

薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会
農薬・動物用医薬品部会
議事次第

日時：平成21年5月20日（水）

14：00～17：00

場所：厚生労働省 共用第7会議室

1. 開会

2. 議題

(1) 食品中の残留農薬等に係る残留基準設定について

- ・ プロチゾラム（動物用医薬品）
- ・ リファキシミン（動物用医薬品）
- ・ 鶏伝染性気管支炎（4-91株）生ワクチン（動物用医薬品）
- ・ アセキノシル（農薬）
- ・ プロヒドロジャスモン（農薬）
- ・ ペンシクロン（農薬）
- ・ イミダクロプリド（農薬）

(2) その他

3. 閉会

(配付資料)

【ブロチゾラム（動物用医薬品）】

資料１－１ 食品安全委員会における食品健康影響評価結果

資料１－２ 農薬・動物用医薬品部会報告（案）

資料１－３ エリスロマイシン JECFA 評価書

【リファキシミン（動物用医薬品）】

資料２－１ 食品安全委員会における食品健康影響評価結果

資料２－２ 農薬・動物用医薬品部会報告（案）

【鶏伝染性気管支炎（4-91 株）生ワクチン（動物用医薬品）】

資料３－１ 食品安全委員会における食品健康影響評価結果

資料３－２ 農薬・動物用医薬品部会報告（案）

【アセキノシル（農薬）】

資料４－１ 食品安全委員会における食品健康影響評価結果

資料４－２ 農薬・動物用医薬品部会報告（案）

【プロヒドロジャスモン（農薬）】

資料５－１ 食品安全委員会における食品健康影響評価結果

資料５－２ 農薬・動物用医薬品部会報告（案）

【ペンシクロン（農薬）】

資料６－１ 食品安全委員会における食品健康影響評価結果

資料６－２ 農薬・動物用医薬品部会報告（案）

【イミダクロプリド（農薬）】

資料７－１ 食品安全委員会における食品健康影響評価結果

資料７－２ 農薬・動物用医薬品部会報告（案）

【参考資料】

参考資料１ 国民平均、幼小児、妊婦、高齢者別の農産物・畜産物摂取量

参考資料２ 食品安全委員会への意見聴取及び食品健康影響評価結果について

動物用医薬品評価書

ブロチゾラム

2008年3月

食品安全委員会

目次

	頁
○審議の経緯	3
○食品安全委員会委員名簿	4
○食品安全委員会動物用医薬品専門調査会専門委員名簿	4
○要約	5
I. 評価対象動物用医薬品の概要	6
1. 用途	6
2. 有効成分の一般名	6
3. 化学名	6
4. 分子式	6
5. 分子量	6
6. 構造式	6
7. 開発の経緯	6
II. 安全性に係る試験の概要	7
1. 吸収・分布・代謝・排泄試験	7
(1) 投与試験（雄マウス）	7
(2) 投与試験（雄ラット）	8
(3) 投与試験（ラット、イヌおよびサル）	8
(4) 投与試験（ラット、イヌ、サルおよびヒト）	10
(5) 投与試験（マウス、ラット、イヌ、サル、牛およびヒト）	10
(6) 体内分布（泌乳牛）	12
(7) 残留試験（牛）	15
2. 急性毒性試験	17
(1) 急性毒性試験（マウス）	17
(2) 急性毒性試験（ラット）	18
(3) 急性毒性試験（イヌ）	19
(4) 急性毒性試験（ウサギ）	19
(5) 急性毒性試験（サル）	19
3. 亜急性毒性試験	19
(1) 4週間亜急性毒性試験（ラット）	19
(2) 5週間亜急性毒性試験（ラット）	20
(3) 13週間亜急性毒性試験（ラット）	21
(4) 13週間亜急性毒性試験（サル）	21
(5) 4週間亜急性毒性試験（イヌ）	22
4. 慢性毒性試験および発がん性試験	23
(1) 12ヶ月間慢性毒性試験（サル）	23
(2) 18ヶ月間慢性毒性試験（ラット）	23
(3) 18ヶ月間慢性毒性試験（マウス）	24
(4) 2年間発がん性試験（ラット）	25
5. 生殖発生毒性試験	27
(1) 妊娠前及び妊娠初期投与試験（第I節）（ラット）	27

(2) 器官形成期投与試験 (第Ⅱ節) (ラット)	28
(3) 器官形成期投与試験 (第Ⅱ節) (ウサギ)	30
(4) 周産期及び授乳期投与試験 (第Ⅲ節) (ラット)	31
6. 遺伝毒性試験	34
7. 一般薬理試験	35
(1) 呼吸・循環器系への作用	35
(2) 自律神経系および平滑筋への作用	36
(3) 血液系への作用	37
(4) 中枢神経系への作用	37
(5) 消化器系への作用	39
(6) 体性神経系への作用	39
(7) 水および電解質代謝への作用	40
(8) 抗炎症作用	40
(9) 1週間あるいは1ヶ月間投与試験による血液生化学的パラメーターおよび 体重への影響 (ラット)	40
8. その他	41
(1) 甲状腺機能に関する特殊毒性試験 (ラット)	41
(2) 甲状腺機能に関する特殊毒性試験 (ヒト)	42
(3) その他の甲状腺機能に関する知見	42
9. ヒトにおける知見について	43
(1) ヒトボランティア試験	43
(2) 副作用等について	43
10. ヒト腸内細菌叢に及ぼす影響について	44
Ⅲ. 食品健康影響評価	44
1. 亜急性・慢性毒性試験について	44
2. 生殖発生毒性試験について	44
3. 遺伝毒性／発がん性について	44
4. ヒトにおける影響について	45
5. 毒性学影響のエンドポイントの選択について	45
6. 一日摂取許容量 (ADI) の設定について	46
・別紙1	47
・参照	48

〈審議の経緯〉

2006 年 4 月 21 日	農林水産大臣より再審査に係る食品健康影響評価について要請 (17 消安第 13900 号)
2006 年 4 月 24 日	関係書類の接受
2006 年 4 月 27 日	第 141 回食品安全委員会 (要請事項説明)
2006 年 4 月 28 日	第 51 回動物用医薬品専門調査会
2006 年 10 月 16 日	厚生労働大臣より残留基準設定に係る食品健康影響評価につい て要請 (厚生労働省発食安第 1016003 号)、関係書類の接受
2006 年 10 月 19 日	第 164 回食品安全委員会 (要請事項説明)
2007 年 9 月 28 日	第 80 回動物用医薬品専門調査会
2007 年 10 月 23 日	第 82 回動物用医薬品専門調査会
2007 年 11 月 27 日	第 84 回動物用医薬品専門調査会
2008 年 1 月 24 日	第 223 回食品安全委員会 (報告)
2008 年 1 月 24 日	より 2008 年 2 月 22 日 国民からの御意見・情報の募集
2008 年 3 月 11 日	動物用医薬品専門調査会座長より食品安全委員会委員長へ報告
2008 年 3 月 13 日	第 230 回食品安全委員会 (報告) 同日付で厚生労働大臣に通知

〈食品安全委員会委員名簿〉

(2006年6月30日まで)

寺田雅昭 (委員長)
寺尾允男 (委員長代理)
小泉直子
坂本元子
中村靖彦
本間清一
見上彪

(2006年12月20日まで)

寺田雅昭 (委員長)
見上彪 (委員長代理)
小泉直子
長尾拓
野村一正
畑江敬子
本間清一

(2006年12月21日から)

見上彪 (委員長)
小泉直子 (委員長代理*)
長尾拓
野村一正
畑江敬子
廣瀬雅雄**
本間清一

*: 2007年2月1日から

**: 2007年4月1日から

〈食品安全委員会動物用医薬品専門調査会専門委員名簿〉

(2007年2月11日まで)

三森 国敏 (座長)
井上 松久 (座長代理)
青木 宙 津田 修治
明石 博臣 寺本 昭二
江馬 眞 長尾 美奈子
大野 泰雄 中村 政幸
小川 久美子 林 眞
渋谷 淳 藤田 正一
嶋田 甚五郎 吉田 緑
鈴木 勝士

(2007年9月30日まで)

三森 国敏 (座長)
井上 松久 (座長代理)
青木 宙 寺本 昭二
明石 博臣 長尾 美奈子
江馬 眞 中村 政幸
小川 久美子 林 眞
渋谷 淳 平塚 明
嶋田 甚五郎 藤田 正一
鈴木 勝士 吉田 緑
津田 修治

(2007年10月1日から)

三森 国敏 (座長)
井上 松久 (座長代理)
青木 宙 寺本 昭二
今井 俊夫 頭金 正博
今田 由美子 戸塚 恭一
江馬 眞 中村 政幸
小川 久美子 林 眞
下位 香代子 山崎 浩史
津田 修治 吉田 緑
寺岡 宏樹

要約

2-bromo-thieno-triazolo-1,4diazepine 誘導体であり、鎮静、抗痙攣、筋弛緩、睡眠効果を有する動物用医薬品「プロチゾラム」(CAS No.57801-81-7)について、各種評価書等(EMEA レポート、動物用医薬品再審査申請時の添付資料等)を用いて食品健康影響評価を実施した。

評価に供した試験成績は、投与試験(マウス、ラット、イヌ、サル、牛及びヒト)、残留試験(牛)、急性毒性試験(マウス、ラット、イヌ、ウサギ及びサル)、亜急性毒性試験(ラット、イヌ及びサル)、慢性毒性試験及び発がん性試験(マウス、ラット及びサル)、生殖発生毒性試験及び催奇形性試験(ラット、ウサギ)、遺伝毒性試験等である。

試験の結果から、プロチゾラム投与による影響は、鎮静、運動失調など主に薬理作用に関連していた。繁殖能に対する影響、催奇形性及び遺伝毒性は認められなかった。

発がん性試験において、ラットの雄に甲状腺濾胞腺腫、ラットの雌に胸腺型悪性リンパ腫及び子宮における神経鞘腫の増加が認められたが、プロチゾラムが遺伝毒性物質ではないこと、マウスについて発がん性を示唆する所見が得られていないこと及びラットにおいては高用量群にのみ、これら腫瘍性病変の発生の増加が認められていることから、一日摂取許容量(ADI)の設定は可能であると考えられた。

各毒性試験の無毒性量または作用量の最小値は、ヒトボランティア試験から得られた最小作用量 0.0013 mg/kg 体重/日であったため、これを根拠として安全係数 100 で除した 0.013 µg/kg 体重/日を一日摂取許容量(ADI)と設定した。

I. 評価対象動物用医薬品の概要

1. 用途 (参照 1)

動物の食欲不振の改善の補助的効果を目的としている。

2. 有効成分の一般名

和名：プロチゾラム

英名：Brotizolam

3. 化学名

IUPAC

和名：2-ブロモ-4-(2-クロロフェニル)-9-メチル-6H-1-チア-5,7,8,9a-テトラアザ-シクロペンタ[e]アズレン

英名：2-Bromo-4-(2-chlorophenyl)-9-methyl-6H-1-thia-5,7,8,9a-tetraaza-cyclopenta[e]azulene

CAS(No.57801-81-7)

和名：2-ブロモ-4-(2-クロロフェニル)-9-メチル-6H-チエノ[3,2-f][1,2,4]トリアゾロ[4,3a][1,4]ジアゼピン

英名：2-Bromo-4-(2-chlorophenyl)-9-methyl-6H-thieno[3,2-f][1,2,4]triazolo[4,3a][1,4]diazepine

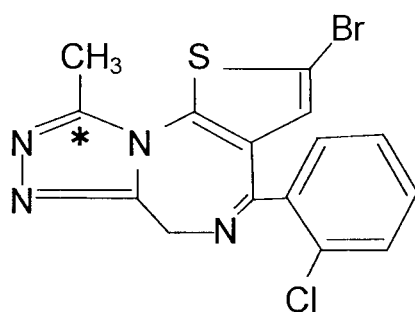
4. 分子式

$C_{15}H_{10}BrClN_4S$

5. 分子量

393.69

6. 構造式



7. 開発の経緯

プロチゾラムは、ドイツ・ベーリンガーインゲルハイム社において抗不安薬あるいは睡眠薬の研究の中から発見された 2-bromo-thieno-triazolo-1,4diazepine 誘導体である。ヒト

用医薬品としては睡眠導入剤として開発されているが、動物に対しては食欲不振改善の補助等を目的として開発された。

わが国では、牛用注射剤として 1998 年 9 月に承認され、1999 年 6 月より販売されている。用法・用量は、牛に対して 1 日量として体重 1kg 当たり 2 μ g 以下の量を静脈内に注射することとされ、食用に供するためにと殺する前 2 日間又は食用に供するために搾乳する前 12 時間使用禁止期間としている。

また、フランス (1987 年 6 月承認)、ドイツ (1988 年 9 月承認)、アイルランド (1990 年 10 月承認)、イタリア (1988 年 9 月承認) 等諸外国においても広く承認を受け、市販されている。

II. 安全性に係る試験の概要

1. 吸収・分布・代謝・排泄試験

(1) 投与試験 (雄マウス) (参照 2)

Chbb: NMRI 系雄マウス (9 匹/群) に ^{14}C 標識ブロチゾラム¹を単回経口 (0.3、10、200 mg/kg 体重) 投与あるいは非標識ブロチゾラムを 4 週間反復経口 (0.3、10、200 mg/kg 体重) 投与後、同用量の ^{14}C 標識ブロチゾラムを単回経口投与した際の体内動態が調べられている。なお、本試験の投与量はマウスを用いた 18 ヶ月間発がん性試験 (参照 3) と同一濃度に設定された。

^{14}C 標識ブロチゾラムの単回投与および非標識ブロチゾラム 0.3、10 mg の 4 週間前投与後の ^{14}C 標識ブロチゾラムの単回投与における血中最大放射活性濃度は、全血量における投与放射活性の 2.1-4.6% の範囲にあった。一方、非標識ブロチゾラム 200 mg を前投与した場合の血中最大放射活性濃度は 1.0-1.6% に低下し、 C_{max} および AUC も低値が認められた。この原因として、反復投与による吸収率の低下や酵素誘導による代謝亢進が示唆された。しかしながら、 C_{max} および AUC は ^{14}C 標識ブロチゾラムの単回および非標識ブロチゾラムの 4 週間前投与に関わらず、いずれの用量においても線形の相関性を示した。また、 $T_{1/2}$ については、前投与の有無および投与量による差は認められず ($T_{1/2}$: 2.5-3.8 時間)、いずれにおいても速やかな排泄が認められた。HPLC による分析により、 ^{14}C 標識ブロチゾラムの単回および非標識ブロチゾラムの前投与に関わりなく主要代謝物として代謝物 A (メチル基の水酸化) (22.2-30.7%) が認められ、その他に代謝物 D (脱メチル体) (17.2%)、代謝物 B (ジアゼピン環の水酸化) (12.3%) および未変化体 (9.3-23%) が認められた。なお、これらの代謝物はいずれも投与後 30 分に検出されていることから、いずれの用量においてもブロチゾラムは速やかに代謝されることが示唆された。一方、非標識ブロチゾラムの 10 および 200 mg を前投与した時に限り、代謝パターンに変化が生じ、高極性物質 (21.4-30.5%、ブロチゾラムのフェニル環が水酸化されたものと考えられる) の割合が増加した。これに伴い代謝物 B および代謝物 D の割合は減少したが、代謝物 A の割合に変化は認められなかった。また、非標識ブロチゾラムの 200 mg の前投与では未変化体の割合 (5.3%) が減少した。このことか

¹ 標識部位は炭素数 9 位 (* : 1 ページ構造式参照。以下、特に記載がなければ同じ。)

ら、マウスにおける 10 および 200 mg の 4 週間前投与では、チトクローム P450 による酵素誘導が生じている可能性が示唆された。

(2) 投与試験 (雄ラット) (参照 4)

Sprague-Dawley 系雄ラットに ^{14}C 標識プロチゾラム 0.5 mg/kg 体重/日を単回および 7 日間反復経口投与した後の体内動態が調べられている。単回投与後の $T_{\max}$ は 1 時間で、そのときの $C_{\max}$ は 18.6 ng/mL であった。血中からの消失はおおむね二相性であり、 $T_{1/2}$ (β 相) は 10.5 時間であった。7 日間反復経口投与後の $T_{\max}$ は最終回投与後 30 分で、そのときの $C_{\max}$ は 51.6 ng/mL であった。血中からの消失は単回投与時と比べ緩徐であったが経時的に減衰した。

単回投与時の組織内濃度は投与後 1 時間までにほとんどの組織で最高値を示し、胃腸管、肝臓、副腎、腎臓および甲状腺に高濃度の分布が認められたが、以降は経時的に減衰した。7 日間反復経口投与後の組織内濃度は、単回投与時と同様に最終回投与後 1 時間までに最大となり、それらの濃度も単回投与時と同程度であった。投与 4 時間以降は単回投与時に比べ高値傾向にあったが経時的に減衰し、投与 48 時間後には全ての組織で最高値の 1/10 以下となった。また、特定組織に放射能が残留することはなかった。

単回投与後 48 時間までの尿中排泄率は 7.6%、糞中排泄率は 88.0% であった。7 日間反復経口投与における最終回投与後 48 時間までの尿・糞中排泄率は、各々全投与量の 5.8% および 83.9% で、単回投与と同様であった。

単回投与後 24 時間までの胆汁中排泄率は 84.0% と高く、その約 1/2 は投与後 1 時間までに迅速に排泄された。採取した胆汁を別の動物の十二指腸内に投与すると、投与 24 時間後以内に総放射能の 39.2% が胆汁中に再排泄され、腸肝循環率は 32.9% であった。

ラット血漿タンパクとの結合率は *in vivo* で 50.6%、*in vitro* で 77.7% であった。ヒト血漿および血清アルブミンとの結合率は、各々 94.0% および 90.9% であった。

単回投与後 2-24 時間の血中放射能濃度と血漿中濃度の比はおおむね全期間にわたって一定であり、約 1.5 であった。

(3) 投与試験 (ラット、イヌおよびサル) (参照 5)

Chbb: THOM ラット(雄)、ビーグル犬(雌、4 頭) 及びアカゲザル(雄 3 頭、雌 2 頭) に ^{14}C 標識プロチゾラムを単回経口あるいは静脈内 (0.5 mg/kg 体重/日) 投与した時の体内動態について調べられている。また、ラットについては胆汁中排泄率についても調べられている。

いずれの種においても、経口投与後のプロチゾラムは迅速かつ良好な吸収性を示し、 $C_{\max}$ および $T_{\max}$ はそれぞれラットで 63 ng eq/mL および 0.25 時間、イヌで 83 ng eq/mL および 1 時間、サルでは 167 ng eq/mL および 1 時間であった。また、経口および静脈内投与ともに血漿中総放射能の消失は二相性を示し、経口投与における $T_{1/2}$ (α 相) はラットで 0.5 時間、イヌで 2.3 時間、サルでは 1.3 時間、 $T_{1/2}$ (β 相) はそれぞれ

17.5 時間、20.8 時間および 17.1 時間であった。静脈内投与における $T_{1/2}$ (α 相) はラットで 0.4 時間、イヌで 0.8 時間、サルでは 1.1 時間、 $T_{1/2}$ (β 相) ではそれぞれ 14.8 時間、18.4 時間および 18.9 時間であった。

腎および糞中からの総排泄率は、経口投与ではラットで 83.6%、イヌで 93.6%、サルでは 87.8%、静脈内投与ではそれぞれ 88.5%、82.6% および 87.0% であった。ラットでは腎排泄率は低く、経口および静脈内投与後 6 時間において 5-6% であった。一方、イヌおよびサルにおける腎排泄率はそれぞれ 49-51% および 28-34% であった。いずれの種においても、プロチゾラムは投与 3-4 日後に完全に排泄された。

腸管吸収率はラットで 89%、イヌとサルでは 100% と高値を示し、いずれの種においても良好な吸収性が認められた。

胆汁中排泄率はラットにおいて投与後 10 時間まで調べられており、投与後 1-2 時間で最も高く、1 時間あたりの排泄率は静脈内投与で 24.6%、経口投与では 14.3% であった。また、投与後 3 時間までに静脈内投与では 54.7%、投与後 10 時間では経口投与で 72.9%、静脈内投与では 84.8% が胆汁中に排泄された。

ラットの胆汁中代謝物、サルおよびイヌの尿中代謝物について、TLC により調べられている。ラットの胆汁およびサルの尿中に未変化体の放射活性はほとんど認められず、 β -グルクロニダーゼ/アリールスルファターゼによる加水分解前は TLC 上の原点以外に放射活性は認められなかった。一方、イヌの尿中には未変化体と TLC 上で同じ挙動を示す放射活性体およびいくつかの非抱合代謝物が認められた。 β -グルクロニダーゼ/アリールスルファターゼによる加水分解後は、個々の代謝物は異なるものの、いずれの種においても 2-3 種の主要代謝物が認められた。

泌乳期のラットに単回経口 (1 mg/kg 体重/日) 投与した際の血中および乳汁中への分布、雄ラットおよび妊娠ラット (妊娠 14、20 および 22 日) に単回経口あるいは静脈内 (雄: 2.8 mg/kg 体重/日、妊娠雌: 3.4 mg/kg 体重/日) 投与した際の体内分布について全身オートラジオグラフィーにより調べられている。

血中および乳汁中排泄率は、泌乳期ラットにおいて投与後 24 時間まで調べられている。血中と乳汁中濃度の推移には並行性が認められ、投与後 24 時間までにいずれも速やかな低下が認められた。投与 4-8 時間後の乳汁サンプルを用いて TLC による分析を行なった結果、大部分がプロチゾラムの代謝物であり、未変化体はごく微量であった。

全身オートラジオグラフィーを用いた体内分布は、雄ラットを用いて投与 0.5、1、4、8 および 24 時間後に調べられている。経口および静脈内投与ともに同様の分布パターンを示し、投与 0.5 時間後には既に全身への分布が認められ、肝臓、腎臓、胃腸管および副腎で高濃度の分布が認められた。また、いずれの投与経路においても、被験物質は脳-血液関門を通過することが確認された。投与 8 時間後には主に消化管および肝臓に分布が認められ、腎臓、副腎および膀胱への分布はわずかであった。その他の臓器・組織への分布はほとんど認められなかった。妊娠 14 日と 20 日のラットにおける体内分布は、経口および静脈内投与 15 分及び 24 時間後では胎盤への通過が認められた。妊娠後期における放射活性の胎児および母動物への分布は同程度であった。投与 24 時間後では、胎児に微量ながら放射活性が認められた。

^{14}C 標識プロチゾラムのタンパク結合率が調べられている。ウシ血清アルブミンおよびヒト血清アルブミンとの結合率はそれぞれ 73-87% および 86-91% であった。また、ヒト血漿との結合率は 89-95% であった。血中における ^{14}C 標識プロチゾラムは、主に血清アルブミンと結合した状態で存在することが示唆された。

(4) 投与試験 (ラット、イヌ、サルおよびヒト) (参照 6)

Chbb: THOM ラット (計 6 匹) に ^{14}C 標識プロチゾラム 10 mg/kg を経口投与した後の胆汁中排泄物、雌のビーグル犬およびアカゲザル (雌雄各 2 例) に ^{14}C 標識プロチゾラム 10 mg/kg を経口投与した後の尿中排泄物、健常ヒトボランティア (男性 3 名、女性 1 名) に ^{14}C 標識プロチゾラム 0.5 mg を経口投与した後の尿中排泄物について調べられている。

全ての種において、プロチゾラムはほぼ完全に代謝された。ラット、イヌ、サルおよびヒトにおいて、主要代謝経路はプロチゾラム分子の様々な部位における水酸化とその後続く抱合であることが確認されている。未変化体は排泄されたとしても非常に微量である。質量分析法により、ラットの胆汁およびサルの尿から未変化体の ^{14}C 標識プロチゾラムが分離同定されたが、その量はラットの胆汁中で 4% 未満、サルの尿中では 3% 未満であった。イヌとヒトにおいてはさらに少なくなると考えられ、RIA を用いた検討では、ヒトにおける未変化体の腎排泄量は投与量のおよそ 1% であることが確認された。

全ての種で認められた代謝物の中で最も多いものは代謝物 A および代謝物 B であった。ヒトとサルにおける主要代謝物は代謝物 A (各々 $\geq 27\%$ および約 46%、腎排泄) と代謝物 B (各々 $\geq 43\%$ および $\geq 20\%$ 、腎排泄) であり、ヒトにおけるプロチゾラムの代謝はサルと非常に類似していることが確認された。また、ヒトおよびサルの尿抽出物における代謝物 A と代謝物 B の比率はそれぞれ、およそ 4:1 および 3:2 であった。イヌにおける主要代謝物は代謝物 A と代謝物 E (We1064) (各々 $\geq 43\%$ および $\geq 20\%$ 、腎排泄) であり、尿中における代謝物 A と代謝物 E の比率は 2:1 以上であった。なお、代謝物 E は代謝物 B の異性体であり、代謝物 B はアルカリ媒体中で代謝物 E に変化する。それ故、イヌの尿中から同定された代謝物 E は試料の抽出・精製過程で代謝物 B から形成されるもので、実際に腎臓から排泄されているのものは代謝物 B であると考えられている。ラットの主要代謝物は、フェニルヒドロキシル基を含むプロチゾラムと代謝物 B (各々 $\geq 14\%$ および $\geq 13\%$ 、胆汁中排泄) であった。

(5) 投与試験 (マウス、ラット、イヌ、サル、牛およびヒト) (参照 7)

マウス、ラット、イヌ、サルおよびヒトに ^{14}C 標識プロチゾラムを単回経口あるいは静脈内投与した後の体内動態について以下のように調べられている。

ラット、イヌおよびサルに ^{14}C 標識プロチゾラムを単回経口投与すると腸管から速やかに吸収された (ラット: 89%、イヌおよびサル: 100%)。

ラットおよびマウスに ^{14}C 標識プロチゾラムをそれぞれ単回経口 (0.3、10、200 mg/kg 体重/日) 投与した際の投与量と AUC、 $C_{\max}$ の間には良好な相関性が認められた。

^{14}C 標識プロチゾラムをマウス (0.3、10、200 mg/kg 体重/日)、ラット (0.3、0.5、10、200 mg/kg 体重/日)、イヌ (0.5 mg/kg 体重/日) およびサル (0.5、7、10 mg/kg 体

重/日) にそれぞれ単回経口投与した際の T_{max} および C_{max} は、それぞれマウスで 0.5 時間および 86-71,539 ng/mL、ラットで 0.25-1.0 時間および 23-15,018 ng/mL、イヌで 1-2 時間および 83 ng/mL、サルで 0.5-2 時間および 167-1,800 ng/mL であった。また、マウス (10 mg/kg 体重/日)、ラット (0.5 mg/kg 体重/日)、イヌ (0.5 mg/kg 体重/日) およびサル (0.5、7、10 mg/kg 体重/日) にそれぞれ単回経口投与した際の分布相半減期および消失相半減期は、それぞれマウスで 0.8 時間および 5.6 時間、ラットで 0.5 時間および 17.5 時間、イヌで 1.8 時間および 20.8 時間、サルでは 0.5 mg 投与で 1.0 時間および 17.0 時間、7 mg 投与で 21 時間 (消失相半減期のみ)、10 mg 投与で 10 時間 (消失相半減期) であった。同様に、単回静脈内投与した際の分布相半減期および消失相半減期は、ラットで 0.33 時間および 14.8 時間、イヌで 0.9 時間および 18.4 時間、サル (0.5 mg 投与) で 1.25 時間および 18.9 時間であった。

^{14}C 標識プロチゾラムを単回経口および静脈内投与すると、いずれの投与経路でも全身に広く分布する。体内分布は投与 30 分後には腸管 (胆汁排泄のため)、肝臓、腎臓および副腎に高濃度が認められ、投与 8 時間後には主に腸管に残留がみられるが、肝臓では低濃度、腎臓および副腎ではごく微量が検出されるに過ぎない。

経口および静脈内投与により ^{14}C 標識プロチゾラムは血液-脳関門を通過する。妊娠ラットに投与すると胎盤を通過し、妊娠後期には胎児と母動物への分布は同等となる。授乳ラットに経口投与すると放射活性は乳汁中に認められ、乳汁中濃度は血中濃度と同様の推移を示し、速やかに消失することが確認された。泌乳牛に静脈内投与すると、放射活性は投与後 4 時間までに乳汁中に検出される。また、血漿中濃度は乳汁中濃度と同様に速やかな消失が認められた。

サルおよびラットを用いた反復投与試験の結果、プロチゾラムには蓄積傾向および酵素誘導は認められなかった。また、ラット肝ミクロソームを用いて薬物代謝酵素誘導について調べた結果、酵素誘導は認められなかった。一方、マウスではプロチゾラムを 4 週間反復経口 (0.3、10、200 mg/kg 体重/日) 投与後、同用量の ^{14}C 標識プロチゾラムを単回経口投与した際に、200 mg 投与群でやや代謝亢進が認められ、酵素誘導が示唆された。

マウスにおける単回経口 (10 mg/kg 体重/日) 投与後 6 日までの尿中排泄率は 22.5%、糞中排泄率は 53.3% であった。尿中および胆汁中から 7 つの代謝物が同定されており、胆汁中の主要代謝物は代謝物 A および代謝物 B、その他に代謝物 C および代謝物 D が低濃度に、未変化体は極微量ながら検出された。胆汁中において、いずれの代謝物も水酸化体のグルクロン酸抱合体及び/あるいは硫酸抱合体として認められた。血漿中の主要代謝物は代謝物 A であり、その他に代謝物 B および代謝物 D が認められた。

ラットにおける単回経口あるいは静脈内 (0.5 mg/kg 体重/日) 投与後 7 日までの尿中排泄率は 5.3-6.0%、胆汁中排泄率は 72.9-84.9%、糞中排泄率は 78.3-82.6% であり、尿中への排泄は主として未変化体であった。なお、代謝物の排泄パターンに投与経路による差異は認められなかった。胆汁中の主要代謝物はフェニルヒドロキシル基を含むプロチゾラムおよび代謝物 B であり、未変化体は極微量ながら検出された。胆汁中において、いずれの代謝物も水酸化体のグルクロン酸抱合体及び/あるいは抱合体として認められた。血漿中における主要代謝物は 2 種類の高極性物質で、その他に代謝物 A、代謝物

B、代謝物 C および代謝物 D が検出された。

イヌでは単回経口あるいは静脈内 (0.5 mg/kg 体重/日) 投与後 8 日までの尿中排泄率は 51.5-49.3%、糞中排泄率は 42.3-33.5% であった。尿中における主要代謝物は代謝物 A (43%) および代謝物 E (20%) であり、未変化体は極微量ながら検出された。いずれの代謝物も水酸化体のグルクロン酸抱合体及び／あるいは硫酸抱合体として認められた。なお、代謝物の排泄パターンに投与経路による差異は認められなかった。

サルにおける単回経口あるいは静脈内 (0.5、7、10 mg/kg 体重/日) 投与後 3 あるいは 5 日までの尿中排泄率は 28-69.2%、糞中排泄率は 23.3-59% であった。尿中の主要代謝物は代謝物 A (46%) および代謝物 B (26%) であった。プロチゾラムは尿中からほぼ完全に排泄され、未変化体としての排泄はわずか 3% に過ぎなかった。いずれの代謝物も水酸化体のグルクロン酸抱合体及び／あるいは硫酸抱合体として認められた。なお、代謝物の排泄パターンに投与経路による差異は認められなかった。また、1 年間反復経口 (7 mg/kg 体重/日) 投与においても代謝パターンは同様であった。

健常人におけるプロチゾラムの各剤型による吸収性が調べられており、溶液 > 錠剤 > カプセルの順に良好な吸収性を示した。また、いずれの剤型においても AUC に差は認められなかった。プロチゾラムの血漿中濃度は 0.125-1.0 mg の用量ではほぼ線形の上昇を示すが、1.5 mg 以上の用量では上昇に明らかな停滞が認められた。健常人においてプロチゾラムは腸管から速やかに吸収され、絶対的生物学的利用率はおおよそ 70% であった。血漿中の $T_{1/2}$ は 4.3-7.3 時間と短く、投与量の 64.9% は尿中から、23.6% は糞中から排泄された。7 日間反復 (1 mg) 投与試験では、血漿中濃度および $T_{1/2}$ はそれぞれ初回投与日に 19.2 ng/mL および 3.6 時間、最終投与日では 19.6 ng/mL および 3.7 時間と同一であり、蓄積性は認められなかった。プロチゾラムはほぼ完全に代謝されて尿中排泄され、投与後 8 時間までに未変化体の占める割合は 1% であった。主要代謝物である代謝物 A および代謝物 B は、それぞれ 27% および 7% が尿中へ排泄された。いずれの代謝物も抱合体として認められた。また、これら代謝物の排出半減期は未変化体のそれと大差はないことが確認された。

重度の腎疾患患者にプロチゾラムを単回あるいは 7 日間反復 (0.25 mg) 投与したときの $T_{1/2}$ は 6.9-7.6 時間で、健常人の値の範囲内にあった。高齢者患者に単回あるいは 3 週間反復投与 (0.25 mg) したときの $T_{1/2}$ は 6.0-9.8 時間であった。肝硬変の患者に単回 (0.25 および 0.5 mg) 投与したときの $T_{1/2}$ には大幅な延長 (9.4-53.3 時間) が認められ、排出が遅く $T_{1/2}$ の検出できない患者も認められた。また、肝硬変患者のタンパク結合率は健常人に比べてやや低いことが確認された。健常人、高齢者患者および腎疾患患者のいずれにおいても反復投与による蓄積性および酵素誘導は認められなかった。

(6) 体内分布 (泌乳牛) (参照 8,9)

^{14}C 標識プロチゾラムを泌乳牛 3 頭 (動物番号: 1♀、2♀および 3♀) に静脈内 (10 $\mu\text{g/kg}$) 投与した際の吸収、分布および排泄について、次に示す 2 種類の試験で調べられている。

第 1 試験は 2 相試験 (Phase 1 および Phase 2) から構成されており、 ^{14}C 標識プロチゾラムを泌乳牛 1 頭 (1♀) に単回静脈内投与した際の代謝および薬物動態について調

べられている。

第2試験は ^{14}C 標識プロチゾラムを泌乳牛(2♀および3♀)に単回静脈内投与した際の体内動態について調べられている。

①第1試験

a. 第1相試験、Phase 1：試験開始後1-6日目

^{14}C 標識プロチゾラムを泌乳牛1頭(1♀)に単回静脈内(10 $\mu\text{g/kg}$)投与した際の、総放射活性の回収率および排泄経路、血漿、全血および乳汁中における残留量が調べられている。血液試料は投与前および投与後144時間までに19時点で、糞尿は投与後12-24時間間隔で、乳汁は朝夕(08:00 および 18:00 の2回)の時点で採取され、それぞれにおける回収率が測定された。

放射活性の総回収率は投与後6日目で112%を示し、投与量の25%は投与後144時間までに尿中に排泄され(24時間では24%)、86%は糞中から排泄された。

単回静脈内(10 $\mu\text{g/kg}$)投与した際の血漿中の総放射活性値は、投与5分後の16.4 から投与1時間後には8.6 ng eq/mLまで低下した。さらに、投与12時間後には0.47 ng eq/mLまで低下し、その後は検出限界未満となった。全血の放射活性値は血漿のそれに比べて低かったが、同様の動態傾向を示した。

乳汁中における総放射活性値は非常に低く、総投与量に対する回収量の比率はわずか0.1%であった。総放射活性の C_{max} (0.58 ng eq/mL)は初回乳汁サンプル(0-9時間)で確認され、それ以降、乳汁中の放射活性の濃度は検出限界未満であった。乳汁成分である乳脂、凝乳および乳清のうち、高濃度の放射活性が認められたのは乳脂分画で C_{max} は1.73 ng eq/mLであった。

b. 第2相試験、Phase 2：試験開始後7日目

第1相試験終了後、 ^{14}C 標識プロチゾラムを泌乳牛1頭(1♀)に単回静脈内(10 $\mu\text{g/kg}$)投与し、その6.5時間後に安楽死させ、全血、血漿、臓器および組織中それぞれの総放射活性の残留量について調べられている。血液試料は投与前および投与6.5時間後までの計5時点で採取した。投与6.5時間後に安楽死させた後、肺、心臓、骨格筋、肝臓、皮膚、胃粘膜、舌、骨塩、骨髓、脂肪(腎臓および皮下)、脾臓、腎臓、副腎、脳、乳汁、胆汁、乳房組織、血漿および全血が採取され、個々の組織および臓器については重量が測定された。また、投与後6時間までの糞尿、乳汁および胆汁が採取され、重量あるいは容量の測定が行われた。

血漿中の総放射活性の濃度は投与30分後に14.05 ng eq/mL、投与1時間後では10.71 ng eq/mLを示し、投与6.5時間後には1.22 ng eq/mLまで低下した。全血中の濃度は投与30分後に11.00 ng eq/mL、投与1時間後では8.25 ng eq/mLを示し、投与6.5時間後には1.16 ng eq/mLまで低下した。これらの結果は、第1相試験の結果と同程度であった。

臓器および組織中濃度は胆汁、肝臓および腎臓の順で高く、総放射活性値はそれぞれ192.5、16.9および5.3 ng eq/gであった。

未変化体の存在について、第1相試験で投与0.25、0.75、1.5、2および8時間後に採取した血漿を用いて調べたところ、それぞれ5.91、5.71、2.97、1.85および0.59 ng/mL

の未変化体が検出された。

肝臓および腎臓中の代謝物産物について HPLC にて分析したところ、代謝物 A あるいは代謝物 B の代謝物は検出されなかったが、少量の未変化体（肝臓で 22.5%、腎臓で 21.5%）が確認された。

②第 2 試験

^{14}C 標識プロチゾラムを泌乳牛 2 頭（2 ♀および 3 ♀）に 12 時間毎に 2 回（0 および 12 時間）、静脈内（10 $\mu\text{g/kg}$ ）投与したときの体内動態について調べられている。2 回目の静脈内投与後、泌乳牛 1 頭（2 ♀）は 24 時間に、泌乳牛 1 頭（3 ♀）は 72 時間に屠殺した。

泌乳牛 1 頭（2 ♀）では投与後 36 時間までに放射活性の 70% が回収され、そのうち 57% は糞中に、13% は尿中に排泄された。乳汁中への排泄は 0.1% と微量であった。泌乳牛 1 頭（3 ♀）では投与後 84 時間までに放射活性の 79% が回収され、そのうち 63% は糞中に（36 時間までに 59% が排泄）、15% は尿中に排泄された。乳汁中への排泄は 0.1% と微量であった。

泌乳牛 1 頭（2 ♀）に初回（0 時間）静脈内投与したときの血漿中の総放射活性値は、投与 5 分後の 30.9 ng eq/mL から投与 3 時間後（ $T_{1/2}$ は投与後 0.5 時間であると推測）には 3.1 ng eq/mL まで低下し、投与 12 時間後では 0.5 ng eq/mL となった。2 回目（12 時間）の投与後の総放射活性値は、投与 5 分後で 15.2 ng eq/mL を示し、投与 16 時間後（ $T_{1/2}$ は投与後 1 時間であると推測）では 1.0 ng eq/mL まで低下した後、投与 20 時間後には 0.6 ng eq/mL となった。泌乳牛 1 頭（3 ♀）に初回静脈内投与後の血漿中の総放射活性値は、投与 5 分後の 23.9 ng eq/mL から投与 2 時間後（ $T_{1/2}$ は投与後 1 時間と推測）には 5.0 ng eq/mL まで低下し、投与 12 時間後では 1.0 ng eq/mL となった。2 回目（12 時間）の投与後の総放射活性値は、投与 5 分後で 27.0 ng eq/mL を示し、投与 15 時間後では 3.7 ng eq/mL まで低下した（ $T_{1/2}$ は投与後 1 時間であると推測）。その後、投与 24 時間後では 1.1 ng eq/mL となった（ $T_{1/2}$ は投与後 5 時間であると推測）。泌乳牛 2 頭（2 ♀および 3 ♀）の総放射活性値は、第 1 試験の第 1 相試験で確認した泌乳牛 1 頭（1 ♀）の結果と類似していた。

泌乳牛 2 頭（2 ♀および 3 ♀）に ^{14}C 標識プロチゾラムを 2 回、静脈内投与した後の乳汁中濃度は、2 頭共に 0.1% と微量であった。2 回目の投与 0-9 時間後に採取された乳汁中の最高値は、2 ♀で 0.1 ng eq/mL、3 ♀で 0.7 ng eq/mL であった。乳汁中の濃度についても、第 1 試験の第 1 相試験の泌乳牛 1 頭（1 ♀）の結果と類似していた。

泌乳牛 2 頭に ^{14}C 標識プロチゾラムを 2 回、静脈内投与したときの 24 時間後（2 ♀）および 72 時間後（3 ♀）の肺、心臓、肝臓、腎臓、舌、皮膚、脂肪（腎臓および皮下）、全血、胆汁および骨格筋の総放射活性値について調べたところ、肝臓以外のほとんどは検出限界未満であった。肝臓では 2 回目の投与 24 時間後で 9.7 ng eq/mL（0.8%）、投与 72 時間後では 12.0 ng eq/mL（0.7%）の濃度が確認された。

以上の 2 試験の結果から、 ^{14}C 標識プロチゾラムを泌乳牛 3 頭（1 ♀、2 ♀および 3 ♀）

に静脈内 (10 µg/kg) 投与すると、放射活性は急速に排泄されることが確認された。主要排泄経路は糞中 (57-86%) であり、多くが胆汁中に排泄されることが考えられた。一方、尿中排泄は少量であった (15-25%)。これらの結果は、先に実施されたラット (糞中排泄 : 86%、尿中排泄 : 6%) およびサル (糞中排泄 : 59%、尿中排泄 : 28%) の試験結果と一致するものであった (参照 10,11)。また、いずれにおいても放射活性の大部分は投与後 24 時間までに排泄された。

血漿中からも急速に排泄され、泌乳牛 3 頭に静脈内投与したときの $T_{1/2}$ は 0.5-1 時間であった。これらの結果は、ラット ($T_{1/2}$: 0.3 時間)、イヌ ($T_{1/2}$: 0.9 時間) およびサル ($T_{1/2}$: 1.3 時間) を用いた先の試験結果と一致している (参照 12)。全血中の濃度は血漿中よりも低い (1♀)、赤血球中への選択的な取り込みは示されていない。

泌乳牛 3 頭共に乳汁中の総放射活性値は低く、わずか 0.1% であることが確認された。乳汁成分の分析では、乳脂分画中に高濃度の放射活性が認められた (1♀)。

泌乳牛 3 頭に静脈内投与 6.5 時間後 (1♀)、投与 24 時間後 (2♀) および投与 72 時間後 (3♀) に屠殺したときの肝臓における濃度は、それぞれ 16.9 ng eq/mL (2.6%)、9.7 ng eq/mL (0.8%) および 12.0 ng eq/mL (0.7%) あった。腎臓中の濃度は投与 6.5 時間後で 5.3 ng eq/mL を示し、投与 24 および 72 時間後では検出限界未満となった。この結果より、糞中への排泄は高く、尿中への排泄は低いことが明らかになった。また、肝臓では投与 72 時間後において 0.1% 以下のブロチゾラムおよび／あるいはその代謝物の残留が確認された。(参照 8)

泌乳牛 (3 頭/群) に ^{14}C 標識ブロチゾラムを静脈内 (2 µg/kg) 投与 6.5、24、72 時間後に各 3 頭から血液、乳汁および組織・臓器 (血漿、骨格筋、脂肪、腎臓、胆汁、肝臓) を採取し、各試料中のブロチゾラム濃度を測定した。血漿では二相性の半減期がみられ、投与 7 分後に $C_{\max}$ (2.83 ng eq/mL) が認められ、投与 3 時間後には 0.53 ng eq/mL まで急速に減少 ($T_{1/2}$ は 1.2 時間) し、その後は緩やかな減少を示し投与 36 時間後には 0.01 ng eq/mL まで減少した ($T_{1/2}$ は 5 時間)。乳汁中の残留量は低く、初回搾乳 7 時間後で $C_{\max}$ (0.08 ng eq/mL) が認められ、47 時間後には検出限界まで減少した。各組織・臓器中における残留は主に肝臓 (投与 6.5 時間後 : 3.54 ng eq/mL、24 時間後 : 1.24 ng eq/mL、72 時間後 : 0.56 ng eq/mL) および腎臓 (投与 6.5 時間後 : 1.12 ng eq/mL、24 時間後 : 0.13 ng eq/mL、72 時間後 : 0.02 ng eq/mL) で認められた。肝臓では投与 72 時間後まで明らかな残留が認められ、 $T_{1/2}$ は 30 分であった。また、胆汁中にはかなりの量の残留が認められ (投与 6.5 時間後 : 33.61 ng eq/mL、24 時間後 : 3.94 ng eq/mL、72 時間後 : 0.01 ng eq/mL)、ブロチゾラムの主要排泄経路は糞中であることが示唆された。筋肉および脂肪中の残留はいずれの時点においても微量であった。(参照 9)

(7) 残留試験 (牛) (参照 13,14,15,16)

雌子牛 (約 6 ヶ月齢、31 頭) に SPV-708 (ブロチゾラム 0.2 mg/mL 製剤) を体重 100 kg あたり常用量群 1.0 mL (有効成分として 0.2 mg、以下同じ) および 2 倍量群 2.0 mL (有効成分として 0.4 mg、以下同じ) として左頸静脈内に 1 日 1 回 3 日間連続投与し、最終投与 2 時間、1、2、3 および 5 日後に各群 3 頭から各組織・臓器を採取してブロチ

ゾラムの経時的な残留推移を確認した。表1に示すように最終投与1日後には全例が検出限界未満となった。(参照13)

表1 ブロチゾラム製剤投与後の組織内残留濃度 3試行 単位: µg/g

試料		採材時点		
		2時間目	1日目	2日目
常用量	筋肉	<0.001	<0.001	—
	肝臓	<0.001	<0.001	—
	腎臓	<0.001	<0.001	—
	脂肪	<0.001	<0.001	—
	小腸	<0.001	<0.001	—
	血液	<0.001	<0.001	—
2倍量	筋肉	<0.001	<0.001	—
	肝臓	<0.001	<0.001	—
	腎臓	<0.001	<0.001	—
	脂肪	0.001*	<0.001	<0.001
	小腸	<0.001	<0.001	—
	血液	<0.001	<0.001	—

・(*) 3例中2例が検出限界未満 ・ — : 実施せず

同じ試験を異なる雌子牛(約6ヶ月齢、31頭)を用いて実施された残留試験の結果は、表2に示すように最終投与1日後においては、いずれの試料も検出限界未満となった。(参照14)

表2 ブロチゾラム製剤投与後の組織内残留濃度 3試行 単位: µg/g

試料		採材時点		
		2時間目	1日目	2日目
常用量	筋肉	<0.001	<0.001	—
	肝臓	0.001 0.003*	<0.001	<0.001
	腎臓	0.002**	<0.001	<0.001
	脂肪	0.002**	<0.001	<0.001
	小腸	0.002**	<0.001	<0.001
	血液	0.001**	<0.001	<0.001
2倍量	筋肉	<0.001	<0.001	—
	肝臓	<0.001	<0.001	—
	腎臓	<0.001	<0.001	—
	脂肪	0.001*	<0.001	—
	小腸	<0.001	<0.001	—
	血液	<0.001	<0.001	—

*は3例中1例で検出限界未満、**は3例中2例で検出限界未満 — : 実施せず

泌乳牛（2～6 才齢、3 頭/群）に SPV-708 を体重 100 kg あたり常用量群 1.0 mL および 2 倍量群 2.0 mL として、朝の搾乳直後に左頸静脈内に 3 日間連続投与した。乳汁採取は 1 回目投与前 1 回（対照）、最終投与 12、24、36、48、60 および 72 時間後に、血液採取は 1 回目投与前 1 回（対照）、最終投与 15、30 分、1、2、6 および 12 時間後に右頸静脈から行い、プロチゾラムの経時的な残留推移を確認した。表 3 においては乳汁では、常用量群および 2 倍量群ともに最終投与 24 時間後まで全試料が検出限界未満であった。表 4 においては血液においては、最終投与 1 時間後にはいずれも検出限界未満となった。（参照 15）

表 3 プロチゾラム製剤投与後の乳汁中残留濃度 単位：μg/g

	投与前	12 時間	24 時間	36 時間
常用量	<0.001	<0.001	<0.001	—
2 倍量	<0.001	<0.001	<0.001	—

表 4 プロチゾラム製剤の血液中残留濃度 単位：μg/g

	投与前	15 分	30 分	1 時間	2 時間
常用量	<0.001	0.001, 0.002, 0.002	0.001*	<0.001	<0.001
2 倍量	<0.001	0.002, 0.003, 0.003	0.001, 0.002, 0.002	<0.001	<0.001

同じ試験で異なる泌乳牛（4 才齢、3 頭/群）を用いて実施された残留試験の結果は、表 5 と表 6 に示すように乳汁では、常用量群および 2 倍量群ともに最終投与 12 時間後で全試料が検出限界未満であった。血液においては、常用量群および 2 倍量群でそれぞれ最終投与 30 分および 1 時間後には検出限界未満となった。（参照 16）

表 5 プロチゾラム製剤投与後の乳汁中残留濃度 単位：μg/g

	投与前	12 時間	24 時間
常用量	<0.001	<0.001	<0.001
2 倍量	<0.001	<0.001	<0.001

36 時間以降は実施せず

表 6 プロチゾラム製剤の血液中残留濃度 単位：μg/g

	投与前	15 分	30 分	1 時間	2 時間
常用量	<0.001	0.001	<0.001	<0.001	—
2 倍量	<0.001	0.003, 0.002, 0.002	0.002, 0.002*	<0.001	<0.001

・ ーは実施せず ・ *3 例中 1 例で検出限界未満 ・ 6 時間以降は検査実施せず

2. 急性毒性試験

（1）急性毒性試験（マウス）（参照 17,18,19）

Chbi: NMRI 系アルビノマウス（雌雄各 10 匹/群）にプロチゾラムを単回強制経口（6,000、8,000、10,000 mg/kg 体重/日）投与したときの LD₅₀ は雌雄ともに 10,000 mg/kg

体重以上であった。死亡例は 8,000 mg/kg 投与群の雄 3 例 10,000 mg/kg 投与群の雌 1 例で認められた。死亡した雄 1/3 例の胃腸管内は乳白色の投与液で満たされていた。また、2/3 例では胃腸管内に残留物は認められなかったものの、1 例の粘膜に充血が認められた。雄 2/3 例および雌 1 例では脱水が認められた。計画解剖例では投与に関連すると思われる変化は認められなかった。

薬物による影響として、全例において投与後に自発運動の著しい減少あるいは睡眠が認められたが、投与後 4 日までには完全に回復した。なお、これらの症状の程度に群間差および性差は認められなかった。(参照 17,19)

ICR-JCL 系マウス（雌雄各 5 匹/群）にブロチゾラムを単回静脈内（0、20 mg/kg 体重/日）投与したが、死亡例は認められず、LD₅₀は雌雄ともに 20 mg/kg 体重以上であった。薬物による影響として、鎮静、自発運動の減少および失調様歩行が認められたが、翌日には回復した。剖検では病理学的変化は認められなかった。(参照 18)

ICR-JCL 系マウス（雌雄各 5 匹/群）にブロチゾラムを単回腹腔内（0、1,000 mg/kg 体重/日）投与したが、死亡例は認められず、LD₅₀は雌雄ともに 1,000 mg/kg 体重以上であった。薬物による影響として、鎮静、睡眠、自発運動の減少および失調様歩行が認められたが、投与 2 日後には全例が回復した。剖検ではいずれの投与群においても腹膜炎が認められた。(参照 18)

（２）急性毒性試験（ラット）（参照 18,20）

SD-JCL 系ラット（雌雄各 5 匹/群）にブロチゾラムを単回静脈内（0、16（雌のみ）、20 mg/kg 体重/日）投与したときの LD₅₀は雌雄ともに 20 mg/kg 体重以上であった。死亡例は 20 mg 投与群の雌 2 例で認められ、1 例は睡眠中投与 5 分後に、別の 1 例は投与 6 時間後に強直性痙攣および呼吸困難により死亡した。

薬物による影響として、雌雄共に鎮静および睡眠が認められたが、投与後 6 時間以内に回復した。また、雌雄共に摂水量の高値が認められた。剖検では、死亡例および計画解剖例に病理学的変化は認められなかった。(参照 18)

SD-JCL 系ラット（雌雄各 5 匹/群）にブロチゾラムを単回腹腔内（0、1,000 mg/kg 体重/日）投与したときの LD₅₀は雌雄ともに 1,000 mg/kg 体重以上であった。投与翌日に 1,000 mg 投与群の雄 1 例で死亡が認められ、剖検では胃底部粘膜の点状出血、腹腔内には被験物質の白色沈着がみられた。

薬物による影響として、鎮静および睡眠、失調様歩行、自発運動の減少、軟便等が認められたが、投与 2～3 日後に回復した。体重変化は雄で投与 7 日後まで遅延が認められ、この期間は摂水量にも低値が認められた。雌では摂水量は高値を示した。計画解剖例ではいずれの投与群でも腹膜炎が認められた。(参照 18)

SD-JCL 系ラット（雌雄各 10 匹）にブロチゾラムを単回強制経口（7,000 mg/kg 体重）投与したとき死亡例は雌 1 例で認められ、LD₅₀は雌雄ともに 7,000 mg/kg 体重以上で

あった。剖検では胃腸管内に投与液が満たされていた以外、明らかな変化は認められなかった。

薬物による影響として、雌雄共に投与 5 分後から鎮静、投与 10 分後にうずくまり、投与 1 時間後に腹臥位、投与 3 時間後には雄では失調様歩行を開始し、雌では腹臥位のまま労作性呼吸を行っていた。雄は翌朝には回復していたが、雌の 3 例が衰弱状態に陥り、そのうち 1 例が死亡した。なお、雌雄共にこれらの症状は投与後 48 時間までには回復した。(参照 20)

(3) 急性毒性試験 (イヌ) (参照 19)

イヌ (雌雄 2 頭/群、計 6 頭) にプロチゾラムを単回経口投与したときの LD₅₀ は雌雄ともに 2,000 mg/kg 体重以上であった。薬物による影響として、投与 1-28 時間後に心拍数および呼吸数の増加、運動失調が認められ、投与後 48 時間までに睡眠、鎮静、振戦および嘔吐が認められた。投与 2~4 日後に摂餌量の低値および体重の軽度な低値が認められた。

(4) 急性毒性試験 (ウサギ) (参照 19)

ウサギ (雌雄 2 羽/群、計 4 羽) にプロチゾラムを単回経口投与したときの LD₅₀ は雌雄ともに 2,000 mg/kg 体重以上であった。薬物による影響として、運動失調、筋弛緩および鎮静が認められた。

(5) 急性毒性試験 (サル) (参照 21)

カニクイザル (雌雄各 1 頭) を用いた強制経口 (0.063、0.25、1、4 mg/kg 体重/日) 投与による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、投与は雌雄各 1 頭に対し、各用量を 7 日間隔で行なった。

本試験期間中に死亡例は認められなかった。

一般的な臨床症状観察では、0.063 mg 投与群の雌雄で発声やひっかき行動の減少、怯えや攻撃性の低下を示す例が認められた。また、振戦、握力の低下および探索行動の増加がいずれも軽度ながら認められた。0.25 および 1 mg 投与群では、自発運動および探索行動の増加が認められた後、鎮静および無関心の状態となった。これ等の症状の程度および持続時間には用量相関性が認められた。4 mg 投与群の症状および程度は 1 mg 投与群と類似していたが、投与後に探索行動は認められず、鎮静状態が長時間認められた。なお、鎮静状態は投与後 24 時間までには回復が認められた。

3. 亜急性毒性試験

(1) 4 週間亜急性毒性試験 (ラット) (参照 19)

ラット (雌雄各 20 匹/群、最高用量の雌は 30 匹) を用いた強制経口 (0.3、10、400 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。また、対照群と高用量群の雌雄各 10 匹は回復群とし、投与終了後 6 週間の観察と検査を行った。

本試験期間中に死亡例は認められなかった。

一般的な臨床症状観察では、10 mg 以上投与群で鎮静を示した後、興奮が認められた。

摂餌量では、400 mg 投与群の雌で高値が認められた。

血液生化学検査では、400 mg 投与群で Tcho の高値が認められた。

臓器重量では、400 mg 投与群で肝重量の高値が認められたが、回復期間中に回復がみられた。

病理組織学的検査では、肝臓を含めて投与に関連すると考えられる異常は認められなかった。

本試験の NOAEL は 0.3mg/kg 体重/日と考えられた。

(2) 5 週間亜急性毒性試験 (ラット) (参照 20,22)

SD-JCL 系ラット (雌雄各 15 匹/群) を用いた強制経口 (0.5、100、1,000 mg/kg 体重/日、低用量の 0.5 mg/kg は推定臨床用量である 0.005 mg/kg の 100 倍量に相当) 投与における 5 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。また、対照群と高用量群にはそれぞれ雌雄各 10 匹を加えて回復群とし、投与終了後 6 週間の観察と検査を行った。

本試験期間中に死亡例は認められなかった。

一般的な臨床症状観察では、0.5 mg 投与群に一般状態の変化はみられなかった。100 mg 以上投与群で投与 10～15 分後から鎮静状態が認められた。鎮静は 100 mg 投与群では 4 時間、1,000 mg 投与群では 4～7 時間継続したが、投与回数を重ねるにつれて徐々に短くなり、投与終了時には両群ともに継続時間は約 2 時間となった。また、両群共に投与 2 週目から攻撃性を示すようになり、1,000 mg 回復群では投与終了後 3～4 日間、全例において興奮と自発運動の亢進が認められた。

体重変化では、1,000 mg 回復群の雄で体重増加に有意な低値が認められた。

摂餌量は 100 mg 投与群以上の雌で増加傾向が認められた。1,000 mg 回復群の雌雄では回復期間第 1 週に減少が認められた。

摂水量は 100 mg 投与群以上の雌および、1000 mg 投与群の雄で投与第 1 週中に増加が認められたが、その後は投与に関連した変動は認められなかった。

血液学的検査では、100 mg 投与群の雌で赤血球数の減少、1,000 mg 投与群の雄で白血球の減少、雌では Hb 量、RBC、Ht 値および好酸球率の減少、分葉核好中球率の増加が認められた。回復群では、1,000 mg 投与群の雌で RBC になお低値が認められたが、その他の項目については対照群との間に有意差は認められなかった。

骨髓塗抹検査は対照群と 1,000 mg 投与群で実施され、1,000 mg 投与群の雌雄で分葉核好中球率の増加、雌で好酸球率の減少にいずれも僅かな有意差が認められた。また、1000mg 投与群の雌で骨髓の桿状球にも有意な増加が認められている。しかし、回復期間終了時には、これらの値に有意差は認められなかった。

血液生化学検査では、0.5 mg 以上の雌でグルコースの軽度ながら有意な高値が認められたが、背景データと比較して対照群の値が低かったことによるものであり²、これらの

² 本試験におけるグルコースの背景データは $9.1 \pm 0.7 \text{ mmol/l}$ 、対照データは $8.4 \pm 0.8 \text{ mmol/l}$ であった。

高値は投与による影響ではないと考えられた。また、1,000 mg 投与群の雌雄でコレステロールの軽度な高値が認められた。また、雄ではカリウムおよびナトリウムの高値、雌ではGPT、総タンパク、アルブミン、カルシウムの高値およびAP、クロライドの低値が認められた。その他、回復群ではいくつかの項目で有意差がみられたが、いずれも対照群との差はわずかであった。

尿検査では、1000mg 投与群の雄の尿比重は有意に高値を示し、2例のタンパク反応は+++を示したが回復期間終了時には、いずれの投与群出でも明らかな変化は認めなかった。

臓器重量では、1,000 mg 投与群の雌雄で甲状腺の絶対・比重量³の高値と脾臓および胸腺の絶対・比重量の低値が認められ、雄では肝臓と腎臓の比重量の高値が、雌ではそれらの絶対・比重量の有意な増加が認められ、回復期間終了時においても肝重量の有意な高値が認められた。

剖検、病理組織学的検査および肝細胞の電子顕微鏡学的検査では、投与に関連すると考えられる変化は認められなかった。

本試験のNOAELは0.5 mg/kg 体重/日と考えられた。

(3) 13 週間亜急性毒性試験（ラット）（参照 19）

ラット（雌雄各 20 匹/群、高用量群は雌雄各 30 匹）を用いた混餌（0.3、10、400 mg/kg 体重/日）投与における 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。また、対照群と高用量群の雌雄各 10 匹は回復群とし、投与終了後 6 週間の観察と検査を行った。

本試験期間中、投与に関連すると考えられる死亡例は認められなかった。

一般的な臨床症状観察では、400 mg 投与群の雌雄で、投与 9 週頃から触れると怖がり防御反応を示すなど反応性の増強が認められたが、これらの反応は回復性を示した。

体重変化および摂餌量は、いずれも 400 mg 投与群の雌雄で低値が認められた。

血液生化学的検査では、400 mg 投与群で AP の低値および Tcho の高値が認められたが、いずれも回復期間中に回復した。

臓器重量では、400 mg 投与群で肝重量の増加認められたが、回復期間中に回復した。

病理組織学的検査では、投与に関連すると考えられる異常は認められなかった。

本試験のNOAELは10mg/kg 体重/日と考えられた。

(4) 13 週間亜急性毒性試験（サル）（参照 24）

アカゲザル（雌雄各 3 頭/群）を用いた強制経口（0、1、10、100 mg/kg 体重/日）投与による 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。なお、脳波検査用として、別に 100 mg 投与群（雌雄各 3 頭）を設定し、13 週間の投与終了後に 5 週間の回復期間を設けて観察した後に脳波検査に供した。

本試験期間中に死亡例は認められなかった。

³ 体重比重量を比重量という（以下同じ）。

一般的な臨床症状観察では、1 mg 以上投与群で運動失調、10 mg 以上投与群では睡眠傾向、攻撃性の明らかな低下、運動失調に伴う筋肉の痙攣が認められ、症状の程度には用量相関性がみられた。100 mg 投与群では過反射やハンドリングによる四肢筋肉の痙攣が認められた。回復群では、音刺激による強直性間代性痙攣を示す例が認められた。

体重変化では、投与群の全例において体重増加量の高値が認められたが、回復期間中に回復を示した。摂餌量および摂水量の測定は行なわれていないが、投与期間中の摂餌は旺盛であった。

血液生化学的検査では、100 mg 投与群でカルシウムの低値が認められたが、回復期間中に回復した。

臓器重量では、100 mg 投与群で肝臓重量の高値が認められたが、回復期間中に回復した。

性周期、筋電図、脳波、血液学的検査、尿排泄、尿検査、眼科学的検査、剖検および病理組織学的検査に、被験物質の投与によると考えられる明らかな異常は認められなかった。

本試験では NOAEL は求められず、LOAEL は 1mg/kg 体重/日と考えられた。

(5) 4 週間亜急性毒性試験 (イヌ) (参考) (参照 23)

ビーグル犬 (雌雄各 3 匹/群) を用いた静脈内 (0、0.05、0.1、0.3 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、試験は 5 群構成とし、対照群には生理食塩液を、溶媒対照群には 10% アルコール溶液を投与した。

本試験期間中に死亡例は認められなかった。

一般的な臨床症状観察では、0.05 mg 投与群以上で重篤な運動失調が認められたが、症状は数分以内に軽減し、1 時間以内に消失した。なお、本症状の発現は試験の経過とともに軽減した。溶媒対照群および 0.05 mg 以上投与群で軽度の流涎が認められ、0.1 および 0.3 mg 投与群雄の各 1 例では下痢が頻発した。

本薬の薬理作用として、自発運動能について投与 2 週および 4 週の投与後 3 時間まで調べられている。いずれの時点においても、0.05 mg 以上投与群で対照群に比べ自発運動の亢進がみられ、症状の程度および持続時間には用量相関性が認められた。

体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、眼科学的検査、臓器重量、剖検および病理組織学的検査に、被験物質の投与による明らかな影響は認められなかった。

表 7 各種亜急性毒性試験の比較

動物種	試験	投与量(mg/kg 体重/日)	無毒性量 (mg/kg 体重/日)
ラット	4 週間 亜急性 毒性試験	0, 0.3, 10, 400	0.3 鎮静

	5 週間 亜急性 毒性試験	0, 0.5, 100, 1000	0.5 鎮静、攻撃性 雌：摂餌量の増加傾向、摂水量の増加、 赤血球数の減少
	13 週間 亜急性 毒性試験	0, 0.3, 10, 400	10 反応性の増強、体重の低値、摂餌量の低 値、AP の低値、Tcho の高値、肝重量の 増加
サル	13 週間 亜急性毒性 試験	0, 1, 10, 100	— 運動失調、体重増加量の高値

4. 慢性毒性試験および発がん性試験

(1) 12 ヶ月間慢性毒性試験（サル）（参照 19）

アカゲサル（雌雄各 4 頭/群）を用いた強制経口（0、1、7、50 mg/kg 体重/日）投与による 12 ヶ月間の慢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。本試験期間中に死亡例は認められなかった。

一般的な臨床症状観察では、7 mg 以上投与群で鎮静、運動失調、傾眠および睡眠が認められ、症状の程度および持続時間には用量相関性が認められた。50 mg 投与群では投与 4 週から反射性筋収縮の亢進が認められた。また、禁断症状として、7 mg 以上投与群で嘔吐、50 mg 投与群では突発性あるいは聴原性の強直性間代性発作が認められた。

体重変化では、7 mg 以上投与群で体重増加量の高値が認められた。

摂餌量は測定されていないが、摂餌は旺盛であった。

病理組織学的検査では、50 mg 投与群の 4 例で副腎皮質への脂肪浸潤が認められた。

本試験の NOAEL は 1mg/kg 体重/日と考えられた。

(2) 18 ヶ月間慢性毒性試験（ラット）（参照 25）

Chbb: THOM 系ラット（雌雄各 25 匹/群）を用いた混餌（0、0.3、10、400 mg/kg 体重/日、低用量は予想臨床用量の 10 倍量に相当）投与による 18 ヶ月間の慢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。

本試験期間中に対照群の 11 例、0.3 mg 投与群の 3 例、10 mg 投与群の 4 例、400 mg 投与群の 24 例に死亡が認められた。死因は自然発生性病変によるものに加え、採血時の麻酔死が多数を占めたが、400 mg 投与群の死亡例増加は、腎盂腎炎と肺のリン脂質症に起因する一般状態の悪化によるものであった。

一般的な臨床症状観察では、各投与群の多くの例において、口周囲の皮膚にパスツレラ感染によると考えられる小さな膿瘍が認められた。400 mg 投与群の雌雄では、投与 3 週から軽度な立毛と興奮が認められたが、これらの症状は投与 10 週には消失した。また、投与 27 週から試験終了まで一般状態の悪化が認められた。

体重変化は、10 mg 投与群の雌雄で体重増加量の軽度な高値が認められた。400 mg 投与群では、雌雄で体重増加量の低値が認められた。特に、投与 8 週以降に明らかな低

下が認められ、投与 23 週以降は体重増加量の抑制が認められた。

摂餌量は体重変化に伴う変動を示し、10 mg 投与群では軽度な増加が、400 mg 投与群では明らかな減少が認められた。

摂水量および尿検査には、投与に関連する変化は認められなかった。

血液学的検査では、400 mg 投与群で薬物投与に関連した変化が認められた。網状赤血球の明らかな高値が雄で投与 65 週、雌では投与 25 週から認められた。また、MCH および MCHC の軽度な低値が、雌雄において投与 25 週より認められた。白血球数の軽度な高値が雌で投与 25 週より認められた。また、好中球の中程度から顕著な高値とそれに伴うリンパ球の低値が雄で投与 6 週、雌では投与 13 週より、血小板の軽度な低値が雄で投与 25 週、雌では投与 52 週より認められた。

生化学検査においても、400 mg 投与群で薬物投与に関連した変化が認められた。雌雄において、Tcho の顕著な高値、AP の明らかな低値、BUN の低値およびグルコースの軽度かつ一過性の高値が認められた。また、雄ではカリウムの軽度な低値が認められた。

剖検では、4 例で精巣の萎縮等の所見が見られている。その他に薬物に関連すると考えられる変化は

認められなかった。

臓器重量では、400 mg 投与群の雌雄で脾臓の顕著な低値および唾液腺の低値が、雄で精巣の顕著な低値、心臓、肺および脳の低値が、雌では副腎の顕著な低値が認められた。

病理組織学的検査では、400 mg 投与群の雌雄において、肺の肺胞腔内に泡沫状細胞の集簇がみられるリン脂質症および腎臓で腎盂腎炎が認められた。また、雄では精上皮細胞の減少による精巣萎縮が 18 例で認められ、そのうち 10 例は重度な萎縮であった。

本試験の NOAEL は 10 mg/kg 体重/日と考えられた。

(3) 18 ヶ月間発がん性試験 (マウス) (参照 3)

Chbi: NMRI マウス (対照群: 雌雄各 100 匹、低用量および中用量群: 雌雄各 50 匹、高用量群: 雌雄各 80 匹、計 560 匹) を用いた混餌 (0、0.3、10、200 mg/kg 体重/日) 投与による 18 ヶ月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。

死亡率において、薬物投与に関連する変化はみられなかった。

一般的な臨床症状観察では、投与期間を通して全投与群の雌雄で明らかな用量依存性の鎮静が認められ、特に雄で強い影響が認められた。また、10 mg 以上投与群の雄の半数例で、膀胱の拡張に起因すると考えられる腹部の膨張が認められた。

体重変化は、全投与群の雌雄で明らかな高値が認められ、特に雄で強く認められた。

摂餌量は雄でわずかな低値を示し、雌では高値を示した。

摂水量は、10 mg 以上投与群の雌雄でわずかな低値が認められた。

血液学的検査では、投与に関連する変化は認められなかった。

臓器重量では、200 mg 投与群で肝重量の高値が認められた。

剖検では、10 mg 以上投与群の雄で膀胱の中程度～重度の拡張および膀胱壁の肥厚が認められた。

病理組織学的検査では、10 mg 投与群以上の雄で認められた膀胱の拡張に関連する所見として膀胱壁の圧迫萎縮、肥厚に関連する所見として膀胱粘膜下における限局性あるいはびまん性の浮腫、繊維化が認められた。また、雄では、膀胱壁における炎症細胞浸潤や包皮腺における慢性炎症の増加が認められた。200 mg 投与群では、膀胱の所見に随伴して片側性あるいは両側性に水腎症を示す例が 17 例認められた。

558/560 匹（2 例は試験中に行方不明）は死亡もしくは安楽死後に病理組織学的に検査されたが、自然発生性腫瘍の頻度、腫瘍の種類および発生時期のいずれにおいても投与による影響は認められなかった。

本試験において、被験物質投与に関連する発がん性は認められなかった。

本試験では NOAEL は求められず、LOAEL は 0.3mg/kg 体重/日と考えられた。

（4）2 年間発がん性試験（ラット）（参照 26）

Chbb: THOM (Wistar) ラット（対照群：雌雄各 100 匹、低用量および中用量群：雌雄各 50 匹、高用量群：雌雄各 80 匹、計 560 匹）を用いた混餌（0、0.3、10、200 mg/kg 体重/日）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。

死亡率は 200 mg 投与群雄では対照群より有意な増加が認められた。

一般的な臨床症状観察では、200 mg 投与群の雌雄でしばしば被毛の粗剛、雄では著しい鎮静および尿量の増加、雌では後肢足底および膝の角質肥厚が認められた。

体重変化は、雌雄共に 0.3 および 10 mg 投与群で高値を示した。一方、200 mg 投与群では雌雄共に低値を示し、特に雄で明らかであった。

摂餌量は 10 mg 投与群の雌で高値を示し、200 mg 投与群では雌雄共に低値を示した。

摂水量は 10 mg 投与群の雌で高値を示した。

血液学的検査では、白血球数の高値が 10 mg 以上投与群の雄 4 例、全投与群の雌 9 例で認められた。また、対照群を含む全投与群において相対的なリンパ球減少症が認められ、その発生頻度は 200 mg 投与群で高かった。本変化は加齢性的変化である可能性が考えられたが、200 mg 投与群については薬物投与との関連性も示唆された。

途中解剖例の剖検では、200 mg 投与群で泌尿器系および雄の副生殖腺に所見の増加が認められた。一方、計画解剖例では、200 mg 投与群の雌雄に共通して食道拡張、肺、肝臓および腎臓に所見が散見された。また、性差がみられた所見として、雄で甲状腺の大きさおよび外観の変化、膀胱および副生殖腺の変化、鼻汁を伴う鼻腔粘膜の変色（茶褐色変化）が、雌では胸腺の大きさおよび外観の変化、後肢足底表面の角質肥厚が認められた。

病理組織学的検査では、腫瘍性病変として、200 mg 投与群の雄で甲状腺濾胞腺腫、雌では胸腺型の悪性リンパ腫および子宮における神経鞘腫の発生に有意な増加がみられた。また同群では、非腫瘍性病変として、雌雄の甲状腺におけるコロイドの好塩基性

化、嚢胞状濾胞、結節性過形成、濾胞上皮細胞のびまん性過形成、肺のリポタンパク症、主として雄における泌尿生殖器系における炎症性（腎盂炎、腎盂腎炎、化膿性膀胱炎、前立腺炎、精囊腺炎）および増殖性（腎盂粘膜上皮のびまん性過形成、膀胱の粘膜上皮過形成）変化が認められた。

本試験の NOAEL は 10 mg/kg 体重/日であった。

表 8 各種慢性毒性試験および発がん性試験の比較

動物種	試験	投与量(mg/kg 体重/日)	無毒性量 (mg/kg 体重/日)
サル	12 ヶ月間 慢性毒性 試験	0, 1, 7, 50	1 鎮静、運動失調、傾眠および睡眠、禁 断症状（嘔吐）、
ラット	18 ヶ月間 慢性毒性 試験	0, 0.3, 10, 400	10 死亡例増加、軽度な立毛、興奮、体重 増加量の低値、摂餌量の減少、網状赤 血球の高値、MCH・MCHC の軽度な 低値、好中球の高値、リンパ球の低値、 血小板の軽度な低値、Tcho の高値、 AP の低値、BUN の低値、グルコー スの軽度かつ一過性の高値、臓器重量 の低値（脾臓、唾液腺）、肺のリン脂 質症、腎盂腎炎 雄：カリウムの軽度な低値、臓器重量 の低値（精巣、心臓、肺、脳）、 精巣萎縮 雌：白血球数の軽度な高値、臓器重量 の低値（副腎）
マウス	18 ヶ月間 発がん性 試験	0, 0.3, 10, 200	— 鎮静 雄：摂餌量の低値 (発がん性は認められていない)
ラット	2 年間 発がん性 試験	0, 0.3, 10, 200	10 被毛粗剛、体重の低値、摂餌量の低値、 リンパ球減少症、食道拡張、肺・肝臓 および腎臓の所見散見、甲状腺におけ るコロイドの好塩基性化、嚢胞状濾 胞、結節性過形成、濾胞上皮細胞のび まん性過形成、肺のリポタンパク症 雄：死亡率増加、鎮静、尿量増加、副 生殖腺の所見の増加、甲状腺濾胞 腺腫、泌尿生殖器系の炎症性およ

			び増殖性変化 雌：後肢足底・膝の角質厚肥、胸腺型 悪性リンパ腫・神経鞘腫（子宮）
--	--	--	--

5. 生殖発生毒性試験

二世世代繁殖毒性試験の代わりに FDA の 3 節試験が実施されている。

(1) 妊娠前及び妊娠初期投与試験（第 I 節）（ラット）（参照 19,27）

SD 系ラット（雌雄各 20 匹/群）を用いた強制経口（雄；0、0.05、2.5、100 mg/kg 体重/日、雌；0、0.05、2.5、50 mg/kg 体重/日）投与による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。被験物質の投与は、雄は交配前 60 日から交配期間中を通じて、雌には交配前 14 日から妊娠 7 日までの間行い、それぞれ交配期間終了後及び妊娠 21 日に剖検した。

投与に関連した死亡はみられなかった。

一般的な臨床症状観察では、2.5 mg 投与群の雌雄で投与初日にのみ、投与後に弱い鎮静を示す例がみられ、高用量群では投与 20～60 分後から鎮静状態が 3～4 時間みられたが、その深さ、持続時間ともに投与期間中徐々に軽減していった。

体重変化は、雄では 100 mg 投与群で有意な低値が認められた。雌では 50 mg 投与群で投与期間終了後の妊娠 8～9 日の体重増加に有意な低値がみられたが、妊娠 21 日には対照群と同程度まで回復した。

摂餌量は雄では有意な変化はみられず、雌では 50 mg 投与群で投与期間終了後に有意な低値が認められた。

摂水量は 100 mg 投与群の雄で投与期間の最初の 2 週間に、雌では 50 mg 投与群で交配前第 1 週に有意な高値がみられた。

臓器重量では、特記すべき変化は認められなかった。

剖検では、雌雄ともに薬物投与に関連すると考えられる影響は認められなかった。

いずれの投与群においても、交尾率、妊娠率、黄体数、生存胎児数、死胚数（早期・後期吸収胚数、死亡胎児数）、胎児体重に異常は認められなかった。50 mg 投与群では胎児の有意な骨化遅延が認められた。

本試験における親動物の一般毒性に対する NOAEL は雌雄ともに 0.05 mg/kg 体重/日、生殖に対する NOAEL は雄で 100 mg/kg 体重/日、雌では 50 mg/kg 体重/日、発生に対する NOAEL は 2.5 mg/kg 体重/日と考えられた。（参照 27）

ラット（雌雄各 20 匹/群）を用いた強制経口（0、1、2、10 mg/kg 体重/日）投与による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。被験物質の投与は、雄は交配前 9 週間、雌は交配前 2 週間の間行なった。

親動物の一般状態、交配、妊娠および出産のいずれにおいても被験物質による影響は認められなかった。また、胎児においても胎児毒性および催奇形性は認められなかった。

本試験の NOAEL は、親動物および胎児ともに 10 mg/kg 体重/日と考えられた。（参

表 9 妊娠前及び妊娠初期投与試験 (第 I 節) (ラット)

動物種	試験	投与量(mg/kg 体重/日)	無毒性量 (mg/kg 体重/日)
ラット	妊娠前及び妊娠初期 投与試験	雄 ; 0, 0.05, 2.5, 100 雌 ; 0, 0.05, 2.5, 50	親動物 : 0.05 生殖 : 雄 100、雌 50 発生 : 2.5 親動物 : 弱い鎮静 発生 : 胎児の骨化遅延
		0, 1, 2, 10	親動物 : 10 胎児 : 10 投与による影響は認められなかった (催奇形性は認められなかった)

(2) 器官形成期投与試験 (第 II 節) (ラット) (参照 27,28,29)

SD 系ラット (雌 37 匹/群) を用いた強制経口 (0, 0.05, 2.5, 250 mg/kg 体重/日) 投与による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。被験物質の投与は、妊娠 7 日から 17 日までの間行い、21 日に 25 匹を帝王切開して胎児 (F_{1a}) への影響を検査し、残りの母体については自然分娩させ新生児 (F_{1a}) を離乳まで哺育して身体発達と行動を検査した。離乳後の児は各群の各母体から雌雄各 2 匹を選抜・飼育し、11 週齢で交配して妊娠末期に次々世代胎児 (F_2) を検査した。授乳を終えた母動物 (F_0) は、離乳後 1 週間を経て再び第一産と同じ雄動物と交配させ、妊娠末期に胎児 (F_{1b}) を検査した。

本試験中に、250 mg 投与群の母動物 2 例で死亡 (1 例 : 剖検では胃内に異嗜によると考えられる多量の床敷および噴門部に新鮮な潰瘍が認められた。1 例 : 分娩予定日の 24 日後に死亡。子宮内に自家中毒によると考えられる浸軟胎児の残存が認められた。) が認められたが、いずれも薬物による直接作用ではないと考えられた。

F_0 母動物の一般的な臨床症状観察では、2.5 mg 投与群で投与開始後 1~2 日間に、弱い鎮静が 5 例に認められた。250 mg 投与群では投与 10~30 分後から鎮静状態が 3~4 時間続いたが、この持続時間は投与回数を重ねるにつれて短くなった。立毛が若干数に認められた。体重変化は、250 mg 投与群で投与期間中に有意な低値を示し、投与期間終了後には一過性の低下が認められた。自然分娩群では分娩後離乳時まで体重は徐々に回復した。250 mg 投与群では投与期間中に摂餌量は有意な低値を示し、摂水量は高値を示した。自然分娩群では、250 mg 投与群の 7 例において妊娠期間が対照群に比べ 1 日延長した。

F_{1a} 胎児では、250 mg 投与群で胎児体重および趾骨の化骨数に有意な低値がみられた。また、14 肋骨および仙椎の腰椎化の発現頻度が有意に上昇し、4 例の奇形胎児 (無尾症、胸椎の異常、水頭症および口蓋裂が各 1 例) が認められた。

F_{1a} 新生児では、250 mg 投与群で次のような所見がみられた。生後 1 日の新生児の体重に有意な低値がみられた。哺乳期間中に児の死亡率が有意に増加し、生存児の立ち直り反射および眼瞼開裂に有意な遅延が認められた。離乳後も、精巣下降の遅延と 11 週齢までの体重に増加抑制が認められた。F₁ の生殖能については、交尾率および妊娠率ともに影響は認められなかったが、黄体数、着床数および生存胎児(F₂)数は有意に少なかった。

次々世代胎児 (F₂) および次産胎児 (F_{1b}) には、薬物投与に関連すると考えられる変化は認められなかった。

本試験の母動物 (F₀) に対する NOAEL は 0.05 mg/kg 体重/日、次世代 (F₁) に対する NOAEL は、2.5 mg/kg 体重/日と考えられた。(参照 27)

Chbb: THOM ラット (雌 20 匹/群) を用いた強制経口 (0、1.5、3、30 mg/kg 体重/日) 投与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通りであった。被験物質の投与は、妊娠 6 日から 15 日までの間行い、妊娠 21 日に帝王切開して 2/3 例の胎児は骨格検査に、残りの 1/3 例は内臓検査に供した。

投与に関連した死亡はみられなかった。

母動物の一般的な臨床症状観察では、投与に関連した異常は認められなかった。体重変化では 30 mg 投与群では投与 10 日後に有意な低値が認められたが、試験終了時には回復傾向が認められた。剖検では、薬物投与に関連すると考えられる影響は認められなかった。

胎児への影響は認められなかった。

本試験の母動物に対する NOAEL は 3 mg/kg 体重/日と考えられ、胎児に対する NOAEL は 30 mg/kg 体重/日と考えられた。催奇形性は認められなかった。(参照 28)

SD 系ラット (雌 15 匹/群) を用いた強制経口 (0、10、30、250、500 mg/kg 体重/日) 投与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通りであった。被験物質の投与は、妊娠 7 日から 17 日までの間行い、妊娠 21 日に帝王切開して胎児の観察を行なった。

母動物の一般的な臨床症状観察では、10 mg 以上投与群で投与 10～30 分後に鎮静が認められ、3～4 時間持続した。なお、鎮静の持続時間および程度は、投与回数を重ねるごとに短縮あるいは軽減した。また、数例において色素涙が認められた。体重変化では 10 mg 以上投与群で有意な低値がみられ、250 mg 以上投与群では投与終了後に顕著な低下が認められた。摂餌量についても 10 mg 以上投与群で有意な低値が認められ、250 mg 以上投与群ではより顕著であった。摂水量は 10 mg 以上投与群で有意な高値が認められた。剖検では、薬物投与に関連すると考えられる影響は認められなかった。

胎児観察では、250 mg 投与群以上で胎児体重の有意な低下、500 mg 投与群で胚/胎児死亡 (特に胎児死亡) の増加が認められた。外表観察では無尾が 500 mg 投与群の 3 例で認められた。内臓観察では大動脈右位が 250 mg 投与群の 2 例、500 mg 投与群の 1

例で認められたほか、500 mg 投与群では胸腺の頸部残留が観察された。骨格変異では、30 mg 以上投与群で 14 肋骨の出現頻度が有意に上昇し、250 mg 以上投与群では仙椎の腰椎化の出現頻度が有意に上昇し、骨化遅延が認められた。

本試験の母動物に対する NOAEL は求められず、LOAEL は 10mg/kg 体重/日と考えられた。一方、胎児に対しては、30 mg 投与群以上で 14 肋骨の出現頻度の上昇が認められたことから、NOAEL は 10 mg/kg 体重/日と考えられた。(参照 29)

表 10 器官形成期投与試験 (第Ⅱ節) (ラット)

動物種	試験	投与量(mg/kg 体重/日)	無毒性量 (mg/kg 体重/日)
ラット	器官形成期 投与試験	0, 0.05, 2.5, 250	母動物 : 0.05 胎児 : 2.5 母動物 : 弱い鎮静 児(F1) : 体重の低値、趾骨の化骨数の 低値、14 肋骨および仙椎の腰椎化の 発現頻度の上昇、死亡率の増加 (哺乳 期間中)、立ち直り反射および眼瞼開 裂の遅延、精巣下降の遅延、体重の増 加抑制 (11 週齢まで)
		0, 1.5, 3, 30	母動物 : 3 胎児 : 30 母動物 : 体重の低値 (催奇形性は認められなかった)
		0, 10, 30, 250, 500	母動物 : — 胎児 : 10 母動物 : 鎮静、体重増加の低値 胎児 : 14 肋骨の出現頻度の上昇

(3) 器官形成期投与試験 (第Ⅱ節) (ウサギ) (参照 27,30)

ヒマラヤウサギ (妊娠雌 15 匹/群) を用いた強制経口 (0、0.05、0.5、3 mg/kg 体重/日) 投与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通りであった。被験物質の投与は妊娠 6 日から 18 日までの間行い、妊娠 29 日に帝王切開して胎児を検査した。

母動物の一般的な臨床症状観察では、0.5 mg 以上投与群で投与開始直後から弱い鎮静が 1～4 時間みられたが、投与回数を重ねるにつれて持続時間は短くなり、およそ 1 週間後にはほとんど見られなくなった。3 mg 投与群の 1 例が妊娠 27 日に 8 匹の胎児を流産した。0.5 mg 以上投与群で投与期間中の体重増加が有意に抑制されたが、投与期間終了後は急速に回復した。また、体重の低下と並行して摂餌量および摂水量は低下した。

胎児では、被験物質投与に関連すると考えられる変化は認められなかった。

本試験の母動物に対する NOAEL は、0.05 mg/kg 体重/日と考えられ、胎児に対する

NOAEL は 3 mg/kg 体重/日と考えられた。催奇形性は認められなかった。(参照 27)

ヒマラヤウサギ (13 匹/群) を用いた強制経口 (0、1.5、3、9 mg/kg 体重/日) 投与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通りであった。被験物質の投与は妊娠 6 日から 18 日まで行い、妊娠 29 日に帝王切開して胎児を検査した。

投与に関連した死亡はみられなかった。

母動物の一般的な臨床症状観察では、投与に関連した異常は認められなかった。いずれの投与群においても投与初期に著しい体重低下が認められ、9 mg 投与群では投与 7 日目に 100 g 低下した。剖検では、薬物投与に関連すると考えられる影響は認められなかった。

胎児には投与の影響は認められなかった。

本試験の母動物に対する NOAEL は求められず、LOAEL は 1.5mg/kg 体重/日と考えられ、胎児に対する NOAEL は 9 mg/kg 体重/日と考えられた。(参照 30)

表 11 器官形成期投与試験 (第Ⅱ節) (ウサギ)

動物種	試験	投与量(mg/kg 体重/日)	無毒性量 (mg/kg 体重/日)
ウサギ	器官形成期 投与試験	0, 0.05, 0.5, 3	母動物 : 0.05 胎児 : 3 母動物 : 弱い鎮静、体重増加抑制、摂餌量の低下、摂水量の低下 (催奇形性は認められなかった)
		0, 1.5, 3, 9	母動物 : — 胎児 : 9 母動物 : 体重低下 (催奇形性は認められなかった)

(4) 周産期及び授乳期投与試験 (第Ⅲ節) (ラット) (参照 19,27,31,32)

SD 系ラット (雌 23 匹/群) を用いた強制経口 (0、0.05、2.5、25 mg/kg 体重/日) 投与による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。被験物質の投与は、妊娠 17 日から分娩後 21 日までの間行った。母動物 (F₀) は自然分娩させ、児 (F₁) の成長、機能および行動に及ぼす影響を検討した。また、離乳時に各母体から雌雄各 1 匹を選抜・飼育し、交配させ生殖能への影響を検査した。

投与に関連した死亡はみられなかった。

F₀ 母動物の一般的な臨床症状観察では、2.5 mg/kg 投与群で弱い鎮静が投与後約 2 時間続き、25 mg 投与群では投与 10 分後から鎮静が 2~3 時間持続したが、分娩後は次第に軽減し、やがて現れなくなった。体重変化は、2.5 mg 以上投与群で用量依存的に低値が認められた。また、2.5 mg 以上投与群で摂餌量に低値がみられ、摂水量は 25 mg 投与群で妊娠末期に高値が認められた。

F₀母動物の妊娠期間については、25 mg 投与群の6例で対照群に比べて1日延長した。剖検所見に薬物投与の影響は認められなかった。

児 (F₁) では、2.5 mg 以上投与群で生後3日までの生存率の有意な低下がみられ、25 mg 投与群では離乳時の児生存率が有意に低かった。25 mg 投与群の生後1日および21日の雌児の体重、0.05 mg 投与群以上の生後21日の雄児の体重が有意に低かった。また、25 mg 投与群ではオープンフィールド試験で立ち上がりの回数が有意に低下した。

F₁の交配試験では、25 mg 投与群で交尾率および妊娠率には影響は認められなかったが、黄体数、着床数および生存胎児 (F₂) 数に有意な低値が認められた。

本試験の母動物 (F₀) に対する NOAEL は 0.05 mg/kg 体重/日と考えられ、次世代 (F₁) に対する NOAEL は求められず、LOAEL は 0.05 mg/kg 体重/日と考えられた。

SD系ラット (雌10匹/群) を用いた強制経口 (0、25 mg/kg 体重/日) 投与による交差乳母哺育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。本試験では、母動物 (F₀) の分娩、哺育状態および交換した新生児 (F₁) の死亡率、成長への影響を検査した。母動物 (F₀) は自然分娩させ、以下に示す組み合わせに従って、いずれも生後4時間以内に児を交換し観察を行なった。

Cc : 溶媒投与母動物 (C) + 溶媒投与母動物の児 (c)

Ct : 溶媒投与母動物 (C) + 薬物投与母動物の児 (t)

Tc : 薬物投与母動物 (T) + 溶媒投与母動物の児 (c)

Tt : 薬物投与母動物 (T) + 薬物投与母動物の児 (t)

F₀母動物の一般的な臨床症状観察は、上記第Ⅲ節試験の25 mg 投与群の母動物と同様であった。

F₁児を交換した後3日齢までの児の死亡はTt群で多発し、CtおよびCc群では少なかったことから、児死亡は投薬中の母動物側に要因があることが確認された。3日齢から離乳までの児死亡はTt群で多数認められ、Tc群でも有意に多かった。哺乳期間中の体重変化は、Cc群では良好な増加がみられ、Tt群では児数の減少に伴って生存児の体重は特に哺乳期間の後半に増加し、Cc群に近づいた。離乳時におけるTc群の体重は最も低かった。(参照27)

Chbb: THOM (SPF)ラット (雌24匹/群) を用いた強制経口 (0、1、2、10 mg/kg 体重/日) 投与による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。被験物質の投与は、妊娠15日から分娩後20日までの間行なった。また、児 (F₁) の機能 (遊泳試験、聴覚および視覚機能試験)、行動 (水迷路試験による学習能および記憶能) および生殖能について検査した。

母動物の一般的な臨床症状観察では、妊娠および哺乳期間を通して、被験物質による影響は認められなかった。体重変化にも投与群と対照群で有意な差は認められなかった。

児 (F₁) では、10 mg 投与群で死産児数の増加および哺乳期間中の死亡率の増加が認

められたが、行動・機能および生殖能に被験物質投与による影響は認められなかった。

本試験の母動物に対する NOAEL は 10 mg/kg 体重/日、F₁に対する NOAEL は 2 mg/kg 体重/日と考えられた。(参照 31)

Chbb: THOM ラット (雌 24 匹/群) を用いた強制経口 (0、400 mg/kg 体重/日) 投与による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。被験物質の投与は、妊娠 15 日から離乳時 (分娩後 20 日) までの間行った。また、児 (F₁) の行動・機能および生殖能について検査した。なお、本試験では、前述の試験 (資料番号: ②-5) で母動物に投与による影響が認められなかったことから、ラットを用いた 13 週間亜急性毒性試験 (資料番号: ①-7) で体重低下作用が確認されている用量 (400 mg) について影響評価が行われた。

母動物の一般的な臨床症状観察では、投与後 30 分から立毛、鎮静および運動失調が認められ、それらの症状は数時間持続した。体重変化では、体重の低値が認められた。

F₁ では、死産児数の増加および体重の有意な低値が認められた。生存例では、母動物の鎮静作用に起因する哺育能欠如による死亡率の増加が認められ (死亡率 90%: 15 腹/17 腹)、特に生後 3 日までに高頻度に認められた。また、生存例では体重増加抑制および歩行遅延が認められたが、感覚機能、生殖能力および児の発生に異常は認められなかった。

本試験の母動物および F₁ に対する NOAEL は求められず、LOAEL は 400mg/kg 体重/日であった。(参照 19,32)

表 12 周産期及び授乳期投与試験 (第Ⅲ節) (ラット)

動物種	試験	投与量(mg/kg 体重/日)	無毒性量 (mg/kg 体重/日)
ラット	周産期及び授乳期投与試験	0, 0.05, 2.5, 25	母動物: 0.05 児(F ₁): 0.05 未満 母動物: 弱い鎮静、体重の低値、摂餌量の低値、 児(F ₁): 雄; 体重の低値
		0, 1, 2, 10	母動物: 10 児(F ₁): 2 児(F ₁): 死産児数の増加、死亡率の増加
		0, 400	母動物: — 児(F ₁): — 母動物: 立毛、鎮静、運動失調、体重の低値 児(F ₁): 死産児数の増加、体重の低値、歩行遅延

6. 遺伝毒性試験

遺伝毒性に関する各種の *in vitro* 及び *in vivo* 試験の結果を次表にまとめた。

表 13 *in vitro* 試験

試験	対象	投与量	結果
Ames 試験	<i>Salmonella typhimurium</i> TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA1538, <i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	10-5,000 µg/plate (±S9) ¹	陰性 (参照 33)
	<i>S. typhimurium</i> TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA1538	0.3、10、200 mg/kg/day ² ① 200 µL/plate ³ ② マウス：100 µL/plate ⁴ ラット：200 µL/plate ⁴	陰性 (参照 34)
不定期 DNA 合成試験	ヒト胎児肺由来の線維芽細胞 (MRC-5)	20、60、100、140、180、220、260、300 µg/mL (±S9) ^{3,5}	陰性 (参照 35)
形質転換試験	マウス胎児線維芽細胞 (C3H/10T1/2 Cl 8 cells)	50、100、150 µg/mL (±S9) ³	陰性 (参照 36)
遺伝子変換試験	酵母(<i>Saccharomyces cerevisiae</i> D4)	62.6、125、250、500、1,000 µg/mL (±S9) ³	陰性 (参照 37)
HGPRT 突然変異試験	チャイニーズハムスター肺由来 V79 細胞	10、100、250、350 g/mL ³ (±S9)	陰性 (参照 38)
点突然変異試験 ⁶	<i>S. typhimurium</i> TA98, TA100, TA1535, TA1537 (ラット・マウス), TA1538 (ラット)	0、100、200 mg/kg/day ⁷ 100 µL/plate (±S9) ³	陰性 (参照 39)

1. S9 はラット由来を使用。
2. Chbi: NMRI マウス (雄 3 例) および Chbb: THOM ラット (雄 3 例) にプロチゾラムをそれぞれ 6 日間 および 8 日間強制経口 (0.3、10、200 mg/kg 体重/日) 投与し、採取した尿 (マウス: 3 例のプール尿、ラット: 個体別の尿) を試験に供した。
3. マウスおよびラットから採取した各尿を 200 µL/plate の濃度で培地上にまいて検査を行なった。
4. マウスおよびラット共に 200 mg/kg 投与群から得られた尿を蒸留水で 10 倍希釈し、マウスは 100 µL/plate、ラットは 200 µL/plate の濃度で同様に検査を行なった。
5. 260 µg/mL 以上の濃度で沈殿が認められた。
6. ラットおよびマウスにおける血漿中の高極性代謝物に対する試験。
7. Chbb: THOM ラット (雄 5 例/群) および Chbb: NMRI マウス (雄 5 例/群) にプロチゾラムをそれぞれ 2 週間強制経口 (0、100、200 mg/kg 体重/日) 投与し、最終投与後に採取した血液から血漿を分離・凍結乾燥し、メタノール抽出の後、試験に供した。

表 14 *in vivo* 試験

試験	対象	投与量	結果
染色体異常試験	チャイニーズハムスター骨髓細胞	62、311 mg/kg 体重/day 5 日間経口投与	陰性 (参照 40)

小核試験	マウス骨髄細胞	80、400、2,000 mg/kg 体重/day 2日間経口投与	陰性 (参照 41)
優性致死試験	CD-1BR マウス	200、640、2,000 mg/kg 体重/day 単回経口投与	陰性 (参照 42)

上記のように、*in vitro*の細菌、酵母、ヒトを含む動物細胞を用いた Ames 試験、不定期 DNA 合成試験、形質転換試験、遺伝子変換試験および突然変異試験、及び *in vivo* のげっ歯類を用いた染色体異常試験、小核試験および優性致死試験のいずれも陰性であり、プロチゾラムは遺伝毒性を有さないものと考えられる。

7. 一般薬理試験 (参照 43,44,45,46)

(1) 呼吸・循環器系への作用 (参照 43)

雌雄のビーグル雑種犬 (各 3 匹/群、プロチゾラム 1、5 mg/kg の静脈内投与、ペントバルビタール麻酔下) の呼吸数、血圧、心拍数、心電図を観察したところ、1 mg および 5 mg 投与群共に投与後 120 分まで心拍数の明らかな低下とこれに伴う T 波の増高および RR 間隔の延長がみられ、呼吸数の低下が投与後 120 分以上にわたり認められた。なお、血圧には明らかな影響は認められなかった。

雄ウサギ (プロチゾラム 5、10 mg/kg の静脈内投与、ウレタン麻酔下) の呼吸、血圧、心拍数を観察したところ、10 mg 投与群で呼吸数にわずかな低下が認められた。血圧と心拍には明らかな影響は認められなかった。なお、非麻酔下のウサギでも同様の影響が認められた。

モルモットの摘出心房 (プロチゾラム 1-10 mg/L、5 分間隔で累積作用) の心筋収縮力と心拍数について観察したところ、心筋収縮力には明らかな影響は認められなかったが、心拍数は 10 mg/L の濃度で軽度な低下が認められた。

雌雄の雑種犬 (プロチゾラム 0.05、0.5 mg/kg の静脈内投与、ペントバルビタール麻酔下) の椎骨動脈流および内頸動脈流について観察したところ、0.5 mg 投与群で椎骨動脈流の増加と頸動脈流の軽度な増加が認められた。なお、これらの変動は 3 分以内に投与前値まで回復した。また、同様の方法でプロチゾラム 0.5、1 mg/kg の静脈内投与により、血圧、心拍数、心拍出量、冠血流および大腿動脈流について観察したところ、1 mg 投与群で血圧と心拍数の低下に伴い心拍出量および冠血流の軽度な減少が認められた。なお、これらの変動は投与 30 分後に正常値まで回復した。いずれの投与群においても、大腿動脈流に変化は認められなかった。

雌雄の雑種犬 (プロチゾラム 5 mg/kg の静脈内投与、ペントバルビタール麻酔下) の頸動脈洞反射、迷走神経刺激、星状神経節の節前および節後神経刺激に対する反射性昇圧について観察したところ、頸動脈洞反射刺激 (30 秒間の閉塞) に対する血圧反応およ

び迷走神経刺激に対する陰性変時作用にブロチゾラム投与による影響は認められなかった。また、ブロチゾラムは星状神経節の節前および節後神経刺激における陽性変時作用を増強したが、有意な増強（ブロチゾラム投与 15 分後）が認められたのは節前神経刺激に対する影響であった。

雌雄の雑種犬（ブロチゾラム 5 mg/kg の静脈内投与、ペントバルビタール麻酔下）に、ノルエピネフリンおよびエピネフリンを 1 μ g/kg 投与した際の心血管系への作用に対するブロチゾラム投与の影響について確認したところ、両被験物質の投与による血圧および心拍数への作用はブロチゾラム投与 15 分後および 60 分後で増強され、エピネフリン投与時の血圧に対する影響は有意であった。

（２）自律神経系および平滑筋への作用（参照 43,45）

瞬膜反射に対する作用は、ネコ（ブロチゾラム 10 μ g-3 mg/kg の舌動脈内投与、ウレタン麻酔下）の上頸神経節の節前神経刺激による瞬膜の収縮について確認したところ、ブロチゾラム投与による明らかな影響は認められなかった。（参照 43）

瞳孔径（マウス）に対する作用は、ブロチゾラム（3、30、100 mg/kg、経口）、ニトラゼパムおよびエスタゾラム（各 30、100 mg/kg）について比較検討されている。ブロチゾラムは 30 mg 投与群まで瞳孔径に明らかな影響を及ぼさず、100 mg 投与群では投与 30 分後から 60 分後に縮瞳が認められた。エスタゾラムは 30 mg 以上投与群で、ニトラゼパムは 100 mg 投与群で縮瞳が認められた。（参照 45）

ラット摘出血管（胸部大動脈、Krebs 液）では、ブロチゾラムは 10 mg/L の濃度まで平滑筋収縮に影響を及ぼさないが、塩化カリウム（5-30 mM）による収縮およびノルエピネフリン（3 mg/L）による持続性収縮に対して抑制作用を示した。なお、ノルエピネフリンによる一過性収縮には影響は認められなかった。（参照 43）

ウサギ摘出回腸（自動運動測定）に対する作用がブロチゾラムおよびニトラゼパムについて比較検討されている。両被験物質ともに 0.001-1.0 mg/L の濃度まで自発運動に影響はみられなかったが、静止張力については 10 mg/L でわずかな減少が認められた。（参照 45）

モルモット摘出回腸（アセチルコリン誘導収縮）に対する作用がブロチゾラムおよびニトラゼパムについて比較検討されている。両被験物質ともに 10 mg/L でアセチルコリン収縮の抑制作用を示した。（参照 45）

ラット摘出子宮（妊娠および非妊娠子宮）に対する作用がブロチゾラムおよびニトラゼパムについて比較検討されている。摘出非妊娠子宮では、ブロチゾラム 0.1-10 mg/L の濃度まで自発運動の振幅に影響は認められなかった。ニトラゼパムについても 10 mg/L の濃度で自発運動に影響は認められなかった。摘出妊娠子宮では、両被験物質ともに自発運動に明らかな影響は認められなかった。（参照 45）

ラット生体位子宮に対する作用がブロチゾラムおよびニトラゼパムについて比較検討されている。ブロチゾラムを 10 mg/kg の濃度まで静脈内投与しても、自発運動能に影響は認められなかった。一方、ニトラゼパムでは同様の濃度で自発運動能にわずかな亢進が認められた。(参照 45)

モルモットの摘出気管（自発収縮）に対する作用がブロチゾラムおよびニトラゼパムについて比較検討されている。両被験物質ともに 10 mg/L の濃度で摘出気管のヒスタミンによる収縮反応を低下させた。(参照 45)

モルモット摘出輸精管に対する作用がブロチゾラムおよびニトラゼパムについて比較検討されている。ブロチゾラムは 0.01-10 mg/L の濃度まで影響はみられなかった。一方、ニトラゼパムは 1.0-10 mg/L の濃度で収縮反応が認められた。(参照 45)

(3) 血液系への作用 (参照 43)

溶血に対する作用は、ウサギの耳介静脈から得られた血液を用いて、ブロチゾラム、エスタゾラムおよびニトラゼパムについて比較検討されている。各被験物質を 125-500 mg/L の濃度で血球とインキュベートした結果、いずれにおいても溶血作用は認められなかった。

凝固に対する作用は、ブロチゾラム、エスタゾラムおよびニトラゼパムをウサギに強制経口（各 25 mg/kg 体重/日）投与し、投与 15、30 および 60 分後に耳介静脈から得られた血液を用いて確認されている。いずれの被験物質についても、凝固作用に影響は認められなかった。

(4) 中枢神経系への作用 (参照 44,45,46)

脊髄反射に対する作用が、ブロチゾラムとエスタゾラムについて比較検討されている。エーテル麻酔下で第一および第二頸椎間の脊髄神経を遮断した雌雄のネコに、ブロチゾラムを静脈内（0.1 mg/kg）あるいは強制経口（1 mg/kg）投与し、投与 30、60 および 120 分後に単シナプス反射（MSR）および多シナプス反射（PSR）の活動電位について確認したところ、いずれの投与経路および用量においても PSR に影響を及ぼし、弱い抑制作用を有することが確認された。一方、エスタゾラムを強制経口（1 mg/kg）投与した場合は、MSR および PSR 共に投与後 30 および 60 分で抑制作用が認められた。ブロチゾラムの脊髄反射に対する抑制作用は、エスタゾラムに比べて軽度であった。(参照 44)

エチルアルコールおよびヘキソバルビタールで誘導される睡眠に対する作用は、ブロチゾラム、ニトラゼパムあるいはエスタゾラムを前投与した際の影響について比較検討されている。エチルアルコールをマウスに皮下（6.25 mg/kg）投与した際に誘導される睡眠時間（30 分）は、各被験物質を投与 30 分前に経口（0.125 mg/kg）投与することにより有意な延長が認められた。ヘキソバルビタールをマウスに腹腔内（85 mg/kg）投

与する 30 分前に各被験物質を経口 (5、15、45 mg/kg) 投与すると、用量非依存的ではあるが睡眠時間は 2.7~3.6 倍に延長した。(参照 45)

メタンフェタミンを投与した際の自発運動量および咀嚼行動に対する作用は、ブロチゾラム、ニトラゼパムあるいはエスタゾラムを前投与した際の影響について比較検討されている。自発運動量は、メタンフェタミンをマウスに皮下 (5 mg/kg) 投与する 30 分前にブロチゾラム、ニトラゼパムおよびエスタゾラム (各 10、30 mg/kg)、陽性対照としてジアゼパム (10 mg/kg) をそれぞれ経口投与すると、ブロチゾラム、ニトラゼパム、ジアゼパムは 10 mg 投与群、エスタゾラムは 30 mg 投与群で自発運動量の亢進が認められた。咀嚼行動は、メタンフェタミンをマウス (6 匹/群) に静脈内 (16 mg/kg) 投与する 30 分前に、ブロチゾラム、ニトラゼパムおよびエスタゾラム (各 30、90 mg/kg)、陽性対照としてハロペリドール (5 mg/kg) をそれぞれ経口投与すると、ハロペリドールは全例に抑制作用を示したが、ブロチゾラム、ニトラゼパムおよびエスタゾラムでは明らかな抑制は認められなかった。(参照 45)

無麻酔下の自発脳波に対する作用は、ウサギを用いて実施されている。ウサギ (雌雄、14 匹) にブロチゾラムを静脈内 (0.001、0.003、0.01 mg/kg 体重/日) 投与し、投与前 30 分 (最後の 10 分間：ベースライン) から投与後 2 時間まで脳波を測定したところ、0.003 mg 投与群以上では明らかにブロチゾラムの鎮静催眠作用が認められた。一方、0.001 mg 投与群では、脳波に鎮静や中枢興奮作用を示す明らかな変動は認められなかった。

本試験における NOEL は 0.001 mg/kg 体重/日と考えられた。(参照 46)

鎮痛作用がブロチゾラム、ニトラゼパムおよびエスタゾラムで比較検討されている。ラット (計 6 匹) に各被験物質を強制経口 (ブロチゾラム：1、10、50、100 mg/kg 体重/日、ニトラゼパムおよびエスタゾラム：1、10、100 mg/kg 体重/日) 投与 30、60、120、180 および 240 分後に、ラットの尾を動脈鉗子で摘んだ際の疼痛に対する鎮痛作用を確認した。ブロチゾラムに鎮痛作用は認められなかったが、ニトラゼパムでは 10 mg 以上投与群で、エスタゾラムは 100 mg 投与群では明らかな鎮痛作用が認められた。ブロチゾラムの鎮静作用の程度は、高用量においてもニトラゼパムおよびエスタゾラムの約 1/3 であった。(参照 44)

正常体温に対する作用が、ブロチゾラム、ニトラゼパムおよびエスタゾラムについて比較検討されている。ラット (Wistar 系、雄) を用いて、各被験物質を強制経口 (ブロチゾラム：1、10、50、100 mg/kg 体重/日、ニトラゼパムおよびエスタゾラム：1、10、50 mg/kg 体重/日) 投与 30、60、120、180 および 240 分後に体温を測定した。ブロチゾラムでは、10 mg 以上投与群で投与 30 分後から用量依存的な下降が認められたが、投与 240 分以内には正常範囲まで回復あるいは回復傾向が認められた。同様に、ニトラゼパムは 10 mg 以上投与群で、エスタゾラムは 1 mg 以上投与群で用量依存的な下降がみられた。いずれの被験物質も高用量で体温下降作用を示し、類似の作用が認められた。(参照 44)

(5) 消化器系への作用 (参照 45)

腸管運動 (雄イヌ、3 匹、空腸) に対する作用は、プロチゾラムおよびニトラゼパムについて比較検討されている。両被験物質ともに 0.01-1 mg/kg の静脈内投与では影響は認められなかった。

腸管輸送能 (マウス) に対する作用は、プロチゾラムおよびニトラゼパムを経口投与した時のバリウム液の移動率について比較検討されている。プロチゾラムは 1-100 mg/kg で、ニトラゼパムは 30 mg/kg で影響は認められなかった。

唾液分泌 (マウス) に対する作用として、カルバコール刺激時の唾液分泌作用への影響についてプロチゾラムおよびニトラゼパムで比較検討されている。プロチゾラムは 3 mg/kg までの皮下投与で影響は認められなかった。一方、両被験物質ともに 10 mg/kg では軽度ながら有意な分泌低下を示した。

胃液分泌 (ラット) に対する作用は、プロチゾラム 1-10 mg/kg までの経口投与では胃液量および酸分泌量ともに影響は認められなかった。

胆汁分泌 (ラット: 各被験物質ともに 12.5、25、50 mg/kg、経口) に対する作用は、プロチゾラム、ニトラゼパムおよびエスタゾラムについて比較検討されている。プロチゾラムおよびニトラゼパムでは 50 mg まで排泄量および胆汁量ともに影響は認められなかった。一方、エスタゾラムでは 12.5 mg で胆汁量の増加、25 mg では排泄量の増加が認められた。

(6) 体性神経系への作用 (参照 44,45)

局所麻酔作用は、プロチゾラム、ニトラゼパムおよびエスタゾラムで比較検討されている。モルモット (Hartley 系、雄) およびウサギ (日本白色種、雄) の目に各被験物質を 1 および 2% の濃度で 0.5 mL 滴下し、同様にもう片方の目には溶媒 (0.5% メチルセルロース) を滴下した。滴下 10、20、30、60、90 および 120 分後に角膜をウマの尾の毛で刺激して角膜反射を確認したところ、各被験物質ともにいずれの濃度および測定ポイントにおいても角膜反射は認められ、局所麻酔作用は認められなかった。プロチゾラムの局所麻酔作用は、ニトラゼパムおよびエスタゾラムと同様の傾向を示した。(参照 44)

横隔膜神経筋標本 (Wistar 系ラット、雄) の電気刺激に対する作用が、プロチゾラム、ニトラゼパムおよびツボクラリン (陽性対照) で比較検討されている。電気刺激に対する攣縮反応に対し、プロチゾラムは 0.1 mg/L まで影響はみられなかったが、1-10 mg/L の濃度では軽度な抑制が認められた。ニトラゼパムは 10 mg/L で軽度な抑制が、ツボクラリンでは 0.1 mg/L で明らかな抑制が認められた。(参照 45)

(7) 水および電解質代謝への作用 (参照 44)

尿量、電解質代謝 (Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 、 Na/K)、pH、グルコースおよび総タンパクに対する作用が、ブロチゾラム、ニトラゼパムおよびエスタゾラムで比較検討されている。ラット (Wistar 系、雄、5 匹/群) に各被験物質をそれぞれ強制経口 (ブロチゾラム : 1、10、50、100 mg/kg 体重/日、ニトラゼパムおよびエスタゾラム : 1、10、100 mg/kg 体重/日) 投与し、採取した尿について確認したところ、尿量の増加がブロチゾラムでは 50 mg 以上投与群で、ニトラゼパムおよびエスタゾラムでは 100 mg 投与群で認められた。尿中電解質、pH、グルコースおよび総タンパクについては、いずれの被験物質においても明らかな影響は認められなかった。ブロチゾラムは高用量で尿排泄量を増加させたが、尿中電解質、pH、グルコースおよび総タンパクに影響を及ぼさず、ニトラゼパムおよびエスタゾラムと類似の作用がみられた。

(8) 抗炎症作用 (参照 44)

抗炎症作用は、ラット (Wistar 系、雄) を用いた浮腫 (カラゲニン誘発の足蹠浮腫) に対する影響について、ブロチゾラム、ニトラゼパムおよびエスタゾラムで比較検討されている。1% のカラゲニン 0.1 mL をラットの足蹠に投与後、直ちに各被験物質を強制経口 (1、10、100 mg/kg 体重/日) 投与し、足蹠の体積を 1 時間毎に測定した。カラゲニン足蹠浮腫に対する抑制作用はブロチゾラムには認められず、ニトラゼパムおよびエスタゾラムにも明らかな抑制作用は認められなかった。ブロチゾラム、ニトラゼパムおよびエスタゾラムとの間に作用差異は認められなかった。

(9) 1 週間あるいは 1 ヶ月間投与試験による血液生化学的パラメーターおよび体重への影響 (ラット) (参照 45)

ラットを用いたブロチゾラム、ニトラゼパムおよびエスタゾラムの 1 週間あるいは 1 ヶ月間強制経口 (10 mg/kg) 投与による血清中のグルコース、乳酸、TG、Tcho、非エステル化脂肪酸、インスリンおよび体重への影響について検討されている。

① 1 週間投与試験

体重変化は、いずれの被験物質においても明らかな変動は認められなかった。

グルコース、TG および Tcho は、いずれの被験物質においても明らかな変動は認められなかった。一方、非エステル化脂肪酸はブロチゾラムおよびエスタゾラムで低値がみられ、乳酸はブロチゾラムで高値、エスタゾラムで軽度な高値、ニトラゼパムは軽度な低値を示し、インスリンはブロチゾラムおよびニトラゼパムで軽度な低値、エスタゾラムでは低値が認められた。

② 1 ヶ月間投与試験

体重変化は、いずれの被験物質においても明らかな変動は認められなかった。

グルコース、TG およびインスリン値は、いずれの被験物質においても明らかな変動は認められなかった。一方、非エステル化脂肪酸はブロチゾラムで高値、Tcho はブロチゾラムおよびニトラゼパムで高値、乳酸はブロチゾラムで低値が認められた。

8. その他

ラットを用いた2年間発がん性試験において、200 mg 投与群の雌雄で甲状腺に結節性および腺腫性病変が認められていることから、以下に示す甲状腺機能に関する特殊毒性試験が実施されている。

(1) 甲状腺機能に関する特殊毒性試験（ラット）（参照 47,48,49）

Chbb: THOM (Wistar) ラット（雌雄各 24 匹/対照群、雌雄各 12 匹/投与群）を用いた強制経口（0、100、400 mg/kg 体重/日）投与による 78 週間の特殊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、甲状腺ホルモン（ T_3 および T_4 ）および甲状腺刺激ホルモン（TSH）の測定は、投与 28 週に全例について、投与 32 週には対照群の雄 8 例、400 mg 投与群の雄 4 例について実施した。

T_3 値は、投与 28 週に 100 mg 投与群以上の雄および 400 mg 投与群の雌で有意な高値が認められ、その程度には用量相関性が認められた（100 mg: $p \leq 0.05$ 、400 mg: $p \leq 0.01$ ）。また、400 mg 投与群では投与 32 週においても有意（ $p \leq 0.01$ ）な高値が認められ、いずれの例も投与 28 週の測定値より高値を示した。一方、 T_4 値は投与 28 週に 400 mg 投与群の雄で有意（ $p \leq 0.01$ ）な低値が認められたが、32 週には回復が認められた。TSH 値については、100 mg 投与群以上で軽度ながら高値傾向がみられ、400 mg 投与群の雌では有意（ $p \leq 0.01$ ）であった。（参照 47）

Chbb: THOM (Wistar) ラット（雌 12 匹、雄 36 匹/対照群、雌 12 匹、雄 12-24 匹/投与群）を用いた強制経口（0、100、400 mg/kg 体重/日）投与による 65 週間の特殊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、 T_3 および T_4 および TSH の測定は、投与 28 週に全投与群の雌雄各 12 例について、投与 32、53 および 65 週には対照群の雄 8 例、400 mg 投与群の雄 4 例について実施した。

T_3 値は、投与 28 週に 100 mg 投与群以上の雄および 400 mg 投与群の雌で有意な高値が認められ、その程度には用量相関性が認められた（100 mg: $p \leq 0.05$ 、400 mg: $p \leq 0.01$ ）。また、400 mg 投与群では投与 32 週においても有意（ $p \leq 0.01$ ）な高値が認められ、平均値は投与 28 週より高値を示した。投与 53 および 65 週では、いずれも各 1 例に高値が認められた。一方、 T_4 値には低値傾向が認められ、400 mg 投与群の雄では投与 28 および 53 週に有意（各々 $p \leq 0.01$ 、 $p \leq 0.05$ ）であった。

TSH 値は、投与 28 週に 100 mg 投与群以上で高値がみられ、400 mg 投与群の雌では有意（ $p \leq 0.01$ ）であった。なお、投与群では対照群に比べて雄で 2.5 倍、雌では 5.7 倍の高値が認められた。投与 32 およ 53 週では 400 mg 投与群の 2 例で高値が認められたが、投与 65 週にはいずれの例においても対照群と同程度の値であった。（参照 48）

Chbb: THOM (Wistar) ラット（雄各 60/群）を用いた強制経口（試験番号 G44：0、200 mg/kg 体重/日、試験番号 G61：0、0.5、2.5 mg/kg 体重/日）投与による 13 週間の特殊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、本試験では高用量試験（G44）および低用量試験（G61）の 2 種類の試験が実施されている。G44 で

はラットにおける発がん性試験で甲状腺に影響（甲状腺腫、甲状腺濾胞の変性、甲状腺の結節性過形成、腺腫性甲状腺腫等）が認められた 200 mg の用量を設定しており、甲状腺の経時的な機能変化について確認することを目的としている。一方、G61 で用いている 0.5 および 2.5 mg の用量は、推定臨床用量の各々 100 および 500 倍であり、低用量における甲状腺機能への影響確認および NOEL の設定を目的としている。血液生化学検査（TSH および T_4 ）は、投与 1 週（2 日および 7 日目）、2 週（7 日目）、4、8 および 13 週（各 2 日目）に各群 10 例について実施し、その 2 日あるいは 3 日後に剖検に供した。

本試験期間中、いずれの試験においても被験物質に起因する死亡例は認められなかった。

一般的な臨床症状観察、体重、摂餌量では、いずれの試験においても被験物質による明らかな影響は認められなかった。

血液生化学検査では、G44 の 200 mg 投与群で投与 2 週から TSH の有意な高値が認められたが、試験の経過と共に値は低下し、投与 13 週には回復が認められた。 T_4 値は投与 1、2 および 4 週に一過性の低値が認められた。G61 では TSH および T_4 値ともに影響は認められなかった。

臓器重量では、G44 の 200 mg 投与群では、肝臓の絶対・比重量の高値が投与 3、4、8 および 13 週に認められた。また、甲状腺は投与 3 週より高値傾向が認められ、投与 13 週には絶対・比重量に有意な高値が認められた。G61 では異常は認められなかった。

剖検では、投与に関連すると考えられる変化は認められなかった。

病理組織学的検査は実施されていない。（参照 49）

（2）甲状腺機能に関する特殊毒性試験（ヒト）（参照 50）

健常人ボランティア（男女各 3 名）に 0.25 mg/日の錠剤を 1 日 1 回 14 日間経口投与し、 T_3 、 T_4 および TSH の変動について検査した。各項目について投与前 8 週（対照値）、初回投与前および最終投与後の計 3 回測定した結果、甲状腺機能に投与による明らかな影響は認められなかった。

（3）その他の甲状腺機能に関する知見（参照 51,52）

下垂体－甲状腺軸が長期にわたり様々な外来性物質や生理学的な変動により攪乱された場合、ヒトのに比べてラットの甲状腺の方が、慢性的な TSH 刺激反応による増殖性病変の発生率が高いことが報告されている。また、雄ラットでは TSH の血中レベルが雌に比べて高いため、慢性毒性および発がん性試験において種々の薬物や化学物質を投与された場合、濾胞上皮細胞過形成および腫瘍の高い発生率が報告されている。ラットとヒトの間でみられる種差として、ヒトに比べてラットでは T_4 の血漿中半減期が著しく短いこと（ヒト：5-9 日、ラット：12-24 時間）、ヒトでは血中の T_4 は輸送タンパクであるサイロキシン結合グロブリン（TBG）に結合しているが、ラットではこのタンパクは存在せず、プレアルブミンやアルブミンと結合していることが挙げられる。なお、TBG の T_4 に対する結合親和性は、プレアルブミンに比べて約 1,000 倍も高く、ヒトでは未結

合の活性 T_4 の比率はラットに比べて低いことが知られている。

9. ヒトにおける知見について

(1) ヒトボランティア試験 (参照 53)

健常なヒトボランティア (男性、19~29 歳、12 名、平均体重 76kg) により、プロチゾラム (0.1、0.3mg : 0.0013、0.0039mg/kg に相当) あるいはフルラゼパム (10mg : 0.13 mg/kg に相当) 単回経口投与後の脳波および認知・行動について検討されている。

プロチゾラム 0.1mg、0.3 mg 投与とフルラゼパム 10mg 投与により、投与 1 時間から 6 時間の間に脳波に有意な変化が現れ、その変化は 2 時間後に最も顕著であった。変化としては 8Hz 領域の活性は減少していた。脳波への影響ではプロチゾラム 0.1mg がフルラゼパム 10mg に相当し、さらにプロチゾラム 0.3mg ではこれらのほぼ 3 倍の活性を示した。

脳波測定中に行われた認知機能試験などでもプロチゾラム 0.1mg から影響が認められた。

(2) 副作用等について (参照 55,56)

プロチゾラムはヒト医薬品として睡眠導入、抗不安、催眠鎮静作用を効能として使用されている。重大な副作用として、肝機能障害及び黄疸 (頻度不明) が報告され、その他の副作用として不穏、興奮、大量連用による薬物依存 (頻度不明) が報告されている。また、類薬のベンゾジアゼピン系薬剤の投与では、呼吸抑制が現れることが報告されている。プロチゾラムの臨床試験および再審査終了時の副作用調査では、調査症例数 6,548 例中、副作用が報告されたのは 256 例 (3.91%) であった。主な副作用は、残眠感・眠気 144 件 (2.20%)、ふらつき 66 件 (1.01%)、頭重感 50 件 (0.76%)、だるさ 48 件 (0.73%)、めまい 25 件 (0.38%)、頭痛 8 件 (0.12%)、倦怠感 7 件 (0.11%) 等であった。就眠時に服用した場合、本剤の作用が翌朝以降に及び、眠気、注意力・集中力・反射運動能力等の低下が起こることがある。また、中枢神経系に対する毒性の強さと発現頻度は、一般に加齢と共に増加することが知られており、高齢者に対しては慎重投与の必要性があるとされている。

妊婦、産婦、授乳婦等、小児等への投与も慎重に投与する必要性があり、特に、妊婦または妊娠している可能性のある婦人には、以下①-③のような報告があることから投与しないことが望ましいとされている。

① 妊娠中にベンゾジアゼピン系化合物の投与を受けた患者の中に奇形を持つ児等の障害児を出産した例が対照群と比較して有意に多いという疫学調査の結果が報告されている。

② 新生児に哺乳困難、筋緊張低下、嗜眠、黄疸の増強等を起こすことがベンゾジアゼピン系化合物 (ジアゼパム、ニトラゼパム) で報告されている。

③ 分娩前に連用した場合、出産後新生児に禁断症状 (神経過敏、振戦、過緊張等) が現れることがベンゾジアゼピン系化合物 (ジアゼパム) で報告されている。

授乳婦への投与は以下に示す④、⑤のような報告があること、また新生児の黄疸を増強

する可能性があることから避けることが望ましいが、やむを得ず投与する場合、授乳は避けさせることになっている。

④ 動物実験で乳汁中に移行することが報告されている。

⑤ ヒト母乳中へ移行し、新生児に嗜眠、体重減少等を起こすことが、ベンゾジアゼピン系化合物（ジアゼパム）で報告されている。

低出世体重児、新生児、乳児、幼児または小児に対する安全性は確立されていない。

10. ヒト腸内細菌叢に及ぼす影響について

プロチゾラムに関しては、*in vivo* および *in vitro* において抗菌作用を示唆するデータは得られていない。

III. 食品健康影響評価

1. 亜急性・慢性毒性試験等について

亜急性・慢性毒性試験について、プロチゾラム投与による影響は、鎮静、運動失調など主に薬理作用に関連していた。ラットにおいて行われた経口投与試験においては、NOAEL が得られている。マウスの18ヶ月発がん性試験では0.3 mg/kg 体重/日以上投与群で鎮静が認められ、サルを用いた13週間亜急性毒性試験では、1 mg/kg 体重/日以上投与群で運動失調が認められており、NOAEL は得られなかった。さらに、サルを用いた単回経口投与試験では、0.063mg/kg 体重/日で発声やひっかき行動の減少、怯えや攻撃性の低下を示す例がみられ、NOAEL は得られなかった。このLOAEL (0.063mg/kg 体重/日) は、亜急性・慢性毒性試験で得られたNOAEL 又はLOAEL より低かった。

なお、プロチゾラムの鎮静作用についての試験は、一般薬理試験でウサギを用いたプロチゾラムの静脈内投与によるウサギの自発脳波に対する影響が確認されており、本試験のNOEL (NOAEL) は0.001mg/kg 体重/日であった。しかし、投与方法が静脈投与のため、リスク評価にはこの結果を用いるのは適当でないと考えられた。

2. 生殖発生毒性試験について (参照 54)

ラットを用いたFDAの3節試験及びウサギによる器官形成期投与試験が実施されている。催奇形性についてはラット、ウサギとも認められていない。ラットを用いた周産期及び授乳期投与試験(第III節)では、母動物に対するNOAELが求められたが、0.05 mg 以上投与群で児(F₁)の生後21日の雄児の体重が有意に低かったことからNOAELが求められていない。他の生殖発生毒性試験ではNOAELが求められているが、周産期及び授乳期投与試験のLOAELが他の生殖発生毒性試験で求められたNOAELと同じまたは低いことから、生殖発生毒性試験の評価としては、0.05 mg/kg 体重/日をLOAELとするのが適当と考えられた。

3. 遺伝毒性/発がん性について (参照 51,52,54,55)

遺伝毒性については*in vitro*でAmes試験、不定期DNA合成試験、形質転換試験、遺伝子変換試験、HGPRT突然変異試験において結果は全て陰性であった。また*in vivo*における染色体異常試験、小核試験及び優性致死試験のいずれも陰性であったことから、

プロチゾラムは遺伝毒性を有さないものと考えられる。

発がん性試験については、マウスを用いた 18 ヶ月間発がん性試験及びラットを用いた 2 年間発がん性試験が実施されている。マウスの試験では、発がん性を示唆する所見は得られなかったが、ラットの試験では、200mg 投与群の雄で甲状腺濾胞腺腫、雌では胸腺型悪性リンパ腫及び子宮における神経鞘腫の有意な発生の増加が認められた。この甲状腺濾胞腺腫の発生増加のメカニズムを検討するため複数の甲状腺機能に関する特殊毒性試験が実施されている。その結果、ラットではプロチゾラムの高用量の投与において甲状腺ホルモン(T_3 および T_4) 及び甲状腺刺激ホルモン (TSH) への影響が認められ、TSH の慢性的刺激により、ラットに甲状腺濾胞上皮細胞の増殖性変化を引き起こし、甲状腺濾胞腺腫の発生増加をもたらす可能性が示唆された。

雄のラットで認められた甲状腺濾胞腺腫は、ホルモンバランスの変動が関与している可能性が示唆された。また、雌の子宮で認められた神経鞘腫の発生率増加及び雌の胸腺型の悪性リンパ腫の増加原因については不明ではあるが、プロチゾラムが遺伝毒性物質ではないこと、マウスについて発がん性を示唆する所見が得られていないこと、及びラットにおいては高用量群にのみ、これら腫瘍性病変の発生の増加が認められていることから、ADI の設定は可能であると考えられた。

4. ヒトにおける影響について (参照 55,56,57)

健常のヒトボランティアにプロチゾラムを単回経口投与し、脳波及び認知・行動検査を行ったところ、0.1mg 投与により脳波及び認知機能試験で影響が確認された。この試験における LOAEL は 0.1mg/ヒト/日 (=0.0013mg/kg 体重/日=1.3 μ g/kg 体重/日) であった。

また、プロチゾラムは既にヒト医薬品として睡眠導入、抗不安、催眠鎮静作用を効能とし使用されている。0.25mg/ヒト/日 (ヒト体重を 60kg とすると、0.0042 mg/kg 体重/日) の臨床用量で不穏、興奮等の副作用が報告されている。また、薬理作用である中枢神経系への作用が翌朝以降に及んだ眠気、注意力・集中力・反射運動能力等の低下、妊婦、産婦、授乳婦及び小児等への作用が懸念されている。

5. 毒性学的影響のエンドポイントの選択について

各種の毒性試験において、サルを用いた急性毒性試験においては LOAEL が 0.063 mg/kg 体重/日、生殖発生毒性試験では LOAEL は 0.05 mg/kg 体重/日、ヒトの健常ボランティア試験においての LOAEL は 0.0013 mg/kg 体重/日が得られた。プロチゾラム投与による影響は、鎮静、運動失調など薬理作用に関連している。これらの影響は、ヒトで最も感受性が高いと考えられ、実験動物から得られた LOAEL はヒト臨床用量より約 40~50 大きい値となっている。

以上のことを踏まえて、ADI を設定するためのエンドポイントとして、ヒトの健常ボランティア試験における LOAEL 0.0013 mg/kg 体重/日を採用するのが適当であると考えられる。

6. 一日摂取許容量(ADI)の設定について

ブロチゾラムについては、遺伝毒性を示さないことから ADI を設定することが可能である。

毒性学的試験において、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、ヒトの健常ボランティア試験におけるLOAEL 0.0013mg/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、LOAELからNOAELへの変換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0.013μg/kg 体重/日と設定される。

以上より、ブロチゾラム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。

ブロチゾラム 0.013 μg /kg 体重/日

暴露量については、当評価結果を踏まえ暫定基準値の見直しを行う際に確認することとする。

<別紙 1 検査値等の略称>

ADI	一日摂取許容量
AP	アルカリフォスファターゼ
AUC	血中薬物濃度－時間曲線下面積
BUN	血液尿素窒素
C _{max}	最高血(漿)中濃度
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)
HPLC	高速液体クロマトグラフ
Ht	ヘマトクリット
LD ₅₀	半数致死量
LOAEL	最小毒性量
MCH	平均赤血球血色素量
MCHC	平均赤血球血色素濃度
NOAEL	無毒性量
NOEL	無作用量
RBC	赤血球数
RIA	放射免疫測定法(ラジオイムノアッセイ)
T _{1/2}	消失相半減期
T ₃	トリヨードサイロニン
T ₄	サイロキシン
TBG	サイロキシン結合グロブリン
Tcho	総コレステロール
TG	トリグリセリド
TLC	薄層クロマトグラフ法
T _{max}	最高血(漿)中濃度到達時間
TSH	甲状腺刺激ホルモン

<参照>

- 1 ブロチゾラムの物理的・化学的性質等に関する資料, ベーリンガーインゲルハイムベトメディカジャパン株式会社社内資料: メデランチル (ブロチゾラムを有効成分とする牛の注射剤) の食品健康影響評価に係る補足資料 (未発表)
- 2 Blood levels and metabolite pattern of [^{14}C]We 941 in mice after a single administration and after 4 weeks of pretreatment with 0.3, 10 and 200 mg/kg, ベーリンガーインゲルハイムベトメディカジャパン株式会社社内資料: メデランチル (ブロチゾラムを有効成分とする牛の注射剤) の食品健康影響評価に係る補足資料 (未発表)
- 3 We 941 BS Carcinogenicity study in mice with oral administration, ベーリンガーインゲルハイムベトメディカジャパン株式会社社内資料: メデランチル (ブロチゾラムを有効成分とする牛の注射剤) の食品健康影響評価に係る補足資料 (未発表)
- 4 吉田 剛, 大岩 陽子, 小林 捷治, 松村 理一郎, 公平 宏, ^{14}C -ブロチゾラムの吸収、分布および排泄—ラットにおける単回及び連続経口投与後の血中濃度, 組織内濃度, 尿・糞中排泄および胆汁中排泄, 腸肝循環, 蛋白結合—, 薬理と治療, 1985, 13(6), p.3333-3344
- 5 W.D, Bechtel., J. Mierau., I. Richter., M. Stiasni., Blood Level, Distribution, Excretion, and Metabolite Pattern of [^{14}C]-Brotizolam in the Rat, Dog, and Rhesus Monkey, *Arzneimittelforsch* 36, 1986, p.568-574
- 6 W.D, Bechtel., J. Mierau, K. Brandt, H.J.Forster, K.H.Pook, Metabolic Fate of [^{14}C]-Brotizolam in the Rat, Dog, Monkey and Man, *Arzneim-Forsch*, 1986, 36(3a), p.578-586
- 7 Synopsis of the pharmacokinetic data on We 941 (brotizolam) in animals and in man, ベーリンガーインゲルハイムベトメディカジャパン株式会社社内資料: メデランチル (ブロチゾラムを有効成分とする牛の注射剤) の食品健康影響評価に係る補足資料 (未発表)
- 8 The metabolism and pharmacokinetics of [^{14}C]-We 941 BS in 3 milking cows, ベーリンガーインゲルハイムベトメディカジャパン株式会社社内資料: メデランチル (ブロチゾラムを有効成分とする牛の注射剤) の食品健康影響評価に係る補足資料 (未発表)

- 9 The residue kinetics of [^{14}C]-We 941 BS in the lactating cow, ベーリンガーインゲルハイムベトメディカジャパン株式会社社内資料：メデランチル（ブロチゾラムを有効成分とする牛の注射剤）の食品健康影響評価に係る補足資料（未発表）
- 1 0 Bechtel, W.D., Kramer, I. and Stiasni, M., Biochemical investigations with [^{14}C]-WE 941 BS in rats. (ADME I). Confidential report from Boehringer Ingelheim Vetmedica, July 1975.
- 1 1 Meirau, J., Biochemical investigations with [^{14}C]-WE 941 BS in monkeys. (ADME II). Confidential report from Boehringer Ingelheim Vetmedica, January 1977.
- 1 2 Bechtel, W.D., Biochemical study of WE 941 BS in man. (ADME III, Oral administration.) Confidential report from Boehringer Ingelheim Vetmedica, Jan. 1978.
- 1 3 SPV-708 の牛における残留試験, ベーリンガーインゲルハイムベトメディカジャパン株式会社社内資料：メデランチル（ブロチゾラムを有効成分とする牛の注射剤）の食品健康影響評価に係る補足資料（未発表）
- 1 4 SPV-708 の牛における畜体残留性試験, ベーリンガーインゲルハイムベトメディカジャパン株式会社社内資料：メデランチル（ブロチゾラムを有効成分とする牛の注射剤）の食品健康影響評価に係る補足資料（未発表）
- 1 5 SPV-708 の搾乳牛における乳汁残留試験, ベーリンガーインゲルハイムベトメディカジャパン株式会社社内資料：メデランチル（ブロチゾラムを有効成分とする牛の注射剤）の食品健康影響評価に係る補足資料（未発表）
- 1 6 SPV-708 の泌乳牛における乳汁中残留性試験, ベーリンガーインゲルハイムベトメディカジャパン株式会社社内資料：メデランチル（ブロチゾラムを有効成分とする牛の注射剤）の食品健康影響評価に係る補足資料（未発表）
- 1 7 We 941 BS Acute toxicity study (LD50) after oral administration to Chbi:NMRI (SPF) mice, ベーリンガーインゲルハイムベトメディカジャパン株式会社社内資料：メデランチル（ブロチゾラムを有効成分とする牛の注射剤）の食品健康影響評価に係る補足資料（未発表）

- 1 8 ラット、マウスにおけるブロチゾラム (We941-BS) の静脈及び腹腔内投与による急性毒性試験, ベーリンガーインゲルハイムベトメディカジャパン株式会社社内資料: メデランチル (ブロチゾラムを有効成分とする牛の注射剤) の食品健康影響評価に係る補足資料 (未発表)
- 1 9 Expanded SYNOPSIS of the Toxicological Studies with WE 941 BS (Brotizolam), ベーリンガーインゲルハイムベトメディカジャパン株式会社社内資料: メデランチル (ブロチゾラムを有効成分とする牛の注射剤) の食品健康影響評価に係る補足資料 (未発表)
- 2 0 恒成 靖生, Alexander KAST, 本間 征人, 西川 順子, 柴田勉, 矢部 友邦, Brotizolam のラットにおける急性及び亜急性毒性試験, 医薬品研究, 1985, 16(2), p.281-293
- 2 1 INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF ACUTE ORAL ADMINISTRATION OF WE 941 BS IN CONSCIOUS MONKEYS, ベーリンガーインゲルハイムベトメディカジャパン株式会社社内資料: メデランチル (ブロチゾラムを有効成分とする牛の注射剤) の食品健康影響評価に係る補足資料 (未発表)
- 2 2 Brotizolam (We 941-BS), Nitrazepam および Flurazepam のラットにおける 5 週間経口投与による比較経口亜急性毒性試験, ベーリンガーインゲルハイムベトメディカジャパン株式会社社内資料: メデランチル (ブロチゾラムを有効成分とする牛の注射剤) の食品健康影響評価に係る補足資料 (未発表)
- 2 3 Subacute toxicity study We 941-BS following intravenous administration in beagles -duration 4 weeks-, ベーリンガーインゲルハイムベトメディカジャパン株式会社社内資料: メデランチル (ブロチゾラムを有効成分とする牛の注射剤) の食品健康影響評価に係る補足資料 (未発表)
- 2 4 Subacute toxicity study of the substance We 941-Bs in rhesus monkeys (Macaca mulatta) following oral administration -Duration 13 weeks-, ベーリンガーインゲルハイムベトメディカジャパン株式会社社内資料: メデランチル (ブロチゾラムを有効成分とする牛の注射剤) の食品健康影響評価に係る補足資料 (未発表)

- 2 5 Chronic toxicity study of the substance We 941-BS in rats with oral administration -Duration 18 months-, ベーリンガーインゲルハイムベトメディカジャパン株式会社社内資料：メデランチル（ブロチゾラムを有効成分とする牛の注射剤）の食品健康影響評価に係る補足資料（未発表）
- 2 6 We 941 BS Carcinogenicity study of 2 years duration in the rat following oral administration, ベーリンガーインゲルハイムベトメディカジャパン株式会社社内資料：メデランチル（ブロチゾラムを有効成分とする牛の注射剤）の食品健康影響評価に係る補足資料（未発表）
- 2 7 松尾 朝紀, Alexander KAST, 恒成 靖生, Brotizolam の経口投与による生殖毒性試験 ラットにおける妊娠前・妊娠初期, 器官形成期及び周産期・授乳期投与試験並びにウサギにおける器官形成期投与試験, 医薬品研究, 16(4), 1985, p.818-838
- 2 8 Teratogenicity Study of We 941-BS in Rats, ベーリンガーインゲルハイムベトメディカジャパン株式会社社内資料：メデランチル（ブロチゾラムを有効成分とする牛の注射剤）の食品健康影響評価に係る補足資料（未発表）
- 2 9 Teratology Study with Brotizolam (We 941-BS) in Rats Dosed by Gavage during the period of Organogenesis, ベーリンガーインゲルハイムベトメディカジャパン株式会社社内資料：メデランチル（ブロチゾラムを有効成分とする牛の注射剤）の食品健康影響評価に係る補足資料（未発表）
- 3 0 Teratogenicity Study of We 941-BS in Rabbits, ベーリンガーインゲルハイムベトメディカジャパン株式会社社内資料：メデランチル（ブロチゾラムを有効成分とする牛の注射剤）の食品健康影響評価に係る補足資料（未発表）
- 3 1 Perinatal and Postnatal Investigations of the Substance We 941- BS on Rats (Test No. A 92), ベーリンガーインゲルハイムベトメディカジャパン株式会社社内資料：メデランチル（ブロチゾラムを有効成分とする牛の注射剤）の食品健康影響評価に係る補足資料（未発表）
- 3 2 Perinatal and Postnatal Study of the Compound We 941 BS in Rats, ベーリンガーインゲルハイムベトメディカジャパン株式会社社内資料：メデランチル（ブロチゾラムを有効成分とする牛の注射剤）の食品健康影響評価に係る補足資料（未発表）

- 3 3 岩原 繁雄, 坂本 京子, 大岩 陽子, Brotizolam の細菌による遺伝子突然変異試験, 薬理と治療, 1984, 12(1), p.121-123
- 3 4 Studies on the possible mutagenicity of metabolites in urine of brotizolam (We 941-BS)-treated mice and rats: Testing for point-mutagenic activity with Salmonella typhimurium (未公表)
- 3 5 We 941 BS Unscheduled DNA synthesis assay in human embryonic cells, ベーリンガーインゲルハイムベトメディカジャパン株式会社社内資料: メデランチル (ブロチゾラムを有効成分とする牛の注射剤) の食品健康影響評価に係る補足資料 (未発表)
- 3 6 We 941 BS: Induction of morphological transformation in C3H/10T1/2 cells, ベーリンガーインゲルハイムベトメディカジャパン株式会社社内資料: メデランチル (ブロチゾラムを有効成分とする牛の注射剤) の食品健康影響評価に係る補足資料 (未発表)
- 3 7 Mitotic Gene Conversion In Saccharomyces Cervisiae D4, ベーリンガーインゲルハイムベトメディカジャパン株式会社社内資料: メデランチル (ブロチゾラムを有効成分とする牛の注射剤) の食品健康影響評価に係る補足資料 (未発表)
- 3 8 Determination of mutations at hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase locus in V79 cells: HGPRt test, ベーリンガーインゲルハイムベトメディカジャパン株式会社社内資料: メデランチル (ブロチゾラムを有効成分とする牛の注射剤) の食品健康影響評価に係る補足資料 (未発表)
- 3 9 Studies on the possible mutagenicity of highly polar metabolites in blood plasma of brotizolam-treated rats and mice: Testing for point-mutagenic activity with Salmonella typhimurium, ベーリンガーインゲルハイムベトメディカジャパン株式会社社内資料: メデランチル (ブロチゾラムを有効成分とする牛の注射剤) の食品健康影響評価に係る補足資料 (未発表)
- 4 0 Cytogenetic study in Chinese hamster of We 941-BS, ベーリンガーインゲルハイムベトメディカジャパン株式会社社内資料: メデランチル (ブロチゾラムを有効成分とする牛の注射剤) の食品健康影響評価に係る補足資料 (未発表)

- 4 1 Expert report on the possible mutagenic activity of the substance “We 941 BS” as evaluated by the micronucleus test, ベーリンガーインゲルハイムベトメディカジャパン株式会社社内資料：メデランチル（ブロチゾラムを有効成分とする牛の注射剤）の食品健康影響評価に係る補足資料（未発表）
- 4 2 Study of the mutagenic activity of the substance “We 941 BS” by the dominant lethal test, ベーリンガーインゲルハイムベトメディカジャパン株式会社社内資料：メデランチル（ブロチゾラムを有効成分とする牛の注射剤）の食品健康影響評価に係る補足資料（未発表）
- 4 3 Pharmacological Study of Brotizolam: Effect on the cardiovascular function and autonomic nervous system, ベーリンガーインゲルハイムベトメディカジャパン株式会社社内資料：メデランチル（ブロチゾラムを有効成分とする牛の注射剤）の食品健康影響評価に係る補足資料（未発表）
- 4 4 Sato Katsuhiko, Matsuda Hiromi, Hayashi Masaaki, Shibuya Takeshi, Pharmacological Studies on Brotizolam, a Thienotriazolodiazepane Derivative with Special Reference to Central Nervous System and General Pharmacology, J.Tokyo.Med.Coll., 1985, 43(4) , p.649-660
- 4 5 Pharmacological Study of Brotizolam: Effect on smooth muscle and other organs, ベーリンガーインゲルハイムベトメディカジャパン株式会社社内資料：メデランチル（ブロチゾラムを有効成分とする牛の注射剤）の食品健康影響評価に係る補足資料（未発表）
- 4 6 EEG studies on rabbits with WE 941-BS to determine a “no effect dose “, ベーリンガーインゲルハイムベトメディカジャパン株式会社社内資料：メデランチル（ブロチゾラムを有効成分とする牛の注射剤）の食品健康影響評価に係る補足資料（未発表）
- 4 7 The effect of We 941 BS on thyroid hormones.Interim report on a special study in rats, ベーリンガーインゲルハイムベトメディカジャパン株式会社社内資料：メデランチル（ブロチゾラムを有効成分とする牛の注射剤）の食品健康影響評価に係る補足資料（未発表）
- 4 8 Effect of We 941 BS on T3, T4 and TSH in the rat, ベーリンガーインゲルハイムベトメディカジャパン株式会社社内資料：メデランチル（ブロチゾラムを有効成分とする牛の注射剤）の食品健康影響評価に係る補足資料（未発表）

- 4 9 Preliminary report on the influence of We 941 BS on certain parameters possibly associated with thyroid function in the rat, ベーリンガーインゲルハイムベトメディカジャパン株式会社社内資料：メデランチル（ブロチゾラムを有効成分とする牛の注射剤）の食品健康影響評価に係る補足資料（未発表）
- 5 0 Lendormin tablets (We 941) Phase III Assessment of thyroxine levels after 14 days' administration of Lendormin in man, ベーリンガーインゲルハイムベトメディカジャパン株式会社社内資料：メデランチル（ブロチゾラムを有効成分とする牛の注射剤）の食品健康影響評価に係る補足資料（未発表）
- 5 1 キャサレット&ドール トキシコロジー 第 6 版, 仮家公夫, 佐藤哲男, 高橋道人, 野口英世 総監訳, 株式会社サイエンティスト社, 東京, 2004, p.827-839
- 5 2 Finch, J.M, Capen, C.C.; A mode of action for induction of thyroid gland tumors by Pyrethrins in the rat.; Toxicol. Appl. Pharmacol. 2006, 214, p.253-262
- 5 3 M.Fink, M.D, Professor of Psychiatry, Dept. of Psychiatry and Behavioral Science, ベーリンガーインゲルハイムベトメディカジャパン株式会社社内資料、1981、未公表
- 5 4 EMEA, COMMITTEE FOR VETERINARY MEDICINAL PRODUCTS, BROTILOLAM, SUMMARY REPORT
- 5 5 日本医薬品集 医療薬 2007 年版, 日本医薬品集フォーラム監修, 株式会社じほう, 東京, 2007, p. 2082-2083
- 5 6 医薬品インタビューフォーム 睡眠導入剤レンドルミン®錠 0.25 mg 第 5 版, 2007
- 5 7 グッドマン・ギルマン薬理書 上 第 10 版, 高折修治, 福田英臣, 赤池昭紀 監訳, 廣川書店, 東京, 2003, p. 501-530

ブロチゾラム (案)

1. 概要

(1) 品目名：ブロチゾラム(Brotizolam)

(2) 用途：牛の諸疾患における食欲不振の改善に対する補助的効果

ブロチゾラムは抗不安薬あるいは睡眠導入薬の研究の中から発見された2-bromo-thieno-triazolo-1,4diazepine誘導体である。ヒト用医薬品としては睡眠導入剤として開発されているが、動物に対して食欲誘発作用を示すことから食欲不振改善の補助等を目的として開発され、我が国をはじめ欧米等で動物用医薬品として用いられている。

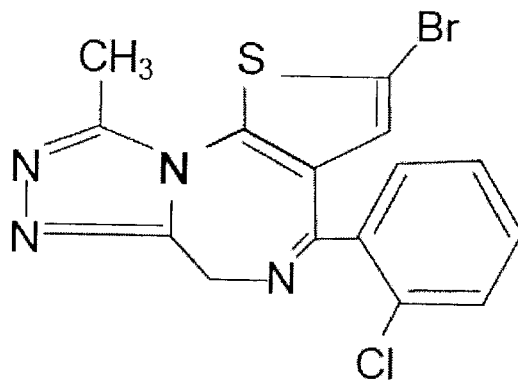
今般の残留基準設定については、ブロチゾラムを有効成分とする製剤（メデランチル）が承認を受けた後、所定の期間（6年）が経過したため再審査申請がなされたことに伴い、内閣府食品安全委員会においてブロチゾラムについてADI設定がなされたことによるものである。

(3) 化学名：

2-Bromo-4-(2-chlorophenyl)-9-methyl-6H-1-thia-5,7,8,9a-tetraazacyclopenta[e]azulene (IUPAC)

2-Bromo-4-(2-chlorophenyl)-9-methyl-6H-thieno[3,2-f][1,2,4]triazolo[4,3a][1,4]diazepine (CAS)

(4) 構造式及び物性



分 子 式 : $C_{15}H_{10}BrClN_4S$

分 子 量 : 393.69

常温における性状 : 白色～微黄色の結晶性粉末

融 点 (分解点) : 208～212℃

溶 解 性 : 酢酸又はジクロロメタンに溶けやすく、メタノールにやや溶けに

くく、エタノール、アセトン又は2-ブタノンに溶けにくく、無水ジエチルエーテルに極めて溶けにくく、水にはほとんど溶けない。

(5) 適用方法及び用量

ブロチゾラムの使用対象動物及び使用方法等を以下に示す。

対象動物及び使用方法		使用国	休薬期間
牛	0.002 mg/kg 体重を単回静脈内投与 (頻回使用の場合は、1日1回3日間まで)	フランス アイルランド	0 日
		ニュージーランド*	0.25 日
		ドイツ オランダ	1 日
		日本	2 日
	0.002 mg/kg 体重を単回静脈内、筋肉内又は皮下投与	イタリア	4 日
泌乳牛	0.002 mg/kg 体重を単回静脈内投与 (頻回使用の場合は、1日1回3日間まで)	フランス アイルランド オランダ	0 日
		ドイツ ニュージーランド* 日本	0.5 日

2. 対象動物における分布、代謝

^{14}C 標識ブロチゾラムを泌乳牛3頭に $10\mu\text{g/kg}$ 体重/頭を静脈内投与したところ、放射活性は急速に排泄され、主要排泄経路は糞中 (57-86%) であり、尿中排泄は少量であった (15-25%)。消失半減期 ($T_{1/2}$) は0.5-1時間であった。乳汁中の総放射活性値は低く、0.1% であり、乳汁成分の分析では、乳脂分画中に高濃度の放射活性が認められた。静脈内投与6.5、24及び72時間後の肝臓における濃度は、16.9 ng eq/mL (2.6%)、9.7 ng eq/mL (0.8%) 及び12.0 ng eq/mL (0.7%) であった。腎臓における濃度は投与6.5時間後で5.3 ng eq/mLを示し、投与24及び72時間後では検出限界未満となった。

^{14}C 標識ブロチゾラムを泌乳牛3頭に $2\mu\text{g/kg}$ 体重/頭を静脈内投与し、血液、乳汁及び組織 (血漿、筋肉、脂肪、腎臓、胆汁、肝臓) 中のブロチゾラム濃度を測定した。血漿では二相性の半減期が見られ、投与7分後に最高血中濃度 (C_{max}) 2.83 ng eq/mL が認められ、投与3時間後には0.53 ng eq/mL まで急速に減少 ($T_{1/2}$ 1.2時間) し、投与36時間後には0.01 ng eq/mL まで減少した ($T_{1/2}$ 5時間)。乳汁では、初回搾乳7時間後で C_{max} 0.08 ng eq/mL が認められ、47時間後には検出限界まで減少した。各組織における残留は主に肝臓 (投与6.5時間後: 3.54 ng eq/mL、24時間: 1.24 ng eq/mL、72時間: 0.56 ng eq/mL) 及び腎臓 (投与6.5時間後: 1.12 ng eq/mL、24時間: 0.13 ng eq/mL、72時間: 0.02 ng eq/mL) で認められた。肝臓では投与72時間後まで明らかな残留が認められ、 $T_{1/2}$ は30分であった。胆汁中には投与6.5時間後: 33.61 ng eq/mL、24時間: 3.94 ng eq/mL、72時間: 0.01 ng eq/mL が認められた。筋肉及び脂肪中の残留はいずれの時点においても微量であった。

3. 対象動物における残留試験結果

(1) 分析の概要

① 分析対象化合物：ブロチゾラム

② 分析法の概要：

ガスクロマトグラフ法により、各対象動物組織における残留性が検証されている。

添加回収率は平均 (n=3) で、筋肉 93%、脂肪 79%、肝臓 91%、腎臓 90%、小腸 80%、乳汁 84%。

(2) 組織における残留

① ウシにブロチゾラムとして 0.002 mg/kg 体重/日 (常用量) 及び 0.004 mg/kg 体重/日 (2倍量) を 3 日間連続して静脈内投与した。最終投与後 2 時間、1、2、3 及び 5 日の筋肉、脂肪、肝臓、腎臓及び小腸におけるブロチゾラム濃度を以下に示す。

ブロチゾラムとして、0.002 mg/kg 体重/日及び 0.004 mg/kg 体重/日を 3 日間連続して静脈内投与した時の食用組織中のブロチゾラム濃度 (ppm)

試験日 (投与後)	筋肉		脂肪		肝臓	
	常用量	2倍量	常用量	2倍量	常用量	2倍量
2 時間	<0.001	<0.001	<0.001 (5), 0.002	<0.001 (5), 0.001	<0.001 (4), 0.001, 0.003	<0.001
1 日	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
2 日	—	—	<0.001	<0.001	<0.001	—
3 日	—	—	—	—	—	—
5 日	—	—	—	—	—	—

試験日 (投与後)	腎臓		小腸	
	常用量	2倍量	常用量	2倍量
2 時間	<0.001 (5), 0.002	<0.001	<0.001 (5), 0.002	<0.001
1 日	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
2 日	<0.001	—	<0.001	—
3 日	—	—	—	—
5 日	—	—	—	—

数値は、分析値で示し、括弧内は検体数を示す。

—は分析を実施せず。

定量限界：0.001 ppm

② ウシにブロチゾラムとして 0.002 mg/kg 体重/日 (常用量) 及び 0.004 mg/kg 体重/日 (2倍量) を 3 日間連続して静脈内投与した。最終投与後 12 及び 24 時間の乳中におけるブロチゾラム濃度を以下に示す。

プロチゾラムとして、0.002 mg/kg 体重/日及び0.004 mg/kg 体重/日を3日間連続して静脈内投与した時の乳中のプロチゾラム濃度 (ppm)

試験日 (投与後時間)	乳	
	常用量	2倍量
12	<0.001	<0.001
24	<0.001	<0.001

数値は、分析値を示す。

定量限界：0.001 ppm

4. 許容一日摂取量 (ADI) 評価

食品安全基本法（平成 15 年法律第 48 号）第 24 条第 2 項の規定に基づき、平成 18 年 10 月 16 日付け厚生労働省発食安第 1016003 号により、食品安全委員会委員長あて意見を求めたプロチゾラムに係る食品健康影響評価について、食品安全委員会において、以下のとおり食品健康影響評価が示されている。

プロチゾラム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。

プロチゾラム 0.013 μ g/kg 体重/日

5. 諸外国における使用状況

米国、EU、豪州、カナダ及びニュージーランドを調査したところ、EU 及びニュージーランドにおいて牛に使用が認められている。

なお、FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議 (JECFA) においては評価されていない（平成 20 年 8 月現在）。

6. 基準値案

(1) 残留の規制対象：プロチゾラム

(2) 基準値案

別紙 1 のとおりである。

(3) ADI 比

各食品において基準値（案）の上限まで又は残留試験成績等のデータから推定される量の本剤が残留していると仮定した場合、国民栄養調査結果に基づき試算される、1 日当たり摂取する本剤の量（推定一日摂取量 (EDI)）の ADI に対する比は、以下のとおりである。

	EDI/ADI (%)
国民平均	16.3
幼小児（1～6歳）	57.2
妊婦	18.2
高齢者（65歳以上）*	16.0

* 高齢者については畜水産物の摂取量データがないため、国民平均の摂取量を参考とした。

なお、詳細の暴露評価については、別紙2のとおりである。

- （4）本剤については、平成17年11月29日付け厚生労働省告示第499号により、食品一般の成分規格7に食品に残留する量の限度（暫定基準）が定められているが、今般、残留基準の見直しを行うことに伴い、暫定基準は削除される。

(別紙 1)
ブロチゾラム

食品名	基準値 (案) ppm	基準値現行 ppm	国際基準 ppm	EU ^{注2} ppm	休薬期間	残留試験成績	試験日
牛の筋肉	0.001	0.001			0 日 ^{*6}	<0.001 <0.001	2 時間 1 日
豚の筋肉	● ^{注1}	0.001					
その他の陸棲哺乳類 ^{*1} の筋肉	●	0.001					
牛の脂肪	0.002	0.001			0 日 ^{*6}	<0.001 (5), 0.002 <0.001	2 時間 1 日
豚の脂肪	●	0.001					
その他の陸棲哺乳類の脂肪	●	0.001					
牛の肝臓	0.003	0.001			0 日 ^{*6}	<0.001 (4), 0.001, 0.003 <0.001	2 時間 1 日
豚の肝臓	●	0.001					
その他の陸棲哺乳類の肝臓	●	0.001					
牛の腎臓	0.002	0.001			0 日 ^{*6}	<0.001 (5), 0.002 <0.001	2 時間 1 日
豚の腎臓	●	0.001					
その他の陸棲哺乳類の腎臓	●	0.001					
牛の食用部分 ^{*2}	0.002	0.001			0 日 ^{*6}	<0.001 (5), 0.002 <0.001	2 時間 (小腸) 1 日 (小腸)
豚の食用部分	●	0.001					
その他の陸棲哺乳類の食用部分	●	0.001					
乳	0.001	0.001			0 日 ^{*7}	<0.001 <0.001	12 時間 24 時間
鶏の筋肉	●	0.001					
その他の家きん ^{*3} の筋肉	●	0.001					
鶏の脂肪	●	0.001					
その他の家きんの脂肪	●	0.001					
鶏の肝臓	●	0.001					
その他の家きんの肝臓	●	0.001					
鶏の腎臓	●	0.001					
その他の家きんの腎臓	●	0.001					
鶏の食用部分	●	0.001					
その他の家きんの食用部分	●	0.001					
鶏の卵	●	0.001					
その他の家きんの卵	●	0.001					
魚介類 (さけ目魚類に限る。)	●	0.001					
魚介類 (うなぎ目魚類に限る。)	●	0.001					
魚介類 (すずき目魚類に限る。)	●	0.001					
魚介類 (その他の魚類 ^{*4} に限る。)	●	0.001					
魚介類 (貝類に限る。)	●	0.001					
魚介類 (甲殻類に限る。)	●	0.001					
その他の魚介類 ^{*5}	●	0.001					
はちみつ	●	0.001					

注1：不検出

注2：EUにおいて $0.01\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日 ($0.6\mu\text{g}/\text{人}/\text{日}$) のADIが設定されているが、食用組織及び乳からの摂取量が $0.6\mu\text{g}$ を越えないため、残留基準は不要としている。

*1：その他の陸棲哺乳類に属する動物とは、陸棲哺乳類に属する動物のうち、牛及び豚以外のものをいう。

*2：食用部分とは、食用に供される部分のうち、筋肉、脂肪、肝臓及び腎臓以外の部分をいう。

*3：その他の家きんとは、家きんのうち、鶏以外のものをいう。

*4：その他の魚類とは、魚類のうち、さけ目魚類、うなぎ目魚類及びびすずき目魚類以外のものをいう。

*5：その他の魚介類とは、魚介類のうち、魚類、貝類及び甲殻類以外のものをいう。

*6：フランス、アイルランド

*7：フランス、アイルランド、オランダ

(別紙2)

ブロチゾラムの推定摂取量 (単位: $\mu\text{g}/\text{人}/\text{日}$)

食品名	基準値案 (ppm)	国民平均 TMDI	国民平均 EDI	幼小児 (1~6歳) TMDI	幼小児 (1~6歳) EDI	妊婦 TMDI	妊婦 EDI	高齢者* ⁴ (65歳以上) TMDI	高齢者* ⁴ (65歳以上) EDI
牛の筋肉	0.001	0.04* ²	0.04* ²	0.02* ²	0.02* ²	0.04* ²	0.04* ²	0.04* ²	0.04* ²
牛の脂肪	0.002								
牛の肝臓	0.003	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00* ³	0.00* ³	0.00	0.00
牛の腎臓	0.002	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
牛の食用部分* ¹	0.002	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
乳	0.001	0.14	0.07* ⁵	0.20	0.10* ⁵	0.18	0.09* ⁵	0.14	0.07* ⁵
計		0.18	0.11	0.22	0.12	0.22	0.13	0.18	0.11
ADI 比 (%)		26.6	16.3	105.2	57.2	30.9	18.2	26.1	16.0

*1: 食用部分とは、食用に供される部分のうち、筋肉、脂肪、肝臓及び腎臓以外の部分をいい、小腸を参照とした。

*2: 脂肪の基準値×筋肉及び脂肪の摂取量

*3: 妊婦の摂取量データがないため、国民平均の摂取量を参考にした。

*4: 高齢者については畜水産物の摂取量データがないため、国民平均の摂取量を参考とした。

*5: 基準値案は 0.001 であるが、当該物の代謝が短時間で進むものであること及び 2 倍量を投与した乳の残留試験結果が定量限界 0.001ppm 未満であったことから、JECFA で過去に用いられた方法である定量限界の 1/2 を乗じた値を推定摂取量の計算に用いた。

(参考)

これまでの経緯

平成18年10月16日	厚生労働大臣から食品安全委員会委員長あてに残留基準設定に係る食品健康影響評価について要請
平成18年10月19日	第164回食品安全委員会（要請事項説明）
平成19年9月28日	第80回動物用医薬品専門調査会
平成19年10月23日	第82回動物用医薬品専門調査会
平成19年11月27日	第84回動物用医薬品専門調査会
平成20年1月24日	食品安全委員会における食品健康影響評価（案）の公表
平成20年3月13日	第230回食品安全委員会（報告） 食品安全委員会委員長から厚生労働大臣あてに食品健康影響評価について通知
平成20年8月6日	薬事・食品衛生審議会へ諮問
平成21年4月14日	薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会農薬・動物用医薬品部会
平成21年5月20日	薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会農薬・動物用医薬品部会

●薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会農薬・動物用医薬品部会

[委員]

青木 宙	東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科教授
生方 公子	北里大学北里生命科学研究科病原微生物分子疫学研究室教授
○大野 泰雄	国立医薬品食品衛生研究所副所長
尾崎 博	東京大学大学院農学生命科学研究科教授
加藤 保博	財団法人残留農薬研究所理事
斉藤 貢一	星薬科大学薬品分析化学教室准教授
佐々木 久美子	元国立医薬品食品衛生研究所食品部第一室長
志賀 正和	元農業技術研究機構中央農業総合研究センター虫害防除部長
豊田 正武	実践女子大学生生活科学部生活基礎化学研究室教授
松田 りえ子	国立医薬品食品衛生研究所食品部長
山内 明子	日本生活協同組合連合会組織推進本部 本部長
山添 康	東北大学大学院薬学研究科医療薬学講座薬物動態学分野教授
吉池 信男	青森県立保健大学健康科学部栄養学科教授
由田 克士	国立健康・栄養研究所栄養疫学プログラム国民健康・栄養調査プロジェクトリーダー
鰐淵 英機	大阪市立大学大学院医学研究科都市環境病理学教授

(○：部会長)

(答申案)

ブロチゾラムについては、食品に含有されるものであってはならないとする食品規格を設定することが適当である。

ただし、牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛の腎臓、牛の食用部位及び乳については、次の残留基準を設定することが適当である。

ブロチゾラム

食品名	残留基準値 ppm
牛の筋肉	0.001
牛の脂肪	0.002
牛の肝臓	0.003
牛の腎臓	0.002
牛の食用部分	0.002
乳	0.001

ERYTHROMYCIN

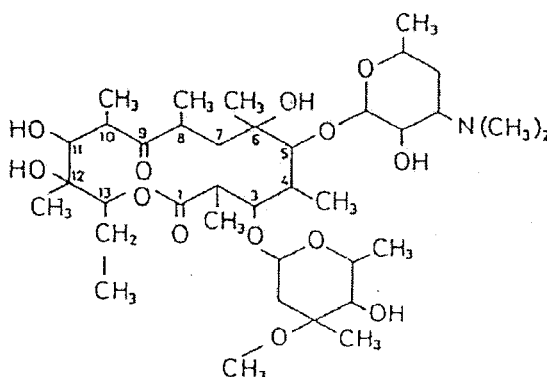
First draft prepared by
 Adriana Fernández Suárez
 Buenos Aires, Argentina
 and
 Richard Ellis
 Myrtle Beach, South Carolina, United States

IDENTITY

- Chemical names** International Union Pure and Applied Chemistry (IUPAC) name:
 6-(4-dimethylamino-3-hydroxy-6-methyl-tetrahydropyran-2-yl)oxy-14-ethyl-7,12,13-trihydroxy-4-(5-hydroxy-4-methoxy-4,6-dimethyl-tetrahydropyran-2-yl)oxy-3,5,7,9,11,13-hexamethyl-1-oxacyclotetradecane-2,10-dione
- C.A.S. number** 114-07-8
- Synonyms and abbreviations**
 Mixture of macrolide antibiotics, the main component (erythromycin A) being (3R, 4S, 5S, 6R, 7R, 9R, 11R, 12R, 13S, 14R)-4-[(2,6-dideoxy-3-C-methyl-3-O-methyl- α -L-*ribo*-hexopyranosyl)oxy]-14-ethyl-7,12,13-trihydroxy-3,5,7,9,11,13-hexamethyl-6-[3,4,6-trideoxy-3dimethylamino- β -D-*xylo*-hexopyranosyl)-oxy]oxacyclotetradecane-2,10-dione
- Structural formula** See next page.
- Molecular formula** $C_{37}H_{67}NO_{13}$
- Molecular weight** Erythromycin A: Mz = 734; Erythromycin B: Mz = 718; Erythromycin C: Mz = 720

OTHER INFORMATION ON IDENTITY AND PROPERTIES

- Appearance** White or slightly yellow powder or colorless or slightly yellow crystals
- Degree of purity** Erythromycin B $\leq 5.0\%$
 Erythromycin C $\leq 5.0\%$
 Any impurity $\leq 3.0\%$
 Sum of impurities $\leq 7.0\%$
- Qualitative composition of impurities**
 N-demethyl-erythromycin A, anhydroerythromycin A, erythromycin A enol ether, pseudoerythromycin A enol ether, erythromycin E, erythromycin F.
- Description of physical properties**
 Slightly hygroscopic, slightly soluble in water but less soluble at higher temperatures, freely soluble in alcohol, soluble in methanol, sensitive to light.



Three erythromycins are produced during fermentation. Erythromycin A and B contain the same sugar moieties, desoxamine and cladinose (3-O-methylmycarose). They differ in position 12 of the aglycone, erytronolide, A having a hydroxyl group. Erythromycin C contains desoxamine and the same aglycone present in A, but differs by the presence of mycarose instead of cladinose (Merck Index). The principal product is erythromycin A with small proportions of B and C.

INTRODUCTION

Erythromycin was first reviewed by the Committee in 1968. No ADI was established but acceptable levels of residues were defined in milk (0-0.04 mg/ml), meat and eggs (0-0.3 mg/kg) (FAO/WHO, 1969).

Pharmacokinetic and metabolic studies in experimental animals, target animals and humans were evaluated, including original studies in calves and chicken and three new non radiolabelled residue depletion studies in chickens, two in laying hens and one in turkeys and the description and validation of the analytical methods used.

Conditions of use

General

Erythromycin, a macrolide antibiotic is effective *in vitro* against *Mycoplasma*, Gram positive *Cocci*, *Neisseria*, some strains of *Haemophilus*, *Corynebacterium*, *Listeria*, *Pasteurella multocida*, *Brucella*, and *Treponemes*. *Proteus*, *Pseudomonas* and *E.Coli* are relatively resistant to the drug. In veterinary medicine, this compound is used for the treatment of clinical and subclinical mastitis in lactating cows, for the treatment of infectious diseases due to erythromycin sensitive bacteria (cattle, sheep, swine, poultry) and for the treatment of chronic diseases due to mycoplasma in poultry (EMEA, 2000). In Europe, for broiler chickens and laying hens, the most often recommended dose (as erythromycin base) is 20 mg/kg/day. Uses and dose ranges are presented in Table 1.

Table 1: Formulation and dose ranges of erythromycin

Formulation	Country	Dosage
Erythromycin thiocyanate Oral powder 5 g per 100 g	Belgium	20 mg / kg / day for 5 days
	France	
	Germany	
	Netherlands	20 mg / kg / day for 5 to 7 days
Erythromycin thiocyanate Oral powder 5.1 g per 100 g	International zone*	5 g of erythromycin in 100 liter of drinking water for 3 to 5 days
	Greece	Curative treatment: 2-4 g of product / liter of drinking water Preventive treatment: 1-2 g of product / liter of drinking water
Erythromycin thiocyanate Oral powder 10 g per 100 g	France	20 mg / kg / day for 3 days
	Algeria	10 g of erythromycin / 100 liter of drinking water for 3 to 6 days
Erythromycin thiocyanate Oral powder 16.5 g per 100 g	Ireland and United Kingdom	25.5 mg / kg / day for 1 to 5 days
Erythromycin thiocyanate Oral powder 20 g per 100 g	France	20 mg / kg / day for 3 days
	Greece	50 mg / kg / day for 3 days
	Spain	130 mg erythromycin / liter of drinking water or 0.65 g erythromycin / liter of water For CRD: treatment for 5 days. For infectious coriza and sinusitis: treatment for 7 days
	International zone*	20 g of erythromycin in 200 liter (prevention) or 100 liter (treatment) of drinking water for 3 to 5 days
	International zone*	5 g of erythromycin per liter of drinking water for 1 to 5 days
	Ireland and United Kingdom	25.5 mg / kg / day for 1 to 5 days
Erythromycin Phosphate Oral powder 29.6 g per 100 g	Ireland and United Kingdom	25.5 mg / kg / day for 1 to 5 days

* Countries other than the European Union and United States

PHARMACOKINETIC AND METABOLIC STUDIES

Absorption

Erythromycin base is destroyed by gastric acid, except if administered with a protective enteric coating. Acidic media degrades erythromycin rapidly to form derivatives with little antimicrobial activity. Erythromycin stearate is more stable, however *in vitro* studies have demonstrated that erythromycin stearate dissolves in gastric acid, retains only 2% antibiotic activity and is rapidly destroyed (DiSanto and Chodos, 1981; Periti et al., 1989; Martindale, 1989). The major site of absorption in rat, dogs and humans is the small intestine. Erythromycin is only slightly absorbed from the stomach. In man, absorption occurs mainly in the duodenum (Anderson et al., 1959; Huber, 1977).

Humans

In humans, erythromycin is rather slowly absorbed after oral administration. Peak serum concentrations occur 1 to 6.3 hours after dosing and vary from 0.1 to 4.8 µg/ml, depending on the formulation, and the coating of erythromycin administered. The oral absorption is less than 50% and

erythromycin is degraded by gastric acid. It is absorbed in the small intestine as erythromycin base (DiSanto and Chodos, 1981; Griffith and Black, 1970; Burrows, 1980).

The oral bioavailability of unprotected erythromycin base and salts is less than 50 % of the dose. Food reduces the absorption of erythromycin (Griffith and Black, 1970; Burrows, 1980). Wilson and Van Boxtel (1978) observed that erythromycin propionate and stearate were better absorbed before rather than after breakfast.

Laboratory animals

In laboratory animals, erythromycin is rather slowly absorbed after oral administration in laboratory animals (except rats). Oral administration of propionyl erythromycin (25 mg/kg) in rats did not produce high peak serum concentrations ($<0.1 \mu\text{g/ml}$). However, the maximum serum concentration was reached rapidly (1 hour after administration). At the end of six hours following oral administration, only a trace of antibiotic activity was found in rat serum (Anderson et al., 1959).

Calves

In calves, 2 hours after a single intramuscular treatment of 5 mg erythromycin/kg b.w., the mean highest concentration in plasma ($0.652 \mu\text{g/ml}$) was reached. Twelve hours after treatment, the concentration of erythromycin in serum was about $0.22 \mu\text{g/ml}$. After repeated intramuscular treatments of 5 mg erythromycin/kg bw/day for 5 days, no accumulation phenomenon was observed (Report PK 5251/E-00).

Chickens

In chickens, 30 minutes after the beginning of a repeated administration of erythromycin via drinking water at a dose of 25,000 IU/kg b.w./day for 3 days (approximately 27 mg/kg b.w.), the average serum levels ranged from 0.11 to $0.22 \mu\text{g/ml}$. After the last administration, serum levels declined to approximately $0.04 \mu\text{g/ml}$ (Report PK 8400/E-00).

Distribution

Plasma protein binding

In humans, erythromycin is highly bound to plasma proteins. The extent of protein binding is $>74\%$ *in vitro* and $>90\%$ *in vivo* (Wilson and Van Boxtel, 1978). Erythromycin undergoes a relatively low extent of binding to bovine serum proteins (37-43%) (Baggot and Gingerich, 1976).

Milk protein binding

Studies show that antibiotics are bound only to a minor extent to milk proteins. However, the unbound fraction of erythromycin may be decreased because it may be bound to milk casein. Erythromycin is $<25\%$ bound to dry udder secretion and to dry udder tissue homogenates (Ziv, 1980).

Serum levels

According to Wilson and Van Boxtel (1978), dose levels of 250 mg of erythromycin base or erythromycin stearate in adults produce similar peak serum concentrations ($0.4 \mu\text{g/ml}$) within 2-4 hours after oral administration. In cattle, after intramuscular administration of erythromycin in cattle, peak serum concentrations are maintained for several hours and then decline slowly. The 12-hour levels are about 25% of peak concentration (Burrows, 1980).

The elimination half-life ($T_{1/2}$) of erythromycin following intravenous injection of a single dose in different species is shown in Table 2.

Table 2: Elimination half-life of erythromycin following intravenous injection

Species	Dose	$T_{1/2}$	References
Cow	12.5 mg/kg	3.16 ± 0.44 hours	Baggot and Gingerich, 1976
Dog	-	1 hour	Burrows, 1980
Man	100 mg	1.02 ± 0.17 hours	Wilson and Van Boxtel, 1978

Tissue distribution

Animal studies indicate that erythromycin is well distributed in the body and tissue levels (e.g. liver, spleen, kidneys, and lungs) are generally higher than serum levels and persist longer (Wilson and Van Boxtel, 1978).

Humans

In humans, erythromycin is distributed to various tissues and fluids. About 10% of erythromycin is estimated to cross the placenta and fetal blood levels are no higher than 10% (usually closer to 2%) of those present in normal circulation. An estimated 0.1% of a daily dose appears in breast milk in pregnant women (Wilson and Van Boxtel, 1978).

Rats

In rats given 100 mg erythromycin base per kg bw orally, erythromycin is concentrated in the liver, sub maxillary glands, spleen, adrenals, lungs and kidneys two hours after administration. Large amounts are also found in the thymus, skin, muscle, reproductive organs and heart (Lee et al., 1953).

Twenty hours after an intravenous treatment of 10 mg erythromycin (N-methyl- ^{14}C -erythromycin, 8 μCi) to rats, about 37-43% of the administered dose is recovered in the intestinal tract plus feces, 27.2 - 36.1% in the urine, and 21-29% in the expired air. It is rapidly metabolized in the liver, mainly through a demethylation process, and excreted in the bile as des-N-methyl-erythromycin, the major metabolite, present only in the bile and in the intestinal contents of rats. The isotopic methyl group is eliminated in the expired air as CO_2 (Lee et al., 1953).

Cattle

After intravenous administration, erythromycin is widely distributed in cows. The apparent volume of distribution (V_d) is 0.8 liter/kg. Tissue concentrations are higher than serum concentrations and erythromycin concentrations in milk of lactating cows (the dose fraction recovered in milk is 3.8%. At 6 hours, the percent of the dose of erythromycin in the central and tissue compartments were 6 and 19%, respectively, with 75% of the dose eliminated (Wilson and Van Boxtel, 1978; Ziv, 1980a). Compared to adult cows, a larger apparent volume of distribution and a higher body clearance rate were determined in calves (Burrows, 1980).

In lactating cows, erythromycin was well distributed in the body and mean erythromycin concentrations in renal cortex, muscle and liver varied from 0.09 to 0.14 $\mu\text{g/g}$ tissue, 16 hours after a single intramammary application of 1200 mg erythromycin base. The highest concentration was observed in the liver (Nouws and Ziv, 1979).

Five hours after intramuscular administration of erythromycin anhydrate (8.3 mg/kg bw) in cows, renal, muscle and liver concentrations were 0.11 to 0.92 $\mu\text{g/g}$, with the highest values in the liver. At a

dose of 9 mg/kg, concentrations were less than 0.03 to 0.06 µg/g; 67 hours after intramuscular injection of erythromycin base, the renal cortex concentration was 0.1 µg/g following a dose of 17.5 mg/kg (Nouws and Ziv, 1979).

Metabolism

The metabolism of erythromycin has been studied in different animal species and in humans. (Lee et al, 1956a; Lee et al, 1956b; Wilson and Van Bostel, 1978; Pineau et al., 1990; Tsubaki and Ichikawa, 1985). These studies show that erythromycin is rapidly metabolized in the liver, mainly through an N-demethylation process in both rats and dogs and in the liver microsomal system of rabbits. Collectively, these studies strongly suggest that the metabolism of erythromycin by N-demethylation occurs in all species tested. Des-N-methyl-erythromycin is the major metabolite and the only microbiologically active metabolite of erythromycin. However, the antimicrobial activity is presumably low and the only form of erythromycin known to be active *in vivo* is the free base. It is excreted in the bile and eliminated through the faeces. Only erythromycin was found in the liver and the absence of des-N-methyl-erythromycin indicates that it is excreted in the bile immediately after erythromycin demethylation. It is absorbed from the intestinal tract but the very minute amount of des-N-methyl-erythromycin available in the body may explain its absence from urine.

The hepatic cytochrome P-450 isozymes that catalyse erythromycin demethylation in rat are highly similar to the form of liver cytochrome P-450 present in rabbit, hamster, gerbil and mouse and this may also extend to humans since human liver contains a protein equivalent to the rat cytochrome P-450. Similarly, a high degree of similarity was found between the ovine cytochrome P-450 involved in N-demethylation of erythromycin and the form isolated in rabbits. This suggests that an equivalent form of these liver cytochrome P-450 isozymes, with similar catalytic activities, is present in the species tested. In cattle a form of cytochrome P-450 isozyme exhibiting a high catalytic activity for N-demethylation was found; this activity was not measured for erythromycin but for other substrates having a N-methyl group structure.

Excretion

Renal excretion

In humans, the portion of an erythromycin dose excreted in the urine varies from 0.02 to 20% and the elimination half-life may be prolonged in renal disease. However, except complete renal failure, renal impairment has only a minor impact on the pharmacokinetics of erythromycin (Wilson and Van Bostel, 1978).

Urinary excretion of erythromycin accounts for approximately 10% of an administered oral or IM dose (Burrows, 1980). Twenty hours after administration of isotopic erythromycin in rats, 27 to 36% of the radioactivity was recovered in the urine (Lee et al., 1956a).

Faecal Excretion

In humans, 15% of an administered dose was excreted in the bile (Griffith and Black, 1970).

In rats, erythromycin and its metabolites are excreted mainly by way of bile, but in part, also by direct passage through the intestinal wall (Baggot and Gingerich, 1976). Two hours following intravenous injection of isotopic erythromycin, 15.1% of the dose was excreted in the bile (Lee et al, 1956b). Twenty hours following intravenous injection of isotopic erythromycin, 37-43% of the radioactivity is recovered in the intestinal tract plus faeces (Lee et al. 1956a). An enterohepatic recirculation may also contribute to the high concentrations of erythromycin in faecal samples (Kroboth et al., 1982).

Pharmacokinetic studies in calves and poultry

Calves

A 1988 study (Report PK 5251/E-00) was performed in calves to determine:

- The pharmacokinetics and bioavailability of erythrocin (erythromycin thiocyanate) injectable following single and multiple IM administrations
- Pulmonary levels after a single IM administration of erythromycin
- Residues of erythromycin in tissues after multiple IM administration of injectable erythrocin

Erythromycin concentrations were assayed by a microbiological method on agar medium using *Micrococcus Luteus* as the sensitive organism (LOD: 0.02 IU/ml in serum; 0.16IU/g in all tissues).

Erythromycin was administered as a single intravenous injection to five calves at a dose of 5 mg erythromycin activity/kg. The study demonstrated a large apparent volume of distribution (V_d area, or $V_{d\beta}$ 1.95 l/kg), a short mean residence time (MRT 2.36 h) and an efficient ability of the organism to remove the drug (Cl 0.77 l/kg/h). As a second experiment in the same assay, a single intramuscular injection of a dose of 5 mg erythromycin activity/kg was administered to seven calves. Good bioavailability was observed (F 95%). Compared to the intravenous route, the elimination half-life and volume of distribution was apparently increased. This could be related to a slow-rate of absorption from the injection site.

In another study, three calves received five consecutive intramuscular injections in the neck or gluteal muscle at a dose of 5 mg/kg at 24-h intervals. No accumulation was observed. The peak concentrations observed after each injection were similar to the C_{max} values obtained after a single injection.

In a third study, ten calves received a single intramuscular injection in the neck or into the gluteal muscle alternatively at a dose of 5 mg/kg erythromycin during five days. Drug levels in lungs were always higher than in serum. These data are consistent with the well-known higher tissue than serum concentrations of erythromycin.

In the fourth study, ten calves received a single intramuscular injection in the neck or into the gluteal muscle alternatively at a dose of 5 mg/kg erythromycin during five days. Liver, kidney, muscle non-injection sites, the last three injection sites and fat tissues were collected at different withdrawal times after the last injection. Five days after the last injection, the tissues were free of antibiotic residues except some injection sites. Seven days after the end of the treatment, all tissues, including injection sites were negative. One calf slaughtered ten days after the last injection confirmed these results.

Poultry

A study (Report PK 8400/E-00) was performed in poultry to determine:

- Pulmonary and blood levels of erythromycin after a drinking water medication for three consecutive days
- Residues of erythromycin in chicken tissues after administration by oral route in drinking water for three consecutive days
- Residues of erythromycin in whole hen eggs after a drinking water medication for seven consecutive days

In the first study, 168 adult broilers were given erythromycin thiocyanate in their drinking water for 3 consecutive days. The treated water was changed every day but the water consumption during treatment was not measured. Assuming that the water consumption was similar during the treatment period and before treatment, where water consumption was 235ml/chicken on average, the dose could be estimated to be 25 mg/kg/day. Blood and lung samples (2-10 birds/sampling time) were collected before the first administration and at:

- 30 min, 1h, 2h, 3h, 4h, 6h, 8h, 9h and 24h on day 1 and 2 of medication

- 30 min, 2h, 3h, 4h, 6h, 8h, 9h and 24h on day 3 of medication
- 3h, 4h, 6h, 8h, 9h and 12h after the end of medication

The microbiological method using *Micrococcus Luteus* as the sensitive organism was used to determine blood and lung levels (LOD: 0.02 IU/ml of serum; 0.2 IU/g tissue). Similar but low serum values were noted during the whole treatment period (0.03-0.2 IU/ml, on average), although large variations were observed between broilers, possibly due to differences in individual water consumption. Higher pulmonary (0.5-1 IU/g) than serum levels were observed during the three days treatment, with maximum levels occurring 4 - 12 hours after each changing of medicated water and an elimination time of eight hours. In samples collected 12 hours after the end of the medication, pulmonary levels were below the limit of detection.

In the second study, 15 adult broilers received one dose of erythromycin thiocyanate estimated to be 25 mg/kg/day by the oral route in their drinking water for 3 consecutive days with the treated water changed every 24 hours. At 3, 5, 7 and 10 days after the end of the treatment, the chickens were slaughtered and liver, muscle, fat and skin tissues were collected. The microbiological method noted above was used (LOD: 0.2 IU/g tissue). In all cases the amounts of erythromycin in chicken tissues were below the detection limits 3 days after the end of the treatment.

In the third study, 40 laying hens received the same treatment as the broilers in the previous experiment for seven consecutive days. Five eggs were collected at 3, 5 and 7 days during treatment. Erythromycin was determined in the whole egg with the microbiological method (LOD: 0.06 µg/ml whole egg). Concentration levels of the drug were below the detection limits six days after the end of the treatment.

RESIDUE DEPLETION STUDIES IN TARGET ANIMALS AND IN HENS' EGGS

No radiolabelled study was performed. The following new original residue depletion studies with unlabelled erythromycin were performed in poultry:

Table 3: Residues depletion studies with erythromycin in target animals and eggs

Species	Dose	Study number
Chicken	20 mg / kg / day for 3 days	MPK/5814/9812 MPK/Erythromycin/9957
	20 mg / kg / day for 8 days	MPK/5814/0301
	50 mg / kg / day for 3 days	MPK/210H1/0148
Laying hens	20 mg / kg / day for 3 days	MPK/5814/9908 MPK/Erythromycin/9961
	20 mg / kg / day for 7 days	MPK/5814/0417
Turkey	20 mg / kg / day for 3 days	MPK/5814/0225

The maximum recommended therapeutic dose is 20/mg/kg/day. The route of administration, the dose and the species are those intended for therapeutic use. These studies were performed in accordance with GLP and the European Community guidelines 87/18/EEC and 88/320/EEC, including all supplements published up to the day of the corresponding study start.

Residue Depletion Studies in Chicken

- Chickens treated for three consecutive days at the maximum recommended dose (MPK/5814/9812 and MPK/Erythromycin/9957)

A residue study was performed in order to assess the depletion of erythromycin and its metabolites (N-desmethyl erythromycin A) in edible tissues of broiler chickens after repeated administration. The test product was erythromycin thiocyanate 20% oral powder. Thirty six chickens (18 males and 18 females plus 6 extra birds to replace any that might become ill and not meeting the inclusion criteria were selected for the 7 day acclimatization period) were treated by oral administration of 20 mg/kg/day of erythromycin for 3 consecutive days. All birds belonged to the same strain, TR 551, and were healthy when they received the treatment. For the entire duration of the study, the experimental broiler chickens were in premises at temperature and hygrometry ranging from 16 - 20 °C and 46 - 76%, respectively. Animals were kept in individual cages and all animals were exposed to an alternating cycle of illumination (12 hours of light followed by 12 hours of darkness). Animals received an individual daily ration of maize, soya, sunflower and wheat supplemented with vegetables and had free access to water. They weighed 0.9 ± 0.1 kg at the beginning of the treatment. Six animals per sampling time were slaughtered at 1 day, 2 days, 3 days, 4 days and 5 days after the end of treatment. Individual edible tissues collected from animals were: 100g of pectoral muscle, 100g of liver, 100g sample of kidneys and 100g of fat and skin in natural proportions.

A specific HPLC method coupled to a mass spectrometer detection system (LC/MS/MS) was used to determine erythromycin A, B and C and N-desmethyl-erythromycin-A in chicken tissues. Antimicrobial activity was measured by a microbiological plate assay. Erythromycin B and C were not detected in all samples, therefore only erythromycin A and N-desmethyl-erythromycin-A were reported. Mean concentrations of erythromycin A measured by both methods were below the LOD or the LOQ for all tissues at 1, 2, 3, 4 and 5 days after the end of the treatment (LOQ: 100 µg/g for all edible tissues and for both methods; LODs for the LC/MS/MS method were: 25 µg/kg for kidney, 30 µg/kg for liver, 3 µg/kg for muscle and 5 µg/kg for skin + fat; the LOD for the microbiological method was 50 µg /kg for all tissues). Mean concentrations of N-desmethyl-erythromycin A are presented in the following table.

Table 4: Mean concentrations of N- desmethyl-erythromycin A in edible tissues of broiler chickens receiving 20mg/kg/day for 3 days

Slaughter time after the end of treatment	Muscle (µg/kg)		Fat/skin (µg/kg)		Liver (µg/kg)		Kidney (µg/kg)	
	HPLC	Micro	HPLC	Micro	HPLC	Micro	HPLC	Micro
1 day	< LOD	< LOD	< LOQ	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
2 days	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	282*	< LOD	< LOD	< LOD
3 days	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	163*	< LOD	< LOD	< LOD

Note: * one value

Results also show that only small concentrations of N-desmethyl-erythromycin A were measured by HPLC in liver up to 3 days in only two individual samples after the end of the treatment. For days 4 and 5, concentrations of the metabolite were under the LOD. Because the depletion rate of the residue was very rapid in all edible tissues, it was not possible to provide any correlation between both methods in broiler chickens.

Following the selection of Erythromycin A as the residue marker in edible tissues of broiler chickens, the following additional residue depletion studies were performed in the broiler chickens with different doses.

- Chickens treated for eight consecutive days at the maximum recommended dose (MPK/5814/0301)

Thirty six broiler chickens (18 males and 18 females plus 6 extra birds to replace any that might become ill and not meet the inclusion criteria) were selected for the acclimatization period (10 days) before the beginning of the treatment. The animals had an approximate age of 8 weeks at start of treatment and a mean weight of 1794g (1423-2154g). They were fed *ad libitum* with a pelleted concentrate ration and had free access to water. Chickens were treated by oral administration of 20% erythromycin A thiocyanate via drinking water at 20 mg/kg/day of erythromycin for 8 consecutive days. Six animals per sampling time were slaughtered at 12 hours, 1, 2, 3 and 4 days after the last administration. Individual edible tissues were collected from animals as follows: 400g sample of breast/leg muscle, entire liver, both kidneys and 200g sample of fat and skin in natural proportions.

The concentrations of residues in edible tissue were analyzed with the same LC/MS/MS validated method as the above reported study. Mean concentrations of erythromycin A were below the LOD or the LOQ for all tissues at 12 hours, 1, 2, 3, and 4 after the end of the treatment. The study demonstrated that, whatever the duration of administration, the 20 mg/kg b.w. dose of erythromycin, leads to concentrations of residues in edible tissues below the limit of quantification.

- Chickens treated for five consecutive days at two and one-half times the maximum recommended dose (MPK/210H1/0148)

A total of 36 broiler chickens (18 males and 18 females plus 6 extra birds to replace any might become ill and not meet the inclusion criteria) were selected for the acclimatization period (10 days) before the beginning of the treatment. The study was performed with a dose of 50 mg/kg body weight. The test product was a powder containing 5.5% erythromycin thiocyanate. The animals had an approximate age of 6 weeks at start of treatment and weighed 800-1000g. They were fed *ad libitum* with a commercial feed and had free access to water. Chickens were treated by oral administration via drinking water for five consecutive days. Six animals per sampling time were slaughtered at 6h, 10h, 24h, 2, 5 and 7 days after the end of treatment. Individual edible tissues collected from animals were: 200g of muscle, entire liver, both kidneys and 40g of fat and skin in natural proportions. Erythromycin A was assayed with the same validated LC/MS/MS method as in the two previous studies. The results are presented in Table 5.

Table 5: Mean concentrations of Erythromycin A in edible tissues of chickens treated with 50mg/kg/day for 5 days

Sampling time after the end of treatment (hours)	Muscle (µg/kg)	Fat/skin (µg/kg)	Liver (µg/kg)	Kidney (µg/kg)
6	133 ± 16	131 ± 35	3220 ± 2080	308 ± 170
10	< LOQ	< LOQ	1760 ± 2840	185 ± 79
24	< LOD	< LOQ	631 ± 393	< LOD

Note: < LOQ: below the quantification limit (100 µg/g for all edible tissues);

< LOD: below the detection limit (25 µg/kg for kidney, 30 µg/kg for liver, 3 µg/kg for muscle and 5 µg/kg for skin + fat).

Concentrations of erythromycin were measurable in all tissues at six hours after the end of the treatment but only in liver and kidney at ten hours after the end of the treatment (the concentrations in muscle and fat/skin were less than the LOQ). Residues at one day after the end of treatment were only found in liver; concentrations in other tissues were below the LOD or LOQ. At day 2 or further times post-treatment, concentrations in all tissues were below the LOQ or the LOD. The study demonstrates that the administration of doses higher than the recommended during consecutive days does not result in accumulation of residues.

Residue Depletion Studies in Laying Hens

- Laying hens treated for three consecutive days at the maximum recommended dose (MPK/5814/9908 and MPK/erythromycin/9961)

A residue study was performed in eggs from laying hens that received a repeated administration for three days. A total of 40 laying hens were selected for the acclimatization period (14 days) before the beginning of the treatment, 30 were selected for treatment according to individual egg production. From these, 25 laying hens were selected for sampling, keeping 5 animals to replace any that might become ill. All birds belonged to the same strain and were healthy when they received the treatment; no animal had received any treatment ten days before the beginning of the study. The laying hens were treated by oral administration of 20 mg/kg/day of erythromycin thiocyanate 20% oral powder. The laying hens weighed 2.1 ± 0.2 kg and were approximately 8 months at the beginning of the treatment. They were fed *ad libitum* with a commercial feed and had free access to water. All eggs produced were collected daily during the treatment and ten days after the end of the treatment. The production ranged from 19-26 eggs per day and 13-17 eggs per laying hen over the 16-day experimental period. Control samples were collected three days before the beginning of the treatment period. The total antimicrobial activity of residues was also determined with the microbiological plate assay. Test samples were a mixture of albumen and yolk of each egg at each time point. Only Erythromycin A and N-desmethyl-erythromycin-A were detected. Results are reported in the following table.

Table 6: Mean concentrations of erythromycin A and N-desmethyl-erythromycin A in eggs of laying hens treated with 20mg/kg/day for 3 days

Sampling time	Mean concentration erythromycin A ($\mu\text{g/kg}$)		Mean concentration N-desmethyl-erythromycin A ($\mu\text{g/kg}$)	Ratio HPLC / microbiological method for erythromycin A	Ratio HPLC / microbiological method for desmethyl-erythromycin A
	HPLC	Micro			
Beginning of treatment					
Day 0	109 $\pm$ nc	194 $\pm$ nc	< LOD	0.56	-
Day 1	78 $\pm$ 12	158 $\pm$ 76	< LOD	0.46	-
Day 2	83 $\pm$ 24	198 $\pm$ 76	< LOD	0.33	-
End of treatment					
1 day post treatment	57 $\pm$ 6	221 $\pm$ 80	97 $\pm$ nc	0.23	-
2 day post treatment	71 $\pm$ 6	207 $\pm$ 59	120 $\pm$ nc	0.25	0.76
3 day post treatment	54 $\pm$ nc	118 $\pm$ 21	69 $\pm$ nc	-	-
4 day post treatment	< LOQ	< LOD	64 $\pm$ nc	-	-
5 day post treatment	< LOQ	< LOD	< LOD	-	-
Mean				0.33	0.76

Note: <LOD: below the limit of detection (0.92 $\mu\text{g/kg}$ for the HPLC method and 50 $\mu\text{g/kg}$ for the microbiological method); <LOQ: below the limit of quantification (50 $\mu\text{g/kg}$ for the HPLC method and 100 $\mu\text{g/kg}$ for the microbiological method); nc: non calculated

Erythromycin A could only be quantified in 25% of eggs at day 1 and 12.5% of the eggs at day 2. Concentrations of erythromycin A after the end of the treatment measured by LC/MS/MS were near the LOQ of the method (50 $\mu\text{g/kg}$). N-desmethyl-erythromycin A had high concentrations but it has a very low antimicrobial activity. Both compounds were below the LOQ (50 $\mu\text{g/kg}$) six days after the end of treatment. Erythromycin A was identified as the marker residue for eggs.

- Laying hens treated for seven consecutive days at the maximum recommended dose (MPK/5814/0417)

Residues in eggs from laying hens were analyzed after repeated administration for seven days. The hens weighed 1.6 ± 0.16 kg and were approximately 23 weeks at the beginning of the treatment. Twenty laying hens were treated by oral administration of 20 mg/kg/day of erythromycin thiocyanate 20% oral powder. All birds belonged to the same strain and were healthy when they received the treatment after an acclimatization period of 21 days. The laying hens were fed *ad libitum* with wheat and a pelleted concentrated ration and had free access to water. Eggs were collected daily beginning five days before the start of the treatment, during the treatment and until 28 days after the last treatment. Ten eggs per day were randomly selected for sampling at each time point coming from the first ten hens having regularly laid one egg per day and throughout all study. Samples were a mixture of albumen and yolk of each egg selected at each time point. Only erythromycin A was measured in eggs with the LC/MS/MS method used in the above studies. The results are presented in Table 7.

Table 7: Mean concentrations of erythromycin A in eggs of laying hens treated with 20 mg/kg/day for seven days.

Sampling time	Mean concentration ($\mu\text{g/kg}$)
Beginning of treatment	
Day 1	< LOD
Day 2	< LOQ
Day 3	< LOQ
Day 4	72 ± 11.1
Day 5	$135 \pm \text{nc}$
Day 6	59 ± 7.1
Day 7	68 ± 18.3
End of treatment	
1 day post treatment	59 ± 0.7
2-8 days post treatment	< LOQ
9-21 days post treatment	< LOD

Note: < LOD: below the limit of detection ($0.9 \mu\text{g/kg}$);
 < LOQ: below the limit of quantification ($50 \mu\text{g/kg}$);
 nc: not calculated

Erythromycin could be quantified only 1 day after the end of the treatment. After this time, the concentrations of the residues were below the LOQ ($50 \mu\text{g/kg}$). The study demonstrated that, whatever the duration of the administration, the administration of 20mg/kg b.w./day results in concentrations of erythromycin in eggs no higher than those found with fewer days of administration.

Residue Depletion Studies in Turkeys

- Treatment for three consecutive days at the maximum recommended dose (MP/5814/0225)

Thirty four white turkeys were treated by oral administration of 20 mg/kg/day of erythromycin thiocyanate 20% oral powder via drinking water for 3 consecutive days. All animals belonged to the same strain and were healthy when they received the treatment. Animals received a daily ration of commercial concentrated feed and had free access to water. They weighed 2289 ± 309 g at the beginning of the treatment. Turkeys were selected for the acclimatization period (14 days) before the beginning of the treatment. Six animals per sampling time were collected at 3, 4, 5, 6 and 8 days after treatment (1, 2, 3, 4 and 6 days after the last dose), 4 birds used as controls were sampled at six days after the end of the treatment. Individual edible tissues collected from animals were: whole liver, both kidneys, 400g of pectoral muscle, and approximately 20-50g of fat+skin in natural proportions. The LC/MS/MS

assay method for the detection of residues in turkeys was adapted from the chicken method. Three days after the end of the treatment, residues were detectable only in liver (166 ± 64 $\mu\text{g/kg}$). At this time, residues were measured only in one sample of kidney, muscle and fat. After four days post-treatment, all concentrations of residues were below the LOQ or the LOD in all tissues. The results are presented in Table 8.

Table 8: Mean concentrations of erythromycin A in edible tissues of turkeys treated with 20mg/kg/day for three days.

Sampling time after treatment	Muscle ($\mu\text{g/kg}$)	Fat/skin ($\mu\text{g/kg}$)	Liver ($\mu\text{g/kg}$)	Kidney ($\mu\text{g/kg}$)
3 days	266*	318*	166 ± 63.6	424*
4, 5, 6 and 8 days	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOD

Note: * only one value; < LOQ: below the quantification limit (100 $\mu\text{g/kg}$ for all tissues); < LOD: below the detection limit (4 $\mu\text{g/kg}$ for skin/fat and 3 $\mu\text{g/kg}$ for all other tissues).

METHODS OF ANALYSIS

Erythromycin A, B and C and N-methyl-erythromycin A by a LC/MS/MS method

Chicken (MPK/5814 /9812 and validation in MPK/erythromycin/9957).

Extraction procedure for muscle, liver and kidney: 1 g thawed tissue was shaken with 1 ml of double distilled water using a vortex mixer. Nine ml of acetonitrile was added and the mixture vortexed for an additional 20 seconds. The mixture was shaken for 10 minutes using a mechanical shaker. After decantation, 100 μl of the supernatant was added to 300 μl of the dilution solution and 15 μl was injected into the chromatographic system.

Extraction procedure for skin/fat: 1 g frozen tissue was shaken with 20 ml of acetonitrile for 20 seconds using a vortex mixer followed by 10 minutes using a mechanical linear shaker. After decantation, 1 ml of supernatant and 1 ml of double distilled water and 2 ml of n-hexane were added. The mixture was shaken 10 minutes using a mechanical shaker, centrifuged at 2500 rpm for 5 minutes, n-hexane was decanted off and 15 μl of solution were injected onto the chromatographic system.

Chromatographic procedure: 15 μl was injected onto the column using the autosampler. The column used was an RP 18ec 30 x 4 mm, 5 μm . The elution was done under isocratic conditions with acetonitrile/double distilled water 50:50 v/v with 1% formic acid. The retention times were 2.7 min for erythromycin A, 3.1 min for erythromycin B, 2.0 min for erythromycin C and 2.4 min for N-desmethyl-erythromycin A. Detection was done by mass-mass using a quadripole instrument with an electrospray source in the positive ionization mode. Multiple Reaction Monitoring (MRM) was applied and the following transition ions were monitored 734.6 $\rightarrow$ 576.6 for erythromycin A, and 718.6 $\rightarrow$ 565.2 for erythromycin B, 720.6 $\rightarrow$ 576.5 for erythromycin C, and 720.5 $\rightarrow$ 562.2 for N-desmethyl-erythromycin A. No internal standard was used. Quantification of both products was done after interpolation of unknown sample peak areas against the theoretical concentrations of calibration curves. Results were expressed as free erythromycin A and N-desmethyl-erythromycin A ($\mu\text{g/kg}$). The method was validated using the following criteria consistent with internationally recognized guidelines.

Specificity: The method was found specific from endogenous compounds, erythromycin B and C, N-desmethyl-erythromycin A, tylosin, tilmicin and spiramycin.

Linearity: The linearity of detector response was assessed in the four tissues matched with standard solutions using 100-5000 $\mu\text{g/kg}$. The correlation coefficients were 0.9996, 0.9993, 0.9998 and 0.9993

for erythromycin A in muscle, liver, kidney and skin/fat respectively and 0.9979, 0.9987, 0.9992 and 0.9976 for N-methyl-erythromycin A in the same tissues, respectively.

Stability: Stability was demonstrated at a concentration of 2000 µg/kg after 3 freeze-thaw cycles.

The within-day precision, day-to-day precision, accuracy, recovery rate, LOQ and LOD are presented in the following tables.

Table 9: Validation parameters for erythromycin A in chicken tissues

Erythromycin A	Muscle	Kidney	Fat / skin	Liver
Concentration (µg/kg)	100 - 5000	100 - 5000	100 - 5000	100 - 5000
Within-day precision (%)	1.95 - 7.57	2.30 - 7.24	2.51 - 7.80	2.89 - 8.19
Day-to-day precision (%)	2.28 - 7.57	2.30 - 7.24	2.51 - 9.36	4.31 - 13.6
Accuracy (E%)	-1.5 ≤ E% ≤ +2.0	-2.0 ≤ E% ≤ +2.4	-7.0 ≤ E% ≤ +10.1	-3.3 ≤ E% ≤ +3.0
Recovery rate (%)	> 98.9	> 92.1	> 87.4	> 98.1
LOQ (µg/kg)	100	100	100	100
LOD (µg/kg)	3	25	5	30

Table 10: Validation parameters for N-desmethyl-Erythromycin A in chicken tissues

N-desmethyl-Erythromycin A	Muscle	Kidney	Fat / skin	Liver
Range (µg/kg)	100 - 5000	100 - 5000	100 - 5000	100 - 5000
Within-day precision (%)	2.56 - 6.37	1.95 - 7.19	2.61 - 9.33	2.48 - 6.85
Day-to-day precision (%)	2.62 - 7.15	1.95 - 7.19	2.61 - 9.33	3.86 - 9.47
Accuracy (E%)	-3.0 ≤ E% ≤ +3.4	-1.2 ≤ E% ≤ +3.8	-4.0 ≤ E% ≤ +10.4	-4.2 ≤ E% ≤ +4.0
Recovery rate (%)	> 99.1	> 96.8	> 81.7	> 97.3
LOQ (µg/kg)	100	100	100	100
LOD (µg/kg)	3	25	24	48

Turkey (MPK/5814/0225)

The analytical method was adapted from the chicken method described above. It was validated using the criteria noted above. The method was partially validated as noted below. The retention time was approximately 3.6 min for erythromycin A.

Specificity: The method was found specific from endogenous compounds, erythromycin B and C, N-desmethyl erythromycin A, tylosin, tilmicosin and spiramycin.

Linearity: The linearity of detector response was assessed in the four tissues matched with standard solutions in the range of 100-5000 µg/kg. The correlation coefficients were 0.9998, 0.9997, 0.9988 and 0.9993 for erythromycin A in muscle, liver, kidney and skin/fat. The within-day precision, accuracy, recovery rate, LOQ and LOD are presented in Table 11.

Table 11: Validation parameters for erythromycin A in turkey tissues

Erythromycin A	Muscle	Liver	Kidney	Fat / skin
Range (µg/kg)	100 - 5000	100 - 5000	100 - 5000	100 - 5000
Within-day precision (%)	1.1 - 2.3	1.6 - 4.6	1.1 - 2.2	4.9 - 11.2
Accuracy (E%)	-5.0 - 6.5	-8.0 - 8.4	-6.8 - 0.2	-3.3 - 8.8
LOQ (µg/kg)	100	100	100	100
LOD (µg/kg)	3	3	3	4

Eggs (MPK/ 5814/9908 and validation in MPK/erythromycin/9961)

Extraction procedure: 1g frozen mixed egg was shaken with 1 ml of double distilled water for 20 seconds using a vortex mixer. Nine ml of acetonitrile were added and the mixture was shaken for 20 seconds using a vortex mixer and for 10 minutes using a mechanical linear shaker. After decantation, 500 µl of supernatant were added to 500 µl of acetonitrile, 1 ml of double distilled water and 2 ml of n-hexane. The mixture was shaken 10 minutes using a mechanical shaker, centrifuged, the n-hexane was decanted off and 10 µl of solution were injected onto the chromatographic system.

Chromatographic procedure: 15 µl were injected onto a RP 18ec 30 x 4 mm, 5 µm column. The elution was obtained under isocratic conditions with acetonitrile/double distilled water 50:50 v/v with 1% formic acid. The retention times were 3 min for erythromycin A and 2.5 min for N-desmethyl-erythromycin A. Detection was done by mass-mass using a quadripole instrument with a turbo ionspray source in the positive ionization mode. MRM was applied and the following transition ions were monitored 734.6→158.0 for erythromycin A and 720.5→144.2 for N-desmethyl-erythromycin A. No internal standard was used. Quantification of both products was done after interpolation of unknown sample peak areas against the theoretical concentrations of calibration curves. Results were expressed as free erythromycin A and N-desmethyl-erythromycin A.

Specificity: The method was found specific from endogenous compounds, erythromycin B and C, N-desmethyl erythromycin A, tylosin, tilmicosin and spiramycin.

Linearity: The linearity of detector response was assessed matched with standard solutions in the range of 50-5000 µg/kg. The correlation coefficients were 0.9993 and 0.9997 for erythromycin A and N-methyl-erythromycin A respectively.

Stability: The stability of erythromycin A and N-desmethyl-erythromycin A was evaluated at the concentration level of 2000 µg/kg after 3 freeze-thaw cycles. The mean concentration was approximately 104% of the mean reference value. Long term stability was evaluated in both compounds in a mixed frozen egg stored at -80 °C for 1 month at the concentration level of 2000 µg/kg. The mean concentration of the pool was 102% and 104% of the nominal value of erythromycin A and N-methyl-erythromycin A, respectively.

The within-day precision, day-to-day precision, accuracy, recovery rate, LOQ and LOD are presented in Table 12.

Table 12: Validation parameters for erythromycin A and N-desmethyl-erythromycin A in eggs

	Erythromycin A	N-desmethyl-Erythromycin A
Range (µg/kg)	50 - 5000	50 - 5000
Within-day precision (%)	1.76 - 9.87	1.10 - 7.79
Day-to-day precision (%)	1.76 - 11.87	1.11 - 7.79
Accuracy (E%)	-5.0 ≤ E% ≤ +7.8	-1.3 ≤ E% ≤ +2.0
Recovery rate (%)	> 82.6	> 71.9
LOQ (µg/kg)	50	50
LOD (µg/kg)	0.92	2.2

Microbiological assay method for erythromycin in chicken tissues and eggs

A microbiological method was used for the assay of erythromycin A and its related metabolites with potential microbiological activity in edible tissues (muscle, kidney, liver and fat/skin) of chicken (MPK/erythromycin/9957) and eggs (MPK/Erythromycin/9961).

Extraction procedure: 1 g of test sample was vortexed with 4 ml of acetonitrile, placed in an ultrasonic bath for five minutes and on a liner shaker for ten minutes. The extract was centrifuged at 7500g for 10 minutes and the supernatant transferred into a disposable tube. Two wells of each Petri dish were filled with this mixture.

Petri dishes: Plates were prepared (diameter 100mm) using agar medium and *Micrococcus Luteus* ATCC9341 as test organism. For each point, two plates with two replicates per plates were used. The diameter of bacterial growth inhibition was the measured response. Amounts of erythromycin were calculated by interpolating the inhibition diameter into the standard curve. The method has been validated according to the following criteria.

Specificity: The method shows specificity between erythromycin and endogenous component of the tissues. Three different matrixes are tested under experimental conditions for each tissue. No inhibition zone was observed for any tissue.

Linearity in chicken tissues: The linearity of detector response was assessed in the four tissues matched with standard solutions in the range from 100 to 2000µg/kg. The correlation coefficients were 0.9994, 0.9513, 0.9571 and 0.9969 for erythromycin A in muscle, liver, kidney and skin/fat, respectively. Other validation parameters are presented in the following tables for each tissue.

Linearity in eggs: The linearity of detector response was assessed matched with standard solutions in the range from 100 to 2000µg/kg. The correlation coefficient was 0.9567 as average of 9 standard curves. Other validation parameters are presented in the following tables.

Table 13: Validation parameters of the microbiological method for erythromycin in chicken

Table 13-A

Validation parameters for kidney							
Concentrations (µg/kg).	100	200	500	1000	1500	2000	Overall
Recovery rate (%) n=9	85.5	86.5	88.2	85.1	84.8	86.1	86.0
Repeatability, Cv,% n=3 per day	5.9	9.4	7.8	10.8	5.7	6.0	-
Intermediate precision, CV _r %/ 3 days	12.9	12.8	13.5	10.8	5.7	10.5	-
Accuracy: difference (% value)	-5.11	3.78	7.07	4.02	-1.90	-4.27	0.60
Limit of Detection (LOD)	50 µg/kg						
Limit of Quantification (LOQ)	100 µg/kg						
- = not calculated							

Table 13-B

Validation parameters for fat + skin							
Concentrations (µg/kg).	100	200	500	1000	1500	2000	Overall
Recovery rate (%) n=9	101.5	102.9	100.0	97.5	97.1	96.6	99.2
Repeatability Cv,% n=3 per day	3.7	5.6	4.6	7.5	6.9	6.7	-
Intermediate precision, CV _r %/ 3 days	3.7	5.6	5.4	7.5	6.9	6.7	-
Accuracy: difference (% value)	0.22	-0.22	-1.13	4.99	-3.44	0.67	0.18
Limit of Detection (LOD)	50 µg/kg						
Limit of Quantification (LOQ)	100 µg/kg						
- = not calculated							

Table 13-C

Validation parameters for muscle							
Concentrations (µg/kg).	100	200	500	1000	1500	2000	Overall
Recovery rate (%) n=9	94.1	94.0	93.6	92.6	93.1	95.9	93.9
Repeatability Cv,% n=3 per day	9.4	13.3	7.9	4.6	7.3	4.5	-
Intermediate precision, CV,%/ 3 days	9.8	13.3	7.9	4.6	7.3	6.2	-
Accuracy: difference (% value)	-3.22	5.22	2.53	-2.00	-1.45	1.06	0.36
Limit of Detection (LOD)	50 µg/kg						
Limit of Quantification (LOQ)	100 µg/kg						
- = not calculated							

Table 13-D

Validation parameters for liver							
Concentrations (µg/kg).	100	200	500	1000	1500	2000	Overall
Recovery rate (%) n=9	86.6	83.7	88.5	87.8	87.8	88.8	87.2
Repeatability, C _v ,% n=3 per day	5.2	7.6	7.0	8.8	6.1	6.3	-
Intermediate precision, C _v , %/ 3 days	9.2	7.9	13.3	8.8	6.2	6.3	-
Accuracy: difference (% value)	0.22	-5.72	9.47	4.04	1.26	-6.51	0.46
Limit of Detection (LOD)	50 µg/kg						
Limit of Quantification (LOQ)	100 µg/kg						
- = not calculated							

Table 14: Validation parameters of a microbiological assay method for erythromycin in eggs

Validation parameters							
Concentrations (µg/kg).	100	200	500	1000	1500	2000	Overall
Recovery rate (%) n=9	87.5	93.5	94.2	93.4	92.4	92.8	92.3
Repeatability, Cvr% n=3 per day	2.9	2.6	4.7	3.9	4.3	4.6	-
Intermediate precision, CVr%/3 days	5.0	4.5	5.1	5.7	4.5	4.6	-
Accuracy : difference (% value)	-4.89	3.11	3.87	5.77	-2.21	-4.59	0.18
Limit of Detection (LOD) :	50 µg/kg						
Limit of Quantification (LOQ) :	100 µg/kg						
- = not calculated							

Wang, et al. (2005) published a method for determination of five macrolide antibiotic residues in eggs (spiramycin, tilmicosin, oleandomycin, erythromycin and tylosin) using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. Data acquisition under MS/MS was achieved by multiple reaction monitoring of two or three fragment ion transitions for both quantification and confirmation. A full experimental design was used to study the measurement uncertainty arising from intermediate precision and trueness or proportional bias. The overall recoveries of spiramycin, tilmicosin, oleandomycin, erythromycin and tylosin at fortified levels of 60, 100, 200 and 300 µg/kg were 96.8, 98.2, 98.3, 98.8 and 95.4, respectively. The method detection limits ($S/N \geq 3:1$) of five macrolides were <1.0 µg/kg).

APPRAISAL

Erythromycin is an old drug. It was first reviewed by the Committee in 1968. No ADI was established but acceptable levels of residues were defined in milk (0-0.04 mg/ml) and meat (0-0.3 mg/kg). Erythromycin is a mixture of three compounds produced during fermentation. The main product is erythromycin A with small portions of B ($\leq 5\%$) and C ($\leq 5\%$). In veterinary medicine, erythromycin is used for the treatment of clinical and subclinical mastitis in lactating cows, for the treatment of infectious diseases due to erythromycin sensitive bacteria (cattle, sheep, swine, and poultry) and for the treatment of chronic diseases due to mycoplasma in poultry. The maximum recommended therapeutic dose in veterinary use is 20/mg/kg/day as erythromycin base.

Data from pharmacokinetic and metabolic studies in experimental and target animals and humans were submitted for evaluation by the Committee together with two earlier residue studies in calves and chickens. Three new non radiolabeled residue depletion studies in chickens, laying hens and turkeys treated with erythromycin and the description and validation of the analytical procedures employed were provided.

Erythromycin is rather slowly absorbed in humans, rats, cattle and chicken with some differences related to the mode of administration (IM, IV and oral), the salt form and the coating of the administered compound. Protein binding is variable ranging from 90% in man to 38-45% in cattle. The major site of absorption in rats, dogs and humans is the small intestine. Erythromycin is only slightly absorbed in the stomach. The tissue concentrations are higher than in serum and persist longer. Erythromycin is mainly excreted in the faeces through the bile, 37 to 43 % of the dose was recovered in the intestinal tract plus faeces of rats. Urinary excretion ranged from 10 to 36 % in different species (human, rats and dogs).

Erythromycin is rapidly metabolized in the liver, mainly through an N-demethylation process in a variety of species of rodents, ruminants and humans. N-desmethyl-erythromycin was the major metabolite and the only microbiologically active metabolite of erythromycin. However, its antimicrobial activity is low and the only form of erythromycin known to be active *in vivo* is erythromycin free base.

Two studies were performed in 1988 in calves and poultry using erythromycin thiocyanate. In poultry, the residues of erythromycin were determined in chicken tissues after administration by the oral route in drinking water for 3 consecutive days. In a similar study the residues of erythromycin in whole eggs were determined following medication administered to laying hens for 7 consecutive days in drinking water. The concentration of the erythromycin in chicken tissues declined to values below the limit of detection three days after the end of treatment and six days after the end of treatment in whole eggs.

There was no radiolabelled study reported, however, four new residue depletion studies with unlabelled erythromycin were performed in poultry. The route of administration, the dose and the species are those intended for therapeutic use.

The residues with microbiological activity were measured in chickens and laying hens by a microbiological plate assay using agar medium and *Micrococcus luteus* ATCC9341 as test organism

(LOD: 50 µg/kg for all chicken tissues and eggs; LOQ: 100 µg/kg for all chicken tissues and eggs). The concentration of erythromycin A and its metabolites were simultaneously assayed using a LC/MS/MS method. For chickens, erythromycin A, B and C, the LOD are as follows: 25 µg/kg for kidney, 30 µg/kg for liver, 3 µg/kg for muscle and 5 µg/kg for skin + fat and the LOQ is 100 µg/kg in all tissues. For N-desmethyl-erythromycin A, the LOD are as follows: 25 µg/kg for kidney, 48 µg/kg for liver, 5 µg/kg for muscle and 24 µg/kg for skin + fat and the LOQ is 100µg/kg in all tissues. For eggs, the erythromycin LOQ is 50 µg/kg and the LOD is 0.92 µg/kg. For turkey, the erythromycin LOQ is 100 µg/kg for all tissues and the LOD is 4 µg/kg for skin/fat and 3 µg/kg for all other tissues.

In the chicken studies, all tissue residue depletion results showed that from day 1 to day 3 after the end of the treatment period, low concentrations of erythromycin A and N-desmethyl-erythromycin A were measured in only a few liver samples. Prolonged treatment for up to eight days resulted in the same tissue residue concentration characteristics. In eggs, during the three days of treatment, mean concentrations of erythromycin A ranged from 109 µg/kg (day 1) to 83 µg/kg (day 3) measured by the LC/MS/MS method. Taking into account the standard deviation, there are no significant differences in residue concentration between days. The egg residues of erythromycin after the end of the treatment were 57±6 µg/kg, 71± 6 µg/kg and 54± nc µg/kg for days 1, 2 and 3, respectively.

Results show that erythromycin A and its metabolite N-desmethyl-erythromycin A were the major compounds observed (the ratio erythromycin/total active microbiological metabolites was 0.33 and the ratio of N-desmethyl-erythromycin/total active microbiological metabolites was 0.75). Erythromycin could only be quantified in 25% of eggs at day 1 and 12.5% of the eggs at day 2. Concentrations of erythromycin after the end of the treatment measured by LC/MS/MS were near the LOQ (50 µg/kg). N-desmethyl-erythromycin was present at higher concentrations but had very low antimicrobial activity. Both compounds were below the LOQ at 6 days after the end of treatment. Erythromycin A was identified as the marker residue for eggs.

Tissue residue depletion studies in turkeys yielded similar results. The LC/MS/MS assay method was adapted from the chicken method. At three days after the end of the treatment, residues were detected only in liver (166±64 µg/kg). At this time, residues were measured only in one sample of kidney, muscle and fat. Four days post-treatment, all concentrations of residues were below the LOQ or the LOD.

The 66th meeting of the Committee agreed to apply a new approach to estimate chronic (long term) exposure using the median residue concentration of residues, using the standard food basket, in addition to the historically used theoretical maximum daily intake calculation based on the MRL. For numerical values reported below the LOD and the LOQ, one-half the analytical limit was applied to each, respectively, for estimating daily exposure concentrations. For erythromycin, the summary of the median residue concentrations in chickens, turkeys and eggs are presented in the following tables, derived from using individual values in all studies using an Excel spreadsheet.

Table 15a: Median residues in chicken and turkey tissues (µg/kg)

Tissue & Time	Chicken			Turkey			
	12 hours	1 day	2 days	1 day	2 days	3 days	4 days
Muscle	1.5	1.5	1.5	50	50	1.5	1.5
Liver	15	15	15	50	50	15	15
Kidney	12.5	12.5	12.5	50	12.5	12.5	12.5
Fat+Skin	50	2.5	2.5	50	25.8	2.5	2.5

Table 15b: Median residues in chicken eggs (µg/kg)

Time (days)											
0 day	1 day	2 days	3 days	4 days	5 days	6 days	7 days	8 days	9 days	10 days	11 days
0.45	25	25	25	25	25	25	41	25	25	25	25

The LC/MS/MS analytical methods provided are applicable for the determination of residues of erythromycin in chicken and turkey tissues (muscle, fat, kidney and liver) and eggs. The method was validated.

MAXIMUM RESIDUE LIMITS

In recommending MRLs for erythromycin, the Committee considered the following factors:

- The marker residue is erythromycin A. Metabolites exhibited little or no microbiological activity.
- Only MRLs in poultry tissues and eggs were considered.
- Residue studies in bovine and ovine tissues suggest mean ratios of marker residue to total residues for tissues to be 0.7 for muscle and kidney, 0.5 for liver and 0.85 for fat. The ratio was not always available for all species and when it was, it was only available based on few individual data. From submitted studies, the marker residue to total residues for eggs was estimated to be 0.33.
- Residue depletion studies generated very limited numbers of residue concentrations above the limit of quantification for all studies in chickens, turkeys and eggs.
- A validated LC/MS/MS method is available with a limit of quantification of 100 µg/kg for all tissues and 50 µg/kg for eggs. The limit of quantification of the microbiological method is 100 µg/kg for all tissues and eggs.
- For residue concentrations reported below the LOD and the LOQ, one-half the analytical limit was applied to each, respectively, for estimating daily exposure concentrations.
- The ADI for erythromycin A was 0 – 0.7 µg/kg body weight, equivalent to 42 µg per person per day.

Noting the factors noted above, the Committee recommended MRLs of 100 µg/kg for chicken and turkey muscle, liver, kidney and fat/skin and 50µg/kg for eggs at the limit of quantification of the LC/MS/MS method, measured as erythromycin A.

Applying the MRLs and the standard food basket, the theoretical maximum daily intake is 55 µg, equivalent to approximately 130% of the ADI. The 66th meeting of the Committee agreed to apply the principle of using median residue concentrations to better estimate long-term (chronic) exposures to residues. Estimated daily intake (EDI) values were determined using median residue values for each tissue from each food-producing species for which data were available. Median residue values were determined using an Excel® spreadsheet program. Where residue values were below the LOD or LOQ of the validated method, values of ½ the LOD and ½ the LOQ, respectively, were used in the calculations. Applying the highest estimated median residue concentrations in turkeys (50 µg/kg in all tissues) – the median residue concentrations in turkey tissues were higher than the corresponding median residue concentrations in chicken tissues - and eggs (41µg/kg), the estimated daily intake is 29.1 µg/kg, equivalent to approximately 69% of the ADI. Results are shown in Table 16.

Table 16: Estimated daily intake

Tissue	Median intake (µg/kg)	Standard Food Basket (kg)	Daily intake (µg)
Muscle	50	0.3	15
Liver	50	0.1	5
Kidney	50	0.05	2.5
Fat	50	0.05	2.5
Eggs	41	0.1	4.1
Total			29.1

REFERENCES

- Anderson, R.C., Lee, C. C., Worth, H.M., and Harris, P.N.** (1959). J. American Pharmaceutical Association, XLVIII, 11, 623-628.
- Baggot J. D., and Gingerich, D. A.** (1976). Pharmacokinetic interpretation of erythromycin and tylosin activity in serum after intravenous administration of a single dose to cows. Research in Veterinary Science, 21, 318-323.
- Burrows, G. E.** (1980). Pharmacotherapeutics of macrolides, lincomycins, and spectinomycin. JAVMA, 176 (10), 1072-1077.
- DiSanto A. R., and Chodos, D .J.** (1981). Influence of study design in assessing food effects on absorption of erythromycin base and erythromycin stearate. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 20 (2), 190-196.
- EMA (2000).** Committee for Veterinary Medicinal Products. Erythromycin. Summary Report (1), EMA/720/99-FINAL.
- FAO/WHO (1969).** Specifications for the identity and purity of food additives and their toxicological evaluation: some antibiotics (Twelfth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). FAO Nutrition Meetings Report Series No. 45/WHO Technical Report Series No. 430.
- Griffith R. S., and Black H. R.** (1970). Erythromycin. Medical Clinics of North America, 54 (5), 1199-1215.
- Huber, W. G.** (1977). Streptomycin, chloramphenicol and other antibacterial agents- Erythromycin: Chemotherapy of microbial, fungal and viral diseases, Meyer-Jones, N.H. Booth and L.E. McDonald, editors. Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 49(section 13), 953-954.
- Kroboth, P. D., Brown, A., Lyon, J. A., Kroboth, F. J., and Juhl, R. P.** (1982). Pharmacokinetics of a single dose erythromycin in normal and alcoholic liver disease subjects. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 21 (1), 135-140.
- Lee, C.-C., Anderson, R C., and Chen, K. K.** (1953). Tissue distribution of erythromycin in rats. Antibiotics and Chemotherapy, III (9), 920-924.
- Lee, C.-C., Anderson, R C., and Chen, K. K.** (1956a). Distribution and excretion of radioactivity in rats receiving N-methyl-¹⁴C-erythromycin, J. Pharmacology and Experimental Therapeutics, 117, 265-273.
- Lee, C.-C., Anderson, R C., and Chen, K. K.** (1956b). The excretory products of N-methyl-¹⁴C-erythromycin in rats. J. Pharmacology and Experimental Therapeutics, 117, 274-280.

Martindale (The Extra Pharmacopoeia) (1989). Erythromycin (Reynolds, editor), 222-227.

Merck Index. Erythromycin (Budivari, editor), 577-578.

Nouws, J. F M., and Ziv, G. (1979). Distribution and residues of macrolide antibiotics in normal dairy cows. *Archive fur Lebensmittelhygiene*, 30, 202-208.

Periti, P., Mazzei, T., Mini E., and Novelli, A. (1989). Clinical pharmacokinetic properties of the macrolide antibiotics. Effects of age and various pathophysiological states. *Clinical Pharmacokinetics*, 16 (4), 193-214.

Pineau, T., Galtier, P., Bonfils, C., Derancourt, J., Maurel, P. (1990). Purification of a sheep liver cytochrome P-450 from the P450III_A gene subfamily: its contribution to the N-dealkylation of veterinary drugs. *Biochemical Pharmacology*, 39 (5), 901-909.

Report No. PK 5251/E-00 (1988). Erythrocin injectable – Pharmacokinetic and residue study (in calves). SANOFI Santé Animale. Libourne, France.

Report No. PK 8400/E-00 (1988). Erythrocin soluble – Pharmacokinetic and residue study (in poultry). SANOFI Santé Animale. Libourne, France.

Report No. MPK/5814/9812 (1999). Depletion study of Erythromycin residues in edible tissues after repeated oral administrations of Erythrovet® to broiler chickens (20MG/KG/24H). SANOFI Santé Nutrition Animale. Libourne, France.

Report No. MPK/ERYTHROMYCIN/9957 (1999). Ratio of LC/MS/MS to microbiological determination of Erythromycin residues in edible tissues after oral administrations of Erythromycin to broiler chickens. SANOFI Santé Nutrition Animale. Libourne, France.

Report No. MPK/5814/0301 (2004). Residue study of Erythromycin in edible tissues of broiler chickens following repeated oral administrations of 5814 via the drinking water. CEVA Santé Animale. Libourne, France.

Report No. MPK/210H1/0148 (2004). Residue study of 210A in edible tissues following repeated oral administrations of 210H1 to broiler chickens. CEVA Santé Animale. Libourne, France.

Report No. MPK/5814/9908 (1999). Depletion study of Erythromycin-A and N-Desmethylethromycin-A residues in eggs after repeated oral administrations of Erythrovet® to laying hens (20MG/KG/24H). SANOFI Santé Nutrition Animale. Libourne, France.

Report No. MPK/ERYTHROMYCIN/9961 (1999). Ratio of LC/MS/MS to microbiological determination of Erythromycin in residues in eggs after oral administrations of Erythrovet® to laying hens. SANOFI Santé Nutrition Animale. Libourne, France.

Report No. MPK/5814/0417 (2004). Residues study of erythromycin in eggs following repeated oral administrations of 5814 via the drinking water to laying hens (20MG/KG/24HOURS for 7 consecutive days). CEVA Santé Animale. Libourne, France.

Report No. MPK/5814/0225 (2003). Residue study of 210A in edible tissues following repeated oral administrations of 5814 to turkey (20MG/KG/24H). CEVA Santé Animale. Libourne, France.

Tsubaki, M., and Ichikawa, Y. (1985). Isolation and characterization of two consecutive forms of microsomal cytochrome P-450 from bovine liver. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 830, 244-257.

Wang, J., Leung, D., and Butterworth, F. (2005). Determination of five macrolide antibiotic residues in eggs using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 1857-1865.

Wilson, J. T., and Van Boxtel, C. J. (1978). Pharmacokinetics of erythromycin in man. *Antibiotics and Chemotherapy*, 25, 181-203.

Ziv, G. (1980). Practical pharmacokinetic aspects of mastitis therapy-3: Intramammary treatment. *Veterinary Medicine/Small Animal Clinician*, 657-670.