

動薬協会発 25 号

平成25年4月17日

公益社団法人日本動物用医薬品協会

会 員 各 位

公益社団法人 日本動物用医薬品協会

理事長 福井邦顯

(公印省略)

「薬事法関係事務の取扱いについて」の一部改正について

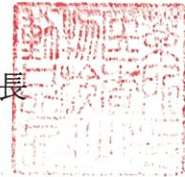
当協会の業務運営につきましては、日頃からご支援、ご協力を頂きお礼申し上げます。
さて、標記のことについて、農林水産省消費・安全局長より通知がありましたのでお知らせします。



24動薬第3481号
平成25年4月10日

社団法人 日本動物用医薬品協会理事長 殿

農林水産省動物医薬品検査所長



「薬事法関係事務の取扱いについて」の一部改正について

薬事法（昭和35年法律第145号）第83条第1項の規定により読み替えて適用される同法第14条第1項に基づく動物用医薬品等の製造販売承認申請の際に添付すべき資料を作成するための試験法のガイドライン等（以下「ガイドライン等」という。）については、「薬事法関係事務の取扱いについて」（平成12年3月31日付け12動薬A第418号農林水産省動物医薬品検査所長通知）の別添8により定めているところです。

今般、「動物用医薬品の承認審査資料の調和に関する国際協力」（International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Resistration of Veterinary Medicinal Products。以下「VICH」という。）において合意した微生物学的一日許容摂取量（ADI）設定の一般的アプローチ（VICH GL36）の付記D 微生物が利用可能な経口用量の分画の決定に関する「イ ガイドライン」の項の追補の追加及び当該ガイドラインの全体の記載の見直しを行うとともに、既に通知されている「不純物：新動物用医薬品、有効成分及び添加物中の残留溶媒（VICH18）」についても記載の見直しを行い、本通知の別添8の一部を別紙新旧対照表のとおり改正しましたので、貴会会員への周知方よろしく申し上げます。

なお、今般追加するガイドラインは平成26年4月10日からの試験に適用されます。



(別紙)

薬事法関係事務の取扱いについて（平成12年3月31日付け12動薬A第418号農林水産省動物医薬品検査所長通知）

改正案	現 行
<p>別添8 動物用医薬品等の承認申請資料のためのガイドライン 等</p> <p>目 次</p> <p>1～16 (略)</p> <p>2-3 不純物：新動物用医薬品、有効成分及び添加物中の残留溶媒 (VICH GL18R)</p> <p>3～16 (略)</p> <p>1 分析法バリデーションに関するテキスト (略)</p> <p>2 動物用医薬品の不純物等に関するガイドライン (略)</p> <p>2-1～2-2 (略)</p> <p>2-3 不純物：新動物用医薬品、有効成分及び添加物中の残留溶媒 (VICH GL18R)</p> <p>(1) 序文 (略)</p> <p>医薬品中の残留溶媒は、原薬又は添加剤の製造若しくは製剤の製造において使用又は生成される揮発性有機化学物質、と定義付けられる。それらの溶媒は、実生産工程で用いられている技術では完全に除去されない。原薬の製造において適切な溶媒を選定することにより、収率の向上又は結晶形、純度、溶解性といった物性の決定が成され得る。したがって、溶媒は、時として製造工程における決定的なパラメータであるといえる。本ガイドラインは、添加剤として用いられる溶媒及び溶媒和物は対象としない。しかし、そのような製剤では、製剤中の溶媒の含量を、評価し、正当化すべきである。</p> <p>残留溶媒から治療上の恩恵を受けることは全くないため、すべての残留溶媒は、製品規格や GMP 又は他の品質上の要求に適合するよう、可能な限り除去</p>	<p>別添8 動物用医薬品等の承認申請資料のためのガイドライン 等</p> <p>目 次</p> <p>1～2-2 (略)</p> <p>2-3 不純物：新動物用医薬品、有効成分及び添加物中の残留溶媒 (VICH GL18)</p> <p>3～16 (略)</p> <p>1 分析法バリデーションに関するテキスト (略)</p> <p>2 動物用医薬品の不純物等に関するガイドライン (略)</p> <p>2-1～2-2 (略)</p> <p>2-3 不純物：新動物用医薬品、有効成分及び添加物中の残留溶媒 (VICH GL18)</p> <p>(1) 序文 (略)</p> <p>医薬品中の残留溶媒は、原薬又は添加剤の製造若しくは製剤の製造において使用又は生成される揮発性有機化学物質、と定義付けられる。それらの溶媒は、実生産工程で用いられている技術では完全に除去されない。原薬の製造において適切な溶媒を選定することにより、収率の向上又は結晶形、純度、溶解性といった物性の決定が成され得る。したがって、溶媒は、時として製造工程における決定的なパラメータであるといえる。本ガイドラインは、添加剤として用いられる溶媒及び溶媒和物は対象としない。しかし、そのような製剤では、製剤中の溶媒の含量を、評価し、正当化すべきである。</p> <p>残留溶媒から治療上の恩恵を受けることは全くないため、全ての残留溶媒は、製品規格や GMP 又は他の品質上の要求に適合するよう、可能な限り除去すべ</p>

すべきである。製剤中においては、安全性データによって保証されるレベルよりも高いレベルの残留溶媒を含んではならない。許容できない種類の毒性を引き起こすことが知られている幾つかの溶媒（クラス1、表1）は、リスクベネフィットの観点から評価し、強く正当化されない限り、原薬、添加剤又は製剤の製造においては使用を避けるべきである。あまり重篤でない毒性に関する溶媒（クラス2、表2）については、潜在する副作用から対象動物及び消費者を守るために制限すべきである。理想的には、低毒性溶媒（クラス3、表3）をできるだけ用いるべきである。本ガイドラインに含まれるすべての溶媒のリストを付属書1に示す。

(略)

(2) ガイドラインの範囲

原薬、添加剤及び製剤中の残留溶媒は、本ガイドラインの範囲に含まれる。したがって、製造又は精製工程においてそれらの溶媒が結果として含有され得る場合には、残留溶媒の試験を行うべきである。原薬、添加剤若しくは製剤の製造又は精製で使用された又は生じた溶媒のみの試験が必要である。医薬品メーカーは、製剤での試験を選択してもよいが、製剤の製造に用いた各成分中の値から製剤中の残留溶媒レベルを累積的に計算する方法を用いることもできる。もし計算値が本ガイドラインで勧告した値以下の場合には製剤中の残留溶媒の試験は一切考慮する必要はない。しかしながら、もし計算値が勧告値を超える場合には、溶媒のレベルが製剤工程で許容量以下に減少したかどうかを確認するために、製剤の試験を行うべきである。また溶媒が、製剤の製造中に用いられている場合にも試験を行わなければならない。

(略)

(3) 一般原則

ア リスクアセスメントによる残留溶媒の分類

「耐容一日摂取量、tolerable daily intake (TDI) という用語は国際化学物質安全性計画 (IPCS) において毒性化学物質のばく露限度値を表すために用いられており、また「一日許容摂取量、acceptable daily intake (ADI) は、世界保健機関 (WHO) 及び他の各国及び国際的な保健担当部局並びに関連団体などによって用いられている。新しい用語である「一日ばく露許容量、permitted daily exposure (PDE) は、同じ物質であるにもかかわらず ADI 値が異なるというような混乱を避けるため、本ガイドラインにおいて残留溶媒の医薬上の摂取許容量を表現するものとして定義されている。

(略)

クラス2溶媒：制限すべき溶媒

遺伝毒性は示さないが動物実験で発がん性を示した物質、又は神経毒性や催奇形性など他の不可逆的毒性の原因となる可能性を有する物質。

きである。製剤中においては、安全性データによって保証されるレベルよりも高いレベルの残留溶媒を含んではならない。許容できない種類の毒性を引き起こすことが知られている幾つかの溶媒（クラス1、表1）は、リスクベネフィットの観点から評価し、強く正当化されない限り、原薬、添加剤又は製剤の製造においては使用を避けるべきである。余り重篤でない毒性に関する溶媒（クラス2、表2）については、潜在する副作用から対象動物及び消費者を守るために制限すべきである。理想的には、低毒性溶媒（クラス3、表3）を実用の場で用いるべきである。本ガイドラインに含まれる全ての溶媒のリストを付属書1に示す。

(略)

(2) ガイドラインの範囲

原薬、添加剤及び製剤中の残留溶媒は、本ガイドラインの範囲に含まれる。したがって、製造又は精製工程においてそれらの溶媒が結果として含有され得る場合には、残留溶媒の試験を行うべきである。原薬、添加剤若しくは製剤の製造又は精製で使用された又は生じた溶媒のみの試験が必要である。医薬品メーカーは、製剤での試験を選択してもよいが、製剤の製造に用いた各成分中の値から製剤中の残留溶媒レベルを累積的に計算する方法を用いることもできる。もし計算値が本ガイドラインで勧告した値以下の場合には製剤中の残留溶媒の試験は一切考慮する必要はない。しかしながら、もし計算値が勧告値以上である場合には、溶媒のレベルが製剤工程で許容量以内に減少したかどうかを確認するために、製剤の試験を行うべきである。また溶媒が、製剤の製造中に用いられている場合にも試験を行わなければならない。

(略)

(3) 一般原則

ア リスクアセスメントによる残留溶媒の分類

「耐容一日摂取量、tolerable daily intake (TDI) という用語は国際化学物質安全性計画 (IPCS) において毒性化学物質のばく露限度値を表すために用いられており、また「一日許容摂取量、acceptable daily intake (ADI) は、世界保健機関 (WHO) 及び他の国内的、国際的保健当局・団体などによって用いられている。新しい用語である「一日ばく露許容量、permitted daily exposure (PDE) は、同じ物質であるにもかかわらず ADI 値が異なるというような混乱を避けるため、本ガイドラインにおいて残留溶媒の医薬上の摂取許容量を表現するものとして定義されている。

(略)

クラス2溶媒：制限すべき溶媒

遺伝毒性の無い動物実験での発がん性物質、又は神経毒性や催奇形性など他の不可逆的毒性の原因となる可能性を有する物質。

他の重大ではあるが可逆的である毒性の疑われる溶媒。

(略)

イ ばく露限度値の設定法

残留溶媒の一日ばく露許容量の評価に用いられる方法は、付属書3に示されている。限度値の評価に用いられた毒性データの要約は、Pharmeuropa, Vol.9, No.1, Supplement, April 1997 及び不純物についてのICHガイドライン：医薬品の残留溶媒ガイドライン (Q3C(R4))の Part II 及び Part III で公表されている。

ウ クラス2溶媒の限度値記述のためのオプション

(略)

オプション2：オプション1で得られる限度値に適合する製剤中の残留溶媒は、考慮する必要はない。表2に示された mg/day で表される PDE 値と実際の1日最大用量から、上式(1)を用いて製剤中に許容される残留溶媒の濃度が算出できる。もし、残留溶媒を実際に可能な最小限にまで減じてきたことが実証されるならば、それらの限度値は許容されるであろう。その限度値は、分析の精度、製造上の能力、製造工程における妥当な変動に関して現実的なものであり、かつ、現在の医薬品製造の標準的なレベルを反映しているべきである。

オプション2は、製剤の各成分中に存在する残留溶媒量を加算することによって適用されうる。1日当たりの溶媒量の合計は PDE 値未満でなければならない。

オプション1とオプション2の使用例として、製剤中のアセトニトリルへの適用を考慮してみる。アセトニトリルの1日ばく露許容量は4.1mg/day、即ちオプション1の限度値は410ppmである。この製剤の1日最大投与量は5.0gであり、2種の添加剤を含んでいる。製剤の組成と計算上の最大残留アセトニトリル量を以下の表に記す。

成分	組成	アセトニトリル含量	一日ばく露量
原薬	0.3g	800ppm	0.24mg
添加剤1	0.9g	400ppm	0.36mg
添加剤2	3.8g	800ppm	3.04mg
製剤	5.0g	728ppm	3.64mg

添加剤1はオプション1の限度値に適合しているが、原薬、添加剤2及び製剤は適合していない。しかしながら、この製剤はオプション2の限度値4.1mg/dayには適合しており、したがって本ガイドラインの勧告値に適合していることになる。

他の重大ではあるが可逆的である毒性の疑われる溶媒。

(略)

イ ばく露限度値の設定法

残留溶媒の一日ばく露許容量の評価に用いられる方法は、付属書3に示されている。限度値の評価に用いられた毒性データの要約は、Pharmeuropa, Vol.9, No.1, Supplement, April 1997 で公表されている。

ウ クラス2溶媒の限度値記述のためのオプション

(略)

オプション2：オプション1で得られる限度値に適合する製剤中の残留溶媒は、考慮する必要はない。表2に示された mg/day で表される PDE 値と実際の1日最大用量から、上式(1)を用いて製剤中に許容される残留溶媒の濃度が算出できる。もし、残留溶媒を実用上最小限にまで減じてきたことが実証されるならば、それらの限度値は許容されるであろう。その限度値は、分析の精度、製造上の能力、製造工程における妥当な変動に関して現実的なものであり、かつ、現代の製造基準を反映しているべきである。

オプション2は、製剤の各成分中に存在する残留溶媒量を加算することによって適用されうる。1日当たりの溶媒量の合計は PDE 値以下でなければならない。

オプション1とオプション2の使用例として、製剤中のアセトニトリルへの適用を考慮してみる。アセトニトリルの1日ばく露許容量は4.1mg/day、即ちオプション1の限度値は410ppmである。この製剤の1日最大投与量は5.0gであり、2種の添加剤を含んでいる。製剤の組成と計算上の最大残留アセトニトリル量を以下の表に記す。

成分	組成	アセトニトリル含量	一日ばく露量
原薬	0.3g	800ppm	0.24mg
添加剤	0.9g	400ppm	0.36mg
添加剤	3.8g	800ppm	3.04mg
製剤	5.0g	728ppm	3.64mg

添加剤1はオプション1の限度値に適合しているが、原薬、添加剤2及び製剤は適合していない。しかしながら、この製剤はオプション2の限度値4.1mg/dayには適合しており、したがって本ガイドラインの勧告値に適合していることになる。

(略)

成分	組成	アセトニトリル含量	一日ばく露量
原薬	0.3g	800ppm	0.24mg
添加剤 1	0.9g	2,000ppm	1.80mg
添加剤 2	3.8g	800ppm	3.04mg
製剤	5.0g	1,016ppm	5.08mg

この例においては、この製剤はオプション1及びオプション2双方の限度値に適合していない。製剤化工程でアセトニトリルが減少するかどうか、製造業者は製剤中の定量試験により調べることができる。もしアセトニトリルのレベルが製剤化工程中に許容限度値まで減少しないならば、製剤の製造業者は製剤中のアセトニトリルを減らすための他の工程を考慮するか又はオプション3を考慮すべきである。

オプション3：申請者は、実際の1日投与量、実際の対象動物種並びに関連した毒性データ及び消費者の安全性を考慮して、より高いPDE値及び濃度限度値を正当化してもよい。このオプションは、次のように適用されるだろう。

3a-申請者は、適切な実際の対象動物種のための体重及び/又は実際の投与量を用意し、ICHの式及びICHがサポートする毒性データからPDE値及び/又は濃度限度値を再計算することができる。

3b-申請者は、新しい毒性データ（実際の対象動物及び投与量の情報を用いなくてもよい。）を用意し、ICHの式からPDE値及び濃度限度値を再計算することができる。

これらすべての方法を試みても、残留溶媒量を減少できなかった場合には、例外的なケースに限られるが、製造業者はガイドライン値に適合させるべく溶媒量を減じる努力をしてきたことについての要約と、その製剤がガイドライン値を超える残留溶媒を含むことの妥当性をサポートするリスクベネフィットの観点からの分析内容を提出することができる。

エ 分析方法

残留溶媒の測定法としては、ガスクロマトグラフィーのようなクロマトグラフィーが一般的に用いられる。もし実行できるのであれば、薬局方に記述されている、残留溶媒レベルの測定に関するいずれかのハーモナイズされた方法を用いるべきである。その他、個別のケースにおいては、製造業者は最も適切なバリデートされた分析方法を自由に選択できよう。もしクラス3溶媒しか存在しない場合には、乾燥減量等の非特異的方法を用いてもよい。

(略)

成分	組成	アセトニトリル含量	一日ばく露量
原薬	0.3g	800ppm	0.24mg
添加剤	0.9g	2,000ppm	1.80mg
添加剤	3.8g	800ppm	3.04mg
製剤	5.0g	1,016ppm	5.08mg

この例においては、この製剤はオプション1及びオプション2双方の限度値に適合していない。もし製剤化工程でアセトニトリルが減少するのであれば、製造業者は製剤中の定量試験を試みることを試みることができる。もしアセトニトリルのレベルが製剤化工程中に許容限度値まで減少しないならば、製剤の製造業者は製剤中のアセトニトリルを減らすための他の工程を考慮するか又はオプション3を考慮すべきである。

オプション3：申請者は、実際の1日投与量、実際の対象動物種並びに関連した毒性データ及び考慮すべき消費者の安全性の期待に基づいて、より高いPDE値及び濃度限度値を正当化してもよい。このオプションは、次のように適用されるだろう。

3a-申請者は、適切な実際の対象動物種のための体重及び/又は実際の投与量を用意し、ICHの式及びICHがサポートする毒性データからPDE値及び/又は濃度限度値を再計算することができる。

3b-申請者は、新しい毒性データ（実際の対象動物及び/又は投与量の情報）を用意し、ICHの式からPDE値及び濃度限度値を再計算することができる。

これら全ての方法を試みても、残留溶媒量の減少に失敗した場合には、例外的な取扱いとして、製造業者はガイドライン値に適合させるべく溶媒量を減じる努力をしてきたことについての要約と、本製剤がガイドライン値以上の残留溶媒を含むことが認められることをサポートするリスクベネフィットの観点からの分析内容を提出することができる。

エ 分析方法

残留溶媒の測定法としては、ガスクロマトグラフィーのようなクロマトグラフィーが典型的に用いられる。もし実行できるのであれば、薬局方に記述されている、残留溶媒レベルの測定に関するいずれかのハーモナイズされた方法を用いるべきである。その他、特殊な場合においては、製造業者は最も適切なバリデートされた分析方法を自由に選択できよう。もしクラス3溶媒しか存在しない場合には、乾燥減量等の非特定の的方法を用いればよい。

残留溶媒の分析方法のバリデーションは「1の(1)分析法バリデーション：定義及び用語に関するテキスト」(VICH GL1)及び「1の(2)分析法バリデーション：方法論に関するテキスト」(VICH GL2)に従うべきである。

オ 残留溶媒の報告レベル

製剤の製造業者は、本ガイドラインの基準に適合させるために、添加剤又は原薬の残留溶媒の含量について、正確な情報を必要としている。以下の記述は、添加剤又は原薬の供給業者が、製剤の製造業者に提供すべき情報の例である。供給業者は、以下から適切な一つを選択することができる。:

- ・ クラス3の溶媒のみが存在するような場合
乾燥減量が0.5%未満であること
- ・ クラス2溶媒X、Y...のみが存在するような場合
全てが、オプション1の限度値未満であること(ここでは、供給業者は、X、Y...で表されたクラス2溶媒の名称を示す。)
- ・ クラス2溶媒X、Y...及びクラス3の溶媒のみが存在するような場合
クラス2溶媒のすべてが、オプション1の限度値未満、かつ、クラス3溶媒の残留量が0.5%未満であること

クラス1溶媒が存在すると考えられる場合には、それらの溶媒は、同定され、定量されるべきである。

「存在すると考えられる」とは、最終製造工程で用いた溶媒及びそれより前の製造工程で用いられ、バリデートされた工程によっていつも取り除けるとは限らない溶媒をさす。

もし、クラス2又はクラス3の溶媒が、それぞれオプション1の限度値又は0.5%を超えて存在する場合、それらの溶媒は、同定され、定量されるべきである。

(4) 残留溶媒の限度値

ア 避けるべき溶媒
(略)

表1 医薬品中のクラス1溶媒 (避けるべき溶媒)		
溶媒	濃度限度値 (ppm)	事柄
ベンゼン	2	発がん性物質
四塩化炭素	4	毒性物質、環境有害物質
1,2-ジクロロエタン	5	毒性物質
1,1-ジクロロエタン	8	毒性物質
1,1,1-トリクロロエタン	1,500	環境有害物質

残留溶媒の分析方法のバリデーションは「1の(1)分析法バリデーション：定義及び用語に関するテキスト」(VICH GL1)及び「1の(2)分析法バリデーション：方法論に関するテキスト」(VICH GL2)に従うべきである。

オ 残留溶媒の報告限度値

製剤の製造業者は、本ガイドラインの基準に適合させるために、添加剤又は原薬の残留溶媒の含量について、正確な情報を必要としている。以下の記述は、添加剤又は原薬の供給業者が、製剤の製造業者に提供される認められる情報の例である。供給業者は、以下から適切な一つを選択することができる。:

- ・ クラス3の溶媒のみが存在するような場合
乾燥減量が0.5%未満
- ・ クラス2溶媒X、Y...のみが存在するような場合
全てが、オプション1の限度値未満(ここでは、供給業者は、X、Y...で表されたクラス2溶媒に名前を入れる。)
- ・ クラス2溶媒X、Y...及びクラス3の溶媒のみが存在するような場合
クラス2溶媒のすべてが、オプション1の限度値未満、かつ、クラス3溶媒の残量が0.5%未満

クラス1溶媒が存在する場合には、それらは、同定され、定量されるべきである。

「存在するような」とは、最終製造工程で用いた溶媒及び初期の製造工程で用いられ、バリデートされた工程で一貫して取り除けない溶媒をさす。

もし、クラス2又はクラス3の溶媒が、オプション1の限度値又は0.5%を超えて存在する場合、それらは、同定され、定量されるべきである。

(4) 残留溶媒の限度値

ア 避けるべき溶媒
(略)

表1 医薬品中のクラス1溶媒 (避けるべき溶媒)		
溶媒	濃度限度値 (ppm)	事柄
ベンゼン	2	発がん性物質
四塩化炭素	4	毒性物質、環境有害物質
1,2-ジクロロエタン	5	毒性物質
1,1-ジクロロエタン	8	毒性物質
1,1,1-トリクロロエタン	1,500	環境有害物質

イ 制限すべき溶媒

表2に示した溶媒は、それら固有の毒性のため、医薬品中において制限すべき溶媒である。PDE 値を 0.1mg/day 単位まで、濃度を 10ppm 単位まで表す。示された値は、測定時に必要な分析精度を反映するものではない。精度は、方法のバリデーションの一部として決定されるべきである。

表2 医薬品中のクラス2溶媒

溶媒	PDE (mg/day)	濃度限度値 (ppm)
アセトニトリル	4.1	410
クロロベンゼン	3.6	360
クロロホルム	0.6	60
シクロヘキサン	38.8	3,880
1,2-ジクロロエテン	18.7	1,870
ジクロロメタン	6.0	600
1,2-ジメトキシエタン	1.0	100
N,N-ジメチルアセトアミド	10.9	1,090
N,N-ジメチルホルムアミド	8.8	880
1,4-ジオキサン	3.8	380
2-エトキシエタノール	1.6	160
エチレングリコール	6.2	620
ホルムアミド	2.2	220
ヘキサン	2.9	290
メタノール	30.0	3,000
2-メトキシエタノール	0.5	50
メチルブチルケトン	0.5	50
メチルシクロヘキサン	11.8	1,180
N-メチルピロリドン	5.3	530
ニトロメタン	0.5	50
ピリジン	2.0	200
スルホラン	1.6	160
テトラヒドロフラン	7.2	720
テトラリン	1.0	100
トルエン	8.9	890
1,1,2-トリクロロエタン	0.8	80
キシレン*	21.7	2,170

* 通常 60% の m-キシレン、14% の p-キシレン、9% の o-キシレン及び 17% の

イ 制限すべき溶媒

表2に示した溶媒は、それら固有の毒性のため、医薬品中において制限すべき溶媒である。PDE 値を 0.1mg/day 単位で、濃度を 10ppm 単位で表す。示された値は、測定時に必要な分析精度を反映するものではない。精度は、方法のバリデーションの部分で決定されるべきである。

表2 医薬品中のクラス2溶媒

溶媒	PDE (mg/day)	濃度限度値 (ppm)
アセトニトリル	4.1	410
クロロベンゼン	3.6	360
クロロホルム	0.6	60
シクロヘキサン	38.8	3,880
1,2-ジクロロエテン	18.7	1,870
ジクロロエタン	6.0	600
1,2-ジメトキシエタン	1.0	100
N,N-ジメチルアセタミド	10.9	1,090
N,N-ジメチルホルムアミド	8.8	880
1,4-ジオキサン	3.8	380
2-エトキシエタノール	1.6	160
エチレングリコール	6.2	620
フォルムアミド	2.2	220
ヘキサン	2.9	290
メタノール	30.0	3,000
2-メトキシエタノール	0.5	50
メチルブチルケトン	0.5	50
メチルシクロヘキサン	11.8	1,180
N-メチルピロリドン	48.4	4,840
ニトロメタン	0.5	50
ピリジン	2.0	200
スルフオラン	1.6	160
テトラリン	1.0	100
トルエン	8.9	890
1,1,2-トリクロロエタン	0.8	80
キシレン*	21.7	2,170

* 通常 60% m-キシレン、14% の p-キシレン、9% の o-キシレン及び 17% のエ

エチルベンゼンの混合物

ウ 低毒性溶媒

クラス3の溶媒(表3に示す)は、低毒性であり、対象動物及び消費者の健康に及ぼすリスクもより低いとみなされる。通常許容される医薬品中のレベルにおいて、ヒトの健康に対する有害物質となることが知られている溶媒は、クラス3には全く含まれない。しかしながら、多くのクラス3溶媒に関する長期毒性試験又は発がん性試験は全く行われていない。実際に入手可能なデータによれば、これらの溶媒は、急性毒性試験又は短期毒性試験において低毒性であり、遺伝毒性試験も陰性であることが示されている。これらの残留溶媒の量が50mg/day(オプション1で5,000ppm、即ち0.5%に相当)以下であるならば、なんら正当化することなく許容されると考えられる。これより多い量については、製造上の能力あるいはGMP遂行上の必要性からみて適当と考えられるならば許容されるであろう。

表3 GMP又は他の品質上の要求により制限されるクラス3溶媒

酢酸	ヘプタン
アセトン	酢酸イソブチル
アニソール	酢酸イソプロピル
1-ブタノール	酢酸メチル
2-ブタノール	3-メチル-1-ブタノール
酢酸ブチル	メチルエチルケトン
t-ブチルメチルエーテル	メチルイソブチルケトン
クメン	2-メチル-1-プロパノール
ジメチルスルホキシド	ペンタン
エタノール	1-ペンタノール
酢酸エチル	1-プロパノール
ジエチルエーテル	2-プロパノール
ギ酸エチル	酢酸プロピル
ギ酸	

エ 適切な毒性データが見当たらない溶媒

以下の溶媒(表4)は、添加剤、原薬あるいは製剤の製造業者にとって関心のある溶媒である。しかしながら、PDE算出の基本となるべき適切な毒性データは見当たらない。製造業者は、医薬品中のこれらの溶媒及び製剤に用いられるためにPDEが評価されていない溶媒が残留することの妥当性についての理由を供給すべきである。

チルベンゼンの混合物

ウ 低毒性溶媒

クラス3の溶媒(表3に示す)は、低毒性であり、対象動物及び消費者の健康に及ぼすリスクもより低いとみなされる。通常許容される医薬品中のレベルにおいて、ヒトの健康に対する有害物質となることが知られている溶媒は、クラス3には全く含まれない。しかしながら、多くのクラス3溶媒に関する長期毒性又は発がん性試験は全く行われていない。実際に入手可能なデータによれば、これらの溶媒は、急性試験又は短期間投与試験において低毒性であり、遺伝毒性試験も陰性であることが示されている。これらの残留溶媒の量が50mg/day(オプション1で5,000ppm、即ち0.5%に相当)以下であるならば、なんら正当化することなく許容されると考えられる。これより多い量については、製造上の能力あるいはGMPに関して現実的であるならば許容されるであろう。

表3 GMP又は他の品質上の要求により制限されるクラス3溶媒

酢酸	ヘプタン
アセトン	酢酸イソブチル
アニソール	酢酸イソプロピル
1-ブタノール	酢酸メチル
2-ブタノール	3-メチル-1-ブタノール
酢酸ブチル	メチルエチルケトン
t-ブチルメチルエーテル	メチルイソブチルケトン
クメン	2-メチル-1-プロパノール
ジメチルスルフォキシド	ペンタン
エタノール	1-ペンタノール
酢酸エチル	1-プロパノール
エチルエーテル	2-プロパノール
蟻酸エチル	酢酸プロピル
蟻酸	テトラヒドロフラン

エ 適切な毒性データがない溶媒

以下の溶媒(表4)は、添加剤、原薬あるいは製剤の製造業者にとって関心のある溶媒である。しかしながら、PDE算出の基本となるべき適切な毒性データは見当たらない。製造業者は、医薬品中のこれらの溶媒及び製剤に用いられるためにPDEが評価されていない他の溶媒の残留レベルが規定できるような理由付けを供給すべきである。

表4 適当な毒性データが見当たらない溶媒

1,1-ジエトキシプロパン	メチルイソプロピルケトン
1,1-ジメトキシメタン	メチルテトラヒドロフラン
2,2-ジメトキシプロパン	石油エーテル
イソオクタン	トリクロロ酢酸
イソプロピルエーテル	トリフルオロ酢酸

(5) 用語の定義

genotoxic carcinogens : 遺伝子又は染色体に作用してがんを発生させる発がん物質

LOEL : lowest-observed effect level (最小作用量) の略

lowest-observed effect level (最小作用量) : ばく露を受けたヒト又は動物における何らかの作用の発現頻度又は程度が、生物学的に有意に増加した最小の投与量

modifying factor (修正係数) : 毒性学者の専門的判断により決定され、実験のデータをヒトの安全性に外挿するための係数

neurotoxicity (神経毒性) : 神経系に有害な作用を引き起こすような性質

NOEL : no-observed-effect level (最大無作用量) の略

no-observed-effect level (最大無作用量) : ばく露を受けたヒト又は動物において、いかなる作用についてもその発生頻度又は程度が生物学的に有意な増加を示さなかった最大の投与量

PDE : Permitted daily exposure (一日ばく露許容量) の略

Permitted daily exposure (一日ばく露許容量) : 医薬品中に残留する溶媒の一日当たりに摂取が許容される最大量

reversible toxicity (可逆的毒性) : ある物質へのばく露により発現し、ばく露停止後には消失するような有害作用

strongly suspected human carcinogen (ヒトにおける発がん性が強く疑われる物質) : ヒトでの発がん性に関する疫学的証拠は無いものの、遺伝毒性は陽性で、げっ歯類(又は他の動物種)での発がん性に関する明確な証拠がある物質

teratogenicity (催奇形性) : 妊娠中に投与した場合に、胎子に形態学的な先天異常を引き起こす性質

付属書1: 本ガイドラインに含まれる溶媒のリスト

溶媒名	別名	化学構造	クラス
(略)			
2-Methoxyethanol	Methyl Cellosolve	CH ₃ OCH ₂ CH ₂ OH	Class 2

表4 適当な毒性データが見いだされていない溶媒

1,1-ジエトキシプロパン	メチルイソプロピルケトン
1,1-ジメトキシエタン	メチルテトラヒドロフラン
2,2-ジエトキシプロパン	石油エーテル
イソオクタン	トリクロロ酢酸
イソプロピルエーテル	トリフルオロ酢酸

(5) 用語の定義

genotoxic carcinogens : 遺伝子又は染色体に作用してがんを発生させる発がん物質

LOEL : lowest-observed effect level (最低作用量) の略

lowest-observed effect level (最低作用量) : ばく露を受けた母集団において何らかの作用の頻度又は重篤度が、統計学上あるいは生物学上有意に増加する試験(群)での最低作用量

modifying factor (修正係数) : 毒性学者の専門的判断により決定され、生物試験データを安全にヒトに関連づけるよう適用された安全係数

neurotoxicity (神経毒性) : 神経系に副作用を引き起こす能力

NOEL : no-observed-effect level (最大無作用量) の略

no-observed-effect level (最大無作用量) : ばく露を受けた母集団における何らかの作用の頻度又は重篤度の、統計学上あるいは生物学上有意な増加が全く見られない最大用量

PDE : Permitted daily exposure (一日ばく露許容量) の略

Permitted daily exposure (一日ばく露許容量) : 医薬品中に残留する溶媒の一日当たりに許容される最大摂取量

reversible toxicity (可逆的毒性) : その物質によって引き起こされ、ばく露の終了とともに消失してしまうような有害作用の発生

strongly suspected human carcinogen : 人での発がんの疫学的証拠は無いものの、変異原性が陽性であり、げっ歯類(又は他の動物種)において発がんの明らかな証拠があるような物質

teratogenicity : 妊娠中に物質が投与された場合の胎子の発生における組織上の奇形の発生

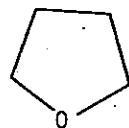
付属書1: 本ガイドラインに含まれる溶媒のリスト

溶媒名	別名	化学構造	クラス
(略)			
2-Methoxyethanol	Methyl Cellosolve	CH ₃ OCH ₂ CH ₂ OH	Class 2

(2-メトキシエタノール)
(略)

Tetrahydrofuran
(テトラヒドロフラン)
(略)

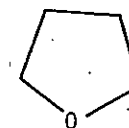
Tetramethylene oxide
Oxacyclopentane



Class 2

(2-メロキシエタノール)
(略)

Tetrahydrofuran Tetramethylene oxide
(テトラヒドロフラン) Oxacyclopentane
(略)



Class 3

付属書2 背景 (付属ガイダンス)

A2-1 揮発性有機溶媒の環境規制

医薬品製造にしばしば用いられる残留溶媒の幾つかは、環境保健クライテリア (EHC) モノグラフや総合リスク情報システム (IRIS) 中に毒性化学物質としてリストアップされている。国際化学物質安全性計画 (IPCS)、米国環境保護庁 (USEPA)、米国食品医薬品局 (USFDA) などのグループの目的の中には、許容ばく露レベルを決定することも含まれている。その最終目標は、化学物質の長期間に渡るばく露環境によって引き起こされる有害作用からヒトの健康を守り、環境保全を維持することにある。最大安全ばく露限度値の評価方法は通常長期毒性試験の結果に基づいている。長期試験のデータがない場合には、より大きな安全係数を用いるなど、方法に修正を加えた上で、より短い期間の毒性試験データを用いることができる。それらの文書中に記述されているアプローチ方法は、主として、環境、すなわち、大気、食品、飲料水並びに他の媒体における一般人の長期間又は一生のばく露に関係している。

A2-2 医薬品中の残留溶媒

本ガイドラインにおけるばく露限度値は、EHC 及び IRIS モノグラフに記述されている方法論と毒性データにより設定されている。しかしながら、医薬品の合成又は製剤化で用いられている残留溶媒に関する幾つかの特殊な仮定は、ばく露限度値を設定する上で考慮しなければならない。すなわち、

- 1) 患者 (通常の動物集団ではない) は医薬品を、病気の治療あるいは感染や疾病の予防のために与えられる。しかし、動物集団中の感染や疾病の存在とは関係なく農業生産を助けるために用いられるような製剤もある。
- 2) 患者への一生のばく露という仮定は大部分の医薬品にとって必要ではなく、製剤が投与された食用動物の可食部位を消費するヒトの一生のばく露という仮定が、ヒトの健康に対するリスクを低減させるための作業仮説として適当なものである。

付属書2 背景 (付属ガイダンス)

A2-1 揮発性有機溶媒の環境規制

医薬品製造にしばしば用いられる残留溶媒の幾つかは、環境保健クライテリア (EHC) モノグラフや総合リスク情報システム (IRIS) 中に毒性化学物質としてリストアップされている。国際化学物質安全性計画 (IPCS)、米国環境保護庁 (USEPA)、米国食品医薬品局 (USFDA) などのグループの目的の中には、許容ばく露レベルを決定することも含まれている。その最終目標は、化学物質の長期間に渡るばく露環境によって引き起こされる有害作用からヒトの健康を守り、環境保全を維持することにある。最大安全ばく露限度値の評価方法は通常長期試験の結果に基づいている。長期試験のデータがない場合には、より大きな安全係数を用いるなど、方法に修正を加えた上で、より短い期間の毒性試験データを用いることができる。それらのモノグラフ中に記述されているアプローチ方法は、主として環境は、すなわち、大気、食品、飲料水並びに他の媒体における一般人の長期間又は一生のばく露に関係している。

A2-2 医薬品中の残留溶媒

本ガイドラインにおけるばく露限度値は、EHC 及び IRIS モノグラフに記述されている方法論と毒性データにより設定されている。しかしながら、医薬品の合成又は製剤化で用いられている残留溶媒に関する幾つかの特殊な仮定は、ばく露限度値を設定する上で考慮しなければならない。すなわち、

- 1) 患者 (通常の動物集団以上) は医薬品を、病気の治療あるいは感染や疾病の予防のために与えられる。しかし、動物集団中の感染や疾病の存在とは関係なく農業生産を助けるために用いられるような製剤もある。
- 2) 患者への一生のばく露という仮定は大部分の医薬品にとっての必要条件ではなく、製剤が投与された食用動物の可食部位を消費するヒトの一生のばく露としてヒトの健康に対するリスクを低減させるための作業仮説として適当なものである。

- 3) 残留溶媒は、医薬品の製造プロセスにおいて避け難い要素であり、しばしば製剤の一部となるものである。
- 4) 残留溶媒は例外的な状況の場合を除き、勧告されたレベルを超えてはならず、その場合には正当化されるべきである。
- 5) 残留溶媒の許容レベルを決定するのに使用される毒性試験データは、OECD、EPA あるいは FDA Red Book に記述されているものに限定する必要はないが、それらを含む適切なプロトコールを用いて出されるべきである。

付属書3 ばく露限度値の設定法

クラス1の発がん性溶媒のリスク評価方法としては、Gaylor-Kodellの方法が適当である (Gaylor, D. W. and Kodell, R. L. Linear Interpolation algorithm for low dose assessment of toxic substance. J. Environ. Pathology, 4,305, 1980)。信頼すべき発がん性データがある場合にのみ、数学的モデルを用いた外挿を、ばく露限度値の設定に適用すべきである。クラス1溶媒のばく露限度値は、最大無作用量 (NOEL) に関して大きな安全係数 (即ち、10,000 ないし 100,000) を用いることにより決定され得る。これらの溶媒の検出・定量は、最新の分析技術によるべきである。

本ガイドラインにおけるクラス2溶媒の許容ばく露レベルは、医薬品中のばく露限度値設定の手順 (Pharmacopieal Forum, Nov-Dec 1989) 及び、有害化学物質評価のための国際化学物質安全性計画 (IPCS) (環境保健クライテリア 170、WHO、1994) において採用された方法に従い、PDE 値を計算することによって設定された。これらの方法は USEPA (IRIS) や USFDA (Red Book) 他で用いられているものと同様の方法である。PDE 値の由来をよりよく理解するために、ここで本方法の概略を述べる。本文中、(4) の表にある PDE 値を使用する場合には、これらの計算を実施する必要はない。

PDE 値は、以下のとおり、最も信頼性の高い動物試験における最大無作用量 (NOEL) 又は最小作用量 (LOEL) から導かれる。

$$PDE = \frac{NOEL \times \text{体重補正}}{F1 \times F2 \times F3 \times F4 \times F5} \quad (1)$$

PDE 値は NOEL から求める方が好ましい。もし、NOEL が無い場合には LOEL を用いても構わない。ここに提示された修正係数は、データをヒトに関連づけるためのものであり、環境保健クライテリア (Environmental Health Criteria 170, World Health Organization, Geneva, 1994) で用いられている "不確定係数、や薬局方フォーラム中の "修正係数、又は "安全係数、と同種のものである。100 % 全身ばく露されるという仮定は、投与ルートにかかわらず、全ての計算において用いられる。

- 3) 残留溶媒は、医薬品の製造プロセスにおいて避け難い成分であり、しばしば製剤の一部となりうるものである。
- 4) 残留溶媒は例外的な状況の場合を除き、勧告されたレベルを超えてはならず、それは正当化されるべきである。
- 5) 残留溶媒の許容レベルを決定する毒性試験データは、OECD、EPA あるいは FDA Red Book に記述されているものに限定する必要はないが、それらを含む適切なプロトコールを用いて出されるべきである。

付属書3 ばく露限度値の設定法

クラス1の発がん性溶媒のリスク評価方法としては、Gaylor-Kodellの方法が適当である (Gaylor, D. W. and Kodell, R. L. Linear Interpolation algorithm for low dose assessment of toxic substance. J. Environ. Pathology, 4,305, 1980)。信頼すべき発がん性データがある場合にのみ、数学的モデルを用いた外挿を、ばく露限度値の設定に適用すべきである。クラス1溶媒のばく露限度値は、最大無作用量 (NOEL) に関して大きな安全係数 (即ち、10,000 ないし 100,000) を用いることにより決定され得る。これらの溶媒の検出・定量は、最新の分析技術によるべきである。

本ガイドラインにおけるクラス2溶媒の許容ばく露レベルは、医薬品中のばく露限度値設定の手順 (Pharmacopieal Forum, Nov-Dec 1989) 及び、有害化学物質評価のための国際化学物質安全性計画 (IPCS) (環境保健クライテリア 170、WHO、1994) において採用された方法に従い、PDE 値を計算することによって設定された。これらの方法は USEPA (IRIS) や USFDA (Red Book) 他で用いられているものと同様の方法である。PDE 値の由来をよりよく理解するために、ここで本方法の概略を述べる。本文中、(4) の表にある PDE 値を使用する場合には、これらの計算を実施する必要はない。

PDE 値は、以下のとおり、最も信頼性の高い動物試験における最大無作用量 (NOEL) 又は最低作用量 (LOEL) から導かれる。

$$PDE = \frac{NOEL \times \text{標準体重}}{F1 \times F2 \times F3 \times F4 \times F5} \quad (1)$$

PDE 値は NOEL から求める方が好ましい。もし、NOEL が無い場合には LOEL を用いても構わない。ここに提示された修正係数は、データをヒトに関連づけるためのものであり、環境保健クライテリア (Environmental Health Criteria 170, World Health Organization, Geneva, 1994) で用いられている "不確定係数、や薬局方フォーラム中の "修正係数、又は "安全係数、と同種のものである。100 % 全身ばく露されるという仮定は、投与ルートにかかわらず、全ての計算において用いられる。

修正係数は、以下のとおりである。

F 1 = 種間の外挿を説明するための係数

F 1 = ラットからヒトへの外挿には 5

F 1 = マウスからヒトへの外挿には 12

F 1 = イヌからヒトへの外挿には 2

F 1 = ウサギからヒトへの外挿には 2.5

F 1 = サルからヒトへの外挿には 3

F 1 = 他の動物からヒトへの外挿には 10

F 1 は、考慮する種と人の表面積：体重の比を比較し、考慮している。表面積 (S) は、次のように計算される。

$$S = kM^{0.67}$$

式中、M = 体重、定数 k は 10 をとる。式で用いられた体重は、表 A3-1 に示す。

F 2 = 個体間の変動を説明するための係数 10

係数 10 は、通常、全ての有機溶媒に適用し、本ガイドラインでは、常に用いる。

F 3 = 短期間ばく露の毒性試験を説明するための変数

F 3 = 寿命の 1/2 (げっ歯類又はウサギでは 1 年：猫、犬及び猿では 7 年)

以上の期間の試験には 1

F 3 = 器官形成のすべての期間をカバーする生殖毒性試験には 1

F 3 = げっ歯類で 6 か月の試験又は非げっ歯類で 3.5 年の試験には 2

F 3 = げっ歯類で 3 か月の試験又は非げっ歯類で 2 年の試験には 5

F 3 = より短期間の試験には 10

すべての事例において、中間の期間での試験には、より高い係数が用いられる。

例えば、げっ歯類で 9 か月の試験には 2

F 4 = 重篤な毒性、たとえば、遺伝毒性を伴わない発がん性、神経毒性又は催奇形性の場合に適用される係数。生殖毒性試験の場合には以下の係数が用いられる。

F 4 = 母体毒性を伴う胎児毒性には 1

F 4 = 母体毒性を伴わない胎児毒性には 5

F 4 = 母体毒性を伴う催奇形性には 5

F 4 = 母体毒性を伴わない催奇形性には 10

F 5 = 最大無作用量が確立していない場合に適用される変数

LOEL しか得られない場合、毒性試験の重篤度により、最大 10 の係数が用いられる。

体重補正では、男女とも成人の体重は、50 kg と仮定している。この比較的低い体重は、この手の計算によく用いられる 60 kg 又は 70 kg の標準体重に、付加的な安全係数を与える。50 kg 未満の成人患者がいることは認められている。：これら

修正係数は、以下のとおりである。

F 1 = 種間の外挿を説明するための係数

F 1 = ラットからヒトへの外挿には 5

F 1 = マウスからヒトへの外挿には 12

F 1 = イヌからヒトへの外挿には 2

F 1 = ウサギからヒトへの外挿には 2.5

F 1 = 他の動物からヒトへの外挿には 10

F 1 は、相対的な表面積：関与する種及び人の体重比、を考慮している。表面積 (S) は、次のように計算される。

$$S = kM^{0.67}$$

式中、M = 体重、定数 k は 10 をとる。式で用いられた体重は、表 A3-1 に示す。

F 2 = 個々の変動を説明するための係数 10

係数 10 は、通常、全ての有機溶媒に適用し、本ガイドラインでは、常に用いる。

F 3 = 短期間ばく露の毒性試験を説明するための変数

F 3 = 寿命の 1/2 (げっ歯類又はウサギでは 1 年：猫、犬及び猿では 7 年)

以上の期間の試験には 1

F 3 = 発がん性試験 (organogenesis) すべての期間をカバーする生殖毒性試験には 1

F 3 = げっ歯類で 6 か月の試験又は非げっ歯類で 3.5 年の試験には 2

F 3 = げっ歯類で 3 か月の試験又は非げっ歯類で 2 年の試験には 5

F 3 = より短期間の試験には 10

すべての事例において、中間の期間での試験には、より高い係数が用いられる。

例えば、げっ歯類で 9 か月の試験には 2

F 4 = 重篤な毒性の場合に適用される係数。生殖毒性試験の場合には以下の係数が用いられる。

F 4 = 母体毒性を伴う胎児毒性には 1

F 4 = 母体毒性を伴わない胎児毒性には 5

F 4 = 母体毒性を伴う催奇形効果には 5

F 4 = 母体毒性を伴わない催奇形効果には 10

F 5 = 最大無作用量が確立していない場合に適用される変数

LOEL のみが利用できる場合、毒性試験の結果により、最大 10 の係数が用いられる。

体重補正では、男女とも成人の体重は、50 kg と仮定している。この比較的低い体重は、この手の計算によく用いられる 60 kg 又は 70 kg の標準体重に、付加的な安全性係数を与える。50 kg 以下の成人患者がいることは認められている。：これら

の患者は、PDE を決定するために用いられたもともと含まれている安全係数によって適合すると考えられる。

この方程式の適用例として、Pharmeuropa, Vol.9, No.1, Supplement, April 1997, page S24 に要約されているアセトニトリルのマウスの毒性試験について考察する。NOEL は計算の結果 $50.7 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ である。この試験におけるアセトニトリルの PDE 値は以下のように計算される。

$$\text{PDE} = \frac{50.7 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1} \times 50 \text{ kg}}{12 \times 10 \times 5 \times 1 \times 1} = 4.22 \text{ mg day}^{-1}$$

$$12 \times 10 \times 5 \times 1 \times 1$$

この例においては、

- F 1 = マウスからヒトへの外挿を説明するため 12
- F 2 = ヒトの個体差を説明するため 10
- F 3 = 試験期間が 13 週間であるため 5
- F 4 = 重篤な毒性が見られないため 1
- F 5 = 最大無作用量が得られているため 1

表 A3-1 本文中の計算において用いられている値
(略)

吸入試験におけるガスの濃度を ppm の単位から mg/L 又は mg/m³ 単位へ変換するために、理想気体の状態方程式 (PV = nRT) が用いられる。Pharmeuropa, Vol.9, No.1, Supplement, April 1997, page S9 に要約されている四塩化炭素 (分子量 153.84) の吸入による生殖毒性試験を例として以下に考察する。

3~9 (略)

9-1 ヒト食品中残留動物用医薬品の安全性を評価する試験

(1) ~ (7) (略)

(8) 微生物学的一日許容摂取量 (ADI) 設定の一般的アプローチ (VICH GL36)

ア 緒言

(ア) 目的

ヒト食品中残留動物用医薬品の安全性を確立するために、様々な毒性学的評価が行われる。動物用抗菌剤について調べる必要のある課題として、ヒト腸内菌叢に対する残留物の安全性がある。このガイドラインの目的は、a) 微生物学的一日許容摂取量 (ADI) 設定の必要性を決定するステップを概説すること、b) 健康上の懸念に対するエンドポイントを決定するための有害な影響が観察されない濃度 (NOAEC; no-observable adverse effect concentration、無毒性濃度) と有害な影響が観察されないレベル (NOAEL;

らの患者は、PDE を決定するために用いられたもともと含まれている安全係数によって適合すると考えられる。

この方程式の適用例として、Pharmeuropa, Vol.9, No.1, Supplement, April 1997, page S24 に要約されているアセトニトリルのマウスの毒性試験について考察する。NOEL は計算の結果 $50.7 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ である。この試験におけるアセトニトリルの PDE 値は以下のように計算される。

$$\text{PDE} = \frac{50.7 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1} \times 50 \text{ kg}}{12 \times 10 \times 5 \times 1 \times 1} = 4.22 \text{ mg day}^{-1}$$

$$12 \times 10 \times 5 \times 1 \times 1$$

この例においては、

- F 1 = マウスからヒトへの外挿を説明するため 12
- F 2 = 個々のヒトの間の相違を説明するため 10
- F 3 = 試験期間が 13 週間であるため 5
- F 4 = 重篤な毒性が見られないため 1
- F 5 = 最大無作用量が計算されていないため 1

表 A3-1 本文中の計算において用いられている値
(略)

吸入試験におけるガスの濃度を ppm の単位から mg/L 又は mg/m³ 単位へ変換するために、理想気体の常態方程式 (PV = nRT) が用いられる。Pharmeuropa, Vol.9, No.1, Supplement, April 1997, page S9 に要約されている四塩化炭素 (分子量 153.84) の吸入による生殖毒性試験を例として以下に考察する。

3~9 (略)

9-1 ヒト食品中残留動物用医薬品の安全性を評価する試験

(1) ~ (7) (略)

(8) 微生物学的一日許容摂取量 (ADI) 設定の一般的アプローチ (VICH GL36)

ア 緒言

(ア) 目的

ヒト食品中残留動物用医薬品の安全性を確立するために、様々な毒性学的評価が行われる。動物用抗菌剤について調べる必要のある課題として、ヒト腸内菌叢に対する残留物の安全性がある。このガイドラインの目的は、a) 微生物学的一日許容摂取量 (ADI) 設定の必要性を決定するステップを概説すること、b) 健康上の懸念に対するエンドポイントを決定するための有害な影響が観察されない濃度 (NOAEC; non-observable adverse effect concentration、無毒性濃度) と有害な影響が観察されないレベル (NOAEL;

no-observable adverse effect level 無毒性量) を決める試験系と方法を勧告すること、及び c) 微生物学的 ADI を決定する手順を勧告することである。別の試験が有用かもしれないことも認められる。勧告する試験から得られた経験によって、いずれこのガイドラインとその勧告が変更されることがある。

(イ) 背景

腸内菌叢は、個体の健康の維持と保護に重要な役割を果たしている。この菌叢は、宿主に対して a) 内因性及び外因性化合物並びに食餌成分の代謝、b) 後で吸収される化合物の生産、及び c) 病原性微生物の侵入とコロニー形成に対する防御などの重要な機能を提供している。

摂取された抗菌剤は、腸内菌叢の生態を変化させる可能性がある。これらは吸収不完全なために、あるいは吸収され、体内を循環した後で胆汁中に排泄されるか又は腸粘膜から分泌されて、結腸に到達することがある。

微生物学的 ADI を設定する場合に考慮すべき、現在の公衆衛生上の懸念となる微生物学的エンドポイントは以下のとおりである：

定着障壁の崩壊：定着障壁 (colonization barrier) とは、外来微生物の結腸における定着並びに内因性の潜在性病原菌の過剰増殖を制限する正常腸内菌叢の機能である。一部の抗菌剤がこの障壁を崩壊させる能力はよく明らかにされており、ヒトの健康に影響することが知られている。

耐性菌のポピュレーション増加：このガイドラインの目的から、耐性を試験薬又は他の抗菌剤に非感受性である腸管内細菌のポピュレーションの増加と定義する。この影響は、以前は感受性であった微生物による耐性の獲得、又はその薬剤に既に感受性が低くなっている微生物のポピュレーションの相対的増加によるらしい。

広範囲に文献をレビューしたが、正常なヒト腸内菌叢における抗菌剤耐性菌の比率が変化した結果として生じるヒトの健康に対する影響（例えば、抗菌剤治療の延長、入院日数の延長、感染し易さ、治療の失敗など）の報告は見られなかった。しかし、微生物の生態学についての見解に基づけば、このような影響を除外することはできない。

食品中残留抗菌剤のヒト腸内菌叢に及ぼす影響は、長年にわたって懸念されていたが、この菌叢に有害な妨害をもたらすであろう閾値用量を定める統一的なアプローチはなかった。国際規制機関は、ヒト腸内細菌に対する最小発育阻止濃度 (MIC) に基づいて、微生物学的 ADI を数式で出す方法を用いてきた。腸内菌叢の複雑さのために、この数式には伝統的に不確定係数が取り込まれてきた。しかし、これらの不確定係数の使用は、控え目な推定値をもたらすので、これらの係数を用いずに微生物学的 ADI のもっと実際の推定を可能にするより適切な試験系が考えられた。

このガイドラインは、ヒト腸内菌叢の複雑さに対応して、微生物学的 ADI

no-observable adverse effect level 無毒性量) を決める試験系と方法を勧告すること、及び c) 微生物学的 ADI を決定する手順を勧告することである。別の試験が有用かもしれないことも認められる。勧告する試験から得られた経験によって、いずれこのガイドラインとその勧告が変更されることがある。

(イ) 背景

腸内菌叢は、個体の健康の維持と保護に重要な役割を果たしている。この菌叢は、宿主に対して a) 内因性及び外因性化合物並びに食餌成分の代謝、b) 後で吸収される化合物の生産、及び c) 病原性微生物の侵入とコロニー形成に対する防御などの重要な機能を提供している。

摂取された抗菌剤は、腸内菌叢の生態を変化させる可能性がある。これらは吸収不完全なために、あるいは吸収され、体内を循環した後で胆汁中に排泄されるか又は腸粘膜から分泌されて、結腸に到達することがある。

微生物学的 ADI を設定する場合に考慮すべき、現在の公衆衛生上の懸念となる微生物学的エンドポイントは以下のとおりである：

定着障壁の崩壊：定着障壁 (colonization barrier) とは、外来微生物の結腸における定着並びに内因性の潜在性病原菌の過剰増殖を制限する正常腸内菌叢の機能である。一部の抗菌剤がこの障壁を崩壊させる能力はよく明らかにされており、ヒトの健康に影響することが知られている。

耐性菌のポピュレーション増加：このガイドラインの目的から、耐性を試験薬又は他の抗菌剤に非感受性である腸管内細菌のポピュレーションの増加と定義する。この影響は、以前は感受性であった微生物による耐性の獲得、又はその薬剤に既に感受性が低くなっている微生物のポピュレーションの相対的増加によるらしい。

広範囲に文献をレビューしたが、正常なヒト腸内菌叢における抗菌剤耐性菌の比率が変化した結果として生じるヒトの健康に対する影響（例えば、抗菌剤治療の延長、入院日数の延長、感染し易さ、治療の失敗など）の報告は見られなかった。しかし、抗菌剤に対する耐性の発現は世界的な懸念になっていることから、このエンドポイントを考慮する責務がある。明らかにこの領域の研究は必要である。

食品中残留抗菌剤のヒト腸内菌叢に及ぼす影響は、長年にわたって懸念されていたが、この菌叢に有害な妨害をもたらすであろう閾値用量を定める統一的なアプローチはなかった。国際規制機関は、ヒト腸内細菌に対する最小発育阻止濃度 (MIC) に基づいて、微生物学的 ADI を数式で出す方法を用いてきた。腸内菌叢の複雑さのために、この数式には伝統的に不確定係数が取り込まれてきた。しかし、これらの不確定係数の使用は、控え目な推定値をもたらすので、これらの係数を用いずに微生物学的 ADI のもっと実際の推定を可能にするより適切な試験系が考えられた。

を決定する際の不確定さを減らす試みである。このガイドラインは、微生物学的 ADI の必要性を決定するための過程を概説し、ヒト腸内菌叢の複雑さを考慮に入れた試験系について考察する。これらの試験系は、規制の目的でヒト腸内菌叢に及ぼす残留抗菌剤の影響を取り扱うために用いることができる。

このガイドラインで考察する全ての試験系の信頼性と確実性を確認するには、さらなる研究が必要であるからことから（付記A参照）、このガイドラインはいずれか一つの試験系を規制目的の意思決定のために用いることを推奨しない。このガイドラインは、そうではなく、微生物学的 ADI を設定するためのハーモナイズした方法を勧告し、試験法を特定せずに試験の選択肢を提起する。

(ウ) 適用範囲

(略)

イ ガイドライン

食料生産動物に使用する抗菌活性を有する薬剤の試験は、それらの残留物の安全性に対処すべきである。微生物学的 ADI の算出は、残留物がヒトの結腸に到達し、微生物学的活性がある場合にのみ必要である。

(ア) 微生物学的 ADI の必要性を決定するステップ

微生物学的 ADI の必要性を決定する場合には、以下の一連のステップによることが勧められる。データは実験的に、又は公表された文献のような適切な情報源から得られるかもしれない。

ステップ1. 薬剤及び（又は）その代謝物の残留物は、ヒト腸内菌叢の代表的細菌に対して微生物学的に活性があるか。

・推奨されるデータ：

- 以下の腸内細菌に関連する属 (*E. coli*, 及び *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Eubacterium* (*Collinsella*), *Fusobacterium*, *Lactobacillus*, *Peptostreptococcus/Peptococcus* の菌種) について得られた標準的試験法による MIC データ

- これらの細菌の相対的重要性の理解は不完全であり、これらの細菌の分類学的位置が変わり得ることが認められている。細菌の選択には最新の科学的知識を考慮すべきである。

・情報が入手できない時には、その化合物及び（又は）その代謝物は微生物学的に活性があると仮定する。

ステップ2. 残留物はヒトの結腸に入るか。

・推奨されるデータ：

- 吸収、分布、代謝、排泄 (ADME)、生物学的利用能 (bioavailability)、

このガイドラインは、ヒト腸内菌叢の複雑さに対応して、微生物学的 ADI を決定する際の不確定係数を減らす試みである。このガイドラインは、微生物学的 ADI の必要性を決定するための過程を概説し、ヒト腸内菌叢の複雑さを考慮に入れた試験系について考察する。これらの試験系は、規制の目的でヒト腸内菌叢に及ぼす残留抗菌剤の影響を取り扱うために用いることができる。

このガイドラインで考察する全ての試験系の信頼性と確実性を確認するには、さらなる研究が必要であるからことから（付記A参照）、このガイドラインはいずれか一つの試験系を規制的意思決定のために用いることを推奨しない。このガイドラインは、そうではなく、微生物学的 ADI を設定するためのハーモナイズした方法を勧告し、試験法を特定せずに試験の選択肢を提起する。

(ウ) 適用範囲

(略)

イ ガイドライン

食料生産動物に使用する抗菌活性を有する薬剤の試験は、それらの残留物の安全性に対処すべきである。抗菌活性残留物質がヒトの結腸に到達しない場合には、標準的な毒性学的試験からのデータを用いて ADI を算出すべきである。

(ア) 微生物学的 ADI の必要性を決定するステップ

微生物学的 ADI の必要性を決定する場合には、以下の一連のステップによることが勧められる。データは実験的に、公表された文献又はその他の情報源から得られるかもしれない。

ステップ1. 薬剤及び（又は）その代謝物の残留物は、ヒト腸内菌叢の代表的細菌に対して微生物学的に活性があるかどうかを調べる。

・推奨されるデータ：

- 以下の腸内細菌に関連する属 (*E. coli*, 及び *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Eubacterium* (*Collinsella*), *Fusobacterium*, *Lactobacillus*, *Peptostreptococcus/Peptococcus* の菌種) について得られた標準的試験法による MIC データ

- これらの細菌の相対的重要性の理解は不完全であり、これらの細菌の分類学的位置が変わり得ることが認められている。細菌の選択には現時点の科学的知識を考慮すべきである。

・情報が入手できない時には、その化合物及び（又は）その代謝物は微生物学的に活性があると仮定する。

ステップ2. 残留物はヒトの結腸に入るかどうかを調べる。

・推奨されるデータ：

- 吸収、分布、代謝、排泄 (ADME)、生物学的利用能 (bioavailability)、

又は類似の (similar) データが、結腸内に入ることになる摂取された残留物のパーセンテージに関する情報を提供することがある。

・ヒトにおける情報が入手できなければ、適切な動物のデータを利用する。情報を入手できない場合には、摂取された残留物の 100 % が結腸内に入ると仮定すべきである。

ステップ 3. ヒト結腸内に入る残留物に、微生物学的活性が残っているか。

・推奨されるデータ：

- 糞便と一緒に培養する薬剤の *in vitro* 不活化試験から微生物学活性の消失を示すデータあるいは動物の糞便又は結腸内容物中の薬物の微生物学的活性を評価する *in vivo* 試験からのデータ。

1、2、又は3のステップのいずれかの質問に対する回答が“いいえ”であれば、ADI は微生物学的エンドポイントに基づかないので、以下のステップに対応する必要はない。

ステップ 4. 懸念のエンドポイントのいずれか一つ又は両方を試験する必要性を排除する科学的妥当性があるかどうかを調べる。定着障壁の崩壊及びその薬剤に対する耐性出現に関する入手可能な情報を考慮する。入手可能な情報によって判断ができなければ、両方のエンドポイントを調べる必要がある。

ステップ 5. ステップ 4 で定められた懸念のエンドポイントの NOAECs/NOAELs を決定する。最も適切な NOAEC/NOAEL を微生物学的 ADI の決定に用いる。

(イ) 懸念のエンドポイントの NOAECs 及び NOAELs を決定するための勧告

① 定着障壁の崩壊

a 定着障壁崩壊の検出
(略)

b 試験系と試験設計

(a) *in vitro* 試験

ある薬剤が定着障壁を崩壊させる可能性を評価するのに MICs を用いる方法は、ヒト腸内菌叢の複雑性を考慮していない。したがって、その薬剤が活性を示す最も適切な属の MIC50 (イの (ア) 参照) は、定着障壁の崩壊を示す NOAEC の控え目な推定値になる。この NOAEC の推定値は、他にも理由があるが、特に接種菌量の桁数が腸管内の細菌のポピュレーションより低いことによって、控えめになる 1)。したがって、これは ADI 設定の選択肢の一つと考える程度のものであろう。分離菌株は複数の健康なヒトから、イの (ア) に示した属のそれぞれについて少なくとも 10 株を含むようにすべきである。

又は関連するデータが、結腸内に入ることになる摂取された残留物のパーセンテージに関する情報を提供することがある。

・ヒトにおける情報が入手できなければ、適切な動物のデータを利用する。情報を入手できない場合には、摂取された残留物の 100 % が結腸内に入ると仮定すべきである。

ステップ 3. ヒト結腸内に入る残留物に、微生物学的活性が残っているかどうかを調べる。

・推奨されるデータ：

- 糞便と一緒に培養する薬剤の *in vitro* 不活化試験から微生物学活性の消失を示すデータあるいは動物の糞便又は結腸内容物に薬物の微生物学的活性のあることを評価する *in vivo* 試験からのデータ。

1、2、又は3のステップのいずれかの質問に対する回答が“いいえ”であれば、ADI は微生物学的エンドポイントに基づかないので、以下のステップに対応する必要はない。

ステップ 4. 懸念のエンドポイントのいずれか一つ又は両方を試験する必要性を排除する科学的妥当性があるかどうかを調べる。コロニー形成バリアの崩壊及びその薬剤に対する耐性出現に関する入手可能な情報を考慮する。入手可能な情報によって判断ができなければ、両方のエンドポイントを調べる必要がある。

ステップ 5. ステップ 4 で定められた懸念のエンドポイントの NOAECs/NOAELs を決定する。最も適切な NOAEC/NOAEL を微生物学的 ADI の決定に用いる。

(イ) 懸念のエンドポイントの NOAECs 及び NOAELs を決定するための勧告

① 定着障壁の崩壊

a 定着障壁崩壊の検出
(略)

b 試験系と試験設計

(a) *in vitro* 試験

ある薬剤が定着障壁を崩壊させる可能性を評価するのに MICs を用いる方法は、ヒト腸内菌叢の複雑性を考慮していない。したがって、その薬剤が活性を示す最も適切な属の MIC50 (アの (イ) 参照) は、定着障壁の崩壊を示す NOAEC の控え目な推定値になる。この NOAEC の推定値は、他にも理由があるが、特に接種菌量の桁数が腸管内の細菌のポピュレーションより低いことによって、控えめになる 1)。したがって、これは ADI 設定の選択肢の一つと考える程度のものであろう。分離菌株は複数の健康なヒトから、アの (イ) に示した属のそれぞれについて少なくとも 10 株を含むようにすべき

(略)

(b) *in vivo* 試験

ヒト菌叢定着 (human flora-associated ; HFA) 及び普通 (conventional) 実験動物を用いる *in vivo* 試験系は、定着障壁の崩壊を評価するには適当かもしれない。普通実験動物と比較すると、HFA 動物の腸内菌叢は細菌ポピュレーションの範囲と代謝活性の両方ですべてヒトの腸内菌叢に近い。しかし、ヒト由来の腸内菌叢は HFA 動物体内で安定しないことがある。移植菌叢の安定性、及びその菌叢の個々の組成の相対的重要性は不明である。技術的な理由から、普通実験動物は多数で試験ができ、結果についてより頑健な統計的分析が可能である。

試験設計には動物種、性別、提供者からの接種材料のばらつき、動物数/群、食餌、処置群の無作為化、糞食の最小化/排除、アイソレーター内の動物の囲い、アイソレーター内の相互汚染及び投与経路 (例えば強制経口、飲水添加) のような因子を考慮すべきである。無菌動物に、まず *Bacteroides fragilis* を 1 株接種し、次いで糞便を接種すべきである。

② ヒト結腸内耐性菌ポピュレーションの増加 (アの (イ) で定義)

以下のガイダンスには、このエンドポイントを求める際に考慮が必要なことを特記する。

a 耐性菌ポピュレーションの変化の検出

耐性出現を評価する試験では、腸管内において懸念される微生物とその系統の抗菌剤に認められている耐性機序を考慮すべきである。ヒト腸内菌叢における耐性の趨勢に関する予備的情報、例えば各個体の日間変動や個体間の変動が、耐性出現を評価するための基準の作成に有益なことがある。懸念される感受性及び既知の耐性菌の MIC 分布は、糞便サンプル中の耐性菌を計数するため、どの程度の薬剤濃度を選択寒天培地に使用すべきかを決定するに当たっての基礎に用いることができる。微生物に対する薬剤の活性は試験条件によって異なるので、選択培地上に発育する微生物の MIC は標準法 (例えば National Committee for Clinical Laboratory Standard [NCCLS]²³) によって測定した MIC と比較すべきである。処置前、処置の間及び処置後における耐性菌ポピュレーションの変化は、表現型法及び分子的方法を用いて、抗菌剤を含む培地と含まない培地における計数手法で評価できる。

抗菌剤耐性の変化は、薬剤ばく露以外の因子 (例えば動物のスト

である。

(略)

(b) *in vivo* 試験

ヒト菌叢定着 (human flora-associated ; HFA) 及び普通 (conventional) 実験動物を用いる *in vivo* 試験系は、定着障壁の崩壊を評価するには適当かもしれない。普通実験動物と比較すると、HFA 動物の腸内菌叢は細菌ポピュレーションと代謝活性の両方ですべてヒトの腸内菌叢に近い。しかし、ヒト由来の腸内菌叢は HFA 動物体内で安定しないことがある。移植菌叢の安定性、及びその菌叢の個々の組成の相対的重要性は不明である。技術的な理由から、普通実験動物は多数で試験ができ、ずっと頑健な統計的分析が可能である。

試験設計には動物種、性別、提供者からの接種材料のばらつき、動物数/群、食餌、処置群の無作為化、糞食の最小化/排除、アイソレーター内の動物の囲い、アイソレーター内の相互汚染及び投与経路 (強制経口か、飲水添加か) のような因子を考慮すべきである。無菌動物に、まず *Bacteroides fragilis* を 1 株接種し、次いで糞便を接種すべきである。

② ヒト結腸内耐性菌ポピュレーションの増加 (アの (イ) で定義)

a 耐性菌ポピュレーションの変化の検出

耐性出現を評価する試験では、腸管内において懸念される微生物とその系統の抗菌剤に認められている耐性機序を考慮すべきである。ヒト腸内菌叢における耐性の趨勢に関する予備的情報、例えば各個体の日間変動や個体間の変動が、耐性出現を評価するための基準の作成に有益なことがある。懸念される感受性及び既知の耐性菌の MIC 分布は、糞便サンプル中の耐性菌を計数するため、どの程度の薬剤濃度を選択寒天培地に使用すべきかを決定するに当たっての基礎に用いることができる。微生物に対する薬剤の活性は試験条件によって異なるので、選択培地上に発育する微生物の MIC は標準法 (例えば National Committee for Clinical Laboratory Standard [NCCLS]²³) によって測定した MIC と比較すべきである。処置前、処置の間及び処置後における耐性菌ポピュレーションの変化は、表現型法及び分子的方法を用いて、抗菌剤を含む培地と含まない培地における計数手法で評価できる。

抗菌剤耐性の変化は、薬剤ばく露以外の因子 (例えば動物のスト

レス)に影響されることがあるので、動物試験系ではそれを考慮すべきである。

b 試験系と試験設計

(a) *in vitro* 試験

細菌のポピュレーションにおいて耐性が出現するために要するばく露期間は、薬剤、耐性機序の性質、細菌が本来どのように進化するか(例えば、細胞間の遺伝子伝達による、遺伝子突然変異によるなど)に依存する。これらの理由から、エンドポイントを評価するための純粋培養の急性試験は適当とは思われない。したがって、耐性ポピュレーションの増加についての NOAEC を決定するのに、MIC 試験は使えない。

(略)

糞便スラリーを薬剤に短期ばく露する試験系は、試験期間が耐性ポピュレーションの変化を評価するには不適当なことから、耐性出現試験には推奨されない。

(略)

(b) *in vivo* 試験

(略)

(ウ) 一般的勧告

・ヒト提供者からの糞便サンプル又は分離菌株は、少なくとも3か月間は抗菌剤のばく露を受けたことのないことが分かっている健康者から入手すべきである。

・*in vivo* 試験の場合には、a) 最大限の独立した繰り返し、b) 分析のために十分な量の糞便の採取、及びc) 最小限の糞食、を可能にする試験動物種を選択すべきである。1つの性が適切であるということを示すデータがない場合には両性の評価を検討すべきである。

・残留抗菌剤の試験を設計する際に統計的手法が明記される必要がある(付記Bを参照)。

・OECDが1996年4から開発しているようなプレーバリデーション及びバリデーションの過程は、ヒト腸内菌叢に及ぼす抗菌剤の影響を評価する試験系のその後のバリデーションのために考慮されるべきである。その手順はバリデートされる試験系に従ってこれを使用するために適合され、改変されるべきである。

・試験計画は、保存及び培養の条件が糞便接種に及ぼす影響という未解決の問題を考慮に入れるべきである。

(エ) 微生物学的 ADI の算出

(略)

レス)に影響されることがあるので、動物試験系ではそれを考慮すべきである。

b 試験系と試験設計

(a) *in vitro* 試験

細菌のポピュレーションにおいて耐性が出現するために要するばく露期間は、薬剤、耐性機序の性質、いかに性状が進化するか(例えば、細胞間の遺伝子伝達による、遺伝子突然変異によるなど)に依存する。これらの理由から、エンドポイントの評価するための純粋培養の急性試験は適当とは思われない。したがって、耐性ポピュレーションの増加についての NOAEC を決定するのに、MIC 試験は使えない。

(略)

糞便スラリーを薬剤に短期ばく露する試験系は、試験期間が耐性ポピュレーションの変化を評価するには不適当なことから、耐性出現試験には奨められない。

(略)

(b) *in vivo* 試験

(略)

(ウ) 一般的勧告

・ヒト提供者からの糞便サンプル又は分離菌株は、少なくとも3か月間は抗菌剤のばく露を受けたことのないことが分かっている健康者から入手すべきである。

・*in vivo* 試験の場合には、a) 最大限の独立した繰り返し、b) 両性での試験、c) 分析のために十分量の糞便の採取、及びd) 最小限の糞食、を可能にする試験動物種を選択すべきである。

・残留抗菌剤の試験を設計する際に考慮すべき統計的問題は、一般毒性試験のそれと明らかに相違する(付記Bを参照)。

・OECDが1996年3から開発しているようなプレーバリデーション及びバリデーションの過程は、ヒト腸内菌叢に及ぼす抗菌剤の影響を評価する試験系のその後のバリデーションのために考慮されるべきである。その手順はバリデートされる試験系に従ってこれを使用するために適合され、改変されるべきである。

(エ) 微生物学的 ADI の算出

(略)

① 定着障壁の崩壊
(略)

MICcalc : 付記 C に示すように、MICcalc は、試験薬に活性のある最も関連のある属の平均 MIC₅₀ の 90 %信頼限界の下限値から導く。

(略)

NOAEC : NOAEC は、*in vitro* 試験系の平均 NOAEC の 90 %信頼限界の下限値から導き、データのばらつきの説明に使用すべきである。したがって、この式には、微生物学的 ADI を算出するための不確定係数は一般には必要とされない。

(略)

微生物が利用する経口用量分画 : 結腸内微生物が利用する経口用量の分画は、薬剤を経口投与した後の *in vivo* 測定値に基づくべきである。さもなければ、十分なデータがある場合には、結腸内微生物菌が利用する用量分画を、1 尿中に排泄された (経口投与量の) 分画として計算できる。ヒトのデータが好ましいが、もしなければ、2 種以上の反芻動物以外の動物のデータでもよい。代謝物の抗菌活性を否定できるデータがない場合には、代謝物は親化合物と等しい抗菌活性を持つと仮定する。申請者が腸管通過中にその薬剤が不活化されることを示す定量的な *in vitro* 又は *in vivo* データを提出すれば、この分画を少なくすることができよう。

b *in vivo* データからの ADI 算出

微生物学的 ADI は NOAEL を不確定係数で除して算出する。

in vivo 試験での不確定係数は、化合物の系統、プロトコール、提供者の数、及び測定した結果変数の感度を考慮して、適切に設定すべきである。

② 耐性菌ポピュレーションの増加

a *in vitro* データからの ADI 算出

(略)

b *in vivo* データからの ADI 算出

微生物学的 ADI は NOAEL を不確定係数で除して算出する。

in vivo 試験での不確定係数は、化合物の系統、プロトコール、提供者の数、及び測定した結果変数の感度を考慮して、適切に設定す

① 定着障壁の崩壊
(略)

MICcalc : 試験薬に活性のある最も関連のある属 (少なくとも 10 分離株/属) の平均 MIC₅₀ の 10 %信頼限界の低い方の片側の値。ほとんど/全ての菌株又は分離菌株がその試験薬に本来耐性である属の MIC₅₀ は、計算に含めてはならない。関連する細菌属については、イの (ア) のリストを参照されたい。この方法は、異なる細菌属間の MIC₅₀ が必ずしも正規分布しないことが認められているが、推奨される。

(略)

NOAEC : これらの試験系の平均 NOAEC の 10 %信頼限界の低い方の片側の値を、データのばらつきの説明に使用すべきである。したがって、この式には、微生物学的 ADI を算出するための不確定係数は一般には必要とされない。

(略)

微生物が利用する経口用量分画 : 結腸内微生物が利用する経口用量の分画は、薬剤を経口投与した後の *in vivo* 測定値に基づくべきである。さもなければ、十分なデータがある場合には、結腸内微生物菌が利用する用量分画を、1 尿中に排泄された (経口投与量の) 分画として計算できる。ヒトのデータが好ましいが、2 種以上の動物のデータでもよい。データが欠如している場合には、代謝物は親化合物と同じ抗菌活性を持つと仮定する。申請者が腸管通過中にその薬剤が不活化されることを示す定量的な *in vitro* 又は *in vivo* データを提出すれば、この分画を下げることができよう。

b *in vivo* データからの ADI 算出

微生物学的 ADI は NOAEL を不確定係数で除して算出する。

in vivo 試験での不確定係数は、化合物の系統、プロトコール、提供者の数、及び測定した結果のばらつきを考慮して、適切に設定すべきである。

② 耐性菌ポピュレーションの増加

a *in vitro* データからの ADI 算出

(略)

b *in vivo* データからの ADI 算出

微生物学的 ADI は NOAEL を不確定係数で除して算出する。

in vivo 試験での不確定係数は、化合物の系統、プロトコール、提供者の数、及び測定した結果のばらつきを考慮して、適切に設定す

べきである。

ウ 用語集

この用語集には本文だけでなく付記中の用語を含む。

(略)

抗菌剤 [Antimicrobial Agent] : 生物学的又は化学的に作られた主たる効果が抗菌活性である薬剤

釣合いのとれた設計 [Balanced Design] : 設計に含まれる全ての因子 (処置因子、性別のような重要な因子、あるいは妨害因子) の値又はレベルの組合せが同じ実験単位又は繰り返しであれば、統計的設計は釣合いがとれている。部分的に釣合いのとれている設計は、釣合いがとれてはいないが、処置とその他の因子の組合せが規則的に生じるので、分析が比較的簡単である。

(略)

完全設計 [Complete Design] : 設計における因子又はグループの全ての組合せが少なくとも 1 回見られる統計的設計は完全である。不完全設計は一部の因子の組合せが見られないものである。

(略)

実験単位 [Experimental Unit] : 処置を行い、測定を行う標準的実験対象。動物全体、又は特定の臓器又は組織、数頭の動物が入っているケージ、細胞培養が例としてあげられる。

因子設計 [Factorial Design] : 処置因子を含む、それぞれ 2 つ以上の値又はレベルを有する多くの因子の組合せを含む実験設計。その他の因子として層化因子 (例えば性別) あるいは阻害因子 (例えばケージ) が含まれることがある。典型的には、結果変数は、様々な因子をそれぞれの組合せレベルとする実験単位の数を基に測定される。データの統計的分析は、多因子分散分析による。

糞便スラリー [Fecal Slurry] : 嫌気性緩衝液で最小限希釈されたヒト糞便又は糞便固形物

(略)

50 % 最少発育阻止濃度 [MIC50] : 適切な属の試験分離菌の 50 % の株の発育を阻止する抗菌剤の濃度

(略)

結果変数 [Outcome Variable] : 実験において測定される特定のパラメーター。特定の結果変数は、プロトコールの一部として規定されなければならない、試験において実際に測定される。

(略)

短鎖脂肪酸 [Short chain Fatty Acid] : 腸内菌叢が生産する炭素原子 2 - 6 個を

べきである。

ウ 用語集

この用語集には本文だけでなく付記中の用語を含む。

(略)

抗菌剤 [Antimicrobial] : 主たる効果として、生物学的又は化学的に作られた抗菌活性のある薬剤

釣合いのとれた設計 [Balanced Design] : 設計に含まれる全ての因子 (処置因子、性別のような重要な因子、あるいは妨害因子) の組合せが同じ回数生じれば、統計的設計は釣合いがとれている。部分的に釣合いのとれている設計は、釣合いがとれてはいないが、処置とその他の因子の組合せが規則的に生じるので、分析が比較的簡単である。

(略)

完全設計 [Complete Design] : 設計における因子の組合せ又はグループが少なくとも 1 回観察される統計的設計は完全である。不完全設計は一部の因子の組合せに観察が行われない。

(略 9)

実験単位 [Experimental Unit] : 処置を行い、測定を行う実験材料の標準量。動物全体、又は特定の臓器又は組織、数頭の動物が入っているケージ、細胞培養又は個々のケモスタットが例としてあげられる。

因子設計 [Factorial Design] : 処置因子を含む、それぞれ 2 段階又はそれ以上の多くの因子の組合せを含む実験設計。その他の因子として層化因子 (例えば性別) あるいは阻害因子 (例えばケージ) が含まれることがある。典型的には、結果のばらつきは、様々な因子をそれぞれの組合せレベルとする実験単位の数を基に測定される。データの統計的分析は、多因子分散分析による。

糞便スラリー [Fecal Slurry] : 希釈されたヒト糞便又は糞便固形物

(略)

50 % 最少発育阻止濃度 [MIC50] : 適切な属の試験分離菌の 50 % の株を発育を阻止する抗菌剤の濃度

(略)

結果のばらつき [Outcome Variable] : 実験において測定される特定のパラメーター。特定の結果のばらつきは、プロトコールの一部として規定されなければならない、試験において実際に測定される。

(略)

短鎖脂肪酸 (SCFA) [Short chain Fatty Acid (SCFA)] : 腸内菌叢が生産する

含む揮発性脂肪酸。主要な酸は、酢酸、プロピオン酸及び酪酸である。

(略)

体系的ばらつき[Systematic Variation] : 結果変数に影響する因子。このようなばらつきは確かに存在する影響を表していることから、体系的である。体系的変動は予測不可能なランダムなばらつきと区別される。体系的ばらつきは性別のような関心の対象である因子に起因することもあり、特定のアイソレーターのようなそうでない因子に起因することもある。

試験系[Test System] : ヒト腸内菌叢に及ぼす抗菌性残留物の影響を明らかにするために用いる方法

不確定係数[Uncertainty Factor] : イの(エ)の①のb、イの(エ)の②のa及びイの(エ)の②のbにおいて述べるとおり、試験データの性質を考慮に入れるための補正係数。

エ 引用文献

1. Cerniglia, C.E., and Kotarski, S. 1999. Evaluation of Veterinary Drug Residues in Food for their Potential to Affect Human Intestinal Microflora. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 29, 231-261.
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 2004. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Anaerobically; Approved Standard ? Sixth Edition. NCCLS document M11-A6. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA, USA.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 2003. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard ? Sixth Edition. NCCLS document M7-A6. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA, USA.
4. OECD. 2001. Series of Testing and Assessment No. 34, Environment, Health and Safety Publications. Draft Guidance Document on the Development, Validation and Regulatory Acceptance of New and Updated Internationally Acceptable Test Methods and Hazard Assessment. Paris.

付記A 試験系開発及びデータの解釈において検討が必要な問題点

1. 実験条件

(略)

抗菌剤感受性はばく露される細菌の菌体の物理的な状態に左右され、試験系で用いる発育条件に左右されよう。このことに基づけば、コロニー形成バリア崩壊及び耐性菌ポピュレーションの増加のNOAECsに及ぼす発育条件の影響を明らかにする検討が更に必要である。

炭素原子2 - 6個を含む揮発性脂肪酸。主要な酸は、酢酸、プロピオン酸及び酪酸である。

(略)

体系的ばらつき[Systematic Variation] : 結果のばらつきに影響する因子。このようなばらつきは確かに存在する影響を表していることから、体系的である。体系的変動は予測不可能なランダムなばらつきと区別される。体系的ばらつきは性別のような関心の対象である因子に起因することもあり、特定のアイソレーターのようなそうでない因子に起因することもある。

試験系[Test System] : ヒト腸内菌叢に及ぼす残留抗菌剤の影響を明らかにするために用いる方法

エ 引用文献

1. Cerniglia, C.E., and Kotarski, S. 1999. Evaluation of Veterinary Drug Residues in Food for their Potential to Affect Human Intestinal Microflora. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 29, 231-261.
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 2000. Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria; Approved Standard - Fifth Edition. NCCLS document M11-A5. NCCLS 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA, USA.
3. OECD. 2001. Series of Testing and Assessment No. 34, Environment, Health and Safety Publications. Draft Guidance Document on the Development, Validation and Regulatory Acceptance of New and Updated Internationally Acceptable Test Methods and Hazard Assessment. Paris.

付記A 試験系開発において検討が必要な問題点

1. 実験条件

(略)

抗菌剤感受性はばく露される細菌の菌体の状態に左右され、試験系で用いる発育条件に左右されよう。このことに基づけば、コロニー形成バリア崩壊及び耐性菌ポピュレーションの増加から得たNOAECsに及ぼす発育条件の影響を明らかにする検討が更に必要である。

in vivo 試験系のプロトコールにおいては多くの因子を考慮すべきである。これらの試験の複雑さと無菌的アイソレーター内で動物試験を実施するに当たっては、交差汚染が主要な問題となる。交差汚染を最小限にするようにプロトコールを設計すべきである。

2. 接種材料 (略)

個体間の菌叢の違いを説明するには、複数の提供者を用いるべきである。プールした接種材料は、個体間の菌叢の違いを説明できない。試験成績を解釈する場合には、提供者の接種材料の構成を考慮すべきである。腸内菌叢に及ぼす残留抗菌剤の影響を明らかにするデータは、個別別に提供者から採取した糞便接種材料を用いる試験系から得ることが好ましい。さらに、試験結果を解釈する際には、提供者の接種材料の組成を考慮にすべきである。

3. 試験期間

糞便バッチ培養における細菌ポピュレーションの変化を監視するための最適な培養時間を明らかにする必要がある。同様に、複雑な長期 *in vitro* 又は *in vivo* 試験系の場合には、腸内菌叢の統合性と複雑性が安定に維持される期間を明らかにすることが重要である。

付記B 抗菌性残留物の試験を設計するときに考慮すべき統計的問題

現在公衆衛生上の懸念とされている二つの一般的なエンドポイントとして、コロニー形成バリアの崩壊と耐性菌ポピュレーションの増加が知られている。実験設計は、これらのどちらを対象にするかによらなければならない。特定の結果変数を考慮すべきである。これらの試験系の設計のパラダイムには、試験系の選択、処置の適用及び試験系の経時的追跡が含まれる。試験系の選択は、その試験系により表されなければならないヒトの消化管の性質に依存する。MIC 試験は設計が単純であるから、以下に考察する問題の多くはこの方法には当てはまらない。

(略)

実験単位にいかなる処置を適用すべきかを決定しなければならない。薬剤処置と細菌攻撃を含む 2 段階処置が必要な場合もある。少なくとも三つの薬剤処置群に加えて適切な対照群を加えるべきである。抗菌剤処置レベルの選択は希望する用量範囲によるが、影響のあるレベルと無影響レベルの両方を含めるべきである。薬剤投与の期間と方法は試験系による。一部の試験で重要な点は経時的な影響の増進であり、結果変数を繰り返し測定する必要があるかもしれない。一般的問題は測定タイミングと間隔及び欠損データに起因するバイアスである。

生物学的ばらつきと測定誤差によるランダムなばらつきのコントロール

in vivo 試験系のプロトコールにおいては多くの因子を考慮すべきである。これらの試験の複雑さとジャームフリーアイソレーター内で動物試験を実施するに当たっては、交差汚染が主要な問題となる。交差汚染を最小限にするようにプロトコールを設計すべきである。

2. 接種材料 (略)

腸内菌叢に及ぼす残留抗菌剤の影響を明らかにするデータは、個別別に提供者から採取した糞便接種材料を用いる試験系から得ることが好ましい。個体間の菌叢の違いを説明するには、複数の提供者を用いるべきである。プールした接種材料は、個体間の菌叢の違いを説明できない。試験成績を解釈する場合には、提供者の接種材料の構成を考慮すべきである。

3. 試験期間

糞便バッチ培養における細菌ポピュレーションの変化を監視するための最適な培養時間を明らかにする必要がある。同様に、複雑な長期 *in vitro* 又は *in vivo* 試験系の場合には、腸内菌叢の統合性と複雑性が安定に維持される期間を明らかにすることが重要である。

付記B 残留抗菌剤の試験を設計するときに考慮すべき統計的問題

現在公衆衛生上の懸念とされている二つの一般的なエンドポイントとして、コロニー形成バリアの崩壊と耐性菌ポピュレーションの増加が知られている。実験設計は、これらのどちらを対象にするかによらなければならない。特定の結果のばらつきを考慮すべきである。これらの試験系の設計のパラダイムには、試験系の選択、処置の適用及び試験系の経時的追跡が含まれる。MIC 試験は設計が単純であるから、以下に考察する問題の多くはこの方法には当てはまらない。

(略)

実験単位にいかなる処置を適用すべきかを決定しなければならない。薬剤処置と細菌攻撃を含む 2 段階処置が必要な場合もある。少なくとも三つの薬剤処置群に加えて適切な対照群を加えるべきである。抗菌剤処置レベルの選択は希望する用量範囲によるが、影響のあるレベルと無影響レベルの両方を含めるべきである。薬剤投与の期間と方法は試験系による。一部の試験で重要な点は経時的な影響の増進であり、結果のばらつきを繰り返し測定する必要があるかもしれない。一般的問題は測定タイミングと間隔及び欠損データに起因するバイアスである。

生物学的ばらつきと測定誤差によるランダムなばらつきのコントロール

は、実験単位の数とサンプル数による。この数は、可能であれば過去の経験から、又はサンプルサイズのコンピューター計算による、その試験系の以前の知識及び結果変数を用いて、決定できる。処置の影響と適切な相互作用、例えば処置の影響の経時的な変化、を正確に測定するために、十分な繰り返しを含めるべきである。試験によっては、このような相互作用を統計的分析の一部として調べることが重要かもしれない。繰り返しの別の形は一つのケージ内の動物からの糞便サンプルのプール又は異なる提供者からの糞便サンプルのプールである。いずれも平均化の利点はあるが、繰り返し間のばらつきを推定する能力がない。プールは（処置及び/又は接種材料）の個々の影響をあいまいにすることがあり、したがってその使用は試験の目的に応じて考慮しなければならない。

付記C MICcalc の計算

薬剤がその菌に対して活性を有する最も関連のある属の平均 MIC₅₀ の 90 %信頼限界の下限値から、MICcalc を算出する。90 %信頼限界の下限値は、対数変換データから計算する。したがって、平均値と標準偏差は、対数変換した MIC₅₀ 値を用いることにより計算される。このことはまた、正確な値を得るためには、90 %信頼限界の下限値を指数変換する必要のあることを意味している。信頼限界の計算式は以下のとおりである：

(略)

適切な属の MIC₅₀ を調べる (イの(ア)参照)。MICcalc は、その化合物に対して本来耐性でない適切な属について得られた値に基づく。したがって、MICcalc はその化合物が活性であるそれらの属の MIC₅₀ に基づくことになる。MICcalc の計算に用いるには、全ての MIC₅₀ 値に不等号が入っていないことを確かめる。

(略)

付記D 微生物が利用可能な経口用量の分画の決定に関する「イ ガイドライン」の項の追補

1. 緒言

2005年以降、本ガイドライン (VICH GL36) が施行されてきた。ガイドラインに基づく作業のなかで経験を重ねた結果、VICH 地域の全ての規制当局が、微生物が利用可能な経口用量の分画を決定するための in vivo 及び in vitro の両試験方法について追加的なガイダンス及び明瞭さが必要であるとの意見で合意した。本付記は、新規のデータ、科学文献及びスポンサー（承認申請者）からの公表された提出書類に記載される情報のレビューに基づいて作成したもので

は、実験単位の数とサンプル数による。この数は、可能であれば過去の経験から、又はサンプルサイズのコンピューター計算による、その試験系の以前の知識及び結果のばらつきを用いて、決定できる。処置の影響と適切な相互作用、例えば処置の影響の経時的な変化、を正確に測定するために、十分な繰り返しを含めるべきである。試験によっては、このような相互作用を統計的分析の一部として調べることが重要かもしれない。繰り返しの別の形は一つのケージ内の動物からの糞便サンプルのプール又は異なる提供者からの糞便サンプルのプールである。いずれも平均化の利点はあるが、繰り返し間のばらつきを推定する能力がない。プールは（処置及び/又は接種材料）の個々の影響をあいまいにすることがあり、したがってその使用は試験の目的に応じて考慮しなければならない。

付記C MICcalc の計算

薬剤がその菌に対して活性を有する関連のある属の平均 MIC₅₀ の 90 %信頼限界の下限値から、MICcalc を算出する。90 %信頼限界の下限値は、対数変換データから計算する。したがって、平均値と標準偏差は、対数変換した MIC₅₀ 値を用いることにより計算される。このことはまた、正確な値を得るためには、90 %信頼限界の下限値を指数変換する必要のあることを意味している。信頼限界の計算式は以下のとおりである：

(略)

適切な属の MIC₅₀ を調べる (2.1参照)。MICcalc は、その化合物に対して本来耐性でない適切な属について得られた値に基づく。したがって、MICcalc はその化合物が活性であるそれらの属の MIC₅₀ に基づくことになる。MICcalc の計算に用いるには、全ての MIC₅₀ 値に不等号が入っていないことを確かめる。

(略)

(追加)

ある。

本付記は、「微生物が利用可能な経口用量の分画の評価のための試験系を例示した表」、「例示した試験系の実施に当たっての方法論に関する一般的考慮事項」及び「微生物が利用可能な経口用量の分画の決定における試験系の使用方法の解説」の3節から構成される。

2. 微生物が利用可能な経口用量の分画の評価のための試験系の例

微生物が利用可能な経口用量の分画の決定にあたり、様々な *in vitro* 試験及び *in vivo* 試験系を、単独で又は組み合わせて使用できる。以下の表では、このような試験系と得られるデータの種類のほか、その使用に関連する考慮事項を例として示す。

微生物が利用可能な経口用量の分画の評価に用いる試験系及び分析方法の例		
試験系	得られるデータの種類	考慮事項
<i>In Vivo</i> 試験系		
ヒト及び(又は)動物の吸収、分布、代謝、排泄に関する (ADME) 試験	<ul style="list-style-type: none"> - 尿中及び (又は) 糞便中の投与薬物 (及び代謝物) の濃度 - 尿中及び (又は) 糞便中の投与薬物の代謝物プロファイル - 結腸内に入る投与薬物の割合 	<ul style="list-style-type: none"> - 経口投与経路から得られるデータを使用すること。 - 動物に投与された経口投与量及び投与期間を考慮する場合がある。 - 同一クラスの類似薬を経口投与したヒトから得られたデータは、裏付けとなる情報をもたらすことが考えられるが、申請予定の薬物に関するデータの方が望ましい。 - ヒトの ADME データが入手できない場合は、動物の ADME データを使用することが可能である。 - 対象動物種の残留物消失試験を実施することにより、糞便中の代謝物プロファイル及び (又は) 結腸内微生物が利用可能な薬物に関する情報が得られる場合がある。 - 微生物が利用可能な経口用量の割合の決定のための微生物学的測定法から得られるデータは、化学分析又は放射性標識化合物分析のデータを補完する場合がある。
結腸内微生物	- 微生物学的測定法及び	- 動物に投与された経口投与量及び投

物が利用可能な薬物を決定するために実験動物に薬物を経口投与する方法	(又は) 化学分析によって決定された糞便中又は腸内内容物中の薬物濃度 - 糞便中又は腸内内容物中の代謝物プロファイル	与期間を考慮する場合がある。 - ヒト腸内細菌叢を定着させたげっ歯類及び普通の動物を考慮する場合がある。 - 反すう動物種及び鳥類は適さない。
-----------------------------------	---	---

In Vitro 試験系

微生物が利用する薬物の分画を決定するために糞便スラリーに薬物を添加する方法	- 試験系中の遊離薬物濃度 (単位体積当たりの質量) - 添加した薬物の結合率 - 糞便スラリー中で代謝される添加薬物量	- 試験計画には、インキュベーション、薬物動態を調べるためのサンプル採取時点、試験対象薬物の濃度、非滅菌糞便と滅菌糞便などの糞便パラメータや、他の試験条件の考慮事項を組み込むこと。 - 分析には、薬物の微生物学的活性の定量と化学分析の両方が挙げられる (「微生物学的測定方法及び化学分析法」参照)。 - 非滅菌糞便スラリーをインキュベーションして、薬物の分解性を明らかにすることができる。
---------------------------------------	--	--

微生物学的測定法

糞便サンプル中又は糞便スラリー培養物中における薬物濃度の微生物学的活性を評価する微生物学的測定法	- 遊離薬物濃度測定のための微生物発育又は発育阻止の定量	- 定量的な微生物学的測定のためには、指標細菌の菌株選択において、用いる方法及び薬物の抗菌スペクトルを考慮に入れなければならない。 - 試験には、例えば、細菌計数、MIC、死滅曲線、最確数、最小破壊濃度の検出、指標代謝物質の検出、分子的方法などが挙げられる。
--	------------------------------	--

化学分析法

糞便サンプル中又は糞便スラリー培養物中に	- 総薬物濃度及び遊離薬物濃度の定量 - 薬物及び代謝物の定量	- 糞便スラリー中の薬物及び代謝物と思われるものを検出及び定量するには、化学分析法 (例えばガスクロマトグラフィー、高速液体クロマトグ
----------------------	------------------------------------	---

おける薬物濃度の化学分析法、放射性同位体分析法及び（又は）免疫学的分析法

ラフイー（HPLC）、HPLC - 質量分析法）、放射性同位体分析法及び（又は）免疫学的分析法を用いることができる。

*本表は、試験系選択肢の総覧ではない。微生物が利用可能な経口用量の分画を求めるには、その薬物に適した試験系を1種以上用いる。

3. 試験系の方法論的側面

本節では、微生物が利用可能な経口用量の分画を決定する試験の計画及び実施に用いられる試験条件に関する概論を述べる。

(1) 投与量及び薬物濃度：

ア 試験系で設定する投与量及び薬物濃度の範囲のほか、試験目的の正当性を示さなければならない。

イ 試験の投与量及び薬物濃度には、ヒトが残留物を摂取することにより予測される抗菌剤のレベルのほか、それよりもさらに高いレベルも設定しなければならない。

(2) 糞便パラメータ

ア 糞便サンプルの供給元及びサンプル数：

(ア) 糞便提供者は、健康であり、少なくとも糞便採取前の3ヵ月間は抗菌剤に曝露されたことが知られていないこと（ガイドラインのイのウ）一般的勧告の項参照）。

(イ) 糞便提供者間でばらつき（例えば、年齢、性別、食事）があるのは本来の姿であるから、実験計画には糞便提供者のばらつきがもたらす影響を考慮に入れるべきである。糞便提供者数は実験の目的に基づいて決定すべきであるが、6名以上が望ましい（図1）。

(ウ) 新鮮なサンプル（その日の初回の糞便）をその日のうちに処理することが推奨される。冷蔵庫内温度で最大72時間、嫌気性の環境で貯蔵することは許容できる。

イ 糞便サンプルの物理的特性（例えば、糞便の粘性、水分量、pH、固形成分含有量）を測定することが推奨される。この情報は、次に実施する試験の成績のばらつきの解釈に有用であると考えられる。

ウ 糞便濃度：

(ア) 少なくとも糞便濃度1濃度について検討すること。結腸内容物を代表

するものとして、25%の糞便調製物（糞便サンプル1+希釈液3）が推奨される。

エ 糞便スラリー調製に用いる希釈液：

（ア）糞便物質の希釈に用いる化学成分については、標準化してばらつきを最小限に抑えること。

（イ）最小限の塩類を含む嫌気性菌用の緩衝液を使用すること。

オ 糞便のインキュベーション：

（ア）適切なプロトコールを決定するには、2名以上の提供者のサンプルを用いて初期実験を検討する。これには、薬物動態に関連する計算ができるよう、適切な範囲の残留物濃度、インキュベーション時間及び多くの時点のサンプリングを含めること。

（イ）微生物が利用可能な経口用量の分画の最終決定には、6名以上の糞便提供者から得られたデータを用いること。

カ 非滅菌又は滅菌糞便サンプルの使用：

（ア）化学分析を用いた初期試験では、糞便の滅菌処理が薬物と糞便懸濁液との結合に及ぼす影響を考慮する。

（イ）In vitroでの薬物結合試験及び不活性化試験を実施する際には、可能であれば非滅菌糞便を使用すること。薬物との結合性において非滅菌糞便懸濁液と滅菌済み糞便懸濁液との間の差がわずかであれば、その後の試験は滅菌糞便のみでよい可能性がある。

（3）微生物が利用可能な微生物学的に活性な薬物の分画の定量法

ア 一連の試験では、微生物学的測定法か化学分析のいずれかを用いる場合があるが、特定の分析法を実施する正当性を示すべきである。化学分析を採用する場合、その分析が微生物学的活性につながるものであるべきである。

イ 薬物の抗菌スペクトルに基づいて、指標細菌の菌種を選定すること。

ウ 分析の感度及び再現性を考慮すること。

エ 試験対照については、用いる試験系に応じて検討すること。

（4）観察された薬物結合の可逆性

ア 薬物結合が可逆的である可能性を明らかにできる時間経過をみるアプローチが推奨される。

イ さらに作業を進めて結合機構を明らかにすることは、微生物が利用可能な経口用量の分画を定めるという目的に必須のものではない。

4. 微生物が利用可能な経口用量の分画の決定の試験系の使用方法の解説

微生物が利用可能な経口用量の分画の決定に適切であると判断したさまざまな試験系を用いて、in vivo及びin vitroのアプローチを特定し、レビューした。この分画を導き出すのにこれらの試験系を応用する概念的アプローチの概要を以下にまとめ、図1に示した。

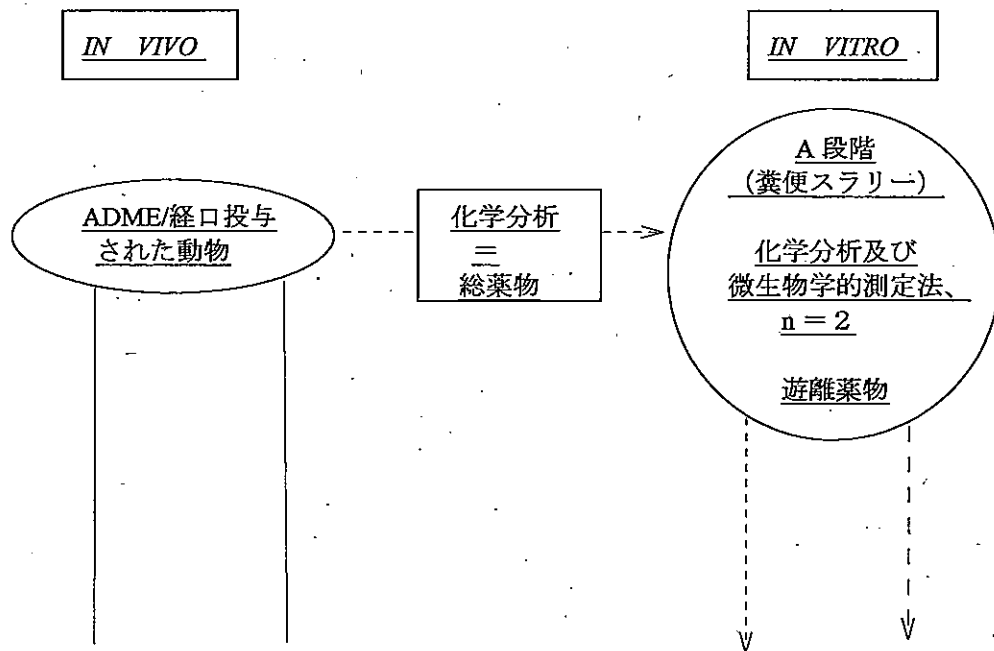
アプローチ1: In vivo 試験系 動物に薬物を投与し、その後、次の選択肢の1つを実施する。

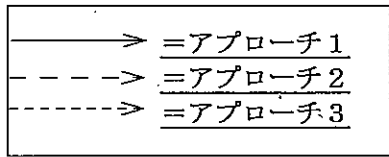
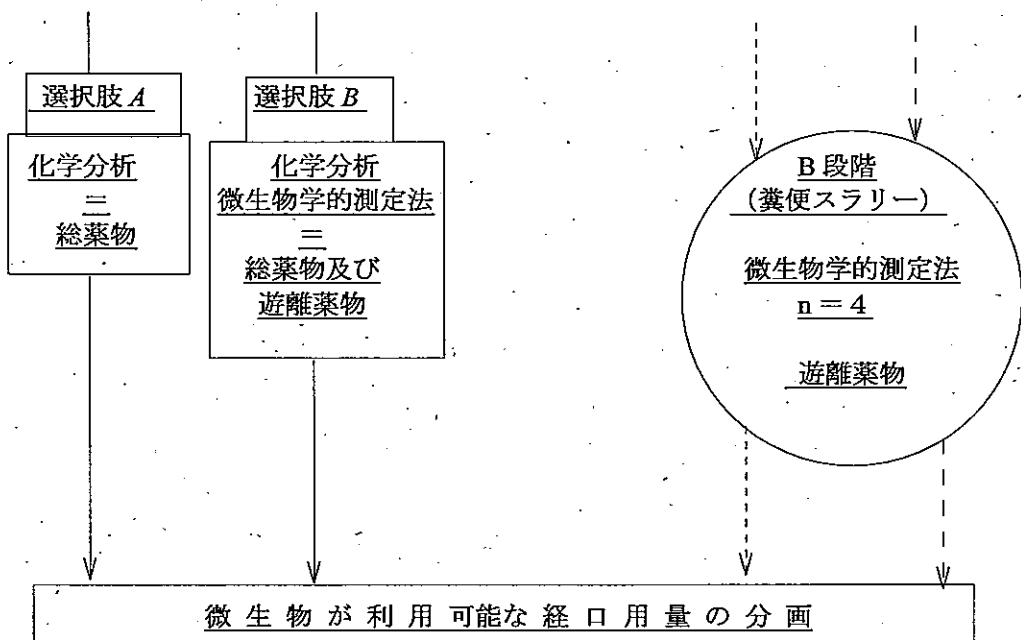
- (1) 選択肢 A: 腸内内容物及び(又は)糞便から抽出して化学分析を行い、総薬物濃度を決定し、微生物が利用可能な経口用量の分画を定める。
- (2) 選択肢 B: 投与した動物の腸内内容物及び(又は)糞便に対して化学分析及び微生物学的活性測定法を実施し、微生物が利用可能な経口用量の分画を定める。

アプローチ2: In vitro 試験系 このアプローチは2段階(A段階及びB段階)から構成され、in vitroでの糞便スラリー試験系を用いる(図1参照)。A段階は初期試験であり、2名の提供者の糞便サンプルを用いて、多くの時点でサンプリングした場合の添加薬物の適切な濃度範囲及びインキュベーション時間について明らかにする。この段階では化学分析及び微生物学的測定法の両方を実施する。B段階はA段階の結果に基づいて実施し、さらに4名の提供者のサンプルを追加し、微生物学的測定法を実施する。微生物が利用可能な経口用量の分画の最終決定には、全6名のデータを用いる。

アプローチ3: アプローチ1(選択肢A) + アプローチ2 このアプローチでは、in vivo 試験と in vitro 試験を組み合わせる。

図1. 微生物が利用する経口用量の分画を決定する試験系の概略図





9-2~16 (略)

9-2~16 (略)