

(案)

家畜等に使用するラサロシドナトリウムによる薬剤
耐性菌に関する食品健康影響評価について

2013年2月

食品安全委員会
肥料・飼料等／微生物・ウイルス合同専門調査会
(薬剤耐性菌に関するワーキンググループ)

目次

	頁
○審議の経緯.....	3
○食品安全委員会委員名簿.....	3
○食品安全委員会肥料・飼料等／微生物・ウイルス合同専門調査会（薬剤耐性菌に関するワーキンググループ）専門委員及び専門参考人名簿.....	4
○要約.....	5
I. ハザードの特定に関する知見.....	6
1. 名称及び化学構造.....	6
(1) 一般名.....	6
(2) 化学名.....	6
(3) 化学構造.....	6
(4) 有効成分の系統.....	6
2. 使用方法.....	7
(1) 対象飼料及び添加量.....	7
(2) 同一飼料に二つ以上の飼料添加物を用いる場合の規制.....	8
(3) 使用上の注意.....	9
(4) 管理分析の実施.....	9
(5) ラサロシドナトリウムの使用量.....	9
3. 海外における評価状況等.....	9
4. 対象家畜等における動物用抗菌性物質の生体内薬物動態.....	10
(1) マウス.....	10
(2) 鶏.....	10
(3) 牛.....	11
5. 抗菌活性の作用機序及びタイプ.....	11
(1) 作用機序.....	11
(2) 作用のタイプ.....	13
(3) コクシジウムに対する作用.....	13
6. 抗菌スペクトル及び感受性菌の分布.....	13
(1) 抗菌スペクトル.....	13
(2) 対象とする家畜等の病原体に対する最小発育阻止濃度（MIC）の分布.....	14
(3) 指標細菌及び食品媒介性病原細菌に対する MIC の分布.....	15
7. 交差耐性を生じる可能性のあるヒト用抗菌性物質及びその重要性.....	15
8. 薬剤耐性菌及び薬剤耐性決定因子に関する情報.....	16
(1) 耐性獲得及び交差耐性に関する試験（ <i>in vitro</i> ）.....	16
(2) 交差耐性に関する試験（ <i>in vivo</i> ）.....	16
(3) 薬剤耐性決定因子に関する情報.....	16
(4) 反すう動物のルーメン内細菌に認められる適応について.....	17

9. ハザードの特定に係る検討.....	17
II. 食品健康影響評価	18
<参照>.....	19

〈審議の経緯〉

- 2003年 12月 8日 農林水産大臣から薬剤耐性菌に係る食品健康影響評価について要請
- 2003年 12月 11日 第23回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2004年 9月 30日 「家畜等への抗菌性物質の使用により選択される薬剤耐性菌の食品健康影響に関する評価指針」決定
- 2006年 4月 13日 「食品を介してヒトの健康に影響を及ぼす細菌に対する抗菌性物質の重要度のランク付けについて」決定
- 2012年 10月 12日 関係資料の接受
- 2012年 10月 30日 肥料・飼料等（第61回）／微生物・ウイルス（第35回）合同専門調査会（薬剤耐性菌に関するワーキンググループ）
- 2013年 2月 25日 第464回食品安全委員会（報告）

〈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

（2009年6月30日まで）

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

（2011年1月6日まで）

小泉 直子（委員長）
見上 彪（委員長代理*）
長尾 拓
野村 一正
畑江 敬子
廣瀬 雅雄
村田 容常

*：2009年7月9日から

（2012年6月30日まで）

小泉 直子（委員長）
熊谷 進（委員長代理*）
長尾 拓
野村 一正
畑江 敬子

（2012年7月1日から）

熊谷 進（委員長）
佐藤 洋（委員長代理）
山添 康（委員長代理）
三森 国敏（委員長代理）
石井 克枝

廣瀬 雅雄

村田 容常

* : 2011 年 1 月 13 日から

上安平 冽子

村田 容常

〈食品安全委員会肥料・飼料等／微生物・ウイルス合同専門調査会（薬剤耐性菌に関するワーキンググループ）専門委員名簿〉

（2011 年 10 月 1 日から）

肥料・飼料等専門調査会

唐木 英明（座長）

青木 宙

池 康嘉

舘田 一博

戸塚 恭一

細川 正清

微生物・ウイルス専門調査会

渡邊 治雄（座長代理）

多田 有希

田村 豊

〈肥料・飼料等（第 61 回）／微生物・ウイルス（第 35 回）合同専門調査会（薬剤耐性菌に関するワーキンググループ）専門参考人名簿〉

荒川 宜親

要 約

飼料添加物として指定されている抗菌性物質であるラサロシドナトリウムが飼料に添加され、家畜等に使用された場合に選択される薬剤耐性菌について、「家畜等への抗菌性物質の使用により選択される薬剤耐性菌の食品健康影響に関する評価指針」（2004年9月30日食品安全委員会決定）に基づき、まず、ハザードの特定に関する検討を行った。

ラサロシドはヒト用医薬品として使用されておらず、また、これと化学構造が類似したヒト用抗菌性物質はない。交差耐性に関する試験において、ラサロシドを鶏に投与した結果、大腸菌及び腸球菌で一部の抗菌性物質に対する耐性菌数の上昇が認められたが、ラサロシド投与との関係は確認されていない。

養鶏場の鶏糞便中から分離された腸球菌の抗菌剤感受性調査において、耐性菌は報告されていない。

耐性決定因子に関連する知見はなく、耐性機序の詳細は不明であるが、ラサロシドの細菌への作用は特定の標的部位に対する作用でないという点等から、ラサロシド感受性菌が耐性決定因子の獲得によって耐性菌に変化する可能性は低いと考えられる。

以上のハザードの特定に関する検討の結果、ラサロシドの家畜等への使用によりラサロシド耐性菌が選択される可能性は否定できないが、ラサロシドがヒト用医薬品として使用されていないこと、ラサロシドがヒトに使用されている抗菌性物質と交差耐性を示したという報告がないこと等から、食品を介してヒトに対して健康上の危害因子となる可能性のある薬剤耐性菌はないと判断した。したがって、ラサロシドを家畜等に使用することによって選択された薬剤耐性菌が、食品を介してヒトの健康に影響を与える可能性は無視できる程度と考えられる。

なお、薬剤耐性菌に関する詳細な情報について、現時点では十分とは言えないので、リスク管理機関である農林水産省において引き続き情報の収集に努めるべきと考える。

I. ハザードの特定に関する知見

1. 名称及び化学構造

(1) 一般名

和名：ラサロシドナトリウム

英名：Lasalocid sodium

(参照 1、2)

(2) 化学名

英名：6-[(3R,4S,5S,7R)-7-[(2S,3S,5S)-5-Ethyl-5-[(2R,5R,6S)-5-ethyltetrahydro-5-hydroxy-6-methyl-2H-pyran-2-yl]tetrahydro-3-methyl-2-furanyl]-4-hydroxy-3,5-dimethyl-6-oxononyl]-2-hydroxy-3-methylbenzoic acid, sodium salt

CAS 番号：25999-20-6

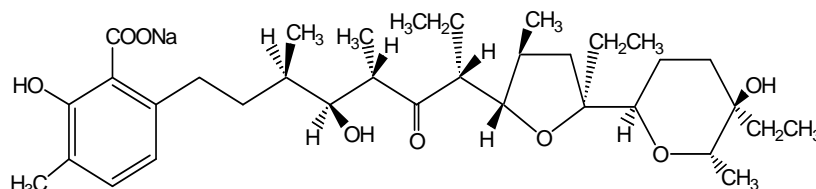
(参照 1、2)

(3) 化学構造

分子式：C₃₄H₅₃O₈Na

分子量：612.77

構造式：



(参照 1、2)

(4) 有効成分の系統

① 有効成分の系統

ラサロシドは *Streptomyces lasaliensis* の培養によって得られるポリエーテル系抗生物質である。分子中に多くのエーテル結合を有し、金属陽イオンとの親和性が高いことからイオノフォアと称される。

日本においては、飼料添加物としてナトリウム塩のラサロシドナトリウム¹が指定されている。(参照 3、4) 動物用医薬品としては使用されていない。

ラサロシドは、ラサロシド A を主成分とし、その他の類縁物質として ラサロシド B、C、D 及び E を含む混合物であり、これらの類縁物質は活性成分の総重量の 10% 以下である。(参照 5、6)

¹本評価書では飼料添加物を示す場合には「ラサロシドナトリウム」、抗菌性物質の本質を示す場合には、「ラサロシド」を用いることとした。

ラサロシドは、ヒト用医薬品としては使用されていない。

② 関連する系統

国内で飼料添加物に指定されているポリエーテル系イオノフォアには、サリノマイシンナトリウム、モネンシンナトリウム、センデュラマイシンナトリウム及びナラシンがある。

2. 使用方法

ラサロシドナトリウムは、飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律（昭和 28 年法律第 35 号。以下「飼料安全法」という。）に基づき、農林水産大臣による飼料添加物としての指定を受けた抗菌性物質（以下「抗菌性飼料添加物」という。）であり、その成分規格、製造等の方法及び表示の基準、使用方法については同法及び同法に基づく「飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令」（昭和 51 年農林省令第 35 号）等により規定されている。

抗菌性飼料添加物全般について設けられている主な規制は以下のとおりである。

- ① 飼料は飼料添加物に指定されていない抗菌性物質を含んではならない。
- ② 抗菌性飼料添加物の種類ごとに添加が認められている対象飼料及び量が定められている。
- ③ 抗菌性飼料添加物及び抗菌性飼料添加物を含む飼料の製造業者は、製造を実地に管理させるため、事業場ごとに飼料管理者を置かなければならない（飼料安全法第 25 条）。
- ④ 抗菌性飼料添加物のうち抗生物質については、飼料安全法第 5 条に基づく特定飼料等に該当し、（独）農林水産消費安全技術センターによる検定を受けて合格したことを示す表示又は登録された特定飼料等製造業者（特定飼料等の製造を業とする者をいう。）が製造したことを示す表示が付されたものでなければならない。
- ⑤ 抗菌性飼料添加物を含む飼料は、対象家畜等及び含有する飼料添加物の名称、量、使用上の注意等を表示しなければならない。
- ⑥ 抗菌性飼料添加物を含む飼料は、搾乳中の牛、産卵中の鶏又はうずら、食用にと殺する前の 7 日間の牛（生後概ね 6 月を超えた肥育牛を除く。）、豚、鶏又はうずらに使用してはならない。

（1）対象飼料及び添加量

ラサロシドナトリウムは鶏（ブロイラーを除く。）を対象とする幼すう用飼料及び中すう用飼料、ブロイラーを対象とする前期用飼料及び後期用飼料、うずら（産卵中のものを除く。）を対象とする飼料並びに生後概ね 6 月を超えた肥育牛（搾乳中のものを除く。）に限り、添加又は混和して使用することができ、対象以外の家畜等に対しては使用できない。

ラサロシドナトリウムの添加が認められている飼料の種類及び添加量は、以下のとおりである。

対象飼料	鶏(ブロイラーを除く。)用	ブロイラー用		牛用
	幼すう用 中すう用	前期用	後期用	肥育期用
添加量 (g 力価/トン)	75	75	75	33

注) うずら用は鶏用に準じて使用される。

(2) 同一飼料に二つ以上の飼料添加物を用いる場合の規制

抗菌性飼料添加物は、以下の四つのカテゴリーに分類されている。

次の表の同一欄内の二つ以上の飼料添加物は、同一飼料に併用してはならない。

区分	飼料添加物
第1欄	アンプロリウム・エトパペート、アンプロリウム・エトパペート・スルファキノキサリン、サリノマイシンナトリウム、センデュラマイシンナトリウム、デコキネート、ナイカルバジン、ナラシン、ハロフジノンポリスチレンスルホン酸カルシウム、モネンシンナトリウム、ラサロシドナトリウム
第2欄	クエン酸モランテル
第3欄	亜鉛バシトラシン、アピラマイシン、アルキルトリメチルアンモニウムカルシウムオキシテトラサイクリン、エフロトマイシン、エンラマイシン、クロルテトラサイクリン、セデカマイシン、ノシヘプタイド、バージニアマイシン、フラボフォスフォリポール、リン酸タイロシン
第4欄	アルキルトリメチルアンモニウムカルシウムオキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン、ビコザマイシン、硫酸コリスチン

以上の規制及び各抗菌性飼料添加物の対象家畜を整理すると、ラサロシドナトリウムと併用可能である抗菌性飼料添加物は以下のとおりである。

・鶏(ブロイラーを除く。)用、ブロイラー用

各区分より1種類ずつ併用が可能である。(飼料1トンあたりの添加量)

区分	飼料 添加物名	単位	鶏(ブロイラーを除く。)用	ブロイラー用	
			幼すう用 中すう用	前期用	後期用
第3欄	亜鉛バシトラシン	万単位	16.8~168	16.8~168	16.8~168
	アピラマイシン	g力価	2.5~10	2.5~10	2.5~10
	アルキルトリメチルアンモニウムカルシウムオキシテトラサイクリン	g力価	5~55	5~55	—
	エンラマイシン	g力価	1~10	1~10	1~10
	クロルテトラサイクリン	g力価	10~55	10~55	—
	ノシヘプタイド	g力価	2.5~10	2.5~10	2.5~10

	バージニアマイシン	g力価	5~15	5~15	5~15
	フラボフォスフォリポール	g力価	1~5	1~5	1~5
第4欄	アルキルトリメチルアンモニウムカルシウムオキシテトラサイクリン	g力価	5~55	5~55	—
	クロルテトラサイクリン	g力価	10~55	10~55	—
	ビコザマイシン	g力価	5~20	5~20	5~20
	硫酸コリスチン	g力価	2~20	2~20	2~20

・牛用

併用可能な抗菌性飼料添加物はない。

飼料中の添加量が規定の範囲内であることの確認は（独）農林水産消費安全技術センターが飼料製造業者に対して行う立入検査の際に行われており、農場におけるラサロシドナトリウム添加飼料の家畜等への使用制限（搾乳中の牛、産卵中の鶏又はうずら、食用を目的としてと殺する前7日間の牛、鶏又はうずらへの使用禁止等）については、各都道府県がその遵守状況を確認することとなっている。

(3) 使用上の注意

ラサロシドナトリウムを含む製剤及び飼料が、対象家畜等に過剰に投与又は給与された場合（又は誤って馬に給与された場合）には、対象家畜等に発育障害の作用が起こる可能性がある。このことから、ラサロシドナトリウムを含む製剤及び飼料には対象家畜等及び添加量、給与方法等に関する使用上の注意の表示が義務付けられている。

また、ラサロシドナトリウム等のポリエーテル系抗生物質は、重篤な副作用を起こすことがあるため、動物用医薬品のチアムリン又はバルネムリンとの併用を避けることとされている。

(4) 管理分析の実施

ラサロシドナトリウムは、対象家畜等に過剰に給与することにより発育障害が起こる可能性があることから、ラサロシドナトリウムを含む飼料については、製造業者が全ての製造ロットに対しラサロシドナトリウムの含量を分析し、定められた管理限界以内のものを販売に供することが義務付けられている。

(5) ラサロシドナトリウムの使用量

1983年7月に飼料添加物に指定されて以降のラサロシドナトリウムの国家検定合格数量は、1989年の70.9トン（力価）がピークであり、その後、製造量は減少し、2011年の製造数量は17.8トン（力価）となっている。（参照7~11）

3. 海外における評価状況等

薬剤耐性菌に関するリスクについて、諸外国ではラサロシドに特定した評価はなされていない。しかし、各国における包括的な耐性菌リスク評価書が公表されており、カナダの評価書では、イオノフォアはヒト医療で用いられていないこと及びヒト用抗菌性物質と交差耐性を示さないことからヒト健康に与える影響は低いとされている。また、ニュージーランドの評価書では、イオノフォアは公衆衛生との関連はないとしている。(参照 12、13)

米国では、リスク評価指針の中でヒトの医療上重要な抗菌性物質をランク付けしているが、イオノフォアはその中に含まれていない。(参照 14)

欧州連合 (EU) では、ヒトや動物の健康を損なうおそれがあるとの理由で、家畜の成長促進を目的に使用されている抗生物質が禁止されたが、イオノフォアの抗コクシジウム剤としての使用は継続して認められている。(参照 1、15、16)

4. 対象家畜等における動物用抗菌性物質の生体内薬物動態

^{14}C 標識ラサロシドを用いてマウス及び鶏における経口投与時の生体内薬物動態試験を実施した。 ^{14}C 標識ラサロシド及びその代謝物はいずれの動物においても速やかに糞尿中に排泄され、血液や全ての可食部での半減期は短かった。少量の放射活性が肝臓に認められたが、 ^{14}C 標識ラサロシドやその代謝物というよりむしろ肝臓の構成成分として組み込まれたと考えられた。(参照 1)

(1) マウス

^{14}C 標識ラサロシド 1 mg/kg 体重相当量を含む 30%エタノール水溶液をマウス (CD-1 系、約 6~7 週齢、雌雄各 18 匹) に 7 日間強制経口投与した薬物動態試験を実施した。

^{14}C 標識ラサロシドは初回投与 24 時間以内に糞尿に 96.68%排泄された。最終投与から 4 時間以内に総投与量の 77.08%が糞中に、1.01%が尿中に排泄された。最終投与 4 時間後にと殺したマウスの肝臓 1 g 当たりの ^{14}C 標識ラサロシドは 2.05 μg 相当であった。 ^{14}C 標識ラサロシドをマウスに反復経口投与した場合、速やかに糞中に排泄されることが明らかになった。(参照 17)

(2) 鶏

肉用鶏 (雌、33 週齢、12 羽、平均体重 767.4 g) に 75 ppm のラサロシドナトリウムを含む飼料を 16 日間摂取させた後、 ^{14}C 標識ラサロシド 5 mg をカプセルで 3 日間経口投与した薬物動態試験の結果、次のことが明らかになった。

^{14}C 標識ラサロシド濃度は、カプセルの最終投与 2 時間後に血中最高濃度 5.62 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に達した。 ^{14}C 標識ラサロシドの消失半減期は 3 時間であり、血中 ^{14}C 標識ラサロシド及びその代謝物の濃度は最終投与 26 時間後に 0.1 ppm レベルまで低下した。 ^{14}C 標識ラサロシドの組織中濃度が 0.1 ppm レベルまで低下するのに要した時間は、脂肪で 36 時間、腎臓で 29 時間、筋肉で 28 時間、皮膚で 23 時間であった。またこれらの組織中濃度は、投与 48 時間で 0.1 ppm 未満となった。肝臓は、例外的に組織中濃度が 48 時間後に 0.4 ppm、72、96 及び 120 時間後に 0.2 ppm であった。投与した ^{14}C 標識ラサロシド総量の 98.04%が組織及び排泄物から回収され、その 95.5%が排泄

物であった。(参照 18)

(3) 牛

¹⁴C 標識ラサロシドを単回経口投与した場合、投与 24 時間後に総放射活性の 89%は糞便から回収され、尿から回収されたのは 0.18%であった。糞便中の放射活性のうち約 80%は抽出可能であり、このうち 54%は未変化体のラサロシドであり、26%は少なくとも 5 種類の代謝物を含むものであった。いずれの代謝物も 4.5%以上は存在しなかった。ラサロシドは一部が吸収され、胆汁中に親化合物又は代謝物として排出されている。(参照 19)

牛 (12 頭) に ¹⁴C 標識ラサロシドをカプセルで 1 mg/kg 体重/日の量で 10 日間連続投与した場合、初回投与約 144 時間後に血漿中濃度は一定となり、投与中止後急速に減少した。主な排出経路は糞便中であり、最終投与 1 日後で平均 74%、7 日後で 80%が排泄された。一方、尿中排泄は少なく、最終投与 7 日後に 0.6%が排泄された。糞便及び尿のいずれについても検出されたのは親化合物のみであった。

この試験において、放射活性のある残留物は肝臓中に最も多く認められ、最終投与直後に 3.6 µg/kg、72 時間後に 1.1 µg/kg、168 時間 (7 日) 後に 0.4 µg/kg であった。一方、筋肉中の残留は少なく、0.05 µg/kg 未満であった。(参照 5)

牛 (2~3 か月齢、30 頭、体重 49~162 kg) に 1.05 mg/kg 体重となる量のラサロシド添加飼料を 28 日間連続投与した場合、筋肉中のラサロシド残留濃度は休薬 72 時間後に検出限界未満となった。また、肝臓中のラサロシド残留濃度は休薬 72 時間後に 101.39 µg/kg (±51.09)、120 時間後に 17.90 µg/kg (±7.80) であり、脂肪及び筋肉中のラサロシド残留濃度は休薬 72 時間後に検出限界未満であった (検出限界: 筋肉及び腎臓 0.14 µg/kg、肝臓 0.13 µg/kg、脂肪 2.81 µg/kg; 定量限界: 全組織 5 µg/kg)。(参照 5)

5. 抗菌活性の作用機序及びタイプ

(1) 作用機序

現在の知見において、イオノフォアの作用機序については、そのほとんどがモネンシンについて検討されている。

ラサロシドはモネンシンと同系統のイオノフォアであり、*in vitro* でのイオンの親和性データやコクシジウムにおける交差耐性の存在などから、ラサロシドの作用はモネンシンと同様であると考えられる。

一般に、多くの抗菌性物質は、細菌細胞内の酵素、リボソーム並びに細胞膜及び細胞壁を標的部位とする。それらの細菌の標的部位には各抗菌性物質が特異的に結合する領域があり、抗菌性物質は細菌の標的部位と特異的に結合することによって細菌の様々な代謝を阻害する。このため、細菌は生存に必須な生理活動の過程が阻害されることとなり、増殖が停止するか又は死滅する。一方、細菌はこの抗菌性物質結合領域の変化を獲得することによって各抗菌性物質による特異的な結合を回避することができる。これが、各抗菌性物質に対する薬剤耐性菌の主要な耐性機序の一つとなっている。

しかしながら、イオノフォアの抗菌活性の作用機序は他の系統の抗菌性物質とは異なっており、細菌ではイオノフォアは細胞膜に結合するものの、前述したように特異的に結合する分子や結合領域の存在は知られていない。(参照 20~22)

飼料添加物に指定されているイオノフォアは、モノバレント (monovalent) (主として、一価の金属イオンのイオノフォアの性質をもつもの；モネンシン、サリノマイシン、ナラシン)、ジバレント (divalent) (主として、二価の金属イオンのイオノフォアの性質をもつもの；ラサロシド) 及びモノバレントの配糖体 (モノバレントで糖を分子中にもつもの；センデュラマイシン) に分類される。

ポリエーテル系イオノフォアは、その化学構造の一端にあるカルボキシル基 (-COOH) ともう一端の水酸基 (-OH) との間の水素結合によって、その構造中の水溶性部分を内側に、脂溶性部分を外側にした球状の立体構造を示す。(参照 20、22~25)

イオノフォアはこの立体構造により、内側に水溶性の金属イオンを抱き込み、一方、脂溶性の高い外部構造により、脂溶性の高い細菌の細胞壁と細胞膜を容易に通過する。こうしてイオノフォアはナトリウムイオン (Na^+) やカリウムイオン (K^+) といった金属イオンと結合して、これらを細胞内外に輸送するための担体として作用し、細胞内外の金属イオンの輸送を促進する。(参照 20、21、23、25)

ラサロシドはカルボン酸系イオノフォアに分類され、その作用機序もモネンシンと同様に細菌細胞に作用すると考えられる。しかし、モネンシンとの違いは一価の陽イオン (K^+ 、 Na^+) だけでなく、二価の陽イオン (マグネシウムイオン (Mg^{2+})、カルシウムイオン (Ca^{2+})) に対しても高い結合親和性を示し、二価の金属イオン (ジバレント) のイオノフォアの性質を有している。

一般に、グラム陽性菌はグラム陰性菌に比べ、イオノフォアに対する感受性が高い。(参照 26) これは、グラム陰性菌の多くが細胞壁の外側にリポ多糖 (LPS) からなる外膜を有し、この外膜の存在によりイオノフォアをはじめとする脂溶性物質の細胞内への移動が大幅に制限されることによる。そのため、外膜を有する大腸菌及びサルモネラ、カンピロバクター等を含むグラム陰性菌は、一般にイオノフォアに対し自然耐性を示す。(参照 20~23、27)

通常、細菌は、外部環境に対して細胞内の K^+ 濃度を高く、かつ Na^+ 及び Ca^{2+} 濃度を低く保つことで恒常性を維持している。しかし、ラサロシドは、細菌細胞内外の陽イオンの濃度勾配にしたがって K^+ の細胞外への移行を促進するとともに Na^+ 及び Ca^{2+} の細胞内への移行を促進し、これらのイオンの濃度勾配を小さくする作用を持つ。細胞はこの異常な細胞内のイオン濃度勾配を是正するためにアデノシン三リン酸 (ATP) を利用するナトリウム・カリウムポンプ及びカルシウムポンプを作動し、 Na^+ 及び Ca^{2+} を細胞外に、 K^+ を細胞内に輸送するが、この状態が長時間持続すると、細胞内の ATP が枯渇し、恒常性が破綻して細胞活動が停止すると考えられている。(参照 20~22)

イオノフォアの作用機序は、前述のように細胞膜を介したイオンの輸送に関するものであるため、他の系統の抗菌性物質のように細菌に対してのみ特異的に作用するものではなく、原虫や、さらには、ほ乳動物等の細胞膜にも作用する。このため、ほ乳

動物である家畜やヒトに対しても毒性が高く、安全域（効果を示す濃度と毒性作用を示さない最大量との比）が比較的小さいため、これがヒト用医薬品としての応用を大きく妨げる要因ともなっている。（参照 27、28）

（2）作用のタイプ

イオノフォアは、ペプチドグリカンを標的にする抗菌性物質（例：ペニシリン）、リボソーム活性を標的にする抗菌性物質（例：クロラムフェニコール）、DNA 転写を標的にする抗菌性物質（例：キノロン）、mRNA 転写を標的にする抗菌性物質（例：リファンピシン）及び葉酸合成を標的にする抗菌性物質（例：スルホンアミド）と異なり、細菌や原虫のイオン輸送に関与し、そのエネルギーを消耗させ、静菌的に作用する。（参照 27、28）

（3）コクシジウムに対する作用

ラサロシドは *Eimeria* 属が引き起こすコクシジウム症に有効な物質として開発され、欧州、米国など世界中で鶏コクシジウム症の予防剤として使用されている。（参照 1、29）

ラサロシドをはじめ、イオノフォアは陽イオンと錯体を形成して、*Eimeria* 属のスポロゾイトやメロゾイトの細胞膜を自由に透過してイオンを運び、細胞内イオン平衡を崩す。無性生殖期のスポロゾイトやメロゾイトは細胞内のイオン平衡を維持するためにナトリウム・カリウムポンプを作動させ、アミロペクチン粒に含まれるエネルギーを消費する。そのエネルギーが枯渇したとき、イオン輸送ポンプは機能しなくなり、原虫の生理的活動が停止する。その結果、ラサロシドはイオノフォア感受性を示すスポロゾイトやメロゾイトが盲腸細胞内に侵入するのを阻害し、コクシジウム生活環の初期に抗コクシジウム効果を発現する。その後、薬剤の投与時期や濃度によっては、陽イオンの浸透圧差によって水が原虫の細胞内に流入して、スポロゾイトやメロゾイトの細胞膜を破裂させて細胞を破壊し、結果的にラサロシドが殺原虫的に作用することもある。ラサロシドは二価の陽イオン（ Mg^{2+} 、 Ca^{2+} ）とも結合親和性があるところが他のイオノフォアと異なるが、コクシジウムに対する作用は非常に似ている。そのようなイオン選択性のため、野外においてモネンシン耐性の *E. tenella* に対しても、高い抗コクシジウム効果が維持される。（参照 21、30～34）

6. 抗菌スペクトル及び感受性菌の分布

（1）抗菌スペクトル

ラサロシドは、*Staphylococcus aureus* や *Streptococcus* 等のグラム陽性菌に対してのみ抗菌活性が認められ、グラム陰性菌及び *Candida albicans* 等の真菌には活性を示さない（表 2）。

グラム陰性菌には細胞膜の外側にグラム陽性菌にはない外膜が存在する。外膜は脂質二重層の外側が LPS で構成されており、疎水性を示すイオノフォアの透過を主に阻害する。そのため、グラム陰性菌はグラム陽性菌に比べイオノフォアに対して耐性を示す。また、イオノフォアの外膜透過の副経路としてはポーリンと呼ばれる外膜タン

パク質が形成する親水性の透過孔も存在するが、ラサロシドは分子量が大きいため、透過孔を通過することができないと考えられている。(参照 20、35、36、37)

表2 各菌株に対するラサロシドの抗菌スペクトル

菌種	MIC* (µg/mL)	
	10 ⁰	10 ⁻²
<u>グラム陽性菌</u>		
<i>Staphylococcus aureus</i> 209P JC-1	6.25	6.25
<i>S. aureus</i> Terashima	6.25	6.25
<i>S. aureus</i> 33	6.25	3.13
<i>S. epidermidis</i> 59	6.25	6.25
<i>Micrococcus luteus</i> PCI-1001	12.5	3.13
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC-6633	3.13	1.56
<i>Streptococcus pneumoniae</i> 111	12.5	6.25
<i>S. pyogenes</i> S-23	12.5	12.5
<i>S. pyogenes</i> A-S-8	25	25
<i>S. faecalis</i> ** 6783	25	25
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> PW-8	25	25
<u>グラム陰性菌</u>		
<i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2	>100	>100
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTC-418	>100	>100
<i>Proteus vulgaris</i> IAM-1025	>100	>100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IAM-1095	>100	>100
<i>Shigella flexneri</i> la EW-8	>100	>100
<i>S. sonnei</i> I EW-33	>100	>100
<i>Salmonella</i> Typhimurium T-287	>100	>100
<i>Bordetella bronchiseptica</i> A-19	>100	>100
<u>真菌</u>		
<i>Candida albicans</i> YU-1200	>100	>100

* 10⁰は培養原液、10⁻²は原液を100倍希釈した菌液を寒天培地に接種して測定したMIC

** 現在の菌種名は *Enterococcus faecalis*

(2) 対象とする家畜等の病原体に対する最小発育阻止濃度 (MIC) の分布

日本では、ラサロシドナトリウムは飼料添加物として指定されており、対象とする家畜の病原菌はない。

諸外国では本物質を含むイオノフォアは抗コクシジウム剤として広範に使用されており、この場合、対象とする家畜等の病原体は鶏や牛等に寄生するコクシジウムである。(参照 22)

1982年から1983年までにかけてポリエーテル系抗生物質が使用されている全国

14の養鶏場から分離された *E. tenella* を用いて抗コクシジウム剤に対する感受性をバタリー試験で検討した。(参照 38)

結果の評価は抗コクシジウム指数 (ACI) で行い、ラサロシドは極めて有効な株が 12 株、中程度有効な株が 2 株、効力の少ない又は無効な株は 0 株であった。

(3) 指標細菌及び食品媒介性病原細菌に対する MIC の分布

ラサロシドナトリウムを使用できる牛及び鶏に由来する食品媒介性病原細菌としては、カンピロバクター、サルモネラ、*Clostridium perfringens* 及び *S. aureus* がある。また、薬剤感受性の指標細菌として重要な菌種は大腸菌及び腸球菌である。しかし、カンピロバクター、サルモネラ及び大腸菌等のグラム陰性菌は細胞膜の外側に外膜を持っていることによりイオノフォアには耐性を示す。(参照 20、21、23、27)

一方、家畜等に由来する腸球菌 及び *C. perfringens* の野外株に対する、ラサロシドの MIC の分布は次のとおりである。

① 腸球菌

ベルギーで、抗コクシジウム剤としてイオノフォアを使用している養鶏場の鶏及び成長促進剤としてイオノフォアを使用している養豚場の豚の糞便から分離した *Enterococcus faecium* 32 株及び *E. faecalis* 33 株を用いて、イオノフォアに対する感受性試験を行った。ラサロシドの MIC 値は、*E. faecium* に対しては 0.5 から 2.0 µg/mL、*E. faecalis* に対しては 0.25 から 2.0 µg/mL の範囲にあり、耐性は認められなかった。一価と二価のイオノフォア間で交差耐性はなかった。(参照 39)

② *C. perfringens*

養鶏場において壊死性腸炎で死亡した肉用鶏 88 羽から採取した消化管内容物を調べ、その全てから *C. perfringens* が 1 g 当たり $10^5 \sim 10^8$ CFU (colony forming unit) 検出された。その検体から分離された 88 株を用い、22 種類の抗菌性物質に対する感受性を *in vitro* で評価した。検体の 90% は 3 種のテトラサイクリンに対して高い耐性を示したが、ラサロシド、サリノマイシン及びモネンシンなどのポリエーテル系は低濃度で抗菌効果を示した。ラサロシドの MIC 値の範囲は 0.20 から 12.5 µg/mL であった。一方、テトラサイクリンに対しては 90% の株が、アミノグリコシド系のストレプトマイシンに対しては全ての株が耐性を示した。(参照 40)

7. 交差耐性を生じる可能性のあるヒト用抗菌性物質及びその重要性

ラサロシド等のポリエーテル系抗生物質は、これまでヒト医療では使用されておらず、また、当該物質と化学構造が類似したヒト用抗菌性物質及び交差耐性を示すヒト用抗菌性物質はない。

ポリエーテル系抗生物質の作用は細胞内外のイオン輸送に対するものであるため、一般の抗菌性物質のように細菌に対して特異的に作用するものではなく、ほ乳動物等の細胞膜にも作用する。このため、家畜等やヒトに対しても毒性が高いことから、ヒト用医薬品として用いられる可能性は低いと考えられる。

また、ポリエーテル系抗生物質間でイオン選択性が若干異なるものの、ほぼ同様の作

用機序や生物活性を示すので、細菌において交差耐性が認められる場合がある。しかし、耐性遺伝子が菌株間で伝達する可能性は想定されていない。(参照 22、39)

8. 薬剤耐性菌及び薬剤耐性決定因子に関する情報

(1) 耐性獲得及び交差耐性に関する試験 (*in vitro*)

発育阻止濃度以下のラサロシド存在下で、培養後に耐性株が出現する可能性について *in vitro* の試験を行った。ナリジクス酸又はテトラサイクリンを対照薬として、ラサロシドの存在下又は非存在下で 20 回継代した 3 種の細菌株 (*S. aureus*、*E. faecalis* 及び *C. perfringens*) を用いて検討した。対照薬で継代した各菌株に対する対照薬の MIC 値は大幅に上昇したが、ラサロシドで継代した各菌株におけるラサロシドの MIC 値はほとんど変化せず、耐性菌は発生しなかった。また、ラサロシドで継代した各菌株に対する他の抗菌性物質 (アンピシリン、クロラムフェニコール、クリンダマイシン、エリスロマイシン、ゲンタマイシン、ナリジクス酸、ストレプトマイシン及びテトラサイクリン) の MIC 値の有意な上昇は認められなかった。(参照 41)

(2) 交差耐性に関する試験 (*in vivo*)

鶏において、ラサロシド投与群及び無投与群から投与開始後 7、14、21、28、35 及び 42 日に大腸菌群及び腸球菌を分離し、12 種類の抗菌性物質に対する感受性試験を行った。投与開始後 7 日から 42 日までに分離された株を総合して、ラサロシド投与群と無投与群で耐性率を比較したところ、大腸菌群ではラサロシド投与群でテトラサイクリン及びスルファジメトキシリンに対する耐性菌数及び中等度の感受性を示す菌数の合計は有意に低く、ストレプトマイシンに対する耐性菌数及び中等度の感受性を示す菌数の合計は有意に高かった。また、腸球菌では、ラサロシド投与群でペニシリン、セファロチン、テトラサイクリン、エリスロマイシン及びリンコマイシン耐性菌数の有意な減少並びにネオマイシン耐性菌数の有意な増加が観察されている。(参照 42) これらの耐性菌及び感受性の低下した菌の増加について、交差耐性の可能性は否定できないが、ラサロシド投与との関係は確認されていない。

(3) 薬剤耐性決定因子に関する情報

ラサロシドに関する耐性決定因子の存在について、現在までに関連する知見はない。ラサロシドをはじめとするイオノフォアに共通する細菌への作用は、細菌の生命維持の根幹をなす細胞内外を隔てた細胞膜が形成するイオンバランスの破壊であるという点及び特定の標的部位に対する作用でないという点から、これらの作用機構に関してラサロシド感受性菌が耐性決定因子を外部から獲得することによって耐性菌に変化する可能性は低いと考えられる。

一方、同系統のモネンシンでは、モネンシン産生菌である *Streptomyces cinnamomensis* が、推定上のモネンシントランスポータータンパクをコードした *monT* 遺伝子を有し、この耐性に関与すると考えられている。(参照 43) このトランスポータータンパクは新たに自己産生されたモネンシンを細胞膜から離れた細胞外環境に効率的に輸送するという作用を持つ。類似の自然耐性機序は *Streptomyces*

longisporoflavus が産生するイオノフォアであるテトロナシンにおいても明らかにされている。これらトランスポーターは各イオノフォアに対して特異的に耐性を付与するのみであり、テトロナシンに耐性を付与する遺伝子はモネンシンに対する耐性は付与しないことが報告されている。(参照 44) ラサロシド産生菌についても同様の耐性遺伝子の保有とトランスポータータンパク発現の可能性はありうるが、現時点では確認されていない。

しかし、これらのイオノフォア排出タンパクは、それぞれのイオノフォアに特異的であり、たとえこれらの耐性遺伝子が食品由来細菌に伝達されたとしても、その遺伝子発現によりヒト用抗菌性物質に対する耐性が付与される可能性は極めて低いと考えられる。

ヒトや動物に使われる多くの抗菌性物質の原料中に、抗菌性物質生産菌の染色体 DNA が混入することが報告されている。家畜の飼料級アボパルシンにおいても、その中に生産菌由来の DNA の一部が混入し、その中にバンコマイシン耐性遺伝子のヌクレオチドが存在していた報告があり、アボパルシンの長期使用が家畜腸内細菌の耐性遺伝子取り込みを助長し、それがヒトへと伝播していく可能性が示唆されている。(参照 45~47) ラサロシドについても、製品中への耐性遺伝子を含む生産菌由来 DNA 混入の可能性は否定できない。しかし、現時点ではラサロシド耐性遺伝子は特定されていない。

(4) 反すう動物のルーメン内細菌に認められる適応について

ラサロシドの属するポリエーテル系抗生物質に対する耐性機序の詳細は不明であるが、モネンシン及びラサロシドについてはルーメン内細菌に関する試験で検討されている。

反すう動物より採取されたモネンシン及びラサロシドに耐性化したルーメン内細菌は、感受性菌に比べイオノフォア的作用である細菌内 K^+ の流出が減少していた。(参照 46) モネンシンに耐性化した *Prevotella bryantii* は外膜の成分が増加していた。(参照 49) *Clostridium aminophilum* F は細胞壁の多糖類が増加し、増殖において誘導期 (Lag phase) がなく急激に増殖する特徴を持っていた。(参照 50、51) しかし、この耐性は不安定であり、薬剤のない条件で数代培養すると耐性が失われたという報告がある。(参照 51) これに対し、28 代以上継代してもモネンシン及びラサロシドに対する耐性が維持され、両剤間に交差耐性がある可能性が考えられたが、他の系統のほとんどの抗菌剤には耐性を示さなかったとの報告もある。(参照 50)

これらの現象は「適応」と呼ぶことが提唱されており、一般的な薬剤耐性菌にみられる菌種の遺伝的変異による耐性の獲得とは異なると考えられているが、詳細な耐性機序は未だ判明していない。(参照 27)

9. ハザードの特定に係る検討

ラサロシドは 1983 年に飼料添加物に指定されて以来、家畜の飼料添加物としてのみ使用されている抗生物質であり、動物用医薬品及びヒト用医薬品としては用いられておらず、当該物質と化学構造が類似したヒト用抗菌性物質はない。交差耐性に関する試験

で、ラサロシドを投与した鶏において、大腸菌群及び腸球菌で一部の抗菌性物質に対する耐性の増加が認められたが、ラサロシド投与との関係は確認されていない。また、ベルギーの養鶏場の鶏糞便中から分離された腸球菌における抗菌剤感受性調査において、耐性菌は報告されていない。ラサロシドに関する耐性決定因子の存在について、現在までに関連する知見はなく、耐性機序の詳細は不明である。しかし、ラサロシドの細菌への作用は、特定の標的部位に対する作用でないという点等からラサロシド感受性菌が耐性決定因子の獲得によって耐性菌に変化する可能性は低いと考えられた。

このように、ラサロシドは家畜のみに使用される抗生物質であり、ヒトに使用されている抗菌性物質と明確に交差耐性を示したという報告がないこと及び野外で家畜由来耐性菌が認められていないことから、ラサロシドを家畜等に使用した結果として出現し、食品を介してヒトに対して健康上の危害因子となる可能性のある薬剤耐性菌はないと判断した。

II. 食品健康影響評価

ラサロシドの家畜等への使用によりラサロシド耐性菌が選択される可能性は否定できないが、ラサロシドがヒト用医薬品として使用されていないこと、ラサロシドがヒトに使用されている抗菌性物質と明確に交差耐性を示したという報告がないこと等から、特定すべきハザードがないと判断した。したがって、ラサロシドを家畜等に使用することによって選択された薬剤耐性菌が、食品を介してヒトの健康に影響を与える可能性は無視できる程度と考えられる。

なお、薬剤耐性菌に関する詳細な情報について、現時点では十分とは言えないので、リスク管理機関である農林水産省において引き続き情報の収集に努めるべきと考える。

<参照>

- 1 アルファーマ社. Hazard analysis and risk assessment with regard to antibiotic resistance-Lasalocid sodium. 2005. (未公表)
- 2 Merck Index, 14th Edition. 2006.
- 3 八杉龍一, 小関治男, 古谷雅樹, 日高敏隆 編: 岩波生物学辞典. 第 4 版. 岩波書店, 1996:53.
- 4 二宮幾代治. 動物の抗生物質. 養賢堂, 東京, 1987:416-420.
- 5 European public MRL assessment report (EPMAR) lasalocid (bovine species), EMA/CVMP/504089/2010.
- 6 ファイザー株式会社. ラサロシドナトリウムの主な関連物質. 2012. (未公表)
- 7 (独) 農林水産消費安全技術センター. 平成 20 年度の特定添加物検定結果について. 2009.
- 8 (独) 農林水産消費安全技術センター. 平成 21 年度の特定添加物検定結果について. 2010.
- 9 (独) 農林水産消費安全技術センター. 平成 22 年度の特定添加物検定結果について. 2011.
- 10 (独) 農林水産消費安全技術センター. 平成 23 年度の特定添加物検定結果について. 2012.
- 11 (財) 畜産生物科学安全研究所. 薬用耐性菌の出現等に関する文献の収集・整理及びその解析調査報告書(内閣府 食品安全委員会 平成 16 年度食品安全確保総合調査). 2005.
- 12 Report of the advisory committee on animal uses of antimicrobials and impact on resistance and human health. Veterinary drugs directorate, Health Canada. June 2002. Uses of antimicrobials in food animals in Canada : Impact on resistance and human health.
http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mpps/pubs/vet/amr-ram_final_report-rapport_06-27_cp-pe-eng.php
- 13 Report of the expert panel on antibiotic resistance. July 2005. A review of the impact of the use of antimicrobials in animals and plants on the development of antimicrobial resistance in human bacterial pathogens. http://www.foodsafety.govt.nz/elibrary/industry/steering-group2004/Review_Impact-Prepared_Appointed.pdf
- 14 # 152 Guidance for Industry. Evaluating the Safety of Antimicrobial New Animal Drugs with Regard to Their Microbiological Effects on Bacteria of Human Health Concern. 2003.
- 15 Official Journal of the European Communities. Council Regulation (EC) No 2821/98 of 17 December 1998, amending, as regards withdrawal of the authorization of certain antibiotics, Directive 70/524/EEC concerning additives in feedingstuffs. Official Journal of the European Communities 29.12.98, L351/4-8. 1998.

- 16 Official Journal of the European Communities. Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003, on additives for use in animal nutrition. 2003.
- 17 ロッシュ社. Hawkins DR, et al. The Metabolism of Lasalocid-C¹⁴ in Mice. 1987. (未公表)
- 18 ロッシュ社. Laurencot HJ, et al. The Uptake and Elimination of Lasalocid-¹⁴C in the Chicken. 1973. (未公表)
- 19 Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food chain on a request from the European Commission on Cross-contamination of non-target feedingstuffs by lasalocid authorised for use as a feed additive. The EFSA Journal. 2007;553:1-46.
- 20 Russell JB, Strobel HJ. Effect of ionophores on ruminal fermentation. Applied and Environmental Microbiology. 1989;55:1-6.
- 21 Callaway TR, Edrington, TS, Rychlik JL, Genovese KJ, Poole TL, Jung YS, et al. Ionophores: their use as ruminant growth promotants and impact on food safety. Current Issues in Intestinal Microbiology. 2003;4:43-51.
- 22 Avcare. 10.Polyether Ionophores. The role of enteric antibiotics in livestock production. a review of published literature. 2003;10-1~10-8. <http://www.avcare.org.au/files/animalhealth/information/The%20Role%20of%20enteric%20antibiotics%20in%20livestock%20production.pdf>
- 23 Edrington TS, Callaway TR, Varey PD, Jug YS, Bischoff KM, Elder RO, et al. Effects of the antibiotic ionophores monensin, lasalocid, laidlomycin propionate and bambarmycin on *Salmonella* and *E. coli* O157:H7 *in vitro*. Journal of Applied Microbiology. 2003;94:207-213.
- 24 田中信男, 中村昭四郎. 第 13 章 polyether 系抗生物質. 抗生物質大要 (第 4 版): 化学と生物活性. 東京大学出版会, 東京, 1995;224-229, 295-296.
- 25 Ben-Tal N, Sitkoff D, Bransburg-Zabary S, Nachliel E, Gutman M. Theoretical calculations of the permeability of Monensin-cation complexes in model bio-membranes. Biochimica et Biophysica Acta. 2000;1466:221-233.
- 26 Berg DH, and Hamill RL. The isolation and characterization of narasin, a new polyether antibiotic. The Journal of Antibiotics. 1978;31:1-6.
- 27 Russell JB, Houlihan AJ. Ionophore resistance of ruminal bacteria and its potential impact on human health. FEMS Microbiology Review. 2003;27:65-74.
- 28 SOU 1997;132. www.sva.se/pdf/antibiotika/SOU132abc.pdf
- 29 角田清, 大永博資, 荒川皓. 鶏コクシジウム症. 角田清 監修. チクサン出版社, 東京, 1983;72-77.
- 30 McQuiston TE, McDougald LR. The effect of combining subtherapeutic concentrations of different ionophorous antibiotics on antibiotics on anticoccidial action in chickens. Journal of Comparative Pathology. 1981;91:503-509.
- 31 Augustine PC, Smith II CK, Danforth HD, and Ruff MD. Effect of ionophorous

- anticoccidials on invasion and development of *Eimeria*: comparison of sensitive and resistant isolates and correlation with drug uptake. Poultry Science. 1987;66:960-965.
- 32 Guyonnet V, Johnson JK, and Long PL. Studies on the stage of action of Lasalocid against *Eimeria tenella* and *Eimeria acervulina* in the chicken. Veterinary Parasitology. 1990;37:93-100.
- 33 McDougald LR. Chapter 15. Control of coccidiosis: chemotherapy. Editor, Long PL. Coccidiosis of man and domestic animals. CRC Press. 1990;307-320.
- 34 Smith II CK, Strout RG. *Eimeria tenella*: accumulation and retention of anticoccidial ionophores by extracellular sporozoites. Experimental Parasitology. 1979;48:325-330.
- 35 藤沢薬品工業株式会社. 上村利明, 西田実. ラサロシドナトリウムの抗菌スペクトラム. (未公表)
- 36 横田健, 平松啓一, 桑原京子, 伊藤輝代, 舘田映子, 堀賢. 細菌の構造. 新・微生物学と抗生物質の基礎知識. (株)じほう. 1999;7-8.
- 37 中江太治. 3.1 ポーリン孔による透過. 橋本一, 井上松久 編. 病原菌の薬剤耐性. 学会出版センター. 1993;69-72.
- 38 原俊彦, 高木洋文, 浅野敏彦, 樺田清彦. 最近の野外分離 *Eimeria tenella* 株に対するポリエーテル系抗コクシジウム剤の薬剤効力試験. 鶏病研究会報. 1984;20 : 216-220.
- 39 Butaye P, Devriese LA, Haesebrouck F. Incomplete cross resistance against ionophores in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* strains from pigs and poultry. Microbial Drug Resistance. 2000;6:59-61.
- 40 Kondo F. In vitro lecithinase activity and sensitivity to 22 antimicrobial agents of *Clostridium perfringens* isolated from necrotic enteritis of broiler chickens. Research in Veterinary Science. 1988;45(3):337-340.
- 41 アルファーマ社. Wheadon A. Assessment of the potential for antimicrobial resistance to lasalocid and cross resistance to other antibiotics to arise in vitro. Inveresk Report Number 21690. 2002. (未公表)
- 42 ロッシュ社. Maestrone G, Yeisley H. Influence of Lasalocid medicated feed on the resistance of the fecal coliform and *Enterococcus* flora in chickens. 1986. (未公表)
- 43 Oliynyk M, Stark CBW, Bhatt A, Jones MA, Hughes-Thomas ZA, Wilkinson C, et al. Analysis of the biosynthetic gene cluster for the polyether antibiotic monensin in *Streptomyces cinnamonensis* and evidence for the role of *monB* and *monC* genes in oxidative cyclization. Molecular Microbiology. 2003;49:1179-1190.
- 44 Linton KJ, Cooper HN, Hunter IS, Leadlay PF. An ABC-transporter from *Streptomyces longisporoflavus* confers resistance to the polyether-ionophore antibiotic tetronasin. Molecular Microbiology. 1994;11:777-785.
- 45 Webb V, Davies J. Antibiotic preparations contain DNA: a source of drug resistance genes? Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1993;37:2379-2384.

- 46 Marshall CG, Lessard IAD, Park I-S, Wright GD. Glycopeptide antibiotic resistance genes in glycopeptide-producing organism. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1998;42:2215-2220.
- 47 Lu K, Asano R, Davies J. Antimicrobial resistance gene delivery in animal feeds. *Emerging Infectious Diseases*. 2004;10:679-683.
- 48 Lana RP, Russell JB. Use of potassium depletion to assess adaptation of ruminal bacteria to ionophores. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996;62 :4499-4503.
- 49 Callaway TR, Russell JB. Selection a highly monensin-resistant *Prevotella bryantii* subpopulation with altered outer membrane characteristics. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999;65:4753-4759.
- 50 Houlihan AJ, Russell JB. The susceptibility of ionophore-resistant *Clostridium aminophilum* F to other antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2003;52:623-628.
- 51 Rychlik JL, Russell JB. The adaptation and resistance of *Clostridium aminophilum* F to the butyrivibriocin-like substance of *Butyrivibrio fibrisolvens* JL5 and monensin. *FEMS Microbiology Letters*. 2002;209 :93-98.