

動物用抗菌剤耐性菌の公衆衛生に及ぼす影響の検討事業 「2. *In vitro*変異頻度および腸管内における抗菌活性に関する 試験基準」の報告にあたって

耐性菌問題検討委員会

当研究会では、動物用抗菌剤耐性菌が公衆衛生に及ぼす影響を検討するために、平成12年(2000年)4月に、耐性菌問題検討委員会を設置し、その事業を開始した。12年度はわが国の薬剤耐性菌の実態について文献調査し、会報23号(2001年12月)にその調査成績を報告した。

その間、各国規制当局あるいは国際的グループで本件に関する討議が進められ、平成13年5月、VICH(動物用医薬品の承認審査資料の調和に関する国際協力)の抗菌剤耐性に関する作業部会で、動物用医薬品の抗菌剤耐性に関する承認前の情報ガイダンス案を設定した。このような状況のもと、国内ではこれまでこのような基準は十分検討されておらず、具体案について、行政あるいは製薬関係者から本会で検討することに対し、深い関心が寄せられた。

これを受けて、9月から3回にわたり委員会を開催し、科学的あるいは実的な面を考慮し、その間、賛助会員の製薬会社にも送付して意見を求め、ガイダンスの一部について具体案を作成した。平成14年4月13日、当研究会理事会の承認を受けたので、これを公表することとした。

なお、本基準の設定にあたり、十分な検討を重ねたつもりではあるが、これらの基準に沿って試験を行った時に、基準に不備があって、実情に即さない場合には、その試験成績と共に、本会に意見をお寄せ頂くようお願いしたい。本会ではお寄せいただいた意見に沿って公正な立場から改訂を要すると判断されれば、機会を見て修正案を提示したい。

平成14年4月13日

In vitro 変異頻度および腸管内における抗菌活性に関する試験基準

動物用抗菌剤研究会

1. はじめに
 - 1.1. 他のガイドラインおよびガイダンスとの関係
2. 被検薬および被検薬剤
3. 試験方法
 - 3.1. *In vitro*変異頻度試験
 - 3.1.1. 自然耐性菌出現頻度試験
 - 3.1.1.1. 供試菌種
 - 3.1.1.2. 供試薬
 - 3.1.1.3. 増菌用および測定用培地
 - 3.1.1.4. 薬剤の濃度段階
 - 3.1.1.5. 接種菌液の調製と菌の接種法
 - 3.1.1.6. コロニーの計数と耐性菌の出現頻度の算出
 - 3.1.1.7. 耐性菌のMIC測定
 - 3.2. 腸管内における抗菌活性
 - 3.2.1. 定量法
 - 3.2.2. 動物種
 - 3.2.3. 動物数
 - 3.2.4. 投与経路
 - 3.2.5. 投与量および投与回数
 - 3.2.6. 標準的な試験法
 - 3.2.6.1. 糞便中濃度の時間的推移
 - 3.2.6.2. 腸内容物中濃度
 - 3.2.6.3. 糞便結合の影響
 - 3.2. 腸管内における抗菌活性
4. 用語解説
5. 関連するガイドライン，ガイダンスおよび成書等一覧

1. はじめに

FDA (米国食品医薬品局) などの各国規制当局ならびにVICH (動物用医薬品の承認審査資料の調和に関する国際協力) やOIE (国際獣疫事務局) のような世界的機関とグループが動物用抗菌剤の耐性問題に関するガイドラインの策定をそれぞれ進めており、一部のガイドライン案は既に公開され始めている^{1), 2)}。本試験基準は、VICHの耐性菌作業部会が作成した「食料生産動物に使用する新動物用医薬品登録のための抗菌剤耐性に関する承認前情報ガイダンス」¹⁾ (以下、VICH抗菌剤耐性ガイドラインと略) に則って、スポンサー (承認申請者) が試験を実施するために設定した。

VICH抗菌剤耐性ガイドラインは、EU、日本および米国において食料生産動物への使用を意図する治療用抗菌剤を登録するための指針で、ヒトの健康上懸念される細菌の耐性選択の特徴付けに関する統一テクニカルガイドラインを提供する。VICH抗菌剤耐性ガイドラインに記載されている情報は基本的情報と随意情報に分かれている。すなわち、基本的情報は抗菌剤の系統、作用様式と作用機序、抗菌活性スペクトル、耐性の機序と遺伝学、耐性遺伝子の発現および伝達率、交差耐性の出現、ならびに薬物動態データである。一方、随意情報は、*in vitro*変異頻度試験、共通耐性(co-resistance)の出現、腸管内における抗菌活性、その他の動物試験、および歴史的情報である。この随意情報は、スポンサーが裁量によってそれらのデータの一部あるいは全部を含めることを選択できるとされている。

本試験基準の目的はこの随意情報のうち、性質の異なる次の二つの情報を得るための試験法を明らかにすることである。すなわち、一つは「*in vitro*変異頻度」試験で、変異菌が出現する頻度を明らかにするために実施する。もう一つは、腸内菌叢に対する被検薬の暴露の程度を調べる「腸管内における抗菌活性」の試験である。

これらの2種類の試験から得られる情報は、耐性菌に関わる事項を個別に判断するためのものではなく、包括的に考えてヒトへの影響を考察

する情報の一部として用いられる。例えば、腸管内の抗菌活性レベルの考察は、食品介在性病原菌および共生細菌に対するMIC値を示すデータなどと合わせて、耐性菌問題を総合的に判断するために用いるべきであろう。このように、この試験基準に従って実施する試験は、提唱する使用条件で動物用抗菌剤を対象動物に投与すると生じるかもしれない耐性発現の可能性を特徴付けるのに必要な情報の一部を提供するものである。

この試験基準に則ってこれらの試験を実施するに当たっては、被検薬の特性や供試動物の特徴に応じた適切で目的に沿う方法を考慮し、適宜取捨選択すべきである。動物を用いる場合には、試験の精度を高めるとともに、動物数を削減する努力ならびに動物福祉への配慮が要望される。新しく開発された方法が科学的に妥当なら、それを用いてもよい。

1.1. 他のガイドラインおよびガイダンスとの関係

本文書は *in vitro* 変異頻度試験および腸管内における抗菌活性に関する試験を行うに当たっての試験基準を示す。この試験基準は、すでに公表された動物用医薬品および医療用医薬品のガイドラインやガイダンス^{3), 4), 5), 6), 7)} からできる限り関連する試験方法を取り込む形で作成されている。

2. 被検薬および被検薬剤

食料生産動物に使用を意図する治療用抗菌剤の原薬および製剤を被検薬および被検薬剤とする。開発の初期段階から最終製剤を用いる試験は稀であるが、「腸管内における抗菌活性」に関する投与試験は最終製剤による必要がある。なお、この試験基準は牛、豚および鶏を主要な食料生産動物とみなしている。

3. 試験方法

3.1. *In vitro*変異頻度試験

VICH抗菌剤耐性ガイドラインは「Antimicrobials

in Laboratory Medicine第4版⁸⁾に示されている方法、すなわち、濃度勾配平板法(傾斜平板法)およびニトロログアニジン法(突然変異誘発法)を*in vitro*変異頻度試験として紹介している。濃度勾配平板法の目的はある薬剤に対して耐性菌ができやすいか否かを定性的に調べることに限られる。また、ニトロログアニジン法は突然変異誘発性の強いニトロログアニジンを用い、検出可能な自発的突然変異頻度を下回る頻度で出現する突然変異菌を分離する特殊な方法である。一方、わが国では、類似した*in vitro*試験法として、飼料添加物を評価する試験法に準拠した、被検薬の増量継代による耐性獲得試験^{9), 10)}あるいは自然耐性菌出現頻度試験^{11), 12), 13)}が⁸⁾、動物用抗菌剤の承認申請添付資料作成のために、広く用いられている。本文書では、変異菌が出現する頻度を調べるというVICH抗菌剤耐性ガイドラインの趣旨に沿い、定量的なデータが得られる自然耐性菌出現頻度試験の具体的な方法を記述する。

3.1.1. 自然耐性菌出現頻度試験

被検薬に対する耐性菌の出現頻度と出現した耐性菌の耐性レベルを以下の試験法で測定する。

3.1.1.1. 供試菌種

被検薬の特質に応じ、*Enterococcus faecalis*, *E. faecium* あるいは *Escherichia coli* を供試菌種とする。対象動物から分離したこれらの菌種を1菌種あたり複数(少なくとも3株)用いる。また、対照菌株として*E. faecalis* JCM7783(=ATCC29212), *E. faecium* JCM5804(=ATCC19434) あるいは *E. coli* JCM5491(=ATCC25922) を使用する。

3.1.1.2. 供試薬

被検薬および対照薬として既知の同系統の薬を用いる。

3.1.1.3. 増菌用および測定用培地

増菌用にはMueller-Hinton 培地を基礎とした半合成の液体培地を、測定用にはMueller-Hinton 培地を基礎とした半合成の寒天培地を用いる。いずれの会社の製品でも良いが、一連の試験には

同一の会社製品を使用することが望ましく、製造会社名を明記する。

3.1.1.4. 薬剤の濃度段階

予め測定したMICの4および8倍の薬剤を含む培地および対照として接種菌数の計測も兼ねた薬剤を含まない培地を用意する。なお、MICの測定は3.1.1.7.項に記載したようなバリデーションされ、標準化された方法で行う。

3.1.1.5. 接種菌液の調製と菌の接種法

被検菌を増菌用培地で37°C, 18~20時間培養し、要すれば増菌用培地で希釈して、あるいは遠心分離操作等で濃縮して10⁹ CFU/mLの接種菌液を調製する。この接種菌液を、薬剤を含む培地に1寒天平板あたり0.1 mLずつそれぞれ10枚に接種する。同時に、接種菌数を測定するために、薬剤を含まない培地に接種菌液の希釈系列を接種する。

3.1.1.6. コロニーの計数と耐性菌の出現頻度の算出

37°C, 18~20時間培養し、薬剤含有培地上に出現したコロニー(耐性菌)を計数する。このコロニー数と、同時に測定した接種菌数から耐性菌の出現頻度を算出する。

3.1.1.7. 耐性菌のMIC測定

薬剤の添加濃度毎に、薬剤含有培地上に発育した全コロニーから複数コロニー(少なくとも5コロニー)を無作為に釣菌し、被検薬のMICを測定する。MICの測定は、動物用抗菌剤研究会¹⁴⁾、日本化学療法学会¹⁵⁾ あるいはNCCLS^{16), 17)}の方法に従う。

3.2. 腸管内における抗菌活性

3.2.1. 定量法

採取した試料に含まれる被検薬および代謝物の濃度測定に用いる定量法は、その感度、精度および再現性がバリデーションされている必要がある。

定量法は試験の目的に合わせて適切に選択されるべきであるが、被検薬と抗菌活性を持つ代謝

物とを分別せずに測定する生物学的定量法は本試験の目的に合う定量法の一つである。生物学的定量法と強い相関があり、それより感度、精度および再現性に優れた方法がある場合には、これに代えることができる。生物学的定量法は動物用医薬品の残留性試験⁶⁾に用いられており、その場合の感度、精度および再現性とは、検出限界値0.05ppm以下、1～2ppmの添加回収実験における回収率70%以上、変動係数が10%程度のものをいう。

3.2.2. 動物種

試験は、飼料および動物用医薬品の使用歴が明らかにされている臨床適用動物（対象動物）種を用いて実施する。

3.2.3. 動物数

動物数は、試験の精度を考慮した上で、被検薬および代謝物の糞便中濃度の推移および腸内容物への分布を明らかにするのに適当な例数で実施する必要がある。

3.2.4. 投与経路

臨床応用に準じて投与経路を選択する。臨床投与経路が複数ある場合は、対象動物の毒性あるいは薬効薬理試験に用いた投与経路を考慮し、適切な投与経路を選択する。経口投与を選択する場合は強制経口投与でもよいが、被検薬剤として最終製剤を用いる必要がある。

3.2.5. 投与量および投与回数

予定臨床用量を考慮して投与量を選択する。数段階の臨床用量が予想される場合は、一般的には予定最高臨床用量を投与量とする。また、投与回数は原則として単回とする。

3.2.6. 標準的な試験法

対象動物を用いた吸収等試験、すなわち血中濃度の時間的な推移を調べる試験および主要臓器組織への分布を測定する試験において糞便および腸内容物をそれぞれ採取し、試料中の被検薬および代謝物濃度を測定して、その動態を評価

する。これら二つの試験、すなわち以下の項で述べる「糞便中濃度の時間的推移」を調べる試験および「腸内容物中濃度」を調べる試験は、供試動物の飼養形態や排泄物の特徴を考慮して、目的に合う試験方法を選択する。また、これらの試験における代謝物とは抗菌活性を有する代謝物を指す。

なお、本文書では詳しく取り上げないが、対象動物における尿中排泄および糞中排泄を調べるために測定した糞便中の被検薬量ならびに代謝物の組成とその量に関するデータを利用して考察することも可能である。

さらに、被検薬が糞便あるいは腸内容物に吸着して抗菌活性に影響する可能性がある場合には、糞便への吸着による被検薬濃度の低下の程度を明らかにする。

3.2.6.1. 糞便中濃度の時間的推移

被検薬の血中濃度（全血中濃度、血漿中濃度、血清中濃度）の推移を調べる試験において糞便を経時的に採取する。すなわち、単回投与試験によって対象動物における被検薬および代謝物の糞中濃度の推移を検討する。経口投与する場合は、基本的に絶食後に行う。被検薬および代謝物の消長を明らかにするために必要な採取時点を設定し、糞便は尿に汚染されないように採取する。

3.2.6.2. 腸内容物中濃度

被検薬の主要臓器組織への分布を調べる試験において、主要臓器組織に加えて結腸内容物を採取し、被検薬および代謝物の濃度を測定する。分布試験は被検薬の臓器および組織分布、その経時的变化ならびに必要なに応じて蓄積性を調べるために行なわれるので、原則として単回投与で実施される。また、試料の採取は、分布の経時的变化を示すために、一般に最高血中濃度を示す時点の近くと、必要なに応じて、消失期に行う。

3.2.6.3. 糞便結合の影響

対象動物から採取した糞便を試験材料とする。

採取した糞便に適当な緩衝液を適量加えて懸濁液とし、それに被検薬溶液を添加して作製した反応液を一定温度(例えば、動物の体温付近)で、一定時間インキュベーションする。反応液の遠心上澄液の被検薬濃度をインキュベーション前後で測定し、糞便結合による被検薬濃度の低下の程度を明らかにする。反応液の被検薬濃度やインキュベーション時間は、薬理作用や前述の糞便中濃度の時間的推移を調べる試験および腸内容物中濃度試験で得た結果を参考に決定する。

4. 用語解説

VICH: 動物用医薬品の承認審査資料の調和に関する国際協力を目的とする三極(日米EU)プログラムで、三極の承認審査機関および製薬団体が参加している。正式名称は“International Cooperation on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products”で、1996年4月に始まった。

食料生産動物: 羊、山羊、家鴨および兎を主要な食料生産動物とみなしている地域もあるが、この試験基準はVICH抗菌剤耐性ガイドラインに準じて牛、豚および鶏を食料生産動物とみなしている。また、魚類は生産システム、関連する細菌ポピュレーションおよび動物起源の公衆衛生上の懸念が基本的に牛、豚および鶏と異なるので、VICH抗菌剤耐性ガイドラインと同様にこの試験基準の対象から外されている。

食品介在性病原菌: 動物がその腸管内に保有することができ、食品を介してヒトの食中毒の原因となる病原菌である。サルモネラ、カンピロバクターなどがこれにあたる。

共生細菌: 動物の体内あるいは体表に棲息しているが、動物には病原性を示さない細菌で、腸球菌、非病原性大腸菌などがこれにあたる。

濃度勾配平板法(傾斜平板法): 耐性菌の出現

を調べる*in vitro*試験の一つで、抗菌物質の濃度を連続的に高めた一枚の寒天平板上に細菌を発育させることによって耐性突然変異菌を選別する方法である。すなわち、傾斜をつけて固めた寒天に抗菌物質を含んだ寒天を注ぎ入れ、抗菌物質の連続的な濃度勾配を持つ寒天平板を作製する。この平板上に被検菌の培養液を広げて接種することにより、突然変異菌を選別する。

バリデーション(validation): 例えば、生体試料中の被検薬およびその代謝物を定量する際に、分析方法の感度、精度、再現性等を確立すること。

生物学的定量法: 生物に対する生理作用を指標にする定量法で、抗菌物質の抗菌力の測定に用いられる。標準的な方法は、検定菌を加えた寒天平板上にディスク(あるいはステンレス製円筒)を置き、試料液を添加して培養する。試料に抗菌物質が含まれる場合は、ディスク周囲に検定菌の発育が阻止されることによる円形の透明帯(阻止円)が形成される。被検抗菌剤の標準液の濃度とそれらの阻止円の径から求めた回帰式を用いて、試料液の阻止円から試料液の抗菌物質濃度を算出する。

吸収等試験: 生体内における薬物の動態を明らかにするために行う試験で、被検薬の吸収、分布、代謝、排泄を調べる。動物用医薬品の場合は被検薬あるいは被検薬剤を対象動物あるいは実験動物に投与して、被検薬の血中濃度、尿・糞中排泄量、胆汁中排泄量、各臓器組織内濃度の経時的变化、生体内代謝産物等を検討する。

5. 関連するガイドライン、ガイダンスおよび成書等一覧

- 1) VICH: Guidance on pre-approval information for registration of new veterinary medicinal products for food producing animals with respect to antimicrobial resistance; for consultation at step 4 (2001)
- 2) OIE: Antimicrobial resistance: reports prepared by the OIE Ad hoc Group of experts on

- antimicrobial resistance (2001)
- 3) 厚生省: 非臨床薬物動態試験ガイドライン (1998)
 - 4) 厚生労働省: 医薬品の臨床薬物動態試験 (2001)
 - 5) 厚生省: 畜水産食品中の残留動物用医薬品等の安全性評価に関する指針, 畜水産品残留安全協議会, 東京 (1998)
 - 6) 農林水産省: 動物用医薬品のための毒性試験法等ガイドライン, (5) 残留に関する試験 (2000)
 - 7) 農林水産省: 水産動物への使用を目的とする動物用医薬品の製造 (輸入) 承認申請のための各試験の実施細則 (2000)
 - 8) Rice LB, Bonomo RA: Antimicrobials in laboratory medicine, Lorian V, ed, 4th ed, 482-483, Williams and Wilkins, Baltimore (1996)
 - 9) 高橋 勇: 動物用医薬品・飼料添加物・新飼料の有用性評価法, 小華和忠ら編, 第1版, 155-192, フジテクノシステム社, 東京 (1977)
 - 10) 農林水産省: 飼料添加物の評価基準及びその試験方法, 第2版, 63-68, 日本科学飼料協会, 東京 (1992)
 - 11) 佐藤謙一, 井上松久, 三橋 進: Chemotherapy, 32, S-1, I-12 (1984)
 - 12) Barry AL, Thornsberry C, Jones RN: Antimicrob Agents Chemother, 29, 40-43 (1986)
 - 13) 鎌田信一, 吉田辰巳, 松永敏幸, 内田和夫: 家衛研会報, 33, 1-3 (1991)
 - 14) 動物用抗菌剤研究会: 動物由来の細菌に対する薬剤の最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法, 動物用抗菌剤研究会報, 18, 40-41 (1997)
 - 15) 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改定について, Chemotherapy, 29, 76-77 (1981)
 - 16) NCCLS: Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard (1999)
 - 17) NCCLS: Development of *in vitro* susceptibility testing criteria and quality control parameters for veterinary antimicrobial agents; approved guideline (1999)

Standards of the *in vitro* mutation frequency study and the antimicrobial activity study in gut

Japanese Society of Antimicrobials for Animals

1. Introduction
 - 1.1. Relationship to other guidelines and guidance
2. Test drugs and formulations
3. Study methods
 - 3.1. *In vitro* mutation frequency studies
 - 3.1.1. *In vitro* appearance frequencies of spontaneous resistant mutants
 - 3.1.1.1. Test bacterial species
 - 3.1.1.2. Test drugs
 - 3.1.1.3. Culture media for enrichment and determination
 - 3.1.1.4. Concentrations of antimicrobial drug
 - 3.1.1.5. Preparation of the bacterial solution for inoculation and the method of inoculation of bacteria
 - 3.1.1.6. Counting of colonies and calculation of appearance frequencies of resistant mutants
 - 3.1.1.7. Determination of MIC of resistant mutants
 - 3.2. Antimicrobial activity in gut
 - 3.2.1. Method of quantification
 - 3.2.2. Animal species
 - 3.2.3. Number of animals
 - 3.2.4. Route of administration
 - 3.2.5. Dose and frequency of administration
 - 3.2.6. Standard test methods
 - 3.2.6.1. Time-course of the concentrations in feces
 - 3.2.6.2. Concentration in the intestinal content
 - 3.2.6.3. Effect of fecal binding
4. Glossary
5. List of related guidelines, guidance and publications

1. Introduction

Regulatory authorities of various countries such as FDA (Food and Drug Administration) and international organizations and groups such as VICH (International Cooperation on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products) and OIE (Office International Des Epizooties) are establishing the guidelines for the issue of resistance of veterinary antimicrobial drugs, and a part of the draft guideline has already been released^{1), 2)}. This standard of studies was established in order that the sponsor (applicant for approval) conducts the study following the “Guidance on pre-approval information for registration of new veterinary medicinal products for food-producing animals with respect to antimicrobial resistance” (hereinafter referred to as the VICH antimicrobial resistance guideline) prepared by the Expert working group on antimicrobial resistance of VICH.

The VICH antimicrobial resistance guideline is a guidance for registration of therapeutic antimicrobial drugs intended for the use in food-producing animals in EU, Japan and USA, which provides the unified technical guidelines with respect to characterization of the selection of bacterial resistance concerned about human health. The information described in the VICH antimicrobial resistance guideline is classified into basic information and optional information. That is, the basic information is the antimicrobial class, the mechanism and type of action, antimicrobial spectrum of activity, resistance mechanisms and genetics, occurrence and rate of transfer of resistance genes, occurrence of cross-resistance, and pharmacokinetic data. On the other hand, the optional information is the *in vitro* mutation frequency studies, occurrence of co-resistance, antimicrobial drug activity in gut, other animal studies and historical information. Sponsors can choose to include some or all of this optional information at their own discretion.

The objective of this standard of studies is to clarify the study methods to obtain the following two information of different characteristics among this optional information. That is, the one is the “*in vitro* mutation frequency” study which is conducted to clarify the frequency of occurrence of mutants. The other is the study on the “antimicrobial activity in gut” to examine the degree of exposure of the test drug to intestinal flora.

The information obtained these two types of studies is not the one to evaluate the matters with respect to resistant mutants individually but used as a part of information to consider the effect of resistant mutants on humans comprehensively. For example, the discussion of the level of antimicrobial activity in gut should be used to evaluate synthetically the problem of resistant mutants together with the data of the MICs for foodborne pathogens and commensal organisms. Thus, the studies to be conducted according to this standard of studies provide a part of information required for characterizing the possibility of occurrence of resistance which may occur after administration of veterinary antimicrobial drugs to the animals subjected under the proposed conditions of use.

When these studies are conducted following this standard of studies, the appropriate methods coming up to its objective according to the properties of the test drugs and the characteristics of test animals should be selected as appropriate. If animals are used, it is desirable to increase the precision of studies, to make effort to reduce the number of animals and to consider animal welfare. If the newly developed method is scientifically valid, it can be used.

1.1. Relationship to other guidelines and guidance

This document shows the study standard to conduct the *in vitro* mutation frequency studies and the study on the “antimicrobial activity in gut”. This

study standard is prepared in the form incorporating the related study methods from the already released guidelines and guidance^{3), 4), 5), 6), 7)} on veterinary medicinal products and ethical drugs as much as possible.

2. Test drugs and formulations

The bulk drugs and preparations of therapeutic antimicrobial drugs intended for the use in food-producing animals are referred to as the test drugs and formulations. The study using the final preparation from the early stage of development is rarely conducted, but it is necessary to use the final preparation in the study on the "antimicrobial activity in gut". In this study standard, cattle, pig and poultry are considered the main food-producing animals.

3. Study methods

3.1. *In vitro* mutation frequency studies

The VICH antimicrobial resistance guideline introduces the methods shown in the "Antimicrobials in Laboratory Medicine, 4th edition"⁸⁾, that is, the concentration gradient plate method (slanted plate method) and the nitrosoguanidine method (mutation induction method) as the *in vitro* mutation frequency studies. The objective of the concentration gradient plate method is limited to qualitative examination on whether or not resistant mutants to a certain drug easily occur. Additionally, the nitrosoguanidine method is a special method to isolate mutants occurring at the frequency below the detectable spontaneous mutation frequency using nitrosoguanidine of strong mutagenicity. In Japan, on the other hand, the resistance acquisition study by subculture at the increased dose of the test drug according to the study methods to evaluate the feed additives^{9), 10)} or the study on appearance frequencies of spontaneous resistant mutants^{11), 12), 13)} have widely been used as the *in vitro* study methods for preparation of the attached data for application for approval of

veterinary antimicrobial drugs. This document describes the concrete methods of the study on appearance frequencies of spontaneous resistant mutants, from which quantitative data can be obtained according to the meaning of the VICH antimicrobial resistance guideline to examine the appearance frequencies of spontaneous resistant mutants.

3.1.1. *In vitro* appearance frequencies of spontaneous resistant mutants

The appearance frequencies of antimicrobial resistance to the test drug and the level of resistance of appeared antimicrobial resistance were determined by the following test methods:

3.1.1.1. Test bacterial species

According to the characteristics of the test drug, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium* or *Escherichia coli* shall be used as the test bacterial species. Multiple strains (at least three strains) per one of those bacterial species isolated from the test animals shall be used. As the control bacterial species, additionally, *E. faecalis* JCM7783 (=ATCC29212) strain or *E. faecium* JCM5804 (=ATCC19434) strain or *E. coli* JCM5491 (=ATCC25922) strain shall be used.

3.1.1.2. Test drugs

The test drug and the known drug of the same class as the control drug shall be used.

3.1.1.3. Culture media for enrichment and determination

For enrichment, a semisynthetic liquid medium based on the Mueller-Hinton medium, and for determination, a semisynthetic agar medium based on Mueller-Hinton medium shall be used. Irrespective of the product of any manufacturer, it is desirable to use the product of the same manufacturer for a series of studies, and the name of manufacturer shall be described clearly.

3.1.1.4. Concentrations of antimicrobial drug

The medium containing the drug at the concentration 4- and 8-times higher than that of the MIC determined in advance and, as the control, the medium not containing the drug used for determination of the count of inoculated bacteria shall be prepared. Additionally, the determination of MIC shall be conducted by the validated and standardized method as described in item 3.1.1.7.

3.1.1.5. Preparation of the bacterial solution for inoculation and the method of inoculation of bacteria

The test bacteria shall be incubated in a medium for enrichment at 37°C for 18 to 20 hours, diluted with a medium for enrichment, if necessary, or concentrated by centrifugation to prepare the inoculating bacterial solution of 10⁹ CFU/mL. This inoculating bacterial solution shall be inoculated to 10 agar plates containing the drug at 0.1 mL per plate. Simultaneously, in order to determine the count of inoculated bacteria, a series of dilutions of inoculating bacterial solution shall be inoculated onto the medium not containing the drug.

3.1.1.6. Counting of colonies and calculation of appearance frequencies of resistant mutants

The colonies (resistant mutants) appearing on the drug-containing medium after incubation at 37°C for 18 to 20 hours shall be counted. From this number of colonies and the simultaneously determined count of inoculated bacteria, the appearance frequency of resistant mutants shall be calculated.

3.1.1.7. Determination of MIC of resistant mutants

At each added concentration of drug, multiple colonies (at least 5 colonies) shall randomly be taken from all colonies growing on the drug-containing medium to determine the MIC of the test drug. The determination of MIC shall follow the

method of Japanese Society of Antimicrobials for Animals¹⁴⁾, Japan Society for Chemotherapy¹⁵⁾, or NCCLS^{16), 17)}.

3.2. Antimicrobial activity in the intestinal tract**3.2.1. Method of quantification**

It is necessary that, for the assay method used for determination of the concentrations of the test drug and metabolites contained in the collected sample, its sensitivity, precision and reproducibility shall be validated.

The assay method shall appropriately be selected according to the objectives of study, and the biological assay method by which the test drug and the metabolites with antimicrobial activity are determined without fractionation is one of the assay methods suitable for the objectives of this study. A certain method strongly correlated with the biological assay method and of better sensitivity, precision and reproducibility can be substituted, if any. The biological assay method is used in the study on the residue of veterinary medicinal products⁶⁾, in which the sensitivity, precision and reproducibility are the limit of detection of 0.05 ppm or lower, the recovery rate of 70% or higher in the spiked recovery experiment at 1 or 2 ppm and the coefficient of variation of about 10%, respectively.

3.2.2. Animal species

The study shall be conducted using the animal species to be clinically applied (test animal species) with an apparent history of use of feed and veterinary medicinal products.

3.2.3. Number of animals

It is necessary to conduct the study in the number of animals suitable to clarify the changes in the concentrations of the test drug and metabolites in feces and the distribution in the intestinal content after considering the precision of the study.

3.2.4. Route of administration

The route of administration shall be selected according to clinical application. If there are multiple routes of clinical administration, an appropriate route of administration shall be selected considering the toxicity in test animals and the route of administration used in the efficacy pharmacology study. If oral administration is selected, forced oral administration by gavage can be used, but it is necessary to use the final preparation as the test formulation.

3.2.5. Dose and frequency of administration

The dose shall be selected considering the expected clinical dose. If several levels of clinical dose are expected, the highest expected clinical dose shall generally be considered the dose. In principle, administration shall be conducted once.

3.2.6. Standard test methods

In the studies on absorption in the test animals, that is, the studies to examine the time-course of blood concentration and the studies to determine the distribution in main organs and tissues, feces and the intestinal content shall be collected, respectively, and the concentrations of the test drug and metabolites in the sample shall be determined to evaluate the pharmacokinetics. For these two studies, that is, the study to examine the "time-course of fecal concentration" and the one to examine the "concentration in the intestinal content" described in the item below, the study methods suitable for the objectives shall be selected considering the form of feeding of test animals and the characteristics of excretion. Additionally, the metabolites in these studies are those with antimicrobial activity.

Not taken in this document in detail, it is also possible to conduct discussion using the data on the amount of the test drug and the composition and amount of metabolites in feces determined to examine urinary and fecal excretions in the test animals.

Additionally, if there is a possibility that the test drug adsorbs to feces or the intestinal content to affect its antimicrobial activity, the extent of decrease in the concentration of the test drug due to adsorption to feces shall be clarified.

3.2.6.1. Time-course of the concentrations in feces

In the study to examine the changes in blood concentrations (whole blood concentration, plasma concentration, and serum concentration) of the test drug, feces shall be collected with time. That is, the change in the fecal concentrations of the test drug and metabolites in the test animals shall be examined by a single-dose study. Basically, oral administration shall be conducted after fasting. The time-point of collection required to clarify the prosperity and decay of the test drug and metabolites shall be established, and feces shall be collected so as not to be contaminated with urine.

3.2.6.2. Concentration in the intestinal content

In the study to examine the distribution of the test drug in main organs and tissues, not only main organs and tissues but also the colonic content shall be collected to determine the concentrations of the test drug and metabolites. Since the distribution study is conducted to examine the distribution of the test drug in organs and tissues, its time-course and accumulation, if necessary, it shall principally be conducted by single administration. In order to show the time-course of distribution, additionally, sampling shall generally be conducted near the time-point showing the highest blood concentration and in the elimination phase, if necessary.

3.2.6.3. Effect of fecal binding

The feces collected from the test animals shall be used as the test material. An appropriate amount of appropriate buffer solution to the collected feces shall be added to prepare a suspension, and the reaction

mixture prepared by addition of the test drug solution to the suspension shall be incubated at a certain temperature (for example, near the body temperature of animals) for a certain period. The concentration of the test drug in the supernatant obtained by centrifugation of the reaction mixture shall be determined before and after incubation to clarify the degree of decrease in the test drug concentration due to fecal binding. The test drug concentration and incubation period of the reaction mixture shall be decided with reference to the results obtained from the study to examine the pharmacological effects, the time-course of the fecal concentration previously described and the study on the concentration in the intestinal content.

4. Glossary

VICH: A trilateral (Japan, USA and EU) program aimed at harmonizing technical requirements for veterinary product registration, in which the trilateral organization for examination of approval and pharmaceutical parties participates. Its official name is the "International Cooperation on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products", which was started in April in 1996.

Food-producing animals: Although there are some regions considering sheep, goats, ducks and rabbits as major food-producing animals, cattle, pig and poultry are considered as major food-producing animals in this study standard according to the VICH antimicrobial resistance guideline. Additionally, since, for fish, the production system, the related bacterial population and the animal-originated concern about public health are basically different from those for cattle, pig and poultry, fish is omitted from the subject of this study standard same as the VICH antimicrobial resistance guideline.

Foodborne pathogens: Pathogens of which animals can be carriers in the gut and which become causes of foodborne poisoning in humans. *Salmonella* and *Campylobacter* are applicable.

Commensal bacteria: Bacteria living in or on animals but not showing pathogenicity in animals. Enterococci and non-pathogenic *E. coli* are applicable.

Concentration gradient plate method (slanted plate method): One of the *in vitro* tests to examine appearance of resistant mutants, which is a method to select resistant mutants by growing bacteria on an agar plate consecutively increasing the concentrations of antimicrobials. That is, an agar containing antibiotics is poured onto the slanted and solidified agar to prepare agar plates of consecutive concentration gradient of antimicrobials. Mutants are selected by inoculating and spreading the culture medium of the test bacteria onto this plate.

Validation: For example, to establish the sensitivity, precision, reproducibility and specificity of analytical method at the time when the test drug and its metabolites in the biological sample are quantified.

Bioassay: An assay method using the physiological effects on organisms as indices, which is used for determination of antimicrobial activity of antimicrobial substances. In the standard method, a disk (or stainless cylinder) is placed on an agar plate containing the test bacteria, and the sample solution is added and incubated. If the sample contains the substance of antimicrobial activity, a circular transparent zone (inhibition zone) produced around the disk due to inhibition of growth of the standard bacteria is formed. Using the regression equation determined from the concentration of the standard solution of the test antimicrobial and the diameter of its inhibition zone, the concentration of antimicrobial drug in the sample solution is calculated from the inhibition zone of the sample solution.

Studies on absorption, etc.: Studies conducted to clarify the pharmacokinetics of the drug in the body, which examine the absorption, distribution, metabolism and excretion of the test drug. For veterinary medicinal products, the test drug or the test formulations are administered to the test animals or experimental animals to examine the time-courses of the blood concentrations, the amount to be excreted into urine and feces, the amount to be excreted into bile and the concentrations in various organs and tissues and the metabolites in the body.

5. List of related guidelines, guidance and publications

- 1) VICH: Guidance on pre-approval information for registration of new veterinary medicinal products for food-producing animals with respect to antimicrobial resistance; for consultation at step 4 (2001)
- 2) OIE: Antimicrobial resistance: reports prepared by the OIE Ad hoc Group of experts on antimicrobial resistance (2001)
- 3) Ministry of Health and Welfare: Guidelines for non-clinical pharmacokinetic studies (1998)
- 4) Ministry of Health, Labour and Welfare: Clinical pharmacokinetic studies of medicinal products (2002)
- 5) Ministry of Health and Welfare: Guidance for safety evaluation of residual veterinary medicinal products in livestock food and aquatic food, Japanese Association of Residues and Safety in Animal Products, Tokyo (1998)
- 6) Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries: Guidelines for toxicity studies of new animal drugs. (5) Guidelines for residue tests (2000)
- 7) Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries: Guidelines, Detailed regulations for

various studies for application for manufacturing (importing) approval of veterinary medicinal products intended for the use in fishery animals (2000)

- 8) Rice LB, Bonomo RA: Antimicrobials in laboratory medicine, Lorian V, ed, 4th ed, 482-483, Williams and Wilkins, Baltimore (1996)
- 9) Takahashi I: Efficacy test methods of antimicrobial drugs, Kohanawa T, ed. 1st ed, 155-192. Fuji-Technosystem. Tokyo (1977)
- 10) Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries: Standards for Evaluation of feed additives and Outline of Procedures for Major Studies, 2nd ed., 63-68, Japan Scientific Feeds Association, Tokyo (1992)
- 11) Sato K, Inoue M, Mitsuhashi S: Chemotherapy, 32, S-1,1-12 (1984)
- 12) Barry AL, Thornsberry C, Jones RN: Antimicrob Agents Chemother, 29, 40-43 (1986)
- 13) Kamata S, Yoshida T, Matsunaga T, Uchida K.: Jpn Bull Anim Hyg, 33, 1-3 (1991)
- 14) Japanese Society of Antimicrobials for Animals: Determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) of drugs on animal-derived bacteria. Proceedings of The Japanese Society of Antimicrobials for Animals, 18, 40-41 (1997)
- 15) Japanese Society of Chemotherapy: Revision of the method of determination of the minimum inhibitory concentration (MIC), Chemotherapy, 29, 76-77 (1981)
- 16) NCCLS: Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard (1999)
- 17) NCCLS: Development of *in vitro* susceptibility testing criteria and quality control parameters for veterinary antimicrobial agents; approved guideline (1999)