

内閣府食品安全委員会事務局
平成23年度食品安全確保総合調査

ポジティブリスト制度施行に伴う暫定基準の設定された
農薬、動物用医薬品及び飼料添加物に係る
食品健康影響評価に関する調査報告書

ナイカルバジン

平成24年1月

株式会社三菱化学テクノロジー

はじめに

食品安全委員会では、ポジティブリスト制度導入に伴い、暫定基準の設定された農薬、動物用医薬品及び飼料添加物(以下「農薬等」という。)について、海外のリスク評価機関等で実施された評価結果を活用し、順次食品健康影響評価を行っているところである。

本報告書はこの内、ナイカルバジンについて、FAO/WHO 合同添加物専門家会議(以下「JECFA」という。)と最新の評価を行っている欧州食品安全委員会(以下「EFSA」という。)の評価書の翻訳を行うとともに、評価に必要な情報について整理し、取りまとめたものである。

平成 24 年 1 月
株式会社三菱化学テクニサーチ

目 次

ナイカルバジン

1. 調査の目的	5
2. 作業の概要	5
2.1. 調査対象物質	5
2.2. 評価書の翻訳	7
2.2.1. 評価書	7
2.3. 翻訳の整理	7
3. 評価書和訳	7
3.1 JECFA (1998 年)	9
3.2 JECFA (1998 年)	27
3.3 EFSA (2010 年)	41

海外のリスク評価機関における農薬の評価結果に関する調査 報告書

ナイカルバジン

1. 調査の目的

食品衛生法の一部を改正する法律(平成15年法律第55号)の施行に伴い、いわゆるポジティブリスト制度が、平成18年5月29日に導入された。本施行に伴い、農薬、動物用医薬品及び飼料添加物(以下「農薬等」という。)758物質に暫定基準が設定され、食品安全委員会では、これらの物質について、海外のリスク評価機関等で実施された評価結果を活用し、順次食品健康影響評価を行っているところである。

本調査は、国際的な評価機関である JMPR (FAO/WHO 合同残留農薬専門家会議)及び JECFA (FAO/WHO 合同残留添加物専門家会議)と最新の評価を行っている EFSA (欧州食品安全委員会)の評価書が、我が国での評価を行う上で有益性が高いため、今後評価を行うべき農薬のうち、JMPR 及び JECFA と EFSA の双方の評価を比較できるものについて、双方の評価書の翻訳を行うとともに評価に必要な情報について整理し、評価書ごとに毒性試験とその結果の概要を一覧表に取りまとめたものである。

2. 作業の概要

本調査では JMPR 及び JECFA と EFSA における評価書の翻訳及び整理を以下のように実施した。

2.1. 調査対象物質

本調査全体では、ポジティブリスト制度施行に伴う暫定基準が設定された農薬等の758物質のうち、表1に示した38物質を調査対象とした。本報告書では、これらのうちナイカルバジンの調査について報告した。

表1 調査対象の農薬等

番号	物質名	主な用途
1	5-プロピルスルホニル-1H-ベンズイミダゾール-2-アミン (アルベンダゾール)	動物薬・寄生虫駆除剤
2	イソメタミジウム	動物薬・寄生虫駆除剤
3	エトキシキン	農薬/飼料添加物・成長調整剤・抗酸化剤
4	オイゲノール	動物薬・麻酔薬
5	オルトフェニルフェノール	農薬・殺菌剤
6	カルバドックス(キノキサリン-2-カルボン酸含む)	動物薬・合成抗菌剤
7	キントゼン(PCNB)	農薬・殺菌剤
8	クロサンテル	動物薬・寄生虫駆除剤
9	クロルプロマジン	動物薬・鎮静剤
10	酢酸トレンボロン	動物薬・ホルモン剤
11	サラフロキサシン	動物薬・合成抗菌剤
12	ジエチルスチルベストロール(DES)	動物薬・ホルモン剤
13	ジクラズリル	動物薬・寄生虫駆除剤
14	シクロキシジム	農薬・除草剤
15	ジブチルヒドロキシトルエン	飼料添加物・抗酸化剤
16	ジメトリダゾール	動物薬・寄生虫駆除・抗原虫剤
17	スペクチノマイシン	動物薬・抗生物質
18	スルファジミジン	動物薬・合成抗菌剤
19	ゼラノール	動物薬・ホルモン剤
20	デキサメタゾン	動物薬・ホルモン剤
21	テクナゼン	農薬・殺菌剤・成長調整剤
22	ドジン	農薬・殺菌剤
23	トリクラベンダゾール	動物薬・寄生虫駆除剤

番号	物質名	主な用途
24	トリベヌロンメチル	農薬・除草剤
25	ナイカルバジン	動物薬/飼料添加物・合成抗菌剤・寄生虫駆除剤
26	ネオマイシン	動物薬・抗生物質
27	バシトラシン	動物薬/飼料添加物・抗生物質
28	ビオレスメリン	農薬・殺虫剤
29	ピペロニルブトキシド	農薬/動物薬・共力剤
30	ブチルヒドロキシアニソール	飼料添加物・抗酸化剤
31	フルアズロン	動物薬・ダニ駆除剤
32	フルメリン	農薬/動物薬・殺虫剤
33	プロモプロピレート	農薬・ダニ駆除剤
34	ポリミキシン B	動物薬・抗生物質
35	マレイン酸ヒドラジン	農薬・除草剤・成長調整剤
36	メロニダゾール	動物薬・寄生虫駆除剤・抗原虫剤
37	モキシデクチン	動物薬・寄生虫駆除剤
38	ロニダゾール	動物薬・寄生虫駆除剤・抗原虫剤

2.2. 評価書の翻訳

2.2.1. 評価書

ナイカルバジンに関して、これまでに食品安全委員会にて収集を行っている JECFA 及び EFSA における評価書の指定部分の翻訳を行った。各評価書等を表 2 に示した。

表 2 調査対象の評価書

機関	発行年	タイトル
JECFA	1998	FNP 41/11-JECFA 50/83, 1998
JECFA	1998	FAS 41-JECFA 50/115, 1998
EFSA	2010	Nicarbazine. EFSAJ1551, 2010

2.3. 翻訳の整理

評価書の翻訳について、評価書ごとに以下のように整理した。

- ・評価書ごとに見出しを整理し、原文の目次を作成した。
- ・翻訳の見出し部分に原文の該当ページを記載した。
- ・評価書ごとに毒性試験とその結果の概要を一覧表に取りまとめた。

3. 評価書訳

以下に評価書の指定箇所の全訳を、評価書ごとに掲載した。

ナイカルバジン 評価書和訳と情報整理

JECFA 1998

ウェブサイト:<ftp://ftp.fao.org/ag/agn/jecfa/vetdrug/41-11-nicarbazin.pdf>

FNP 41/11-JECFA 50/83

ナイカルバジン 評価書和訳と情報整理 JECFA (1998) 目次

ナイカルバジン(原文 p.83)	14
性質(原文 p.83)	14
性質と特性に関するその他の情報(原文 p.83)	14
食品中の残留物及びその評価(原文 p.83)	15
使用状況(原文 p.83)	15
概要(原文 p.83)	15
用量(原文 p.84)	15
代謝(原文 p.84)	15
放射能標識ナイカルバジン(原文 p.84)	15
薬物動態(原文 p.84)	15
生物学的利用能と排泄(原文 p.84)	15
代謝(原文 p.85)	17
ナイカルバジンの代謝物(原文 p.87)	18
組織残留物減少試験(原文 p.87)	19
放射能標識残留物の減少試験(原文 p.87)	19
未標識ナイカルバジンを用いた残留消失試験(原文 p.88)	21
鶏及び卵における解析方法(原文 p.89)	21
評価(原文 p.90)	22
薬物動態(原文 p.90)	23
代謝(原文 p.90)	23
残留物減少試験(原文 p.91)	23
解析方法(原文 p.92)	24
最大残留限界(原文 p.92)	25
ナイカルバジンの毒性試験と結果の概要 (評価書:JECFA 1998)	26
略称	26

原文 目次

	原文ページ
ナイカルバジン	83
性質	83
性質と特性に関するその他の情報	83
食品中の残留物及びその評価	83
使用状況	83
概要	83
用量	84
代謝	84
放射能標識ナイカルバジン	84
薬物動態	84
生体利用効率と排泄	84
代謝	85
ナイカルバジンの代謝物	87
組織残留物減少試験	87
放射能標識残留物の減少試験	87
未標識ナイカルバジンを用いた残留物減少試験	88
鶏と卵における解析方法	89
評価	90
薬物動態	90
代謝	90
残留物減少試験	91
解析方法	92
最大残留基準	92
引用文献	92
NICARBAZIN	83
IDENTITY	83
OTHER INFORMATION ON IDENTITY AND PROPERTIES	83
RESIDUES IN FOOD AND THEIR EVALUATION	83
CONDITION OF USE	83
General	83
Dosage	84
METABOLISM	84
Radiolabeled Nicarbazine	84
Pharmacokinetics	84
Bioavailability and Excretion	84
Metabolism	85
Metabolites of Naicarbazine	87
TISSUE RESIDUE DEPLETION STUDIES	87
Radiolabeled Residue Depletion Studies	87

Residue Depletion Studies Using Unlabeled Nicarbazin	88
METHODS OF ANALYSIS IN CHICKEN TISSUE AND EGGS	89
APPRAISAL	90
Pharmacokinetics	90
Metabolism	90
Residue Depletion Studies	91
Methods of Analysis	92
Maximum Residue Limits	92
REFERENCES	92

ナイカルバジン(原文 p.83)

原案

Dr.Robert J.Wells

オーストラリア政府分析研究所

ピンブル、オーストラリア

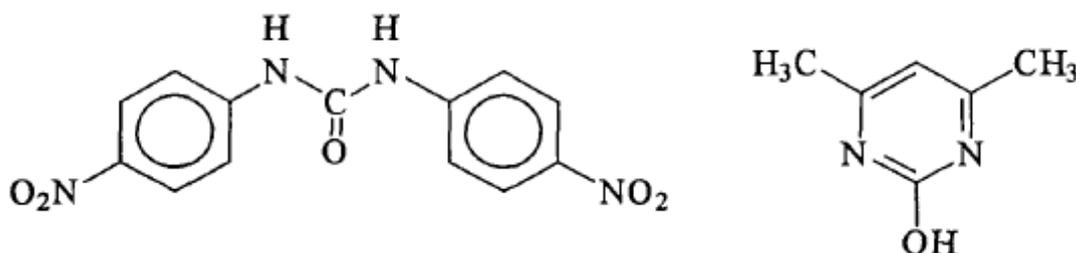
性質(原文 p.83)

化学名

N,N'-ビス(4-ニトロフェニル)尿素及び 4,6-ジメチル-2(1H)-ピリミジノン(等モル錯体)

4,4'-ジメチルカルバニリド及び 4,6-ジメチル-2-ピリミジノール(等モル錯体)

化学構造



分子式:

$C_{13}H_{10}N_4O_5$ (分子錯体のフェニル尿素部位)

$C_{19}H_{18}N_6O_6$ (フェニル尿素-ジメチルジメチルピリミジノン、1:1 分子錯体)

分子量:

292.25(分子錯体のフェニル尿素部位)

426.38(フェニル尿素-ジメチルジメチルピリミジノン、1:1 分子錯体)

性質と特性に関するその他の情報(原文 p.83)

純度:

ナイカルバジンは N,N'-ビス(4-ニトロフェニル)尿素及び 4,6-ジメチル-2(1H)-ピリミジノールのモル比 1:1 の混合物で、純度は少なくとも 96 %以上

外観:

薄黄色の粉末

融解度:

265-275 °C (dec.)

溶解性(g/L):

水
アルコール、エーテル
及びクロロホルム
希酸
ジメチルホルムアミド

ほぼ不溶。複合体はゆっくり解離する。
非常にわずかに溶解。複合体はゆっくり解離する。
ほぼ溶解。複合体は速やかに解離する。
溶解(1:700)複合体は解離。

ジメチルスルホキシド

溶解。複合体は解離。

食品中の残留物及びその評価(原文 p.83)

使用状況(原文 p.83)

概要(原文 p.83)

ナイカルバジンは鶏(ブロイラー)の盲腸及び腸のコクシジウムの予防のための抗コクシジウム薬として利用されている。動物又は家禽の製剤に単独で使用される。市販薬の構成物である N,N'-ビス(4-ニトロフェニル)尿素及び 4,6-ジメチル-2(1H)-ピリミジノンの複合体は抗コクシジウムの性質に不可欠だといわれているが、N,N'-ビス(4-ニトロフェニル)尿素と 4,6-ジメチル-2(1H)-ピリミジノンの等モル混合物では再現されない。

用量(原文 p.84)

ナイカルバジンは、飼料に 125 mg/kg (0.0125 %) の割合で混ぜ、連続して混餌投与させる。

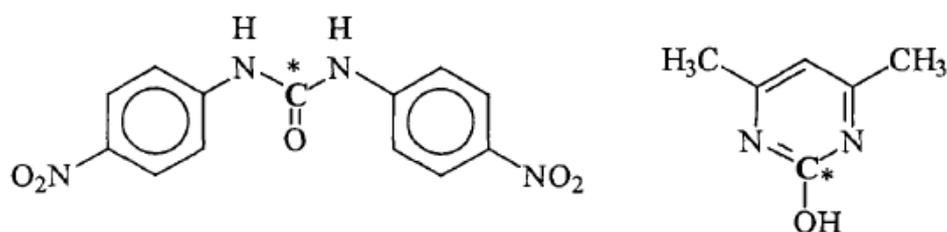
代謝(原文 p.84)

放射能標識ナイカルバジン(原文 p.84)

3 種の ^{14}C 標識ナイカルバジンを用いて様々な排泄及び薬物動態試験が行われた。初期試験ではビス-4-ニトロフェニル尿素のカルボニル基に特異的に ^{14}C 標識した物と、ピリミジノン環の 2 位に特異的に ^{14}C 標識した物の 2 種が用いられた。これらの分子標識部位を図 1 に示す。

ナイカルバジンは、溶液中に移行すると、ニトロフェニル尿素及びピリミジノンの成分から成る等モル複合体は分解する。元の複合体のそれぞれの構成物は異なる割合で個々に代謝される (Porter and Gilfillan, 1955)。そのため初期の標識実験では元のナイカルバジン複合体の両方の構成物の代謝運命を決定するために計画された。

図 1 薬物動態、代謝及び残留消失試験で用いた ^{14}C 放射能標識ナイカルバジンの構造



薬物動態(原文 p.84)

生物学的利用能と排泄(原文 p.84)

複合体のフェニル尿素又はピリミジノン部位を標識した ^{14}C -ナイカルバジンを投与した鶏で行った 5 つの試験の結果を表 1 及び表 2 にまとめる。鶏に、適切に標識した ^{14}C -ナイカルバジンを 3 日間混餌投与し、続いて 4 日間休薬した。試験期間中の尿及び糞便を収集して放射能を測定した。フェニル尿素又はピリミジノン部位の ^{14}C 標識ナイカルバジン 125 mg/kg を 3 日間混餌投与し、続いて 4 日休薬した鶏の試験中の尿及び糞便から回収された ^{14}C の回収率を表 1 に示した。尿及び糞便に存在する総放射能を 7 日間測定し投与量と比較した試験結果を表 2 に示した (Nessl, 1977)。放射能回収率は、投与 ^{14}C -ナイカルバジンのほぼ全てを占めており、フェニル尿素標識ナイカルバジンを投与した鶏では 94 %、ピリミジノン標識ナイカルバジンを投与した鶏では 104 %であった。

別の試験(Neddel, 1977)では、尿及び糞便中の¹⁴C標識ナイカルバジンの分布を、上記と同じ標識化合物及び同じ投与計画(投与3日、休薬4日)を用いた3つの異なる試験で測定した。排泄された放射標識フェニル尿素は、3日後に糞便中には平均50%、尿中には5.6%排泄された。休薬4日のs終了時では、更に41%が糞便中に、3.3%が尿中に排泄された。これに対して、排泄された放射標識ピリミドンは、投与3日後では平均83%が尿中に、7.4%が糞便中に排泄された。休薬4日の終了時では、更に7%が尿中に、2.6%が糞便中に排泄された。

複合体のピリミジン部位の主な排泄経路は尿であった(90%)。3日目までに投与の83%が排泄されていることから、この部位はよく吸収され、また速やかに排泄されることが証明された。対照的に、ナイカルバジン複合体のフェニル尿素部位はピリミジンよりも遅い速度で主に糞便中に排泄され(90%)、休薬後の最初の3日で大半の放射能が回収された。ピリミジンの尿中にみられた濃度が5-10%に過ぎないことは、フェニル尿素部位は腎臓を経由すると速やかには排泄されないことを示している。ナイカルバジンのフェニル尿素部位の血漿濃度はピリミジン部位よりも高く、フェニル尿素部位の血漿クリアランス値はピリミジン部位よりもかなり低かった(Nesel, 1977)。

表1 フェニル尿素又はピリミジン部位¹⁴C標識ナイカルバジン125 mg/kgを3日間混餌投与し、続いて4日休薬した鶏の試験中の尿中及び糞便中から回収された¹⁴Cの回収率

日	ピリミジン環 ¹⁴ C標識				ビス-4-ニトロフェニル尿素 ¹⁴ C標識			
	投与量 (mg)	総投与 量(%)*	排泄量 (尿)(%)	排泄量 (糞便) (%)	投与量 (mg)	総投与 量(%)	排泄量 (尿)(%)	排泄量 (糞便) (%)
投与1日	27.5	37	21.7	1.3	17.5	22	0.4	4.6
投与2日	28.8	75	53.8	4.1	34.4	65	5.9	23.1
投与3日	17.5	100	83.9	6.7	28.1	100	7.5	44.5
休薬1日		100	90.4	8.2		100	8.4	63.8
休薬2日		100	90.7	9.0		100	8.8	79.4
休薬3日		100	90.7	9.3		100	9.0	83.7
休薬4日		100	90.8	9.8		100	9.0	85.4
排泄されたピリミジン部位の総量=100.6%					排泄された尿素部位の総量=94.4%			

*3日間で投与した総投与量の%を計算

表2 フェニル尿素又はピリミジノン部位 ^{14}C 標識ナイカルバジン 125 mg/kg を3日間混餌投与し、続いて4日休薬した人口肛門を持つ鶏の尿中及び糞便中の ^{14}C 総回収率をナイカルバジン相当量に換算した

日	ピリミジノン環を ^{14}C 標識				ビス-(4-ニトロフェニル)尿素を ^{14}C 標識			
	投与量 (mg)	^{14}C 排泄 (尿) (%) *	^{14}C 排泄 (糞便) (%) *	化合物排泄 (総量) (%)#	投与量 (mg)	^{14}C 排泄 (尿) (%) *	^{14}C 排泄 (糞便) (%)	%化合物排泄 (総量) (%) #
7週齢鶏	53.1	89.8	10.2	110	50	10.1	89.9	95.4
14週齢鶏 実験1	NM	NM	NM	NM	78.8	7.1	92.9	93.1
14週齢鶏 実験2	73.8	90.3	9.7	100.5	80	9.5	90.5	94.4
回収率平均値 (%)		90	10	105.3		8.9	91.1	94.1

*尿中及び糞便中に排泄された ^{14}C -化合物の総結合量の%を計算

#尿及び糞便の混合物中に排泄された、投与 ^{14}C -化合物の%を計算

代謝(原文 p.85)

^{14}C を用いた試験で、ナイカルバジンのピリミジノン部位は、休薬4日後には明白な残留が認識できない程速やかに排泄された。この分子の残留物が有害である可能性は大変低いため、この残留物に関する代謝試験は行われていない。対照的に、ナイカルバジンのフェニル尿素部位はかなりゆっくりと排泄され、肝臓及び腎臓に明らかに残留する。

鶏にナイカルバジン 125 mg/kg を7日間混餌投与して、2日から7日に連続してと殺した。尿素部位及びピリミジノン部位は図1に示したようにいずれも ^{14}C 標識し、この試験結果を表3にまとめた。 ^{14}C 標識ピリミジノン濃度は2日目の血漿における 2.1 mg/kg が最大で、一方 ^{14}C 標識フェニル尿素の血漿濃度の最大は4日目の 3.8 mg/kg だった。 ^{14}C 標識複合体の尿素部位の濃度は血漿及び筋肉よりも肝臓及び腎臓でより高く、一方 ^{14}C 標識ピリミジノンの濃度は肝臓で最も高いにも関わらず、4つ全てのマトリクスにおいて同程度であった。ナイカルバジン複合体のピリミジノン部位の肝臓及び腎臓における濃度は、複合体のフェニル尿素部位の濃度の約10分の1だった(Nessel, 1977)。

1950年に行われた Merck の初期の放射能標識試験では、比色測定でも同定又は定量できた唯一の代謝物は N,N'-ビス(4-アセチルアミノフェニル)尿素であった。比色解析から、 ^{14}C 放射能標識フェニル尿素は広く代謝されず、投与終了後4日でほぼ完全に排泄されると結論された。

表3 複合体のフェニル尿素部位及びピリミジノン部位標識 ^{14}C ナイカルバジンを 125 mg/kg、7日間混餌投与した4週齢の鶏の2日目から7日目における血漿、肝臓、腎臓及び筋肉組織中の分析結果

と殺日数	ナイカルバジンに換算した濃度(mg/kg)*							
	血漿		肝臓		腎臓		筋肉	
	^{14}C 尿素	^{14}C ピリミジノン	^{14}C 尿素	^{14}C ピリミジノン	^{14}C 尿素	^{14}C ピリミジノン	^{14}C 尿素	^{14}C ピリミジノン
2日目	2.50	2.07	23.11	2.36	18.26	3.52	4.11	2.13
3日目	2.54	1.84	26.48	2.15	19.26	3.09	3.86	2.03
4日目	3.80	1.58	34.79	1.89	27.44	2.48	5.57	1.52
5日目	2.75	1.07	29.82	1.32	20.35	1.96	4.52	1.42
7日目	3.33	1.79	33.78	2.08	26.74	2.95	5.98	1.63

^{14}C 尿素=ビス-(4-ニトロフェニル)尿素のカルボニル器を特異的に ^{14}C 標識

^{14}C ピリミジノン=ピリミジノン環の2カ所を特異的に ^{14}C 標識; *二反復の平均

放射標識試験に基づく初期試験の懸念は、 ^{14}C 標識フェニル尿素のカルボニル基に ^{14}C 原子を配置したことであった。この位置は不安定であり、そのため放射標識は、おそらく広範囲に及ぶナイカルバジンのフェニル尿素部位の代謝分解の初期段階で消失しやすいと考えられる。一般的に、フェニル尿素部位の ^{14}C 標識ナイカルバジンをを用いた代謝試験が行われてきた(Manthey, 1986)。約6週齢の Hubbard x White Mountain ブロイラーに、 ^{14}C -ナイカルバジン 50 mg/kg を単独、又はイオノフォアと共に5日間混餌投与し、投与終了後直ちにと殺した。イオノフォアの有無にかかわらず、代謝パターンは同じであった。親ナイカルバジンは肝臓の総放射能のうち約79%を占め、代謝物 M-3 は約10%、M-1 は約2%であった。腎臓の放射能の約6%が親化合物であり、13%が代謝物 M-1 で、残りは抽出不可能な極性活性物であった。代謝物 M-2 は排泄物中のみでみられた。検出した放射能平均は、上記試験で ^{14}C -ナイカルバジンを投与した鶏組織中のナイカルバジン量 mg/kg として換算して表4に示した。

表4. 放射標識 ^{14}C -ナイカルバジン 50 mg/kg を5日間投与した鶏の肝臓、腎臓、筋肉及び脂肪における化合物代謝物の分析結果

試験番号	鶏の数	ナイカルバジンに換算した組織中濃度(mg/kg)				
		肝臓	腎臓	筋肉	皮膚	脂肪
1	6	10.84	7.17	1.47	1.52	1.77
2	8	11.64	7.57	1.35	1.62	2.00
3*	8	14.00	10.09	2.13	2.26	2.65

*=ナイカルバジンはイオノフォアと一緒に投与した。

ナイカルバジンの代謝物(原文 p.87)

代謝物コード	物質
M1	N,N'-ビス(4-アセチルアミノフェニル)尿素
M3	N,N'-4 アセチルアミノ-4'-ニトロジフェニル尿素
M2	1,4-ジアセチルアミノベンゼン

組織残留物消失試験(原文 p.87)

放射能標識残留物の減少試験(原文 p.87)

数年にわたって Merck & Co.及び Eli Lilly & Co.により行われた組織分布及び排泄の試験は、EU-SCAN に最終化合物評価として合同で提出された報告書にまとめられた (Merck and Lilly, 1986)。この報告書が基にした原文書のほとんどは入手できないため、ここではこの報告書で述べられている結果についてのみ議論する。

鶏にナイカルバジン 125 mg/kg を 7 日間混餌投与し 2 日目から 7 日目に連続してと殺した試験の結果については、上記に議論し表 5 にまとめた。

両部位に標識したナイカルバジン 125 mg/kg (図 1 参照) を 3 日間混餌投与した鶏の残留消失試験を表 5 に示した (Merck and Lilly, 1986)。鶏は休薬直後 (3 日目)、休薬後 2 日 (5 日目)、それから 3 日おきに 14 日目まで及び最後に 21 日目に、連続してと殺された。

表 5 のデータから、両化合物及びその代謝物が鶏から速やかに排泄されることが示された。感度 0.003-0.004 mg/kg のアッセイによると、全ての組織において基本的に休薬 5 日後までにナイカルバジンのピリミジン部位由来 ¹⁴C 残留物が消失した。ナイカルバジンのフェニル尿素部位由来 ¹⁴C 残留物は、基本的に休薬 5 日後の肝臓においてのみ存在していた。

表 5 フェニル尿素部位及びピリミジン部位を標識した ¹⁴C-ナイカルバジン 125 mg/kg を 3 日間混餌投与しその後休薬した鶏の血漿、肝臓、腎臓及び筋肉の解析結果

と殺した日数	ナイカルバジンに換算した濃度 (mg/kg)*							
	血漿		肝臓		腎臓		筋肉	
	¹⁴ C 尿素	¹⁴ C ピリミジン	¹⁴ C 尿素	¹⁴ C ピリミジン	¹⁴ C 尿素	¹⁴ C ピリミジン	¹⁴ C 尿素	¹⁴ C ピリミジン
3 日目*	4.48-5.32	1.50-1.79	41.48-51.5	1.80-2.38	36.58-40.05	2.63-3.73	8.15-9.30	1.78-2.00
5 日目#	<0.04	<0.04	0.2-0.34	0-0.216	0-0.085	<0.04	<0.04	0-0.18
8 日目#	<0.04	<0.04	0.105-0.228	<0.04	0-0.13	<0.04	<0.04	0-0.115
11 日目*	<0.04	<0.04	0.080-0.088	<0.04	<0.04	<0.04	<0.04	<0.04
14 日目*	<0.04	<0.04	<0.04	<0.04	<0.04	<0.04	<0.04	<0.04
21 日目*	<0.04	<0.04	0.053-0.073	<0.04	<0.04	<0.04	<<0.04	<0.04

¹⁴C 尿素=ビス(4-ニトロフェニル)尿素のカルボニル基の特異的 ¹⁴C 標識

¹⁴C ピリミジン=ピリミジン環の 2 カ所の特異的 ¹⁴C 標識;

2 羽の鶏の値の幅; # 5 羽の鶏の値の幅

Lilly によって行われた試験 (Merck and Lilly, 1986) では、分子複合体の尿素又はピリミジン部位のいずれかに ¹⁴C 標識ナイカルバジン 50 又は 60 mg/kg がイオノフォアと組み合わせて投与された。5 日間投与して最終投与後直ちにと殺した。表 6 に示した結果から、それまでの他の試験の議論と一致する組織分布パターンが示された。と殺した時点で、複合体のピリミジン部位残留物はジニトロフェニル尿素残留物と比較してかなり少ない。他の全ての試験では、ジニトロフェニル尿素残留物は肝臓と腎臓において最も高い。

表 6 ¹⁴C 標識ナイカルバジンを 5 日間投与した直後にと殺した鶏の肝臓、腎臓、筋肉、皮膚及び脂肪に

おける残留物の分析結果

試験番号	標識部位及び投与量	ナイカルバジンに換算した組織中濃度 (mg/kg)				
		肝臓	腎臓	筋肉	皮膚	脂肪
1	¹⁴ C-尿素 60 mg/kg	14.86	11.46	2.36	2.59	2.43
1	¹⁴ C-ピリミジノン 60 mg/kg	0.28	0.34	0.31	0.18	-
2	¹⁴ C-尿素 50 mg/kg	11.15	7.24	1.18	1.81	1.93

残留消失試験でも、同様に分子のフェニル尿素部位 ¹⁴C 標識ナイカルバジン及びイオノフォアの混合物を 50 mg/kg、6 日間鶏に投与した。休薬後 0、1、3、5 及び 7 日に 4 羽ずつと殺した。総放射能を測定し、HPLC でフェニル尿素部位の濃度を測定した。これらの試験の結果を表 7 に示す。放射能及び HPLC の測定結果は筋肉、脂肪及び皮膚で良く一致していて、これらの組織中には代謝物は存在していなかった。休薬 5 日後で親化合物の著しい残留が見られたのは肝臓のみであった。

表 7 ¹⁴C-ナイカルバジン 50 mg/kg 体重を 6 日間投与して様々な休薬時間後にと殺した鶏の肝臓、腎臓、筋肉、皮膚及び脂肪の残留物の解析結果

組織		休薬後のと殺日数				
		0	1	3	5	7
肝臓	NC (mg/kg)	10.24	4.82	0.50	0.10	ND
	TR (mg/kg)	16.81	7.88	1.19	0.22	0.06
	NC/TR 比	0.61	0.61	0.42	0.45	-
腎臓	NC (mg/kg)	2.95	1.32	0.1	ND	NA
	TR (mg/kg)	12.09	5.38	0.8	0.14	0.03
	NC/TR 比	0.24	0.25	0.13	-	-
筋肉	NC (mg/kg)	1.52	0.49	0.1	ND	NA
	TR (mg/kg)	2.19	0.76	0.11	0.02	ND
	NC/TR 比	0.69	0.64	0.91	-	-
皮膚	NC (mg/kg)	2.98	1.09	0.1	ND	NA
	TR (mg/kg)	2.44	0.85	0.13	0.03	0.01
	NC/TR 比	1.22	1.28	0.77	-	-
脂肪	NC (mg/kg)	2.67	0.78	0.12	ND	NA
	TR (mg/kg)	2.85	0.97	0.13	0.02	0.01
	NC/TR 比	0.94	0.80	0.92	-	-

NC=N,N'-ビス(4-ニトロフェニル)尿素； TR=総残留物量； ND=検出不能； NA=解析不能

放射能測定を行った総残留物に対する HPLC 測定によるナイカルバジン残留物の割合は、休薬 0、1、3 及び 5 日において、肝臓でそれぞれ 0.61、0.61、0.42 及び 0.45、腎臓で 0.24、0.25、0.13 及び測定不可能、筋肉で 0.69、0.64、0.91 及び測定不可能、そして皮膚と脂肪においては全ての測定値が 0.77 から 1.28 の間であった。

未標識ナイカルバジンをを用いた残留消失試験(原文 p.88)

ナイカルバジン 125 mg/kg の混餌濃度の飼料を 3 日齢から 44 日齢まで混餌投与した残留消失試験が行われた。最終投与から 0、1、3、5、7 及び 9 日に、1 群 8 羽(一群雄雌各 4 羽)ずつと殺した。可食組織中のナイカルバジンのフェニル尿素部位を、定量限界 0.1 mg/kg、検出限界 0.03 mg/kg のパルスポーラログラフィー法により解析した(Wood and Dowling, 1980)。この試験結果を表 8 に示す。このデータにより、全休薬時間において最も濃度が高かったのは肝臓で、次いで腎臓、皮膚/脂肪及び筋肉であったことが示された。腎臓、皮膚/脂肪及び筋肉における残留値は、4~6 日で 0.1 mg/kg 未満まで低下し、休薬 1 日目以降の肝臓の値と比較すると 10 倍低かった。囲いの中のごみをつついている鶏*については、化合物再利用の証拠は得られなかった。またこの試験では凍結組織中の残留物は、-20℃で少なくとも 5 ヶ月安定であることがわかった。解析結果は回収率 80 %以上になるものは補正していない。

*原文の「chickens picking at the litter of the holding pen」は、文意から litter をごみと訳した。

表 8 ナイカルバジン 125 mg/kg を 42 日間投与し、様々な休薬時間でと殺した鶏の肝臓、腎臓、筋肉及び皮膚/脂肪の化合物残留

休薬後からと殺までの日数	フェニル尿素により測定した組織にナイカルバジン濃度幅 (mg/kg)			
	肝臓	腎臓	筋肉	皮膚/脂肪
1 日	14.4-21.0	2.8-5.4	1.4-2.2	1.6-3.0
3 日	3.0-9.4	0.18-2.5	0.12-0.78	0.18-0.86
5 日	0.40-2.7	<0.1-0.28	<0.1-0.1	<0.1-0.22
7 日	0.14-0.59	<0.1	<0.1	<0.1-0.1
9 日	<0.1-0.12	<0.1	<0.1	<0.1

LOQ=0.1 mg/kg; LOD=0.03 mg/kg; 各時点において 8 羽をと殺

より近年の試験(Kramer, 1990)では、鶏にナイカルバジンを 125 mg/kg の混餌濃度で 49 日間投与した。休薬後、一群 4 羽(一群雄雌各 2 羽)を投与 24、36、48、60 及び 72 時間後にと殺した。肝臓、筋肉及び皮膚/脂肪の N,N'-ビス(4-ニトロフェニル)尿素の残留濃度は Lewis (1989) の HPLC の手法で測定された。表 9 に示した結果は初期試験の結果と一致していたが、初期試験では休薬 3 日まで測定していなかった。この時の筋肉及び皮膚/脂肪の残留物は 0.2 mg/kg 以下で、一方最も高い肝臓の残留濃度は 3.39 mg/kg だった。

表 9 ナイカルバジン 125 mg/kg を 49 日間投与し、様々な休薬時間でと殺した鶏の肝臓、腎臓、筋肉及び皮膚/脂肪の化合物残留

休薬からと殺までの時間	フェニル尿素により測定した組織にナイカルバジン濃度幅 (mg/kg)		
	肝臓	筋肉	皮膚/脂肪
24 時間	14.4-21.0	1.4-2.2	1.6-3.0
36 時間	3.0-9.4	0.12-0.78	0.18-0.86
48 時間	0.40-2.7	<0.1-0.1	<0.1-0.22
60 時間	0.14-0.59	<0.1	<0.1-0.1
72 時間	<0.1-0.12	<0.1	<0.1

*各時点において 4 羽をと殺(雄 2 羽、雌 2 羽)

鶏及び卵における解析方法(原文 p.89)

ナイカルバジンの解析手法で初期に報告されているものは示差パルスポーラログラフィー又は比色分析

に基づいていた。これらの手法は現在の制御手法で必要とされる感度又は選択性に欠けていたが使用され、上記で論じた残留試験のうちいくつかのデータもこの手法で収集された(例 Michielli and Downing 1974)。監査機関によって一般的に 1 mg/kg 以下が求められる鶏の組織残留も、示差パルスポーラログラフィーによって得られた。複合体の 4,4'-ジニトロフェニル尿素部位はエチルアセテートで抽出された。溶媒の除去後、腎臓及び肝臓の試料はアセトニトリル及び少量のジメチルスルホキシド(DMSO)を含むアセトニトリル/水溶液の一連のヘキサン洗浄により精製され、続いてジクロロメタン中に抽出した。ジクロロメタンの除去後、ヘキサン/トルエン洗浄後の DMSO 溶液残留物についてのパルスポーラログラムが得られた。得られたポーラログラムでは、基本的に未処理の鶏組織では放射能は検出されず、0.1-0.4 mg/kg に増加した組織回収率のそれぞれ平均値は肝臓で 73 %、腎臓で 76 %、筋肉で 85 %及び皮膚-脂肪で 94 %であった(Wood and Dawning, 1980)。組織中の定量限界は 0.1 mg/kg であったが、提唱されている検出限界はさらに低く 0.03 mg/kg であった。

鶏の組織中のナイカルバジン残留物を測定した最初的高速液体クロマトグラフィー(HPLC)手法は、1983年に発表(Takahashi and Yoshida)され、続いて卵中のナイカルバジンのフェニル尿素部位を測定するための HPLC では検出手段として UV-スペクトロフォトメトリーが用いられた(Malisch, 1986)。

近年のナイカルバジンのフェニル尿素部位の解析手法には、LC での測定に UV 検出が付加され、続く鶏組織中のナイカルバジン検出のために LC-サーモスプレイ質量分析が採用された(Lewis et al., 1989)。ナイカルバジンのジニトロフェニル尿素部位は組織からエチルアセテートを用いて抽出された。濾過、蒸発の後、抽出物はアセトニトリルヘキサンを使った液液分配と、続くアルミナクロマトグラフィーにより精製した。ジニトロフェニル尿素を分離し、340 nm の UV 検出器を付属したオクタデシルシリルカラムによる逆相 LC で測定した。強化組織(fortified tissues)由来のフェニル尿素の総回収率は 83.4 ± 3.1 %で、変動係数(CVs)は 10 %以下であった。この手法により肝臓、腎臓、筋肉及び脂肪組織において評価された最低濃度は、0.10 mg/kg であった。検出限界値は 0.020 mg/kg に確立された。分析物の性質は、精製した抽出物を負イオン検出及び選択的イオンモニタリングを用いたサーモスプレイ質量分析のスペクトル解析で確認した。m/z 302(M⁺)、272 及び 164 の 3 種のイオンが分析物の特徴である。4 つの研究所において鶏の肝臓及び筋肉を用いて行われた US-FDA による手法の評価試験が報告された(Leadbetter and Matusik, 1993)。4 mg/kg において、試験の上での平均回収率及び CVs は筋肉及び肝臓でそれぞれ 87.1 % (10.9 %)と 87.4 % (7.5 %)であった(n=21)。残留試験の議論の初期段階の 1990 年の間に、この手法を用いた別の評価データが出された(Hazelton-Planalquimica, 1990)。固相分散クリーンアップに基づく類似の LC 手法もまた発表された(Schenck, 1992)が、Lewis の手法に勝る利点は示されなかった。

ナイカルバジンについて、産卵鶏を用いた確認は行われていないが、卵中の予期されない残留物(accidental residue)を監視する手法がいくつかあり、近年の LC 手法で実証されている(Kondo et al., 1993)。ナイカルバジンを与えた卵中の回収率は 90.2 %で、検出限界は 0.005 mg/kg であった。ナイカルバジンを 0.07 から 1.39 mg/kg の幅で混餌投与した鶏から得られた卵の 10 %でナイカルバジンが検出されたが、購入卵からは検出されなかった。

評価(原文 p.90)

ナイカルバジンはブロイラーの盲腸及び腸のコクシジウムの予防のための抗コクシジウム薬で、長期の使用実績(40年)がある。市販薬の構成成分である N,N'-ビス(4-ニトロフェニル)尿素及び 4,6-ジメチル-2(1H)-ピリミジンの複合体が抗コクシジウム作用には必要である。ナイカルバジンは初期飼料中 125

mg/kg(0.0125 %)で混合し、連続投与する。

薬物動態(原文 p.90)

排泄試験は、ナイカルバジン分子のフェニル尿素部位及びピリミジノン部位^[14C]放射標識ナイカルバジンを投与した鶏を用いて行われた。複合体のピリミジノン部位の主な排泄経路は尿であった(>90 %)。このピリミジノン部位はよく吸収されることが証明された。またピリミジノン部位の排泄は速やかであり、最終投与3日後までに83 %が排泄された。これとは対照的に、ナイカルバジン複合体のフェニル尿素部位の大部分(90 %)は糞便を通じて排泄され、ピリミジノン部位よりもペースは遅いものの、放射能の大半は休薬後の最初の3日間で回収された。尿中に観察されたフェニル尿素部位の濃度は、ピリミジノン部位の5-10 %に過ぎず、このことから腎臓は主な排泄経路ではないことが示された。

代謝(原文 p.90)

フェニル尿素及びピリミジノン部位の両方を^[14C]放射標識したナイカルバジンの混餌濃度が125 mg/kgの飼料をブロイラーに7日間混餌投与し、2日目から7日目に投与群ごとにと殺した。複合体の^[14C]標識フェニル尿素部位の濃度は血漿及び筋肉に比べて肝臓及び腎臓でより高かった。^[14C]標識ピリミジノンの濃度は腎臓で最も高く、筋肉、血漿及び肝臓では僅かに低かった。ナイカルバジンのピリミジノン部位の肝臓及び腎臓における濃度はフェニル尿素部位の約10倍少ない。ナイカルバジンのピリミジノン部位は速やかに排泄され、またその代謝物も未検出であることから、続く代謝と残留試験の焦点はほぼフェニル尿素部位のみに絞られた。

別の試験では、混餌濃度が50 mg/kgの^[14C]-ナイカルバジンを単独又はイオノフォアとともに5日間投与したブロイラーを投与終了後直ちにと殺した。観察された代謝パターンはイオノフォアの有無に関わらず同じであった。肝臓の総放射能のうち親ナイカルバジンのフェニル尿素部位は79 %、代謝物M-3(N,N'-4-アセチルアミノ-4'-ニトロジフェニル尿素)は約10 %、M-1[N,N'-ビス(4-アセチルアミノフェニル)尿素]は2 %であった。腎臓の放射能は6 %が親化合物、13 %が代謝物M-1、残りの残留物は検出不可能であった。これらのデータからN,N'-ビス(4-ニトロフェニル)尿素は全ての残留消失試験でマーカーとして選択された。

残留物減少試験(原文 p.91)

鶏の残留消失試験では、両分子を^[14C]標識したナイカルバジンを用いた125 mg/kgの混餌飼料を3日間投与したところ、親化合物及び代謝物はともに速やかに排泄されることが示された。0.003-0.004 mg/kgの感度のアッセイによると、休薬後5日目までに全ての組織でナイカルバジンのピリミジノン部位由来の残留物が消失していた。ナイカルバジンのピリミジノン部位から放出された^[14C]は休薬後5日では肝臓にのみ存在していた。

2つめの試験では、鶏に分子複合体のフェニル尿素又はピリミジノン部位のいずれかを^[14C]放射標識したナイカルバジンを用いて50又は60 mg/kgの混餌飼料を、単独又はイオノフォアとともに混餌投与した。鶏には5日間投与し、最終投与直後にと殺した。複合体のピリミジノン部位に起因する残留物は、ジニトロフェニル尿素残留物に比べてかなり低かった。ピリミジノン残留物に対するフェニル尿素の割合は、と殺時の肝臓、腎臓、筋肉及び脂肪においてそれぞれ53:1、34:1、8:1、14:1であった。他の全試験では、ジニトロフェニル尿素残留物は肝臓及び腎臓で最も高かった。

別の残留消失試験では、鶏に分子のフェニル尿素部位を^{14C}標識したナイカルバジンを用いて50 mg/kgの混餌飼料をイオノフォアとともに6日間投与した。総放射能をモニターし、HPLCによって薬物の

フェニル尿素部位の濃度を測定した。この試験結果を表 10 にまとめた。またマーカ-残留物である N,N'-ビス(4-ニトロフェニル)尿素の総放射能に対する割合も示した。

表 10 ナイカルバジンを 50 mg/kg 体重、6 日間投与した鶏のナイカルバジン残留物量(mg/kg)

組織	ナイカルバジンの部位	化合物投与後と殺までの日数				
		0	1	3	5	7
肝臓	NP	10.24	4.82	0.50	0.10	ND
	TR	16.81	7.88	1.19	0.22	0.06
	NP/TR	0.61	0.61	0.42	0.45	-
腎臓	NP	2.95	1.32	0.1	ND	NA
	TR	12.09	5.38	0.8	0.14	0.03
	NP/TR	0.24	0.25	0.13	-	-
筋肉	NP	1.52	0.49	0.1	ND	NA
	TR	2.19	0.76	0.11	0.03	ND
	NP/TR	0.69	0.64	0.91	-	-
皮膚	NP	2.98	1.09	0.1	ND	NA
	TR	2.44	0.85	0.13	0.03	0.01
	NP/TR	1.22	1.28	0.77	-	-
脂肪	NP	2.67	0.78	0.12	ND	NA
	TR	2.85	0.97	0.13	0.02	0.01
	NP/TR	0.94	0.80	0.92	-	-

NP=N,N'-ビス(4-ニトロフェニル)尿素; TR=総残留量; ND=検出不能; NA=解析不能

ある試験では鶏にナイカルバジン 125 mg/kg の混餌飼料を毎日、49 日間混餌投与した。休薬 24、36、48、60 及び 72 時間後にと殺した。肝臓、筋肉及び皮膚/脂肪中の残留物濃度を HPLC により測定した。休薬 72 時間後において、筋肉及び皮膚/脂肪の残留物は 0.2 mg/kg 以下であった。肝臓の残留物濃度が最も高かったのは休薬 36 時間後で 7.09 mg/kg であった。初期の長期試験では、若い雛にナイカルバジン 125mg/kg の混餌飼料を 3 日齢から 44 日齢まで混餌投与した。鶏は投与群ごとに最終投与 1、3、5、7 及び 9 日後にと殺された。全ての休薬時間で、N,N'-ビス(4-ニトロフェニル)尿素の最高濃度は肝臓中でみられた。腎臓、皮膚/脂肪及び筋肉中のそれぞれの残留物は、より少なかった。腎臓、皮膚/脂肪及び筋肉における残留物は 5 日間で 0.2 mg/kg 未満にまで減少し、休薬 1 日後から肝臓における値より 10 倍低かった。肝臓のマーカ-残留物濃度の幅は 1 日目では 14.4-21 mg/kg、3 日目では 3.0-9.4 mg/kg、5 日目では 0.4-2.7 mg/kg、7 日目では 0.14-0.59 mg/kg 及び 9 日目では <0.1-0.12 mg/kg であった。

解析方法(原文 p.92)

鶏組織中のナイカルバジンのフェニル尿素部位の残留物測定には、いくつかの HPLC 手法が利用可能である。UV 検出器を利用する方法は、ナイカルバジン残留物の定期的モニタリングに適している。検出限界は 0.02 mg/kg を実現できる。最近の手法では、ナイカルバジンのフェニル尿素部位の解析は UV 検出器を配置した HPLC で行い、続いて LC-サーモスプレイ質量分析を用いて鶏組織中のナイカルバジンを確認する。強化組織から回収された総フェニル尿素の平均は 83 %で、変動係数は 10 %以下であった。US-FDA が計画した試験で 6 つの研究室により認証された解析手法は、0.1 mg/kg の定量限界を持ち、全組織における 0.2 mg/kg の MRL の定期的な監視に適している。産卵鶏に対するナイカルバジンの使用は認められていないが、想定外の汚染からもたらされた卵中の残留物を検出感度 0.005 mg/kg でモニ

ターすることが可能になる適切な手法もある。

最大残留限界(原文 p.92)

委員会により設定された ADI 0-400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ に基づき、親化合物の一日の摂取許容量及び/又はその相当量は 60-kg の人で 24000 μg であった。ブロイラーにおけるナイカルバジンの推奨 MRL について、委員会では以下の項目を考慮に入れた。

- ・ 解析手法の定量限界は全ての組織で 0.1 mg/kg
- ・ ブロイラーに対するナイカルバジンの使用は孵化後最初の 28 日間のみ
- ・ マーカー残留物は N,N'-ビス(4-ニトロフェニル)尿素
- ・ 総残留物に対するマーカーの残留比は肝臓、腎臓、筋肉及び皮膚/脂肪でそれぞれ 0.45、0.25、0.65 及び 0.90
- ・ 推奨 MRL は動物薬の適正な使用と優れた治療に矛盾しない

委員会はブロイラーの筋肉、肝臓、腎臓及び皮膚/脂肪に対する MRLs は、N,N'-ビス(4-ニトロフェニル)尿素について 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を推奨する。これらの MRLs 及び筋肉 300 g、肝臓 100 g、腎臓 50 g 及び脂肪 50g といった食品摂取係数を用いると、残留物の理論最大一日摂取量はナイカルバジン 187 μg 相当である。

ナイカルバジンの毒性試験と結果の概要（評価書: JECFA 1998）

毒性試験に該当する記載なし

ブロイラーの推奨 MRLs

筋肉、肝臓、腎臓及び皮膚/脂肪において、N,N'-ビス-(4-ニトロフェニル)尿素で 200 µg/kg

略称

略称	正式名称(英語)	日本語訳
T _{1/2}	Terminal _{1/2}	半減期
LOQ	Limit of quantification	定量限界
LOD	Limit of detection	検出限界
m/z		質量電荷比
FDA	United States Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
ADI	Acceptable Daily Intake	1日摂取許容量
MRL	Maximum Residue Limit	最大残留基準値

ナイカルバジン 評価書和訳と情報整理

JECFA 1998

ウェブサイト:<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v041je10.htm>

FAS 41-JECFA 50/115, 1998

ナイカルバジン評価書和訳と情報整理 JECFA (1998) 目次

1. 説明 (原文 p.1)	32
2. 生物学的データ (原文 p.1)	32
2.1 生化学的側面 (原文 p.1)	32
2.1.1 吸収,分布, 及び排泄 (原文 p.2)	32
2.2 毒性試験 (原文 p.2)	32
2.2.1 急性毒性(原文 p.2)	32
2.2.2 短期毒性 (原文 p.2)	32
2.2.3 長期毒性及びがん原性試験 (原文 p.3)	33
2.2.4 遺伝毒性 (原文 p.3)	34
2.2.5 生殖毒性 (原文 p.3)	34
(i) 多世代生殖毒性 (原文 p.3)	34
(ii) 発生毒性 (原文 p.4)	35
3. コメント (原文 p.4)	35
4. 評価 (原文 p.5)	37
ナイカルバジンの毒性試験と結果の概要 (評価書:JECFA 1998)	38
略称.....	39

原文 目次

	原文ページ
1. 説明	1
2. 生物学的データ	1
2.1 生化学的側面	1
2.1.1 吸収,分布, 及び排泄	2
2.2 毒性試験	2
2.2.1 急性毒性	2
2.2.2 短期毒性	2
2.2.3 長期毒性及びがん原性試験	3
2.2.4 遺伝毒性	3
2.2.5 生殖毒性	3
(i)多世代生殖毒性	3
(ii)発生毒性	4
3. コメント	4
4. 評価	5
5. 参考文献	5
NICARBAZIN	1
1. Explanation	1
2. Biological data	1
2.1 Biochemical aspects	1
2.1.1 Absorption, distribution and excretion	2
2.2 Toxicological studies	2
2.2.1 Acute toxicity	2
2.2.2 Short-term toxicity	2
2.2.3 Long-term toxicity and carcinogenicity	3
2.2.4 Genotoxicity	3
2.2.5 Reproductive toxicity	3
(i) Multigeneration reproductive toxicity	3
(ii) Developmental toxicity	4
3. Comments	4
4. Evaluation	5
5. References	5

国際化学物質安全性計画

世界保健機関

食品中の特定動物用医薬品残留物の毒性学的評価

世界保健機関食品添加物シリーズ41

作成:

第 50 回 FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議 (JECFA)

世界保健機関、ジュネーブ 1998

ナイカルバジン

第1稿作成

Dr G. Roberts

化学物質製品評価セクション

家族健康サービス省

キャンベラ、オーストラリア

1.説明

2.生物学的データ

2.1 生化学的側面

2.1.1 吸収、分布及び排泄

2.2 毒性試験

2.2.1 急性毒性

2.2.2 短期毒性

2.2.3 長期毒性及び発がん性試験

2.2.4 遺伝毒性

2.2.5 生殖毒性

3.コメント

4.評価

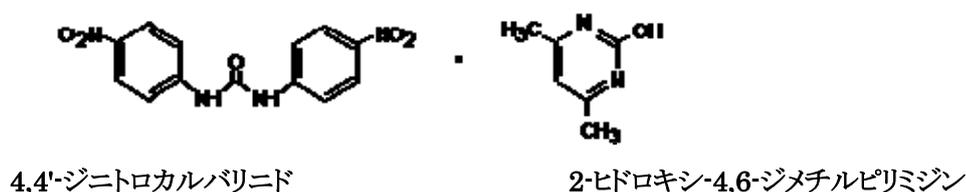
5.参考文献

1. 説明 (原文 p.1)

ナイカルバジンは、ブロイラー鶏における糞便コクシジウム症及び腸コクシジウム症の予防における補助として、数十年間初期飼料に用いられてきた。ナイカルバジンは、イオノフォアの抗コクシジウム剤とともに使用される可能性がある。化学的には、1,3-*N,N'*ビス(4-ニトロフェニル)尿素及び4,6-ジメチル-2(1*H*)-ピリミドンの等モル複合体である。これらの化合物は、それぞれ4,4'-ジニトロカルバリニド及び2-ヒドロキシ-4,6-ジメチルピリミジンとして知られている(図1参照)。ナイカルバジンは、電子供与体-受容体の分子複合体であり、その相互作用部位は、受容体のフェニル尿素の電子不足のNHアミド基及びピリミドン供与体の環中の電子が豊富な孤立電子対の窒素である。

ナイカルバジンは、委員会による評価はこれまで行われていない。

図1. ナイカルバジンの成分の構造



2. 生物学的データ (原文 p.1)

2.1 生化学的側面 (原文 p.1)

実験動物におけるナイカルバジンの吸収、分布、生体内変化及び排泄に関する情報はほとんど入手できなかった。

利用可能な情報は、方法の詳細が僅かであるか又は全く提示されておらず、結果は概要の形式のみでしか提供されておらず、結論の個々の確認ができる状況ではなかった。

2.1.1 吸収,分布, 及び排泄 (原文 p.2)

ラットに、1、5又は10 mg/kg体重のナイカルバジンを単回経口投与し、各投与群あたり1匹を投与6又は18時間後にと殺し、フェニル尿素及びピリミドン成分の血中濃度が測定された。低濃度のフェニル尿素成分は6時間後で検出されたが、18時間後では検出されなかった。ピリミドン成分は、極めて高濃度で検出され、6時間から18時間で増加した。定性的に同様の所見が、ラットに0.1、1又は5 mg/kg体重/日で8日間経口投与し、最終投与4又は24時間後にと殺した試験で認められた。ピリミドン成分の血中濃度は用量相関的であったが、フェニル尿素成分では平坦な応答を示した。後者の試験において、最終投与後5時間採取された尿では、ナイカルバジンの各成分の用量相関的な濃度が検出され、ピリミドン濃度はフェニル尿素成分より一桁高かった(Kuna, 1955)。

2.2 毒性試験 (原文 p.2)

2.2.1 急性毒性(原文 p.2)

ナイカルバジン及びその成分についての短期毒性試験の結果を、表1に示した。

2.2.2 短期毒性 (原文 p.2)

ナイカルバジンの多くの短期試験が利用可能であったが、報告書には、使用したプロトコールの最小限の詳細しか含まれておらず、毒性学的な所見についてのデータは限られており、しばしば進捗報告の形で

あって、詳細な評価には不十分であった。

概要では、500 mg/kg 体重/日及びそれ以上の経口投与量で、ラットの集合管において、結晶状の沈着物の形の腎臓損傷が報告された。イヌでは、1,600 mg/kg 体重/日の経口投与後の胆管増殖が主要な所見であった。

表1 経口投与後のナイカルバジン、4,4'-ジニトロカルバニリド (DNC) 及び2-ヒドロキシ-4,6-ジメチルピリミジン(HDP)の急性毒性

種	性	物質	LD ₅₀ (mg/kg bw)
マウス	特定なし	ナイカルバジン	> 25,000
		HDP	約4,000
		DNC	> 18,000
ラット	特定なし	ナイカルバジン	> 10,000

Kuna, 1955 から

イヌ

ビーグル犬(一群雄雌各 5 匹)に、フェニル尿素及びピリミドン成分(純度不定)を 3: 1 の割合で週 6 日、2 年間混餌投与した。実際の摂取量は、フェニル尿素成分が 0、60、180 又は 600 mg/kg 体重/日及びピリミドン成分は 0、20、60 又は 200 mg/kg 体重/日であった。一群雄雌各 2 匹のイヌを 1 年後にと殺した。臨床所見を毎日行い、体重、摂餌量及び反射神経を毎週測定した。また、摂水量及び尿量を毎月測定した。血液学的、臨床化学的及び尿に関するパラメータは、投与前並びに 3、6、12、18 及び 24 ヶ月に測定した。すべてのイヌから広範囲の組織を肉眼的及び顕微鏡的に検査した。試験は、毒性試験の実施ガイドラインの策定前に行われた。

異常行動又は身体的徴候は見られなかった。しかし、中用量群において雄 1 匹が、44 週に原因不明で死亡した。投与した全てのイヌの排泄物に、緑色から黄色の色調が見られた。体重増加、摂餌量及び血液学的パラメータ及び尿パラメータは、投与に影響されなかった。最高用量群の数匹のイヌ及び低用量群のそれぞれ 1 匹のイヌにおいて、血清アラニンアミノトランスフェラーゼ活性が増加したが、大半の症例で影響は一過性であった。最高値は約 12 ヶ月で観察され、高活性は高用量群における 2 匹のイヌにのみ持続した。臓器重量及び肉眼的な病理学的外観は、投与に関連した変化は見られなかった。病理組織学的検査では、1 年後にと殺された高用量群のイヌ 1 匹における軽度な胆管増殖以外は、全く顕著ではなかった。このイヌは血清アラニンアミノトランスフェラーゼ活性が増加していることが分かった。肝臓の所見及び投与の関係は明確ではなかったが、本試験における無作用量(NOEL)は、少なく見積もって 240 mg/kg 体重/日*である(Vogin, 1969a)。

*原文では「mg/kg bw day」となっているが、「mg/kg bw/day」として訳した。

2.2.3 長期毒性及びがん原性試験 (原文 p.3)

ラット

FDRL ラットの各群に、フェニル尿素及びピリミドン成分(純度不明)を、フェニル尿素成分が 0、50、150 又は 300 mg/kg 体重/日及びピリミドン成分が 0、17、50 又は 100 mg/kg 体重/日になるように計算した混餌飼料を 2 年間混餌投与した。対照群及び高用量群は一群雄雌各 50 匹並びに低用量群及び中用量群は一群雄雌各 40 匹であった。対照群及び高用量群は、一群雄雌各 5 匹のラットを 6 及び 18 ヶ月の間にと殺し、一群雄雌各 10 匹のラットを 56 週でと殺した。ラットの行動、物理的外観及び生存について毎日観

察した。摂餌量及び飼料利用効率(efficiency of food use)を、一群雄雌各 15 匹のラットについて、最初の 12 週間は毎週、その後は一定期間ごとに評価した。体重を、最初の 12 週間は毎週、その後は 26 週まで隔週、そしてその後は毎月記録した。摂水量及び尿量を、最初の 3 ヶ月間は一ヶ月あたり 1 週間、一群雄雌各 10 匹のラットについて測定した。限られた血液学的、臨床化学的及び尿パラメータは、3、6、9、12、18 及び 24 ヶ月に一群雄雌各 10 匹のラットについて検査した。全ラットからの広範囲の組織について、肉眼及び顕微鏡検査を行った。試験は、毒性試験実施ガイドラインの策定前に行われた。

異常行動はみられず、死亡は投与に影響されなかった。摂餌量、摂水量及び体重増加量は、いずれの投与群においても同様であった。ヘモグロビン、ヘマトクリット、白血球、血中尿素窒素、血清アラニンアミノトランスフェラーゼ活性、血中グルコース、尿パラメータ、臓器重量又は肉眼的病理学的外観に投与に関連した影響は全くみられなかった。尿細管における石灰物質、腎盂、尿細管、糸球体又は髄質における石灰化のような腎臓の変化並びに結石は、56 週の投与群においてたびたび見られたが、全発生頻度は試験終了時には全群でほぼ同じであった。精巣萎縮の発生頻度は、104 週においていくつかの投与群の雄で軽度上昇したが、有意ではなかった。腫瘍発生頻度には影響がなかった。無作用量(NOEL)は、3: 1 の混合物に対して 400 mg/kg 体重/日であった(Vogin, 1969b)。

2.2.4 遺伝毒性 (原文 p.3)

ナイカルバジン及びその成分の遺伝毒性試験の結果は、表2に示されている。

表 2 ナイカルバジン、4,4'-ジニトロカルバニリド(DNC)及び 2-ヒドロキシ-4,6-ジメチルピリミジン(HDP)の遺伝毒性試験結果

エンドポイント	試験対象物	物質	濃度 (µg/plate)	S9	結果	参照
復帰突然変異	S. typhimurium TA98	Nicarbazine	100-500 ^a	+/-	陰性	Bradley & Cook (1980)
	TA100TA1535	DNC	100-300 ^a	+/-	陰性	
	TA1537	HDP	200-2000	+/-	陰性	
復帰突然変異	S. typhimurium TA98, TA1538	Nicarbazine	0-10,000	+/-	弱陽性	Ohta et al. (1980)
	TA100, TA1535, TA1537		NR	+/-	陰性	
	E coli WP2 hcr trp		NR	+/-	陰性	
DNA損傷	h17rec+ m45rec-	Nicarbazine	NR	+/-	陰性	Ohta et al. (1980)

S9、ラット肝臓の9,000×g画分; NR、報告なし。

a: より高濃度の沈殿

2.2.5 生殖毒性 (原文 p.3)

(i) 多世代生殖毒性 (原文 p.3)

ラット

FDRL ラット(一群雄雌各 12 匹)に、フェニル尿素及びピリミドン成分(純度不明)をフェニル尿素が 0、50、150 又は 300 mg/kg 体重/日及びピリミドンが 0、17、50 又は 100 mg/kg 体重/日となるように計算した混餌濃度で混餌投与した。投与は、連続した 3 世代に 1 世代当たり 2 同腹児を生産される間、連続的に

行われた。第1群のラットは、F_{1a}同腹児の生成のために投与開始後10週間交配し、F_{1b}同腹児を生成するために、最初の同腹児の離乳の7日後に再び交配した。雄雌各12匹のF_{1b}児動物は、4週齢で、F_{2a}及びF_{2b}同腹児を生成するために、上記の日程に従って交配し、F_{3a}及びF_{3b}同腹児を生成するためにF_{2b}児動物を用いた。ラットの生存、行動及び外観を毎日観察した。成獣については、体重及び摂餌量を毎週測定した。各同腹児は誕生後、8児動物に限定し、出生時及び出生後4、12及び21日に体重を測定した。その児動物の離乳後に、成体ラットを剖検した。また、対照群及び高用量群のF₂雄の精巣は、組織病理学的検査を行った。各群の離乳した雄雌各5匹のF_{3b}について、肝臓、腎臓、心臓、膀胱及び生殖腺についても顕微鏡検査を行った。試験は、毒性試験の実施ガイドラインの策定前に行われた。

各世代の成獣ラットは、生存、体重増加又は摂餌量に対する影響を示さず、肉眼剖検及び精巣検査の結果は顕著ではなかった。妊娠率と妊娠期間は影響を受けなかった。高用量群のF_{1b}児動物の体重増加は授乳の間わずかに減少したが、同様の影響は他の同腹児にはみられなかった。それ以降の世代では、高用量群でのF_{2a}及びF_{3a}同腹児にはわずかに児動物数が減少したが、この影響はF_{2b}又はF_{3b}同腹児においては再現性がみられなかった。F_{3b}児動物の特定臓器の組織病理学的検査では、投与に起因する異常は示されず、生殖に関する有意な影響はなかったと考えられた。無作用量(NOEL)は、3:1混合物について400 mg/kg体重/日であり、これは試験した最高投与量であった(Kirschner&Vogin, 1970)。

(ii) 発生毒性 (原文 p.4)

ラット

CD/CRJ妊娠ラット(一群24-25匹)の妊娠7~17日に、1%カルボキシメチルセルロース懸濁液中のナイカルバジン(等モル複合体; 純度不明)を0、70、200又は600 mg/kg体重/日の用量で強制経口投与した。方法の詳細は報告に記載されていなかったが、表集計結果から、摂餌量、摂水量及び体重が妊娠7~21日*の期間毎日記録されたことが示されている。母動物のと殺及び胎児の検査の時間は示されていない。胎児は、外表、内臓及び骨格検査に供された。プロトコールは提供されていないため、認知された試験ガイドラインに準拠しているかどうか、又は品質保証が試みられたか、及び試験の妥当性は、判断できないであろう。

*原文では「7to21」となっているが、「7 to 21」として訳した。

600 mg/kg体重/日投与群のラット7匹は、ほとんどが投与期間中に死亡した。600 mg/kg体重/日投与群での母動物の摂餌量及び体重増加量は妊娠8日から減少した。胎児体重は600 mg/kg体重/日投与群で低かったが、着床及び子宮内生存頻度は、全群において同様であった。

600 mg/kg体重/日投与群の母動物の胎児は、骨化遅延、肋骨の過形成及び湾曲(bent)(胎児4匹)、第6又は第7腰椎(lumbar vertebrae)の仙椎化(sacralization)(胎児2匹)、口蓋裂(cleft palate)(同腹児の2匹)、皮下水腫(subcutaneous oedema)(同腹児の3匹)、水腎症(hydronephrosis)(5匹の胎児)、潜在睾丸症(cryptorchismus)(胎児1匹)、メルケル憩室の残存(Merkel's diverticulum)(胎児1匹)が認められた。母動物及び胎児毒性の無作用量(NOEL)は、200 mg/kg体重/日であった(Tajima, 1979)。

3. コメント (原文 p.4)

委員会は、ナイカルバジンの薬物動態、急性、短期及び長期毒性、遺伝毒性、生殖毒性及び発生毒性の試験結果を検討した。試験は毒性試験実施ガイドラインの策定前に実施された。いくつかの報告は独立した評価のために十分に詳細な報告をしており、評価可能な内容であると考えられた。さらに、専門家報告書は、検討に利用可能であった(Fitzpatrick, 1997)。

ラットへのナイカルバジンの経口投与後、低濃度のフェニル尿素成分及び高濃度のピリミドンが、血中に検出された。後者の尿中への排泄は、フェニル尿素の排泄と比較して極めて高かった。したがって、ピリミドン成分はおそらく大幅に吸収され、ほとんどのフェニル尿素は吸収されずに糞中に排泄された。全データは、ナイカルバジンの代謝に関して利用可能なデータはなかった。

げっ歯類におけるナイカルバジンの急性経口毒性は低く、LD₅₀はマウスで>25,000 mg/kg 体重、ラットでは>10,000 mg/kg 体重であった。個々の成分も急性毒性は低く、マウスにおける LD₅₀はピリミドンで4,000 mg/kg 体重、フェニル尿素成分で>18,000 mg/kg 体重であった。

ナイカルバジンの短期試験は利用可能なものが多かったが、報告書には、使用したプロトコールの詳細は僅かしか含まれておらず、毒性結果のデータは限られており、しばしば経過報告の形であって、詳細な評価には不十分であった。概要では、500 mg/kg 体重/日以上を経口投与で、ラットの尿細管において、結晶状の沈着物の形の腎臓損傷が報告された。イヌでは、1,600 mg/kg 体重/日の経口投与後の胆管増殖が主要な所見であった。

ラットにおける2年間毒性試験及び生殖毒性の試験で選択された最高用量は、400 mg/kg 体重/日であった。500 mg/kg 体重/日を経口投与したラットでは、腎臓における結晶沈着を伴うフェニル尿素のアセチル化が形成されたため、この用量が選択された。一部の毒性試験において、試験動物に3:1比のフェニル尿素及びピリミドン成分を与えた。これは、投与した鶏の筋肉中でフェニル尿素とピリミドンがこの比率で存在すると言われているためである。より近年のデータでは、ピリミドン残留物に対するフェニル尿素は8:1比程度と言われている。イヌにフェニル尿素とピリミドン成分を3:1比で含む飼料を2年間投与した。実質的な化合物摂取量は、0、80、240又は800 mg/kg 体重/日であった。数頭のイヌにおいて血清アラニンアミノトランスフェラーゼ活性が上昇し、800 mg/kg 体重/日のイヌ1匹で軽い胆汁胆管増殖が認められた。その他の投与による作用は認められなかった。NOELは、フェニル尿素とピリミドンの3:1混合物で240 mg/kg 体重/日であった。ラットの2年間試験ではフェニル尿素とピリミドン成分の3:1混合物で0、67、200又は400mg/kg 体重/日を混餌投与した。投与による毒性はみられず、腫瘍発生頻度は影響を受けなかった。NOELは、最高投与量である400 mg/kg 体重/日であった。

ナイカルバジンは、ある試験でサルモネラ菌 TA98 及び TA1538 において突然変異出現頻度がわずかに増加したが、他の菌種ではそうではなかった。サルモネラ菌 TA100、TA1535 又は TA1537 若しくは大腸菌 WP2 では、突然変異は検出されなかった。DNA 損傷は、修復試験では誘発されなかった。その他評価項目は試験されなかった。細菌のみで試験が行われているため、遺伝毒性の可能性の検討は不十分だと考えられた。

3世代生殖毒性試験では、ラットにフェニル尿素及びピリミドン成分3:1混合物0、67、200又は400 mg/kg 体重/日が混餌投与された。最高用量群において、出生時の同腹児数のわずかな減少、又は授乳期の体重増加抑制が単発的に出現したが、これらの所見はほとんどの同腹児で再現されず、試験期間中に進行しなかった。そのため、委員会は、ナイカルバジンは生殖に対して有意な影響は及ぼさなかったと結論した。NOELは、試験の最高用量である、400 mg/kg 体重/日であった。

フェニル尿素及びピリミドン等を等モル比で含むナイカルバジン0、70、200又は600 mg/kg 体重/日をラットの妊娠7-17日に混餌強制経口投与して発生毒性試験が実施された。600 mg/kg 体重/日では母動物の摂餌量及び体重の抑制がみられ、25匹のうち7匹の動物が死亡した。この用量では、胎児の体重低下及び骨化の抑制という胎児の発育遅延を示唆する所見が得られ、また多くの異常、特に水腎症並びに肋

骨の過形成及び彎曲が観察された。NOELは、母動物の及び胎児の毒性に基づき 200 mg/kg 体重/日であった。催奇形性作用は、全く見られなかった。

4. 評価 (原文 p.5)

委員会は、ナイカルバジンの承認に際し、いくつかの毒性試験の欠如に注目した。しかし、入手した他のデータからこれらの不足をほぼ補完する十分な情報を提供された。ナイカルバジンが 40 年にわたって多くの国々で動物用医薬品として使用されてきたことに注目した。委員会は、この長い使用の歴史と、ブローイラーにおける開始飼料に限定した使用であるという事実に基づき、ADI の承認を考慮した。

ラットの発生毒性試験の NOEL 200 mg/kg 体重/日及びデータベースの限界を補うために選んだ安全係数 500 に基づき、委員会は ADI 0-400 µg/kg 体重を設定した。

ナイカルバジンの毒性試験と結果の概要（評価書:JECFA 1998）

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
急性毒性			表 1 に記載の通り
短期毒性	ラット イヌ	不明	500 mg/kg 体重/日以上を経口投与したラットにおける集合尿細管の結晶沈着 1,600 mg/kg 体重/日を経口投与したイヌにおける胆汁管増殖
2 年毒性(経口)	イヌ	フェニル尿素成分 0、60、180 又は 600 mg/kg 体重/日及びピリミドン成分 0、20、60 又は 200 mg/kg 体重/日	NOEL 3:1 混合物で 240 mg/kg 体重/日
2 年長期毒性／がん原性試験	ラット	フェニル尿素成分 0、50、150 又は 300 mg/kg 体重/日及びピリミドン成分 0、17、50 又は 100 mg/kg 体重/日	NOEL 3:1 混合物で 400 mg/kg 体重/日 腫瘍の発生頻度は変化なし 腎臓における結晶沈殿を伴うフェニル尿素のアセチル化に基づく
遺伝毒性			表 2 に記載の通り
3 世代繁殖	ラット	フェニル尿素成分 0、50、150 又は 300 mg/kg 体重/日、及びピリミドン成分 0、17、50 又は 100 mg/kg 体重/日	NOEL 3:1 混合物で 400 mg/kg 体重/日
発生毒性	ラット	0、70、200 又は 600 mg/kg 体重/日	母動物の及び胎児毒性の NOEL 200 mg/kg 体重/日 母動物の死亡、摂餌量及び体重増加の抑制 胎児の体重低下、骨化の遅れ、肋骨の過形成性及び湾曲、第 6 又は第 7 腰椎の仙椎化、口蓋裂、皮下水腫、水腎症、潜在睾丸症、及びメッケル憩室の残存に基づく
その他			ADI 0-400 µg/kg 体重

略称

略称	正式名称(英語)	日本語訳
FAO	Food and Agriculture Organization	国連食糧農業機関
WHO	World Health Organization	世界保健機関
NOEL	No Observed Effect Level	無作用量
LD50	50% Lethal Dose	半数致死量
ADI	Acceptable Daily Intake	1日摂取許容量

ナイカルバジン 評価書和訳と情報整理

EFSA 2010

ウェブサイト:<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/1551.pdf>

Nicarbazine. EFSAJ1551, 2010

ナイカルバジン 評価書和訳と情報整理 EFSA: (2010) 目次

抄録 (原文 p.1)	50
まとめ (原文 p.2)	52
3. 安全性 (原文 p.12)	62
3.1. 標的株に対する安全性 (原文 p.12)	62
3.1.1. 標的株における耐性試験 (原文 p.12)	62
3.1.2. 添加物の微生物学的安全性 (原文 p.12)	62
3.1.3. 交互作用/不適合性 (原文 p.13)	63
3.1.4. 熱ストレス (原文 p.13)	63
3.1.5. 標的種の安全性に関する結論 (原文 p.13)	63
3.2. 消費者に対する安全性 (原文 p.13)	63
3.2.1. 代謝及び残留試験 (原文 p.13)	63
3.2.1.1. 代謝 (原文 p.13)	63
3.2.1.2. 残留物 (原文 p.14)	65
3.2.1.3. 代謝及び残留試験についての結論 (原文 p.16)	67
3.2.2. 毒性試験 (原文 p.16)	67
3.2.2.1. 急性毒性 (原文 p.16)	67
3.2.2.2. 遺伝毒性(変異原性及び染色体異常性) (原文 p.17)	67
3.2.2.3. 亜慢性経口毒性 (原文 p.18)	69
3.2.2.4. 2年間経口毒性試験 (原文 p.19)	71
3.2.2.5. 発生毒性を含む生殖毒性試験 (原文 p.19)	71
3.2.2.7. 毒性試験についての結論 (原文 p.21)	73
3.2.3. 消費者の安全性 (原文 p.22)	74
3.2.3.1. 一日摂取許容量(ADI)の提案 (原文 p.22)	74
3.2.3.2. 消費者暴露及び最大残留許容量 (MRL)の提案(原文 p.22)	75
3.2.3.3. 休薬期間 (原文 p.23)	76
3.3. 使用者に対する安全性 (原文 p.23)	76
3.3.1. Koffogran の粉化の可能性(原文 p.24)	76
3.3.2. 作業/使用者の吸入暴露の推定 (原文 p.24)	77
3.3.3. 使用者の安全性についての結論 (原文 p.25)	78
3.4. 環境の安全 (原文 p.25)	78
3.4.1. 暴露評価 (原文 p.25)	78
3.4.1.1. 運命及び挙動 (原文 p.25)	79
3.4.1.2. 予測環境濃度(PEC) (原文 p.26)	80
3.4.2. 影響評価 (原文 p.27)	80
3.4.2.1. 土壌生物への毒性 (原文 p.27)	80
3.4.2.2. 水生生物への毒性 (原文 p.28)	81

3.4.2.3. 結論 (原文 p.28)	82
3.4.2.4. 生物濃縮 (原文 p.29)	83
3.4.3. リスク特性 (原文 p.29)	83
3.4.3.1. 土壌に対するリスク (原文 p.29)	83
3.4.3.2. 表層水に対するリスク (原文 p.29)	83
3.4.3.3. 地下水に対するリスク (原文 p.30)	84
3.4.3.4. 二次中毒に対するリスク (原文 p.30)	84
3.4.3. 結論 (原文 p.30)	84
4. 有効性 (原文 p.30)	85
4.1. 肉用鶏における有効性 (原文 p.30)	85
4.1.1. 用量滴定及び用量確認 (原文 p.30)	85
4.1.2. 鶏舎試験 (原文 p.31)	85
4.1.3. 床飼い試験 (原文 p.31)	86
4.1.4. シヤトル計画による野外試験 (原文 p.33)	88
4.1.5. アイメリアのナイカルバジン耐性 (原文 p.34)	89
4.1.6. 製品品質 (原文 p.34)	90
4.1.7. 有効性に関する結論 (原文 p.34)	90
結論と提言 (原文 p.35)	90
結論 (原文 p.35)	90
提言 (原文 p.36)	92
EFSA に提出された文書(原文 p.36)	92
付録 (原文 p.38)	92
付録 A-1	92
付録 A-2	94
付録 B.....	96
ナイカルバジンの毒性試験と結果の概要 (評価書:FEEDAP 2010).....	98
略称.....	100

原文 目次

原文ページ

抄録.....	1
まとめ.....	2
含有量の表.....	4
欧州委員会によって提供される背景.....	6
欧州委員会による委任事項.....	6
評価.....	8
1. 緒言.....	8
2. 添加物の特性.....	8
2.1. 添加剤の同定.....	9
2.2. 活性物質の特性.....	9
2.3. 製造工程.....	10
2.3.1. 活性物質.....	10
2.3.2. 添加物.....	10
2.4. 添加物の物理化学的性質及び工学的特性.....	10
2.4.1. 安定性.....	10
2.4.1.1. 添加剤の貯蔵寿命.....	10
2.4.1.2. プレミクスチャー及び飼料に使用される添加物の安定性.....	11
2.4.2. 均一性.....	11
2.4.3. 交差汚染.....	11
2.5. 使用条件.....	12
2.6. 分析法.....	12
2.6.1 プレミクスチャー及び飼料中の活性物質の制御ルーチンのための分析法.....	12
2.6.2 標的組織にある活性物質の残留試験の分析法.....	12
3. 安全性.....	12
3.1. 標的種に対する安全性.....	12
3.1.1. 標的種における耐性試験.....	12
3.1.2. 添加物の微生物学的安全性.....	12
3.1.3. 交互作用/不適合性.....	13
3.1.4. 熱ストレス.....	13
3.1.5. 標的種の安全性に関する結論.....	13
3.2. 消費者に対する安全性.....	13
3.2.1. 代謝及び残留試験.....	13
3.2.1.1. 代謝).....	13
3.2.1.2. 残留物.....	14
3.2.1.3. 代謝及び残留試験についての結論.....	16

3.2.2. 毒性試験	16
3.2.2.1. 急性毒性	16
3.2.2.2. 遺伝毒性(変異原性及び染色体異常性)	17
3.2.2.3. 亜慢性経口毒性	18
3.2.2.4. 2年間の経口毒性試験	19
3.2.2.5. 発生毒性を含む生殖毒性	19
3.2.2.7. 毒性試験についての結論	21
3.2.3. 消費者の安全性	22
3.2.3.1. 一日摂取許容量(ADI)についての提案	22
3.2.3.2. 消費者暴露及び最大残留許容量(MRL)の提案	22
3.2.3.3. 休薬期間	23
3.3. 使用者に対する安全性	23
3.3.1. Koffogran の粉化の可能性	24
3.3.2. 作業員/使用者の吸入暴露の推定	24
3.3.3. 使用者の安全性についての結論	25
3.4. 環境に対する安全性	25
3.4.1. 暴露評価	25
3.4.1.1. 運命及び挙動	25
3.4.1.2. 予測環境濃度(PEC)	26
3.4.2. 影響評価	27
3.4.2.1. 土壌生物への毒性	27
3.4.2.2. 水生生物への毒性	28
3.4.2.3. 結論	28
3.4.2.4. 生物濃縮	29
3.4.3. リスク特性	29
3.4.3.1. 土壌に対するリスク	29
3.4.3.2. 表層水に対するリスク	29
3.4.3.3. 地下水に対するリスク	30
3.4.3.4. 二次中毒に対するリスク	30
3.4.3. 結論	30
4. 有効性	30
4.1. 肉用鶏における有効性	30
4.1.1. 用量滴定及び用量確認	30
4.1.2. 鶏舎試験	31
4.1.3. 床飼い試験	31
4.1.4. シヤトル計画による野外試験	33
4.1.5. アイメリアのナイカルバジン耐性	34
4.1.6. 製品品質	34

4.1.7. 有効性に関する結論	34
5. 市販後調査.....	35
結論と提言	35
結論	35
提言	36
EFSA に提出された文書	36
付録.....	38

Abstract.....	1
Table of contents	4
Background as provided by the European Commission	6
Terms of reference by the European Commission	6
Assessment	8
1. Introduction	8
2. Characterisation of the additive	8
2.1. Identity of the additive	9
2.2. Characterisation of the active substance	9
2.3. Manufacturing processes	10
2.3.1. Active substance	10
2.3.2. Additive	10
2.4. Physico-chemical and technological properties of the additive	10
2.4.1. Stability	10
2.4.1.1. Shelf life of the additive	10
2.4.1.2. Stability of the additive used in premixtures and feedingstuffs	11
2.4.2. Homogeneity	11
2.4.3. Cross contamination	11
2.5. Conditions of use	12
2.6. Analytical methods	12
2.6.1. Analytical methods for routine control of the active substance in premixtures and feedingstuffs	12
2.6.2. Analytical method for the determination of the residues of the active substance in target tissues.....	12
3. Safety	12
3.1. Safety for the target species	12
3.1.1. Tolerance studies in the target species	12
3.1.2. Microbiological safety of the additive	12
3.1.3. Interactions/incompatibilities	13

3.1.4. Heat stress	13
3.1.5. Conclusions on the safety for the target species	13
3.2. Safety for the consumer	13
3.2.1. Metabolism and residue studies	13
3.2.1.1. Metabolism	13
3.2.1.2. Residues	14
3.2.1.3. Conclusion on the metabolism and residue studies	16
3.2.2. Toxicological studies	16
3.2.2.1. Acute toxicity	16
3.2.2.2. Genotoxicity (mutagenicity and clastogenicity)	17
3.2.2.3. Sub-chronic oral toxicity	18
3.2.2.4. Two-year oral toxicity study	19
3.2.2.5. Reproduction toxicity including developmental toxicity	19
3.2.2.6. Genotoxicity and carcinogenicity of p-Nitroaniline	20
3.2.2.7. Conclusions on toxicological studies	21
3.2.3. Consumer safety	22
3.2.3.1. Proposal for an acceptable daily intake (ADI)	22
3.2.3.2. Consumer exposure and proposal for maximum residue limits (MRLs)	22
3.2.3.3. Withdrawal period	23
3.3. Safety for the user	23
3.3.1. Dusting potential of Koffogran	24
3.3.2. Worker/user inhalatory exposure estimate	24
3.3.3. Conclusions on user safety	25
3.4. Safety for the environment	25
3.4.1. Exposure assessment	25
3.4.1.1. Fate and behaviour	25
3.4.1.2. Predicted environmental concentrations (PECs)	26
3.4.2. Effect assessment	27
3.4.2.1. Toxicity to soil organisms	27
3.4.2.2. Toxicity to aquatic organisms	28
3.4.2.3. Conclusion	28
3.4.2.4. Bioaccumulation	29
3.4.3. Risk characterisation	29
3.4.3.1. Risk for soil	29
3.4.3.2. Risk for surface water	29
3.4.3.3. Risk for groundwater	30
3.4.3.4. Risk for secondary poisoning	30
4. Efficacy	30

4.1. Efficacy in chickens for fattening	30
4.1.1. Dose titration and dose confirmation	30
4.1.2. Battery cage trials	31
4.1.3. Floor pen trials	31
4.1.4. Field trials with shuttle program	33
4.1.5. Resistance of Eimeria to nicarbazin	34
4.1.6. Product quality	34
4.1.7. Conclusion on efficacy	34
5. Post-market monitoring	35
Conclusions and Recommendations	35
Documentation provided to EFSA	36
References	36
Appendices	38

科学的見解

肉用鶏用飼料添加物としての Koffogran(ナイカルバジン)の安全性及び有効性に関する科学的意見書¹

動物用飼料添加物及び製品又は物質についてのEFSAパネル(FEEDAP)^{2,3}

欧州食品安全機関(EFSA)、パルマ、イタリア

抄録(原文 p.1)

Koffogran(ナイカルバジン 25%含有)は、抗コクシジウム剤として 28 日齢までの肉用鶏への使用が意図されている。肉用鶏への(125 ナイカルバジン mg/kg 飼料)投与は、鶏の肥育に安全であり(安全範囲は約 1.5)、かつコクシジウム症の制御に有効であった。摂取されたナイカルバジンは、速やかに 2-ヒドロキシ-4,6-ジメチルピリミジン(HDP)と 4,4'-ジニトロカルバニリド(DNC)に分解される。DNC は肝臓を標的組織とする残留マーカである。HDP 関連残留物は DNC 関連残留物に比べて極めて少量である。ナイカルバジンに遺伝毒性は認められない。ラットの亜慢性試験ではナイカルバジンの無毒性量(NOAEL)は算出できなかったが、DNC の NOAELは 709 mg/kg 体重/日と算出された。この違いは、DNC 単独ではなくナイカルバジンとして投与されたときに、ラットへの DNC の全身暴露がより高いことと関連している可能性がある。ラットに 300 mg DNC + 100 mg HDP/kg 体重/日を投与した多世代繁殖試験、及びラットに 70 mg ナイカルバジン/kg 体重/日、ウサギに 60 mg ナイカルバジン/kg 体重/日を投与した発達毒性試験では、懸念事項は特にみられなかった。消費者はナイカルバジンではなくむしろ DNC に暴露する。そのため、イヌを用いた 2 年間試験(154 mg DNC/kg 体重/日を投与)で得られた NOAEL に安全係数 200 を適用し、DNC の一日摂取許容量(ADI)は 0.77 mg/kg 体重/日と算出された。MRL(残留基準値)として、肝臓:15 mg DNC/kg、腎臓:6 mg DNC/kg、筋肉:4 mg DNC/kg、皮膚/脂肪:4 mg DNC/kg がそれぞれ提案された。これらの MRL を適用すると、消費者暴露は ADI の 24 % を越えない。休薬期間は 1 日で充分とみなされた。ナイカルバジンは肌に対して刺激性又は感作性ではないが、微弱な眼刺激性が認められた。ナイカルバジンへの吸入暴露は無視できるほど少なかった。土壌、地下水、あるいは二次汚染による安全懸念はないが、表層水におけるリスクは評価されなかった。

¹ 欧州委員会の要請による、案件番号 EFSA-Q-2009-00225, 2010 年 3 月 10 日採用

² パネル委員: Gabriele Aquilina, Georges Bories, Andrew Chesson, Pier Sandro Cocconcelli, Joop de Knecht, Noël Albert Dierick, Mikolaj Antoni Gralak, Jürgen Gropp, Ingrid Halle, Reinhard Kroker, Lubomir Leng, Sven Lindgren, Anne-Katrine Lundebye Haldorsen, Alberto Mantovani, Miklós Mézes, Derek Renshaw 及び Maria Saarela。パネル委員のうち一人は、利益の宣言に関する EFSA の方針に従って確認される利益相反の可能性のため、上記の課題に関する議論に参加しなかった。連絡先: FEEDAP@efsa.europa.eu

³謝辞: パネルは、この意見の調整に対し、Atte Von Wright 氏を包む、抗コクシジウム剤及び抗ヒストモナス剤に関する作業部会のメンバーに感謝する。

キーワード

抗コキシジウム剤、ナイカルバジン、DNC、HDP、肉用鶏、安全性、ADI、MRL、有効性

推奨される引用先；添加物及び製品あるいは動物飼料中で使用される物質に関する EFSA パネル (FEEDAP)；肉用鶏の飼料添加物としての Koffogran(ナイカルバジン)の安全性及び有効性に関する科学的見解。EFSA ジャーナル 2010。8(3)： 1551. [40 pp.]. doi: 10.2903/j.efsa.2010.1551. 利用可能なオンライン： www.efsa.europa.eu

まとめ（原文 p.2）

欧州食品安全機関(EFSA)は、欧州委員会からの要請により、抗コクシジウム剤として28日齢までの肉用鶏への使用が意図されているKoffogran(活性物質としてナイカルバジンを25%含有)の安全性及び有効性についての見解を述べるよう依頼された。

Koffogran中のナイカルバジンは、最大125 mg/kg完全飼料の使用レベルでは、標準的な気候条件及び微生物学的リスクを配慮した環境下における肉用鶏(安全範囲およそ1.5)において安全であると考えられていた。

摂取されたナイカルバジンは速やかに 2 成分、2-ヒドロキシ-4,6-ジメチルピリミジン(HDP)及び 4,4'-ジニトロカルバニリド(DNC)に分解された。これらの 2 物質は、薬物動態及び代謝については互いに独立して挙動した。ナイカルバジンからの DNC は、動物に対して単独で与えられる場合や、ナイカルバジン中と同様の割合で HDP と同時に投与される場合に比べ、極めて活性が高かった。DNC は残留マーカーと言われており、肝臓が標的組織であった。ナイカルバジンの使用中止後、DNC 残留物は組織から速やかに減少した。HDP-関連残留物は DNC に由来した残留物よりもはるかに低い。

さらなる変異原性試験の提出に基づいて、飼料添加物に関する科学パネル(FEEDAP)は、ナイカルバジンには遺伝毒性を認めないと結論した。ラットの亜慢性試験では、ナイカルバジンが試験を実施したすべての用量において有害影響を示したため、ナイカルバジンに対する NOAEL は得られなかった(最低用量 181 mg/kg 体重/日)。しかし、DNC のみを使用したラットの亜慢性試験より、DNC の NOAEL は 709 mg/kg 体重/日と設定された。DNC としてではなくナイカルバジンとして投与した際の、この明らかに矛盾する結果は、DNC に対するラットのより高い全身性暴露に起因している可能性がある。イヌの 2 年間試験から得られた 154 mg DNC(+ 51 mg HDP)/kg 体重/日は最も低い NOAEL と考えられる。ラットの多世代生殖試験は欠如しているが、試験した最高用量(300 mg DNC + 100 mg HDP/kg 体重/日)でも大きな懸念はみられなかった。FEEDAP パネルは胎児毒性作用 200 mg/kg 体重/日に基づき、ラットの発生毒性に関する懸念はナイカルバジン 70 mg/kg 体重/日までないと結論した。ウサギ試験での母動物毒性の NOAEL は、控えめにナイカルバジン 60 mg/kg 体重/日と確立することが可能であったが、それに対して発生毒性の NOAEL は、ナイカルバジン 120 mg/kg 体重/日(与えられた最高用量)であった。

ナイカルバジン関連混入物であるパラニトロアニリン(PNA)は、発がん性物質の疑いがある。ラットにおける PNA の体内動態データ、及び FEEDAP パネルの推奨するナイカルバジン中の最大 PNA レベルを考慮し、提示された最大レベルの Koffogran を投与された肉用鶏組織の消費に起因する消費者の PNA 暴露は、無視できるほど低いと思われる。

消費者が DNC のみに曝露されるとして、イヌの 2 年間試験から得られた NOAEL (154 mg DNC/kg 体重/日)に安全係数 200 を適用し、DNC に対する一日摂取許容量(ADI)を 0.77 mg/kg 体重/日と設定した。DNC の MRL として、肝臓(15 mg/kg)、腎臓(6 mg/kg)、筋肉(4 mg/kg)及び皮膚/脂肪(4 mg/kg)がそれぞれ提案された。これらの MRL を適用した経口曝露による最悪のケースの計算結果は、ADI の 24 % に過ぎなかった。休薬

期間は1日で充分とみなされた。

ナイカルバジンは肌に対して刺激性又は感作性ではないが、微弱な眼刺激性(一過性の作用)が認められた。**Koffogran** の取り扱いによるナイカルバジンへの吸入暴露は無視できるほど小さいとみなされた。

FEEDAP パネルは、推奨用量でのナイカルバジンの使用が土壌画分、地下水又は二次中毒の予測可能なリスクを引き起こすとは考えていない。しかし藻類に対する毒性生データがなく、表層水に対するリスクは評価されなかった。

FEEDAP パネルは、提案された最高用量(125 mg/kg 完全飼料)のナイカルバジンが、肉用鶏のкокциジウム症の抑制に有効であるとみなした。

FEEDAP パネルは、ナイカルバジン中の PNA の削減、及び肉用鶏における耐性*アイメリア*株に対するさらなるモニタリングに関し、提言を発表した。

欧州委員会により規定される背景（原文 p.6）

委員会規則(EC) No 1831 /2003は、家畜栄養用添加物のECにおける承認を管理する規則を定め、特に第25条により、理事会指令70/524/EECの条件下で、添加物の承認を満たさなければならない経過措置を定義する。

委員会は、肉用鶏の飼料添加物として使用する際のナイカルバジンに基づいた製品”Koffogran”に関する欠落データを満たすために、申請会社Phibro Animal Healthから補足の調査資料を受理した。

欧州委員会による委任事項（原文 p.6）

委員会は申請者により提供された補足データを評価し、肉用鶏に使用する際のナイカルバジンに基づいた”Koffogran”の安全性及び有効性に関する見解を、欧州食品安全機関に表明するよう依頼する。

表 1：申請者による添加物の説明と使用状況(原文 p.7)

添加物	ナイカルバジン (Koffogran)
登録番号/EC 番号/番号 (適正な場合)	
添加物の種類	抗コクシジウム剤及び抗ヒストモナス剤
添加物の官能基	該当なし

説明			
組成、説明	化学式	純度分類 (適正な場合)	分析法 (適正な場合)
ナイカルバジン 250.00 g/kg ステアリン酸 126.00± 5% ポリソルベート 20 13.90± 10% ふすま 100%に達するまで 活性物質：ナイカルバジン	ナイカルバジン C ₁₉ H ₁₈ N ₆ O ₆ CAS 番号: 330-95-0 粒状において、 1,3-ビス(4-ニトロフェニル)尿素 と 4,6-ジメチルピリミジン-2-オ ールの等モル複合体 IUPAC 命名法: 4,4'ジニトロカルバニリドと2-ヒド ロキシ-4,6-ジメチルピリミジン 複合体	ナイカルバジン 関連混入物: 1%以下 パラニトロアニリン 最大. 0.5%	ナイカルバジン 4,4'-ジニトロカルバニ リド(DNC)と 2-ヒドロ キシ-4,6-ジメチルピリ ミジン(HDP)の 1:1 等モル複合体 DNC 成分を 340mm 波長の逆相アイソクラ チック法により分析

商標名(適正な場合)	Koffogran
承認保有者名(適正な場合)	Phibro Animal Health s.a. Belgium BE 4033

使用条件				
動物種又は区分	最大齢	最少含量	最大含量	休薬期間 (適正な場合)
		完全飼料中の含量 (mg/kg)		
肉用鶏	28 日	100	125	5 日

ラベル用の他の条項及び追加要件	
使用のための特定条件又は制限(適正な場合)	
投与のための特定条件又は制限 (適正な場合)	屠殺 5 日前に休薬
市販後調査(適正な場合)	
補足飼料への使用上の特定条件(適正な場合)	—

最大残留基準値(MRL) (適正な場合)			
残留マーカ	動物種又は区分	標的組織又は食品	組織内最大含有量
4,4' ジニトロカルバニリド (DNC)	肉用鶏	肝臓	750 µg/kg

評価 (原文 p.8)

1. 緒言 (原文 p.8)

Koffogran は、ナイカルバジン⁵を活性物質として 25 %含有する。抗コクシジウム剤として、完全飼料中 100～125 mg ナイカルバジン/kg の範囲で肉用鶏に投与される。FEEDAP パネルは、2003 年に申請者によって提出された資料について評価を実施した (EFSA, 2003)。

調査資料の毒性に関する部分は決して満足とは言えず、消費者及び使用者の安全性に関する結論は導き出せなかった。加えて、提供された情報が不十分であり、陸上環境及び水中環境についてのリスクを評価できなかった。同様に、提供された最新の試験数が不足しており、最近のデータに基づいた有効性の全評価はできなかった。

申請者は、現在の評価基準⁴においてあらかじめ確認された不備を補うため、2008 年に補足調査資料を提出した。

EFSA はこの意見に照らして、Maxiban®G160 (ナラシン及びナイカルバジン含有) 調査資料の安全性及び工業用データの共有を可能にする Maxiban®G160 申請者からの相互参照文書を受理した。

2. 添加物の特性 (原文 p.8)

前回の評価書 (EFSA, 2003) では、FEEDAP パネルは調査資料のこの項に対する説明を公表しなかった。しかし多くの案件が加盟国によって提起された。

一連の案件は、様々な化合物の仕様書及び分析上の問題と関連していた。現行の調査資料において、ナイカルバジン⁵、ポリソルベート 20⁶、ステアリン酸⁷、ふすま⁸、Koffogran の包装⁹、ナイカルバジンの包装¹⁰、及び Koffogran¹¹に関する仕様書が提供された。また、Koffogran 製品データシート¹²が供給された。FEEDAP パネルにより正規に採択された調査に従って、安全性の懸念がないかぎり、それらのデータについて論評されない。

⁴ 欧州食品安全機関 (EFSA) 調査資料参照: FAD-2008-0062

⁵ 工業用調査資料/信頼性フォルダ/付録 1

⁶ 工業用調査資料/信頼性フォルダ/付録 3

⁷ 工業用調査資料/信頼性フォルダ/付録 4

⁸ 工業用調査資料/信頼性フォルダ/付録 5

⁹ 工業用調査資料/信頼性フォルダ/付録 6

¹⁰ 工業用調査資料/品質フォルダ/付録 12

¹¹ 工業用調査資料/品質フォルダ/付録 15

¹² 工業用調査資料/品質フォルダ/付録 38

分析方法に関する情報は、Koffogran 中の遊離 HDP に対して¹³、ふすまの微生物学的分析証明書を含む微生物学的分析に関するイスラエル標準に対して¹⁴、DNC の分析方法の検証¹⁵、プレミクスチャー及び飼料におけるナイカルバジンの測定に関して¹⁶、残留溶媒に対する方法¹⁷（及び溶媒のクロマトグラム）の検証¹⁸、及び分析方法の検証¹⁹に対して提供された。それらのデータは、FEEDAP パネルのいずれにおいても論評されない。参照標準の分析証明書が添付された²⁰。

以下の章は、現在の調査資料中の関連情報、また適正な場合、前回の書類中で既に提供された情報に基づく。

2.1. 添加物の同定（原文 p.9）

Koffogran は、肉用鶏のコクシジウム症抑制に用いられる飼料添加物である。麦藁色から褐色を帯びた粒状固体であり、以下の物質を含有する(% w/w)：ナイカルバジン：25.00(仕様書 23.7～27.5 %)、ステアリン酸：12.60、ポリソルベート 20：1.39、及びふすま：61.01²¹。Koffogran のナイカルバジン含有量は4つのバッチで分析され²²、24.3～25.1%(平均 24.8 ±0.3%)の範囲であった。

最終製剤における粒子の90%以上が850 µm の直径を有し、7%未満の粒子は径が125 µm 未満である。製品の容積密度は約0.5 g/ml である。

レーザー線回折法によって得られる粒子サイズのデータは、使用者/作業者の吸引暴露の推定に利用された。

重金属は3つのバッチで分析された²³。鉛換算の含有量は10 mg/kg 未満であった。Koffogran のダイオキシン類含有量は3つのバッチで測定された²⁴。値は常に低く、0.040～0.047 ngWHO- PCDD/F TEQ/kg の範囲であった。

¹³ 工業用調査資料/信頼性フォルダ/付録 2

¹⁴ 工業用調査資料/品質フォルダ/付録 5-2

¹⁵ 工業用調査資料/信頼性フォルダ/付録 9

¹⁶ 工業用調査資料/品質フォルダ/付録 13-1

¹⁷ 工業用調査資料/品質フォルダ/付録 14

¹⁸ 工業用調査資料/品質フォルダ/付録 11

¹⁹ 工業用調査資料/品質フォルダ/付録 17

²⁰ 工業用調査資料/品質フォルダ/付録 10

²¹ 工業用調査資料/品質フォルダ/付録 15

²² 工業用調査資料/品質フォルダ/付録 19

²³ 工業用調査資料/品質フォルダ/付録 18

²⁴ 工業用調査資料/品質フォルダ/付録 19

2.2. 活性物質の特性 (原文 p.9)

化学合成物質であるナイカルバジンは、分子式 $C_{19}H_{18}N_6O_6$ 、CAS番号330-95-0(MW=426.38)、4,4'-ジニトロカルバニリド(DNC)及び2-ヒドロキシ-4,6-ジメチルピリミジン(HDP)の等分子複合体である。構造式を図1に示す。

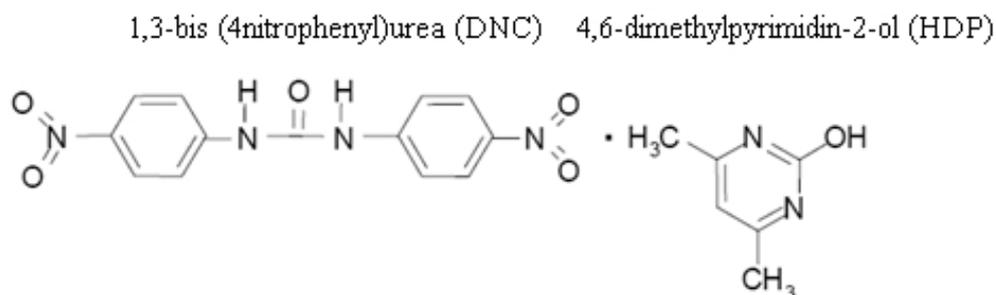


図1：ナイカルバジンの構造式

請願者により明示されたナイカルバジン純度は、95.1%以上である²⁵。潜在的混入物は、遊離HDP(最大3.0%)、パラニトロアニリン(PNA, 最大0.5%)、アンモニア(最大0.5%)、クロリド(最大0.3%)、硫酸(最大1.5%)、メタノール(最大0.02%)、ジエチルベンゼン(最大0.02%)及び他の未特定混入物(最大0.2%)である。仕様書、分析法及びデータが提供された^{26,27}。

ナイカルバジン(仕様書28.0~30.0%HDP, 67.7~73.0%DNC)の含量均一性は、6つのバッチ分析により確認された(HDP 28.9~29.4%, DNC 67.7~69.1%)^{28,29}。PNA含量は、6つのバッチ分析の結果0.1~0.2%であり³⁰、36ヶ月の貯蔵中に増加しなかった³¹。遊離HDP(複合体を含まない)はナイカルバジンの1.5%であった(3つのバッチ)³²。

残留溶媒に対する仕様は、VICH³³閾値を下回る; 6つのバッチ分析により確認(0.01%未満)³⁴。対照法は適切に行われている。

DNC及びHDPの物性及び化学的特性を表2(EFSA, 2003)に要約する。しかし空気中の環境リスク評価

²⁵ 工業用調査資料. モノグラフセクション

²⁶ 工業用調査資料. モノグラフセクション

²⁷ 工業用調査資料/信頼性フォルダ/付録 8

²⁸ 工業用調査資料/品質フォルダ/付録 21

²⁹ 工業用調査資料/品質フォルダ/付録 27

³⁰ 工業用調査資料/品質フォルダ付録 21

³¹ 工業用調査資料/品質フォルダ/付録 22

³² 工業用申請資料/品質フォルダ/付録 27

³³ <http://www.vichsec.org/en/guidelines.htm>

³⁴ 工業用申請資料/品質フォルダ/付録 21

(ERA)は無視できるとの考えから、DNCとHDPの蒸気圧は記載されていない。

表 2: 4,4'-ジニトロカルバニリド (DNC) 及び 2-ヒドロキシ-4-6-ジメチルピリミジン (HDP) の性質

	DNC	HDP
分子量	302 g/モル	124 g/モル
水への溶解度	0.02 mg/L 未満	約 70 g/L
log Kow	3.6 (pH 5~9)	-0.94 (pH 5~9)

2.3. 製造工程

2.3.1. 活性物質 (原文 p.10)

ナイカルバジンの製造方法は、すべて調査資料に記載されている。ナイカルバジンは DNC 及び HDP から化学的過程を経て合成される。また申請社は、DNC 及び HDP の製造方法に関する追加情報を提供した。

2.3.2. 添加物 (原文 p.10)

ふすま及びポリソルベート 20 は 15 分間で混合される。ナイカルバジンを加えた後、それらの化合物はさらに 15 分間混合される。ステアリン酸の添加後、さらに 15 分間混合される。その後、調製物は 75~85 °C に加熱され、30 分間さらに混合される。製品は空冷される³⁵。

2.4. 添加物の物理化学的及び工学的特性 (原文 p.10)

2.4.1 安定性 (原文 p.10)

水素結合によって安定化したナイカルバジン複合体は、水中では解離しにくい溶媒中では容易に解離する³⁶。したがって溶媒抽出後に行われる試験では、2 成分 (DNC 及び HDP) のそれぞれが個別に分析される。

2.4.1.1. 添加剤の貯蔵寿命 (原文 p.10)

製品の有効期限は、すでに前回の調査資料で明示された³⁷。要約すると、2つのKoffogranバッチ (25 °C/相対湿度 (RH) 60 %で貯蔵) のナイカルバジン濃度 (DNC及びHDPを個別に測定) を、24ヶ月間貯蔵して分析した。初期値はそれぞれ24.7 %及び25 %、24ヶ月貯蔵後の値はそれぞれ23.8及び25.1 %であった。3番目のバッチでは、貯蔵9ヶ月後に分析した (初期値: 24.5 %, 最終値: 24.7 %ナイカルバジン)。さらに2つのバッチを

³⁵ 工業用申請資料。モノグラフセクション

³⁶ 工業用申請資料/品質フォルダ/付録 31

³⁷ 工業用申請資料/品質フォルダ/付録 30

40 °C/75 %RHで、一つは12ヶ月間、もう一つは9ヶ月間貯蔵した。初期値は24.7 %及び24.5 %ナイカルバジンで、9ヶ月後の値は23.9 %、12ヶ月後では24.0 %であった。2つのバッチは、非空調室(5~35 °C及び25~60 %RH)で貯蔵された。DNCとHDPはそれぞれ43ヶ月間及び32ヶ月間測定し、安定であることが認められた(HDP初期値及び最終値:28 %;DNC初期値69 %、最終値70 %)。3番目のバッチは、25°C /60 %RHで36ヶ月間貯蔵され、同様に安定であることが認められた(HDP初期値及び最終値: 29 %、DNC初期値:69 %、最終値68 %)。両化合物がともに無変化であることが観察されたことから、それぞれのナイカルバジン成分は安定であったと結論づけられる。

これは、36ヶ月の貯蔵期間中に潜在的な分解物質(PNA及びパラニトロフェニルウレア)がみられなかったことより支持される³⁸。強制分解試験では、H₂O₂処理あるいは加熱処理(100°Cで4時間)後に分解は全く観察されなかったが(HDP及びDNCは減少せず)、酸性又は塩基性条件下では限定的に有意な量の分解が生じた。

このデータは、申請者により提案された、25 °C未満で貯蔵する際の有効期間24ヶ月³⁹を裏付ける。

2.4.1.2. プレミクスチャー及び飼料に使用される添加物の安定性 (原文 p.11)

肉用鶏用の Koffogran のプレミクスチャー段階に含まれるナイカルバジンの安定性(微量成分含む)に関し、最近の3試験の結果が報告された⁴⁰。ナイカルバジンの設定濃度は1.04 %であった。ナイカルバジン(DNCとして測定)は、それぞれ30 °C/65 %RH及び40 °C/75 %RHの条件で、4、8及び12週間貯蔵後に測定した。試験1では、ナイカルバジン濃度の初期値が0.94 %、3ヶ月後の測定値は40 °C/75 %RH貯蔵で0.95 %、30 °C/65 %RH貯蔵で0.86 %であった。試験2及び3も同様の結果が示された。申請者は、加速条件下で3ヶ月後に測定されたナイカルバジン濃度と比較して、プレミクスチャー中のナイカルバジンの方が通常貯蔵条件下で6ヶ月間安定であると結論した。

粉飼料及びペレット飼料(肉用鶏の一般的な幼雛飼料)における、Koffogran(125 mg ナイカルバジン/kg 完全飼料)中のナイカルバジンの安定性に関する最近の3試験の結果が報告された⁴¹。試験1では、3サンプル中のナイカルバジン濃度(DNCとして測定)を、粉飼料では118 mg/kg、ペレット飼料では111 mg/kgに平均化した。それぞれ30 °C/65 %RH及び40 °C/75 %RHの条件で貯蔵し、4、8及び12週間後にDNC濃度を測定した。試験1では、30 °C/65 %RHでの12週間貯蔵後のナイカルバジン濃度が粉飼料で106 mg/kg、ペレット飼料で103 mg/kgであった。40 °C/75 %RHにおける換算値は、それぞれ124 mg/kg及び101 mg/kgであった。試験2及び3も同様の結果を示した。

³⁸ 工業用調査資料/品質フォルダ/付録 22

³⁹ 工業用調査資料。モノグラフセクション

⁴⁰ 工業用調査資料/品質フォルダ/付録 40

⁴¹ 工業用調査資料/品質フォルダ/付録 39

2.4.2. 均一性 (原文 p.11)

Koffogran は、完全プレミクスチャーに 1.78 %の水準までナイカルバジンを加えたものであり、試験用に 6 つの無作為サンプルが抽出された。測定の結果、平均濃度は 1.72 %、変動係数(CV) 1.1 %であり、均一性が示された⁴²。

最近のナイカルバジンの安定性試験において、肉用鶏に用いるためのプレミクスチャー及び粉飼料、ペレット飼料(第 2.4.1.2 節参照)⁴³の添加物の分布について、同様の結論が認められる。3 試験中において、それぞれ 3 サンプルずつが分析された。プレミクスチャー(設定濃度:1.04 %)におけるナイカルバジン濃度は 1.00(CV 3.9 %)、1.02(CV: 4.7 %)、0.97 %(CV: 5.8 %)であった。粉飼料(設定濃度 125 mg/kg)では 118(CV: 4.1 %)、117(CV: 4.1 %)、124 mg/kg(CV: 6.9 %)、ペレット飼料では 111(CV: 7.3 %)、103(CV: 4.2 %)、109 mg/kg(CV: 2.5 %)であった。

これらの結果から、肉用鶏に用いるプレミクスチャー及び最終飼料における Koffogran 中のナイカルバジンの均質な分布が証明された。

2.4.3. 交差汚染 (原文 p.11)

飼料の調整中に起こり得る交差汚染に関する試験が報告された⁴⁴。125 mg ナイカルバジン/kg を含む一般的な商用家禽飼料が処方され、混合後ペレット化された。その後全製品がフラッシュされ、非添加飼料が混合されてペレット化された。この手順は 3 回繰り返された。ナイカルバジンの設定濃度は、補足飼料中において許容範囲内の分散で解析的に確かめられた。

播り潰された飼料サンプル(ミキサー中)及びフラッシュ後の非補足飼料から完成されたペレットにおける解析の結果、3 反復すべてでナイカルバジンは検出されなかった(この方法における LOD: 1 mg/kg 飼料)。これらの結果は、ナイカルバジンが混合装置に一切付着しないことを示している。

2.5. 使用条件 (原文 p.12)

Koffogran は完全飼料中ナイカルバジンを濃度 100~125 mg/kg 含む、28 日齢以下の肉用鶏のコクシジウム症抑制用飼料添加物である。申請者は休薬期間として 5 日を提案している。

2.6. 分析法 (原文 p.12)

⁴² 工業用調査資料/品質フォルダ/付録 32

⁴³ 工業用調査資料/信頼性フォルダ/付録 39 及び 40

⁴⁴ 工業用調査資料/品質フォルダ/付録 13-0

2.6.1 プレミクスチャー及び飼料中の活性物質の制御ルーチンのための分析法（原文 p.12）

申請者は、評価された後に、研究所間で試験され、欧州各国の肉用鶏に用いるプレミクスチャー及び飼料に適用されている分析法に触れている⁴⁵。その方法は、DNC の UV 検出装置に連結した逆相液体クロマトグラフィーからなる。相対標準偏差はプレミクスチャーで 5.7 %であった。飼料での回収率は 91～108 %、検出限界は 20 mg DNC/kg 未満で、相対標準偏差は 2.6～10.2 %であった。

2.6.2 標的組織の活性物質の残留試験の分析法（原文 p.12）

Koffogran 意見集 (EFSA, 2003) は、鶏組織中の DNC を LOQ 0.1 mg/kg で測定できる HPLC/UV 分析法を報告した。

申請者は、鶏組織中の DNC 測定に LC-MS/MS を利用する新しく有効な方法を提出した⁴⁶。濃度 100 µg/kg 以上での添加試料の平均回収率は、すべて 70～110 %の間で、変動係数は 15%以下であった。LOQ は肝臓で 0.050、腎臓で 0.100、筋肉で 0.025、皮膚/脂肪 0.025 mg DNC/kg である。

3. 安全性（原文 p.12）

3.1. 標的株に対する安全性（原文 p.12）

3.1.1. 標的株における耐性試験（原文 p.12）

申請者による新たなデータの提供はなかった。Koffogranに関する見解 (EFSA, 2003) において、FEEDAP パネルは以下を結論した。:

「安全範囲は体重増加に基づき約1.5である。生殖器官で観察された有害影響のため、産卵鶏及び種畜の飼料汚染は避けるべきである」

FEEDAP パネルの知見の範囲において、上記結論の見直しを必要とするような利用可能な新たなデータはない。

3.1.2. 添加物の微生物学的安全性（原文 p.12）

申請者による新たなデータの提供はなかった。Koffogranに関する見解 (EFSA, 2003) 内において、FEEDAP パネルは微生物学的所見に関し結論を下した[新規挿入]。:

「混餌レベルの濃度のナイカルバジンにおいて、DNC及びHDPは、標準的*in vitro*試験[寒天希釈試験: MICはすべて256 mg/lより大きい]において、病原性及び非病原、内因性及び内因性細菌

⁴⁵ 工業用調査資料/品質フォルダ/付録 13-1

⁴⁶ 工業用調査資料/単行本フォルダ/付録 25

[*Salmonella*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Escherichia coli*, *Proteus*, *Lactobacillus*, *Campylobacter*, *Clostridium*, *Bacteroides*のそれぞれについて5菌株]に対する抗菌活性を有しなかった。490 mg/kgでは、ナイカルバジンは*Salmonella enterica* (serovar Enteritidis)に対し、全く抗菌活性を有しなかった。また、ナイカルバジンは*Salmonella enterica* (serovar Enteritidis)のコロニー形成又は排泄に全く影響しなかった」

3.1.3. 交互作用/不適合性 (原文 p.13)

申請者による新たなデータの提供はなかった。Koffogranに関する見解(EFSA, 2003)において、FEEDAPパネルが以下を結論した。:

「適合性試験の結果はない。知られている限りの製品の履歴において、実際の使用からいかなる事態も生じていないことから、飼料、担体、他の認可された添加剤又は薬製品の不適合性又は交互作用は予想されない」

3.1.4. 熱ストレス (原文 p.13)

推奨される使用レベルでのナイカルバジンは、肉用鶏の熱ストレス症状を悪化させることが知られている。熱ストレスを受ける環境下において、熱産生(Wiernusz and Teeter, 1995)と同様、体温及び心拍数が増加する(Beers et al., 1989)。

3.1.5. 標的種の安全性に関する結論 (原文 p.13)

推奨される最大使用レベル(125 mg/kg完全飼料)でのナイカルバジンは、確立された温度状況における肉用鶏に対し安全であると考えられる(安全範囲約1.5)。

微生物学的リスクの面から、ナイカルバジンは安全であると思われる。

3.2. 消費者に対する安全性 (原文 p.13)

3.2.1. 代謝及び残留試験 (原文 p.13)

3.2.1.1. 代謝 (原文 p.13)

Koffogranに関する前回の評価(EFSA, 2003)において、FEEDAPパネルは以下のように結論した。:

- i) 鶏では、6日後に代謝恒常状態に達した。
- ii) ナイカルバジンの代謝運命において、複合体の DNC 及び HDP 成分が分割されて単独で挙動し、DNC 成分(及びその代謝物)は主に糞中に排泄され(未変化の DNC が 46%)、HDP 成分は主に

尿中に排泄された(未変化の HDP が 90 %)。

- iii) 鶏における DNC の代謝運命が確立され、主要代謝物は糞尿、胆汁及び組織中で同定された：ニトロ基の還元及びアセチル化により生じるモノアセチルアミノ DNC、両ニトロ基の還元及びアセチル化により生じるジアセチルアミノ DNC、分子の裂開、還元及びアセチル化により生じる N,N'-1,4-フェニレンビス(アセトアミド)。
- iv) 未変化の HDP は排泄物、肝臓及び腎臓中の総 HDP 残留物の約 85 %に相当し、その他の代謝物は 10 %未満であった。
- v) 肝臓は標的組織であり、DNC は残留マーカールとみなすことができる。
- vi) ナイカルバジンの代謝運命は、鶏とラットにおいて質的に類似している。

6 週齢の鶏(雄雌5羽ずつ)に50 mg^[14C]-DNC-ナイカルバジン/kg飼料を連続5日間投与する新たな試験が行われた⁴⁷。各個体は休薬期間0日目にと殺され、排泄物及び胆汁が採取された。DNC代謝物の同定により、以前記載されたナイカルバジンの代謝経路(EFSA, 2003)が確認された。

別の新たな試験では⁴⁸、21日齢の鶏に一日二回(カプセル)、連続7日間、125 mg^[14C]-DNC-ナイカルバジン/kg飼料 相当量が投与された。血漿は5日後に定常状態に到達した。4羽の個体における累積排泄物(1~7日目)の代謝物プロフィール(radio-HPLC)により、主要排泄成分は未変化DNC(抽出された放射能は約90%)であり、DNCのモノアセチル化合物が5%、13種類の少量の代謝物がそれぞれ総放射能のうち2%未満に過ぎないことが確認された。

3番目の試験⁴⁹は、125 mg^[14C]-HDP-ナイカルバジン/kg飼料を使用し、同様のプロトコールにより行われた。血漿は6日後に定常状態に到達した。投与された放射能の約97%は、16時間後の排泄物中で回収され、ナイカルバジンのHDPが速やかに代謝されることが示された。排泄物中の未変化HDPは総放射能の約65%であり、それに対して少量の代謝物はそれぞれ6%未満であった。使用中止0日後においても、HDPは組織に存在する残留放射能(肝臓77%、腎臓22%、筋肉5%及び皮膚/脂肪46%)の主成分であった。

ナイカルバジン成分の相互作用

DNC単独あるいはHDPとの結合体に対するナイカルバジン由来のDNCの相対経口生体利用効率が、ラットを用いて試験された⁵⁰。頸静脈にカニューレが挿入された5匹のラット9群に、50、150及び450 mg/kg体重ナイカルバジンを単回経口投与した；DNCとHDPの混合物(ナイカルバジン中と同じ分子比)では50、150及び450 mg/kg体重、DNC単独では150、450及び900 mg/kg体重。投与0.5、1、2、4、8、12、24、36、48及び72時間後に血液サンプルを採取してDNC濃度を測定し、薬物動態解析を行った。その結果、DNCはナイカルバジンとして投与される場合、単独又はHDPとの混合物として投与される場合よりも33~65倍高い生物学的利用率を

47 相互参照/Maxiban®G160 工業用調査資料/第III節/付属書 13

48 工業用調査資料/人間の安全項/付録 7

49 工業用調査資料/人間の安全項/付録 8

50 相互参照/Maxiban®G160 工業用調査資料/補足情報/2009年 2009年 9月/付属書 7

示すことが示唆された。

これらの結果は、ナイカルバジンの抗コクシジウム作用がDNCとHDPの混合物より優れているとする、鶏での従来の結果 (Cuckler et al., 1955) を裏付ける。このデータは、DNCの吸収増加をもたらすと考えられる、水溶液中に形成される超微細結晶の観察に基づいた、ナイカルバジン由来DNCの生物学的利用率の劇的な増加(予想の80~100倍)についての以前からの仮説 (Rogers et al., 1983) をも支持する。

3.2.1.2. 残留物 (原文 p.14)

総残留物

使用時の提案用量で投与された $[^{14}\text{C}]$ -HDP及び $[^{14}\text{C}]$ -DNC-ナイカルバジン由来の組織中残留物の速度論に関する2試験が提出された。

試験1⁵¹では、6羽の鶏(オス3羽及びメス3羽、21日齢)の4群に、一日二回(カプセル)7日間、総用量125 mg $[^{14}\text{C}]$ -HDP-ナイカルバジン/kg飼料相当を反復投与した。各投与群はそれぞれ、最終日の朝の投与から24時間後、すなわち休薬期間1日とみなせる16時間の休薬期間後、それから3日後、5日後、及び10日後にと殺された。その後、総残留物を測定し、radio-HPLCに基づいて代謝物プロフィールを作成した。ナイカルバジンのHDP成分に由来する総残留量を表3に示す。

表3：125 mg $[^{14}\text{C}]$ -HDP-ナイカルバジン/kg飼料を7日間反復投与された鶏(各群6羽)組織中の休薬期間における総残留物の速度論(mg当量HDP/kg湿組織として表記)^a

	休薬期間(日数)			
	1	3	5	10
肝臓	0.095 ± 0.041	0.008 ± 0.003	0.006 ± 0.002	0.0022 ± 0.002
腎臓	0.134 ± 0.061	0.0051 ± 0.003	0.0022 ± 0.001	0.0022 ± 0.001
筋肉	0.084 ± 0.037	0.0032 ± 0.001	0.0022 ± 0.001	-
皮膚/脂肪	0.106 ± 0.036	0.027 ± 0.010	0.0172 ± 0.010	0.0062 ± 0.002

^a: LOQ(肝臓、腎臓及び筋肉: 0.004 mg/kg ; 皮膚/脂肪: 0.011 mg/kg) を下回る試料の LOQ を含む平均値

細胞中の代謝物分離法の分析能が低いため、FEEDAPパネルはすべての組織中の主要代謝物としてのHDPの広がり(肝臓45%~64%、腎臓26%)と、低い割合の代謝物の存在(各10%未満)を結論するにとどめた。

試験2⁵²では同様のプロトコールで125 mg $[^{14}\text{C}]$ -DNC-ナイカルバジン/kgを投与したが、休薬期間は3段階のみとした。試験1と同様に、鶏は最終日朝の投与から24時間後、すなわち休薬期間1日とみなせる16時間の休

⁵¹ 工業用調査資料/人間の安全項/付録 8

⁵² 工業用調査資料/人間の安全項/付録 7

薬期間後、5日後、及び10日後にと殺した。改良解析法(LC/MS/MS)を用いて代謝プロフィールを作成した。

血漿中の放射能は休薬4日後に定常状態に達した。ナイカルバジンのDNC成分に由来する全残留物を表4に示す。休薬1日後では、 $[^{14}\text{C}]$ -HDP-ナイカルバジンの値は投与した値よりも数桁、すなわち50倍(皮膚/脂肪)から300倍(肝臓)大きかった。すべての組織で休薬4日後以降、放射能の急激な低下が認められた。肝臓は標的組織であった。

表4：7日連続で125(mg $[^{14}\text{C}]$ -HDP-ナイカルバジン/kg飼料)を投与した鶏(各時点につき6羽)組織中の休薬期間における全残留物の速度論(mg当量HDP/kg湿組織で表現) a

	休薬期間(日数)		
	1	5	10
肝臓	27.797 ± 1.445	0.608 ± 0.198	0.050 ± 0.014
腎臓	16.776 ± 1.254	0.369 ± 0.121	0.033 ± 0.011
筋肉	4.431 ± 0.571	0.069 ± 0.016	0.002 ± 0.001
皮膚/脂肪	5.122 ± 0.320	0.151 ± 0.039	0.024 ± 0.010

a: LOQ (肝臓、腎臓及び筋肉: 0.004 mg/kg; 皮膚/脂肪 : 0.011 mg/kg) を下回る試料の LOQ を含む平均値

組織中の総残留物抽出率は、休薬後1日に高かったが(肝臓94%、筋肉83%、及び皮膚/脂肪90%)、休薬期間の延長に伴い、肝臓において顕著に減少した(5日後75%、10日後27%)。休薬後1日においては、DNC及びアセチル-DNC(桁の低下による)が組織中の主要残留物であり、そのほか多くの少量代謝物(肝臓で13種、筋肉及び皮膚/脂肪で4種)がそれぞれ10%未満みられた。組織中のDNCと全残留物の比を表5に示す。

表5：休薬期間の鶏組織中の総放射能のDNC比(全DNC関連残留物に対するDNCの百分率)

	休薬期間(日数)	
	1	5
肝臓	38~49	23~48
腎臓	31~42	0~5
筋肉	21~27	0~18
皮膚/脂肪	40~55	-

残留マーカ

野外条件において、鶏組織中にDNCとして測定されるナイカルバジン残留物の消失に関する試験⁵³を行った。一群6羽(1日齢の雌雄各3羽)に、1kgあたり125mgナイカルバジン(解析的に制御)添加したKoffogran飼料を28日間投与した。各投与群は休薬期間1、5、7、9、11及び14日後にと殺され、組織が採取された。DNC残

⁵³ 工業用調査資料/人間の安全項/付録9

留物は、LOQがそれぞれ肝臓0.050 mg/kg、腎臓0.100 mg/kg、筋肉0.025 mg/kg及び皮膚/脂肪0.025 mg/kgである分析法を用いて求められた。結果を表6に示す。

表 6 : Koffogran1 kg あたり 125 mg ナイカルバジン添加飼料を 28 日間投与した鶏組織中の休薬期間における DNC 残留物の消失(mg DNC/kg 組織)

	休薬期間(日数)		
	1	5	7
肝臓	9.249 ± 1.804	0.453 ± 0.047	< LOQ
腎臓	3.007 ± 1.095	< LOQ ^a	<LOQ
筋肉	2.110 ± 0.506	0.045 ± 0.008	< LOQ
皮膚/脂肪	2.327 ± 0.372	0.131 ± 0.033	<0.027 ± 0.004

^a LOQ= 0.05 (肝臓)、0.1 (腎臓)、0.025 (筋肉) 及び0.025 mg/kg (皮膚/脂肪)

休薬期間7日以上での結果はすべてLOQを下回った。

3.2.1.3. 代謝及び残留試験についての結論 (原文 p.16)

以前供給された補追試験及びデータは、以下を確認する。(i)鶏におけるKoffogranからのナイカルバジンの代謝に関するFEEDAP Panelの前の結論 (欧州食品安全機関 (EFSA), 2003)、(ii)ナイカルバジン由来 DNCは、単独に投与されたDNC、又はナイカルバジン中と類似の割合のHDPと共に投与されたDNCと比較して、極めて動物に利用可能である。

さらに、ナイカルバジンのHDP又はDNC成分のどちらかから生成された総残留物(最高推奨用量で投与投与された場合)は次のことを示す。(i)HDP関連残留物はDNCに由来する残留物と比較して極めて少量である、(ii) 5日後には全ての組織中でHDP由来残留物は基本的に消失する、(iii)DNCは代謝物マーカーであろう。ナイカルバジンの休薬後には、DNC残留物は速やかに組織中から消失し、その標的組織は肝臓である。

3.2.2. 毒性試験 (原文 p.16)

3.2.2.1. 急性毒性 (原文 p.16)

申請者は新たな試験を提供しなかった。以前の见解 (EFSA, 2003) で評価された2つの急性試験はいずれも GLP以前であったことは留意されるべきである。試験の結果、ナイカルバジンの急性毒性は低いことが示された。

3.2.2.2. 遺伝毒性(変異原性及び染色体異常性) (原文 p.17)

FEEDAPパネルは、ナイカルバジンに関する2つのバクテリア変異原性試験を評価した (EFSA, 2003)。

ナイカルバジン、HDP及びDNCについて、アロクロール1254で前処理したラットの肝臓酵素(S9混合液)による代謝活性化法及び直接法により、ネズミチフス菌(*Salmonella typhimurium*)TA1535、TA1537、TA98及びTA100株を用いてエームス変異原性試験を行った。ナイカルバジン、HDP及びDNCの濃度(DMSO中)は、それぞれ100~2,000 µg/plate、200~2,000 µg/plate、及び100~2,000 µg/plateとした。ナイカルバジン及びDNCが、それぞれ500 µg/plate以上、及び300 µg/plate以上の濃度で沈殿物を形成したことが注記された。これらの物質は本試験において変異原性反応を起こさなかった。

Ohta et al. (1980)によると、アロクロール1254処理したラット雄の肝臓由来のS9混合液による代謝活性化法及び直接法において、ナイカルバジン(10 %DMSO中10,000 µg/plateまで)がネズミチフス菌(*Salmonella typhimurium*)TA98及びTA1538株で変異原性を示した。TA100、TA1535及びTA1537株又は大腸菌Wp2 hcr trp株では変異原性はみられなかった。別のrec-assayによるDNA修復試験では、ナイカルバジン暴露において枯草菌(*Bacillus subtilis*)H17(rec+)及びM45(rec-)株で増殖阻止帯の差異が全くみられなかったことから、変異原性試験結果は陰性と示された。

申請者は、エームス試験に関する第3次報告書を新たに提出した⁵⁴。ナイカルバジンの変異活性を、ネズミチフス菌(*Salmonella typhimurium*)TA1537、TA98及びTA100株及び大腸菌(*Escherichia coli*)WP2uvrA株を用いて、3~1,000 µg/plateの濃度範囲(DMSO溶媒)で試験した。両活性化条件において、333 µg/plateまではみられなかった試験材料の沈殿が、1000 µg/plateで認められた。アロクロール1254処理したフィッシャーラット雄の肝臓から得たS9混合液の有無の条件下で、2つの独立した試験が各濃度で実施された。両独立試験において、フレームシフト試験に用いられるTA98株において、S9混合液を添加した場合と未添加の場合のいずれにおいても変異活性が確認された。これらの所見は、エームス試験におけるナイカルバジンの変異原性を裏付ける。

大小コロニーの個別スコアリングにより点突然変異(tk座位)と染色体効果の両方の検出に最適化されたマウスリンフォーマ試験(L5178Y細胞株、クローン3.7.2.C)により、ナイカルバジンの変異原性能を試験した、新たなデータが最近提出された⁵⁵。細胞を、ナイカルバジン100 µg/mlまでで、4及び24時間暴露した4つの独立した試験が行われた:そのうち2試験では、アロクロール1254処理したフィッシャーラットの肝臓から得たS9混合液が用いられ、残り2試験では用いられなかった。各処理での各濃度において、培養はそれぞれ2回行われた。試験の結果、ナイカルバジンの変異原性及び染色体異常の証拠は全くみられなかった。

*in vivo*でのナイカルバジンの遺伝毒性能を評価するために、初期の申請において、CD-1マウス雄雌の骨髓赤血球による小核試験が行われた(EFSA,2003)⁵⁶。ナイカルバジン2,000 mg/kg体重を毎日2回経口投与したマウスにおいて、小核含有多染性赤血球数の増加はみられなかった。ナイカルバジン投与後の血漿中にDNC

⁵⁴ 工業用調査資料/人間の安全項/付録1

⁵⁵ 工業用調査資料/人間の安全項/付録2

⁵⁶ 工業用調査資料/人体の安全項/付録15

が存在すると分析されたことから、ナイカルバジンの吸収が確認された。これらの結果、本試験においてナイカルバジン及びDNCに遺伝毒性がみられないことが示された。

別の *in vivo* 試験結果が新たに提出された。

1,000 mg/kg 体重及び 2,000 mg/kg 体重を経口投与されたフィッシャーラット雄の肝細胞における *ex vivo* の不定期 DNA 合成 (UDS) 試験により、ナイカルバジンの遺伝毒性能が調査された⁵⁷。発現時間は 12～16 時間及び 2～4 時間とした。いずれの発現時間におけるいずれのナイカルバジン濃度においても UDS は認められなかった。この試験において、ナイカルバジンが *in vivo* で暴露されたラット肝細胞に対し遺伝毒性はないと結論された。

2つの異なる臓器の *in vivo* の体細胞暴露を含む哺乳動物系において、ナイカルバジンの遺伝毒性がみられなかったことから、FEEDAP パネルはナイカルバジンが遺伝毒性リスクを有しないと結論した。ナイカルバジンは容易に DNC 及び HDP に代謝することから、DNC 及び HDP もまた非遺伝毒性物質であると結論するのが妥当である。

3.2.2.3. 亜慢性経口毒性 (原文 p.18)

申請者は EFSA の要求に対し、DNC 単独と、DNC とナイカルバジンの両方をラットに 90 日間投与した 2 試験の結果を提供した。

最初の試験⁵⁸は、ナイカルバジン (分析により確かめられた仕様) の亜慢性毒性を評価するために、OECD ガイドライン 408 に基づいて行われた。スプレーグドローリー由来ラット雄雌各 15 匹の 3 投与群に、200、600/400、及び 1,000/600 mg/kg 体重/日を 13 週間混餌投与した。別に雄雌各 15 頭の一 1 群を対照群とした。平均体重及び摂餌量に基づいた週ごとの濃度調整により、投与量を維持した。ナイカルバジン投与の最初の 1 週間後の摂餌量及び体重の減少のため、中及び高用量投与は、それぞれ 400 mg/kg/日及び 600 mg/kg/日に調整された。飼料中の濃度は分析して確認された。投与期間の被検物質の平均摂取量は、雄で 181、384 及び 599 mg/kg 体重/日、雌で 189、400 及び 619 mg/kg 体重/日であった。

1,000/600 mg/kg/日投与群では、1/15 例が 11 日目に死亡し、600/400 mg/kg/日処理では雄 1/15 例が 88 日目及び 90 日目に死亡した。1,000/600 mg/kg/日投与群では、2/15 例が 85 日目に死亡した。顕微鏡検査した組織数が限られるため、これらの個体の死因は特定できなかった。全処理群において、ナイカルバジンに起因する体重増加に対する明確な影響が用量依存的に認められた。この体重減少は摂餌量の減少と直接関連があると考えられる。摂餌量は明らかに各投与群で減少した。雄雌及び全処理群において、用量依存的な赤血球数、ヘモグロビン及びヘマトクリットの減少、及び用量依存的な血液中の尿素窒素及び血漿クレアチニンの増加がみられた。また、雄雌及び全処理群において用量依存的な血漿リン酸増加がみられた。全血漿タンパク質パラ

⁵⁷ 工業用調査資料/人間の安全項/付録 3

⁵⁸ 相互参照/ Maxiban®G160 工業用調査資料/補足情報/2009 年 2009 年 9 月/付録 1

メータ(総タンパク質、アルブミン及びグロブリン)は、一般に全処理群において用量依存的に減少した。中用量及び高用量投与群の雄雌において血漿トリグリセリドの増加、また全3投与群の雄雌において一般に用量依存性を示す血漿コレステロール増加がみられた。

ほとんど全ての投与群において、腎臓、脾臓、脳、副腎腺、副睾丸、心臓、肝臓、卵巣、脳下垂体腺、精巣、胸腺、甲状腺/上皮小体腺、及び子宮頸部を含む、臓器の肉眼的変化を伴う相対重量の増加がみられた。顕微鏡検査は腎臓、精巣及び副睾丸のみで行われた。腎臓重量の増加は、顕微鏡観察の結果、尿細管の変性/回復、慢性炎症及び線維症と相関がみられた。尿細管中に結晶が観察され、糸球体、骨盤及び間質中にみられる場合もあった。

最高用量群の雄において、精巣に軽度から重度の細精管変性/萎縮がみられた。NOAELは導き出せなかった(181 mg/kg体重/日未満)。

2番目の試験(OECDガイドライン408にしたがって実施)⁵⁹では、スプレーグドーリー由来ラットの雄雌各15匹の3投与群に対し、DNC106、284及び709 mg/kg体重を一日に1度、91日反復経口強制投与(10 mL/kg)した。DNC用量は、150、400及び1,000 mgナイカルバジン/kg体重/日に相当した。別に雄雌各15の1群を対照群とし、賦形剤(0.5 %メチルセルロース)のみを投与した。さらにラット雄雌各4匹の3投与群に、薬物動態(TK)試験用の動物として同用量のDNCを投与した。

全個体について、一日2回、疾病、死亡、傷害及び飼料及び飲水の利用率を調査した。詳細な臨床的及び量的な観察を行った。常に主要な試験動物の摂水量及び摂餌量を測定して、毎日記録し、毎週報告した。最終剖検の前に、予備試験として検眼鏡検査が行われた。

臨床病理学調査用の血液と尿の検体は、指定された個体から第6週及び最終剖検前に採取された。試験物質の血漿中濃度測定用の血液検体は、試験期間中、週に一度及び91日目の指定された時点において、試験物質投与前に、指定されたTK動物から採取された。試験物質に対しTKパラメータが決定された。

試験終了時点ですべての関連臓器の剖検検査が行われた。臓器重量が記録され、顕微鏡により組織が調べられた。

全試験動物は、92日目に予定された最終剖検まで生存した。試験期間中、臨床症状、機能観察総合評価、体重、摂餌量、摂水量、眼科検査、臨床病理学、臓器重量、肉眼及び顕微鏡病理学において、DNCに起因する影響は観察されなかった。

雄雌において、 $AUC_{0-\tau}$ 及び最高血中濃度(C_{max})は、ほぼ投与量に比例する形で106及び284 mg/kg/日の間

⁵⁹ 相互参照/ Maxiban®G160 工業用調査資料/補足情報/2009年11月

で増加したが、91日目では284～709 mg/kg/日の間でAUC_{0-τ}あるいは最高血中濃度(C_{max})の増加は全くみられなかった。

この試験の条件下で、NOAELは709 mg DNC/kg/日と設定された。

3.2.2.4. 2年間経口毒性試験 (原文 p.19)

前回、ラット⁶⁰及びイヌ⁶¹におけるDNCとHDPの混合物(重量比3:1)の2年間経口投与試験がGLP以前に評価された(EFSA, 2003)。試験設計及び報告に欠陥はあったが、利用可能なデータには大きな懸念の可能性はみられなかった。

ラット試験のNOAELは、最高投与量と判断された(DNCは300 mg/kg体重/日、HDPは100 mg/kg体重/日)。

イヌの試験では、最高用量群(1週間に6回、600 mg DNC/kg体重、及び200 mg HDP/kg体重を投与した)において、統計的に有意な血清ALTの上昇が認められた。この所見により、イヌの試験のNOAELは、週6日投与に基づいて、一日あたり180 mg DNC/kg体重及び60 mg HDP/kg体重と算出された。一週間の全投与量に基づいて算出した結果、NOAELは一日あたり154 mg DNC/kg体重、及び51 mg HDP/kg体重とみなされた。

3.2.2.5. 発生毒性を含む生殖毒性試験 (原文 p.19)

FEEDAPパネルは前回のKoffogranに関する見解(EFSA, 2003)において、ともにDNC + HDPの重量比3:1で行われた、ラットを用いた2つのGLP以前の多世代試験を評価した。

最初の試験は実験計画及び付随試験と本試験との関係が明確でないと判断された。一連の中間報告書として示された第2の試験⁶²は、記述が乏しいうえに現行基準に適さず、特に試験動物の各世代の選抜に関して、以前の子宮内暴露の参照もなかった。いずれも試験の欠陥はあったが、最高用量群の試験(300 mg DNC + 100 mg HDP/kg体重/日)において大きな懸念の可能性はみられなかった。

ラットを用いたナイカルバジンの発育試験⁶³は、すでに2003年にFEEDAPパネルにより評価されている(EFSA, 2003)。この試験の実験IIIでは、妊娠した雌のラット計24匹に、それぞれ0、70、200及び600 mgナイカルバジン/kg体重(7～17日)を経口投与した。以下の奇形が観察された:200、600 mg/kg投与群で尾椎骨化の低下(p< 0.05)、及び200 mg/kg投与群で腰肋過剰(p<0.01)。中、高用量投与群のラット21匹中5匹に、有意に高い摂水量が認められた。最大用量では、母動物死亡の増加、摂餌量及び母動物と生存胎児の体重

⁶⁰ 工業用調査資料/人間の安全項/付録17

⁶¹ 業用調査資料/人間の安全項/付録 18

⁶² 業用調査資料/人間の安全項/付録 19

⁶³ ⁶³工業用調査資料/人体の安全項/付録20

抑制がみられた。データの報告に一部欠落がみられるが、70 mgナイカルバジン/kg体重までは発生毒性に関する懸念はないとFEEDAPパネルは結論した。

ナイカルバジンを投与したウサギにおける新たな発生毒性試験が提供された⁶⁴。交配後の雌ウサギ一群24匹に妊娠6～28日目の間、一日1回、0、30、60あるいは120 mgナイカルバジン/kg体重/日を強制経口投与した。妊娠した雌は試験期間中一日2回調査した。体重は3日ごと、摂餌量は毎日測定した。妊娠29日目にすべての個体をと殺し、成体については肉眼剖検を実施した。剖検時にすべての組織が調べられ、特に子宮及び内容物について注記した。黄体、着床及び胎児の数及び評価が記録された。胎児は、固定及び骨格検査の処理前に剖検した。

臨床又は行動観察において、ナイカルバジン投与に起因する影響はみられず、体重及び摂餌量は全群で同様であった。いずれの生殖パラメータ及び胎児毒性においても、投与に起因する影響はみられなかった。120 mg/kg体重/日投与群においては、24匹のうち2匹において、肝臓に顕著な分葉がみられた。投与に起因すると考えるには小さ過ぎる発生頻度であるが、投与量設定試験において⁶⁵、200及び400 mg/kg/日投与各群の雌6匹中2匹に同じ所見が認められた。したがって120 mg/kg体重/日投与群において観察された肝臓への影響は、投与が寄与したとみなすべきである。しかし、毒性の関連性はいまだ明らかになっていない。母動物毒性のNOAELは60 mgナイカルバジン/kg体重と設定できる。それに対し発生毒性のNOAELは120 mgナイカルバジン/kg体重(投与された最高用量)であった。

3.2.2.6. パラニトロアニリンの遺伝毒性及び発がん性

パラニトロアニリン(PNA)はDNC合成における出発物質の1つで、ナイカルバジン中に混入物として残留する。

オランダ健康審議会(GR, 2008)はそのレビューの中で、NTPの枠組み内で行われた試験(1993)において、雄マウスにおける血管肉腫増加の観察に基づき、PNAに発がん物質の疑いがあると結論した。雄マウスにおける血管肉腫増加は、対照群では50匹中0匹であったが、3 mg PNA/kg体重投与群では50匹中1匹、30 mg PNA/kg体重投与群では50匹中2匹、100 mg PNA/kg体重投与群では50匹中4匹(歴史的対照: 2.1 %; 範囲0～6 %)と、用量依存的な発生頻度の上昇傾向がみられた。雌マウスでは注目すべき結果はみられなかった。他の2つの発がん性試験は陰性の結果を示したが、審議会により、試験での投与量が低過ぎる(2年間試験のラットに0.25～9 mg/kg体重投与)、あるいは試験情報が不十分(2年間試験のマウスに2～70 mg/kg体重投与)とみなされた。遺伝毒性試験の再検討の結果に矛盾がみられたため、発がん可能性についてのこれらの所見は、遺伝毒性作用に関してどれほどの隔たりがあるのかは明らかではない。*in vitro*での細菌の変異原性試験では、外来代謝系の有無に関わらず、PNAがフレームシフト突然変異を起こすことが示された。他の変異原性試験の結果は陰性であった。また、PNAは哺乳類細胞において、代謝系の有無に関わらず染色体異常を誘発した。しかし陰性の結果も同様に報告されている。ある試験では、PNAは活性系存在下で姉妹染色分体交換を誘発したが、他の研究者による同一試験では陰性又は疑わしい結果であった。陰性の結果は*in vivo*での試験

⁶⁴ 工業用調査資料/人間の安全項/付録 5

⁶⁵ 工業用調査資料/人間の安全項/付録 4

からも報告されている(キイロシヨウジョウバエを用いた伴性の劣性致死突然変異試験、雄ラット肝細胞中の不定期DNA合成試験)。

オランダ健康審議会は、PNAの試験は不十分であり、懸念を引き起こし得ると結論した。

Chopade及びMatthews (1984)は、雄のF-344ラットにおいて、経口投与及び静脈内投与後のp-[¹⁴C]-ニトロアニリン(PNA)の体内動態を試験した。PNAの消化管吸収はほぼ100%であり、試験範囲内の投与量(経口で0.276及び13.8 mg/kg体重)の影響を受けなかった。PNAは体内に速やかに分配され、特定の組織に対して顕著な結合を示さなかった。さまざまな組織中の[¹⁴C]-PNA由来の放射能消失は速やかであり、PNAの全身半減期は約1時間であった。体内のPNA由来放射能の消失は3日以内にほぼ完了した。[¹⁴C]-PNAは代謝により9種の代謝物に速やかに変化し、おもに尿中、及びそれより少ない量が糞便中に排泄された。尿中放射能の主要成分(56%)は、PNAの代謝物2種の硫酸抱合体の形態をとった。非代謝PNAの排泄はわずかであった(3%未満)。[¹⁴C]-PNAの胆汁への排泄もみられたが、多くのPNA由来の放射能は腸間循環を経て、その後尿中に排泄された。これらのデータは、Koffogran添加飼料(FEEDAPパネルの推奨するナイカルバジン中の最大値0.1%PNAに基づく0.006 mgPNA/kg体重)を投与された肉用鶏の組織中の消費に起因する、PNAへの消費者の暴露が無視できるほど小さいことを示すと考えられる。

3.2.2.7. 毒性試験についての結論 (原文 p.21)

サルモネラ菌の株を用いた2種の試験の結果、ナイカルバジンの変異原性は陽性であった。ナイカルバジンの遺伝毒性が哺乳動物系中(2種の体細胞組織における有効性の*in vivo*試験を含む、小核及び不定期DNA合成及びマウスリンフォーマ試験)でみられなかったため、FEEDAPパネルは、ナイカルバジンは遺伝毒性はみられないと結論した。

ラットの亜慢性試験では、ナイカルバジンはしたすべての試験投与量において有害影響を示した(最低用量181 mg/kg体重/日)。NOAELは設定できなかった。DNC単独のラットの亜慢性試験を行った。試験の最高用量群でDNCに起因する影響は認められず、NOAELは709 mg DNC/kg体重と導き出された。これらの明らかに矛盾する結果は、DNC単独(あるいはHDPとの単純な混合物として)ではなくナイカルバジンとして投与された場合、ラットのDNCに対するより高い全身性暴露に関連する可能性がある

ラット及びイヌで実施された2年間毒性試験から、イヌの試験で154 mg DNC(+ 51 mg HDP)/kg体重という最も低いNOAELが導かれた。

ラットの多世代試験では、試験の欠陥はあったが最高用量群(300 mg DNC + 100 mg HDP/kg体重/日)でも大きな懸念はみられなかった。FEEDAPパネルは、データ報告に一部の欠陥があったが、200 mg/kg体重での胎児毒性作用に基づいて、ラットにおいて70 mgナイカルバジン/kg体重まで発生毒性に関する懸念はないと結論した。ウサギ試験での母動物毒性のNOAELは控えめに60 mgナイカルバジン/kg体重として設定されたが、それに対して発生毒性のNOAELは120 mgナイカルバジン/kg体重(最高用量)であった。

ナイカルバジン関連混入物であるパラニトロアニリン(PNA)は発がん物質の疑いがある。ラットでのPNA体内動態に関するデータ、及びFEEDAPパネルの推奨するナイカルバジンでの最大PNAレベルから、提案された最大レベルのKoffogran添加飼料を投与された肉用鶏の組織中の消費による消費者のPNA暴露は、無視できるほど小さいと考えられる。

3.2.3. 消費者の安全性 (原文 p.22)

3.2.3.1. 一日摂取許容量(ADI)の提案 (原文 p.22)

ナイカルバジンのADI設定に関して、JECFAは(WHO, 1998)、「ナイカルバジンを支持する明確な毒性試験の不足に留意した。しかし利用可能な他のデータは、これらの不足をほぼ克服する十分な情報を提供した。また、ナイカルバジンが40年にわたり、多くの国々で動物用医薬品に使用されてきたことが留意された。ナイカルバジン利用の長い歴史と、ブロイラー鶏の幼雛飼料としてのみ利用されるという事実に基づいて、委員会はADIが支持できるとみなした。委員会は、ラットの発生毒性試験におけるNOELが一日あたり200 mg/kg体重をもとにして、データベース中の制限を説明するために選択した安全係数500を用いて、ADIを0~400 µgナイカルバジン/kg体重と設定した」。

高い安全係数500を導いたおもな制限要因は、

- (i) ナイカルバジンの遺伝毒性に関して示された疑わしい結果(哺乳動物系に関する試験が利用不可能)
- (ii) ラットにおけるナイカルバジン発生試験の設計及び報告の不備である。

FEEDAPパネルは、ラットでの新たな亜慢性試験及びラットとウサギの発生試験の結果は、全てナイカルバジンを用いて実施されているが、JECFAによって考慮されたナイカルバジンのNOAELより、低いNOAELを示すことに留意している。実際、ラットの亜慢性試験ではNOAELを確認できなかった。

消費者はナイカルバジンではなく DNC に暴露されるため(消費者暴露レベルが動物中で毒性を示すレベルより数桁程度低いと予想されるため、HDP 残留物は無視できる)、ナイカルバジンに基づいた ADIは消費者の安全性を反映しないと考えられる。消費者の安全評価としては DNC のみを考慮すべきである。

DNC (3:1でHDP含む)投与によるイヌの2年間毒性試験から導かれた最低のNOAELは、154 mg DNC/kg 体重/日であった。GLP前の試験結果の有効性は、間接的にDNC投与したラットの最近の亜慢性試験結果を支持する。不確実係数200は、NOAELからADIを導くために適用される。通常的安全係数100に適用された追加係数2は、イヌの試験における設計及び手順の欠陥を考慮している。これはADI770 µg DNC/kg体重(体重60 kgの人間あたり46 mgDNCに相当)に相当する。

消費者の安全性評価については、ナイカルバジンのADIが役立つ可能性がある。最も低いNOAELは、ウサギ

を用いた発生試験での60 mgナイカルバジン/kg体重であった。ラットを用いた90日試験でナイカルバジンのNOAELが設定できなかったため、発生試験からは暫定的なADIしか得られない。上記と同様に不確実係数200を適用し、暫定ADIは300 µgナイカルバジン/kg体重(体重60 kgの人間あたり18 mg/日)が提案される。

3.2.3.2. 消費者暴露及び最大残留許容量 (MRL)の提案(原文 p.22)

FEEDAPパネルは、鶏及びラットにおけるナイカルバジンの代謝的運命の類似性を考慮し、実験動物に基づいたDNCのADIがMRL計算の基準として適切であると結論する。

ナイカルバジンの2成分が単独で挙動することから、毒性に関連する代謝物への消費者暴露を評価するには、原理的には両構成成分の代謝運命に起因する全残留物が考慮されるべきである。しかし、ナイカルバジンのDNC成分由来の残留物がHDP由来の残留物よりも数桁高いことを考慮し、前者のみを検討する。

FEEDAPパネルは控えめなアプローチをとり、DNC由来の全代謝物が、最大でもDNC当量と同等のリスクを示すと考える。

DNC関連残留物の消費者暴露は、規則(EC)No429/2008において設定された一日あたりの動物製品の消費量に従って算出され、算出されたDNC総残留物+2SD(信頼限界95%)が、異なる組織と異なる休薬期間で求められた。その結果を、ADIに対する百分率とともに表7に示す。

表7：休薬1日後及び5日後の鶏組織中の総DNC由来残留物に対する消費者の生活暴露、及び一日摂取許容量(ADI)に対する百分率

	肝臓	腎臓	筋肉	皮膚/脂肪	合計
全DNC残留物					
(mg DNC 当量/kg 組織) 平均値 + 2SD					
1日	30.687	19.284	5.573	5.762	
5日	1.004	0.611	0.101	0.229	
暴露(mg DNC/人/日)					
1日	3.069	0.193	1.672	0.519	5.453
5日	0.100	0.006	0.030	0.021	0.157
ADI (46 mg/人/日) に対する百分率					
1日	-	-	-	-	12
5日	-	-	-	-	0.3

この結果は、休薬1日後の鶏組織中に存在する総DNC由来残留物の消費者暴露が、ADIに適合していることを示している。

休薬期間1日を考慮し、以下のMRLが提案される; 15 mg DNC/kg(肝臓)、6 mg DNC/kg(腎臓)、4 mg

DNC/kg(筋肉)及び4 mg DNC/kg(皮膚/脂肪)。適用組織に特異的な、総残留物に対するマーカの比率は、表5のデータより求められる。

表8: 提案されたMRLのKoffogran投与鶏の可食組織、可食部位における安全性

	肝臓	腎臓	筋肉	皮膚/脂肪	合計
提案されたMRL (mg/kg組織)	15	6	4	4	
総残留物に対するマーカ比	0.4	0.3	0.2	0.4	
消費量 (kg/日)	0.1	0.01	0.3	0.09	0.5
DITR ^a (mg/日)	3.75	0.20	6.00	0.90	10.85
消費量 (%ADI)					24

^a 総残留物の一日摂取量

MRLに相当する組織の消費に起因する消費者暴露は、ADIに適合している。

3.2.3.3. 休薬期間 (原文 p.23)

FEEDAP パネルは、休薬期間は1日で十分としている。

3.3. 使用者に対する安全性 (原文 p.23)

FEEDAPパネルはリスク評価に関し、2003年に以下のように結論した(EFSA, 2003):

「ナイカルバジンは皮膚刺激性、皮膚感作性を示さず、一過性結膜刺激性のみが認められた。有機溶媒に難溶性のため、経皮吸収性は低いと考えられる。ラットにおける短期暴露の影響及び作業員の慢性暴露から、作業員の呼吸器への有害影響の可能性は除外できない」。

粒度及び粉化の可能性を懸念し、新たなデータが提供されている。

3.3.1. Koffogranの粉化の可能性(原文 p.24)

Stauber-Heubach試験は、Koffogranの3つのバッチで行った。粉塵濃度は100 L空气中7.9、3.3及び3.1 mg/100gであり、それぞれ0.079、0.033及び0.031 g Koffogran/m³に相当する⁶⁶。

ナイカルバジン(6つのバッチ)とKoffogran(6つのバッチ)の中の粒度分布は、レーザー回折によって測定された⁶⁷。その結果を表9に示す。ナイカルバジン粒子の約50%は呼吸域サイズ(8.3~12.5 µm以下)であり、

⁶⁶ 工業用調査資料/品質項/付録 25-1

⁶⁷ 補足情報. 2009年12月

Koffogranがこれと異なるパターンを示したのは、造粒の効果及び希釈剤(ふすま)粒子がより大きいことを反映している。試料はすべて粒子サイズ10 µm未満の微粒子を含むが、健康上有害である⁶⁸と考えられる肺胞の粉塵に関する限界値(7.1 µm未満100 %、5.0 µm未満 50%)は得られていない。

表9： ナイカルバジン及びKoffogranの粒子径(µm)

ナイカルバジン				Koffogran			
バッチ ^a	10パーセント イル	50パーセント イル	90パーセント イル	バッチ ^a	10パーセント イル	50パーセント イル	90パーセント イル
031184	1.28	9.47	31.15	5_01_37	19.39	278.6	477.6
031185	1.75	12.51	68.81	5_01_38	20.91	284.7	484.6
031186	1.35	11.14	47.45	5_01_39	24.92	301.4	510.2
0301869	3.3	8.3	18.3				
0307880	3.1	8.3	20.0				
0306851	3.1	8.9	20.3				

^a ナイカルバジンバッチ 031184、031185、031186 及び Koffogran バッチ 5 01 37、5 01 38、5 01 39 は最近の製品、ナイカルバジンバッチ 0301869、0307880 及び 0306851 は 1999、2000 及び 2001 の製品

粉塵中のナイカルバジンは分析しなかった。さらなる計算において、粉塵中のナイカルバジン含量は、Koffogran中の含量に等しいと仮定される。

3.3.2. 作業員/使用者の吸入暴露の推定 (原文 p.24)

作業員がKoffogran粉塵への暴露の可能性のあるプレミクスチャー工場に関して、別の計算がある:

- ・調剤所での秤量のため袋からKoffogranを採取する作業
- ・ホッパー又はミキサーにおいて、事前に計量された材料の袋を空にする作業
- ・最終プレミクスチャーの梱包作業

最悪の場合のシナリオにおいて考慮される要因を、そのシナリオにおける推定値と共に、付録A-1に一覧表に示す。

プレミクスチャー工場のKoffogran取扱者の呼吸器経路を介した8時間労働におけるナイカルバジン摂取量は、250 µgと推定される。しかし量的にみて、この総吸入量はより低い気道(気管、気管支、細気管支、肺胞)には到達しないと考えられる。鼻咽頭、気管、気管支、及び細気管支では粒子は粘液に付着し、吸収されるのは非常に低いレベルであり得る。粘液は痰として吐かれ、飲み込まれ、経口暴露と同様に消化管に吸収され、腸内細菌叢及び肝臓による初回通過代謝にまで及ぶと仮定できる。

Koffogranの約10 %は、肺胞の吸収表面に到達すると考えられる粒子(20 µm以下、DIN EN 481)から成る。

⁶⁸ TA Luft 2002 in : Feldhaus/Hansel Bundesimmissionsschutzgesetz, 15. Auflage 2002, C.F. ミュラー出版社, ハイデルベルク

しかしこれらの粒子は、異なる肺胞への利用性（付録A-2、DIN EN 481参照）を示す。微細塵粒子のナイカルバジン量は、付録A-2で報告された表及び試料5 01 37のレーザー回折分析⁶⁹を基に計算される。

粒度のレーザー回折データがKoffogranの粉塵ではなくKoffogranのみで得られたため、粉塵は100 µmより大きい粒子を含まないと仮定される。Koffogranの100 µmまでの大きさの粒子の合計は25.5 %であった；したがってKoffogranの肺胞利用性をもつ画分のデータは、Koffogranダストをモデル化するため、100/25.5をかけた。

試料5 01 37における16 µm以下の粒子の補正済み合計は26.5 %であるが、肺胞に達した量は7.3 %のみであった。結局、一日8時間労働（直接暴露は6分間）で肺胞に達するのは、18 µgナイカルバジン(0.3 µg/kg体重)のみと考えられる。

実験動物におけるナイカルバジンの吸入毒性のデータは利用可能ではない。FEEDAパネルによって提案されるナイカルバジンに対する暫定ADI(300 µg/kg体重)は、最悪のケースにおける消費者の吸入暴露より1,000倍高い。

申請者は少なくとも最近10年間、2つの生産工場において、ナイカルバジンの作業員に対する有害反応が全く認められなかったという情報を提供した⁷⁰。

3.3.3. 使用者の安全性についての結論（原文 p.25）

今回の評価、及び作業場におけるKoffogran/ナイカルバジン取り扱いの広範囲に及ぶ経験、及び使用者に対するいかなる有害影響の証拠もないという点を考慮し、FEEDAPパネルは、日常的に粉塵発生製品を取り扱う使用者に対し、特別な安全対策は必要ではないと結論する。

3.4. 環境の安全（原文 p.25）

有効成分は確立された環境安全の生理的/天然物質ではない。添加物は伴侶動物に適しない。結果的に、第一段階評価は、予測環境濃度(PEC)を決定するために継続されるべきである。

第一段階及び第二段階では、最初に最も悪いケースのPEC_{initial}を推定するために、総残留量アプローチがとられるだろう。ナイカルバジンは親化合物として100 %排泄されると想定される。ナイカルバジンはDNC及びHDP成分の複合体であるため、70:30 w/wの割合において記録された最高投与量における両化合物を基にして、環境リスク評価が行われるであろう。関連代謝物に関するデータが提出されない限り、他の段階への販売も両成分の性質に基づく。

3.4.1. 暴露評価（原文 p.25）

⁶⁹ 補足情報. 2009年12月

⁷⁰ 補足情報. 2009年5月

3.4.1.1. 運命及び挙動 (原文 p.25)

堆肥中での運命

対象動物の堆肥中におけるナイカルバジンの運命に関するデータは提出されていない。

土壌中の運命

吸着

[¹⁴C]-DNCの吸着/脱離の挙動は、砂質壤土、埴壤土及びシルト質壤土⁷¹の3つの土壌型で調査された。土壌のpHは6.1～7.5の範囲であり、土壌中の有機炭素含有量は1.3 %～3.1 %の範囲であった。吸着が速やかで完全であったため、OECDガイドライン106に概説されている手順に完全には従うことはできなかった。重要な変更は、試験を5段階濃度でなく2段階で実施したため、試験結果の解釈ができず、正確なKd/Kocが得られなかったことである。最低濃度(0.02 µg/L)でのKoc値は16137～21962の範囲であり、最高濃度(0.15 µg/L)での範囲62591～123923よりはるかに低かった。最高試験濃度は水への溶解度に近かったため、高いKd/Koc値は土壌吸着の過大予測と考えられる。したがって最低値の方がより信頼性が高いと思われる。試験は3つの土壌型のみで行われたため、最低Koc値がリスク評価に用いられる。

[¹⁴C]-HDPの吸着/脱離の挙動は、砂質壤土、埴壤土及びシルト質壤土⁷²の3つの土壌型で調査された。土壌pHは6.1～7.5の範囲であり、土壌中の有機炭素含有量は1.3 %～3.1 %の範囲であった。吸着平衡に達することができず、OECDガイドライン106に概説される手順を完了することができなかった。他の重要な変更は、5段階濃度でなく2段階で試験を実施したことである。両方の試験濃度を試験したが、Koc値は33～114の範囲で同程度であった。試験は3つの土壌型のみで行われたため、最低のKoc値がリスク評価に用いられる。

分解

OECD307に従ったDNCの好氣的分解試験には、[¹⁴C]-DNCを使用し、砂質壤土、砂質壤土及びシルト質壤土⁷³について土壌中運命及び挙動の評価も含めて推定された。放出された[¹⁴C]-O₂はすべての土壌で試験期間を通じて低く、120日後において処理した放射能の1～2%であった。クロマトグラフ分析により、DNCのみがすべての土壌型に存在する重要成分であることが示された。64及び120日では4種類までの微量成分(それぞれ3 %未満)が検出されたが、特定できなかった。消失はおもに砂質壤土中において27%を占めた結合残留物の形成によるものであった。他の土壌型では非抽出性残留物は検出されなかった。一次速度論に基づいたDT₅₀は、砂質壤土、砂質壤土及びシルト質壤土において、それぞれ239、193及び257日であった。

⁷¹ 工業用調査資料/項/付録1情報

⁷² ⁷²工業用調査資料/項/付録2情報

⁷³ 工業用調査資料/環境セクション/付録3

[¹⁴C]-HDPの好氣的分解は、上記のDNC試験で述べられていたのと同様の、同一土壌型⁷⁴を用いて試験された。[¹⁴C]-O₂の形成は比較的試験全体で高く、120日後において処理した放射能の22～31 %を占めた。HDPのみが全土壌型の検体中に存在する主要成分であり、処理された総放射能の10 %以上に相当する代謝物は認められなかった。消失は砂質壤土土壌(他の土壌型では測定できず)で示されたように、非抽出性残留物の速やかな形成に強く起因した。線形回帰及び一次速度論に基づき、砂質壤土、砂質壤土及びシルト質壤土について、それぞれDT₅₀は6、7及び3日、DT₉₀は20、23及び11日と算出された。

水中運命

水中におけるDNC及びHDPの(光)生分解のデータは提出されなかった。

3.4.1.2. 予測環境濃度(PEC) (原文 p.26)

糞尿、土壌、地下水及び表層水におけるPECの推定法は、環境に対する飼料添加物の安全性調査のための技術ガイダンス(EFSA, 2008)に記述されている。算出値を表10に示す。

表10：土壌(µg/kg)、地下水及び表層水(µg/L)中のDNC, HDPの初期予測環境濃度(PEC)

	耕 地	
	DNC ^a	HDP
土壌	690	189
地下水	2.42	270
表層水	0.81	90

(a) DNC の DT₅₀ は 60 日より大きいため、PEC 平坦域は土壌蓄積の可能性を考慮して算出した。

土壌・地下水用の第一段階PECTリガー値はすべて超過している。そのため、第二段階評価は必要であると考えられる。

3.4.2. 影響評価 (原文 p.27)

3.4.2.1. 土壌生物への毒性 (原文 p.27)

土壌微生物に関する影響

DNC及びHDPが土壌の硝化に及ぼす影響は、OECDガイドライン216^{75,76}に従い、砂質壤土を用いた2つの別々の試験において測定した。濃度8.0 mg DNC/kg以下、及び3.5 mg HDP/kg以下の土壌において、これら

⁷⁴ 工業用調査資料/環境項/付録 4

⁷⁵ 工業用調査資料/項/付録6情報

⁷⁶ 工業用調査資料/項/付録7情報

の試験から選択された25%トリガーを上回る影響は観察されなかった。

植物への影響

以下の陸生植物に対するHDPの毒性⁷⁷を、壤質砂土を用いて試験した:マカラスムギ(*Avena sativa*)、レタス(*Lactuca sativa*)、カブ(*Brassica rapa*)、ペレニアルライグラス(*Lolium perenne*)、リョクトウ(*Phaseolus aureus*)及びダイコン(*R. sativus*)。OECDガイドライン208に完全には従わず、濃度範囲を使用する代わりとして、推定されたPEC0.35 mg/kgの1倍、5倍及び10倍処理における影響を測定した。レタス、エンバク、ライグラス及びカブの発芽及び生長に対するHDPの影響はみられなかった。HDPではダイコンとリョクトウの両方の発芽に植物毒性影響が認められ、それぞれ2.8及び2.9 mg/kgのLC₅₀値を示した。乾燥重量の解析では確認されなかったが、ダイコン苗条の平均新鮮重は、対照と比較して10倍処理の方が高かった。リョクトウについては、3.5 mg/kg(10倍)処理の総乾燥重量が対照に比べて有意に低かった。しかし3.5 mg/kg処理では対照より発芽が少なかった。両植物のNOECは1.75 mg/kgであった。

HDPの試験(上記参照)と同様に、同種及び同試験設計を用いて、DNC⁷⁸の陸上植物への毒性試験を行った。推定されたPEC値0.8 mg/kgの1倍、5倍及び10倍処理における影響を測定した。発芽への影響はいずれの作物種でもみられなかった。DNCは、レタス、リョクトウ、ダイコン、ライグラス及びカブの生長に影響を示さなかった。エンバク苗条の平均生鮮量がDNC濃度の上昇に伴いわずかに減少したが、有意ではなかった。NOECは8 mg/kgであった。

ミミズへの影響

DNC⁷⁹及びHDP⁸⁰が*E. foetidal*に及ぼす影響を、OECDガイドライン207に従い、21~22 °C、14日の暴露期間、0、95、171、309、556及び1,000 mg/kg土壌(各処理4倍)の6段階の試験濃度で実験室条件下、人工土壌(70 %砂、20 %粘土及び10 %有機物)を用いて個別の試験で調査した。いかなる試験濃度でも死亡はみられなかった。DNCとHDPのLC₅₀はどちらも1,000 mg/kg土壌より大きい。

3.4.2.2. 水生生物への毒性(原文 p.28)

*D. magna*及びニジマス(*O. mykiss*)へのナイカルバジンの急性毒性は、ガイドライン202⁸¹に類似したUS EPA及びASTMのガイドラインに従って測定された。毒性は100 mg ナイカルバジン/Lの濃度における限界試験として実施された。申請者は、DNCは水に不溶とみなしたため、HDPのみが測定された。*D. magna*の試験における測定濃度は24.2 mg HDP/L、マスの試験では26.7 mg HDP/Lであり、どちらの濃度も試験終了時まで安定であった。*D. magna*への急性毒性は認められず、HDPのLC₅₀は24.2 mg/Lより大きいことが示された。マス

⁷⁷ 工業用調査資料/環境項/付録9

⁷⁸ 工業用調査資料/環境項/付録 8

⁷⁹ 工業用調査資料/項/付録 12 情報

⁸⁰ 相互参照/Maxiban@G160 工業用調査資料第 III 節/付録 55

⁸¹ 工業用調査資料/環境節/付録 10

においても急性毒性は認められず、HDPのLC₅₀は26.7 mg/ Lより大きいことが示された。

どちらの試験でもDNCは分析されなかったため、試験動物がどれほどの濃度のDNCに暴露されたかは不明である。

より最近の試験において、OECDガイドライン202及び203に従い、*D. magna*⁸²、ニジマス(*O. mykiss*)⁸³ 及びブルーギル (*Lepomis macrochirus*)⁸⁴へのDNCの毒性が測定された。試験条件は、すべて許容限界の範囲内であった。これらの試験では暴露濃度も測定した。*D. magna*への毒性は投与範囲で試験されたが、2つの魚種への毒性は100µg/Lの名目濃度による限界試験で検査され、報告された水への最大溶解度(それぞれ69及び72 µg/L)に近い測定濃度が得られた。E(L)C₅₀が最大溶解度に達しなかったため、*D. magna*への48h EC₅₀及び*O. mykiss*と*L. macrochirus*の96h LC₅₀を測定できなかった。

より古い試験では、詳細は報告されていないが、藻類 *Chlorella pyrenoidosa*、魚類 *D. magna*、*Poecilia reticulata* (グッピー) 及びニジマス(*O. mykiss*)に対する急性毒性について、DNCとHDPの両方が試験されている⁸⁵。この試験はすでに前回のKoffogranに関する見解(EFSA, 2003)において、FEEDAPパネルにより評価されている。重要なパラメータの分析及びデータの報告の欠陥のため、FEEDAPパネルは2003年同様、この試験が有効だとはみなしていない。

申請者は、化学分析及び実験結果の詳細情報が欠けているため、藻類における試験⁸⁶のすべての評価はできないと通知された。申請者はこの試験について、これ以上の詳細は得られなかったことをEFSAに通知した。申請者は考慮の代わりに、高い評価の研究所により実施された試験の信頼性について疑問の余地はないと提案した。FEEDAPパネルはこれらの議論に従うことができず、生データが存在しない状態では、藻類に対するDNC及びHDPの毒性の評価はできないとした。

底質中の生物に対するDNC及びHDPの毒性に関するデータは提出されていない。

3.4.2.3. 結論 (原文 p.28)

陸上領域に対するPNEC

HDPにおいて観察された最も敏感なエンドポイントは発芽におけるNOEC 1.75 mg/kgである。これは評価係数10を用いるとPNEC 0.18 mg/kgとなる。DNCについては、最も低いエンドポイントは植物及び微生物のNOEC 8 mg/kgであり、評価係数10を用いて結果的にPNECは0.8 mg/kgとなる。

⁸² 相互参照 Maxiban®G160 工業用調査資料/補足情報/2009年7月/ERA 添付書類/付録 7

⁸³ 相互参照 Maxiban®G160 工業用調査資料/補足情報/2009年7月/ERA 添付書類/付録 8

⁸⁴ 相互参照 Maxiban®G160 工業用調査資料/補足情報/2009年7月/ERA 添付書類/付録 9

⁸⁵ 相互参照/Maxiban®G160 工業用調査資料/第 III 節/付録 69

⁸⁶ 相互参照/Maxiban®G160 工業用調査資料/第 III 節/付録 69

水中領域に対するPNEC

DNCとHDPの両方で*D. magna*と魚類に対する毒性は十分に調査されたが、藻類に対する毒性データは評価できなかった。結果として、水中環境におけるDNCとHDPのPNECはどちらも決定できない。

3.4.2.4. 生物濃縮（原文 p.29）

実験的に測定されたミミズ及び魚の生物濃縮率(BCF)は提出されていない。logKow DNCは3.6であり、生物濃縮される可能性はある。

3.4.3. リスク特性（原文 p.29）

3.4.3.1. 土壌に対するリスク（原文 p.29）

最高用量の100%が親化合物として排泄されたという仮定に基づいた場合、DNCのPEC/PNECは1未満である（表11）。HDPのPEC/PNECはわずかに1を越える。しかし、投与量の約65 %が親化合物として排泄され、10 %を越える代謝物がないことを示す排泄物データに基づいて、PECはPEC/PNECが1未満になるよう修正可能である。

DNCのPNECが無制限のNOECに基づくことは留意すべきである。さらにナイカルバジンに関する植物試験において、1,000 mg/kgまで影響は全く観察されなかった(EFSA, 2003)。したがって、DNCとHDPの複合効果の結果として許容できないリスクは予想されない。

表 11 :推奨投与量 100%及び代謝データに基づいた修正による PEC/PNEC 比較

	化合物	
	DNC	HDP
PEC _{土壌、初期値} (mg/kg)	0.69	0.19
PEC _{土壌、修正値} (mg/kg)	-	0.12
PNEC (mg/kg)	0.8	0.18
PEC/ PNEC _{初期値}	0.9	1.1
PEC/ PNEC _{修正値}	-	0.7

3.4.3.2. 表層水に対するリスク（原文 p.29）

提出された藻類に関するDNC及びHDPのデータが評価できなかったため、水中環境へのリスクを十分には評価できない。

甲殻類及び魚類に対する急性毒性は、水への溶解度まで認められなかったことは留意すべきである。しかし短期毒性がないことは、必ずしも長期毒性がないということを意味するわけでない。工業薬品及び殺生物剤に使用される通則として、長期毒性試験は、logKowが3より大（あるいはBCFが100より大）、及びPECが水への溶解度の1/100より大きい物質に求められる。HDPの場合、この基準を明確には満たさない。DNC (logKowが3より大)のPEC初期値は、水の溶解度の1/100に近い。FOCUSモデルを用いた場合、1つのシナリオ (R3)のみが同程度の初期濃度を与えるが、それに対してこのシナリオの時間加重平均及び他のシナリオのPEC初期値はそれより低い。くわえて、EcoSARv.1.0を使用したアミド及び置換型ウレアのQSAR計算結果は、DNCの慢性毒性が10以上でPEC初期値より大きいことを示す。従って、FEEDAPパネルは、安全に対し十分な範囲があると仮定し、甲殻類及び魚類の慢性毒性試験を必要とはみなさない。同じ理由から、平衡分配に基づく堆積物へのPEC初期値が、底生生物に許容できないリスクをもたらすことは予期されない。これ以上の試験は必要でないと考えられる。

3.4.3.3. 地下水に対するリスク (原文 p.30)

環境に対する飼料添加物の安全性評価のための工業用ガイダンス (EFSA, 2008) に記載のスクリーニングモデルに基づいた、DNC及びHDPの地下水におけるPECは、0.1 µg/Lより大きい。報告された土壌における分解速度を考慮に入れ、FOCUS PEARLモデルを用いたが、算出された濃度は地下水トリガー値である0.1 µg/Lを越えなかった。

3.4.3.4. 二次中毒に対するリスク (原文 p.30)

DNCのlogKowは3.6であり、生物濃縮が起こる可能性がある。ミズ及び魚類の濃縮率 (BCF) は提供されていないため、これらは現行化合物のREACHガイダンスに記述されているQSARを使用して推定され、それぞれ48.6及び229であった。表層水及び土壌での初期濃度に基づいて、食餌の50 %は暴露された土壌/水から得られると仮定して算出された、魚食の鳥/哺乳類及び虫食の鳥/哺乳類のPEC_{経口}を表12に示す。

鳥類/哺乳類におけるDNCの最も低いNOELは、154 mg/kg飼料である。現行化合物のREACHガイダンスに従って評価係数30を用いて算出すると、PNEC_{経口}は5 mg/kg飼料である。算出されたPEC_{経口}を比較すると、両方のPEC/PNEC比は1未満である (表12参照)。FEEDAPパネルは二次中毒に関する安全性の懸念はないと結論する。

表12: 推奨投与量100%に基づくDNCの二次中毒のリスク評価

	PEC _{経口, 土・水} (mg/kg)	PEC _{経口, 土壌} (mg/kg)	PNEC _{経口} (mg/kg)	PEC/PNEC _{土・水}	PEC/PNEC _{土壌}
DNC	0.093	0.15	5	0.019	0.03

3.4.3. 結論 (原文 p.30)

Koffogranの使用状況の考慮と提供されたデータに基づき、土壌、地下水、あるいは二次中毒による安全性の懸念は確認できなかった。しかし藻類に対する毒性の生データがないため、表層水に対するリスクは評価できない。

4. 有効性 (原文 p.30)

ナイカルバジンは、殺コクシジウム作用とみなされる第2世代シズントの破壊を引き起こす。しかし、抗コクシジウム作用又はその両方を示す所見もみられた (Chapman, 1993)。

実験室条件下における新たな用量滴定試験は、抗コクシジウム薬の再評価に要しない。申請者は結局この目的に対して新しいデータを提出しなかった。数年間すでに使用されている抗コクシジウム薬の有効性を判断するために、現在の使用条件下で実施された3つの新たな床飼い試験 (floor pen studies) 及び野外試験の必要性を考慮する (床飼い試験では新たに単離されたアイメリア種を使用)。

4.1. 肉用鶏における有効性 (原文 p.30)

4.1.1. 用量滴定及び用量確認 (原文 p.30)

FEEDAPパネルは、前回のKoffogranに関する見解 (EFSA, 2003) において、用量滴定及び用量確認試験について要約した。:

「管理条件においてナイカルバジンを50～1000 mg/kg飼料の範囲で投与した4回の鶏舎試験 (1955/56)の結果、*E. necatrix*、*E. acervulina*、*E. tenella*及び体重増加に対して有効性を示す投与量は、125 mg ナイカルバジン/kg完全飼料であった。用量確認試験は、1959、1970及び1992に実施された。*E. mivati*、*E. hagani*及び*E. praecox*といった種に対する125 mg ナイカルバジン/kg飼料の効果が確認された」

4.1.2. 鶏舎試験 (原文 p.31)

2006～2008年の間に行われた一連の11回の鶏舎試験が提供された⁸⁷。各試験において、ナイカルバジン投与群 (125 mg/kg飼料 ± 20%、分析により確認)は、非感染非投与対照群 (UU)と同様に、ポリエーテル抗コクシジウム薬投与群 (60 mg/kg、分析により確認)及び感染非投与対照群 (IU)と比較された。各試験は、計224羽の雄ロスチキンの4群 (7羽/ケージ、8反復/群)を無作為化して行われた。鶏は12日齢に処理され、14日齢で*E. tenella* (3試験)、*E. acervulina* (3試験)、*E. maxima* (3試験)、*E. brunetti* (1試験)及び*E. necatrix* (1試験)に感染された。それぞれフランス、イギリス、ドイツ及びオランダで単離された野生分離株である。

⁸⁷ 工業用調査資料/有効性節/付録 1-11

測定するパラメータは以下である：コクシジウム症による死亡率、体重、体重増加、摂餌量、及び飼料要求率 (feed to gain ratio) (12～21日に測定)、腸の病変部スコア (21日に測定)、オーシスト排泄 (19～22日に測定)。結果及び各接種用量の詳細を付録Bに示す。

11回の全試験結果を表13にまとめる。試験8、9及び11では死亡は生じなかった。それらの3試験を考慮しない場合、IU群の死亡率はナイカルバジン投与群において、12.7 %から7.1 %まで低下した。試験1、5及び6では、ナイカルバジン投与群における死亡率の範囲は10.7～23.2 %であった。しかし死亡した鶏にコクシジウム症による病変部はみられなかった。したがって、高い死亡率にコクシジウム症は関与していないと仮定できる。それらの3試験がそれぞれ表13に示される平均値から除外された場合、死亡率はUU群、IU群、ナイカルバジン投与群及びポリエーテル抗コクシジウム薬投与群でそれぞれ0 %、14.6 %、0.4 %及び10 %となる。病変部スコアは、すべての試験でナイカルバジン投与により有意に低下した。試験2を除いたすべての試験で、オーシスト排泄は、ポリエーテル抗コクシジウム薬投与では低下しなかったが、ナイカルバジン投与では有意に低下した。すべての試験において、IU群及びポリエーテル抗コクシジウム薬投与群と比較して、ナイカルバジン投与は体重増加及び飼料要求率 (試験2除く) を有意に改善した。しかしナイカルバジン (及びポリエーテル抗コクシジウム薬) は、体重増加及び飼料要求率に関するコクシジウム症の抑制作用を十分には補うことができなかった。

表 13 : アイメリア野生分離株に感染した肉用鶏について行われた 11 回の鶏舎試験における死亡率、病変部スコア、オーシスト排泄、体重増加及び体重増加に対する飼料の重量比のまとめ^a

処理群	死亡率 (%) ^b	病変部スコア	1日あたり、1羽あたりのオーシスト排泄 (×10 ³)	体重増加 (g)	飼料要求率 (g/g)
非感染未投与 (UU)	1.6	0	0	563	1.40
感染未投与 (IU)	12.7	3.3	92,522	374	1.84
ナイカルバジン (125 mg/kg)	7.1	0.7	15,596	471	1.57
ポリエーテル (60 mg/kg)	8.7	2.8	84,950	466	1.58

^a 死亡率、体重増加及び飼料要求率は実験期間 12～21 日、病変部スコアは 21 日目、一日あたりのオーシスト排泄は実験期間 19～22 日で算出した。

^b 値は死亡のなかった試験8、9及び11を含まない。

4.1.3. 床飼い試験 (原文 p.31)

3つの床飼い試験をこの評価において検討する。最初の試験 (Fitz-Coy and Edgar, 1992) は、すでに前回の評価 (EFSA, 2003) において検討された。2番目及び3番目の試験は、2007/2008にフランスで実施された床飼い試験である。

最初の試験 (Fitz-Coy and Edgar, 1992) は、*E. mitis* の悪性攻撃感染の制御において、125 mg ナイカルバジン/kg 完全飼料 (用量分析は出版に際し提供されず) の有効性を非感染非投与対照群と感染非投与対照群とで比較するために実施した。試験は、21日齢の鶏を用いた5群 (6羽/ケージ、5反復/群) の無作為化で実施した。菌の接種は、21日目に植物培養 (B4及びC2菌株、惹起用量、オーシスト/羽の近似値; *E. acervulina* :

51000; *E. maxima* :9300; *E. tenella* : 19300; *E. mitis*: 8260; *E. praecox*: 1520)で行われた: 体重は2日、接種0日後及び7日後に記録され、飼料要求率は接種後0~7日について算出した。試験期間中、死亡は記録されなかった。*E. mitis*の菌株B4に感染し、125 mgナイカルバジン/kg飼料を投与した鶏では、非感染非投与対照と同等の成長がみられたが、菌株C2に感染した鶏では有意な成長の低下が観察された。飼料効率は有意に高かった(表14)。

表 14: 接種後 0~7 日における感染した肉用鶏の体重増加及び飼料効率へのナイカルバジンの効果

<i>E. mitis</i> 菌株	処理	体重増加 (g, %) ¹	飼料効率 (g/g)
無し	無し	306, 100 ^a	2.06 ^a
B4	無し	214, 70 ^c	2.35 ^b
B4	ナイカルバジン	284, 93 ^a	2.33 ^b
C2	無し	184, 60 ^d	2.41 ^b
C2	ナイカルバジン	265, 87 ^b	2.46 ^b

¹体重増加の全グラム数、及び非感染非投与群の結果を基準とした百分率

a, b, c, d:列内で添字の異なる値は有意に異なる(P< 0.05)

新たに行われた2つの試験^{88,89}は、無作為完全乱塊法で実施された。各試験では、125 mg ナイカルバジン/kg飼料(分析により確認)の効果を、感染非投与対照群(IU)及びポリエーテル抗コクシジウム薬(必要な用量 60 mg/kg:分析値47~48 mg/kg)投与群とで比較した。各試験は、960羽の雄の肉用鶏3群(40羽/ケージ、8反復/群)を無作為法で行った。処理期間は試験1が30日、試験2が31日で、その後休薬期間を4日間とした。感染は、感染性の材料(孢子形成オーシスト;220 000 *E. acervulina*, 40 000 *E. maxima*, 220 000 *E. tenella*)の経口処理(飼料による)により、16/17日目(試験1/2)に行なわれた。

死亡率、体重及び摂餌量を調査し、飼料要求率を算出した。試験1及び2でそれぞれ22/23日及び30/31日目に腸の病変部をスコアし、糞便試料はオーシスト(nb/g糞と表現)の測定に用いた。

2つの試験結果を表15にまとめる。死亡率に関して有意差はみられなかったが、投与群(ナイカルバジン及びポリエーテル)ではIU群と比較して数的により低かった。体重はIU群、ポリエーテル投与群よりナイカルバジン投与群の方が高かった。22/23日目及び30/31日目における病変部スコアは、ナイカルバジン投与群で最低であった。22/23日目における十二指腸、空腸及び盲腸中の病変部スコアと30/31日目における空腸及び盲腸中の病変部スコアは、対照群(IU、ポリエーテル)と比較して、ナイカルバジン投与群の方が有意に低かった。

ナイカルバジン投与は、試験1においてIU群、試験2においてIU群及びポリエーテル投与群と比較してオーシスト排泄を有意に低下させた。30/31日目において、*E. maxima*のオーシスト排泄はナイカルバジン投与群でIU群及びポリエーテル投与群と比較して有意に減少した。

⁸⁸ 工業用調査資料/効果項/付録 12

⁸⁹ 工業用調査資料/効果項/付録 13

表 15 :感染した肉用鶏の死亡率、病変部スコア、オーシスト排泄、体重増加及び飼料効率比に対するナイカルバジンの効果

試験	処理群	死亡率 (%)	病変部スコア ²			オーシスト排泄 (nb/g 糞便)	最終体重 (g)	飼料効率比 (g/g)
			(Du)	(JI)	(Ca)			
1	IU	19.9	3.3 ^b	2.5 ^b	3.1 ^b	1504750 ^a	1656 ^c	1.527
	ナイカルバジン	1.1	1.6 ^a	1.3 ^a	2.2 ^a	550,500 ^b	1937 ^a	1.503
	ポリエーテル	13.4	3.2 ^b	2.3 ^b	3.5 ^b	774250 ^{ab}	1712 ^b	1.526
2	IU	19.4	3.5 ^b	2.9 ^b	3.6 ^b	2345250 ^a	1767 ^c	1.554
	ナイカルバジン	1.1	1.9 ^a	0.8 ^a	1.8 ^a	459,750 ^b	2078 ^a	1.530
	ポリエーテル	12.9	3.4 ^b	3.0 ^b	3.8 ^b	2026750 ^a	1843 ^b	1.541

¹死亡率は16/17～22/23日目(それぞれ試験1、2)、病変部スコアは22/23日目、合計オーシスト排泄は22/23日目に測定

² Du,十二指腸. JI,空腸及び回腸. Ca,盲腸.

a、b、c列内で異なる添字の付いた平均値は有意に異なる

4.1.4. シャトル計画による野外試験 (原文 p.33)

2008年に4つの野外試験が行われ、うち3つがフランス、1つがイギリスで行われた。これらの比較において、シャトル計画(28日齢まで)の初期段階の間、125 mg ナイカルバジン/kg飼料を与え、その後はイオノフォア抗コクシジウム薬を投与した。各試験における抗コクシジウム薬の投与量を解析して決定した;投与量は試験4におけるいくつかの値を除き、ほとんどのケースで確立された。エンドポイント(体重、病変部スコア及びオーシスト排泄)は異なる時点、主に試験期間中の個体減少時に測定し、試験終了までおよそその体重を測定した。したがって、平均を求めて統計解析を適用することはできない。各試験中の必要な抗コクシジウム薬濃度は解析して決定された。それらは試験4におけるいくつかの値を除き、ほとんどのケースで確立された。

最初の試験⁹⁰は、ナイカルバジン(125 mg/kg)投与後、ポリエーテル抗コクシジウム薬(70 mg/kg)を投与するというシャトル計画を、同じポリエーテル(70 mg/kg)投与を対照として、同じポリエーテル47.2 mg及び47.2 mg/ナイカルバジンkgの複合投与を取り込んだ同様のプログラムと比較した。雄雌合わせて約30,600羽の肉用鶏は、2棟の同様の鶏舎(各処理1棟)で飼育された。第1段階としてナイカルバジン及び複合投与が28日目まで、第2段階として33日目までポリエーテルが投与された。雌は37日目に、雄は49日目にと殺された。各プログラムからの病変部スコア(処理あたり20羽)及び敷き藁のオーシスト数は、23日目及び30日目について求めた。30日目に小腸の顕微鏡的オーシスト評価を実施した。全ブロイラー体重はと殺時に記録した。と殺時の平均体

⁹⁰ 工業用調査資料. 有効性節. 付録14

重は、2群(雌ナイカルバジン1.58 kg、及び雄ナイカルバジン2.94 kg;対照はそれぞれ1.66 kg及び3.01 kg)の間で差はなかった。また、飼料要求率(両群で1.9)及び死亡率(死亡及び処分;ナイカルバジン処理3.43%、対照2.88%)の差も非常に小さかった。

2番目の試験⁹¹は、ナイカルバジン(125 mg/kg)を28日間投与後に、9日間ポリエーテル抗コクシジウム薬(25 mg/kg)を投与するシャトル計画を、28日間別のポリエーテル抗コクシジウム薬(60 mg/kg)投与群の対照と比較した。雄雌合わせて約25,300羽の肉用鶏は4区画(1処理2反復)で飼育された。抗コクシジウム薬投与の休薬後、49日目のと殺までの間、抗コクシジウム薬非投与の対照飼料を与えた。21日目及び28日目に病変部スコアを求め、敷き藁のオーシスト数を測定した(1反復10羽)。35日目に仕切り(200羽/処理)当たり100羽の体重を計量した。と殺時にトラック重量の差により全個体の合計体積を求めて記録した。最終体重はナイカルバジン投与群で1.78 kg、対照で1.84 kg、飼料要求率は両群とも2.1であった。ナイカルバジン投与群における死亡率は3.7、対照は4.5であった。

オーシスト排泄はナイカルバジン投与群では対照と比較して減少した。しかし、これは、病変部スコアには反映されなかった。

3番目の試験⁹²は、と殺が42日目という以外は2番目の試験と同じ実験計画で、計24,240羽の肉用鶏に対して行われた。21日目及び25日目に病変部スコア及びオーシスト数が測定された。9、21、28及び35日目では、区分(200羽/処理)あたり100羽の体重を測定した。と殺時にトラック重量の差により全個体の合計体積を求めて記録した。最終体重はナイカルバジン投与群で2.11 kg、対照群で2.14 kg、ナイカルバジン投与群における死亡率は4.7、対照群は5.9であった。オーシスト排泄はナイカルバジン投与群では対照群と比較して減少したが、これは病変部スコアには反映されなかった。

4番目の試験⁹³は、最初の28日間のナイカルバジン(125 mg/kg)投与群と、最初の23日間の抗コクシジウム薬の複合投与群(ポリエーテル50 mg及び50 mgナイカルバジン/kg)と比較した。両群とも投与終了後、32日目まで別のポリエーテル抗コクシジウム薬(100 mg/kg)を投与した。その後と殺(屠殺時点の平均齢:雌及び孵化した雛約40日、雄44日)まで休薬飼料を与えた。雄雌合わせて約165,000羽の鶏がブロイラー飼育場6棟(各投与につき3棟)で飼育された。一棟あたり10羽について、腸の病変部スコアを21日目に、敷き藁のオーシスト数は22及び29日目に測定した。7、14、21、28、35及び42日目に、一棟あたり150羽(300羽/処理)について計量した。と殺時にトラック重量の差により全個体の合計体積を求めて記録した。体重(平均2.16 kg)、飼料要求率(平均1.9)、死亡率(6棟における範囲1.4~6.8%)及びオーシスト排泄に関し、同一投与群の棟間の差は投与群間の差より大きかった。腸の病変部は検出されなかった。

4.1.5. アイメリアのナイカルバジン耐性 (原文 p.34)

⁹¹ 工業用調査資料. 有効性節. 付録15

⁹² 工業用調査資料. 有効性節. 付録16

⁹³ 工業用調査資料. 有効性節. 付録17

抗コクシジウム薬に対するアイメリアの耐性発現は家禽における共通の問題であるが、実験室条件下でのナイカルバジンに対する耐性の誘導は難しく、ほとんど成功しなかった。いくつかの抗コクシジウム薬に交差耐性を示すアイメリアも、依然ナイカルバジンに感受性であった (Chapman, 1993)。

4.1.6. 製品品質 (原文 p.34)

製品の品質に関するナイカルバジンの影響のデータは提供されなかった。しかし、報告又はナイカルバジン長期使用において、製品品質に関する有害影響は認められなかった。

4.1.7. 有効性に関する結論 (原文 p.34)

いくつかのアイメリア株による肉用鶏のコクシジウム症を抑制するというナイカルバジンの主要作用は、数年の長期(1955～1992)にわたり示され、125 mg/kg飼料が最適処理量として確立された。異なる国々、異なるアイメリア野生株を用いて新たに行われた11回の一連の鶏舎試験はこの結論を確証する。

3つの床飼い試験において、3つの異なるアイメリア株の人工感染後にナイカルバジン125 mg/kg飼料が投与され、体重増加の改善、死亡率、病変部スコア及びオーシスト排泄の減少により、コクシジウム症制御に有効であることが示された。最初の4週間のナイカルバジン投与(125 mg/kg飼料)を伴うシャトル計画の下、計245,000羽の鶏を用いて行われた4つの野外試験は、ナイカルバジンが比較対象として用いられた他の抗コクシジウム薬と同程度に効果があるという結論を裏付ける。野外試験のデータは固有の変動があるため、より詳細な比較はできない。

FEEDAPパネルは、提案される最高用量(125 mg/kg完全飼料)のナイカルバジンが、肉用鶏におけるコクシジウム症制御に有効であるとみなしている。

5. 市販後調査(原文 p.35)

Koffogranの利用に起因する特別なリスクは同定できなかった。すでに設立された飼料衛生規則⁹⁴及び製造管理及び品質管理に関する基準以外に、市販後調査計画に対する特別な必要性はないと考えられる。

結論と提言 (原文 p.35)

結論 (原文 p.35)

最大用量レベル(125 mg/kg飼料)でのナイカルバジンは、通常の気候条件下、肉用鶏に対して安全であると考えられる(安全範囲約1.5)。ナイカルバジンは微生物学的リスクが懸念される範囲内では安全であると思われる。

⁹⁴ OJ L 35, 8.2.2005, p.1

摂取されたナイカルバジンは、HDP及びDNCの2つの成分に速やかに分離し、それぞれ単独でふるまう。ナイカルバジンからのDNCは、DNC単独で、あるいはナイカルバジンと同様の割合でHDPとともに投与される場合より、動物体内での活性がかなり高い。

DNCは残留マーカールのようにふるまう。ナイカルバジン投与の休薬後、DNC残留物は組織から速やかに減少する。肝臓が標的組織である。HDP関連残留物は、それらがDNC由来残留物したよりもはるかに少ない。

哺乳動物系 (*in vivo*での2種の体細胞組織における影響試験を含む、小核、不定期DNA合成及びマウスリンフォーマ試験)においてナイカルバジンの遺伝毒性がみられなかったため、ナイカルバジンに遺伝毒性を認めないとFEEDAPパネルは結論する。

最近の亜慢性ラットの試験において、試験されたすべての投与量(最低用量181 mg/kg体重/日)で有害影響がみられたため、ナイカルバジンのNOAELは求められなかった。しかしDNCのNOAELは、DNC単独投与した最近の亜慢性ラットの試験から、709 mg/kg体重/日と算出された。この明らかに矛盾する結果は、DNC単独ではなくナイカルバジンとして投与された場合、ラットがDNCに対しより高い全身性暴露を受けることに関連している可能性がある。イヌの2年間試験から得られた154 mg DNC(+ 51 mg HDP)/kg体重/日は、最も低いNOAELと考えられる。

ラットの多世代生殖試験は欠陥があったが、試験した最高用量群でも大きな懸念はみられなかった(300 mg DNC + 100 mg HDP/kg体重/日)。FEEDAPパネルはデータ報告の複数の欠陥にも関わらず、200 mg/kg体重/日での胎児毒性作用に基づいて、70 mgナイカルバジン/kg体重/日までラットの発生毒性に関する懸念はないと結論した。ウサギ試験での母動物毒性のNOAELは控えめに60 mgナイカルバジン/kg体重として確立できるが、それに対して発生毒性のNOAELは120 mgナイカルバジン/kg体重/日(投与された最高用量)であった。

ナイカルバジン関連混入物であるパラニトロアニリン(PNA)には発がん物質である疑いがある。ラットにおけるPNAの体内動態に関するデータ、及びFEEDAPパネルによって推奨されるナイカルバジンでの最大PNAレベルを検討した場合、提案された最大レベルでKoffogranを投与された肉用鶏組織の消費によるPNAへの消費者暴露は、無視してよいほどに低いと考えられる。消費者がDNCのみに暴露したとして、イヌの2年間試験(154 mg DNC/kg体重/日)のNOAELを基にDNCに対するADIを0.77 mg/kg体重と設定し、安全係数200を適用する。

DNCのMRLは、肝臓(15 mg/kg)、腎臓(6 mg/kg)、筋肉(4 mg/kg)及び皮膚/脂肪(4 mg/kg)と提案される。これらのMRLを適用して算出した結果、最悪のケースの経口暴露でもADIの24%にしか達しない。休薬期間は1日で十分であると見なされる。ナイカルバジンは皮膚刺激性又は感作性の可能性を示さないが、わずかな眼刺激性(一時的な影響)を示す。Koffogran処理によるナイカルバジンの吸入暴露は、無視できるほど小さいと考えられる。FEEDAPパネルは推奨用量でのナイカルバジン使用が土壌画分、地下水又は二次中毒の予測可能なリスクをもたらすとは考えていない。しかし藻類に対する毒性の生データがないため、表層水に対するリス

クは評価できない。FEEDAPパネルは、最高用量(125 mg/kg完全飼料)のナイカルバジン投与が肉用鶏のコクシジウム症制御に有効であるとみなす。

提言 (原文 p.36)

ナイカルバジン中のパラニトロアニリン含有量は、できるかぎり低く抑えるべきである。FEEDAPパネルは、ナイカルバジン中の上限含有量を、0.5 %から0.1 %まで低減することを提言する。

アイメリア種のナイカルバジンに対する耐性の野外調査は、好ましくは認可期間の後半には実施されるべきである。

消費者はDNCにのみ暴露され、ナイカルバジンには暴露されないため、ナイカルバジンに対し規則 (EC) No124/2009で設定された、非標的飼料の交差汚染による動物組織及び動物製品における不可避の残留の最大レベルは再考されるべきである。

EFSAに提出された文書(原文 p.36)

1. Koffogran調査資料に対する応答書類. 2008年12月. 加盟国報告者(ベルギー)により提出.
2. Eli Lilly社と株式会社(Elanco Animal Health)間の相互参照文書(ナイカルバジンによるラットでの90日試験). 2009年3月.
3. ナイカルバジンの製造方法に関する補足情報. 2009年5月. 加盟国報告者(ベルギー)により提出.
4. 作業者の安全性報告に関する補足情報. 2009年5月. 加盟国報告者(ベルギー)により提出.
5. Eli Lilly社と株式会社(Elanco Animal Health)間の相互参照文書(安全性及び工業用データ). 2009年6月.
6. Innolytics, LLCからのDNC水生毒性試験及び水溶解度データに関する督促文書. 2009年8月.
7. Phibro Animal Health. 補足情報. 2009年12月.
8. 2008年10月のKoffogran調査資料に対する応答書類に対するオランダの見解. 2009年3月. Medicines Evaluation Board Veterinary Medicinal Products Unit. オランダ.

付録 (原文 p.38)

付録A-1

- 大量の処理能力を備えた工場は、一日あたり40のプレミクスチャーバッチ(8時間/シフト)を作成できる
- 秤量/排泄にかかる最大時間は 20 秒である
- 同じ工場内で約 20 %のプレミクスチャー⁹⁵が Koffogran を含む可能性がある
- すべての粉塵は Maxiban から生じる
- 吸気可能な全空气体積は、Koffogran 粉塵で満たされる
- 最大粉塵濃度は 0.08 g/m³である
- 粉塵中のナイカルバジン濃度は 25 % (Koffogran として)である
- 作業員一人あたりの総吸気量は、8 時間あたり 10 m³=1 時間あたり 1.25m³である
- 個人用の保護具の使用(作業服、ゴーグル、手袋、及び吸入暴露を 10 %に減らす P2 型マスク)

シナリオ:

暴露ポテンシャルのバッチ	40(計)×0.2(プレミクスチャーに含まれるKoffogranの百分率)= 8バッチ
暴露時間	8(バッチ)×20秒=160秒~3分 安全上の理由からKoffogranとの接触を6分間と考慮
暴露時間中の吸気量	1時間あたり1.25 m ³ ×0.1時間(6分)=0.125 m ³
空気中のナイカルバジン	0.08g/m ³ (Koffogran粉塵)×25(粉塵中のナイカルバジンの百分率)= 0.02g/m ³
吸気中のナイカルバジン	0.02 g/ m ³ ×0.125 m ³ = 0.0025 g(2.5 mg)
フィルターマスクによる低下	2.5 mg×0.1(10 %まで低下)= 0.25 mg

⁹⁵ 2008 年の欧州連合(EU)における総飼料生産量を 150,570,000 t と推測、そのうち 32.5 %が養鶏飼料である。加盟国のデータから、動物の種類としては Maxiban 認可を申請されるブロイラー飼料が 50 %以下であることが導き出せる。16.25 %は四捨五入により 20 %とする。

付録A-2

DIN EN 481による、空気中を輸送される全エアロゾルに関して労働衛生に関わるエアロゾル画分をまとめた分離曲線の数値

空力的直径(mm)	呼吸域画分(%)	胸部画分(%)	肺胞画分(%)
0	100.0	100.0	100.0
1	97.1	97.1	97.1
2	94.3	94.3	91.4
3	91.7	91.7	73.9
4	89.3	89.0	50.0
5	87.0	85.4	30.0
6	84.9	80.5	16.8
7	82.9	74.2	9.0
8	80.9	66.6	4.8
9	79.1	58.3	2.5
10	77.4	50.0	1.3
11	75.8	42.1	0.7
12	74.3	34.9	0.4
13	72.9	28.6	0.2
14	71.6	23.2	0.2
15	70.3	18.7	0.1
16	69.1	15.0	0
18	67.0	9.5	
20	65.1	5.9	
25	61.2	1.8	
30	58.3	0.6	
35	56.1	0.2	
40	54.5	0.1	
50	52.5	0	
60	51.4		
80	50.4		
100	50.1		

1. 吸入画分:吸入確率の平均に相当する分離曲線
2. 胸部画分: 気管-気管支及び肺胞領域に入る粒子の吸入確率の平均に相当する分離曲線
3. 肺胞(呼吸域)画分: この画分は胸部画分の一部である。肺胞領域に入る粒子の吸入確率の平均に相当する分離曲線

4. 胸外面分: この画分は吸入画分と胸部画分の差異に起因する

5. 気管-気管支画分: この画分は胸部画分と肺胞画分の差異に起因する。分離曲線は数学的に定義されない

付録B

アメリカ野生分離株による11回の鶏舎試験

肉用鶏の実験計画、死亡率、病変部スコア、オーシスト排泄、体重増加及び飼料要求率

試験番号 アメリカsp. オーシスト用量 国名	処理群	死亡率 % 12~21日	病変部スコア 21日	1日あたりの オーシスト 排泄 鳥×10 ³	体重増加 g 12~21日	g feed/ g増加 12~21日
1 <i>E.tenella</i> 25,000 フランス	NU	3.6	0 c	0	624	1.36 a
	IU	19.6	3.8 a	52,562	443 c	1.71 c
	ナイカルバジン	10.7	0.8 b	23	528 b	1.56 b
	ポリエーテル	17.9	3.7 a	41,119	538 b	1.59 b
4 <i>E.tenella</i> 25,000 イギリス	NU	0 b	0 d	0	628	1.35 a
	IU	25.0 a	3.9 a	88,160	460 d	1.70 c
	ナイカルバジン	1.8 b	1.1 c	8	536 c	1.49 b
	ポリエーテル	10.7 a	3.2 b	83,720	569 b	1.46 b
7 <i>E.tenella</i> 25,000 ドイツ	NU	0 b	0 c	0	590	1.44 a
	IU	23.2 a	3.3 a	57,061	415 c	1.89 b
	ナイカルバジン	0 b	0.5 b	0	483 b	1.60 a
	ポリエーテル	32.1 a	3.3 a	53,920	478 b	1.63 a
2 <i>E.acervulina</i> 250,000 フランス	NU	0	0	0	627	1.32 b
	IU	7.1	3.4 d	154,126	479 c	1.52 a
	ナイカルバジン	0	1.4 b	158,960	527 b	1.58 a
	ポリエーテル	5.4	3.0 c	164,630	524 b	1.45 ab
5 <i>E.acervulina</i> 250,000 イギリス	NU	3.6 b	0 b	0	556	1.40 c
	IU	1.8 b	3.4 a	369,466	380 d	1.81 a
	ナイカルバジン	23.2 a	0.1 b	2,741	461 c	1.57 b
	ポリエーテル	0 b	3.3 a	236,872	488 b	1.45 c
8 <i>E.acervulina</i> 250,000 ドイツ	NU	0	0 b	0	549	1.51 d
	IU	0	3.2 a	233,652	391 d	1.93 a
	ナイカルバジン	0	0 b	9,276	477 b	1.66 c
	ポリエーテル	0	3.3 a	251,661	451 c	1.74 b
3 <i>E.maxima</i> 50,000 フランス	NU	0	0 c	0	601	1.36 d
	IU	1.8	3.3 a	18,559	333 d	2.02 a
	ナイカルバジン	0	1.6 b	156	502 b	1.51 c
	ポリエーテル	1.8	3.4 a	22,825	418 c	1.75 b
6 <i>E.maxima</i> 50,000 イギリス	NU	5.4 b	0 c	0	447	1.44 c
	IU	7.1 b	2.3 a	8,305	300 d	1.91 a
	ナイカルバジン	21.4 a	0.02 c	7	360 c	1.63 b
	ポリエーテル	1.8 b	1.6 b	9,156	392 b	1.58 b

9 <i>E.maxima</i> 50,000 オランダ	NU	0	0 d	0	469	1.46 c
	IU	0	3.3 a	11,947	340 c	1.80 a
	ナイカルバジン	0	1.4 c	389	381 b	1.66 b
	ポリエーテル	0	2.7 b	44,546	347 c	1.74 ab
10 <i>E.necatrix</i> 50,000 フランス	NU	0	0 b	0 b	554	1.35 a
	IU	16.0	3.41 a	449	336 c	1.73 c
	ナイカルバジン	0	0.13 b	0 b	476 b	1.47 b
	ポリエーテル	0	0.20 b	636	547	1.34 a
11 <i>E.brunetti</i> 80,000 フランス	NU	0	0 d	0	547	1.36 a
	IU	0	3.0 a	23,450	242 d	2.23 d
	ナイカルバジン	0	0.87 c	359	453 b	1.52 b
	ポリエーテル	0	2.56 b	25,369	377 c	1.69 c

ナイカルバジンの毒性試験と結果の概要（評価書：FEEDAP 2010）

試験の種類	供試動物等	投与量	結果
変異原性 (エームス試験)	サルモネラ菌	100～2000、200～2000、100～2000 µg/plate	変異原性なし
変異原性 (エームス試験)	サルモネラ菌	10000 µg/plate まで	菌株 TA98 および TA1538 で変異原性 菌株 TA100、TA1535 および TA1537、大腸菌 Wp2 hcr trp で変異原性なし
変異原性 (rec-assay)	枯草菌		陰性
変異原性 (エームス試験)	サルモネラ菌、大腸菌	3～1000 µg/plate	変異原性 (1000 µg/plate で試験材料の沈殿)
変異原性 (マウスリンフォーマ試験)	L5178Y 細胞株	100 µg/ml まで	変異原性、染色体異常なし
遺伝毒性 (小核試験)	マウス	2000 mg/kg 体重を毎日 2 回経口投与	遺伝毒性なし (小核含有多染性赤血球数の増加はみられず)
遺伝毒性 (不定期 DNA 合成試験)	ラット	1000、2000 mg/kg 体重を経口投与	遺伝毒性なし (不定期 DNA 合成は認められず)
13 週間亜慢性経口毒性	ラット	200、600/400、1000/600 mg/kg 体重/日	NOAELは導き出せず(181 mg/kg体重/日未満) 用量依存的な体重減少、飼料摂取量減少、赤血球数・ヘモグロビン・ヘマトクリットの減少、血液中のウレア窒素・血漿クレアチニンの増加、血漿リン酸増加、全血漿タンパク質減少、血漿トリグリセリド増加、血漿コレステロール増加 肉眼的変化を伴う臓器の重量増加 腎臓重量の増加 精巢の細精管変性/萎縮
91 日間亜慢性経口毒性	ラット	106、284、709 mg DNC /kg 体重、1 日に 1 度	NOAEL 709 mg DNC/kg/日 (AUC0-τ、最高血中濃度の増加)
2 年間経口毒性	ラット		NOAEL; DNC 300 mg/kg体重/日、HDP 100 mg/kg 体重/日

試験の種類	供試動物等	投与量	結果
2年間経口毒性	イヌ	600 mg DNC/kg 体重、200 mg HDP/kg 体重を1週間に6回	NOAEL; 154 mg DNC/kg 体重、51 mg HDP/kg 体重 (統計的に有意な血清 ALT の上昇)
発生毒性を含む生殖毒性	ラット	0、70、200 および 600 mg ナイカルバジン/kg 体重を経口投与	70 mg/kg 体重までは懸念はない 200、600 mg/kg 体重で尾椎骨化の低下 200 mg/kg 体重で腰肋過剰 中、高用量投与群で摂水量の増加、母動物の死亡率上昇、飼料摂取量、母動物と生存胎児の体重減少
発生毒性を含む生殖毒性	ウサギ	0、30、60、120 mg ナイカルバジン/kg 体重/日を経口投与	母動物毒性の NOAEL; 60 mg ナイカルバジン/kg 体重 発生毒性の NOAEL; 120 mg ナイカルバジン/kg 体重 (肝臓の分葉発生に基づく)

略称

略称	正式名称(英語)	日本語訳
EFSA	European Food Safety Authority	欧州食品安全機関
FEEDAP	EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed	動物用飼料添加物および製品または物質についての EFSA パネル
HDP	2-hydroxy-4,6-dimethylpyrimidine	2-ヒドロキシ-4,6-ジメチルピリミジン
DNC	4,4'-dinitrocarbanilide	4,4'-ジニトロカルバニリド
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level	無毒性量
ALT	alanine transaminase	アラニントランスアミナーゼ
MRL	Maximum Residue Limit	残留基準値
ADI	acceptable daily intake	一日摂取許容量
PNA	p-nitroaniline	パラニトロアニリン
EC	European Community	欧州共同体
n/a	not applicable	該当なし
CAS	Chemical Abstracts Service	化学情報検索サービス機関
WHO	World Health Organization	世界保健機関
PCDD	polychlorinated dibenzo-p-dioxin	ポリ塩化ジベンゾダイオキシン
TEQ	toxicity equivalence quantity	毒性当量
MW	molecular weight	分子量
VICH	International Cooperation on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products	動物用医薬品の承認審査資料の調和に関する国際協力会議
ERA	environmental risk assessment	環境リスク評価
RH	relative humidity	相対湿度
CV	coefficient of variation	変動係数
LOD	limit of detection	検出限界
UV	ultraviolet	紫外線
LOQ	limit of quantitation	定量限界
HPLC	high-performance liquid chromatography	高速液体クロマトグラフィー
LC	liquid chromatography	液体クロマトグラフィー
MS	mass spectrometry	質量分析
UDS	unscheduled DNA synthesis	不定期 DNA 合成
MIC	minimal inhibitory concentration	最小発育阻止濃度
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品安全性試験実施基準
DMSO	dimethylsulfoxide	ジメチルスルホキシド

OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development	経済協力開発機構
TK	toxicokinetic	トキシコキネティクス
AUC	area under the blood concentration-time curve	血中濃度-時間曲線下面積
NTP	National Toxicology Program	国家毒性プログラム
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives	FAO/WHO 合同食品添加物 専門家会議
PEC	predicted environmental concentration	予測環境濃度
pH	potential Hydrogen	水素イオン指数
DT ₅₀	50% decay time	50%分解時間
DT ₉₀	90% decay time	90%分解時間
LC ₅₀	Lethal Concentration 50	半数致死濃度
NOEC	No Observed Effect Concentration	最大無影響濃度
US EPA	United States Environmental Protection Agency	米国環境保護庁
ASTM	American Society for Testing and Materials	米国材料試験協会
PNEC	predicted no-effect concentration	予測無影響濃度
BCF	bioconcentration factor	生物濃縮係数
QSAR	quantitative structure-activity relationship	定量的構造活性相関
UU	uninfected untreated control group	非感染非投与対照群
IU	infected untreated control group	感染非投与対照群