

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

カルバドックス

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、カルバドックスについて、国際的な評価機関である FAO/WHO 合同添加物専門家会議(以下「JECFA」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ノロジーサーチ

目 次

カルバドックス

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(1990 年).....	9
3.2 JECFA(1990 年).....	25
3.3 JECFA(2003 年).....	59
3.4 JECFA(2003 年).....	91

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 カルバドックス

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、これらのうちカルバドックス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	ジェ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	ピオレスメリン	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

カルバドックスに関して、これまでに食品安全委員会にて収集を行っている JECFA 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	1990	FNP 41/3-JECFA 36/19, 1990
JECFA	1990	FAS 27-JECFA 36/141, 1990
JECFA	2003	FNP 41/15-JECFA 60/1, 2003
JECFA	2003	FAS 51-JECFA 60/49, 2003

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。

カルバドックス 評価書和訳と情報整理

JECFA 1990

ウェブサイト: <ftp://ftp.fao.org/ag/agn/jecfa/vetdrug/41-3-carbadox.pdf>

FNP 41/3-JECFA 36/19, 1990

カルバドックス 評価書和訳と情報整理 JMPR (1990) 目次

評価対象動物薬の概要	13
食品中残留物とその評価 (p. 19)	13
使用条件 (p. 19)	13
代謝試験 (p. 20)	13
放射能標識残留物の消失試験 (p. 24)	17
残留消失試験 (p. 26)	19
残留物分析法 (p. 29)	22
休薬 28 日の残留物の同定 (p. 29)	22
分析法 (p. 29)	23
評価 (p. 30)	23
カルバドックスの毒性試験と結果の概要 (評価書:JECFA 1990)	24
略称	24

原文 目次

原文ページ

評価対象動物薬の概要 -----	16
食品中残留物とその評価 (P. 19) -----	19
使用条件 (P. 19) -----	19
代謝試験 (P. 20) -----	20
放射能標識残留物の消失試験 (P. 24) -----	24
残留消失試験 (P. 26) -----	26
残留物分析法 (P. 29) -----	29
休薬 28 日の残留物の同定 (p. 29) -----	29
分析法 (p. 29) -----	29
評価 (P. 30) -----	30

IDENTITY-----	19
RESIDUES IN FOOD AND THEIR EVALUATION-----	19
CONDITIONS OF USE -----	19
METABOLISM STUDIES-----	20
RADIOLABELED RESIDUE DEPLETION STUDIES -----	24
RESIDUE DEPLETION STUDIES -----	26
METHODS OF RESIDUE ANALYSIS -----	29
Hypothetical -CH=N-N- Tissue Bond -----	29
APPRAISAL -----	30
REFERENCES-----	30

カルバドックス

評価対象動物薬の概要

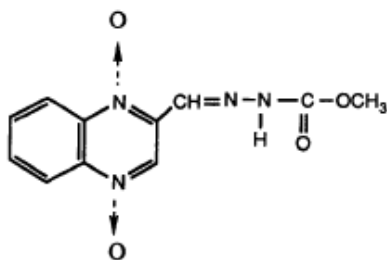
化学名: メチル-3-(2-キノキサリニル-メチレン)カルバゼート-N1,N4-ジオキシド

Methyl-3-(2-quinoxalinyln-methylene)carbazate-N1,N4-dioxide

同義語: メカドックス (Mecadox); フォルティグロ (Fortigro); GS-6244;

ニュートリトン (Nutriton); ゲトロキセル (Getroxel)

構造式:



分子式: $C_{11}H_{10}N_4O_4$

分子量: 262.2

食品中残留物とその評価 (p. 19)

使用条件 (p. 19)

カルバドックスは抗菌薬であり、現在は豚の飼育において用いられるが、その使用目的は、成長促進、飼料効率の改善及び体重増加率の向上、また豚の赤痢及び細菌性腸炎の制御である。カルバドックスの製品は市販されているが、それは初期飼料及び育成飼料、あるいはそのどちらかに用いるものであり、仕上げ飼料に用いるものではない。カルバドックスは世界中のほとんどの地域で飼料中に 50 ppm 添加して 4 ヶ月齢までの豚に与えることができるが、人の食用に供するためには、と殺前の 4 週間は休薬しなければならない。米国においては、米国での使用法を遵守し、豚には 55 ppm で体重が 35 kg になるまでは使うことが承認されており、70 日間の休薬期間を設けなければならない。

代謝試験 (p. 20)

豚、サル及びラットにおける代謝に関する比較試験 (p. 20)

豚(1 頭)にはカルバドックスの非標識体を混餌(50 g/t)で 3 週間与えた後、胃管を用いて ^{14}C -標識体を 3.5 mg/kg の用量で投与した。ラット(6 匹)には胃管を用いて 5 mg/kg で投与し、またサル(1 頭)にはカプセル剤で 5 mg/kg で投与した。投与に用いたカルバドックスの比活性は 1.97 $\mu Ci/mg$ であった。尿と排泄物を採取し、総放射能を測定した。カルバドックスの尿中代謝物は TLC とラジオグラフィーで定性的に比較検討した。これらの 3 つの動物種における放射能の排泄パターンは表 I に示した。

表 I. ^{14}C -標識カルバドックス投与後の豚、サル及びラットにおける放射能の排泄パターン(投与量に対する%)

動物	用量	尿	排泄物
		0～72 時間	0～72 時間
豚	3.5 mg/kg	74.1	16.5
サル	5 mg/kg	61.3	7.5
ラット(6)	5 mg/kg	54.0	N.A.

豚の尿中には 15 個の代謝物が検出されたが、そのうちの 13 個はラット又はサルの尿中にも検出された。サルやラットにおいて検出されなかった代謝物の 1 つはキノキサリン・2-カルボン酸のグリシン抱合体であり、もう 1 つは尿中の総放射能のわずかに数パーセントを占めるにすぎなかった(von Wittenau, 1978)。

豚 (p. 20)

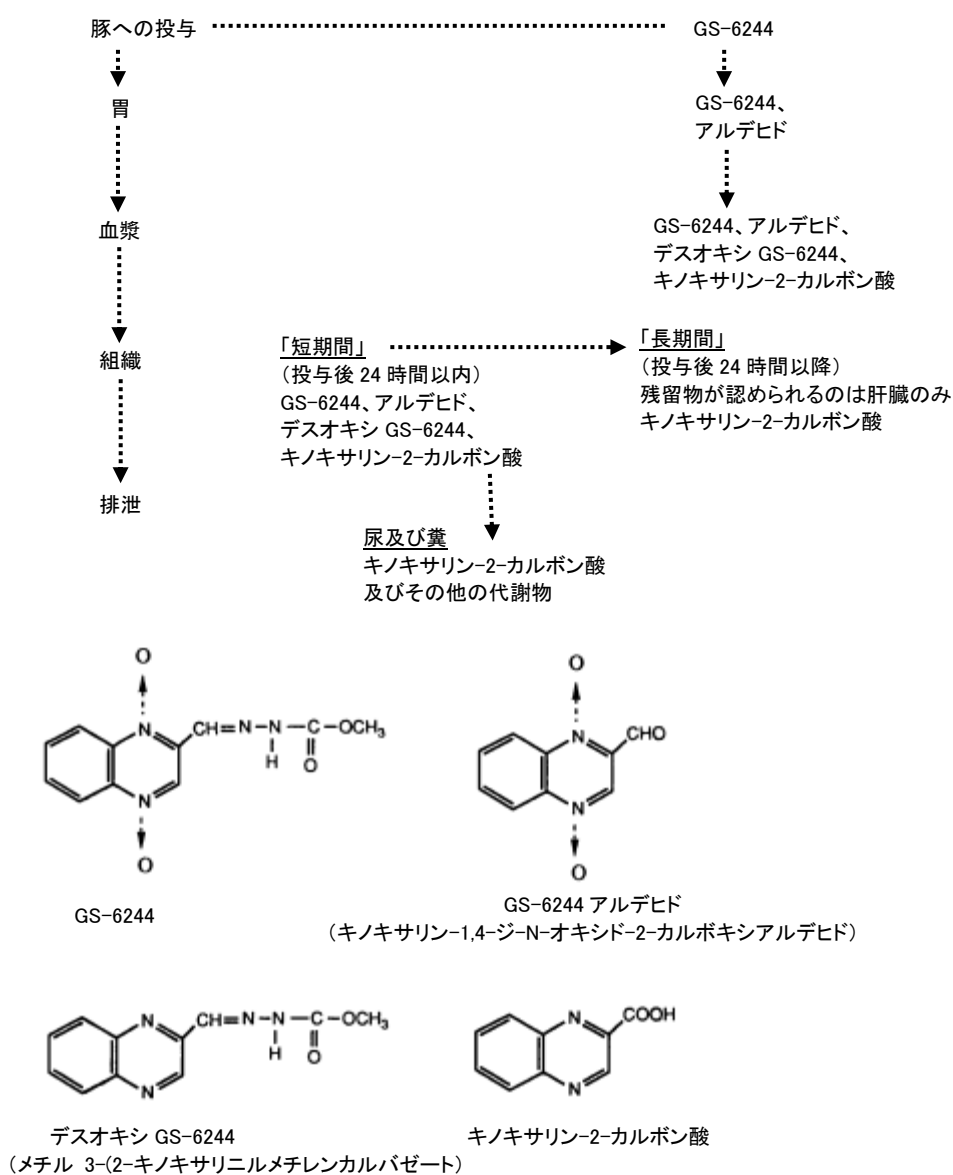
豚におけるカルバドックスの代謝試験に用いられた ^{14}C -カルバドックスは、カルバドックスの環又はカルボニル基を標識したものである。カルバドックスの環を均一に標識したものをを用いた試験では、豚(約 7 週齢)には放射能標識体の単回投与前に非標識体を混餌(50 g/t)で 7 週間与えた。

血漿中の放射能濃度は投与後約 3 時間でピークとなり、経口投与後の吸収は良好であることを示していた。用量の約 2/3 は尿中に排泄され、残りは糞中に排泄された。排泄は速やかであり、尿中の放射能の 95%超が投与後 24 時間以内に排泄された。

カルバドックス投与後 5 時間では、極めて少量のカルバドックス(GS-6244)及び対応するアルデヒドが胃内に検出された。血漿中には、これらの 2 つの化合物の他にもデスオキシ-カルバドックス及びキノキサリン・2-カルボン酸(QCA)が投与後数時間以内に検出されるが、これらの 4 化合物はいずれもが投与後 24 時間以内に消失した。尿中の主代謝物はキノキサリン・2-カルボン酸であり、この化合物は抱合体としても排泄されることが明らかにされた。N-オキシドは尿中には検出されなかった。糞中にはキノキサリン・2-カルボン酸はある程度検出されたが、カルバドックスの未変化体は検出されなかった。カルバドックス環標識体の代謝は、図 1 に要約した。(Pfizer, 1989a)。

図 1

豚におけるカルバドックス環標識体 (GS-6244) の代謝の要約



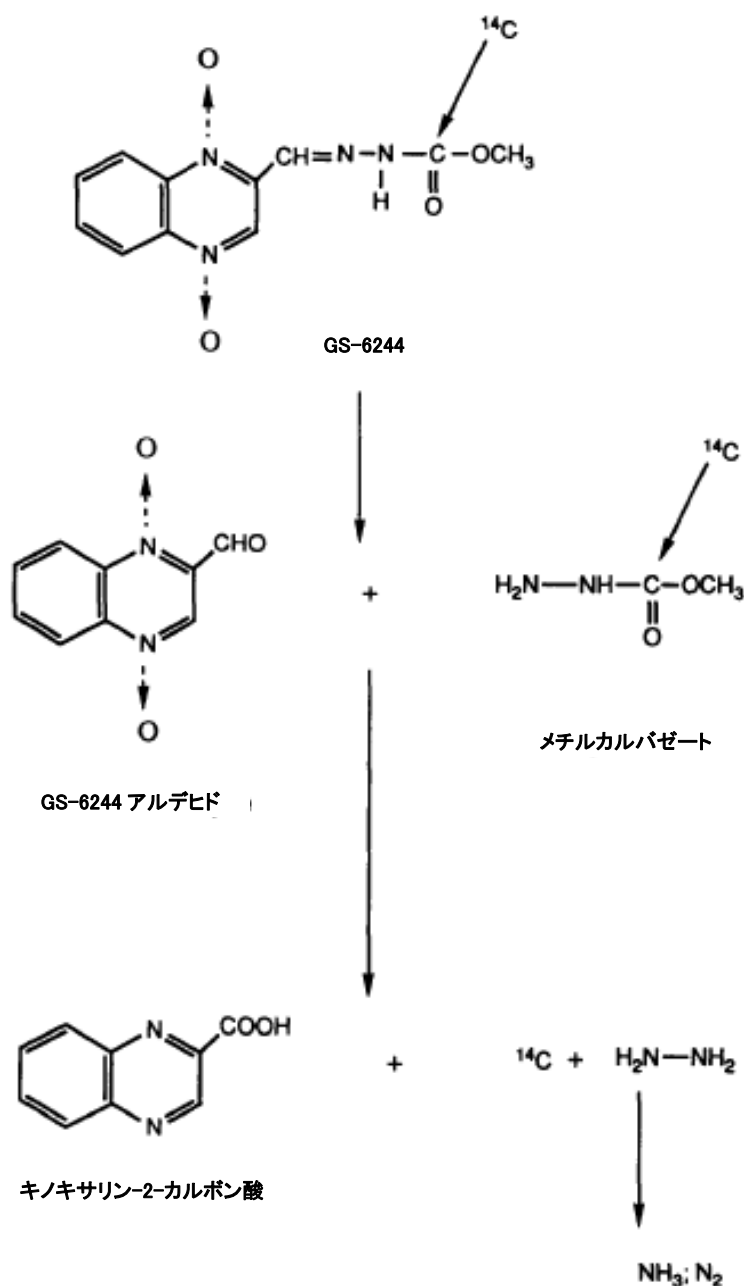
カルボニル基を標識したカルバドックスを用いた試験では、メチルカルバゼートの生成が示された。投与量の 25% 近くがメチルカルバゼート誘導体として尿中に排泄されたものと考えられた。生成したメチルカルバゼートのほとんどは酵素的加水分解により CO_2 となり、呼気中に排泄される。放射能の肝臓からの半減期は 2 日で、投与後 5 日にはメチルカルバゼート当量で 0.12 ppm にまで減少したが、この放射能は $^{14}\text{CO}_2$ が一部のアミノ酸に取り込まれて存在していることが示された。

メチルカルバゼートの酵素的加水分解はヒドラジンの生成を示唆するものであるが、その証明とはならない。メチルカルバゼートやキノキサリン誘導体に由来する組織中残留物については、適切に標識した薬物を用いれば最

高濃度を測定することができ、それらの残留物が組織から完全に消失したかどうかを証明することができるが、ヒドラジン関連残留物については、それらの追跡が可能となる適切な放射能標識体がない。しかしながら、化学的な分析結果と状況証拠からは、組織中残留物においてヒドラジンが生成されていないことが強く示唆される。すなわち、0.1 ppm まで検出できる鋭敏な分析法によっても、血漿中に遊離のヒドラジンは検出されなかった。ヒドラジンについてはいくつかの酵素による分解経路が知られているので、血漿中に遊離のヒドラジンが検出されなかったことは予想できないことではない。カルボニル基標識したカルバドックス代謝を図 2 に示した。(Pfizer, 1969b)。

図 2

豚における ^{14}C -カルボニル基標識カルバドックス代謝の要約



放射能標識残留物の消失試験 (p. 24)

^{14}C -カルバドックス (3.5 mg/kg) の単回経口投与後の豚組織中残留放射能を表 II に示した。(Pfizer, 1989a)。

表 II. カルバドックスの 3 週間混餌 (50 g/t) 投与後に ^{14}C -標識体 (3.5 mg/kg) を単回投与した場合の組織中放射能 (ppm ^{14}C -カルバドックス当量)。(Pfizer, 1989a)

投与後日数	動物番号	肝臓	腎臓	筋肉	脂肪
1	1	1.09	0.39	0 (a)	0
3	21	0.54	—	(b)	—
5	10, 13	0.36, 0.44	0	0	0
	14, 15	0.49, 0.48	0	0	0
6	11	0.34	—	—	—
7	2, 3	0.29, 0.26	—	—	—
	12	0.21	—	—	—
14	4	0.096	0	0	0
21	5	<0.03	0	0	0

(a) 0=0.1 ppm

(b) 分析対象としなかった組織

豚 (p. 24)

豚 (雌雄各 5 頭、計 10 頭) を用いた放射能標識カルバドックスの投与試験が実施された。用いた豚は異種交配種で体重は約 30 kg であった。10 頭の豚は 5 頭ずつ 2 つの檻に収容し、 ^{14}C 標識カルバドックスを 55 ppm 含む飼料を連続 5 日間自由に摂取させた。その後は通常の飼料に戻した。混餌投与終了後 30 日に 3 例、45 日に 3 例、70 日に 4 例の動物をそれぞれと殺した。薬物を混合していない飼料を与えた豚 (2 頭) をと殺し、対照群の組織試料を得た。食用に供される 4 つの主要組織については、と殺時に試料を採取し、凍結保存した。組織試料については、総放射能を測定し、存在する残留物量からキノキサリン-2-カルボン酸を測定した。

試験に用いた ^{14}C -カルバドックスは、ヘテロ環の一部を成すフェニル環を一様に標識したもので、その最終製品としての表示によると、比活性は 8.4 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ 、TLC 及び HPLC による放射能及び化学的純度はともに 99% 以上であった。報告書によると、トレーサの比活性は十分であり、1 ppb 以上の残留物の検出が可能であった。

組織試料は燃焼して、総放射能を測定した。測定結果は表 III に示した。(Pfizer, 1989c)。

表 III. ^{14}C -カルバドックスの 5 日間混餌 (55 ppm) 投与後の豚における組織中総放射能 (ppb ^{14}C -カルバドックス当量)。(Pfizer, 1989c)

クス当量)

<u>投与後日数</u>	<u>動物番号</u>	<u>肝臓</u>	<u>腎臓</u>	<u>筋肉</u>	<u>脂肪</u>
30	1382	117	12	5	3
	1385	55	10	3	1
	1386	76	18	6	3
	1389	<u>50</u>	21	6	2
		平均 = 74			
45	1392	21	6	3	1
	1396	17	5	4	1
	1397	<u>21</u>	4	2	<1
		平均 = 20			
70	1381	13	4	3	1
	1387	13	3	2	<1
	1393	<u>14</u>	4	2	<1
		平均 = 13			

摂餌量を減少した以外は上述した試験と同じ試験が実施された。この試験では、組織中の放射能については抽出可能なものと組織に結合したもののそれぞれを測定した。すなわち、肝臓、腎臓及び筋肉の組織試料の一部(10 g)をとり、メタノール、アセトン及びn-ヘキサン(各 100 mL)で順次抽出した。それぞれの抽出では、試料を遠心管に入れ、これに溶媒を加えて 5 分間振盪し、遠心分離した。抽出後の組織試料は減圧下で一晩乾燥し、総放射能を測定した。溶媒抽出後に組織に残存した放射能は、測定対象とした 3 つの組織ではいずれも平均で 5~8%であった。個々の値は、下表 IV に示した。(Pfizer, 1989d)。

表 IV. メタノール、アセトン及び n-ヘキサンで順次抽出した後に組織中に残存した放射能(%)。

<u>投与後日数</u>	<u>動物番号</u>	<u>肝臓</u>	<u>腎臓</u>	<u>筋肉</u>	<u>脂肪</u>
30	257	93.0	94.4	98.8	NA
	259	93.3	92.0	92.6	NA
	265	95.0	92.5	94.7	NA
45	260	96.1	100.0	95.7	NA
	264	92.5	92.4	94.7	NA
	271	94.0	91.5	90.0	NA

肝臓組織は、アルカリで分解後、TLC、GLC 及び同位元素による逆希釈を行い、QCA(キノキサリン-2-カルボン酸メチルとして測定)を定量した。その結果、組織中の QCA は平均で投与後 30 日では 18.9 ppb、45 日では 5.5 ppb、70 日では 1.3 ppb であった。個々の肝臓試料の分析結果は、下表 V に示した。

表 V. 豚の組織中のキノキサリン-2-カルボン酸メチル(ppb ^{14}C -カルバドックス当量)。

<u>投与後日数</u>	<u>動物番号</u>	<u>肝臓</u>	<u>腎臓</u>	<u>筋肉</u>	<u>脂肪</u>
30	1382	33.8	NA	NA	NA
	1385	11.6	NA	NA	NA
	1386	18.2	NA	NA	NA
	1389	<u>11.9</u>	NA	NA	NA
		平均値 = 18.9			
45	1392	5.5	NA	NA	NA
	1396	4.4	NA	NA	NA
	1397	<u>6.5</u>	NA	NA	NA
		平均値 = 5.5			
70	1381	0.8	NA	NA	NA
	1387	1.7	NA	NA	NA
	1393	<u>1.5</u>	NA	NA	NA
		平均値 = 1.3			

NA = 測定せず

総残留物中に占める QCA の平均的なパーセンテージを下に示した。(Pfizer, 1989c)。

<u>投与後日数</u>	<u>総残留物</u>	<u>QCA</u>	<u>QCA の割合(%)</u>
30	75 ppb	18.9 ppb	24.4
45	20 ppb	5.5 ppb	27.5
70	13 ppb	1.3 ppb	9.9

残留消失試験 (p. 26)

若い豚を用いたカルバドックスの 1 週間混餌投与試験が実施された。この試験では、液体クロマトグラフィーを用いて動物組織からのカルバドックス(及びその最も主要な代謝物であるデスオキシカルバドックス)の消失を観察した。カルバドックスは、混餌投与終了後 24 時間に、血中(20 ppb)、血清中(26 ppb)及び筋肉組織中に検出

されたが、48 時間では残留物は痕跡程度 (<2 ppb) まで減少し、72 時間では消失した。デスオキシカルバドックスは、血中には検出されなかったが、休薬後 24 時間で筋肉中 (17 ppb) に検出され、48 時間では 9 ppb に、また 72 時間では痕跡程度まで減少した。肝臓では、カルバドックスは休薬後 24 時間に検出されなかったが、48 時間では 17 ppb に、また 72 時間では痕跡程度まで減少した。

腎臓では、カルバドックスは休薬後 24 時間に痕跡量が検出されただけだが、デスオキシカルバドックスは休薬後 24 時間では 186 ppb、48 時間では 34 ppb が検出され、72 時間に痕跡量となった。この混餌投与試験においては、豚組織からの抽出物中にはデスオキシカルバドックスの他にはカルバドックスの代謝物は検出されず、確立された分析法を用いても血液からの抽出物中にはいずれの代謝物も検出されなかった。(Macintosh et. al., 1985)

豚を用いたカルバドックスの混餌 (55 ppm) による 4 日間又は 21 日間投与試験が実施された。この試験では、未変化体は休薬 24 時間で組織中に検出されず (<5 ppb)、また血漿中にも検出されなかった (<10 ppb)。デスオキシカルバドックスの濃度は、筋肉では休薬 24 時間に、腎臓では 48 時間に、肝臓では 72 時間に 5 ppb 未満にまで減少した。血漿中にはデスオキシカルバドックスは、休薬 6 時間でも、また 24 時間でも検出されなかった (<10 ppb)。QCA は肝臓中に長く残存するが、筋肉、腎臓及び血漿からは 24 時間以内に速やかに消失する。一日摂取量の約 0.03% がデスオキシカルバドックスとして尿及び糞中に排泄された。(Pfizer, 1969e)。

肝臓と筋肉中の QCA 残留物は、電子捕獲型検出器付ガス・クロマトグラフィー (GC) を用いて定量した。この実験結果は表 VI に要約した。(Lauridsen et a, 1988)。

表 VI. 体重が 6～7 kg から 20～27 kg になるまでの期間 (30～45 日間) にカルバドックス混合飼料 (20 mg/kg) を与えた豚の肝臓と筋肉中のキノキサリン・2-カルボン酸残留物

組織	豚体重 (kg)	mg/kg (豚体重)			
		農場 1	農場 2	農場 3	農場 4
肝臓	20～27	0.15 (0)	006 (0)	0.14 (0)	0.18 (0)
肝臓	34～37	ND (49)	ND (32)	0.03 (18)	0.01 (30)
肝臓	44～48	ND (49)	ND (32)	ND (36)	ND (57)
筋肉	20～27	ND (0)	ND (0)	ND (0)	ND (0)

ND＝検出されず (0.01 mg/kg 未満)。括弧の数値は休薬後の日数。

豚 (18 頭、平均体重＝25 ポンド) を用いたカルバドックス (50 g/t) の混餌投与試験が実施された。混餌投与は 47 日間 (動物の体重が 103 ポンドになるまでの期間) 実施した。動物は、この時点 (休薬開始日、0 日)、7 日、14 日、21 日、28 日及び 35 日にそれぞれ 3 例ずつと殺した。用いた分析法の定量限界は 30 ppb であった。結果は表 VII に要約した。(Pfizer, 1989f)

表 VII. 47 日間カルバドックス混餌投与後の豚における組織中 QCA 濃度 (ppb)

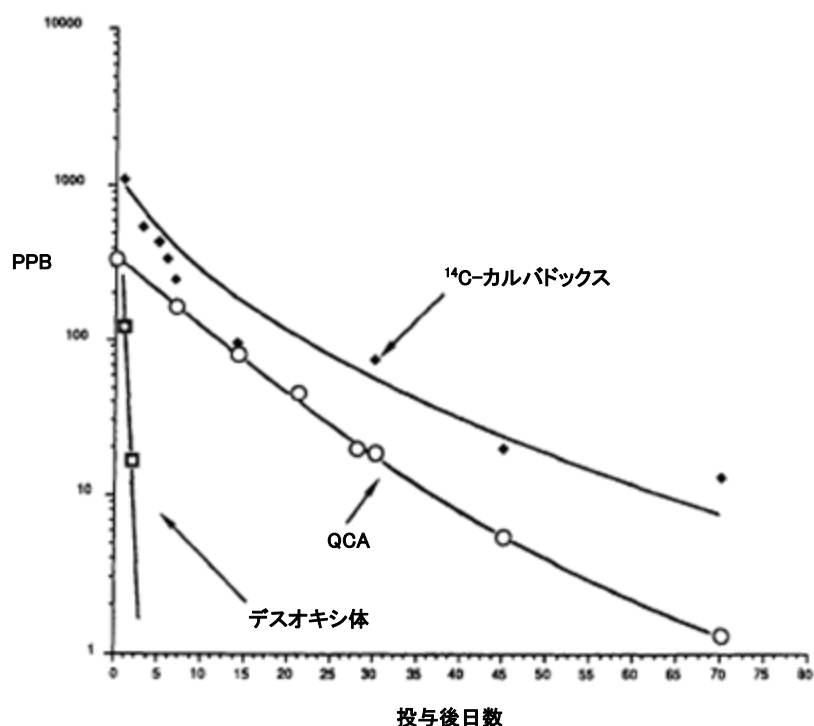
<u>投与後日数</u>	<u>動物番号</u>	<u>肝臓</u>	<u>腎臓</u>	<u>筋肉</u>
0	76	400	299	<30
	94	293	191	<30
	109	342	142	<30
7	1	167	<30	<30
	13	186	<30	<30
	48	153	<30	<30
14	38	76	<30	
	66	70	<30	
	100	102	<30	
21	31	48		
	69	40		
	74	49		

(投与後 28 日及び 35 日ともに、測定に供された計 6 例の肝臓中 QCA 濃度は 30 ppb 未満であった)。

休薬 0 日から 70 日までのカルバドックス総残留物及び QCA の消失を図 3 に要約した。

図 3

豚肝臓のカルバドックスの残留物



残留物分析法 (p. 29)

休薬 28 日の残留物の同定 (p. 29)

豚肝臓中に残存する放射能を化学的な手法で同定することを目的として、多くの実験が実施された。これらの実験では、種々の方法で肝臓を分解し、その組織から放射能を分離しようとしたが、それは成功しなかった。長期にわたって残存する化学物質を同定する試みが不成功に終わったことは、後になって肝臓中の放射能の大部分を占める成分として同定されたキノキサリン-2-カルボン酸の示す溶媒系への分布や安定性などの挙動を当初は予想できなかったためとするとよく説明できる。

肝臓の酵素的分解 放射性の残留物を含む豚肝臓を種々の酵素標品で処理し、組織を分解して遊離した放射能を含む部分の抽出を試みた。しかしながら、酸性、中性及び塩基性 pH 条件下でのクロロホルムで抽出した場合には、放射能はほとんど回収されなかった。最も良い結果はペプシンによる分解物を酸性の側で抽出した場合に得られ、放射能の回収率は約 19%であった。ペプシンによる分解物についてイオン交換樹脂とセファデックスカラムクロマトグラフィーを行っても特定の放射能標識体を分離することはできなかった。クロマトグラム上で放射性は特定のピークを示さず、全般的に広がっていた。

組織に-CH=N-N-を介して結合しているという仮説 組織中の放射能の化学的性質を明らかにする試みが行われている間に、標識体はカルバゼート側鎖を介して組織に結合している可能性が指摘された。もしその通りであるならば、セミカルバゾンの開裂反応を行えば、抽出可能なキノキサリンアルデヒドを再生することができるはず

である。過酸による酸化反応では、キノキサリン類はキノキサリンジ-N-オキシドに酸化される。しかしながら、標識体の回収率は全般的に低く、 -CH=N-N- 結合は組織中に存在しなかったことが示唆された。

組織の抽出法 長期にわたって肝臓に残存する残留物の分離分析では、以下のことが明らかにされた。すなわち、極性溶媒による抽出では、肝臓中の 14C 残留物を得ることはできないこと、また透析や組織の分画化では、標識体のほとんどが組織中の蛋白質成分に結合していることが明らかになった。残留物の性質についてさらに検討が加えられたが、可溶性の残留物は組織中に一様に分布し、いかなる代謝物も存在しなかった。

分析法 (p. 29)

豚肝臓中のカルバドックスに関連した残留物は、QCA に変換して測定する。この残留物の変換は組織をアルカリ加水分解して行い、得られた加水分解物を抽出してクロマトグラフィーを行って分析対象物を単離する。電子捕獲型検出器付ガス・クロマトグラフィー (GLC/EC) を用いた場合の定量限界は 30 ppb である。この方法は異なる研究所間で検証され、米国食品医薬品庁の公式分析法となっている。(Lynch, 1976)。

豚肝臓中の QCA を 30 ppb のレベルで同定するための確認方法が開発された。QCA は、肝臓の加水分解物から溶媒で抽出し、イオン排除クロマトグラフィーにより単離し、メチルエステル誘導体にしてガスクロマトグラフィー/マススペクトロメトリーで選択イオンをモニタリングすることによって同定する。(Lynch et. al., 1982)

最近の文献では、電子捕獲型検出器付クロマトグラフィーを用いると定量限界は 10 ppb まで低くできるとしており、上述したガス・クロマトグラフィーマススペクトロメトリーによる単離と精製と同等である。(Lauridsen et. Al., 1988)。

QCA のエステルの安定同位元素誘導体を用いてイオン捕獲検出する方法による GLC/MS を用いることにより、定量限界は、3 ppb まで低くなった。(Lynch et. al., 1989)。

評価 (p. 30)

カルバドックスを混合した飼料を与えた豚の可食組織中に検出される残留物のうち 2 つの化合物、すなわちカルバドックスとデスオキシカルバドックスには発がん性が疑われているが、カルバドックスの使用条件と残留物の消失パターンから、これら 2 つの代謝物によるヒトにおける食品安全性の問題は少ないものと考えられる。優良動物飼育基準では、豚飼料にカルバドックスを用いることができるが、休薬期間を長くすること(28 日間)を求めている。休薬開始後最初の 72 時間で、カルバドックスとデスオキシカルバドックスは血漿、尿及び組織にわずかに(<5 ppb) 検出されるが、休薬開始後 28 日では、可食組織中のそれらの濃度は無視できるレベルである。

カルバドックスの残留物は、最低 28 日間、非発がん性の化合物である QCA を分析することによって監視できる。28 日間の休薬期間後の肝臓中の残留物は組織に結合しているか、抽出不能であり、アルカリ加水分解した場合にのみ QCA が遊離する。休薬期間を 28 日間よりも長くした場合にも、QCA を測定する分析法はいくつかあるが、その方法はきわめて煩雑であること、また休薬開始後 30 日から 70 日の間の総残留物の消失はゆるやかであることを考慮に入れると、休薬期間を 28 日より長くすることは妥当ではない。

カルバドックスの毒性試験と結果の概要（評価書：JECFA 1990）

該当する試験なし

略称

略称	正式名称(英語)	日本語訳
GLC/MS	gas liquid chromatography/mass spectrometry	ガスクロマトグラフィー／マススペクトロメトリー
HPLC	high performance liquid chromatography	高速液体クロマトグラフィー
ppb	parts per billion	10 億分の 1
QCA	quinoxaline-2-carboxylic acid	キノキサリン-2-カルボン酸
TLC	thin-layer chromatography	薄層クロマトグラフィー
U. S.	United States	米国

カルバドックス 評価書和訳と情報整理

JECFA: 1990

ウェブサイト: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v27je07.htm>

FAS 27-JECFA 36/141, 1990

カルバドックス 評価書和訳と情報整理 JECFA(1990) 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.1)	32
2.1.2 生体内変化 (原文 p.2)	32
2.1.3 酵素及びその他生化学的パラメーター上の効果 (原文 p.3)	33
2.2. 毒性試験 (原文 p.5)	34
2.2.1 急性毒性試験 (原文 p.5)	35
2.2.2 短期試験 (原文 p.5)	35
2.2.2.1 ラット (原文 p.5)	35
2.2.2.2 イヌ (原文 p.6)	35
2.2.3 長期/発がん性試験 (原文 p.6)	36
2.2.3.1 ラット (原文 p.6)	36
2.2.3.2 サル (原文 p.9)	38
2.2.4 繁殖試験 (原文 p.9)	38
2.2.4.1 ラット (原文 p.9)	38
2.2.5 遺伝毒性に関する特別な試験 (原文 p.10)	39
2.2.6 リレー毒性に関する特別試験 (原文 p.10)	39
2.2.6.1 ラット (原文 p.10)	39
2.2.6.2 イヌ (原文 p.11)	39
3.1 - 61.7 (nM)	40
キノキサリン-2-カルボン酸	41
2.2 毒性試験 (原文 p.12)	41
2.2.1 急性毒性試験 (原文 p.12)	41
2.2.3 長期/発がん性試験 (原文 p.13)	41
2.2.3.1 マウス (原文 p.13)	41
2.2.3.2 ラット (原文 p.13)	41
2.2.4 繁殖試験 (原文 p.15)	43
2.2.4.1 ラット (原文 p.15)	43
2.2.5 胚毒性/催奇形性の特別な試験 (原文 p.16)	43
2.2.5.1 ウサギ (原文 p.16)	43
2.2.6 遺伝毒性に関する特別な試験 (原文 p.16)	44
デスオキシカルバドックス	44
2.2 毒性試験 (原文 p.17)	44
2.2.3 長期/発がん性試験 (原文 p.17)	44
2.2.3.1 ラット (原文 p.17)	44

2.2.5.2 遺伝毒性に関する特別な試験 (原文 p.18)	45
カルバジン酸メチル	47
2.2 毒性試験 (原文 p.20)	47
2.2.3 長期/発がん性試験 (原文 p.20)	47
2.2.3.1 ラット (原文 p.20)	47
2.2.5 遺伝毒性に関する特別な試験 (原文 p.21)	48
ヒドラジン	49
2.1 生化学的側面 (原文 p.22)	49
2.1.1 吸収,分布,代謝, 及び排泄 (原文 p.22)	49
2.1.3 酵素及びその他生化学的パラメーターの効果 (原文 p.22)	49
2.2 毒性試験 (原文 p.23)	50
2.2.3 長期発がん性試験 (原文 p.23)	50
2.2.3.1 マウス (原文 p.23)	50
2.2.3.2 ハムスター (原文 p.24)	51
2.2.3.3 ラット (原文 p.24)	51
2.2.7.5 遺伝毒性に関する特別な試験	51
2.3. ヒトにおける観察 (原文 p.25)	52
3. コメント (原文 p.25)	52
4. 評価 (原文 p.28)	54
カルバドックスの毒性試験と結果の概要 (評価書:JECFA 1990)	55
略称	57

原文 目次

原文ページ

カルバドックス

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	1
2.1.2 生体内変化	2
2.1.3 酵素及びその他生化学的パラメーター上の効果	3
2.2. 毒性試験	5
2.2.1 急性毒性試験	5
2.2.2 短期試験	5
2.2.2.1 ラット	5
2.2.2.2 イヌ	6
2.2.3 長期/発がん性試験	6
2.2.3.1 ラット	6
2.2.3.2 サル	9
2.2.4 繁殖試験	9
2.2.5 遺伝毒性に関する特別な試験	10
2.2.6. リレー毒性に関する特別な試験	10
2.2.6.1 ラット	10
2.2.6.2 イヌ	11

キノキサリン-2-カルボン酸

2.2 毒性試験	12
2.2.1 急性毒性試験	12
2.2.3 長期/発がん性試験	13
2.2.3.1 マウス	13
2.2.3.2 ラット	13
2.2.4 繁殖試験	15
2.2.4.1 ラット	15
2.2.5 胚毒性/催奇形性の特別な試験	16
2.2.5.1 ウサギ	16
2.2.6 遺伝毒性に関する特別な試験	16

デスオキシカルバドックス

2.2. 毒性試験	17
2.2.3 長期/発がん性試験	17
2.2.3.1 ラット	17
2.2.5.2 遺伝毒性に関する特別な試験	18

カルバジン酸メチル

2.2 毒性試験	20
2.2.3 長期/発がん性試験	20
2.2.3.1 ラット	20
2.2.5 遺伝毒性に関する特別な試験	21
ヒドラジン	
2.1 生化学的側面	22
2.1.1 吸収、分析、代謝、及び排泄	22
2.1.3 酵素及びその他生化学的パラメーター上の効果	22
2.2 毒性試験	23
2.2.3 長期発がん性試験	23
2.2.3.1 マウス	23
2.2.3.2 ハムスター	24
2.2.3.3 ラット	24
2.2.7.5 遺伝毒性に関する特別な試験	24
2.3 ヒトの観察所見	25
3. コメント	25
4. 評価	28
5. 引用文献	1

CARBADOX

1. EXPLANATION	1
2. BIOLOGICAL DATA	1
2.1 Biochemical aspects	1
2.1.1 Absorption, distribution, and excretion	1
2.1.2 Biotransformation	2
2.1.3 Effects on enzymes and other biochemical parameters	3
2.2 Toxicological Studies	5
2.2.1 Acute toxicity studies	5
2.2.2 Short-term studies	5
2.2.2.1 Rats	5
2.2.2.2 Dogs	6
2.2.3 Long-term/carcinogenicity studies	6
2.2.3.1 Rats	6
2.2.3.2 Monkeys	9
2.2.4 Reproduction studies	9
2.2.4.1 Rats	
2.2.5 Special studies on genotoxicity	10

2.2.6. Special studies on relay toxicity	10
2.2.6.1 Rats	10
2.2.6.2 Dogs	11
QUINOXALINE-2-CARBOXYLIC ACID	
2.2 Toxicological studies	12
2.2.1 Acute toxicity studies	12
2.2.3 Long-term/carcinogenicity studies	13
2.2.3.1 Mouse	13
2.2.3.2 Rats	13
2.2.4 Reproduction Studies	15
2.2.4.1 Rats	15
2.2.5 Special studies on embryotoxicity/teratogenicity	16
2.2.5.1 Rabbits	16
2.2.6 Special studies on genotoxicity	16
DESOXYCARBADOX	
2.2. Toxicological studies	17
2.2.3 Long-term/carcinogenicity studies	17
2.2.3.1 Rats	17
2.2.5.2 Special Studies on Genotoxicity	18
METHYL CARBAZATE	
2.2 Toxicological studies	20
2.2.3 Long-term/carcinogenicity studies	20
2.2.3.1 Rats	20
2.2.5 Special studies on genotoxicity	21
HYDRAZIN	
2.1 Biochemical aspects	22
2.1.1 Absorption, distribution, metabolism, and excretion	22
2.1.3 Effects on enzyme and other biochemical parameters	22
2.2 Toxicological studies	23
2.2.3 Long-term carcinogenicity studies	23
2.2.3.1 Mice	23
2.2.3.2 Hamsters	24
2.2.3.2 Rats	24
2.2.7.5 Special studies on genotoxicity	24
2.3 Observations in humans	25
3. COMMENTS	25
4. EVALUATION	25
5. REFERENCES	

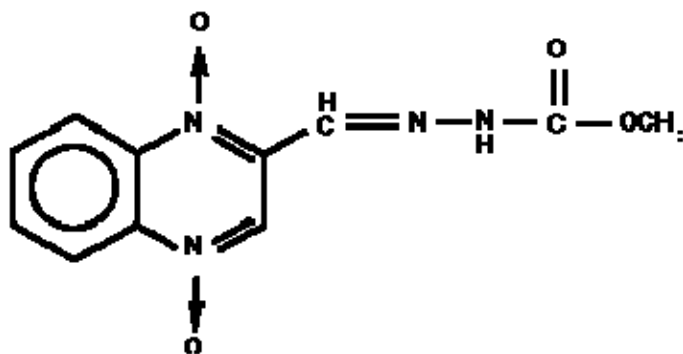
カルバドックス

1. 説明（原文 p.1）

カルバドックスは、50 ppm の割合で豚の飼料に添加される生育促進及び抗菌薬である。世界の大半の地域では、4ヶ月齢の動物を食用にと殺する前に4週間の休薬期間を経て用いられる。カルバドックスは、これまでFAO/WHO合同食品添加物専門家会議では評価されいなかった。

カルバドックスの構造は図1に示される。

図1



2. 生物学的データ（原文 p.1）

2.1 生化学的側面（原文 p.1）

2.1.1 吸収,分布, 及び排泄（原文 p.1）

カルバドックスの排泄を、ラット、豚及びサルで試験した。豚は、数週間50 g/トンの未標識カルバドックスを混餌投与した後、3.5 mg/kg の¹⁴C-カルバドックスを投与した。一方マウスやサルは5 mg/kgの¹⁴C-カルバドックスを単回投与した。尿及び糞を採取し、放射能を測定した。尿中の代謝物は、TLCを用いて定性的に評価した。豚の尿中に存在する代謝物のほとんど(13/15)は、ラット及びサルの尿中にみられる。他の2つのうち1つは、キノキサリン-2-カルボン酸のグリシン共役体であった。すべての種において、回収期間72時間の尿に、投与量の50%超（豚：74%，サル：61%，ラット：54%）が排泄された。以下の放射能は、72時間の糞において報告された。：豚、17%、サル、8-10%及びラット29%である。排泄総量は、72時間を通じて70-90%の範囲であるようであった。著者は放射能の分布は3つの種で同様であったと結論付けた(von Wittenau, 1969)。

2.1.2 生体内変化（原文 p.2）

7週齢の豚に、50g/トンの未標識のカルバドックスを数週間混餌投与し、次に3.5 mg/kg又は0.8 mg/kgのフェニル環標識した¹⁴C-カルバドックスを単回経口投与した。投与の約3時間後、血漿中の放射能のピークが認められた。以下は投与5-8時間後の血漿で確認された：カルバドックス(13%)、デスオキシカルバドックス(9-19%)、カルバドキシサルデヒド(13%)及びキノキサリン-2-カルボン酸(19%)(総血漿中放射能に占める割合で全てを表した)。胃内容物においてカルバドキシサルデヒドの存在を確認した。カルバドックスは、速やかに排泄された。投与量の約2/3は48～72時間のうちに尿中に、残りは糞中に排泄された(合計約90%)。投与14日後の肝臓には約0.1 ppmカルバドックス相当の放射能が残存していることがわかった。この残留放射能の同定を試みたがうまくいかなかった。24時間後に肝臓中で同定される唯一の代謝物は、尿中に排泄される主な代謝物である、キノキサリン-2-カルボン酸であった(Figdor et al., 1969)。

第2試験では、7週齢の豚に、50 g/トンの割合で未標識のカルバドックスを数週間投与し、その後、胃管を通じてカルボニル基標識した¹⁴C-カルバドックスを単回経口投与した。以下の評価がまとめられた：呼吸は¹⁴CO₂を評価し、肝臓及び尿中の標識物質はメチルカルバゼート関連かどうかを確認するために評価し、血漿及び尿は遊離ヒドラジンを経験した。放射能標識物質の最大血漿中濃度は、約3時間後であった。初期の血漿濃度は環標識カルバドックスと同様であったが、24時間後ではやや高い濃度が残っていた。3 時間における血漿中の放射能標識物の約50%はカルバドックスと同定され、一方30%はカルバジン酸メチルであると推定された。放射能標識物の主要な排泄経路は尿中であった。第1試験で環標識したカルバドックスの回収量の半分以下しかカルボニル基標識のカルバドックスは回収できなかった (37% vs 88%)。この理由は、放射能標識のCO₂への高い変換である(ラットで36%まで確認している)。5日目の肝臓には0.1-0.34 ppm のカルバドックスに相当する放射能標識物が存在した。この物質のいくつかはCO₂と結合したと筆者らは結論した(25%は潜在的)。7 mg/kgを投与した豚は投与量の7%が遊離ヒドラジンとして24時間の尿中に排泄されたが、一方でより少ない用量を投与した豚の尿中にはいかなる認識ヒドラジンも検出されなかった(Figdor, 1969)。

試験の報告は、図2に示した代謝スキームを裏付けた。

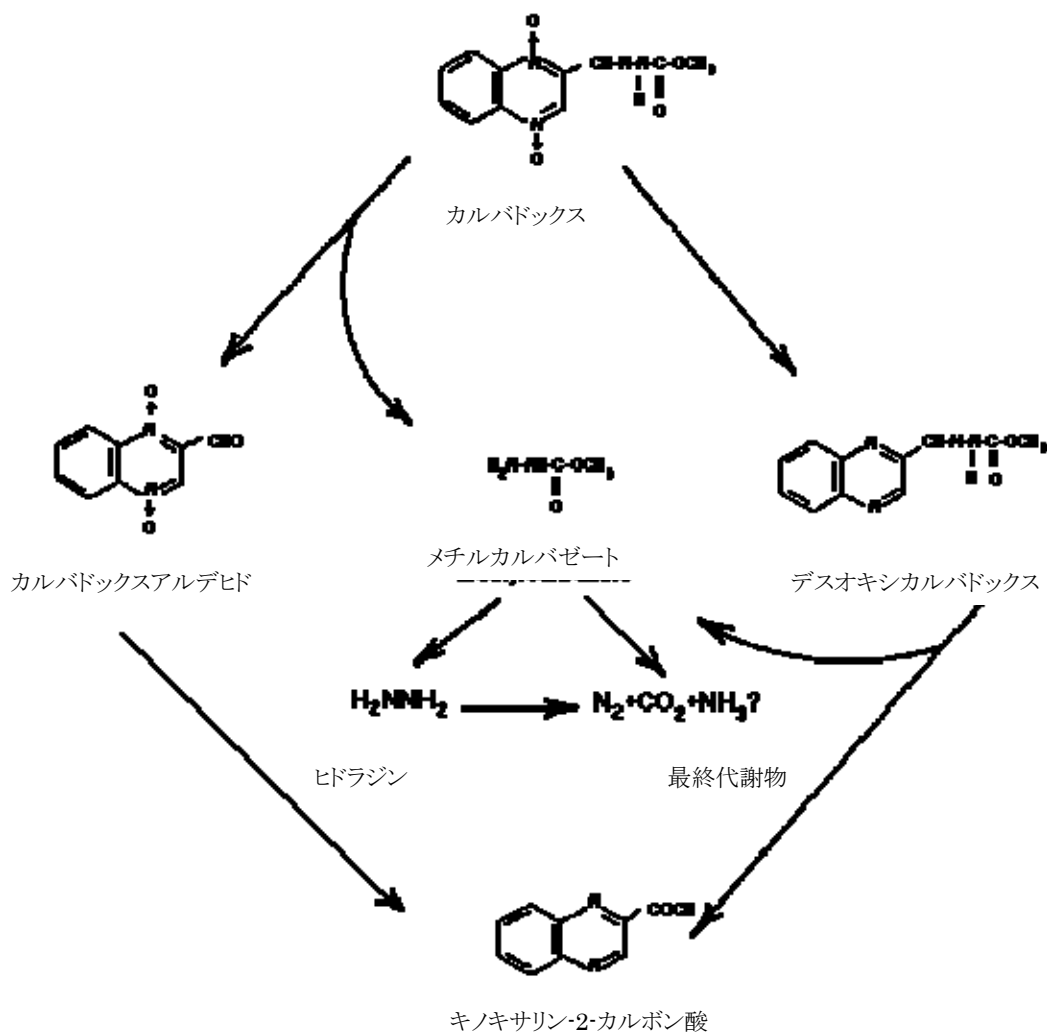
カルバドックスについてだけでなくその代謝物についても広範な試験を行った。試験はこの論文で物質ごとに分けてまとめる。

2.1.3 酵素及びその他生化学的パラメーター上の効果 (原文 p.3)

豚を用いて、カルバドックスで誘発された副腎病変の残留試験が行われた。一群13頭の動物に0、25、50、100又は200 ppm のカルバドックスを10週間混餌投与した。休薬 5及び11週後に、一群2頭の豚の検死を行い、副腎を組織学的に評価した。25及び50 ppm投与群の豚は、休薬5週後に副腎病変からの回復が見られた。100及び200 ppm投与群では休薬11週後にも病変は全快しなかった。血漿アルドステロン値は、投与1、2、4、6及び8週後にモニターした。1週後のアルドステロン濃度は、100 ppm群と200 ppm群で対照群に対し低下した。それ以外の投与群のアルドステロン測定値は、すべて対照値と同様であった(Van der Molen et al., 1989a)。

豚を用いて、カルバドックスがレニンアンジオテンシン系に及ぼす影響について評価した。一群13頭の5週齢の離乳豚5群に、目標用量0、2、4、6及び8mg/kg体重となるように0、50、100、150及び200 ppmのカルバドックスを10週間混餌投与した。全投与群の血漿レニンレベルは、9週まで対照群より有意に高かった。5及び10週において、2～3頭の豚の腎免疫活性レニンが評価された。全ての豚は、免疫活性レニンの増加を示した。カルバドックスは、鉱質コルチコイドの分泌抑制を引き起こし、続いてレニン・アンジオテンシン系の活性を引き起こすという結論に達した(vander Molen et al., 1989b)。

図2: カルバドックスの代謝スキームの簡略図



3-5週齢の豚から採取した豚副腎スライスをを用いて、*in vitro*での副腎アルドステロンの生成に対するカルバドックスの影響について評価を行った。副腎スライスはクレブス溶液で保存し、1-40 μ gカルバドックス/mLにさらした。毎時間隔でRIAを使用してアルドステロンを見積もった。40 μ g/mLにおいて25-35%削減した場合に、アルドステロン生成の用量依存的な減少が生じた (Spierenburg et al; 1988)。

2.2. 毒性試験(原文 p.5)

2.2.1 急性毒性試験(原文 p.5)

カルバドックスに関する急性毒性試験の結果は表1に示される。

表1：カルバドックス急性毒性データ

種	性	ルート	LD ₅₀ (mg/kg b.w.)	参照
マウス	M	経口	2810	Pfizer (日付なしa)
	F	経口	>2810	
		腹腔内	1050	
ラット	M	経口	850	
		腹腔内	810	

サル及びイヌのカルバドックスの催吐作用を評価する試験を行なった。一群3頭の動物にカルバドックスをカプセル単回経口投与した。投与量は、25、10、5及び1 mg/kg 体重/日であった。投与量が多い2群の1/3のサルで嘔吐が見られた一方、イヌは全てのグループ群において嘔吐が見られた。

2.2.2 短期試験 (原文 p.5)

2.2.2.1 ラット (原文 p.5)

Charles River CD離乳ラット20匹は、次のとおり分けられ、30日間投与された。すなわち、50 mg/kg 体重/日及び100 mg/kg 体重/日投与群として2-3 匹の雄雌、ならびに無投与の対照群として10頭の雄である。カルバドックスは混餌で投与された。体重及び摂餌量は毎週観察し、必要に応じて濃度を調整した。CBCは30日、尿中電解質は1、2、3、14、及び30日、コレステロールは30日、及び尿検査14、30日について評価した。試験終了時にラットは肉眼剖検し、組織を顕微鏡下で評価した。体重増加率及び摂餌量における用量依存的な減少が認められた。著者らは、他のパラメータはすべて正常であったと結論した(Pfizer, 1963)。

2.2.2.2 イヌ (原文 p.6)

イヌを用いて、カルバドックスを6日/週で3週間投与した短期毒性試験が行われた。ビーグル犬(一群雄雌各1匹)には、最初は25又は50 mg/kg 体重/日用量のカルバドックスをカプセル経口投与した。嘔吐のため、これらの投与量は後に10 mg/kg体重/日及び15 mg/kg体重/日に減らした。試験終了時において、臨床化学的検査、肉眼剖検及び顕微鏡的組織検査を含む多様なパラメータが評価された。イヌは体重が減少し、SGPTが上昇した。カルバドックスはイヌに対して催吐作用があり、おそらく肝毒性があるという結論に達した(Stebbins, 1964)。

2.2.3 長期/発がん性試験（原文 p.6）

2.2.3.1 ラット（原文 p.6）

ラットを用いて、カルバドックスの慢性毒性及び腫瘍形成試験が実施された。Charles River CDラット120匹は、6群（一群雄雌各10匹）に分け、カルバドックスを100、50、25、10、5及び0 mgカルバドックス/kg 体重/日の用量で26ヶ月間混餌投与した。飼料濃度は毎週調整した。臨床症状、体重及び摂餌量は毎週記録した。3、6、12、18及び25ヶ月で一群雄雌各5匹のラットの血液学及び尿検査の評価を行った。ラットは14及び112週で解剖に付し、肉眼剖検を行った。組織は組織病理学的に検査した。

高用量投与群の生存率は低かった。中間解剖まで（解剖日を含む）の動物について以下の所見が報告された：

100 mg/kg 体重/日（ラット雄雌各10匹を解剖）－ 体重増加率及び摂餌量の減少と、ヘモグロビン、赤血球（RBC）及び好中球の減少。報告された顕微鏡的变化は、肺出血及び浮腫、副腎皮質の出血及び変性、脾臓のヘモジデリン及び胸腺萎縮を含む。14週のと殺まで生存した動物はみられなかった。

50 mg/kg 体重/日（ラット雄雌各10匹を解剖）－ 体重増加率及び摂餌量の減少。報告された顕微鏡的变化は、肺出血及び浮腫、副腎皮質の出血、壊死及び変性、脾臓のヘモジデリン及び腎皮質髄質の脂肪変性を含む。14週のと殺まで生存した動物はみられなかった。

25 mg/kg 体重/日（ラット雄雌各3匹を解剖）－ 体重増加率の減少、軽度の副腎皮質萎縮、変性/壊死及び腎尿細管の脂肪変性。

5及び10 mg/kg 体重/日（ラット雄雌各3匹を解剖）－ 3ヶ月時点における臨床的、総体的又は微視的な変化は、全く報告されなかった。

3ヶ月から26ヶ月のと殺まで（当日を含む）のラットについて、以下の所見が報告された。：

25 mg/kg 体重/日－ 雌1匹は、薬物に起因する特筆すべき変化のないまま51週で死亡した。残りの13匹のラットは、明白な腹部腫瘍のため73週までにすべて解剖に付した。剖検時、全てのラットは多発性肝結節を有していた。顕微鏡検査では、13匹のうち10匹のラットが良性の結節性過形成であると診断され、残り3匹のラットは他の臓器（肺、腎臓及びリンパ節）で転移病巣がみられたことから、悪性転化が起きていると結論された。

10 mg/kg 体重/日－ ラット1匹は、老齢のラットの一般的な腫瘍である、細網内皮系の腫瘍形成により67週で死亡した。残り13匹のラットは、64週及び112週の間で解剖に付した。そのうち11匹では良性の肝結節性過形成がみられた。

5 mg/kg 体重/日－ 雄1匹は肺の膿瘍により20週で死亡した。残り13匹は、61から112週の間で死亡、又はと

殺した。これらのうち5匹では良性の肝結節性過形成がみられた。

対照群 - 雄1匹は前胃部乳頭腫と無気肺のため33週で死亡し、別の雄は心筋炎、腎硬化症及び気管支周囲炎で93週で死亡した。残りの動物は試験の80～112週の間に死亡した。対照群の動物には、肝結節性過形成は全く観察されなかった。投与群において観察された結節性過形成は肝傷害を伴っており、著者らは、いずれの用量群のラットもカルバドックスの試験に耐えられなかったという結論に達したと示唆した。また、カルバドックス投与群のラットにおいては、投与に関連した総腫瘍数の増加もカルバドックス投与ラットに関して報告された。高用量投与群においては、腫瘍発生頻度はより低かったが、死亡時期は他の投与群に比べて早かった (Stebbins & Coleman, 1967)。

ラットの慢性カルバドックス耐容性を測定するために追跡試験を実施した。Charles Riverラットの雄60匹 (124-173 gm)及び雌60匹(107-152 gm)は、3群(一群雄雌各20匹)に分け、2.5、1.0、又は0 mg/kg 体重/日のカルバドックスを混餌投与した。症状、体重及び摂餌量は週間を記録し、それに従い投与量を修正した。血液学、徹底した検尿及び眼底鏡検査は、3、6、12、18及び24ヶ月で一群雄雌各5匹のラットについて実施された。54週で一群雄雌各5匹のラットを中間と殺し、残りのラットは106週でと殺した。各ラットは、以下を含む肉眼剖検及び標準的な組織の顕微鏡検査を受けた。すなわち、脳、脊髄の索、目、顎下腺、大腿神経を伴った甲状腺、胸腺、心臓、大動脈、肺、胸骨、肝臓、脾臓、膵臓、腎臓、副腎、胃、腸間膜リンパ節、繁殖器官、膀胱、大腿神経、大腿骨の骨髓及び乳房である。

すべての評価項目は組織病理学的検査を含めて54週で正常値の範囲内であった。2年生存率は、次のとおり。すなわち、対照-38%、1 mg/kg 体重/日-45%、2.5 mg/kg 体重/日-43%であった。2.5mg/kg 体重/日投与群では7/27のラットで良性の肝結節性過形成及び7/27に肝臓紫斑病が示された。1.0mg/kg 体重/日投与群では1/29のラットに良性の肝結節性過形成及び3/29に肝臓紫斑病が現れた。対照群の3/29のラットは良性の結節性過形成があり、2/29は肝臓紫斑病を有した。さらに、2.5 mg/kg 体重投与群で乳腫瘍全体の増加が報告された。著者らは、肝傷害と他の臓器における腫瘍の両発生頻度が、投与群と対照群で類似していることに基づき、ラットに毒性影響を与えない投与量は、2年間で1 mg/kg 体重/日であると結論づけた。

ラット(14/性別) 28匹の3群には、カルバドックス及びデスオキシカルバドックスの腫瘍活性を比較するため、カルバドックスの目標用量である25 mg/kg 体重/日、又は2ロットのうち1つのデスオキシカルバドックスを11ヶ月間投与した。同数の群を未処理の対照群とした。被験物質は10ヶ月間混餌投与した。2～4匹のラットを30、60、90、191及び309日で解剖に付した。毒性及び死亡は毎日観察した。体重及び摂餌量は38週までは毎週、その後は隔週で記録した。ラットはと殺時に肉眼剖検を行い、肝臓及び副腎を組織病理学的に評価した。カルバドックスを投与した雌雄において、体重増加率の軽度の減少が起こった。その他有意な臨床所見は全くみられなかった。肉眼剖検では、10ヶ月間投与の全群で壊死や小節形成を含む肝臓異常の証拠が示された。カルバドックス投与群の変化は、デスオキシカルバドックス投与群ほどは大きくなかった。組織病理学的検査では、カルバドックス投与群ラットの2/18で肝細胞癌が認められた一方で、デスオキシカルバドックス投与群の全てのラットで肝細胞癌が認められた。カルバドックス及びデスオキシカルバドックス投与群のいずれも、副腎皮質の出血の有意な増加がみられた(King, 1976)。

近年更に、ラットを用いたカルバドックスの発がん性が種々の投与方法で試験された。出産後、雌雄それぞれ計119匹のWistarラットを種々の数の群に分け(2-18匹)、試験終了までの1年間、カルバドックス300 ppmを腹腔内又は混餌投与した(離乳前8~20日間)。試験の間、ラットを検査し定期的に体重を計測した。腫瘍は試験終了時に肉眼的及び組織病理学的に診断した。体重増加率は低下した。300 ppm のカルバドックスを混餌投与したラットは、全て肝腫瘍が発生した。カルバドックスを腹腔内投与したラットは、未投与の対照群に比べて肝腫瘍の発生頻度がより高かった。自然発生癌及び希少な腫瘍の発生が最も多かったのは、両方の経路を介してカルバドックスを投与した群であった(Sykora & Vortel, 1986)。

2.2.3.2 サル (原文 p.9)

霊長類を用いて、カルバドックスの長期毒性試験が評価された。サル28匹は、一群7匹(雄雌各3匹又は4匹)の4群に分けられ、ゼラチンカプセルに入れたカルバドックスを5日/週投与した。投与群として、20 (5 mg/kg を1日4回)、10 (5 mg/kg を1日2回)又は5 mg/kg 体重/日、及び対照群を設定した。ヘモグロビン、ヘマトクリット、赤血球、白血球、凝固時間、プロトロンビン時間、徹底した検尿、血中グルコース、血中尿素窒素、アルカリホスファターゼ、血清グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ及び血清グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼを含む多様なパラメーターを1、3、6、12及び24ヶ月時点で評価した。眼底鏡検査は同間隔で行われた。3ヶ月及び2年で動物をと殺して剖検に付した。飼料には、結核予防として0.2%イソニアジドを含有した。

投与群と対照群の両方の動物において、トランスアミナーゼ値の上昇が、3及び6ヶ月時点の評価で認められた。著者らは、サルは20 mg/kg/日の2年間投与に対して、毒性への影響無く耐容したと結論づけた(Coleman, 1967)。

2.2.4 繁殖試験 (原文 p.9)

2.2.4.1 ラット (原文 p.9)

2.5、1.0及び10 mg/kg 体重/日の目標用量となるように飼料を調節し、一世代当たり2同腹児に関する3世代繁殖試験を実施した。投与量は、並行していた2年間慢性試験に使用したものと同一にした。Charles River CDラットの雌60匹及び雄30匹の第1世代を一群当たり雌20匹及び雄10匹に分けた。雌2匹をそれぞれ雄に交配させた。授乳21日において、肉眼的検査に従って第1同腹児をと殺した。10日間の安静期間後、雌を別の雄に再交配させた。第2世代とするために、第2同腹児の各投与群から雌20匹及び雄10匹を選択した。これらのラットは100日齢で交配した。第2及び第3世代は、離乳期から繁殖期を通して用量を維持したまま投与した。評価項目には以下を含めた。すなわち、受精率、妊娠期間の長さ、生児出生、死産、4日目の生存率、離乳日数、24時間における同腹総体重、離乳時における同腹総体重、離乳時の性別、生存能力指数、授乳指数、成長指標、生存出生率及び肉眼的異常所見である。さらに、眼底鏡検査及び肉眼剖検を受けた第3世代の2番目の同腹児の一群10匹の離乳児について、組織の標準配置を顕微鏡的に評価した。

対照群のパラメーターとの例外的な差はあったが、これらは散発性であり、投与に起因するものとは考えられない。妊娠率の低下は、第3世代全群で報告され、1.0 mg/kg 体重/日投与群の最初の同腹児に限っては50%以上であった。さらに、第3世代投与群でカニバリズムの高い発生頻度(30-44%)がみられたが、これは無投与の対照群の2番目の同腹児 (19%)でも同様にみられた。このカニバリズムは、第3世代投与群において、投与とは無関係に授乳指数の減少を引き起こした(対照群の93-98%に対し、投与群の同腹児では59-79%)。最初の2世代では、影響は全く報告されなかった。著者らは、カルバドックスはいずれの用量でも繁殖能力、授乳又は新生児への影響を有しなかったと結論づけた(Sigler, 1969b)。

2.2.5 遺伝毒性に関する特別な試験 (原文 p.10)

カルバドックスに関する遺伝毒性試験の結果は表2に示されている。

2.2.6 リレー毒性に関する特別試験 (原文 p.10)

2.2.6.1 ラット (原文 p.10)

カルバドックスを投与した豚の肉における毒性リスクを検討するため試験を行なった。試験のために、体重60-80 kgの豚にカルバドックスを0、20、及び200ppmの割合で30日間混餌投与し、と殺した。これらの豚の肉は、約200gに分割し、-18 °Cで冷凍した。

Weanling Wistarラットを、一群雄雌各12匹 (高用量投与群は雌24匹)に分けた。ラットには上記のカルバドックス投与を受けた豚に由来する10%豚肝臓の栄養補助飼料を投与した。23-25月間、この混餌投与を継続した。すべてのラットは肉眼剖検し、以下の臓器は、顕微鏡的に評価した。すなわち、肝臓、腎臓、副腎、精巣、卵巣、及び甲状腺である。体重及び死亡率を記録した。死亡率への影響は全くみられなかった。投与に起因する組織学的変化は全く報告されなかった(Ferrando et al., 1975)。

2.2.6.2 イヌ (原文 p.11)

別の試験では、体重約4.5 kgのビーグル犬12頭が、様々な飼料の一部分として100 gの対照豚肉を1ヶ月間与えられた。次に3つの投与群に分け、最初の5ヶ月間100 gm/日、残りの投与期間(85ヶ月)200 gmsのカルバドックス投与を受けた豚の肉を与えた。イヌは定期的に計量した。4ヶ月ごとに血液学、臨床化学及び尿検査の各検査項目を評価した。

と殺時に全てのイヌの健康状態は良好であった。試験終了時に肉眼剖検を行い、一連の標準的組織を組織病理学的に評価した。投与に起因した影響は、本試験では全く報告されなかった。著者らはカルバドックスが豚飼料に50 ppmで成長促進剤として使用される際、人体への影響は全くないと結論づけた(Ferrando, et

al., 1978)。

表2 カルバドックスに関する遺伝毒性試験の結果

試験系	試験対象	濃度	結果	参照
エームス試験	ネズミチフス菌 TA1535	0.0004 - 0.125 (mg/plate)	陽性	Pfizer, undated b
	TA1536, TA1537 TA1538, C340		不明瞭	
エームス試験	TA100 TA98(+/-S9)	3.1 - 61.7 (nM)	陽性	Beutin et al, 1981
エームス試験	TA100 TA98(+/-S9)	2.5-15 μ g/プレート	陽性	吉村 et al, 1981
エームス試験	TA100, TA98	.1 umole/プレート	陽性	根岸, et al, 1980
エームス試験	TA100	0.001-.02	陽性	Voogd et al., 1980
変異原性 エームス試験	E. 大腸菌WP2hcr TA100+/-S9 TA98 TA1538 TA1537 TA1535	5-50 μ g/プレート	陽性 陽性 陽性 陰性 陰性 陰性	Ohta et al, 1980
宿主経由アッセイ	ネズミチフス菌 TA1534, TA1952	0、1、2、2.5、5、10、 0、1、2.5、5、7.5、 10、12.5、20 mg/kg	陰性 陽性	Pfizer, undated b
修復試験	枯草菌(rec) ネズミチフス菌(urv)	1-100 μ g/ディスク	陽性	吉村 et al., 1981
彷徨試験	肺炎桿菌 大腸菌 K12	.00002 – .005 nmoles/L	陽性	Voogd et al., 1980
変異原性試験	出芽酵母 D4	.02%	陽性	Voogd et al, 1980
小核試験	ラット骨髓	5-240 mg/kg 腹腔内	陽性	Cihak and Srb, 1983
修復試験	枯草菌 M45	.1 - 100 umole/ディスク	陽性	Ohta et al, 1980
染色体損傷	マウス骨髓	200 mg/kg 急性 10 mg/kg 日 7日	陽性	Pfizer, undated b
染色体損傷	In vitro ヒト リンパ球	0 - 250 μ g/mL	陽性	Pfizer, undated b
優性致死試験	CD-1マウス	10,50,150,30 mg/kg	陰性	Pfizer, undated b

キノキサリン-2-カルボン酸

2.2 毒性試験(原文 p.12)

2.2.1 急性毒性試験(原文 p.12)

キノキサリン-2-カルボン酸による急性毒性試験の結果を表3に示す。

表3 :キノキサリン-2-カルボン酸の急性毒性

種	性	LD ₅₀		参照
		投与経路	(mg/kg)	
ラット	雄	経口	4450	Briggs, 1971
マウス	雄	経口	1360	

*原文に「2.2.2」項はない。

2.2.3 長期/発がん性試験 (原文 p.13)

2.2.3.1 マウス (原文 p.13)

一群雄雌各50匹(対照群は100匹)のCharles River CDマウスを用いて、キノキサリン-2-カルボン酸の19ヶ月間混餌投与による慢性経口毒性及び発がん性試験が行われた。毎週新しい飼料を調製した。摂餌量及び摂水量は、その後最初の3ヶ月間は毎週、その後は毎月モニターした。キノキサリン-2-カルボン酸の投与量は、モニターする度に0、25、50及び100 mg/kg 体重/日の目標投与量に調整した。と殺前に血液学及び生化学検査を一回評価した。すべての動物で剖検を実施した。臓器重量は、脳、心臓、腎臓、肝臓、精巣及び卵巣について得た。組織病理学的検査は、標準的な一連の組織について行った。

投与に起因する影響は、試験中に測定したいずれのパラメーターにおいてもみられなかった。累積死亡率は、対照群の雌及び雄でそれぞれ20%及び15%であったのに対し、投与群の累積死亡率は10%から20%の範囲内であった。全腫瘍の発生頻度は、対照群の雌で33%、雄で46%であったのに対し、投与群では32%から42%の範囲内であった。著者らは、マウスへのキノキサリン-2-カルボン酸の19ヶ月間経口投与では、毒性症状は全く示されなかったと結論した(Faccini et al., 1979)。

2.2.3.2 ラット (原文 p.13)

Charles River CDラットの雄雌各9匹を一群雄雌各3匹の投与群に分けた。ラットは、キノキサリン-2-カル

ボン酸の混餌投与を2年間受けた。体重及び摂餌量は、30週間は毎週、その後は毎月記録した。100、50又は0 mg/kg 体重/日の目標投与量になるように、投薬量を調整した。

ラットは、0、30、92、186、365、554及び733日目において臨床検査及び眼底鏡検査を受けた。血液学的検査及び尿検査の各検査項目は、31、93、182、274、370、461、547、644及び730日目に評価した。最終と殺は、試験735日目に実施した。ラットは、すべて肉眼剖検を受け、各ラットの標準的な組織を顕微鏡検査により評価した。投与に起因する変化の報告は全く無かった。著者らは、ラットにキノキサリン-2-カルボン酸を混餌投与する際、100 mg/kg 体重/日まで許容できると結論した(Coleman, 1971)。

キノキサリン-2-カルボン酸の発がん性を判定する追加試験を実施した。試験を達成するため、Charles River Sprague-Dawleyラット(20匹/性別/投与レベル)にキノキサリン-2-カルボン酸0、10、25及び50 mg/kg 体重/日の目標投与量で2年間混餌投与した。体重及び摂餌量は、毎週モニターし、それに従い薬物濃度を修正した。ラットは臨床症状の兆候を毎週検査した。眼科的検査は、投与前、6、12、20及び24ヶ月においてすべてのラットで実施した。臨床化学、血液学及び尿のパラメーターは、6及び12ヶ月において5匹、18ヶ月において2～4匹、及び終了時において全てのラットで評価を行った。剖検は、12ヶ月は5匹のラット/性別/投与、及び24ヶ月は残る全てのラットについて実施し、肉眼剖検を行い、組織の顕微鏡的評価を実施した。臓器重量は、心臓、肝臓、肺、腎臓、繁殖腺、副腎、脾臓及び脳に対して測定した。一連の標準的な組織については組織病理学的検査を行った。

投与に起因する影響は、いずれの評価項目にも全く見られなかった。投与群の任意の臓器で生じた腫瘍の累積発生率は(一群雌雄合わせてラット計40匹の結果に基づく)表4にまとめる。ラットへのキノキサリン-2-カルボン酸の10、25及び50 mg/kg体重/日容量の2年間投与は、いかなる毒性も腫瘍発生頻度の上昇も引き起こさないという結論に達した(Pfizer, 1971)。

表4 ラットへのキノキサリン-2-カルボン酸投与後の腫瘍の累積発生頻度(雄雌の合計)

投与群	乳房	脳下垂体	膵臓	肝臓
対照	28%	30%	3%	5%
10 mg/kg 体重/日	18	23	10	5
25 mg/kg 体重/日	13	28	3	5
50 mg/kg 体重/日	33	28	3	3

3世代試験のF1同腹児から得られたラットを用い、追跡慢性試験を実施した。この試験では、更なる高容量群(100 mg/kg 体重/日)が追加された。Charles River C-D ラット是一群雄雌各50匹に分けられ、100、50、25又は0 mg/kg 体重/日のキノキサリン-2-カルボン酸を29ヶ月間混餌投与された。さらに12ヶ月目の臨床試験では、対照群と100 mg/kg体重/日投与群に雄雌各10匹のラットを追加した。体重は毎週記録した。摂餌量は初めの5ヶ月間は毎週、6ヶ月目は2回、それ以降は月ごとに記録し、投与量はそれに従い修正した。臨床

検査は毎日行った。臨床検査パラメーターについては、6、12及び29ヶ月で評価した。血液学的検査は、試験終了にあたり評価された。ラットは全て肉眼剖検を受けた。肝臓と腎臓は12か月でと殺されたラットで重量測定し、心臓、肝臓、腎臓、脳及び精巣は29ヶ月の全体剖検時に重量測定した。肉眼的異常を示している多くの器官に加え、肉眼的に正常な組織についての標準的配列は顕微鏡観察により評価した。

ラットの全身の健康状態には、投与による影響は無かった。89日齢及び97日齢の間に唾液腺炎の発生がみられた。僅かな体重増加率の減少(3-5%)が、両性において高用量投与群でみられた。累積死亡率は、対照群の雄で56%及び雌で70%であった一方で、投与群では46%～74%の範囲内であった。対照群と投与群の間の非腫瘍性傷害の発生頻度の差は全くみられず、また投与群では投与による寿命短縮も認められなかった。ラットへの2年間投与は、動物の悪性又は良性腫瘍の対照群と比較した発生頻度の増加を引き起こさなかった。著者らは、無毒性量(NOEL)は100 mg/kg 体重/日であると結論づけた(King, 1979a)。

2.2.4 繁殖試験 (原文 p.15)

2.2.4.1 ラット (原文 p.15)

ラットでキノキサリン-2-カルボン酸の繁殖毒性が検討された。2年間慢性試験と同時に試験が実施された。投与経路は飼料とした。試験は、一群雄雌各20匹のラットの1世代当たり2同腹児に対して3世代にわたって25、50及び100 mg/kg 体重/日の目標投与量を投与した。F₀ラットは約60日間のキノキサリン-2-カルボン酸を投与して飼養された。並行する慢性試験のために、最初のF₁同腹児から一群雄雌各50匹のラットを選定した。7日間の安静期間後、第2の同腹児を産生するために、雌を異なる雄に再交配させた。その後の各世代の最初の同腹児は、離乳時にと殺し、一方第2同腹児は次世代の産生に使用された。これらの最初の同腹児は飼育中に児動物10匹/同腹児(可能であった場合雄雌各5匹)に削減され、さらに離乳時にと殺及び剖検した。第2同腹児は次世代の産生に使用された。以降の世代のラットは、100日齢で交配させた。試験動物には、離乳期から繁殖期を通じて同じ用量を維持して投与した。

ラットは毎日検査を実施した。摂餌量及び体重は交配期を除いて毎週測定された。全世代の成獣は、第2同腹児の離乳後にと殺され、肝臓重量の測定と肉眼剖検を受けた。血中濃度は、と殺の直前にF₀ラット(5/雌雄/レベル)において測定した。児動物は離乳まで毎日検査し、誕生から1、4及び21日に体重測定した。肉眼的剖検は、死亡、又は死産したすべての児動物、及び一群雄雌各5匹の離乳したての児動物について実施された。評価した繁殖パラメーターは、以下を包含した。すなわち、受胎能、妊娠期間、生児出生の数、死産、1、4及び21日における生存数、離乳数、性比、児動物の平均体重、授乳指数及び肉眼的異常所見である。投与に起因する変化は、試験中に測定したいずれのパラメーターについても全く認められなかった(King, 1979b)。

2.2.5 胚毒性/催奇形性の特別な試験 (原文 p.16)

2.2.5.1 ウサギ (原文 p.16)

NZWウサギを用いて、キノキサリン-2-カルボン酸の胎児毒性又は催奇形性試験が行われた。ウサギは、一群19-20匹の4つの投与群に無作為に割り当て、妊娠7-18日に0、25、50又は100 mg/kg 体重のキノキサリン-2-カルボン酸を強制経口投与した。毒性について毎日観察し、妊娠0、3、7、9、12、15、18、21、24及び28日に体重を測定した。ウサギは28日にと殺し、黄体数、及び子宮内の生存及び死亡した着床数と位置を記録した。全ての胎児について外表奇形の有無を検査し、体重を測定した。胎児の半分は取り出し、アリザリンレッドで染色して骨格異常検査を実施した。残り半分はBouin Allen液体で固定し、連続切片法によって検査した。母動物毒性、胚毒性又は外表奇形に対する投与の影響は見られなかった(Holmes, 1976a)。

2.2.6 遺伝毒性に関する特別な試験（原文 p.16）

キノキサリン-2-カルボン酸による遺伝毒性試験の結果を表5に示した。

表5 キノキサリン-2-カルボン酸の遺伝毒性

試験系	試験対象	濃度	結果	参照
エームス試験	ネズミチフス菌	.008、.032、	陰性	Pfizer, 1975
	TA1535	.125、.5、		
	TA1537	2 mg/プレート		
	TA1538			
	TA 1535+S9	.16、.63	陰性	Pfizer, 1975
		2.5 mg/プレート		
染色体異常	ヒト	50、100	陰性	Pfizer, 1975
	リンパ球	µg/mL		
	<i>in vitro</i>			

デスオキシカルバドックス

2.2 毒性試験（原文 p.17）

2.2.3 長期/発がん性試験（原文 p.17）

2.2.3.1 ラット（原文 p.17）

デスオキシカルバドックス(カルバドックス代謝物)の発がん性を評価する長期試験が行われた。Charles River CDラット(5週齢) 400匹は、一群雄雌各50匹に分けられた。ラットは体重に従って、無作為に分配された。0、5、10及び25mg/kg 体重/日の目標投与量のデスオキシカルバドックスを継続的に混餌投与した。体重は毎週記録した。摂餌量は最初の3ヶ月は毎週、その後は毎月記録した。それに従って投与量が修正された。

投与計画は2年間であったが、高い罹病率及び死亡率のため、25 mg/kg 体重/日投与群については全てのラットから、他の2つの投与群については350日で雌雄それぞれ50%から試料を採取した。デスオキシカルバドックスの投与は、416日に完全に止めた。試験は447日後に終了した。

臨床検査は週に2度実施した。多くの投与に関連する徴候が観察された。これらは、以下を包含した。すなわち、雌雄共に乳房部位における腫瘍、小さい皮膚結節、体重減少及び多食が先行する結節を伴った肝臓の腫大であった。また、投与に関連した体重増加率の減少及び生存率の減少もみられた。

臨床化学パラメーターを評価した。デスオキシカルバドックスの投与は、血漿の酵素活性、ウレア、及びビリルビンに、投与に起因する上昇をもたらした。異常症状は、肝障害と一致していた。個体間の大きな変動の度合いや、薬物中止後の可逆性の欠如は、腫瘍の進行との相関を示唆する。投与に起因する低血糖が雌雄で認められた。血液学的パラメーターは、413日における一群雄雌各10匹のラット、及び447日における残りのラットについて評価された。投与ラットの血液学上の主要な2種の変化は、25 mg/kg 体重/日投与群における中程度の低色素性小球性貧血、10 mg/kg 体重/日投与群における軽度の貧血、及び25 mg/kg 体重/日投与群における好中球増加症であった。

全てのラットについて肉眼剖検を行った。任意の臓器の重量を測定した。全ての極めて異常な組織について組織病理学的に検査し、標準的な組織についても定常的に実施した。尿細管及びネフローゼの色素沈着の投与に起因する増加があった。腫瘍発生頻度の増加に関連する主要な病理学的所見を表6にまとめる。著者らは、デスオキシカルバドックスはラットにおける強い肝発がん性物質であり、他の腫瘍についても投与に起因する増加が認められたと結論づけた(Reinert, 1976)。

表6 ラットへのデスオキシカルバドックスの投与の後の腫瘍の発生頻度

投与群	肝癌	皮下の線維腫	血管腫	乳癌
	雄雌の合計			雌のみ
対照	0%	0%	0%	12%
5 mg/kg 体重/日	75	2	0	24%
10 mg/kg 体重/日	95	10	5	28
25 mg/kg 体重/日	100	18	47	27

2.2.5.2 遺伝毒性に関する特別な試験（原文 p.18）

デスオキシカルバドックスに関する遺伝毒性試験の結果を、表7に要約する。

表7：デスオキシカルバドックスの遺伝毒性

試験系	試験対象	濃度	結果	参照
エームス試験	TA1535	0008, .0032	陰性	Pfizer, 1975
	TA1537	0125, 0.05, .125,		
	TA1538	5, 2, 20 mg/プレート		
	TA1535+S9	0125, .05, .2, 1 5 mL/プレート		
エームス試験	TA1535	032,.25,.4,.5	陰性	Pfizer, 1975
	TA1537	mL/plate 血漿;		
	TA1538	032,.25. .5 mL/プレート 尿 ¹		
宿主経路試験	TA1950	500 mg/kg 急性	陰性	Pfizer, 1975
染色体損傷	ヒトリンパ球 ラット骨髓	200 µg/mL	陰性	Pfizer, 1975
		200 mg/kg 急性	陰性	Pfizer, 1975
		又は、100 mg/kg 5日	陽性	Pfizer, 1975
		10 mg 又は 25 mg/kg 9ヶ月 混餌		
マウスの 宿主経路試験	TA1950	400 or 500 mg/kg	陰性	Pfizer, 1975
ラットの 宿主経路試験	TA1950	前31日の100 mg /kg/日 を伴う300 mg/kg	陰性	Pfizer, 1975
	TA1535	200 mg/kg	陰性	

表7(続き)

試験システム	試験対象物	濃度	結果	参照
酵母試験	出芽酵母 D3& D4	10 mg/mL	陰性	Holmes, 1976b
宿主経路 試験(マウス)	TA1950	400 mg/kg +DMNA	陰性	Holmes, 1976b
エームス試験	TA1537	01 - 10 mg/plate	陰性	Holmes, 1976b
	TA100 TA98			
エームス試験	TA1535+/-TA100 S9(ラット)	005-2mg/プレート	陽性	Holmes, 1976b
エームス試験	TA1537+S9	005-2mg/プレート	陰性	Holmes, 1976b

	TA98			
エームス試験	TA1535+S9 由来	005-2mg/プレート		Holmes, 1976b
	ラット			
	マウス		陽性	
	ハムスター		陽性	
	イヌ		陰性	
	サル		陰性	
			陰性	
エームス試験	TA1535	カルバドックス、あるいは デスオキシカルバドックス を投与したラットの慢性試験 において任意の間隔で採取 された血漿、肝臓及び 尿における定量培養	陰性	Holmes, 1976b
細胞形質転換 試験	BALB/C Swiss 3T3	1-10 µg/mL	陽性	Holmes, 1976b

¹ 400 mg/kg 用量のデスオキシカルバドックス投与を3時間毎に投与、又は100 mg/kg/日を5日間投与したマウスやラットから得られる尿及び血漿

カルバジン酸メチル

2.2 毒性試験（原文 p.20）

2.2.3 長期/発がん性試験（原文 p.20）

2.2.3.1 ラット（原文 p.20）

カルバジン酸メチルは、カルバドックスの代謝物である。ラットを用いてカルバジン酸メチルの慢性経口毒性試験が実施された。Wistarラットを、一群雄雌各12匹に分けカルバジン酸メチル、1及び10 mg/kg 体重/日の目標投与量を21ヶ月間混餌投与した。コロニーは、対照として用いた。摂餌量は、2日ごと、体重は2～3週ごとに測定した。剖検は、すべての動物について実施した。臓器重量は、肝臓、腎臓、副腎、精巣及び甲状腺に対して測定した。肝臓、腎臓、副腎、甲状腺、精巣、卵巣、及び肉眼で腫瘍が確認できる組織について組織検査が行われた。高用量投与群の雄3匹及び雌3匹は試験終了前に死亡した。低用量投与群では試験終了前に死亡したラットは全くなかった。毒性の組織病理学的証拠及び腫瘍の増加兆候は全く報告されなかった。著者らは、1及び10 mg/kg 体重/日のカルバジン酸メチルのラットへの混餌投与は、毒性あるいは発がん頻度の増加の兆候を全く示さなかったと結論した(Rutty, 1972)。

第2の試験では、離乳期のWistarラットを一群雄雌各24匹に分割し、目標投与量0、2.5、5及び10 mg/kg 体重/日のカルバジン酸メチルを710日間混餌投与した。体重は毎週、摂餌量は最初の3ヶ月は毎週、それ以降は毎月測定した。薬物濃度はそれに従い調節した。臨床検査は毎週行った。臨床化学検査の血液検体は、最終と殺及び瀕死動物から得た。また、これらの検体、及び12ヶ月の6匹の検体について、血液学的検査を実施した。ラットは710日でと殺し、剖検を行った。また、12ヶ月では中間と殺も実施した。瀕死及び死亡したラットも、すべて肉眼剖検を受けた。組織病理学検査は、すべての重大な病変及び以下の臓器について実施した:肝臓、脳下垂体、甲状腺、上皮小体、副腎、肺、腎臓、膀胱、卵巣、及び精巣。

本試験で評価したいずれのパラメーターについても、投与に起因する影響は全く見られなかった。全群において、広範囲に慢性呼吸器疾患の組織学的証拠がみられた。カルバジン酸メチルを2年間ラットに混餌投与した場合、有害作用は全く及ぼさないと結論された(Ferrando, 1980)。

2.2.5 遺伝毒性に関する特別な試験（原文 p.21）

カルバジン酸メチルに関する遺伝毒性試験の結果は、表8に要約される。

表8：カルバジン酸メチルに関する遺伝毒性試験

試験系	試験対象	濃度	結果	参照
エームス試験	TA1535	.0005、.002	陰性	Pfizer, 1975
	TA1537	.008、.032、		
	TA1538	.125、0.5、2、5 mg/プレート		
	TA1535+S9	.0125、.05、.2 1、5、10 mg/プレート		
宿主経由試験	TA1950	50、100、300 mg/kg	不明瞭	Pfizer, 1975
染色体 損傷試験	ヒト リンパ球 <i>in vitro</i>	50、100 μg/mL	陰性	Pfizer, 1975
エームス試験	TA1535+S9	0.5～10 mg/プレート	陰性	Holmes, 1976b

ヒドラジン

2.1 生化学的側面（原文 p.22）

2.1.1 吸収、分布、代謝、及び排泄（原文 p.22）

ウサギを用いてヒドラジンのトキシコキネティクスパラメータが測定された。ウサギに、12 mg/kg 体重がボーラス投与された。一群5羽のウサギを用い、1-コンパートメントモデル及びヒドラジンの分光光度法血清分析を使用して、パラメーターが導かれた。血清半減期は2.3時間であり、分布容積は0.63 L/kg であった(Keller et al., 1981)。

¹⁵N-標識ヒドラジン又は分光学的方法を使用し、ラットにおけるヒドラジンの代謝、分布及び排泄試験が行われた。¹⁵N標識の約15%はN₂として検出された。注入されたヒドラジンの約20%及び30%は、それぞれアセチル化代謝物及びヒドラジンとして尿から回収された。2-コンパートメントモデルを用いた測定では、血中半減期は、ヒドラジン排泄の大半は0.74時間、及びより遅く、より小さい排泄成分は26.9時間であった(Dost et al., 1981)。

2.1.3 酵素及びその他生化学的パラメーターの効果（原文 p.22）

Sprague-Dawley ラットを用い、ヒドラジンに誘導される短期的な生化学的パラメーター変化をヒドラジンの経口投与により試験した。一群5匹のラットにヒドラジン(0-200 mg/kg 体重)を投与した。一部のラットには、ヒドラジンによる肝作用をより明確にするため、ピルビン酸アジン、フェノバルビタール、ピペロニルブトキシド又はマレイン酸ジエチルを投与した。ヒドラジンは、投与に起因する肝臓トリグリセリド及び肝臓重量の上昇、及び肝臓グルタチオンの減少を引き起こした。毒性に対する閾値は約10 mg/kg 体重であった。肝臓重量及びグルタチオン変化は30分以内に明白であったが、中性脂肪変化は4時間後においても表れなかった。フェノバルビタールの前処理により毒性は軽減されたが、ピペロニルブトキシドの前処理により毒性が増大したことから、肝毒性が親化合物によるものであり、代謝物ではないことが示唆された。肝臓グルタチオンの枯渇は肝毒性に影響を与えず、ピルビン酸アジン(酸化代謝物と予想される)を用いた試験もさらにこの結論を裏付けた(Timbrell, et al., 1982)。

Sprague-Dawley ラットにヒドラジンの経口投与を行い、ヒドラジンに誘導される短期的な組織学的変化及び微細構造変化を試験した。ラットの5群は、ヒドラジンを投与された(0-200 mg/kg 体重)。一部のラットには、ヒドラジンの肝作用をより明らかにするために、ピルビン酸アジン、フェノバルビタール、ピペロニルブトキシド、又はマレイン酸ジエチルを投与した。20 mg/kg投与群では、脂質の蓄積、ミトコンドリア腫大、さらに門脈域周囲及び中間体肝細胞の微小体の出現を引き起こした。脂肪滴の蓄積及びミトコンドリアの腫大は、投与30分後、電子顕微鏡によって確認された。ピペロニルブトキシド又はフェノバルビタール投与により、肝脂肪がそれぞれ増加又は減少したが、ピルビン酸アジンのこの効果の誘導作用は、ヒドラジンに比べてより弱かった(Scales & Timbrell, 1982)。

2.2 毒性試験 (原文 p.23)

2.2.3 長期発がん性試験 (原文 p.23)

2.2.3.1 マウス (原文 p.23)

Balb/c雌マウスを用いた、1.13 mg/日のヒドラジン硫酸塩の46週間経口投与試験では、肺腫瘍が100%発生した(Biancifiori&Ribacchi, 1962)。

別の試験では、スイスマウス25匹の雌にヒドラジンを0.25 mg/日で5日/週、40週間強制経口投与した。マウス85匹を対照として用いた。この投与計画では、投与群のマウスにおいて肺腫瘍の発生頻度が46%であったのに対し、対照群は10%であった(Roe et al., 1967)。

CBA/Cb/Seマウスを用いて、ヒドラジン硫酸の36週間強制経口投与試験を実施した。雄雌各21匹の8週齢のラットに、1.13 mg/日を投与した。投与ラットの肺腫瘍発生率は、雄で76%及び雌で90%であったが、対照群は3%であった。肝癌は、ヒドラジン投与した雄の62%及び雌の71%であったが、対照群の雄は11%及び雌で4%だった(Severi & Biancifiori 1968)。

マウスを用いた別の試験では、8週齢のCBAマウスを一群雄雌各40-59匹に分けた。ヒドラジン硫酸塩の45、22、11、5.6及び0 mg/kg 体重/日を150日間毎日、強制経口投与した。マウスは、自然死、又は瀕死状態で行われたと殺時に検査された。肝癌発生頻度は、対照群の雄マウスは10%を示したが、雌は3.4%であった。肝癌頻度は、投与群の雄は45、22、11及び5.6mg/kg 体重/日群でそれぞれ60、48、28及び3.8%であった。投与群の雌の肝癌頻度は、それぞれ62.5、66.6、8及び0%であった。著者は、投与群における多くの肺腫瘍を報告したが、発生率は示されなかった(Biancifiori, 1970)。

2.2.3.2 ハムスター (原文 p.24)

ゴールデンハムスターの8週齢を、23匹、35匹、及び56匹の3群に分け、それぞれヒドラジン硫酸3.0 mgを15週間60回、2.8 mgを20週間100回挿管投与、及びヒドラジン無しにより試験を行った。肝傷害の報告には以下が含まれた:線維症、網内系細胞増殖、及び胆汁管増殖。肝傷害は、投与群ハムスターの60-80%で認められたが、対照群には認められなかった。肝腫瘍は報告されなかった(Biancifiori, 1970)。

ハムスターを用いた2.3 mg/日の生涯投与による追加の慢性試験で、陰性の腫瘍形成結果が得られた。この試験では、ハムスター9週齢雄雌各50匹に生涯に渡りヒドラジンを飲水投与した (Toth, 1972)。

2.2.3.3 ラット (原文 p.24)

上述のCb/Seラットの8週齢を用いた試験と共同で、慢性経口投与試験を実施した。ラット雄14匹にヒドラジン硫酸水溶液18 mgを、ラット雌18匹に12 mgを、68週間毎日胃管を通じて投与した。投与された雄と雌のラットのそれぞれ21及び27%に肺腫瘍がみられた。雄28匹及び雌22匹の対照群は、肺腫瘍は全く認められなかった。肝腫瘍は、雌ラット又は対照群では全く認められなかったが、雄の30%に見られた(Severi & Biancifiori, 1968)。

2.2.7.5 遺伝毒性に関する特別な試験

ヒドラジンによる遺伝毒性試験の結果は、表9に要約する。

表9 :ヒドラジンによる遺伝毒性試験

試験系	試験対象	濃度	結果	参照
細菌	E. 大腸菌WP2 uvr A trp	0.5 - 2.0 μ mole	陽性	vonWright & Tikkanen, 1980
マウス リンパ腫細胞 エームス試験	L5178Y ネズミチフス菌	0.1 - 5 mmole	陽性 陽性	Rogers & Back, 1981年 Ames, 1971

2.3. ヒトにおける観察（原文 p.25）

利用可能な情報はない

3. コメント（原文 p.25）

委員会は、短期、長期及び「リレー」毒性試験、さらにカルバドックスを伴う発がん性、変異原性及び繁殖試験のデータ及びその代謝物の変異原性及び長期毒性試験のデータを併せて検討した。

ラット、豚及びサルを用いて、側鎖のフェニル環又はカルボニル基を標識した¹⁴Cカルバドックスによるカルバドックスの代謝が検討された。カルバドックスの代謝は、N-オキシド群の速やかな還元、及びメチルカルバジド酸側鎖の切断及び呼気CO₂の遊離に特徴があった。尿中の一次代謝物はキノキサリン-2-カルボン酸で、結合体としても排出された。投与中止後24 時間までの組織中において検出可能な残留物は、カルバドックス、デスオキシカルバドックス、キノキサリン-1,4-ジ-N-オキシド-2-カルボキサルデヒド及びキノキサリン-2-カルボン酸であった。ヒドラジン少量の代謝物であったが、更なる代謝の前の短時間でのみ存在すると予想される。

組織中のカルバドックス及びデスオキシカルバドックスの濃度は速やかに減少し（半減期約6 時間）、3日後には5 µg/kg未満であった。豚を用いてカルボニル基を標識した¹⁴Cカルバドックスを強制経口投与した試験では、休薬期間5日目の肝臓中の総残留物濃度は、0.12mg/kgメチルカルバジド酸当量に相当した。しかしながら、この放射能のうちのいくらかは、¹⁴Cカルバジド酸が豚に投与された際に取り込まれた¹⁴CO₂により標識されたアミノ酸の存在によるもので、休薬期間7日以上肝臓において、極めて低濃度の未同定代謝物が残留した。これらの残留物は部分的に放出され、肝臓のアルカリ消化によって部分的にキノキサリン-2-カルボン酸に変換された。

委員会はカルバドックスが豚の副腎機能に与える影響に関する近年の報告書も見直したが、その情報は評価に影響を及ぼさなかった。

ラットを用いたいくつかの長期混餌投与試験では、1.0 mg/kg 体重/日を上回るカルバドックスの投与を行った場合の良性及び悪性肝臓腫瘍の発生頻度の投与に起因する増加を評価した。25mg/kg 体重/日以上投与群では、長期投与を妨げるような明らかな毒性作用を及ぼした。また、多様な哺乳類及び哺乳類以外の遺伝毒性試験データを見直した。実施された15試験のうち14で陽性所見が報告された。委員会は、カルバドックスは遺伝毒性と発がん性の両方を示すと結論した。

委員会は、豚に200 mg/kgまでのカルバドックスを30日間混餌投与し、休薬期間0の時点ですべて殺して、その肝臓を10%混ぜた餌をラットに2年間与えた「リレー」毒性試験を評価した。本試験は納得のいく実施がされ、投与に起因する影響は報告されなかったが、試験動物数の理由、及びこの種の試験でにおいてラットは僅かな残留物しか摂餌できなかったことを理由に、委員会ではカルバドックス残留物の発がん性評価に使用しなかつ

た。

ラットを用いた長期試験では、デスオキシカルバドックスは腫瘍発生頻度を増加させることが報告された。デスオキシカルバドックス25 mg/kg 体重を10ヶ月間毎日混餌投与されたラットでは、全てに肝腫瘍が発生した。腫瘍発生頻度は、5・25 mg/kg 体重/日投与の全群で増加した。腫瘍発生頻度では、最も著明な変化が生じたのは肝臓であったが、皮膚及び乳房を含めた他の部位でも増加した。

デスオキシカルバドックスの変異原性潜在性が試験の範囲内で検討された。デスオキシカルバドックスはほとんどの変異原性試験結果において陰性であった一方、細胞形質転換試験、及びポリ塩化ビフェニル投与ラットの肝ミクロソームを用いたエームス試験では、陽性所見が認められたことが、委員会では指摘された。デスオキシカルバドックスの変異原性潜在性は親化合物より大きいと考えられるため、委員会は、デスオキシカルバドックスはおそらくラットにおけるカルバドックスの発がん活性に有意に寄与しているであろうと言及した。しかし委員会は、カルバドックスの代謝データから、デスオキシカルバドックスはカルバドックスとキノキサリン-2-カルボン酸の間の比較的に短寿命な中間体であるという結論を裏付けることも指摘した。

委員会は、カルバドックス側鎖の代謝物であるカルバジン酸メチルに関する情報も検討した。この情報は、ラットを用いた2つの長期試験及び多くの変異原性試験の結果から成っていた。より有用な長期試験(ここでは投与群あたりより多い動物数、及び平行対照群が用いられた)では、ラットにカルバジン酸メチルの混餌投与を710日間行なわれた。試験の最高用量群である10 mg/kg 体重/日群においては、腫瘍発生頻度の増加や、その他の投与に起因する影響はみられなかった。影響が認められなかったことから、この試験の有用性が限定された。この試験のNOELは、10 mg/kg 体重/日であった。有用な変異原性試験では陰性であったと報告された。

委員会は、ヒドラジンの薬物動態、変異原性及び発がん性試験の結果も検討した。ヒドラジンの既知の化学反応と同様に、ラット及びウサギを用いた薬物動態データから、ヒドラジンが速やかに排泄されることが示唆された。カルバドックスの構造とその既知の代謝経路から、ヒドラジンがおそらくカルバジン酸メチルの更なる代謝物であろうことが示される。ヒドラジンは変異原性及び発がん性の可能性を示した。

委員は、カルバドックス残留物の潜在毒性評価において、カルバドックス代謝物のキノキサリン-2-カルボン酸に関する毒性データが有用であるとみなした。キノキサリン-2-カルボン酸を19ヶ月間混餌投与したマウスにおける発がん性試験では、投与による腫瘍発生頻度の増加、あるいはその他の動物への影響は報告されなかった。NOELは100 mg/kg 体重/日であった。

ラットを用いてキノキサリン-2-カルボン酸投与による24ヶ月間慢性毒性及び発がん性試験がいくつか実施された。腫瘍発生頻度に対する影響は全くみられず、唯一の所見は100 mg/kg 体重/日投与群における体重増加の軽度な抑制であった。NOELは50 mg/kg 体重/日であった。

ラットを用いた3世代繁殖試験では、キノキサリン-2-カルボン酸を100 mg/kg 体重/日まで混餌投与した。

投与に関連した効果は、全く観察されなかった。ラットとウサギを用いた化合物の100 mg/kg体重/日を強制経口投与による発育試験が実施された。いずれの種においても母体毒性、胚毒性又は催奇形性の証拠は全くみられなかった。これらの試験のNOELは100 mg/kg 体重/日であった。

4. 評価（原文 p.28）

現行の試験方法では、キノキサリン-2-カルボン酸は、動物用医薬品の適正な使用に従って治療した豚の肝臓中で識別可能な唯一のカルバドックス代謝物である。しかし、肝臓中の未同定残留物の存在のため、不確実性が残る。委員会は、カルバドックス及びそのいくつかの代謝物の遺伝毒性と発がん性のため、一日摂取許容量(ADI)を設定することができなかった。

キノキサリン-2-カルボン酸の毒性試験データ、カルバドックスの代謝及び消失試験データ、及び結合残留物から遊離した化合物の特性に基づき、豚におけるカルバドックス使用による残留物は許容された。但し、推奨MRLを超えないことを条件とすると、委員会は結論した。

カルバドックスの毒性試験と結果の概要（評価書：JECFA 1990）

試験の種類	供 試 動 物等	投与量	結果
急性毒性(経口)	マウス	記載なし	LD ₅₀ : 雄 2,810 mg/kg 体重、雌 > 2,810mg/kg 体重
急性毒性(腹腔内)	マウス	記載なし	LD ₅₀ : 雌 1,050 mg/kg 体重
急性毒性(経口)	ラット	記載無し	LD ₅₀ : 雄 850 mg/kg 体重
急性毒性(腹腔内)	ラット	記載無し	LD ₅₀ : 雄 810 mg/kg 体重
急性毒性(経口)	サル	25、10、5、1 mg/kg 体重/日	25、及び 10 mg/kg 体重/日の投与群の 1/3 が嘔吐
急性毒性(経口)	イヌ	25、10、5、1 mg/kg 体重/日	すべての用量で嘔吐
2 年間慢性毒性/発癌性	ラット	100、50、25、10、5、2.5、1、0 mg/kg 体重/日	NOAEL=1 mg/kg 体重/日 雌雄における結節性過形成に伴う肝障害に基づく
2 年間慢性毒性	サル	20、10、5、0 mg/kg 体重/日	NOAEL=20 mg/kg 体重/日
3 世代繁殖試験	ラット	2.5、1.0、10 mg/kg 体重/日	影響なし
遺伝毒性			表 2 に記載されている通り
リレー毒性	ラット	0、20、200 ppm を 30 日間 混餌投与した豚の肝臓 10%	組織学的変化、死亡率への影響なし
リレー毒性	イヌ	0、20、200 ppm を 30 日間 混餌投与した豚肉を、最初 5 ヶ月 100gm/日、続く 85 ヶ月 200 gm	組織学的変化、死亡率への影響なし

キノキサリン-2-カルボン酸

試験の種類	供 試 動 物等	投与量	結果
急性毒性(経口)	ラット	記載なし	LD ₅₀ : 雄 4,450 mg/kg
急性毒性(経口)	マウス	記載なし	LD ₅₀ : 雌 1,360 mg/kg
慢性経口毒性/発癌性	マウス	0、25、50、100 mg/kg 体重/日	NOAEL=100 mg/kg 体重/日
2 年間慢性経口毒性/発癌性	ラット	0、10、25、50、100 mg/kg 体重/日	NOAEL=50 mg/kg 体重/日
3 世代繁殖毒性	ラット	25、50、100 mg/kg 体重	NOAEL=100 mg/kg 体重/日

試験の種類	供 試 動 物等	投与量	結果
胚毒性/催奇形性	ウサギ	0、25、50、100 mg/kg 体重/ 日	NOAEL=100 mg/kg 体重/日
遺伝毒性			表 5 に記載されている通り

デスオキシカルバドックス

試験の種類	供 試 動 物等	投与量	結果
2 年間慢性毒性/発 癌性	ラット	0、5、10、25mg/kg 体重/日	雌雄共に乳房腫瘍、小さい皮膚結節、体重 減少、肝臓の腫大、体重増加率の減少、生 存率の減少、原形質の酵素活性、ウレア及 びビリルビン上昇 25 mg/kg 体重/日で中程度の低色素性小 球性貧血、10 mg/kg 体重/日での軽度の 貧血、及び 25 mg/kg 体重/日で好中球増 加症、尿細管及びネフローゼの色素沈着の 増加、腫瘍の増加
遺伝毒性			表 7 に記載されている通り

カルバジン酸メチル

試験の種類	供 試 動 物等	投与量	結果
2 年間慢性毒性/発 癌性	ラット	0、1、2.5、5、10 mg/kg 体 重/日	NOAEL=10 mg/kg 体重/日
遺伝毒性			表 8 に記載されている通り

ヒドラジン

試験の種類	供 試 動 物等	投与量	結果
慢性毒性/発癌性	マウス (雌)	1.13 mg/日	肺腫瘍発生率 100%
慢性毒性/発癌性	マウス (雌)	0.25 mg/日	肺腫瘍発生率 46%
慢性毒性/発癌性	マウス	1.13 mg/日	肺腫瘍発生率 雄 76%、雌 90% 肝癌 雄 62%、雌 71%

試験の種類	供 試 動 物等	投与量	結果
慢性毒性/発癌性	マウス	45、22、11、5.6 mg/kg 体重/日	肝癌 雄（用量順に）60、48、28 及び 3.8% 雌（用量順に）62.5、66.6、8 及び 0% 肺腫瘍の発生多数（発生率は不明）
慢性毒性/発癌性	マウス	0、1、2.5、5、10 mg/kg 体重/日	影響無し
慢性毒性/発癌性	ハムスター	3.0 mg 15 週間 60 回、2.8 mg 20 週間 100 回、又は 2.3 mg/日を一生涯	線維症、網内系細胞増殖、及び胆汁管増殖 投与群の 60-80%に肝障害（対照群はなし） 2.3 mg/日を生涯飲水投与すると陰性腫瘍形成
慢性毒性/発癌性	ラット	18、12 mg/ラット	雄 21%及び雌 27%に肺腫瘍 雄 30%に肝腫瘍
遺伝毒性			表 9 に記載されている通り

カルバドックス及びその代謝物のヒトにおける観察所見は報告されていない。

略称

略称	正式名称(英語)	日本語訳
CBC	Complete blood count	全血算
LD ₅₀	50% Lethal Dose	半数致死量
RBC	Red blood cell	赤血球
WBC	White blood cell	白血球
BUN	Blood urea nitrogen	血液尿素窒素
SGOT	Serum glutamic oxaloacetic transaminase	血清グルタミン酸オキザロ酢酸トランスアミナーゼ
SGPT	Serum glutamate pyruvate transaminase	血清グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level	最大無毒性量
ADI	Acceptal daily intake	1日摂取許容量
MRL	Maximum residue limit	最大残留基準値

カルバドックス 評価書和訳と情報整理

JECFA: 2003

ウェブサイト:<ftp://ftp.fao.org/ag/agn/jecfa/vetdrug/41-15-carbadox.pdf>

FNP 41/15-JECFA 60/1, 2003

カルバドックス 評価書和訳と情報整理 JECFA (2003) 目次

補遺 (原文 p.1)	64
特性 (原文 p.1)	64
序論 (原文 p.1)	64
食品中の残留とその評価 (原文 p.2)	65
使用条件 (原文 p.2)	65
これまでのカルバドックスの代謝試験 (原文 p.2)	66
残留物データ (原文 p.5)	69
カルバドックスの残留物に関する新たな情報 (原文 p.6)	70
その他の関連残留試験 (原文 p.12)	79
肝臓中の残留物の相対的消失: 消失時の評価 (原文 p.12)	79
QCA と発がん性残留物の関係 (原文 p.14)	83
分析方法 (原文 p.15)	83
評価 (原文 p.16)	85
新しい試験 (原文 p.17)	86
分析方法 (原文 p.17)	88
QCA と発がん性残留物の間の関係 (原文 p.18)	89
結論 (原文 p.18)	89
カルバドックスの毒性試験と結果の概要 (評価書: JECFA 2003)	90
略称	90

原文 目次

原文ページ

カルバドックス	1
性質	1
序論	1
食品中の残留とその評価	2
使用条件	2
これまでのカルバドックスの代謝試験	2
残留データ	5
カルバドックスの残留物に関する新たな情報	6
関連するその他の残留試験	12
肝臓中の残留物の相対的消失: 消失時の評価	12
QCA と発がん性残留物の関係	14
分析方法	15
評価	16
新しい試験	17
分析方法	17
QCA と発がん性残留物の間の関係 (原文 p.18)	18
結論	18
引用文献	18
 CARBADOX	 1
IDENTITY	1
INTRODUCTION	1
RESIDUES IN FOOD AND THEIR EVALUATION	2
Conditions of use	2
Previous studies of the metabolism of carbadox	2
Residue data	5
New information about residues of carbadox	6
Other relevant residue studies	12
Comparative Depletion of Residue in liver: estimation of depletion times	12
Relationship between QCA and carcinogenic residues	14
METHODS OF ANALYSIS	15
APPRAISAL	16
New studies	17
Methods of analysis	17
Relationship between QCA and carcinogenic residues	18
Conclusions	18

REFERENCES18

カルバドックス

第1稿は Adriana Fernández Suárez、ブエノスアイレス、アルゼンチン、Dieter Arnold、ベルリン、ドイツにより作成された。

補遺（原文 p.1）

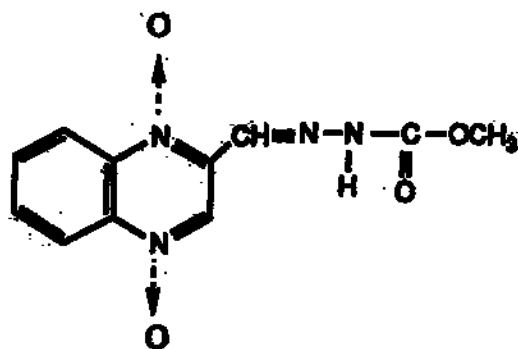
第 36 回委員会総会によって作成され、国際連合食糧農協機関(FAO)Food and Nutrition Paper 41/3, Rome 1991 で刊行されたカルバドックス研究論文

特性（原文 p.1）

化学名：メチル-3-(2-キノキサニルメチレン)カルバジン酸N1,N4-ジオキシド

一般的な商品名：Mecadox. Fortigro. GS-6244.Nutriton. Getroxel.

構造式：



分子式： $C_{11}H_{10}N_4O_4$

分子量： 262.2

序論（原文 p.1）

カルバドックスは、1990年(世界保健機関(WHO)1990)の第36回総会の委員会により始めて審査された。委員会は、カルバドックスの最大残留許容量に関する決議を行う際に以下の項目を検討した。：

- 委員会は、カルバドックス及びその代謝物デスオキシカルバドックスの遺伝毒性及び発がん性の特性のため、一日摂取許容量(ADI)を設定することができなかった。
- カルバドックス及びデスオキシカルバドックスは組織中で投与後最初の72時間に検出されるのみで(<5µg/kg)、休薬28日での値はごくわずかである。
- 組織中の総残留物のうち90%より多くは結合性残留物で、休薬28日では抽出できない。
- キノキサリン-2-カルボン酸酸(QCA)は、動物用医薬品の適正使用に従って投与を受けた豚の肝臓内で現行の試験法によって識別できる唯一のカルバドックス代謝物である。
- 投与後28日の豚の肝臓中の結合残留物は、消費者のリスクを示すものではないであろう。
- 消費者に対していかなる残留物リスクも与えないためには、28日の休薬期間は適切であった。
- アルカリ加水分解によって抽出されるキノキサリン-2-カルボン酸塩基は、28日の休薬後は30 µg/kg未満であった。
-
- 実用されている分析方法は、筋肉中では5 µg/kgまで、及び肝臓中では30 µg/kgまでのキノキサリン-2-カルボン酸酸の測定に利用可能である。

キノキサリン-2-カルボン酸の毒性試験、またカルバドックスの代謝及び消失試験データ、及び結合性残留物の遊離化合物の特性に基づき、委員会は、カルバドックスを使用した豚に起因する残留物は許容可能であり、推奨MRLはキノキサリン-2-カルボン酸の発現相当で豚の肝臓で30 µg/kg、筋肉で5 µg/kgと結論した。

第13回残留動物用医薬品規格部会(CCRVDF)は、と殺前に投与を中止しなかった豚組織中に、カルバドックス及びデスオキシカルバドックスが存在する可能性が残留物データから予測されるため、FAO/WHO合同食品添加物専門家総会による審査の優先度を高めることを要求した。FAO/WHO合同食品添加物専門家総会(JECFA)の事務局は要求された以下の情報を求めた：

- JECFA による以前の評価以来得られた、豚組織中の親化合物及び代謝物を検出するための分析方法を含めたすべての関連する毒性及び残留物データ

食品中の残留とその評価(原文 p.2)

使用条件 (原文 p.2)

概要

カルバドックス(GS-6244)は、成長促進作用、飼料効率向上、体重増加率の向上や、豚の赤痢及び細菌性腸炎抑制のため豚飼料に使用する抗菌性物質製剤である。商用製品は仕上げ飼料ではなく育雛及び(又は)養育飼料(grower rations)での使用が意図されている。

用量

通常55 mg/kg(50 g/ton)で仕上げ飼料に経口投与される。(米国食品医薬品局(FDA), 1998)

これまでのカルバドックスの代謝試験 (原文 p.2)

ラット、サル及び豚を用いた(¹⁴C)カルバドックスによるカルバドックスの代謝試験が実施された。側鎖のフェニル環又はカルボニル基が標識された。カルバドックスの代謝は、N-オキシド基の速やかな還元によるデスオキシカルバドックス、及びカルバジン酸メチル側鎖の切断が生じ、更にカルボキシアルデヒドと関連するカルボン酸及び呼吸CO₂の遊離が生じることに特徴がある。組織(休薬の24時間後まで)中の検出可能な残留物は、カルバドックス、デスオキシカルバドックス、キノキサリン-1,4-ジ-N-オキシド-2-カルボキサルデヒド、及びキノキサリン-2-カルボン酸(QCA)であった。QCAは、投与後24時間又はそれ以上において肝臓で検出される唯一の残留物であった。環標識カルバドックスの代謝は、図1(Pfizer, 1989a)にまとめる。

カルボニル標識カルバドックスに関する試験ではカルバジン酸メチルが生成されることが示された。ほとんどのカルバジン酸メチルは酵素で加水分解されてCO₂を生成する。肝臓中の放射能の半減期は2日で、投与後5日では0.12 mg/kg カルバジン酸メチル当量であることが、¹⁴CO₂ の取り込みにより標識したアミノ酸部分の構成から明らかになった。カルバジン酸メチルの酵素的加水分解はヒドラジンの形成を意味するが、証明するものではない。適切に標識した薬物の試験ではカルバジン酸メチル又はキノキサリン誘導体から生じた組織中残留物は測定可能であるが、放射性トレーサー法ではヒドラジンの欠如を示すことができない。しかし、ヒドラジンが少量の代謝物であり、いくつかの酵素過程でヒドラジンが分解されることが知られており、さらなる代謝の前に短時間のみ存在することが予想される。血漿中の遊離ヒドラジンは、検出限界0.1 mg/kgの試験では検出できなかった。カルボニル標識カルバドックスの代謝は、図2 (Pfizer, 1989a)にまとめる。

血漿中のピーク放射能濃度は投与後約3時間で観察され、経口吸収率が高いことが示された。カルバドックス、カルバドックスアルデヒド、デスオキシカルバドックス及びQCAは薬剤投与後数時間に血漿中に存在したが、24時間後に消失した。

投与の2/3は、24時間以内に尿中に速やかに排出され、残りは糞便中に排泄された。尿中の主要代謝物はQCAで、共役体としても排出されることが分かった。N-オキシドは尿中にみられなかった。糞便にはいくつかのQCAが含まれており、未変化カルバドックスは認められなかった。

豚における環標識カルバドックス (CS-6244) 代謝の概要

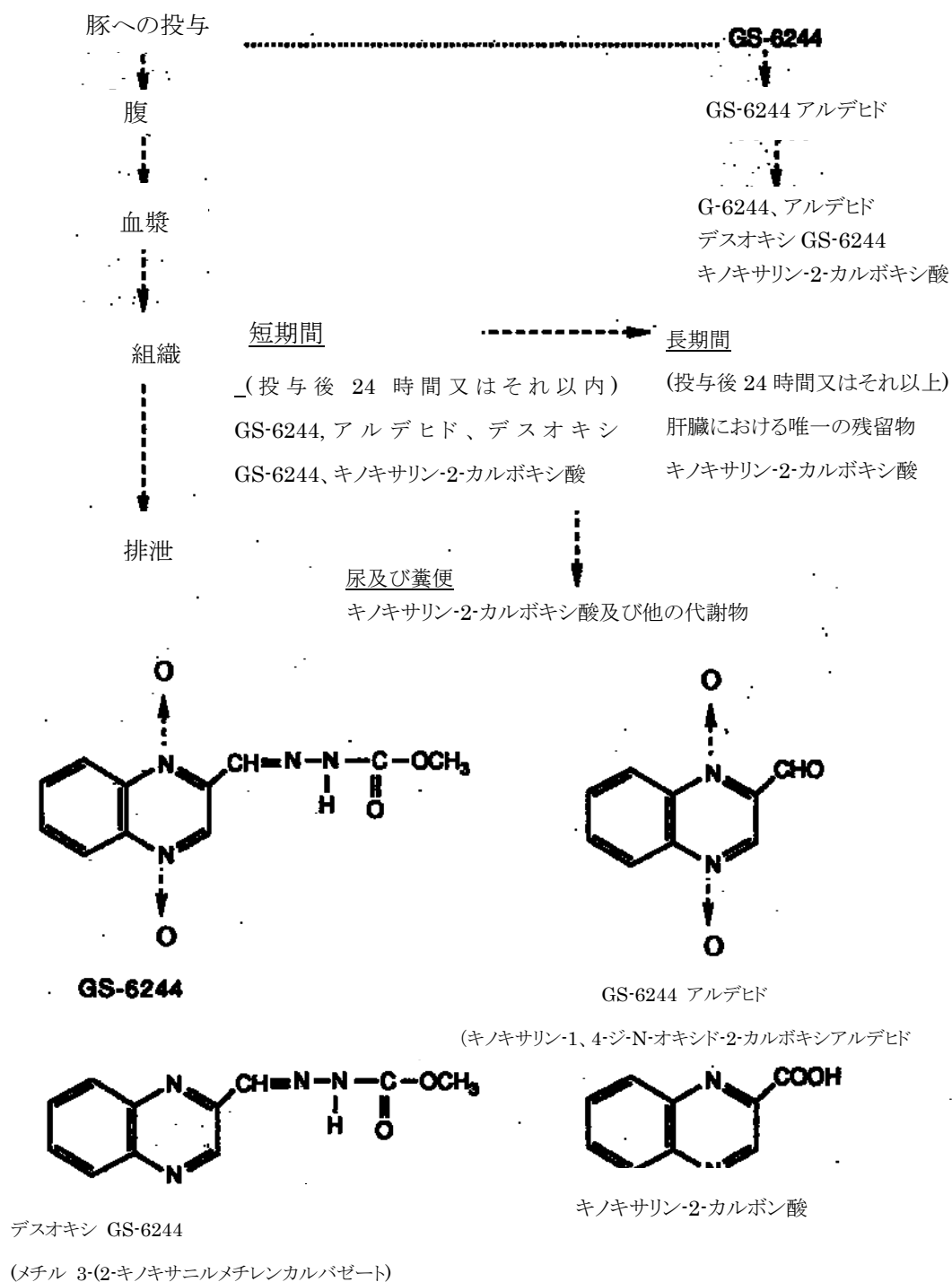
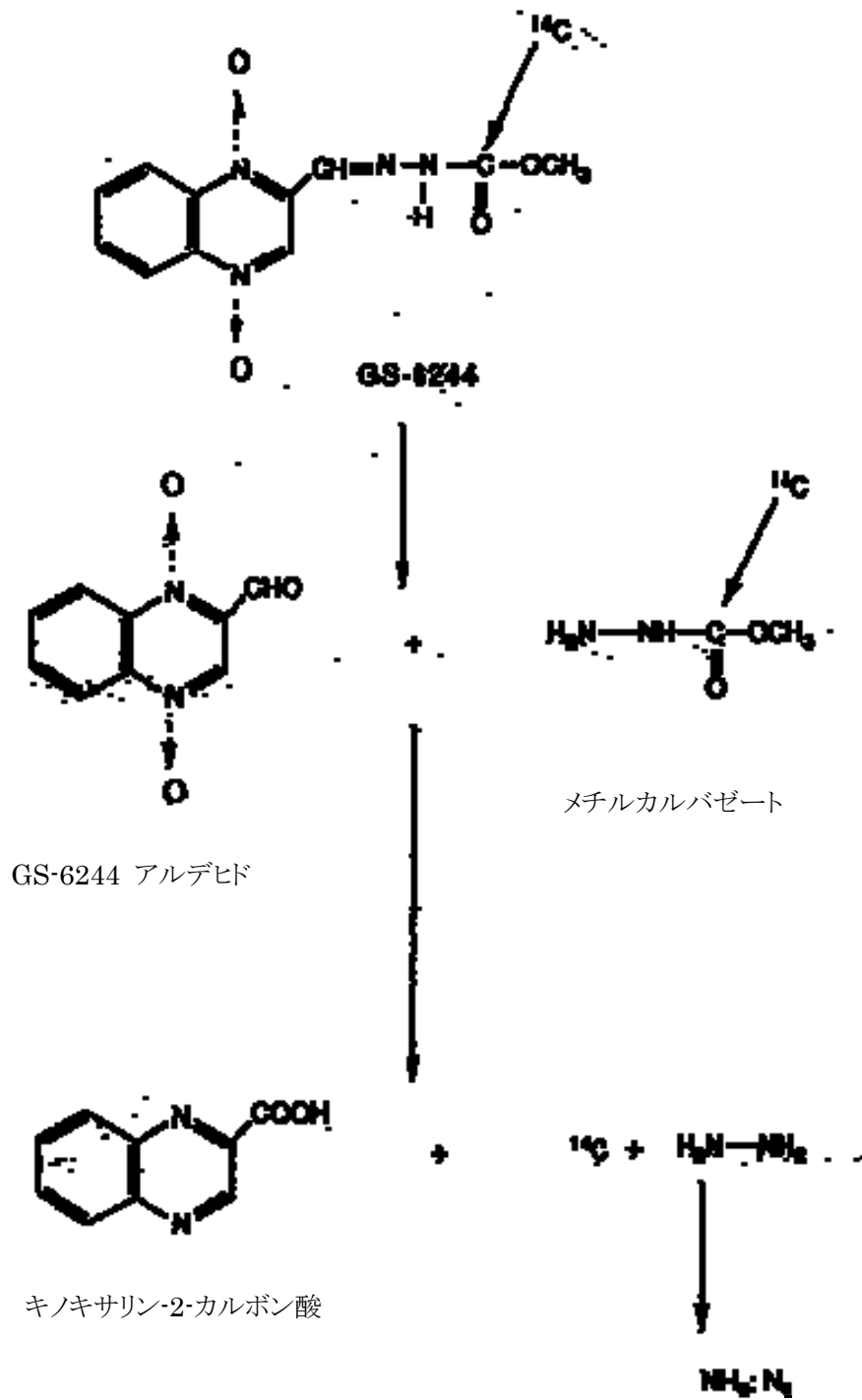


図 2

豚における ^{14}C -カルボニル標識カルバドックス代謝の概要



残留物データ（原文 p.5）

若齢豚を用い、カルバドックス含有飼料(55 mg/kg)の1週間混餌投与による液体クロマトグラフィー法(LOD 2µg/kg)を使用したカルバドックス及びデスオキシカルバドックス(MacIntosh et al., 1985)の消失試験が行われた。豚1頭の投与後72時間までの各時点における、組織中のカルバドックス及びデスオキシカルバドックスの存在が報告された。結果は表1に示す。

表1 投与した豚組織中のカルバドックス及びデスオキシカルバドックスの残留物(µg/kg) (55 mg/kg、7日)

休薬期間	カルバドックス			デスオキシカルバドックス		
	肝臓	筋肉	腎臓	肝臓	筋肉	腎臓
24時間	<2	19	<2	125	17	186
48時間	<2	<2	<2	17	9	34
72時間	<2	<2	<2	<2	<2	<2

本試験は、カルバドックスを投与した休薬期間なしの豚組織中にカルバドックス及びデスオキシカルバドックスが存在する可能性を予測した。

重要な試験(Pfizer, 1989c)では、豚10頭に55 mg/kg[¹⁴C]カルバドックス(フェニル環に均一に標識、比放射能は8.4のµCi/g)を連続5日間無制限に混餌投与し、投与後30、45及び70日にそれぞれと殺した。組織中の総残留濃度を測定した(LOD = 1µg/kg)。

表2. 投与した豚(55 mg/kg、5日^a)組織中の総残留濃度(µg/kg カルバドックス当量)

休薬期間 (日)	肝臓	腎臓	筋肉	脂肪
30	74 (50-117)	15 (10-21)	5 (3-6)	2 (1-3)
45	20 (17-21)	5 (4-6)	3 (2-4)	1
70	13 (13-14)	4 (3-4)	2 (2-3)	<1

^a括弧内の数値は得られた値の幅を参照

同様に設計された別の試験(Pfizer, 1989d)では、飼料の使用量は低く、メタノール、アセトン及びノルマルヘキサンによる連続抽出後、組織中の抽出可能な結合放射能について分析した。その結果、30及び45日休薬期間の組織中総残留物の90%超が抽出不可能であったことが示された。

組織中のカルバドックス及びデスオキシカルバドックスの濃度は速やかに低下し、3日後は5 µg/kg未満であった。休薬期間7日以上肝臓で未同定代謝物が極めて低い水準で滞留した。これらの残留物は、部分的に放出され、肝臓のアルカリ消化によってキノキサリン-2-カルボン酸に変換された。

肝組織は、アルカリ消化処理、薄層クロマトグラフィー、ガス液体クロマトグラフィー及び同位体逆希釈分析を含む方法によってQCAについて(メチルキノキサリン-2-カルボキシラートによって測定するように)分析した。残留物濃度は休薬期間30日で18.9 µg/kg、45日で5.5 µg/kg、及び70日で1.3 µg/kgにまで低下し、それぞれ総残留物の24.4%、27.5%及び9.9%に相当した。

[¹⁴C]カルバドックス(フェニル環標識)を用いて結合残留物の同定を目的とした試験が行われた。薬剤添加飼料の休薬後1週間に得られた肝臓サンプルは、酸性、中性及びアルカリ性条件下で酵素処理により抽出された。しかし抽出可能であったのは放射能の19%以下であり、主要代謝物を同定できなかった。

*in vivo*試験法による結合残留物のバイオアベイラビリティ試験では、休薬4週間の肝組織中の残留物は低レベルであったため実行不可能とみなされた。

平均体重25ポンドの豚18頭に、103ポンド体重に達するまで、47日間継続的に55 mg/kg(50 g/t)のカルバドックスを混餌投与した。この時点(休薬0日)で豚3頭をと殺し、続いて休薬7、14、21、28及び35日にそれぞれ更に3頭ずつと殺した。試験法の定量限界は30 µg/kgであった。休薬後28日の肝臓中の残留物はMRL未満であった。筋肉中では、分析したすべての時間でLOQ未満であった。結果を表3にまとめた。

表3. カルバドックス(55 mg/kg)を47日間投与した豚の組織中のQCAの値(µg/kg)

休薬期間 (日)	肝臓	腎臓	筋肉
0	345 (293-400)	210 (142-299)	<LOQ
7	168 (153-186)	<LOQ	<LOQ
14	82.6 (70-102)	<LOQ	<LOQ
21	45.6 (40-49)	<LOQ	<LOQ
28	<LOQ	<LOQ	<LOQ
35	<LOQ	<LOQ	<LOQ

括弧内の数値は得られた値の幅を参照

カルバドックスの残留物に関する新たな情報 (原文 p.6)

新たに2つの試験が実施され、豚の肝臓及び筋肉からのカルバドックスの残留消失についての新たな情報が得られた。1つは、オキシテトラサイクリン及びカルバドックスを混餌投与した豚の肝臓において休薬42日までのQCA残留物を測定した。もう1つの試験では、55 mg/kgの薬剤の混餌投与後、最初の15日間のQCA、カルバドックス及びデスオキシカルバドックス残留物を測定した。この試験では、発がん性残留物の消失に関して詳細な情報が得られた。

試験はQCAの最大残留基準値(MRL)に基づき休薬期間を設定するために行った:カルバドックス及びオキシテトラサイクリンの混合物摂餌後の豚の成獣の肝臓中のQCAの残留消失

カルバドックス及びオキシテトラサイクリンの混合物は、体重増加率向上、飼料効率向上、大腸菌及びオキシテトラサイクリンに感受性を持つ豚コレラ菌によって引き起こされる細菌性腸炎の治療、オキシテトラサイクリンに感受性を持つパスツレラ・ムルトシダによって引き起こされる細菌性肺炎の治療を目的として使用される。両製品を単回投与で使用する認可を得るためには、組織のカルバドックスマーカ―残留物の濃度がオキシテトラサイクリンの使用により許容限界以上に増加することはないということを明らかにする必要がある。

豚に、オキシテトラサイクリン880 mg/kg及びカルバドックス27.5 mg/kg(25g/t)を混餌投与した(Heird and Spires, 2002)。その他7頭にカルバドックスを28日間混餌投与し、休薬期間前の最後の14日間はオキシテトラサイクリン及びカルバドックスを添加した。最初にカルバドックスの混餌投与を始めた時の試験動物の平均体重は約63ポンドであった。休薬期間開始時の平均体重は119ポンドで、最後の動物群をと殺した時は203ポンドに上昇していた。

7つの異なる時間にそれぞれ5頭をと殺した。第36回FAO/WHO合同食品添加物専門家総会(JECFA)によって推奨されるMRLに基づいた休薬期間の規制を提案するために、肝臓のQCAを分析した(Lynch and Bartolucci, 1982)。結果は、すべて回収率に対して補正した。結果は表4に示す。

表 4 27.5 mg/kg のカルバドックスを混餌投与した豚の肝臓における QCA 消失(μg/kg)

休薬期間(日)	観察した個体数	平均	標準偏差
0	5	133	74
7	5	41	9.3
14	5	28.7	11.8
21	5	6.7	3.1
28	4	3.1	0.095
35	1	2.3**	-
42	2	2.15	0.071

*カルバドックスの休薬後28日にと殺した5頭のうち1頭、42日にと殺した5頭のうち4頭はQCAがLOD(2 μg/kg)以下。LOQ=5 μg/kg

**この値は 5 頭のうち検出可能だった 1 頭のみの値

これらの結果に基づき、7、14、21及び28日間の休薬後にと殺した豚のデータをQCA消失曲線に当てはめた。最終投与から35及び42日後のデータは統計解析に使用しなかった。 $\ln[QCA]$ と時間の線形モデルは極めて有意($P < 0.0001$)であったが、線形性から程遠く適合テストが思わしくない部分では有意ではなかった($P=0.0553$)。

使用した統計法は、動物用医薬品センターガイドライン(米国食品医薬品局(FDA)、1994)により提案された方法に従っている。適合した線形モデルに基づき、かつ95%信頼性を第99パーセント母集団に統計的許容限界として設定し、肝臓においてQCA濃度が許容限界の30 $\mu\text{g/kg}$ 以下の13.1 $\mu\text{g/kg}$ となるのを保証する休薬期間を計算すると22日であった。

休薬後最初の15日間の短期残留消失について

体重100～125ポンドの豚(去勢豚雄13頭及び豚雌13頭)を用い、短期間休薬残留試験を実施した。動物に、推奨最大濃度の50 g/t (55 mg/kg)を14日間混餌投与した。休薬期間を0、3、6、9、12、24時間、2、4、7、10、及び15日とした後に、それぞれ3頭ずつと殺した。採取した組織は、筋肉、肝臓、腎臓、皮膚及び脂肪であった。カルバドックスを基本飼料に混ぜて医薬食品を調製し、十分な均質性を確保するために検証されたHPLC方法でカルバドックス濃度を分析した。

組織の未処理サンプル中のカルバドックス、デスオキシカルバドックス、及びQCAが測定された。未処理組織をUSP擬似胃液(ペプシン)と共にインキュベーションした後の全組織サンプル、USP人工腸液(パンクレアチン)と共にインキュベーションした後の全組織サンプル、及び人工消化液の処理後のサンプルの上清について、直接測定した。規定のGC-ECD方法によってQCAを測定した。カルバドックス及びデスオキシカルバドックスの残留物は、アセトニトリル抽出後にタンデム質量分析(LC/ACPI-MS/MS)による液体クロマトグラフィーにより定量的に測定した。サンプルの酵素処理後、カルバドックス、デスオキシカルバドックス及びQCAの残留物をエチルアセテート抽出した後に、LC/ACPI-MS/MSで測定した。LOQの報告は、カルバドックスで50 ng/kg、デスオキシカルバドックスで30 ng/kg及びQCAで15 $\mu\text{g/kg}$ であった。

図5及び6、及び、表5、6、7及び8に、この残留消失試験の結果を示す。肝臓中の主な残留物はQCAであり、次いでデスオキシカルバドックスであった。試料の消化酵素による前処理は組織中残留物を大幅に増大させた。特に、サンプルを抽出及び分析するの前にパンクレアチンで処理すると、発がん性デスオキシカルバドックスの値は4倍増加した。

休薬期間の早期に採取したサンプル2点を除き、筋肉中でQCAは検出されなかった。薬剤添加飼料の休薬後の最初の数時間は、筋肉中のカルバドックス及びデスオキシカルバドックス濃度に急激な減少がみられた。試験終了まで定量可能な残留物はデスオキシカルバドックスのみであった。

QCAは皮膚又は脂肪中では検出又は定量されなかった。皮膚組織中のカルバドックス残留物の値は肝臓又は

筋肉中よりも高く、デスオキシカルバドックスの値はそれらの組織中より低い。時には酵素による測定サンプル前処理により発がん性残留物の水準が増加したが、それぞれの時点でサンプル1点のみを分析した。カルバドックスは休薬10日には、全サンプルにおいて検出できず、デスオキシカルバドックスが休薬15日で定量できた唯一の残留物であった。

脂肪中の酵素処理サンプルでは、休薬期間の最初の数時間のわずかなサンプルに限り、カルバドックス及びデスオキシカルバドックスの濃度が上昇した(各時点サンプル1点のみを解析)。カルバドックスの組織中の値は時間経過で非常に変わりやすく、デスオキシカルバドックスの値は肝臓又は筋肉のものよりも低かった。カルバドックス及びデスオキシカルバドックスは休薬7日から10日では定量できなかった。

休薬0、6、12、24、48、96 時間における単一の腎臓サンプル中のカルバドックス、デスオキシカルバドックス及びQCA濃度を測定した。これらのサンプルは各時点で肝臓の最高値と一致した。休薬0時間後のカルバドックスとQCAの値は定量不可又は非常に低レベルであった。肝臓の値と比較するとデスオキシカルバドックスの値は最初の数時間で速やかに減少し、休薬96時間では424 ng/kgを下回った。

図5：55 mg/kgのカルバドックスを14日間投与した豚の肝臓中カルバドックス残留物の減少

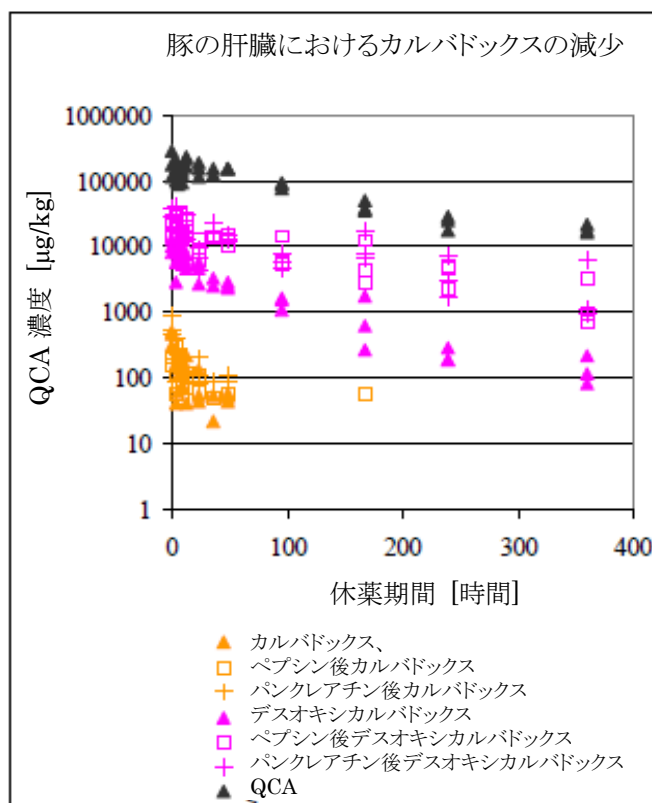


図6：55 mg/kgのカルバドックスを14日間投与した豚の筋肉中カルバドックス残留物の減少

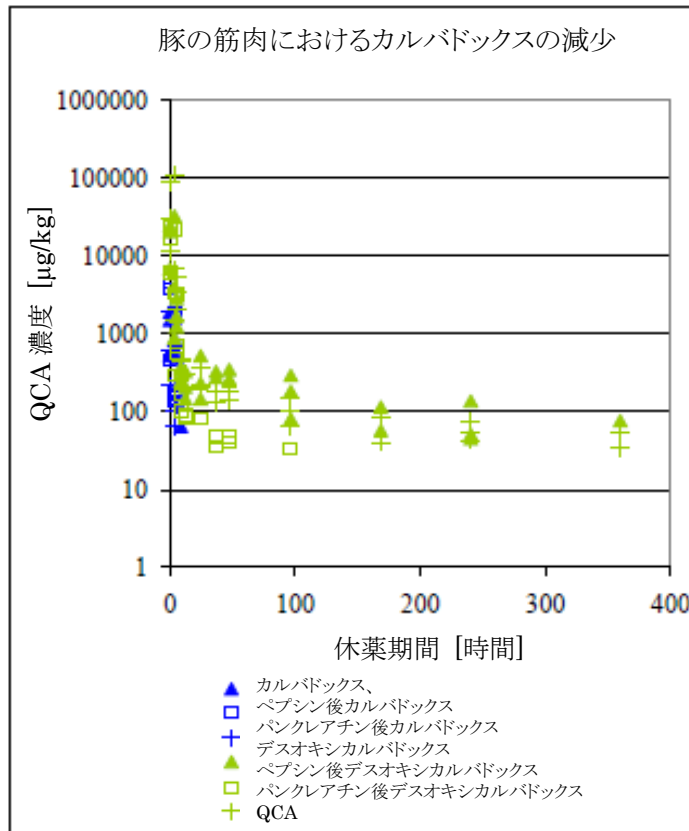


表5: 豚の肝組織、溶媒抽出物及び上清中のカルバドックス、デスオキシカルバドックス及びQCA

休薬期間	カルバドックス					デスオキシカルバドックス(ng/kg)					QCA (µg/kg)
	組織	胃液	腸液	胃の上	腸の上	組織	胃液	腸液	胃の上清	腸の上清	組織
0 hours	423 ± 82	173 ± 23	621 ± 163	150 ± 30	590 ± 5	10,506 ± 2,151	20,030 ± 4,308	34,666 ± 4,437	4,306 ± 59	11,800 ± 1,435	188 ± 69
3 hours	119 ± 56	153 ± 102	244 ± 127	99 ± 26	305 ± 187	5,510 ± 2,151	21,500 ± 5,880	32,066 ± 9,816	3,102 ± 1,714	12,106 ± 5,256	152 ± 75
6 hours	123 ± 55	153 ± 57	250 ± 30	126 ± 36	233 ± 88	7,260 ± 1,069	10,976 ± 2,137	11,246 ± 4,716	3,550 ± 665	11,233 ± 974	123 ± 32
9 hours	139 ± 47	68 ± 13	137 ± 23	53 (x)	307 ± 49	7,750 ± 1,805	14,553 ± 1,500	19,466 ± 3,350	3,586 ± 1,052	16,866 ± 2,347	119 ± 20
12 hours	128 ± 71	85 ± 12	122 ± 14	99 ± 22	252 ± 56	5,590 ± 1,160	19,166 ± 5,253	19,700 ± 7,239	3,873 ± 627	24,666 ± 1,915	201 ± 30
24 hours	77 ± 40	82 ± 22	131 ± 55	85 ± 13	226 ± 62	4,383 ± 1,294	9,066 ± 2,826	6,846 ± 1,997	3,849 ± 2,968	21,200 ± 978	150 ± 26
36 hours*	37 ± 15	50 (x)	87 (x)	NQ, ND	154 ± 50	2,970 ± 420	13,600 ± 3,000	20,700 ± 2,900	740 ± 202	1,705 ± 235	141 ± 14
48 hours	50 ± 7	57.5 ± 0.5*	93 ± 8	NQ, ND	168 ± 24	2,230 ± 256	12,933 ± 2,200	13,600 ± 1,267	690 ± 66	16,966 ± 1,144	152 ± 2
96 hours	NQ	NQ	NQ	NQ, ND	83 ± 14	1,413 ± 265	8,293 ± 3,900	6,006 ± 1,115	1359 ± 980	8,156 ± 2,642	86.0 ± 7.8
7 days	NQ	56 (x)	NQ, ND	NQ, ND	NQ, ND	875 ± 628	6,500 ± 4,280	10,390 ± 4,970	247 ± 194	203 ± 280	41.0 ± 7.2
10 days	NQ	NQ	NQ, ND	NQ, ND	NQ, ND	219 ± 48	4,067 ± 1,218	3,930 ± 2,244	82.0 ± 10.2	667 ± 198	23.0 ± 4.5
15 days	NQ	NQ, ND	NQ, ND	NQ, ND	NQ, ND	138 ± 56	1,613 ± 1,131	2,693 ± 2,387	79.3 ± 28.7	210 ± 101	18.3 ± 2.0
Controls	NQ, ND	NQ, ND	NQ, ND	NQ, ND	NQ, ND	NQ, ND	NQ, ND	NQ, ND	NQ, ND	NQ, ND	NQ, ND

データは平均値で表示 (n=3 ± SD)。(x)一つだけ検出できた値; *2つの値のみ

LOQカルバドックス = 50 ng/kg デスオキシカルバドックス = 30 ng/kg QCA JECFA MRL = 30 µg/kg

ND=検出不可能、NQ=定量不可能、ND<NQ<LOQ

表 6: 豚の筋組織、溶媒抽出及び上清におけるカルバドックス、デスオキシカルバドックス及び QCA

休 薬 期 間	カルバドックス(ng/kg)					デスオキシカルバドックス(ng/kg)					QCA
	組織	胃液	腸液	胃 の 上清	腸の上 清	組織	胃液	腸液	胃の上清	腸の上清	組織
0 hours	1292±585	2961±1818	946 ±767	874±727*	153 ± 70*	16916 ± 7248	14751± 6635	42351±32063	6522 ±298*	21987±14302	18 (x)
3 hours	990 ± 369	732 ± 814	250 ±241	185 ±168	94 ± 40*	11989±13700	8245 ± 9188	38851±49176	3557 ±4471	1592 ± 18510	16 (x)
6 hours	491 ± 228	147 ± 17*	119 (x)	108 (x)	NQ	1881 ± 662	1452 ± 1210	3591 ± 1308	472 ± 132	3376 ± 756	ND
9 hours	64 (x)	NQ, ND	NQ, ND	NQ, ND	NQ	299 ± 55	182 ± 78	445 ± 14	234 ± 38	2283 ± 24	ND
12 hours	ND	NQ, ND	NQ, ND	NQ, ND	NQ	211 ± 72	86.5 ± 2.5	230 ± 47	136 ± 30	141 ± 37	ND
24 hours	NQ, ND	NQ, ND	NQ, ND	NQ, ND	NQ	295 ± 156	77 (x)	258 ± 69	132 ± 50	104 ± 30	ND
36 hours	NQ, ND	ND	NQ, ND	ND	NQ	295 ± 32*	42 ± 6*	152 ± 23*	ND	38 ± 2*	ND
48 hours	ND	ND	NQ, ND	ND	111 (x)	280 ± 44	41 ± 3	153 ± 20	30 (x)	39 ± 6	15 (x)
96 hours	ND	ND	NQ, ND	ND	ND	182 ± 85	33.5 ± 0.5*	103 ± 34	NQ	31 (x)	ND
7 days	ND	ND	NQ, ND	ND	NQ, ND	83 ± 28*	NQ	62.5 ± 22.5*	NQ	NQ	ND
10 days	ND	ND	NQ, ND	ND	ND	76 ± 41	NQ	56.0 ± 13.0	NQ	NQ	ND
15 days	ND	ND	NQ, ND	ND	ND	74 (x)	NQ	43.0 ± 9.0*	NQ	NQ	ND
Controls	NQ, ND	NQ, ND	NQ, ND	ND, NQ	ND, NQ	ND, NQ	ND, NQ	ND, NQ	NQ, ND	NQ, ND	ND, NQ

データは平均値で表示 (n=3±SD)。(x)一つだけ検出できた値;*2つの値のみ

LOQカルバドックス = 50 ng/kg デスオキシカルバドックス = 30 ng/kg QCA JECFA MRL = 5 µg/kg

ND=検出不可能、NQ=定量不可能、ND<NQ<LOQ

表 7: 豚の皮膚組織、溶媒抽出及び上清におけるカルバドックス、デスオキシカルバドックス及び QCA

休薬 期間	カルバドックス(ng/kg)					デスオキシカルバドックス(ng/kg)					QCA
	組織	胃液	腸液	胃の上清	腸の上清	組織	胃液	腸液	胃の上清	腸の上清	組織
0 hours	1843 ±1034	1290	382	1520	174	6560 ±2342	143	15300	127	10800	NQ
3 hours	1062 ± 640	647 ± 37	186 ±26	1320±409	303 ±102	6476 ±7594	111 ±58	11765 ±5935	57 ±20	8235 ±4465	NQ
6 hours	782 ± 277	339	150	227	167	1800 ± 652	73	2560	41	933	NQ
9 hours	1167 ± 456	95	853	736	147	1224 ±378	3440	35	43	2270	ND
12 hours	649 ± 277	210	816	756	81	538 ± 83	3420	40	37	2570	ND
24 hours	773 ± 446	172	625	907	166	732 ± 513	5540	107	93	3700	ND
36 hours	585 ± 348*	107	810	690	96	374 ± 11	2900	NQ	43	2160	ND
48 hours	145 ± 38	75	197	185	73	223 ± 101	931	39	42	613	ND
96 hours	98 ± 29*	78	610	67	53	185 ± 86	312	NQ	NQ	222	ND
7 days	NQ,ND	NQ	76	NQ	NQ	83 ± 34	253	NQ	NQ	216	ND
10 days	ND	NQ	NQ	NQ	NQ	77 ± 28	144	NQ	45	108	ND
15 days	NQ,ND	NQ	NQ	ND	NQ	58 ± 8	100	NQ	NQ	94	ND
Controls	NQ, ND	ND	NQ, ND	ND,NQ	ND,NQ	ND,NQ	ND,NQ	ND,NQ	NQ, ND	NQ, ND	ND,NQ

^aデータは平均値で表示 (n=3±SD)。^b各時点で1つのみ、36時間は2の値

(x)一つだけ検出できた値;*検出できた値は2つのみ

LOQカルバドックス = 50 ng/kg デスオキシカルバドックス = 30 ng/kg QCA JECFA MRL = 15 µg/kg

ND=検出不可能、NQ=定量不可能、ND<NQ<LOQ

表 8: 豚の脂肪組織、溶媒抽出及び上清におけるカルバドックス、デスオキシカルバドックス及び QCA

休薬期間	カルバドックス(ng/kg)					デスオキシカルバドックス(ng/kg)					QCA
	組織	胃液	腸液	胃の上清	腸の上清	組織	胃液	腸液	胃の上清	腸の上清	組織
0 hours	444 ± 371	NQ	NQ	86	NQ	7710 ± 3790	102	9210	42	6120	ND
3 hours	134 ± 77	NQ	NQ	NQ	61	5935 ± 6231	83	7780	72	10400	NQ
6 hours	526 (x)	NQ	NQ	NQ	80	1131 ± 538	313	NQ	NQ	257	ND
9 hours	456 ± 214	NQ	NQ	NQ	NQ	336 ± 81	NQ	110		118	ND
12 hours	323 ± 78	NQ	NQ	66	114	206 ± 32	NQ	70	NQ	71	ND
24 hours	1235 ± 703	NQ	NQ	137	113	159 ± 20	NQ	61	NQ	56	ND
36 hours	609 ± 65	NQ	NQ	NQ	90	93 ± 14	NQ	45	NQ	73	ND
48 hours	663 ± 319	ND	NQ	135	58	106 ± 68	NQ	41	NQ	39	ND
96 hours	353 ± 157	NQ	NQ	NQ	NQ	33 ± 2	NQ	33	NQ	NQ	ND
7 days	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	32	NQ	NQ	ND
10 days	NQ, ND	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	ND
15 days	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	ND	NQ	NQ	NQ	ND
Controls	NQ, ND	ND	NQ, ND	ND, NQ	ND, NQ	ND, NQ	ND, NQ	ND, NQ	NQ, ND	NQ, ND	ND, NQ

(^aデータは平均値で表示 (n=3±SD)。^b各時点で1つのみ、36時間は2の値

(x)一つだけ検出できた値; *検出できた値は2つのみ

LOQカルバドックス = 50 ng/kg デスオキシカルバドックス = 30 ng/kg QCA JECFA MRL = 15 µg/kg

ND=検出不可能、NQ=定量不可能、ND<NQ<LOQ

その他の関連残留試験（原文 p.12）

豚組織中カルバドックスのと殺前休薬期間42日の設定に関する情報に資する、米国食品医薬品局(US-FDA)のカルバドックスの食品栄養剤評価（NADA 041-061）。

米国食品医薬品局は、カルバドックスに対して法的に設定された休薬期間に基づいた残留試験を公表した。34頭の豚の交雑種(雌及び去勢雄各17頭)に、カルバドックス55mg/kgを混餌投与した。豚は、投与後14、21、28、35、42及び49日にと殺した。QCA残留物の分析のために各動物から筋肉及び肝臓を採取した。組織サンプルはすべて3回分析した。上述のQCAのための規定のGC-EC法(Lynch and Bartolucci, 1982)を使用しQCAの残留物を測定した。この方法の定量限界は5 µg/kgである。結果は表9に示す。

表 9. カルバドックス 55 mg/kg を 28 日間混餌投与した豚組織における QCA 残留物(µg/kg)

休薬期間(日)	個体数	QCA 濃度(µg/kg)	
		肝臓	筋肉
14	5	51.93 ± 15.14	<LOQ*
21	5	29.09 ± 8.20	<LOQ
28	5	17.72 ± 4.72	<LOQ
35	5	11.23 ± 1.86	<LOQ
42	3	11.16 ± 2.13	<LOQ
49	1	10.90 ± 2.35	<LOQ

LOQ 肝臓、筋肉 = 5 µg/kg; LOD 肝臓、筋肉 = 2 µg/kg

休薬期間を設定するため、肝臓残留物のみを用いた。休薬期間は、95%の信頼限界で集団の99%を含む上限許容限界を用いた減少データの統計解析に基づいた。14～49日目から肝臓の未補正残留物データを用いて、休薬期間は39.34日と計算された。このデータに基づき、休薬期間は42日と設定した。

肝臓中の残留物の相対的消失: 消失時の評価（原文 p.12）

投与した豚の組織中の残留物の消失動態について、上記の3つの試験と、第36回FAO/WHO合同食品添加物専門家総会(JECFA)の報告書に記載される2つの追加試験を比較した(Pfizer, 1989 and MacIntosh, 1985)。

多くの試験を見直し、統計的許容限界及び消失時間の線形回帰及び計算のような統計的方法を用いて、(可能な地点を)定量的に評価した。残留消失について述べるために、一般的に次式が用いられた：

$$\log_{10}C_t = \log_{10}a + b \cdot t$$

C_tを、与えられた休薬期間 *t* における残留物濃度と仮定すると、*a* は休薬期間 0 で算定される濃度であり、*b* は消失に関する速度定数である。全ての試験及び計算で *t* は時間で表した。95th又は99thパーセンタイルにおける上片側公差に対する95%と99%信頼区間の上限は、消失時間の関数としての必要な試験の選択で計算された。

肝臓中QCAの消失(図7、表10)について新たに提出された2つの試験では、投与量に2倍の差があるにも関わらず動態パラメーターが著しく類似しており、MRLまで消失する時間計算の近似(それぞれ11日及び10日)に反映されている。

その一方で、第36回総会で評価された試験のうちの1つ(Pfizer, 1989)及びFDAにより発表された試験、及び新たな短期試験、の3つの試験は、同じ投与量にも関わらず動態パラメーターに有意な差があった。これらの違いは、これら一連のデータから算出される消失時間に極めて重要な影響を与える。

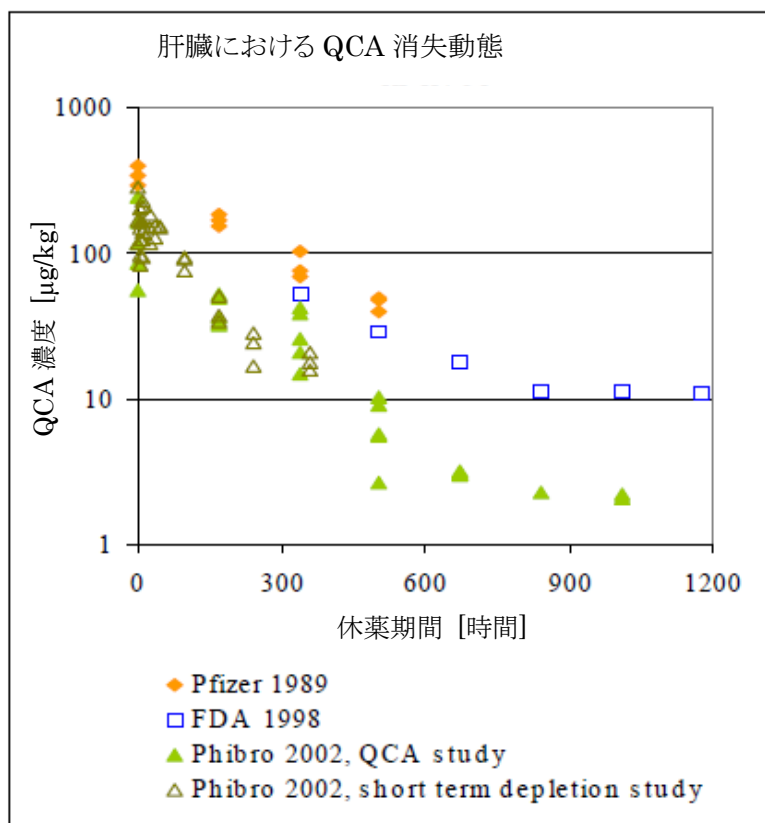
表10: 豚肝臓におけるQCA消失動態について述べた4つの異なる試験のパラメーター比較

試験	カルバドックス 濃度 (投与の mg/kg/日)	線形回帰解析のパラメーター			MRL 以下になるまでの消失時間(日)	
		<i>a</i> ⁺	<i>b</i> [時間 ⁻¹]	<i>r</i>	平均値を 基にした場合	許容限界を 基にした場合
Pfizer 1989	55/47	5.5239	-0.0018	-0.9867	25	*
FDA 1998	55/28	4.8823	-0.0008	-0.9285	21	39.3
Phibro 2002, QCA study	27.5/42	5.1488	-0.0025	-0.9419	11	21.5
Phibro 2002, short term study	55/14	5.2027	-0.0029	-0.9292	10	16.8

*a*は無次元(ppmで示した残留物容量)

*計算不可能;個々のデータポイントは発表なし

図7: 豚の肝臓中の4つの異なるQCA消失試験結果の比較



豚の肝臓及び筋肉中のデスオキシカルバドックスに対して決定された消失動態について、親カルバドックス55 mg/kg を等量投与した2つの試験においても比較した(14日間短期消失試験及びMacIntosh, 1985による7日間試験で、2番目の試験のデータポイントは2点のみ)。肝臓において得られた残留物の結果は大部分が同じであった一方、筋肉について得られた結果は大きな相違があると思われた。

表11aに、カルバドックス 55 mg/kgを投与した豚の肝臓中のカルバドックス関連残留物の短期排泄の動力学的特徴をまとめる。

表11aの値は、デスオキシカルバドックスの残留物に関連する一連のデータに対して線形回帰モデルが十分に適合することを実証している。これはカルバドックス残留データ、特にペプシン処理した組織で得られるデータにはほとんど当てはまらない。

消化酵素による処理は、カルバドックス及びデスオキシカルバドックスの両方の回収濃度が増加する。しかし、著しく影響するのはデスオキシカルバドックスの残留物のみである。パンクレアチンは、ペプシンより効果的である。

表11: 豚肝臓中のカルバドックス残留消失動態パラメーター —消化酵素による組織サンプル処理の影響

a) 線形回帰から得られたパラメーターの影響

残留物	酵素処理	消失動態のパラメーター			
		a^+	b [hour ⁻¹]	r	n
QCA	無し	5.2027	-0.0029	-0.9292	35
カルバドックス	無し	2.2418	-0.0147	-0.6489	23
	ペプシン	2.0182	-0.0026	-0.4156	19
	パンクレアチン	2.4231	-0.0120	-0.6519	22
デスオキシカルバドックス	無し	3.7876	-0.0053	-0.9464	35
	ペプシン	4.2042	-0.0029	-0.8707	35
	パンクレアチン	4.2651	-0.0029	-0.7767	35

aは無次元(pptで示した残留物容量)

b) 残留物が許容限度/濃度まで消失するのに要する時間の影響

残留物	規制限度		消失時間(投薬の休薬後の日数) 基準:						
			平均	1-α	1-γ	1-α	1-γ	1-α	1-γ
	限度の 種類	数値		95	95	99	95	99	99
QCA	MRL	30μg/kg	10.3	15.1		16.8		18.0	

図8: 肝臓中QCA濃度と肝臓及び筋肉中の発がん性残留物濃度の相関

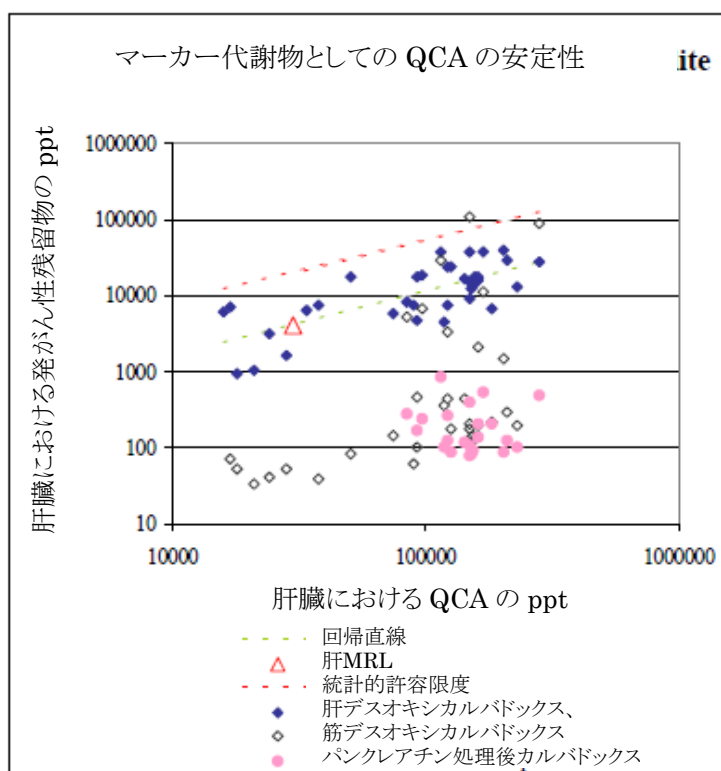


表11bは、QCAが必要とする消失時間の推定を示す。平均残留物濃度に基づき、同様に(統計的)許容限界に基づいて計算を行った。選択するパーセンタイル及び上限信頼限界については、3例検討した。((95パーセンタイルに関する95%信頼区間、95パーセンタイルに関する99%信頼区間、99パーセンタイルに関する99%信頼区間))。

QCAと発がん性残留物の関係 (原文 p.14)

標的組織である肝臓中のマーカー代謝物として提案されたQCA、及び肝臓及び筋肉中の発がん性残留物であるカルバドックスとデスオキシカルバドックスのそれぞれの濃度の関係性を明らかにするために、短期消失試験データも用いられた。肝臓中のQCA及びカルバドックスの濃度の対数の間には直線関係があるとみられる(図 8)。肝臓中のQCA及び筋肉中のデスオキシカルバドックスの関係は、限られた範囲の濃度のみ使用できる。

肝臓中のQCAの最大残留基準値(MRL)において、回帰分析により推定される肝臓中の発がん性残留物デスオキシカルバドックスの平均濃度は約4 µg/kgであった。

分析方法 (原文 p.15)

委員会が検討した3つの新しい残留試験において、2つの測定方法が使用された。GC-ECDに基づいて、第36回委員会総会において承認された(Lynch and Bartolucci, 1982)認可規定法は、2つの試験において使用された。これらの試験では、ラベルに記載された用量及びその1/2量の豚への投与に起因する残留物が測定された。この方法では、アルカリ加水分解処理により結合残留物を遊離させ、組織に存在するカルバドックス親化合物又は関連代謝物をマーカー残留物であるQCAに変換する。分析方法の原則は、次のとおりである: ホモジナイズした組織サンプルをアルカリ溶液中で加水分解し、冷却後に酸性にする。QCAは、酢酸エチルで抽出する。次にクエン酸緩衝液を使用し、有機相から再抽出する。抽出物はさらにイオン交換カラムで精製し、14%メタノールでQCAを溶出する。クロロホルムに分配した後溶媒を蒸発させ、残留物をn-プロパノール/硫酸と共に誘導体化してプロピルエステルを形成する。エステルはトルエン中に抽出し、電子捕獲ガスクロマトグラフィーを用いて測定する。平均回収率は、10 µg/kgで109.4%、及び50 µg/kgで80.9%であった。

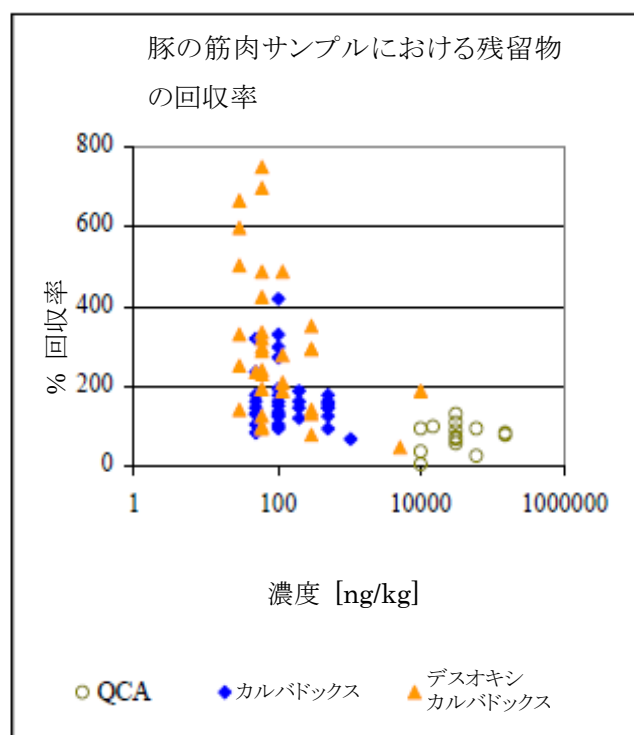
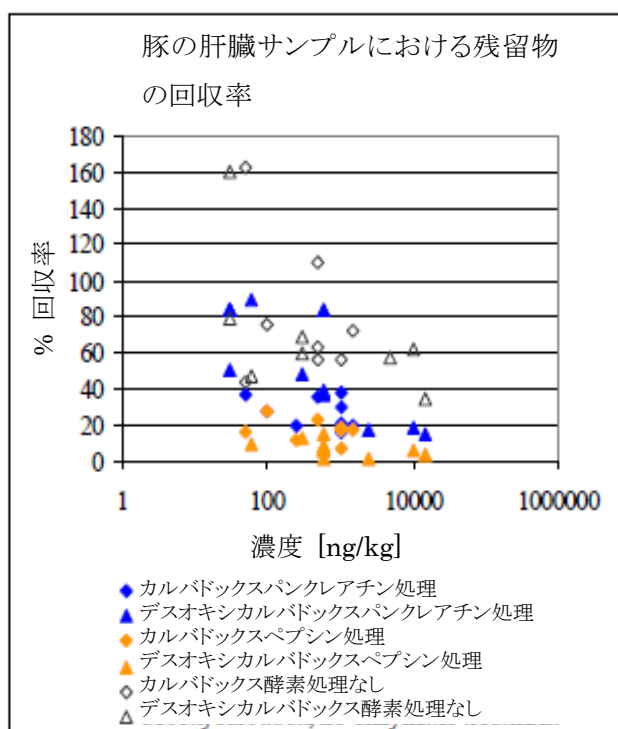
肝臓中の1/2用量の投与試験、及び肝臓と筋肉における推奨用量の投与試験ではこの手法が用いられ、LOQ 0.002 mg/kg及びLOD 0.005 mg/kgと報告されている。

組織(方法EXM-049-037)、又は全サンプル、又は人工消化液で直接処理した後に得られた上清中のカルバドックス、デスオキシカルバドックス及びQCA濃度を測定するために、液体クロマトグラフィー大気圧化学イオン化タンデム質量分析(LC/APCI-MS/MS)に基づく新しい方法が近年の試験への使用に向けて開発された。その定量は、MS/MS分析の最初の段階で親分子から形成された前駆イオンの断片化後に、MS/MS分析の第2段階で分離された生成イオンの測定に基づいている。使用される最も複雑なマトリクスを表す肝臓を用いてこの

方法が開発された。肝臓は、ドライアイス存在下で粉末状の固さに粉砕して前処理を行った。副サンプルとして1 gをアセトニトリルで抽出し、遠心後、イソオクタンで分配し、2 mLになるまで蒸発させる。最終抽出物はフェニルヘキシルカラム(150 x 4.6 mm x 3 μ m)を装備した勾配(アセトニトリル:水、14分)高感度液体クロマトグラフィー、及び大気圧エレクトロスプレーイオン化ソース(700 $^{\circ}$ C)を介する高感度トリプル四重極質量分析計に接続した25 μ Lを噴射することができる可変容積インジェクタを持つLC/MS/MSで分析した。イオン移動をもたらす前駆体について、各化合物に関してモニターし、外部標準曲線に対してプロットする。(カルバドックス質量移行 263 $\rightarrow$ 231, デスオキシカルバドックス質量移行 231 $\rightarrow$ 199)(保持時間:カルバドックス 5.55分, デスオキシカルバドックス 6.01分)

サンプルを消化液でインキュベートした場合の抽出手順は異なっている。この場合、硫酸ナトリウムを試験サンプルに添加し、残留物を酢酸エチルで3回抽出した。パンクレアチン消化の場合、酢酸エチルの3回目の抽出の前にギ酸を添加した。酢酸エチルを蒸発させ、残留物をアセトニトリル中に溶解した。酵素消化の上清の残留物を測定する際は、単に液を遠心分離し、清澄な上清を直接分析に使用した。

図9(a,b): 豚の組織中の分析物の回収率



線形応答が分析範囲内で検出され、LOQは、カルバドックス 50 ng/kg、デスオキシカルバドックス 30 ng/kg、及びQCA 0.015 mg/kgと報告された。分析物の回収率は通常は試験で得られた肝臓サンプルと共に変動し、抽出前に消化酵素を用いた場合は低レベルまで低下した(図9a参照)。回収率を推定するために、2つの強化サンプルをサンプルごとに設定した同一の条件下で分析した。回収率の補正に利用できる適切な内部標準はなかった。筋肉組織を分析した時、分析物回収の変動は分析物、及びサンプルの処理に依存してさらに高くなった。数百%という異常に高い「回収」が得られた理由は、この試験では説明されなかった。結果は図9bに示す。

消化酵素で4時間インキュベーションしたカルバドックス、デスオキシカルバドックス、及びQCAの分析では、カルバドックス及びデスオキシカルバドックスをペプシン処理したサンプルは不安定であったが、パンクレアチンは両化合物においてわずかしき効果がないことが明らかになった。肝臓とインキュベートしたサンプルは、カルバドックス及びデスオキシカルバドックスのペプシン処理サンプルと同様に不安定であった。しかし、パンクレアチン処理したサンプルのデスオキシカルバドックスの減少は顕著であった。QCA濃度は、酵素処理による変化を受けなかった。結果は表12及び表13に示す。

表12: 胃液及び腸液中のカルバドックス、デスオキシカルバドックス及びQCA:回収率対時間

時間	胃液:%回収率			腸液:%回収率		
	カルバドックス	デスオキシカルバドックス	QCA	カルバドックス	デスオキシカルバドックス	QCA
0時間	18.4±12.2	33.6±10.1	98.4±6.7	61.2±5.1	94.1±12.5	31.2±13.7
4時間	4.34±3.15	0	118±15	86.0±5.9	77.6±6.2	29.1±12.6

データは平均値で表示 (n=12±SD)

各化合物において測定された最大値はそれぞれのLOQ以下

表13: 胃液及び腸液中(肝臓入り)のカルバドックス、デスオキシカルバドックス及びQCA:回収率対時間

時間	胃液:%回収率			腸液:%回収率		
	カルバドックス	デスオキシカルバドックス	QCA	カルバドックス	デスオキシカルバドックス	QCA
0時間	39.3±11.1	114±22	42.7±3.3	34.6±6.9	104±33	26.8±7.0
4時間	13.5±6.8	38.4±33.3	34.2±5.5	4.6±6.9	74.7±10.3	31.9±10.7

データは平均値で表示 (n=12±SD)

各化合物において測定された最大値はそれぞれのLOQ以下

評価 (原文 p.16)

過去の評価試験以来カルバドックスとその代謝物の遺伝毒性又は発がん性情報の関する新たなデータは全く作成されなかったため、委員会は一日摂取許容量(ADI)を再設定することができなかった。

しかし今回の総会で提出された新たな試験は豚の肝臓、筋肉、脂肪及び皮膚中のカルバドックス残留消失に関する情報を提供した。現在進行中の今後の評価に関連する試験の1つは、混餌投与中止後の最初の15日を対象とした発がん性残留物の消失に関する詳細な情報を提供する。結果は、最初の評価時に得られた情報ベースから大きく変わっている。

第36回委員会総会は、カルバドックスに対する最大残留許容量の決定に至る際に、現在では全体あるいは一

部根拠のない以下を含めた各種要因を検討した。:

- ・ 委員会はカルバドックス及びデスオキシカルバドックスが組織において検出されたのは投与後最初の72時間のみであり、休薬後28日の濃度は無視できると結論した。新たな要素は、定量限界がそれぞれカルバドックスで50 ng/kg、デスオキシカルバドックスで30 ng/kgである新しいHPLC/MS/MS法の可用性である。手法の性能改善により、カルバドックスは肝臓において48 時間までしか定量的に測ることができなかったが、デスオキシカルバドックスは試験終了である最終混餌投与後15日までの濃度が定量可能であった。

- ・ 第36回委員会総会は、組織中総残留物の90%超が休薬28日後には結合により抽出不可能であると結論した。投与28日後の豚の肝臓中の結合残留物は消費者リスクを示すことにはならないだろうということで合意された。その時利用した試験方法では、動物用医薬品の使用基準に従った投与を行った豚の肝臓内で識別できた唯一のカルバドックス代謝物はQCAであった。新たな試験方法では、消化酵素(胃液及び腸液を模倣するUSPシステム)によるサンプル処理が含まれた。これらの技術によって、肝臓組織から遊離できたデスオキシカルバドックス量は、2〜4倍増加した。これらの技術により、デスオキシカルバドックスが本試験期間の15日を超えた時間においても遊離した可能性は除外できない。

- ・ また、第36回委員会総会では、アルカリ加水分解によって抽出されるQCA量が休薬後28日で30 µg/kg未満であったと結論した。実際の分析方法では、肝臓中 30 µg/kg及び筋肉中 5 µg/kgまでの濃度のQCA測定が可能であった。委員会では、QCAの毒性試験、及びカルバドックスの代謝と消失、結合性残留物から遊離する化合物の性質に関する試験に基づいて、豚におけるカルバドックスの使用に起因する残留物を、QCA濃度として肝臓において30 µg/kg未満及び筋肉において5 µg/kg未満を条件として許容すると結論した。委員会は推奨MRLを、QCA濃度に基づきQCA換算で豚の肝臓で30 µg/kg及び筋肉とした。新たな試験では、肝臓中QCAとデスオキシカルバドックス濃度の強い相関、及びQCAが30 µg/kg未満まで消失するのに必要な時間を裏付けた一方、QCA濃度がMRLに達した時にデスオキシカルバドックスが依然として肝臓に存在することも示された。委員会が濃度の対数の線形回帰により計算した2つの代謝物濃度間の関係は、肝臓中のQCA 30 µg/kgがデスオキシカルバドックス約4 µg/kgに相当することを示した。デスオキシカルバドックス濃度に対する許容限界は、データの変動が広いため数倍高かった。それ故に、委員会が第36回総会で推奨したMRLを伴うコンプライアンスにおいて、QCAは肝臓中のカルバドックスの発がん性代謝物のモニタリングに適切なマーカーではなく、発がん性残留物が存在しないとは保証されない。また、QCAは筋肉中に発がん性残留物が存在しないことを保証する適切なマーカーでもない。

新しい試験 (原文 p.17)

2つの新しい試験が提出され、豚の肝臓及び筋肉中のカルバドックスの残留物の消失に関する新しい情報が提供された。1つは、カルバドックス及びオキシテトラサイクリンを混餌投与した豚の肝臓について、休薬期間後42日までQCA残留物を測定した。他方の試験は、55 mg/kgを混餌投与した後最初の15日間のQCA、カルバドックス及びデスオキシカルバドックス残留物を測定したもので、この試験は、発がん性残留物の消失に関する詳細

情報を提供した。

カルバドックス及びオキシテトラサイクリンの投与後の豚肝臓のQCA残留物の減少を測定する試験は、豚35頭にカルバドックス 28 mg/kg(25 g/t)、及びオキシテトラサイクリン 880 mg/kgを混餌投与した。豚に、28日間のカルバドックスを投与し、更に14日間オキシテトラサイクリンを投与した。5頭ずつ7回に分けてと殺し、肝臓は電子捕獲検出ガスクロマトグラフィー(GC-EC)によってQCAの分析を行った(LOQ, 5µg/kg)。平均QCA濃度は0日で130 µg/kg、7日で41 µg/kg、14日で29 µg/kg、21日で7 µg/kg、28日で3 µg/kg、35日で2 µg/kg(1つの値)及び42日で2 µg/kgであった。

休薬後最初の15日間の残留消失を試験する短期試験では、豚34頭に最大許容濃度の50g/t (55 mg/kg)を14日間混餌投与した。3頭は休薬3、6、9、12及び24 時間及び2、4、7、10及び15日後にと殺し、カルバドックス、デスオキシカルバドックス及びQCAの濃度を組織で直接、又はUSP人工胃液(ペプシン)とUSP人工腸液(パンクレアチン)と共にインキュベーションした組織サンプル全体で、又は人工消化液の処理後のサンプルの上清で測定した。QCAはGC-ECDによって測定した。カルバドックス及びデスオキシカルバドックスの残留物は、アセトニトリルによる抽出後タンデム質量分析(LC-MS/MS)による液体クロマトグラフィーにより定量的に測定された。カルバドックス、デスオキシカルバドックス及びQCAの残留物といったサンプルの酵素処理後、エチルアセタートによる抽出後LC-MS/MSで測定した。LOQの報告は、カルバドックスで50 ng/kg、デスオキシカルバドックスで30 ng/kg及びQCAで15 µg/kgであった。

この試験では、QCAが肝臓中の主要代謝物であり、次いでデスオキシカルバドックスであった。カルバドックスは肝臓では休薬後0 時間における420 ng/kgから2日における50 ng/kgまで消失し、デスオキシカルバドックスは休薬後0時間における $10\,500 \pm 2200$ ng/kg から15日における 140 ± 56 ng/kgまで消失し、QCAは、休薬後0 時間における $190\,000 \pm 69\,000$ ng/kg から15日における $18\,000 \pm 2000$ ng/kgまで消失した(結果の広範囲のにわたる変動を表すために標準偏差を含む)。

サンプルの消化液による前処理により、全組織に存在する発がん性残留物の量が増加した。肝臓において、休薬時のカルバドックスの濃度は 620 ± 160 ng/kgまで増加したが、10日後は定量不可能であった。サンプルを腸液で処理した時、デスオキシカルバドックス濃度は4倍以上増加し、休薬後15日においても大量に存在していた(休薬後0 時間で $35\,000 \pm 4400$ ng/kg、15日で 3000 ± 2400 ng/kg)。

QCAは筋組織においては休薬後0及び3 時間後に採取した2点のサンプルにのみから検出された。カルバドックス及びデスオキシカルバドックス濃度は、混餌投与における休薬後の最初の数時間に全ての筋肉サンプルで急激に減少し、休薬後12時間ではカルバドックスは検出できなかった。試験終了時(15日)に定量できた唯一の残留物はデスオキシカルバドックスであったが、微量であった(組織において74 ng/kg、腸液で処理後は43 ng/kg)。QCAは皮膚又は脂肪で検出されなかった。カルバドックスは休薬10日後の皮膚組織において検出されず、デスオキシカルバドックスは休薬15日後に定量できた唯一の残留物だが少量であった(< 100 ng/kg)。カルバドックスもデスオキシカルバドックスも休薬7日後は定量できなかった。休薬の0、6、12、24、48及び96 時間後に、肝臓の値が各時点で最高の動物から採取した腎臓1サンプルを分析した。QCAは休薬24 時間後検

出されず、カルバドックスは休薬48 時間後には全く認められなかった。デスオキシカルバドックスは休薬後の0 時間における22 000 ng/kgから96 時間における420 ng/kgまで速やかに消失した。

USAでのカルバドックス残留物に関する試験では、34頭の交雑種の豚(雌雄各17頭)に28日間55 mg/kgのカルバドックスを混餌投与した。各動物から採取した筋肉及び肝臓中のQCA残留物を規定のGC-ECD法(定量限界(LOQ), 5 µg/kg)によって測定した。筋肉中の残留物濃度はLOQを下回った。QCAの残留物濃度は、休薬後14日で52 µg/kg、21日で 29 µg/kg、28日で18 µg/kg、35日で11 µg/kg、42日で11 µg/kg及び49日で11 µg/kgであった。QCAの濃度は、休薬後28日で30 µg/kg未満であった。

分析方法 (原文 p.17)

委員会が検討した3つの新しい残留試験では2つの測定方法を使用した。ラベルに記載されている用量、及びその半量を投与した豚に由来する残留物を測定するため、2つの試験ではGC-ECDに基づき第36回委員会総会で承認された規定の方法を使用した。この方法は結合性残留物の遊離のためのアルカリ加水分解処理を伴い、組織中のいずれのカルバドックス親化合物又は関連代謝物もマーカー残留物のQCAへと変換される。半量を投与した肝臓の試験、及び推奨用量を投与した肝臓と筋肉の試験で用いられたと報告されたLOQは、0.005 mg/kgであった。この分析方法は、多くの規定研究所の中で10年以上慣例的に使用されている。

液体クロマトグラフィー大気圧化学イオン化逐次質量分析(LC/APCI-MS/MS)に基づく新しい方法は、カルバドックス、デスオキシカルバドックス、及びQCAの濃度測定に使用するため近年の試験で開発された。その方法は規定のGC-ECD法より良い特異性を示した。ここでの定量は、MS/MSの第1段階で親分子から形成された前駆イオンの断片化後、第2段階のMS/MSで生成する遊離イオンの測定に基づいている。分析範囲にわたって線形応答が見られ、報告されたLOQはカルバドックスで50 ng/kg、デスオキシカルバドックスで30 ng/kg及びQCAで0.015 mg/kgであった。報告されたLOQは精密性と回収率の必要条件を兼ね備えるために試験を実施した最も低い濃度であるため、控えめである可能性があるが、LOQは必ずしも実験的に検出し得る最低濃度を表すわけではない。この方法では肝臓、腎臓、筋肉、皮膚及び脂肪で試験され筋肉以外のすべての組織からの上記の濃度、又はそれ以上の濃度の回収率が満たされた。筋肉からの回収では、濃度<1000 ng/kgの際は400% の範囲内となり、使用される外部較正がマトリックス効果に依存して不適切であったことが示唆された。質量分光検出に基づく微量分析方法でマトリックスによる増幅が起こる可能性がある。この方法はカルバドックス及びデスオキシカルバドックスの微量濃度測定にあたって優れた機能を発揮する。この方法により、毒性に関する総残留物測定のためのGC-ECDの規定法を補足し、QCAとして測定される残留物に対する親カルバドックス及びデスオキシカルバドックスの寄与を測定することが可能になる。さらなるイオンの生成は、測定には使用されないが、確認のための追加情報を提供するであろう。確認法としてこの方法を認識するような補助的データは、評価には提供されなかった。

LC-MS/MS法は、胃腸の代表的処理と考えられる2つの酵素システムによるカルバドックス残留物含有組織の消化から得られた上清の分析のためにも開発された。酵素による4時間の消化の後、ペプシン処理するとカルバ

ドックス及びデスオキシカルバドックスはいずれも不安定であると分かったが、パンクレアチンはいずれか一方の化合物ではほとんど効果がなかった。溶液に肝臓を添加して行った消化でも、ペプシン処理後のカルバドックス及びデスオキシカルバドックスの不安定性と、パンクレアチン処理後のデスオキシカルバドックス濃度の低下が示された。QCAの回収率は、いずれの処理によっても影響を受けなかった。

QCAと発がん性残留物の間の関係（原文 p.18）

標的組織である肝臓中のマーカー代謝物QCAの濃度と、肝臓及び筋肉それぞれにおける発がん性残留物のカルバドックス及びデスオキシカルバドックス濃度の相関を明らかにするためにも、短期消失試験結果が使用された。QCA濃度の対数と肝臓中のデスオキシカルバドックスの間で良好な直線関係が認められたが、筋組織においては全く測定されなかった。回帰分析により、肝臓におけるQCA濃度30 µg/kgに対し、発がん性残留物デスオキシカルバドックスの平均濃度は約4 µg/kgと推測される。

結論（原文 p.18）

新たなデータにより、発がん性残留物(特にデスオキシカルバドックス)が親カルバドックスの消失の間に可食組織に存在することが裏付けられている。残留物が比較的長期持続することは、新しい所見である。その結果から、飼料中の最高推奨用量の55 mg/kgの投与後は、QCAは短時間で第36回委員会総会で推奨されたMRL以下まで消失する(99パーセンタイルについての95%信頼区間の上限に基づく約17日)ことが示された。

消化酵素を用いた試験では、酵素処理中に未知の遊離可能残留物の一部が破壊されるため、組織中の発がん性代謝物の実濃度はまだ確実には予測できないことが示された。そのため、酵素消化後の上清及び残りの組織で測定される総残留物は、組織中のより低い総推定値で表される。この残留物の生物学的利用可能なる画分はより少ない可能性があるが、妥当な確実性を持つ値は測定できない。

委員会は、カルバドックスのADIを割り当てることができなかったため、残留物に関する新しいデータと比較する承認基準は全くない。そのため、新しいデータに基づいて第36回委員会総会により推奨されたQCAのMRLは、肝臓での毒性に関するカルバドックスの残留物測定に裏付けられていない。

第36回委員会総会により推奨された、筋肉中のQCAのMRL 5 µg/kgは、新しいデータに裏付けられていない。デスオキシカルバドックスは15日までのすべての時間で見られたが、QCAは休薬0及び3 時間後に採取される2点のサンプルのみから検出された。そのため、QCA濃度とデスオキシカルバドックスの関係は明らかになっていない。

委員会は、新しい試験の再検討の後に、消費者に有害な健康影響を与えないカルバドックスの残留物の食品中量を決定できなかった。委員会は第36回総会において推薦されたカルバドックスの最大残留許容量を撤回することを決定した。

カルバドックスの毒性試験と結果の概要（評価書: JECFA 2003）

該当する試験なし

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
ADI	Acceptable Daily Intake	1日摂取許容量
QCA	Quinoxaline-2-carboxylic acid	キノキサリン-2-カルボン酸
MRL	Maximum Residue Limit	最大残留限界
CCRVDF	The Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs in Food	食品残留動物用医薬品部会
JECFA	FAO/WHO Joint Expert Committee on Food Additives	FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議
JMPR	Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues	FAO/WHO 合同残留農薬専門家総会
FDA	Food and Drug Administration	アメリカ食品医薬品局

カルバドックス 評価書和訳と情報整理

JECFA: 2003

ウェブサイト: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v51je05.htm>

FAS 51-JECFA 60/49, 2003

カルバドックス 評価書和訳と情報整理 JECFA(2003) 目次

1. 説明 (原文 p.1)	95
2.1 生殖毒性 (原文 p.2)	96
2.2 遺伝毒性及び発がん性 (原文 p.3)	98
3. コメント (原文 p.6)	103
4. 評価 (原文 p.7)	103
カルバドックスの毒性試験と結果の概要 (評価書:JECFA 2003)	104
略称	104

原文 目次

原文ページ

1. 説明	1
2. 生物学的データ	1
2.1 生殖毒性	2
2.2 遺伝毒性及び発がん性	3
3. コメント	6
4. 評価	7
5. 引用文献	

1. EXPLANATION	1
2. BIOLOGICAL DATA	1
2.1 Reproductive toxicity	2
2.2 Genotoxicity and carcinogenicity	3
3. COMMENTS	6
4. EVALUATION	7
5. REFERENCES	

CARBADOX(補遺)

第1稿は、*Professor Fritz R, Ungemach* により作成された。

薬理学協会, 薬学及び毒物学, 獣医学部, ライプツィヒ大学, ライプツィヒ, ドイツ

説明

生物学的データ

生殖毒性

遺伝毒性及び発がん性

コメント

評価

参照

1. 説明 (原文 p.1)

キノキサリン-1,4-ジオキシド化合物カルバドックス(メチル-3-[キノキサリニルメチレン]カルバザート-N1,N4-ジオキシド)は、豚の体重増加及び飼料効率改善のための成長促進剤、及び赤痢及び細菌性腸炎の防止と抑制のための抗菌剤として使用される。

カルバドックスは、委員会の第36回の会合で審査された(添付1, 参照 92)。当時審議会がADIを設定できなかったのは、カルバドックス及びいくつかの代謝物(デスオキシカルバドックス及びヒドラジン)の遺伝毒性がげっ歯類で認められ、発がん性があることが明らかになったからである。最終代謝物であるキノキサリン-2-カルボン酸(QCA)については、動物における発がん性又は変異原性は認められなかった。残留試験では、肝臓及び筋肉中の親化合物とその遺伝毒性代謝物が、当時利用できた解析方法の検出限界以内である2 µg/kg以下まで、72時間以内に速やかに消失することが示された(MacIntosh et al., 1985)。QCAは最も持続性の高い代謝物であり、投与72時間後の豚の可食組織において検出できる唯一の残留物であった。28日の休薬後の濃度は肝臓で<30 µg/kg、及び筋肉で5 µg/kgであり、当時使用していたアルカリ加水分解による抽出を基本とした分析方法の定量限界を示した。肝臓の結合残留物の性質について不確実性が残った。しかし、委員会は投与後28日の肝臓中の結合残留物は消費者のリスクとならないと結論した。QCAの毒性試験より得られたデータ、カ

カルバドックスの代謝及び消失、及び結合残留物から遊離する化合物の性質に基づき、審議会では、豚におけるカルバドックスの使用に起因する残留物は、QCAレベルに基づき、またQCA換算で、肝臓において0.03 mg/kg及び筋肉において0.005 mg/kgの推奨最大残留値を超えないことを条件として容認すると結論した。動物医薬品の適正実施に従ったカルバドックスの使用(豚の仕上げ飼料には使用しない、及び最低28日の休薬期間を設ける)は人の健康被害を及ぼさないと結論付けられた。

カルバドックスは、遺伝毒性及び発がん性のため、また作業者の安全性のため、1999年欧州連合において食品生産動物への使用が禁止された。カナダ保健省は、2001年にカルバドックスの販売中止要請を出した。誤用や交差汚染の報告と、より高感度でデスオキシカルバドックスを検出する解析法により、発がん性残留物が組織に存在し、十分に休薬しなかった豚の残りの組織から検出されることが示された。これらは、この薬物の安全性について深刻な懸念の原因となった(Vilim & Lambert, 2001)。

カナダ政府から要請がある場合は、食品中の動物用医薬品残留物に関するコーデックス審議会が、カルバドックスを専門審議会の第60回会議の優先リストに置き、毒性及びカルバドックス残留物とその豚組織中の代謝物に関するデータを、それらを検出したJECFAによる過去の評価試験以来生成されてきた分析法を含めて見直すよう依頼した。

2. 生物学的データ (原文 p.1)

2.1 生殖毒性 (原文 p.2)

過去の評価試験では、カルバドックスの生殖毒性と、その持続性をもつ最終代謝物であるQCAに関する試験について検討された。3世代試験では、Charles River CDラットに1世代当たり2同腹児に対して、0、1 又は 2.5 mg/kg 体重/日の目標投与量のカルバドックスを混餌投与した。生殖毒性の兆候は、最初の2世代には全く見られなかった。時折生じる対照群のパラメーターとの違いは散発性であり、投与に起因するとは考えられなかった。カルバドックスは、投与量2.5 mg/kg 体重/日まで、受胎能、授乳又は新生児に影響を与えないという結論に達した。QCAの潜在的な生殖毒性は、ラット及びウサギで試験された。ラットにおける3世代生殖毒性試験で100 mg/kg 体重/日の用量までのQCAを混餌投与したが、投与に起因する影響は全く見られなかった。NZWウサギの発生毒性試験では、妊娠7～18日目に0、25、50又は100 mg/kg 体重/日を経口投与し、母動物毒性、胎児毒性又は催奇形性の兆候は全くみられなかった。NOELは、100 mg/kg 体重/日であった。

委員会の過去の評価試験以来、ラットにおけるカルバドックスの催奇形性の試験が報告されてきた。報告は、GLPに準拠した試験は全く含まれていなかった。試験のプロトコル及び実施は、一群10匹のみであり、投与を妊娠8日前に開始しなかったという点を除いて、発生毒性試験の認可されたガイドラインに準じていた。妊娠中のSprague-Dawleyラット10匹に、妊娠8-15日目にカルバドックス水溶液の0、10、25、50又は100 mg/kg 体重用量を1日1回、強制経口投与した。母動物の体重増加を毎日観察した。動物は妊娠21日にと殺し、胎児は手術で取り出し、受精数、吸収及び生存児動物数を測定した。胎児は体重を測定し、性比、及び外表、骨格、内部の先天性異常を調べた。児動物の生存率及び黄体数は示されなかった。

母動物の体重増加率は、全投与群において投与量依存的に明らかに減少していたが、投与母動物で死亡例はなかった。投与中止後、最高用量群の動物を除いて、体重増加率は15～21日目で回復した。50 mg/kg 体重/日までの投与群では、生存児動物数に対照群との違いは無く、同腹児当たり平均13.5匹であった。胎児死亡は最高用量群で見られ、生存胎児数は同腹児あたり 2.4匹まで減少した。後期吸収は82%で、母動物5匹では完全に吸収されたのに比べ、対照群においては3.4%だった。早期吸収は投与による影響は全く報告されなかった。児動物の体重には、用量依存的な減少が見られ、投与量>25 mg/kg 体重/日投与群においては統計的に有意であった。最高用量群では、カルバドックスは先天性異常の発生頻度の有意な増加を誘発した。外表奇形を検査した24匹の胎児のうち、短い尾が11匹、屈曲尾が5匹、下顎短小が5匹、欠指が3匹、内反足が1匹及び全身性浮腫が1匹と記録された。骨格の先天性異常は主に融合脊柱で、胎児17匹のうち8匹で観察された。解剖により、胎児7匹のうち2匹の水頭症が明らかになった。胎児の性比は100 mg/kg 体重/日で影響が見られたが、統計的にそれほど有意ではなかった。

著者らは、カルバドックス投与による母動物毒性が胎児毒性及び胎児死亡を引き起こしたと結論付けた。カルバドックスは催奇形性も認められると考えられた。高用量試験における胎児の先天性異常及び重度の母動物毒性は、母動物への悪影響、及び胎児奇形や胎仔死亡につながる受胎動物への直接的影響を示唆していた。NOELは、胎児毒性で10 mg/kg 体重/日、及び催奇形性で50 mg/kg 体重/日であった。母動物毒性のNOELは、確定できなかった(Yoshimura, 2002)。

NOEL 10 mg/kg 体重/日は、ラットにおける生殖毒性試験のNOELである 2.5 mg/kg 体重/日をはるかに上回り、また以前委員会によって評価されたラットを用いた長期毒性試験(添付1、参照86及び92)で悪影響が見られた最低投与量の1又は5 mg/kg 体重/日も超えている。QCA(カルバドックス投与後の主要残留物)は、投与量100 mg/kg 体重/日の生殖毒性試験において悪影響は見られず、催奇形性は認められないと考えられた。そのため、この新しい試験結果は、生殖及び発生毒性及び、そのカルバドックスのリスク判定における総括的結論に関する委員会のこれまでの評価には影響を及ぼさない。

カルバドックスの生殖毒性試験の主な所見は、表1に要約する。

表1.カルバドックス及びキノキサリン-2-カルボン酸(QCA)の経口投与による生殖及び発生毒性の重要な試験のまとめ

種及び動物数	暴露	投与量 (mg/kg 体重/日)	NOEL (mg/kg 体重/日)	LOEL(臨界影響) (mg/kg 体重/日)	参照
生殖毒性					
ラット、 Charles River 一群雌 20匹 雄 10匹	3世代	カルバドックス: 0, 1, 2.5	2.5	投与に関連する 影響なし	付属書 1, 参照 92
ラット 一群雌雄各20匹	3世代	QCA : 25,50, 100	100	投与に関連する 影響なし	付属書1 参照 92
催奇形性					
ラット、 Sprague-Dawley, 一群10匹	妊娠8-15日 妊娠21日に と殺	カルバドックス: 0,10,25,50,100	10(胎児毒性):10(母性毒性);25 50(催奇形性)	(胎児の体重減少、 吸収増加); 100(先天性異常)	Yoshimura (2002)
ウサギ、white New Zealand, 一群19-20匹	妊娠7-18日 妊娠28日に と殺	QCA : 0,25,50,100	100	母性、胎児毒性 又は催奇形性への 投与に関連する 影響なし	付属書 1、 参照92

2.2 遺伝毒性及び発がん性（原文 p.3）

委員会は、過去の評価で、カルバドックス及び代謝物のデスオキシカルバドックス、カルバジン酸メチル及び潜在的加水分解物のヒドラジン、及びQCAに関して細菌及び哺乳動物細胞で行った遺伝毒性試験の結果を検討した。15の試験のうちの14のカルバドックスで陽性所見が得られた。デスオキシカルバドックスは多くの試験で陰性結果が得られたが、マウス細胞の細胞トランスフォーメーション、ラット骨髄の染色体異常、及びポリ塩化ビフェニル投与ラットのマイクロソーム及びネズミチフス菌での復帰突然変異で、陽性所見が報告された。ヒドラジンは、3つの変異原性試験で陽性所見が得られた。カルバジン酸メチルは、3つの試験では陰性、及び1つの試験では疑わしい結果となった。QCAの変異原性の可能性が、細菌での復帰突然変異、及びヒトリンパ球における染色体異常の2つのアッセイのみで試験され、陰性所見となった。変異原性試験の結果は、カルバドックス、デスオキシカルバドックス及びヒドラジンには遺伝毒性の可能性があるが、一方デスオキシカルバドックスの遺伝毒性の可能性は親カルバドックスよりも低いことが示されている。

委員会は、カルバドックス及びその代謝物をげっ歯類に投与したいくつかの長期試験も見直した。主な所見を表2に要約する。

表2. 第36回会合で委員会が評価したカルバドックス及びその遺伝毒性代謝物の長期毒性試験及び発がん性試験でみられた腫瘍発生頻度(添付1, 参照 92)

種、 動物数	暴露期間	投与量(mg/ kg 体重/日)	腫瘍発生頻度			
			肝臓	乳腺 (雌)	その他	
カルバドックス						
ラット、 Charles River 一群雌雄各10匹	26ヶ月	0		0%		
	26ヶ月	5		38%		
	26ヶ月	10		78%		
	18ヶ月	25		100%		
	3ヶ月	50				
	3ヶ月	100				
ラット、 Charles River, 一群雄雌各20匹					肝紫斑病	
	26.5 月	0	10%	20%	7%	
	26.5 月	1	3.5%	33%	10%	
	26.5 月	2.5	24%	64%	26%	
ラット 一群雌雄各14匹	10 ヶ月	0				
	10ヶ月	25	100%(11% 肝細胞癌)			
デスオキシカルバドックス						
ラット 一群雌雄50匹					血管腫	皮下繊維腫
	24ヶ月	0	0%	12%	0%	0%
	24ヶ月	5	75%	24%	0%	2%
	12-24ヶ月	10	95%	28%	5%	10%
	12ヶ月	25	100%	27%	47%	18%

ヒドラジン

マウス、Balb/c雌	46週	50			肺腫瘍 100%
マウス Swiss 一群雌 25匹	40週	0 12.5			肺腫瘍 10% 46%
マウス CBA/Cb/Se 一群雌雄各21匹	36週	0 50	雄 11% 雌 4% 雄 62% 雌 71%		肺腫瘍 3% 雄 76% 雌 90%
マウス、CBA 一群雄雌各 40-59匹	150日	0 5.6 11 22 45	雄/雌 10% / 3.4% 3.8% / 0% 28% / 8% 48% / 66.6% 60% / 62.5%		
ハムスター, old golden 一群23-56匹	20週	2.8 mg /動物	0%		
	15週	3 mg/動物	0%		
ハムスター, old golden 雌雄各50匹	生涯	2.3 mg /動物	0%	0%	
ラット、Cb/Sc 雄 28匹 雄 14匹 雌 22匹 雌 18匹	68週	0 18 mg/ラット 0 12 mg/ラット	0% 30% 0% 0%		肺腫瘍 0% 21% 0% 27%

ラットにおいて、カルバドックスは1 mg/kg 体重/日の用量以上の投与群で、肝臓と乳房の良性及び悪性腫瘍の発生頻度の用量依存的な増加を引き起こすことが報告された。投与量>25 mg/kg 体重/日は毒性があり、投与

は継続できなかった。投与群あたりの動物数が比較的少ないとはいえ、全ての試験の結果でカルバドックスの発がん可能性が示された。サル、ラット及びイヌにおける「リレー毒性」試験(実験動物は薬剤投与した家畜の食肉を与えられる)は、発がん性評価には適切ではなかった。ラットを用いたデスオキシカルバドックスの2つの長期投与試験では、全投与量で腫瘍発生頻度の増加が見られた。デスオキシカルバドックスは、強力な肝臓の発がん性物質というだけでなく、乳房及び皮膚を含めた他の部位において、投与量依存的に腫瘍の発生頻度を増加させた。ヒドラジンはマウスとラットで発がん性があるが、ハムスターにはないことがわかった。21又は23ヶ月間カルバジン酸メチルを10 mg/kg 体重/日投与したラット、又はQCAを100 mg/kg 体重/日混餌投与したラット又はマウスは、投与に起因する腫瘍発生頻度の増加は見られなかった。

カルバジン酸メチル及び持続性のある最終代謝物のQCAの試験の結果では、上述の通り遺伝毒性又は発がん性の兆候は見られなかった。QCAのNOELは、50 mg/kg 体重/日であった。審議会は、カルバドックス、デスオキシカルバドックス及びヒドラジンは遺伝毒性発がん物質であると結論した。デスオキシカルバドックスの発がん性は親化合物よりも大きいと考えられたため、おそらくラットにおけるカルバドックスの発がん性に顕著に貢献することも委員会は忠告した。しかし、カルバドックスの代謝試験の結果、デスオキシカルバドックスはカルバドックスとQCAの間の比較的短命な中間体であることが示唆された。げっ歯類における長期混餌投与試験で、カルバドックス、デスオキシカルバドックス又はヒドラジンのNOELは確認できなかった。カルバドックス、デスオキシカルバドックス及び潜在的代謝物ヒドラジンの遺伝毒性及び発がん性のため、審議会は、ADIの設定や、いかなる閾値のない総残留物の安全濃度の測定を行うことができなかった。

カルバドックス残留物の評価は1998年に完了しており、カルバドックスとその代謝物の残留物がもたらす可食組織中の発がん性及び消費者へのリスクに対し、改訂された許容量について成文化したものを提供した(米国食品医薬品局、1998年)。その文書は第36回会合の委員会による再検討を基にしており、カルバドックス及びその代謝物の毒性関連評価項目は遺伝毒性及び発がん性であったと述べた。遺伝毒性試験、表2にまとめた毒性及び発がん性の長期試験、及びサルにおける反復投与毒性試験が再検討された。これら試験から、「残留物なし」とされる濃度は、発がん性化合物カルバドックス、デスオキシカルバドックス及びヒドラジンの S_0 値から決定された。ヒトの摂取量を補正するために、 S_0 値は、 S_m 値に変換された。全食事において発がん性の懸念がある残留物が S_0 を超えない場合、可食組織に残る化合物は「残留物なし」と考えられる。 S_0 は、試験動物の全飼料中の試験化合物の発がん性が懸念される総残留物濃度であり、100万分の1の試験動物におけるがんの最大生涯リスク相当と定義される。カルバドックス及び各発がん性代謝物の定量投与の線形統計モデルから計算された S_0 値は、カルバドックスで106 ng/kg、デスオキシカルバドックスで61 ng/kg及びヒドラジンで11ppb($\mu\text{g/kg}$)である。デスオキシカルバドックスで得られた61 ng/kgという最も低い値は、カルバドックス残留物の S_0 と指定された。 S_m は特定の食品中の発がん性の懸念のある残留物の許容濃度である(米国食品医薬品局、1998)。

S_0 値はラット雌雄における肝腫瘍に基づき、1ヒット線形外挿法モデル(審査用、Calabrese(1983)参照)を用いて99%信頼区間で計算された。モデルで得られた結果は、99%信頼区間で S_0 は680 ng/kg、及びデスオキシカルバドックスのリスクは 10^{-6} というMantel Bryan外挿法(審査用、Calabrese(1983)参照)の予測より控えめであった(L. Friedlander, 個人的交流、2003)。 S_0 値の割り当てに関する更なる詳細情報(例えば含まれている試験など)は入手できなかったため、外挿結果を単独では確認できなかった。

発がん性の懸念がある残留物の可食組織で許容されるべき濃度を測定するためには、ヒトの全食事が食料生産動物のみに由来するわけではないことから、摂取量についての修正が行われる。ヒトの1日の総食事量を1500 gとすると、500 gまでは肉の摂取に由来していると考えられ、そのうち300 gは筋肉、100 gは肝臓、50 gは腎臓、及び50 gは脂肪で構成される。このように、表3に示すように、各可食組織の S_m は最も低いデスオキシカルバドックスの S_0 に基づいて計算される。

表3.豚の可食組織において発がん性が懸念されるカルバドックスの総残留物に対する消費量及び S_m 値の計算

組織	消費 (g)	食事全体に占める割合	S_0 (ng/kg)	S_m (ng/kg)
筋肉	300	1/5	61	305
肝臓	100	1/15	61	915
腎臓	50	1/30	61	1830
脂肪	50	1/30	61	1830

S_0 は、試験動物の総食事の中の発がん性が懸念される試験化合物の総残留物濃度で、100万分の1の試験動物におけるがんの最大生涯リスクに相当する。 S_m は、特定の食品中の発がん性が懸念される残留物の許容濃度である(米国食品医薬品局, 1998)。

再検討時、豚の筋肉及び肝臓中の S_0 及び S_m 値から発がん性が懸念されるカルバドックス残留物の測定に、規定の分析手法は全く利用できなかった。ペプシン又はパンクレアチンにより消化される豚組織中のカルバドックス残留物の試験結果、及び、より高感度の検出手法によって、休薬後15日間の試験期間に渡り、実質的には肝臓の S_m 値を越えた濃度でデスオキシカルバドックスが存在することが示された。マーカー残留物であるQCAの濃度がMRLの30 $\mu\text{g/kg}$ を下回った時、肝臓中のデスオキシカルバドックス残留濃度は規定の S_m 値を更に4～5倍上回っていた(Heird, 2002/2003)。そのため、第36回会合で委員会により推奨された肝臓のMRL 30 $\mu\text{g/kg}$ は、発がん性が懸念されるカルバドックス残留物の消失の確認には不十分である。

委員会は、食品中の動物用医薬品の残留評価に、閾値では‘実質的安全用量’を確認できなかった低用量投与において、化学物質の不可逆的作用に関する、1ヒット線形モデル又はMantel Bryanモデルのような数学的モデルを用いた推測を現在まで用いてこなかった。‘実質的安全用量’の推測に用いられるモデルは、有効性の欠如、実験系における一貫した低用量の線形性の不足、Mantel Bryanプロビット分析における傾きの任意の選択、桁違いの変異を伴う極めて低用量における膨大な多様性、薬物動態の影響に関する認識の不十分さ、ヒトの集団内の感受性の個体差の考慮の欠如などといったいくつかの根拠のもとに批判されてきた。そのようなリスクの想定はかなりの内在的不確実性を伴うが、1ヒット低用量外挿モデルは、ヒトにおける発がん性リスクの過小評価に帰着する可能性が最も少ないとされ、免疫学的試験から得られるヒトの反応速度に最も近似した適用性を示すと報告される、保守的なアプローチとされている(Calabrese, 1983)。

3. コメント (原文 p.6)

発生毒性試験では、妊娠8～15日目のラットに0、10、25、50 もしくは100 mg/kg 体重/日のカルバドックスを経口投与した。投与された母動物で死亡例はなかった。母動物の体重増加率は、全投与量において投与量依存的に明らかに減少した。最高用量投与した動物を除き、体重増加率は投与を中止することで回復した。動物は妊娠21日目にと殺され、胎児は手術で取り出した。児体重の投与量依存的な減少によって示された(それは、25 mg/kg 体重/日以上)の投与量で統計学的に有意であった)ように、カルバドックスには胚毒性及び、胎児毒性があった。50 mg/kg 体重/日以下を投与した際の生存胎児数及び母動物の吸収は、対照と変わらなかった。胚死亡は最高投与量で見られ、後期吸収は82%であり、生存児動物数の割合は対照群と比べて80%以上減少した。最高投与量では、カルバドックスは外表、骨格、内部の先天性異常をそれぞれ47%、45%及び28%誘発した。記録された異常は、短い尾、屈曲尾、下顎短小、欠趾、内反足、顕著な全身浮腫、融合椎及び水頭症であった。カルバドックスは強い母動物毒性の影響として、胚毒性及び胎児毒性をもち、ラットにおいて催奇形性と考えられた。NOELは、胚毒性では10 mg/kg 体重/日、及び催奇形性では50 mg/kg 体重/日であった。母動物毒性のNOELは確認できなかった。本試験における発生毒性のNOELが、以前に委員会によって評価されたラットの生殖毒性の試験で認められた2.5 mg/kg 体重/日のNOELをはるかに上回ったことを委員は忠告した。

カルバドックスの代謝又は遺伝毒性、又はカルバドックスとその代謝物の発がん性に関する新しい試験データは全く提出されなかった。委員会はカルバドックスと発がん性が懸念される代謝物の‘実質的安全用量’を推測した線形外挿法に基づく評価を認めた。この推測は、以前委員会によって評価されたラットの長期発がん性試験における肝腫瘍の発生頻度に基づき作成された。その評価から、可食組織中のカルバドックス及び発がん性が懸念される代謝物の残留物、及び消費者へのそれらのリスクに対する許容範囲の文書が提供された。かなりの不確実な推定が含まれているため、委員会はこのアプローチが適切とは考えなかった。

近年の豚におけるカルバドックスの残留試験結果は、休薬 15 日後の試験終了時、及びマーカー残留物 QCA の濃度が MRL の 0.03 mg/kg を下回った時において、肝臓中の発がん性代謝物デスオキシカルバドックスの成分が大量に残留していることを示唆した。

4. 評価 (原文 p.7)

本委員会は、代謝物であるデスオキシカルバドックスが15日の試験休薬期間終了時に可食組織に残存することが示された残留濃度に関する新しい情報に基づき、カルバドックスを再検討した。審議会は、これまで提出された情報から、カルバドックス及びデスオキシカルバドックスの両方を遺伝毒性作用に示される発がん物質としてみなすべきであるとした。線形外挿法がカルバドックスの‘実質的安全用量’の推定に用いられていることは認識していたが、この方法からは消費者に許容できるリスクをもたらすカルバドックスの投与量を確認できないと結論した。そのため、委員会はカルバドックスのADIを設定しなかった。

カルバドックスの毒性試験と結果の概要（評価書：JECFA 2003）

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
生殖発生毒性			表 1 に記載の通り
遺伝毒性／発がん性試験			表 2 に記載の通り
遺伝毒性／発がん性試験	マウス	記載なし	影響なし QCA の NOAEL=50 mg/kg 体重/日

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
JECFA	FAO/WHO Joint Expert Committee on Food Additives	FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議
NOEL	No Observed Effect Leve	無影響量
LOEL	Lowest Observed Effect Level	最小影響量
ADI	Acceptal daily intake	1日摂取許容量
MRL	Maximum residue limit	最大残留基準値

