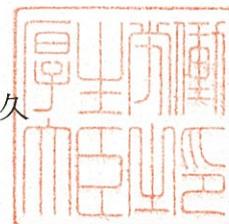


厚生労働省発食安 0907 第1号
平成 27 年 9 月 7 日

薬事・食品衛生審議会
会長 橋田 充 殿

厚生労働大臣 塩崎 恭久



諮問書

食品衛生法（昭和 22 年法律第 233 号）第 11 条第 1 項の規定に基づき、下記の事項について、貴会の意見を求めます。

記

次に掲げる農薬等の食品中の残留基準設定について

農薬アシベンゾラルー S-メチル
農薬イソキサフルトール
農薬オキサチアピプロリン
動物用医薬品クロルプロマジン
農薬シクロプロトリン
動物用医薬品ジメトリダゾール
動物用医薬品セフチオフル
農薬トリアファモン
動物用医薬品ノルフロキサシン
農薬フルオキサストロビン
農薬メトラフェノン
動物用医薬品メトロニダゾール
動物用医薬品ロニダゾール

平成 28 年 1 月 26 日

薬事・食品衛生審議会
食品衛生分科会長 岸 玲子 殿

薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会
農薬・動物用医薬品部会長 大野 泰雄

薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会
農薬・動物用医薬品部会報告について

平成 27 年 9 月 7 日付け厚生労働省発食安 0907 第 1 号をもって諮問された、食品衛生法（昭和 22 年法律第 233 号）第 11 条第 1 項の規定に基づくロニダゾールに係る食品規格（食品中の動物用医薬品の残留基準）の設定について、当部会で審議を行った結果を別添のとおり取りまとめたので、これを報告する。

ロニダゾール

今般の残留基準の検討については、食品中の農薬等のポジティブリスト制度導入時に、食品中に「不検出」とする農薬等の成分である物質として新たに定めたことの見直しについて、食品安全委員会において食品健康影響評価がなされたことを踏まえ、農薬・動物用医薬品部会において審議を行い、以下の報告を取りまとめるものである。

1. 概要

(1) 品目名：ロニダゾール [Ronidazole]

(2) 用途：寄生虫駆除剤/抗原虫剤

5-ニトロイミダゾール類に属する寄生虫駆除剤・抗原虫剤である。

海外では、動物用医薬品として、七面鳥のヒストモナス症の予防及び治療並びに豚赤痢の予防及び治療を目的に使用されると報告されていた。また、1996年以前のEMEAの評価書によれば、ハトのトリコモナス症及び牛の膣トリコモナス症の治療にも使用されると報告されていた。現在、EUではロニダゾールを最大残留基準値（MRL）が設定できない成分とし、食用動物への使用が禁止されている。

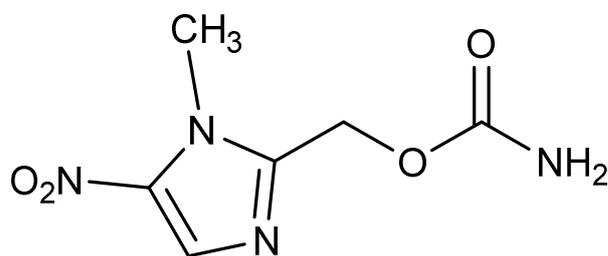
国内では、ヒト用及び動物用医薬品の承認はない。

(3) 化学名

(1-methyl-5-nitro-1*H*-imidazol-2-yl)methyl carbamate (IUPAC)

1-methyl-5-nitroimidazole-2-methanol carbamate (CAS)

(4) 構造式及び物性



分子式 $C_6H_8N_4O_4$

分子量 200.15

2. ADI の評価

食品安全基本法（平成 15 年法律第 48 号）第 24 条第 2 項の規定に基づき、食品安全委員会あて意見を求めたロニダゾールに係る食品健康影響評価において、以下のとおり評価されている。

(1) JECFAにおける評価

JECFAは、1989年及び1994年の2回評価を行っている。

1989 年の評価では、慢性毒性試験及び発生毒性試験において、NOELが5 mg/kg体重/日以上であることが明らかであるとし、NOEL 5 mg/kg 体重/日及び安全係数200に基づいて、暫定的な一日摂取許容量（ADI）を0～0.025 mg/kg 体重/日と設定した。安全係数は、ほ乳動物におけるロニダゾールの遺伝毒性試験、発がん性及び他に関連する毒性影響についてのNOELを調べた最近の発がん性試験2試験の結果から選定された。これにはロニダゾールの複数の代謝物に変異原性がないことも影響している。

当時の評価において、JECFAは発がん性試験の個々の動物のデータ提出及び発がんメカニズムを調べた試験成績を1993年までに提出するよう求めた。

1994年の評価では求められたデータが提出されなかったため、JECFAは、暫定的に設定されたADIを延長せず、ADIを設定できないと判断した。

(2) EMEAにおける評価

EMEAは、2回評価を行っている。

1回目の評価では、CVMPは、復帰突然変異試験における陽性結果及び最高用量群のラットの雌における乳腺癌の増殖は除外しても、ロニダゾールを用いた数々の変異原性試験において得られた曖昧な結果に鑑み、ニトロフラン類においてみられた現実的な解決方法と同様のものをロニダゾールに採用すること並びにロニダゾール及びニトロイミダゾール構造を保持した代謝物を含む抽出可能な残留物の暫定のMRLとして2 ng/gを容認することを提案し、適用された。

この暫定MRLは2年間という期限が設けられており、マーカ代謝物の特定に関する更なる情報が求められた。しかし、暫定MRLの期間満了時に追加情報の提出はなかったため、暫定MRLの期間は1994年の1月1日に終了し、本剤はMRLが設定できない成分が掲載されるCOUNCIL REGULATAION (EEC) No 2377/90の附属書IVに収載され、使用が禁止された。

(3) 食品健康影響評価について

ロニダゾールの遺伝毒性を判断できず、発がん性が示唆されたことから、ADIを設定すべきでないと判断した。

3. 諸外国における状況

JECFAにおいて1994年に評価されているが、ADI及びMRLは設定出来ないと結論付けている。

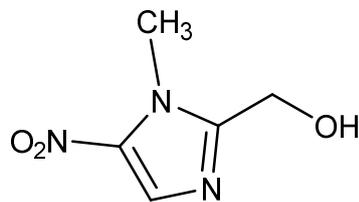
米国、カナダ、EU、豪州及びニュージーランドについて調査した結果、いずれの国及び地域においても基準値が設定されていない。

4. 基準値案

食品中に「不検出」とする農薬等の成分である物質として定める現行の管理措置を維持することとし、ロニダゾールは食品に含有されるものであってはならないものとする。

規制対象物質はロニダゾール及び代謝物HMMNIとする。代謝試験の結果において、代謝物HMMNIが主要な代謝物として検出されていることから、規制対象に代謝物HMMNIを含めることにした。

また、代謝物HMMNIはジメトリダゾールから生成する代謝物A（2-ヒドロキシメチル-1-メチル-5-ニトロイミダゾール）と同一物質である。ジメトリダゾールも食品中に「不検出」とする農薬等の成分であることから、代謝物HMMNIが検出された場合は、ジメトリダゾールの使用実績等に関わらず、「不検出」を適用するものとする。



2-ヒドロキシメチル-1-メチル-5-ニトロイミダゾール（代謝物 HMMNI）

なお、JECFA における残留試験結果は以下のとおりである。

(1) 豚

① 豚（体重 20～30 kg、雄雌混合 3 頭/時点）に [*N*-methyl-¹⁴C] 標識ロニダゾールを 3 日間混餌投与（7 mg/kg 体重/回、混餌濃度 0.006%に相当、1 日 1 回）し、最終投与 6 時間、3、7、14、28 及び 42 日後に筋肉、脂肪、肝臓及び腎臓におけるロニダゾールの残留濃度について燃焼法（検出限界未記載）により測定した。

表1: 豚に [*N*-methyl-¹⁴C]ロニダゾールを3日間混餌投与した後の各組織中の総残留濃度

($\mu\text{g eq/g}$)

組織	最終投与後日数					
	6 時間	3	7	14	28	42
筋肉	6.32	0.49	0.52	0.35	0.18	0.13
脂肪	1.46	0.30	0.25	0.15	0.06	0.05
肝臓	10.63	1.53	1.15	0.44	0.10	0.06
腎臓	9.37	1.22	0.85	0.27	0.09	0.05

② 去勢豚（体重約 20 kg、4 頭）に [*N*-methyl-¹⁴C] 標識ロニダゾールを 3 日間混餌投与（6.7～12 mg/kg 体重/day）し、最終投与 6 及び 72 時間後に筋肉、脂肪、肝臓及び腎臓におけるロニダゾールの残留濃度を測定した。

表2: 豚に[N-methyl-¹⁴C]ロニダゾールを3日間混餌投与した後の各組織中の総残留濃度

($\mu\text{g eq/g}$)

最終投与後時間	6		72	
投与量(mg/kg 体重/日)	6.7		12	
筋肉	5.0	8.6	9.2	12
脂肪	2.5	1.3	0.5	1.1
肝臓	7.8	12.3	0.4	0.2
腎臓	7.9	11.9	1.6	2.4

③ 豚(体重約 265 kg、雌雄 3 頭/群)にロニダゾールを 7 日間飲水投与(濃度 0.012%)し、最終投与 1 及び 3 日後に筋肉、脂肪、肝臓及び腎臓におけるロニダゾールの残留濃度について微分パルスポーラログラフ法(検出限界未記載)により測定した。

表3: 豚にロニダゾールを7日間飲水投与した後の各組織中の総残留濃度 (ng/g)

組織	最終投与後日数	
	1	3
筋肉	24	ND
脂肪	ND	ND
肝臓	ND	ND
腎臓	ND	ND

ND : 検出されず(感度: 2 ng/g)

④ 豚(体重約 165 kg、雌雄計 3 頭/時点)にロニダゾールを 7 日間飲水投与(濃度 0.012%)し、最終投与後 0 及び 1 日後に筋肉、脂肪、肝臓及び腎臓におけるロニダゾールの残留濃度について微分パルスポーラログラフ法(検出限界未記載)により測定した。

表4: 豚にロニダゾールを7日間飲水投与した後の各組織中の総残留濃度 (ng/g)

組織	最終投与後日数	
	0	1
筋肉	3,010	80
脂肪	58	ND
肝臓	ND	ND
腎臓	14	ND

ND : 検出されず(感度: 2 ng/g)

⑤ 豚（体重約 55 kg、雌雄計 3 頭/時点）にロニダゾールを 7 週間（体重が約 165 kg になるまで）混餌投与（濃度 0.009%）し、最終投与 0 及び 1 日後に筋肉、脂肪、肝臓及び腎臓におけるロニダゾールの残留濃度について微分パルスポーラログラフ法（検出限界未記載）により測定した。

表5: 豚にロニダゾールを7週間混餌投与した後の各組織中の総残留濃度 (ng/g)

組織	最終投与後日数	
	0	1
筋肉	612	152
脂肪	20	4
肝臓	ND	ND
腎臓	16	6

ND : 検出されず (感度 : 2 ng/g)

⑥ 豚（体重約 55 kg）にロニダゾールを 12 週間（体重が約 386 kg になるまで）混餌投与（濃度 0.009%）し、最終投与 0 及び 1 日後に筋肉、脂肪、肝臓及び腎臓におけるロニダゾールの残留濃度について微分パルスポーラログラフ法（検出限界未記載）により測定した。

表6: 豚にロニダゾールを12週間混餌投与した後の各組織中の総残留濃度 (ng/g)

組織	最終投与後日数	
	0	1
筋肉	409	9
脂肪	4	ND
肝臓	ND	ND
腎臓	1.3	ND

ND : 検出されず (感度 : 2 ng/g)

(2) 七面鳥

① 七面鳥のヒナ（3週齢）に [*N*-methyl-¹⁴C] 標識ロニダゾール又は [ring-2-¹⁴C] 標識ロニダゾールを4日間混餌投与（混餌濃度0.006%）し、最終投与0、2、5、10、14及び21日後に筋肉、脂肪、肝臓及び腎臓におけるロニダゾールの残留濃度（検出限界未記載）を測定した。

表7: 七面鳥に¹⁴Cで標識したロニダゾールを4日間混餌投与した後の各組織中の総残留濃度 (μg eq/g)

組織	最終投与後日数					
	0	2	5	10	14	21
筋肉	3.0	0.28	0.09	0.26	0.03	0.04
脂肪	-	0.37	-	-	-	-
肝臓	4.5	0.5	0.18	0.05	0	0
腎臓	4.7	0.73	0.4	0.14	0.07	0

- : 詳細不明

② 七面鳥に[N-methyl-¹⁴C]標識ロニダゾール又は[ring-2-¹⁴C]標識ロニダゾールを3日間混餌投与(混餌濃度0.006%)し、最終投与0、2及び5日後に筋肉、脂肪、肝臓及び腎臓におけるロニダゾール及びその代謝物HMMNIの残留濃度についてTC及び電気泳動法(検出限界未記載)により測定した。

表8: 七面鳥に¹⁴Cで標識したロニダゾールを3日間混餌投与した後の各組織中の総残留、ロニダゾール及び代謝物HMMNIの濃度 (μg eq/g)

標識部位	組織	最終投与後日数					
		0			2 or 5		
		総残留	ロニダゾール	代謝物HMMNI	総残留	ロニダゾール	代謝物HMMNI
[N-methyl- ¹⁴ C]	筋肉	2.58	1.5	0.1	0.15	0.007	<0.01
	肝臓	4.15	<0.02	0.0	0.38	0.0	0.0
	腎臓	4.00	<0.03	0.0	0.9	0.0	0.0
[ring-2- ¹⁴ C]	筋肉	2.05	1.6	0.03	0.07	0.0	0.0
	肝臓	3.77	0.01	0.0	0.13	0.0	0.0
	腎臓	4.43	0.09	0.02	0.44	0.0	0.0

(参考)

これまでの経緯

平成17年11月29日	暫定基準告示
平成24年2月24日	厚生労働大臣から食品安全委員会委員長あてに残留基準設定に係る食品健康影響評価について要請
平成26年7月29日	食品安全委員会委員長から厚生労働大臣あてに食品健康影響評価について通知
平成27年9月7日	薬事・食品衛生審議会へ諮問
平成27年12月15日	薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会農薬・動物用医薬品部会

● 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会農薬・動物用医薬品部会

[委員]

石井 里枝	埼玉県衛生研究所水・食品担当部長
○大野 泰雄	公益財団法人木原記念横浜生命科学振興財団理事長
尾崎 博	東京大学大学院農学生命科学研究科獣医薬理学教室教授
斉藤 貢一	星薬科大学薬品分析化学教室教授
佐々木 一昭	東京農工大学大学院農学研究院動物生命科学部門准教授
佐藤 清	一般財団法人残留農薬研究所技術顧問
佐野 元彦	東京海洋大学海洋生物資源学部門教授
永山 敏廣	明治薬科大学薬学部薬学教育研究センター基礎薬学部門教授
根本 了	国立医薬品食品衛生研究所食品部第一室長
二村 睦子	日本生活協同組合連合会組織推進本部組合員活動部部長
宮井 俊一	一般社団法人日本植物防疫協会技術顧問
由田 克士	大阪市立大学大学院生活科学研究科公衆栄養学教授
吉成 浩一	静岡県立大学薬学部衛生分子毒性学分野教授
鰐淵 英機	大阪市立大学大学院医学研究科分子病理学教授

(○：部会長)

答申

ロニダゾールについては、食品に含有されるものであってはならないとする現行の食品規格を維持することが妥当である。



府食第577号

平成26年7月29日

厚生労働大臣

田村 憲久 殿

食品安全委員会

委員長 熊谷 進



食品健康影響評価の結果の通知について

平成24年2月22日付け厚生労働省発食安0222第10号をもって厚生労働大臣から食品安全委員会に意見を求められたロニダゾールに係る食品健康影響評価の結果は下記のとおりですので、食品安全基本法(平成15年法律第48号)第23条第2項の規定に基づき通知します。

なお、食品健康影響評価の詳細は別添のとおりです。

記

ロニダゾールについて遺伝毒性を判断できず、発がん性が示唆されたことから、一日摂取許容量を設定すべきでない。

動物用医薬品評価書

ロニダゾール

2014年7月

食品安全委員会

目次

	頁
○審議の経緯	3
○食品安全委員会委員名簿	3
○食品安全委員会動物用医薬品専門調査会専門委員名簿	3
○要約	4
I. 評価対象動物用医薬品の概要	5
1. 用途	5
2. 有効成分の一般名	5
3. 化学名	5
4. 分子式	5
5. 分子量	5
6. 構造式	5
7. 使用目的及び使用状況	5
II. 安全性に係る知見の概要	6
1. 薬物動態試験	6
(1) 薬物動態試験	6
(2) 代謝試験 (ラット)	7
(3) 代謝試験 (豚)	8
(4) 代謝試験 (七面鳥)	9
(5) 代謝試験 (<i>in vitro</i>)	10
(6) 生物学的利用試験 (ラット)	10
2. 残留試験	11
(1) 残留試験 (豚)	11
(2) 残留試験 (七面鳥)	13
(3) 長期残留物 (persistent residue) について	14
3. 遺伝毒性試験	16
(1) ロニダゾール	16
(2) ロニダゾールのタンパク質結合残留物	17
4. 急性毒性試験	18
5. 亜急性毒性試験	19
(1) 13 週間亜急性毒性試験 (ラット)	19
(2) 17 週間亜急性毒性試験 (イヌ)	19
6. 慢性毒性及び発がん性試験	20
(1) 2 年間慢性毒性試験 (イヌ)	20
(2) 81 週間発がん性試験 (マウス)	22
(3) 95 週間慢性毒性/発がん性併合試験 (ラット)	22

(4) 104 週間慢性毒性/発がん性併合試験 (ラット)	23
7. 生殖発生毒性試験	24
(1) 3 世代繁殖試験 (ラット)	24
(2) 発生毒性試験 (マウス)	25
(3) 発生毒性試験 (ラット)	25
(4) 発生毒性試験 (ウサギ)	26
III. 食品健康影響評価	27
1. 国際機関等における評価	27
(1) JECFA における評価	27
(2) EMEA における評価	27
2. 食品健康影響評価	27
・表 20 JECFA における各種試験の無毒性量等の比較	29
・別紙 1 : 代謝物/分解物等略称	30
・別紙 2 : 検査値等略称	30
・参照	31

<審議の経緯>

- 2005年 11月 29日 暫定基準告示（参照1）
2012年 2月 24日 厚生労働大臣から残留基準設定に係る食品健康影響評価について要請（厚生労働省発食安0222第10号）、関係資料の接受
2012年 3月 1日 第421回食品安全委員会（要請事項説明）
2014年 4月 11日 第163回動物用医薬品専門調査会
2014年 6月 17日 第518回食品安全委員会（報告）
2014年 6月 18日から7月17日まで 国民からの意見・情報の募集
2014年 7月 24日 動物用医薬品専門調査会座長から食品安全委員会委員長へ報告
2014年 7月 29日 第524回食品安全委員会
（同日付で厚生労働大臣に通知）

<食品安全委員会委員名簿>

（2012年6月30日まで）

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

（2012年7月1日から）

熊谷 進（委員長）
佐藤 洋（委員長代理）
山添 康（委員長代理）
三森 国敏（委員長代理）
石井 克枝
上安平 冽子
村田 容常

*：2011年1月13日から

<食品安全委員会動物用医薬品専門調査会専門委員名簿>

（2013年10月1日から）

山手 丈至（座長*）
小川 久美子（座長代理*）
青木 博史
青山 博昭
石川 さと子
石川 整

川治 聡子
須永 藤子
辻 尚利
寺岡 宏樹
能美 健彦
舞田 正志

松尾 三郎
宮田 昌明
山崎 浩史
吉田 和生
吉田 敏則
渡邊 敏明

*：2013年10月22日から

要 約

寄生虫駆除剤・抗原虫剤である「ロニダゾール」(CAS No. 7681-76-7)について、JECFA 及び EMEA の評価書等を用いて食品健康影響評価を実施した。

評価に用いた試験成績等は、薬物動態(ラット、豚及び七面鳥)、残留(豚及び七面鳥)、遺伝毒性、急性毒性(マウス、ラット及びウサギ)、亜急性毒性(ラット及びイヌ)、慢性毒性及び発がん性(マウス、ラット及びイヌ)、生殖発生毒性(マウス、ラット及びウサギ)等の試験成績である。

各種遺伝毒性試験の結果、ロニダゾールは *in vitro* の細菌を用いた復帰突然変異試験及び fluctuation test で陽性であった。これは供試微生物自身のニトロ還元酵素活性による可能性が示唆されたが、この可能性については証明されていない。また、*in vivo* のマウスを用いた優性致死試験及び小核試験の結果は陰性であったが、キイロショウジョウバエを用いた伴性劣性致死試験で陽性であり、マウスの骨髄細胞染色体異常試験で染色体異常誘発作用が報告されるなど相反した結果であった。マウスを用いた小核試験と染色体異常試験の結果が相反しているため、ロニダゾールの生体にとって問題となる遺伝毒性については判断できなかった。

また、マウス及びラットを用いた発がん性試験が 3 試験実施されている。マウスを用いた発がん性試験では、良性及び悪性の肺腫瘍及び癌がそれぞれ 10 及び 20 mg/kg 体重/日以上、ラットを用いた発がん性試験 2 試験では、乳腺腫瘍が 10 mg/kg 体重/日以上の雌で有意に増加し、ロニダゾールの発がん性が示唆された。なお、発がんメカニズムは解明されておらず、遺伝毒性と発がん性の関連性も不明であることから、現時点で評価した知見からは、ロニダゾールの発がん性に閾値が存在するかどうかについては判断できなかった。

ロニダゾールの遺伝毒性を判断できず、発がん性が示唆されたことから、一日摂取許容量 (ADI) を設定すべきでない判断した。

I. 評価対象動物用医薬品の概要

1. 用途

寄生虫駆除剤・抗原虫剤

2. 有効成分の一般名

和名：ロニダゾール

英名：Ronidazole

3. 化学名

IUPAC

英名：(1-methyl-5-nitroimidazol-2-yl)methyl carbamate

CAS (No. 7681-76-7)

英名：1-Methyl-5-nitroimidazole-2-methanol carbamate (ester)

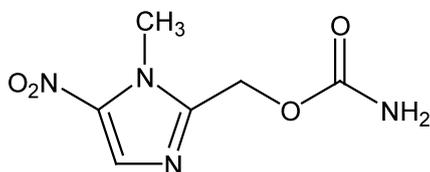
4. 分子式

$C_6H_8N_4O_4$

5. 分子量

200.15

6. 構造式



(参照 2)

7. 使用目的及び使用状況

ロニダゾールは、5-ニトロイミダゾール類に属する寄生虫駆除剤・抗原虫剤である。

1990年のJECFAの評価書によれば、海外では動物用医薬品として、七面鳥のヒストモナス症の予防(混餌濃度0.006~0.009%で7~14日間投与)及び治療(混餌濃度0.012%又は飲水濃度0.004~0.006%で7~14日間投与)並びに豚赤痢の予防(混餌濃度0.006~0.008%で3~5日間)及び治療(混餌濃度0.012%又は飲水濃度0.006%で3~5日間投与)を目的に使用されると報告されていた。(参照3、4) また、1996年以前のEMEAの評価書によれば、ロニダゾールは、ハトのトリコモナス症及び牛の膣トリコモナス症の治療にも使用されると報告されていた。(参照5) 現在、EUではロニダゾールを最大残留基準値(MRL)が設定できない成分とし、食用動物への使用が禁止されている。(参照6)

日本では、ヒト用及び動物用医薬品の承認はない。

なお、ポジティブリスト制度導入に際して、食品において「不検出」とされる農薬等の成分であると規定されている。(参照1)

II. 安全性に係る知見の概要

本評価書では、JECFA 及び EMEA の評価書等を基に、ロニダゾールの毒性に関する主な知見を整理した。(参照 3~8)

代謝物/分解物等略称及び検査値等略称を別紙 1 及び 2 に示した。

各種代謝及び残留試験で用いられたロニダゾールの放射性標識化合物については、以下の略称を用いた。

略称	標識位置
[N-methyl- ¹⁴ C]ロニダゾール	1位のメチル基の炭素を ¹⁴ Cで標識したもの
[methylene- ¹⁴ C]ロニダゾール	2位のメチレン基の炭素を ¹⁴ Cで標識したもの
[carbonyl- ¹⁴ C]ロニダゾール	カルボニル基の炭素を ¹⁴ Cで標識したもの
[ring-2- ¹⁴ C]ロニダゾール	イミダゾール環の2位の炭素を ¹⁴ Cで標識したもの
[ring-4,5- ¹⁴ C]ロニダゾール	イミダゾール環の4位及び5位の炭素を ¹⁴ Cで標識したもの
¹⁴ C 標識ロニダゾール	標識位置不明のもの

1. 薬物動態試験

(1) 薬物動態試験

① 吸収

いくつかの動物種における¹⁴C 標識体を用いた多くの試験により、ロニダゾールは消化管から容易に吸収されることが明らかになった。

また、ラットに¹⁴C 標識ロニダゾールを経口投与(2及び10 mg/kg 体重)したところ、投与24時間後の血漿中濃度はそれぞれ0.09及び0.5 µg eq/mLであった。(参照3)

生物学的利用試験 [II.1. (6)] において、¹⁴C 標識ロニダゾールの混餌投与後2日間の尿、糞、呼気、胃腸管及びカーカスの放射活性が、それぞれ44.69%、39.12%、3.31%、1.97%及び2.24%であったことから、ロニダゾールの経口吸収率は、少なくとも50%以上と考えられた。(参照4)

② 分布

¹⁴C 標識体を用いた試験により、ロニダゾールは動物体に広く分布することが示された。ロニダゾールに関連した放射活性が、脳、脂肪、心臓、腎臓、肝臓、肺、筋肉、脾臓、皮膚及び脾臓中に存在することが示された。(参照3)

③ 排泄

ロニダゾールは、主に動物の尿及び糞中に排泄される。二酸化炭素としての呼気中への排泄は、最大でも投与量の3%であった。ロニダゾールを単回経口投与された動物は、投与後24時間以内に、投与量の30~36%を尿中に、16~40%を糞中に排泄し

た。その後の排泄は遅く、不完全であった。

ラットでは投与初日に尿及び糞中に合わせて 36~40%が排泄されていたが、投与 2 日には 2~6%に減少した。(参照 3)

(2) 代謝試験 (ラット)

ラット (体重 180~200 g, 3 匹/時点) を用いて、¹⁴C 標識したロニダゾールの単回強制経口投与 (10 mg/kg 体重) による代謝試験が実施された。投与には、4 つの部位のうち 1 箇所を ¹⁴C で標識したロニダゾール ([*N*-methyl-¹⁴C]、[methylene-¹⁴C]、[ring-4,5-¹⁴C]又は[carbonyl-¹⁴C]ロニダゾール) を用いた。投与 2、4、7、11 又は 14 日後の各組織中総放射活性が調べられた。

各標識化合物の各組織中総放射活性濃度を表 1 に示した。

組織中残留物がそれぞれ標識した部位のイミダゾール環を完全に保持する物質のみである場合には、組織毎の各時点の濃度は同濃度となり、半減期 ($T_{1/2}$) 等のパラメータが等しくなるはずである。しかし、標識部位が異なるロニダゾールを投与した動物における組織中放射活性濃度は異なっており、残留物の全てが完全な *N*-メチルイミダゾール核を含むのではないことが明らかにされた。

総残留物の範囲を確定するためにメチルアミン産生試験を行ったところ、完全なイミダゾール環を含む残留物の合計は、投与 7 及び 11 日後の筋肉及び肝臓中の総残留物の 10~30%と推測された。これらの結果は、豚で得られた結果 [II.1. (3)] と同様であった。(参照 4)

本試験 [II.1. (2)] から、ロニダゾール由来の残留物が組織中に長時間存在し続けられるのは、イミダゾール環が通常のタンパク質合成反応を介して細胞内の高分子に取り込まれる可能性を有する生体内成分 (endogenous substance) を形成するような炭素数 1 又は 2 の断片へと代謝分解されることに起因するためと考えられた。(参照 3)

表 1 ラットへの ¹⁴C で標識したロニダゾールの単回強制経口投与後における各標識化合物の各組織中総放射活性濃度 (µg eq/g)

標識部位	組織	休薬期間 (日)			
		2	4	7	11
[<i>N</i> -methyl- ¹⁴ C]	肝臓	0.33	0.27	0.16	0.11
	腎臓	0.48	0.41	0.26	0.17
	筋肉	0.31	0.26	0.23	0.18
	脂肪	0.14	0.13	0.09	0.07
[methylene- ¹⁴ C]	肝臓	0.22	0.10	0.07	0.02
	腎臓	0.35	0.26	0.11	0.04
	筋肉	0.18	0.13	0.10	0.05
	脂肪	0.23	0.14	0.08	0.06
[ring-4,5- ¹⁴ C]	肝臓	0.18	0.10	0.06	0.03
	腎臓	0.26	0.14	0.07	0.04
	筋肉	0.17	0.11	0.07	0.06
	脂肪	0.04	0.03	0.02	0.02

[carbonyl- ¹⁴ C]	肝臓	0.40	0.25	0.12	0.04
	腎臓	0.19	0.17	0.08	0.04
	筋肉	0.12	0.11	0.07	0.06
	脂肪	0.07	0.11	0.07	0.05

ラットにロニダゾールを投与 (10 mg/kg 体重) すると、尿中代謝物としてアセトアミドが同定されたことに注意を払うべきである。アセトアミドは発がん物質として知られており、また、メトロニダゾールの分解物である。ロニダゾール及びジメトリダゾールからアセトアミドが生成される可能性がある (quite possible)。 (参照 4)

(3) 代謝試験 (豚)

去勢豚 (体重約 20 kg、10 週齢、雄 1 頭/時点) を用いた [*N*-methyl-¹⁴C]ロニダゾールの 3 日間混餌又は飲水投与 (6.7 又は 9.2 mg/kg 体重/日) による代謝試験が実施された。最終投与 4 及び 72 時間後の代謝物について検討した。

総放射活性の約 70~80%が尿、糞、腸管内容物及び組織中から回収された。残りの放射活性は呼気を通じて、例えばメチルアミンとして排泄された可能性がある と推測された。

投与動物の筋肉及び肝臓中からの非抽出残留物の量は時間とともに増加した。投与 4 時間後の肝臓の放射活性の 74%及び筋肉の 16%は水溶性で、それぞれ 28%及び 14%は不溶性であった。投与 72 時間後の肝臓の放射活性の 26%及び筋肉の 27%は水溶性で、それぞれ 71%及び 65%は不溶性であった。

また、投与 72 時間後の各組織中の細胞構成物を調べたところ、肝臓中の総放射活性の 53.6%がタンパク質と結合し、核酸及び脂質画分にはそれぞれ約 10%が分布していた。筋肉中では、総放射活性の 58.3%がタンパク質と結合し、核酸及び脂質画分にそれぞれ約 6%が分布していた。不溶性残留物の放射活性の割合が増加したことから、¹⁴C が、水溶性画分中の低分子の化合物中よりも生物学的半減期が比較的長い高分子の細胞内成分に取り込まれることが考えられた。

尿、筋肉及び肝臓中のロニダゾールの代謝物について、ロニダゾール、1-メチル-2-ヒドロキシメチル-5-ニトロイミダゾール (HMMNI)、イミダゾール及び 1-メチル-2-カルバモイルオキシメチル-5-アセトアミドイミダゾールの 4 種類の化合物が同定された。投与 4 時間後の筋肉から、ロニダゾール 4,500 ng eq/g 及び HMMNI 95 ng eq/g が検出されたが、それ以外の代謝物は、いずれの時点においても筋肉又は肝臓中で 5 ng eq/g を超えるものはなかった。尿中にはニトロ基を含む化合物が 2 種類のみ含まれ、それらはロニダゾール及び HMMNI であった。 (参照 4)

豚を用いた残留試験 [II. 2. (1)] における総残留物の消失のデータ (表 3) では、速やかな排泄がみられた (休薬 0~3 日) 後、残留物が組織中に最長 42 日間残存することが示されている。これらの残存する残留物は、細胞内高分子と結合していると考えられた。実際に、休薬 7 日後の筋肉中の放射活性の約 60%はタンパク質画分に存在することが確認された。また、この割合は休薬 42 日後でも大きく変化することはない。

かった。

単一炭素単位まで分解されなかったロニダゾールの全代謝物は、放射性メチルアミンを産生することから、標識化合物の生体内成分への取り込みに起因しない残留物の残存量を推測するため、組織試料を酸性条件下で加水分解してメチルアミンを生成させ、メチルアミンの収率を定量した。

休薬 0 日後では、筋肉中の放射活性の約 90%及び肝臓中の放射活性の約 70%が放射性メチルアミンを遊離した。休薬 3 日後では、筋肉中の放射活性の 30%未満がメチルアミンを遊離した。この時点の遊離しているメチルアミン残基の大半はタンパク質画分に存在していた。休薬 3 日後まで残存する放射活性は、休薬 0 日後の総放射活性の 8~10%にすぎず、休薬 7 日後でもほとんど変化しなかったことから、物質から生じるメチルアミンの大半は休薬 3 日以内に排出されることが明らかとなった。

これらのことから、メチルアミンを遊離しない残留物の 70~80%は、¹⁴C が生体内成分に取り込まれたことを意味すると考えられた。(参照 4)

(4) 代謝試験 (七面鳥)

七面鳥を用いた[ring-2-¹⁴C]又は[N-methyl-¹⁴C]ロニダゾールの 3 日間混餌投与 (混餌濃度 0.006%) による代謝試験が実施された。各組織中の代謝物を濾紙電気泳動法及び薄層クロマトグラフィー (TC) により検討した。

ロニダゾール及びその代謝物である HMMNI は、休薬 0 日後の筋肉からのみ同定された。ロニダゾール及び HMMNI のグルクロン酸抱合体は筋肉及び尿からは検出されなかった。肝臓中総放射活性の約 80%を含む肝臓の水溶性抽出物の解析では、¹⁴C-N-メチルグリコールアミド、¹⁴C-シュウ酸 ([ring-2-¹⁴C]ロニダゾールを投与した七面鳥から) 及び ¹⁴C-メチルアミンがみられた。また、投与した七面鳥由来の肝臓抽出物中に、フマル酸、コハク酸、グリコール酸、リンゴ酸、 α -ケトグルタル酸、クエン酸等の様々な酸の存在を示す証拠がみられた。さらに、投与した七面鳥由来のプール肝臓中では、アミノ酸に結合している放射標識がみられた。

そのため、肝臓における放射活性の大部分は、正常組織に一般的に存在する様々な単純な既知物質として再分布することが明らかにされ、結果として毒性学的には重要ではないことが強く主張された。(参照 4)

七面鳥におけるロニダゾールの推定代謝経路を図 1 に示した。

ロニダゾールは、カルバメート基が加水分解され、HMMNI を生成する。複数の経路で環開裂が起こる可能性があり、経路 1 及び 2 では N-メチルグリコールアミドを生じ、さらにシュウ酸、メチルアミン及び二酸化炭素に代謝されると考えられる。ニトロ基は、その正確な状態が不明であるため R で示した。しかし、ニトロ基はそのまま加水分解されるか又はアミンへ還元され、次に水酸基に加水分解される可能性がある。(参照 4)

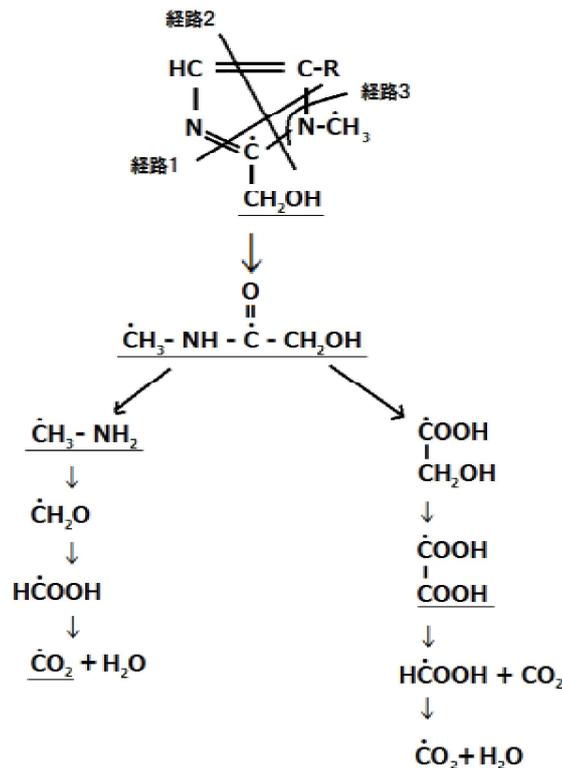


図 1 七面鳥におけるロニダゾールの推定代謝経路

(5) 代謝試験 (*in vitro*)

ラットの肝臓中のロニダゾールのタンパク質結合代謝物への生体内変化が調べられた。ラット肝ミクロソーム分画は、好気性又は嫌気性のいずれの条件下においてもロニダゾール代謝物の NADH 及び NADPH 依存性のタンパク質との共有結合の両方を触媒することが示された。NADPH は NADH より効率よく、嫌気的条件下においてより結合し、ロニダゾールのタンパク質結合代謝物への代謝が還元経路を通じて起こることが示された。

ラットの精製肝ミクロソーム NADPH-チトクローム P-450 還元酵素は、ロニダゾールのタンパク質共有結合代謝物への活性化を触媒する。ラットの肝ミクロソームによる触媒反応のように、等価物の還元を求める精製還元酵素によるタンパク質のアルキル化は酸素感受性であり、SH 基含有化合物によって阻害され、フラビンモノヌクレオチド又はメチルピオロゲンにより数倍に亢進される。フェノバルビタール及び 3-メチルコラントレン誘導性のラットの肝ミクロソームから精製されるチトクローム P-450 はいずれも、結合代謝物の生成には関連していないことが示されており、ラットの肝ミクロソームに存在する他のチトクローム P-450 アイソザイムがロニダゾール活性化に関与する可能性があることを示唆している。(参照 3)

(6) 生物学的利用試験 (ラット)

豚に [N-methyl-¹⁴C]ロニダゾールを 3 日間混餌投与し、最終投与 7 日後の筋肉を 4 倍量の水を加えてホモジナイズし凍結乾燥した。凍結乾燥した豚筋肉をラットの飼料に、4 対 5 の割合で混じた飼料 (ロニダゾール 16 µg eq、以下「投与豚由来筋肉混合

飼料」という。) を作製した。一方、対照飼料を、未投与の豚筋肉の凍結乾燥物及び [N-methyl-¹⁴C]ロニダゾール 16 µg eq を混ぜて作製した。ラットにこれらの飼料 (18 g) を 2 日間、夜 (late in the day) に混餌投与し、尿、糞、呼気、胃腸管及びカーカス (皮膚及び胃腸管を取り除いた残渣) 中の放射活性濃度を測定した。測定した放射活性の回収率を表 2 に示した。

投与豚由来筋肉混合飼料投与群の放射標識ロニダゾールの全体の回収率は 102.78%、対照飼料投与群では 91.33%であった。

投与豚由来筋肉混合飼料投与群のラットにおけるカーカス及び呼気に含まれる放射活性の百分率は、ロニダゾールを添加した対照飼料投与群のラットよりも高かった。また、豚の筋肉中のメチルアミン遊離残留物 (すなわち、ロニダゾール、N-メチル基含有誘導体等の化合物) の 92%がラットの尿及び糞中から回収され、0.5%未満がカーカス中から回収された。

組織中の放射活性の残留は、薬物に関連した結合残基の形成によるものよりも、放射標識が生体内成分へ取り込まれたことを反映していると考えられた。(参照 4)

表 2 [N-methyl-¹⁴C]ロニダゾール又は投与豚由来筋肉混合飼料を投与したラットからの放射活性の回収率 (%)

群	尿	糞	呼気	胃腸管	カーカス	総計
対照飼料	44.69	39.12	3.31	1.97	2.24	91.33
投与豚由来筋肉混合飼料	26.39	25.29	11.20	18.00	21.90	102.78

対照飼料 : [N-methyl-¹⁴C]ロニダゾール (16 µg eq) + 未投与豚由来筋肉 + 飼料

投与豚由来筋肉混合飼料 : [N-methyl-¹⁴C]ロニダゾールを投与した豚由来の筋肉 (16 µg eq) + 飼料

2. 残留試験

(1) 残留試験 (豚)

豚 (体重 20~30 kg、雄雌混合 3 頭/時点) を用いた [N-methyl-¹⁴C]ロニダゾールの 1 日 1 回、3 日間混餌投与 (7 mg/kg 体重/日、混餌濃度 0.006%に相当) による残留試験が実施された。休薬期間 (0 (6 時間)、3、7、14、28 及び 42 日) 後の各組織中の総残留濃度を燃焼法により測定した。

各組織中総残留濃度を表 3 に示した。(参照 4)

表 3 豚への [N-methyl-¹⁴C]ロニダゾールの 3 日間混餌投与後における各組織中の総残留濃度 (µg eq/g)

組織	休薬期間 (日)					
	0 (6 時間)	3	7	14	28	42
肝臓	10.63	1.53	1.15	0.44	0.10	0.06
腎臓	9.37	1.22	0.85	0.27	0.09	0.05
筋肉	6.32	0.49	0.52	0.25	0.18	0.13
脂肪	1.46	0.30	0.25	0.15	0.06	0.05

去勢豚（体重約 20 kg、4 頭）を用いた[*N*-methyl-¹⁴C]ロニダゾールの 3 日間混餌投与（6.7～12 mg/kg 体重/日）による残留試験が実施された。休薬 6 又は 72 時間後の各組織中の総残留濃度を測定した。

各組織中の総残留濃度を表 4 に示した。（参照 4）

表 4 去勢豚への[*N*-methyl-¹⁴C]ロニダゾールの 3 日間混餌投与後における各組織中の総残留濃度（ $\mu\text{g eq/g}$ ）

休薬期間（時間）	6		72	
投与量 (mg/kg 体重/日)	6.7	12	9.2	12
肝臓	7.8	12.3	1.6	2.4
腎臓	7.9	11.9	1.1	2.5
筋肉	5.0	8.6	0.5	1.1
脂肪	2.5	1.3	0.4	0.2

豚（体重約 120 ポンド(約 265 kg)、雌雄計 3 頭/群）を用いたロニダゾールの 7 日間飲水投与（濃度 0.012%）による残留試験が実施された。休薬 1 及び 3 日後の各組織（肝臓、腎臓、筋肉及び脂肪）中のロニダゾール濃度を微分パルスポーラログラフ法（感度 2 ng/g）により測定した。

ロニダゾールは休薬 1 日後の筋肉のみで検出され、その濃度は平均 24 ng/g であった。（参照 4）

豚（体重約 75 ポンド(約 165 kg)、雌雄計 3 頭/時点）を用いたロニダゾールの 7 日間飲水投与（濃度 0.012%）による残留試験が実施された。休薬期間（0、1、3、5、7 又は 9 日）後の各組織（肝臓、腎臓、筋肉及び脂肪）中のロニダゾール濃度を微分パルスポーラログラフ法（感度 2 ng/g）により測定した。

休薬 0 及び 1 日後のみで検出可能な量のロニダゾールが得られたが、その他の時点ではロニダゾールは検出されなかった（表 5）。（参照 4）

表 5 豚へのロニダゾールの 7 日間飲水投与後における各組織中のロニダゾール濃度（ng/g）

組織	休薬期間（日）	
	0	1
肝臓	ND	ND
腎臓	14	ND
筋肉	3,010	80
脂肪	58	ND

ND：不検出

豚（体重約 25 ポンド(約 55 kg)、雌雄計 3 頭/時点）を用いたロニダゾールを 7 週間（豚の体重が約 75 ポンドになるまで）の混餌投与（混餌濃度 0.009%）による残留試験が実施された。休薬期間（0、1、3、5、7 又は 9 日）後の各組織（肝臓、腎臓、筋肉及び脂肪）中のロニダゾール濃度を微分パルスポーラログラフ法（感度 2 ng/g）により測定した。

休薬 0 及び 1 日後のみで検出可能な量のロニダゾールが得られたが、その他の時点ではロニダゾールは検出されなかった（表 6）。（参照 4）

表 6 豚へのロニダゾールの 7 週間混餌投与後における各組織中のロニダゾール濃度 (ng/g)

組織	休薬期間 (日)	
	0	1
肝臓	ND	ND
腎臓	16	6
筋肉	612	152
脂肪	20	4

ND : 不検出

豚を用いたロニダゾールの 12 週間（豚の体重が約 175(約 386 kg)ポンドになるまで）の混餌投与（混餌濃度 0.009%）による残留試験が実施された。休薬期間（0、1、3、5、7 又は 9 日）後の各組織中のロニダゾール濃度を微分パルスポーラログラフ法（感度 2 ng/g）により測定した。

休薬 0 及び 1 日後のみで検出可能な量のロニダゾールが得られたが、その他の時点ではロニダゾールは検出されなかった（表 7）。（参照 4）

表 7 豚へのロニダゾールの 12 週間混餌投与後における各組織中のロニダゾール濃度 (ng/g)

組織	休薬期間 (日)	
	0	1
肝臓	ND	ND
腎臓	1.3	ND
筋肉	409	9
脂肪	4	ND

ND : 不検出

(2) 残留試験（七面鳥）

七面鳥のヒナ（3 週齢）を用いた[*N*-methyl-¹⁴C]又は[ring-2-¹⁴C]ロニダゾールの 4 日間混餌投与（混餌濃度 0.006%）による残留試験が実施された。休薬期間（0、2、5、10、14 又は 21 日）後の総残留濃度を測定した。

各組織中の総残留濃度を表 8 に示した。組織中の総残留濃度は休薬 21 日後までに対照群と同程度になった。ロニダゾールの残留の消失に標識部位による差はなかった。（参照 4）

表 8 七面鳥への¹⁴Cで標識したロニダゾールの4日間混餌投与後における各組織中の総残留濃度 (µg eq/g)

組織	休薬期間 (日)					
	0	2	5	10	14	21
肝臓	4.5	0.5	0.18	0.05	0	0
腎臓	4.7	0.73	0.4	0.14	0.07	0
筋肉	3.0	0.28	0.09	0.26	0.03	0.04
脂肪	—	0.37	—	—	—	—

- : 詳細不明

七面鳥を用いた[*N*-methyl-¹⁴C]又は[ring-2-¹⁴C]ロニダゾールの混餌投与 (混餌濃度 0.006%) による残留試験が実施された。休薬期間 (0、2 又は 3 日) 後の各組織中の総残留物、ロニダゾール及びその代謝物 HMMNI の濃度を測定した。ロニダゾール及び HMMNI の測定には TC 及び電気泳動法を用いた。

各組織中の総残留物、ロニダゾール及び HMMNI の濃度を表 9 に示した。本試験の結果は、それぞれの休薬期間後の総残留濃度及び各標識ロニダゾールを用いて得られたデータとの同等性の両方の点で上述の試験と同様であった。(参照 4)

表 9 七面鳥への¹⁴Cで標識したロニダゾールの3日間混餌投与後における各組織中の総残留、ロニダゾール及び HMMNI の濃度 (µg eq/g)

標識部位及び休薬期間	組織	総残留	ロニダゾール	HMMNI
[<i>N</i> -methyl- ¹⁴ C] 休薬 0 日	肝臓	4.15	<0.02	0.0
	腎臓	4.00	<0.03	0.0
	筋肉	2.58	1.5	0.1
[ring-2- ¹⁴ C] 休薬 0 日	肝臓	3.77	0.01	0.0
	腎臓	4.43	0.09	0.02
	筋肉	2.05	1.6	0.03
[ring-2- ¹⁴ C] 休薬 2 日	肝臓	0.38	0.0	0.0
	腎臓	0.9	0.0	0.0
	筋肉	0.15	0.007	<0.01
[ring-2- ¹⁴ C] 休薬 3 日	肝臓	0.13	0.0	0.0
	腎臓	0.44	0.0	0.0
	筋肉	0.07	0.0	0.0

(3) 長期残留物 (persistent residue) について

代謝及び残留試験の結果から、ラット、七面鳥及び豚の組織中残留物は長期残留することが示唆された。ロニダゾールが *in vivo* で広範囲に代謝されることを示す代謝試験が実施されているが、総残留物の正確な性質は不確定である。しかし、組織中の残留放射活性の約 50~60%がタンパク質結合残留物として存在していることがデータから示されている。この放射活性の大半は生体内成分に起因すると考えられ、そのため毒性学的な懸念はないと考えられるが、一部の放射活性が完全なイミダゾール環を含むタンパク質結合代謝物である可能性は無視できない。

そのため、結合残留物の性質、その生成のメカニズム及びロニダゾール結合残留物の毒性学的可能性を明らかにするため、以下の一連の試験が実施された。(参照 4)

① 結合残留物の生成メカニズム試験 (*in vitro*)

ラット肝ミクロソームを用いて、*in vitro*における結合残留物生成のメカニズムが調べられた。a.~f. のとおり重要な所見が得られた。(参照 4)

- a. 最大限の結合には嫌気的条件が必要であり、高濃度の酸素は共有結合を阻害する。タンパク質は主な結合標的物であり、核酸は非常に弱い競合を示す。また、ロニダゾール代謝物の 20 分子につきわずか 1 分子 (5%) がミクロソームタンパク質をアルキル化する。
- b. NADPH の存在下で、チトクローム P-450 及び P-450 還元酵素がロニダゾールの還元活性化を触媒する。
- c. タンパク質の非特異的なアルキル化の主な標的はシステインのチオール基である。
- d. 主要なタンパク質付加体はイミダゾール環を保持していたが、カルバメート基及び 4 位の水素を失っていた。
- e. システインのチオール残基への付加は 2-メチレン基又は環の 4 位で生じるが、試験結果から付加体は主に 2-メチレン基で生じることが示されている (図 2)。
- f. この試験の結果、ロニダゾールの *N*-ヒドロキシルアミン誘導体が活性体として共有結合に関与することが示唆された。

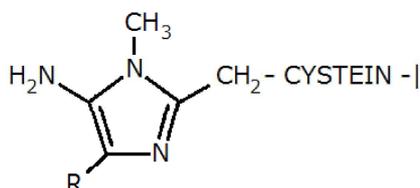


図 2 タンパク質が結合したロニダゾールの付加体の概要構造

② ラット及び豚の *in vivo* 試験

ラット及び豚に、異なる部位に標識したロニダゾールを投与し、投与 6 時間後の肝臓及び筋肉からタンパク質結合残留物を抽出し、メチルアミン遊離試験、シュウ酸生成の測定及びクロマトグラフ特性試験が実施された。*in vitro* のラットの肝ミクロソーム系由来並びに *in vivo* のラット及び豚由来のタンパク質結合残留物を比較して、a.~c. が証明された。(参照 4)

- a. [methylene-¹⁴C] ロニダゾールを用いた *in vitro* 及び *in vivo* のタンパク質結合残留物の酸加水分解物を HPLC で分析すると、ラジオクロマトグラフィーのプロファイルはほぼ同じであった。
- b. [*N*-methyl-¹⁴C] ロニダゾールを用いた *in vitro* 及び *in vivo* の残留物の酸加水分解物から生成されたメチルアミンの量は同様であった (*in vitro* のラットの肝ミクロソームで 97%、*in vivo* のラットで 76%、*in vivo* の豚の肝臓及び筋肉で 94% 及び 86%)。また、[ring-4,5-¹⁴C] ロニダゾールを用いた試料の酸加水分解で得られたシ

ユウ酸の量も同様であった (*in vitro* のラットの肝ミクロソームで 10%、*in vivo* のラットで 8.7%、*in vivo* の豚の肝臓及び筋肉で 9%及び 6.5%)。

- c. 3 種類のタンパク質結合残留物は全て完全なイミダゾール環を保持しているが、4 位の水素を失っていた。

3. 遺伝毒性試験

(1) ロニダゾール

ロニダゾールの *in vitro* 及び *in vivo* の遺伝毒性試験結果を表 10 及び 11 に示した。
(参照 3、7、8)

表 10 *in vitro* 試験

検査項目	試験対象	用量	結果
復帰突然変異試験	<i>Salmonella typhimurium</i> TA1530、TA1532、TA1534、LT2、 <i>hisG46</i>	0.03 mmol/L (−S9)	陽性
	<i>S. typhimurium</i> TA1530、TA1531、TA1532、TA1534、TA1535、TA1536、TA1537、TA1538	10~50 µg/plate (±S9)	陽性
	<i>S. typhimurium</i> TA97a、TA98、TA100、TA102	0.1 µg/mL (±S9)	陽性
Luria and Delbrück's fluctuation test	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 、 <i>Escherichia coli</i> K12HfrH、 <i>Citrobacter freundii</i> 425	0.01 mmol/L	陽性

表 11 *in vivo* 試験

検査項目	試験対象	用量	結果
伴性劣性致死試験	キイロショウジョウバエ (<i>Drosophila melanogaster</i>)	10 mmol/L	陽性
優性致死試験	CF ₁ S 雄マウス	50~200 mg/kg 体重/日、経口投与	陰性
骨髄細胞染色体異常試験 (Bone marrow cytogenic assay)	CF ₁ S マウス	50~200 mg/kg 体重/日、単回経口投与 (6、24 及び 48 時間後) 又は 5 日間経口投与	陽性 ^a
小核試験	CF ₁ S 雄マウス	50~200 mg/kg 体重/日、2 又は 5 日間経口投与	陰性
	Swiss/RIV マウス	280 mg/kg 体重/日、単回腹腔内投与	陰性

a : 単回投与 24 時間後の 50 及び 200 mg/kg 体重投与群において染色体形態異常 (abnormal chromosome morphology) 及び染色体再配列 (chromosome rearrangements)、単回投与 48 時間後の 200 mg/kg 体重投与群において高二倍性 (hyperdiploidy) 及び染色体再配列の増加が認められた。また、5 日間投与では、100 mg/kg 体重/日投与群において染色体形態異常及び染色体再配列、200 mg/kg 体重/日投与群において染色体形態異常、染色体切断及び染色体再配列の増加が認められた。

in vitro 試験では、細菌を用いた復帰突然変異試験及び fluctuation test の結果は陽性であった。この陽性結果はジメトリダゾールのように、供試微生物自身のニトロ還元酵素活性による可能性があったが、この可能性は証明されていない。*in vivo* 試験では、マウスを用いた優性致死試験及び小核試験の結果は陰性であったが、キイロショウジョウバエを用いた伴性劣性致死試験で陽性であり、マウスの骨髄細胞染色体異常試験で染色体異常誘発作用が報告されるなど相反した結果であった。(参照 5)

以上のことから、食品安全委員会は、マウスを用いた小核試験と染色体異常試験の結果が相反しているため、ロニダゾールの生体にとって問題となる遺伝毒性については判断できなかった。

(2) ロニダゾールのタンパク質結合残留物

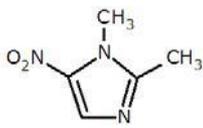
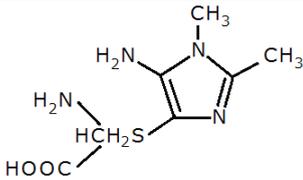
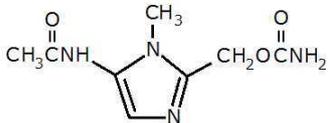
ロニダゾールは復帰突然変異試験において変異原性を示したため、ロニダゾール及びその誘導体を用いた変異原性の体系的な試験が、タンパク質結合残留物の毒性学的可能性を評価するために論理的方法であると考えられた。遊離の状態及びマイクロソーム結合状態のロニダゾール代謝物並びにタンパク質結合ロニダゾール付加物の分解物の構造活性相関を立証し、結合残留物に関連した構造的な化合物の活性を評価するため、復帰突然変異試験が実施された。

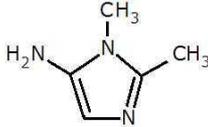
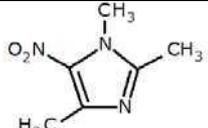
ロニダゾール関連化合物の変異原活性を表 12 に示した。

ロニダゾールのカルバメート基の除去 (ジメトリダゾール) により、変異原活性は 1/10 に低下した。4 位のアルキル基の置換 (1,2,4-トリメチル-5-ニトロイミダゾール) により活性はさらに 1/10 低下した。ニトロ基の還元 (1,2-ジメチル-5-アミノイミダゾール及び *N*-アセチルアミノ-1-メチルイミダゾール-2-メタノールカルバメート) により変異原活性は完全に失われた。

これらの結果及びモノシステイン-ロニダゾール付加体は変異原活性を持たないという所見に基づき、タンパク質付加体は変異原性を示さないと結論された。(参照 4)

表 12 復帰突然変異試験におけるロニダゾール及びその関連物質の変異原活性の相対値 (ロニダゾールを 100 と仮定)

ロニダゾールの関連物質	構造式	相対値
ジメトリダゾール		10
モノシステイン-ロニダゾール付加体		0
<i>N</i> -アセチルアミノ-1-メチルイミダゾール-2-メタノールカルバメート		0

1,2-ジメチル-5-アミノイミダゾール		0
1,2,4-トリメチル-5-ニトロイミダゾール		1

ロニダゾールは99%以上が代謝されることから、ラットの肝ミクロソーム、NADPH生成システム及びシステインを嫌氣的条件下で長時間インキュベーションし、ロニダゾール残余物、還元された代謝物及びその分解物を含む上清をミクロソームから分離し、S9画分の存在下及び非存在下における復帰突然変異試験が実施された。

上清には僅かな変異原活性がみられたが、ロニダゾール残余物に起因するものであった。これらの結果から、還元代謝物及びロニダゾール由来のシステイン付加体は変異原性を示さず、肝臓の酵素による変異原種への活性化は起こらないことが証明された。(参照 4)

in vitro のロニダゾールタンパク質残留物から変異原性物質が放出されるかどうかを調べるため、タンパク質分解酵素処理したロニダゾール結合残留物を、感度を向上させた復帰突然変異試験で調べたが、変異原活性はみられなかった。対照的に、最大量の加水分解したタンパク質試料を含むアッセイシステムに数 μg のロニダゾールを添加すると変異原活性がみられた。(参照 4)

これらの結合性残留物の変異原活性に関する試験から、結合性残留物はいかなる変異原作用も持たないことが示されたとして、EMEA はこれらの結合性残留物を、ロニダゾール残留物の毒性評価に取り入れなかった。(参照 5)

4. 急性毒性試験

各種動物におけるロニダゾールの LD₅₀ を表 13 に示した。(参照 3)

表 13 ロニダゾールの各種動物における LD₅₀

動物	投与経路	性別	LD ₅₀ (mg/kg 体重)
マウス	経口投与	雌	2,330、2,440
	腹腔内投与	雌	1,250
	皮下投与	雌	1,730
ラット	経口投与	雄	2,850
		雌	3,140
	腹腔内投与	雄	1,140
		雌	969
	皮下投与	雄	3,080
		雌	3,350
ウサギ	経口投与	雌雄	1,250

5. 亜急性毒性試験

(1) 13 週間亜急性毒性試験（ラット）

ラット（FDRL 系アルビノ、雌雄各 15 匹）を用いたロニダゾールの 13 週間強制経口投与（0、50、100 又は 200 mg/kg 体重/日、週 5 日投与）による亜急性毒性試験が実施された。毒性所見を表 14 に示した。

全投与群で過度の流涎が認められ、流涎の発現時期は用量に関係しており、200 mg/kg 体重/日投与群では第 3 週に最も早い出現がみられた。また 100 mg/kg 体重/日以上投与群の一部で過剰な排尿が認められた。100 mg/kg 体重/日以上投与群において、体重増加量の低下がみられた。

投与に起因する眼科的又は血液学的変化はみられなかった。

臓器重量について、200 mg/kg 体重/日投与群の雄の肝臓及び脾臓の平均重量が増加していた。

剖検では、200 mg/kg 体重/日投与群の全例及び 100 mg/kg 体重/日投与群の 11 例の精巣が、通常の大きさの約半分に縮小していた。対照群及び 50 mg/kg 体重/日投与群では精巣の大きさに違いはみられなかった。全投与群で盲腸の大きさが増大していたが、病理組織学的に異常な所見はみられなかった。

病理組織学的検査では、200 mg/kg 体重/日投与群に中等度～高度及び 100 mg/kg 体重/日投与群にごく僅か～高度の精細管萎縮がみられた。200 mg/kg 体重/日投与群では精子又は正常な精子細胞はみられなかった。200 mg/kg 体重/日投与群では、非常に軽度な肝細胞の肥大が認められた。（参照 3）

食品安全委員会は、本試験において、全投与群に投与量に関係した流涎が認められたことから、無毒性量（NOAEL）を設定できず、最小毒性量（LOAEL）を 50 mg/kg 体重/日と設定した。

表 14 ラットを用いた 13 週間亜急性毒性試験の毒性所見

投与量 (mg/kg 体重/日)	雄	雌
200	<ul style="list-style-type: none"> 肝臓及び脾臓の重量増加 精巣サイズの縮小（全例） 肝細胞の肥大（非常に軽度） 精子又は正常な精子細胞の消失 精細管萎縮（中等度～高度） 	<ul style="list-style-type: none"> 肝細胞肥大（非常に軽度）
100 以上	<ul style="list-style-type: none"> 過剰な排尿 体重増加量の低下 精巣サイズの縮小（11/15 例） 精細管萎縮（ごく僅か～高度） 	<ul style="list-style-type: none"> 過剰な排尿 体重増加量の低下
50 以上	<ul style="list-style-type: none"> 過度の流涎 	<ul style="list-style-type: none"> 過度の流涎

(2) 17 週間亜急性毒性試験（イヌ）

イヌ（ビーグル種、雄雌各 2 匹/群）を用いたロニダゾールの 17 週間経口投与（0、25、50、100 又は 200 mg/kg 体重/日、週 5 日投与）による亜急性毒性試験が実施された。毒性所見を表 15 に示した。

対照群及び 25 mg/kg 体重/日投与群では、試験期間を通じて良好な健康状態を維持

した。1 週後、200 mg/kg 体重/日投与群の全例を体調不良のため安楽死処置した。これらは強直性痙攣を起こし、後弓反張（opisthotonus）、微細振戦（fine tremors）、運動失調、後軀硬直、口腔内及び歯茎の乾燥、軽度の頻脈並びに呼吸数の低下及び浅呼吸を示していた。2 週後、100 mg/kg 体重/日投与群にも同様の症状がみられ、体調不良のため安楽死処置した。50 mg/kg 体重/日投与群の 4 例中 3 例も、同じ理由から 5 及び 8 週に安楽死処置した。

心電図検査では、投与 1 週間後の 100 mg/kg 体重/日投与群の 4 例中 2 例に Q-T 延長がみられ、200 mg/kg 体重/日投与群の 1 例のみも同様のパターンを示した。

血液学的及び血液生化学的検査では、100 mg/kg 体重/日以上投与群に血液濃縮が認められた。50 mg/kg 体重/日以上投与群の一部に Glu 及び AST の軽度な増加が認められた。200 mg/kg 体重/日投与群の 2 例では、血液中の尿素及び ALP が中等度に増加した。

尿検査では、200 mg/kg 体重/日投与群の全例にタンパク尿（albuminuria）及び血尿がみられた。

剖検及び病理組織学的検査では、精巣低形成が、50 mg/kg 体重/日以上投与群における一般的な所見であった。また、200 mg/kg 体重/日投与群では、心外膜、心筋及び弁の出血、肝臓、腎臓及び副腎重量の増加、リンパ節の萎縮並びに肝臓及び腎臓の脂肪浸潤が認められた。（参照 3）

食品安全委員会は、本試験において、50 mg/kg 体重/日以上投与群に体調不良、血清 AST の軽度の増加及び精巣低形成がみられたことから、NOAEL を 25 mg/kg 体重/日と設定した。

表 15 イヌを用いた 17 週間亜急性毒性試験の毒性所見

投与量 (mg/kg 体重/日)	雌雄
200	<ul style="list-style-type: none"> ・強直性痙攣、後弓反張、微細振戦、運動失調等*（1 週） ・Q-T 延長（1 例） ・血液尿素及び ALP の中等度の増加 ・タンパク尿 ・心外膜、心筋及び弁の出血、肝臓、腎臓及び副腎重量の増加、リンパ節萎縮、 ・肝臓及び腎臓の脂肪浸潤
100 以上	<ul style="list-style-type: none"> ・強直性痙攣、後弓反張、微細振戦、運動失調等*（2 週） ・Q-T 延長（2 例） ・血液濃縮
50 以上	<ul style="list-style-type: none"> ・強直性痙攣、後弓反張、微細振戦、運動失調等*（5 又は 8 週） ・Glu、AST の軽度の増加 ・精巣低形成
25	毒性所見なし

*：安楽死処置した個体においてみられた所見

6. 慢性毒性及び発がん性試験

(1) 2 年間慢性毒性試験（イヌ）

イヌ（若年成犬、雌雄各 5 匹/群）を用いたロニダゾールの 2 年間経口投与（0、10、

20 又は 40 mg/kg 体重/日、ゼラチンカプセルを使用) による慢性毒性試験が実施された。投与 34 日後、投与継続が困難のため、投与量 40 mg/kg 体重/日を 30 mg/kg 体重/日に減量した (以下この投与群を「40/30 mg/kg 体重/日」とする)。1 年後の試験終了時に、剖検及び病理組織学的検査のため雌雄各 2 匹/群を、2 年間の投与後に残りを安楽死処置した。毒性所見を表 16 に示した。

一般状態については、10 mg/kg 体重/日投与群で、一過性の微細振戦及び軽度の脱水がみられた。20 mg/kg 体重/日投与群は行動が神経質になり、過敏になった。この投与群の 3 例は、試験期間中に死亡・安楽死処置した。40/30 mg/kg 体重/日投与群では、同様の症状がみられ、より強く、より長かった。また、この投与群では食欲不振、体重減少、運動失調、間代性及び強直性痙攣を示した。1 年の終了時には、40/30 mg/kg 体重/日投与群の 10 例中 7 例を死亡又は瀕死状態のため安楽死処置した。

20 mg/kg 体重/日以上投与群では、白血球減少症、赤血球沈降速度の上昇、Hb 及び Ht の減少等の血液学的変化が観察された。

臓器重量については、全投与群で、対照群と比較して精巣の絶対重量が減少した。

剖検では、40/30 mg/kg 体重/日投与群の雄 2 例の脳に、視神経交叉 (optic chiasma) 及び淡蒼球 (globus pallidus) 付近の腹側内包に肉眼的病変がみられた。20 mg/kg 体重/日投与群では、軽度の水頭症 (hydrocephalus)、硬膜下血腫 (subdural hemorrhage) 及び脳の淡黄色着色が認められた。20 mg/kg 体重/日以上投与群において、心臓に多発性の出血がみられた。

病理組織学的検査では、20 mg/kg 体重/日以上投与群の脳組織に、小脳の局所出血、白質軟化症 (leukomalacia)、血管内膜増殖を伴う血管新生、神経食現象及び食作用 (phagocytosis) を含む変化がみられた。精巣では、精子形成不全及び精子過少症が明らかになった。これらの精巣の病変は投与に関連したものであると考えられた。(参照 3)

食品安全委員会は、本試験において、全投与群に中枢神経系の毒性影響として臨床症状 (微細振戦等) がみられたことから、NOAEL を設定できず、LOAEL を 10 mg/kg 体重/日と設定した。

表 16 イヌを用いた 2 年間慢性毒性試験

投与量 (mg/kg 体重/日)	雌雄
40/30	<ul style="list-style-type: none"> ・行動過敏、食欲不振、体重減少、運動失調、間代性及び強直性痙攣 ・視神経交叉及び淡蒼球付近の腹側内包における病変 (雄 2 例)
20 以上	<ul style="list-style-type: none"> ・行動過敏 ・白血球減少症、赤血球沈降速度の上昇、Hb 及び Ht の減少等、 ・水頭症、硬膜下血腫及び脳の淡黄色着色 (20 のみ)、心臓の多発性出血 ・小脳局所出血、白質軟化症、血管内膜増殖を伴う血管新生、神経食現象及び食作用を伴う変化、精子形成不全及び精子過少症
10 以上	<ul style="list-style-type: none"> ・一過性の微細振戦及び軽度の脱水 (10 のみ) ・精巣絶対重量の減少

* : 安楽死処置した個体においてみられた所見

(2) 81 週間発がん性試験 (マウス)

マウス (Alderly Park 系、雌雄各 60 匹/群) を用いたロニダゾールの 81 週間混餌投与 (0 (2 群)、5、10 又は 20 mg/kg 体重/日) による発がん性試験が実施された。全被験動物について体重及び摂餌量を毎週測定し、試験終了時には、剖検を行った。病理組織学的検査を、全被験動物の組織及び肉眼的病変に対して実施した。なお、本試験は要約のみが提出されており、個々の動物のデータは提出されていない。

試験期間中、全投与群において体重増加量又は摂餌量に影響はみられなかった。また、生存及び一般状態にも投与に関連した影響はみられなかった。

剖検では、いずれの群でも投与に起因する肉眼的な病変はみられなかった。しかし、10 mg/kg 体重/日以上投与群の雌雄に良性及び悪性肺腫瘍を合算した発生率 (combined benign and malignant tumour) に用量依存的な増加が認められた。肺腺腫/癌の発生の増加は、雌雄とも 20 mg/kg 体重/日で統計学的に有意であった (表 17)。(参照 3)

食品安全委員会は、本試験において、非腫瘍性病変に係る詳細な情報が不明であることから、NOAEL を設定することは適切ではないと判断した。また、20 mg/kg 体重/日投与群で肺腫瘍の有意な増加がみられたことから、発がん性が示唆された。

表 17 マウスを用いたロニダゾールの 81 週間発がん性試験における肺腫瘍の発生数 (発生率%)

性別	腫瘍の種類	投与量 (mg/kg 体重/日)				
		対照群 1	対照群 2	5	10	20
雄	肺腺腫	4 (6.7%)	3 (5%)	8 (13.3%)	9 (15%)	19* (31.7%)
	肺癌	3 (5%)	1 (1.7%)	2 (3.3%)	3 (5%)	8* (13.3%)
	合計	7 (11.7%)	4 (6.7%)	10 (16.7%)	12 (20%)	27* (45%)
雌	肺腺腫	1 (1.7%)	5 (8.3%)	3 (5%)	8 (13.3%)	14* (23.3%)
	肺癌	0 (0%)	1 (1.7%)	1 (1.7%)	2 (3.3%)	6* (10%)
	合計	1 (1.7%)	6 (10%)	4 (6.7%)	10 (16.7%)	20* (33.3%)

* : $p < 0.05$

n=60

(3) 95 週間慢性毒性/発がん性併合試験 (ラット)

ラット (Manor Farm 系アルビノ、雌雄各 42 匹/群) を用いたロニダゾールの 95 週間混餌投与 (0、10、20 又は 40 mg/kg 体重/日) による慢性毒性/発がん性併合試験が実施された。

試験の最初の 52 週間で、ロニダゾールに関連した薬力学又は毒性学的所見はいずれの投与量でも認められなかった。

いずれの投与群の雌雄においても、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査及び尿検査に重要な変化はなかった。

40 mg/kg 体重/日投与群で精巣萎縮が観察され、この所見は投与に関連した影響であると考えられた。

52 週後の 40 mg/kg 体重/日投与群の雄及び全投与群の雌に、良性の乳腺腫瘍の増加

がみられた。また、雌では悪性の乳腺腫瘍が、対照群では 39 例中 0 例であったのに対し 40 mg/kg 体重/日投与群の雌では 41 例中 5 例、10 mg/kg 体重/日投与群 41 例中 2 例でみられた。このラットの系統における乳腺腫瘍の背景データは提出されず、20 mg/kg 体重/日投与群の雌では乳腺の悪性腫瘍の発生がみられなかったことから、この悪性乳腺腫瘍の生物学的意義は明確でなかった (表 18)。(参照 3)

食品安全委員会は、本試験において、40 mg/kg 体重/日投与群の雄に精巣萎縮がみられたことから、NOAEL を 20 mg/kg 体重/日と設定した。また、全投与群の雌に良性の乳腺腫瘍の増加がみられたことから、発がん性が示唆された。

表 18 ラットを用いた 95 週間慢性毒性/発がん性併合試験における
乳腺腫瘍の発生数 (発生率%)

性別	腫瘍の種類	投与量 (mg/kg 体重/日)			
		対照群	10	20	40
雄	乳腺腫/乳腺線維腫	0/34 ^a (0%)	0/40 (0%)	0/40 (0%)	5/32 (15.6%)
	乳腺癌	0/34 ^a (0%)	0/40 (0%)	0/40 (0%)	1/32 (3.1%)
	合計	0/34 ^a (0%)	0/40 (0%)	0/40 (0%)	6/32 (18.8%)
雌	乳腺腫/乳腺線維腫	7/39 ^a (17.9%)	13/41 (31.7%)	21/41 (51.2%)	19/41 (46.3%)
	乳腺癌	0/39 ^a (0%)	2/41 (4.9%)	0/41 (0%)	5/41 (12.2%)
	合計 ^b	7/39 ^a (17.9%)	14/41 (34.1%)	21/41 (51.2%)	20/41 (48.8%)

n=42

a : 分母は 52 週後に生存していたラット数。52 週以前に死亡したラットに腫瘍はみられなかった。

b : 一部のラットは良性及び悪性腫瘍の両方を有していたため、この欄は乳腺腫/乳腺線維腫及び乳腺癌の合計ではない。

(4) 104 週間慢性毒性/発がん性併合試験 (ラット)

ラット (SD 系、雌雄各 60 匹/群) を用いたロニダゾールの少なくとも 104 週間の混餌投与 (0 (2 群)、約 5、10 又は 20 mg/kg 体重/日) による慢性毒性/発がん性併合試験が実施された。また、衛星群 (一群雌雄各 15 匹) を設定し、投与 6、13、25、52 及び 78 週に採血及び尿検査を実施した。投与は、少なくとも 104 週間、剖検が終了する 108 週まで継続された。病理組織学的検査を、全主試験群の組織に対して実施した。なお、本試験は要約のみが提出されており、個々の動物のデータは提出されていない。

試験期間を通じて投与に関連した一般状態の異常はみられなかった。最後の数か月間、20 mg/kg 体重/日投与群で、生存率の有意な低下が認められた。他の投与群における生存率は対照群と同程度であった。試験 2 年目において 10 mg/kg 体重/日以上投与群の雌雄の体重増加量は、対照群と比較して軽度に減少した。

非腫瘍性病変については、20 mg/kg 体重/日投与群において精巣萎縮が増加したのみであった。

腫瘍性病変については、20 mg/kg 体重/日投与群の雄及び 10 mg/kg 体重/日以上投与群の雌において、乳腺線維腺腫の発生率が有意に増加したのみであった。これらの腫瘍の発生率を表 19 に示した。(参照 3)

食品安全委員会は、本試験において、10 mg/kg 体重/日以上投与群に体重増加量の

減少がみられたことから、NOAEL を 5 mg/kg 体重/日と設定した。また、20 mg/kg 体重/日以上投与群の雄及び10 mg/kg 体重/日以上投与群の雌に乳腺線維腺腫の増加が認められたことから、発がん性が示唆された。

表 19 ラットを用いた 104 週間慢性毒性/発がん性併合試験における
乳腺線維腺腫の発生数（発生率%）

性別	投与量 (mg/kg 体重/日)				
	対照群 1	対照群 2	5	10	20
雄	3 (5%)	2 (3.3%)	3 (5%)	6 (10%)	8* (13.3%)
雌	45 (75%)	42 (70%)	49 (81.7%)	53* (88.3%)	54* (90%)

* : $p < 0.05$

n=60

JECFA は、イヌを用いた 2 年間慢性毒性試験 [II. 6. (1)] 及びラットを用いた 104 週間慢性毒性/発がん性併合試験 [II. 6. (4)] でみられた精巣及び中枢神経系への影響から、無作用量 (NOEL) を 5 mg/kg 体重/日と設定した。また、マウスを用いた 81 週間発がん性試験 [II. 6. (2)] 及びラットを用いた 104 週間慢性毒性/発がん性併合試験 [II. 6. (4)] でみられた肺腫瘍及び乳腺腫瘍の増加から、発がん性に対する NOEL を 5 mg/kg 体重/日と設定した。(参照 3)

食品安全委員会は、イヌを用いた 2 年間慢性毒性試験 [II. 6. (1)] 及びラットを用いた 104 週間慢性毒性/発がん性併合試験 [II. 6. (4)] でみられた体重増加量の減少、精巣及び中枢神経系への影響から、一般毒性に対する NOAEL を 5 mg/kg 体重/日と設定した。また、マウスを用いた 81 週間発がん性試験 [II. 6. (2)] でみられた肺腫瘍の増加並びにラットを用いた 95 週間及び 104 週間慢性毒性/発がん性併合試験 [II. 6. (3) 及び(4)] でみられた乳腺腫瘍の増加から、ロニダゾールには発がん性が示唆された。

7. 生殖発生毒性試験

(1) 3 世代繁殖試験 (ラット)

ラット (SD 系、試験開始時 35 日齢、雄 10 匹及び雌 20 匹/群) を用いたロニダゾールの混餌投与 (混餌濃度 0、0.02、0.04 又は 0.089% (0、約 25、30 及び 60 mg/kg 体重/日に相当)) による 3 世代 (2 腹/世代) 繁殖試験が実施された。被験物質の投与を親動物の交配 70 日前に開始し、3 世代に渡って継続した。次世代の親動物は、2 産目の児動物から選択して交配した。1 産目に得られた児動物は、離乳児の検査が終了した時点で安楽死処置した。

母動物について、行動、外観、体重又は平均摂餌量に変化はみられなかった。投与に関連した異常は、いずれの投与群の児動物にも認められなかった。3 世代に渡る合計 6 回の繁殖期のいずれにおいても、受胎能、妊娠期間、生存率及びほ育率といった指標には、対照群と投与群との間に差はみられなかった。

出生時の児動物の平均体重に影響はみられなかった。0.089%投与群では、対照群又は 0.02%投与群と比較して、同腹児数が有意に減少した。0.04%投与群でも同腹児数

がやや減少したが、対照群との間で統計学的に有意な差はみられなかった。同腹児数が少なかったため、離乳児の平均体重は 0.04%以上投与群¹でより大きくなった。いずれの投与群の F_{3b} 児動物にも、関連した肉眼的又は病理組織学的変化はみられなかった。(参照 3)

食品安全委員会は、本試験において、親動物に投与による影響がみられなかったことから、親動物に対する NOAEL を最高用量の 0.089% (60 mg/kg 体重/日に相当) と設定した。また、0.089%投与群で同腹児数が有意に減少したことから、児動物に対する NOAEL を 0.04% (30 mg/kg 体重/日に相当) と設定した。

(2) 発生毒性試験 (マウス)

妊娠マウス (CF₁S 系、20 匹/群) の妊娠 6~15 日にロニダゾールを強制経口投与 (0 (2 群)、50、100 又は 200 mg/kg 体重/日) して、発生毒性試験が実施された。

200 mg/kg 体重/日投与群では、対照群と比較して、母動物の平均体重増加量が有意に低下した。50 及び 100 mg/kg 体重/日投与群における一腹当たりの平均着床数、吸収数及び生存胎児数並びに一腹当たりの平均胎児体重は、対照群の値とほぼ同じであった。一腹当たりの平均着床数及び平均生存胎児数は、200 mg/kg 体重/日投与群でやや低下した。

対照群と投与群で得られた全胎児の外表検査では、奇形の誘発は認められなかった。対照群及び 200 mg/kg 体重/日投与群の内臓及び骨格検査では、奇形の誘発は認められなかった。200 mg/kg 体重/日投与群でみられた 4 種類の内臓奇形は同じ胎児でみられており、自然発生であると考えられた。(参照 3)

食品安全委員会は、本試験において、200 mg/kg 体重/日投与群の母動物に体重増加量の低下が認められたことから、母動物に対する NOAEL を 100 mg/kg 体重/日と設定した。一方、胎児には投与による影響はみられなかったことから、胎児に対する NOAEL を最高用量である 200 mg/kg 体重/日と設定した。催奇形性はみられなかった。

(3) 発生毒性試験 (ラット)

妊娠ラット (SD 系、20 匹/群) の妊娠 6~15 日に、試験 1 では 0、50、100 及び 200 mg/kg 体重/日、試験 2 では 0、100、150 及び 200 mg/kg 体重/日の用量でロニダゾールを強制経口投与して、発生毒性試験が実施された。

50、100 又は 150 mg/kg 体重/日投与群のいずれにおいても、投与に関連した胚毒性は認められなかった。200 mg/kg 体重/日投与群では、吸収胚数が試験 1 では僅かながら有意に増加したが、このような変化は試験 2 ではみられなかった。

100 mg/kg 体重/日以上投与群では、いずれの試験においても一腹あたりの平均胎児体重が減少した。100 mg/kg 体重/日投与群では、母動物の平均体重増加量が試験 2 で有意に低下した。150 又は 200 mg/kg 体重/日投与群では、試験 1 及び試験 2 で母動

¹ 原文では “40 and 60 mg/kg bw/day” とあるが、高い 2 用量を指すと考えられることから、“0.04% 以上投与群” と記載した。

物の平均体重増加量が有意に低下した。

試験 1 で実施された全群の全胎児の外表検査では、50 mg/kg 体重/日投与群に奇形は認められなかった。100 mg/kg 体重/日投与群では、重度の水頭症を伴う矮小胎児 1 例に小眼球が生じた。200 mg/kg 体重/日投与群では、胎児 4 例に頭部の奇形がみられた（小眼球 2 例、異所性眼球 1 例、小顎症及び口蓋裂 1 例）。対照群及び 200 mg/kg 体重/日投与群の全胎児並びに 100 mg/kg 体重/日投与群で外表奇形がみられた胎児 1 例の内臓及び骨格検査では、催奇形性の証拠となるような新たな所見はみられなかった。しかし、200 mg/kg 体重/日投与群では、胸骨分節の未骨化、頭頂骨間（interparietals）、上後頭骨（supraoccipitals）及び頬骨（zygomatics）の不完全骨化といった骨格変異の発生率が増加した。

試験 2 で実施された全群の全胎児の外表検査では、奇形の誘発は認められなかった。対照群の胎児 1 例に左眼の小眼症が、200 mg/kg 体重/日投与群の胎児 1 例に小顎症を伴わない頸部の水腫がみられた。二つの対照群と 200 mg/kg 体重/日投与群で得られた胎児の約 1/3 に対する内臓検査では、奇形の誘発は認められなかった。200 mg/kg 体重/日投与群で観察された 11 種類の奇形は、重度の矮小を含む複数の外表奇形を有する同一の胎児に観察されたことから、いずれも自然発生奇形と考えられた。200 mg/kg 体重/日投与群では、骨格変異及び胸骨分節未骨化の発生率の増加がみられた。（参照 3）

食品安全委員会は、これら 2 試験において、100 mg/kg 体重/日以上投与群で母動物の体重増加量の低下、100 mg/kg 体重/日以上投与群で胎児体重の減少がみられたことから、母動物及び胎児に対する NOAEL をいずれも 50 mg/kg 体重/日と設定した。催奇形性はみられなかった。

（4）発生毒性試験（ウサギ）

独立した 2 試験が報告された。

最初の試験では、妊娠ウサギ（New Zealand 種、15 匹/群）の妊娠 7～15 日に、試験 1 では 0、3、10 又は 30 mg/kg 体重/日、試験 2 では 0、10 又は 30 mg/kg 体重/日の用量でロニダゾールを強制経口投与して、発生毒性試験が実施された。

3 及び 10 mg/kg 体重/日投与量群では、投与に起因する奇形の誘発、胚毒性又は胎児毒性は観察されなかった。30 mg/kg 体重/日投与群では、母動物の体重増加量及び胎児の平均体重が有意に低下した。

30 mg/kg 体重/日投与群の胎児に心臓及び大血管の奇形がみられた。ウサギでは、心大血管系に様々な奇形が自然発生することが知られている。このような奇形を有する胎児の出現率は、過去 7 試験の対照群で 0.4～2.4%であったのに対して、ロニダゾールの 2 試験では、30 mg/kg 体重/日投与群の胎児における発生率は 2.7～2.8%であった。これらの事実から、ロニダゾールを投与された母動物由来の胎児で観察される心臓血管奇形は、投与に関連していないと結論づけられた。（参照 3）

食品安全委員会は、本試験において、30 mg/kg 体重/日投与群で母動物の体重増加量及び胎児の平均体重の有意な低下がみられたことから、母動物及び胎児に対する NOAEL を 10 mg/kg 体重/日と設定した。催奇形性はみられなかった。

III. 食品健康影響評価

1. 国際機関等における評価

(1) JECFA における評価

JECFA は、1989 年及び 1994 年の 2 回評価を行っている。

1989 年の評価では、慢性毒性試験及び発生毒性試験において、NOEL が 5 mg/kg 体重/日以上であることが明らかであるとし、NOEL 5 mg/kg 体重/日及び安全係数 200 に基づいて、暫定的な一日摂取許容量 (ADI) を 0~0.025 mg/kg 体重/日と設定した。安全係数は、ほ乳動物におけるロニダゾールの遺伝毒性試験、発がん性及び他に関連する毒性影響についての NOEL を調べた最近の発がん性試験 2 試験の結果から選定された。これにはロニダゾールの複数の代謝物に変異原性がないことも影響している。

当時の評価において、JECFA は発がん性試験の個々の動物のデータ提出及び発がんメカニズムを調べた試験成績を 1993 年までに提出するよう求めた。(参照 3)

1994 年の評価では求められたデータが提出されなかったため、JECFA は、暫定的に設定された ADI を延長せず、ADI を設定できないと判断した。(参照 9)

(2) EMEA における評価

EMEA は、2 回評価を行っている。

1 回目の評価では、CVMP は、復帰突然変異試験における陽性結果及び最高用量群のラットの雌における乳腺癌の増殖は除外しても、ロニダゾールを用いた数々の変異原性試験において得られた曖昧な結果に鑑み、ニトロフラン類においてみられた現実的な解決方法と同様のものをロニダゾールに採用すること並びにロニダゾール及びニトロイミダゾール構造を保持した代謝物を含む抽出可能な残留物の暫定の MRL として 2 ng/g を容認することを提案し、適用された。(参照 5)

この暫定 MRL は 2 年間という期限が設けられており、マーカー代謝物の特定に関する更なる情報が求められた。しかし、暫定 MRL の期間満了時に追加情報の提出はなかったため、暫定 MRL の期間は 1994 年の 1 月 1 日に終了し、本剤は MRL が設定できない成分が掲載される COUNCIL REGULATAION (EEC) No 2377/90 の附属書 IV²に収載され、使用が禁止された。(参照 10)

2. 食品健康影響評価

各種遺伝毒性試験より、ロニダゾールは *in vitro* の細菌を用いた復帰突然変異試験及び fluctuation test で陽性であった。これは供試微生物自身のニトロ還元酵素活性による可能性が示唆されたが、この可能性については証明されていない。また、*in vivo* のマウスを用いた優性致死試験及び小核試験の結果は陰性であったが、キイロシヨウジョウバエを用いた伴性劣性致死試験で陽性であり、マウスの骨髄細胞染色体異常試験で染色体異常誘発作用が報告されるなど相反した結果であった。マウスを用いた小核試験と染

² いくつかの値においても有害影響の可能性があるので、MRL を設定できない成分が掲載されている。付属書IVに収載された物質は EU 各国で食用動物への使用が禁止される。(現在の COMMISSION REGULATION (EU) No 37/2010 の Table 2 に該当する。) (参照 6、11)

色体異常試験の結果が相反しているため、ロニダゾールの生体にとって問題となる遺伝毒性については判断できなかった。

また、マウス及びラットを用いた発がん性試験が3試験実施されている。マウスを用いた発がん性試験では、良性及び悪性の肺腫瘍及び癌がそれぞれ10及び20 mg/kg 体重/日以上、ラットを用いた発がん性試験2試験では、乳腺腫瘍が10 mg/kg 体重/日以上の雌で有意に増加し、ロニダゾールの発がん性が示唆された。なお、発がんメカニズムは解明されておらず、遺伝毒性と発がん性の関連性も不明であることから、現時点で評価した知見からは、ロニダゾールの発がん性に閾値が存在するかどうかについては判断できなかった。

ロニダゾールの遺伝毒性を判断できず、発がん性が示唆されたことから、ADIを設定すべきでないと判断した。

表 20 JECFA における各種試験の無毒性量等の比較

動物種	試験	投与量 (mg/kg 体重/日)	無毒性量等 (mg/kg 体重/日)
マウス	81 週間慢性毒性/発がん性併合	0、5、10、20、混餌投与	5 良性・悪性肺腫瘍増加
	発生毒性	0、50、100、200、強制経口投与	100 体重増加量減少 催奇形性なし
ラット	13 週間亜急性毒性	0、50、100、200、強制経口 (週 5 日)	50 体重増加量減少、精巣縮小、精細管萎縮
	95 週間慢性毒性/発がん性併合	0、10、20、40、混餌投与	— 20 雄：精巣萎縮
	104 週間慢性毒性/発がん性併合	0、約 5、10、20、混餌投与	5 体重増加量減少、乳腺腫瘍
	3 世代繁殖毒性	0、0.02、0.04、0.89 %、混餌投与 (0、25、30、60)	30 同腹児数の減少、生殖毒性及び催奇形性なし
	発生毒性	0、50、100、200、強制経口 0、100、150、200、強制経口	母動物：100 胎児：50 母動物の体重増加量減少、胎児体重減少 催奇形性なし
ウサギ	発生毒性	0、3、10、30、強制経口	母動物及び胎児：10 母動物の体重増加量減少、胎児の体重減少 催奇形性なし
		0、10、30、強制経口	
イヌ	17 週間亜急性毒性	0、25、50、100、200、経口 (週 5 日)	25 体調不良、血清 AST 軽度増加、精巣低形成
	2 年間慢性毒性	0、10、20、40、経口	— 10：中枢神経症状
ADI			ADI を設定できない
ADI 設定根拠資料			NOEL：— SF：—

<別紙1：代謝物/分解物等略称>

略称等	代謝物/分解物名称
HMMNI	1-メチル-2-ヒドロキシメチル-5-ニトロイミダゾール
—	1-メチル-2-カルバモイルオキシメチル-5-アセトアミドイミダゾール
—	1-メチル-2-カルバモイルメチル-5-アセトアミドイミダゾール
—	1-メチル-2-ヒドロキシメチル-5-アセトアミドイミダゾール
—	イミダゾール

—：略称なし

<別紙2：検査値等略称>

略称等	名称
ADI	一日摂取許容量
ALP	アルカリホスファターゼ
AST	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ [= グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ (GOT)]
CVMP	欧州医薬品審査庁動物用医薬品委員会
EMA	欧州医薬品審査庁
Glu	血清グルコース
Hb	ヘモグロビン（血色素）量
HPLC	高速液体クロマトグラフィー
Ht	ヘマトクリット値
JECFA	FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議
LD ₅₀	半数致死量
LOAEL	最小毒性量
MRL	最大残留基準値
NADH	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド
NADPH	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリッ酸
NOAEL	無毒性量
NOEL	無作用量
T _{1/2}	半減期
TC	薄層クロマトグラフィー

<参照>

1. 食品、添加物等の規格基準（昭和 34 年厚生省告示第 370 号）の一部を改正する件（平成 17 年 11 月 29 日付、厚生労働省告示第 499 号）
2. The Merck Index, 15th, 2013
3. JECFA: Ronidazole. Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food. WHO Food Additives Series, No. 25, 1990, nos 669 on INCHEM.
4. JECFA: Ronidazole. Residues of some veterinary drugs in foods and animals, 1989.
5. EMEA: Committee for Veterinary Medicinal Products, RONIDAZOLE (1), Summary Report, 1996.
6. European Union: COMMISSION REGULATION (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in food stuffs of animal origin.
7. M Hite, H Skeggs, J Noveroske, H Peck: Mutagenic Evaluation of Ronidazole. Mutation Research, 1976; 40: 289-304.
8. JL Oud, AHH Reutlinger, J Branger: An Investigation into the Cytogenetic Damage Induced By the Coccidiostatic Agents Amprolium, Carbadox, Dimetridazole and Ronidazole. Mutation research, 1979; 68: 179-182.
9. JECFA: Ronidazole. Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food. WHO Food Additives Series, No. 33, 1994, nos 811 on INCHEM.
10. EMEA: Committee for Veterinary Medicinal Products, RONIDAZOLE (2), Summary Report, 1996.
11. European Union: COUNCIL REGULATION (EEC) No 2377/90 of 26 June 1990 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin.