



FRONT OFFICE VOEDSEL- EN PRODUCTVEILIGHEID

**Beoordeling toxicologie furazolidon en  
3-amino-2-oxazolidinone (AOZ)**

---

Risicobeoordeling aangevraagd door:	NVWA-BuRO
Risicobeoordeling opgesteld door:	RIVM
Datum aanvraag:	18-07-2014
Datum risicobeoordeling:	23-07-2014 (aangepaste definitieve versie)
Projectnummer:	V/090130

---

**Subject**

The NVWA heeft bedrijfsmonsters van charges Sojamix, geleverd op 15, 22 en 29 maart 2014 door een diervoederhandelaar aan een mengvoederbedrijf, onderzocht op gehalten furazolidon. Vervolgens zijn charges aan kalverhouders geleverd waarvan de dieren later positief bleken voor furazolidon. In deze drie bedrijfsmonsters zijn hoeveelheden van 25, 15.000 en 160 microgram/kg sojamix aangetroffen (of 0,75, 450 en 4,8 microgram/kg diervoeder). Inmiddels is ook bekend dat varkenshouders vergelijkbare met furazolidon verontreinigde Sojamixen hebben ontvangen.

**Vraagstelling**

1. Is het correct te stellen dat schattingen van de WHO (1993) en RIVM (2003) leiden tot een ontoelaatbaar risico voor de mens bij een blootstelling van 3 microgram furazolidon per dag gedurende een levenslange periode?
2. Is het wetenschappelijk correct om te veronderstellen dat AOZ eenzelfde mate van giftigheid heeft als de moederstof furazolidon?

### **Conclusies**

- 1) RIVM heeft in 2003 op basis van de beschikbare gegevens uit WHO (1993) door middel van lineaire extrapolatie een Virtual Safe Dose (VSD) van 50 ng/kg lichaamsgewicht/dag afgeleid voor furazolidon. Voor een persoon van 60 kilogram komt dit overeen met een blootstelling van 3 µg/dag. Het risico bij blootstelling aan furazolidon gelijk of lager dan de VSD wordt toelaatbaar geacht.
- 2) Op basis van data uit een micronucleusstudie met AOZ in muizen is met behulp van een recent door het RIVM ontwikkelde methode de carcinogene potentie van AOZ geschat. Op basis hiervan zou kunnen worden geconcludeerd dat de carcinogene potentie van AOZ zeer waarschijnlijk lager is dan die van furazolidon.

### **Inleiding**

De toxicologie van furazolidon is beoordeeld door JECFA in 1993 en EMA in 1997. Verder zijn meer recent studies over de kinetiek, het metabolisme en genotoxiciteit van furazolidon en/of zijn meest belangrijke metaboliet 3-amino-2-oxazolidinon (AOZ) verschenen. In 2003 heeft het RIVM een risicobeoordeling uitgevoerd voor consumptie van garnalen waarin AOZ was aangetroffen. Destijds is geconcludeerd dat een blootstelling aan ca. 50 ng furazolidon/kg lg/dag (3 microgram furazolidon per dag voor een 60 kg volwassene) gedurende een levenslange periode resulteert in een extra kankerincidentie risico van 1 per 1 miljoen in de humane populatie.

#### **Vraag 1**

*Is het correct te stellen dat schattingen van de WHO (1993) en RIVM (2003) leiden tot een ontoelaatbaar risico voor de mens bij een blootstelling van 3 microgram furazolidon per dag gedurende een levenslange periode?*

WHO (1993) heeft geen schatting van de "Virtual Safe Dose" gemaakt. WHO concludeerde dat "gezien de genotoxische en carcinogene eigenschappen van furazolidon en de deficiënties met betrekking tot data over de metabolieten er geen ADI kon worden afgeleid".

Carcinogeniteitsstudies met furazolidon zijn uitgevoerd met ratten en muizen. Bij ratten werden bij doseringen van 25 en 50 mg/kg lg/dag een verhoogde tumorincidentie gezien (o.a. schildklier-, borst- en huidtumoren). Bij muizen werden bij doseringen van 12, 24 en 47 mg/kg lg/dag eveneens tumoren, met name long- en lymfosarcomen, waargenomen (WHO, 1993).

RIVM (2003) heeft op basis van de beschikbare gegevens uit WHO (1993) door middel van lineaire extrapolatie een schatting gemaakt van de Virtual Safe Dose (VSD), d.w.z. de dagelijkse dosis waarbij de kankerincidentie in de humane populatie 1 per 1 miljoen levenslang blootgestelden bedraagt (het  $1 : 10^6$  risico); dit risico wordt acceptabel geacht (zie [http://www.rivm.nl/rvs/Normen/Consumenten/VSD\\_en\\_MTR](http://www.rivm.nl/rvs/Normen/Consumenten/VSD_en_MTR)).

Voor furazolidon kan aldus een VSD van ca. 50 ng/kg lg/dag worden afgeleid. Voor een persoon van 60 kilogram komt dit overeen met een blootstelling van 3 µg/dag.

Hierbij dient te worden opgemerkt dat het hier om levenslange dagelijkse blootstelling gaat. Uiteraard zal bij een kortdurende blootstelling veel hogere innames nog tot een toelaatbaar risico leiden.

## Vraag 2

*Is het wetenschappelijk correct om te veronderstellen dat AOZ eenzelfde mate van giftigheid heeft als de moederstof furazolidon?*

### Niet carcinogene effecten.

Furazolidon veroorzaakt bij zoogdieren remming van het enzym mono-amine-oxidase (MAO), dat betrokken is bij de afbraak van belangrijke signaalstoffen in het lichaam zoals (nor)adrenaline, dopamine en serotonine. MAO-remming leidt tot verhoogde bloeddruk en ligt mogelijk ten grondslag aan de bij proefdieren waargenomen neurotoxische verschijnselen (excitatie) (WHO, 1993). Na herhaalde blootstelling van ratten werden onder meer levereffecten (vacuolisatie), een verminderde voedselconsumptie, een verminderd lichaamsgewicht en anemie gevonden. Herhaalde blootstelling van honden resulteerde onder meer in levereffecten, anemie, een verlengde thrombine tijd en cholestase bij doseringen vanaf 1 mg/kg lg/dag.

Er zijn, behalve in vitro studies naar MAO-inhibitie in levercellen van het varken (Hoogenboom et al., 1991, 2002) en een in vivo micronucleus test in de muis (Hoogenboom et al., 2002; zie onder) geen toxiciteitsstudies of toxicokinetiekstudies met AOZ beschikbaar. AOZ blijkt in vitro het enzym MAO te kunnen remmen. In de in vivo micronucleus-test trad bij een aantal dieren mortaliteit op bij eenmalige intraperitoneale doseringen  $\geq$  125 mg AOZ/kg lg. Het is niet duidelijk of de effecten in de studies met furazolidon worden veroorzaakt door de moederstof en/of door de metaboliet AOZ of één of meerdere van de andere metabolieten.

Wel kan worden opgemerkt dat de hierboven beschreven effecten optreden bij doseringen die veel hoger zijn dan de VSD van 50 ng/kg lg/dag voor carcinogene effecten van furazolidon.

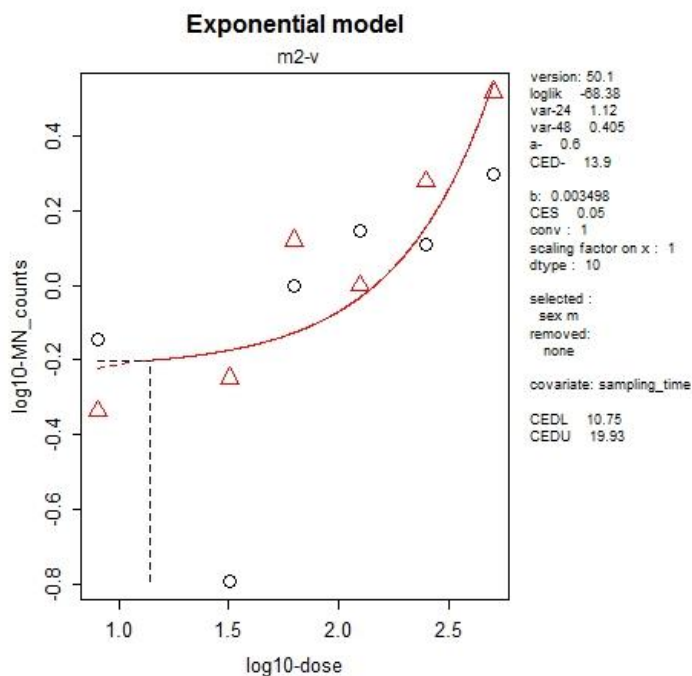
### Carcinogene en genotoxische effecten.

Furazolidon is een mutagene stof dat DNA-schade geeft in zowel bacteriële als zoogdiercellen systemen. In bacteriële systemen was furazolidon genotoxisch zowel met als zonder metabole activatie, hetgeen erop duidt dat de moederstof zelf mutageen is. In ratten en muizen is furazolidon carcinogeen (zie onder vraag 1). Op basis van de data uit de carcinogeniteitsstudies werd een VSD van 50 ng/kg lg/dag afgeleid.

Er zijn vrijwel geen toxiciteitsgegevens over AOZ beschikbaar. De carcinogeniteit van AOZ is niet onderzocht, maar er wordt op basis van de genotoxische eigenschappen van AOZ verondersteld dat deze metaboliet betrokken is bij de carcinogene werking van furazolidon. AOZ is mutageen in bacteriën, zowel met als zonder metabole activering. AOZ veroorzaakt in humane perifere lymfocyten in vitro schade aan de chromosomen. Deze clastogene activiteit vindt plaats in afwezigheid van metabole activering. Ook in vivo heeft AOZ een DNA-beschadigende werking: micronucleustesten uitgevoerd in muizen lieten een toename zien van micronucleï in beenmerg (Hoogenboom et al., 2002). Er zijn onvoldoende gegevens om een directe vergelijking van de carcinogene potentie van beide stoffen te maken.

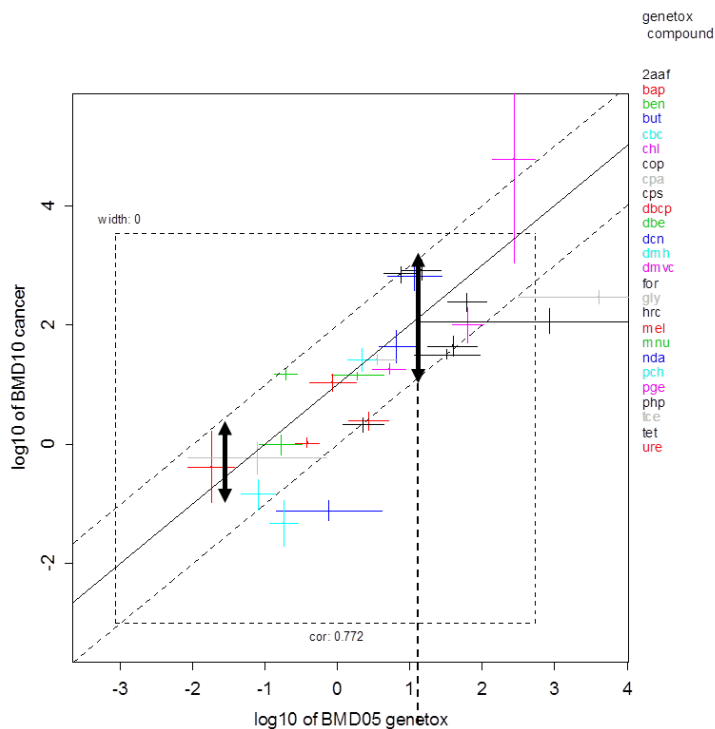
Het RIVM heeft recent een methode ontwikkeld waarmee op basis van gegevens uit een in vivo micronucleus test in de muis een schatting kan worden gemaakt van de carcinogene potentie van die stof (Hernandez et al., 2012). Deze methode is in de huidige toxi-

citeitsbeoordeling toegepast op de data van de micronucleus test met AOZ. Hoogenboom et al. (2002) hebben de micronucleus incidentie in beenmergcellen van de muis getest na intraperitoneale blootstelling aan AOZ in eenmalige doseringen van 32, 62.5, 125, 250 en 500 mg/kg lg in mannetjes en 250, 500, 750, 1000, 1500 mg/kg lg in vrouwtjes (de doseringen waren gebaseerd op twee pilot studies). Beenmergcellen werden bemonsterd na 24 en 48 uur. In de test werden 5 mannetjes en 5 vrouwtjes per dosering en monstertijd behandeld. Bij mannetjes trad mortaliteit op bij doseringen van 125 mg/kg lg (2 van de 10) en 500 mg/kg lg (2 van de 10), bij vrouwtjes trad mortaliteit op bij 500 mg/kg lg (2 van de 10), 750 mg/kg lg (1 van de 10), 1000 mg/kg lg (2 van de 10) en 1500 mg/kg lg (1 van de 10). Hoogenboom et al. (2002) merkten op dat gezien het verschil in gevoeligheid voor AOZ tussen mannetjes en vrouwtjes, de afwezigheid van een dosis respons relatie en de grote interindividuele variatie in toxiciteit/mortaliteit en de frequentie van micronucleus vorming, de resultaten met de nodige voorzichtigheid geïnterpreteerd dienen te worden, en dat mogelijk een niet-genotoxisch mechanisme verantwoordelijk was voor micronucleusinductie door AOZ. Echter, in afwezigheid van verdere data wordt vooralsnog geconcludeerd dat AOZ mutageen is in de micronucleus test in de muis.



Figuur 1. Effect van AOZ op micronucleusinductie in beenmerg van mannelijke muizen

De gegevens van de mannelijke muizen in de studie van Hoogenboom et al. (2002) laten wel degelijk een goede dosis respons relatie zien (zie Fig. 1). Hieruit werd in de huidige toxiciteitsbeoordeling een  $BMDL_{05}$  afgeleid van 11 mg/kg lg ( $BMDU_{05} = 20$  mg/kg lg). Volgens de methode van het RIVM (Hernandez et al. 2012) kan hieruit afgeleid worden dat de  $BMD_{10}$  voor carcinogeniteit ergens in de range van 11-2000 mg/kg lg/dag zou moeten liggen. Zie Fig. 2 voor illustratie van deze empirische relatie.



Figuur 2. BMD10 van carcinogeniteitstest uitgezet tegen BMD05 van *in vivo* micronucleustest voor 26 stoffen. De 90%-betrouwbaarheidsintervallen zijn in beide richtingen uitgezet. De onderste gestippelde lijn is de lijn waarbij de BMD10 (tumoren) gelijk is aan de BMD05 (micronucleus), de bovenste gestippelde lijn ligt daar een factor 100 boven. De kleine dikke pijl geeft de onzekerheid van de BMD voor een bepaalde stof waar een carcinogeniteitstest voor beschikbaar is. De grote dikke pijl geeft de onzekerheid in de BMD voor tumoren, gegeven een micronucleustest voor die stof (en dus bekende BMD op de x-as, zie verticale stippellijn).

Op basis van de VSD van 50 ng/kg lg/dag voor furazolidon en de BMD10 voor AOZ kan een grove schatting van het verschil in carcinogene potentie van furazolidon en AOZ gemaakt worden. De VSD van 50 ng/kg lg/dag (verkregen via lineaire extrapolatie naar  $10^{-6}$  risico) komt overeen met een BMD10 ( $10^{-1}$  risico) van ongeveer 5 mg/kg lg/dag. Deze waarde voor furazolidon is lager dan de ondergrens van de onzekerheidsrange van de BMD10 voor AOZ. Op basis hiervan zou kunnen worden geconcludeerd dat de carcinogene potentie van AOZ zeer waarschijnlijk lager is dan die van furazolidon.

## Referenties

- WHO (1993) Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food, 40th JECFA, WHO Food Additives Series 31, Geneva.
- RIVM (2003) Advies inzake residuen van furazolidon in garnalen. Advies van RIVM aan de Keuringsdienst van Waren.
- EMA, 1997. Summary report Furazolidone. European Agency for the Evaluation of Medicines, Committee for Veterinary Medicinal Products, London.
- L.A.P. Hoogenboom, O. Tomassini, M.B.M. Oorsprong, H.A. Kuiper (1991). The use of pig hepatocytes to study the inhibition of monoamine oxidase by furazolidone. Food and Chemical Toxicology. 29: 185-191.

- L.A.P. Hoogenboom, G.D. van Bruchem, K. Sonne, I.C. Enninga, J.A. van Rhijn, H. Heskamp, M. B.M. Huveneers-Oorsprong, J.C.M. van der Hoeven and H.A. Kuiper (2002). Absorption of a mutagenic metabolite released from protein-bound residues of furazolidone. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 11: 273-287.
- L. Hernández, J van Benthem and W. Slob (2012). Estimating the carcinogenic potency of chemicals from the in vivo micronucleus test RIVM report 340700007. National Institute for Public Health and the Environment (RIVM). Available online: [www.rivm.nl](http://www.rivm.nl).