

A. 研究目的

本研究は、飲料水中の化学物質の基準値設定及び改定に資するために、食品安全委員会や WHO が新たに健康影響を評価した化学物質や、新たに健康影響が懸念される化学物質の毒性情報を収集し整理すると共に、化学物質の安全性評価手法に関する最新知見の動向調査を行い、得られた知見の基準値設定等への適用の妥当性について検証することを目的としている。

本年度は、昨年度から継続して行っている化学物質の複合暴露によるリスク評価手法に関する研究では、これまでに提案されている評価手法について、その利点や欠点を含めて整理した。また、WHO 飲料水水質ガイドラインで不確実係数の分割アプローチが適用されているホウ素について、最新の情報を基に確率論的アプローチを用いて算出した新規不確実係数及びその分割値 (Hasegawa et al., 2010) の適用を試みた。さらに、環境を介した暴露によるヒトの健康への影響が懸念される長鎖パーフルオロカルボン酸類に関して、その毒性強度が炭素鎖の長さ依存して変化する要因を明らかにすることを目的として、ラットの血清中有機フッ素化合物の濃度を測定するための分析法を開発し、perfluorooctadecanoic acid (PFOcDA) を経口投与したラット血清試料中の有機フッ素化合物 (PFCs) 濃度の測定を試みた。

B. 研究方法

1. 複合暴露によるリスク評価手法に関する研究: 混合物への複合暴露によるヒト健康影響評価に関して、これまでに公表されているガイダンスや Review (Kortenkamp et al. 2009; Meek et al. 2011; Reffstrup et al.

2010; Teuschler 2007; US EPA 1986, 2000, 2003; Wilkinson et al. 2000) を基に、提案されている具体的な評価手法を整理し、その問題点について考察した。

2. 新規不確実係数及びその分割法を適用したホウ素の安全性評価: ホウ素の毒性関連情報を収集・整理し、最新の情報を基に確率論的アプローチを用いて算出した新規不確実係数及びその分割値 (Hasegawa et al. 2010) の適用を試みた。

3. 長鎖パーフルオロカルボン酸の毒性発現の違いに関する研究:

ラットの血清中有機フッ素化合物の濃度を測定するために、硫酸水素テトラブチルアンモニウム (TBAS) を用いた液-液抽出法による試料調製と逆相系の LC/MS/MS 法による分離定量を組み合わせた分析法を開発した。さらに、この分析法を用いて、炭素数 18 の perfluorooctadecanoic acid (PFOcDA, CAS No. 16517-11-6) の反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験のラット血清試料中の各種 PFCs の濃度の測定を試みた。

3.1. 標準物質および試薬

有機フッ素化合物 (PFCs): 表 1 に示す炭素数 14 以下の PFCs の 2mg/L メタノール溶液は、ウェリントンラボオラトリー社から購入した。ペルフルオロヘキサデカン酸 (PFHxDA) 及び PFOcDA は Exflour Research Corporation (Round Rock, TX, USA) から購入したものを使用した。

PFHxDA 及び PFOcDA の各 10mg を採り、アセトンで 10mL とし、各溶液を 1mL をメスフラスコに採り、メタノールで 100 倍に希釈した。

内部標準物質: パーフルオロオクタン酸の 2 重水素体 (PFOA-13C₂, ウェリントンラ

ボラトリー社製), ミリスチン酸の重水素体 (FA14-d3, ケンブリッジアイソトープラボラトリー社製), パルミチン酸重水素体 (FA16-d3, ケンブリッジアイソトープラボラトリー社製) の各 10mg を採り, メタノールで 10mL とした。各溶液 1mL をメスフラスコに採り, メタノールで 1000 倍希釈した。

0.5M 硫酸水素テトラブチルアンモニウム (TBAS) 溶液: TBAS の試薬特級 (和光純薬) 17.0g を採り, 精製水で 80mL にし, 水酸化ナトリウムで pH10 とした後, 全量を 100mL としたもの

0.25M 炭酸ナトリウム: 試薬特級 (和光純薬) 5.3g を採り, 精製水で全量を 200mL にしたもの

メチルターシャリーブチルエーテル

(MTBE): 水質試験用 (関東化学)

酢酸アンモニウム: 試薬特級 (和光純薬)

精製水: 水道水を純水製造装置 Elix UV5 (ミリポア製) で処理したもの

メタノール: 残留農薬試験用 (和光純薬)

アセトニトリル: 高速液体クロマトグラフィー用

窒素ガス

表 1. 測定対象の有機フッ素化合物 (PFCs)

No	PFCs	PFCs	略名	LOG (ng/mL)	tR (min)	cone (V)	collision (V)	parent (m/z)	daughter (m/z)
1	perfluoro-n-butanoic acid	パーフルオロブタン酸	PFBA	0.5	2.4	35	10	213	169
2	perfluoro-n-pentanoic acid	パーフルオロペンタン酸	PFFeA	0.50	2.9	35	10	263	219
3	perfluoro-n-hexanoic acid	パーフルオロヘキサン酸	PFFxA	0.50	3.8	35	10	313	269
4	perfluoro-n-heptanoic acid	パーフルオロヘプタン酸	PFFpA	0.50	5.9	35	10	363	319
5	perfluoro-n-octanoic acid	パーフルオロオクタン酸	PFOA	0.50	8.6	35	10	413	369
6	perfluoro-n-[1,2- ¹³ C ₂]-octanoic acid	パーフルオロオクタン酸	PFOA- ¹³ C ₂	0.50	8.6	35	10	415	370
7	perfluoro-n-nonanoic acid	パーフルオロノナン酸	PFNA	0.50	10.9	35	10	463	419
8	perfluoro-n-decanoic acid	パーフルオロデカン酸	PFDA	0.50	12.5	35	10	513	469
9	perfluoro-n-undecanoic acid	パーフルオロウンデカン酸	PFDuA	0.50	14.3	35	10	563	519
10	perfluoro-n-dodecanoic acid	パーフルオロドデカン酸	PFDoA	0.50	16.0	35	10	613	569
11	perfluoro-n-tridecanoic acid	パーフルオロトリデカン酸	PFTrDA	0.50	17.6	35	10	663	619
12	perfluoro-n-tetradecanoic acid	パーフルオロテトラデカン酸	PFTeDA	0.50	19.1	35	10	713	669
13	perfluoro-n-hexadecanoic acid	パーフルオロヘキサデカン酸	PFFxDA	0.50	21.9	35	10	813	769
14	perfluoro-n-octadecanoic acid	パーフルオロオクタデカン酸	PFOcDA	0.50	24.3	50	10	913	869
15	tetradecanoic acid-mehtyl-D ₃	テトラデカン酸	FA14-D ₃	0.50	18.9	10	50	230	230
16	hexadecanoic acid-mehtyl-D ₃	ヘキサデカン酸	FA16-D ₃	0.50	23.8	10	40	258	258

3.2 器具および装置

共栓ガラス製スピッツ: ガラス製 (容量 10mL, イワキガラス製)

マイクロシリンジ: 10~100 μL 用

遠心分離機: H-3R (国産精工製)

ポリエチレン製サンプル瓶: テフロンを使用していないポリプロピレン製 (キャップ部はポリエチレン製, 容量 300 μL, ウォーターズ製)

3.3 LC/MS/MS の分析条件

本実験には、LC/MS/MS の LC 部は Alliance 2695 Separation Module (ウォーターズ製)、MS/MS 部は Ultima PT (マイクロマス製) を用いた。

LC 部の分析は、以下の条件に従って行った。カラム：Xbridge C18 (粒径 $5\mu\text{m}$, $2 \times 150\text{mm}$)、移動相：A 液 10mM 酢酸アンモニウム-CH₃CN (10:90)、B 液 10mM 酢酸アンモニウム。グラジエント分析の条件：A 液 40% で 1 分間保持し、20 分後に A 液 100% になるようにグラジエントをかけ、25 分まで保持し、25.1 分に A 液 40% とし、35 分まで保持した。カラム温度：40°C、試料注入量：10 μL 。

MS/MS 部では以下の分析条件に従って測定した。キャピラリー電圧：1.2kV、イオン源温度：120°C、脱溶媒温度：400°C、コーンガス：50L/hr、脱溶媒ガス：580L/hr、検出器電圧：650V。その他の分析条件は表 1 に示した。

3.4 試験溶液の調製

反復投与毒性・生殖毒性併合試験において、PFOcDA (0、40、200、1000 mg/kg bw/day) を 42~56 日間投与したラット雌雄各 5 例/群 (主試験群) 及び PFOcDA (0、1000 mg/kg bw/day) を 42 日間投与し、14 日間回復させたラット雌雄各 5 例/群 (回復群) を 16~21 時間絶食させ、その後、エーテル麻酔し、腹部大動脈より採血した。分離剤入り試験管に血液を採取し、3500 回転/分で 10 分間の遠心分離で得られた血清 200 μL を共栓ガラス製スピッツに採り、内部標準 1mg/L をマイクロシリンジで 10 μL 添加した。ついで、メタノール 400 μL を加え、攪はん後 5 分間放置し、除タンパクを行った。TBAS (pH10) 200 μL 及び 0.25M 炭酸ナトリウム 400 μL を添加し、攪はん後 2 分間放置し、PFCs と TBAS のイオンペアを形成させた。さらに、MTBE 約 2mL を添加し、ミキサーで 1 分間攪はん後、20°C、3000rpm で 10 分間遠心分離し、MTBE 層を共栓ガラ

ス製スピッツに分取した。再度、MTBE 約 2mL をスピッツに加え、ミキサーで 1 分間攪はん後、20°C、3000rpm で 10 分間遠心分離し、MTBE 層を分取し、先の MTBE 層と合わせた。MTBE 層を窒素気流下で乾固し、メタノール 0.2mL を加え、十分に攪拌し、これを試験溶液とした。

C. 研究結果

1. 混合物への複合暴露によるリスク評価手法に関する研究

化学物質の複合影響を評価する方法は、『混合物全体からのアプローチ [(whole) mixture approach]』と『成分に基づいたアプローチ (Component-based approach もしくは single compound approach)』の二つに分類することが出来る。

1.1. 混合物全体からのアプローチ

複雑な環境サンプル、エンジンの排気物やヒトの血液サンプルなどの特定の化学物質混合物の直接的な毒性学的評価を行う。混合物そのものが生物学的に評価されるので、複雑なサンプルに含まれるすべての化合物の影響を、化合物間の相乗作用や拮抗作用を含めてとらえることができる。このアプローチは、例えば、関連化合物の化学的分析方法が開発されていない、もしくは、特定のサンプルに費やす費用や時間が限られているといった理由で、化学物質成分に関する知識が断片的にしか得られない状況で適用されることが多い。

一方で、混合物全体からのアプローチには、重大な欠点がある。まず、このアプローチを適用する場合には、対象とする混合物自身が直接実験に使用可能でなければならない。得られた結果は、厳格に言えば、実際に調査した混合物についてのみ適用可能であり、異なる暴露状況、特に高用量から低用量への外挿を行うには、多くの困難があると考えられる。それゆえに、環境基準の設定などを期待

した評価手法としては不適切な場合が多い。

1.2. 成分に基づいたアプローチ

評価すべき混合物そのものについてデータがない場合には、混合物中の成分に関する毒性データに基づいたリスク評価が行われる。化学物質の複合影響を、その含有成分から考えるとき、複合作用は下記の3種に分類することが出来る。

- ① 単純な類似作用 (Simple similar action): 同じ生物学的部位に同じメカニズム/作用様式で作用するが、その効力が異なる化学物質の複合影響。各々の化学物質が相互作用せず、お互いの希釈液かのようにふるまうと仮定されるため、用量(濃度)相加 [Dose (concentration) addition]を仮定した評価手法が適用される。
- ② 単純な非類似作用 [Simple dissimilar action, independent (joint) action]: 混合物中の化学物質が異なる作用様式もしくは異なる標的細胞、組織や器官に、独立して作用する。反応相加 [Response (effect) addition]を仮定した評価手法が適用される。
- ③ 相互作用 (Interaction): 用量/反応相加を仮定して予測されるよりも強い (相乗作用)、もしくは弱い (拮抗作用)影響をもたらす複合作用と定義される

以下に、成分に基づいた各アプローチの具体的な方法及びその特徴をまとめた。

1.2.1. 用量相加を仮定したアプローチ

異なる作用モードにより影響を及ぼす化学物質を含む混合物への複合曝露による影響に関する実験結果の解析により、用量相加を仮定したアプローチは保守的な評価手法であることが示されている。従って、混合物中の成分間の相互作用に関する定量的データがほとんどもしくは全くない場合には、相加モデルが推奨されている。用量相加を仮定した評価では、相乗的な相互作用の結果として起きる影

響を過小評価する可能性があるが、実際にそれを示す報告は少ない。最近、それらの限られたデータを解析した結果、その差は10倍未満であったことが報告された。

ハザードインデックス

ハザードインデックス (Hazard index; HI)アプローチでは、混合物中の各々の化合物の暴露量を、健康影響に基づいて設定された、許容一日摂取量 (Acceptable daily intake; ADI)などの最大許容量を用いて標準化する。すべての成分について十分な毒性情報がある混合物に適用される方法である。HIは下記の式で算出される。

$$HI = \frac{E_1}{AL_1} + \frac{E_2}{AL_2} + \dots + \frac{E_n}{AL_n} = \sum_{i=1}^n \frac{E_i}{AL_i}$$

E_1, E_2, \dots, E_n 及び E_i : 混合物に含まれる個々の物質への暴露レベル

AL_1, AL_2, \dots, AL_n 及び AL_i : 各々の物質の最大許容量 [ADI, 耐容一日摂取量 (Tolerable daily intake; TDI)や参照用量 (Reference Dose; RfD)など]

個々の化合物の暴露レベルを最大許容量で割った値 (E_i/AL_i)は、ハザード比 (Hazard quotient: HQ)と呼ばれる。HQの総和であるHIが1に近づくと、対象とする混合物への暴露による有害性が高まり、1を超えた場合は、その暴露量は最大許容量を超える、つまり、混合物暴露によるリスクがある可能性があることを示している。しかし、HIは明確な用量反応関係を基に算出された値ではないので、その値をリスクの推定値そのものと解釈すべきではない。

HIアプローチは、同じ作用モードによって同じ影響を引き起こす化学物質からなる混合物に対して最も適切に適用できる用量相加性を仮定しているため、懸念されるエンドポイントそれぞれについて別々のHIを算出すべきである。様々な影響それぞれについて許容レベルを算出するためのデータがある場合には、HI

アプローチを用いることで混合物暴露がどのような影響を及ぼすのかを推測することができるだろう。

相対作用係数

相対作用係数 (Relative potency factor: RPF) アプローチは、1物質に関して広範な情報が入手可能で、その他の物質についてはあまり情報がない混合物に適用される。最も広範な情報が入手可能な物質をインデックス物質 (基準物質) として、各々の化合物の作用強度を、インデックス物質の作用強度に対する比率として表したものがRPFである。RPFアプローチでは、RPFを用いて、各々の化合物の残留濃度や暴露量をインデックス物質の相当量として表し、その合計値とインデックス物質の評価値 (ADI, TDI, RfDなど)との比較が行われる。

RPFアプローチでは、混合物中の化合物間の作用強度の比がすべての用量レベルで一定であることを仮定している。さらに、特定の条件 (エンドポイント、暴露経路及び期間)下での毒性学的類似性が必要である。それぞれの暴露条件下で、もしくはそれぞれの標的組織に対して、異なる作用様式で作用する可能性がある場合やデータが不十分な場合には、それぞれの影響もしくは暴露条件に関して、エンドポイント特異的なRPFが導かれる。

毒性等価係数

毒性等価係数 (Toxicity equivalency factor: TEF) アプローチは、RPF手法の特殊なケースで、エンドポイント及び暴露条件を問わず、各々の物質について単一のTEF (インデックス物質に対する作用強度の比)が導かれる。従って、懸念される毒性影響すべてが共通の作用様式によって引き起こされたものと仮定され、すべてのエンドポイントにわたって強度の毒性学的類似性及び等価性が求められる。さらに、混合物中のそれぞれの化合物の影響は、原則として相加的であり、用量反応曲線は平行であると仮定

される。TEFモデルに関するこれらの仮定を用いるためには、評価対象の化合物群に関して多量のデータが収集される必要があるだろう。

TEFアプローチでは、混合物中の各々の化合物の濃度 (C_i)をTEF値 (TEF_i)で乗じることによって、下記のように毒性等価 (toxicity equivalent: TEQ)濃度が算出される。

$$TEQ = \sum C_i \times TEF_i$$

TEF手法は、当初は、1980年代に、ポリ塩化ジベンゾ-p-ダイオキシン類及びジベンゾフラン類の混合物の毒性強度を表すために開発された。ポリ塩化ジベンゾ-p-ダイオキシン類、ジベンゾフラン類及びダイオキシン様ポリ塩化ビフェニル類について一貫したTEF値を導き出す目的で、WHOによって組織された1997年の専門家会議においても、同様の基準が用いられた。ダイオキシン類のTEF値は、2005年に別のWHO会議で再評価されている (Van den Berg et al. 2006)。TEFアプローチは、これまでに有機リン系化合物及びカルバメート類の混合物への暴露による複合リスクの評価にも適用されている (Reffstrup et al. 2010)。

評価基点インデックス

評価基点インデックス (Point of departure index: PODI)は、混合物中の各々の化合物の暴露量を評価基点 (Point of departure: POD)で割った値を合計して下記のように算出される。

$$PODI = \frac{E_1}{POD_1} + \frac{E_2}{POD_2} + \dots + \frac{E_n}{POD_n} = \sum_{i=1}^n \frac{E_i}{POD_i}$$

PODとは、動物試験等で観察された用量反応データから導き出されたデータポイント (NOAELなど)もしくは推定値 (10%影響レベルでのベンチマークドーズなど)である。従っ

て、HI手法とは異なり、PODI手法は不確実係数を採用していない。

算出されたPODIを評価する方法については、国際的なコンセンサスは得られていない。しかし、PODIをグループUFで乗じることによって、評価を行うことが可能と考えられる。得られた値が1を超える場合は、リスクがある可能性が考えられるだろう。

欧州食品安全機関 (European Food Safety Authority; EFSA)の科学討論会は、不確実係数を含むという意味で、透明性の低いHI手法よりも、PODIの使用を推奨している (EFSA 2007)。しかし、彼らは、スクリーニングの目的ではHIは実用的なツールであると述べている。

暴露マージンインデックス

暴露マージン (Margin of exposure: MOE)は、PODを特定の経路からの測定/推定暴露量で割って求められる。MOEアプローチは、単一の化学物質の急性リスクを評価するために、米国EPAによって使用されている。通常は、ヒト及び動物試験から得られた毒性学的データからPODが導かれた場合には、MOEがそれぞれ10もしくは100を超える場合に許容できると判定される。これらの値が選ばれた理由は、不確実係数のdefault値と数値的に同じであるからである。

複合曝露マージン (combined margin of exposure: MOE_T)は、下記のように算出される。

$$\begin{aligned} \text{MOE}_T &= \frac{1}{1/\text{MOE}_1 + 1/\text{MOE}_2 + \dots + 1/\text{MOE}_n} \\ &= \sum_{i=1}^n \frac{1}{\text{MOE}_i} \end{aligned}$$

つまり、MOE_TはPODIの逆数である。動物試験の結果を基にPODを求めた場合は、通常は、MOE_Tが100より大きければ許容できると考えられる。

複合リスクインデックス

米国EPAは、それぞれの化合物の不確実係数とMOEを用いて複合リスクインデックス (cumulative risk index: CRI)を算出することを提案している。CRIは、下記のように求められる (Reffstrup et al. 2010)。

$$\text{CRI} = \frac{1}{1/\text{RI}_1 + 1/\text{RI}_2 + \dots + 1/\text{RI}_n} = \sum_{i=1}^n \frac{1}{\text{RI}_i}$$

ここで、RIとはそれぞれの物質のリスクインデックス (Risk index: RI)であり、下記のように算出される。

$$\text{RI} = \frac{\text{POD}}{\text{E} \times \text{UF}} = \frac{\text{RfD}}{\text{E}}$$

CRIは、HIの逆数である。CRIが1より低くなる、つまり、暴露がRfDより大きくなると、リスクは増加する。

1.2.2. 反応相加を仮定したアプローチ

反応相加を仮定したアプローチでは、それぞれの化学物質による影響を、確率的に独立した事象と仮定し、複合影響を予測する。つまり、混合物中のそれぞれの化学物質が、他の化学物質の存在とは無関係に、影響を及ぼすと仮定する。このことは、数学的に下記のように示すことができる。

$$\begin{aligned} p_{mix} &= 1 - [(1 - p_1) \times (1 - p_2) \dots \\ &\quad \times \dots (1 - p_n)] \\ &= 1 - \prod_{i=1}^n (1 - p_i) \end{aligned}$$

p_{mix} : n個の化合物からなる混合物への複合曝露によって影響が起きる確率

p_1, p_2, \dots, p_n : 混合物中の個々の化合物が影響を及ぼす確率

つまり、混合物への複合暴露によって影響が起きる確率 p_{mix} は、1からいずれの化合物の影響も見られない確率を引いたものとなる。この方程式は、混合物に含まれるそれぞれの化合物に対する感受性（耐性）がお互いに相関していないことを示しており、統計学的な独立性を示した基準式である。しかし、例えば、対象とする集団に属する個体を化合物Aに対する感受性の高い順に並べて、その順序が化合物Bに対する感受性の順序と一致する場合には、化合物A及びBに対する感受性は完全に正の相関性を示す（ $r=1$ ）。この場合、両化合物への暴露によって影響が起きる確率は、毒性のより強い化合物に依存するだろう。つまり、下記のようになる。

$$p_{mix} = p_A \text{ if } p_A > p_B$$

$$p_{mix} = p_B \text{ if } p_A < p_B$$

一方で、完全な負の相関性がある場合（ $r=-1$ ）、つまり、化合物Aに最も感受性の高い個体が化合物Bに対して最も低い感受性を示すか、その逆の場合には、下記の通り、化合物A及びBへの複合暴露による影響の確率は、各々の化合物への単一暴露による影響の確率の合計に等しくなる。

$$p_{mix} = p_A + p_B \text{ if } p_{mix} \leq 1$$

この方程式は、単純な非類似作用のための最も保守的なアプローチであり、米国EPAは、発がん性物質の混合物のリスクを評価する際にこのアプローチを使うことを推奨している（US EPA 1986）。

反応相加は、それぞれの生物が各々の化合物にある程度の感受性を示し、反応を示すためには、感受性の閾値を上回る必要があるという原則に基づいている。このことは、混合物中の個々の化合物が影響を及ぼさない用量で存在

する場合には、混合物の毒性影響を推定できないことを意味している。このことから、EFSAは、それぞれの毒性レベルより低いレベルで存在する食品中の残留農薬に関しては、ほとんどの場合、反応相加は有用ではないと結論している（EFSA 2008）。

1.2.3. 相互作用に対するアプローチ

相互作用による影響を定量的に解析した報告は少なく、相互作用の用量依存性に関する報告はさらに少ない。そのため、起こりうる毒性相互作用による影響を判定するためには、いくつかの定性的な方法が必要と考えられる。米国EPAは、相互作用する化合物の混合物に関して、拮抗作用及び相乗作用を考慮したHIを算出する、相互作用ハザードインデックス（interaction-based HI: HI_{INT} ）アプローチを提案している（EPA 2000）。このアプローチでは、用量相加を仮定して求めたHI（ HI_{ADD} ）を、証拠の重みづけ（weight of evidence; WOE）手法を用いて修正することで、相互作用による影響を反映させる。2成分の相互作用が最も重要とみなされ、混合物中のすべての相互作用は、2成分の相互作用に関する情報を基に適切に予測することができるかと仮定される。米国EPAは、混合物中に含まれるそれぞれの化合物の有害性を示す値としてハザード比（HQ）を用い、それぞれの化合物のHQを、他の化合物のHQ、二成分からなる相互作用の大きさ及びWOEを数値化した値からなる関数で乗じることにより、用量相加に基づくHIを修正する方法を提案している。提案された式を下記に示す。

$$HI_{INT} = \sum_{i=1}^n \left(HQ_i \times \sum_{j \neq i}^n f_{ij} M_{ij}^{B_{ij} \theta_{ij}} \right)$$

ここで、 HQ_i は、 n 個の化合物からなる混合物に含まれる i 番目の化合物のハザード比

(HQ)である。

B_{ij} は、二成分の相互作用に関する証拠の重みづけ (binary weight of evidence; BINWOE)係数であり、 j 番目の化合物による i 番目の化合物の毒性への影響について、その方向 (拮抗作用なのか相乗作用なのか)、妥当性及びヒトへの外挿性に関する評価を基に求められる。このアプローチでは、2 種の化合物からなる各々の組み合わせについて、2 種の WOE の評価が行われている。つまり、例えば、化学物質 A 及び B の組み合わせについて考えると、化学物質 B の毒性に対する化学物質 A の影響に関する WOE と化学物質 A の毒性に対する化学物質 B の影響に関する WOE である。

f_{ij} は、 i 番目の化合物と相互作用するすべての化合物に対する j 番目の化合物との相互作用の重要性を数値化したもので、下記のように求められる。

$$f_{ij} = \frac{HQ_j}{HI_{ADD} - HQ_i}$$

M_{ij} は、 j 番目の化合物の i 番目の化合物への影響 (相互作用)の大きさを示す。2 化合物の組み合わせ 53 種について、もしくは 27 物質のすべての可能な組み合わせについて行われた複合作用に関する実験の結果から、デフォルト値として 5 を用いることが提案されているが、対象とする相互作用についてデータがある場合は使用すべきである。しかし、相互作用に関する多くの情報は、高用量での結果に基づくもの、それらには閾値があるか、もしくは飽和現象 (活性化、解毒もしくは修復過程の飽和)によって引き起こされるものなので、その相互作用が実際の暴露レベルでも起きるのかについて十分に検討する必要がある。

θ_{ij} は、 i 番目の化合物と j 番目の化合物が同等の毒性を示す量で存在する度合いを示し、下記のように求められる。

$$\theta_{ij} = \frac{(HQ_i \cdot HQ_j)^{0.5}}{[(HQ_i - HQ_j) \cdot 0.5]}$$

この値は、相互作用する二つの化合物に関して、用量相加からのずれは両物質が同等の毒性を示す量で存在するときに最大となる、という仮定の下に取り入れられている。

HI_{INT}アプローチは、毒性学的な相互作用を直接的にモデル化したものではなく、相互作用に関する「懸念 (concern)」をモデル化したものである。この点において、この方法は、相互作用を生物学的にモデル化する試みというより、単一物質のリスクアセスメントにおける不確実係数の適用に類似している。米国EPAは、相互作用に関するより多くの研究が行われ、相互作用の様式やメカニズムの理解がより深まった際には、この方法は改定されるだろう、と述べている (US EPA 2000)。

2. 新規不確実係数及びその分割法を適用したホウ素の安全性評価

2.1. ホウ素の毒性関連情報

ホウ素はヒトでも実験動物でもほとんど完全に吸収・排泄されると考えられ、ホウ素の平均クリアランスはラットで 163 mL/h/kg (2.72 mL/min/kg)、ヒトで 41 mL/h/kg (0.68 mL/min/kg)とラットの方が約 4 倍高い (Dourson ら, 1998)。なお、妊婦におけるホウ素の腎クリアランスは 1.02 mL/min/kg (66.1 mL/min) (Pahl ら, 2001)と 50%高く、妊娠ラットでは 3.3 mL/min/kg (1.0 mL/min) (Vaziri ら, 2001)と 21%高いことが示された。

ヒトの健康影響に関する情報として、高濃度曝露された男性の生殖能に関する調査が

行われており、その結果、生殖への影響を示す証拠は得られていない (Sayli, 2001 & 2003; Whorton ら, 1994; Yazbeck ら, 2005)。一方、実験動物では複数の試験で精巣毒性及び発生毒性を示すことが報告されているが、遺伝毒性は陰性で発がん性はないと評価されている (NTP, 1987)。

ホウ素の反復投与毒性に関する 9 試験及び生殖発生毒性に関する 5 試験の使用動物種、投与方法・期間、標的毒性及び NOAEL (LOAEL)を表 2-1 にまとめた。なお、これらの試験はホウ酸又はホウ砂を用いて行われたものであるため、NOAEL 等は、ホウ酸又はホウ砂とホウ素 (Boron: B) の分子量比 ($10.81 / 61.84 = 0.1748$) 又は ($4 \times 10.81 / 381.3 = 0.1134$) を乗じ、ホウ素の量 [mg B/kg(body weight)/day] に換算して示した。各試験の結果の概要を下記に示す。

反復投与毒性

ラットの短期間混餌投与精巣毒性試験 [各群 6 匹の F344 ラット、ホウ酸濃度 9,000ppm (61 mg B/kg/day)] : 投与 4 日に異常は認められなかったが、投与 7 日後にはホウ酸投与群の半数、投与 10 日後には全例に排精 (spermiation) 抑制が認められ、投与 28 日目にはすべてのラットの精細管における精母細胞及び精子細胞の減少が認められた。さらに、投与 4 日以降に血清テストステロン濃度の減少が認められた (Treinen & Chapin, 1991)。

ラットの 30 又は 60 日混餌投与精巣毒性試験 (各群 18 匹の雄 SD ラット、ホウ酸濃度 0、500、1,000、2,000 ppm): 1,000 又は 2,000 ppm を 30 又は 60 日間投与した結果、用量依存的な精巣及び精巣上体重量の減少、精母細胞、精細胞、精子及び精細管径の減少が認められた。これらの形態変化と関連して、減数分裂後の生殖細胞のマーカである hyaluronidase、sorbitol dehydrogenase 及

び lactate dehydrogenase isozyme-X の比活性の低下と、セルトリ細胞や精原細胞に比較的存在量の多い glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase 及び malate dehydrogenase の比活性の上昇及び血漿中の FSH 濃度の上昇が用量依存的に認められた。投与した雄を雌と同居させた結果、交配行動には変化がなかったものの、受精能力の低下が認められた。精巣毒性に基づき、NOAEL は 500 ppm (25 mg B/kg/day) である (Lee ら, 1978)。

ラットの 9 週間混餌投与精巣毒性試験 (各群 6 匹の雄 F344 ラット、ホウ酸濃度 0、3,000、4,500、6,000、9,000 ppm) : すべての投与群で排精抑制、さらには、6,000 ppm 以上の投与群で精巣萎縮が認められた。最低用量である 3,000 ppm (26 mg B/kg/day) が LOAEL であった (Ku ら, 1991)。

マウスの 13 週間混餌投与試験 (各群 10 匹の雌雄 B6C3F₁ マウス、ホウ酸濃度 0、0.12、0.25、0.50、1.0 及び 2.0 %) : 2.0 % 投与群で、死亡率の増加、前胃の過角化及び有棘細胞増生が観察され、0.5 % 以上の投与群の雌雄に体重増加抑制、雄で精細管の変性又は萎縮が認められた。さらに、すべての投与群において、脾臓に軽度の髓外造血充進が見られたが用量依存性はなく、貧血も見られなかった。従って、精巣毒性に基づいて 0.25 % (雄 : 70 mg B/kg/day) が NOAEL として適切であると考えられた (NTP, 1987; Dieter, 1994)。

ラットの 90 日間混餌投与試験 (各群 10 匹の雌雄 SD ラット、ホウ酸又はホウ砂濃度 0、52.5、175、525、1,750 及び 5,250 ppm) : 5,250 ppm 投与群では全動物が死亡し、1,750 ppm 投与群では、浅速呼吸、体重減少、肝臓及び脾臓等の相対重量の減少が認められた。また、雄の精巣重量の減少と完全萎縮及び雌の卵巣重量の減少が認められた。精巣毒性に基づいて、NOAEL を 525 ppm (38 mg B/

kg/day) と判断した (Weir & Fisher, 1972)。

イヌの 90 日間混餌投与試験 (各群 5 匹の雌雄ビーグル犬、ホウ酸又はホウ砂濃度 0、17.5、175 及び 1,750 ppm) : 1,750 ppm 投与群の雄に、重度の精巣萎縮及び甲状腺の相対重量の減少、雌では、相対肝重量の増加が認められた。精巣毒性に基づいて、LOAEL は 1,750 ppm (30.4 mg B/ kg/day)、NOAEL は 175 ppm (3.9 mg B/ kg/day) となったが、設定投与量が 10 倍間隔であることから、NOAEL としては適切ではないと考えられる (Weir & Fisher, 1972)。

マウスの発がん性試験 (各群 50 匹の雌雄 B6C3F₁ マウス、ホウ酸濃度 0、0.25 及び 0.5 % で 2 年間混餌投与) : 0.5 % 投与群では体重増加抑制が認められた。病理組織学的所見として、両投与量群の雄で精巣萎縮が観察され、精細管からの精原細胞、一次・二次精母細胞、精細胞、精子の消失と、それに伴うセルトリ細胞のみからなる精細管の出現・増加などが認められたが、これらの変化は対照群でも見られており、0.25% 投与群及び対照群での発現頻度に有意差は認められなかった。0.5% 投与群では精巣間細胞の過形成も認められたが、腫瘍発生頻度の上昇は認められなかった。雄の 0.25 % (48 mg B/kg/day) は NOAEL である (NTP, 1987; Dieter, 1994)。

ラットの 2 年間混餌投与試験 (各群 35 匹の雌雄 SD ラット、ホウ酸又はホウ砂濃度 0、117、350 及び 1,170 ppm) : 1,170 ppm 投与群の雄で、精巣の相対重量の減少、精細管上皮の萎縮が、雌でヘマトクリット値及びヘモグロビン濃度の減少が認められた。117 及び 350 ppm 投与群では統計学的に有意な影響は認められなかった。発がん性は認められなかった。精巣毒性に基づいて、NOAEL は 350 ppm (17.5 mg B/kg/day) と判断された (Weir & Fisher, 1972)。

イヌの 2 年間混餌投与試験 (雌雄各 4 匹/群のビーグル犬、ホウ酸又はホウ砂濃度 0、58、117 及び 350 ppm) : いずれの投与群においても投与に関連した変化は見られず、NOAEL は 350 ppm (8.8 mg B/kg/day) であった。なお、追加試験として、ビーグル犬の雄 2 匹にホウ酸又はホウ砂を 1,170 ppm (29.2 mg B/kg /day) の濃度で 26 週間混餌した結果、重度の精巣萎縮及び精子形成不全が認められている (Weir & Fisher, 1972)。

生殖発生毒性

マウスの発生毒性試験 (28~29 匹/群の Swiss マウス、ホウ酸濃度 0、0.1、0.2 及び 0.4% で妊娠 0~17 日混餌投与) : 0.4% 投与群の母動物に体重増加抑制及び相対腎重量の増加が認められた。胎児への影響としては、0.2% 以上の投与群で胎児体重の減少、0.4% 投与群で吸収胚の発生頻度及び一腹あたりの奇形発生 (主に第 13 肋骨の短縮) 頻度の増加が認められた。発生毒性に関する NOAEL は 0.1 % (43 mg B/kg/day) である (Heindel ら, 1992)。

ラットの発生毒性試験 (各群雌 29 匹 SD ラット、ホウ酸濃度 0、0.1、0.2 及び 0.4% で妊娠 0~20 日混餌投与) : 0.2% 以上の投与群で、一腹あたりの奇形胎児発生頻度及び 1 例以上の奇形胎児を生じた腹の割合が増加した。主な奇形は側脳室の拡張及び第 13 肋骨の無形成又は短縮であった。胎児の平均体重は全ての群で減少し、0.1 % 投与群でも 6-7 % の減少が認められた。最低用量の 0.1% (14 mg B/kg/day) が LOAEL であった。 (Heindel ら, 1992)

ラットの発生毒性試験 (各群 60 匹 SD ラット、ホウ酸濃度 0、0.025、0.05、0.075、0.1 及び 0.2 % で妊娠 0~20 日混餌投与) : 0.1 及び 0.2 % 投与群において、胎児体重の減少及び骨格奇形 (第 13 肋骨の短縮及び波状肋骨の発生頻度上昇) が認められた。生後 21

日目の児動物には、体重減少や波状肋骨は認められなかったが、第13肋骨の短縮が0.2%投与群で認められた。発生毒性のNOAELは0.075% (9.6 mg B/kg/day)であった (Priceら, 1996b)。

ラットの3世代試験 (各群雄8匹、雌16匹SDラット、ホウ酸又はホウ砂濃度0、117、350及び1,170 ppmで混餌投与) : 1,170 ppm投与群の動物は不妊で、雄では精巣萎縮と生存精子の欠落、雌では排卵減少が認められた。また、この群の雌を対照群の雄と交配させたところ、妊娠は認められなかった。一方、117及び350 ppm投与群では生殖・授乳や児動物の生存率への有害影響は認められなかった。生殖毒性のNOAELは350 ppm(17.5 mg

B/kg/day)と判断した (Weir & Fisher, 1972)。

ウサギの発生毒性試験 (各群雌18~23匹 New Zealand White ウサギ、ホウ酸濃度0、62.5、125及び250 mg/kg/dayで妊娠6~19日に強制経口投与し、妊娠30日に検査) : 250 mg/kg/day投与群では、母体重の低値、黄体数の減少及び膣出血が認められた。胎児への影響に関しては、250 mg/kg/day投与群で出生前死亡率の上昇、生存胎児のない妊娠母動物数の増加、妊娠30日における一腹あたり生存児数の減少、一腹あたりの生存奇形胎児数の増加が認められた。奇形は主に心室中隔欠損などの心血管系障害であった。NOAELは125 mg/kg/day(22 mg B/kg/day)であった (Priceら, 1996a)。

表 2-1 ホウ酸の反復投与毒性、発生毒性及び世代試験の要旨、標的毒性及びNOAEL

動物種	投与方法	期間	標的毒性	NOAEL ^a	引用文献
反復投与毒性試験					
ラット	混餌投与	28日	精巣	61 mg ^{effective}	Treinen & Chapin, 1991
ラット	混餌投与	30-60日	精巣	25 mg	Lee et al. 1978
ラット	混餌投与	9週	精巣	26 mg ^{effective}	Ku et al. 1991
マウス	混餌投与	13週	精巣	70 mg	Dieter, 1994
ラット	混餌投与	90日	精巣	38 mg	Weir & Fisher, 1972
イヌ	混餌投与	90日	精巣	3.9 mg	Weir & Fisher, 1972
マウス	混餌投与	2年	精巣	48 mg	Dieter, 1994
ラット	混餌投与	2年	精巣	17.5 mg	Weir & Fisher, 1972
イヌ	混餌投与	2年	精巣	8.8 mg	Weir & Fisher, 1972
発生毒性又は世代試験					
マウス	混餌投与	妊娠0-17日	胎児体重	43 mg	Heindel et al., 1992
ラット	混餌投与	妊娠0-20日	胎児体重	14 mg ^{effective}	Heindel et al., 1992
ラット	混餌投与	妊娠0-20日	胎児毒性	9.6 mg	Price et al., 1996b
ラット	混餌投与	3世代	生殖毒性	17.5 mg	Weir & Fisher, 1972
ウサギ	強制経口	妊娠6-19日	胎児毒性	22 mg	Price et al., 1996a

a: mg B/kg/day, effective: LOAEL

2.2. 諸外国での評価値の導出

a) WHO 飲料水基準値の評価 (WHO, 2009)

評価対象毒性指標は、2つのラット発生毒性試験 (Heindelら, 1992; Priceら, 1996b)に

おける胎児体重の減少、第13肋骨の欠損又は短縮、第1腰肋の変異として、胎児重量に関して算出された BMDL₀₅ 10.3 mg B/kg/day (Allen et al., 1996)を用いて評価値を導出した。

UFの適用は、種差・個人差に対して10 x 10とし、さらに、それぞれについてWHO方式(IPCS, 1994, WHO, 2005)を用いてPK及びPDへの分割を検討した。種差に関してはPK及びPDデータは十分でないとの評価からUFa 10を適用した。個体差に関しては、BMDLの基となった影響が発生に関するものであるため、妊娠中の女性を検討の対象として、PKデータの解析を行った。ホウ素の体内動態はホウ素の特性からイヌリン等を用いて測定されたGFRデータを用いることができるかと判断された。複数の研究から得られた個々のデータを合算し、健康な妊婦の妊娠後期GFRを144±32 mL/minとした(Doursonら, 1998)。集団の約95%での変動を対象とすると、平均値の上下2σの範囲に母集団の約95%が属するので、GFRの平均値(GFR_A: 144 mL/min)を平均よりも2σ小さい値(GFR_{2SD} = 144 - 32 × 2 = 80 mL/min)で割ると、個人差に関するPKの比は1.8 (144/80=1.8)となる(Doursonら, 1998)。なお、PDに関するデータは得られなかった。そこで、UFh(PK)のdefault値3.2を1.8に置き換え、UFh(PD)にdefault値3.2を用いて、UFhを6 (1.8×3.2=5.7)とした。

最終的に、UF = UFa x UFh = 10 x 6 = 60を適用して、TDIを0.20 mg B/kg/dayとした。

b) EPAの毒性評価(US EPA, 2004)

評価対象毒性指標はWHOと同様に、2つのラット発生毒性試験(Heindelら, 1992; Priceら, 1996b)における胎児体重の減少、第13肋骨の欠損又は短縮、第1腰肋の変異とし、胎

児重量に関するBMDL₀₅ 10.3 mg B/kg/day (Allenら, 1996)を用いて評価値を導出した。

UFのdefault値は、種差・個人差に対して10 x 10としたが、PK及びPDへの分割に関してはWHOとは異なり、いずれも等分割とした。すなわち、UFa及びUFh共に、default値10 = PK x PD = 3.16 x 3.16と分割される。しかし、いずれもPDに関するデータはないことから、PKデータについてのみ解析を行った。なお、評価の対象が発生毒性であるため、種差は妊娠ラットと妊婦との相違を、個人差は妊婦でのばらつきの大きさを解析した。ホウ素化合物は体内で代謝を受けず、ヒト及び動物いずれにおいても経口摂取すると容易に吸収され、その90%以上が短時間で排泄される。ヒトでは、92-94%が96時間以内に尿中に未変化体として排泄される。ラットでも24時間以内に完全に吸収され、吸収されたホウ素は均一に体内分布した。

種差に関しては、妊娠ラットにホウ酸を3用量(0.3, 3.0, 30 mg B/kg)で強制経口投与した結果、ホウ素クリアランスは用量に依存せず1.00 mL/minとなったことが報告されている(Vaziriら, 2001; U.S. Borax, 2000)。さらに、ホウ素を多く含むフルーツ及び野菜を食した15名の妊婦について、ホウ素の血中濃度及び尿中濃度を2時間測定した結果、ホウ素クリアランスは66.1 mL/minと算出された(Pahlら, 2001; U.S. Borax, 2000)。2-コンパートメントモデルでの定常状態血中濃度C_{ss}は以下の様に表すことができる。

$$C_{ss} = \frac{\text{Dose} \times f \times \text{BW}}{\text{Cl}}$$

Dose: 投与量, f: 吸収率, BW: 体重, Cl: クリアランス

妊娠ラットと妊婦のC_{ss}が等しくなる投与量の差をUFa(PK)として採用できるので、ヒトのホウ素吸収率f_hを0.92 (Schouら, 1984)、

ラットのホウ素吸収率 f_a を 0.95 (Vanderpool ら, 1994)、妊婦の体重を 67.6 kg (Pahl ら, 2001)、妊娠ラットの体重を 0.303 kg (Vaziri ら, 2001)として以下の様に計算した。

$$\frac{Dose_a}{Dose_h} = UF_a(PK) = \frac{Cl_a \times f_h \times BWh}{Cl_h \times f_a \times BW_a} = \frac{1.00 \times 0.92 \times 67.6}{66.1 \times 0.95 \times 0.303} = \frac{62.192}{19.027} = 3.3$$

以上から、 $UF_a = UF_a(PK) \times UF_a(PD) = 3.3 \times 3.16$ となる。

$UF_h(PK)$ に関しては、上記の Pahl ら (2001)の資料を用いる方法も考えられたが、この試験はヒトのばらつきを評価するために

計画されたものではないため、検体数が少なく、食事からのホウ素摂取量がコントロールされていないことから、このデータを採用することは相応しくないと判断された。そこで、健常妊婦の GFR のデータを 3つの文献から集め、 GFR_A を $(GFR_A - GFR_{3SD})$ より $UF_h(PK)$ を求めた (表 2-2)。WHO では、Dourson ら (1998) が提案した $GFR_A / (GFR_A - GFR_{2SD})$ を使用しているが、EPA では、特に子癩前症患者のような GFR の低い妊婦をカバーするために平均値の上下 3σ の範囲を対象としている。

表 2-2 健常妊婦における糸球体濾過率の平均値とばらつきの解析

GFR _A ± SD (mL/min)	GFR _A -GFR _{3SD}	UF _h (PK)	文献
150.5 ± 17.6 ^a	97.7	1.54	Dunlop (1981)
195 ± 32 ^b	99	1.97	Krutzen ら (1992)
138.9 ± 26.1 ^c	60.6	2.29	Sturgiss ら (1996)
上記 3 文献データの計算値の平均		1.93	

a: 25 人の健常妊婦の 12、26、36 週の個別平均値からの集計

b: 13 人の健常妊婦の妊娠第 3 期の値

c: 21 人の健常妊婦の妊娠初期と妊娠後期の個別平均値からの集計

以上から、 $UF_h = UF_h(PK) \times UF_h(PD) = 2 \times 3.16$ となる。

最終的に、 $UF = UF_a \times UF_h = 3.3 \times 3.16 \times 2 \times 3.16 = 66$ を適用して、TDI を 0.20 mg B/kg/day とした。

2.3. 新規不確実係数の考え方

最近、種差に関する UF としては、体表面積補正よりも代謝速度補正又はカロリー需要補正を用いた方がより適切であることが示された (Schneider ら, 2004)。体表面積は、体重の $\frac{2}{3}$ 乗に比例するが、代謝速度又はカロリー需要は体重の $\frac{3}{4}$ 乗に比例する。

$$\text{カロリー需要} = f \times W^{3/4}$$

その際、動物と体重 W 及び代謝速度 f

はカロリー需要比は、以下のようになる。

$$\frac{\text{動物のカロリー需要 / 体重}}{\text{ヒトのカロリー需要 / 体重}} = \frac{f \times W_a^{-1/4}}{f \times W_h^{-1/4}} = \frac{W_h^{1/4}}{W_a^{1/4}} = \left(\frac{W_h}{W_a} \right)^{1/4}$$

ヒトの体重を 60kg、ラットとマウスの体重をそれぞれ 350g と 40g とすると、補正値は 3.6 及び 6.2 となり、 UF_a の default 値 10 の方がかなり大きな値となる。しかし、これはあくまでも中央値であり、その変動範囲を十分にカバーしていない。Schneider ら (2004) は、63 種の抗がん剤についてヒト及び各種実験動物の最大耐容摂取量を比較し、それらの対数正規分布のデータから幾何標準偏差が求めた。この値を用いて、ヒト/動物のカロリー

需要補正值の95%タイル値を求めると、マウスで38、ラットで27となり、むしろUFaのdefault値10では不十分となった。Falk-Filipssonら(2007)は、UFaとしてこのカロリー需要補正の適用が適切であるとしている。

一方、UFhは、ヒトの標準的な集団のNOAELと高感受性集団のNOAELとの違いと考えるのが適切であるが、ヒトでのデータの入手は難しいことから、動物実験データの適用でやむを得ないと考えられる。高感受性集団としては乳幼児、妊婦、高齢者などが相当するが、妊婦や高齢者に関しては生殖毒性及び慢性毒性試験が実施されているので、一般的にはすでに考慮されていることになる。一方、乳幼児については公認された試験法はなく、乳幼児期を対象とした試験は通常は実施されない。最近、化学物質18種について新生児ラットと若齢ラットを用いた反復投与毒性試験から得たNOAELの比較が行われ、NOAEL比(若齢ラット/新生児ラット)の中央値は3、幾何標準偏差は1.38となった(Hasegawaら, 2007, 2010)。

種差及び個体差に関わるこれら2つの対数正規分布データを確率論的アプローチを用いて掛け合わせて算出された動物種ごとの値が、新規のUFとして提案されている(表2-3)(Hasegawaら, 2010)。

これらの新規UFに関しては、動物サイズにより種差と個体差の関与の度合いが異なることから、表2-4に示したようにUFa及びUFh、さらにはUF(PK)及びUF(PD)に分割する方法も提案されている。例えば、ラットの場合、新規のUF100は、UFa27.5とUFh5.09からなると考えられるため、その寄与率を考慮して25:4に分割するとUFaのdefault値は15、UFhのdefault値は4となる。さらにUFhのPK及びPDへの分割に関

しては、寄与率を60:40、UFh(PK)及びUFh(PD)に関しては50:50とすると、それぞれのdefault値は7.0、3.6、2及び2となった。実際に採用可能な実測値あるいはPBPKモデルによる算出データがある場合は、それらに基づいた補正係数を採用し、ない部分についてはこれらのdefault値を用いる。

表 2-3 動物サイズ毎の新規不確実係数の提案

動物種	UFa	UFh	UFa x UFh	新規 UF
マウス	48.2	5.09	155	150
ハムスター	34.4	5.09	111	100
ラット	27.5	5.09	88.7	
ウサギ	13.8	5.09	44.3	40
サル	11.7	5.09	37.7	
イヌ	9.63	5.09	31.0	

UFa: カロリー需要補正值及び幾何標準偏差 3.23 を基に求めた種差の95%タイル値、UFh: 中央値 3.0 及び幾何標準偏差 1.38 を基に求めた個体差の95%タイル値、UFa x UFh: 2つの対数正規分布データを確率論的アプローチを用いて掛け合わせて求めた95%タイル値

表 2-4 新規不確実係数の種差・個体差及びPK・PDへの分割案

動物種	新規 UF	UFa UFh	UF(PK) x UF(PD)
マウス	150	38	9.0 x 4.3
		4	2 x 2
ハムスター	100	25	7.0 x 3.6
		4	2 x 2
ウサギ	40	10	4.0 x 2.5
		4	2 x 2

2.4. 新規不確実係数及びその分割の適用試案 安全性評価のための毒性データの選択と NOAEL/BMDL

① 反復投与毒性試験としては、ラットの2年間混餌投与試験(Weir & Fisher, 1972)で、

精巣毒性に基づいた LOAEL 1,170 ppm (58.5 mg B/kg/day)及び NOAEL 350 ppm (17.5 mg B/kg/day)が得られている。最高用量の 1,170 ppm 投与群のみで毒性が発現したため、BMD アプローチの適用は適切ではない。

- ② イヌの 2 年間混餌投与試験 (Weir & Fisher, 1972)では、最高用量群でも投与に関連した変化は見られず、NOAEL は 350 ppm (8.8 mg B/kg/day)となった。イヌの 90 日間混餌投与試験では、1,750 ppm (30.4 mg B/kg/day)投与群で明確な精巣毒性が、さらに、イヌの雄 2 匹にホウ酸 1,170 ppm (29 mg B/kg/day)を 26 週間混餌投与した追加試験では、重度の精巣萎縮及び精子形成不全が認められている (Weir & Fisher, 1972)。以上のことから、イヌの精巣毒性については暴露期間の延長による重篤化はみられないものと考えられた。
- ③ マウスの発生毒性試験では、妊娠 0~17 日の混餌投与により、0.4%投与群で奇形発生頻度の増加 (主に第 13 肋骨の短縮)が、さらに 0.2%以上の投与群で胎児体重の減少が認められ、胎児体重の減少を根拠に NOAEL は 0.1% (43 mg B/kg/day)となった (Heindel ら, 1992)。BMD アプローチを適用した結果、雌胎児体重に関する BMDL₀₅ 44.9 mg B/kg/day が算出された。
- ④ ラットの発生毒性試験では、0.1% (12.9 mg B/kg/day)以上の用量で妊娠 0~20 日に混餌投与した結果、胎児体重の減少及び骨格奇形 (第 13 肋骨の短縮及び波状肋骨の発生頻度上昇)が認められた (Heindel ら, 1992)。投与量を下げ、同じ研究グループが同じプロトコールで実施した試験の結果、NOAEL は 0.075% (9.6 mg B/kg/day)となった (Price ら, 1996b)。な

お、Allen ら(1996)はこれら 2 つの試験のデータを用いて、胎児体重をエンドポイントとした BMDL₀₅ を 10.3 mg B/kg/day と算出した。

新規不確実係数を適用した TDI の算出

- ① 雄ラットにおける精巣毒性に関しては、雄ラットとヒト成人男性のホウ素クリアランスを基に UFa(PK)を算出した。雄ラット及びヒト男性のホウ素クリアランスは、0.359 mL/min/100 g BW (Usuda ら, 1998)及び 54.6 mL/min/1.73m² (体重 72 kg に相当) (Jansen ら, 1984)と報告されている。これらの値を US EPA が用いた計算式に当てはめると、UFa(PK)は以下の様になる。

$$\frac{\text{Dose}_{\text{sea}}}{\text{Dose}_{\text{h}}} = \text{UFa(PK)} = \frac{\text{Cl}_{\text{a}} \times \text{f}_{\text{h}} \times \text{BWh}}{\text{Cl}_{\text{h}} \times \text{f}_{\text{a}} \times \text{BWh}}$$

$$= \frac{0.359 \times 0.92 \times 72}{54.6 \times 0.95 \times 0.1} = \frac{23.78}{5.187} = 4.58$$

UFa(PD)に関する有用なデータはないことから、UFa = 4.58 x 3.6 から 16.5 となった。

上述したように、UFh は、ヒトの標準的集団での NOAEL と高感受性集団での NOAEL の違いとするのが適切である。対象となる毒性指標が精巣毒性であることから、高感受性集団としては小児男子が対象となる。しかし、小児男子や幼児期雄ラットのホウ素クリアランスや GFR は報告されていない。さらに、動物を用いた発生毒性試験や多世代試験では、胎児や児の精巣異常に関する報告はなく、幼児期のホウ素曝露による精巣への影響の検討も行われていない。そこで、UFh は default 値の 4 を用いることが適切であると判断した。

以上から、UFa x UFh = 16.5 x 4 = 66.0 となることから、UF を 70 とし、ラ

ットの精巣毒性に基づく TDI は、NOAEL 17.5 mg B/kg/day に UF 70 を適用して、0.25 mg B/kg/day となった。

② イヌで観察された精巣毒性の評価では、UFa に関しては、PK 及び PD ともに有用なデータがない。UFh に関しても、①と同様に適切なデータがないことから、UF として default 値である 40 を適用した。なお、対象となる試験は 2 年間曝露試験で、イヌとしての生涯曝露ではないものの、90 日間曝露試験で認められた精巣毒性が 2 年間曝露試験で増強されていないことから、追加の UF を適用する必要はないと判断した。従って、イヌの精巣毒性に基づく TDI は、NOAEL 8.8 mg B/kg/day に UF 40 を適用して、0.22 mg B/kg/day となった。

③ マウスでは、発生毒性試験における胎児体重の低下が最も感受性が高いエンドポイントであったが、PK 及び PD いずれについても種差に関するデータがないため、UFa として default 値である 38 を適用した。

UFh としては、妊婦のホウ素クリアランスのばらつきに関するデータ (Pahl ら, 2001) を用いることが可能と考えられた。しかし、その試験はヒトのばらつきを

評価するために計画されたものではないこと (検体数が少なく、食事からのホウ素摂取量がコントロールされていない) から、適用することは相応しくないと判断した。そこで、EPA が用いた健常妊婦における GFR データの 3 報に加え、高血圧症、子癩前症及び糖尿病を患った妊婦における GFR データ (Krutzen ら, 1996) も含めて解析することとした (表 2-5)。UFh は、標準的ヒト集団の平均値と高感受性ヒト集団の 95% タイル値の違いと考えることがより適切と考えられた。ここでは、妊娠動物から健常妊婦への外挿はすでに終了しているので、健常妊婦集団の GFR_A と、疾病妊婦集団の中で最も低い値を示した子癩前症患者の GFR の 95% タイル値 ($GFR_A - GFR_{2SD}$) を比較することとした。健常妊婦の GFR データは 3 報あるが、それぞれの値はかなり異なることから、子癩前症患者と同一プロトコルで測定されたと判断される Krutzen ら (1992) のデータを採用した。その結果、UFh(PK) は $195/60.3 = 3.23$ となり、UFh(PD) に関するデータはないため、UFh は 3.23×2 から 6.46 となった。

表 2-5 健常妊婦及び疾病を有する妊婦の GFR

対象妊婦	人数	$GFR_A \pm SD$ (mL/min)	$GFR_A \cdot GFR_{2SD}$
健常者 ^a	25	150.5 ± 17.6	115.3
健常者 ^b	21	138.9 ± 26.1	86.7
健常者 ^c	13	195 ± 32	131
高血圧患者 ^c	8	198.9 ± 57.9	83.1
子癩前症患者 ^c	12	128.1 ± 33.9	60.3
糖尿病患者 ^c	20	169 ± 34.7	99.6

a: Dunlop (1981)、b: Sturgiss ら (1996)、c: Krutzen ら (1992)

以上から、UF は $38 \times 6.46 = 245$ となっ

た。従って、マウスの発生毒性を根拠とし

た BMDL₀₅ 44.9 mg B/kg/day を UF 245 で割り、TDI は 0.18 mg B/kg/day となった。

- ④ ラットの発生毒性としては、胎児の体重減少や肋骨奇形があるので、種差及び個体差の評価においては妊娠を考慮することが必要である。UFa(PK)に関しては、妊娠ラットと妊婦のホウ素クリアランスに関してはそれぞれ一つずつの報告 (Vaziri ら, 2001; Pahl ら, 2001)がある。これらを基に US EPA と同様の方法で UFa(PK)を計算した結果、3.3 となった。UFa(PD)に関する有用なデータはないことから、UFa = 3.3 x 3.6 から 11.9 となった。

UFh に関しては、③と同様に表 2-5 に示した Krutzen ら (1992)の健常妊婦の GFR_A と子癩前症患者の GFR の 95% タイル値 (GFR_A-GFR_{2SD})から、UFh(PK)は 195/60.3 = 3.23 となる。UFh(PD)のデータはないことから、UFh は 3.23 x 2 から

6.46 となった。

従って、UF は 11.9 x 6.46 = 76.9 となり、ラットの発生毒性を根拠とした BMDL₀₅ の 10.3 mg/kg/day を UF 80 で割り、TDI は 0.13 mg B/kg/day となった。

ホウ素の新規評価値の提案 (表 2-6)

ホウ素の明確な発現毒性として、精巣毒性と胎児毒性が認められており、特に精巣毒性はと試験された全ての動物種 (マウス、ラット、イヌ)で発現した共通の毒性である。精巣毒性に関する最も適切なデータと判断された、ラット及びイヌを用いた長期反復投与試験の NOAEL から求められた TDI は、0.25 mg B/kg/day 及び 0.22 mg B/kg/day と近似した値となった。マウス及びラットの発生毒性試験から得られた TDI も、0.18 mg B/kg/day 及び 0.13 mg B/kg/day と近似した値であったが、精巣毒性から得られた TDI よりも低い値となった。以上の結果から、ホウ素の TDI としては 0.13 mg B/kg/day が適切である。

表 2-6 新規 UF 及び PK データを活用したホウ素の TDI の算出

毒性エンドポイント NOAEL もしくは BMDL	UFa [PK x PD]	UFh [PK x PD]	UF	TDI
ラットの精巣毒性 NOAEL = 17.5 mg B/kg/day	16.5 [4.58 x 3.6*]	4*	70	0.25 mg B/kg/day
イヌの精巣毒性 NOAEL = 8.8 mg B/kg/day	10*	4*	40 *	0.22 mg B/kg/day
マウスの発生毒性 BMDL ₀₅ = 44.9 mg B/kg/day	38 *	6.46 [3.23 x 2.0*]	245	0.18 mg B/kg/day
ラットの発生毒性 BMDL ₀₅ = 10.3 mg B/kg/day	11.9 [3.3 x 3.6*]	6.46 [3.23 x 2.0*]	80	0.13 mg B/kg/day

*: default 値

3. 長鎖パーフルオロカルボン酸の毒性発現の違いに関する研究

3.1. LC/MS/MS 分析条件の検討

3.1.1 PFCs の分離

これまでの報告によると PFCs の LC 分離はカラムに逆相系の単体を充填したものをを用い、2~10mM 酢酸アンモニウム-CH₃CN を移動相として良好な分離が行われている。本研究では、市販の ODS カラム Xbridge C18 (粒径 5 μm, 2 x 150 mm) を用いて移動相の種類について検討した。酢酸アンモニウム-CH₃CN 系の方が酢酸アンモニウム-メタノール系よりも PFCs の分離が良好であった。また、別の市販カラム Capcell Pak C18 MG (2.0 x 150 mm, 5 μm) や XTerra MS C18 (2.1 x 150 mm, 5 μm) を用いても各 PFCs の良好な分離が可能であった。

3.1.2. PFCs の MS/MS 条件

キャピラリー電圧の値を 1~3 kV の間で変化させて対象化合物の親イオンの感度を比較した。その結果、パーフルオロカルボン酸類の感度はキャピラリー電圧の値を上げるに従い低下したことから、キャピラリー電圧を約 1 kV に設定した。

コーン電圧の値を 35~120 V の間で変化させて対象化合物の親イオンの感度を比較した。その結果、パーフルオロカルボン酸類は 35 V で最高の感度を示した。

コリジョン電圧の値を 10~40 V の間で変化させて対象化合物の娘イオンの感度を比較した。その結果、パーフルオロカルボン酸類は 10 V で最高の感度を示した。

以上の結果より、イオンの取込時間を 0.2 秒、その他の条件を表 1 に示すとおりに設定することとした。

3.1.3. 検出感度

注入量 10 μL における各 PFCs の定量下限値は 0.5ng/mL であった。この値は過去の文献の PFCs の定量下限値と同程度であった。

3.2. 液-液抽出の条件の検討

過去の血清等の生体試料を対象とした PFCs の分析法では、炭素鎖が 15 以下の PFCs を対象としたものがほとんどである。本研究で対象とする PFOcDA は、他の PFCs に比べて脂溶性が高いことから、抽出時のメタノール量を変えて各 PFCs のピーク強度を調べた (図 3-1)。各 PFCs について、メタノール無添加時のピーク強度を 100% とした。炭素数 4~8 の PFCs (PFBA, PFPeA, PFHxA, PFHpA および PFOA) のピーク強度は、メタノール添加量の増加に伴い減少し、メタノール添加量 0.8mL ではほとんど回収されなかった。炭素数 9~13 の PFCs (PFNA, PFDA, PFUnDA, PFDoDA 及び PFTrDA) のピーク強度も、メタノール添加量の増加に伴い減少したが、メタノール添加量 0.8mL では炭素鎖長の増加に伴いピーク強度は増加傾向にあった。炭素数 14~18 の PFCs (PFTeDA, PFHxDA 及び PFOcDA) のピーク強度は、メタノールの添加量の増加に伴い上昇した。各 PFCs のピーク強度はメタノール添加量により変動することがわかった。

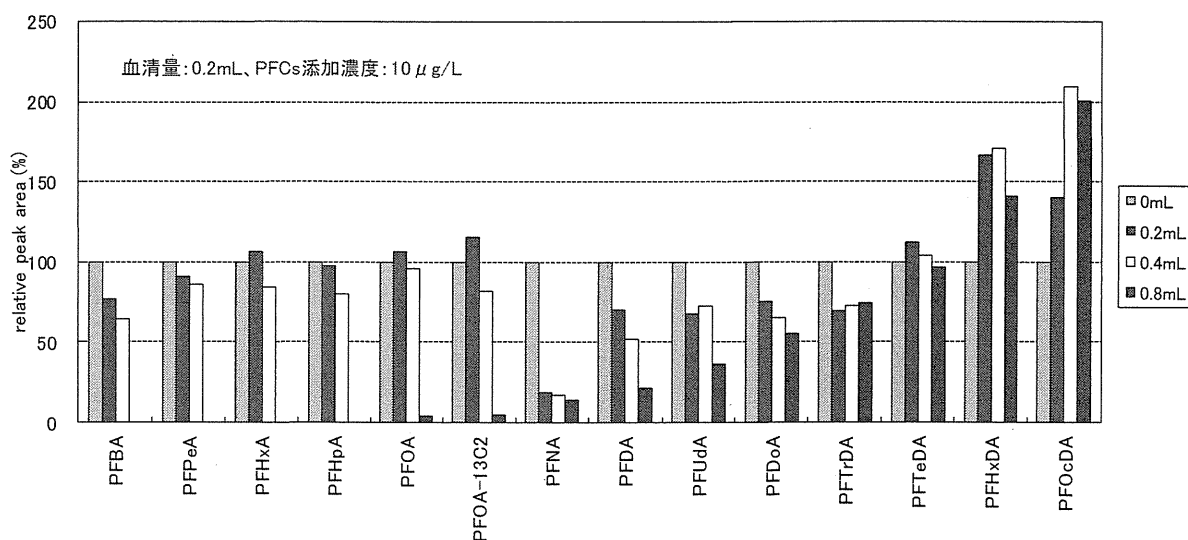


図3-1. PFCsの感度に及ぼすメタノール量の影響

以上のことから、短鎖から長鎖のPFCsを精度良く一斉分析するためには、標準液についても血清試料と同様に操作し、検量線を作成する必要があることがわかった。さらに、定量計算の際には、炭素数4~10のPFCsについてはPFOA-¹³C₂で、炭素数12~18のPFCsについては、FA14-d₃で補正することにより、精度をより一層向上させることとした。

3.3. 添加回収率

血清 200 µL に PFCs 標準溶液（最終濃度 10 µg/L）、サロゲート溶液（最終濃度 50 µg/L）を添加し、回収率を調べた（表 3-1）。PFDoA および PFTTrDA の回収率は他の PFCs に比べ、低い傾向にあったが、その他の PFCs の回収率は 70%以上と、ほぼ良好な結果であった。

表 3-1. ラット血清中 PFCs の添加回収率

No	PFCs	recovery (%)					
		Exp. 1 (n=4)			Exp. 2 (n=5)		
		average	SD	CV	average	SD	CV
1	PFBA	94	15	16	108	11	10
2	PFPeA	110	24	22	96	6	6
3	PFHxA	107	22	21	105	10	9
4	PFHpA	110	15	14	98	12	12
5	PFOA	81	15	18	87	9	10
6	PFNA	116	19	16	104	9	9
7	PFDA	118	22	18	103	10	10
8	PFUdA	90	18	20	88	17	20
9	PFDoA	78	19	24	69	20	28
10	PFTTrDA	70	29	42	62	23	37
11	PFTeDA	93	26	28	78	17	21
12	PFHxDA	84	29	34	71	18	26
13	PFOcDA	100	24	25	86	16	18
14	PFOS	113	21	19	86	9	11

3.4. PFOcDA 投与ラット血清中の PFCs

予備的な分析の結果、対照群 (0mg/kg) でも、雌雄ともに PFOcDA や PFHxDA, PFTeDA, PFTTrDA, PFUdDA 及び PFOA が低レベルで検出された。PFOcDA 投与群 (主試験群) では PFDA, PFUdDA, PFDoA, PFTTrDA 及び PFTeDA の濃度が、PFOcDA や PFHxDA よりも高かった。一方、PFBA や PFPeA は検出されなかった。回復群 (1000 mg/kg) では、投与終了時と比較して、PFHpA、PFOA、PFNA 及び PFDA 濃度の減少がみられたが、その他の有機フッ素化合物については、明確な濃度低下は認められなかった。

3.5. PFOcDA の純度

血清中に PFOcDA 以外の PFCs が検出されたことから、それらが代謝によるものか、また投与した PFOcDA の不純物によるものかを調べるために、投与に使用した PFOcDA の純度を調べた。

PFOcDA 標準品 10mg をアセトン 10mL に溶解したのち、その 1mL を正確にとり、メタノールで 100 倍希釈し、10mg/L 溶液 1,2 を調製した。溶液 1,2 を LC/MS/MS で測定した。PFOcDA の組成比は約 98% で最も多く、PDHxDA が 1.424%、PFTeDA が 0.371%、PFTTrDA が 0.148% であった。その他に PFDoDA, PFUnDA, PFDA および PFNA が若干存在した。PFOA よりも炭素鎖が短い PFCs は検出されなかった。

D. 考察

化学物質の複合曝露によるリスク評価手法として、これまでに提案されている方法について、その利点や欠点を含めて整理した。評価手法の一つに、混合物その物を用いた毒性試験結果を基に評価する方法があるが、異なる曝露状況、特に高用量から低用量への外挿が困難なため、混合物中の成分に関する毒性情報を基に評価を行うのが現実的である。その方法として、用量相加モデルを仮定した HI_{ADD}、RPF や TEF アプローチの他、反応相

加を仮定したアプローチや HI_{INT} アプローチなど多くの方法が提案されていた。

これらの手法を選択する方法として、国際機関や各国機関により様々なフローチャートやフレームワークが提案されている。最近、国際化学物質安全性計画 (International Programme on Chemical Safety; IPCS) により公表されたフレームワークは、階層的 (段階的) なアプローチに基づいたものである (Meek et al. 2011)。すべての階層に曝露及びハザードに関する統合的な、そして繰り返しの検討が含まれ、階層が上がるごとにその検討方法はより確実なものに改善される。複合曝露が予測される様々な状況に関して、リスク管理の優先度を決定する際に、リスク評価者を支援することを目的として作成された。

これらに対し、日本では、化学物質への複合曝露を考慮した評価手法の適応は非常に限られている。1999年にダイオキシン類について TEFアプローチを用いた評価が行われ (厚生省、環境庁 1999)、さらに、水道水中の農薬に関して、下記のような HI_{ADD} アプローチに類似した方法による管理が行われている (厚生労働省 2003) が、化学物質への複合曝露による影響を評価するためのガイダンス等は作成されておらず、今後の検討が望まれる。

$$DI = \sum_{i=1}^n \frac{DV_i}{GV_i}$$

DI: 検出指標値 (1 を超えないこと)

DV_i: 農薬 i の検出値

GV_i: 農薬 i の目標値

新規不確実係数及びその分割法を適用したホウ素の安全性評価では、新たに収集及び整理したホウ素の毒性関連情報を基に、再検討した NOAEL 又は BMDL₀₅ を適切に採用し、かつ出来る限りホウ素クリアランス及び腎クリアランスの実測データを活用した。さ