

平成30年度 食品健康影響評価技術研究 成果発表会

日時：平成30年11月19日（月）

14：00～16：30

場所：食品安全委員会 中会議室

（東京都港区赤坂5-2-20

赤坂パークビル22階）

～プログラム～



- (1) 食事由来アクリルアミドばく露量推定方法の
開発と妥当性の検討および大規模コホート研究
に基づく発がんリスクとの関連に関する研究

（主任研究者：祖父江 友孝）

14：05～14：50

- (2) 食品用ペットボトルから溶出する化学物質の
摂取量の推定に関する研究

（主任研究者：尾崎 麻子）

14：50～15：35

- (3) インビボ毒性試験成績のデータベース化とその
インシリコ解析・評価への応用に関する研究

（主任研究者：吉成 浩一）

15：35～16：20



食事由来アクリルアミドばく露量推定方法の開発と 妥当性の検討および大規模コホート研究に基づく 発がんリスクとの関連に関する研究

祖父江 友孝 (そぶえ ともたか)

国立大学法人大阪大学大学院
医学系研究科環境医学講座 教授

アクリルアミドは、国際がん研究機関では、ヒトに対して、おそらく発がん性がある物質とされています。近年、アスパラギンと還元糖を含む食品を120℃以上の高温で加工・調理することによって、普段食べている食品中においてもアクリルアミドが生成されることがわかりました。しかしその健康影響については、日本でも評価が行われ、その中で個人摂取量を正確に把握する方法の開発や発がん性の疫学研究の実施などによるリスク評価研究が必要とされています。

そこで、日本人が食事を通してアクリルアミドをどの程度摂取しているのかを調べ、摂取量と発がんリスクとの関連を検討することを目的とした研究を行いました。具体的な内容は、①食事調査由来のアクリルアミド摂取量推定値の検討（分析値との比較）、②大規模コホート研究データを用いた食事由来アクリルアミド摂取量とがん罹患リスクとの関連検討、③生体指標を用いたアクリルアミドの長期ばく露評価と摂取量との関連の3点で、アクリルアミド摂取による健康影響を検討しました。

①食事調査由来のアクリルアミド摂取量推定値の検討（分析値との比較）

2日間の陰膳法（実際に被験者が摂取した食事と同じものを科学的分析する方法）を用いて集めた食品サンプル中アクリルアミドと、秤量法（食べたものを計量して記録する方法）を用いて推定した摂取量を比較しました（14名対象）。秤量法を用いた摂取量の推定には文献値から作成したアクリルアミドの含有量データを用いました。その結果、陰膳法で分析された分析値と、秤量法からの推定値の相関が高い結果となり、秤量法を用いてアクリルアミド摂取量を推定することの妥当性が明らかになりました。

②大規模コホート研究データを用いた食事由来アクリルアミド摂取量とがん罹患リスクとの関連検討

アクリルアミド摂取量とがん罹患リスクとの関連について、大規模な集団を対象とした解析を行うため、多目的コホート研究（約10万人）で用いられている食物摂取頻度調査票（アンケート票）によって推定された摂取量の妥当性を明らかにしました（コホートの一部の集団550名対象）。さらにコホート集団全体において、調査票から推定された摂取量と、約15年追跡後のがん罹患リスクを部位別に解析しました。その結果、摂取量と乳がん、卵巣がん、子宮体がん等との関連は認められませんでした（図）。

③生体指標を用いたアクリルアミドの長期ばく露評価と摂取量との関連

調査票を用いた推計方法は測定誤差の影響を受ける可能性があるため、別の指標として、生体指標を測定する方法も検討しました。国際的にアクリルアミドの生体指標として用いられている赤血球中のアクリルアミドヘモグロビン付加体量を、N-alkylエドマン法を用いて測定する方法を確立しました。119名の血液を収集、測定し、陰膳サンプル分析値および食物摂取頻度調査による推定値と比較したところ、分析値や推定値が高い群ほど、アクリルアミドヘモグロビン付加体濃度が高いという結果となりました。また、西欧諸国の被験者の赤血球中の付加体濃度と比較して、我が国の被験者の濃度が低くはないことが観察されました。

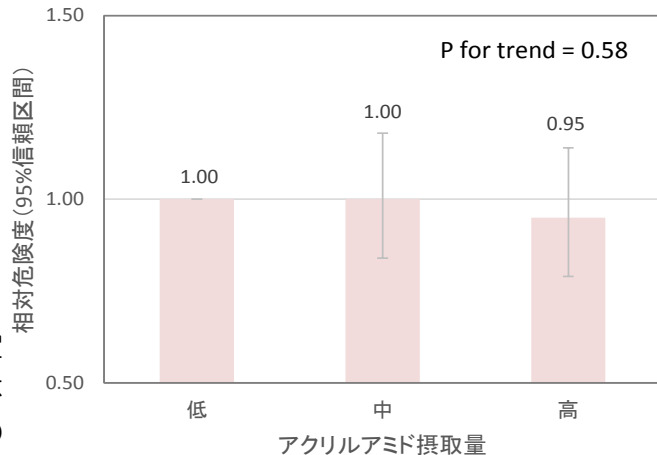
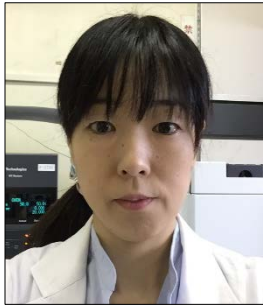


図. アクリルアミド摂取量によって3群に分けた場合の、各群の乳がん罹患リスク



食品用ペットボトルから溶出する化学物質の 摂取量の推定に関する研究

尾崎 麻子 (おざき あさこ)

地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所
衛生化学部食品化学2課 主幹研究員

ペットボトルから溶出する化学物質の摂取量を推定するために、溶出物質の同定と定量を行った。試料は、国内において多く消費されている清涼飲料用の未使用のペットボトルとした。

まず、溶出する可能性のある化学物質を物性ごとに適した分析装置を用いて探索し、14物質を同定した。これにペットボトルの製造に使用されている既知のモノマーや副生成物の環状オリゴマー等を加えた計25物質を溶出試験の対象とした。

食品擬似溶媒への溶出量を高感度かつ高精度に定量するために、迅速で簡易な分析法を確立した。溶出試験は保存温度を25℃、40℃、60℃と変えた10日間の短期間溶出試験と、ペットボトル飲料の賞味期限が比較的長いことから、25℃で3～12ヶ月の長期間溶出試験を行った。その結果、アンチモン、ゲルマニウム、2-メチル-1,3-ジオキソラン、新規に同定した末端がカルボキシ基のオリゴマー2種類、ビスヒドロキシエチルテレフタル酸、環状3量体、アセトアルデヒド、ホルムアルデヒドの溶出がみられ、いずれも保存温度は高いほど、保存期間は長くなるほど溶出量が増加した。溶出試験を実施した25物質について、25℃12ヶ月での溶出量と、一日あたりのペットボトル入り清涼飲料の摂取量より推定ばく露量を算出した。耐容一日摂取量 (TDI) もしくは許容一日摂取量 (ADI) が設定されているアンチモンやホルムアルデヒド等の7物質について、推定ばく露量との比較を行った結果、TDIもしくはADIに対する割合は0.0001%未満～1.4%であり、十分に低い値であった。

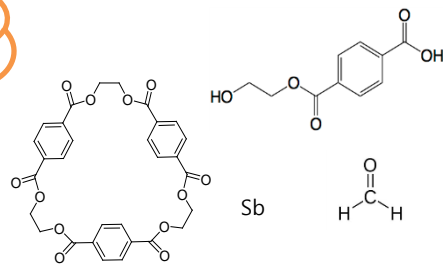
本研究は、国内流通ペットボトルを対象とした1年間にもおよび長期間溶出試験を実施した初めての研究報告である。

食品擬似溶媒 (水、4%酢酸、50%エタノール)



10日～12ヶ月
保存

なにがどれくらい
溶け出てくる？



各種分析装置で溶出物質を同定し、溶出量を定量



ペットボトル溶出物質の推定ばく露量を算出



インビボ毒性試験成績のデータベース化と そのインシリコ解析・評価への応用に関する研究

吉成 浩一（よしなり こういち）
静岡県立大学薬学部
衛生分子毒性学分野 教授

製品開発や安全性評価の効率化、動物愛護・福祉からの動物実験の削減の観点から、動物実験代替法、特にインシリコ手法（コンピューターを用いた解析手法）による安全性評価手法の確立が世界的に求められている。この安全性評価手法の確立には、既存の動物実験データの利活用が必要であることから、本研究において、食品健康影響評価書のデータを有害性評価支援システム統合プラットフォーム（HESS）に組み込んでデータセットを拡充した。さらに、それらを利用して重篤な毒性の機序や種差の解明、毒性機序と化学構造に基づくカテゴリー作成、毒性学的懸念の閾値（TTC）の補助ツールとしての有用性の検証、インシリコ毒性予測手法の確立等を行い、インシリコ手法による新たな食品中化学物質の安全性評価手法の確立を目指した。

研究結果として、食品健康影響評価書のデータを利用して、224物質（計674試験）のラット反復投与毒性試験のデータをHESSに搭載することができた。これらデータは、これまであまりHESSに掲載がなかった化学物質の試験データが主であり、これによりHESSに掲載された化学物質のケミカルスペースが拡充され、より広範囲の化学物質の食品健康影響評価をサポートすることが可能になったと考えられる。

また、本研究ではこれまで世界的にもデータベースがほとんど存在しない生殖発生毒性試験情報（一世代試験、二世代試験、発生試験等）の試験結果を抽出してMicrosoft Excel上で整理した。さらに、フタル酸エステル類6物質についてはFileMakerを用いたデータベースを構築した。本データベースは生殖発生毒性試験の評価をサポートする非常に有用なツールになると思われる。また、本データベースでは複雑な生殖発生毒性試験の試験結果を体系的に整理しており、今後同様のデータベースを構築する際の基盤になることが期待される。

さらに、本研究では、データベースの構築、拡充に加えてそれらの有用性についても様々な観点から検討を行った。

構築した生殖発生毒性試験データベースを用いてのフタル酸エステルの毒性学的特徴を解析や、毒性情報データベースの活用例として、反復投与毒性について、動物種差の比較解析、非発がんエンドポイントの閾値（Non-Cancer TTC）の検討、化学構造と毒性発現の関連性の解析等を行った。

最後に、薬物代謝の毒性発現への関与を検討するために、P450との反応性を評価し、それらとラットインビボ毒性との関連性を解析した。その結果、血中 γ -GTP増加、肝相対重量増加・肝絶対重量増加、血中総タンパク質減少、血中グロブリン減少並びに甲状腺絶対重量増加などがいくつかのP450分子種の反応性と有意に関連することが明らかになり、薬物代謝のこれら毒性発現への寄与が示唆された。

以上、本研究では、食品健康影響評価書のデータを活用し、ラット毒性試験データベースであるHESSを拡充するとともに、収集した毒性試験情報を利用して様々な検討を行い、毒性試験情報の有用性、データベース構築の重要性を示すことができた。これら成果は、毒性試験データベースを活用したインシリコ手法による新たな食品中化学物質の安全性評価手法の確立に有益と考えられる。

食事由来アクリルアミドばく露量推定方法 の開発と妥当性の検討および大規模コ ホート研究に基づく発がんリスクとの関連 に関する研究

平成30年度 食品健康影響評価技術研究 成果発表会

平成30年11月19日 14:05-14:50

祖父江 友孝

背景

- アクリルアミドとは、紙力増強剤や接着剤、塗料などの製造に用いられるポリアクリルアミドの原料として1950年代から用いられている化合物。
- 職業上の曝露によって神経障害を引き起こし、動物実験でも遺伝毒性、発がん性を有することが報告されている。
- 「ヒトに対しておそらく発がん性がある(Group 2A)」と国際がん研究機関によって判定されている(1994年)。

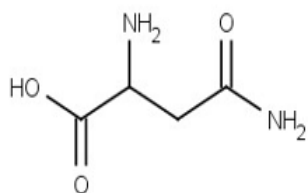
IARC (International Agency for Research on Cancer), Volume 60 Some Industrial Chemicals, Acrylamide. 1994

- 高温で加工されたジャガイモや穀類の加工食品中からアクリルアミドが検出されたとの報告が、スウェーデン食品庁とストックホルム大学によってされる(2002年)。

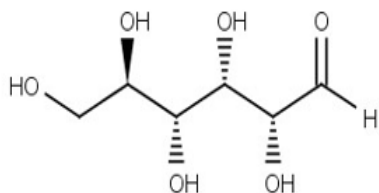
National Food Administration: Acrylamide is formed during the preparation of food and occurs in many foodstuffs. 2002

背景

アクリルアミドの生成



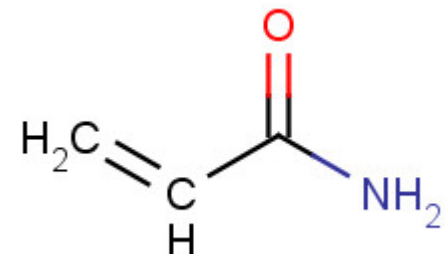
アスパラギン



グルコース (ブドウ糖)



120°C以上



アクリルアミド

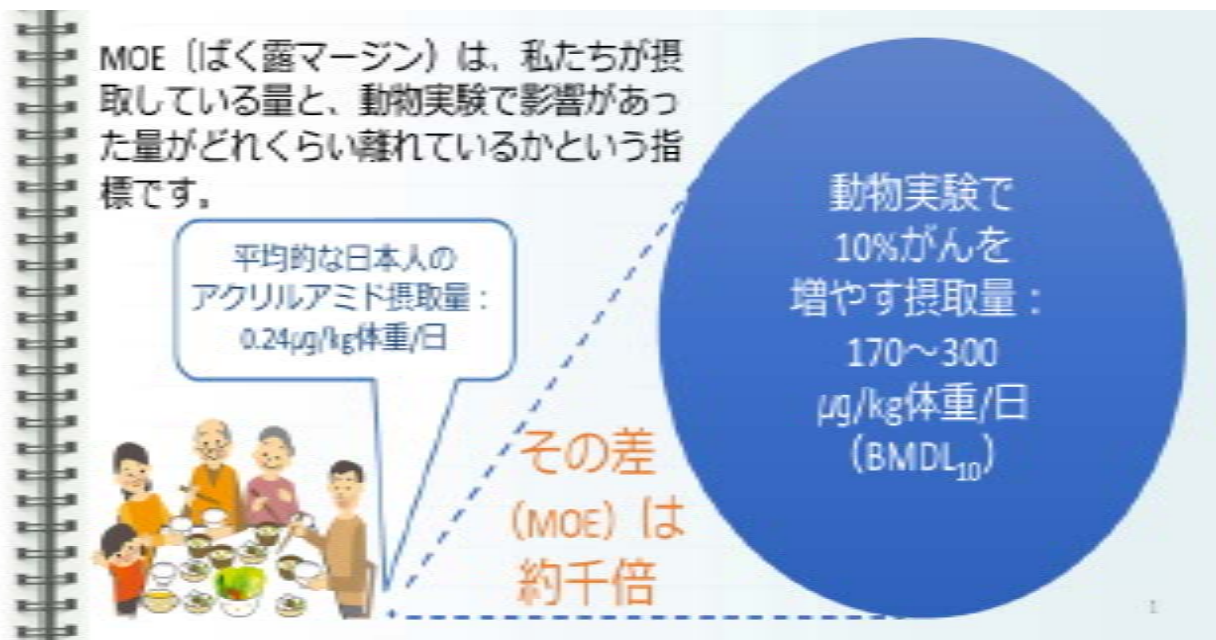
揚げる、焼く、焙る→**メイラード反応**



背景

□ 食品安全委員会による評価書「加熱時に生じるアクリルアミド」(2016年4月)

発がん影響のリスクについては、(中略)ヒトにおける健康影響は明確ではないが、動物実験から求めた BMDL₁₀と日本人の食品からのアクリルアミドの推定摂取量から算出したばく露マージンが十分ではないことから、**公衆衛生上の観点から懸念がないとは言えない。**



背景

- 欧米では、食事由来の曝露とがん罹患の関連を調査した疫学研究が行われているが、結果に一致性がない。
- 日本人を対象として、食事由来アクリルアミドと発がんリスクとの関連を調べた疫学研究の報告はない。
- その一因としては、日本人の食事を対象とした曝露量(=摂取量)の評価方法が確立されていないことがあげられる。

目的

日本人におけるアクリルアミド摂取と主要部位別の発がんリスクとの関連を検討することを目的とする。

様々な摂取量調査方法の特徴

	概要	長所	短所	長期間の摂取量が評価
秤量法(食事記録) DR (Dietary Record)	摂取した食物を調査対象者が自分で調査票に記入する。食品の種類と重量を測定	対象者の記憶に依存しない。精度を評価する際の、 ゴールドスタンダードとして使われることが多い	対象者の負担が大きい。調査期間中の食事が、通常と異なる可能性がある。	多くの栄養素では、長期間の調査を行わないと不可能
食物摂取頻度調査票 FFQ (Food Frequency Questionnaire)	数十～百数十項目の食品の摂取頻度を、調査票を用いて尋ねる。	簡便に調査を行える。対象者1人当たりのコストが安く、データ処理に要する時間と労力が少ない。	対象者の記憶に依存する。得られる結果は質問項目や選択肢に依存する。 妥当性研究を行う必要がある	可能
陰膳法 DM (Duplicate Method)	摂取した食物の実物と同じものを、同量集める。食物試料を化学分析する。	対象者の記憶に依存しない。食品成分表の精度に依存しない	対象者の負担が大きい。試料の分析に時間と費用がかかる	多くの栄養素では、長期間の調査を行わないと不可能

秤量法食事記録 (DR)

対象者が食べた（飲んだ）食品の量をはかり、一定期間リアルタイムで記録する方法

1月18日（木） 朝食

料理名	食品名	料理した量	食べた量
ご飯	白飯		150g
みそ汁	みそ	20 g	全体の半分
	豆腐	40 g	
	わかめ（乾燥）	1 g	
	だしの素	小さじ1	

食物摂取頻度調査法 (FFQ)



各食品項目の摂取量 = 頻度 × 標準目分量 × 相対目分量
 「いわし」の摂取量 = 3.5回/7日 × 80グラム × 0.5
 = 20 (グラム/日)

過去1年間の食事を思い出して、

平均的な頻度や量を記入してください。

食品名	月に1回未満	月に1〜3回	週に1〜2回	週に3〜4回	週に5〜6回	毎日1回	毎日2〜3回	毎日4〜6回	毎日7回以上	1回あたりの目分量	目分量より		
											少ない(半分以下)	同じ	多い(1.5倍以上)
いわし	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1尾 (80g位)	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
さんま	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1尾 (80g位)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
えび	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	大正えび2尾 (40g位)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
あさり	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	むき身10個 (20g位)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

摂取頻度(9段階)

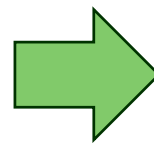
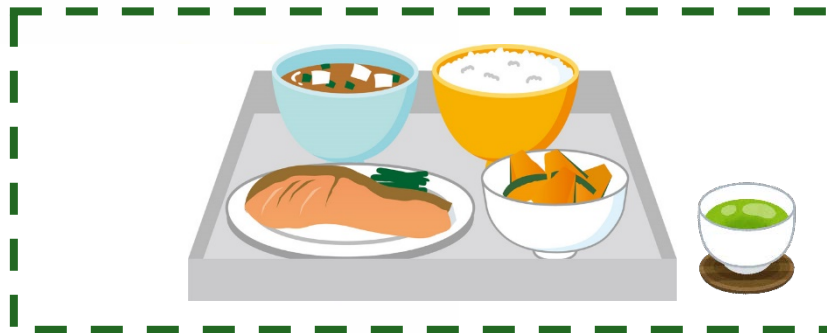
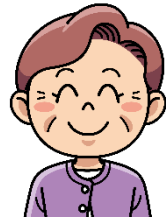
標準目分量
(g)

相対目分量
(0.5, 1 or 1.5)

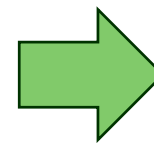


陰膳法 (DM)

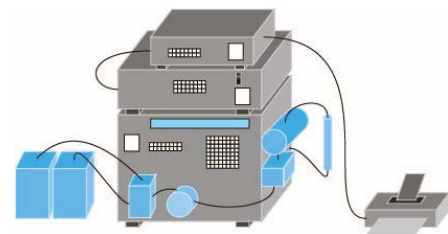
対象者が食べた (飲んだ) 料理をもう一食分用意してもらい、それを回収して化学的に分析する手法



回収



分析



様々な摂取量調査方法の特徴

	概要	長所	短所	長期間の摂取量が評価
秤量法(食事記録) DR (Dietary Record)	摂取した食物を調査対象者が自分で調査票に記入する。食品の種類と重量を測定	対象者の記憶に依存しない。精度を評価する際の、 ゴールドスタンダードとして使われることが多い	対象者の負担が大きい。調査期間中の食事が、通常と異なる可能性がある。	多くの栄養素では、長期間の調査を行わないと不可能
食物摂取頻度調査票 FFQ (Food Frequency Questionnaire)	数十～百数十項目の食品の摂取頻度を、調査票を用いて尋ねる。	簡便に調査を行える。対象者1人当たりのコストが安く、データ処理に要する時間と労力が少ない。	対象者の記憶に依存する。得られる結果は質問項目や選択肢に依存する。 妥当性研究を行う必要がある	可能
陰膳法 DM (Duplicate Method)	摂取した食物の実物と同じものを、同量集める。食物試料を化学分析する。	対象者の記憶に依存しない。食品成分表の精度に依存しない	対象者の負担が大きい。試料の分析に時間と費用がかかる	多くの栄養素では、長期間の調査を行わないと不可能

研究項目

(1) 食事調査由来のアクリルアミド推定値の検討—分析値との比較 n=14

- 1) DRおよびFFQによる摂取量推定方法の開発
- 2) DR、FFQによる推定値とDMサンプル中アクリルアミド分析値との比較

(2) 大規模コホート研究データを用いた食事由来アクリルアミドばく露量とがん罹患リスクとの関連検討

- 1) FFQの妥当性・再現性の検討 n=565
- 2) FFQとがん罹患リスクとの関連検討 n=男女各4~5万人(がん種により異なる)

(3) 生体指標を用いたアクリルアミドの長期ばく露評価と摂取量との関連(河原班との共同研究) n=119

- 1) 血液および尿検体の収集
- 2) FFQの収集
- 3) アクリルアミド-ヘモグロビン付加体を用いた長期ばく露の評価
- 4) その他のばく露指標の利用に関する探索的検討
- 5) DMによる分析値およびDRと、生体指標との関連検討
- 6) FFQを用いた長期間の摂取量推定と、生体指標との関連検討

研究項目(1)

食事調査由来のアクリルアミド推定値の
検討ー分析値との比較

方法

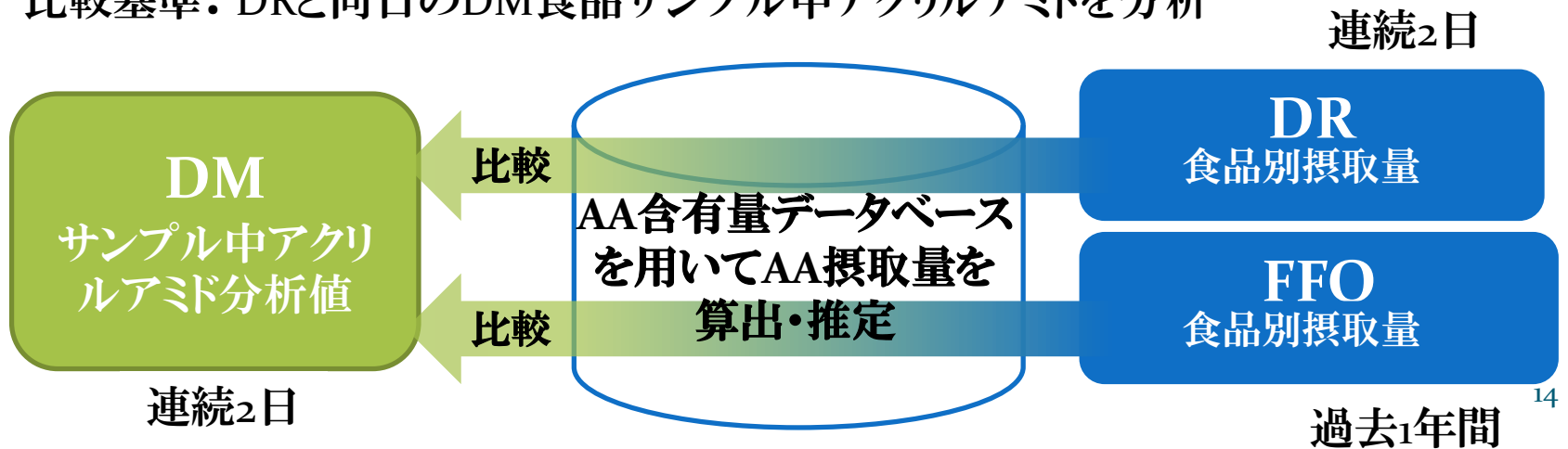
(1) 食事調査由来のアクリルアミド推定値の検討—分析値との比較

1) DRおよびFFQによる摂取量推定方法の開発

- AA含有量データベース: 食品安全委員会などの公開値から、日本食品標準成分表1878食品中321食品について値を充当
- FFQ: 多目的コホートの138食品項目FFQ過去一年の食事を反映、野菜の調理によるアクリルアミドも考慮

2) DR、FFQによる推定値とDMサンプル中アクリルアミド分析値との比較

- 対象者: 神奈川在住14名(男性3名、女性11名、20~74歳)
- 摂取量推定: 連続2日間(日曜日と月曜日) DR及びFFQ
- 比較基準: DRと同日のDM食品サンプル中アクリルアミドを分析

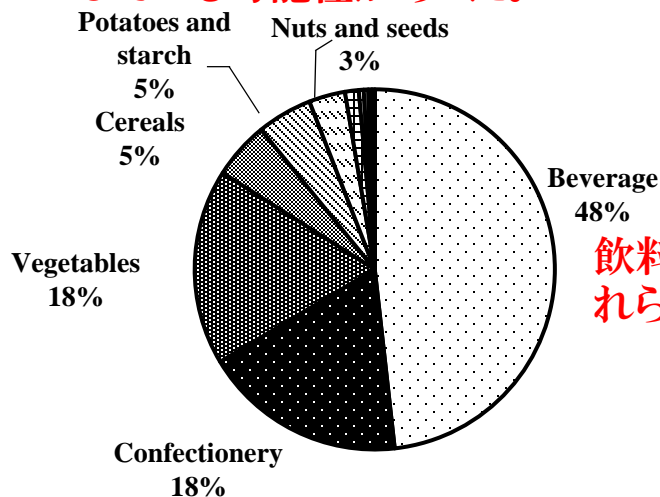


(1) 食事調査由来のアクリルアミド推定値の検討—分析値との比較

体重あたりアクリルアミド摂取量(分析値および推定値) n=14

	Acrylamide intake ($\mu\text{g}/\text{body weight (kg)}/\text{day}$)				
	mean	SD	Median	Min.	Max.
DM	0.106	± 0.123	0.066	0.00	0.457
DR	0.233	± 0.192	0.183	0.064	0.710
FFQ	0.128	± 0.062	0.112	0.045	0.262

- 推定された摂取量中央値は、食品安全委員会報告書のモンテカルロ法によって推計されたアクリルアミド摂取量中央値の $0.154\mu\text{g}/\text{体重(kg)}/\text{日}$ と同程度であった。
- FFQおよびDRの推定値はDMの値より高く推定されていた。DRでは、摂取量を過大評価している可能性があった。

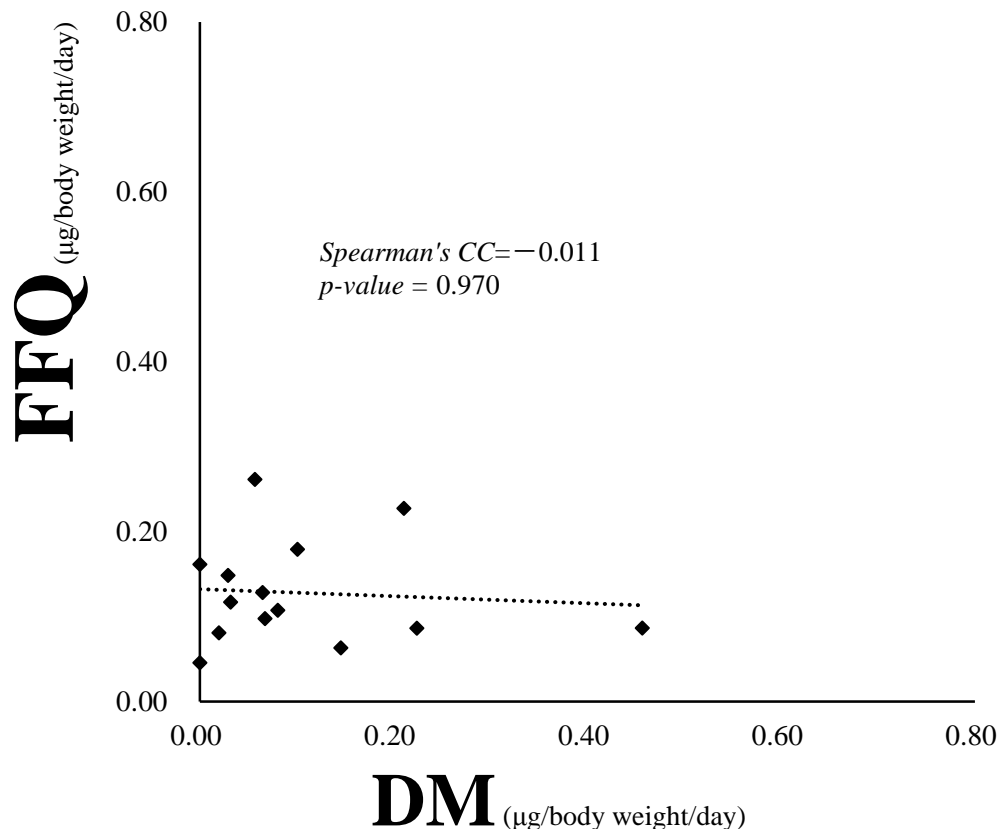
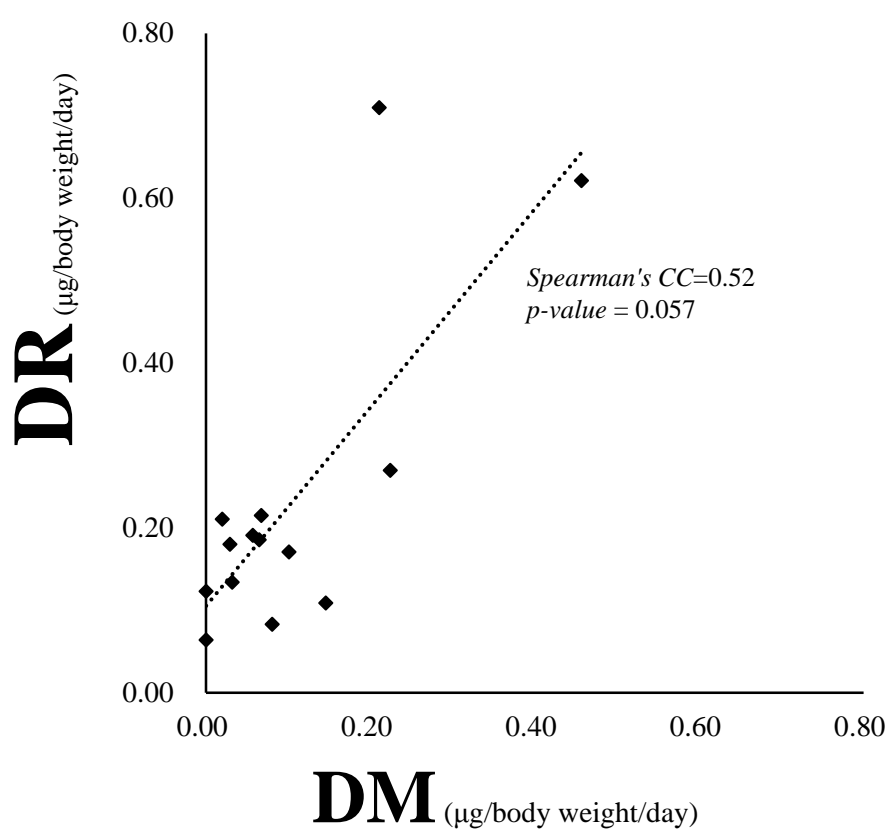


飲料の寄与が最も高く、次いで菓子類、加熱された野菜類で、これらの食品群で約75%を占めた。

- 嗜好飲料類: 緑茶類 (19.9%)、コーヒー類 (15.4%)
- 菓子類 : スナック類 (9.3%)、チョコレート類 (5.7%)
- 野菜類 : もやし (6.3%)、ピーマン (5.4%)

DR(DR)を用いたアクリルアミド摂取量の寄与食品と割合

(1) 食事調査由来のアクリルアミド推定値の検討—分析値との比較



DM (2日間) 分析値とDR (2日間)、FFQ (過去1年間) による推定値の関連

- 2日間のDR (DMと同日の2日間を反映) から推定したアクリルアミド摂取量は統計学的に有意ではないもののDMと比較的高い相関
- FFQ (長期摂取量を反映) はDMと低い相関

研究項目(2)

大規模コホート研究データを用いた食事由来アクリルアミドばく露量とがん罹患リスクとの関連検討

方法

(2)大規模コホート研究データを用いた食事由来アクリルアミドばく露量とがん罹患リスクとの関連検討

1) FFQの妥当性・再現性の検討

- 1995～1998年開始のコホート研究の小集団(10地域からボランティアで参加した約500名を対象とした多目的コホートFFQ妥当性研究)から収集した既存データ
 - ✓ 2回のFFQ(1年間隔)
 - ✓ 計28日間(7日間×4季節)のDR
- (1)のデータベースを用いてアクリルアミド摂取量を算出
- 妥当性:FFQとDRの推定摂取量を比較
- 再現性:2回のFFQの推定摂取量を比較

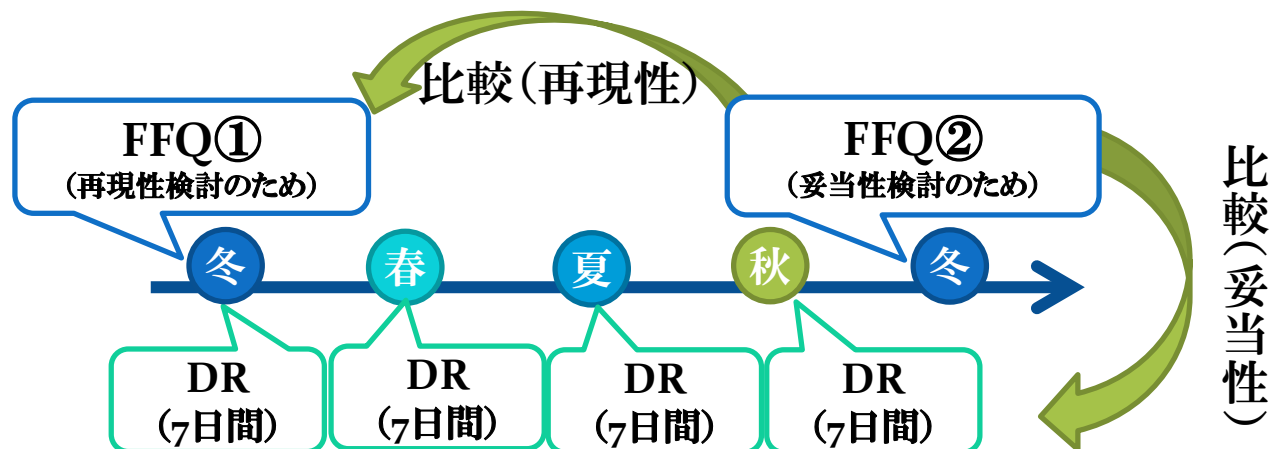


図. 研究の流れ(基本形)

(2)大規模コホート研究データを用いた食事由来アクリルアミドばく露量とがん罹患リスクとの関連検討

FFQおよびDRから推定したアクリルアミド摂取量と、FFQの妥当性・再現性

	DR		FFQ		% *	妥当性 ^a	再現性 ^b
	平均	標準 偏差	平均	標準 偏差		エネルギー 調整後	エネルギー 調整後
コホート I							
体重あたり粗アクリルアミド摂取量(μg/体重kg/day)							
男性 (n=102)	0.10	± 0.06	0.11	± 0.07	5	0.48	0.62
女性 (n=113)	0.13	± 0.08	0.14	± 0.09	5	0.42	0.56
合計 (n=215)	0.12	± 0.07	0.12	± 0.08	2	-	-
コホート II							
体重あたり粗アクリルアミド摂取量(μg/体重kg/day)							
男性 (n=174)	0.12	± 0.06	0.11	± 0.06	-7	0.37	0.61
女性 (n=176)	0.13	± 0.06	0.14	± 0.06	5	0.34	0.58
合計 (n=350)	0.12	± 0.06	0.12	± 0.06	3	-	-

DR, 食事記録; FFQ, 食物摂取頻度調査票.

*パーセント差(%): (FFQ-DR)/DR × 100.

^aDRとFFQのスピアマンの順位相関係数.

^b2回のFFQのスピアマンの順位相関係数.

- FFQによって推定された摂取量を用いて、摂取量の順位づけをすることが可能と考えられた。

考察

■ DRによる体重kgあたりの平均摂取量の比較

- ・ 食品安全委員会による推定値と同程度であった。
- ・ 欧米と比較すると、アクリルアミド摂取量は半分以下だった。

本研究	食品安全委員会 報告書の推定値 ^a	オランダ人 ^b
0.12 (SD, 0.07)	0.154	0.45 (SD, 0.49)

a 2016年4月食品安全委員会評価書「加熱時に生じるアクリルアミド」、平成24年国民健康・栄養調査における24,293名のデータを用いて、モンテカルロシミュレーションによって推計された結果(中央値)。

b Konings EJ. et al., Eur J Clin Nutr. 2010;64:534-540.

■ FFQによるアクリルアミド摂取量推定の妥当性

- ・ ヨーロッパのEPIC研究では、DRとFFQの相関係数が0.35だった。
(Ferrari P. et al., Eur J Nutr. 2013;52:1503-1512.)

本研究の相関係数は0.34~0.47であり、κ係数も高かった。

FFQによるアクリルアミド摂取量推定の妥当性が確認できた。

(2)大規模コホート研究データを用いた食事由来アクリルアミドばく露量とがん罹患リスクとの関連検討

2) FFQとがん罹患リスクとの関連検討

【研究内容・方法】

- 対象者:多目的コホート研究*対象者男女各4~5万人(がん種により異なる)
- *多目的コホートに基づくがん予防など健康の維持・増進に役立つエビデンスの構築に関する研究
- 1995~1998年に実施したFFQ(138食品項目を含む)を用いたアクリルアミド個人別摂取量
- その後2013年まで(約15年)の部位別がん(乳、肺、肝臓、子宮体、卵巣、消化器系他)罹患率算出
- 解析
 - 推定摂取量を三分位に分けた最低摂取量群を比較基準として、摂取量が高いグループのリスクをCox比例ハザードモデルを用いて算出(喫煙、飲酒、コーヒー摂取量などによる層別および多変量解析)
 - 寄与食品の算出

方法

コホート
I



2013年まで罹患数

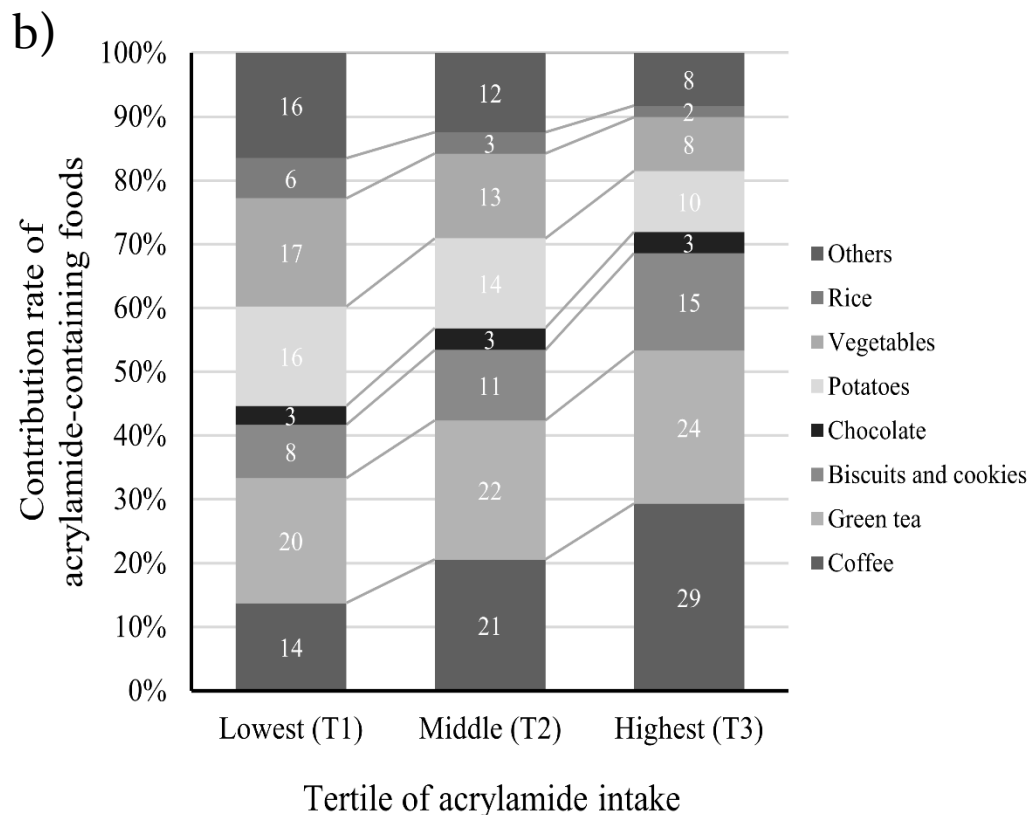
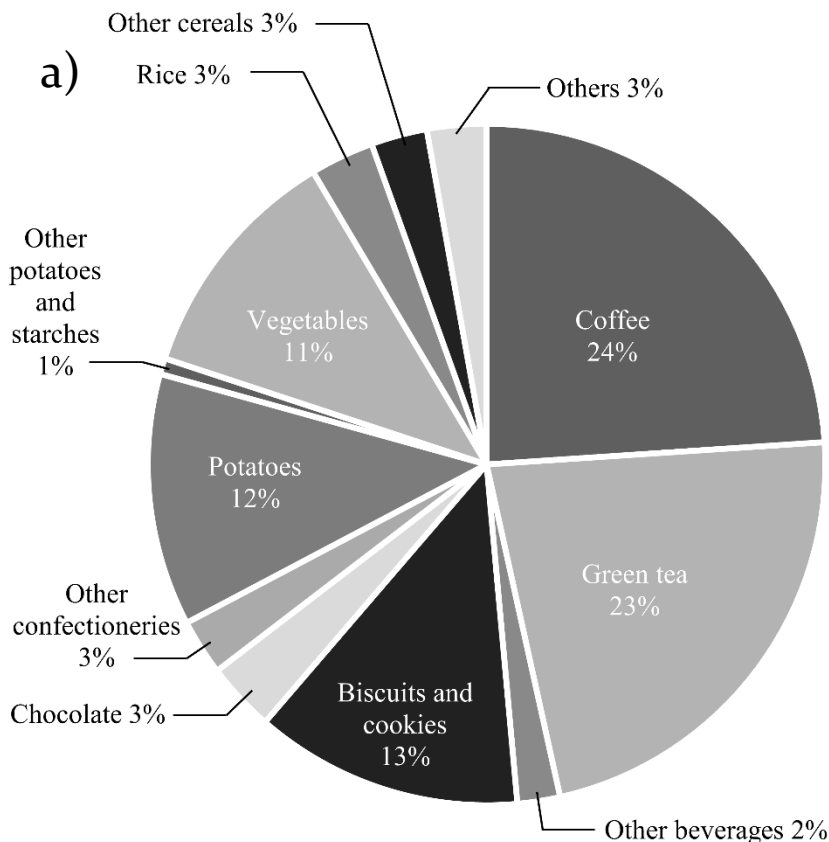
乳がん	792例
子宮体がん	161例
卵巣がん	122例
肺がん	1,674例
肝がん	800例
食道がん	391例
胃がん	2,218例
大腸がん	2,470例
腎臓がん	81例
膀胱がん	132例
前立腺がん	431例

コホート
II



(2)大規模コホート研究データを用いた食事由来アクリルアミドばく露量とがん罹患リスクとの関連検討

【研究成果】



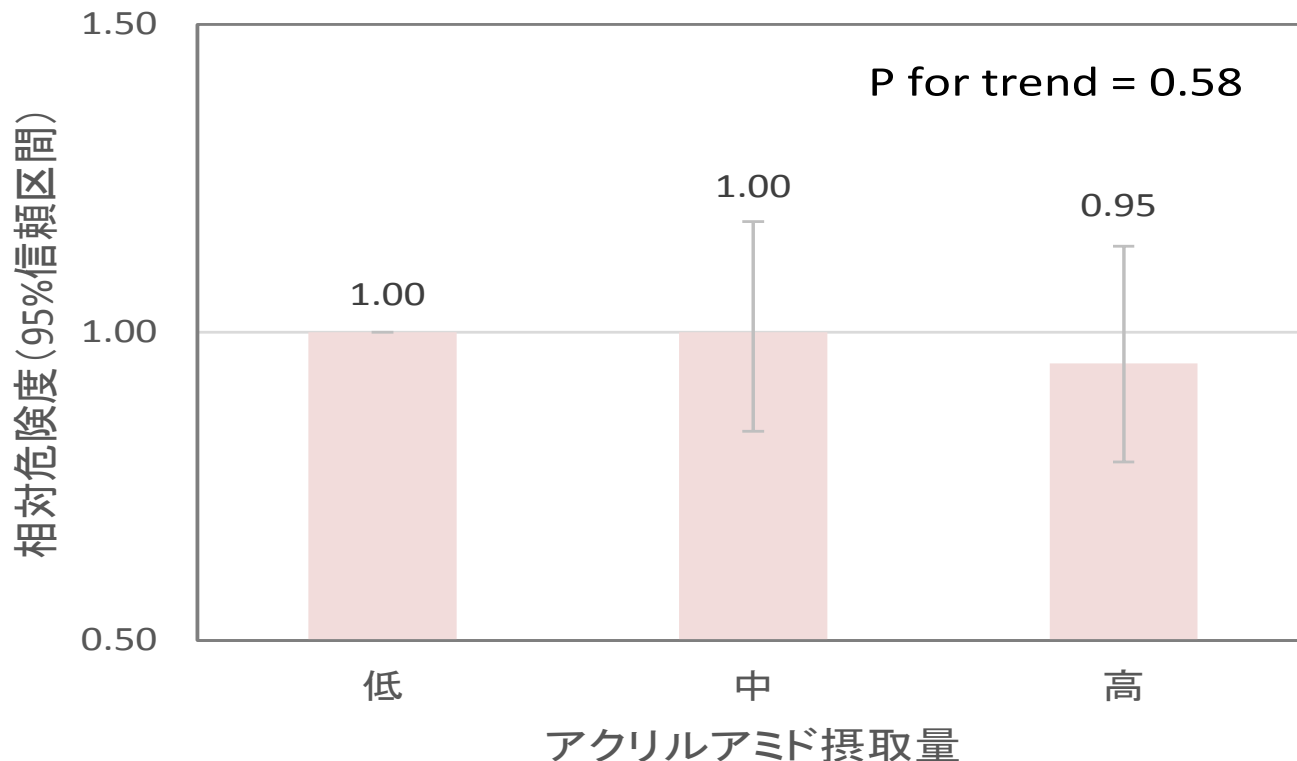
FFQを用いて推定したアクリルアミド摂取量に寄与する食品とその寄与割合

a)集団全体、b)摂取量による三分位群別

- 大規模コホート集団での寄与食品はコーヒーや緑茶など、飲料が約50%を占めた

(2)大規模コホート研究データを用いた食事由来アクリルアミドばく露量とがん罹患リスクとの関連検討

【研究成果】



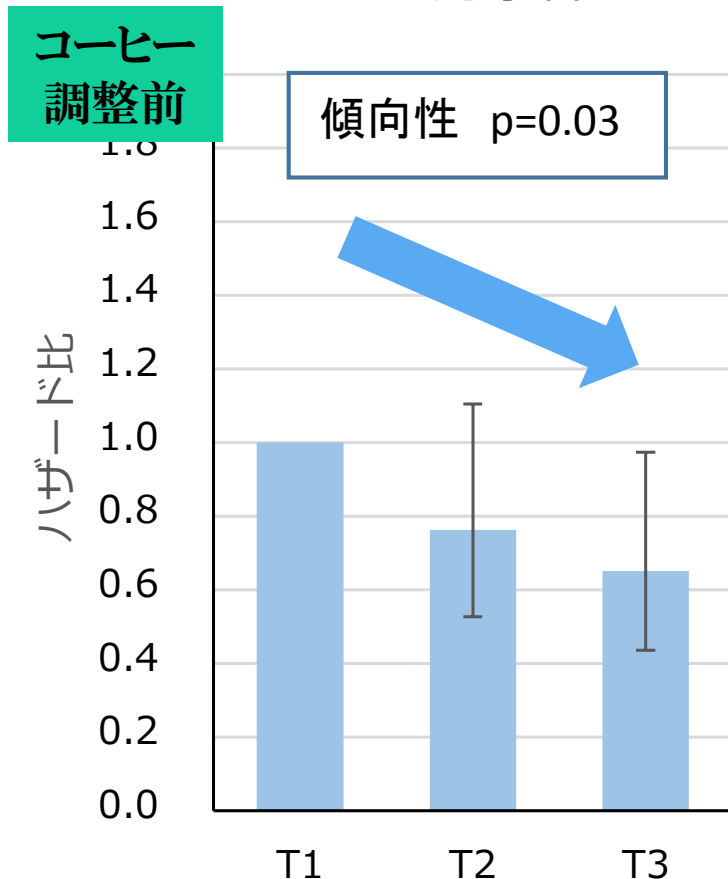
年齢、地域、BMI、乳がん家族歴、初潮年齢、初産年齢、閉経状況・年齢、出産回数、ホルモン療法有無、喫煙、飲酒で調整

アクリルアミド摂取量と乳がんリスクの関連(乳がん 792例)

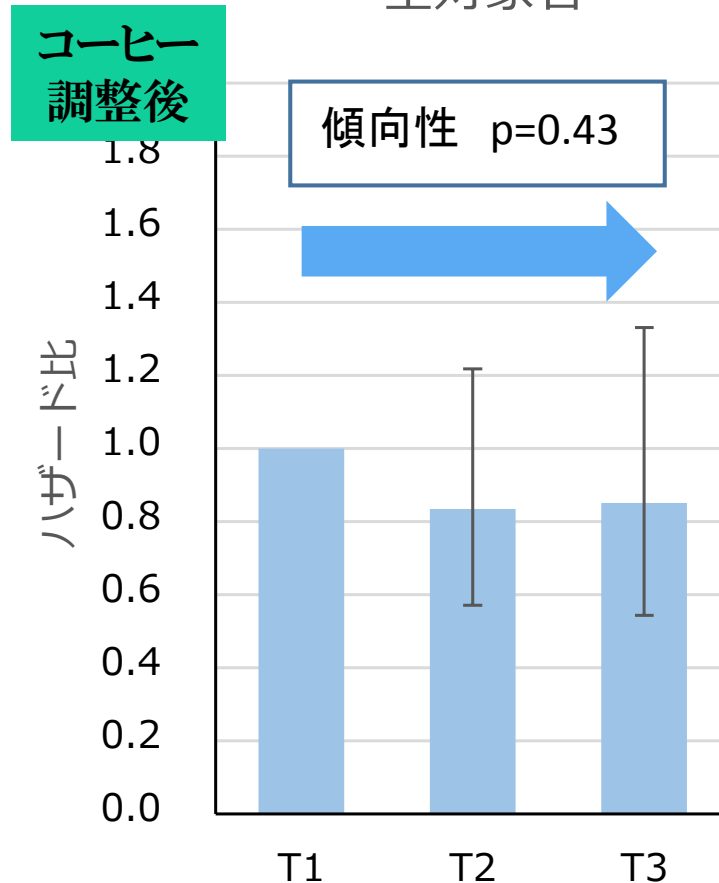
- アクリルアミド摂取量による乳がん罹患のリスク増加は認められなかった。

(2)大規模コホート研究データを用いた食事由来アクリルアミドばく露量とがん罹患リスクとの関連検討

全対象者



全対象者



アクリルアミド摂取量と子宮体がんリスクの関連(子宮体がん 161例)

- アクリルアミド摂取量による子宮体がん罹患のリスクが減少したが、コーヒー摂取量で調整すると有意な負の関連はみられなくなった

研究項目(3)

生体指標を用いたアクリルアミドの
長期ばく露評価と摂取量との関連

方法

(3) 生体指標を用いたアクリルアミドの長期ばく露評価と摂取量との関連（河原班との共同研究）

1) 血液および尿検体の収集

2) FFQの収集

- 対象者：茨城県つくば市、東京都町田市、神奈川県相模原市とこれらの周辺地域に在住の約119名（20～60歳代、男48名、女71名）
- 2015～2016年に陰膳の収集（食品健康影響評価技術研究河原班と共同実施）
- 生体試料の収集
 - 血液：食事調査実施から3日～3ヶ月の期間（若干名最長5ヶ月）に採血（各1ml、赤血球2本、血漿4本、buffy coat1本、血清3本）
 - 尿：採血調査当日の早朝尿を自宅で採取（4ml×1本）
（2015年度対象者は、血液一般検査項目の結果返却時に依頼し、調査日を調整）
- FFQ（多目的コホート138項目）

血液・尿検体およびFFQの性・年齢階級別回収者数

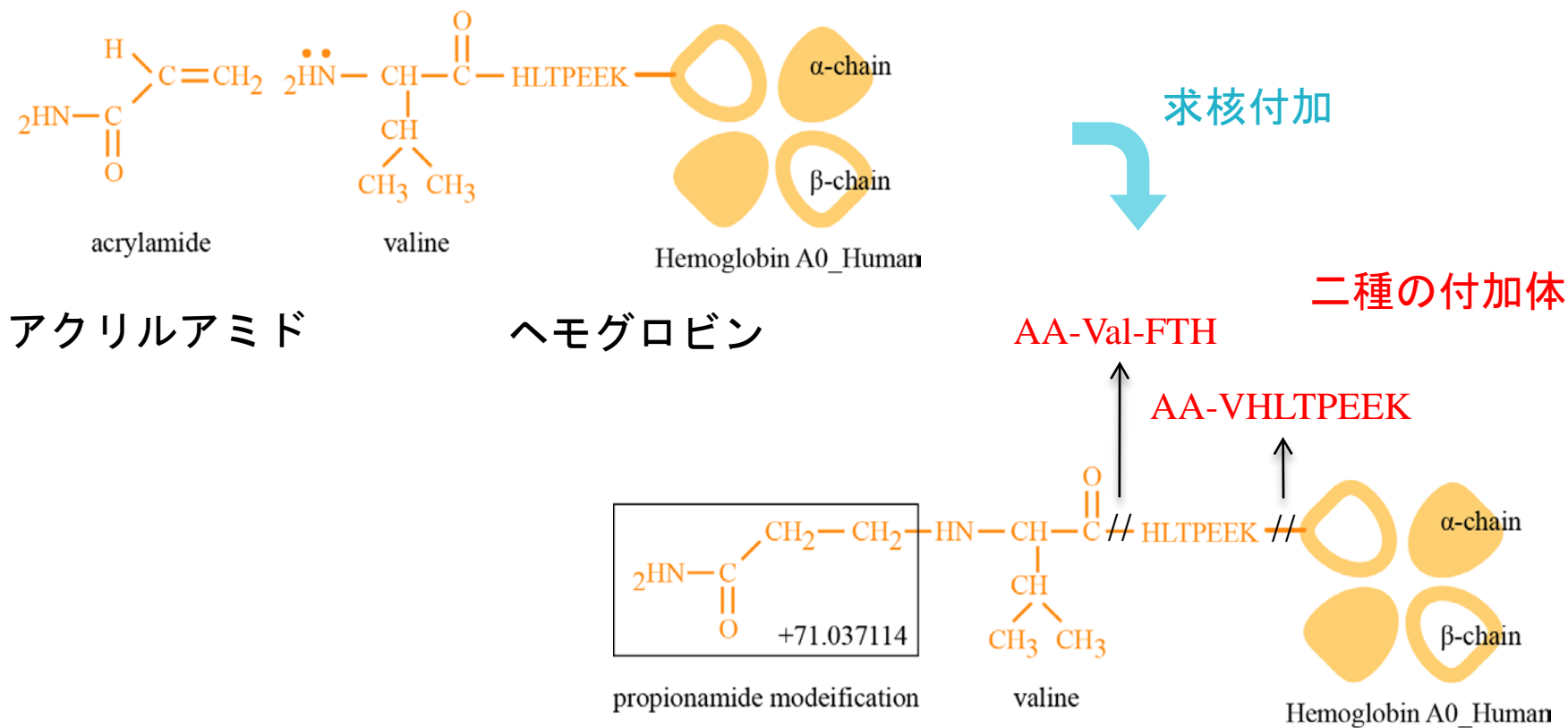
年齢区分	人数 (人)					
	男性			女性		
	血液	尿	FFQ	血液	尿	FFQ
20-29歳	10	9	10	13	10	13
30-39歳	8	7	8	12	12	12
40-49歳	8	6	9	15	11	16
50-59歳	8	8	8	14	13	14
60歳以上	9	9	10	5	5	6
合計	43	39	45	59	51	61

- 血液検体回収率85.7%、尿検体回収率75.6%
- FFQ回答率89.1%

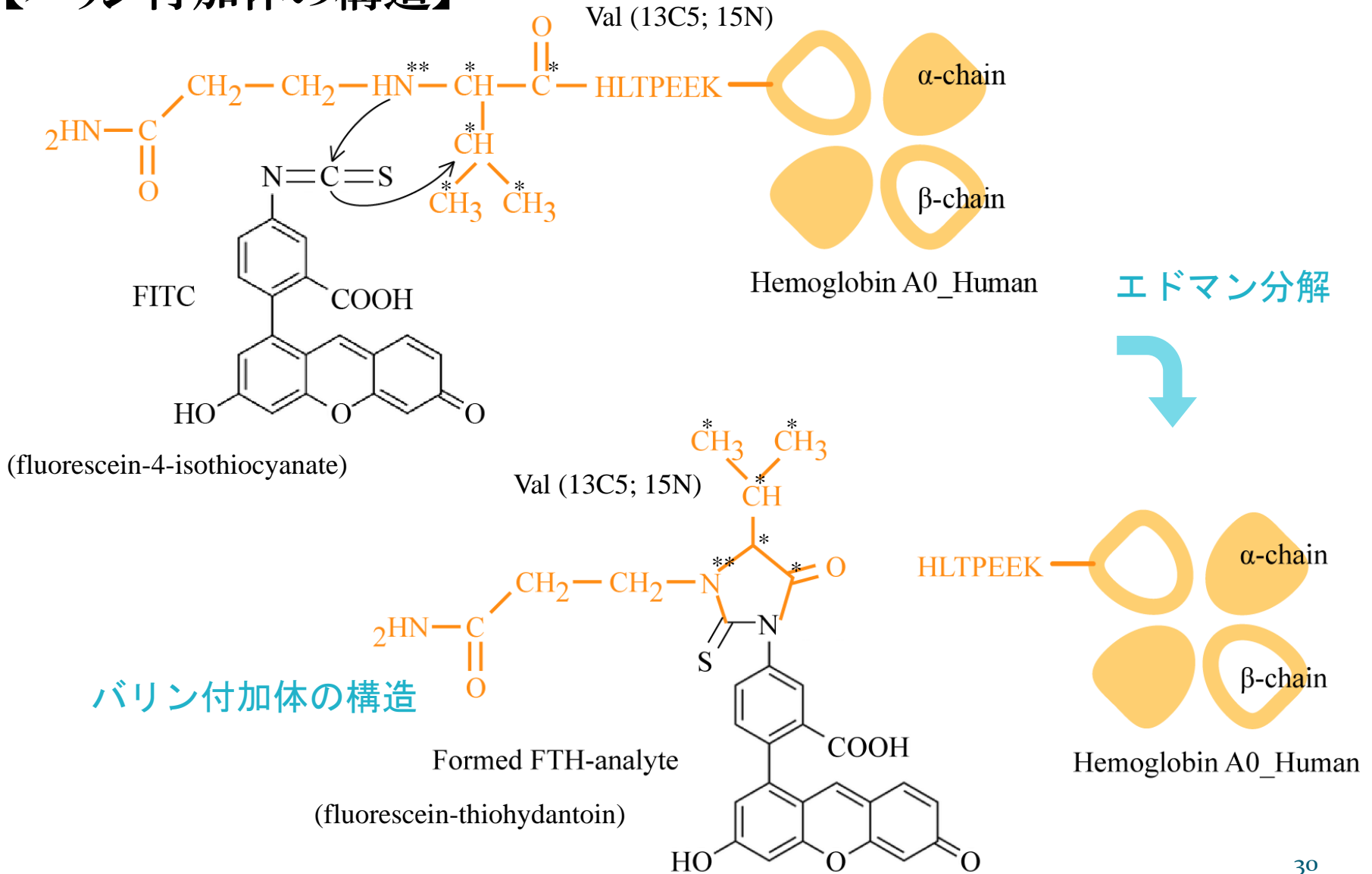
(3) 生体指標を用いたアクリルアミドの長期ばく露評価と 摂取量との関連 (河原班との共同研究)

3) アクリルアミド-ヘモグロビン付加体を用いた長期ばく露の評価

【測定対象物】

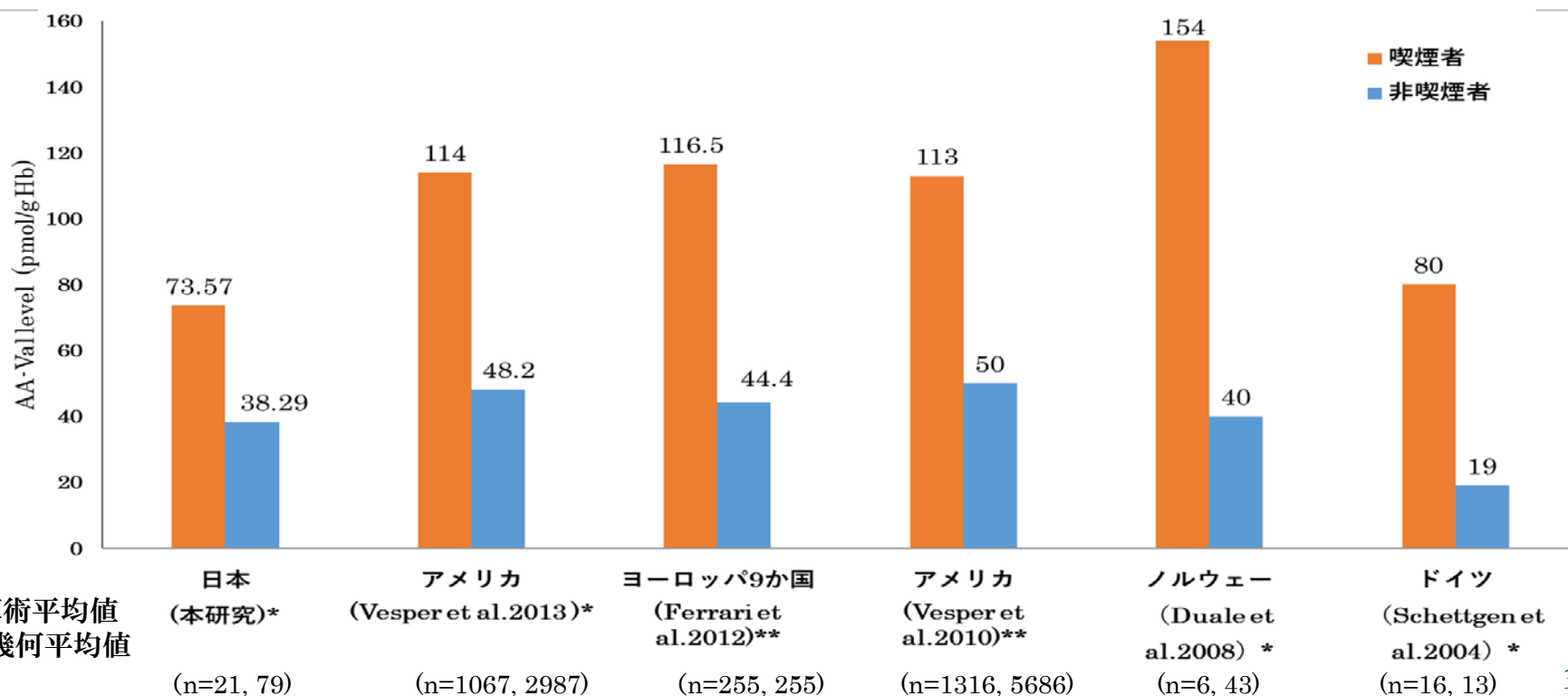


【バリン付加体の構造】



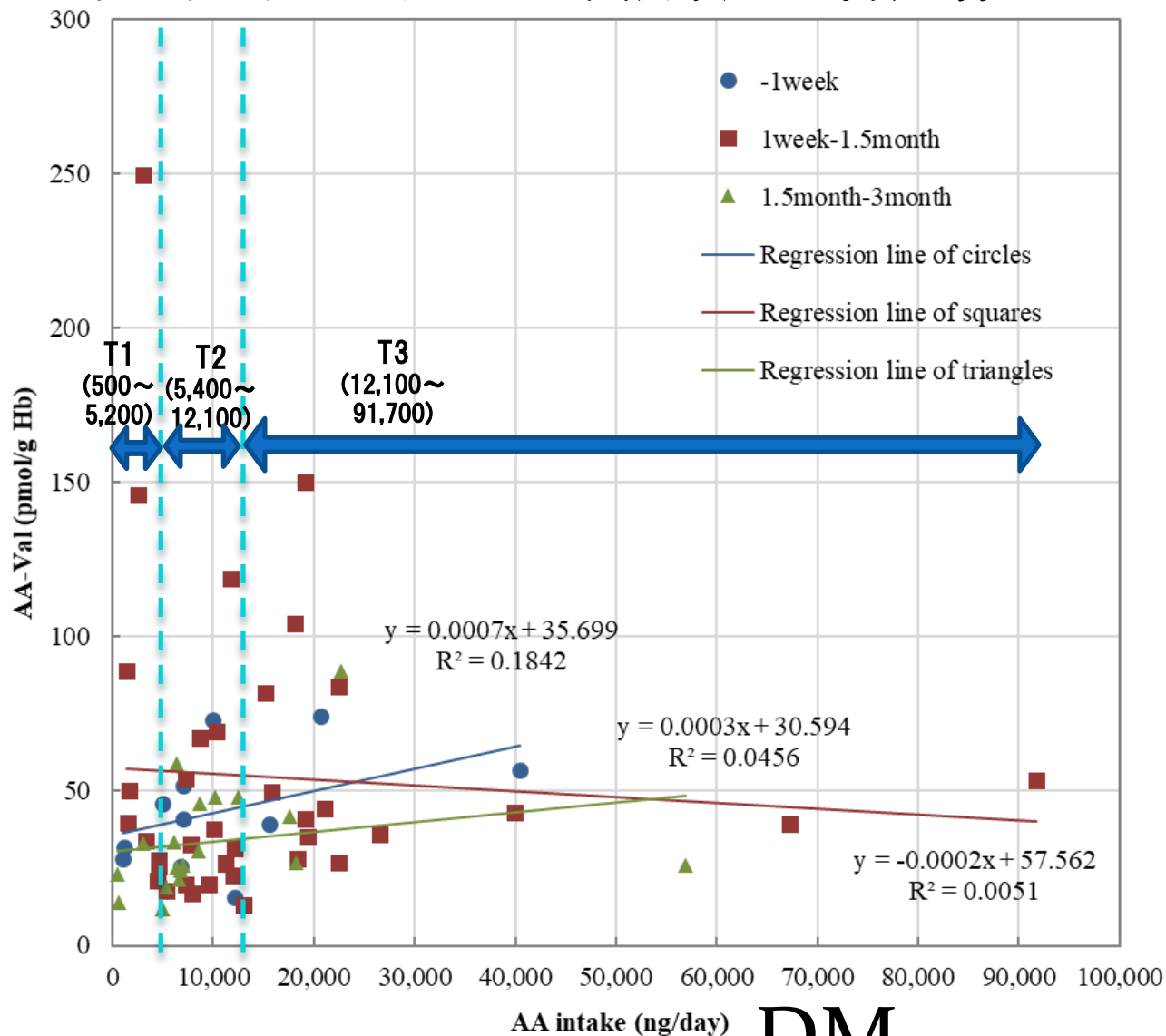
【バリン付加体の定量結果と過去の報告との比較】

	AA-Val level (pmol/g Hb)						
	平均値	標準偏差	最小値	25パーセンタイル	中央値	75パーセンタイル	最大値
男女 (n=102)	45.55	± 34.16	11.91	25.53	35.69	53.05	249.5
男性 (n=43)	44.86	± 31.54	11.91	22.65	33.96	57.27	146.0
女性 (n=59)	46.06	± 36.20	15.35	27.00	39.21	50.89	249.5
非喫煙者 (n=79)	38.29	± 29.14	11.91	24.15	32.57	44.23	249.5
喫煙者 (n=21)	73.57	± 38.16	13.76	51.80	68.29	94.42	150.2



【DMによる一日当たりアクリルアミド摂取量と付加体量との関係】

付加体量



DM

(3) 生体指標を用いたアクリルアミドの長期ばく露評価と 摂取量との関連 (河原班との共同研究)

4) その他のばく露指標の利用に関する探索的検討

【付加体に関する過去の文献調査】

Title	Quantitative Target	Preprocessing and Quantitative Equipment
Alcohol influence on acrylamide to glycidamide metabolism assessed with hemoglobin-adducts and questionnaire data	Hb adducts to N-terminal valine	GC-MS
A new modified Edman procedure for analysis of N-terminal valine adducts in hemoglobin by LC-MS/MS	AA-Val-FTH, d3-AA-Val-FTH, AA-d7-Val-FTH, GA-Val-FTH, d3-GA-Val-FTH, GA-d7-Val-FTH, EO-Val-FTH, EO-d7-Val-FTH	Edman degradation, N-alkyl Edman method LC-MS
Monoclonal antibody development for acrylamide-adducted human hemoglobin; A biomarker of dietary acrylamide exposure	Hb adducts to N-terminal valine	Edman degradation, N-alkyl Edman method LC-MS
Relationships between biomarkers of exposure and toxicokinetics in Fischer 344 rats and B6C3F1 mice administered single doses of acrylamide and glycidamide and multiple doses of acrylamide	C5-AA-Val-PFPTH, C5-GA-Val-PFPTH	Edman degradation, N-alkyl Edman method LC-MS
Hemoglobin adducts from glycidamide: acetonization of hydrophilic groups for reproducible gas chromatography/tandem mass spectrometric analysis	GA-d7Val-PFPTH	Edman degradation, N-alkyl Edman method GC-MS
Laboratory Procedure Manual (CDC)	AA-VHLTPEEK, GA-VHLTPEEK, Isotope labeled AA-Val(13C5 15N)-HLTPEEK, GA-Val(13C5 15N)-HLTPEEK	LC-MS/MS
Analysis of hemoglobin adducts	AA-Val-PTH, GA-Val-PTH	Edman degradation, N-alkyl Edman method LC-MS
Hemoglobin adducts and micronucleus frequencies in mouse and rat after acrylamide or N-methylolacrylamide treatment	N-(2-carbamoyl-ethyl)[2H7]valine-PFPTH for AA-Val adducts, N-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)[2H7]valine-PFPTH for GA-Val adducts	Edman degradation, N-alkyl Edman method GC-MS
Differences in hemoglobin adduct levels	AA-Val-PFPTH	GC-MS
Simultaneous quantification of hemoglobin adducts	Hb adducts to N-terminal valine	GC-MS

(3)生体指標を用いたアクリルアミドの長期ばく露評価と 摂取量との関連（河原班との共同研究）

5) DMによる分析値およびDRと、生体指標との関連検討

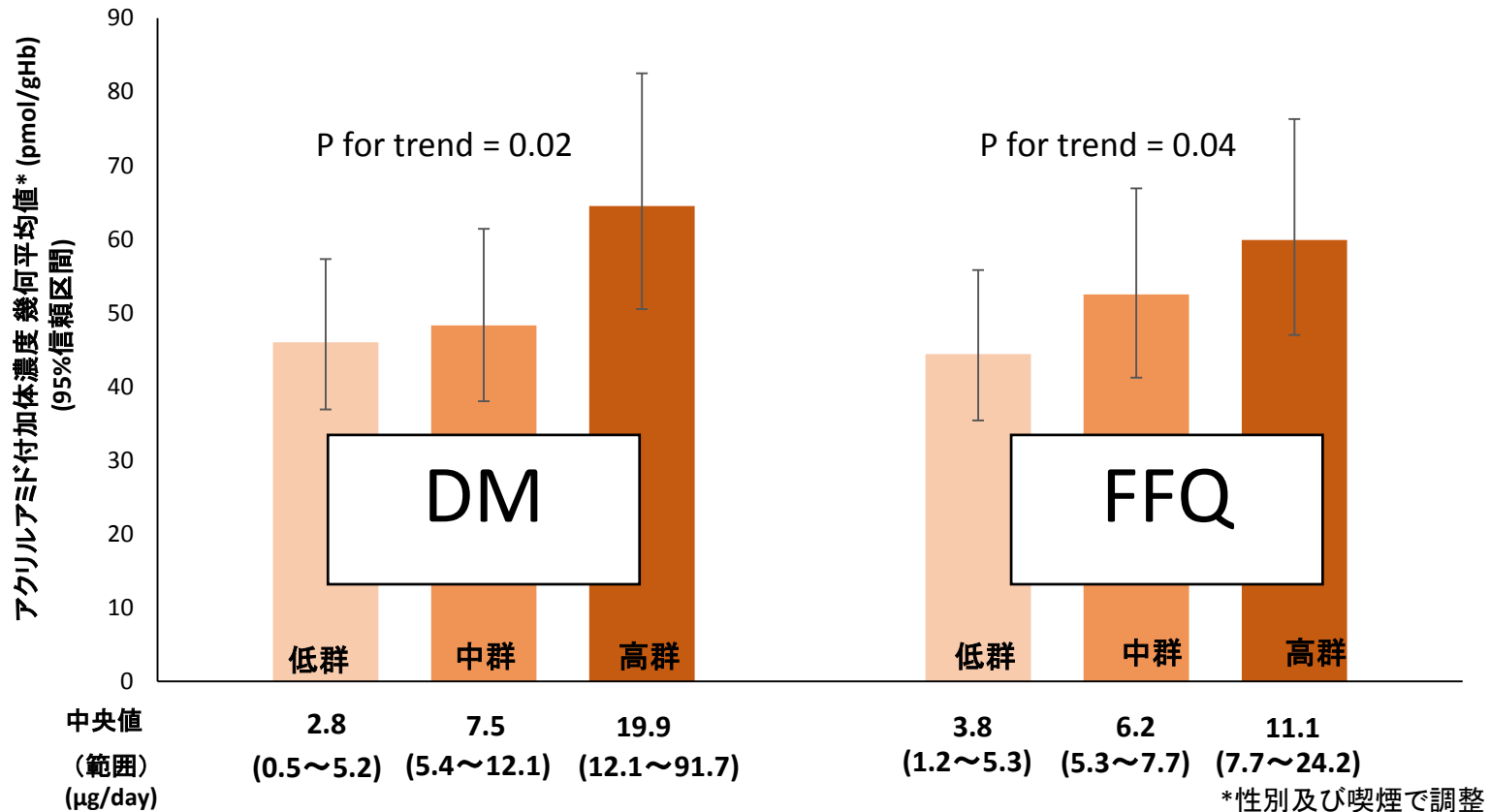
6) FFQを用いた長期間の摂取量推定と、生体指標との関連検討

【研究内容・方法】

- DM分析値とアクリルアミド-ヘモグロビン付加体を比較
- FFQからの摂取量推定：
 - 河原班共同実施の陰膳を伴うDRを用いて、家庭での加熱調理についての情報を調理コードとして調理法ごとに整理
- アクリルアミド-ヘモグロビン付加体測定値と、FFQから推定される長期間の個人別摂取量推定値を比較

【結果】

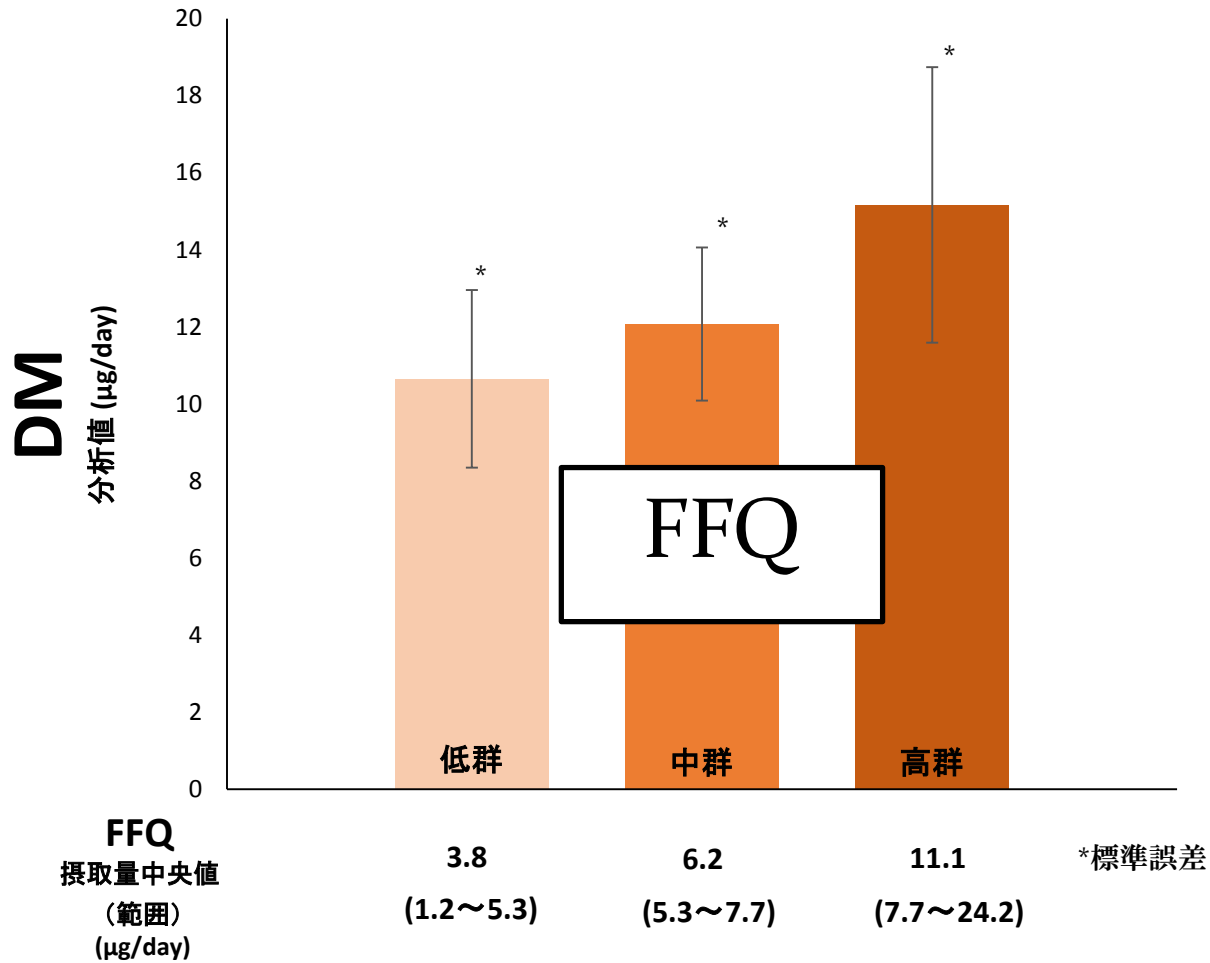
摂取量推定値の三分位群別アクリルアミド-ヘモグロビン付加体濃度(pmol/gHb)



- 推定摂取量 (DMおよびFFQ) とアクリルアミド-ヘモグロビン付加体濃度の間に関連が見られ、アクリルアミド-ヘモグロビン付加体濃度は摂取量を反映する生体指標となる可能性が示唆された。

【結果】

FFQによる摂取量推定値の三分位群別DM分析値平均値($\mu\text{g}/\text{day}$)



研究全体の成果、考察及び結論

1. アクリルアミドの含有量データベースを作成し、2日間DR(短期間の摂取量を把握する方法)を用いて摂取量を推定し、同日のDMサンプルの分析値と比較。
→含有量データベースとFFQを用いて、個人別摂取量の定量的把握、集団内の順位付けが可能であった。
2. FFQ(含有量データベースを用いて長期間の摂取量を把握する方法)を用いて推定されたアクリルアミド摂取量を、28日間DRと比較。
→FFQによる個人摂取量推定には、一定レベルの妥当性、再現性があった。

研究全体の成果、考察及び結論

3. 大規模なコホート集団においてFFQによってアクリルアミド摂取量を推定し、約15年追跡後の部位別がん罹患との関連を解析したところ、乳がんなどでリスク増加は認められなかった。また、子宮がんなどでは、寄与食品であるコーヒーの予防的作用によって、見かけ上リスクが下がるという結果になった。

→日本人においても、主要部位別に見た場合のがん罹患リスクの増加は認められなかった。

4. アクリルアミドの生体指標として、赤血球中のアクリルアミド-ヘモグロビン付加体を疫学研究において国際標準的に用いられている方法で測定し、他の食事調査法との比較を行った。

→ヘモグロビン付加体濃度は、非喫煙者より喫煙者で高かった。欧米の測定値とほぼ同様であった。

研究全体の成果、考察及び結論

● 研究の限界

- 食事調査 (DMやDR、FFQ) では生体内におけるアクリルアミドの代謝の個人差については考慮されない
- 異なる構成のFFQによって推定された摂取量との絶対値の直接比較が難しい (例: 国外のFFQ)
- **FFQの推定誤差によってがんのリスクが希薄化、過小評価されている可能性**

● 今後の課題

- 本研究で収集された血液・尿サンプルなど生体試料を活用したアクリルアミドのばく露評価
- ばく露の個人間、個人内変動 (食事調査や生体指標) を検討
- コホート内症例対照研究など、食事調査の測定誤差の影響を受けないばく露評価法による検討

食品用ペットボトルから溶出する化学物質の 摂取量の推定に関する研究

(課題番号: 1603)



主任研究者: 尾崎麻子 ((地独)大阪健康安全基盤研究所)

分担研究者: 静間基博 ((地独)大阪産業技術研究所)

山本敦史 (公立大学法人公立鳥取環境大学)

阿部 裕 (国立医薬品食品衛生研究所)

六鹿元雄 (国立医薬品食品衛生研究所)

本研究の対象はペットボトル

P E T PETボトル（ポリエチレンテレフタレート）

透明性に優れ、強靱でガスバリア性に優れていることから、食品用容器包装においてボトルとして汎用されている。特に清涼飲料、調味料及び酒類に多く使用されている。



清涼飲料用ペットボトルから
どんな物質が溶出する？

プラスチックの1種

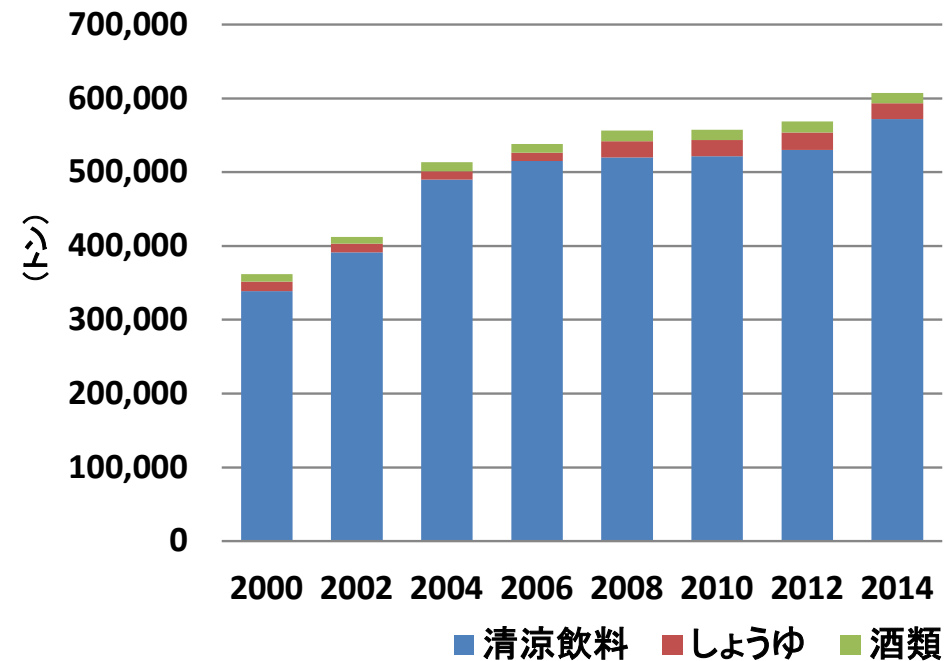
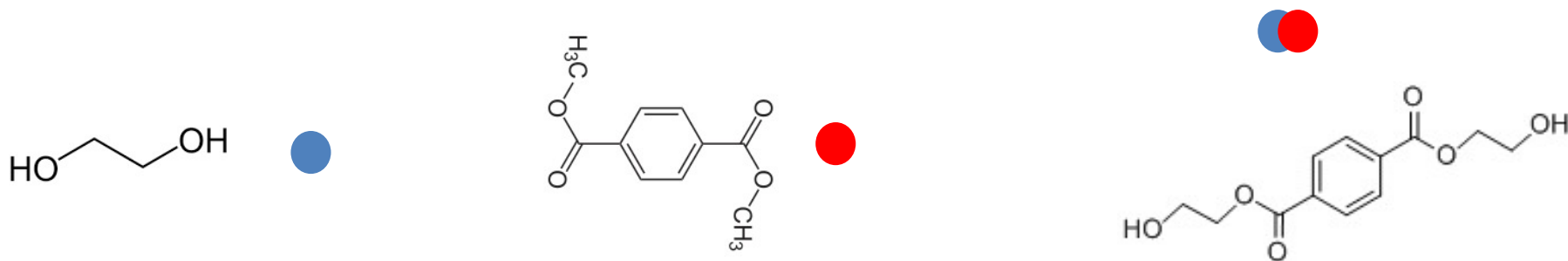


図 ボトル用PET樹脂需要実績推移
(PETボトル協議会調べ)

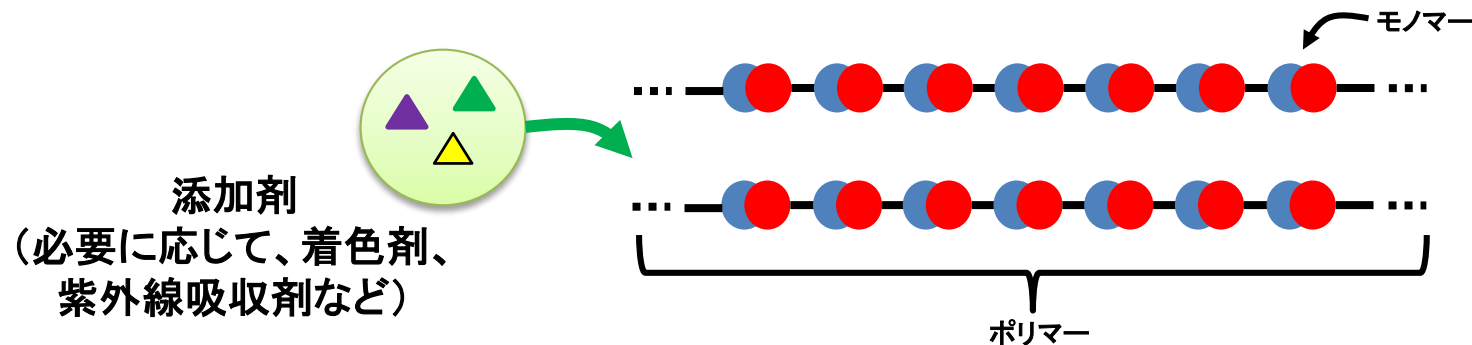
ペットボトルの製造方法



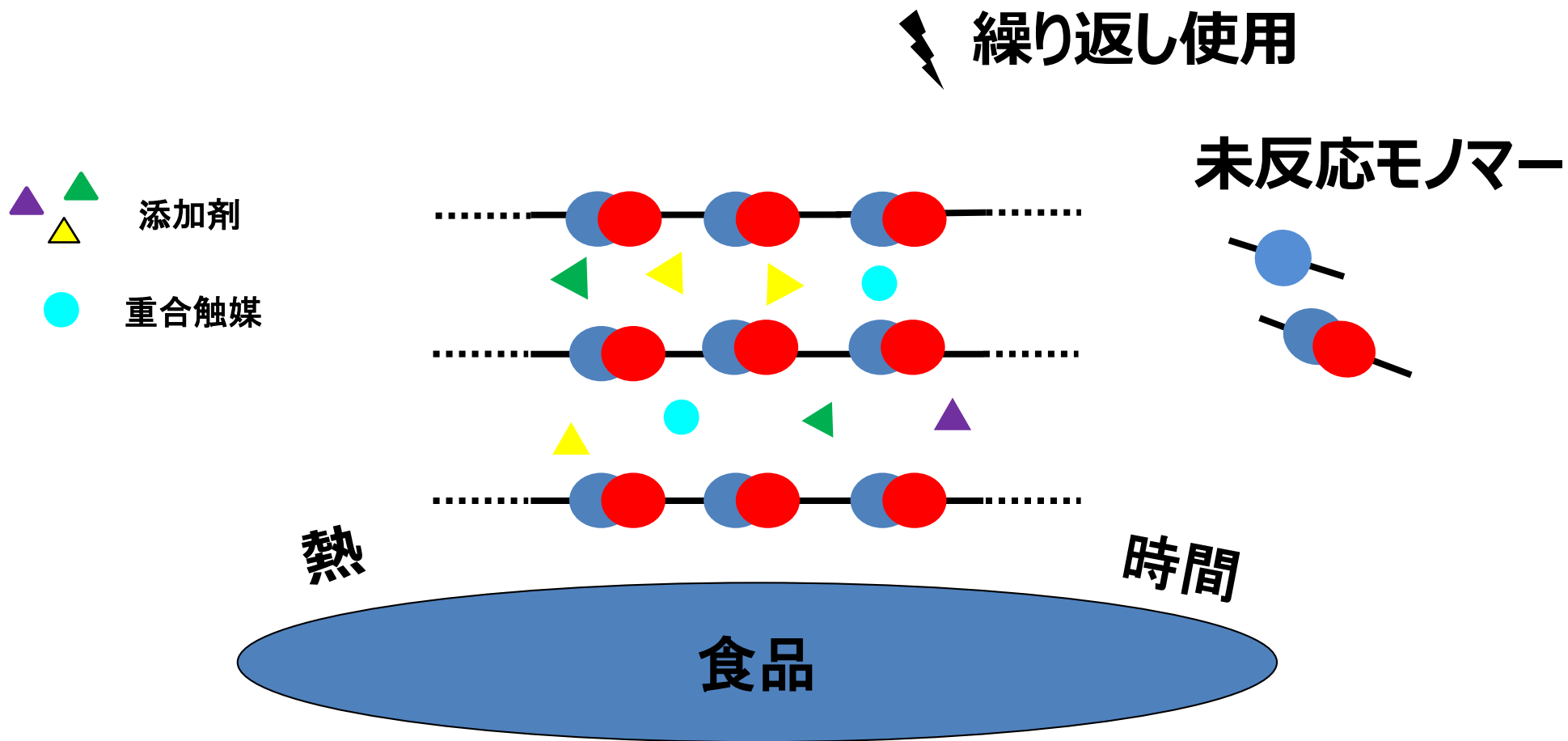
エチレングリコール + ジメチルテレフタル酸
テレフタル酸・イソフタル酸 → ビスヒドロキシエチルテレフタル酸



PET樹脂



プラスチックから食品へのモノマーや添加剤の移行



プラスチックには様々な化学物質が含まれます

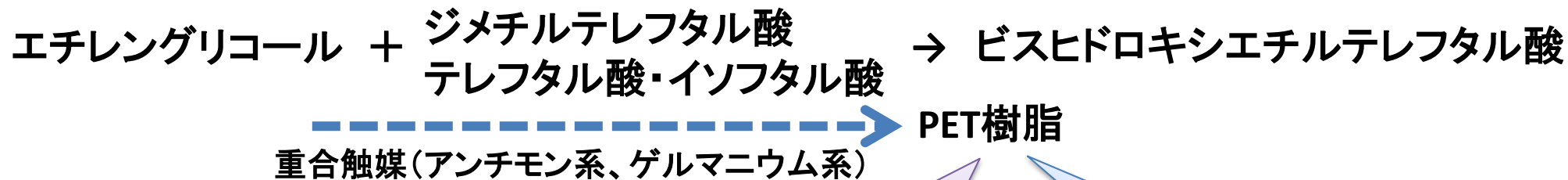
ペットボトルには、原料モノマー、触媒、添加剤、原料中の不純物、製造工程における副生成物や分解物など、様々な化学物質が含有される可能性がある

これらが食品に移行して人の健康を損なうことがないように、ペットボトルのリスク評価が必要



ペットボトルから溶出する可能性のある化合物

ペットボトルの製造方法



①

アンチモン、
ゲルマニウム、
その他金属類

②③

モノマー類、原料中の不純物、
副生成物の環状オリゴマー
や未知物質

④

熱分解物である
アセトアルデヒドや
ホルムアルデヒド

Sb,Geは食品衛生法で基準値があるため試験数は多いが、検出データが少ない(定量下限値が比較的高い)。その他の金属類については報告がない。

モノマーや環状オリゴマーについて海外では溶出試験が実施されているが、国内では報告がない。その他の未知物質に関しても報告がない。

国内を流通する国産のミネラルウォーターから溶出が報告されており、水道水中濃度よりも高い。

国内における溶出試験データが限られており、
リスク評価に必要な摂取量推定のためのデータが不足している

本研究では溶出試験を行い、不足データを補完

本研究では、国内で使用されているペットボトルを対象として、
溶出する可能性のある化学物質を探索・同定



食品擬似溶媒を用いた溶出試験を実施

ペットボトルから
どんな化学物質が
どれくらい溶出してる？

清涼飲料水用のペットボトル(ホット用・コールド用)を対象
短期間の溶出試験を実施(室温・40°Cで10日間)
長期間の溶出試験を実施(室温で3~12ヶ月間)



溶出量より推定ばく露量を算出

ペットボトル由来の
化学物質を
どれくらい摂取してる？

分析機器

- ☆誘導結合プラズマ質量分析計(ICP-MS)
- ☆ヘッドスペース-ガスクロマトグラフ質量分析計(HS-GC-MS)
- ☆ページ&トラップ-ガスクロマトグラフ質量分析計(PT-GC-MS)
- ☆高速液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS)

効率的・高感度・高精度！

ペットボトルから溶出する化学物質の網羅的測定

- ① ペットボトルから溶出する金属類及び揮発性物質の定性・定量
ならびに推定摂取量の算出
- ② 高分解能質量分析を用いるペットボトル溶出成分の構造解析
- ③ ペットボトル溶出成分のLC-MSを用いた定量
- ④ ペットボトルから溶出するアセトアルデヒド及び
ホルムアルデヒドの定量

ペットボトルの情報・試料収集を実施

国内で多く使用されている飲料ボトルを対象とし、可能な限り実際に即した溶出試験を行う → 国内の関連業界団体や飲料メーカーより情報収集

	耐熱用ボトル (ホット飲料含む)	耐熱圧用ボトル	炭酸用ボトル	無菌充填用ボトル
用途	お茶・果汁など	果汁入り炭酸	炭酸	水、お茶、 スポーツドリンクなど
重合触媒	Ge、Ti、(Al)		Sb	Sb、Ti
殺菌方法	90℃前後 充填殺菌	室温充填後 温水シャワー殺菌 (約70℃・1h)	炭酸の静菌作用	殺菌容器に殺菌飲料を充填 し、殺菌キャップで閉める
材料	国産、韓国、台湾、(中国)		海外(台湾、韓国、インドネシア、中国、タイ)	
生産量	20万トン(ホット飲料3万トン)		10万トン	30万トン
製造者	 ボトルメーカーが製造		飲料メーカーが製造 	

高い技術が必要、硬めのボトル

無菌設備が必要、薄くて軽いエコボトル

市場で多く使用されている様々な種類のボトルを対象に

国内大手のペットボトルメーカー及び飲料メーカーの未使用のペットボトル16試料を使用

ボトル No.	サンプルボトル情報			原料PET樹脂情報		
	ボトル分類	商品用途	バリアー付加の有無	国産／輸入	触媒	共重合の有無
A	耐熱ボトル	お茶系	なし	国産材	Ge系	なし
B	耐熱ボトル	お茶系	なし	輸入材	Ti系	なし
C	耐熱ボトル	お茶系	あり（ナイロン積層）	国産材	Ge系	なし
D	耐熱ボトル	お茶系	あり（内面カーボン系コーティング）	国産材	Ge系	なし
E	耐熱ボトル	お茶系	あり（内面カーボン系コーティング）	輸入材	Ti系	なし
F	耐圧ボトル	炭酸飲料	なし	輸入材	Sb系	あり
G	耐圧ボトル	炭酸飲料	なし	輸入材（台湾）	Sb系	あり
H	耐熱圧ボトル	果汁炭酸飲料	なし	国産材	Ge系	なし
I	耐熱圧ボトル	果汁炭酸飲料	なし	輸入材	Ti系	なし
J	無菌炭酸充填用ボトル	果汁炭酸飲料	なし	輸入材（台湾）	Sb系	あり
K	無菌充填用ボトル	お茶系	なし	輸入材（中国）	Sb系	あり
L	無菌充填用ボトル	お茶系	なし	輸入材	Sb系	あり
M	無菌充填用ボトル	お茶系	なし	輸入材	Sb系	あり
N	無菌充填用ボトル	お茶系	なし	輸入材（台湾）	Sb系	あり
O	無菌充填用ボトル	ミネラルウォーター	なし	輸入材（韓国）	Sb系	あり
P	無菌充填用ボトル	ミネラルウォーター	なし	輸入材	Sb系	あり

金属類と揮発性物質の定性・定量

①

ペットボトルから溶出する金属類及び揮発性物質の定性・定量
ならびに推定摂取量の算出

金属類

重合触媒として用いられるアンチモン、ゲルマニウムやチタンに加え、有害元素やその他添加剤として用いられる可能性のある20元素以上について一斉分析法を確立し、ペットボトル溶出液の定量を行う。

☆分析機器は、高感度で多元素分析が可能なICP-MSを用いる。

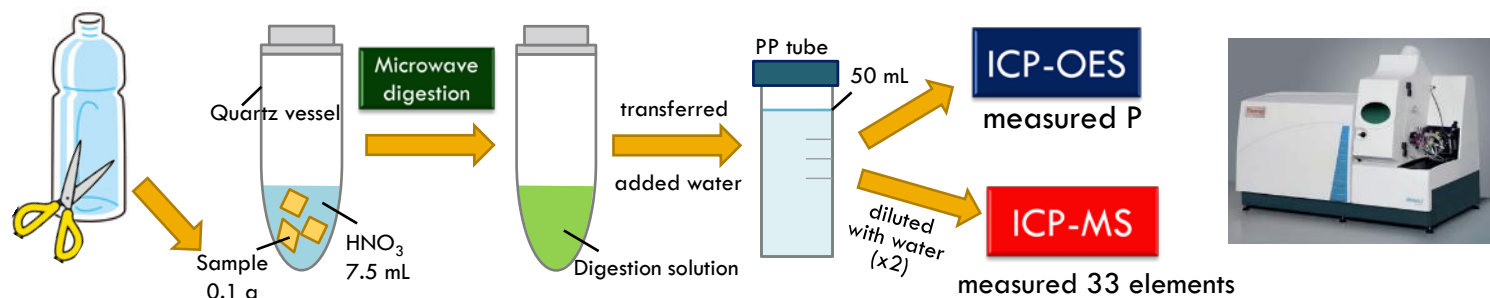
揮発性物質

ペットボトルに含有される揮発性物質についてほとんど報告がないことから、揮発性物質の探索を行い、溶出液の定量を行う。

☆分析機器は揮発性物質の定性及び定量が可能なHS-GC-MSを用いる。

ペットボトルにはどんな金属が含まれている？

ペットボトルに含有される金属類を明らかにするために、一斉分析法の確立を試みた。試料をマイクロウェーブ分解装置で前処理後、ICP-MSおよびICP-OESで測定する一斉分析法を検討した。



添加回収試験結果

元素	定量下限 (mg/kg)	添加濃度 (mg/kg)	平均回収率 (%)	RSD (%)
Cd, U	0.05	10	95-101	0.2-1.4
Sb	0.1	10	98-108	0.6-0.9
Li, V, Mn, Co, Ge, As, Se, Rb, Sr, Zr, Mo, Ag, Cs, Pb	0.5	10	94-106	0.1-2.5
Ti, Cr, Ni, Sn, W	1	10	96-114	0.1-3.1
Cu, Ga, Ba	2	10	93-108	0.3-4.0
B, Mg	5	10	102-105	0.4-4.0
Al, Fe, Zn	10	100	95-102	0.3-3.0
Na, K, Ca	50	100	102-110	0.4-4.7
P	10	100	97-103	0.2-2.9

ペットボトルの触媒等の添加物として使用される可能性のある元素 (Sb, Ge, Ti, Al, Ca, Mg, Li, Zn, Co, Mn) に加え、有害元素 (Cd, Pb, As等) を含む**34元素**について効率的かつ高感度・高精度な一斉分析法を確立した。

触媒として使用されているGe, Ti, Sbに加え、Co, Pを検出

No.	試料情報			含有量 (mg/kg)*				
	分類	バリアー付加の有無	触媒	Ge	Ti	Sb	Co	P
A	耐熱ボトル	なし	Ge	48 ± 0.9	ND	ND	ND	31 ± 0.3
C★	耐熱ボトル	あり		42 ± 0.3	ND	ND	53 ± 1.5	48 ± 0.6
D	耐熱ボトル	あり		48 ± 0.2	ND	ND	ND	31 ± 0.1
H★	耐熱圧ボトル	なし		50 ± 0.4	ND	ND	ND	29 ± 0.9
B★	耐熱ボトル	なし	Ti	ND	26 ± 0.2	0.6 ± 0.0	ND	10 ± 0.2
E★	耐熱ボトル	あり		ND	8 ± 0.1	0.8 ± 0.0	ND	ND
I	耐熱圧ボトル	なし		ND	7 ± 0.1	0.3 ± 0.0	ND	ND
F	耐圧ボトル	なし	Sb	ND	ND	257 ± 1.7	ND	ND
G★	耐圧ボトル	なし		ND	ND	279 ± 2.8	ND	ND
J	無菌炭酸充填用 ボトル	なし		ND	ND	179 ± 2.2	12 ± 0.1	18 ± 0.4
K	無菌充填用ボトル	なし		ND	ND	257 ± 1.6	ND	ND
L★	無菌充填用ボトル	なし		ND	ND	151 ± 0.5	ND	11 ± 0.4
M	無菌充填用ボトル	なし		ND	ND	177 ± 2.3	ND	12 ± 0.4
N★	無菌充填用ボトル	なし		ND	ND	172 ± 2.3	16 ± 0.1	18 ± 0.0
O	無菌充填用ボトル	なし		ND	ND	261 ± 2.7	14 ± 0.1	17 ± 0.3
P★	無菌充填用ボトル	なし	ND	ND	249 ± 6.2	ND	ND	

Ge: 約50 mg/kg
Ti: 10 – 30 mg/kg
Sb: 約200 mg/kg

Co: 10 – 50 mg/kg
P: 10 – 50 mg/kg

★
溶出試験は
検出された元素や
その組成が
異なる8試料を
選定して実施

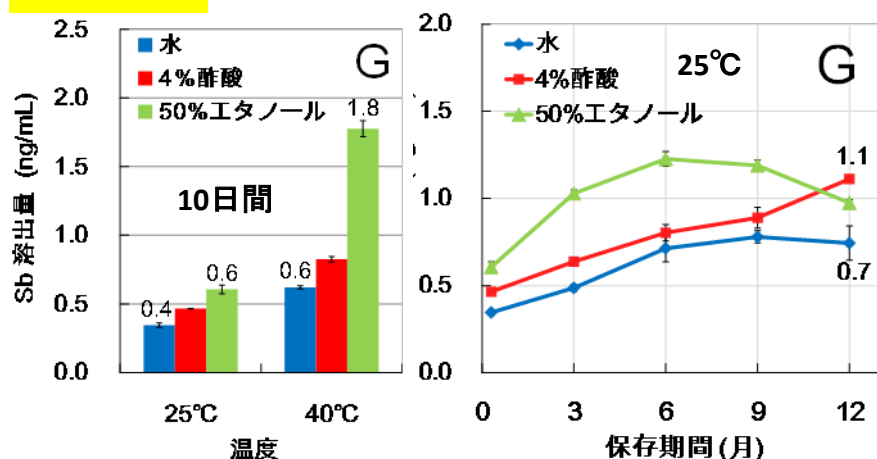
* 平均値 ± SD (n=3), ND: Not detected (Ge: ND < 0.5 mg/kg, Ti: ND < 1 mg/kg, Sb: ND < 0.1 mg/kg, Co: ND < 0.5 mg/kg, P: ND < 10 mg/kg)

Ge, Ti, Sb, Co, Pはどれくらい溶出する？

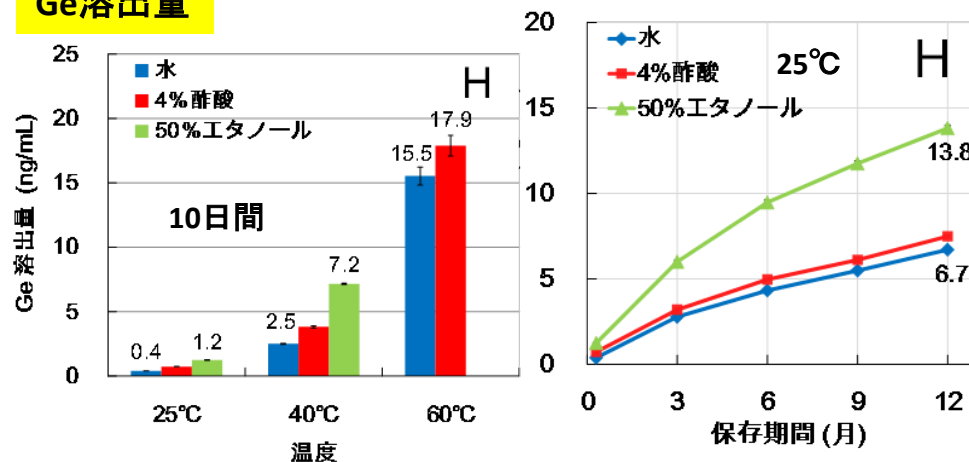
食品擬似溶媒を用いた溶出試験を実施 → Sb, Geが溶出 (Ti, Co, Pは検出されず)



Sb溶出量



Ge溶出量

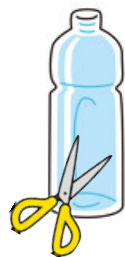


Sb, Geについて高感度分析により溶出量・溶出傾向を明らかにすることができた
(いずれも食品衛生法による規格基準値(4%酢酸, 60°C30分, Sb: 50 ng/mL, Ge: 100 ng/mL)以下であった)

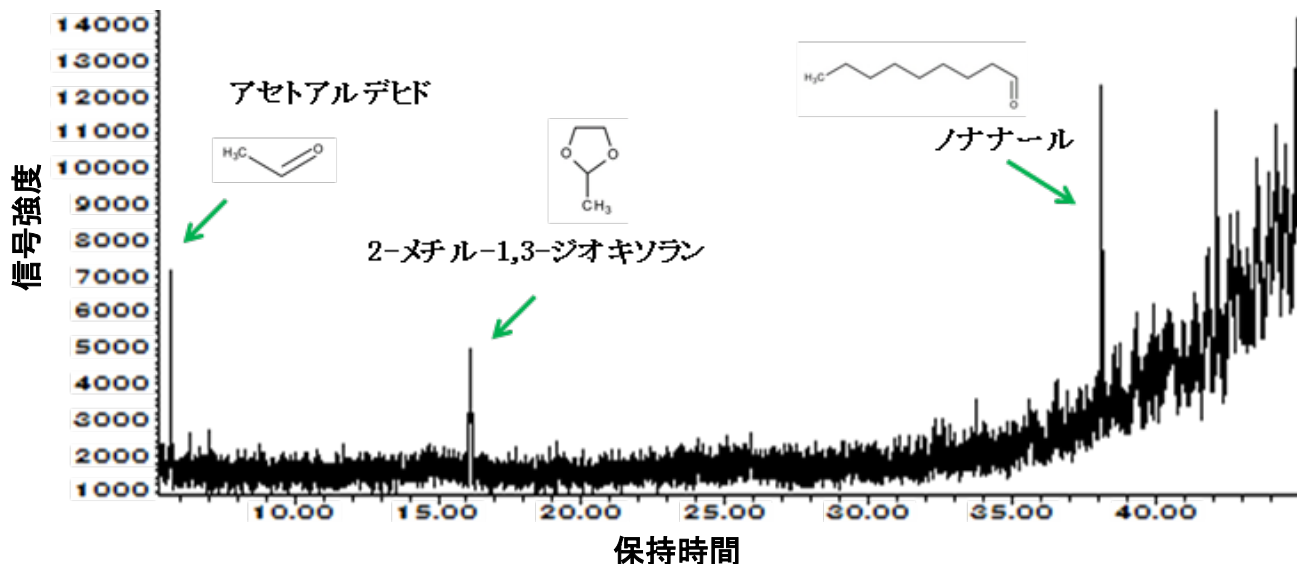
国内・海外製の市販ミネラルウォーター21検体についても実態調査を実施 → Sb溶出量は水の長期間溶出試験結果と同等
また、保存により溶出量は増加

ペットボトルにはどんな揮発性物質が含まれている？

ペットボトルに含有される揮発性物質をHS-GC-MSを用いて探索した。



サンプル1.5gを
ヘッドスペース用
バイアルに採取



ボトルMのトータルイオンクロマトグラム

(アセトアルデヒド)
2-メチル-1,3-ジオキソラン
ノナナル

多くのボトル
から検出

デカナル
シクロペンタノン
ベンズアルデヒド

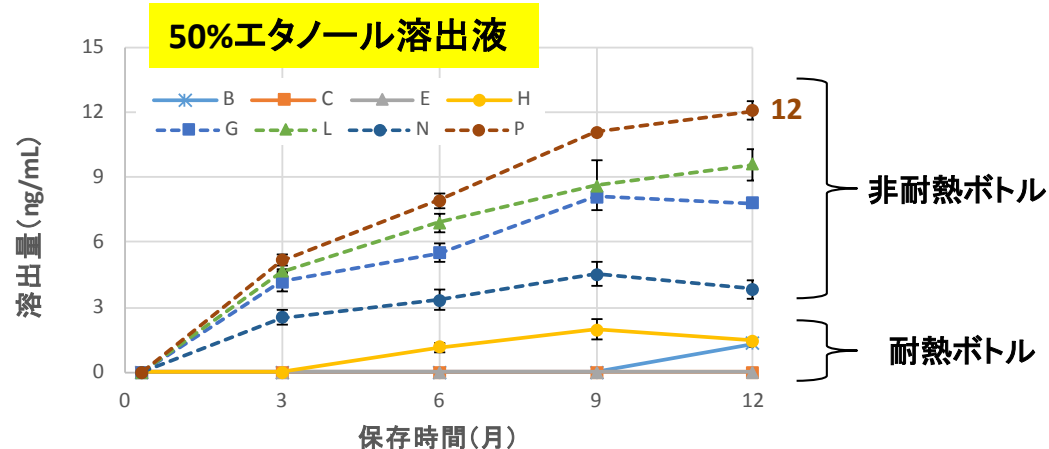
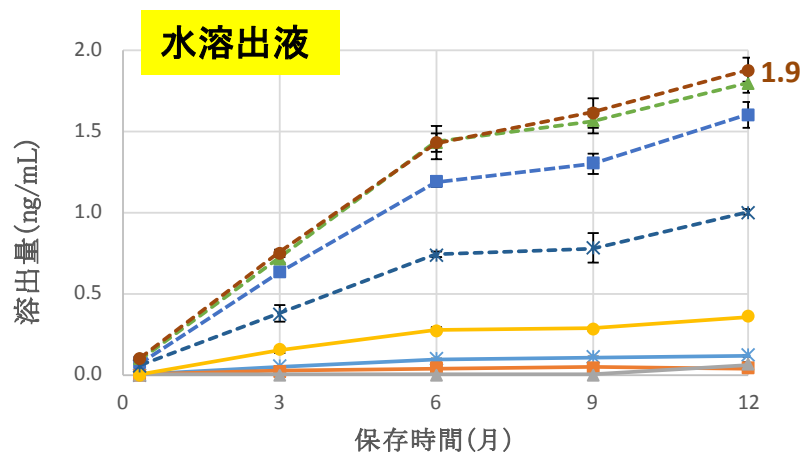
→ 6物質が同定された

同定した揮発性物質はどれくらい溶出する？

同定した5物質の溶出量定量のため、PT-GC-MSを用いた高感度・高精度な一斉分析法を確立し、溶出量を測定した。



短期間・長期間溶出試験を実施 → 2-メチル-1,3-ジオキソランが溶出



2-メチル-1,3-ジオキソランについて高感度分析により溶出量・溶出傾向を明らかにすることができた
(非耐熱ボトルで高い傾向がみられた)

国内・海外製の市販ミネラルウォーター21検体についても実態調査を実施 → 溶出量は水の長期間溶出試験結果と同等
また、保存により溶出量は増加

ペットボトルの未知溶出成分の定性

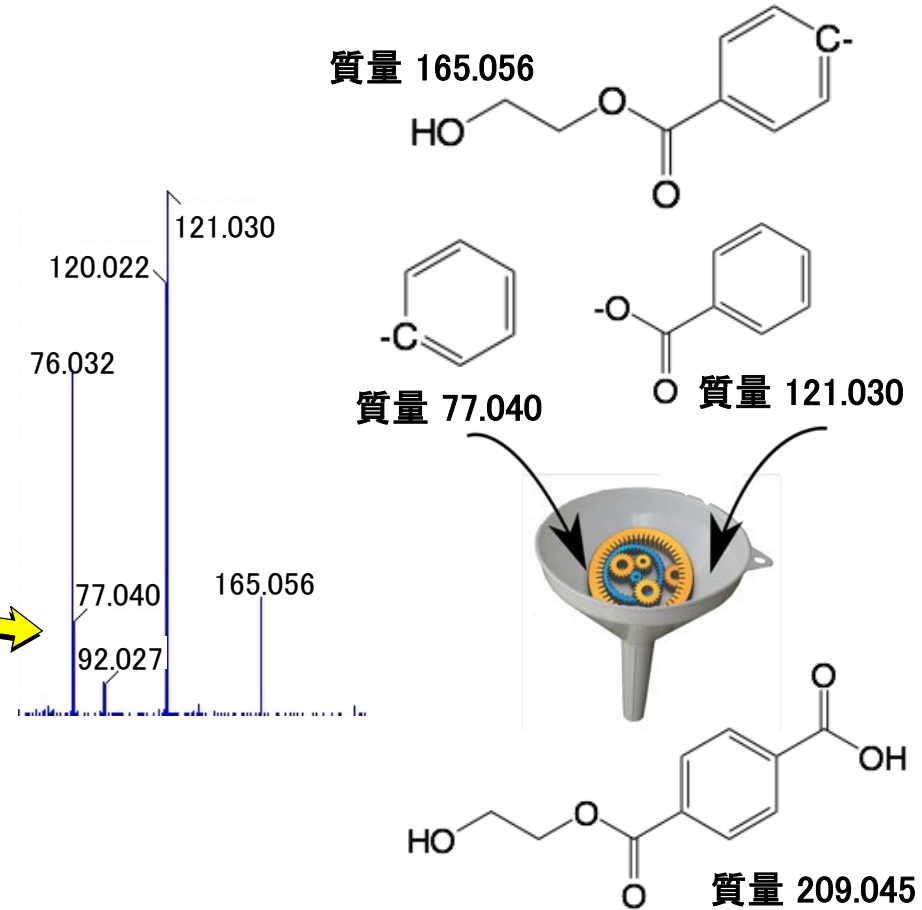
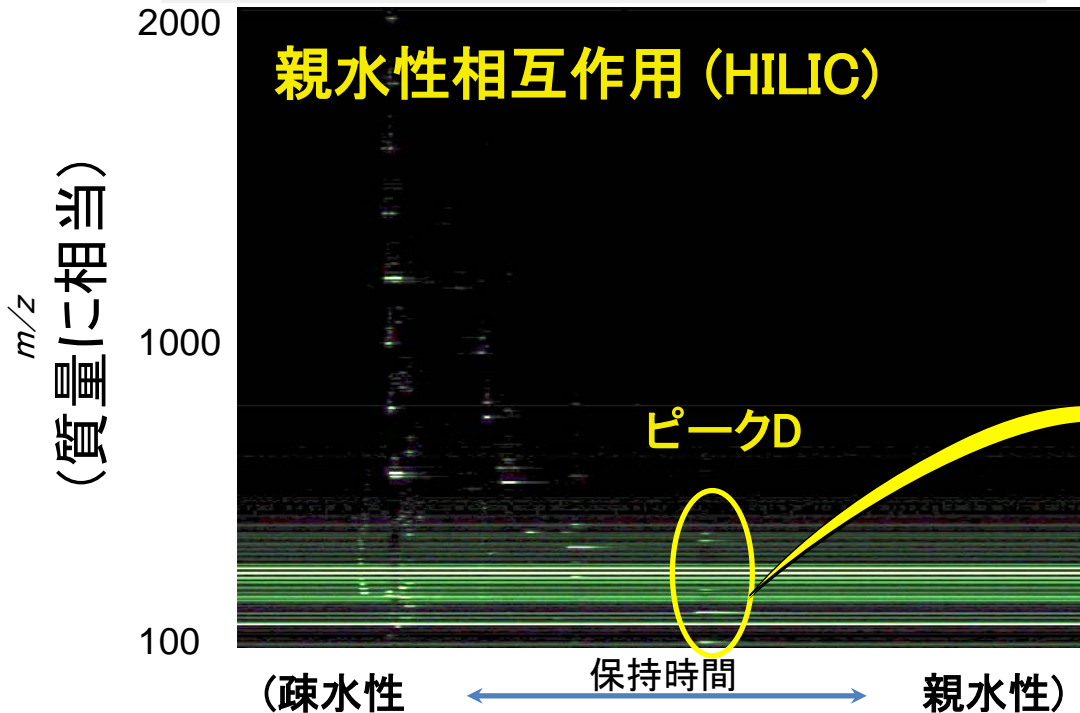
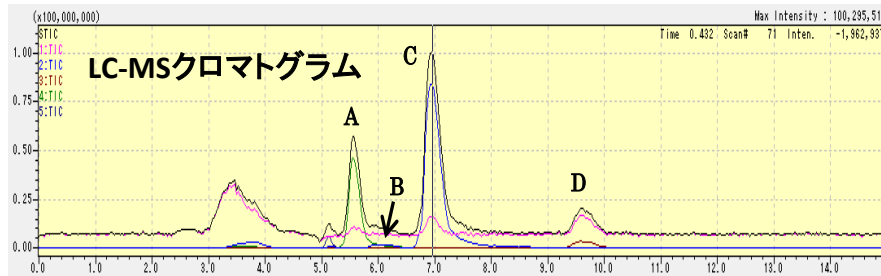
② 高分解能質量分析を用いるペットボトル溶出成分の構造解析

ペットボトル材質中には、添加剤の他に重合反応における低分子のオリゴマーが含有されているが、どのような成分が溶出液に含まれているかの詳細な調査は限られており、溶出成分の解明はペットボトルの安全性評価上の大きな課題となっている。これら未知成分の構造解析を行う。

☆分析機器は、多段階フラグメンテーションによってフラグメントイオンの精密質量を得ることができ、定性能力の高いイオントラップ飛行時間(IT-TOF)型の質量分析計を用いる。

ペットボトルにはどんな未知物質が含まれてる？

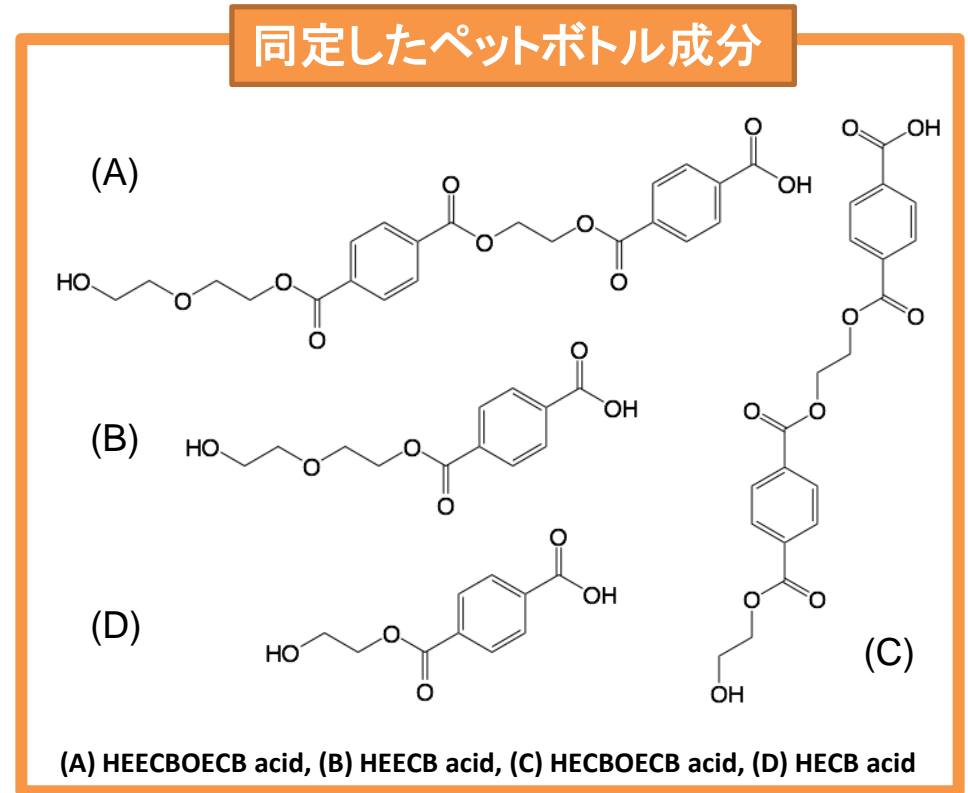
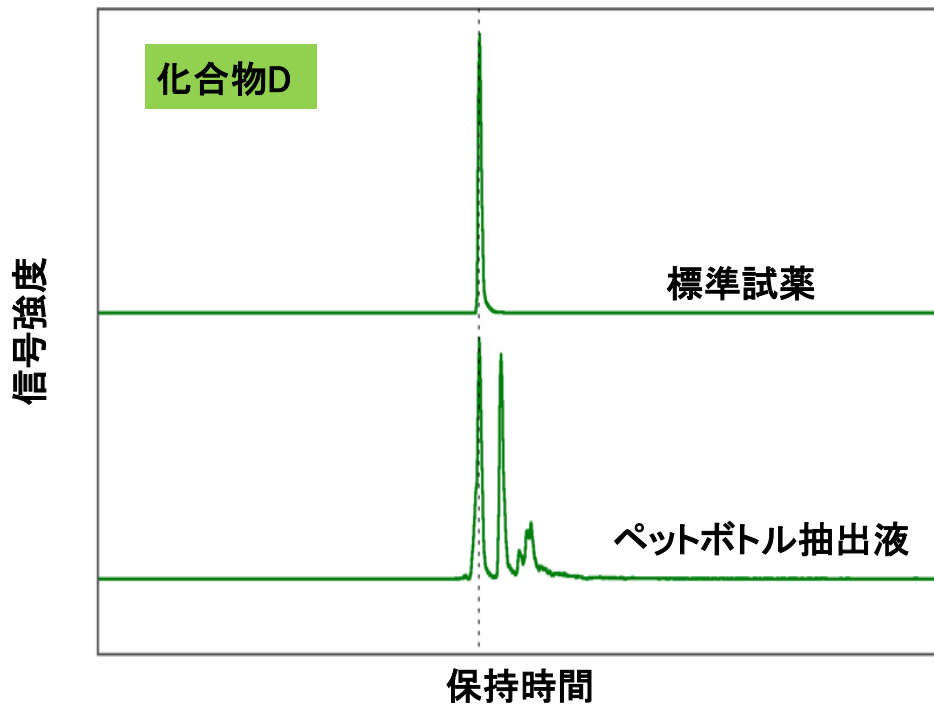
ペットボトルから溶出する可能性がある比較的極性が高い化学物質を同定するためのLC-MS分析条件を確立した。



断片の精密質量(構造情報)から元の分子構造を推定した

ペットボトルの未知成分4物質を同定

分子構造を推定した**4物質**について標準試薬を受託合成して比較した
→ 推定化学物質と一致



これまでに報告のない新たなペットボトル溶出物質の同定に成功した

ペットボトルの既知および未知溶出成分の定量

③ ペットボトル溶出成分のLC-MSを用いた定量

ペットボトルから溶出する可能性のある物質(既知のモノマーやオリゴマー、②によって同定された4物質)について定量分析法を確立し、溶出量を明らかにする。

☆分析機器は、定量能力の高いタンデム四重極型のLC-MSを用いる。

モノマー類と同定した未知物質の分析法を開発

★ 親水性



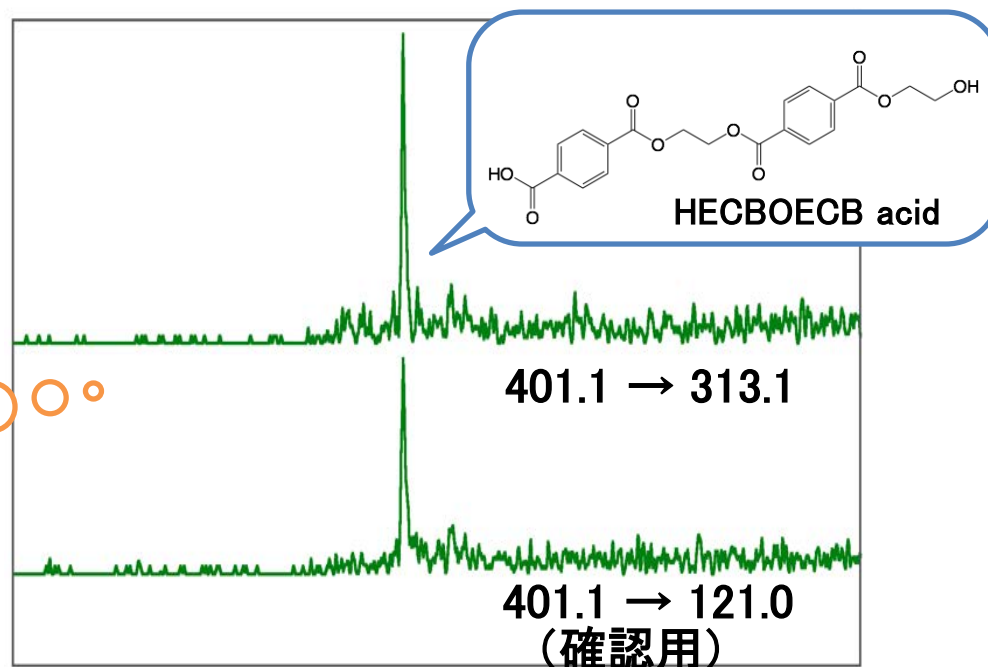
親油性



モノマー類	ジエチレングリコール、ジメチルテレフタル酸、ブタンジオール、ビスヒドロキシエチルテレフタル酸
②で同定した4物質	HECB acid, HECBOECB acid, HEECB acid, HEECBOECB acid
環状オリゴマー類	環状 2 ~ 6 量体

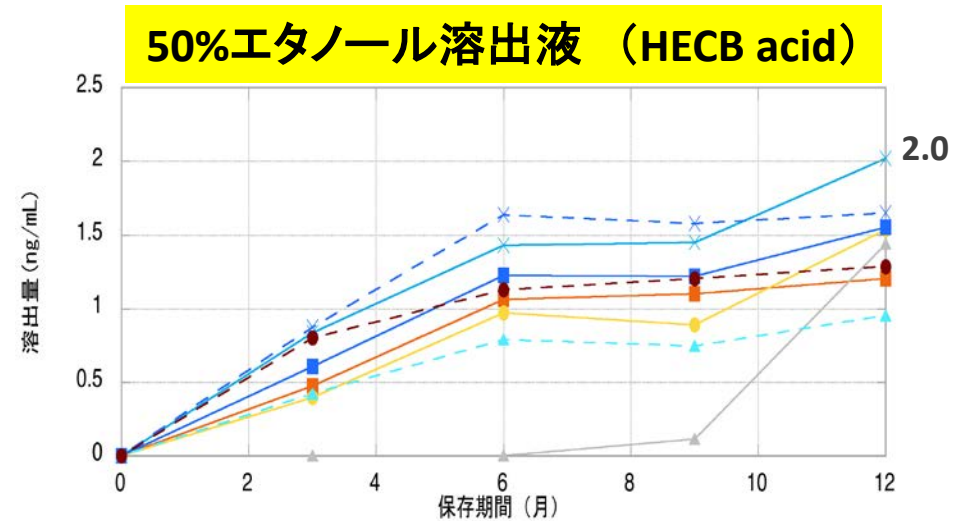
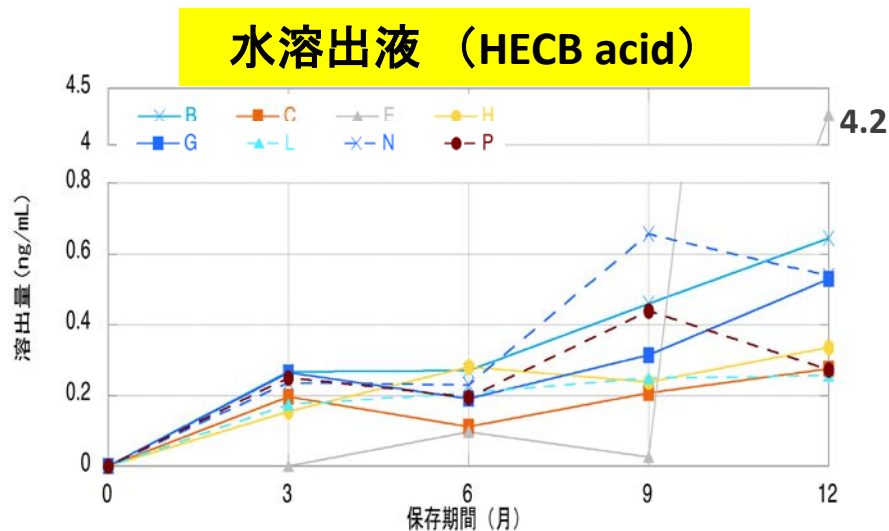
親水性の8物質について、高感度・高精度な一斉分析法を確立した。

0.02 ng/mL から
定量可能



モノマー類と同定した未知物質はどれくらい溶出する？

溶出試験を実施 → 8物質のうち、HECB acid, HECBOECB acid, ビスヒドロキシエチルテレフタル酸が溶出



HECB acid、HECBOECB acidの溶出について初めての報告であり、高感度分析により溶出量・溶出傾向を明らかにすることができた

環状オリゴマー類の分析法を開発

親水性



モノマー類

ジエチレングリコール、ジメチルテレフタル酸、ブタンジオール、ビスヒドロキシエチルテレフタル酸

②で同定した4物質

HECB acid, HECBOECB acid, HEECB acid, HEECBOECB acid

★親油性



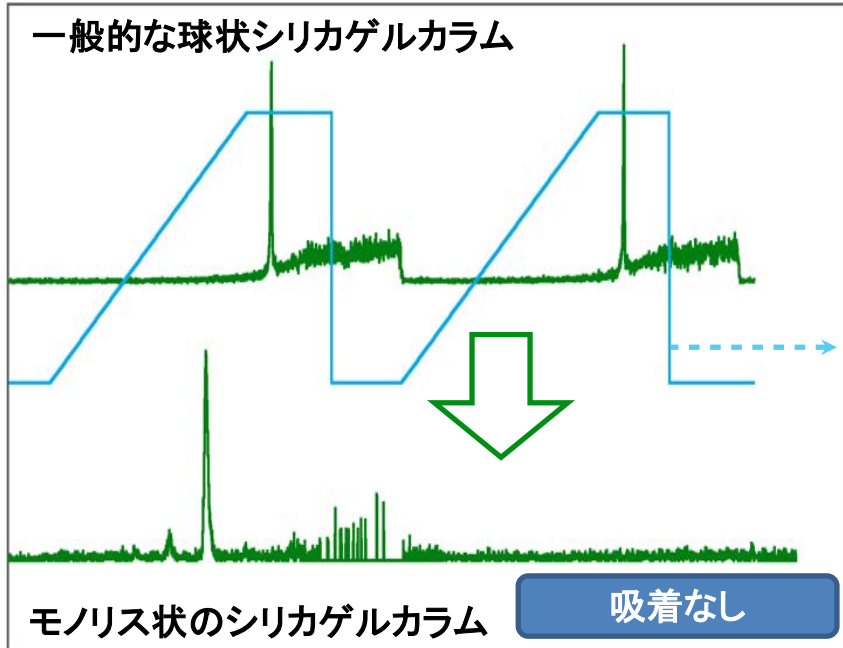
環状オリゴマー類

環状 2 ~ 6 量体

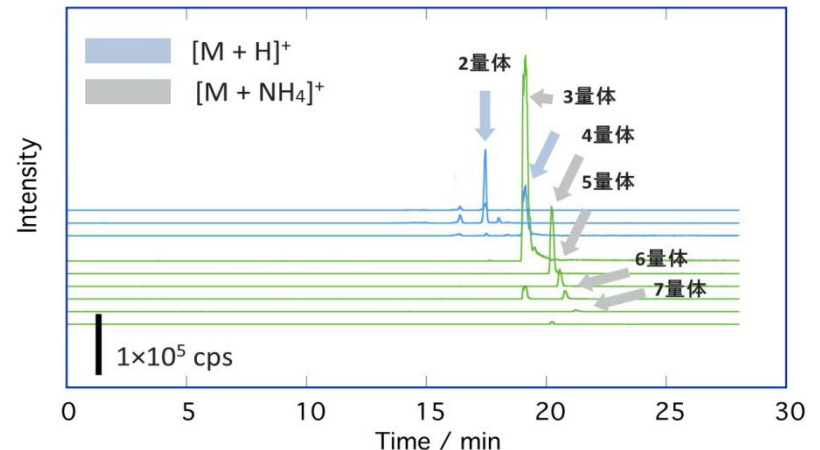
分析カラムに吸着!

一般的な球状シリカゲルカラム

信号強度



HPLC グラジエント組成変化

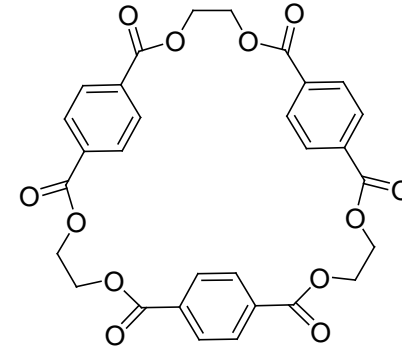
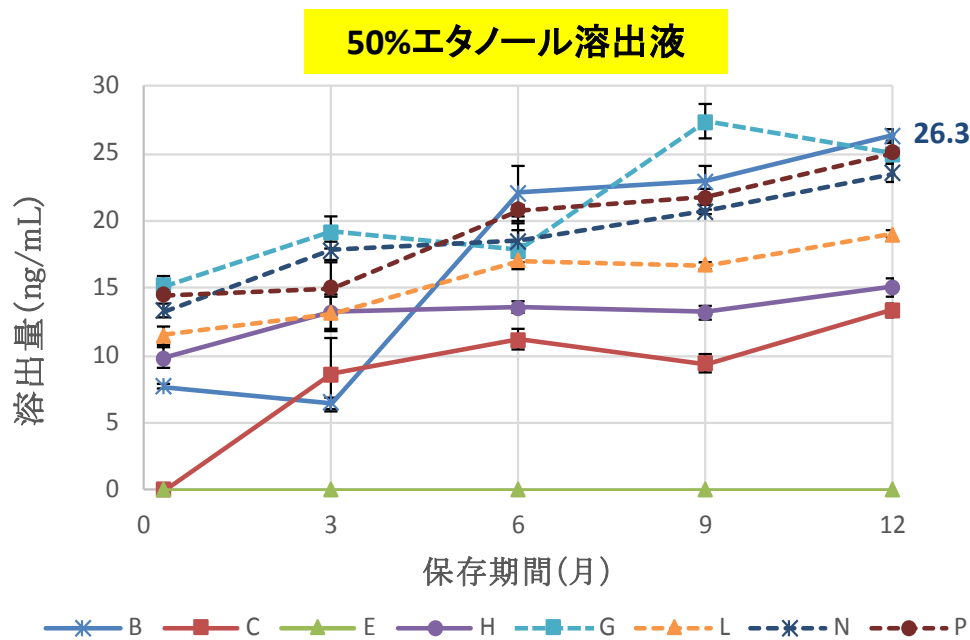


環状オリゴマーのLC-MSクロマトグラム

環状オリゴマーについて、吸着のない高感度・高精度な一斉分析法を確立した

環状オリゴマー類はどれくらい溶出する？

溶出試験を実施 → 2～6量体のうち3量体が溶出



幅広い物性を有するペットボトル
溶出物質の分析法を報告した事例は
これまでにない

極性の高いHECB acidや
材質含有量が高い環状3量体の
溶出量が確認された

アセトアルデヒド及びホルムアルデヒドの定量

④

ペットボトルから溶出するアセトアルデヒド及びホルムアルデヒドの定量

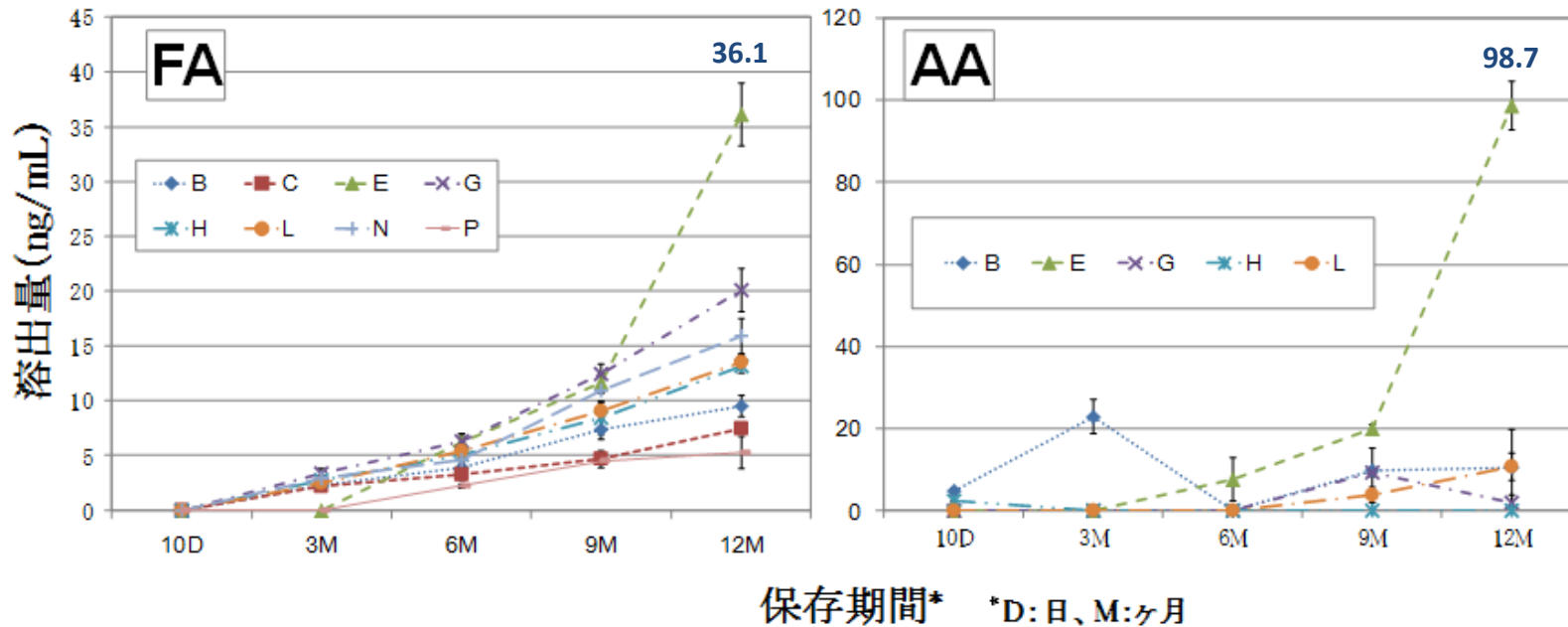
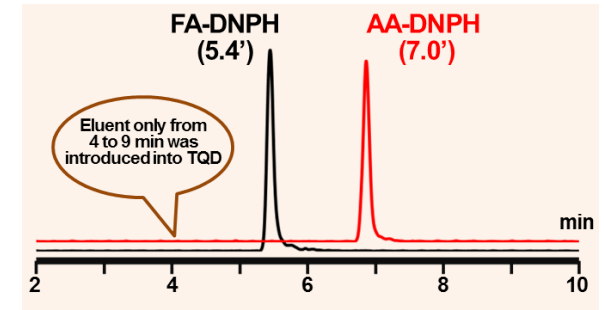
ペットボトルから溶出するアセトアルデヒド及びホルムアルデヒド(いずれもPETの熱分解物)について、最も高感度な分析法を検討し、ペットボトル溶出液の定量を行う。

さらに、国内外で製造された市販のペットボトル入りミネラルウォーター—約100検体に含まれるアセトアルデヒド及びホルムアルデヒドの実態調査を行う。

☆分析機器は、LC-MSを用いる。

アセトアルデヒド及びホルムアルデヒドはどれくらい溶出する？

日本の水道法で用いられているLC-MS法をさらに迅速・簡便化し、ミネラルウォーター中のホルムアルデヒド(FA)およびアセトアルデヒド(AA)を効率的かつ高感度・高精度に測定可能な分析法を確立した。



FAは保存期間とともに溶出量が増加 (AAはボトルにより溶出挙動が異なった)

国産、海外産ミネラルウォーターの実態調査結果

市販のペットボトル入りミネラルウォーター（計105検体）の実態調査結果

種類	検体数	検出数（検出率%）		ホルムアルデヒド			アセトアルデヒド		
		FA	AA	最小値	最大値	平均値	最小値	最大値	平均値
全体	105	64 (61)	71 (68)	2.6	31.4	11.0	5.3	142.0	44.8
内容量 237~600 mL	国産/無炭酸	29 (91)	30 (94)	2.7	21.4	11.1	14.0	142.0	54.8
	国産/炭酸入り	8 (89)	8 (89)	9.5	27.3	17.9	31.5	115.5	68.3
	海外産/無炭酸	9 (32)	9 (32)	2.9	31.4	18.0	22.6	100.6	48.3
	海外産/炭酸入り	1 (20)	4 (80)	5.7	-	5.7	5.3	50.6	25.7
内容量 1,020~2,000 mL	国産/無炭酸	16 (62)	19 (73)	2.6	13.1	5.4	7.6	70.9	25.2
	国産/炭酸入り	0	-	-	-	-	-	-	-
	海外産/無炭酸	0 (0)	0 (0)	-	-	-	-	-	-
	海外産/炭酸入り	1 (100)	1 (100)	7.2	-	-	52.1	-	-

FAおよびAA量の単位は ng/mL

検出率
国産 > 海外産

ミネラルウォーター中の
規格値 80 ng/mL未満

国産のFAおよびAA検出率が約90%と高かった（海外産は20~30%*）
アセトアルデヒド溶出量 > ホルムアルデヒド溶出量
溶出量は過去の国内・海外の研究報告とほぼ同程度であった

*海外産のミネラルウォーターにはFA及びAAを分解する細菌が存在することが報告されている

ペットボトル溶出物質の推定ばく露量の算出

本研究では、国内で汎用されているペットボトルを対象として、溶出する可能性のある化学物質を同定した。さらに、ICP-MS, PT-GC-MS, LC-MS等の質量分析計を装備した機器を用いた高感度・高精度な分析法を確立し、**25物質**の溶出量を定量した。これらの物質について推定ばく露量の算出を行った。

推定ばく露量	=	各化学物質の最大溶出量 (25°C12ヶ月)	×	一日あたりのペットボトル入り 清涼飲料摂取量 (約312 mL)
リアリスティックケース	=	水への最大溶出量 4%酢酸への最大溶出量	×	187 mL (中性飲料) 125 mL (酸性飲料)
ワーストケース	=	50%エタノールへの最大溶出量	×	312 mL

賞味期限 ジュース、紅茶など:約6ヶ月
お茶:約1年
ミネラルウォーター:約2年

ペットボトル溶出物質の推定ばく露量の算出

化学物質		推定ばく露量 (μg/day)	
		リアリスティックケース	ワーストケース
金属類	アンチモン	0.28	0.30
	ゲルマニウム	2.2	4.3
揮発性物質	2-メチル-1,3-ジオキソラン	0.59	3.8
モノマー類	ビスヒドロキシエチルテレフタル酸	<0.16	0.53
オリゴマー類	HECB acid	1.2	0.62
	HECBOECB acid	<0.17	0.50
環状オリゴマー	環状3量体	<3.1	8.2
アルデヒド	アセトアルデヒド	30.8	—
	ホルムアルデヒド	11.3	—
その他の定量下限値未満の16物質*		<0.0062 ~ <16	

*定量下限値を最大溶出量とし、推定ばく露量を算出

ペットボトル溶出物質25物質の推定ばく露量は
リアリスティックケースにおいて <0.0062 μg/day ~ 30.8 μg/dayであった

推定ばく露量と一日耐容摂取量(TDI)/一日許容摂取量(ADI)との比較

化学物質		TDI(ADI)比* (%)		TDI(ADI)
		リアリスティック ケース	ワーストケース	
金属類	アンチモン	0.08	0.1	6 µg/bw kg/day
揮発性物質	ベンズアルデヒド	<0.0001	<0.006	5 mg/bw kg/day (Group TDI)
モノマー類	ジエチレングリコール	<0.1	<0.1	0.1 mg/bw kg/day
	ブタンジオール	<0.1	<0.1	0.125 mg/bw kg/day
	ジメチルテレフタル酸	<0.01	<0.01	1 mg/bw kg/day
アルデヒド	アセトアルデヒド	0.56	—	0.1 mg/bw kg/day (Group TDI)
	ホルムアルデヒド	1.4	—	15 µg/bw kg/day

*TDI(ADI)比は体重を55.1 kg(国民平均体重)としたときのTDI(ADI)に対する推定ばく露量の割合(%)

TDIもしくはADIが設定されている6物質について推定ばく露量との比較を行った結果、TDI(ADI)に対する割合は0.0001%未満～1.4%であり、十分に低い値であった

長期間の溶出試験を短期間で実施可能？

化学物質		推定ばく露量 (μg/day)	
		25°C1年	40°C10日
金属類	アンチモン	0.30	0.56
	ゲルマニウム	4.3	2.2
揮発性物質	2-メチル-1,3-ジオキソラン	3.8	1.6
モノマー類	ビスヒドロキシエチルテレフタル酸	0.53	0.50
オリゴマー類	HECB acid	0.62	0.56
	HECBOECB acid	0.50	0.37
環状オリゴマー	環状3量体	8.2	15.6

40°C 10日の結果は25°C 1年とほぼ同等であり、
加速試験条件として使用できる可能性が示された



清涼飲料用ペットボトルから溶出する化学物質の 網羅的測定を行い、推定ばく露量を算出した



迅速、簡便で精度の高い金属類、揮発性物質、既知のモノマー、環状オリゴマー、本研究で新たに同定した極性の高いオリゴマー、ホルムアルデヒドおよびアセトアルデヒド、といった幅広い物性を有する分析法を確立した。



国内流通ペットボトルを用い、短期間および長期間保存時の溶出量を定量し、25物質の推定ばく露量を算出した。



国内流通ペットボトルを対象とした1年間にもおよぶ長期溶出試験を実施した初めての研究報告である。



市販品の実態調査やそれらの保存期間による溶出量への影響も明らかにすることができた。



ペットボトルから溶出する化学物質のリスク評価に資することができる

謝辞

本研究を実施するにあたり、ご協力・ご助言頂いた
ペットボトル及び飲料に関わる協議会、工業会、メーカーの
皆様方に感謝いたします

また、清涼飲料用ペットボトルを提供して頂いた
PETボトル協議会様に深くお礼申し上げます

研究協力者

岸 映里、村上太郎、大嶋智子、角谷直哉
((地独)大阪健康安全基盤研究所)
小野大助 ((地独)大阪産業技術研究所)
山口未来 (国立医薬品食品衛生研究所)

インビボ毒性試験成績のデータベース化と そのインシリコ解析・評価への応用 に関する研究

吉成浩一

静岡県立大学薬学部

分担研究者：頭金正博（名古屋市立大学大学院薬学研究科）

分担研究者：山田隆志（国立医薬品食品衛生研究所）

- 農薬、食品添加物、器具・容器包装由来物質など、食品中化学物質の安全性評価は、国民衛生確保のための重要課題である。
- 化学物質の安全性評価は主に動物実験により行われているが、動物愛護・福祉の観点から、また製品開発の効率化、コストの面から、動物実験代替法の開発が求められている。
- 特に、評価対象物質数の膨大さ、化学合成の困難さから、既知の毒性情報を利用した、インシリコ手法への期待が大きい。

- インシリコ手法による安全性評価系の開発には多数の化学物質の高品質な毒性試験情報が必要である。
- 食品健康影響評価書は貴重な情報源となるが、その情報は体系的に整理されていない。
- 製品評価技術基盤機構により公開されている有害性評価支援システム統合プラットフォーム(HESS)は、化学物質の反復投与毒性データベース並びに毒性発現機序情報を搭載し、試験データのない物質についてDB中の類似物質の情報により毒性エンドポイントとその強度を類推可能な有用な国産のツールである。

- 食品健康影響評価書データをHESSに搭載してデータセットを拡充し、以下を実施する。
 - ① 重篤な毒性の機序や種差の解明
 - ② 毒性機序と化学構造に基づくカテゴリーの作成
 - ③ 毒性学的懸念の閾値 (Threshold of Toxicological Concern: TTC) の補助ツールとしての有用性を検証
 - ④ インシリコ毒性予測手法の開発

インシリコ手法による新たな食品中化学物質の安全性評価手法の確立を目指す。

1. 公開毒性試験成績のデータベース化

- ① 有害性評価支援システム統合プラットフォーム（HESS）のデータベース拡充
- ② 生殖発生毒性試験情報の収集と管理・検索システムの構築

2. データベースのインシリコ毒性予測・評価への応用

- ③ フタル酸エステル類の毒性学的特徴の解析
- ④ 反復投与毒性の種差の解析
- ⑤ 反復投与肝毒性と関連する化学構造の抽出
- ⑥ 肝毒性以外の反復投与毒性カテゴリーの拡充
- ⑦ 毒性学的懸念の閾値に関する解析
- ⑧ 機械学習法を用いた肝毒性予測モデルの構築

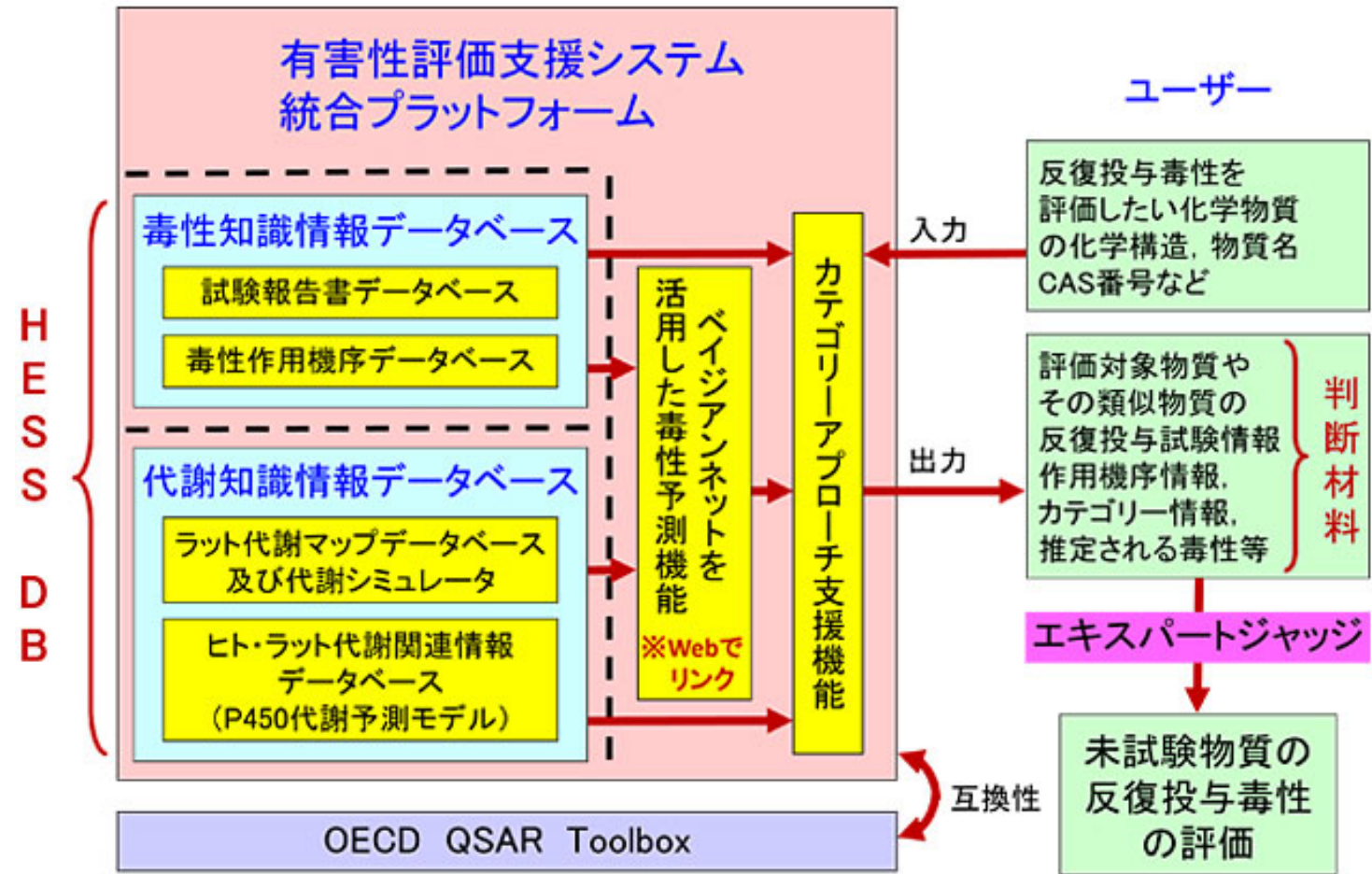
3. 毒性発現機序のインビボ・インビトロ検証試験

- ⑨ ラットインビボ毒性とP450反応性の関連性解析

1. 有害性評価支援システム統合プラットフォーム (HESS) のデータベース拡充
2. 生殖発生毒性試験情報の収集と管理・検索システムの構築
3. 毒性学的懸念の閾値 (TTC) に関する解析
4. 肝毒性と関連する物理化学的、生物学的特徴の同定

1. 有害性評価支援システム統合プラットフォーム (HESS) のデータベース拡充
2. 生殖発生毒性試験情報の収集と管理・検索システムの構築
3. 毒性学的懸念の閾値 (TTC) に関する解析
4. 肝毒性と関連する物理化学的、生物学的特徴の同定

有害性評価支援システム統合プラットフォーム:HESS



- 化学物質のラット反復投与毒性試験情報、毒性発現機序情報などを備えたシステム
- 化学物質間のデータの比較や化学物質の分子構造、物理化学的性質などによる化学物質の分類(カテゴリー化)を行うことを支援
- 未試験化学物質の反復投与毒性の評価を支援することが可能

食品健康影響評価書

10. 亜急性毒性試験.....

(1) 90日間亜急性毒性試験

(2) 90日間亜急性毒性試験

(3) 90日間亜急性毒性試験

(4) 28日間亜急性神経毒性試験

11. 慢性毒性試験及び発がん試験.....

(1) 2年間慢性毒性試験 (ラット)

(2) 1年間慢性毒性試験 (ラット)

(3) 2年間発がん性試験 (ラット)

(4) 21か月間発がん性試験 (ラット)

12. 生殖発生毒性試験.....

(1) 2世代繁殖試験 (ラット)

(2) 発生毒性試験 (ラット)

(3) 発生毒性試験 (ラット)

(4) 発生毒性試験 (ウサギ)

(5) 発生毒性試験 (ウサギ)

(6) 発生毒性試験 (ウサギ)

(7) 発生毒性試験 (ウサギ)

(8) 発生毒性試験 (ウサギ)

(9) 発生毒性試験 (経皮投与)

13. 遺伝毒性試験.....

表 17 90日間亜急性毒性試験 (ラット) で認められた毒性所見

投与群	雄	雌
3,000 ppm	<ul style="list-style-type: none"> 食餌効率減少 Hb、Ht、MCV、MCH、MCHC、平均赤血球直径、PLT 減少 ALP、AST、GGT 増加 限局性クッパー細胞色素沈着 脾髄外造血低下 白脾髄辺縁帯食細胞増生、白脾髄萎縮 APTT 短縮 脾比重量²増加、精巣絶対重量減少 前立腺及び精嚢の小型化 中等度の副腎皮質空胞化頻度増加 前胃/境界隆線部過形成/角化症増加 	<ul style="list-style-type: none"> 体重増加抑制、摂餌量減少、食餌効率減少 Ht、MCV、PLT、TG、Glu 減少 ALP、AST、β-Glob 増加 限局性クッパー細胞色素沈着 脾髄外造血低下 白脾髄辺縁帯食細胞増生、白脾髄萎縮 卵巣絶対重量減少 子宮壁萎縮性菲薄化 小葉中心性肝細胞肥大 ごく軽度の副腎皮質空胞化頻度増加 子宮萎縮
1,000 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> 体重増加抑制、摂餌量減少 肝絶対及び比重量増加 PT 延長 ALT 増加、T.Chol 減少 TG 減少 β-Glob 増加 小葉中心性肝細胞肥大 	<ul style="list-style-type: none"> 肝絶対及び比重量増加 Hb、MCH、MCHC、平均赤血球直径減少 GGT 増加 肝細胞脂肪化
300 ppm 以上	<ul style="list-style-type: none"> 肝細胞脂肪化 	<ul style="list-style-type: none"> 脾絶対及び比重量増加
100 ppm	毒性所見なし	毒性所見なし

HESSのデータベース拡充: 方法

食品健康影響 評価書



毒性徴候表

Registered number:	S3000-200001-C30181	
Cat. No.:	201314	
Chemical name:	1-saphthaleneacetic acid, sodium salt	
Study type:	90-day RDT	
Species:	Rat (SD)	
Sexes:	Oval (Feed)	
Solvent:	-	
Dose level:	7 doses (200, 2000, 8000)	
Dose unit:	ppm	
Purity:	-	
Findings:	Male	Female
NOEL:	200	200
NOAEL:	-	-
Death:	None	None
General signs:	-	-
Body weight:	Gain ↓ 8000	Gain ↓ 8000
Food consumption:	↓ 8000	↓ 8000
Water consumption:	-	-
FOB:	-	-
Uric analysis:	-	-
Hematology:	RBC ↓ 8000, HGB ↓ 8000, HCT ↓ 8000, PLT ↓ 8000, MCH ↑ 8000, MCHC ↑ 8000	RBC ↓ 8000, HGB ↓ 2000, HCT ↓ 2000
Blood chemistry:	TP ↓ 8000, ALB ↓ 8000	-
Absolut organ weight:	-	Liver ↑ 8000
Relative organ weight:	Liver ↑ 8000	Liver ↑ 2000, Brain ↑ 2000
Necropsy:	Kidney ↑ 2000	Liver: Hypertrophy/hepatocyte 8000, Liver: Vacuolization, hepatocyte 2000
Histopathology:	Liver: Hypertrophy/hepatocyte 8000, Adrenal: Zona glomerulosa, hypertrophy 8000, Urinary bladder: Hypertrophy, mucosal epithelium 8000	Liver: Hypertrophy/hepatocyte 8000, Adrenal: Zona glomerulosa, hypertrophy 2000, Urinary bladder: Hypertrophy, mucosal epithelium 8000

データ入力シート

CAS No.	41083-11-8	41083-11-8	41083-11-8	41083-11-8
Name	azocyclotin	azocyclotin	azocyclotin	azocyclotin
Chemical No. (Link to HESS DB)	8032	8032	8032	8032
Report No.	1	1	1	1
Study No. (Link to SGRDT)	8140	8140	8140	8140
Route	Oral (Feed)	Oral (Feed)	Oral (Feed)	Oral (Feed)
Species	Rat	Rat	Rat	Rat
Strain	Wistar	Wistar	Wistar	Wistar
Gender	Male	Male	Female	Female
Test group	Main	Main	Main	Main
Administration period	90D	90D	90D	90D
Dose unit	ppm	ppm	ppm	ppm
Min dose	5	10	10	10
Max dose	150	100	100	100
Comment	Sppm=0.41/μ, 0.48/μ, 1.50ppm=1.24/μ, 1.40			
Parameter (NOEL/LOEL)	NOEL	LOEL	NOEL	LOEL
Findings	NOEL	LOEL	NOEL	LOEL
Total	15	50	15	50
Death	50	150	50	150
Body weight ↑				
Body weight ↓	15	50	15	50
Food consumption ↑				
Food consumption ↓	15	50	15	50
Water consumption ↑				
Water consumption ↓				
Hypothermia				
Hypothermia				
Coma				
Emaciation				
Abnormal breathing				
Vocalization				
Abnormal body position				
Abnormal gait				
Abnormal behavior				
Strab. tail				
Locomotor activity ↑				
Locomotor activity ↓	50	150	50	150
Tremor/Convulsion				
Muscle tone ↓				
Abnormal appearance				
Cyanosis or pale skin				
Abnormal fur				
Piloerection				
Salivation				
Pross/Palpebral closure				
Lacrimation				
Miosis				
Mydriasis				
Diarrhea/Loose stool/Bloody stool				
Abnormal sensory response				
Abnormal response in handling				
Other findings				
Hypothermia				
Hypothermia				
Coma				
emaciation				
Abnormal breathing				
Vocalization				
Abnormal body position				
Abnormal gait				
Abnormal behavior				
Strab. tail				
Locomotor activity ↑				
Locomotor activity ↓				
Tremor/Convulsion				
Muscle strength				
Muscle tone ↓				
Abnormal appearance				
Cyanosis or pale skin				

物質情報

試験情報

毒性所見
(~500)

雄

雌

毒性所見が現れた
用量(LOEL値)を
入力

LOELの1つ下の用
量(NOEL値)を入
力



インポート



OECD QSAR Toolboxへもインポート可能

HESSの活用方法

A

選択可能

化学構造の入力

B

データベースの選択

本研究で構築した反復投与毒性データベース

認められた所見とそのLOEL/NOEL値を表示

C

代謝シミュレータによるラット代謝物の予測

D

類似物質の試験データの収集・カテゴリー化

対象物質

データベースから抽出された類似物質

- 我が国で開発された有害性評価支援システム統合プラットフォーム（HESS）に、食品安全委員会で公開されている食品健康影響評価書のラット反復投与毒性試験情報を搭載した。
- 食品安全委員会における食品中化学物質の安全性評価に有用なツールとなると期待される。

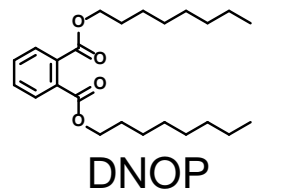
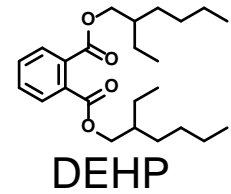
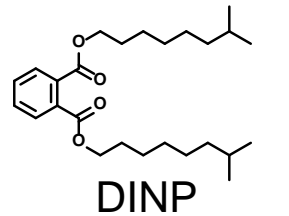
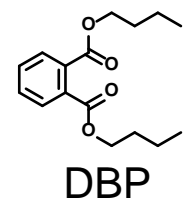
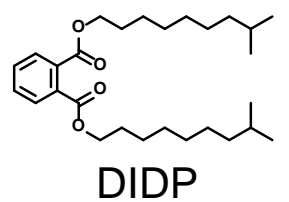
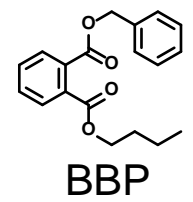
1. 有害性評価支援システム統合プラットフォーム (HESS) のデータベース拡充
2. 生殖発生毒性試験情報の収集と管理・検索システムの構築
3. 毒性学的懸念の閾値 (TTC) に関する解析
4. 肝毒性と関連する物理化学的、生物学的特徴の同定

- 食品用の器具及び容器包装は、食品衛生法において規格基準等が定められている。
- その原材料については、安全性が評価され使用が認められた物質以外は、原則使用が禁止されるポジティブリスト制度の導入が進められている。
- ポリカーボネートから溶出されるビスフェノール A、並びにフタル酸エステル等のプラスチック可塑剤で生殖・発生毒性の懸念が報告されている。

器具・容器包装関連物質

▶ フタル酸エステル類6剤

	略称	正式名称
1	BBP	フタル酸ベンジルブチル
2	DBP	フタル酸ジブチル
3	DEHP	フタル酸ビス(2-エチルヘキシル)
4	DIDP	フタル酸ジイソデシル
5	DINP	フタル酸ジイソノニル
6	DNOP	フタル酸ジオクチル



▶ **ポリ乳酸を主成分とする合成樹脂製の器具又は容器包装**
 ポリ乳酸、ラクチド、2-エチルヘキサン酸、スズ

▶ **ポリエチレンナフタレート(PEN)を主成分とする合成樹脂製の器具又は容器包装**
 2,6-ナフタレンジカルボン酸ジメチル、エチレングリコール、テレフタル酸ジメチル、ジエチレングリコール、シクロヘキサンジメタノール、アンチモン、二酸化ゲルマニウム、ゲルマン酸ナトリウム、二酸化チタン

▶ **再生PET及び溶出物質**

生殖・発生毒性試験情報の収集と整理

- 器具・容器包装評価書および関連する文献情報
- 一世代試験、二世代試験、発生試験
- 動物種、系統、雌雄、投与量、全毒性所見、各所見のLOAEL/NOAELの情報、文献の信頼度等を抽出
- Excelシートに入力
- 合計9剤、91試験
 - ✓ フタル酸エステル類(6剤)・・・79試験
BBP:17試験、DBP:29試験、DEHP:22試験、DIDP:5試験、DINP:4試験、DNOP:2試験
 - ✓ ポリ乳酸・・・3試験
 - ✓ ポリエチレンナフタレート・・・9試験
 - ✓ 再生PETの溶出物質・・・0試験

生殖・発生毒性試験情報の収集と整理(続き)

- 医薬品の生殖発生毒性試験に係るガイドラインを参考にし、「一世代生殖毒性」、「二世代生殖毒性」、「発生毒性」の3つに分けた。
- 入力した試験数
 - ✓ 一世代:5試験、二世代:12試験、発生:62試験
- 発生試験に関してはさらにA~Fの6つの期間に分けた。
 - A:交尾前~受精
 - B:受精~着床
 - C:着床~硬口蓋閉鎖
 - D:硬口蓋閉鎖~妊娠終了
 - E:出生~離乳
 - F:離乳~性成熟

◆ 試験情報の例

物質名	BBP
CAS番号	85-68-7
試験の種類	一世代
文献情報	TNO NaFRI, 1993
動物種	ラット
系統	Wistar
投与方法	経口
NOAEL	418 mg/kg/day
LOAEL	690 mg/kg/day
親動物/児動物	P(F0)
性別	雄
投与量	100 mg/kg/day

■ 試験情報と毒性情報を入力

生殖・発生毒性試験の毒性所見

体重	
交配前	増加 減少
妊娠期	増加 減少
授乳期	増加 減少
その他	
体重増加	
交配前	増加 減少
妊娠期	増加 減少
授乳期	増加 減少
その他	
摂餌量	
交配前	増加 減少
妊娠期	増加 減少
授乳期	増加 減少
その他	

一般状態の異常		
例) 流産、死亡など		
器官重量		
子宮	絶対重量	増加 減少
	相対重量	増加 減少
卵巣	絶対重量	増加 減少
	相対重量	増加 減少
精巣	絶対重量	増加 減少
	相対重量	増加 減少
精巣上体	絶対重量	増加 減少
	相対重量	増加 減少
前立腺	絶対重量	増加 減少
	相対重量	増加 減少
精嚢	絶対重量	増加 減少
	相対重量	増加 減少

脳	絶対重量	増加 減少
	相対重量	増加 減少
肝臓	絶対重量	増加 減少
	相対重量	増加 減少
腎臓	絶対重量	増加 減少
	相対重量	増加 減少
脾臓	絶対重量	増加 減少
	相対重量	増加 減少
下垂体	絶対重量	増加 減少
	相対重量	増加 減少
甲状腺	絶対重量	増加 減少
	相対重量	増加 減少
副腎	絶対重量	増加 減少
	相対重量	増加 減少

生殖・発生毒性試験の毒性所見(続き)

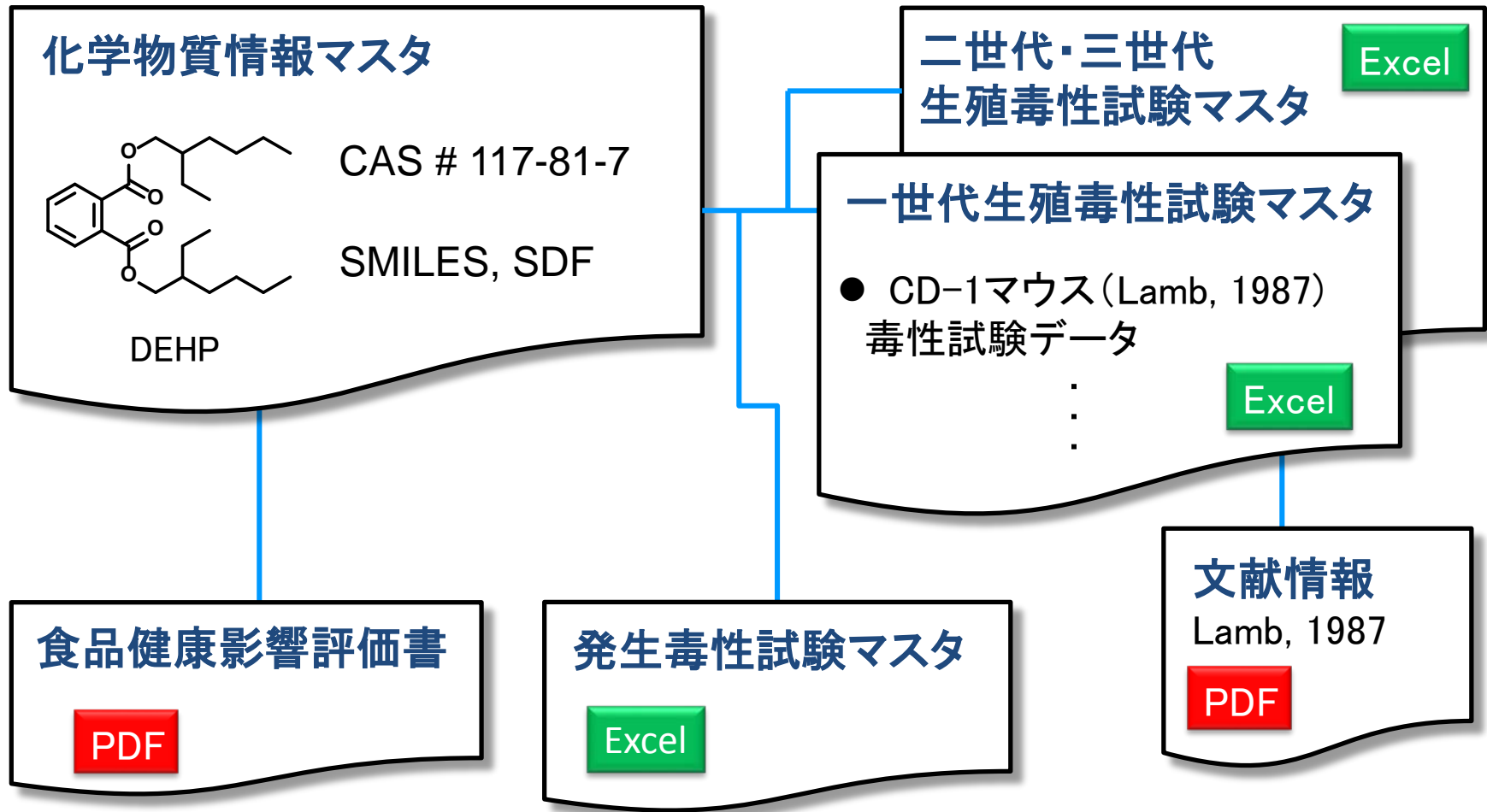
剖検所見	
(例)	精巣矮小、精巣の軟化
病理組織所見	
(例)	精母細胞形成遅延
血液学的検査	
(例)	白血球数、赤血球数
血液生化学的検査	
(例)	コレステロール、ALT、AST

出生児検査		
出生児生存数	増加	減少
出生児生存率	増加	減少
性比の異常		
外表異常		
肛門・生殖間距離 (AGD)	増加	減少
その他		

繁殖能力		
性周期	延長	短縮
	不規則	
精子検査	精子数減少 運動能減少 形態異常	
交尾率	増加	減少
受胎率	増加	減少
妊娠率	増加	減少
妊娠期間	延長	短縮
着床数	増加	減少
出産率	増加	減少
その他		

生殖・発生毒性試験情報のデータベース化

■ **FileMaker** (リレーショナルデータベースシステム作成ソフト) を使用



生殖・発生毒性試験情報のデータベース化(続き)

■ ユーザーインターフェース

FileMaker Pro - [毒性試験DB]
ファイル(F) 編集(E) 表示(V) 挿入(I) 書式(M) レコード(R) スクリプト(S) ウィンドウ(W) ヘルプ(H)

2 3 / 4
該当件数 (未ソート)
レコード
すべてを表示 新規レコード レコード削除 検索

レイアウト: 基本画面 表示方法の切り替え: [アイコン] プレビュー

毒性試験データベース

No. 1 CAS No. 68515-49-1/26761-40-0

一般名 フタル酸ジイソデシル 略称 DIDP

英名 Di-isodecyl phthalate

構造式



一世代 二世代 発生

FileMaker Pro - [毒性試験DB]
ファイル(F) 編集(E) 表示(V) 挿入(I) 書式(M) レコード(R) スクリプト(S) ウィンドウ(W) ヘルプ(H)

2 3 / 4
該当件数 (未ソート)
レコード
すべてを表示 新規レコード レコード削除 検索 ソート 共有

レイアウト: 二世代 表示方法の切り替え: [アイコン] プレビュー

二世代試験

No. 1

一般名 フタル酸ジイソデシル 略称 DIDP

二世代試験情報

DIDPSDラットStudyA.xlsx	Hushka 2001	24_Hushkaら (2001) .pdf
DIDPSDラットStudyB.xlsx	Hushka 2001	24_Hushkaら (2001) .pdf

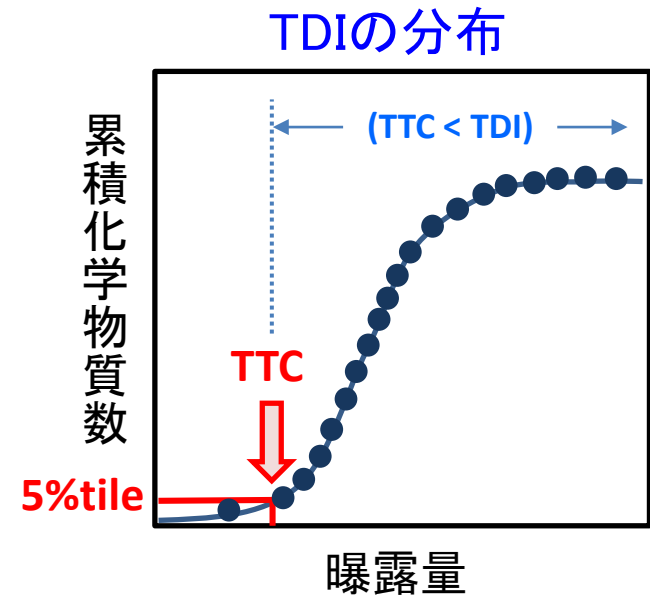
BACK

- 食品安全委員会で公開されている器具容器包装評価書等を利用して、フタル酸エステル類等の生殖発生毒性試験情報を収集し、Microsoft ExcelやFileMakerを利用したデータベースを作成した。
- 食品安全委員会における食品中化学物質の安全性評価に有用なツールとなると期待される。

1. 有害性評価支援システム統合プラットフォーム (HESS) のデータベース拡充
2. 生殖発生毒性試験情報の収集と管理・検索システムの構築
3. 毒性学的懸念の閾値 (TTC) に関する解析
4. 肝毒性と関連する物理化学的、生物学的特徴の同定

毒性学的懸念の閾値 Threshold of Toxicological Concern (TTC)

- 毒性学的懸念の閾値 (TTC) は、あらゆる化学物質について**それ以下の曝露量では明らかな有害影響が現れないとするヒト曝露の閾値**として設定される。
- 香料や食品包装材料物質など、多くの物質で**毒性学的情報は極めて限られているが、曝露量が通常極めて低く、多くの機能的に同類の物質を含む化学物質群を包括的に評価**するために、TTCが有用であると考えられている。
- 発がんTTC (1.5 $\mu\text{g}/\text{人}/\text{day}$) と**非発がんTTC (90 $\mu\text{g}/\text{人}/\text{day}$)**が提案されている。



TDI (Tolerable Daily Intake)
耐容一日摂取量.

HESSの反復投与毒性試験データを活用して、非発がんTTCを検証する。

TTCの解析:方法

■ 使用データ:HESS データベース

- 主に化審法既存点検化学物質
- 投与ルート:経口
- 投与期間:28-90 日
- 大半の試験はGLP基準で実施
- 1物質で複数の試験データ→低いNOEL値を採用
- 732物質/732試験

■ 解析方法

- 化学構造→ Cramer分類
- ppm→mg/kg体重/日に変換
- $TDI = NO(A)EL / \text{不確実係数} UF^*$

*UF:種差・個体差:100

試験期間:28-50日間→6、90日間→2を追加

LOELを用いる場合→10を追加

Cramer分類

クラス I

単純な化学構造をもつ物質で、効率的な代謝機序を有し、経口毒性が低いと考えられるもの

クラス II

クラス I とクラス III の中間物質。クラス I ほど無害性は低くない構造をもつが、クラス III のような毒性を示唆する構造特性を持たない物質

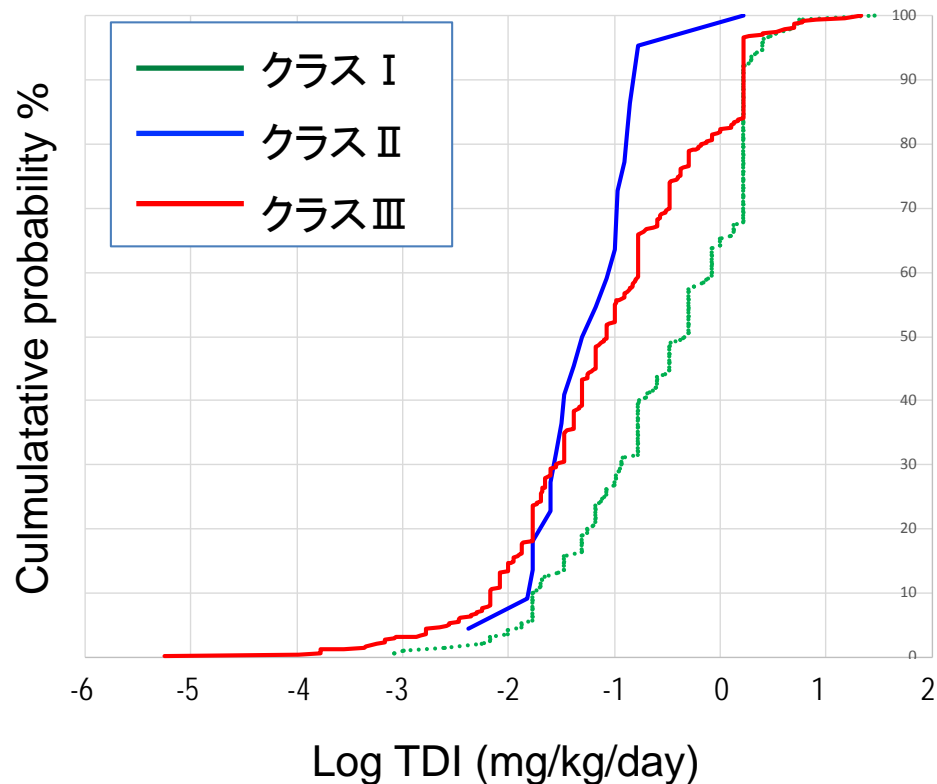
クラス III

初期評価で安全であるという強い根拠は全くないか、あるいは顕著な毒性を示唆する化学構造を有する物質

Cramer et al., *Food Cosmet Toxicol.* 16:255-276, 1978.

除外物質: アフラトキシン様化合物、アゾキシ化合物、*N*-ニトロソ化合物、ダイオキシン類、ステロイド類(強力な発がん性)、ポリハロゲン化ダイオキシン類、重金属類(体内での蓄積)、非必須金属(元素、イオン、それらの有機体)、タンパク質(解析対象となっていないため)、ホルモン用物質(低用量影響が不明)

TTCの解析: 結果及び考察



- HESSのTTC値は、クラスⅢではMunroの値と同程度であったが、クラスⅠでは他のデータベースの値に比べてやや低値を示した。
- 化審法既存化学物質点検事業では、毒性学的懸念が高い物質が優先評価されてきたことが一因と考えられる。

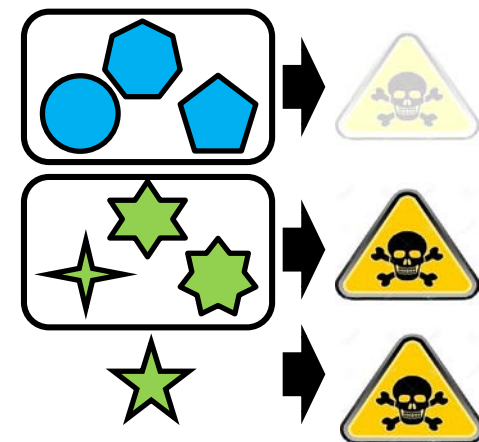
非発がんTTC値 (μg/人/日)

データベース	クラス I	クラス II	クラス III
HESS	800 (N=190)	348 (N=22)	166 (N=520)
Munro	1800 (N=137)	546 (N=28)	90 (N=448)
COSMOS	2500 (N=219)	350 (N=40)	470 (N=293)

1. 有害性評価支援システム統合プラットフォーム (HESS) のデータベース拡充
2. 生殖発生毒性試験情報の収集と管理・検索システムの構築
3. 毒性学的懸念の閾値 (TTC) に関する解析
4. 肝毒性と関連する物理化学的、生物学的特徴の同定

カテゴリー(グルーピング)アプローチ

- 化学構造や生物学的特徴が類似した化学物質群をグルーピングして評価する方法
- 同じグループに属する物質の毒性データを用いて、毒性データがない物質の毒性を予測



目的

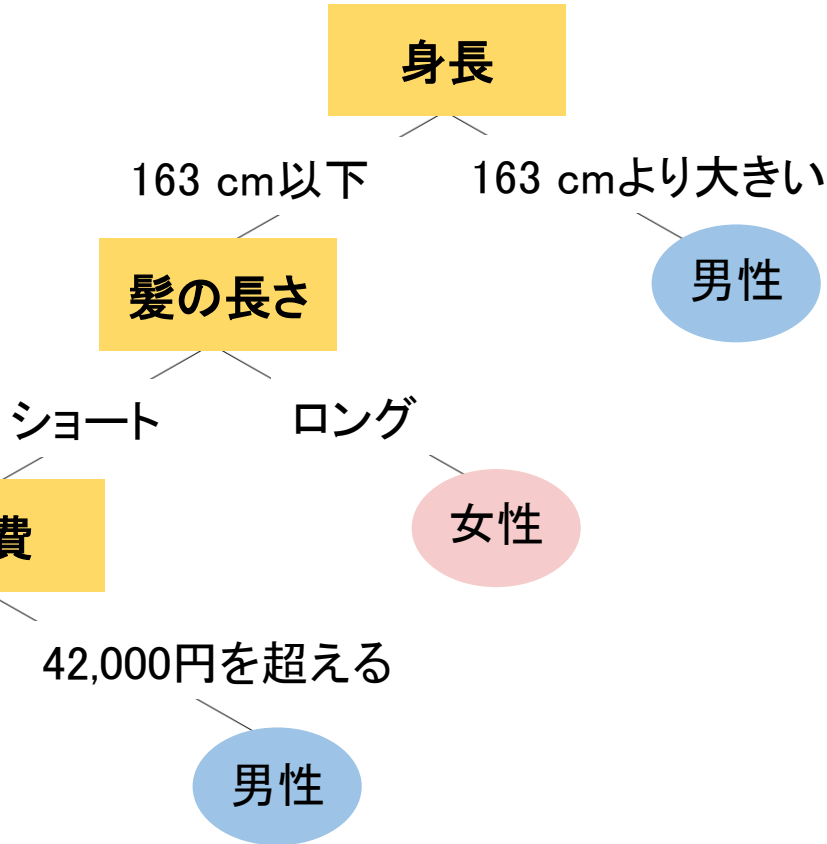
- HESSや食品健康影響評価書の毒性試験情報を活用して、肝毒性と関連する化学構造的特徴、生物学的特徴を同定する。
- カテゴリーアプローチによる化学物質の安全性評価に有用な情報を取得する。

決定木分析

- 結果(目的変数又は従属変数)に影響する様々な要因(説明変数)を分析して、サンプルを分類する手法の1つ

例

属性	身長 (cm)	髪の毛の長さ	趣味	食費 (円/月)
男	184	ショート	テニス	70,000
女	155	ロング	水泳	30,000
女	152	ロング	読書	40,000
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮

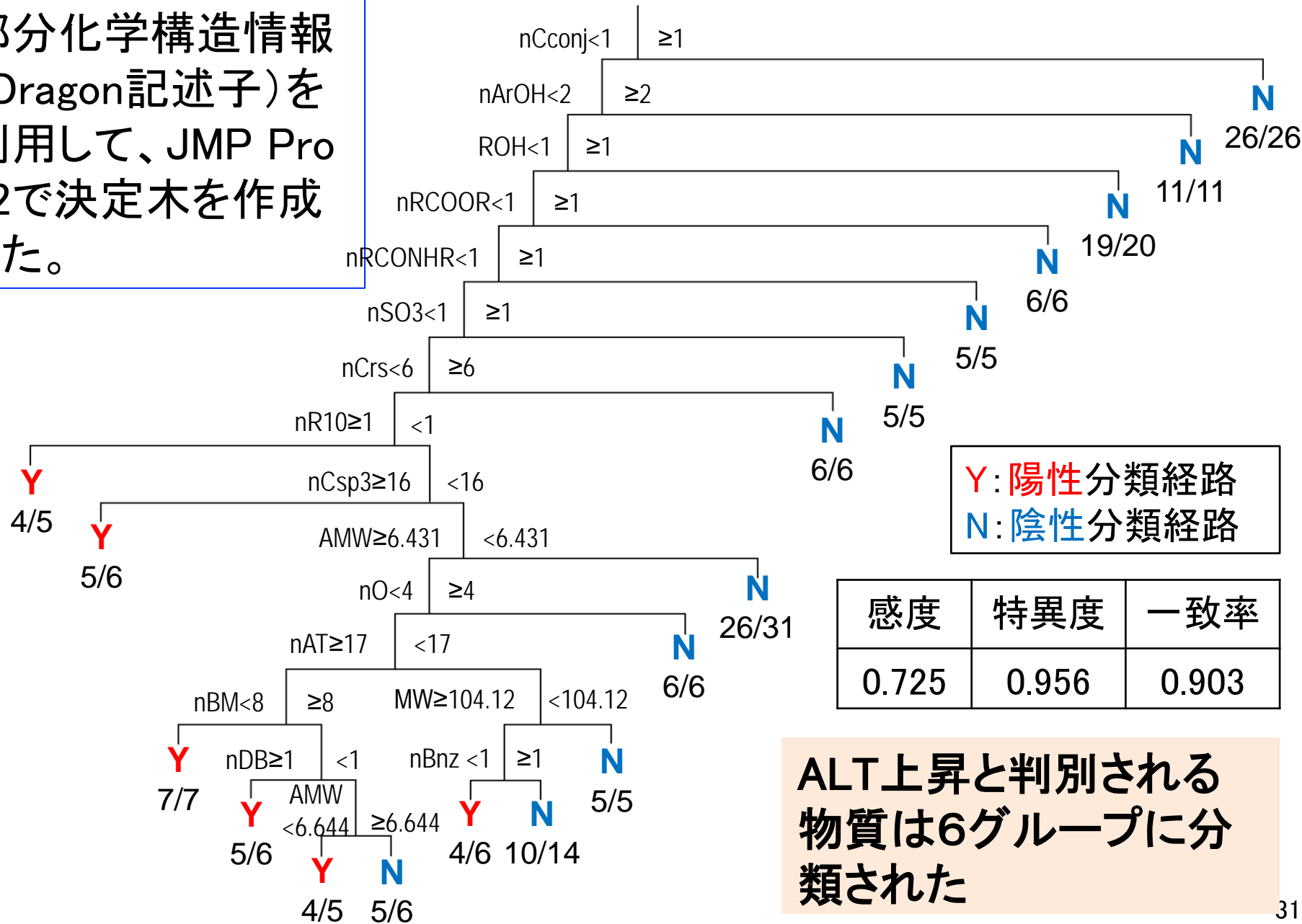


問題:短髪で身長160cm、食費に1月5万円使う人は男性か女性か？



決定木解析によるALT上昇陽性物質の分類

部分化学構造情報 (Dragon記述子) を利用して、JMP Pro 12で決定木を作成した。



Y: 陽性分類経路
N: 陰性分類経路

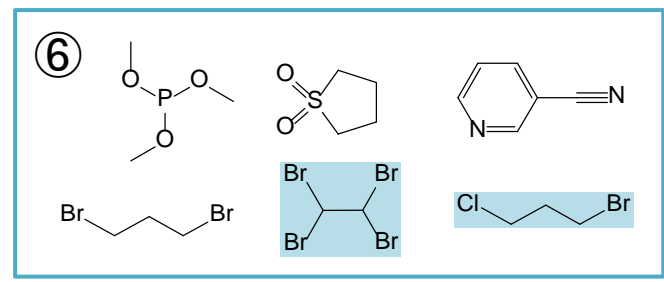
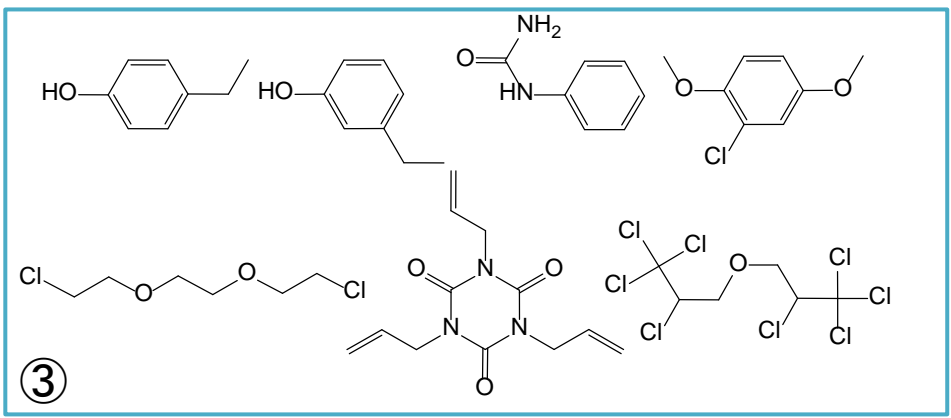
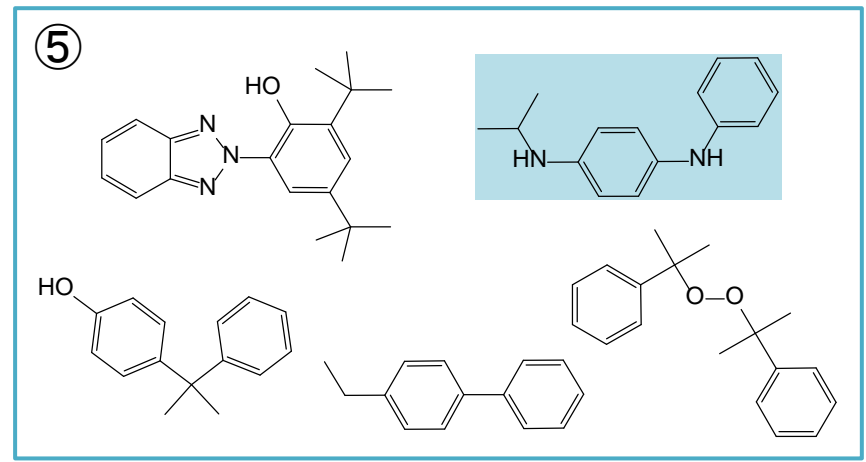
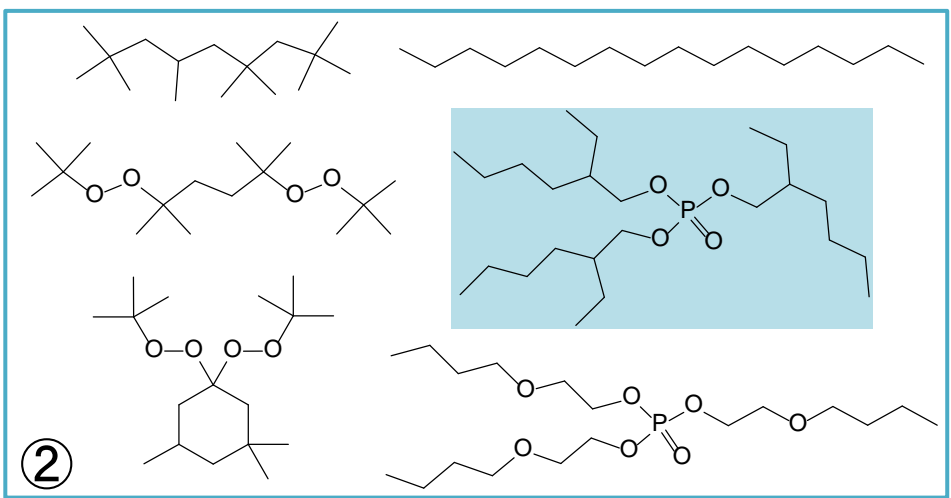
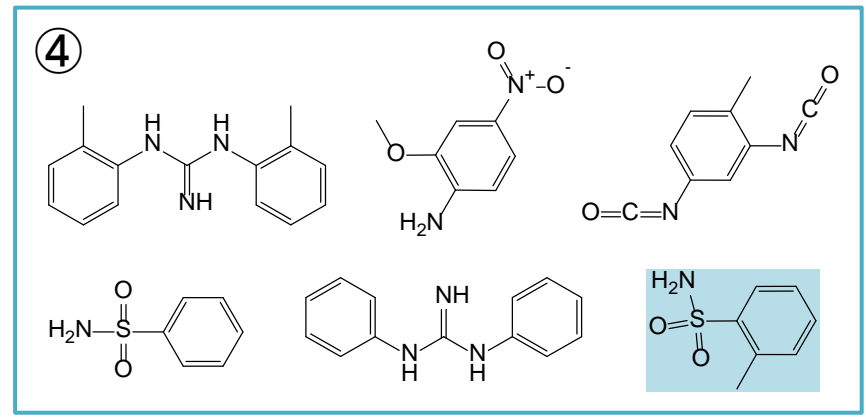
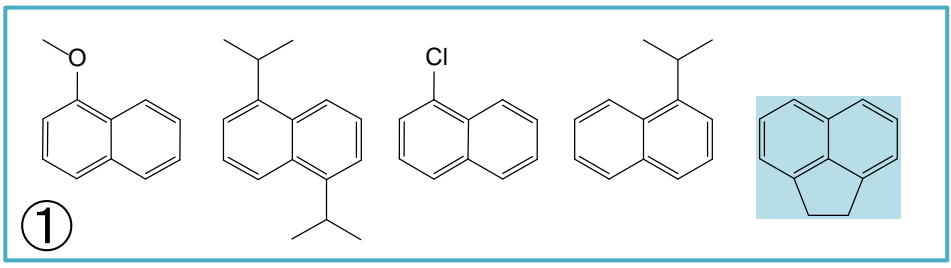
感度	特異度	一致率
0.725	0.956	0.903

ALT上昇と判別される物質は6グループに分類された

ALT上昇陽性と判定された物質のグループ

グループ1には**ナフタレン骨格**を有する物質のみが含まれていた。

偽陽性



食品健康影響評価書を用いた解析:結果

見出した部分化学構造と毒性所見の関連性

● 90日間試験

- ピラゾール環 — 肝機能低下 (オッズ比:3.36)
- ピラゾール環 — 肥大 (オッズ比:2.99)
- トリアゾール環 — 胆管系障害 (オッズ比:3.06)
- シアノ基 — 過形成 (オッズ比:4.47)
- シアノ基 — 脂肪化 (オッズ比:2.02)
- シアノ基 — 肥大 (オッズ比:2.79)

● 2年間試験

- ピラゾール環 — 脂質代謝異常 (オッズ比:3.01)
- ピラゾール環 — 肝機能亢進 (オッズ比:2.96)
- ピラゾール環 — 肥大 (オッズ比:2.50)
- ピラゾール環 — 変異細胞巢 (オッズ比:2.96)
- トリアゾール環 — 脂肪化 (オッズ比:5.33)
- トリアゾール環 — 肝機能亢進 (オッズ比:2.30)
- トリアゾール環 — 肥大 (オッズ比:2.70)
- シアノ基 — 脂質代謝異常 (オッズ比:2.65)
- シアノ基 — 肥大 (オッズ比:3.31)

シトクロムP450反応性と毒性発現：背景

- 薬物代謝は化学物質の解毒及び毒性発現を規定する重要な因子の一つである。
- 肝毒性の発現にはしばしば代謝物（代謝活性化）が関与する。
- 薬物代謝酵素は、基質特性の異なる多数の分子種からなり、1つの酵素が特異的な化学構造の物質を認識する。

代表的な薬物代謝酵素であるシトクロムP450との反応性と毒性発現との関連性を解析し、その毒性予測への有用性を検討した。

P450反応性と反復投与毒性との関連性解析: 結果

- 方法**
- 発光基質を利用したP450-Glo™ assay system (Promega)を使用し、120物質のP450反応性をインビトロ試験で評価
 - 食品健康影響評価書のラット90日間反復投与毒性試験における主要な所見との関連性をカイニ乗検定により解析
- $P < 0.05$

P450分子種		肝				甲状腺		血液生化学					腎	脾臓	血液学					体重	外観/行動		
		絶対重量増加	相対重量増加	小葉中心性肝細胞肥大	小葉びまん性肝細胞肥大	絶対重量増加	相対重量増加	総タンパク質減少	グロブリン減少	γ-GTP増加	コレステロール増加	中性脂肪減少	絶対重量増加	重量増加	網状赤血球増加	Hb濃度減少	Ht値減少	MCH減少	MCV減少	増加抑制	摂餌量減少	摂餌量減少	
Human	1A1	0.012	0.026	0.074	0.410	0.020	0.020	0.013	0.030	0.001	0.098	0.506	0.736	0.337	0.368	0.592	0.337	0.419	0.486	0.608	0.847	0.528	0.218
	1A2	0.852	0.493	0.190	0.910	0.864	0.689	0.517	0.677	0.020	0.489	0.947	0.517	0.164	0.666	0.689	0.487	0.592	0.644	0.623	0.447	0.595	0.218
	1B1	0.781	0.677	0.145	0.694	0.711	0.842	0.452	0.629	0.002	0.383	0.718	0.830	0.334	0.390	0.131	0.018	0.070	0.192	0.462	0.010	0.028	0.608
	2B6	0.206	0.536	0.933	0.034	0.947	0.947	0.642	0.836	0.027	0.487	0.751	0.092	0.271	0.543	0.101	0.968	0.207	0.557	0.121	0.187	0.467	0.095
	2C8	0.419	0.363	0.827	0.806	0.901	0.457	0.101	0.035	0.646	0.596	0.365	0.197	0.580	0.907	0.047	0.713	0.966	0.738	0.285	0.167	0.282	0.703
	2C9	0.081	0.133	0.458	0.705	0.078	0.236	0.097	0.164	0.033	0.182	0.103	0.033	0.455	0.112	0.267	0.170	0.048	0.918	0.410	0.173	0.102	0.373
	2C19	0.049	0.038	0.103	0.660	0.070	0.070	0.006	0.246	0.003	0.286	0.235	0.400	0.452	0.149	0.464	0.221	0.603	0.264	0.170	0.672	0.616	0.035
	2D6	0.052	0.608	0.164	0.790	0.003	0.016	0.146	0.208	0.135	0.632	0.096	0.856	0.374	0.468	0.923	0.040	0.151	0.001	0.005	0.351	0.339	0.642
3A4	0.058	0.001	0.853	0.023	0.498	0.211	0.296	0.187	0.008	0.419	0.198	0.028	0.040	0.264	0.298	0.508	0.892	0.129	0.162	0.813	0.475	0.189	
Rat	1A1	0.012	0.015	0.163	0.454	0.089	0.089	0.003	0.049	0.001	0.198	0.324	0.191	0.973	0.191	0.689	0.360	0.801	0.704	0.926	0.806	0.920	0.533
	1A2	0.632	0.845	0.629	0.648	0.215	0.061	0.361	0.444	0.815	0.016	0.024	0.361	0.375	0.781	0.983	0.777	0.821	0.610	0.717	0.129	0.003	0.732
	2B1	0.082	0.493	0.595	0.081	0.042	0.148	0.133	0.525	0.040	0.126	0.849	0.072	0.364	0.486	0.143	0.356	0.837	0.110	0.155	0.698	0.968	0.068
	2C6	0.150	0.180	0.256	0.112	0.315	0.315	0.037	0.242	0.074	0.316	0.643	0.448	0.679	0.849	0.159	0.509	0.780	0.588	0.225	0.665	0.606	0.052
	2D1	0.604	0.641	0.049	0.950	0.924	0.924	0.400	0.938	0.288	0.015	0.207	0.810	0.752	0.030	0.588	0.420	0.065	0.587	0.784	0.672	0.751	0.900
	2E1	0.169	0.122	0.852	0.144	0.460	0.460	0.425	0.442	1.000	0.328	0.273	0.425	0.158	0.425	0.460	0.103	0.174	0.393	0.363	0.305	0.325	0.610
	3A2	0.003	0.003	0.118	0.266	0.315	0.688	0.037	0.079	0.025	0.316	0.354	0.184	0.215	0.184	0.688	0.290	0.576	0.104	0.166	1.000	0.302	0.157

特定のP450分子種と毒性所見との間に有意な関連性が認められた。

- 化学構造と反復投与毒性の関連性を解析し、以下の関連性を見出した。
 - ラット肝障害(血中ALTレベル上昇)と、ナフタレン骨格かつ脂溶性や特定の分子構造、表面電荷条件との関連性
 - ピラゾール環、トリアゾール環、シアノ基とラット肝毒性との関連性
 - 薬物代謝酵素シトクロムP450との反応性と反復投与毒性との関連性
- カテゴリーアプローチ手法による安全性評価に有用な知見を提供できた。

- 食品健康影響評価書データをHESSへ搭載してデータセットを拡充した。また、生殖・発生毒性試験情報のデータベースを作成した。
- 上記データベース等を利用して、毒性学的懸念の閾値(TTC)に関する解析を実施し、TTC解析に本データベースが有用であることを示した。
- 反復投与毒性と関連する化学構造情報、生物学的情報を抽出した。
- 食品中化学物質の安全性評価に有益なツール及び情報を提供することができた。
- インシリコ手法による新たな安全性評価手法の確立に有用な知見を提供することができた。