

具体的事例に基づく毒性病理学的観点からの BMD 法適用に関する検討

(1) 一般的な取扱い手順や考え方

・ BMD 法は、従来は LOAEL しか取れなかった試験や、発がん性が遺伝毒性機序であった場合に適用することを推奨されていたが、BMD 法の理論に基づくと、BMD 法適用に合致したデータがある場合は、上記に関わらず適用することが望ましい。

・ 基本的に、評価対象物質により誘発された病理所見のうち、最も毒性学的意義が高い所見の発生頻度に対し BMD 法を適用するべきであるが、毒性試験の詳細な報告書を入手できる場合は、当該所見の発生頻度に関する集計データだけでなく、関連病変の発生状況や機序、対照群にも発生している場合は同一試験施設における背景データを確認し、用量相関性の有無を含めて BMD 法適用に妥当な所見及び発生頻度かを判断することが求められる。

・ 評価対象物質の投与により誘発され、当該物質の毒性を評価する上で重要な所見について、病変の程度（グレード）毎に発生頻度データがある場合は、BMD 法適用時に、総発生数を適用すべきか、ある程度以上の発生頻度に対して適用すべきか等、毒性学的意義や用量相関性等を考慮しながら検討してはどうか。

本研究では、具体的な事例について、BMD 法を適用する際に毒性病理学の観点から留意すべき点を可能な限りまとめた。また、事例の一部について、本研究事業において開発した MA-3 法を用いた BMDL₁₀ 値を算出し、その妥当性について考察を行った。

(2) 病理所見の発生頻度に加えてグレードが記載されたデータの二値データ化に関する検討

①対照群にも発生し、各群の発生総数には用量相関性はないが、グレード毎の発生頻度に用量相関性があるケース

投与物質の毒性影響として重要な所見について、各群の発生総数には用量相関性がなくても、病変の程度が投与物質の用量に相関して変化している場合は、対照群での発生状況や対照群と投与群との間の統計学的有意差等を踏まえ、どのグレードから毒性学的意義があるかを判断し、当該グレード以上の発生頻度（2 つ以上のグレードが対象の場合は各々の発生頻度を合算する）に基づき、BMD 法を適用することを検討してはどうか。

(事例 1) アカネ色素のラットを用いた 13 週間反復混餌投与試験で認められた腎病変
(Inoue et al., 2014)

食品添加物の着色料として使用されていたアカネ色素を、最高 5%の用量で 13 週間混餌投与されたラットの腎臓において、髓質外帯・近位尿細管上皮細胞の核の大小不同が認められた。発生頻度を下表に示す。

表 1-1：ラットを用いたアカネ色素の 13 週間反復投与試験で認められた腎病変の一例

	アカネ色素用量 (% in diet)				
	0	0.6	1.2	2.5	5.0
検索動物数(雄)	10	10	10	10	10
核の大小不同 近位尿細管上皮 細胞、髓質外帯 (±/+ /++)	2 (2/0/0)	10(7/3/0)**,#	10(10/0/0)**,#	10(10/0/0)**,#	10 (1/7/2)**,#

** : p<0.01 (Fisher's exact probability test, #: p<0.001 (Mann-Whitney's U-test).

病変の程度 : ± : ごく軽度、+ : 軽度、++ : 中等度

表 1 に示した通り、各群の発生総数のみ見ると、用量相関性がない変化として認識されるが、病変の程度を踏まえた発生頻度をみると、用量の増加と共に病変の程度が増していることがわかる。最高用量の 5.0%群では、ごく軽度の発生数が他の投与群に比し減少しているが、他群には認められなかった軽度及び中等度の病変が、各々7例、2例発生している。対照群においてごく軽度の病変が2例発生していること、0.6~2.5%群においては用量に関わらず、ごく軽度の病変が全例に認められていることから、本物質の投与による毒性影響として重要なのは、軽度以上の病変と考えられた。したがって、本事例に対しては、軽度以上の発生頻度の合算値に BMD 法を適用するのが望ましいと考えられた。

上記の考え方に基づき、試験的に MA-3 により BMDL₁₀ を求めた結果を以下に示す。

表 1-2. 本試験における軽度以上の発生頻度 (MA-3 入力データ)

X	dose	positive	sample	negative
1	0.0	0	10	10
2	0.6	3	10	7
3	1.2	0	10	10

別添

4	2.5	0	10	10
5	5.0	9	10	1

表 1-3. MA-3 による計算結果

Model	BMD	BMDL	BMDU	BMDL/BMDU
logistic	1.63679	1.1836	2.48443	0.476408
log-logistic	4.29679	2.49223	4.47557	0.556852
probit	1.42389	1.0288	2.24738	0.457777
log-probit	3.88558	2.4884	4.18386	0.594762
gamma	4.40853	2.99003	4.58928	0.651524
quantal-linear	0.581232	0.36419	1.03632	0.351426
Weibull	3.83221	2.47002	4.06655	0.607398
multistage2	3.64722	2.91954	4.121	0.708453
multistage3	0.328424	0.241382	0.617982	0.390597
MA ALL	3.33464	1.97193	3.96593	0.497217
MA-3	3.24521	1.69056	4.28061	0.394935

(参考) 本試験の LOAEL は当該所見の発生等に基づき 0.6%であった。

本事例の場合、本試験は LOAEL しか得られてないため、NOAEL は 0.6 より低値であると想定されるが、MA-3 により得た BMDL₁₀ は LOAEL より高値 (1.69056) であった。当該所見の軽度以上の発生頻度の合算することは毒性学的に妥当と考え計算したが、その計算結果に毒性学的な妥当性を支持しなかったため、本計算結果を採用することはできない。軽度以上の発生頻度に用量反応関係がないこと (最低用量で軽度以上の所見が 3 例認められたが、中間 2 用量では認められなかった) が原因と考えられるため、そもそも BMD 法を適用すべきではないデータといえるが、毒性学的 (病理学的) に意義があり、エンドポイントとすべき重要な所見であっても、その発生頻度によっては、BMD 法適用の妥当性を判断する必要があることを示した事例となった。本事例の病変の程度は、顕微鏡下での病変の発生状況を標本観察者の印象で判断している。本事例では実施していなかったが、画像解析装置を用いた定量解析により病変のグレードを定量化することにより、BMD 法の適用可能な用量反応性を見いだすことが可能かも知れない。

(事例 2) ラットを用いたセミカルバジドの慢性毒性・発がん性併合試験においてみられた骨病変 (Takahashi et al., 2014)

瓶詰のパッキン製造過程において発泡剤として使用されるアゾジカルボンアミドの熱分解物質である塩酸セミカルバジドは、ラットに 1 年 (52 週) 以上混餌投与すると、様々な骨病変を誘発する。誘発される病変の一つ、脛骨にみられた軟骨細胞の骨髓腔への突出の発生頻度の総数は、アカネ色素の例と同様、各群の発生頻度の総数だけ見ると、用量依存性は認められない。しかし、病変の程度毎の発生頻度は、用量の増加と共に程度が高まっていることを示している (表 3 参照)。

表 2-1: セミカルバジドにより誘発されたラット脛骨にみられた病変の一例 (雄)

	セミカルバジド用量 (ppm)			
	0	10	50	250
検索動物数	10	9	10	10
軟骨細胞の骨髓腔 への突出 (+/++/+++)	7 (6/1/0)	5 (4/1/0)	10 (5/5/0)#	10 (0/2/8)##

#, #: p<0.05 and p<0.01, respectively (Mann-Whitney's U test).

病変の程度: +: 軽度、++: 中等度、+++ : 高度

同病変は、対照群にも発生し、7 例中 6 例が軽度であった。軽度の同病変は投与群でも認められるが、最高用量群では軽度の発生はない。中等度の同病変は、中間用量群から発生が増加し、最高用量群では高度な病変が認められている。以上の発生状況から、毒性影響として重要なのは、中等度以上の同病変であることが考えられた。そこで、中等度以上の同病変の発生頻度を合算し、MA-3 により BMDL₁₀ を求めた。結果を以下に示す。

表 2-2. 本試験における中等度以上の軟骨細胞の骨髓腔への突出の発生頻度 (MA-3 入力データ)

X	dose	positive	sample	negative
1	0	1	10	9
2	10	1	9	8
3	50	5	10	5
4	250	10	10	0

表 2-3. MA-3 による計算結果

Model	BMD	BMDL	BMDU	BMDL/BMDU
logistic	17.652	11.4464	46.4027	0.246675
log-logistic	42.3876	37.5869	49.3939	0.760963
probit	16.3299	10.6532	41.3694	0.257514
log-probit	36.5649	30.374	46.4577	0.653799
gamma	24.9297	4.4563	46.7752	0.0952707
quantal-linear	7.54428	4.03882	12.3587	0.3268
Weibull	24.3985	4.98873	47.5677	0.104876
multistage2	22.8253	6.33987	49.3036	0.128588
multistage3	23.0644	0.592841	45.8002	0.0129441
MA ALL	19.5755	5.98597	47.9135	0.124933
MA-3	13.9107	6.31506	47.0428	0.134241

(参考) 本試験の雄の NOAEL は当該所見の発生等に基づき 10 ppm であった。

表 2-1 に示した当該所見の中等度以上の発生頻度から、有害性が発現する閾値は 10~50 ppm の間にあることが予想された。MA-3 による BMDL₁₀ は NOAEL よりやや低めの 6.31506 であったが桁違いの数字を算出したわけではなく、MA-3 による BMDL と BMDU の比も一桁以内に収まっていることから、信頼性の幅も大きく過ぎず概ね妥当な計算結果を示したものであると考えられた。

② 関心の病理所見において続発性の病変を伴うケースの取扱い等

(事例 3) 3-クロロプロパン-1,2-ジオール (3-MCPD) のラット 2 年間発がん性試験においてみられた腎尿細管過形成 (Cho et al., 2008)

食品に含まれる 3-MCPD 等のクロロプロパノール類は、主に調味料等の原材料に使用される酸加水分解植物性蛋白や、一部のチーズ、穀物加工品、肉や魚の加工品等様々な食品からも検出されるとの報告がある。また、3-MCPD が脂肪酸とエステル結合した 3-MCPD 脂肪酸エステルが精製食用油から検出されたという報告もある。

3-MCPD については、JECFA (2016) にて評価され、ラットを用いた 2 年間発がん性試験において認められた腎尿細管過形成をエンドポイントとし、Cho ら (2008) により報告された当該所見の発生頻度から求めた最小 BMDL₁₀ に基づき、3-MCPD 及び 3-MCPD エステルの PMTDI 4 mg/kg bw を設定した (<https://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/chemical.aspx?chemID=698>)。

Cho ら (2008) により報告されたラット 2 年間発がん性試験 (飲水投与) においてみられた腎病変 (雄) の発生頻度は以下の通りである。

表 3-1: 3-MCPD のラット 2 年間発がん性試験(飲水投与)においてみられた腎病変(雄)
(Cho et al., 2008; JECFA, 2016)

	用量 (mg/L)				腫瘍性病変の historical data ^a
	0	25	100	400	
検索動物数	50	50	50	50	1531
慢性進行性腎症	15	27*	39*	41*	-
尿細管過形成	1	11*	21*	36*	-
腎細胞腺腫	0	0	1	4	1.43-4.00
腎細胞がん	0	0	0	5*	1.67-4.00
腎細胞腺腫 またはがん	0	0	1	7*	-

*: $p < 0.05$ vs. controls (poly-3 and Fisher exact pair-wise test)

^a: 無処置 SD ラットにおける腫瘍発生頻度の幅(Giknis and Clifford, 2001) : 同一の動物供給会社におけるデータ

表 3-1 に示した通り、3-MCPD は最高用量群において腎細胞腺腫の増加傾向及び腎細胞がんの統計学的に有意な増加を誘発した。非腫瘍性病変については、慢性進行性腎症及び尿細管過形成が、全ての投与群においてみられ、発生頻度は用量依存的に増加していた。尿細管過形成が異型性を有するかは原著および JECFA (2018) には記載がないため、過形成が前がん病変であるかの判断ができないが、原著においては、腫瘍性病変の発生は、慢性進行性腎症や過形成の二次的影響としている。過形成と腫瘍性病変は、病理学的には腫瘍性病変の方の重症度が高く、腫瘍性病変を毒性評価におけるエンドポイントとして採用することが多いが、本事例では、腫瘍発生より低い用量から過形成が認められていること、本試験でみられた非腫瘍性病変が腫瘍性病変を誘発したという機序を踏まえると、JECFA における評価の通り、尿細管過形成をエンドポイントとして採用することが妥当であると考えられた。

このように、重症度が高い続発性病変(例えば腫瘍性病変)の発生が認められた場合であっても、着目した病変の方が毒性的意義が高いと判断された場合は、当該の非腫瘍性病変の発生頻度に BMD 法を適用すべきである。

尿細管過形成の発生頻度について、MA-3 により BMDL₁₀ を求めた。結果を以下に示す。

表 3-2. 本試験における尿細管過形成の発生頻度 (MA-3 入力データ)

用量(dose)は、単位を mg/kg bw/day とした場合の数値 (JECFA モノグラフより)とした。

X	dose	positive	sample	negative
1	0.00	1	50	49
2	1.97	11	50	39
3	8.27	21	50	29
4	29.50	36	50	14

表 3-3. MA-3 による計算結果(単位は mg/kg bw/day)

Model	BMD	BMDL	BMDU	BMDL/BMDU
logistic	5.62347	4.63258	6.97932	0.663758
log-logistic	0.830881	0.256395	1.94611	0.131747
probit	5.35563	4.41937	6.59666	0.66994
log-probit	0.916884	0.297901	1.83827	0.162055
gamma	0.526373	0.0933645	1.58374	0.0589521
quantal-linear	2.13762	1.68645	2.83457	0.594959
Weibull	0.630904	0.161499	1.58596	0.10183
multistage2	1.28459	0.906579	1.98156	0.457508
multistage3	0.825411	0.517556	1.89451	0.273187
MA ALL	0.810931	0.306016	2.21597	0.138096
MA-3	0.654083	0.235713	2.29365	0.102767

(参考) JECFA の評価^aにおける本試験の LOAEL は 25 mg/L (1.97 mg/kg bw/day)、BMDs (version 2.6.1) による BMDL₁₀ は 0.87 mg/kg/day (restricted log-logistic model)、モデル平均化 (Wheeler and Bailer, 2008) による BMDL₁₀ は 0.89 mg/kg bw/day であった (JECFA は評価値として最小値を示した BMDL₁₀ 0.87 mg/kg/day を採用)。また、EFSA による本物質の再評価(2017)^bでは、同エンドポイントの発生頻度に基づくモデル平均化により、BMDL₁₀ 0.20 mg/kg bw/day を導出している。

^a: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/276868/9789241660747-eng.pdf?ua=1#page=673>>

^b: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2018.5083>

本試験については、NOAEL は 25 mg/L (1.97 mg/kg bw/day) 未満であると考えられるため、MA-3 により導出された BMDL₁₀ 0.235713 mg/kg bw/day はその範囲に入っていた。また、MA-3 と同様の頻度論的手法を用いた平均化手法を用いている EFSA による BMDL₁₀ とほぼ同レベルの値として計算された。JECFA による評価では、モデ

ル化において restriction を採用したものであったり、平均化手法も Bayesian 判定基準使った重み付けを行うなど算出手法が異なるため MA-3 や EFSA の計算値より 4 倍程度高い値が算出されることになったと考えられる。

③ 関心の病理所見において、前段階の所見が認められるケースの取扱い等

(事例 4) 2-メルカプトベンゾチアゾール (2-MBT) による腎盂・移行上皮乳頭腫及びがん

ゴム製品の増進剤として使用される 2-MBT の発がん性について、発がんユニットリスク及びスロープファクターを導出していた論文 (Ginsberg et al., 2011) において、腎盂にみられた腫瘍性病変の発生頻度に対し BMD 法を適用していた。本論文では、ヒトの疫学調査において膀胱腫瘍の発生が報告されていること等を根拠に、2-MBT のラット発がん性試験 (NTP, 1988) においてみられた腎盂・移行上皮の乳頭腫及びがんを、ヒト健康影響評価のための妥当なエンドポイントとした。

Ginsberg らは、発がん性を評価するために移行上皮細胞の乳頭腫とがんを合算することを推奨した McConnell ら (1986) の報告に基づき、NTP 試験で認められた腎盂・移行上皮の乳頭腫及びがんの発生頻度データ (下表) を合算して BMD 法を適用した。

表 4: 2-MBT の NTP 試験 (1988) で雄ラットに認められた腎盂・移行上皮細胞由来増殖病変の発生頻度

Dose/No. of animal examined	0 mg/kg (50)	375 mg/kg (50)	750 mg/kg (49)
Epithelial hyperplasia	0	4	1
Transitional cell papilloma	0	1	1
Transitional cell carcinoma	0	1	0

この例では、移行上皮の乳頭腫とがんの発生頻度を合算していたが、移行上皮乳頭腫はがんの前段階の所見であることから、由来細胞を同じくする良性及び悪性腫瘍の発生頻度の合算は問題ないと考えた。一方、適用した発生頻度データについては、合算したとき対照群 0/50、低用量群 2/50、高用量群 1/50 となり、用量相関性が認められない。また、低用量群でみられた乳頭腫及びがんは、同一個体で認められたのか、別個体で認められたのかは個別データに遡らなければわからない。したがって、この例については、データの合算に関する考え方は妥当であったが、用量相関性とデータの由来に関する信頼性に関しては、BMD 法適用にはふさわしくないと考えた。また、本事例は、BMD 法

を適用する前に、発生状況（用量依存性等）を踏まえた腎盂・移行上皮細胞由来増殖病変の毒性学的意義を十分議論すべき事例であると考えられた。

（事例5）オクラトキシンAの腎発がん（前がん病変と腫瘍性病変）

オクラトキシンA (OTA)は、*A. ochraceus*、*P. verrucosum* 等の数種の菌によって主に貯蔵食物で産生されるかび毒で、穀類、コーヒー、ココア、ビール、ワイン等様々な食品でOTAによる食品汚染が報告されている。OTAについては、ラットを用いた2年間発がん性試験（強制経口投与）において、腎細胞腺腫及びがんの発生増加が認められている（NTP, 1989: https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/lt_rpts/tr358.pdf）。本物質は、2014年に食品安全委員会にて評価されており*、DNAに間接的に作用する非遺伝毒性発がん物質であり、TDIを設定することが可能であると判断され、前述のラットを用いた発がん性試験における発がん性NOAEL 21 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重（週5回投与、15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日に相当）を根拠にTDI 15 ng/kg 体重/日（不確実係数1000：種差10、個体差10、発がん性10）を求めた。OTAによる腎発がん性は、雌より雄の発がん感受性が高かった。

(*<http://www.fsc.go.jp/fsciis/evaluationDocument/show/kya200903190ks>)

NTPによるラット発がん性試験で認められた腎臓における病理組織学的所見とその発生頻度（雄動物のみ）は下表5-1及び5-2のとおりである。

表5-1:雄ラットの腎・尿管上皮にみられたOTAによる病理組織学的所見（NTP, 1989）

部位/所見	投与用量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)			
	0	21	70	210
検索動物数	50	51	51	50
非腫瘍性病変				
細胞質の変化 (cytoplasmic alteration) ¹	1	0	3	8
変性	0	0	50	49
過形成	1	1	16	24
カリオメガリー	0	1	51	50
細胞増殖 ²	0	0	10	26

別添

腫瘍性病変				
腎細胞腺腫（孤在性）	1	1	5	10
腎細胞腺腫（多発性）	0	0	1	0
腎細胞がん（孤在性）	0	0	12	20
腎細胞がん （両側性/多発性）	0	0	4	10
腎細胞がんの転移 （全ての部位）	0	0	4	13

1: 細胞質に好酸性顆粒をもつ腫大した尿細管上皮細胞

2: 腫大し多層化した尿細管上皮細胞に内張された嚢胞（尿細管拡張）

表 5-2：腎細胞腺腫及びがんの発生頻度に関する解析結果（NTP, 1989）

	投与用量（ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）			
	0	21	70	210
腎細胞腺腫				
発生率（全動物）	1/50 (2%)	1/51 (2%)	6/51 (2%)	10/50 (20%)
発生率（調整後）	2.6%	3.8%	19.7%	33.1%
最終解剖動物における 発生率	1/39 (3%)	1/26 (4%)	4/26 (15%)	5/23 (22%)
初回確認日	729	729	524	513
生命表解析 (life table tests)	P<0.001	P=0.669	P=0.023	P<0.001
ロジスティック回帰分析	P<0.001	P=0.669	P=0.053	P=0.004
腎細胞がん				
発生率（全動物）	0/50 (0%)	0/51 (0%)	16/51 (31%)	30/50 (60%)
発生率（調整後）	0.0%	0.0%	43.4%	77.2%
最終解剖動物における 発生率	0/39 (0%)	0/26 (0%)	7/26 (27%)	15/23 (65%)
初回確認日			507	390
生命表解析 (life table tests)	P<0.001	(b)	P<0.001	P<0.001
ロジスティック回帰分析	P<0.001	(b)	P<0.001	P<0.001

腎細胞腺腫またはがん ^(c)				
発生率 (全動物)	1/50 (2%)	1/51 (2%)	20/51 (39%)	36/50 (72%)
発生率 (調整後)	2.6%	3.8%	53.4%	87.2%
最終解剖動物における 発生率	1/39 (3%)	1/26 (4%)	10/26 (38%)	18/23 (78%)
初回確認日	729	729	507	390
生命表解析 (life table tests)	P<0.001	P=0.669	P<0.001	P<0.001
ロジスティック回帰分析	P<0.001	P=0.669	P<0.001	P<0.001

表 5-1 からわかる通り、腎尿細管上皮細胞に発生した非腫瘍性病変は、70 µg/kg 以上で明らかに発生増加していた。また、非腫瘍性病変のうち、増殖性変化（過形成及び細胞増殖）の発生頻度が、70 µg/kg 以上で用量依存的に増加していた。過形成については、NTP による報告書（1989）の当該所見に関する組織像写真の説明によると、過形成を構成する尿細管上皮細胞の形態学的特徴が、腺腫を構成する細胞に類似していたことが示されていたため、多層性であったことも考慮すると、OTA 投与群に認められた過形成構成細胞は、前がん病変であったと言えるのではないかと考えられる。これらの増殖性変化（特に過形成）は、腫瘍形成につながる発がん過程の初期変化であると考えられるため、その発生頻度に BMD 法を適用するという考え方もできるのではないかと考えられる。また、本事例では、過形成も腫瘍性病変も 70 µg/kg 以上で明らかに発生増加しているが、もし前がん病変であることが確認できた過形成がより低用量（本事例の場合、21µg/kg）以上から対照群に比し発生増加し、用量相関性が認められた場合は、腫瘍性病変より前がん病変である過形成の発生頻度に BMD 法を適用することも一案であると考えられる。ただし、本事例の過形成については、対照群及び低用量群にも 1 例ずつ発生しているが、一般的に、発生増加しているのが単純な過形成か前がん病変としての過形成かを判別できない場合は、発がん性に関する評価値を求めるための過形成の発生頻度に対する BMD 法適用には留意したほうがよい。また、病理学者は、発がん標的細胞由来の過形成を評価する場合、異形成の有無を明らかにし、区別して発生頻度等のデータを提供することが望ましい。

OTA により誘発された腫瘍性病変（腎細胞腺腫及びがん）については、発生率（全動物）を比較すると、腺腫よりがんの発生率が高く、用量の増加と共に発生頻度及び 1 個体あたりの腫瘍発生数ならびに悪性度が増加していた。腎細胞腺腫とがんの各発生率を比較すると、腺腫のみが認められた動物数は、70 µg/kg 以上の群で各々 4 例、6 例であると考えられ、腎細胞腺腫またはがんの発生率は、がんの発生率を反映していた。以上のことから、OTA は 70 µg/kg 以上で明らかに腎発がん性を有し、誘発された腫瘍は用量の増加及び暴露期間の長期化とともに悪性度を増す性質を持つことがわかる。したがって、OTA の発がん性について評価する場合は、良性以上の腫瘍が誘発されたことを重視し、腎細胞腺

別添

腫またはがんの発生増加をエンドポイントとして、それらの発生率(全動物)に対して BMD 法を適用することが望ましい。ただし、本例のように、対照群及び低用量群で腫瘍性病変が発生していた場合は、試験を実施した試験機関の同系統（本例の場合は F344/N）のラットの無処置動物における背景データ（historical control data）を参照し、その毒性学意義を確認する必要がある。本例に関しては、NTP (1989)の Table A4a に、OTA の発がん性試験実施機関におけるキシレンやベンゼン等の計 5 物質に関する発がん性試験にて、雄性 F344/N ラットの無処置対照群に認められた腎細胞腺腫またはがんの発生頻度（合計 248 匹中 3 匹（1.2%）：最低 0/50、最高 1/48）が示されており、OTA の対照群及び低用量群で認められた各 1 例の腎細胞腺腫は、やや発生率が高いものの背景データの範囲内であると考えられた。したがって、発生頻度を見れば明白ではあるが、OTA による発がん性は 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上で毒性学的意義ありと言える。

腎細胞腺腫またはがんの発生頻度について、MA-3 により BMDL_{10} を求めた。結果を以下に示す。

表 5-3. 本試験における腎細胞腺腫またはがんの発生頻度（MA-3 入力データ）

X	dose	positive	sample	negative
1	0	1	50	49
2	21	1	51	50
3	70	20	51	31
4	210	36	50	14

表 5-4. MA-3 による計算結果

Model	BMD	BMDL	BMDU	BMDL/BMDU
logistic	52.3684	44.4144	65.6059	0.676988
log-logistic	31.8916	21.591	48.2039	0.447909
probit	49.175	40.8431	59.7983	0.683015
log-probit	33.2462	23.3394	50.1056	0.465805
gamma	30.975	18.7153	50.5567	0.370184
quantal-linear	18.5708	14.6267	24.2187	0.603941
Weibull	28.656	17.5192	47.192	0.371232
multistage2	24.3699	15.4302	45.0042	0.342862
multistage3	38.9048	31.119	47.6573	0.652974
MA ALL	34.9005	20.5532	46.5481	0.441548
MA-3	36.2829	19.919	47.0069	0.423746

(参考) 食品安全委員会の評価における本試験の NOAEL は 21 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重とされた。

別添

表 5-4 に示した通り、MA-3 による BMDL₁₀ は 19.9 mg/kg 体重となり、NOAEL とほぼ同値であった。また、この MA-3 による BMDL₁₀ は、OTA による発がん性は 70 mg/kg 以上で毒性学的意義ありと判断できることから、本物質の評価値導出の基点とするには妥当な値であると考えられた。

(3) 複数の試験で得られた同一病理所見の発生頻度の合算について

(事例 6) キサンタンガム (Xanthan gum):

・ JECFA にて評価 (2016)

<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/258934/9789241660730-eng.pdf#page=277>

・ 食品添加物 (乳化剤、発泡剤、安定剤または増粘剤)

・ 新生児ブタ (生後 2 日) 雌雄各 6 頭/群に代用乳に添加した本物質を 20 日間反復経口投与した 2 つの試験について、同じ試験機関において、試験①終了後 2 か月以内に同一のプロトコールで実施したから等の理由で 2 試験の結果を総合的に評価し、NOAEL を 750 mg/kg bw/day と判断した。(JECFA にて BMD 法を適用した事例ではない)

2 つの試験の概要は以下の通り :

試験①

投与用量 : 0 (対照群)、375、3750 mg/kg bw/day

雌雄の高用量群において有意な代用乳への耐性 (下痢、摂餌量減少、平均体重の低値等)、大腸粘膜上皮の杯細胞の肥大/過形成、直腸粘膜上皮の炎症、大腸内の異物 foreign material、小腸粘膜上皮の萎縮が認められたことに基づき、NOAEL は 375 mg/kg bw/day と判断された。

試験②

投与用量 : 0 (対照群)、750 mg/kg bw/day

投与群において、雌雄の投与群において糞の変色及び軟便等が認められた。また、試験①において高用量群の小腸及び大腸に認められた変化 (杯細胞の肥大・過形成等) が軽微に認められた。しかし、本試験でみられたこれらの軽微な変化は、最終的に適応性で毒性学的に意義のない変化であると判断された。

試験①及び②で認められた大腸における主な病理所見とその発生頻度は下表の通りである。なお、下表は JECFA のモノグラフに記載があった各試験の病理所見表を 1 つにまとめた。

表 6-1：生後 2 日から 20 日間 Xanthan gum を投与された子ブタの大腸に認められた主な病理所見

Dose (mg/kg bw/day)		0 ^a		375 ^a		750 ^b		3750 ^a	
Sex		M	F	M	F	M	F	M	F
No. of animal examined		6	6	6	6	6	6	6	6
Hypertrophy/ hyperplasia, Goblet cell, caecum	total	0	0	0	2	0	3	3	4
	minimal	0	0	0	2	0	3	1	1
	mild	0	0	0	0	ND	ND	2	2
	moderate	0	0	0	0	ND	ND	0	1
Dilatation, gland/lumen, caecum	total	0	0	0	0	3	2	4	1
	minimal	0	0	0	0	3	2	2	1
	mild	0	0	0	0	ND	ND	2	0
Foreign material, caecum	total	0	0	0	0	3	2	3	2
	minimal	0	0	0	0	3	2	1	2
	mild	0	0	0	0	ND	ND	1	0
	moderate	0	0	0	0	ND	ND	1	0
Hypertrophy/ hyperplasia, Goblet cell, colon	total	0	0	0	2	2	2	6	5
	minimal	0	0	0	1	2	2	1	1
	mild	0	0	0	1	ND	ND	3	1
	moderate	0	0	0	0	ND	ND	2	3

a: 試験①の結果、b: 試験②の結果（試験②における各所見の対照群での発生頻度はいずれも 0 であった）、c: 軽度と中等度の発生頻度を合算したときの発生頻度（本検討による合算）

ND: not detected（発生頻度としては 0 とする）

本評価では、2 本の試験結果から総合的に判断して NOAEL が判定されたが、各病変の程度の判定が同じ条件で行われたか、試験報告書等の情報が無い限り確認できない点が課題となる。病変の程度の判定は、程度付けの条件を定めたとしても、各グレードの境界をどう判断するかは病理学者によって異なるため、担当者によって結果が異なる場合がある。2 試験の病理組織学的検索結果を合わせる場合は、2 試験分の標本を同じ病理学者が同時に検査し一定の条件下で程度の判定する必要があり、そのよう標本を評価したことがわかる情報を得ることが望ましい。JECFA の評価では、低・中用量群の大腸にみられた軽微（minimal）から軽度（mild）な変化は適応性であると判断されていることから、この事例に病変の程度を考慮して BMD 法を適用する場合は、中等度（moderate）の病変を毒性学的意義ありとして、その発生頻度に基づき計算することが適切と考えられた。本検討では、

別添

病変の程度付けが 2 試験間で同じであり 2 試験の結果を合わせることが妥当であると仮定し、最高用量で中等度の発生頻度が比較的高かった、結腸にみられた杯細胞の肥大/過形成の発生頻度に BMD 法 (MA-3) を適用した。また、同病変の発生総数に対しても同様に計算してみた。その結果を以下に示す。

表 6-2. 本試験における結腸にみられた杯細胞の肥大/過形成の発生頻度 (雄) : 中等度の同所見に関する発生頻度に適用 (MA-3 入力データ)

X	dose	positive	sample	negative
1	0	0	6	6
2	375	0	6	6
3	750	0	6	6
4	3750	2	6	4

表 6-3. MA-3 による計算結果 (雄) : 中等度の同所見に関する発生頻度に適用した場合

Model	BMD	BMDL	BMDU	BMDL/BMDU
logistic	3511.23	3290.36	3652.79	0.90078
log-logistic	942.27	153.938	9.74964e+20	1.57891e-19
probit	3373.24	-6.05019	3601.51	-0.0016799
log-probit	333.296	0.0059011	27103.2	2.17727e-07
gamma	2982.07	2272.54	98820.5	0.0229966
quantal-linear	1333.78	-2.46073e+10	2880.27	-8.54339e+06
Weibull	1312.44	129.841	3001.24	0.0432623
multistage2	2280.31	NA	NA	NA
multistage3	2794	NA	NA	NA
MA ALL	3237.08	1037.02	3576.21	0.289978
MA-3	3348.47	1344.35	3609.95	0.372402

表 6-4. 本試験における結腸にみられた杯細胞の肥大/過形成の発生頻度 (雄) : 同所見に関する総発生頻度に適用 (MA-3 入力データ)

X	dose	positive	sample	negative
1	0	0	6	6
2	375	0	6	6
3	750	2	6	4
4	3750	6	6	0

表 6-5. MA-3 による計算結果 (雄) : 同所見に関する総発生頻度に適用した場合

Model	BMD	BMDL	BMDU	BMDL/BMDU
logistic	710.565	673.777	2027.03	0.332396
log-logistic	699.56	655.383	1500.37	0.436815
probit	695.369	640.114	1772.62	0.361113
log-probit	669.926	596.271	1387.64	0.429703
gamma	200.708	11.2154	686.252	0.016343
quantal-linear	174.91	94.6717	343.554	0.275566
Weibull	169.763	20.0013	663.299	0.0301543
multistage2	528.31	442.603	1214.7	0.364373
multistage3	27.1747	NA	NA	NA
MA ALL	680.221	324.996	1525.99	0.212974
MA-3	698.665	305.388	1603.49	0.190452

(参考)

- ・雌の同所見についても、中等度のみの発生頻度 (0/6, 0/6, 0/6, 3/6)及び総発生頻度 (0/6, 2/6, 2/6, 5/6)各々に MA-3 を適用した結果、BMDL₁₀ は各々994.378, 23.4619であった。
- ・JECFA においては、試験①, ②の NOAEL は、試験①において最高用量にみられた代用乳への耐性に関する所見に基づき、750 mg/kg bw/day と判断された。

病変の程度を考慮せず、総発生頻度について MA-3 による BMDL₁₀ を求めた場合、最低用量より低い値 305.388 となった。この結果は、中等度以上の病変に毒性学的意義があるしているにもかかわらず、中等度以上の病変が認められない低用量や中用量よりも低い値を算出していることから、その数字の妥当性に疑問が残る。試験の用量設定の公比が一定になっていないことが妥当な計算値を算出できない可能性が考えられる。一方、病変の程度を考慮した中等度の病変が認められた動物数も用いた場合は、MA-3 による BMDL₁₀ は 1344.35 となり、毒性学的妥当性に基づいた無毒性量相当量として適切な値であるように考えられた。雌の中等度病変の発生頻度に適用した場合についても、同様であると考えられた。以上より、本事例は、病変の程度を考慮した MA-3 による BMDL₁₀ を評価値導出の基点にすることが適した事例であった。ただし、本事例は、一群当たりの動物数が少なく、最高用量のみに中等度の病変が認められていたことに留意が必要である。

(事例7) テフルベンズロン (農薬)

JECFA (2016), JMPR (2016)によると、両評価において、テフルベンズロンのマウスを用いた 78 週間発がん性試験 (Suter et al., 1987)において雄マウスに認められた肝細胞肥大 (びまん性+小葉中心性) の発生頻度に、BMD 法を適用した。びまん性及び小葉中

別添

心性各々のタイプの肝細胞肥大の発生頻度は、非公開データであるため詳細を確認できない。JECFA (2016)によると、両タイプの肝細胞肥大の発生頻度の合算値は、無処置群、投与群 (15, 75, 375 mg/kg feed; 2.1, 10.5, 53.6 mg/kg bw/day) 各々において、以下の通りであった：12/60, 29/60, 46/60, 56/60。また、雄マウスにおいては、肝細胞肥大の他に、肝細胞の単細胞壊死(13/60, 26/60, 42/60, 56/60)、食細胞増殖巣(17/60, 21/60, 43/60, 54/60)、リポフスチン沈着 (8/60, 11/60, 20/60, 27/60)等の発生が用量の増加とともに増加していた。さらに、血清生化学的検査において、雄の最高用量群では、AST (Aspartate transaminase) , Alanine transaminase (ALT) の高値 (52, 78 週目) 及び Alkaline Phosphatase (ALP) の高値 (52 週目) が認められていた。

以上の所見より、雄マウスにみられたびまん性または小葉中心性肝細胞肥大は、適応反応ではなく肝障害に関連した変化であると考えられた。また、各タイプの発生頻度を確認することはできないが、おそらく小葉中心性が用量の増加と共に高度化し、びまん性になった一連の変化であると考えられたため、JECFA 及び JMPR の評価において、小葉中心性とびまん性肝細胞肥大の発生頻度を合算して BMD 法を適用したことは妥当であると考えられた。このように、2つの所見の発生頻度を合算して BMD 法を適用する場合は、各々の所見の毒性学的意義や成り立ちを考えた上で、両所見の関係性を判断する必要がある。また、このような病変の程度に連続性がある肝細胞肥大の例に関しては、発生頻度とその用量相関性によっては、対照群との統計学的有意差を考慮した上で、より強い毒性影響と考えられるびまん性肝細胞肥大の発生頻度のみに着目し、BMD 法を適用することも選択肢の一つになるかもしれない。

雄マウスに認められた小葉中心性及びびまん性肝細胞肥大の発生頻度について、MA-3により BMDL₁₀を求めた。結果を以下に示す。

表 7-1. 本試験における小葉中心性及びびまん性肝細胞肥大の発生頻度 (MA-3 入力データ)

用量(dose)は、単位を mg/kg bw/day とした場合の数値 (JECFA モノグラフより)とした。

X	dose	positive	sample	negative
1	0.0	12	60	48
2	2.1	29	60	31
3	10.5	46	60	14
4	53.6	56	60	4

表 7-2. MA-3 による計算結果

別添

Model	BMD	BMDL	BMDU	BMDL/BMDU
logistic	3.37788	2.36978	4.36394	0.543036
log-logistic	0.374312	0.0965085	1.07274	0.089964
probit	4.00266	2.975	4.96607	0.599066
log-probit	0.383681	0.0913988	1.01902	0.0896927
gamma	0.0343823	0.00111176	0.405593	0.00274107
quantal-linear	1.65756	1.1915	2.21701	0.537437
Weibull	0.110643	0.0138353	0.500972	0.0276169
multistage2	0.73067	0.530657	1.06236	0.499508
multistage3	0.460361	0.27204	0.940311	0.289309
MA ALL	0.264195	0.100153	48.4111	0.00206881
MA-3	0.283565	0.036489	46.9537	0.000777127

(参考) JECFA の評価 (2016)では、低用量群にみられた非腫瘍性病変の発生を毒性学的意義ありと判断し、本試験の LOAEL を 15 mg/kg feed (2.1 mg/kg bw/day)とした。また、肝細胞肥大を最も毒性学的意義がある所見として、当該所見の発生頻度に BMD 法を適用し、BMD 0.73 mg/kg bw/day, BMDL₁₀ 0.54 mg/kg bw/day (multistage model by BMDS (バージョンは不明))を導出した。

本試験の NOAEL は、15 mg/kg feed (2.1 mg/kg bw/day)未満であると考えられるため、MA-3 により導出された BMDL₁₀0.036489 (mg/kg bw/day)はその範囲に入っているがかなり小さな値となっている。BMDL/BMDU の値は 0.0007 であり、信頼性の幅がかなり広いことから、MA-3 はかなり安全側の数字を示すこととなっている。本試験では、投与用量 0 の対照群においても肝細胞肥大をはじめ、肝臓における非腫瘍性病変の発生が一定以上認められていることを踏まえると、可能であれば背景データなどを用いて対照群での肝肥大が誘発する頻度の分散などの解析で BMDL の妥当性を検証する必要があるかもしれない。

(参考) The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) (2016). Teflubenzuron. Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food. WHO FOOD ADDITIVES SERIES: 72. 99-139.

<https://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/chemical.aspx?chemID=6308>