

4. 器具・容器包装における安全性評価に関する最近の文献

(1) 食品安全性の評価手法について

毒物動態学的 (toxicokinetic) 及び毒物動力的 (toxicodynamic) プロセス並びに化学物質のハザード評価及びそれらの応用について、現代的方法論とツールに関するレビューが EFSA から出されている (EFSA 2014b)。その概要は以下のとおりである。

1) 作用様式 (MoA) /有害性アウトカム経路 (AOP) に関する概念

ヒトに関する化学物質のハザード評価は、毒物動態学的 (toxicokinetic、TK) 及び毒物動力的 (toxicodynamic、TD) プロセスの理解を通じて、ハザード確認 (hazard identification) 及びハザード判定 (hazard characterisation) から構成される。従来は、試験動物種を用いた毒性学的研究により、特定の化学物質に関する基準点 (reference point) が決定され、この基準点から健康影響に基づいた指標値又は暴露マージンが導かれている。過去 10 年間、化学物質のトキシコキネティクス (TK) 及びトキシコダイナミクス (TD) プロセスの試験として、多くの現代的な *in vitro* 及び *in vivo* 試験及び *in silico* ツールが開発されてきた。TK 及び TD プロセス (図 2-4-1) では、生体、器官、細胞及び分子レベルといった異なる生物学的組織レベルにおける作用様式 (mode of action、MoA) /有害性影響発現経路 (adverse outcome pathway、AOP) (図 2-4-2) について研究が行われた。これらの方法論によりメカニズムから毒性を理解する方向が得られ、毒性学研究における動物使用を削減する統合的試験戦略 (ITS) という選択肢が可能になる。このような考え方は EFSA の業務において将来的に使用することが期待されている。

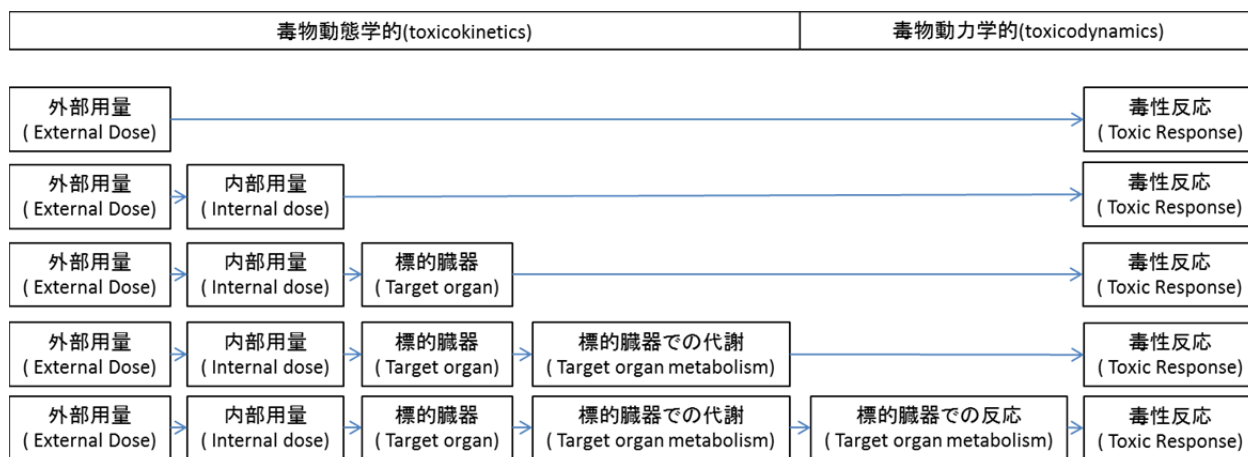


図 2-4-1 毒物動態学的 (toxicokinetic) 及び毒物動力的 (toxicodynamic) プロセスの知見レベル

(EFSA 2014b を参考に作成)

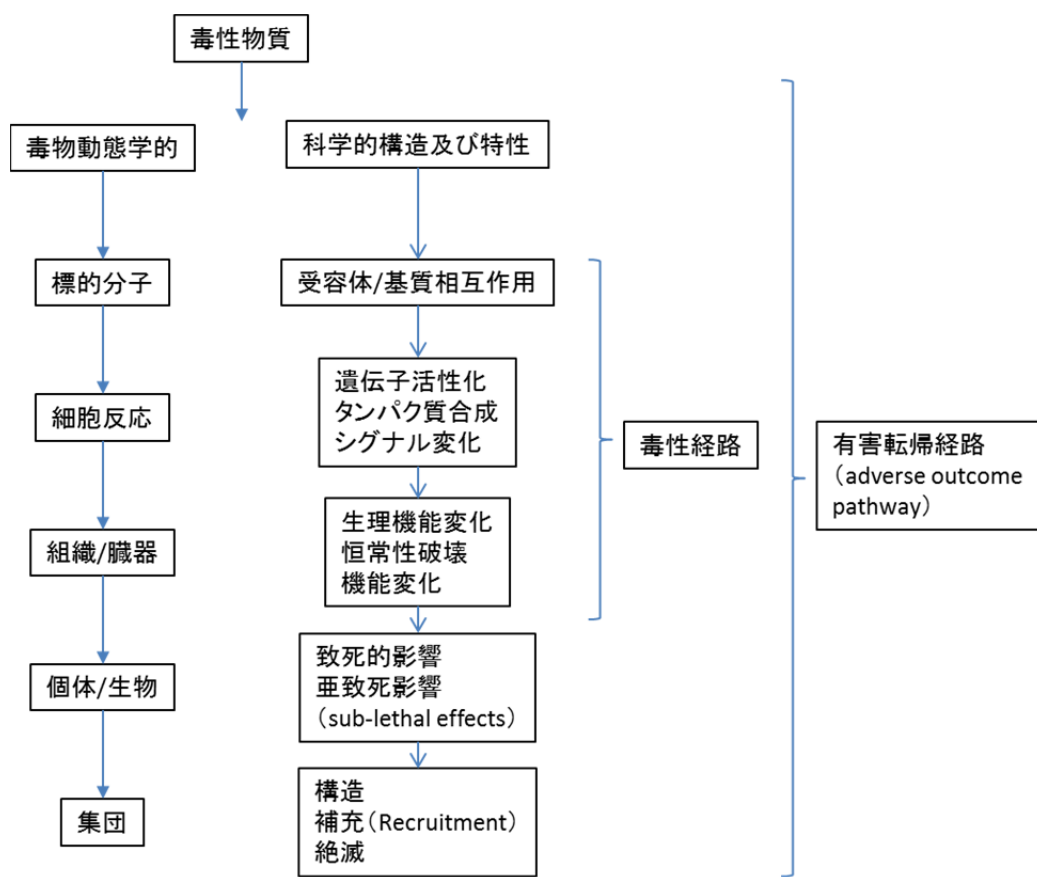


図 2-4-2 生物学的組織レベル、毒性経路及び有害性アウトカム経路

(EFSA 2014b を参考に作成)

2) 現代的方法論とツール

現在、MoA/AOP の情報は、特定の化学物質に関して利用可能ではない。そのため、リスク評価においては、試験動物を用いた用量反応性の評価における外部用量 (external dose) を、ハザード判定での定量的基準点として検討している。しかし、最近の国際的な進展においては、WHO の MoA に関する新規な応用の枠組み及び AOP に関する OECD 国際プログラムのような、MoA/AOP を解明する方向が支持されている。これについては、2 つの研究プログラム、米国の TOX-21 及び欧州の SEURAT-1 において、*in vitro* 試験のような動物試験の代替法及びその他の統合試験戦略 (ITS) が取り扱われている。化学物質をスクリーニングして動物試験を最小化し、優先付けが可能性になることが、ハイスループットスクリーニング (high throughput screening, HTS) アッセイにみられるような ITS の強みである。一方、このような手法の限界は、a) 化学物質に誘導された疾病関連経路 (chemically-induced disease-associated pathways)、b) 代謝、c) 異なる細胞型の間の相互作用、d) 組織レベルの細胞相互作用及び e) 慢性暴露に関する予測が欠落していることである。

①*in vitro* 系

ヒト細胞に基づく多くの最近の *in vitro* モデルは、化学物質の吸収、分布、代謝、排泄 (ADME) 等のヒトにおける TK プロセスを研究する上で極めて有用なツールである。OECD 試験ガイドライン 417 (OECD 2010) は主として吸収及び代謝に関係しており、*in vitro* モデルにより補足的な TK 情報を得て、実質的に *in vivo* の動物試験を削減できることが示されている。これらの *in vitro* モデルは食品安全分野に関する化学物質のハザード評価においては、まだほとんど注目されていないが、生物学的利用能やタンパク質結合のような ADME に関する重要な情報が提供され、また、ヒトにおける輸送経路 (transporters) 及び代謝経路を同定することができる。更に、これらのパラメータを用いて、*in vivo* での肝クリアランス、生理学的 (PB) モデルの構築、肝臓全体に拡大したヒトの変動性を検討することができる。これらの *in vitro* 法を一般的に適用するには、*in vitro* から *in vivo* への外挿 (*in vitro* to *in vivo* extrapolation、IVIVE) を行い、ヒトの生理及び腸管内代謝のような肝臓及び肝臓外代謝を反映し、さらに定量的 IVIVE (QIVIVE) においてヒト変動性を組み込むことが必要である。

②生理学的モデル

生理学的 (PB) モデルにより、トキシコキネティクス (TK) プロセス (PB-TK) 及び TK、TD プロセス (PB-TK-TD) のモデル化が可能である。また、PB-TK モデルは TK プロセスを取り扱うための定量的手段となるため、ハザード評価において極めて有用なツールである。TK 及び TD の次元を結びつける PB-TK-TD は、PB-TK モデルに比較すると更に複雑であるが、これらを使用することが世界的規模で規制当局によって推奨されている。世界保健機関 (WHO) と米国環境保護庁 (US EPA) は、化学物質のハザード評価及びリスク評価においてこれらの手法を応用する際の共通原則を追求するための指針を開発する必要性を強調してきた。それらを日常的に使用する条件として、化学物質に関する詳細な TK についての知見が必要であり、さらに、高レベルの専門性及び人的資源並びにモデルの検証等が必要である。その結果、PB-TK 及び PB-TK-TD は、高い階層のリスク評価 (high-tier risk assessment) において用いられるであろう。この PB-TK 及び PB-TK-TD モデルは、TK パラメータ及び毒性パラメータの決定に関する課題である ITS、IVIVE 及び QIVIVE を用いて開発することができる。これらのモデルは食品安全分野においては大部分が殺虫剤、汚染物質及び食品接触物質に適用され、種差、ヒトの変動性、バイオモニタリングプログラム、複数の化学物質に対する複合暴露及び *in vitro* から *in vivo* への外挿のようなハザード評価における重要な問題を取り扱うために極めて有用である。

③*in silico* ツール

in silico (インシリコ) ツールには、(定量的) 構造活性相関 ((Q)SARs) 及びリードアクロス (read-across) 法があり、これらはモデル、データベース及びツールを用いて化学物質の多くの毒性学的性状を予測するために開発されてきた。ハザード評価及びリスク評価においてますます使用が増加しているもう一つのツールは、TTC である。

QSAR は、ITS 及び証拠の重みづけ (Weight of Evidence、WoE) 評価において、一般的にリードアクロスのようなその他の試験によらない方法及び *in vitro* 法のような試験による方

法と組み合わせて使用される。(Q)SARs 及びリードアクロス法では、ハザード評価、特に、急性毒性、変異原性、遺伝毒性及び生体内蓄積 (bioaccumulation) に関する予測性がますます高められている。しかしながら、TK の特質 (ADME) や亜慢性毒性及び慢性毒性に関する予測性は依然として限定的であり、これらの問題に取り組むために多くの研究が行われている。種々の(Q)SAR モデル、構造アラート及び WoE 法を用いた *in vitro* 及び *in vivo* の毒性試験によるリードアクロス予測からの結果を組み合わせてこれらのツールの使用と検証を改善することにより、*in silico* 法の全体的な信頼性が向上するであろう。

④オミクス技術

・ DNA/RNA に関するトランスクリプトミクス

OMICs 技術は、DNA/RNA に関するトランスクリプトミクス、タンパク質に関するプロテオミクス及び全体的な代謝に関するメタボロミクスのレベルにおいて、MoA/AOP に関連して生化学的变化を評価する重要なツールである。これらは、ヒトと動物における用量反応モデルを示すバイオマーカーを同定し、動物種差及びヒトとの関係性を研究して、ヒトにおける変動性 (年齢差、人種差、多型性) を組み込む手段を提供している。また、OMICs 技術により、*in vitro* モデルを用いる AOP の範囲内で遺伝子の転写物、タンパク質及び代謝物のパターンを研究することが可能となり、メカニズム的な *in vitro* アッセイを用いた ITS を検証する有用な手段となり、予測モデルを提供することにより動物試験を削減することができる。

OMICs 法の弱点は、複雑な分子の分析技術、大規模なデータセットを解析するための高度に専門的な訓練及び高性能なバイオインフォマティクスツールの必要性があることである。もう一つの重要な問題点は方法論の感度に関するもので、生物学的又は毒性学的に関連性のない変化を検出する可能性にある。

OMICs 研究では、研究者が OMICs データセットを臨床化学及び組織病理学的な標準化されたエンドポイントと関係づけるためには、ほとんどの場合、既知の参照物質に限定されてきた。将来、化学物質の *in vitro* 及び *in vivo* OMIC データセットに関する大きなデータベースと MoA/AOP の知見を結びつけるようなデータベースが公表されれば、相当役に立つことになるであろう。すなわち、a) 特定の AOP に関連したバイオマーカーを同定するため及び b) 予測毒性学 (predictive toxicology) に関する新規ツールを提供するために有用である。食品安全分野における化学物質のハザード評価への応用は既に検討されており、転写プロファイリング (transcriptomic profiling) からのベンチマーク用量のモデル化、エピゲノミックメカニズム (epigenomic mechanisms) の研究、毒性バイオマーカーの同定 (プロテオミクス) 及び単一/複数化学物質に関する MoA の研究 (メタボロミクス) が対象となっている。

3) 現代的方法論とツールの応用

化学物質の優先順位付けとランク付けのために多くの方法が開発されている。US EPA では、毒性学的優先順位付け指標 (toxicological prioritisation index、ToxPi) の決定支援体制 (decision support framework) が設定され、毒性及び暴露の代替え (surrogates) について様々な情報源の証拠を用い、化学物質の順位付けを検討することが可能になっている。ToxPi の開発に関しては、単一物質暴露代理物質 (simple exposure surrogates)、階層的スクリーニングレベル暴露評価 (tiered screening-level exposure assessments) 及び集団レベルバイオモニタリングデータ (population-level biomonitoring data) 及び追加的な研究が将来的に必要である。更に、US EPA は最近 NextGenp プロジェクトにおいて、優先順位付けツールとして階層的方法を開発した。実際には、階層 1 (Tier 1) において ITS (Toxcast HTS アッセイ、*in vitro* 遺伝毒性試験、IVIVE TK モデル等々) を用いて化学物質を優先順位付けしてスクリーニングし、階層 2 (Tier 2) 及び階層 3 (Tier 3) における追加試験を検討することを目的としている。階層 2 (Tier 2) では、限定的な *in vivo* 毒性試験が用いられる。例えば、*in vivo* での転写物の研究、選択的 MoA のある化学物質の出発点 (point of departure for chemicals with a selective MoA) を確認する *in vivo* 試験及び暴露と体内用量を結びつける IVIVE TK 試験等である。階層 3 (Tier 3) は、実験動物における伝統的な毒性学的 *in vivo* 試験と同じである。

新たに発生している化学物質のリスクを同定するために、EFSA は最近、工業化学物質及び汚染物質等の化学物質の出所に関して、多くのデータソースを使用する系統的な枠組み及び環境における挙動並びに構造特性及び物理化学的性状から化学物質の潜在的毒性を予測するツールとして、例えば、QSAR モデル及び PB-TK モデルのようなソフトウェアを開発した。

4) 将来の業務及び研究に関する勧告及び推奨

2013 年に化学物質のリスク評価に取り組んでいる EFSA パネル及び職員並びに国際機関のその他の専門家 (ECHA、OECD、WHO 等々) との全体協議の結果として、以下のような勧告が提示された。

- ・ 現代的な方法及びツールについて、ヒト健康、動物健康及び環境リスク評価に関する専門用語と定義の調和の必要性
- ・ 動物健康及び環境リスク評価において、リスク評価における MoA の使用に関するガイダンス文書、及び現代的な方法論及びツールの使用
- ・ 複数の化学物質及びストレッサー (stressors) (例えば、生物学的ハザード、物理的因子など) への複合暴露のリスク評価に対して、これらのツールの応用を探索すること

TK プロセスに関する勧告

- ・ 化学物質のヒト TK データが欠如していることが重要なデータギャップである。
- ・ TK プロセスにおける動物種差とヒトの変動性を十分に特性づけるための TK データが必要。これにより、PB モデルを用いて、暴露、体内用量及び毒性を結びつける根拠が提供できる。

- ・複数の化学物質に対する暴露における TK 基準に基づいた評価グループの設定に科学的根拠を与えることになるであろう。

5) その他の推奨

- ・ヒトにおける吸収、分布、代謝（消化管、肝臓）及び排泄パターンを測定して TK データを作成する *in vitro* 法の改良
- ・ハザード評価のために、暴露、毒物動態学情報及び毒性データを統合する特定の事例研究を用いた生理学的モデルの開発
化学物質のリスク評価における PB モデルの使用に関するガイダンスの開発
- ・物理化学的、生理学的、毒性学的モデルを構築するため、重要なパラメータを提供するデータベース及びそのようなデータを解析、統合するための生物情報学的ツール (bioinformatic tools) /アルゴリズムの開発

化学リスク評価における *in silico* ツールの応用に関する推奨

- ・QSAR 使用のために系統的かつ調和された方法
- ・TTC アプローチの精緻化とともに、特に、QSAR、物理化学的性状及び毒性学的データを用いたリードアクロス法の更なる開発

OMICs 技術に関する推奨

- ・ヒトのハザード評価における使用のために、許容基準に関する詳細なガイダンスとともに
- ・OMICs 技術の検証と標準化
- ・食品及び飼料分野に関連したヒトのハザード評価における OMICs の使用の探索
その探索におけるベンチマーク (benchmark) 用量モデル、*in vitro* データの考慮、暴露と作用のバイオマーカーの使用
- ・動物健康及び生態学的リスク評価並びに栄養学のようなその他の分野への応用

(EFSA 2014b)

(2) 食品接触材料等における未知物質の TTC によるリスク評価手法

1) 同定されていない複合物質への TTC 適用

Rennen ら (2011) は、化学複合食品マトリックス (CCFM、chemically complex food matrices) の安全性評価への TTC の概念の応用について報告している。CCFM には高い割合で未知化学物質が含まれており、クロマトグラフィーによる化学分析の結果は「ピークの森」となる。この混合物を同定し、定量すること及び検出されたピークの全てについて安全性評価を実施することは、大部分が未知物質であることから非現実的である。そこで、時間、動物及び原資を節約するための实际的で効果的なプロトコルを開発する有望な手段として、Kroes ら (2004) 及び Munro ら (2008) が開発した TTC のディシジョンツリーを CCFM の安全性評価に応用し、構造未知の物質を取り扱うための段階的アプローチを提案した。

TTC の概念は固有の構造が判っている物質でのみ発達してきたが、本研究では CCFM の安全性評価への TTC の概念の応用を可能にするため、幾つかの段階を除外して枠組みを設定した (図 2-4-3)。

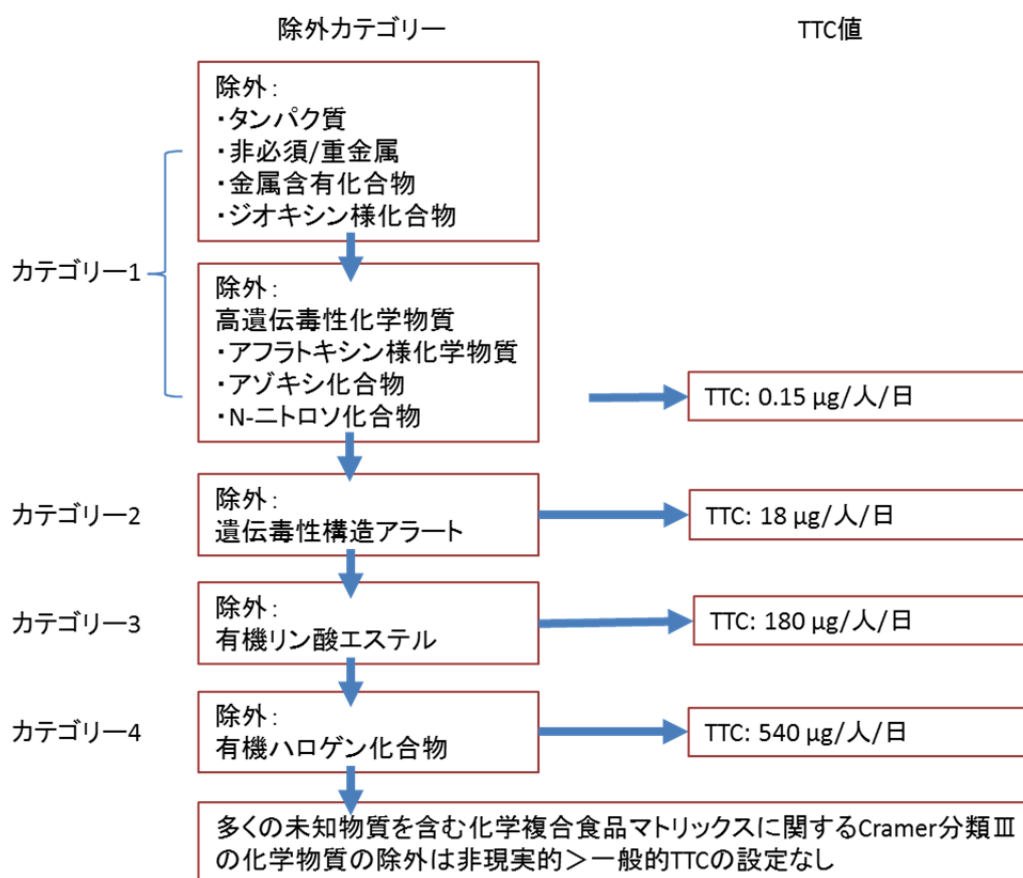


図 2-4-3 TTC を CCFM に適用するために作成した除外スキーム

(Rennenn et al. 2011 の Fig.3 を参考に作成)

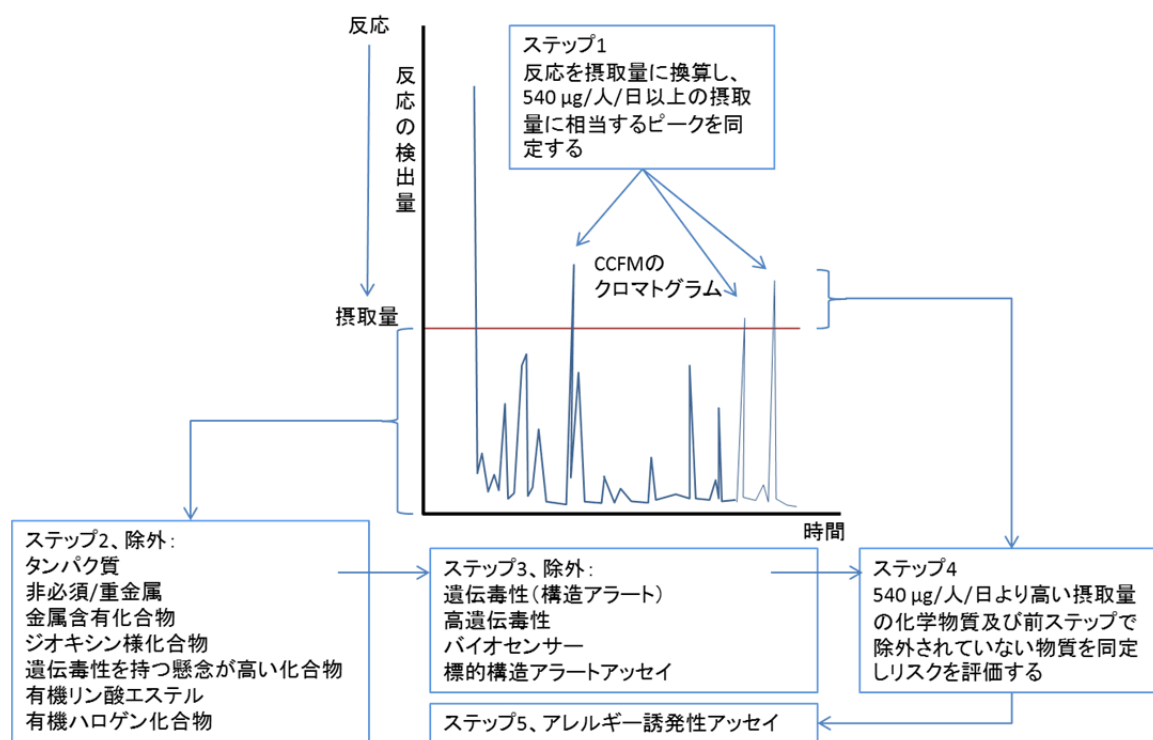


図 2-4-4 CCFM の安全性評価における TTC 適用のフレームワーク

(Rennenn et al. 2011 を参考に作成)

予備的な解析作業では、大まかに 540 µg/人/日の閾値が、複雑な化学複合食品、食品接触物質からの移行物質及び化粧品の評価に実践的であることが示された。その他の可能性として、新原料、新製造プロセス、新食品、新成分、添加物、香料、遺伝子組み換え体、予想外のピーク等の評価に応用される。著者らは、多くの枠組みの応用には新規の分析手段、評価方法、さらに好ましくは CCFM 中の低濃度の遺伝毒性物質の検出のために高感度かつ特異性の高い高度な *in vitro* の遺伝毒性試験法の開発が求められるとしている。

(Rennenn et al. 2011)

2) 同定されていない新規物質への TTC 適用

Koster ら (2011) は、食品分析において検出された未知物質 (unknown substances, not previously observed) に対する TTC の概念の適用可能性についての検討を報告している。品質管理においては、食品中に従来認められていなかった未知物質が、頻繁に検出されている。多くの場合、これら「新規」物質のリスクを評価するためには、化学分析を行って物質を同定することが必要となる。この同定には相当の時間とコストを要し、場合によっては困難を伴う。さらに、その物質の毒性情報が得られない場合が多い。したがって、それら物質のリスク評価を遅滞なく行うために、未同定物質が有する潜在的毒性を評価する実用的なツールの開発が必要である。

そこで、「食品中に検出された予期せぬピークへの TTC の概念の適用に関する ILSI ユーロッパ専門家グループ」が設置され、TTC の概念を適用して食品中に従来検出されていなかった未知物質のリスク評価をより実践的に実施するための検討が行われた。

段階的 TTC の概念では物質の構造に関する知見が必要であるが、未知物質ピークの構造同定を必要とする点は、そのピークに対し TTC の概念を適用すること、ひいては安全性評価に対する大きな障害となる。安全性評価が求められる状況の事例として次のようなシナリオが考えられ、これらの未知ピークに健康上の懸念があるかどうかを応えることを趣旨とした。

- (1) 品質管理試験室で行ったある食品の定常的モニタリングで、以前のその食品の分析では認められなかった未知ピークが検出された。今回のサンプルは、以前と調達元や製造条件には何ら変更はなかった。
- (2) 新規加工技術（例えば、新規加熱プロセス）の検証で、一連の未知ピークが痕跡量で検出されたが、これらは従来のプロセスで加工した食品には存在していなかった。
- (3) ある製造業者は、新規添加剤を含有する新規食品接触材料を使用する予定である。添加物ではない未知ピークが、食品中に低レベルで認められた。
- (4) 認可食品添加物の製造業者が、製造工程をわずかに変更した。既存の添加物と新製品を比較すると、新たな未知ピークの出現など仕様書に記載されていないいくつかのマイナーな相違があった。

本論文では、食品材料の供給源、分析技術に関する情報、未知物質が含まれている食品材料の消費量及び未知物質の定量的な情報に関する専門家の判断を基に、TTC を用いて消費者の安全性を評価する段階的アプローチが導入された（図 2-4-5）。ここでは、構造が全く不明かごく一部しか確認されていない未知物質をケースバイケースで評価できるような段階的アプローチを提案している。この段階的アプローチに従えば、食品中の未知物質に対して TTC 閾値 90 $\mu\text{g}/\text{日}$ を適用することができるケースがある。

このアプローチは、一般論として対象食品全体における特定の物質の存在を否定したり、対象食品全体の安全性を結論付けたりするのではなく、あるサンプルに検出された一つ又は少数の未知ピークを評価することを目的としてデザインしたものである。

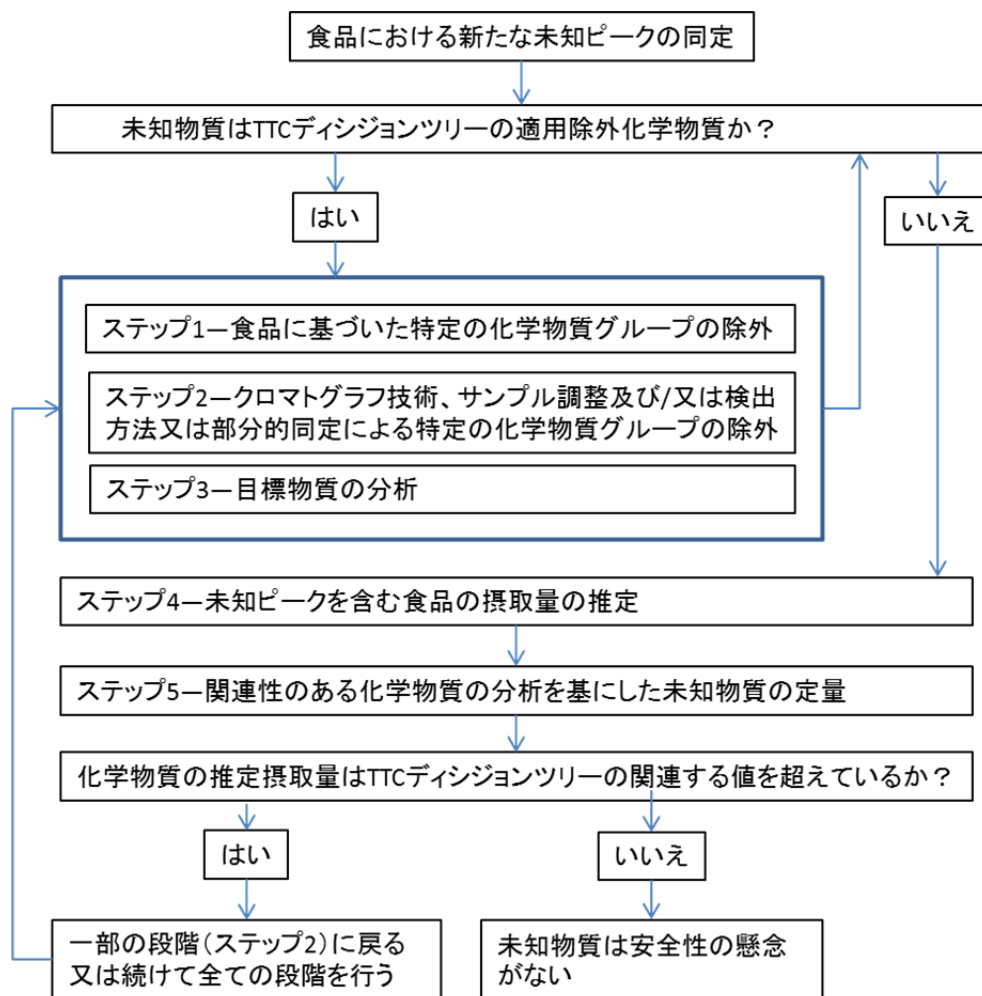


図 2-4-5 未知ピークに TTC を適用する方法に関する概要

(Koster et al. 2011 を参考に作成)

・ステップ 1：サンプルの由来に基づく除外

サンプルに関する事前情報を活用して、ある具体的な製品に具体的な「TTC 除外クラス」物質が存在する可能性があるかどうか判断できることがある。例えば、ポリプロピレン製食品接触材料が、ダイオキシン類、タンパク質、ステロイド類、アゾキシ化合物又はアフラトキシンを含有する可能性は極めて低い。

・ステップ 2：クロマトグラフィー手法、試料調製と検出方法、部分同定による除外

特定の「TTC 除外クラス」は分析化学の基礎的な知識を用い、使用した分析技術/サンプル処理手順を評価することにより除外することができる。この評価は以下の分析技術の原則に基づいている。

- (1) 用いたクロマトグラフ手法。例えば、GC クロマトグラムのも未同定ピークは、タンパク質であることを、その物理化学的特性に基づき否定することができる。
- (2) 用いたサンプル調製技術。あるピークが肉製品の水性抽出物中に検出された場合は、ダイオキシン類であることを、その水への溶解特性に基づき否定することができる。

- (3) 用いた検出法。例えば、蛍光検出器で検出されたピークは、ステロイドは蛍光を発しないことから、ステロイドではない。
- (4) 分析データから得られる部分構造。新規ピークをある物質構造グループに割り当てることはできるものの、完全な同定は不可能であるということがある。例えば、GC-MS スペクトルから、ある物質は非置換アルカン（すなわち、C 及び H のみを含む）であることが判る。この場合、「TTC 除外クラス」に属する物質、及び遺伝毒性構造アラートを有する物質であることを否定できる。

・ステップ3：的を絞った解析による除外

未知ピークがある特定の TTC 除外物質クラス（例えば N-ニトロソアミン）に属することを、サンプルの由来や試料調製に基づいて否定することができない場合には、TTC 除外クラスに特異的な分析が実行できるかどうかを考慮する。

・ステップ4：未知ピーク含有食品の摂取量に基づく推定暴露量

追加分析の優先順位を設定する際は、未知物質含有食品の消費量を考慮しなければならない。問題となっている食品の消費パターンとして可能性が高いものを評価することにより、食品中濃度が推定できれば（ステップ5）、未知ピークへの暴露に対する結論を下すことができるようになる。

特定の食品の消費量推定には、国際的なデータベースが有用である。WHO の GEMS/食品プロジェクト（地球環境監視システム）、EU の EFSA（欧州食品安全機関）のコンサイス欧州食品消費データベース（EFSA, 2008b）などが利用可能である。

ステップ4では、問題となっている未知物質の閾値を超える場合、未知物質含有食品消費グラム数を計算することもある。この計算で状況のおおまかな概要が把握でき、未確認ピークが重要な問題となりそうかどうかの指標となるであろう。食品に混入し得る物質に対し、TTC 値を超えることのない最大濃度を設定する方法は、TTC の代替法として考えられる。

・ステップ5：未同定ピークの定量とリスクの判定

未知ピークが「TTC 除外クラス」に属さないことが合理的に確信できたら、混入物質量を推定する。この際、適切な抽出・濃縮方法及び分析方法を注意深く選択しなければならない。ある未知物質に適切な分析方法を検討する際の、一般的なプロセスは次のとおりである。

- (1) 未知物質検出の前処理に、非選択的な抽出・精製手法を用いる。
- (2) 応答が非特異的で、未同定ピークの定量に適した検出系を用いるように既存の分析法を再検討する。
- (3) 抽出・精製条件を変更して最大限に回収し、未知物質の応答を最大にする。
- (4) 適切な物理化学的特性を持つ種々の標準物質を TTC から導き出した目標濃度となるようにサンプルに添加して定量する。

ステップ4、5で、推定が得られると、一日当たりの暴露量が算出でき、相応したTTC閾値と比較できるようになる。

サンプルの由来や前処理条件から遺伝毒性物質の存在を否定することができない場合、推定摂取量は閾値0.15 µg/人/日（又は短期暴露の調整係数が採用される場合はより高い値）を超えてはならない。推定摂取量がこの値よりも低い場合、その摂取量によるリスクは無視できる範囲ではあるが、さらなるアクションが必要と見なすか否かは、ケース・バイ・ケースで決定する。

未知ピークは遺伝毒性物質である（又は遺伝毒性の構造アラートを有している）ことが否定でき、分析結果からその物質は「TTC除外クラス」や有機リン又はN-メチル-カルバメートに属さないことが判れば、ある食品の推定摂取量とTTC値90 µg/人/日（又は短期暴露の調整係数を適用した補正值）との比較により、そのピークに毒性学的懸念があるかどうか判別できる。懸念があるとすれば、その時は、リスク管理上、化学物質の同定と分析法の最適化が必要であると判断することとなる。

本報告では、さらに従来検出されていなかった未知ピークに段階的なアプローチを適用した3つの事例を掲げ、各ステップを実際にどのように用いるかについて考察されている。そのうち、プラスチック製食品接触材料の事例を以下に記載する。

食品接触材料用ポリプロピレン（PP）樹脂の特性を改善するために、新規連鎖移動剤の開発が行われている。新規連鎖移動剤により、実験室規模及びパイロットプラントで樹脂が製造された。新タイプ樹脂はトルエン抽出後、ガスクロマトグラフィー/FIDによる分析が行われた。新規連鎖移動剤は、ポリマー製造プロセスで分解し、抽出物中には検出されなかった。しかし分析により、従来の食品接触樹脂の溶剤抽出物中には存在していなかった2つの新たな未知ピークが低濃度で存在していることが判明した。2つの未知のピークは15.85分及び15.90分に溶出するダブルレットであった。ピークは小さく、抽出物から同定することは困難であった。

ステップ1. サンプルの由来、及びステップ2. 用いられたクロマトグラフィー技術、サンプル調製と検出方法

新規連鎖移動剤は有機物質であり、水や酸性媒体に不溶であるが、食用油、95%エタノール及びイソオクタンに可溶である。分解して生成する可能性がある物質がいくつか考えられたが、いずれも市販物質ではなかった。

これら分解生成物の溶解特性は親化合物と同様であるものと予想された。連鎖移動剤又は考えられる分解生成物の構造から、溶媒抽出物中の未知物質はポリハロゲン化ダイオキシン、ージベンゾフラン、又はビフェニル化合物ではないと結論付けることができる。金属又は金属含有化合物もまた、プロセス化学の知識から否定されたが、これらは今回の分析法では検出されないであろう。同様に、プロセス化学と連鎖移動剤の化学的性質から、非必須金属、アゾキシ化合物及びN-ニトロソ化合物も未知物質としての可能性が否定された。アフラトキシン様化合物、ポリマー及びタンパク質は、クロマトグラフィー技術によって否定することができる。

ステップ 3. 的を絞った分析

サンプルの由来と分析技術から、未知ピークは「TTC 除外クラス」のいずれにも属していないと結論されるので、「TTC 除外クラス」に対象を絞った分析は必要ない。

ステップ 4. 未知ピーク含有食材の摂取量

一日あたりの食品摂取量を 200 グラムとする標準的な仮定 (EFSA, 2008a) に基づいてリスク評価が行われた。なお、脂肪減少係数は 5 とし (参照 ; 委員会指令 2007/19/ EC April 2, 2007)、各食品はそれぞれの材料で包装されているものとした。2 つの未知ピークに TTC 値 0.15 µg/日を適用する場合、食品中の懸念なしの最大濃度は 0.75 µg/kg に相当する。2 つの未知ピークの模擬脂肪食品への移行量が、暴露量 0.15 µg/日に対応するレベル未満であることを示すことができれば、TTC の概念に従って、2 つの未知物質の及ぼすリスクは無視できる程度であると言える。

ステップ 5. 定量

図 3 の上側のクロマトグラムは、2 つの未知ピークが検出された溶媒抽出物のクロマトグラムである。トルエン溶媒抽出物で検出されたピークは、樹脂中の存在物を示すものであり、必ずしも、食品中に移行する物質を示しているものではないことに留意すること。溶媒抽出物は、移行試験液よりも高濃度で物質を含むので、移行する可能性がある物質を簡単にチェックするために用いられた。食品への移行レベルを推定し、そのレベルから暴露量を推定するため、移行のシミュレーション試験が行われた。

本材料の使用目的は脂肪食品の包装であるため、標準的な模擬脂肪食品 (standard fatty food simulants) として 95%エタノール及びイソオクタンが移行試験に用いられた。入手した PP 樹脂のフィルムサンプルを用いて移行試験が行われた。95%エタノールによる移行試験は 40 °C 10 日間、イソオクタンによる試験は室温 48 時間の条件で行われた (指令 82/711/EEC、第Ⅲ章、表 4)。移行試験での容量と表面積の比率は、25 mL/dm² すなわち 150 mL/6 dm² であった。この場合、食品中濃度 0.75 µg/kg は模擬食品 (food simulant) 中の濃度として $1,000/150 \times 0.75 = 5$ µg/L に相当する。

検出器には、炭素量に応じて応答するユニバーサル検出器が用いられているため、定量に用いられた標準品 (テトラデカン) と検討対象成分の検出器応答は同等と仮定された。移行溶液に添加した標準品 5 µg/L のレベルは、以下の仮定の下で、暴露レベル 0.15 µg/日に相当する (委員会指令、2007/19/EC April 2, 2007) :

- ・各材料に包装された食品の摂取量 : 1 日あたり 200 g (脂肪の減少係数 5)。
- ・食品接触樹脂の表面積 : 6 dm²/kg 食品。
- ・樹脂表面に接触する模擬食品容量 : 25 mL/dm² (容量当たりの表面積を増大)
- $0.15 \mu\text{g/日} \times \text{日数} / 0.2 \text{ kg 食品} \times 1 \text{ kg} / 6 \text{ dm}^2 \times 1 \text{ dm}^2 / 25 \text{ mL 模擬食品} = 5 \mu\text{g/L 模擬食品}。$
- $(0.15 \mu\text{g/day} \times \text{day} / 0.2 \text{ kg food} \times 1 \text{ kg} / 6 \text{ dm}^2 \times 1 \text{ dm}^2 / 25 \text{ mL sim} = 5 \mu\text{g/L simulant})$

溶媒抽出物と、二つの模擬食品（イソオクタン及び95%エタノール）のクロマトグラムを重ね合わせたクロマトグラムでは、未知ピークはポリマーのトルエン抽出物にのみ検出され、移行試験でプラスチックフィルムに接触した95%エタノール及びイソオクタンには検出されていない。一方、内部標準物質は、95%エタノール及びイソオクタンの両者とも、5 µg/Lで検出可能であった。従って、二種の未知物質はプラスチック中には存在するものの、暴露レベルで0.15 µg/日以上に相当する量が模擬脂肪食品に移行することはないと結論付けることができる。従って二種の未知物質には、安全上の懸念がない可能性が高い。

トルエンは模擬食品に比べより多くの物質をPP樹脂から抽出していることに留意すべきである。また、連鎖移動剤、プロセス条件及び考えられる分解生成物に関する知見なくして、COCの否定は不可能であることに留意すべきである。

（別添1 297～300頁参照）

（Koster et al. 2011）

3) 非意図的に含まれる物質へのTTCの適用

Kosterら（2014）は、ボール紙製の食品接触材料に非意図的に含まれる物質（NIAS）に関する新しい安全性評価戦略を提案した。食品接触材料（FCM、food contact materials）中に低暴露レベルで存在するNIASの未知複合混合物に関する、科学的で実証的な安全性評価に関する戦略（complex mixture safety assessment strategy、CoMSAS）が提案された。それぞれのNIASの暴露レベルについて、毒性学的に関連性のある物質とより関連性が少ない物質を区別することにより、潜在的に健康に懸念のある物質に焦点を当てる。特に、特定の物質クラスにおいては、暴露が健康と関連性がないと見なされる特定の閾値未満であると予測される物質を除外する。これによって、低濃度の未知物質の同定、判定及び評価に関して、要求される作業量を低減できる。本報告では、3種類のボール紙試料から移行する可能性のある未知のNIASの安全性評価としてCoMSAS法を提示した。

CoMSASにおいては、TTCの概念を適用するために、ディシジョンツリーに基づいた方法（decision tree-based approach）を基礎としている（Rulis 1989、Cheeseman et al. 1999、Kroes et al. 2004）。さらに、Rennenら（2011）は、化学的に複雑な混合物の評価へのCoMSASの使用について述べている。CoMSASは、FCM（food contact materials）中に低暴露レベルで存在する未知のNIASの安全性の評価に利用することができる。またCoMSASは、FCMとして使用することが意図されたボール紙試料に適用された。

CoMSAS法では、ボール紙製のFCMから移行する可能性があるNIASの安全性を評価する手法として以下の5つのステップが示された。この戦略では、特定の物質グループの排除に基づいた段階的な方法が重要であり、Kroesら（2004）によるディシジョンツリー及びMunroら（2008）の改変を基に、目標解析手法（target analytical techniques）を用いた。また、TTCの概念に対する最近のEFSAの意見書（EFSA opinion）における結論（EFSA 2012a）を検討した。

- ・ ステップ1: 90 µg/日を超える移行物質の一般的スクリーニング
- ・ ステップ2: 毒性が高い既知物質及びTTCアプローチから除外されている物質の排除

- ・ステップ 3: 遺伝毒性を有する物質の排除
- ・ステップ 4: 安全性評価
- ・ステップ 5: アレルギー誘発性

FCM に含まれる化学物質の特異的な移行試験、総移行量及び又は/又は移行量の計算は、使用した意図的に添加した物質 (IAS, intentionally added substances) の試験基準に従って実施した。スクリーニング試験では GC-MS 及びヘッドスペース GC-MS を用いて測定し、遺伝毒性試験が行われた。

よく知られた NIAS の存在については (例えば、鉱物油、DIPN、フタル酸エステル、過フッ素化化学物質 (perfluorinated chemicals) 及び光重合開始剤 (photoinitiators))、分析に焦点を置いた試験を行うことにより評価が可能である。移行試験により暴露が測定できる場合、これらの既知 NIAS への暴露に対するリスク評価が実施されるべきである。このような NIAS に加え、FCM は特性及び暴露量が未知である多くの NIAS が含有されている可能性があるが、これらすべての NIAS を同定して定量することは非常に困難であるか又は不可能であり、安全性の観点からは必然的ではないと考えられる。この報告では、CoMSAS 法を紹介し、3 種類のボール紙試料から移行する未知の NIAS に適用した。そのうちの 2 種類は冷凍貯蔵用途のために乾燥ファーストフードへの利用が意図されたものである。この戦略の最も重要な特徴は、特定の条件下では、Cramer クラスⅢの TTC 値 (Cramer class III TTC threshold) に相当する 90 µg/日未満で移行抽出物中に存在している未知物質については、必ずしも同定しないということであり、实际的である。

この戦略は、Kroes ら (2004) によって紹介されている従来の TTC の概念で導入されたすべての決定を尊重している。強度の毒性物質とその他の TTC の概念の適用外物質を除外するために、幾つかの排除ステップを導入した。その例として、有機リン酸エステル/カルバメート及び遺伝毒性物質がある。CoMSAS を適用することにより、検出された未知 NIAS はいずれも健康に関する懸念を提起しなかったと結論した。しかし、5 種類の NIAS については、さらに一日暴露が 90 µg/日を超えるかどうかを決定するために、実際の移行量を測定すべきである。同様に、検出された鉱物油については、実際の暴露を測定するために特異的な移行実験と追加的なリスク評価が求められる。しかしながら、既知 NIAS について特異的な移行実験を行うことは本論文の範囲ではなかった。試験的な事例においては、CoMSAS 法適用の妥当性に関して 90µg/日の閾値は十分に高いことが証明された。TTC の概念は、近い将来により多くの情報が公開されることが予想される開発中の概念であることに留意すべきである。それ故、TTC 値も利用可能な情報に依存して変更される可能性がある。提示された除外スキーム及び戦略は、TTC の概念に関して執筆時近くに公開された文献に基づいている。

CoMSAS と従来法を比較し、従来の 10 µg/kg 食品の閾値を適用する場合、ボール紙試料あたり 66~87 種類の物質を同定、定量及び評価する必要があるが、90 µg/日閾値を適用す

ることにより、ボール紙試料あたり 6～43 種類の物質まで分析可能であることが示された。
提案された CoMSAS による安全性評価は、以下の要素から構成された。

- (1) 関連する規制の枠組みに従った FCM IAS の評価、
- (2) 調査中の材料に関する既知 NIAS の評価（ボール紙に関しては、例えば、鉱物油、ジ
イソプロピルナフタレン（DIPN）異性体、フタル酸エステル、光重合開始剤及びフッ
素化化学物質）、
- (3) 調査中の材料に関して利用可能な情報に基づいて予測可能な NIAS の評価（例えば、
IAS の反応/分解生成物）、
- (4) CoMSAS を用いた未知 NIAS に関するスクリーニング。

（別添 1 305 頁参照）

（Koster et al. 2014）

(3) 食品接触材料等における複合物質に対する TTC の概念の適用

食品接触材料から複数の化学物質が低レベルで食品や飲料に移行される可能性があり、消費者がこれらの物質に対して食品消費を介して暴露される可能性がある。Price ら (2014) は、Cefic 混合物特別チーム (Cefic Mixtures Ad hoc Team, MIAT) のディシジョンツリーを利用することにより、複数の移行物質への暴露による潜在的な非発がん影響について調査した。評価の目的は、特定の成分に関するハザード又は構造データのいずれかを用いて、一日許容摂取量 (ADI) 又は TTC 値に基づき、MIAT ディシジョンツリーを複数の移行物質への同時暴露に適用する可能性を検証することであった。

MIAT ディシジョンツリーは、表面水及び排水処理施設からの排水に適用されてきたもので、最大累積比 (MCR、maximum cumulative ratio) を導入したことに特徴がある。MCR は、累積リスク評価を実施せずに単一化学物質法 (single chemical approach) を用いた場合に見逃す毒性の大きさを調査するツールで、単一成分毒性と比較して累積毒性の重篤度を定量化する指標である (Junghans et al. 2006)。MCR は、個々の物質のハザード比 (hazard quotients, HQs) 及び累積ハザードインデックス (cumulative hazard index, HI) に基づいて表現される (Price and Han 2011)。水中の n 個の物質に個人が暴露されたときの MCR 値から、以下の 4 つの場合に分類し、リスクマネジメント戦略を実施する方法を提案した。

- ・グループ I：一つ以上の物質が、潜在的懸念を示す。
- ・グループ II：物質の複合影響の懸念が低い。
- ・グループ IIIA：一つの物質によって決定される複合影響の潜在的懸念を示す。
- ・グループ IIIB：複数の物質による複合影響の潜在的懸念を示す。

グループ I では懸念をもたらす個々の物質についてさらに調査する。クラス II では懸念は低いため対応の必要はない。グループ IIIA では懸念の元である一つの物質に焦点を当て、グループ IIIB では化学物質が相加的に作用するかあるいは独立に作用するかに焦点を当てる。

本研究では、FCM に関する既存のデータが懸念を示すかどうかを検証するために、MIAT ディシジョンツリーを、3 種類の分析試験で観察された移行物質の同時暴露に適用した。この方法により、複合暴露に関して利用可能なデータによって提示される潜在リスクに関して有用な洞察が得られた。具体的には、ディシジョンツリーにより、利用可能なスクリーニングデータに基づくと、報告された移行物質は、単独暴露の場合も複合暴露の場合も、有害な健康影響を引き起こすことはありそうもないことが示された。しかし、元素のイオン型への複合暴露に関する将来の研究については、追加的な毒性情報が有用と考えられる。

今回の例では、より詳細な同時暴露評価 (Tier 2 評価) は不要であった。その理由は、保守的な最初の段階の仮定でも、複合暴露はヒトの健康に懸念を生じないと結論するのに十分であったためである。このことは、これらの事例研究で評価された移行物質への同時暴露に関するデータは毒性学的懸念の低いものであり、本報告で説明した安全性評価は有用なスクリーニングツールであることを示している。少数又は複数の物質が、総リスクポテンシャルに重大な寄与をするかどうかを理解するために、MCR 法が有用であることが立証された。さらに精緻化されたリスク推定の必要性が示された場合は、MCR は、取り組みの焦点を最大の影響を与える物質に宛てるための一助となる。

(Price et al. 2014)

(4) 食品接触材料のリサイクルプロセスにおけるリスク評価への TTC の概念の適用

EFSA の科学的意見書 (EFSA 2011b) において、食品接触材料であるテレフタル酸ポリエチレン (poly (ethylene terephthalate)、PET) リサイクルプロセスの評価に TTC の概念を使用した特有の基準値が提供された。

食品との接触が意図されたリサイクルプラスチック材料に関する欧州委員会(3月27日、2008年)の規制 (EC) No 282/2008 及び欧州食品安全機関 (EFSA) による安全性評価のための一式文書 (dossier) の提出に関連して、EFSA 指針が公表された。これに引き続き、食品接触材料である PET に関するリサイクルプロセスを取り扱った多くの文書が EFSA に提出された。これらのプロセスでは、食品と接触する用途を目的としたリサイクル PET を製造するために、使用済み PET を使用している。このような PET リサイクルプロセスが CEF パネルにおいて評価されており、評価プロセスに用いられるプラスチックに特有の基準が作成された。EFSA における PET リサイクルプロセスのリスク評価についてこの基準を基に引き続き検討するため、この基準をすべての利害関係者 (stakeholders) に透明性をもって認知するために公表された。

その結果、安全性評価において定められた要件に対するリサイクル製品の法的な順守を保証するためには、投入物について、優良医薬品製造基準 (GMP) の下でのプロセス管理の枠組みで、あらかじめ適切な規格管理 (図 2-4-6) を定めることが必須であるとされている。

(別添 1 306～307 頁参照)

(EFSA 2011b)

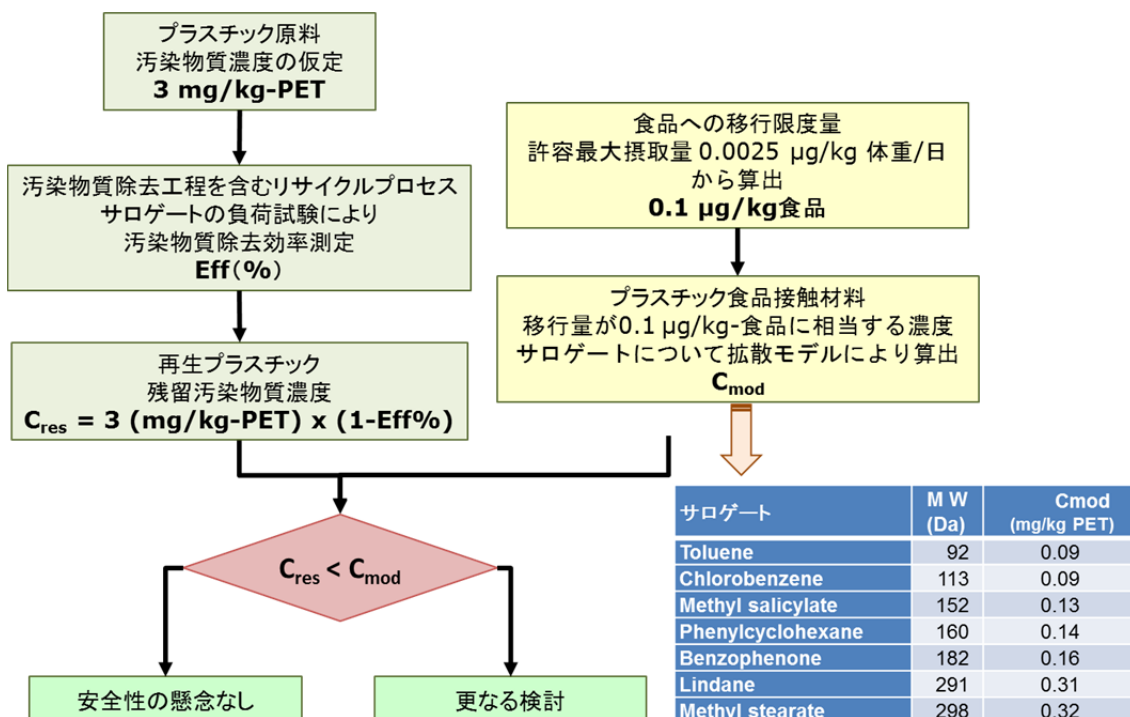


図 2-4-6 評価スキームにおける重要なパラメータ間の相互関係

また、EFSA は、食品への接触を目的とした再生プラスチック材料に関する EC 規制（No 282/2008、5 月 27 日、2008 年）に従って、プラスチック廃棄物を再利用するリサイクルプロセスの評価を要請され、CEF パネルは Phoenix-ESPS 技術プロセスについて評価を行った。Phoenix – ESPS は、米国 Phoenix Technologies Intl LLC のために提出されたリサイクルプロセスであり、ドイツにおける消費者保護と食品安全に関する連邦政府機関（Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit）から評価依頼された（EFSA 2014a）。

本リサイクルプロセスでは、PET 容器からテレフタル酸ポリエチレン（poly(ethylene terephthalate)、PET）粉体をリサイクルする。リサイクルされた粉体は、食品接触材料を製造するために、100 %まで使用されることが意図されている。また、リサイクルされた材料と成形品（articles）は、熱間充填（hot-fill）の有無に関わらず、室温下で長期保存のためにあらゆる種類の食品と直接接触して使用することが意図されている。

このプロセスは、3 種類のステップから構成される。最初に、使用済み PET 容器は、洗浄、乾燥されたフレークに加工され（ステップ 1）、Phoenix-ESPS プロセスに投入される。ステップ 2 において、乾燥フレークは粉体まで粉砕（pulverisation）され、次にステップ 3 において汚染物が除去（decontamination）される。汚染物除去効率を測定するために、ステップ 2（粉体化）とステップ 3（汚染物除去）のプロセスの能力を低下させたパイロットスケールにおいて、代替汚染物質による負荷試験が実施された。

その結果、本リサイクルプロセス（Phoenix ESPS）において、食品に接触した使用済みの PET の予見可能な偶発的な汚染については、ヒトの健康リスクに対する懸念を生じない濃度まで、低下させることが可能であることが明らかとなった。必要とされる条件は、i) プロセスの汚染物除去効率を測定するために使用された負荷試験と、少なくとも同様な厳格な条件のもとで運転される場合、そして、ii) 投入物は、非食品性の消費者用途からの 5%を超えない PET を含み、食品に接触する材料に関する EC の法律に従って製造された材料及び成形品から発生したものを、洗浄、乾燥した使用済 PET フレークが使用される場合とされた。

（別添 1 308 頁参照）

（EFSA 2014a）

Barthélémy ら（2014）は、食品と接触する用途が意図されたポリエチレンテレフタレート（PET）を製造するために使用される機械的リサイクルプロセスの安全性評価についての研究結果を報告している。

食品に接触するリサイクルプラスチックの使用に関連するリスクは、リサイクルされたプラスチック中の汚染物質が包装された食品に移行する可能性から生じる。リサイクルプラスチックでは、プラスチック処理に高温条件が使用されるため、微生物汚染は無視できるが、化学物質に関しては様々な汚染源と経路から多様な汚染物質が混入しうるため、リサイクルプロセスにおいて汚染物質をヒト健康にリスクを与えないレベルまで低減できることが示されなければならない。しかし、個別に対応することは現実的に不可能であることから、EFSA のガイドライン（2008）はリサイクルプロセスにおける洗浄効率の実験的測定を行うことを求めている。これは、モデル汚染物質で汚染したプラスチックをリサイク

ルして残留汚染物質濃度を測定するものである（負荷試験、challenge test）。総合的なリスク評価では、リサイクル技術の洗浄効率、以下に基づいて評価される必要がある。

(1) 参照投入汚染レベル（reference input contamination level）（原料の汚染が実際にどの程度でありそうか）

(2) 移行する化学物質が何であっても、消費者の食事性暴露のヒト健康リスクが無視できるレベルとなるために必要な、リサイクルプラスチックの移行ポテンシャル目標値。

この報告では、PET（polyethylene terephthalate）の機械的リサイクルに関して、どのようにしてこれらの参照点（reference points）が設定されたか、また、それがリサイクルプロセスの安全性評価にどのように用いられるかについて説明されている。

PET の機械的リサイクルプロセスにおける安全性評価スキームの開発では、毒性学的懸念の閾値が採用され、リサイクル PET からの移行により $0.0025 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日を超える食事性暴露を生じてはならないとした。この値は潜在的遺伝毒性の懸念を与える構造アラートをもった化学物質に関する暴露閾値であり、この値未満では、ヒトの健康に対するリスクは無視できると考えられる。

理論的に生じる可能性のある多様な汚染化学物質に関して、入荷する回収 PET のすべてのバッチ及びリサイクル PET のすべての製造バッチを試験することは実際上不可能である。従って、安全性評価の原則は、代用汚染物質を用いた負荷試験（challenge test）によって、リサイクルプロセスの洗浄効率を測定することである。この洗浄効率は、消費者による誤使用により生じる可能性のある汚染物質に対して、安全側に $3 \text{ mg}/\text{kg}$ PET と設定された使用済み PET に関する参照汚染レベルを低下させるために使用される。その結果得られた、リサイクル PET におけるそれぞれの汚染物質の残留濃度から、保守的な（conservative）移行モデルを用いて、移行レベルを算出する。この移行レベルを食品消費データとともに用いて、潜在的な食事性暴露の予測値が得られる。リサイクル PET を一般的な用途に使用する場合、デフォルトシナリオは、体重 5 kg の乳児が、毎日、100%リサイクル PET を用いて製造された水容器からの 0.75 L の水で調製された調製粉乳を消費するというものである。このシナリオに従うと、食事性暴露が $0.0025 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日を超えないことを保証する水中最大濃度は、 $0.017 \mu\text{g}/\text{kg}$ である。この移行限度を満たす最大残留量は分子量に依存し、代表的な代用汚染物質では $0.09\text{-}0.32 \text{ mg}/\text{kg}$ PET の範囲にある。

(Barthélémy et al. 2014)

(5) 食品接触材料に TTC の概念を適用するための拡張データセット構築

Pinalli ら (2011) は、TTC アプローチが、プラスチック製食品接触材料 (food contact materials、FCM) の製造に用いられる物質の評価に適用できるかどうかを調べるために、新たなデータセットとして FCM に使用されている 232 物質を用い、過去に研究された Munro ら (1996) のデータセットを拡張して比較を行った。この新規データセットは、経口動物試験に基づいて十分に評価されたものである。拡張データセット (Munro らのデータ+新規 FCM データセット) には 845 物質が含まれた。このうち 613 物質は、当初の Munro ら (1996) により分類が行われ、FCM の 232 物質については EFSA 又は SCF によって評価されて ADI/TDI が設定された。拡張データセットの Cramer クラス I 物質と III 物質の NOEL に関する対数正規分布を、Munro らの分布と比較した。なお、Munro らの論文 (Munro et al. 1996) に示されている NOEL は、亜慢性試験の NOEL を採用した場合は、慢性試験から得られる NOEL に近似させるために、係数 3 を用いて補正 (3 で割る) されている。

拡張データセットでは、Munro らのデータセットと同様、最低位の NOEL を有する物質は Cramer クラス III に属していたことから、クラス I と III との分別が妥当であることが裏付けられた。また、物質ごとに、対応する TTC 値とそれぞれの NOEL から導出した耐容摂取量とを比較することにより、TTC アプローチの妥当性が証明された。

本研究において調査した 845 化学物質の 96% については、個別の物質の完全なリスク評価に比べて、Munro らの提案した TTC アプローチはより保守的であると考えられた。それ以外の大部分の物質には、TTC アプローチ適用除外の要件である特定官能基の存在が確認された。このことから、著者らは本データセットによる TTC アプローチは、毒性データが得られていない一連の物質に対して評価の優先順位付けするための有用なツールとなり得ることが示唆されたとしている。

(別添 1 309～311 頁参照)

(Pinalli et al. 2011)

(6) Cramer 分類の再評価

1) Toxtree データベースを用いた Cramer 分類スキームの再解析

JRC (2011) は、経口全身毒性に関する Cramer 分類スキームの解析を行い、Toxtree への実装を以下のように検討し、JRC Scientific and Technical Report に公表している。

発がん性及び非発がん性エンドポイントの評価を含む、一貫性があり、透明性のある TTC アプローチの適用を促進するために、JRC は、様々な分野の共同研究者とともに、Toxtree ソフトウェアを開発した。非発がん性エンドポイントに関して最も広く用いられている TTC アプローチは、1978 年に Cramer、Ford 及び Hall によって開発された Cramer ディシジョンツリーである (Cramer et al. 1978)。Patlewicz と共同研究者 (2008) は、Toxtree を用いて Cramer スキームを最初に評価した。その結果、Cramer スキームとコンピュータによる Toxtree の解釈を改善するために、幾つかの勧告が行われた。本報告には、文献レビューと Toxtree ユーザーの調査に基づく、Cramer スキームに関する追加的な所見及び観察結果がまとめられている。この調査は、EFSA との共同作業によって実施された。その結果は、食品及び飼料の安全性分野における TTC の適用性に関する EFSA の意見書の作成を支援するために用いられた。

(JRC 2011)

①Cramer ディシジョンツリーのソフトウェアへの実装

Cramer 分類のルールベースは化学構造、化学反応性、毒性及び代謝であり、有機化学、生化学の実際上の知識を必要とするため、主観が入り込む余地がある。そのため、JRC はソフトウェアツールである Toxtree を開発した。Toxtree に実装された Cramer スキームは有機分子、有機塩、有機金属及び構造が明確なオリゴマーとポリマーに適用可能であるが、データが不十分であるため除外される物質もある。

Toxtree (v. 2.1.0 及びそれ以降) は、TTC 評価に関係する 3 種のルールベースを含んでいる。

- ・最初の報告 (Cramer et al. 1978) で説明されている Cramer ディシジョンツリー。
- ・拡大された Cramer ルールベース。
- ・Kroes ら (2004) による TTC ディシジョンツリー。

Cramer スキームの質問と構造を拡大部分も含めて示した拡大 Cramer ルールベースでは、当初の 1-33 の質問に加えて 40-44 の追加の質問を用いてクラス分類を行う。また自然の身体成分として、当初の 67 物質から 400 物質以上 (ホルモンは含まない) への拡大が図られている。

Toxtree は、コンピュータ以前に開発された Cramer スキーム (及び関連するルールベース) について、簡便で、コンピュータに基づいた一貫性のある適用手段を提供する。Toxtree による分類と予想された Cramer による分類割り当ての不一致は、Toxtree 経路を調べることによって、固有なルールに遡ることができる。Toxtree 経路 (詳しい説明「verbose explanation」と称される) は、ソフトウェアの主スクリーンの論理ウインドウ

(reasoning window) に現れ、これにより、各質問に対する答えに続いて、最終的な分類（例えば 1N、2N、3Y、4N-クラスⅢ）が与えられる。

②Toxtree 中の Cramer デシジョンツリーに関する調査

Toxtree 中の Cramer デシジョンツリーの使用が産業界や規制機関において拡大しているため、利用者を対象とした質問票調査を行った（回答数：5/12）。その結果、Cramer スキームは現在、飲料水中の微量汚染物質、香料、包装材料からの移行物、医薬品・パーソナルケア製品・家庭用ケア製品中の添加剤及び不純物の評価に用いられている。

Cramer スキームの科学的改良点については下記が挙げられた。

- ・元の Cramer の質問は分かりにくく予測の根拠を示すのが困難であるため、修正したり順番を変えるなど、分かりやすく書きなおす必要がある。
- ・二つの質問は化学的特徴に基づいておらず、参照表 (look-up list) を見るようになっている (Q1 通常の身体成分、Q22 通常の食品成分)。これらを除外して Cramer スキームを改訂すべきである。これらを参照して安全かどうかを判断するのは、Cramer スキーム外で、全体としての TTC 評価スキームの中で行うべきである。これらの参照表は専門家の知識や経験に合わせて変更が可能である。リストを規制上のピアレビューにかけるべきである。
- ・いくつかの質問は化学的特徴としてはあいまいであり（例えば立体障害）、明確化あるいは改訂／削除が必要である。
- ・拡大された Cramer ルールベースは広く使用されていないようである。
- ・Cramer 分類のアウトライヤーが確認されているため、NOEL 値に基づいて分類が行われるように、これらを考慮して改訂することが必要である。
- ・Cramer スキームの変更について合意するための国際フォーラムの設置が望ましい。

③通常の身体成分及び食品成分に関する参照表の解析

上記 2) のコメントから、著者らは参照表がなかった場合に身体成分や食品成分が Cramer スキームにおいてどのように分類されるかを調べた。その結果、合計 548 物質 (Toxtree に組み込まれている身体成分 440 物質、食品成分 108 物質) のうち 75% (409 物質) がクラスⅡ又はクラスⅢに分類された。この 409 物質のうち 114 物質は発がん性及び変異原性に関する Benigni-Bossa モジュール (JRC 2008) で遺伝毒性と予測された。従って、全体的な TTC 評価の枠組み、例えば Kroes のデシジョンツリーでは、これらの 114 物質は最初の段階で除かれる。また、クラスⅠに分類された 139 物質のうち 10 物質も Benigni-Bossa モジュールで遺伝毒性と予測された。従って、Benigni-Bossa モジュールでプレスクリーニングを行うと、548 物質中 124 物質が最初の段階でのぞかれ、424 物質が Cramer スキームに入ることになる。

④勧告

Cramer スキームはヒトの健康保護に実際に適用されているが、幾つかの科学的限界がある。すなわち、a) 1970 年代の知識に基づき時代遅れである、b) 3 つのクラスの NOEL

の分布にかなりの重なりがあり、毒性の強度による物質の分別が良くない、c) クラス II に入る物質数が少なく存在意義が疑問である。

短期的には Cramer スキームを書き変えてより分かりやすくすることが必要である。クラス I 及びクラス III のみを含め、スキームには安全又は不安全物質のリスト（例えば、通常の身体成分や食品成分のリスト）を入れるべきではない。

長期的には、Cramer スキームを大幅に書きかえるかあるいは放棄し、ヒトの暴露閾値の設定に有用な構造的特徴を明らかにする統計学的あるいはデータマイニング手法に基づく最近の研究を考慮して、純粋に構造に基づく分類スキームを採用すべきである。また、(遺伝毒性) 発がん物質 や神経毒性等の懸念の高いエンドポイントに関係する追加の閾値を全体的 TTC 評価スキームに入れるべきである。さらに、Cramer スキームの変更について討議し、合意するための国際的なプラットフォームの設置が望ましい。

⑤結論

TTC の概念の非発がん性エンドポイントへの適用において、1978 年に Cramer、Ford と Hall によって提案されたディシジョンツリーは、予測される経口全身毒性のレベルに従って、化学物質を分類して、ランク付けするために、最も広範に使用される方法である (Cramer et al. 1978)。ディシジョンツリーにより、化学物質は主に化学的構造と反応性に基づいて 3 種類に分類される。すなわち、化学物質は、懸念に応じて、高 (クラス III)、中 (クラス II) 又は低 (クラス I) レベルを示唆する分類に分けられる。それぞれの Cramer 分類は、特定のヒト暴露レベルに関連している。そして、そのレベル未満においては、化学物質は、ヒトの健康に対して、無視できるリスクを与えると見なされる。実験的なハザードデータがない場合、このような TTC は、リスク評価プロセスにおける優先度設定のベースとなってきた。TTC アプローチの適用を促進するために、もとの Cramer スキームとその拡大版を用いて Toxtree を実行した。Toxtree は、毒性学的影響と作用メカニズムを予測するために、無料で利用可能なソフトウェアツールである。Patlewicz らによる以前の研究 (Patlewicz G et al. 2008) を基にして、この報告では Cramer スキームを改善する幾つかの提案が提供された。

(JRC 2011)

2) TTCRepDose を用いた Cramer 分類の改良

Pluczkiewicz ら (2011) は経口暴露に関する Cramer 分類のデータベース TTCRepDose を用いた改良を以下のように提案した。類似の内容は 2009 年の EUROTOX 会議においても発表されている (Pluczkiewicz et al. 2009)。

TTC は、その値未満ではヒトへの健康リスクが想定されない、化学構造グループに関する包括的なヒト暴露閾値であり、それ故、追加の試験が必要とされない (Barlow 2005)。化学物質に関する毒性情報が利用できなくて、ヒトへの暴露が相当する TTC 値未満であることが予想される場合には、物質固有な情報の代用として使用することができる。

Munro ら (1996) は、Cramer ディシジョンツリーに従って、低度、中度及び高度の毒性を識別する 3 種類の広範な毒性構造クラスに関して TTC 値を導出した。Cramer クラス I -

Ⅲには、有機リン酸エステルや遺伝毒性に関する構造アラートが含まれる。有機リン酸エステルを除外すると、Cramer クラスⅢに関する TTC 値は、90 µg/人/日から 180 µg/人/日に上昇する (Munro et al. 2008)。TTC 値は主として亜急性毒性について試験された 813 の新規工業化学物質から構成されるデータベースによって再評価された (Kalkhof et al. 2011)。この再評価においては、大部分の化学物質が Cramer クラスⅢ (88.5%) に、極少数の化学物質が Cramer クラスⅠ (8.3%) 及び Cramer クラスⅡ (2.4%) に分類された。Cramer 分類ごとの NOEL 分布は示されなかったが、5 及び 50 パーセンタイル値から、クラスⅠとⅢにおいては幾分かの重なりがあることが示唆された。Cramer クラスⅠに関する TTC 値は Munro によって誘導された閾値と類似していたが、Cramer クラスⅡとⅢに関してはわずかに高い閾値が報告された。NOEL 分布の重なりから、信頼性のある閾値を誘導するために構造クラスに関する Cramer ディシジョンツリーの精緻化が必要であることが示唆された。

①データ編集

本報告においては、反復投与毒性に関する以下の 4 種類のデータベースが、データ量の増加及び導出された閾値の適用性/化学ドメインの増加のために一体化された。

- RepDose (Bitsch et al. 2006) : ラット及びマウスにおける 582 物質に関する経口 (混餌、強制、飲水) 及び吸入反復毒性試験である。吸入毒性試験データは、本研究では除外された。
- Munro (Munro et al. 1996) : 611 工業化学物質、医薬品、食品添加物、環境及び消費者製品由来物質に関する、ラット、ウサギ、ハムスター及びモルモットにおける、主として、経口反復毒性試験である。
- ToxRef (Martin et al. 2009) : US EPA から本研究のために提供された、通常の農薬登録の一部として提出された 372 化学物質に関する経口慢性反復毒性試験である。
- Toxbase : TNO によって開発されたデータベースで、有機リン酸エステル等の農薬に焦点が当てられたラット及びマウスにおける経口反復毒性試験である。101 化学物質に関して、540 試験が含まれている。

今回の解析では、経口反復投与毒性試験に的を絞り、Munro データベースのうちの 163 の生殖/発生毒性試験、及び 28 の非げっ歯類の試験は解析に含めなかった。

②N(L)OEL 値の標準化及びデータの優先順位付け

特定の化学物質に関しては、1 以上の反復毒性試験が利用できることから、試験の優先順位付けの基準が定義される必要があった。NOEL 値は、試験デザインに依存しない比較可能な値を得るために、アロメトリー、LOEL から NOEL への外挿及び試験期間の差に関して標準化された。

TTC の概念は、ヒトの予測生涯暴露に関する閾値から構成される。そのため、経口慢性反復投与試験がより好まれる結果となった。TTC RepDose データベースにおいては、高品質の短期試験に関して、最初に、亜慢性試験 (84-98 日間) が、次に、亜急性試験 (24-32 日間) が検討された。優先順位付けがなされた暴露期間で、科学的に完全な *in vivo* 試験が 2 種類以上利用できる化学物質に関しては、最悪のシナリオをカバーするため、最低の

N(L)OEL 値が解析のために検討された。しかしながら、1 試験のみが利用可能である場合には、この試験が解析のために含まれた。アロメトリー及び外挿に用いる係数は ECHA による REACH の手引書に従った。

最終的に TTCRepDose データベースには 521 化学物質の *in vivo* 試験が含まれた (RepDose : 197、Munro : 124、Toxbase : 30、ToxRef : 170)。

③Cramer 分類

Cramer 分類への化学物質の割り付けには、オープンソースプログラムである Toxtre version 1.60 の Cramer ディシジョンツリーの拡大版を使用した。(<http://ecb.jrc.ec.europa.eu/qsar/qsar-tools/index.php?c=TOXTREE>)

④TTC 値の導出

全体あるいは各 Cramer 分類の NOEL は対数正規分布を示した。この分布より、幾何平均値、中央値、5 パーセンタイル値、95 パーセンタイル値を求めた。Munro は TTC 値の導出にあたり、各 Cramer 分類の NOEL の 5 パーセンタイル値を体重 60 kg で除し、さらに安全係数 100 (種差及び個体差) で除した。今回は、安全係数 100 のかわりに、REACH ガイドラインの方法に従った。ガイドラインは種差に関して、熱量要求 (calomeric demand) の違いを説明するアロメトリーに基づくスケーリングファクターに、毒物動態学と毒物動力学の残りの違いに関する追加的なファクターの 2.5 を乗ずることを推奨している (REACH guideline、EC ETOC review)。消費者暴露に関しては、個人差に対するファクターとしてさらに 10 を適用する必要がある。アロメトリーに基づくスケーリングは、既に N(L)OEL 標準化のために考慮されていることから、動物種内及び動物種間のファクター 25 (2.5x10) が適用された (式 1)。

$$\text{TTC}[\mu\text{mol}/\text{人}/\text{日}] = \frac{5 \text{ パーセンタイル NOEL } [\text{mmol}/\text{kg 体重}/\text{日}] \cdot 60 [\text{kg}]}{2.5 \cdot 10} \times 1,000 \quad (\text{式 1})$$

本研究においては、NOELs を、mmol/kg 体重/日を用いたモルベースで解析した。モル TTC に、TTC RepDose DB の分子量の中央値、220 g/mol で乗じて得られた TTC 値 (μg/人/日) (式 2) を、初めに Munro データベースで導出された値と比較した。

$$\text{TTC } [\mu\text{g}/\text{人}/\text{日}] = \text{TTC } [\mu\text{mol}/\text{人}/\text{日}] \times \text{Median}_{\text{Molweight}} [\text{g}/\text{mol}] \quad (\text{式 2})$$

⑤Cramer クラス I の毒性物質及び Cramer クラス III の低毒性物質の解析

Cramer クラス I に含まれる毒性物質及び Cramer クラス III に含まれる低毒性物質を判定するために、カットオフ値として GHS の「特定標的臓器毒性 (反復暴露)」のラット経口暴露のカテゴリー 1 と 2 を用いた。経口暴露に対するカテゴリー 1 (毒性あり) の GHS 限界値 (LOEL) 10mg/kg 体重/日を 3 で除して NOEL とした。経口暴露に対するカテゴリー 2 (低

毒性) の GHS 上限値 (LOEL) 100 mg/kg 体重/日も同様に 3 で除して NOEL とした。TTC RepDose DB の分子量の中央値は 220 g/mol であるため、この値で除して、Cramer クラス III (毒性あり) のカットオフ値は、0.01 mmol/kg 体重/日、Cramer クラス I (低毒性) のカットオフ値は 0.1 mmol/kg 体重/日となった。

Cramer クラス I で NOEL が 0.1 mmol/kg 体重/日より低い物質及び Cramer クラス III で NOEL が 0.01 mmol/kg 体重/日より高い物質は中程度の毒性を持つ物質とみなし、これらの物質をアウト라이어と呼ぶこととした。さらに、アウト라이어を OECD の (Q)SAR Application toolbox version 2.1 で解析し、プロファイリングツールにより化学物質の有機官能基を調べ、この特性を化学物質のサブグループへの分類に用いた。

⑥結果

TTC RepDose データベースの NOEL 分布

Cramer ディシジョンツリーに従うと、TTC RepDose データベースの化学物質の 77%が、Cramer クラス III に、そして、わずか 2%のみが Cramer クラス II に 21%が Cramer クラス I に割り当てられた。Munro ら (1996) も、彼らの参照データベースを用いることによって、極めて類似した値を得ている。すなわち、物質の 73%、4%及び 22%が、それぞれ、Cramer クラス III、Cramer クラス II 及び Cramer クラス I に割り当てられた。

Munro データベースで見られていたと同様に、RepDose データベースの Cramer クラス I においては、0.001 から 100 mmol/kg 体重/日まで、Cramer クラス III においては、0.00001 から 10 mmol/kg 体重/日まで、NOEL 値の広範な分布が観察された。このような広範な分布から、結果として、TTC RepDose データベースにおいて、Cramer クラス I と III の著しい重なりが導かれた。従って、Cramer ディシジョンツリーは、低毒性と強毒性の化学物質を区別していない。

非常に低 NOELs の毒性物質を含有している Cramer クラス I において、NOEL 値が広範に拡散していることから、低い 5 パーセンタイル NOEL が得られる結果となり、相対的に、この分類における低い閾値が導かれることになった。その反対も同様であり、Cramer クラス III においては、低～中等度の毒性を有する多数の NOEL 値により、相対的に、高い閾値が得られる結果となった。

しかしながら、5 パーセンタイル NOELs では、Cramer クラス I、クラス II 及びクラス III に関して、それぞれ、 3.6×10^{-3} mmol/kg 体重/日、 8.0×10^{-4} mmol/kg 体重/日及び 1.4×10^{-4} mmol/kg 体重/日のように、明確に、識別できる (表 1)。また、Cramer クラス I 及び Cramer クラス III に関して、それぞれ、8.7 μ mol/人/日及び 0.34 μ mol/人/日が得られる結果となった。

TTC RepDose データベースの 521 化学物質は、分子量の中央値が 220 g/mol である。そこで、この中央値が閾値の計算に使用された場合、TTC RepDose データベースの TTC 値は、Munro ら (1996) によって、最初に提案された値 (Cramer クラス I 及び Cramer クラス III に関して、それぞれ、1930 μ g/人/日及び 74 μ g/人/日) とよく一致している。一方、Cramer クラス II の閾値に関しては、このクラスのデータ量が限定的であるために導出されなかった。

Cramer クラス I 及び Cramer クラス III におけるアウト라이어の確認と解析

本報告においては、反復投与経口暴露に関して、GHS 分類によって提案された 0.01 及び 0.1 mmol/kg 体重/日に近い参照値が、Cramer クラス I における毒性化学物質及び Cramer クラス III における中等度から低毒性の化学物質を示すために用いられている。

カットオフ値の 0.1 mmol/kg 体重/日より低い NOEL 値を有するすべての化学物質は、毒性があると見なされ、Cramer クラス I においては、48 毒性化学物質 (44%) のグループが生じる結果となった (N=109)。

これらの物質の NOEL 値は、指定された Cramer クラスに属さないことが示されたことから、以下のように、アウトライアーと呼ばれる。Cramer クラス III (N=400) の 186 化学物質 (47%) が、カットオフ値の 0.01 mmol/kg 体重/日より大きい NOEL 値を有していた。186 のアウトライアーからなるこのサブグループにおける NOEL 値は、0.01 から 1.65 mmol/kg 体重/日までの範囲にわたっており、それ故に、中度から低毒性と見なされる。

ついで、TTC RepDose データベースの Cramer 分類でアウトライアーとされた全物質の構造特性を調べた。頻度の高かった (N=5 以上) 47 の官能基を表 3 に示す。各構造クラスについてアウトライアー頻度 R (アウトライアー/非アウトライアー) を求めた。クラス I でアウトライアー頻度の高かった構造クラスは脂肪族三級アミン、アリル基及びシクロアルカンであった。Cramer クラス III でアウトライアー頻度の高かった構造クラスは、フェノール類、スルホンアミド、縮合多環芳香族、脂肪族一級アミン、アニリン、ベンゾジオキソールであった。本報告ではフェノール類と一級アミン (アニリンを含む) について、Cramer ディシジョンツリーにおける構造クラスの毒性強度に基づく再グループ化の評価を行った。

データベースにはフェノール基を持つ 44 の化学物質が含まれ、3 つの Cramer クラスに分布していたが、Cramer クラス III では 29 化学物質のうち 25 がアウトライアーであった。また、44 化学物質全体の NOEL の分布も 0.002~0.3 mmol/kg 体重/日と狭かった。GHS の毒性化学物質の限界値である 0.01 mmol/kg 体重/日より低い NOEL が低い化学物質が 6 物質、0.01 mmol/kg 体重/日と 0.1 mmol/kg 体重/日の間 (中毒性領域) の物質が 27 物質、0.1 mmol/kg 体重/日のカットオフ値よりも NOEL が高い物質が 11 物質含まれていた。幾つかの NOEL は GHS クラス分類から導出した参照値とあっていなかったが、全体としての NOEL の分布は中等度の毒性を示していたため、すべてのフェノール化合物は Cramer クラス II に再分類された。

データベースには一級アミン基を持つ化学物質が 15 含まれていた。このうち、Cramer クラス I の化学物質中 (5 物質) にはアウトライアーはなかったが、Cramer クラス III のすべての一級脂肪族アミン (6 物質) 及びアニリン (4 物質) の NOEL は 0.02~0.35 mmol/kg 体重/日と中程度の毒性を示し、アウトライアーであった。このことから、一級アミンは Cramer クラス II に再分類された。

フェノール誘導体と一級アミンを Cramer クラス II に再分類した結果、TTC RepDose データベースの Cramer クラス I には 93 物質 (18%)、クラス II には 67 物質 (67%)、クラス III には 361 物質 (69%) が含まれることになった。

なお、44 のフェノール類及び 15 の一級アミンについて、カテゴリー特異的な TTC 値を算出したところ、それぞれ、6.76 µmol/人/日 (1331 µg/人/日)、49.7 µmol/人/日 (8547 µg/人/日) であった。

⑦結論

本報告においては、TTC RepDose と呼ばれる広範なデータベースを用いて、TTC の概念に関する現在の Cramer 分類を精緻化するための戦略が説明されている。Cramer クラス I - III には、ある程度の重なりがみられることから、毒性、中等度毒性又は低毒性の可能性のある構造クラスの良い分離の必要性が示唆される。Cramer クラス I の強毒性化学物質及び Cramer クラス III の中度から低毒性化学物質においては、構造的に類似したグループが確認され、*in vivo* 試験において観察されたそれぞれの毒性強度に従って、適切な Cramer 分類に再度割り付けられた。この精緻化により、Cramer クラス I と III のより良好な識別が可能となり、Cramer クラス II の物質数が増加する結果となった。TTC 値は、8.7 $\mu\text{mol}/\text{人}/\text{日}$ (クラス I)、6.72 $\mu\text{mol}/\text{人}/\text{日}$ (クラス II) 及び 0.28 $\mu\text{mol}/\text{人}/\text{日}$ (クラス III) である。TTC RepDose DB の化学物質に関する分子量の中央値を 220 g/mol と仮定すると、相当する TTC 値は、クラス I、クラス II 及びクラス III に関して、それぞれ、1930、1478 及び 63 $\mu\text{mol}/\text{人}/\text{日}$ である。導出された閾値は、最初、Munro によって提案された TTC 値 (1800、540 及び 90 $\mu\text{mol}/\text{人}/\text{日}$) に、それぞれ、近接している。現在の Cramer 分類スキームを、さらに精緻化する目的から、追加的な構造クラスが検討されている。

(Tluczkiewicz et al. 2011)

3) 反復投与毒性に関する統合試験戦略

Tluczkiewicz ら (2013) は、OSIRIS 証拠の重み付けアプローチとして反復投与毒性エンドポイントに関する統合試験戦略 (ITS) を以下のように報告している。

本報告では、げっ歯類における反復投与毒性試験 (RDT) に関する統合試験戦略 ITS (Integrated Testing Strategy) が説明されている。RDT は、亜急性、亜慢性及び慢性といったタイプの試験によって評価される。従って、RDT は、変異原性又は感作性のようなカテゴリー的なエンドポイントではなく、連続的なエンドポイント (例えば、体重変化、致死率の増加) の集合である。RDT 試験の総合的な結果は、無影響レベル (No Observed Effect Level、NOEL) 又は最小影響レベル (Lowest Observed Effect Level、LOEL) として表され、それぞれの試験における最小用量と最大用量間のいかなる値でもとり得る。*in vivo* における反復投与毒性は、多数の特異的な作用メカニズムはもとより、明らかではないことが多い非特異的な作用メカニズムによっても、引き起こされる。このように複雑な状況にあるため、*in vivo* RDT を完全に置き換える代替試験法 (QSAR モデルのような非試験 (non-testing) 法又は *in vitro* 法) は、現在のところ得られていない。しかし、「古い」非ガイドライン試験は多数あり、これらの試験から、ある程度、対象物質の毒性に関連した情報を得ることができる。そこで、RepDose ITS では、2 種類の主要構成要素すなわち、「古い」非ガイドライン試験の妥当性 validity の評価、及び 2 種類の代替法 (TTC とリードアクロス (read-across) の適用に焦点が当てられた。

本報告では、ITS 概念の開発と構成要素が説明され、ITS 概念の亜急性、亜慢性と慢性毒性試験への適用が例示されている。

(注) OSIRIS : Optimized Strategies for Risk Assessment of Industrial Chemicals through Integration of Non-Test and Test Information (非試験及び試験情報の統合による工業化学品の

リスク評価の最適化戦略)。EU の研究プロジェクトである FP6 の一つのテーマとして、2007 年 4 月～2011 年 9 月まで研究が行われた。OSIRIS プロジェクトの目標は、規制上の意思決定の際、非試験情報活用の著しい増加と、これによる動物試験必要性の最低限化を図ることができるように、REACH 規則に適合した統合試験戦略 (ITS) を開発することにあった。

(別添 1 312～315 頁参照)

(Tluczkiewicz et al. 2013)

4) 非遺伝的毒性に関する Cramer 分類の再評価

Kalkhof ら (2012) は、工業化学物質における非遺伝的毒性影響に関する毒性学的懸念の閾値に関して、Cramer 分類の再評価を行った。

非遺伝毒性物質の TTC 値の誘導に関しては、Cramer と共同著者らによって提案された化学物質クラスが知られている (Cramer et al. 1978)。Cramer クラスへの分類を用いる場合、Munro と共同研究者によって提案された、適切な TTC 値の選択を可能にするためには

(Munro et al. 1996)、物質の化学構造を知る必要がある。しかしながら、Munro データベースは、化学物質の小さな領域のみを取り扱っていることから、TTC アプローチの使用に関しては、ある種の抵抗感がある。また、このデータベースから誘導された TTC 値は、十分に保護的であることはないだろうとの議論がある。以前、著者らは、これらの TTC 値と、生殖毒性エンドポイントから特異的に導出した TTC 値を比較した (Bernauer et al. 2008)。本研究では、規制データベースからの毒性試験と NOAEL を使用した。Munro らの概念を適用して、Cramer 分類に区分した化学物質の NOAEL から TTC 値を導出し、Munro らが公表した値との比較を行った。第 2 番目の目標は、現在の TTC 値の使用と本質的に関係している Cramer 分類を、既存の GHS システムに従った反復投与毒性の分類結果と比較することにある。このような比較は、Cramer 分類システムの外部検証として役立つと考えられる。

欧州の届出化学物質リストに登録された工業的化学物質 813 のデータを分析した。そのうち 756 の化学物質は OECD407 (28 日間反復投与) に、57 の化学物質は OECD408 (90 日間反復投与) に準拠して試験されたデータであった。28 日間試験については係数 6、90 日間試験については係数 2 を適用して得た慢性毒性の NOAEL を Cramer クラス I 及びⅢの値と比較したところ、これら二つの Cramer 分類の TTC 値が保守的な値に設定されていることが確認された。

(Kalkhof et al. 2012)

5) Cramer クラスⅢの再評価

Leeman WR ら (2014) は、Cramer クラスⅢに属する有機リン酸エステルは個別に TTC 値が設定され、有機ハロゲンも他の Cramer クラスⅢの物質とは分けて扱うことが提案されているが、Cramer クラスⅢに対する TTC 値は調整されていないままであることから、カルバメートを含む有機リン酸エステル、有機ハロゲン、及び残りの Cramer のクラスⅢの各グループに対して、より適切で合理的な TTC 値を設定するために、その基となる Munro のデータセットを再検証した。

その結果、Munro のデータセット中に存在する Cramer のクラスⅢの物質の再検証により、カルバメートを含む有機リン酸エステル、有機ハロゲン、残りの Cramer クラスⅢの各グル

ープに対して TTC 値を導出することができた。各グループに対する TTC 値は、カルバメートを含む有機リン酸エステルに対しては 0.3 µg/kg 体重/日、有機ハロゲンについては 1.5 µg/kg 体重/日、残りの Cramer クラスⅢに対しては 4.0 µg/kg 体重/日となった。残りの Cramer のクラスⅢに対する TTC 値は、元のカルバメートを含む有機リン酸エステル及び有機ハロゲンを含んだ Cramer クラスⅢより高いが、リスクが高いとは考えられない。さらに、他のデータセットについて TTC 値を計算した場合も同等の数値が導出される。このことから、上記の TTC 値は適度に慎重な合理的数値であると考えられる。

(Leeman et al. 2014)

(7) *in silico* 法を用いた階層的 TTC の改良

Schilter ら (2014) は、毒性学的データが利用できない化学物質の食事性暴露に関する安全性の懸念レベルを設定する手法を検討するに当たり、コンピュータシミュレーション (*in silico* 法) の適用を次のように検討した。

安全性を検討するためには、毒性学的評価項目について、無毒性量 (no observed adverse effect level) や DNA 反応性化学物質の発がん性のような、定量的な予測が要求される。暴露情報、定量的構造活性相関ソフトウェアにより予測された毒性学的評価項目、及びリードアクロス (read across) との統合を支援するため、ディシジョンツリーが開発された。予測された毒性学的数値は、暴露マージン (margins of exposure、MoE) を得るために暴露量と比較する。MoE の大きさは安全性の懸念レベルと定義している。また、ケースバイケースで決定する他の要因とともに、古典的な動物種間及び個体間変動のような多くの不確実性についても説明がなされるべきである。本研究では事例研究の結果と合わせて、*in silico* 法における不確実性の解析を行った。

提案したディシジョンツリーにより統合した *in silico* 法は、予測毒性学評価点と推定ヒト暴露との間の MoE を計算することにより、安全性懸念レベルを設定することが可能である。MoE の大きさにより、懸念レベルが決定される。安全性を結論するため、選択した MoE は、動物種差及び個体差、用量反応性の考慮及び経路間の外挿を含む、多くの不確実性に関して、十分に大きくあるべきである。このような不確実性は、既に古典的なリスク評価において広く応用されているファクターにより適切に取り扱うことができる。

事例研究結果と合わせて、*in silico* 法に関する不確実性の解析により、ディシジョンツリーの適用に基づいた安全性懸念の設定は、実験データに基づく方法に比べて著しく不確実にはならないことが示された。ディシジョンツリーは、利用可能な全てのデータを十分に活用することによって、適切な保守性を保証している。ディシジョンツリーの適用から得られたを使用することにより、リスクマネージャーに非常に短期間内に、科学的助言の提供ができる。しかし、本方法を適切に応用するためには、構造化学における能力、コンピュータモデル、毒性学、メカニズム/作用の様式、及びリスク評価を含めて、学際的に顕著な専門性が必要であることに、留意しなければならない。すなわち、ディシジョンツリーの適用に基づいて安全性の懸念を設定することにより、実験データに基づくよりさらに不確実性が高くなる可能性は低い。ディシジョンツリーは、適切な程度の保守性 (conservatism) を保証しながら、利用可能な全てのデータを十分に活用している。そして、迅速な意思決定が要求されている場合に利用可能である。

(Schilter et al. 2014)

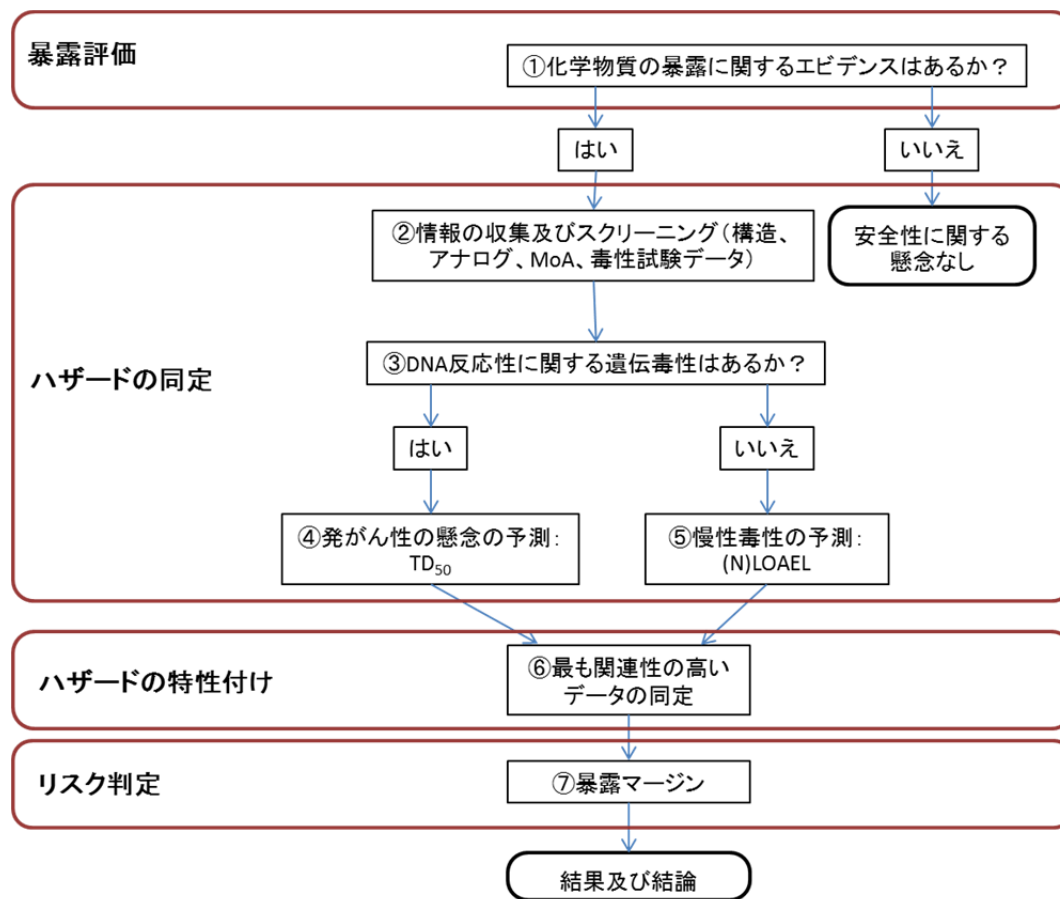


図 2-4-7 古典的なリスク評価において、基本的な論理が統合されたコンピュータを用いた毒性学的方法のフローチャート

(Schilter et al. 2014 を参考に作成)

また、Hauge and Keller (2014) は、*in silico* 及び実験データに基づいた追加的規則による TTC の概念の精緻化の研究結果について、次のように報告している。

この実現可能性研究においては、化学物質をメカニズム化学領域 (mechanistic chemistry domains) に分類することにより、潜在的 (無) 毒性物質の同定を改善するために使用できるかどうか、そして、それによって、TTC アプローチの頑健性を改善できるかどうかを探索した。そのため、識別基準としての生物学的利用能、代謝活性及びタンパク質結合性を、構造活性相関に基づいて計算したサブグループを構築するために使用した。この考え方は、有害性アウトカム経路 (adverse outcome pathway, AOP) の概念 (Ankley et al. 2010) に一致している。AOP 概念においては、分子レベルの開始事象 (molecular initiating event, MIE)、すなわち、毒性学的反応の引き金が重要なステップとなる。最初の毒物動態学的ステップ又はメカニズム反応が起こらない場合には、毒性学的ハザードは低いと仮定される。提案した概念の中で、生物学的利用能、代謝活性及びタンパク質結合性が、最初の MIE を表している。次の NIE は、実験的に急性毒性が低い物質から構成される。

単一で一般的な限界値を発端として、TTC の概念は、長年にわたって、例えば、Cramer ら (Food Chem Toxicol 16: 255–276, 1978) の規則に従って、識別された構造クラスを含める

ことによって、一層発展してきた。本研究では、追加的な構造活性相関及び利用可能な毒性データを導入することによって、その概念を精緻化する可能性を探索した。OECD Toolboxを使用したコンピュータモデリングについては、基本的なデータセットにおいて、176 件の化学物質に関する無（毒性）作用レベル（NO(A)EL）データを収集した。その結果、以下の基準を用いる新規なサブグループを創製した。すなわち、拡張 Cramer 規則、低生物学的利用能（bioavailability）、低急性毒性、タンパク質結合親和性なし及び予想された肝臓代謝の考慮である。「タンパク質結合親和性なし」と「予想された肝臓代謝」の基準を複合した最も高い TTC 限界値として、236 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ が算定された。この値は、元の Cramer クラス 1 の限界値の 30 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ と比較すると、およそ 8 倍高い値である。今回の実現可能性研究では、提案した基準を含めることによって TTC 値を改善した。

(Hauge and Keller 2014)

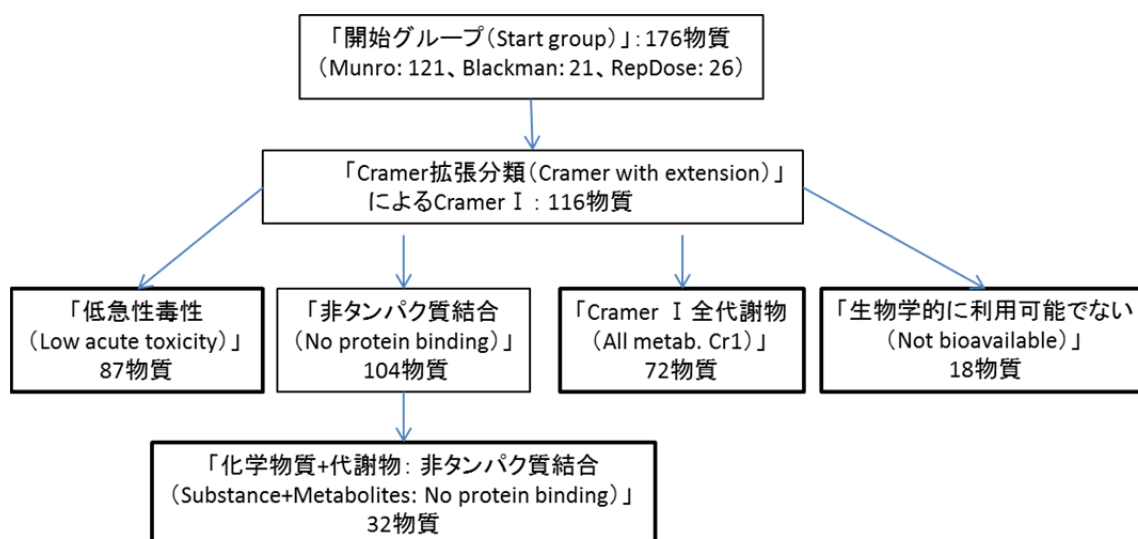


図 2-4-8 適用された方法のフローチャート (Hauge and Keller 2014 を参考に作成)

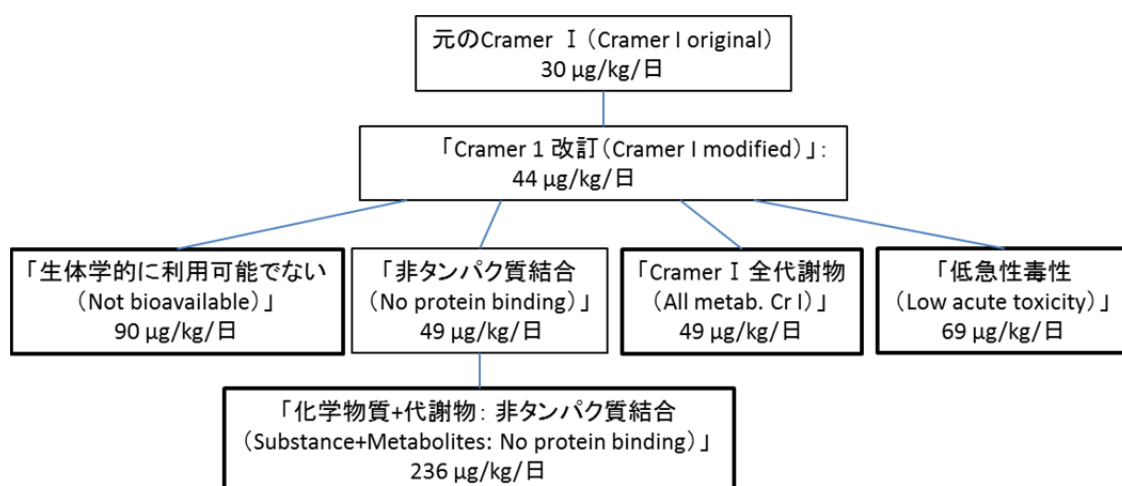


図 2-4-9 計算された限界値の概要 (Hauge and Keller 2014 を参考に作成)

参考) リスク評価における QSAR の利用

TTC の概念による化学物質のリスク評価手法の開発には、近年の分類外の解析や定量的構造活性相関 (QSAR) あるいは作用機序に関する知見をディシジョンツリーに取り入れることによって改良されうる (Danish EPA 2011) との見解がある。以下に FDA において食品接触材料のリスク評価に用いられている QSAR について紹介する。

米国 FDA 食品安全応用栄養センター (CFSAN) の食品添加物安全室は、食品接触物質が安全であることを確保するための工業規制を担当しており、ホームページにおいて食品接触物質の安全性評価に関するいくつかの毒性学的問題、及び新規の食物接触物質の安全性の決定における、種々のタイプの毒性試験及びコンピュータプログラムを利用する有効性について以下のように述べている (FDA 2014a)。

げっ歯類の発がん物質及び非発がん物質を予測するために用いられている最も一般的に用いられている遺伝毒性試験の能力について Kirkland らが最近評価した。著者らは遺伝毒性データがある 553 のげっ歯類発がん物質について検討した。Ames 試験、MLA 試験、*in vitro* 染色体異常試験、及び *in vitro* 小核試験がこの評価に使用された。Kirkland らは 2 試験又は 3 試験の組み合わせが単一の試験よりも感度 (真の発がん物質を検出する試験の能力) が高いことを報告した。この感度は試験の組み合わせにもよるが約 90%であった。しかし、特異性 (非発がん物質を正確に特定する試験の能力) は 2 試験の組み合わせでは約 40%、3 試験の組み合わせでは 30%以下に減少する。これらの結果は食物に接触する物質 (FCS) の発がんの可能性を推定するためにほかの方法を含めることの重要性を浮き彫りにしている。

Cheeseman は、げっ歯類での発がん性物質 359 物質の発がん性の正確な予測について、Ames 試験、MLA 及び染色体異常試験と MultiCaseV.3.1.ソフトウェアとの感度を比較した。0.15 から 150 µg/人/日の範囲の食事暴露における懸念物質の拡張データセットについて、3 種の遺伝毒性試験の組み合わせによる感度は 90%から 71%に変化した。これと比較して、同じ懸念物質の拡張データセットについて、MultiCaseV.3.1.ソフトウェアの感度は 96%から 83%の範囲であった。これらのデータはコンピュータによる毒性ソフトウェアプログラムがある種のタイプの化学物質に関して遺伝毒性試験と同じくらい信頼でき、安全性評価におけるソフトウェアによる予測が妥当であることを示している。

構造-活性相関 (SAR) は化学物質の化学構造及び物理化学的性質と化学物質の生物学的影響 (がん等) との間の関係を示すものである。SAR 解析は、遺伝毒性試験と同様に化学物質の発がんの予測に役立つ。一般に受け入れられている SAR 解析手法は構造アラートの化学構造を評価することにある。発がん性に係る構造アラートは、DNA 損傷によってがんを引き起こす一因となる化学構造の特性 (イソシアネートやニトロソアミン官能基の存在など) である。Ashby-Tennant の構造アラートは、化学物質が発がんの原因となりうる遺伝子突然変異を引き起こすか否かを予測するために長年使用されてきた。1991 年に Ashby と Tennant は彼らが試験したげっ歯類発がん物質の大部分が構造アラートを含んでおり、構造アラートを有する発がん物質の 84%が遺伝子突然変異を引き起こすことを見出した。構造アラートは、化学物質の毒性について試験されていない又は未知の場合、変異原性及びある場合には発がん性を予測する有用な手段である。

複雑なコンピュータソフトウェアのモデルプログラムは定量的構造-活性相関（QSAR）に基づき発がん性及び変異原性を予測するために開発されている。これらのプログラムは2通りの一般的カテゴリーに分けられる。

- 1) 専門家判断と統計的かつ相関的手法とを組み合わせたプログラム、
- 2) プログラムは捕捉ルール、自動化ルール及び専門家知識に基づくディシジョンツリーからなっている。

第1カテゴリーの例として MultiCASE Inc. (MC4PC)、MDL[®]-QSAR、及び TOPKAT[®]がある。第2カテゴリーの例として DEREK[®]及び Oncologic[®]がある。これらのプログラムはFDAにより公式には承認されておらず、また使用可能な QSAR プログラムの一つにすぎない。

MultiCASE の MC4PC は変異原性、発がん性及び催奇形性のためのいくつかの所定の予測モデルを内蔵している統計/相関プログラムである。所定の発がん性モジュールは約 1200 の化学物質（化学構造が明確であり、発がん性の有無が知られている工業化学品、医薬品、植物由来物質）からの SAR 情報を捉えるように設計されている。MC4PC プログラムは個々のこれらの化学物質を可能性のある 2 から 10 個の原子フラグメントに分類するアルゴリズムを用いている。これらのフラグメントを発がん性に関連させたトレーニングセット（ライブラリー）や、バイオアベイラビリティ及び化学物質の立体構造といった他のモジュレーターも設定している。

毒性未知の化学物質の化学構造をこのソフトウェアに入れると、MC4PC のアルゴリズムがこの構造を可能性のある 2 から 10 個の原子フラグメントに分解する。これらのフラグメントはフラグメントリストと照合され、トレーニングセット中にみられる生物活性と関連づけられる。解析結果は 10 から 80 の計算スコアから成る。10 から 19 のスコアは毒性なしと考えられ、20 から 29 は曖昧又は弱い所見であり、30 から 49 は中等度の毒性物質であり、50 から 80 は強力な毒性物質である。上述したように、これらのプログラムは実際、不完全/統計的であり、解析結果は、予測に至ったパラメータの数や、その被験分子が生物学的に活性であり、この予測の信頼度が如何なるものかに関して考慮した、一連の専門家ルールによる承認を必要とする。

OncoLogic は専門家ルールに基づいたプログラムの例である。1990 年代に LogiChem, Inc. により開発され、US EPA から利用可能な公的に利用可能なソフトウェアである。OncoLogic は繊維、金属、有機金属化合物、ポリマー及び有機物質に関する 4 つの発がんモジュールから成る。このプログラムは疫学研究からの知見や作用機序に関する知見を取り込んだディシジョンツリーを適用することにより化学物質を解析する。解析の出力は化学物質の発がん性に関する段階的懸念レベル（低、僅か、中等度下、中等度、中等度上、高）及びディシジョンツリー解析に用いる化学物質の予測と特定に至る包含している専門家ルールの正当化から成る。

食品添加物局（OFAS）は最近、Ashby-Tennant の構造アラート、MultiCase（Version 3.1）、及び OncoLogic の予測能力について遺伝毒性試験（未公表の結果）と比較して評価した。Cheeseman の報告のように、感度は SAR 手法のほうが遺伝毒性手法（Ames、染色体異常及

びマウスリンフォーマ試験)よりも高いと報告している。3種の SAR 手法の組み合わせによる感度は 93%であったのに対し、遺伝毒性試験の組み合わせでは 82%であった。特異性は SAR 手法の組み合わせで 44%であったのに対し、遺伝毒性試験の組み合わせでは 37%であった。マウスリンフォーマ試験が遺伝毒性試験のなかで最も感度が高く (80%)、SAR 手法間では OncoLogic が最も高かった (92%)。MultiCase 及び OncoLogic の両者が発がん予測に「ある程度の有用性を示しており、このことは QSAR ソフトウェアモデリングプログラムが、試験データが不十分又は利用不可能な時にその化学物質に関する有用な毒性情報を提供できることを示している。

QSAR ソフトウェアプログラムはかなり効果的であり、遺伝毒性試験よりもどちらかと云えば資源消費がより少ないが、これらのプログラムには限界がある。例えば、ソフトウェアプログラムの出力は、どのソフトウェアパッケージとも同じ様に、プログラムに入れた毒性情報の正確さによって決まる。その情報が信頼性に欠けるならば、その予測も信頼性に欠けるであろう。加えて、ユーザーはそのソフトウェアプログラムが、トレーニングセットに含まれる化学物質と似ている化学構造の物質のみを評価可能であることに留意しなければならない (分子の範囲)。

金属、ポリマー及びイオンといった多くの化学物質については一部の QSAR ソフトウェアプログラムで評価できない。何故なら、これらの分子種はトレーニングセットにないからである。このような限界はあっても、QSAR プログラムや Ashby-Tennant の構造アラートは毒性学者に化学物質の変異原性及び発がん性に関する情報を提供するのに役立つ。

このように、QSAR 手法は遺伝毒性試験と共に、発がん性予測のために用いることができる。QSAR ソフトウェア手法は、ソフトウェア会社及び FDA の医薬品評価研究センターの情報科学及びコンピュータ安全性解析職員により絶えず進化され、拡大され、正当性の確認がなされている。FDA は規制目的で任意の QSAR 手法を受け入れるために、その手法を合法化し、適切に正当性を確認し、また、代表的トレーニングデータセットを持たなければならない。げっ歯類発がん物質を予測するための高い感受性及び特異性を考えると、QSAR 解析は食品接触物質において目下要求されている遺伝毒性バッテリーをおそらく減らし、補完するための役立つツールであると考えられる。

(FDA 2014a)

(8) TTC の概念の適用除外

Canady ら (2013) は、食品中の物質のリスク評価への TTC アプローチの適用性を決定するための手法を以下のように報告している。

TTC は階層的な閾値に基づいたアプローチで、一見単純であり、既にいくつかの規制当局で実施されているが、誤用されかねないツールでもある。本報告は、リスク管理者が与えられた状況に対し、TTC アプローチが適切であるかどうかを判断する際の手助けとなるように意図されたものである。TTC の概念自体は、毒性試験とリスク管理措置に優先順位をつける「スクリーニング」手法とみなされている (Felter et al. 2009) が、本論文では食品中に予期しなかった化学物質が検出された際の対応として、TTC アプローチの適切さを判断するために行うべきプレスクリーニングプロセスが概説されている。

TTC アプローチから除外されている物質群があり、これらは構造その他の具体的データによって定義されている。しかし、除外グループが設定されているからといって、他のすべての場合に TTC アプローチが適切であるというわけではない。次のような状況は、TTC の概念を用いた評価に不適格となる要件を示している (図 2-4-10)。

- (1) 汚染は適正製造規範 (GMP) 又は適切な危害分析重要管理点 (HACCP) 計画の下では回避可能であった

食品の汚染が発生した場合、汚染が GMP や HACCP 手順によって防止されていたかどうか (すなわち、汚染が合理的に予見可能であったかどうか) 判断することが重要である。食品の安全対策の実施・実行における欠点は、これらの対策に関するベストプラクティス、ガイダンス、又は規則の中で対処しなければならない。このような欠点がある場合は、TTC アプローチを使用することはできない。TTC アプローチは、適切な管理措置の欠如や既存標準の不履行に起因する汚染に対処するために意図されたものでも設計されたものでもないからである。

- (2) 当該物質は適用除外グループのメンバーである

TTC の根拠となっている現在のデータベースと評価に基づき、ある種の化学物質クラスは、TTC の適用が不適切と判断されてきた。

- (3) 当該化学物質の毒性は十分に明確にされている

毒性データが十分に存在し、当該物質に固有な安全性評価ができるようであれば、TTC のような一般的な閾値を適用するのではなく、それらのデータを用いるべきである。地域、国、又は国際レベルでさまざまな研究機関や規制当局によって導出された最大基準値、最大残留基準値、許容/耐容一日摂取量あるときには、それに従わなければならない。化学物質固有の正式なリスク評価が行われていれば、TTC 適用は無効である。

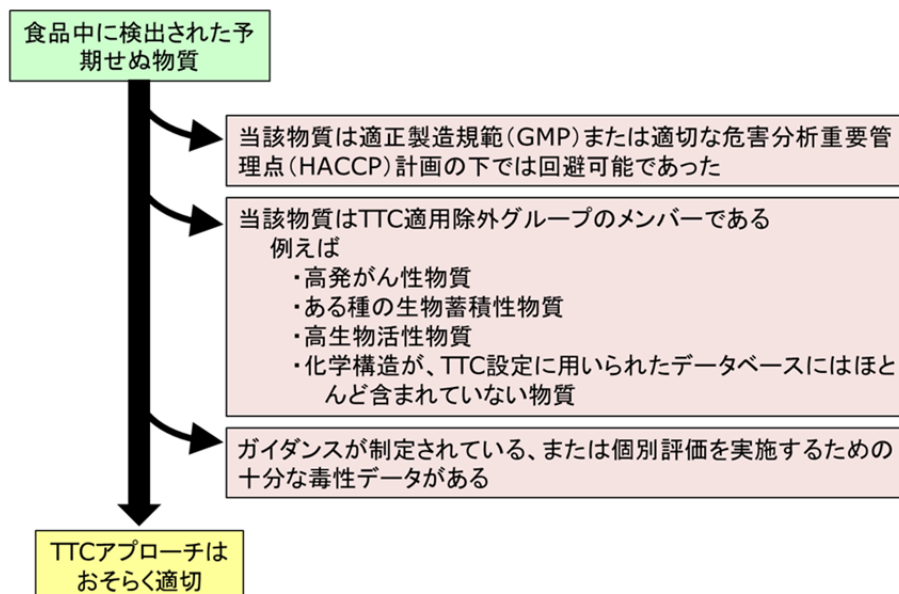


図 2-4-10 TTC アプローチが適切ではない主な状況

(Canady et al. 2013 を参考に作成)

ケーススタディとして、潤滑油による汚染等が示されている。

ある漏えいにより、菓子製品 ("グミ"キャンディー) に潤滑油が検出された。この潤滑油は食品と偶発的に接触する可能性のある箇所で使用が認められている潤滑剤としての認証を受けていた。潤滑油の成分のうち、一つの物質、すなわちアルキル化ジフェニルアミンには懸念があると判断された。漏えいの結果、500 kg のキャンディに 40 ppb のアルキル化ジフェニルアミンが混入していた。漏えいの原因となった機器の故障は、HACCP 計画では予想されず GMP 逸脱の影響によるものでもなかった。アルキル化ジフェニルアミンは、いずれの除外グループにも属さず、毒性データはほとんど得られていない。この状況は TTC アプローチの適用候補として好例である。

TTC の概念は、ここに提示されている段階的な意思決定のアプローチに基づいて適用された場合、化学物質のリスク管理において、適用範囲は狭いが重要な役割を果たしている。TTC の概念により、毒性試験における動物使用と投資の必要性を、公衆衛生にとって利益が最大となるようなケースに絞り込むための、サイエンスに基づいた根拠が得られる。暴露濃度が極めて低く試験を行っても何らメリットがない場合は、動物を用いる必要はまったくない。また、分析の検出限界が低くなった場合、暴露量は TTC 閾値でカバーされる範囲に入る可能性がより高くなるという状況になりがちであるため、分析化学における感度の絶え間ない向上に対応するために、TTC アプローチは、特に適している。

(別添 1 300～305 頁参照)

(Canady et al. 2013)

(9) 種々のエンドポイントへの TTC の概念の適用

1) 発がん性への適用

Benigni ら (2010) は発がん性への TTC の概念の適用を検討した。

発がん性は他の毒性エンドポイント以上に長い一連のメカニズム研究の主題であることから、相当量の科学的背景が利用可能である。化学物質の発がん性を評価する主要な実験ツールであるげっ歯類を用いるバイオアッセイは、動物の生命、時間と経費のために、高いコストが必要となる。このため、多くの短期間代替法が、この十年間にデザインされ、試験スキーム及び規制のための候補として検討された。求電子性 (electrophilic) 及びプロ求電子性 (pro-electrophilic) 発がん物質に関する Millers (1977, 1981) の重要な研究に引き続いて、何人かの研究者によって、この分野における知識の進歩と普及に対して顕著な寄与がもたらされた。主要な 2 系統の研究は、以下のものであった。i) げっ歯類バイオアッセイに関して、廉価な短期間代替法に関する研究 (short-term tests, STTs)。このような代替法の大部分は、遺伝毒性作用の検出に基づいている。また、ii) 化学発がんメカニズムを理解する上で、Millers の助けになった構造活性相関 (SAR) 概念の形式化に関する研究も行われた。

この分野の総合的見解は、*in silico* 法の最近の進展によって利用可能になった広範囲のツールを有効に使うことによって得られる。*in silico* 法は、定量的構造活性相関から化学発がんメカニズムをコードするエキスパートシステム (expert systems) 及び最近開発された化学物質関係データベース (chemical relational databases) までの範囲に及んでいる。

広範囲な *in silico* 法の開発によって、げっ歯類のアッセイに対する代替法に関する現在の包括的な見解が可能になった。最も注目すべきは、これらのツールには、発がん性の化学 (SAs の形で) に関するメカニズムの知見をコードするエキスパートシステム (例えば、Toxtree) 及び ISSCAN のような化学物質関係データベース (chemical relational database) が含まれていることである。化学物質関係データベースは、関係データベースの特別な型である。そして、その主要な情報単位は、化学構造であり、そのフィールドは、化学構造に関連した属性又はデータ (例えば、毒性) である。伝統的なデータベースにおいては、名称や CAS 番号のような指標付与要素 (indexing elements, 識別子 (identifier)) は、固有でなく、エラーしやすい。しかしながら、固有情報が欠けているけれども、化学識別子としての化学構造は、普遍的に理解された意義と科学的妥当性 (scientific relevance) を有している。分子の識別子である化学構造と情報技術との組み合わせにより、他のもっと古典的なデータベースではできない非常に広範囲の作業 (例えば、化学物質又は化学分類の読み出し、データベースの中身の説明、類似した化学物質を見つけること、生物学的及び化学的質問が交叉すること) が可能である。この論文においては、現代的な *in silico* 技術の使用により、例えば、SAs と Ames 試験の間の相補性や、個別的及び全体的な両方における SAs の予測性の迅速な評価が可能であった。

(Benigni et al. 2010)

2) REACH 法における生殖毒性への適用の提案

Bernauer ら (2008) は、REACH 法の下での暴露により要求される生殖毒性試験を定義するための提案をしている。

新 REACH 法の下では、化学物質が製造又は輸入された年間トン数に関連して、毒性試験が要求される。製造量が増加した場合には、毒性情報に関する要求内容も増加する。それぞれの情報要求性は REACH 付属文書 VII-X に規定されている。ヒト毒性に関して、ある種の毒性試験は特定条件下で免除される場合がある。この免除プロセスでは、「関係する暴露なし」、「限定的暴露」、「暴露なし」又は「重大な暴露なし」の場合に毒性試験が要求されず、暴露が決定的な役割を持つ。しかし、現在までにこのような表記を正確に定義づける基準は整っていない。外部暴露濃度と TTC の原則に基づいて、「関係しない」あるいは「関係する (有害な)」暴露の間のカットオフ基準を設定する試みがなされてきた。

①リスク評価の方法

暴露に基づいて毒性試験が免除される場合に、検討対象の毒性学的エンドポイントについて固有の TTC を適用することを提案する。エンドポイント固有の TTC を設定するためには、その固有のエンドポイントに対する無毒性量 (NOAEL) 又は無毒性濃度 (NOAEC) に関して既存のデータを用いることにより、経験分布を設定し、カットオフ値を決定する。本論文ではその例を、受胎能と発生毒性に関して示している。アレルギー又は内分泌かく乱のような特定のエンドポイントに関するデータベースには、制約があることが知られている (Barlow 2005)。

②使用データベース等

データベースには、EU 既存化学物質評価プログラムのもとで評価された化学物質が選択された。リスク評価報告書 (RARs) の中から、受胎能と発生毒性に関する NOAEL/NOAEC が調べられた 91 物質について、調査した。

経口経路における受胎能及び発生毒性について、それぞれ、58 の NOAEL 及び 62 の NOAEL が得られた。また、吸入経路については 24 の NOAEC が得られた。受胎能及び発生毒性に関する NOAEL は、それぞれ、1.5 mg/kg 体重/日から 17,260 mg/kg 体重/日、及び 1.1 mg/kg 体重/日から 2,430 mg/kg 体重/日の範囲であった。吸入経路においては、受胎能及び発生毒性について、それぞれ、0.1 mg/m³ から 36,900 mg/m³、及び 0.05 mg/m³ から 24,500 mg/m³ の範囲であった。データ数に限りがあることから、適切なカットオフ値としてあらかじめ定義されたパーセンタイル値ではなくデータ中の最低値を用いることを著者らは提案している。次に、適切な評価/安全係数として、受胎能及び発生毒性に関しては、経口経路及び吸入経路において、それぞれ、1,000 及び 100 が選択された。

③暴露評価の方法

毒性影響の用量反応関係は、通常、外部用量レベル (暴露) と観察した影響との関係として表わされる。しかし、毒性影響に対しては、内部暴露は外部暴露に比べ、より意味のある測定量であり、対象化学物質の吸収が不完全な場合には、特にそうである。外部暴露

の予測モデルにおいては吸収率が無視されることから、暴露モデルを精緻化する可能性の一つに、内部暴露に吸収率を含める予測が考えられる。そこで、著者らは吸収率を予測又は測定する階層的な方法を提案した。

エンドポイントに固有な TTC に比べて、外部暴露が高い物質の吸収率データを作る階層的方法として、以下を提案した。

- ・物質の物理化学的性質に基づいた *in silico* 法。例えば、物質の log Pow が -1 未満又は +4 を超え、分子量が 500 を超えるときは、経皮吸収は無視できると想定される。
- ・*in vitro* 法。物理化学的性質及び生理学的パラメータと組み合わせた ADME（吸収、分布、代謝、排泄）に基づいた多くの *in vitro* データは、生理学的データに基づいた毒物動態学モデル（PBTK）に統合することが可能である。しかし、経口又は吸入による吸収率を測定する *in vitro* モデルは確立していない。経皮吸収において確立されたモデルは、OECD 試験ガイドライン 428 に詳細に記述されている（OECD 2004）。
- ・*in vivo* 毒物動態学的研究。関連する全ての ADME ステップは *in vivo* 毒物動態学的研究によって調査できる（OECD 試験ガイドライン 417）（OECD 2010）。吸収率は、呼吸、尿、糞便/胆汁における基質/放射活性（及び代謝物）の定量化によって調べられる。さらに、投与後には血漿中及び組織中濃度を様々な時間で測定することが可能である。データ解析から内部暴露を予測し、定量化ができる。

本研究は、不十分に記述されている表現「関係する/重大な」暴露をどのように定義するかについての方法を説明、提案し、エンドポイントに固有な TTC アプローチに基づいて、暫定的な外部暴露を固有 TTC と比較することを手掛かりとして、「関係する/重大な」暴露を定義するように提案している。本提案は、暴露推定値の精緻化を伴っており、内部及び標的臓器への暴露の実験的な測定をもって完結することができる。本法においては、何が「関係する暴露なし」であるかについて、十分な根拠に基づいた評価が可能であり、一般公衆の保護に関して、適切なレベルが維持される。本法の実現可能性は、生殖毒性エンドポイントに関して、実証された。

(Bernauer et al. 2008)

3) 生殖及び発生毒性への適用

Kroes ら（2000）は、発生毒性のデータベースの構築において、600 種以上の化学物質に関する文献から引き出された最も低い NOEL を含む Munro ら（1996）のデータベースから物質の選定を行い、これらを精査した後に US EPA（1986）により幅広く定義された発生毒性の影響を示す物質をデータベースに記録した。発生神経毒性のデータベースでは、発生神経毒性の影響が実証されたか、少なくとも、生化学的又は薬理学的基準によりそのような影響を示す可能性があると考えられる化学物質のグループ全てを扱い、81 物質の発生毒性データを評価した。

(Kroes et al. 2000)

Laufersweiler ら（2012）は、TTC の使用に関係する、生殖及び発生毒性と化学構造との相関について報告している。

TTC アプローチは、未試験の化学物質の潜在的な毒性について保守的な推定をするために、化学物質に関する既存の毒性データを基にする。毒性データが限定されているか又は不足している場合には、化学物質に対する許容暴露レベルを確認するためのシステムを提供する。生殖及び発生毒性に関する暴露閾値を確認する考え方は、規制要求事項を満足させるために、生殖及び発生毒性試験を実施する必要性を優先順位付けするツールとして、例えば、REACH のもとで検討されてきた。以前の研究では、相対的に少数の化学物質が解析に使用された。例えば、Kroes ら（2000）では、81 物質の発生毒性データを調べ、Bernauer ら（2008）は 91 物質の受胎能と発生毒性データを調べ、van Ravenzwaay ら（2011）は 93 の化学物質を解析して Kroes のデータとともに 111 物質に拡大した。この研究では、生殖及び発生毒性エンドポイントデータのある約 300 の化学物質を含む大きなデータセットを用いた。このデータセットには、以前に、Kroes ら（2000）及び Bernauer ら（2008）が調べた化学物質と、追加的な公表文献データとが組み合わされている。さらに、Cramer ら（1978）のディシジョンツリーを用いて Munro ら（1996）が行ったような構造解析を組み込むことによって、エンドポイントに固有な閾値を、既存の Cramer 分類により構造を基にした閾値と比較することが可能である。

Cramer クラス I ～III に関する NOAELs の累積分布において、クラスによる分離が認められ、毒性における明確な構造的影響が示唆された。それぞれの Cramer 分類に関する分布の 5 パーセンタイルの NOAEL を、Munro ら（1996）の解析と同様の方法を用いて計算した。Cramer クラス I、II 及び III に関して、5 パーセンタイル NOAEL は、それぞれ、13.1、1.87 及び 0.31 mg/kg/日であった。これらの NOAELs から、Munro ら（1996）と同じ仮定（100 倍の不確定係数（UF）（種差とヒト個体間の変化としてそれぞれ 10 倍）及び体重 60 kg）を用いてヒト暴露閾値を計算した。

次に、Bernauer ら（2008）と van Ravenzwaay ら（2011）が導出した暴露閾値と直接比較するために収集したデータ全体の NOAELs 分布から 5 パーセンタイル NOAEL を計算し、0.57 mg/kg/日を得た。ここから、ヒト暴露閾値の 342 µg/日（体重 60 kg 及び 100 倍の合成 UF を用いて）が得られた。導出されたそれぞれのエンドポイントに固有の閾値に関して、全体的な分布から確認された値を表 2-4-1 に示した。本研究でまとめた拡大データセットが、以前の解析と同一の毒性範囲にある化学物質を十分カバーしており、閾値の大きさの違いは異なる不確定係数の選択から生じたことが示唆された。

TTC アプローチは、化学物質に関する毒性データがない場合は、TTC レベル未満においては、有害な毒性影響に関するリスクの確率が低いとする保守的な（安全側に立った）暴露を予測するシステムを提供する。TTC の基礎となっている元の毒性データセットは、反復投与試験から得られた無影響レベル（NOEL）に基づいている。その後、これらの限界値が生殖/発生影響に関して、保護的であるかどうかを評価する努力が続けられた。今回の解析から、それぞれの Cramer 分類に関する生殖/発生毒性エンドポイントは、Munro ら（1996）の導出した TTC 値に対応する一般的な TTC により、保護されると考えられる。

表 2-4-1 エンドポイント固有の閾値の比較と適用された UF

エンドポイント	5 パーセンタイル NOAEL (mg/kg/日)	適用した UF	閾値 (μg/日)
授精率 (Fertility) (Bernauer et al. 2008)	1.5*	1,000	90
発生毒性 (Bernauer et al. 2008)	1*	1,000	60
発生毒性 (van Ravenzwaay et al. 2011)	4	500	480
生殖/発生毒性 (本論文の解析)	0.57	100	342
生殖/発生毒性 クラスⅢ	0.31	100	186
生殖/発生毒性 クラスⅡ	1.87	100	1,122
生殖/発生毒性 クラスⅠ	13.1	100	7,860

* Bernauer et al. 2008 は、5 パーセンタイル NOAEL を用いず、小さなデータセットによる限界のため NOAEL の最小値を使用している。

(Lauferweiler et al. 2012)

Van Ravenzwaay ら (2011) は、出生前発生毒性に TTC の概念を応用する検討をしている。研究室で 20 年間にわたって実施したラットでの OECD 414 ガイドラインによる 93 試験の種々の NOAEL 及び LOAEL 値を解析することによって、出生前発生毒性試験のための TTC 値設定の可能性を評価した。ラットを用いた経口投与発生毒性試験 (OECD 414) (OECD 2001) における母動物毒性及び発生毒性の 92 及び 93 の NOAEL 値に関する我々のデータベースの評価に関し検討した。NOAL 分布の 5 パーセンタイル値は母体毒性で 4 mg/kg 体重/日、発生毒性で 5 mg/kg 体重/日と算出された。Kroes ら (2004) による発生毒性試験データを加え、111 試験の NOAEL 値を評価すると、5 パーセンタイル値は 4 mg/kg 体重/日となった。5 パーセンタイル値に安全係数として 500 (可能性のある化学品種の不足のため) を用い、発生毒性の TTC 値を合併したデータに基づき 8 μg/kg 体重/日と算出し、母動物毒性についてはこれらのデータベースに基づき 8 μg/kg 体重/日と算出した。REACH の枠内において、この値は動物実験を実施するか又は推定される暴露量が十分に低いときに TTC 値に頼るかのガイダンスとして役立つと考えられる。

(Van Ravenzwaay et al. 2011)

4) 感作性への適用

Safford ら (2008) は、皮膚感作性のうちアレルギー性接触皮膚炎への TTC アプローチの適用を検討した。Rulis AM が TTC 設定に用いたリスク予測原則を用いて既存のデータを分析することにより、実験データの無い含有物についても感作リスクが存在しない皮膚感作性閾値 (Dermal Sensitisation Threshold、DST) を設定することができると結論づけた。DST の設定の手順は、以下の 1 から 5 とし、化粧品及びパーソナルケア製品の皮膚への低レベルの接触到適用可能な DST 値を設定するための確率論的手法が紹介されている。

1. 感作性物質が化学物質において占める割合を推定する
2. 既知の感作性物質の強度の分布を調べる
3. 強度推定値に基づいてヒトにおける感作リスクを計算する
4. 許容リスクを設定する
5. DST 値を決定する

筆者らは、以下のように結論づけている。製品によって SAF (Sensitisation Assessment Factors) が変化するため DST は単一の値ではないことが、DST アプローチと TTC アプローチの根本的な違いである。さらに、DST は $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ で表されるため、製品がどのように使用されるかによって DST の製品中濃度への変換値が異なる。また、利用可能なデータが限定的であるため、DST アプローチは消費者の皮膚に対する接触が限定的である化粧品・パーソナルケア用品に使用されるべきである。

(Safford 2008)

Safford ら (2011) は、更に大きなデータセットを用いて、皮膚感作性閾値 (DST) 法の精緻化を行った。消費者製品に含まれる成分の毒性学的安全性を保障するためには、成分についての潜在的な皮膚感作性を評価することが必要であり、経皮暴露が低い場合に、TTC アプローチのプロセスに類似した皮膚感作性閾値 (DST) を用いるリスク評価を提案した。

Safford らは 4 つのデータ源からの 363 の化学物質 (271 : 感作性物質、92 : 非感作性物質) の局所リンパ節アッセイ (LLNA) データに基づいて DST を定義した。化学物質を反応性物質群 (reactive domain) 及び非反応生物質群 (non-reactive domain) に大別し、EC3 値をガンマ分布にプロットして、95 パーセンタイル値から非反応性皮膚感作性物質 (non-reactive skin sensitizer) に対する DST 値 $900 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ を設定した (Hennes 2012)。

また、ヒト連続パッチテスト (human repeat insult patch test) の 58 香料アレルゲンに関するメタ分析により、「典型的」及び「望ましくない」暴露条件に対する TTC 値として、それぞれ $0.91 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 及び $0.30 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ が設定された。この DST は、皮膚暴露が十分に低い非反応性及び非プロアクティブ化学物質に関して、動物試験の必要性を排除するために役立つであろう。DST に基づいた定量的リスク評価により、適切な安全マージン (margin of safety) が与えられず、反応性として分類された化学物質に関しては、事例ごとのリスク評価が必要とされるであろう。

(Safford 2011)

また、Keller ら (2009) は、感作性に TTC の概念を検討する実現可能性を検討した。RIFM (Research Institute for Fragrance Materials, Inc.) 専門家委員会 (Api et al. 2006) によって公表された利用可能な NESIL (予測無感作性誘導レベル、No Expected Sensitization Induction Level) を考慮して、ヒトデータのメタ分析 (meta-analysis) を行うことによって、感作性懸念の閾値 (TSC、Threshold of Sensitization Concern) 法の実現可能性を評価した。NESIL は、「IFRA/RIFM データセット」とされるが、IFRA コード (www.ifraorg.org) に対する国際化粧品香料協会 (International Fragrance Association、IFRA) を介してアクセスできる。これには、例えば、欧州化粧品規制 (European Cosmetics Directive, 2003/15/EC, 7th Amendment) や化学品規制 (REACH) に動物試験数の削減として反映されている。ヒトの皮膚への暴露が設定された懸念の閾値を下回る場合は、TSC 概念により、ヒトの健康を損なうことなく、広範な動物試験を避けることができる可能性がある。

(Keller et al. 2009)

（１０）経口経路以外の暴露経路への TTC の概念の適用

１）急性吸入暴露への適用

Grant ら（2007）は、限定的な毒性情報を有する化学物質に関する急性吸入毒性の評価について報告している。

テキサス清浄大気法（Texas Clean Air Act, Chapter 382 of the Texas Health and Safety Code）は、環境質に関するテキサス州委員会（Texas Commission on Environmental Quality、TCEQ）に対し、申請された施設の稼働によって大気汚染の状態を引き起こさないこと、あるいは大気汚染に寄与しないことを保証するため、すべての新規及び改修施設の大気排出許可レビュー（air permit reviews）を実施する権限を与えている。大気排出許可レビューには、典型的には、利用可能な最善の管理技術、及び新規又は改修施設からの申請された排出に係る予測大気濃度の評価が含まれている。保守的な評価においては、最悪の排出率をモデル化して、短期及び長期の化学物質特異的の最大地表面大気濃度（maximum ground level air concentrations、GLC_{max}）を予測する。排出案の審査では、連邦/州基準及び TCEQ 毒性スタッフが開発した化学物質特異的影響スクリーニングレベル（chemical-specific effects screening levels、ESLs）が、それぞれ、大気環境基準汚染物質又は非大気環境基準汚染物質に対して使用される。ESL は、ヒトの健康と福祉を保護するための化学物質特異的な大気濃度の組み合わせであり、排出率限度値の保護性を評価するため、大気許可プロセスにおいて使用される。短期 ESL 及び長期 ESL は、それぞれ、1 時間急性間歇暴露及び慢性暴露を評価するために開発された。テキサス健康安全規則は包括的であり、ESL は、限定的な毒性データしかない化学物質であっても、できる限り多くの大気汚染物質を評価するために開発された。

毒性データが限られている化学物質について、二つの方法（懸念の閾値: TOC; NOAEL-LC₅₀ 比）を用いて健康保護濃度を導出する方法を検討した。急性吸入無影響レベル（NOAELs）及び 97 種類の化学物質の急性致死データから構成される大きな参照データベースを作成した。その目的は、1 時間間歇吸入暴露の評価において、限られた毒性データしかない化学物質の健康を保護する濃度を導出するためである。一つの方法は、急性毒性強度カテゴリー（acute toxicity potency categories）に関する懸念濃度の閾値（TOC）を算定することである。そして、他方は、NOAEL 対 LC₅₀ 比（N-L 比）を算定することである。TOC 法においては、国連によって提案された「化学品の分類と表示に関する世界調和システム（Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals: GHS）」に基づいて、97 種類の化学物質が、異なった急性毒性カテゴリー（最強から最小の毒性まで）に分類された。すなわち、カテゴリー1、カテゴリー2、カテゴリー3、カテゴリー4、及びカテゴリー5 の 5 種類である。それぞれのカテゴリーにおいて、NOAEL の累積パーセンテージについて、10 パーセンタイル値を算定した。そして、健康保護に関する TOC 濃度を導出するために、不確実係数 100 で除した。TOC として、カテゴリー1 に分類された化学物質については 4 µg/m³、カテゴリー2 については 20 µg/m³、カテゴリー3 と 4 の両方については 125 µg/m³、カテゴリー5 については 1,000 µg/m³ が得られた。また、55 種類の化学物質について、それぞれの、NOAEL と暴露期間（≤24 時間）から、NOAEL 対 LC₅₀ 比（N-L 比）を計算した。

そして、N-L 比の累積パーセンテージ分布の 10 パーセンタイル値を計算した。これを不確実係数の 100 で除し、 8.3×10^{-5} に等しい複合係数が得られた。限定的な毒性情報しかない化学物質については、この複合係数を、4 時間 LC50 値又はその他の適切な急性致死データに乗じる。両方の方法は、大気中濃度に関する保守的な閾値の予測値を作るために使用できる。そして、その濃度未満では、1 時間の間歇暴露の後では、一般公衆に対する明らかなリスクがないことが期待される。

(Grant et al. 2007)

2) 大気有害物質スクリーニング評価のための TTC の開発と適用

西オーストラリア州政府保健局 (DOH-WA) は、大気有害物質のスクリーニング評価のための TTC の開発と適用を行い、Drew によって以下の内容の報告書が作成された (2010)。

西オーストラリア州政府保健局は、都市大気への産業排出物のスクリーニング評価に対して TTC の概念を適用するように、Toxikos 社に要請した。TTC はもともと、物質の毒性データが必要かどうかを規制機関が決定しやすくするために開発されたもので、それ以来リスク評価に取り入れることが推奨されている。この報告書では、TTC を大気濃度に変換して、大気に少量存在する産業・自動車排出物がヒトの健康に与える影響は「小さくて大したことがない」と定義づけるために役立つようなプロセスを開発した。

TTC を適用して開発された大気発がん性ガイドライン値 (FDA 発がん性データベースに基づく) は、CoNTC (Concentration of No Toxicological Concern、毒性学的懸念のない濃度) と称される (Drew and Frangos 2007)。

①リスク評価スクリーニングにおける CoNTC の適用

リスク評価のスクリーニングにおける CoNTC の本質的概念では、化学物質の大気濃度と CoNTC を単純に比較する。大気濃度が CoNTC より低ければ、直接的な健康影響が起こる可能性は極めて低く、さらなる技術的リスク評価は必要ない。化学物質濃度の推定値が CoNTC より高い場合は、当該化学物質に対する大気指針値 (AGV : air guideline value) が設定されているかどうかを調べることになり、評価プロセスは標準的なリスク評価スクリーニングに立ち戻る。

個別のレセプターに対する大気濃度は、大気拡散モデル (急性暴露には 1~24 時間、慢性暴露には年間平均) あるいは直接測定によって見積もることができる。後者の場合は定量分析法 (MoQ) が適切であることが重要であり、対応する CoNTC より明らかに低いので、CoNTC より 5 倍低いレベルの MoQ を用いることを Toxikos 社は推奨している。

化学物質の地表濃度推定値が CoNTC を上回り、適切な AGV が設定されていない場合は、推定暴露値について追加情報を取得することが必要になる。

TTC 及び CoNTC の概念に包含されている注意事項はたくさんあり、これらはリスク評価ツールとしての CoNTC の適用限度を示すものである。主として、TTC を裏付ける毒性学的データベースの情報が欠如していることによるものである。

◇CoNTC の適用には、その化学物質について入手できる合理的な暴露推定値が必要。

◇次の物質には CoNTC を用いるべきではない。

- ・金属類、又は半金属類
 - ・ステロイド類、ダイオキシン類、フラン類
 - ・アフラトキシン類、N-ニトロソあるいはアゾキシ構造を有する化学物質（これらの物質は、CoNTC の最低濃度以下の濃度の長期暴露により影響があるとみなされている。）
- ◇CoNTC は、臭気、及び感覚刺激といったエンドポイントには適用されない。

②CoNTC の開発

Task 1) CoNTC の導出

CoNTC の導出は、まず産業排出物に含まれる化学物質リストの作成から始まる。

Toxikos 社は、たくさんの産業排出物リストからマスターリストをまとめ、それに US EPA の有害廃棄物燃焼設備のためのリスク評価プロトコール (US EPA 2005) に記載の化学物質を追加した。発がん性と考えられる物質リストに記載されている化学物質は、除外して「発がん性リスト」に載せ、FDA 発がん性データベースに基づく包括的な CoNTC 値を当てた (Drew and Frangos 2007)。残りの物質は、Toxtree ソフトウェアを用いて Cramer クラス (I、II、III) に従って分類し、各クラスに対する CoNTC 値を算出した。

Task 2) 化学物質を Cramer クラス I、II、III に振り分けるソフトウェア (Toxtree) の評価

Toxtree ソフトウェアは ECB (European Chemicals Bureau) が作成したもので、一般的な科学領域あるいは規制領域ではまだあまり広く適用されていない新しいソフトウェアである。そのため、Toxtree が Cramer 規則に従って正しく化学物質を分類することを確認する必要がある。

Task 3) 化学物質分類に対する保守的な NOAEL として、各 CoNTC に対応する TTC の評価

CoNTC 導出の出発点は各 Cramer 分類に対応する TTC 値であり、CoNTC が多くの健康悪影響のいずれに対しても保守的かつ保護的であることを保証するためには、TTC が多くの毒性学的エンドポイントに対応しているという条件を満たす必要がある。

Task 4) 健康リスク評価のスクリーニングにおける AGV 代替としての CoNTC の評価

CoNTC がリスク評価のスクリーニングに用いられる場合には、AGV の代替としての機能を果たすことになる。これが CoNTC の妥当な利用法であって、公衆衛生目的としてふさわしく保護的であることを示すためには、CoNTC (つまり AGV の代替) は同化学物質分類に対する既存の AGV の分布においてそれを下回る、あるいはその低値域部分でなければならない。

③CoNTC の導出

平均生涯一日呼吸速度を、ライフステージ（0～1、2～5、6～15、16～70）ごとのデータ（表3）を用いて、0.324 m³/kg/d と算出した。これを用いて「第一次」CoNTCは以下の式で算出された。（P：吸入暴露による一日化学物質摂取の割合 = 50%（0.5））

$$\text{CoNTC} (\mu\text{g}/\text{m}^3) = \text{TTC} (\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}) \times P / 0.324 (\text{m}^3/\text{kg}/\text{日})$$

「第一次」CoNTCは、各化学物質分類に対するAGVの累積分布と比較することで、AGV代替として用いるために調整が必要であるかどうかを決定した。その結果、調整係数として10を用い、さらに利用しやすいように端数を処理して「最終」CoNTCを算出した。発がん性物質に対するCoNTCについては、最低AGVより下回っていたことから、調整は必要ないと判断された。

④Toxtree による Cramer 分類の評価

Toxtreeの妥当性を評価するのに、既に専門家らによってCramer分類にクラス分けされている3つのデータセット（Cramer et al.1978、Munro et al. 1996、Blackburn et al. 2005）を用いた。Toxtreeによる分類を専門家らによる分類と比較すると、対象化学物質全体では91%とよく一致していた。特に、最も毒性の高いカテゴリーであるCramerクラスⅢについては、98%と高い一致性を示しており、この類の化学物質がより低いカテゴリーに誤分類される可能性は低いと考えられる。

また、Toxtreeと専門家らの分類が異なった化学物質についても、その約70%でToxtreeは専門家らよりも高いカテゴリーに分類しているため、Toxtreeの分類はより保守的であるといえる。

Toxtreeの適用には、基礎的な化学知識以上の知識が必要とされ、その結果は毒性学者によって精査されなければならない。最も著しい問題は、Toxtreeによる立体化学の解釈が確定的でないこと、また暴露経路に準じた誤分類（例：ホルムアルデヒドは、天然の生体成分でありToxtreeではクラスⅠとなるが、吸入した場合毒性の可能性はある）である。

総合的に見てToxtreeは、リスク評価におけるスクリーニング基準を設定する目的での、Cramer構造クラスの体系的評価のツールとして有用である。

⑤CoNTC の AGV 代替としての評価

・慢性 AGV の代替としての使用

CramerクラスⅠ、Ⅲ、発がん性物質についての慢性AGV累積分布では、CramerクラスⅡに対するAGVは6個しかなく、有意な分布図が作成できないので、これらの化学物質はCramerクラスⅢに含めた。

CramerクラスⅢについて、「第一次」CoNTCより低いAGVは14個（11化学物質）（27%）あったが、調整係数10を用いた「最終」CoNTCでは3個（アクロレイン、2-クロロアセトフェノン、グルタルアルデヒド）（5.8%）になった。CramerクラスⅠでは、

「最終」CoNTCより低いAGVはなかった。発がん性物質に対しては、CoNTCは全てのAGVより低かった。

- ・急性AGVの代替としての使用

CramerクラスⅠ、Ⅲについての急性AGV累積分布では、刺激物質及び臭気物質については、TTC作成に用いられたデータベースにこれらのエンドポイントが含まれていないことから、除外した。「第一次」CoNTCより低い値であった急性AGVはCramerクラスⅢの1物質（クロロナフタレン）（2.2%）のみであった。従って慢性暴露のような調整係数は必要ないと考えられ、急性影響に対するCoNTC値は慢性影響より10倍高くなっている。これは、慢性AGVの設定には不確実係数10を適用するという一般的な方法と、概ね一致するものである。

刺激物質及び臭気物質を含む全ての急性AGVの累積分布を作成したところ、「第一次」CoNTCより低い値であった急性AGVは、CramerクラスⅢの2物質（3.7%）、及びCramerクラスⅠの1物質（3.3%）のみであった。したがって、急性影響に対する「第一次」CoNTCは、刺激物質や臭気物質への懸念に関しても保護的である。

CoNTCを有効に利用するためには、産業排出された化学物質についてCramer schemeに従って分類することが必要である。Cramer分類を目的としたソフトウェアプログラムとして、欧州化学品庁（ECB：European Chemical Bureau）から「Toxfree」が公開されており（Ideaconsult Ltd. 2007、2008、2009）、これを用いて検索リストを作成した。本報告書で導出されたCoNTC値は、大気中の有機化合物濃度について、懸念がありさらなる調査が必要であるかどうかを迅速に判断する実際のプロセスとなる、と結論付けられた。

(DOH-WA 2010)

3) 暴露経路間の外挿

The Interdepartmental Group on Health Risks from Chemicals (IGHRC) では、化学物質の健康リスク評価における毒性データの経路から経路への外挿に関する指針（2006）をまとめた。この文書では、毒性データの経路から経路への外挿（route-to-route extrapolation）において検討する必要がある重要な因子について概要を説明した。そのような外挿における信頼性の基準についても、併せて説明し、幾つかの包括的な勧告を行った。その勧告は、特定の事例において、経路から経路への外挿が適切であるかどうかを検討する場合、これら因子が化学物質の健康リスクの評価に関与する際に有用である。しかしながら、専門家の判断により、個々の事例に応じて、物質を検討する必要がある。最も利用可能な実験データは、経口経路を用いているため、この文書においては経口から経皮又は吸入経路への外挿に集約している。また、吸入から経口経路への外挿についても検討されている。

(IGHRC 2006)