

## (0036) 土の摂取による人体暴露のアセスメント (ISO/TS17924) の紹介

ー人体に対するバイオアクセシビリティ・バイオアベイラビリティ評価のための物理的溶出法の選択・応用ガイドラインー

○吉野 満昭<sup>1</sup>・松村 光夫<sup>1</sup>・平田 桂<sup>1</sup>・ISO/TC190 部会<sup>1</sup>  
<sup>1</sup> 土壌環境センター

### 1. はじめに

(一社) 土壌環境センター技術委員会のISO/TC190部会では、ISO/TC190規格及び規格化の情報収集、会員企業に向けた情報発信を行っている。本稿ではISO/TS17924『土の摂取による人体暴露のアセスメントー人体に対するバイオアクセシビリティ及びバイオアベイラビリティ評価に係る物理的溶出法の選択・応用ガイドラインー』(以下、本技術仕様書)を紹介する。

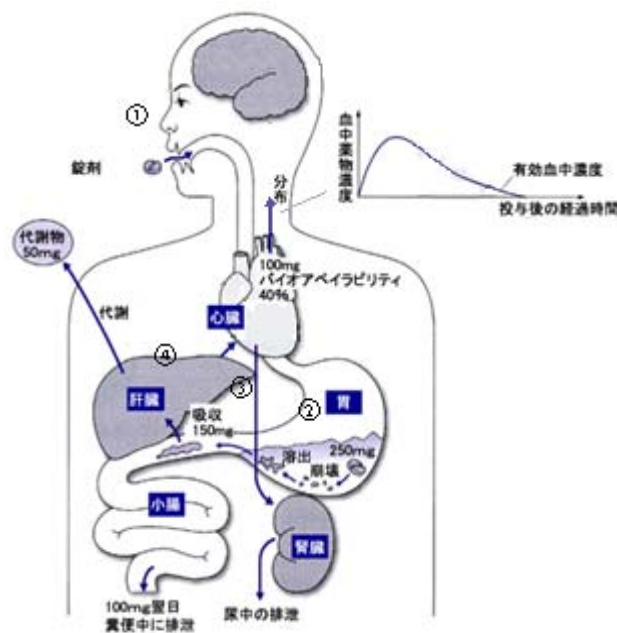
我が国の土壌含有量調査に係る測定方法(平成15年環境省告示第19号)では1規定塩酸を用いた溶出試験を行うが、これは土壌に吸着した重金属の体内における溶出を考慮したものであり、同測定方法は本技術仕様書の基本概念であるバイオアクセシビリティそのものである。そこで、本稿ではバイオアクセシビリティの概略を説明した後、本技術仕様書で推奨されているバイオアクセシビリティ評価のための物理的溶出法(以下、バイオアクセシビリティ法)と我が国の土壌含有量調査に係る測定方法とを具体的に比較し、土の摂取による人体暴露のアセスメントを理解する上での一助としたい。ただし、バイオアクセシビリティは溶出試験法の一側面であるため、我が国の土壌含有量調査に係る測定方法を策定するにあたっては、バイオアクセシビリティ以外の様々な観点も検討されたことを併せて紹介する。

### 2. 重金属のヒト体内における溶出、吸収過程とバイオアクセシビリティ

#### 2.1 重金属のヒト体内における溶出、吸収過程

本技術仕様書では、直接摂取による重金属の吸収プロセスを大きく4つの連続する過程(①口腔内への摂取(摂食量)②胃、小腸管腔での溶出(溶出量)③胃、小腸上皮細胞膜での吸収(吸収量)④内膜と肝臓での代謝による減少)に分けている。この過程のうち④を通過した画分が生物学的利用量(バイオアベイラブル量)であり、重金属は血液循環により全身もしくは標的組織に到達し毒性が発現する。図-1は薬剤を経口投与した後の体内動態を模式的に示しており、土壌に吸着した重金属の動態も同様であると考えられる。

バイオアクセシビリティとはこの過程のうち、①から②までの摂取から消化・溶出過程を範囲とし、③吸収、④代謝による減少は含まない。③、④を含む場合は、バイオアベイラビリティ(生物学的利用率)と言う。我が国の1規定塩酸を用いた酸溶出試験もバイオアクセシビリティ法も、②の胃、小腸管腔(主に十二指腸)での溶出過程を考慮している。バイオアクセシビリティ法の測定結果の評価方法、および具体的な方法については後述(2.2節、3章)する。



※日本臨床薬理学会ホームページより転載・一部改変

図-1 薬剤を経口投与した後の体内動態

Introduction of Soil quality-Assessment of human exposure from ingestion of soil and soil material (ISO/TS (Technical Specification) 17924) – Guidance on the application and selection of physiologically based extraction methods for the estimation of the human bioaccessibility/bioavailability of metals in soil

Mitsuaki Yoshino<sup>1</sup>, Mitsuo Matsumura<sup>1</sup>, Kei Hirata<sup>1</sup> and ISO/TC190 Study Group<sup>1</sup> (<sup>1</sup>GEPC)

連絡先: 〒102-0083 東京都千代田区麴町 4-2 (一社) 土壌環境センター

TEL 03-5215-5955 FAX 03-5215-5954 E-mail info@gepc.or.jp

## 2.2 相対的バイオアクセシビリティとヒト健康リスク評価

本技術仕様書では人の健康リスク評価にあたり、生物学的利用量を考慮する場合は相対的バイオアクセシビリティを用いるのが適当としている。相対的バイオアクセシビリティは、物理的溶出法により測定された重金属溶出量（バイオアクセシブル量）より求められる評価値であり、定義式は以下のとおりである。

$$\text{相対的バイオアクセシビリティ} = \frac{\text{土壌の重金属溶出量}}{\text{毒性試験で用いられた媒体の重金属溶出量}}$$

定義式から分かるように、相対的バイオアクセシビリティを求めるためには、標準的な毒性試験の条件（毒性試験で用いられた媒体から溶出した画分）と評価対象サイト固有の条件でのバイオアクセシビリティ法の測定結果（土壌から溶出した画分）がともに必要となる。これらの緒条件うち、測定結果に大きく影響を与えるものには重金属の化合物形態と媒体があると考えられる。

上記相対的バイオアクセシビリティの定義式に対して、相対的バイオアベイラビリティの定義式は以下のとおりである。

$$\text{相対的バイオアベイラビリティ} = \frac{\text{土壌から体循環血液中への重金属吸収量}}{\text{毒性試験で用いられた媒体から血液中への重金属吸収量}}$$

相対的バイオアベイラビリティは生物学的利用量そのものを比較しているが、実際に生物学的利用量を測定することは困難であるため、本技術仕様書では相対的バイオアクセシビリティを人の健康リスク評価に用いることとしている。

表-1 は基準となる一般的な毒性試験または評価対象サイトの条件下での経口摂取による重金属の吸収プロセスと各過程での体内動態下での存在量を概念的に示している。餌食・飲用水または土壌中の重金属量が「①経口摂取量“B+A+H”」であり、胃腸管内での「②溶出量“A+H”もしくは“a+h”」は主に重金属イオンより構成される可溶体で“B+A+H”未満である。また、可溶体が全てフリーの重金属イオンの場合は、腸壁での重金属イオンの吸収速度が溶出速度を上回っていると考えられ、「③吸収量」は「②溶出量」と同一であり減少しない。吸収された重金属は一部肝臓の代謝で排出されるが、排出されずに体循環血液中に移行した重金属量が「④生物学的利用量“H”もしくは“h”」である。

相対的バイオアクセシビリティは胃腸で土壌から溶出した画分（表-1の“a+h”）を毒性試験で用いられた媒体の重金属溶出量（表-1の“A+H”）で除した「a+h/A+H」である。（評価対象サイト固有の条件での「①摂取量」を等しく B+A+H としている点に留意されたい。）表-1の「②溶出量」はバイオアクセシビリティ法の測定結果より求められ、例えば土質等の違いにより溶出特性がサイトごとに異なれば、当然相対的バイオアクセシビリティは異なることから、サイト固有の条件が反映された結果を得ることとなる。

表-1 経口摂取から代謝までのプロセスと各過程での体内動態下での重金属存在量

単位 mg

	①摂取（口腔） 摂取量	②溶出（胃、腸） 溶解量 バイオアクセシブル量	③吸収（小腸） 吸収量	④代謝（肝臓） 生物学的利用量 バイオアベイラブル量
毒性試験の条件 ・重金属の存在形態 ・媒体：溶液、餌食	B+A+H	A+H	A+H	H
評価対象サイト固有の条件 ・重金属の存在形態 ・媒体：土壌（土質）	B+A+H	a+h	a+h	h

凡例 B, b: 胃腸管内で溶出せず、腸壁で吸収されずに排泄される重金属量

A, a: 肝臓で代謝され、体外へ排出される重金属量

H, h: 体循環血流により全身に運ばれ毒性を発現する重金属量（腎臓等で代謝、排泄され血中濃度は低減する）

相対的バイオアクセシビリティを考慮した場合、重金属汚染土壌による人の健康リスク評価には以下の2点が含まれることとなる。

- ・一般的な毒性試験と評価対象サイトとの条件の相違
- ・評価対象サイトごとの条件

また、一般的な毒性試験と評価対象サイトとの条件の相違は、「②溶出量」同士を比較することにより評価される。一般的にTDI (Tolerable Daily Intake)等の毒性値は毒性試験における「①摂取量」に基づき算出されており、毒性値と評価対象サイト固有の条件での「②溶出量」との比較によっては相対的バイオアクセシビリティは正確に反映されない。

物理的溶出法を具体的に定めるには様々な因子の検討が必要になるが、次節では本技術仕様書で示されている化学反応性や我が国の土壌含有量調査に係わる測定方法策定にあたり検討された要因について述べる。

### 2.3 バイオアクセシビリティを考慮した土壌中重金属の物理的溶出試験法の諸条件

本技術仕様書において、胃腸管内に混入した土壌に含まれる重金属の溶出・吸収過程の化学反応性、反応速度論的な考え方について、胃及び小腸における $PbSO_4$ の挙動を例とした検討がなされている(図-2)。ここでは、重金属が体内で土壌から溶脱することによって起こる化学的・生物学的プロセスは、土壌と汚染物質の化学的特性と同様にその重金属の溶解 / 輸送 / 吸収の現象であると考えられることから、そのプロセスについて消化管で連続的に起こっている重金属の化学変化に関する化学反応速度論を考える必要性が示唆されている。

鉛は通常胃中で鉛イオン( $Pb^{++}$ )として溶存しているが、胃中でのpHが低く、高い塩濃度下では $PbSO_4$ として胃液中に留まる。一方、食物あるいは土壌に由来する水酸化リン酸カルシウム [ $Ca_5(PO_4)_3OH$ ]のようなリン酸塩は、胃中のpHが低ければリン酸イオン [ $H_2(PO_4)^-$ ]として溶けるが、胃中のpHが高ければ溶解は遅くなり、完全に溶解しないとされている。胃中で解離して小腸に入った鉛イオン( $Pb^{++}$ )とリン酸イオン( $PO_4^{3-}$ )は、リン酸鉛 [ $Pb_3(PO_4)_2$ ]と塩化リン酸鉛 [ $Pb_5(PO_4)_3Cl$ ]を生成するが、リン酸鉛の方が非常に速く析出するとされている。

この過程で胃の通過が(断食条件の下等で)速い場合、水酸化リン酸カルシウムは胃で溶けて、弱アルカリ性になるため、それ以上溶解をしなくなるとともに塩化リン酸鉛から解離した鉛の析出物の生成を妨げるようになる」とされている。

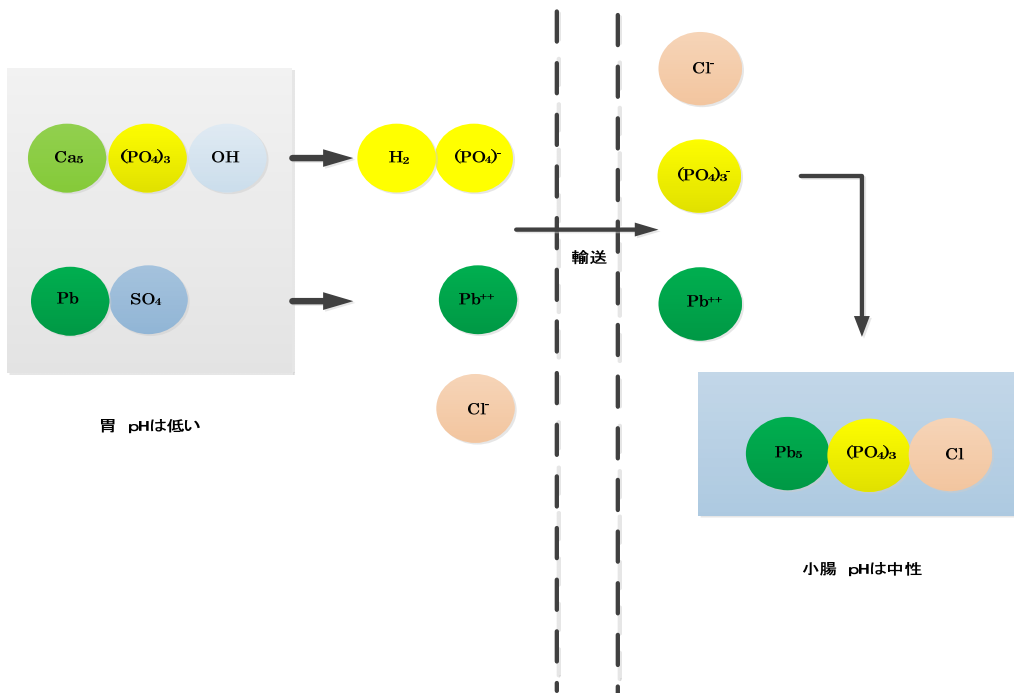


図-2 硫酸鉛の胃での解離と小腸での塩析出例

このような胃腸管内の環境を想定してバイオアクセシビリティ法では表-2に示すように、胃の環境または小腸の環境を想定した規格化が検討されている。

表-2 胃腸管内の環境を想定したバイオアクセシビリティ法の諸条件

	一次消化作用	主要な添加薬品	pH	滞留時間	汚染物質の溶解作用
胃	蛋白質と脂質の消化	塩酸 プロテアーゼ リパーゼ	1-5	8分~3時間	①酸が対象金属のオキシド、硫化物、炭酸塩等の不安定無機質を溶解
小腸	オリゴ糖、蛋白質、脂質及びその他の可溶性成分の消化	重炭酸塩 胆汁 プロテアーゼ リパーゼ オリゴサッカロース 脱リン酸化酵素	4-7.5	2~10時間	①溶解した有機物質と汚染物質の化合 ②陽イオン金属が胆汁酸と錯化したことによる可溶化 ③高いpH及びリン酸によって沈殿した金属

備考：従って、表-2の酵素、胆汁他の部分にはこれらの試薬の添加も含む。

一方、我が国の土壌含有量調査に係る測定方法の策定にあたっては、汚染土壌を直接摂取することによるリスクの観点から、土壌環境中の化合物の形態変化及び土壌からの対象物質の体内摂取を考慮し、一定の安全性を見込むものの全量分析までは行わないような分析法として検討された。

ここでの検討条件と内容は、①酸濃度：胃内のpH 1-2を模擬した酸の種類と濃度 ②固液比：胃内の1日あたりの胃酸分泌量及び土壌の1日あたりの摂取量を踏まえた固液比 ③試験温度：反応時間、体温、操作性 ④試験時間：胃内の滞留時間等であった。これらの検討結果を踏まえて土壌汚染対策法では次のような抽出条件で試験を行うよう定められた。

- ① 酸濃度 : 1.0 mol/l 塩酸
- ② 固液比 : 固液比は 1:30-1:50
- ③ 試験温度 : 実用的な室温 25 °C
- ④ 試験時間 : 胃内の滞留時間と同様に 2 時間

なお、六価クロム及びシアンについては 0.1 mol/l または 1.0 mol/l 塩酸によって種々の土壌から安定して抽出できないと考えられたため、六価クロムについては水抽出法、シアンについては弱酸性での蒸留法によって試験するよう定められた。

### 3. バイオアクセシビリティ法の具体的方法

本技術仕様書では、バイオアクセシビリティ法を選択する上で、胃腸管内の環境等に関連した項目（振とう、消化時間、温度、食物の存在、pH、土粒子径、土粒子/溶媒比、消化液（ムチン（胃粘液の成分）、胆汁、膵臓液等）、胃と腸各々での溶解、酸化還元状態、リン酸等のイオン、試料の前処理、検液の後処理）について留意点が述べられている。

バイオアクセシビリティの測定では、胃での溶解と小腸（十二指腸）での溶解を検液作成の手順に含めることが重要で、各々について人体での環境を考慮した pH 管理が必要となってくる。また、手に付着した土粒子の非意図的な直接摂取を扱う場合には、土粒子径は 250 μm 以下に調整し、固液比は 1:100 とするのが適当だとしている。食物、胆汁、膵臓液は、金属イオンと有機物との可溶複合体の形成に関わり、一般的に重金属のバイオアクセシビリティを増加させることが知られている。

本技術仕様書の Annex A では PBET (Physiologically Based Extraction Test method)、SBET(Solubility Based Extraction Test)、ドイツ規格協会規格 19738、オランダ RIVM 研究所の方法等九つの方法が比較・整理されている。これらの方法は、唾液（アミラーゼ）や食物の添加の有無については異なる部分もあるが、それら以外の項目については多少のバラツキはあるものの概ね共通している。これらの方法の一例として、オランダ RIVM 研究所のバイオアクセシビリティ測定方法のスキームを図-3 に示す。唾液、胃液、十二指腸液、胆汁はリン酸バッファーを用い人工的に調製したものを使用するが、調製方法の詳細等は、A.J.A.M. Sips et. al. (2001) Appendix I を参照されたい。

前述したとおり、我が国の土壤含有量調査に係る測定方法の策定にあたっては、汚染土壤を直接摂取することによるリスクの観点から、土壤環境中の化合物の形態変化及び土壤からの対象物質の体内摂取を考慮し、一定の安全性を見込むものの全量分析までは行わないような分析法として検討された。そのことをふまえ、

我が国の土壤含有量調査に係る測定方法（平成 15 年環境省告示第 19 号）と本技術仕様書で推奨されている方法との比較を表-3 にまとめた。基本的には土壤含有量調査に係る測定方法で考慮されている項目よりも本技術仕様書で設定されている項目が多く、腸での溶解（アルカリ抽出）、酵素の影響、胆汁の影響等が考慮されていることが大きな違いである。ただし、土壤含有量調査に係る測定方法においても胃での溶解は本技術仕様書と同等に考慮されていると言える。その他の共通事項については、比較的類似している部分も多い。

#### 4. おわりに

本稿では、ISO/TS 17924（土の摂取による人体暴露のアセスメント）の内容を紹介した。本稿に紹介されているバイオアクセシビリティ・バイオアベイラビリティという言葉自体は日本ではあまり一般的ではないものだが、土壤汚染による人への健康影響を考える上では非常に重要なことであり、その考え方自体は日本でも採用されているケースも多いと考えられる。ISO/TC190 部会の活動を通じて、ISO 規格及び「バイオアクセシビリティ・バイオアベイラビリティ」に対する理解の一助となれば幸いである。

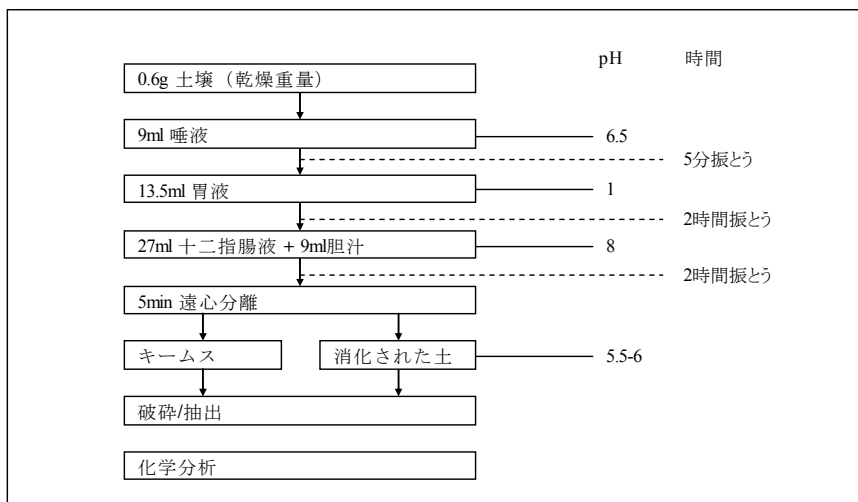


図-3 最適化された *in vitro* 消化モデルのスキーム  
(A. J. A. M. Sips et. al. (2001) Figure 2.1.)

表-3 バイオアクセシビリティの測定に係わる検液作成方法比較

項目	方法	ISO/TS 17924 recommendations	平成15年環境省告示第19号（六価クロム、シアン化合物は対象外）
乾燥、破砕		40℃以下で風乾もしくはオープン、粒径250μm以下	風乾し、中小礫、木片等を除き、土塊、団粒を粗砕、粒径2mm以下
酸抽出（胃）	試薬	塩酸、水酸化ナトリウム	1規定塩酸
	pH	1.0-2.5の範囲とする。（1.2推奨）	—
	時間	通常：2時間（断食状態：1時間）	2時間
アルカリ抽出（腸）	試薬	塩酸、水酸化ナトリウム	—
	pH	5.5以上とする。（6.3推奨）	—
	時間	2時間	—
酵素		ヒトの胃腸管でみられる酵素	—
胆汁他		胆汁を添加する。キームス（粥状液）を添加する。	—
温度		37℃	室温（おおむね、25℃）
酸化還元		通常、酸化雰囲気とする。（砒素や六価クロムは還元雰囲気が適当。）	—
振とう		end-over-end（回転式）	振とう回数：毎分約200回 振とう幅：4-5cm 振とう時間：2時間連続
液固比		100	重量体積比3%
遠心分離		3000rpm、5分	10-30分静置、必要に応じ遠心分離
濾過		推奨なし（知見が不十分）	0.45μmメンブレンフィルター使用

【参考文献】

- 1) A.J.A.M. Sips et. al. (2001) : Bioaccessibility of contaminanants from ingested soil in humans. Method development and research on the bioaccessibility of lead and benzo[a] pyrene. RIVM report 711701012
- 2) U.S. EPA. (2007) : Guidance for Evaluating the Oral Bioavailability of Metals in Soils for Use in Human Health Risk Assessment. OSWER 9285.7-80
- 3) U.S. EPA. (2009) : Validation Assessment of In Vitro Lead Bioaccessibility Assay for Predicting Relative Bioavailability of Lead in Soils and Soil-like Materials at Superfund Sites. OSWER 9200.3-51