

Bijlage 1. Dosis-respons referentiepunt voor antrachinon

Er moet een keuze gemaakt worden voor een dosis-respons referentiepunt dat als basis kan dienen voor een MOE. De optie TTC is mogelijk, maar niet nodig indien genotoxische en carcinogene testen beschikbaar zijn. De optie TD50 is mogelijk, op voorwaarde dat deze op een transparante wijze afgeleid is.

Uit de NTP studie (2005) blijkt duidelijk dat antrachinon (AQ) kankerverwekkend is, al dan niet door een genotoxisch mechanisme, mogelijks door de aanwezigheid van de onzuiverheid 9-nitroanthracen (9-NA) en/of van diens metabolieten 2-hydroxyantrachinon (2-OH-AQ) of 1-hydroxyantrachinon (1-OH-AQ).

Er werd geopperd dat de productiemethode bepalend zou kunnen zijn voor het genotoxisch-carcinogeen karakter van AQ, maar dit is niet afdoende bewezen gelet op het feit dat slechts één carcinogenese studie (NTP studie), bestaande uit een test op muizen en één op ratten, aanwezig is. Het Comité meent dat er voorlopig van uitgegaan dient te worden dat AQ een genotoxisch carcinogeen is, los van het type van synthese van deze stof.

In het evaluatierapport dat naar aanleiding van de opname van AQ in bijlage I van Richtlijn 91/414/EEG (Verordening (EG) nr. 1107/2009) werd opgesteld, werd volgende besloten (Belgium, 2009 ¹⁰):

“No NOAEL can be proposed in these studies.

The final reports of the 2 carcinogenicity studies, conducted by the NTP USA, with anthraquinone in rats and mice are still under discussion. According to the published data by Butterworth (2004), the presence of 9-nitroanthracene used in the NTP cancer bioassays was responsible for the carcinogenic effects as a result of its genotoxic activity; the evidence for this is only indirect.

*Although the genotoxic activity was demonstrated, the carcinogenicity of 9-nitroanthracene was not demonstrated or published. The positive results reported with *S. typhimurium* does not mean that the chemical possess carcinogenic activity as only a correlation exists between the results of genotoxicity assays and rodent carcinogenicity for some chemicals, but not for all chemicals. **It is also not known whether the relatively low levels of 9-nitroanthracene measured in the NTP material, if this compound is carcinogenic, would be potent enough to cause the reported tumours.**”*

In de laatste NTP herziening (NTP, 2005) is de uitkomst velerlei, aangezien er zeer duidelijk AQ-gerelateerde verhoogde incidenties werden waargenomen in verschillende organen en weefsels. De rapportering is echter ook vrij complex gelet op het gewicht dat aan de verschillende tumoren toegekend wordt. In de NTP-standaardverwoording wordt dit gewicht opgesplitst in “CLEAR evidence” (++++), “SOME evidence” (+++), “WERE related to” (++) en “MAY be related to...” (+).

Op basis van de NTP dosis-responsdata werd nagegaan of een MOE benadering gehanteerd kan worden op basis van de BMDL₁₀ als dosis descriptor. Er werd gebruik gemaakt van de PROAST software (versie 69.0) zoals die aangeboden wordt op een platform van de EFSA. Verschillende berekeningen werden uitgevoerd voor alle eindpunten, maar geen enkele leverde een betrouwbare BMD schatting op (Tabel 1). De details worden weergegeven voor de twee types tumoren waarvoor NTP een **duidelijke evidentie** heeft geconcludeerd, nl. voor de nieren (♀ rat) en de lever (♂ +♀ muis). De incidenties voor zowel de nier- als de levertumoren waren hoger dan de spontane historische

¹⁰ Belgium (2009). Evaluation report on the review of the existing EU MRLs for anthraquinone prepared by the rapporteur Member State Belgium in the framework of Article 12 of Regulation (EC) No 396/2005, November 2009.

incidentiewaarden. De software berekent een schatting voor verschillende modellen en genereert eveneens een gemiddelde BMD parameter. De berekende BMDL waarden in de verschillende modellen voor de belangrijkste tumorincidenties waargenomen in de NTP studie (NTP, 2005) worden in Tabel 2 gegeven (in het geel aangeduid in Tabel 1).

De verhouding BMDU/BMDL (hoge/lage limiet van het betrouwbaarheidsinterval) is voor elk van de modellen minstens één grootte-orde, waardoor de gemiddelde waarde te onzeker is om gebruikt te kunnen worden. In de grafieken (Tabel 1) werd steeds het model weergegeven waarvoor de theoretische BMD dicht aanleunde bij dat van de gemiddelde waarde (het online model staat niet toe de «gemiddelde» curve te construeren, wat ook niet nuttig zou zijn gelet op de grote verschillen tussen sommige voorgestelde modellen). De modellen die niet beantwoorden aan de vooraf ingestelde betrouwbaarheidscriteria worden uit de gemiddelde berekeningen gehouden.

Ieder model gaat uit van een BMR van 10%, d.w.z. een stijging van 10% risico, wat gebruikelijk is voor niet-continuë gegevenssets zoals carcinogene uitkomsten.

Het is duidelijk dat de aard van de dosis-respons curve in geen enkel geval een betrouwbare BMD-schatting mogelijk maakt, en al helemaal niet voor tumoren waar de top-dosis een te grote daling van de incidentie laat zien t.o.v. de lage- en midden-dosis. De mogelijke oorzaak voor deze dalingen werd niet gegeven maar wel aangestipt in het NTP-rapport. De stof heeft een vrij complexe metabolisatie (de stof induceert haar eigen metabolisme), maar een dergelijk top-dosis effect wordt onvoldoende uitgelegd door eventuele metabolische saturatie of een verhoogde mortaliteit die de testresultaten zou vertroebelen (verhoogde mortaliteit werd waargenomen bij de ♂ muis, maar niet bij de ♂ rat). Anderzijds zijn de vastgestelde verhogingen statistisch beduidend en deze kunnen niet genegeerd worden door het afwijkend effect aan de top-dosis.

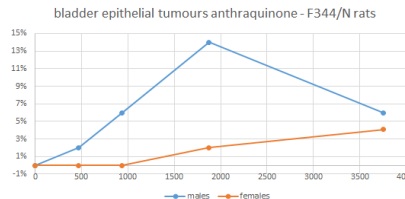
Opmerkelijk is echter dat voor de tumoren die gekenmerkt werden als “duidelijk bewijs” (en waar er een niet-lineaire dosis-respons werd waargenomen) ook geen erg betrouwbare BMDL-schatting mogelijk is. Dit wordt algemeen als typisch beschouwd in de BMDL modellering door PROAST, waar aangenomen wordt dat erg lage BMDL-waarden vaak gegenereerd worden bij supralineaire dosis-respons curves. Voor de hierboven genoemde tumoren komen de BMDL-waarden overeen met:

- Nier: 9,33 ppm ~0,49 mg/kg lg/dag (♀ rat)
- Lever: 0,001540 ppm ~0,15 µg/kg lg/dag (♀ muis) en 55,4 ppm ~5,98 mg/kg lg/dag (♂ muis)

Tabel 1. Overzicht van waargenomen tumoren en de BMD ('benchmark dose')-modellering op de dosis-responsdata van de NTP studies (NTP, 2005)

Soort ♂,♀	Gewicht (*)	Orgaan	neoplasie	Dosis (ppm, X-as)-respons (% , Y-as) (♂,♀)	BMDL ♂	BMDL ♀
Rat, ♀	++++	Nier	tubulaire neoplasie (adenoma+ carcinoma)	renal tubular tumours anthraquinone - F344/N rats 		
Muis ♂,♀	++++	Lever	neoplasie (adenoma+ carcinoma+ hepatoblastoma)	all liver tumours anthraquinone - B6C3F1 mouse 		
Rat, ♂	+++	Nier	tubulaire adenoma	renal tubular tumours anthraquinone - F344/N rats 		
Rat, ♂	+++	Nier/ urineblaas	overgangsepitheel papilloma	renal/bladder epithelial papilloma anthraquinone - F344/N rats 		

Rat, ++
♀ Urineblaas overgangsepitheel adenoma + carcinoma



Rat, ++
♀ Lever Hepatocellulaire adenoma
Rat, +
♂ Lever neoplasië (algemeen)
Rat, +
♂♀ Thyroid Folliculaire neoplasië

(*) "CLEAR evidence" (++++), "SOME evidence" (+++), "WERE related to" (++) , "MAY be related to..." (+)

Tabel 2. Berekende BMDL waarden in de verschillende modellen voor de 3 belangrijkste tumorincidenties waargenomen in de NTP studie van 2004 (NTP, 2005), nl. nier- (♀ rat) en levertumoren (♂♀ muis).

* De relevante details worden weergegeven voor de twee types tumoren waarvoor NTP **duidelijke evidentie** heeft geconcludeerd (in het geel aangeduid het model weergegeven in Tabel 1)

(i) Nier (♀ rat)

Dose (ppm)	Response (%)	N	model	No.par	loglik	AIC	accepted	BMDL (ppm)	BMDU (ppm)	BMD (ppm)	conv
0	0	50	null	1	-1.5236e+02	3.0672e+02		NA	NA	NA	NA
469	12	50	full	5	-1.2470e+02	2.5940e+02		NA	NA	NA	NA
938	18	50	two.stage	3	-1.3050e+02	2.6700e+02	no	NA	NA	3.59e+02	yes
1875	16	50	log.logist	3	-1.2635e+02	2.5870e+02	yes	6.52	263	9.92	yes
3750	29	49	Weibull	3	-1.2623e+02	2.5846e+02	yes	4.23	236	8.00	yes
			log.prob	3	-1.2637e+02	2.5874e+02	yes	9.33	285	117	yes
			gamma	3	-1.2615e+02	2.5830e+02	yes	2.17	223	6.42	yes
			logistic	2	-1.5229e+02	3.0858e+02	no	NA	NA	2.64e+05	yes
			probit	2	-1.0000e+10	2.0000e+10	no	NA	NA	2.63e+08	yes
			LVM: Expon. m3-	3	-1.2695e+02	2.5990e+02	yes	54.40	269	127	yes
			LVM: Hill m3-	3	-1.2650e+02	2.5900e+02	yes	41.40	273	114	yes
			AVERAGE					9.23	305		

(ii) Lever (♀ muis)

Dose (ppm)	Response (%)	N	model	No.par	loglik	AIC	accepted	BMDL (ppm)	BMDU (ppm)	BMD (ppm)	conv
0	6	49	null	1	-1.3660e+02	2.7520e+02		NA	NA	NA	NA
833	30	50	full	4	-1.0733e+02	2.2266e+02		NA	NA	NA	NA
2500	30	50	two.stage	3	-1.1472e+02	2.3544e+02	no	NA	NA	408	yes
7500	41	49	log.logist	3	-1.0861e+02	2.2322e+02	yes	0.001540	138.0	16.5	yes
			Weibull	3	-1.0841e+02	2.2282e+02	yes	0.000136	77.0	5.34	yes
			log.prob	3	-1.0857e+02	2.2314e+02	yes	0.003780	157.0	21.0	yes
			gamma	3	-1.0825e+02	2.2250e+02	yes	0.000000	47.5	0.91	yes
			logistic	2	-1.1773e+02	2.3946e+02	no	NA	NA	812	yes
			probit	2	-1.0000e+10	2.0000e+10	no	NA	NA	6.12e+08	yes
			LVM: Expon. m3-	3	-1.0846e+02	2.2292e+02	yes	2.86	47.0	5.63	yes
			LVM: Hill m3-	3	-1.0840e+02	2.2280e+02	yes	1.49	57.1	2.98	yes
			AVERAGE					0.03	98.8		

(iii) Lever (♂ muis)

Dose (ppm)	Response (%)	N	model	No.par	loglik	AIC	accepted	BMDL (ppm)	BMDU (ppm)	BMD (ppm)	conv
0	26	50	null	1	-1.0878e+02	2.1956e+02		NA	NA	NA	NA
833	35	50	full	4	-9.0290e+01	1.8858e+02		NA	NA	NA	NA
2500	43	50	two.stage	3	-9.0410e+01	1.8682e+02	yes	159.00	354	229	yes
7500	48	49	log.logist	3	-9.0440e+01	1.8688e+02	yes	55.40	1010	315	yes
			Weibull	3	-9.0290e+01	1.8658e+02	yes	12.50	612	146	yes
			log.prob	3	-9.0360e+01	1.8672e+02	yes	57.00	925	315	yes
			gamma	3	-9.0290e+01	1.8658e+02	yes	1.90	709	126	yes
			logistic	2	-9.0780e+01	1.8556e+02	yes	232.00	460	317	yes
			probit	2	-1.0000e+10	2.0000e+10	no	NA	NA	5.21e+08	yes
			LVM: Expon. m3-	3	-9.0310e+01	1.8662e+02	yes	4.68	491	90.4	yes
			LVM: Hill m3-	3	-9.0290e+01	1.8658e+02	yes	8.19	556	119	Yes
			AVERAGE					50.2	922		

Het gebruik van een TD50 (Butterworth, 2001) staat in sterk contrast met elke andere benadering (zowel TTC, BMDL) aangezien de waarden variëren tussen 310 en 940 mg/kg lg per dag. In de publicatie worden echter niet veel details vrijgegeven voor deze berekening.

Voor een stof met een overduidelijk effect op de doelwitorganen lever en nier (ook zichtbaar in de richtinggevende subacute testen en niet-neoplastische eindpunten in de chronische testen, zonder NOAEL) mag niet alleen afgegaan worden op een parameter die rekening houdt met de tumorlatentie (wat de TD50 duidelijk is) maar op de tumorincidentie op zich, en zeker indien een genotoxisch werkingsmechanisme wordt vermoed.

Een andere reden voor het niet-verkiezen van deze methode ligt in de keuze die gemaakt werd voor de bepaling van de TD50 in bepaalde organen. De laagste TD50-waarde (310 mg/kg lg per dag) vindt men in de verhoogde incidentie van urineblaastumoren (overgangsepitheel adenoma + carcinoma) in ♀ ratten, dat door NTP als *mogelijks gerelateerd* met de blootstelling aan AQ («*may be related to...*», ++) werd gekenmerkt (echter enkel bij ♂ ratten!). De dosis-respons kenmerkt zich door een dosisbereik waar geen histopathologische effecten werden gevonden tot en met 1.000 ppm (i.e. een drempel-effect), met een vrij vlak verloop van incidentie aan de hoogste dosis, terwijl in tegendeel een sterke stijging merkbaar is bij de ♂ ratten vanaf de laagste dosis.

De auteurs gaan er kennelijk van uit dat de kankerstudie onbetrouwbaar is door 'confounding' met de onzuiverheid, en dat enkel deze onzuiverheid verantwoordelijk zou zijn voor het positief resultaat. In hun conclusie wordt aangenomen dat in afwezigheid van een betrouwbare kankerstudie op "zuiver" AQ, dat geen mutagen zou zijn op zichzelf, geen definitieve conclusies kunnen getrokken worden aangaande het kankerverwekkende vermogen van AQ. Mocht dit zo zijn, dan lijkt ons dat de voorgestelde TD50-methode, die duidelijk tot een minder kritisch referentiepunt leidt, logischerwijze ook niet preferentieel in aanmerking zou mogen komen voor een MOE aanpak.

Conclusie

Aangezien door de aard van de dosis-respons curve de BMDL-methode niet noodzakelijk tot een meer realistisch RP leidt, menen we dat in dit geval moet uitgegaan worden van de laagste LOAEL (20 mg/kg lg per dag). Als MOE waarboven de blootstelling niet meteen zorgwekkend is, wordt de standaardwaarde van 10.000 voorgesteld, vermenigvuldigd met een bijkomende onzekerheidsfactor van 3 voor het gebruik van een LOAEL als referentiepunt.