

研究报告

基于脱氧雪腐镰刀菌烯醇的概率参考剂量推导及其适用性分析

蔡金良, 魏晟, 吴静

(华中科技大学同济医学院公共卫生学院流行病学与卫生统计学系, 湖北 武汉 430030)

摘要:目的 以脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)的参考剂量(RfD)推导为例,探讨概率RfD的适用性。方法 以世界卫生组织的不确定性分析指南为基础,选择唯一1项小鼠经口慢性暴露于DON的实验数据,分别采用近似概率法和完全概率法推导DON的概率RfD。采用敏感性分析探讨两种概率法分析不确定因素的能力。结果 DON的完全概率RfD为0.42 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{BW}\cdot\text{d}$,略高于近似概率法推导的RfD 0.30 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{BW}\cdot\text{d}$ 。完全概率法的不确定性跨度为42,低于近似概率法的46,提示完全概率RfD的保守性更小。敏感性分析表明,完全概率法极大程度降低了由选择出发点(POD)引起的不确定性。结论 在不确定性分析尤其在POD方面,完全概率法优于近似概率法。当数据满足贝叶斯剂量反应模型的条件,建议采用完全概率法推导相应参考剂量。

关键词:脱氧雪腐镰刀菌烯醇; 概率法; 概率参考剂量; 不确定因素; 贝叶斯基准剂量

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2023)07-0988-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2023.07.003

Derivation of probabilistic reference dose and its applicability analysis based on deoxynivalenol

CAI Jinliang, WEI Sheng, WU Jing

(Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Public Health, Tongji Medical College,
Huazhong University of Science and Technology, Hubei Wuhan 430030, China)

Abstract: Objective Based on the reference dose (RfD) of deoxynivalenol (DON), the applicability of probabilistic RfD was explored. **Methods** Based on the uncertainty analysis guidelines established by the World Health Organization, an experimental study of chronic oral exposure to DON in mice was performed to derive RfD. The probability distribution of the reference dose of DON was calculated by the approximate probabilistic method and the complete probabilistic method, respectively. Then, sensitivity analysis was conducted to study the ability of the two probabilistic methods to analyze uncertainty factors. **Results** The complete probabilistic RfD of DON was 0.42 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{BW}\cdot\text{d}$, which was higher than the approximate probabilistic reference dose of 0.30 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{BW}\cdot\text{d}$, and the complete probabilistic method had an uncertainty spanning factor of 42, which was slightly lower than factor of 46 of the approximate probabilistic method, suggested that complete probabilistic RfD had lower conservatism. Sensitivity analysis showed that the complete probabilistic method greatly reduced the uncertainty caused by point of departure (POD). **Conclusion** The complete probability method has advantages over the approximate probabilistic method in analyzing uncertainty, especially in POD aspects. If the data can satisfy the Bayesian analysis of dose-response model, the use of the complete probabilistic method is recommended.

Key words: Deoxynivalenol; probability method; probabilistic reference dose; uncertain factors; Bayesian benchmark dose

传统参考剂量(确定参考剂量)通常将计算出的选择出发点(Point of departure, POD)除以一系列不确定因素(Uncertainty factor, UF)相乘得出的总不

确定因素来计算参考值,而无法定量评估特定剂量下化学物对个体造成伤害的可能性或该伤害的严重性,因此美国国家研究委员会(National Research Council, NRC)建议使用“概率”的方法来推导概率参考剂量(Reference dose, RfD),其目的是在将剂量反应模型的结果从动物数据推算到人群时,通过概率的方法合并及调整不确定性^[1]。在世界卫生组织的国际化学安全计划(The International Programme on Chemical Safety of World Health Organization, WHO/

收稿日期:2021-07-10

基金项目:国家重点研发计划项目(2018YFC1603105)

作者简介:蔡金良 男 硕士研究生 研究方向为食品安全风险评估 E-mail:m201975300@hust.edu.cn

通信作者:吴静 女 教授 研究方向为慢性病流行病学 E-mail:wujingtj@hust.edu.cn

IPCS)的不确定性分析指南中,专家组以脱氧雪腐镰刀菌烯醇(Deoxynivalenol, DON)为例比较了近似概率参考剂量和传统参考剂量,其结果表明近似概率参考剂量优于传统参考剂量^[2]。而相比于近似概率 RfD, CHIU 等^[3]认为完全概率法或许可以更准确估计不确定性分布,但目前没有研究评估过两种概率方法对不确定性分析的能力。为评估近似概率法和完全概率法在确定参考剂量的差异,本研究分别采用近似概率法和完全概率法进行长期 DON 膳食暴露的参考剂量推导,并探讨两种概率法在不确定性分析方面的适用性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

雄性和雌性 B6C3F1 小鼠取自美国印第安纳州 Halan Sprague Dawley。小鼠在断奶时购买,13~14 g, 22~28 日龄。研究使用 Purina 认证饲料(5002),含有 DON 的日粮与混合前添加玉米油(4%)的 Purina 日粮混合,以减少含有 DON 的灰尘对周围环境的污染。以周为单位计算每个笼子的小鼠的平均每日食物消耗的平均值^[4]。

1.1.2 主要仪器与试剂

研究中使用的样品包括两个来源:(1)田间玉米中提纯和纯化;(2)液体培养,后经乙酸盐水解。根据薄层色谱和质谱分析,样品纯度估计为 95%^[4]。

1.2 方法

1.2.1 DON 对 B6C3F1 小鼠体质量的影响

体质量增加较少与饮食中的 DON 水平有关。雌性小鼠的体质量变化大于雄性,体质量变化与 DON 的剂量关系详细参照 IVERSON 的研究^[4]。

1.2.2 概率风险特定剂量的计算

通常将概率风险特定剂量 HD_M^1 概率分布的 95% 置信下限视为概率 RfD。 HD_M^1 表示在特定的人类剂量或暴露量(Human dose, HD)下,目标人群中关键效应显示出效应或严重性(Magnitude, M)的发生率为 I (Incidence, I),以公式 1 计算^[5]。本研究 POD 均采用基准剂量(Bechmark dose, BMD)或基于贝叶斯的基准剂量(Bayesian Bechmark Dose, BBMD)。公式中每个 AF 代表一个“调整因子”,k 是 AF 的数量。等式中的每个部分都被视为连续随机变量,其分布则反映了其中的不确定性。因此, HD_M^1 也是一个具有分布的随机变量。

$$HD_M^1 = \text{POD} / \text{AF}_1 \times \dots \times \text{AF}_k \quad \text{公式(1)}$$

1.2.3 APROBA 推导近似概率 RfD

采用 WHO/IPCS 发布的工具 APROBA (the

Approximate Probabilistic Analysis spreadsheet)^[2] 推导近似概率 RfD。此时,公式(1)中各 AF 被视为独立的对数正态分布随机变量。默认情况下,APROBA 包含以下不确定性成分:选择 POD 产生的部分 AF;动物与人类毒代谢和毒动力(Toxicokinetic/Toxicodynamic, TK/TD)差异方面的 AF;动物与人体型(Interspecies scaling)差异的 AF;动物实验暴露周期与估计人群的暴露周期不同的持续时间外推的 AF;人群内部的种内变异 AF。对于上述各 AF,APROBA 提供临时对数正态参数值(P50、P95、P95/P50),这些值源自 IPCS 的荟萃数据^[6]。本研究将膳食暴露 2 年的研究特征和体质量减轻终点以及影响 M(5%)和人类发病率 I (1%)的大小输入 APROBA。动物种族选择小鼠,动物体质量和目标人群体质量输入为 0.04 kg 和 60 kg,并将“基准剂量下限(BMD lower limit, BMDL)”设为 POD 类型,估计目标人群剂量 HD_{05}^{01} ,即该剂量引起 5% 体质量变化在人群中的发生率为 1%。

1.2.4 BBMDs 推导完全概率 RfD

采用 SHAO 和 SHAPIRO^[8] 的贝叶斯基基准剂量系统(Bayesian Benchmark dose system, BBMDs) (<https://benchmarkdose.org/>) 自动化推导完全概率 RfD。该法通过马尔卡夫链蒙特卡罗(Markov Chain Monte Carlo, MCMC)实现更精确的不确定性分布估计^[3]。BBMDs 中的不确定性组件与 APROBA 相同,它提供通过总结经验数据^[2] 得出的各不确定性分布的临时默认几何残差。首先将表 1 数据输入系统,采用迭代 30 000 次、预热百分比 50%、随机种子编号的默认设置进行 MCMC 模拟以估计 BBMD。然后采用默认的 BBMD 类型(基于中心相对变化)和随机种子参数(3 664)推导 RfD,动物种族和体质量以及目标人群体质量的设定均与 APROBA 相同。

表 1 膳食暴露 2 年 DON 对 B6C3F1 小鼠体质量的影响
Table 1 Effect of 2 years of dietary exposure to DON on body weight in B6C3F1 mice

组别	样本量	剂量(mg/kg·BW·d)	体质量/g
雌性			
A	36	0	41.54 ± 6.26
B	42	0.12	38.71 ± 4.73
C	37	0.70	33.76 ± 3.92
D	38	1.50	28.55 ± 2.08
雄性			
A	37	0	43.85 ± 2.69
B	35	0.10	43.51 ± 2.86
C	43	0.50	40.04 ± 3.00
D	42	1.10	35.09 ± 2.56

注:每组小鼠平均体质量为 40 g

1.2.5 两种概率法结果的敏感性分析及其保守性比较

概率法可分析各种来源的不确定性对总不确

定性的相对贡献度,从而确定不确定性的最大来源,然后通过敏感性分析评估难以量化的剩余不确定性。本研究通过比较两种概率法中选择导致的不确定因素(Point of departure, POD)AF对总不确定度相对贡献的大小来评估其结果的稳定性。采用不确定度跨度(Degree of uncertainty, DOU)评估两种概率RfD的保守性大小。DOU等于 HD_{05}^1 的UCL除以LCL,表示真实人群安全剂量可能高于概率参考剂量的倍数。在统一预设的置信度下,DOU越小,参考剂量的保守性则越小。

2 结果

2.1 膳食暴露2年DON对B6C3F1小鼠体质量的影响

由于动物数据外推人群的局限性,慢性暴露的动物数据是推导参考剂量的最优选择,因此选择唯一的1项慢性经口暴露DON的B6C3F1小鼠动物实验数据^[4],用于推导体质量减轻为关键效应的概率RfD。实验动物分雌、雄两组,分别进行不同浓度DON的喂养,剂量为动物实际的DON摄入量,见表1。

2.2 DON的近似概率RfD

根据欧洲食品安全局食物链宪法小组(the European Food Safety Authority Panel on Contaminants in the Food Chain, CONTAM)计算出的BMD范围0.11~0.28 mg/kg·BW·d,将其下限和上限分别作为BMDL/基准剂量上限(BMD upper limit, BMDU)输入APOROA。除了POD AF,其他方面AF分布均采用默认参数值(表2),得出 HD_{05}^1 的95%置信分布为0.30~13.66 μg/kg·BW·d。该范围的下置信限0.3 μg/kg·BW·d即为近似概率RfD。

表2 近似概率参考剂量的不确定性组成

Table 2 Uncertainty composition of approximate probabilistic reference dose

各部分不确定性	LCL	GM	UCL
POD AF/(mg/kg)	0.11	0.18	0.28
种间缩放 AF	6.70	8.97	12.02
种间TK/TD AF	0.33	1.00	3.00
种内差异 AF(I=1%)	2.24	9.69	41.80
HD_{05}^1 /(μg/kg)	0.30	2.00	13.66

注:LCL:低于5%置信限;GM:几何平均值=对数正态近似估计下的中位数;UCL:95%置信上限;POD:出发点;AF:调整因素;TK/TD:毒性动力学;I:人群发生率; HD_{05}^1 :在人口分布中最敏感的1%的部分造成5%体质量变化的人体剂量

2.3 DON的完全概率RfD

在BBMDS中采用8个连续变量数据的剂量反应模型(Linear, Power, Michaelis Menten, Hill, Exponential 2, Exponential 3, Exponential 4, Exponential 5)进行拟合,各模型拟合曲线见图1。Exponential 4模型的后验权重最大即最佳拟合结果,取其BMD₅为BBMD,见表3。因此,BBMD为Exponential 4模型的95%CI 0.098~0.213 mg/kg·BW·d。计算出的 HD_{05}^1 各百分位数见表4,取 P_{05} 和 P_{95} 为其LCL和UCL,范围为0.43~18.11 μg/kg·BW·d。完全概率RfD可视为 HD_{05}^1 的95%置信下限(0.43 μg/kg·BW·d)。

2.4 两种概率法结果的敏感性分析及其保守性比较

由表5可见,种间AF和TK/TD AF是本次研究数据不确定性的主要来源,尤其是种间AF远大于其他部分。近似概率RfD中POD AF的贡献比完全概率RfD高12倍,提示完全概率法极大程度降低了POD来源的不确定性。两种概率法的POD分别为BMD和BBMD,当使用BBMD替代BMD在APOROA中计算近似概率RfD后,POD AF对总不确定度的相对贡献从6%减少到4%。与完全概率

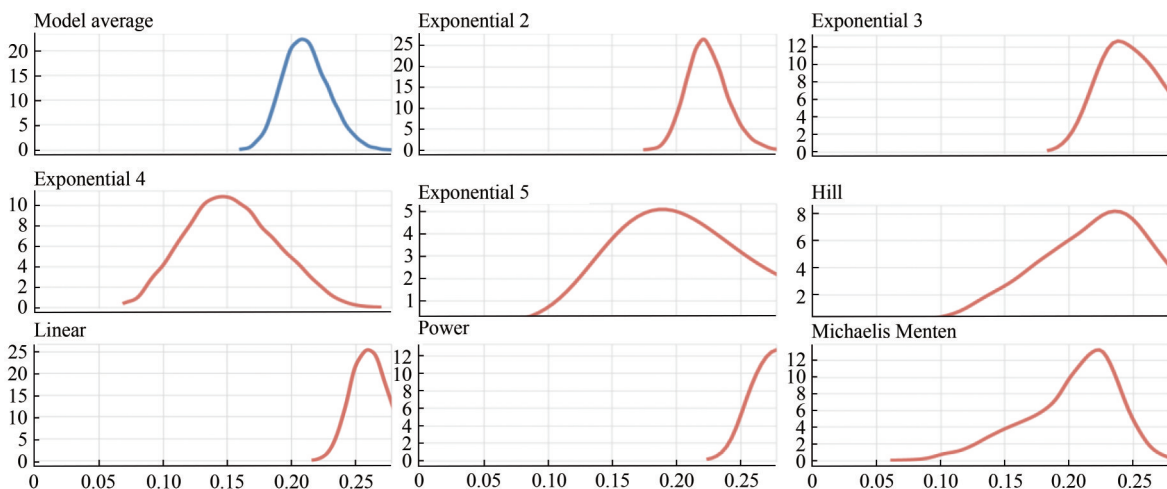


图1 各BMD模型及模型平均的拟合曲线

Figure 1 The fitting curve of each BMD model and the model average

表 3 BBMD 推导结果
Table 3 Results of BBMD

模型	后验权重	BMDL ₅	Mean (SD)	95% CI
model average	N/A	0.184	0.211 (0.018)	0.242
Linear	0.07	0.238	0.262 (0.016)	0.289
Power	0.018	0.252	0.301 (0.042)	0.380
MM	0.192	0.132	0.202 (0.037)	0.251
Hill	0.083	0.141	0.230 (0.057)	0.328
Exp2	0.213	0.2	0.224 (0.016)	0.251
Exp3	0.059	0.213	0.262 (0.042)	0.343
Exp4*	0.284	0.098	0.153 (0.035)	0.213
Exp5	0.08	0.134	0.284 (0.141)	0.578

注:后验权重最大的为拟合最佳模型;BMDL₅:BBMD的95%置信区间下限值;Mean (SD):即相比对照组,结局产生5%效应变化时的剂量;*指数4模型拟合最好

RfD的POD AF贡献相比,从相差12倍变为相差8倍。这提示完全概率法解决POD来源不确定性的能力不是单独通过贝叶斯优化BMD的结果。

在不确定性评估的背景下,保守性小表示RfD

表 4 完全概率法的HD_M¹的分布

Table 4 HD_M¹ distribution of complete probability method

百分位数	HD _M ¹
P ₀₁	0.000 1
P ₀₅	0.000 4
P ₁₀	0.000 8
P ₂₅	0.001 8
P ₅₀	0.003 9
P ₇₅	0.007 6
P ₉₀	0.013 3
P ₉₅	0.018 1
P ₉₉	0.031 7
平均数	0.005 9
标准差	0.006 7

注:P₀₅和P₉₅分别作HD_M¹的上下限,完全概率RfD值为P₀₅

可以更精确严谨地实现对目标人群的保护^[2]。本研究的置信度均设为95%,表示概率RfD有95%的可能性低于真实的人类安全剂量。完全概率法中HD₀₅⁰¹分布为0.43~18.11 μg/kg·BW·d,近似概率法为0.30~13.66 μg/kg·BW·d。在相同的95%置信度下,两种概率RfD的DOU分别为42和46(图2),完全概率法的DOU更低,表示保守性更小,完全概率法更大程度地降低了总不确定性。

表 5 各来源不确定因素对总不确定度的相对贡献

Table 5 Relative contribution of each aspect of uncertainty to the total uncertainty

不确定度来源	BBMD ^f /%	BBMD ^a /%	BMD ^f /%
POD AF	0.50*	4.00	6.00
Allometric scaling AF	2.23	2.00	2.00
TK/TD AF	31.73	34.00	33.00
种间 AF	65.54	60.00	59.00

注:f:完全概率法的不确定度贡献分布;a:BBMD为POD时,近似概率法参考剂量的不确定度贡献分布;BMD:近似概率法的不确定度贡献分布;*:完全概率法的POD AF接近0

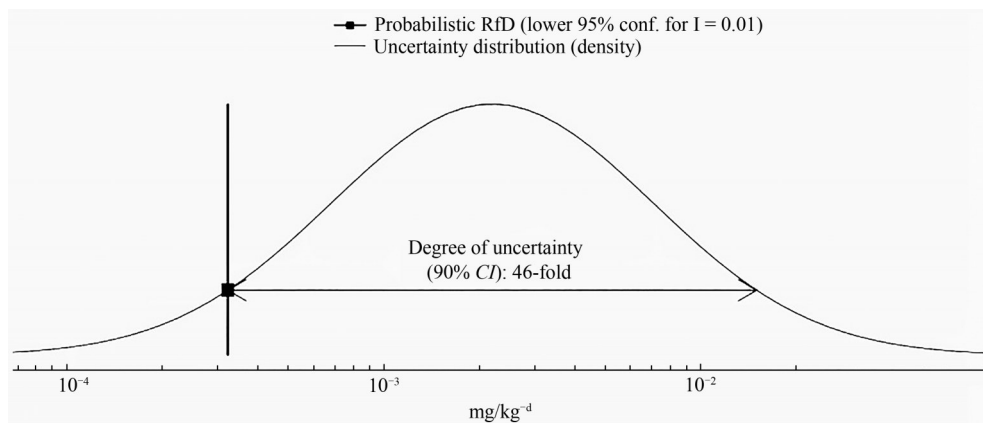


图 2 近似概率法 HD₀₅⁰¹的不确定分布

Figure 2 The uncertain distribution of HD₀₅⁰¹ of approximate probability method

3 讨论

本研究采用近似概率法和完全概率法两种方法推导了DON的RfD,评估了两者在不确定性分析方面的能力。尽管完全概率RfD略高于近似概率

RfD,但完全概率RfD的总不确定性小于近似概率RfD。同时更小的DOU表明完全概率RfD减少了参考剂量的保守性。在各来源的不确定性相对贡献中,两种方法中最大的部分均来自人群变异性以

及动物和人 TK/TD 的差异,POD 来源的贡献最低。完全概率法的 POD 来源的不确定性相对贡献为最低值(0.5%)。

完全概率法在估计 RfD 的计算中降低了 POD 来源的不确定性,BBMD 与 MCMC 模拟均发挥了作用。相关研究表明,NOAEL 作为毒理学风险评估的 POD 存在局限性。NOAEL 依赖样本量及实验方法的灵敏性,其结果稳定性差且无法充分利用数据信息,因此 EFSA 认为 BMD 更合适作为 POD^[7]。CHIU 等^[3]对 608 种化学物的不确定性分析结果表明,最大的单一不确定性来源是使用 NOAEL 而不是 BMDL 作为 POD。与 BMD 相比,BBMD 通过贝叶斯框架纳入了先验信息,提高了数据的剂量反应建模的可靠性,而且它的分布性质更符合概率风险评估^[8]。在敏感性分析中,使用 BBMD 推导近似概率 RfD 后,POD 来源的不确定贡献度降低,但没有完全概率法显著。一方面可能是因为纳入的数据与剂量反应模型拟合较好,而对于其他低质量的数据(如样本不足、周期短等),BBMD 可以发挥更好的作用;另一方面也展现出通过 MCMC 分析不确定性分布是近似概率法无法实现的优势。

完全概率法虽然降低了 RfD 的总不确定性,但本研究不能证明完全概率 RfD 相比近似概率 RfD 更具保护性。首先,由于两者的 POD 和不确定性均采用不同的方法计算,所以通过直接比较参考剂量的大小来判断其保护性的优劣并不合理^[2]。如何选择 RfD,首要应该考虑风险管理的需求。若要最大程度保护人群,则更推荐使用近似概率 RfD;若要降低保守性以更好的实现保护目标,则更推荐使用完全概率 RfD。其次,由于种间 AF 和 TK/TD AF 的变异性没有更好的历史数据调整,因此如何更好量化这两部分的不确定性,后续仍需进一步探索。新兴的分子生物学技术和高通量系统可为更快方式解决这一数据需求提供机会^[9]。另外,概率法要求数据有良好的剂量反应关系,否则难以量化不确定性。此外,概率框架也不建议使用

化学调整因子或者生物模型等调整的数据,这会产生额外的不确定性,且目前缺少对此类不确定性的量化工具^[3]。

总之,概率法计算参考剂量还需要更多模型及数据的支持,但它在食品安全风险评估的流程中有着令人期待的前景,使用概率法可以更精准地估计不确定性分布,使参考剂量的推导更严谨透明,提供更明智的风险管理决策。

参考文献

- [1] SWARTOUT J C, PRICE P S, DOURSON M L, et al. A probabilistic framework for the reference dose (probabilistic RfD)[J]. *Risk Analysis*, 1998, 18(3): 271-282.
- [2] World Health Organization. Guidance document on evaluating and expressing uncertainty in hazard characterization- 2nd edition[R]. Geneva: WHO, 2018: 1-158.
- [3] CHIU W A, AXELRAD D A, DALAIJAMTS C, et al. Beyond the RfD: Broad application of a probabilistic approach to improve chemical dose-response assessments for noncancer effects [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2018, 126(6): 067009.
- [4] IVERSON F, ARMSTRONG C, NERA E, et al. Chronic feeding study of deoxynivalenol in B₆C₃F₁ male and female mice [J]. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, 1995, 15(6): 283-306.
- [5] CHIU W A, SLOB W. A unified probabilistic framework for dose-response assessment of human health effects[J]. *Environmental Health Perspectives*, 2015, 123(12): 1241-1254.
- [6] BLESSINGER T, DAVIS A, CHIU W A, et al. Application of a unified probabilistic framework to the dose-response assessment of acrolein[J]. *Environment International*, 2020, 143: 105953.
- [7] SCIENTIFIC COMMITTEE E A, HARDY A, BENFORD D, et al. Update: Use of the benchmark dose approach in risk assessment [J]. *EFSA Journal European Food Safety Authority*, 2017, 15(1): e04658.
- [8] SHAO K, SHAPIRO A J. Erratum: A web-based system for Bayesian benchmark dose estimation [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2022, 130(3): 39002.
- [9] DARNEY K, TURCO L, BURATTI F M, et al. Human variability in influx and efflux transporters in relation to uncertainty factors for chemical risk assessment [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2020, 140: 111305.