



## Appendiks I: Evaluering af kravværdien for nitrat i drikkevand

### Miljøstyrelsens beskrivelse af opgaven

- 1) Miljøstyrelsen (MST) bad d.9. november 2023 DTU Fødevareinstituttet om at fremsende oplysninger om kendskab til ny viden eller nye data, der undersøger sammenhængen mellem nitrat i drikkevand og kolorektalkræft eller andre former for kræft. Det vil sige siden DTU Fødevareinstituttet sidst evaluerede grænseværdien, DTU DOCX nr. 19/1037578. DTU Fødevareinstituttet fremsendte information til MST om nye studier d.22. november 2023.
- 2) Endvidere bad MST DTU Fødevareinstituttet om "*en faglig vurdering af, om der er nye data, der understøtter en sænkning af kravværdien for nitrat i drikkevand, og i givet fald komme med et konkret forslag til et sundhedsmæssigt baseret kvalitetskriterium for nitrat i drikkevand*".
- 3) MST fremsendte d.5. december kommentarer fra Sundhedsstyrelsen (SST, 1/5-2020, Sagsnr. 03-0099-20) og Fødevarestyrelsen (FVST), samt liste over nye studier som SST havde identificeret.

### DTU Fødevareinstituttets konkretisering af opgaven

DTU Fødevareinstituttet fremsendte d.1. december et forslag til MST til, hvordan opgaven kunne udføres, hvorefter opgaven blev konkretiseret i løbende dialog med MST.

- 1) På baggrund af konklusionerne i 2019-notatet vil det primære fokus for den aktuelle opgave være en gennemgang af de nye befolkningsundersøgelser af sammenhængen mellem nitrat i drikkevand og udvikling af kræft, der er publiceret siden 2019, hvor DTU Fødevareinstituttet sidst vurderede risikoen.

- 2) Der er ligeledes publiceret nye befolkningsundersøgelser, der har undersøgt association mellem nitrat i drikkevand og risikoen for skadevirkninger på reproduktion eller misdannelser. Men for disse skadevirkninger mangler der, i modsætning til udvikling af kræft stadig mekanistiske studier og dyreforsøg, der kan underbygge de associationer, der er fundet i nogle af befolkningsundersøgelserne. Afsnittet der behandler disse studier vil blive opdateret, men holdt i samme stil som i 2019-notatet. Det vil sige at der i vurderingen lægges vægt på en kortfattet gennemgang af undersøgelseernes resultater.
- 3) Derfor, hvis der er nye data, der substantielt kan understøtte en sænkning af kravværdien for nitrat i drikkevand, skal de findes i de data, der vedrører sammenhængen mellem nitrat i drikkevand og udvikling af kræft. I særdeleshed i de data, der vedrører sammenhængen mellem nitrat i drikkevand og udvikling af kolorektalkræft.
- 4) Kvaliteten af udførelsen af nye oversigtsartikler med metaanalyser af sammenhængen mellem eksponering for nitrat i drikkevand og udvikling af kolorektalkræft vil blive vurderet. De nye befolkningsundersøgelser af sammenhængen mellem eksponering for nitrat i drikkevand og udvikling af kolorektalkræft samt de befolkningsundersøgelser (primære studier), der er inkluderet i oversigtsartiklerne, vil så vidt muligt blive vurderet iht. de anbefalinger, der er udviklet af arbejdsgruppe ifm. brug af befolkningsundersøgelser i risikovurdering af pesticider (Notat 1, <https://www.ft.dk/samling/20181/almdele/MOF/bilag/355/index.htm>). Dette inkluderer vurdering af pålidelighed for hver af studierne og vurdering af relevans (evidensintegrering).
- 5) De nye befolkningsundersøgelser af eksponering for nitrat i drikkevand og udvikling af andre kræftformer end kolorektalkræft vil blive beskrevet på samme vis som i 2019-notatet. Dvs. en kortfattet gennemgang af undersøgelserne og deres resultater.
- 6) De dele af vurderingen i 2019, der ikke vedrører befolkningsundersøgelser, vil blive gennemgået, også i forhold til de fremsendte kommentarer fra SST og FVST, og opdateret om nødvendigt. Der er dog fremkommet meget få nye data. MST har betonet, at det er særlig vigtigt, at gennemgangen af nitrats akutte toksicitet (methæmoglobinæmi) bliver opdateret.

- 7) På baggrund af den opdaterede vurdering vil DTU Fødevareinstituttet evaluere, om der kan være basis for at fremkomme med et konkret forslag til et sundhedsmæssigt baseret kvalitetskriterium for nitrat i drikkevand.
- 8) Det nye notat er en opdatering af DTU Fødevareinstituttets vurdering i 2019. På baggrund af opdateringen vil DTU Fødevareinstituttet foretage en revurdering af DTU Fødevareinstituttets konklusioner i 2019-notatet.
- 9) Som i 2019 omfatter det opdaterede notat ikke:
  - Studier vedrørende nitrats samlede indvirkning på folkesundheden, herunder gavnlige sundhedsmæssige påvirkninger, samt undersøgelser af nitrat, der ikke vurderes som relevante i forhold til at vurdere risikoen af nitrat i drikkevand.
  - En stillingtagen til det acceptable daglige indtag (ADI) af nitrat, fastsat af den Europæiske Fødevarerikkerhedsautoritet (EFSA) eller Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA).
  - En stillingtagen til om den nuværende grænseværdi for nitrat i drikkevand bør ændres (risikohåndtering).

## Indtag af nitrat

Nitrat forekommer naturligt og er vigtigt næringsstof for planter vækst. Planterne kan optage nitrat fra jorden hvad enten nitraten kommer fra naturlige kilder eller fra kunstgødning. Nitrat forekommer således i varierende koncentrationer i alle planter og dermed i mange plantebaserede fødevarer. Nitrat forekommer også i drikkevand. Mennesker indtager således nitrat fra plantebaserede fødevarer, fra forarbejdede fødevarer som følge af anvendelse af nitratsalte som tilsætningsstoffer og fra drikkevand. Grøntsager udgør generelt den største enkeltkilde til indtaget af nitrat. Men indtag fra kornprodukter, oliefrø og frugt bidrager også relativt meget. Nitrat omdannes i nogen grad til det langt mere toksiske nitrit efter indtagelse. Derfor er det nødvendigt at inddrage nitrit i vurderingen af nitrat.

Den seneste indtagsberegning for nitrat er foretaget af Den Europæiske Fødevarer sikkerhedsautoritet EFSA (2017c). Det er beregnet, at med en nitrat koncentration på 7,9 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/l drikkevand så vil drikkevand typisk udgøre omkring 10 % af det samlede nitratindtag. Hvis vandet kommer fra en boring, hvor koncentrationen af nitrat ligger på den nuværende grænseværdi (50 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/l), så vil drikkevand udgøre omkring 40 % af det totale nitratindtag. I nedenstående tabel 1 er resultaterne af EFSA's estimerede nitratindtag for danske borgere præsenteret. I efterfølgende tabel 2 er bidraget fra drikkevand sat til 0.

**Tabel 1.: Danske borgeres estimerede totale nitrat indtag, i mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/kg legemsvægt pr. dag (EFSA, 2017c)\***

	Spædbørn	Små børn	Børn	Unge	Voksne	Ældre
	< 1 år	1 – <3 år	3 – 9 år	10 – 17 år	18 – 64 år	≥ 65 år
Gennemsnit	2,2 (0,06)	2,3 (0,06)	2,2 (0,06)	1,3 (0,04)	1,1 (0,03)	1,0 (0,03)
95 percentil	3,9 (0,11)	3,5 (0,10)	3,8 (0,11)	2,3 (0,06)	1,9 (0,05)	1,6 (0,04)

\* Data korrigeret for tab af nitrat under tilberedning af mad. Conc. i drikkevand: 7,9 mg/kg. Tal i parentes angiver nitritindtag som følge af en ca. gennemsnitlig endogen nitritdannelse på 3,75 % (25 % nitrat udskillelse i spyt og 15 % omsætning til nitrit).

**Tabel 2.: Som tabel 1, men uden bidrag fra vand (EFSA, 2017c)\***

	Spædbørn	Små børn	Børn	Unge	Voksne	Ældre
	< 1 år	1 – <3 år	3 – 9 år	10 – 17 år	18 – 64 år	≥ 65 år
Gennemsnit	2,0 (0,06)	2,0 (0,06)	2,0 (0,06)	1,1 (0,03)	1,0 (0,03)	0,9 (0,02)
95 percentil	3,5 (0,10)	3,2 (0,09)	3,5 (0,10)	2,0 (0,06)	1,7 (0,05)	1,4 (0,04)

\* Data korrigeret for tab af nitrat under tilberedning af mad. Tal i parentes angiver nitritindtag som følge af en ca. gennemsnitlig endogen nitritdannelse på 3,75 % (25 % nitrat udskillelse i spyt og 15 % omsætning til nitrit).

Risikovurdering af nitrat er, som nævnt, relateret til risikovurderingen af nitrit. I nedenstående tabel 3 er de af EFSA (2017b) estimerede nitritindtag for danske borgere præsenteret (inkludere ikke bidrag fra indtaget af nitrat).

**Tabel 3.: Danske borgeres estimerede totale nitrit indtag, i mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/kg legemsvægt pr. dag (EFSA, 2017b)**

	Spædbørn	Små børn	Børn	Unge	Voksne	Ældre
	< 1 år	1 – <3 år	3 – 9 år	10 – 17 år	18 – 64 år	≥ 65 år
Gennemsnit	0,08	0,10	0,08	0,05	0,04	0,04
95 percentil	0,15	0,16	0,14	0,08	0,06	0,06

Værdierne for indtag i tabel 3 vurderes at være overestimerede i og med, at EFSA har beregnet dem på basis af europæiske niveauer for anvendelse af nitrit som tilsætningsstof i fødevarer. Danmark har mere restriktive regler for nitrit tilsætning til kødvarer end det øvrige EU. EFSA (2017b) har anslået, at nitritindholdet i forarbejdede kødvarer på det danske marked er 30 til 50 % lavere end i resten af EU. I gennemsnit bidrager tilsætningsstoffer med 17 % af nitritindtaget (der er dog stor individuel variation). Det vil sige, at tallene i tabel 3 er overestimerede med omkring 5-10 %.

## Absorption, fordeling, metabolisme og udskillelse

Oralt indtaget nitrat absorberes hurtigt og næsten fuldstændigt fra kosten i mavetarmsystemet. Det absorberede nitrat fordeles hurtigt i kroppens væv. Mennesker danner også selv nitrat fra nitrogen oxide eller nedbrydning af proteiner (endogen dannelse). Nitrat udskilles hurtigt og effektivt, primært sker udskillelsen via urinen. Nitrat udskilles også via modermælk. Hos mennesker udskilles nitrat også i spytet, formodentlig via transportproteinet  $\text{Na}^+/\text{I}^-$  symporter (NIS). NIS er ansvarlig for transporten af nitrat i plasma ind i andre organer, f.eks. skjoldbruskirtelen eller mælkekirtler (EFSA, 2017c). EFSA (2017c) har redegjort for, at omkring 20-25 % af den indtagne mængde nitrat udskilles i menneskers spyt, og 5-36 % omsættes til nitrit af nitratreducerende bakterier i mundhulen, hvilket betyder, at 1-9 % af den indtagne mængde nitrat omsættes til nitrit i mundhulen. Hos rotter er denne omsætning minimal, hvilket er en væsentlig begrænsning, når rotten anvendes som forsøgsdyr i toksikologiske undersøgelser af nitrat. Noget nitrat kan også reduceres til nitrit i maven og af nitratreducerende bakterier i tarmen. Hos spædbørn kan der opstå vækst af nitratreducerende bakterier i den øvre del af maven grundet højere pH i deres mave (EFSA, 2017c). Dette betyder, at spædbørn er mere følsomme over for den akut toksiske effekt af nitrat, end tilfældet er for ældre børn og voksne. I kroppen kan nitrit re-oxideres til nitrat eller omdannes til nitrogen oxider (EFSA, 2017c; Pereira *et al.*, 2013).

Da nitrit er langt mere toksisk end nitrat, så hænger nitrat og nitrit uløseligt sammen, når der skal foretages en risikovurdering af menneskers eksponering for nitrat.

## Vurdering af grænseværdi i forhold til akut toksicitet

Selv om nitrat i sig selv (*per se*) har et meget lavt akut toksisk potentiale, så kan nitrat, som beskrevet, omdannes til nitrit af bakterier i mundhulen og i mavetarmkanalen. Nitrit kan oxidere jern atomet i hæmoglobinmolekylets hæm grupper fra  $\text{Fe}^{2+}$  til  $\text{Fe}^{3+}$ , og der dannes methæmoglobin.  $\text{Fe}^{3+}$  kan ikke binde ilt og ændringen fører ligeledes til en allosterisk ændring hæmoglobinmolekylet så ilt bindes stærkere til de resterende  $\text{Fe}^{2+}$  ioner. Resultatet er hæmoglobinets vitale evne til at transportere ilt rundt i kroppen reduceres hvilket fører til methæmoglobinæmi. Dette kan føre til cyanose (blåfarvning af huden) hvilket har givet navn til "blå-børn-syndrom". Men det skal understreges, at der skal en vis forøgelse af methæmoglobinniveauet i blodet til, før der optræder synlige tegn på cyanose. Methæmoglobin udgør normalt 1 % af organismens hæmoglobin. Hos de mest følsomme spædbørn er der set cyanose ved en koncentration på 3 % methæmoglobin, men generelt vil cyanose først ses ved en koncentration på 10 % methæmoglobin, mens at der ved en koncentration på 20 % methæmoglobin kan opstå hypoxi (iltmangel i vævene) (EFSA, 2010). Ved en koncentration på 50 % eller højere kan koma og død hurtigt indtræde (Knobeloch *et al.*, 2000).

For at undgå cyanose hos små børn fastsatte US Environmental Protection Agency (US-EPA) en grænseværdi for nitrat i drikkevand på 10 mg  $\text{NO}_3^-$ -N (nitrat-nitrogen)/liter vand (44,3 mg  $\text{NO}_3^-$ /l), hvilket nogenlunde svarer til WHO's og EU direktivets grænseværdi på 50 mg  $\text{NO}_3^-$ /l. Baggrunden for fastsættelsen af grænseværdien skulle være et litteraturstudie udført af Walton (1951). Walton (1951) fandt at der ikke var nogen tilfælde af methæmoglobinæmi ved 44,3 mg  $\text{NO}_3^-$ /l, mens at i 2,3 % af tilfældene var nitratindholdet under 88,6 mg  $\text{NO}_3^-$ /l (hhv. 10 og 20 mg kvælstof nitrat/liter). US-EPA må have valgt at fastsætte grænseværdien baseret på at der ikke er registreret tilfælde ved et drikkevandindhold på 44,3 mg  $\text{NO}_3^-$ /l. Det vil sige at US-EPA har brugt en sikkerhedsfaktor på under 2. I dag ville man næppe have valgt en så lille sikkerhedsfaktor hvis man skulle have fastsat en grænseværdi på basis af Walton (1951) data. Men tilsyneladende har indførelsen af en grænseværdi på 50 mg  $\text{NO}_3^-$ /l været tilstrækkelig til at undgå at spædbørn udviser symptomer på methæmoglobinæmi.

Kontrol med nitratindholdet i drikkevandsforsyninger har i dag kraftigt reduceret antallet af tilfælde af methæmoglobinæmi hos spædbørn, men der ses stadig tilfælde. Eksempelvis har Knobeloch *et al.* (2000) rapporteret om to tilfælde af methæmoglobinæmi fra 1998 og 1999, hvor der til fremstilling af modermælkserstatning var anvendt drikkevand med hhv. 100 og 120 mg  $\text{NO}_3^-$ /l.

DTU Fødevareinstituttet vurderer, at hvis den nuværende grænseværdi for nitrat i drikkevand på 50 mg/liter overholdes, så udgør nitrat en ubetydelig sundhedsmæssig risiko i forhold til at der ses akutte effekter af nitratindtaget hos spædbørn. Det skal dog bemærkes, at der kun er en meget lille margin mellem den nuværende grænseværdi, og til den nitrat koncentration i drikkevand hvor en sundhedsmæssig risiko hos spædbørn ikke kan udelukkes. Selv mindre overskridelser af grænseværdien kan således medføre en risiko hvis drikkevandet bruges i modermælkserstatninger.

EFSA (2010) vurderede risikoen for methæmoglobinæmi som følge af nitratindtag. Det blev vurderet, at der ikke var tilstrækkelige data til fastsættelse af en akut reference dosis (ARfD). Men for børn over 3 måneder vurderede EFSA, at der ikke sker en forøgelse af koncentrationen af methæmoglobin, når det daglige indtag af nitrat holdes under 15 mg  $\text{NO}_3^-$ /kg legemsvægt. Det vil sige, at et 5 kg spædbarn kan indtage max. 75 mg  $\text{NO}_3^-$ , hvis indtaget skal holdes under 15 mg  $\text{NO}_3^-$ /kg legemsvægt. EFSA (2017a) anbefaler, at eksponeringsberegninger for stoffer i modermælkserstatninger baseres på 95 percentilen for indtag af modermælkserstatning, som er estimeret til 260 ml/kg legemsvægt. Dvs. at et 5 kg barn, der indtager 1,3 liter modermælkserstatning om dagen med et nitratindhold svarende til den nuværende grænseværdi, vil kunne indtage 65 mg  $\text{NO}_3^-$ , altså ikke langt fra de ovenfor beregnede 75 mg  $\text{NO}_3^-$ . Hertil kommer, at spædbørn under 3 måneder er mere følsomme for methæmoglobinæmi end ældre spædbørn grundet en 40-50 % lavere NADH-cytochrome b5 MetHb reductase aktivitet (det enzym der gendanner hæmoglobin fra methæmoglobin) (EFSA, 2010).

DTU Fødevareinstituttet vurderer, at det ikke kan udelukkes, at der kan ske en forøgelse af niveauet af methæmoglobin hos de mest følsomme spædbørn under 3 måneder, selv om grænseværdien for nitrat i drikkevand på 50 mg/l overholdes (forøgelsen er for lav til at der kan opstå synlige tegn på methæmoglobinæmi). Om der kan være sundhedsmæssige konsekvenser af et sådan lettere forhøjet niveau af methæmoglobin, er dog uvist.

## Vurdering af grænseværdi i forhold til kroniske ikke-neoplastiske skadevirkninger i forhold til nitrat *per se*.

Generelt har nitrat *per se* en meget lav kronisk toksicitet. Men der er beskrevet effekter af nitrat på skjoldbruskkirtlen i en række studier med forsøgsdyr såvel som hos mennesker.

EFSA har gennemgået en del dyrestudier, der omhandler effekter af nitrat på skjoldbruskkirtlen og skjoldbruskkirtelhormoner (EFSA, 2017c). Overordnet viser disse studier, at nitrat sænker absorptionen af jod i skjoldbruskkirtlen og øger vægten af skjoldbruskkirtlen. Der ses desuden i flere studier en stigning i blodkoncentrationen af TSH og en sænkning af T3 og T4. I de fleste studier ses der et fald i blodkoncentrationen af både T3 og T4, men der findes studier, der viser den modsatte effekt.

EFSA har ligeledes gennemgået de humane studier. Dels et enkelt forsøg med frivillige og dels epidemiologiske studier (EFSA, 2017c). Forsøget i frivillige viste ingen effekt, men dosen var relativt lav, og forsøget kørte kun i 28 dage. Flere epidemiologiske studier viser en korrelation mellem drikkevandets indhold af nitrat og størrelsen af skjoldbruskkirtlen. Nogle studier finder desuden en øget forekomst af struma i områder, hvor der er et højt indhold af nitrat i drikkevandet. Der er også studier, der ikke viser nogen sammenhæng. EFSA konkluderede samlet, at der er nogen evidens for en association mellem indtag af nitrat fra drikkevand og både struma og størrelsen af skjoldbruskkirtlen (EFSA, 2017c).

I et slovakisk tværsnitstudie blev sammenhængen mellem struma i stadie 1 hos gravide og indholdet af nitrat i drikkevand undersøgt. Indholdet af nitrat i højdosis området var 93 mg/l (n=26) og 8 g/ml i lavdosisområdet (n=22). Odds ratio for udviklingen af struma var 5,924 (CI 1,003-27,939, p=0,0454) (EFSA, 2017c).

I et andet tværsnitstudie blev der gennemført en klinisk undersøgelse af skjoldbruskkirtelstatus hos børn, der var kronisk udsat for høje niveauer af nitrat i drikkevand (78 mg/l) og børn der var udsat for lave niveauer af nitrat i drikkevand (8 mg/l). Blandt de 156 børn i højdosis gruppen havde 13,5% struma, hvorimod kun 4,9% af de 163 børn i lavdosisgruppen havde struma. Forskellen var statistisk signifikant. Forfatterne påpeger at hvis indtaget af jod er lavt vil selv drikkevandskoncentrationer af nitrat på under 50 mg/l kunne påvirke skjoldbruskkirtlen negativt (Gatseva & Argirova, 2008). DTU Fødevareinstituttet er enig så langt, at en effekt ved drikkevandskoncentrationer der ligger under den nuværende grænseværdi, ikke kan udelukkes.



Der er desuden nogle studier vedrørende sammenhængen mellem indtag af nitrat og risikoen for kræft i skjoldbruskkirtlen. Nogle studier viser en stigning i incidensen af kræft i skjoldbruskkirtlen ved høje indtag af nitrat, mens andre ikke viser en signifikant sammenhæng. EFSA konkluderede, at der er utilstrækkelig evidens for en sammenhæng mellem indtag af nitrat og kræft i skjoldbruskkirtlen (EFSA, 2017c). Et enkelt studie relaterer til nitrat fra drikkevand og er beskrevet i afsnittet om epidemiologiske kræftstudier.

Det anbefalede indtag af jod er i Danmark fastsat til mindst 150 µg/person (Nordic Council of Ministers, 2014). I nogle aldersgrupper er der en del individer, der har et meget lavt indtag af jod i forhold til det anbefalede indtag (Rasmussen *et al.*, 2014). Det kan derfor ikke udelukkes, at selvom den nuværende grænseværdi for nitrat i drikkevand på 50 mg/liter ikke overskrides, så kan et højt indtag af nitrat fra drikkevand i nogle befolkningsgrupper sænke skjoldbruskkirtlens optag af jod til et niveau, der kan udgøre en sundhedsmæssig risiko.

## **Vurdering af grænseværdi i forhold til kroniske ikke-neoplastiske skadevirkninger som følge af endogent dannet nitrit**

En række nitratsalte er godkendt som tilsætningsstoffer, og derfor har der været behov for at fastsætte et acceptabelt dagligt indtag (ADI), hvilket EU's Scientific Committee for Food gjorde i 1990 (SCF, 1992). ADI blev fastsat på baggrund af et 2 års rottestudie udført af Maekawa *et al.* (1982), hvor der ikke blev identificeret nogen skadevirkninger ved dosering med 2500 mg natriumnitrat/kg legemsvægt pr. dag. SCF brugte en samlet "assessment factor" på 500 og fastsatte ADI til 3,7 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/kg legemsvægt pr. dag. Denne ADI har været revurderet flere gange af SCF, WHO/FAO's ekspertpanel; Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) samt EFSA, senest af EFSA (2017c) og JECFA (2003). Ingen af revurderingerne førte til ændring af ADI. Det skal dog bemærkes, at ADI er fastsat på et meget usikkert grundlag, og diverse ekspertpaneler har ofte anvendt forskellige tilgange til at fastsætte ADI. Den primære usikkerhed relaterer til, at rotten i modsætning til mennesker ikke har nogen endogen reduktion af nitrat til det langt mere toksiske stof nitrit. De senere revurderinger af ADI har derfor beroet på at fastsætte ADI for nitrat på basis af ADI for nitrit, og herefter korrigere for den endogene omsætning af nitrat til nitrit i mennesker (beskrevet i detaljer af EFSA (2017c)).

Både EFSA (2017b) og JECFA (2003) har fastsat ADI for nitrit til 0,07 mg  $\text{NO}_2^-$ /kg legemsvægt pr. dag baseret på rottestudier. EFSA har vurderet forøget methæmoglobin niveau efter 14 ugers dosering i et forsøg udført af NTP (2001) som den kritiske effekt. JECFA har vurderet den kritiske effekt som værende skadevirkninger på hjerte og lunger, der blev set i et gammelt 2 års studie udført af Shuval & Gruener (1972). Begge ekspertpaneler har brugt en samlet "assessment factor" på 100 for at fastsætte ADI.

EFSA beregnede med udgangspunkt i ADI for nitrit, at ADI for nitrat kan ligge mellem 1,05 and 9,40 mg  $\text{NO}_3^-$ /kg legemsvægt pr. dag. Der er dog usikkerheder i datagrundlaget, eksempelvis vil en del af den dannede nitrit reagere med prolin, der også udskilles i spytet, og således inaktiveres. EFSA (2017c) vurderede, at datagrundlaget ikke var tilstrækkeligt til at ændre den oprindelige ADI på 3,7 mg  $\text{NO}_3^-$ /kg legemsvægt pr. dag.

Som det kan ses af de estimerede nitrat indtag i tabel 2, så ligger mange borgeres nitratindtag fra kosten alene væsentligt over den af EFSA vurderede nedre grænse på 1,05 mg  $\text{NO}_3^-$ /kg legemsvægt pr. dag, men under ADI 3,7 mg  $\text{NO}_3^-$ /kg legemsvægt pr. dag. Hvis der indregnes et bidrag fra vand på 7,9 mg  $\text{NO}_3^-$ /l drikkevand som i tabel 1, så ses en mindre overskridelse af ADI på 3,7 mg  $\text{NO}_3^-$ /kg legemsvægt pr. dag for 95 percentilen blandt børn og spædbørn.

Hertil kommer, at borgerne også er eksponeret for nitrit via kosten (tilsætningsstof, naturlig tilstedeværelse og kontaminering). I EFSA (2017b) risikovurderingen af nitrit blev EU-borgernes eksponering, på tværs af aldersgrupper og nationale forskelle, estimeret til 0,03-0,11 mg  $\text{NO}_2^-$ /kg legemsvægt pr. dag for gennemsnitsforbrugeren og 0,05-0,20 mg  $\text{NO}_2^-$ /kg legemsvægt pr. dag for 95 percentilen. Børn er de højest eksponerede. Som det kan ses af tabel 3 (nitritindtag blandt danske borgere), så overskrider eller tangerer børn med et gennemsnitligt nitritindtag ADI på 0,07 mg  $\text{NO}_2^-$ /kg legemsvægt pr. dag, og for 95 percentilen er indtaget for børnene ca. 2 x ADI, mens at unge og voksne tangerer ADI. Den mængde nitrit, der endogent dannes fra nitrat, kommer således oven i et nitrit indtag fra kosten, der for mange borgere allerede tangerer eller overskrider ADI. Med udgangspunkt i at omkring 3,75 % af indtaget nitrat omdannes til nitrit, så vil nitritindtaget fra nitrat i kosten, udgøre et ekstra bidrag svarende til 60-70 % af den mængde nitrit der indtages direkte fra kosten (se tabel 2 og 3). Oven i bidraget fra kosten kommer så nitrat fra drikkevand. Den samlede nitrit eksponering som præsenteret i tabel 2 (nitrit via nitrat indtag) og tabel 3 (nitrit indtag) kan imidlertid ikke på simpel vis lægges sammen. F.eks. er der en ukendt korrektion for endogent dannet nitrit, der kan inaktiveres ved reaktion med prolin. Men beregningerne viser, at både nitrat og nitrit er væsentlige kilder til det

samlede indtag af nitrit, og det samlede nitritindtag vil for nogle børn overstige 2 x ADI, selv uden yderligere nitrit bidrag fra nitrat i drikkevand.

DTU Fødevareinstituttet vurderer at for en stor del af den danske befolkning ligger det samlede indtag af nitrit (nitrit + nitrit dannet fra nitrat) over den fastsatte ADI for nitrit, for nogle grupper væsentligt højere. På dette grundlag kan en sundhedsmæssig risiko for kroniske effekter af det samlede indtag af nitrat + nitrit ikke udelukkes. Drikkevand, der har et højt indhold af nitrat, men under den nuværende grænseværdi på 50 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/l, vil kunne bidrage væsentligt til forbrugernes samlede overskridelse af ADI for nitrit.

## Vurdering af grænseværdi i forhold til reproduktion og misdannelser

### Toksikologiske undersøgelser

Der er udført en række dyreforsøg for at undersøge effekten af nitrat og nitrit på reproduktion og afkom. EFSA (2017b, 2017c) har gennemgået de udførte dyrestudier. Forsøg med nitrat viste ingen tegn på misdannelser eller nedsat reproduktionsevne. De fleste af studierne er dog gamle studier fra 1972, udført af Food and Drug Research Laboratories i USA, på vegne af Food and Drug Administration. Et 35 dages rotteforsøg udført af Pant & Srivastava (2002) viste dog en reduktion i antallet af sædceller, deres bevægelighed samt anormaliteter i sædcellerne ved den højeste dosis testet (157 mg kaliumnitrat/kg legemsvægt pr. dag), mens der ikke sås effekter ved den næsthøjeste dosis (122 mg kaliumnitrat/kg legemsvægt pr. dag). Studiet er dog af begrænset størrelse, og der mangler yderligere studier for at vurdere relevansen af dette fund.

To studier har undersøgt effekten af nitrit på reproduktionen i mus. Ingen af studierne viste klare reproduktionstoksiske effekter. Det mest omfattende studie var et 2 generationsstudie udført af NTP (1990). Eneste betydelige effekt observeret hos forældredyrene i den første generation (F<sub>0</sub>) var et nedsat indtag af vand hos den højest doserede gruppe, der blev doseret med hhv. 437 mg natrium nitrit/kg legemsvægt pr. dag for hanner og 412 mg natrium nitrit/kg legemsvægt pr. dag for hunner. Ungerne fra denne dosisgruppe (F<sub>1</sub>) fik lov at vokse til og få unger (F<sub>2</sub>), og disse havde reduceret legemsvægt, men det er uklart, om effekten skyldtes en toksisk påvirkning fra nitrit eller var relateret til dehydrering hos forældrene. Ingen effekter blev set hos forældredyrene (F<sub>0</sub>) og deres afkom (F<sub>1</sub>) i den næsthøjeste dosering på hhv. 273 mg natrium

nitrit/kg legemsvægt pr. dag for hanner og 254 mg natrium nitrit/kg legemsvægt pr. dag for hunner, en dosering der er over 2400 gange højere end den fastsatte ADI på 0,07 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/kg legemsvægt pr. dag. Et nyere 14 ugers NTP studie udført på mus fra 2001 viste en reduktion i antallet af sædcellers bevægelighed ved den højeste dosering (990 mg natrium nitrit/kg legemsvægt pr. dag), samt en øget incidens af mild grad af testis degeneration ved de to højeste doser (345 og 990 mg natrium nitrit/kg legemsvægt pr. dag) (EFSA, 2017b). EFSA vurderede den sidstnævnte effekt som værende af tvivlsom betydning.

En række forsøg, der undersøgte om nitrit kunne føre til misdannelser, blev udført af FDA i 1972. For mus, hamstere og kaniner blev der ikke fundet nogen skadevirkninger af nitrit, mens der for rotter blev set en svag hæmning af skeletudviklingen blandt dyr i den højeste dosisgruppe (10 mg natrium nitrit eller kalium nitrit/kg legemsvægt pr. dag) (EFSA, 2017b). I forhold til vurderingen af om nitrit kan føre til misdannelser, er det en væsentlig begrænsning, at det ikke er afklaret, om den sette effekt på skeletudviklingen følger et dosis-respons forløb (højeste dosis i forsøgene, er for lav til at det kan afklares), og om effekten kan genfindes i nyere studier.

DTU Fødevarerinstitutionen vurderer, at de dyreforsøg, der har undersøgt reproduktionstoksicitet, samlet set understøtter, at nitrat *per se* og nitrit *per se* udgør en ubetydelig sundhedsmæssig risiko i relation til reproduktionsskader ved de mængder nitrat og nitrit, som danskere får via drikkevand og kost. I forhold til misdannelser så peger dyreforsøgene også på, at der er en ubetydelig risiko i relation til danskernes indtag af nitrat og nitrit. Men evidensgrundlaget er mindre stærkt end tilfældet er for reproduktionstoksicitet.

## **Epidemiologiske studier**

En række epidemiologiske studier har undersøgt, om nitrat i drikkevand er en risikofaktor i forhold til spontan abort, fosterdød, for tidlig fødsel, lav fødselsvægt, fødselslængde, hovedomkreds, spædbarnsdødelighed, tidlig start af pubertet og misdannelser. Ældre studier publiceret før 2019 er opsummeret af Ward *et al.* (2005); Ward *et al.* (2018). Mens Lin *et al.* (2023) har opsummeret studier frem til 2023. Nyere studier publiceret siden 2017 er opsummeret af Clemmensen *et al.* (2023b). Senere er der publiceret et nyt studie af Jensen *et al.* (2023). EFSA (2017b, 2017c) har ikke inddraget de epidemiologiske studier i deres

vurdering. I følgende gennemgang er der alene set på resultater fra kohortestudie og case-kontrol undersøgelser (publiceret i peer reviewed tidsskrifter).

Ward *et al.* (2018) peger på, at effekten måske ikke direkte skyldes nitrat eller nitrit *per se*, men derimod reaktionsprodukter mellem nitrit og nitroserbare lægemidler, der indtages under graviditeten. Denne sammenhæng er også undersøgt i en enkelte nyere studier.

Association mellem nitrat i drikkevand dødfødsel og neonatal død blev undersøgt Aschengrau *et al.* (1993) i et amerikansk case-kontrol studie og der blev ikke fundet nogen sammenhæng. Et nyt dansk kohorte studie af Thomsen *et al.* (2021) undersøgte sammenhængen til dødfødsel men fandt heller ikke nogen statistisk signifikant sammenhæng. "Hazard ratio (HR)" var dog forhøjet hos kvinder med over 25 mg/L i boligens drikkevandsforsyning (justeret HR = 1,26; 95 % CI = 0,89 – 1,79). Thomsen *et al.* (2021) undersøgte herefter om der var en forskel i risikoen mellem en undergruppe af kvinder der tog receptpligtig medicin indeholdende potentielt nitroserbare forbindelser (sekundære aminer, tertiære aminer og amider). Ved sammenligning mellem den laveste (< 1 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L) og den næstlaveste drikkevandkoncentration (>1 - ≤ 2 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L) blev der set en statistisk signifikant positiv association. Men for de øvrige, højere nitratkoncentrationer var der ikke statistisk signifikans, eller nogen tegn på en dosis respons sammenhæng. Det svækker evidensen for at der skulle være en sammenhæng. HR var dog generelt forøget for alle dosisgrupper over > 1 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L i drikkevandsforsyningen, sammenlignet med de kvinder der ikke tog medicinen. Men da Thomsen *et al.* (2021) undersøger sammenhængen til receptpligtig medicin bestående af alene af sekundære aminer blev der fundet en statistisk signifikant og kraftig forøget HR hos de kvinder der tager denne form for medicin (justeret HR = 3,11; 95 % CI = 1,08 – 8,94).

Association mellem nitrat i drikkevand og spontan abort blev undersøgt af Aschengrau *et al.* (1989), som ikke fandt nogen forhøjet risiko. I et nyt dansk skohortestudie af Ebdrup *et al.* (2022) blev der heller ikke fundet nogen statistisk signifikant sammenhæng mellem spontan abort under graviditetens første 22 uger. Ebdrup *et al.* (2022) undersøgte endvidere spontan abort under hhv. første og andet trimester, men resultaterne var ikke statistisk signifikant for nogen af de undersøgte dosisgrupper. HR for første trimester var lettere forhøjet ved nitratindhold over 2 mg/L, og HR faldt ved den højeste dosering sammenlignet med den næsthøjeste. Ebdrup *et al.* (2022) modellerede herefter eksponeringen som en kontinuerlig variabel hvor HR toppede omkring 5 til 10 mg/L og opnåede statistisk signifikans i dette interval.

Association mellem nitrat i drikkevand og for tidlig fødsel er undersøgt af Albouy-Llaty *et al.* (2016); Coffman *et al.* (2022); Huang *et al.* (2018) og Sherris *et al.* (2021). Albouy-Llaty *et al.* (2016) udførte et fransk kohortestudie der undersøgte effekten af nitrat i drikkevand hhv. med og uden indhold af atrazin metaboliter. Der blev ikke fundet nogen association mellem nitrat i drikkevand og tidlig fødsel. Det skal bemærkes at kohorten med sine 13.654 deltagere er langt mindre end kohorterne i de tre nyere studier der alle havde over 1 million deltagere. Huang *et al.* (2018) var et amerikansk (californisk) kohortestudie der undersøgte en lang række af faktoreres effekt på for tidlige fødsel, her i blandt nitrat i drikkevandet. Huang *et al.* (2018) fandt en statistisk signifikant positiv association mellem for tidlig fødsel og nitrat i drikkevandet (justeret OR: 1,017, 95% CI = 1,005 – 1,029, pr. 9,3 mg/L forøgelse af vandets nitrat koncentration ("interquartile range change")). Sherris *et al.* (2021) var som Huang *et al.* (2018) et californisk kohortestudie, men hvor Huang *et al.* (2018) opgjorde nitrateksponeringen på basis af det boligområde som deltagerne boede i ("census tracts"), så estimerede Sherris *et al.* (2021) nitrat eksponering på basis af information fra den offentlige vandforsyning der leverede vand til husholdningen under graviditeten. Nitratindholdet i husholdningens drikkevandsforsyning blev opdelt i tre grupper, hhv. <22,15 mg/L, ≥22,15 - 44,3 mg/L, ≥44,3 mg/L. Sherris *et al.* (2021) sammenlignede forekomsten af for tidlig fødsel for søskende hvis mødre havde haft forskellige nitrateksponering under graviditeten. For tidlige fødsler i uge 20 – 31 af graviditeten, blev der fundet en klar statistisk signifikant positiv association når de mødre der havde den laveste eksponering blev sammenlignet med mødre der havde hhv. en middel eksponering (justeret OR: 1,47, 95% CI = 1,29 – 1,67) eller en høj eksponering (justeret OR: 2,52, 95% CI = 1,49 – 4,26). For tidlige fødsler i uge 32 – 36 af graviditeten var associationen mindre stærk, men stadig signifikant når mødre der havde den laveste eksponering blev sammenlignet med mødre med middel eksponering (justeret OR: 1,08, 95% CI = 1,02 – 1,15). Ved sammenligning med de mest eksponerede mødre var der en antydning til en positiv association (OR: 1,05), men association var ikke statistisk signifikant. Når der blev set på alle mødre, så blev der set de samme statistisk signifikante interaktioner, om end association for fødsler i uge 20 – 31, var mindre stærk for mødre med den laveste eksponering sammenlignet med den højeste eksponering. Et dansk kohortestudie blev foretaget af Coffman *et al.* (2022). Mødrenes nitrat eksponering fra drikkevand under graviditeten blev baseret på nitratmålinger fra offentlige danske vandværker samt registreringer af mødrenes bopæl under graviditeten. Mødrene blev opdelt i fire eksponeringsgrupper på hhv. ≤2 mg/L, >2 – 5 mg/L, >5 – 25 mg/L og >25 mg/L. For alle for tidlige fødsler i perioden fra dag 140 til 258 af graviditeten, blev der set en statistisk signifikant positiv association mellem nitratindholdet i drikkevandet og for tidlig fødsel. Associationen var statistisk signifikant selv ved et lavt nitratindhold på >2 – 5 mg/L (justeret OR:

1,03, 95% CI = 1,01 – 1,06) og OR steg svagt med stigende nitratkoncentration (justeret OR: 1,05, 95% CI = 1,00 – 1,10, >25 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L). Coffman *et al.* (2022) undersøgte yderligere sammenhængen i perioderne fra 140 til 195 dage af graviditeten, fra 196 til 223 dage af graviditeten og fra 224 til 258 dage af graviditeten. Associationen til for tidlige fødsler i perioderne fra 140 til 195 og fra 196 til 223 dage af graviditeten var ikke statistisk signifikante, om end der var en tendens i retning af en positiv association. For perioden 224 til 258 dage af graviditeten blev der derimod fundet en lettere styrket association, end hvad der blev fundet for den samlede periode fra 140 til 258 af graviditeten. At associationen var stærkest sidst i graviditeten står således i modsætning til resultaterne fra Sherris *et al.* (2021), hvor association var stærkest i uge 20 til 31 af graviditeten.

Association mellem nitrat i drikkevand (fri for atrazin metabolitter) og lav vægt af barnet i forhold til gestationsalder, blev undersøgt i et fransk kohorte studie af Migeot *et al.* (2013). De gravide kvinder blev grupperet i tre grupper efter nitratindholdet i husholdningens drikkevandsforsyning. Blandt de kvinder der havde et middelhøjt indhold af nitrat i bopælens drikkevand (>14,1 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L, < 27,0 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L) under anden trimester, var der en forøget risiko for lav vægt af barnet (justeret OR: 1,74, 95 % CI = 1,10 - 2,75), sammenlignet med kvinder der havde et lavt indtag af nitrat fra drikkevand (<14,13 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L). Effekten var dog mindre og ikke længere statistisk signifikant (justeret OR: 1,51, 95 % CI = 0,96 - 2,40) for de kvinder der i den tilsvarende periode havde et højt indhold af nitrat i drikkevandet (> 27,0 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L). En tilsvarende i effekt kunne ikke ses i drikkevand der indeholdt atrazin metabolitter. Jensen *et al.* (2023) undersøgte i et dansk kohortestudie også association mellem nitrat i drikkevand og lav vægt af barnet i forhold til gestationsalder (barnets vægt ≤ 10 % i forhold til køn og gestationsalder og ≤ 5 % defineret som alvorlig). De gravide kvinder blev opdelt i fire eksponeringsgrupper på hhv. ≤2 mg/L, >2 – 5 mg/L, >5 – 25 mg/L og >25 mg/L. For de mellemste eksponeringsgrupper var der en positiv statistisk signifikant association til lav vægt af barnet når der blev sammenlignet med det kvinder i den laveste eksponeringsgruppe. Effekten var stærkest for kvinder med en eksponering fra >2 – 5 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L (justeret OR: 1,04, 95 % CI = 1,03 – 1,06). Også for alvorlig lav vægt var der en statistisk signifikant positiv association.

I et dansk kohortestudie af Coffman *et al.* (2021) blev associationen mellem nitrat i husholdningens drikkevand og barnets tilvækst i løbet af graviditeten undersøgt, ved at se på fødselsvægt, lav fødsels vægt (< 2500 g ved fødsel), fødselslængde og hovedomkreds. Studiet er tidligere vurderet af DTU Fødevareinstituttet (DTU DOCX nr. 21/1027743), hvor kvaliteten og pålideligheden af studiet generelt blev vurderet til at være høj. Der blev ikke fundet nogen

sammenhæng mellem nitrat i drikkevandet og lav fødselsvægt eller hovedomkreds, men der blev fundet en statistisk signifikant association mellem nitrateksponeringen og en reduktion i fødselsvægt- og længde. Reduktionen i fødselsvægt- og længde var dog lille (- 9,7 g og 0,3 mm for 25 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L sammenlignet med 0 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L) og det vurderes meget usikkert, om resultaterne har klinisk relevans. Der var ikke en dosis-respons sammenhæng mellem den næsthøjeste og højeste eksponerede gruppe (> 25 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L), hvilket svækker evidensen for en sammenhæng. Den højeste eksponerede gruppe er dog væsentlig mindre end de andre grupper og dermed kan grupperesultatet være mere usikkert. Hvad der også er bemærkelsesværdigt, er at størstedelen af påvirkningen af fødselsvægten, allerede ses ved sammenligning mellem borgere der har en drikkevandsforsyning med et nitratindhold på ≤ 1 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L og borgere hvor indholdet er ≤ 5 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L, altså et ret snævert dosisinterval.

I et dansk kohortestudie af Clemmensen *et al.* (2023a) blev associationen mellem nitrat i husholdningens drikkevand og starttidspunkt af puberteten undersøgt. Studiet fandt ikke nogen klare sammenhænge men for sønner af mødre der havde haft et nitratindhold >25 mg/L i deres drikkevand, var der en tendens i retning af en tidligere start af puberteten på 1,2 måneder (95 % CI = -3,0 – 0,6). Clemmensen *et al.* (2023a) undersøgte om der kunne være en sammenhæng mellem starttidspunkt af puberteten og mødrenes indtag af nitroserbare lægemidler, men fandt ingen sammenhæng.

Hvis der ses på studierne vedr. misdannelser, så er der udført flere studier hvoraf flere studier peger på en sammenhæng mellem misdannelser og nitratindholdet i drikkevand. I forhold til misdannelse af centralnervesystemet, herunder neuralrørsdefekter er der i en række ældre studier fundet en sammenhæng til nitratindholdet i drikkevand. Ward *et al.* (2018) opgjorde, at fem (Arbuckle *et al.*, 1988; Brender *et al.*, 2004; Brender *et al.*, 2013; Croen *et al.*, 2001; Dorsch *et al.*, 1984) ud af seks af disse ældre studier pegede på en sammenhæng med nitratindholdet i drikkevand (alle case-kontrol studier). Hvis man kigger mere detaljeret på resultaterne fra disse studier så er billedet dog mere tvetydigt. Arbuckle *et al.* (1988) fandt en positiv association (OR: 2,3) mellem nitrat i husholdningens drikkevand og misdannelser af centralnervesystemet (alle typer), men associationen var ikke statistisk signifikant (CI: 0,73 – 7,29). Dorsch *et al.* (1984) fandt en statistisk positiv association mellem det estimerede indhold af nitrat i husholdningens drikkevand og alle typer misdannelser, drevet af misdannelser i centralnervesystemet (alle typer) og bevægelsesapparatet. Studiet bruger dog data fra mødre der enten drak grundvand eller regnvand, og sammenligneligheden af disse to kilder kan diskuteres. Croen *et al.* (2001) fandt en klar dosis afhængig statistisk positiv association mellem det estimerede indhold af



nitrat i husholdningens drikkevand og anencefali, men der var ikke nogen association til neuralrørsdefekter (spina bifida). Brender *et al.* (2004) fandt en positiv association mellem indtag af nitrosebar medicin og neuralrørsdefekter, og associationen blev stærkere og statistisk signifikant for mødre med et drikkevandsnitratindhold  $\geq 3,52$  mg/L. Brender *et al.* (2013) undersøgte i et nyt studie igen denne sammenhæng mellem drikkevandsnitrat og indtag af nitroserbar medicin, men her blev der ikke fundet nogen sammenhæng. Derimod fandt Brender *et al.* (2013), at mødre, der indtog mere end 5 mg nitrat fra drikkevand pr. dag, sammenlignet med under 0,91 mg pr. dag, havde dobbelt så stor risiko for neuralrørsdefekter (spina bifida) hos deres børn (justeret OR: 2,02, 95 % CI = 1,27 – 3,22). I modsætning til Croen *et al.* (2001) var der imidlertid ingen tegn på en positiv association til anencefali. En styrke ved studiet af Brender *et al.* (2013) er at nitratindtaget fra flaskevand indgik i beregningen af det samlede nitratindtag fra drikkevand. Et væsentligt problem i forhold til disse "ældre" studier, der alle er fra Nordamerika eller Australien, er, at boringer med højt nitratindhold ofte er højtliggende og ofte private boringer, hvor der er forøget risiko for kontaminering med miljøforurenende stoffer, og hvor kontrollen med vandkvaliteten kan være ringe. Siden er der udført to nyere studier af hhv. Blaisdell *et al.* (2019) og Stayner *et al.* (2022) der begge har undersøgt sammenhængen mellem nitratindhold i drikkevand og neuralrørsdefekter. Studiet af Blaisdell *et al.* (2019) er baseret på en amerikansk kohorte (Missouri) mens Stayner *et al.* (2022) er baseret på en dansk kohorte. Stayner *et al.* (2022) er tidligere blevet vurderet af DTU Fødevareinstituttet (DTU DOCX nr. 22/1001341), hvor pålideligheden af studiet blev vurderet til at være høj. Ingen af de to studier finder nogen overbevisende sammenhæng mellem nitratkoncentrationen i drikkevand og misdannelser i centralnervesystemet (herunder neuralrørsdefekter og anencefali). Der er således modstridende resultater i forhold til en potentiel sammenhæng mellem nitrat i drikkevand og misdannelser i centralnervesystemet.

I forhold til misdannelser i lemmerne så fandt Blaisdell *et al.* (2019) og Brender *et al.* (2013) begge en statistisk signifikant positiv association mellem nitrat i drikkevand og misdannelser af lemmer, mens Stayner *et al.* (2022) ikke fandt nogen antydning af en sammenhæng. Et kohorte studie af Cedergren *et al.* (2002) fandt en positiv association mellem nitrat i drikkevand og misdannelser i hjertet. Den justerede OR opnåede dog ikke statistisk signifikans. Hverken Blaisdell *et al.* (2019); Brender *et al.* (2013); Stayner *et al.* (2022) fandt nogen overbevisende sammenhæng mellem nitrat i drikkevandet, om end der var generel tendens mod en positiv association i alle studierne. Brender *et al.* (2013) fandt en statistisk signifikant positiv association mellem nitrat i drikkevand og læbe-ganespalte, men hverken Blaisdell *et al.* (2019) eller Stayner *et al.* (2022) fandt nogen antydning af en sammenhæng. Stayner *et al.* (2022)

fandt en statistisk signifikant dosisafhængig positiv association mellem nitrat i drikkevand og misdannelser i øjet (justeret OR: 1,09, 95 % CI = 1,03 – 1,16, pr. 10 mg/L). Denne sammenhæng er ikke undersøgt i andre studier.

## Vurdering af risiko i forhold til reproduktion og misdannelser

Siden DTU Fødevareinstituttet i 2019 sidst vurderede om nitrat i drikkevand var en risikofaktor i forhold til en fosterskadelig påvirkning, er der publiceret flere veldesignede epidemiologiske studier. I 2019 vurderingen var associationen mellem neuralrørsdefekter og drikkevandsnitrat, den fosterskadelige effekt hvor evidensgrundlaget var stærkest, men nye studier fra Stayner *et al.* (2022) og Blaisdell *et al.* (2019) har kraftigt svækket den samlede evidens for en sammenhæng mellem nitrat og neuralrørsdefekter. Begge de to nye studier finder til gengæld sammenhænge til andre misdannelser (hhv. øjne og lemmer). Overordnet set er der en række studier der kobler nitratindtag fra drikkevand til en forøget risiko for misdannelser, men når man ser på de enkelte typer af misdannelser, er resultaterne tvetydige. Resultater fra disse studier passer derfor dårligt med at nitrat eller nitrit *pr. se.* skulle kunne forårsage misdannelser, for i så fald ville forventningen være mere konsistente resultater for bestemte misdannelser på tværs af de udførte studier. Dette er også i overensstemmelse med resultaterne fra dyreforsøgene. Men ud fra en hypotese om at forøget risiko for misdannelser skyldes en indirekte påvirkning fra stoffer der nitroseres i mavetarmsystemet, stoffer der kommer enten fra de fødevarer (naturlige indholdsstoffer såvel som fødevarekontaminanter) eller medikamenter der indtages under graviditeten, så kan det måske forklare at der ses så store forskelle i de typer af misdannelser der kobles til indtag af nitrat. Hvis dette reelt er virkningsmekanismen, er de udførte dyreforsøg der har undersøgt om nitrit og nitrat kan forårsage misdannelser ikke velegnede, i og med at forsøgsdyrene samtidig med indtag af nitrit, kun doseres samtidig med et fåtal (via foder) af de nitroserbare stoffer som mennesker kan tænkes at kunne indtage fra kosten eller lægemidler. Det vurderes, at der er store usikkerheder i forhold til, om der skulle være en årsagssammenhæng mellem nitratindtag i drikkevand og de medfødte misdannelser, der er rapporteret i en flere epidemiologiske forsøg. På det forliggende grundlag kan risikoen for at nitrat fra drikkevand, via forøget endogen nitrosering i mavetarmsystemet, kan forøge risikoen for misdannelser, ikke udelukkes.

Ud over de studier der har fokuseret på misdannelser, så er der publiceret en række studier der finder at nitrat i drikkevand kan forøge risikoen for spontan abort, dødfødsel, for tidlig fødsel og

reduceret tilvækst af barnet, mens der ikke blev fundet en sammenhæng til lav fødsels vægt (< 2500 g ved fødsel).

De to epidemiologiske studier, der har undersøgt nitrat i drikkevand og risiko for spontan abort er modstridende (Aschengrau *et al.*, 1989; Ebdrup *et al.*, 2022), og det er ikke en stærk sammenhæng der ses i studiet af Ebdrup *et al.* (2022). På den baggrund kan der ikke foretages en pålidelig vurdering af risikoen.

Et studie (Coffman *et al.*, 2021) fandt en sammenhæng til en svagt reduceret tilvækst af barnet, men det er usikkert om en reduktion af den størrelsesorden kan anses for at være skadeligt for barnet. Men herudover har to studier fundet en forøget risiko for en reduceret vægt af barnet i forhold til gestationsalder (Jensen *et al.*, 2023; Migeot *et al.*, 2013). Samlet set peger studierne i retning af, at nitrat i drikkevand er en risikofaktor for barnets tilvækst under graviditeten.

Coffman *et al.* (2021) nævner en forringet transport af ilt til fostret (som følge af nitrit dannet via den endogene omdannelse af nitrat til nitrit), eller nitrats påvirkning af skjoldbruskkirtlen og dens produktion af hormoner, som en mekanistisk forklaring på at nitrat skulle kunne hæmme fostrets vækst. Hvis det er tilfældet, så burde risikoen stige med stigende indtag af nitrat fra drikkevandet, men dette ses ikke i nogen af de tre studier. Associationen svækkes ved den højeste eksponering, sammenlignet med den næsthøjeste eksponering. I begge de to danske studier ses effekten ved meget lave nitratkoncentrationer i drikkevandet (< 5 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L), eller ved nitrateksponeringer der ligger langt under den af EFSA fastsatte ADI for nitrat (der tager udgangspunkt i ADI for nitrit). Der kan spekuleres i mulige forklaringer men en velunderbygget mekanistisk forklaring mangler. På baggrund af de udførte studier vurderes det at en risiko ikke kan udelukkes.

Tre ud af fire kohortestudier finder en positiv association mellem indholdet af nitrat i drikkevand og for tidlig fødsel. Begge de to nyeste studier af Coffman *et al.* (2022) og Sherris *et al.* (2021) peger i retning af en dosis-respons sammenhæng. Der er imidlertid en inkonsistens mellem de to studier i forhold til hvilken periode i graviditeten der påvirkes. En velunderbygget mekanistisk forklaring mangler. På baggrund af de udførte studier vurderes det at en risiko ikke kan udelukkes.

Thomsen *et al.* (2021) fandt for en undergruppe af kvinder der under graviditeten brugte receptpligtig medicin som bestod af sekundære aminer, en kraftig forøget risiko for dødfødsel hos de kvinder der havde et højt indhold af nitrat (> 25 mg/L) i husstandens drikkevand. DTU

Fødevarerinstitutionen vurderer sammenhængen som værende mekanistisk plausibel, så på trods af at der kun foreligger et studie, så vurderes det at en risiko ikke kan udelukkes.

For at bibringe et bedre fundament for fremtidige risikovurderinger ville det være ønskeligt, at nitrit undersøges bedre for teratogene egenskaber i et rotteforsøg udført i henhold til nu gældende test guidelines, og ved test af højere nitrit doser end i tidligere forsøg. Yderligere veldefinerede epidemiologiske studier, hvor der ses på effekten af nitrat fra drikkevand i sammenhæng med deltagernes kost samt indtag af lægemidler, vil ligeledes være ønskelige.

## **Vurdering af grænseværdi i forhold til neoplastiske skadevirkninger**

### **Dyreforsøg, mekanistiske studier og vurderinger fra EFSA, JECFA og IARC**

IARC (2010) har gennemgået den videnskabelige litteratur frem til 2006, herunder dyreforsøg, mekanistiske studier og epidemiologiske studier vedr. nitrats og nitrits potentielt kræftfremkaldende egenskaber. EFSA (2017b, 2017c) har på tilsvarende vis gennemgået studier vedr. nitrat og nitrit, men kun med fokus på nitrat og nitrits anvendelse som tilsætningsstoffer.

På baggrund af en række dyreforsøg, der samstemmende ikke finder nogen sammenhæng mellem indtag af nitrat og udvikling af kræft, vurderes det, at nitrat *per se* ikke er kræftfremkaldende. Der er generel videnskabelig enighed om denne vurdering (EFSA, 2017c; IARC, 2010; JECFA, 2003).

Der er lavet forholdsvis mange studier, der undersøger hvorvidt nitrit *per se* er genotoksisk, både i *in vitro* og i *in vivo* studier. EFSA (2017b) vurderer på baggrund af de udførte studier, at nitrit er klart genotoksisk *in vitro*, men ikke genotoksisk *in vivo*, hvilket også er JECFA (2003) vurdering. Det skal understreges, at der i litteraturen er modstridende *in vivo* resultater, så det er en vurdering, der er behæftet med nogen usikkerhed. Karcinogenicitetsforsøg udført på dyr og rotter viser ikke nogen klar kræftfremkaldende effekt af nitrit, men der er tvetydige fund, og de videnskabelige vurderinger er til dels divergerende. EFSA (2017b) vurderede, at nitrit *per se*

ikke er kræftfremkaldende, mens IARC (2010) vurderede, at der er begrænset evidens, for at nitrit *per se* er kræftfremkaldende i forsøgsdyr. Der er ikke kommet nye dyrestudier siden IARC's vurdering. DTU Fødevareinstituttet vurderer, at selv om der skulle være en evt. kræftfremkaldende effekt af nitrit *per se*, så er det en sekundær risiko i forhold til den risiko, der kommer fra nitrits evne til at danne genotoksiske og kræftfremkaldende N-nitrosoforbindelser i mavetarmsystemet.

Nitrit kan i maven, hvor der er et surt pH, omsættes til salpetersyring og videre til dinitrogen trioxid og andre reaktive nitrogen oxider, som igen kan reagere med nitroserbare forbindelser i mavetarmsystemet. Sekundære aminer og amider kan nitroseres, hvilket kan føre til dannelse af N-nitrosaminer og N-nitrosamider, typisk samlet under forkortelsen NOC (N-nitroso compounds). Mange, men ikke alle, NOC's er genotoksiske og kræftfremkaldende, og der er adskillige dyrestudier, hvor forsøgsdyr er doseret med en nitroserbar forbindelse samt nitrit, med efterfølgende udvikling af kræft. N-nitrosaminers kræftfremkaldende effekt er demonstreret i over 40 arter, blandt andet i primater (EFSA, 2017b; IARC, 2010). Den kræftfremkaldende effekt skyldes, at NOC's kan skade DNA med deraf følgende risiko for, at der opstår mutationer. N-nitrosamider kan reagere direkte med DNA, mens N-nitrosaminer først skal metabolisk aktiveres via P450 enzymatisk omdannelse til N-hydroxynitrosaminer og videre omdannelse til reaktive elektrofile diazohydroxider (EFSA, 2017b). I forsøgsdyr (gnavere) har nitrosaminer vist at forårsage kræft i lever, spiserør, næse- og mundhule, nyre, bugspytkirtel, blære, lunger og skjoldbruskkirtel, mens nitrosamider har vist at forårsage kræft i lymfesystemet, nervesystemet, mave og tolvfingertarmen. Hvilke typer kræft, der optræder, afhænger af forsøgsdyr, samt hvilken NOC dyrene udsættes for (IARC, 2010).

At endogene nitroseringsreaktioner også foregår *in vivo* hos mennesker, blev først vist af Ohshima & Bartsch (1981) i et forsøg, hvor forsøgspersoner samtidigt indtog aminosyren L-prolin og nitrat, hvilket førte til dannelse og udskillelse af N-nitrosoprolin (som ikke er kræftfremkaldende). Udskillelsen af N-nitrosoprolin kan derfor bruges som en markør for endogene nitroseringsreaktioner. Der har været udført en række forsøg, der i de fleste tilfælde indikerede en højere udskillelse af N-nitrosoprolin i geografiske områder med forøget risiko for kræft i mave, spiserør og næsehule (IARC, 2010). Et dansk humanstudie udført af Møller *et al.* (1989), hvor forsøgspersonerne indtog 500 mg L-prolin, viste en klar sammenhæng mellem udskillelsen af N-nitrosoprolin og det totale indtag af nitrat. For nitrat fra drikkevand (fra < 25 mg/l, i 25 mg/l intervaller op til >100mg/l), var der ligeledes en sammenhæng mellem forøget udskillelse af N-nitrosoprolin med øget nitratindhold i drikkevandet, men effekten var mindre

markant og opnåede ikke statistisk signifikans ( $P=0,08$ ). Andre faktorer end nitrat/nitrit indtaget spiller en rolle for de endogene nitroseringsreaktioner. Askorbinsyre,  $\alpha$ -tocopherol, polyphenoler og givetvis også andre plantestoffer hæmmer den endogene nitroseringsreaktion, mens rygning forøger de endogene nitroseringsreaktioner (IARC, 2010; Møller *et al.*, 1989). At nitrat/nitrit kan forårsage endogene nitroseringsreaktioner, både hos forsøgsdyr og mennesker, er veldokumenteret. Adskillige dyreforsøg har vist, at i de tilfælde hvor et endogent dannet reaktionsprodukt er mutagen, så udvikler forsøgsdyrene tumorer. Eksempelvis har museforsøg vist, at samtidigt indtag af drikkevand indeholdende nitrit samt nitroserbare stoffer som piperazin, morpholin, eller N-methylanilin iblandet kosten førte til øget forekomst af tumorer i lungerne, mens indtag af stofferne hver for sig ikke havde nogen effekt (Greenblatt *et al.*, 1971). Mange af de udførte studier er gamle, men der er også nyere studier, f.eks. er det nyligt demonstreret i rotteforsøg, at samtidig oral indtagelse af sarcosin ethyl ester og nitrit i drikkevand effektivt kan inducere tumorer i spiserøret (Shubin *et al.*, 2018; Xiang *et al.*, 1995). En gennemgang af studier udført før 2006 kan findes hos IARC (2010). Forudsætningen for udvikling af kræft via endogen nitrososering, er således, at ud over nitrit skal der være nitroserbare forbindelser til stede i mave-tarmsystemet. Tre studier har undersøgt, om nitroserbare forbindelser i fødevarer iblandet nitrit kan føre til udvikling af kræft i forsøgsdyr. Kød af forskellig slags (herunder fisk) indeholder nitroserbare forbindelser og er typisk brugt i disse forsøg. Generelt har resultaterne ikke vist en overbevisende effekt. Et 2 års studie udført af van Logten *et al.* (1972) fandt ingen effekt af nitrit tilsat dåsekød, mens et dansk studie udført af Olsen *et al.* (1984), hvor rotter blev fodret med forarbejdet kød tilsat nitrit i 2,5 år, ikke fandt nogen effekt hos hunrotter. Mens der blandt hanrotter var en mindre, men signifikant stigning i det totale antal af maligne tumorer. Der var ingen signifikante forøgelser af bestemte typer tumorer. Et rottestudie udført af Lin & Ho (1992), hvor dyrene ud over deres rottefoder fik tilsat 10 % af enten hvide, blæksprutte eller blæksprutte med nitrit (0,3 %) i 10 måneder, viste en forøget forekomst af lever tumorer (hhv. 0/13, 2/13, 4/13 dyr). Der er tale om et meget lille studie, hvilket gør det svært afgøre, om der er en effekt af nitrit. Generelt har dyreforsøg en lav statistisk styrke grundet det begrænsede antal dyr, der indgår i dyreforsøg, samt en biologisk variation der kan maskere effekterne. Derfor kompensere man typisk ved at give dyrene høje doser i forhold til menneskers reelle eksponering for at kunne observere en effekt af teststofferne. Men dette er ikke muligt i denne type af studier, hvor de nitroserbare forbindelser kun vil være til stede i små mængder. Et andet problem med disse studier i forhold til at vurdere evt. endogene effekter, er at positive fund ikke nødvendigvis skyldes endogen dannelse af NOC's, men kan skyldes dannelse af præformede NOC's. Men et 2 års studie af Furukawa *et al.* (2000) har specifikt fokuseret på den endogene dannelse, og her fik rotterne nitrit via

drikkevandet samtidigt med indtag af varierende mængder fiskemel (der er således ingen dannelse af præformede NOC's). Dette studie viste rimeligt klart, at indtag af nitrit i kombination med fiskemel var korreleret til udvikling af tumorer i nyrerne. Der var tillige en statistisk signifikant sammenhæng mellem den doserede mængde fiskemel (nitroserbare stoffer), og hyppigheden af tumorer (dosis respons). Effekten var tydeligst hos hanrotter.

Ud over studier med forsøgsdyr er der også foretaget enkelte humanstudier, der direkte undersøgte endogen dannelse af mutagene NOC's. Vermeer *et al.* (1998) undersøgte 25 kvindelige forsøgspersoner, der i en uge blev holdt på en nitratfattig diet, og i ugen efter fik de en middag med fisk (en kilde til dimethylamin) og samtidigt indtog de 170 mg nitrat i drikkevand (dosen var fastsat så det totale nitratindtag ca. svarede til ADI for nitrat). Herefter var der endnu en kontrol uge med en nitratfattig kost. Forsøget viste forventeligt, at nitratindtaget førte til en kraftig stigning af nitrat og nitritindholdet i forsøgspersonernes spyt, og herudover var der en signifikant forøgelse af N-nitrosodimethylamin udskillelsen i urinen, når forsøgspersonerne indtog nitrat og fisk samtidigt. Udskillelsen af N-nitrosodimethylamin var korreleret til udskillelsen af nitrat i urinen og til nitrat og nitrit i spytet. For en anden nitrosamin, N-nitrosopiperidin, der også blev målt i urinen, sås ikke nogen klar sammenhæng med nitratindtag og kost. Forsøget demonstrerer, at indtag af nitrat sammen med nitroserbare stoffer i kosten kan føre til dannelse af genotoksiske og karcinogene stoffer. Det er dog en svaghed, at studiet ikke blev gennemført over en fjerde kontroluge, hvor deltagerne fik fisk, men ikke nitrat fra drikkevand. Vermeer *et al.* (1999) viste ved et tilsvarende forsøgsdesign, at indtag af askorbinsyre og grøn te kan hæmme den endogene dannelse af N-nitrosodimethylamin, formodentlig grundet indhold af polyphenoler i grøn te.

Et nyligt studie af van Breda *et al.* (2019) undersøgte 20 forsøgspersoner, hvor halvdelen spiste hvidt kød (kylling, kalkun), og den anden halvdel fik forarbejdet rødt kød (bacon, skinke, pølser) igennem en uge. I den første uge drak forsøgspersonerne vand med lavt nitratindhold (< 1,5 mg/l), og i uge to drak de vand med nitrat i en dosering svarende til ADI. Indtagelse af kød (uanset type) havde, i forhold til forsøgspersonernes startniveauet, ikke nogen indflydelse på dannelse af "apparat total N-nitrose compounds" (ATNC) i fækkalt vand, en markør for den endogene nitrosering. Men i ugen efter dosering med nitrat sås en klar og statistisk signifikant forøgelse i ATNC hos begge grupper. Der var en tendens til størst effekt i gruppen, der fik forarbejdet rødt kød, hvilket indikerer, at det forarbejdede røde kød indeholder flere nitroserbare forbindelser end hvidt kød. Resultatet er i overensstemmelse med et ældre forsøg af Rowland *et al.* (1991).

En forudsætning for dannelse af NOC's er tilstedeværelsen af nitroserbare forbindelser i kosten. Davis *et al.* (2012) oprensede potentielt nitroserbare forbindelser fra hot dogs og nitroserede dem med nitrit i en sur opløsning. De nitroserede forbindelser blev doseret via kosten til forsøgsmus i 38 uger. Sammenlignet med kontrolmus blev der set en begrænset, men signifikant forøgelse i aberrante crypt foci i tarmene hos de mus, der fik nitroserede forbindelser. Aberrante crypt foci bruges som en tidlig markør på ændringer i tarmen, der kan føre til kræft.

På baggrund af de tilgængelige data vurderes det, at der er stærk evidens for, at nitroserbare forbindelser kan nitroseres til NOC's i mavetarmsystemet hos mennesker. Reaktionen sker via nitrat, der omdannes til nitrit i spyt, og nitrit når derefter frem til mavetarmsystemet, hvor nitrit omdannes til reaktive forbindelser. Mange NOC's er fundet at være genotoksiske og kræftfremkaldende. En del nitrit vil blive inaktiveret i spyt ved reaktion med prolin eller andre ikke genotoksiske nitroserbare forbindelser. Der er også rimelig evidens for, at et øget indtag af nitrat forøger den endogene dannelse af NOC's. Det skal bemærkes, at der i kosten også er stoffer, der hæmmer den endogene nitrosering, f.eks. askorbinsyre,  $\alpha$ -tocopherol, polyphenoler og givetvis også andre plantestoffer. Den samlede effekt af en fødevarer/drikkevand på den endogene nitrosering er således afhængig af, om kilden til nitrat er drikkevand (fremmer entydigt den endogene nitrosering) eller grøntsager (på en gang både fremmende og hæmmende for den endogene nitrosering). Samlet set konkluderes det, i overensstemmelse med IARC (2010), at nitrit og nitrat, der indtages under forhold, der kan føre til endogen nitrosering, formodentligt er kræftfremkaldende hos mennesker. Det er dog meget vigtigt at understrege, at ovenstående konklusion intet siger om, hvor stor en kræftisiko nitrat og nitrit udgør for mennesker. For at der kan opstå NOC's, skal der være nitroserbare forbindelser til stede i kosten. EFSA (2017b) har på basis af modelberegninger vurderet risikoen fra endogent dannet N-nitrosodimethylamin som værende lav, men det er blot et enkelt stof. Der er en meget stor mangel på viden om, hvilke NOC's der dannes endogent, og i hvilke mængder disse stoffer dannes. Der ligger en stor forskningsmæssig udfordring i at få lukket dette vidensgab, i og med, at de dannede mængder af enkeltstoffer er små. Og f.eks. N-nitrosamider, som er den mest oplagte stofgruppe at mistænke i forhold til kræft i mavetarmsystemet, er meget reaktive og forsvinder således hurtigt. Forsøg udført af Chen *et al.* (1996) har også vist, at nitrit i et surt miljø, hvor der er chlorid ioner tilstede, kan reagere med aminosyren methionin og danne det genotoksiske stof, 2-chloro-4-methylthiobutansyre. Dette indikerer, at der måske også endogent kan dannes DNA reaktive stoffer, der ikke er NOC's.



Det vurderes, at på basis af den tilgængelige viden fra dyreforsøg og mekanistiske studier, at det for nuværende ikke er muligt at komme med et estimat for kræftisikoens størrelse, da usikkerhederne er alt for store.

## **Epidemiologiske studier vedrørende andre kræftformer end kolorektalkræft**

### **Søgestrategi**

DTU Fødevarerinstitutionen foretog en litteratursøgning i MEDLINE (via PubMed) for at identificere kohorteundersøgelser og case-kontrol undersøgelser mellem eksponering for nitrat i drikkevand og udvikling af kræft. Søgestrategien indeholdt kun søgetermer relateret til eksponering og udfald. Studier publiceret frem til og med 2023 blev søgt (2019 til 2023 i den seneste opdatering).

### **Inklusionskriterier**

Population: Den generelle befolkning

Eksponering: Nitrat i drikkevand

Udfald: Nye sygdomstilfælde af kræft (cancer incidens)

Studiedesign: Kohortestudie og case-kontrol undersøgelse

### **Yderligere bemærkninger**

Flere studier har undersøgt, om der kan findes en association mellem nitrat fra grøntsager/totalt nitratindtag fra kosten og risiko for kræft. Disse studier er ikke medtaget her, i og med at en effekt af nitrat på den endogene nitrosering, vil være blandet sammen med modsatrettede effekter fra de øvrige indholdsstoffer i grøntsager, og det er således meget svært, på basis af disse studier at vurdere effekten af nitrat isoleret set.

## Identificeret litteratur

Der er en række epidemiologiske studier, som har undersøgt associationen mellem nitrat i drikkevand og risikoen for udvikling af kræft. Disse studier er gennemgået af Ward *et al.* (2005); Ward *et al.* (2018).

Det bemærkes, at epidemiologiske studier har en begrænset styrke til at finde associationer, hvilket betyder, at resultater, der hverken finder positive eller inverse associationer, ikke skal tolkes som evidens for, at der ingen effekt er, men at effekten, hvis den eksisterer, ligger under et vist niveau defineret af den statistiske styrke i det enkelte studie.

Association mellem nitrat i drikkevand og kræft i lungerne, livmoderen, huden er undersøgt af Weyer *et al.* (2001), mens association mellem nitrat i drikkevand og kræft i spiserøret er undersøgt af Ward *et al.* (2008) og Buller *et al.* (2021). Ingen af studierne fandt signifikante associationer. Buller *et al.* (2021) og Medgyesi *et al.* (2022) udførte studier af samme kohorte (Iowa Women's Health Study cohort) som Weyer *et al.* (2001) brugte med yderligere hhv. 13 og 15 års opfølgning ("Iowa Women's Health Study cohort"). Buller *et al.* (2021) undersøgte om nitrat i drikkevand var associeret til kræft i tyndtarmen, leveren, galde og galdegange. Medgyesi *et al.* (2022) undersøgte om nitrat i drikkevand var associeret til kræft i livmoderslimhinden (endometriekræft). Ingen af studierne fandt signifikant associationer. Tre studier har undersøgt, om nitrat i drikkevand var associeret til kræft i maven (Buller *et al.*, 2021; van Loon *et al.*, 1998; Ward *et al.*, 2008; Weyer *et al.*, 2001). Ingen af studierne fandt en signifikant association. Tre studier har undersøgt, om nitrat i drikkevand var associeret til kræft i bugspytkirtlen (Coss *et al.*, 2004; Quist *et al.*, 2018; Weyer *et al.*, 2001). Ingen af studierne fandt en signifikant association.

Tre studier har undersøgt, om nitrat i drikkevand var associeret til leukæmi (Infante-Rivard *et al.*, 2001; Stayner *et al.*, 2021; Weyer *et al.*, 2001). Ingen af studierne fandt en signifikant association.

Fem studier har undersøgt, om nitrat i drikkevand var associeret til lymfeknudekræft (Freedman *et al.*, 2000; Stayner *et al.*, 2021; Ward *et al.*, 2006; Ward *et al.*, 1996; Weyer *et al.*, 2001). Stayner *et al.* (2021) undersøgte associationen lymfeknudekræft uanset type, mens de øvrige studier fokuserede på Non-Hodgkin's lymfom. Det ældste studie af Ward *et al.* (1996), fandt en positiv signifikant association mellem nitrat i drikkevand og Non-Hodgkin's lymfom, mens ingen af de efterfølgende fem studier har kunnet underbygge dette resultat.

Fire studier fandt ingen signifikant association mellem nitrat i drikkevand og brystkræft hos kvinder generelt (Brody *et al.*, 2006; Espejo-Herrera *et al.*, 2016b; Inoue-Choi *et al.*, 2012; Weyer *et al.*, 2001), men for undergrupper fandt Espejo-Herrera *et al.* (2016b) en positiv signifikant association blandt post-menopausale kvinder med et højt indtag af rødt kød eller forarbejdet kød, mens Inoue-Choi *et al.* (2012) fandt en positiv signifikant association blandt post-menopausale kvinder der samtidig havde et højt indtag af folsyre.

To studier har undersøgt, om nitrat i drikkevand var associeret til kræft i hjernen hos voksne (Steindorf *et al.*, 1994; Ward *et al.*, 2004) Ingen af studierne fandt en signifikant association mellem nitrat og kræft. Ward *et al.* (2004) fandt dog en positiv signifikant association for kvinder, der samtidigt havde et lavt indtag af askorbinsyre.

Fire studier har undersøgt, om nitrat i drikkevand var associeret til kræft i hjernen hos unge eller børn, i sammenhæng med mødrenes eksponering af nitrat fra drikkevandet (Mueller *et al.*, 2001; Mueller *et al.*, 2004; Stayner *et al.*, 2021; Zumel-Marne *et al.*, 2021). Ingen af de to studier af Mueller *et al.* (2001); Mueller *et al.* (2004) fandt en association mellem nitrat i drikkevandet og forekomst af kræft i hjernen hos børn. Mueller *et al.* (2004) fandt dog en signifikant positiv association mellem nitritindtag fra drikkevand i den periode hvor mødrene var gravide og udvikling af astrocytomaer hos børn (OR (odds ratio) = 5,7; 95% CI = 1,2 - 27,2 for nitrit  $\geq$  5 mg/L vs. nitrit under detektionsgrænsen), og når man ekskluderede data fra brugere af flaskevand, var der også en signifikant positiv association mellem nitritindtaget fra drikkevand i den periode hvor mødrene var gravide og hjernetumorer generelt hos børn (OR = 5,2; 95 % CI = 1,2 - 23,3, for nitrit  $\geq$  5 mg/L vs. nitrit under detektionsgrænsen). Også Mueller *et al.* (2001) fandt en signifikant positiv association mellem mødres nitritindtag fra drikkevand i den periode hvor mødrene var gravide og hjernetumorer generelt hos børn (OR = 8,8; 95 % CI = 2,1 - 46, for drikkevand indeholdende nitrit vs. nitrit under detektionsgrænsen). Hvis der som studierne peger på, er en signifikant positiv association mellem mødres nitritindtag fra drikkevand og kræft i hjernen hos børn, så er det bemærkelsesværdigt at der ikke blev fundet en stærkere association for nitrat i drikkevandet, i og med at nitrat i betydeligt omfang omsættes til nitrit i mundhulen (for nitratindhold over 50 mg/L, så var OR lettere forøget, men langt fra statistisk signifikant). Resultaterne fra begge studier af Mueller *et al.* skal dog tolkes med forsigtighed. Nitrat og nitritindholdet blev målt med en grov semikvantitativ måling med brug af en neddypnings "stick" og målingerne blev ofte foretaget flere år efter graviditeten. Hvis der var nitrit i vandet, kunne det også interferere med nitratmålingen. Der er i studiet ikke informationer om hvorvidt forældrene var tobaksrygere, hvilket er en mulig risikofaktor for udvikling af kræft i

hjernen hos børn (Boffetta *et al.*, 2000). Zumel-Marne *et al.* (2021) undersøgte i et internationalt case-kontrol studie (seks lande), om nitrat i boligens drikkevand, prænatalt og postnatalt var associeret til udvikling af hjernetumorer hos unge (10 – 24 år). Ved nitratindhold i drikkevandet over 3,26 mg/L var der en forøget odds ratio (OR), og en antydning i retning af en dosis respons. Resultaterne opnåede dog ikke statistisk signifikans (OR = 1,80; 95 % CI = 0,91 – 3,63, for postnatal nitrat > 8,48 mg/L vs. nitrat ≤ 3,26 mg/L og OR = 1,76; 95 % CI = 0,91 – 3,41, for prænatal nitrat > 8,48 mg/L vs. nitrat ≤ 3,26 mg/L). I studiet af Stayner *et al.* (2021) var højeste prækonceptionelle eksponeringskategori (>25 mg/L) sammenlignet med laveste eksponeringskategori (≤1 mg/L) for nitrat i drikkevand, statistisk signifikant associeret med højere risiko for kræft i centralnervesystemet (OR = 1,82; 95% CI = 1,09 - 3,04). Resultaterne for prænatal og postnatal eksponering peger i samme retning som resultaterne for prækonceptionel eksponering, men opnåede ikke statistisk signifikans. Der var ikke tegn på en positiv association ved nitratindhold under 25 mg/L. Studiet er tidligere vurderet af DTU Fødevareinstituttet (DTU DOCX nr. 21/1037128), hvor pålideligheden af undersøgelsen samlet set blev vurderet til at være høj. En svaghed ved alle studierne er at deltagernes væske-indtag fra drikkevand, ikke kan korrigeres for indtag af andre drikkevarer der erstatter indtag af vand fra hjemmets drikkevandsforsyning. Selv om indtag af drikkevand fra flaske er begrænset i Danmark sammenlignet med mange andre lande, så kan folk til dels erstatte væskeindtaget fra hjemmets drikkevand, med eks. mælk, sodavand, danskvand, juice, vand indtaget uden for hjemmet m.m., hvilket giver en usikkerhed i forhold til estimeringen af det samlede nitratindtag fra drikkevandet. Det skal dog understreges at estimeringen af mødrenes nitratindtag fra drikkevand i Stayner *et al.* (2021) undersøgelsen, vurderes som markant mere pålidelig og velgennemført end i de øvrige studier der har undersøgt en sammenhæng mellem nitrat i drikkevand og kræft i hjernen hos børn. Og igen, usikkerheder i estimeringen af nitratindtaget fra vand vil normalt gøre det sværere at finde associationer. En styrke ved Stayner *et al.* (2021) er at i Danmark er risikoen for miljøforurenende stoffer i drikkevandsforsyningen (der evt. kunne introducere bias i studiet), mindsket gennem en kontinuerlig og kontrol med drikkevandskvaliteten (Schullehner & Hansen, 2014). Det anvendte studiedesign har en begrænsning i at der er visse mangler i den individuelle viden om deltagerne (eks. kost, medicinindtag), hvilket gør at det er ikke muligt at undersøge for interaktioner med faktorer, der må forventes at påvirke den endogene nitrosering. Havde man eks. kunne se at risikoen for kræft blev forøget ved et højt kødindtag eller et lavt indtag af askorbinsyre, så ville det være med til at underbygge en årsagssammenhæng.

Et studie har undersøgt om nitrat i drikkevand var associeret til kræft i prostata (Donat-Vargas *et al.*, 2023). En særlig styrke ved dette spanske case-kontrol studiet er, i modsætning til mange andre studier, er at der indgår informationer om forbrugernes drikkevaner, således at nitratindtaget kan estimeres på basis både af vand både fra bopælens vandforsyning, samt flaskevand. Der var også viden om vandforbruget i hjemmet, på arbejdet og andre steder. Gennemsnitligt kom det største indtag dog fra hjemmets vandforsyning (80 %). Der blev i studiet fundet en positiv statistisk signifikant association mellem indtaget af nitrat fra drikkevand og kræft i prostata (OR per 5 mg  $\text{NO}_3^-$ /dag = 1,13; 95% CI = 1,06 – 1,21, justeret for alder og uddannelsesniveau; OR per 5 mg  $\text{NO}_3^-$ /dag = 1,22; 95% CI = 1,12 – 1,33, yderligere justeret for vandets indhold af trihalomethaner). I stratificerede analyser var associationen stærkest hos deltagere med lavt indtag af fibre, frugt og grøntsager samt askorbinsyre, mens indtaget af kød og forarbejdet kød ikke havde viste nogen forskel. Imidlertid var ingen af interaktionerne dog statistisk signifikante.

Tre studier har undersøgt om nitrat i drikkevand var associeret til kræft i nyrerne (Jones *et al.*, 2017; Ward *et al.*, 2007; Weyer *et al.*, 2001). Weyer *et al.* (2001) fandt ingen signifikant association mellem nitrat i drikkevand og kræft i nyrerne. Ward *et al.* (2007) fandt heller ingen signifikant association mellem nitrat i drikkevand og den undersøgte population som helhed, men for undergrupper der i over 10 år havde drukket postevand med indhold af nitrat over 22 mg  $\text{NO}_3^-$ /l, og samtidig havde et højt kødindtag eller et lavt indtag af askorbinsyre, sås en positiv signifikant association (høj kød: OR = 1.91; 95 % CI: 1,04 – 3,51; p-interaktion 0,01), (lav askorbinsyre: OR = 1.90; 95 % CI: 1,01 – 3,56; p-interaktion 0,13). Forfatterne er dog usikre på det positive fund, eftersom det skyldes et stort antal deltagere fra en enkelt by (Des Moines). Jones *et al.* (2017) fandt en positiv signifikant association mellem nitrat og kræft i nyrerne hos de deltagere, der havde mest nitrat i drikkevandet (> 22 mg  $\text{NO}_3^-$ /l) (HR = 2,2; CI: 1,2 – 4,2; p-trend = 0,35). Der er tale om et opfølgende studie af samme IWHS (Iowa Women's Health Study) kohorte som Weyer *et al.* (2001) gjorde brug af. Der blev ikke fundet en interaktion med askorbinsyre.

En enkelt studie af Ward *et al.* (2010) er udført vedrørende kræft i skjoldbruskkirtlen. Her sås en positiv signifikant association hos personer, der i over 5 år havde indtaget drikkevand fra et offentligt vandværk med et højt nitratindhold (> 22 mg  $\text{NO}_3^-$ /l) (HR = 2,59; CI: 1,09 – 6,19; p-trend = 0,04). Studiet er rimeligt velgennemført og dækkede et stort antal deltagere, men antallet af deltagere i studiet der udviklede kræft i skjoldbruskkirtlen, var meget lavt (i alt 28 cases). Hertil kommer en manglende kontrol med deltagernes tidligere bopæl og vandindtag fra

andre kilder end hjemmet. Ufuldstændige oplysninger om nitratindtaget fra vand vil dog normalt gøre det sværere at finde associationer.

To studier har undersøgt, om nitrat i drikkevand var associeret til kræft i æggestokkene hos post-menopausale kvinder (Inoue-Choi *et al.*, 2015; Weyer *et al.*, 2001). Begge studier er baseret på IWHS kohorten, og begge fandt en positiv signifikant association. Inoue-Choi *et al.* (2015), som er den mest opdaterede analyse af kohorten, fandt, at de kvinder, der havde mest nitrat i drikkevandet (13-111 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/l), havde en signifikant positiv association med kræft i æggestokkene (HR = 2,03; CI: 1,22 – 3,38; p-trend = 0,003). Der var ligeledes en signifikant positiv association i forhold til kvinder, der i over 4 år eller mere havde drukket vand med et nitratindhold over 22 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/l (HR = 1,52; CI: 1,00 – 2,31; p-trend = 0,05). Associationen blev styrket hos kvinder, der samtidigt havde et askorbinsyreindtag, der lå under medianniveauet. Der var ligeledes en tendens til, at associationen blev styrket hos kvinder, der samtidigt havde et højt indtag af rødt kød. Tilsvarende beregninger i forhold til effekt af askorbinsyre og rødt kød blev ikke foretaget af Weyer *et al.* (2001). Der var ingen association mellem indhold af trihalomethan i vandet og kræft i æggestokkene (Inoue-Choi *et al.*, 2015).

Seks studier har undersøgt, om nitrat i drikkevand var associeret til kræft i blæren (Barry *et al.*, 2020; Espejo-Herrera *et al.*, 2015; Jones *et al.*, 2016; Ward *et al.*, 2003; Weyer *et al.*, 2001; Zeegers *et al.*, 2006). Zeegers *et al.* (2006) og Espejo-Herrera *et al.* (2015) fandt ingen signifikant association, Espejo-Herrera *et al.* (2015) fandt dog en tendens til en positiv association for personer, der havde været udsat for de højeste nitratkoncentrationer i længst tid (> 20 år) (OR = 1,4; 95 % CI: 0,9 – 2,3). Ward *et al.* (2003) fandt en signifikant invers association for mænd (højeste kvartil: OR = 0,5; 95 % CI: 0,4 – 0,8), men ingen signifikant association for kvinder. I ingen af de tre studier blev der fundet en interaktion med indtaget af askorbinsyre. Weyer *et al.* (2001) fandt en positiv signifikant association for post-menopausale kvinder (højeste kvartil, OR = 2,83; 95 % CI: 1,11 – 7,19), men på basis af få cases. Jones *et al.* (2016), som gennemførte en opfølgende analyse af IWHS kohorten, fandt en positiv signifikant association for post-menopausale kvinder, der havde indtaget drikkevand med højt nitratindhold i over 4 år (HR = 1,62; 95 % CI: 1,06 - 2,47; p-trend = 0,03), men der var ingen signifikant interaktion i forhold til askorbinsyre indtaget (kun en svag tendens). Der var en stærk interaktion til rygning, som forstærkede den positive association. Barry *et al.* (2020) fandt ligeledes en positiv nærsignifikant association mellem deltagere med lavest (< 0,9 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/l) og højest nitratindhold i drikkevandet (> 9,2 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/l) (OR = 1,5; 95 % CI: 0,97 – 2,3; p-trend = 0,01), men der var ingen interaktion til hverken rygning eller indtag af askorbinsyre. Men der blev

fundet en interaktion til indtag af rødt og forarbejdet kød, der begge forstærkede associationen (statistisk signifikant).

### **Vurdering af kræft risiko**

De epidemiologiske studier, der har undersøgt associationen mellem nitrat i drikkevand og kræft, har ikke kunnet underbygge, at der skulle være en forøget risiko for kræft i lungerne, hjernen (voksne), livmoderen, huden, spiserøret, tyndtarmen, leveren, galde, galdegange, bugspytkirtlen og maven eller en forøget risiko for leukæmi. Det skal bemærkes, at EFSA (2017b) og IARC (2010) fandt hhv. nogen og begrænset evidens for en association mellem nitrit fra kosten og forøget risiko for kræft i maven, så yderligere undersøgelser af associationen mellem nitrat i drikkevand og kræft i maven er ønskelig. På trods af en positiv association i et studie, peger de udførte studier samlet set heller ikke på en forøget risiko for lymfeknudekræft.

De studier, der har undersøgt nitrat i drikkevand og risiko for brystkræft er tvetydige, og der kan ikke foretages pålidelige vurderinger på den baggrund.

De fire studier, der har undersøgt nitrat i drikkevand og risiko for kræft/tumorer i hjernen hos børn og unge er ikke entydige og vurderingsgrundlaget er samlet set begrænset, men de to nyeste studier peger i retning af en forøget risiko for kræft/tumorer ved et forøget indhold af nitrat i det drikkevand deres mødre drak under graviditeten. På baggrund af de udførte studier vurderes det at en risiko ikke kan udelukkes.

Det ene studie, der har undersøgt risikoen for kræft i skjoldbruskkirtlen samt et andet studie der har set på kræft i prostata, de to studier (samme kohorte), der har undersøgt risikoen for kræft i æggestokkene, og to af tre studier der har undersøgt risikoen for kræft i nyrerne, indikerer, at nitrat i drikkevand kan være associeret til forøget kræft risiko i disse organer. Antallet af studier der har undersøgt sammenhængen af de enkelte kræftformer er imidlertid begrænset og der er behov for flere studier. På baggrund af de udførte studier vurderes det at en risiko ikke kan udelukkes.

Seks studier har undersøgt risikoen for kræft i blæren. To studier fandt ingen association, mens et studie fandt en invers association, og tre studier fandt en positiv association (heraf dog to studier fra samme kohorte). Samlet set peger studierne i retning af, at nitrat i drikkevandet kan

forøge risikoen for kræft i blæren, men det skal understreges, at usikkerheden af resultatet også for denne kræftform, er stor. På baggrund af de udførte studier vurderes det at en risiko ikke kan udelukkes.

Kræft i blæren er med seks studier den næstmest undersøgte kræftform. To studier fandt ingen statistisk signifikant association, mens et studie indikerer en positiv association, og tre studier fandt en positiv association (heraf dog to studier fra samme kohorte). Samlet set peger studierne i retning af, at nitrat i drikkevandet kan forøge risikoen for kræft i blæren, men det skal understreges, at usikkerheden er stadig stor. På baggrund af de udførte studier vurderes det at en risiko ikke kan udelukkes.

Samlet set viser resultaterne et klart behov for flere veldeignede epidemiologiske studier, målrettet undersøgelser af sammenhængen mellem nitrat i drikkevandet og kræft, i særdeleshed kræft i blæren, hjernen (børn og unge), prostata, nyrerne, æggestokkene og skjoldbruskkirtlen.



# **Vurdering af epidemiologiske observationsundersøgelser til belysning af mulig sammenhæng mellem eksponering for nitrat i drikkevand og udvikling af kolorektalkræft**

## **Søgestrategi**

DTU Fødevarerinstitutionen foretog en litteratursøgning i MEDLINE (via PubMed) for at identificere kohorteundersøgelser, case-kontrolundersøgelser og systematiske oversigtsartikler inklusiv metaanalyser (engelsk systematic reviews with meta-analyses), der undersøger sammenhængen mellem eksponering for nitrat i drikkevand og udvikling af kolorektalkræft. Søgestrategien indeholdt kun søgetermer relateret til eksponering og udfald. Studier publiceret i perioden 2019 til og med 2023 blev søgt.

## **Inklusionskriterier**

Population: Den generelle befolkning

Eksponering: Nitrat i drikkevand

Udfald: Incidens (nye sygdomstilfælde) af tyktarms- eller endetarmskræft (total kolorektalkræft) og tyktarms- og endetarmskræft hver for sig

Studiedesign: Kohorteundersøgelse, case-kontrolundersøgelse, systematisk oversigtsartikel inklusiv metaanalyse

En oversigtsartikel blev anset for at være systematisk, hvis oversigtsartiklen forsøgte at identificere al tilgængelig evidens, der opfylder specificerede inklusionskriterier (med andre ord population, eksponering, udfald og studiedesign) for at besvare forskningsspørgsmålet.

## Identificeret litteratur

DTU Fødevareinstituttet identificerede fem oversigtsartikler inklusiv metaanalyser, der undersøger sammenhængen mellem eksponering for nitrat i drikkevand og risikoen for kolorektalkræft (Elwood & Werf, 2022; Essien *et al.*, 2022; Hosseini *et al.*, 2021; Picetti *et al.*, 2022; Seyyedsalehi *et al.*, 2023) og en case-kontrolundersøgelse af sammenhængen mellem eksponering for nitrat i drikkevand og udvikling af kolorektalkræft (Villanueva *et al.*, 2021). De fem oversigtsartikler inkluderer i alt 12 tidligere gennemførte befolkningsundersøgelser (primære studier), heraf tre kohorteundersøgelser af sammenhængen mellem eksponering for nitrat i drikkevand og udvikling af kolorektalkræft (Jones *et al.*, 2019; Schullehner *et al.*, 2018; Weyer *et al.*, 2001), fire case-kontrolundersøgelser af sammenhængen mellem eksponering for nitrat i drikkevand og udvikling af kolorektalkræft (De Roos *et al.*, 2003; Espejo-Herrera *et al.*, 2016a; Fathmawati *et al.*, 2017; McElroy *et al.*, 2008), fire case-kontrolundersøgelser af sammenhængen mellem eksponering for nitrat i drikkevand og død af tyktarms- eller endetarmskræft (Chang *et al.*, 2010; Chiu *et al.*, 2010; Kuo *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2007) og en økologisk undersøgelse (makroundersøgelse) af sammenhængen mellem eksponering for nitrat i drikkevand og død af tyktarmskræft (Morales-Suárez-Varela *et al.*, 1995).

De fire case-kontrolundersøgelser af sammenhængen mellem eksponering for nitrat i drikkevand og død af tyktarms- eller endetarmskræft (Chang *et al.*, 2010; Chiu *et al.*, 2010; Kuo *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2007) vil ikke blive behandlet, da udfaldet er død af kræft og ikke nye sygdomstilfælde af kræft. Den økologiske undersøgelse af sammenhængen mellem eksponering for nitrat i drikkevand og død af tyktarmskræft (Morales-Suárez-Varela *et al.*, 1995) vil heller ikke blive behandlet, da udfaldet er død af tyktarmskræft og eksponerings- og udfaldsoplysninger er baseret på grupperede data. Analyseenheden er således populationer (ikke individer).

## Vurdering af udførelsen af de systematiske oversigtsartikler

Vurderingsværktøjet AMSTAR 2 (Shea *et al.*, 2017) er anvendt til at vurdere kvaliteten af, hvordan hver af de inkluderede systematiske oversigtsartikler blev udført og til at vurdere den overordnede tillid til resultaterne fra hver af oversigtsartiklerne.

Hvis oversigtsartiklen inkluderede metanalyser på både total kolorektalkræft og tyktarms- og endetarmskræft hver for sig, vurderede DTU Fødevarerinstitutionen metanalysen på total kolorektalkræft. Hvis oversigtsartiklen inkluderede både metaanalyse med høj versus lav (eller lav versus høj) eksponering for nitrat i drikkevand og dosis-respons-metaanalyse, vurderede DTU Fødevarerinstitutionen dosis-respons-metaanalysen, da det kan bestyrke en årsagssammenhæng, hvis incidensen af kolorektalkræft stiger med stigende eksponering for nitrat i drikkevandet. Et ratiomål fra høj-lav-metaanalyse udtrykker, om personer med høj eksponering for nitrat i drikkevandet har højere eller lavere risiko for udvikling af kolorektalkræft sammenlignet med personer med lav eksponering for nitrat i drikkevandet. Et ratiomål fra dosis-respons-metaanalyse udtrykker, hvor meget risikoen for kolorektalkræft er højere eller lavere for personer med en givet højere eksponering for nitrat i drikkevandet.

DTU Fødevarerinstitutionen har vurderet fem systematiske oversigtsartikler inklusiv metaanalyse, der har undersøgt sammenhængen mellem eksponering for nitrat i drikkevand og risikoen for kolorektalkræft (Elwood & Werf, 2022; Essien *et al.*, 2022; Hosseini *et al.*, 2021; Picetti *et al.*, 2022; Seyyedsalehi *et al.*, 2023). Fødevarerinstitutionen vurderer, at kvaliteten af udførelsen af oversigtsartiklerne er kritisk lav. De har hver især mere end én kritisk fejl, og man bør derfor ikke have tillid til, at de giver et nøjagtigt og udtømmende resumé af de tilgængelige befolkningsundersøgelser (Shea *et al.*, 2017). Resultaterne fra metaanalyserne i de systematiske oversigtsartikler og DTU Fødevarerinstitutionens vurdering af udførelsen af oversigtsartiklerne fremgår af **tabel 4**.

**Table 4** Resultater fra systematiske oversigtsartikler inklusiv metaanalyse, der har undersøgt sammenhængen mellem eksponering for nitrat i drikkevand og risikoen for kolorektalkræft<sup>a</sup>

	Total kolorektal	Tyktarm	Endetarm	Vurdering af kvaliteten af udførelsen af oversigtsartiklen
Hosseini 2021	Ingen	Ingen <sup>b</sup>	Ingen <sup>b</sup>	Kritisk lav <sup>c</sup> (mangel på protokol, liste over ekskluderede studier og begrundelse for kombineret af data i metaanalyse)
Elwood & van der Werf 2022	Positiv	Positiv	Ingen	Kritisk lav <sup>c</sup> (mangel på protokol, liste over ekskluderede studier, systematisk vurdering af metodologisk kvalitet af de inkluderede primære studier, begrundelse for kombineret af data i metaanalyse og diskussion af publikationsbias)
Essien 2022	Ikke rapporteret	Positiv	Ingen	Kritisk lav <sup>c</sup> (mangel på protokol, udtømmende søgestrategi, liste over ekskluderede studier og begrundelse for kombineret af data i metaanalyse)
Picetti 2022	Ingen	Ingen	Ingen	Kritisk lav <sup>c</sup> (protokollen indeholder ikke en plan for undersøgelse af årsager, der kan forklare forskellig effekt i de inkluderede primære studier (heterogenitet), mangel på udtømmende søgestrategi, liste over ekskluderede studier og begrundelse for kombineret af data i metaanalyse)
Seyedsalehi 2023	Ingen	Ikke rapporteret	Ikke rapporteret	Kritisk lav <sup>c</sup> (mangel på protokol, udtømmende søgestrategi, liste over ekskluderede studier, begrundelse for kombineret af data i metaanalyse og test/diskussion af publikationsbias)

<sup>a</sup> Hvis en oversigtsartikel inkluderer både metaanalyse med høj versus lav (eller lav versus høj) eksponering for nitrat i drikkevand og dosis-respons-metaanalyse, vurderede DTU Fødevarerinstitutionen dosis-respons-metaanalysen, da det kan bestyrke en årsagssammenhæng, hvis incidensen af kolorektalkræft stiger med stigende eksponering for nitrat i drikkevandet.

<sup>b</sup> Resultatet i tabellen er baseret på figur udleveret af den korresponderende forfatter og indgår ikke i den bragte videnskabelige artikel (Hosseini *et al.*, 2021).

<sup>c</sup> Den systematiske oversigtsartikel har mere end én kritisk fejl, og man bør derfor ikke have tillid til, at den giver et nøjagtigt og udtømmende resumé af de tilgængelige befolkningsundersøgelser (Shea *et al.*, 2017).

Oversigtsartiklen af Hosseini *et al.* (2021) inkluderede både metaanalyse med høj versus lav eksponering for nitrat i drikkevand og dosis-respons-metaanalyse. Hverken høj-lav- eller dosis-respons-metaanalysen indikerede en sammenhæng mellem eksponering for nitrat i drikkevand og risikoen for total kolorektalkræft. Som også fremhævet af Chambers *et al.* (2021) i en kort besked (engelsk Letter to the Editor) er der nogle kritiske fejl i høj-lav-metaanalysen af eksponering for nitrat i drikkevand og risikoen for total kolorektalkræft. For det første har forfatterne ved en fejl inkluderet odds ratioen fra analysen af indtag af nitrat fra kosten og udvikling af kolorektalkræft i case-kontrolundersøgelsen af Espejo-Herrera *et al.* (2016a) i stedet for odds ratioen fra analysen af indtag af nitrat fra drikkevand. For det andet har forfatterne inkluderet case-kontrolundersøgelsen af Chiu *et al.* (2010), hvor udfaldet er død og ikke nye sygdomstilfælde, der er udfaldet i de øvrige primære studier inkluderet i metaanalysen. For det tredje har forfatterne inkluderet hazard ratioer fra undersøgelser baseret på den samme kohorte (Jones *et al.*, 2019; Weyer *et al.*, 2001) og risikoestimer for både tyktarms- og endetarmskræft fra enkeltstående undersøgelser (De Roos *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2019) i metaanalysen, hvilket også er problematisk, da undersøgelserne antages uafhængige af hinanden i metaanalysen.

I dosis-respons-metaanalysen af eksponering for nitrat i drikkevand og risikoen for total kolorektalkræft af Hosseini *et al.* (2021) er der også problemer, da dosis-respons-metaanalysen ligeledes blandede primære studier, hvor udfaldet var død, og primære studier, hvor udfaldet var nye sygdomstilfælde. Se **tabel 5**. Desuden er det ikke rapporteret hvilke(t) risikoestimer, der er inkluderet fra Jones *et al.* (2019). I Jones *et al.* (2019) var udfaldene tyktarms- og endetarmskræft hver for sig.

**Table 5** Primære studier inkluderet i metaanalyser af sammenhængen mellem eksponering for nitrat i drikkevand og risikoen for kolorektalkræft.<sup>a</sup>

Primært studie	Studiedesign	Udfald	Hosseini 2021			Elwood & van der Werf 2022	Essien 2022			Picetti 2022 <sup>c</sup>			Seyyed-salehi 2023
			Total kolorektal	Tyktarm	Ende-tarm	Total kolorektal <sup>b</sup>	Tyktarm	Ende-tarm	Total kolorektal	Tyktarm	Ende-tarm	Total kolorektal	
			Dosis-respons	Dosis-respons <sup>d</sup>	Dosis-respons <sup>d</sup>	Dosis-respons	Høj-lav	Høj-lav	Dosis-respons	Dosis-respons	Dosis-respons	Høj-lav	
Morales-Suarez-Varela 1995	Økologisk	Død					X						
Weyer 2001	Kohorte	Nye sygdomstilfælde					X	X	X	X	X		
De Roos 2003	Case-kontrol	Nye sygdomstilfælde		X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Kuo 2007	Case-kontrol	Død				X		X	X		X		
Yang 2007	Case-kontrol	Død				X	X		X	X			
McElroy 2008	Case-kontrol	Nye sygdomstilfælde	X				X	X	X	X	X	X	
Chang 2010	Case-kontrol	Død				X		X	X		X		
Chiu 2010	Case-kontrol	Død	X			X	X		X	X			
Espejo-Herrera 2016	Case-kontrol	Nye sygdomstilfælde	X	X	X	X	X	X				X	
Fathmawati 2017	Case-kontrol	Sygdomstilfælde <sup>e</sup>							X			X	
Schullehner 2018	Kohorte	Nye sygdomstilfælde				X	X	X	X	X	X	X	
Jones 2019	Kohorte	Nye sygdomstilfælde	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	

<sup>a</sup> Hvis en oversigtsartikel inkluderer både metaanalyse med høj versus lav (eller lav versus høj) eksponering for nitrat i drikkevand og dosis-respons-metaanalyse, vurderede DTU Fødevarerinstitutionen dosis-respons-metaanalysen, da det kan bestyrke en årsagssammenhæng, hvis incidensen af kolorektalkræft stiger med stigende eksponering for nitrat i drikkevandet.

<sup>b</sup> Forfatterne angiver, at de bruger sygdomstype som moderator i metaanalysen til at estimere sammenhængen mellem eksponering for nitrat i drikkevand og risikoen for tyktarms- og endetarmskræft hver for sig. Moderation (effektmodifikation) involverer brug af moderatoren til at estimere separate effekter af den uafhængige variabel (eksponering for nitrat i drikkevand) for hver værdi af moderatoren.

<sup>c</sup> Metaanalyserne var opdelt efter studiedesign.

<sup>d</sup> Resultatet i tabellen er baseret på figur udleveret af den korresponderende forfatter og indgår ikke i den bragte videnskabelige artikel (Hosseini *et al.*, 2021).

<sup>e</sup> Det er ikke rapporteret om udfaldet er nye sygdomstilfælde eller prævalente tilfælde.

Chambers *et al.* (2022) har diskuteret specifikke problemstillinger inden for området i en kommentar (engelsk Commentary) i forlængelse af den bragte systematiske oversigtsartikel af Hosseini *et al.* (2021) og samlet resultater fra kohorteundersøgelser (Jones *et al.*, 2019; Schullehner *et al.*, 2018) og case-kontrolundersøgelser (De Roos *et al.*, 2003; Espejo-Herrera *et al.*, 2016a; Fathmawati *et al.*, 2017; McElroy *et al.*, 2008) af eksponering for nitrat i drikkevand og udvikling af kolorektalkræft i høj-lav-metaanalyser (**tabel 6**).

**Tabel 6** Resultater fra Chambers & kollegaers (2022) høj-lav-metaanalyse af tidligere gennemførte kohorteundersøgelser og case-kontrolundersøgelser af sammenhængen mellem eksponering for nitrat i drikkevand og udvikling af kolorektalkræft.

	Studiedesign	Udfald	Total kolorektal	Tyktarm	Endetarm
			Høj-lav	Høj-lav	Høj-lav
Schullehner 2018	Kohorte	Nye sygdomstilfælde	X	X	X
Jones 2019	Kohorte	Nye sygdomstilfælde	Ikke rapporteret	X	X
De Roos 2003	Case-kontrol	Nye sygdomstilfælde	Ikke rapporteret	X	X
McElroy 2008	Case-kontrol	Nye sygdomstilfælde	X	X <sup>a</sup>	X
Espejo-Herrera 2016	Case-kontrol	Nye sygdomstilfælde	X <sup>b</sup>	X	X
Fathmawati 2017	Case-kontrol	Nye sygdomstilfælde <sup>c</sup>	X	Ikke rapporteret	Ikke rapporteret

<sup>a</sup> Høj-lav-metaanalysen af Chambers *et al.* (2022) inkluderede odds ratio fra analysen, hvor den proksimale del af tyktarmen var udfaldet.

<sup>b</sup> Hovedanalyserne af indtag af nitrat fra drikkevand og odds for total kolorektalkræft blandt alle undersøgelsesdeltagere indikerede effektmodifikation fra køn (P=0,01).

<sup>c</sup> Det er ikke rapporteret om udfaldet er nye sygdomstilfælde eller prævalente tilfælde.

Det fælles (pooled) risikoestimat fra Chambers *et al.* (2022) høj-lav-metaanalyse af eksponering for nitrat i drikkevand og risikoen for total kolorektalkræft indikerede, i modsætning til det pooled risikoestimat fra Hosseini *et al.* (2021) høj-lav-metaanalyse, at personer med høj eksponering for nitrat i drikkevandet havde højere risiko for total kolorektalkræft sammenlignet med personer med lav eksponering for nitrat i drikkevandet. Det pooled risikoestimat for total kolorektalkræft var 1,39; 95% konfidensinterval 1,09-1,78, I<sup>2</sup> 75%, P<sub>heterogenitet</sub> = 0,008. For tyktarmskræft alene var det pooled risikoestimat 1,27; 95% konfidensinterval 1,03-1,57, I<sup>2</sup> 73%, P<sub>heterogenitet</sub> = 0,005. Der var ingen sammenhæng for endetarmskræft (pooled risikoestimat 1,16; 95% konfidensinterval 0,90-1,49, I<sup>2</sup> 63%, P<sub>heterogenitet</sub> = 0,03). Der var tegn på forskellige effekter i de medtagne undersøgelser i alle tre metaanalyser. Chambers *et al.* (2022) udførte ikke undergruppeanalyser med henblik på at undersøge

om der var tegn på forskellige effekter i undergrupper, der kunne forklare den observerede heterogenitet i metaanalyserne.

Problemerne i metaanalyserne af Hosseini *et al.* (2021) går igen i de andre metaanalyser af eksponering for nitrat i drikkevand og risikoen for kolorektalkræft. Elwood & Werf (2022) blandede også primære studier, hvor udfaldet var død, og primære studier, hvor udfaldet var nye sygdomstilfælde i deres dosis-respons-metaanalyse af eksponering for nitrat i drikkevand og risikoen for total kolorektalkræft. Se tabel 5. Desuden inkluderede de risikoestimer for både tyktarms- og endetarmskræft fra enkeltstående undersøgelser (De Roos *et al.*, 2003; Espejo-Herrera *et al.*, 2016a; Jones *et al.*, 2019; Schullehner *et al.*, 2018), hvilket også er problematisk. Det pooled risikoestimat for hhv. tyktarms- og endetarmskræft blev beregnet i modellen for metaanalysen, hvor total kolorektalkræft var udfaldet ved at bruge sygdomstype som moderator i metaanalysen. Moderation (effektmodifikation) involverer brug af moderatoren til at estimere separate effekter af den uafhængige variabel (eksponering for nitrat i drikkevand) for hver værdi af moderatoren.

Essien *et al.* (2022) blandede primære studier, hvor udfaldet var død, og primære studier, hvor udfaldet var nye sygdomstilfælde og inkluderede hazard ratioer fra undersøgelser baseret på den samme kohorte (Jones *et al.*, 2019; Weyer *et al.*, 2001) i deres høj-lav-metaanalyser af eksponering for nitrat i drikkevand og risikoen for tyktarms- og endetarmskræft hver for sig. Se tabel 5. Desuden inkluderede forfatterne odds ratioer for både tyktarmskræft i den proksimale ende og den distale ende fra det samme primære studie (McElroy *et al.*, 2008) og risikoestimer fra den økologiske undersøgelse af Morales-Suárez-Varela *et al.* (1995) i høj-lav-metaanalysen, hvor udfaldet var tyktarmskræft alene. I økologiske undersøgelser er analyseenheden populationer og ikke individer.

I Picetti *et al.* (2022) var metaanalyserne delt op efter studiedesign. I dosis-respons-metaanalysen baseret på kohortestudier af sammenhængen mellem eksponering for nitrat i drikkevand og risikoen for total kolorektalkræft, inkluderede forfatterne hazard ratioer fra undersøgelser baseret på den samme kohorte (Jones *et al.*, 2019; Weyer *et al.*, 2001) (tabel 5) og hazard ratioer for både tyktarms- og endetarmskræft fra enkeltstående undersøgelser (Jones *et al.*, 2019; Weyer *et al.*, 2001). I dosis-respons-metaanalyserne baseret på kohortestudier af sammenhængen mellem eksponering for nitrat i drikkevand og risikoen for tyktarms- og endetarmskræft hver for sig, inkluderede forfatterne ligeledes hazard ratioer fra undersøgelser baseret på den samme kohorte (Jones *et al.*, 2019; Weyer *et al.*, 2001) (tabel 5). I dosis-respons-metaanalyserne baseret på case-kontrolundersøgelser af sammenhængen mellem eksponering for nitrat i drikkevand og risikoen for total kolorektalkræft og tyktarms- og endetarmskræft hver for sig blandede forfatterne primære studier, hvor udfaldet var død, og primære studier, hvor udfaldet var nye sygdomstilfælde (tabel 5). Desuden inkluderede de odds ratioer for både tyktarms- og endetarmskræft fra det samme primære studie (De Roos *et al.*, 2003) i



dosis-respons-metaanalysen, hvor udfaldet var total kolorektalkræft og de inkluderede odds ratioer for både tyktarmskræft i den proksimale ende og den distale ende fra det samme primære studie (McElroy *et al.*, 2008) i dosis-respons-metaanalysen, hvor udfaldet var tyktarmskræft alene.

I Seyyedsalehi *et al.* (2023) er det ikke rapporteret hvilke(t) risikoestimer, der er inkluderet fra De Roos *et al.* (2003) og Jones *et al.* (2019) i deres høj-lav-metaanalyse af sammenhængen mellem eksponering for nitrat i drikkevand og risikoen for total kolorektalkræft. I De Roos *et al.* (2003) og Jones *et al.* (2019) var udfaldene tyktarms- og endetarmskræft hver for sig. Desuden er der fejl i dataudtræk. Kohorteundersøgelsen af Schullehner *et al.* (2018) indikerede en positiv sammenhæng mellem eksponering for nitrat i drikkevand og udvikling af total kolorektalkræft og ikke en negativ sammenhæng.

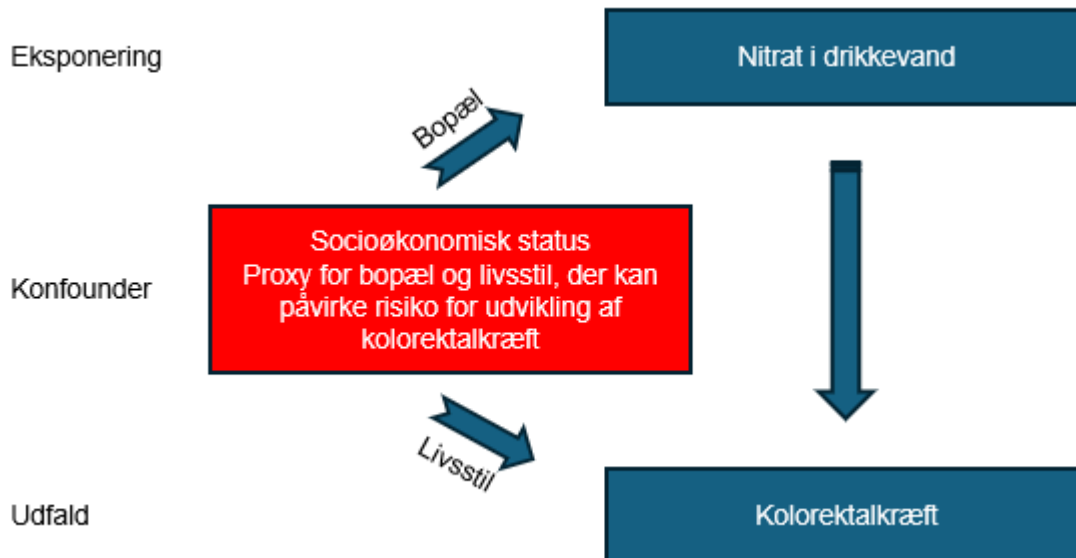
### **Vurdering af pålideligheden af befolkningsundersøgelserne**

Vurdering af befolkningsundersøgelserne er så vidt muligt foretaget iht. de anbefalinger, der er udviklet af arbejdsgruppe ifm. brug af befolkningsundersøgelser i risikovurdering af pesticider (Notat 1, <https://www.ft.dk/samling/20181/almdel/MOF/bilag/355/index.htm>). Dette inkluderer vurdering af pålideligheden af hver af befolkningsundersøgelserne, hvilket er behandlet i dette afsnit og en samlet vurdering af deres relevans (evidensintegrering), hvilket er behandlet i afsnittet i det efterfølgende afsnit "Samlet vurdering af befolkningsundersøgelsesernes relevans".

DTU Fødevarerinstitutionen har vurderet pålideligheden af hver af befolkningsundersøgelserne med udgangspunkt i syv kvalitetsparametre, der omhandler undersøgelsesdesign og udførelse, population, eksponeringsvurdering, udfaldsvurdering, kontrol for konfounding, statistisk analyse og rapportering.

Konfounding (forveksling, sammenblanding) i en epidemiologisk undersøgelse kan lede til en over- eller undervurdering af den sande sammenhæng (bias). Se **Figur**. Der er forskellige metoder til kontrol af konfounding, herunder regressionsanalyse. Væsentlige risikofaktorer for kolorektalkræft, der kan betragtes som potentielle konfoundere i befolkningsundersøgelserne, blev identificeret via litteratur (WCRF/AICR, 2018) og inddragelse af eksterne eksperter inden for området. Følgende potentielle konfoundere blev udvalgt a priori og udgør grundlaget for vurdering af kontrol af konfounding ved regressionsanalyse i undersøgelserne: Alder, køn og socioøkonomisk status, der hænger sammen med eksponering for nitrat i drikkevand (via bopæl) og livsstil (kost, rygning og alkohol og motion), der kan påvirke risiko for udvikling af kolorektalkræft. Se illustration nedenfor. Desuden kan andre miljøforurenende stoffer i drikkevandet (f.eks. pesticider, klorerede opløsningsmidler, desinfektionsbiprodukter) betragtes som potentielle konfoundere i lande med lavere krav til

drikkevandskvaliteten end i Danmark. Det skal fremhæves, at i epidemiologiske observationsundersøgelser kan residualkonfounding (herunder konfounding fra ukendte risikofaktorer) ikke udelukkes.



**Figur** Eksempel på konfounding. Socioøkonomisk status og eksponering for nitrat i drikkevand kan begge være årsag til udvikling af kolorektalkræft og er indbyrdes relateret. Konfounding kan lede til en over- eller undervurdering af den sande sammenhæng (bias).

Der foregår et samspil mellem eksponering for nitrat i drikkevand og andre komponenter fra kosten der også potentielt kan påvirke dannelse af endogene N-nitrosforbindelser (engelsk N-nitroso compounds (NOC)) og dermed den samlede risiko for kolorektalkræft. Disse andre eksponeringer (potentielle effektmodifikatorer) blev identificeret via litteratur (Bondonno *et al.*, 2023; Erichsen *et al.*, 2024) og inddragelse af eksterne eksperter inden for området. Følgende faktorer blev udvalgt a priori: (Højt) indtag af askorbinsyre,  $\alpha$ -tocopherol og polyphenoler fra kosten, der hver især kan hæmme dannelse af N-nitrosforbindelser samt (højt) indtag af rødt kød og/eller forarbejdet kød, der på grund af tilstedeværelsen af sekundære aminer (nitroserbare forbindelser) kan fremme dannelse af N-nitrosforbindelser. Resultater fra undersøgelser, der har undersøgt om disse faktorer modificerer effekten, vil blive inddraget i diskussionen af den samlede vurdering af befolkningsundersøgelsesternes relevans.

## *Kohorteundersøgelser af sammenhængen mellem eksponering for nitrat i drikkevand og udvikling af kolorektalkræft*

To (Jones *et al.*, 2019; Weyer *et al.*, 2001) af de tre (Jones *et al.*, 2019; Schullehner *et al.*, 2018; Weyer *et al.*, 2001) kohorteundersøgelser er baseret på den samme kohorte. DTU Fødevarerinstitutionen har valgt at vurdere undersøgelsen med længst opfølgningsperiode (Jones *et al.*, 2019). Karakteristik af undersøgelse og deres resultater fremgår af Appendiks II.

Undersøgelsen af Schullehner *et al.* (2018) er en kohorteundersøgelse, hvor der er anvendt registerdata til at undersøge sammenhængen mellem eksponering for nitrat i drikkevand og udvikling af total kolorektalkræft og tyktarms- og endetarmskræft hver for sig. Studiepopulationen var alle indbyggere i Danmark i perioden 1. januar 1978 til 31. december 2011, der var i live på deres 35-års fødselsdag. Undersøgelsesdeltagerne blev identificeret via det danske Centrale Personregister (CPR) og fulgt fra deres 35-års fødselsdag indtil opståen af tyktarms- eller endetarmskræft, slutdato for opfølgning (31. december 2011), død, emigration eller forsvinden. Årlige gennemsnitlige nitratkoncentrationer for offentlige vandforsyninger og private brønde blev brugt til at fastsætte nitratkoncentrationer for hver husstand. Nitratkoncentrationerne for undersøgelsesdeltagerens husstande koblet med deres bopælshistorie (skiftende bopæl og dermed skiftende vandforsyninger) blev anvendt til at beregne det gennemsnitlige eksponeringsniveau for hver af deltagerne i perioden fra deres 20-års til deres 35-års fødselsdag. Eksponeringen er derfor et mål for den kumulerede eksponering over en længere periode inden inklusion i undersøgelsen. Udfaldene i undersøgelsen var udvikling af total kolorektalkræft og tyktarms- og endetarmskræft hver for sig. Nye sygdomstilfælde af tyktarms- og endetarmskræft blev identificeret via det danske Cancerregister. Information om potentielle konfoundere (demografiske faktorer, uddannelse og tidligere kræftdiagnose) blev indhentet fra registre.

Hazard ratioer med tilhørende 95% konfidensintervaller blev anvendt til at beskrive sammenhængen mellem eksponering for nitrat i drikkevand og risikoen for total kolorektalkræft og tyktarms- og endetarmskræft hver for sig. Cox proportional hazards model blev anvendt til at beregne hazard ratioer. I hovedanalyserne blev der kontrolleret for alder, køn, fødselsår, tidligere kræftdiagnose og uddannelse. Forskerne undersøgte også om køn påvirkede effekten af nitratniveauet i drikkevand på risikoen for kolorektalkræft. Resultaternes robusthed blev undersøgt i følsomhedsanalyser, hvor betydningen af kvaliteten af information om eksponeringsniveau blev undersøgt, herunder ændret eksponeringsperiode til alder fra 30 til 40 år.

I alt 1.742.093 mænd og kvinder indgik i undersøgelsen. I løbet af 23 millioner person-års opfølgning blev 3.700 personer diagnosticeret med tyktarmskræft og 2.308 med endetarmskræft. Højeste

kategori ( $\geq 16,75$  mg nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) per liter vand) sammenlignet med laveste kategori ( $< 0,69$  mg nitrat per liter vand) af eksponering for nitrat i drikkevand var associeret med en højere risiko for total kolorektalkræft (5.944 sygdomstilfælde) og tyktarms- og endetarmskræft hver for sig. For total kolorektalkræft og endetarmskræft alene var der en forhøjet risiko ved eksponeringsniveauer på 3,87-9,25 mg nitrat per liter vand sammenlignet med eksponeringsniveauer  $< 1,27$  mg nitrat per liter vand og punkttestimatet for risikoen for total kolorektalkræft antydede en yderligere forhøjet risiko ved eksponeringsniveauer  $\geq 9,25$  mg nitrat per liter vand sammenlignet med eksponeringsniveauer  $< 1,27$  mg nitrat per liter vand. For tyktarmskræft alene var der en forhøjet risiko ved eksponeringsniveauer på  $\geq 9,25$  mg nitrat per liter vand og punkttestimatet for risikoen for tyktarmskræft alene antydede en forhøjet risiko ved eksponeringsniveauer på 3,87-9,25 mg nitrat per liter vand. Køn modificerede ikke effekten af eksponering for nitrat i drikkevand på risikoen for kolorektalkræft, og følsomhedsanalyserne indikerede at de fundne sammenhænge var robuste.

Samlet set vurderer DTU Fødevarerinstitutionen, at pålideligheden af undersøgelsen af Schullehner *et al.* (2018) er *høj*. Resultaterne fra undersøgelsen indikerer, at der er en sammenhæng mellem højere eksponering for nitrat i drikkevand og højere risiko for udvikling af kolorektalkræft. En svaghed ved denne undersøgelse og andre undersøgelser, hvor der alene er anvendt registerdata, er at oplysninger om undersøgelsesdeltagerne er begrænset til de informationer, der kan udtrækkes fra registre. I aktuelle undersøgelser var oplysninger om mængden af forbrug af drikkevand i og uden for hjemmet således ikke tilgængelig. Denne måleusikkerhed (ikke-differentieret misklassifikation) medfører sandsynligvis, at de estimerede sammenhænge er underestimeret af de faktiske sammenhænge (bias mod nulhypotesens værdi). Der blev kontrolleret for potentielle konfoundere i regressionsanalyserne, men residualkonfounding kan ikke udelukkes.

Vurdering af pålideligheden af kohorteundersøgelsen af Schullehner *et al.* (2018).

Kvalitetsparameter	Høj kvalitet	Middel kvalitet	Lav kvalitet
Undersøgelsens design og udførelse	X		
Population	X		
Eksponeringsvurdering		X	
Udfaldsvurdering	X		
Kontrol for konfounding	X		
Statistisk analyse	X		
Rapportering	X		

Undersøgelsen af Jones *et al.* (2019) er en kohorteundersøgelse af sammenhængen mellem eksponering for nitrat i drikkevand og udvikling af tyktarms- og endetarmskræft baseret på data fra

Iowa Women's Health Study. Studiepopulationen var 15.532 kvinder i alderen 55-69 år, da de blev inkluderet i undersøgelsen i 1986 og som rapporterede brug af den samme offentlige vandforsyning i >10 år i et opfølgende spørgeskema, hvor undersøgelsesdeltagerne blev spurgt om at angive varighed i kategorier (<1, 1-5, 6-10, 11-20, >20 år). Deltagerne blev fulgt fra de blev inkluderet i undersøgelsen indtil opståen af tyktarms- eller endetarmskræft, død, emigration fra Iowa eller slutdato for opfølgning (31. december 2010). Nitratkoncentrationer målt i vandprøver fra kommunale vandforsyninger i Iowa blev brugt til at beregne årlige gennemsnitlige nitratkoncentrationer for hver offentlig vandforsyning i den historiske eksponeringsperiode 1955-1988. Nitratkoncentrationerne for undersøgelsesdeltageres offentlige vandforsyning koblet med deres rapporterede varighed af eksponering fra deres vandforsyning blev brugt til at beregne det gennemsnitlige eksponeringsniveau for hver af deltagerne. Eksponeringen er derfor et mål for den kumulerede eksponering over en længere periode inden inklusion i undersøgelsen. Udfaldene i undersøgelsen var udvikling af tyktarms- og endetarmskræft. Nye tilfælde af tyktarms- og endetarmskræft blev identificeret via State Health Registry of Iowa. Information om potentielle konfoundere (demografiske faktorer og livsstilsfaktorer) blev indhentet via spørgeskemaer ved inklusion i undersøgelsen. Information om eksponering for trihalomethaner i drikkevand var også tilgængelig.

Hazard ratioer med tilhørende 95% konfidensintervaller blev anvendt til at beskrive sammenhængen mellem eksponering for nitrat i drikkevand og risikoen for tyktarms- og endetarmskræft hver for sig. Cox proportional hazards model blev anvendt til at beregne hazard ratioer. I analyserne blev der kontrolleret for konfounding. Forskerne undersøgte også om faktorer (herunder kost), der kan påvirke dannelse af endogene N-nitrosforbindelser, indvirkede på effekten af nitratniveauet i drikkevand.

I alt 15.532 kvinder indgik i undersøgelsen. I løbet af 23 års opfølgning blev 612 kvinder diagnosticeret med tyktarmskræft og 155 med endetarmskræft. Der var ingen sammenhæng mellem eksponering for nitrat i drikkevand og risikoen for tyktarms- eller endetarmskræft og ingen evidens for interaktion med faktorer, der kan påvirke dannelse af endogene N-nitrosforbindelser. Det fremgår af diskussionsafsnittet, at det mediane eksponeringsniveau i studiepopulationen var 4,74 mg nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) per liter vand (omregnet fra  $\text{NO}_3^-$ -N ved multiplikation med 4,43).

Samlet set vurderer DTU Fødevareinstituttet, at pålideligheden af undersøgelsen af Jones *et al.* (2019) er *midde*. Resultaterne fra undersøgelsen indikerer ikke en sammenhæng mellem eksponering for nitrat i drikkevand og udvikling af kolorektalkræft. En svaghed ved undersøgelsen og andre epidemiologiske observationsundersøgelser er, at oplysninger om eksponering ofte er selvrapporterede. I aktuelle undersøgelser var det beregnede gennemsnitlige eksponeringsniveau delvist baseret på undersøgelsesdeltageres rapporterede varighed af eksponering fra deres vandforsyning. Desuden var oplysninger om mængden af forbrug af drikkevand i og uden for hjemmet

ikke indsamlet. Denne ikke-differentieret misklassifikation medfører sandsynligvis bias mod nulhypotesens værdi. Konfounding blev forebygget via design (køn, da kun kvinder) og kontrol for potentielle konfoundere i regressionsanalyserne, men residualkonfounding kan ikke udelukkes.

Vurdering af pålideligheden af kohorteundersøgelsen af Jones *et al.* (2019).

Kvalitetsparameter	Høj kvalitet	Middel kvalitet	Lav kvalitet
Undersøgelsens design og udførelse	X		
Population	X		
Eksponeringsvurdering			X
Udfaldsvurdering	X		
Kontrol for konfounding		X	
Statistisk analyse	X		
Rapportering	X		

Resultaterne fra de to kohorteundersøgelser (Jones *et al.*, 2019; Schullehner *et al.*, 2018) og DTU Fødevareinstituttets vurdering af pålidelighed af undersøgelserne fremgår af **tabel 7**.

**Tabel 7** Resultater fra kohorteundersøgelser af sammenhængen mellem eksponering for nitrat i drikkevand og udvikling af kolorektalkræft.

	Total kolorektal	Tyktarm	Endetarm	Vurdering af pålidelighed
Schullehner 2018	Positiv	Positiv	Positiv	Høj
Jones 2019 <sup>a</sup>	Ikke rapporteret	Ingen	Ingen	Middel

<sup>a</sup> Resultaterne var de samme i analyser, hvor eksponering for nitrat i drikkevand indgik som kontinuert variabel.

#### *Case-kontrolundersøgelser af sammenhængen mellem eksponering for nitrat i drikkevand og udvikling af kolorektalkræft*

I to (Espejo-Herrera *et al.*, 2016a; Villanueva *et al.*, 2021) af de fem (De Roos *et al.*, 2003; Espejo-Herrera *et al.*, 2016a; Fathmawati *et al.*, 2017; McElroy *et al.*, 2008; Villanueva *et al.*, 2021) case-kontrolundersøgelser indgår de samme cases og kontroller. DTU Fødevareinstituttet har valgt at vurdere undersøgelsen af Espejo-Herrera *et al.* (2016a), da cases og kontroller i Villanueva *et al.* (2021) udgør en delmængde af cases og kontroller i Espejo-Herrera *et al.* (2016a) bestående af ikke-rygere. Karakteristik af case-kontrolundersøgelserne og deres resultater fremgår af Appendiks II.

Undersøgelsen af De Roos *et al.* (2003) er en case-kontrolundersøgelse af sammenhængen mellem eksponering for nitrat i drikkevand og udvikling af tyktarms- og endetarmskræft. Cases var indbyggere i Iowa, USA i alderen 40 til 85 år, som for nylig var blevet diagnosticeret med tyktarmskræft i 1987 eller endetarmskræft i 1986 eller 1987 (nyopståede (incidente) tilfælde)). Cases blev identificeret fra Iowa Cancer Registry. Kontrollerne blev rekrutteret fra 1986 til og med 1990, identificeret via kørekortsregister (<65 år) eller via Health Care Financing Administration (føderal sundhedsforsikring) (≥65 år) og (frequency-)matchet til cases på alder (5-års aldersgrupper) og køn. Data om årlige gennemsnitlige nitratkoncentrationer i offentlige vandforsyninger i byer i Iowa byer blev skaffet fra 1960 og fremefter. De årlige gennemsnitlige nitratkoncentrationer blev koblet med undersøgelsesdeltagernes selvrapporterede bopælshistorie. Deltagere der rapporterede at bruge flaskevand som deres primære kilde til drikkevand, blev tildelt en lav værdi for nitrat (2,22 mg nitrat (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) per liter vand, omregnet fra NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N). Hver persons gennemsnitlige eksponeringsniveau blev beregnet som de årlige gennemsnitlige nitratkoncentrationer fra 1960 indtil tyktarms- eller endetarmskræft diagnose for cases (1986 eller 1987) eller indtil 1987 for kontroller. Eksponeringen er derfor et mål for den kumulerede eksponering over en længere periode forud for udvælgelsen af undersøgelsesdeltagerne. Information om potentielle konfoundere (demografiske faktorer, uddannelse og livsstilsfaktorer) blev indhentet via spørgeskemaer. Information om eksponering for kloreret overfladevand var også tilgængelig.

Odds ratioer med tilhørende 95% konfidensintervaller blev anvendt til at beskrive sammenhængen mellem eksponering for nitrat i drikkevand og odds for tyktarms- og endetarmskræft hver for sig. Logistisk regression blev anvendt til at beregne odds ratioer. I analyserne blev der kontrolleret for konfounding. Forskerne undersøgte også om faktorer (herunder kost), der kan påvirke dannelse af endogene N-nitrosforbindelser, indvirkede på effekten af nitratniveauet i drikkevand. Resultaternes robusthed blev undersøgt i følsomhedsanalyser, hvor deltagere der havde brugt private brønde i >20 år i løbet af deres levetid blev ekskluderet, da information om nitratkoncentrationer i private brønde ikke var tilgængelig.

Analyserne inkluderede 376 cases med tyktarmskræft, 338 cases med endetarmskræft og 1.244 kontroller. Gennemsnitlige eksponeringsniveauer var generelt lave. Næsten halvdelen af kontrollerne havde gennemsnitlige eksponeringsniveauer lavere end 4,43 mg nitrat (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) per liter vand. Der var ingen sammenhæng mellem eksponering for nitrat i drikkevand og odds for tyktarms- eller endetarmskræft i hovedanalyserne. Men ved eksponering for >22,15 mg nitrat per liter vand i >10 år og indtag af askorbinsyre <131,8 mg/dag sammenlignet med eksponering for >22,15 mg nitrat per liter vand i 0 år og indtag af askorbinsyre >131,8 mg/dag var der en tendens til højere odds for tyktarmskræft (0,05<p<0,10). Ved eksponering for >22,15 mg nitrat per liter vand i >10 år og indtag af

kød >1,5 portioner/dag sammenlignet med eksponering for >22,15 mg nitrat per liter vand i 0 år og indtag af kød <1,5 portioner/dag var der højere odds for tyktarmskræft ( $p < 0,05$ ). Der var ingen evidens for interaktion i analyserne, hvor endetarmskræft var udfaldet. Følsomhedsanalyserne hvor deltagere der havde brugt private brønde i >20 år i løbet af deres levetid blev ekskluderet, viste det samme som hovedanalyserne.

Samlet set vurderer DTU Fødevareinstituttet, at pålideligheden af undersøgelsen af De Roos *et al.* (2003) er *middel*. Resultaterne fra hovedanalyserne indikerer ikke en sammenhæng mellem eksponering for nitrat i drikkevand og udvikling af kolorektalkræft. Men eksponering for højt nitratniveau i >10 år og højt indtag af kød sammenlignet med eksponering for højt nitratniveau i 0 år og lavt indtag af kød var associeret med højere odds for udvikling af tyktarmskræft. En svaghed ved undersøgelsen er, at oplysninger om eksponeringsniveau delvist var selvrapporterede. Der er risiko for, at det påvirker erindringerne eller rapporteringen forskelligt, om man er syg eller ikke syg, hvilket kan lede til bias. I aktuelle undersøgelser var det beregnede gennemsnitlige eksponeringsniveau delvist baseret på deltagernes egne oplysninger om bopælshistorie, men der er dog ingen grund til at tro, at den bagudrettede information om bopælshistorie er påvirket af om en deltager var syg eller ikke syg. Derimod er ikke-differentieret misklassifikation af eksponeringen en svaghed ved undersøgelsen. Den selvrapporterede bopælshistorie og manglende information om nitratkoncentrationer i private brønde og mængden af forbrug af drikkevand i og uden for hjemmet i den historiske eksponeringsperiode giver problemer med informationskvaliteten. Denne misklassifikation medfører sandsynligvis bias mod nulhypotesens værdi. Konfounding blev forebygget via design (kontrollerne var matchet til cases på alder og køn) og kontrol for potentielle konfoundere i regressionsanalyserne, men residualkonfounding kan ikke udelukkes.

Vurdering af pålideligheden af case-kontrolundersøgelsen af De Roos *et al.* (2003).

Kvalitetsparameter	Høj kvalitet	Middel kvalitet	Lav kvalitet
Undersøgelsens design og udførelse		X	
Population	X		
Eksponeringsvurdering			X
Udfaldsvurdering	X		
Kontrol for konfounding	X		
Statistisk analyse	X		
Rapportering	X		



Undersøgelsen af McElroy *et al.* (2008) er en case-kontrolundersøgelse af sammenhængen mellem eksponering for nitrat i drikkevand og udvikling af total kolorektalkræft og tyktarms- og endetarmskræft hver for sig blandt kvinder i landdistriktsområder i Wisconsin, USA. Cases var kvindelige indbyggere i alderen 20 til 74 år, som for nylig var blevet diagnosticeret med tyktarmskræft (proksimale/distale del) eller endetarmskræft i perioden 1990-1992 eller 1999-2001. Kontrollerne blev identificeret via befolkningslister over bilejere i Wisconsin (kvinder <65 år) eller via Medicare (føderal sundhedsforsikring) (kvinder ≥65 år) og havde ikke nogen historie med kolorektalkræft. Eksponering for nitrat blev interpoleret til undersøgelsesdeltagernes husstande baseret på nitratmålinger foretaget i 1994 i brønde beliggende i landdistrikterne i Wisconsin. Information om potentielle konfoundere (risikofaktorer for kolorektalkræft) blev indhentet via interviews.

Odds ratioer med tilhørende 95% konfidensintervaller blev anvendt til at beskrive sammenhængen mellem eksponering for nitrat i drikkevand og odds for total kolorektalkræft og tyktarmskræft (proksimale/distale del) og endetarmskræft hver for sig. Logistisk regression blev anvendt til at beregne odds ratioer. I analyserne blev der kontrolleret for alder, interviewperiode, familiehistorie med kolorektalkræft, kolorektalscreening og rygestatus. Resultaternes robusthed blev undersøgt i følsomhedsanalyser, hvor der blev anvendt en anden interpolationsteknik.

Analyserne inkluderede 475 cases med kolorektalkræft, 151 cases med tyktarmskræft i den proksimale del, 202 cases med tyktarmskræft i den distale del, 96 cases med endetarmskræft og 1.447 kontroller. Højeste kategori (≥44,3 mg nitrat (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) per liter vand, omregnet fra NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N) sammenlignet med laveste kategori (<2,22 mg nitrat per liter vand) af eksponering for nitrat i drikkevand var associeret med højere odds for kræft i den proksimale del af tyktarmen. Der var ingen sammenhæng mellem eksponering for nitrat i drikkevand og odds for total kolorektalkræft, kræft i den distale del af tyktarmen eller endetarmskræft. Følsomhedsanalyserne hvor der blev anvendt en anden interpolationsteknik, viste det samme som hovedanalyserne.

Samlet set vurderer DTU Fødevarerinstitutionen, at pålideligheden af undersøgelsen af McElroy *et al.* (2008) er *lav*. Resultaterne fra undersøgelsen indikerer, at der er en sammenhæng mellem høj eksponering for nitrat i drikkevand versus lav eksponering for nitrat i drikkevand og højere odds for udvikling af kræft i den proksimale del af tyktarmen, men ingen sammenhæng for total kolorektalkræft, kræft i den distale del af tyktarmen eller endetarmskræft. I aktuelle undersøgelser var eksponering for nitrat i drikkevand baseret på nitratmålinger foretaget i samme periode, som cases og kontroller blev udvalgt. Eksponeringen blev interpoleret til undersøgelsesdeltagernes husstande og oplysninger om mængden af forbrug af drikkevand i og uden for hjemmet var ikke tilgængelig. Denne ikke-differentieret misklassifikation medfører sandsynligvis bias mod nulhypotesens værdi. Konfounding blev forebygget via design (køn, da kun kvinder) og kontrol for potentielle konfoundere i

regressionsanalyserne, men residualkonfounding kan ikke udelukkes. Det er ikke rapporteret hvordan cases blev identificeret.

Vurdering af pålideligheden af case-kontrolundersøgelsen af McElroy *et al.* (2008).

Kvalitetsparameter	Høj kvalitet	Middel kvalitet	Lav kvalitet
Undersøgelsens design og udførelse		X	
Population	X		
Eksponeringsvurdering			X
Udfaldsvurdering	X		
Kontrol for konfounding		X	
Statistisk analyse	X		
Rapportering	X		

Undersøgelsen af Espejo-Herrera *et al.* (2016a) er en case-kontrolundersøgelse af sammenhængen mellem eksponering for nitrat i drikkevand og udvikling af total kolorektalkræft og tyktarms- og endetarmskræft hver for sig. Cases var patienter indlagt på hospitaler i 11 provinser (ni fra Spanien og to fra Italien) i alderen 20 til 85 år, som for nylig var blevet diagnosticeret med tyktarms- eller endetarmskræft i perioden 2008-2013. Cases blev identificeret via aktiv søgning herunder periodiske besøg på hospitalsafdelingerne (onkologi, gastroenterologi, generel kirurgi, strålebehandling og patologi). Kontrollerne var hospitalsbaserede (Italien) eller befolkningsbaserede (Spanien) og (frequency-)matchet til cases på alder, køn og bopælsområde. De hospitalsbaserede kontroller var patienter indlagt på de samme hospitaler som cases for akutte, ikke-kroniske sygdomme, som ikke var relateret til kendte risikofaktorer for kolorektalkræft. Nitratkoncentrationer målt i vandprøver fra kommunalt og ikke-kommunalt drikkevand blev brugt til at beregne årlige gennemsnitlige nitratkoncentrationer. Det gennemsnitlige indtag af nitrat fra drikkevand i perioden 30 til 2 år forud for udvælgelsen af cases og kontroller blev estimeret ved hjælp af personlige oplysninger om bopælshistorie, type vand forbrugt (hane, flaske, brønd) og mængden. Eksponeringen er derfor et mål for det kumulerede indtag over en længere periode forud for udvælgelsen af undersøgelsesdeltagerne. Oplysninger om bopælshistorie, type vand forbrugt og mængden og information om potentielle konfoundere (demografiske faktorer, uddannelse og livsstilsfaktorer) blev indhentet via interviews og spørgeskemaer. Information om eksponering for trihalomethaner i drikkevand var også tilgængelig.

Odds ratioer med tilhørende 95% konfidensintervaller blev anvendt til at beskrive sammenhængen mellem indtag af nitrat fra drikkevand og odds for total kolorektalkræft og tyktarms- og endetarmskræft hver for sig. Logistisk regression blev anvendt til at beregne odds ratioer. I analyserne blev der kontrolleret for konfounding. Forskerne undersøgte også om faktorer (herunder kost), der kan påvirke dannelse af endogene N-nitrosforbindelser, indvirkede på effekten af indtaget af nitrat fra drikkevand. Resultaternes robusthed blev undersøgt i følsomhedsanalyser, hvor indtag af nitrat fra drikkevand i en alternativ eksponeringsperiode (fra alder 18 år til 30 år) blev anvendt som eksponering i analyserne.

Analyserne inkluderede 1.869 cases med kolorektalkræft, 1.285 cases med tyktarmskræft, 557 cases med endetarmskræft og 3.530 kontroller, heraf og 11% hospitalsbaserede (Italien) og 89% populationsbaserede (Spanien). Indtag af nitrat fra drikkevand (gennemsnit  $\pm$  spredning (engelsk standard deviation)) varierede fra  $3,4 \pm 3,3$  mg nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) per dag i den provins, hvor undersøgelsesdeltagerne indtog den laveste mængde i gennemsnit til  $19,7 \pm 22,6$  mg nitrat per dag i den provins, hvor undersøgelsesdeltagerne indtog den højeste mængde i gennemsnit. Hovedanalyserne af indtag af nitrat fra drikkevand og odds for total kolorektalkræft blandt alle undersøgelsesdeltagere indikerede effektmodifikation fra køn ( $P=0,01$ ). Punktestimaterne for kategorierne af indtag af nitrat fra drikkevand ( $\leq 5$ ,  $>5-10$ ,  $>10$  mg per dag) antydede højere odds for total kolorektalkræft ved højere indtag af nitrat blandt både mænd og kvinder og punktestimatet for total kolorektalkræft for den højeste kategori af indtag af nitrat ( $>10$  mg per dag) var statistisk signifikant højere end punktestimatet for den laveste kategori af indtag af nitrat ( $\leq 5$  mg per dag) blandt både mænd ( $P<0,05$ ) og kvinder ( $P<0,05$ ). Mønsteret var det samme for tyktarmskræft alene. Punktestimaterne for kategorierne af indtag af nitrat fra drikkevand ( $\leq 5$ ,  $>5-10$ ,  $>10$  mg per dag) antydede ikke højere odds for endetarmskræft alene ved højere indtag af nitrat, men punktestimatet for odds for endetarmskræft for den højeste kategori af indtag af nitrat ( $>10$  mg per dag) var statistisk signifikant højere end punktestimatet for odds for endetarmskræft for den laveste kategori af indtag af nitrat ( $\leq 5$  mg per dag) blandt mænd ( $P<0,05$ ). Ved indtag af nitrat fra drikkevand  $>4,4$  mg/dag og indtag af rødt kød  $>29$  g/dag sammenlignet med indtag af nitrat fra drikkevand  $\leq 4,4$  mg/dag og indtag af rødt kød  $\leq 29$  g/dag var der højere odds for total kolorektalkræft blandt mænd ( $p<0,05$  vurderet ud fra konfidensintervallet), men ikke blandt kvinder. Følsomhedsanalyserne indikerede, at de fundne sammenhænge var robuste.

Samlet set vurderer DTU Fødevarerinstitutionen, at pålideligheden af undersøgelsen af Espejo-Herrera *et al.* (2016a) er høj. Resultaterne fra undersøgelsen antyder, at der er en sammenhæng mellem højere indtag af nitrat fra drikkevand og højere odds for udvikling af kolorektalkræft blandt både mænd og kvinder. Desuden indikerer resultaterne at højt indtag af rødt kød kan indvirke på effekten af indtag af nitrat fra drikkevand. En svaghed ved undersøgelsen er, at oplysninger om eksponeringsniveau delvist var selvrapporterede. Der er risiko for, at det påvirker erindringen eller rapporteringen forskelligt, om

man er syg eller ikke syg, hvilket kan lede til bias. I aktuelle undersøgelser var det beregnede gennemsnitlige eksponeringsniveau delvist baseret på deltagernes egne oplysninger om bopælshistorie, type vand forbrugt (hane, flaske, brønd) og mængden. Konfounding blev forebygget via design (kontrollerne var matchet til cases på alder, køn og bopælsområde) og kontrol for potentielle konfoundere i regressionsanalyserne, men residualkonfounding kan ikke udelukkes.

Vurdering af pålideligheden af case-kontrolundersøgelsen af Espejo-Herrera *et al.* (2016).

Kvalitetsparameter	Høj kvalitet	Middel kvalitet	Lav kvalitet
Undersøgelsens design og udførelse		X	
Population	X		
Eksponeringsvurdering		X	
Udfaldsvurdering	X		
Kontrol for konfounding	X		
Statistisk analyse	X		
Rapportering	X		

Undersøgelsen af Fathmawati *et al.* (2017) er en case-kontrolundersøgelse af sammenhængen mellem eksponering for nitrat i drikkevand og udvikling af kolorektalkræft. Cases og kontroller var patienter indlagt på et hospital i Yogyakarta, Indonesien i perioden 2014-2016. Cases var patienter, som var blevet diagnosticeret med kolorektalkræft. Kontrollerne var patienter på samme hospital som cases, hvor diagnosticering ved undersøgelse af tyktarmsbiopsier havde vist ikke-neoplastiske polypper. Undersøgelsesdeltagerne blev identificeret via medicinske optegnelser. Inklusionskriterier var indbygger i byen Yogyakarta eller to nabodistrikter i minimum 3 år og alder  $\geq 18$  år. Nitratkoncentrationer målt i vandprøver fra undersøgelsesdeltagernes brønde i 2016 blev brugt til at estimere eksponering for nitrat. Information om potentielle konfoundere (demografiske faktorer, uddannelse og livsstilsfaktorer) blev indhentet via spørgeskemaer.

Odds ratioer med tilhørende 95% konfidensintervaller blev anvendt til at beskrive sammenhængen mellem eksponering for nitrat i drikkevand og odds for total kolorektalkræft. Logistisk regression blev anvendt til at beregne odds ratioer. I analyserne blev der kontrolleret for konfounding. Resultaternes robusthed blev undersøgt i følsomhedsanalyser, hvor analyserne blev stratificeret efter selvrapporterede oplysninger om varighed af eksponering fra deres vandforsyning ( $\leq 10$  år,  $> 10$  år).

Analyserne inkluderede 75 cases med kolorektalkræft og 75 kontroller. Eksponering for nitrat i drikkevand (gennemsnit  $\pm$  spredning) var fra  $30,51 \pm 27,91$  mg nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) per liter vand blandt cases og  $20,26 \pm 15,05$  mg nitrat per liter vand blandt kontrollerne. Eksponering for nitrat  $>50$  mg per liter vand sammenlignet med eksponering for nitrat  $\leq 50$  mg per liter vand var associeret med højere odds for kolorektalkræft. Følsomhedsanalyserne hvor analyserne blev stratificeret efter selvrapporterede oplysninger om varighed af eksponering fra deres vandforsyning, indikerede en positiv sammenhæng i høj-lav-analyserne blandt undersøgelsesdeltagere, der rapporterede  $>10$  års eksponering og ingen sammenhæng blandt undersøgelsesdeltagere, der rapporterede  $<10$  år eksponering.

Samlet set vurderer DTU Fødevarerinstitutionen, at pålideligheden af undersøgelsen af Fathmawati *et al.* (2017) er *lav*. Resultaterne fra undersøgelsen indikerer, at der er en sammenhæng mellem høj eksponering for nitrat i drikkevand versus lav eksponering for nitrat i drikkevand og højere odds for udvikling af kolorektalkræft. Brug af hospitalskontroller kan medføre selektionsbias i undersøgelsen. I undersøgelsen af Fathmawati *et al.* (2017) var kontrolgruppen endda en anden patientkategori med symptomer fra tyktarmen. Selektionsbias i designfasen kan derfor ikke udelukkes. Desuden er ikke-differentieret misklassifikation af eksponeringen en svaghed ved undersøgelsen.

Undersøgelsesdeltagernes eksponering for nitrat i drikkevand var baseret på nitratmålinger i samme periode, som cases og kontroller blev udvalgt og oplysninger om mængden af forbrug af drikkevand i og uden for hjemmet var ikke tilgængelig. Denne misklassifikation medfører sandsynligvis bias mod nulhypotesens værdi. Der blev kontrolleret for potentielle konfoundere i regressionsanalyserne, men residualkonfounding kan ikke udelukkes.

Vurdering af pålideligheden af case-kontrolundersøgelsen af Fathmawati *et al.* (2017).

Kvalitetsparameter	Høj kvalitet	Middel kvalitet	Lav kvalitet
Undersøgelsens design og udførelse			X
Population	X		
Eksponeringsvurdering			X
Udfaldsvurdering	X		
Kontrol for konfounding	X		
Statistisk analyse	X		
Rapportering	X		

Resultaterne fra de fire case-kontrolundersøgelser (De Roos *et al.*, 2003; Espejo-Herrera *et al.*, 2016a; Fathmawati *et al.*, 2017; McElroy *et al.*, 2008) og DTU Fødevareinstituttets vurdering af pålidelighed af undersøgelserne fremgår af **tabel 8**.

**Tabel 8** Resultater fra case-kontrolundersøgelser af sammenhængen mellem eksponering for nitrat i drikkevand og udvikling af kolorektalkræft.

	Total kolorektal	Tyktarm	Endetarm	Vurdering af pålidelighed
De Roos 2003	Ikke rapporteret	Ingen	Ingen	Middel
McElroy 2008	Ingen	Positiv <sup>a</sup> /Ingen <sup>b</sup>	Ingen	Lav
Espejo-Herrera 2016, M	Positiv	Positiv	Positiv	Høj
Espejo-Herrera 2016, F	Positiv	Positiv	Ingen	Høj
Fathmawati 2017	Positiv	Ikke rapporteret	Ikke rapporteret	Lav

M, male; F, female.

<sup>a</sup> I analysen, hvor den proksimale del af tyktarmen var udfaldet.

<sup>b</sup> I analysen, hvor den distale del af tyktarmen var udfaldet.

### Samlet vurdering af befolkningsundersøgelsesernes relevans

I forlængelse af vurderingen af pålideligheden af hver af befolkningsundersøgelserne har DTU Fødevareinstituttet foretaget en samlet vurdering af befolkningsundersøgelsesernes relevans, der med udgangspunkt i modificerede Bradford Hill-retningslinjer vurderer den samlede evidens for en årsagssammenhæng (sammenhængens styrke og signifikans, sammenhængens konsistens, specificitet, temporalitet (tidsrelation), biologisk gradient ("dosis-respons"), biologisk plausibilitet, logisk sammenhæng, eksperimentel evidens, rækkefølge af nøglebegivenheder og analogi).

#### *Sammenhængens styrke og signifikans*

DTU Fødevareinstituttet har vurderet pålideligheden af seks befolkningsundersøgelser af sammenhængen mellem eksponering for nitrat i drikkevand og udvikling af kolorektalkræft (De Roos *et al.*, 2003; Espejo-Herrera *et al.*, 2016a; Fathmawati *et al.*, 2017; Jones *et al.*, 2019; McElroy *et al.*, 2008; Schullehner *et al.*, 2018). To af de seks undersøgelser er kohorteundersøgelser (Jones *et al.*, 2019; Schullehner *et al.*, 2018) og fire er case-kontrolundersøgelser (De Roos *et al.*, 2003; Espejo-Herrera *et al.*, 2016a; Fathmawati *et al.*, 2017; McElroy *et al.*, 2008). Resultaterne fra de seks undersøgelser og DTU Fødevareinstituttets vurdering af pålidelighed af undersøgelserne fremgår af **tabel 9**.

**Table 9** Resultater fra kohorteundersøgelser og case-kontrolundersøgelser af sammenhængen mellem eksponering for nitrat i drikkevand og udvikling af kolorektalkræft.

	Studiedesign	Total kolorektal	Tyktarm	Endetarm	Vurdering af pålidelighed
		Høj-lav	Høj-lav	Høj-lav	
Schullehner 2018	Kohorte	Positiv	Positiv	Positiv	Høj
Jones 2019 <sup>a</sup>	Kohorte	Ikke rapporteret	Ingen	Ingen	Middel
De Roos 2003	Case-kontrol	Ikke rapporteret	Ingen	Ingen	Middel
McElroy 2008	Case-kontrol	Ingen	Positiv <sup>b</sup> /Ingen <sup>c</sup>	Ingen	Lav
Espejo-Herrera 2016, M	Case-kontrol	Positiv	Positiv	Positiv	Høj
Espejo-Herrera 2016, K	Case-kontrol	Positiv	Positiv	Ingen	Høj
Fathmawati 2017	Case-kontrol	Positiv	Ikke rapporteret	Ikke rapporteret	Lav

M, mand; K, kvinde.

<sup>a</sup> Resultaterne var de samme i analyser, hvor eksponering for nitrat i drikkevand indgik som kontinuert variabel.

<sup>b</sup> I analysen, hvor den proksimale del af tyktarmen var udfaldet.

<sup>c</sup> I analysen, hvor den distale del af tyktarmen var udfaldet.

I de to undersøgelser, hvor pålideligheden er vurderet til at være høj (Espejo-Herrera *et al.*, 2016a; Schullehner *et al.*, 2018), er der en sammenhæng mellem høj versus lav eksponering for nitrat i drikkevand og højere risiko for total kolorektalkræft og tyktarms- og endetarmskræft hver for sig.

I kohorteundersøgelsen af Schullehner *et al.* (2018) var højeste kategori ( $\geq 16,75$  mg nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) per liter vand) sammenlignet med laveste kategori ( $< 0,69$  mg nitrat per liter vand) af eksponering for nitrat i drikkevand associeret med en højere risiko for total kolorektalkræft (hazard ratio 1,14; 95% konfidensinterval 1,06-1,23) og tyktarms- og endetarmskræft hver for sig (hazard ratio 1,14; 95% konfidensinterval 1,04-1,26 for tyktarmskræft alene og hazard ratio 1,13; 95% konfidensinterval 1,00-1,27 for endetarmskræft alene). For total kolorektalkræft og endetarmskræft alene var der en forhøjet risiko ved eksponeringsniveauer på 3,87-9,25 mg nitrat per liter vand sammenlignet med eksponeringsniveauer  $< 1,27$  mg nitrat per liter vand og punktestimatet for risikoen for total kolorektalkræft antydede en yderligere forhøjet risiko ved eksponeringsniveauer  $\geq 9,25$  mg nitrat per liter vand sammenlignet med eksponeringsniveauer  $< 1,27$  mg nitrat per liter vand. For tyktarmskræft alene var der en forhøjet risiko ved eksponeringsniveauer på  $\geq 9,25$  mg nitrat per liter vand og punktestimatet for risikoen for tyktarmskræft alene antydede en forhøjet risiko ved eksponeringsniveauer på 3,87-9,25 mg nitrat per liter vand. Køn modificerede ikke effekten af eksponering for nitrat i drikkevand på risikoen for kolorektalkræft. En associations styrke afspejler blandt andet hyppigheden af andre medvirkende årsager til sygdommen. Dette taler for at fokusere på differensmål, der udtrykker sundhedsgevinsten i form af undgåede sygdomstilfælde, frem for ratiomål,

når man skal vurdere konsekvenserne af en eksponering. Schullehner *et al.* (2018) rapporterede ikke differensmål.

I case-kontrolundersøgelsen af Espejo-Herrera *et al.* (2016a) indikerede hovedanalyserne af indtag af nitrat fra drikkevand og odds for total kolorektalkræft blandt alle undersøgelsesdeltagere effektmodifikation fra køn ( $P=0,01$ ). Punktestimaterne for kategorierne af indtag af nitrat fra drikkevand ( $\leq 5$ ,  $>5-10$ ,  $>10$  mg per dag) antydede højere odds for total kolorektalkræft ved højere indtag af nitrat blandt både mænd og kvinder og punktestimatet for total kolorektalkræft for den højeste kategori af indtag af nitrat ( $>10$  mg per dag) var statistisk signifikant højere end punktestimatet for den laveste kategori af indtag af nitrat ( $\leq 5$  mg per dag) blandt både mænd (odds ratio 1,50; 95% konfidensinterval 1,21-1,87) og kvinder (odds ratio 1,41; 95% konfidensinterval 1,04-1,91). Mønsteret var det samme for tyktarmskræft alene (odds ratio 1,51; 95% konfidensinterval 1,17-1,94 blandt mænd og odds ratio 1,46; 95% konfidensinterval 1,04-2,05 blandt kvinder). Punktestimaterne for kategorierne af indtag af nitrat fra drikkevand ( $\leq 5$ ,  $>5-10$ ,  $>10$  mg per dag) antydede ikke højere odds for endetarmskræft alene ved højere indtag af nitrat, men punktestimatet for odds for endetarmskræft for den højeste kategori af indtag af nitrat ( $>10$  mg per dag) var statistisk signifikant højere end punktestimatet for odds for endetarmskræft for den laveste kategori af indtag af nitrat ( $\leq 5$  mg per dag) blandt mænd (odds ratio 1,55; 95% konfidensinterval 1,16-2,08).

Det pooled risikoestimat fra Chambers *et al.* (2022) høj-lav-metaanalyse baseret på kohorteundersøgelsen af Schullehner *et al.* (2018) og case-kontrolundersøgelserne af Espejo-Herrera *et al.* (2016a); Fathmawati *et al.* (2017); McElroy *et al.* (2008) af eksponering for nitrat i drikkevand og udvikling af total kolorektalkræft indikerede en positiv sammenhæng (1,39; 95% konfidensinterval 1,09-1,78,  $I^2$  75%,  $P_{\text{heterogenitet}} = 0,008$ ). Det pooled risikoestimat baseret på kohorteundersøgelserne af Jones *et al.* (2019); Schullehner *et al.* (2018) og case-kontrolundersøgelserne af De Roos *et al.* (2003); Espejo-Herrera *et al.* (2016a); McElroy *et al.* (2008) af eksponering for nitrat i drikkevand og udvikling af tyktarms- og endetarmskræft hver for sig indikerede henholdsvis en positiv sammenhæng (1,27; 95% konfidensinterval 1,03-1,57,  $I^2$  73%,  $P_{\text{heterogenitet}} = 0,005$ ) og ingen sammenhæng (1,16; 95% konfidensinterval 0,90-1,49,  $I^2$  63%,  $P_{\text{heterogenitet}} = 0,03$ ). Der var tegn på forskellige effekter i de medtagne undersøgelser i alle tre metaanalyser. Chambers *et al.* (2022) udførte ikke undergruppeanalyser med henblik på at undersøge om der var tegn på forskellige effekter i undergrupper, der kunne forklare den observerede heterogenitet i metaanalyserne.



## Sammenhængens konsistens

Sammenhængenes konsistens fremgår af tabel 9. Tre (Espejo-Herrera *et al.*, 2016a; Fathmawati *et al.*, 2017; Schullehner *et al.*, 2018) ud af de fire (Espejo-Herrera *et al.*, 2016a; Fathmawati *et al.*, 2017; McElroy *et al.*, 2008; Schullehner *et al.*, 2018) befolkningsundersøgelser, der har undersøgt sammenhængen mellem eksponering for nitrat i drikkevand og udviklingen af total kolorektalkræft indikerer en positiv sammenhæng. Tre (Espejo-Herrera *et al.*, 2016a; McElroy *et al.*, 2008; Schullehner *et al.*, 2018) ud af de fem (De Roos *et al.*, 2003; Espejo-Herrera *et al.*, 2016a; Jones *et al.*, 2019; McElroy *et al.*, 2008; Schullehner *et al.*, 2018) befolkningsundersøgelser, der har undersøgt sammenhængen mellem eksponering for nitrat i drikkevand og udviklingen af tyktarmskræft alene indikerer en positiv sammenhæng og to (Espejo-Herrera *et al.*, 2016a; Schullehner *et al.*, 2018) ud af de fem (De Roos *et al.*, 2003; Espejo-Herrera *et al.*, 2016a; Jones *et al.*, 2019; McElroy *et al.*, 2008; Schullehner *et al.*, 2018) befolkningsundersøgelser, der har undersøgt sammenhængen mellem eksponering for nitrat i drikkevand og udviklingen af endetarmskræft alene indikerer en positiv sammenhæng.

I alle seks befolkningsundersøgelser (De Roos *et al.*, 2003; Espejo-Herrera *et al.*, 2016a; Fathmawati *et al.*, 2017; Jones *et al.*, 2019; McElroy *et al.*, 2008; Schullehner *et al.*, 2018) forebyggede forfatterne konfounding via design og/eller via kontrol for potentielle konfoundere i regressionsanalyserne, herunder sociodemografiske faktorer, men residualkonfounding kan ikke udelukkes.

Som beskrevet i afsnittet ”Dyreforsøg, mekanistiske studier og vurderinger fra EFSA, JECFA og IARC” så indikerer de udførte dyreforsøg samstemmende, at der ikke er en sammenhæng mellem indtag af nitrat *per se* og udvikling af kræft. Sammenhængen mellem indtag af nitrit *per se* og udvikling af kræft er mere usikker, men DTU Fødevarerinstitutionen vurderer, at selv om der skulle være en evt. kræftfremkaldende effekt af nitrit *per se*, så er det en sekundær risiko i forhold til den kræftfremkaldende effekt fra en forøget endogen nitrosering (se afsnit vedr. biologisk plausibilitet nedenfor). Traditionelt udførte dyreforsøg der er designet til at undersøge om nitrat eller nitrit *per se* er kræftfremkaldende kan ikke bruges til at vurdere en risiko der stammer fra en forøget endogen nitrosering.

## Specificitet

Kolorektalkræft er ikke associeret med én specifik årsag. Kolorektalkræft har mange årsager. F.eks. rygning og højt alkoholforbrug (WCRF/AICR, 2018).

### *Temporalitet (tidsrelation)*

I kohorteundersøgelserne (Jones *et al.*, 2019; Schullehner *et al.*, 2018) var eksponeringen et mål for den kumulerede eksponering over en længere periode inden inklusion i undersøgelserne og i to (De Roos *et al.*, 2003; Espejo-Herrera *et al.*, 2016a) af de fire (De Roos *et al.*, 2003; Espejo-Herrera *et al.*, 2016a; Fathmawati *et al.*, 2017; McElroy *et al.*, 2008) case-kontrolundersøgelser var eksponeringen et mål for den kumulerede eksponering over en længere periode forud for udvælgelsen af cases og kontroller og i undersøgelserne. I undersøgelserne af McElroy *et al.* (2008) og Fathmawati *et al.* (2017) var undersøgelsesdeltagernes eksponering for nitrat i drikkevand baseret på nitratmålinger i samme periode, som cases og kontroller blev udvalgt.

Der er således tidsmæssig konsistens i fire (De Roos *et al.*, 2003; Espejo-Herrera *et al.*, 2016a; Jones *et al.*, 2019; Schullehner *et al.*, 2018) af de seks undersøgelser (De Roos *et al.*, 2003; Espejo-Herrera *et al.*, 2016a; Fathmawati *et al.*, 2017; Jones *et al.*, 2019; McElroy *et al.*, 2008; Schullehner *et al.*, 2018). I Fathmawati *et al.* (2017) blev resultaternes robusthed (positiv sammenhæng mellem eksponering for nitrat i drikkevand og udvikling af kolorektalkræft) undersøgt i følsomhedsanalyser, hvor analyserne blev stratificeret efter selvrapporterede oplysninger om varighed af eksponering fra deres vandforsyning ( $\leq 10$  år,  $> 10$  år). Følsomhedsanalyserne indikerede en positiv sammenhæng blandt undersøgelsesdeltagere, der rapporterede  $> 10$  års eksponering og ingen sammenhæng blandt undersøgelsesdeltagere, der rapporterede  $< 10$  år eksponering.

### *Biologisk gradient ("dosis-respons")*

Hvis incidensen af kolorektalkræft stiger med stigende eksponering for nitrat i drikkevandet, bestyrker det en årsagssammenhæng. I kohorteundersøgelsen af Schullehner *et al.* (2018) var der en forhøjet risiko for total kolorektalkræft og endetarmskræft alene ved eksponeringsniveauer på 3,87-9,25 mg nitrat per liter vand sammenlignet med eksponeringsniveauer  $< 1,27$  mg nitrat per liter vand og punktestimatet for risikoen for total kolorektalkræft antydede en yderligere forhøjet risiko ved eksponeringsniveauer  $\geq 9,25$  mg nitrat per liter vand sammenlignet med eksponeringsniveauer  $< 1,27$  mg nitrat per liter vand, hvilket indikerer en dosis-respons-sammenhæng. For tyktarmskræft alene var der en forhøjet risiko ved eksponeringsniveauer på  $\geq 9,25$  mg nitrat per liter vand og punktestimatet for risikoen for tyktarmskræft alene antydede en forhøjet risiko ved eksponeringsniveauer på 3,87-9,25 mg nitrat per liter vand. I case-kontrolundersøgelsen af Espejo-Herrera *et al.* (2016a) antydede punktestimaterne for kategorierne af indtag af nitrat fra drikkevand ( $\leq 5$ ,  $> 5-10$ ,  $> 10$  mg per dag) højere odds for total kolorektalkræft ved højere indtag af nitrat blandt både mænd og kvinder og punktestimatet for total kolorektalkræft for den højeste kategori af indtag af nitrat ( $> 10$  mg per dag) var

statistisk signifikant højere end punkttestimatet for den laveste kategori af indtag af nitrat ( $\leq 5$  mg per dag) blandt både mænd ( $P < 0,05$ ) og kvinder ( $P < 0,05$ ). Mønsteret var det samme for tyktarmskræft alene. Punkttestimaterne for kategorierne af indtag af nitrat fra drikkevand ( $\leq 5$ ,  $> 5-10$ ,  $> 10$  mg per dag) antydede ikke højere odds for endetarmskræft alene ved højere indtag af nitrat, men punkttestimatet for odds for endetarmskræft for den højeste kategori af indtag af nitrat ( $> 10$  mg per dag) var statistisk signifikant højere end punkttestimatet for odds for endetarmskræft for den laveste kategori af indtag af nitrat ( $\leq 5$  mg per dag) blandt mænd ( $P < 0,05$ ).

### *Biologisk plausibilitet, logisk sammenhæng, eksperimentel evidens og rækkefølge af nøglebegivenheder*

Som beskrevet i afsnittet "Absorption, fordeling, metabolisme og udskillelse" så optages nitrat i fra mavetarmsystemet og transporteres via blodet rundt i kroppen. Hos menneskers udskilles nitrat aktivt i mundhulen, hvor nitrat delvist reduceres til nitrit af bakterier i mundhulen. Når spyttes synkes føres nitriten ned i mavetarmsystemet. Som beskrevet i afsnittet "Dyreforsøg, mekanistiske studier og vurderinger fra EFSA, JECFA og IARC" så underbygger dyreforsøg og mekanistiske studier, der specifikt har undersøgt den endogene nitrosering, at nitrat fra drikkevand, efter omdannelse til nitrit *in vivo*, forøger den endogene nitrosering i mavetarmsystemet og dermed potentiel forøger dannelsen af genotoksiske og kræftfremkaldende N-nitrosoforbindelser.

Nitrats påvirkning af den endogene nitrosering vurderes at være aktiv, også ved en nitrateksponering der kan komme fra drikkevand med et nitratindhold, der ligger under den nuværende grænseværdi. Visse reaktionsprodukter fra den endogene nitrosering er veldokumenterede karcinogener, men der er ikke et samlet overblik over alle de reaktionsprodukter, der kan dannes, og der er meget lidt viden om i hvilke mængder stofferne dannes i mavetarmsystemet. Så selv om mekanismen for en indirekte kræftfremkaldende effekt af nitrat fra drikkevand er velunderbygget og følger en logisk sammenhæng og samlet set vurderes som plausibel, så foreligger der ikke data fra dyreforsøg eller mekanistiske studier der muliggør en estimering af størrelsen af den kræftisiko, som indtag af nitrat (og nitrit) udgør for mennesker som følge af en forøget endogen nitrosering.

Nitratindtaget er dog ikke den eneste faktor der påvirker den endogene nitrosering. Indtag af askorbinsyre,  $\alpha$ -tocopherol og polyphenoler der ofte kommer fra den plantebaserede kost kan hæmme den endogene nitrosering, mens rødt kød og/eller forarbejdet kød er gode kilder til nitroserbare forbindelser og kan derved forøge den endogene nitrosering. Hvis man i befolkningsundersøgelser finder en interaktion mellem indtag af nitrat fra drikkevand og disse kostfaktorer, bestyrker det

evidensen for en kausal sammenhæng. To befolkningsundersøgelser har antydnet, at der kan være en sammenhæng.

Case-kontrolundersøgelsen af De Roos *et al.* (2003) indikerede ikke en sammenhæng mellem eksponering for nitrat i drikkevand og udvikling af tyktarms- eller endetarmskræft i hovedanalyserne, men eksponering for højt nitratniveau i >10 år og højt indtag af kød sammenlignet med eksponering for højt nitratniveau i 0 år og lavt indtag af kød var associeret med højere odds for tyktarmskræft. Ved eksponering for højt nitratniveau i >10 år og lavt indtag af askorbinsyre sammenlignet med eksponering for højt nitratniveau i 0 år og højt indtag af askorbinsyre var der en tendens til højere odds for tyktarmskræft ( $0,05 < p < 0,10$ ). Case-kontrolundersøgelsen af Espejo-Herrera *et al.* (2016a) antydede en sammenhæng mellem højere indtag af nitrat fra drikkevand og højere odds for udvikling af kolorektalkræft. Desuden indikerede undersøgelsen, at ved højt indtag af nitrat fra drikkevand og højt indtag af rødt kød sammenlignet med lavt indtag af nitrat fra drikkevand og lavt indtag af rødt kød var der højere odds for total kolorektalkræft blandt mænd ( $p < 0,05$  vurderet ud fra konfidensintervallet), men ikke blandt kvinder.

Det skal understreges et forøget nitratindtags effekt på den endogene nitrosering ikke er uafhængig af kilden til indtaget, hvad enten der er tale om drikkevand, grøntsager eller forarbejdede kødprodukter. Nitratindtaget fra grøntsager indgår som del af en pakke af stoffer, hvoraf flere modvirker den endogene nitrosering, mens nitrat fra forarbejdet kød vil indgå som del af en pakke af stoffer der overvejende vil forventes at fremme den endogene nitrosering. F.eks., fandt Espejo-Herrera *et al.* (2016a) at forøget nitratindtag fra kød var signifikant associeret til en forøget risiko for kolorektal kræft, mens der var en signifikant invers association mellem et forøget nitratindtag fra grøntsager og kolorektal kræft. Dette demonstrerer, at en evt. kræftfremkaldende effekt af nitrat ikke kan vurderes uafhængigt af kilden til indtaget. Herudover kan grøntsager indeholde stoffer der modvirker kræft, via mekanismer der må antages at være helt uafhængige af den endogene nitrosering. Eksempelvis er kostfibre associeret til lavere risiko for kolorektal kræft (Oh *et al.*, 2019; WCRF/AICR, 2018). Konklusionerne i denne vurdering relaterer kun til indtag af nitrat fra drikkevand.

### *Analogi*

Ikke relevant i dette tilfælde.

## Konklusion

DTU Fødevarerinstitutionen vurderer, at eksponering for nitrat i drikkevand under forhold, der kan føre til endogen nitrosering, sandsynligvis er kræftfremkaldende hos mennesker.

DTU Fødevarerinstitutionens gennemgang af undersøgelser af sammenhængen mellem eksponering for nitrat i drikkevand og udvikling af kolorektalkræft inkluderede fem systematiske oversigtsartikler inklusiv metaanalyser, to kohorteundersøgelser og fire case-kontrolundersøgelser. DTU Fødevarerinstitutionen vurderer, at kvaliteten af udførelsen af de systematiske oversigtsartikler er kritisk lav. De har hver især mere end én kritisk fejl, og man bør derfor ikke have tillid til, at de giver et nøjagtigt og udtømmende resumé af de tilgængelige befolkningsundersøgelser. DTU Fødevarerinstitutionen vurderer, at pålideligheden af to af de seks befolkningsundersøgelser er høj og at pålideligheden af de fire andre befolkningsundersøgelser er middel eller lav.

Samlet set indikerer befolkningsundersøgelserne, at høj eksponering for nitrat i drikkevand sammenlignet med lav eksponering for nitrat i drikkevand er associeret med højere risiko for at udvikle kolorektalkræft. Den ene af de to undersøgelser, hvor pålideligheden er vurderet til at være høj, indikerer en dosis-respons-sammenhæng og bestyrker dermed en årsagssammenhæng. I undersøgelsen er der en forhøjet risiko for udvikling af kolorektalkræft ved eksponeringsniveauer på 3,87-9,25 mg nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) per liter vand sammenlignet med eksponeringsniveauer  $<1,27$  mg nitrat per liter vand og antydning af en yderligere forhøjet risiko ved eksponeringsniveauer  $\geq 9,25$  mg nitrat per liter vand sammenlignet med eksponeringsniveauer  $<1,27$  mg nitrat per liter vand. Den anden undersøgelse, hvor pålideligheden også er vurderet til at være høj, indikerer en højere risiko for udvikling af kolorektalkræft ved indtag af nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) fra drikkevand  $>10$  mg nitrat per dag sammenlignet med  $<5$  mg nitrat per dag og antyder en dosis-responssammenhæng mellem indtag af nitrat fra drikkevand ( $\leq 5$ ,  $>5-10$ ,  $>10$  mg per dag) og udvikling af kolorektalkræft, hvor incidensen af kolorektalkræft stiger med stigende indtag af nitrat fra drikkevandet. Konfounding blev forebygget i alle seks befolkningsundersøgelser via design og/eller via kontrol for potentielle konfoundere i regressionsanalyserne, men residualkonfounding kan ikke udelukkes.

DTU Fødevarerinstitutionen vurderer på baggrund af den samlede viden, at eksponering for nitrat i drikkevand er positivt associeret med risiko for udvikling af kolorektalkræft. Derfor vurderes det at nitrat i drikkevand udgør en sundhedsmæssig risiko. Denne vurdering er gældende ved eksponering for nitrat i drikkevand, der ligger under den nuværende grænseværdi på 50 mg nitrat per liter vand.

## Basis for at fremkomme med et sundhedsmæssigt baseret kvalitetskriterium for nitrat i drikkevand.

Der foreligger en række udfordringer i forhold til at fastsætte et sundhedsmæssigt baseret kvalitetskriterium for nitrat i drikkevand. Som det fremgår af dette appendiks, så foreligger der flere epidemiologiske undersøgelser, der peger på, at nitrat i drikkevand er associeret med en forøget risiko for kræft samt en forøget risiko for at kunne skade reproduktion og fostrets udvikling *in utero*. Kræft er dog den skadevirkning, hvor der foreligger den klart bedst underbyggede virkningsmekanisme for at nitrat fra drikkevand skulle kunne udøve en sådan skadevirkning (når der ses på risici af drikkevand med et nitratindhold under den nuværende grænseværdi). Det er dog en udfordring for vurderingen, at den kræftfremkaldende påvirkning altovervejende ikke vurderes at skyldes nitrat *per se*, eller metabolitter af nitrat, men derimod tilskrives reaktionsprodukter der dannes under den endogene nitrosering i mavetarmsystemet, en proces, der ud over nitratindtaget, er påvirkelig af flere andre faktorer. Dette kompliceres yderligere af, at den endogene nitrosering ikke blot fører til dannelsen af et mutagent stof, men en hel række af mutagene stoffer, kendte såvel som ukendte, der hver er forskellige i deres mutagene potens, som dannes i forskellige mængder endogent, og nok så afgørende, er forskellige i hvor de i kroppen inducerer kræft. At de epidemiologiske undersøgelser ud over en forøget risiko for kolorektal kræft, peger på en forøget risiko for en række forskellige kræftformer, er således fint i overensstemmelse med hypotesen. Men den indirekte mekanisme gør det langt vanskeligere utvetydigt at fastslå kausalitet, og det gør også at der ikke foreligger nogle dyreforsøg som kan danne udgangspunkt for fastsættelse af et tolerabelt dagligt indtag, eller en beregning af "margin of exposure" (MOE). De redskaber der, traditionelt bruges i forbindelse med den toksikologiske risikovurdering, er derfor ikke anvendelige i dette tilfælde.

Hvis der skal fastsættes et niveau for, hvornår indtaget af nitrat fra drikkevand kan vurderes til at udgøre en lav sundhedsmæssig risiko, er den eneste mulighed, at der tages udgangspunkt i resultaterne fra de epidemiologiske undersøgelser. Imidlertid er problemet, at for kontaminanter i fødevarer foreligger der pt. ikke generelt accepterede principper for, hvordan dette arbejde bør udføres. EFSA har i enkelte tilfælde taget udgangspunkt i epidemiologiske studier, når der skulle fastsættes et sikkert indtagsniveau af en kontaminant. Men der har været tale om en "case by case" tilgang. Den nok mest sammenlignelige "case" er EFSA's nylige risikovurdering af uorganisk arsen i fødevarer (2024). EFSA har i disse tilfælde kunne trække på specialiserede eksperter inden for alle dele af risikovurdering, ikke mindst inden for udførelsen af benchmark dose-modelleringen. DTU Fødevareinstituttet har ikke disse ressourcer. EFSA er dog klar over problemet, og anerkender behovet for systematisk at få integreret data fra epidemiologiske undersøgelser i den samlede risikovurdering. Et udkast af "*Scientific Committee guidance on appraising and integrating evidence from epidemiological studies for use in EFSA's scientific assessments*" er sendt til offentlig høring og

forventes færdiggjort i sommeren 2024<sup>1</sup>. En væsentlig anbefaling i dette udkast er at der anbefales at udarbejde: *"a guidance on human BMD modelling specifically addressed to modelling of human observational data should be developed."* DTU Fødevareinstituttet har brug for disse vejledningsdokumenter for at fastsætte en generel grænse for hvornår indtaget af nitrat fra drikkevand kan vurderes at udgøre en lav sundhedsmæssig risiko.

En reduktion af grænseværdien vil kunne mindske den sundhedsmæssige risiko, men grundet ovenstående problemstillinger vurderer DTU Fødevareinstituttet, at det er ikke muligt for nuværende at komme med et konkret sundhedsmæssigt baseret kvalitetskriterium for et indhold af nitrat i drikkevand, hvor risikoen vurderes som værende ubetydelig.

---

<sup>1</sup> EFSA Scientific Committee 115th Plenary meeting, MINUTES Agreed on 12 October 2023.

## Referencer

- Albouy-Llaty M, Limousi F, Carles C, Dupuis A, Rabouan S, Migeot V, 2016. Association between Exposure to Endocrine Disruptors in Drinking Water and Preterm Birth, Taking Neighborhood Deprivation into Account: A Historic Cohort Study. *Int J Environ Res Public Health*, 13.
- Arbuckle TE, Sherman GJ, Corey PN, Walters D, Lo B, 1988. Water Nitrates and CNS Birth Defects: A Population-based Case-Control Study. *Archives of Environmental Health*, 43, 162-167.
- Aschengrau A, Zierler S, Cohen A, 1989. Quality of community drinking water and the occurrence of spontaneous abortion. *Arch Environ Health*, 44, 283-290.
- Aschengrau A, Zierler S, Cohen A, 1993. Quality of community drinking water and the occurrence of late adverse pregnancy outcomes. *Arch Environ Health*, 48, 105-113.
- Barry KH, Jones RR, Cantor KP, Beane Freeman LE, Wheeler DC, Baris D, Johnson AT, Hosain GM, Schwenn M, Zhang H, Sinha R, Koutros S, Karagas MR, Silverman DT, Ward MH, 2020. Ingested Nitrate and Nitrite and Bladder Cancer in Northern New England. *Epidemiology*, 31, 136-144.
- Blaisdell J, Turyk ME, Almberg KS, Jones RM, Stayner LT, 2019. Prenatal exposure to nitrate in drinking water and the risk of congenital anomalies. *Environmental Research*, 176.
- Boffetta P, Trédaniel J, Greco A, 2000. Risk of childhood cancer and adult lung cancer after childhood exposure to passive smoke: A meta-analysis. *Environ Health Perspect*, 108, 73-82.
- Bondonno CP, Zhong L, Bondonno NP, Sim M, Blekkenhorst LC, Liu A, Rajendra A, Pokharel P, Erichsen DW, Neubauer O, Croft KD, Hodgson JM, 2023. Nitrate: The Dr. Jekyll and Mr. Hyde of human health? *Trends in Food Science & Technology*, 135, 57-73.
- Brender JD, Olive JM, Felkner M, Suarez L, Marckwardt W, Hendricks KA, 2004. Dietary nitrites and nitrates, nitrosatable drugs, and neural tube defects. *Epidemiology*, 15, 330-336.
- Brender JD, Weyer PJ, Romitti PA, Mohanty BP, Shinde MU, Vuong AM, Sharkey JR, Dwivedi D, Horel SA, Kantamneni J, Huber JC, Jr., Zheng Q, Werler MM, Kelley KE, Griesenbeck JS, Zhan FB, Langlois PH, Suarez L, Canfield MA, 2013. Prenatal nitrate intake from drinking water and selected birth defects in offspring of participants in the national birth defects prevention study. *Environ Health Perspect*, 121, 1083-1089.
- Brody JG, Aschengrau A, McKelvey W, Swartz CH, Kennedy T, Rudel RA, 2006. Breast cancer risk and drinking water contaminated by wastewater: a case control study. *Environ Health*, 5, 28.
- Buller ID, Patel DM, Weyer PJ, Prizment A, Jones RR, Ward MH, 2021. Ingestion of Nitrate and Nitrite and Risk of Stomach and Other Digestive System Cancers in the Iowa Women's Health Study. *Int J Environ Res Public Health*, 18.
- Cedergren MI, Selbing AJ, Löfman O, Källén BAJ, 2002. Chlorination byproducts and nitrate in drinking water and risk for congenital cardiac defects. *Environmental Research*, 89, 124-130.
- Chambers T, Hales S, Anglemeyer A, 2021. Letter to the editor: Correction "Nitrate-nitrite exposure through drinking water and diet and risk of colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis of observational studies". *Clinical Nutrition*, 40, 5443-5444.
- Chambers T, Douwes J, Mannelje At, Woodward A, Baker M, Wilson N, Hales S, 2022. Nitrate in drinking water and cancer risk: the biological mechanism, epidemiological evidence and future research. *Australian and New Zealand Journal of Public Health*, 46, 105-108.
- Chang CC, Chen CC, Wu DC, Yang CY, 2010. Nitrates in drinking water and the risk of death from rectal cancer: Does hardness in drinking water matter? *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues*, 73, 1337-1347.
- Chen W, Weisburger JH, Fiala ES, Spratt TE, Carmella SG, Chen D, Hecht SS, 1996. Gastric Carcinogenesis: 2-Chloro-4-methylthiobutanoic Acid, A Novel Mutagen in Salted, Pickled Sanma Hiraki Fish or Similarly Treated Methionine. *Chem. Res. Toxicol.*, 9, 58-66.
- Chiu HF, Tsai SS, Wu TN, Yang CY, 2010. Colon cancer and content of nitrates and magnesium in drinking water. *Magnes Res*, 23, 81-89.



- Clemmensen PJ, Brix N, Schullehner J, Ernst A, Harrits Lunddorf LL, Bjerregaard AA, Halldorsson TI, Olsen SF, Hansen B, Stayner LT, Kolstad HA, Sigsgaard T, Ramlau-Hansen CH, 2023a. Prenatal exposure to nitrosatable drugs and timing of puberty in sons and daughters: A nationwide cohort study. *Int J Hyg Environ Health*, 254, 114271.
- Clemmensen PJ, Schullehner J, Brix N, Sigsgaard T, Stayner LT, Kolstad HA, Ramlau-Hansen CH, 2023b. Prenatal Exposure to Nitrate in Drinking Water and Adverse Health Outcomes in the Offspring: a Review of Current Epidemiological Research. *Curr Environ Health Rep*, 10, 250-263.
- Coffman VR, Jensen AS, Trabjerg BB, Pedersen CB, Hansen B, Sigsgaard T, Olsen J, Schaumburg I, Schullehner J, Pedersen M, Stayner LT, 2021. Prenatal exposure to nitrate from drinking water and markers of fetal growth restriction: A population-based study of nearly one million danish-born children. *Environmental Health Perspectives*, 129.
- Coffman VR, Søndergaard Jensen A, Trabjerg BB, Pedersen CB, Hansen B, Sigsgaard T, Olsen J, Schullehner J, Pedersen M, Stayner LT, 2022. Prenatal exposure to nitrate from drinking water and the risk of preterm birth: A Danish nationwide cohort study. *Environmental Epidemiology*, 6.
- Coss A, Cantor KP, Reif JS, Lynch CF, Ward MH, 2004. Pancreatic cancer and drinking water and dietary sources of nitrate and nitrite. *Am J Epidemiol*, 159, 693-701.
- Croen LA, Todoroff K, Shaw GM, 2001. Maternal exposure to nitrate from drinking water and diet and risk for neural tube defects. *American Journal of Epidemiology*, 153, 325-331.
- Davis ME, Lisowyj MP, Zhou L, Wisecarver JL, Gulizia JM, Shostrom VK, Naud N, Corpet DE, Mirvish SS, 2012. Induction of colonic aberrant crypts in mice by feeding apparent N-nitroso compounds derived from hot dogs. *Nutr Cancer*, 64, 342-349.
- De Roos AJ, Ward MH, Lynch CF, Cantor KP, 2003. Nitrate in public water supplies and the risk of colon and rectum cancers. *Epidemiology*, 14, 640-649.
- Donat-Vargas C, Kogevinas M, Castaño-Vinyals G, Pérez-Gómez B, Llorca J, Vanaclocha-Espí M, Fernandez-Tardon G, Costas L, Aragonés N, Gómez-Acebo I, Moreno V, Pollan M, Villanueva CM, 2023. Long-Term Exposure to Nitrate and Trihalomethanes in Drinking Water and Prostate Cancer: A Multicase-Control Study in Spain (MCC-Spain). *Environ Health Perspect*, 131, 37004.
- Dorsch MM, Scragg RKR, McMichael AJ, Baghurst PA, Dyer KF, 1984. Congenital Malformations and Maternal Drinking Water Supply in Rural South Australia: A Case-Control Study. *American Journal of Epidemiology*, 119, 473-486.
- Ebdrup NH, Schullehner J, Knudsen UB, Liew Z, Thomsen AML, Lyngsø J, Bay B, Arendt LH, Clemmensen PJ, Sigsgaard T, Hansen B, Ramlau-Hansen CH, 2022. Drinking water nitrate and risk of pregnancy loss: a nationwide cohort study. *Environmental Health: a Global Access Science Source*, 21.
- EFSA (European Food Safety Authority), 2010. Statement on possible public health risks for infants and young children from the presence of nitrates in leafy vegetables. *The EFSA Journal* EFSA Journal 2010;8(12):1935, 1-42.
- EFSA (European Food Safety Authority - Scientific Committee), 2017a. Guidance on the risk assessment of substances present in food intended for infants below 16 weeks of age. *EFSA Journal* 2017;15(5):4849, 1-58.
- EFSA (EFSA ANS panel, EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food), 2017b. Re-evaluation of potassium nitrite (E 249) and sodium nitrite (E 250) as food additives. *The EFSA Journal* EFSA Journal 2017;15(6):4786, 1-157.
- EFSA (EFSA ANS panel, EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food), 2017c. Re-evaluation of sodium nitrate (E 251) and potassium nitrate (E 252) as food additives. *The EFSA Journal* EFSA Journal 2017;15(6):4787, 1-123.
- Elwood JM, Werf BV, 2022. Nitrates in drinking water and cancers of the colon and rectum: a meta-analysis of epidemiological studies. *Cancer Epidemiol*, 78, 102148.
- Erichsen DW, Pokharel P, Kyrø C, Schullehner J, Zhong L, Bondonno CP, Dalgaard F, Fjeldstad Hendriksen P, Sigsgaard T, Hodgson JM, Olsen A, Tjønneland A, Bondonno NP, 2024. Source-specific nitrate and

- nitrite intakes and associations with sociodemographic factors in the Danish Diet Cancer and Health cohort. *Front Nutr*, 11, 1326991.
- Espejo-Herrera N, Cantor KP, Malats N, Silverman DT, Tardon A, Garcia-Closas R, Serra C, Kogevinas M, Villanueva CM, 2015. Nitrate in drinking water and bladder cancer risk in Spain. *Environ Res*, 137, 299-307.
- Espejo-Herrera N, Gràcia-Lavedan E, Boldo E, Aragonés N, Pérez-Gómez B, Pollán M, Molina AJ, Fernández T, Martín V, La Vecchia C, Bosetti C, Tavani A, Polesel J, Serraino D, Gómez Acebo I, Altzibar JM, Ardanaz E, Burgui R, Pisa F, Fernández-Tardón G, Tardón A, Peiró R, Navarro C, Castaño-Vinyals G, Moreno V, Righi E, Aggazzotti G, Basagaña X, Nieuwenhuijsen M, Kogevinas M, Villanueva CM, 2016a. Colorectal cancer risk and nitrate exposure through drinking water and diet. *International Journal of Cancer*, 139, 334-346.
- Espejo-Herrera N, Gracia-Lavedan E, Pollan M, Aragonés N, Boldo E, Perez-Gomez B, Altzibar JM, Amiano P, Zabala AJ, Ardanaz E, Guevara M, Molina AJ, Barrio JP, Gomez-Acebo I, Tardon A, Peiro R, Chirlaque MD, Palau M, Munoz M, Font-Ribera L, Castano-Vinyals G, Kogevinas M, Villanueva CM, 2016b. Ingested Nitrate and Breast Cancer in the Spanish Multicase-Control Study on Cancer (MCC-Spain). *Environ Health Perspect*, 124, 1042-1049.
- Essien EE, Said Abasse K, Côté A, Mohamed KS, Baig M, Habib M, Naveed M, Yu X, Xie W, Jinfang S, Abbas M, 2022. Drinking-water nitrate and cancer risk: A systematic review and meta-analysis. *Arch Environ Occup Health*, 77, 51-67.
- Fathmawati, Fachiroh J, Gravitiani E, Sarto, Husodo AH, 2017. Nitrate in drinking water and risk of colorectal cancer in Yogyakarta, Indonesia. *J Toxicol Environ Health A*, 80, 120-128.
- Freedman DM, Cantor KP, Ward MH, Helzlsouer KJ, 2000. A case-control study of nitrate in drinking water and non-Hodgkin's lymphoma in Minnesota. *Arch Environ Health*, 55, 326-329.
- Furukawa F, Nishikawa A, Ishiwata H, Takahashi M, Hayashi Y, Hirose M, 2000. Renal carcinogenicity of concurrently administered fish meal and sodium nitrite in F344 rats. *Jpn J Cancer Res*, 91, 139-147.
- Gatseva PD, Argirova MD, 2008. Iodine status and goitre prevalence in nitrate-exposed schoolchildren living in rural Bulgaria. *Public Health*, 122, 458-461.
- Greenblatt M, Mirvish S, So BT, 1971. Nitrosamine studies: induction of lung adenomas by concurrent administration of sodium nitrite and secondary amines in Swiss mice. *J Natl Cancer Inst*, 46, 1029-1034.
- Hosseini F, Majdi M, Naghshi S, Sheikhhosseini F, Djafarian K, Shab-Bidar S, 2021. Nitrate-nitrite exposure through drinking water and diet and risk of colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Clinical Nutrition*, 40, 3073-3081.
- Huang H, Woodruff TJ, Baer RJ, Bangia K, August LM, Jelliffe-Palowski LL, Padula AM, Sirota M, 2018. Investigation of association between environmental and socioeconomic factors and preterm birth in California. *Environment International*, 121, 1066-1078.
- IARC, 2010. Ingested Nitrate and Nitrite, and Cyanobacterial Peptide Toxins. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Volume 94). 94, International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, France, 43-325
- Infante-Rivard C, Olson E, Jacques L, Ayotte P, 2001. Drinking water contaminants and childhood leukemia. *Epidemiology*, 12, 13-19.
- Inoue-Choi M, Ward MH, Cerhan JR, Weyer PJ, Anderson KE, Robien K, 2012. Interaction of nitrate and folate on the risk of breast cancer among postmenopausal women. *Nutr Cancer*, 64, 685-694.
- Inoue-Choi M, Jones RR, Anderson KE, Cantor KP, Cerhan JR, Krasner S, Robien K, Weyer PJ, Ward MH, 2015. Nitrate and nitrite ingestion and risk of ovarian cancer among postmenopausal women in Iowa. *Int J Cancer*, 137, 173-182.
- JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives), 2003. Nitrite (and potential endogenous formation of N-nitroso compounds). WHO Food additives series (FAS), No. 50.
- Jensen AS, Coffman VR, Schullehner J, Trabjerg BB, Pedersen CB, Hansen B, Olsen J, Pedersen M, Stayner LT, Sigsgaard T, 2023. Prenatal exposure to tap water containing nitrate and the risk of small-for-

- gestational-age: A nationwide register-based study of Danish births, 1991-2015. *Environ Int*, 174, 107883.
- Jones RR, Weyer PJ, DellaValle CT, Inoue-Choi M, Anderson KE, Cantor KP, Krasner S, Robien K, Freeman LE, Silverman DT, Ward MH, 2016. Nitrate from Drinking Water and Diet and Bladder Cancer Among Postmenopausal Women in Iowa. *Environ Health Perspect*, 124, 1751-1758.
- Jones RR, Weyer PJ, DellaValle CT, Robien K, Cantor KP, Krasner S, Beane Freeman LE, Ward MH, 2017. Ingested Nitrate, Disinfection By-products, and Kidney Cancer Risk in Older Women. *Epidemiology*, 28, 703-711.
- Jones RR, DellaValle CT, Weyer PJ, Robien K, Cantor KP, Krasner S, Beane Freeman LE, Ward MH, 2019. Ingested nitrate, disinfection by-products, and risk of colon and rectal cancers in the Iowa Women's Health Study cohort. *Environ Int*, 126, 242-251.
- Knobeloch L, Salna B, Hogan A, Postle J, Anderson H, 2000. Blue babies and nitrate-contaminated well water. *Environmental Health Perspectives*, 108, 675-678.
- Kuo HW, Wu TN, Yang CY, 2007. Nitrates in drinking water and risk of death from rectal cancer in Taiwan. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues*, 70, 1717-1722.
- Lin JK, Ho YS, 1992. Hepatotoxicity and hepatocarcinogenicity in rats fed squid with or without exogenous nitrite. *Food Chem Toxicol*, 30, 695-702.
- Lin L, St Clair S, Gamble GD, Crowther CA, Dixon L, Bloomfield FH, Harding JE, 2023. Nitrate contamination in drinking water and adverse reproductive and birth outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*, 13, 563.
- Maekawa A, Ogiu T, Onodera H, Furuta K, Matsuoka C, Ohno Y, Odashima S, 1982. Carcinogenicity studies of sodium nitrite and sodium nitrate in F-344 rats. *Food Chem Toxicol*, 20, 25-33.
- McElroy JA, Trentham-Dietz A, Gangnon RE, Hampton JM, Bersch AJ, Kanarek MS, Newcomb PA, 2008. Nitrogen-nitrate exposure from drinking water and colorectal cancer risk for rural women in Wisconsin, USA. *Journal of Water and Health*, 6, 399-409.
- Medgyesi DN, Trabert B, Sampson J, Weyer PJ, Prizment A, Fisher JA, Beane Freeman LE, Ward MH, Jones RR, 2022. Drinking Water Disinfection Byproducts, Ingested Nitrate, and Risk of Endometrial Cancer in Postmenopausal Women. *Environ Health Perspect*, 130, 57012.
- Migeot V, Albouy-Llaty M, Carles C, Limousi F, Strezlec S, Dupuis A, Rabouan S, 2013. Drinking-water exposure to a mixture of nitrate and low-dose atrazine metabolites and small-for-gestational age (SGA) babies: A historic cohort study. *Environmental Research*, 122, 58-64.
- Morales-Suárez-Varela MM, Llopis-Gonzalez A, Tejerizo-Perez ML, 1995. Impact of nitrates in drinking water on cancer mortality in Valencia, Spain. *Eur J Epidemiol*, 11, 15-21.
- Mueller BA, Newton K, Holly EA, Preston-Martin S, 2001. Residential water source and the risk of childhood brain tumors. *Environ Health Perspect*, 109, 551-556.
- Mueller BA, Searles Nielsen S, Preston-Martin S, Holly EA, Cordier S, Filippini G, Peris-Bonet R, Choi NW, 2004. Household water source and the risk of childhood brain tumours: results of the SEARCH International Brain Tumor Study. *Int J Epidemiol*, 33, 1209-1216.
- Møller H, Landt J, Pedersen E, Jensen P, Autrup H, Jensen OM, 1989. Endogenous nitrosation in relation to nitrate exposure from drinking water and diet in a Danish rural population. *Cancer Res*, 49, 3117-3121.
- Nordic Council of Ministers (Nordic Council of Ministers ), 2014. Nordic Nutrition Recommendations 2012, Integrating Nutrition and Physical Activity. Nord 2014:002.
- NTP (National Toxicology Program), 1990. Reproductive Toxicity of Sodium Nitrite (CAS NO. 7632-00-0) in CD-1 Swiss mice. Report # NTP 90-266, 1-218.
- NTP, 2001. Toxicology and carcinogenesis studies of sodium nitrite (CAS NO. 7632-00-0) in F344/N rats and B6C3F1 mice (drinking water studies). *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser*, 495, 7-273.
- Oh H, Kim H, Hoon Lee D, Lee A, Giovannucci EL, Kang SS, Keum N, 2019. Different dietary fiber sources and risks of colorectal cancer and adenoma: Dose-response meta-analysis of prospective studies. *British Journal of Nutrition*, 122.
- Ohshima H, Bartsch H, 1981. Quantitative estimation of endogenous nitrosation in humans by monitoring N-nitrosoproline excreted in the urine. *Cancer Res*, 41, 3658-3662.

- Olsen P, Gry J, Knudsen I, Meyer O, Poulsen E, 1984. Animal feeding study with nitrite-treated meat. *IARC Sci Publ*, 667-675.
- Pant N, Srivastava SP, 2002. Testicular and spermatotoxic effect of nitrate in mice. *Hum Exp Toxicol*, 21, 37-41.
- Pereira C, Ferreira NR, Rocha BS, Barbosa RM, Laranjinha J, 2013. The redox interplay between nitrite and nitric oxide: From the gut to the brain. *Redox Biol*, 1, 276-284.
- Picetti R, Deeney M, Pastorino S, Miller MR, Shah A, Leon DA, Dangour AD, Green R, 2022. Nitrate and nitrite contamination in drinking water and cancer risk: A systematic review with meta-analysis. *Environmental Research*, 210.
- Quist AJL, Inoue-Choi M, Weyer PJ, Anderson KE, Cantor KP, Krasner S, Freeman LEB, Ward MH, Jones RR, 2018. Ingested nitrate and nitrite, disinfection by-products, and pancreatic cancer risk in postmenopausal women. *Int J Cancer*, 142, 251-261.
- Rasmussen LB, Jorgensen T, Perrild H, Knudsen N, Krejbjerg A, Laurberg P, Pedersen IB, Bjergved L, Ovesen L, 2014. Mandatory iodine fortification of bread and salt increases iodine excretion in adults in Denmark - a 11-year follow-up study. *Clin Nutr*, 33, 1033-1040.
- Rowland IR, Granli T, Bockman OC, Key PE, Massey RC, 1991. Endogenous N-nitrosation in man assessed by measurement of apparent total N-nitroso compounds in faeces. *Carcinogenesis*, 12, 1395-1401.
- SCF (Scientific Committee for Food), 1992. Nitrates and nitrites (opinion expressed on 19th October 1990). *Food - science and techniques. Reports of the Scientific Committee for Food (Twenty-sixth series)*, 1-52.
- Schullehner J, Hansen B, 2014. Nitrate exposure from drinking water in Denmark over the last 35 years. *Environmental Research Letters*, 9.
- Schullehner J, Hansen B, Thygesen M, Pedersen CB, Sigsgaard T, 2018. Nitrate in drinking water and colorectal cancer risk: A nationwide population-based cohort study. *Int J Cancer*.
- Seyedsalehi MS, Mohebbi E, Tourang F, Sasanfar B, Boffetta P, Zendejdel K, 2023. Association of Dietary Nitrate, Nitrite, and N-Nitroso Compounds Intake and Gastrointestinal Cancers: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Toxics*, 11.
- Shea BJ, Reeves BC, Wells G, Thuku M, Hamel C, Moran J, Moher D, Tugwell P, Welch V, Kristjansson E, Henry DA, 2017. AMSTAR 2: a critical appraisal tool for systematic reviews that include randomised or non-randomised studies of healthcare interventions, or both. *Bmj*, 358, j4008.
- Sherris AR, Baiocchi M, Fendorf S, Luby SP, Yang W, Shaw GM, 2021. Nitrate in drinking water during pregnancy and spontaneous preterm birth: A retrospective within-mother analysis in california. *Environmental Health Perspectives*, 129.
- Shubin AV, Lesovaya EA, Kirsanov KI, Antoshina EE, Trukhanova LS, Gorkova TG, Belitsky GA, Yakubovskaya MG, Demiduk IV, 2018. Re-Examination of the Esophageal Squamous Cell Carcinoma Model in Rats Induced by N-Nitrososarcosine Ethyl Ester Precursors. *Bull Exp Biol Med*, 164, 676-679.
- Shuval HI, Gruener N, 1972. Epidemiological and toxicological aspects of nitrates and nitrites in the environment. *Am J Public Health*, 62, 1045-1052.
- Stayner LT, Schullehner J, Semark BD, Jensen AS, Trabjerg BB, Pedersen M, Olsen J, Hansen B, Ward MH, Jones RR, Coffman VR, Pedersen CB, Sigsgaard T, 2021. Exposure to nitrate from drinking water and the risk of childhood cancer in Denmark. *Environ Int*, 155, 106613.
- Stayner LT, Jensen AS, Schullehner J, Coffman VR, Trabjerg BB, Olsen J, Hansen B, Pedersen M, Pedersen CB, Sigsgaard T, 2022. Nitrate in drinking water and risk of birth defects: Findings from a cohort study of over one million births in Denmark. *Lancet Regional Health - Europe*, 14.
- Steindorf K, Schlehofer B, Becher H, Hornig G, Wahrendorf J, 1994. Nitrate in drinking water. A case-control study on primary brain tumours with an embedded drinking water survey in Germany. *Int J Epidemiol*, 23, 451-457.
- Thomsen AML, Ramlau-Hansen CH, Schullehner J, Ebdrup NH, Liew Z, Coffman V, Stayner L, Hansen B, Olsen J, 2021. Prenatal nitrosatable prescription drug intake, drinking water nitrate, and the risk of stillbirth: a register- and population-based cohort of Danish pregnancies, 1997–2017. *Environmental Health: a Global Access Science Source*, 20.

- van Breda SG, Mathijs K, Sagi-Kiss V, Kuhnle GG, van der Veer B, Jones RR, Sinha R, Ward MH, de Kok TM, 2019. Impact of high drinking water nitrate levels on the endogenous formation of apparent N-nitroso compounds in combination with meat intake in healthy volunteers. *Environ Health*, 18, 87.
- van Logten MJ, den Tonkelaar EM, Kroes R, Berkvens JM, van Esch GJ, 1972. Long-term experiment with canned meat treated with sodium nitrite and glucono-delta-lactone in rats. *Food Cosmet Toxicol*, 10, 475-488.
- van Loon AJ, Botterweck AA, Goldbohm RA, Brants HA, van Klaveren JD, van den Brandt PA, 1998. Intake of nitrate and nitrite and the risk of gastric cancer: a prospective cohort study. *Br J Cancer*, 78, 129-135.
- Vermeer IT, Pachen DM, Dallinga JW, Kleinjans JC, van Maanen JM, 1998. Volatile N-nitrosamine formation after intake of nitrate at the ADI level in combination with an amine-rich diet. *Environ Health Perspect*, 106, 459-463.
- Vermeer IT, Moonen EJ, Dallinga JW, Kleinjans JC, van Maanen JM, 1999. Effect of ascorbic acid and green tea on endogenous formation of N-nitrosodimethylamine and N-nitrosopiperidine in humans. *Mutat Res*, 428, 353-361.
- Villanueva CM, Espinosa A, Gracia-Lavedan E, Vlaanderen J, Vermeulen R, Molina AJ, Amiano P, Gómez-Acebo I, Castaño-Vinyals G, Vineis P, Kogevinas M, 2021. Exposure to widespread drinking water chemicals, blood inflammation markers, and colorectal cancer. *Environ Int*, 157, 106873.
- Walton G, 1951. Survey of literature relating to infant methemoglobinemia due to nitrate-contaminated water. *Am J Public Health Nations Health*, 41, 986-996.
- Ward MH, Mark SD, Cantor KP, Weisenburger DD, Correa-Villasenor A, Zahm SH, 1996. Drinking water nitrate and the risk of non-Hodgkin's lymphoma. *Epidemiology*, 7, 465-471.
- Ward MH, Cantor KP, Riley D, Merkle S, Lynch CF, 2003. Nitrate in public water supplies and risk of bladder cancer. *Epidemiology*, 14, 183-190.
- Ward MH, Cantor KP, Cerhan J, Lynch CF, Hartge P, 2004. Nitrate in public water supplies and risk of cancer: Results from recent studies in the midwestern united states. *Epidemiology*, 15.
- Ward MH, deKok TM, Levallois P, Brender J, Gulis G, Nolan BT, VanDerslice J, 2005. Workgroup Report: Drinking-Water Nitrate and Health-Recent Findings and Research Needs. *Environmental Health Perspectives*, 113, 1607-1614.
- Ward MH, Cerhan JR, Colt JS, Hartge P, 2006. Risk of non-Hodgkin lymphoma and nitrate and nitrite from drinking water and diet. *Epidemiology*, 17, 375-382.
- Ward MH, Rusiecki JA, Lynch CF, Cantor KP, 2007. Nitrate in public water supplies and the risk of renal cell carcinoma. *Cancer Causes Control*, 18, 1141-1151.
- Ward MH, Heineman EF, Markin RS, Weisenburger DD, 2008. Adenocarcinoma of the stomach and esophagus and drinking water and dietary sources of nitrate and nitrite. *Int J Occup Environ Health*, 14, 193-197.
- Ward MH, Kilfoy BA, Weyer PJ, Anderson KE, Folsom AR, Cerhan JR, 2010. Nitrate intake and the risk of thyroid cancer and thyroid disease. *Epidemiology*, 21, 389-395.
- Ward MH, Jones RR, Brender JD, de Kok TM, Weyer PJ, Nolan BT, Villanueva CM, van Breda SG, 2018. Drinking Water Nitrate and Human Health: An Updated Review. *Int J Environ Res Public Health*, 15.
- WCRF/AICR (World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research), 2018. Diet, nutrition, physical activity and colorectal cancer. Continuous Update Project Expert Report, 1-109.
- Weyer PJ, Cerhan JR, Kross BC, Hallberg GR, Kantamneni J, Breuer G, Jones MP, Zheng W, Lynch CF, 2001. Municipal drinking water nitrate level and cancer risk in older women: The Iowa women's health study. *Epidemiology*, 12, 327-338.
- Xiang YY, Wang DY, Tanaka M, Igarashi H, Kamo T, Shen Q, Sugimura H, Kino I, 1995. Efficient and specific induction of esophageal tumors in rats by precursors of N-nitrososarcosine ethyl ester. *Pathol Int*, 45, 415-421.
- Yang CY, Wu DC, Chang CC, 2007. Nitrate in drinking water and risk of death from colon cancer in Taiwan. *Environ Int*, 33, 649-653.
- Zeegers MP, Selen RF, Kleinjans JC, Goldbohm RA, van den Brandt PA, 2006. Nitrate intake does not influence bladder cancer risk: the Netherlands cohort study. *Environ Health Perspect*, 114, 1527-1531.

Zumel-Marne A, Castaño-Vinyals G, Alguacil J, Villanueva CM, Maule M, Gracia-Lavedan E, Momoli F, Krewski D, Mohipp C, Petridou E, Bouka E, Merletti F, Migliore E, Piro S, Ha M, Mannetje A, Eng A, Aragones N, Cardis E, 2021. Exposure to drinking water trihalomethanes and nitrate and the risk of brain tumours in young people. *Environ Res*, 200, 111392.