

1 生殖発生毒性に係るOTA評価書第1版以降の追加知見（案）

2
3 ・ *in vitro*試験

4 （文献リストNo.103）

5 生後6か月未満の羊の卵巣から卵丘細胞複合体を分離して、0、0.0001、1
6 又は10 μM のOTAでインキュベーションした結果、10 μM 群で卵丘膨張及び
7 卵母細胞核の成熟低下を誘発し、アポトーシスを起こした卵丘細胞の割合が
8 増加した。また、胚は2～4細胞期で分裂が停止した。1 μM 群で卵丘が膨張し
9 GV（Germinal Vesicle）期の卵母細胞の割合が増加した。0.1 μM 群では、4
10 ～8細胞期及び8～16細胞期の発育率が減少した。胚盤胞は、形成率及び形態
11 学的に正常であっても、細胞分裂の停滞が生じ、アポトーシスの割合が増加
12 した。ナノモル濃度のOTA は、卵丘細胞複合体 の形態機能パラメータには
13 影響しないが、アポトーシスを増加させた。

14
15 （文献リストNo.164）

16 H4IIE細胞（ラット肝細胞由来株）を0.003～100 μM （0.01～40.4 mg/L）
17 のOTAで24時間インキュベーションしてAlamarBlue試験（レサズリン；ミト
18 コンドリアの代謝活性）、CFDA-AM試験（カルセイン；細胞膜完全性）及び
19 NRU試験（ニュートラルレッド；リソソーム膜完全性）で生存率を測定した
20 結果、それぞれのIC₁₀及びIC₅₀は>40.4及び>40.4、>40.4及び>40.4、9.75及
21 び21.65 mg/Lだった。

22
23 （文献リストNo.164）

24 【事務局より】

25 スクリーニング作業を行った際には、ラット（哺乳動物）の細胞に関する記載
26 があったため確認対象文献としましたが、エストロゲン受容体とエストロゲン
27 の活性に関する内容については、哺乳動物の細胞を用いた記載がありませんで
28 した。原則、哺乳動物を用いた知見を採用することとしておりますが、哺乳類以
29 外（魚類）を用いた結果についても生殖発生毒性の観点から記載が必要な内容が
30 あるかご検討ください。

31
32 【高橋専門参考人からのコメント】

33 哺乳類の細胞は肝細胞由来でembryonicなものではないため、生殖発生毒性関
34 連の知見には該当しないと考える。魚類は環境毒性の観点からは有用だが、食
35 品健康影響評価の観点では掲載不要と考える。

1 (文献リストNo.216)

2 マウス (ICR) の胚盤胞を0、1、5又は 10 μ M のOTAに24 時間インキュベ
3 ーションしてTUNEL染色した結果、10 μ M 群でアポトーシスを誘発し対照
4 群の9倍の胚盤胞の細胞が死滅した。また、桑実胚の胚盤胞への発育割合は、
5 対照群の83%に対して10 μ M群で30.4%に減少した。各群の胚盤胞をそれぞれ
6 300~320個採取して8日間培養した結果、フィブロネクチンコートディッシ
7 ュへの着床率に各群で違いが無かった。各群の胚を偽妊娠4日目のマウス
8 (ICRの雌をC57BL/6Jの精管切除雄で偽妊娠させた) に移植した結果、10
9 μ M処理群は着床率で対照群と差が無かったが胚の吸収率が増加した。また、
10 各群で胎盤重量に差が無かったが、処理群の胎児体重が低下した。各群の胚
11 盤胞について蛍光色素DCF-DAによりROS含量を測定したところ、10 μ M処
12 理群で増加がみられた。抗Bax及び抗Bcl-2免疫染色した結果、処理群でそれ
13 ぞれアポトーシス促進因子のBaxが増加し、アポトーシス誘発又は阻害する
14 Bcl-2が減少した。また、10 μ M群でミトコンドリア染色色素のDIOC6取込み
15 が抑制された。

16
17 (文献リストNo.622)

18 ブタの顆粒膜細胞を0、20又は40 μ MのOTAで24時間インキュベーションし
19 た結果、それぞれの生存細胞率が100、87.67及び74.16%で処理群のG2/M期
20 割合が増加した。*DEG (differentially expressed gene)* は、用量依存的に増
21 加して20 μ M又は40 μ M群でセリン/スレオニンキナーゼ (*ATR : Atraxia*
22 *Telangiectasia and Red3-related*)、DNA2本鎖切断修復の*BRCA1*及び
23 *RAD51*が増加した。また、20及び40 μ M群でDNA2本鎖切断マーカーの*γ-*
24 *H2AX*、DNA2本鎖切断修復の*PARP1*、DNA修復タンパク質の*PARP1*及び
25 RNA損傷関連タンパク質の*RPA2*及び*P53*が増加した。一方、DNA合成酵素
26 活性促進因子の*PCNA (Proliferation Cell Nuclear)* が処理群で低下した。

27
28 (文献リストNo.622)

29 【事務局より】

30 生殖発生毒性の内容として、「DEG」以降（斜体部分）の記載が必要かご検
31 討をお願いします。

32
33 【高橋専門参考人からのコメント】

34 DEG以降の記載については、細胞死の分子的背景を理解するために必要な情
35 報であれば、割愛しないほうが良いと考える。

1 ・ *in vivo*試験

2 (文献リストNo.048)

3 ラット (Fischer、雌雄、一群各10匹) に0、0.16、0.4、1.0又は2.5 mg/kg
4 飼料のOTAを70日間 (交配前2週、交配期間最長2週、妊娠期間21日及び哺育
5 期間21日) 混餌投与 (雄: 0 ± 0 、 0.0089 ± 0.0025 、 0.0217 ± 0.0057 、 0.0552
6 ± 0.0169 又は 0.1418 ± 0.0394 mg/kg 体重/日相当、雌: 0 ± 0 、 0.0119 ± 0.0042 、
7 0.0339 ± 0.0045 、 0.0733 ± 0.0271 又は 0.167 ± 0.0482 mg/kg 体重/日相当) し
8 た結果、着床への影響はなかったが、2.5 mg/kg 飼料投与群において着床後
9 に胎児毒性 (胚・胎児死亡) がみられた。また、1.0 mg/kg 飼料投与の成獣ラ
10 ット及び母動物に0.4 mg/kg 飼料を給餌していた生後21日齢ラットで体重と
11 腎臓の重量低下及び腎毒性を示す臨床検査値上昇がみられた。

12
13 (ご提供文献No.1)

14 ラット (F344、雌雄、一群各16匹) に0、0.026、0.064、0.16、0.4又は1.0
15 mg/kg 飼料のOTAを138日間 (交配前2週、交配期間2週、妊娠期間21日、哺
16 育期間21日及び離乳後69日) 混餌投与 (F_0 雄: 0 、 0.0014 ± 0.0002 、 $0.0033 \pm$
17 0.0005 、 0.0084 ± 0.0011 、 0.0210 ± 0.0031 又は 0.0520 ± 0.0077 mg/kg 体重/
18 日相当、 F_0 雌: 0 、 0.0021 ± 0.0012 、 0.0055 ± 0.0033 、 0.0135 ± 0.0071 、 0.0317
19 ± 0.0161 又は 0.0796 ± 0.0377 mg/kg 体重/日相当、 F_1 雄90日齢: 0 、 $0.0021 \pm$
20 0.0009 、 0.0052 ± 0.0022 、 0.0130 ± 0.0053 、 0.032 ± 0.0131 又は $0.0837 \pm$
21 0.0327 mg/kg 体重/日相当、 F_1 雌90日齢: 0 、 0.0022 ± 0.0009 、 0.0056 ± 0.0023 、
22 0.0130 ± 0.0051 、 0.0342 ± 0.0136 又は 0.0870 ± 0.0341 mg/kg 体重相当) し
23 た。1.0 mg/kg 飼料群の雄で腎髄質外層外帯の上皮細胞にアポトーシス増加
24 及び尿細管変性をみた。また、OTA投与による妊娠ラットの匹数又は出産ラ
25 ットの匹数に影響は無かった。1.0 mg/kg群の母動物1匹あたりの着床数は対
26 照群に比較して多く、着床から生後4日までに母動物1匹あたりの失われた F_1
27 の数も多かったが、生後4日における児の数は対照群とほぼ同じであった。0.4
28 及び1.0 mg/kg 飼料群の F_1 ラットの性成熟 (包皮分離又は膻開口) が用量依
29 存的に遅延した。また、腎重量減少及び肝相対重量低下並びに腎髄質外層外
30 帯の核大小不同、巨大核化及びアポトーシスが用量依存的に増加した。 F_1 雄
31 においては、胸腺相対重量及び副腎相対重量が増加した。0.16及び0.4 mg/kg
32 飼料投与群の多卵胞数/総卵胞数割合上昇及び生後90日の F_1 雌の原始卵胞、
33 移行卵胞、一次卵胞及び二次卵胞が増加した。血漿中テストステロンは F_0 雄
34 で減少し、 F_0 及び F_1 雄ラットでは精子運動性、進路速度、進行速度及び軌跡
35 速度が低下した。

36

オクラトキシンAの生殖発生毒性試験の結果（案）

動物種等 (動物数 /群)	試験、投与 方法、期間	投与量		作用	LOAEL (mg/kg 体重/日)	NOAEL (mg/kg 体重/日)	参考文献
		mg/kg 飼料	mg/kg 体重/日				
羊卵丘細胞複合体		0、 0.0001、 0.001、 0.01、0.1、 1、10 μM		<ul style="list-style-type: none"> ・ 10 μMで卵丘の膨張と卵母細胞各成熟率の低下 ・ 1 μMで卵丘の膨張しGV期の卵母細胞の割合が増加 ・ 卵母細胞の正常受精率は用量依存的に低下し異常受精卵母細胞は低用量群で増加 ・ 10 μM群で2~4細胞期で停止 ・ 0.0001 μM群では4~8細胞期迄の発育の停止 	0.0001 μM		文献リスト No.103
ICRマウス桑実胚 (妊娠3日目に支給 洗浄回収)、胚盤胞(妊娠4日目に子宮角洗浄回収)		0、1、10 μM、24時間ばく露		<ul style="list-style-type: none"> ・ 10 μM処理胚盤胞でアポトーシス増加、総細胞数及び内部細胞塊細胞減少 ・ 10 μM群で胚盤胞/桑実胚率は83%が30.4%に減少 		1 μM	文献リスト No.216
ラット、Fischer、雌雄(各10)	生殖発生毒性混餌投与70日間(交配前2週間、交配2週間、妊娠21日間、哺乳)	0、0.16、0.4、1.0又は2.5	雄：0、0.0089、0.0217、0.0552又は0.1418 雌：0、	<ul style="list-style-type: none"> ・ 0.0552 mg/kg 体重/日相当投与雄、0.0733 mg/kg 体重/日相当投与雌及び0.0339 mg/kg 体重/日投与妊娠獣F1の体 	0.0339	0.0119	文献リスト No.048

	育21日間投与)		0.0119、 0.0339、 0.0733又は 0.167	重及び腎重量の低下並びに腎毒性パラメータ上昇			
ラット Fischer 雌雄各 (16)	生殖発生毒性 混餌投与 138日間（交配前14日間、 交配14日間、 妊娠21日間、 哺育21日間、 離乳後69日）	0、0.026、 0.064、 0.16、0.4、 1.0 mg/kg 飼料	F0雄： 0、 0.0014、 0.0033、 0.0084、 0.0210、 0.0520 F0雌：0、 0.0021、 0.0055、 0.0135、 0.0317、 0.0796 F1生後90日 雄0、 0.0021、 0.0052、 0.0130、 0.0320、 0.0837 F1生後90日 雌0、 0.0022、 0.0056、 0.0130、 0.0342、 0.0870	・0.0520 mg/kg 体重/日相当群のF0雄の腎髄質外層外帯にアポトーシス性上皮細胞増加、尿細管変性 ・0.0796 mg/kg 体重/日相当群母ラットの着床数増加、生後4日目迄にF1の死亡数増加（生後4日の児数には影響なし） ・0.4及び0.1 mg/kg 飼料のF1雄の包皮分離及びF1雌の膈開口が用量依存的に遅延 ・F1雌雄の腎重量減少及び肝相対重量低下及び腎外層外帯に核大小不同、アポトーシス、核巨大化が用量依存的に増加 ・F1雄胸腺相対重量、副腎相対重量増加 ・0.0130、0.0342 mg/kg 体重相当投与群のF1雌の生後90日の原始卵胞、移行卵胞、一次卵胞、二次卵胞の増加 ・0.0130 mg/kg 体重/日相当以上投与群		F0雄； 0.0084 F0雌； 0.0135 F1雄； 0.0130 F1雌； 0.0130	専門参考人提供 文献No.1

				<p>で多卵胞数/総卵胞数割合上昇</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ F₀雄の精子運動性、進路速度、進行速度、軌跡速度低下 		
ブタの顆粒膜細胞		0、20、40 μM、24時間ばく露		<ul style="list-style-type: none"> ・ 生細胞数は用量依存的に減少 ・ G2/M期割合が用量依存的に増加 ・ 用量依存的にDEG増加 ・ DEGは主にDNA複製進行阻害に関与 ・ 40μM群でATR γ-H2AX及びRNA損傷関連タンパク質増加 ・ PCNA低下 ・ BRCA1、RAD51、PARP1及びXRCC1増加 	20 μM	文献リスト No.622

1