

毒性試験のまとめ（案）

【事務局より】

第1版の記載を維持しつつ、今般ご確認いただいた追加知見を追記する形で修正しておりますので、全体的な方向性や事実誤認がないか等について、ご審議をお願いいたします。なお、BMD法を用いた解析結果に関連する内容は、本日のご審議を踏まえ、記載いたします。そのため、現時点で未記載としております。（黄色ハイライト部分）

実験動物を用いた経口投与による急性毒性試験では、LD₅₀ 値がマウスで 46～58 mg/kg 体重、ラットで 20～30 mg/kg 体重、イヌで 0.2 mg/kg 体重およびブタで 1 mg/kg 体重と種差が認められた。亜急性毒性試験では、OTA を投与した実験動物全てに尿細管の部位特異的な腎毒性が認められた。腎臓髄質外層外帯の近位尿細管 S3 セグメントには、巨大核細胞及び肥大した細胞と共に有糸分裂像とアポトーシスの増加がみられ、尿細管の萎縮及び組織破壊も観察された。ラットにおいて、雌雄いずれにおいても用量及び投与期間依存的にこれらの所見の増強が認められた。マウスにおいては肝臓においても肝細胞腫大とアポトーシスが認められた。OTA は腎臓において有機アニオントランスポーターを介して膜輸送されることが示されており、近位尿細管に選択的な OTA の毒性作用は、OTA が近位尿細管細胞の刷子縁又は側底膜にある有機アニオン輸送システムにより細胞内外に移行することと関連すると考えられている。実験動物による亜急性毒性試験において、ラット（雄）に 0.0014、0.0033、0.0084、0.0210 又は 0.0520 mg/kg 体重/日相当の OTA を 138 日間混餌投与した結果、血中ナトリウム減少が 0.0033 mg/kg 体重/日相当で認められたが、生理学的変化の範囲であると判断した。最も低い用量で毒性が認められたのはブタ（雌）にで、120 日間 0.008、0.040 又は 0.160 mg/kg 体重/日相当の OTA を 120 日間混餌投与した結果、用量依存的に Tm_{PAH}PAH 及び Tm_{PAH}PAH のイヌリンクリアランスに対する割合の減少並びに尿糖が増加した。0.008 mg/kg 体重/日相当の OTA 投与群では 9 頭中 4 頭、0.040 mg/kg 体重/日相当以上の OTA 投与群では、全てのブタに尿細管上皮における病変に伴う線維化等の変化退行性変性が観察された。ブタにおける LOAEL は 0.008 mg/kg 体重/日であった。また、BMD 法を用いて解析した結果、・・・。

慢性毒性・発がん性試験では、げっ歯類に OTA を経口投与すると主に腎臓髄質外層外帯に腎細胞腺腫及び腎細胞癌が雄に多く発生した。ラットに 0、0.021、0.070 又は 0.210 mg/kg 体重/日の OTA を週 5 回強制経口投与し

た NTP における 2 年間発がん性試験では、0.070 mg/kg 体重/日以上
の用量で雄ラットの腎臓に腫瘍が認められた。NOAEL は 0.021 mg/kg 体
重/日 (週 5 日投与を週 7 日投与に換算した場合、0.015 mg/kg 体
重/日に相当) であった。また、この NTP 試験のデータを基に BMD 法を用いて解析した
結果、……。ブタを用いた慢性毒性試験では、0.040 mg/kg 体重/日の OTA
を 2 年間投与した結果、尿細管萎縮や間質の線維化等、進行性の腎障害が
みられたが、がんの誘発は認められなかった。

生殖発生毒性は、ラットの F₀ 雌雄に OTA を 138 日間 (交配 2 週間前か
ら、離乳後 69 日まで) 投与した F₁ 雌において、多卵性卵胞数及び総卵胞
数に対するその割合の上昇が 0.0130 mg/kg 体重/日相当以上群で認められ
たが、多卵性卵胞の増加については、生殖に対する確定的な影響を与えるも
のではないと考えた。神経毒性は、ラットの妊娠 6 日目から離乳までの母
動物に OTA を投与した F₁ の海馬の神経新生の抑制と共に歯状回門部 SST
陽性ニューロンの減少が認められた。生殖発生毒性、神経毒性及び免疫毒性
は、いずれもブタにおける腎臓への影響と比べると 1~2 桁高い用量で観察
された。

遺伝毒性試験の結果、Ames 試験では代謝活性化の有無にかかわらずほと
んどが陰性であり、大腸菌及びサルモネラ菌を用いた SOS 試験及び哺乳類
培養細胞を用いた遺伝子突然変異試験の結果のほとんどが陰性であった。
一方、哺乳類の培養細胞において OTA が一本鎖 DNA 切断を誘導すること
が示されており、OTA を投与したマウス又はラットの脾臓、肝臓、腎臓等
においてもコメットアッセイの結果は陽性であった。コメットアッセイで
みられる DNA 損傷の量は抗酸化剤によって抑制されることが示されてい
る。DNA 修復を示す不定期 DNA 合成では、ラット肝細胞、ブタ膀胱上皮
細胞、ヒト尿路上皮細胞において陽性であった。姉妹染色分体交換が *in vitro*
のいくつかの試験でみられたが、*in vivo* の試験では陰性であった。小核試
験は、*in vitro* で陽性、*in vivo* の腹腔内投与試験で共に陽性であったが経口
投与試験では陰性であった。*in vitro* の染色体異常試験では、陽性及び陰性
の結果が共に得られているが、ラットに発がん用量を経口投与した試験で
は陰性、マウスに腹腔内又は経口投与した試験では陽性であった。トランス
ジェニックラット (*gpt* delta) マウス又はラットを用いた *in vivo* 遺伝毒
性試験では、腎臓または腎臓髄質外層外帯に DNA の欠失変異 (*Spi*-アッセ
イ陽性) がみられたが、それがこの部位で発生するがんの原因であるとする
直接的な証拠は得られていない。また、同部位における点突然変異 (*gpt* ア
ッセイ陰性) や酸化的 DNA 損傷の証拠となる変異スペクトルは検出されな
かったことが報告されている。

OTA の遺伝毒性発がん性物質としてのメカニズムに関して、OTA あるい

はその代謝物が DNA に直接作用するか否かを調べる目的で以下のようにさまざまな試験が実施されている。動物に OTA を投与した *in vivo* における DNA 付加体形成試験において、ポストラベル法により DNA 付加体は検出されなかったとの報告がある。一方、ポストラベル法により *in vitro* 及び *in vivo* において、DNA 付加体が検出されたとする報告があるが、その構造解析はされておらず、検出されたとされる付加体が OTA 又は OTA 代謝物と DNA が共有結合したものであるとの確認はされていない。更に、^[3H] 又は^[14C]でラベルした OTA をラットに投与した *in vivo* 試験において検出感度はポストラベリング法と同等であったが、付加体形成は認められていない。一方で、腎臓髄質外層外帯の近位尿細管上皮に γ -H2AX 陽性の小核や核の陽性細胞数が増加し DNA の二本鎖切断誘発が示唆された。相同組換え修復遺伝子の増加も認められ、欠失変異へとつながると考えられる。

OTA の非遺伝毒性発がん性物質としてのメカニズムに関して、細胞周期のや DNA 二本鎖切断修復機構の破たん、タンパク質合成酵素阻害、細胞増殖とアポトーシスの変化、酸化ストレス、ミトコンドリアの機能低下、MAP キナーゼ等のシグナル伝達の変化に加えて、フェニルアラニン tRNA 合成酵素、ヒストン等のアセチル化阻害等やがん抑制遺伝子や DNA 修復関連遺伝子のメチル化異常等のエピジェネティックなメカニズムなど、がんに関与する様々な原因が多数報告されている。その他、OTA による遺伝子傷害性については、DNA 複製ストレスに起因する可能性や、毒性及び発がん機構においては、OTA が直接結合することによる低分子量 GTPase の機能異常の関与が示唆されている。

以上の知見より、OTA 又は OTA 代謝物が主として欠失変異のみを誘導するメカニズムは不明であるものの、DNA と直接反応するという証拠が得られていないこと、小核の誘導を含む染色体不安定性を誘導するような非遺伝毒性機序に関する知見の集積状況を踏まえ、OTA 又は OTA 代謝物は DNA 付加体を形成する遺伝毒性発がん物質ではなく、間接的に DNA に作用する非遺伝毒性発がん物質と考えることが妥当であると判断された。そこで、発がん性については、「ヒトに対する経口発がんリスク評価に関する手引き（清涼飲料水を対象）」（平成 20 年 9 月 2 日化学物質・汚染物質専門調査会決定）の考え方を参考に、*in vitro* 遺伝毒性試験では陽性であるが、*in vivo* 遺伝毒性試験で DNA への直接的な作用が確認されず、「発がん性に対する遺伝毒性の関与が不確実」と考えられることから、発がん影響に関しては、NTP における 2 年間発がん性試験に基づく NOAEL を基に算出し、・・・。（参考資料 2 参照）