

1 吸収、分布、代謝、排泄に係る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.019)

5 *Salmonella typhimurium* 1535/pSK1002 菌及びラットの肝臓又は腎臓の
6 S9 を用いて OTA の SOS/umu 試験をした結果、OTA は、S9 の有無に拘わら
7 ず遺伝毒性を示さなかった。
8

(文献リストNo.019)

【事務局より】

2014 年評価時には同様の内容を代謝の項目に記載 (37 ページ 8~11 行目) しておりますが、遺伝毒性の知見として記載すべきかご審議いただきたいと思っております。

【小澤専門参考人からのコメント】

SOS/umu テストは遺伝毒性試験の一つです。本論文に、OTA の代謝に関する詳細な知見が述べられているわけではありません。S9 存在下でも OTA は本テスト陰性ではありますが、所在としては遺伝毒性がより相応しいと考えます。

9
10 (文献リスト No.183)11 Caco-2 細胞 (HTB-37) 及び HepG2 細胞 (HB-8065) を共培養して 0、5、
12 15 又は 45 μM の OTA で 24 時間インキュベーションして細胞生存率を MTS
13 試験及び経上皮電気抵抗測定した結果、用量及びばく露時間に依存して細胞毒
14 性がみられた。Caco-2 細胞では 45 μM で 24 時間ばく露した場合の細胞死は、
15 33%であった。HepG2 細胞の毒性は、Caco-2 細胞に比較して低かった。単層
16 の Caco-2 細胞に OTA をばく露した結果、フェノールレッドの透過率が用量
17 及びばく露時間に依存して増加した。生成された OTA 代謝物の量を評価した
18 結果、Caco-2 細胞では、HepG2 細胞よりも多くの代謝物 (主に OTA-メチル
19 エステル) が検出された。代謝物の量と細胞毒性は、正の相関を示した。生成
20 された OTA 代謝物は、オクラトキシン B (OTB)、OTA メチルエステル、
21 OTA エチルエステル及び OTA グルタチオン抱合体 (OTA-GSH) であった。
22 OTA メチルエステルは、Caco-2 細胞及び HepG2 細胞の両方において検出さ
23 れた主要な代謝物だった。なお、OT β 、OT α 、OT α メチルエステル、OT α
24 エチルエステルは検出されなかった。

1 (文献リスト No.277)

2 HK-2 細胞を 0、25、50、100、200 又は 400 nM の OTA で 48 時間インキ
3 ュベーションした結果、OTA は細胞生存率を低下させた。また、RNAisoPlus
4 を用いて総 RNA を抽出し、cDNA synthesis kit を用いて cDNA を合成して
5 リアルタイムサイバーグリーン法を用いて測定した結果、OTA がアрил炭化
6 水素受容体 (AhR) 及びプレグナン X 受容体 (PXR) 遺伝子を誘導し、フェー
7 ズ I 酵素の CYP4501A1 (CYP1A1)、CYP1A2 及び CYP3A4 遺伝子を誘導し
8 した。ヘムオキシゲナーゼ-1、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸-キ
9 ノンオキシドリダクターゼ-1 及びグルタミン酸システインリガーゼ触媒サブ
10 ユニットなどのフェーズ II 酵素の mRNA 発現は、OTA 処理による NF-E2 関
11 連因子 2 (NRF2) 転座の活性化によって増強された。

12
13 (文献リスト No.475)

14 胃又は腸における吸収及び排泄を知る目的で NCI-N87 細胞 (ヒト胃由来細
15 胞株) 及び Caco-2 細胞 (ヒト結腸腺癌由来細胞株) を用いた胃腸の粘膜から
16 基底膜側、及び基底膜から粘膜側への双方向輸送のモデルシステムを構築した。
17 1.24 μM の OTA を 3 時間インキュベーションして頂端から基底外側への移行
18 及び基底外側から頂端への移行の比率を計算した結果、それぞれ NCI-N87 細
19 胞で $41.2 \pm 10.6\%$ 及び 0% 、Caco-2 細胞で $0.29 \pm 0.07\%$ 及び 0% の見かけの透
20 過率 (Papp ; apparent permeability) を示した。

21
22 (文献リスト No.476)

23 液体ヨーグルト及びコーンクッキーの 10:1 の混合物 (30 g) に 9 μg の OTA
24 を添加して試料にした。上部消化管モデルとして、試料 10 g にヒトアミラー
25 ゼを含む模擬唾液 (150 U/mL^1) を 2 mL 添加して 37°C で 2 分間消化し、模擬
26 胃液 (0.925 mL の 1.5 M 塩酸に 6.3 μL の 0.3 M 塩化カルシウムと 1.57 mL
27 の水及び 1.125 mL の酵素液 (ペプシン 4000 U/mL^2)) を混合して 37°C で 85
28 分間消化した。さらに模擬腸液 (模擬胃液を 1N の水酸化ナトリウム 200 μL
29 で pH を 7 に調製) 及び胆汁抽出物を混合し 37°C で 2 時間消化した。遠心分
30 離した吸収消化されうる物質を含む画分 (バイオアクセス可能画分) の OTA
31 含有量は 72.4% だった。ラクトバチルス・カゼイ菌 (BL23) 及びビフィドバク
32 テリウム・ラクティス菌 (ATCC 27536) にバイオアクセス非可能画分を 1%
33 又は 2% 添加して 37°C で 24 時間嫌気培養した結果、1% 群では菌の増殖速度に
34 影響し、2% 群では菌の増殖パラメータが増加した。さらにバイオアクセス非可

¹ 37°C 1 分間で $1 \mu\text{M}$ のでんぷんを加水分解できる酵素活性を 1 U (ユニット) とする。

² pH2.0 において 37°C 1 分間で 280 nm の蛍光吸収を 0.001 増加させる酵素活性を 1 U とする。

1 能画分をヒト（健常ボランティア、n=5）の糞便に混合した結果、総細菌量が
2 増加して腸内細菌叢の構成が変化した。糞便上清は免疫反応において中心的
3 役割を果たす転写因子の NF- κ B の活性化経路を誘発しなかった。

4
5 (文献リスト No.592)

6 ラット (Wistar、雌雄、各 3 匹)、ニワトリ (Avian、雌雄、各 3 羽)、ブ
7 タ (Changbai、雌雄、各 3 頭)、ヤギ (品種不明、雌雄、各 2 頭)、ウシ (品
8 種不明、雌雄、各 1 頭) 及びヒトの肝ミクロソームが OTA を代謝した結果、
9 UPLC-Q/TOF-MS (Ultra-Performance Liquid Chromatography-
10 Quadrupole/Time-of-Flight hybrid Mass Spectrometry) 法を用いて 8 種類の
11 代謝物が同定され、そのうちフェニルアラニン部分がヒドロキシル化された 3
12 つの代謝物 (9'-OH-OTA、7'-OH-OTA 及び 5'-OH-OTA) を新たに同定した。
13 他の 5 つの代謝物 (4(S)-OH-OTA、4(R)-OH-OTA、OTB、4(R)-OH-OTB 及
14 び 4(S)-OH-OTB) はこれまでの報告と一致した。ニワトリ及びヒトの肝ミク
15 ロソームは、OTA を多量の 7'-OH-OTA に代謝した。

16
17 ・ *in vivo* 試験

18 (文献リスト No.277)

19 マウス (ICR、雄、一群 6 匹) に 0、0.2、1 又は 3 mg/kg 体重/日の OTA を
20 6 週間 (5 日/週) 経口投与後、RNAisoPlus を用いて総 RNA を抽出し、cDNA
21 synthesis kit を用いて cDNA を合成してリアルタイムサイバーグリーン法を
22 用いて測定した。さらに、ウエスタンブロット解析した結果、フェーズ I 及び
23 II 酵素の mRNA 及びタンパク質の増加をみた。KIM-1 (**Kidney
24 Injury Molecule 1**) は、低用量群では増加しなかったが、中用量及び高用量群
25 で増加した。

26
27 (文献リスト No.226)

28 マウス (Balb/c、雄、一群 4 匹) に 0、0.21、0.5 又は 1.5 mg/kg 体重/日の
29 OTA を 28 日間経口投与し、直腸から糞便を採取し、16SrRNA 遺伝子シーク
30 エンシングとメタゲノミクスを用いて糞便中の細菌叢を解析した結果、低用量
31 及び中用量群は対照群と比較して、Bacteroidetes 門の相対存在量は増加し、
32 Firmicutes 門の相対存在量は減少した。高用量群では Bacteroidetes 門と
33 Firmicutes 門の相対存在量は、対照群の相対存在量と同様だった。
34 Cyanobacteria 門は高用量群で対照群に比較して減少したが、低用量群及び中
35 用量群では明らかな変化は見られなかった。科レベルでは、6 つの細菌科が変
36 化した。未分類の Bacteroidales 科は、全用量群で増加した。

1 Porphyromonadaceae 科は、全用量群で増加した。未分類の Cyanobacteria 科
2 は、高用量群のみで減少した。Streptococcaceae 科は、低用量及び中用量群で
3 増加した。Enterobacteriaceae 科は、低用量及び中用量群で増加した。
4 Ruminococcaceae 科は、中用量群で減少した。

5
6 (文献リスト No.234)

7 75mg/kg 体重/日のチオアセトアミドを 8 週間腹腔内投与して非アルコール
8 性脂肪性肝炎 (NASH ; nonalcoholic steatohepatitis) を誘発した NASH マ
9 ウス (C57BL/6J、雄、一群 4 匹) の 3 日後及び健常マウス (C57BL/6J、雄、
10 一群 4 匹) に 12.5 mg/kg 体重の OTA を単回経口投与した結果、NASH マ
11 ウスの体重は、健常マウスに比較して 44%軽く、腎臓重量及び肝臓重量はそれ
12 ぞれ 11%及び 24%重かった。臓器及び体重の変化は、腎近位尿細管細胞の空
13 胞化、変性、壊死の減少と一致していたが、OTA 誘発性肝病変は認められな
14 かった。NASH マウスにおける OTA ばく露量は、健常マウスと比較して $5.65 \pm$
15 1.10 から 7.95 ± 0.61 mg*h/ml/kg 体重に増加し、腎排泄は $5.55\% \pm 0.37\%$
16 から $13.11\% \pm 3.10\%$ に増加した。NASH マウスにおける OTA の総尿中排泄
17 量は 24.41 ± 1.74 μ g から 40.07 ± 9.19 μ g に増加し、腎臓残留 OTA は約 30%
18 減少した。NASH マウスにおける腎臓 OAT アイソフォーム発現 (OAT1~5)
19 は、近位尿細管細胞による OTA 取り込みの減少に伴い約 50%減少した。これ
20 らの結果、NASH マウスが OTA の腎臓分泌及び再吸収が減衰し、OTA の尿
21 中排泄量が増加して腎臓へのばく露(残留)量が減少した。NASH マウスでは、
22 腎臓のすべての OAT アイソフォームが減少し、肝臓では OAT2 のみが減少
23 した。腎基底外側部の OTA 取り込みトランスポーターである OAT1 及び
24 OAT3 は、NASH マウスでそれぞれ 0.37 ± 0.07 から 0.19 ± 0.09 pmol/mg
25 及び 1.02 ± 0.43 から 0.29 ± 0.13 pmol/mg に減少した。NASH マウスの腎
26 臓と肝臓でも、OAT2 の発現はそれぞれ 2.20 ± 0.19 pmol/mg から 1.22 ± 0.46
27 pmol/mg 及び 3.03 ± 0.41 pmol/mg から 2.39 ± 0.30 pmol/mg に減少した。
28 NASH マウスでは、健常マウスと比較して、頂端に発現している腎臓 OAT5
29 が 1.12 ± 0.09 pmol/mg から 0.49 ± 0.19 pmol/mg に減少した。P 糖タンパク
30 質 (P-gp)は、NASH マウスの腎臓組織で、低濃度から約 1.25 pmol/mg に増加
31 した。さらに、NASH マウスでは腎臓 MRP2 が健常マウスと比較して約半分
32 に減少したが、肝臓 MRP2 は NASH マウスで増加した。能動的な有機アニオ
33 ンの輸出を促進する BCRP、MRP3 及び MRP4 は、NASH マウスと健常マウ
34 スの間で変化しなかった。

1 (文献リスト No.389)

2 ラット (F344、雌雄、一群 6 匹) に 0、0.21 又は 0.50 mg/kg 体重/日の OTA
3 を 7 又は 21 日間経口投与した結果、ATP のエネルギーを用いずに共輸送、逆
4 輸送及び単輸送をするトランスポーターの SLC (Solute-carrier) ファミリー
5 の SLC22 ファミリーで近位尿細管基底側に存在する OAT2 及び OAT5 が雄
6 より雌で多く発現した。消化管における両親媒性薬物の吸収に關与する
7 SLCO1 ファミリーの OATP1 (Organic Anion Transporting Polypeptide 1)
8 が雌で発現しなかった。OTA は、OAT をダウンレギュレーションしたが、雌
9 の OAT3 遺伝子発現には影響しなかった。OAT のダウンレギュレーションは
10 雄が雌より遅かった。ATP の加水分解エネルギーを利用した能動輸送を行う
11 ABC (ATP-binding cassette transporter) ファミリーで細胞内から細胞外に
12 排泄及び腸管吸収に關与する多選択性トランスポーターの BCRP の発現量は、
13 投与 7 日後で雄より雌が少なく、投与 21 日後で雄が減少して雌が増加した。
14 多剤耐性タンパク質の MPR2 の発現は雄が雌より早く、投与 21 日後の雄の
15 OATP1 がダウンレギュレーションした。これらの結果として、用量及び投与
16 期間に依存して、血漿、肝臓及び腎臓の OTA 濃度が増加した。また、投与 7
17 日後の血漿及び肝臓の OTA 濃度が雄よりも雌で高値を示した。

18
19 (文献リスト No.592)

20 ラット (Wistar、雌雄、各 3 匹) に 5 mg/kg 体重の OTA を単回経口投与し
21 て尿と糞便を採取し試料として測定した結果、8 種類の代謝物が排泄された。
22 8 種類の代謝物は、OTA の 5 種類の水酸化代謝物、OTA の脱塩素化代謝物
23 (OTB)、および 2 種類の OTB の水酸化代謝物が含まれた。尿中の遊離化合
24 物 (OTA) は、 $64 \pm 4.0\%$ で、4(R)-OH-OTA が主な代謝物で 4(S)-OH-OTA は
25 ごく微量 ($0.2 \pm 0.1\%$) しか検出されなかった。OTB の量が多く 2 つのヒドロ
26 キシル化 OTB が検出された。OTA のフェニルアラニン部分が切断されて形
27 成された OT α が、ラットの糞便中に相当量検出されるが同定できなかった。
28 OTA のグルクロン酸抱合体は検出されなかった。

29
30 (文献リスト No.630)

31 ウシ (ホルスタイン、搾乳牛、一群 4 頭 (対照群 1 頭)) に 0 又は 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$
32 体重の OTA を単回経口投与した結果、OTA 及び OT α が尿中に検出され、最
33 大濃度はそれぞれ 1.8 ng/mL 及び 324.6 ng/mL であったが、乳、血漿、その
34 他の組織中には検出されなかった。さらに、複数のスーパーマーケットでから
35 無作為に採取した 100 個の牛乳サンプルも分析したが、陽性サンプルは検出さ
36 れなかった。

1 (文献リスト No.200)

2 搾乳牛 (ホルスタイン、42~104 か月齢、520~762 kg、18.4~32.3 kg 乳/日
3 /頭、一群 3 頭) に OTA を含まない飼料で 7 日間飼育後、0.005、0.050、0.1
4 mg/kg 飼料の OTA を 28 日間混餌投与し、さらに 7 日間 OTA を含まない飼
5 料で飼育した結果、0.050 mg/kg 飼料投与群の 1 頭の血漿中に 0.2 µg /kg の
6 濃度で OTA が検出されたが、他のウシの血漿中には検出されなかった。0.1
7 mg/kg 飼料投与群の 1、7、10、14 及び 21 日目の 1~2 頭の血漿中に 0.1 µg/kg
8 の濃度で OTA が検出された。試験期間中に搾乳した乳中からは OTA が検出
9 されなかった。さらに、肝臓、腎臓、筋肉、脂肪及び空腸から OTA を検出し
10 なかった。

11

【事務局より】

以下の、(文献リスト No.190) 及び (文献リスト No.575) については、OTA に係る詳細情報が一部不足していることから、その取扱いについてご検討をお願いいたします。

【小澤専門参考人からのコメント】

(文献リスト No.190)

本論文で用いられた OTA の由来に関する記載がみられない。科学的にインパクトがある結果が報告されているが、本論文を OTA の評価に用いることの妥当性については検討の必要があると考える。

(文献リスト No.575)

本論文は、OTA をラットに 26 週間経口投与し、メタボローム解析を通じて脂肪酸、核酸、糖代謝の変動を測定した。本論文には OTA の投与量、投与期間は明記されているが、OTA の由来についての記述が見当たらない。本論文を OTA の評価に用いるかどうかは検討の余地がある文献と考える。

1

2 (文献リスト No.190)

3 ラット (F344、雄、一群 6 匹) に 0、0.070、0.210 mg/kg 体重/日の OTA
4 を 28 日間(5 日/週)経口投与して投与 0 日目及び 28 日目の糞中の細菌の DNA
5 を抽出し、16S rRNA シーケンス及びショットガンシーケンスを実施し、ブレ
6 イ・カーティス指数を計算し、これらのデータを NMDS プロットした結果、
7 OTA 投与により腸内細菌叢の多様性が減少し、乳酸菌の相対的存在量が増加
8 した。シグナル伝達、炭水化物輸送、トランスポザーゼ、アミノ酸輸送システ
9 ム、ミスマッチ修復など、腸内細菌叢の機能遺伝子の変化が観察された。乳酸
10 菌選択培地を用いて糞便サンプルから分離した乳酸菌がラクトバチルス・プラ
11 ンタラム PFK2 株と 99.8%の相同性を有していた。薄層クロマトグラフィーに
12 より、この株は OTA を吸収はできるが分解はできないことが示された。

13

14 (文献リスト No.575)

15 ラット (F344、雄、一群 6 匹) に 0、0.07 又は 0.210 mg/kg 体重/日の OTA
16 を 2、4、13 又は 26 週間 (5 日/週) 経口投与し尿及び血漿を分析した結果、血
17 清中糖タンパク質、グルコース、アミノ酸及び乳酸、イソ酪酸、アラニン、TMAO
18 (Trimethylamine-oxide)、スレオニン、クレアチニンなどのカルボン酸の濃
19 度に投与群と対照群で相違があった。ただし、用量依存及びばく露時間依存性
20 が確認できなかった。尿中代謝物の変化は、D-グルコース及びミオイノシトール

- 1 ルが増加、ならびにヘキサノイック酸及びペンタンノイック酸が減少した。
- 2 これらは、PCA (Principal Component Analysis) モデルにおいて時間依存的
- 3 反応を示した。