

# かび毒・自然毒等専門調査会

## 第25回会合議事録

1. 日時 平成25年6月21日（金） 10：00～12：09
2. 場所 食品安全委員会大会議室
3. 議事
  - (1) オクラトキシンAの食品健康影響評価について
  - (2) その他
4. 出席者
  - (専門委員)  
芳澤座長、大島専門委員、川原専門委員、久米田専門委員、高鳥専門委員  
渋谷専門委員、宮崎専門委員、長島専門委員、山浦専門委員  
矢部専門委員、山田専門委員、山崎専門委員、
  - (専門参考人)  
能美専門参考人（独立行政法人医薬基盤研究所創薬支援戦略室 コーディネーター）  
梅村専門参考人（国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 病理部  
第一室長）
  - (食品安全委員会委員)  
熊谷委員長、三森委員
  - (事務局)  
本郷事務局次長、山本評価第二課長、前田調整官、松尾課長補佐、  
大曾根課長補佐、岩橋係長、小山技術参与
5. 配布資料
  - 資料1 平成25年度食品安全委員会運営計画
  - 資料2-1 *gpt delta*マウス、ラット遺伝子突然変異試験
  - 資料2-2 オクラトキシンA誘発腎発がん過程における遺伝毒性メカニズム関与
  - 資料3-1 オクラトキシンAの評価書（毒性部分の案）
  - 資料3-2 オクラトキシンAの評価書項目（毒性部分の項目修正案）
  - 資料4-1 オクラトキシンAの暴露状況の知見の整理表
  - 資料4-2 オクラトキシンAの評価書項目（ヒトにおける知見～暴露状況部分の案）

- 資料4-3 国内汚染実態調査結果データ集（オクラトキシンAの暴露状況）
- 参考資料1 オクラトキシンAの国際的な評価状況（概要）
- 参考資料2 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）
- 参考資料3 オクラトキシンAの評価書骨子（全体案）

## 6. 議事内容

○芳澤座長 おはようございます。定刻になりましたので、ただ今より第25回かび毒・自然毒等専門調査会を開催します。

本日は12名の専門委員が御出席でございます。また、本日は専門参考人として、独立行政法人医薬基盤研究所創薬支援戦略室の能美健彦先生、及び国立医薬品食品衛生研究所の安全性生物試験研究センター病理部の梅村隆志先生に御出席いただいております。また、食品安全委員会から2名の委員に御出席いただいております。

本日の会議全体のスケジュールにつきましては、お手元の議事次第をご覧ください。

それでは、議事に入ります前に事務局より資料の確認をお願いします。

○松尾課長補佐 それでは、資料の確認の前に、事務局の組織再編がございましたので、報告させていただきます。

5月16日付で評価課が評価第一課と評価第二課に分かれまして、勧告広報課と情報緊急時対応課が合併しまして、情報・勧告広報課となっております。この再編に伴いまして、かび毒・自然毒の担当は評価第二課に所属することとなりました。

評価第二課長といたしまして、山本が着任しております。

○山本評価第二課長 山本でございます。どうぞよろしく申し上げます。

評価第二課、生物系のハザードを担当するということになりました。よろしく申し上げます。

○松尾課長補佐 また、このオクラトキシンAの評価につきましては、私、松尾のほうで担当させていただくことになりましたので、よろしく申し上げます。

先生方に御連絡をさせていただきますけれども、本年も例年のごとくクールビズということで、5月から10月までの間、服装の軽装を励行させていただいておりますので、御協力のほう、よろしくお願いいたします。

また、マイクを今年度から新しくしましたが、振動に弱いものになっておりますので、できるだけ本体を動かさないように御注意をお願いいたします。

配付資料の確認をさせていただきますが、まず議事次第、座席表、専門委員名簿に加えまして、資料1といたしまして、平成25年度食品安全委員会の運営計画。

資料2-1といたしまして *gpt delta* マウス、ラット遺伝子突然変異試験としまして、能美先生からの御説明資料です。

資料 2-2 といたしまして、オクラトキシシン A 誘発腎発がん過程における遺伝毒性メカニズムの関与ということで、梅村先生からの御説明資料です。

資料 3-1 といたしまして、オクラトキシシン A の評価書の毒性部分の案でございます。

資料 3-2 といたしまして、評価書項目のうち毒性部分の項目の修正案でございます。

資料 4-1 といたしましてオクラトキシシン A の暴露状況の知見の整理表でございます。

資料 4-2 といたしまして、オクラトキシシン A の評価書の項目のうち、ヒトにおける知見から暴露状況部分の案でございます。

資料 4-3 といたしまして、国内の汚染実態調査結果データ集、オクラトキシシン A の暴露状況についてでございます。

あと、参考資料 1 といたしまして、オクラトキシシン A の国際的な評価状況の概要。

参考資料 2 といたしまして、ヒトに対する経口発がんリスク評価に関する手引き、清涼飲料水を対象にしたものです。

参考資料 3 といたしまして、オクラトキシシン A の評価書骨子の全体案を御用意させていただいております。

資料等御不足等ございませんでしょうか。もしありましたら、また御連絡いただければと思います。

今回の評価に関する文献につきましては、お席の後ろの机の上にファイルを用意しておりますので、必要に応じてご覧いただけますようお願いいたします。本日におきましては、2 人に 1 部という形で配付させていただいておりますので、御協力のほどお願いいたします。

傍聴の方に申し上げますけれども、専門委員の先生のお手元にあるものにつきましては、著作権の関係と、あと大部になりますことから、傍聴の方にはお配りしていないものがございます。調査会終了後、事務局で閲覧できるようにしておりますので、傍聴の方で必要とされる場合は、この会議終了後に事務局までお申し出ください。

以上です。

○芳澤座長 それでは、次に事務局から平成 15 年 10 月 2 日食品安全委員会決定の「食品安全委員会における調査審議方法等について」に基づいて、必要となる専門委員の調査審議等への参加に関する事項について報告を行っていただきたいと思っております。

○松尾課長補佐 それでは、本日の議事に関する専門委員の調査審議等へ参加に関する事項について御報告いたします。

本日の議事につきまして、専門委員の先生方から御提出いただいた確認書を確認したところ、平成 15 年 10 月 2 日委員会決定の 2 の (1) に規定する調査審議等に参加しないこととなる事由に該当する専門委員はいらっしゃいません。

○芳澤座長 皆さんから御提出いただいた確認書について、相違はございませんでしょうか。どうもありがとうございました。

それでは、次に事務局から運営計画について説明があると聞いておりますので、この説明をお願いいたします。

○前田調整官 では、お手元の資料 1 の平成 25 年度食品安全委員会運営計画に基づきまして、説明をさせていただきます。

こちらにつきましては、毎年食品安全委員会が年度ごとに決めているものでございまして、1 ページ目の第 1 にございますが、平成 25 年度における委員会の運営の重点事項といたしまして、(2) にございますが、食品健康影響評価の着実な実施、リスクコミュニケーションの戦略的な実施、調査・研究事業の重点化、そして緊急時対応の強化というものを重点事項として挙げているところでございます。

第 2 の委員会の運営全般につきましては、(3) のところですが、食品健康影響評価に関する専門調査会の開催ということで、必要に応じ効率的な調査審議を実施するというところで、②の専門調査会に他の専門調査会の専門委員を招いて調査審議というふうに、本日、能美先生、梅村先生にお越しいただいておりますが、こういった効率的な調査審議を進めていく所存でございます。

そして、(6)の事務局体制の整備としまして、評価第一課、評価第二課ということに分けて評価体制の充実を図っているところでございますし、この来たる 7 月 3 日でございますけれども、委員会設立 10 周年記念事業ということで、3 年ぶりにシュラッター博士をまたお招きしまして、MOE（暴露マージン）についての講演をいただくなど、事業を進めていくところでございます。

それから、第 3 の食品健康影響評価の実施でございますが、1 つはリスク管理機関から評価要請された案件を着実に実施していくということ、そしてもう一つが 3 ページの 3 番にございますけれども、「自ら評価」を行う案件の定期的な点検・検討及び実施ということで、本日の議題となっておりますオクラトキシン A につきましては、4 ページの④にございますが、平成 20 年度決定の本件につきまして、かび毒・自然毒等専門調査会で調査審議を行うこととしているところでございます。

そして、この(3)の「自ら評価」の結果の情報発信ということで、オクラトキシン A につきましては非常にもう評価結果がまとめに近い状況にございますので、今年度中に評価が終了した場合には、その評価結果に関して意見交換会の開催や機関誌への掲載等により、丁寧に情報発信をしていくということを計画に盛り込んでいるところでございます。

その他 5 ページの第 4 の食品健康影響評価の結果に基づく施策の実施状況の監視、そして第 5 の食品の安全性の確保に関する調査・研究事業の推進、そして 6 ページの第 6 のリスクコミュニケーションの促進、そして 8 ページの第 7 の緊急の事態への対処、そして 9 ページの食品の安全性の確保に関する情報の収集、整理及び活用、そして第 9 の国際協調の推進ということで、幅広く今年度も食品安全委員会の運営をしていくということでございますので、その紹介をさせていただきました。どうもありがとうございました。○芳澤座長 ただ今、今年度の食品安全委員会の運営計画について御説明いただきましたけれども、御質問等がございましたらお願いしたいと思います。よろしいでしょうか。

それでは、本日の議事次第に従いまして、議事を進めさせていただきます。

まず議事の 1 でございますけれども、オクラトキシシン A の食品健康影響評価について。本日は、食品安全委員会が自ら行う食品健康影響評価としてオクラトキシシン A の審議を行います。

まず事務局から説明をお願いします。

○松尾補佐 オクラトキシシン A につきましては、平成 21 年 3 月に「自ら評価」、今座長からありましたけれども、選定プロセスに従いまして、既に評価済みの DONNIV（デオキシニバレノール及びニバレノール）とともに選定をされております。これまで 4 回の専門調査会を行っておりまして、これまでに 1 の背景から 3 の安全性に係る知見のうち概要の 1、実験動物における体内動態部分まで審議が進んでおります。

平成 23 年 3 月の 20 回の専門調査会に毒性部分の評価書の案について御提示をさせていただきましたが、その後審議するというところでございました。今年の 3 月の第 24 回専門調査会で、この毒性部分について次回から審議をするということをアナウンスさせていただいて、今回に至っております。

オクラトキシシン A (OTA) の遺伝毒性に関する論点整理を説明させていただきますと、参考資料 1 として配らせていただいておりますが、まず EFSA におきましては、最新が 2010 年になりますけれども、実験動物を用いましたがん原性試験におきましては、げっ歯類において腎臓を標的とする発がん物質である十分な証拠があるとされております。ただ、遺伝毒性試験におきましては相反する結果もあるけれども、Ames ネガティブ、染色体試験ではポジティブの結果が得られております。

一方で、OTA の DNA 付加体について現時点でまだ確認がされていないということ、またヒトにおきまして発がんへの影響に関する疫学データがまだ不足しているということ、また OTA の発がんメカニズムについては、細胞の酸化損傷が関係する可能性が示されていることもありまして、現時点では閾値のある発がん物質としてのオクラトキシシン A のリスク評価が EFSA では実施されております。

また、JECFA については最新が 2007 年になりますけれども、オクラトキシシン A の発がんメカニズムについては、これまでの遺伝毒性と非遺伝毒性の両方作用が検討されましたが、結論が出なかったことから、これまでの PTWI を変更する科学的証拠はないというふうに現時点ではされております。

また、IARC におきましては、2B、ヒトに対して発がん性の疑いがあるものと区分されております。

そういった中、2011 年におきまして、本日御発表いただきます梅村先生のグループから、*gpt delta* ラットを用いました *in vivo* レポーター遺伝子アッセイの結果、発がん用量のオクラトキシシン A を投与した場合、ラットの腎臓髄質外帯に特異的に染色体欠損が誘導されていることが示されております。しかしながら、部位特異的な遺伝毒性につきましては、量的質的にどの程度欠損を生じているか、もしくは欠損を生じるメカニズムといった、さらに検討するものがあるところでございます。

以上でございます。

○芳澤座長 これまでの経緯について御説明いただきましたけれども、それでは本日は議事の 1 のオクラトキシシン A の食品健康影響評価について、主に毒性部分、特に遺伝毒性、発がん作用について集中して審議をいただきたいというふうに思いますが、先ほど御紹介のあった *gpt delta* ラットを用いた新たな遺伝毒性の研究が審議の中心になるかと考えております。そこで審議の流れとして次のように考えております。

まず本日、専門参考人として御出席いただいている *gpt delta* マウス、ラットの開発者であります能美健彦先生に、*gpt delta* マウス、ラット遺伝子突然変異試験として *gpt delta* マウス、ラットの特徴について御説明いただいて、それに引き続いて同じく専門参考人の梅村隆志先生に、オクラトキシシン A の誘発腎発がん過程における遺伝毒性メカニズムの関与というタイトルで御研究の概要について御説明いただきたいというふうに思っております。これがまず第 1 であります。

これに引き続いて、事務局が準備しております毒性部分の評価書案について、事務局から説明をいただいて、それら全体を通じまして各専門委員からの補足説明やら御意見を出していただいて、評価書案をまとめていきたいというふうに考えております。

なお、評価書をまとめるに当たりまして、梅村先生の新たな知見を踏まえながら、オクラトキシシン A の毒性部分をどのように考え、評価を進めていくのか、発がんの閾値があるとみなすのか、ないとみなすのか、発がんメカニズムはどのように考えたらいいかという点について重点的に審議を行いたいと思っておりますので、その趣旨について御理解いただきたいと思っております。

さらに、時間が許す限り、今日は 2 時間と限られておりますけれども、時間が許す限り、次回の調査会において御審議いただくヒトにおける知見、暴露状況のまとめ方、これについて審議を行いたいというふうに思っております。

それでは、専門参考人の方から御説明をいただきますが、御質問については両専門委員の説明、並びに新たな知見を踏まえた評価書案の毒性部分の取りまとめを事務局のほうから説明いただいた後、あわせて質疑等を実施したいというふうに考えておりますので、よろしく願います。

それでは、まず能美先生のほうから御説明をお願いします。

○能美専門参考人 今、御紹介いただきました医薬基盤研究所の能美でございます。

私のほうのテーマは、*gpt delta* マウス、ラットの概要、特徴について御説明することです。

こちらに書いてありますのがマウスバージョンで、こちらがラットバージョンで、今ラットについては 3 種類のバックグラウンドに基づいてできておりますけれども、こちらのマウスのほうでのデータがたくさんありますので、最初にマウスについて基本的なことを説明させていただいて、最後にラットについて若干御説明させていただきたいと思っております。

最初に、今、事務局のほうからも閾値の問題が取り上げられたわけですがけれども、一般に遺伝毒性発がん物質の作用に閾値はないというふうに言われて、その物質が遺伝毒性発がん性を持った場合には閾値のない物質として規制が行われるというのが一般的なわけですがけれども、もう少し細かく、あるいは厳密に申し上げますと、この遺伝毒性という言葉と、もう一つ、変異原性という言葉があります。WHO などでは変異原性という言葉と遺伝毒性という言葉に分けて使っておりまして、簡単に言いますと遺伝毒性のほうがより大きな概念で、変異原性のほうがより小さな概念。変異原性物質というのは一般的には娘細胞、あるいは次世代に伝わる遺伝情報の変化を誘発する化学物質や物理的因子ということで、基本的には DNA に反応するような、そして次の世代に伝わるような変化を起こす、そういう性質を持った物質や物理的因子の性質というのを指しております。

それに対しまして遺伝毒性というのはもう少し広い意味で、例えば染色体の分裂などにかかわるタンパクなどに作用して、いろいろな染色体異常を起こすような、そういう必ずしも DNA に損傷を起こさないような物質も含めて遺伝毒性というふうに呼んでおります。ですので、厳密に言いますと、遺伝毒性発がん物質とは言わずに、むしろ DNA と反応して変異原性を示す発がん物質には閾値がないというふうにしたほうが明確ではないかというふうに思うところです。

これに基づきまして、遺伝毒性試験、評価書にもいろいろな遺伝毒性試験が出てくるわけですがけれども、DNA と反応するような、そして次の世代や娘細胞に変化を伝える、そういうことを見ている変異原性試験、例えばよく出てきます Ames 試験や染色体異常試験、*in vitro* の試験、それから *in vivo* の小核試験、それから今日御説明いたしますトランスジェニックの試験、こういうものは基本的には DNA に対する反応性を見ている試験というふうに言うことができますと思います。

これに対して、インディケーター試験と呼ばれているものにはポストラベルというような DNA に付加体がつくとか、あるいはコメットアッセイの場合、もちろん DNA に対する損傷も検出しますがけれども、それ以外のものも検出する。あるいは、不定期 DNA 合成試験、これは DNA に対する傷を見ているということで、次の世代に伝わるかどうかというのは、まだこちらではよくわからない、そういうふうな試験というものがあるわけです。

閾値があるかどうかということを見る場合には、やはり DNA に反応して、それが変異として次の世代、あるいは次の娘細胞に伝わっていくかどうか、そこを見るという点が非常に重要だというふうに今考えられているわけです。

このトランスジェニック試験はもう既に十数年前に私どもで作製したわけですがけれども、突然変異というのは非常にまれな現象でありまして、例えば、がん細胞のようなクローナルが増えてきたものの場合ですと、例えば *ras* 遺伝子の同じ変異があるわけですが、例えば私たちの体に突然変異が起きたとしても、そこから細胞をとってシーケンスしても、その変異というのは見えないわけです。ですので、何らかのセレクション、選択方法を使ってまれに起こる変異というのを敏感に検出していかなければいけないという意味で、普

通のマウスやラットではなくて、ここの中にトランスジーンという、この場合にはλファージを体の中にトランスジェニックとして入れてやって、そういう特殊なマウス、ラットをつくって、それを化学物質で処理した後に、いろいろな組織から肺や、今回ですと腎臓ですとか肝臓、そういうところから DNA を抽出して、そのλファージを *in vitro* パッケージングという方法で回収して、*gpt* アッセイ、*Spi*<sup>-</sup>アッセイ、こういう選択法である特定の突然変異を検出する、そういう仕組みをとらないと、なかなかまれな突然変異というのは検出ができないわけです。

*gpt* アッセイというのを我々はこのマウス、ラットでは使っているわけですが、この *gpt* というのはグアニンホスホリボシルトランスフェラーゼという、そのプリンのサルベージに関係した遺伝子で、ここに変異がありますと 6-thioguanine という毒物に対して耐性になる、そういうある特殊な酵素の遺伝子です。この遺伝子のコード領域というのは 500 塩基ぐらいですので、非常にシークエンスしやすいという意味でこのマーカーを使っています。

この *gpt* アッセイを使いますといろいろな、ここに書いてありますようないわゆる点突然変異、塩基置換、例えば G が A になるとか、A が G になる、そういうものが検出できます。それから、あと短い欠失、tandem 塩基置換というふうなものを検出することができます。これは今までにとられたマウスでの *gpt* の変異スペクトルなんですけれども、ここですと肝臓にγ線を当てると G から T が増えるとか、あるいは PhIP、焼け焦げですと T が小腸で増える。いろいろな臓器でいろいろな小さな変異を検出することができる、そういう特徴があります。

それに対して 2 番目の選択法であります *Spi*<sup>-</sup>セレクション、これが今日のオクラトキシン A で非常に重要になるわけなんですけれども、これはもう少し違ったタイプのいわゆる欠失変異を検出できるような選択法です。

このスライドはその原理を示していますが、λファージというのは大腸菌に感染するウイルスで、大腸菌を溶かしてプラークという溶菌斑をつくります。しかし、大腸菌の中にあらかじめ P2 ファージというのが大腸菌の染色体の中に入っていると、こういうのは P2 溶原菌と言いますが、一種占有権を主張してプラークができないわけです。こういうことを P2 による干渉ということで、P2 Interference というふうに呼ばれています。

しかし、λファージの中の *red* と *gam* という 2 つ隣り合った遺伝子が両方とも欠失した、そういう欠失変異体は、この P2 溶原菌にプラークをつくることができます。ですので、この *Spi*<sup>-</sup>アッセイ、P2 溶原菌を使った選択法をとりますと、この *red* と *gam* という 2 つの遺伝子が同時に不活化した、多くの場合にはその領域が欠失した、そういう変異体をつかまえることができるわけです。

実際にこの *Spi*<sup>-</sup> selection を使ってみますと、炭素線、もう少し後で出てきますけれども、γ線などでは、あるいは UVB、紫外線、マイトマイシン C などはこの赤に書いて

ありますけれども、1 キロから 10 キロ程度の欠失変異体というのが検出されてきます。

それに対して、PhIP、APNH、これは焼け焦げのたぐいですが、こういうものだと、こういう大きな変異というのは、欠失変異というのは余り出てこずに、マイナス 1 塩基の欠失変異がたくさんとれてくるというふうな特徴があります。ですので、*gpt* と同じとは言いませんけれども、Spi<sup>-</sup> selection を使うといろいろなタイプの欠失変異体をとれてくるという特徴があります。

実際にやってみますと、その Spi<sup>-</sup>変異というのはいろいろな大きな欠失変異、今のγ線などで見えたものと、それ以外にマイナス 1 のフレームシフト、これは *gam* 遺伝子、非常に細かい話になりますけれども、*gam* と *red* というのはこういうふうに 1 本の mRNA からトランスレーションされてくる一種のオペロンを組んでいるわけです。ですので、この *gam* の遺伝子の中にマイナス 1 のフレームシフトとか、それからまれですが、塩基置換でストップコドンをつくるような場合には、翻訳が、これにリボソームがくっついて、ずっと mRNA の情報をタンパクのほうに翻訳していくわけですが、途中でとまってしまいますので、この下流にある *redB*、*A* の翻訳というのが進まないために、こちらの遺伝子には別に変化はないのですけれども、タンパクが出てこないという意味で、機能的に *gam* と *red* 両方の機能がとまってしまうので、Spi<sup>-</sup>というフェノタイプを示すというふうな特徴があります。ですので、こういう大きな欠失変異も検出しますが、マイナス 1 のフレームシフトも検出しますし、まれですが *gam* 遺伝子内のナンセンス変異、ストップコドンをつくるような変異も検出すると言うことができます。自然突然変異では主にこれが多く出ます。

これまでいろいろやっていますと、*gpt* と Spi<sup>-</sup>とをやっていくと、Spi<sup>-</sup>でだけ陽性になったものというのは、私たちがやった中では炭素線というのが唯一です。炭素線というのは宇宙線、宇宙放射線、炭素を加速してできてくるとときの変異でありまして、この場合にはちょうど大きな大砲の弾が飛んでくるように染色体を物理的に切っていくので、大きな欠失が出てくると。若干こちらの *gpt* も上がるのですけれども、有意にはコントロールに比べて上がらないと。それに対して X 線やγ線といういわゆる低 LET 放射線の場合ですと、水の活性化、活性酸素をつくっていきますので、塩基の部分の酸化損傷が起きるので *gpt* が上がってくる。この場合には、こちらの Spi<sup>-</sup>のほうは有意差はないですが、若干は上がってくるという点で、炭素線というのは水の活性化をせずに Spi<sup>-</sup>の変異、染色体の切断を起こすという意味で非常に特殊な例であります。

ここに出ていますのはその Spi<sup>-</sup>によって出てくる大きな欠失変異体の特徴でありまして、これは紫外線によって出てくる欠失変異体ですが、その *red*、*gam* の領域を含んだ欠失変異というのはたくさん出てきます。特徴としては、こういう末端にホモロジー配列があるものとかかなり出てきて、ないものもあるのですけれども、こういう特徴があります。大きさとしては、1,000 塩基から数千塩基。λファージを使っていますので、余り大きいものは、10 キロ以上のものはとれないのですけれども、こういう数キロオーダーの欠失

変異体がとれてきます。

そのメカニズムですけれども、放射線の場合ですと物理的に染色体を切っていくわけですが、それに対してこういう紫外線などの場合ですと、これは付加体ができて、付加体のところで DNA の複製がとまってしまいます。これが原因になって二本鎖の切断が起きて、ヌクレアーゼによって一部がりがりと削られて、短いホモロジーを使って、こういったもう一度くっついてくる。非相同組み換えというふうに呼びますけれども、そういうメカニズム、あるいはホモロジーなしにくっつくために、末端にホモロジーを持った欠失変異体とそうでないもの、そういうのが出てくるのではないかというふうに考えています。

それから、マイナス 1 のフレームシフトが起こるといふふうに申しあげましたけれども、この *gam* という遺伝子の中にはこういう同じ A とか G が並んだ配列がたくさんあるものですから、特に *spontaneous mutation* の場合には、こういう同じ、ラン配列と呼びますけれども、同じ配列から 1 塩基抜けるというふうな変異体がたくさん出てきます。ですので、*Spi*<sup>-</sup> の場合には欠失変異体が多いわけですが、やはり分子解析してこういう 1 塩基のフレームシフトなのか、それとも大きな欠失なのかということを決めるということは非常に重要だと思います。

それから、今までマウスのお話をしていましたけれども、マウスにだけ発がんを起こす物質、それからラットにだけ発がんを起こす物質というのが *NTP* というアメリカの毒性プログラムの中で随分明らかになってきました。ですので、マウスに発がん性を示せば必ずラットに起こすというふうなものではないわけです。その種特異性というのがあるということで、2003 年に、これは明治製菓のグループが同じ *EG10*、我々が作り出した *EG10* を *Sprague-Dawley* ラットの受精卵に入れて、トランスジェニックラット、*Sprague-Dawley background* のトランスジェニックラットというのを作製しました。これにベンゾピレンを投与すると肝臓での *gpt* や *Spi*<sup>-</sup> の変異頻度が上がって、ちゃんと感度があるということがわかったわけです。

しかし、ラットにもいろいろな種類があって、特に *F344* というのが発がん実験では非常に汎用されるということで、*Sprague-Dawley* の *gpt* を *F344* に 15 代バッククロスして、*F344* の *gpt delta* ラットというのが明治製菓と衛研と *SLC* との共同研究でできたわけです。

これは *F344* の *gpt* ラットを使った 1 つの実験例で、これは病理部の梅村先生たちとの共同ですけれども、これに *2,4-DAT* というふうな物質を投与しまして、これも肝臓発がん物質でありますけれども、それで突然変異が起こるかどうかというのを調べています。こちら側は *DEN* というニトロソアミンの陽性対照として使っています。

これは肝臓での *gpt* アッセイの結果ですけれども、用量相関的に *2,4-DAT* でもって変異頻度が上がって、*DEN* という陽性対照物質では確かに変異頻度が上がっていますということです。これは *Spi*<sup>-</sup> についても同じようなアッセイをやりますと、*Spi*<sup>-</sup> の変異頻度もこういうふうにあがってきますということです。

この場合の Spi<sup>-</sup>のシーケンスでやってみますと、この物質によって誘発される Spi<sup>-</sup>変異の多くはマイナス 1 のフレームシフトというのが非常に多くて、余りラージ欠失というのはこの場合には出てこなかったということで、先ほど例を示しましたがけれども、焼け焦げなどと比較的よく似たスペクトラムで、炭素線などとはちょっと起こるメカニズムが違うだろうということがここから示唆されるわけです。

まとめといたしまして、トランスジェニック遺伝子突然変異試験は、マウス、ラットの全ての臓器、組織で突然変異を検出でき、変異を分子解析することができる変異検出系であると。 *gpt delta* マウス、ラットで用いられる *gpt* アッセイは、主に塩基置換変異などの点突然変異を検出し、Spi<sup>-</sup>アッセイは主に欠失変異を検出すると。それから、突然変異のメカニズムを知るためには *gpt*、Spi<sup>-</sup>変異体の分子解析が重要である。それから、*gpt delta* マウスは C57 を背景とし、ラットのほうは S.D.,F-344、それから最近 Wistar-Hannover ができまして、遺伝的背景として樹立されている。それから、F344 ラットは発がん試験に汎用されているため、F344*gpt delta* ラットは試験化合物が発がんの標的臓器に突然変異を誘発するか否かを検討する際に有用であるということです。

以上です。

○芳澤座長 どうもありがとうございました。

それでは、引き続きまして梅村先生のほうから御説明をよろしくお願いします。

○梅村専門参考人 よろしくお願ひいたします。

今回はこのオクラトキシン A に関する実験を幾つか我々の教室のほうで発表しております、その内容について少しお話をということでしゃべらせていただきます。

オクラトキシン A は、先ほど来からお話がありましたように、ラットやマウスに投与すると腎臓に腫瘍を誘発する。しかし一方で、幾つの変異原性試験からは統一的な結果が出てこないということから、この発がん機序に変異原性あるいは遺伝毒性、この辺りは言葉を正確に言わなければいけないのかもしれないのですが、こういう遺伝毒性メカニズムが関与しているのかどうかということを明らかにする目的で、先ほど御紹介のあった能美先生が開発された *gpt delta* ラットを用いて、まず *in vivo* 変異原性があるかどうかを確認しました。

これは最初の実験のプロトコールですけれども、雌雄の *gpt delta* ラットを用いて、OTA を粉末の飼料に混ぜまして動物に自由に摂取させました。濃度は発がんを引き起こす 5 ppm の濃度を用いて 4 週、さらには 13 週間投与させて、動物を解剖して腎臓の DNA を抽出し、そこでの変異原性を確認したということでもあります。

これが結果ですけれども、まずここでは雄だけの結果をお示ししますが、雌も同様なですけれども、*gpt* の変異頻度も Spi<sup>-</sup>の変異頻度にも投与群と対照群の間に変化がありませんでした。また、先ほど来、お話がありました通り、OTA の発がん機序には酸化ストレスが関与している可能性があるということだったので、酸化的な DNA 損傷の 1 つであります 8-OHdG を HPLC で定量解析しました。しかし、いずれの群にも変化はなか

ったということだったのですが、病理組織学的に投与したラットの腎臓を観察しますと、非常に特徴的な変化がありました。

それは、こちら側は腎臓の皮質部分なのですが、それには何の変化もないのですが、それより一段内側の髓質の外帯外層と呼ばれる部分では、このようにアポトーシスや、これが腎臓尿細管の細胞の核の正常な大きさですが、それよりも 2 倍、あるいはもっと 3 倍、大きなカリオメガリーというような病変がこの部分に特異的にあらわれてきて、皮質部やその他の髓質、さらに内側の部分には変化がなく、ここの部分にだけこのような変化が認められたということで、非常にオクラトキシンの病変が部位特異的だということがわかりました。

先ほどお示ししました実験は、全ての腎臓をそのままホモジナイズして、そこから DNA を抽出して、*gpt* 遺伝子なり *Spi*<sup>-</sup> をアッセイしたということで、ではもっと部位特異的な検査を試みようということで、また別の実験を組み、解析を進めました。

これは同じ投与量で、今回は 4 週間。どのような工夫をしたかと言いますと、これ、腎臓の断面ですが、まず腎臓を長軸に沿ってこうやって切りまして、ちょうどここに弓状動脈が見えてくるのですけれども、ここがちょうど皮質と髓質の境ですので、ここを目視で切り取りまして、こういうような形。内側はこの白い部分と、色がここは違いますので、ここからくり抜いて、この 3 つの部分に分けました。結局何かと言いますと、ここはいわゆる皮質の部分であり、ここは先ほど説明しました髓質の外側の部分を多く含む部分であります。実際に病理組織学的にもこの摘出した部分を確認しましたところ、ここにちょうど糸球体がありますので、ぎりぎり皮質部分をくり抜いてある。こちら側にはもう糸球体が見えておりませんので、しかも少しここは違う部分、内帯の部分が入っていますけれども、ほとんどが先ほどお示しした OTA のターゲットである部位を含む部分であるということを確認しました。

次にこの部分から DNA を先ほどと同じように抽出して、*gpt*、*Spi*<sup>-</sup> アッセイを行い、同様にこちらからも抽出して、*gpt* と *Spi*<sup>-</sup> アッセイを行いました。

その結果、まず皮質部ですけれども、やはり *gpt* の変異体頻度も *Spi*<sup>-</sup> の変異体頻度も変化なく、8-OHdG にも全く変化はありませんでした。次に内側の部分、OTA の標的部位であると考えられている部分では、このように *gpt* には変化がなかったし、8-OHdG にも変化はなかったのですが、*Spi*<sup>-</sup> 変異体頻度が有意に上昇しました。この *Spi*<sup>-</sup> の変化が、先ほど能美先生がお話しされたような 1 塩基の欠失なのか、さらにもっと大きなサイズの欠失が起きているのかを調べるために、実は先ほどのこの実験自体は n=10 でやっていたんですが、この結果は頭から 5 匹分だけを使ったデータでしたので、全体 10 匹を使って再アッセイを行い、そのスペクトラム解析を行いました。

*Spi*<sup>-</sup> のスペクトラム解析というのは、先ほど少し能美先生からもお話があって、私が改めて説明する必要はないのですが、*red* と *gam* の両方にまたがるような変異、つまり両方の遺伝子が不活化しないと、*red/gam* 蛋白が不活化しないということから、上流の

*gam* に 1 塩基が欠失すればフレームシフトが起きて、こっちまで不活化するというお話もありましたし、あるいは両方にまたがるような欠失、あるいはもっと大きな欠失があるか、そのあたりを調べていったわけです。

どのようなやり方をするかという、まず一番短い 5 キロ塩基で、このあたりからこのあたりが保持されているかどうかを確認する。この部分だけで PCR をかけて、もし PCR が動けば、この部分は保持されていて、そのまま増えていくということになります。例えば、5 キロでやりますと、これはちょうど 5 キロ塩基のところなのですが、コントロールを見ると、例えばこうやって全て 5 キロ塩基のところ PCR 産物が出てくるので、このコントロールのこのものについては、ここは正常に維持されているし、長さもちょうど 5 キロなので、中に大きな欠失変異はないというふうに考えられるという訳です。

OTA 投与の個体でやりますと、ここに 2 つ例があるのですが、全く増えてこない。この全く増えてこないということは、ここはもう落ちている可能性があるということ。でも、例えばこのように増えてはくるけれども、ずっと短くなっているということになると、この辺は維持されているが、中に 5 キロ塩基以内の欠失が入っているというふうに考えられるわけです。

さらに、全く増えない部分をもう少し広い、14 キロ塩基まで広げて PCR をかけたのがこの結果で、個体としては上記のものとは一致していないのですけれども、例としてここにお示ししてありますけれども、14 キロ塩基になると増えてくる。増えてくるけれども、全長としては短くなっているというのが分かります。

この例は本当はここにバンドがあるのですが、例えば、14 キロでも見つからない場合は 21 キロまで広げてやるというような形で Spi<sup>-</sup>変異体のスペクトラム解析をしていくわけですが、PCR 産物ができれば、これをダイレクトにシーケンスして、どのような変異が入ったかというのを調べていくということで、先ほどの OTA で上昇しました Spi<sup>-</sup>のスペクトラム解析の結果がこのデータで、ちょっとこのデータはハンドアウトのほうでは、まだこのデータは論文好評されていけませんので、発表のときだけということで御紹介させていただきます。

結果なのですけれども、先ほど能美先生からお話があったような 1 塩基の欠失は、これは G か C が単独に、ここらは GG とか AAA となっている部分で、1 塩基の欠失がどのくらいの頻度で起きたかということと、あるいはもっと長い部分が欠失した、2 塩基から 1 キロ塩基、1 キロ塩基以上というような形で分けて解析いたしました。そうするとここでも明らかなように、1 キロ塩基以上の欠失が約 5 倍近く OTA 投与群で増えていたと。

その内訳なのですけれども、ここに書いてありますが、大体の位置をあらわしているのですけれども、例えばこの個体では約 4,000 塩基の欠失がこの *gam* の途中からこのあたりまでドスンと落ちていたということがわかったというようなことがここに示してあるわけです。

このように、恐らく OTA で起きた Spi<sup>-</sup>アッセイ陽性の内容は、このような 1 キロ塩

基以上の大きな欠失が関与しているのではないかとということがわかりました。

今までの結果をまとめさせていただきますと、最初の評価では腎臓全体を使って検索しましたが、その結果として *in vivo* 変異原性に変化がなかった。また、酸化的 DNA 損傷も変化がなかったのですが、こういうふうには外帯外層、ちょうどこの部分あたりに特徴的な部位特異的な毒性変化が認められたということです。この部位特異的な変化は、OTA に特異的なトランスポーターに起因しているというようなことが既に言われています。

一方で、部位ごとに *in vivo* 変異原性を行ったところ、その非標的部位である皮質では、腎全体でやったときと同じように全く変化がなかったのですが、この外帯の部分だけをとってきた DNA で検査をしますと、*in vivo* 変異原性が陽性になり、またスペクトラム解析からそれらが 1 キロ塩基以上のラージ欠失によるものである可能性が示されたわけです。しかし、8-OHdG はやはりこのところでも変化がなかったということで、OTA による欠失変異の誘導というのは、酸化的 DNA 損傷が関与していないのではないかと我々は今考えています。

次に、この部位特異的なマイクロアレイの結果をお示しします。

こちら側、COR と書いてあるのは皮質のことで、OM と書いてあるのは外帯外層、すなわち標的部位であるということで、特に DNA の傷害や修復、細胞回転、あるいはアポトーシスなどに関連した遺伝子に注目してデータを解析していきました。

その結果、例えば、これは全体としてそれぞれ対照群と投与群の皮質同士、対照群の髄質外帯と投与群の髄質の外帯同士を比較したときの遺伝子発現の増減のことなのですが、ちょうど標的部位の外帯部ではこのように発現が上昇した遺伝子がこのぐらいあったということでありまして。その内訳を見ますと、この二重鎖切断の修復に関するような遺伝子が特に上昇している、あるいは乗り越え修復に関与する遺伝子も動いていたということで、特にこの遺伝子の中から重要と考えられるような遺伝子についてはさらに RT-PCR で確認をいたしました。そうすると、やはり二重鎖切断にかかわるような遺伝子群、あるいはそれを抑制するような遺伝子群では逆に減少するような傾向が見てとれました。

同時に、細胞回転に影響を与えるような細胞増殖を進めるような遺伝子群や、逆にその細胞周期をとめるような遺伝子も同時に増加しているということがわかりました。これも注目する幾つかの遺伝子について RT-PCR で確認したところ、やはり細胞の周期を動かすような遺伝子群が、少し皮質部でも動くのですが、標的部位で明らかな変化が認められておりましたし、またこれは G2/M 期で細胞周期をとめる遺伝子と考えられていますけれども、やはり外帯部で有意な変化となったわけでありまして。

そこで、これまでの結果から二重鎖切断が起きている可能性がその修復酵素が動いているという事実から考えられたので、全く別の実験を組みまして、これはまだ非公表のデータなのでハンドアウトには載せておりませんが、今度は OTA のそれらの変化に対して用量相関も見たいということで、3 用量の OTA、この 210  $\mu$ g、今度は強制経口投与したのですけれども、強制経口のこの用量が大体換算しますと 5 ppm を飼料に混ぜて

投与したときとほぼ同様の量というふうに考えられている量でありまして、その 3 倍と 3 分の 1 の量をそれぞれ強制経口投与で週 7 日間、4 週間投与したということです。

なぜ強制経口を投与したのかといいますと、コメットアッセイを同時に実施する理由から、こういう実験プロトコールにしました。コメットアッセイは、能美先生のお話の中でも出てきましたけれども、DNA 鎖切断の指標の 1 つということから、二重鎖切断が起きている可能性を考え、まず行ってみました。

その結果ですけれども、このように中間用量までは用量相関性に上がってくるのが、一番上は少し毒性影響が出ていて、少し下がっているのだろうと今は考えていますが、発がん用量を含むこの中間用量と下の用量では、きれいに有意な上昇が認められました。

二重鎖切断が起きている可能性があるということに加え、その修復酵素も動いていたということで、まず二重鎖切断が起きたときに最初に起きるヒストンのリン酸化が、H2X のリン酸化というのがまず最初のイニシャルステップなのですが、そのタンパクがどう動いているかというのを調べてみたところ、この発がん用量を含む中間用量と高用量でこのように発現は高まっていると、H2X がリン酸化されているということがわかりましたし、これを免疫染色で調べたところ、こちらは対照群で、これは先ほどの部位、つまり髄質の外帯外層部のところですが、このように核が H2X に強陽性所見を示すことがわかりました。

また、その二重鎖切断が起きたときに修復していく過程は、相同組み換えと非相同組み換えに分かれていくのですが、相同組み換えのほうの遺伝子が動いていたので、その代表的な遺伝子として *Rad51* を取り上げて、そのタンパクを調べたところ、やはり中間用量、発がん用量のあたりからこのように強く発現していることがわかりました。

さらに、先ほど言った相同組み換えに関する遺伝子群と非相同組み換えに関与する遺伝子群を比較して、これは RT-PCR で調べただけですけれども、このように相同組み換えのほうの遺伝子群が有意に動いていることがわかりまして、非相同のほうはほとんど動いていないということがわかりました。

これらの結果をまとめますと、OTA によるまず最初の DNA ダメージは恐らく二重鎖切断ではないかということは今考えております。その理由は、二重鎖切断が生じると特異的に起きてきますこのヒストン H2X のリン酸化が確かに増えていたということ、さらには相同組み換えの修復遺伝子である *Rad51* もタンパク量として増加していること、その他の関与する遺伝子群もメッセージレベルですが上昇が確認され、二重鎖切断のリペアに対して抑制的に働くと考えられている遺伝子の減少も、メッセージレベルですけれども、明らかになったということから、恐らくこのような経路が予想されております。

その結果、同時に細胞周期が回っていたということもありますので、こういう遺伝子への傷害に対して細胞増殖が加わることで、発がんが起きているのではないかというふうに今は予想しているわけでありまして。

細胞増殖のほうでは、このように細胞を回すほうと止める両方がメッセージレベルです

けれども、増えていたということから、恐らく止めておきながら回しているの、どんどんこういうふうな、ちょっと絵をお見せしたと思いますが、核が大きくなってしまふような、分裂の異常みたいな形の細胞がこのようなメカニズムで起きてくるんだらうというふうに今考えています。またアポトーシスも幾つかの関連遺伝子がかまっています、恐らくこういう機序で起きているんだらうというふうに考えております。

このあたりは p53 が多く関与していて、今回はちょっとお話を省略させていただきましたが、p53 の関与がこの機序の中ですごく疑われたので、やはりこれも能美先生たちが開発された p53 ノックアウト *gpt delta* マウスを用いた実験を既に行っておりまして、これはもう今年の論文に投稿しておりまして、簡単に説明しますが、マウスにおいても同様に、マウスではさすがに腎臓が小さいものですから、あの部位のところだけとってこれないということで、腎臓全体を使いますと、野生型のマウスでは変化はないのですが、p53 ノックアウトのほうでは、腎臓全体でも Spi<sup>-</sup>だけが上昇してくるということで、ここで報告したのはそこまでののですが、現在はそのスペクトラム解析などを加えて研究を進めているというところでございます。

以上です。

○芳澤座長 どうもありがとうございました。

次に、事務局のほうから毒性部分の評価書案について、その内容をかいつまんで説明をお願いしたいというふうに思います。よろしく申し上げます。

○松尾課長補佐 それでは、資料 3-1 に基づきまして、説明をさせていただきます。

項目がありますけれども、あけていただいて 2 ページ目、まず急性毒性ですけれども、急性毒性におきましては表 1 に示しておりますが、イヌ及びブタが感受性が高く、ラット、マウスは感受性が低い種であるということがこれまで示されてきております。

また、15 行目からの単回強制投与試験におきましては、膀胱、胃、腸管、心内膜下、脾臓、肝臓に局所出血、脾臓、脳の脈絡叢、肝臓、腎臓、心臓において線維素血栓が認められておりまして、播種性血管内凝固症を示しております。また、肝臓の肝細胞、リンパ細胞の壊死、消化管の絨毛の萎縮を伴う腸炎並びにネフローゼが見られております。

26 行目から、フェノバルビタールと 3-メチルコラントレンを投与した結果につきましては、OTA を強制経口投与した場合の LD<sub>50</sub> の増加が見られております。また、ミクロソームのモノオキシゲナーゼ阻害剤、ピペロニルブトキシドを投与した場合に LD<sub>50</sub> の減少が見られております。

また、3 ページの 2 行目ですけれども、ホルスタインにおきましても単回投与量 13 mg/kg を数ミリ上回るところで致死的な量が見られるというふうに推察されております。

亜急性毒性ですけれども、7 ページ目、3 行目から、マウスにおきまして、肝臓及び腎臓で濃度依存的な DNA、RNA の有意減少、並びに総タンパク質量、酸性、塩基性、中性タンパク質量の減少が見られております。また、7 行目で、精巣における脂質過酸化反応の有意な亢進が見られております。また、非酵素性及び酵素性の抗酸化物質の活性は精

巢中で著しい減少が見られております。

14 行目からはラットについての試験ですけれども、2 週間混餌投与におきまして、体重増加抑制及び飼料摂餌量の減少、また最大投与量におきまして、腎臓の相対重量の増加、BUN の投与量依存的な増加、また試験全体で尿量の有意な減少、比重の有意な増加、また尿の pH が通常の 7.0 に対しまして 6.5 まで減少しております。

また、近位尿細管におきまして、好酸性の顆粒を有した上皮細胞が認められておりまして、また核の凝縮も認められております。また、ヘンレループ下降脚におきまして細胞肥大が認められ、近位尿細管ヘンレループ、遠位尿細管及び集合管におきまして剥離細胞が認められております。

8 ページ目から、90 日間投与におきまして、体重増加率の減少、腎臓の相対重量の減少が認められておりますが、雄の最高用量を除きまして対照値まで回復も確認されております。また、近位尿細管上皮細胞におきまして、巨大核細胞及び好酸性変性細胞の増加が認められております。また、最大用量におきまして、近位尿細管の上皮細胞の剥離及び尿細管基底膜の肥厚が認められております。ただ、90 日間この後回復期間を置きましても、巨大核と尿細管基底膜肥厚については残存しております。

5 行目から、3 日間の経口投与試験におきまして、血中パラアミノ馬尿酸の濃度が有意に増加しております。また、腎皮質切片におきまして、血中パラアミノ馬尿酸の取り込みの有意な減少並びに曲尿細管基底膜の肥厚並びに楕円形に膨脹したミトコンドリアについても確認がされております。

12 行目から、2 日間の経口投与試験におきまして、腎皮質におけるピルビン酸塩からの糖新生が 26%減少しております。またホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼの活性が約 55%低下しております。

肝臓におきまして、このホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼの活性の低下については認められておりません。

また、このホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼの mRNA 量につきましては、腎臓で減少しておりますが、肝臓では減少していないことが確認されております。

21 行目、3 日から 5 日間の摂取試験におきましては、poly(A)<sup>+</sup>RNA の総量につきまして、腎臓で 50%減少が確認されましたが、肝臓では変化しておりません。

24 行目、8 週から 12 週の経口投与試験におきまして、腎臓におきまして乳酸脱水素酵素、アルカリホスファターゼ、ロイシンアミノペプチターゼ及びγGTP の活性につきましては、有意な減少が認められておりまして、またこれらの物質につきまして尿中におきまして出現が確認されております。

酵素活性につきまして、酵素につきましては増減を繰り返しておりまして、このことから尿細管の損傷と再生が繰り返されていると考えられております。このことは PHA クリアランスの変化においても同様に示唆されております。

9 ページの上のほうになりますけれども、リソゾームに存在する酵素であります N-ア

セチルβ-D-グルコシダーゼの活性が2週間後より尿中で増加を確認されております。ただ、肝臓におきましては影響を受けておりませんでした。

5行目におきまして、16日間の強制経口投与試験におきまして、下痢と鼻汁が認められまして、試験終了前に全て死亡しております。最大投与量において全て死亡しております。

また、腎臓、心臓及び脳の相対重量の増加、胸腺萎縮、前胃上皮の壊死、もしくは過形成並びに副腎の出血が認められております。

また、全てにおきまして、骨髄細胞の減少及び腎臓また腎臓における尿細管の変性並びに再生の変化を伴った変化が認められております。

12行目から、13週の強制経口投与試験におきまして、腎臓尿細管の壊死及び近位尿細管上皮細胞における用量依存的な巨大核細胞が認められております。

また、高用量におきまして、成長遅延及び腎臓の相対重量の減少、また腎臓の皮質、髄質の境界部及び髄質における尿細管萎縮が認められております。

19行目から、10日間の経口投与試験ですけれども、尿中窒素濃度の減少並びに尿容量の増加が認められております。

また、血中総タンパク質濃度と尿中尿素濃度については、対照群より高くなっておりましたが、総脂質とコレステロールの濃度は低下しております。

24行目から、2週間の強制経口投与試験におきまして、腎臓髄質外層外帯の近位尿細管(S3セグメント)におきまして、用量依存的巨大核及び核異形を有する細胞の増加が認められております。

また、最大投与群におきまして、分裂期におきます細胞数が明らかに多く認められております。

また、基底膜上もしくは管腔内におきましては、アポトーシスの細胞が認められておりまして、腎臓で細胞核抗原が用量に依存して増加しております。

ただ、肝臓におきましては、細胞核抗原につきましては増加しておりません。

また、高用量におきまして、尿中トリメチルアミン-N-オキサイドが増加しておりまして、近位尿細管に毒性を示す物質に見られるような、増加しておりますが、グルコース濃度の増加等、典型的な変化は認められませんでした。

38行目、一番最後ですけれども、28日間の経口投与試験におきまして、10ページにありまして、近位尿細管に変性が認められ、血清中のクレアチニン、BUN、ALP、ALT及びMDA濃度が有意に高く、血清の抗酸化作用は有意に低いことが確認されております。

また、アクチンのリモデリング遺伝子であります *advillin* の産生が最も亢進されております。

また、作用機序につきましては、エピジェネティックなものが示唆されると考えられておりまして、この結果から、著者におきまして遺伝毒性によるものではないのではないかというふうな考察がされております。

8 行目におきまして、30 日間の混餌投与におきまして、チロキシン、プロラクチンの血中濃度が有意に減少しております、トリヨードサイロニン、テストステロン、インスリン及びコルチゾールの血中濃度も有意に減少しております。

13 行目から、4 週間の混餌投与試験におきまして、肝臓と腎臓に iNOS が認められておりまして、eNOS 及び DDAH-1<sup>1</sup> の過剰発現が腎臓においてのみ認められております。

また、飼料におきまして、C3D の投与によって、こういった影響の軽減も確認されております。

③ニワトリですけれども、20 行目から、2 カ月の投与試験におきまして、体重の減少、肝臓及び前胃、砂嚢及び心臓の相対的重量の増加、ファブリキウス嚢の相対的重量の減少が確認されておりますし、致死率は 42%でした。

L-フェニルアラニンの投与によりまして、この致死率は減少しております。

26 行目から、14 日間以上の混餌投与試験におきまして、肝臓で肝細胞の硝子様腫大、炎症性単核細胞の浸潤、クッパー細胞の過形成、凝固壊死及び充出血が見られております。

腎臓におきましては、局所の出血、尿細管上皮変性、尿細管腫大、壊死及び間質性腎炎が認められておりまして、糸球体の萎縮も見られております。

ファブリキウス嚢におきましては、軽度の萎縮、髄質リンパ球の減少及び間質結合組織の増加が見られておりまして、脾臓、胸腺におきましてリンパ球の減少が認められております。

32 行目から、42 日間の混餌投与試験におきまして、腎臓、肝臓の相対重量の増加、血清の LDH、 $\gamma$ -GTP 及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼの上昇、腎臓近位尿細管上皮の壊死が認められております。

11 ページに行きまして、すみません、ここ漢字に直さなければいけないですけれども、Hisex Brown の 3 週間混餌投与試験におきまして、相対肝重量の有意な増加が認められております。

8 行目、ウサギにおける 19 日間の投与試験におきまして、乳中のオクラトキシン A の濃度と乳児の血清中オクラトキシン A の濃度との間に直線的な相関が認められております。

12 行目から、ウサギにおける 60 日間投与試験におきまして、腎臓近位曲尿細管上皮におきまして、巨大核細胞及び細胞の基底膜からの剥離が認められておりまして、刷子縁の消失、微絨毛の退化、細胞小器官の消失を伴います細胞質空胞形成、核小体の消失及びクリステの消滅が認められております。

17 行目から、30 日もしくは 60 日間の投与試験におきまして、体重増加の抑制、生存率の低下が認められておりまして、腎臓におきまして、スーパーオキシドジスムターゼ活性及びカタラーゼ活性並びに、肝臓におきましてマロンジアルデヒドの上昇が認められております。

腎臓におきましては、腫大、退色が時間依存的に認められております。

また、ミトコンドリアの変形及びクリステの消失も認められております。

28 行目から、イヌにおきまして 14 日間の経口投与試験におきまして、尿細管壊死及び近位尿細管上皮細胞におけます細胞質空胞化及びミエロイド小体の形成が認められておきまして、胸腺と扁桃腺におきまして、リンパ系組織の壊死も認められております。

36 行目、ブタにつきましては、腎臓に最も感受性のある種と考えられておきまして、腎臓近位尿細管に特異的な形態的、機能的変化がこれまでも報告されております。

12 ページ目におきまして、ブタにおけます 5 日から 6 日の経口投与試験におきまして、尿量の増加、尿比重の低下、尿中タンパク質濃度並びに糖濃度の増加、血中タンパク質濃度及び BUN の増加が認められております。

尿におきまして、LDH、AST 及びイソクエン酸脱水素酵素の濃度が増加しております。

曲尿細管及び集合管の上皮に水腫が認められておきまして、近位尿細管、特に上皮細胞において壊死が認められております。

管腔内には壊死した細胞片及び基底膜から剥離した細胞が認められております。

腸管上皮細胞及び粘膜固有層に壊死が認められ、単球及び好中球の浸潤が認められております。

9 行目から、投与後、9 日、68 日間並びに 4 カ月といった投与試験がなされておりますけれども、用量依存的にパラアミノ馬尿酸の尿細管最大排泄量及びこの排泄量のイヌリンクリアランスに対する割合が減少しております。

また、1 mg/kg 及び 4 mg/kg 投与群におきましては、近位尿細管上皮細胞におきまして障害が認められております。

24 行目から、8 週間もしくは 70 kg、90 kg になるまでの混餌投与試験におきまして、腎臓重量の増加、近位尿細管の構造変化、尿細管の萎縮並びに間質の線維化及び尿細管基底膜の肥厚が認められております。また、若齢のブタで感受性が強いことが確認されております。

31 行目におきまして、5 日間から 3 カ月の混餌投与試験におきまして、近位尿細管上皮細胞に局所的な萎縮や上皮細胞の脱落等が認められておきまして、近位尿細管及び近位直尿細管におきまして、NADPH テトラゾリウム還元酵素活性の低下及びコハク酸テトラゾリウム還元酵素活性の低下が認められております。

13 ページにおきましては、ALP の酵素活性の低下が認められております。

4 行目におきまして、5 日間経口投与試験におきまして、尿細管上皮細胞の脱落が認められております。

8 行目におきまして、5 週間投与試験におきまして、用量依存的な  $T_{mPHA}/C_{In}$  の減少、尿中糖排出量の増加が認められておきまして、腎皮質におけます PEPCK 活性が減少しております。

12 行目におきまして、5 週間経口投与試験におきまして、 $T_{mPHA}$  の有意な減少並びに糖排出の増加及び用量依存的な近位尿細管の機能障害が認められております。

また、腎臓皮質におきまして、PEPCK の活性、ミトコンドリアの $\gamma$ GTP の活性の有意な減少が認められておりますが、肝臓におきましては変化が認められておりません。

19 行目におきまして、合計 5 カ月の飼料投与試験におきまして、呼吸性アシドーシスが認められまして、尿の pH の有意な低下が認められております。

また、近位尿細管上皮細胞における顆粒状及び空胞状変性などの退行性変性が認められまして、間質では線維芽細胞の増殖が認められております。

また、この追加試験におきまして、1 年間投与試験におきまして、近位尿細管上皮細胞の退行性変性及び間質における炎症性単球の浸潤と間質線維芽細胞の異常な増殖が認められております。

以上におきまして、腎臓がオクラトキシン A の主な標的器官でありまして、マウス、ラット、イヌ、ブタにおきまして、用量依存的、時間依存的な進行性の腎症発生を認められております。

慢性毒性、発がん性につきましては、表にありますが、上から 44 週の投与試験におきまして、嚢胞性腺腫ですとか、結節性の腎臓腫瘍の形成が確認されております。

その次の試験におきまして、70 週の投与試験におきまして、腎臓の嚢胞性腫瘍並びに腎臓腫瘍、肝細胞がんの形成が認められております。

その次が、5 から 30 週の投与試験におきまして、肝臓腫瘍の投与が 25、30 週におきまして増加が認められております。

その次が、マウスにおけます 24 カ月の投与試験におきまして、腎臓の良性腫瘍並びに悪性腫瘍に発生が認められております。

ラットにおけます最大 2 年間の強制経口投与試験におきましては、腎細胞がんの発生が、それぞれ 70、210  $\mu$ g/kg の雄並びに雌において認められております。

90 日間のラットにおける投与試験におきまして、髄質外層外帯の近位直尿細管の単細胞死、細胞核の拡大が認められております。

最大 2 年間の混餌投与試験におきまして、発がん率の上昇、腎臓におけるがんが認められておりますが、400 ppb の 2 年間混餌投与試験においての発がんが認められておりません。

2 年間の混餌投与試験におきまして、腎臓がんの発現が認められておりますが、これは NTP が行いましたオクラトキシンの強制投与結果よりも少ない値が出ております。

ブタにおけます 2 年間の混餌投与試験におきましては、細尿管の萎縮、局所的な間質の線維化が認められておりまして、単核細胞の浸潤、NADH-テトラゾリウム還元酵素、コハク酸脱水素酵素活性の減少が認められております。

次に、生殖発生毒性におきまして、まず、マウスにおけます試験におきまして、24 ページになりますけれども、3 行目から、マウスにおけます投与試験におきまして 20%前後の胎児の死亡率が確認されております。

また、変性としまして、脳ヘルニアですとか、奇形の顎及び舌突出、椎骨及び胸骨にお

けます癒合が認められております。

25 ページですけれども、オクラトキシン A の用量依存的な外表奇形の増加が認められておりまして、タンパク含有量が少ないほど増加が確認されております。

11 行目からですけれども、脳重量の有意な減少、大脳皮質の有意に薄いこと、また、小脳症並びにニューロン当たりのシナプス量の減少が認められております。

18 行目におきまして、多指症、無嗅脳症におきまして、神経管欠損が認められております。

24 行目から、ラットにおけます試験におきまして、胎児の死亡並びに胎児の体内吸収が認められております。

また、体重の軽減、鼻の変性、肋骨の彎曲及び胸骨の文節の形成不全が認められております。

26 ページにつきまして、精巣中の  $\alpha$ -アミラーゼ、アルカリフォスファターゼ及び  $\gamma$ -グルタミルトランスフェラーゼ並びに精子形成の不全が認められております。

16 行目におきまして、用量依存的な胚吸収の数がここでも確認をされております。

21 行目から、新生ラット平均数の生存率の用量的な減少が認められております。

また、水頭症等が認められておりまして、これらの 40%については死亡が確認されております。

その他、骨格の骨化不全、腎臓及び胚の奇形が認められております。

27 ページになりますけれども、用量依存的なこちらも生存胎児数の減少、外表奇形、骨格等の異常の増加、脳ヘルニア、頭蓋骨の閉鎖不全、小顎症等の変性並びに水腫、腎臓線維化及び尿細管上皮等の変性等が認められております。

20 行目から、ウサギにおきまして、胎児体重の減少及び生存胎児数の減少が認められておりまして、ラット同様に、水頭症、頭蓋骨の異常等々が認められております。

また、肝臓及び腎臓におきまして、用量依存的な障害の上昇が認められております。

27 行目から、これは Holstein ですので牛ですけれども、乳中にオクラトキシン  $\alpha$  が認められておりますが、流産もしくは胎児死亡については確認されておられません。

次が遺伝毒性ですけれども、35 ページからです。

バクテリアを用いました復帰突然変異試験におきましては、オクラトキシン A の影響はほとんど認められておりませんが、一部陽性が、サルモネラ菌株を用いた試験について認められておりますが、同様の試験において、陰性が認められているものもあることととか、マウスの腎臓ミクロソーム存在下で代謝活性化されたものについては陽性が認められますが、肝臓ミクロソームの存在下では陰性であったことととか、あと、ラット肝臓及び腎臓ミクロソームを用いた試験におきまして陰性が確認されていることと、オクラトキシン A の影響については確認がされていないものが多くございます。

また、24 行目におきまして、ヒト CYP450 を導入しました NHI/3T3 の細胞におきまして、陽性反応が認められておりますが、この結果につきましても、自然発生的な突然

変異の増強の結果ということも考察をされております。

31 行目におきまして、*in vitro* の試験におきまして、ヒトリンパ細胞試験で、染色体の構造異常が観察されております。肝臓及び腎臓の代謝活性の影響は認められておりません。

また、*vitro* の小核試験におきましての陽性反応も確認されております。

姉妹染色分体交換試験におきまして陽性の結果も確認されております。

36 ページの 11 行目から、*in vivo* 試験におきまして、姉妹染色分体の交換試験の陰性が確認されております。

また、腹腔内投与試験におきまして、骨髓細胞における用量依存的な癒合、切断、リンク形成及び欠失といった構造異常が認められております。

DNA 損傷及び修復におきましては、*in vitro* 試験におきまして DNA の一本鎖切断が認められております。

また、DNA の修復反応につきましても、ヒト尿路上皮細胞において確認されております。

また、37 ページにおきまして、これらの結果から、DNA 塩基の酸化修飾をオクラトキシンが誘発していることを示唆していると考察されております。

また、DNA の損傷の増加と活性酸素種の相関が示唆されております。

また、14 行目から、*in vivo* 試験ですけれども、こちらにおきましても DNA の一本鎖切断が認められております。

また、用量依存的な DNA 損傷の増加も認められておりまして、31 行目におきまして、肝臓、腎臓、脾臓の細胞を用いましたコメットアッセイの結果について、全て陽性という結果も得られております。

38 ページですけれども、Spi<sup>-</sup>の変異体頻度の有意な増加並びに点突然変異体頻度が認められておりますけれども、今、先生から説明がありましたように、点突然変異体頻度の有意な増加が認めないような反応についても確認をされております。

○山本評価第二課長 すみませんが、ちょっと説明が長くなっておりますので、一回ここで切って、遺伝毒性のところまでとさせていただきます。

○芳澤座長 時間の関係がありますので、今日の評価書の審議は慢性毒性、それから、(3)の慢性毒性・発がん性、(5)遺伝毒性、それから、(7)腫瘍形成のメカニズム、特に腫瘍形成のメカニズムについて、能美先生、梅村先生にも来ていただいているので、そこに議論を集中したいと思っております。

もし、遺伝子突然変異等の遺伝毒性について御意見があれば、その中で一緒に議論したらどうかというふうに思うのです。ここで一旦切って、それで実質的な評価書の審議のほうに行きましようか、ちょっと説明だけで終わってしまいそうな感じがするので。もし、ここまでの能美先生、梅村先生、それから、事務局からの説明で、もし何か特に御質問等がありましたらお願いしたいというふうに思うのですけれども、いかがでしょうか。

それでは、なければ一応評価書の案について、本来であれば、逐一審議しなければならないのですが、今日は先ほど申し上げましたように、慢性毒性、特に発がん、しかも発がんの中でも、そのメカニズムについてどうしても議論を深めなければいけないと思いますので、そのようにしたいと思います。

その他の急性毒性その他については、もし御意見がありましたら、後日メール等で事務局に寄せていただいて、私のほうでそれらを取りまとめて最終的な評価書に反映したいというふうに思います。

それでは、事務局からの説明はそういうことで、メカニズム、その他の審議のところでもたまた御説明いただくようになるかと思うのでお願いします。

それでは、評価書の中で、(3) 慢性毒性・発がん性について、ページで言えば、14 ページからマウス、ラット等、それから、ブタを使ったのがあります。ここではアメリカの NTP のデータが非常に詳しく書かれております。

ここで何か御意見、御質問等がありましたらお願いします。

よろしいでしょうか。もしありましたら、また後でお願いしたいと思います。

それから、次に 28 ページからになりますが、(5) 遺伝毒性、これは表の 12-1 に *in vitro* の試験、細菌を用いた突然変異、ほとんどがマイナスであるということ、哺乳動物の培養細胞を用いた *in vitro* の試験が表 12-2、それから、30 ページに、表 12-4 として、インディケーター試験、それから、表 13 に *in vivo* の遺伝毒性試験の結果が一応まとめられておりますけれども、この点について特に何か御意見等ありましたらお願いします。

はい、どうぞ。

○熊谷委員長 表 12 の 28 ページです。下から 4 つ目の試験、復帰突然変異。

○芳澤座長 1999 年の論文ですか。

○熊谷委員長 参照 77 という論文です。

これで活性化の方法が 4 通り書いてありますけれども、有のところに +、+、+ とありますけれども、これ 4 種類とも込みなのか、そこの区別がちょっとよくわからないので、わかるような表にさせていただいたほうがいいのかなど。

○山田専門委員 それはそうですね。ちょっと細かく書かなきゃいけないかもしれないと思います。私もこの論文は確認しまして、3 つとも株で陽性になっている条件というのは、マウスの腎臓の S9 とアラキドン酸を使ったという条件のもののみです。あとはそんなに変化はないという条件です。

だから、ここの 4 つの中だと、最後のマウス腎臓 S9+アラキドン酸というのだけにしてもいいかもしれないと思うのですが、実験で活性化に用いているのは、この 4 つなのですけど、実際にこの+に反映されているのは、最後の条件だけですので、それだけ書いたほうが、そうすると、整合性から他のも全部調べてそういうふうを書くようなことになるんじゃないかと思いますが、そのほうがわかりやすいかもしれません。

○芳澤座長 それでは、ここの表での示し方と本文との整合性については、専門委員のほ

うに工夫していただくということでお願いしたいと思います。ありがとうございました。  
ほかは、いかがでしょうか。

それでは、ちょっと先を急がせるようで恐縮ですが、7番目の腫瘍形成の機序、ページでいいますと、42ページからになります。

今日、能美先生、梅村先生に御説明いただいたのですが、まず、この御発表について特に何か御質問等がありましたら出していただきたいというふうに思いますけれども、いかがでしょうか。

はい、どうぞ。

○山崎専門委員 先生の発表、貴重に聞いたのですが、結局、最後に評価する場合、閾値があるかないかになると思うのですよ。

それで、梅村先生の発表で、二重鎖でそこで切断されると、オクラトキシンを与えて、その間にアダクトができるかどうか、例えば、アフラトキシンなんかはアダクトできて、それで発がん物質というふうになると思うのですが、能美先生の最初の DNA と反応して変異原性を示すのが閾値があると、これがこの試験で証明されるのかどうかということになると思うのですよ。

そこで、閾値があるかないかで評価は変わっていくんじゃないかと思うのですが、先生そこはいかがですか。

○芳澤座長 どちらの方からでも、どうぞお願いします。

○能美専門参考人 これは非常に重要な問題だと思います。

今、梅村先生のデータを見させていただいて、確かに二重鎖切断が起きて、あと、変異体の分子解析のデータを見させていただいて、確かに二重鎖切断の結果として、ああいう欠失変異体ができているんだな、そこはそのとおりだなと思うのです。

ただ、その原因となる二重鎖切断がどうして起きたのかという、そこがやはりまだよくわからないというふうに思います。

ですので、一般的に付加体ができ二重鎖切断が起きる。先ほどの私のスライドですと、紫外線の例を挙げていましたけれども、あるいはアフラトキシンなどですと、付加体ができるところで、複製しようとして、複製がとまってしまうので、その結果として二重鎖切断が起きるとするのが一般的なのですが、そういう場合ですと、大概 *gpt* の変異頻度も上がってきますので、今回、またちょっと違ったメカニズムで起きているんだろうというふうに推測しています。

梅村先生のスライドを見せていただきますと、いろんな相同組み換えに関係した遺伝子がたくさん出ていますので、あくまで推測ですが、あと **G2/M** でとまっていますので、複製が済むところまでは正常に起きて、そこで何らかのメカニズムで二重鎖切断が起きて、それを直すために相同組み換えが活性化しているのかなというふうに思います。

ですから、そこで相同組み換えでうまく直らなかったものについては、両鎖が変な形でくっついて欠失変異体をつくっているんだろうと思うのですが、ただ、先生の御質問にあ

るような、一番最初のイベント、二重鎖切断が一体なぜ起きてくるのかというのは、私もまだちょっとよくわからないというところです。

ですから、一般的な付加体ができる、その結果複製がとまって、二重鎖切断が起きたというのは、またちょっと違ったメカニズムなんじゃないかというふうに思います。

ただ、それが一体何なのかというのが、そこがまだよくわからないというところです。

○芳澤座長 梅村先生のほうから何か補足をお願いします。

○梅村専門参考人 私も同感ですが、なぜ二重鎖切断が起きるのかというところが、何しろ重要なポイントで、付加体量をはかるというのも 1 つのアプローチではあったのですが、なぜやっていないかという、なかなか測定が難しくてはかれないというのが現状で、それはうちの研究室ではかれないのではなくて、世界的にも付加体を発表した論文の前後にそのデータはおかしいとかというような議論が起きるほど、非常にオクラトキシンの DNA 付加体は定量が難しいという話を聞いておりますので、ちょっと手を出していないのです。ただ、付加体ができると、AP サイトができやすいという話がありますので、AP サイトができることが DNA の二重鎖切断の原因なのかどうかというあたりがキーポイントなのかなと思っています。

ただ、我々のところで、別の、また話が変わっちゃいますけど、アクリルアミドの実験をやっています、やはりこれも AP サイトをつくるので有名なのですが、やはり Spi<sup>+</sup>が上がります。調べると、大きな欠失ではなくて 1 塩基がたくさん落ちる。アクリルアミドは同時に *gpt* アッセイも陽性ポジになりますが、オクラトキシンは、なぜ大きな欠失が非常に頻発してくるというところが、すごい特徴的なので、そのあたり、なぜそうなのかというあたりは、まだちょっと私自身もつかめ切れていないというのが実情です。

○芳澤座長 ありがとうございます。

今の御質問というか、意見交換していただいている部分は核心に触れる部分だと思いますけれども、何か関連して三森先生のほうから何か。

○三森委員 今回の *gpt delta* ラットのデータは、今までのオクラトキシン A の遺伝毒性、そして、発がん機序の不明確なところがかなり見えてきたと感じます。山崎専門委員がおっしゃるように、なぜ二重鎖切断が起こってくるのかについてのメカニズムがわかっていないこと、そして髄質外帯に腫瘍が誘発されてくるのですが、欠失変異から腎臓腫瘍に至るところが、まだ見えていないというところがあるのですが、因果関係はありそうに思えます。

そういう面で、今まで JECFA も EFSA も PTWI だけ出して、非発がん影響だけ提示していますが、発がん影響についてはわからないところが多過ぎるということでペンディングの状態です。ここのところが今回の専門調査会で御議論いただいて、ある程度のところにいけるのではないかというふうに思います。

○芳澤座長 ありがとうございます。

○三森委員 すみません、1 点だけ、梅村先生にお伺いします。先ほどの *gpt delta* のデ

ータで、カリオメガリーにいくメカニズムには G2、アレスト、それと細胞増殖のアンバランスにより発現しているとのことですが、カリオメガリーと腎臓がんについての関連性について、これはどうお考えですか。

○梅村専門参考人 御存じのようにカリオメガリー自身、あの形態を示すこと自体に発がんとの関連性はまだ不明なところが多いというのが一般的な考え方だと思うのです。今回の件に関しては、特に私たちが注目したのは Wee1 という遺伝子が働いて、G2/M のところで細胞周期停止を起こさせているということがわかって、この Wee1 というのは、DNA 障害から活性化が起きてくるような遺伝子ですので、我々としては、今回のこのカリオメガリーに関しては、DNA 障害を通じて起きてきた変化だろうというふうに考えています。

ただ、この変化自体が発がんに関与しているというデータはもちろん持っていませんし、病理学的な現在の状況では、このカリオメガリーと発がんとの関連性は不明だというふうに考えています。

○渋谷専門委員 能美先生に質問ですけれども、このオクラトキシン A は今、梅村先生がおっしゃったような細胞周期のチェックポイント異常がかなり起こってきて、カリオメガリーとかを起すのですけれども、こういうチェックポイント機能異常から欠失変異を起すようなメカニズムということは考えられるのでしょうか。

○能美専門参考人 そうですね。今まで私たちが経験した中では、チェックポイントの、化学物質でチェックポイントの異常だけを起す化学物質というのも余り少ないものですから、聞いたことないものですから、それは証拠は持っていません。

可能性として、そういう DNA 損傷以外のメカニズムでこういう欠失が起きているという可能性、それが一体どれぐらいあるかというのは、私自身も関心はありますけれども、証拠は今のところないということです。

こういう G2/M でアレストすると、言うなれば、普通の状態の相同染色体は  $2n$  になっていますけれども、その染色体が倍加したような状態でとまっていますので、そういうときは相同組み換えという両方のストランドの間で交換して、二重鎖切断を直そうとする仕組みのほうが主要な修復系になりますから、梅村先生の今日データ見せていただいて、こういう Rad51 ですとか、相同組み換えに関係した遺伝子が高く上がってきているというのは、なるほどなという感じがします。

ですので、多分 G2/M でとまった段階で、どちらかのストランドが切れて、それを直すために相同組み換えが一生懸命働いているということなんだと思うのです。ただ、直し切れなかったものが、やはりああいう欠失変異体として残っているということなのではないかなと思うのですが、ただ、最初のイベントとして、今の御質問に、あと山崎先生の質問にも深く関係するところですがけれども、最初のイベント、二重鎖切断を起こしているものが何なのか、それが細胞周期異常のために起きているのか、あるいは、今、見せていただきますと、オクラトキシン A はいろんな染色体の異常とかも起すようなので、です

から、そういう染色体の分裂装置のほうに何か働いて間接的に起こしているのか、そこら辺はまだオープンクエスチョンといいますか、わからない段階だと思います。

○大島専門委員 私は化学が専門なものですから、OTA と DNA のアダクトが形成されたという確証というか、証拠の文献をずっと見てみました。2010 年のマントルの文献（参照 167）では、一応それらしいというか、LC/MS で確認しているのです、量的な評価だとかはよくわかりませんが、確認はされているだろうと思います。ただ、JECFA の 2010 年の議論のときに、それが挙がったかどうかというのも、私はよくわかりません。いろんな論がありますが、そこには仮説に関して決定的な証拠を提出したみたいなことが書かれています、それについて評価書の DNA アダクトのところでは、ほとんど触れられていません。何らかのコメントをもう少し突っ込んで書く必要があるのではないかと思います。

○芳澤座長 参照文献では 167、本文の中ではどこに。

○前田調整官 本文ですと、46 ページの 18 行目のところから参照 167 の内容について記載がございます。

○芳澤座長 この論文は、そのページでいうと 46 ページの OTA 由来活性キノン/ヒドロキノンと DNA 付加体の中の 1 つということですね。

この部分は仮説に基づいた内容が多いのではないかと思います。OTA のクロール原子が酸化的に外れて、ヒドロキノン体を形成したとした場合に OTA と DNA との反応がどうなるかということについて書かれたような内容です。

○大島専門委員 サンプル中から LC/MS で検出していると主張しているような気がするのですけれども。

○芳澤座長 ここは今までの EFSA での評価には、この論文は出ていないということでしょうか。

○前田調整官 EFSA の評価には入っているかどうか、今のところまだ確認されていません。

一応、この *in vitro* において光酸化させた知見ということで、今紹介させていただいておりますが、参照になる部分につきまして、もう少し内容を含めて抄録から引っ張ってきたり、データを引っ張ってくるということは可能でございますので。

○芳澤座長 評価書の中に少し詳しく、その点を評価した上で反映したいと思います。大島先生のほうでもまたお願いしたいと思います。

その他いかがでしょうか。

○矢部専門委員 資料 4-1 を見ますと、バルカン腎症の発症には性差が顕著にあり、女性のほうが男性よりも影響されやすいという報告があります。かなり古い論文ですが、先生の御研究では、性差が顕著にあるというこの点に関して、実験結果として何か出てきているのでしょうか。

○梅村専門参考人 最初の腎全体を使った実験のときには雌雄を使ったのですが、雌雄と

も陰性で、御説明申し上げたように部位を特異的にやったときには OTA の感受性がたしか雄のほうが強く出るのですよね？ですので、雄を使ってやってしまったので、つまり陽性の結果が出始めてからは実は性差を比べていないので、ちょっと私のほうには持ち合わせがない。

○芳澤座長 それでは、ちょっと時間の関係もありますので、今日の能美先生、梅村先生の御研究の内容を説明していただいたことと、それから、今までの議論、あるいは JECFA とか EFSA での評価を踏まえて腫瘍形成のメカニズムのまとめ方について、42 ページからかなり長いのですけれども、55 ページまで、これを評価書のたたき台案では、腫瘍形成の機序として 7 項目に分けていたのですけれども、これを少し整理して、今日の御発表の内容等が的確に反映できるような項目の整理をしなければいけないのではないかとこのように考えております。

この点について、事務局のほうから一つ考え方について説明をお願いします。

○松尾課長補佐 資料 3-2 で項目の整理案を示させていただいております。

今、座長からございましたように、今の段階では機序につきましては、①から⑦まで羅列して書かせていただいておりますが、これを OTA の代謝活性と DNA 付加体についてを 1 つの項目、それ以外のものについて、酸化ストレスと発がん作用並びに DNA 損傷と腫瘍形成、これに大きく分けまして、新たな知見につきましては、その他というふうなくくりで整理し直すという形でどうかというふうに考えております。

○芳澤座長 このような項目立てでまとめてみたらというのが 1 つの考えですが、これについていかがでしょうか。

○三森委員 今回の腫瘍メカニズムのところ、このような事務局の提案でよろしいのではと思うのですが、今回の梅村先生の実施された研究データの要約が、この評価書には載っていないですね。どこの範疇に入れるのか検討して頂けますか。評価書の 54 ページには、31 行目から *gpt delta* ラットのデータが載っていますが、これは細胞周期関連のデータであって、その前のところの *gpt* アッセイや *Spi*<sup>-</sup>アッセイのデータの記載が見つからないのです。今回はこれを含めていないのでしょうか。

○山田専門委員 37 ページの 34 行目にあります。

○三森委員 何ページですか。

○山田専門委員 37 ページの 34 行目。

○松尾課長補佐 *in vivo* 試験のほうに。

○三森委員 そこには *Spi*<sup>-</sup>変異のことが書いてあるぐらいですが、今回、お示いただいた追加のデータは一切記載がされていないですね。

○松尾課長補佐 追加の分については、まとめ直さなくてはいけないというふうには考えております。

○芳澤座長 梅村先生のこれまで発表されたのは 2011 年から 2013 年まで 3 報が今回の評価書に出ているのですけれども、最初の論文が前のほうに引用されているだけで、あと

のメカニズムのところでは、引用されていないので、3つの論文を1つのセットとして、そこを説明するような形にする必要があるのではないかと思いますので、梅村先生いかがでしょうか。

○梅村専門参考人 もちろんそれで結構でございます。

○芳澤座長 そういうふうにしないと研究の意味している内容が十分反映できていない、難しいのではないかとこのように考えますので、そのようにここではまとめたいと思います。それから、項目立てについて梅村先生、能美先生御専門の立場から、少し的確なもし表現法があれば、この場で御指摘いただきたいのですけど、もし、ありましたらお願いします。

○梅村専門参考人 酸化ストレスの項で、我々のところでは、酸化的 DNA 損傷レベルを測っていて、その結果からだけ見れば、DNA の損傷は起きていない、酸化的な DNA 損傷は起きていないという結果も、もし参考を含めていただければと思います。

○渋谷専門委員 この項目立てで私もいいと思うのですけれども、カリオメガリーの形成メカニズムというの、まだわかっていない部分が結構あるのですけれども、そういう細胞周期異常ということも1つ項目として入れるべきかなと思います。

○芳澤座長 ありがとうございます。

それでは、この項目については、オクラトキシンの代謝活性化、それから、DNA 付加体の議論のあるところですが、それと酸化ストレスによる発がんの問題、それから、今日御説明いただきました腎臓の標的部位における腫瘍形成、すなわち DNA 損傷と腫瘍形成、細胞周期との関係、それから、その他という形でまとめ上げてみたいと思います。

こういう形のまとめ方で今日の審議の内容が鮮明に反映できるような形にすることにしたいと思います。

それでは、次に今日の御議論の方向性を確認することになるかと思うのですけれども、これまでの情報と、それから、今日の御審議等を踏まえて、オクラトキシシン A の毒性について、どのように考えて評価を進めていったらいいのかということについて御審議いただきたいと思います。

まず、事務局のほうで説明をお願いしたいと思いますけれども。

○松尾課長補佐 参考資料 2 をご覧ください。これは清涼飲料水のとくに発がんリスク評価に関する手引として整理したものでございます。

内容については、また見ていただければと思うのですが、一番後ろのページに評価手順全体を整理しております。このときに発がん物質につきましては、カテゴリーとして 1 から 3 まで遺伝毒性の関与について整理をしておりますが、それとともに発がん物質については、発がん影響並びに非発がん影響両方を見ながらやっていくという整理もしておりますので、この清涼飲料水を対象としたものを参考にしてはいかがかというふうに考えております。

○芳澤座長 清涼飲料水の評価について、食品安全委員会としてこういう整理をしたとい

う既に前例がありますので、これをオクラトキシシン A の評価に参考にしたらどうかということでもありますけれども、この点について何か御意見がありましたらお願いしたいというふうに思います。

渋谷先生どうぞ。

○渋谷専門委員 この案で賛成だと思います。

オクラトキシシンの影響は発がん用量より非発がん用量のほうがかなり下のほうから出ていますので、非発がん用量での NOAEL を求めるべきだと思います。

また、発がん性に関しましては、付加体形成の有無がまだはっきりしていない部分がありますので、この別紙、一番最後の裏のシェーマで示されている別紙の発がん影響のⅡ及びⅢ、それに基づいた形でのリスクレベルを求めるべきだと私は思います。

○芳澤座長 今、そういった方向性についての御意見がございましたけれども、その点についていかがでしょうか。

本日の冒頭のほうで説明がありました参考資料 1 で、これまでの経緯として JECFA で 2 回評価を行い、それから、EFSA がやはり直近では 2010 年に評価を行っています。

そういう形で行ってきておりますけれども、食品安全委員会での評価は、それらを踏まえつつ、今日御説明いただいた研究の最前線の内容を踏まえて、少し踏み込んだ評価をするということで、ここの参考資料の 2 にありますⅡもしくはⅢに基づいて評価するという形です。ですから、数理モデルを使うのと、もう一つの NOAEL のほうをもとにした評価、二本立てのような考え方が妥当ではないかということです。

この点について三森先生何か御意見がございましたらお願いしたい。

○三森委員 渋谷先生が今おっしゃったような形で、非発がん影響、これはブタのデータが、非常に腎毒性が低い用量から出ていますので、これから PTWI をとらざるを得ないということは、私もそうだなというふうに思います。

発がん影響のほうについては、ローマ数字の 2 番目にするか、3 番目にするかということで、本専門調査会でそののところどっちにするかを決めていただけたらと思うのですが、限りなく遺伝毒性の可能性はある。本日、梅村先生に御説明いただいた内容からいくと否定できないというところがありますが、完璧に 100 %メカニズムがわかったわけではないということです。だから、ローマ数字のⅢにするのか、Ⅱの右側の数理モデルによる発がんリスク評価にするのか、この辺のところを当専門調査会で御議論いただけたらと思います。

○芳澤座長 この点については、一応方向性は定まったけれども、具体的にどれを当てはめるかということについては、次回の審議予定の人の暴露の問題も関係してまいりますし、それから、今日の審議内容を評価書にどういう形で反映するか、その内容を見た上でまた最終的な判断は次回にしてもいいのではないかと思いますけれども、それでよろしいでしょうか。

○松尾課長補佐 ⅡかⅢという判断は次に回すとしましても、まずは数理モデルについて

は検討するという形と、あと非発がん影響についても、清涼飲料水と同様に見ていくということであれば、特段作業に関して方向性に違いはないと思っております。

○山本評価第二課長 座長提案ありがとうございます。

先ほど評価項目の構成案も見直すということで提案して議論いただいたので、それに基づいて評価書を整理しまして、また梅村委員の論文も入れた形で次回までにお示ししますので、その整理をした資料のもとでまた議論していただければと思います。

○芳澤座長 ありがとうございます。

まとめ方については、特に御異議なければ、そのような形にしたいと思います。ありがとうございます。

今日の毒性部分の評価に関する審議は、一応これで閉めたいと思います。御協力ありがとうございます。

次回の審議に関わる部分ですけれども、今日は時間の関係で、予定の時間 10 分ほど過ぎているのですけれども、ヒトにおける知見、暴露評価について、お手元の資料がありますけれども、簡単に説明を事務局のほうでしていただいて、御質問とか御意見等については、またメール等でお寄せいただき、それらをまとめた上で次回の審議にかけたいと思います。

○松尾課長補佐 資料 4-2 におきまして、ヒトにおける知見から暴露状況の項目についてお示しさせていただいております。

現在、この方針で取りまとめを進めたいと思っておりますが、今、座長からありましたように、時間の関係もございますので、この項目立てに御意見等ありましたら、メール等でお知らせいただければ、それを反映した形で次回までに取りまとめを進めたいと思いますので、御意見のほどよろしくお願ひしたいと思います。

○芳澤座長 そういうことですが、よろしくお願ひしたいと思います。

それでは、本日の審議結果を踏まえて、事務局のほうでは評価書案の修正並びに作成をお願ひしたいというふうに思います。

また、評価書案の毒性部分、特に毒性試験のまとめの部分がまだできていませんけれども、その点については毒性の専門の委員の先生方に御協力をお願ひしたいというふうに考えておりますので、よろしくお願ひしたいと思います。

また、委員の先生方におかれましては、今後の議論に役立つような関連のデータや知見等、あるいは検討すべき項目等がありましたら事務局のほうにぜひ連絡をお願ひして、審議がスムーズにいくように御協力をお願ひしたいと思います。

事務局のほうからほかに連絡はございますでしょうか。

○松尾課長補佐 特にございませぬ。

○芳澤座長 本日は限られた時間の中で、非常に重要な審議を行ったわけですが、特に能美先生、梅村先生には御参加いただきましてありがとうございます。本日の審議を終了いたします。

次回については、また御協力のほどよろしくお願ひしたいと思います。本日はどうもありがとうございました。