

II. 食品健康影響評価の 2. 実験動物等における影響 (案)

【※評価書案に転記予定】

2. 実験動物等における影響

六価クロムの急性毒性については、種々の六価クロム化合物を経口投与した試験において、LD₅₀ はラットで 13~811 mg Cr(VI)/kg 体重であった。

反復投与毒性については、マウス及びラットを用いた試験において、貧血、小腸や肝臓の炎症等の毒性影響がみられている。亜急性毒性試験及び慢性毒性試験において最も低い用量でみられた毒性所見は、マウスの 2 年間飲水投与試験における十二指腸のびまん性上皮過形成、十二指腸や腸間膜リンパ節等での組織球浸潤、肝臓の炎症や膵臓の腺房細胞質変性、貧血等の影響が認められた。等であった。

発がん性については、マウスを用いた試験において、小腸で発がん頻度の有意な増加がみられており、ラットを用いた試験において、口腔粘膜及び舌で発がん頻度の有意な増加がみられている。これらの結果から、六価クロムは発がん物質であると考えられた。

生殖・発生毒性については、マウス及びラットを用いた試験において、着床数や生存胎児数の減少、児動物の骨化遅延等の影響が認められた。

遺伝毒性については、六価クロムは、*in vitro* の試験系では、細菌を用いた復帰突然変異試験を含め多くの試験において陽性を示した。*In vivo* の試験系では、職業性ばく露とされたヒトのリンパ球を用いた染色体異常試験、小核試験等は陽性及び陰性であった。ラットに飲水投与した遺伝子突然変異試験は陰性であった。マウスに飲水投与した小核試験はほぼ陰性であったが、強制経口投与した DNA 損傷試験は陽性であった。マウス及びラットに腹腔内投与した遺伝子突然変異試験、染色体異常試験、小核試験等は陽性を示した。これらの結果から、六価クロムは遺伝毒性を有すると考えられた。

【事務局より】

前回、3月8日のワーキンググループでのご意見を踏まえ、毒性のメカニズムについて作成いたしました。ご確認をお願いいたします。

六価クロムの発がんメカニズムについては、DNA に直接的／間接的に作用する遺伝毒性メカニズムと、遺伝毒性が関与しない非遺伝毒性メカニズムが報告されている。

1 Thompson ら (2013) は最も低用量でみられたマウスの小腸腫瘍について、
2 1) 小腸管腔からの六価クロムの吸収、2) 絨毛に対する細胞毒性、3) 陰窩で
3 の再生性 (regenerative) の過形成、4) 陰窩幹細胞の増殖による突然変異誘発
4 の増大変異細胞のクローン性増殖増村先生修正から腫瘍発生、という 4 つの事
5 象から、非変異原性 MOA による発生と考えられるとしている。

6 本ワーキンググループとしては、Thompson ら (2013) で提唱された発がん
7 メカニズム及び新たに報告された知見等も踏まえ、飲水投与における六価クロ
8 ムの発がんメカニズムについて以下のように考察した。

9
【増村先生コメント】

突然変異誘発の増大 ⇒ 変異細胞のクローン性増殖

(d) clonal expansion of mutations within the crypt stem cells, resulting in late onset tumorigenesis. (Thompson et al., 2013)

10
11
12 1) 小腸管腔からの六価クロムの吸収

13 六価クロムは主に胃液によって三価クロムに還元されるが、その還元能は
14 胃の状態 (pH、還元剤、及び胃の内容物) に依存する。

15 NTP (2008) の研究において、組織損傷と腫瘍発生の多くが十二指腸で増
16 加し、空腸でも僅かにみられたが、回腸及び大腸では増加しなかったことか
17 ら、六価クロムが胃液による還元を逃れ小腸まで到達したことが考えられる。

18
19 2) 小腸絨毛上皮細胞の損傷、及び、3) 損傷した小腸粘膜を修復/置換する
20 ことによる陰窩での代償性再生性増村先生修正の過形成の増加

21 マウスに重クロム酸ナトリウム二水和物(VI)を 90 日間飲水投与した試験
22 (Thompson et al. 2011) において、十二指腸の絨毛に対する細胞毒性 (細
23 胞質空胞化) が、絨毛の萎縮及び陰窩の過形成よりも低用量で起こっていた
24 ことから、六価クロムが絨毛に損傷を与えることで、損傷した小腸粘膜を修
25 復/置換するために、陰窩での代償性再生性増村先生修正の過形成を引き起
26 こすというメカニズムが考えられる。このメカニズムは、小腸における腫瘍
27 発生メカニズムの解明を目的として、この試験に付随して実施された以下の
28 知見からも裏付けられると考えられる。

29 ①マウスでの飲水投与による高濃度の六価クロムばく露において、陰窩に
30 異常核がみられなかった一方で、絨毛では用量依存的な発生がみられた
31 (O'Brien et al. 2013)。これは、六価クロムは絨毛に対する細胞毒性
32 を有するが、陰窩に対しては直接的な遺伝毒性又は細胞毒性はないこと

1 を示唆している。

2 ②六価クロムはマウス小腸での GSH/GSSG 比を時間及び用量依存的に低
3 下させたが、DNA 酸化損傷の指標となる 8-OHdG の増加はみられな
4 かった (Thompson et al. 2011)。一方で、小腸上皮の遺伝子発現変動解析
5 において、酸化ストレス応答遺伝子発現の上昇がみられた (Kopeck et al.
6 2012a, 2012b)。これらは、酸化的 DNA 損傷が検出されていなくても、
7 絨毛での酸化ストレスが低濃度ばく露から起こっていることを示唆し
8 ている。

9 ③クロム濃度は陰窩部分より絨毛で高く、DNA 損傷は陰窩部分ではみら
10 れず絨毛のみでみられたが、絨毛に形質転換を示す異常巣はみられな
11 かった (Thompson et al. 2015a, 2015b)。これらは、慢性的な高濃度の
12 六価クロムばく露においても、陰窩にクロムは到達せず、陰窩幹細胞に
13 においてクロムは DNA に作用しなかったことを示唆している。

14 ④絨毛において用量依存的に小核がみられた (O'Brien et al. 2013) こ
15 とは、絨毛に対する細胞毒性には用量依存性があると考えられ、絨毛への
16 細胞毒性が原因で、陰窩で再生細胞増殖反応が起こることを示唆してい
17 る。一方、陰窩において小核がみられなかった (O'Brien et al. 2013、
18 Thompson et al. 2015b) ことは、陰窩の細胞増殖反応が陰窩幹細胞へ
19 の直接的な損傷によるものではない可能性があることを示唆している。

20
21 4) 陰窩における幹細胞の活発な細胞増殖による形質転換細胞発現頻度の増大
22 に伴う広瀬先生修正腫瘍発生頻度の増加

23 十二指腸上皮粘膜に六価クロムの投与に関連した K-Ras コドン 12 GAT
24 変異頻度増村先生修正の増加はみられなかった (O'Brien et al. 2013) こ
25 とは、2 年間試験 (NTP 2008) において早期腫瘍、転移及び死亡率上昇がみ
26 られなかったこと、90 日間試験 (Thompson et al. 2011) において前がん病
27 変 (限局性の過形成) や腫瘍性病変がみられなかったこと、陰窩で細胞遺伝
28 学的な損傷がみられなかった (O'Brien et al. 2013) ことと一致している。
29 また、六価クロムによって誘発された十二指腸の遺伝子発現パターンは、変
30 異原性肝発がん性物質よりも非変異原性肝発がん性物質のパターンに類似
31 していた (Thompson et al. 2012a)。

32 以上のことから、高濃度の六価クロムに長期間ばく露されることで、陰窩
33 での過形成が起こった結果生じ、自然発生性の形質転換細胞の発現頻度が増
34 大し、その中で腫瘍形成につながる自然発生性の突然変異が起こったことで
35 腫瘍発生頻度の増加を引き起こす腫瘍形成を促進すると考えられる。

【増村先生修正案】

以上のことから、高濃度の六価クロムに長期間ばく露されることで、陰窩での過形成が起こった結果生じ、自然発生性の DNA 損傷および再生性の細胞増殖を背景として、形質転換細胞がの発現頻度が増大し、その中で腫瘍形成につながる自然発生性の突然変異及びが起こったことで腫瘍発生頻度の増加を引き起こすと考えられる。

【広瀬先生修正案】

以上のことから、高濃度の六価クロムに長期間ばく露されることで、陰窩での過形成が起こった結果、形質転換細胞がの発現頻度が増大し、その中で腫瘍形成につながる自然発生性の突然変異及びが起こったことで腫瘍形成を促進することによるものと腫瘍発生頻度の増加を引き起こすと考えられる。

【事務局より】

ご指摘を踏まえ、修正いたしました。ご確認をお願いいたします。

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17

また、NTP (2008) で小腸腫瘍がみられた用量の重クロム酸ナトリウム(VI)を雄 *gpt delta* マウス (C57BL/6) に 28 及び 90 日間飲水投与した結果、小腸の *gpt* 遺伝子突然変異体頻度の増加は認められなかった (青木 2014)。さらに、NTP (2008) で口腔腫瘍がみられた用量の重クロム酸ナトリウム二水和物(VI)を雄 Big Blue® TgF344 ラットに 28 日間飲水投与した結果、口腔組織及び十二指腸の *cII* 遺伝子突然変異頻度の増加も認められなかった (Thompson et al. 2015c、2017b)。

従って、NTP (2008) の飲水投与による発がん試験においてマウスに認められた小腸腫瘍の発生メカニズムは、高濃度の六価クロムに長期間ばく露されることで、六価クロムが小腸上皮細胞に持続的に損傷を与えた結果、陰窩幹細胞の増殖及びでの過形成が起こり、自然発生性の過形成の中から腫瘍形成につながる自然発生性の突然変異を誘発し、腫瘍発生頻度の増加を引き起こす腫瘍形成が促進されることによるものと考えられる。

【増村先生修正案】

従って、NTP (2008) の飲水投与による発がん試験においてマウスに認められた小腸腫瘍の発生メカニズムは、高濃度の六価クロムに長期間ばく露されることで、六価クロムが小腸上皮細胞に損傷を与え、陰窩幹細胞の増殖及びでの過形成が起こり、自然発生性の DNA 損傷および再生性の細胞増殖を背景として、過形成の中から腫瘍形成につながる自

然発生性の突然変異を誘発し、腫瘍発生頻度の増加を引き起こすと考えられる。

【広瀬先生修正案】

従って、NTP（2008）の飲水投与による発がん試験においてマウスに認められた小腸腫瘍の発生メカニズムは、高濃度の六価クロムに長期間ばく露されることで、六価クロムが小腸上皮細胞に持続的に損傷を与える→結果、陰窩幹細胞の増殖及びでの過形成を引き起こしが起り、陰窩における自然発生性の腫瘍形成を促進することによるもの過形成の中から腫瘍形成につながる自然発生性の突然変異を誘発し、腫瘍発生頻度の増加を引き起こすと考えられる。

【事務局より】

ご指摘を踏まえ、修正いたしました。ご確認をお願いいたします。

1
2
3 また、同試験においてラットに認められた口腔腫瘍の発生メカニズムは不明
4 であるが、疫学研究において六価クロムと口腔腫瘍との関連を示した報告はな
5 く、また、ラットで口腔腫瘍がみられた用量（雄 5.9 mg Cr(VI)/kg 体重/日、雌
6 7.0 mg Cr(VI)/kg 体重/日）は六価クロムの一日推定摂取量（● $\mu\text{g Cr(VI)/kg}$ 体
7 重/日）に比べてはるかに高く、ヒトがばく露される飲料水中の濃度では、唾液
8 により六価クロムは三価クロムに還元されると考えられることから、ヒトでは
9 口腔腫瘍は起こりにくいことが考えられる。さらに、トランスジェニックラット
10 遺伝子突然変異試験において、発がん標的組織である口腔での結果が陰性であ
11 ったことから、遺伝毒性が関与しているとは考えにくい。

12
13 これらを総合的に判断した結果、六価クロムは、*in vitro* で細菌を用いた遺伝
14 子突然変異試験を含む多くの試験で陽性を示し、*in vivo* で非経口投与の試験系
15 を中心に遺伝子突然変異試験、染色体異常試験、小核試験等で陽性を示すことか
16 ら遺伝毒性を有すると考えられるが、飲水投与による発がん試験において認め
17 られた腫瘍は、トランスジェニック動物を用いた研究において発がん標的組織
18 における遺伝子突然変異の増加増村先生修正が認められていないこと等から、
19 遺伝毒性によるものとは考え難いと判断した。

【事務局より】

上述のとおり、「飲水投与による発がん試験において認められた腫瘍は、・・・遺伝毒性によるものとは考え難い」と判断した場合、評価値の算出にあたり、以下の点について整理が必要と思われます。

1. 上述の判断を踏まえ、発がん影響の評価について、「ヒトに対する経口発がんリスク評価に関する手引き（以下「手引き」という。）」の「I.発がん性に対する遺伝毒性の関与がない」場合に該当すると判断し、TDI で評価することでよいかご審議をお願いいたします。

2. 評価値の算出方法について、手引きにおいて、発がん影響の場合（I の場合）及び非発がん影響の場合、いずれも「NOAEL をもとに TDI 算出。NOAEL が求められないときはベンチマークドーズ法を考慮」とされております。

どの方法で評価値を算出すべきかご審議をお願いいたします。

また、評価書（案）には PBPK モデルを用いて値を算出している知見を記載していますが、PBPK モデルを用いて算出することが可能かどうかについてもご審議をお願いいたします。

（参考）NTP（2008）

【発がん影響】

ラット雄：NOAEL 2.1 mg Cr（VI）/kg 体重/日

ラット雌：NOAEL 2.4 mg Cr（VI）/kg 体重/日

マウス雌：NOAEL 0.91 mg Cr（VI）/kg 体重/日

マウス雄：NOAEL 1.4 mg Cr（VI）/kg 体重/日

【非発がん影響】

ラット雄：NOAEL 0.21 mg Cr（VI）/kg 体重/日

ラット雌：LOAEL 0.24 mg Cr（VI）/kg 体重/日

マウス雌：LOAEL 0.38 mg Cr（VI）/kg 体重/日

マウス雄：LOAEL 0.38mg Cr（VI）/kg 体重/日