

タイでは2つの症例、肝細胞ガンと胆管ガンのいずれにおいても血清中のアフラトキシン-アルブミンアダクトとの相関性は認められなかった。

中国での2つの集団例は B 型肝炎ウイルスとアフラトキシンが混合している曝露状況を扱っているが、それぞれが独立した効果をもつことが示唆された。いくつかの相関性のある結果は推定されるアフラトキシンの摂取量と肝臓ガン事例に強い相関があることを示していた。そのなかの少数例において肝炎ウイルスの流行との何らかの相関性が同時に評価されている。1つはスイスでの症例、もうひとつは中国での症例であるが、その症例では B 型肝炎ウイルスと AFB1 の曝露には強い相関があることを示していた。中国で最も大規模で行われた研究では、摂取されたアフラトキシン B 1 と尿中の B 1 代謝物の間には相関が認められなかった。

3. 実験動物における発がん性

<AFB1>アフラトキシン混合物および AFB1 に関しては数種のマウス、ラット、ハムスター、数種の魚類、アヒル、ニジマス、サルを用いていろいろなルートでの投与実験での発ガン性が 広く研究されている。経口投与ではアフラトキシン混合物および AFB1 は、マウス以外の動物において肝細胞ガンおよび胆管ガンを発症した。ラットでは腎細胞ガンと直腸などの他の臓器での腫瘍が低い確立であるが見出された。サルでは肝細胞ガンおよび胆管ガンにくわえて肝血管肉腫、骨原肉腫、胆管の腺腫、すい臓ガンが認められた。成熟したマウスでは AFB1 を腹腔内に投与すると肺アデノーマの事例が増加した。未成熟のマウスや成熟したラットでは AFB1 の腹腔内投与によって肝細胞腫瘍がすべての系統において認められた。AFB1 の皮下投与では局所的な腫瘍が認められた。妊娠中および哺乳中でのアフラトキシン B 1 の腹腔投与は母親およびその子供たちに中枢および末梢神経、子宮、消化管の腫瘍を含む種々の臓器に良性および悪性の腫瘍が誘導された。いくつかの動物種においては、異なった投与ルートで投与されたアフラトキシン B 1 が肝細胞の変化を伴う病巣を作りその数と大きさはその後の肝細胞の腫瘍やガンへの発達に深く相関していた。

<AFB2> AFB2 はラットで経口投与において肝細胞の病巣と肝細胞腺腫を起こした。腹腔内投与ではその確立は低くなった。

<AFG1> AFG1 の経口投与はラットにおいて肝細胞の病巣と肝細胞腺腫、腎細胞腫瘍を起こし、魚類において肝細胞腫瘍を誘導した。AFG1 の肝ガン原性はアフラトキシン B 1 より弱かった。AFG1 の皮下投与では局所の肉腫を起こしたが、AFB1 を同じルートで同量投与した場合より発症まで時間がかかった。AFG2 の経口投与では、1 実験しかされていないが、マスにおいても肝ガン性は認められなかった。

<AFM1> AFB1 の加水分解代謝物であるが、AFB1 と経口投与で同量投与場合には、ラットおよび魚類において比較的低い割合であるが肝臓ガンが認められた。

<AFQ1> AFQ1, これも AFB1 の代謝物のひとつであるが、経口投与で魚類において高い割合で肝臓ガンが認められた。代謝物のひとつであるアフラトキシコールはラットおよび魚

類において AFB1 に比べて低い確率であるが腫瘍が見出された。

4. 関連データ

A F B 1 : 堅実に遺伝毒性があり、ヒトや動物において体内でアダクトを生成し、げっ歯類、サルにおいてクロモゾームが変則をおこす。ヒトや動物において細胞内で DNA に損害を与え遺伝子変異とクロモゾームの変則をおこし、細胞のトランスフォーメーションを促す。虫類に対しても遺伝子変異と組み替えを起こし、細菌に対しては DNA 損害と遺伝子変異を起こす。アフラトキシン B 1 はヒトと動物に対しては肝毒性を示し、動物に対しては腎毒性と免疫毒性を示す。

A F B 2 : 広範囲に研究はされていない。A F B 2 はラットにおける動物実験の結果 DNA と結合し、その後代謝されて A F B 1 になることが報告されている。げっ歯類の細胞では DNA 損傷、姉妹染色体変換および細胞のトランスフォーメーションを起こす。しかし遺伝子変異はない。真菌においては遺伝子変異も組み替えも起こさないが細菌に対しては遺伝子変異を起こす。

A F G 1 : げっ歯類において DNA と結合し染色体異常を引き起こす。ヒトや動物の継代細胞では、DNA 損傷および染色体変則を誘導する。真菌に対しては DNA 損傷を、細菌に対しては遺伝子変異を引き起こす。

A F G 2 および A F M 1 に関しては遺伝毒性に関する研究はあまりされていないが、A F G 2 は遺伝子変異とク染色体の変則を誘導し、A F M 1 はげっ歯類の継代細胞において DNA 損傷を引き起こし、細菌においては遺伝子変異を誘導する。

ヒトでの A F B 1 の代謝物である 8, 9-エポキシドは、他のアフラトキシンに感受性の高い動物種と同じように、DNA やアルブミンとアダクトを形成する。ヒトでの主な AFB1 の代謝物であるアフラトキシン B 1-N7 グアニジンと血清アルブミンアダクトはアフラトキシンに感受性の高い動物（ラット）と比較した研究が多くなされている。

グルタチオン S-トランスフェラーゼが仲介してできるグルタチオンと 8, 9-エポキシドの複合体は、DNA 損傷を減少させる。これは実験動物において腫瘍形成を減少させるのに重要なメカニズムである。マウスなどの動物種ではアフラトキシンの発ガン原性に抵抗性があるが、これはラットなどのアフラトキシンに化して感受性の高い動物に比べて 3 倍から 5 倍グルタチオン S-トランスフェラーゼ活性が高いからだといわれている。ヒトはラットやマウスより 8, 9-エポキシド複合体に対するグルタチオン S-トランスフェラーゼ活性は低いので、アフラトキシンに対する解毒能力は低いことが考えられる。

1998年 JECFA Monograph 要旨

毒性学的研究 <抜粋>

1. 急性毒性

他の review で述べられているのでここでは省略する。

2. 生殖毒性

● 妊娠マウスを用いて、AFG1 4.8 ng/kg bw/day および AFB1 0.8ng ng/kg bw/day を独立にまたは共に飼料に混ぜて与えた場合、子供マウスにおいて、AFG1 では肝臓の中性脂肪の上昇が見られ、AFB1 では肝臓の中性脂肪と脂肪酸の蓄積および肝臓、腎臓での細胞毒性が認められた。

3. 遺伝毒性

● AFB1 はDNAに結合し、p53 のコドン 249番目のグアニンをチミジンに変異させる作用を持つ。この変異は p53 遺伝子特有の働きを阻害するのだが、一般にこのような毒性を異型接合性と呼んでいる。ヘテロジニアスな化学物質に対する代謝系を有する *Saccharomyces cerevisiae* 試験種を用いた実験結果から、活性化された AFB1 は DNA 組み換えを潜在的に誘引することが明らかになった。

● ラットは AFB1 原発性肝ガンに感受性が高く、マウスは低い。この種による感受性の違いを、AFB1-アルブミンアダクトの量により比較してみると、ラットでは染色体異常量と血中の AFB1-アルブミンアダクトに相関性があった。また、マウスよりラットの方が AFB1-アルブミンアダクトの量が高かった。

● AFB1-アルブミンアダクトの生成は、異なる種における AFB1 原発性肝ガンに対する感受性を反映している。尿中の AFB1-N7 グアニンアダクトも中国の集団例においては肝ガン発症の進行に関係するリスクと関係していた。

4. 免疫毒性

● ラットにおける実験結果から、低レベルのAFの継続的な曝露は成長期の宿主における感染やガンに対する感受性を高めることが見出されている。

● 呼吸器からのAFの曝露も、肺の局所および全身の免疫防除機構を衰えさせる。

5. アフラトキシンの発がん性を修飾する因子

● 低カロリー食はAFB1が誘引するDNA合成を肝臓と腎臓において遅延させる。

● 低タンパク食はAFB1が誘発する腫瘍が出現するために要する期間は長くなったが、腫瘍の大きさ、数などが減少した。

● 高脂肪食は高炭水化物食よりチトクローム 1A1 と 2B1 活性を高くする。こ

のことは AFB1 の解毒を促進し、肝高分子タンパク質と結合する AFB1 の量を減らすことに役立つ。

- 今後の重要な問題として次のものが挙げられる。
 - 1) アフラトキシンから生物活性を有するエポキシド代謝物への異なる代謝経路
 - 2) エポキシドから生物活性体への変換活性と解毒活性へのバランス
 - 3) AFB1 エポキシドと DNA との関係とガン化への変異
 - 4) AFB1 エポキシドの細胞毒性と発ガン性に対する役割
 - 5) 毒性発現における非エポキシドの重要性
 - 6) マイコトキシンに関連性のない疾病の進行への寄与度
- 6. 核酸およびタンパクと結合したアフラトキシン残基
 - セリンの前処理は、用量依存性に AFB1-DNA 結合を阻害する。
 - ヒト、マウス、ラットで生成された AFB1-DNA アダクトは標的細胞で DNA 損傷をおこすが、ゲッシ類で得られた結果が、ヒトにおける AFB1-DNA アダクトの影響に関する結果が不完全であることからそのままヒトに外挿することは出来ない。
- 7. グルコース輸送
 - グルコース代謝に関係の深い Glyoxalase-1 活性は低レベルの AFB1 により抑制されるので、グルコースに対する耐性の変化が、肝臓の AF を介する過酸化を誘引すると考えられている。
- 8. コットンシード中のアンモニア処理アフラトキシンの影響
 - 大気圧を用いた試料中のアンモニウム処理は、飼料中の AFB1, AFM1 のミルクへの移行を減少させる。このことによって肝ガンへのリスクを減らすことが出来る。
- 9. ウッドチャック、アヒル、リス、ツバイにおける B 型肝炎ウイルスとアフラトキシン
 - 肝炎ウイルスに感染することにより AFB1 の代謝活性が上昇し、AFB1-DNA アダクト形成に影響がでるものと考えられていることから、AFB1 と B 型肝炎ウイルスは、相乗作用をもつ。
- 10. ヒトにおける情報
 - 10-1. アフラトキシン曝露のバイオマーカー
 - ゲッシ類では、血清中の AFB1-アルブミンアダクトは、肝で出来ている AFB1-DNA アダクトのマーカーであり、これらのパラメーターは少なくとも、AFB1 原発性肝ガンへの感受性と関係している。このマーカーは今後検討していかなければならない問題である。
 - 10-2. ヒト肝細胞ガンにおける p 53 ガン抑制遺伝子の変異

- p53 ガン抑制遺伝子上にいくつかの変異はアフラトキシン曝露の特異的マーカーとなるであろうという仮定は、肝ガン疫学的調査の分野の突破口となるかもしれない。特に p53 とアフラトキシンの関係の特異性を確かめることは、アフラトキシンが肝ガン発症の原発であるかどうかの評価や肝炎ウイルスとの相互作用の可能性を見定めることに役立つであろう。

10-3. 原発性肝ガンの疫学的調査

アフリカやアジアなど食物にアフラトキシンが相当含まれている地域における多くの疫学的研究によってヒトにおいてアフラトキシン（トータルまたはAFB1）の潜在的な発ガン性が検討されている。アフラトキシンの曝露は B 型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルスの可能性もある、の曝露によりリスクは高まる。この関係は、ガン性の潜在性に影響を及ぼしているだけでなく、アフラトキシンの代謝系、生化学的、薬理的なプロセスにも影響を及ぼしている。他の多くの原発性肝ガンの多くの病原因子がアフラトキシン原発性肝ガンのリスクを背景とした疫学的研究の解釈を難しいものにしてている。おそらく更なる進歩によって見出された生化学、薬理的マーカーが正確な曝露評価を可能にするであろう。

アフラトキシン B₂, G₁, G₂の毒性に関しては、1993年に行われた IARC の評価後、新たな知見はない。

2002 年 IARC Monograph 要旨

World Health Organization

International Agency for Research on Cancer

IARC Monographs volume 82(2002)

1、Studies of Cancer in Humans

1960 年代初頭から 1980 年代にかけてアフラトキシンの摂取と肝ガンのリスクの関係について疫学調査が進んだ。主にサハラアフリカとアジアを対象とした。しかし、個人のアフラトキシン摂取量などに不明な点が多いことからこれらの調査には限界があり、個人単位で研究する必要性が出てきた。

1980 年代、高いリスク地域で症例対照研究が行われた。アフラトキシンの摂取量は、質問表やバイオマーカーの測定に基づいて調査した。病気が発症してからはこれらを調べても過去のアフラトキシン摂取量が分からなかった。

1980 年代半ばになるとコホート研究が行われるようになった。1992 年、IARC Working Group はアフラトキシン B1 と自然界で起こりうるアフラトキシンの混合物がヒトの肝ガン発生原因として重要であることを明らかにした。

1-1 Descriptive studies

Hatch (1993)

原発性肝細胞ガン発生が多い台湾の 8 地域で横断研究を行った。計 250 人の成人を対象とし、インタビューと朝に尿と血液サンプルを集めた。血清は B 型肝炎ウイルスの表面抗原 (HBsAb) を検出し、尿はアフラトキシン B1、G1 や M1、P1 などの代謝産物を測定した。B 型肝炎ウイルスキャリアーとノンキャリアーは、男女で差がみられなかった。アフラトキシンの摂取量は HCC 発生と関係があった。喫煙やアルコールなど他の 190 項目については関係が排除された。

Omer(1998)

スーダンの 2 地域についてアフラトキシン汚染ピーナッツと HCC 発生の関係を検討した。HCC 発生は都市部よりも東部地方で高いとされた。スーパーで販売されているピーナツバターをサンプルとし、保存状態と HPLC によりアフラトキシン B1 摂取量を測定した。アフラトキシン B1 測定量は東部スーダンではるかに上回り、消費量も多いことが明らかになった。

1-2 Cohort studies

Qian (1994)

上海で 45 から 64 歳の男性 18244 人を対象とした。調査票と採血、採尿を行った。1986 年から 1989 年の間に開始し、1992 年 2 月 1 日まで行った。364 例のガン発症例があり、55 例で原発性肝ガンとされた。また、アフラトキシン曝露のバイオマーカーとリスクの関係

を明らかにするために 50 症例について症例対照研究を行った。尿中のアフラトキシン B1、P1、M1 とアフラトキシン-N7-グアニン複合体について測定し、HBsAg をラジオイムノアッセイを用いて検討した。50 症例中 2/3 とコントロール 31/267 人に HBsAg 陽性が認められた。アフラトキシンバイオマーカーは多くの症例で認められた。アフラトキシン B1-N7-グアニン複合体の形成がリスクを高めた。アフラトキシンバイオマーカーと HBsAg 陽性の場合に高いリスクを高めた。

Chen(1996)

30 ~65 歳の男性 4691 人、女性 1796 人を対象とした。食事や薬の摂取について調査を行い、採血と採尿を行った。血清マーカーと超音波検査によって HCC のスクリーニングを行った。さらに年に 1 回追跡調査を行った。1993 年までに 33 人が HCC と診断され、2 人は HBsAg 陰性であった。血液中の HBsAg、抗 C 型肝炎ウイルス抗体、アフラトキシン B1-アルブミン複合体を測定したところ、アフラトキシン-アルブミン複合体と HCC 発生の関係は HBsAg 陽性の場合にさらに上昇した。ピーナッツがアフラトキシンの汚染源であるとした。

Wang(1996)

台湾の 7 つの町の 25618 人(男性 47%)を対象とし 1990 年 7 月から 1992 年 6 月に調査した。アルコール、喫煙、薬の摂取状態について調査し、採血と採尿を行った。血液中の HBsAg、 α -フェトプロテイン、高 HCV と肝機能調査、腹腔内超音波検査を行った。さらに 1992~1994 年の間に追跡調査も実施した。1995 年まで死亡やガン発生の有無を調査した。1991 年~1995 年の間に 56 症例の HCC 発生がみられ、うち 22 症例は組織、細胞診断によって明らかになった。アフラトキシンバイオマーカーが陽性のとき HCC 発生に大きな影響を与えることが分かった。

Sun (2001)

1991 年~1997 年に調査を行った。HCC 発生とアフラトキシン B1-アルブミン複合体の間には密接な関係がみられた。GSTM1 と GSTT1-null は HCC 発生を減少させ、これらには相互作用がみられることが分かった。

Yu(1997)

1988 年~1992 年に台湾の 30~60 歳の男性 HBsAg 陽性 4841 人と陰性 2501 人を対象にした。50 症例に HCC 発生が認められ、1 例を除き HBsAg 陽性であった。すべてアフラトキシン M1 陽性、アフラトキシン P1 は 81%、アフラトキシン B1-N7-グアニン複合体は 43%、アフラトキシン B1 は 28%、アフラトキシン G1 は 12%に陽性であった。アフラトキシンを含む食品の摂取と尿中のアフラトキシン M1 の間には関係があることが示唆された。アフラトキシン G1 を除くアフラトキシンバイオマーカーが上昇すると HCC のリスクが高まることが示唆された。

Lu(1998)

HBsAg キャリアーの中で肝ガンを起こした 30 人はアフラトキシン B1-アルブミン複合

体が高く、年齢地域には差がなかった。

Sun(1999)

1981年~1982年に慢性B型肝炎を持つ145人の男性を対象とし、1987~98年まで追跡調査を行った。145人中22人が肝ガンと診断され、うち10人は組織調査により分かった。HCVが陽性だと陰性と比較してHCCのリスクが増すことが分かった。

1-3. Case-control studies

Olbuyide(1993)

ナイジェリアの症例22人、対照22人について調査した。HBsAgとアフラトキシンが原発性肝ガンと関係があることを示唆した。

Omer(2001)

スーダンのHCC症例150人と対照250人について調査を行い、アフラトキシンの汚染源であるピーナツバター摂取とGSTM1遺伝子型の関係を明らかにした。症例はピーナツバターの消費量が多かった。ピーナツバターの消費量とHCC発生の危険度は比例関係にあった。特に東部地方で深刻であった。地域による環境や遺伝的な違いも影響する可能性があった。GSTM1遺伝型はHCC発生の危険度と関係なかった。GSTM1-null型がピーナツバターによるHCC発生の危険度を増すことが示唆された。

1-4. Limitations and recent studies

アフラトキシンバイオマーカーはアフラトキシン曝露を知るために用いられるようになった。しかし、尿中のアフラトキシン代謝産物や血清中のアフラトキシン-アルブミン複合体は数日、数週間前の曝露状態を知るのみである。さらに肝ガン発生前の肝障害が血清や尿中のバイオマーカー量に影響するのかは明らかになっていない。

2. Studies of Cancer in Experimental Animals

アフラトキシンの混合物や、アフラトキシンB1をラット、ハムスター、鮭、ニジマス、カモ、トガリネズミやサルに経口投与すると良性や悪性肝細胞腫瘍や胆管細胞腫瘍が発生する。マウスでは経口投与しても肝細胞腫瘍の発生が認められなかった。ラットでは経口投与後に尿管で腫瘍の発生がおり、マウスでは腹腔内投与後に肺で発生した。妊娠や授乳中のラットに腹腔内投与すると母親だけでなく子供の肝臓にも腫瘍の発生が認められた。アフラトキシンB1をラットに経口投与すると肝臓で腺腫が発生し、腹腔内投与すると肝細胞ガンがやや発生した。アフラトキシンG1をラットに経口投与すると肝細胞の腺腫や腫瘍や尿管細胞の腫瘍が発生したが、アフラトキシンB1に比べて軽度であった。アフラトキシンM1やその代謝産物であるアフラトキシコールも同じ傾向がみられたが、アフラトキシンQ1はニジマスにおいてB1よりも高い発生が認められた。

実験動物を用いたアフラトキシンの発ガン性評価は、アフラトキシンB1、G1、M1で進

んでいる。

2-1. 腹腔内投与

2-1.1 トランスジェニックマウス

野生型 F1×F1 (C57BL/6×CBA) とトランスジェニックマウスに $6\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{w.}$ を 7 日間腹腔内投与した。12 ヶ月後に腺腫と肝細胞ガンが発生した。トランスジェニックマウスでは腺腫が 2/12、肝細胞ガンが 1/12 であり、野生型では腺腫が 3/11、肝細胞ガンが 0/11 であった。

3.1 アンモニア化物の経口投与

3.1.1 ラット

Wistar WAG と Fisher 344 ラットにアフラトキシン B1 を 1000ppb 含む餌を 4 - 5 週間与えた。また、アンモニアガスでこの餌を処理し、アンモニアの影響を検討した。

アンモニアを含まない餌を与えたラットでは死亡する個体が現れた。

アンモニアを同時に含む餌を与えたラットで肝細胞腫瘍の発生率は低かった。アンモニアの含有量が上がると発生は認められなかった。

3.1.2 ニジマス

80 匹のニジマス $180\mu\text{g}/\text{kg}$ のアフラトキシンを含む餌 (アンモニア未処理と処理) を 12 ヶ月間与えた。

アンモニア処理によりアフラトキシン B1 によるガン発生率が低下した。

3.2 Carcinogenicity of metabolites

アフラトキシンの代謝産物 (B1、M1、アフラトキシコールなど) によって腫瘍形成の程度が異なるのは、DNA 複合体自身のガン誘発作用の強さよりも、その吸収量と代謝によって DNA 複合体の形成を起こす程度が主な原因である

3.3 Administration with known carcinogens and other modifying factors

3.3.1 ウイルス

トランスジェニックマウス

B 型肝炎ウイルス陽性 (HBV+) C57BL/6 マウスを TP53-null (TP53^{-/-}) マウスを交配させて TP53^{+/-}, HBV+ マウスを作出した。

1 週齢時にアフラトキシン B1 (10mg/kg b.w.) を腹腔内投与し、13 週間後に解剖して HBsAg 発現により HBV を判定した。

Beckers の分類に当てはめると、TP53 がヘテロ型の雄ではグレード 2 以上の肝細胞腫瘍が 100%見られ、ホモの場合は 62.5%であった。また、ヘテロ型の場合 HBV のみ陽性

である方が、アフラトキシンのみ陽性である場合よりもより強かった。アフラトキシンと HBV のどちらか一方のみ曝露を受けた場合は野生型 TP53 が腫瘍を抑制した。TP53 のセリン 246 に突然変異が起こるとウイルスまたはアフラトキシンの存在に関わらず 25%で腫瘍の発生が認められた。TP53 の 246 セリンが突然変異したヘテロ型個体ではアフラトキシン B1 を曝露された 71%に腫瘍の発生をみた。雌では腫瘍発生率が低かったが、同様の傾向が認められた。HBsAg とアフラトキシン B1 の相互作用とアフラトキシン B1 曝露のみでは腫瘍発生率を増加させた。

トガリネズミ

HBV 感染と非感染のトガリネズミにアフラトキシン B1 150 μ g/kg b.w.を 6 日/週で 150 日間にわたり曝露させた。

肝細胞腫瘍は、HBV 感染群で 67%、非感染群で 30%に認められた。HBV 感染群では腫瘍の形成が早期に起こった。

ウッドチャック

2~7 日齢で肝炎ウイルス (WHV) に感染させ、12 ヶ月齢でアフラトキシン B1 50 μ g/kg b.w.を 5 日/週で 4 ヶ月間投与しさらに 20 μ g/kg b.w.を投与し続けた。

WHV 感染とアフラトキシン曝露では、WHV 感染+アフラトキシン非曝露に比べて肝細胞腫瘍の形成が早期に認められた。

4、Other Data Relevant to an Evaluation of Carcinogenicity and its Metabolisms

4.1 Absorption, distribution, metabolism and excretion

4.1.1 Human

ヒトでは、他の種と同様にシトクローム P450 により 8,9-エポキシド⁶が形成され、アフラトキシン B1-DNA 複合体を形成し発ガン性を示す。アフラトキシンの活性化の程度は個人差がみられ、子供と成人で異なる。ヒトにおけるアフラトキシンの動態はいまだに明らかにされていない。

アフラトキシンに対する感受性がヒト、動物種で異なるのは、アフラトキシンが 8,9-エポキシド⁶や、他の毒性の低い物質に代謝される割合の違いによる。

アフラトキシン B1 の 8,9-エポキシド⁶は半減期が短い、細胞障害の原因になる。アフラトキシン B1 はグアニンの N7 部位に結合する。

ヒトにおけるアフラトキシン代謝は主に CYP1A2 や CYP3A4 などの CYP 酵素によって行われる。CYP3A4 はエキソ-エポキシド⁶とアフラトキシン Q1 に代謝し、CYP1A2 は少量のエキソ-エポキシド⁶と多量のエンド-エポキシド⁶とアフラトキシン M1 に代謝する。In vivo 試験では、CYP1A2 と 3A4 がヒトにおけるアフラトキシン代謝に重要な酵素であり、バイオマーカー試験で使われている。アフラトキシン M1 と Q1 はアフラトキシン曝露を受

けた個体の尿中に存在する。アフラトキシンと N7-グアニン複合体は、エキソ-8,9-エポキシド⁶によって形成され、複合体の 98%以上を占める。CYP3A5 は 3A4 と異なりアフラトキシンを主にエキソ-8,9-エポキシド⁶に代謝し、アフラトキシン Q への代謝能力は 1/100 以下である。肝臓の CYP3A5 発現には個人差があり、40%のアフリカ系アメリカ人には存在しない。さらに CYP3A5 発現の違いはアフラトキシン感受性の違いに反映しており、プロモータ部分に多様性がある。

CYP3A7 は胎児の肝臓で主要なシトクローム P450 であり、アフラトキシン B1 を 8,9-エポキシド⁶に活性化する。ガンビアでは、アフラトキシン B1 の曝露を受けた母親から生まれた子供の血液からアフラトキシン-アルブミン複合体が検出された。

ヒトでは、エキソ-、エンド-エポキシド⁶の解毒経路がいくつかある。一つはグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) によりグルタチオン (GSH) とアフラトキシン B1 を結合させる経路である。また、非酵素作用による水酸化で 8,9-ジヒドロジオールをつくる。アフラトキシン B1、G1 のジアルデヒドはリジンなどのアミノ酸とシッフ結合をつくり、タンパク複合体をつくる。アフラトキシン B1 アルデヒドレダクターゼ (AFB1-AR) は NADPH 依存性の代謝を促進する酵素で、ヒトとラットが持つ。

住血吸虫除去剤である Oltiplaz はアフラトキシン誘発性の肝細胞腫瘍を阻害する。毎週 500mg の oltiplaz を摂取すると尿中のアフラトキシン M1 量が 51%減少した。125mg ではアフラトキシン M1 排泄量に変化は見られなかった。従って、高用量の oltipraz はアフラトキシンの活性を阻害するが、低用量では 8,9-エポキシド⁶の GSH 結合を増加させることが分かった。

ガン患者では CYP3A4 が 57 倍、2B6 が 56 倍、2A6 が 120 倍の活性を示した。肝細胞腫瘍からマイクロソームを取るとアフラトキシン B1 から 8,9-エポキシド⁶とアフラトキシン Q への代謝は CYP3A3/4 と CYP2B6 の濃度と関係する。腫瘍細胞では主な CYP 酵素が減少していた。腫瘍細胞のサイトゾルでは α と μ クラス蛋白質は低下するが、 π は増加した。一方、サイトゾルの GST 活性は顕著に低下した。アフラトキシン B1 8,9-エポキシド⁶と GSH 結合には変化が認められなかった。

B 型肝炎ウイルスや C 型肝炎ウイルスに感染すると CYP2A6 が増加し、肝細胞は繊維化と肝硬変へと進んだ。CYP3A4 や 2B1 も増加したが、1A2 には影響がなかった。C 型肝炎ウイルスでは、CYP2A6、CYP3A4、CYP2B1 が増加した肝細胞ではヘモジデリンの沈着がみられた。

4.1.2. Experimental systems

Human tissues

Gallagher は CYP3A4 や CYP1A2cDNA を発現するヒト肝臓やリンパ芽球のマイクロソームがアフラトキシン酸化を起こす機序について研究した。CYP1A2 でアフラトキシンと強い親和性があった。ヒトでは、アフラトキシン 8,9-エポキシド⁶形成率は CYP1A2 多い

と高まった。

アフラトキシン汚染穀物を扱うことで肺ガン発生率のリスクが高まることは、ヒトの肺がアフラトキシンの代謝を起こすことと関係がある。トリチウム化したアフラトキシン B1 の生物活性を肺ガン患者のサンプルから評価した。リポキシゲナーゼやプロスタグランジン H の合成は CYP 酵素よりアフラトキシン活性化と関係があることを明らかにした。

Neal ら(1998)はアフラトキシン B1 と M1 の代謝についてヒトの肝臓ミクロソームを用いて検討した。マウスのサイトゾル存在する Tris や GST で代謝産物をトラップし、アフラトキシン M1 から 8,9-エポキシド⁶への代謝を測定した。ヒト肝臓サイトゾルには GST とミクロソームで活性化したアフラトキシン B1 と M1 の結合体は存在しなかった。アフラトキシン B1 と異なり、低用量のアフラトキシン M1 は、代謝によって活性化されなくても細胞毒性を示した。アフラトキシン B1 がヒドロキシル化してアフラトキシン M1 になると DNA 損傷を起こすことを示唆する研究もある。

以上のようにヒトサイトゾル分画や肝臓の薄片はアフラトキシン B1-8,9-エポキシド⁶の結合は検出されなかった。ヒトの組み換え α -クラス GSTs (hGSTA1-1 と 1-2) も活性はなく、ヒト μ -クラス GSTs M1a-1a と M2-2 はエンド-エポキシド⁶に対するのが大部分であるが結合を示した。

(b) Experiment on animals and animal tissues

Kirby(1996)は肝障害を起こすウイルス感染がアフラトキシン代謝活性を変化させることを明らかにした。トランスジェニックマウスでは HBV のエンベロープの過剰産生が肝細胞の損傷を起こし、炎症や過形成を起こした。CYP2A5 と CYP3A の活性と GST α アイソザイムをこれらのマウスで測定した。CYP2A5 の活性増加と分布の変化が、肝障害の形成と関係することが明らかになった。CYP3A 量も増加したが、GST α 酵素濃度は変化がみられなかった。

胎児ラットのかんぞうはアフラトキシン B1-8,9-エポキシド⁶と結合する GST を含み、GST α とされる。雌の成熟個体では雄に比べて酵素サブユニット (Yc2) の濃度が 10 倍ほど高い。これは、雌でアフラトキシン感受性が欠如することに関係する。

CYP 誘発性の活性化に加えて、アフラトキシン B1-8,9-エポキシド⁶は、リポオキシゲナーゼやプロスタグランジン H 合成によって形成することも報告された。モルモットの腎臓では CYP 酵素とプロスタグランジン H 合成によるエポキシド⁶形成は類似している。

アフラトキシンの発ガン性に対する感受性には動物種差がみられる。マウスでは肝切除や HBV 感染による肝障害の状態を除いて抵抗性があるが、ラットでは感受性が高い。マウスのマイクロソーム分画はラットに比べてアフラトキシン B1-8,9-エポキシド⁶産生に高い特異的活性を示す。しかしマウスではアフラトキシンに抵抗性があり、アフラトキシン B1 8,9-エポキシド⁶と高い親和性を示す α -クラス GST、mGSTA3-3 の肝発現が関係ある。一方、ラットではエポキシド⁶と高い活性を示す GST 異性体や発現はないが、 α GST が発現

する。この酵素の誘導は、ラットがアフラトキシン抵抗性を示す原因である。

アフラトキシン B1 曝露後のアルブミンと DNA 複合体の形成は、ラット>モルモット>ハムスター>マウスの順である。アルブミン複合体は肝 DNA 損傷を反映している。ヒトの曝露量とアルブミン複合体を測定すると、ヒトとラットは感受性が高い種であり、アルブミン複合体の形成が類似していることがわかった。

ラットでは μ クラス酵素 rGSTM2-2 と rGSTM2-3 が endo-と exo-エポキシド⁶と結合する。Wang(2000)らはヒト以外の種の 8,9-エポキシド⁶に対する GST の結合能は、ヒト hGSTM2 と 96%の相同性を示す μ クラス GST、mfaGST2-2 によるとした。mfaGSTM2-2 は endo-エポキシド⁶に対して活性を示し、GSHA-GST は exo-エポキシド⁶に対して活性を示した。しかし、これらの活性はげっ歯類の α -クラス GST、nGSTA3-3 と rGSTA5-5 に比べて低かった。

ヒトやモルモットの肝マイクロソームはアフラトキシン B1 から 8,9-エポキシド⁶への酸化の程度がマカークに類似している。しかし、GST のエポキシド⁶に対する活性は検出限界以下である。

Stresser(1994)はインドール-3-カルビノールを摂取することが、アフラトキシン代謝をする CYP 酵素量に及ぼす影響について検討した。ラットマイクロソーム中の CYP1A1、1A2、3A1/2 酵素は増加した。CYP2C11 には影響がなかった。アフラトキシン B1 グルタチオン解毒経路とアフラトキシン B1-DNA 複合体形成について検討したところ、肝臓のアフラトキシン B1-DNA 複合体形成は 68%ほど低下した。

4.2 Toxic effects

4.2.1 Humans

アフラトキシン摂取の結果起こりうる急性肝細胞毒性は成人よりも子供の方が深刻である。嘔吐、発作、黄疸などの症状に加え、肝機能障害や血清肝酵素の上昇が認められる。小麦で作られた麺を食べた子供において、血液や臓器からアフラトキシンが検出された。成人では同じくらい食べた場合でも影響が見られなかった。

発展途上国ではタンパク質-エネルギー不足の子供がアフラトキシンの曝露を受けている。南アフリカの子供たちは血清中のアフラトキシン濃度がコントロールの子供に比べて高かった。しかし、コントロールの子供では尿中のアフラトキシン濃度が高かった。さらに蛋白質-エネルギー不足に加え、アフラトキシンの曝露を受けた子供では、ヘモグロビンの低下、水腫回復の遅延、感染症の増加、入院期間の延長がみられた。アフラトキシンの曝露を受けた子供ではマラリアの感染が増加した。

4.2.2 Experimental systems

(a) Immunosuppression

アフラトキシンを数 mg/kg feed 投与することで免疫抑制が起こることが報告されている。

主な影響は遅延型過敏症などの細胞性免疫反応を抑制することである。そのほか抗体産生の減少、拒絶反応の低下、食食能の低下、マイコジエンに対する細胞増殖反応の低下などが起こりうる。In vitro でアフラトキシンなどのマイコトキシンを作用させるとサイトカインの分泌や、インターロイキンの遺伝子発現が変化する。妊娠期間と授乳期間にアフラトキシン B1、G1 に曝露された豚では免疫機能に影響が見られた。好中球の寿命と走化性はアフラトキシンを含む飼料を与えた子豚で低下した。さらに、妊娠 60 日から、出生後 28 日までアフラトキシン B1 の曝露を受けた子豚では胸腺のリンパ球が減少し、胸腺重量が低下していた。

ラットでは成熟個体と未成熟個体でアフラトキシンによる影響が類似していた。離乳後のラットにアフラトキシンを投与すると、細胞性免疫反応が低下していた。

アフラトキシンとトキソプラズマ症の関係を明らかにするために CF1 マウスに *Toxoplasma gondii* を摂取し、一ヶ月後にアフラトキシン B1 を摂取させた。すべてのマウスにシストの形成が見られたが、アフラトキシンの曝露を受けたマウスでは損傷が大きかった。

アフラトキシンが分離した肺胞マクロファージに及ぼす影響について検討した。鼻からアフラトキシン B1 を吸引させた Swiss マウスでは肺胞マクロファージの食食能が低下した。胸部内に投与したマウスでも見られたが、10 倍量を必要とした。胸部内の投与では TNF- α 産生能の低下と腹腔マクロファージ食食能の低下が認められた。

アフラトキシンによる免疫抑制は細菌や寄生虫の感受性が増加し、ワクチン接種後の獲得免疫を阻害する。ヒトでは動物実験と異なり in vitro 試験しか行われていない。ヒトの単球とアフラトキシン B1 を曝露させると *Candida albicans* に対する食食能と殺菌能が低下し、IL-1、6、TNF- α 産生能も低下した。マイコトキシンによる免疫抑制は子供の感染症への感受性を増加させる。B 型肝炎ウイルスに対する免疫反応の低下は、肝細胞ガン発症のリスクを高めることになるであろう。

4.3 Reproductive and developmental effects

アフラトキシンは胎盤を通過し、母体よりも胎児の濃度が高くなるという報告がある。高用量(32~90mg/kg b.w.)のアフラトキシンをマウスの腹腔内に投与すると、奇形や未熟児出産がみられたが、経口投与ではみられなかった。ラットでは、未熟児の出産や行動異常がみられたが、奇形は 2~7 mg/kg b.w. で投与した場合にのみ発生した。

4.3.1 Humans

アフラトキシンは胎盤を通過し、胎児に蓄積されることが報告されている。母体の血液中のアフラトキシンを測定すると、6%にしか検出されなかったが、胎児の血液中は 38%に検出された。

アフラトキシン曝露と成長の関係について検討すると血液中のアフラトキシン-アルブミ

ン複合体は授乳期の子供に比べて離乳した子供で高かった。WHO の報告によると血液中のアフラトキシン-アルブミン複合体と身長-年齢、体重-年齢の関係は負の関係にある。つまり、アフラトキシンは東アフリカの子供たちの成長阻害の原因物質であることを示す。

イバダンの黄疸発生がアフラトキシンに起因しているのかを検討するために 327 人の黄疸患者と 60 人のコントロールの血液を採取した。アフラトキシンは 24.7%の黄疸患者、16.6%のコントロールから検出された。グルコース-6-ホスファターゼデヒドロゲナーゼ不足と血清中のアフラトキシンは子供の黄疸発生の原因であることを示唆した。

開環したイミダゾール環をもつアフラトキシン B1-DNA 複合体の量を胎盤と胎児血液について測定した。その結果アフラトキシン B1 とその代謝産物は次世代に移行する可能性があることを示唆した。

ナイジェリアでは男性の不妊症患者の 40%の血液中からアフラトキシン B1 が検出された。

4.3.2 Experimental systems

(a) Developmental toxicity studies

Wister ラットに 0.3mg/kg b.w./day のアフラトキシン B1 を妊娠 11~14 日または妊娠 15~18 日に皮下投与した。妊娠期または授乳期の間母体への影響は認められなかった。アフラトキシンの曝露は子供の運動能力や学習能力の発達を阻害した。妊娠 11~14 日に投与した群の方がより顕著であった。

アフラトキシン B1 を鶏卵に投与すると胚の致死率増加、胚重量の低下などが認められた。

(b) Reproductive toxicity studies

Druckrey ラットに 7.5mg/kg b.w.のアフラトキシン B1 を 14 日間投与すると、受胎能力の低下、卵巣と子宮サイズの低下、ホルモンサイクルの乱れ、妊娠率の低下や胎児サイズの減少などがみられた。

Druckrey ラットに 7.5 または 15mg/kg b.w.のアフラトキシンを 21 日間投与した。卵母細胞や濾胞の減少が用量依存的に認められた。血中ホルモン量と生殖器官の重量低下も認められた。

雄のウサギに 15 または 30mg/kg b.w. のアフラトキシン B1 を 1 日おきに 9 週間に渡って投与した。体重、精巣重量、射精量、精子濃度、精子の生存力は低下し、奇形精子の増加が認められた。これらは投与後 9 週間に渡る回復期まで続いた。アスコルビン酸の投与はこれらの影響を緩和した。

雌ミンクに 5 または 10ppb のアフラトキシンを含む飼料を 90 日間与えた。1 生後間もない体重は 10ppb で減少がみられ、生後 3 週間目では両群で抑制された。生後 3 週間目には 10ppb では 33%の致死率を示した。10ppb ではミルク中のアフラトキシン代謝産物

量は低かった。

In vitro 試験で卵母細胞と精子の生存率の低下が示された。

4.4 Genetic and related effects

4.4.1 Humans

(a) General

アフラトキシン-DNA、蛋白質複合体は多くの実験でヒトの肝臓や体内から検出されている。いくつかの実験では酵素で代謝されて形成された複合体がアフラトキシンの感受性を測るために利用されている。

アフラトキシン-アルブミン複合体量と GSTM1、GSTT1、GSTP1 とエポキシドヒドロゲナーゼ遺伝子の関係について検討した。GSTM1-null 遺伝子型だけがアフラトキシン-アルブミン複合体の増加と関係があり、この影響は HBV 非感染個体に限定されることが分かった。CYP3A4 表現型を尿中コルチゾル代謝産物の割合によって評価すると、複合体とは関係がないことが分かった。アフラトキシン-アルブミン複合体量に影響を与える主要因は、居住地域（地方）と採血時の季節（乾燥気候のほうが高い）であることが分かった。アフラトキシン-アルブミン複合体と GSTM1 遺伝子型の間には関係がないことが分かった。

DNA 修復酵素である XRCC1 がアフラトキシン B1-DNA 複合体と関係がみられるかを、胎盤 DNA のサンプルを用いて検討した。399Ala のホモ型と比べて、399Glu を対立遺伝子に持つ場合はアフラトキシン B1-DNA 複合体の検出が 2、3 倍に上昇した。しかしながら、399Glu は直接作用しているのではないことが分かり、修復経路の飽和状態を反映していることを示唆した。

血清アフラトキシン B1-アルブミン複合体量によってアフラトキシン曝露量を高程度と低程度に分類し、リンパ球の HPRT 突然変異発生頻度を比較した。HPRT 変異発生は高程度の曝露群でみられた。

アフラトキシン-アルブミン複合体と細胞の染色体異常、DNA 損傷は関係なかった。

(b) TP53 mutations in human hepatocellular carcinoma(HCC)

ヒト HCC の分子学的分析により、アフラトキシンの曝露で TP53 腫瘍-抑制遺伝子のコドン 249 の AGG から AGT への転換が起こることを明らかにした。1993 年以降アフラトキシンと TP53 変異の関係について多くの報告がある。

アフラトキシン汚染の程度が高い地域の HCC 組織 25 サンプルと、低い地域の 9 サンプルについて検討した。汚染の高い地域では 52%のサンプルに 249^{ser} 突然変異が認められたが低い地域では認められなかった。さらに中国の Jiang-su 地方で HCC を 31 サンプル採取し検討した。アフラトキシン汚染が低いと考えられる北部では 15%、汚染が高いと考えられる南部では 56%に 249^{ser} 突然変異が認められた。香港や上海でも 249^{ser} 突然変異を示したサンプルがあったが、日本や USA では認められなかった。

アフラトキシン汚染の低い地域（日本、韓国、ヨーロッパ、北米）では 249^{ser} 突然変異は 1%以下の確率で起こり、249 コドンの 3 番目のヌクレオチドより、2 番目で突然変異がみられた。

慢性的な HBV 感染とアフラトキシン曝露は、HCC 発生のリスク要因となりうるが、慢性的な HBV 感染のみでも 249^{ser} 突然変異がおこるのかを検討することが重要である。様々な研究からアフラトキシン汚染の低い地域では、HBV 感染のみで 249^{ser} 突然変異は起こらないことがわかった。アフラトキシン汚染の高い地域では HBV 感染率が高いために両要因が突然変異の発生に必要であるのかを判断するのは困難であった。

TP53 突然変異が HCC 発生のどの段階で起こるのかいまだにはっきりしない。モザンビークでは HCC 患者の非腫瘍部分の DNA から TP53249^{ser} 突然変異が検出された。この突然変異は組織学的には正常な細胞でもみられることが分かった。

TP53 249^{ser} 突然変異は HCC 患者の血液サンプルからも検出され、肝硬変患者や肝臓に疾病が認められないヒトでも認められた。249^{ser} 突然変異は HB s Ag-陽性、陰性には関係がなかった。

(c) Other genetic alternation in human HCC

アフラトキシン曝露が TP53 突然変異だけでなく、他の遺伝子へも変化をおよぼしている可能性がある。

TP53249^{ser} 突然変異は、北京に比べチートのサンプルで多く検出された。さらに異型接合体の損失 (LOH) もみつかった。チートンでは染色体 4 (4p11-q21) と 16q22.1, 16q22-24 にそれぞれ 28、90、58%のサンプルから LOH がみつかった。一方北京では検出されなかった。

また、HCC サンプルはハイブリダイゼーションを起こしていた。上海ではサンプルから変異が検出される確率が高く、染色体 4q、8p、16q、と 5p に多くみられた。これはアフラトキシンの影響が単に TP53 遺伝子の 249^{ser} 突然変異を起こすだけでなく、遺伝子に広範囲に及ぶことを示唆している。

4.4.2 Experimental systems

(a) General

アフラトキシン B1 は *Salmonella typhimurium* TA98 と TA100 に突然変異を起こし、DNA 合成の異常、染色体の異常、娘染色分体の置換、小核形成、細胞のトランスフォーメーションなどを起こすことが知られている。

アフラトキシン B1 は酵母や、哺乳類の細胞で点変異だけでなく、組み換えもおこす。ヒトのリンパ芽球細胞ではアフラトキシン B1 が組み換えや LOH を起こすことが示されている。

組み換えヒト CYP1A2 を発現する酵母のマイクロサテライトをシーケンスすると、アフラトキシン B1 により組み換えを起こしていた。さらに HBV トランスジェニックマウス

では、アフラトキシン曝露によりマイクロサテライト領域で再配列が起こっていた。アフラトキシンは点変異だけでなく、遺伝子を不安定にすることが分かった。

アフラトキシン B1 は代謝産物よりも変異原性が高い。S9 非存在下では *Salmonella* TA98、TA100 の変異原性が S9 存在下に比べて 1/1000 以下であった。

Fisher 344 ラットの脾臓リンパ球における Hprt 遺伝子突然変異を測定した。アフラトキシン B1 を 3 週間にわたり投与すると Hprt 変異が発生した。また、アフラトキシンを曝露させたラットでは、カロリーを制限すると突然変異の発生頻度が低くなることが分かった。

Fisher 344 ラットに①コントロール食②交互 4 週間ずつアフラトキシン B1 含有飼料とコントロール飼料 (0.01~1.6ppm) ③腫瘍原生を持つアフラトキシン濃度 (1.6ppm) を含む飼料を 20 週間にわたり与えた。②では、2 回目のアフラトキシン投与期間に脾臓リンパ球の Hprt 変異が用量依存性に増加した。これは、3 回目のアフラトキシン投与期間にさらに強くみられた。これらは脾臓リンパ球 DNA の DNA 損傷の結果と考えられる。

アフラトキシン投与後に毒性や発ガン性に種差が認められるのは、遺伝子の損傷を起こす原因になるマイクロソーム活性に違いがあるためである。ヒト、マウス、ラットの肝臓によりアフラトキシンを活性化し、ヒトリンパ球で染色分体交換発生について検討した。ヒト肝臓のマイクロソームで活性化したアフラトキシン B1 に曝露したリンパ球で、染色分体の交換が起こる頻度は個人差があった。染色分体の交換は CYP1A2 表現型に関係があり、GSTM1 遺伝子型やエポキシドヒドロラーゼ表現型とは関係がない。マウスのマイクロソームが最も強く働く。マウスのサイトゾルを加えるとアフラトキシン B1 誘発性の遺伝子毒性が低下した。

チャイニーズハムスター卵巣 AS52 のキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Gpt) 遺伝子とチャイニーズハムスター卵巣 K1BH4 細胞の変異原性試験を、鶏胚またはラットの肝臓 S9 によるアフラトキシンの代謝産物を用いて行った。Gpt 試験ではラットより鶏胚の S9 で 25 倍も変異原性が強かった。クマリンは、鶏胚で活性化したアフラトキシン B1 による変異発生頻度を低下させた。さらに鶏胚では、マウスに比べて K1BH4 細胞での Hprt 変異が高かった。

雄ラットとマウスにアフラトキシン B1 (0.01-1.0mg/kg b.w.) を投与し、染色体異常と骨髄の小核の出現頻度、末梢血のアフラトキシン B1-アルブミン複合体量について測定した。ラットでは 0.1mg/kg b.w.以上で染色体異常と小核出現頻度が増加したが、マウスでは 1.0mg/kg b.w.で染色体異常がやや増加し、小核は出現しなかった。ラットではアフラトキシン B1-アルブミン複合体量と染色体異常に関係がみられた。

Lambda/lacI トランスジェニック C57BL/6 マウスと Fisher 344 ラットにアフラトキシン B1 を投与し、in vivo で突然変異試験を行った。2.5mg/kg b.w.のアフラトキシンを腹腔内投与すると 14 日間の観察期間では突然変異がみられなかった。一方、0.25mg/kg b.w.のアフラトキシン B1 をラットに投与すると突然変異の発生頻度が 20 倍近く増加した。アフ