

動物用医薬品専門調査会における審議状況について

1. 審議状況

厚生労働省から食品安全委員会に意見を求められたマラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンに係る食品健康影響評価（平成 17 年 9 月 13 日付 厚生労働省発食安第 0913013 号）については、平成 17 年 9 月 26 日に開催された第 34 回動物用医薬品専門調査会（座長：三森国敏）において、審議結果（案）がとりまとめられた。

また、審議結果（案）については、幅広く国民に意見・情報を募った後に、食品安全委員会に報告することとなった。

2. マラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンに係る食品健康影響評価についての意見・情報の募集について

第 34 回動物用医薬品専門調査会における審議結果（案）を食品安全委員会ホームページ等に公開し、意見・情報を募集する。

1) 募集期間

平成 17 年 10 月 13 日（木）開催の食品安全委員会（第 115 回会合）終了後、平成 17 年 11 月 9 日（水）までの 4 週間。

2) 受付体制

電子メール（ホームページ上）、ファックス及び郵送

3) 意見・情報提供等への対応

いただいた意見・情報等を取りまとめ、動物用医薬品専門調査会の座長の指示のもと、必要に応じて専門調査会を開催し、審議結果を取りまとめ、食品安全委員会に報告する。

(案)

動物用医薬品評価書

マラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンの
食品健康影響評価について

2005年10月

食品安全委員会 動物用医薬品専門調査会

目次

頁

〈審議の経緯〉

〈食品安全委員会委員名簿〉

〈食品安全委員会動物用医薬品専門調査会専門委員名簿〉

〈マラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンの食品健康影響評価について（案）〉

1. はじめに	1
2. 薬剤の概要	2
3. MG及びLMGの安全性について	2
亜急性毒性試験	2
マウスを用いた2年間発がん性試験	3
ラットを用いた2年間発がん性試験	4
遺伝毒性試験	6
4. 食品健康影響評価について	10
5. 参考文献	12

〈審議の経緯〉

平成17年9月13日

厚生労働大臣から食品健康影響評価について要請、関係書類の
接受

平成17年9月15、22日

第111、112回食品安全委員会（要望事項説明）

平成17年9月26日

第34回動物用医薬品専門調査会

平成17年10月13日

第115回食品安全委員会（報告）

〈食品安全委員会委員〉

委員長	寺田 雅昭
委員長代理	寺尾 允男
	小泉 直子
	坂本 元子
	中村 靖彦
	本間 清一
	見上 彪

〈食品安全委員会動物用医薬品専門調査会専門委員〉

H17. 9. 30まで

座 長	三森 国敏	
座長代理	井上 松久	
	青木 宙	津田 洋幸
	明石 博臣	寺本 昭二
	江馬 眞	長尾 美奈子
	大野 泰雄	中村 政幸
	菅野 純	林 眞
	嶋田 甚五郎	藤田 正一
	鈴木 勝士	

H17. 10. 1から

青木 宙	津田 修治
明石 博臣	寺本 昭二
井上 松久	長尾 美奈子
江馬 眞	中村 政幸
大野 泰雄	林 眞
小川 久美子	藤田 正一
渋谷 淳	三森 国敏
嶋田 甚五郎	吉田 緑
鈴木 勝士	

マラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンの食品健康影響評価について(案)

1. はじめに

マラカイトグリーン(MG)は緑色の合成色素で、工業的にトリフェニルメタン染料として繊維等の染色に使用されている。また、抗菌活性を示し、安価で、利用しやすく効果も高かったこともあり、水産業において水カビ病の治療薬等として広く使用されていたが、構造的に核酸への親和性や、他の遺伝毒性発がん性が疑われる物質との類似性が指摘され、特に近年食用動物への使用が制限されてきている。JECFA や IARC と行った国際機関による評価はなされていないが、欧州等の諸外国において養殖水産動物への使用は禁止されている。

日本では MG は薬事法の一部改正 (H15 年 6 月 11 日公布、H15 年 7 月 30 日施行) 及びそれに伴う動物用医薬品等取締規則の一部改正により、平成 17 年 7 月 31 日を以って全ての食用水産用動物に対しての使用が禁止されている。また、食品衛生法上の規制として食肉、食鳥卵及び魚介類は、別途基準がある場合を除き、合成抗菌剤を含有してはならないとされていることから、MG が検出された食品は流通、販売されないよう管理されている。しかしながら、毒性に関する詳細な評価は行われておらず、マラカイトグリーンについての個別基準は設定されていない。

ロイコマラカイトグリーン(LMG)は MG の主要な代謝物であり、MG が生体内で還元されて生じる。MG と LMG の細菌、酵母、真菌に対する阻止円の比較の知見からは、LMG の抗菌活性は MG と比較して 100 倍程度低く⁽¹⁾抗菌活性はほとんど無い。しかし、0.8ppm の MG 溶液で 1 時間処理したナマズにおいて、血漿中の MG は 1-2 日以内に検出限界以下になったのに対し、LMG は 4 週間まで検出され、筋肉中では、MG は 2 週間、LMG は 6 週間まで残留が認められたとする報告や、ニジマス筋肉中の MG の半減期は 1.5 日であるのに対し、マス筋肉中の LMG の半減期は脂肪含有量に応じて 10-40 日とする報告があり⁽²⁾、MG が使用された魚類組織中には LMG が残留する可能性がある。LMG についても、毒性に関する詳細な評価は行われておらず、残留基準は設定されていない。

MG の食用動物への使用は国内及び諸外国においても多くで禁止されているが、なお輸入時の検査等において検出事例が報告されている。また、EU やカナダでは、MG に加え、主要な代謝物である LMG が魚類から検出されているとの報告がなされている。

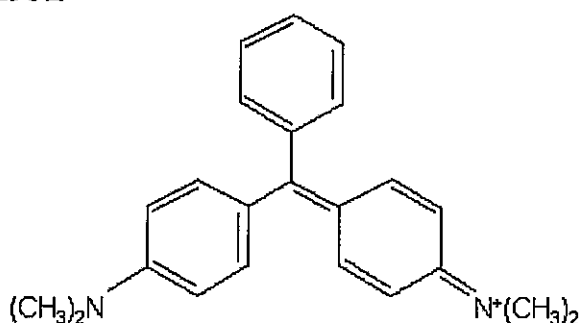
このため、今般、厚生労働省において MG 及び LMG について食品衛生法に基づく個別の規格基準の設定の検討を開始するに当たって、食品安全基本法に基づき、食品安全委員会に食品健康影響評価が依頼されたものである。

MG 及び LMG については、JECFA における毒性評価はなされておらず、国際基準も設定されていないが、EU において、MG 及び LMG の和として 2 μ g/kg との MRPLs (Minimum Required Performance Limits)³が、養殖水産動物について設定されている。

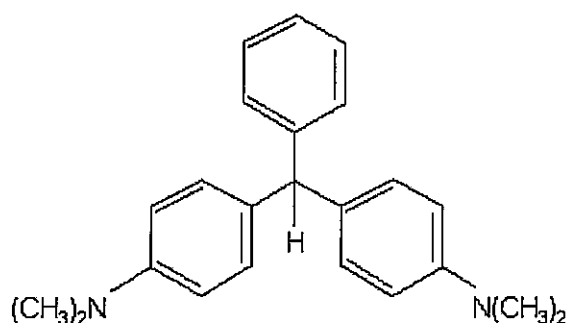
³「ある検体における対象物質の最少量のことであり、その量は少なくとも検出及び確認されなければならない。これは、基準が設定できない物質に対する分析方法の精度等を調和させることを目的とするためのものである。」と解説されている。EU 域内においてある物質の不検出の精度を調和させるために設定されている。

2. 薬剤の概要

物質名



マラカイトグリーン(Malachite green ; MG)



ロイコマラカイトグリーン(Leucomalachite green ; LMG)

分 子 式 : $C_{23}H_{25}N_2$ (マラカイトグリーン)、 $C_{23}H_{26}N_2$ (ロイコマラカイトグリーン)

分 子 量 : 329.47(MG)、330.48(LMG)

常温における性状 : MG は青緑色、LMG は白色の結晶

溶 解 度 : 水に可溶

3. MG 及び LMG の安全性について

MG 及び LMG については、通常動物用医薬品で要求されている体系的な毒性試験は実施されていない。しかしながら、米国 NTP^bによりげっ歯類を用いた 2 年間の発がん性試験及び、そのパイロット試験として実施された 28 日間亜急性毒性試験が報告されている。また、遺伝毒性に関する種々の公表論文が報告されている他、英国 COM^cと COC^dの共同声明が公表されている⁽³⁾。これらの入手し得た知見を総括すると、MG 及び LMG の安全性に関する所見は次のとおりである。

【亜急性毒性試験】⁽⁴⁾

<マラカイトグリーン>

雌雄の F344/N ラット(8 匹/群)及び B6C3F₁ マウス(8 匹/群)に塩化 MG を混餌(0、25、100、300、600、1200ppm；雄ラット 0、3、12、40、70、175mg/kg 体重、雌ラット 0、3、12、40、75、190mg/kg 体重、雄マウス 0、4、18、50、100、220mg/kg 体重、雌マウス 0、5、20、65、120、250mg/kg 体重)投与した 28 日間の亜急性毒性試験が米国 NTP より報告されている。

ラット、マウスともに試験中の生存率に影響は認められなかったが、1200ppm では体重増加量の減少や体重の低値が見られ、2 年間の試験の用量としては適切でないと考察されている。毒性所見としては Ht の低値(雄マウスの 300ppm 以上投与群、雌マウスの 600ppm 以上投与群、雌ラットの 1200ppm 投与群)、Hb の低値(雌雄マウスの 300ppm 以上投与群、雌雄ラットの 1200ppm 投与群)、赤血球数の低値(雌マウスの 100ppm 以上投与群、雄マウスの 300ppm 以上投与群、雌ラットの 1200ppm 投与群)等の貧血傾向が認められた。また、ラットにおいて雌の 300ppm 以上投与群で肝臓の相対及び絶対重量の増加、600ppm 以上の雄で相対重量の増加、血液生化学的検査で雌の 600ppm 以上投与群で γ -glutamyltransferase 活性の増加、病理組織学的検査で 1200ppm 投与群の雌雄で肝細胞空胞化が認められ、ラットにおける肝毒性が

^b National Toxicology Program

^c COMMITTEE ON MUTAGENICITY OF CHEMICALS IN FOOD, CONSUMER PRODUCTS AND THE ENVIRONMENT

^d COMMITTEE ON CARCINOGENICITY OF CHEMICALS IN FOOD, CONSUMER PRODUCTS AND THE ENVIRONMENT

示唆された。

マウス、ラットとも雌で影響がより強い傾向が認められた。

<ロイコマラカイトグリーン>

F344/N 雄ラット(8 匹/群)及び B6C3F₁ 雌マウス(8 匹/群)に LMG を混餌(0、290、580、1160ppm；雄ラット 0、30、60、115mg/kg 体重、雌マウス 0、60、110、220mg/kg 体重)投与した 28 日間の亜急性毒性試験が米国 NTP より報告されている。

ラット、マウスともに試験中の生存率に影響は認められなかったが、580ppm 以上投与群では体重増加量の減少、1160ppm 投与群では体重の低値が見られ、1160ppm の投与量は 2 年間の試験の用量としては適切でないと考察されている。毒性所見としてはラットの 1160ppm 投与群で Ht、Hb、赤血球数の低値等の貧血の傾向が認められた。また、ラットの全ての投与群で肝臓の相対重量の増加が認められ、1160ppm 投与群では絶対重量も増加していた。マウスでは 1160ppm 投与群の雌で相対重量の増加が認められた。ラットの 1160ppm 投与群で γ -glutamyltransferase 活性の増加、病理組織学的検査で 580ppm 以上投与群に肝細胞空胞化が認められ、MG と同様にラットにおける肝毒性が示唆された。また、マウスの 1160ppm 投与群で膀胱の移行上皮細胞でアポトーシスが認められた。

これらの知見から、げっ歯類においては MG よりも LMG がより強い毒性を示すことが示唆されたとされている。

【マウスを用いた 2 年間発がん性試験】⁽⁵⁾

<マラカイトグリーン>

B6C3F₁ 雌マウス(48 匹/群)に塩化 MG を混餌投与した 2 年間の発がん性試験が報告されている。投与量は 0、100、225、450 ppm (およそ 0、15、33、67 mg/kg 体重/日に相当)であった。

生存率、一般的な臨床症状観察、平均体重、摂餌量に有意な変化は認められなかった。

臓器重量については右腎臓で絶対重量の減少が 225 ppm 以上投与群、相対重量の減少が 100、225 ppm 投与群で認められた。左腎臓では絶対重量の減少が 450 ppm 投与群、相対重量の減少が 225 ppm 投与群で認められた。

剖検及び病理組織学検査では全ての投与群で膀胱の移行上皮細胞に細胞質内封入体の増加が認められ、その頻度は高用量でより高かった(7/47、15/46、34/45、39/48)。一般状態や死亡率に影響は認められておらず、封入体の毒性学的な意義は定かでないが、分解物を反映したものであろうと考察されている。その他、MG の投与は特にがん及び前がん病変の発生頻度に影響を与えなかった。

<ロイコマラカイトグリーン>

B6C3F₁ 雌マウス(48 匹/群)に LMG を混餌投与した 2 年間の発がん性試験が報告されている。投与量は 0、91、204、408 ppm(およそ 0、13、31、63 mg/kg 体重/日に相当)であった。

生存率、一般的な臨床症状観察、平均体重、摂餌量に有意な変化は認められなかった。

臓器重量については全ての投与群で腎臓の相対重量の減少が認められた。

剖検及び病理組織学検査では全ての投与群で膀胱の移行上皮細胞に細胞質内封入体の増加が認められ、その頻度は高用量でより高かった。がん及び前がん病変については、肝細胞腺腫が対照群を含めた全ての群で、肝細胞がんが 204ppm 以上投与群で認められた。腺腫の発生頻度は対照群との比較では統計学的に有意ではなかったが、91 及び 408ppm 投与群では背景対照における発生頻度を上回っていた。腺腫とがん腫の合計発生数は投与量とともに増加する傾向が認められ、408 ppm 投与群では対照群と比

較して顕著に増加し、また、背景対照を上回った。これらの病変の形態は病理組織学的には自然発生病変と同様であった。それぞれの発生頻度は下記の通りであった。

	0ppm	91ppm	204ppm	408ppm
非腫瘍性病変				
膀胱移行上皮細胞：細胞質内封入体	14/46	33/48	44/47	44/44
腫瘍性病変				
肝細胞腺腫 ¹	3/47	6/48	5/47	9/47
肝細胞がん	0/47	0/48	1/47	2/47
肝細胞腺腫/肝細胞がん ²	3/47	6/48	6/47	11/47

1 背景対照群 26/563(4.6%)、範囲 0-11%

2 背景対照群 34/563(6.0%)、範囲 0-11%

【ラットを用いた2年間発がん性試験】⁽⁵⁾

<マラカイトグリーン>

F344/N 雌ラット(48 匹/群)に塩化 MG を混餌投与した 2 年間の発がん性試験が報告されている。投与量はラット 0、100、300、600 ppm (およそ 0、7、21、43 mg/kg 体重/日に相当) であった。

生存率、摂餌量、一般的な臨床症状観察に異常はみられなかった。

体重変化では 300ppm 以上投与群で対照群を下回る傾向にあった。

臓器重量は 600 ppm 投与群で相対肝臓重量の増加がみられた。

剖検及び病理組織学的検査では甲状腺濾胞上皮からなる嚢胞形成が全ての投与群で、過形成が 300ppm 以上投与群で認められた。肝臓において対照群を含めてすべての投与群に好酸性細胞巣が認められたが、600 ppm 投与群では有意に増加していた。甲状腺のがん及び前がん病変については、濾胞上皮細胞の腺腫及び腺がんが 300ppm 以上投与群で認められた。腺腫及び腺がんを合計した場合の発生頻度は背景対照群を上回った。肝細胞腺腫が対照群を含め全ての群で認められ、発生頻度はいずれも背景対照群を上回った。乳腺がんが対照群を含め全ての群で認められ、600 ppm 投与群では対照群と比較して有意ではないが背景対照群を上回る発生頻度で認められた。一方、単核球性白血病は対照群を含め全ての群で認められたが、発生頻度は用量相関的に減少し、300、600 ppm 投与群では統計学的にも有意であった。それぞれの発生頻度は下記の通りであった。

	0ppm	100ppm	300ppm	600ppm
非腫瘍性病変				
甲状腺濾胞上皮嚢胞	0/46	1/48	1/47	3/46
甲状腺濾胞上皮過形成	0/46	0/48	1/47	2/46
肝臓好酸性細胞巣	5/48	10/48	13/48	14/48
腫瘍性病変				
甲状腺濾胞上皮細胞腺腫	0/46	0/48	1/47	1/46
甲状腺濾胞上皮細胞腺がん	0/46	0/48	2/47	1/46
甲状腺濾胞上皮細胞腺腫/腺がん ¹	0/46	0/48	3/47	2/46
肝細胞腺腫 ²	1/48	1/48	3/48	4/48
乳腺がん ³	2/48	2/48	1/48	5/48
下垂体腺腫	26/48	36/47	32/46	29/45
下垂体腺腫/腺がん ⁴	26/48	36/47	32/46	30/45

単核球性白血病 ⁵	19/48	17/48	10/48	1/48
----------------------	-------	-------	-------	------

*太字は対照群と比較して統計学的有意差あり

- 1 背景対照群 7/517(1.4%)、範囲0-3%
- 2 背景対照群 1/541(0.2%)、範囲0-0.6%
- 3 背景対照群 4/534(0.7%)、範囲0-4%
- 4 背景対照群 306/528(58.0%)、範囲51-68%
- 5 背景対照群 188/542(34.7%)、範囲13-45%

<ロイコマラカイトグリーン>

F344/N ラット（雌雄各 48 匹/群）に LMG を混餌投与した 2 年間の発がん性試験を実施した。投与量はラット 0、91、272、543 ppm（雄でおよそ 0、5、15、30 mg/kg 体重/日に相当、雌でおよそ 0、6、17、35 mg/kg 体重/日に相当）であった。

生存率は雄ラットの 272 ppm 投与群で対照群を上回ったが、その他は同様であった。

一般的な臨床症状観察では異常はみられなかった。

体重変化では 272ppm 以上投与群の雌、543 ppm 投与群の雄で試験期間を通じて低値を示した。272mg 投与群の雄、91ppm 投与群の雌では 2 年目の体重が低値を示した。

摂餌量は 543 ppm 投与群の雌雄で対照群と比較して断続的に減少した。雌の 272 ppm 投与群では 2 年目で対照群と比較して断続的に減少した。

臓器重量は 272 ppm 以上投与群の雄で肝臓の相対及び絶対重量、雌で相対重量の増加が認められた。543 ppm 投与群の雌雄で甲状腺の相対重量の増加が認められた。

剖検及び病理組織学的検査では甲状腺濾胞上皮由来の嚢胞形成が雄の 543ppm 投与群と雌の 91 及び 543ppm 投与群で、過形成が雄の対照群及び全ての投与群と雌の対照群と 543ppm 投与群で認められた。肝臓において対照群を含めてすべての投与群に好酸性細胞巣、嚢胞性変性、空胞化が認められたが、このうち好酸性細胞巣は雌雄とも全ての投与群で、嚢胞性変性は雄の全ての投与群で、空胞化は雄の 91ppm 投与群、雌の 272ppm 以上投与群では統計学的に有意であった。甲状腺のがん及び前がん病変については、濾胞上皮細胞の腺腫と腺がんの合計が全ての投与群で認められた。543ppm 投与群の雄と 272ppm 投与群の雌では腺腫及び腺がんを合計した場合の発生頻度は背景対照群を上回った。肝細胞腺腫が雌の対照群、91 及び 543ppm 投与群で認められ、対照群におけるものを含め発生頻度はいずれも背景対照群を上回った。雌では乳腺腺腫及び乳腺がんが全ての群で認められ、543 ppm 投与群では腺腫と腺がんを合計した場合の発生頻度は対照群と比較して有意ではないが背景対照群を上回る発生頻度で認められた。雄では精巣の両側性の間質性細胞腺腫が対照群を含めた全ての投与群で認められ、543ppm 投与群では対照群と比較して有意であった。一方、単核球性白血病は対照群を含め全ての群で認められたが、雌雄ともに発生頻度は投与群で減少し、雄の脳下垂体腺腫の発生頻度は投与群で減少したが、雌ではこの減少は認められなかった。それぞれの発生頻度は下記の通りであった。

雄

	0ppm	91ppm	272ppm	543ppm
非腫瘍性病変				
甲状腺濾胞上皮嚢胞	0/47	0/47	0/48	3/46
甲状腺濾胞上皮過形成	2/47	1/47	3/48	3/46
肝臓好酸性細胞巣	3/48	14/47	19/48	33/47
肝臓嚢胞性変性	4/48	18/47	13/48	19/47
肝臓空胞化	9/48	21/47	10/48	13/47

腫瘍性病変				
甲状腺濾胞上皮細胞腺腫	0/47	2/47	0/48	1/46
甲状腺濾胞上皮細胞腺がん	0/47	0/47	1/48	2/46
甲状腺濾胞上皮細胞腺腫/腺がん ¹	0/47	2/47	1/48	3/46
肝細胞腺腫 ²	2/48	2/47	3/48	2/47
両側性精巣間質性細胞腺腫 ³	22/48	30/47	38/48	39/47
単核球性白血病 ⁴	29/48	16/47	19/48	7/47
下垂体腺腫	30/45	19/46	21/48	13/45

*太字は対照群と比較して統計学的有意差あり

1 背景対照群 2/511(0.4%)、範囲 0-2%

2 背景対照群 4/548(0.7%)、範囲 0-2%

3 背景対照群 469/547(85.7%)、範囲 69-90%

4 背景対照群 240/550(43.6%)、範囲 31-58%

雌

	0ppm	91ppm	272ppm	543ppm
非腫瘍性病変				
甲状腺濾胞上皮嚢胞	0/46	1/46	0/47	2/48
甲状腺濾胞上皮過形成	1/46	0/46	0/47	3/48
肝臓好酸性細胞巣	3/48	12/48	20/48	16/48
肝臓嚢胞性変性	3/48	2/48	5/48	3/48
肝臓空胞化	5/48	5/48	17/48	22/48
腫瘍性病変				
甲状腺濾胞上皮細胞腺腫	0/46	0/46	0/47	1/48
甲状腺濾胞上皮細胞腺がん	0/46	1/46	2/47	0/48
甲状腺濾胞上皮細胞腺腫/腺がん ¹	0/46	1/46	2/47	1/48
肝細胞腺腫 ²	1/48	3/48	0/48	3/48
乳腺腺腫	0/48	1/48	1/48	2/48
乳腺腺がん	0/48	1/48	2/48	2/48
乳腺腺腫/腺がん ³	0/48	2/48	3/48	4/48
単核球性白血病 ⁴	17/48	8/48	5/48	8/48
下垂体腺腫	26/47	23/47	17/45	20/46

*太字は対照群と比較して統計学的有意差あり

1 背景対照群 7/517(1.4%)、範囲 0-3%

2 背景対照群 1/541(0.2%)、範囲 0-1%

3 背景対照群 9/534(1.7%)、範囲 0-6%

4 背景対照群 188/543(34.6%)、範囲 13-45%

【遺伝毒性試験】

in vitro、*in vivo* における試験の結果は以下のとおりであった。

<マラカイトグリーン>

in vitro

試験系	試験対象	用量	結果	参考文献
Ames 試験	<i>S. typhimurium</i> TA98,TA100,TA1535, TA1537	0.05、0.26、1.28、6.4、32、 160μg/plate (-S9)	陰性 ¹	(6)
		0.05、0.26、1.28、6.4、32、 160μg/plate (+S9)	陽性 ² (TA98 の 6.4μg/plate 以上)	(6)

	<i>S. typhimurium</i> TA98	10~150 μ g/plate (+S9)	陽性 ³ (30 μ g/mL 以上)	(6)
	<i>S. typhimurium</i> TA98,TA100, TA1537	用量不明(-S9)	陰性	(7)
	<i>S. typhimurium</i> TA97,TA98,TA100,TA102,TA 104,TA1535	0.1~10 μ g/plate ($\pm$ S9) ⁴	陰性	(4), (5)
	<i>S. typhimurium</i> TA97,TA98,TA100,TA102	0.01~10 μ g/plate ($\pm$ S9)	陰性 ⁵	(8)
前進突然変異試験	CHO/HPRT	0.001~0.05 μ g/mL(-S9) 5h+7 日	陰性 ⁶	(8)
		0.01~1 μ g/mL(+S9) 5h+7 日	陰性	(8)
Comet assay	CHO	1, 2, 3, 4, 5, 10 μ g/mL(-S9)	陽性 ⁷ (3 μ g/mL 以上)	(8)
		1~20 μ g/mL(+S9)	陽性 ⁸ (15 μ g/mL 以上)	(8)

1 1.28 μ g/plate で菌の生育阻害

2 菌の生育阻害濃度の記載なし

3 100 μ g/plate 以上で菌の生育阻害。20~70 μ g/plate にかけて用量依存的に復帰変異頻度が増加

4 S9mix はハムスター、ラット由来の2種を使用

5 -S9 の10 μ g/plate でTA98を除き菌の生育阻害が認められた。+S9 では細胞毒性を確認した予備実験の結果に基づき10 μ g/plate までテストした。

6 0.1 μ g/mL 以上で著しい細胞毒性が認められた。0.01 μ g/mL の1試行(1/2)でのみで陽性。

7 細胞生存率が3 μ g/mL で約80%、4及び5 μ g/mL で約70%、10 μ g/mL で約30%に低下。

8 15 μ g/mL 以上で細胞生存率がやや低下(約80-90%)

in vivo

試験	対象	投与量	結果	参考文献
小核試験	マウス骨髄	37.5 mg/kg 単回経口投与後 24, 42, 66 時間	陰性	(6)
	ラット骨髄	1.094~8.750 mg/kg 1 回/日、3 日間腹腔内注射	陰性 ¹	(4)
	マウス末梢血	25~1200 ppm 28 日間 混餌投与	陰性	(4)
	雌 Big Blue B6C3F ₁ マウス末 梢血	450 ppm 4 週間混餌投与 ² 450 ppm 16 週間混餌投与 ²	陰性 陰性	(5)、(9) (5)、(9)
前進突然変異試験 (HPRT)	雌 Big Blue B6C3F ₁ マウス 脾臓リンパ球	450 ppm 4 週間混餌投与	陰性	(5)、(9)
		450 ppm 16 週間混餌投与	陰性	(5)、(9)
突然変異試験 (マウス肝臓c II 遺伝 子突然変異試験)	雌 Big Blue B6C3F ₁ マウス 肝臓c II 遺伝子	450 ppm 16 週間混餌投与	陰性	(5)、(9)
³² P ポストラベル試験	雌 B6C3F ₁ マウス肝臓DNA	0, 100, 600 ppm 28 日間 混餌投与	600 ppm 投与群で付加 体が有意に増加	(10)
	雄 F344 ラット肝臓DNA	0, 100, 600 ppm 28 日間 混餌投与	全投与群において付 加体が有意に増加	(10)
	雌 B6C3F ₁ マウス 肝臓DNA	450 ppm 28 日間 混餌投与	付加体が有意に増加	(5)

1 4.375mg/kg 体重で有意に増加したが他の用量では増加は認められなかった。

2 純度88%(12%の大部分はロイコマラカイトグリーンで他はMG またはLMG の脱メチル化体)

<ロイコマラカイトグリーン>

in vitro

試験	対象	投与量	結果	参考文献
Ames 試験	<i>S. typhimurium</i> TA97, TA98,TA100,TA102	10~2000 μ g/plate($\pm$ S9)	陰性 ¹	(8)

前進突然変異試験	CHO/HPRT	5~100 μ g/mL(-S9) 5h+7 日	陰性 ²	(8)
		5~100 μ g/mL(+S9) 5h+7 日	陰性 ³	(8)
Comet assay	CHO	5~500 μ g/mL(-S9)	陰性	(8)
		25~300 μ g/mL(+S9)	陰性	(8)

1 1000 μ g/plate 以上の生存率は対照と比較して 35-45%に低下。また 500 μ g/plate 以上では被験物質の沈殿が認められた。

2 予備試験で 500 μ g/mL 以上で著しい細胞毒性が認められたため 100 μ g/mL 以下で実施。

3 予備試験で 500 μ g/mL 以上で著しい細胞毒性が認められたため 100 μ g/mL 以下で実施。

in vivo

試験	対象	投与量	結果	参考文献
小核試験	雌 Big Blue ラット骨髓	0, 9, 27, 91, 272, 543 ppm 4, 16, 32 週間混餌投与	陰性	(11)
	雌 B6C3F ₁ /NctrBR マウス末梢血	0, 290, 580, 1160 ppm 28 日間 混餌投与	陽性 ¹ (290,580 ppm)	(4)
	雌 Big Blue B6C3F ₁ マウス末梢血	204,408 ppm 4 週間混餌投与	陰性	(5)、(9)
		204,408 ppm 16 週間混餌投与	陰性	(5)、(9)
	雌 Big Blue B6C3F ₁ マウス骨髓	0, 9, 27, 91, 272, 543 ppm 4, 16, 32 週間混餌投与	陰性	(11)
前進突然変異試験 (HPRT)	雌 Big Blue B6C3F ₁ マウス脾臓リンパ球	204 ppm 4 週間混餌投与	陰性	(5)、(9)
		408 ppm 16 週間混餌投与	陰性	(5)、(9)
	雌 Big Blue ラット脾臓リンパ球	0, 9, 27, 91, 272, 543 ppm 4, 16, 32 週間 混餌投与	陰性	(11)
³² P ポストラベル試験	雌 B6C3F ₁ マウス肝臓 DNA	0, 204, 408 ppm 28 日間 混餌投与	陰性	(5)
	雌 B6C3F ₁ マウス肝臓 DNA	0, 96, 580 ppm 28 日間 混餌投与	陰性	(10)
	雄 F344 ラット肝臓 DNA	0, 96, 580 ppm 28 日間 混餌投与	580ppm 投与群で付加体が有意に増加	(10)
	雌 Big Blue ラット肝臓 DNA	0, 9, 27, 91, 272, 543 ppm 4 週間混餌投与	91ppm 以上で DNA 付加体が用量相関的に有意に増加	(12)
突然変異試験 (肝臓 lacI 遺伝子突然変異試験)	雌 Big Blue ラット肝臓 DNA	0, 91, 272, 543 ppm 4, 16, 32 週間混餌投与	陰性 ²	(12)
突然変異試験 (肝臓 c II 遺伝子突然変異試験)	雌 Big Blue B6C3F ₁ マウス肝臓 c II 遺伝子	408 ppm 16 週間混餌投与	陽性	(5)、(9)
	雌 Big Blue F344 ラット肝臓 c II 遺伝子	543 ppm 16 週間混餌投与	陰性	(5)、(9)

1 1160ppm ではやや増加したが統計学的有意差はなし

2 543ppm 投与群の 16 週時点では増加

in vitro については、Ames 試験、前進突然変異試験、Comet 試験が実施されている。

Ames 試験は *Salmonella typhimurium* の TA97、TA98、TA100、TA102、TA104、TA1535、TA1537 用いて実施されているが、MG については抗菌活性を示したため一部を除いて高用量の試験は行われていない。LMG については最大 2000 μ g/plate までの試験が行われている。MG については、Ames で TA98 (10-150 μ g/plate) の+S9 で陽性の結果が報告されている⁽⁶⁾が、後に報告された試験⁽⁸⁾では予備試験で抗菌作用が認められたため 10 μ g/plate までの用量で実施したと記載されている。この報告では再現性が得られなかった理由についても考察されているが、MG の TA98(+S9)についてはさらなる再現性の確認が必要であると考えられる。LMG では 2000 μ g/plate まで陰性の結果が得られている。前進突然変異試験は CHO の *Hprt* 遺伝子座を用いて実施されているが、細胞毒性が認められたため MG では-S9 で 0.05 μ g/mL、

+S9 で 1 μ g/mL、LMG で 100 μ g/mL までの用量で試験が行われ、いずれも陰性と報告されているが、MG の+S9 では細胞毒性が減弱し、最高用量においても細胞毒性が認められておらず、用量不足の可能性が残っている。Comet 試験は CHO を用いて、MG では-S9 で 10 μ g/mL、+S9 で 20 μ g/mL、LMG では-S9 で 500 μ g/mL、+S9 で 300 μ g/mL までの用量で試験が実施されている。MG について代謝活性化系の有無にかかわらず陽性と報告されている。陽性所見が認められた用量における細胞毒性は、-S9 で細胞生存率が 20-70%低下したが、+S9 では 10-20%の低下であった。LMG についてはいずれも陰性とされている。染色体異常誘発性を指標とした試験結果についての公表論文は報告されていない。

in vivo については、小核試験、前進突然変異試験、³²P-post label 法による DNA 付加体形成試験、Big Blue マウスあるいはラットを用いて肝臓における導入 *lac I* あるいは *c H* 遺伝子の突然変異試験が実施されている。小核試験は MG、LMG とともにマウス骨髄、ラット骨髄、マウス末梢血について試験が実施されているが、NTP の 2004 年の報告では LMG を 28 日間混餌投与したマウス末梢血の 1 試験(B6C3F₁/NctrBR)において陽性の報告があるが、2005 年の NTP 報告では 4 あるいは 16 週間混餌投与した別のマウスの末梢血の試験(Big Blue B6C3F₁)では陰性であったと報告している。他の試験では全て陰性と報告されている。前進突然変異試験は MG ではマウス、LMG ではマウス及びラットの脾臓リンパ球における HPRT 変異について実施されているが、いずれも陰性と報告されている。³²P-post label 法による DNA 付加体形成試験は、MG では雌 B6C3F₁ マウス及び雄 F344 ラットの肝臓 DNA について実施され、いずれも付加体の形成が認められたと報告されている。LMG については雌 B6C3F₁ マウス、雄 F344 ラット、雌 Big Blue ラットの肝臓 DNA について実施され、ラットでは付加体の形成が認められたが、マウスでは認められなかったと報告されている。Big Blue マウスあるいはラットの肝臓における導入 *lac I* あるいは *c H* 遺伝子の突然変異試験の結果は、MG についてはマウスの *c H* 遺伝子で陰性であった。一方、LMG についてはマウスの *c H* 遺伝子で陽性、ラットの *c H* 遺伝子で陰性で、ラットの *lac I* 遺伝子では最高投与量において 16 週の時点では変異発生率が有意に増加したが、32 週では増加が見られず、また、clonality を考慮した解析では 16 週の場合も変異の発生率に有意差がなかった⁽¹⁾と報告されている。

MG については、マウスとラットの肝臓において ³²P-post label 法で DNA 付加体の形成が認められている。ただし、マウスを用いた小核や前進突然変異試験の結果は陰性で、DNA 付加体形成が染色体異常や遺伝子突然変異として固定される可能性は低いものと考えられる。ただし、小核や前進突然変異試験の多くは混餌投与による試験で、がん原性試験の用量を参考に設定されているため、遺伝毒性試験としては用量不足の可能性はある。ラットについてはこれらに関する知見は得られていない。

LMG については ³²P-post label 法でラットの肝臓で DNA 付加体形成が認められているが、マウスの肝臓では認められなかった。小核試験、HPRT 突然変異試験については、小核の 1 試験を除きいずれも陰性であるが、混餌投与による試験で、がん原性試験の用量を参考に設定されているため、遺伝毒性試験としては用量不足の可能性はある。トランスジェニック動物(Big Blue)を用いた試験では、マウス肝臓で *c H* 遺伝子に弱い突然変異誘発が認められたが、ラットにおいては *c H* および *lac I* ともに陰性の結果であった。一方、DNA 付加体試験の結果は、マウスで陰性、ラットで陽性であり突然変異試験と矛盾した結果となっている。

4. 食品健康影響評価について

【発がん性について】

発がん性については、NTPにおいてMGについて雌B6C3F₁マウス、雌F344ラット、LMGについて雌B6C3F₁マウス、雌雄F344ラットについて2年間の混餌投与試験が実施されている。一部について雌のみ実施されているのは、28日のパイロット試験において、雌でより強い毒性が認められたことに基づいている。

MG及びLMGの発がん性について2005年のNTPの報告書においては次のように結論している。また、英国のCOMとCOCは共同声明においてこの結論を支持するとした。

MGについては、雌B6C3F₁マウスの450ppmまでのMGの経口投与において発がん性は認められない。雌F344ラットにおいては甲状腺濾胞上皮細胞腺腫及び腺がんを合計した場合の発生頻度、肝細胞腺腫、乳腺がんの発生頻度のわずかな上昇が認められたことから、恐らくMGの投与に起因して腫瘍性病変のわずかな増加が示されたとしている(equivocal evidence of carcinogenic activity)^e。

LMGについては、雌B6C3F₁マウスにおいて肝細胞腺腫、腺腫とがん腫の合計発生頻度の上昇が認められたことから、LMGの投与に起因して腫瘍性病変の発生頻度の増加が示されたとしている(some evidence of carcinogenic activity)^f。雄F344ラットにおいては甲状腺濾胞上皮細胞の腺腫及び腺がんを合計した場合の発生頻度、精巣の両側性の間質性細胞腺腫の発生頻度のわずかな上昇が認められたことから、恐らくLMGの投与に起因して腫瘍性病変のわずかな増加が示されたとしている(equivocal evidence of carcinogenic activity)。雌F344ラットにおいては甲状腺濾胞上皮細胞の腺腫及び腺がんを合計した場合の発生頻度、肝細胞腺腫の発生頻度のわずかな上昇が認められたことから、恐らくLMGの投与に起因して腫瘍性病変のわずかな増加が示されたとしている(equivocal evidence of carcinogenic activity)。

MGとLMGの発がん性について評価するためのデータは、現時点では上記NTPの試験のみであった。対照群との比較で明確な統計学的に有意な腫瘍性病変発生数の増加が認められた例はほとんどなかったが、MGの雌ラットの肝細胞腺腫(1/48, 1/48, 3/48, 4/48)、乳腺がん(2/48, 2/48, 1/48, 5/48)、LMGの雄ラットの甲状腺濾胞上皮細胞腺腫/がん腫(0/47, 2/47, 1/48, 3/46)、雌ラットの肝細胞腺腫(1/48, 3/48, 0/48, 3/48)、雌マウスの肝細胞腺腫/がん腫(3/47, 6/48, 6/47, 11/47)については用量と発生数からは無視し得ないと考えられた。また、MG、LMGともにラットでは投与により好酸性細胞巣が明らかに増加しており、肝細胞腺腫との関連が示唆された。なお、LMGの雄F344ラットの両側性の精巣間細胞腫は全ての投与群で認められ、最高用量では対照群との比較では統計学的に有意であったが、もともとF344系ラットにおいて発生率が高く、この結果から影響を判断することはできなかった。

これらのことから、現時点において得られている知見からは、LMGが雌マウスの肝臓に発がん性を有することが示唆された。また、ラット肝臓及び甲状腺に発がん性が弱いながらも示唆された。MGは雌ラット肝臓及び乳腺における発がん性が弱いながらも示唆された。

^e NTPは発がん性のレベルについて clear evidence, some evidence, equivocal evidence, no evidence の4種にクラス分けしている。

Equivocal evidence of carcinogenic activity についてNTPは次のように補足している。Studies that are interpreted as showing a marginal increase of neoplasms that may be chemical related.

^f Some evidence of carcinogenic activity についてNTPは次のように補足している。Studies that are interpreted as showing a chemical-related increased incidence of neoplasms (malignant, benign, or combined) in which the strength of the response is less than that required for clear evidence.

【遺伝毒性について】

遺伝毒性試験については、*in vitro* の Ames 試験、前進突然変異試験、Comet 試験、*in vivo* の小核試験、前進突然変異試験、³²P-post label 法による DNA 付加体形成試験、Big Blue マウスあるいはラットを用いて肝臓における導入 *lacI* あるいは *c H* 遺伝子の突然変異試験が実施されており、ほとんどの試験において陰性の結果が得られている。

MG については、*in vitro* の Ames の 1 試験で TA98 について代謝活性化系存在下で陽性、Comet 試験で代謝活性化系の有無にかかわらず陽性、*in vivo* の ³²P-post label 法による DNA 付加体形成試験で雌 B6C3F₁ マウス及び雄 F344 ラットの肝臓 DNA についていずれも付加体の増加が認められている。LMG については、*in vitro* は実施された範囲内の試験では全て陰性であったが、*in vivo* ではマウス末梢血を用いる小核試験において弱い陽性、Big Blue マウスの肝臓における導入 *c H* 遺伝子の突然変異試験で弱い陽性、³²P-post label 法による DNA 付加体形成試験で、雄 F344 ラット、雌 Big Blue ラットの肝臓 DNA について付加体の形成が認められている。これらの結果について、2004 年の英国の COM と COC は共同声明において、MG についてはラット、マウスともに DNA 付加体が形成されることから、MG は *in vivo* 変異原性物質であると見なすのが賢明である、としている。また、LMG については、雌 Big Blue マウス肝臓において *c H* 遺伝子の突然変異発生率の増加が認められることから LMG は *in vivo* 変異原性物質であると見なすべきであると結論している。

遺伝毒性に関するデータを整理すると、MG は Comet 試験で陽性であるが、*in vivo* の小核試験は陰性であった。ただし、小核試験については用量不足の可能性が残る。また、ラットおよびマウス肝で DNA 付加体が明確に示されているが、マウスの肝で突然変異は検出されず、ラットの肝の突然変異については知見が得られていない。LMG については、発がん性が示唆されているマウス肝で *c H* 遺伝子の突然変異が弱いながらも陽性であるが、DNA 付加体形成試験や *in vitro* での遺伝子突然変異試験は陰性であり、ラット肝では DNA 付加体形成試験は陽性であったが *c H* 遺伝子の突然変異や *in vitro* での遺伝子突然変異試験は陰性であった。これらのことを考えあわせると、DNA 付加体生成や *c H* 遺伝子の突然変異等の *in vivo* における突然変異を一義的には説明できない。しかし、現時点で得られている結果から総合的に判断すると、MG、LMG が遺伝毒性を有する可能性は否定できないと判断するのが賢明であると判断された。なお、確実な結論を得るには、さらなる試験の追加が必要であろう。

【食品健康影響評価について】

MG 及び LMG は、現時点において発がん性を評価するのに適当な唯一の資料と考えられたげっ歯類を用いた 2 年間発がん試験の結果から、LMG が雌マウスの肝臓に発がん性を有することが示唆され、LMG のラット肝臓及び甲状腺、MG の雌ラット肝臓及び乳腺の発がん性が弱いながらも示唆された。ただし、認められた腫瘍性病変の多くは腺腫であった。発がん標的臓器における遺伝毒性については、MG はラットおよびマウス肝で DNA 付加体形成が示されているが、マウスの肝で遺伝子突然変異を誘発しなかった。LMG は、マウス肝で *c H* 変異を誘発したが、DNA 付加体形成試験は陰性であった。これら及び *in vitro* 試験結果を含め、現時点で得られたデータを総合的に評価すると、*in vivo* で認められた遺伝子突然変異の誘発が DNA 損傷性に起因するとの説明は難しいものの、MG、LMG が遺伝毒性を有する可能性は否定できないと考えられる。

以上のように、発がん性のメカニズムを明らかにすることはできず、ヒトにおける発がんリスクは明確ではないが、現時点で評価した試験結果からみる限り、げっ歯類における発がん性が示唆され、遺伝毒性も否定できないことから MG 及び LMG に ADI を設定することは適当でない。

<参考文献>

- (1) Jones J. J., et al. 3rd (2003); Decolorization of malachite green and crystal violet by waterborne pathogenic mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* : 2003, 47, 2323-2326
- (2) David J., et al. *Xenobiotics in Fish*
- (3) JOINT COM & COC STATEMENT ON MUTAGENICITY AND CARCINOGENICITY OF MALACHITE GREEN (MG) AND LEUCOMALACHITE GREEN (LMG)
COM/04/S4 & COC/04/S7 – December 2004
- (4) Culp S. J. (2004); NTP technical report on the toxicity studies of malachite green chloride and leucomalachite green (CAS Nos. 569-64-2 and 129-73-7) administered in feed to F344/N rats and B6C3F1 mice.
Toxic Rep Ser 71, MID-15208078
- (5) NTP (2005) - Toxicology and carcinogenesis studies of malachite green chloride and leucomalachite green. (CAS NOS. 569-64-2 and 129-73-7) in F344/N rats and B6C3F1 mice (feed studies).
Natl Toxicol Program Tech Rep Ser 527, 1-312
- (6) Clemmensen S., et al. (1984); Toxicological studies on malachite green: a triphenylmethane dye.
Arch Toxicol : 1984, 56, 43-45
- (7) Lynnette R. Ferguson and Bruce C. Baguley (1988); Verapamil as a co-mutagen in the Salmonella/mammalian microsome mutagenicity test.
Mutation Research : 1988, 209, 57-62
- (8) Fessard V., et al. (1999); Mutagenicity of malachite green and leucomalachite green in in vitro tests.
J Appl Toxicol : 1999, 19, 421-430
- (9) Mittelstaedt R. A., et al. (2004); Genotoxicity of malachite green and leucomalachite green in female Big Blue B6C3F1 mice.
Mutat Res : 2004, 561, 127-138
- (10) Culp S. J., et al. (1999); Toxicity and metabolism of malachite green and leucomalachite green during short-term feeding to Fischer 344 rats and B6C3F1 mice.
Chem Biol Interact : 1999, 122, 153-170
- (11) Manjanatha M. G., et al. (2004); Analysis of mutations and bone marrow micronuclei in Big Blue rats fed leucomalachite green.
Mutat Res : 2004, 547, 5-18
- (12) Culp S. J., et al. (2002); Mutagenicity and carcinogenicity in relation to DNA adduct formation in rats fed leucomalachite green.
Mutat Res : 2002, 507, 55-63