

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(Jefferson J.J. et al 2003)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(David J.S. et. al ;Xanobiotics in Fish)、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。

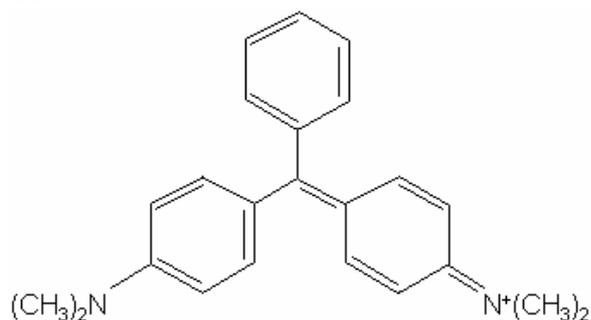
このため、今般、厚生労働省において MG 及び LMG について食品衛生法に基づく個別の規格基準の設定の検討を開始するに当たって、食品安全基本法に基づき、食品安全委員会に食品健康影響評価が依頼されたものである。

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 $2\mu\text{g}/\text{kg}$ との MPRLs (Minimum Required Performance Limits)^a が、養殖水産動物について設定されている。

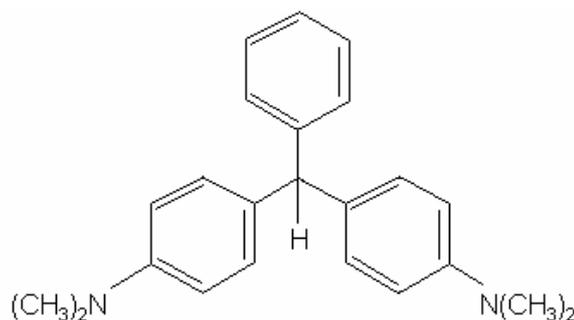
^a「ある検体における対象物質の最少量のことであり、その量は少なくとも検出及び確認されなければならない。これは、基準が設定できない物質に対する分析方法の精度等を調和させることを目的とするためのものである。」と解説されている。EU 域内においてある物質の不検出の精度を調和させるために設定されている。

2. 薬剤の概要

(1)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 : $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{N}_2$ (マラカイトグリーン)、 $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{N}_2$ (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。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】(NTP2004)

<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えられている。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(マウスの 300ppm 以上投与群の雌雄、ラットの 1200ppm 投与群の雌雄)、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 -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

^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

毒性が示唆された。

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えられている。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】(NTP2005)

<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異常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顕著であ高かった(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、分解物を反映したの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、摂餌量に異常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顕著であ高かった。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
Nonneoplastic effect				
Urinary bladder : inclusion body	14/46	33/48	44/47	44/44
Neoplastic effect				
Liver hepatocellular adenoma 1	3/47	6/48	5/47	9/47
Liver hepatocellular carcinoma	0/47	0/48	1/47	2/47
Liver hepatocellular adenoma or carcinoma 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】(NTP2005)

<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の濾胞上皮からなるのシスト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エジオン染色性の病巣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
Nonneoplastic effect				
Thyroid gland follicle cyst	0/46	1/48	1/47	3/46
Thyroid gland follicle hyperplasia	0/46	0/48	1/47	2/46
Liver eosinophilic focus	5/48	10/48	13/48	14/48
Neoplastic effect				
Thyroid gland follicular cell adenoma	0/46	0/48	1/47	1/46
Thyroid gland follicular cell carcinoma	0/46	0/48	2/47	1/46
Thyroid gland follicular cell adenoma or carcinoma 1	0/46	0/48	2/47	1/46
Liver hepatocellular adenoma 2	1/48	1/48	3/48	4/48
Mammary gland carcinoma 3	2/48	2/48	1/48	5/48
Pituitary gland adenoma	26/48	36/47	32/46	29/45
Pituitary gland adenoma or carcinoma 4	26/48	36/47	32/46	30/45
Mononuclear cell leukemia 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の濾胞上皮由来の嚢胞形成のシストが雄の 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エジオン染色性の病好酸性細胞巣、嚢胞性変性、空胞性変性が認められたが、このうちエジオン染色性病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、空胞性変性は雄の 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及び/又は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。←また背景対照群を上回っていた。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
Nonneoplastic effect				
Thyroid gland follicle cyst	0/47	0/47	0/48	3/46
Thyroid gland follicle hyperplasia	2/47	1/47	3/48	3/46
Liver eosinophilic focus	3/48	14/47	19/48	33/47
Liver cystic degeneration	4/48	18/47	13/48	19/47
Liver cytoplasmic vacuolization	9/48	21/47	10/48	13/47
Neoplastic effect				
Thyroid gland follicular cell adenoma	0/47	2/47	0/48	1/46

Thyroid gland follicular cell carcinoma	0/47	0/47	1/48	2/46
Thyroid gland follicular cell adenoma or carcinoma 1	0/47	2/47	1/48	3/46
Liver hepatocellular adenoma 2	2/48	2/47	3/48	2/47
Testes interstitial cell carcinoma(bilateral) 3	22/48	30/47	38/48	39/47
Mononuclear cell leukemia 4	29/48	16/47	19/48	7/47
Pituitary gland adenoma 5	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%
- 5 背景対照群 2/511(0.4%)、範囲 0-2%

雌

	0ppm	91ppm	272ppm	543ppm
Nonneoplastic effect				
Thyroid gland follicle cyst	0/46	1/46	0/47	2/48
Thyroid gland follicle hyperplasia	1/46	0/46	0/47	3/48
Liver eosinophilic focus	3/48	12/48	20/48	16/48
Liver cystic degeneration	3/48	2/48	5/48	3/48
Liver cytoplasmic vacuolization	5/48	5/48	17/48	22/48
Neoplastic effect				
Thyroid gland follicular cell adenoma	0/46	0/46	0/47	1/48
Thyroid gland follicular cell carcinoma	0/46	1/46	2/47	0/48
Thyroid gland follicular cell adenoma or carcinoma 1	0/46	1/46	2/47	1/48
Liver hepatocellular adenoma 2	1/48	3/48	0/48	3/48
Mammary gland adenoma	0/48	1/48	1/48	2/48
Mammary gland carcinoma	0/48	1/48	2/48	2/48
Mammary gland adenoma or carcinoma 3	0/48	1/48	2/48	2/48
Mononuclear cell leukemia 4	17/48	8/48	5/48	8/48
Pituitary gland adenoma	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	参照文献
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	Clemmensen et al.(1984)
		0.05, 0.26, 1.28, 6.4, 32, 160µg/plate (+S9)	陽性 ² (TA98 の 6.4µg/plate 以上)	Clemmensen et al.(1984)
	<i>S. typhimurium</i> TA98	10 ~ 150µg/plate (+S9)	陽性 ³ (30µg/mL 以上)	Clemmensen et al.(1984)

	<i>S. typhimurium</i> TA98,TA100, TA1537	用量不明(-S9)	陰性	Ferguson and Baguley(1988)
	<i>S. typhimurium</i> TA97,TA98,TA100,TA102,TA 104,TA1535	0.1 ~ 10µg/plate (± S9) ⁴	陰性	NTP(2004,2005)
	<i>S. typhimurium</i> TA97,TA98,TA100,TA102	0.01 ~ 10µg/plate (± S9)	陰性 ⁵	Fessard et al.(1999)
前進突然変異試験	CHO/HGPRT	0.001 ~ 0.05µg/mL(-S9) 5h+7 日	陰性 ⁵	Fessard et al.(1999)
		0.01 ~ 1µg/mL(+S9) 5h+7 日	陰性	Fessard et al.(1999)
Comet assay	CHO	1, 2, 3, 4, 5, 10µg/mL(-S9)	陽性 ⁷ (3µg/mL 以上)	Fessard et al.(1999)
		1 ~ 20µg/mL(+S9)	陽性 ⁸ (15µg/mL 以上)	Fessard et al.(1999)

- 1 1.28µg/plate で菌の生育阻害
- 2 菌の生育阻害濃度の記載なし
- 3 100µg/plate 以上で菌の生育阻害。20-70µg/plate にかけて用量依存的に倒戻変異頻度が増加
- 4 S9mix はハムスター、ラット由来の2種を使用
- 5 -S9 の10µg/plate で TA98 を除き菌の生育阻害が認められた
- 6 0.1µg/mL 以上で著しい細胞毒性が認められた。0.01µg/ml の1試行(1/2)のみで陽性
- 7 細胞生存率が3µg/mL で約80%、4及び5µg/mL で約70%、10µg/mL で約30%に低下。
- 8 15µg/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	Clemmensen et al.(1984)
	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	NTP(2004)
	マウス末梢血	25-1200 ppm 28 日間 混餌投与	陰性	NTP(2004)
	雌 Big Blue B6C3F ₁ マウス末梢血	450 ppm 4 週間混餌投与 ²	陰性	NTP (2005) = Roberta A. Mittelstaedt et al.(2004)
450 ppm 16 週間混餌投与 ²		陰性	NTP (2005) = Roberta A. Mittelstaedt et al.(2004)	
前進突然変異試験 (HGPRT)	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	NTP (2005) = Roberta A. Mittelstaedt et al.(2004)
		450 ppm 16 週間混餌投与	陰性	NTP (2005) = Roberta A. Mittelstaedt et al.(2004)
突然変異試験 (マウス肝臓 c 遺伝子突然変異試験)	雌 Big Blue B6C3F ₁ マウス肝臓 c 遺伝子	450 ppm 16 週間混餌投与	陰性	NTP (2005) = Roberta A. Mittelstaedt et al.(2004)
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	Culp et al.(1999)
	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	Culp et al.(1999)

	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	NTP(2005)
--	------------------------------------	-----------------------	-----------	-----------

- 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 µg/plate (± S9)	陰性 ¹	Fessard et al.(1999)
前進突然変異試験	CHO/HGPRT	5 ~ 100µg/mL(-S9) 5h+7 日	陰性 ²	Fessard et al.(1999)
		5 ~ 100µg/mL(+S9) 5h+7 日	陰性 ³	Fessard et al.(1999)
Comet assay	CHO	5 ~ 500µg/mL(-S9)	陰性	Fessard et al.(1999)
		25 ~ 300µg/mL(+S9)	陰性	Fessard et al.(1999)

- 1 1000µg/plate 以上の生存率は対照と比較して 35-45%に低下。また 500µg/plate 以上では被験物質の沈殿が認められた。
2 予備試験で 500µg/mL 以上で著しい細胞毒性が認められたため 100µg/mL 以下で実施。75µg/ml の 2 試行(2/3)でのみで陽性。
3 予備試験で 500µg/mL 以上で著しい細胞毒性が認められたため 100µg/mL 以下で実施。5µg/ml の 1 試行(1/2)でのみで陽性。

in vivo

試験	対象	投与量	結果	参考文献
小体試験	雌 Big Blue ラット骨髄	0, 9, 27, 91, 272, 543 ppm 4, 16, 32 週間混餌投与	陰性	Manjanatha et al.(2004)
	マウス末梢血	0, 290, 580, 1160 ppm 28 日間 混餌投与	陽性 ¹ (290,580 ppm)	NTP (2004)
	雌 Big Blue B6C3F ₁ マウス末梢血	204,408 ppm 4 週間混餌投与	陰性	NTP (2005) = Roberta A. Mittelstaedt et al.(2004)
		204,408 ppm 16 週間混餌投与	陰性	NTP (2005) = Roberta A. Mittelstaedt et al.(2004)
	雌 Big Blue B6C3F ₁ マウス骨髄	0, 9, 27, 91, 272, 543 ppm 4, 16, 32 週間混餌投与	陰性	Manjanatha et al.(2004)
前進突然変異試験 (HGPRT)	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	NTP (2005) = Roberta A. Mittelstaedt et al.(2004)
		408 ppm 16 週間混餌投与	陰性	NTP (2005) = Roberta A. Mittelstaedt et al.(2004)
	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	Manjanatha et al.(2004)
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	NTP (2005)
	雌 B6C3F ₁ マウス肝臓 DNA	0, 96, 580 ppm 28 日間 混餌投与	陰性	Culp et al.(1999)
	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	Culp et al.(1999)

	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	Culp et al.(2002)
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	Culp et al.(2002)
突然変異試験 (肝臓 c 遺伝子突然 変異試験)	雌 Big Blue B6C3F ₁ マウス 肝臓 c 遺伝子	408 ppm 16 週間混餌投与	陽性	NTP (2005) = Roberta A. Mittelstaedt et al.(2004)
	雌 Big Blue F344 ラット 肝臓 c 遺伝子	543 ppm 16 週間混餌投与	陰性	NTP (2005) = Roberta A. Mittelstaedt et al.(2004)

1 1160ppm ではやや増加したが統計学的有意差はなし

2 543ppm 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高用量の試験は行われていない。LMG については最大 1mg/plate までの試験が行われている。MG の 1 試験で TA98 について代謝活性化系存在下で陽性と報告されているが、他の試験ではすべて陰性とされている。前進突然変異試験は CHO の HGPRT 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 0.05µg/mL、+S9 で 1µg/mL、LMG で 100µg/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。Comet 試験は CHO を用いて、MG では -S9 で 10µg/mL、+S9 で 20µg/mL、LMG では -S9 で 500µg/mL、+S9 で 20µg/mL までの用量で試験が実施されている。細胞毒性が認められる用量ではあるが、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。LMG についてはいずれも陰性とされている。

MG については、Ames で TA98(10-150 µg/plate)の+S9 で陽性の結果が報告されている(Clemmensen et al.)。この結果については、-S9 では陰性ではあることから、S9mix による代謝産物の影響が考えられるが、LMG では 2000µg/plate まで陰性の結果が得られている。また、後に報告された試験(Fessard et al.)では 10µg/plate 以上の用量の試験は抗菌作用のため不可能であっ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。また、CHO/HPRT 試験では、代謝活性化系の存否にかかわらず陰性であるが、+S9 では細胞毒性が减弱し、最高用量においても細胞毒性が認められておらず、容量不足の可能性が残っている。Comet 試験では代謝活性化系の存否にかかわらず陽性の結果が報告されており、MG の DNA 損傷性は否定できない。ただし、細胞毒性との相関や、+S9 で活性が低下すること等から、著者は非遺伝毒性的な作用を介した酸化的傷害による陽性反応である可能性を考察しており、確認のための追加試験の必要性を述べている。

LMG については報告された試験は全て陰性の結果であるが、染色体異常誘発性を指標とした試験結果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 ポストラベリング試験、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 cII 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 ともマウス骨髄、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、LMG を 28 日間混餌投与したマウス末梢血の 1 試験において陽性の報告があるが、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では陰性とされている。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を用いて HGPRT 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 ポストラベリング試験は、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、いずれも付加体の増加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、雄 F344 ラットと雌 Big Blue ラットで付加体の増加が認められたとされているが、マウスでは増加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 lacI あるいは cII 遺伝子の突然変異試験については、MG についてはマウスの cII 遺伝子で陰性、LMG についてはマウスの cII 遺伝子で陽性、ラットの cII 遺伝子で陰性とされている。ラットの lacI 遺伝子については、最高投与量の 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変異の発生率に有意差がなかった(Manjanatha et al. 2004)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においては、遺伝子突然変異ならびに染色体異常誘発性は認められておらず、DNA 付加体形成が遺伝子突然変異や染色体異常として固定される可能性は低いものと考えられる。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 遺伝子突然変異試験については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がある。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 cII 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 cII および lacI とともに陰性の結果であった。一方、DNA 付加体試験の陰性結果は、マウスで陰性、ラットで陽性であり矛盾した結果となっている。また、*in vitro* では遺伝子突然変異誘発性が認められておらず、トランスジェニックマウスを用いた HPRT 遺伝子突然変異試験、マウス DNA 付加体試験では陰性であった。

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、発がん性は**明確でない証拠がある(equivocal evidence of carcinogenic activity)**。

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、発がん性を示すある程度の証拠がある(**some evidence of carcinogenic activity**)。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、精巢の両側性の間

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、発がん性は**明確でない証拠がある** (equivocal evidence of carcinogenic activity)。雌 F344 ラットにおいては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て**おりたことから**、発がん性は**明確でない証拠がある**(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巢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。

【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 ポストラベリング試験、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 cII 遺伝子の突然変異試験が実施されており、~~いる。~~ほとんどの試験において陰性の結果が得られている。

~~が~~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 ポストラベリング試験で雌 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**たと報告されている**。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**マウス末梢血小核(マウス末梢血)**の 1 試験において陽性、Big Blue **マウスラット**の肝臓における導入 cII 遺伝子の突然変異試験**でについて**陽性、³²P ポストラベリング試験で、雄 F344 ラット、雌 Big Blue ラットの肝臓 DNA について付加体の増加が認められ**たと報告されている**。なお、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。LMG については、雌 Big Blue マウス肝臓において cII 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。

発がん性との関連で遺伝毒性に関するデータを整理すると、MG は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、ラットおよびマウスの肝で突然変異は検出されず、ラット肝発がんについて弱い示唆が得られているに過ぎない。LMG については、発がん性が示唆されているマウス肝では *in vivo* cII 変異が陽性であるが、DNA 付加体試験は陰性であり、DNA 付加体生成によって、*in vivo* 突然変異と発がん性を一義的には説明できない。しかし、遺伝毒性を完全に否定できる証拠も不十分であることを考えると、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妥当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り、標的臓器も限られていた。遺伝毒性については、MG はラットおよびマウス肝で DNA 付加体が明確に示されているが、ラットおよびマウスの肝で突然変異は検出されず、LMG については、マウス肝で *in vivo* cII 変異が陽性であるが、DNA 付加体試験は陰性である等、*in vivo* 突然変異と発がん性を一義的には説明できない。しかし、遺伝毒性を完全に否定できる証拠も不十分であり、MG、LMG が遺伝毒性を有する可能性は否定できない。以上のように、これらの所見から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、遺伝毒性も否定することはできないことから ADI を設定することは適当でないと考えられる。