

マウス肝臓カタラーゼにおよぼす食用赤色104号 (フロキシンの) の影響

榎本則行・田口継喜・内田 泰

(食品製造学教室)

昭和46年11月12日 受理

Effect of Phloxine (Food Red No. 104) on Liver Catalase Activity of Mouse

Noriyuki ENOMOTO, Tsuguyoshi TAGUCHI and Yasushi UCHIDA

(Laboratory of Food Technology)

Received November 12, 1971

Summary

- 1) Liver catalase activities of mice fed with the diet containing phloxine (0.5, 1.0 and 2.0 %) during five to eight months were determined.
- 2) Phloxine depressed liver catalase activity. Catalase activity decreased in response to the quantity of phloxine added in diet and to raising terms.
- 3) Phloxine was excreted in faeces of mice without decomposition.

食用タール色素が、タンパク質分解酵素¹⁾ や RNase, DNase²⁾ の活性を阻害することは先に報告した。しかし、これらは *in vitro* での実験であって、生体内でもこれと同一の作用が起ると考えるのは早計である。

生体内の酵素系に及ぼす食用タール色素の影響を調べる目的で、今回はカタラーゼをとりあげた。色素混入飼料でマウスを飼育し、一定期間後の肝臓カタラーゼ活性の推移を測定した結果について報告する。

実験方法

1) 供試色素および飼料の調製法

前回^{1,2)} までの実験結果を勘案して、供試色素は食用赤色104号(phloxine)をえらんだ。市販の短桿状のマウス固型飼料(オリエンタル酵母KK製)を粉碎し、これに重量比で0.5, 1.0, 2.0%³⁾ になるように赤色104号(市販品, 熊谷染料KK製)を混合し、適量の水を加えてふたたび短桿状に整形した後、60°C以下で乾燥して実験用飼料とした。飼料および水は不断給与・給水とし、飼育は自然温度の舎内で行なった。

2) マウス肝臓カタラーゼ抽出液の調製法

用いたマウスは、毛色について固定した近交系A(Agouti)である。屠殺後マウスの肝臓に
本研究の要旨は、昭和45年9月日本農芸化学会シンポジウム(食品と公害)で発表した。

0.1M リン酸緩衝液 (pH 6.8) を加えて 0°C で homogenize し, 遠心分離 (0°C, 10,000 r.p.m. 15分間) した. 上澄液を同一緩衝液で 50ml に定容し, この 5 ml をさらに上記緩衝液で 100ml に定容した粗抽出液を, 肝臓カタラーゼの活性測定用試料とした.

3) 過酸化水素分解力の測定

市販のカタラーゼを用いて至適反応条件を求め, 次のような条件でマウス肝臓カタラーゼの過酸化水素分解力を測定した. 0.01 M 過酸化水素 0.5 ml と 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.8) 2.0 ml との混液に前記カタラーゼ抽出液 1 ml を添加し, 氷水中で 5 分間反応させた. 2 N 硫酸 1 ml を加えて反応を止め, 遠心分離 (0°C, 10,000 r.p.m. 15 分間) 後の上澄液の 2 ml をとって, 0.005 N 過マンガン酸カリウム液で滴定し, カタラーゼ抽出液無添加の対照との差から分解された過酸化水素量を求めた.

4) 糞中色素の paper chromatography

実験飼料で 8 カ月間飼育されたマウスの糞 (4~5 g) を集め, 50 % エタノールあるいは蒸留水を加えて乳鉢ですりつぶした. 遠心分離して上澄液をとり, 濃縮して paper chromatography の試料とした. 展開溶媒としては, (a)アセトン・イソアミルアルコール・水 (6:5:5) および(b)イソプロピルアルコール・酢酸エチル・水 (6:1:3) の 2 種を用いた.

実験結果

I. マウス肝臓カタラーゼの活性変化

カタラーゼ活性の測定は, 色素添加飼料を与えて 5 カ月目から 8 カ月目まで, 1 カ月毎に行なった. 結果は Fig. 1 のようであった.

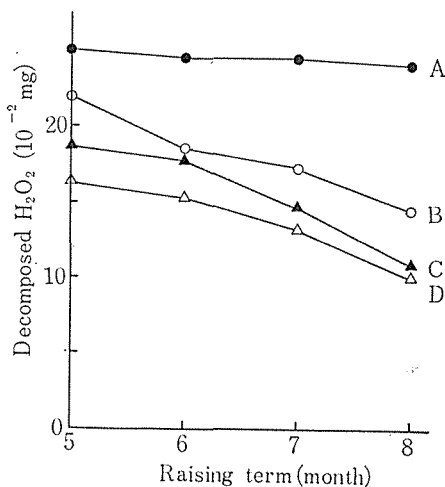


Fig. 1. Changes of catalase activity of mice fed with diet containing various amounts of phloxine.

A: 0% phloxine (normal diet)

B: 0.5% phloxine added

C: 1.0% phloxine added

D: 2.0% phloxine added

Decomposed H_2O_2 is expressed as 10^{-2} mg/mg protein.

カタラーゼの活性はカタラーゼ抽出液中のタンパク質を Lowry らの法⁴⁾ によって測定し、単位タンパク質中に含まれるカタラーゼによって分解された過酸化水素量を求めて、タンパク質 1 mg 当りの活性度として示した。

色素無添加の飼料によって飼育したマウスでは、肝臓カタラーゼの活性は実験期間中ほとんど変化がなかった。これに対し、色素を添加したものでは添加量が多くなるにつれてカタラーゼの活性は阻害された。また、色素添加量が同一のものでも飼育期間が長くなるにつれて活性は阻害された。カタラーゼ抽出前にマウスの肝臓重量を測定し、体重に対する比を求めた結果は Table 1

Table 1. Ratios of liver weight to body weight. ($\times 100$)

Phloxine added (%)	Raising term (month)	5	6	7	8
	0				
0	0	3.51	4.98	4.08	4.55
0.5	0.5	2.11	5.15	3.99	6.47
1.0	1.0	4.08	4.42	5.06	7.56
2.0	2.0	4.02	5.40	5.54	5.68

のようであった。短期間の飼育であり試料数も少ないのではっきりしたことは云えないが、一般に色素添加飼料を与えたものの方が肝臓が肥大している傾向が見られた。

II. 飼料および水の摂取量

マウス 1 匹が毎月摂取した飼料重量は Table 2 のようであった。色素添加のものと色素無添加のものに大差は認められなかった。

Table 2. Quantity of diet taken per one mouse every month.

Phloxine added (%)	Month	1969					1970		
		Jul.	Aug.	Sep.	Oct.	Nov.	Dec.	Jan.	Feb.
0		g							
0	0	133.3	95.6	97.9	115.7	101.6	129.5	104.5	105.4
0.5	0.5	126.9	109.8	115.1	119.3	110.6	133.4	116.5	116.8
1.0	1.0	121.7	121.8	135.4	126.3	92.1	144.3	109.4	121.8
2.0	2.0	115.3	109.2	119.4	118.4	109.9	145.8	121.6	130.6

Table 3. Quantity of water taken per one mouse every month.

Phloxine added (%)	Month	1969			1970	
		Oct.	Nov.	Dec.	Jan.	Feb.
0		ml				
0	0	184	165	193	174	182
0.5	0.5	260	231	248	251	249
1.0	1.0	269	246	253	251	262
2.0	2.0	288	280	264	270	269

また、飼育途中からではあったが、マウス 1 匹当りの毎月の水の摂取量を調べた結果が Table 3 である。水の摂取量は色素添加飼料を与えたものの方が多く、色素添加量が多い程増加する傾向が認められた。

III. 糞中の色素の paper chromatography

飼料に添加した色素が体内で変化を受けたか否かを調べるため、糞中の色素を抽出して paper

chromatography で調べた。結果は Fig. 2 のようであって、色素が体内で分解された形跡は認められなかった。

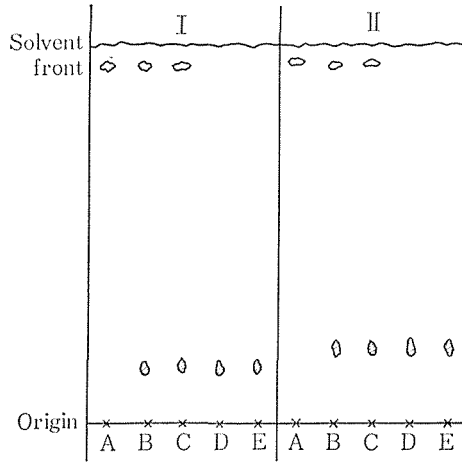


Fig. 2. Paper chromatograms of extracts from faeces of mice.

A: phloxine

B: extract with 50% EtOH from faeces of mouse fed with phloxine containing diet

C: extract with water from the same faeces as B

D: extract with 50% EtOH from faeces of mouse fed with normal diet

E: extract with water from the same faeces as D.

Solvent { I acetone · isoamyl alcohol · water (6:5:5)
II isopropyl alcohol · ethyl acetate · water (6:1:3)

○ : spots detected by ultraviolet ray

考 察

赤色104号の毒性に関しては、1年間の長期毒性試験の結果、重大な毒性は認められていないとあるもの⁵⁾、あるいは慢性毒性試験の結果、安全であることが確認された⁶⁾などの記載がある。また、ラットの胎仔および育成仔に対して赤色104号の影響は認められなかったとの報告⁷⁾もある。しかし、本実験の結果によれば、経口的に摂取された赤色104号がマウスの肝臓カタラーゼの活性を阻害することは明らかである。与えた色素量は通常の食品への添加量0.01~0.03%にくらべると著しく多量であったので、この結果をもって直ちに赤色104号の有害性を云々することは避けなければならないが、赤色104号が肝臓機能に何らかの影響を与えるおそれがあるとは云えよう。

先に赤色103号については、毒性試験が行なわれていないとの理由で指定がとり消された。これによって、かつては24種類あったタール系色素は12種と半減し、この残りの12種についてはすべて慢性毒性試験による安全性が確認され一応の整理ができた⁶⁾といわれている。しかし、赤色104号を食品添加物として現在認めている国は、日本とウルグァイとの2カ国^{5,8)}のみであり、本実験の結果および核酸分解酵素に対する作用²⁾などを考える時、赤色104号の安全性についてはさらに詳細な実験が行なわれることが望まれる。

本実験中に赤色 104 号添加飼料を与えたマウスの中に、毛なみが非常に荒れたものが出現したが、その原因が本色素によるものとは断じがたい点もあるので、参考事実として追記しておくたい。

要 約

- 1) 食用赤色 104 号（フロキシン）を 0.5, 1.0 および 2.0 % 添加した飼料でマウスを 8 カ月間飼育し、5 カ月目から 8 カ月目まで 1 カ月ごとに肝臓カタラーゼ活性の推移を調べた。
- 2) 赤色 104 号はカタラーゼ活性を阻害した。活性の阻害度は色素添加量が増大するにつれて、また同一添加量のものでは飼育期間が長くなるにつれて高くなった。
- 3) 赤色 104 号はマウスの体内では変化を受けずに排出された。

本実験に協力して頂いた本学部職員池田哲也氏、また実験材料のマウスを提供して頂いた本学部畜産学研究室に対して感謝の意を表する。

文 献

- 1) 榎本則行・井上芳昌・内田 泰：佐大農彙，No. 29, 9 (1970).
- 2) 内田 泰・楠本忠夫・榎本則行：日本農芸化学会講演要旨集，p. 235, 昭和 44 年度，於東京。
- 3) 相磯和嘉：フアルマシア，1, 336 (1965).
- 4) 赤堀四郎編：酵素研究法，第 1 巻，p. 166 (1961)，朝倉書店，東京。
- 5) 桜井芳人・川城巖編：食品別添加物要覧，p. 173 (1970)，化学工業社，東京。
- 6) 市川和孝：食品と科学，13(5)，72 (1971)。
- 7) 田中 悟・川島邦夫・中浦根介・長尾重之・桑村 司・大森義仁：日本食品衛生学会第 22 回学術講演会報告，(1971)。
- 8) 岡村一弘：食品添加物の使用法，p. 68 (1967)，食品と科学社，東京。