食品添加物のトリプシンへの影響
カップ法およびディスク法による検討

池沢 宏郎, 奥田 和代, 森下恵美子, 伊藤 利之, 石坂 音治
名古屋市立大学薬学部¹⁾

Studies on the Effect of Food Additives on the Activity
of Trypsin, using Cup and Disc Methods

HIROH IKEZAWA, KAZUYO OKUDA, EMIKO MORISHITA,
TOSHIYUKI ITO and OTOHARU ISHIZAKA
The School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University¹⁾

(Received May 6, 1968)

For the purpose of studying the effect of food additives on the activity of trypsin, the cup and disc methods were applied. Eight kinds of food additives, *i. e.*, sodium benzoate, sodium dehydroacetate, dulcin, sodium cyclamate, sodium glutamate, glycine, Phloxine and Rose Bengale were tested. In each experimental run, one of these additives was dissolved in 20 ml of 1.5 % agar solution (pH 7.6) which contained 0.5 % of casein. The casein-agar medium which contained no food additives, was used as the control. These casein-agar solutions were poured into petri-dishes and solidified. Then, diluted trypsin solutions were added through stainless cup or paper disc to the casein-agar plates in petri-dishes. The dishes were incubated at 37° for 24 hr. After incubation, transparent circles were formed in the plates by the action of trypsin on casein. The outlines of the digested casein circles became distinct by adding 9 % trichloroacetic acid. After removal of trichloroacetic acid, the diameters of the circles were measured. The plot of the mean diameters of circles versus logarithm of enzyme concentration became linear. Thus the ratio of the enzyme activity in the presence of each food additive to that of control was calculated. The ratios were very small when dulcin, Phloxine and Rose Bengale were added to the reaction medium. These results showed that these three additives were inhibitory for the tryptic digestion of casein. It was also shown that other five additives had no effect on the activity of trypsin.

現在、食品添加物が生体におよぼす影響は、衛生化学上きわめて重要な問題であり、社会的に大きな関心をもたれている。ことに、発がん性の問題や、肝臓におよぼす影響などについては、いろいろと検討されている。しかし、食品とともに摂取されて生体へ吸収される前段階である消化過程において、消化酵素にどのような作用をおよぼすかについては、系統的な報告が少ない。この問題は、食品添加物の生体への作用のいわば第一段階であり、食品の消化吸収に添加物がどのような直接的影響をもつかは、添加物の適不適を決定する一つの条件として考慮するべきである。その一例として、カゼインなどの蛋白質を基質とする蛋白分解酵素トリプシンに対する影

響を検討することは、上記の問題への一つのアプローチとして意義がある。このような研究においては、食品添加物の存在下で試験管内で酵素をカゼイン溶液に作用させたのち、トリクロル酢酸で除蛋白した上清を比色して対照と比較するが、食品添加物が芳香族化合物である場合は、その吸収のために比色が妨害される。最近、著者等²⁾は、数種の食品添加物のトリプシンへの作用につき検討しているが、このような妨害を避けるため、ゲルろ過によって反応液中の食品添加物をカゼイン分解産物から分離除去したのち、比色を行なっている。また、食品添加物を対象とした報告ではないが、岡崎等³⁾は、パンクレアチン中のトリプシン活性に対する自律神経遮断剤の

- 1) Location: Tanabe-dori, Mizuho-ku, Nagoya (名古屋市瑞穂区田辺通 3-1).
- 2) 伊藤利之, 池沢宏郎, 石坂音治, 衛生化学, **14**, 207 (1968).
- 3) 岡崎寛蔵, 飯沼竜一, 葛谷有甫, 薬剤学, **17**, 116 (1957).

影響をしらべる方法として、カップ法を用いている。この方法では、カップを通して酵素溶液をカゼイン含有の寒天平板に加えて反応させ、酵素によるカゼイン分解の結果、生じた消化円を氷酢酸を用いて発現させて、その直径を測定する。この方法は、試験管内の反応の場合と異なり、比色法を用いぬため、上記の妨害を考慮する必要はない。しかし、岡崎等の方法は、カゼインを酵素作用にとって不適な NaOH 溶液に溶解するなど、不適当とおもわれる面が多い。一方、藤井等⁴⁾は、やはりカゼイン—寒天平板において、ディスク法を用いてトリプシン活性を定量する試みを行なっており、対数酵素濃度と消化円の直径との間に直線関係が成立することをたしかめている。藤井等の報告は、定量法としてのディスク法の有効性に関する基礎的研究であるが、これを食品添加物の酵素に対する影響を検索するために応用することは十分可能であろうと考えられる。

本報告においては、保存料、甘味料、着色料、調味料に属する各2種、計8種の食品添加物について、そのおのおのをカゼイン含有の寒天平板に加え、トリプシンの酵素活性におよぼす影響を、カップ法およびディスク法によりしらべた結果について述べる。本研究で使用した方法は、カゼイン—寒天平板の調製法、反応条件などにおいて、岡崎等の方法および藤井等の方法に改良を加えた。

実 験

実験材料

食品添加物、保存料として、デヒドロ酢酸ナトリウム、安息香酸ナトリウム、甘味料として、ズルチン、サイクラミン酸ナトリウム、調味料として、グルタミン酸ナトリウム、グリシンを使用した（以上特級試薬）。着色料としては、フロキシン、ローズベンガル（ともに国立衛生試験所標準品、純度 95.5%, 95%）を用いた。

カゼイン：nach Hammarsten (Merck 製)。

トリプシン：Difco 製 (1:250)。

寒天：片山化学製細菌用。

ディスクろ紙：東洋汙紙製抗生物質検定用（直径 8 mm, thick）。

カップ：日本抗生物質学術協議会製ペニシリン検定用ステンレスカップ。

実験方法

カゼイン (0.5%)、寒天 (1.5%) および前記の食品添加物中の一つ ($10^{-2}M$ — $10^{-4}M$) を 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.6) に溶解した液 20ml を、三寸型ペトリ皿中に水平に固めて平板とする。対照としては、食品添加物を加

えないカゼイン—寒天液 20ml を使用する。対照および添加物含有の場合について、それぞれのペトリ皿を 4—6 ケずつ使用した。

つぎに、4 ケのステンレスカップを、各ペトリ皿のカゼイン—寒天平板上におき、トリプシンを 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.6) に溶解した酵素溶液 (1.5%)、あるいはその希釈溶液 (1/4, 1/16, 1/64) 0.25ml を、カップ中に注入する。ディスク法の場合、トリプシン溶液あるいはその希釈液に浸したディスクろ紙を、カゼイン—寒天平板上におく。

以上の操作をほどこしたペトリ皿を、37° で 24 時間放置したのち、カップあるいはディスクろ紙を去り、9% トリクロル酢酸を加えて 15 分間室温で放置し、無色の消化円を発現させる。このとき、カップ法の場合は、平板をろ紙にてぬぐってから、トリクロル酢酸を加える。トリクロル酢酸を除去したのち、消化円の直径を測定し平均値をとる。

結 果

酵素濃度のそれぞれの値に応じて得られた消化円の直径の平均値を、対照および添加物含有の場合について示すと、Table I (カップ法)、Table II (ディスク法) のごとくなる。

TABLE I. Change of Mean Diameters of Digested Casein Circles in the Presence of Food Additives (Cup Method)

Additives	Concentration (M)	Enzyme concentration	Mean diameters of circles (mm)
Sodium Benzoate	10^{-2}	1.5% × 1	30.3
		× 1/4	27.6
		× 1/16	24.8
		× 1/64	22.4
Control	0	1.5% × 1	30.3
		× 1/4	27.1
		× 1/16	24.5
		× 1/64	22.3
Sodium Dehydroacetate	10^{-2}	1.5% × 1	29.8
		× 1/4	26.9
		× 1/16	24.7
		× 1/64	21.7
Control	0	1.5% × 1	29.6
		× 1/4	26.7
		× 1/16	24.5
		× 1/64	21.6
Sodium Cyclamate	10^{-2}	1.5% × 1	30.1
		× 1/4	27.6
		× 1/16	25.0
		× 1/64	22.0
Control	0	1.5% × 1	29.7
		× 1/4	27.0
		× 1/16	24.8
		× 1/64	21.4

4) 藤井 実, 富田輝雄, 農水講研報, 8, 147 (1959)。

Dulcin	5×10^{-3}	$1.5\% \times 1$	29.7
		$\times 1/4$	26.5
		$\times 1/16$	23.6
		$\times 1/64$	20.9
Control	0	$1.5\% \times 1$	31.1
		$\times 1/4$	28.4
		$\times 1/16$	26.3
		$\times 1/64$	23.2
Sodium Glutamate	10^{-2}	$1.5\% \times 1$	30.4
		$\times 1/4$	27.9
		$\times 1/16$	25.5
		$\times 1/64$	22.2
Control	0	$1.5\% \times 1$	30.8
		$\times 1/4$	27.9
		$\times 1/16$	25.3
		$\times 1/64$	22.8
Glycine	10^{-2}	$1.5\% \times 1$	29.6
		$\times 1/4$	26.7
		$\times 1/16$	24.6
		$\times 1/64$	21.6
Control	0	$1.5\% \times 1$	30.3
		$\times 1/4$	27.5
		$\times 1/16$	25.5
		$\times 1/64$	21.9
Phloxine	10^{-3}	$1.5\% \times 1$	27.7
		$\times 1/4$	24.8
		$\times 1/16$	22.6
		$\times 1/64$	21.3
Control	0	$1.5\% \times 1$	30.3
		$\times 1/4$	27.6
		$\times 1/16$	25.2
		$\times 1/64$	22.5
Rose Bengale	10^{-3}	$1.5\% \times 1$	26.1
		$\times 1/4$	23.9
		$\times 1/16$	22.2
		$\times 1/64$	20.5
Control	0	$1.5\% \times 1$	29.9
		$\times 1/4$	26.9
		$\times 1/16$	24.2
		$\times 1/64$	21.4

TABLE II. Change of Mean Diameters of Digested Casein Circles in the Presence of Food Additives (Disc Method)

Additives	Concentration (M)	Enzyme concentration	Mean diameters of circles (mm)
Sodium Benzoate	10^{-2}	$1.5\% \times 1$	30.4
		$\times 1/4$	27.1
		$\times 1/16$	23.5
		$\times 1/64$	20.9
Control	0	$1.5\% \times 1$	30.8
		$\times 1/4$	27.9
		$\times 1/16$	24.4
		$\times 1/64$	21.7
Sodium Dehydroacetate	10^{-2}	$1.5\% \times 1$	30.7
		$\times 1/4$	27.5
		$\times 1/16$	24.1
		$\times 1/64$	21.6
Control	0	$1.5\% \times 1$	31.1
		$\times 1/4$	27.8
		$\times 1/16$	25.1
		$\times 1/64$	22.1

Sodium Cyclamate	10^{-2}	$1.5\% \times 1$	30.0
		$\times 1/4$	27.3
		$\times 1/16$	23.9
		$\times 1/64$	20.5
Control	0	$1.5\% \times 1$	30.4
		$\times 1/4$	27.5
		$\times 1/16$	23.8
		$\times 1/64$	20.3
Dulcin	5×10^{-3}	$1.5\% \times 1$	29.8
		$\times 1/4$	26.7
		$\times 1/16$	23.4
		$\times 1/64$	19.7
Control	0	$1.5\% \times 1$	32.2
		$\times 1/4$	29.3
		$\times 1/16$	26.1
		$\times 1/64$	23.1
Sodium Glutamate	10^{-2}	$1.5\% \times 1$	30.5
		$\times 1/4$	27.5
		$\times 1/16$	24.6
		$\times 1/64$	21.4
Control	0	$1.5\% \times 1$	31.3
		$\times 1/4$	28.5
		$\times 1/16$	25.1
		$\times 1/64$	22.1
Glycine	10^{-2}	$1.5\% \times 1$	30.8
		$\times 1/4$	27.8
		$\times 1/16$	24.7
		$\times 1/64$	22.0
Control	0	$1.5\% \times 1$	30.4
		$\times 1/4$	28.2
		$\times 1/16$	24.5
		$\times 1/64$	20.9
Phloxine	10^{-3}	$1.5\% \times 1$	27.4
		$\times 1/4$	25.0
		$\times 1/16$	22.7
		$\times 1/64$	20.4
Control	0	$1.5\% \times 1$	31.5
		$\times 1/4$	28.3
		$\times 1/16$	25.3
		$\times 1/64$	22.1
Rose Bengale	10^{-3}	$1.5\% \times 1$	28.6
		$\times 1/4$	26.7
		$\times 1/16$	24.1
		$\times 1/64$	21.2
Control	0	$1.5\% \times 1$	31.1
		$\times 1/4$	28.1
		$\times 1/16$	25.4
		$\times 1/64$	22.5

Table I および II を用いて酵素濃度の対数値に対して消化円の平均直径をプロットすると、Fig. 1 のズルチン ($5 \times 10^{-3}M$) 添加の例にみるごとく、ディスク法およびカップ法のいずれの場合も直線となる。直線関係が成立する酵素濃度の範囲は、ディスク法の場合は $1.5\% - 1.5\% \times 1/64$ 、カップ法の場合は、フロキシソ添加のときのみ $1.5\% - 1.5\% \times 1/16$ 、他の実験のとき $1.5\% - 1.5\% \times 1/64$ であった。

Table I, II および Fig. 1 の結果が示すごとく、ズルチン、フロキシソ、ローズベンガル添加のとき、明らかに対照と比して消化円の平均直径は小となる。これら3

Fig. 1. Relationship between Mean Diameters of Digested Casein Circles and Logarithm of Enzyme Concentration in the Presence of Dulcin

○—○ dulcin ($5 \times 10^{-3}M$)
●—● control

種の添加物および他の5種の添加物についてそのトリプシン活性への影響を定量的に表現するため、上記の直線関係が成立する酵素濃度の範囲において、検定公式⁵⁾

$$\log \theta = \frac{(\sum U_H + \sum U_L) - (\sum S_H + \sum S_L)}{(\sum U_H + \sum S_H) - (\sum U_L + \sum S_L)} \log A$$

を用い、食品添加物を加えた場合の活性度 θ を算出し、対照と比較した百分率として表示した (Table III).

本実験においては、希釈度 $A=4$ で、 U_H , U_L は食品添加物を加えた場合の酵素の高濃度および低濃度に対応した消化円の直径に相当し、 S_H , S_L は対照の場合の同様の消化円の直径をあらわす。Table III から、安息香酸ナトリウム、デヒドロ酢酸ナトリウム、サイクラミン酸ナトリウム、グルタミン酸ナトリウム、グリシンの場合、カゼイン-寒天平板へ添加 ($10^{-2}M$) しても、酵素活性にはほとんどみられべき影響をおよぼさないとみられる。ズルチンは、 $5 \times 10^{-3}M$ の濃度で、ディスク法およびカップ法のいずれにおいても、酵素活性を対照の $1/3$ 程度に減少させ、明らかに阻害がみとめられる。また、フロキ

TABLE III. Effect of Food Additives on the Caseinolytic Activity of Trypsin

Additives	Concentration (M)	% Activity ratio	
		Cup method	Disc method
Control	0	100.0	100.0
Sodium Benzoate	$10^{-2}M$	105.7	68.7
Sodium Dehydroacetate	$10^{-2}M$	101.1	80.3
Sodium Cyclamate	$10^{-2}M$	121.0	99.6
Dulcin	$5 \times 10^{-3}M$	36.0	32.6
Sodium Glutamate	$10^{-2}M$	93.9	85.8
Glycine	$10^{-2}M$	65.7	83.5
Phloxine	$10^{-3}M$	38.6	26.1
Rose Bengale	$10^{-3}M$	29.0	17.8

Note: The activity ratios (θ) were calculated by the equation in text. And % activity ratios (100 θ) are shown in Table III. The enzyme activity in the absence of food additives (control) is expressed as 100 % in this case.

シン、ローズベンガルは、ともに $10^{-3}M$ の濃度で、酵素活性を大きく阻害する。なお、Table I, II 以外に、フロキシン、ローズベンガルについて、 $10^{-4}M$ の濃度で、トリプシン阻害の有無につき実験を行なったが、この濃度では、全く阻害がみられなかった。

このように、トリプシン活性が、安息香酸ナトリウムやデヒドロ酢酸ナトリウムによって影響を受けず、フロキシン、ローズベンガルによって阻害されるという結果は、最近著者等^{2,6)} が行なった試験管内でのカゼイン分解反応の結果と全く一致する。

考 察

岡崎等³⁾の方法では、カゼインをNaOH溶液に溶解したのち、寒天を加えているが、このときカゼイン-寒天平板のpHは約10となり、カップ法あるいはディスク法で添加したトリプシンを失活させるおそれがある。一方藤井等⁴⁾の方法においては、カゼイン-寒天平板のpHは8.5に調整されているが、反応温度は45°で高温すぎる。

本研究では、カゼインを寒天とともに0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.6)に溶解し、岡崎等³⁾の方法の欠陥を除くとともに、反応温度を37°とし、通常の酵素反応の条件下においた。また、カゼインが酵素の作用により消化されて生ずる消化円を発現させるのに、藤井等⁴⁾の方法と同様、強力な蛋白沈殿剤であるトリクロル酢酸を使用し

5) L. F. Knudsen, W. A. Randall, *J. Bact.*, **50**, 187 (1945).

6) 伊藤利之他, 未発表(執筆中).

たが、これは、岡崎等⁷⁾の方法のように氷酢酸を用いる場合よりも、より外郭が鮮明で測定の容易な消化円が得られる。また、本研究においては、食品添加物をカゼイン-寒天平板に直接溶解して加える方式をとり、酵素とともにカップあるいはディスクろ紙を通じて添加する方式をとらなかった。後者の方法では、添加物と酵素の媒質中における拡散速度の相違のため、酵素と添加物との接触が不十分になるおそれがある。以上の反応条件により、食品添加物のトリプシン阻害の有無をしらべるのに、カップ法およびディスク法が有効であることが示された。

なお、以上あげた食品添加物による蛋白分解酵素の阻害については、着色料であるフロキシン、ローズベンガルについて数例の報告がある。すなわち、古武等⁷⁾は、試験管内でのカゼインに対するペプシンの作用を、この

2種の色素が阻害することを報告している。丸野⁸⁾は、フィブリンの水解反応において、フロキシンがペプシンやパンクレアチンを阻害するにもかかわらず、トリプシンを阻害しないとしているが、これは色素濃度(0.05M)がきわめて高いため、不純物の夾雑による影響が無視できないと考えられる。また、色素以外では、安息香酸ナトリウムが1% (約0.07M)の高濃度でペプシンを阻害するという、Sailer等⁹⁾の報告がある。

本研究では、カップ法およびディスク法を用い、検定公式により8種の食品添加物のトリプシン活性への影響の程度が算出され、その結果、ズルチン、フロキシン、ローズベンガルによるトリプシン阻害がみとめられた。

謝辞 本研究において、種々実験上の助力を受けた石原英子氏に厚く謝意を表する。

7) 古武弥三, 水田泰子, 樫本 隆, 食衛誌, **7**, 230 (1966).

8) 丸野義雅, 実験消化器病学, **3**, 911 (1928).

9) J. Sailer, C. B. Farr, *Am. J. Med. Sci.*, **133**, 113 (1907).