食品添加物と消化酵素作用 (第3報¹⁾)

着色料とトリプシン その2

伊藤利之, 池沢宏郎, 手島節三

名古屋市立大学薬学部²⁾

Food Additives and Digestive Enzyme. III.¹⁾

Food Dyes and Tryptic Activity. (2)

TOSHIYUKI ITO, HIROH IKEZAWA, and SETSUZO TEJIMA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University²⁾

(Received February 16, 1970)

Effect of food dyes on the amidase activity of trypsin was examined by using a synthetic substrate, N^α -benzoyl-L-arginine amide. Xanthene dyes strongly inhibited the tryptic activity, as shown previously in the case of hydrolysis of casein.

The effects of xanthene dyes including fluorescein and its lower halogenated derivatives were also examined. From the experimental results, it was found that the extent of inhibition becomes stronger in the following order: fluorescein, 2',7'-dichlorofluorescein < 4',5'-diiodofluorescein, 4',5'-dibromofluorescein < eosine < 3,4,5,6-tetrachlorofluorescein < erythrosine < phloxine < rose bengal. It seems that the extent of inhibition is related to the number and position of halogen atoms on the structure of xanthene analogs.

From Lineweaver-Burk's plots, xanthene dyes exhibited non-competitive inhibitions. K_i values of these dyes were 4.7, 0.7, 0.4, 0.1, and 0.9 mM, respectively, for eosine, erythrosine, phloxine, rose bengal, and 3,4,5,6-tetrachlorofluorescein.

著者らは¹⁾先にカゼインを基質としてトリプシン活性への合成着色料の影響について検討し、どの着色料も1 mMで阻害し、とくに xanthene 系色素の阻害が強いことを報告した。

今回は合成基質の N^α -benzoyl-L-arginine amide (以下 BAA と略す) を用いて、トリプシンのアミダーゼ活性への xanthene 系色素、アマランス、ポンソー 3R、ポンソー SX およびナフトールイエロー S の影響について検討した。さらに xanthene 系色素の関連化合物として、フルオレッセイン、4',5'-ジブロムフルオレッセイン、4',5'-ジヨードフルオレッセイン、2',7'-ジクロロフルオレッセイン、3,4,5,6-テトラクロロフルオレッセイン、

レゾルシン、2,4-ジブロムレゾルシン、フタル酸および 3,4,5,6-テトラクロロフタル酸についても試験した。

アミダーゼ活性の測定には Schwert ら³⁾の微量拡散法による方法を準用したが、分離したアンモニアの定量にはニトロプルシッドナトリウムを触媒とするインドフェノール法⁴⁾を利用した。

実験の部

I 試薬・試液⁵⁾

I-1 0.1M リン酸緩衝液 (以下 P-buf, と略す)——
 KH_2PO_4 1.57 g, Na_2HPO_4 12.56 g を再蒸留水約 990 ml に溶解し、pH を 7.6 に調整して全容を 1 liter にする。

I-2 0.0025N HCl——再蒸留水で調製する。

1) 第2報: 伊藤利之, 池沢宏郎, 石坂音治, 衛生化学, 15, 253 (1969).

2) Location: Tanabe-dori, Mizuhoku, Nagoya (名古屋市瑞穂区田辺通3-1).

3) G. W. Schwert, H. Neurath, S. Kaufman, J. E. Snoke. *J. Biol. Chem.*, 172, 221 (1948).

4) B. Lubochinsky, J. P. Zalta, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 36, 1363 (1954) [(*C. A.*, 49, 6774 i (1955))]; A. L. Chaney, E. P. Marbach, *Clin. Chem.*, 8, 130 (1962).

5) 特記のないものは試薬特級品をもちいた。

I-3 トリプシン溶液——結晶トリプシン (Nutritional Biochemicals Co. 製, 2×cryst., salt free) 約2mg をとり 0.0025N HCl 20 ml に溶かし, OD₂₈₀ を測定し酵素たんぱく量を算出しておく⁶⁾ (終濃度を約 40 μg/ml とする)。

I-4 BAA 溶液——BAA·HCl·H₂O (大阪大学・蛋白研究所・蛋白研究奨励会事業部製) 19.9 mg を P-buf. で 20 ml とする (終濃度 1 mM)。Ki の測定には終濃度が 4.0, 3.2, 2.4, 1.6 および 0.8 mM となるようそれぞれ調製した。

I-5 被検液——アマランス, エリスロシン, エオン, ノフロキシン, ローズベンガル, ナフトールイエロー S, ポンソー 3 R, ポンソー SX (以上国立衛生試験所標準品), フルオレッセイン, 2',7'-ジクロロフルオレッセイン, 3,4,5,6-テトラクロロフルオレッセイン (以上は市販品を AcOEt-EtOH から再結, PPC⁷⁾ で単一), 4',5'-ジブロムフルオレッセイン,⁸⁾ 4',5'-ジョードフルオレッセイン⁹⁾ (以上はそれぞれ文献記載にしたがって合成した。ともにセルローズ粉末カラムにより 2% NaOH で展開し精製), 2,4-ジブロムレゾルシン (文献¹⁰⁾ により合成), レゾルシン, フタル酸, 3,4,5,6-テトラクロロフタル酸以上をそれぞれ精秤し, P-buf. で一定量とする。遊離酸のものは 2N NaOH の中和量に溶かし P-buf. で一定量とする。

I-6 吸収液——1/200N H₂SO₄。

I-7 放出液——飽和 K₂CO₃ 溶液。

I-8 発色液 I ——フェノール 10 g, ニトロプルシッドナトリウム 50 mg を蒸留水に溶解し 1 liter とする。

I-9 発色液 II ——NaOH 5 g と次亜塩素酸ナトリウム溶液 (available Cl: 5%) 15 ml を蒸留水で 1 liter とする。

I-10 アンモニア標準液——(NH₄)₂SO₄ を硫酸デンケータ中で乾燥後 13.2 mg を蒸留水で 500 ml とする (NH₃ として 4×10⁻⁴M)。

II 装置

微量拡散分析用ユニット (柴田理器製, 標準型)。気密剤にはグリセリンと飽和 K₂CO₃ 溶液の等容混合液を

用いる。

III 試験方法

III-1 試験操作——BAA 溶液 (終濃度 1 mM) 1 ml をとり, 25° で 4.5 min 加温し, 被検液 1 ml を加え 30 sec 後トリプシン溶液 1 ml を加える。よく混和し, 25° で 35 min インキュベーションする。あらかじめ内室に吸収液 1 ml を入れた微量拡散分析用ユニットの外室に酵素反応液 1 ml を入れ, 放出液 1 ml をすばやく加え, 室温で 2 hr 拡散吸収させる。終了後吸収液 0.5 ml を試験管にとり, 発色液 I と発色液 II をそれぞれ 3 ml ずつ加え, 室温で 40 min 放置後 OD₆₂₅ を測定し, アンモニア検量線からアンモニア量を求める。空試験には BAA 溶液の代りに P-buf. を用いたものと, また, それぞれのトリプシン溶液の代りに 0.0025N HCl を用いたものを同様に操作し測定する。空試験値は前報¹⁾ と同様に差引き, 標準線により対応する酵素濃度を求め, 対照¹¹⁾ との比を算出する。

III-2 標準線——BAA 溶液 (終濃度 1 mM) 1 ml ずつをとり, 25° で 4.5 min 加温し, P-buf. を 1 ml ずつ加え, 30 sec 後トリプシン溶液 0.0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 および 1.0 ml を含む 0.0025N HCl 溶液各 1 ml をそれぞれ加え, よく混和し, 25° で 35 min インキュベーションする。以下 III-1 に従い測定し, 各酵素濃度に対するアンモニア量を plot し標準線を作成する。

III-3 阻害定数の測定——各濃度 (終濃度 0.8, 1.6, 2.4, 3.2, 4.0 mM) の BAA 溶液 2 ml ずつをとり, 25° で 4.5 min 加温し, 被検液 (終濃度として, ローズベンガル 0.025 mM, フロキシン 0.12 mM, エリスロシン 0.3 mM, エオン 2 mM, 3,4,5,6-テトラクロロフルオレッセイン 0.5 mM) 2 ml を加え, 30 sec 後トリプシン溶液 2 ml を加え, よく混和し, 10, 20, 30, 40 min 後にそれぞれ 1 ml ずつ微量拡散分析用ユニットに移し, 放出液 1 ml を加え, 以下 III-1 に従い操作し, アンモニア量 (Pt) を求める。BAA の t 時間後の濃度 St ¹²⁾ を算出し, $\log St$ を t 時間に対し plot して, 0 時間における接線の勾配 ϕ を求め, 各基質濃度での初速度 (v) を次式で計算する (BAA の初濃度を So とする)。

6) $OD_{280} \times 0.585 \text{ mg/ml} = \text{トリプシン量}$ 。

7) 展開剤 25% EtOH : 5% NH₄OH = 1 : 1, 東洋ろ紙 No. 51, 試料液 : 0.1%, 2 μl。

8) A. V. Baeyer, *Ann.*, **183**, 37 (1876); M. A. Phillips, *J. Chem. Soc.*, **1932**, 724。

9) 森 逸男, 薬学雑誌, **85**, 679 (1965)。

10) R. B. Sandin, R. A. McKee, "Organic Syntheses," Vol. 17, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1937, p. 23。

11) トリプシン溶液 1 ml 中のトリプシン量 $\times 1/4$, (トリプシンの終濃度)。

12) $St = So - Pt$ 。

$v=2.303 S_0 \phi$

Lineweaver-Burk 法¹³⁾ の plot により K_i を算出する。

III-4 アンモニア 検量線——アンモニア 標準液 0.0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 および 0.5 ml を含む水溶液 0.5 ml にそれぞれ 発色液 I, 発色液 II を 3 ml ずつ加え, 室温で 40 min 放置後 OD_{625} を測定し, 検量線を作成する。

結果と考察

Xanthene 系色素, その関連化合物, および xanthene 系以外の 4 種の合成着色料の存在下で, トリプシンのアミダーゼ活性を測定し Table I に結果を示した。

カゼインを基質とした場合¹⁾と同様に, 合成基質の BAA を用いた場合も, 食品添加物として許可されている xanthene 系色素は, トリプシン作用を強く阻害し, アマランスおよび不許可の色素 3 種は影響が小さいか, または全くなかった。

xanthene系色素の基本構造であるフルオレッセイン自

TABLE I. Amidase Activity of Trypsin in the Presence of Food Dyes and Xanthene Related Compounds

Compounds	Concentration mM	Amidase activity %
Control		100
(Official food dyes)		
Amaranth	1	90
Erythrosine ^{a)}	1	41
Eosine ^{a)}	1	63
Phloxine ^{a)}	1	16
Rose Bengal ^{a)}	1	0
(Nonofficial)		
Ponceau 3R	1	85
Ponceau SX	1	101
Naphthol Yellow S	1	103
(Xanthene related compounds)		
Fluorescein	1	101
2', 7'-Dichlorofluorescein	1	102
4', 5'-Dibromofluorescein	1	87
4', 5'-Diiodofluorescein	1	90
3, 4, 5, 6-Tetrachlorofluorescein	1	49
(Materials for synthesis of xanthene related compounds)		
Resorcinol	2	100
2, 4-Dibromoresorcinol	2	91
Phthalic acid	2	103
3, 4, 5, 6-Tetrachlorophthalic acid	2	94

a) Xanthene related dye.

Chart 1. Structure of Xanthene Related Compounds

Compound	X	X'	Y
Fluorescein	H	H	H
2', 7'-Dichlorofluorescein	H	Cl	H
4', 5'-Dibromofluorescein	Br	H	H
4', 5'-Diiodofluorescein	I	H	H
Eosine (Na salt)	Br	Br	H
Erythrosine (Na salt)	I	I	H
Phloxine (Na salt)	Br	Br	Cl
Rose Bengal (Na salt)	I	I	Cl
3, 4, 5, 6-Tetrachlorofluorescein	H	H	Cl

体は全く阻害せず, 4', 5' 位に Br または I があるとやや阻害し, これにさらに Br または I が 2', 7' 位に入ると増強され, また, 3, 4, 5, 6 位の Cl の存在で阻害作用が強くなることが認められた。Xanthene 系色素類の合成原料であるレゾルシンと 2, 4-ジブロムレゾルシン, フタル酸と 3, 4, 5, 6-テトラクロルフタル酸の影響をみると, Br または Cl のないものは全く阻害作用がなく, Br または Cl をもつものは阻害を示した。なお, 2', 7'-ジクロルフルオレッセインは全く影響が認められなかった。

Lineweaver-Burk 法により xanthene 系色素の阻害定数 K_i を求め Table II に示した。これらの色素は Fig. 1 のエオシンの場合の様にいずれも非拮抗型を示し, 不活性なトリプシン-色素かトリプシン-BAA-色素の結合体の生成により, 酵素反応の過程で酵素-基質結合体の生成量が減少し阻害作用を示すものと考えられる。

TABLE II. K_i Values of Xanthene Related Compounds on the Tryptic Amidase Activity

Compounds	K_i (mM)
Eosine	4.7
Erythrosine	0.7
Phloxine	0.4
Rose Bengal	0.1
3, 4, 5, 6-Tetrachlorofluorescein	0.9

substrate: N α -benzoyl-L-arginine amide
enzyme reaction: at 25° in 0.1M phosphate buffer at pH7.6
estimation of K_i : Lineweaver-Burk's plot

13) H. Lineweaver, D. Burk, *J. Am. Chem. Soc.*, **56**, 658 (1934).

Fig. 1. Lineweaver-Burk's Plot of Hydrolysis of BAA by Trypsin in the Presence and Absence of Eosine at 25° in 0.1M Phosphate Buffer (pH 7.6)

○—○: in the presence of eosine (2 mM)
●—●: control (in the absence of eosine)

中林¹⁴⁾はたんぱく質(カゼイン, 卵白, アルブミン)への xanthene 系色素の染着力について比較し, エオシ

ン, エリスロシン, フロキシン, ローズベンガルの順序で強くなることを報告しており, また, 相沢¹⁵⁾はウシ血漿アルブミンへの xanthene 系色素の結合数を測定し, 同順序で結合数が増加することを認めている. これらの結果から xanthene 系色素類によるトリプシンへの染色結合性も先に示した順序で強くなり, したがってトリプシンへの活性阻害作用も同じ順序で強くなるものと考えられる.

Webb ら¹⁶⁾は xanthene 系色素をラットに経口投与し, 高ハロゲン体のエリスロシン, エオシン, フロキシンはフルオレッセインおよび低ハロゲン体の 4', 5'-ジブロムフルオレッセイン, 2', 7'-ジクロルフルオレッセインに比べ, 糞中へ(約 90-100%)排泄される速度が速く, その速度は Br, I, Cl の数と相関関係があることを認めている. したがって高ハロゲン体は肝や腎への影響は少ないと考えられるが, 消化酵素のトリプシンやペプシン¹⁷⁾と接触しその作用を阻害し, 大量の場合は消化不良の原因となることが予想される.

謝辞 本研究にあたり御懇篤な御指導を賜りました石坂音治博士に厚くお礼申しあげる. また実験の一部に協力された片山久美子氏に深謝する.

- 14) 中林敏郎, 竹内弘明, 食品工誌, **10**, 441 (1963); 中林敏郎, 橋本博司, 河井昌三, 食品工誌, **13**, 14 (1966).
- 15) 相沢秀俊, 食衛誌, **8**, 40 (1967).
- 16) J. M. Webb, M. Fonda, E. A. Brouwer, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, **139**, 141 (1962).
- 17) 古武弥三, 水田泰子, 榎木 隆, 食衛誌, **7**, 230 (1966).