食品添加物（赤色系合成着色料）のウサギ血小板機能に及ぼす影響

山崎裕康, 山口孝子, 山内あい子, 垣内靖男
神戸学院大学薬学部

Effect of Food Additives (Artificial Red Colors) on Rabbit Platelet Functions

HIROYASU YAMAZAKI, TAKAKO YAMAGUCHI, AIKO YAMAUCHI and YASUO KAKIUCHI

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kobe-Gakuin University 518, Arise,
Ikawadani-cho, Nishi-ku, Kobe, 651-21,
Japan

(Received April 8, 1994)

Coloring is added to many foods and beverages to compensate for the loss of color during processing and to enhance their visual appeal. We have been studying the effect of food additives around the ADI level on cellular functions using washed rabbit platelets. The present study has been carried out to investigate the effect of artificial red colors on rabbit platelet functions both *in vitro* and *ex vivo*.

Among seven red colors used, Nos. 3, 104 and 106, which are xanthene dyes, had an inhibitory effect on A-23187 induced TXB_2 synthesis at the concentration of 0.01–0.05% when added simultaneously *in vitro*. On the other hand, all seven colors affected thrombin induced TXB_2 synthesis at the concentration of around 0.01%. Namely, Nos. 2, 3, 40, 102, 104 and 105 inhibited and No. 106 stimulated thrombin induced TXB_2 synthesis.

In the pretreatment, only No. 106 had a reversible inhibitory effect on A-23187 induced TXB_2 synthesis, but thrombin induced ones were inhibited by Nos. 2, 3, 40, 102, 104 and 105. These inhibitions were irreversible in the cases of Nos. 3 and 104.

Thrombin induced TXB_2 synthesis in the platelet from rabbit fed ADI levels of Nos. 3, 102, 104, 105 and 106, with the diet for 5 d was stimulated.

These results indicate that the amount of these compounds added to foods should be reduced to the minimum necessary to lower the risk of their potential hazard to humans.

Keywords — food additives; artificial red color; rabbit platelet; activation; inhibition; thrombin

はじめに

食品には各種添加物が使用されている。添加物のうち化学的合成品については厳しい安全基準にもとづいて指定されたものだけが使用されている。赤色系合成着色料についても使用基準にもとづいて菓子、ケーキ、清涼飲料などに広く使用されている。¹⁾さらに、これらの着色料は食品以外にも医薬品をはじめ、口紅やプラスチックの着色などに使用されていること²⁾も考慮するとその日常的な摂取量レベルで生体になんらかの影響を及ぼす可能性がある。現

在わが国で使用されている赤色系合成着色料としては2号、3号、40号、102号、104号、105号、106号の7品目がある。現在これらの添加物の使用量は動物における慢性毒性実験結果より導かれたADIを基に定められているがたとえADIレベルの摂取量であっても個々の細胞に対してはその機能を損なう可能性があり、細胞レベルでの影響を検討する必要があると考えられる。著者らはこれまで環境汚染物質をはじめとする種々の化合物についてウサギ洗浄血小板を用いてそれらの日常摂取レベルが細胞に及ぼす影響について検討し、報告してきた。³⁻⁵⁾ま

た、食品添加物に関しても、酸化防止剤がその ADI レベルの摂取量でウサギ血小板の活性化を阻害することを報告した。⁶⁾今回は赤色系合成着色料についてウサギ血小板に及ぼす影響を *in vitro* 及び *ex vivo* で検討を行った。

実験方法

1. 試薬 食用赤色 2 号, 3 号, 40 号, 102 号, 104 号, 105 号及び 106 号はいずれも国家検定合格品を用いた。トロンボキサン B₂ (TXB₂), カルシウムイオノフォア A-23187, トロンピンは Sigma Chemicals Co. から購入した。ジメチルスルホキシド (DMSO) は同仁化学より購入した。その他の試薬類はいずれも市販特級品を使用した。トロンボキサン B₂ 抗体は米国ケンタッキー大学薬学部 H.-H. Tai 教授より供与いただいた。

各着色料は種々の濃度で Ca²⁺, Mg²⁺ を含まない Tyrode 液に溶解して使用した。

2. ウサギ洗浄血小板の調製 ウサギ洗浄血小板の調製は既報³⁾に準じて行い、最終的に Ca²⁺, Mg²⁺ を含まない Tyrode 液 (pH 7.4) に懸濁した。

3. 各種化合物による血小板の処置及び活性化の測定 反応溶液 1 ml 中の血小板が 2×10^7 個になるように調製した後、DMSO に溶解した A-23187 (1 μ M) あるいは Tyrode 液に溶解したトロンピン (終濃度 1 U/ml) 単独若しくは種々の被験化合物とともに 37°C で 5 分間インキュベートした。⁶⁾また、血小板を上記各刺激剤の溶解溶媒でインキュベートした場合をコントロールとした。

各添加物による血小板の前処置実験においては、血小板を化合物とともに 37°C で 5 分間インキュベートした後、前記刺激剤を添加し活性化を測定した。また、前処置後遠心分離により各添加物を除去し、血小板を新しい反応液に懸濁してから刺激剤を添加、活性化した。活性化の程度は生成される TXB₂ 量を指標とした。

4. 各種添加物添加食による *ex vivo* 実験 通常飼育のウサギ (体重 4 kg) に、各化合物を添加した食餌を、化合物の摂取量が ADI レベル (2 号: 0.5 mg/kg 体重/日, 3 号: 1.25 mg/kg 体重/日, 40 号: 7 mg/kg 体重/日, 102 号: 4 mg/kg 体重/日, 104 号: 0.5 mg/kg 体重/日, 105 号: 0.5 mg/kg 体重/日, 106 号: 0.5 mg/kg 体重/日) になるように連続 5 日間与え、6 日目にそれぞれのウサギから洗浄血小板を調製し、前述の方法によりその活性化を測定した。

5. TXB₂ の定量 血小板の活性化に伴う TXB₂ 生成量は既報の Enzyme immunoassay により定量した。⁷⁾TXB₂ 量は血小板 10^8 個あたりの ng で表わし、有意差は Student の *t* テストにより検定した。

結 果

1. A-23187 による活性化に及ぼす添加物濃度の影響

血小板を、種々の濃度の各添加物共存下で 1 μ M の A-23187 により刺激した場合の産生量を Table I に示した。なお 2 号, 40 号及び 102 号はモノアゾ系, 3 号, 104 号, 105 号並びに 106 号はキサンテン系の色素である。アゾ系色素は使用したすべての濃度で本刺激剤による TXB₂ 産生に影響を与えなかったが、キサンテン系色素の場合は 3 号では添加濃度が 0.01% 以上, 104 号及び 106 号では 0.05% で TXB₂ 産生量の有意な抑制が認められた。105 号では産生量の抑制は観察されなかった。また、各添加物単独処理の場合の TXB₂ 産生量は溶媒コントロールの場合と有意差がなかったため Table 及び Fig には示さなかった。

2. トロンピンによる活性化に及ぼす添加物濃度の影響

上記と同様の条件で刺激をトロンピン (1 U/ml) で行ったときの TXB₂ 産生量を Table II に示した。アゾ系色素は添加量が 0.02% 以上で TXB₂ 産生を抑制し、0.05% ではその抑制率は 90% であった。一方、キサンテン系色素は 3 号, 104 号及び 105 号が 0.005% 以上の添加量で TXB₂ 産生を有意に抑制し、106 号では逆に産生促進傾向が観察された。

3. 各添加物による血小板の前処置の影響

血小板を各添加物 (0.05%) とともに前処置したものをそのまま、あるいは前処置後新しい反応液に交換した後 A-23187 又はトロンピンで刺激した場合の TXB₂ 産生量を Fig. 1, 2 に示した。A-23187 刺激による TXB₂ 産生の抑制は 106 号で前処置した場合にのみ観察され、この作用は 106 号を除去すると消失した (Fig. 1)。

一方、トロンピン刺激の場合には、106 号を除く用いたすべての化合物において TXB₂ 産生の有意な抑制が観察された。2 号, 40 号, 102 号及び 105 号ではこれらの化合物除去により抑制効果が消失したが、3 号並びに 104 号ではこれらの化合物除去後も抑制が見られた。これに対し、106 号においては前処置後化合物を除去するとトロンピン刺激による

TABLE I. Effect of Food Colors on A-23187 Induced TXB₂ Synthesis in Rabbit Platelets

Compound	Final concentration	TXB ₂ synthesis (ng/10 ⁸ cells)
DMSO		220.0±42.4
Food Red No.2	0.001 (%)	270.0±34.8
	0.005	190.0±18.3
	0.01	220.0± 8.2
	0.02	195.0±30.0
	0.05	206.1±36.2
Food Red No.3	0.001	150.0±21.6 ^{a)}
	0.005	162.5±44.2
	0.01	142.5±18.9 ^{a)}
	0.02	145.0±20.8 ^{a)}
	0.05	161.8±13.8 ^{a)}
Food Red No.40	0.001	175.0±28.9
	0.005	195.0±33.2
	0.01	183.8±32.0
	0.02	200.0±40.8
	0.05	213.8±53.4
Food Red No.102	0.001	225.0±56.9
	0.005	238.8±35.0
	0.01	247.5±53.2
	0.02	243.8±12.5
	0.05	192.5±35.9
Food Red No.104	0.001	172.5±15.5
	0.005	204.8±44.1
	0.01	175.5±22.5
	0.02	200.3±26.4
	0.05	162.5±17.1 ^{a)}
Food Red No.105	0.001	195.0±31.1
	0.005	221.3±51.4
	0.01	243.8±12.5
	0.02	192.5±11.9
	0.05	222.5±15.0
Food Red No.106	0.001	188.8±22.5
	0.005	182.5± 8.2
	0.01	164.0±30.1
	0.02	176.3±59.4
	0.05	53.8± 9.2 ^{a)}

Control (DMSO alone) 8.66±2.37 ngTXB₂/10⁸ cells.
Each value represents the mean±S.D. of 6 determinations.

a) $p < 0.05$ Vs. DMSO (A-23187).

TABLE II. Effect of Food Colors on Thrombin Induced TXB₂ Synthesis in Rabbit Platelets

Compound	Final concentration	TXB ₂ synthesis (ng/10 ⁸ cells)
Tyrode		11.0±1.8
Food Red No.2	0.001 (%)	8.4±0.7 ^{a)}
	0.005	9.3±2.3
	0.01	5.6±0.7 ^{a)}
	0.02	1.6±0.7 ^{a)}
	0.05	1.4±0.4 ^{a)}
Food Red No.3	0.001	11.0±2.3
	0.005	4.7±0.3 ^{a)}
	0.01	6.8±0.6 ^{a)}
	0.02	4.2±0.8 ^{a)}
	0.05	3.8±0.8 ^{a)}
Food Red No.40	0.001	9.6±1.4
	0.005	10.6±2.1
	0.01	7.1±1.0 ^{a)}
	0.02	4.7±1.7 ^{a)}
	0.05	1.0±0.5 ^{a)}
Food Red No.102	0.001	8.9±0.5
	0.005	9.9±1.0
	0.01	9.2±3.1
	0.02	7.0±1.0 ^{a)}
	0.05	1.2±0.3 ^{a)}
Food Red No.104	0.001	9.9±2.5
	0.005	4.8±0.6 ^{a)}
	0.01	3.3±0.8 ^{a)}
	0.02	3.8±0.9 ^{a)}
	0.05	5.3±1.2 ^{a)}
Food Red No.105	0.001	11.5±2.7
	0.005	6.3±1.2 ^{a)}
	0.01	2.5±0.5 ^{a)}
	0.02	5.0±0.8 ^{a)}
	0.05	2.0±0.3 ^{a)}
Food Red No.106	0.001	14.9±6.1
	0.005	15.5±3.9
	0.01	17.3±4.4
	0.02	17.3±6.2
	0.05	18.0±6.1 ^{a)}

Control (Tyrode buffer) 1.2±0.4 ngTXB₂/10⁸ cells.
Each value represents the mean±S.D. of 6 determinations.

a) $p < 0.05$ Vs. Tyrode (thrombin).

Fig. 1. Effect of Presence or Absence of Food Colors on TXB₂ Synthesis in A-23187 Induced Rabbit Platelets Pretreated with Food Colors

□ present, ■ absent

a) $p < 0.05$ Vs. DMSO.

Platelets were pretreated with 0.05% of each food color.

Each column with bar represents the mean $\pm$ S.D. of 8 determinations.

Fig. 2. Effect of Presence or Absence of Food Colors on TXB₂ Synthesis in Thrombin Induced Rabbit Platelets Pretreated with Food Colors

□ present, ■ absent

a) $p < 0.05$ Vs. Tyrode.

Platelets were pretreated with 0.05% of each food color.

Each column with bar represents the mean $\pm$ S.D. of 8 determinations.

TXB₂ 産生の促進が認められた (Fig. 2).

4. 添加物含有食摂取時の血小板反応性

上記化合物添加食を, 化合物の摂取量が ADI にな

Fig. 3. Effect of Food Colors in the Diet on A-23187 Induced TXB₂ Synthesis in Rabbit Platelets

Control (DMSO) 0.8 ± 0.5 ng TXB₂/10⁸ cells.

a) $p < 0.05$ Vs. DMSO.

Each column with bar represents the mean $\pm$ S.D. of 8 determinations.

Fig. 4. Effect of Food Colors in the Diet on Thrombin Induced TXB₂ Synthesis in Rabbit Platelets

Control (Tyrode) 0.6 ± 0.2 ng TXB₂/10⁸ cells.

a) $p < 0.05$ Vs. Tyrode.

Each column with bar represents the mean $\pm$ S.D. of 8 determinations.

るように 5 日間連続摂取させたウサギより調製した血小板における, 各刺激剤で活性化した時の TXB₂ 産生量を Fig. 3, 4 に示した. A-23187 刺激による TXB₂ 産生に対する各添加物の影響は観察されなかったが (Fig. 3), トロンビン刺激に対しては赤色 3 号, 102 号, 104 号, 105 号及び 106 号で TXB₂ 産生の促進が認められた. 特に赤色 106 号においては

かなり顕著な促進効果が認められた (Fig. 4).

考 察

わが国で現在許可されている赤色系合成着色料 7 種のうち 104, 105, 106 号はわが国以外で使用を許可している国はほとんどない。

2 号の細胞毒性に関しては細胞培養液中への 0.3 mm (0.02%) の添加で C3H マウス胎仔由来細胞の増殖を阻害することが報告されている。⁸⁾ 血小板を用いた本実験においても *in vitro* で、0.02% 添加時にトロンビン刺激による TXB₂ 産生を強く阻害することが判明した。

3 号については、数世代にわたる慢性毒性実験,⁹⁾ 添加飲料水による催奇形性,¹⁰⁾ Osborne-Mendel ラットに対する胎仔毒性や催奇形性が最高 800 mg/kg/d の投与でも観察されなかった。^{8,11)} また、3 号の ADI 値に関する意見も最近出されている。¹²⁾ しかしながら、今回の実験では、ADI レベル (1.25 mg/kg/d) の化合物を摂取したウサギから調製した血小板においてそのトロンビン刺激に対する反応性の亢進が認められた。

104 号については、最高 0.9% の添加食を CD 系マウスに投与するとその仔の神経運動学的機能に影響が表われる。¹³⁾ また、1, 3, 5% 添加食を与えた ICR マウスにおける催奇形性が報告されている。¹⁴⁾ しかしながらこれらの実験における使用量はいずれも ADI レベルをはるかに超えており、実際の摂取量でこれらの作用が引き起こされるか否かは明らかではない。本実験では、ADI レベルの摂取量で血小板のトロンビン刺激に対する反応性がたかまることが明らかとなった。

40 号はアメリカでは従来より広く使用されている着色料でわが国においても 1991 年に許可された。40 号に関しても Osborne-Mendel 系や SD 系ラットを用いた催奇形性あるいは毒性、発ガン性実験が行われ、いずれも陰性の結果が報告されており、¹⁵⁻¹⁷⁾ 今回の血小板機能に対する実験においても ADI レベルの摂取量では有意な影響は観察されなかった。

今回の実験より、*in vitro* において、カルシウム流入を介する A-23187 刺激に呼応した TXB₂ の産生は、同時添加の場合、キサンテン系色素である 3, 104, 106 号により阻害され、また、106 号については共存時でも阻害がみられた。これらの結果から、これらの色素は A-23187 との直接的な相互作用によりその刺激作用を阻害していること、3 号及び

104 号はその添加時期により阻害作用がみられないことから、血小板膜に対しても親和性を持つことが示唆された。一方、血小板膜受容体を介するトロンビン刺激に対しては、同時添加の場合、用いた化合物すべてにおいて抑制あるいは促進作用が観察され、共存実験の結果よりこの作用は可逆性 (2, 40, 102, 105 号) あるいは不可逆性 (3, 104 号) であることが判明した。106 号については、A-23187 刺激の時とは逆の TXB₂ 生成促進作用がみられた。また、共存時には、同時添加時にみられた促進作用がみられなかったものの、化合物除去後には促進作用がみられた。以上のことから、これらの化合物は血小板膜あるいは膜のトロンビン受容体に可逆的 (2, 40, 102, 105 号) 若しくは不可逆的 (3, 104 号) な変化を及ぼすことを示唆している。106 号と血小板膜及び両各刺激剤との相互作用については今後詳しい検討が必要だと思われる。

一方、ADI レベルの合成着色料添加食を与えたウサギより調製した血小板を用いた *ex vivo* 実験では上記着色料のうち 4 種においてトロンビン刺激による TXB₂ 産生の有意な促進が観察された。トロンビン刺激に対する *in vitro* と *ex vivo* における反応性の相違は、着色料の生体への吸収率、分布、代謝、排泄率などが影響している^{18,19)} ものと考えられる。また、食餌成分と着色料及びその代謝物などの生体内相互作用により血小板のトロンビン刺激に対する反応性が亢進している可能性も考えられ、この点についても今後検討する必要があると思われる。いずれにせよ、本実験により、食品添加物として現在許可されている赤色系合成着色料のなかには、個体レベルでは影響がないとされている ADI レベルの摂取量でも摂取が長期間にわたれば、細胞レベルではその機能に影響を及ぼす着色料もあることが明らかになった。

ま と め

食品添加物として広く使用されている合成着色料のうち、赤色系タール色素 7 種についてこれらの ADI レベルの摂取が及ぼす細胞機能への影響を調べるため、ウサギ洗浄血小板を用いて A-23187 及びトロンビン刺激に対する TXB₂ 生成に及ぼす影響を検討した。その結果、*in vitro* においては A-23187 刺激による産生は同時添加の場合 3, 104 並びに 106 号により抑制された。また、前処置実験においては 106 号で抑制作用がみられたが、この作用は可逆的であった。一方、トロンビン刺激に対しては同時添

加の場合、106号がTXB₂産生の促進を、その他の化合物が産生を強く抑制することが判明した。このトロンビン刺激に対する血小板の応答に及ぼす作用は、これらの化合物で血小板を前処置した場合にもみられたが、3号と104号以外においては、前処置後反応液中からこれらの化合物を除去すると消失した。これらの化合物を、そのADIレベルで食餌とともに5日間連続摂取させたウサギから調製した血小板について上記の2種の刺激剤に対する反応を調べたところ、A-23187刺激に対する有意な影響は全く

みられなかったものの、トロンビン刺激に対しては3, 102, 104, 105及び106号において、*in vitro*における結果とは逆のTXB₂産生の促進傾向が観察された。これらの結果より、今回調べた赤色系タール色素についても既報⁶⁾の酸化防止剤と同様、その摂取量が生体に影響を及ぼさないADIレベルであっても細胞のレベルでは血小板機能の一つであるトロンビン刺激によるTXB₂生成に影響を及ぼすことが明らかとなった。

引用文献

- 1) 厚生省, “第六版食品添加物公定書,” 1992, pp.307—322.
- 2) 谷村顕雄, 藤井正美他監修, “食品中の食品添加物分析法解説書,” 講談社, 1992, pp.260—289.
- 3) H. Yamazaki, E. Imamura, S. Kamei, A. Yamauchi, Y. Kakiuchi, H.-H. Tai, *Chemosphere*, **21**, 21 (1990).
- 4) H. Yamazaki, M. Inoi, T. Yamaguchi, A. Yamauchi, Y. Kakiuchi, H.-H. Tai, *Chemosphere*, **22**, 859 (1991).
- 5) H. Yamazaki, T. Yamaguchi, A. Yamauchi, Y. Kakiuchi, *Chemosphere*, **25**, 665 (1992).
- 6) 山崎裕康, 山口孝子, 山内あい子, 垣内靖男, 衛生化学, **39**, 453 (1993).
- 7) 北川常広, 南原利夫, 辻 章夫, 石川栄治編, “酵素免疫測定法,” 蛋白質核酸酵素, 別冊 No. 31, 1987, pp.90—97.
- 8) 大川美子, 吉元 誠, 宮本敬久, 波多野昌二, 食衛誌, **30**, 496 (1989).
- 9) J.F. Borzelleca, J.B. Hallagan, *Fd. Chem. Toxic.*, **28**, 813 (1990).
- 10) T.F.X. Collins, T.N. Black, M.W. O'Donnell, Jr, M.E. Shackelford, P. Bulhack, *Fd. Chem. Toxic.*, **31**, 161 (1993).
- 11) T.F.X. Collins, T.N. Black, D.I. Ruggles, *Toxicol. Indust. Health*, **9**, 605 (1993).
- 12) E. Poulsen, *Food Additives and Contaminants*, **10**, 315 (1993).
- 13) T. Tanaka, *Fd. Chem. Toxic.*, **31**, 1013 (1993).
- 14) M. Seno, S. Fukuda, H. Umisa, *Fd. Chem. Toxic.*, **22**, 55 (1984).
- 15) T.F.X. Collins, T.N. Black, J.J. Welsh, L.H. Brown, *Fd. Chem. Toxic.*, **27**, 707 (1989).
- 16) J.F. Borzelleca, J.W. Olson, F.E. Reno, *Fd. Chem. Toxic.*, **27**, 701 (1989).
- 17) J.F. Borzelleca, J.W. Olson, F.E. Reno, *Fd. Chem. Toxic.*, **29**, 313 (1991).
- 18) 新村寿夫, “食品添加物の生化学と安全性,” 地人書館, 1979, pp.211—260.
- 19) 新村寿夫, “食品添加物の代謝と活性発現,” トキシコロジーフォーラム, **9**(2), 1986, pp.138—150.