清涼飲料水の衛生学的研究 (第 7 報)

II 合成保存料について (6)

デヒドロ酢酸変化生成物の毒性と抗かび性

(昭和 46 年 8 月 24 日受理)

佐々木 清 司

Studies on Soft Drinks (VII)

Part II Preservatives in Soft Drinks (6)

Acute Toxicity and Moldstatic Activity for *Aspergillus niger* of Dehydroacetic Acid and its Transformation Products

Kiyoshi SASAKI

(Osaka City Institute of Hygiene: 38 Kitaogi-machi, Kita-ku, Osaka)

Acute toxicity and moldstatic activity for *Asp. niger* of transformation products of dehydroacetic acid were investigated.

And the results obtained were as follows:

1) The moldstatic activity of each compounds compared with dehydroacetic acid were found to be 1/15 of dehydroacetic acid in strength for diacetylacetone, 1/30 for 2, 6-dimethyl-4-pyrone-3-carboxylic acid, and 1/180 for 2, 6-dimethyl-4-pyrone.

2) On acute toxicity, the oral LD₅₀ (and 95% confidence limits) in mice were found to be 1.33 g/kg (1.23~1.44 g/kg) for dehydroacetic acid, 2.33 g/kg (2.04~2.65 g/kg) for 2, 6-dimethyl-4-pyrone-3-carboxylic acid, 1.67 g/kg (1.49~1.88 g/kg) for 2, 6-dimethyl-4-pyrone, and 0.65 g/kg (0.59~0.72 g/kg) for diacetylacetone.

(Received August 24, 1971)

緒 言

さきに¹⁾²⁾ 清涼飲料水などの酸性を呈する食品中においてデヒドロ酢酸 (以下 DHA と略記) が 2, 6-dimethyl-4-pyrone (以下 DMP と略記) に変化することを見出し、さらに DHA から DMP への変化過程において、2, 6-dimethyl-4-pyrone-3-carboxylic acid (以下 DM-PCA と略記)、diacetylacetone (以下 DAA と略記) などが生成することもあわせて見出した。このことより DHA は酸性食品中において Chart 1 に示した変化経路をとるものと考えた。

DHA の代謝に関する研究は Meister³⁾ も *in vitro* で行なっているが、詳細なものは Williams ら⁴⁾⁵⁾ の C¹⁴-DHA による研究以外ほとんど見当らない。

Williams らは、Chinchilla rabbits と Albino rats を用いて、DHA の生体内代謝を Chart 2 に示したように解明している。

大阪市立衛生研究所： 大阪市北区北扇町 38

Chart 1, 2 の比較からも明らかのように食品中において DHA から生成する DMPCA, DMP, DAA が生体内代謝物とまったく異なっていた。またこれらのものの毒性に関しては、記載文献も見当らず、まったく不明である。したがって、これらの変化生成物が生体に対して DHA と異なる作用を示す可能性があることを意味し、これは食品衛生上重大な問題を含む事柄と考えられた。

このため、これらの変化生成物についてマウスを用いて経口投与による急性毒性試験を行なった (一部既報²⁾)。また DHA がこれらの物質に変化することにより、微生物に対する活性も当然異なると考えられ、さらに変化生成物中のより毒性の低い物質に、微生物に対してより高い活性が認められれば、保存料としての利用価値が生じると考えられたため、これら変化生成物について *Asp. niger* に対する抗かび性を paper disc 法により調べた。

Chart 1.

Chart 2.

実験方法

1. 急性毒性試験

体重 20 g の *dd* 系雄マウス 1 群 10 匹, 10 ないし 20 群を用い, 一定の濃度系列に調製した試料乳化液 (10 w/v % アラビアゴム乳化液) を体重 10 g あたり 0.18 ml ずつ経口的に強制投与した。投与後 1 週間観察して, その間の死亡率を求めて Van der Waerden の方法 (Behrens-Kärber 改良法) で計算処理して LD₅₀ を求めた。

2. 抗かび性試験

供試菌株: *Asp. niger* (大阪市立衛生研究所微生物課保存株)

滅菌生理食塩液 (Tween 80): 0.01% Tween 80 200 ml に食塩 1.7 g を溶解し高圧滅菌を行なった。

Asp. niger 孢子けん濁液: *Asp. niger* を 8 日間, 25° で培養した斜面培地に滅菌生理食塩液 (Tween 80) を加えて振りまぜ, 駒込ピペットでよく孢子を洗いおとしたのちガーゼでろ過し孢子けん濁液 100 ml を調製した。

培地: ポテトデキストロース寒天培地 “栄研” 58.5 g に寒天末 “栄研” 15 g を追加して H₂O 1.5 L に溶解し高圧滅菌を行なった。滅菌後これにクエン酸 3 g を H₂O 10 ml に溶解して高圧滅菌したものを加えてよく混和し, 25 ml ずつを直径 9 cm のペトリザラに分注して平板培地とした。培地 1000 ml あたりの組成は Table 1 に示した。

供試液 I: DHA 0.168 g をアセトン 10 ml に溶解し (10⁻¹M), これをアセトンで 10 倍希釈し, 10⁻²M, 10⁻³M, 10⁻⁴M, 10⁻⁵M, 10⁻⁶M 濃度とした。

供試液 II: DMPCA 1.68 g をアセトン 10 ml にとかし (1 M), さらにアセトンで 10 倍希釈を行なって 1 M ~ 10⁻⁶M 濃度の溶液を調製した。

Table 1. Medium Composition

Potato extract	200 g
Dextrose	20 g
Agar	25 g
Citric acid	2 g
in 1000 ml dist. water	
pH 3.7	

供試液 III: DAA 1.42 g をアセトンに上記と同様に溶解して 1 M ~ 10⁻⁶M 濃度の溶液を調製した。

供試液 IV: DMP 1.24 g を H₂O 10 ml に溶解し (1 M), これをアセトンで 10 倍希釈を行なって 1 M ~ 10⁻⁶M 濃度溶液を調製した。

paper disc: 東洋濾紙製抗生物質試験用の paper disc (Thin) size φ 8 mm を用いた。

試験方法: 各供試液に paper disc を 10 分間浸してとり出し乾燥後, これを平板培地に希釈系列順に貼付した。対照として disc をアセトンに 10 分間浸した後, 乾燥したものを貼付した。同じ平板を各 5 枚作製し, これに孢子けん濁液を 0.5 ml ずつ均一にスプレーして 25° のフラン器中で培養を行なった。べつに平板培地のみ 5 枚に孢子けん濁液をスプレーしたものも同時に培養した。生じた阻止円の直径を測定し各 5 枚の平均値を求めた。

実験結果ならびに考察

急性毒性について: 食品中における DHA の変化生成物として単離できた DMP, DMPCA, DAA などの物質, および DHA のマウスに対する経口投与による急性毒性試験の結果を Table 2 に示した。すなわち DHA, DMP, DMPCA, DAA の四者間の毒性には, 明らかに有意差が認められた。

Table 2. The Acute Toxicity of DHA and Related Compounds

Compound	DHA	DMPCA	DMP	DAA
Oral LD ₅₀ in mice (g/kg)	1.33	2.33	1.67	0.65
95% Confidence limits (g/kg)	1.23~1.44	2.04~3.65	1.49~1.88	0.59~0.72

前報²⁾においても述べたが, DHA がより毒性の強い物質である DAA に食品中で変化することは, 食品衛生上, 非常に好ましくない現象である。しかし酸性食品中では生成した DAA が DMP に変化しやすいこと, DMP の急性毒性が, DHA のそれより, 1 段と低いこと, 加熱実験や放置実験²⁾でも明らかにされたように DHA, DAA, DMP の三者間の量的関係において, DAA の生成量が一定限度より高くなる可能性が少なく, したがって食品中に多量に蓄積されるおそれも少ないことなどから, 食品中における DHA の変化生成物として単離できたこれらの物質による急性中毒の危険性はほとんどないと推論

できた。

抗かび性について: さき⁶⁾にも DHA の変化生成物について抗かび性試験を行なったが, その時は, 各変化生成物を単離しておらず, 反応溶液についての実験であり詳細は不明であった。このため緒言において述べた観点より, DHA, DMP, DMPCA, DAA について抗かび性を試験した。使用菌株としては, 清涼飲料水について試験した時, しばしば見出され, また食品のかびとして普遍的な存在である *Asp. niger* を用いて, このものに対する抗かび性を paper disc 法により調べた。

各化合物の *Asp. niger* に対する阻止円の時間的变化

Table 3. Inhibitory Effect of Compounds for *Asp. niger* Estimated by Paper Disc Method

Compound and Concentration		Incubation time (Day)							
		2	3	4	5	10	14	16	20
DHA	10 ⁻¹ M	†	†	†	†	†	±	—	—
	10 ⁻² M	†	†	+	—				
	10 ⁻³ M	†	—						
DMPCA	1 M	†	†	†	†	+	±	±	—
	10 ⁻¹ M	†	—						
	10 ⁻² M	†	—						
DAA	1 M	†	†	†	†	+	+	±	—
	10 ⁻¹ M	†	±	—	—				
	10 ⁻² M	†	—						
DMP	1 M	†	—						
	10 ⁻¹ M	†	—						
	10 ⁻² M	†	—						
	10 ⁻³ M	†	—						

(incubated at 25°C)

†: inhibition rings was formed clearly.

+: on disc no growth of hyphae was observed.

±: the circumference of disc was slightly covered with hyphae.

—: more than 1/3 area of disc was covered with hyphae.

Table 4. Moldstatic Activity for *Asp. niger* (compared with DHA)

DHA	100	(1.0)
DAA	6.3	(1/15)
DMPCA	3.3	(1/30)
DMP	0.56	(1/180)

を Table 3 および Fig. 1 に、また36時間培養後の阻止円の直径と濃度との関係を Fig. 2 に示した。

Table 3 ならびに Fig. 1, Fig. 2 に示したこれら各物質の阻止円の関係より *Asp. niger* に対する各変化生成物の抗かび力は、Table 4 に示したような関係になることが判明した。すなわち *Asp. niger* に対する DHA の力価を100とした場合、DAA, DMPCA, DMP の力価はそれぞれ6.3, 3.3, 0.56であった。換言すれば、それぞれ DHA に比して DAA は1/15, DMPCA は1/30, DMP は1/180と小さいことが判明した。

Fig. 1. Relation between incubation time at 25°C and changes in diameter of inhibition ring for *Asp. niger* concentration

(1): 1 M (2): 10⁻¹M (3): 10⁻²M
(4): 10⁻³M

Fig. 2. Relation between inhibition ring for *Asp. niger* and concentration of each compounds
(after 36 hrs. incubation at 25°C)

結 論

食品中における DHA の変化生成物に関する食品衛生

上の問題点として微生物に対する作用と、急性毒性の面から検討を行ない、DHA の変化生成物の *Asp. niger* に対する阻害度が DHA に比較して、DAA は 1/15, DMPCA は 1/30, DMP は 1/180 と小さくなることを見出し、DHA の食品中における変化により保存効果が減少すると推論した。また、DHA, DMPCA, DMP, DAA のマウスに対する経口投与による LD₅₀ を求めたところ、その値はそれぞれ 1.33 g/kg, 2.33 g/kg, 1.67 g/kg, 0.65 g/kg であり DHA の変化生成物である DAA の毒性が DHA より強いことを見出した。しかし DAA の DMP への変化によりその存在量がわずかな点などから、これら変化生成物による急性中毒の危険はほとんどないと推論した。

終りに臨み本研究にご指導、ご激励を賜った大阪市立衛生研究所食品栄養課長川北兵蔵博士、同じく研究主幹岡村一弘博士、また動物実験をお願いした谷口 繁博士に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 佐々木清司: 食衛誌, 10, 365 (1969).
- 2) 佐々木清司: 同上, 11, 164 (1970).
- 3) A. Meister: J. Biol. Chem. 178, 577 (1949).
- 4) T. E. Barman, D. V. Parke and R. T. Williams: Bio. Pharmacol. 8, 46 (1961).
- 5) T. E. Barman, D. V. Parke and R. T. Williams: Toxicol. Appl. Pharmacol. 5, 545 (1963).
- 6) 佐々木清司: 食衛誌, 10, 431 (1969).