くん液のラットにおける急性毒性について

(平成元年 12 月 20 日受理)

清水 充* 中間昭彦* 野田 勉*
山野哲夫* 藤田忠雄* 黒田孝一*
森田 茂*

Acute Toxicity of Smoke Flavorings in Rats

Mitsuru SHIMIZU, Akihiko NAKAMA, Tsutomu NODA, Tetsuo YAMANO, Tadao FUJITA,
Koichi KURODA and Shigeru MORITA

(Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences: 8-34
Tojo-cho, Tennoji-ku, Osaka, Japan)

The acute oral toxicity of seven smoke flavorings used as natural food additives was examined in rats. No death occurred during the 14-day period of observation after treatment with these preparations at a single dose of 5.0 g/kg. Two preparations caused marked swelling and hemorrhage of the glandular stomach and small intestine at 24 hr after administration. Moreover, these two preparations increased the relative organ weights of the stomach and liver, and decreased serum alkaline phosphatase (ALP) activity and urea nitrogen (BUN) concentration in a dose-dependent manner, but did not change serum glutamic-pyruvic transaminase (GPT) activity. Although these two flavorings both contained total acids corresponding to about 10% acetic acid, gastric irritation by these flavorings was stronger than that by 10% acetic acid. Gastric irritation by the other preparation containing total acids corresponding to about 5% acetic acid was similar to that by 5% acetic acid. These results indicate that gastric irritation caused by the smoke flavorings containing high concentrations of total acids is largely due to acetic acid, and partly due to unknown compounds.

(Received December 20, 1989)

Key words: くん液 smoke flavorings; 天然食品添加物 natural food additives; 急性毒性 acute toxicity; 胃粘膜刺激性 gastric irritation; ラット rats

緒 言

くん液製品の製造において、従来のくん煙法ではくん煙中の多環芳香族炭化水素類、とくに発ガン性物質である3,4-ベンツピレンの混入が問題となっている¹⁾。そのため、米国及びカナダにおいてはくん製肉の製造には、3,4-ベンツピレンの除去が容易なくん液が用いられており²⁾、我が国においても天然食品添加物として使用されている。

くん液の安全性に関して、著者らは天然食品添加物の安全性評価の一環として行った急性毒性試験において、ある種のくん液の経口投与により、胃及び小腸に強い出血ないし出血がみられることを報告した³⁾。また、

FAO/WHOの食品添加物専門委員会によると⁴⁾、飼料にくん液を添加してラットに1~3か月間摂取せたいくつかの実験において、肝及び腎の相対重量が増加し、消化管、肝及び腎に組織学的変化がみられたという報告がある一方で、用量依存性の変化はなかったという報告もあり、必ずしも一致したものではない。これは、くん液の成分がその原材料及び製法によって大きく異なるためであると考えられる。そこで、本研究では現在流通している種々のくん液及びくん液様着香料についてそれらの安全性を再評価するためにラットにおける急性毒性、とくに胃、肝及び腎に対する作用を検討した。

実験方法

1. 試 料

原材料及び製法が異なる市販のくん液5試料及びく

* 大阪市立環境科学研究所：大阪市天王寺区東上町 8-34

Table 1. Characteristics of Various Smoke Flavorings

Sample	Material	pH	Total acids (%) ¹⁾	Absorbance	
				270 nm ²⁾	470 nm ³⁾
A(Liquid)	Hickory	2.1	10.5	1,520	6.2
B(Liquid)	Hickory	2.1	11.7	1,000	4.3
C(Liquid)	Broadleaves	2.6	4.0	360	0.2
D(Liquid)	Broadleaves	2.7	4.9	660	6.2
E(Liquid)	Cherry	2.7	2.3	32	3.5
F(Powder) ⁴⁾	Hickory	6.4	0.1	6	0.1
G(Oil)	Unknown	—	—	620	0.1

¹⁾: Calculated as acetic acid²⁾: As indication of concentrations of phenols and polycyclic aromatic hydrocarbons³⁾: As indication of brownish coloring⁴⁾: 1% Solution in water

—: Not determined

ん液様着香料 2 試料を用いた。

これらの特徴については Table 1 に示した。試料の総酸度は直接法により酢酸として測定した。試料の 270 nm における吸光度を測定して試料中のフェノール類と多環芳香族炭化水素類の濃度のある程度の目安とした⁵⁾。また、試料の 470 nm における吸光度を測定して試料の着色度の指標とした。一般に食品の褐変反応による着色度の目安は 470 nm 付近の吸光度の測定により行われている。

Table 1 に示すように、今回用いたくん液の pH はほぼ同じであったが、総酸度、フェノール類と多環芳香族炭化水素類濃度及び着色度は製品によってかなり異なっていた。

液体試料 A, B, C, D, E 及び G は原液を投与した。粉末試料 F は精製水に懸濁し、技術的に投与可能限度の 50% 懸濁液として用いた。

2. 動物及び実験方法

1) 動物

生後 4 週齢の Sprague-Dawley 系雄ラット (Slc: SD, 日本エスエルシー(株)) を購入し、予備飼育の後に実験に用いた。動物は室温 $23 \pm 2^\circ$ 、湿度 $60 \pm 10\%$ の環境下で飼育し、処理のための絶食以外は固形試料 (MF, オリエンタル酵母(株)) 及び水道水を自由に摂取させた。

2) 急性毒性試験

生後 5 週齢のラットを各群 5 匹用い、試料投与前夜 (投与 17 時間前) から投与 4 時間後まで絶食させた。予備試験の結果から限界用量を 5.0 g/kg に設定し、これを超える用量の投与は行わなかった。すなわち、試料 F を除いた各試料は原液 5.0 g/kg を、また試料 F は 50% 水性懸濁液 10 ml/kg を強制経口投与した。なお、対照群として精製水 10 ml/kg を同様に投与した。その後 14 日間にわたって一般状態を観察し、14 日後に動物を

ベントバルビタール麻酔下で放血致死させ、剖検を行った。

3) 試料投与 24 時間後の検査

生後 6 週齢のラットを各群 5~12 匹用い、試料投与 4 時間前から投与 24 時間後まで絶食させた。各試料は所定の用量を強制経口投与した。また、対照群には精製水 10 ml/kg を同様に投与した。さらに試料の総酸度を考慮して、陽性対照として 10% 酢酸液を用い、所定の用量を投与した。試料投与 24 時間後に動物をベントバルビタール麻酔下で開腹し、腹部大動脈から採血後内部臓器の異常の有無を肉眼的に観察するとともに、肝、腎及び胃 (前胃及び腺胃) 重量を測定した。採取した血清についてアルカリ性ホスファターゼ (ALP) 活性 (フェニルリン酸基質法)、トランスアミナーゼ (GPT) 活性 (酵素法) 及び尿素窒素 (BUN) 量 (ジアセチルモノオキシム法) を分光光度計 (島津 UV-150-02) を用いて測定した。

4) 胃粘膜に対する作用

生後 8 週齢のラットを各群 4~5 匹用いた。動物は試料経口投与 24 時間前に絶食させ、さらに 4 時間前には絶食させた。試料 A 及び B は原液 2.5 g/kg を投与し、その陽性対照として 10% 酢酸液 2.5 g/kg を同様に投与した。また、試料 C 及び D は原液 5.0 g/kg を投与し、その陽性対照として 5% 酢酸液 5.0 g/kg を投与した。試料または酢酸液の投与 1 時間後に、エーテル麻酔下で放血致死後、直ちに 2% ホルマリン液を 6 ml 胃内に注入した。噴門部及び幽門部はホルマリン液の漏出を防ぐために結紮し、胃を摘出した。摘出した胃は 2% ホルマリン液で 10~15 分固定した。固定後、胃大弯に沿って切開し、各試料の胃粘膜刺激作用は胃腺胃粘膜の出血部位の長さの総和を測定することによって評価した⁶⁾。

3. 統計処理

数値は平均値 $\pm$ 標準誤差で表し、*t* 検定によって各投

Table 2. Relative Organ Weights of Rats 24 hr after Treatment of Various Smoke Flavorings

Sample	Dose (g/kg)	Body wt. (g)	Liver (g%)	Kidney (g%)	Stomach (g%)
Control	0	136.3±3.4	3.61±0.10	0.87±0.01	0.60±0.01
A	5.0	140.2±2.0	4.28±0.07**	0.90±0.01	0.92±0.02**
B	5.0	142.9±2.0	4.14±0.06**	0.88±0.01	0.84±0.02**
C	5.0	134.2±2.9	3.47±0.03	0.89±0.01	0.63±0.01
D	5.0	138.8±3.8	3.69±0.06	0.88±0.01	0.65±0.01*
F	5.0	137.5±1.1	3.54±0.06	0.88±0.01	0.64±0.01*
Control	0	167.8±5.5	3.41±0.04	0.78±0.01	0.62±0.00
E	5.0	164.6±4.6	3.56±0.07	0.80±0.02	0.62±0.02
G	5.0	168.6±4.9	3.36±0.07	0.80±0.01	0.64±0.02

Rats were orally treated with each sample 24 hr prior to sacrifice. Control received distilled water (10 ml/kg). Rats were fasted from 4 hr before to 24 hr after treatment. Each value represents the mean ± S. E. of 6 rats.

* Significantly different from control at $p < 0.05$.

** Significantly different from control at $p < 0.01$.

与群と対照群との間の有意差を検定した。

実験結果

1. 急性毒性試験

14日間の観察期間中には、A～G いずれの試験投与群においても限界用量として設定した 5.0 g/kg の経口投与では死亡例はみられず、致死量からみた各試料の急性毒性は極めて低いものであった。

試料投与後の体重増加の推移について、試料 A 及び B 投与群においては対照群に比べて抑制がみられた。すなわち、試料 A 投与群の体重は投与 1 日後に有意に減少し、2, 3 日後でもなお有意差はなかったものの減少傾向にあった。また、試料 B 投与群の体重は投与 7 日後まで対照群と比べて有意に減少した。しかし、その他の試料投与群の体重は対照群との間に有意差は認められなかった。

一般状態について、試料 A 及び B 投与群において投与 10 分後から自発運動の減少、閉眼がみられた。これらの症状は投与翌日には消失した。その他の試料投与群においてはとくに異常はみられなかった。

14 日の観察期間終了時の剖検所見について、試料 B 投与群の 1 例に前胃と腺胃の境界部に肥厚及び白濁がみられた。その他の試料投与群においてはとくに異常はみられなかった。

2. 試料投与 24 時間後の検査

各試料 5.0 g/kg の経口投与 24 時間後の剖検所見について、試料 A 及び B 投与群において腺胃及び小腸上部粘膜に強い浮腫及び出血がみられた。また、試料 C 及び D 投与群において軽度の腺胃粘膜の浮腫、充血ないしうっ血がみられた。しかし、試料 A 及び B 群のその他の臓器にはとくに異常はみられなかった。その他の試料投与群においてはとくに異常はみられなかった。

臓器重量 (Table 2) について、試料 A 及び B 投与群において肝及び胃相対重量が著明に増加した。その他の試料投与群においても軽度の胃相対重量の増加がみられたが、肝相対重量の増加はみられなかった。一方、いずれの試料投与群においても腎相対重量の増加はみられなかった。

血清生化学的検査 (Table 3) については、血清 GPT 活性はいずれの試料投与群においても対照群と有意差がなかった。しかし、血清 ALP 活性は試料 A 及び B 投与群において著明な減少が、試料 D 投与群において軽度の減少がみられた。血清 BUN 量は試料 A, B, E 及び F 投与群において有意な減少がみられた。

次に作用発現の強かった試料 A 及び B について、それらの投与量の変化が肝及び胃相対重量と血清 ALP 活性及び BUN 量にどのように影響を及ぼすかを調べ、さらにそれらの総酸度とほぼ等しい 10% 酢酸の作用と比較した (Table 4 及び 5)。肝及び胃相対重量は試料 A 及び B の投与量の増加とともにその重量が増加した。また、10% 酢酸投与群においても肝及び胃相対重量の増加がみられ、その作用は試料 A 及び B とほぼ同じかやや弱かった。血清 ALP 活性及び BUN 量は試料 A, B 及び 10% 酢酸液の投与量の増加とともにその活性及び量が減少した。血清 ALP 活性に対する減少効果にはほとんど差がなかったが、血清 BUN 量に対する減少効果は試料 A 及び B の方が 10% 酢酸よりも強かった。検討した種々の項目に対する試料 A 及び B の作用は 1.25 あるいは 0.625 g/kg の投与量では対照群と差がみられなかった。

3. 胃粘膜に対する作用

試料の胃粘膜刺激性を調べるにあたり、試料 A 及び B はその総酸度が約 10% であり、試料 C 及び D はその総

Table 3. Serum Biochemical Finding of Rats 24 hr after Treatment of Various Smoke Flavorings

Sample	Dose (g/kg)	GPT (KU/ml)	ALP (KAU/dl)	BUN (mg/dl)
Control	0	31.1±3.8	43.8±2.4	15.7±1.6
A	5.0	24.1±0.4	24.6±0.4**	11.6±0.9*
B	5.0	24.5±1.5	24.3±0.6**	11.2±0.5**
C	5.0	26.5±1.7	38.0±0.6	13.5±0.7
D	5.0	24.5±0.9	33.7±1.0	13.1±0.7
F	5.0	26.0±1.0	41.5±0.8	11.8±0.4*
Control	0	28.7±2.2	41.6±1.5	15.4±0.4
E	5.0	33.1±2.3	42.5±1.4	12.3±0.3**
G	5.0	29.2±0.8	42.5±1.7	13.9±0.5

See the legend to Table 2.

Table 4. Relative Organ Weights of Rats 24 hr after Treatment of Samples A and B

Sample	Dose (g/kg)	Body wt. (g)	Liver (g%)	Stomach (g%)
Control	0	127.8±2.2	3.67±0.05	0.63±0.01
A	5.0	130.7±1.1	4.24±0.05**	0.91±0.05**
	2.5	129.9±2.0	3.97±0.07**	0.80±0.02**
	1.25	127.1±1.0	3.82±0.05	0.67±0.03
	0.625	127.7±2.2	3.81±0.08	0.63±0.01
B	5.0	129.3±2.9	4.30±0.07**	0.96±0.03**
	2.5	127.9±1.9	3.98±0.06**	0.81±0.02**
	1.25	125.8±2.4	3.84±0.12	0.73±0.02**
	0.625	126.6±1.0	3.70±0.05	0.62±0.01
10% Acetic acid	5.0	127.8±0.9	3.99±0.10**	0.90±0.07**
	2.5	127.8±1.7	3.81±0.06	0.68±0.02**
	1.25	123.9±2.2	3.75±0.08	0.69±0.02**
	0.625	126.9±2.5	3.74±0.09	0.60±0.01

Rats were orally treated with sample A, B or 10% acetic acid 24 hr prior to sacrifice. Control received distilled water (10 ml/kg). Rats were fasted from 4 hr before to 24 hr after treatment. Each value represents the mean ± S. E. 5 to 12 rats.

* Significantly different from control at $p < 0.05$.

** Significantly different from control at $p < 0.01$.

酸度が約 5% であったので、陽性対照としてそれぞれ 10% 及び 5% 酢酸液を用いた。

試料 A 及び B の投与により、強い胃粘膜刺激性がみられ、その効果は 10% 酢酸よりも強かった。しかし、試料 C 及び D の刺激作用は弱く、その作用は 5% 酢酸とはほぼ同程度ないしそれ以下であった (Table 6)。

考 察

天然食品添加物の安全性評価の一環として、著者らはラットを用いた急性毒性試験において、くん液には胃及び小腸に強いうっ血ないし出血を引き起こす作用のあることを報告した³⁾。その他にも、ラットにおいてくん液の

連続投与により肝及び腎の相対重量の増加と消化管、肝及び腎の組織学的変化がみられることが報告されている⁴⁾。通常の急性毒性試験では、死亡例はその都度、生存例は投与 14 日後に剖検することが要求されるが、とくに毒性の低い試料の場合には投与初期の内部変化を見落とす恐れがあると考えられる。そこで、くん液の胃、肝及び腎に対する作用を詳細に検討するため、試料投与 24 時間後の剖検及び血清生化学的検査及び胃粘膜刺激性を調べた。

菰田及び白石は種々の市販のくん液の組成を調べた結果、18 種の市販くん液中には総酸度が 0.1~6.3%、フェ

Table 5. Serum Biochemical Finding of Rats 24 hr after Treatment of Samples A and B

Sample	Dose (g/kg)	ALP (KAU/dl)	BUN (mg/dl)
Control	0	47.3±1.2	14.7±0.4
A	5.0	24.3±1.2**	11.7±0.5**
	2.5	32.7±3.0**	12.8±0.6*
	1.25	36.5±1.9**	14.5±0.6
	0.625	44.5±1.3	15.4±0.3
B	5.0	27.0±0.9**	12.1±0.3**
	2.5	31.1±1.3**	13.7±0.4
	1.25	36.8±1.2*	14.8±0.2
	0.625	43.5±1.9	14.8±0.6
10% Acetic acid	5.0	31.0±2.0**	13.1±0.8
	2.5	32.9±3.0**	13.6±0.4
	1.25	38.1±3.0**	16.3±0.6
	0.625	44.9±1.8	15.7±0.8

See the legend to Table 4.

ノール類がフェノールとして0.008~15.88%, ホルムアルデヒドが0.6~450 mg%, メタノールが0.007~1.6%の範囲で含有されていると報告している⁷⁾. このように市販のくん液の性状は製品によってかなり異なっている. 一方, 本研究に用いた試料は, その成分の詳細については不明であるが, 著者らの調べたかぎりにおいても Table 1 に示すようにそれらの性状がかなり異なっていた. これは, 各製品の原材料及び製造法の差異によると思われる. しかし, これら7試料はいずれも5.0 g/kgの経口投与では死亡例はなく, そのLD₅₀値は5.0 g/kg以上と推定された. なお, この5.0 g/kgという値は, OECD などにおいて急性経口毒性試験の限界用量として採用されていたもので, 最近では2.0 g/kgという値が採用されている. このように天然食品添加物は一般にLD₅₀値からみた急性毒性は低い. しかし, 試料A及びBの投与により投与初期における体重増加の抑制及び一般状態の変化がみられた.

試料A及びB投与24時間後の胃相対重量の増加及び剖検所見から, これらの試料は胃に対して強い障害を引き起こすことが分かった. 試料C及びDも, 軽度の障害を引き起こした. これらの結果は, 以前著者らが行ったくん液の急性毒性試験の結果⁹⁾と一致しており, くん液の特徴的な所見であると考えられる. しかし, その作用は試料によってかなり異なっており, その性状の差がその作用に反映していると思われる. とくに, 試料A及びBは他の試料に比較してその総酸度が高い. また, 報告されている市販くん液の総酸度よりもかなり高い⁷⁾. 一方, くん液に含まれている有機酸は酢酸が主成分とされており⁹⁾, 酢酸それ自体に胃粘膜刺激性があることが知られている⁹⁾. そこで, 試料A, B, C及びDの胃に対す

Table 6. Gastric Mucosal Lesions Induced by Smoke Flavorings

Sample	Dose (g/kg)	Total length of lesions (mm)
10% Acetic acid	2.5	21.6±6.4
A	2.5	42.6±4.8*
B	2.5	45.7±11.9
5% Acetic acid	5.0	1.3±2.3
C	5.0	0
D	5.0	1.7±2.9

Rats were orally treated with each sample, 10% or 5% acetic acid 1 hr prior to sacrifice. Rats were deprived of food 24 hr before and water 4 hr before treatment. Each value represents the mean ± S. E. of 4 to 5 rats.

* Significantly different from the corresponding positive control at $p < 0.05$.

る作用をこれらの試料の総酸度とほぼ等しい酢酸と比較した. 試料A及びBの胃相対重量増加作用は10%酢酸とほぼ同程度であったが, その胃粘膜刺激性は酢酸よりも強いことが分かった. 一方, 総酸度の低い試料C及びDの胃粘膜刺激性は, 5%酢酸とほぼ同程度かそれよりも弱かった. これらの結果から, 試料A及びBによる強い胃粘膜刺激性は, 酢酸の作用に加えて酢酸以外のそれ自体が刺激作用をもつ成分あるいは酢酸による刺激作用を強めるような成分が含まれている可能性があると思われる. くん液中には種々の成分が含まれ⁹⁾, 酸性画分として酢酸, 乳酸, プロピオン酸など, フェノール性画分として2,6-ジメトキシフェノールなど, カルボニル化合物としてアセトン, アルデヒドなど, その他にもアルコール類, 多環芳香族炭化水素類などが知られている. これらの成分の中には粘膜刺激性を有するものもある¹⁰⁾.

試料A及びB投与24時間後には肝相対重量の増加がみられた. しかし, 剖検所見には異常がみられず, また血清GPT活性の上昇もなかったことから, 肝機能障害には直接結びつくとは考えられないが, 今後さらに検討を要する. その他にも血清ALP活性の低下がみられた. 一方, このような作用は上記の試料の総酸度とほぼ等しい10%酢酸液を投与しても同様にみられた. 従って, 肝相対重量及び血清ALP活性に対するこれらの作用はその大部分が酢酸によるものと考えられるが, その機序については不明である.

腎相対重量に変化はなくさらに剖検所見にも異常はなかったが, 血清BUN量の低下が一部の試料投与群にみられた. これは試料投与後の摂水量の増加(データは示していない)が一部原因していると考えられる. さらに, 10%酢酸液投与群においても有意差はないものの血清BUN量の減少がみられた. 従って, これらの作用にも酢

酸が関与していると思われる。

本研究において、くん液の胃、肝及び腎に対する作用は、大部分がくん液中の酢酸によるものであることが示唆された。試料によっては胃粘膜刺激性が強いものがあり、その作用は大部分が酢酸によるが、一部酢酸以外の成分にも負うところがあると考えられる。今後は胃粘膜刺激性を強めるような物質の同定、それら成分の減少あるいは除去法の確立を検討する必要がある。

要 約

天然食品添加物で着色料として用いられているくん液5試料及びくん液様着色料2試料についてラットにおける急性経口毒性、とくに胃、肝及び腎に対する作用を調べ、以下の結果を得た。

1) 試料5.0 g/kg投与後14日間観察を行った急性毒性試験において、いずれの試料も死亡例はみられなかったが、2種の試料では体重増加の抑制がみられた。

2) 試料投与24時間後の検査においては、4種の試料で胃及び小腸粘膜の浮腫、出血、充血ないしはうっ血がみられた。とくに2種の試料では上記の変化が著明であり、胃及び肝相対重量の著しい増加がみられた。しかし、血清GPT及びALP活性の上昇はみられなかった。これらの作用は試料の総酸度とほぼ等しい10%酢酸の作用と同程度かあるいはやや強かった。

3) くん液投与によって胃粘膜刺激性作用がみられた。とくに2種の試料は強い胃粘膜刺激性を引き起こし、その作用はそれら試料の総酸度とほぼ等しい10%

酢酸の作用より強かった。その他の試料では、それらの総酸度とほぼ等しい酢酸の刺激作用とほとんど差異がなかった。

本研究の一部は大阪市環境保健局特別調査研究として行われたもので、日本食品衛生学会第57回学術講演会(1989)において発表した。

文 献

- 1) 岩垂荘二: 食の化学 129, 49~51 (1988).
- 2) Hollenbeck, C. M.: Pure Appl. Chem. 49, 1687~1702 (1977).
- 3) 黒田孝一, 野田 勉, 清水 充, 森田 茂, 山田明男: 大阪市立環境科学研究所報. 49, 33~38 (1987).
- 4) WHO/FAO: WHO Food Additives Series 22, 41~57 (1988).
- 5) 泉 美春, 小川雅彌, 加藤俊二, 塩川二郎, 芝 哲夫編: "機器分析のてびき (データ集)" p. 74~76 (1980), 化学同人.
- 6) Nakagawa, M., Okabe, S.: Jpn. J. Pharmacol. 43, 469~472 (1987).
- 7) 菰田太郎, 白石慶子: 食衛誌. 5, 336~340 (1964).
- 8) 太田静行: "くん製食品" p. 39~78 (1986), 恒星社恒星閣.
- 9) Takagi, K., Okabe, S., Sakazaki, R.: Jpn. J. Pharmacol. 19, 418~426 (1969).
- 10) 後藤 稠, 池田正之, 原 一郎編: "産業中毒便覧" (1977), 医歯薬出版.