食品添加物に関する研究 (第 1 報)
食品よりデヒドロ酢酸の分離定量法の検討

佐谷戸安好* 仲田 典子*
岡崎 政智* 西条 達也*

食衛誌. 7(3), 119~203 (1966)

食品に含まれるデヒドロ酢酸 (DHA) の分離測定について抽出法, 加水蒸留法および水蒸気蒸留法の 3 者による比較分離を行なった。その結果, 水蒸気蒸留法が他の 2 法に比べ, 回収時比較的妨害が少なくデンプン食品で 96.5% の好回収結果を示した。水蒸気蒸留に際しては, あらかじめ試料に食塩を飽和したのち 酒石酸 0.7 g を入れて蒸留し, 留液を 0.5 N NaOH 溶液 4 ml 中にうけ留液量を 100 ml うけ, これを紫外部吸光度測定法により波長 290 m μ で定量することによってジュース, しょう油, デンプン食品, バター, チーズ等より DHA を分離定量できる結果を得た。

* 茨城県立衛生研究所

食用色素 Ponceau 3R の慢性毒性ならびに
発癌性に関する研究

相磯 和嘉* 蟹沢 成好*
岡本 達也* 中條 朋子*

食衛誌. 7(3), 211~221 (1966)

食用赤色タール色素 Ponceau 3R の慢性経口毒性ならびに発癌性を, ラットで最長 2 年にわたり 2.0%, 1.0% および 0.5% 添加食投与により病理組織学的に検索した。変化は肝臓に限られ, 脂肪変性を中心に各種退行変性が実験早期より出現したが, 肝硬変の発生はなかった。増殖性変化は実験 1 年以上の動物に多発し, 1 年 7 か月で腺腫の発生があり, 実験 2 年で 1 例の肝癌と 5 例の多発性腺腫を含む高率の腫瘍性病変の発生を認めた。

* 千葉大学腐敗研究所

食品の腐敗に関する研究 (VI)

魚肉ソーセージおよびちくわの貯蔵中
における腐敗生成物の消長

坂部 美雄* 石原 利克*
食衛誌. 7(3), 226~229 (1966)

魚肉ソーセージおよびちくわを冷蔵庫と 20° 恒温庫に貯蔵して腐敗生成物の変化について調べた。

腐敗の発見因子としては揮発性塩基窒素が最適である。ちくわでは揮発性還元物質も発見因子になりうる。魚肉ソーセージは遊離ヒスタミンがかなり存在し腐敗とともに減少するが, ヒスタミンは検出されない。冷蔵庫中では両者ともに腐敗生成物の生成は少ない。

* 名古屋市衛生研究所

溶媒抽出法およびイオン交換樹脂応用
による数種の保存料の分離定量

井上哲男*¹ 河村太郎*¹ 上條昌弥*¹
佐藤洋子*¹ 菅野三郎*² 落合昭吾*²
中岡正吉*²

食衛誌. 7(3), 204~210 (1966)

食品中の保存料の分別定量を目的として溶媒抽出およびイオン交換樹脂と紫外部吸収スペクトル測定との組合せによる方法について検討した。

保存料としてデヒドロ酢酸, ソルビン酸, 安息香酸, サリチル酸, およびパラオキシン安息香酸のエステル類の 5 種を用いた。

本法の特徴はつぎの諸点である。

(1) 四塩化炭素によりサッカリンは不溶であり, 保存料は可溶なので両者の分離が可能である。(2) イオン交換樹脂 (Amberlite CG 400-I 型) を使用することによりサリチル酸は他の保存料と分離される。(3) イオン交換樹脂 (Amberlite CG 400-I 型) を使用することは食品に起因する妨害を除去するのに有効である。本法を市販食品のジュース, 漬物類に応用しその結果を報告した。

*¹ 横浜市衛生研究所

*² 神奈川県衛生研究所

キレート試薬を用いた分光光度滴定法
による食品中の銅の分析

鹿島 哲*¹ 天野立爾*² 武見和子*²
川田公平*² 川城 巖*²

食衛誌. 7(3), 222~225 (1966)

10~100 μ g の銅を含む試料に緩衝液を加えて pH 4.5 ~ 6 にした試料液を 0.01M または 0.001M エチレンジアミン 2 プロピオン酸標準液で 261 m μ の単色光を用いて光度滴定したところ, Ca(II), Mg(II), Ni(II), Pb(II) および Hg(II) が共存していても 1% 以内の測定精度で定量できることを見いだしたので, グリンビース, ピーナッツ, ココアまめなどの試料 10 g を灰化し, 緩衝液で pH 4.5~5.6 として光度滴定したところ, その食品中の微量の銅を定量することができた。

*¹ 共立薬科大学

*² 国立衛生試験所

ペプシンのタンパク消化作用に対する
食用, 医薬品用色素の影響について

古武彌三* 水田泰子* 榎本 隆*
食衛誌. 7(3), 230~233 (1966)

食用, 医薬品用色素はペプシンのタンパク消化作用に対して阻害を示すが, とくに xanthene 系の Phloxine (赤色 104 号), Rose Bengale (赤色 105 号) は強く阻害する。阻害作用は Phloxine, Rose Bengale などの色素がペプシン酵素に直接結合するためであると考えられる。Phloxine のペプシン阻害性は色素酸として遊離される酸性 medium においてのみ現われる。

* 大阪府立公衆衛生研究所

食用色素 Ponceau 3 R の慢性毒性ならびに 発癌性に関する研究

(昭和 41 年 2 月 2 日 受理)

相 磯 和 嘉* 蟹 沢 成 好*
岡 本 達 也* 中 條 朋 子*

Chronic Oral Toxicity and Carcinogenicity of Ponceau 3 R

Kazuyoshi AISO, Masayoshi KANISAWA, Tatsuya OKAMOTO,
and Tomoko CHUJO

(The Institute of Food Microbiology, Chiba University:
Okubo, Narashino, Chiba-ken)

Two year feeding experiments of Ponceau 3 R (Food Red No. 1) were carried out to ascertain of its chronic oral toxicity and carcinogenicity in rats. Eighty Wistar rats were divided into 4 groups of twenty each (equally divided by sex), and each group was fed at dosage levels of 2.0, 1.0, 0.5% and 0.0% (control). The animals were allowed food and water ad libitum. Food consumption and body weight gains were weighed weekly. Liver biopsy at the 30 th and the 53 rd week, and autopsy at the 83 rd and the 105 th week (at the end of experiment) were performed. All these specimens were examined histopathologically and at the end of the experiment blood samples were collected from the tail veins of 2 or 3 animals from each level for blood counts.

Results were as follows:

Inhibition of body weight gains was observed in all dosage levels, especially in 2.0% level of Ponceau 3 R, but food consumption did not show any differences between control and treated groups.

Histopathologically, toxic effects and neoplastic changes attributable to Ponceau 3R were limited to liver. From early liver showed marked fatty metamorphoses, hydropic degeneration, acidophilic degeneration, cell edema with decrease or loss of basophilic bodies in the cytoplasm, and single cell necrosis of hepatic cells. Atypical nodular hyperplasia of hepatic small-round-cell were observed in surgical specimens of a few rats at the 53 rd week and first incidence of hepatic tumor was seen in the autopsy material of the 2.0% level at the 83 rd week.

Summarizing from the results of neoplastic changes of livers, there were one case of hepatoma, five cases of hepatic adenoma including bile duct adenoma and seven cases of adenomatous or nodular hyperplasia in the 2.0% feeding level; one of hepatic adenoma, seven of adenomatous or nodular hyperplasia in the 1.0% feeding level; two of hepatic adenoma, five of adenomatous or nodular hyperplasia in the 0.5% feeding level; and four of adenomatous or nodular hyperplasia in the control.

From these results carcinogenicity or tumorigenicity of Ponceau 3 R was revealed in our experiment, too.

(Received February 2, 1966)

* 千葉大学腐敗研究所：千葉県習志野市大久保町

Ponceau 3R は食用赤色 1 号 (Food Red No. 1) として昭和22年に食品添加物の指定を受けた人工着色料の 1 つである¹⁾²⁾。本色素は Fig. 1 に示すような化学構造をもつタール系アゾ色素で 1-(2',4',5'-トリメチルフェニルアゾ)-2-ナフトール-3,6-ジスルホン酸二ナトリウムを85%以上含んでいる³⁾。

Fig. 1. Chemical structure of Ponceau 3R

本物質の毒性ならびに発癌性については、これまで二,三の研究がある。Willheim and Ivy (1953)⁴⁾は本色素を4.0%に添加した食餌でラットを19か月飼育し、胆管の増殖を伴う肝硬変ができるが悪性腫瘍の発生はみられなかったと報告している。これに対し Grice ら(1961)⁵⁾は3.0%添加食餌でラットを65週(15か月)飼育した結果、30匹中7匹に悪性肝腫瘍の発生をみたと記載している。Hansen ら(1963)⁶⁾は本色素についてさらに精細な実験を行なった。すなわち2つの異なった系のラットを用い5.0, 2.0, 1.0, 0.5%添加食餌で2年飼育した結果、濃度のいかに問わず実験群は高い死亡率を示し、成長抑制が認められた。肝には高率に腺腫の発生が見られ悪性肝腫瘍の発生も各群に認められ、5%群は統計上有意の差が証明された。マウスとイスについても同様の実験を行ない、マウスでも肝腺腫および肝癌が発生することを明らかにした。

このように Ponceau 3R はラット、マウス等に肝腫瘍を発生させるいわゆる発癌性 (tumorigenic or carcinogenic) を有することがわかってきたので、欧米諸国においては好ましくあらざる色素としてその使用を禁止し法定色素から除外された⁷⁾。

このような状況下にあつて1965年9月までわが国においてはなお本色素の使用が続けられてきた。筆者らは食品衛生上の見地から本色素の毒性と発癌性をあらためて検討する必要を認めたので、本研究に着手した。実験は1963年7月に開始し、1964年11月の食品衛生学会において1か年経過ラットの生検により肝に著しい退行変性と一部異型増殖の発生を、1965年4月の病理学会では1年7か月飼育動物の一部剖検例に肝腺腫および肝細胞の異型増殖を認めたことを、さらに1965年10月の癌学会において2年飼育例につき、高率に肝腺腫の発生を認め、その一部は悪性化していることを報告してきた。かくし

て本色素がラット肝に発癌性を有することを確認したので、その成績をここに記載する。なお成績の一部はすでに中間報文として発表した⁸⁾⁹⁾。

1. 実験材料ならびに方法

使用色素は国家検定合格の市販 Ponceau 3R (以下 P. 3R と略記) で、一応の純度試験を行なったのち実験に供した。動物は体重60~80gの Wistar 系ラット(船橋農場産)を購入し基礎食で1週間飼育したもののうちより80~100gの健康動物80匹(雌雄各40匹)を選んで使用した。飼料は実中研(現日本クレア)製 CE-2 (粉末)を基礎食とし、これに P. 3R を2.0, 1.0および0.5%に添加した固型飼料(自家製)を実験食として投与した。

各濃度につき雄雌10匹ずつ計20匹を1群として無添加対照群を含めて4群に分けた。動物は実験30週までは1箱に2匹ずつ、その後は1匹を金属製ケージに収容し、温度24°, 湿度60±10%, 全換気の恒温恒湿飼育室において、飼料と水を自由に摂取せしめて飼育した。実験期間は最長105週(24か月)に及んだが、99週以後は基礎食にもどして飼育した。

週1回体重および飼料摂取量を計測したほか、常時動物の外観、運動機能等に留意管理した。途中死亡例はすべて剖検し、主要臓器については組織学的検索を加えるとともに、死因を究明するようにした。

投与30週で、各群より任意の雌2匹を選んで、また53週には生存56匹中30週ですでに生検を加えた6匹を除く50匹(2%雄7匹雌6匹, 1%雄6匹雌6匹, 0.5%雄5匹雌6匹, 対照雄5匹雌9匹)について肝臓の生検を行ない病理組織学的に検索した。さらに83週では生存35匹中11匹(2%1例, 1%3例, 0.5%4例, 対照3例)を、また105週では残存16匹全例(2%6例, 1%4例, 0.5%4例, 対照2例)をと殺剖検し、肝、腎、脾、心、肺、膵、甲状腺、副腎、胃、小腸、大腿骨骨髓(105週のみ)、睪丸または卵巣について、10%ホルマリンおよびカルノア液で固定し、パラフィンおよびゼラチン封埋し、haematoxyline-eosin, Sudan-Ⅲ(川村・矢崎氏法)、必要に応じて van Gieson, Azan-Mallory, PAS, Gomori 氏鍍銀染色の各染色を施し観察した。なお、105週生存例については、各群より2~3匹(主として雄)を選んで血液検査も行なった。

2. 実験成績

1) 飼育中の一般観察および動物の死亡

P. 3R 投与により動物は淡赤色に着色した尿、糞を排泄したが、体表、体腔等に着色は認められなかった。少数の rolling disease 罹患動物を除き運動機能の異常は実験終了時まで認められなかった。実験途中の死亡は大部分が肺炎または肺膿瘍によるものであったが、実験48週以後9匹に自然発生皮下腫瘍および腹腔内腫瘍の発生が見られ、このうち4匹は腹腔内腫瘍で、このうち3匹は腫瘍死した。

実験開始時より動物数の推移を生存曲線によって Fig. 2 に示した。Fig. 2 にみるように、われわれの投与濃度の範囲では P. 3R 投与が動物の死亡率に著しく影響を及ぼしている事実はなかった。

2) 飼料および色素摂取量

53週および98週までの1匹当たり平均飼料ならびに色素摂取量を雌雄別に Table 1 に示した。また1日当たり摂取量を Table 2 に示した。動物は色素添加濃度の高低にかかわらず、平均してよく飼料を摂っており、0～53週平均で雄は16.5～18.8 g、雌は14.6～15.0 g で、ことに対照ラットの摂取量が著しく高値を示すことはなく飼料摂取量の差が動物の成長に影響を及ぼしたとは考えられない。53週および98週までの平均色素総摂取量も、実験の前半と後半でほとんど同量の色素が投与されており、また各濃度間でみても投与濃度に比例した値が得られた。

Fig. 2. Survival curves of experimental animals

Table 1. Total Food and Color Consumption per Rat

Feeding period		Total food consumption		Total color intake	
		53 week	98 week	53 week	98 week
Male	0.0%	6,140 g	14,000 g	— g	— g
	0.5	6,980	12,650	34.9	63.3
	1.0	6,390	12,750	63.9	128.0
	2.0	6,500	13,500	130.0	270.0
Female	0.0	5,580	11,710	—	—
	0.5	5,530	10,110	27.7	50.6
	1.0	5,400	10,330	54.0	103.0
	2.0	5,490	10,850	109.8	217.0

Table 2. Mean Food Consumption per Day

Drug level	Male		Female	
	0~4 week	0~52 week	0~4 week	0~52 week
0.0%	14.0 g	16.5 g	13.3 g	15.0 g
0.5	15.3	18.8	12.7	14.9
1.0	14.4	17.2	14.1	14.6
2.0	14.6	17.5	14.5	14.8

3) 成 長

雌雄別に体重の変移を実験開始時の体重を100とした百分比によって平均体重増加率表（半対数目盛）に描いて Fig. 3 および Fig. 4 に示した。雄では2%群の体重増加が著明に抑制され5週以後増加率は他群より明らかに低かった。雌では実験群はすべて低率を示したが、やはり2%群できわだっていた。このように、P. 3R 投与

によって動物の体重増加は濃度に比例して抑制される結果を得た。

4) 血液検査

105週飼育群について各濃度2匹（2%のみ3匹）の尾部より血液を採取して、血球数および白血球像の検査を行なった。その詳細を Table 3 に示した。数値にかなりの変動があるが実験群でも貧血は全く認められず、白

Fig. 3. Growth rate curve of rats fed diet containing Ponceau 3R

Fig. 4. Growth rate curve of rats fed diet containing Ponceau 3R

Table 3. Haematological Findings of Rats Fed Ponceau 3R

Color content	Control		0.5%		1.0%		2.0%		
	♂	♀	♂	♂	♂	♂	♂	♀	♀
R. B. C. ($\times 10^4$)	790	644	761	793	819	830	918	699	759
W. B. C.	7,800	9,000	5,000	5,900	13,900	8,800	16,000	5,900	7,800
Neutrophils %	45	26	25	42	52	55	47	37	30
Lymphocytes %	54	72	75	56	48	45	52	63	70
Eosinophils %	1	2	—	2	—	—	1	—	—

血球数も2%♂2と1%♂2でやや増多が見られたが、両者ともかなり著明な腎盂腎炎が認められた。白血球像にも動揺があるが病的所見はなかった。

5) 病理所見

既述のように病理学的検索は2回の肝生検(30週と53週)と2回の剖検(83週と105週)例について行なった。途中死亡例についても解剖して主要臓器の組織学的検索を行なったが、腫瘍性変化を除いて退行性病変については死亡原因疾患の影響や死後変化等を考慮して病理学的検索成績に含めなかった。

a. 肉眼所見

30週および50週の肝生検時には、肉眼的に肝には著変が認められず、表面は濃赤色平滑であったが、やや腫脹していた。また開腹により胃、腸管系にも著変は認められなかった。83週と殺の11匹では、実験群の8例の肝臓に表面および剖面で粟粒大ないし小豆大の黄かっ色または灰黄色の結節が少数ないし多数散見された。しかし肝表面は平滑であった。その他1%2例の肺に肺炎を、0.5%1例に肺膿瘍を認め、また0.5%の雄雌各1例では1側の甲状腺が小豆大に腫大していた。その他には肉眼的に異常を認めなかった。105週と殺の実験群14例では2%6匹中4匹、1%4匹中2匹、0.5%4匹中2匹の肝において、1～数個の周囲と境界がかなり明瞭で黄

かっ色ないし灰黄色の表面にやや盛上った大豆大以下の結節が認められた。2%の1例は一部出血を伴い表面は不規則に盛り、結節は融合して亜小指頭大の広がりを示した。その他2%1匹と0.5%1匹に肺炎を、2%3匹、1%1匹に自然発生皮下腫瘍を認めた。また1%♂9では脾周囲のリンパ節が腫瘍性に腫大、甲状腺も2%1匹、0.5%2匹に小豆大ぐらいの結節が認められた。自然発生皮下腫瘍としては、2%雌3例、1%雌1例に乳腺の存在とほぼ一致して固い鳩卵大ないし鶏卵大の腫瘤の発生が認められた。

b. 臓器重量

83週ならびに105週剖検動物については、主要実質臓器を剔出してその重量を測定し体重百分比を求めて比較を試みた。その成績をTable 4, Table 5に示した。これらの表に見るようにそのほとんどが1～2匹という少数例の統計であるため、その値に十分の信頼をおけないが、実験群ごとに2%群の肝重量の増大が推測される成績であった。

c. 組織学的所見

30週の生検肝では、対照には病的所見を全く認めなかったが、実験群では主として小葉周辺から中間帯にかけて、ときに小葉中心性の中等度ないしやや高度の脂肪沈着が認められ肝細胞は変性に傾いていた。しかし肝細胞

Table 4. Organ-Body Weight Ratio (%), Ponceau 3R Feeding, at the 83rd Week

	Male				Female			
	Control	0.5%	1.0%	2.0%	Control	0.5%	1.0%	2.0%
Rats sacrificed at 83-week	0	2	2	0	3	2	1	1
Mean body weight	—	346 g	266 g	—	278 g	169 g	150 g	140 g
Liver	—	3.76	4.29	—	4.40	6.20	6.23	9.11
Kidney	—	0.41	0.51	—	0.44	0.67	0.53	0.63
Spleen	—	0.28	0.56	—	0.34	0.49	0.33	0.68
Heart	—	0.35	0.41	—	0.37	0.62	0.50	0.57
Testis	—	0.49	0.57	—	—	—	—	—

Table 5. Organ-Body Weight Ratio (%), Ponceau 3R Feeding, at the 105th Week

	Male				Female			
	Control	0.5%	1.0%	2.0%	Control	0.5%	1.0%	2.0%
Rats sacrificed at 105-week	1	2	2	1	1	2	2	5
Mean body weight	365	351	332	326	262	239	275	221
Liver	4.44	4.38	3.84	5.18	7.18	4.02	4.31	6.17
Kidney	0.53	0.49	0.42	0.51	0.61	0.44	0.45	0.50
Heart	0.44	0.38	0.37	0.51	0.57	0.45	0.47	0.51
Spleen	0.41	0.28	0.27	0.22	0.47	0.33	0.30	0.40
Testis	0.30	0.39	0.38	0.35	—	—	—	—
Adrenal	0.011	0.011	0.009	0.012	0.017	0.013	0.017	0.016

の結節性増殖像や線維組織の増生等は全く認められなかった。53週には50匹について肝の生検を行なったが、さらに退行変性の進展と、一方はじめて増殖性変化の発生を認めた。これらの変化は、いずれも色素添加濃度の高低に正比例して現われた。すなわち、2%投与群では検索13例全例の肝小葉の全域にわたってびまん性の細胞浮腫が中等度ないしやや高度に認められ、ことに小葉中心部に著しかった。浮腫細胞は著明に腫脹し類洞はほとんど認めがたく、細胞形質は粗となり顆粒状構造は不明りょうで染色質に乏しく、ために淡明でしかもラット肝細胞に顕著な好塩基質は減少し、ときにほとんど認められず、しかも細胞質内での分布も細胞膜沿いに圧排され疎開していた。しかし核の変化は軽微であった。脂肪染色では小葉周辺性あるいは中心性に不規則に粗大あるいは微細滴状の脂肪沈着が認められた。壊死巣は認められず線維の増生は全く見られなかった。1%投与群でも浮腫性変化、脂肪変性等所見は似ていたが、その程度は2%群に比べ軽度であり、小葉辺縁部では変化の乏しい例もあった。0.5%投与群では、症例により変性の度合が異なり変化の乏しいものも認められた。

増殖性変化としては、細胞がかなり小型円形で比較的

均一の大きさを持ち、細胞質は好塩基性色を、核、ことに核膜の過染性が顕著な異型肝細胞の結節性増殖巣が2%雌の1例でとくに著しく、その他2%2例、1%および0.5%各1例にも認められた。これらの結節性巣は周囲肝組織に圧排像を全く示さなかった。なお全般に肝細胞は大小不同が目立ち核分裂像が散見されたが、腫瘍の形成は認められなかった。

83週剖検の11匹中対照群の3匹では、肝細胞には変性、浮腫等を認めず細胞の配列も整っているが、1例で小型不整卵円形、原形質は好塩基性を示し核に軽度の過染性が認められる小さな異型増殖巣1個が認められた。しかし他に腫瘍性変化は全くなかった。これに対し、実験群では全例に細胞浮腫が著明で、同時に脂肪変性や空胞ないし水胞変性も著しかった。また初めて腫瘍の発生が認められた。変性像は、53週に行なった肝生検の際の所見と変る所はなかったが、細胞の膨化浮腫、脂肪変性等いずれも程度が強まり0.5%群でもその程度、範囲が増した。また、1%雄の1例は散在性に小円形細胞および好中球の少数浸潤巣が見られ単細胞壊死が疑われ、また小葉中間帯から中心部にかけてかなりの好酸性変性細胞と好酸小体（マロリー体）の形成が認められはしたが、どの例

においても線維の増生、硬変像の出現等は見いだされなかった。増殖性変化としては、検索した1例の2%投与ラット肝には、多発性に独自の細胞索形成を示す結節性増殖巣があり軽い周囲肝組織に対する圧排像を示す腺腫様増殖巣と異型増殖巣が認められたほか、1か所に過小葉大、周囲への圧排像が明りょうでしばしば2列性以上の細胞配列を示し、また腺様構造をとったり、細胞および核の大小不同が目だち核は淡明空胞状で異型性のある腺腫の発生を認めた。その他、1%群2例、0.5%群1例の肝に腺腫様増殖もしくは軽度の異型増殖巣の発生が認められた。その他の臓器では、0.5%の雄雌各1例に小型淡明細胞よりなる腺腫の発生を認めたが、1%あるいは2%投与の高濃度群の甲状腺には全く異常を認めなかった。その他合併症としての腎盂腎炎、肺炎または肺膿瘍の発生を対照群を含めて少数例に認め、脾臓では、2%1例、0.5%2例で髄外造血巣が対照群に比べ多数認められた。

初めて異型増殖の発生を認めた53週時の肝生検以後に死亡した実験群ラット18匹(2%群8匹、1%群6匹、0.5%群4匹)のうち肝生検に直接関係して死亡した9匹を除いて、他の原因で死亡した9匹(2%4匹、1%3匹、0.5%2匹)では、死後変化等のため5例(2%2例、1%2例、0.5%2例)の検索ができたにとどまったが、このうち98週で死んだ1%雄の1例と0.5%雄の1例に散在性に小型異型肝細胞の異型増殖を認めたほかは腫瘍性増殖を認めえなかった。

105週で最終的に剖検した16例(2%群6例、1%群4例、0.5%群4例、対照群2例)では、肉眼的にすでに認めえたように腫瘍の発生を組織学的に確認できた。53週生検肝および83週剖検肝のいずれでも著明であった細胞浮腫と脂肪変性その他の退行性病変は、105週剖検群では、はるかに軽微となりことに浮腫はほとんど認められず、脂肪変性も肝内に少数散在的に結節状の変性巣として残存するにとどまった。本群ではと殺前6週間にわたり基礎食で飼育されていることがこの所見と関係していることを、基礎食にもどす直前に死んだ1%雄の1例での著明な肝の脂肪変性像から推測できた。また、線維の増生は本群でも全く認められなかった。肝における腫瘍の発生は、2%群雌の1例では大きな肝細胞の島を形成して定型的索状へパトーマの像を示す肝癌の発生が認められた。写真に示したように核は空胞状、核膜の過染性が顕著で細胞・核に大小不同が著しかった。この例では、その他にも定型的索状腺腫や、管腔形成とその外周における基底膜の形成が目だつ胆管腺腫等多発性に腺腫の発生が見られた。そのほか2%雌2例に腺腫の発生を認めたが、ことに1例は細胞にかなりの異型性があり広はんに腫瘍の増殖が認められた。腺腫の発生は1%群では雄の1例に、0.5%群では雄雌各1例合計2例に認められたが、0.5%雄の1例では、他の2例の腺腫が異型性

に乏しいのに反して多発しており、1つはきわめて小型の異型性に富む肝細胞が充実性増殖を示し、また他の1つでは腺腫の辺縁の一部に細胞、核の大小不同、過染性、好塩基性が著明で、核分裂像も多数認められる異型性著しい増殖部分が認められた。その他、腺腫様増殖あるいは異型増殖巣を認めたものは、2%群6例中4例、1%群4例全部、0.5%群4例中3例の計11例に達した。一方対照群の2例でも雄の1例では数個の軽度の異型性を示すやや小型不整卵円形の異型増殖と、これに接して2個の圧排像が一部で明りょうな腺腫様増殖巣が認められ雌の1例でも多発性に小型角円形異型細胞増殖巣が認められた。なお104週で死亡した対照群雌1例の肝にも3個の小さい小型だ円形細胞の異型増殖巣が認められた。その他の腫瘍性病変としては、1%雄1例で膵臓腺腫を2%雌1例、0.5%雄2例の甲状腺に乳頭腫もしくは小型淡明細胞腫を、さらに1%雄1例に肺腺腫と気管支上皮の異型増殖巣を各1個、1%雌および0.5%雄各1例に気管支上皮細胞の異型増殖を認め、また皮下腫瘍として2%雌3例に乳腺の線維腺腫2例と線維腫1例を、1%雌1例に線維腫の発生を認めた。腎には対照群も含めてしばしば腎盂炎または腎盂腎炎を認めたが色素の投与と関連づけられるような退行性あるいは進行性または腫瘍性病変の発生は認められなかった。脾では、2%群で髄外造血巣の増生が他よりやや強く認められた。一方大腿骨髄には、脂肪髄化の進んだものと細胞髄の像を示すものと不定な所見が得られたが、2%群で細胞髄を示すものがやや目だった。

以上に述べた肝臓の腫瘍性変化の発現動物数をまとめて Table 6 に示すとともに、実験の経過と対照させて腫瘍性変化の発現時期と数を Fig. 5 に示した。また剖検例についてのみ組織所見を総括して Table 7, Table 8 に示した。なお剖検動物の詳細な所見については別に腐敗研究所年報に症例ごとに記載報告した。

Fig. 5. Procedure of experiment and development of tumorigenic changes of liver

Explanation of Plates

1. Section of liver of a rat autopsied at the 53rd week on the 2.0% feeding level of Ponceau 3R. Atypical small-round-cell proliferation is seen in center of the photograph. Hematoxylin and eosin $\times 100$.
2. High magnification of the boundary area of small-round-cell group. Hematoxylin and eosin $\times 400$.
3. Adenomatous nodule of liver of rat sacrificed at the 83rd week on the 1.0% dietary level of Ponceau 3R. Pressure atrophy of hepatic cells is seen in right. Hematoxylin and eosin $\times 100$.
4. Hepatic adenoma of a rat fed Ponceau 3R at 2.0% of the diet and sacrificed at the 83rd week of experiment. Hematoxylin and eosin $\times 400$.
5. Section of specific type of fatty metamorphosis of the hepatic cells on 0.5% level for 83 weeks. Hematoxylin and eosin $\times 100$.
6. High magnification of the plate 5. Basophilic bodies in the cytoplasm are not recognized. Hematoxylin and eosin $\times 400$.
7. Remarkable hepatic cell edema developed in rat fed Ponceau 3R at the 1.0% of the diet for 83 weeks. Hematoxylin and eosin $\times 400$.
8. Conspicuous fatty metamorphosis and cell edema in hepatic cells of rat fed Ponceau 3R at the 2.0% of the diet for 83 weeks. Hematoxylin and eosin $\times 100$.
9. Section of hepatoma induced by feeding of Ponceau 3R to rat on the 2.0% of the diet for 105 weeks. Hematoxylin eosin $\times 100$.
10. High magnification of cholangioma developed in 2.0% dietary level.
11. Marked formation of basement membrane around cholangioma. Gomori's silver impregnation for reticulum $\times 100$.
12. Hepatic adenoma of rat fed Ponceau 3R at the 2.0% of diet for 105 weeks. Considerable atypic configuration is seen in adenoma cells. Hematoxylin and eosin $\times 100$.
13. Well-differentiated hepatic adenoma in 1.0% level of diet. Hematoxylin and eosin $\times 100$.
14. Section of hepatic adenoma on 0.5% level of the diet. In periphery of the nodule of adenoma atypical growth is remarkable. Hematoxylin and eosin $\times 100$.
15. Slightly atypic growth of hepatic cells of rat fed basal diet for 105 weeks. Hematoxylin and eosin $\times 100$.
16. Section of normal liver of control rat fed basal diet for 105 weeks. Hematoxylin and eosin $\times 100$.

Table 6. Incidence of Hepatic Tumor and Atypical Growth of Hepatic Cells

Color level	2.0%	1.0%	0.5%	Control
No. of animals	20(10)	20(10)	20(10)	20(10)
Rats surviving beyond 53-week	15 (8)	13 (7)	12 (7)	16(10)
Atypical Growth of hepatic cells	7 (6)	8 (4)	5 (3)	4 (3)
Hepatic adenoma	4 (4)	1 (1)	2 (1)	0
Hepatoma	1 (1)	0	0	0

() female

Table 7. Microscopic Observation of Rats Fed Ponceau 3R during 83-week

Observation	Dietary label			
	2.0%	1.0%	0.5%	Control
Rats sacrificed at 83-week	1	3	4	3
Pyelonephritis	1	0	1	1
Increase of extramedullary haematopoiesis in spleer	1	0	2	0
Increase of haemosiderosis in spleen	0	0	2	1
Bronchopneumonia and pulmonary abscess	0	3	1	0
Adenoma in thyroid	0	0	2	0

Table 8. Microscopic Observation of Rats Fed Ponceau 3R during 105-week

Observation	Dietary label			
	2.0%	1.0%	0.5%	Control
Rats surviving 2-year test and sacrificed	6	4	4	2
Pyelonephritis and hyaline cylinder in tubules	4	3	3	2
Increase of extramedullary haematopoiesis in spleen	4	1	1	1
Bronchopneumonia	1	0	1	0
Atypical growth of bronchial epithelium	0	2	1	0
Pancreas adenoma	0	1	0	0
Thyroid adenoma	1	0	2	0
Fibrom and fibroadenoma in mammary gland	3	1	0	0
Fibrosarcoma in abdominal cavity	0	0	1	0

3. 考 按

タール系アゾ色素のなかに経口投与により動物に発癌性を示すものが存在することは古くから知られていた。これらの研究が日本において盛んであったことは興味深いことである。

1932年佐々木、吉田ら¹⁰⁾が *o*-aminoazotoluol をラットに経口的に投与して肝臓癌を発生せしめたのが最初である。次いで木下ら¹¹⁾は1937年dimethylaminoazobenzene (DAB, butter yellow) が肝臓に対し強い癌原性を有することを発見し注目をあびた。DABは今日化学物質の発癌研究の有力な武器として多くの研究者によって取上げられているが、かつてはバター着色にも使用されたことがあり、食用色素の発癌性の証明の最初のものであった。

P. 3R については前述のごとく発癌性が問題となり、近年になってアメリカを初め主要国家において食用色素としての指定が取消された。これは1956年に国際対癌連合の食品添加物による発癌の可能性についての評価に関するシンポジウムが持たれたことが契機となり、タール系食用色素について発癌性のスクリーニングの必要が認められ、今日の科学水準においての発癌試験の方法論の検討がなされ、この方面の研究の新しい進展がみられるようになった^{12)~14)}。

P. 3R の発癌性を報告した Grice の使用した rat の系統は記載されていないが、Hansen, Nelson らは osborne-Mendel rat と Bethesda Black rat を用いて発癌させている。

著者らは Wistar strain を用いて発癌性を立証したもので、本物質が rat に広く癌原性を有することが明らかになった。著者らの実験は Hansen らの原著の入手前すなわち1963年7月に開始したもので1965年7月に2か年の飼育実験を終了している。ほとんど時を同じうしてこの方面のわが国の先達の一人である国立衛生試験所の池田ら¹⁵⁾は Ponceau R (赤色101号) について長期

飼育実験を行ないこの色素もまた発癌性を有することが発見された。したがって Ponceau R, Ponceau 3R の2色素は米国の FDA の cancer clause にならって当然指定を削除すべきものであり、1965年9月でわが国における本色素使用が禁止されたのは適切な行政措置であったといえよう。

本色素の一般毒性については飼育の早期から肝に脂肪変性が出現し、肝細胞の変性は添加濃度の高いものほど投与の経過の進行につれて強くなっていくことが観察されたことは慢性毒性という点からも添加物として警戒を要する色素であることを示唆している。とくに食用色素には使用基準がないために摂取量の算定が困難であって安全性の確認に不安が残るものである。ただし著者らの実験で投与99週後に添加を終了して以後普通食にもどして6週間飼育した動物については肝の変性の強さが著しく軽減されており、なお修復の可能性を示していたことは注目される所見であった。

タール色素が高濃度の投与で肝に毒性を示すことの研究は八尾氏¹⁶⁾初め多くの人の報じているところである。しかしその毒性の程度は色素の種類すなわちその化学構造によって幅広い差異のあることも事実であり著者らが同時に行なった Sunset yellow の投与においては肝の変性もきわめて微弱で、癌原性も示されなかった。これらの問題については次報で論究するつもりである。

4. 総 括

タール系食用色素 P. 3R を Wistar 系ラットに経口的に2か年投与して慢性毒性ならびに発癌性の有無について実験を行なった。動物は各群20匹(雌雄10匹ずつ)とし、色素の添加濃度は2%, 1%および0.5%の3段階である。

得られた成績はつぎのごとくである。

1. 動物は各群とも飼料をよく摂取して2か年の長期投与に耐えた。
2. 雄では5週以後色素添加濃度に対応して体重増加

は抑制され2%群で著明であり、雌でも2%群に成長阻害がみられた。

3. 飼育12か月時の死亡は高濃度順に4, 7, 6, 4匹ずつ、19か月飼育時ではおのおの13, 11, 10, 11匹であってとくに色素の濃度と死亡率との間に相関はみられなかった。なかでも死亡例は主として肺炎、肺膿瘍等感染死であった。

4. 色素添加動物の肝臓に早期に実質細胞の変性、脂肪沈着がみられ、この変性は高濃度群に強くかつ飼育の経過の進行とともに著明になった。しかし23か月経過後に色素投与を中止して6週間後の動物では変性像はかなり修復されていた。

5. 色素投与動物にはその添加濃度に対応して肝臓に高率に異型増殖、腺腫の発生がみられその一部は悪性化してヘパトームを形成しており、本色素が癌原性を有することが確証された。

6. 腎臓その他の主要臓器および血液には色素の摂取に起因すると思われる病変の著明なものは認められなかった。

本研究の一部は文部省科学研究費によった。

なお、本研究の要旨は日本食品衛生学会第8回学術講演会(1964)、第54回日本病理学会総会(1965)、第24回日本癌学会総会(1965)において発表。

文 献

- 1) 厚生省食品化学課：食品衛生研究 15(9), 19 (1965).
- 2) 黒川和男：同上 15(12), 13 (1965).
- 3) 刈米達夫編：“食品添加物公定書注解” 221 (1961) 金原出版.
- 4) R. Willheim, A. C. Ivy: Gastroenterology 23, 1 (1953).
- 5) H. C. Grice, W. A. Mannell, M. G. Allmark: Toxicol. & Appl. Pharmacol. 3, 509 (1961).
- 6) W. H. Hansen, K. J. Davis et al.: ibid. 5, 105 (1963).
- 7) 厚生省食品化学課編：食品衛生研究 15(3), 77 (1965).
- 8) 相磯和嘉：ファルマシア 1, 336 (1965).
- 9) 相磯和嘉, 蟹沢成好：日本医事新報 No. 2165, 22 (1965).
- 10) Takaoki Sasaki, Tomizo Yoshida: Virchows Arch. path. Anat. 295, 175 (1935).
- 11) 原田三樹男, 水田太郎, 丸谷八郎：大阪医学会誌 36, 783 (1937).
- 12) WHO Tech. Rep.: General Principles Governing the Use of Food Additives, Ser. 129, 5 (1957).
- 13) 池田良雄：日本医事新報 No. 1912, 25 (1960).
- 14) H. O. Calvery: Am. J. Pharm. 114, 324 (1942).
- 15) 池田良雄, 他：日薬理. 61(2), 77 (1965).
- 16) 八尾正夫：大阪医学会誌 36, 1485 (1937).
- 17) 厚生省食品化学課：食品衛生研究 15(11), 3 (1965).