クロレラおよび清酒酵母による食品 添加物の毒性試験 (第1報)

食用色素の毒性試験 (1)

(昭和42年6月28日受理)

山本 栄* 伊東洋子* 野田昇治*

Toxicity Test of Food Additives by the Disturbance of Life Cycles
of *Chlorella* and *Saccharomyces cerevisiae* var. *Sake* (I)
Toxicity Test of Food Pigments (1)

Sakae YAMAMOTO, Yoko ITO and Shoji NODA

(The Research Institute of Shochikubai Wine Brewing Co., LTD.:
Hama-cho, Nishinomiya, Hyogo)

In this paper, the Arnon liquid culture method (A); the ameliorated Arnon culture method by adding 0.1% Mg (OAc)₂ and 1% glucose (B) to *Chlorella vulgaris*; the Henneberg liquid culture method to *Saccharomyces cerevisiae* var. *Sake* the Brewing Institute No. 6 were respectively applied to toxicity test of twenty two food pigments at the concentration of 0.1 and 0.01 percentages of these dyes, and during 4 days as the culture period for the method (A) and 7 days for the method (B) to *Chlorella* at about 25°C under 10 W white fluorescent lamp and during 4 days as the culture period at ca. 35°C to *Saccharomyces*, the following four points were inspected: (1) the observation of the outlook by naked eye, (2) the micrometric determination of cell number by Thomas' method and the ratio Sample/Std., (3) the micrometric determination of cell diameter and the ratio Sample/Std., and (4) the microscopic observation of inner structure and coloration grade of these organisms.

Results of the test were as follows:

1. The coloration of the cell was more or less a bad phenomenon to the life cycles and appeared in thirteen cases: Red No. 1, 3, 101, 103, 104, 105, 106, Orange No. 1, 2, Yellow No. 2, Green No. 1, Blue No. 1 and Violet No. 1.

2. Red No. 4, Yellow No. 1 and Blue No. 2 had also influence to inhibit the life cycles without coloration.

3. From the results of the examination, four pigments—Red No. 2 (Amaranth), 102 (New Coccine), Yellow No. 4 (Tartrazine) and No. 5 (Sunset Yellow FCF)—had almost no influence on the life cycles and three of them except New Coccine are ones having the highest safety grade among all pigments reported hitherto by the Expert Committee of Food Additives of FAO/WHO.

4. The coloration of the cell by pigment was not always similar in both cases of microorganisms. Which term of the life cycle was affected by the pigments was different in each case but generally the addition of pigment had more or less bad influence on all over the life cycle when it colored. For example, on the test of *Saccharomyces*, the bubbling of carbon dioxide and then the ethanol fermentation decreased in the cases of Red No. 104, 105 and Orange No. 1 and especially an infragrant smell was emitted in the case of Red No. 105.

5. The adequate concentration of pigment in the test medium which contained 10⁶~10⁸ cells was about 0.1 percentage in all cases because the toxicity test was effectively examined. The pH of medium changed somehow to acidic area but at least remained at 4.5. At this pH figure, there appeared almost no influence on the life cycle and as one of the special case, Blue No. 2 discolored during the culture but this discoloration did not depend on the acidic pH.

* 松竹梅酒造株式会社研究所: 兵庫県西宮市浜町13番10号

In view of the above description, it will be summarized that any pigment may not be available or desirable as food additive when some bad influences appeared on the life cycle of the microorganisms in this method. None the less, as this method is aimed at inspection for only four items at some constant and not various concentrations of pigment, so the result does not always show direct concern with deciding on the availability of food additives.

(Received June 28, 1967)

緒 言

食品添加物の安全性確認試験法¹⁾には、ラット、マウスなどを用いた急性毒性、慢性毒性^{2)~4)}の試験があり、さらに特殊な場合は、代謝、作用機序および生化学的影響などを調べ、安全性の確認が行なわれている。

動物試験法は、動物の選択、種類、数また動物飼育の設備、実験期間など手軽には行なえない点がある。したがって、あらかじめ急性毒性試験を行ない、多くの添加物のなかから考慮すべき物質を選び、その後の研究への足がかりとしている。しかし、この予備試験も動物を対象とする。したがって、急性毒性試験の予備試験として、検査物質を添加した培地を用い、クロレラと清酒酵母⁵⁾を培養し、これら微生物の個体成長と増殖を観察することにより比較的安易に被検物質の適用性の可否を見いだそうと考えた。

しかし、動物試験⁶⁾においても問題となることではあるが、マウス、ラットよりさらに下等な単細胞生物であるクロレラや酵母の細胞の示した反応が、そのまま高等動物さらに人間の細胞に適用されるとは考えられない。また作用機序の差異は別として、単細胞生物はその細胞の死すなわち個体の死であるに対し、高等動物では細胞の死すなわちその組織の死とはならない。しかし、微生物の細胞に毒性を示す物質は、組織体にもなんらかの異常作用を及ぼすことが考えられる。

本試験に、他の微生物を使用せず、クロレラと清酒酵母を選んだのは、クロレラは光合成⁷⁾⁸⁾により二酸化炭素と無機質より有機物を合成し、酵母は糖を分解しエタノールと二酸化炭素⁹⁾を生成するため、両者の組み合わせは試験判定上好都合と考えられ、また操作上危険性なく安易に処理できるためである。

これらの詳細については、前報¹⁰⁾に詳論したが、今回はクロレラと清酒酵母を用い、食品添加物の毒性の予備試験として食用色素を対象とし、その一律定濃度添加培養による示票判定の有用性を追究した。

食用色素の毒性については、他の食品添加物と同様マウス、ラットを使用した試験が報告¹¹⁾¹²⁾されている。

今回下記の簡易予備試験法により追究した結果、従来報文にその適用性が問題とされ、また現在すでにその使用を禁止されている色素が、本法でも同様に注意すべき色素として判定されたので、一応利用価値あるものと考え以下報告する。

実験方法

使用色素： 三栄化学工業 (株) 製 食品添加物法定規格品食用色素標本 (不許可品を含む) 22 種

使用クロレラ: *Chlorella vulgaris*

使用酵母: *Saccharomyces cerevisiae* var. *Sake* 醸造試験所 No. 6

培 養 液: クロレラ用 A 培地 Arnon 培地
B 培地 Arnon 培地¹³⁾¹⁴⁾に
ブドウ糖 1% と酢酸マグネシウム 0.1% 添加
酵母用 Henneberg 培地

Table 1. Composition of Arnon Liquid Culture Medium

KNO ₃	5.0 g	*Arnon A ₅ solution H ₃ BO ₃ 2.85 g MnCl ₂ ·4H ₂ O 1.81 g ZnSO ₄ ·7H ₂ O 0.22 g CuSO ₄ ·5H ₂ O 0.078 g (NH ₄) ₂ ·MoO ₄ 0.71 g add. H ₂ O up to 1L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2.5 g	
KH ₂ PO ₄	1.25 g	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	5 mg	
*Arnon A ₅ sol.	1 ml	
EDTA	7 mg	
add. H ₂ O up to 1L		

Table 2. Composition of Henneberg Liquid Culture Medium

Sucrose	150 g	MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.0 g
Peptone	5.0 g	CaCO ₃	5.0 g
KH ₂ PO ₄	5.0 g	add. H ₂ O up to 1L	

1. クロレラ法

1) クロレラ検液の調製

a) L 型藻体浮遊液 *Chlorella vulgaris* を Arnon 培養液に寒天 2% を加え、加圧滅菌した斜面培地に接種し、室温 (夏期) またはビニル被包中 (冬期) で、10 W 白色ケイ光灯照射下 (照射距離約 3 cm) に気温約 25° に保ち約 10 日間培養する。生育後、滅菌 Arnon 培養液適量 (5~10 ml) を加え、振とうして均質な浮遊液を作る。

b) 液体培養に用いる検液

標準用検液: クロレラ培養 A 培地または B 培地 9.5 ml をステンレス鋼製キャップ付き試験管 (内径 15 mm, 長さ 160 mm) に分注し、加圧滅菌する。a) の L 型藻体浮遊液 0.5 ml を加えてよく混合し藻体浮遊濃度を均

整にする。その一部につき Thoma 計算板を用いて藻体数を、また micrometer を用いて細胞の大きさを計測する。

試験用検液：標準用と同一型の試験管 5~6 本に、それぞれ A 培地または B 培地に色素を加え必要に応じて pH を 6.5 に調節した検液 9.5 ml を入れ、標準用検液と同様に a) の L 型藻体浮遊液 0.5 ml ずつを加え、上記の標準用検液と組になるよう藻体浮遊濃度の均整な組試験用の検液を作る。

色素濃度は 0.1% と 0.01% の 2 種とし、0.1% の場合は色素粉末 10 mg を、0.01% の場合は 0.1% 溶液 1 ml を加え検液全量を 10 ml とした。

2) 培養と検査

光源は 10 W の白色ケイ光灯を用い、室温(夏期)またビニル被包内(冬期)において気温約 25° に保ち、照射距離約 3 cm で静置培養を行なった。午前と午後の各 1 回培養液を振りまぜ藻体を分散させ、A 培地の場合は 7 日間、B 培地の場合は 4 日間培養し、つぎの 5 項目について経日検査を行なう。藻体は増殖するのが普通であるが、添加色素の毒性に応じて、増殖率が減退または停止する。

①概観：培養期の沈殿、色調などの肉眼的観察を行ない、pH の変動を検査する。

②個体細胞成長の計測：micrometer を用い、球形ではその直径、だ円形ではその長短両径を開始日と培養終日に測定し、同一検液中の比率また標準に対する試験群の成長比率をそれぞれ求める。また形態的な検査をする。

③増殖の計数：開始日と培養最終日の個体数を、それぞれ Thoma 計算法で求め、同一検液中の比率また標準に対する試験群の増殖比率をそれぞれ求める。

④藻体内部構造の観察：顕微鏡 1,000 倍率下の観察により、細胞の外形、内部構造、色調などの特異的な変化を検査する。

⑤色素の細胞染色性の観察：顕微鏡下で藻体細胞染色性の強度とその細胞に及ぼす影響を観察する。

2. 酵母法

1) 酵母検液の調製

a) 酵母浮遊液 クロレラ法と同様供試醸造試験所 6 号酵母を Henneberg 培養液に寒天 2% を加えて加圧滅菌した斜面培地に接種し、フ卵器中 30~35° で、4 日間培養する。生育後滅菌 Henneberg 培養液適量 (5~10 ml) を加え、振とうして均質な浮遊液を作る。

b) 液体培養に用いる検液

標準用検液：Henneberg 培地を用い、クロレラ法の場合と同様に操作し調製する。

試験用検液：Henneberg 培地を用い、クロレラ法の場合に準じて操作し標準用と試験用の組み合わせ検液群を調製する。

2) 培養と検査

フ卵器中 30~35° で 4 日間の静置培養を行なった。午前と午後の各 1 回培養液を振りまぜ、菌体を均整に分散させ培養期の経日検査を行なう。

検査はクロレラ法の場合と同様 5 項目について行なった。

実験結果

食用色素を 0.1%, 0.01% 添加した、A, B 両培地にクロレラを、Henneberg 培地に清酒酵母を培養してその増殖などに対する影響を調べ、その毒性を検討した結果つぎのような成績が得られた。Table 3, Table 4 は、クロレラの A 培地、Table 5, Table 6 は、クロレラの B 培地、Table 7, Table 8 は、清酒酵母について各 0.1%, 0.01% の濃度で色素を添加した場合の結果を示した。Table 9 は、これら色素のうちから 5 種を選び再試した結果である。

考察および結論

本試験の微生物効果を総括すれば、Table 10 に示される。また主要な現象について要約すればつぎのようになる。

1) 細胞が染色された場合、クロレラの増殖、成長ともに抑制された。検鏡によれば、細胞の形態、細胞膜、細胞質にいろいろな変形や異常が認められたが、個々の色素について系統的な検索は今後の課題にしたい。

染色された細胞は、セファデックスと加熱処理¹⁰⁾しても脱色されず、染色力は相当強いようであったため、もし動物臓器の細胞を染色するような機会があるとすれば、なんらかの悪影響が現われるものと考えられる。よって染色性色素のうち赤色 3 号を、0.1% 水溶液として約 2 週間ラットに飲料として与えた結果、糞は赤色に染色したが、体重、臓器の重量、その所見などに異常を認めなかった。すなわち赤色 3 号は大部分が排泄されるが、長期投与の場合に影響が皆無とはいえない。赤色 105 号についても 40 日間投与で同じ結果が得られた。その他の細胞染色性色素についても同様のことが考えられる。

試験微生物について生活環の一部または全域にわたって染色がみられた色素は、赤色 1 号、3 号、101 号、103 号、104 号、105 号、106 号、とう色 1 号、2 号、黄色 2 号、緑色 1 号、青色 1 号、紫色 1 号の 13 種であった。

2) 赤色 4 号、黄色 1 号、青色 2 号は細胞染色をみなかったが、微生物の生活環に対して抑制的結果が得られた。

3) 前項の 1) 2) の結果から、なんらかの悪影響を及ぼす色素として上記 16 種があげられる。このうち、たとえば黄色 2 号は、クロレラの B 培地試験で個体細胞の大きさが盲検値の 2 倍弱なのに対し、細胞数が非常に少ないのが特徴であるが、これは検鏡上から L₄ 型成熟期でその分裂が抑制されたものと考えられる。その他の色素は、大部分細胞増殖の減退が顕著にあらわれており生活環全

Table 3. Influence of 0.1% Pigment on *Chlorella vulgaris* in A Medium

Pigment	Cell diameter			Cell number			Microscopic observation and note
	(μ)	Sample/Std.		10 ⁷	Sample/Std.		
		first	last	(per ml)	first	last	
GROUP 1							
Arnon {first	3.40	1.00		2.56	1.00		
Standard {last	3.55	1.05	1.00	5.12	2.00	1.00	
Red 1	1.15		0.32	5.12		1.00	(p) Dye cell to red in part.
" 2	1.78		0.50	12.4		2.42	Almost normal.
" 3	1.77		0.50				Dye cell to brilliant red.
" 4	3.96		1.11	6.4		1.25	(p)
" 5	4.08		1.35	8.6		1.68	(p) (insoluble)
GROUP 2							
Arnon {first	3.46	1.00		6.52	1.00		
Standard {last	3.44	0.99	1.00	17.9	2.75	1.00	
Red C1	4.24		1.21	7.36		0.41	(p) Big cells in divisional term are not many.
" C2	4.08		1.18	5.96		0.33	
" C3	3.43		1.00	5.16		0.29	Dye to red.
" C4	4.48		1.30	6.08		0.34	Dye to pink.
" C5	3.64		1.06	5.32		0.30	Dye to pink (Transformation in part)
GROUP 3							
Arnon {first	3.14	1.00		3.64	1.00		
Standard {last	3.51	1.11	1.00	11.4	3.11	1.00	
Red C6	3.63		1.03	4.72		0.41	Slightly dye cell.
Orange 1	4.14		1.18	5.04		0.44	(p) Dye about half the cell number. (Dyed cells are small 1.5 μ .)
" 2	3.96		1.12	9.20		0.80	(p) Slightly dye cell. (insoluble) Large cell.
Yellow 1	3.88		1.11	8.76		0.77	(p) Da cells are many.
" 2	3.55		1.00	6.60		0.58	(p) (insoluble) Dye a small number of cells.
GROUP 4							
Arnon {first	4.86	1.00		9.36	1.00		
Standard {last	3.89	0.80	1.00	14.7	1.57	1.00	
Yellow 3	4.03		1.04	15.4		1.05	(p) (insoluble)
" 4	3.99		1.04	12.7		0.86	
" 5	3.86		0.99	11.3		0.77	
Green 1	3.58		0.92	6.60		0.45	Dye cell. Small: 1.5 μ
Blue 1	3.77		0.97	10.00		0.68	
" 2	3.16		0.81	9.88		0.67	
Violet 1	2.29		0.67	6.72		0.46	Dyed cells are many.

(p): Pigment prohibited for food additive
(insoluble): Pigment insoluble in medium

Table 4. Influence of 0.01% Pigment on *Chlorella vulgaris* in A Medium

Pigment	Cell diameter			Cell number			Microscopic observation and note
	(μ)	Sample/Std.		10 ⁷ (per ml)	Sample/Std.		
		last	first		first	last	
GROUP 1							
Arnon Standard	{first	3.50	1.00	8.9	1.00		
	{last	4.15	1.19	13.6	1.60	1.00	
Red 1		3.77	0.91	11.5	0.84		(p)
" 2		4.26	1.03	11.8	0.87		
" 3		3.49	0.84	8.68	0.64		
" 4		4.14	1.00	10.3	0.78		(p)
" 5		4.44	1.07	12.3	0.90		(p) (insoluble)
GROUP 2							
Arnon Standard	{first	3.37	1.00	7.72	1.00		
	{last	3.77	1.90	11.8	1.53	1.00	
Red C1		3.94	1.05	11.9	1.00		(p)
" C2		3.97	1.05	11.8	1.00		
" C3		4.82	1.28	38.6	3.26		Green. Large cells are many and granules in cell are many.
" C4		2.94	0.78	10.0	0.84		Dye cell lightly.
" C5		3.37	0.89	9.52	0.80		Dye cell. Cell in divisional term: none.
GROUP 3							
Arnon Standard	{first	3.54	1.00	4.36	1.00		
	{last	3.74	1.06	14.9	3.41	1.00	
Red C6		3.58	0.95	11.5	0.97		
Orange 1		3.88	1.03	2.76	0.18		(p) Dye cells about half the number.
" 2		3.55	0.95	10.8	0.73		(p) (insoluble)
Yellow 1		3.31	0.89	14.0	0.94		(p)
" 2		3.74	1.00	9.68	0.65		(p) (insoluble) Dye cell rarely.
GROUP 4							
Arnon Standard	{first	3.32	1.00	10.6	1.00		
	{last	3.99	1.20	13.4	1.26	1.00	
Yellow 3		3.10	0.78	12.7	0.95		pH: 4.8~5.0
" 4		3.74	0.94	14.1	1.05		(p) (insoluble) pH: 4.8
" 5		3.57	0.89	14.0	1.05		pH: 4.4~4.6
Green 1		3.22	0.81	9.76	0.73		pH: 4.6~4.8
Blue 1		3.54	0.89	10.8	0.80		pH: 4.6~4.8
" 2		3.61	0.90	11.8	0.88		pH: 5.2 Dye cell in part, and has divisional ability.
Violet 1		3.67	0.92	10.4	0.77		pH: 5.2
							pH: 4.6~4.8 Dye cell in part

Table 5. Influence of 0.1% Pigment on *Chlorella vulgaris* in B Med² μm

Pigment	Cell diameter			Cell number			Microscopic observation and note
	(μ)	Sample/Std.		10 ⁸ (per ml)	Sample/Std.		
		first	last		first	last	
GROUP 1							
Arnon Standard	{first	3.49	1.00	1.72	1.00		
	{last	6.32	1.81	24.7	20.2	1.00	
Red 1		3.48	0.55	7.74	0.31		(p) Da cells are many.
" 2		6.04	0.96	8.88	0.36		D-L cells are many.
" 3		3.69	0.59	1.04	0.04		Dye cell to red. Slightly distorted.
" 4		5.16	0.82	7.6	0.31		(p) D-L cells, elliptic and small cells are many.
" 5		5.32	0.86	2.01	0.81		(p) (insoluble)
GROUP 2							
Arnon Standard	{first	3.47	1.00	0.504	1.00		
	{last	4.52	1.30	18.2	27.1	1.00	
Red C1		4.84	1.07	59.8	3.3		(p) Cell in divisional term: none.
" C2		6.28	1.39	77.2	4.2		
" C3		6.16	1.36	10.4	0.57		Dye cell to pink.
" C4		3.99	0.88	4.88	0.27		Dye cell to pink. It has divisional ability.
" C5		3.64	0.81	4.84	0.27		Dye cell to pink. Distorted cells are many.
GROUP 3							
Arnon Standard	{first	3.14	1.00	0.364	1.00		
	{last	4.15	1.32	18.4	5.06	1.00	
Red C6		4.85	1.17	9.36	0.5		
Orange 1		2.96	0.71	0.76	0.04		(p) Dye cell to orange. Multiplication is not observed at all.
" 2		4.07	0.96	19.8	1.07		(p) (insoluble) Da cells are many.
Yellow 1		2.54	0.61	13.0	0.71		(p) Da cells are many.
" 2		7.60	1.83	7.56	0.41		(p) (insoluble) Cells in divisional term and Da cells are many.
GROUP 4							
Arnon Standard	{first	3.53	1.00	0.936	1.00		
	{last	4.78	1.34	12.6	1.34	1.00	
Yellow 3		4.57	1.96	13.0	1.04		(p) (insoluble)
" 4		5.17	1.08	14.4	1.14		Cells in divisional term are many.
" 5		4.78	1.00	16.7	1.32		
Green 1		4.61	0.96	2.05	0.16		Dye cell to green.
Blue 1		4.87	1.02	4.88	0.39		
" 2		4.57	0.96	3.16	0.25		
Violet 1		3.92	0.82	1.16	0.09		Dye cells half the number.

Table 6. Influence of 0.01% Pigment on *Chlorella vulgaris* in B Medium

Pigment	Cell diameter			Cell number			Microscopic observation and note
	(μ)	Sample/Std.		10 ⁸ (per ml)	Sample/Std.		
		first	last		first	last	
GROUP 1							
Arnon	{first last	3.45	1.00	1.22	1.00		(p)
Standard		6.26	1.81	1.00	12.9	10.6	
Red 1	5.92		0.94	9.28		0.72	
" 2	6.32		1.09	8.60		0.67	
" 3	6.08		0.96	7.88		0.61	
" 4	6.98		1.12	3.88		0.30	(p)
" 5	6.03		0.95	19.8		1.53	(p) (insoluble)
GROUP 2							
Arnon	{first last	3.37	1.00	0.772	1.00		(p) Granules are many in cell, and cell is distorted.
Standard		4.46	1.32	1.00	16.9	21.8	
Red C1	6.71		1.05	11.9		0.70	
" C2	4.49		1.01	8.60		0.51	
" C3	5.33		1.19	30.6		1.81	
" C4	3.59		0.80	1.32		0.07	Dye cell to pink.
" C5	3.67		0.82	1.32		0.07	Dye cell to pink.
GROUP 3							
Arnon	{first last	3.54	1.00	0.436	1.00		(p) Dye cell to orange in small part.
Standard		4.11	1.16	1.00	27.0	6.17	
Red C6	3.93		0.98	19.2		0.71	
Orange 1	4.95		1.24	15.6		0.58	
" 2	4.22		1.02	29.2		1.08	
Yellow 1	4.58		1.11	22.7		0.83	(p) Da cells are many.
" 2	7.22		1.75	5.20		0.19	(p) (insoluble) Large and divisional cells are many.
GROUP 4							
Arnon	{first last	3.35	1.00	0.864	1.00		pH: 6.0~6.2
Standard		5.73	1.71	1.00	10.0	11.5	
Yellow 3	5.49		0.96	8.96		0.90	
" 4	4.70		0.82	11.0		1.10	
" 5	4.49		0.78	17.2		1.72	
Green 1	4.95		0.86	5.16		0.52	pH: 6.4
Blue 1	4.55		0.79	17.2		1.72	pH: 5.6 Dye cell in part.
" 2	4.92		0.86	11.4		1.14	pH: 6.4
Violet 1	4.97		0.87	9.48		0.95	pH: 5.6~5.8
							pH: 5.6~6.0 Dye cell in part.

Table 7. Influence of 0.01% Pigment on *Saccharomyces cerevisiae* var. *Sake* in Henneberg Medium

Pigment	Cell diameter			Cell number			Microscopic observation and note	
	(μ) long $\times$ short	Sample/Std. first last		10 ⁸ (per ml)	Sample/Std. first last			
GROUP 1								
Standard	{first	5.14 $\times$ 4.34	1.00	2.14	1.00		(p) Dye cell and distorted cells are many. Dye cell half the number. Mostly distorted. (p) Divisional cells are few. (p) (insoluble) Divisional activity is great.	
	{last	5.08 $\times$ 4.14	0.29 $\times$ 0.96	18.4	8.6	1.00		
Red 1		4.90 $\times$ 4.13	0.96 $\times$ 0.99	14.6		0.79		
" 2		5.28 $\times$ 4.46	1.04 $\times$ 1.08	16.4		0.89		
" 3		5.06 $\times$ 4.47	1.04 $\times$ 1.08	4.68		0.25		
" 4		5.60 $\times$ 5.20	1.12 $\times$ 1.25	8.88		0.48		
" 5		5.11 $\times$ 4.29	1.00 $\times$ 1.03	21.1		1.14		
GROUP 2								
Standard	{first	6.88 $\times$ 6.12	1.00	2.17	1.00			(p) Dye cell to orange. Dye cell 1/3 the number. Dye cell half the number. Dye cell half the number. It has divisional ability.
	{last	5.56 $\times$ 4.63	0.83 $\times$ 0.75	68.0	32.4	1.00		
Red C1		5.23 $\times$ 4.61	0.94 $\times$ 0.99	56.8		0.81		
" C2		5.17 $\times$ 4.36	0.93 $\times$ 0.94	64.8		0.95		
" C3		5.53 $\times$ 4.49	0.99 $\times$ 0.97	58.8		0.89		
" C4		4.72 $\times$ 4.12	0.85 $\times$ 0.89	43.6		0.64		
" C5		4.77 $\times$ 4.19	0.89 $\times$ 0.90	41.6		0.61		
GROUP 3								
Standard	{first	4.34 $\times$ 4.94	1.00	1.39	1.00		Dye cell 1/3~1/4 the number. (p) Dye cell half the number. Bad smell. (p) Fragrant. (insoluble). (p) Fragrant. (insoluble). Dye cell inside rarely.	
	{last	5.91 $\times$ 5.02	1.36 $\times$ 1.02	13.5	9.7	1.00		
Red C6		4.93 $\times$ 4.30	0.83 $\times$ 0.85	11.9		0.89		
Orange 1		4.72 $\times$ 4.52	0.79 $\times$ 0.90	3.04		0.22		
" 2		5.41 $\times$ 4.53	0.92 $\times$ 0.90	12.0		0.88		
Yellow 1		5.34 $\times$ 4.64	0.92 $\times$ 0.92	10.2		0.75		
" 2		5.58 $\times$ 5.13	0.94 $\times$ 1.02	2.52		0.19		
GROUP 4								
Standard	{first	5.30 $\times$ 4.44	1.00	1.30	1.00			(p) Actively bubble. (insoluble). Few bubble. pH: 5.6~5.8 No discoloration. Dye cells in part. Divisional cell.
	{last	5.34 $\times$ 4.18	1.00 $\times$ 0.94	36.9	2.84	1.00		
Yellow 3		4.90 $\times$ 3.96	0.91 $\times$ 0.95	34.4		0.93		
" 4		5.64 $\times$ 4.44	1.08 $\times$ 1.06	32.2		0.87		
" 5		4.84 $\times$ 4.12	0.92 $\times$ 0.99	27.3		0.74		
Green 1		5.04 $\times$ 3.66	0.96 $\times$ 0.88	13.1		0.36		
Blue 1		5.28 $\times$ 4.30	1.01 $\times$ 1.03	20.2		0.55		
" 2		5.46 $\times$ 4.30	1.04 $\times$ 1.03	23.9		0.65		
Violet 1		4.93 $\times$ 3.52	0.92 $\times$ 0.84	31.4		0.85		

Table 8. Influence of 0.01% Pigment on *Saccharomyces cerevisiae* var. *Sake* No. 6 in Henneberg Medium

Pigment	Cell diameter			Cell number			Microscopic observation and note	
	(μ)	Sample/Std.		10 ⁸	Sample/Std.			
	long $\times$ short	first	last	(per ml)	first	last		
GROUP 1								
Standard	{first	4.84	1.00	1.99	1.00		(p)	
	{last	4.33	0.89	1.00	31.6	15.9		1.00
Red 1		5.44 $\times$ 4.73		1.28 $\times$ 1.09	31.2	0.99		
" 2		5.34 $\times$ 4.13		1.23 $\times$ 0.95	31.1	0.99		
" 3		5.18 $\times$ 4.18		1.19 $\times$ 0.96	18.1	0.57		
" 4		5.39 $\times$ 4.27		1.24 $\times$ 0.99	26.7	0.84	(p)	
" 5		4.97 $\times$ 3.94		1.15 $\times$ 0.91	37.6	1.19	(p) (insoluble)	
GROUP 2								
Standard	{first	4.69 $\times$ 3.75	1.00	1.16	1.00		(p) Dye cell to orange. Fragrant. Divisional cells are many.	
	{last	5.43 $\times$ 4.38	1.16 $\times$ 1.17	1.00	27.4	23.6		1.00
Red C1		5.06 $\times$ 4.22		0.93 $\times$ 0.96	24.6	0.90		
" C2		5.34 $\times$ 4.35		0.98 $\times$ 0.09	21.9	0.80		Fragrant; Rarely dye cell.
" C3		5.00 $\times$ 4.74		0.92 $\times$ 1.08	10.7	0.39		Dye cells 1/3 the number to pink. Divisional and round cells are many.
" C4		4.61 $\times$ 3.83		0.85 $\times$ 0.87	7.28	0.27	Dye cell to rose red.	
" C5		4.64 $\times$ 3.53		0.85 $\times$ 0.70	3.40	0.12	Dye cell. Bad smell.	
GROUP 3								
Standard	{first	5.43 $\times$ 4.73	1.00	1.35	1.00		(p)	
	{last	5.16 $\times$ 4.20	0.95 $\times$ 0.88	1.00	28.6	21.2		1.00
Red C6		5.41 $\times$ 4.02		1.05 $\times$ 0.95	23.6	1.18		
Orange 1		5.33 $\times$ 4.51		1.03 $\times$ 1.07	22.6	0.79		
" 2		5.15 $\times$ 4.15		0.99 $\times$ 0.99	28.8	1.01		
Yellow 1		5.45 $\times$ 3.98		1.05 $\times$ 0.95	31.2	1.13	(p) Germinating cells are many.	
" 2		5.35 $\times$ 4.19		1.03 $\times$ 0.99	29.0	1.01	(p) Germinating cells are many.	
GROUP 4								
Standard	{first	6.44 $\times$ 5.29	1.00	0.32	1.00		(p) (insoluble)	
	{last	4.85 $\times$ 3.55	0.75 $\times$ 0.67	1.00	3.24	9.9		1.00
Yellow 3		5.57 $\times$ 4.47		0.86 $\times$ 1.26	38.7	1.19		
" 4		5.86 $\times$ 4.63		1.23 $\times$ 1.30	35.9	1.11		
" 5		5.81 $\times$ 4.23		1.22 $\times$ 1.19	39.0	1.20		
Green 1		5.56 $\times$ 4.31		1.15 $\times$ 1.24	37.9	1.17	Dye cell to green.	
Blue 1		5.50 $\times$ 3.90		1.13 $\times$ 1.10	34.1	1.05	Slightly dye cell.	
" 2		5.59 $\times$ 4.21		1.15 $\times$ 1.18	30.4	9.91	pH: 4.6~4.8. Colorless and after agitation, gradually color to blue.	
Violet 1		5.54 $\times$ 4.21		1.14 $\times$ 1.18	34.8	1.07	Dye cell in small part.	

Table 9. Influence of 0.1% Pigment on *Chlorella vulgaris* and *Saccharomyces cerevisiae* var. *Sake* No. 6 (Reexamined)

Pigment	Cell diameter			Cell number			Microscopic observation and note
	(μ)	Sample/Std.		10 ⁷	Sample/Std.		
	long $\times$ short	first	last	(per ml)	first	last	
(1) <i>Chlorella</i> (A medium)							
Arnon Standard	{first last	3.13 3.42	1.00 1.09		4.36 4.80	1.00 1.00	
Red 1		3.46		1.01	2.92	0.61	(p) Slightly dye cell.
" 3		3.19		0.93	2.52	0.53	Dye cell membrane.
" C3		3.16		0.92	3.64	0.76	Dye cell.
" C4		3.19		0.93	3.32	0.69	Dye cell deep.
Orange 1		3.84		1.12	2.60	0.54	(p) Dye cell in part. (1.7~2 μ)
(2) <i>Chlorella</i> (B medium)							
Arnon Standard	{first last	3.13 4.62	1.00 1.48		4.36 128	1.00 29.3	
Red 1		4.43		1.00	130	1.01	(p) Partly dividing cell.
" 3		3.19		0.96	39.6	0.31	Dye cell in part.
" C3		4.06		0.63	36.8	0.29	Dye cell in part.
" C4		3.52		0.88	54	0.42	Dye cell. Distorted.
Orange 1		3.10		0.76	33.2	0.26	(p) Almost dye cell. Cell membrane mostly broken.
(3) <i>Saccharomyces</i> (Henneberg medium)							
Henneberg Standard	{first last	5.44 $\times$ 4.72 5.56 $\times$ 3.90	1.00 1.02 $\times$ 0.85		1.35 316	1.00 24.1	
Red 1		5.16 $\times$ 3.98		0.93 $\times$ 1.02	244	0.77	(p) Slightly dye cell. Bubble is much. Surface ring.
" 3		5.26 $\times$ 4.38		0.95 $\times$ 1.12	28	0.09	Dye cell 1/3 the number. Bubbling.
" C3		5.18 $\times$ 4.38		0.93 $\times$ 1.12	84	0.26	Bubbling. Dye cell to orange.
" C4		4.72 $\times$ 3.76		0.85 $\times$ 0.71	46	0.15	No bubbling. Mostly dye cell. Germinating cell is ellipse.
Orange 1		5.56 $\times$ 4.84		1.00 $\times$ 1.24	55	0.17	(p) No bubbling. Dye cell partly.

域にわたる抑制と考えられる。

4) 清酒酵母については、赤色104号、105号、とう色1号に発泡、培地液面の泡、また酵母環生成の低下など概観的影響が認められ、芳香性も減退し、とくに赤色105号は異臭を認めた。発酵試験を別に行なった結果、他に比べ低いエタノール生成値を示した。

現在法令で使用禁止品¹⁶⁾として追加された赤色1号、4号、5号、101号、とう色1号、2号、黄色1号、2号、3号について、水溶性のものは本試験でも不適の結果を得たが、水不溶性の赤色5号、黄色3号は操作上試験対

象となりえなかった。

悪影響を認めなかった色素は、赤色2号 (Amaranth), 102号 (New Coccine), 黄色4号 (Tartrazine), 5号 (Sunset Yellow FCF) の4種に限られ、このうち New Coccine を除く3種は FAO/WHO の食品添加物合同委員会の報告¹⁷⁾ (1964年) によれば、最も安全性の高い色素とされている。

5) 試験条件について、今回は一律定濃度添加培養を行なったが、添加物の濃度は両微生物の個体数 $10^6 \sim 10^8$ に対して作用を示すためには、0.1% 濃度が適当と考え

Table 10. Summary of Test Results on *Chlorella* and *Saccharomyces*

Pigment	Influence on <i>Chlorella vulgaris</i>	Influence on <i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. Sake No. 6
Red 1 (Ponceau 3R)	Da cells or daughter cells are many.	Dyed cells are distorted.
Red 2 (Amaranth)	L ₂ -L ₄ cells are many.	(No influence)
Red 3 (Erythrosine)	Dye cell. Cell form is slightly abnormal.	Dye cell. Dyed cells have ability to germinate. Transformation is observed.
Red 4 (Ponceau SX)	Da cells and small cells are many.	Almost normal. Germinating cells few.
Red 5 (Oil Red XO)	(insoluble) Influence is not clear.	Active division.
Red C1 (Ponceau R)	Cells in divisional term are few. Large cells are few. Granules in cell are many and cell membrane is distorted.	Dye cell. Cells in divisional term are many. Scarcely changed.
Red C2 (New Coccine)	Rarely transformed. Scarcely changed.	(No influence)
Red C3 (Eosine)	Dye cell. Dyed cell is about 4.7~5.3 μ and scarcely grow.	Dye cell. Cell form is almost round.
Red C4 (Phloxine)	Dye cell. Dyed cells are many in divisional term, too. Divisional lines are many. Cells look distorted.	Dye cell. Germinative ability is not lack. Bubbling is weak. cell is a quite ellipse.
Red C5 (Rose Bengale)	Dye cell. Distorted cells are many. Cells in divisional term are few.	Dye cell. Small, somewhat bad. Bubbling is few.
Red C6 (Acid Red)	Slightly dye cell.	Dye cell.
Orange 1 (Orange I)	Dye cell. Dyed cell is small. (2.3~3 μ). Multiplication is lacked. Many cells have broken membrane.	Dye cell. Infragrant smell. Bubbling is lacked.
Orange 2 (Orange SS)	(insoluble) Da cells are many. Scarcely changed.	(No influence)
Yellow 1 (Naphthol Yellow)	Da cells are many.	Germinating cells are many.
Yellow 2 (Oil Yellow AB)	(slightly insoluble) Dye cell. Cells in the B medium divide actively and promote its growth but slightly multiply.	Slightly dye cell. Germinating cells are few.
Yellow 3 (Oil Yellow OB)	(insoluble).	
Yellow 4 (Tartrazine)	Cells in divisional term are many. Separation of cell is clear.	(No influence)
Yellow 5 (Sunset Yellow FCF)	(No influence)	
Green 1 (Guinea Green B)	Dye cell. Dyed cell is small. Divisional ability is not lacked.	Dyed cell. Bubbling is few.
Blue 1 (Brilliant Blue FCF)	Slightly dye cell.	Dye cell.
Blue 2 (Indigo Carmine)	Blue discolored in the B medium.	In cultivation, blue discolored, but when small the discoloration is not observed.
Violet 1	Dye cell.	Dye cell. Number of cells is few. Germinating cells are few.

られた。

なお、培養後の液性は経時的に酸性に傾くが、pH 4.5程度にとどまり、酵母やクロレラの培養には、とくに不適とはならず、また pH 低下による色調の変化も認められなかった。しかし、例外として青色2号は培養中色調の退色を認めたが、pH 変化によるものではなかった。

以上を要約すると、本実験で概観、成長度、増殖度その他顕微鏡的観察に対しなんらかの悪影響または異常を示した色素は、食品添加物^{18) 19)}として不適または好ましくない部類に属することが認められる。

今回の試験では、倍数希釈培養法によらないで、一律定濃度添加培養により前記検査項目を示票とした判定の結果であり、食品添加物の適不適の示票に直結するものではない。この点については、今後さらに倍数希釈培養法と栄養素組合せ試験法または生活環上の細胞染色期などの検索により検討したい。

終りに、ご指導とご校閲を賜った名古屋市立大学薬学部教授 石坂音治博士に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 川城 巖：食衛誌. 1 (1), 101 (1960).
- 2) 池田良雄：同 上. 2 (4), 23 (1961).
- 3) 池田良雄：同 上. 3 (1), 1 (1962).
- 4) 池田良雄：同 上. 3 (2), 125 (1962).
- 5) 京都大学農学部農芸化学教室：“農芸化学実験書”第2巻 p. 816 (1965) 産業図書.

- 6) 相磯和嘉：食衛誌. 5 (4), 273 (1964).
- 7) 高富 篤：蛋白質・核酸・酵素 10 (14), 1475 (1965).
- 8) 宮地重遠：化学の領域 13 (7), 19 (1959).
- 9) 武富 昇：“工業化学全書 18 発酵工業” p. 45 (1958), 日刊工業新聞社.
- 10) 石坂音治, 他：名古屋市立大学薬学部研究年報 14, 1 (1966).
- 11) K. J. Davis, A. A. Nelson et al.: Toxicol. Appl. Pharmacol. 8, 306 (1966).
- 12) W. H. Nansen, O. G. Fitzhugh et al.: ibid. 8, 29 (1966).
- 13) Ikuko Shihira, Eiji Hase et al.: Plant. & Cell Physiol. 5, 227 (1964).
- 14) Yoshinori Fujimoto, June Sakamoto: Bull. Agr. Chem. Soc. Japan 19, 253 (1955).
- 15) 坂上米次, 岩村泰子, 他：“第22回日本薬学会講演要旨” 109 (1966).
- 16) 厚生省・食品衛生課・乳肉衛生課・食品化学課：食品衛生研究 8, 698 (1966).
- 17) 厚生省・食品衛生課・乳肉衛生課・食品化学課：同上 8, 704 (1966).
- 18) H. Lück: Z. Lebensm. Untersuch. u.-Forsch. 126/H-3, 193 (1965).
- 19) 天野立爾：食衛誌. 6 (3), 266 (1965).