

## 細菌およびヒト培養細胞に対する デヒドロ酢酸ナトリウムの影響

野村 治子

### A Comparative Study on the Bacteriostatic and Cytotoxic Effects of Sodium Dehydroacetate

HARUKO NOMURA

The toxic effects on bacteria (*E. coli* and *S. aureus*) and cultured human FL-cells of sodium dehydroacetate (DHA-S), a food preservative used in Japan for cheese, butter, and margarine, were studied.

1. DHA-S in a concentration of 1% markedly inhibited the growth of both bacterial strains after 24hr in culture. In a concentration of 0.05%, the slightly depressed growth of both strains was observed after 6hr in culture, but no significant effect on *S. aureus* was observed after 24hr.
2. The growth of cultured FL-cells treated with 1% DHA-S for 5min was depressed to about 5% of control at 5days after treatment. Treatment with 0.05% DHA-S had no detectable effect on the growth of FL-cells.
3. The morphologic effects of 1% DHA-S on FL-cells were degenerative changes such as swelling of mitochondrion and fragmentations of nuclear envelope and plasma membrane.

(Received July 28, 1979)

#### 緒 言

近年の食品工業の発達に伴う加工食品の進展はめざましい。しかし、これら食品の製造・加工・貯蔵に際して使用される食品添加物（化学合成品）の安全性については、社会的にも学問的にもかかってない関心が与せられ、慎重・適正に使用することが重要な課題となっている。

食品添加物のうち保存料は、食品の保存あるいは防腐の目的で食品中の微生物の発育を抑制するために添加されるものであるが、その条件は、ヒトに対して全く毒性のないこと、逆に食品中に含まれる微生物に対しては、抗菌作用の強いものでなければならない。

しかしながら、実際には微生物細胞にとって異物であるこの物質は、かならずしもヒトに対して無害であるとは考えられず、結局は相互の作用関係を許容量という制約を与えることによって、保存料としての価値を決定させている。したがって健康を中心に考えたときそれは「両刃の剣である」ということはいなめない。

1865年 Genter によって合成されたデヒドロ酢酸は、1940年代 Broderson, Kjaer らの不飽和ラクトン類に関する抗菌性・毒性研究においてとりあげられた。1949年にはアメリカの Dow Chemical C. O. が食品防腐剤としての使用特許を得たが、これと前後しておこなわれた研究の結果<sup>1)~6)</sup>、細菌・カビ・酵母などの微生物に対して、広い抗菌スペクトルを有することが知ら

れている。わが国においても昭和28年3月厚生省令第9号でこの許可を導入して、デヒドロ酢酸(以後 DHA と略称) およびデヒドロ酢酸ナトリウム(以後 DHA-S と略称) を食品添加物(保存料)として指定して、現在はチーズ、バター、マーガリンに使用されている。しかし最近諸外国においては、ほとんどの国が食品添加物として許可しておらず、むしろ有毒物質とさえ見なしている向きもあり、FAO/WHO 合同食品添加物専門家委員会においては、ADI(1日摂取許容量)すら設定されていない。

近年食品添加物の安全性を培養細系胞を用いてチェックする試みがなされつつあるが、DHA、DHA-Sの毒性をこのような方法で検討した報告はみられない。

著者らは、DHA-Sを大腸菌およびブドウ球菌に作用させその抗菌作用を把握した後、一つの試みとして、同一濃度のDHA-Sをヒト由来FL-細胞<sup>8)</sup>に作用させ、その増殖に及ぼす影響について検討したので報告する。

また、DHA-SがFL-細胞の形態に及ぼす影響を電子顕微鏡によって観察したので、その結果についてもあわせて報告する。

#### 材料および方法

##### 1. DHA-Sの濃度

DHA および DHA-S は Fig. 1. に示した構造式をもつ。DHA-S は水にきわめて溶けやすく、食品に添加しやすい利点のために、保存料としては DHA よりもむしろ本品がよく用いられる。したがって本実験においても市販 DHA-S を使用した。含量は98.8%以上(120°C 5 hr 乾燥後定量)であり、実験濃度は食品に対して定められた使用基準量である0.5g/kg (0.05%) と、さらにその20倍量の濃度(1%)を設定した。

なお、細胞の培養実験には操作上培養液と等量に混合する関係で、いずれの濃度も上記の2倍濃度を作成し使用した。実験に先だち、ろ過滅菌を行った。

##### 2. 細菌の培養

###### 1) 菌株

使用菌株は *Escherichia coli*, N. I. H. J. 株と, *Staphylococcus aureus*, F. D. A. 209-P 株を用いた。

###### 2) 培養液の組成

培養は Brain-heart infusionbroth (以後 BHI と略称) 培地を使用した。培養液の組成を Table. 1. に示す。

Table. 1. Composition of Bacteria Culture Medium

|                                  | g/1000ml |
|----------------------------------|----------|
| Calf Brain Extract (Eiken)       | 200      |
| Cattle Heart Extract (Eiken)     | 250      |
| Peptone                          | 10       |
| Glucose                          | 2        |
| NaCl                             | 5        |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 2.5      |
|                                  | pH 7.4   |

DHA, DHA-S はともに効力が pH によって多少影響されるが、比較的解離しにくいために、中性附近でも効力があるとの報告もあり<sup>2)7)12)</sup>, pH は7.4に修正されてある培地をそのまま用いることにした。

###### 3) 前培養液

両菌株はともに BHI 培地 10 ml に斜面寒天培地より一白金耳を浮遊させ、それぞれ37°C 18 hr づつ2回前培養を行った。

###### 4) DHA-S の添加と培養および菌数の算定

蒸留水 300 ml に溶解させるべき BHI培養液成分量を、蒸留水 270 ml に溶解させた培養液を調製する。それに両菌とも前培養菌をそれぞれ 0.3 ml を無菌的に浮遊させた。十分に菌を浮遊させた後、90 ml づつの3群にそれぞれ分け、内2群に対しては、別に用意した DHA-S ろ過滅菌溶液 10 ml (最終的に培養液 100 ml 中に0.05%および1%濃度になるよう DHA-S を溶解させてある)を注入し、他の1群には滅菌蒸留水10 ml を加えて対照群とした。結果的に両菌ともに100 ml づつの実験用培地を作成した。このときの

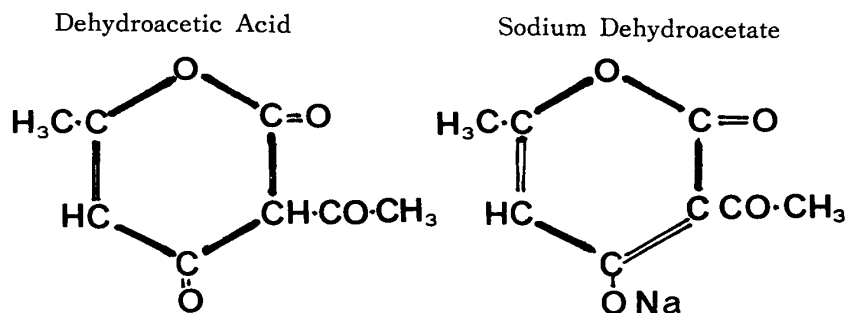


Fig. 1. Structural Formula

細菌数は、*E. coli* では $1.5 \times 10^6$ /ml, *S. aureus* では $5.5 \times 10^5$ /ml である。この菌浮遊液を $37^\circ\text{C}$ のふらん器内で培養し、3, 6, および24 hr ごとにそれぞれ0.1 ml を無菌的に採取、生理的食塩水で段階稀釈後HIB 寒天培地 (Table. 2. の組成に寒天を添加) に撒き、 $37^\circ\text{C}$  24hr 培養後30~300ヶ出現した菌数を読み、1 ml 当りの細菌に換算した。

### 3. 細胞の培養

#### 1) 細胞

使用細胞はヒト由来の正常羊膜である FL-株化細胞<sup>9)</sup>を使用した。

#### 2) 培養液の組成

培養液は実験の操作上2種類の濃度を作成した。

一般に使用する培養液は、Eagle の MEM 培地<sup>9)</sup>に L-グルタミンおよび仔ウシ血清を添加した培養液を作成した。その組成を Table. 2. に示す。pH は重炭酸ソーダ溶液で7.4に修正した。

Table. 2. Composition of Cell Culture Medium

|                                  |                           |
|----------------------------------|---------------------------|
| Minimum Essential Medium (Daiko) | 4.6g/500ml dis. water     |
| L-Glutamine (Waken)              | 5.0ml (14.6mg/5ml PBS(-)) |
| Calf Serum (Handai Biken)        | 25.0ml                    |
| NaHCO <sub>3</sub> (Waken)       | 5.0ml (7W/V%)             |

pH 7.4

今ひとつは、DHA-S 添加の実験操作上、上記組成の2倍濃度の培養液を作成して使用した。

#### 3) 細胞浮遊液の調製

3本の培養角びんを用意し、1本はつねに細胞の継代維持のための培養用に、他の2本を実験のための細胞浮遊液作成に供した。

前もって培養角びん2本の底面にそれぞれ80%の単層シートを形成させた細胞を、0.25%トリプシン PBS (-) 溶液 (Table. 3.) 4 ml で十分に分散させ、新たに注入した20 ml の培養液中に浮遊させる。その後2本の培養角びん細胞浮遊液を1本の培養びんにまとめ、

Table. 3. Phosphate-Buffer Saline PBS(-)

|                                  | g/1000ml |
|----------------------------------|----------|
| NaCl                             | 8.0      |
| KCl                              | 0.2      |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 1.15     |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | 0.2      |

その浮遊液0.1 ml をニグロシンで染色し、Fuches Rosenthal の計算板を用いて生細胞数を計算、さらに $2.5 \times 10^5$ /ml の均一な細胞浮遊液になるよう培養液で調製した。

#### 4) DHA-S の添加と培養および細胞数の算定

ファルコンポリエステル社製シャーレ (30×10 mm) 75枚に細胞浮遊液を2 ml ずつ移植し、 $37^\circ\text{C}$ , 5%CO<sub>2</sub> ふらん器内で培養して約60%の単層シートを形成させる。(培養後48 hr) 上清を除去後培養液で細胞を洗浄する。このシャーレを25枚ずつの3群に分け、内2群に対しては、その都度無菌的に調製したDHA-S 含有培養液 (0.05%および1%濃度になるよう各2倍濃度のDHA-S 水溶液と、2倍濃度の培養液を等量ずつ混合する。) を、他の1群には培養液のみを対照としてそれぞれ2 ml ずつ注入した。作用時間はいずれも5 min である。

その後、培養上清液を吸引除去、新しい培養液で洗浄を繰り返して薬剤を完全に除去した後、再び2 ml の培養液を注ぎ、 $37^\circ\text{C}$ , 5% CO<sub>2</sub> ふらん器内で培養、その後は培養液を交換することなく経日的に5枚ずつシャーレを採取、0.25%トリプシン PBS(-) 溶液で細胞を分散、ニグロシンで染色、不染の生細胞数のみを算定した。対照群についても同様操作を行った。但し、各群2枚はつねに電子顕微鏡試料に供した。

#### 4. 電子顕微鏡試料の作成と観察・撮影

シャーレの底面に形成された細胞シートをゴムラバーで集め、1%のグルタルアルデヒド・PBS (-) 溶液中に5 min 間浮遊させて細胞を固定する。グルタルアルデヒドを除去するため、PBS (-) 溶液で3回遠心 (3000回転, 10 min) 操作を繰り返した後、沈渣をペレット状に集め、寒天でサンドウィッチにした試料を、Bennt & Luft の方法<sup>10)</sup>に準じて作成した。包埋はEpon 812 を主剤とする Luft<sup>11)</sup>の方法に準じて行った。

超薄切片はPotter-Blum 型マイクローム (MR-1) により作成し、日立 HU-11PS 型電子顕微鏡を用いて、加速電圧75 KV で観察・撮影した。

## 実験結果

### 1. 細菌の増殖に及ぼす影響

DHA-S の *E. coli*, *S. aureus* に対する増殖抑制効果を対照と比較した結果を Fig. 2. および 3. に示した。いずれもシャーレ3枚についての実験を3回繰り返した結果の平均値である。1%添加群では、両菌とも培養後3hr からその増殖は抑制され、*E. coli* は3hr で対照群の約1/5, 6 hr で約 $1/3 \times 10^3$ , 24 hr では

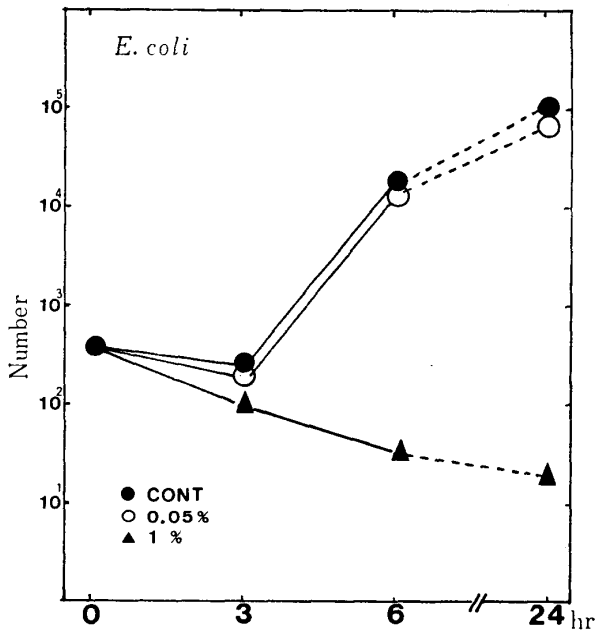


Fig. 2. Effects of DHA-S on the Growth of *E. coli*

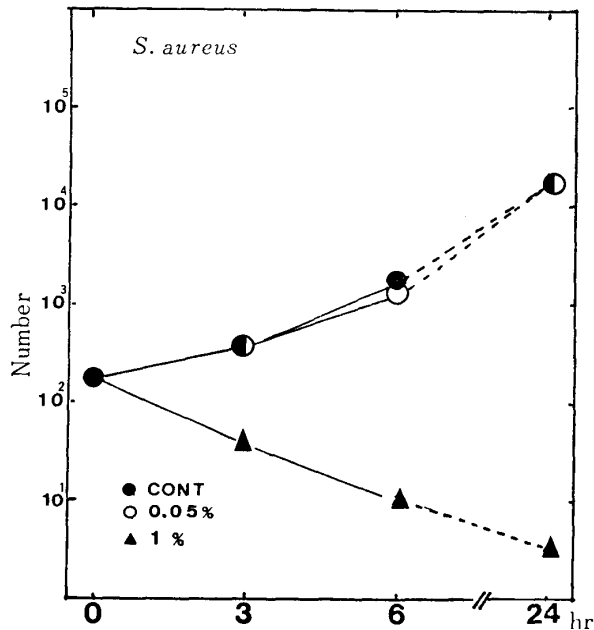


Fig. 3. Effects of DHA-S on the Growth of *S. aureus*

1/2×10<sup>3</sup>まで菌数は減少した。*S. aureus*は、3hrで約1/10、6hrで1/3×10<sup>2</sup>、24hrでは1/5×10<sup>3</sup>まで減少した。

0.05%添加群は、*E. coli*に対しては、3hr、6hrで対照群の約1/4、24hrでは4/5まで菌数は減少したが、*S. aureus*に対する抑制効果は低く、6hrで約6/10、24hrを経過した時点においては菌の増殖はまったく抑制されなかった。

## 2. FL-細胞の増殖に及ぼす影響

DHA-Sの0.05%および1%溶液を、単層シートを形成させたFL-細胞に5min作用させた後、新しく交換した培養液中における細胞の増殖に対する影響についての結果をFig.4および5.に示した。0.05%作用群では、対照群とほぼ同様の増殖経過をたどり、DHA-S作用の影響はほとんど認められなかった。

一方1%の濃度における影響は、作用後5日目においてもっとも顕著にあらわれ、細胞数は対照群に比し1/20に減少し、最初に移植した細胞数よりもさらに少なくなった。

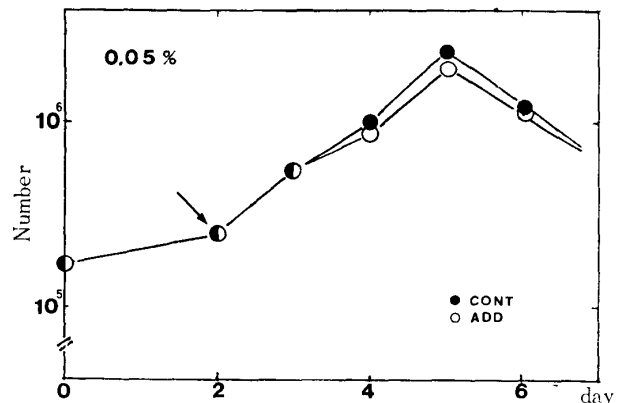


Fig. 4. Toxicity of 0.05% of DHA-S on FL-cells

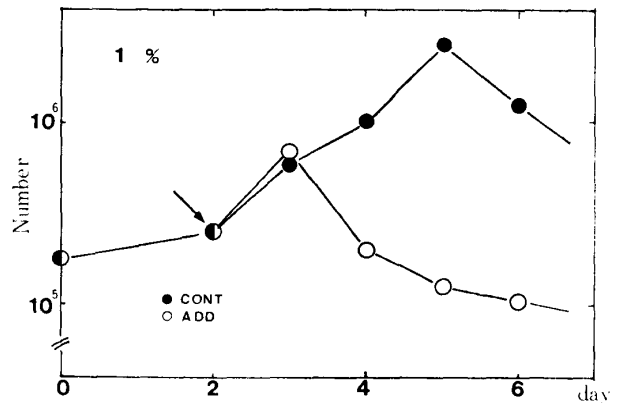
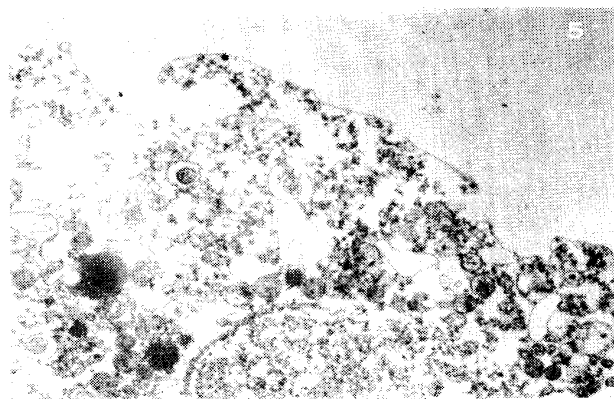
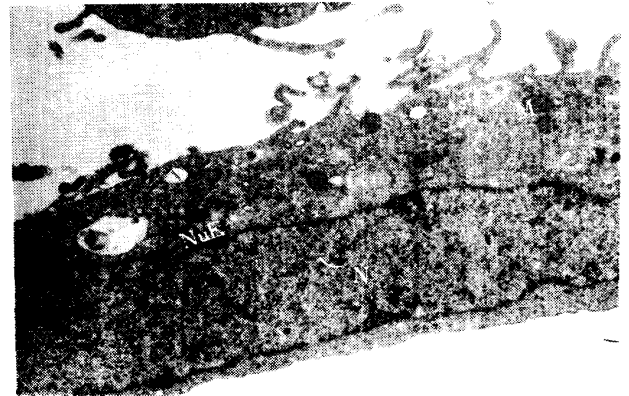
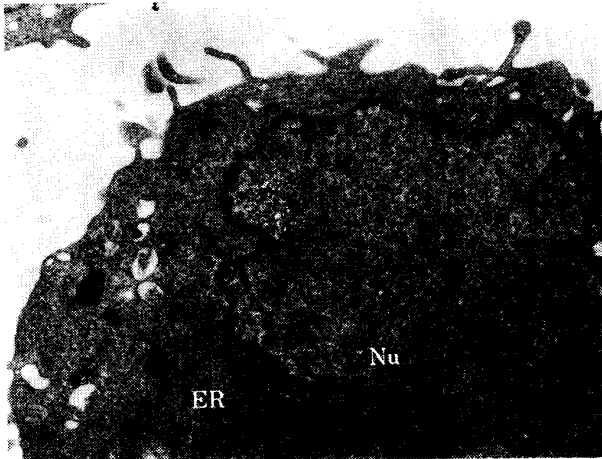
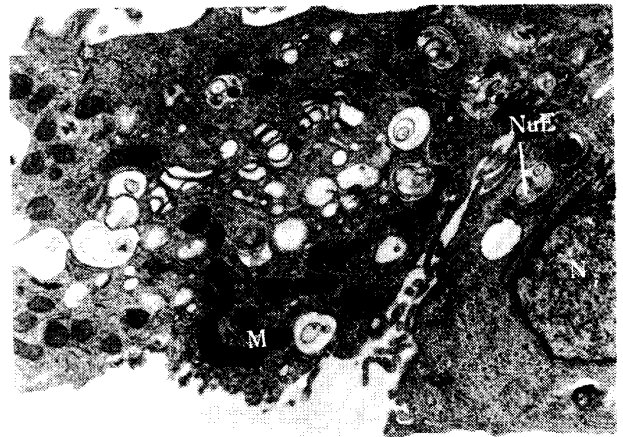
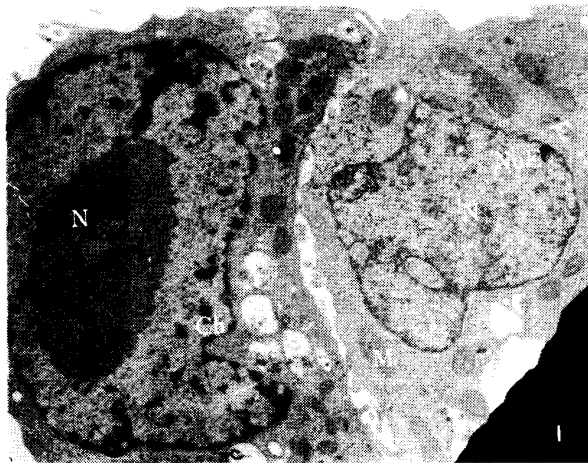


Fig. 5. Toxicity of 1% of DHA-S on FL-cells

## 3. FL-細胞の電子顕微鏡像

ヒトFL-細胞に1%のDHA-Sを作用させた場合の電顕像と正常細胞のそれをPhoto.1.~5.に示した。正常細胞においては、核(N)、核膜(NuE)、核小体(Nu)、ミトコンドリア(M)、粗面小胞体(ER)が明瞭に観察される。しかし、DHA-Sを1%作用させた細胞では、核膜(NuE)は凹凸をなくし、ミトコンドリア(M)は減少、細胞突起(Mv)も脱落し、さらに時間が経過すると(6日目)細胞変性は著しく、ミトコンドリア(M)は膨化し、核膜(NuE)、原形質膜(PM)が糸状に切断された像が観察された。



EXPLANATION OF PLATE

Photo. 1. through 5 show electron microscopic observations of FL-cells.

Photo. 1. Original FL-cell (x 6200)

Photo. 2. Control FL-cell cultivated for 5days (x 6200)

Photo. 3. FL-cell cultivated for 5days after treatment with 0.05% DHA-S for 5-min (x 6200)

Photo. 4. FL-cell cultivated for 5days after treatment with 1% DHA-S for 5min (x6200)

Photo. 5. FL-cell cultivated for 6days after treatment with 1% DHA-S for 5min (x6200)

N : Nucleus      Mv : Microvillus      NuE : Nuclear Envelope      PM : Plasma Membrane  
M : Mitochondrion      ER : Endoplasmic Reticulum      Ch : Chromatin

## 考 察

従来より食品添加物の毒性については、動物実験の結果が尊重されており、今もなおそのデータからヒトに対する安全性評価がなされている。しかし、一般に動物実験には莫大な費用と長い期間が必要であり、このことが多数の化学物質を対象とした試験を制約している。また、食品添加物が生活細胞の正常組織にとって異物であることについても異論はなく、したがってヒト由来細胞系レベルでの速やかな実験系の確立も望まれるべきものとする。

著者らは、まず、現在の使用基準である濃度（0.05%）とその20倍の高濃度（1%）を設定して大腸菌およびブドウ球菌に作用させ、その増殖効果を検討したのであるが、1%では両菌ともに3hr頃よりその増殖は抑制され、明らかに静菌の効果が認められた。

0.05%においては、大腸菌に対しては僅かに増殖抑制が認められたものの、ブドウ球菌は24hrを経過した時点では全くその効果は認められなかった。

相磯<sup>2)~5)</sup>らは、DHAの防腐効力を判定する場合の基礎となる、腐敗微生物に対する影響を系統的に実験

を行ない、「①好気性グラム陰性および陽性菌、嫌気性球菌、消化器系伝染病原菌、ならびに嫌気性芽胞菌に対して、DHA、DHA-Sは抗菌的に作用するほか、糸状菌・酵母・放線菌に対しても同様に作用する。②その抗菌作用は、強力なものではなく、むしろ抗菌力の弱い物質で大体500~1000倍で完全に発育を阻止する。したがって本物質はいわゆる抗菌性物質ということとはできない。なお高濃度においては、時間を要するも殺菌的な作用も有している。」と結論<sup>2)</sup>した。そのデータの一部分をTable 4. および5.にかかげておく。また、Wolf & Westveer<sup>12)</sup>らも相磯らとほぼ同様の結果を報告している。これらの報告と著者らの結果を比較するとき、培地、培養温度など培養条件に相違はあるが、食品添加物としての使用基準濃度である0.05%（2000倍）では微生物に対する抑制効果は小さいという点では一致した結果が認められた。

つぎに細菌の場合と同じ濃度のDHA-SをヒトFL細胞に単層を形成させた後、これに5min作用させその後の細胞の増殖に及ぼす影響を検討してみたが、0.05%の濃度では対照群との間には顕著な差は認められなかった。しかし、1%の濃度においては細胞に対

Table 4. Inhibitory Effects of DHA-S on the Growth of Saprophytic Bacterium<sup>2)</sup>

|                          | K  |    | x250 | x300 | x500 | x1000 | x2000 | x5000 |
|--------------------------|----|----|------|------|------|-------|-------|-------|
|                          | 24 | 48 | hr   |      |      |       |       |       |
| <i>Pseudomonas</i>       | ++ | ++ | -    | +    | +    | ++    | ++    | ++    |
| <i>Flavobacterium</i>    | ++ | ++ | -    | -    | -    | -     | -     | +     |
| <i>Achromobacter</i>     | ++ | ++ | -    | -    | -    | -     | -     | +     |
| <i>Proteus</i>           | +  | ++ | -    | -    | -    | -     | +     | +     |
| <i>Escherichia</i>       | ++ | ++ | -    | -    | -    | -     | +     | +     |
| <i>Serratia</i>          | ++ | ++ | -    | +    | +    | +     | ++    | ++    |
| <i>Micrococcus</i>       | ++ | ++ | -    | -    | -    | -     | +     | ++    |
| <i>Bacillus subtilis</i> | ++ | ++ | -    | -    | -    | -     | +     | +     |
| <i>B. mycoides</i>       | ++ | ++ | -    | -    | -    | -     | -     | +     |
| <i>B. mesentericus</i>   | ++ | ++ | -    | -    | -    | -     | -     | +     |

Table 5. Inhibitory Effects of DHA-S on the Growth of Pathogenic Bacterium<sup>2)</sup>

|                       | K  |    | x250 | x300 | x500 | x1000 | x2000 | x3000 |
|-----------------------|----|----|------|------|------|-------|-------|-------|
|                       | 24 | 48 | hr   |      |      |       |       |       |
| <i>Shigella</i>       | ++ | ++ | -    | +    | +    | +     | +     | +     |
| <i>S. typhi</i>       | ++ | ++ | -    | +    | +    | +     | +     | ++    |
| <i>S. Paratyphi</i>   | ++ | ++ | -    | +    | +    | +     | +     | +     |
| <i>B. Gaertner</i>    | ++ | ++ | -    | +    | +    | +     | +     | ++    |
| <i>S. typhimurium</i> | ++ | ++ | -    | +    | +    | +     | +     | +     |
| <i>Staphylococcus</i> | ++ | ++ | -    | -    | -    | -     | +     | +     |

して明らかな毒性を示し、この結果は電子顕微鏡像の観察によってもうらづけられた。以上の実験で細菌に対する増殖抑制効果と、細胞に対する毒性との相互関係について、明らかに証拠づけられたことになったが、このように株化ヒト培養細胞系を用い、僅かの処理時間での影響を観察する試みは、今後動物実験以前に簡単に行える毒性スクリーニングテスト法として、新しい方法を示唆したともいえよう。この手法を確立するためには、この種の実験により適した細胞の選択、培養条件などの検討などをさらにすすめる必要がある。

なお、DHA-S は保存料として果して価値ある添加物であろうか。確かに本実験からも現在の基準量はヒトの細胞に対して急性な毒性を与えていない。しかし、過去の抗菌作用に関するデータからも、本実験の結果からもその抗菌効果は低い。また現在、バター、マーガリン、チーズにのみ限られて許可されているが、マーガリンの使用の多い学校給食など、1日摂取量は必ずしも少なくない。慢性毒性に対する考慮も必要となろう。安全性とその作用効果をふまえて、食品添加物 DHA-S について今一度検討し直すべきではなからうか。

### 要 約

食品添加物 DHA-S の、*E. coli* および *S. aureus* に対する静菌の効果について検討した。また培養ヒト FL-細胞の増殖に及ぼす影響を検討した。DHA-S の作用濃度として、0.05%および1%を設定した。

1. 細菌に対する静菌効果は、1%においては完全に増殖を抑制したが、0.05%においては極く僅かにその増殖を抑制した。但し、*S. aureus* に対しては、24 hr を経過した時点では静菌の効果は認められなかった。
2. FL-細胞に対しては、1%濃度においては作用後5日目において著しく増殖を阻害した。0.05%濃度においては、増殖抑制効果は認められなかった。
3. 電子顕微鏡によって DHA-S の FL-細胞に対する形態学的影響を観察したが、1%濃度においては、退化的な細胞変性を来し、遂には細胞は破壊された。

### 謝 辞

本研究に際し御指導を頂いた京都府立医科大学・微生物学教室、管沼 惇名誉教授、岸田綱太郎教授に謝

意を表するとともに、研究のための機会と御助言をお与え頂いた水谷 民雄教授に深謝する。

(1979年7月28日 受理)

### 文 献

- 1) 宮木高明 (1951) : Dehydroacetic Acid の研究 (第1報), 腐敗研報, **4**, 1-3.
- 2) 相磯和嘉, 柳澤文徳, 柴田鉄郎, 小笠原龍雄, 中島三之丞, 那須昭夫, 松本控, 宮木高明 (1951) : Dehydroacetic Acid の研究 (第2報) DHA の防腐効果に関する基礎的研究, 腐敗研報, **4**, 4-8.
- 3) 相磯和嘉, 柳澤文徳, 柴田鉄郎, 中島三之丞, 宮木高明, 今川洋, 尾谷茂 (1951) : Dehydroacetic Acid の研究 (第3報) DHA の水産加工食品に対する防腐効果, 腐敗研報, **4**, 9-14.
- 4) 柳澤文徳, 柴田鉄郎, 小笠原龍雄, 松本控, 村磯旺嗣, 佐野達夫, 中村久敬 (1951) : Dehydroacetic Acid の研究 (第4報) DHA の植物性食品に対する防腐効果, 腐敗研報, **4**, 15-19.
- 5) 相磯和嘉, 柳澤文徳, 井野米次, 齊藤享, 小笠原龍雄 (1952) : DHA の二・三の加工食品に対する保存効果の実験的補遺, 腐敗研報, **5**, 1-4.
- 6) Wolf P. A. (1950) : Dehydroacetic Acid New-Micro-biological Inhibition, Food Technology, *JULY*, 294-297.
- 7) 川城巖, 藤井清次 (1963) : 食品衛生学, 相磯和嘉, 辺野嘉正夫, 川城巖, 松井武夫, 宮木高明, 豊川行平編, 朝倉書店, p. 298.
- 8) Fogh J., Lund R. O. (1957) : Continuous Cultivation of Epithelial Cell Strain (FL) from Human Amniotic Membrane, Proc. Soc. Exper. Biol. & Med, **94** 532-537.
- 9) Eagle H. (1959) : Amino Acid Metabolism in Mamalian Cell Culture, Science, **130**, 434.
- 10) Bennett H. S., Luft J. H. (1959) : s-Collidine as a Basis for Buffering Fixatives, J. Biophys. Biochem. Cytol, **6**, 113.
- 11) Luft J. H. (1961) : Improvement in Epoxyresin Embedding Methods, J. Biophys. Biochem Cytol, **9**, 409-414.
- 12) Walf P. A., Westveer W. M. (1950) : The Antimicrobial Activity of Several Substituted Pyrones, A. B. B. **28**, 201-206.