

ナフトキノ誘導体並びにメチル・イソプロピル・フェノールの 毒性と食品防腐作用に関する研究

千葉大学腐敗研究所(指導 相磯教授)

北 沢 吉 郎

KICHIRO KITAZAWA

昭和30年12月6日受付

I. methyl-naphthoquinone に関する研究

methyl-naphthoquinone は抗菌性を有し、グラム陽性球菌及び桿菌、糸状菌、酵母菌等の外、グラム陰性桿菌の一部にも広い抗菌像を示す物質であるが、生体に対する毒性が比較的低いことから、本物質を食品保存剤として応用することが実用化した。

既にビタミン K₃ (2-methyl-1,4-naphthoquinone) 並びにビタミン K₅ (4-amino-2-methyl-1-naphthol-hydrochloride) が保存剤として登録され、ジャム、ケチャップに 0.05 g/kg 以下、つくだ煮に 0.03 g/kg 以下、ねりうに、塩辛類、醤油に各々 0.1 g/kg 以下に添加することが厚生省より許可され広く使用されている状況である⁽¹⁾。

当研究所に於ては既に真銅⁽²⁾、伊東⁽³⁾等によつてメチルナフトキノ誘導体の抗菌性並びに防腐剤としての基礎的研究が行われ、本剤の実用化に寄与する所があつた。即ちメチルナフトキノ系物質が蛋白質の存在に於て抗菌力が減退する事以外には食品保存剤として適性のあることが指摘された。

併し本物質の毒性特に長期投与の場合の慢性中毒量を食品防腐剤としての見地から検討した研究は比較的少ない。

著者は抗菌力、防腐作用は特徴の外にこの点を明らかにする目的でビタミン K₃、K₅ 並びに M. N. Q (2-methyl mercapto 1,4-naphthoquinone) の3物質を用いて精細な実験を行い、その一部は相磯教授⁽⁴⁾により報告された所であるが、ここに実験成績の概要を報告し大方の御批判を仰ぎたい。

1. ビタミン K₃、K₅ の抗菌作用

ナフトキノ誘導体が抗細菌性並びに抗糸状菌作用を有することは Palmer⁽⁵⁾、Cooper⁽⁶⁾、Geiger⁽⁷⁾、Armstrong⁽⁸⁾、Atkinson⁽⁹⁾等により知られた所であり、又その抗菌機作については Cooper 等の必須アミノ酸のアミノ基とキノンのカルボニル基との結合による説、並びに Geiger 等の酵素

蛋白の SH 基との結合による説が広く認められている。

その抗菌作用はグラム陽性細菌と糸状菌、酵母菌に強く、又ある種のグラム陰性菌にも弱く作用する比較的広い抗菌スペクトラを有している。我国に於ても八田教授一門⁽¹⁰⁾を始め富安⁽¹¹⁾、佐藤⁽¹²⁾、中野、鉄本等及び当研究所に於て柳田⁽¹³⁾、宮木、相磯、伊東等により報告されている。その成績は大体類似したものであつて、合成培地に於て検定された場合は *Pseudomonas* 属を除いた被験菌の凡てに強い抗菌力を示し、蛋白質を含んだ培地に於ては特にグラム陰性桿菌に対する抗菌力が著明に低下することが強調されている。

著者は改めてビタミン K₃ について当研究所保存

第1表 ビタミン K₃、DHA、Furacin の
抗菌像比較 (単位 10⁻³)

菌 種	薬 剤	DHA-S	Furacin	V-K ₃
<i>Pseudomonas</i>		0.25	< 2.5	10
<i>Flavobacterium</i>		2	200	160
<i>Achromobacter</i>		4	300	160
<i>Proteus</i>		2	150	20
<i>Escherichia</i>		1	150	10
<i>Micrococcus</i>		1	5	20
<i>B. subtilis</i>		1	400	160
志 賀 菌		1	150	40
腸 チ フ ス 菌		1	200	10
ゲルトネル菌		1	200	10
葡 萄 球 菌		4	200	40
<i>Penicill. glaucum</i>		2	< 2.5	40
<i>Aspergillus niger</i>		1	< 2.5	80
<i>Mucor. mucedo</i>		2	2.5	10
<i>Willia anomala</i>		2	< 2.5	80
<i>Sacch. sake</i>		2	< 2.5	80
<i>Torula</i>		4	< 2.5	160

数字は最小阻止濃度、合成培地 24~48 時間培養。

になる各種腐敗細菌、病原細菌、糸状菌、酵母菌等 17 種を用い、1% glucose Czapek agar 培地に於て 27°C、48 時間培養してその抗菌力を Dehydroacetic acid (DHA) 及び nitrofurazone (Furacin) の 2 種の防腐剤のそれと比較した実験を行った。その成績を第 1 表に示す。

表の様に本物質は合成培地上にては *Pseudomonas*, *Escherichia coli* に於ても 1 万倍稀釈でその発育を阻止し、枯草菌類に 16 万倍、糸状菌、酵母菌に対しても 4~16 万倍の稀釈で阻止力を示している。この抗菌力の強さは細菌類については nitrofurazone のそれには遙に及ばないが、nitrofurazone が糸状菌に抗菌力を示さないのに比してまさり、又 DHA よりも全般的に強い作用を有している。所が本実験を peptone を 1% に加えた培地にて行ってみると抗菌力は激減しブドウ球菌の 4 万倍

が $1/2$ に、酵母菌が $1/4$ になり、グラム陰性桿菌には殆んど抗菌力を示さない様になる。この事は既に諸家の認める所であり、伊東はこのペプトン中の抗菌阻止因子の解明につとめた。この事実は本剤の防腐剤としての性能に制限のあることを示唆するものである。

2. 防腐剤としての特徴

抗菌物質を食品防腐剤として応用しようとする場合、化学療法剤として要求される限度よりも更に厳格な条件を必要とすることは言をまたないが、特に微生物に対する選択性の無いこと、食品中で抗菌力が著明には減少しないこと等は最も重要な問題である。

今本物質を nitrofurazone, Dehydroacetic acid と並べて防腐剤としての利点、欠点を比較してみると次表の様になる。

第 2 表 3 防腐剤の防腐作用の性能比較

防腐剤名	比較項目		抗腐敗菌作用		微生物に対する選択性		防腐効果を低下させる因子			
	作用の本態	強弱	有 効 菌	無 効 菌	食品 pH	食品成分	熱	光線		
Nitrofurazon (Furacin)	発育阻止作用 殺菌作用 (誘導期延長)	強	大部分の好気性 嫌気性細菌 腸管系病原菌	糸状菌、酵母菌、 球菌の一部、 ブドウ球菌、 モナス属	pH 4~8 の範囲で安定	影響殆 んどなし	安定	低下		
Methylnaphthoquinone (Vitamin K ₃)	発育阻止作用 (誘導期延長) 活性 SH 基との結合	相当強	糸状菌、酵母菌、 グラム陽性細菌 グラム陰性細菌の一部	グラム陰性細菌の大部分	pH 4~8 の範囲で安定	蛋白質の存在で著明に低下	安定	やや低下		
Dehydroacetic acid (DHA, DHA-S)	発育阻止作用 (適応酵素毒)	微弱	糸状菌、酵母菌 大部分の細菌	稀に抵抗菌	安定	殆んどなし	安定	安定		

即ち微生物に対する抗菌力の選択性と云う点では DHA が最適であり、本剤がこれに次いでおりその安定性と云う点では DHA に劣り、抗菌力の強さの点で DHA に勝るといふことになりそれぞれ一長一短は免れない。

3. 各種食品の防腐実験

a) ジャム類：桃ジャム、リンゴジャム等の自製のものに V-K₃ (武田製カビノンを再結晶したもの) をそれぞれの濃度に添加して 27°C に保存して自然腐敗をさせて、その防腐効果を判定した。その成績は第 3 表の如くである。

桃ジャムでは対照無添加のものが 10 日で発カビし、次で異臭を生ずるのに対して 5000 分の 1 に本剤を添加したものは 20 日間発カビ、異臭の発生なく良好の状態に保存された。1 万分の 1 添加では 20 日で僅に発カビするがまだ有効であるが 4 万分の 1 では効果は充分でない。

リンゴジャムでは 2 万分の 1 で 20 日間完全に防腐できた。使用許可量は 2 万分の 1 量であるからジャム類にはほぼ目的を達する事ができよう。

b) トマトケチャップ：自製のトマトケチャップに就いて実験したが 2 万分の 1 の添加量では稍不足する様に思われた (第 3 表)。

c) 小豆餡：20% に加糖した食餡に添加した場合には 1 万分の 1 で有効、2 万分の 1 量の添加が限界であつた。その効果は DHA, Furacin に比して遜色の無いものであつた。

d) 佃煮類：製造元より防腐剤の添加していない製品を購入しこれに本剤を添加して実験した。昆布佃煮の場合は対照は 10 日で発カビしたのに対し 2 万分の 1 では完全に、4 万分の 1 では稍不完全に防腐できた。アサリ佃煮では対照が 6 日で発カビしたのに対し 1 万分の 1 の量では 16 日以後僅に発カビし、2 万分の 1 量では 12 日で軽度のカビが発生した。4

第3表 V-K₃の防腐効果 (27°C 保存)

材料名	桃ジャム	リンゴジャム	トマト ケチャップ	
日数	濃度 変化	五 一 二 四 対 千 万 万 万 照	五 一 二 四 対 千 万 万 万 照	五 一 二 四 対 千 万 万 万 照
2	腐臭 カビ	— — — — — — — — — —	— — — — — — — — — —	— — — — — — — — — —
4	腐臭 カビ	— — — — — — — — — —	— — — — — — — — — —	— — — — 土 — — — — —
6	腐臭 カビ	— — — — — — — — — —	— — — — — — — — — —	— — — 土 + — — 土 + +
8	腐臭 カビ	— — — — — — — — — +	— — — — — — — — — +	— — — + + + — — + + + +
10	腐臭 カビ	— — — — — — — 土 + +	— — — — — — — — — +	— — + + + + — — + + + +
12	腐臭 カビ	— — — 土 + — + + + +	— — — — + — — — + +	土 + + + + + — + + + + +
14	腐臭 カビ	— — — + + — + + + +	— — — + + — — — + +	+ + + + + + — + + + + +
16	腐臭 カビ	— — + + + — 土 + + +	— — — + + — — — + +	
18	腐臭 カビ	— — 土 + + — 土 + + +	— — — + + — — — + +	
20	腐臭 カビ	— + + + + — + + + +	— — — + + — — — + +	

万分の1量では効果は不充分であつた。小豆、佃煮類の防腐効果を表示すると第4表の如くである。

e) 醤油: ポーメ15°の防腐剤無添加の醤油を野田醤油株式会社より分与をうけ本剤を添加して27°Cに保存して観察した。対照は8日で発カビしたのに対し2万分の1量までは30日間完全に発カビ防止ができ、4万分の1では24日で発カビした。その成績は第5表に示した。

f) 本剤の食品に対する防腐、防カビ効果については諸家の報告がある。ジャム類については山田⁽¹⁴⁾は1万分の1量の添加で完全に防カビができるとし、佐藤は4~5mg%で有効としている。ウニの塩辛類では富安は10mg%で有効を認め、醤油については山田は100 p. p. mを必要とするとし、佐藤は1.5mg%で有効であると記載している。生筍については佐藤は4~5mg%で効果を認めている。これ等の成績は著者の実験成績と大体に於て一致しており、蛋白質を多量に含有していない食品について

第4表 V-K₃の防腐効果 (27°C 保存)

材料名	小豆 (20% 加糖)	昆布佃煮	あさり佃煮
日数	濃 度 変 化	五 一 二 四 対 千 万 万 万 照	五 一 二 四 対 千 万 万 万 照
2	腐臭 カビ	— —	— —
4	腐臭 カビ	— —	— —
6	腐臭 カビ	— —	— —
8	腐臭 カビ	— —	— —
10	腐臭 カビ	— —	— —
12	腐臭 カビ	— —	— —
14	腐臭 カビ	— —	— —
16	腐臭 カビ	— —	— —
18	腐臭 カビ	— —	— —
20	腐臭 カビ	— —	— —

第5表 V-K₃をポーメ15°醤油に添加した場合の効果 (27°C 保存)

濃度	日数	2	4	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30
5000×	対照	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
10000×	対照	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
20000×	対照	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
40000×	対照	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
80000×	対照	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
160000×	対照	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
対照	対照	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

は本剤が防腐、防カビ剤として実用価値の少ないことを立証したものである。

4. 急性中毒量

本剤の薬理、生理作用については比較的よく調べられており、その抗出血性作用の故に血液凝固促進ビタミンとして医学的利用の道が拓かれたのである。

本剤の毒性ことに急性中毒量については山田⁽¹⁰⁾はマウスを用い経口投与による LD 50 を算定しているが氏によれば LD 50 は 0.46 g/kg である。

著者はマウスを用いゾンデによつて強制経口投与を行つた場合の LD 50 を Behrens Körber 氏法により算定した。そのときの実験値を示せば第6表の如くである。

第6表 V-K₃並びに V-K₅の経口投与の場合の急性中毒量 (マウス LD 50)

1. Vitamin K₃ (Behrens Körber 氏法による算定)

投与量 (g)	0.825	0.700	0.575	0.450	0.325	0.200
経過						
生	0	1	2	2	3	5
死	5	4	3	3	2	0

LD 50 (マウス) 0.44g/kg

2. Vitamin K₅

投与量 (g)	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3
経過						
生	0	1	0	3	4	5
死	5	4	5	2	1	0

LD 50 (マウス) 0.51g/kg

即ち V-K₃ では LD 50 は 0.44 g/kg 又 V-K₅ のそれは 0.51 g/kg であつて稍 K₅ の方が毒性が低い様な結果になつた。その際の中毒症状は四肢のけいれん、全身の震え等であつた。

5. 慢性中毒

著者はラッテを用い本剤の長期投与による慢性中毒の状況を見るため次の方法により実験を実施した。

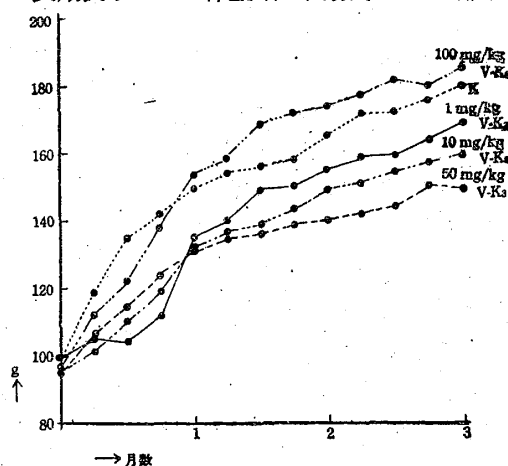
100 g 以下のラッテ1群6匹づつを用意し、予め2週間飼育して健康状況を調べておいた上、K₃ 及び K₅ のアラビヤゴム浮遊液をゾンデを以て1日1回、1週6日投与し3カ月に及んだ。薬剤の濃度は K₃ は体重 1 kg 当り 1 mg, 10 mg, 100 mg の3段階、K₅ は 10 mg のみとした。動物の飼料は小麦粉、カゼイン、粉乳、バター、食塩、炭酸石灰の混合飼料を用い、体重の測定は1週間毎に前後3日間正午前後に測定しその平均値をとり、更に6匹の平均値をとつて体重増加曲線を書いて観察した。対照動物にはアラビヤゴム溶液のみを同様の方法で投与した。実験の経過中1カ月毎に各群の一部を撲殺して臓器の重量を測定し更に組織標本を作成して病変を検索した。

体重の増加：今1カ月毎の体重表を示せば第7表の如くなる。又1週間毎の体重増加曲線を描けば第1図の如くなる。

第7表 2-methyl-1.4 naphthoquinone の長期投与による体重表

投与量	番号	性別	始めの体重 (g)	1カ月	2カ月	3カ月
V-K ₃ 1 mg/kg	13	♀	100	155	167	175
	15	♂	80	120	175	195
	18	♂	110	160	170	
	33	♀	113	120	148	
	40	♂	105	125		
V-K ₃ 10 mg/kg	41	♀	85	130		
	7	♀	85	120	135	150
	10	♀	90	150	150	155
	31	♀	100	135	128	
	32	♂	105	140	155	
V-K ₃ 100 mg/kg	35	♀	105	130	143	
	39	♂	85	118		
	2	♀	85	140	162	175
	30	♀	105	138	165	175
	29	♀	85	120	130	
V-K ₃ 10 mg/kg	26	♀	110	175	195	
	37	♂	110	180		
	38	♂	90	170		
V-K ₅ 10 mg/kg	21	♀	80	110	123	135
	22	♀	95	125	140	155
	34	♀	95	135	158	160
	23	♂	110	160	175	
	27	♀	110	155	170	
対照 平均値	42	♀	90	110		
			100	146	160	180

第1図 2-methyl 1.4 naphthoquinone の長期投与による体重増加曲線 (6匹平均値)



即ち K_3 , 1 mg/kg 群は対照動物群と殆んど差異はなく体重の増加が認められた。10 mg/kg 群は稍劣つて悪影響があるかの如く見えるが、最も大量の 100 mg/kg 群は反つて対照より増加率が良くなっている。 K_5 , 10 mg/kg 群も対照と同様に経過した。この曲線からみて各投与濃度に於ては3ヵ月後も体重の増加に及ぼす悪影響はないものと判定して差支えないと思われる。

尚実験中動物に異常症状を云うべき変化を見出すことは出来なかつた。

臓器重量：投与各1ヵ月毎に撲殺した動物について肝、肺、脾、腎、心、睪丸の各臓器の重量を測定した。その成績は第8表に示した。

第8表 2-methyl 1.4 naphthoquinone の
長期経口投与によるラットの臓器重量 (g)

投与量 (g/kg)	投与 月数	撲殺時 の体重	肝臓	肺臓	脾臓	腎臓	心臓	睪丸
V- K_3 1 mg/kg	3	175	5.5	2.8	0.9	2.2	1.1	
	3	195	8.1	1.7	2.4	2.0	1.0	2.4
	2	170	6.7	2.7	1.0	2.5	1.3	1.9
	2	148	5.8	2.0	0.8	2.2	0.9	
	1	125	4.5	1.6	0.6	1.6	0.8	1.8
	1	130	5.4	1.9	0.7	1.8	0.6	
V- K_3 10 mg/kg	3	150	6.6	1.7	0.7	1.4	0.6	
	3	155	6.5	1.8	0.9	1.8	0.9	
	2	128	5.8	3.7	0.6	1.9	0.9	
	2	155	7.4	2.2	1.4	2.2	1.0	2.6
	2	143	6.8	3.5	1.5	2.7	1.2	
	1	118	6.2	1.8	1.0	1.6	0.8	1.8
V- K_3 100 mg/kg	3	175	5.8	1.3	1.0	1.2	0.8	
	3	175	6.8	1.3	1.4	1.6	0.8	
	2	130	4.8	2.4	0.7	1.2	0.8	
	2	195	7.2	2.5	1.2	2.3	1.2	
	1	180	8.5	1.7	1.1	2.3	1.0	2.2
	1	170	7.8	2.2	1.0	2.3	1.1	2.6
V- K_5 10 mg/kg	3	135	5.3	1.6	0.8	1.6	0.8	
	3	155	6.6	2.7	1.1	2.6	1.3	
	3	160	6.0	1.7	0.7	1.6	0.7	
	2	175	8.0	2.3	1.3	2.0	0.6	1.8
	2	170	7.5	2.4	1.3	1.7	1.3	
	1	110	4.6	1.3	0.8	1.2	0.6	
対 照	3	178	6.6	2.0	0.5	1.8	0.7	
	3	168	6.4	2.1	0.9	2.0	0.9	2.2
	2	149	5.4	1.8	0.6	1.6	0.7	1.7
	2	141	6.4	1.3	0.6	2.0	0.8	

いづれの濃度に於ても有意の差を思わせる萎縮或は肥大を見出す事はできなかつた。但し動物の中に肝に寄生虫を保有しているものがあつた為に若干の測定誤差を免れない。

病理組織学的所見：各臓器の組織学的病変と薬物の投与との関係を律する為に、著者は故石橋豊彦教授の御意見に従つて次の如き標準をもつて判定した。同一の環境で飼育した対照動物の標本をよく見た上で対照動物にも屢々見られた軽度の肝臓の Stannig, Zellprotoplasma Degeneration, Periphäre Fettinfiltration 等は直接薬剤による病的所見とは見做さず、Glissonsche Scheide の部の細胞浸潤も軽度のものは除き、専ら細胞核の変性、強い脂肪変性、壊死等に重点を置いた。腎臓については脂肪変性、グロメルルスの変化を観察した。この様な規準に従つて検索した結果は第9表に示した。

第9表 2-methyl-1.4-naphthoquinone の
長期経口投与の病理組織学的所見 (ラット)

投与量 (g/kg)	投与月数	肝	腎
V- K_3 0.001	1	正 常	正 常
	2	正 常	正 常
	3	正 常	正 常
V- K_3 0.01	1	正 常	正 常
	2	正 常	正 常
	3	正 常	正 常
V- R_3 0.1	1	正 常	正 常
	2	細胞萎縮	正 常
	3	壊 死	正 常
V- K_5 0.01	1	正 常	正 常
	2	正 常	正 常
	3	脂肪変性 細胞核変性	脂肪変性

即ちビタミン K_3 では 1 mg, 10 mg 群は 3 ヶ月までは肝、腎共に病的所見を認めることはできなかつた。しかし 100 mg 群では 2 ヶ月投与のものに肝では細胞萎縮が認められたが軽度、腎ではまだ正常であつた。3 ヶ月後のものでは肝に細胞の壊死が見られ、明らかに毒性の限界と認められた。ビタミン K_5 群では 10 mg 投与のものの 3 ヶ月のものに肝に比較的強い脂肪変性、細胞核の変化が見られ、腎にも脂肪変性をみた。この場合は K_5 の方が K_3 より強い毒性を示している様に思われた。

II. 2-methylmercapto-1.4-naphthoquinone (M. N. Q) に関する研究

1952年伊東⁽³⁾は宮木、池田等が合成した1.4-naphthoquinoneの2位置換体の内2-methylmercapto 1.4-naphthoquinone (M. N. Q) について抗菌性を検討しこのものがビタミン K₃ よりも強い抗菌力を示し、且つペプトン培地で抗菌力の不活性化の少いことを報告している。又真銅⁽²⁾もこの点を特に追求し M. N. Q の抗菌力は10% peptone, 10% meatextract, 0.1% cystein, 0.1% Na₂SO₄ 等の存在で激しく減退するが0.5% ペプトンではそれ程著明でなく5% glucose, 5% starch, 0.1% cystin, 1% tyrosin, 10% guanidin 等の存在では殆んど不活性化が見られないことを見出している。伊東の報告から Czapek 培地で示された M. N. Q の抗菌像と1% peptone Czapek でのそれを比較してみると次の表の如くである。

第10表 M. N. Q の抗菌スペクトラム (agar streak method) 単位 10⁻⁴

被 験 菌	培 地	合成培地	合成培地 + 1% ペプトン
E. coli		2.5	< 2.5
Staphy. albus		20	10
B. subtilis		40	10
S. lavendulae		20	10
Oidium lactis		10	5
Sacch. sake		20	10
Willia anomala		20	10
Torula rubra		20	10
Asp. niger		20	10
Pen. glaucum		20	10
Muc. javanicus		20	10

これらの報告から判断しても M. N. Q はビタミン K₃, K₅ よりも防腐剤の性能が高くなっていると思われるが、その毒性はどの様であるかを知ることが興味ある事と考え次の実験を行った。

M. N. Q の毒性

本剤の薬理作用については小林、萩原⁽¹⁵⁾によって行われた。著者の実験ではマウスの経口投与の場合の LD 50 は第11表の如くである。

即ち急性毒性は K₃, K₅ よりも顕著に低くなっていることがわかる。

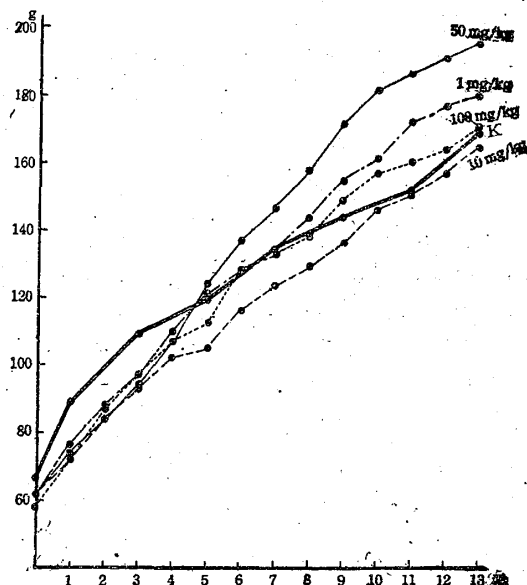
慢性毒試験はビタミン K₃, K₅ の方法に準じて行なった。投与量では1 mg/kg, 10 mg/kg, 50 mg/kg, 100 mg/kg の4系列とした。

第11表 M. N. Q. のマウス経口投与による急性中毒量

投与量 (g)	1.1	1.0	0.9	0.8	0.7	0.6
生 過	0	1	3	4	4	5
死	5	4	2	1	1	0

LD 50 (マウス) = 0.89 g/kg

第2図 M. N. Q. 長期投与によるラットの体重曲線 (平均値)



体重の増加: 各群の平均体重増加曲線は第2図に示した。投与期間は3ヵ月とした。

即ち各群共対照と同様の体重増加の傾向を示し、薬剤の体重に及ぼす障害を認めることができなかった。

臓器重量: 薬剤投与1ヵ月, 2ヵ月, 3ヵ月毎に撲殺した動物の各臓器の重量を測定した成績は第12表の如くで肝, 腎, 肺, 脾, 心, 睪丸いづれも対照動物のそれに比して著しい差異を認めなかった。

病理組織標本所見: 主として肝, 腎の病的変化を重点的に検査したが肺, 脾の変化も併せ観察した。判定の規準は V-K₃ の場合に準じた。1 mg/kg 群は1, 2, 3ヵ月投与動物共に軽度の鬱血と脂肪変性が見られたが、いづれもアラビヤゴム投与群の対照動物のそれに見られる程度のもので、薬物の直接影響ではないと判定される。肝細胞の萎縮の見られたものもあるが壊死や細胞核の変化は見られなかった。腎臓に軽い濁腫脹を見るのみで強い変化はなかった。

10 mg, 50 mg/kg 群共に1 mg 群に比して強い変化と思われるものは見られなかった。

第12表 M. N. Q 長期投与ラットの臓器重量(g)

投与量	使獣 番号	性	投与 月数	体重	肝	腎	肺	脾	心	睾丸
50 mg/kg	37	♀	1	75	3.8	1.0	1.0	0.7	0.7	
	49	♀	1	110	5.2	2.2	1.8	0.8	1.0	
	18	♀	2	150	6.5	1.2	1.4	0.4	0.8	
	38	♀	2	172	7.8	1.2	1.6	0.5	0.6	
	3	♀	3	172	8.0	1.6	1.9			
	4	♀	3	160	5.3	1.6	2.0	0.6	0.8	
	17	♂	3	195	8.6	1.6	1.8	0.9	1.0	2.0
100 mg/kg	19	♂	3	255	9.0	2.0	1.3	0.6	1.2	2.6
	48	♀	1	120	7.2	1.3	3.1	1.1	1.0	
	46	♂	1	135	5.2	0.8	0.8	0.5	0.5	1.6
	34	♀	2	108	4.2	0.8	1.3	0.4	0.5	
	47	♀	2	160	5.9	2.2	1.9	1.1	1.1	
	10	♂	3	195	6.7	1.8	2.0	0.6	1.0	2.2
	12	♀	3	175	5.6	1.6	1.3	0.6	1.0	
	33	♀	3	165	6.2	1.2	1.2	0.7	0.8	
	35	♀	3	142	4.3	1.2	1.1	0.5	0.6	

対照は V-K₃ の表に示してある。

第13表 M. N. Q 長期投与による白鼠の臓器の組織学的変化

投与量	投与 月数	肝	臓	腎	臓
100 mg/kg	1	正常	壊死及び 細胞核の 変化なし	正常	皮質細胞浸潤 あるものあり
	2	正常		正常	
	3	正常			
50 mg/kg	1	正常	壊死及び 細胞核の 変化なし	正常	
	2	正常		正常	
	3	正常		正常	
10 mg/kg	1	正常	軽度の肝 細胞変性	正常	
	2	正常		正常	
	3	正常?		正常	
1 mg/kg	1	正常		正常	
	2	正常		正常	
	3	正常		正常	
対 照 (アラビ ヤゴム)	1	正常	鬱 血	正常	軽 度 の 濁 腫
	2	正常	軽 度 の 脂肪変性	正常	
	3	正常	軽 度 の 細胞萎縮	正常	

100 mg/kg 群は肝に於て周辺部の細胞浸潤が多少認められた外は特に病的所見が強くなっている像は見られない。腎臓に於て皮質細胞の浸潤が現われているが著明ではなく V-K₃ の 100 mg, 3 カ月投与群

に於けるが如き強い中毒像はこれを見ることはできなかった。次のその所見の一覧表を第13表に掲げる。

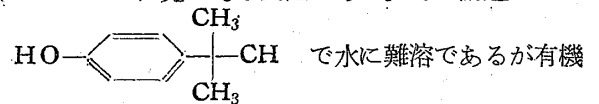
以上の毒性検査の結果は、急性中毒量、慢性中毒量共に V-K₃ よりも低い値が示された事になるがこの差異が本質的なものであるか否かはにわかに判定することはできない。只少く共 M. N. Q が V-K₃, V-K₅ に比し毒性が強くなつていないと云う事は云えると思う。

III. 3-methyl-4-isopropyl-phenol

(Biosol) の研究

Biosol は 1954 年大阪有機合成株式会社に於て庄野唯衛博士によつて合成された Thymal の同族体である 3-methyl-4-isopropyl-phenol・C₆H₃ (C H₃) OH (CH₃—CH—CH₃) の商品名である。

本剤は無色、無味、殆んど無臭の針状結晶で m.p 111~112°C, 光に対し安定である。その構造は



溶剤に易溶である。その溶解度は次の如くである。

第14表 Biosol の溶解度

溶 剤	22°C に於ける溶解度
水	0.014%
アル コ ー ル (99.5%)	31.0%
アルコ ー ル (局方 91%)	10.7%
ク ロ ロ ホ ル ム	2.5%
エ ー テ ル	20.0%
グリセリン (局方 85%)	0.1%
流 動 パ ラ フ ィ ン	0.014%

チモールが防腐性を有することは古くから知られているが Biosol も防腐性を有し細菌類、糸状菌、酵母菌に抗菌性を有することが大阪市立衛生研究所の田中氏⁽¹⁶⁾等によつて報告された。田中氏によれば本剤は細菌類に対し 0.01~0.02% で発育阻止を示し、糸状菌、酵母菌には 0.005~0.01% で有効であった。尤も本物質が難溶性であるので抗菌力試験は稍々困難であり田中氏は 50% アルコール溶液、或はプロピレングリコール溶液を用いており、一般的には倍数稀釈法が正確を欠くを免れない。

又大阪衛研に於ては本剤を各食品の防腐剤として応用した場合の効果をも検討しており、魚肉煉製品については Biosol 0.01%, 0.02% の混入で約 2 日間防腐効果を認めたと記載している。

Biosol の毒性

本剤の毒性についても大阪市立衛生研究所の報告⁽¹⁹⁾がある。この研究によればマウスを用い水中油乳剤として腹腔内に注射した場合の LD 50 は 0.47 g/kg であったと云う。又同じ方法で連続注射法による場合は kg 当り 0.3 g 以内では 22 日間の実験に於て生命の危険はなかった。次に経口投与の場合は Biosol 末 10 g, アラビヤゴム末 10 g, グリセリン 10 cc 及び生理食塩水 90 cc を乳化したものを体重 100 ~ 200 g 前後のラッテに餌料に 200 mg/100 g, 100 mg/100 g, 10 mg/100 mg, 1 mg/100 g の割合に添加して自由に摂取させて 3 カ月の実験を行つてゐる。その結果は一般状態に認め得べき障害がなかったと云う。しかし大量投与群では体重の増加に抑制が見られ、10 mg, 1 mg 投与群にはその悪影響がないと云う。尿の所見も異常がなく投与期間終了後の臓器の組織学的検索の結果も特に異常がなかったと云う。

急性中毒量：著者は大阪有機合成化学株式会社から提供された Biosol をアラビヤゴムを用いて懸濁液を作りゾンデを用いマウスの経口投与による LD 50 を測定した。その成績は第 15 表の如くである。

第 15 表 Biosol LD 50

投与量 (g)	3.5	3.0	2.5	2.0	1.5	1.0
生	0	3	3	4	3	5
死	5	2	2	1	2	0

LD 50 2.55 g/kg

即ち急性毒は非常に低いと云うことになるが、本剤が非溶解性であることを特に考慮する必要がある。又 3 g/kg, 2 g/kg, 0.75 g/kg, 0.5 g/kg づつを 1 回投与して 1 週間後撲殺して各臓器を組織学的に検索したが 3.0 g 群にも特別の病的所見は見られなかった。

慢性中毒量：ビタミン K₃, M. N. Q 等で用いた方法と全く同じ方式にて 1 日 1 回強制投与して 6 カ月の実験を行つた。薬剤の濃度は 0.05 g/kg, 0.1 g/kg, 0.5 g/kg, 1.0 g/kg の 4 段階とした。実験の全経過を通じて動物は特に目立つた症状を示したものは見られなかった。今 1 カ月毎の体重表を示すと第 16 表の如くなる。

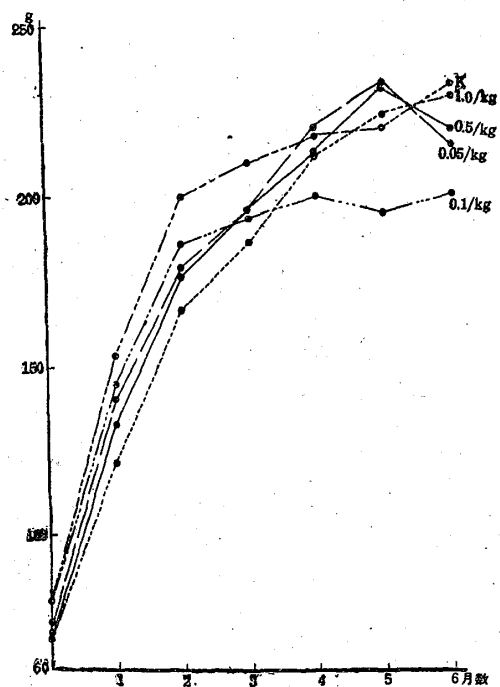
又各群の平均体重増加の曲線を第 3 図に示す。

0.05 g, 0.5 g, 1.0 g 群共順調に体重増加を示し 5 カ月までは対照動物群と全く同様に経過した。0.05,

第 16 表 Biosol 経口投与によるラッテ体重表

投与量	月数	番号	開始時 体重	1 カ月	2 カ月	3 カ月	4 カ月	5 カ月	6 カ月
0.05 g/kg	6	18	90	155	195	215	245	235	215
	5	19	70	155	200	225	245	230	
	4	20	70	135	150	160	170		
	3	32	65	140	170	185			
0.1 g/kg	6	13	80	150	190	205	210	200	200
	5	16	80	115	180	175	195	190	
	4	28	70	150	195	195	190		
	3	31	70	148	180	200			
0.5 g/kg	6	8	80	140	190	210	215	215	220
	5	34	75	145	190	210	225	250	
	4	30	65	115	165	190	200		
	3	9	65	130	165	180			
1.0 g/kg	6	27	70	125	195	215	250	250	230
	5	29	65	135	170	180	180	200	
	4	33	75	115	150	185	205		
	3	3	65	110	150	170			
対 照		23	85	140	180	190	205	210	
		24	85	155	190	200	230	225	230
		25	90	165	200	220	230	220	235

第 3 図 Biosol 長期投与による体重曲線



0.5 g 群が 5 カ月後稍下向してきたが、最も大量である 1.0 g 群は対照と同様の成績を示した。又 0.1 g 群は 4 カ月頃より増加率が低下しているが、これも薬

剤の濃度に並行していない点を考慮しなければならない。

又各群撲殺例について病理組織学的検査を実施中であるが、概略して強い病的所見は見られない様であった。尙詳細については別報で述べることにする。

IV. 考按並びに総括

考 按

戦後抗菌性物質の研究が目覚ましく発展して治療医学に長足の進歩をもたらしたが、食品防腐剤の方面にも著しい前進を見た。

相磯、宮木、柳沢、八田各教授を始めとして多くの研究者により新しい防腐剤が登場し、methyl naphthoquinone はもとより、DHA, nitrofurazone, Sorbic acid 等が許可され、食品の鮮度保持に多くの貢献をなしていることは周知のことである。

methyl naphthoquinone もこの様にして出現した食品保存剤であるが、その性能を十分に発揮する為には蛋白質を主成分としない。含水炭素、脂肪等の食品を選び且つバクテリアよりもカビの害の多い食品を選ぶべきである。このことは伊東、真銅等の早くから強調している所であるが、著者の実験もこれを裏書きしている。

methyl naphthoquinone の毒性は K_3 では 10 mg/kg を一応の目安とすれば成人では 500 mg となり、現在許可されている全食品に添加されていて、これを毎日食べると仮定しても、1日の全量は 10~20 mg であつて、尙 50~25 倍の安全度を見ることになる。従つて現在許可されている程度では本剤の毒性について懸念する必要はないと思われる。しかし本剤が決して無害ではなく例えば 100 mg/kg を3ヵ月連用すると肝臓に明らかな病変が見られたことは本剤の誤用を充分注意すべきである。

M. N. Q は宮木が合成し、相磯が早くから抗菌力を研究していたものであるが、著者により毒性が意外に低いものであることが今回明らかにされた。その化学構造と毒性の低下については著者はなお多くの研究を必要とするものとするが、防腐剤として $V-K_3$ にまさるものと推定している。

Thymol は石炭酸、クレゾールに比し抗菌力が強いがその毒性が懸念されて防腐剤としては我国では禁止されている薬剤である。併しその毒性は石炭酸やクレゾールに比してそれ程強いものではなく、駆虫剤として用いる場合はときに 8 g (0.16 g/kg) 程度服用することがある。

Thymol は又刺激性の臭いがあり、胃腸障害が副作用として伴うものである。

Thymol は同族体である Biosol は Thymol のもつ防腐力を生かして、臭いをなくし、毒性を低下させたもので、防腐剤として実用価値が検討されつつある物質である。

大阪衛研の報告と同様に著者の成績も本剤が意外に毒性の低いことは非溶解性にあることは充分想像される所であり、何等かの因子により腸管よりの吸収が高まるときはその毒性の発現を早めることも予想される所である。それにしても著者の実験は6ヵ月投与であるから若し蓄積作用のあるものなら、微量の吸収にしても毒性が更に強く現われるべきであろうと考えられる。

更に標本について組織学的検査を完了した上で詳細な検討を加えたい。

総 括

著者は食品防腐剤としての見地から methyl naphthoquinone, methylmercapto naphthoquinone の抗菌性、防腐効果、毒性について又 methyl isopropyl phenol の毒性について検討し次の如き結果を得た。

1. 各種腐敗細菌、病原細菌、糸状菌、酵母菌 17 種を用い合成培地に於て agar streak method により $V-K_3$ の抗菌像を DHA 及び nitrofurazone のそれと比較した。Pseudomonas, Escherichia 等のグラム陰性桿菌に 1 万倍希釈、他は 4~16 万倍希釈でその発育を阻止し広い抗菌像を示した。併し培地にペプトンを添加すると抗菌力は減退しグラム陰性菌に著しく阻止力を失う。

2. $V-K_3$ の防腐剤としての利点、欠点を、DHA, nitrofurazone と比較した。微生物に対する抗菌力の選択性と云う点では DHA が最適で $V-K_3$ がこれに次いでおり nitrofurazone はカビに抗菌性がない。熱、光、pH、蛋白質の存在等の条件に対しては $V-K_3$ は DHA に劣るか抗菌力の強さでは DHA に勝り、それぞれ一長一短のあることは免れない。

3. $V-K_3$ はジャム類、ケチャップ、小豆餡等に 2 万分の 1 量に添加された場合は実用的な範囲で防腐、防カビ効果を発揮する。佃煮類に対しては 1 万~2 万分の 1 量の添加で有効である。概してこれら澱粉質性の植物性食品の防腐に適當であり又動物性の食品でも加工してあつてカビ、酵母の害を受け易い様な食品に使用して効果の勝る薬剤と云うことができる。

4. V-K₃の急性中毒量はマウスの経口投与によるLD 50は0.44 g/kgであり、V-K₅のそれは0.51 g/kgであつた。

5. V-K₃の慢性中毒量を測定する為に白鼠を用い、薬剤のアラビヤゴム懸濁液を強制的に1日1回ゾンデで投与して3カ月の長期投与実験を行つた。薬剤の濃度はV-K₃はkg当り1 mg, 10 mg, 100 mg, V-K₅は10 mgであつた。

V-K₃の1 mg, 10 mg, 100 mg群, V-K₅の10 mg群共3カ月の投与中体重の増加は順調で対照のそれに比して劣ることはなかつた。各臓器の重量も対照のものに比して著しい変動は見られなかつた。

6. 肝、腎の病理組織学的所見ではV-K₃では1 mg, 10 mg群は肝、腎共に正常であるが、100 mg群は2カ月投与群で肝臓に細胞萎縮が中等度に見られ3カ月投与群では肝臓に壊死が見られ毒性の限界を示した。V-K₅群では10 mg投与でも3カ月経過のものに細胞核の変性が見られた。

7. M. N. Qの抗菌作用はV-K₃のそれよりも2倍以上強く且つペプトンの存在で不活性化される程度が弱かつた。

8. M. N. Qのマウスの経口投与による急性中毒量はLD 50が0.89 g/kgでV-K₃, V-K₅よりも低い値を示した。

9. M. N. Qの慢性中毒量試験はV-K₃の場合と

全く同様に行つたが1 mg, 10 mg, 50 mg, 100 mg群共体重増加曲線は対照動物のそれと大差なく、体重に及ぼす薬剤の悪影響は認められなかつた。

10. M. N. Qの長期投与動物のギセイ死による臓器の病理組織学的検査の結果は1 mg, 10 mg, 50 mg, 100 mg共明らかな病的所見を見出すことができなかった。その慢性中毒量はむしろV-K₃のそれよりも低いと云う成績が得られた。

11. methyl-isopropylphenol (Biosol)のマウス経口投与によるLD 50は2.2 g/kgであつて著しく毒性の低い物質であることが判明したが、本物質が水に難溶性であることを考慮すべきである。1回投与で3 g/kg, 2.0 g/kgのマウスのギセイ死させた臓器の病変には明らかな薬剤の作用は見られなかつた。

12. Biosolの慢性中毒量試験はV-K₃の場合と同様に行つたが、本剤の場合は投与期間を6カ月とした。薬剤の濃度は最高1.0 g/kgとした。

体重増加曲線は5カ月までは各群共対照と同様に経過し中等量のものは以後下降したが、高濃度のものでは反つて対照と同様に経過した。臓器の重量にも著しい異常はなかつた。病理組織標本による検査は目下続行中であるが概して本物質は吸収も悪く、蓄積作用もなく慢性毒性の低い物質と考えられ、Thymol 同族体としては進歩したものと云えよう。

終りに臨み御指導、御校閲を賜つた恩師相磯教授に深謝し、終始御指導、御助言を戴いた柳沢教授に感謝の意を表すと共に、懇切なる御教示を賜つた千葉大学医学部病理学教室故石橋教授の御冥福を祈り感謝の意を表す。

尙薬剤の提供に種々便宜を与えられた武田薬品工業並びに大阪有機合成株式会社に謝意を表す。

引用文献

- 1) 柳沢文徳：食品衛生，3，1955.
- 2) 真銅参太郎：腐研報，4，20，1951.
- 3) 伊東由巳：腐研報，5，18，1952.
- 4) 相磯和嘉：日衛誌，8，159，1954.
- 5) Thalheimer, Palmer：J. infect. Dis.，9，172，1911.
- 6) Cooper：Appl. Chem.，19，243，1912.
- 7) Geiger：Arch. Biochem.，11，Sept.，1946.
- 8) Armstrong：Proc. Soc. exp. Biol. a. Med.，53，230，1943.
- 9) Atkinson：J. exp. Biol. a. Med. Soc.，21，255，1943.
- 10) 山田寛司：日医大誌，19，650，1952.
- 11) 富安行雄：醸酵工学誌，29，187，1951.
- 12) 佐藤喜吉：私信
- 13) 柳田友道：酵素化学の進歩（I），285，1949.
- 14) 山田寛司：日医大誌，19，776，1952.
- 15) 小林龍男：日薬誌，46，163，1950.
- 16) 田中薫樹：大阪市立衛研事業成績概要，69，1953.