

## 初代培養肝細胞法での食事環境異物の複合毒性の解析

金 沢 和 樹 (神戸大学農学部助教授)

### 緒 言

私達が日常口にする加工食品には何種類かの食品添加物が使用されている。平成6年11月現在、日本で認可されている食品添加物は1399品目あり、そのうち348品目が合成添加物である。合成添加物に関しては、一般毒性試験、特殊毒性試験などの多くの試験が行われ、その安全性が確認されており、それぞれの最大無作用量が決められ、さらに100倍の安全率を見込んでヒトに対する一日摂取許容量(ADI; Acceptable Daily Intake)が定められている。従って、個々の添加物単独では、このADIを越える量を摂らない限りは安全とされている。

しかし、私達の食事環境には、調理時に生じる発ガン性のあるTrp-P-1のようなアミノ酸の加熱分解物、アルコール、農薬、煙草の煙に含まれるベンゾ[a]ピレン、かび毒のアフラトキシン、水に含まれるトリハロメタンなどの異物が存在する。このような、食事環境異物と食品添加物が複合毒性を示さないのかは未解決な疑問である。

複合毒性を動物個体で解析しようとする、異物の組み合わせが無限に近く、多数の実験動物が必要となり、試験は不可能に近い。そこで、本研究では、複合毒性の解析にラットの初代培養肝細胞を用いる手法を開発した。

### 1. 初代培養肝細胞法の栄養化学的手法への応用

これまでに著者らが解明した食品中の過酸化脂質による肝障害を、初代培養肝細胞法を用いて再

解析した。

過酸化脂質を摂取し、酸化的ストレスを起こしたラットから肝細胞を分離し、初代培養した。つまり、Tanakaらの方法<sup>1)</sup>に従い、肝実質細胞をコラゲナーゼの*in situ*灌流法によって分離し、低速遠心で精製した後、 $5.0 \times 10^5$  cells/mlの細胞密度に希釈した。この細胞希釈液を予めコラーゲンコートしたディッシュに播き込み、CO<sub>2</sub>インキュベーター(5% CO<sub>2</sub>-95% air, 37°C)で初代培養した。培養開始4時間後、ディッシュに接着しなかった細胞を除去し、培地を更新して、その生理機能を分析した。

過酸化脂質を摂取したラットの肝細胞は、摂取していない対照ラットの肝細胞と比べ、培養24時間までは、過酸化物質の指標であるTBA値が高く、ビタミンE含有量が低く、過酸化脂質による酸化的ストレスを維持していると判断された(図1)。

また、このストレスを持った細胞のホルモン応答能は対照の正常ラットの肝細胞と明らかに異なっていた。例えば、チロシニアミノトランスフェラーゼのデキサメタゾンに対する応答は、ストレスを持った細胞ではその酵素誘導率が正常細胞よりも顕著に低かった(図2)。このように、初代培養肝細胞を用いれば、細胞のホルモン応答能の変化も測定できた。

食品の抗酸化成分による細胞の酸化的ストレス回復効果を調べると、ゴマのセサモール、緑茶抽出物、カテキン類は、合成抗酸化剤のBHAと同程度の少量で細胞の酸化的ストレスを回復させた

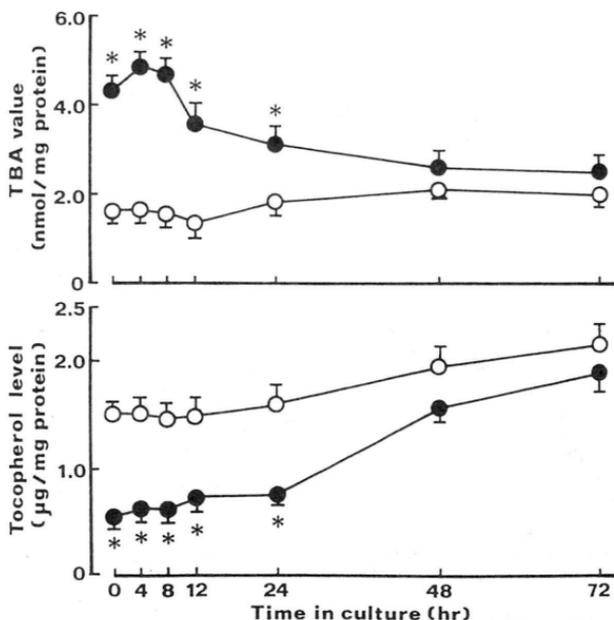


図1 過酸化脂質を与えたラット肝細胞のTBA値(上)とビタミンE量(下)の初代培養における変化

●；リノール酸自動酸化二次産物を与えたラットの肝細胞 (n=6),  
○；生理食塩水を与えたラットの肝細胞 (n=6)

(表1)。トウガラシ成分のカプサイシンの効果はビタミンEと同程度であった。これらの食品成分が食品中で強い抗酸化能を示すことはよく知られている。初代培養肝細胞法を用いた著者らの研究結果は、これらの抗酸化物質がさらに肝細胞内でも有効に働き、酸化的ストレスをも回復させることを示唆している。

このように初代培養肝細胞法は、栄養化学的試験に次の3つの利点を持って応用できる。①初代培養肝細胞は動物個体が持っていたストレスや栄養状態を維持している。②肝細胞のホルモン応答能の変化を簡便に測定できる。③少数の実験動物で、生体条件に近い栄養化学的試験が可能である。

つまり、食品添加物など食餌環境異物を含む飼料でラットを飼育すれば、その初代培養肝細胞は

表1 食品の抗酸化成分による酸化的ストレス回復効果

成分	TBA値を正常値に回復させる濃度 ( $\mu\text{M}$ ) <sup>*</sup>
セサモール	1.8
緑茶抽出物	2.4
エピカテキン	2.6
BHA	2.9
カテキン	3.5
カプサイシン	10
ビタミンE	12
ケンフェロール	43
ガラガンジン	145

<sup>\*</sup>過酸化脂質を投与して酸化的ストレスを与えたラット肝細胞のTBA値を正常値(ストレスを持っていない細胞のTBA値)に回復させるのに必要な抗酸化成分の濃度

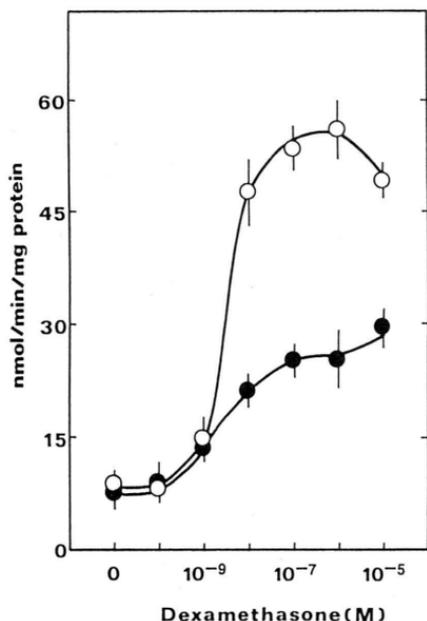


図2 過酸化脂質を与えたラット肝細胞のチロシンアミノトランスフェラーゼのホルモン応答能 (●) (n=3) と、生理食塩水を与えた細胞の応答能 (○) (n=3) との比較

食餌環境異物によるストレスを維持しており、ホルモン応答能も変化している。この細胞の培地に別の異物を添加すれば、これらの相乗あるいは相

加毒性を判定できる。そこで、この手法の複合毒性試験への応用を試みた。

## 2. 食事環境異物の肝細胞に対する複合毒性

### 2.1 実験方法

Wistar 系 3 週齢の雄ラット (体重 40~60 g) を 3 群に分け、日本人の理想の栄養摂取条件と考えられている組成に合わせた飼料を調製し、ここに種々の食品添加物あるいは人工着色料を添加して 4 週間飼育した。食品添加物群には、表 2 に示した、日本での生産と消費量が比較的高い添加物 4 種を混合し、人工着色料群には食用色素 6 種を混合した。対照群のラットはこれらを含まない飼料とした。飼料に混ぜた食品添加物及び着色料の量は、体重 150 g のラットが一日平均 15 g の飼料を摂食すると考え、ADI の定められているものについてはその半量を、特定されていないソルビトールとグルタミン酸ナトリウムについてはプロピレングリコールの ADI に準じて添加した。

これらのラットから肝実質細胞を分離・初代培養した。培養開始 4 時間後、ディッシュに接着しなかった細胞を除去し、表 3 に示した食事環境異物を含む培地に交換した。異物添加 12 時間後の肝細胞を用いて、細胞膜障害の指標となる乳酸脱水素酵素の漏出<sup>2)</sup>、ミトコンドリアの代謝活性の指

表 2 飼料に加えた食品添加物及び人工着色料の量と ADI 値

添加物名	添加量 (mg/100g飼)	ADI 値 (mg/kg体重)
食品添加物群		
ソルビトール	12.5	特定しない
L-グルタミン酸ナトリウム	12.5	特定しない
安息香酸	2.5	5
プロピレングリコール	12.5	25
人工着色料群		
赤色 3号	1.25	0~2.5
赤色 40号	3.5	0~7
赤色102号	0.0625	0~0.125
青色 1号	6.25	0~12.5
黄色 4号	3.75	0~7.5
緑色 3号	6.25	0~12.5

表3 細胞に添加した食餌環境異物

	細胞5×10 <sup>6</sup> 個あたりの最大添加量 (μg)*
食品添加物	
サッカリンナトリウム	6.25
BHA	1.25
パラベン	25
飲酒並びに喫煙を想定した異物	
エタノール	0.5 (%)
ベンゾ [ a ] ピレン	12.5
お焦げに含まれる発がん物質	
Trp-P-1	5.0
医薬品	
フェノバルビタール	37.5
化学発がん物質	
3-メチルコラントレン	12.5
肝炎誘発物質	
四塩化炭素	8 (mM)

\*肝細胞に添加した量は、エタノールは泥酔時の血中濃度、Trp-P-1は細胞死を起こす濃度の1/5、四塩化炭素は細胞膜障害を起こす濃度とし、食品添加物はADIの1/2量、それ以外の異物はLD<sub>50</sub>の1/2量が肝臓に取り込まれたとしたときの濃度とした。

標となるMTT代謝能<sup>3,4)</sup>、細胞増殖阻害を知ることができるDNA合成及びタンパク質合成活性の測定を行った。

## 2.2 細胞膜に対する影響

細胞膜障害の指標となる乳酸脱水素酵素の漏出に対する9種の食餌環境異物の毒性を比較すると、四塩化炭素とTrp-P-1を培地へ添加した場合に、酵素の漏出率が著しく上がった(表4)。これらは細胞膜表面に原形質突出を生成させ、これを破壊して、細胞質酵素である乳酸脱水素酵素を漏出させる。四塩化炭素の毒性は、それがP450薬物代謝系で代謝されたときに生じるラジカルにより、Trp-P-1の毒性は、やはりP450で活性化された時に生じるN-ヒドロキシラジカルによると考えられている。しかし、食品添加物群及び人工着色料群の細胞で、これらを加えていない対照群の細胞と比較して、四塩化炭素あるいはTrp-P-1による漏出率の増加は認められなかった。つまり、食品添加物や着色料と四塩化炭素あるいはTrp-P-1との相加毒性はないと考えられた。

表4 食品添加物及び人工着色料を含む飼料で飼育したラットの肝細胞膜に対する異物の影響

	酵素漏出率 (%)*		
	対照群	食添群	着色料群
0.5%DMSO	21±3	18±3	21±4
サッカリンナトリウム	10±2	9±2	12±2
BHA	16±2	12±2	18±3
パラベン	24±2	18±1 <sup>b</sup>	18±1 <sup>b</sup>
エタノール	6±2	4±1	4±2
ベンゾ [ a ] ピレン	27±2	21±1 <sup>b</sup>	25±4
Trp-P-1	52±8 <sup>a</sup>	46±11 <sup>a</sup>	60±11 <sup>a</sup>
フェノバルビタール	12±2	5±2 <sup>b</sup>	13±2
3-メチルコラントレン	24±2	22±2	26±5
四塩化炭素	48±5 <sup>a</sup>	43±5 <sup>a</sup>	54±6 <sup>a</sup>

異物はDMSOに溶解して培地に添加した。細胞質の乳酸脱水素酵素の細胞外への漏出量を、肝細胞の本来持っている酵素活性に対する百分率で表した。

\*、平均値±標準誤差で示した (n=8)

a、異物を加えていない場合 (0.5%DMSO) と有意差があることを示す (p<0.05)

b、対照群と有意差があることを示す (p<0.05)

## 2.3 ミトコンドリアの代謝活性に対する影響

四塩化炭素とTrp-P-1を細胞培地へ添加すると、ミトコンドリアによるMTT代謝活性の低下が認められた。そこで様々な濃度の四塩化炭素とTrp-P-1を、食品添加物群と着色料群のラットの肝細胞に添加した。四塩化炭素による活性低下は食品添加物群及び着色料群と対照群の間に差はなかった。ところが、5μg/mlのTrp-P-1は細胞死を起こさない濃度であるが、この濃度で着色料群の細胞のみMTT代謝活性が著しく低下した(図3)。

## 2.4 DNA合成及びタンパク質合成に対する影響

Trp-P-1の5μg/mlを添加すると、DNA合成とタンパク質合成活性のいずれも低下した(図4)。ところが、着色料群の細胞では、Trp-P-1によるこれらの合成能の低下を、食品添加物群及び対照群に比べて有意に抑えていた。

## 2.5 考察

食餌環境異物9種類の肝細胞膜に対する損傷作用を比較すると、Trp-P-1と四塩化炭素の毒性が

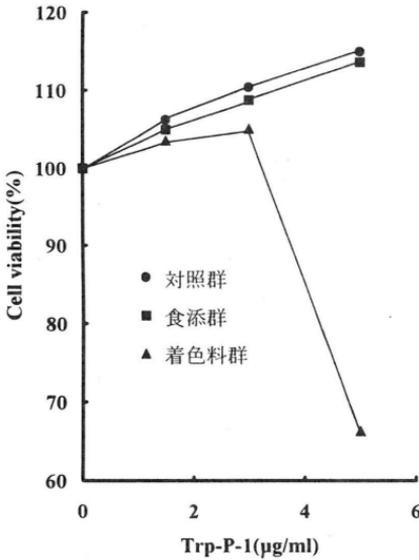


図3 食品添加物あるいは人工着色料を与えて飼育したラット肝細胞のMTT代謝活性と、それに対するTrp-P-1の影響  
Trp-P-1はDMSOに溶かして添加したので、Trp-P-1を含まずDMSOのみを与えた細胞の活性を100%とした。データは8回の個別実験の平均値として表した。

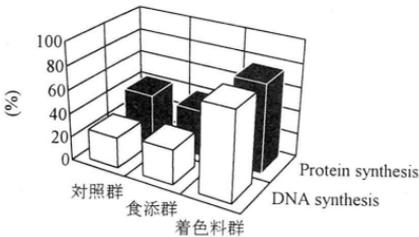


図4 食品添加物あるいは人工着色料を与えて飼育したラット肝細胞の細胞増殖活性とそれに対するTrp-P-1の影響  
Trp-P-1はDMSOに溶かして5µg/mlの濃度になるように添加したので、Trp-P-1を含まずDMSOのみを与えた細胞の活性を100%とした。データは2回の個別実験の平均値として表した。

顕著であった(表4)。しかし、食品添加物で飼育しても、着色料で飼育しても、これらによる膜障害を助長しなかった。一方、着色料を含む飼料

で飼育したラットの肝細胞では、Trp-P-1の添加でミトコンドリアの代謝能は低下したが、DNA合成とタンパク質合成活性は、むしろその毒性を抑制するように高く維持されていた。つまり、着色料群の肝細胞はDNA合成やタンパク質合成など細胞障害の修復機能を強めていると考えられた。

このように、肝細胞はTrp-P-1に対して敏感であるが、特に、着色料を摂取したラットではそれが顕著であると考えられた。

### 3. 食品添加物及び人工着色料と食事発ガン物質 Trp-P-1 の肝特異機能に及ぼす複合的影響

Trp-P-1は食品の調理時にトリプトファンが熱分解して生じる発ガン前駆物質である。私達が食物を調理する限り、この非常に強力な発ガン前駆物質を避けることはできない。そこで、食品添加物あるいは人工着色料を与えたラットの肝細胞で、Trp-P-1の肝特異機能に及ぼす影響についてさらに詳しく解析した。

肝臓は様々な特異機能を持っている。血糖値の維持のための糖新生能、アンモニアの解毒機構である尿素合成能、アミノ酸分解酵素の一つのチロシンアミノトランスフェラーゼ活性、異物を解毒するP450薬物代謝能などである。食品添加物や着色料を与えたラットの肝細胞の特異機能が、Trp-P-1の毒性でどのように変化するかを検討した。

#### 3.1 糖新生能の変化

糖新生能を、フルクトースあるいはピルビン酸を基質として細胞に与え、グルコースの生産で見た<sup>5)</sup>。人工着色料群の細胞で、フルクトースを基質とした場合、Trp-P-1の添加量が3µg/ml以上の時、糖新生活性の低下が認められた(図5A)。また、ピルビン酸を基質とした場合も、着色料群の活性は対照群や食品添加物群よりTrp-P-1の影響を強く受けた(図5B)。

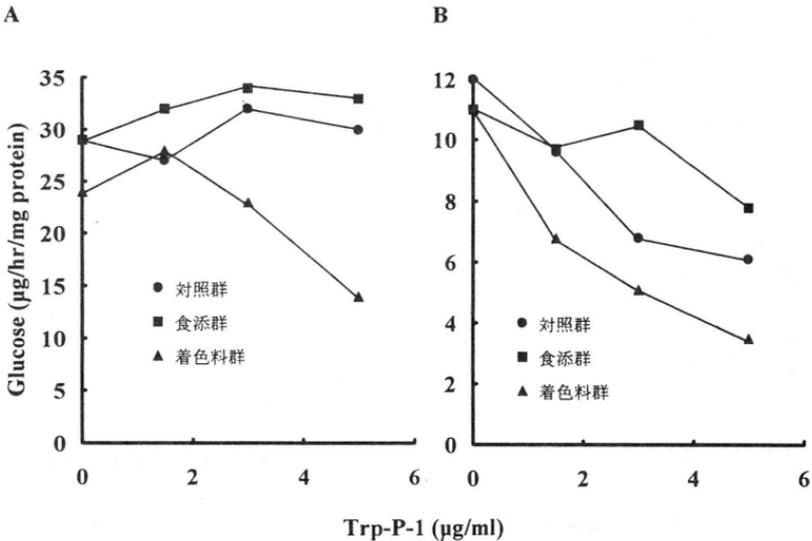


図5 食品添加物あるいは人工着色料を与えて飼育したラット肝細胞の糖新生能とそれに対する Trp-P-1 の影響  
A: 基質をフルクトースとした場合, B: 基質をピルビン酸とした場合  
データは8回の個別実験の平均値として表した。

### 3.2 尿素合成能の変化

塩化アンモニウムを基質としたときの尿素合成能を、尿素態窒素を定量して測定した<sup>6)</sup>。食品添加物群の尿素合成能は対照群より1.5倍高く、着色料群の活性も1.2倍高い値を示した(図6)。ここに Trp-P-1 を添加すると、その  $3\mu\text{g/ml}$  以下の濃度では、いずれの細胞も高い活性を維持した。一方、着色料群に  $5\mu\text{g/ml}$  の Trp-P-1 を与えると、尿素合成能がほぼ消失した。

従って、食品添加物や着色料は肝細胞の尿素合成能を上げるが、着色料は、高濃度の Trp-P-1 の毒性に対する耐性を弱めると考えられた。

### 3.3 アミノ酸代謝系の変化

チロシニアミノトランスフェラーゼは肝臓に特異的なアミノ酸代謝系の鍵酵素である。また、この酵素はグルココルチコイドホルモンで誘導される<sup>7)</sup>。食品添加物群の酵素活性は Trp-P-1 を添加

しても、対照群と同様に影響を受けなかった。しかし、着色料群の活性は Trp-P-1 濃度が上がるに従って低下し、 $5\mu\text{g/ml}$  で失活した(図7)。そこで、肝細胞に  $10^{-7}\text{M}$  の合成グルココルチコイドであるデキサメタゾンを添加して酵素を誘導し、Trp-P-1 の影響を調べた。食品添加物群のホルモン応答能も着色料群のそれも、対照群の応答能に比較して有意に高かった。また、Trp-P-1 の添加によって、食品添加物群と着色料群の酵素誘導は対照群よりも顕著に低下した。

このように、チロシニアミノトランスフェラーゼ活性、及びそのホルモンによる誘導は、尿素合成能が受ける影響と同様に、食品添加物や着色料の影響、特に着色料の影響を強く受けた。

### 3.4 薬物代謝系に対する影響

チクロム P 450 量を一酸化炭素結合タンパク質の  $450\text{nm}$  付近の差スペクトルから求めた<sup>8)</sup>。肝

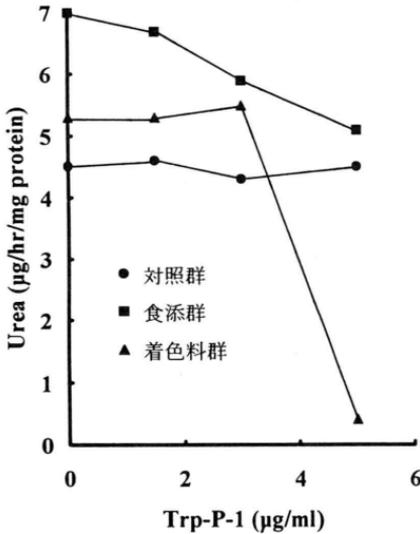


図6 食品添加物あるいは人工着色料を与えて飼育したラット肝細胞の尿素合成能と、それに対する Trp-P-1 の影響  
データは 8 回の個別実験の平均値として表した。

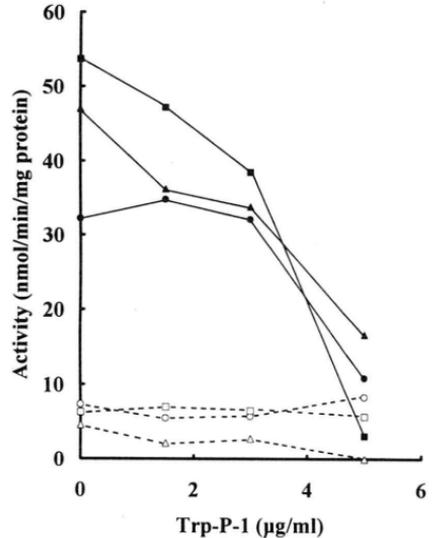


図7 食品添加物あるいは人工着色料を与えて飼育したラット肝細胞のチロシンアミノトランスフェラーゼ誘導と、それに対する Trp-P-1 の影響  
データは個別の 2 回の平均値。細胞の酵素活性: 対照群; ○●●, 食添群; □□□, 着色料群; …△…。ホルモン誘導時の酵素活性: 対照群; ●●●, 食添群; ■■■, 着色料群; ▲▲▲。

細胞の P 450 量は食品添加物群, 着色料群, 及び対照群の間に有意な差はなく, これらの細胞に 3 µg/ml あるいは 5 µg/ml の Trp-P-1 を添加しても, その量は変化しなかった (表 5)。ところで, ラット肝臓の P 450 量は細胞を初代培養することで大きく低下すると知られている<sup>9)</sup>。そこで, これらのラットの肝臓を培養に供する前に, ミクロソーム中の P 450 を定量したが, 各群の P 450

表 5 食品添加物及び人工着色料を含む飼料で飼育したラットの肝細胞 Cytochrome P450 量とそれに対する Trp-P-1 の影響

異物	P450 (pmol/mg protein)*		
	対照群	食添群	着色料群
0.5% DMSO + Trp-P-1	79 ± 15	64 ± 14	80 ± 10
3.0 µg/ml	84 ± 13	64 ± 8	89 ± 8
5.0 µg/ml	118 ± 28	82 ± 15	113 ± 24

\*、平均値 ± 標準誤差で示した (n=3)。

量に有意な差は認められなかった。

従って, 食品添加物や着色料は肝臓の P 450 酵素系には影響を及ぼさないと考えられた。

### 3.5 考察

以上の結果は, 食品添加物や人工着色料を毎日食べると, 肝臓の特異機能, 糖新生能とアンモニア代謝やアミノ酸代謝などの窒素代謝能が影響を受けることを示唆している。特に, Trp-P-1 のような食事異物を同時に摂取した場合は, それらの複合毒性が現れることがある。

作用機構は不明で, 今後詳しく解析する必要があるが, 食品添加物や着色料は肝臓の窒素代謝活性を向上させることが示唆された (図 6, 7)。また, 着色料は食事発がん物質である Trp-P-1 の毒性と相加効果を示し, MTT 代謝活性低下 (図 3),

糖新生能(図5)や尿素合成能の低下(図6)を助長した。つまり、着色料を日常摂取していると、肝細胞はTrp-P-1を十分に解毒できなくなることを意味している。

Trp-P-1は発ガン前駆体である。薬物代謝系でN-ヒドロキシ体で代謝され<sup>10)</sup>、これが容易にラジカルとなり<sup>11)</sup>、DNAに損傷を与えてフレームシフト型の突然変異を誘発し、同時に細胞膜を損傷して発ガンに導くと考えられている<sup>12,13)</sup>。Trp-P-1はP450dあるいはP450cで発ガン体に活性化される<sup>14)</sup>。本研究の結果では、人工着色料を与えたラットの肝細胞のP450量に変化はなく(表5)、人工着色料はP450によるTrp-P-1の活性化に影響を与えないと考えられた。にもかかわらず、着色料群の肝細胞はTrp-P-1の影響を対照群より強く受け、肝特異機能を低下させた。これらの結果は、人工着色料を日常摂取すると、Trp-P-1を発ガン体に活性化する能力を維持しながら、肝機能は低下し、発ガンのリスクが高まることを推測させる。

Trp-P-1の発ガン機構に人工着色料がどのように関わるかについては、最近著者らはその微量の活性化体を感度よく定量する方法を確立したので<sup>15)</sup>、さらに詳細に研究したいと考えている。

## おわりに

近年、消費者は食品添加物や人工着色料に過敏になっている。これらの安全性については、FAO/WHOが膨大な毒性試験のデータに基づいてADIを設定し、さらに日本の厚生省は厳しい使用規制を設けている。私達が普通に食生活を営めば、食品添加物などの毒性に神経質になる必要はないであろう。しかし、最近、タール系色素がその有用性を含め、アレルギー性や行動異常毒性などの点で問題になっている。本研究の結果は、さらにこれに違った視点から、人工着色料を摂取し

続けるとTrp-P-1などの他の食事異物に対する耐性が低下し、複合毒性が起こる可能性を指摘した。

タール系色素は、安全性に疑いがあるものは淘汰され、日本で認可されているものは12品目になり、需要も年々減少し、過去数年の年間消費は約240tである。さらに、企業が使用を自粛しており、今後の使用量はより減少すると思われる。食品添加物にはそれぞれにリスクとベネフィットがあるが、着色料のベネフィットは視覚効果である。日本食は「目で味わう」とも言われ、視覚も重要な嗜好の一つである。しかし、本来の視覚効果とは食品の自然な色、器、盛り付けなどであり、人工色素で故意に色付けした食品は、むしろ日本人の繊細な美的感覚を損なうと思われる。

食品添加物は、人類の知恵が生み出した、近代社会に必須の食文明の一つである。現代の食生活から全ての食品添加物を除けば、品質劣化、カビ毒など様々なリスクを負うことになる。しかし、人工着色料はむしろ食文化を退廃させるもので、これを除いても負うリスクはなく、私達の将来の食文明のために、人工着色料の使用はできるだけ控える方がよいと考える。

最後に、本研究を遂行するにあたり、研究助成金を賜りました浦上食品・食文化振興財団および関係各位に心から深謝いたしますと共に貴財団の益々のご発展を祈念申し上げます。

## 文 献

- 1) K. Tanaka, M. Sato, Y. Tomita, and A. Ichihara, *J. Biochem.*, **84**, 937-946 (1978).
- 2) 佐藤和子「細胞トキシコロジー試験法」日本組織培養学会編, 朝倉書店, 東京(1991), PP. 95-96.
- 3) M. Oka, S. Maeda, N. Koga, K. Kato, and T. Saito, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 1472-1473 (1992).
- 4) T. Mosmann, *J. Immuno. Methods*, **65**, 55-63 (1983).
- 5) 中村敏一「初代培養肝細胞実験法」, 学会出版センター, 東京(1987), p. 71.

- 6) W.H. Marsh, B. Fingerhut, and H. Miller, *Clin. Chem.*, **11**, 624-627 (1965).
- 7) C. Noda, T. Nakamura, and A. Ichihara, *J. Biol. Chem.*, **258**, 1520-1525 (1983).
- 8) T. Omura and R. Sato, *J. Biol. Chem.*, **239**, 2379-2385 (1964).
- 9) C. Guguen-Guillouzo and A. Guillouzo, *Mol. Cell Biochem.*, **53/54**, 35-56 (1983).
- 10) Y. Yamazoe, K. Ishii, T. Kamataki, R. Kato, and T. Sugimura, *Chem. -Biol. Interactions*, **30**, 125-138 (1980).
- 11) Y. Wataya, K. Yamane, K. Hiramoto Y. Ohtsuka, Y. Okubata, K. Negishi, and H. Hayatsu, *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, **79**, 576-579 (1988).
- 12) Y. Hashimoto, K. Takeda, K. Shudo, T. Okamoto, T. Sugimura, and T. Kosuge, *Chem. -Biol. Interactions*, **23**, 137-140 (1978).
- 13) A. Wakata, N. Oka, K. Hiramoto, A. Yoshioka, K. Negishi, Y. Wataya, and H. Hayatsu, *Cancer Res.*, **45**, 5867-5871 (1985).
- 14) R. Kato and Y. Yamazoe, *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, **78**, 297-311 (1987).
- 15) 源伸介, 金沢和樹, 今石浩正, 大川秀郎, 日本農芸化学会平成5年度関西・西日本支部合同大会講演要旨集, P. 74 (E-1).

## Detection of Multiple Toxicity of Dietary Xenobiotics with Primary Cultured Hepatocytes of Rat

Kazuki Kanazawa (Department of Biofunctional Chemistry, Kobe University)

Multiple toxicity of food additives and colorings with other dietary xenobiotics was examined using primary cultured hepatocytes, because they kept a stress by the xenobiotics when had given the rat. The rats fed a mixture of 4 food additives, sorbitol, sodium glutamate, benzoic acid, and propylene glycol, or fed a mixture of 6 artificial food-colorings, erythrosine B, allura red AC, new cocchine, brilliant blue, tertrazine, and fast green, with a half amount of their respective acceptable daily intake for 4 weeks. After the preparation and the primary culture of hepatocytes having the stress by food additives or colorings, the other dietary xenobiotics were added to the medium for the examination of their multiple toxicities.

One of dietary carcinogens, Trp-P-1, was most toxic in the xenobiotics when added to the cells, particularly on the hepatocytes from rats fed colorings. Trp-P-1 facilitated to suppress glyconeogenesis, urea cycle activity, amino acid metabolic system, and metabolic activity of the mitochondria in the colorings-stress cells, although the cells kept synthetic activities of DNA and protein, and P450 system unchanged. These results indicated that the liver having stress by colorings impaired the hepatic functions but maintained the activity to metabolize Trp-P-1 to its ultimate carcinogenic form by P450 systems.

Trp-P-1 occurs in our daily food and we can not avoid it because formed during cooking. The daily intake of artificial food-colorings may increase a risk of carcinogenicity caused by dietary carcinogens such as Trp-P-1.