

食用藍の安全性試験

小谷 航, 本村衛由, 瀧野 佑, 小島梨沙, 田中志歩, 辻 博子, 近藤真紀

1. はじめに

藍染の原料として用いられている藍には、様々な種類があり、主に台湾や沖縄で栽培されているキツネノマゴ科の琉球藍、沖縄に自生しているガガイモ科のアイカズラ、インド原産でマメ科のインド藍、ヨーロッパを中心に栽培されているアブラナ科のハマタイセイ、ウオードである¹⁾。日本で主に栽培され利用されているのは、タデ科のタデ藍である。

藍の歴史は古く、世界各地で利用されてきた。海外では自然から得られる青色はとても貴重であり、神秘的なものであると考えられてきた。世界各地で価値のあるものとして、富裕層の間で流行した藍であるが、安価で大量に流通が可能なインド藍の出現によって、また時代の変化とともに繁盛、衰退を繰り返してきた。

阿波藍の起源は平安時代にさかのぼり、藍が布を丈夫にして菌を繁殖しにくくすることから、衣料などを藍で染める文化が高まった。しかし、藍は薬としての一面もある。昔から「藍職人は病気知らず」という言葉があるほど、藍職人を中心に薬草として暮らしに取り入れられ、解毒や解熱、食あたりに効果があるとされていた。その効能には、解毒や解熱、抗酸化性、抗炎症作用、抗がん作用などがあり²⁾、現在もハマタイセイの根を乾燥させた板藍根が漢方薬として利用されている。

近年、藍は染料としての美的要素や漢方以外に、表1に示すような抗酸化性や殺菌作用などの機能性成分が注目されており、食用に活かす取り組みもある。しかし、その機能性については*in vitro*での研究がほとんどであり、*in vivo*での科学的根拠が十分に示されているわけではない。

そこで我々は、ラットを用いて食用藍の機能性に注目して研究を行った。その結果、Wistar系雄

表1 藍の機能性成分に関する先行研究

藍に含まれる成分	主な作用
没食子酸	抗酸化 (1999)
カフェ酸	抗酸化 (1999)
ケンフェロール	抗酸化 (1999)、抗炎症 (1999)、抗ピロリ菌 (1999)
トリプタンスリン	抗がん (1999, 2001)、抗炎症 (2000)、抗ピロリ菌 (1999)、抗白癩菌 (1979)
インディルビン	抗がん (1994)、抗アレルギー (2000)
フラボノイド類	血小板凝集抑制 (1990)

() 内は論文発表年

ラットに藍葉粉末添加食を投与すると、10%添加群で体重増加抑制、腹腔内脂肪減少、血清グルコース・トリアシルグリセロールの減少、腸管からのグルコース吸収抑制、脂肪肝の改善がみられることが分かった。また、2型糖尿病モデルラットへの藍葉粉末投与実験でも、体重増加抑制、血糖値正常化、インスリン分泌亢進がおこることがわかった³⁾。一方、古くから漢方薬に用いられている藍の種子でも、同様の効果が得られるのかを調べるため、藍種子投与実験を行ったが、藍葉に見られるような効果は認められなかった⁴⁾。そこで、藍葉と藍種子の成分分析を行ったところ、トリプタンスリン、ケンフェロール、インディルビン、タンニン酸などの機能性成分が藍葉には豊富に含まれており、ポリフェノールの総量も多かったが、藍種子にはこれらの成分がほとんど含まれていないことがわかった。このことから、藍葉が生長する段階で機能性成分が増えてくると推察した。しかし、藍葉に含まれているポリフェノールの大半を占めるタンニン酸が関与している可能性があるため、タンニン酸を投与してその影響を観察したが、関与が示唆される結果が得られなかった⁵⁾。このことから、藍葉ポリフェノールの中でも比較的多く含まれる、トリプタンスリン、インディルビン、ケンフェロールの関与が考えられた。藍を食用に活用するためには、安全性試験を行

う必要がある。そこで、本研究では慢性毒性試験として、反復投与毒性試験ならびにAmes試験（復帰突然変異試験）を行った。

2. 方法

1) 実験用動物

平成30年6月14日にWistar系ラット（4週齢雄30匹、雌30匹）を日本チャールズリバー株式会社より入手した。2週間程度、標準固型飼料MF（オリエンタル酵母工業株式会社）と水道水を自由摂取させて馴化した。雌雄それぞれを層別無作為化により3群に割付け、対照群（AIN-93G）、低用量群（AIN-93Gに藍葉を1%添加）、高用量群（AIN-93Gに藍葉を5%添加）とした。なお、各群10匹ずつとし、雄については平成30年6月27日～12月25日まで、また雌については、平成30年6月28日～12月26日までの26週間にわたり、各食餌を自由摂取させて飼育した。

なお飼育期間中、体重は週3回、摂食量は週4回測定した。

2) 飼料

AIN-93Gは育成飼料のため12週齢ごろからAIN-93M（維持用）に切り替えた。各飼料はオリエンタル酵母工業株式会社より入手した。また、飼料に添加した藍葉粉末は、ボン・アーム株式会社より入手した。

3) 解剖

解剖前日は水道水のみを与え、絶食とし、ペントバルビタール麻酔下で開腹して、下大静脈より採血（約5mL）し、血液は血清分離剤入りバキュエティナ採血管に移し、数回転倒混和した後、遠心分離（3,000rpm, 10分間）して、血清をサンプル管に移して-30℃で凍結保存した。

胸骨を切開して呼吸を停止したのち、各臓器（心臓、肺、胃、脾臓、小腸、肝臓、腎臓、腎臓周囲脂肪、副睪丸あるいは子宮周囲脂肪、腸間膜周囲脂肪）を採取して、生理食塩水で洗浄後、水気をキムワイプで除去してから、湿重量を測定した。また心臓は重量を測定後水平方向に切断し、左肺は重量測定後、ホルマリンで固定した。

またヘマトクリット管に採血して、一方の端にクリトシールを詰め、11,000rpm, 5分間遠心分離し、ヘマトクリット値を測定した。

4) 血清成分の測定

血清成分の測定は、乾式臨床化学装置・富士ドライケム7000（FUJIFILM）を使用し、血清中のグルコース、トリアシルグリセロール、総コレステロール、HDL-コレステロール、AST（GOT）、ALT（GPT）、ALP、総ビリルビン、総タンパク質、アルブミン、尿素窒素、ナトリウム、カリウム、クロール、カルシウムを自動測定した。各スライドの測定方法は以下のとおりである。

- ①グルコース量：GLU-PⅢ（GOD・POD法）
- ②トリアシルグリセロール量：TG-PⅢ（GOP・ロイコ色素法）
- ③総コレステロール量：THCO-PⅢ（COD・POD法）
- ④HDL-コレステロール量：HDL-C-PⅢD（選択可溶化・COD・PCD/4AA・DAOS色素法）
- ⑤AST（GOT）活性：オキサロ酢酸デカルボキシラーゼ・POP・POD・ロイコ色素法
- ⑥ALT（GPT）活性：POP・POD・ロイコ色素法
- ⑦ALP活性：p-ニトロフェニルリン酸基質法
- ⑧総ビリルビン量：2,4-ジクロロベンゼンジアゾニウム塩法
- ⑨総タンパク質量：ビウレット法
- ⑩アルブミン量：BCG法
- ⑪尿素窒素量：ウレアーゼ・BCG指示薬法
- ⑫ナトリウム量：メチルモネンシン（電極法）
- ⑬カリウム量：バリノマイシン（電極法）
- ⑭クロール量：4級アンモニウム塩（電極法）
- ⑮カルシウム量：クロロフォスフォナゾⅢ（キレート法）

測定スライドに付属しているQCカードを測定機のカードリーダー部に挿入して読み込ませた。その後、凍結保存した血清を解冻し、プレーンチューブに約0.5mL分注して本体にセットした。血清自動点着チップ及びQCカードに対応した各スライドを2枚ずつセットして自動測定を行った。

5) 統計処理

数値はすべて平均値±標準偏差で表した。統計処理にはSPSSver.25.0 (IBM) を使用し、一元配置分散分析後、Tukeyの方法による多重比較検定を行った。統計的有意水準は危険率5%以下とした。

3. 結果および考察

1) 体重変化

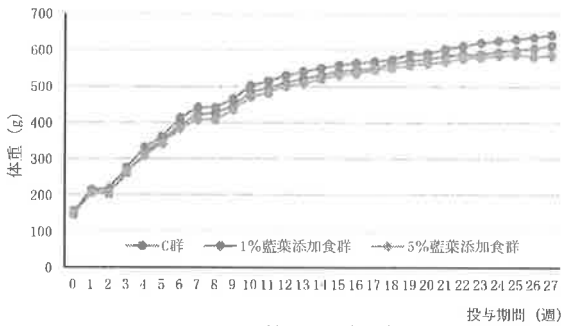


図1 雄ラットの体重変化

図1に雄ラット、図2には雌ラットの体重変化を示した。雄ラットは3群間に明確な差は認められなかったが、藍葉添加群で体重増加がわずかに抑制される傾向が認められた。雌ラットは対照群に比べると藍葉添加群（低用量，高用量）で体重増加が抑制される傾向が認められた。雌雄ともに、低用量群と高用量群の差は認められなかった。

表2 雄ラット・解剖時の体重

投与群	最終体重
対照群 (10)	610.0±54.1g
低用量群 (10)	596.6±21.0g
高用量群 (10)	555.7±44.7g

表3 雌ラット・解剖時の体重

投与群	最終体重
対照群 (10)	382.3±39.0g
低用量群 (10)	337.6±30.4g
高用量群 (10)	338.7±21.5g

雄ラットの解剖時の体重を表2に示した。対照群よりも他の2群で体重がやや少ない傾向があり、とくに高用量群で体重が低かったが、統計的な有意差は認められなかった。表3には、雌ラットの解剖時の体重を示した。対照群と比較して、低用量群，高用量群ともに有意に体重が低かった。

なおデータには示さないが、雌雄ともに3群間の摂食量に有意差は認められなかった。

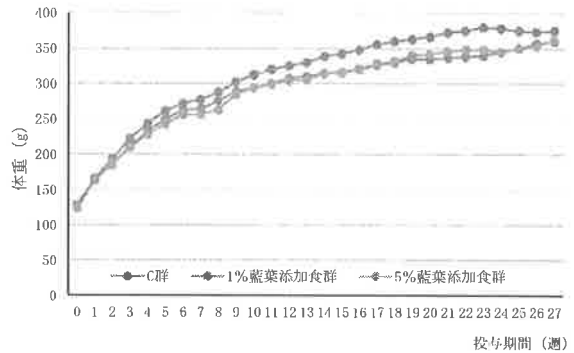


図2 雌ラットの体重変化

2) 臓器重量および腹腔内脂肪重量

表4 雄ラットの臓器重量

	臓器重量 (g/100g BW)					
	肺	心臓	脾臓	肝臓	腎臓	胃
対照群 (10)	0.29±0.04	0.24±0.02	0.13±0.03	2.34±0.30	0.51±0.05	0.36±0.05
低用量群 (10)	0.31±0.03	0.25±0.02	0.12±0.02	2.33±0.21	0.52±0.06	0.35±0.03
高用量群 (10)	0.32±0.04	0.25±0.02	0.14±0.03	2.36±0.25	0.53±0.05	0.38±0.05

表4には雄ラットの臓器重量を、体重100gあたりで示した。懸念された肺や心臓への副作用もなく、3群間に差は認められなかった。また表5には、雄ラットの腹腔内脂肪重量を示した。腎臓周囲脂肪と副睾丸周囲脂肪は、高用量群で有意に減少しており、腹腔内脂肪重量の減少が確認できた。これは、我々がこれまでに見出している現象と一致しているが、低用量群では明確ではなく、減少傾向があるものの、統計的に有意な低下が認められなかった。これは、普通飼料 (AIN-93GあるいはAIN-93M) に藍葉を添加したためと考えられる。我々がこれまでに行った高脂肪食をベースにした飼料を用いると、有意差が認められるものと考えられる。

表6には、雌ラットの臓器重量を、体重100g当

たりで示した。雄と同様、臓器重量は3群間で差は認められなかった。

表5 雄ラットの腹腔内脂肪重量

	腎臓周囲 (g)	膵臓周囲 (g)	腸間膜周囲 (g)	腹腔内脂肪 (g/100gBW)
対照群 (10)	18.27±3.60*	16.75±2.33*	8.50±1.59	6.98±0.38
低用量群 (10)	16.39±2.70*	14.13±2.36*	7.26±1.24	6.32±0.84
高用量群 (10)	13.20±2.18*	13.00±2.43*	6.93±1.39	6.07±1.11

*異なるアルファベットは有意差があることを示す (p<0.05)

表6 雌ラットの臓器重量

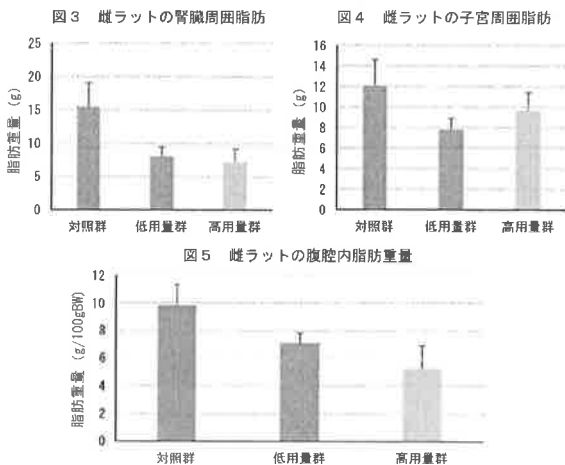
	臓器重量 (g/100g BW)					
	肺	心臓	脾臓	肝臓	腎臓	胃
対照群 (10)	0.35±0.06	0.28±0.03	0.18±0.03	2.33±0.29	0.55±0.06	0.45±0.09
低用量群 (10)	0.40±0.07	0.29±0.02	0.17±0.02	2.30±0.13	0.58±0.04	0.43±0.04
高用量群 (10)	0.39±0.04	0.30±0.02	0.18±0.04	2.45±0.17	0.57±0.04	0.45±0.05

表7 雌ラットの腹腔内脂肪重量

	腎臓周囲 (g)	子宮周囲 (g)	腸間膜周囲 (g)	腹腔内脂肪 (g/100gBW)
対照群 (10)	15.53±3.53*	12.09±2.51*	11.77±4.41	9.84±1.48*
低用量群 (10)	7.97±1.51*	7.80±1.13*	7.89±1.13	7.08±0.75*
高用量群 (10)	7.10±2.06*	9.63±1.81*	5.56±2.79	5.26±1.70*

*異なるアルファベットは有意差があることを示す (p<0.05)

表7には、雌ラットの腹腔内脂肪重量を示した。腸間膜周囲脂肪重量には、3群間の差は認められないが、腎臓周囲脂肪は図3に示すように、対照群と比較すると、低用量群は49%、高用量群は54%、有意に低値を示した。また子宮周囲脂肪は低用量群で35%ほど、有意に減少していた (図4)。腹腔内脂肪重量は、腎臓周囲、子宮周囲、腸間膜周囲脂肪重量を合計したものであるが、図5に示すように、高用量群で46%ほど有意に低下した。



3) 血清成分

表8には脂質代謝に関連する血清成分を示した。血清総コレステロールは雄と比べると雌で高い傾向が認められるが雌雄ともに正常範囲であり異常はない。また3群間に差は認められなかった。

表8 脂質代謝に関する成分

		脂質代謝		
		総コレステロール (mg/dL)	HDLコレステロール (mg/dL)	トリアシルグリセロール (mg/dL)
正常値		120~220	40~70	50~140
雄	対照群	50±0	34±8	109±35
	低用量群	55±0	36±8	98±18
	高用量群	73±11	50±9	99±25
雌	対照群	74±17	60±12	82±30
	低用量群	77±11	63±8	82±24
	高用量群	80±12	64±8	85±29

HDLコレステロールは雄の対照群で低い傾向はあるが、藍葉添加群の方が高いことが分かる。雌については、3群で差は認められなかった。トリアシルグリセロールは雌雄ともに正常範囲であり、3群の差も認められなかった。

表9 肝機能に関する成分

		肝機能					
		AST(GOT) (unit)	ALT(GPT) (unit)	ALP (unit)	総ビリルビン (mg/dL)	総タンパク質 (g/dL)	アルブミン (g/dL)
正常値		10~30	0~40	100~200	0.2~1.2	6.0~8.1	4.1~5.1
雄	対照群	93±14	21±8	188±38	0.21±0.12	6.9±0.3	2.6±0.3
	低用量群	82±22	20±3	234±57	0.18±0.05	8.8±0.2	5.8±0.2
	高用量群	86±13	21±6	208±95	0.17±0.08	8.0±0.4	5.4±0.2
雌	対照群	96±16	18±2	94±33	0.37±0.20	6.2±0.3	4.2±0.4
	低用量群	65±8	17±2	97±17	0.28±0.08	6.1±0.3	4.2±0.3
	高用量群	67±12	18±4	114±19	0.28±0.08	6.2±0.4	4.3±0.5

肝機能に関連する血清成分を、表9にまとめた。AST (GOT) 活性がヒトの場合よりも高値であるが、雌雄ともに対照群との差は認められなかった。また、雄の方が雌よりも全体的に高値を示していた。ALP活性は雄が雌よりも高い傾向が認められ、総ビリルビン値は雌の方が雄より高い傾向が認められたが、それぞれの対照群との差は認められなかった。ALT (GPT) 活性、総タンパク質量、アルブミン量は性差も3群間の差も認められなかった。以上の結果から、藍葉を長期投与しても、肝機能には異常がみられないことが分かる。

表10には血糖値と尿素窒素の値を示した。血糖値は雌雄ともに3群で差は認められなかった。尿素窒素量も正常範囲であり、糖質代謝、腎機能に

表10 糖質代謝、腎機能指標

		糖質代謝	腎機能
		グルコース mg/dL	尿素窒素 mg/dL
正常値		70~110	8~20
雌	対照群	105±31	12.1±1.2
	低用量群	113±10	14.3±0.7
	高用量群	120±30	14.4±2.04
雄	対照群	112±13	11.8±1.6
	低用量群	122±9	15.3±2.2
	高用量群	119±14	15.6±1.5

表11 電解質代謝の指標

		その性・電解質			
		ナトリウム mEq/L	カリウム mEq/L	クロール mEq/L	カルシウム mEq/L
正常値		135~150	3.5~5.5	95~110	8.6~10.4
雌	対照群	145±2	5.0±2.3	104±2	9.4±0.5
	低用量群	144±1	4.0±0.2	103±1	9.0±0.2
	高用量群	146±5	4.0±0.2	105±6	9.1±0.3
雄	対照群	143±2	4.0±0.4	100±2	9.4±0.4
	低用量群	143±1	3.8±0.4	103±2	9.3±0.3
	高用量群	144±1	3.7±0.3	102±2	9.3±0.3

も異常は認められなかった。

表11には電解質代謝に関する指標をまとめた。ナトリウム、カリウム、クロール、カルシウムともに雌雄ならびに各3群間の差は認められなかった。このことから、ホルモン代謝も正常に機能しているものと推察された。

またデータには示さないがヘマトクリット値は雌雄ともに3群間に差は認められず、全て正常値を示していた。このことから、藍葉の長期投与で貧血がおこる可能性も全くないことがわかった。

4) Ames試験

一般財団法人日本食品分析センター千歳研究所に委託してAmes試験を実施した。試験の概要は以下に示すとおりである。

藍葉粉末の遺伝子突然変異誘発性を調べる目的で、「医薬品の遺伝毒性試験に関するガイドラインについて」(平成11年11月1日 医薬審第1604号)の別添「遺伝毒性試験ガイドライン」及び「医薬品の遺伝毒性試験及び解釈に関するガイダンスについて」(平成24年9月20日 薬食審査発0920第2号)の別添「医薬品の遺伝毒性試験及び解釈に関するガイダンス」に従い、*Escherichia coli* WP2uvrA及び*Salmonella typhimurium* TA系4菌株を用いて復帰突然変異試験(Ames試験)を実施した。

検体について、313~5000µg/プレートの用量で試験を行った。その結果、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上のことから、本試験条件下における検体の遺伝子突然変異誘発性は、陰性と結論した。

4. 要約

1) 雌雄30匹ずつのWistar系ラットを3群ずつに分けて、対照群(AIN-93GあるいはAIN-93M)、低用量群(1%藍葉添加食群)、高用量群(5%藍葉添加食群)として、各食餌を26週間にわたり自由摂取させて飼育した。

2) 雄、雌共に3群間の摂食量に有意差は認められなかった。

3) 飼育期間中、ラットの異常は観察されず、死亡例はなかった。

4) 雄ラットは3群間に明確な差は認められなかったが、藍葉添加群で体重増加がわずかに抑制される傾向が認められた。雌ラットは対照群に比べると藍葉添加群(低用量、高用量)で体重増加が抑制される傾向が認められた。

5) 雄ラットの臓器重量を比較すると、懸念された肺や心臓への副作用もなく、3群間に差は認められなかった。また腎臓周囲脂肪と副睾丸周囲脂肪は、高用量群で有意に減少しており、腹腔内脂肪重量の減少が確認できた。

6) 雌ラットの臓器重量を、体重100g当たりで示した。雄と同様、臓器重量は3群間で差は認められなかった。腸間膜周囲脂肪重量には、3群間の差はなく、腎臓周囲脂肪は、対照群と比較すると、低用量群は49%、高用量群は54%、有意に低値を示した。また子宮周囲脂肪は低用量群で35%ほど、有意に減少した。

7) 血清成分を測定した結果、肝機能、腎機能の異常はみられなかった。

8) Ames試験の結果、藍葉には発がん性がないことが証明された。

5. 参考文献

1) 岩城完三, 栗本雅司: 藍 医色同源(日本文

教出版株式会社) (2001)

- 2) 木本哲夫, 山本祐規子, 日野恵子, 古谷聡美, 阿賀 創, 橋本貴治, 花谷利春, 新井成之, 池田雅夫, 福田恵温, 栗本雅司: 蓼藍 (*Polygonum tinctorium* Lour.) に含まれる悪性腫瘍細胞傷害物質について *Natural Medicines* 53(2), 72-79 (1999)
- 3) 本村衛由: 阿波食用藍の機能性成分に関する研究~ 2型糖尿病モデルラットへの影響~ 平成30年度, 修士研究論文 (2018)
- 4) 小谷 航: 阿波食用藍の機能性成分に関する研究~ 藍種子投与の影響~ 平成30年度, 修士研究論文 (2018)
- 5) 小島梨沙: 阿波食用藍の機能性成分について I. タンニン酸の関与について II. 食用藍の活用とその評価 令和元年度修士研究論文 (2019)