天然着色料クチナシ青色素の分子量及び消化管内における安定性と吸収

遠山良介,^a 井上博之,^b 瀬崎 仁^c
 台糖株式会社,^a 京都大学薬学部,^b 摂南大学薬学部^c

Average Molecular Weight and Gastro-Intestinal Absorption of a Natural Food Color Gardenia Blue

RYOUSUKE TOUYAMA,^a HIROYUKI INOUE^b and HITOSI SEZAKI^c

Taito Company Research Laboratory,^a 1-26, Higasisirike-sinmachi, Nagata-ku, Kobe 653, Japan,
 Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University,^b Yosida, Sakyo-ku, Kyoto 606,
 Japan and Faculty of Pharmaceutical Sciences, Setsunan University,^c 45-1,
 Nagaotoge-cho, Hirakata, 573-01 Japan

(Received November 24, 1993)

The natural coloring matter (blue color) produced from an aqueous extract of gardenia fruits (*Gardenia augusta* MERR.) and the decomposed protein was found to be of a mean molecular weight of 15600 ± 400 , based on the measurements of the osmotic pressure.

The absorption from the gastrointestinal tract of this natural coloring matter was examined by testing the stability of the color in the gastrointestinal tract, by observing the absorption, both *in vitro* and *in situ*, and by conducting histopathological examinations of the gastrointestinal tract and other related organs in mice which had received the color for five months. The results showed that the color was very stable at the pH levels of the gastrointestinal tract and in the presence of digestive enzymes and enterococci. No evidence of the gastrointestinal absorption was obtained.

Keywords — natural coloring matter ; gardenia blue ; molecular weight ; gastrointestinal absorption

緒 言

中南米に分布するアカネ科クチナシの近縁種 *Genipa americana* L. の果実は、古来より食用に供されてきたが、その際果汁が皮膚に触れると、青紫色を呈することが知られていた。Djerassi ら^{1,2)} によって、その原因は、主成分として単離された genipin (1) と、アミノ酸との結合によることが報告された。クチナシ青色素は、この現象を起源として、クチナシ (*Gardenia augusta* MERR.) の果実抽出物と、大豆蛋白分解物を、食用酵素 β -グルコシダーゼ存在下で作用させて得られた青色系天然着色料³⁾ である。すなわち、クチナシ果実に含有されている geniposide (2) をはじめとする各種のイリドイド配

糖体⁴⁾ が、食用酵素 β -グルコシダーゼにより 1 をはじめとする種々のアグリコンとなり、さらにこれらのアグリコンが、大豆蛋白分解物中の一級アミノ基と、空気中で酸化的に重合したものである。

著者らは、1 とメチルアミンを用いたモデル実験より、単純な青色色素⁵⁾ の一つとして 5 を報告した。一方藤川ら⁶⁾ は、1 とグリシンより生成する青色色素 (6) の構造を報告している。また著者らは、上述のモデル実験より青色色素の前駆体が 3 及び 4 のような 2-methyl-4-carbomethoxy-2-pyridine 骨格⁷⁻⁹⁾ を有する構造単位からなるポリマー⁵⁾ であること、及びその生成機構¹⁰⁾ について推定した。よって、青色色素の構造は、これらの前駆体が更に、酸化・ラジカル反応を経て、共役系がのびた高分子構

Chart 1.

造を持つものと考えられる。

クチナシ青色素は、高分子構造を持つと推定されることから、消化管で吸収されにくいものと予想される。事実、Furia と Bellanca¹¹⁾ は、高分子で消化管から吸収されない抗酸化剤について、さらに Furia¹²⁾ は、同じく高分子で吸収されない食用着色料について報告している。これらの報告によると、物質の消化管からの吸収の難易度は、分子の大きさと安定性また油/水分配比などに関連し、分子量 1500 以上の安定な高分子物質は、ほとんど吸収されないとしている。

そこで著者らは、クチナシ青色素の安全性を検討する目的で、浸透圧法により分子量を調べ、消化管での色素の安定性試験、*in vitro* 吸収試験、ラットによる *in situ* 吸収試験を行い、さらにクチナシ青色素 5 ヶ月投与マウスの組織学的検索を行った。

実験方法

1. 試薬及び装置 クチナシ青色素は、台糖社の液体クチナシ青色素 (GB-L) [$E_{1\text{cm}}^{0.1\%} = 0.5$ (590

nm)] を使用した。腸内細菌として使用した大腸菌は、*Escherichia coli* Migula IFO 3366, 乳酸菌は、*Lactobacillus plantarum* IFO 3070 を使用した。なお、使用培地は、*Escherichia* 用培地 (酵母エキス, 2.5 g; ペプトン, 5.0 g; ブドウ糖, 1.0 g; 精製水, 1.0 l; pH 6.8) と *Lactobacillus* 用培地 (酵母エキス, 25.0 g; ブドウ糖, 8.0 g; 酢酸ソーダ, 8.0 g; 精製水, 1.0 l; pH 5.5) であり、各培地は、120°C で 15 分間滅菌したものを使用した。その他の試薬は、市販特級品を用いた。pH 6.5 の等張リン酸緩衝液は 0.16 M・NaH₂PO₄ と 0.123 M・Na₂HPO₄ により調製した。色素の安定試験及び吸収試験に使用した第 1 液と第 2 液は日本薬局方 (JP XII) 崩壊試験法記載の試験液¹³⁾ 及び人工胃液 (ペプシン含有) と人工腸液 (パンクレアチン含有) は同 (JP VII) 崩壊試験法記載の試験液¹⁴⁾ を使用した。浸透圧測定用半透膜は、Sartorius Membranfilter GmbH 製半透膜 SM-12136 を用い、透析膜チューブは A.H. Thomas Company 製 Dialyzer Tubing 3787-H 45 (分子量 3500 cut off, 11 mmφ) を用いた。吸収スペクトル

は日立ダブルビーム分光光度計 200-20 を使用して測定した。

2. 数平均分子量 Zimm Myerson 型セルに半透膜をセットし、25°C の水中での各色素濃度溶液の浸透圧を測定し、その値に基づき数平均分子量 (Mn) を算出した。¹⁵⁾ 浸透圧 (π) は溶質濃度 (C) の関数として表されるので、その測定値に基づき C に対する $\pi/C \cdot R \cdot T$ をプロットすると、稀薄溶液では直線に近似するので、 C を 0 へ外挿した値から (Mn)⁻¹ が得られる。¹⁶⁾

3. 色素の安定性試験 胃液と腸液の pH 及び消化酵素の、本色素に対する影響を調べるため、第 1 液と第 2 液¹³⁾ 及び人工胃液と人工腸液に、¹⁴⁾ 色素を溶解し 37°C で 72 時間保存して経時的に波長 590 nm での吸光度の測定を行った。次に、腸内細菌に対する本色素の安定性を調べるため、色素を溶解した培地 100 ml に大腸菌及び乳酸菌をスラントより一白金耳接種し、37°C で 48 時間浸透培養を行い経時的に 590 nm での吸光度を測定した。

4. *In vitro* 吸収試験 第 1 液、第 2 液、人工胃液、人工腸液に色素を濃度 $E_{1\text{cm}}^{10\%}(590\text{nm})=0.5$ になるように溶解し、その 20 ml を透析膜チューブに入れ、透析外液に浸漬して体温 (37°C) と同じ温度で透析を行った。なお透析外液としては、各々色素溶液と等張の溶液を使用し、これを 5, 24, 48 時間目に取り替えて、72 時間透析を継続し、透析された色素量 [$E_{1\text{cm}}^{10\%}(590\text{nm}) \times 10 \times \text{色素溶液量 (ml)}$] を測定した。次に、大腸菌及び乳酸菌を各々接種した培地に色素を $E_{1\text{cm}}^{10\%}(590\text{nm})=1.7$ になるように溶解し、その 20 ml を透析膜チューブに入れ 37°C で透析を行った。透析外液としては、色素溶液と等張の培養液を使用し、これを 24 時間後に一度取り替え、計 48 時間透析を継続し、透析された色素量を測定した。

5. *In situ* 吸収試験 生理食塩水 (physiological saline solution) あるいは pH 6.5 の等張リン酸緩衝液 (isotonic phosphate buffer solution) に色素を各々 $E_{1\text{cm}}^{100\%}(590\text{nm})=1.2$ になるように溶解して灌流試験溶液として使用した。体重 160—210 g の Wistar 系雄性ラット (生物医学研究所より購入)、を pentobarbital (40—45 mg/kg) で麻酔後固定し、腹部正中線に沿って開腹した。胃幽門部と回盲接合部にカテーテルを挿入し結紮するとともに胆汁の影響を除外するため、胆管も同時に結紮した。生理食塩水で小腸管を洗浄後カテーテルを灌流ポンプに接続し、毎分 5 ml の速度で 37°C に加温した上記試料溶

液 40 ml を連続灌流した。その間、直腸温度は 36—37°C に保った。¹⁷⁾ 灌流開始 1 時間後に腸管内の灌流液をできるだけ回収し、ついで生理食塩水で装置及び腸管腔内を洗浄し、洗液と灌流液を合わせ全液を 100 ml として定量に供した。吸収量は原液と回収液中の吸光度の差から算出した。

6. 色素の吸収による消化管及び関連臓器の病理組織学的検査 B₆C₃F₁ マウス (5 週齢、日本チャールス・リバー社より購入) 雄、雌各 10 匹を 1 群とし、対照群とクチナシ青色素 4% 添加飼料投与群の 2 水準で行った。基礎飼料は CE-2 (日本クレア社製) を、色素添加飼料は同飼料に色素を添加混合後成型 (日本クレア社に依頼) したものを使用した。飼料及び水を自由に摂取させて 5 ヶ月間飼育した後、体重測定、屠殺、剖検を行った。その後直ちに、消化吸收によって直接間接影響を受ける臓器 (胃・小腸・肝臓・腎臓) を摘出し、臓器湿重量測定後に切片を作成した。その切片を 10% 中性ホルマリン溶液で固定した後、常法に従ってヘマトキシリン・エオシン染色を行い、光学顕微鏡を用いて病理組織学的検査を行った。

実験結果及び考察

1. 分子量

分子量測定法としてはゲル濾過法、浸透圧法等が考えられる。本色素は前述したごとく、クチナシ果実由来の複数のイリドイド化合物と、単純な組成にない大豆蛋白分解物の重合物である。よって、構成分子の分子量、極性等が大きくばらつくことが予想された。このような場合ゲル濾過法は、不適となり、事実、分析を行ったところ、広くテーリングし、ピークが特定できなかった。そこで、構成分子全体の平均分子量をうまく測定できる方法として、浸透圧法を採用した。

Fig. 1 に、各色素濃度 (C) における浸透圧測定値から得られた $\pi/C \cdot R \cdot T$ 値をプロットした。次に C を 0 に外挿し、プロット切片より Mn を算出したところ、 $Mn=15600 \pm 400$ という値が得られた。genipin とメチルアミンにより生成したモデル化合物の場合、モノマーが 40—44 個結合していることが判明している。⁵⁾ 本色素の数平均分子量を 15600 ± 400 として考えると、本色素のモノマーの数は、350—400 と推定される。

2. 色素の安定性試験

たとえ高分子の色素であっても、消化管で分解後吸収される場合もありうる。よって、消化管での吸

Fig. 1. Relation between Concentration of Coloring Matter (C) and Apparent Number-average Molecular Weight [$\pi/C \cdot R \cdot T$]

収の難易を調べる上で、物質の安定性試験は重要な検討項目の一つである。本研究では、色素の胃液・腸液の pH における安定性、また消化酵素や腸内細菌に対する安定性を検討した。腸内細菌としては代表的な大腸菌と乳酸菌を用いた。

第 1 液、第 2 液、人工胃液、人工腸液での安定性試験の結果 (Table I)、本色素は第 1 液、第 2 液、ペプシン含有の人工胃液、パンクレアチン含有の人工腸液中で非常に安定であることが判明した。また Table II に示すように、消化管内の大腸菌や乳酸菌によっても分解されないことが明らかとなった。

3. *In vitro* 吸収試験

上記のように本物質は第 1 液、第 2 液、人工胃液、

人工腸液及び腸内細菌に対して安定であるが、それらの液中の色素が消化管でどの程度吸収されるかを、まず *in vitro* モデル実験で検討した。一般に分子の大きさと吸収との間には相関関係があり、Furia の報告^{11,12)}によると、分子量 1500 以上の物質はほとんど吸収されないという。そこで著者らは、透析膜チューブを消化管モデルとみなして吸収試験を行った。チューブの中に色素を各々の液に溶解した液をいれて透析を行い、外液に透析された色素量を腸管からの吸収量とみなすこととした。まず色素を第 1 液、第 2 液、人工胃液、人工腸液、大腸菌培養液、乳酸菌培養液に各々溶解し、透析外液を 5, 24, 48 時間ごとに取り替えてその都度色素の透析度を調べた。

72 時間で透析された色素量の合計は第 1 液で 2.3%、第 2 液で 9.9%、人工胃液で 4.4%、人工腸液で 13.2%であることが判った (Table III)。

中村ら¹⁷⁾は本透析膜チューブを使用して透析した場合、72 時間での透析量の合計が 20%以下であれば実際の消化管では、ほとんど吸収されないと報告している。よって、上記の結果は本色素が非常に吸収されにくい物質であることを示したものと考えられる。

大腸菌培養液での色素透析率は 48 時間で 9.5%、乳酸菌培養液での場合は、14.4%であった (Table IV)。乳酸菌の場合は人工腸液の場合よりやや高い数値を示したが、その値は 20%以下であった。したがって腸内細菌の影響により本色素が消化管で分解、吸収される割合は、非常に少ないものと推定された。

TABLE I. ^{a)} Stability of Coloring Matter against 1st and 2nd Solutions and Artificial Gastric and Intestinal Juices Cited from Japanese Pharmacopoeia

passage of time		0 h	5 h	24 h	48 h	72 h
1st Solution	Absorbance ($-\log T$)	58.61	58.32	52.66	50.27	49.71
	% Residual	100.0	99.5	89.8	85.8	84.8
	pH	1.30	1.40	1.30	1.35	1.35
2nd Solution	Absorbance ($-\log T$)	8.36	8.27	8.06	7.97	8.30
	% Residual	100.0	98.9	96.4	95.3	99.3
	pH	7.25	7.25	7.25	7.20	7.30
Artificial intestinal juice	Absorbance ($-\log T$)	15.40	15.49	14.75	14.43	13.74
	% Residual	100.0	100.6	95.8	93.7	89.2
	pH	1.30	1.40	1.30	1.30	1.30
Artificial intestinal juice	Absorbance ($-\log T$)	8.70	9.17	8.37	8.94	9.11
	% Residual	100.0	105.4	96.2	102.8	104.7
	pH	8.60	8.70	8.80	8.95	9.25

^{a)} Figures in the following Tables are the average of duplicate measurements.

TABLE II. Stability of Coloring Matter against Escherichia and Lactbacillus Bacterias

passage of time		0 h	24 h	48 h
<i>E. coli</i>	Absorbance (-logT)	17.7	19.7	17.4
<i>Migula</i>	% Residual	100.0	111.1	98.3
(IFO 3366)	pH	6.8	4.8	4.7
<i>L. plantarum</i>	Absorbance (-logT)	17.7	18.4	18.2
(IFO 3070)	% Residual	100.0	107.4	102.8
	pH	5.5	4.4	4.1

4. *In situ* 吸収試験

次に実際にラット腸管による *in situ* 吸収試験を実施し、その結果を Table V に示した。色素液は、一時間灌流後においても色素濃度に変化がなく、色素はほぼ 100% 回収されたことより、小腸内での明瞭な分解、吸収、吸着は起こらない事が確認された。なお生理食塩水に溶解した色素液の pH は 4.7 であったが、灌流後 pH は 6.7 に上昇した。

5. 色素の吸収による消化管及び関連臓器の病理組織学的検査

体重 50 kg の成人が 1 日に摂取する食品を 1500 g とし、その 1/3 を色素濃度 $E_{1\text{cm}}^{100\%}(590\text{ nm})=0.5$ に着色したものであるとすれば、体重 kg あたり 5 ユニット ($1500/50 \times 1/3 \times 0.5$) の色素を摂取したことになる。一方、体重 30 g のマウスが 1 日に摂取する 4 % 色素添加飼料を 3.5 g とすれば、マウス体重 kg あたり 2320 ユニットの色素を摂取したことになり、約 500 倍の安全係数を有することになる。飼育結果

TABLE IV. Dialysis of Coloring Matter in Fermented Broth of Escherichia and Lactbacillus Bacterias

	broth of <i>E. coli</i>	broth of <i>L. plantarum</i>
Initial color in tube ^{a)}	100 ^{b)}	100
% Dialyzed color	24 h 4.2 48 h 5.3 (sum) (9.5)	7.0 7.4 (14.4)
Residual color in tube	48 h 90.9	86.6
Total color	48 h 100.4	101.0
% Residual color after 48 h of Table II	98.3	102.8

a) 20 ml color solution of $E_{1\text{cm}}^{10\%}(590\text{ nm})=0.5$ was used.

b) $E_{1\text{cm}}^{10\%}(590\text{ nm}) \times 10 \times 20$ (volume of color solution).

は、雄の平均体重 31.58 g 平均飼料摂取量 3.75 g であり、雌の平均体重 23.58 g 平均飼料摂取量 3.60 g であった。

5 ヶ月間の飼育終了後、動物は全数屠殺してその剖検を行った後、臓器の湿重量を測定しその体重比を求めた。これら臓器重量の体重比について各群間の差の検定を行ったが、いずれの場合にも危険率 5 % で有意差は検出されなかった。剖検における肉眼観察結果は消化管及び各臓器とも正常で、対照群との間に差は認められなかった。また、消化管からの色素の吸収を調べるため消化管及び関連臓器の病理組織学的検査を行ったが、色素が腸管から吸収されたという所見は得られなかった。すなわち、

1) 色素は腸管上皮間隙、リンパ管などには認めら

TABLE III. Dialyzable Amount of Coloring Matter in Several Test Solutions

	1st solution	2nd solution	Artificial gast. juice	Artificial inte. juice
Initial color in tube ^{a)}	100 ^{b)}	100	100	100
5 h	0.4	1.2	0.6	1.9
24 h	0.6	3.2	1.4	3.9
% Dialyzed color	(sum) (1.0)	(4.4)	(2.0)	(5.8)
48 h	0.7	2.9	1.3	3.7
(sum)	(1.7)	(7.3)	(3.3)	(9.5)
72 h	0.6	2.6	1.1	3.7
(sum)	(2.3)	(9.9)	(4.4)	(13.2)
Residual color in tube	after 72 h 80.9	89.1	82.2	81.9
Total color	after 72 h 83.2	99.0	86.6	95.1
% Residual color after 72 h of Table I	84.8	99.3	89.2	104.7

a) 20 ml color solution of $E_{1\text{cm}}^{10\%}(590\text{ nm})=0.5$ was used.

b) $E_{1\text{cm}}^{10\%}(590\text{ nm}) \times 10 \times 20$ (volume of color solution).

TABLE V. Absorption of Coloring Matter by the Intestine of Rats

No.	body weight (g)	solvent	absorbance ^{a)} of perfusing soln.		% recovery	pH of perfusing soln.	
			initial	1 h		initial	1 h
1	200	Physiological saline solution	0.552	0.562	101.8	4.7	6.5
2	205	Physiological saline solution	0.552	0.569	100.9	4.7	6.5
3	175	Isotonic phosphate buffer solution.	0.482	0.478	99.2	6.5	6.5
4	195	Isotonic phosphate buffer solution.	0.482	0.467	96.9	6.5	6.5

a) Absorbance was measured after filling up the solution before and after irrigation to constant volume.

Fig. 2. Microscopic Photographs of the Liver and Kidney

れなかった。

2) 上皮内に色素が取り込まれると、細胞胞体内にセカンダリー・ライソゾーム (secondly lysosome) が出現するため、たとえ色素が認められなくても光学顕微鏡観察によって色素が取り込まれたことを推定することはできる。しかし実際には、セカンダリー・ライソゾームなどは認められなかった。

3) また、色素が腸管から吸収された場合、当然經由すべき肝臓・腎臓の組織にも変化が見られるが、Fig. 2 の顕微鏡写真にも示したごとく特記すべき変化は認められなかった。

以上の結果と、先に報告した³⁾ 急性、亜急性、変異原性等の毒性試験の結果を考え合わせ、クチナシ青色素の安全性については、特に問題になるとは考えられなかった。

結 論

著者らは、クチナシ青色素について

- 1) 色素の数平均分子量
- 2) 色素の消化管内での安定性の試験
- 3) 色素のラット消化管よりの吸収性の試験
- 4) 色素長期投与後のマウスの消化管及び関連臓器の組織学的検索

を行った。その結果本色素は、分子量 15000 前後の高分子色素であること、pH の変化・消化酵素・腸内細菌に対して非常に安定であること、また *in vitro*, *in situ* の吸収試験及び関連臓器の組織学的検索においても吸収が認められないことが判った。

謝辞 本研究を行うに当たり、病理学的組織検査についてご指導いただきました東北大学抗酸菌病研究所教授福田多禾男・玉橋信彰博士、有益なご助言・ご鞭撻を賜りました元国立衛生試験所食品添加物室長神蔵美枝子博士に厚くお礼申し上げます。

引 用 文 献

- 1) C. Djerassi, J.D. Gray, F.A. Kincl, *J. Org. Chem.*, **25**, 2174 (1960).
- 2) C. Djerassi, T. Nakano, A.N. James, L.H. Zalkow, E.J. Eisenbraun, J.N. Shooley, *J. Org. Chem.*, **26**, 1192 (1961).
- 3) 吉積智司, 奥山秀俊, 遠山良介, 食品工業, **23**, 41 (1980).
- 4) 井上博之, 武田美雄, 斉藤節生, 桜木菱子, 薬誌, **94**, 577 (1974).
- 5) R. Touyama, Y. Takeda, K. Inoue, I. Kawamura, M. Yatsuzuka, T. Ikumoto, T. Shingu, T. Yokoi, H. Inouye, *Chem. Pharm. Bull.*, **42**, 668 (1994).
- 6) S. Fujikawa, Y. Fukui, K. Koga, K. Nomoto, *Tetrahedron Lett.*, **28**, 4699 (1987).
- 7) G. Anderson, Jr., William F. Harrison, Robert Gordon Anderson, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 3448 (1963).
- 8) G. Anderson, Jr., William F. Harrison, *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 708 (1963).
- 9) 本報告における 2-methyl-4-carbomethoxy-2-pirindine 骨格の命名ナンバーは、IUPAC 命名法ではなく、イリドイド化合物に使用されている慣例命名法に従った。
- 10) R. Touyama, K. Inoue, Y. Takeda, M. Yatsuzuka, T. Ikumoto, N. Moritome, T. Shingu, T. Yokoi, H. Inouye, *Chem. Pharm. Bull.*, **42**, in press (1994).
- 11) T.E. Furia, N. Bellanca, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **54**, 239 (1977).
- 12) T.E. Furia, *Food Technol.*, **31**, 34 (1977).
- 13) 日本薬局方, 第 12 改正 B-382.
- 14) 日本薬局方, 第 7 改正 754.
- 15) 河合 徹, 井上智治, “実験化学講座,” 8 (上), 日本化学会編, 丸善, 東京, 1956, p.43.
- 16) W.H., Stockmayer, E.F. Casassa, *J. Chem. Phys.*, **20**, 1560 (1952).
- 17) J. Nakamura, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagasaki Univ., personal communication, 1984.