

氏名(本籍) 武 田 由 比 子

学位の種類 薬 学 博 士

学位記番号 薬 第 310 号

学位授与年月日 平成 2 年 11 月 28 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当

学位論文題目 クロロフィル分解物の生成と試験法および細胞毒性に関する研究

(主 査)

論文審査委員 教授 鈴木康男 教授 橋本嘉幸

教授 佐藤 進

論文内容要旨

緑色野菜中の色素クロロフィルは、光、微生物あるいはpH等により、容易に多種の分解物に変化し、食品、飼料等に残存したこれらの分解物が人畜に対して健康障害を与えた事例が数多く報告されるようになった。食品中に存在する可能性の高いクロロフィル関連化合物の構造式をFig.1に示す。これらの中、クロロフィルの脱マグネシウム且つ脱フィチル化合物であるフェオホルバイド、ピロフェオホルバイド類がクロレラ食品に存在し、これらを摂取すると光過敏症が発生することが知られている。最近、自然食品を濃縮、加工したいわゆる健康食品が多数市販されており、分解物濃度も高くなり、思わぬ障害が多数発生する恐れを否定できない。

まず、著者はこの種の問題の危険度を予測し、適切な対策を講ずるため、薄層クロマトグラフィー及び高速液体クロマトグラフィーによるクロロフィル関連化合物の簡易定量分析方法を確立した。ついで市販品の実態調査を行った結果、重要な保存食の一つである緑色野菜の塩蔵加工品中にも、種々のクロロフィル分解物の存在が認められた。また、上述のフェオホルバイド類化合物の他に、クロロフィル分解物としてフェオフィチン類も存在することを確認した。

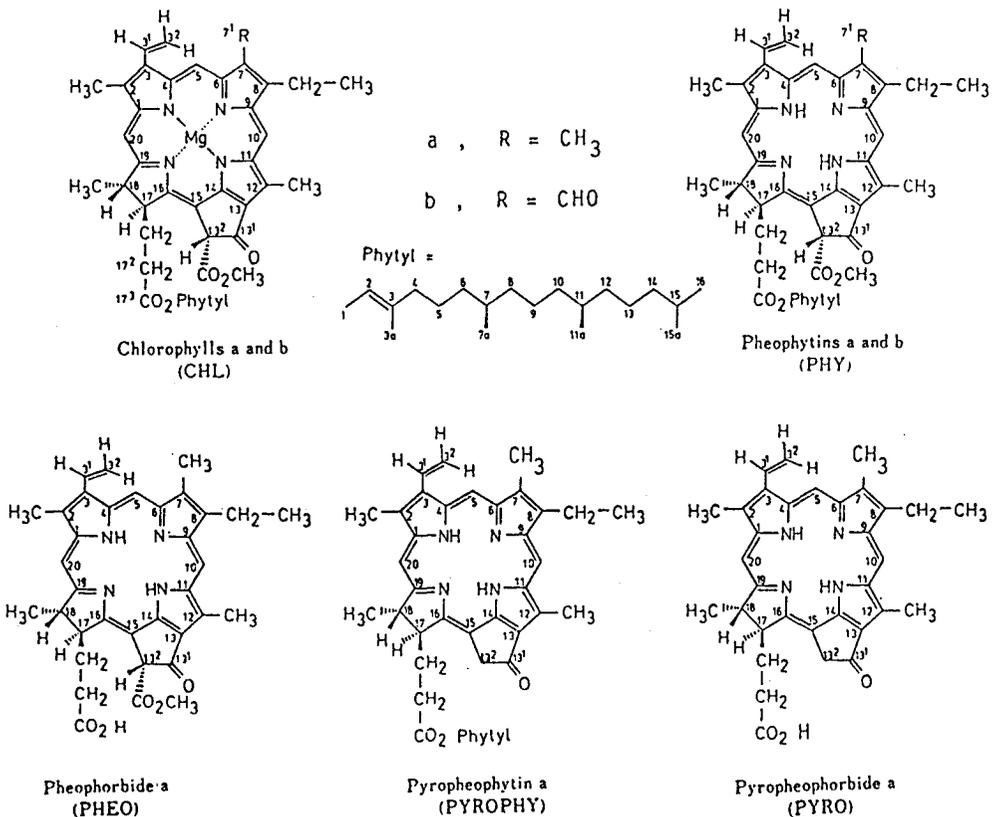


Fig. 1 Chemical structures of chlorophyll-relatives

つぎに、これらの食品におけるフェオホルバイド a (PHEO-a)、ピロフェオホルバイド a (PYRO-a) の生成される原因及びその生成機構を解明した。さらにこれら化合物の毒性発現の機構には、生体膜脂質の過酸化反応が関与することが推定されているので、まず食用油脂を用いてその過酸化反応に対するこれら化合物の作用を比較検討した。酸化の指標としてはエタンや、ペンタン等の炭化水素生成量を選び、その測定系を開発した。

この測定系を利用し、ウサギ赤血球、培養細胞等の生体膜の脂質の光酸化に対するクロロフィル関連化合物の影響を調べ、細胞の損傷との関連について検討した。

第一章 分析法と市販食品の実態調査

クロロフィル分解物の分析のための公定法（環食第99号）には比色法が採用されているが、これらの方法では分解物の総量が測定されるのみである。そこでまず PHEO-a、PYRO-a などの分解物を分離分析するため、薄層クロマトグラフィー（TLC）による簡易定量分析法を開発した。市販食品の実態調査では、数多くの試料の分析が必要であるのでこの方法がより適当であった。つぎに分解物生成機構や生成因の究明のための微量定量分析として、液体クロマトグラフィー（HPLC）法を確立した。これらの方法を用いて多数の市販野菜、漬物、クロレラ食品等を分析した。

その結果、古漬高菜で560 ppm の PYRO-a、クロレラでは最高211 mg%（厚生省環食第99号規制値100 mg%）の PHEO-a が検出された。クロロフィルラーゼが残存する検体では、保存中に分解が進み、PHEO-a の総量（規制値160 mg%）が、500 mg%以上のものもあった。一般食品である牡蛎やあわびの中腸腺にも PHEO-a、PYRO-a が検出された。

第二章 分解物の生成と成因

クロレラ中に検出される PHEO-a は、製品とする過程で共存するクロロフィルラーゼの作用により生成したものであることが知られている。市販食品実態調査において、多数種の塩蔵加工品（漬物）中に PHEO-a、および PYRO-a を検出したが、これらの生成過程は不明である。そこで、高菜加工品の製造過程で増殖する微生物に着目し、クロロフィル分解物の生成との関連を解析した。

その結果、菌数増加のみられる9日間は PHEO-a が増加し、その後減少し、それに代わり PYRO-a が増加した。また、PHEO-a 及び PYRO-a の総生成量と、総菌数及び Lactobacillus 菌数とは類似の増加傾向を示していた。

つぎに、材料の高菜を短時間煮沸殺菌したものと未処理のもので、分解物の生成動向を比較した結果、両者ともに未処理試料のほうが、明らかに生成量が高かった。

煮沸殺菌にかえて保存料ソルビン酸カリウムを添加しても、菌数の減少に伴いPYRO-aの生成が抑制された。

クロロフィルa (CHL-a) に高菜漬物浸出液より調製した有菌画分と無菌画分を作用させた結果、PHEO-a, PYRO-aのいずれの生成量も有菌画分で明らかに多かった。PHEO-aを基質とした場合PYRO-aが産生されるが、その生成は有菌画分で大であった。漬物中の主要な菌2種 (Lactobacillus, Enterobacterium) を単離して作用させると、CHL-aからはPHEO-aおよびPYRO-a, PHEO-aからはPYRO-aの生成が認められた。

またクロロフィルは赤血球やあわび中腸腺内の酵素等により分解され、PHEO-a, PYRO-aが生成することも明らかとなった。CHL-aからMgの脱離したPHY-aはウサギ赤血球中でPHEO-aに、PYROPHY-aはPYRO-aを生成することがわかった。CHL-aは5時間後に半分に減少するがPHEO-a, PYRO-aは未検出である。一方、あわび中腸腺の酵素の働きでPHEO-aからPYRO-aが生成された。

第三章 クロロフィル関連化合物の脂質過酸化促進作用

まず食用油脂、生体膜脂質等の劣化の指標である炭化水素の発生量をガスクロマトグラフィーによって測定する方法を開発した。すなわち試料に硫酸銅およびアスコルビン酸を加え、30分間反応後のヘッドスペースガスを採取し、ガスクロマトグラフィーにより炭化水素を定量した。この方法を用い、大豆油の脂質過酸化反応に対するクロロフィル関連化合物の影響を比較した。

クロロフィル自体も過酸化促進作用があるが、分解物にはこの作用の強いものが多く、その中でPYRO-aが最も強い。また、各測定値と過酸化価 (POV) との間に相関性が認められた。

次に、同様の測定系を用い、培養細胞 (ラット初代培養肝細胞, マウス BALB 3T3細胞, マウス皮膚繊維芽細胞) とウサギ赤血球の脂質の過酸化反応に対し、各種クロロフィル関連化合物がどのような影響を与えるかを調べた。ラット初代培養肝細胞, マウス BALB 3T3培養細胞では無添加でもエタン, ペンタン生成は短時間光照射で完了するため化合物の影響を比較できない。またマウス皮膚繊維芽細胞の場合には、無添加時にはエタン, ペンタンの生成が少なく、クロロフィル関連化合物によってその生成量が増加するのでその効果の判定が可能であった。その程度を比較するとPYRO-a, PHEO-a, フェオフィチン, クロロフィルの順であった。

本結果は生体細胞膜の過酸化反応が分解物によって特異的に促進されていることを示す。

第四章 クロロフィル関連化合物の細胞障害

PYRO-aやPHEO-aによる人や動物での光過敏症が明らかにされているが、種々の化合物の作用を知るには試験管内でのスクリーニング法を確立することが必要である。まず著者はこれら

化合物のウサギ赤血球に対する強い溶血反応に注目し、これを指標として細胞障害作用を評価した。また食品中にはPYRO-aやPHEO-a以外にもフェオフィチン等の油脂の酸化を促進する物質が混在しているので、これらについても溶血作用を比較し、化学構造との相関を調べた。各濃度クロロフィル関連化合物の存在下における照射経過時間と赤血球の溶血率との関係は、溶血率の高い方からPYRO-a>PHEO-a>>PHY-b>PHY-a>PYROPHY-a>CHL-a>CHL-b>対照群の順であった。

つぎにC3Hマウス皮膚繊維芽細胞を用い、生存率を指標としてクロロフィル関連化合物の細胞損傷作用を調べた。細胞の損傷率はPYRO-a>PHEO-a>PHY-bの順であり、他の化合物の作用は低い。

この際同時にマウス皮膚繊維芽細胞を用いてペントンの生成量を測定すると、その値と細胞損傷率の間には相関性 ($r=0.9629$) が認められ、細胞障害性と脂質過酸化反応とは密接な関連性があるものと考えられた。

以上の結果より、毒性の強さを化学構造式によって次のように大別するとタイプ1, 2, 3の順に溶血作用が強くなる。

1 : Mg, phytol=CHL-a, b

2 : 脱Mg, phytol=PHY-a, b, PYROPHY-a

3 : 脱Mg, 脱 phytol=PHEO-a, PYRO-a

脱Mg, 脱フィチル化合物は作用が強く、特にC-13位の脱 carboxymethyl 体であるPYRO-aが最も強い。CHL-a, bはそれ自体では溶血作用は殆ど認められないが、酸等の外的因子が加えられると急速に脱Mg, 更に脱フィチル化合物となり作用を引き起すこととなる。また脱Mg化合物となると赤血球中の酵素等により容易に脱フィチル化合物が生成され、障害作用が強くなり得ると推察された。

審査結果の要旨

クロロフィルは天然色素として食品中に含まれることが多いが、容易に多種の分解物に変化し、食品中に残存したこれら分解物は、人畜に対して健康障害を与えることが知られている。本論文は、クロロフィルの脱Mg、脱フィチル体であるフェオフィルバイド、ピロフェオフィルバイドを取り上げ、これら化合物の食品中への残存の実態調査と毒性発現の機構について検討している。

まず市販の食品について、これらクロロフィル分解物を迅速に測定する方法として薄層クロマトグラフ法および高速液体クロマトグラフ法を確立し、実態調査に応用した。その結果、健康食品や重要な保存食の一つである緑色野菜の塩蔵加工品中には、これらの種々の分解物がかなりの量検出されることを明らかにした。またクロロフィル分解物として、フェオフィチン類の存在も確認した。

つぎにその生成原因および生成機構を調べ、フェオフィルバイド類の生成には、微生物が作用していると考えられる結果が得られた。またクロロフィルは赤血球やあわび中腸腺内の酵素によっても分解されることを示した。

さらにこれらクロロフィル関連化合物の毒性の発現には、生体膜脂質の過酸化反応が関与していることが考えられるので、不飽和脂肪酸の過酸化反応の指標として、炭化水素の発生をガスクロマトグラフ法によって測定する方法を開発した。この方法により、クロロフィル分解物には脂質過酸化促進作用があり、この作用と毒性発現との間には密接な関連性のあることを示した。

またこれらクロロフィル分解物の簡便な毒性スクリーニング法の開発を目的とし、赤血球の溶血反応を利用する方法を検討した。その結果、溶血反応の強さと化学構造との間には一定の関係が存在し、毒性と関連性があることを示した。すなわち、その強度からクロロフィル関連化合物は3つの型(Mgとフィチル基をもつもの、脱Mg体、および脱Mg、脱フィチル体)に分類でき、それぞれが毒性の発現と関連づけられることを明らかにした。

さらに種々の培養細胞を用いてクロロフィル分解物の細胞障害性を調べ、毒性との関連性を検討した。

以上本研究は、クロロフィル分解物の食品中への残存を検査する簡便な方法を開発し、ついでこれら化合物の毒性発現の機構を明らかにしたものであり、博士論文として十分価値あるものと認める。