

## 銅クロロフィルおよび銅クロロフィリンナトリウムについて

### 1. はじめに

銅クロロフィルおよび銅クロロフィリンナトリウムは、昭和30年代に化学的合成品としてグリーンピースや山菜など野菜、果実の貯蔵品あるいはチューイングガムなど一部の食品の着色にのみ使用が認められた食品添加物である。これらはFAO/WHOの規格で安全性の高い食品添加物としてAリストに記載されており、EC諸国では一般食品に対しての使用規制はなく菓子類の着色を中心に広く用いられている。平成5年4月、それらの使用基準が緩和され、表1に示したようにあめや生菓子などにも使うことができるようになった。それに伴い今後、銅クロロフィルおよび銅クロロフィリンナトリウムを使用した食品の流通が増加することが予想される。そこでこれを機会にそれらの特徴、構造、製法および分析法などを紹介したい。

### 2. 特徴

クロロフィルは葉緑素とも呼ばれ、植物が光合成を行うのになくしてはならない物質である。一方で、それは私たちが毎日食べる野菜などの植物に広く含まれる緑色成分でもあり、安全な色素であることは言うまでもない。そのクロロフィルを原料にして製造される銅クロロフィ

ルおよび銅クロロフィリンナトリウムにも、同じように安全であるというイメージがあり、消費者に受け入れられやすいと考えられる。また、これらは熱に対して比較的安定であるという特徴があるほかに、クロロフィルと同様に脱臭効果があり、その面でのメリットも期待できる。

### 3. 構造

クロロフィルは、その構造を図1に示したように、クロロフィルaおよびbの2種類の成分の混合物であり、高等植物におけるaおよびbの存在比は約3:1であると言われている。クロロフィルは、上述したように安全な色素であるが、それを植物から抽出するとすぐに退色してしまうため、食品などの着色に用いるのには不適當である。その原因は、クロロフィルの中心にキレート結合して存在するマグネシウムが脱離し、フィオフィチンと呼ばれる暗褐色の成分に変化するためである。しかし、そのマグネシウムを銅に置換することによって、クロロフィルは安定な銅クロロフィルと呼ばれる成分に変化することが知られており、それはクロロフィルと同じような緑色を有することから、古くから食品や医薬品などの着色に用いられてきた。その構造を図2に示したが、こ

表1 銅クロロフィルおよび銅クロロフィリンナトリウムの使用基準

	銅クロロフィル	銅クロロフィリンナトリウム
果実類または野菜類の貯蔵品	銅としてその1kgにつき0.10g以下	
こんぶ	銅としてその無水物1kgにつき0.15g以下	
チューイングガム	銅としてその1kgにつき0.050g以下	
みつ豆缶詰または みつ豆合成樹脂製包装詰中の寒天	銅としてその1kgにつき0.00040g以下	
* あめ類	—	銅としてその1kgにつき0.020g以下
* 魚肉ねり製品(魚肉すり身を除く)	銅としてその1kgにつき0.030g以下	銅としてその1kgにつき0.040g以下
* 生菓子(菓子パンを除く)	銅としてその1kgにつき0.0064g以下	
* チョコレート	銅としてその1kgにつき0.0010g以下	銅としてその1kgにつき0.0064g以下
* シロップ	—	銅としてその1kgにつき0.064g以下

\*新たに追加された品目

の化合物は生成する際に10位の炭素の絶対配置が一部逆転するため、銅クロロフィルa、a'、bおよびb'の4種類の成分の混合物であることがわかっている。

この銅クロロフィルは油溶性色素であり、水にほとんど溶けないため、着色料としての使用対象はかなり限定される。そこで、この銅クロロフィルを加水分解し、水溶性のナトリウム塩とした化合物が図3に示した銅クロロフィリンナトリウムである。

#### 4. 製造法

市販されている銅クロロフィルおよび銅クロロフィリンナトリウムは、アルファルファやクロレラあるいは牧

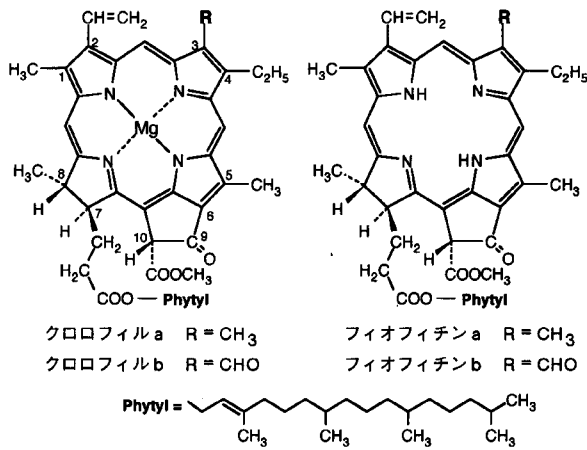


図1 クロロフィルおよびフィオフィチンの構造

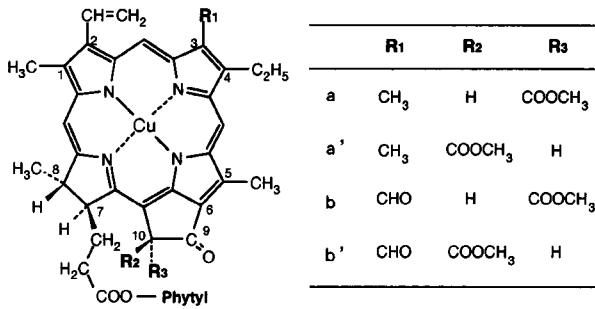


図2 銅クロロフィルの構造

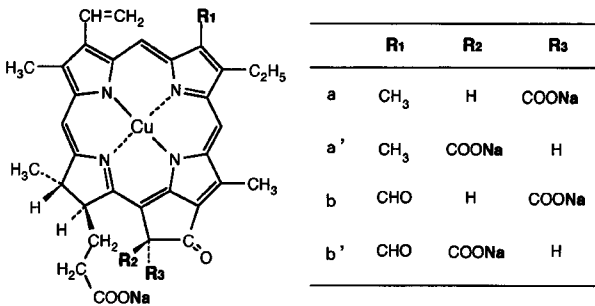


図3 銅クロロフィリンナトリウムの構造

草などから抽出したクロロフィルから作られる場合もあるが、それらの大部分は、中国から輸入されるフィオフィチンを原料にして製造される。そのフィオフィチンは、蚕の糞の中に大量に含まれるクロロフィルを酸性条件下で溶媒抽出して得られたものである。フィオフィチンを少量の有機溶剤に溶かし、そこに無機の銅塩（塩化第二銅）のメタノール溶液を加えた後、攪拌しながら加温するだけで銅クロロフィルが生成する。生成した銅クロロフィルは溶媒抽出された後、溶媒を留去し製品化される。またそれとは別に、山菜などを加工する際に、銅鍋で煮ることによって、見栄えのよい製品ができることも知られている。これは、加工中に鍋から溶けだした銅が山菜に含まれるクロロフィルの一部と反応し、銅クロロフィルが生成するため色鮮やかに仕上がるためであり、そのような方法で製造された着色料無添加の製品から銅クロロフィルが検出され問題になることがある。

#### 5. 分析法

表1をご覧いただきたい。ここで注目すべきは、銅クロロフィルおよび銅クロロフィリンナトリウムの使用量が銅クロロフィルおよび銅クロロフィリンナトリウムとしてではなく、銅の含有量として間接的に規定されている点である。その理由については、次のように考えられる。食品添加物として使用される銅クロロフィルおよび銅クロロフィリンナトリウム製剤は、その名称からは単成分のような印象を受けるが、実際は図2および3に示したa、a'、bおよびb'の4種類の成分以外にも、それらに類似した構造および色調を有する様々な成分によって構成される混合物であり、また、製剤中のそれら構成成分の含有割合はメーカーや製造ロットによって著しく異なっている。したがって、食品に添加されたそれら色素成分の総量を規制するには、すべての成分に共通するキレート中心の銅の量によるほかないためである。

その分析法として、従来は試料を灰化し、原子吸光度計で定量する方法が用いられてきた。しかし、この方法では銅クロロフィルおよび銅クロロフィリンナトリウムを区別できないだけでなく、食品に天然に含まれる銅の影響を受けるため正確な定量ができない。そこで、天然由来の銅の影響を除き、銅クロロフィルおよび銅クロロフィリンナトリウムを分別定量するために図4に示した分析法<sup>1)</sup>が用いられるようになった。しかし、この方法は、溶媒抽出、カラムクロマトグラフィーおよび灰化などの煩雑な前処理を行う必要があり、分析に非常に長い時間を要する。

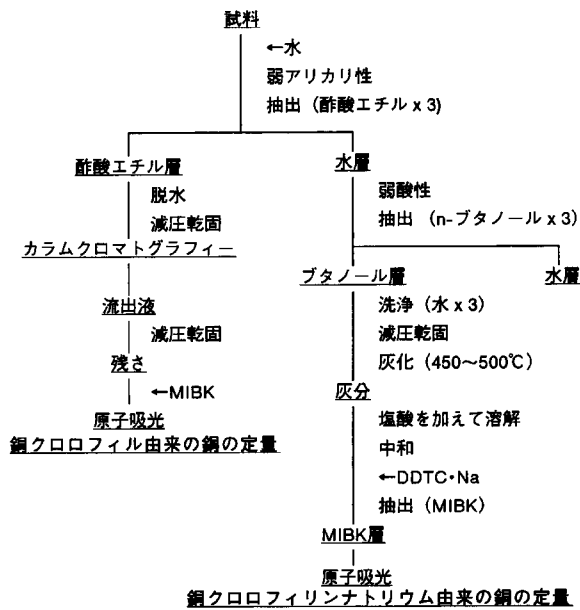


図4 銅クロロフィルおよび同ナトリウムの分析法

### 6. 製剤中の構成成分の構造

市販の銅クロロフィル製剤をHPLCで分離すると図5に示したようなクロマトグラムが得られ、そこには非常に多くの構成成分が含まれていることがわかる。そのクロマトグラム上の主なピーク(B, H, I, J, NおよびO)についてフォトダイオードアレイ検出-HPLCを用いて吸光スペクトルを測定したところ、それらの成分はすべて、クロロフィルや銅クロロフィルと同様に、400-450 および 650nm付近の2箇所には大きな吸収帯を有することが認められた。それより、これらのピーク成分はクロロフィルと同じような緑色を有することが推定されたが、極大吸収波長がクロロフィルや銅クロロフィルの文献値とは一致しないことより、これらはすべて銅クロロフィル類似成分であると考えられた。しかしながら、製剤中の銅クロロフィルの類似成分については、図6に示した構造<sup>2)</sup>

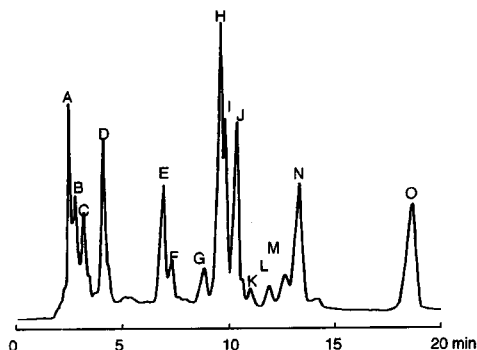
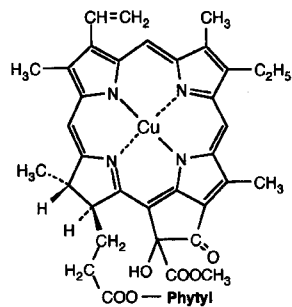
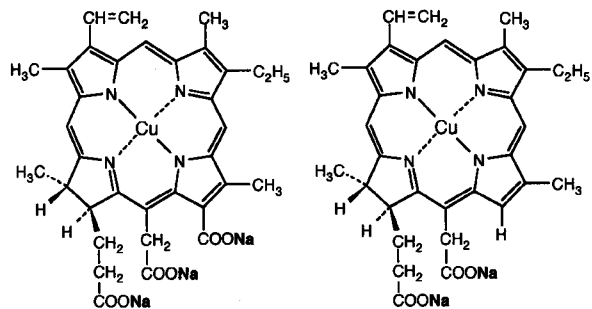


図5 銅クロロフィルのHPLCクロマトグラム  
条件：カラム, ODS; 検出, 420 nm;  
移動層, アセトン-アセトニトリル(1;1)



10-ヒドロキシ-銅クロロフィル a

図6 銅クロロフィル類似物質の構造



銅クロリン e<sub>6</sub>ナトリウム

銅クロリン e<sub>4</sub>ナトリウム

図7 銅クロロフィリンナトリウム類似物質の構造

の成分が含まれているという報告があるのみであり、早急な解明が望まれている。

一方、銅クロロフィリンナトリウム製剤中には、図7に示すようなクロリン e<sub>4</sub> および e<sub>6</sub> と命名された成分<sup>3)</sup> が存在することが報告されている。

### 7. おわりに

以上のように銅クロロフィルおよび銅クロロフィリンナトリウムには、多くの類似成分が含まれており、それらの多くは未だ構造が明らかにされていない。したがって、それらの成分の構造を解明するとともに、上述の原子吸光による分析法は、煩雑である上に非常に長い時間を要するため、HPLCや TLCを用いて短時間で分析可能な方法を確立する必要があると考える。そのためには、それぞれの製剤中に含まれる安定な指標成分を見出し、それを標準品として供給できる体制づくりが望まれる。

### 文献

- 1) 食品中の食品添加物分析法解説書, 講談社, pp. 321-326, (1992).
- 2) 大戸ら, 衛生化学, 40, 279, (1994).
- 3) S. Chernomorsky, *J. AOAC International*, 77, 756 (1994).

(食品薬品部 猪飼蒼友)

## A型肝炎ウイルスの検査法と現況

環境衛生が整備され経口感染症は減少した。A型肝炎ウイルス(HAV)感染症もその一つであり、愛知県血清バンク事業による県民の抗体保有状況を調べると、1940年以前に出生した人は80%以上が抗体陽性であるのに対し、1950年以後出生した人の80%以上が抗体陰性であった。しかしながら、HAVの感染経路が完全に断たれたわけではなく、A型肝炎患者の発生は毎年報告されている。感染症サーベイランス事業によると、愛知県では1990年をピークとする散発流行があり、その前後5年間で690名の患者報告があった。

HAVに感染した場合の発症率は年齢に大きく左右され、5歳未満では殆どがかぜ様症状か不顕性で終わる。当研究所では、厚生省の依頼でパキスタンの小児の感染症についても調べているが、親からの移行抗体がなくなる6ヵ月齢以降からHAVの感染を受け2歳で100%近くが抗体陽性になっている。しかしA型肝炎については殆ど問題になっていない。わが国で、1940年以前に生まれた人の多くが抗体を保有しているにもかかわらず、多くの人々が肝炎の経験がないのも幼児期に感染したせいであろう。しかしながら、加齢とともに肝炎の発症率は高くなり、成人ではHAVに感染した人の多くが1ヵ月以上の入院加療を余儀なくされている。A型肝炎は、環境の整備された先進各国で成人の感染症として問題となっている。このような状況から、わが国でもワクチンの開発が行われ、まもなく実用化される場所であるが、投与の対象者は限定されると思われる。流行規模を抑えるため感染源を充分把握し予防措置を講ずる必要がある。

### 【感染経路】

A型肝炎ウイルスの感染経路は2つあり、1つは人から人で、もう一つが水や食品から人への感染が証明されている。これらは集団発生例によって明らかとなったが、我々がA型肝炎患者の家族に対して行った散発例の調査では、25% (45家族中11家族) に家族内感染が認められた。そのほとんどが、就学前の小児が関与しており、個人衛生がうまくできない人々のHAVの流行における役割を再認識した。水による感染は米国での発生報告が多く、上水道と下水道の老朽化が原因と考えられる。現時点のわが国では心配ないが、施設が老朽化する将来にはこういう事例が起こるであろう。食品を介した感染には2つの様式があり、1つは調理人が感染者としてウイルスを排泄し食品を汚染する場合と、もう1つは自然の状態食品が汚染されている場合(2枚貝や輸入食品など)である。このような感染経路が完全には断たれていないた

めか、患者は毎年発生している。個々の事例についてその経路を把握することは非常に有意義でかつ我々の義務であると考えられる。そこで、A型肝炎患者の検査材料(糞便と血清)を採取するのに適した時期と検査方法について以下にまとめた。

### 【患者材料の採取】

HAVに感染した場合の患者モデルを図に示した。感染から発症には4週間を要する。臨床症状として、黄疸、発熱、全身倦怠感、悪心、嘔吐、上腹部痛、関節痛などがあるが、症状からは鑑別できない。この時期に血清を検査するとHAVに特異的なIgM抗体が検出されるので確定診断がなされる。このIgM抗体は2ヵ月以上検出されるので患者周囲の不顕性感染者の把握もできる。HAV特異IgG抗体はその後も長く検出される。我々が65歳以上の高齢者を調べたところ若干の抗体価の低下が認められたが、保有率は50歳代と殆ど変わっていなかった。HAVは糞便中に排泄され新たな感染源となるが、そのピークは発症時期とは一致しない。ウイルス粒子は感染2週間(発症の2週間前)から排泄され3週間(発症1週間前)にピークとなり発症と共に激減する(図)。以後1ヵ月間排泄が続くので周囲の人々は注意が必要だが、家族内感染者の殆どが3週間後の発症間隔であったことから、感染の多くは発症前1週間後の抗原排泄ピーク時に成立する場合が多いようである。

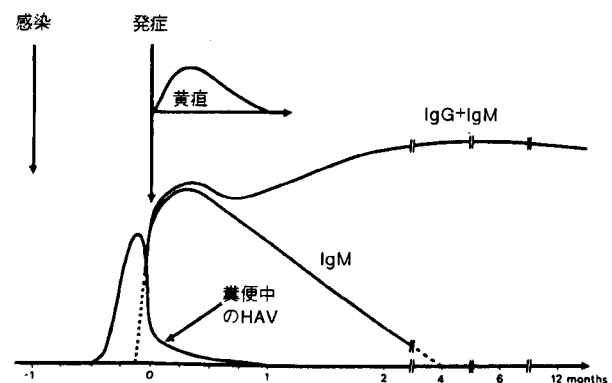


図 A型肝炎患者の血中抗体と糞便中の抗原量

### 【検査方法】

1) 酵素抗体法 HAVの抗原および抗体の検出には、主に酵素抗体法(ELISA)が用いられている。ELISAの原理については技術情報の17巻4号に詳しく述べられているので参照されたい。当研究所で用いているHAV抗原の測定方法を述べる。まず、アッセイ用プレートの各wellに緩衝生理食塩水(PBS)で希釈した抗HAV抗体を添加し、

4℃で一晩吸着する。次に、0.01%のTween 20を加えたPBS(PBS-T)でプレートを洗浄後、1%の牛血清アルブミンを加えたPBS-Tを各wellに加え、以後の非特異的な蛋白質の吸着を抑える(ブロッキング)。検体(糞便の10%乳剤の遠心上清をクロロホルムで処理したもの)を加える。4℃で一晩反応させる、洗浄し、ペルオキシダーゼ酵素でラベルした抗HAV血清(ラベル血清)を反応させる(37℃、2時間)。これを洗浄し0-フェニレンジアミン(基質)を加え室温で30分反応後、2Mの硫酸で反応を止め492nmの吸光度を測定する。検体中にHAV抗原が存在すれば一連の反応が成立しそのwellには酵素が残るので、加えた基質が反応して発色するので判る。この方法で発症直後までの排泄抗原(図)が検出できる。従って、発症の1週間以上前に感染が証明できるので、うまく利用すれば症状を軽減させるばかりでなく、発症も防げるはずである。

HAV特異IgM抗体を検出する場合は、まずヒトのIgMに対する抗体をPBSで希釈してアッセイ用プレートに吸着させる。ブロッキングし、被検血清を反応させる。次に、HAV抗原を添加し、さらにラベル血清を反応させる。被検血清中にHAVに対するIgM抗体が存在する時のみ一連の反応が成立するので、これを基質で確認する。全体のHAV特異抗体は、競合抑制ELISAという方法を用いている。この方法は先に述べた抗原検出法と手順は殆ど変わらない。アッセイ用プレートにHAV抗体を吸着させた後、精製したHAV抗原を反応させる。次に、各wellに被検血清を加えた後ラベル血清を反応させる。陽性抗体であればラベル血清とHAV抗原の反応が抑制され、陰性であれば抑制されず反応系が成立する。それを基質の発色で確認する。

2) PCR法 最近、PCR法(技術情報18巻1号)により、HAVの検出に関して目覚ましい発展がみられた。従来の電子顕微鏡による検出や前記のELISAでは、発症直後の、ウイルス粒子が比較的大量に含まれた検体からしか検出はできなかった。ところが、PCR法では少量のウイルス粒子でも検出可能となった。われわれの調べた結果では、発症1週以内であれば殆ど検出可能で、4週後に検出された例もあった。PCR法はさらに応用範囲があり、その産物の塩基配列を調べることで遺伝子型別ができ、材料さえそろえば感染源や感染経路の特定も可能である。HAV遺伝子は約7,500塩基のプラス鎖RNAからなる。現在最も進んでいるのは、VP1/2A接合領域と呼ばれる部位の168塩基を用いた比較である。これによると、世界のHAVは7種類(2亜群)の遺伝子型に分けられる。1A、1B、2、3A、3B、および7型は人から、4、

5、および6型はサルから検出された。日本で人から検出されたウイルスは1Aと3B型であった。この両型はおのおの92.5%の塩基相率率をもつが、それ以下で多種多様に変異しており疫学調査への応用が可能となる。

HAV RNA検出のためのPCR法の概要を述べる。便材料からの検出は、Jansenらの方法を応用した抗原捕捉RT-PCR法で行なわれる。即ち、抗HAV抗体を吸着したELISA用プレートに検体を添加後4℃に一晩置く。プレートをPBS-Tで良く洗浄した後、尿素溶液を用いてプレートに捕捉されているウイルス粒子を回収し、フェノール抽出、エタノール沈殿を行ないHAV RNAを抽出する。逆転写酵素を用いて抽出したRNAに相補的なDNA(cDNA)を作成する。次に、HAVの塩基配列のVP1から2Aタンパクをコードする遺伝子領域を目標とするプライマーを用いてPCRを行い、498 bpのDNAを増幅する。増殖の有無をアガロースゲル電気泳動で調べた後、さらに内側の塩基配列に相補的なプライマー(酵素あるいは放射線でラベルされている)を用いて増幅させ、その遺伝子の塩基配列を決定する。

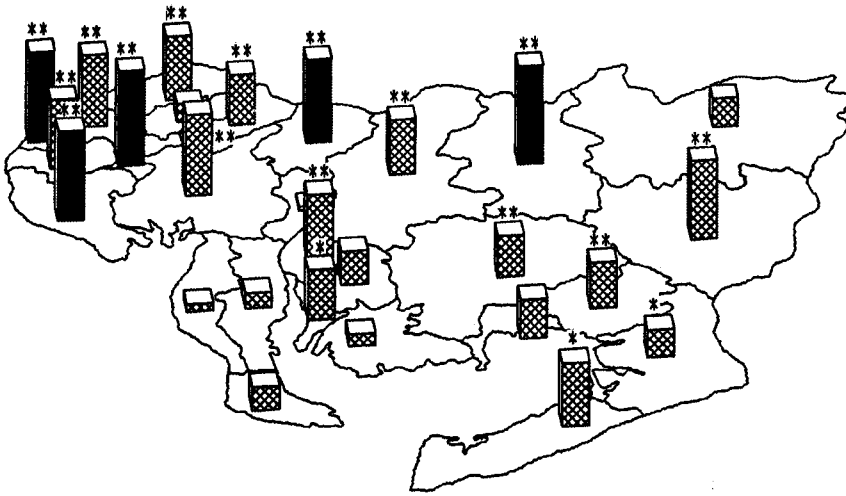
#### 【分子疫学】

上記の方法を用いて1990年から91年の流行期に愛知県下で検出されたHAV 47例を調べたところ、13種類の遺伝子型に分類された。11種類は1A型で2種類は3B型であった。米国などで検出された株に比べ多種多様であることから、海外からウイルスが持ち込まれている可能性も指摘されている。実際に、1990年に瀬戸市で検出された株は日本の株より中国の株に近いものであった。一方、3B型に分類された1株は1977年に佐賀県で流行した株と同じ塩基配列であり、長年わが国に存在し続けているものと考えられた。このようなことについて、地域や年代を広げて調査することで、流行株の伝播経路や非流行期の存在場所などが判明することが望まれる。1990年の愛知県内の流行において2名の患者から検出されたHAVのRNAは、各々の患者の子供が通う保育園の別の園児から検出されたものと同一であった。保育園での流行が子供を通じて周囲にまで及んだことが証明されたわけである。しかしながら、この保育園への侵入経路や、この年愛知県内で患者が急増した理由、さらには毎年繰り返される季節流行性など、判らない点も多い。PCR法により、水や食品などからのHAV遺伝子の検出も試みられているが、問題解明のためには精力的な検体採取をはじめ一層の努力が必要である。

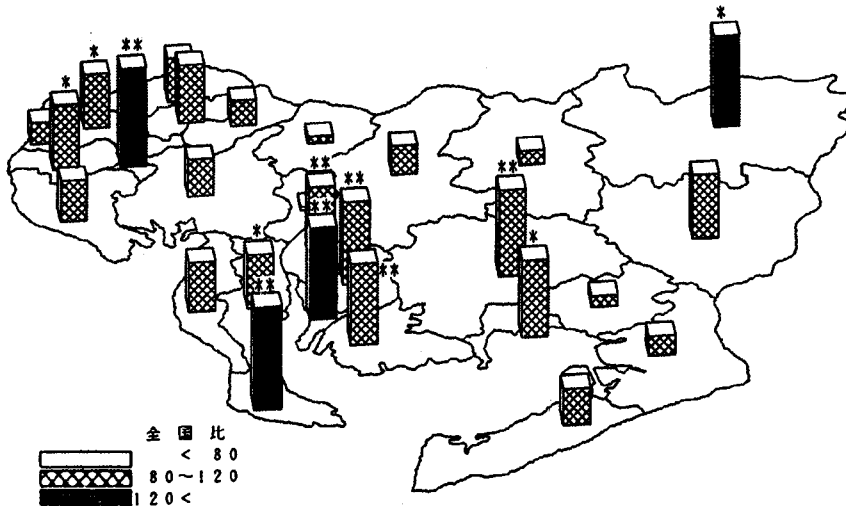
(ウイルス部 山下照夫)

〔 I 〕 地域特異性

(17)心疾患の標準化死亡比(全国比)1989~1991年



(18)脳血管疾患の標準化死亡比(全国比)1989~1991年



全国比  
 < 80  
 80~120  
 120<

(注)人口データは1990年のものを使用した  
 (厚生省地域保健医療計画支援システムより)  
 なお、棒の高さは正確な値ではないので  
 模様で区別して下さい。

表1 標準化死亡比

	心疾患			
	1989年	1990年	1991年	89-91年
愛知県	118.0 **	114.4 **	116.5 **	114.7 **
名古屋	118.0 **	121.0 **	121.4 **	120.2 **
豊橋	106.7	110.1 *	102.4	106.3 *
岡崎	107.1	111.0 *	118.0 *	110.4 **
一宮	114.1 *	117.3 **	123.6 **	118.4 **
瀬戸	115.2 *	136.9 **	114.6 *	122.3 **
半田	102.9	94.6	103.8	100.4
春日井	116.3 *	116.6 *	105.5	112.7 **
豊川	95.5	111.5	124.2 **	110.7 **
津島	132.3 **	120.2 **	123.2 **	125.1 **
刈谷	106.8	116.6 *	119.0 *	114.3 **
豊田	110.8	112.3 *	115.7 **	113.0 **
安城	103.7	98.9	121.9 *	107.7
西尾	94.8	104.4	101.4	100.3
蒲郡	108.1	103.3	113.4	108.3
江南	115.3 *	107.7	120.3 **	114.4 **
尾西	108.8	140.8 **	127.2 *	125.9 **
稲沢	117.8 *	123.5 **	112.5	117.9 **
新城	117.5	110.0	130.4 **	119.4 **
知多	95.4	99.0	98.8	97.8
師勝	139.5 **	131.2 **	121.7 *	130.6 **
美浜	114.0	103.9	99.2	105.5
足助	161.5 **	159.2 **	162.3 **	161.0 **
設楽	121.8	84.7	116.2	107.4
田原	109.1	107.9	122.0 *	113.1 *
小牧	106.0	100.0	103.8	103.2
碧南	102.2	109.6	121.6 *	111.4 *
豊明	96.4	78.6	108.7	94.6

	脳血管疾患			
	1989年	1990年	1991年	89-91年
愛知県	106.2 **	103.6 **	103.4 *	104.4 **
名古屋	102.4	101.4	101.6	101.8
豊橋	107.0	88.4	90.9	94.7
岡崎	114.4 *	127.8 **	113.6 *	118.7 **
一宮	109.8	104.5	115.4 *	109.8 **
瀬戸	82.2	86.2	80.3	82.9
半田	115.1 *	93.0	118.9 **	108.9 *
春日井	107.8	91.4	97.7	99.0
豊川	84.1	76.0	94.6	84.8
津島	104.2	108.2	95.7	102.7
刈谷	114.6	117.1	112.4	114.7 **
豊田	102.3	103.1	93.5	99.7
安城	124.1 *	112.8	118.3	118.4 **
西尾	125.7 **	115.5	111.0	117.4 **
蒲郡	115.1	123.5 *	108.8	115.8 *
江南	115.1 *	105.9	102.8	107.9
尾西	99.3	98.5	90.3	96.1
稲沢	114.7	107.1	119.0	113.5 *
新城	107.4	118.0	109.2	111.6
知多	112.0	112.1	100.2	108.2
師勝	136.3 **	119.9	129.8 **	128.6 **
美浜	120.9	144.6 **	110.3	125.5 **
足助	89.5	97.6	75.2	87.4
設楽	116.6	102.3	147.4 **	121.8 *
田原	97.1	106.1	98.8	100.7
小牧	103.2	115.1	112.0	110.1
碧南	116.8	129.4 **	116.7	121.0 **
豊明	74.4	72.7	86.8	77.9

(\*) 有意差あり(危険率5%以下)  
 (\*\*) 有意差あり(危険率1%以下)

【コメント】

心疾患の死亡率は全国で132.3(人口10万人対)である。SMRを用いて計算してみると、愛知県は3年間で見ても単年度毎に見ても約15%程高く、有意に高い傾向にある。保健所別に見ても、17保健所中で有意に高く、単年度別に見て、一宮・瀬戸・津島・師勝・足助を始め多くの地域で高かった。

脳血管疾患の死亡率は全国で97.3(人口10万人対)である。愛知県は、SMRを用いると104%であるが、有意に高い傾向にあるという結果が出た。保健所別では岡崎・半田・師勝が、単年度別に見ても有意に高い傾向にあり、地域によってSMRの高低の差が明確に出る結果となった。

(保健情報室)