

No. 70.

June 1952

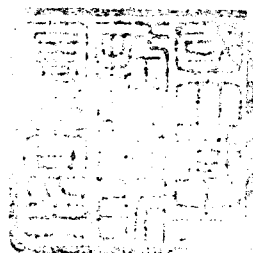
BULLETIN
OF THE NATIONAL
HYGIENIC LABORATORY

Yoga, Setagayaku, Tokyo, Japan.

衛生試験所報告

第七十号

昭和二十七年六月



国立衛生試験所

東京都世田谷区玉川用賀町

衛 試

Bull. Hyg. Lab.

目 次

脳下垂体後葉ホルモンの検定(第1報) 試験法, 一斉検査, 国家検査及び国家検定成績について 長沢佳熊, 苗村徳次郎, 中山豪一, 佐藤 浩...	1
昭和26~27年におけるインシュリン注射液の国家検査及び国家検定成績 長沢佳熊, 竹中祐典, 三橋謙一, 池田伝市...	5
性腺刺激ホルモンの検定について 長沢佳熊, 越村栄之助...	9
エピネフリン注射液の血圧上昇作用について 長沢佳熊, 中山豪一, 佐藤 浩...	13
ビスチン及びビスチン製剤の試験法について(第1報) ... 喜谷市郎右衛門, 河内敬朝, 笠原 閑, 松倉 幸...	17
日局中のジアスターゼ澱粉消化力試験法の改良案 朝比奈正人, 芹沢 淳...	23
発熱性物質試験法に対する検討 横井泰生, 堀内茂友, 近藤 了...	27
ブドウ酒中のズルチンの検出法 川城 巖, 福沢富美, 佐々木睦江...	37
食品中のデハイドロ酢酸及びその塩類の検出法 川城 巖, 福沢富美, 竹内末久...	41
食品の異物検査について(第1報)..... 野崎泰彦, 川田公平, 渡辺秀子, 小菅美代子...	49
数種の N・アルキルピリジニウムヒドロキシドの合成とそのマウスに対する作用について 板井孝信, 井下田 浩, 桑原章吾, 柳町徳三...	57
ルチンについて(第1報)加水分解による定量及び定性反応..... 鹿 島 哲...	59
ルチンについて(第2報)ペーパークロマトグラフィによる分離定量(その1)..... 鹿 島 哲...	67
バンクレアチンのエンテロキナーゼによる活性化について 山 羽 力, 朝比奈正人...	71
ビタミン C の螢光反応(第1報) 定性反応としての価値について..... 小川俊太郎...	77
発熱療法剤(細菌性発熱物質)の創製並に臨床応用に関する研究(第1報) Schwartzman 有効因子と 細菌性物質の作用本態について 八田真義, 青山好作, 丹治國枝, 中島富子, 小沢茂子...	83
腸腺についての実験(第1報) 吸収試験..... 八田真義, 功刀 博...	95
避妊薬の殺精子についての実験的研究(第4報) 避妊薬主剤である硫酸オキシヒノリンについての考察 功 刀 博...	99
避妊薬の殺精子についての実験的研究(第5報) 避妊薬の経年変化..... 功 刀 博...	103
ラテックス製コンドームについて(第1報) 市販品について..... 藤井正道, 佐藤 寿, 辻 楠雄...	111
除虫菊の日長効果とピレトリン含有量について..... 木 下 孝 三...	121
麦角菌 Claviceps の寄主植物(その1)..... 川 谷 豊 彦...	127
予 報	
レプトスピラの培地の新考案 八田真義, 山地幸雄, 亀井弘子, 平林磐夫...	153
I. 酵母浸液の発育促進作用	
II. ジャガイモ浸液及び家兎肝浸液の発育促進作用	
ズプトニン, ヒスタミン, アセチルコリン, 脳下垂体後葉注射液の白鼠及びモルモットの摘出子宮収縮と, 鶏の血圧に及ぼす作用 長沢佳熊, 中山豪一, 佐藤 浩...	157
抄 録.....	159
業務報告(昭和26年1月~12月)..... 総合調整部...	165

CONTENTS

K. Nagasawa, T. Naemura, G. Nakayama and H. Satō: On the Standardization of Hormones of Posterior Lobe of Pituitary I. The Result of the National Assay of Posterior Pituitary Injections.	1
K. Nagasawa, Y. Takenaka, K. Mitsuhashi and D. Ikeda: The Result of the National Assay of Commercial Insulin Injections in Japan	5
K. Nagasawa and E. Koshimura: On the Studies of Gonadotropic Hormones I.	9
K. Nagasawa, G. Nakayama and H. Satō: On the Blood Pressure Rising Action of Commercial Epinephrine Injections in Japan.....	13
I. Kidani, Y. Kōchi, S. Kasahara and K. Matsukura: Assay of Bisatin and its Preparations	17
M. Asahina and J. Serizawa: Improvement on the Assay for Starch Digestive Power of Diastase in J. P.	23
Y. Yokoi, S. Horiuchi and S. Kondo: Studies on Pyrogen Test	27
I. Kawashiro, F. Fukuzawa and M. Sasaki: Detection of Dulcin in Wines.....	37
I. Kawashiro, F. Fukuzawa and H. Takeuchi: Detection of Dehydroacetic Acid and its Salts in Foods (1).....	41
Y. Nozaki, K. Kawada, G. Urakubo, H. Watanabe and M. Kosuga: Test on Extraneous Matter in Food and Food Product. I	49
T. Itai, H. Igeta, S. Kuwahara and T. Yanagimachi: The Synthesis of Several N-alkyl Pyridinium Hydroxide and their Actions against Mice.	57
T. Kashima: Rutin I. The Quantitative Determination by Hydrolysis and the Qualitative Reaction of Rutin.	59
T. Kashima: Rutin II. The Separation and Quantitative Determination by Paper Chromatography (1) 67	
T. Yamaha and M. Asahina: On the Activation of Paucreatin by Enterokinase.....	71
S. Ogawa, E. Hiraoka and S. Nanbara: Fluorescent Reaction of Vitamin C I. On the Specificity and Sensitivity.	77
S. Hatta, K. Aoyama, S. Tanji, T. Nakajima and S. Ozawa: Studies on the <i>Fever Treatment</i> with Bacterial Pyrogenic Substances (I) On the Correlation of Active Factors of Shwartzman Phenomenon and Bacterial Pyrogenic Substances.	83
S. Hatta, H. Kunugi and Y. Noguchi: Experimental Studies on the Catgut. I. Absorption Test.	95
H. Kunugi: Experimental Studies on Spermicidal Effect of Contraceptives. IV. Studies on Oxyquinoline Sulfate as the Principal Component of Contraceptives.	99
H. Kunugi: Experimental Studies on Spermicidal Effect of Contraceptives. V. Change in Spermicidal Time with Age of Contraceptives.	103
M. Fujii, H. Sato, and K. Tsuji: Studies on the Quality of Latex Condom. I. Research on the Present Products.	111
K. Kinoshita: Studies on the Photoperiodism and Pyrethrin Content of Insect Flowers.....	121
T. Kawatani: Host of Claviceps. (Part 1).	127
Preliminary Reports	153
Abstracts	159
Annual Report (1951).....	165

脳下垂体後葉ホルモンの検定 (第1報)
試験法, 一斉検査, 国家検査及び国家検定成績について

長沢 佳熊, 苗村 徳次郎, 中山 豪一, 佐藤 浩

The Result of the National Assay of Posterior Pituitary Injections.

On the Standardization of Hormones of Posterior Lobe of Pituitary (I)

By Kakuma NAGASAWA, Tokujirô NAEMURA, Gôichi NAKAYAMA and Hiroshi SATÔ

脳下垂体後葉ホルモン (以下脳ホと略す) を含む脳下垂体後葉注射液 (以下脳注と略す) 中には子宮収縮成分 Oxytocin, 血圧上昇成分 Vasopressin 及び抗利尿成分を含む。日局 VI では Oxytocin のみを検定しているが、英局 VII 及び国局 I では以上の 3 成分を、米局 XIV では Oxytocin 及び Vasopressin を検定している。別にそれから精製分離した Oxytocin 注射液及び Vasopressin 注射液をも英局 VII, 米局 XIV, 及び国局 I で収載している。脳注の作用目的は主として Oxytocin によるものであるから、その作用を検査すれば大体よろしい。

Oxytocin 検定法に関しては従来モルモットの摘出子宮収縮法が一般に採用され、日局 VI, 英局 VII, 米局 XIII, 国局 I でもこの方法による。然るに 1939 年 Coon²⁾ は鶏の坐骨動脈血圧の下降作用による方法を推した。その後この方法は Gallagher³⁾ 等によつて脳ホの分離研究の場合に使われ、米局 XIV (1950) で採用した。

著者等は先ずモルモット法と鶏法とを追試し、その優劣を判定しようと試み、更に Burn の推す白鼠の摘出子宮収縮法を追試して比較し、更に以上の方法を用いて脳下垂体後葉の日局標準品を製造し検定を行つたが、これについては別に報告することとし、日局法による脳注の一斉検査、国家検査及び国家検定の成績を記しておく。

現在我国での市販脳注は全部国立衛生試験所で検査し、その封緘したものののみが使われることとなつている。

検体 A. 一斉検査検体 7 例は昭和 24 年 1 月頃の製品で製造業者が製品として呈出したもの¹⁾。B 国家検査検体 (昭和 26 年 1 月~8 月製造品) 23 例、及び国家検定検体 (昭和 26 年 9 月以降現在まで) 18 例で、各都府県庁の薬事監視員が製品の製造者又は販売責任者の許において抜きとりしたものである。

試験法 日局 VI すなわち米局 XIII のモルモット摘出子宮の収縮法による。なお 3 例については米局 XIV の鶏血圧下降法を併用した。次に著者等の経験による知見の主な点を記しておく。1. モルモット体重は日局では 175~350 g とあるが 175~250 g がよく、特に 200 g 前後のものの子宮がよかつた。一般に冬期には大きいものがよく、夏期には小さなものがよかつた。2. 子宮: モルモットを打殺し瀉血し、直ちに両側子宮角を摘出してロックリンゲル液に浸し、ほぼ中間部を約 1 cm ほど切除して用いた。子宮は著者等の経験では白色でやや細いものがよく、桃色を呈する太いものや、又はロウ色を呈するものは定量には不適當であつた。ただし体重の小さい動物でよく見受けられるような白色で細すぎる子宮は、一般に収縮及び弛緩の時間が長い。薬液を作用させる時間は子宮によつてちがうが、著者等は約 5 分間とし、ロックリンゲル液の交換後は少くとも 15 分間を経て、次の用量を注入している。その前に注入した薬液の影響を受けさせないためには充分な注射間隔が必要である。この作用時間と注射間隔は 1 回の定量中は一定にしておく。子宮の収縮が最高の近くで、例えば 90% 附近では悪い子宮でも常に美しい曲線を描くが、定量的結果を示さないから、最大収縮の約 75% 附近で美しい曲線を描くものがよい。一個の子宮標品で約 5 時間以上実験を行つた場合には終りの頃になると収縮が不規則になるから、懸垂後 1~3 時間内に定量した。3. 浴温は作用に著しい影響があり、日局 VI では $\pm 1^\circ$ 、米局 XIII では $\pm 0.1^\circ$ の差で行うとの規定であるが、著者等は $\pm 0.05^\circ \sim 0.1^\circ$ の差で行つた。4. 溶液: ロックリンゲル液に使う薬品はなるべく純品がよく、蒸留水は Cu を含まぬものを使わねばならない。

成績 Vasopressin 含量の多いもの、例えば鯨脳下垂体後葉ではモルモット法と鶏法とは一致しないので注意を要するといわれているが、脳注についての著者等の実験ではよく一致した (実験 1)。検定鋭敏度は著者等の実験では、モルモット法で 0.012 単位と 0.013 単位の効力差 (100:108) を明確に区別できた (実験 2)。一斉検査検体 7 例中合格 6 例で合格率約 86%、国家検査及び国家検定検体 41 例中合格 40 例で合格率約 98% であつた (第 1 表参照)

第1表

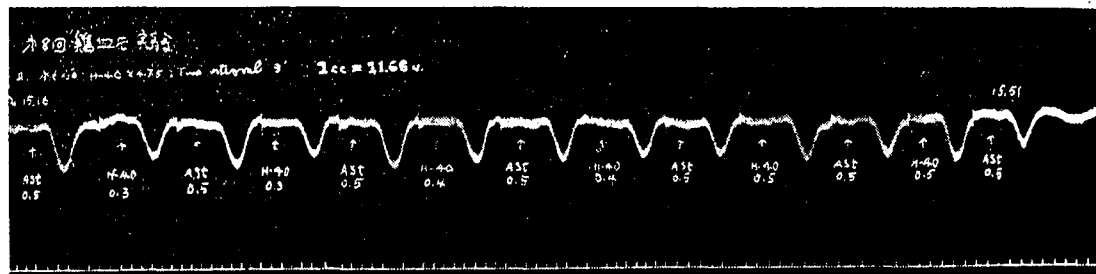
検査の種類	対照單位に對する 実験單位%	例数		
一 齊 検 査	66.0	1	107.0	1
	80.0	3	115.0	1
	100.0	2	117.0	1
	120.0	1	120.0	1
			160.0	1
国 家 検 査	80.0	7	80.0	2
	86.0	1	89.0	2
	91.0	1	100.0	8
	92.0	1	105.0	1
	100.0	1	108.0	2
		8	115.0	1
			120.0	2

実験の部

実験 1. A. 効法: 体重 1.5 kg 白色レグホン雄鶏, 溶性フェノバルビタール 0.2 g/kg 体重を膀胱筋内注射, 抗血液凝固剤として 8.5% クエン酸ナトリウム液を使用. 用量: 稀釈標準液 (10 倍) 0.5 cc* (0.1 単位). 検体: (H-40) の稀釈液 (47.5 倍) 0.3 cc, 0.4 cc, 0.5 cc (第 2 表及び第 1 図参照)

	第1回	第2回	第3回	第4回	第5回	第6回	第7回
稀釈標準液 (0.1 単位) により起つた血圧下降 mm Hg	(1) 20 (0.5)	(3) 18 (0.5)	(5) 18 (0.5)	(7) 16 (0.5)	(9) 14 (0.5)	(11) 16 (0.5)	(13) 14 (0.5)
検体 H-40 (47.5 倍液) により起つた血圧下降 mm Hg	(2) 16 (0.3)	(4) 14 (0.3)	(6) 16 (0.4)	(8) 14 (0.4)	(10) 18 (0.5)	(12) 18 (0.5)	

第2表 () 内の太数字は第1図のそれぞれに対応する. () 内の数字は注射 cc 数



(1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13)

第1図 注射順は第2表の () 内の太数字で示したものに對應する成績(グラフ)を示した. 下の刻みの間隔は6秒.

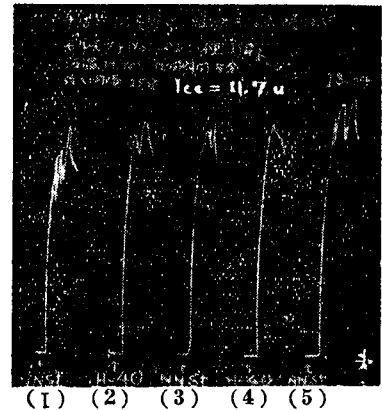
第2表の結果を米局 XIV 法によつて計算すると H-40 1 cc 中表記單位の 116.57% の効力を含む, 標準誤差は 0.3 単位であるからこの定量法は成立する. ただしこの実験では血圧下降は米局規定の 20~40mm 以下であるが, その作用は注射量によく比例したので, 採用した.

B. モルモット子宮法: 体重 190 g 雌モルモット, 用量: 稀釈標準液 (150 倍): 0.5 cc, 検体: (H-40) の稀釈液 (877.5 倍) 0.5 cc, (第 3 表及び第 2 図参照)

稀釈標準液により起つた子宮収縮の高さ (mm)	(1) 30.0	(3) 30.4	(5) 34.0 (25% 増)
H-40 (877.5 倍液) により起つた収縮の高さ (mm)	(2) 30.5	(4) 30.3	

第 3 表 () 内の太数字は第 2 図のそれぞれに対応する。

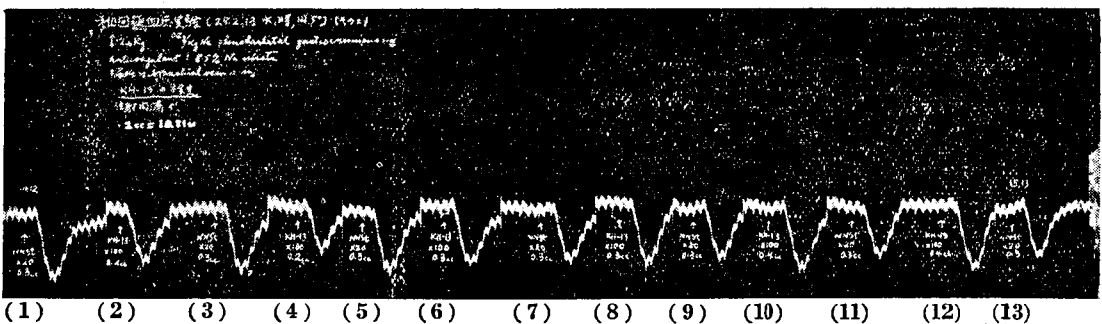
実験 2. A. 鶏法: 体重 2.6 kg 白色レグホン雄鶏, 溶性フェノバルビタール 0.2 g/kg 体重を腓腸筋内注射, 抗血液凝固剤として 8.5% クエン酸ナトリウム液を使用. 用量: 稀釈標準液 (20 倍) 0.3 cc (=0.03 単位), 検体 (KH-13): 稀釈液 (100 倍) 0.2 cc, 0.3 cc, 0.4 cc (第 4 表及び第 3 図参照)



第 2 図実験順は第 3 表 () の太数字で示したものに对应する。

	第 1 回	第 2 回	第 3 回	第 4 回	第 5 回	第 6 回	第 7 回
稀釈標準液 (0.03 単位) により起つた血圧下降 mm Hg	(1) 30 (0.3)	(3) 30 (0.3)	(5) 28 (0.3)	(7) 24 (0.3)	(9) 26 (0.3)	(11) 22 (0.3)	(13) 23 (0.3)
KH-13 (100 倍液) により起つた血圧下降 mm Hg	(2) 25 (0.2)	(4) 20 (0.2)	(6) 28 (0.3)	(8) 29 (0.3)	(10) 30 (0.4)	(12) 29 (0.4)	

第 4 表 () 内の太数字は第 3 図のそれぞれに対応する () 内の数字は注射 cc 数。



第 3 図 注射順は第 4 表の () 内の太数字で示したものに对应する。

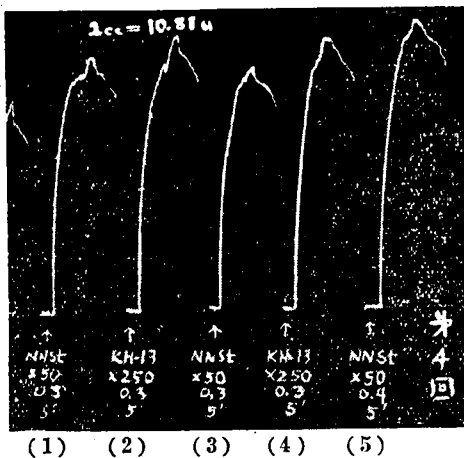
第 4 表の結果を米局 XIV 法によつて計算すると KH-13 1cc 中表記単位の 108.1% の効力を含む。標準誤差は 0.4 単位であるからこの定量は成立する。

B. モルモット子宮法: a. 体重 235 g 雌モルモット, 用量: 稀釈標準液 (50 倍) 0.3 cc (=0.012 単位), 検体 (KH-13): 稀釈液 (250 倍) 0.3 cc (第 5 表及び第 4 図参照)

b. 体重 182 g 雌モルモット, 用量: 稀釈標準液 (150 倍) 0.5 cc (=0.007 単位), 検体 (KH-13): 稀釈液 (810 倍) 0.5 cc, (第 6 表, 第 5 図参照)

稀釈標準液により 起つた子宮収縮の 高さ (mm)	(1) 34.5	(3) 33.0	(5) 38.5 (25%増)
KH-13 (250倍液) により起つた子宮 収縮の高さ (mm)	(2) 37.0	(4) 36.5	

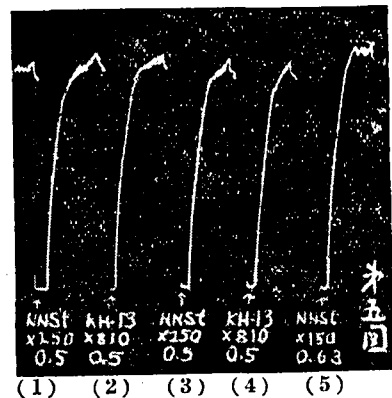
第 5 表 () 内の太数字は第 4 図の
それぞれに対応する



第 4 図 実験順は第 5 表の () の太数字で
示したものに对应する。

稀釈標準液により 起つた子宮収縮の 高さ (mm)	(1) 31	(3) 30.5	(5) 33 (25%増)
KH-13 (810倍液) により起つた子宮 収縮の高さ (mm)	(2) 31	(4) 30.5	

第 6 表 () 内の太数字は第 5 図の
それぞれに対応する



第 5 図 実験順は第 6 表の () の太数字で
示したものに对应する。

文 献

- 1) 長沢佳熊, 苗村徳次郎: 昭和 24 年 日本薬剤師協会学術大会講演でこの成績は公表した。
- 2) J.M. Coon: Arch. int. Pharmacodyn., 62, 79~99 (1939)
- 3) A.M Potts, T.F. Gallagher: J. biol. chem., 143, 561~562 (1942), 154, 349~356 (1944)

On the standardization of Hormones of Posterior Lobe of Pituitary.

By Kakuma NAGASAWA, Tokujirô NAEMURA, Gôichi NAKAYAMA, and Hiroshi SATÔ

We assayed 43 samples of Posterior Pituitary Injections in Japan, of which 7 had been produced about January, 1949 and 41 from January, 1951 to March, 1952. In the result of the assays, the rate of the former passed was ca. 86 per cent and that of the latter passed was ca. 98 per cent.

We also made a comparison between the guinea pig method (J.P. 6th or U.S.P. 13th) and the chicken method (U.S.P. 14th) and obtained the following results:

1. Two methods agreed each other in results.
2. By the guinea pig method we could distinguish the difference of the activity between 0.012 and 0.013 units (100:108).

昭和 26 年度におけるインシュリン注射液の国家検査及び国家検定成績

長沢佳熊 竹中祐典 三橋謙一 池田伝市

The Result of the National Assay of Commercial Insulin Injections in Japan

By Kakuma NAGASAWA, Yūsuke TAKENAKA, Ken-ichi MITSUHASHI and Den-ichi IKEDA

長沢は市販インシュリン製剤の試験成績について第 1 報¹⁾ (昭和 17 年)及び第 2 報²⁾ (昭和 25 年)に報告した。我国では効力不足、純度不全の製品が多かつたので、昭和 26 年 1 月から国家検査、同年 9 月から国家検定となり、我国におけるインシュリン注射液は全部国立衛生試験所で検査し、その封緘をしたもののみが市販されることとなっている。今回は主として製造所で抜きとりした注射液についての日局 VI による試験成績を報告する。

検体 各都府県庁の薬事監視員が製品の製造者又は販売責任者の許において抜き取りしたものである。国産品はほとんどカツオ又はマグロのスタニウス小体を原料としたもので、一部はクジラ肝臓からの製品も混有していると考える。

試験方法 昭和 26 年 1~6 月は大体第 2 報²⁾ により、昭和 26 年 9 月以降は日局 VI による。日局 VI の方法は米国薬局方 XIII に準拠し、長沢の追試により一部を改案したものである。

標準品 国際標準品インシュリン結晶 $1\text{mg}=22$ 単位 (第 2 報²⁾ 参照) 又は米国薬局方標準品 $1\text{mg}=23$ 単位のもの又はこれ等によつて著者等が効力を比較検定した副標準品を使った。

成績 第 1 表及び第 2 表に示す、第 1 表は昭和 26 年 2 月~8 月までの国家検査によるもので、第 2 表は同年 9 月以降の国家検定によるものである。検体数 38, その内適品 28, 不適品 10, 不適品は効価過多 2, 効価不足 2, 灰分過多 3, 窒素含量過多 3 である。

考察 1. 純度: 第 2 報において製品の純度の規準となる 100 単位中の窒素量はインシュリン協会の協定純度 $1\text{mg}=9$ 単位以上から換算すると大約 $N 1.6\text{mg}$ 以下となるが、今回は日局により $N 1.2\text{mg}$ 以下となった。それにもかかわらず合格率 73.7% であるから、国産インシュリンの純度の著しい向上が見られた。

2. 効価: 効価不足とは表記単位だけのインシュリンの効力を認めないことを意味し、日局は表記単位の 95~105% を含むという規定である。効価の合格率 85%, 不適品も効価過多のものが 2 例、不足のものが 2 例認められたにすぎない。国産インシュリンの単位不足の非難もほとんど解消された問題になつてしまつたといつてよい。はつきりした標準品の採用が行われ、検定技術も著しく進歩したといつても過言ではない。

3. 灰分: 過多の製品はインシュリンの精製上の不注意や不熟練に基づくもので、注意すれば避けられるからたいた問題ではない。

以上の点で最も重要なのは純度であつて、日局 $N 1.2\text{mg}$ 以下 /100 単位に対して米局は 0.85mg 以下 /100 単位であり、国産品の純度がまだ米局品に及ばないことは米国製品の検定結果 (第 2 表 5) に照しても肯定される。前年からの向上は著しいとしても今後留意しなければならない。

インシュリン粉末の試験成績 この点について当所が検定したインシュリン注射液の原料であるインシュリン粉末の試験結果を参考のため第 3 表に記しておく。この結果によれば検体 26 種中 1mg につき、15~16 単位 6, 14~14.9 単位 2, 12~13.9 単位 4, 10~11.9 単位 7, 9.9 単位以下 6 であつて前報の成績から遙かに向上し、日局規格 (1mg =大約 11 単位以上) には十分合格する品質の製品が工業的に生産されていることがわかる。なお昭和 26 年度のインシュリン注射液の生産数量は約 36,120,000 単位、著者等の方法³⁾ により製造されているものが大部分である。

* この報告は長沢佳熊：インシュリンの薬化学的研究第 9 報、第 8 報は昭和 26 年 5 月日本薬剤師協会学術大会講演；日本特許第 190597 号

第1表 国家検査成績

(昭和26年2月~9月)

検体 No.	定量試験	純度試験 (N量mg/100u)	備 考	検体 No.	定量試験	純度試験 (N量mg/100u)	備 考
1	90%	1.7	N量過多	12	95~105%	1.2	
2	—	1.47	"	13	120%	1.13	含量過多
3	90%	1.25		14	90~110%	1.07	
4	90~110%	1.24		15	107%	1.06	
5	90%以下	1.28	含量不足	16	100~110%	1.16	
6	90~110%	1.01		17	—	1.29	N量過多
7	100%	1.1		18	111%	1.11	
8	100%	1.13		19	92%	1.06	
9	90~110%	1.1		20	100%	0.57	Danish Leo insulin
10	86%	—	含量不足	21	100%	0.55	Insulin Novo
11	96%	1.09					

第2表 国家検定成績

(昭和26年10月以降)

検体 No.	定量試験	純度試験 (N量mg/100u)	灰 分 (mg/500u)	備 考	検体 No.	定量試験	純度試験 (N量mg/100u)	灰 分 (mg/500u)	備 考
1	103%	1.16	0.5		10	95%	1.05	0.35	
2	—	—	2.5	灰分過多	11	102%	1.06	0.47	
3	111%	1.11	0.48		12	100~110%	1.16	0.9	灰分過多
4	113%	1.07	0.45		13	107%	1.11	0.4	
5	95~100%	0.75	0.25	Lilly 製品	14	107%	1.03	0.23	
6	—	0.96	2.3	灰分過多	15	120%	1.05	0.5	含量過多
7	105~110%	1.02	0.3		16	98%	1.09	0.2	
8	100~110%	1.01	0.4	Squibb 製	17	105~110%	0.92	0.46	
9	100%	0.96	—	P-Z-I					

第3表 依頼試験成績

(昭和25年2月~26年12月)

検体 No.	定量試験 (i.u./mg)	窒 素 1mgにつき	含量 (mg) 100単位につき	備 考	検体 No.	定量試験 (i.u./mg)	窒 素 1mgにつき	含量 (mg) 100単位につき	備 考
1	11.0	—	—		14	4.5	—	—	
2	10.2	—	—		15	11.0	—	—	
3	8.5	—	—		16	16.0	—	—	
4	11.3	—	—		17	10.8	—	—	
5	9.5	—	—		18	9.0~10.0	—	—	
6	10.0	—	—		19	14.0	—	—	クジラ
7	5.0	—	—		20	15.3	—	—	
8	5.0	—	—		21	11.0	0.147	1.34	
9	5.5	—	—		22	15.5	—	—	クジラ
10	15.0	—	—		23	13.8	—	—	クジラ
11	15.0	—	—		24	15.2	0.152	1.0	
12	12.0	—	—	クジラ	25	13.7	0.147	1.07	
13	13.5	—	—		26	14.1	0.142	1.0	

文 献

- 1) 長沢佳熊: 薬業往来, 18, 123~143 (昭 17)
- 2) 長沢佳熊: 衛生試験所報告 第68号, 20~23 (昭 25)

- 3) 第六改正日本薬局方 (厚生省版) 60~62 (昭 26)
 4) 長沢佳熊: 薬誌, 62, 288~292 (昭 17)

Pharmaceutical Chemical Studies on Insulin (IX)

The Result of the National Assay of Commercial Insulin Injections in Japan, in 1951

By Kakuma NAGASAWA, Yusuke TAKENAKA, Ken-ichi MITSUHASHI and Den-ichi IKEDA

As the commercial insulin injections in Japan which are almost made from the Stannius' body of bonito fish (Katsuwonidae) according to author's report in 1942, have been standardized by the National Assay, since January 1951, so we report it in this paper.

The test method used is that described in the J.P. VI which depends principally upon the U.S.P. XIII, 1947, and the standard preparation used was the international standard of insulin, U.S.P. Insulin Standard or our laboratory standard which had been standardized with international standard by us.

We have also tested insulin powders from which insulin injections were made from various manufacturing companies (Table 3).

The Result as follows.

Number of samples tested	38 samples
Passed	28
Failed	10
1) Activity.	Over --- 2
	Below --- 2
2) Nitrogen Content per 100 units.	Over --- 3
3) Ash	Over --- 3

Insulin Powder

15~16 units (per 1 mg)	--- 6 Samples
14~14.9 units	--- 2 Samples
12~13.9 units	--- 4 Samples
10~11.9 units	--- 7 Samples
Less than 9.9 units	--- 6 Samples

性腺刺激ホルモンの研究 (第1報)

白鼠卵巢重量増加法による検定 (その1)

長沢 佳熊 越村 栄之助

On the Studies of Gonadotrophic Hormones. I.
Their Standardization by Rat's Ovarium-weight-method 1.

By Kakuma NAGASAWA and Einosuke KOSHIMURA

性腺刺激ホルモンの検定法は種々知られているが^{1), 2), 3)}, 英局 Chorionic Gonadotrophin 検定法⁴⁾に従つて、幼若白鼠の卵巢重量増加法を用い、胎盤性国際標準品と市販品数種及び動物臓器とを比較して後者の性腺刺激ホルモンの生物学的定量を行つた結果について述べる。

試験動物の年齢 (体重) と卵巢重量との関係: 英局方は体重 40~50g の雌白鼠を使うと規定しており、このような動物の卵巢重量は約 10mg であるというが、著者等の使っている白鼠の卵巢はこれより遙かに小さく、6~8mg のものが多い。これは一般に我国における白鼠についての傾向である。恐らくは strain の差によるものとする。

年齢 (体重) と鋭敏度との関係: 性腺刺激ホルモンの作用は幼若白鼠に対しては発育するに従つて強い感受性を示すが、それらの詳細については研究を続行中であり、今回は主として体重 40~50g の白鼠を用いた。

1. 白鼠の体重と卵巢重量との関係: 一定飼料で飼育した白鼠の卵巢を摘出し、不要の組織を切除し Bouin 固定液で1日間固定した後 70% アルコールに2~3時間浸して脱水して取出し、附いているアルコールを濾紙で夾んで除き手早く秤量する。正常白鼠の体重 (横座標) と両側卵巢重量の和 (タテ座標) との関係は著者等の実験では第1図になった。

2. 体重と鋭敏度との関係 胎盤性国際標準品を pH 7.0 の水に溶かし、その 2.5cc 中 2, 4, 8, 及び 16 単位を含む液を調製し、この液 0.5cc づつを1日5日間体重 70g 及び 45g の白鼠に1回皮下注射し、第6日に殺し、卵巢重量を秤る。その卵巢重量と对照動物 (ホルモンを注射しないもの) の卵巢重量との差を以てその増加量とし、これをタテ座標にとり、注射量 (単位数) を横座標とすると第2図となった。

3. 市販品の検定適当量の検体を用い、国際標準品との効力を上述のような方法で比較検定を行つた。

- 検体 A 2.5cc 中 25 白鼠単位及び 100 白鼠単位を含む 2 検体
- B-1 0.17 家兎単位を含む 1 検体
- B-2 0.04 家兎単位及び 0.17 家兎単位を含む 2 検体
- C 500 白鼠単位を含む 1 検体

その成績を第3図に示す。

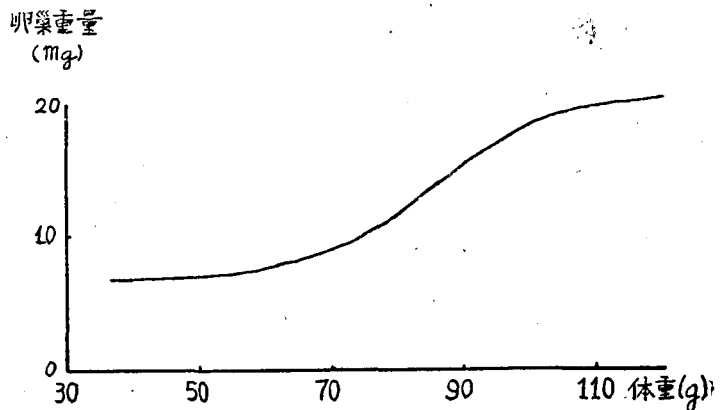


Fig. 1

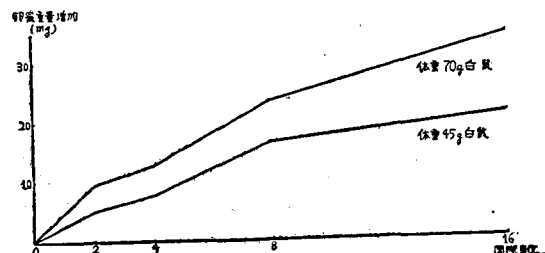


Fig. 2

これから各検体中の効価を求めると次表のようになる。

表記単位数	国際単位数 (実験値)
A 100 白鼠単位	約 2~12 単位
B-1 20' 家兎単位 (1000 国際単位)	約 50 単位
B-2 50 家兎単位 (2500 国際単位)	約 2880~3100 単位
C 500 白鼠単位	約 0.5 単位

4. 動物臓器の検定: ウシ, カツオ, イワシクジラの脳下垂体のアセトン乾燥粉末, 凍結乾燥粉末を McShan 法⁵⁾ を少しく改変して抽出し, その効価を検定した。ウシは脳下

垂体前葉のアセトン乾燥粉末及び凍結乾燥粉末 0.5 g を, カツオは脳下垂体全腺のアセトン乾燥粉末, クジラは脳下垂体前葉 (原料はやや古い) のアセトン乾燥粉末それぞれ 1 g を用いた。この検定は原料の新鮮度, 抽出法になお研究の余地があるので, カツオ脳下垂体中の性腺刺激ホルモン量の他の動物脳下垂体との概略の比を調査する目的で行つたに過ぎない。

定量的抽出法及び生物分析法については今後の研究にゆずる。

それらの成績は第 4~8 図に示す。

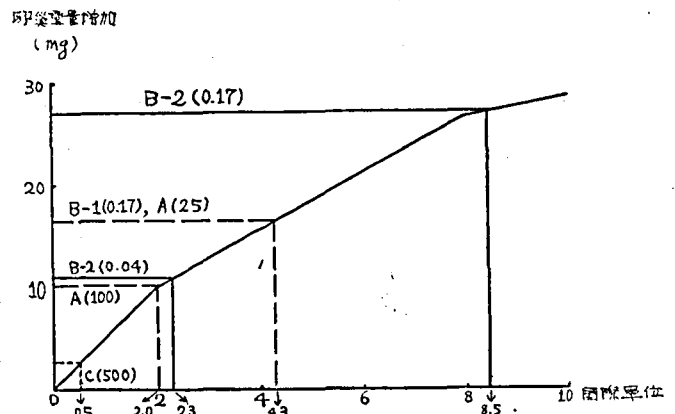


Fig. 3

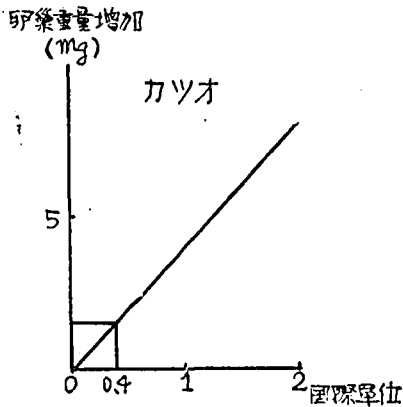


Fig. 4

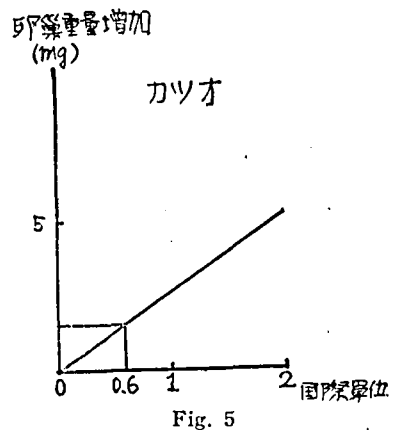


Fig. 5

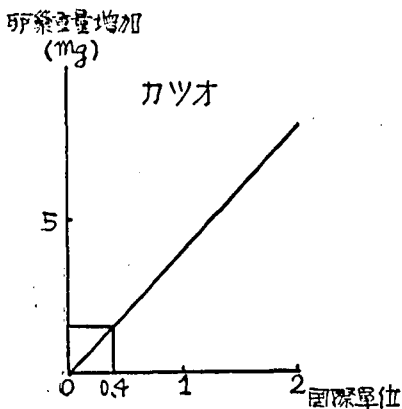


Fig. 6

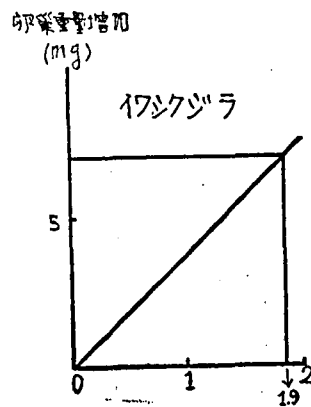


Fig. 7

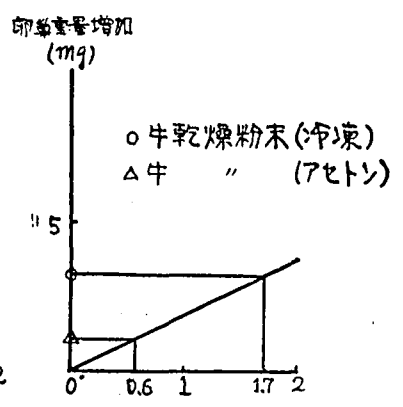


Fig. 8

その結果は大約下表のとおりとなつた。

原 料	含 有 量 (国 際 単 位) (McShan 法 に よ る)
ウ シ (アセトン乾燥粉末)	1.2
ウ シ (凍 結 乾 燥 粉 末)	3.4
イ ワ シ ク ジ ラ	1.9
カ ツ オ	0.4
カ ツ オ	0.6
カ ツ オ	0.4

(原料の新鮮度, 条件により含量差があるので, この表は著者等の実験室における McShan 法による一定操作を行つたものについての含量で, 真の含量を必ずしも示すものではない)

む す び

1. 胎盤性国際標準品を用い, 英局方の Chorionic Gonadotrophin 検定法に従つて市販されている 5 種の尿製, 胎盤製または脳下垂体製性腺刺激ホルモン製剤を検定した結果, その内 4 種の作用はきわめて弱く, 実用価値はほとんどないと考える。
2. 牛及びイワシクジラ脳下垂体前葉 1 個中にはかなり作用を認めたが, カツオの脳下垂体はそれ等の $1/8.5 \sim 1/2$ であつた。

この研究の一部は厚生科学研究補助金によつたことを記し, 感謝の意を表する。

文 献

- 1) C. Hamburger: Emmen's Hormone Assay, 173~203 (1950)
- 2) J. H. Burn: Biological Standardization, 277~279 (1950)
- 3) H. M. Evans, et al: Pincuss' Hormones, Vol. 1, 356~358 (1948); Vol. 2, 634~636, 643~644 (1950)
- 4) 第七英国薬局方: 804 (1948)
- 5) W. H. McShan, et al: J. biol chem., 135, 473 (1940)

On the Studies of Gonadotrophic Hormones (I)

Their Standardization by Rat's Ovarium-weight-method 1.

By Kakuma NAGASAWA and Einosuke KOSHIMURA

1. We assayed five commercial preparations of gonadotrophic principle of human pregnant urine, placenta and pituitary of domestic animals by the method of Chorionic Gonadotrophin of the British Pharmacopoeia VII compared with the international standard of chorionic gonadotrophin. The activity of the four is too weak to use for therapeutic purpose.

2. Each anterior pituitary lobe of cattle and whale has fair activity, and that of bonito fish has $1/8.5 \sim 1/2$ of the activity of the former.

エピレナミン注射液の血圧上昇作用について

長沢 佳熊, 中山 豪一, 佐藤 浩

On the Blood Pressure Rising Action of Commercial Epinephrine
Injections in Japan

By Kakuma NAGASAWA, Gôichi NAKAYAMA and Hiroshi SATÔ

昭和 15 年長沢¹⁾ はエピレナミン液の市販品 16 種について Zangfrognini 法²⁾³⁾ による比色価と、猫または家兎の血圧上昇作用を試験し、合成品は天然品より一般に比色価が血圧上昇作用に比較して大きいことを報告し、合成品は製造過程において d 体の分離が不充分であるためではないかと推論した。その後天然エピレナミン中には約 20% に達する l-Noradrenaline が夾雑する場合があるといわれ、その生理作用の強力な点から比色価が血圧上昇作用に比較して小さい原因になり得ることが当然考えられるに至つた。今回は現在我国で市販されているエピレナミン注射液 3 検体 (2 種) について検査し、血圧上昇作用を米局標準品と比較した結果、その内 2 検体 (2 種類) の作用がかなり弱いことを知つたのでここに報告する。

この検体はいずれも日局 VI の塩化第二鉄試液又は酢酸第二水銀試液の呈色試験には適品であるし、日局適品といえるものである。

検体 A 社製品 IE-13, IE-14, B 社製品 IE-79 の 3 種でいずれも合成塩酸エピレナミンを原料として調製されたものである。

試験方法 米局 XIV に準拠した、ただし成熟した体重 3.5~4.25 kg の雄猫を用い、先ずクロロホルムで軽く麻酔し、溶性フェノバルビタール 0.2 g/kg 体重を皮下注射する。次に頸動脈及び気管カニューレを挿入し、気管カニューレは人工呼吸器に接続し、動脈カニューレは水銀マンオメータを経てキモグラフ上に血圧を記録した。動脈カニューレ部分に用いる抗血液凝固剤として 10% クエン酸ナトリウム液を用い、迷走神経を麻酔するために 1% 硫酸アトロピン 0.1 cc/kg 体重を股静脈から注射し、30 分間後定量を行つた。稀釈標準液注射の真中の時間に検体稀釈液の用量を、即ち 2 回は稀釈標準液によつて起つた血圧上昇に比べて $\frac{1}{5}$ 小さい用量を、2 回はほぼ等しい用量を、2 回は $\frac{1}{5}$ 大きい用量を注射した。注射間隔は 5 分間隔とした。

成績 A 社製品 IE-13 は表記効力の 100% (実験 1), IE-14 は 81% (実験 2), 又 B 社製品 IE-79 は 78% (実験 3) の効力を示した。

実験の部

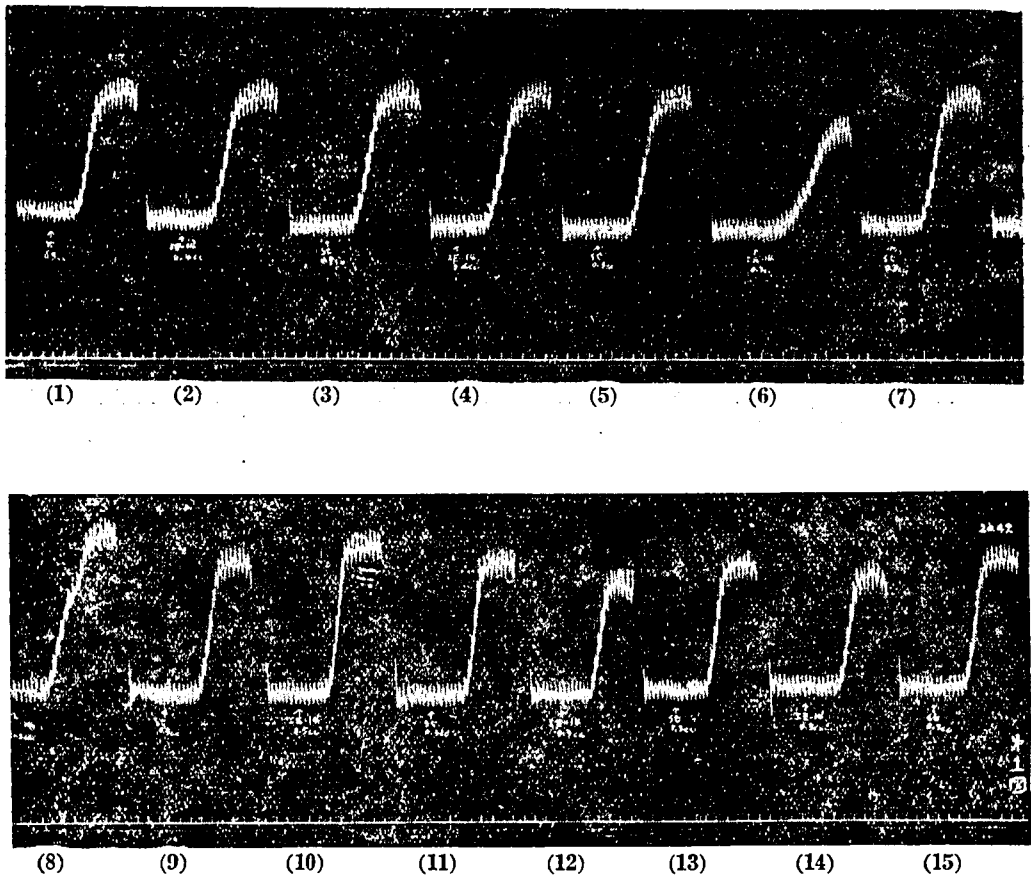
実験 1. 体重: 3.5 kg 雄猫. 用量: 稀釈標準液 (米局標準品 50 mg を精秤し, N_{10} 塩酸 5 cc に溶かし, 蒸留水で 50 cc とした液 1 cc に生理食塩液 49 cc を加えて製した 50,000 倍溶液) 0.5 cc (=0.01 mg), 検体 (IE-13): 稀釈液 (50,000 倍) 0.5 cc を注射したときの血圧上昇を第 1 表に示す。

実験 2. 体重 3.5 kg 雄猫. 用量: 稀釈標準液 (実験 1 の稀釈標準液に同じく 50,000 倍溶液) 0.3 cc (=0.006 mg). 検体 (IE-14): 稀釈液 (50,000 倍) 0.4 cc, 0.5 cc, 0.3 cc を注射したときの血圧上昇を第 2 表 (第 1 図参照) に示す。

第 1 表

稀釈標準液 (mm Hg)	24.0	25.5
検体稀釈液 (mm Hg)	24.0	26.0

第 1 図 注射順は第 2 表中の () 内の太数字に対応する。



	第 1 回	第 2 回	第 3 回	第 4 回	第 5 回	第 6 回	第 7 回	第 8 回
稀釈標準液により 起つた血圧上昇 mm Hg	(1) 50 (0.3)	(3) 58 (0.3)	(5) 57 (0.3)	(7) 59 (0.3)	(9) 59 (0.3)	(11) 60 (0.3)	(13) 56 (0.3)	(15) 58 (0.3)
IE-14 により起つ た血圧上昇 mm Hg	(2) 59 (0.4)	(4) 61 (0.4)	(6) 47 (0.3)	(8) 73 (0.5)	(10) 68 (0.5)	(12) 50 (0.3)	(14) 51 (0.3)	

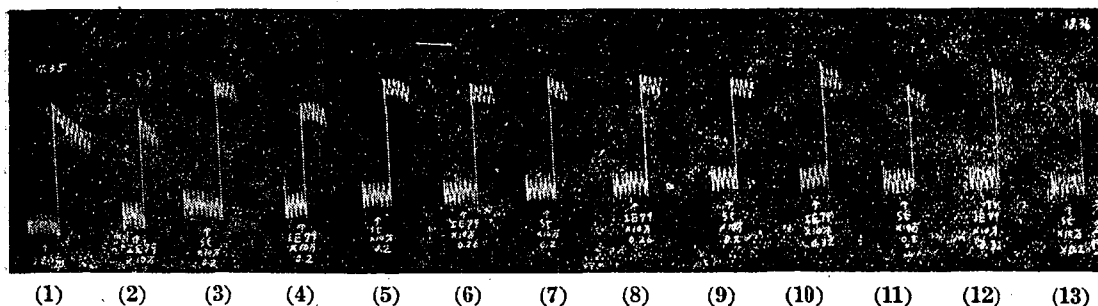
第 2 表 () 内の太数字は第 1 図のそれぞれに対応する。() 内の数字は注射 cc 数。

第 2 表の結果を米局 XIV 法により計算すると IE-14 (1,000 倍液) 100 cc 中エピレナミン塩基 0.0812 g, 標準誤差 2%。

実験 3. 体重: 4.25 kg 雄猫, 用量: 稀釈標準液 (実験 1 の稀釈標準液を生理食塩液で 2 倍に稀釈して調製する。100,000 倍溶液) 0.2 cc (=0.002 mg)。検体 (IE-79): 稀釈液 (100,000 倍溶液) 0.2 cc, 0.26 cc, 0.32 cc を注射したときの血圧上昇を第 3 表 (第 2 図参照) に示す。

	第 1 回	第 2 回	第 3 回	第 4 回	第 5 回	第 6 回	第 7 回
稀釈標準液により 起つた血圧上昇 mm Hg	(1) 43 (0.2)	(3) 43 (0.2)	(5) 40 (0.2)	(7) 39 (0.2)	(9) 35 (0.2)	(11) 34 (0.2)	(13) 33 (0.2)
IE-79 により起つ た血圧上昇 mm Hg	(2) 37 (0.2)	(4) 35 (0.2)	(6) 38 (0.26)	(8) 38 (0.26)	(10) 42 (0.32)	(12) 39 (0.32)	

第 3 表 () 内の太数字は第 2 図のそれぞれに対応する。() 内の数字は注射 cc 液。



第 2 図 注射順は第 3 表の () 太数字に対応する。

第 3 表の結果を米局 XIV 法により計算すると IE-79 (1,000 倍液) 100 cc 中にエピレナミン塩基 0.0783 g, 標準誤差 2.2%。

む す び

市販の合成エピレナミン注射液中には日局適品であつても、血圧上昇力が弱いものがあることを検体 3 種中 2 種について知つた。これは恐らくは *dl* 体の分離が不十分なためであろう。

- 文 献
- 1) 長沢佳熊: 昭和 15 年熊本薬学会報告
 - 2) A. Zangfrotnini: Deut. med. Wochschr. 35, 1752 (1909)
 - 3) 緒方章, 長沢佳熊: 「臓器薬品化学」第 3 版, 43~47 (昭 10)

On the Blood Pressure Rising Action of Commercial Epinephrine Injections in Japan

By Kakuma NAGASAWA, Gôichi NAKAYAMA and Hiroshi SATÔ

We tested 3 samples of commercial Epinephrine Injections in Japan by U.S.P. XIV using male cat (3.5~4.25 kg body weight) instead of dog. Two of them contained only 0.0812 g and 0.0783 g of epinephrine base per 100 cc respectively.

This will perhaps be caused by incomplete separation of *dl*-epinephrine.

ビサチン及びビサチン製剤の試験法について (第1報)

喜谷市郎右衛門 河内 敬 朝

笠 原 閑 松 倉 幸

Assay of Bisatin and Its Preparation.

By Ichirōemon KIDANI, Yositomo KŌCHI, Sizuka KASAHARA and Kō MATUKURA

緒 言

第六改正日本薬局方ビサチン及びビサチン錠の確認反応及び定量法を AKA 光電管比色計 (小滝製作所製) を用いて検討し若干の改良すべき点を認めたので, その改良すべき点及び著者等の考案した改良法の試案を報告する。

ビサチンの呈色反応について

ビサチンの呈色反応については, ビサチンをアルコール製アルカリで加水分解して生ずる Diphenolisatin にアルカリ製フェリシアン化カリウム試液を作用させると紅色を呈する Liebermann and N. Danaila¹⁾ の報告があり, これを利用してビサチン製剤の定量及び確認反応²⁾ を行っているが, この色は不安定で暫時の後消えるため, 定量に応用し難い点を認めたのでその呈色の条件について検討した。

ビサチンの呈色反応についてはこの外ビサチンをアルコール製水酸化ナトリウム試液で加水分解して Diphenolisatin となし之を臭素酸化して生ずる青色物質をクロロホルムに転溶する M.J. Schultze³⁾ の報告及び Diphenolisatin のアルカリ製溶液に過硫酸カリウム, ヨウ素等を作用させると青色を呈すると云う Liebermann, Danaila の報告及び Diphenolisatin の濃硫酸溶液が紅色を呈すると云う稲垣⁴⁾ の報告等があるが, いずれもその色は不安定で暫時の後消える。

Diphenolisatin のアルカリ製溶液にフェリシアン化カリウム試液を作用させて呈する紅色について Liebermann and Danaila⁵⁾ はその反応の過程を Diphenolisatin より 2-Amino-4', 4''-dioxypheylcarbinol を経て o-Aminoaurine に至る過程を予想している。又稲垣⁶⁾ はビサチンの酸化成績体について研究し, 氷酢酸溶液のクロム酸化により Diacetylbisoxypheylisatonic acid anhydride を生じ, これが加水分解されて 2-Amino dioxypheyl carbinole の不安定な中間体を経て 2-Amino-4', 4''-dioxypheyl methane の生成を報告している。又稲垣⁷⁾ は Diphenylisatin をアルカリ製過酸化水素で酸化して 2-Amino-4'-oxybenzophenone 及び Anthranilic acid を確認しているがアルカリ製フェリシアン化カリウム酸化成績体については非結晶性の物質を得てこれをイサチンレッド⁸⁾ と称しているのみである。

イサチンレッドについての Sixteen Ljunberg⁹⁾ の報告によると水素イオン濃度が 9~12 の間では比較的安定であり, 可視部の吸収極大は波長 5580Å であると報告している。著者もイサチンレッドの色の安定性に関し, 温度, 水素イオン濃度, 安定剤について検討し次の結果を得た。

温度の影響 日局 VI. ビサチンの定量法³⁾ の方法で呈色させ各温度に於ける時間的变化は Fig. 1 の様であつた。呈色後 5 分より 60 分間の色及びその 10 分間に対する平均変化 X の吸光係数を示せば第1表の様である。

第1表

Variation of Extinction Coefficient (S.57)

Temp. Time	0°	15°	20°	25°	30°
After 5min.	0.366	0.350	0.320	0.318	0.319
After 60min.	0.253	0.194	0.145	0.136	0.130
X	0.008	0.019	0.029	0.030	0.032

Ecm of Isatinred by J.P. VI

フェリシアン化カリウム試液の量について 日局 VI²⁾ では 10% フェリシアン化カリウム溶液を使用しているのであるが、試薬の過剰はその黄色の為に肉眼による比色を困難にし、色を不安定にする。呈色と試薬の量との関係は Fig. 2 の様である。

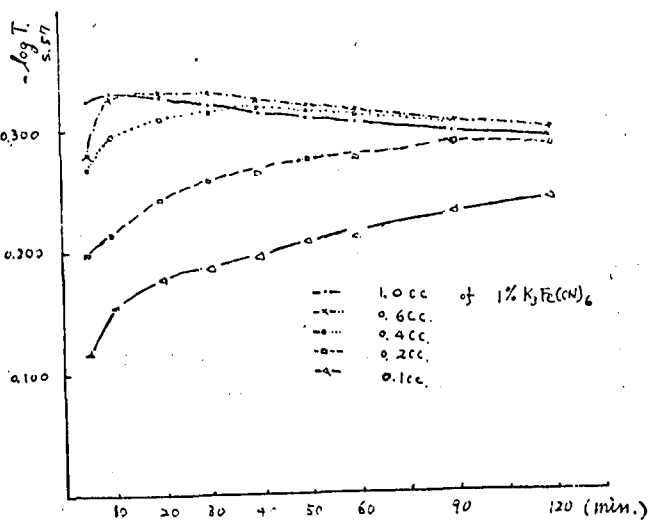
ビスチン 0.2 mg に対し 1% フェリシアン化カリウム試液 0.2 cc を使用する場合は反応速度は遅いが 120 分以上経過後もその色は余り退色しない。

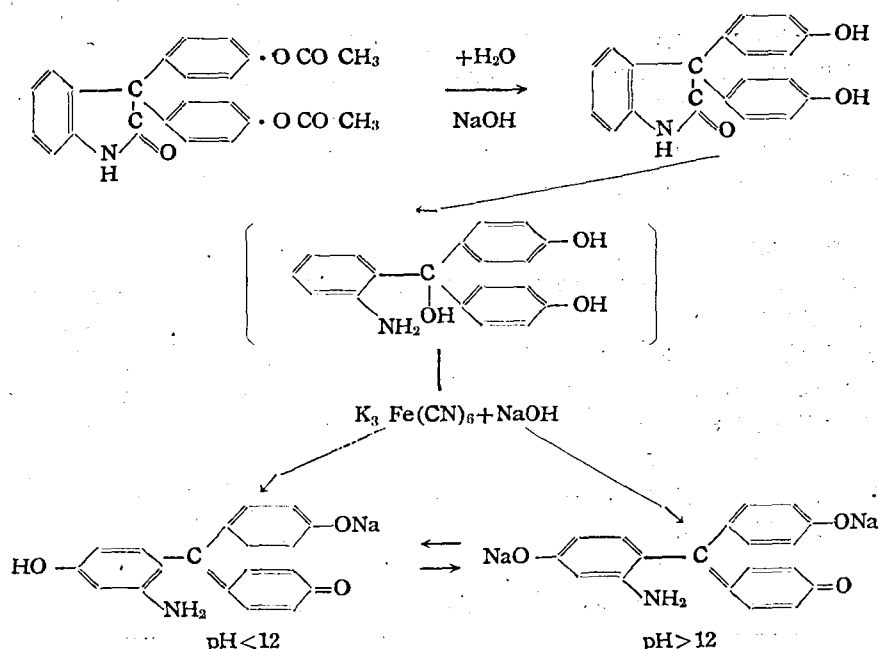
ビスチン 0.2 mg に対し 1% フェリシアン化カリウム試液 0.6 cc 以上を使用する時は呈色は早いとその色は不安定である。

安定剤に就いて ゼラチン、デキストリンの添加によつて色は安定化されない。

呈色操作 日局 VI の方法²⁾ によつて製したビスチン標準原液 2cc を比色管に取りこれに 1% フェリシアン化カリウム試液 0.2 cc を加え一定時間放置した後水を加えて 50 cc とした場合 4 分から 6 分の間で一定の最高値を示したので反応後 5 分間放置して規定量迄希釈する。

吸収曲線 日局 VI の方法²⁾ によつて製したビスチン標準原液 2cc を比色管に取りこれに 1% フェリシアン化カリウム試液 0.2 cc を加え、1 分間ふりまぜた後水を加えて 50 cc とした直後の色は Fig. 3 (—印を以て示す) のようであり、これを沸騰水浴中で 10 分間加熱すると Fig. 3 (—印を以て示す) の如くその最大吸収端が短波長に 50 Å 移動する。加熱時間は沸騰水浴中 5 分以上必要である。以上の結果からビスチンの呈色反応は次の様に進行するものと考えられる。

Fig. 2
Effect of Amount of 1% $K_3Fe(CN)_6$



即ち pH が 12 以上になると 2-Aminophenyl 基の 4 の水酸基が更にナトリウム塩になつて濃色的になり、これは酸化され易く不安定で早く退色するのではないかと考えられる。

イサチンレッドの吸収曲線は Fig. 3 の如くである。即ち pH=12 以下の場合可視部の吸収極大は 555 mμ でその吸光係数 $E_{1\text{cm}}^{0.0001\%}$ の値は 0.598 であり、pH=12 以上の場合の吸収極大は 560 mμ、でその吸光係数 $E_{1\text{cm}}^{0.0001\%}$ の値は 0.615 である。即ち吸収極大部が約 50 Å 長波長に移動する。又フェノールフタレインの可視部の吸収曲線はイサチンレッドのそれと類似の型を有する。

ビスチンの定量法に就いて

ビスチンの定量法に関しては第六改正日本薬局方²⁾の方法で行う際にその色が非常に不安定で特に夏期には 1 時間後にその色が黄色に変じ、定量する事が出来なくなる。イサチンレッドの紅色の各種の条件に於ける安定性に就いては前述の様な結果を得たから、これを定量法に利用する事を試み、日局 VI²⁾の方法より良い結果を得たのでここに報告する。

ビスチンの定量法に関してはこの外に Sixteen Ljunberg^{3) 9)}の報告があるが、これを追試した結果は、色はなお幾分不安定で本法より退色が速やかである。

前述した様にビスチンのアルカリ溶液に、フェリシアン化カリウム試液を加えて呈する色は pH=12 を境としてその吸収極大部が約 50 Å だけ移動し、pH=12 以上になるとその吸収極大部が長波長に移動し、その時の色は不安定である。又フェリシアン化カリウムの過剰は紅色を不安定とし肉眼による比色の際その黄色に障害されて色が見難いからフェリシアン化カリウムの量を余り多くする事は良くない。

操作法 試薬: 1. アルコール性水酸化ナトリウム試液: 水酸化ナトリウム 1g (炭酸塩不含) を水 1.5cc に溶解し、これに 95% アルコール (無アルデヒド) 10 cc を加えて製する。

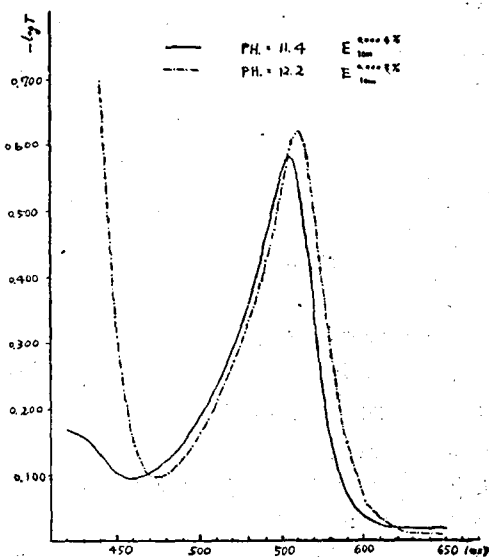


Fig. 3

2. フェリシアン化カリウム試液: フェリシアン化カリウム 1g を粉末となし水 100 cc に溶解する.

3. 水酸化ナトリウム試液: 局方 N/20 水酸化ナトリウム液を使用.

標準液: ビサチンの結晶を 100° で恒量を得るまで乾燥したもの 50 mg を精密に秤り, これにアルコール製水酸化ナトリウム試液 10 cc を加え, 還流冷却器を附し, ととき揺動し水浴上で 30 分間加熱した後濾過し, 冷水を加えて 500 cc とする. この液 1 cc はビサチン 0.1 mg を含む. この液は冬期 1 ケ月間放置しても変化しなかつた.

定量操作: ビサチン 0.1~0.25 mg に相当する量を 50 cc のメスフラスコに取り, N/20 水酸化ナトリウム液で各々全量を 2.5 cc としこれにフェリシアン化カリウム試液 0.2 cc を加え 1 分間よくふりまぜ, 5 分後, 新に煮沸し冷却した水を加えて全量を 50 cc とし沸騰水浴中で 10 分間加熱後氷水中で冷却した後比色する.

註 本法に於て反応液を水酸化ナトリウム試液を加えて 2.5 cc とするのはビサチン標準液が 0.1 mg/cc の N/20 水酸化ナトリウム液である為, 0.25 mg のビサチンを取るためには原液 2.5 cc を要し, 呈色後の pH を一定するめに水酸化ナトリウム試液で各々を 2.5 cc に調整して反応させたのである. 故に実験の操作上適宜に反応終了後の液が pH=12 以下であり各々皆同じ pH である様に調整すれば良いのである.

これを光電管比色計で吸光係数をフィルター S.53 を使用して測定してその時間的变化を見た. 実験 3 回に於ける結果は第 2 表に示す通りであつた.

第 2 表
Variation of Extinction Coefficient (S. 53)

mg min.	0.100			0.150			0.200			0.250		
5	0.104	0.112	0.107	0.160	0.160	0.160	0.208	0.212	0.206	0.260	0.265	0.252
15	0.107	0.110	0.107	0.159	0.158	0.156	0.201	0.208	0.204	0.255	0.260	0.250
30	0.107	0.107	0.107	0.150	0.156	0.155	0.195	0.205	0.200	0.250	0.255	0.249
45	0.105	0.106	0.103	0.150	0.150	0.152	0.192	0.195	0.198	0.250	0.250	0.246
60	0.105	0.106	0.099	0.148	0.150	0.148	0.192	0.195	0.195	0.245	0.245	0.236

又これをベックマン分光光度計 (B 型) により呈色 30 分後の吸光係数を測定したところその結果は第 3 表に示す通りであつた.

第 3 表
Extinction Coefficient

mg	0.10	0.15	0.20	0.25
5550 Å.	0.288	0.448	0.598	0.748

E 1 cm

呈色の吸収曲線と標準曲線

イサチンレッドの pH 12 以下の時の吸収曲線をベックマン分光光度計 (B 型) で測定した場合は Fig. 3 の如くで, 可視部の吸収極大は 555 mμ であつてその吸光係数 $E_{1\text{ cm}}^{0.0004\%}$ は 0.598 であり, 光電管比色計のフィルター S. 53 の場合の E はベックマン分光光度計の 530 mμ の E より高い値を示した. 即ち $E_{1\text{ cm}}^{0.0004\%} = 0.371$ ベックマン分光光度計

$E_{0.5\text{ cm}}^{0.0004\%} = 0.192$ 光電管比色計

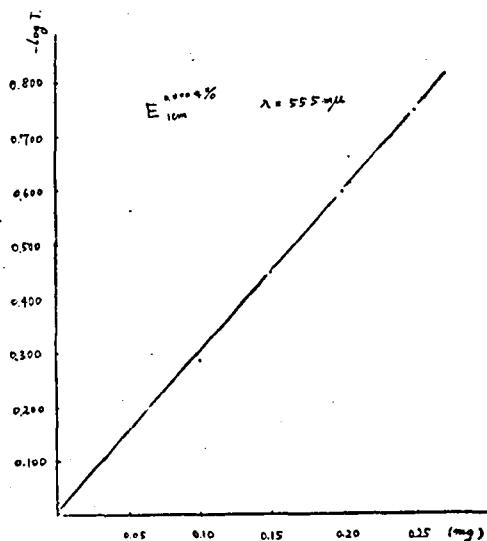


Fig. 4 Standard curve of Isatinred

光電管比色計及びベックマン分光光度計を用いて吸光係数を測定した結果ビサチン 0.15~0.25 mg の間では吸光係数と濃度とは比例する。ベックマンにより 555 m μ に於けるビサチンの mg と吸光係数との関係は次式の通りである。

$$E_{1\text{ cm}} = 0.300 \times \text{mg} - 0.002$$

ビサチン 0.2 mg に対応する吸光係数の平均値は 5 回測定した結果 S.53 に対して 0.207 で $\sigma = \pm 0.003$ となつた。

結 語

1. 光電管比色計によりビサチン及びビサチン錠の試験法を検討し、第六改正日本薬局方の定量法の不備を指摘した。

2. 本実験はビサチンの結晶に就いて行つたのであるがビサチン錠の定量法に関しては操作上更に不備の点を認めたので之に関しては目下検討中である。

本研究の一部は厚生科学研究費に依つた。当局に対し謝意を表する。

文 献

- 1) Liebermann and N. Danaila: Ber., 40. 3594 (1907)
- 2) 第六改正日本薬局方 (厚生省版) 471, 472 (1949)
- 3) M. J. Schulle: C. A., 34, 4225 (1940)
- 4) 稲垣: 薬誌., 45, 689 (昭 8 年)
- 5) Liebermann and N. Danaila: Ber., 40. 3591 (1907)
- 6) 稲垣: 薬誌., 58. 976 (昭 13 年)
- 7) 稲垣: 薬誌., 54. 702 (昭 8 年)
- 8) Sixteen Ljunberg: C.A., 44. 7025 (1950), Farm. Revy., 49. 241~51 (1950)
- 9) Sixteen Ljunberg: C.A., 45. 2145 (1951), Farm. Revy., 49. 649~52 (1950)

Assay of Bisatin and Its Preparation

By Ichiroemon KIDANI, Yositemo KŌCHI, Sizuka KASAHARA and Kō MATUKURA

Addition of 1% $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ to diphenolisatin in the pH range of 8 to 12 developes a red color which has a maximum absorption at 5550Å. When pH of the solution is greater than 12, the color has a maximum absorption at 5600Å and its color is unstable. Color development is complete after a 30-minutes hydrolysis in 10% alcoholic sodium hydroxide, and the color is stable.

The photometric determination is carried out as follows: 50 mg acetophenolisatin dried at 100° are dissolved in 10% alcoholic sodium hydroxide solution. The solution is refluxed for 30-minutes. After cooling, the solution is transferred to 500-cc volumetric flask and distilled water is added to make exactly 500 cc.

The solution which corresponds to 0.10 to 0.25 mg of acetophenolisatin is transferred to a 50 cc volumetric flask. After N/20 sodium hydroxide Solution is added to make the volume 2.5cc 0.2cc of 1% Potassium ferricyanide is added and shaken for 1 minute. After 5 minutes, or more distilled water is added to make the volume 50cc, and heat it in the boiling water bath for ten minutes. After cooling it in the ice water, the extinction coefficient is measured through the filter S.53 and at 5550Å. The amount is calculated from a standard curve.

$$\lambda = 555 \text{ m}\mu$$

$$E_{1\text{ cm}}^{0.0001\%} = 0.598$$

日局中のジアスターゼ澱粉消化力試験法の改良案

朝比奈正人, 芹沢 淳

Improvement on the Assay for Starch Digestive

Power of Diastase in J.P.

By Masato ASAHINA and Jun SERIZAWA

緒 言

日局 VI のジアスターゼ澱粉消化力試験法は、主として次の点で改良を要する。

1. 使用する澱粉糊液の濃度が約 5% の高濃度で、作製と取り扱いが不便であり、又誤差の原因となり易い。
2. 反応の終点として完全分解時の 90% 近く迄分解した点をとっているため、この時まで生成した還元糖の量と酵素の強さとの比例関係がよくない、このため酵素の強さの倍率を求めるのが困難である。

この改良法では澱粉糊液として約 1% の濃度のものを使用し、反応の終点としては完全分解時の約 50% の点をとっている。その他若干の点に關しても改良をほどこしてある。

改 良 法

100° で 3 時間乾燥したバレイショ澱粉 1g を 200 cc の共栓三角フラスコにとり、約 40° の水 30 cc を加え、揺動しながら更に熱湯 60 cc を加え、15 分間沸騰水浴中で加熱した後 40° に冷却し、均等となつた糊液に本品 20mg を加え 30 秒間ふりまぜた後 40° で静置し、本品を加えてから正確に 20 分後 N-水酸化ナトリウム液 1 cc を加えて反応をとめ、内容を 100 cc のメスシリンダに入れ、約 8 cc の水でフラスコを洗い、洗液をメスシリンダ中に合し、更に水を加えて 100 cc とした液 11 cc をとり大型試験管中のフェーリング試液 5cc に加え、ゆるやかにガラス製の蓋をほどこして沸騰水浴中に 10 分間放置し、冷後濾過して得た澄明な濾液 5cc に硫化ナトリウム試液 2 滴を加えるとき変化してはならない。

補 助 的 測 定 法

反応液中に生成した還元糖の量又は一定量のフェーリング試液を還元し得る反応液の容積を求めるには、次のような方法を用いるのが簡便である。又、供試ジアスターゼの効力と生成する還元糖の量が比例関係を有するとすれば、これらの方法を用いてそのジアスターゼが局方限界のジアスターゼの何倍の効力を有するかを大体定めることができるわけである。我々の実験した所では、後でも述べるように局方限界の $\frac{1}{2} \sim \frac{3}{2}$ 倍の効力をもつものでは数%の誤差で倍率を求めることができる。 $\frac{1}{2}$ 倍以下又は $\frac{3}{2}$ 倍以上のものでは $\frac{1}{2} \sim \frac{3}{2}$ 倍の範囲内に入るようにジアスターゼの使用量を変えればよい。

第 1 法: フェーリング試液 5cc 宛を有する数本の大型試験管に、種々の容積の反応液を加え、以下改良法に従つてフェーリング溶液が完全に還元された限界点を求める。加える反応液の容積は限界点附近では 0.1~0.2cc の差であることを要する。この方法は最も改良法に近いが、未知の試料につき限界点を探すのが面倒で時間がかかる。この方法で求めたフェーリング溶液 5cc を丁度還元する反応液の容積 (a cc) はジアスターゼの効力に反比例するから、倍率は $\frac{11.0}{a}$ である。

第 2 法: これは Fehling-Lehmann-Schoorl 法²⁾ に準じたもので、大型試験管中のフェーリング試液 5cc に反応液 5~15 cc (生成した還元糖量に応じて適宜定める) を加え、ゆるやかにガラス製の蓋をほどこし沸騰水浴中で 10 分間放置した後冷却し、ヨウ化カリウム 0.5~1g 及び 20% 硫酸 3cc を加え、更に水 20 cc を加えて残存す銅イオンにより生成したヨウ素を N/10 チオ硫酸ナトリウム液で滴定する。別に、フェーリング試液 5cc に対応する N/10 チオ硫酸ナトリウム液の量を求めておき (理論値 6.94 cc)、これから前記滴定値を差し引くと、これが還

元されたフエーリング試液の量即ち生成した還元糖の量に対応する。この値を反応液 10 cc 当りの量に換算し a cc とする。一方、局方限界のジアスターゼ 20 mg は反応液 11 cc がフエーリング試液 5 cc を丁度還元するわけであるから、反応液 10 cc では 4.55 cc のフエーリング溶液を還元し、これは $N/10$ チオ硫酸ナトリウム液 $6.94 \times 4.55 / 5 = 6.32$ cc に対応する、従つて倍率は $a / 6.32$ となる。

第 3 法: これは Willstätter-Schudel 法³⁾ に準じたもので、反応液 10 cc に $N/10$ ヨウ素液 10 cc 及び $N/10$ 水酸化ナトリウム液 15 cc を加え、15 分間室温に放置後 20 % 硫酸 1 cc を加えて直ちに $N/10$ チオ硫酸ナトリウム液で滴定する。別に、反応液の代りに水 10 cc を用いて盲験を行い、この値から前記滴定値を差し引くと (a cc とする)、これが生成した還元糖量に対応する。局方限界のジアスターゼについて実験してみるとこの値は 2.09 cc であつた、従つて倍率は $a / 2.09$ となる。

改良法の反応の追跡

改良法に従い、バレイショ澱粉 1 g に約 40° の水 30 cc 及び熱湯 60 cc を加え 15 min 沸騰水浴中で還流冷却器をつけて加熱した後、40° に冷却し、40° の水 10 cc を加え、局方ジアスターゼ 20 mg を加えて反応させる。反応液はちょうど 100 cc である。これから一定時間毎に反応液 10 cc をとり、前記第 3 法に従つて生成した還元糖量を測定した、Fig. 1 の縦軸には還元糖量に相当する $N/10$ チオ硫酸ナトリウム液の容積がとつてある。

なお、1% 澱粉にジアスターゼ 10 mg を 40° で作用させた場合、同じく 55° で作用させた場合及び 2% 澱粉にジアスターゼ 20 mg を作用させた場合も参考までに図示しておく。

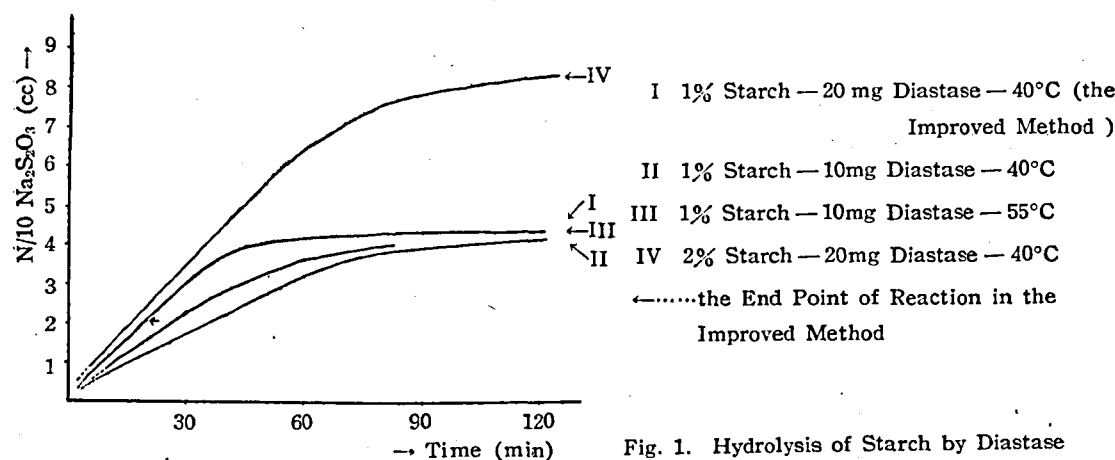


Fig. 1. Hydrolysis of Starch by Diastase

これによると改良法では反応の終点を、最大分解時に対し、澱粉が約 50% 分解した点をとつてある。これは現局方試験に比し、効力の倍率を定めるのに都合がよいからである。

改良法と現局試験法との比較

数種の市販ジアスターゼ及びこれを適当にデキストリンでうすめたジアスターゼについて改良法に従つて反応させ、第 1 法によりフエーリング試液 5 cc を還元するに要する反応液の容積を求めた。一方、日局 VI に従つて澱粉消化力の適否を求めこれと比較した。但し、ジアスターゼ I, II, III, VIII は市販品、IV, V, VI, VII は III を適当にデキストリンでうすめて製したものである。

第 1 表

ジアスターゼ	フエーリング試液 5cc を還元する反応液の容積 (cc)	日局 VI 試験法による適否
I	7.9	適
II	9.7	適
III	10.5	適
IV	10.9	適
V	11.1	適
VI	11.9	不適
VII	12.5	不適
VIII	15.0	不適

この結果から局方限界のジアスターゼを使用すると、反応液約 11 cc がフエーリング試液 5cc を還元することがわかる。従つて、現在の局方とジアスターゼの効力を大体一致させるために、改良法では反応液 11 cc がフエーリング試液 5cc を還元しなくてはならないと規定した。しかし、少し効力の強いものを要求して反応液の量を 10 cc とすれば、試験法としての体裁は更にととのうこととなる。

ジアスターゼ効力の倍率測定

局方限界に近いジアスターゼを用い、その使用量を変え、前記の方法によつて倍率を定め理論値と比較してみたところ、ジアスターゼ 10~30 mg 即ちジアスターゼ 20 mg の $\frac{1}{2}$ ~ $\frac{3}{2}$ 倍の範囲内では数%の誤差で一致した。次に示すのは第 1 法を用いた 1 例である、但し、ジアスターゼ 10 mg 以下ではフエーリング試液の使用量を少量にして実験した。

第 2 表

ジアスターゼ mg	フエーリング試液 5cc を還元する反 応液の容積 (acc)	効力の倍率		
		理 論 値	実測値 ($\frac{11.0}{a}$)	誤差 %
40	6.3	2.00	1.75	- 12.5
35	6.8	1.75	1.62	- 7.4
30	7.6	1.50	1.45	- 3.3
25	9.4	1.25	1.17	- 6.4
20	11.0	1.00	1.00	-
15	13.7	0.75	0.60	+ 6.7
10	21.5	0.50	0.51	+ 2.0
5	41.0	0.25	0.27	+ 8.0

この実験例をみるとジアスターゼ 25 mg 及び 15 mg 使用の場合の誤差が大きすぎるようであるが、その後第 2 法 第 3 法等で検討してみると誤差は更に少なくすることができた。しかし、この試験法は日局 VI のためのもので

あつて、それほど精密なものでないから、倍率の測定には数%の誤差を考えに入れておかねばならない。又倍率は局方限界より強いものでは幾分低めに、弱いものでは幾分高めに出来るようである、けれども現局方試験法と比較するならば、ジアスターゼの効力と生成する還元糖量は一層広範囲に比例することはあきらかである。

結 論

この改良法では次の点で現在の局方試験法よりすぐれている。

1. 澱粉糊液の濃度がうすいので (現局方では約 5%, この改良法では約 1%), 作製, 取扱いが容易である。
2. 試験の所要時間が短縮されている。
3. 反応温度は 40° の方が体温に近く又操作も楽である (現局方では 55°)。
4. 一定時間後化学的にジアスターゼ作用をとめているから、その後の酵素作用の進行による誤差を防止できる。
5. 反応の終点は完全分解時の約 50% の点をとつているから (現局法では約 90%), 効力の倍率を一層広範囲に簡便に求めることができる。

しかしながらこの改良法ではまだ誤差の入る可能性が多く、決して満足なものではないから、今後更に検討を加える必要がある。

文 献

- 1) 寺山, 菅山: 衛試 67, 35, 68, 14の附記
- 2) 化学実験学第二部天然物取扱法 III, 175
- 3) Willstätter und Schudel: Ber. 51 780 (1918)
Willstätter, Waldscmidt-Leitz, und Hesse: Z. physiol. Chem. 126, 143 (1923)
化学実験学第二部微生物及び酵素実験法, 651

Improvement on the Assay for Starch Digestive

Power of Diastase in J.P.

By Masato ASAHINA and Jun SERIZAWA

The improved method proposed here on the assay for Diastase digestive power is different from that of the present J.P. mainly in the following two points. The first, about 1% starch solution is used instead of about 5%, for the purpose of making its preparation and treatment easy and of reducing error. The second, the hydrolysed stage of about 50% of the maximum hydrolysis of starch is adopted instead of about 90% as the end point of reaction, because the intensity of diastase function is able to be determined conveniently in larger range. Some improvements are performed in the other points.

発熱性物質試験法に対する検討*

横井 泰生, 堀内 茂友, 近藤 了

Studies on Pyrogen Test

By Yasuo Yokoi, Shigetomo Horiuchi and Satoru Kondo

緒 言

薬液を患者の静脈内に注射する際、悪寒戦慄等の副作用を招くことは珍しくない。その主な原因が薬液中に存在する発熱性物質（パイロジェン, Pyrogen）であることは、近時一般に広く承認されている。このための検出法が我が国でも第六改正日本薬局方（昭和 26 年；以下日局 VI と略す）に収載されたが、この発熱性物質試験法は第十三改正米国薬局方（1946；以下米局 XIII と略す）の Pyrogen Test にきわめて近く、こゝ 2~3 年来、我が国で研究者がそれぞれ行っていたものよりもきわめて厳格である。¹⁾

本法の原理は家兎の静脈内に薬液を注射し、その結果としての直腸体温上昇の有無を検査し、薬液中の発熱性物質の存否を判断するにある。このような家兎体温測定法に対して化学的検出法（過マンガン酸カリウム脱色反応²⁾, T.B.P 反応³⁾）、光学的検出法（螢光反応⁴⁾）等が唱えられ、或は動物体温測定にしても冷血動物としてはカエル、ガマ⁵⁾、温血動物としては犬⁶⁾ 或は猫⁷⁾ を使用する方法が考案され、また発熱性物質が温血動物の白血球数に及ぼす影響⁸⁾、鶏卵孵化に及ぼす影響⁹⁾ を検査目標とするなど種々の企てがある。

発熱性物質検出法は以上列記しただけでも十種類に達する。これら全部が実用性を有するわけではなく、あるものは過去のものとなり、あるものは発見者自身実用性が不充分であると認めている。人体発熱に最も忠実な原理を採用すれば温血動物による体温測定法ということになり、また実用上犬、猫よりも家兎の方が好都合である。そして家兎体温測定法は実験条件が最もよく検討された方法でもある。本法は米局 XII (1942) 制定に際しての膨大な共同研究の成果であり、¹⁴⁾ 米局 XIII 及び XIV にて多少の変化を見せている。デンマーク薬局方 (1948)、フランス薬局方 (1949) も我が国の第 6 改正薬局方と同じく米国薬局方同様のようであり、英国薬局方 (1948) もその趣旨は同一である。今や本法は約 10 年の批判に堪えて各国により公認されたもので、充分検討する価値がある。一方我が国は米国とは風土を異にし、家兎の系統、飼育条件等に関し同一ではない。米国法を殆どそのまま適用することの可否は甚だ興味のある問題であり、この方法と我が国諸家の方式との比較検討を併せて行いたいと思う。因にフランスでは米局方の直訳的採用に異論もあるようである。¹²⁾

実験材料と実験方法

従来の研究で使用された発熱性物質は、いずれも微生物の菌体または産生物に何等かの処理を施したものである。それらとしては比較的簡単な操作を加えたに過ぎないワクチン、または更に複雑な操作を加え比較的純粋に取り出した化学的物質がある。これらのものはいずれも市販注射薬中に含まれる発熱性物質を代表するという証明はない。従つて我々は注射薬に対する発熱性物質試験法の研究においては、発熱性注射薬それ自体を用いるのが最も適当であると考えた。そこで今回の実験における発熱性物質としては、我が国内の工場で誤つて生産された発熱性の注射薬を各方面から集めて使用した。

実験動物としては、日本国内で一般に入手の容易な普通の白兎（日本白兎、白色日本種等と呼ばれているもの）を用いた。なるべく雄を用い、体重は局方の規定通り 1.5 kg 以上で充分健康にして、使用前少くも 1 週間は体重の減少のなかつたものに限つた。

第 1 回体温測定 1 時間前に家兎から餌を除去した。体温測定には測定者は椅子に腰掛けて動物を静かに膝の上

* 本論文の要旨は昭和 25 年 11 月 23 日東京医科歯科大学で開催された日本薬理学会関東部会で講演した。

で布にくるみ、「く」字形動物用体温計を肛門から約 6cm の深さに直腸内に充分な時間挿入し読みを取った。注射筒、注射針は使用前毎回 250° 以上に約 40 分間乾熱して発熱性物質の除去に努めた。

室温は米局方に最適条件と指定されている 25° を目標とした。しかし我々がこの試験法の検討を開始したのが昭和 25 年夏で、当時は温度調節に関しては全く無設備であつたので北側の涼しい部屋を使用した。幸にも真夏の一日の最高温度が 30° (米局方の許容最高限度) を越すことは殆んどなかつた。その上、一昼夜の室温動揺も 5~6° に止まつた。昭和 25~26 年の冬は電氣的に室温の自動調節を行つたが、なお厳寒期は日中でも室温を 20° (米局方の許容最低限度) に維持することは困難であつて 17~18° 程度で我慢せねばならぬ状態で、夜間の最低温度はそれよりも 5~6° 低下していた。昭和 26 年 4 月以後は四季を通じて昼夜の別なく室温は大体 25° に調節できた。

実験成績

有意であると思ふ体温上昇値 一般に我が国の研究者は注射前に比しての動物体温上昇が 0.8~1.0° 程度以上なる場合を以て発熱反応陽性と思ふ。一方日本薬局方では米局方同様、注射前に比して 0.6° 以上の体温上昇のあつた場合に意味を持たせている。体温上昇に意味を持たせる値の限界を低く取ればそれだけ同一条件下では検定上発熱性物質を見逃す危険は少くなるが、誤つて全く体温上昇作用のないものに発熱性物質陽性との判定を下す危険は逆に増大する。ともかく、自然動揺による体温上昇と注射発熱によるそれとを区分する線をどこに引くべきかは、本試験法の実施上最も重要な検討題目の一つである。

第 1 表は家兎の自然動揺としての体温上昇程度を知る目的を以て行つた実験である。局方の体温測定操作に従いながら注射操作は全然行わないとき、注射直前に相当する体温を基準としてその後の体温上昇の程度を知ろうとした。すなわちその後 1 時間間隔で 3 回体温を測定した値の中最高のものは基準体温に比してどれほど高いかを求めた。このときの室温は 12°~30° の範囲で、1 日の間の温度は比較的一定であつた。調査は 482 匹の家兎について行つたが、この中には体温測定操作を初めて受けたものも多数含まれる。

Table I

Maximum Normal Temperature Variation in Rabbits Within 3 Hours

(Nothing was injected)

Basal Temp. °C	Maximum Temp. Rise °C	
	0.5° or more	0.6° or more
38.9~39.8	4.3%	0
less than 38.9	15.2%	4.6%

(Remarks) 278 observations with 38.9~39.8°C basal rectal temperature, and 208 observations with less than 38.9°C basal temperature. Room temperature was pretty constant between 12° and 30°C.

日局に従えば注射直前の体温とは試験当日における 1 時間毎の第 3 回体温測定値であつて、これを便宜上対照体温と呼ぶ。第 2 回と第 3 回の値のほぼ相等しいことを条件としているが、我々の 482 匹についてはこの点を全く顧慮しなかつた。

第 1 表に示すように注射直前の、すなわち対照体温が 38.9~39.8° の範囲にあるときは、38.9° 未満の場合に比してその後の自然動揺による体温上昇は著しく少い。我々の実験ではこの範囲の対照体温を示す家兎 278 匹中、自然動揺により体温上昇が 0.6° 以上となる家兎は 1 匹もなかつた。従つて日局において対照体温をこの範囲に定め

るという規定は、注射発熱による体温上昇と自然動揺による体温上昇とを混同しない上に充分意味のあることを知った。この日局規定を守る限り、有意義な体温上昇値と見なす臨界値を 0.6° と区切つても本試験法運用上差支えないと一応推察されるが、この点につき更に統計学的考察を行うとする。今、自然動揺のため 0.6° 以上の体温上昇を来す家兎の真の比率を p とし、また誤つて即ち全く発熱性物質を含有せず体温上昇作用のない薬液に日局試験法を行つた結果、発熱性物質陽性との判定を下してしまう確率を P とすれば次式が成立する。

$$P = {}_3C_3 p^3 + {}_3C_2 p^2 (1-p) + \{ {}_3C_1 p (1-p)^2 + x \} \{ {}_5C_5 p^5 + {}_5C_4 p^4 (1-p) + {}_5C_3 p^3 (1-p)^2 + {}_5C_2 p^2 (1-p)^3 \}$$

上式は使用家兎数を一応 3 匹とし、場合により更に 5 匹を使用するという次の日局規定に基づく。すなわち家兎 3 匹中 2~3 匹が 0.6° 以上の体温上昇を来す場合には直ちに発熱性物質陽性との判定を下し、3 匹中ただ 1 匹が 0.6° 以上の体温上昇を示すとき及び 3 匹中 0.6° 以上の体温上昇となるものは皆無であつても 3 匹各々の体温上昇合計が 1.4° を越えるときは（仮に後者の確率を x とおく）、更に 5 匹について試験を行い、この中の 2 匹以上が体温上昇 0.6° 以上となる場合もまた発熱性物質陽性との判定するのである。

我々がこの試験法を 1,000 例以上行つた実際の経験からいうと、最初の 3 匹の試験で 1 匹だけ 0.6° 以上の体温上昇を示したのは 50 回以上の試験例があるにもかかわらず、体温上昇 0.6° 以上のものが皆無でしかも 3 匹各々の体温上昇の合計が 1.4° を越えるという試験例は 1 回もなかつた。故に事実上

$$\frac{x}{{}_3C_1 p (1-p)^2} < \frac{1}{50} \quad \text{即ち} \quad \frac{x}{{}_3C_1 p (1-p)^2} \approx 0$$

と見なして差支えあるまい。従つて

$$P \approx p^3 + 3p^2 (1-p) + 3p (1-p)^2 \{ p^5 + 5p^4 (1-p) + 10p^3 (1-p)^2 + 10p^2 (1-p)^3 \}$$

p を与えれば上式から P を計算することは容易である。具体的結果は第 2 表 (A) に譲る。

ともかく我々の実験条件では、自然の体温上昇が 0.6° 以上ということは 278 例中 1 例もなかつた（第 1 表）のであるから、体温の自然動揺のために、体温上昇作用のない薬液に対して発熱性物質陽性の判定を下すことは、先ず 0.01% 以下と考えられる。これは文字通り万に一の誤りもないことで、局方の 0.6° という規定は我々の実験的条件下においても全く正当である。

Table II

(A) False Positive Test

(誤つて発熱性物質陽性との判定される確率)

p *	False Positive Test	
5 %	below	5 %
2 %	"	1 %
1 %	"	0.1 %
0.5%	"	0.01%

*p means percentage of rabbits which show 0.6°C or more in maximum temperature rise as normal fluctuation.

(B) False Negative Test

(誤つて発熱性物質陰性との判定される確率)

Pyrogen Dose **	False Negative Test	
P D 50	approximately	20%
P D 10	"	95%

** PD X means the pyrogen dose which causes; by intravenous injection, X% rabbits to be elevated 0.6°C or more in rectal temperature.

発熱性物質陽性判定の再現性 発熱性物質試験法によつて発熱性反応陽性との判定を受けた注射液は、その後何回検査を繰返しても同様に陽性という判定をうけるであらうか？

此の際、議論の範囲を純粹に数学的な問題に限ることとする。ここに眞の発熱率 50% の注射液 (極めて多数の家兎に注射を行つた場合、体温上昇 0.6° 以上のものの全数に対する割合が正に 50% となるようなもの) があつたとする。局方試験を無限回繰返したとすると、試験結果が発熱性物質陽性 pyrogen positive となるのは約 80% の場合であつて、残りの場合はそうはならないことは、前節に準じて既述の P 式を適用することにより判明する。結果は第 2 表 (B) に示す通りであるが同様に眞の発熱率 10% なる注射液 (きわめて多数の家兎に注射を行つた場合その中のちようど 10% のものが 0.6° 以上の体温上昇を示すようなもの) があつたとすると、無限回試験を繰返した際、発熱性物質陽性の判定を得るのは全回数約 5% に相当し、残りの大多數の回数においてはそのような結果を示さない。

以上の論議は数学的問題のみを取扱つたのであるが、実際の場合には室温、栄養、家兎の系統、健康状態等の物質条件を全く均一に維持することは至難で、試験結果の動搖はこの方面から上述の数字よりも更に増大することを覚悟せねばならない。

注射量と発熱との関係 我が国では発熱性物質試験法の実施に当り試験動物に対する検査の静脈内注射量として 5 cc/kg を採用する人が多い。然るに日本薬局方の規定では米國薬局方と同様に 10 cc/kg となつた。勿論、常識的に考えても或は文献¹⁰⁾に徴するも一定範囲内では発熱性物質投与量を増すと共に体温上昇平均値の増加する傾向は明白である。然し文献にあるような細菌性発熱性物質ではなく、発熱性注射液自体を用いた場合、このような注射量の増減は具体的に如何なる結果をもたらすかは興味ある問題である。しかも動物匹数は故意に多数を避け局方規定の匹数 (3匹、ときに 5匹追加) にほぼ等しくした。注射直前の体温も局方通り $38.9 \sim 39.8^{\circ}$ のもののみを用いた。発熱性判定の指数としては通常用いられる体温上昇平均値のほかは発熱率 (注射による体温上昇 0.6° 以上となるものの割合) を採用して局方の発熱性判定の趣旨に近くした。

結果は第 3 表に示す通りである。いずれの発熱性ブドウ糖注射液においても殆ど例外なく注射量を pro kg 10 cc, 5 cc, 2.5 cc と逓減するに従ひ発熱性の低下が見られる。これから見ても発熱性物質検出という試験法本来の目的には、10 cc/kg が 5 cc/kg よりは優れていることは明白である。一般に各種濃度の注射用糖液を 10 cc/kg の割合で静脈内注射を行つても実際問題としては実験の実施に何等差支えないのである。但しこれが厳密な意味での家兎の生理的条件を乱すか否かは別個の問題である。

Table III

Grade of Febrile Reaction (Average Maximum Rise in Rectal Temperature above Starting Temperature and Fever Ratio) of Rabbits Injected Intravenously with Varied Volume of Test Solutions

Test Solution	Volume Injected (cc/kg)	Fever Ratio* (発熱率)	Average Maximum Rise in Rectal Temp. ($^{\circ}$ C)	Room Temperature ($^{\circ}$ C)
① 20% Glucose Solution for Injection	10	3/3	0.85	19
	5	1/3	0.40	
	2.5	0/3	0.43	
② 5% Glucose Solution for Injection	10	1/3	0.40	22
	5	1/3	0.20	
	2.5	0/3	0.03	
③ 20% Crude Glucose Solution	10	3/3	0.95	20
	5	1/3	0.35	
	2.5	0/3	0.28	

To be continued

④ 20% Glucose Solution for Injection	10	2/3	1.05	22
	5	1/3	0.50	
	2.5	1/3	0.33	
	1.25	0/3	0.28	
⑤ 20% Glucose Solution for Injection	10	5/6	0.85	25
	5	4/6	0.60	
	10 (1:2)**	4/6	0.69	
⑥ 20% Glucose Solution for Injection	5	3/6	0.58	27
	10 (1:2)**	3/6	0.49	

* Fever Ratio = $\frac{\text{No. of rabbits whose temp. were elevated } 0.6^{\circ}\text{C or more}}{\text{No. of rabbits injected}}$

** (1:2) means two-fold dilution by pyrogen free water.

なお、第3表の成績中検液⑤及び⑥を用いての実験から見て、原液 5 cc/kg をそのまま注射したのと、原液 5 cc を発熱性物質を含有しない蒸留水にて2倍希釈したものを 10 cc/kg 注射したのでは発熱反応は殆どかわらないものと想像される。

同一家兎の反復使用によつて生ずる耐性の程度 Beeson¹¹⁾ によれば、細菌性発熱性物質を同一動物に反復注射するとき、その動物は発熱性物質に対して耐性 Tolerance を生じて著しく発熱し難くなるのであるが、この現象は抗原体反応によるのではなく、R.E.S. の発熱性物質処理機能が著しく亢進するためであるという。浦口¹²⁾ もカビから得た発熱性物質について同様に家兎感受性の低下を報告している。勿論、以上とは反対の結果を発表している者も多い。我々はできるだけ忠実にこの点の検討を試みた。

実験1: すでに発熱性物質陽性であると判定されていたブドウ糖末をば厳密な調整法に従つてアンプル入りの20%注射液とし、実験材料とした。この液は新しい家兎30匹についての体温上昇平均値が 0.7° であるから、発熱性も比較的弱く発熱性注射液としてはしばしば存在する程度のものである。実験用家兎は1群10匹とし、A, B, C 3群を用い、使用度数はA群3回、B群2回、C群1回と定めた。家兎の休養期間間はいずれも1週間で(米国薬局方では最低2日) 実際上の立場からは比較的中とりのある程度である。各群ともいつも第1回は10匹を使用した。局方条件を忠実に守つたため、第2回、第3回となると使用匹数はこれよりも少しずつ減少し勝ちであつた。実験は同一群で前回との発熱性の比較を行うのみならず同一時における新しい家兎のそれとの比較も行ふにした。室温、飼料その他家兎発熱の感受性の動揺を除外した結果を知りたいためである。

結果は第4表(A)に見るように休養期間を1週間としてもなお反復注射による耐性の獲得が充分察知される。

Table IV (A)

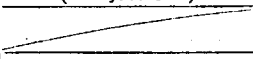
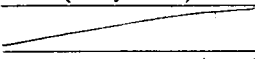
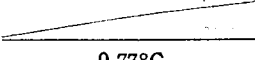
Effect of Repeated Injections of Pyrogenic Glucose Solutions (Exp. I)

(1) From the standpoint of fever ratio.

Date (room temp.)	Group A (3 injections)	Group B (2 injections)	Group C (1 injection)
12 Dec. 1950 (13°C)	70% [7/10]		
19 " (18°C)	44% [4/9]	70% [7/10]	
26 " (19°C)	29% [2/7]	75% [6/8]	80% [8/10]

To be continued.

(2) From the standpoint of average maximum rise in rectal temp.

Date (room temp.)	Group A (3 injections)	Group B (2 injections)	Group C (1 injection)
12 Dec. 1950 (13°C)	0.73°C		
19 " (18°C)	0.46°C	0.61°C	
26 " (19°C)	0.52°C	0.65°C	0.77°C

(3) Summarized result.

	Average Maximum Rise	Fever Ratio
1st injection	0.70°C	73%
2nd "	0.55°C	59%
3rd "	0.52°C	29%

Remarks: Interval between injections was 1 week.

実験 2: 発熱性物質として用いたものは、我が国の某工場で市販用に製造された 20% ブドウ糖注射液で我々の検査により発熱性物質陽性と判定されたもので、薬局方の化学的及び細菌学的試験には適合する製品である。

結果は第 4 表 (B) に見る通りである。この発熱性物質注射液を 3~4 日の休養期間をおいて注射してゆくときは (発熱性物質試験法で家兎を 1 週に 2 度の割合で使用するに当る)、家兎感受性の低下が見られる。本実験においても局方条件 (対照体温 38.9~39.8° などの条件) を忠実に守つたため第 2 回以後は使用し得る匹数が相当の割合で減少した。

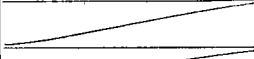
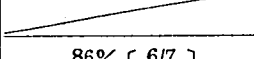
以上二つの実験から局方条件で発熱性注射液の反復注射がやはり家兎の感受性を低下さすことを知つた。

然し絶えず新しい家兎のみを使用することは検定の実際上にはかなりの困難が伴う。我々は当試験所の発熱性物質試験を担当するに当り、発熱反応陽性またはその疑があると考えられた検体の注射をうけた家兎はすべて廃棄してゆき、その分は新しい家兎で補充した。

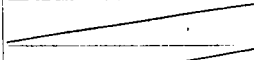
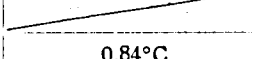
Table IV (B)

Effect of Repeated Injections of Pyrogenic Glucose Solutions (Exp. 2)

(1) From the standpoint of fever ratio.

Date	Group A (3 injections)	Group B (1 injection)
7 Dec. 1951	100% [12/12]	
10 "	57% [4/7]	
14 "	50% [2/4]	86% [6/7]

(2) From the standpoint of average maximum rise in rectal temperature.

Date	Group A (3 injections)	Group B (1 injection)
7 Dec. 1951	0.85°C	
10 "	0.54°C	
14 "	0.675°C	0.84°C

(Remarks) The room temperature was always kept at 25°C. Interval of injection was respectively 3 and 4 days.

Table V

Effect of Repeated Use on Percentage Fever Response

(Result in our laboratory discarding all the rabbits which received solution pyrogen positive or likely so.)

Repetition Time		Percentage Fever Response	
1st	time	34/99	34.3%
2nd	time	17/72	23.6%
3rd	time	26/57	45.6%
4th	time	11/35	31.4%
5th	time	13/24	54.2%
6th	time	5/11	41.9%
7th	time	2/10	
8th	time	5/6	
9th	time	1/3	
10th	time	0/0	
11th	time	0/1	

Percentage Fever Response

$$= \frac{\text{No. of rabbits whose temp. were elevated } 0.6^{\circ}\text{C or more}}{\text{No. of rabbits which received the solution by whose administration one rabbit at least showed } 0.6^{\circ}\text{C or more temp. rise}} \times 100$$

このような方式を取つても、なお注射回数を増すに伴い家兎に発熱性鈍化の傾向があるかどうか、我々が管理する家兎、延べ総数約 5,000 匹について検討を行つた。この中で発熱性物質試験法実施により体温上昇 0.6° 以上のものが 1 匹でも出た検体の注射をうけた家兎すべてを抽出しこれを分類した。結果は第 5 表に示す。各使用頻度毎に発熱率 (体温上昇 0.6° 以上の家兎の割合) を計算してあるが、発熱性鈍化というような傾向はなかつた。

総 括 と 結 論

今回制定された日本薬局方 VI の発熱性物質試験法は、我が国としては訓期的なものであるが、米国薬局方の内容が殆んどそのまま取り入れられている。このような厳格な試験法は我が国では実行不可能であるともいわれた。我々の実験室で集積した資料と発熱性注射液そのものを用いての実験によつて、我が国内における本試験法実施の可能性を検討すると共に、内外で異論のある点その他本試験法に関する諸問題につき研究を行つた。

1. 家兎において 1 時間々隔で直腸体温を測定するとき、第 3 回目の体温を基準としてその後 3 時間におわたる自然動揺としての体温上昇度を測定した。自然動揺としての体温上昇は、基準体温が 38.9° 未満のときは比較的大きいが、 $38.9 \sim 39.8^{\circ}$ であるときは比較的少く、278 匹中体温上昇が 0.6° 以上のものは皆無であつた。(このときの室温は $12 \sim 30^{\circ}$ 、1 日の間の温度は比較的一定に保つた)。家兎数を 1 匹とせず、局方の形式による家兎数を用いるときは、自然動揺に基づき体温上昇によつて、体温上昇作用のない注射液に対し発熱反応陽性と判定する可能性は絶無に近い。

2. 我々が試験した国内製品の成績によれば、極めて多数の家兎に注射するとき、その全部が体温上昇 0.6° 以上というほど強い発熱性注射液は少く、大多数の発熱性注射液はその何割かの家兎に 0.6° 以上の体温上昇を来すにすぎない。このような注射液に局方試験を適用すると現行の 3 匹、多くも 8 匹という規定では試験の度毎に発熱性に関する判定結果が動揺し勝ちである。これには試験法そのものの持つ形式上の不備 (使用動物数に関する規定) に由来する部分がある。そしてこれに基づき再現性の程度を極く大略ながら示した。

3. 発熱性の有無を検定すべき検液の注射量として、我が国では大部分の人は 5cc/kg を用いていたが、局方では 10cc/kg としてある。発熱性物質検出感度の点からいつて 10cc/kg の方が 5cc/kg よりもよいことを我々は明らかにした。而して各種濃度の糖類注射液、リンゲル液、ロック液については 10cc/kg は家兎が十分に耐えられる量である。

4. 発熱性注射液それ自体を用いた実験の結果、発熱性物質試験法の実施時、家兎を毎週 2 回程度反復使用する場合は勿論、休養期間を 1 週間とする場合も反復使用は家兎の発熱性を鈍化せしめることを知った。

然し検定の実施に当り毎回新しい家兎を使用しなくても、発熱性物質陽性と判定された、またはそれに近い成績を得た注射液を注射された家兎をすべて廃棄してゆくことにより、試験用家兎の発熱性物質に対する感受性を低下せしめることはなかつた。極めて弱い、すなわち我々の手では検出のつかなかつた程度の弱さの発熱性物質の影響は 5~14 日程度の休養で消失するようである。

但し乾燥血漿等の如くそのもの自体が血清学上の抗原となり得る注射液の検定には、常に新しい家兎を使用せねばならぬことは申すまでもない。

本研究費の一部は厚生科学研究補助金によつた。文献蒐集に御便宜を頂いた三沢株式会社恒松不二夫氏に謝意を表する。

文 献

- 1) 小林芳人, 浦口健二, 酒井文徳: 日本薬理学雑誌 44 (3), 15—16 (1949)
山田肇, 小林衛: 日本薬理学雑誌 44 (3), 15 (1949)
青山好作: 衛試 68, 127—137 (1950)
小林衛: 日新医学 37 (10—11), 448—453 (1950)
Hatta, S; Aoyama, K; and Tanji, S: Jap. Med. J. 3 (2), 125—135 (1950)
- 2) Co Tui & Schrift, M. H., Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 49, 320—323 (1942) より引用
- 3) 小林芳人, 浦口健二, 酒井文徳: 日本薬理学雑誌 44, 15—16 (1949)
- 4) 青山好作: 衛試 68, 127—137 (1950)
- 5) 西田敬, 田中正寿, 徳永友喜子: 日本薬理学雑誌 46, 175—176 (1951)
- 6) Co Tui, Schrift, M. H., Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 49, 320—323 (1942)
- 7) 小林芳人, 浦口健二: 日本学士院紀要 6, 195 (1948)
- 8) Young, E. G. & Price, F.A.H., J. Lab. Clin. Med. 29, 735 (1944)
- 9) 箕島 高: 文部省科学試験研究医学関係要望課題 127 報告書による (1950)
- 10) 小林 衛: 日本薬理学雑誌 47 (1), 75—80 (1951)
Welch, H; Price, C.W.; Velma, L. & Hunter, A.C. J. Am. Pharm. Assoc. 34 114 (1945)
Molitor, H; Gundel, M.; Kuna, S. & Ott, W. H.: J. Am. Pharm. Assoc. 35, 356—363 (1946)
- 11) Beeson, P.B.: J. Exp. Med. 86, 29—44 (1947)
- 12) Charonnat, T.; Lechat, P., Annales Pharmac. Françaises 8 (3) 161—171 (1950)
- 13) 浦口健二, 酒井文徳: 日本薬理学雑誌 45 (2), 110 (1949)
- 14) McClosky W.T., Price, C. W, Van Winkle W., Welch, H. G. Calvery H. O.: J. Am. Pharm. Assoc. 32, 69—73 (1943)

Studies on Pyrogen Test

By Yasuo YOKOI, Shigetomo HORIUCHI and Satoru KONDO

The occurrences of fever and chills are so frequent phenomenon following the intravenous injection of aqueous solution of medicinal agents in the postwar Japan. The subject therefore has been on the field of research. Many new devices of detecting such pyrogenic solutions have been discovered by Japanese scholars, but the Pyrogen Test of U.S.P. XIII with slight modification has been taken into the new Japanese Pharmacopoeia VI. This method by the new Japanese Pharmacopoeia is by far more strict and precise than any other method hitherto employed in Japan. Some Japanese authors claim that it would be impossible to introduce such a difficult test into Japan, wherein the condition of laboratories is unsatisfactory. In fact, there is a wide difference between in Japan and in U.S., for instance, with regards to test animals, diet, etc. We, Japanese, are very anxious to know whether or not this pyrogen test can be conducted according to U.S.P. in Japan. Objections for this new test have been presented by Japanese academic circles, and it was examined in our laboratory. Intentionally avoiding pyrogen from bacterial source, we for experimental material used the solutions of glucose made for injection by Japanese medicinal manufacturers and proved by us pyrogenic. We believe that they are the most natural and suitable materials for solving the problem of Pyrogen Test.

The results obtained were as follows:

(1). The rise of rectal temperature in rabbits as normal fluctuation was much more diminished than it had been expected by Japanese academic circle. Out of 278 observations with 38.9~39.8°C starting level, none showed in three hours a maximum rise in temperature of 0.6°C or more. It appears that the temperature rise of 0.6°C or more, following the injection of suspected materials is indicative of presence of pyrogens. By use of sufficient animals (usually 3, if necessary 8), false positive reaction may be eliminated from consideration.

(2) Seeing from the purely statistical point of view about the construction of Pyrogen Test (U.S.P.; J.P.), we were unable to expect the constant results about positive or negative for intravenous solution which was slightly pyrogenic relatively.

(3) It was evidently demonstrated that 10cc intravenous injection per kg of rabbit was more efficient and sensitive for detection of pyrogen than 5cc or 2.5cc injection per kg.

(4) At the result of repeated injections, rabbits became relatively irresponsive to pyrogenic glucose solution, even if rest of a week was allowed. In conducting pyrogen test, we discarded all the rabbits which had received solutions pyrogen positive or doubtful ones. By this methods, we could keep our laboratory rabbits fully responsive to pyrogenic agents as in the case of fresh animals.

ブドウ酒中のズルチンの検出法

川 城 巖, 福 沢 富 美, 佐 々 木 睦 江

Detection of Dulcin in Wines

By Iwao KAWASHIRO, Fumi FUKUZAWA and Mutsue SASAKI

ま え が き

「食品衛生検査指針」においてブドウ酒の試験法中ズルチンの検出法は未だ規定されていない。この項目を規定するにあたり、同指針人工甘味質検査法中「食品中のズルチン」に記載されている方法を、そのまま、これに適用し得るか否かにつき検討を行つた。なお特に日本薬局方によるブドウ酒には甘味料として、ズルチンの使用は許可されていないので、これを検出してはならない。そこで、ここにおいては、定性的検出法についてのみ検討を行つた。その結果、ほぼ前記の方法を採用して支障のないことを確かめ得たので、ここに操作上の多少の注意と確定反応の追加等を行い、その試験法案を得た。その検討の結果を示すと次の通りである。

実 験 の 部

ズルチンの抽出に対する検討 「食品衛生検査指針」においては、試料に水酸化アルカリを加えて、アルカリ性とし、エーテルを用いて、ズルチンを抽出する方法を採用している。この場合粘ちよう性の高いもの及び炭酸含有の試料に対する注意は記されているが、アルコール含有の試料についての注意は記載されていない。ブドウ酒の場合はその一定量を取り、水浴上で、アルコールを蒸発して、後水を加えて原容とし、この試料について溶媒抽出を行わなければならない。

次に抽出溶媒として、エーテルを用いた場合と、酢酸エチルを用いた場合とについて、その抽出状況及び回収率を比較検討した。その実験結果を示すと次の通りである。

実 施 法

試料: ブドウ酒 (甘味質, 防腐剤等を全く含まないもの), ズルチン (予め 100°, 1 時間乾燥したもの), ブドウ酒中のズルチンの含量は 200 mg/l とする。

試験法: **むすび**に記載の方法により行う。但し、酢酸エチル抽出法の場合はエーテルの代りに酢酸エチルを用いて抽出を行つた。直接秤量法はズルチン抽出の全エーテル液 (酢酸エチル) を水洗した後、予め秤量したフラスコを用いて、エーテル (酢酸エチル) を蒸発し去り、残留物を 100~105° で 1 時間乾燥した後、デンケータ中に放冷秤量する。キサントヒドロール法はエーテルを蒸留し去つた残留物につき、「食品衛生検査指針」III (1951) 357 頁ズルチンの定量法 ② キサンチヒドロール法に従つて行う。

Table. I

Methods	Extraction with Ether		Extraction with Ethyl acetate	
	Direct weighing	Xanthidrol method	Direct weighing	Xanthidrol method
Recovery	70.00 %	68.05 %	97.00 %	81.50 %
	75.08	73.06	104.40	79.65
	77.10	74.01	101.30	80.02

以上の試験により、エーテル抽出法は酢酸エチル抽出法に比し、回収率はおとるが、ズルチン以外の物質の共に抽出される恐れが少ない結果となる。そこで抽出溶媒としてはエーテル使用の抽出法を、そのまま採用して支障のないものと認める。

確定反応に対する検討 「食品衛生検査指針」に採用されている、甘味試験、Berlinerblau 及び Thoms 法 (Morpurgo 法)、Jorissen 法の 3 反応以外に、鋭敏なアルデヒドと縮合させる呈色反応¹⁾を検討したので追加しておく。

次にこれら反応の検出限度を知るため、次の基本試験を行った。

実施法

検液の調製: 予め 100° で 1 時間乾燥したズルチン 0.1g をアルコールに溶かして 50 cc とした溶液の各一定量ずつを各試験管にとり、氷浴中でアルコールを蒸発し去り、その残留物について次の各反応を行う。

確定反応:

1. 甘味試験: 残留物につき甘味を調べる。
2. サリチルアルデヒド縮合反応: 残留物につき、**むすび**に記載の方法に従って行う。この呈色反応は、ズルチンの含量が微量であるときはその赤色が稍橙色を帯びる。
3. Jorissen 法: 残留物につき、**むすび**に記載の方法に従って行う。
4. Morpurgo 法: 残留物につき、**むすび**の部記載の方法に従って行う。試薬の量、アルカリ液の加え方等はズルチンの量より考慮し、注意を加えた。

Table II

Reactions Dulcin mg	(1)	(2)	(3)	(4)
1	(+)	(+)	(+)	(+)
0.5	(+)	(+)	(+)	(+)
0.3	(+)	(+)	(+)	(+)
0.2	(+)	(+)	(+)	(+)
0.1	(+)	(+)	(±)	(±)

以上の試験の結果、4 反応により、ズルチン略 0.1 mg を検出することができる。

又これらの反応が、ズルチンを含まないブドウ酒自体から抽出されてくる物質によつて陽性の反応を示すかどうかを検討するためにズルチンを全く含有していない白ブドウ酒、及び赤ブドウ酒について同様の操作により抽出を行いその残留物のエーテル溶液について上記 4 反応を行った結果これらの反応はすべて陰性を示した。

ブドウ酒中のズルチンの検出 実施法: **むすび**に記載の方法によつて行う。その結果を表に示すと次の通りである。

Table III

cc of Samples (wine)	Concentration (mg)	Reaction (1)(2)(3)(4)
50	1/5,000 (10 mg)	(+) (+) (+) (+)
50	1/10,000 (5 mg)	(+) (+) (+) (+)
50	1/20,000 (2.5 mg)	(+) (+) (+) (±)

即ちブドウ酒中 1/10,000 のズルチンを含有する場合は、上記 4 反応は明らかに陽性であり、1/20,000 の場合は、反応 (1), (2), (3) は陽性を示し、反応 (4) は陽陰性であつた。

以上の試験によつて、これらの確定反応を用いるときは、ブドウ酒中ズルチンの含有量約 1/20,000 まで検出で

き得ることを証明した。その他共存する心配があると思われる、他の甘味物質（溶性サツカリン、メタニトロアニリン系甘味物質、エチレングリコール等）、防腐剤（サリチル酸、安息香酸、p-アミノ安息香酸エチル等）を含んだ試料について検討したところ、これらの反応を妨害する恐れはなかった。但しメタニトロアニリン系の甘味物質のみを含みズルチンを含まない試料の場合は、サリチルアルデヒドの縮合反応は黄色で赤色は呈しない、又他の3反応も陰性である。

む す び

以上の試験の結果、ブドウ酒中に含まれるズルチンの検出に対し、次の試験法案を提出する。

ブドウ酒中のズルチンの検出法

(1) 試 薬：

- | | |
|-------------------|------------|
| (i) 30% 水酸化ナトリウム液 | (v) 過酸化鉛 |
| (ii) サリチルアルデヒド | (vi) 液状石炭酸 |
| (iii) 塩 酸 | (vii) 硫 酸 |
| (iv) 硝酸第二水銀液 | |

サリチルアルデヒドは、蒸留して、無色～微黄色のものを用いる。

硝酸第二水銀液の製法は 食品衛生検査指針 III (1951) 354 頁記載の方法に従ってつくる。

(2) 検液の調製

試料 50 cc を蒸発皿にとり、水浴上で蒸発し、約 10 cc とし、ここに得た粘ちよう物質は、水を加えて、分液漏斗に洗い込み、蒸発皿は水洗し、洗液は分液漏斗中に合せ、ほとんど原容とする。後 30% 水酸化ナトリウム液 2～4 cc を加えてアルカリ性とし、毎回エーテル約 60 cc ずつと 4 回ふりまぜ、抽出する。各抽出液を合せ、毎回水約 30 cc で 2 回洗い、水浴上でエーテルを留去する。ここに得た残留物にエーテル約 10 cc を加えて溶かし、検液とする。

(3) 確定反応

検液を 4 分し次の反応を行う。

- (i) 甘味試験：検液の 1 部を小ビーカーにとり水浴上で蒸発し、残留物について甘味を検査する。
- (ii) サリチルアルデヒド縮合反応：検液の 1 部を試験管にとり水浴上でエーテルを蒸発し去り、残留物にサリチルアルデヒド及び塩酸各 1 滴を加えるとき、ズルチンが存在すれば美麗な赤色を呈する。
- (iii) Jorissen 反応：検液の 1 部を試験管にとり水浴上でエーテルを蒸発し去り、残留物に水約 5 cc を加えふりまぜ、以下“食品衛生検査指針 III (1951)” 355 頁 ③ Jorissen 法に従って行う。
- (iv) Morpurgo 法 (Berlinerblau 及び Thoms 法)：検液の 1 部を試験管にとり水浴でエーテルを蒸発し去り、残留物に液状石炭酸 2 滴及び硫酸 2 滴を加え、小火炎を用いて注意して沸騰させ、冷後水約 5 cc を加えて溶かし、これに 30% 水酸化ナトリウム液 3～5 滴を静かに滴加しながら層積すると、2～3 分間後に青色帯を生ずる。

なお本案は厚生省編纂衛生検査指針中食品衛生検査指針に採用される予定である。

文 献

- 1) 岡崎寛蔵, その他: 薬誌 71, 891 (昭 26)

Detection of Dulcin in Wines

By Iwao KAWASHIRO, Fumi FUKUZAWA and Mutsue SASAKI

The method of detection of dulcin in wines was studied. In general, we detected it according to the Method of Detection of Artificial Sweeteners in Foods in the hygienic examination text book (published by the welfare Ministry).

But in some points we modified the procedure and supplemented a new colour-reaction with salicylic aldehyde.

食品中のデハイドロ酢酸及び其の塩類の検出法(第一報)

川城 巖, 福沢 富美, 竹内 末久

Detection of Dehydroacetic Acid and its Salts in Foods (1)

By Iwao KAWASHIRO, Fumi FUKUZAWA and Hidenaga TAKEUCHI

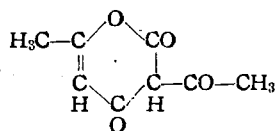
緒 言

デハイドロ酢酸(以下 DHA と略す)は化合物として既に古くから Beilstein, Schmidt その他の成書に記載されてあるが, 数年前よりアメリカで, H. C. Spencer, M. H. Seevers, L. A. Woods, F. E. Shideman 等により, その抗菌力, 防ばい力, 毒性等について詳細な実験が行われた¹⁾。その結果相当有効な, 又毒性も少い防腐, 防ばい剤となり得ることが認められた。

我国でも近時新たな合成法による本品の製造が企てられ, 同時にその抗菌試験, 防ばい試験が追試的に行われた。然し現在は未だその使用を許可されていないが, 世上広範囲に本品を食品に使用せんとする情勢が観取されるのでその検出法をきめる必要がある。今回は本品が特に液体食品中, しょう油, 酒類に屢々使用される傾向がある点より, とりあえず対象としてその 2 者を取り上げ, 以後順次他種食品に及ぶ予定である。

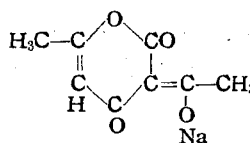
実験の部

DHA の性状: DHA は 4,6-Dioxo-2-methyl-5-acetyl-[1,4-pyran]-dihydride, $C_8H_6O_4$, 又その Na 塩は $C_8H_5O_4Na \cdot H_2O$ で, 下記の構造式を有する。



D. H. A.

Fig. 1



D. H. A-Na

針状又は板状結晶(熱湯より), 時に無晶形を呈する。m.p. 108.5~109°, 水蒸気蒸留で相当揮発し, 又昇華性がある。水にほとんど難溶, 熱湯に易溶, アルコールに溶け, 熱アルコールに易溶, エーテル, ベンゼン, クロロホルムに易溶, 石油エーテルにやや溶ける。DHA-Na は水に易溶, アルコール, エーテル, 石油エーテル, ベンゼン, クロロホルムに難溶である。

なお DHA 水溶液は微弱酸性を呈し, 120~130° で 1 時間安定である。

検出法に用いる基本的反応: しょう油, 酒類から適当な抽出法(後記)によつて得た DHA の確認反応としては, CH_3CO- の検出反応, $-CO-CH_2-CO-$ の検出反応を利用するのが得策と考え, これらを併用してその存在を確認することにした。

1. CH_3CO- の検出反応: これには Liebens のヨードホルム反応²⁾, ニトロプルンツドナトリウム, 又は 1,2-ナフトキノンスルホン酸ナトリウムによる呈色反応^{3) 4) 5)}, ピリジンの存在で次亜ブロム酸による反応⁶⁾, 芳香族アルデヒド化合物(ベンズアルデヒド, サリチルアルデヒド, ワニリン, パラジメチルアミノベンズアルデヒド等)による呈色反応^{1) 5) 7) 8)} その他があるが, 今回は後 2 者のうちいずれかをとることにした。

次にそれ等の場合の検出限度を DHA-Na 溶液を試料として比較した。(Table 1)。なおアルデヒド化合物による呈色反応は, その呈色度が反応液のアルカリ度により相当相異し, アルカリ性が高い程呈色が明かであることが肉眼的にも認められたので, 添加する水酸化ナトリウム溶液の濃度をできるだけ濃くした, しかし下記に用いた約 10N 溶液より高い濃度になると反応中に反応液が固化する心配があるので, これ以上高濃度のものを用いることを中止した。

(1) 次亜ブロム酸による呈色反応を用いた場合の試薬及び操作法

試薬: (i) 次亜ブロム酸液: 0.6N 水酸化ナトリウム溶液 25 cc に臭素 1g をかきまぜながら徐々に溶かす。

(ii) ピリジン

操作法: 検液 1 cc に試薬 (i) 1 cc, 試薬 (ii) 2 cc を加えて, 直火で加熱する。DHA が存在するときはその濃度の多少により赤色～橙色を呈する。

(2) アルデヒド化合物による呈色反応を用いた場合の試薬及び操作法

試薬: (i) 20% アルデヒド化合物アルコール液

ベンズアルデヒド, サリチルアルデヒドの場合は新たに蒸留精製したものを用いる。アルコールは 95%。

(ii) 10 N 水酸化ナトリウム液

操作法: 検液 1 cc に試薬 (i) 0.5 cc, 試薬 (ii) 1 cc を加え, 約 100° で 10 分間加熱する。DHA が存在するときはベンズアルデヒドの場合は黄色, ワニリン, サリチルアルデヒドの場合は赤色～橙色, パラジメチルアミノベンズアルデヒドの場合は橙黄色を呈する。

Table 1
Sensitivity of Colour Reactions by NaOBr and Aldehyde Derivatives.

Method	D. H. A. conc. (γ/cc)							
	2000	320	160	80	40	20	10	5
NaOBr+Pyridin	+	-	-	-	-	-	-	-
Benzaldehyde	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>o</i> -Nitrobenzaldehyde	-	-	-	-	-	-	-	-
Salicylaldehyde	+	+	+	+	+	+	+	+
Vanillin	+	+	+	+	+	+	±	-
<i>p</i> -Dimethylamino-benzaldehyde	+	+	+	±	-	-	-	-

以上の結果を総合し, 此の場合操作も比較的簡単で, しかも鋭敏度の高いサリチルアルデヒドを取り上げることにした。

(3) サリチルアルデヒドによる呈色反応の検討

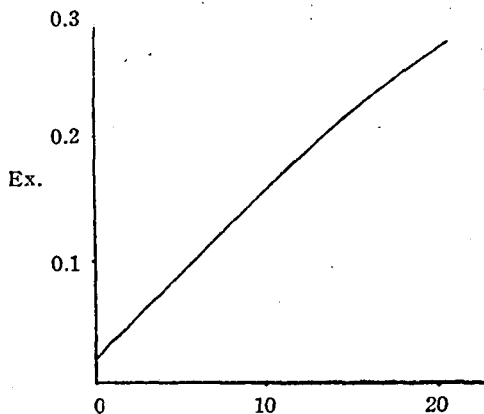
(i) 呈色の吸光度曲線: 精製 DHA-Na·H₂O の水溶液を作り 1. (2) の試薬, 操作法をそのまま用いて, 25 分間加熱反応後の液を室温に 30 分間放置し, 水で 25 cc にうすめ, 光電池比色計を用い, 吸光度を測定した。フイルタは緑色(東芝 GI) その結果は第 2 表及び第 2 図の通りである。

Table 2

Extinction of Various D.H.A.-Na Solutions
by Colour Reaction with Salicylaldehyde

DHA-Na·H ₂ O conc. (mg/100 cc)		DHA-Na·H ₂ O conc. (mg/100 cc)	
0	0.029	11	0.172
1	0.041	12	0.185
2	0.053	13	0.196
3	0.066	14	0.208
4	0.080	15	0.218
5	0.093	16	0.230
6	0.108	17	0.240
7	0.118	18	0.250
8	0.132	19	0.259
9	0.146	20	0.269
10	0.157		

Extinction of Various DHA-Na Solutions
by Colour Reaction with Salicylaldehyde

Fig. 2 DHA-Na·H₂O Conc. (mg/100 cc)

以上の結果から見ると, サルチルアルデハイド呈色反応は 20 mg/100 cc までの範囲ではほとんど定量的であることが知られる。

(ii) 加熱反応時間の検討

1. (2) 即ちアルデハイド呈色反応において, 使用するアルカル濃度は 10N が適当であることは既に述べたが, 加熱反応時間は果して何程が最大呈色を示すかを検討した。

試料として精製 DHA 8 mg/100 cc 水溶液を用い, 加熱反応時間を色々に変えて, 然る後室温に 30 分間放置後, 水で 10 cc にうすめ, 吸光度を測定した。その結果は第 3 表の如くである。

Table 3
Comparison of D.H.A. Colour Reaction by Various Times of Heating.

Time (min.)	Extinction			
	1st.	2nd.	3rd.	Mean
5	0.244	—	—	0.244
10	0.295	—	—	0.295
15	0.319	0.319	0.315	0.317
20	0.319	0.311	0.324	0.318
25	0.321	0.326	0.308	0.318
30	0.304	—	—	0.304

故に加熱時間は 20 分をとることとした。ここで以上を要約すれば, $\text{CH}_3\text{CO}-$ 検出には検液 1 cc に 20% サルチルアルデハイドアルコール溶液 0.5 cc, 10N 水酸化ナトリウム液 1 cc を加え, 約 100° で 20 分間加熱することになる。

2. $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CO}-$ の検出反応: これには難溶性金属塩 (主として銅塩) の生成反応⁽⁸⁾⁽⁹⁾, 及びフェニルヒドラジン等による反応⁽¹⁰⁾ 他がある。然し今回はとりあえず前者をとることとし, 後者についての検討は後日にした。前者による DHA の検出限度を見ると, 第 4 表の如くである。なお試薬, 操作法は次の通りである。

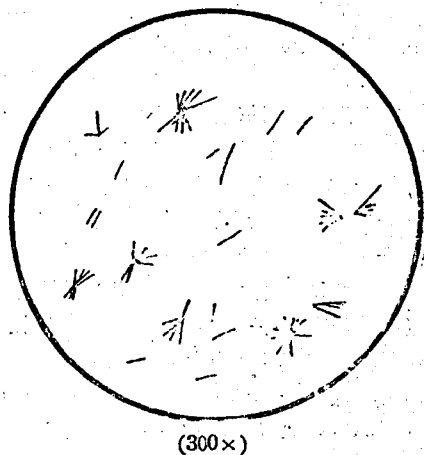
試薬: (i) 10% 酒石酸ナトリウムカリウム溶液⁽¹¹⁾ (水酸化銅の析出を防止するために用いる)

(ii) 強酢酸第二銅試液(日局 VI)

(iii) 10% 酢酸

Table 4
Sensitivity of Cu-salt Reaction

D.H.A. conc. mg/cc	Cu-salt Reaction	Remarks
0.50	+	precipitate immediately
0.40	+	do.
0.35	+	precipitate after few min.
0.30	+	do.
0.25	+	precipitate after 1 hr.
0.20	+	precipitate after 10 hrs. crystalline needles (microscopic test)
0.15	—	during 24 hrs. cannot observe any precipitate



(300×)

Fig. 3

Crystalline Needles of $(\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_2)_2\text{Cu}$.

操作法: 試料 1cc に試薬 (i) を 2 滴, 試薬 (ii) を 1 滴加えよく振り混ぜ, 試薬 (iii) を 1 滴加える。然しこの時酸性が強いと生成した銅塩が溶解するから, 中性から微弱酸性にとどめることが必要である。DHA が相当量存在すれば直ちに帯白紫色沈澱を生じ, 微量のときは暫く放置後 (30~60 分) 微細の沈澱を生ずる。此の 1 滴を鏡検 (300×) すれば明かに特異の針晶が認められる。($\text{Cu}(\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_4)_2$) (第 3 図)

即ち検出限度は 0.20~0.25 mg/cc である。

要するに検出法に用いる基本的反応としてはサリチルアルデハイド呈色反応と銅塩沈澱反応を採用することにした。しょう油及び清酒からサリチルアルデハイドによる DHA の検出法の検討

1. DHA 水溶液から DHA の抽出

(1) 直接抽出法: DHA 20 mg/100 cc 含有水溶液 20 cc をとり, 10% 磷酸各数 cc を加え, 毎回エーテル 40 cc で 3 回抽出し, エーテルを合して毎回 10 cc の水で 3 回水洗, エーテルを注意して留去し, 残留物を N/10 水酸化ナトリウム液に溶かして 50 cc とする。この 1 cc を用いて呈色反応を行い, 呈色液を 10 cc にうすめて吸光度を測り, それより DHA の回収率を見ると次の様である。(第 5 表)

Table 5
Recovery of D.H.A. by Various Volumes of 10% H_3PO_4

10% H_3PO_4 (cc)	0	0.5	1.0	2.5	4.5
Recovery (%)	80	90	95	99	99

これにより 10% 磷酸は 3cc でよいことになる。

(2) 水蒸気蒸留法: DHA 25 mg/100 cc 含有水溶液 20 cc をとり, これに 90% 磷酸各数 cc を加え, 水蒸気蒸留を行い, 留液 100 cc を取つて, この中 20 cc をもつて上記 (1) と同様の方法を行い (10% 磷酸は 3cc) その吸光度より回収率を計算すると次の如くである。(第 6 表)

Table 6
Recovery of D.H.A. by Various Volumes of 90% H_3PO_4

90% H_3PO_4 (cc)	0.5 (10% 5 cc)	2.0	3.0	5.0	7.0	10.0
Recovery (%)	trace	79	84	83	75	67

この方法は回収率良好とはいえない。

2. しょう油から DHA の抽出

(1) 醗造しょう油(国税庁醗造試験所製で DHA 不含のもの。しょう油 A とする。) 20 cc をとり, 一度これを中性にした後上記 (1) の場合と同様に操作し, 呈色反応を行つて見ると, DHA 3.8 mg/100 cc に相当する呈色度を示した。

(2) アミノ酸しょう油(某醗造所特製, DHA 不含, しょう油 B とする。)は DHA 12.0 mg/100 cc に相当する呈色度を示した。この実験により上記 1. (1) の抽出法は少くともしょう油については不適當であるので, 下記の如く抽出法を色々に変更してサリチルアルデハイド呈色反応の有無を検討した。試料はしょう油 A としょう油 B。

(3) エーテル抽出物を N/10 水酸化ナトリウム液に溶解, 10% 磷酸酸性でエーテル抽出。……呈色陽性。

(4) エーテル抽出物を石油エーテル 10 cc ずつで 4 回抽出し, 石油エーテル蒸発残留物について呈色反応を行ふ。……しょう油 A は陰性, しょう油 B は陽性 (DHA として 6.5 mg/100 cc の程度)。

(5) (4) の場合のエーテル抽出液を完全に酸性を呈しなくなるまで水洗。……しょう油 A 陰性, しょう油 B 陽性 (DHA として 1.4 mg/100 cc の程度)。

(6) 抽出溶媒をエーテル・石油エーテル等容混液にかえ, (4) の通り行つた。……しょう油 A 陰性, しょう油 B 陽性 (DHA として 1.0 mg/100 cc の程度)。

(7) 水蒸気蒸留法により, エーテル・石油エーテル混液使用。……しょう油 A 陰性, しょう油 B 陽性 (DHA として 1.0 mg/100 cc の程度)。

(8) しょう油 B につき pH 8~8.5 にしてからエーテル抽出を行い, その残留水性液を酸性にしてエーテル・石油エーテル混液抽出を行ったが呈色陽性 (DHA として 1.0 mg/100 cc の程度).

(9) しょう油 B につきエーテル抽出物を 0.1 mm Hg, 80° で昇華させて見たが呈色陽性. (DHA として 1.5 mg/100 cc の程度).

なおこの類似呈色物質は水に溶け, 酸性が相当強く, 呈色反応の際の加熱時間に比例して色調は濃くなる. 又ニヒドリソ反応陰性, ニトロプルシッドナトリウムで橙色となる.

(10) 10% 酢酸を 10% 酢酸に変更し試料の抽出時の pH をなるべく弱酸性にする様にし, 抽出溶媒をエーテル・石油エーテル等容混液とする. その為には DHA の回収率からみた 10% 酢酸の適当な使用量を概測する必要がある. 基本実験とし DHA 20 mg/100 cc 含有弱アルカリ性水溶液 60 cc をとり, 10% 酢酸でリトマス中性に戻し, 更に 10% 酢酸の種々の cc を加えて, 毎回エーテル・石油エーテル混液 80 cc で 4 回ふりまぜ抽出する. 各抽出液を合して, 毎回 30 cc の水で 2 回洗い, この抽出液を注意して蒸留し, その残留物を N/10 水酸化ナトリウム液に溶かして 100 cc とした. その 1 cc を用いて反応呈色させ回収率を計算すると第 7 表の如くなる.

Table 7
Recovery of D.H.A. by Various Volumes of 10% CH₃COOH

10% CH ₃ COOH (cc)	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0
Recovery (%)	91	92	93	92	93

要するにこの場合は 10% 酢酸は 2 cc でよいことになる.

次にしょう油 B 60 cc をとり 10% 水酸化ナトリウム溶液でリトマスアルカリ性とし, 再び 10% 酢酸でリトマス中性に戻し, 更に 10% 酢酸 2 cc を加える. 以下上記の如くエーテル・石油エーテル混液 80 cc 4 回抽出, 水 30 cc で 2 回水洗を行つて, 次に蒸発残留物 (殆ど肉眼的に見得るものがない) を N/10 水酸化ナトリウム液 4 cc に溶解, その 1 cc をとつて呈色反応を試みると殆ど反応は認められなかつた.

(11) 特に添加された共存物質の影響: しばしば使用される防腐剤数種をあげ, 次の如き量で各 1 種ずつ及び 2 種組合せの形でしょう油 B に添加し, その影響を検討した.

サリチル酸 0.25 g/kg, ロダン酢酸エチル 0.03 g/kg, 安息香酸 0.6 g/kg, パラオキシ安息香酸エチル 0.25 g/kg, 昇汞 0.1 g/kg.

その結果はいずれの場合も呈色反応陰性で影響を認められなかつた. なお念のため上記の各防腐剤を添加した試料に 20 mg/100 cc の割合で DHA を加えて抽出を行つて見たところ, 呈色反応は完全に陽性であつた.

要するに 2. の一応の結論としては: 試料 60 cc を水酸化ナトリウム溶液でアルカリ性とし, 之を 10% 酢酸で中和した後更に 2 cc を追加, エーテル・石油エーテル等容混液 80 cc で 4 回抽出, 残留物を N/10 水酸化ナトリウム液 4 cc に溶解して検液とする. 尙之は検液調製法にもなる.

3. 酒類 (清酒, 合成酒) から DHA の抽出: 国税庁醸造試験所から分譲された防腐剤不含の清酒 (以下清酒 A とする) 及び合成清酒 (以下清酒 B とする) を試料として 2. で求められた方法により抽出を行い, 呈色反応を検するといずれも陰性である. 又 2. の場合の通り防腐剤添加による影響も検討したが, これも障害は認められなかつた.

次に清酒 A, 清酒 B に DHA を 20 mg/100 cc の割合に添加して試験を行つて見たが, 呈色反応はいずれも顕著に陽性であつた.

4. 鋭敏度: しょう油 A, B, 清酒 A, B, 及び両者の市販品 C, D, E を試料として DHA の検出限度を検討した. その結果は第 8 表の通りである.

従つて 2. の方法では試料中 1 mg/100 cc までは検出できる. なおこの鋭敏度は上記の防腐剤によつても影響されないことを確めた.

銅塩沈澱反応

1. しょう油 A, B, 酒 A, B についての實驗: 前項 2. で得られた検液調製法に従つて製した検液より, その 3 cc をとりこれを前々項 2. の操作法に従い試験を行うと, いずれも本反応は陰性であつた.

Table 8
Results of D.H.A. Detection Test by Salicylaldehyde from Sake and Soy Sauce

DHA conc. (mg/100 cc)	Sake					Soy Sauce				
	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E
20	Red	"	"	"	"	"	"	"	"	"
10	Red	"	"	"	"	"	"	"	"	"
5	Orange red	"	"	"	"	"	"	"	"	"
2	Orange red	"	"	"	"	"	"	"	"	"
1.0	Orange red	"	"	"	"	"	"	"	"	"
0.5	Slightly orange yellow	"	"	"	"	"	"	"	"	"
0	Slightly yellow	"	"	"	"	"	"	"	"	"

2. 特に添加された共存物質の影響：他種防腐剤による影響を検討したのであるが、前項 2. (11) と全く同様にして試料を作り試験を行つたところ、それ等の影響は全く認められなかつた。即ち本反応陰性である。次に同じ試料に DHA を 20 mg/100 cc の割合で更に添加して試験を行つたが、この時は明かに特異の針晶を検出した。

3. 鋭敏度：上記 1 に用いた試料に DHA を試料 100 cc につき 15, 10, 7, 4, 2 mg ずつ添加して、抽出、検液調製を行い、その 3 cc をとつて反応の結果をみると、DHA の量の多いものは間もなく帯白青紫色の沈澱を生じ、少いものは暫くの後 (30 分～60 分) 微細な沈澱が浮遊し始めて、後沈着する。この 1 滴を鏡檢 (300 倍) すれば明かに特異の針晶を見出す。但しこの操作法によれば DHA 2 mg/100 cc の検出は困難であつて、まず 4 mg/100 cc が限度である。

なお念のため 2 の他種防腐剤添加の試料を用いて鋭敏度を検討したが上記と異なるところがなかつた。

結 論

以上実験結果を綜合して、しょう油、酒類中の D.H.A. 及びその塩類検出法は次の如く提案したい。

1. 検液の調製 試料 (酒類、しょう油) 60 cc をとり 10% 水酸化ナトリウム溶液を加え、リトマス紙に対して明かにアルカリ性とし、次に 10% 酢酸で中和し、更に 10% 酢酸 2 cc を加えて酸性とした後毎回エーテル・石油エーテル等容混液約 80 cc ずつで 4 回ふりまぜ抽出する。各抽出液を合せ、毎回水約 30 cc で 2 回洗い、水浴上で注意して蒸留し、最後に空気を送つて溶媒を完全に除く。(この際残留物が着色しているときは、石油エーテル約 10 cc を加え、ガラス棒でよくねりまぜた後、石油エーテルを不溶性の着色物質から分離し、この操作を 4 回繰り返す、石油エーテル液を合せ、石油エーテルで湿した小濾紙を用いて濾過し、濾紙は石油エーテルで洗い、全石油エーテルを合せ、水浴上で注意して完全に蒸留し去る。) こゝに得た残留物に N/10 水酸化ナトリウム液 4 cc を加え、微温を与えて溶かし冷却した後、水で湿した小濾紙を用いて試験管中に濾入し、検液とする。

2. 確定反応 (1) 呈色反応：検液 1 cc を試験管にとり、これにサリチルアルデハイド溶液 (後記) 0.5 cc 及び水酸化ナトリウム溶液 (後記) 1 cc を加え、コルク栓をゆるく施して水浴中で 98～100°, 20 分間加熱する。D.H.A. を含有するときには液は赤色～橙赤色を呈する。(2) 沈澱反応：検液の残部 (約 3 cc) を試験管にとり、10% 酒石酸ナトリウムカリウム溶液 5 滴、強酢酸液第二銅試液 3 滴を加え、よくふりまぜた後 10% 酢酸を注意して滴加し、中性又は微弱酸性とする。D.H.A. を含有するときには、その多少により液は直ちに帯白紫色の沈澱を生ずるか、又はしばらくの後、微細な沈澱を生じ白濁を生ずる。この液 1 滴をとり鏡檢 (300 倍) すると、明かに針状結晶を認め得る。

サリチルアルデハイド液: 新たに蒸留して製した殆ど無色のサリチルアルデハイド 20 g を 95% アルコールに溶かして 100 cc とする。

水酸化ナトリウム液: 水酸化ナトリウム 40 g を水に溶かして 100 cc とする。

【備考】なお本法によると、呈色反応においては試料中 1 mg / 100 cc, 又沈澱反応においては 4 mg / 100 cc の D. H.A. を検出できる。

本研究費の一部は厚生科学研究費によつた。又試料は国税庁醸造試験所長山田博士の御好意によつたところが頗る多い。謹んで謝意を表する。

なお本案は厚生省編纂衛生検査指針に採用され、又昭和 27 年 4 月、日本薬剤師協会学術大会衛生化学技術者会議の席上発表する予定である。

引用文献

- 1) Spencer, H.C., Seevers M.H., Woods, L.A., Shideman, F.E., et al.: J. Pharmacol. Exptl. Therap. 99, 57 (1950).
- 2) Meyer, H.: Analyse und Konstitutionsermittlung der Organischen Verbindungen. 6 版. (1938).
- 3) v. Bitts, B.: Liebigs Ann. Chem. 267, 372 (1892).
- 4) Feigl, F.: Qualitative Analyse mit Tüpfelreaktionen. 13 版 (1938).
- 5) 石鐘守三: 微量定性分析, 鳥海書房 (昭 24).
- 6) 安達次郎: 日化 71, 566 (昭 25).
- 7) Feigl, F.: Mikrochemie 17, 169 (1935).
- 8) 百瀬 勉: 有機定性分析, 広川書店 (昭 25).
- 9) Claisen, Ehrhardt: Ber. 22, 1015 (1889).
- 10) Meyer, H.: Analyse und Konstitutionsermittlung der Organischen Verbindungen, 6 版, 577 (1938).
- 11) 高木誠司: 定量分析の計算. I. 共立出版. (昭 24).

Detection of Dehydropacetic Acid (D.H.A.) and its Salts in Soy Sauce and Sake

By Iwao KAWASHIRO, Fumi FUKUZAWA and Hidenaga TAKEUCHI

The method of detection of D.H.A. in soy sauce and saké was studied. D.H.A. is extracted by the ether-petroleum ether mixture (1:1) from the sample, which has been slightly acidified with 10% acetic acid. The ethereal extract is repeatedly washed by water to remove the acid. Then the residue, which is obtained by carefully evaporating the solvent, is dissolved in 4 cc of N/10 sodium hydroxide solution. The solution is divided in two parts, 1 cc (I) and 3 cc (II).

On the part I, the salicylic aldehyde test (reddish-orange red in the presence of D.H.A.) and on the part II, the copper salt precipitation test (fine needles under the microscope in the presence of D.H.A.) were carried out.

食 品 の 異 物 検 査 (第 1 報)

野崎 泰彦, 川田 公平, 浦久保 五郎, 渡辺 秀子, 小菅 美代子

Tests on the Extraneous Materials in Food and Food Products. I.

By Yasuhiko NOZAKI, Kôhei KAWADA, Gorô URAKUBO,
Hideko WATANABE and Miyoko KOSUGA

異物検査は 1940 年頃から米国において一般に行なわれるようになった食品検査の新しい分野であつて、従来の物理学的、化学的検査では直接とり上げられなかつた異物を問題とするようになったことは衛生上一つの大きな進歩である。

米国では“Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists” (以下 A.O.A.C. と略称する.) に“Extraneous Material”の項目を設けて試験法を掲げてある。

我国でも最近ようやくこの問題がとり上げられ、当試験所生化学試験部でこの検査を行なうようになったが、従来我国では全く組織的に行なわれなかつた方法であるから基礎的資料がない。さし当り A.O.A.C. 等に従つて検査を行なうほかないが、我国独特の食品についてはの成書を参考にしてそれぞれ適当な方法を考案しなければならぬ。著者等は昭和 26 年夏食品の一斉検査の一環として異物検査を行なつたのでその際得られた知見を報告する。

検査の対象となつた食品は米(内地米及び外国産米)、小麦粉、みそ、及び砂糖であつて、この中米は A.O.A.C. 中トウモロコシの検査法を一部変更して応用し、小麦粉及び砂糖は大体 A.O.A.C. 法に従つて検査した。ただ、みそは我国固有のものであるので二三基礎実験を行つて、後述の如く塩酸と煮た後ガソリン捕集法を適用して好結果を得た。

米

操作 1. 重い異物(土砂、齧歯類の糞)の分離

検体 50 g を 100 cc のビーカーに入れ、クロロホルム約 60 cc を加えてよくかきまぜ、静置すると土砂、糞等は沈み、米粒等は浮き上る。上層をブフネル漏斗においた迅速濾紙(東洋濾紙 No. 5A)の上に傾斜し、吸引濾過する。ビーカー中の残留物にクロロホルム約 10 cc を加えてかきまぜ、浮き上るものがなくなるまでこの操作をくり返し(通例 1 回でよい)、上層は前の濾紙で吸引濾過する。ビーカー中の残留物を検査する。

2. 軽い異物(昆虫及びその破片、齧歯類の毛)の分離

1. に於けるブフネル漏斗上の残留物は十分空気を吸引してクロロホルムを完全に除き、100 cc のビーカーに 60% アルコールを使つて移し、更に 60% アルコールを米が十分浸る程度に加える。5 分間放置後ワイルドマンフラスコ(ワイルドマンフラスコに使うゴム栓はガソリンその他の油にふれるのでふつうのゴム製のものは油を吸つて軟化する。われわれは耐油性合成ゴム製のものを採用し、又柄はゴム栓の中に埋設成型したナットにねじ込み、異物の入り込む隙間をつくらないようにした。)に移し、水 200 cc を加え、ガソリン 20 cc を用いて捕集し、異物を濾紙上に集めて鏡検する。

検査結果 以上の操作を内地米 134 検体、外地米 71 検体に対して行なつた結果は次の通りである。

検出された異物はダニ、昆虫(成虫、幼虫、蛹)及びその破片、ネズミの毛、土砂、植物性異物(わらごみ、種皮、繊維その他)であつて、この中で種類の確認できたものは次の 3 種である。

ダニ: (i) ケナガコナダニ *Thyrophagus dimidiatus* (コナダニ科): これは穀類にふつう発見されるもので、数の上からは特に多い。(ii) イエダニ *Liponyssus nagayoi* Yamada (イエダニ科): このものの存在は直接間接にネズミが関係していたことを示すものである。(iii) Parasites: 種の同定まではできなかったが、このものは他のダニが多数繁殖するとき、これを食べつて生存繁殖する類である。

昆虫: (i) ノコギリコクヌスト。(ii) カクムネコクヌスト。(iii) コクゾウ。(iv) チャタテムシ。(v) コナチャタテムシ。(vi) 果実蠅 *Drosophylla*

これらの中ではコクヌスト及びコクゾウが多数みられた。(i)~(v)は穀類にふつうにみられるものである。

異物の種類別頻度を表にすると次の通りであつて、内地米も外地米も昆虫及びダニの発見率は非常に高い。しかしこれらは米をかしく時かなりの部分が洗い流される可能性がある。米粒と共に残留する土砂は外地米に多数見出される。

第1表 内地米(総検体数 134)

異 物	検出検体数	検出率 %*
昆 虫	81	61.8
ダ ニ	76	58.1
毛	11	8.5
糞	0	0
土 砂	8	6.1

第2表 外地米(総検体数 71)

異 物	検出検体数	検出率 %
昆 虫	69	97.0
ダ ニ	68	95.8
毛	9	12.7
糞	5	7.0
土 砂	37	52.0

* (異物を検出した検体数 / 全検体数) × 100 以下同じ。

検出された昆虫及びダニの数を区分して表示すると次のようになる。

昆虫： 第3表 内地米

昆 虫 数	頻 度	
	検 体 数	%
0 ~ 9	118	90.1
10 ~ 19	10	7.6
20 ~ 29	2	1.5
30 ~ 39	0	0
40 <	1	0.8

第4表 外地米

昆 虫 数	頻 度	
	検 体 数	%
0 ~ 9	30	42.2
10 ~ 29	21	29.6
30 ~ 49	6	8.5
50 ~ 69	4	5.6
70 ~ 89	4	5.6
90 <	6	8.5

ダニ：

第5表 内地米(総検体数 134)

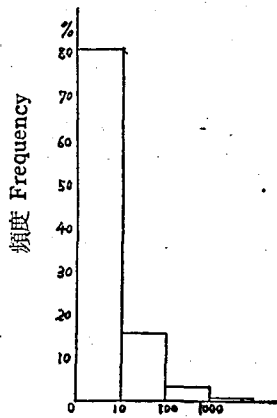
ダ ニ 数	頻 度	
	検 体 数	%
0 ~ 9	106	80.9
10 ~ 99	20	15.3
100 ~ 999	4	3.1
1,000 <	1	0.8

第6表 外地米(総検体数 71)

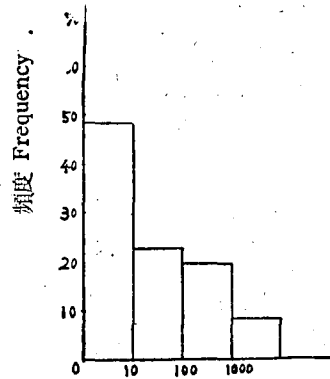
ダ ニ 数	頻 度	
	検 体 数	%
0 ~ 9	106	48.5
10 ~ 99	16	22.7
100 ~ 999	14	19.7
1,000 <	6	8.5

内地米ではどの異物も検出しなかつたものは全体の 17% を占めているが、外地米は全く異物の存在しないものはなかつた。

前表の結果を図示すると次のようになる。



ダニ数 Nos. of Mites
Fig. 1



ダニ数 Nos. of Mites
Fig. 2

以上の結果によると内地米, 外地米共に昆虫, ダニによる汚染は高率を示し, 外地米はすべての異物について汚染度が高い。

又これらの異物が数多く検出される検体は概してヌカが多く, 湿気を帯びている。事実穀類の含水量が或程度をこえる時はダニによる被害の大きいことは古くから知られている。従つて虫害, 汚染を防ぐためには精米, 貯蔵に注意しなければならない。

小麦粉

操作 検体 50 g を 100 又は 70 メッシュの篩で十分ふるい, 篩に残つた異物をビーカーに移し, アルコール 2~3 cc 及び 5% 塩酸 30 cc を加えて十分間加熱し, 迅速濾紙を用いて吸引濾過し, N/10 ヨウ素液で染め, 1% 硫酸で脱色して鏡検する。

なお検体を大きな時計皿にひろげ紫外線燈で照射すると昆虫のいる検体では糞が螢光を発する。又検体の容器に接した部分に昆虫による坑道がみられる。

検査結果 検出された異物はダニ, 昆虫成虫, 幼虫, 蛹及びその破片, 齧歯類の毛, 植物性異物等で, 異物の種類別頻度を表にすると次の通りである。

第 7 表 小麦粉 (総検体数 137)

異 物	検出検体数	検出率 %
昆 虫	98	72
ダ ニ	22	16
糞	—	—

ダニによる汚染は比較的少く, 又検出されたダニの数も大抵 1 検体について 1~3 匹程度である。しかし昆虫による汚染はかなり大きく, 之はコクゾウ, コクヌストが主なもので, 中でも之らの幼虫が 50 匹位検出された例が二三ある。之ら汚染された小麦粉は湿気を帯びたものに多い事は米の場合と同様である。

なお納醗黒麹病菌により汚染され, 黒色を帯び且つアミン——この菌がトリメチルアミンを生成することが知られている——臭の著しい検体が 1 件あつた。

砂糖

操作 検体 50 g をビーカーに入れ, 温湯約 100 cc を加え, 全く溶けるまでおだやかに加熱する。溶解後予め水

蒸気で加温したブフネル漏斗上に、径 7 cm の迅速濾紙に鉛筆で約 7 mm 間隔に平行線を引いたものをおいて吸引濾過し、異物を濾紙上に集め、水洗し、よく吸引した後、グリセリン・アルコール (1:1) 2 cc を入れた浅いペトリ皿に濾紙を移して鏡検する。

以上の操作を 132 検体について行なつたところ次の結果を得た。

検査結果 検出された異物にはダニ、昆虫、植物性繊維、土砂、齧歯類の毛等があるがダニ以外の異物は非常に少く、異物として問題となるのはダニのみである。発見されたダニはコナダニ科のサトウダニ *Carpoglyphus lactis* である。

ダニを全く検出しなかつたもの 64 検体 (48.5%)、検出したもの 63 検体 (50.8%) で約半数にダニが存在した。検出されたダニの数により区分すると次のようになる。

第 8 表

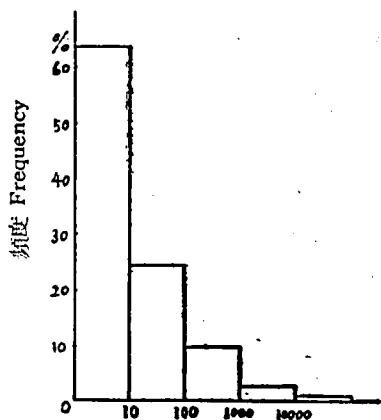
ダニ数	頻度	
	検体数	%
0 ~ 9	84	63.6
10 ~ 99	32	24.2
100 ~ 999	12	9.1
1,000 ~ 9999	3	2.3
10,000 <	1	0.8

又ダニの検出されなかつたものを別にすると第 9 表が得られる。

第 9 表

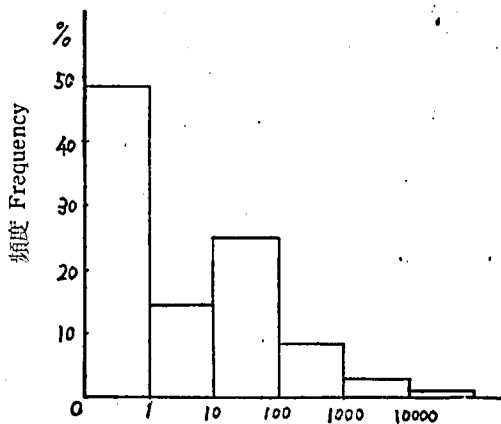
ダニ数	頻度	
	検体数	%
0	64	48.5
1~10	19	14.4
11~100	33	25.0
101~1,000	11	8.3
1,000~10,000	4	3.0
10,000 <	1	0.8

以上の結果を図に示すと次のようになる。



ダニ数 Nos. of Mites

Fig. 3



ダニ数 Nos. of Mites

Fig. 4

図に見られるようにダニの数と頻度との関係が比較的なだらかな分布曲線を示す事は、ダニが他の異物と異り全形を保っている事、形や大きさ等が一樣であることなどから当然期待されることである。そこでダニの数と他の化学的検査結果との間に何らかの関連がみられはしないかとの考えから水分、粗蛋白、酸度との関係を図にあらわしてみると次のようになる。

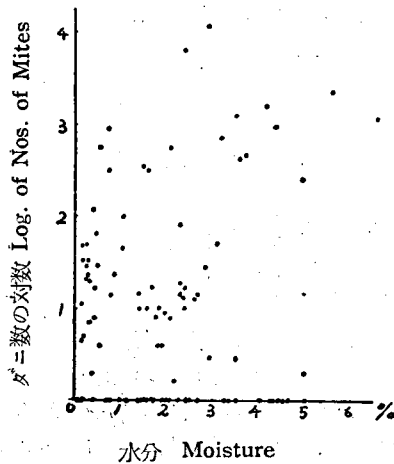


Fig. 5

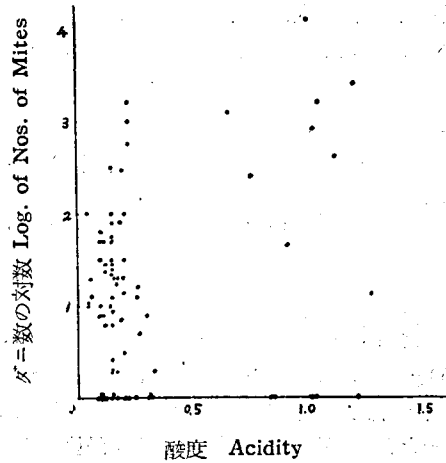


Fig. 6

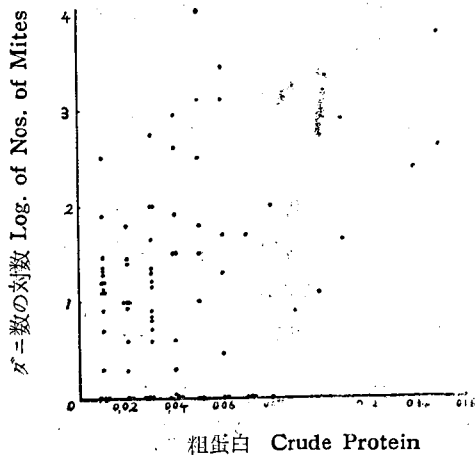


Fig. 7

これによるとあまりはつきりした関係はみられないが次のような事はいえる。ダニの非常に多いのは例外なく水分、蛋白、酸度の値の高い、精製度の低いものであるが、精製度の低いものに必ずしもダニが多いとはいえない。むしろある程度以上水分その他が存在すればダニが生存し得ることがみとめられる。これはダニによる汚染の機会が一樣でないことを意味するもので、砂糖の清潔度は第一に製造、運搬、貯蔵の場所の清潔度によつてきまることが推定できる。しかし一面精製度の非常に高い、米国 C & H 製砂糖にはダニが全く認められなかつた例をみれば高度に精製された砂糖を供給することも汚染を防ぐ上に有効であるといえる。

み そ

操作 みそをそのまま水でうすめてガソリン捕集を行なつたところ回収率は非常に悪く、猫の毛 10 本を加えた試料についてわずかに約半数が発見できたにすぎない。

次にみそ約 50 g に猫の毛 5 本、ねずみの糞 2 個を加えて混ぜ合せ、水 200 cc でうすめ、水酸化カリウムで pH 8.0 とし、パンクレアチン溶液 10 cc を加え、36° で 1 時間消化してガソリン捕集を行なつた。この時は毛 10 本、糞 4 個を発見した。

この結果捕集を行なう前に予め消化する必要があることがみとめられたので更に塩酸で消化を行なつた。

まず異物、殊に糞が塩酸と煮る事のために変形するかどうかを知る目的でねずみの糞 10 個を、水 300 cc に濃塩酸 12 cc を加えた液 (約 1.2%) の中で煮沸し、時間の経過に伴う崩壊度をみた。

第 10 表

時 間 (分)	5	10	15	20	25	30
原形を止めたものの数	10	10	9	9	9	9
崩壊したものの数	0	0	1	1	1	1

これによつて 5~10 分の煮沸にたえる事がわかつた、そこで次のような操作によつて検出を行なう事にした。

検体 50 g を 500 cc のビーカに入れ、水 300 cc を加えて均一に分散させ、塩酸 12 cc を加えて加熱し、沸騰後尚 5 分間おだやかに煮沸をつづけ、後常温に冷却し、1 l のワイルドマンフラスコに移し、ガソリン 20 cc を加えてよくかきまぜ常法に従つて捕集、濾過、鏡検する。ワイルドマンフラスコ中の液は水酸化ナトリウムで中和し、しばらく静置し、まず上澄を傾瀉して 20 メラシユの篩に注ぎ、更に残部を全部篩に注いで濾し、よく水洗して後検査する。

この方法の適否を検討するためみそ 50 g に猫の毛及びモルモットの糞を加えてよく混ぜた試料について行つたところ次のような結果を得た。

第 11 表

試料番号	毛	糞
1	9/10	2/2
2	8/10	2/2
3	10/10	3/3
4*	6/7	—

+表中の数字は(検出した数/加えた数)を表す。

* 試料 20 g に猫の毛をまぜ 9ヶ月間貯蔵したもの。

この方法はパンクレアチン消化法に比べてやや検出率が劣るが高価なパンクレアチンを使わず、且つ短時間に行える利点を有するのでこれを採用して 135 検体を検査したところ次のような結果を得た。

検査結果 検出された異物は、ダニ、昆虫 (成虫、幼虫、蛹) 及びその破片、動物の毛、土砂、糞、及び植物性繊維であつて、この中ダニはサトウダニ *Carpoglyphus lactis* 及び種名の明かでないコナダニである。昆虫の中同定できたものはコクゾウ、コクヌストモドキの幼虫、寄生蠅の一種である。

更に異物別の出現頻度を表示すると第 12 表のようになる。

第 12 表 み そ (総検体数 135)

異 物	検出検体数	検 出 率 %
昆 虫	132	97.7
(内 幼 虫)	(57)	(42.2)
ダ ニ	74	54.8
動物の毛(主にネズミ)	60	44.4
ネズミの糞	8	5.9
わらごみ	68	50.5
土 砂	46	34.1

この中ダニ及び昆虫の数と頻度との関係を表示すると次のようになる。

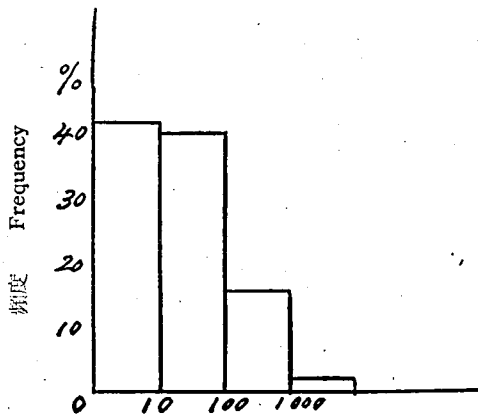
第 13 表

ダニ数	頻 度	
	検 体 数	%
0 ~ 9	57	41.4
10 ~ 99	54	40.0
100 ~ 999	21	15.6
1,000 <	3	2.2

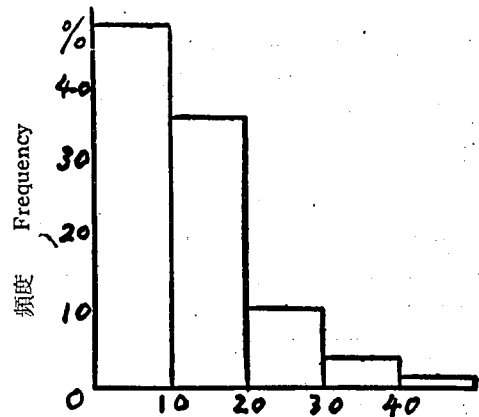
第 14 表

昆虫数	頻 度	
	検 体 数	%
0 ~ 9	64	47.4
10 ~ 19	49	36.3
20 ~ 29	15	11.1
30 ~ 39	5	3.7
40 <	2	1.5

上の表を図に示すと次のようになる。



ダニ数 Nos. of Mites
Fig. 8



昆虫数 Nos. of Insects
Fig. 9

又異物の数の区分法を変えて 0, 1~10 等とした場合は次の通りである。

第 15 表

ダニの数	頻 度	
	検 体 数	%
0	18	13.3
1 ~ 10	40	29.6
11 ~ 100	54	40.0
101 ~ 1,000	20	14.8
1,000 <	3	2.2

第 16 表

昆虫の数	頻 度	
	検 体 数	%
0	5	3.7
1 ~ 10	69	51.1
11 ~ 100	61	45.2
101 ~ 1,000	0	0

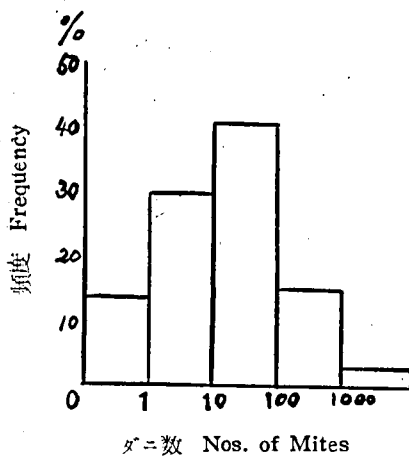


Fig. 10

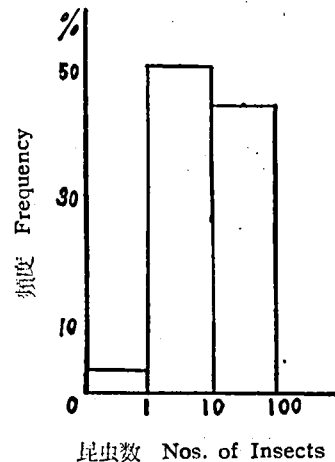


Fig. 11

結果の考察 以上の結果をみると昆虫による汚染は 97.7% の高率で、昆虫による汚染を受けていないものも、土砂、毛等を含み、みそに関する限り異物を含まないものはない。みそが現在のような製造、貯蔵法による限りこの状態は改善されようとは思われない。

又上の表及び図からみられるようにダニのような比較的多数存在し、且つ一様な異物については割合規則正しい分布状態がみられ、或程度統計的な取扱いが可能であろうと思われる。

この検査の実施に当り御援助を賜つた厚生省食品衛課尾崎課長、同課浜田技官其他の諸氏、御指導を仰いだ当所生化学試験部長川城巖氏に感謝する。又ダニの同定については資源科学研究所浅沼靖博士に、昆虫の同定については食糧検査所原田豊秋氏に、網醒黒穂病菌については当所薬用植物部長平山重勝博士から懇篤な御教示を頂いた。三氏に対して深甚な謝意を表する。

Tests on the Extraneous Materials in Food and Food Products. I.

By Yasuhiko NOZAKI, Kôhei KAWADA, Gorô URAKUBO,
Hideko WATANABE, and Miyoko KOSUGA

Tests on the extraneous materials in rice (domestic and imported), sugar, wheat flour, and Miso were made.

The isolation of filths was carried out according to the modified A.O.A.C.-methods, except in Miso, which was digested with hydrochloric acid and examined after gasoline-trapping and sieving.

We found mites, especially in sugar and Miso, insects, rodent excreta and hairs, sand and soil, and plant tissues.

数種の N アルキルピリジニウムヒドロキシドの合成と

そのマウスに対する作用に就て

板井孝信, 井下田 浩, 桑原章吾, 柳町徳三

The Syntheses of Several N-Alkyl Pyridinium Hydroxide

and Their Actions against Mice

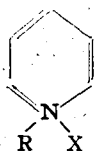
By Takanobu ITAI, Hiroshi IGETA, Syogo KUWAHARA and Tokuzo YANAGIMACHI

昭和 17, 18 年及び昭和 24, 25 年に浜名湖畔の新居, 舞坂町に起つたアサリ, カキによる中毒事件は前者では当所に於て松尾, 秋葉, 服部及び八田により, 後者では秋葉教授を委員長とする貝類中毒委員会 (厚生省) で種々な研究がされている. この委員会における著者等の研究の 1 部は先に報告した.¹ 一方昭和 17, 18 年の中毒事件のとき, 京大の鈴木はアサリエキス中の含窒素成分を追及し, 蛋白質, アミノ酸の外に特異な成分として N-Methyl pyridinium hydroxide の存在を認め, このものが何か浜名湖産アサリの毒成分に関係あるらしい事を述べている. このものは又緒方, 菰田により貝類の一種ハスノハカンパンのエキス中にも認められ, 多少アサリ毒に似た毒性を有することが記載されている.

かくの如くピリジン核を持った化合物が貝の成分として存在し, 且ある種の生理作用を有することに興味を感じ数種の Alkyl 同族体を合成し, アサリ毒と比較しながらマウスに対する作用をしらべて見た.

合成方法 常法に従いピリジンとハロゲンアルキルを封管中 130~140° に 3 時間加熱すると固化する. 然し非常に吸湿性であるので一部を白金塩として N-Alkyl pyridinium halogenide を証明し, 残部は直ちに水に溶解してエーテルで未反応物を抽出し去つてから新たに作つた湿つた酸化銀と振りまぜて水酸化物とする. 塩化銀を濾去した水溶液を酸で滴定してその濃度を知り適当にうすめて検液とした.

合成した物質とその白金塩及びマウスに対する致死量は次のようである.



R	X	Platinum salt	MLD
Methyl	J	m.p. 211~12° (Picrate)	3.6 mg
Ethyl	Br	204~5°	2.8
n-Buthyl	"		0.8
*Octyl	"	230°	0.3
*Lauryl	"	209~10°	0.4
Cetyl	"		0.6
*Allyl	"	169°	4.9
Pyridinium-betaine			non-poisonus
Pyridinium-betaine hydrochloride			
			2.0

* new compounds.

マウスに対する実験法 実験にはすべて体重 15~18 g の健康白マウスを用い、はじめ1週から10日程度飼育して食餌に馴らしてから試剤投与を行った。

試剤の投与はすべて腹腔内注射によつた。すなわち試剤の必要量が蒸留水 0.2 cc に含まれるような溶液をつくり、1群3匹ずつのマウスに腹腔内投与し、1週間にわたつて観察を行った。死亡したマウスはできるだけ速やかに剖見を行い、内臓はツェンケル-フォールモール固定、ヘマトキシリン-エオジン染色標本をつくり、池田技官に病理検査を依頼した。

致死量及び内臓剖見所見 致死量は前表の通りで、10 mg を投与して異常のなかつた Pyridinium-betaine を除けば R=Octyl の場合が 0.3 mg で最も強く、R=Allyl が 4.9 mg で最もよい。全般にアサリ毒と比べて異なる点はアサリ毒の場合に致死量すれすれに投与したマウスは大体死亡するまでに 3~4 日を要するが、今回の実験では2日以上にわたつたものはほとんどなく、大多数が 24~36 時間以内に死亡した点である。

例外として不飽和アルキルである Allyl の入つたものは注射後直ちに痙れんを起して死ぬことである。

Allyl 以外の同族体も製造後時日のたつたものは毒性が変り注射すれば直ちに死亡するようになる。これは Pyridinium hydroxyde が不安定で時日の経過と共に水酸基の転位その他の変化をすることと考え合せば当然ともいえるが如何なるものに変化するかは現在究めていない。

死亡したマウスの多くは肝臓の充血が著明であつたが、アサリ毒に特有な肝の黄変、班紋の出現、腸管、胃及び肺の出血などの像が認められなかつた。

マウス肝臓の病理組織学的所見 R=methyl, ethyl, n-butyl の3群について行われた。いずれも血管は拡張しウツ血が認められる。肝細胞は明るく大きくて所々に空泡が認められる。R=ethyl の場合には肝細胞中に巨大核 (12~15 μ) が認められた。R=butyl の場合は変化が軽微であつた。

結 論 N-Alkyl pyridinium hydroxyde がアサリ毒か若しくはそれに関係したものではないかと考え、数種の Alkyl 同族体を合成して動物試験をして見たが、臓器に親和性のない毒で、アサリ毒とは違うものである。

以上の研究に病理組織学的標本を作成、調べて下さつた池田良雄博士に感謝の意を表する。

又本研究の費用の一部は文部省科学試験研究費の補助を受けたものである。

The Syntheses of Several N-Alkyl Pyridinium Hydroxide and Their Actions against Mice

By Takanobu ITAI, Hiroshi IGETA, Syogo KUWAHARA and Tokuzo YANAGIMACHI

To determine whether N-Alkyl Pyridinium Hydroxides are related to poisonous substances of Oyster and Shellfish (venerupis) or not, we have synthesised several Alkyl-derivatives which were studied with regard to their toxicological actions. We found that they differ from the poisonous substances on the point of their affinity to the organs — they have no affinity.

ルチンについて 第1報 加水分解による定量及び定性反応

鹿 島 哲

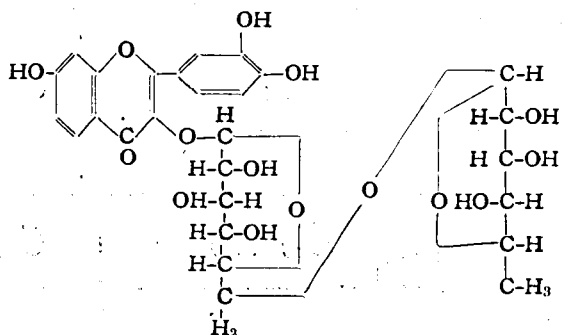
Rutin I. The Quantitative Determination by Hydrolysis and
the Qualitative Reaction of Rutin

By Tetsu KASHIMA

まえがき ルチンの発見は 1842 年 Weiss⁽⁴²⁾ がヘンルーダ *Ruta graveolens* L. の全草に含まれていることを見出したことに始まる。1859 年 Schunck⁽³⁵⁾ はソバ (*Polygonum fagopyrum* L. 原文の通り) の葉からルチンを抽出し、1904 年 Waliaschko⁽⁴¹⁾ はヘンルーダから抽出したルチンを用いて詳細に研究しルチンばかりでなくクエルセチンの誘導体などについても報告している。

その後 1936 年 Szent-Gyorgyi 等⁽³²⁾ によつて血液に対する毛細管の透過性に及ぼすフラボン系色素の影響に関する研究が発表された、すなわちレモン汁や紅色トウガラシ *Paprica* からビタミン C 以外の物質が抽出され、それが毛細管の血液に対する抵抗性の低下 (出血性紫斑病)⁽²⁵⁾ や血漿蛋白に対する透過性の増加 (敗血症などに見られる症状)⁽¹⁾ に有効であるとして、その有効物質をビタミン P (Permeabilitätsvitamin) と名付けた。Szent-Gyorgyi⁽³⁹⁾ はその物質を結晶として取出して Citrin と命名したが間もなくそれが Hesperidin と Eriodictin との混合物であることを見出した。⁽⁵⁾ 故に一時ヘスペリヂンがビタミン P としての医薬品に用いられたのである。

1944 年頃よりルチンがやはりビタミン P 作用を強力に有することが知られ、とくに Couch 等⁽¹⁰⁾ がタバコの葉やソバ *Fagopyrum esculentum* L. やエンジュ⁽²⁷⁾ *Styphnolobium japonicum* Schott から多量に抽出して大規模に研究や製造を始めてから多数の報告が提出されるようになり、次いで 1949 年頃からルチン製剤が広く用られ始めた。またエンジュの開花しようとするつぼみを乾燥して製造した槐花は止血剤として昔から用いられて来たが、これが現在ではルチン含量の一番多い植物として知られている。しかしフラボン類はビタミン C の作用を増強するがビタミン P のみの欠乏症が認められないためビタミンとしての薬理、生理作用⁽³⁾ ⁽⁴⁾ には疑問の点が多く⁽⁵⁾ ⁽³⁹⁾、1950 年には The American Society of Institute of Nutrition の命名委員会はビタミン P の名称廃止を決定した⁽⁴⁰⁾。しかし放射線を多く取扱い出した昨今では又それによる疾患、白血病などにルチンは有効であると云われている。Schmidt⁽³⁴⁾ はルチンの加水分解はクエルセチン、ラムノース、グルコース各 1 分子を与えることを確認し、Attree & Perkin⁽²⁾ はルチンをメチル化してから加水分解して 5,7,3',4'-テトラメチルクエルセチンを得ることによりルチンがクエルセチンの 3-ラムノグルコシドであることを決定し、Charaux⁽⁹⁾ はラムノーズとグルコースの結合した二糖体を得 Rutinose と名付けた。Zemplén & Gerecs⁽⁴⁴⁾ は酵素によつてルチノーズを加水分解して分離し、ヘプタアセチル化合物として精製し、これが β -Heptaacetyl- β -L-rhamno-6-D-glykose であることを決定したので、ルチンの構造は下記の如きものであることが確定された。



綜説としては小沢・奥田⁽²⁷⁾ がルチンの化学と薬理作用について、島菌⁽³⁷⁾ がビタミン研究 50 年史の中でビタミ

ン P として、又 Annual Reveiw of Biochemistry では 1940 年から 10 年振りで 1951 年 Natural Pigments の項で Seshadri³⁶⁾ が Haeme Pigments と Carotenoids を除き主としてフラボン類とアントチアン類について記載している、今後毎年この項が設けられる筈である。単刊書としては服部²⁰⁾、Klein²³⁾ の著書の中にルチンのことが記載されている。

研究史 ルチンの定性反応については、以上の文献以外に篠田³⁵⁾、Wilson⁴³⁾、Rae³⁰⁾ などに、特に Gage 等¹⁸⁾ によつて 38 種のフラボン類につき種々なる試薬による自然光及び紫外線下における呈色が報告された。しかしルチンに他のフラボン類の色素が夾雑していると、その呈色反応が余りにも類似しているため、クロマトグラフィ¹⁷⁾ などを用いてあらかじめ分離してから確認している。ルチンにはラムノースとグルコースが附いているからこれも分離してから確認する³⁸⁾。

定量も比色法によるものが多数報告されたが検体が純粋でないと定量は不可能に近い。その理由はルチンを製する過程において生ずるためか、あるいは原料の植物中に存するクエルセチンがルチンの中に夾雑し、その吸収曲線が互に類似し吸収極大値の差はわずかに約 12.5 mμ しかないためである、又それらの塩の吸収曲線も近似している。それ故 National Formulary IX (1950)²⁵⁾ ではアルデヒドを含まない無水エチルアルコール 1 l にルチン 10~15 mg を溶かし微量の酢酸を加えてルチンのオキシニウム塩として分解を防いだ検体を分光光度計を用い、その上 3 mμ 以内の幅の単色光で測定し、濃度は吸光係数に比例するものとして、

$$\text{Rutin } (\%) = 100 K_{362.5} / 32.55 \quad (1)$$

なる実験計算式を用いて含有量を出している。そのときクエルセチンの量をルチンの極大値に影響を与えない一定量以下に抑えるためにルチンのスペクトルの吸収極大値 362.5 mμ とクエルセチンの 375.0 mμ における吸光係数の比を一定の範囲に抑えている。

$$K_{375.0} / K_{362.5} = 0.875 \pm 0.004 \quad (2)$$

その値が 0.879 より大きいときはクエルセチンの量が多いのであるから次の実験計算式を用いる。

$$\text{Rutin } (\%) = 14.605 K_{362.5} - 13.181 K_{375.0} \quad (3)$$

Glazko 等¹⁸⁾ はルチンにホウ酸を加えて蛍光分析をし、Gage & Wender¹⁵⁾ はペーパークロマトグラフィで検体からルチンを分離後 0.5% の塩化アルミニウム水溶液に溶かして比色定量した。刈米、橋本²²⁾ もアルミニウム化合物を加え、0.0506% クロム酸カリウム溶液は標準液として比色定量した。本報告でも前号において市川等²¹⁾ はルチンを亜鉛で還元してから比色定量している。なお Brockmann 等⁷⁾ はソバから得た色素の中から光によつて変化する色素 Fagopyrin を得た。又 Naghski 等²⁸⁾ はペーパークロマトグラフィでルチンとクエルセチンを分離する際それ等と Rf 値の違う 2 種の未知フラボノールを認めている。

方法 ルチンを加水分解するとクエルセチンが得られるが、その際ルチンに統合したラムノースとグルコースが

分離る。そこで得られたクエルセチンの量を測定することにより糖の量が解る、それより次いでルチンの量を計算するのである。第 1 図により説明するとまず結晶水を完全に除き、加水分解するとき得られる残留物クエルセチンの量を試料の重量から引くことにより糖の量が解る、その値にルチンの分子量と糖の分子量の比を乗することによつて検体中のルチンの量が計算できる。

もし検体中にルチンとクエルセチン以外の物質が含まれているときは、その量をも差引いて糖の量を出す、ルチンの含量は次の式で表わされる。又加水分解溶液中のクエルセチンの溶解度

Rutin			
$C_{27} H_{30} O_{16}$			3
			H ₂ O
Q _s	Quercetin	Sugar	
Q _s	$C_{15} H_{10} O_7$	$C_{12} H_{20} O_9$	x

Fig. 1
Components of Rutin Samples
Q_s: Quercetin in the Sample
x: Unknown Material in the Sample

も考慮しなければならない。

$$\text{Rutin (\%)} = \frac{S - Q + Q' - x}{S} \times \frac{R}{Z} \times 100 \quad (4)$$

S: 試料, Q: 加水分解して得たクエルセチン, Q': クエルセチンの溶解量, x: 試料中のルチンとクエルセチン以外の物質, R: ルチンの分子量, Z: ルチンの分子量からクテルセチンの分子量を引いたもの。(大体ラムノースとグルコースとの分子量の和)

実験法 検体約 0.5 g を精密に秤り, 110°, 5 mm Hg 以下の減圧で 1 時間乾燥し, その重量を Sg とする。それに無水アルコール 10 cc を加え還流冷却器を附して水浴上で 30 分間加熱し, あらかじめ秤量したガラスフィルタで熱時濾過し更に熱アルコール 10 cc で洗い濾液に合する。得た残留物の量を ag とする。濾液を水浴上でアルコールを完全に留去し稀塩酸 10 cc 及び水 30 cc を加え還流冷却器を附し水浴中で 2 時間加熱し, 還流冷却器をとり, なお 1 時間加熱する。冷後 300 cc の冷水を加え完全に沈澱を落してから水浴上で少し加温し, あらかじめ秤量したガラスフィルタで濾過し, 少量の温水で洗い洗液が硝酸銀試液で濁らなくなつた時, 得た残留物を 110°, 5 mm Hg 以下の減圧で 1 時間乾燥し, 得たクエルセチンの量を bg とするとルチンの含量は次の式で表わされる。

$$\begin{aligned} \text{Rutin (\%)} &= \frac{S - a - b - 0.008b}{S} \times 1.9797 \times 100 \\ &= \frac{S - a - 1.008b}{S} \times 197.97 \end{aligned} \quad (5)$$

(0.008 は Quercetin の溶解度に対する補正, 1.9797 = R/Z)

加水分解に用いたガラスフィルタと吸引ビンを図 2 に示す。

実験材料 ダツタン種のソバ³⁾ *Fagopyrum tataricum* Gaertner を栽培し。その根を除いた全草を 1 時間熱湯で抽出し, 冷却し析出した粗結晶を熱アルコールに溶かし多量の水を加えて冷却するとルチンの結晶が得られた。ルチンとクエルセチンの標品を東京大学, 植物生理化学教室より, 実験例に用いたルチンは日本衛材, 第一製薬, 中外製薬の諸会社より分与されたものを用いた。塩酸は 1 級品を, アルコールは硫酸を加えて蒸留したものに酸化銀を加えて一昼夜放置し更に水酸化カリウムを加えて再蒸留したものを用いた。

実験結果 規格をつくるための参考にするため, 大体 N.F. IX (1950)²⁵⁾ により定性確認反応を行つた。

性状 ルチンは淡黄色～微帯緑黄色で無味無臭の顕微鏡的針状結晶である。純品は淡黄色である。ちなみにクテルセチンは黄色である。ルチンの水に対する溶解度は, 20° で 0.130 g, 25° で 0.143 g, 40° で 0.178 g, 50° で 0.261 g が 1 l に溶け, ルチン 1 g は沸騰水約 200 cc に溶ける。アルコールは良く溶けるが, ルチン 1 g はアルコール約 600 cc, 沸騰アルコール約 30 cc に溶ける。その他水酸化アルカリ溶液やビリジンを溶け易く, メチルアルコール, イソプロピルアルコールなどの 1 価アルコール, エチレングリコール, グリセリンなどの多価アルコール, 酢酸や塩酸の溶液に溶ける。クロロホルム, エーテル, ベンゼン, アセトン, 酢酸エチル, 石油エーテル, 二硫化炭素に溶けない。ルチンの飽和水溶液は Beckman pH meter (model G) のガラス電極を用いて測定するとき 25° で pH 約 6.8 である。ルチンの融点是不明瞭で 182°~192° で軟化し 210° 附近で分解する。

確認試験 1. ルチン 0.1 g に稀塩酸 2 cc 及び水 8 cc を加え, 還流冷却器を附して 1 時間加熱する。冷後ガラスフィルタで濾過し, 沈澱を水でよく洗つた後アルコールから再結晶し, 得られたクエルセチンの融点は 312~316° で, 同時に分解する。

2. 1. の濾液 5 cc を水酸化ナトリウム試液を用いて中和し, フェーリング試液 3 cc を加え, 水浴中で 5 分間加熱するとき酸化第一銅の赤褐色の沈澱を生ずる。これはルチンが加水分解して生じた還元性の糖によるものである。なお 1. の濾液を水酸化ナトリウムで中和した液を水浴上で水を蒸散させると立方晶系の糖の結晶が析出する。

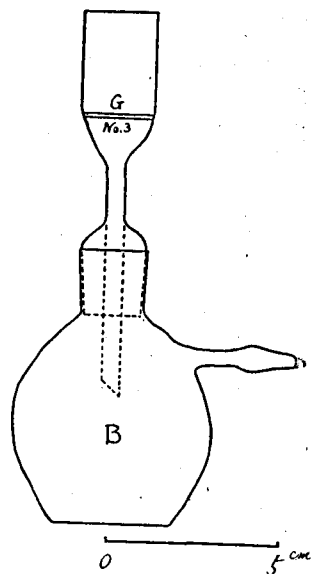


Fig. 2.
Glass Filter and Suction Bottle.

L-Rhamnose と D-Glucose の分離確認は上の結晶の 10% 水溶液を 0.02 cc 程度をブタノール 4 部、氷酢 1 部、水 2 部の混合溶媒でペーパークロマトグラフィを行いアンモニア性硝酸銀水溶液を噴霧すると、ラムノース 0.38, グルコース 0.11 の Rf 値を示す。

3. ルチン少量に水酸化アルカリ試液 5cc を加えると錯塩をつくり橙黄色を呈する。それは徐々に分解されて褐色を帯びてくる。ルチンに稀塩酸を加えるとオキソニウム塩を生じ黄色を呈するがこれは安定である。

4. ルチン 10mg をアルコール 10cc に溶かし稀塩化第二鉄試液 1~2 滴を加えると帯緑褐色を呈する。これは鉄とルチンとのハロクロミーの現象によるもので主として 3' と 4' の Ortho の OH によつて起るのである。アルミニウムやモリブデンの化合物とも黄褐色の呈色反応を起す。又ルチンに酢酸カリウムのアルコール溶液を加えると鮮黄色のモノカリウム塩を生ずる。²⁰⁾

5. ルチン 20mg をアルコール 5cc に溶かし塩酸 1cc 及びマグネシウムの少片を加えると徐々に赤色を呈する。これはルチンが還元されてアントシアニン系の色素が生じたためであつて、マグネシウムの代りに亜鉛を用いても反応は遅いが同様な変化を来す。²¹⁾

純度試験 1. ルチン 20mg に水 5cc を加えて徐々に沸騰させると黄色を呈し澄明に溶ける。

2. ルチン 0.1g に無水アルコール 5cc を加え水浴中で 2 分間加熱すると黄色を呈し澄明に溶ける。1. 及び 2. の試験で液が褐色を帯びたり沈殿物を生ずるのはクエルセチン以外の不純物が数パーセント以上存在するためである。

3. ルチン 50mg にアセトン又はエーテル 5cc を加え、よく振りまぜても溶液は濁りも着色もしない。不純物の存在するときは濁ったり着色したりする。

乾燥減量 本品を 110°, 5mm Hg 以下の減圧下で五酸化磷をもつて 1 時間乾燥すると、市販ルチンは 5.7~7.6% 減量する。(蒸気乾燥のとき 1 分子の結晶水がとれるためである。理論値は 8.35%)

灰分 常法に従い灰化したとき、灰分は 0.2~1.5% である。

定量法 方法の項で述べた実験方法で行なつた成績を第 1 表にのせる。

S_0 は試料, S はそれを完全に脱水したもの、従つて $(S_0 - S/S_0) \times 100$ は乾燥減量である。加水分解によつて求めた結果は H の如くかなりルチンの含量が低いような成績が出た。次に N.F. IX (1950) によつて Spectrophotometry を行つた処、試料は皆クエルセチンの含量が多かつたので実験計算式 (3) を適用すると S の如き値となつた。これを一応正しい値とする。次に吸収極大値は皆ルチンによつて生じたものと考え、(2) 式を適用して K の値が得られた。その K と S の値の差を試料中のクエルセチンによると考えると、その含量がわかる。それはクエルセチンのみの検体をルチンと吸収スペクトルが近似している処から、波長 362.5 $m\mu$ における吸光係数を測定して、仮りにルチンのみを含むものとして測定した処 210% のルチンを含むものと同等であると出たことによる。これはスペクトルの近似と分子量が約 2 倍であることと一致している。クエルセチンの水に対する溶解量は 10°~50° のとき 1g に約 22mg 溶けたので、その溶解度に対する補正値を 0.008 b とした。以上のことにより未知物質も算出できる。従つて a のパーセンテージを差引いた残りの未知物質が稀酸に全部とけるとすると、ルチンの含量 H の補正値として H' が求められ半分の稀酸に溶けると仮定すると H'' が求まる。N.F. IX の方法により Spectrophotometry でクロロフィル $[C = K_{555} - 1/2 (K_{530} + K_{570})]$ と赤色色素 $[P = 4 \{K_{593} - 1/2 (K_{530} + K_{570})\}]$ の量を求めたが、計算にからなかつた。

考察 ルチンが医薬として広く多量に用いられるようになってから多数の人々が簡便して正確な確認法、定量法を考案しようと努力したが、市販のルチンに必ず 2~5% 以上、通常 10% 前後含まれているクエルセチンがルチンのアグリコンであるため、ルチンを化学的に分離、確認、定量することが大層困難であつた。しかし両者の分子量の比が 2 であることに基きクロマトグラフィや溶解度などの物理的性質の差を利用して分離し得ぬことはない。また定性試験としては必ず L-Rhamnose の確認試験を加えるべきであり、更に適切にして簡便な純度試験法がないから不純物の量を一定限度以下に抑えるために、N.F. IX で 0.5% 以下と定めた灰分を 0.2~0.1% と規定することが望ましい。検体の溶液の色も不純物の量を簡便に見分ける指針となろう。定量試験としてルチンの加水分解によつて離脱した糖の量から試料中のルチンの含量を求めて見たが、第 1 表に見られる如く実際よりかなり高い。恐らくクエルセチン以外の不純物がその誤差の原因となつているのであろうが、特にアルコールに溶けその上稀酸に溶けて出る不純物が糖として計算されるためである。しかし故意に検体中に糖を混ぜたり、クエルセチン

Table 1
Rutin in the Commercial Preparations

	A	B	C	D
S_0 (g)	0.5653	0.5067	0.5993	0.5082
S (g)	0.5277	0.4681	0.5690	0.4793
$\frac{S_0-S}{S_0} \times 100$ (%)	6.7	7.6	5.7	6.7
a (g)	0.0002	0.0005	0.0012	0.0018
b (g)	0.2546	0.2342	0.2816	0.2584
Rutin (%) H	98.2	97.8	98.8	89.6
Rutin (%)				
S (Spectrophotometry)	92.7	90.7	86.2	76.6
K (100 $K_{362.5/37.55}$)	107.7	99.0	96.8	100.7
Difference	15.7	8.3	10.6	24.1
Quercetin	7.5	4.0	5.0	11.5
Rutin+Quercetin	100.2	94.7	91.2	88.1
Unknown Material	/	5.3	8.8	11.9
Rutin (%)				
Correlated H'	98.2	87.9	83.8	66.8
H''	98.2	92.9	91.3	78.2
Chlorophyll	0	0	0	0
Red Pigment	0	0	0	0

S_0 : Sample

S: Sample, dehydrated

a: Impurities, do not dissolve in alcohol

b: Residue by the hydrolysis, main of which being quercetin

が余り多い時は、検体を温湯で浸出した液がフエーリング液を還元するから見分けることができる。分光光度計を用いても、単に吸光係数の比で定量すると試料中のクエルセチンのため、ルチンの含量が第1表 K の如く 100% 前後の値を示す。そのためルチンとクエルセチンの吸収極大値におけるクエルセチンとルチンの吸光係数の比が 0.879 より大なるときは、複雑な実験計算式 (3) を用いているのである、しかし実際に Spectrophotometry を行なつて見ると、余程精密な実験を行なわないと一定値が得られないことは (3) の計算式の係数が 5 桁であること又吸光係数や吸収極大値が報告により異なる^{12) 24) 25)} ことから推察できる。また溶媒が無水アルコールであるから、その温度係数が大で、常温において 10° の差で約 1.5% の定量誤差が生じるから、検液を造つたときと測定時における温度差を 3° 以内に止める必要がある。

Spectrophotometry でクエルセチン以外の未知物質を計算して、加水分解によつて求めた含量に補正を加え、未知物質が全部熱アルコールに溶けその上稀酸に溶けるときは第1表の H' となり、半分がそのようなものであると仮定したときおよそ H'' となる、そして比較的正確であると思われる、Spectrophotometry による補正計算式で求めた値 S と H'' は近似する。故にその程度のそういった種類の不純物が試料に含まれていると推測できる。結局この方法ではもちろん、いずれの方法でも検体に不純物が含まれていれば、特にクエルセチン以外の不純物が含まれているときは大きな誤差を生ずる。

むすび ルチンの規格を設定する基礎となる試験を行なつた。検体を加水分解し、その時ルチンから分離した糖の量からルチンの含量を定量した。その結果試料がクエルセチン以外の夾雑物を含まないか、又はそれを除去するか定量できるときは測定可能である。つまりルチンの定量はそれが純粋である時にのみ正確に求めることができる。その純化精製を行なつてから測定する方法は第2報にのせる。

実験材料のソバを栽培するに当り当試験所植物園長平山重勝、技官山根恂、三木、藤本諸氏の援助を受けた。その種子は長野県農事改良実験所、桔梗原試験地より分与して戴いた。その他試料を分与して下さつた東京大学植物生理化学教室、日本備材、第一製薬、中外製薬の諸会社にも謝意を表する。

文 献

- 1) Armentano, L., Bentsáth, A., Béres, T., St. Rusznyák und Szent-Györgyi, A., Deutch. Med. Wochenschr., **62**, 1325 (1936)
- 2) Attree, G.F. and Perkin, A.G., J. Chem. Soc. London, **1927**, 234~40.
- 3) Beiler, J.M. and Martin, G.J., J. Biol. Chem., **171**, 507~11 (1947)
- 4) Beiler, J.M., Brendel, R., Graff, M. and Martin, G.T., Arch. Biochem., **26**, 72~6 (1950)
- 5) Bentsáth, A. and Szent-Györgyi, A., Nature, **140**, 426 (1931)
- 6) Bentsáth, A., St. Rusznyák and Szent-Györgyi, A., Nature, **138**, 798 (1938)
- 7) Brockmann, H., Weher, E. und Sander, E., Naturwissenschaften, **37**, 43 (1950); C.A., **44**, 8849d (1950)
- 8) Bruckner, V. and Szent-Györgyi, A., Nature, **138**, 1057 (1936)
- 9) Charaux, C., Bull. Soc. Chim. Biol., **6**, 631~40 (1924); Compt. rend., **178**, 1312~4 (1924)
- 10) Couch, J.F. and Krewson, C.F., Chemrigie, **3**, 230 (1944); C.A., **38**, 6046⁵.
- 11) Couch, J.F., Naghski, J. and Krewson, C.F., Science, **103**, 197~8 (1946)
- 12) Couch, J.F., J. Am. Chem. Soc., **70**, 256~7 (1948)
- 13) Couch, J.F., Naghski, J., Sando, J.W. and Street, O.E., U.S. Dept. Agr., Bur. Agr. Ind. Chem. AIC-222, 3 pp. (1949); C.A., **43**, 4428 h (1949)
- 14) Crampton, E.W. and Lloyd, L.E., Science, **110**, 18 (1949)
- 15) Gage, T.B. and Wender, S.H., Anal. Chem., **22**, 708~11 (1950)
- 16) Gage, T.B., Douglass, C.D. and Wender, S. H., Anal. Chem., **23**, 1582~5 (1951)
- 17) Gage, T.B., Morris, Q.L., Oetty, W.E. and Wender, S.H., Science, **113**, 522~3 (1951)
- 18) Glazko, A.J., Adair, F., Papageorge, E. and Lewis, G.T., Science, **105**, 48 (1947)
- 19) 長谷川浩: 農化, **7**, 1036~49 (1931)
- 20) 服部静夫: 植物色素, 昭 17, 岩波書店, p. 210~23.
- 21) 市川重春, 鈴木繁: 衛試, **68**, 104~12 (1950); 同誌, **69**, 10~16; 17~21 (1951)
- 22) 刈米達夫, 橋本昭平: 薬学研究, **22**, 108~9 (1950); 薬誌, **71**, 433~6 (1951)
- 23) Klein, G., Handbuch der Pflanzenanalyse, Bd. III, 1932, p. 874.
- 24) Krewson, C.F. and Couch, J.F., J. Am. Chem. Soc., **70**, 257~8 (1948)
- 25) The National Formulary, Ninth Edition, Rutin, p. 438~40 (1950)
- 26) Naghski, J., Fenske, C.S. Jr. and Couch, J.F., J. Am. Pharm. Assoc., **40**, 613~6 (1951)
- 27) 小沢光, 奥田朝晴: 薬学, **4** (3), 264~81 (1950)
- 28) 小沢光, 奥田朝晴, 松本滋: 薬誌, **71**, 1173~8 (1951)
- 29) Perkin, A.G., J. Chem. Soc. London, **75**, 440 (1899)
- 30) Rae, J., Pharm. J., **163**, 111 (1949); C.A., **44**, 281e (1950)
- 31) Rekkers, P.E. and Field, J.B., Science, **107**, 16~7 (1948)

- 32) St. Rusznyák and Szent-Györgyi, A., *Nature*, **138**, 27 (1936)
- 33) 佐竹一夫：クロマトグラフ，昭 27，共立社，p. 58~9.
- 34) Schunck, E., *Chemic. Gaz.*, **1859**, 303~5; *Chem. Zentr.*, **30**, 911 (1859)
- 36) Seshadri, T.R., *Ann. Rev. Biochem.*, **20**, 487~509 (1951)
- 37) 島岡順雄：化学の領域，**5** (8), 469~71 (1951)
- 38) 篠田淳三：薬誌，**48**, 214~20 (1928)
- 39) Szent-Györgyi, A., *Z. Physiol. Chem.*, **225**, 126~31 (1938)
- 40) Vickery, H.B., Nelson, E.M., Almquist, H.J. and Elvehjem, C.A., *Science*, **112**, 628 (1950)
- 41) Waliaschko, N., *Arch. Pharm.*, **242**, 225~54 (1904)
- 42) Weiss, A., *Chem. Zentr.*, **1842**, 305.
- 43) Wilson, C.W., *J. Am. Chem. Soc.*, **61**, 2303~6 (1939)
- 44) Zemplén, G. und Gerecs, A., *Ber.*, **68**, 1318~21 (1935); **67**, 2049~51 (1934)

Rutin I. The Quantitative Determination and
the Qualitative Reaction of Rutin
By Tetsu KASHIMA

Commercial preparations of rutin contain always a few percents of quercetin. When hydrolysed, rutin gives its L-rhamnose and D-glucose in the solution. The content of rutin is, therefore, calculated by the following formula:

$$\text{Rutin (\%)} = \frac{S - a - Z - Z'}{S} \times 197.97$$

Here, S : Sample

a : Impurities except quercetin

Z : Residue by the hydrolysis, main of which being quercetin

Z' : Quantity of quercetin in the solution

1.9797: Mol. wt. of rutin/Mol. wt. of quercetin

When the impurity in the sample consists of flavones, except quercetin, and especially of those soluble in hot alcohol and dilute acids, the result is liable to contain a big error. It is, therefore, necessary to purify the sample before the analysis, as far as possible by the physico-chemical methods, which is also applicable to any other analytical method.

The improved determination of rutin by which the sample is purified by paper chromatography before the analysis, will be reported in the next paper.

ル チ ン に つ い て

第 2 報, ペーパークロマトグラフィによる分離定量 (その 1)

鹿 島 哲

Rutin. II. The Separation and Quantitative Determination
by Paper Chromatography (1)

By Tetsu KASHIMA

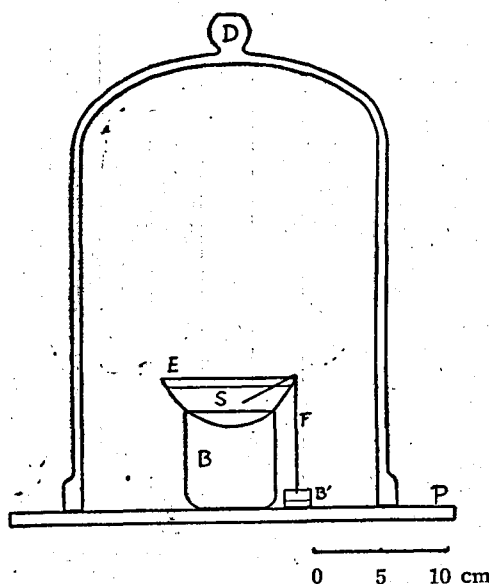
まえがき——ルチンに関する一般的ことは第 1 報に記載したので省略する。

ルチンは分光光度計で吸収スペクトルの 1 つの吸収極大の波長 $362.5^{(9)}$ $\sim 362.7^{(1)}$ $m\mu$ における吸光係数を条件を厳密に規定して測定することによつて定量しているが, 吸光係数も試料の原料の種類により微量不純物が違うためか $32.55^{(9)}$ $\sim 32.6^{(1)}$ $\sim 32.74^{(7)}$ などと種々報告され決定的な値が公認されていない。たとえば共存するフラボン類, 特に類似の吸収スペクトルを示すクエルセチンによつてルチンのスペクトルは乱される, 故に酢酸で微酸性にして測定したり⁽⁹⁾, アルミニウムの化合物⁽²⁾ $^{(6)}$ やホウ酸⁽⁵⁾ 又はモリブデン酸アンモニウム⁽¹⁰⁾ を加えて安定な錯塩として後, 比色定量しているが, 余り良い結果を得ることができない。結論的に云うと検体を何等かの方法で純粋にしてから定量する必要がある。純粋にする物理化学的手段としてペーパークロマトグラフィ⁽²⁾, イオン交換樹脂⁽⁴⁾ などが用いられ, Gage 等⁽³⁾ によつて 38 種のフラボン類のペーパークロマトグラフィの R_f 値が種々の溶媒を用いて測定された。また Naghski 等⁽⁸⁾ はルチンの中のクエルセチンをペーパークロマトグラフィの R_f 値の大きな差を利用して分離し分光光度計を用いて定量している。

材料——日本衛材, 第一製薬, 中外製薬より分与された実験材料を用いた。イソプロピルアルコールは特級品を, アルコールは硫酸を加えて蒸留したものに, 酸化銀を加えて 1 昼夜以上収置し水酸化カリウムを加えて再蒸留したものを用いた。

方法——東洋濾紙 No. 51 の濾紙 2×40 cm を 3 等分し, 先ずイソプロピルアルコール 25% を含む水溶液で

第 1 図の如き装置で 2 時間ほど展開して洗い, ついで水で又 2 時間ほど展開して洗い自然乾燥してから, 第 2 図 R の如く 2×1 cm の面積に濃度 約 5 g/l のルチンの無水アルコール溶液(原液)を 0.001 cc の精度を有するマイクロピペットで正確に 0.1 cc (含量 約 0.5 mg) をつける。この時検液を何度にも分け, 液をつけては電熱器で乾燥し, 乾燥したら又つけ裏面からもつける, この時ルチンは完全に濾紙の繊維の間に吸蔵されていないと, 完全に展開することはできない。たとえばルチンの量が多過ぎたり乾燥の方法が悪いとルチンが濾紙の上に析出する。



- B, B': Beaker
- D: Glass Dome
- E: Evaporating Dish
- F: Filter Paper
- P: Glass Plate
- S: Developing Solvent

Fig. 1.

Apparatus of Quantitative Determination by Paper Chromatography.

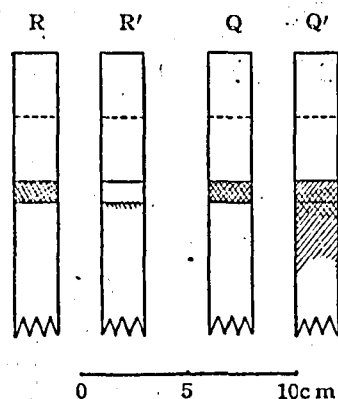


Fig. 2

Papers of Quantitative Determination

ルチンは約 $50 \mu\text{g}$, クエルセチンは約 $20 \mu\text{g}$ をつけ降下法で^{11) 12)} 同様に展開するとき, 第 3 図の R, Q の如くなる。

実験結果——前記の方法でペーパークロマトグラフィで溶出したものを定量した成績 (I) と, ルチン原液をそのまま N. F. IX の方法で定量した結果 (II), 並びにルチン, クエルセチン及び未知物質の Rf 値を掲げる。

Table 1.
Components of Rutin Preparations

Sample	A	B	C	D	Q
I. Rutin (%)	78.8	78.6	70.7	62.9	0
$K_{375.0} / K_{362.5}$	0.877	0.876	0.872	0.874	—
II. Rutin (%)	92.7	90.7	86.2	76.6	(210)
$K_{375.0} / K_{362.5}$	0.894	0.894	0.900	0.927	1.22
I / II (%)	85.0	86.7	82.0	82.1	—
Rutin (Rf value)	0.61	0.63	0.25	0.63	—
Quercetin (Rf value)	—	—	0.01	0.02	0.03
Unknown (Rf value)	0.88	0.88	0.91	0.89	—

考察——分光光度計を用いて吸光係数で比較する物理化学的試験において, ルチンとクエルセチンの吸収曲線はその基本の 3, 5, 7, 3', 4'-Pentahydroxyflavone (Quercetin) によって左右され, ルチンの 3-Rhamnoglucoside は吸収スペクトルに余り影響を与えない。しかるに分子量においては約 2 倍という大きな差がある, 故に物理的性質は融点や溶解度において顕著な差があるのである。この報告ではその物理的性質の差を用い,

既知量の検体をつけた濾紙を第 1 図の如くガラス鐘の中で展開液 (25% イソプロピルアルコール水溶液) を 8 分目に入れた蒸発皿につるす, 受け器として容量 5~6 cc の小形の硬質ビーカを用いる。約 6 時間展開してビーカに 1.5 cc ほど溶出された液が溜つたらガラス鐘から取出し水浴上で展開液を蒸発させ, それにアルデヒドを含まない, かつ微量の酢酸を加えたアルコールを加え溶し出して 25 cc のメスフラスコに入れる, 何もつけない濾紙で展開して同様の操作を行なったものを対照として Beckman の分光光度計で $362.5 \text{ m}\mu$ と $375.0 \text{ m}\mu$ における吸光係数を測定し, N. F. IX⁹⁾ の方法に従って定量した。又クエルセチンのみの検体をルチンと同様の方法で定量して比較した。

(第 2 図)

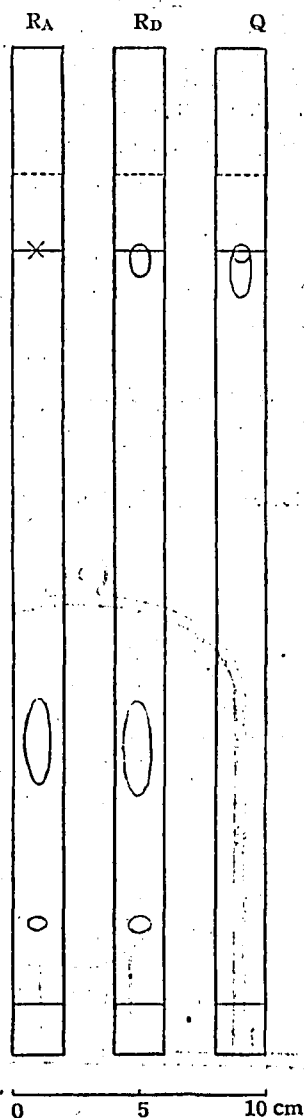
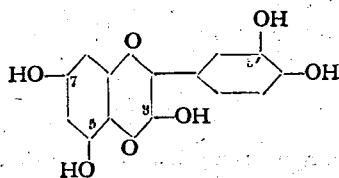
ルチンは約 $50 \mu\text{g}$, クエル

Fig. 3.
Papers of Qualitative
Determination

ペーパークロマトグラフィにおけるルチンとケルセチンの Rf 値の異なる差



$$\text{Rf 値 (Rutin)} / \text{Rf 値 (Quercetin)} = 0.64 / 0.03 = 21.$$

を利用してルチンをケルセチンから分離精製して後比色定量せんと試みたのである。このとき検体中のルチンが果して純粋にされたかどうかと云うに、第 1 表の如く、 $K_{375.0} / K_{362.5}$ というケルセチンとルチンの吸収極大値における吸光係数の比がペーパークロマトグラフィによつて減少し、その値はルチンの純品として知られている値 (0.875 ± 0.004) に近付いている。またケルセチンのみをペーパークロマトグラフィで展開したときは、それが全く溶出しないという結果から見てルチンが精製純化されたことは確実である。

次にこの精製過程においてルチンの損失が何パーセントあるか、又その損失率が一定であるかという点に就ては、第 1 表における如くその損失はかなり大で 13.3~18% であるが、比色法が夾雑するケルセチンのため実際より稍々大きな値を示す傾向にあるから、ここに表われた結果ほどの損失は無いと思われるし、各損失率間には余り差がない。しかしより多量の試料 (数ミリグラム) を用いてみたり、全般に互つての方法や技術の改良を行なう余地が多い。

市販のルチンのペーパークロマトグラフィを行なうと直ぐ気付くことは、Rf 値が約 0.9 の処に褐色の未知物質が認められる。これはルチンの分解されたものではないかと推察される。この物質はケルセチン (東京大学植物生理化学教室より恵与を受けたもの) や濾紙のみを展開した時は認められなかつた。

以上のことよりルチンを検体から溶出するときケルセチンと未知物質を展開液を変えるなどの手段により分離確認定量し全回収率を測定して見るか、純品を用いた場合と比較して見ると、この方法が定量に適するかどうか判断することができる。その結果は後報する予定である。

結論—1. ルチンの検体はその不純なままでは、いかなる方法によるも直接定量することは該差も多く、不可能に近い。

2. ペーパークロマトグラフィによつてルチンを純化精製することができたが収量はまだ明かにされないから定量に利用するためには検討の余地が多い。しかし、純粋にされたルチンは簡単に比色定量出来る。

3. 市販ルチンにはケルセチン以外に未知物質が数パーセント含まれている。

文 献

- 1) Couch, J.F., J. Am. Chem. Soc., **70**, 256~7 (1948)
- 2) Gage, T.B. and Wender, S. H., Anal. Chem., **22**, 708~11 (1950)
- 3) Gage, T.B., Douglass, C.D. and Wender, S.H., Anal. Chem., **23**, 1582~5 (1951)
- 4) Gage, T.B., Morris, Q.L., Oetty, W.E. and Wender, S.H. Science, **113**, 522~3 (1951)
- 5) Glazko, A.J., Adair, F., Papageorge, E. and Lewis, G.T., Science, **105**, 48 (1947)
- 6) 刈米達夫, 橋本庸平: 薬学研究, **22**, 108~9 (1950); 薬誌, **71**, 433~6 (1951)
- 7) Krewson, C.F. and Couch, J.F., J. Am. Chem. Soc. **70**, 257~8 (1948)
- 8) Naghski, J., Fenske, C.S. Jr. and Couch, J.F., J. Am. Pharm. Assoc., **40**, 613~6 (1951)
- 9) The National Formulary, Ninth Edition, 1950, p. 438~40
- 10) Rae, John, Pharm. J., **163**, 111 (1949); C.A., **44**, 281e (1950)
- 11) Wender, S.H. and Gage, T.B., Science, **109**, 287~9 (1949)
- 12) Winsten, W.A., Science, **107**, 605 (1948)

Rutin II. The Separation and Quantitative Determination by Paper Chromatography (I)

By Tetsu KASHIMA

When commercial preparations of rutin are purified by paper chromatography, using an aqueous solution of 25% iso-propylalcohol as a developing solvent. By the rapid mobility of rutin during chromatography, quercetin in the preparation is remained on paper and rutin is eluted and purified. And rutin in the elution can accurately be measured by the spectrophotometry. But the loss of rutin by the paper chromatography is not determined, unless the contents of quercetin, flavones and other impurities in the sample are measured; the conclusion will, therefore, be reported in the next paper.

If the preparation is not purified by chromatography or other method, there is a possibility to contain a big error in the result, which is also probable in the determination by spectrophotometry, colorimetry or any other analytical method.

パンクレアチンのエンテロキナーゼによる活性化について

山 羽 力, 朝 比 奈 正 人

On the Activation of Pancreatin by Enterokinase

By Tsutomu YAMAHA and Masato ASAHINA

パンクレアチン中の蛋白消化酵素の主成分であるトリプシン及びキモトリプシンは、膵臓中ではそれぞれ不活性なトリプシノーゲン及びキモトリプシノーゲンとして存在する。不活性トリプシノーゲンは、小腸の粘膜より分泌されるエンテロキナーゼ又はトリプシン自体によりトリプシンに賦活される。不活性キモトリプシノーゲンは、トリプシンによりキモトリプシンになる。そこで種々の方法で製造したパンクレアチン及び市販の局方パンクレアチン製品は、どの程度不活性酵素の形になっているのか、又それにエンテロキナーゼを添加した場合どのくらい賦活がおこるものであるかを検討する必要がある。もし、かゝるエンテロキナーゼによる賦活がかなり著しくあらわれるなら、パンクレアチンの局方試験の場合もこれを考慮しなければならない。かゝる目的で、以下述べるごとき実験をおこなつたのでここに報告する次第である。

パンクレアチンの蛋白消化試験法

日局のパンクレアチンの蛋白消化試験では、0.2% カゼイン 5 cc, 水 3 cc, パンクレアチン溶液 (0.1 g のパンクレアチンを水 500 cc にとかす) 2 cc を混じ、40° の水浴中で 1 時間反応させた後アルコール・酢酸混液を 3 滴加えカゼインの等電点にもちきたし、残存カゼインの白濁の程度をみるのであるが、これでは充分定量的に使用することは出来ない。そのほか、蛋白分解酵素の測定には、ヴァンスライク法によるアミノ窒素の増加をみるとか、フォルモール滴定、アルコール溶液中でのアルカリ滴定など遊離アミノ基の解離をおさえる条件で、そのカルボキシル基の増加を測る方法とかがあるが、これらはいずれもかなり面倒である。本実験においては、Anson 法¹⁾ につとり不消化カゼインをトリクロル酢酸で沈澱させ、沈澱しない蛋白分解生成物を Folin の試薬²⁾ により定量を行つた。すなわち、本試薬により分解物中のチロジン及びトリプトファンが青色を呈することによる。

Folin 試薬によるチロジンの定量 チロジン 10 mg を N/5 塩酸 200 cc に溶かし基準原液 (チロジン含量 50 γ /cc) とし、以下これを希釈する。試料液 1 cc に 12.5% 炭酸ナトリウム液 3 cc, 0.1% 硫酸銅溶液 0.5 cc 及び Folin 試薬 (使用に際し 1:3 に水で希釈して用う) 0.5 cc を順次加え、室温に 30 分放置後光電管比色計で S_{660} フィルターを用いて比色定量した。その結果は Fig. 1 の如く、チロジン濃度と吸光度とは直線的関係にある。

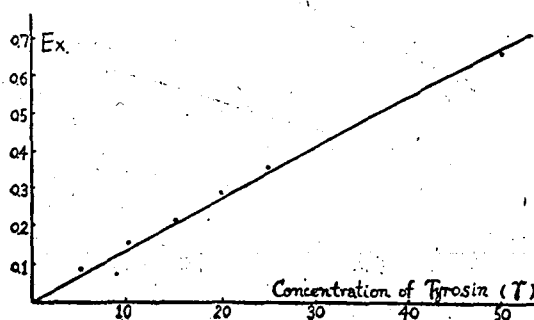


Fig. 1.

Determination of tyrosin by Folin reagent

本法のパンクレアチンによるカゼインの加水分解の応用 局方パンクレアチン 0.1 g を水 500 cc にとかし時々振りまぜ、約 1 時間後にこれを濾過して酵素液とする。0.2% カゼイン (Hammarsten) 液 10 cc と M/6 磷酸塩緩衝液 6 cc (pH=8.0) を試験管に入れ、37° の恒温槽に浸した後これに上記の酵素液 4 cc を加え、一定時間毎にその 2 cc をピペットで吸いとり、あらかじめ用意した 5% トリクロル酢酸 2 cc を入れた試験管中に入れ、残存

カゼインを沈澱させ 30 分後に濾紙で濾過する。この濾液 1 cc に 12.5% 炭酸ナトリウム液 3 cc, 0.1% 硫酸銅液 0.5 cc 及び Folin 試薬 (1:3) 0.5 cc を加え、室温に 30 分放置後光電管比色計で S_{80} フィルターを用いて比色定量する。カゼイン分解の時間的变化は Fig. 2. の如くである。

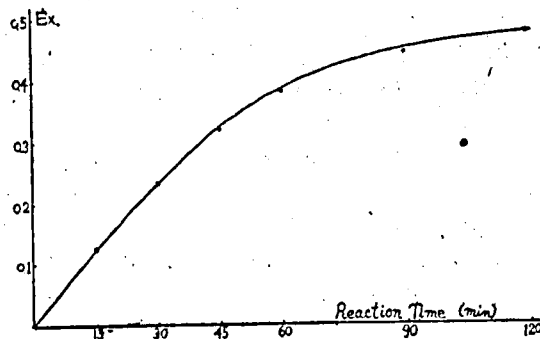


Fig. 2

Hydrolysis of casein by pancreatin (Anson's method)

種々酵素濃度によるカゼイン分解量の変化 上の条件でパンクレアチンの濃度を種々変えた場合のカゼイン分解の様子は Fig. 3 の示す如くで、反応の初期においてはあきらかに分解量と酵素濃度とは比例することが分る。

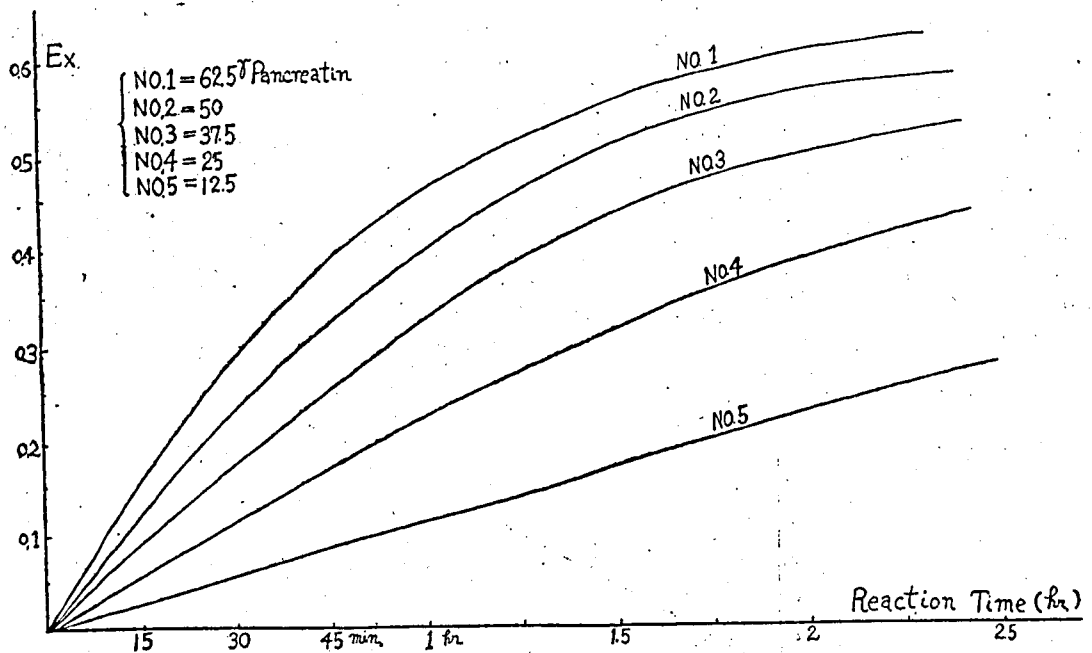


Fig. 3.

Hydrolysis of casein by various concentrations of pancreatin

パンクレアチン及びエンテロキナーゼの製造

本実験の目的たる市販パンクレアチン製品がどの程度 エンテロキナーゼにより活性化されるかを検討するためには、活性なエンテロキナーゼ及び少くともかなりの量がトリプシノーゲンの形で存在するパンクレアチン製品が必要である。また、色々の製造法でつくった製品中のトリプシノーゲンの含有量を調べるため、以下述べるような数種の試料をつくつてみた。

パンクレアチン No. 1: 屠殺したての豚脾臓をホモジナイザーでかゆ状にし、これを大型のバット上に薄くひろげ約半日間日光乾燥を行つた後これをかき集め乳鉢で磨砕しエーテルで一回脱脂し乾燥粉末にする。

No. 2: 上と同様ホモジナイザにかけた豚脾臓のかゆを大型シャーレにひろげ、40°で減圧乾燥を2日間おこなつた後これをかき集めエタノールで脱水、エーテルで脱脂乾燥させる。

No. 3: 屠殺したての豚脾臓をホモジナイザでかゆ状にしたもの 80 g を少量のクロロホルムをふくむ水 160 cc で1時間かきまぜて抽出を行い、遠心分離及びガーゼで濾過後、全容 150 cc に対し氷冷メタノール 450 cc を加え沈澱をとり、数回メタノール、エタノールで脱水洗浄し乾燥粉末とする。

No. 4: 上の操作中水で24時間抽出したものを同様な粉末にする。

No. 5: 上と同様のかゆ状豚脾臓をアセトン、アルコール・エーテル及びエーテルで順次脱脂し乾燥粉末にする。

No. 6 及び No. 7: No. 1~No. 5 が屠殺場から臓器を試験室に持ち帰つてから処理を始めたのに対し、屠殺場で殺したての豚の脾臓をその場で肉挽に2回かけ、直ちにアセトンに浸して持ち帰り、なお数回アセトン、エーテルで脱脂乾燥する。以上の製品を局方試験でその蛋白消化力を調べたところ、第1表のような結果を得た。

No.	トリブシン効力の局方限界に対する倍率
1	1 倍
2	2
3	1
4	3
5	2
6	1/5
7	1

エンテロキナーゼ 豚の小腸の上端部だけ約 1~2 m 位を数頭分屠殺場から持ち帰り、注意して粘膜をかきとり、アセトン、アセトン・エーテル及びエーテルで順次脱脂乾燥する。

パンクレアチンのエンテロキナーゼによる活性化

パンクレアチンのグリセリン抽出による方法 パンクレアチン (No. 7 製品) 10 mg を 87% グリセリン 40 cc

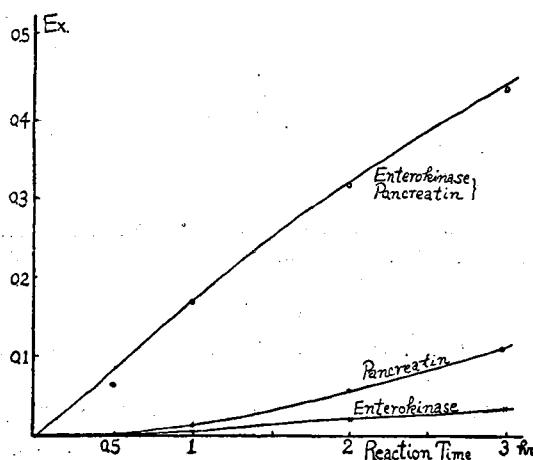


Fig. 4.

Activation of glycerin extract of pancreatin by enterokinase

を加えて抽出し、約2時間後遠心分離し沈澱を分け(12,000 R.P.M.)その上清をとりパンクレアチン液とする。また、エンテロキナーゼ 50 mg を水 10 cc で抽出し約2時間後に濾紙で濾過してエンテロキナーゼ液とする。次にこれを下の如き割合で混合して室温で1時間活性化せしめる。

- 1 パンクレアチン液 2 cc とエンテロキナーゼ液 2 cc
- 2 パンクレアチン液 2 cc と水 2 cc
- 3 エンテロキナーゼ液 2 cc と水 2 cc

次に前記の方法で1, 2 及び 3 につきカゼイン水解を行う。すなわち、反応液の組成は次の通りである。

0.2% カゼイン溶液	5 cc	pH=8.0 反応温度: 37°
M/6 磷酸塩緩衝液	3 cc	
酵素液	2 cc	

その分解の時間的变化は Fig. 4 の如くである。これによつてパンクレアチンのグリセリン抽出液は明かに作用が低いのに對し、これにエンテロキナーゼを混ざると著しく活性化されることがわかる。

パンクレアチンの水抽出による方法 局方試験等におけるパンクレアチンはすべて水で一定時間抽出してから反応を行っているから、かかる間にトリプシノーゲンが自蝕滅的にトリプシンに変化することも考えられる。この意味からパンクレアチンを水で抽出した場合の活性化の程度を調べてみた。

パンクレアチン (No. 7 製品) 10 mg を水 40 cc にとかし、ときどきかきまぜ1時間後に濾過する。又エンテロキナーゼ 50 mg を水 10 cc に溶かし時々かきまぜ1時間後に濾過する。そして前述の如く、1. パンクレアチン液 5 cc とエンテロキナーゼ液 5 cc 2. パンクレアチン液 5 cc と水 5 cc 3. エンテロキナーゼ液 5 cc と水 5 cc。

の割合で混合し、室温に放置し一定時間毎にその 1 cc をとり出しカゼイン水解を行う。反応時間は 60 分とする。その反応液の組成は次の通りである。

0.2% カゼイン溶液	2.5 cc	pH=8.0 反応温度: 37° 反応時間: 60分
M/6 磷酸塩緩衝液	1.5 cc	
酵素液	1 cc	

この結果は Fig. 5 の如くなり、水抽出の場合パンクレアチンの自然活性化は幾分おこるが、これにエンテロキナーゼを添加すると著しくその作用を増大させることができる。

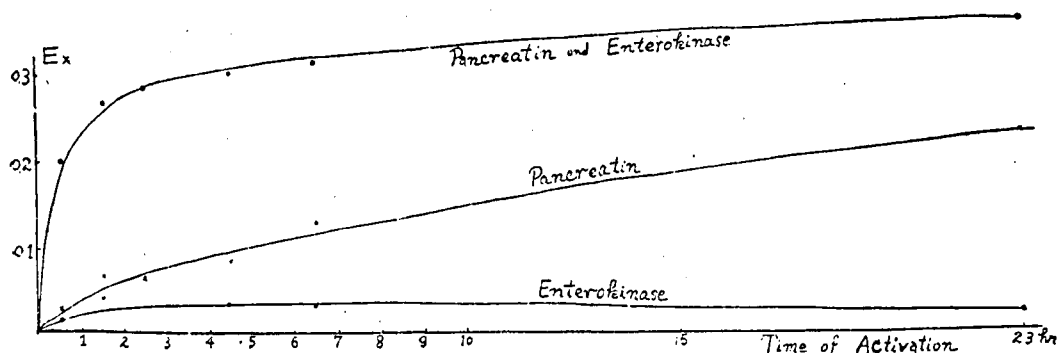


Fig. 5.

Activation of water extract of pancreatin by enterokinase

各種パンクレアチン製品のエンテロキナーゼによる活性化

以上で本実験に用いたエンテロキナーゼが活性なものであること、及びパンクレアチン製品 No. 7 が少くともかなりの程度トリプシノーゲンを含んでいることが明らかになったので、このエンテロキナーゼを用い先に製造したパンクレアチン No. 1~No. 7 及び現在手許にある市販パンクレアチン製品 A~G につき、エンテロキナーゼ添加に

よる活性化を検討してみた。即ち一定量のパンクレアチン 3~50 mg (これはそれぞれの製品の効力に応じて、用いる分量を加減し大体局方の $\frac{1}{2}$ の効力位になる見当である。) を水 40 cc に、また、エンテロキナーゼ 50 mg を水 10 cc に抽出し、1 時間後にそれぞれ濾紙で濾過し、

1 パンクレアチン液 2 cc とエンテロキナーゼ液 2 cc. 2 パンクレアチン液 2 cc と水 2 cc. 3 エンテロキナーゼ液 2 cc と水 2 cc. の如く混じ、1 時間放置後これらを酵素液として使用する、反応時間は 60 分で、反応液の組成及び測定法は前述の通りである。

この結果は第 2 表及び第 3 表の如くである。表中のパンクレアチン効力として用いた数字は、

$$\frac{\text{各種製品による吸光度}}{\text{市販品「A」による吸光度}} \times \frac{\text{水 40 cc で抽出した市販品「A」の瓦数}}{\text{水 40 cc で抽出した各種製品の瓦数}} \times 100$$

の如く市販パンクレアチン「A」製品の効力を便宜上 100 として、各種製品の効力を比較した。

第 2 表

種々の方法でつくつたパンクレアチン製品 (前述)

No.	パンクレアチンのみ (X)	パンクレアチンと エンテロキナーゼ (Y)	Y/X
1	117	191	1.63
2	380	278	0.73
3	106	59	0.55
4	837	753	0.90
5	208	229	1.10
6	35	59	1.68
7	67	195	2.84

第 3 表

市販の局方パンクレアチン製品

製品の種類	パンクレアチンのみ (X)	パンクレアチンと エンテロキナーゼ (Y)	Y/X
A	100	70	0.70
B	135	104	0.77
C	92	109	1.18
D	55	48	0.87
E	467	333	0.71
F	256	262	1.02
G	231	179	0.77

表中の Y/X の値が 1 以上のものはエンテロキナーゼにより活性化されたものであるし、1 以下のものはエンテロキナーゼにより阻害されたものである。

第 2 表から分ることは、

1. No. 5, No. 6 及び No. 7 の如く迅速にアセトン、エーテルで脱脂乾燥したものではエンテロキナーゼにより活性化される。

2. No. 6 及び No. 7 の如くパンクレアチンのみでは局方以下の効力のものでも、エンテロキナーゼでかなり活性化されることがある。

3. No. 3 及び No. 4 の如く一度水で抽出したものとか, No. 2 の如く乾燥に日時を要したものではエンテロキナーゼで活性化がおこらない。然し No. 1 の如く日光乾燥を行つてもそれが手早くなされればエンテロキナーゼで活性化される。

又第 3 表からは市販品ではエンテロキナーゼ添加によりほとんど賦活がなされない。

第 2 表及び第 3 表を通じて, エンテロキナーゼで活性化されない製品はかえつて阻害されている。これは一寸不思議な現象であるが, その原因については現在のところ不明である。

結 論

本実験においては, 先づエンテロキナーゼによるパンクレアチンの活性化に対する実験方法を定め, これを各種のパンクレアチン製品に対して適用してみた。注意し且つ迅速に処理した製品ではあきらかにその 1 部はトリプシノーゲンの形で存在し, エンテロキナーゼによりかなりの活性化がみられた。多くの市販の局方パンクレアチンでは, ほとんどトリプシノーゲンはトリプシンに変化しているから, 局方試験にエンテロキナーゼ添加を考慮することは, 現在は不必要であるが将来問題となることが予想される。

文 献

- 1) Anson, M.L., J. Gen. Physiol. 22, 74 (1938)
- 2) Folin, O. and Ciocalteu, V., J. Biol. Chem. 73, 627 (1927)

On Activation of Pancreatin by Enterokinase

By Tsutomu YAMAHA and Masato ASAHINA

Trypsinogen contained in various kinds of pancreatin preparation was determined.

- 1) The hydrolysis of casein by pancreatin was tested according to Anson's method.
- 2) An active enterokinase and some kinds of pancreatin containing trypsinogen were prepared and the experimental method on activation of pancreatin by enterokinase was established.
- 3) Testing various preparations, some of them rapidly dried with acetone were activated, while others extracted with water or taken too much time for treatment and most of pancreatins for sale were not.
- 4) From the result of this study, it seems to be unnecessary to activate pancreatin by enterokinase previously in the assay in J.P.

ビ タ ミ ン C の 螢 光 反 応

第1報 定性反応としての価値に就て

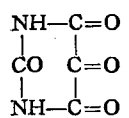
小 川 俊 太 郎

Fluorescent Reaction of Vitamin C.

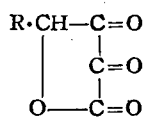
Part 1. On the Specificity and Sensitivity.

By Shuntarō OGAWA

緒 言 在来ビタミン C (L-アスコルビン酸, 以後 AA と略記する) の定性定量反応として挙げられたものは殆んど本品が持つ "Endiol" 構造に基く還元力を利用しているため特異性に欠ける憾みがあつたので, Roe,¹⁾ Zilva²⁾ は AA の第一階酸化成績体である Dehydro-l-Ascorbic acid (以後 DAA と略記する) が次に示すように相隣れる 3 個のカルボニル基を含む特有な分子構造を有する事実に着目し, Dinitrophenylhydrazone として定性定量する方法を案出した。



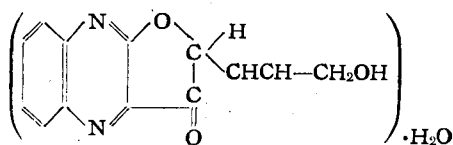
Alloxane



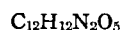
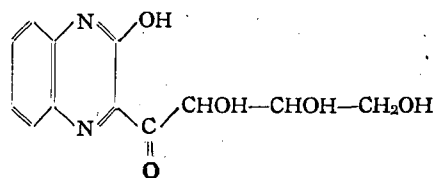
Dehydro-l-Ascorbic acid



DAA のカルボニル基の反応に関しては上記の他に Ohle,³⁾ Weidenhagen⁴⁾ 等の報告があり, Ohle³⁾ は彼の報文中に於て DAA が当量の O-Phenylendiamine (以後 OPD と略記する) と中性水溶液中で Quinoxaline 体に縮合することを認めているが, その構造を単に次の如くであろうと記したのみで成績体の性質, 構造等に就ての詳細な記載はしなかつた。



又は



然るに, Quinoxaline 構造は, 水溶液が著明な螢光を発する Flavine 化合物の中核をなし, また Kuhn⁵⁾ によれば, 2,3-Dioxyquinoxaline の稀アルカリ性溶液は青色螢光を発するというのであるから, 上記 Ohle の得た物質の水溶液には螢光を期待することができよう。

そこで, 著者等は AA の水溶液に OPD 液を加え, 室温, 暗所に 1 時間放置したところ液は紫外線下に鮮明な紫藍色の螢光を発し, 液中の AA をヨウ素またわ 2,6-Dichlorophenolindophenol で酸化すれば短時間内に遙かに強烈な螢光を生ずる事実を認めた。

この予試験により, AA は常温で OPD と作用し螢光物質を生ずるがその反応の本体は AA の第一階酸化成績体である DAA と OPD の間に起るものと予想された。かつて Archibald⁶⁾ が生体試料中の Alloxane を OPD と縮合させ Flavine 体として比螢光的に定量的方法を發表した際共存する AA が青色螢光を発する旨記載しているが, これも恐らく著者等の場合と同一の機序による螢光反応であろうと想像される。

元來、DAA は Alloxane と似た構造部分を有し、生理的には白鼠に Alloxane 糖尿に類した症状をおこし、^{10,11,12} 化学的には Pyrrole に対して両者相似た呈色反応を行う^{13,14} など様々な共通点が見出されるのであるが、OPD との縮合反応に於ても Alloxane が蛍光性の Flavine 体を生じ、DAA もまた青色蛍光物質を生ずる点はすこぶる興味ある現象といわねばならぬ。また、蛍光反応は呈色反応などに比し甚だ鋭敏であるから、もし著者等の蛍光反応が真に DAA (言換えれば AA) に特異的であれば、ここに従来の反応と全く違った原理に基づく定性定量試験法を発見できるかも知れない。

かような希望の下に調査した結果著者等は少くとも本反応が定性反応として高度の特異性を有することを確かめたので第1報としてその経過を報告したいと思う。

試薬 1. 6% メタ燐酸・酢酸液 メタ燐酸 15g を氷酢酸 40 cc 及び水 200 cc によく振りまぜながら溶かし、水で 250 cc とし速やかに摺付濾紙で共栓ビン中に濾過する。冷所に貯え 1 週間経てに作る。

2. 抽出溶剤(註1) 試薬(1) 及び水の等容量混和液で用時作る。

3. N/100 ヨウ素液(註2) AA を酸化し DAA とするために使う。

4. N/100 チオ硫酸ナトリウム液 過剰のヨウ素を除くために使う。

5. OPD 液 純 OPD 10 mg を N/500 硫酸 100 cc に溶かし冷所に遮光して貯える。貯蔵中次第に黄褐変し紫外線下で類黄褐色の蛍光を発するようになったものは使えない。

6. アルカリ液(註3) N/10 水酸化ナトリウム液 3 容量と M/20 ホウ砂液 2 容量との混和液で比蛍光液の pH を 3~4 に一定するために使う。

定性反応の操作 1. 試料を抽出溶剤で抽出し、その 1 cc 中に AA 約 10 γ を含む検液を作る。

2. 検液 1 cc を無蛍光試験管にとり、N/100 ヨウ素液 0.2 cc、N/100 チオ硫酸ナトリウム液 0.2 cc、OPD 液 1 cc 及びアルカリ液 2 cc を順次に加え、添加の都度混和する。

3. 暗所に 10~20 min 放置後紫外線を照射して蛍光の有無と色調とを見る。検液中に AA が存在すれば強烈な紫藍色の蛍光が認められる。(註4)

註1 抽出溶剤には 3~10% メタ燐酸、0.5~2% 酢酸等と共に、本実験に採用したメタ燐酸・酢酸混液が重用されるが、上記のどの酸を使つてもこの反応は起る。

註2 還元性物質が特に多量共存しない限り上記の量で足りるが、一般にヨウ素液は検液が極微に黄色を呈するまで加えればよい。

註3 リボフラビンの水溶液が現わす蛍光の強度は pH により著しい変化を示すが、¹⁵ DAA による蛍光はそれ程影響されぬ。然し pH が 1 以下になると白色を帯び、また 11 を超えれば紫色となりいずれも不安定さを増し、中性近傍でも充分安定といえない。今までのところではこの操作のようにしたものが色及び安定性共最も望ましかった。

註4 Iso-Ascorbic acid (Iso-Vitamin C, d-arabo-Ascorbic acid) は AA と全く同じに反応し、蛍光の色、強度その他すべての点で AA と区別がつかない。また試料中に DAA が始めから存在するときにも AA があつた場合と同じ結果を生む。

確認限度 検液の AA 濃度が 1 γ /cc あれば反応は陽性である。低濃度の場合には液は無色で、チオクロムに似た紫藍色の蛍光を発するが、高濃度になると液が類黄色をおび、紫外線に最初に接する試験管の最外側の液が強烈な碧青色の蛍光を発するのみで液の中心部は光らなくなる。これは紫外線が外側の液層を透過する間に吸収されてしまうためかと推察する。Feigl¹⁶ に従つて表示すれば Erfassungs Grenze が 0.05 γ 、Grenz Konzentration は 1:1,000,000 である。

特異性 次表の諸物質に就て本反応を行い、蛍光の有無を調べて次記の成績を得た。被検溶液の濃度はその物質が天然に AA と共存するときの濃度比とその物質の溶解度を考慮して定めた。(第1表)

第 1 表

分 類	濃 度 (mg/cc)	陽 性	陰 性
A. 含水炭素類	250	Mannose (5 mg/cc で陰性)	Dextrin Fructose Galactose Gluconic acid Glucosamine Glucose Glucuronic acid Glycogen Lactose Maltose Mannitol Sorbitol Xylose Inositol
B. アミノ酸	1.0	Tryptophane (100 γ/cc で陰性)	α-Alanine l-Arginine l-Asparagic acid ○l-Cysteine l-Cystine l-Glutamic acid ○Glutathione Glycine l-Histidine l-Isoleucine l-Leucine l-Lysine l-Methionine l-Phenylalanine dl-Threonine l-Tyrosine dl-Valine
C. アルコール アルデヒド ケトン等 酸	1.0	Pyruvic acid (紫藍) α-Ketoglutaric acid (紫藍) 2-Keto-l-Gulonic acid (紫藍) ○2, 3-Diketo-l-Gulonic acid (紫藍) ○Glucoreductone (紫藍) ○Reductic acid (紫藍) ○Iso-Ascorbic acid (紫藍)	*Acetaldehyde Acetic acid Acetoacetic ester Acetone Acetylacetone Alcohol ※Benzaldehyde Benzoic acid Benzylalcohol Chloretone *Cinnamic acid Diacetyl Formic acid Fumaric acid Glycerol Glycol Lactic acid Maleic acid Malic acid ※Malonic acid Methanol Oxalic acid Oxaloacetic acid Phthalic anhydride ※Salicylic acid Succinic acid Tartaric acid Nicotinic acid Pantothenic acid
D. 有機化合物	1.0	Adrenaline (緑) Alloxane (黄緑) Benzoquinone (褐) (100 γ/cc で陰性) B ₂ (自体黄緑)	Barbital Caffeine Creatine Creatinine 2, 4-Dinitrophenylhydrazine ○Hydroquinone Ninhydrine Phenobarbital Phenol Phloroglucinol ○Pyrogallol Santonine ○Tannic acid Thiourea Uracil Urea Xanthine B ₁ B ₂ Nicotiamide p-Aminobenzoic acid K ₃ K ₅
E. 無機物			○FeSO ₄ ○Na ₂ S ○Na ₂ S ₂ O ₃ ○Na ₂ S ₂ O ₄ SnCl ₂ NaHSO ₃

○印を付した物質はインドフェノールによる酸化還元定量またワジニトロフェニルヒドラジンによる比色定量を妨害するもの。

* 印を付した物質は 100 γ /cc で陰性であるが 1 mg/cc ではアルカリ液のみで青緑色の蛍光を発する。

※印を付した物質は * と同様に 100 γ /cc で陰性であるが 1 mg/cc では紫藍色の蛍光を出す。

C 類中反応陽性のものの蛍光強度を同濃度の AA の蛍光強度と比べると大体次の如くである。

AA	1.0
Iso-AA	1.0
α -Ketoglutaric acid	3/4
Pyruvic acid	1/6
Glucoreductone	1/12
Reductic acid	1/50
2-Keto-l-gulonic acid	1/150
2,3-Diketo-l-gulonic acid	1/150

蛍光物質の一、二の性質 1. AA から生じた蛍光物質を反応液中より有機溶剤に転溶する試みは如何なる液性、塩類による塩析を試みたにも拘らず不成功に終つた。この際ブタノール、イソブタノール、酢酸エチルには一部分転溶したが、エーテル、ベンゼン、クロロホルム等には全然溶解しない。この点で本物質はチオクロムよりむしろリボフラビンに似ている。

2. 蛍光液にヒドロサルファイトの少量を投ずると蛍光は一旦消滅し、液をふりまぜると漸次再現する。但し、酸性なので微細な析出硫黄のためやや見にくい。この現象は程度こそ異なるが第1表中の C 類で反応陽性の物質ならばどれに就いても認められるから、恐らく Quinoxaline 核の 1 及び 4 位の N 原子の所で可逆的酸化還元が起るためと想像され、これまたリボフラビンと似た性質といえよう。

永久蛍光液の考案 AA 約 10 γ をその中 1 cc に含む検液の発する蛍光は等容量中に精製硫酸キニーネ 10 mg を N/10 硫酸 10 l に溶かし液 2 容量と塩酸ハルミン Harmin hydrochloride の 0.1 mg % 水溶液 3 容量を混和した液 0.12 cc を含む液が発する蛍光とは等しくかつた。

総括 1. 著者等は AA より定量的に生ずる DAA に常温の下で OPD を縮合させ、縮合体が水溶液中で発する蛍光を以て AA の微量を検出する特異的定性試験法を見出した。

2. 本法の操作は極めて簡単である。

3. 本法は従来の酸化還元反応を著しく妨げるシステイン、グルタチオン及び還元性無機塩に全然感じない。

4. 本法は従来のヒドラゾン法^{1)~4)}に感ずる α -ケト酸、^{17)~20)} Glucoreductone, Reductic acid またわ 2,3-Diketo-l-Gulonic acid 等には反応するが、 α -ケトグルタル酸を除けば、AA に比し 1/10~1/100 強度の蛍光しか発しない。

5. 本法は従来の定性反応中最も特異性に富み、現米国薬局方及び日本薬局方にビタミン C の確認反応として使われている Tipson の Pyrrole Test¹⁴⁾ に比べて、特異性に於て劣らず、鋭敏度に於ては 100 倍している。

終りに臨み御懇切な御指導を賜つた高木誠司先生並びに秋谷七郎先生に謹んで謝意を表し、実験に協力された平岡栄一技官及び南原精一助手並びに資料を分与せられた武田薬工及び東京田辺製薬両社に感謝する。研究費の一部は文部省科学研究費より仰いだ。(昭和27年3月)

文 献

- 1) Roe, J. H.: J. Biol. Chem. **152**, 511 (1944).
- 2) Roe, J. H.: ibid. **174**, 201 (1948).
- 3) Zilva, S. S.: Biochem. J. **37**, 39 (1943).
- 4) Zilva, S. S.: ibid. **37**, 403 (1943).
- 5) Ohle, H.: Ber. **67**, 555 (1934).
- 6) Weidenhagen, R.: ibid. **72**, 2010 (1939).

- 7) Kuhn, R.: *ibid.* **67**, 898 (1934).
- 8) Archibald, R. M.: *J. Biol. Chem.* **158**, 347 (1945).
- 9) Karrer, P.: *Helv.* **28**, 1529 (1945).
- 10) Patterson, J. W.: *J. Biol. Chem.* **183**, 81 (1950).
- 11) Patterson, J. W.: *Endocrinol.* **45**, 344 (1949).
- 12) Banerjee, S.: *Science.* **106**, 128 (1947).
- 13) Tipson, R. S.: *Arch. Biochem.* **8**, 1 (1945).
- 14) Tipson, R. S.: *J. Am. Pharm. Assoc.* **34**, 190 (1945).
- 15) Kuhn, R.: *Ber.* **67**, 888 (1934).
- 16) Feigl, F.: *Qualitative Analyse mit Hilfe von Tüpfelreaktionen.* **4** (1938).
- 17) Penrose, L.: *Biochem. J.* **31**, 266 (1937).
- 18) Sealock, R. R.: *J. Biol. Chem.* **140** Proc. CXIV.
- 19) Sealock, R. R.: *ibid.* **135**, 251 (1940).
- 20) Lu, G. D.: *Biochem. J.* **33**, 249 (1939).

Fluorescent Reaction of Vitamin C.

Part 1. On the Specificity and Sensitivity.

By Shuntarō OGAWA

Oxidized Ascorbic acid solution (viz. Dehydroascorbic acid solution) coupled with *o*-Phenylendiamine, shows a marked blue fluorescence under ultraviolet light and 1 γ of Ascorbic acid per cc of the test solution can be detected easily.

Many compounds such as alcohols, aldehydes, ketones, acids, carbohydrates, aminoacids, vitamins, or inorganic substances do not react, and the influence of Reductic acid, Glucoreductone, Glutathione, Cysteine or 2,3-Diketo-1-gulonic acid, which causes serious errors in redox-titration or dinitrophenylhydrazine formation, can be avoided almost completely.

This reaction, which is far superior to Tipson's Pyrrole-test, in its specificity and sensitivity, renders a new and promising identification test for Ascorbic acid.

発熱療法剤 (細菌性発熱物質) の創製並に臨床応用に関する研究

(1) Shwartzman 有効因子と細菌性発熱物質の作用本態について

八 田 貞 義 青 山 好 作 丹 治 國 枝
中 島 富 子 小 沢 茂 子

Studies on the Fever Treatment with Bacterial Pyrogenic Substances.

(1) On the Correlation of Active Factors of Shwartzman Phenomenon and Bacterial Pyrogenic Substances.

By Sadayoshi HATTA, Kosaku AOYAMA, Sonoe TANJI,
Tomiko NAKAJIMA and Shigeko OZAWA

ま え が き

生体発熱の原因は血流中を循環する Pyrotoxin によるとの Centanni の考えは Robinson¹⁻⁴⁾ 一派が菌体成分或は菌代謝物を化学的に分割し、発熱性物質の精製に成功してこれを証明したが、それよりこれは発熱性物質 Pyrogen substance と名付けられその作用本態の究明が汎く系統的に試みられるに至つた。

発熱性物質を化学的に精製しての報告は主として Robinson, Rodney,⁵⁾ McGinty,⁶⁾ 八田,⁷⁻¹³⁾ Nasset¹⁴⁾ 等によつてなされてきたが、この成績を総合すると発熱性物質は生化学的には non protein, non toxic, non anaphylactogenic な多糖体に属し、熱・酸・アルカリ及び光線等の環境下にもよく耐え、化学的にはかなり安定した物質といふことができる。一方生理学的には温熱神経系の刺激により惹起される一過性の体温の昇降所謂発熱と、これとほぼ並行してみられる血液像特に(ときに Leucocytose を招く)白血球像の著明な質的量的変化(血球、血清等には何等の障害を与えない)であるが、家兎ではこの発熱性が頻回にわたると網内皮系の異物処理能力は昂進して発熱不感性を生じ、また細菌免疫学的には類属免疫血清と非特異反応を示すので haptin と解せられている。この発熱性物質は人体に用いたところ比較的毒性及び副作用の少いことが Lonsen, Liebert¹⁵⁾ によつて確認され、更に Irvine¹⁶⁾ により Malignant hypertension に対し発熱療法を試みて成功するに及んで一層活潑に検討されようとしている。著者らは発熱性物質を臨床応用するに先立ち、2, 3 の基礎的考察を加えつつあるうち、この細菌性発熱物質が時に Shwartzman 性をも具備するとの新知見を得るに至つたので、こゝでは主として Shwartzman 性の有効因子と発熱性物質の作用本態との関係を検討した成績について述べる。

実験に使つた菌の栄養代謝と生理作用

実験に使つた菌は藤沢薬品工業研究部から分与された大腸菌 2 株 (Coli communis, 以下 C.S と略す。Coli communior 以下 C.R と略す) と当教室保存の腸チフス菌 1 株 (S. typhi. S. 58 以下 S と略す) である。供試菌はこれを精製するに先立つて単一分離菌の栄養代謝と生理作用について精査し S 型菌の撰択に努めた。即ち各菌株ごとに液体培地に培養 (37°, 24 時間) 後、寒天平板法で多数の単一コロニーを分離して純培養した。これを別表に示す液体或は固形培地に移植して 37° で 48 時間培養し液体培地ではこれを Seitz 濾過器で濾過除菌した。固形培地のときは (Roux のフラスコを用いた) 培養菌を生理食塩液 10 cc に浮遊させてよくふりまぜた後これを Seitz 濾過器で濾過除菌して濾液を得た。液体合成培地の培養濾液は Shwartzman 試験 (以下 Sh 試験と略す) を行う一方、発熱性物質試験をも併せて行つた。他の培地では Sh 試験だけを実施した。

培 地 処 方

a. 合 成 培 地

第一磷酸カリウム	5.0 g	塩化アンモニウム	0.5 g	硫酸アンモニウム	0.5 g
硫酸マグネシウム	0.001 g	硫 酸 鉄	0.001 g	蒸 留 水	1000 cc

pH 7.4

b. 半合成培地

第二磷酸ナトリウム	2.5 g	第一磷酸カリウム	0.35 g	トリプトファン	0.02 g
シスチン	0.05 g	ブドウ糖	1.0 g	カゼイン	1.0 g
ニコチン酸	10 ⁻⁴ モル	ビタミン B ₁	10 ⁻⁴ モル	(元の量として)	
					蒸留水 1000 cc
					pH 7.2

c. 合成寒天培地

第一磷酸カリウム	5.0 g	塩化アンモニウム	0.5 g	硫酸アンモニウム	0.5 g
硫酸マグネシウム	0.001 g	硫酸鉄	0.001 g	寒天	30.0 g
蒸留水	1000 cc	pH 7.4			

d. ブイヨン

肉エキス	10.0 g	ポリペプトン	10.0 g
食塩	3.0 g	蒸留水	1000 cc
pH 7.4			

Sh 試験法は家兎を用い、予め毛をきり消毒した腹部に Seitz 濾過液 0.2 cc 量ずつを皮内注射し(準備因子)、ついで惹起因子として精製物質 N (この詳細については後述する) 1 mg を尿管内注射し、注射後 1, 3, 5 及び 24 時間の4回にわたり判定を行つた。このとき反応が IV 度に現われたものはこの表面積をプランメーターで計測した。

発熱試験は日本薬局方 VI に大約準じたが、この注射量は Seitz 濾過液を 5 cc/kg とした。試験の結果同一菌株中にもかなりその生理作用強度を異にするものの存在することを実証した。即ち C.S と C.R とでは、C.S において一般に作用は強く現われ、同一菌株中の個々のコロニーの間にも作用度の差異がみられた。即ち単一コロニーを発熱性物質試験で検査すると C.S 株では 10 コロニー中発熱疑陽性が 2 例、実験中致死 1 例、発熱陽性は 7 例であつた。C.R 株は 9 コロニー中発熱陰性が 4 例、発熱疑陽性が 3 例、発熱陽性が 2 例であつた。

Sh 反応は両菌株共に合成培地(液体)では全く認められなかつたが、ブイヨン培地では菌株により明瞭に Sh 反応は認められ、その反応は前者よりも後者に発育させた場合に強く現われた。しかし合成寒天培地とブイヨン培地とでは反応に幾分の差異がみられた。(培地基体では反応は全く陰性である。)

Sh 反応と Pyrogen 性とを比べると、C.S では大部分のコロニーに Sh 性と発熱性とを具備するのがみられたが、C.R では約半数が Sh 性と発熱性とは平行したが、他の半数は Sh 性を有しても発熱性は認められなかつた。そこでこのような生理作用が異なる同一菌株の個々のコロニーについて、その発育時の菌代謝を菌の性状別に糖分解を中心に精査したが、全く同一性状及び糖分解能を示しこの実験からはその特性を識別するに足る根拠を見出すことはできなかつた。そこでこの濾液実験を基にしてなるべく Sh 性と発熱性とを良好に具えた菌株 (C.S では No. 6, C.R では No. 3) を選び以後の試験に用いた。

第1表 供試菌株コロニーの Shwartzman 反応と発熱性

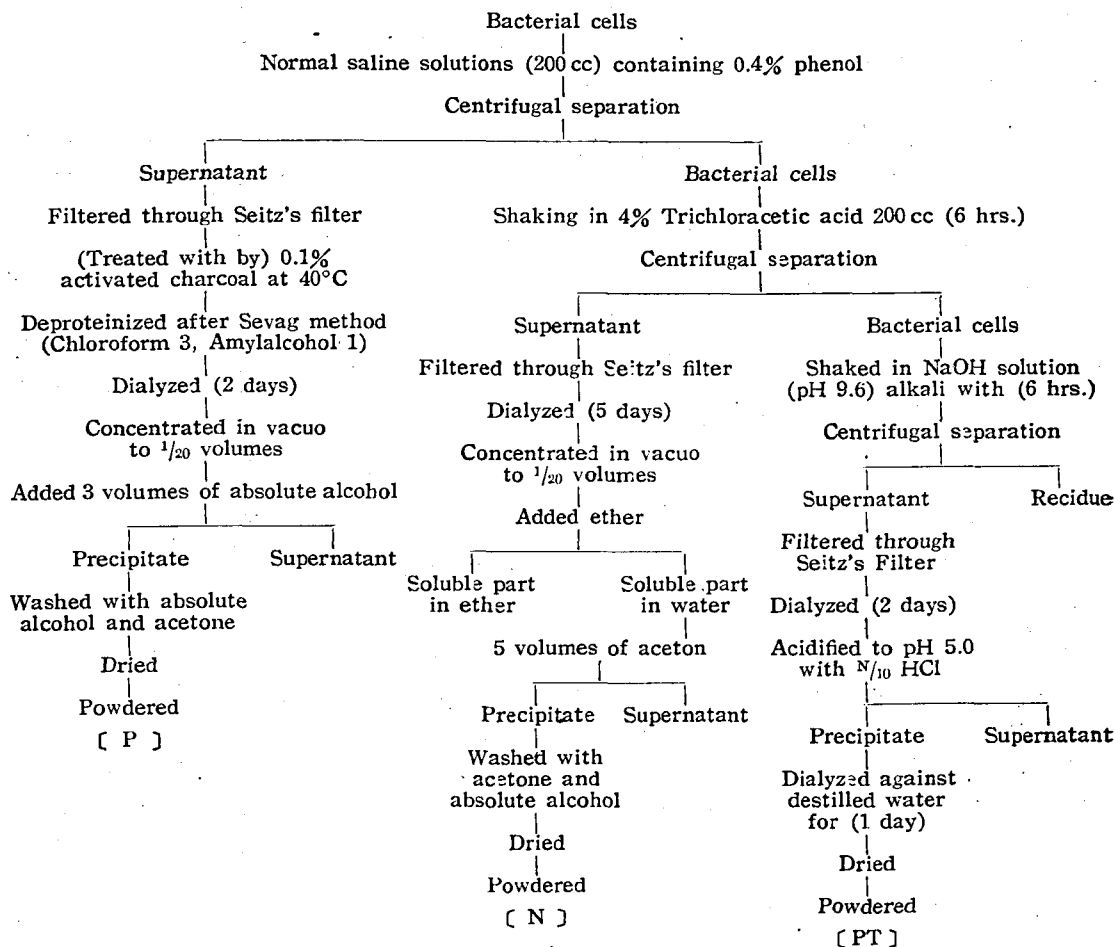
菌株	C.R					C.S				
	合成培地		半合成培地	ブイヨン		合成培地		半合成培地	ブイヨン	
	P	S	S	S	S	P	S	S	S	S
1	+0.7	0	0	IV 2.0	0	+1.2	0	II	IV 1.1	IV 4.0
2	+0.2	0	III	IV 1.7	IV 0.8	+0.6	0	II	IV 1.4	IV 1.2
3	+1.2	0	0	IV 1.8	IV 0.9	+1.1	0	0	IV 0.9	IV 3.0
4	+0.1	0	0	IV 2.2	IV 1.1	+0.6	0	0	IV 1.4	IV 3.2
5	+0.7	0	0	IV 1.7	II	+1.2	0	III	IV 2.3	IV 1.7
6	+0.4	0	III	IV 2.0	II	+1.5	0	III	IV 2.1	IV 2.7
7	+0.7	0	II	III 1.1	IV 1.2	+1.8	0	II	IV 2.2	IV 2.0
8	+0.4	0	II	III 0.6	I	死	0	0	IV 2.0	IV 2.7
9	+1.0	0	II	III 0.6	III	+2.1	0	II	III	IV 3.9
10	+0.3	0	II	0	0	+1.4	0	II	IV 1.6	IV 2.8
対照	培地	+0.2	0	0	0	+0.2	0	0	0	0
	C.S(N)		IV 2.3	IV 1.4	IV 6.7			IV 5.2	IV 5.9	IV 3.0

註 P: 発熱性物質試験 S: Shwartzman 反応成績

精製法及び理化学的性状

発熱性物質の精製法についての報告は少く Robinson は石炭酸処置法により, Nesset 等¹⁹⁾ は蛋白質を含まない発熱性因子を得る方法として蛋白除去をトリプシン消化による方法, Sevag 法による方法, 95% 石炭酸を用いる方法について検討し, トリプシン消化による方法が最も良結果が得られたと述べている。著者は菌体成分の作用因子を単に複合多糖体にだけ求めることなく、菌体蛋白についても実験を進め考察を加えたので、精製法も振盪抽出法を主体に行うこととした。即ち普通寒天培地で 37°, 48 時間培養し精密に雑菌混入のないことを確め、ついで培地をかき取らぬよう注意して菌体を掻集め湿菌量約 20 g を得た。この湿菌量に 0.4% 石炭酸加生理食塩液 200 cc を加え、約 30 分間ふりまぜ (1 分間 150~170 回振盪, 振幅 5 cm) た後遠心分離により菌体を沈澱させ、更に Seitz 濾過器で除菌した。この濾過液を塩酸で pH 5.8 に修正し、これに 0.1% に予め精製した活性炭を加え 40° の温浴上で加温吸着により培養基成分を除去、ついで直ちに Sevag 法により除蛋白 (寒天も除去される) を数回繰返した後セロファン膜に包み流水中で 2 日間透析する。この透析液を $1/10$ 量に減圧濃縮し 3 倍量の無水アルコールを加え、沈澱を集めこれを再溶して操作を反覆後アセトン洗滌を行つた。これを真空乾燥によつて 50 mg の P 物質を得た。次にさきに遠心分離により得た菌体 (鏡検により菌体は大体原型を保つていた) を 4% トリクロル酢酸 200 cc で 6~8 時間ふりまぜた後遠心分離及び Seitz 濾過による菌体除去を行い、5 日間流水に対して透析する。これを $1/10$ 容に減圧濃縮後等量のエーテルを加えて充分ふりまぜ、エーテルを分液し、リポイド性分劃を除去しこれに 3 倍量にアセトンを加え沈澱させアセトン洗浄後真空乾燥し、物質 60 mg を得た、これを N とした。

Table 2 Purifying method of pyrogenic substances.



菌体蛋白の精製は 0.4% 石炭酸加生理食塩液及びトリクロル酢酸で多糖類を除去したものについて試みた。まず菌体を蒸留水 200 cc にとり、これを 2.5 N 水酸化ナトリウム液で pH 9.6 とし 6~8 時間ふりまぜた後遠心分離により菌体を除去、セロファン膜で 2 日間透析する。この間液性は pH 6.0 附近を示し若干の析出物を認める。これを Seitz 濾過し濾液を N/10 塩酸で pH 5.0 を終末液性とした沈澱を反覆させ、この沈澱をセロファン膜に包み蒸留水に一応透析し浸透乾燥して物質約 1 g を得た、これを P.T とした (S. typhi は P と N の精製に止め P.T は除いた。)

以上の方法により得た 6 種の物質の理化学的性状をみると C.S, C.R, S 共に同一操作により得られた物質は大体類似した定性反応がみられ P 及び N (第 3 表参照) では蛋白反応はビュレット反応、ニンヒドリン反応、Xantho-protein 反応、Millon 反応、Lieberman 反応、T.B.P 反応の呈色反応及びタンニン酸、トリクロル酢酸、100° 15 分加熱等の沈澱反応はいずれも陰性であるが、多糖類を検出する Molisch 反応が陽性、Fehling 反応も塩酸による水解後はいずれも陽性である。なお紫外線 (波長 3600 Å) 照射による螢光反応はいずれも強陽性で、硫酸による水解操作はその前と後とは色調が幾分異つた。一方 PT は糖反応は陰性で蛋白反応もニンヒドリン反応を除くすべての反応が陽性の成績を示した。また紫外線照射による螢光も硫酸処置により蛋白特有の黄金色を呈した。従つて上の定性試験成績から P 及び N に属するものは多糖体性物質で、PT に属するものは蛋白様物質と考えられる。

第3表 理 化 学 的 性 状

				C.S.			C.R.			S.	
				P.	N.	P.T.	P.	N.	P.T.	P.	N.
定性反応	呈色反応	ビュレット	水解前後	—	—	卅	—	—	卅	—	—
		テトラブロムフェノール	—	—	卅	—	—	卅	—	—	
		フタレイントロテイン	—	—	卅	—	—	卅	—	—	
		キサントプロテイン	—	—	卅	—	—	卅	—	—	
		ミリーベロマン	—	—	卅	—	—	卅	—	—	
	沈澱反応	10% トリクロル酢酸	—	—	卅	—	—	卅	—	—	
		中 性 100° 15' 加	—	—	卅	—	—	卅	—	—	
	フェーリング		水解前後	—	—	—	—	—	—	—	
			水	卅	卅	—	卅	卅	—	卅	
	モリツシン		ユ酸	卅	卅	—	卅	卅	—	卅	
螢光試験		水解前後	青白	青緑	濃青白	青白	青緑	濃青白	青白	青白	
pH			6.0	7.1		6.1	7.3		6.4	6.6	

註 測定濃度は 0.5% とした。

精製物質の Sh 活性と発熱性

精製物質の生物学的性状特に生理作用を Sh 性と発熱性とに分けて調べ作用本態の一端を窺うこととした。

1. Sh 活性 Sh 因子の本態については Schwartzman, Morell¹⁷⁻¹⁸⁾ は腸チフス菌を硫酸アンモニウムで割分したところビュレット反応、Molisch 反応共に陽性で窒素量は 8~12%, 水解により還元糖 10.4% を定量できたといひ Olitski, Leibowitz¹⁹⁾ もこれを支持したが Apitz²⁰⁻²¹⁾ はパラチフス B 菌をアルカリ性アルコール溶液により、Andervont²²⁾ は大腸菌培養濾液を磷酸カルシウム吸着アルコール沈澱法により精製したところ Sh 活性は核蛋白よりも炭水化物に強く認められたといっている。その後岡本²³⁻²⁵⁾ はコレラ菌毒素を山下²⁶⁻²⁹⁾ は大腸菌毒素について、武田・渡辺³⁰⁻³²⁾ は大腸菌、チフス菌、赤痢菌(大野)等について本態の究明を試みたがそれらの成績を要約すると、Sh 毒性は菌体蛋白にもみられるが多糖体のそれに比較すると毒性は少く、Sh 毒性の主因子は多糖体にあると

いえる。武田³²⁻³⁵⁾は多糖体を更に酸分解し、無毒の多糖体と、無晶型の X 物質とに分け、後者には毒性及び Sh 活性はみられたが、菌体から分離した核蛋白には毒性はあるが Sh 活性は認められないと注目すべき報告をしている。そこで著者は以上を考慮しながら多糖体及び蛋白質の Sh 活性について調べた。実験方法はすでに詳記したので省略するが、この Sh 現象はときに Sh 性を有するにもかかわらず作用がみられないことが再三あり、この主因を家兎の個体差、感受性の問題に帰着させていたが、これは主な原因の一部が惹起因子 (Reacting-factor, 以下 R.F と略す) にも基因していることを知った。実験には予め準備能ある N を対照としておきこれと実験値との比較を行ったが各精製物質の R.F は常に同種のものを用いたが更に R.F を他種のものに求めて交叉惹起を行った。これによると Sh 活性作用は惹起方法によつても左右され Preparatory-factor (準備因子以下 P.F と略す) を C.S の N とし R.F を同じ C.S の N とし相互関係をみると R.F が 2mg のときは P.F は 0.78 γ , 1.5mg では 1.55 γ , 1.2mg では 3.12 γ 1.0mg では 2.5 γ と惹起量に反比例し、Sh 活性の反応度も準備量が 200 γ の量るときその発現の面積が量に比例して拡大或は縮小するのがみられた。しかし P.T を P.F とし多糖体 (C.S の N) で惹起するとその惹起量が 1.5mg 以上のときに家兎はいずれも注射後過敏症となり痙攣並びに脳症状を呈しながら 2 時間前後で急性死した。この斃死した家兎を解剖して肉眼的に観察したところ肝臓に著しい点状出血斑を (2 頭共に) 認めたほかは他の臓器には著変を認めなかつた。なお一定の P.F の惹起を同種のもので行つた場合と異種のもので試みた場合とは両者共に大体同程度の稀釈度まで Sh 活性は陽性となつた。これは一つに R.F の惹起能力の如何に影響される。ところが大きく、強力な惹起力を有する fraction では同種は勿論他種のものでほぼ同程度に発現した。そこで成績の比較を試みる上から Sh 活性の惹起は便宜上 C.S の N を用いて行つた。そこで精製物質の Sh 性を P と N と P.T を比較してみると同じ多糖体でも N が最も Sh 活性強く C.S の N では 0.8 γ でも確実に発現した。C.R の N は 3 γ 前後、S の N は 0.8 γ で反応陽性であつた。一方菌体蛋白は 200 γ (C.S) 或は 50 γ (C.R) で反応陽性となりその作用は N に比較すると幾分弱い明瞭に準備能力を示した。

第4表 Shwartzman 反応

発熱性物質	注射量 (γ)	C.S.				C.R.				S.			
		判 定 時 間											
		1	3	5	24	1	3	5	24	1	3	5	24
P	200	I	II	IV	II	I	I	II	II				
	100	0	II	IV	IV	0	0	I	I				
	50	0	I	III	III	0	0	0	0	0	I	II	IV
	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	IV
	12.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6.25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N	200	II	IV	IV	IV	II	IV	IV	IV				
	100	II	IV	IV	IV	II	IV	IV	IV				
	50	II	III	IV	IV	II	IV	IV	IV				
	12.5	II	III	IV	IV	II	IV	IV	IV				
	6.25	I	III	IV	IV	II	IV	IV	IV	I	II	IV	IV
	3.12	I	III	IV	IV	II	III	IV	IV	I	III	IV	IV
	1.55	0	II	IV	IV	0	0	0	0	0	0	I	III
	0.78	0	II	IV	IV	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.39	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P.T	200	0	I	III	III	I	IV	IV	IV				
	100	0	0	0	0	I	II	IV	IV				
	50	0	0	0	0	I	II	III	III				
	25	0	0	0	0	0	0	0	0				
	12.5	0	0	0	0	0	0	0	0				
	6.25	0	0	0	0	0	0	0	0				
	3.12	0	0	0	0	0	0	0	0				

註 惹起因子として、F.C.N を Pro. kg 500~700 γ 静注。

2. 発熱性 上の調分物質について Sh 活性と同じに発熱性についてみた。この方法は日本薬局方に準じて行つたが従来の成績との系統的比較を試みるため便宜上家兎平均体温が注射前より 1° 以上上昇したものを陽性としたの

で断つておく。

精製物質の発熱性も Sh 性と同様蛋白質よりも多糖体においてその作用は強力で発熱陽性は C.S では N は 5%, P は 10%, P.T は 100% である。これに反し S では P は 25% 以上の場合には発熱性は陽性となつたが、N では 100% 以上では発熱性は余りみられず 500% 以上では、むしろ体温は下降しこれより量が増大するとこれにつれてその生理作用は強度に現われ急性死するものが屢々認められた。家兔の発熱曲線⁹⁰⁻⁹⁷は分割により熱型が異り C.S の N (S の N は発熱性はみられない) は最もその作用が強烈で且上昇並に消退が速いである。即ち注射後 30 分~1 時間で最高に達し以後急速に旧に復したが、P では C.S, C.R, S 共に 1.5~2 時間で最高に達し以後減少し、いずれも一過性であつた。

第5表 発熱性物質試験

注射量 (γ /kg)	C.S.							S.			
	C.P.		N.		P.T.			P.		N.	
100					1.7 1.0 1.3	1.3					
75	1.4 1.8 1.5	1.6	1.0 1.1 0.9	1.0	1.0 0.7 0.8	0.8				0.2 1.0 0.1	0.4
50	1.4 1.2 1.6	1.4	1.3 1.2 1.1	1.1	0.6 0.9 1.1	0.9	1.5 1.6 2.0	1.7	0.2 0.5 0.4	0.4	
10	1.0 1.6 1.2	1.3	0.9 1.7 1.5	1.3	0.8 0.2 0.6	0.5	0.8 0.4 0.5	0.6			
5	0.8 0.6 1.0	0.8	1.4 1.1 1.5	1.3							
1	0.4 0 0.2	0.2	0.6 0.8 0.4	0.6							

精製物質に対する理化学的処置並に分解操作とその影響

検体としては実験の都合上 C.S の P と N を中心として系統的に検討を加えた。

1. 酸分解法 検体 100 mg を N/5 酢酸 20 cc に溶かし、還流冷却器を付した沸騰水浴中で 10 時間煮沸する。加熱開始後 1 時間前後から淡白色絮状の物質が析出してくるが、そのまま加熱をつづけ所定時間終了後 1 夜氷室に放置遠心分離して沈澱を得る。

これを精製するために pH 8.0 の弱アルカリ水に溶かし微量の不溶物を遠心分離により除去して分解物質 (I) を得る。その上清に N/10 塩酸を加えて pH 3.8 とし酸不溶性の物質を沈澱させる。

この等電点沈澱による精製を再操作し、沈澱に蒸留水を加え蒸留水の pH が中性になるまで洗い、ついでアセトンで洗った後真空乾燥し、分解物質 (II) を得る。

分解後の上清は流水で 2 日、蒸留水で 1 日透析して内液を 20 cc に減圧濃縮する。これを等量の精製エーテルで 3 回振盪を繰返し、エーテル層は脱水後エーテルを留去してエーテル可溶性物質を得る。エーテル振盪溶出後の液層は P では無水アルコールを、N では精製アセトンを 3 倍量に加えて 1 夜氷室に放置、白色絮状の沈澱を遠心分離する。これを再び蒸留水 15 cc に溶解、それぞれの溶媒で沈澱させ、アセトンで洗った後真空乾燥し、分解物質 (III) を得る。(第 6 表その 1 参照)

2. アルカリ分解法 検体 100 mg を蒸留水 10 cc に溶解する。この溶液をまず氷水中で 0° に冷却しながら、これに 10% 水酸化ナトリウム液 1.2 cc を滴加する。滴加後 5 分以内に予め冷却した無水アルコールを 2 倍量を加し、0° の氷水中に 30 分間放置後白色絮状の沈澱を遠心分離する。これを再び蒸留水 10 cc に溶解させ冷アルカリ性アルコールによる分解を更に 2 回繰返し(計 3 回となる)、沈澱は蒸留水に溶解後(不溶物は遠心分離で除去する) 1 夜透析させ P では無水アルコールを、N ではアセトンを 2 倍量に加えて 1 夜氷室に放置する。

沈澱を遠心分離しアセトンで沈澱後真空乾燥し分解物質 (I') を得る。(I') 分離後の上清は合併して (3 回分量)、酢酸で中和後減圧濃縮し、これを流水中で 2 日、蒸留水で更に 1 日透析する。内液を遠心分離して得た白色絮状沈澱をアセトン沈澱後真空乾燥して分解物質 (II') を得る。

(II') 分離後の上清にアセトンを 2 倍量に加え沈澱物質を得る (第 6 表その 2 参照)。

Added 3 volumes of acetone
↓
Precipitate
↓
Washed with acetone
↓
Dried
↓
Powdered
(III')

Yield (%) of the fractions by
alkaline decomposition.

	I'	II'	III'
P	48.0	2.3	3.3
N	57.0	3.5	12.5

N は酸、アルカリ分解により溶解している部分即ち【III】及び分解物質【III'】はいずれも Sh 性も発熱性もなくなり 200 γ でも陰性成績を示したが、分解操作により沈澱した部分即ち【II】及び分解物質【I'】は Sh 性も発熱性もみられる。しかし発熱性には酸分解によりみるべき低下を示さないが、Sh 性は著しく減弱し 10 γ で認められず 200 γ で 1.6 と測定された。これに反しアルカリ分解では Sh 性も発熱性も殆んど障害されていない。

第7表 劃分分解物質の定性反応

定性反応	検 体	酸 分 解			アルカリ分解				対 照	
		P	N		P		N		N	P
		III	II	III	I'	III'	I'	III'		
モ	リ	+	-	+	+	+	+	-	卅	卅
フ	エ	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ビ	ユ	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ニ	ン	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ミ	ン	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ボ	キ	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ノ	ン	-	-	-	-	-	-	-	-	-
イ	ス	-	-	-	-	-	-	-	-	-
エ	ロ	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ル	コ	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ン	エ	-	-	-	-	-	-	-	-	-
タ	ン	-	+	-	-	-	-	-	-	-

第8表 酸分解及びアルカリ分解

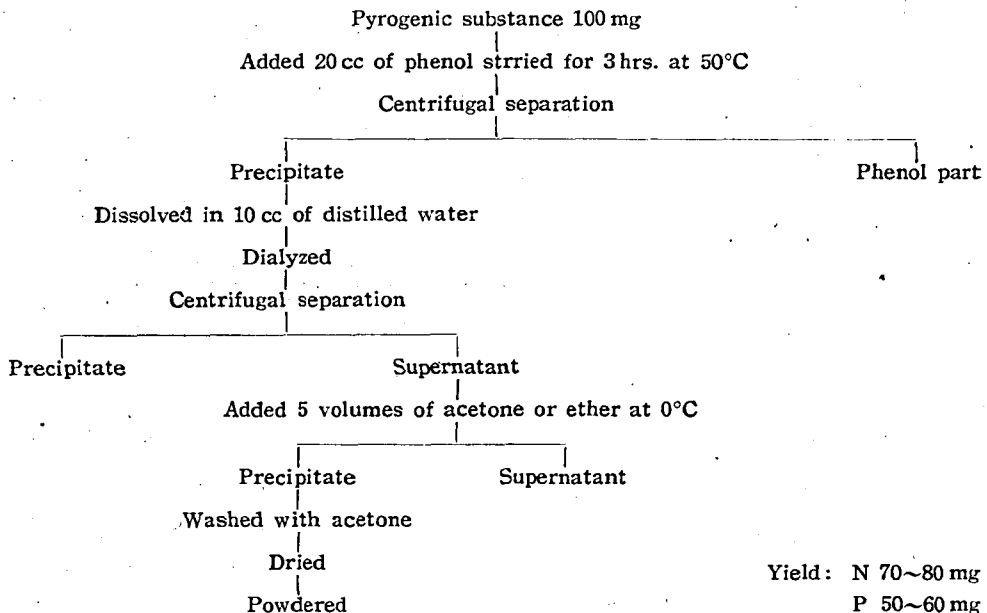
処 置 別	発熱物質		Shwartzman 反応			発 熱 性			
			200	10	5	200	20	10	5
酸 分 解	P	対 照 III	—	3.7 —	2.6 —	1.3	0.4	1.0 0.3	1.1 0.1
	N	対 照 II III	1.6 —	3.4 — —	2.9 — —			1.1 1.5 0.9	1.0 0.8 0.6

アルカリ分解	P	対照 I' III'	— —	3.7 — —	2.6 — —	1.5	0.6	1.2 0.3 0.1	1.0 0.6 0.1
	N	対照 I' III'	1.6 —	3.4 0.2 —	2.6 — —	—	0.5	1.1 1.0 0.1	1.0 1.3 0.2

4. 石炭酸処置 検体 100 mg を秤量しこれに加温により融かした純石炭酸 20 cc を加え 50° に保温しながら 3 時間連続かきまぜた後、温を保ちながら遠心して石炭酸を分離後沈澱物をアセトンで洗った。ついで蒸留水に溶解後、流水中で 24 時間透析し、この内液を遠心分離して澄明な上清液を得る。これを 0° に冷却して予め 0° に冷却したアセトン (N) 又は無水アルコール (P) を 5 倍量加えて沈澱させ、これをアセトンで洗った後真空乾燥した。

そこで石炭酸処置前と処置後の検体の生理作用についてみると、Sh 性は P では、処置前が 50 γ で 0.4, 25 γ で 0 のものが処置後には、50 γ で 0.53, 25 γ で 0.4, 12.5 γ で 0 となり石炭酸処置により単位の上昇がみられたが、N では石炭酸処置を加えても顕著な差異は見出せなかつた。

Table 9 Method of phenol treatment.



5. 加熱分解 次に P, N 物質の加熱による分解試験を行つた。即ち各検体の原物質 140 mg を蒸留水 140 cc に溶解し 15 cc ずつ分注し、湿熱により 60° 30 分, 80° 20 分, 100° 15 分及び 30 分, 120° 10 分及び 140° 15 分間加熱した。なお加熱操作を全く加えないものを対照にとり前者の各試験成績を生理学的に判定した。これによると P は 100° 以上の加熱処理により Sh 性因子にその作用の減弱乃至消失がみられるが、発熱性には 100° 以下の温度では認むべき障害が加えられていないが、しかし 120° 以上では認められた。すなわち N では 120° 以上の場合に Sh 性に、140° 以上に於て発熱性に、その作用の減弱がみられた。したがって P と N とでは同系の複合多糖体にもかかわらず、同一作用温度で比較すると熱処理により障害される度合を異にし、N は P に比べ耐熱度が幾分強いといふことができる。

6. 紫外線による分解 この P, N 物質は紫外線を照射すると美麗な青白色の螢光を發する。この螢光現象は物質の分子が光量子を吸収して興奮分子となり、これが低度の興奮分子に変わる際の輻射エネルギーを失う現象とい

われる。即ち物質が刺激光体(エネルギー)を吸収して分子内に変動を起し、これに用いられたエネルギーと吸収エネルギーとの差だけを輻射して自ら発光する理であるから、この紫外線による発熱性物質の分解を試みてみた。即ち原物質 100 mg を蒸留水 50 cc に溶かし 20 cc 2 組と 10 cc 1 組とに分注、前 2 者は紫外線照射下に放置し、照射時間は 5 時間に及んだ。紫外線はその放射波長が 2537 Å と 3600 Å のものを用いた。

なお対照としては照射しないものを同時間室温に放置したものを用いた。この結果 P、N 物質はいずれも紫外線(2537 Å, 3600 Å)によつては障害されず対照と同程度の Sh 性及び発熱性を有した。即ち紫外線による分解は出来なかつた。

総括並考察

著者は大腸菌、腸チフス菌の Sh 濾液の有効因子について系統的研究を行い、同一菌株中にも Sh 活性の強力なものと比較的作用の少ないものが混在することを知つた。そこでこの作用特異性を生物学的な性状、菌の栄養学的な立場から検討したが、明解な区分は得られなかつた。

そこで良好な Sh 性と発熱作用とを具えた菌株を選びいずれも振盪抽出法を中心にして石炭酸加生理食塩液、トリクロル酢酸及びアルカリ性蒸留水等の基礎溶媒で抽出しそれぞれに分割した。

次いでこれらの理化学的な性状を調べながら Sh 活性、発熱性、毒性を比較対照して Sh 活性因子と発熱因子との相関について考察を加えてみた。

今日までの成績からは決定的なことはいえないが、比較的发熱性を有した P、N (S の N を除く) はまた良好な Sh 活性を有した。したがつてこの作用物質の化学的性状より推論すればこの作用本態は複合多糖体であろうとされる。すると同一物質が全く異つた二つの生体反応を示し一つは発熱作用、一つは Sh 反応となつて現われた。したがつて発熱性物質が Sh 活性を有することは容易に推論し得られるところであるが、これが全く同一物質が示す作用であるか、或は類似物質のため精製操作中に完全に分離されず混在しているためか等幾多考えられるが、そこでこの反応を惹起される作用因子の化学的本態を解明するため精製物質に種々の分解操作を加え、その前後の生理反応を系統的に究明して考察した。この結果 P 及び N (C.S) の発熱性物質は酸及びアルカリ分解により、P では原物質の Sh 性は消失し、同時に発熱性をも減弱したが N も P と同様に分解操作後は著しく作用強度は消失し分解操作はいずれも反応惹起力を弱めるか或は失わせ、Sh 性の消失は発熱性の減弱となつて現われた。即ち試みた方法では発熱性物質から Sh 性因子だけを完全に離脱させることは困難であつた。

石炭酸処置は N では何等生理作用に顕著な差異を認めないが、P では作用度の上昇が認められた。そこで更に加熱分解を加えたところ、P と N は同系複合多糖体にもかかわらず熱による分解度が幾分異つた。しかし酸及びアルカリ分解の場合と同様 Sh 性の消失は発熱性の減弱乃至消失となつて現われた。紫外線照射によつては発熱性物質はいささかの障害も受けなかつた。

以上の実験範囲から考察すると発熱因子と Sh 因子とはかなりその化学的性状が類似しており、理化学的な分解処置はその作用に影響を与えるが、両因子を完全に単独の状態に離脱させることは甚だ困難で Sh 反応作用が減弱する時に発熱作用も障害されるので大腸菌産生発熱性物質では発熱性物質自体が Sh 性を具備する如き感が深められた。しかし著者は糸状菌 (*Macrosporium* sp.) 菌体から半透膜を透析し熱に安定且つ蛋白及び多糖体の反応陰性を示す比較的分子量の構造をもつ発熱性物質が精製されており、枯草菌、緑膿菌、単球菌等の細菌性発熱物質の精製に成功しているが、細菌由来の、どの発熱物質も Sh 活性を具えているものであるかは上の実験からは説明し尽せず、将来の実験に俟つに他ない。

むすび

大腸菌、腸チフス菌菌体から発熱性と Sh 性を有する物質を精製しこの化学的性状を究明しながらこの異なる二作用惹起因子の本態について 2, 3 の基礎的実験を加え考察を試みた。

終りに臨み貴重な菌株を分与下された 藤沢薬品工業研究部の方々に深謝し、なお種々御援助下さつた日本医科大学衛生学教室小島教授、本多義夫学士並に教室員の各位にも感謝する。

文 献

- 1) Robinson E. S. and Flussen B. A.: J. Biol. Chem., 153, 529 (1944)
- 2) Cotui F. W. and Schrift M. H.: J. Lab. Clin. Med., 29, 58 (1944)
- 3) Seibert F. B.: Am. J. Physiol., 67, 90 (1923)
- 4) Seibert F. B.: Am. J. Physiol., 71, 621 (1924)
- 5) Rodney G. and Welcke M.: J. Bact., 50, 129 (1945)
- 6) Mc Ginty D. A., Wilson M. I. and Rodney G.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 70, 335 (1949)
- 7) 八田, 青山, 丹治: 総合医学 6 (17), 7 (1949)
- 8) 八田, 青山, 丹治: 総合医学 6 (16), 4 (1949)
- 9) 八田, 青山, 丹治: 日本医事新報 1326, 9 (1949)
- 10) 八田, 青山, 丹治: 総合医学 7 (13), 18 (1950)
- 11) 青山: 衛試 68, 127 (1950)
- 12) 八田: 総合医学 9 (6), 29 (1952)
- 13) 八田, 获生: 日本医事新報 1404, 15 (1951)
- 14) Nessel N. M., McLallen J., Anthony P. Z. and Ginger L. B.: J. Am. Pharm. Assoc., 39, 456 (1950)
- 15) Lonsen W. and Liebert E.: Med. J., 3, 96 (1949)
- 16) Irvine H. and Robert D.: Pub. Med. Con. Cardio. Disease, 18, 51 (1949)
- 17) Schwartzman G.: J. Infectious Diseases, 45, 283 (1929)
- 18) Schwartzman G., Morell S. and Sobotka H.: J. Exp. Med., 65, 323 (1937)
- 19) Olitski L. and Leibowitz J.: Brit. J. Exp. Path., 16, 523 (1935)
- 20) Apitz K.: J. Immunol., 29, 255 (1935)
- 21) Apitz K.: J. Immunol., 29, 343 (1935)
- 22) Andervont H. and Shear M.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 34, 323 (1936)
- 23) 岡本: 実医 22, 1634 (1938)
- 24) 菅原: 実医 23, 1640 (1939)
- 25) 岡本, 久津見: 実医 25 (6), 595 (1941)
- 26) 山下: 新潟医学会雑誌 62 (2), 3 (1948)
- 27) 山下: 新潟医学会雑誌 62 (2), 64 (1948)
- 28) 山下: 日本細菌学雑誌 4 (2), 61 (1949)
- 29) 武田, 山下: 日本細菌学雑誌 4 (1), 45 (1949)
- 30) 武田, 渡辺, 詹: 日新医学 35, 268 (1948)
- 31) 河西: 日本細菌学雑誌 5 (6), 385 (1950)
- 32) 河西: 日本細菌学雑誌 5 (9), 437 (1950)
- 33) 武田, 花新発: 日本細菌学雑誌 5 (6), 99 (1951)
- 34) 栗塚: 日本細菌学雑誌 6 (6), 99 (1951)
- 35) Goebel W. F., Brinkley F. and Perlman E.: J. Exp. Med., 81, 315 (1945)
- 36) 注射薬及内服薬の販用医薬品中の微生物及びその有害物質の調査研究, 文部省科学誌験研究 要望課題 127 号 1950
- 37) Hatta, Aoyama, Tanji: Japan. Med. J., 3 (2), 125 (1945)

Studies on the Pyrogen Fever Treatment and the Preparation
of Bacterial Pyrogenic Substances.

(1) On the Correlation of Active Factors of Schwartzman's
Phenomenon and Bacterial Pyrogenic Substances.

By Sadayoshi HATTA, Kosaku AOYAMA, Sonoe TANJI,
Tomiko NAKAZIMA and Shigeko OZAWA

Summary

1. Purifying the substance produced by *E. coli* and *S. typhi* which held both pyrogenic and Schwartzman natures, we examined its chemical nature. At the same time we tried to isolate observe the essence of these two different reacting factors.
2. The pyrogenic substance of comparatively high molecule, especially of polysaccharide nature was observed to have a strong Schwartzman nature, however it was difficult to separate only the Schwartzman factors completely from the pyrogenic substance even by physical and chemical treatments.
3. It was considered in the case of the pyrogenic substance produced by *E. coli* that the substance itself had Schwartzman reacting nature. However, the N fraction from *S. typhi* was observed to have only Schwartzman nature, but not have pyrogenic nature distinctly.

腸線 についての実験 (I)

吸収試験

八田 貞義, 功刀 博, 野口 瑤子

Experimental Studies on the Catgut. (I).

Absorption Test

By Sadayoshi HATTA, Hiroshi KUNUGI and Yôko NOGUCHI

緒言

創傷の縫合材料としての腸線は、元来動物性組織、即ち皮膚、血管壁、腸管等より作られ、その吸収性の良好な点から、絹糸とは別に治療方面に利用されるようになった。腸線のほとんどが、羊、山羊の腸管から作られた羊腸線に限られていたが、羊類の不足と入手困難な現状から羊腸線に代る馬腸線が使用されている。腸線に関する種々の実験成績は、主として羊腸線に関するもので、馬腸線の報告は余りきかれない。故にこの馬腸線につき吸収性の面から、いささか検討を加えてみることにした。

腸線の歴史

腸線に関する歴史は古く、紀元前 1000~2000 年代以前の頃、印度に於て楽器の絃或は弓絃として使用されていたのが始めだといわれるが、医学的に応用されたのは、紀元前千数百年頃のことである。Galen (紀元の始め頃) は動物の小腸より作つた腸線を医学的に応用し、Antyllus (紀元 300 年) は外科的に動脈瘤手術に用いた。アラビヤの医師 Rhazes (第 10 世紀) は腸縫合に利用したという。

Theoderich von Lucca (第 13 世紀), Berengario da Carpi および Bertapaglio (第 15 世紀) も腹部創面に用い、爾來腸線の使用が次第にまし、第 18 世紀になつて、Phsick によつて羊腸線が絹糸よりも吸収が良好なことが知られた。次に Hallwachs 及び Béclard (1818), Jameison (1829) 等が腸線を用いて実験を行い、Porta (1845) は腸線を動物実験に用いてその吸収性を説いている。Bégin (1838) は腸線が化膿及び早期吸収により不結果を来すおそれがあるとして、その使用不適をとなえたが、1865 年 Lister¹⁾ によるその消毒法の発見は、その外科的応用に一紀元を劃するにいたつた。彼は動物実験で腸線の吸収組織化を組織学的に究明してその使用を推奨した。Sänger²⁾ (1890) は帝王切開術に腸線を使用し、Döderlein³⁾ (1890) は腸線の吸収を延ばすため、クロム酸の処置により、その目的を達したと述べている。その後間もなく Conrad Brunner⁴⁾ (1891) は臨床的に腸線の化膿の有無を論じ、Sneguireff⁵⁾ (1899) は腸線の消毒法について説明を加えた。Verebely⁶⁾ (1907) は腸線を種々の臓器に使用することを試みた。わが国においても宇山⁷⁾ (大正 12 年) は理想的な腸線を作り、その吸収性を論じたのを始めとして、岡⁸⁾、矢部⁹⁾、本間¹⁰⁾ 等の相次ぐ業績の発表があり、臨床应用到今日の隆盛をみるに至つた。

腸線の原料について

腸線の原料は古来から、皮膚、血管、腸管等であつたが、腸管を材料として使用された場合が多いようである。Lister は羊腸の粘膜下組織がよいと述べたが、結合組織だけで充分であると説いた者もあつた。Goris は動物腸管の血管壁及び粘膜筋板の結合組織が適當であるというが、Konrich は平滑筋センイ及び結合組織、Braun は腸管の縦走及び輪状筋の応用を指摘した。わが国においては、宇山は羊、山羊の腸管粘膜下層の発達に優秀であるため、そのみで作らうと説いた。

腸線の吸収について

吸収性については、組織解剖学的にみる方法と、人工的に消化させて簡単に判定を試みんとするものがある。組織学的に研究したのは、Lister 以来であるが、多くの研究者の共通した点は、腸線周囲に結合組織細胞、白血球、巨大細胞の浸潤を受け、外層より漸次破壊吸収され血管新生と相まつて、新生結合組織に置換されるとある。

Haufen¹¹⁾ は家兎背部の皮下組織或は背筋内に埋没し、数日の間隔をおいて周囲組織と共に剔出し、固定染色鏡検した結果、第 9 日になると無菌的炎症過程は相当進んで、腸線外面は、多数の白血球、結合組織母細胞を含む組織に密接し、同時に内部への毛細血管及び反応組織の浸入が認められる。120 日に至ると強拡大でも腸線物質を証明しなくなるが、これは腸線の種類、埋没部位によりその吸収を異にすると報告した。Bates¹²⁾ は動物実験において、普通腸線は強い異物性反応をおこし、結合組織母細胞の出現をおこし、創傷治癒を遅延させるが、これと反対にクロム腸線は結合組織母細胞の出現を早め、創傷治癒が早いという興味ある見地から吸収反応を証明した。

わが国においては宇山⁷⁾ は、家兎の皮下組織、横紋筋、胃壁漿膜に縫合しその部位における比較を試み、漿膜、横紋筋、皮下組織の順に吸収がおそくなることをみている。岡⁸⁾ は第 16 週になるともはや肉眼的にも鏡検的にも痕跡さえ残さないといい、本間¹⁰⁾ は第 17 週になると肉眼的に腸線は完全に吸収されて、痕跡を止めないが、鏡検的にはなお腸線実質の遺残を認め、それを圍繞する細胞群は無菌膿瘍を形成するといっている。高山¹³⁾ も吸収時間についてはその局所の状態により異り、又非吸収性の絹糸より、吸収性の腸線の方が後遺症を残すことが少いと述べている。

次に人工消化作用については、Kraissl¹⁴⁾ は特別な装置を考察し、2% トリプシン溶液 10 cc に腸線を浸し、空気を遮断してその消化時間を測定したが、腸線の太さによる差異を認めなかつた。しかしクロム腸線は普通腸線より消化時間が長いといつた。又本間もこれと同様な実験を行つた結果、同種のものでもその消化時間は、腸線の直径の大小には全く無関係であるという。

実験の部

1. 人工的消化実験

実験材料 馬腸線としては、A 馬腸線 (Plain, Chromic) 及び B 馬腸線 (Plain)、羊腸線としては、A 羊腸線 (Plain) 及び米国製 Johnson & Johnson (Plain) 羊腸線である。

実験方法 口径 2 cm 長さ 15 cm の試験管に 2% パンクレアチン溶液 (pH 6.8 及び pH 8.0) 20 cc を入れ、それぞれの試験管にアンプルから取出して 24 時間、無菌的に乾燥 (45°) させて重量を計つた腸線を浸漬して、上層にトルエンを加え、37°, 70 時間保温作用させた後腸線を取り出し、水洗、24 時間前記の如く乾燥して重量を計り、始めの重量との差をみた。

Table 1.

Catgut	pH	Initial Weight (gr)	Final Weight (gr)	$\frac{\text{Decreased Wt.}}{\text{Initial Wt.}} \times 100$
A No. 0000	6.8	0.150	0.090	40
A No. 00	6.8	0.300	0.260	13
A No. 0	6.8	0.389	0.349	10
A No. 0	8.0	0.290	0.230	21
A No. 1	6.8	0.407	0.240	41
A No. 3	6.8	0.616	0.420	32
A No. 3	8.0	0.563	0.380	33
A No. 5	6.8	0.790	0.495	37
B No. 0	8.0	0.220	0.170	23
B No. 3	8.0	0.460	0.375	18
Contrast	A No. 0000	Water	0.130	0.129
	A No. 3	Water	0.610	0.612

実験成績 A 及び B 馬腸線を pH 6.8 と pH 8.0 のパンクレアチン溶液について消化させてみた成績は第一表の通りである。pH による差異もまた直径の大小による消化時間の差異も余りみられなかつた。

Table 2.

Catgut	pH	Initial Weight (gr)	Final Weight (gr)	$\frac{\text{Decreased Wt.}}{\text{Initial Wt.}} \times 100$
A No. 1 (s)	6.8	0.227	0.198	13
A No. 2 (s)	"	0.340	0.292	14
A No. 00	"	0.195	0.158	19
A No. 0	"	0.340	0.294	14
A No. 1	"	0.420	0.275	35
A No. 00 Chromic	"	0.270	0.272	
A No. 0 Chromic	"	0.223	0.175	21
Johnson & Johnson. No. 1	"	0.279	0.094	65

(s): Sheep

次に A 羊腸線及び A 馬腸線を pH 6.8 のパンクレアチン溶液に浸してみた結果は (第 2 表), 概して A 羊腸線は A 馬腸線に比較して, 消化時間が遅いが Johnson & Johnson 羊腸線は比較的消化時間が早い。

2. 動 物 実 験

実験方法 使用した動物は, 成熟健康雄性家兎 (体重 2.5~3.0 kg) である。手術部を剃毛, 消毒し, エーテル麻酔下で無菌的操作のもとに, 背部筋肉に上記の腸線を埋没或は縫合 (結節, 連続) した。埋没の場合はアンプルからとり出したそのままの腸線一束を対照である絹糸でくくり, 4 日間筋中に深く埋没した後, 始めの抗張力と後の抗張力とを比較してその吸収程度を観察した。又縫合の場合は 1 週間位の間隔をおいて毎週各結節部を周囲の小組織片と共に剔出した。対照としては絹糸を同様な縫合で観察した。切開部はいずれも絹糸で縫合した。とり出した標本は, これをホルマリン固定し, パラフィン包埋, ヘマトキシリン, エオジン重染色を施して鏡検した。

実験成績 (埋没試験) 4 日間埋没した 腸線は筋肉内に多少癒着していたので, これを鈍的に剥離してとり出した。このものは肉眼的にみると, 1 束の腸線は互にセンイ性の癒着を来して一つの塊状をなし, 多少血性を帯びていた。これを水中に浸した後, 附着物を鈍的に剥離して, 静かに腸線を引き延ばし, これについて抗張力を検した。これの比較としては埋没しない同じ No. のものについても抗張力をしらべ, 両者を比較してその吸収度をみた。それが第 3 表である。表よりわかるように A 及び B 腸線共に, 直径の大小による吸収度の差異は認められない。即ち太さに比例した吸収度を示していないことがわかる。又 A 羊腸線と B 馬腸線とを比較しても, 同じ No. で近似した数字を示しているのは, 大体羊腸線も馬腸線も吸収程度に大差がないと考えられる。

なお埋没した腸線は皮膚上からは, 多少硬結としてふれるが, 余り明かではない。切りひらくと 腸線は周囲組織と軽くセンイ性癒着を来し, 周囲筋肉には出血及び壊死竈が認められた。腸線を取り出してみると一束そのままセンイ性癒着を来し, 脂肪組織の侵入が認められたが, 一般に多少の血性を帯びていた。

腸線そのものは褪色, 軟化, 膨大するが腸線の原形は保持されていた。癒着した腸線は静かに水中で鈍的に剥離しうる程度のものであつた。しかし埋没試験も 7~10 日を経ると, 腸線 1 束をそのまま鈍的に筋肉内よりとり出すことに困難を感じた。対照の絹糸は何等周囲組織と癒着をみず, 勿論原形を保持していた。

Table 3.

Catgut	Initial kg Tensile Strength	Final kg Tensile Strength	$\frac{\text{Decreased T.S.}}{\text{Initial T.S.}} \times 100$
A No. 00	3.033	1.090	64
A No. 0	2.853	1.790	37
A No. 1	3.800	0.993	74
A No. 3	5.800	2.760	52
A No. 5	6.126	3.270	47
B No. 2	3.333	2.693	19
B No. 6	6.030	2.675	56
A No. 0 (s)	2.617	1.693	36
A No. 3 (s)	5.693	2.317	60
A No. 00 Chromic	1.988	1.715	14

(s) designates sheep-catgut

小括 腸線の吸収試験は宇山、本間等の述べるが如く、試験管内にても生体内にても、その成績は腸線の直径とは全く無関係な数字を示している。これは腸線の吸収試験の判定を困難にする理由でもある。実際には病理解剖学的に最後の判定をするのが、一番妥当なやり方であるが、短期間にしかも簡単に判定を下す意味においては試験管内或は生体内埋没試験も多少参考となろう。病理組織的な処見については続報する。

終りに御協力下さった物理試験部長藤井正道氏及び辻楠雄氏に感謝の意を表する。

文 献

- 1) Lister: Lancet, 1, 451 (1869)
- 2) Sänger: Zentr. Gynäkol., 13, 2 (1890)
- 3) Döderlein: Zentr. Gynäkol., 30, 534 (1890)
- 4) Brunner: Arch. Klin. Chir., 42, 558 (1891)
- 5) Sneguireff: Zentr. Chir., 24, 692 (1899)
- 6) Verebely: Zentr. Gynäkol., 14, 391 (1907)
- 7) 宇山: 外科, 35, 138 (昭 9)
- 8) 岡: 岡山医, 44, 1585 (昭 7)
- 9) 矢部: 東京医, 41, 1007 (昭 12)
- 10) 本間: 婦人科, 36, 1090 (昭 16)
- 11) Häufen: 10) より引用
- 12) Bates: Am. J. Surg., 43, 702 (1939)
- 13) 高山: 日本医事新報, 1450, 63 (昭 27)
- 14) Kraissl: Surg., Gynecol. Obstet., 63, 561 (1936)

Experimental Studies on the Catgut. [1]

Absorption Test.

By Sadayoshi HATTA, Hiroshi KUNUGI and Yōko NOGUCHI

We studied on the absorbability of catgut, especially on the absorbability or the digestibility of horse-catgut in vitro and in vivo. The results shows that there is no correlation between the absorbability and the thickness of catgut.

避妊薬の殺精子力についての実験的研究 (IV)

避妊薬主剤である硫酸オキシキノリンについての考察

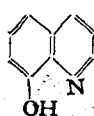
功 刀 博

Experimental Studies on Spermicidal Effect of Contraceptives (4)

Studies on Oxyquinoline Sulfate as the Principal Component of Contraceptives

By Hiroshi KUNUGI

避妊薬の主剤は現在主として、酢酸フェニル水銀及び硫酸オキシキノリン（以下硫オと略す）が用いられている。ここでは後者についての研究をとりあげた。


 $\cdot \frac{1}{2} \text{H}_2\text{SO}_4$

硫オは左図のような構造式を有する黄色粉末で、約 10 倍の水、¹⁾ アルコールに溶け、エーテルには不溶である。²⁾

実験は主として殺精子試験を対象にして行つた。用いた硫オは吉富製薬の厚意により分与されたものである。

1. 重層法による殺精子力の検討

殺精子力の比較検討は第 3 報³⁾において示した川上の培地⁴⁾による重層法によつた。硫オは蒸留水にて倍数稀釈せるものについて、阻止帯の長さ及び殺精子時間を測定した。結果は第 1 表の通りである。

Table 1.

Per cent of Oxyquinoline Sulfate	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0312	0.0156	0.0078	Contrast 0.1% Mercetate
Length of Inhibited Zone (cm)	3.10	2.08	2.0	1.90	1.79	1.69	1.55	1.42	1.28	1.05	1.88
Spermicidal Time (min)	<1	<1	7	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30	<1

増山⁶⁾の公式、 $Y(x) = G(1 - e^{-r(x-a)})$ を満足するか否かを検討するために定差図を画くと、殆んど直線に近くなるので、重層法は硫オ検定に適した方法と考えられる。表よりわかるように、硫オ単独では 1% 以上でないと充分なる殺精子力はない。現在用いられている避妊薬の硫オ含有量は避妊薬許可基準によると、1 回使用量中に含む量は、0.001g 以上とあるが、殺精子の点で酢酸フェニル水銀よりはるかに低いので、市販避妊薬(硫オ含有のもの)について、一応その含有量を検討する必要があると思う。

2. Cl イオンに対する影響

0.5%, 0.85%, 1%, 2%, 4%, 8% の塩化ナトリウム溶液をつくり、これで 0.67% 硫オ含有溶液と、0.67% 硫

Table 2.

Per cent of Saline Solution	0.5	0.85	1	2	4	8	Contrast 0.67 Per cent Oxyquinoline Sulfate*
Length of Inhibited Zone (cm)							
0.67 Per cent Oxyquinoline Sulfate	1.40	1.40	1.40	1.45	1.42	1.42	1.40
0.67 Per cent Jelly Include Oxyquinoline Sulfate	1.40	1.40	1.40	1.40	1.40	1.40	1.40

* 5×Dilute with 0.85 Per cent Saline Solution.

培地としては次の処方を用いた。

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2.5 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	4.5 g
KH_2PO_4	0.35 g
NH_4Cl	0.5 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.001 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.001 g
ブドウ糖	2.0 g
蒸留水	1L, pH 7.2.

用いた菌は大腸菌及び緑膿菌(藤田株)である。結果は第 5 表の通りである。緑膿菌は大腸菌に比し、硫オに対し強い抵抗性を示した。

5. むすび

1) 硫オは現在避妊薬として使用されている含有量では、充分な殺精子作用を発揮しないので、主剤を硫オ単独とするには一応検討を必要とする。

2) 硫オは Cl イオンにより何等の影響を受けないので、避妊薬稀釈媒液として生理食塩水を用いることは差支えない。

3) 硫オは pH の影響で、8-Oxyquinoline の結晶が析出する。pH の高いしかも緩衝作用の強い精液で殺精子試験を行うと、或程度殺精子力が低下を来す。

終りに御指導、御校閲を賜った八田貞義博士、終始御助力下さった野口瑠子氏に感謝する。

文 献

- 1) 秋葉朝一郎, 田中 穰: 薬学領域の微生物学 (昭 16)
- 2) Beilstein-PRAGER-JACOBSON: ORGANISCHE CHEMIE, 21. 91~92 (1935)
- 3) 功刀 博: 衛試, 69, 56~61 (昭 26)
- 4) 鳥居, 川上, 小島: ペニシリン, 1 (5), 281~291 (昭 22)
- 5) 川上: ペニシリン, 1 (7), 445~454 (昭 23)
- 6) 増山: 科学, 17, (6), 158~163 (昭 22)
- 7) 森山: 医学通信, 5, 193 (昭 25)

Experimental Studies on Spermicidal Effect of Contraceptives. (4)

Studies on Oxyquinoline Sulfate as the Principal Component of Contraceptives.

By Hiroshi KUNUGI.

The author has investigated oxyquinoline sulfate as the Principal-component of Contraceptives from the point of view of its spermicidal power.

From the results of experiments the spermicidal Power of oxyquinoline sulfate at the concentration now employed seems to be too low and easy to drop by the buffer action of human semen.

避妊薬の殺精子力についての実験的研究 (V)

避妊薬の経年変化

功 刀 博

Experimental Studies on Spermicidal Effect of Contraceptives. (5)

Change in Spermicidal Time with Age of Contraceptives.

By Hiroshi KUNUGI

まえがき

避妊薬は基剤の種類によりゼリー、クリーム、坐剤及び錠剤に区別されている。これらのものには経年変化の著明にみられるものがある。そこでこの経年的に効力の低下する原因は主剤或は基剤の影響か、将又、主剤と基剤が互に何等かの反応をおこすための影響であるかを検討してみることにした。錠剤の発泡力についての実験¹⁾はすでに報告してある。

実 験 の 部

1. 各基剤による主剤の影響

まず避妊薬主剤がそれぞれの基剤により、どの程度抗菌力の低下を来すかをみた。その抗菌力の比較は川上の培地による重層法によつた。

(第3報参照¹⁾)

選んだ個々の基剤は次の通りである。

澱粉 (0.1%), デキストリン (10%), アラビヤゴム (5%), 寒天 (0.5%), フノリ (5%), グリセリン (10%), ホウ酸 (2%), 乳酸 (2%), ゼラチン (3%), ステアリン酸ナトリウム (10%), アルギン酸ナトリウム (2%)。

Table 1.

Fundamental Components \ Principal Components	M cm	H cm
10% Starch	1.74	1.20
10% Dextrine	1.73	1.17
5% Gum Arabic	1.74	1.13
0.5% Agar	1.74	1.11
5% Gloiopelitis glue	1.72	1.10
10% Glycerin	1.75	1.10
2% Boric acid	1.74	1.12
2% Lactic acid	1.78	1.10
3% Gelatin	1.70	1.13
10% Sodium Stearate	1.10	1.10
2% Sodium Arginate	1.65	1.08
Control non Fundamental Components	1.77	1.20

M: Mercetate

H: Oxyquinolin Sulfate

これらの各基剤は主剤である 0.1% 酢酸フェニル水銀 (以下 M と略す), 及び 1% 硫酸オキシヒノリン (以下 H と略す) 水溶液に所要の濃度でとかし, 更にこれらを 5 倍希釈したものについて, その抗菌力を比較してみた. その結果は第 1 表の通りで, M の場合はステアリン酸ナトリウム, H の場合はステアリン酸ナトリウム及びアルギン酸ナトリウムが比較的抗菌力が低下している.

2. 粘性基剤による主剤の影響

ゼリー剤については, 粘度性を保持する基剤がその主要な役割を演じている.

実験に供した基剤は, アルギン酸ナトリウム, C.M.C. (carboxymethylcellulose), 寒天, フノリ, ゼラチン等である. このうち C.M.C. はパルプから製されたもので, 水に易溶で又腐敗しない特徴がある.²⁾ アルギン酸ナトリウムはいわゆる代用血漿として臨牀上に応用されている.^{3) 4)} このものは褐藻類中に多量に含まれている多糖類である.

方法としてはまず 0.1% M, 1% H 及び 0.05% M+0.1% H の水溶液をつくり, これに上記各基剤の水溶液を 0.1% の割合に加えたものについて実験を行った. 抗菌力を比較するため短時間に変化をおこさせる意味にて, 5 分間 100 度に加温したものと, 然らざるものについて同時に検討を加えてみた. その結果は第 2 表の通りで,

Table 2.

Principal and Base Components		Length of Inhibited Zone (cm)	Before Boiling	After Boiling	Difference
M	Sodium Arginate		1.56	1.52	0.04
H	"		1.53	1.46	0.09
M+H	"		1.49	1.46	0.03
M	C.M.C.		1.58	1.52	0.06
H	"		1.52	1.48	0.04
M+H	"		1.52	1.50	0.02
M	Agar		1.51	1.48	0.06
H	"		1.55	1.50	0.05
M+H	"		1.43	1.42	0.01
M	Gloiopelitis glue		1.56	1.52	0.04
H	"		1.54	1.53	0.01
M+H	"		1.54	1.45	0.09
M	Gelatin		1.57	1.52	0.05
H	"		1.54	1.48	0.06
M+H	"		1.55	1.48	0.07
(Control) Fundamental Components	M		1.57		
	H		1.55		
	M+H		1.56		

これからみると、C.M.C.、寒天が低下の程度が少く、ゼラチンは変化が大で、抗菌力が大部低下している。次にこれをゾウリムシ *Paramecium caudatum* によつて検討を加えてみた。この方法については前に述べた。⁵⁾

実験に供したものは、0.05% の M 水溶液、0.5% の H 水溶液及び 0.025% と 0.25% の M+H 水溶液で、これにそれぞれ 1% の割合で各基剤即ち C.M.C.、アルギン酸ナトリウム、寒天、アラビヤゴム、ゼラチン、グリセリンをとかした。これについて新鮮な場合と、1 ヶ月室温に放置した場合とで、ゾウリムシ滅殺時間を測定比較してみた。その結果は第 3 表に示す如く、ゼラチンの M+H、アラビヤゴムの H、寒天の H、C.M.C. の M+H が著

Table 3.

Fundamental Components	Principal Components	Fresh	After a Month
C.M.C.	M 50×	<10"	<10"
	H 5×	60"	110"
	M+H 50×	4'10"	4'
Sodium arginic acid	M	60"	20"
	H	120"	160"
	M+H	145"	160"
Agar	M	<10"	<10"
	H	45"	2'25"
	M+H	<10"	55"
Gum-Arabia	M	<10"	<10"
	H	90"	3'30"
	M+H	<10"	<10"
Gelatine	M	<10"	<10"
	H	80"	80"
	M+H	30"	>15'
Glycerin	M	<10"	<10"
	H	100"	125"
	M+H	90"	60"

明に低下を来している。なお 2~3 ヶ月の経過を観察する考えていたが、長い間に水分の蒸発を来すので、1ヶ月の観察で中止した。

3. 主剤及び基剤の肉眼的比較

前記の主剤の入つた 0.1% 各基剤の溶液で加温しないものを 1 週間室温に放置し、その肉眼的にみた性状を示したのが第 4 表である。

静置したものについて、上清の性状と沈澱或は不溶解物の有無及び性状とに区別してみると、上清は M 含有のものでは淡白色、H 及び M+H 含有のものは黄色味を帯びている。沈澱或は不溶解物は、アルギン酸ナトリウム、フノリによつて多量に認められたのでゼリーの基剤としては不適當と考えられる。これに反して、C.M.C.、寒天、ゼラチンは肉眼的に沈澱或は不溶解物を認めなかつた。

Table 4.

Principal and Base Components	Transparent Part (colour)	Precipitation or Insoluble Matter (colour)
M. Sodium Arginate	faintly white	—
H. "	yellow	white yellow
M+H "	faintly yellow	yellow
M. C.M.C.	faintly white	—
H "	yellow	—
M+H "	white yellow	—
M. Agar	white	—
H "	white yellow	—
M+H "	white-yellow	—
M Gloiopelitis glue	faintly white	white
H "	faintly yellow	faintly yellow
M+H "	faintly yellow	yellow
M Gelatin	faintly white	—
H "	yellow	—
M+H "	faintly yellow	—

主剤水溶液については、0.1% の M, 0.5 % の H, 及び 0.05% M+0.25% H のものを夫々倍数稀釈して、室温に放置(日光光線を避けた)し、約 2 ケ月後に観察したところ、M 及び H 単独の溶液では、肉眼的に何等の変化はみられなかつたが、M+H のもののみ黄色の不溶性物質(錯塩と考えられる)を生じた。

ただし M+H の稀釈番号 4 番目から pH 値が弱アルカリになつていたので、これは 8-Oxyquinoline の結晶が折出したものと考えられる。即ち M+H の水溶液は、或一定の pH 値の範囲で不溶性物質を生じ、pH 値がアルカリ性に傾くと、8-Oxyquinoline のみ折出してくる。第 5 表はそれを示したもので M+H の場合のみを記した。

Table 5.

M+H Concentration	M 0.05%	0.025%	0.0125%	0.0062%	0.0031%
	H 0.25%	0.125%	0.0325%	0.031%	0.0156%
Insoluble Matter	+	卅	卅	±	±
Crystal of 8-Oxyquinoline	—	—	—	+	+
pH	4.7	4.8	4.8	6.9	7.0

4. 主剤水溶液の経日変化

基剤に関係なく主剤のみの経日変化をみるために、M, H 及び M+H を培養液にとかし、その抗菌力をみた後、更に 1 ケ月室温に放置再び抗菌力を測定して、両者を比較してみた。用いた培養液は次の通りである。

Na₂HPO₄·12H₂O 2.5 g, (NH₄)₂SO₄ 4.5 g, KH₂PO₄ 0.35 g, NH₄Cl 0.5 g,
FeSO₄·7H₂O 0.001 g, MgSO₄·7H₂O 0.001 g, ブドウ糖 2.0 g, 蒸留水 1 l

Table 6. (1)

	Concentration	10×10 ⁴	40×10 ⁴	80×10 ⁴	160×10 ⁴	320×10 ⁴	640×10 ⁴	1280×10 ⁴	2560×10 ⁴	Contrast
	Bacillus									
Fresh	E. coli	—	—	—	—	±	+	+	++	++
	B. pyocyaneus	—	—	—	—	+	+	++	++	++
After a Month	E. coli	—	—	—	—	+	+	+	++	++
	B. pyocyaneus	—	—	—	—	+	++	++	++	+++

Table 6. (2)

	Concentration	200×	400×	800×	1600×	3200×	6400×	12800×	25600×	51200×	Contrast
	Bacillus										
Fresh	E. coli	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+++
	B. pyoc.	—	—	—	+	+	++	++	++	++	+++
After a Month	E. coli	—	—	—	—	—	+	+	+	+	++
	B. pyoc.	—	—	—	+	++	++	++	++	++	+++

Table 6. (3)

	Concentration	M. 40×10 ⁴	80×10 ⁴	160×10 ⁴	320×10 ⁴	640×10 ⁴	128×10 ⁴	256×10 ⁴		Contrast
	Bacillus	H. 10 ³	2×10 ³	4×10 ³	8×10 ³	1.6×10 ⁴	3.2×10 ⁴	6.4×10 ⁴		
Fresh	E. coli	—	—	—	—	—	+	+		+
	B. pyoc.	—	—	—	+	+	++	++		++
After a Month	E. coli	—	—	—	—	—	+	+		+
	B. pyoc.	—	—	±	+	++	++	++		++

使用した菌種は大腸菌及び緑膿菌である。その結果は第6表 1, 2, 3 である。表よりわかるように M では1ヶ月位では低下をみない。H 及び M+H が多少低下したと思われる程度で、主剤単独のみでは1ヶ月位では差程著明な低下をみない。

5. 市販避妊薬の経年変化

Gamble⁷⁾ は避妊薬を室温で1ヶ年放置しておいても殺精子時間には大した変化なく、37°で1ヶ月放置により42種中4種に殺精子力の変化がみられたという。又彼は多数の避妊薬の経年変化をくらべ⁷⁾ フェニール水銀を含む避妊薬は3~11ヶ月を経ても殺精子時間はさほど低減しないと指摘している。

そこで市販避妊薬の経年変化を温度をかえた条件のもとに観察してみた。温度は20°, 37°, 45°の三段階にわけ、約2ヶ月近くまで観察した。その結果は第7表の通りである。(製造月日は表に示した。)

Aゼリーは20°に於ても始めから低下著明で、45°では半ヶ月にて著明な低下を来した。もつともAゼリーの製造月日は昭和25年であるから、1ヶ年以上も経過しているわけである。新鮮なCゼリーは45°にて1ヶ月半後もなお殺精子力は良好である。又錠剤はかなり長い間、しかも高温にても低下をみない。以上の検体はDゼリーを除いては、以前に国家検定試験に合格したものである。

Table 7.

Contraceptives	Temperature (°C)	Date of Production	Number of Days				Method of Test
			June 8	June 8	July 11	July 31	
A. Jelly (M. include)	20°	February 1950	>20'	>30'	>30'	>30'	S
				>20'			P
A. Jelly (M. ")	37°	August 1950	<1'	<1'	<1'	<1'	S
				3'	8'30"		P
A. Jelly (M. ")	45°	August 1950	<1'	15'	>30'		S
				>20'	>20'		P
B. Tablet (M. ")	37°	August 1950	<1'	<1'		<1'	S
				20"	20"		P
B. Tablet (M. ")	45°	August 1950	<1'	<1'		<1'	S
				20"	45"		P
C. Jelly (M. ")	37°	March 1951	<1'	<1'	<1'		S
				20"	25"		P
C. Jelly (M. ")	45°	March 1951	<1'	<1'		<1'	S
				25"	60"		P
D. Jelly (M+H ")	37°	May 1950	>30'	>30'			S
							P
D. Jelly (M+H ")	45°	May 1950	>30'	>30'			S
							P
(Contrast) Phthalate Time			8'30"	7'	9'	7'	S
				.			

S: Spermicidal Time

P: Paramedicidal Time (250×)

結 論

1. 基剤については、その主剤の効力を低下させる意味において、ゼリー及び坐剤に用いられるステアリン酸ナトリウム及びアルギン酸ナトリウムが問題になるが、概して錠剤の基剤は安定性がある。
2. 粘性基剤としてのゼラチンは抗菌力の低下を来すので不適である。又主剤と基剤の関係では、M+H とアルギン酸ナトリウム及び H とアルギン酸ナトリウムが経年変化を来し易い。C.M.C. は比較的安定性があるが、主剤 M+H の場合はかなり主剤の作用を始めから低下させる。寒天も抗菌力の低下は少いが、屢々腐敗し易い欠点がある。
3. 主剤単独の経年変化は短時間では余り著明ではない。やはり主剤と基剤とが合して始めて著明な経年変化をおこす。又主剤 M+H 水溶液の場合は長期間に錯塩と思われる不溶解性物質を生ずる。これは pH 値によるもので、一定の pH 値の範囲で特にこの不溶解物質は著明にみられる。

主剤と基剤の組合せたものを試験管内で観察とすると、アルギン酸ナトリウム、フノリは外観的にみて、ゼリー基剤としては良好とは考えられない。

4. 市販避妊薬中、1 カ年以上経ったゼリー剤において、効力低下を起したものがみられた。錠剤の場合では著明ではない。

温度に対しては、室温よりやや高温に放置すると効力は低下する。

終りに御指導、御校閲を賜った八田貞義博士、及び終始協力下さった野口瑤子氏に感謝する。

文 献

- 1) 功刀 博：衛試, 69, 56~61 (昭 26)
- 2) 浅野栄太郎：薬局, 1, 12 (昭 25)
- 3) 真崎 健夫：医学通信, 5, 205 号, 3 (昭 25)
- 4) 高橋 長雄：北海道医学雑誌, 24, 495 (昭 24)
- 5) 八田 貞義, 桑原 章吾, 功刀 博, 他：公衆衛生, 9, 1 号, 71 頁 (昭 26)
- 6) Gamble, C. L. & et al.: Human Fertility, 8, 9 (1943)
- 7) Gamble, C. L. & Hamblin, L.: J. A. M. A., 1, 1 (1952)

Experimental Studies on Spermicidal Effect of Contraceptives. (5)

Change in Spermicidal Time with Age of the Contraceptives

Hiroshi KUNUGI

The author has examined on the selection of contraceptive-base and discussed on the relation between principal and base components of contraceptives. Besides, the cause of change of spermicidal power with Age of the contraceptives was investigated.

ラテックス製コンドームに就いて (第1報) 市販品に就て

藤井 正道, 佐藤 壽, 辻 楠雄

共同研究者

加藤 督尙, 山本 利隆, 大砂 古登

Study on the quality of latex condom

(I) Commercial condom

By Masamichi FUJII, Hisashi SATO, and Kusuo TSUJI

Collaborater

Tokusho KATO, Toshitaka YAMAMOTO, and Noboru OSAGO

緒 言

避妊及び性病予防の目的に使用される医薬品並びに衛生用品は多種多様であるが, その中で広く且つ多量に使用されているものは, 衛生サックである。これ等の多くは主として避妊を主目的とするものであり, 女性が体内に挿入又は装着し或は薬品と衛生用品とを併用するものであつて, 性病予防に於ては満足すべきものは少いが, しかし衛生サックのみは男性が装置し避妊の目的を達すること及び性病予防等現在では避妊と性病予防の両目的のために使用されている。然るに世上屢々衛生サックを使用したにかかはらず或は妊娠し或は性病に感染したということを開く。

昭和24年9月3日付薬発第1556号を以て厚生省業務局長より都道府県知事宛に避妊用具基準が通達され, 昭和25年10月26日, 厚生省発第260号を以て命令書が各製造会社に対して発せられ衛生サックは薬事法第45条の規定に基き国家検査を受けることとなり, 当所に於て国家検査が施行され, 今日に至つてゐる。

衛生サックには, ラテックス製及びそれ以外のコンドーム類があるが一般に多量に販売されているものは前者であつて後者の製造量はきわめて少量で未だ研究時代である。

ラテックス製コンドームの製造方法

A. 原料液に就て

1. 原料 (i) ラテックス (Latex) 主として *Hevea Brasiliensis* の樹皮を傷けて浸出する乳状分泌液すなわちラテックスを蒸発法, 遠心分離法或はクリーニング法 (遠心分離法が最も広く用いられる) によりゴム炭化水素を60~70%に濃縮し且つ凝縮させないためにアルカル性 (主としてアンモニア・アルカル性) としラテックス製品の原料として販売されている。

(ii) 硫黄 ギュムを加硫する為めに使用される薬品の主剤は硫黄であり, 主としてコロイド硫黄が使用される。

(iii) 加硫促進剤 主として次の如き超促進剤が使用される。即ち *Piperisyl-pentamethylen-dithiocarbamate*, *Ethyl-phenyl-dithiocarbamate*, *Sodium-dibutylcarbamate* 等である。

(iv) 亜鉛華 加硫促進助剤として, 又ゴムに強靱性を与え且つ硫化中に生ずる酸性物質を中和する機能を有するために亜鉛華はゴム製品には必要欠くべからざるものである。

(v) 保護コロイド 上記の薬品をラテックスに配合し温度処理をして得たラテックス乳液を安定なものにするためにカゼイン或は石鹼等が配合される。

2. 配合 上記の各薬品の配合割合の一例を示すと次の通りである。

ラテックス (ラテックスのゴム炭化水素分)	100%
硫 黄	1~2%
亜 鉛 華	0.5~1%

加硫促進剤	0.5~1%
カゼイン	0.2~0.5%

硫黄、亜鉛華及びカゼイン水溶液は合してボールミルにかけ或は別々にボールミルにかけた後ラテックス原液に加えて上記の如き配合の配合液とする。

数社のラテックス製品の硫黄量を測定した結果次の如き成績を得た。

第 1 表 ラテックス製品の硫黄量

	含 硫 黄 (%)	遊 離 硫 黄 (%)	推定結合硫黄 (%)
A	1.04	0.54	0.5 以下
B	0.76	0.36	0.4 "
C	0.75	0.45	0.3 "
D	0.86	0.46	0.4 "

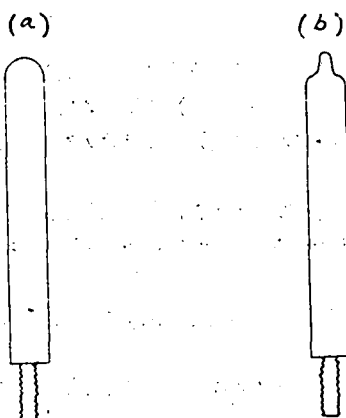
3. 配合液の前加硫 上記の配合液を加硫釜に入れ約 70° で 1~2 時間加硫を行う。勿論加硫温度及び時間は加硫促進剤の種類及び量等により異なるものである。即ち此の操作により幾分加硫され、且つ安定性のある乳状のラテックス乳液が得られ、これを原料液として使用する。原料液は濃度 45~58%, 粘度 27~30 CPS である。

B. 製造方法

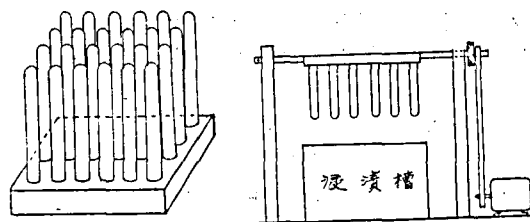
製法の概略を示すと次の通りである。現在主として行われている方法は浸漬法と称せられるもので、原料液中にガラス製コンドーム型を浸漬し静かに型を液から引上げると型の表面に薄く原料液が附着する。これを型ごと乾燥した後型から剥離し製品とするのである。

即ち以上の如き順序によつて製造するのであるが、実際に操作する場合、現在は 2 方法が行われている。即ち平浸法と称するものと Endless belt による連続回転式方法即ち Continuous belt conveyor system とである。

(i) 平浸法 この方法は大量生産に対しては多数の人手を要するものであり適しないけれども殆んど装置を要せず簡単に行い得ることと、コンドーム以外のもの例えば氷簀、ゴム風船等の如きあまり大量でないものの製造或は特殊なもの等の製造に用いられる方法であり、今日なほこの方法が行われている。型はガラス管の端を封じて作製されたものであり、その形状は種々あるが大別して次の (a), (b) 2 種がある。(第 1 図参照)



第 1 図



第 2 図

即ち (a) は先端が円く所謂坊主(ボーズ)と称される Without nipple のもので、(b) は先端に所謂精液だまりとなる部分ができるように乳頭状突起部を有する With nipple のものである。このガラス型 18 本或は 24 本を 40×30 cm の木枠に一定間隔に立てて固定する。木枠に固定したガラス型はよく水洗し乾燥する。次に此のガラ

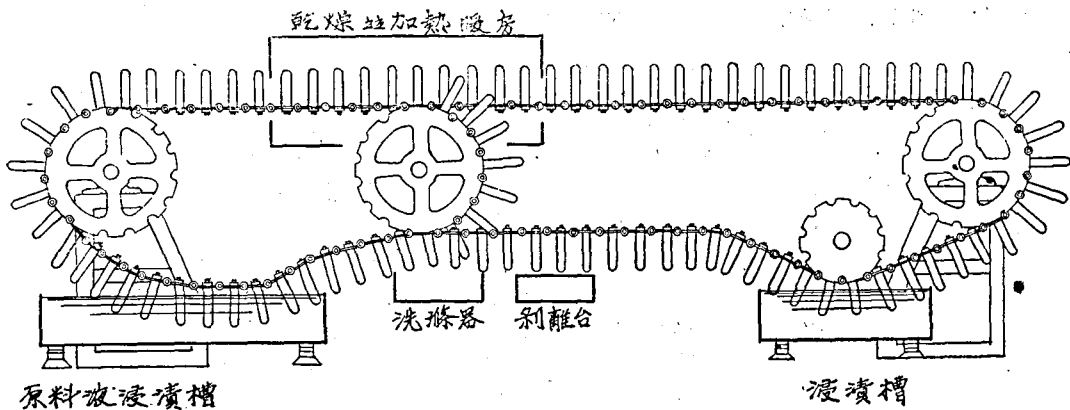
ス型を固定した木枠を数個ガラス型を下向きにして手動或は機械的に上下移動のできる機械の長方形の木枠にはめる(第2図参照)。

このガラス型が装着された枠が上下する機械の下方に原料液を満した長方形の槽があり、枠を静かに降してガラス型を原料液中に浸漬し次に徐々に引上げる。この際引上げる速度は1分間約20 cmである。液から引上げた後ガラス型が固定された木枠を機械から取外し、下向になつてゐるガラス型を直ちに上向にして枠を台上におき、ガラス型に附着した原料液が型の表面を垂れ下る方向を逆にすることによつて原料液が均等にガラス型に附着するよう操作する。次にこれを枠ごと60~70°の乾燥器中に約5~10分間入れて乾燥する。この操作は普通2回繰返す。この際乾燥により幾分加硫を行う。次に元巻き操作を行う。これはガラス型に密着したゴム膜の元部を入差指と母指を環状に曲げて型の元部に当て、ゴム膜を僅かに捲り上げる事により捲り上げられたゴム膜は互ひに密着して直径約1 mmの円味のある元部(開口部)が形成される。かくして出来たゴム膜は未加硫のためガラス型から剥離するのが困難であるから、これを水或は70~80°の熱湯中に短時間くぐらせ附着したゴム膜を通して水分を型と膜との間に浸入させ剥離し易くし、次に剥離に当りゴム膜が互いに密着するのを防ぐために、剥離剤としてタルク或は雲母等の微粉末を型に附着せるゴム膜に振りかけながら剥離する。かようにして得た未完成のコンドームは湿気を有し且つ多量の剥離剤が附着している。

次に之等を集めて回転脱粉機に入れる。この脱粉機は密閉されていて、コンドームをこの中で回転しながら70~80°で1~2時間、或は100°で約30分間加熱乾燥し、過剰に附着した剥離剤を除くと同時に仕上加硫が行われる。

かく出来上つたコンドームには勿論タルク或は雲母等の微粉末が幾分附着しているが、これによつて保存期間中の密着及び空気に触れて劣化するを防ぐ。

(2) Continuous belt conveyer system. この方法はラテックス製コンドームの大量生産に対して最も新しい方法で、Endless belt に普通2列にガラス型約1500本を固定し、これを回転させて、ガラス型の洗浄—ガラス型の乾燥—型の原料液浸漬—乾燥—再び原料液浸漬—乾燥—元巻き—加硫—熱湯浸漬—型から剥離の操作を連続的に回転反復するものである。以上の操作を行う機械を第3図に示す。



第3図

すなわちガラス型は洗浄し乾燥した後、原料液の槽中に移動され、浸漬される。この移動速度は原料液の濃度及び粘度により異なるが、1分間約2~3 mである。槽から出た型は直ちに上向になつて原料液が型に均等に附着するよう操作する。この際型を回転するか或は先端にたまり易い液を吸引風力によつて取去る等の操作を行うものもある。上向になつた型は一旦乾燥され再び原料槽に浸漬され、槽から出た後直ちに上向になつて乾燥される。

乾燥暖房の温度は60~70°である。次いで元巻きの操作が加えられ、再び60~70°の暖房中で加硫が行われる。暖房から出ると70~80°の熱湯槽に浸漬され、次に剥離台上で剥離剤を振りかけながら型から剥離される。以上の製造行程中人手を必要とする点は元巻きと、剥離剤を振りかけながらコンドームを型から剥離する2箇所である。剥

離された未完成のコンドームは回転脱粉機にかけられる。この操作は平設法のところで記載したので省略する。

製品検査

製品検査としては外観試験、寸法及び重量試験、引張り試験、老化試験及びピンホール試験等を行う。

1. 外観試験 外観は正常な事すなわち形状正しく、肉厚均等で、斑無く夾雑物の混入のないことが望まれる。

この試験では製品をそのまま試験する以外に、少量の空気を吹き込んで2~3倍大に膨脹させたとき片膨れすることがないならば均質で肉厚が均等であると考えてよい。

現在の国産品は多少肉厚不均等であり、製作上先端部より中央部にかけてやや厚みを帯びている。すなわち特殊なものを除き普通元部(開口部)が最も薄く0.05~0.06 mmで、中央部は0.06~0.07 mm、先端部は最も厚く0.07~0.08 mmである。これは製造行程上浸漬法によることに基づくのであつて、浸漬法において通常型を1回浸漬して得られる膜の厚さは0.02~0.03 mmとされている。然るにコンドームにおいては現在普通2回浸漬しているから上記の如き肉厚となるものであり、又浸漬後型の表面を原液が垂れ下る故に幾分先端部が元部よりも肉厚となるのである。

2. 寸法及び重量試験 寸法については国家検査基準では長さのみが規定してある。太さ即ち直径については現在各製造会社にて勿論使用されているガラス型の直径が約36 mmとなつている関係上実際には長さのみを規定して差支えない。

重量に関してはラテックスの配給統制時代には、配給量と生産数量との関係上1箇当りの重量が重要視されたが、コンドームの本質上からは寸法が規定されれば重量はさほど重要視すべきものではない。測定の結果重量は0.95~1.7 gの範囲であるが、そのうち1.0~1.3のものが大多数である。

3. 引張り試験 国家検査基準では単に伸びのみが規定してある。即ち両端を保持して約80 cm(約6倍)に伸ばし5分間保持した後異状のある品は不良品とする。JIS K 6301 加硫ゴム製品物理試験方法によれば伸600%以下にて異状のあるものは不良品とする。この引張り試験によつても種々のことがわかるのであつて、製品にピンホールの多いものは伸びが少く、又最適加硫が行われていないものは引張した後永久歪を検すると大である。各製品の80 cm 伸びと荷重との関係及びその際の永久伸びを第2表に示す。

第2表 引張り試験成績

試料	中央部の厚さ (mm)	80 cm 伸びに 対する荷重 (g)	永久伸び (80 cm 伸張5分 5分後測定 (%)
A	0.06	640	3
A'	0.06	1170	2
B	0.06-0.07	1105	2
C	0.06	1043	2
C'	0.06	1460	2
D	0.06	957	2.5
D'	0.06	1360	2
E	0.06	1093	2
E'	0.06	1640	2
F	0.08	1225	2
F'	0.08	1790	2

著者等は500 g以上の力に耐え得るものは充分使用し得るものではないかと推察する。又使用上局部的に伸張されることもあるが、約2倍以上に伸張されることは先づないであらう。

4. 老化試験 一般にゴム製品は製造後時間が経過すると各種の性質が変化し特に物理的性質が劣化する。この老化現象の主な原因は光、熱及び酸化であると云われるが、コンドームは通例暗所に保存するのであるから、その原因は主として熱、酸化及び後硫化 After vulcanisation によるものである。著者等はギャー氏老化試験 Geer's

oven ageing test を行つた。

又ゴム製品検査協会で行われたギヤー氏老化試験によると $70 \pm 1^\circ$ に於て 4 日間促進老化した後伸びの低下率を測定した結果次の如き成績を得ている (第 3 表参照)。

第 3 表 伸び及び老化後の伸びの低下率

試料	老 化 前 (%)	老 化 後 (%)	老化後伸びの低下率 (%)
A	785.5	665.5	15.29
B	759.0	678.5	10.61
C	763.0	683.0	10.48

勿論低下率の小なるもの程ゴムとしての性質が良いのである。

国家検査に準じ伸張試験を行ひ伸びと荷重の関係を種々な促進老化程度に於て測定すると次の如き成績を得た。(第 4 表参照)

第 4 表 老化前後の 80 cm 伸びに対する荷重

試料	原 品 荷重 (g)	温度 $70 \pm 1^\circ$ 各日数経過後の荷重 (g)						
		1 日	2 日	3 日	4 日	6 日	8 日	10 日
A	640	1,105	—	1,345	—	—	—	—
A'	1,170	—	—	—	1,100	—	1,070	1,000
B	1,105	1,210	1,210	—	—	—	—	—
C	1,043	1,290	1,535	1,520	—	—	—	—
C'	1,460	—	—	—	1,450	—	1,170	1,170
C''	1,270	1,390	—	1,605	1,700	1,630	1,183	1,110(切断)
D	957	1,270	1,183	1,653	—	—	—	—
D'	1,360	—	—	—	1,335	—	1,150	1,100
E	1,093	1,240	—	1,400	—	—	—	—
E'	1,640	—	—	—	1,620	—	1,325	1,250
F	1,225	1,715	1,725	1,850	—	—	—	—
F'	1,790	—	—	—	2,395	—	1,690	1,690

本試験成績に於て現在の市販品については製造者により又同じ製造者の製品でも各ロットにより多少相違がある。試験の結果から見ると大体 4 日目頃から劣化が起るが、10 日を経過するも使用性質を失わないことも判明している。

又試験成績が 4 日までは次第によくなることから市販品は加硫やや不十分な程度に止めて、加硫促進剤を適当に入れて品質の劣化を防いでいることが推定される。又この試験では試料は全部展開して促進老化したのであるが、巻いたままで促進老化したものに就き容易に展開し得るや否やを試験した結果、1 日後では原品と殆んど変化無く 2 日後からは原品のように先端部を持つて軽く振ることにより容易に展開はしないが、手で回転しながら展開することは容易である。又変色及び附着等は起らず、使用上の障害は全く無いことが判明した。

5. ピンホール試験 前記の如き製造行程より判断されるように、上記各試験は原料 1 仕込みごと、或は原料液 1 釜ごと、或は原料液 1 槽の一定使用期間毎等に於ける 1 或は数ロットに就て時折試験を施行すれば充分であるが、ピンホールの有無に関しては現在なお全数検査しなくては完全でない。その理由はラテックス原料液にはカゼイン等の保護コロイドの添加が必要であるが、この保護コロイドがその液中にガラス型を浸漬する操作中に発生する微細気泡の生成を助け、しかも一度発生した気泡の除去は非常に困難であること、及び原料中に既存する不純物或は工場内にて発生する塵埃、特に剥離剤の微粉末等がラテックス浸漬液中に混入することが原因して製品にピンホ

ールが生じ或は使用時に生ずる原因となるからである。勿論ピンホールもその大きさの程度によるがピンホールを有するものは常識上性病予防及び避妊の目的に適しない。

ピンホールを検査するには種々な方法が考えられるが常識的に考えつく試験方法としては次の如きものが挙げられる。即ち気体を使用するもの、液体を使用するもの及び電気を使用するもの等である。

(a) 気体を使用する方法 空気を入れ(簡単には口にて息を吹き込む)脹らして試験する。即ち顔に当たるとか或は雲母、炭酸カルシウム或は炭酸マグネシウム等の微粉末を入れた器の上にかざしてこれ等の粉末が飛散するや否やを検査する。別法として煙を入れる方法、この場合簡単には煙草の煙を吹き込んで脹らす。そして煙の漏出するや否やを検査する。

勿論気体による試験方法において問題となる点は何なる程度気体を吹き込んで脹らすかにある。極微細で問題にならぬ程度の孔も膨脹により拡大し又微細な気泡の存在により気泡部の肉薄の部分膨脹により破れ又は微細な夾雑物のため、その部に於て夾雑物とゴムとが分離してピンホールを形成するからである。

(b) 液体を使用する試験方法 水を注入し漏出するや否やを検査する。この際水の重量により先端部或は肉薄の部分片膜れし水圧が均等にかからないため、その点の対策を施さねばならない。即ちガラス製大円筒中に水を入れ、此の中に僅かに着色液を注入したコンドームを入れ着色液を円筒中の水面より僅かに高く一定の差をつけ、着色液を次第に増す、或は又此の際ガラス大円筒中には例えば 0.2% 水酸化ナトリウム溶液を入れ、コンドームにはフェノールフタレイン溶液を入れる、この場合ピンホールがあるときは、漏出する状態を容易に見ることができる。この方法の缺点是均等に水圧を加えることが困難な点と注入する液体の量如何によつては気体の場合と同様な

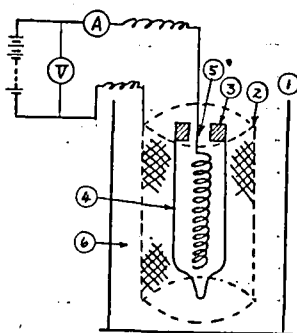


Fig. 1

1. 硝子製円筒
2. 銅網性円筒
3. ゴム栓
4. コンドーム
5. 螺旋状銅線
6. 食塩水溶液
- A マイクロアンペラー
- V ミリボルトメーター

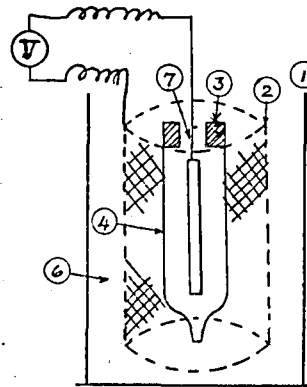


Fig. 2

1. 硝子製円筒
2. 銅網性円筒
3. ゴム栓
4. コンドーム
5. 螺旋状銅線
6. 食塩水溶液
7. 純亜鉛棒
- V ミリボルトメーター

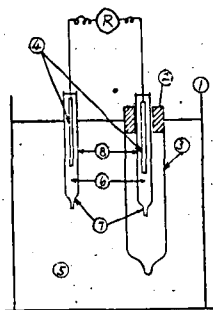


Fig. 3

1. 硝子製円筒
2. ゴム栓
3. コンドーム
4. 純亜鉛棒
5. 1% NaCl 溶液
6. 飽和硫酸亜鉛溶液
7. 濃度 NaCl 溶液
8. 小硝子製円筒
- R 大型アスケー

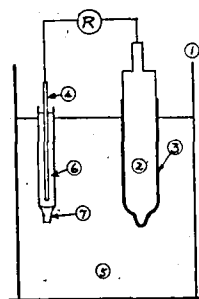


Fig. 4

1. 硝子製円筒
2. 金属型
3. コンドーム
4. 純亜鉛棒
5. 1% NaCl 溶液
6. 飽和硫酸亜鉛溶液
7. 3% NaCl 溶液
8. 小硝子製円筒
- R 大型アスケー

缺点を生ずる点, 及びコンドームの内外の液面の差をあまりつけずコンドームを殆んど原型とする場合は, コンドームの表面に附着する剥離剤及び微細な気泡等によつてピンホールの正確な検査ができない点などである。

(c) 電気を使用する方法 実験室の方法には次の如きものが考案された (第 4 図参照)。

第 4 図の説明:

(Fig. 1) 硝子円筒 (1) に銅網製円筒 (2) 及び塩化ナトリウム溶液 (1~25%) を入れ, 試料の元部に孔開きゴム栓をはめて銅網の中央部に入れ, 内部に食塩水を注入しガラス円筒 (1) 内の塩化ナトリウム溶液からやや水面を高くする。次に銅線を直径約 20 mm のラセン状に巻いて極としこれを試料の中央部に挿入する。

ラセン状の極と銅網との間に 10 V の直流電流を通ずると, ピンホールがあれば電流が流れる。

(Fig. 2) (Fig. 1) と殆んど等しい, ただ試料の中央に亜鉛板を挿入し, 銅網との間に起電力を測定する。

(Fig. 3) 不分極電導子(無成極電極)を使用し, 大型テスターにより測定する。

(Fig. 4) 試料を金属型に装着し, この金属型を一方の極として大型テスターにより測定する。但しこの場合金属型はコンドーム製造用ガラス型よりも稍大であり直径約 40 mm とする。

これ等の装置により測定した結果の 1 部を表示すると第 5~第 8 表の如くかなり欠点がある。

第 5 表 (Fig. 1) の装置による成績の一部

試料 番号	μA		ピンホールの 裂目の寸法 (1/100 mm)
	浸漬1分後	浸漬5分後	
1	3	5	—
2	750	1,400	—
3	800	1,000	—
4	120	560	7×13
5	340	365	5×6
6	0	0	—
7	15,000	12,000	$\begin{cases} 13 \times 8 \\ 13 \times 9 \\ 7 \times 10 \end{cases}$
8	100	235	—
9	70	240	11×6
10	8	300	—

第 6 表 (Fig. 1) 及 (Fig. 2) の装置による成績の一部

試料 番号	μA		mV		ピンホールの 裂目の寸法 (1/100 mm)
	浸漬1分後	浸漬5分後	浸漬1分後	浸漬5分後	
1	365	370	6.1	6.2	—
2	4,300	4,300	Scale over	Scale over	25×14
3	0	0	0	0	—
4	1	2	0.1	0.1	—
5	1,950	5,500	13.0	Scale over	3×24
6	70	6,200	4.4	Scale over	—
7	0	15	0	0.4	—
8	0	1.5	0	0.1	—
9	780	780	11.0	14.4	16×8
10	0	1,250	0	13.6	21×6

第 7 表 (Fig. 3) の装置による成績の一部

試料番号	各時間浸漬後の K ₂				ピンホールの有無
	10 分後	20 分後	30 分後	60 分後	
1	∞	∞	∞	∞	0
2	∞	∞	∞	∞	0
3	78	78	77	76	1
4	200	32	21	18	1
5	28	27	26	26	微少 1
6	250	230	210	180	微少 1
7	30	36	38	41	1
8	550	550	550	550	0
9	98	40	43	55	0
10	50	51	53	57	0

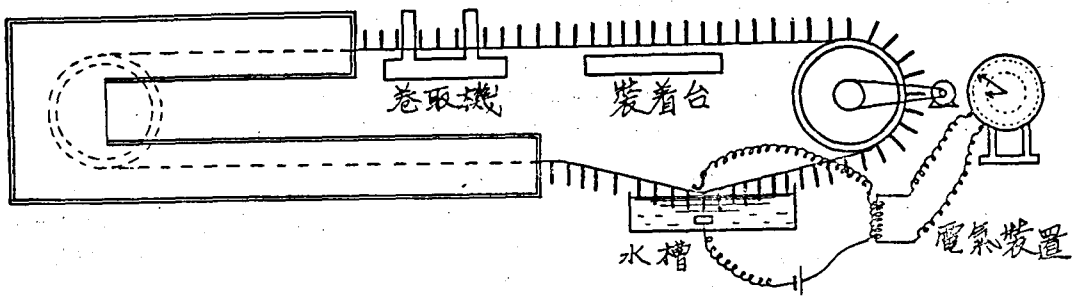
第 8 表 (Fig. 4) の装置による成績の一部

試料番号	各時間浸漬後の K ₂				ピンホールの有無
	10 分後	20 分後	30 分後	60 分後	
1	20	18	18	18	0?
2	∞	∞	∞	∞	1 (剝離剤の影響)
3	150	100	200	200	1
4	20	20	20	27	2
5	50	50	50	25	1
6	∞	450	300	400	1
7	0	0	0	0	1
8	8	0	0	0	1
9	∞	∞	∞	∞	0
10	∞	∞	∞	∞	0

すなわちコンドームは (Fig. 4) の方法以外は殆んど原型に等しい状態で電流、電圧又は電気抵抗を測定するものである。そこに問題がある。

又吸湿性の強いコンドームにおいては浸漬して測定するまでの時間が問題になる。コンドームの吸湿性は原料ラテックスに大きく影響され、ラテックス安定剤として、水酸化カリウムの多いもの又は配合剤の亜鉛華の量の多いもの (これは亜鉛のアンモニウム塩のできるためであろう) 又保護コロイドとしてのカゼインの量の多いものは吸湿性が増大する。又剝離剤或は微細な気泡が阻害して測定が正確に行い難い事も起る。

故に煙試験によつて測定した結果及び顕微鏡によつて測定したピンホールの裂目の大きさと上記の各電気試験において測定した電流、電圧又は電気抵抗との関係が正確に比例しない場合が生ずる。しかし各製造者自身が製品の各条件を定めて (Fig. 4) に示す如き方法により検査を行えば連続的にに行い得る長所がある。しかもこの方法によればコンドームは金属型に被せられるゆゑ、型の大きさを適宜に作れば幾分拡大されピンホールも亦拡大されるか、或はピンホールとなり易い不安定な部分は破れてピンホールを生じ使用上の実情にも添ひ、又他の方法の如く内外両面に液に接せず外面のみ液に接する為に吸湿性のものに対する判定誤差は幾分減じる。現在製造者の行つている最も新しい電氣的検査機は第 5 図に示す如きものである。



第 5 図

即ち出来上つたコンドームを金属型に装着する。この金属型の直径は約 40 mm である。コンドームを被せた金属型は 50~60° の温湯槽中に浸漬する。この際金属型と槽中の極板との間に 20~35 V の直流電流を通ずる。ピンホールがあれば電流が流れ、この不良品は自動的に除去される。この操作が連続的に行われる機械で、人手を必要とするのはコンドームを金属型に装着する操作のみである。勿論この検査機に於ても実験室の上記の方法と同様な欠点を有するものであるが、各製造者において自己の製品に対して、例えば温湯槽中の浸漬時間、電圧を幾何程にするか、又幾何程の電流を通ずるものをピンホールとするか、或は製造行程のどこに検査機を入れるか等の諸条件を定めることによつて、一律に行つた実験室の成績よりも遙かに正確な成績が得られることは確実である。又これ等の諸条件は各製造者によつて異なるべきものであり、一律に定め得べきものでない。

ピンホールの状態：顕微鏡検査によるとピンホールの部分が貫通した孔の場合、すり鉢状に陥没して貫通した孔の見えない場合、タルク或は雲母粉末即ち剝離剤が塊つて入りその塊の中に孔の生じている場合、或は夾雑物とゴム質との間に稍陥没した裂目を生じている場合等がある。稀には径 1 mm にも及ぶ孔もあるが、夾雑物の塊の中に生じた孔では縦横 30~100 μ の大きさの貫通したものもある。微細な気泡或は夾雑物とゴム質との分離等によつて生じたピンホールは、静置状態では種々な形の陥没或は裂目として存在し、貫通した孔は見ることほとんど不可能なものが多く、膨脹とか引き張りによつて拡大されて貫通した孔を生ずると思われるものが大多数である。ピンホール部の陥没の大きさは縦横 10~80 μ 程度のものが多く静置状態では孔は見えない。又ピンホールの存在するものについてその位置を試験した結果次の如き成績を得た。

第 9 表 ピンホールの場所

試料番号	先 端 部	中 央 部	元 部
1	—	1	—
2	—	—	1
3	—	1	1
4	—	2	—
5	—	—	1
6	—	1	—
7	—	2	1
8	1	—	—
9	1	—	1
10	—	1	—
10 箇	2 箇	8 箇	5 箇

第 9 表に示す如くピンホールは中央部が最も多く、次に元部(開口部)で先端部には少い。

これは製造行程からも想像がつくのであつて、原料液中に生じた微細な気泡及び工場内の塵埃、特にタルク或は雲母粉末(剝離剤)が原料液槽に入つたもの等は共に液の上層部に浮び、これがガラス型の中央部より上方の元部辺に

附着し易く、先端部には夾雑物の少い清潔な原料液が附着するからである。突端にピンホールを生ずる場合は主として気泡による場合が多い。

コンドーム国家検査基準

(ラテックス製コンドーム)

ラテックス製コンドームは先端に精液たまりのあるものは精液たまりの部分以外の長さが 16 cm 以上、精液たまりのないものは全長が 17 cm 以上それぞれあることを要し、ゴム質及び厚さは全体について均等でピンホール及夾雑物、気泡等を有せず、重量は 1 個について 1 g 以下であつてはならない。本品の両端を把持して左右に伸張させた場合には室温で最少限 80 cm の伸張に 5 分間以上堪えるものであることを要する。

ピンホールの検査法：原型容積の 2~3 倍まで煙を入れふくらして検査する。

結 論

ラテックス製コンドームについて世上屢々使用時の不快感及び失敗の声をきくので、これ等の製造法、検査法、販売状態を調査した。その結果次の如し。

1. 原料及び製造行程上加熱減菌的操作が反復行われるから、製品に有害な物質及び病原性細菌等の附着は考えられない。ただ小分袋入作業はできれば米国製品に見られるように機械的の密封方法を採用するのが望ましい。
2. 老化試験の結果、製品が最悪な条件におかれな限り現在の包装のままで数年間放置しても使用に適しくなることはない。老化試験で $70 \pm 1^\circ$ の空气中に 24 時間放置することは自然老化の半か年に相当するものと推定されるので、試験成績からいえば製造後 5 年経過後もなお使用に耐えることを示す。
3. ピンホールの実験室的検査方法は種々あり又新たに考案することも可能であるが、製造行程の一部に連結して行い得る方法としては現在 Belt conveyer system による電気的検査方法が最も優れたものであろう。又各人が装置を要せず簡単且つ随處で行い得る方法としては煙草の煙による試験が最も簡明である。但しこの際巨大に膨脹さす事は避け原型容積の約 2~3 倍大に止める。
4. 国家検査としてのピンホール検査は現在煙試験であり、参考及び補正のために電気検査も行っている。
5. 米国製品中にはその組織内に不純物を存せず、組織も均等で、ピンホールを考慮する必要は全くないと思われるものもあるのに対して国産品はその点の製造技術をなお一段進歩さす余地があると思う。然るに国産品でも例えば煙試験で人頭大に膨脹させてもピンホールを検出しないものが 80~90% であることから考えて、ほとんどピンホールを有しない製品のできる可能性があると思われる。
6. ピンホールが静置状態で貫通した孔である場合はきわめて稀であり、拡大したとき貫通した孔となるものが大多数である。その存在場所は先端部には少い。しかし孔の程度及び位置によつては無視しても良いと云ふ根拠は無いので現在のところ国家検査の適合品を使えば避妊及び性病予防に対する有効率の高い点と使用上簡便な点で、その使用価値はこの種のものの中で最高位に位するものであろう。

終りに調査に御援助下さつた、岡本ゴム工業株式会社、相模ゴム工業株式会社、沢谷ゴム工業株式会社及び日本ラテックス工業所に謝意を表する。

Study on the quality of latex condom.

(1) Commercial condom

Masamichi FUJII, Hisashi SATO, and Kusuo TSUJI

Collaborater

Tokusho KATO, Toshitaka YAMAMOTO, and Noboru OSAGO

The manufacturing and testing method of latex condom were reported in details.

Commercial goods have now fairly good quality and they will be the best condom in the world.

除虫菊の日長効果とピレトリン含有量について

木下孝三

Studies on the Photoperiodism and Pyrethrin Content of Insect Flowers

By Kozo KINOSHITA

緒言 我が国における除虫菊の栽培は第二次大戦中には激減して往時の産額の約 10% に過ぎなかつたが、最近再び増加の傾向に向つてゐる。除虫菊の殺虫成分であるピレトリンは植物体内で如何にして合成されるかは不明であるが、その含有量は生育期間中の種々の要素により左右されることは明かである。著者はその要素として日長時間をとりあげ、ピレトリン含有量との関係を調査しようとして 1949~1950 年にわたり薬用植物園和歌山分場で行つた試験の概要を述べることにする。

供試材料及び方法

1. 供試材料 本実験に使用した材料は当分場圃場で育成したシロバナムショウゲキク (*Chrysanthemum Cinerariaefolium* Bocc.) の株令 2 年の本田定植苗を用いた。この場合株分けによる無性繁殖の苗を用いると材料が整一になるが、個体数が少いためにやむを得ず種子繁殖による苗を用いた。

2. 方法 上記の苗を径 1 尺 2 寸、高さ 1 尺の素焼植木鉢に 1 本植えとした。土壌は予め反当堆肥 200 貫、硫酸アンモニウム 10 貫、過磷酸カルシウム 20 貫の割合で施用した普通の水田の壤土を用いた。

日長時間の調節としては短日区は遮光、長日区は電燈照明を行つた。遮光には各試験区毎に暗幕代用の黒色遮光紙を張つた框を用いて被覆遮光し、照明には 100 ワットの電球を地上 4 尺の所につけて照明した。以上の操作は苗の花芽分化が未だ進んでいないと思われる 2 月 1 日から始め、収穫の時期即ち 5 月中旬まで行つた。その他の管理としては期間中適宜灌水等を行つただけである。

殺虫成分ピレトリンの分析はベンゼン抽出による容量法によつて行つた。

実験結果 実験期間中を通じ各区とも生育は順調に進み、両年とも故障なく 5 月中旬収穫期に達した。収穫物を調査したのが第 1 表である。

Table 1. The influence of day length upon the yield of Insect flowers (per a stock)

Treatment		Weight of whole plant (g)	Relative number	Weight of fresh flowers (g)	Relative number	Length of plants (cm)	Number of stems	Number of branches	Number of capitulate flowers
(1949)	Control (Natural condition)	85.9	100.0	13.3	100.0	46.9	26	45	44
	Short day								
	Day length 4 hours	52.0	60.5	2.0	15.0	27.2	9	26	10
	Day length 6 hours	56.0	65.1	2.0	15.0	34.5	22	19	10
	Day length 8 hours	75.0	87.3	12.5	93.9	35.5	19	32	24
	Day length 10 hours	86.4	100.5	15.3	115.0	38.8	21	33	36
	Day length 14 hours	76.0	88.4	16.0	120.3	42.5	20	42	31
	Long day								
	Day length 16 hours	85.0	98.9	16.0	120.3	45.0	23	22	32
	Day length 18 hours	106.0	123.3	16.5	124.0	45.2	24	41	33
	Day length 20 hours	98.0	114.0	16.0	120.3	46.0	23	28	37
	Day length 24 hours	77.0	89.6	13.5	101.5	48.1	28	25	23

Table 1. The influence of day length upon the yield of Insect flowers (per a stock) (Cont'd)

Treatment		Weight of whole plant (g)	Relative number	Weight of fresh flowers (g)	Relative number	Length of plants (cm)	Number of stems	Number of branches	Number of capitula flowers
(1950)	Control (Natural condition)	65.0	100.0	10.5	100.0	57.0	13	28	23
	Short day								
	Day length 4 hours	41.0	63.8	2.5	23.8	29.5	11	21	8
	Day length 6 hours	43.2	66.4	2.3	21.9	31.2	10	18	8
	Day length 8 hours	83.2	128.0	12.1	115.2	48.0	13	23	30
	Day length 10 hours	62.5	96.1	8.9	84.7	44.0	14	24	24
	Long day								
	Day length 14 hours	71.2	109.5	12.8	121.9	52.0	31	35	35
	Day length 16 hours	66.2	101.8	12.6	120.0	42.0	18	25	24
	Day length 18 hours	65.5	100.7	14.5	138.0	53.2	22	34	31
	Day length 20 hours	62.5	96.1	14.9	141.9	50.6	17	30	28
	Day length 24 hours	67.5	103.8	12.2	116.1	47.0	17	43	39

第 1 表によると兩年を通じ程度に差はあるが、短日区は一般に生育不良である。特に日長 4 時間、6 時間区は 3 月上旬頃から光線不足の徴候があらわれ葉色は黄化し 4 月上旬頃には益々その傾向が著しくなり遂に供試個体の約 8 割までが枯死してしまつた。残存した株も生育は極めて不良であつた。

長日区においては一般に生育良好であり、総重量はときに無処理区より低い指数を示している場合もあるが、生花重量においては約 20% の増収を示している。その増収率は日長 18 時間区が最大であつて左右へ漸減する傾向を示している。

次に日長時間と開花期との関係を調査したのが第 2 表である。

Table 2. Effect of day length on the flowering period.

Treatment		Efflorescence					
		Date of budding	Date of beginning	Date of final	Period (days)	Date of mode	Number of days accelerated (days)
(1949)	Control (Natural condition)	Mar. 19	Apr. 26	May 1	6	Apr. 28	0
	Short day						
	Day length 4 hours	Mar. 29	May 8	May 16	9	May 12	-14
	Day length 6 hours	Apr. 6	May 8	May 15	8	May 11	-13
	Day length 8 hours	Apr. 8	May 4	May 10	7	May 7	-9
	Day length 10 hours	Mar. 29	May 3	May 9	7	May 6	-8
	Long day						
	Day length 14 hours	Mar. 26	Apr. 26	Apr. 30	5	Apr. 28	0
	Day length 16 hours	Mar. 22	Apr. 24	Apr. 29	6	Apr. 26	+2
	Day length 18 hours	Mar. 24	Apr. 18	Apr. 23	6	Apr. 20	+8
	Day length 20 hours	Mar. 23	Apr. 19	Apr. 24	6	Apr. 21	+7
	Day length 24 hours	Mar. 20	Apr. 23	Apr. 29	7	Apr. 26	+2

Table 2. Effect of day length on the flowering period (continued)

(1950)		Control (Natural condition)	Apr. 2	Apr. 23	Apr. 29	7	Apr. 26	0
		Day length 4 hours	Apr. 8	May 6	May 12	7	May 9	-13
		Day length 6 hours	Apr. 8	May 6	May 13	8	May 9	-13
		Day length 8 hours	Apr. 5	May 2	May 9	8	May 5	-9
		Day length 10 hours	Apr. 5	Apr. 30	May 6	8	May 3	-7
		Day length 14 hours	Mar. 29	Apr. 19	Apr. 25	7	Apr. 22	+4
		Day length 16 hours	Mar. 29	Apr. 16	Apr. 20	5	Apr. 18	+8
		Day length 18 hours	Mar. 29	Apr. 17	Apr. 21	5	Apr. 19	+7
		Day length 20 hours	Mar. 29	Apr. 18	Apr. 22	5	Apr. 20	+6
		Day length 24 hours	Mar. 29	Apr. 21	Apr. 24	4	Apr. 22	+4

この問題はいわゆる日長効果、或は光周律ともいわれ、Garner 及び Allard 両氏によつて研究され、昼夜の時間の長短が植物の開花結実に関係する外種々の生理現象に関係がある。特に開花現象については世人の注目を集めたのであつた。その後多くの研究者によりあらゆる種類の植物について研究されたが、未だ除虫菊については発表されたものを見ないようである。

第 2 表によると兩年とも短日区は開花が遅延し日長時間の短くなるほど開花の遅延の程度が著しくなる傾向を示している。これに反し長日区はすべて開花が促進され特に日長 16 時間、18 時間区が最も著しく促進され、これを頂点として左右へ促進程度が漸減している。

これによつて除虫菊は長日性植物であるということが実験的に確めることができた。

次に日長時間と乾花ピレトリン含有量との関係を調査したのが第 3 表である。

Table 3. Effect of day length on the pyrethrin content in dried flowers.

Treatment		Pyrethrin I (%)	Pyrethrin II (%)	Ratio I: II	Pyrethrin (%)	Relative number
(1949)	Control (Natural condition)	0.38	0.63	1:1.65	1.01	100.0
	Day length 4 hours*	—	—	—	—	—
	Day length 6 hours*	—	—	—	—	—
	Day length 8 hours	0.28	0.58	1:2.07	0.86	85.1
	Day length 10 hours	0.37	0.60	1:1.62	0.97	96.0
	Day length 14 hours	0.36	0.65	1:1.81	1.01	100.0
	Day length 16 hours	0.37	0.66	1:1.75	1.03	101.9
	Day length 18 hours	0.42	0.70	1:1.66	1.12	110.8
	Day length 20 hours	0.42	0.72	1:1.71	1.14	112.8
	Day length 24 hours	0.38	0.66	1:1.73	1.04	102.9

Table 3. Effect of day length on the pyrethrin content in dried flowers. (Cont'd)

Treatment		Pyrethrin I (%)	Pyrethrin II (%)	Ratio I:II	Pyrethrin (%)	Relative number
(1950)	Control (Natural condition)	0.51	0.61	1:1.19	1.12	100.0
	Short day					
	Day length 4 hours*	—	—	—	—	—
	Day length 6 hours*	—	—	—	—	—
	Day length 8 hours	0.36	0.49	1:1.39	0.85	75.8
	Day length 10 hours	0.41	0.51	1:1.24	0.92	82.1
	Day length 14 hours	0.52	0.64	1:1.23	1.16	103.5
	Day length 16 hours	0.56	0.67	1:1.21	1.23	109.8
	Day length 18 hours	0.59	0.70	1:1.18	1.29	115.2
	Day length 20 hours	0.58	0.71	1:1.22	1.29	115.2
	Long day					
	Day length 24 hours	0.52	0.68	1:1.30	1.20	107.1

* The yield was too low to assay the pyrethrin content.

第 3 表によると両年度とも数値に差はあるが傾向は等しく、短日区はともに無処理にくらべてピレトリン含有量少く、日長時間の短くなるほどピレトリン含有量も減少している。これに反し長日区は無処理にくらべてピレトリン含有量は高く、その傾向は日長時間の長くなるほどピレトリン含有量も増加し、日長 20 時間で最大に達し、日長 24 時間区に於ては少しく減少している。これは常時照明されて夜間の時間が全くないことが原因と考えられるが、植物体内におけるピレトリン生産の機構に何等かの障害を与えるものとして興味がある。

一般に除虫菊乾花のピレトリン含有量は系統により、又生育地の環境即ち気象、土壌、肥料の状態等によつて相当な差異のあるのが常である。生育過程においても開花が進むにつれてピレトリンが増加蓄積されることが明かにされている。又収穫後の乾花調製に際しての乾燥処置の管理がピレトリン含有量を左右する重大な要素となつている。

実際問題として北海道産の乾花は内地府県産の乾花に比して色沢、碎け花の混入等外観劣悪であるにもかかわらずピレトリン含有量が多いとされている。この事実には両者の乾花収穫後の貯蔵中の気温の差が最大の原因となつていることは明かであるが、生育期間中特に開花期間中の日長時間の差が又その原因をなしていることも本実験の結果によつて明かとなつた。今開花期間中の和歌山と北海道の栽培地帯の中心地和寒、名寄地方との日長時間を比較して見るに、和歌山は平均 13 時間 39 分、北海道では 15 時間 18 分であり、その差は 1 時間 39 分である。両者間の気温の差もあるが、これを考えないで日長時間のみを考慮して見ると本実験によればピレトリン含有量は指数において平均 3.8 の差が認められる。

摘要 1. 除虫菊の日長効果が収量、開花期及びピレトリン含有量に及ぼす影響を調査した。

2. 除虫菊生花の収量は日長時間の長くなるに従い増加し、日長 18 時間で最大に達している。

3. 除虫菊は長日性植物であることが認められた。

4. 除虫菊乾花のピレトリン含有量は日長時間が長くなるに従い増加し、日長 20 時間で最大となる。

本試験施行にあたり種々御指導を賜つた平山薬用植物園長、長期にわたる煩雑な管理に助力された当分場本下、小峰両助手に厚く謝意を表する。

文 献

1. 武居三吉, 若園潔, 平岡敬造: 日農化, 16, 8 (1941).
2. Garner and Allard: Jour. Agr. Res., 18, 553 (1920).
3. 横瀬理一郎: 農及園, 11, 539, 751, 1011 (1936).
4. C. B. Gnadinger: Pyrethrum flowers. 2nd Ed. Mc. G. King. Co., Minneapolis., 1936.
5. 若園潔: 除虫菊の化学と応用, 1950, 朝倉書店.

Studies on the Photoperiodism and Pyrethrin Content of Insect Flowers

By KOZO KINOSHITA

1. In this experiment, effects of various length of day on the yield of flowers, the period of bloom, and the pyrethrin content were studied on insect flowers.
2. Higher yield of fresh flowers was obtained by the long-day treatment, and maximum yield was seen in the plot of 18 hours' day-length.
3. It was recognized that insect flower was to be a long-day plant.
4. The higher pyrethrin content of dried flowers was obtained in the long-day treatment plots and reached maximum at the plot of 20 hours' day-length.

麦角菌 *Claviceps* の寄主植物 (その 1)

川谷 豊彦

Hosts of *Claviceps* (I)

By Toyohiko KAWATANI

I 麦角菌 *Claviceps* の種類 Species of *Claviceps*

麦角菌の種類については, ATANASOFF (1920) は 18 種 1 変種, SACCARDO (1882-1931) は 20 種 2 変種を輯録しているが, 其の後富樫 (1936) は *Cl. yanagawaensis* を, 著者 (1944a) は *Cl. litoralis* を記載したので, 現在まで判っている種類は 22 種 *¹ 2 変種となる. 列記すれば次の通りである. この内本邦産のものは 5 種である. (* の記号のあるものは本邦産, * known in Japan)

1. *Cl. balansioides* A. MÖLLER⁽¹⁸⁰⁾ (1901) Sacc. Syll. xvi. 609.
2. *Cl. ? caricina* D. GRIFFITHS⁽⁹³⁾ (1902) Sacc. Syll. xvii. 820-821.
3. *Cl. cinerea* D. GRIFFITHS⁽⁹²⁾ (1901) Sacc. Syll. xvii. 820.
4. *Cl. Junci* ADAMS⁽¹³⁾ (1907) Sacc. Syll. xxii. 509.
- *5. *Cl. litoralis* KAWATANI⁽¹²⁹⁾ (1944a)
6. *Cl. lutea* A. MÖLLER⁽¹⁸⁰⁾ (1901) Sacc. Syll. xvi. 609.
- *7. *Cl. microcephala* (WALLR.) TULASNE⁽²⁷⁸⁾ (1853) Sacc. Syll. ii. 565.
8. *Cl. microcephala* (WALLR.) TULASNE var. *Acus* DESM. Sacc. Syll. ii. 565.
- *9. *Cl. nigricans* TULASNE⁽²⁷⁸⁾ (1853) Sacc. Syll. ii. 565.
10. *Cl. pallida* (WINTER) P. HENNINGS⁽¹¹²⁾ (1899) Sacc. Syll. xvi. 610-611.
Syn. *Balansia pallida* WINTER (1887) Sacc. Syll. xi. 366.
11. *Cl. pallida* (WINTER) P. HENNINGS var. *Orthocladae* P. HENNINGS⁽¹¹³⁾ (1900) Sacc. Syll. xvi. 610-611.
12. *Cl. Paspali* STEVENS et HALL⁽²⁵⁵⁾ (1910) Sacc. Syll. xxii. 508-509.
Syn. ? *Cl. deliquescens* (SPEG.) HAUMAN⁽¹⁰³⁾ (1922)
13. *Cl. Patouillardiana* P. HENNINGS⁽¹¹²⁾ (1899) Sacc. Syll. xvi. 610.
Syn. *Cl. pallida* PATOULLARD (1899) cf. Sacc. Syll. xvi. 610.
14. *Cl. Philippii* REHM⁽²¹²⁾ (1889) Sacc. Syll. ix. 998.
- *15. *Cl. purpurea* (FR.) TULASNE⁽²⁷⁸⁾ (1853) Sacc. Syll. ii. 564.
16. *Cl. pusilla* CESATI⁽⁵²⁾ (1848)⁽⁵³⁾ (1861) Sacc. Syll. ii. 565.
17. *Cl. ranunculoides* A. MÖLLER⁽¹⁸⁰⁾ (1901) Sacc. Syll. xvi. 609-610.
18. *Cl. Rolfsii* STEVENS et HALL⁽²⁵⁵⁾ (1910) Sacc. Syll. xxii. 508.
19. *Cl. Sesleriae* STÄGER⁽²⁴⁷⁾ (1907) Sacc. Syll. xxii. 509.
20. *Cl. setulosa* (QUÉLET) SACCARDO⁽²²¹⁾ (1883) Sacc. Syll. ii. 566.
21. *Cl. Tripsaci* STEVENS et HALL⁽²⁵⁵⁾ (1910) Sacc. Syll. xxii. 509.
22. *Cl. Uleana* P. HENNINGS⁽¹¹²⁾ (1899) Sacc. Syll. xvi. 610.
23. *Cl. Wilsoni* COOKE⁽⁶¹⁾ (1884) Sacc. Syll. ix. 998.

*¹ 最近, PADWICK & AZMATULLAH (1943) により *Cl. viridis* が印度から, 又 GROVES (1943) により *Cl. Grohii* がカナダから, 戦時中報告されていることを知った. 都合計 24 種 2 変種となる. なお SEYMOUR (1929) の list には *Phleum pratense* に *Cl. rubra* WHETZEL et REDDICK が寄生するよう書かれているが, その記載を認め得ないのでこの中に含めてない.

Syn. *Cl. purpurea* (FR.) TULASNE var. *Wilsoni* W. SMITH⁽²⁴²⁾ (1884)

*24. *Cl. yanagawaensis* TOGASHI⁽²⁷²⁾ (1936)

ATANASOFF (1920) は前記の外に学名としての記載ではないけれども、*Zizania aquatica* 及び *Z. palustris*, *Spartina stricta* に寄生する麦角菌の2種を種として区別して挙げているが、その後現在までに命名規約による正式の記載報告はなされていない。

欧洲から報告されたものは *Cl. purpurea* を初めとして 4, 7, 8, 9, 16, 19, 20, 23 の8種1変種であり、南北アメリカから報告されたものは 1, 2, 3, 6, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 18, 21, 22 の12種1変種である。

Cl. purpurea, *Cl. microcephala* は次節に示す如く驚くべき多種の植物に寄生し全世界に分布している。

近時注意されているものにスズメノヒエ属 *Paspalum* に寄生する麦角菌 *Cl. Paspali* がある。特に *Dallis grass* (*Paspalum dilatatum*) は元来南アメリカのパンパスの重要な牧草であり、今世紀の初め米国の南部諸州その他亜熱帯諸国に入れられ重要な牧草となつていのであるが、同時にそれに寄生する麦角 (*Cl. Paspali*) は特に有毒のためこの牧草の価値を下げていることは甚だ注目される。*Paspalum dilatatum* の麦角は米国において既に NORTON (1902) により報告されていたが STEVENS & HALL により *Cl. Paspali* と命名されて以来、南部諸州⁽¹⁴⁶⁾ ミシシッピ州⁽⁴³⁾⁽⁴⁴⁾⁽⁸⁸⁾、ハワイ⁽⁷⁾ から発見報告されている*。又、ブラジル⁽³⁶⁾⁽⁵⁴⁾、アルゼンチン⁽¹⁰³⁾⁽¹⁶²⁾⁽²⁴³⁾、濠洲⁽¹¹⁴⁾⁽¹⁶⁵⁾⁽¹⁸³⁾⁽¹⁸⁷⁾⁽¹⁹⁰⁾⁽¹⁹¹⁾⁽⁸¹⁾、ニュージーランド⁽⁸⁾⁽¹¹⁸⁾、南アフリカ⁽¹⁷¹⁾⁽¹⁷³⁾⁽¹⁷⁴⁾⁽²⁰¹⁾⁽²⁵⁷⁾、モーリシャス島⁽³⁰⁾ からも報告されている。HAUMAN (1922) は *Paspalum dilatatum* の原産地たるアルゼンチンにおいてこの植物に *Sphacelia* 期 (分生孢子期) を発見して *Cl. deliquescens* と命名したが、その後、同国の SORIANO (1928) はこれを *Cl. Paspali* の異名と見なしている。なお SHEPHERD (1927) はモーリシャス島においてこの植物に *Sphacelia* 期 (麦角菌?) を発見している。(彼は *Panicum maximum* にも *Sphacelia* 期を発見している。)

熱帯から報告されている麦角菌 (寄主植物) の種類は極めて少いようである。熱帯アフリカよりは ZIMMERMANN (1904) により *Pennisetum spicatum* (Negerhirse), インド *4 から AJREKAR (1926) により *Sorghum vulgare*, *Andropogon caricosus* var. *mollicornis*, *Ischaemum pilosum*, *Pennisetum Alopecuroides* の4種が *Claviceps* として報告されているが *Pennisetum Alopecuroides* においてのみ其の麦角体を観察したに止まり、すべて麦角菌の種名は記されていない。ジャバからは、STÄGER (1910) により *Calamagrostis javanica*, *Hierochloa Horsfieldii*, *Festuca nubigena* に寄生する麦角3種がもたらされたが、麦角菌の種名には言及されていない。フィリピンからは甘蔗の麦角が報告されているのは注目される⁽¹⁹⁶⁾⁽¹⁹⁷⁾。種名は未決定である。

オーストラリアの麦角については小麦の麦角が初めて 1892 年に発見⁽¹⁵³⁾ されて以来あまり報告されていなかったが、近時、*Paspalum* 属特に *P. dilatatum* の麦角が注目されている事はすでに述べた。

ニュージーランドの麦角については*3, ANONYM. (1940), CHARLTON, COCKAYNE (1912), KIRK (1894) 等の報告がある。

以上は麦角菌の平面的分布であるが、麦角菌は平坦地におけると同様高山においても見られる⁽¹⁵¹⁾。ANDERSON (1889a) はモンタナ州において平坦地(平均海拔 3,000 呎)におけると同じく 8,000 呎の地点においても *Cl. purpurea* を普通に見るといい、KUHN (1863) は 4,000 呎以上の地点において *Agrostis vulgaris*, *Nardus stricta* に豊富な麦角寄生を見ている。COCKERELL (1889) は 8,400 呎の地点にて *Cl. purpurea* 麦角を見出し、FRANK (1896)

*2 戦時中ジョージア州⁽²⁹⁷⁾、カリフォルニア州⁽³⁰⁸⁾ からも報告されている。

*3 クイーンズランド州における *Cl. Paspali* (*Paspalum dilatatum* 及び *P. orbiculare* に寄生のもの) には生態種が存在するという⁽³⁰⁵⁾。なおビクトリア州からも報告されている⁽³⁰¹⁾。

*1 戦時中報告されたものに、KULKARNI (1942), NATH & PADWICK (1941), THIRUMALACHAR (1944) (1945), THOMAS, et al. (1945), PADWICK (1942), PADWICK & AZMATULLAH (1943) の研究がある。

*3 戦時中報告されたものに、CUNNINGHAM (1941), FOSTER & GRANT (1944), HASSAL (1944), NEILL & BELL (1941) 等がある。インド、ニュージーランドの麦角については報告は従来極めて少くあまり知られていなかったが、戦時中、かく多くの研究報告のあることは注目される。これは寄生的栽培の問題に刺戟されたことも一因と考えられる。

は麦角菌は木穀類栽培の垂直的上界まで見られると言っている。STAGER (1910) はジャバの Merbabu (海拔 3,119 米) の頂上よりの麦角を報告している。

興味あるものにトウモロコシ⁽²⁶⁾⁽¹⁹⁹⁾⁽²⁵⁴⁾ 稲⁽²⁶⁾⁽⁷⁹⁾⁽⁸³⁾⁽²²⁸⁾⁽³⁴²⁾⁽²⁹¹⁾⁽⁹¹⁾ の麦角が報告されている。然しトウモロコシについては前記の外、報告を見るができない。

稲については、中田 (1934) は稲麴菌を *Cl. virens* (COOKE) SAKURAI *3 とし、富樫 (1940) 及び宮本・大川 (1942) もこの学名をあてているが、中田 (1937) はその著書第 2 版において *Ustilagoidea virens* (COOKE) TAKAHASHI に変えた。逸見・小西 (1939) は、*Claviceps* とするは不当であり *Ustilagoidea* とすべきであると報告している。ともかく稲に寄生する *Claviceps* については前記の他報告を見ない。著者も逸見・小西に従い稲麴菌は *Claviceps* と認めないからこの表に加えてない。

本邦における麦角発見の最初は白井 (1892) により明治 24 年 (1891) 農科大学構内において見出されたススキ、パレンシバ、マグサの麦角であるとされている。なお白井は明治 20 年 (1887) 農業上の見地から「我邦古来麦奴アリ。未だ麦角アラズ。而テ人往々誤テ物トナス。辨ゼザルベカラズ。而シテ麦角ノ穀草人畜ニ大害アル耕種ニ従事スル者尤知ラズンベ有ル可カラズ……」と世人に大いに注意を喚起するところがあつた。竹本 (1943) によれば、東大医学部薬学科には明治 20 年採集の北海道産チモシーの麦角があると言われ、彼はこれをもつて本邦麦角発見の嚆矢としている。著者の調査によれば、松原は明治 15 年 (1882) 我観草 (カモジグサ) に麦角の発生ある事をその著書に記載している*7。その後カモジグサの麦角は安田 (1914) により *Cl. purpurea* とされている。本邦には 5 種の *Claviceps* が知られていることは既に述べた。竹本 (1944a, b) は本邦産の寄主植物 34 種につき分析を行つたことは注目される。

北樺太、南樺太 (旧本邦領) からは *Cl. litoralis*, *Cl. purpurea* ⁽¹⁵⁴⁾⁽¹⁴²⁾⁽¹⁷⁷⁾ が知られている。朝鮮には *Cl. purpurea* のみしか知られていない。⁽¹⁸⁸⁾⁽¹⁹³⁾⁽²⁶⁵⁾ 台湾には *Claviceps* は全然知られていないようである。沢田 (1931a, b) の台湾菌類調査報告⁽²²⁵⁾ 及び台湾菌類目録⁽²²⁶⁾ にも *Claviceps* は見当らない。満洲には、*Cl. purpurea*, *Cl. microcephala* の 2 種が知られているに過ぎない。⁽¹²⁴⁾⁽¹⁷⁶⁾。

II. 麦角菌 *Claviceps* の寄主植物目録 Host-index of *Claviceps*

Claviceps 属菌の寄主植物については、TULASNE (1853) が *Cl. purpurea* につき 13 種、*Cl. microcephala* につき 3 種、*Cl. nigricans* につき 3 種合計 19 種を記載して以来、FARLOW & SEYMOUR (1888-91) は米国産のものにつき 22 種、SYDOW (1898) は 35 種、ATANASOFF (1920) は 138 種、SEYMOUR (1929) は北米産 84 種、BARGER (1931) は 192 種 (変種をも含む) を転録して、その数は飛躍的に増加して来た。BARGER (1931) のものは ATANASOFF (1920), ROJDESTVENSKY (1927) 及び彼自身アメリカ及び熱帯産の寄主植物を転録したものである。本邦産のものとしては、日本菌類目録第 1 版 (1905)⁽¹³⁶⁾ に 3 種、第 2 版 (1917)⁽¹⁵⁷⁾ に 8 種、第 3 版 (1927)⁽²³⁸⁾ に 11 種が記載されたに過ぎなかつた。富樫 (1942 a) は更にその後報告されたもの及び自身の標本を整理して 279 種 (内本邦産 54 種) と発表している。たゞし個々の植物目録の明細は発表していない。

ATANASOFF は synonym を全然整理していないし、BARGER は *Index kewensis* によつて synonym を整理しているため、首肯し難い個所がありその他不当と思われる個所も存在する。著者は以上についてでき得る限り原論文を調べ、その後広く各地から報告されたもの (本邦・満洲・樺太は昭和 21 年 (1946) まで、外国のものは 1941 年

*3 稲麴菌はもともと *Ustilagoidea virens* (COOKE) TAKAHASHI とされていたもので、中田 (1934) はこれを桜井が *Claviceps* に移した理由及び出所を明記していないから、むしろ *Cl. virens* (COOKE) NAKATA (non SAKURAI) とすべきであつた。

*7 当時、カモジグサは松村 (1884) によれば *Brachypodium japonicum* MIQ. (今日のヤマカモジグサの学名に当る) なる学名が当てられており (誤用)、当時 *Agropyron semicostatum* NEES (今日のカモジグサの学名) なる学名は知られていなかった。ともかくヤマカモジグサの麦角は今日まで未だ報告されていない。松原 (1882) のカモジグサ麦角は *Agropyron semicostatum* をさすものと考えられる。

前半まで*)、及び著者の行いたる接種試験⁽¹³⁰⁾⁽¹³¹⁾及び標本を加え、かつ synonym の整理を行つて寄主植物目録を作製した。

1. この目録は応用菌学上の目的からつくられたものである。広く世界的に集められた寄主植物の synonym の整理に当つては、ABRAMS (1923), ARMSTRONG (1917), BABINGTON (1922), BEAL (1896), BUCHENAU (1906), GRISEBACH (1853), HEGI (1906), HITCHCOCK (1935), 本田 (1930), 北川 (1939), KOMAROV (1901), KOKENTHAL (1909), KUNTH (1833), 牧野・根本 (1931), 三浦 (1925), 根本 (1936), STEUDEL (1855), 菅原 (1937) 等を参考とした。然して synonym につき意見の相違あるものは一応別種として取扱つておいた*²。寄主植物に対する厳密な分類学を論ずるものではない。

2. 混乱を避ける為寄主植物は学名で発表されているものを一般に転録した。たゞし通俗名(英・独・日語等近代語名)で発表されたものでも重要なもの、混乱のおそれのないものはそれを学名に直して目録に入れた。この場合には原著者名の前に。の符号が入れてある。なお原著者の発表した寄主植物の学名には必ずしも Author name が附記されていない場合があるのでこの場合には Index kewensis によつた。寄主植物名が通俗名で発表されているため、或は学名で発表されていても Author name を欠くためその学名の不明確な場合には原著者名の前に?の符号を入れてある。

3. 寄主植物はイネ科、タケ科、カヤツリグサ科、キ科に分ち各々アルファベット順に排列し、次にこれを報告した原著者の文献を附し、発表順に排列した。

4. 日本産の寄主植物にはその排列番号の前に * の符号を入れてある。

5. BARGER (1931) は BUNTING (1926, 1928), RHIND (1928), RITCHIE (1926), ROBERTSON (1928) 等が *Sphacelia* として発表したものを全部 *Claviceps* に属するものとして包含せしめているが、本論文においては原著者が *Sphacelia* としていても *Claviceps* に属することを附記するもののみ目録に加えた。

6. 寄主植物に関する原著者の文献としては単に *Sphacelia* (*Claviceps* sp.) に言されると述べたものから、接種試験の行われた結果寄主であることの判明した記録に至る総てを包含する。

7. 原著者が *Claviceps* の種名を附記している場合は勿論これをこの目録に記入してあるが簡単化して次の略号を用いた。

Cl. littoralis=l

Cl. microcephala=m

Cl. Paspali=pli

Cl. purpurea=p

Cl. Sesleriae=s

Cl. Wilsoni=w

Zizania に寄生する麦角菌=z

8. STAGER⁽²⁴⁴⁾⁽²⁴⁵⁾⁽²⁴⁶⁾⁽²⁴⁷⁾⁽²⁴⁸⁾⁽²⁴⁹⁾⁽²⁵⁰⁾⁽²⁵¹⁾⁽²⁵²⁾⁽²⁵³⁾ (1900-23) は接種試験によつて *Cl. purpurea*, *Cl. microcephala* をそれぞれ 4, 2 の biological form に分つているので、簡単化して次の略号を用いた。

pl ライ麦を餌するもので *Cl. purpurea* の typical form であり、19 種の植物を餌す。後 McFARLAND (1921) により 3 種が追加された。(著者の接種試験の結果を加え、著者の目録の如き分類による時は、この form は計 29 種の植物を餌することとなる。)

ps *Brachypodium sylvaticum* を餌するもの。 4 種を餌す。

*³ 戦時中、外国より報告 (1941-45) されたものについては、最近通覧する機会を得た。これらについては、一々原論文を見得ないものもあるので、不完全のおそれはあるけれども、この目録の末尾に、別目録として入れてある。(pp. 151-152)

*⁴ 菌学上の目的には寄主植物が二つの近縁の種に split up される方が妥当であろうと或は逆に他の近縁の種に unite with される方が妥当であろうとあまり影響を蒙らない。事実寄生菌は互に近縁のものを餌す傾向がある。

p_3^{*10} *Lolium perenne* を胃すもの。 5 種を胃す。

p_4 *Anthoxanthum odoratum* に麦角を形成するもの。 ライ麦を含む 5 種を胃す。

m_1 *Phragmites communis* を胃すもの。 4 種を胃す。

m_2 *Poa annua* を胃すもの。 1 種のみ。

接種試験は上記の略号の前に + 又は - を附することにより寄生の有無を示した。 ± は接種の結果 Sphacelia 期(分生孢子期)までは認められたが菌核形成に至らなかったもの。干 は子嚢孢子からは寄生がおこるが分生孢子からは寄生が認められなかったことを示す。

9. その他の略号 p.p. pro parte
 s.s. seed sample

10. これら寄主植物一覧の作製には、広義の禾本科 (Gramineae) をタケ科 Bambusaceae とイネ科 Poaceae に分ち、Poaceae については本田 (1930) に従い、Oryzoideae, Poaeoideae, Agrostoidae, Panicoideae の 4 亜科に分ち更に 16 族に分つ方法に従つた。たゞし *Holcus* 属は Aveneae に属せしめた。なお Nardeae を Poaeoideae に加えた。

寄 主 植 物 目 録 Host-index

Poaceae イ ネ 科

* hosts known in Japan

Gramineae gen. indet. *Cl. Patouillardiana* P. HENN.⁽¹¹²⁾ (1899)

1. *Agropyron acutum* ROEM. et SCHULT. BARGER (1931)
Agropyrum acutum ROEM. et SCHULT. ROSTRUP (1902)
2. *Agropyron barbulatum* SCHUR. BARNAS (1909) p ; BARGER (1931)
3. *Agropyron biflorum* ROEM. et SCHULT. SEYMOUR (1929) p
4. *Agropyron caninum* BEAUV. cf. LIND (1913); SEYMOUR (1929) p ; °MATSUOKA (1942) .
Agropyrum caninum BEAUV. ROSTRUP (1902)
Triticum caninum L. ANONYM (1870) p ; BARNAS (1909) p ; OUDEMANS (1919) p ; ATANASOFF (1920)
5. *Agropyron cristatum* GAERTN. MAINS (1924); SEYMOUR (1929) p
6. *Agropyron dasystachyum* SCRIBN. SEYMOUR (1929) p
7. *Agropyron divergens* NEES BARGER (1931)
Agropyrum divergens NEES FARLOW & SEYMOUR (1888-91) p ; ANDERSON (1889 b) p ; SYDOW (1898) p
8. *Agropyron glaucum* ROEM. et SCHULT. WILLIAMS (1891); WILLIAMS (1893); SEYMOUR (1929) p
Agropyrum glaucum ROEM. et SCHULT. FARLOW & SEYMOUR (1888-91) p ; BUFFUM (1893) p
9. *Agropyron inerme* RYDB. MAINS (1924); SEYMOUR (1929) p
10. *Agropyron junceum* BEAUV. BARGER (1931)
Agropyrum junceum BEAUV. ROSTRUP (1902)
Triticum junceum L. JAAP (1905) p ; OUDEMANS (1919) p
11. *Agropyron maritimum* BEAUV. BARGER (1931)
- *12. *Agropyron Mayebaranum* HONDA KARIYONE (1923)

*10 STÄGER によれば勿論、 p_3 はライ麦及び *Arrhenatherum* を胃さないのであるが、オランダの MASTENBROEK & OORT (1941) によれば p_3 (*Lolium perenne* の麦角及び *Bromus erectus* の麦角) にてライ麦及び *Arrhenatherum* を胃し得る如き biological form を発見している。

13. *Agropyron molle* RYDB. SEYMOUR (1929) *p*
14. *Agropyron occidentale* SCRIBN. HEALD & PETERS (1906); PAMMEL (1911); BARGER (1931)
15. *Agropyron occidentale* SCRIBN. × *Agropyron repens* BEAUV. cf. ATANASOFF (1920); BARGER (1931)
16. *Agropyron repens* BEAUV. PLENK (1794); °NOFFRAY (1900); PAMMEL (1911); MCFARLAND (1921) + *p*₁; STÄGER (1922); WENIGER (1923) *p*; MAINS (1924); WENIGER (1924) *p*₁; ANDERSON et al. (1926) *p*; BONDARZEW (1929) *p*; SEYMOUR (1929) *p*; ANONYM. (1935) *p*; G. M. SMITH (1938); °KIMOTO (1943 a)
Agropyrum repens BEAUV. ANONYM. (1870) *p*; ROSTRUP (1902); AINWORTH (1937) *p*
Agropyrum repens L. FARLOW & SEYMOUR (1888-91) *p*
Triticum repens L. QUEKETT (1841); TULASNE (1853) *p*; CARRUTHERS (1875); FRANK (1880); W. G. SMITH (1884) *p*; MASSEE (1886) *p*; FRANK (1896); FRANK (1897); BONDARZEW & BUCHOLTZ (1903) *p*; BUCHOLTZ (1904) *Cl. sp. indet.*; BARNAS (1909) *p*; OUDEMANS (1919) *p*; KOSSOBUTZKY (1929) *p*; cf. BARGER (1931)
17. *Agropyron Richardsonii* SCHRAD. SEYMOUR (1929) *p*
18. *Agropyron rigidum* GAUD. BARGER (1931)
19. *Agropyron Smithii* RYDB. PAMMEL (1911); WENIGER (1923) *p*; WENIGER (1924); MAINS (1924); SEYMOUR (1929) *p*; °ANONYM. (1935) *p*
20. *Agropyron spicatum* SCRIBN. et SMITH PAMMEL et al. (1901) [cf. ATANASSOFF]; SEYMOUR (1929) *p*; BARGER (1931)
21. *Agropyron strigosum* BOISS. BARGER (1931)
Triticum caninum LEDEB. cf. BARGER (1931)
22. *Agropyron tenerum* VASEY WILLIAMS (1893); FYLES (1915) - *z*; WENIGER (1923) *p*; WENIGER (1924); SEYMOUR (1929) *p*; MOURASHKINSKY (1926) *p*; BARGER (1931) *p*
23. *Agropyron violaceum* LANGE FARLOW & SEYMOUR (1888-91) *p*
24. • *Agropyron violacum* VASEY
Agropyrum violaceum VASEY ANDERSON (1889 b) *p*; BUFFUM (1893) *p*
- Agrostis sp.* W. G. SMITH (1884) *p*
- *25. *Agrostis alba* L. HELMER (1901) *m*; ROSTRUP (1902); BUCHOLTZ (1904) *Cl. sp. indet.*; PAMMEL (1911); GARMAN (1914); WENIGER (1923) *p*; WENIGER (1924); SEYMOUR (1929) *p*; TAKEMOTO (1944 a)
Agrostis alba WITH. [error for L.] KIRCHNER (1890) *p*; KIRCHNER (1923) *m*
Agrostis palustris HUDS. p.p. SEYMOUR (1929) *p*
26. *Agrostis exarata* TRIN. TOGASHI (1942 a); TAKEMOTO (1944 a)
27. *Agrostis hiemalis* BRITTON, STERN et POGG. WENIGER (1924); SEYMOUR (1929) *Cl. sp. indet.*; BARGER (1931)
Agrostis scabra WILLD. FARLOW & SEYMOUR (1888-91) *Cl. sp.*; SYDOW (1898) *p*; BARGER (1931)
- *28. *Agrostis palustris* HUDS. ANDERSON et al. (1926) *p*; SEYMOUR (1929) *p*; °TOKUNAGA (1934); TOGASHI (1942 a)
29. *Agrostis spica-venti* L. cf. GALAMA (1834)
Apera spica-venti BEAUV. cf. BARGER (1931)
30. *Agrostis stolonifera* L. GALAMA (1834); OHTANI (1928); DORPH-PETERSEN (1929) *p* (s.s.); DORPH-PETERSEN (1932) *m* (s.s.)
31. *Agrostis tenuis* SIBTH.
Agrostis sylvatica HUDS. BARGER (1931)

- Agrostis vulgaris* WITH. KÜHN (1863); FRANK (1890); WOLF & ZOPF (1887); FRANK (1896);
cf. SEYMOUR (1929) *p*
- Agrostis vulgaris* L. [error for WITH.] KIRCHNER (1890) *p*; KIRCHNER (1923) *m*
- Agrostis palustris* HUDS. p.p. SEYMOUR (1929) *p*
- Alopecurus* SYDOW (1898) *m*
- Alopecurus* sp. AINWORTH (1937) *p*
- *32. *Alopecurus aequalis* SOBOL. °TOKUNAGA (1934)
Alopecurus fulvus SM. ANONYM. (1870) *p*; cf. BARGER (1931)
33. *Alopecurus alpinus* SM. BARGER (1931)
34. *Alopecurus geniculatus* L. GALAMA (1834); KÜHN (1863); FRANK (1880); WOLF & ZOPF (1887);
FRANK (1896); ROSTRUP (1902); BLAS (1912) *m*; cf. OUDEMANS (1919) *m*; WENIGER (1924)
35. *Alopecurus myosuroides* HUDS. OUDEMANS (1919) *p*; STÄGER (1922); BARGER (1931)
Alopecurus agrestis L. TULASNE (1853) *p*; MASSEE (1886); ROSTRUP (1902); cf. LIND (1913)
36. *Alopecurus pratensis* L. QUEKETT (1841); KÜHN (1856); DIETRICH (1856-59); KÜHN (1858);
ANONYM. (1870) *p*; CARRUTHERS (1875); FRANK (1880); W. G. SMITH (1884) *p*; MASSEE (1886);
WOLF & ZOPF (1887); KIRCHNER (1890) *p*; FRANK (1896); °NOFFRAY (1930); ROSTRUP (1902);
STÄGER (1903) $+p_1? -p_3 -m_1$; BUCHOLTZ (1904) p_1 ; ERIKSSON (1913) *p*; FYLES (1915) $-z$;
cf. OUDEMANS (1919) *m*; cf. ATANASOFF (1920) *m*; KIRCHNER (1923) *p*; WENIGER (1923) *p*;
WENIGER (1924) p_1 ; SEYMOUR (1929) *m, p*; DORPH-PETERSEN (1931) *p* (s.s.)
- Alopecurus alpestris* WAHLENB. cf. BARGER (1931)
37. *Alopecurus ventricosus* PERS. BARGER (1931)
Alopecurus arundinaceus POIR. cf. BARGER (1931)
Alopecurus ruthenicus WEINM. cf. BARGER (1931)
38. *Ammophila arenaria* LINK TULASNE (1853) *p*; SYDOW (1898) *p*; STÄGER (1903) $-w$; BUCHOLTZ
(1904) *Cl. sp. indet.*; ANDERSON et al. (1926) *p*; BARGER (1931)
Arundo arenaria L. CARRUTHERS (1875); cf. BARGER (1931)
Psamma arenaria ROEM. et SCHULT. SYDOW (1898) *p*; ROSTRUP (1902); LUTZ (1904) *p*; BARGER
(1931)
Ammophila arundinacea HOST BARGER (1931)
39. *Ammophila arenaria* LINK × *Calamagrostis Epigeios* ROTH JAAP (1905) *m*
Ammophila arundinacea HOST × *Calamagrostis Epigeios* ROTH BARGER (1931)
40. *Ammophila baltica* LINK BARGER (1931)
Psamma baltica ROEM. et SCHULT. ROSTRUP (1902)
41. *Ammophila breviligulata* FERN. SEYMOUR (1929) *p*
42. *Ampelodesmos tenax* LINK DUCCELLIER (1922); TANRET (1922 a) *p*; cf. TANRET (1922 b);
TANRET (1923) *p*
Ampelodesma tenax LINK cf. BARGER (1931)
Ampelodesmus tenax LINK cf. OHTANI (1928)
Arundo festucoides DESF. TANRET (1923) *p*
- Andropogon* SYDOW (1893) *Cl. pusilla*; STEVENSON (1926) *Cl. pusilla*
43. *Andropogon caricosus* L. var. *mollicomus* HACK. AJREKAR (1926) *Sphac.* (conidial stage of *Cl.*)

44. *Andropogon intermedius* R. BR. BIRMINGHAM (1921) Sphac. stage (*Cl. sp.*)
45. *Andropogon Ischaemum* L. DE CESATI (1848); KUHN (1858) *Cl. pusilla*; *Cl. pusilla* CESATI⁽⁵³⁾ (1861); FRANK (1880); FRANK (1896)
Andropogon Ischaemon L. cf. OUDEMANS (1919) *Cl. pusilla*
46. *Andropogon tener* KUNTH SEYMOUR (1929) *p*
47. *Aneurolepidium pseudoagropyrum* NEVSKI °MATSUOKA (1942); TAKEMOTO (1944 a)
- Anthoxanthum* MASSEE (1886) *m*
48. *Anthoxanthum odoratum* L. TULASNE (1853) *p*; ANONYM. (1870) *p*; FRANK (1880); W. G. SMITH (1884) *p*; MASSEE (1886) *p*; WOLF & ZOPF (1887); KIRCHNER (1890) *p*; FRANK (1896); SYDOW (1898) *m*; STÄGER (1900) $+p_1$; ROSTRUP (1902); STÄGER (1903) $+p_1 - p_2 - p_3 - m_1 - w$; BONDARZEW & BUCHOLTZ (1903) *p*; BUCHOLTZ (1904) p_1 ; STÄGER (1907) $+p_1 - s$; BLAS (1912) *m, p*; ERIKSSON (1913) p_1 ; OUDEMANS (1919) *m, p*; KIRCHNER (1923) *p*; TAKEMOTO (1944 a)
49. *Arrhenatherum elatius* MERT. et KOCH ANONYM. (1870) *p*; FRANK (1880); WOLF & ZOPF (1887); KIRCHNER (1890) *p*; FRANK (1896); STÄGER (1900) $+p_1$; STÄGER (1903) $+p_1 - p_2 - p_3 - m_1 - w$; STÄGER (1907) $+p_1 - s$; STÄGER (1908 a) $-m_1$; GAIN (1912); FYLES (1915) $-z$; MCFARLAND (1921) $+p_1$; STÄGER (1922); KIRCHNER (1923) *p*; AINWORTH (1937) *p*; PETCH (1937 a)
Arrhenatherum elatius BEAUV. [error for MERT. et KOCH] SEYMOUR (1929) *p*; cf. BARGER (1931)
Avena elatior L. PLENK (1794); TULASNE (1853) *p*; ROSTRUP (1902); ERIKSSON (1913) p_1 ; OUDEMANS (1919) *m, p*; cf. BARGER (1931); DORPH-PETERSEN (1931) *p* (s.s.)
Holcus avenaceus SCOP. OHTANI (1928)
Arrhenatherum avenaceum BEAUV. WILSON (1875); W. G. SMITH (1884) *p*; MASSEE (1886) *p*
50. *Arrhenatherum erianthum* BOISS. et REUT. BLAS (1912) *m*
- *51. *Arundinella hirta* TANAKA var. *ciliata* KOIDZ. °SHIRAI (1892); °SHIRAI (1894); °SHIRAI (1903) *m*; °KARIYONE (1923); °TOKUNAGA (1934); SHIMADA (1939) *m*; ABE (1944 c)
Arundinella hirta KOIDZ. [error for TANAKA] var. *ciliata* KOIDZ. TAKEMOTO (1944 a)
- *52. *Arundinella hirta* TANAKA var. *typica* HONDA SHIMADA (1939) *m*
53. *Arundo plinii* TURRA cf. OUDEMANS (1919) *m*
Arundo Pliniana TURRA. BARGER (1931)
54. *Avena algeriensis* TRAB. DUCELLIER (1922); DUCELLIER (1923) *p*
Festuca algeriensis TRAB. cf. BARGER (1931) *p*
55. *Avena barbata* BROT. BARGER (1931)
56. *Avena fatua* L. BARGER (1931)
57. *Avena fatua* L. var. *glabrescens* COSS. DUCELLIER (1922)
58. *Avena pratensis* L. DIETRICH (1856-59; FRANK (1880); FRANK (1896); ROSTRUP (1902); BUCHOLTZ (1904) *Cl. sp. indet.*
59. *Avena pubescens* HUDS. cf. OUDEMANS (1919) *p*; BARGER (1931)
60. *Avena sativa* L. °FRANK (1880); KIRCHNER (1890) *p*; °ZOPF (1890); °FRANK (1896); °BASTIDE

- et al. (1907); WARBURTON (1911) p ; °ERIKSSON (1913); °FYLES (1915) $-z$; DUCCELLIER (1922) p ; °TANRET (1922 a); TANRET (1922 b); TANRET (1923) p ; DUCCELLIER (1923) p ; KIRCHNER (1923) p ; °WENIGER (1923) p ; WENIGER (1924); ANDERSON et al. (1926) p ; SEYMOUR (1929) p ; °DORPH-PETERSEN (1929) p (s.s.); MCCREA (1931); KAWATANI (1944 b) $-l$; KAWATANI (1945) $-p_1$
61. *Avena sterilis* L. DUCCELLIER (1923) p
62. *Beckmannia erucaeformis* HOST BARGER (1931)
- Brachypodium japonicum* MIQ. ? °MATSUBARA (1882); ? °OHTANI (1928)
- *63. *Brachypodium miserum* KOIDZ. °TOKUNAGA (1934)
64. *Brachypodium pinnatum* BEAUV. FRANK (1880); FRANK (1896); STÄGER (1905) $-p_2$; STÄGER (1910)
65. *Brachypodium sylvaticum* BEAUV. FRANK (1880); MASSEE (1886); FRANK (1896)
Brachypodium sylvaticum BEAUV. ROSTRUP (1902); STÄGER (1903) $+p_2 - p_3 - w$; ERIKSSON (1913); STÄGER (1922)
Brachypodium sylvaticum PALIS. TULASNE (1853) p
Brachypodium sylvaticum ROEM. et SCHULT. cf. OUDERMANS (1919) p
66. *Briza media* L. STÄGER (1900) $+p_1$; STÄGER (1903) $+p_1$; BONDARZEW & BUCHOLTZ (1903) p ; BUCHOLTZ (1904) p_1 ; ERIKSSON (1913) p_1
67. *Briza minor* L. BARGER (1931)
- Bromus* sp. ABE (1944 b)
68. *Bromus albidus* BIEB. BARGER (1931)
69. *Bromus arvensis* L. ARMSTRONG (1917) p (s.s.); DORPH-PETERSEN (1931) p (s.s.)
70. *Bromus asper* MURR. BARGER (1931)
Bromus ramosus HUDS. cf. OUDEMANS (1919) p ; cf. BARGER (1931)
Schenodorus serotinus ROSTRUP ROSTRUP (1902)
71. *Bromus caprinus* KERN. cf. OUDEMANS (1919) p
72. *Bromus ciliatus* L. °MATSUOKA (1942)
73. *Bromus condensatus* HACK. SEYMOUR (1929) p
74. *Bromus erectus* HUDS. KIRCHNER (1890) p ; STÄGER (1900) $-p_1$; STÄGER (1903) $+p_3 - p_1 - w$; STÄGER (1905) $-p_2$; STÄGER (1907) $-s$; STÄGER (1908 a) $-m_2$; cf. OUDEMANS (1919) p ; KIRCHNER (1923) p
Bromus pratensis LAM. cf. BARGER (1931)
75. *Bromus inermis* LEYSS. KÜHN (1863); FRANK (1880); WOLF & ZOPF (1887); KIRCHNER (1890) p ; BONDARZEW & BUCHOLTZ (1903) p ; BUCHOLTZ (1904) *Cl. sp. indet.*; BARNAS (1909) p ; MCFARLAND (1921) $+p_1$; BIRMINGHAM (1921); KIRCHNER (1923) p ; WENIGER (1923) p_1 ; MAINS (1924); WENIGER (1924) p_1 ; ANDERSON et al. (1926) p ; SEYMOUR (1929) p ; °ANONYM. (1935) p ; KREBS (1936) p_1 ; °MATSUOKA (1942)
Schenodorus inermis BEAUV. DORPH-PETERSEN (1903) p (s.s.) [cf. ATANHSOFF]; cf. BARGER (1931)
- *76. *Bromus japonicus* THUNB. °KOBAYASHI (1939) p
77. *Bromus marginatus* NEES SEYMOUR (1929) p

78. *Bromus marginatus* STEUD. MAINS (1924)
 79. *Bromus mollis* L. KUHN (1863); CARRUTHERS (1875); FRANK (1880); WOLF & ZOPF (1887); KIRCHNER (1890) *p*; FRANK (1896); BONDARZEW & BUCHOLTZ (1903) *p*; BUCHOLTZ (1904) *Cl. sp. indet.*; KIRCHNER (1923) *p*
 80. *Bromus pratensis* EHRH. CARRUTHERS (1874); CARRUTHERS (1875)
 - *81. *Bromus remotiflorus* OHWI °SHIRAI (1905) *m*; °SHIRAI & MIYAKE (1917) *m*; °SHIRAI & HARA (1927) *m*; °TOKUNAGA (1934); °KOBAYASHI (1939) *p*; TAKEMOTO (1944 a)
 82. *Bromus rubens* L. BARGER (1931)
 83. *Bromus secalinus* L. KUHN (1856); DIETRICH (1856-59); KUHN (1858); ANONYM. (1870) *p*; CARRUTHERS (1875); FRANK (1880); WOLF & ZOPF (1887); FRANK (1896); ROSTRUP (1902); BONDARZEW & BUCHOLTZ (1903) *p*; BUCHOLTZ (1904) *Cl. sp. indet.*; MAINS (1924)
 84. *Bromus sterilis* L. STÄGER (1900) +*p*₁; STÄGER (1903) +*p*₁
 - *85. *Bromus unioloides* H.B.K. KAWATANI
 86. *Bromus vestitus* SCHRAD. ROSTRUP (1902)
- Calamagrostis Cl. microcephala* (WALLR.) TUL. var. *Acus* DESM. [Sacc. Syll. II. p. 565; SYDOW (1898); OUDEMANS (1919)]
- Calamagrostis sp.* MIURA (1928) *m*
87. *Calamagrostis aleutica* BONG. SEYMOUR (1929) *m*
 88. *Calamagrostis arundinacea* ROTH STÄGER (1900) +*p*₁; ROSTRUP (1902); STÄGER (1903) +*p*₁ -*m*₁ -*w*; BUCHOLTZ (1904) *p*₁; ERIKSSON (1913) *p*₁; cf. OUDEMANS (1919) *m*; cf. BARGER (1931)
 - Deyouxia sylvatica* KUNTH BARGER (1931)
 - *89. *Calamagrostis arundinacea* ROTH var. *robusta* NAKAI °KOBAYASHI (1939) *m*; °SHIMADA (1939) *m*; TAKEMOTO (1944 a)
 - *90. *Calamagrostis arundinacea* ROTH var. *sciuroides* HACK. ? °OHTANI (1928); ? °ANONYM. (1936); SHIMADA (1939) *m*; TAKEMOTO (1944 a)
 91. *Calamagrostis canadensis* BEAUV. FARLOW & SEYMOUR (1888-91) *Cl. sp.*; WILLIAMS (1893) *p*; PAMMEL (1911); SEYMOUR (1929) *p*; BARGER (1931)
 - Deyouxia canadensis* MUNRO BARGER (1931)
 92. *Calamagrostis chalybaea* FRIES BARGER (1931)
 - Calamagrostis chalybaea* TR. [error for FR.] cf. OUDEMANS (1919) *p*
 93. *Calamagrostis cinnoides* BARTON
 - Arundo cinnoides* MUHL. cf. GALAMA (1834)
 - Deyouxia Nuttalliana* VASEY BARGER (1931)
 94. *Calamagrostis confinis* NUTT. WILLIAMS (1893) *p*
 - *95. *Calamagrostis Epigeios* ROTH ROSTRUP (1902); BONDARZEW & BUCHOLTZ (1903) *m*; BUCHOLTZ (1904) *Cl. sp. indet.*; °SHIRAI (1905) *m*; °SHIRAI & MIYAKE (1907) *m*; cf. OUDEMANS (1919) *m*; STÄGER (1922); °SHIRAI & HARA (1927) *m*; °KOBAYASHI (1939) *m*; MATSUOKA (1940); SUGIMOTO & MATSUOKA (1941); °MATSUOKA (1942); TAKEMOTO (1944 a); ABE (1944 b)
 - Calamagrostis Epigeios* L. [error for ROTH] SYDOW (1898) *m*
 - *96. *Calamagrostis Epigeios* ROTH var. *densiflora* LEDEB. °SHIRAI & HARA (1927) *m*; HIRATSUKA & KOTANI (1930); °TOKUNAGA (1934); TOCHINAI (1938); TOGASHI (1942 a); TAKEMOTO (1944 a); ABE (1944 b)

97. *Calamagrostis groenlandica* KUNTH FARLOW & SEYMOUR (1888-91) *p*; SYDOW (1898) *p*; SEYMOUR (1929) *p*
98. *Calamagrostis hyperborea* LANGE WENIGER (1923) *p*; WENIGER (1924)
99. *Calamagrostis inexpansa* GRAY SEYMOUR (1929) *p*
100. *Calamagrostis javanica* STEUD. STÄGER (1910)
101. *Calamagrostis lanceolata* ROTH KÜHN (1858) *m*; cf. BARGER (1931) *m*
Arundo calamagrostis L. TULASNE (1853) *m*; KÜHN (1863)
- *102. *Calamagrostis Langsdorffii* TRIN. SEYMOUR (1929) *m*; cf. BARGER (1931); °TOKUNAGA (1934); °MATSUOKA (1942); °KIMOTO (1943 a)
Deyeuxia Langsdorffii KUNTH BARGER (1931)
- *103. *Calamagrostis Matsumurae* MAXIM. TAKEMOTO (1944 a)
104. *Calamagrostis neglecta* GAERTN. MEY. et SCHERB. BUCHOLTZ (1904) *Cl. sp. indet.*; WENIGER (1923) *m*; SEYMOUR (1929) *m, p*
Calamagrostis neglecta GAERTN. cf. BARGER (1931)
Deyeuxia neglecta KUNTH BARGER (1931)
? *Calamagrostis neglecta* BEAUV. MIURA (1928) *m*
105. *Calamagrostis silvatica* DC. SYDOW (1898) *m*
106. *Calamagrostis silvatica* BESS. BARGER (1931)
- *107. *Calamagrostis urelytra* HACK. °TOKUNAGA (1934)
- *108. *Calamagrostis urelytra* HACK. var. *pumila* TAKEDA °TOKUNAGA (1934)
109. *Calamagrostis varia* HOST cf. OUDEMANS (1919) *m*; cf. BARGER (1931)
Deyeuxia Halleriana VASEY BARGER (1931)
110. *Calamagrostis villosa* MUTEL MIURA (1928) *m*
111. *Catabrosa aquatica* BEAUV. DIETRICH (1856-59); BUCHOLTZ (1904) *Cl. sp. indet.*
Molinia aquatica WIBEL cf. BARGER (1931)
112. *Corynephorus canescens* BEAUV. BARGER (1931)
Weingaertneria canescens BERNH. SYDOW (1898) *m*
113. *Cynodon Dactylon* PERS. °NOFFRAY (1900)
114. *Cynosurus cristatus* L. STÄGER (1903) *-w*; BLAS (1912) *m*; DORPH-PETERSEN (1931) *p (s.s.)*
- *115. *Dactylis glomerata* L. QUEKETT (1841); TULASNE (1853) *p*; KÜHN (1856); KÜHN (1858); ANONYM. (1870) *p*; FRANK (1880); W. G. SMITH (1884) *p*; MASSEE (1886) *p*; WOLF & ZOPF (1887); KIRCHNER (1890) *p*; FRANK (1896); °NOFFRAY (1900); STÄGER (1900) *+p₁*; ROSTRUP (1902); STÄGER (1903) *+p₁ -w*; BONDARZEW & BUCHOLTZ (1903) *p*; BUCHOLTZ (1904) *p₁*; STÄGER (1907) *-p₁ -s*; BARNAS (1909) *p*; WHETZEL & REDDICK (1911); ERIKSSON (1913) *p₁*; GARMAN (1914); FYLES (1915) *-z*; cf. OUDEMANS (1919) *p*; STÄGER (1922); KIRCHNER (1923) *p*; WENIGER (1923) *p*; MAINS (1924); WENIGER (1924) *p₁*; SEYMOUR (1929) *m, p*; DORPH-PETERSEN (1931) *p (s.s.)*; AINWORTH (1937) *p*; ANONYM. (1940) *p*; °KIMOTO (1943 a); TAKEMOTO (1944 a)
Festuca glomerata ALL. GALAMA (1834)

116. *Danthonia Parryi* SCRIBN. BARGER (1931)
117. *Deschampsia caespitosa* BEAUV. BARGER (1931)
Aira caespitosa L. ANONYM. (1870) *p*; WILSON (1875); W. G. SMITH (1884) *p*; MASSEE (1886) *p*; SYDOW (1898) *m*; STÄGER (1903) $+m_1 - p_2$; BONDARZEW & BUCHOLTZ (1903) *m*; BUCHOLTZ (1904) *m*; STÄGER (1908 a) $-m_2$; ERIKSSON (1913) *m*; cf. OUDEMANS (1919) *m*; cf. BARGER (1931)
118. *Deschampsia flexuosa* TRIN. STÄGER (1910)
Aira flexuosa L. WILSON (1875); W. G. SMITH (1884) *p*; MASSEE (1886); ROSTRUP (1902); STÄGER (1903) $-w$; BUCHOLTZ (1904) *Cl. sp. indet.*; BARNAS (1909) *p*; cf. BARGER (1931)
- Diplachne* OHTANI (1928)
- *119. *Eccoilopus cotulifer* A. CAMUS °KARIYONE (1923)
Spodiopogon cotulifer HACK. SYDOW (1898) *p*
- Echinochloa Cl. balansoides* A. MOLLER⁽¹⁸⁰⁾ (1901)
120. *Elymus akmolinensis* DROB. BARGER (1931)
121. *Elymus arenarius* L. GALAMA (1834); KOHN (1863); FRANK (1880); W. G. SMITH (1884) *p*; ?SHIRAI (1887); ZOPF (1890); FRANK (1896); SYDOW (1898) *p*; ROSTRUP (1902); BUCHOLTZ (1904) *Cl. sp. indet.*; JAAP (1905) *p*; OHTANI (1928)
Hordeum arenarium ASCHERS. cf. OUDEMANS (1919) *p*
122. *Elymus arenarius* L. $\times$ *Agropyron junceum* BEAUV. BARGER (1931)
Elymus arenarius L. $\times$ *Triticum junceum* L. JAAP (1905) *p*
123. *Elymus canadensis* L. BESSEY (1884); FARLOW & SEYMOUR (1888-91) *p*; SYDOW (1898) *p*; PAMMEL (1911); WENIGER (1923) *p*; WENIGER (1924)
124. *Elymus canadensis* Auct. Amer. saltem p.p. SEYMOUR (1929) *p*
125. *Elymus condensatus* PRESL FARLOW & SEYMOUR (1888-91) *p*; BUFFUM (1893); SYDOW (1898) *p*; MAINS (1924); SEYMOUR (1929) *p*; TAKEMOTO (1944a)
- *126. *Elymus dahuricus* TURCZ. MATSUOKA (1940); SUGIMOTO & MATSUOKA (1941); °MATSUOKA (1942); TOGASHI (1942a); °KIMOTO (1943a); TAKEMOTO (1944a)
127. *Elymus europaeus* L. GALAMA (1834); OHTANI (1928); BARGER (1931)
Hordeum europaeum ALL. ROSTRUP (1902); cf. BARGER (1931)
128. *Elymus giganteus* VAHL W. G. SMITH (1884)
129. *Elymus glaucus* BUCKL. TAKEMOTO (1944a)
130. *Elymus innovatus* BEAL SEYMOUR (1929) *p*
131. *Elymus Macounii* VASEY WENIGER (1923) *p*; WENIGER (1924); SEYMOUR (1929) *p*
- *132. *Elymus mollis* TRIN. ?°SHIRAI (1887); °MIYABE & MIYAKE (1907) *p*; °IDETA (1911); KUDO (1924) *p*; SEYMOUR (1929) *p*; HIRATSUKA & KOTANI (1930) *p*; °TOKUNAGA (1934); ITO (1939); SHIMADA (1939); TOGASHI (1942a); °KIMOTO (1943a); KIMOTO (1943b) *p*; TAKEMOTO (1944a, b); HASHIMOTO (1944a, b); ABE (1944a); MATSUO et al. (1944); *Cl. litoralis* KAWATANI⁽¹²⁵⁾ (1944a); KAWATANI (1944b) $+l$; KAWATANI (1945) $+p_1$; KAWATANI (1946) *l*; HASHIMOTO (1946)
133. *Elymus robustus* SCRIBN. et SMITH HALSTED (1886) [cf. ATANASOFF]; PAMMEL (1911) *p*; SEYMOUR (1929) *p*
Elymus robustus SCRIBN. BARGER (1931)

134. *Elymus sabulosus* BIEB. QUEKETT (1841); BARGER (1931)
135. *Elymus sibiricus* L. MATSUOKA (1940); SUGIMOTO & MATSUOKA (1941); °MATSUOKA (1942)
136. *Elymus striatus* WILLD. PAMMEL et al. (1901) [cf. ATANASOFF]; PAMMEL (1911); WENIGER (1923) *p*; WENIGER (1924); SEYMOUR (1929) *p*
137. *Elymus sylvaticus* FRANK (1896)
138. *Elymus triticoides* BUCKL. SEYMOUR (1929) *p*
139. *Elymus virescens* PIPER SEYMOUR (1929) *p*
140. *Elymus virginicus* L. FARLOW & SEYMOUR (1888-91) *p*; SYDOW (1898) *p*; PAMMEL et al. (1901) [cf. ATANASOFF]; DUGGAR (1909) *p*; PAMMEL (1911); WENIGER (1924); SEYMOUR (1929) *p*
141. *Elymus virginicus* L. var. *submuticus* HOOK. SALMON (1884)
- *142. *Eragrostis pilosa* BEAUV. °TOGASHI (1942 a)
- Erianthus* sp. SEYMOUR (1929) *Cl. sp. indet.*
- Festuca* sp. °EVANS (1912-13)
- Festuca* sp. ANDERSON et al. (1926) *p*
- Festuca* sp. AINWORTH (1937) *p*
- Festuca* sp. ABE (1944 b)
143. *Festuca elatior* L. CARRUTHERS (1875); WILSON (1875); W. G. SMITH (1884) *p*; MASSEE (1886) *p*; BONDARZEW & BUCHOLTZ (1903) *p*; BUCHOLTZ (1904) *p*₁; WHETZEL & REDDICK (1911); ERIKSSON (1913) *p*₁; BIRMINGHAM (1921); WENIGER (1924); SEYMOUR (1929) *p*; of SMITH & TIMMIS (1930-31); KREBS (1936) *p*₁; ANONYM. (1940) *p*
- *144. *Festuca elatior* L. var. *arundinacea* WIMM.
- Festuca arundinacea* SCHREB. ROSTRUP (1902); BONDARZEW & BUCHOLTZ (1903) *p*; BUCHOLTZ (1904) *Cl. sp. indet.*; STÄGER (1908 a) + *p*₁; ERIKSSON (1913) *p*; OUDEMANS (1919) *p*; BIRMINGHAM (1921); PETCH (1937 a)
- Festuca elatior* L. subsp. *arundinacea* HACK. ARMSTRONG (1917) *p* (s.s.); TAKEMOTO (1944 a)
145. *Festuca gigantea* VILL. KUHN (1856); KUHN (1858); KUHN (1863); FRANK (1880); FRANK (1896); ROSTRUP (1902); OUDEMANS (1919) *p*
146. *Festuca Hookeriana* F. MUELL. BIRMINGHAM (1921)
147. *Festuca nubigena* JUNGH. STÄGER (1910)
- *148. *Festuca ovina* L. KIRCHNER (1890) *p*; BUCHOLTZ (1904) *Cl. sp. indet.*; OUDEMANS (1919) *p*; KIRCHNER (1923) *p*; SEYMOUR (1929) *p*; ABE (1944 b)
- Festuca pratensis* VERZ. cf. BARGER (1931)
149. *Festuca ovina* L. var. *duriuscula* KOCH
- Festuca duriuscula* L. cf. GALAMA (1834); OHTANI (1928)
- *150. *Festuca pratensis* HUDS. QUEKETT (1841); ANONYM. (1870) *p*; WILSON (1875); W. G. SMITH (1884) *p*; MASSEE (1886); ROSTRUP (1902); STÄGER (1903) + *p*₁ - *p*₂ - *w*; GARMAN (1914); WENIGER (1923) *p*; OHTANI (1928); DORPH-PETERSEN (1929) *p* (s. s.); DORPH-PETERSEN (1931) *p* (s. s.)
- Festuca pratensis* L. [error for HUDS.] KIRCHNER (1890) *p*; KIRCHNER (1923) *p*
- Festuca elatior* L. subsp. *pratensis* HACK. TAKEMOTO (1944 a)
- *151. *Festuca rubra* L. KIRCHNER (1890) *p*; ROSTRUP (1902); BUCHOLTZ (1904). *Cl. sp. indet.*; KIRCHNER (1923) *p*; °TOKUNAGA (1934); TOGASHI (1942 a); °KIMOTO (1943 a); TAKEMOTO

- (1944 a); ABE (1944 b)
152. *Festuca rubra* L. var. *heterophylla* MUTEL SEYMOUR (1929) *Cl. sp. indet.*
153. *Festuca rubra* L. var. *lanuginosa* MERT. et KOCH BUCHOLTZ (1904). *Cl. sp. indet.*
154. *Festuca spadicea* cf. BARGER (1931)
155. *Festuca sylvatica* Vill. BARGER (1931)
Festuca sylvatica VILL. OUDEMANS (1919) *p*
- Glyceria* MASSEE (1886) *w*
156. *Glyceria aquatica* WAHLENB. OUDEMANS (1919) *p*; cf. BARGER (1931)
Poa aquatica L. TULASNE (1853) *p*
Glyceria spectabilis MERT. et KOCH KÜHN (1863); FRANK (1880); WOLF & ZOPF (1887); FRANK (1896)
- *157. *Glyceria arundinacea* KUNTH °TOKUNAGA (1934)
158. *Glyceria borealis* BATCHELDER KREBS (1936) *w?* or *p*
159. *Glyceria fluitans* R. BR. PLENK (1794); TULASNE (1853) *p*; ANONYM. (1870) *p*; CARRUTHERS (1875); FRANK (1880); W. G. SMITH (1884) *p*, *Cl. purpurea* TUL. var. *Wilsoni* W. SM.; *Cl. Wilsoni* COOKE⁽⁵¹⁾ (1884); MASSEE (1886) *p*; WOLF & ZOPF (1887); FARLOW & SEYMOUR (1888-91) *p*; KIRCHNER (1890) *p*; FRANK (1896) *w*; FRANK (1897); SYDOW (1898) *p*, *w*; STÄGER (1900) *w?* - *p*₁; ROSTRUP (1902); STÄGER (1903) + *w* - *p*₁; BONDARZEW & BUCHOLTZ (1903) *p*; BUCHOLTZ (1904) *w*; STÄGER (1905) - *p*₂; PAMMEL (1911); ERIKSSON (1913); OUDEMANS (1919) *p*, *w*; STÄGER (1922) *w*; KIRCHNER (1923) *p*; PETCH (1937 a)
160. *Glyceria grandis* WATSON SEYMOUR (1929) *p*
Panicularia grandis NASH WENIGER (1923) *p*; WENIGER (1924)
161. *Glyceria nervata* TRIN. FARLOW & SEYMOUR (1888-91) *Cl. sp.*; MCNEIL & PAMMEL (1908); DUGGAR (1909) *p*; PAMMEL (1911); SEYMOUR (1929) *Cl.*
162. *Glyceria plicata* FRIES KIRCHNER (1890) *p*; KIRCHNER (1923) *p*
163. *Glyceria septentrionalis* HITCHC. SEYMOUR (1929) *p*
- *164. *Hakonechloa macra* MAKINO °SHIRAI & MIYAKE (1917) *p*; °SHIRAI & HARA (1927) *p*
- *165. *Hierochloa alpina* ROEM. et SCHULT. °TOKUNAGA (1934); °KIMOTO (1943 a)
- *166. *Hierochloa odorata* BEAUV. °TOKUNAGA (1934); °KIMOTO (1943 a)
Hierochloa odorata BEAUV. WENIGER (1923) *p*; WENIGER (1924) *p*₁
Hierochloa borealis ROEM. et SCHULT. DIETRICH (1856-59); STÄGER (1900); + *p*₁; STÄGER (1903) + *p*₁; BUCHOLTZ (1904) *p*₁
Hierochloa odorata WAHLENB. cf. BARGER (1931)
167. *Hierochloa Horsfieldii* MAXIM.
Ataxia Horsfieldii R. BR. [error for KUNTH] = *Hierochloa odorata* JUNGH. STÄGER (1910)
168. *Hilaria cenchroides* H.B.K. *Cl. cinerea* GRIFFITHS⁽⁵²⁾ (1901)
169. *Hilaria mutica* BENTH. *Cl. cinerea* GRIFFITHS⁽⁵²⁾ (1901)
- Holcus* SYDOW (1898) *m*
- Holcus* sp. OUDEMANS (1919) *m*
170. *Holcus lanatus* L. WILSON (1875); W. G. SMITH (1884) *p*; MASSEE (1886) *m*, *p* (?); KIRCHNER (1890) *p*; ROSTRUP (1902); STÄGER (1907) - *s*; GAIN (1912); cf. OUDEMANS (1919) *m*; STÄGER

- (1922); KIRCHNER (1923) *p*; DORPH-PETERSEN (1931) *p*(s. s.); ANONYM. (1940) *p*.
171. *Holcus mollis* L. WILSON (1875); W. G. SMITH (1884) *p*; MASSEE (1886) *p*; ROSTRUP (1902); STÄGER (1903) $-p_2 -w$; STÄGER (1907) $+p_1 -s$; BLAS (1912) *m*; OUDEMANS (1919) *m, p*; STÄGER (1922); OHTANI (1928)
172. *Hordeum boreale* SCRIBN. et SMITH SEYMOUR (1929) *p*
173. *Hordeum bulbosum* L. BUCHOLTZ (1904) *Cl. sp. indet.*; STÄGER (1907) $-s$; BARGER (1931)
- *174. *Hordeum distichon* L. var. *erectum* SCHÜBL. KAWATANI (1944 b) $+l$; KAWATANI (1945) $+p_1$
Hordeum distichon L. p.p. WILSON (1875)
Hordeum distichum L. p.p. W. G. SMITH (1884) *p*; MASSEE (1886); ROSTRUP (1902); BONDARZEW & BUCHOLTZ (1903) *p*; BUCHOLTZ (1904) *Cl. sp. indet.*
Hordeum sativum JESS. p.p. °KÜHN (1856); °KÜHN (1858); °FRANK (1880); °ZOPF (1890); °FRANK (1896); °FRANK (1897); °STÄGER (1900) $+p_1$; °STÄGER (1903) $+p_1$; °STÄGER (1907) $-p_1$; STÄGER (1908 a) $-m_2$; °DUGGAR (1909) *p*; ERIKSSON (1913) p_1 ; °GÜSSOW (1914); °FYLES (1915) $-z$; °DUC (1922); °HENNING (1922) *p*; °WENIGER (1923) p_1 ; KIRCHNER (1923) *p*; °MAINS (1924) *p*; °SHIRAI & HARA (1927) *p*; °GRAM et al. (1928) *p*; °DORPH-PETERSEN (1929) *p*(s. s.); °ANONYM. (1935) *p*; °MCROSTIE (1936) *p*; °AINWORTH (1937); °KOBAYASHI (1939) *p*; °KIMOTO (1943 a)
- *175. *Hordeum distichon* L. var. *nutans* SCHÜBL. KAWATANI (1944 b) $+l$; KAWATANI (1945) $+p_1$
Horbeum distichon L. p.p. l. c.
Hordeum distichum L. p.p. l. c.
Hordeum sativum JESS. p.p. l. c.
- *176. *Hordeum hexastichon* L. °ANERUD (1939); °WITTE (1940); KAWATANI (1944 b) $+l$; KAWATANI (1945) $+p_1$
Hordeum sativum JESS. p.p. l. c.
- *177. *Hordeum hexastichon* L. var. *nudum* KAWATANI (1944 b) $+l$; KAWATANI (1945) $+p_1$
Hordeum sativum JESS. p.p. l. c.
178. *Hordeum jubatum* L. FARLOW & SEYMOUR (1888-91) *p*; SYDOW (1898) *p*; PAMMEL et al. (1901) [cf. ATANASOFF]; PAMMEL (1911); cf. OUDEMANS (1919) *p*; WENIGER (1923) *p*; WENIGER (1924); SEYMOUR (1929) *p*.
179. *Hordeum murinum* L. QUEKETT (1841); ANONYM. (1870) *p*; CARRUTHERS (1875); FRANK (1880); FRANK (1896); STÄGER (1900) $+p_1$; ROSTRUP (1902); STÄGER (1903) $+p_1 -m_1$; ERIKSSON (1913) p_1 ; cf. OUDEMANS (1919) *p*
- *180. *Hordeum nudum* ARD. ROSTRUP (1902); BARNAS (1909) *p*; KAWATANI (1944 b) $+l$; KAWATANI (1945) $+p_1$
Hordeum sativum JESS. p.p. l. c.
181. *Hordeum pratense* HUDS. QUEKETT (1841)
- *182. *Hordeum vulgare* L. ANONYM. (1870) *p*; KIRCHNER (1890) *p*; ROSTRUP (1902); BUCHOLTZ (1904) p_1 ; WENIGER (1924); ANDERSON et al. (1926) *p*; SEYMOUR (1929) *p*; cf. BARGER (1931) $+p_1$; KAWATANI (1944 b) $+l$; KAWATANI (1945) $+p_1$
Hordeum tetrastichum STOKES BONDARZEW & BUCHOLTZ (1903) *p*; BUCHOLTZ (1904) p_1
Hordeum polystichum β *vulgare* DOLL cf. OUDEMANS (1919) *p*
Hordeum vulgare L. var. *tetrastichum* BARGER (1931)
Hordeum sativum JESS. p.p. l. c.
- *183. *Hordeum vulgare* L. var. *nudum* KAWATANI (1944 b) $+l$; KAWATANI (1945) $+p_1$

- Hordeum sativum* JESS. p.p. 1. c.
184. *Hyparrhenia rufa* STAFF GONÇALVES (1937)
185. *Hystrix patula* MOENCH
Asperella Hystrix HUMB. SEYMOUR (1929) *p*; cf. BARGER (1931)
Asprella Hystrix WILLD. PAMMEL et al. (1901) [cf. ATANASOFF]; PAMMEL (1911)
Hystrix Hystrix MILLSP. WENIGER (1923) *p*; WENIGER (1924); MAINS (1924)
- *186. *Imperata cylindra* BEAUV. var. *Koenigii* DUR. et SCHINZ
Imperata cylindra BEAUV. var. *Koenigii* HONDA [error for DUR. et SCHINZ] TAKEMOTO (1944 a)
- *187. *Ischaemum antheophoroides* MIQ. var. *eroistachyum* HONDA TAKEMOTO (1944 a)
- *188. *Ischaemum crassipes* NAKAI ?°SHIRAI (1903); TAKEMOTO (1944 a)
189. *Ischaemum pilosum* HACK. AJREKAR (1926) *Sphac.* (conidial stage of *Cl.*)
190. *Koeleria cristata* PERS. GALAMA (1834); FARLOW & SEYMOUR (1888-91) *p*; ANDERSON (1889 a) *p*; SYDOW (1898) *p*; PAMMEL (1911); OUDEMANS (1919) *p*; WENIGER (1923) *p*; WENIGER (1924); SEYMOUR (1929) *p*; BARGER (1931)
Aira cristata L. OHTANI (1928); cf. BARGER (1931)
191. *Koeleria glauca* DC. BUCHOLTZ (1904) *Cl.* sp. indet.
- *192. *Koeleria tokiensis* DOMIN °SHIRAI (1905) *m*; °SHIRAI & MIYAKE (1917) *m*; °SHIRAI & HARA (1927) *m*
- Leerzia oryzoides* SW.
Poa fertilis HOST ?ROSTRUP (1902)
- Lolium* sp. AINWORTH (1937) *p*
193. *Lolium italicum* A. BR. KÜHN (1856); KÜHN (1858); FRANK (1880); WOLF & ZOPF (1887); KIRCHNER (1890) *p*; FRANK (1896); STÄGER (1900, 1903) $+p_3 - p_1 - p_2 - m_2$; KIRCHNER (1923) *p*; cf. BARGER (1931); HORNE (1932)
194. *Lolium lanceolatum* A. BR. BARGER (1931)
195. *Lolium multiflorum* LAM. SYDOW (1898) *p*; ROSTRUP (1902); ERIKSSON (1913) *p*; BIRMINGHAM (1921); ANDERSON et al. (1926) *p*; SEYMOUR (1929) *p*.
196. *Lolium perenne* L. QUEKETT (1841); TULASNE (1853) *p*; KÜHN (1856); KÜHN (1858); TANNER (1858); ANONYM. (1870) *p*; CARRUTHERS (1875); FRANK (1880); W. G. SMITH (1884) *p*; MASSEE (1886) *p*; WOLF & ZOPF (1887); KIRCHNER (1890) *p*; FRANK (1896); FRANK (1897); SYDOW (1898) *p*; STÄGER (1900, 1903) $-p_1$; ROSTRUP (1902); STÄGER (1903) $+p_3 - m_1 - m_2 - w$; BUCHOLTZ (1904) p_3 ; STÄGER (1907) $-p_4 - s$; DUGGAR (1909) *p*; MERCIER (1911); °COCKAYNE (1912); GAIN (1912); BREDEMANN (1912) *p*; ERIKSSON (1913) p_3 ; OUDEMANS (1919) *p*; BIRMINGHAM (1921); KIRCHNER (1923) *p*; WENIGER (1923) *p*; WENIGER (1924) p_3 ; ANDERSON et al. (1926) *p*; SEYMOUR (1929) *p*; DORPH-PETERSEN (1929) *p*(s. s.); DORPH-PETERSEN (1931) *p*(s. s.); APPEL (1933) *p*; PETCH (1937 a); ANONYM. (1940) *p*
197. *Lolium remotum* SCHRANK BARGER (1931)
Lolium Linicola A. BR. ROSTRUP (1902)
198. *Lolium rigidum* Gaud. SYDOW (1898) *p*; STÄGER (1900, 1903) $+p_3 - p_1 - m_2$; OUDEMANS (1919) *p*; cf. OHTANI (1928)
199. *Lolium strictum* PRESL BARGER (1931)

200. *Lolium temulentum* L. PLENK (1794); TULASNE (1853) *p*; FRANK (1880); W. G. SMITH (1884) *p*; MASSEE (1886); FRANK (1896); STÄGER (1900, 1903) $+p_3 -p_1$; ROSTRUP (1902); BARNAS (1909) *p*; ERIKSSON (1913) *p*
201. *Luziola peruviana* GMEL.
Luziola peruviana JUSS. [error for GMEL.] cf. WINTER (1887); *Cl. pallida* P. HENNINGS⁽¹¹²⁾ (1899)
202. *Melica altissima* L. ROSTRUP (1902); cf. OUDEMANS (1919) *p*
203. *Melica ciliata* L. STÄGER (1907) $-s$; STÄGER (1910); STÄGER (1922)
204. *Melica mutica* WALT. SEYMOUR (1929) *Cl. cinerea*
205. *Melica nutans* L. QUEKETT (1841); STÄGER (1907) $\pm s$; STÄGER (1908a) $\pm p_1$
206. *Melica uniflora* RETZ. STÄGER (1907) $\pm s$
- *207. *Milium effusum* L. STÄGER (1903, 1905) $\pm p_2$; BUCHOLTZ (1904) *p_2*; STÄGER (1907) $-p_1 -s$; ERIKSSON (1913); °TOKUNAGA (1934); °KIMOTO (1943 a)
208. *Milium multiflorum* CAV. BARGER (1931)
- Miscanthus* °SHIRAI (1905) *m*; °SHIRAI & MIYAKE (1917) *m*; °SHIRAI & HARA (1927) *m*
- *209. *Miscanthus japonicus* ANDERSS. °TOKUNAGA (1934)
- *210. *Miscanthus sacchariflorus* BENTH. et HOOK.
Miscanthus sacchariflorus HACK. [error for BENTH. et HOOK.] TAKEMOTO (1944 a)
- *211. *Miscanthus sinensis* ANDERSS. °SHIRAI (1892); °SHIRAI (1894); °SHIRAI (1903) *m*; °OHMORI & YAMADA (1904) *m*; HIRATSUKA & KOTANI (1930) *m*; °TOKUNAGA (1934); SHIMADA (1939) *m*; °KOBAYASHI (1939) *m*; TOGASHI (1942 a); TAKEMOTO (1944 a); ABE (1944 c)
- *212. *Miscanthus sinensis* ANDERSS. var. *condensatus* MAKINO °SHIRAI (1892); °OHTANI (1928); SHIMADA (1939); TAKEMOTO (1943); TAKEMOTO (1944 a); ABE (1944 c)
Miscanthus condensatus HACK. TOGASHI (1942 a)
- *213. *Miscanthus tinctorius* HACK. °TOKUNAGA (1934)
- Molinia* °SHIRAI (1905) *m*; °SHIRAI & MIYAKE (1917) *m*; °SHIRAI & HARA (1927) *m*
214. *Molinia caerulea* MOENCH TULASNE (1853) *m*; KÜHN (1856) *m*; ANONYM. (1870) *p*; FRANK (1880) *m*; MASSEE (1886) *p*; HARTWICH (1895); FRANK (1896) *m*; FRANK (1897); TUBEUF (1897) *m*; SYDOW (1898) *m*; STÄGER (1900) $+m_1$; ROSTRUP (1902); STÄGER (1903) $+m_1 -p_1 -p_2$; BONDARZEW & BUCHOLTZ (1903) *m*; BUCHOLTZ (1904) *m*; ERIKSSON (1913) *m*; cf. OUDEMANS (1919) *m, p*; STÄGER (1922); TAKEMOTO (1944 a)
Molinia caerulea SCHRK. [error for MOENCH] KÜHN (1858)
215. *Nardus stricta* L. KÜHN (1863); FRANK (1880); WINTER (1882) *m*; W. G. SMITH (1884) *p*; MASSEE (1886) *p*; FRANK (1896) *m*; SYDOW (1898) *m*; STÄGER (1900) $+m_1$; STÄGER (1903) $+m_1 -p_1 -w$; BONDARZEW & BUCHOLTZ (1903) *m*; BUCHOLTZ (1904) *m*; ERIKSSON (1913) *m*; OUDEMANS (1919) *m, p*
Nardus strictus [error for stricta] L. ROSTRUP (1902)
- Orthoclada* sp. *Cl. pallida* (WINTER) P. HENNINGS var. *Orthocladae* P. HENNINGS⁽¹¹³⁾ (1900)

216. *Oryza sativa* L. FRANK (1880); W. G. SMITH (1884) *p*; WOLF & ZOPF (1887); °SHIRAI (1887); °ZOPF (1890); FRANK (1896); SEYMOUR (1929) *p*; BARGER (1931)
217. *Oryzopsis asperifolia* MICHX. CONNERS (1937) *p*
- Panicum* sp. *Cl. Uleana* P. HENNINGS⁽¹¹²⁾ (1899)
218. *Panicum barbinode* TRIN. GONÇALVES (1937)
219. *Panicum bulbosum* H. B. K. BIRMINGHAM (1921)
220. *Panicum maximum* NEES SHEPHERD (1927) Sphac. stage (*Cl. sp.*)
221. *Panicum miliaceum* L. GALAMA (1834); KUHN (1863); FRANK (1880); WOLF & ZOPF (1887); KIRCHNER (1890) *p*; °ZOPF (1890); FRANK (1896); STÄGER (1908 a) $-m_2$; KIRCHNER (1923) *p*
- Paspalum* sp. *Cl. lutea* A. MÖLLER⁽¹⁸⁰⁾ (1901)
- Paspalum* sp. CHARDON et al. (1940) *pli*
- Paspalum* sp. ANONYM. (1940) *pli*
- Paspalum* sp. TAKEMOTO (1944 a)
222. *Paspalum ciliatifolium* MICHX. LEFEBVRE (1939) *pli*
223. *Paspalum dilatatum* POIR. NORTON (1902); STEVENS & HALL (1910) *pli*, *Cl. Rolfsii* STEVENS et HALL⁽²⁵⁵⁾ (1910); BROWN & RANCK (1915) *pli*; BROWN (1916) *pli*; PAINE (1917) *pli*; MITCHELL (1918) *pli*; MITCHELL (1920 a, b) *pli*; MITCHELL (1921) *pli*; *Cl. deliquescens* (SPEG.) HAUMAN⁽¹⁰³⁾ (1922); SHEPHERD (1927) Sphac. stage (*Cl. sp.*); SORIANO (1928) *Cl. deliquescens* = (?) *pli*; ANONYM. (1928) *pli*; SHEPHERD (1930) *pli*; MARCHIONATTO (1930) *pli*; GIEGER (1931) *pli*; NOBLE (1936 a, b) *pli*; HOPKIRK (1936) *pli*; MAUNDER (1936) *pli*; MORWOOD (1936) *pli*; BITANCOURT (1937) *pli*; MORWOOD (1937) *pli*; WATERHOUSE (1937) *pli*; HINDMARSH & HART (1938) *pli*; LEFEBVRE (1939) *pli*; ANONYM. (1939) *pli*; STEYN (1939) *pli*
224. *Paspalum distichum* L. cf. ATANASOFF (1920); SEYMOUR (1929) *pli*, *Cl. Rolfsii*; NOBLE (1936 a); LEFEBVRE (1939) *pli*
225. *Paspalum floridanum* MICHX. ROSEN (1920); SEYMOUR (1929) *pli*?; cf. BARGER (1931); LEFEBVRE (1939) *pli*
226. *Paspalum intermedium* MUNRO LEFEBVRE (1939) *pli*
227. *Paspalum langei* NASH LEFEBVRE (1939) *pli*
228. *Paspalum laeve* MICHX. STEVENS & HALL (1910) *pli*, *Cl. Rolfsii* STEVENS et HALL⁽²⁵⁵⁾ (1910); NORTON (1916); ELLIOTT (1920) *pli* or *Cl. Rolfsii*; KREBS (1936) *pli*; SEYMOUR (1929) *pli*, *Cl. Rolfsii*; BARGER (1931) *pli*; LEFEBVRE (1939) *pli*
229. *Paspalum longipilum* NASH LEFEBVRE (1939) *pli*
230. *Paspalum notatum* FLUEGGE LEFEBVRE (1939) *pli*
231. *Paspalum orbiculare* FORST. ANONYM. (1939) *pli*
232. *Paspalum plicatulum* MICHX. SEYMOUR (1929) *pli*; LEFEBVRE (1939) *pli*; BITANCOURT (1940) *pli*
233. *Paspalum proliferum* ARECHAV. BITANCOURT (1940) *pli*
234. *Paspalum pubescens* MUHL. LEFEBVRE (1939) *pli*
235. *Paspalum pubiflorum* RUPR. LEFEBVRE (1939) *pli*
236. *Paspalum setaceum* MICHX. GALAMA (1834); cf. BARGER (1931)
237. *Paspalum urvillei* STEUD. NOBLE (1936 a); LEFEBVRE (1939) *pli*

Pennisetum SYDOW (1909) *p*

238. *Pennisetum Alopecuroides* STEUD. AJREKAR (1926) *Sphac.* (conidial stage of *Cl.*)

239. *Pennisetum spicatum* ROEM. et SCHULT. ZIMMERMANN (1904) *Cl.*

Pennisetum typhoideum RICH. BUNTING (1926) *Cl.*?

- *240. *Pharalis arundinacea* L. ANONYM. (1870) *p*; WILSON (1875); FRANK (1880); W. G. SMITH (1884) *p*; MASSEE (1886); FARLOW & SEYMOUR (1888-91) *p*; ANDERSON (1889 a) *p*; WILLIAMS (1893) *p*; FRANK (1896); SYDOW (1898) *p*; STÄGER (1900) *+p₁*; STÄGER (1903) *+p₁*; BUCHOLTZ (1904) *p₁*; PAMMEL (1911); ERIKSSON (1913) *p*; OUDEMANS (1919) *p*; STÄGER (1922); KIRCHNER (1923) *p*; WENIGER (1923) *p*; WENIGER (1924) *p₁*; SEYMOUR (1929) *p*; °TOKUNAGA (1934); °MATSUOKA (1942); °KIMOTO (1943 a); TAKEMOTO (1944 a, b); ABE (1944 a)
- Pharalis arundinacea* L. var. *genuina* HACK. HIRATSUKA & KOTANI (1930) *m*; SHIMADA (1939) *m*

Digraphis arundinacea TRIN. ROSTRUP (1902)

Baldingera arundinacea DUMORT. KÜHN (1856); ERIKSSON (1913) *p₁*

Baldingera arundinacea REHB. [error for DUMORT.] KÜHN (1858)

241. *Pharalis canariensis* L. PLENK (1794); cf. GALAMA (1834); FRANK (1880); KIRCHNER (1890) *p*; FRANK (1896); KIRCHNER (1923) *p*

Pharalis aquatica DELILE cf. BARGER (1931)

242. *Pharalis coerulescens* DESF. SYDOW (1898) *p*; OUDEMANS (1919) *p*; BARGER (1931)

243. *Pharalis minor* RETZ. BIRMINGHAM (1921)

- *244. *Phleum alpinum* L. HIRATSUKA & KOTANI (1930); TAKEMOTO (1943); TAKEMOTO (1944 a)

245. *Phleum Boehmeri* WIBEL BARGER (1931)

- *246. *Phleum paniculatum* HUDS. var. *annuum* HONDA °OHTANI (1928); SHIMADA (1939)

Phleum asperum VILL. var. *annuum* GRISEB. ANONYM. (1936)

- *247. *Phleum pratense* L. KÜHN (1856); KÜHN (1863); ANONYM. (1870) *p*; CARRUTHERS (1875); FRANK (1880); W. G. SMITH (1884) *p*; MASSEE (1886); WOLF & ZOPF (1887); KIRCHNER (1890) *p*; FRANK (1896); °NOFFRAY (1900); ROSTRUP (1902); BONDARZEW & BUCHOLTZ (1903) *m*; BUCHOLTZ (1904) *Cl. sp. indet.*; °MIYABE & MIYAKE (1907) *p*; DUGGAR (1909) *p*; PAMMEL (1911) *p*; GAIN (1912); ERIKSSON (1913) *p*; OUDEMANS (1919) *m, p*; KIRCHNER (1923) *p*; WENIGER (1924); ANDERSON et al. (1926) *m, p*; DORPH-PETERSEN (1929) *p (s.s.)*; SEYMOUR (1929) *m, p, Cl. rubra* WHETZEL et REDDICK; DORPH-PETERSEN (1931) *p (s.s.)*; °TOKUNAGA (1934); AINWORTH (1937) *p*; °MATSUOKA (1942); °KIMOTO (1943 a); cf. TAKEMOTO (1943); TAKEMOTO (1944 a)

Phragmites °SHIRAI (1905) *m*; °SHIRAI & MIYAKE (1917) *m*; °SHIRAI & HARA (1927) *m*

- *248. *Phragmites communis* TRIN. TULASNE (1853) *m*; KÜHN (1858); ANONYM. (1870) *m*; FRANK (1880) *m*; WINTER (1882) *m*; °W. G. SMITH (1884) variety of *p*; MASSEE (1886) *m*; WOLF & ZOPF (1887) *m*; FARLOW & SEYMOUR (1888-91); *m*; °KIRCHNER (1890) *m*; FRANK (1896) *m*; ROSTRUP (1897) *m*; SYDOW (1898) *m*; STÄGER (1900) *+m₁*; ROSTRUP (1902); BUCHOLTZ (1904) *m*; ERIKSSON (1913) *m*; STÄGER (1922); KIRCHNER (1923) *m*; SEYMOUR (1929) *m*; HIRATSUKA & KOTANI (1930); °TOKUNAGA (1934); °KIMOTO (1943 a); TAKEMOTO (1944 a)
- Arundo Phragmites* L. QUEKETT (1841); KÜHN (1856) *m*; OUDEMANS (1919) *m, p*; cf. BARGER (1931)

- Phragmites vulgaris* TRIN. ABE (1944 b)
Phragmites Phragmites KARST. WENIGER (1923) *m*; WENIGER (1924) *m*
- *249. *Phragmites japonica* STEUD. SHIMADA (1939) *m*
Phragmites prostrata MAKINO TOGASHI (1942 a); ABE (1944 b)
Phragmites prostratus MAKINO TAKEMOTO (1944 a, b)
- *250. *Phragmites Karka* TRIN. SHIMADA (1939) *m*; TOGASHI (1942 a); TAKEMOTO (1944 a, b); ABE (1944 b)
- *251. *Phragmites longivalvis* STEUD. °OHMORI & YAMADA (1904) *m*; TOGASHI (1942 a); TAKEMOTO (1944 a, b); ABE (1944 b)
- Poa* cf. QUÉLET (1876); *Cl. setulosa* (QUÉL.) SACCARDO (1883, Syll. 2: 566.)
Poa sp. FARLOW & SEYMOUR (1888-91) *p*
Poa sp. cf. OUDEMANS (1919) *p*
252. *Poa alpina* L. STÄGER (1900) $+p_1$; STÄGER (1903) $\pm p_1$; STÄGER (1905) $-p_2$; STÄGER (1907) $-s$; STÄGER (1908 a) $-m_2$
- *253. *Poa annua* L. ANONYM. (1870) *p*; FRANK (1880); W. G. SMITH (1884) *p*; MASSEE (1886); KIRCHNER (1890) *p*; FRANK (1896); SYDOW (1898) *m*; STÄGER (1903) $(+m_2) -p_1 -w$; BONDARZEW & BUCHOLTZ (1903) *m*; STÄGER (1908 a) $(+m_2)$; STÄGER (1910) $+m_2$; PAMMEL (1911); ERIKSSON (1913); OUDEMANS (1919) *m, p*; STÄGER (1922); KIRCHNER (1923) *m*; °TOKUNAGA (1934); °KIMOTO (1943 a); TAKEMOTO (1944 a)
254. *Poa caesia* SM. STÄGER (1900) $+p_1$; STÄGER (1903) $+p_1$; STÄGER (1908 a) $-m_2$
255. *Poa cenisia* ALL. STÄGER (1908 a) $-m_2$; BARGER (1931)
256. *Poa compressa* L. DIETRICH (1856-59); FRANK (1880); FARLOW & SEYMOUR (1888-91) *Cl.*; WILLIAMS (1893) *p*; FRANK (1896); SYDOW (1898) *p*; STÄGER (1903) $+p_1$; BUCHOLTZ (1904) p_1 ; OUDEMANS (1919) *p*; WENIGER (1923) *p*; WENIGER (1924); SEYMOUR (1929) *p*•
257. *Poa concinna* GAUD. STÄGER (1903) $\pm p_1$?
Poa eminens PRESL ? °TOKUNAGA (1934)
258. *Poa hybrida* GAUD. STÄGER (1900) $+p_1$; STÄGER (1903) $+p_1 -m_1$
259. *Poa interior* RYDB. SEYMOUR (1929) *p*
- *260. *Poa kurilensis* HACK. °TOKUNAGA (1934)
261. *Poa longiligula* SRIEN. et WILLIAMS SEYMOUR (1929) *p*
- *262. *Poa macrocalyx* TRAUTV. et MEY. °TOKUNAGA (1934)
- *263. *Poa nemoralis* L. ANONYM. (1870) *p*; KIRCHNER (1890) *p*; STÄGER (1903) $-m_1$; STÄGER (1905) $-p_2$; OUDEMANS (1919) *p*; STÄGER (1922); KIRCHNER (1923) *m*; °TOKUNAGA (1934); °KIMOTO (1943 a)
264. *Poa palustris* L. cf. OUDEMANS (1919) *p*; WENIGER (1923) *p*; SEYMOUR (1929) *p*
Poa serotina EHRH. SYDOW (1898) *p*; BONDARZEW & BUCHOLTZ (1903) *p*; cf. BARGER (1931)
Poa fertilis HOST ? ROSTRUP (1902); ? STÄGER (1903) $-p_1$
Poa palustris H. MART. cf. BARGER (1931)
- *265. *Poa pratensis* L. MASSEE (1886) *p*; KIRCHNER (1890) *p*; WILLIAMS (1893) *p*; STÄGER (1900) $+p_1$; ROSTRUP (1902); STÄGER (1903) $+p_1 -p_2 -p_3 -w$; BUCHOLTZ (1904) p_1 ; STÄGER (1905) $-p_2 \mp (\pm) p_2$; STÄGER (1907) $+p_1 -s$; DUGGAR (1909) not (?) *p*; PAMMEL (1911); GARMAN (1914); FYLES (1915) $-z$; MCFARLAND (1921) $+p_1$; KIRCHNER (1923) *m*; WENIGER (1923) *p*; WENIGER (1924) p_1 ; ANDERSON et al. (1926) *p, Cl. microcephala* (WALLR.) KARST.; SEYMOUR (1929) *m, p*; DORPH-PETERSEN (1931) *p* (s.s.); DORPH-PETERSEN (1932) *m* (s.s.); °TOKUNAGA

- (1934); KREBS (1936) p_1 ; °KIMOTO (1943 a); TAKEMOTO (1944 a)
Poa sudetica SCHLEICH. cf. BARGER (1931)
Poa stenantha TRIN. ? °TOKUNAGA (1934)
 266. *Poa sudetica* HAENKE ? FRANK (1880); ? FRANK (1896); ? STÄGER (1900) $+p_1$; ? STÄGER (1903) $+p_1 - m_1 - w$
Poa radula FRANCH. et SAV. ? °TOKUNAGA (1934)
 267. *Poa trivialis* L. KIRCHNER (1890) p ; STÄGER (1903) $-m_1$; BUCHOLTZ (1904) *Cl. sp. indet.*; STÄGER (1905) $-p_2 \mp (\pm) p_2$; KIRCHNER (1923) m ; DORPH-PETERSEN (1931) p (s s.); DORPH-PETERSEN (1932) m (s.s.)
 268. *Pollinia fulva* BENTH. BIRMINGHAM (1921)
 269. *Pucinellia distans* PARL.
Glyceria distans WAHLENB. ROSTRUP (1902); STÄGER (1903) $-p_1$
Atropis distans GRISEB. JACZEWSKI (1906)
 *270. *Roegneria ciliaris* NEVSKI MATSUOKA (1940); SUGIMOTO & MATSUOKA (1941); °MATSUOKA (1942)
Agropyrum ciliare FRANCH. ABE (1944 a)
 271. *Roegneria Gmelini* KITAGAWA °MATSUOKA (1942)
 *272. *Roegneria semicostata* KITAGAWA ? °MATSUBARA (1882); °YASUDA (1914) p ; °SHIRAI & MIYAKE (1917) p ; °TAKIMOTO (1918) p ; °KARIYONE (1923); °HEMMI (1926); °SUEMATSU (1926); °SHIRAI & HARA (1927) p ; ? °OHTANI (1928); °KOBAYASHI (1939) p ; °MATSUOKA (1942)
Agropyron semicostatum NEES TOGASHI (1942 a)
Agropyrum semicostatum NEES NOMURA (1926); ANONYM. (1936); SHIMADA (1939); TAKEMOTO (1944 a, b); ABE (1944 a)
 273. *Saccharum officinarum* L. OCFEMIA (1931) $p?$; OCFEMIA (1939) *Cl. sp. indet.*
 274. *Schenodorus Benekeni* LANGE ROSTRUP (1902)
 275. *Scolochloa festuacea* LINK SEYMOUR (1929) p
 *276. *Secale cereale* L. PLENK (1794); QUEKETT (1841); TULASNE (1853) p ; KUHN (1856) p ; KUHN (1858); ANONYM. (1870) p ; CARRUTHERS (1875); °FRANK (1880); °W. G. SMITH (1884) p ; MASSEE (1886) p ; WOLF & ZOPF (1887); FARLOW & SEYMOUR (1888-91) p ; °E. F. SMITH (1889) p ; KIRCHNER (1890) p ; °PAMMEL (1892); °WILLIAMS (1893) p ; °FRANK (1896); TUBEUF (1897) p ; °FRANK (1897); SYDOW (1898) p ; °NOFFRAY (1900); °STÄGER (1900) $+p_1$; ROSTRUP (1902); °ROSTOWZEW (1902); STÄGER (1903) $+p_1 - p_2 - p_3 - w$; °IWANOFF (1903) p ; BONDARZEW & BUCHOLTZ (1903) p ; °GRANDEAU (1904); BUCHOLTZ (1904) p_1 ; MALKOFF (1905); JAAP (1907); °STÄGER (1907) $+p_1 - s$; MALKOFF (1908) p ; DUGGAR (1909) p ; RANOJEVIC (1910) p ; °IDETA (1911); WHETZEL & REDDICK (1911); ERIKSSON (1913) p_1 ; °GARMAN (1914); °FYLES (1915) $-z$; GARRIGUES (1921); °BIRMINGHAM (1921); KIRCHNER (1923) p ; °WENIGER (1923) p ; °MAINS (1924) p ; °MOESZ (1924); WENIGER (1924) p_1 ; °ESTIFEYEFF (1925) p ; °MOROZOV (1926) p ; °LUDWIGS (1926) p ; ANDERSON et al. (1926) p ; °ANONYM.

- (1927) *p*; GAUMANN (1927); °SHIRAI & HARA (1927) *p*; °GRAM et al. (1928) *p*; °PAPE (1928); °PONSARD (1928) *p*; BONDARZEW (1929) *p*; SEYMOUR (1929) *p*; ANONYM. (1931); °SĂVULESCU et al. (1934) *p*; °ANONYM. (1935) *p*; MARKHASSEVA (1936) *p*; AINWORTH (1937) *p*; BÉKÉSY (1938); TOCHINAI (1938); °ANERUD (1939) *p*; °SCOSSIROLI (1939) *p*; °VLADIMIRSKY (1939) *p*; °KOBAYASHI (1939) *p*; °WITTE (1940) (s.s.); °MOURASHKINSKY (1940) *p*; MATSUOKA (1940); SUGIMOTO & MATSUOKA (1941); TOGASHI (1942 a); °MATSUOKA (1942); °KIMOTO (1943 a); °IWATARE et al. (1943) *p*; TAKEMOTO (1944 a); ABE (1944 a); KAWATANI (1944 b) -*l*; KAWATANI (1945) +*p*₁
- Triticum cereale* SALIS. cf. OUDEMANS (1919) *p*
277. *Secale cereale* L. × *Secale montanum* GUSS. HECKE (1921-22); HECKE (1923); BÉKÉSY (1938)
Secale cereale L. × *Triticum sativum* LAM. °AJROLDI (1940) *p*?
278. *Secale cereale* L. (♂) × *Triticum Spelta* L. (♀) BLARINGHEM (1922) *p*
279. *Secale montanum* GUSS. BUCHOLTZ (1904) *Cl. sp. indet.*; HECKE (1921-22); BÉKÉSY (1938)
280. *Sesleria argentea* SAVI STÄGER (1910)
281. *Sesleria coerulea* ARD., STÄGER (1903) -*m*₁ -*p*₂; BUCHOLTZ (1904) *Cl. sp. indet.*; STÄGER (1907) +*s* -*p*₁ -*p*₄; STÄGER (1922)
282. *Sesleria cylindra* DC. cf. OUDEMANS (1919) *p*
- Setaria sp. Cl. ranunculoides* A. MÖLLER⁽¹⁸³⁾ (1901)
283. *Sorghastrum nutans* NASH. SEYMOUR (1929) *Cl. sp. indet.*
284. *Sorghum vulgare* PERS. AJREKAR (1926) *Sphac.* (conidial stage of *Cl.*)
Andropogon Sorghum BROT. cf. BARGER (1931)
- Spartina sp. cf. FARLOW & SEYMOUR (1888-91) (p)*
285. *Spartina alterniflora* LOISEL. var. *glabra* FERN. cf. SEYMOUR (1929) *p*
286. *Spartina cynosuroides* WILLD. FARLOW & SEYMOUR (1888-91) *p*; SYDOW (1898) *p*
287. *Spartina cynosuroides* Auct. Amer. p.p. SEYMOUR (1929) *p*
288. *Spartina michauxiana* HITCHC. SEYMOUR (1929) *p*
289. *Spartina pectinata* BOSC SEYMOUR (1929) *p*
290. *Spartina stricta* ROTH STÄGER (1910)
- *291. *Spodiopogon sibiricus* TRIN. °TOKUNAGA (1934); TOGASHI (1942 a); TAKEMOTO (1944 a)
292. *Stipa capillata* L. BARGER (1931)
293. *Stipa comata* TRIN. et RUPR. WENIGER (1923) *p*; WENIGER (1924)
294. *Stipa minor* SCRIBN. SEYMOUR (1929) *p*
295. *Stipa spartea* TRIN. WENIGER (1923) *p*; WENIGER (1924)
296. *Stipa viridula* TRIN. WENIGER (1923) *p*; WENIGER (1924); SEYMOUR (1929) *p*?
297. *Tricholaena rosea* NEES GONÇALVES (1937)
298. *Tripsacum dactyloides* L. FARLOW & SEYMOUR (1888-91) *p*; SYDOW (1898) *p*; *Cl. Tripsaci* STEVENS et HALL⁽²⁵⁾ (1910); SEYMOUR (1929) *p*, *Cl. Tripsaci*

- *299. *Trisetum bifidum* OHWI °TOKUNAGA (1934); °KIMOTO (1943 a); ABE (1944 b)
Trisetum flavescens BEAUV. var. *papillosum* HACK. HIRATSUKA & KOTANI (1930) m; TAKEMOTO (1944 a)
300. *Trisetum pratense* PERS. cf. BARGER (1931)
Avena flavescens L. KIRCHNER (1890) p; ROSTRUP (1902); KIRCHNER (1923) p
Trisetum pratense BEAUV. [error for PERS.] BARGER (1931)
301. *Triticum desertorum* FISCH. ERIKSSON (1913)
302. *Triticum dicoccum* SCHRANK KIRCHNER (1923) p; WENIGER (1924)
Triticum sativum LAM. p.p. WILSON (1875); °FRANK (1880); W. G. SMITH (1884) p; °MASSEE (1886); °KIRCHNER (1890) p; °ZOPF (1890); °MCALPINE (1894); °FRANK (1896); °FRANK (1897); °APPEL (1908) p₁; °DUGGAR (1909) p; °ERIKSSON (1913); °GARMAN (1914); °DARNELL-SMITH & MACKINNON (1915); °CHIFFLOT (1918) *Cl. purpurea tritici manitobae*; °SAMPSON (1920) p; °MCFARLAND (1921) +p₁; °BIRMINGHAM (1921); °DUC (1922); °MONICAULT (1922); °WENIGER (1923) p; °STÄGER (1923) +p₁; °MAINS (1924); °FERRARIS & GABOTTO (1927); °PONSARD (1928) p; °PAPE (1928); cf. SEYMOUR (1929) p; °ANONYM. (1935) p; °KOBAYASHI (1939) p; °ANERUD (1939); °MATSUOKA (1942); °KIMOTO (1943 a); °IWATARE et al. (1943) p
303. *Triticum durum* DESF. KÜHN (1856); KÜHN (1858); KÜHN (1863); °WENIGER (1923) p₁; WENIGER (1924); cf. °ANDERSON et al. (1926) p; cf. °BARGER (1931); °ANONYM. (1935) p
Triticum tenax A. et G. p.p. BARGER (1931)
Triticum sativum LAM. p.p. l. c.
304. *Triticum haplodurum* DUSSEAU (1932) p
305. *Triticum hibernum* L. TULASNE (1853) p
Triticum tenax A. et G. p.p. l. c.
Triticum sativum LAM. p.p. l. c.
306. *Triticum intermedium* BESS. BARGER (1931)
307. *Triticum monococcum* L. ROSTRUP (1902); LIND (1913); cf. OUDEMANS (1919) p; KIRCHNER (1923) p
308. *Triticum Rodeti* TRAB. BARGER (1931)
309. *Triticum Spelta* L. GALAMA (1834); KÜHN (1856); KÜHN (1858); KÜHN (1863); KIRCHNER (1890) p; STÄGER (1903) -p₁; BLAS (1912) p; KIRCHNER (1923) p
Triticum sativum LAM. p.p. l. c.
310. *Triticum turgidum* L. KÜHN (1856); KÜHN (1858); KÜHN (1863); cf. SEYMOUR (1929) p; cf. BARGER (1931)
Triticum tenax A. et G. p.p. l. c.
Triticum sativum LAM. p.p. l. c.
311. *Triticum turgidum* L. x *Triticum vulgare* VILL. BIFFEN (1912); BIFFEN & ENGLENDOW (1926) p
- *312. *Triticum vulgare* VILL. KÜHN (1856); KÜHN (1858); ANONYM. (1870) p; ROSTRUP (1902); BONDARZEW & BUCHOLTZ (1903) p; BUCHOLTZ (1904) *Cl. sp. indet.*; cf. OUDEMANS (1919) p; WENIGER (1924) p₁; cf. SEYMOUR (1929) p; cf. BARGER (1931); KAWATANI (1944 b) -l; KAWATANI (1945) +p₁
Triticum vulgare L. [error for VILL.] FARLOW & SEYMOUR (1888-91) p; SYDOW (1898) p; KIRCHNER (1923) p
Triticum tenax A. et G. p.p. l. c.
Triticum sativum LAM. p.p. l. c.

313. *Zea Mays* L. °ZOPF (1890); cf. OHTANI (1928); cf. BARGER (1931)
314. *Zizania aquatica* L. FARLOW & SEYMOUR (1888-91) *Cl.*; DENNISTON (1900); FYLES (1915) +z;
WENIGER (1923) *p*; WENIGER (1924) not(?) *p*; CONNERS (1939) *p*
Zizania aquatica L. var. *interior* FASSETT SEYMOUR (1929) *p*
315. *Zizania aquatica* L. var. *angustifolia* HITCHC. SEYMOUR (1929) *Cl.* sp. indet.
Zizania palustris L. FYLES (1915) +z; cf. BARGER (1931)
- *316. *Zoysia japonica* STEUD. *Cl. yanagawaensis* TOGASHI⁽⁷²⁾ (1936); TOGASHI (1942 a); TOGASHI (1942 b); TAKEMOTO (1944 a); ABE (1944 c)

Bambusaceae タケ科

- Sasa* °KOBAYASHI (1939) *p*
Sasa sp. °KIMOTO (1943 a)
Sasa sp. ABE (1944 a)
- *1. *Sasa nipponica* MAKINO et SHIBATA ABE (1944 a)
- *2. *Sasa paniculata* MAKINO et SHIBATA HIRATSUKA & KOTANI (1930); IMAI (1935); TAKEMOTO (1944 a)
- *3. *Sasa paniculata* MAKINO et SHIBATA var. *paniculata* NAKAI °IDETA (1911); °TOKUNAGA (1934); °TOCHINAI (1938)
- *4. *Sasamorpha purpurascens* NAKAI °SHIRAI & MIYAKE (1917) *p*; °SHIRAI & HARA (1927) *p*
Sasa spiculosa MAKINO HARA (1913) *p*

Cyperaceae カヤツリグサ科

- Carex* sp. KUHN (1863)
1. *Carex nebraskensis* DEWEY *Cl. ?caricina* GRIFFITHS⁽⁷³⁾ (1902)
2. *Carex stellulata* GOOD. var. *angustata* CAREY GROH (1911) *n?*
- Cyperus* sp. KUHN (1863)
- Heleocharis* FRANK (1880) *n*; FRANK (1896) *n*; SYDOW (1898) *n*
Eleocharis MASSEE (1886) *n*
3. *Heleocharis multicaulis* SM.
Eleocharis multicaulis SM. KUHN (1863)
Scirpus multicaulis SM. TULASNE (1853) *n*; cf. LIND (1913) *n*
4. *Heleocharis palustris* ROEM. et SCHULT. ANONYM. (1870) *n*; BUCHOLTZ (1904) *n*
Eleocharis palustris ROEM. et SCHULT. KUHN (1863); SEYMOUR (1929) *n*; cf. BARGER (1931)
Scirpus palustris L. KUHN (1863); SYDOW (1898) *n*; cf. BARGER (1931)
5. *Heleocharis uniglumis* SCHULT.
Eleocharis uniglumis SCHULT. KUHN (1863)
Scirpus uniglumis LINK TULASNE (1853) *n*; SYDOW (1893) *n*; cf. LIND (1913) *n*; cf. BARGER (1931)
- *3. *Heleocharis plantaginea* BOECK. °SHIRAI & MIYAKE (1917) *n*; °SHIRAI & HARA (1927) *n*

- Scirpus FRANK (1880) *n*; FRANK (1896) *n*; SYDOW (1898) *n*
7. Scirpus lacustris L. SYDOW (1898) *n*; BARGER (1931) *n*
8. Scirpus pauciflorus LIGHTF. cf. OUDEMANS (1919) *n*
Scirpus Baeothryon L. TULASNE (1853) *n*
Limnochloa Baeothryon REICHB. KUHN (1863)
9. Scirpus rufus SCHRAD. KUHN (1863); BARGER (1931) *n*
- *10. Scirpus Tabernaemontani GMEL. °SHIRAI & MIYAKE (1917) *n*; °SHIRAI & HARA (1927) *n*

Juncaceae 荻 科

1. Juncus glaucus EHRH. *Cl. Junci* ADAMS⁽¹⁵⁾ (1907)
2. Juncus nodosus L. SEYMOUR (1929). *Cl. Junci*

戦時中 (1941-45) 外国より報告されたもの

新寄主植物

Hosts reported from foreign countries during the World War II (1941-45) # new hosts

Poaceae イネ科

1. Avena sativa L. °DILLON WESTON & TAYLOR (1942); °STEINMETZ & WRIGHT (1943) -z
- # 2. Bothriochloa decipiens HUBBARD LANGDON (1942)
3. Brachypodium sylvaticum BEAUV. PADWICK & AZMATULLAH (1943) *p*
- # 4. Cymbopogon caecium STAPP THIRUMALACHAR (1945)
- # 5. Cymbopogon refractus A. CAMUS LANGDON (1942)
6. Cynodon Dactylyn PERS. THIRUMALACHAR (1944)
- # 7. Digitaria longiflora PERS. THIRUMALACHAR (1945)
- # 8. Dichanthium sericeum A. CAMUS LANGDON (1941a) *Cl. pusilla*
- # 9. Heteropogon contortus BEAUV. LANGDON (1942); THIRUMALACHAR (1945)
10. Hordeum sativum Jess. °DILLON WESTON & TAYLOR (1942) *p*; °STEINMETZ & WRIGHT (1943)
- z
- # 11. Oplismenus compositus BEAUV. *Cl. viridis* PADWICK et AZMATULLAH⁽³¹⁴⁾ (1943)
12. Paspalum dilatatum POIR. LANGDON (1941b) *pli*; BURTON (1943); MACKIE & SNYDER (1945) *pli*;
 ANONYM. (1945) *pli*
13. Paspalum notatum FLUEGGE ANONYM. (1945)
14. Paspalum orbiculare FORST. LANGDON (1941b) *pli*
15. Saccharum officinarum L. °THIRUMALACHAR (1944)
16. Secale cereale L. °AVIZOHAR (1940) *p*; °DILLON WESTON & TAYLOR (1942); °PLANTE &
 SUTHERLAND (1943); °SCHWARTING (1943)
- # 17. Themeda australis STAPP LANGDON (1942)
- # 18. Tricholaena repens HITCHC. WEST (1943) Sphac. stage of *Cl.*; WEST (1945) *Cl. sp.*
19. Triticum sativum LAM. °DILLON WESTON & TAYLOR (1942); °SCHWARTING (1943), °STEINMETZ
 & WRIGHT (1943) -z
20. Zoysia japonica STEUD. LEFEBVRE (1942) *Cl. yanagawazensis*

Cyperaceae カヤツリグサ科

- # 1. Carex brunnescens POIR. *Cl. Grohii* GROVES⁽³⁰²⁾ (1943)
- # 2. Carex muricata L.(?) *Cl. Grohii* GROVES⁽³⁰²⁾ (1943)

- # 3. *Carex scirpoides* SCHKUHR. *Cl. Grohii* GROVES⁽³⁰²⁾ (1943)
 # 4. *Carex stellulata* GOOD. *Cl. Grohii* GROVES⁽³⁰²⁾ (1943)
 5. *Carex stellulata* GOOD. var. *angustata* CAREY *Cl. Grohii* GROVES⁽³⁰²⁾ (1943)
 Carex angustior MACK. *Cl. Grohii* GROVES⁽³⁰²⁾ (1943)
 # 6. *Carex stipata* MUHL. *Cl. Grohii* GROVES⁽³⁰²⁾ (1943)
 # 7. *Carex tribuloides* WAHL. *Cl. Grohii* GROVES⁽³⁰²⁾ (1943)

第 1 表 麦角菌の寄主植物一覽

Table 1. Summarized list of hosts of *Claviceps*

	總 Nos. of hosts known in the world	括 Nos. of hosts known in Japan
Bambusaceae	4	4
Poaceae	316	68
Oryzoideae	4	—
Oryzeae	1	—
Zizanieae	3	—
Poaioideae	196	37
Hordeae	85	15
Nardeae	1	—
Festuceae	81	20
Aveneae	21	2
Chlorideae	8	—
Agrostioideae	60	18
Agrostideae	34	10
Phleaeae	10	4
Stipeae	8	1
Phalarideae	8	3
Panicoideae	50	13
Paniceae	23	—
Arundinelleae	2	2
Zoysieae	3	1
Andropogoneae	20	10
Maydeae	2	—
Unclassified	6	—
Cyperaceae	10	2
Juncaceae	2	—
Total	332	74

予 報

レプトスピラの培地の新考案

1. 酵母浸液の発育促進作用

八田貞義, 山地幸雄, 亀井弘子, 平林磐夫, 駒崎哲郎

レプトスピラの発育促進物質としては、ビタミン B 群^{1) 2)}、肝浸液³⁾ 等の報告があるが、私は酵母浸液を培地に加えることにより、レプトスピラが著るしく豊富に発育する事実を認めたのでその大要を報告する。

実験方法：基礎培地には 10%~1% 家兎血清加 Korthoff 培地を使用した。家兎血清はレプトスピラの培養の場合、個体差が甚しいので実験を確実なものにするため、原則として 5 匹の家兎より採取した血清につき、5 列の併行実験をした。接種材料、培養、判定等はフラン誘導体の作用に関する論文⁴⁾ と同様の方法によつた。使用株は *L. icterohaemorrhagiae* の 3 株, *L. hebdomadis* A, *L. hebdomadis*, *L. australis* A, *L. pyrogenes* の各 1 株である。酵母はビール会社より分与を受けた乾燥酵母及び生酵母を用い、前者は 5%, 後者は 10% 浸液を原液とした。

実験成績：乾燥酵母を原料とした実験に於ては、もとの乾燥酵母の量に換算して 1~0.1% 浸液に於て、対照の発育しない例についても、レプトスピラが顕著に発育する事実を認めたので、次にペプトンを除いた培地で更に稀薄な浸液について実験したところ、同様に著るしい発育促進作用が認められた。生酵母を原料とした実験では生酵母に換算して 0.5% の浸液に於て最も顕著な発育が見られた。そしていずれの場合でも対照に発育が起つていなくても(血清に原因がある)、酵母浸液含有培地で発育が認められる、という興味ある事実が起つたのである。

次に酵母浸液を透析したところ、有効成分の可成りの部分が透析膜を通過する事実が認められた。

善養寺等⁵⁾ は活性炭末が百日咳菌の培養に際し血清の代用となる事実を報告しているので、酵母浸液及び活性炭末を含有する培地に血清を加えずにレプトスピラを接種してみたが、レプトスピラは殆ど発育しなかつた。

- 1) 吉田：福岡医誌, 32, (上) 昭. 14.
- 2) Rosenfeld and Green: J. Bacf. 42, 165~172, 1941.
- 3) Chang: J. Inf. Dis. 81, (1) 28~34, 1947.
- 4) 山地：衛試, 69, 120~125. 昭. 26.
- 5) 善養寺：綜合医学, 8, (3) 32~34. 昭. 26.

レプトスピラの培地の新考案

2. ジャガイモ浸液及び家兎肝

浸液の発育促進作用

八田貞義, 山地幸雄, 亀井弘子, 平林磐夫, 駒崎哲郎

レプトスピラは血清を含有しない培地に培養出来ない。ヘモフィルスと名付けられている百日咳菌は血清を加えなくても炭末、澱粉、或はジャガイモ浸液を培地に加えることにより発育する。¹⁻³⁾ 以上の事実より、我々はジャガイモ浸液、家兎肝浸液をコルトフ培地に加えた場合、レプトスピラの発育に如何なる作用を及ぼすかを追究し、興味ある事実を認めた。

実験方法：前報 1 と同様の方法によつた。ジャガイモ浸液はジャガイモの皮芽を除去し、細挫した後 100°C 40 分間熱浸し、1 夜放置した上清を原液として使用した。家兎肝浸液は、単なる熱浸液のみではかえつてレプトスピラの発育を阻害することがあるから、これに 10% 塩酸を加えて pH 4.0 前後とし、沈澱物を除去した上清を原液として使用した。

実験成績：ジャガイモ水浸液には顕著な作用はない。グリセリンは 1~2% の濃度で多少発育促進作用がある。

ジャガイモの 4% グリセリン水浸液を原液とし、これをコルトフ培地に加えると、もとのジャガイモの量に換算して 4~24 倍浸液に於てレプトスピラは対照の 2 倍以上発育した。そしてこの場合、対照に発育が起つていなくても（血清に原因がある）、被検浸液加培地にレプトスピラの発育が認められる、という事実が起つた。

この発育促進成分に対する考察として、まず馬鈴薯澱粉、可溶性澱粉を培地に加えてみたが、これらには著るしい発育促進作用は認められなかつた。

サツマイモでは却て発育が阻止された。

ジャガイモの皮芽の浸液については現在実験中である。

家兎肝浸液は前記の方法の 50 倍浸液においてレプトスピラの発育を 1.8 倍程度に促進する。肝浸液と上記ジャガイモグリセリン水浸液とをコルトフ培地に加え、血清を 1~3% に減量した培地にレプトスピラを培養したところ、継代間隔を約 3~4 週間としても、3% 血清のときは 6 代以上（7 代から先は行わず）、1% のときは 4 代迄継代が可能であつた。そして肝浸液或はジャガイモ浸液のみを加えて、血清を減量した対照培地には、レプトスピラは継代出来なかつた。

1) 善養寺：総合医学，5，(23) 9. 昭 23.

2) 善養寺：総合医学，6，(17) 32. 昭 23.

3) 善養寺，加藤：総合医学，6，(22) 22. 昭 24.

ズプトニン、ヒスタミン、アセチルコリン、脳下垂体後葉注射液の

白鼠及びモルモットの摘出子宮収縮と、鶏の血圧に及ぼす作用

長沢佳熊，中山豪一，佐藤 浩

白鼠摘出子宮収縮法は大体 Burn の方法により，モルモット子宮収縮法は日局 VI「脳注」の検定法により，鶏血圧測定法は米局 XIV「脳注」の検定法により行つた。「ズ」は「脳注」の白鼠子宮収縮作用を抑制しほとんど無作用化した。「ヒ」は「脳注」の白鼠子宮収縮作用を抑制する作用はなく，「ズ」には「ア」の白鼠子宮収縮作用を抑制する作用を認めない。「ヒ」と「ズ」は白鼠子宮収縮作用を認めない。「ズ」は「ヒ」のモルモット子宮収縮作用を抑制しほとんど無作用化する。「ズ」は鶏の血圧を上昇さすが，ネコの血圧は下降さす。これを次表に示しておくが，以上の実験は量的関係による影響が大きいので，目下詳細を検討中である。

略号：「ズ」ズプトニン（帝国臓器），「ヒ」磷酸ヒスタミン，「ア」アセチルコリン，「脳注」脳下垂体後葉注射液。

〔表〕

検体 (混合比)	白 鼠 子 宮	モルモット子宮	鶏 血 圧	猫 血 圧
「脳注」	収 縮 0.4 cc=0.008 u. (100 倍液)	収 縮 0.4 cc=0.008 u. (100 倍液)	下 降 0.5 cc=0.05 u. (20 倍液) [28 mm Hg]	上 昇 0.65 cc=0.26 u. (5 倍液) [38 mm Hg]
「ズ」	無 作 用 0.5 cc (1 倍液)	僅かに収縮 1.0 cc (1 倍液)	下降後上昇 0.05 cc (1 倍液) [24 mm Hg 下降後] [54 mm Hg 上 昇]	下 降 0.4 cc (1 倍液) [6 mm Hg 上昇後] [12 mm Hg 下 降]
「ヒ」	無 作 用 0.4 cc=40 γ (10,000 倍液)	収 縮 0.4 cc=40 γ (10,000 倍液)	下 降 0.1 cc=0.86 γ (116,000 倍液) [16 mm Hg]	下 降 0.1 cc=2.5 γ (40,000 倍液) [36 mm Hg]
「ア」	収 縮 0.4 cc=7.2 γ (55,000 倍液)	収 縮 0.4 cc=200 γ (2,000 倍液)	下 降 0.05 cc=0.25 γ (200,000 倍液) [20 mm Hg 下降後] [5 mm Hg 上 昇]	下 降 0.7 cc=700 γ (1,000 倍液) [120 mm Hg]
「脳注」+「ズ」 (1:1)	無作用 ※ 0.4 cc (「脳注」50 倍液) (0.2 cc=0.008 u.)	収 縮 ※※ 0.4 cc (「脳注」50 倍液) (0.2 cc=0.008 u.)	—	—
「ヒ」+「ズ」 (1:1)	—	強く抑制 ※ 0.4 cc (「ヒ」10,000 倍液) (0.2 cc=20 γ)	—	—
「ア」+「ズ」 (1:55)	収 縮 ※※ 0.4 cc (「ア」10,000 倍液) (0.06 cc=6 γ)	—	—	—
「ア」+「ズ」 (1:1)	—	収 縮 ※※ 0.4 cc (「ア」1,000 倍液) (0.2 cc=200 γ)	—	—

検体 (混合比)	白鼠子宮	モルモット子宮	鶏 血 圧	猫 血 圧
「脳注」+「ヒ」 (12:11)	収 縮 ※※※ 0.4 cc (「脳注」50 倍液 0.21 cc=0.0084 u.; 「ヒ」1,000 倍液 0.19 cc=190 γ)	—	—	—
「脳注」+「ヒ」 (3:2)	収 縮 ※※※ 0.4 cc (「脳注」50 倍液 0.24 cc=0.0096 u.; 「ヒ」10,000 倍液 0.16 cc=16 γ)	—	—	—

〔註〕 ※ 「ズ」により抑制。

※※ 「ズ」により影響なし。

※※※ 「ヒ」の影響なし。

抄 録

2,4-ジニトロフェニルヒドラジン試液によるサントニンの定量 (第1報) 重量法及びベックマン光度計による比色定量 山口一孝, 太幡利一, 長沢元夫, 吉川嶺子: 薬試 72, (昭和 27). 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン試液(日局 VI) を用い製剤又は生薬中のサントニンを定量的に 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン (以下 2,4-D.P.H. と略す) とする条件を定め, バリタ法との成績を比較した. 次に 2,4-D.P.H. のアセトン溶液に 1% 水酸化ナトリウム溶液を加えると最大透過波長部分を 500 m μ にもつ赤紫色を呈するが, この呈色は安定で 30 μ g/10 cc 程度で明かに認められるのでベックマン光度計を用い比色定量を行った. 即ち純 2,4-D.P.H. を定濃度に希釈した標準検液に 1% 水酸化ナトリウム溶液を加えたとき呈する色について 500 m μ 単色光で吸光係数を測定し, それらから回帰方程式, 標準偏差 σ , 2σ 限界に対応する濃度等を求めた. 測定値 ε から算出した濃度を推定する回帰方程式は

$$\gamma = 1214\varepsilon - 4.339$$

15 回の測定値を単一母集団とし得た標準偏差 σ は 0.015 であり 2σ 限界に相当する濃度限界は $\pm 47.5 \mu$ g である.

2,4-ジニトロフェニルヒドラジン試液によるサントニンの定量 (第2報) フィルタ光電池比色計による定量 山口一孝, 太幡利一: 薬試 72, (昭和 27). サントニン-2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン (以下 2,4-D.P.H. と略す) のアセトン溶液に 1% 水酸化ナトリウム溶液を加えたとき呈する赤紫色をフィルタ光電池比色計を用い, 比色定量する場合, 使用するフィルタの吸収スペクトルと, それを用いて得る成績との関係を吟味した. 次に一番適合したフィルタを選びこれを用いて測定した吸光係数から第1報の場合と同様に濃度を推定する回帰方程式, 標準偏差 σ 及び 2σ 限界に対応する濃度を算出した.

各フィルタの透過率-波長曲線とこれを用いて得る成績とを比較するとフィルタの波長巾のせまいもの程吸光係数-濃度曲線の傾斜は大となり, 次に青透過の認められるものはその影響で傾斜及び直線性は著しく減殺される.

実験 43 例から算出した 2σ 限界に対応する濃度限界は $\pm 42.2 \mu$ g であり, 第1報で得た値と近いことからフィルタ比色計の精度もこの範囲ではベックマン光度計と大差ないものと思われる. 更にフィルタを間接光下に約4ヶ月放置し退色によつて性能に変化を来した場合の透過率曲線及び測定値についても併せて報告した.

合成ビタミン K₃ 並びに類似化合物の細菌学的基礎研究 (1) 八田貞義, 青山好作, 山田寛司, 丹次園枝, 小沢茂子: 昭和 26 年 11 月第 6 回日本公衆衛生学会講演 抗出血性ビタミンであるビタミン K₃ (2-Methyl-1,4-naphthoquinone) 及びこの類似化合物 5 種類を用い, この抗菌活性の状態並びに抗菌機序及び毒性等について基礎的に検討を加え, 化合物中ビタミン K₃ が特に毒性が軽微なこと及び強力な抗菌活性を有する等の諸点を見出した.

胞子 (*Aspergillus niger*) の発芽抑制現象から抗菌機序を窺ったところビタミン K₃ の抗菌活性は即効性よりもむしろ遅効性に属することが明かになった.

またこの種キノ系薬剤はチオグリコール酸, システイン等の SH 化合物やヒドロサルファイトナトリウム及び亜硫酸水素ナトリウムのような還元剤の共存は 2 種薬剤と菌との間の抗菌像が干渉され不活性化現象がみられた.

合成ビタミン K₃ 並びに類似化合物の細菌学的基礎研究 (2) 八田貞義, 青山好作, 丹治園枝, 小沢茂子: 昭和 26 年 11 月第 6 回日本公衆衛生学会講演 ビタミン K₃ はグラム陽性菌, 一部のグラム陰性菌及び糸状菌, 放線菌, 酵母類に対して抗菌作用を有し, 5~25 p.p.m. でこれらの菌の発育を阻止した. そこで飲食品の新鮮度保持特に醤油, 清酒及びジャムの防腐効果について検討したところビタミン K₃ は清酒火落菌に対しサリチル酸の約 10 倍の阻止作用を示し, 40 p.p.m. 濃度で完全に防腐し得た. 醤油に対しては醤油に最も発育する *Zygosaccharomyces*, *Mycoderma*, *Willia*, *Pichia* 等に対し 10~100 p.p.m. で有効で, この濃度であれば醤油貯蔵樽や腐敗醤油から直接分離した菌に対しても完全防腐が可能であつた. ジャムでは検体の糖示度が 65% では 20 日間放置するも実験群, 対照群共にほとんど著変がみられないが糖示度が 35% で且開壺しないのでそのまま恒温 (25°C), 恒湿 (60%) 内に放置した場合 (壺内真空度は 2) は対照は 5 日目に糸状菌が発育したに対し 15 日間放置によるも糸状菌の発育を認めなかつた.

炎症性滲出液中の発熱因子及び皮膚傷害因子と蛋白分解能との関係について 八田貞義, 青山好作, 荻生三雄, 丹治園枝, 小沢茂子: 昭和 26 年 4 月第 24 回日本細菌学会総会講演 炎症性滲出液中の成分として, 線維素溶解酵素及びこれの抑制因子の存在を知り, 正常血漿と各種結核性滲出液とについて生物学的な定量により, それらの比

較検討を試みた。その結果、個々の成績では幾分特異的な成績がみられたが、大体急性初回滲留滲出液、膿性滲出液では線維素溶解酵素の含有が多く、慢性型の滲出液及び正常血漿では大体類似した定量成績が得られた。

一方この線維素溶解酵素に拮抗する所謂抑制因子をアルブミン分解に証明し、この線維素溶解酵素抑制力についてみたところ、この抑制因子の強さは、一部の例外を除くと多くの場合慢性滲出液が最も強く、正常血漿これに次ぎ、急性滲出液は同属滲出液(急性滲出液)ではかなり抑制するが、他属のもの(慢性滲出液又は正常血漿)にはその抑制力が弱いか或は全く抑制しないという興味ある成績が得られた。更にこの溶解酵素及び抑制因子が理化学的影響を受けた場合の傷害程度について精査したが溶解酵素は強酸(pH 4)、強アルカリ(pH 9)により著しく不活性化され【抑制因子は強アルカリ(pH 9)では幾分安定性を示したが、強酸(pH 4以下)では不安定であつた】熱により容易に作用を消失した。しかし、フェニール水銀アセテート、ホルマリン、石炭酸等の防腐濃度範囲では、顕著な影響は受けない様である。なおこの線維素分解酵素は、線維素をアミノ酸等では分解しないことを知った。

飲食品の新鮮保持に関する研究(III) ヘキシールレゾルシンの抗菌性と拮抗物質に対する態度について 八田貞義、青山好作、丹治國枝、林長男、中島富子、小沢茂子：昭和26年4月第21回日本衛生学会講演「ヘキシールレゾルシン(2,4-Dihydroxy-*n*-hexylbenzene)の殺菌的な防腐、防黴性を利用して飲食品添加剤として用いるに必要な二、三の基礎的な検討をIn vitroで加え、ヘキシールレゾルシンが好、嫌気性菌、糸状菌、放線状菌等に対しかなり高度の稀釈でも殺菌的に作用し、この際作用温度の昇降は力価の増減となつて現われた。この作用機作を検討したところ糸状菌の胞子に直接に作用し、能働性に作用することを知った。またこの抗菌性はPolypeptide, Proteinなどの比較的分子の大きなものには拮抗されて力価は減弱したがアミノ酸、糖、甘味剤などには影響されるところがないので、われわれが初めに考案した如く、甘味飲料水、人工甘味汁、果汁などの防腐剤として用い興味ある効果が予想される。

食品の新鮮保持に関する研究(IV) ニトロフラゾーンの蛋白煉製品に対すを防腐効果について 八田貞義、青山好作、丹治國枝、林長男、中島富子、小沢茂子、藤井清次、林敏夫、原田基夫、栗山直弘、隈崎藤夫：日本衛生学雑誌, 6(3), 170~173(1951)。われわれは蛋白煉製品を基本として、これにニトロフラゾーンを添加し、その際生ずる防腐効果について細菌、化学及び官能の三分野より考察を加えたところ、ニトロフラゾーンの添加は31°C湿度80%の環境に於ても、よく約24時間前後の新鮮並に品質保持の可能なことを知った。

市販薬用石鹼の石炭酸係数 八田貞義、青山好作、平井正義、本多義夫：公衆衛生, 10(3), 30, (1951) 市販薬用石鹼及び試供品20種について殺菌力試験、手洗法及び滲透抗菌力試験を行つた。その結果市販薬用石鹼の石炭酸係数は腸チフス菌に対しては0.9~0.1或はそれ以下、黄色葡萄球菌に対しては0.9乃至0.2以下で、0.9が最高であつた。市販薬用石鹼中クレゾール、石炭酸などを主剤としたものは一般に効力は低く現われた。これは石鹼が一定の溶解係数比に従つてその溶液から石炭酸成分を析出させ、また菌体の保護膠質として石鹼が作用するためと考えられ石炭酸の作用を増強させるよりはむしろ阻害している。検体中特に良好な薬用効果を示したものはB石鹼とE及びF石鹼でこれらは主剤としていずれも有機性水銀剤が配剤されており、薬用石鹼の配合薬剤について意義ある示唆をあたえている。

細菌の薬剤耐性についての知見補遺 2. ス剤耐性のでき方についての一実験とPABA産生について 桑原章吾、小山恒太郎、小山近由、大林達、斎藤長門、石井次男：医学と生物学, 19(1), 55~57, (1951)。志賀菌人工ス剤耐性株をつかつて、ス剤耐性は菌のアリルアミン産生と結びつけて考えることがむづかしい点、耐性のでき方は淘汰による面と慣れによる面のどちらも必要らしいことを指摘した。

細菌の薬剤耐性についての知見補遺 3. ス剤耐性赤痢菌の栄養要求について 桑原章吾、大淵令子、小山近由、鶴谷孔明、隈崎藤夫、井上種子：医学と生物学, 21(1), 39~41, (1951)。ス剤耐性志賀菌の栄養をしらべ、耐性菌は一部のアミノ酸の合成能を失ない、exactな方向に変異していることを示した。

バクテリヤの栄養についての実験的研究 1. 2株の偽結核菌の発育素と窒素源について 桑原章吾、鶴谷孔明、大淵令子、小山近由、隈崎藤夫、斎藤長門：日新医学, 38(11), 627~631, (1951)。2株の偽結核菌の栄養をしらべその1株は発育素としてニコチン酸(アミド)を必要とすること、アミノ酸としてはシスチン、トリプトファンが必要である外に数種のアミノ酸が増殖を助けること、その結果2株とも8~10種のアミノ酸とニコチン酸を含む培地に安全に継代できることを示した。

モルモット屍体の細菌叢について 松永英, 桑原章吾, 隈崎藤夫, 斎藤長門, 鶴谷孔明, 井上種子: 東京医事新誌, 68 (10), 19~20, (1951). 絞殺したモルモットの臓器内の細菌叢をしらべ, それがモルモット腸内細菌と大体において一致することを示した.

Bis-(5-nitrofurfurylidene)-acetoneguanylylhydrazone の抗菌作用について 桑原章吾, 大淵令子, 鈴木滋夫, 西田義春: 東京医事新誌, 69 (2), 107~108, (1952). Bis-(5-nitrofurfurylidene)-acetoneguanylylhydrazone-HCl がシゲラに対してこれまでのフラン誘導体より高い抗菌力を示すこと, マウスに対する LD₅₀ は腹腔内投与で 12.4 mg であることをのべた.

ミブヨモギ煎剤の駆虫作用に関する研究(其の 1) 尿中呈色素物質排泄に関する研究 高橋悦郎, 川谷豊彦: 昭和 24 年 4 月 2 日第 22 回日本生理学会講演, 日薬理誌, 44 (3), *8§ (1949)

ミブヨモギ(春日部に於て栽培しサントニン含量検定済のもの)について, その駆虫作用が煎剤によつて得られるや否やを知るために本研究を行った. 健康な成人(男)に前夜軽食, 朝絶食, 服用後 4 時間絶食の条件下にサントニン 50 mg 相当量のミブヨモギ煎剤 (5%) を服用せしめ, 毎時間毎に劃分採集した尿に 10% 水酸化カリウム溶液を数滴加え, 出現する呈色素物質の赤色色調を 1~100 万倍 Azorubin 標準液と比色定量し次式により比較量を計算した.

$$\frac{\text{稀釈時のアルカリ性被検液量} \times \text{被検液総量} \times 10000}{\text{測定に使用した被検液量} \times \text{Azorubin 標準液の倍数}} = \text{総尿量中の呈色素比較量}$$

なお前記各採算尿について生体外における豚蛔虫に対する作用を併せて観察した. 1. 5% ミブヨモギ煎剤 (50 mg. 相当量) の内服により, 尿中にアルカリにより赤色を呈する呈色物質の出現を認める. 2. 該物質は尿中に内服後 15 分にて出現し, はば 1 時間で急激に頂点に達し比較的急速に減少する. なぜミブヨモギ煎剤の吸収排泄がサントニン等に比し急速であるかについては今のところ不明である. (急激且迅速な尿中への尿呈色物質の排泄が *Artemisia* 中に含まれ得るサントニン以外の成分により生ずるかどうかを知るために乾燥ヨモギ (*Artemisia vulgaris* L. var. *indica* Maxim.) 葉末の 5% 煎剤 100 cc をサントニンと同時に内服させると, 出現時間, 速度並に排泄総量は全くサントニン単独内服時と差を認め得ない. なお 5% ヨモギ煎剤 100 cc 単独内服ではアルカリによる呈色を全く認めない.) 3. ミブヨモギ煎剤及びサントニン内服尿は正常尿に比して豚蛔虫致死時間が短い. (昭和 24 年 4 月 2 日 第 22 回 日本薬理学会講演)

有望な薬草「ミブヨモギ」の栽培 川谷豊彦: 農業及園芸, 25 (11), 1004~1006 (1950); 26 (2), 252~256 (1951.) ミブヨモギの栽培に関する総説.

アメリカアリタソウの栽培 川谷豊彦: 農業及園芸, 26 (2), 237~243 (1951) アメリカアリタソウの栽培に関する総説.

薬用植物栽培の植物化学的研究 (第 1 報) ミブヨモギのサントニン含量の時期的変化とその組織化学的考察 (その 1) 柴田承二, 三橋 博, 原岡通晴, 川谷豊彦: (昭和 25 年 4 月 15 日 日本薬学会 4 月例会〔東部支部〕に於て発表) 薬誌, 71 (3), 161~165 (1951.) 1949 年 6 月より 9 月に亘り春日部に於て, ミブヨモギの 1 品種山科二号を用いて, サントニン含量の時期的変化を追求し合理的収穫時期を考察した. 又, 苞及び管状花に於けるナトリウムメチラートによる呈色腺毛数, 並びに苞及び管状花の長さを時期的に追求してそれらのサントニン含有率との相関を考究し, それらの一定数値がミブヨモギのサントニン含量の最高時期の判定に対し一つの簡単な目標となり得るのではないかと知見が得られた.

麦角中の遊離アミノ酸及びアミンについて (1) 川谷豊彦, 片柳益二郎, 清岡寿美子: 昭和 25 年 4 月 15 日日本薬学会 4 月例会 (東部支部) 講演 薬誌, 71 (5), 385~389 (1951.) 麦角中の遊離アミノ酸の検出を専らクロマトグラフ法によつて行つたものである. 細粉とした麦角を直ちに 80° の温水で 30 分抽出し, 其の濃縮液を濾紙上に落し, そのまま一次元はフェノール, 二次元は n-ブタノールで 20° で展開し, ニンヒドリンで検出したが, 同時に抽出される麦角中のカリウム塩類に影響され, 展開不充分或はスポットの境界不明瞭となり, 一定の Rf 値を得ることが不可能であつた. よつて塩類による展解能の障害を検するため, 既知アミノ酸の各液に塩化ナトリウム又は酢酸ナトリウムを種々な濃度に溶解した検体についてフェノール及び n-ブタノールを展開剤として Rf 値を測定し其の変化を検討した. 即ち酢酸ナトリウムは塩化ナトリウムに比し Rf 値に与える影響大でその値を小さくす

る。又同時にスポットを不明瞭にする。酢酸ナトリウムはフェノールの場合は0.5%, n-ブタノールの場合は5%で顕著な Rf 値の低下が見られ、塩化ナトリウムはフェノールで0.5%, n-ブタノールにて1%の濃度で Rf 値を低下させる。何れの場合も塩類の濃度が高ければスポットが不明瞭となり判定極めて困難となる。よつて著者等は第2報に記載する如く麦角抽出液よりアミノ酸を水銀塩として分離精製することによりその検出を行つた。

麦角中の遊離アミノ酸及びアミンについて(2) 川谷豊彦, 片柳益二郎, 清岡寿美子: 昭和25年4月15日日本薬学会4月例会(東部支部)講演 薬誌, 71 (5), 389~393 (1951) 栽培麦角(ライ麦及び小麦)及び天然麦角(ハマニシク, チガヤ, ミヤコザサ)等について麦角水浸液より遊離アミノ酸を水銀塩として分離精製し、ペーパークロマトグラフ法により検出した。同時に総アルカロイド含量, ニンヒドリン呈色物質含量をも検査した。然して1. アスパラギン酸, グルタミン酸, アラニン, ヒスチジン, バリン, フェニルアラニン, ロイシン, アラニンの左肩に位置する不明のスポットは大部分の麦角(ライ麦, チガヤ, ミヤコザサ)のクロマトグラムに見出された。2. 特殊のスポットとしては, チロジンがライ麦及びミヤコザサのそれに, 又グリシンが脱落麦角及び小麦麦角のそれに見出された。3. ヒスタミンは大部分の麦角(ライ麦, ミヤコザサ, 小麦)に見出された。4. 27年保存の陳旧ライ麦麦角には, アスパラギン酸, グルタミン酸, アラニン, フェニルアラニンのみが認められた。5. D-プロリン及びトリプトファンはいずれの麦角にも見出されなかつた。6. ニンヒドリン呈色物質はライ麦麦角に最も多く, 小麦, ミヤコザサ, チガヤ麦角これに次ぐ。ハマニシク麦角及び27年保存陳旧麦角は最も少であつた。7. 対照のライ麦穀粒中にはペーパークロマトグラフで検出されるアミノ酸は認め得なかつた。8. 総アルカロイド含量はハマニシク麦角 *Claviceps litoralis* が最も多く1%以上であり, ライ麦麦角 *C. purpurea* はほぼ0.5%であつた。収穫前脱落した麦角(ライ麦)はアミノ酸, アルカロイド共に減少し, 特にアルカロイド含量は正常収穫に比し減少著しい。

On Colchicine-Induced Polyploid *Lobelia* (*L. inflata* Linn.) with Special Reference to the Content of Alkaloids. (コルヒチン処理により育成された倍數体ロベリア特にアルカロイド含量について…英文) 川谷豊彦, 大野忠郎, 今関和泉: 薬誌, 71 (6), 623~624 (1951) 著者等は1948年コルヒチン処理によりロベリアの4倍体を育成し引続き2箇年にわたり栽培し, その形態, 生育, アルカロイド含量等について調べ, 2倍体との比較を行つた。4倍体ロベリアは2倍体に比し, 気孔, 花粉, 子葉, 葉は大形となり, 葉は厚さを増し濃色を呈し丸味を帯びる事が認められた。草丈については両者に差を認めなかつたが, 植物体の重量は4倍体は2倍体より重いことが認められた。アルカロイド含有率については4倍体は2倍体の略々2倍であつた。以上の結果は甚だ興味あるものであり4倍体ロベリアの栽培の可能性を示すものである。

野性アリタソウ (*Chenopodium ambrosioides* L.) の栽培について(予報) 川谷豊彦, 大野忠郎: 日本作物学会紀事, 20 (1~2), 49~52 (1951) 1. 野生アリタソウ (*Chenopodium ambrosioides* L.) 及び栽培種たるアメリカアリタソウ (*Chenopodium ambrosioides* L. var. *anthelminticum* A. Gray) の染色体数は前者は $n=8, 16, 24$, 後者は $n=32$ なる事が初めて著者等により1948年決定された。2. アリタソウ及びアメリカアリタソウの染色体数を異にする各々のものは, 夫々明瞭な形態の特徴を持つ。3. アリタソウの他に若干の *Chenopodium* 属植物の染色体数を観察したが, これらは何れも8を基礎とする事が新しく初めて決定された。4. 野生アリタソウの揮発油には20~60%のアスカリドールを含み, 栽培試験, 収油試験の結果野生アリタソウの中には, 収量, 収油率共に栽培種アメリカアリタソウに劣るものがある事が初めて著者等によつて証明された。5. 染色体数とアスカリドール含有率及び収油率との関係は本実験に於ては別に認められなかつた。(昭和25年2月11日日本作物学会第86回講演会講演)

サントニン含有 *Artemisia* 属植物の研究特に其の栽培について(第1報) クラムヨモギについて(その1) 川谷豊彦, 藤田早苗之助, 大野忠郎: 薬誌, 72 (1), 37~41 (1951) 現在世界的に著名な新サントニン原料植物クラムヨモギ *Artemisia kurramensis* Qazilbash の大要を紹介し, 且つこれを春日部に於て栽培してその形態, 習性, 生育を観察し, サントニン含量(1950年度)を検し, 本邦に其の栽培の可能なことを認めた。発芽の適温は $10^{\circ}\sim 15^{\circ}\text{C}$ である。染色体数は $2n=18$, クラムヨモギと混生するサントニン不含の *A. maritima* は $2n=36$ であり, 従つて両者は細胞遺伝学的にも別植物なる事を明らかにした。

ムラサキオモトの肥料三要素試験(予報) 宮崎幸男: 日作紀, 20 (1~2), 117~120 (1951) 伊豆分場内圃場の土壌を用い, 三要素区, 無窒素区, 無磷酸区, 無加里区, 無肥料区との五区を設け, ムラサキオモト (*Rhoeo discolor* Hance)

の三要素試験を行つた結果、三要素区と無カリウム区、無窒素区と無肥料区とは夫々大体似通つた生育状態を示し、無磷酸区は他区に比し著しく生育劣り、本土壤は窒素、磷酸欠乏しカリウムは相当量含まれるものと思われる。無窒素区、無肥料区では葉の貯水組織の発達に基づき葉の厚さ、生葉重、含水率の比較的大なること、逆に乾物率、水性エキス含量の小なる事、葉の同化・色素組織の緑色・紫色共に淡色なる事、花器・分蘗の發育の劣る事、根部の發育良好なる傾向が認められた。無磷酸区では枯葉数多く且つその枯死状態が異常であり、生葉数少く、又葉形極めて小形で草丈、生葉重も最小で、同化・色素両組織の緑色・紫色共に稍々暗色を帯び、主茎・花器・分蘗の發育も極めて不良で根部の發育も最も劣る傾向が認められた。

性ホルモンの代謝について 長沢佳熊：日新医学：35, 402~413 (昭和 23) 綜説

性ホルモンの代謝 長沢佳熊：臨床 3, 364~379 (昭和 25) 綜説

医薬品としてのホルモンとその進歩 長沢佳熊：薬学 4, No. 3, 191~198 綜説

脳下垂体後葉ホルモンの綜説 長沢佳熊：綜合医学 9, 129~132 (昭和 27) 主に生化学的見地からの進歩綜説
試薬について 長沢佳熊：化学の領域 6, 87~91 (昭和 27) JIS 試薬, 日本薬局方品, 日本薬局方試薬, 標準試薬, 殊に当所田中試験部長が米国から持ち販つた National Bureau of Standards の標準品などを説明した。

卵胞ホルモンの定量法について 長沢佳熊 越村榮之助：昭和 23~10~23. 日本薬剤師協会学術講演大会講演
水溶性注射液, 妊馬尿から演者等の考案した抽出法で得たものにつき Kober 法を応用して卵胞ホルモンをその標準品と比較定量を行つた。

インシュリンの薬化学的研究 長沢佳熊：第 12 回日本医学会総会第 23 回日本内分泌学会特別講演。(昭和 25 年 3 月 31 日) 演者の昭和 7 年から行つたインシュリンの製造法, 検定法, 持続インシュリンの製造法, 鯨及び魚類臓器からインシュリンの製造, 脾臓又は魚類スタニウス小体中の持続性血糖降下成分及び血糖上昇成分に関する研究を綜説した。

脳下垂体後葉標準品の製造 長沢佳熊, 中山豪一, 苗村徳次郎, 佐藤浩：昭和 26 年度日本薬剤師協会学術大会講演 (昭和 26 年 7 月 4 日) 日局 VI 脳下垂体後葉標準品を製造し, セルモットの摘出子宮収縮法, 鶏の血圧下降法, 白鼠の摘出子宮収縮法によりオキトシンを測定し, 米局標準品及び米国製 Posterior Pituitary Injection (U. S. P.) と比較し, 日局標準品として使用し得ることを報告した。その製法, 検定法における知見を述べた。

インシュリンの薬化学的研究 (8). カツオのスタニウス小体中の持続インシュリンについて 長沢佳熊, 三橋謙一, 苗村徳次郎：同上講演 インシュリンが生体内でどのような化合物として存在するかを知るためには硬骨魚類のスタニウス小体を用いて研究するのが最も適當であると考えて演者等は数年間その探究に努め, カツオのスタニウス小体中には持続型インシュリンが存在する事実を確めた。その性質, 製法については日本特許第 190597 号 (昭和 26 年) 参照。

アモバルビタールの規格 溶性アモバルビタールの規格 長沢佳熊：同上全国病院薬剤部長会議宿題報告 (昭和 26 年 5 月 3 日) アモバルビタール, 溶性アモバルビタールとの名称を採用してその規格及び試験法を制定し, 公表した。詳細は薬剤年報第 11 号 19~12 (昭和 27 年)。

ルチンの規格 長沢佳熊, 鹿島哲：同上宿題報告 (昭和 26 年 5 月 3 日) ルチンの規格及び試験法を制定し公表した。詳細は薬剤年報第 11 号 12~14 (昭和 27 年)。

新薬局方の一般試験法 長沢佳熊：同上特別講演 (昭和 26 年 7 月 3 日) 日局 IV の編輯に従事した演者の知見を加えて解説した。

ヘパリンの抽出について (第 1 報) 長沢佳熊, 中山豪一, 斎藤十六, 柴田威：第 24 回日本内分泌学会総会 (昭和 26 年 4 月 3 日) 講演 牛肝臓, 肺臓から Charles, Scott 法, Marvin, Kuizenga, Spaulding 法によりヘパリンを抽出した。

カツオの脳下垂体の成分について (第 1 報) 長沢佳熊：同上 (昭和 26 年 4 月 3 日) 講演 子宮収縮成分を抽出しその含量及び生理的性質について述べ, 血圧上昇成分を比較的多く含むことを知つた。

ニトロ化合物の新呈色反応 長沢佳熊：分析と試薬 3, 109~112 (昭和 25) 芳香ニトロ化合物の水溶液に亜鉛末を加え中性還元を行つた後硫酸少量を加えると呈色する。一般に NO_2 と NH_2 のあるベンゼン系化合物ではこの反応が著しく, m-Dinitro 体では特に顕著である。m, p-Nitroanilin では陰性, o-化合物は陽性, 2, 4, 6-Trinitro-

toluene, Trinitrobenzene, Picric acid のような Trinitro 化合物は陰性。

卵胞ホルモンの定量法について 長沢佳熊, 越村榮之助: 昭和23年10月23日日本薬剤師協会学術講演大会講演 尿, 又は水溶製品から演者等の考えた抽出法で得た製品について Kober 法に準拠して卵胞ホルモンの標準品と比色定量を行った。

インシュリン注射液の規格 長沢佳熊: 同上講演。

市販インシュリン製剤の試験成績 長沢佳熊, 苗村徳次郎, 三橋謙一, 寺岡葉子: 薬剤部年報 9, 57~60 (1950). 衛試 68, 20~23 に包含されているからそれを参照。

脳下垂体後葉注射液の検定について 長沢佳熊, 苗村徳次郎: 昭和25年7月3日日本薬剤師協会学術大会講演 市販品10種について試験を行い, その内4種が効力不足であつた。検定法はモルモットの摘出子宮による。

特 許 (昭和26年度)

油溶性アゾ色素添加による油脂中ビタミンAの安全な保存方法(日本特許第187551号, 出願25.7.6. 公告26.2.16. 特許26.5.10, 発明者 大岡増次郎, 国東寿夫)。

ミラカンバその他ベツラ *Betula* 属植物の樹皮又はその抽出物を乾留して得たる原油を原料とする新殺虫剤の製造法(日本特許第189586号, 出願25.2.16. 公告26.6.22. 特許26.9.8. 発明者 山口一孝, 鈴木猛, 庄司初枝)。

魚類のスタニウス小体より持続性血糖降下ホルモンの製法(日本特許第190597号, 出願24.11.7. 公告26.8.8. 特許26.11.28. 発明者 長沢佳熊)。

アンブル入注射液中の有害物質の有無を迅速に判別する方法(日本特許第191134号, 出願24.3.31. 公告26.9.13. 特許26.12.3. 発明者 八田貞義, 青山好作, 丹治園枝)。

国家検定, 国家検査等の試験成績報告 総合調整部

昭和22年3月スルファミン等の国家検査が指令されてから, その後昭和25年に行われた一斉検査の結果避妊薬をはじめブドウ糖注射液等の特定医薬品として追加指定以来各種品目にわたる重要医薬品の検定指定並に医薬品, 用具, 歯科材料に対する国家検査命令が発せられた。それに従つて当所における試験も日を追つて増加し又朝鮮事変に伴う特品納入品の検査, 輸出入医薬品, 食品の検査等その試験品目及び数量において多数の検体を処理している。ここに当所における昭和26年1月より同年12月に到る間の成績を報告する。

衛生試験所における検査の状況 (昭和26年)

品 名	試 験 機 関		合 計
	東 京	大 阪	
特定医薬品検定	1,001	157	1,158
国 家 検 査	6,062	1,724	7,786
製 品 検 査	980	1,931 ⁹⁵¹	2,911 ¹⁹³¹
輸 出 検 査 (薬)	195	107	302
輸 出 検 査 (食)	214	358	572
輸 入 検 査	19	118	137
一 般 依 頼 試 験	753	82	835
特 行 試 験	1,899	—	1,899
特 需 試 験	478	—	478
計	11,601	4,477 ³⁴⁷⁷	16,078 ¹⁵⁰⁷⁸

特定医薬品検定成績 (昭和26年)

月別 品名	試験 機関	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12		計	
		合	不	合	不	合	不	合	不	合	不	合	不	合	不	合	不	合	不	合	不	合	不	合	不	合	不
		計	格	計	格	計	格	計	格	計	格	計	格	計	格	計	格	計	格	計	格	計	格	計	格	計	格
スルファチアゾール	東京 大阪	24 5	24 0	35 11	35 0	45 9	45 0	40 10	38 0	33 9	38 0	33 9	33 0	27 8	27 0	29 6	28 0	24 7	24 0	32 6	32 0	44 9	44 0	27 6	27 0	398 995	3 0
スルファチアゾール錠	東京 大阪	3 2	3 0	4 4	4 0	4 2	4 0	4 2	4 0	6 3	6 0	3 5	3 0	3 3	1 0	2 2	2 0	2 1	2 0	2 1	2 0	1 2	1 0	3 3	3 0	33 28	0 0
次ナリチル酸ビスマ ス注射液	東京 大阪	1 1	1 0	2 —	2 —	1 —	1 —	1 —	1 —	1 —	1 —	2 —	1 —	1 —	1 —	1 —	2 —	2 —	2 —	1 —	1 —	—	—	1 —	1 —	13 10	3 2
塩酸オキソフェナル シリン	東京 大阪	— —	— —	— —	— —	1 —	1 —	3 —	3 —	4 —	4 —	3 —	3 —	2 —	2 —	1 —	1 —	2 —	2 —	1 —	1 —	2 —	2 —	1 —	1 —	20 20	0 0
注射用 塩酸オキソフェナル シリン	東京 大阪	— —	— —	4 —	4 —	3 —	3 —	1 —	1 —	3 —	3 —	4 —	4 —	1 —	1 —	3 —	3 —	3 —	3 —	6 —	6 —	1 —	1 —	3 —	3 —	32 30	2 0
ヘキシレゾルシン	東京 大阪	— —	— —	— —	— —	— —	— —	2 —	2 —	1 —	1 —	— —	— —	1 —	1 —	— —	— —	— —	— —	2 —	2 —	1 —	1 —	1 —	1 —	8 8	0 0
ヘキシレゾルシン 丸	東京 大阪	1 4	1 0	3 —	3 —	10 —	10 —	5 —	5 —	8 —	8 —	8 —	8 —	5 —	5 —	— —	— —	— —	— —	11 —	10 —	5 —	5 —	5 —	5 —	61 6	1 0
避 妊 薬	東京	7	7	16	15	11	11	18	18	15	15	12	12	13	13	9	9	13	13	13	12	9	9	15	15	151	149
インジュリン注射液	"	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	8	6
脳下垂体後葉注射液	"	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	8	0
ブドウ糖注射液	"	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	200	183
転化糖注射液	"	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	10	9
果糖注射液	"	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
リンゲル液	"	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	58	48
ロツク液	"	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	0
合 計	東京 大阪	35 12	35 0	64 15	63 15	74 15	74 15	72 15	71 15	78 14	76 14	65 18	64 18	51 14	50 14	44 11	43 10	58 11	57 10	1148 9	140 9	159 14	144 15	153 10	143 9	1001 90	41 2

エ	テ	ル	1	1	0	1	1	0	—	—	—	—	1	1	0	1	1	0	1	1	0	2	2	0	—	—	8	8	0												
塩酸エフエドリン	"	大阪	1	1	0	5	5	0	3	0	1	1	0	3	3	0	5	5	0	8	8	0	4	0	—	4	4	0	34	0											
プロムワレリル尿素	東京	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	0	3	3	0	3	3	0	—	—	—	—	1	1	0	11	0											
プロムヂエチルアセチル尿素	東京	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—				
アセチルサリチル酸	"	大阪	2	2	0	12	12	0	9	0	7	7	0	6	5	1	3	2	1	5	5	0	4	3	1	5	5	0	5	5	0	5	5	0	5	5	0	58	55	3	
薬用炭	東京	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—			
タンニン酸アルブミン	"	大阪	—	—	—	—	—	—	2	2	0	1	0	1	3	3	0	5	3	2	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	15	12	3
D D T	東京	大阪	—	—	—	—	—	—	33	33	0	43	0	56	55	1	46	46	0	41	41	0	28	28	0	13	13	0	13	13	0	273	272	1	—	—	—	—	—	—	
クレゾール石鹼液	"	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—			
カフェイン	東京	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—			
安息香酸ナトリウム	東京	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—			
サリチル酸ナトリウム	東京	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—			
パツカク流エキス	東京	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—			
ホミカエキス	"	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—			
ホミカチンキ	"	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—			
サリチル酸ナトリウム	東京	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—			
合 計	東京	大阪	349	337	12	449	430	19	599	569	30	631	577	54	608	555	53	637	586	51	519	487	32	521	502	19	461	433	28	446	432	14	348	339	9	494	473	21	6062	5720	342
	大阪	21	18	3	66	41	5	115	113	2	149	143	6	153	151	2	168	167	1	159	156	3	166	159	7	167	157	10	201	197	4	196	193	3	163	162	1	1724	1677	47	

製 品 検 査 状 況 (昭和26年)

検査場所	品名	業者数	月別		1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12		合計												
			合格	不合格	合格	不合格	合格	不合格	合格	不合格	合格	不合格	合格	不合格	合格	不合格	合格	不合格	合格	不合格	合格	不合格	合格	不合格	合格	不合格	合格	不合格	合格	不合格											
東京	溶性サツカリソ	40	4	0	13	10	3	106	105	1	27	124	3	103	101	2	64	62	2	33	27	6	42	37	5	57	52	5	30	30	0	18	17	1	37	36	1	634	605	29	
	ズルチソ	26	3	3	0	2	2	0	18	14	4	2	1	1	4	3	1	8	5	3	13	13	0	19	16	3	20	19	1	13	12	1	8	7	1	5	4	1	115	99	16
	食用色素	24	11	11	0	19	19	0	22	22	0	44	44	0	10	10	0	11	11	0	22	22	0	27	26	1	15	15	0	5	5	0	26	26	0	16	16	0	228	227	1
	ニトロフラゾン及剤	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3	3	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3	3	0		
	小計	91	18	18	0	34	31	3	146	141	5	173	169	4	117	114	3	86	81	5	68	62	6	83	79	9	92	85	6	48	47	1	52	50	2	58	56	2	980	934	46
大阪	溶性サツカリソ	29	2	2	0	6	6	0	124	124	0	5	4	1	47	47	0	63	63	0	51	50	1	14	13	1	1	1	0	4	4	0	24	24	0	34	34	0	375	372	3
	ズルチソ	20	—	—	—	9	8	1	57	57	0	35	35	0	32	30	2	45	38	7	41	40	1	15	14	1	49	49	0	4	4	0	20	20	0	18	18	0	325	313	12
	食用色素	15	2	2	0	15	15	0	3	3	0	6	6	0	38	37	1	14	13	1	18	18	0	8	7	1	25	24	1	15	13	2	16	16	0	14	14	0	174	168	6
	ニトロフラゾン及剤	1	—	—	—	26	26	0	16	16	0	14	14	0	9	9	0	9	9	0	3	3	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	77	77	0
	小計	65	4	4	0	56	55	1	200	200	0	60	59	1	126	123	3	131	123	8	113	111	2	37	34	3	75	74	1	23	21	2	60	60	0	66	66	0	951	930	21
合計		156	22	22	0	90	85	4	346	341	5	233	228	5	243	237	6	217	204	13	181	173	8	125	113	12	167	160	7	71	68	3	112	110	2	124	122	2	1,931	1,864	67