

No. 71

January 1953

BULLETIN
OF THE NATIONAL
HYGIENIC LABORATORY

Yôga, Setagayaku, Tokyo, Japan.

衛生試験所報告

第七十一号

昭和二十八年一月

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

報 文

長沢佳熊, 越村榮之助: 卵胞ホルモンの研究 (第 4 報) その定量法 (その 2) 妊馬尿中のエストロンの比色定量法	1
長沢佳熊, 三橋謙一, 高瀬新三郎: 人臍臓腫瘍, Cushing 病患者臍臓のインシュリン含量について (附) その他の動物臓器のインシュリン含量との比較	12
朝日奈晴世, 水町彰吾: アヘン産地鑑別法について (第 1 報) 乾燥減量とモルヒネ含量	20
川城 巖, 福沢富美: 魚肉ねり製品中のニトロフラゾンの定性及び定量法	27
鹿島 哲, 太幡利一: ルチンについて, 第 3 報, 減圧ペーパークロマトグラフィによる分離定量 (その 2)	35
八田貞義, 青山好作, 小沢茂子, 宮沢文雄, 小笠原美知: 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 (2) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> からの発熱物質の精製と人体への応用について	40
八田貞義, 青山好作, 丹治園枝, 宮沢文雄, 小沢茂子, 小笠原美知: 拮抗現象の面から観たイソニコチン酸ヒドラジドの抗菌性と生体臓器親和性についての研究	49
八田貞義, 山地幸雄, 田中弘子, 功力 博, 平林磐夫, 山下 昇, 宮川忠夫, 山田義郎: 腸チフス, パラチフスワクチン被接種者血清の感染防禦力について	58
山地幸雄, 平林磐夫: フラン誘導体のレプトスピラに対する作用 (実験的感染モルットモトにおける作用)	67
鈴木 昭: 牛乳由来ブドウ球菌に関する研究 (第 1 報) 生物学的性状について, 特に病原株, 非病原株の区別	73
鈴木 昭: 牛乳由来ブドウ球菌に関する研究 (第 2 報) 生物学的性状について, 特に溶血性について	82
桑原章吾, 大淵令子, 井上種子: 細菌の薬剤耐性についての知見補遺 (6) 黄色ブドウ球菌の人工ストレプトマイシン耐性変異について	97

資 料

○ 長沢佳熊, 中山豪一, 佐藤 浩: 脳下垂体後葉ホルモンの検定 (第 2 報) 標準粉末 (日局標準品) の製造と子宮収縮成分の力価検定について	103
○ 川城 巖, 浦久保五郎, 佐藤とし: 食品工場の空気検査成績について	114
○ 八田貞義, 青山好作, 丹治園枝, 小沢茂子, 宮沢文雄, 穂坂圭蔵, 栗栖弘光: 市販紫外線燈の殺菌効力に関する研究	123
○ 八田貞義, 青山好作, 旭 哲也, 宮沢文雄, 小沢茂子, 小笠原美知: 食品の新鮮度保持に関する研究 [VI] 電気漂白及び薬品漂白小麦粉中の細菌数及びその消長について	135
○ 越沼さみえ, 桑原章吾: パラアミノサリチル酸の抗菌作用について	139
○ 功力 博: 人精子についての観察 (第 1 報)	143
○ 藤井正道, 佐藤 寿, 辻 楠雄, 薩摩義一郎: 市販の腸線について	149
○ 藤井正道, 堀部 隆, 亀田 務: 歯科用合成樹脂について	154
○ 川谷豊彦: 麦角菌 <i>Claviceps</i> の寄生植物 (その 2)	161
抄 録	172
業務報告 (昭和 27 年 1 月~12 月) 総合調整部	177

CONTENTS

K. Nagasawa and E. Koshimura: Studies on Follicular Hormones (IV) On the Quantitative Analytical Method (2) Quantitative Method of Oestrone in the Pregnant Mare Urine.	1
K. Nagasawa, K. Mitsuhashi, and S. Takase: Insulin-Contents in the Tumors of Langerhans' Islands of Men and in the Pancreas of a Patient Suffering from Cushing's Disease.....	12
H. Asahina and S. Mizumachi: Research on the Methods of Determining the Origin of Opium. I. Loss in Weight on Drying and Morphine Content.....	20
I. Kawashiro and F. Fukuzawa: Detection and Determination of 5-Nitro-furfural-semicarbazone (Nitrofurazone) in Hampen, Kamaboko, etc.....	27
T. Kashima and T. Tabata: Rutin. III. The Separation and Determination by Paper Chromatography Under Reduced Pressure (2)	35
S. Hatta, K. Aoyama, S. Ozawa, F. Miyasawa, and M. Ogasawara: Purification of Pyrogenic Substance from <i>Pseudomonas aeruginosa</i> and its Application to Human Body.....	40
S. Hatta, K. Aoyama, S. Tanji, F. Miyazawa, S. Ozawa, and M. Ogasawara: Studies of Isonicotinyl hydrazine, especially on its Antagonists and Organ Affinity.	49
S. Hatta, Y. Yamaji, H. Tanaka, H. Kunugi, I. Hirabayashi, N. Yamasita, T. Miyazawa, and Y. Yamada: On the Protective Potency Agglutinin Titer of Sera of Immunised with Typhoid-paratyphoid Vaccine, and Ill-Effect Reactions at the Time of Administrating Vaccine	58
Y. Yamazi and I. Hirabayashi: On the Action of Nitrofurans Derivatives against <i>Leptospira</i> with Special Reference to the Effect of the Drugs on the Guinea-Pigs Infected with <i>Leptospira icterohaemorrhagiae</i>	67
A. Suzuki: Studies on the Biological Function of <i>Staphylococci</i> from Bovine Milk. I. On the Differences of Biological Characteristics between the Virulent and Avirulent Strains of <i>Staphylococci</i> ...	73
A. Suzuki: Studies on the Biological Function of <i>Staphylococci</i> from Bovine milk. II. On the Haemolysis of <i>Staphylococci</i>	82
S. Kuwahara, R. Ofuchi, and T. Inoue: Studies on the Resistance of Bacteria to Drugs (6) On the Induced Streptomycin-resistant Strains of <i>Micrococcus pyogenes var. aureus</i>	97
K. Nagasawa, G. Nakayama, and H. Sato: Bioassay of Posterior Pituitary Hormones (II) Studies on the Preparation of the Standard Power and the Bioassay of Oxytocin.	103
I. Kawashiro, G. Urakubo, and T. Sato: Investigation on the Air at Several Food-plants.....	114
S. Hatta, K. Aoyama, S. Tanji, S. Ozawa, F. Miyasawa, K. Hosaka, and H. Kurisu: Studies on the Germicidal Action of Commercial Sterilamps.	123
S. Hatta, K. Aoyama, T. Asahi, F. Miyazawa, S. Ozawa, and M. Ogasawara: Studies on Holding Food Fresh (6) On Number of Bacteria in Flour Bleached by Electricity and Chemicals. ...	135
K. Koshinuma and S. Kuwahara: On the Bacteriostatic Action of <i>p</i> -Aminosalicylic Acid.	139
H. Kunugi: Observation on Several Characters of Human Semen.	143
M. Fujii, H. Sato, K. Tsuji, and G. Satsuma: Study on the Quality of Commercial Catgut.	149
M. Fujii, T. Horibe, and T. Kameda: Study on the Resin for Dental Use.....	154
T. Kawatani: Host of <i>Claviceps</i> (II)	161
Abstracts	172
Annual Report (1952)	177

卵胞ホルモンの研究 (第4報)*
その定量法 (その2)*

妊馬尿中のエストロンの比色定量法

長沢 佳熊, 越村 栄之助

Studies on Follicular Hormones (IV)

On the Quantitative Analytical Method (2)

Quantitative Method of Oestrone in the Pregnant Mare Urine.

By Kakumia NAGASAWA and Einosuke KOSHIMURA

まえがき

卵胞ホルモンを簡単に定量することは、その製品の試験及び製造上にきわめて重要である。これについて著者等は昭和23年第3報¹⁾において簡単に報告したが、その後の実験においてほとんど100%定量することができる事を確かめその他二三の知見を得たのでここに報告する。

- 比色定量法の考察 妊馬尿中のエストロンを定量するには、1. 妊馬尿からエストロンを定量的に抽出すること、2. エストロンの適当な比色操作を選ぶこと、の2条件が重要な要素となる。
妊馬尿をそのまま検体とすると、夾雑物が比色操作において妨害するので、予め前処理法を行う。

前処理法に関する従来の研究とそれ等に対する考察

前処理法を 1. 加水分解 2. 抽出 3. 精製の3段階に分ける、この内加水分解と抽出とは離すことのできないものである。

加水分解と抽出 尿中に排泄するエストロンは大部分水溶性の結合型²⁾、例えばエストロン硫酸エステル^{3) 4)}、又はグルクロン酸エステル (実際にはエストリオールグルクロナイドは単離されているが、エストロングルクロン酸エステルは未だ単離されていない) などとなっているから、加水分解を行つて有機溶媒に可溶の遊離エストロンに変化させて抽出する方法と、結合型のままでエストロンとともにブタノールなどを用いて抽出した後、加水分解を行う方法とがある。

尿の加水分解についてはほとんどの研究者は強塩酸⁵⁾として加熱しているが、その条件は研究者によつて著るしい差異がある。例えば Smith⁵⁾ は尿に濃塩酸を15v/v%の割合になるまで加え、10分間加熱し、Cohen, Marrian⁶⁾ は尿をpH 1.0とした後更に尿100ccについて12N塩酸3.3ccを加え、120°で2時間加圧加熱し、Dingemans⁷⁾ は尿100ccにつき25%塩酸1.5cc及びベンゼン50ccを加え4時間加熱し、加水分解と抽出を同時に行い (彼女はそれによつて遊離型をなるべく速かにベンゼンに移行させて分解を防ぐのであるという)。Edson⁸⁾ はpH 0.4~0.6とし28日間室温に放置している。又Cohen, Bates^{9) 10)} は酵素を用いて加水分解を行い、著者等¹¹⁾ は細菌によつて完全に加水分解することを知つた。その他Stevenson, Marrian¹²⁾ 及びVan Bruggen¹³⁾ の研究もあるが、結合型が加水分解すると同時に生成したエストロンもまた破壊を受けるといわれる。従つて十分に加水分解を行うとともに、一方エストロンの変化を最小限度に止めなければならない。Banes¹⁴⁾ 等は妊馬尿中に少量含まれるエクイリン Equilin は酸加水分解時に異性化され、ヒツプリン Hippulin 等を生ずるという。このような変化を防ぐために窒素気流中又は保護剤を加え、酸及び空気中の酸素の影響を除こうとした報告もある(Doisy¹⁵⁾)。Smith⁹⁾ は亜鉛末を加えて酸化を防いだ。

著者等は塩酸濃度、加熱時間、加水分解に用いる酸としては硫酸、塩酸などを用いて実験した(実験4参照)元来加水分解によるエストロンの破壊は原料尿中にはじめから存在する遊離及び複合型エストロンの含量を正確に検定して始めて議論が正当に行われる。これには現在生物学的試験により発情物質を定量している。従つて当然妊馬

* 第3報及びその1は長沢佳熊, 越村栄之助: 昭和23年10月日本薬剤師協会学術講演大会講演

尿中に存在するエストロン以外の発情物質 (例えば equilenin, hippulin, equilin, estradiol-17(β), estradiol-17(α), 17(α)-dihydroequilenin, Δ 5,6,8 -estratrienol-3 (α)-one-17 など) も測定値に含んでくる。しかもそれ等は結合型及び遊離型として存在している。それゆえ、発情効力の減少は必ずしもエストロンの破壊を意味するものではないので、この点に各研究者が正確な一致、真理を見出せない原因がある。著者等の実験によれば結合型を完全に加水分解することはさほど容易でなく、又遊離したエストロンはさほど破壊され易くもない。これ等の点からエストロンの分解するという説には必ずしも賛成できない(実験 4 参照)。又 Edson⁸⁾ の実験を追試したが、室温放置による加水分解はかなり異なる成績を示した。これについては後に報告する予定である。

抽出は多くの報告では分液漏斗を用いてふりまぜ分離を行っている。Cohen¹⁶⁾、Leiboff¹⁷⁾ 等は連続抽出器を用いた。通例エーテルを用い酸性で行うが、一部乳化し、殊にアルカリ性では甚しい。かつて長沢¹⁸⁾ はこれを避けるためベンゼンを用い、その抽出能力もよいことを知り、エストロンの工業的製造法として推奨した。

著者等の実験によると、エストロンの N/10 水酸化ナトリウム溶液からはベンゼンよりもエーテルの方が抽出し易い(実験 1 参照)。N 水酸化ナトリウム溶液からは有機溶媒では抽出し難い(実験 1 参照)。酸性溶液からは有機溶媒できわめて容易に抽出される(実験 1 参照)。エストロンのベンゼン又はエーテル溶液は 10% 炭酸ナトリウム液、5% 硫酸では全く抽出されない(実験 1 参照)。エストロンはフェノール性物質であるから以上の事実は当然ではあるが、その酸性度はエストロン、エストラジオール、エストリオールの順に強くなり、エストリオールになると 10% 炭酸ナトリウム液に溶けてくる。又これ等の結果は Mather¹⁹⁾ の報告ともほとんど一致している(実験 1 参照)。

以上のことから妊馬尿を加水分解した後、先ずベンゼンで抽出し、5% 硫酸、10% 炭酸ナトリウム液で洗った後ベンゼンを留去し、残留物を N/10 水酸化ナトリウム液に溶かし、エーテルで抽出し、エーテルを留去した残留物について比色操作を行うこととした。その方法は後述する。

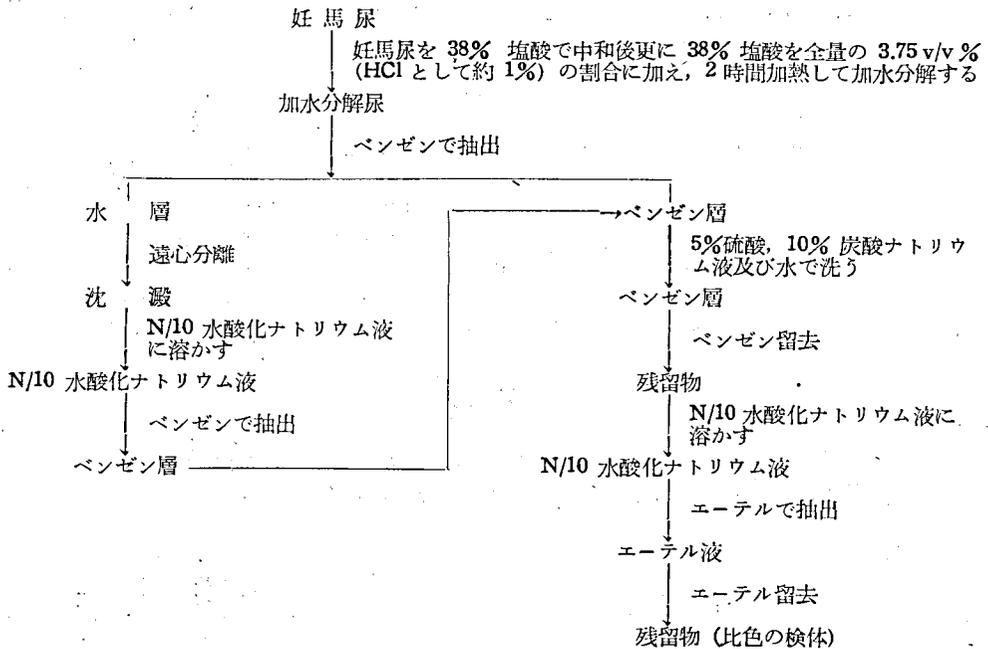
ベンゼン抽出液の蒸留残留物を検体として発色させると色相が悪く定量し難いが、妊馬尿のようにホルモン含量の大きい場合(1 cc 中 10 γ 以上)には他の溶媒との転溶を繰返すだけで比色の目的を達する。殊に N/10 水酸化ナトリウム液に溶存するエストロンをエーテル又はベンゼンでふりまぜ抽出すると、エストロンはかなり精製されて定量的にこれに移る(実験 1 参照)。妊馬尿その他エストロン含量の少ないもの、又は精密に測定する場合には更にクロマトグラフ法²⁰⁾ や Girard 試薬法²¹⁾ を用いて高度に精製する必要がある。

加水分解尿からの抽出操作中の損失については、エストロンを特に加えた回収試験では Cohen, Marrian 等²²⁾ によると 93~100%、Talbot 等²³⁾、Szego 等²⁴⁾、Reifenstein 等²⁵⁾、Jailer 等²⁶⁾ によると数十%にすぎないという。著者等の回収試験では通例 70~80% である(実験 3 参照)。その原因として妊馬尿を塩酸酸性で加水分解するとき、析出する沈澱中にエストロンが含まれ、これは単に有機溶媒で処理しただけでは抽出できないことがかとなつた。この沈澱を稀水酸化ナトリウム液に溶かした後エストロンを抽出し、溶液部分中の抽出分と合すると、エストロンの回収率は常に 100% に達することを知つた(実験 2,3 参照)。

従来の定量法又は製造に関する報告にはこの沈澱を処理することについての記載がなく、従つて多くの場合抽出が不完全であると考られ、100% 回収したとの報告はこの沈澱が析出しなかつた場合ではないかと想像する。ブタノールエキスを加水分解するのが最も高収量を示すという報告¹³⁾ も沈澱が少い状態で尿を抽出したからであろう。原料としての妊馬尿は通例そのまま又は必要に応じて加熱濃縮して貯え、用時加水分解して抽出するのが通例の工業的製造の際に行われる方法である。その際器底に沈澱を析出するが、この沈澱については前述のような考慮が払われていない。実際にはこの中に多量のエストロンを含み、尿中の総効力の 90% 以上にも達する。この沈澱を利用する工業的簡易製造法¹³⁾ は現在別に特許申請中であり、近く報告する予定である。

以上の事柄から著者等は次表の如き抽出法を考案した(第 1 表)。

第1表 著者等による妊馬尿中のエストロンの比色定量を目的とする抽出法



比色操作法

Kober²⁷⁾ の報告以来その変法^{22) 28) 29) 30) 31) 32)}, Zimmerman の方法³³⁾, 及びその他多くの方法^{34) 35) 36) 37) 38) 39)} が報告されているが、その中で Kober 法は操作し易く、鋭敏度も充分で、検体としても比較的粗製物を使つても夾雑物の影響が少いなどの点から簡易比色定量法として適当である。比色に際しては多くは光電比色計を用い、Jailer³⁴⁾, Stimmel⁴⁰⁾, Venning³²⁾ は補正式を用いて好結果を得たという。著者等は Cartland 法²⁹⁾ に基づき比色した。比色標準液としては Kober³¹⁾ はクレゾールレッドの酸性溶液を用いたが、著者等はエオシンとニューコキシンの混液の方が色相が適当であることを知つた⁴¹⁾、然し純エストロンの呈色と比較する方法が最良であることは勿論であるが色の安定度が劣る。

著者等の実験では比色定量の誤差は 1 cc 中 2.5~20 γ を含む濃度では、試験管列を用いて比色するときには含量差が 15%、Dubosqu 比色計又は光電比色計を使うときは含量差が 5% ならば明らかに識別し得る (実験 5 参照)。発色操作時の試薬及び水のわずかの増減でも著しい誤差を生ずる。呈色液はかなり不安定であるが、氷水中で冷却するときは約 10 分間は大きな変化を示さない。濃度が小さいときほど退色は速やかである。なお安定剤を用いる方法⁴²⁾ の追試及び尿中の微量のエストロンの比色定量については後報にゆずる。

動物試験値との比較 妊馬尿中のエストロンの定量では、Van Bruggen¹³⁾ は比色法の方が動物試験法より 2~8 倍高い値を示すことがあるといい、Jailer³⁴⁾ はよく一致するという。著者等の実験では比色法の方が幾分高い値を示す傾向を認めるが、詳細に関しては改めて報告する (実験 7 参照)。この原因としては他のステロイド及びその他の夾雑物が試薬と反応して呈色するものと考えられる。著者等の実験でも動物試験値の高い、すなわち効力の強いエストラジオールはエストロンに比して呈色が弱く約 0.8 倍であることが確認された⁴¹⁾。エストラジオールとエストロンと共存するときは、エストラジオールが反応しない Zimmerman 法³³⁾ を用いれば識別できる。

著者等の比色定量法でエストロンの工業的製造原料の妊馬尿について定量を行つた結果、従来のように単に妊馬尿の比重で原料の品質を鑑別する方法は大して意味がないことがわかつた (実験 6 参照)。触診による妊娠診断よりもこの比色法によつて妊娠診断の方が確実であるという成績を佐々木⁴³⁾ は示している。

実験の部

実験 1. 有機溶媒によるエストロンの抽出.

エストロン結晶を N/10 水酸化ナトリウム液に溶かし、ベンゼン又はエーテルで抽出した結果は、ベンゼンよりエーテルの方が有効である(第2表).

第2表

N/10 水酸化ナトリウム液 (cc)	エストロン (γ /cc)	抽出液	抽出液量 (cc \times 回数)	回収率 (%)
20	12.5	エーテル	10 \times 4	84.8
20	12.5	エーテル	10 \times 7	97.2
20	12.5	エーテル	20 \times 3	100
20	12.5	エーテル	20 \times 4	100
20	12.5	ベンゼン	20 \times 4	84
20	200	ベンゼン	20 \times 5	91
20	200	エーテル	20 \times 4	100

エストロンの N. 水酸化ナトリウム溶液からは有機溶媒では甚だ抽出し難い(第3表).

有機溶媒に溶したエストロンは N/10 水酸化ナトリウム液では抽出し難い(第4表).

第3表

溶媒	溶媒量 (cc)	エストロン量 (γ /cc)	抽出液	抽出液量 (cc \times 回数)	回収量 (%)
N 水酸化 ナトリウム	20	20	エーテル	20 \times 4	78
N 水酸化 ナトリウム	20	20	ベンゼン	20 \times 4	55

第4表

溶媒	溶媒量 (cc)	エストロン量 (γ /cc)	抽出液	抽出液量 (cc \times 回数)	回収量 (%)
エーテル	20	20	N/10 水酸化ナトリウム液	20 \times 4	80
ベンゼン	20	20	N/10 水酸化ナトリウム液	20 \times 4	85

酸性液からは有機溶媒で極めて容易に抽出される(第5表).

第5表

溶媒	溶媒量 (cc)	エストロン量 (γ /cc)	抽出液	抽出液量 (cc \times 回数)	回収量 (%)
1% 塩酸	40	20	ベンゼン	20 \times 4	100
1% 塩酸	40	20	エーテル	20 \times 4	100

エストロンのベンゼン又はエーテル溶液は 10% 炭酸ナトリウム液又は 5% 硫酸では全く抽出されない.

即ちエストロン結晶 2 mg をベンゼン又はエーテル 40 cc に溶かし(1 cc 中 50 γ), 10% 炭酸ナトリウム液で振り混ぜ抽出し, 炭酸ナトリウム抽出液を中和後弱酸性とし, エーテルで抽出し, エーテル抽出液について Kober 法で呈色反応を試験した結果はエストロンの反応を示さない. 又同様のエストロンのベンゼン又はエーテル溶液を 5% 硫酸で抽出し, 弱酸性まで中和後, エーテルで抽出し, これについて呈色反応を行つても全く陰性である.

実験 2. 沈澱の処理

加水分解した尿をベンゼンで抽出後遠心分離して集めた沈澱を稀アルカリに溶かし, 再びベンゼン(又はエーテル等)で抽出し, 沈澱中に存在するエストロンの量と加水分解尿を単に有機溶媒と振り混ぜ抽出した水層部分のエストロンの量を比較すると沈澱は水層部分の約 6~25% のエストロンを含む. 沈澱を処理しないとこれだけ損失するわけである (第 6 表).

第 6 表

水層部分中のエストロン (γ)	沈澱中のエストロン (γ) 及 (%)	
1600	400	25
880	96	11
800	96	12
1120	100	9
880	52	6

実験 3. エストロンの回収試験.

空試験で呈色物質を含まないことを確めた加水分解尿にエストロンを加え, 著者法で抽出した結果は, 沈澱を処理しない場合には損失が多く, この沈澱を処理した場合及び予め漏過して沈澱を除いた加水分解尿を用いるとほとんど 100% の回収率を得る (第 7 表).

第 7 表

尿番号	加水分解尿 (cc)	加えたエストロン (γ)	1 cc 中のエストロン (γ/cc)	抽出液	抽出液量 (cc×回数)	回収率 (%)	備 考
A-1	40	800	20	ベンゼン	20×2	41.6	沈澱を処理しない抽出法による
A-2	40	800	20	ベンゼン	20×4	62.5	同上
A-3	40	800	20	ベンゼン	40×2	62.5	同上
A-4	40	800	20	ベンゼン	40×4	62.5	同上
A-5	40	800	20	ベンゼン	20×4	100	加水分解尿を漏過して用いた場合
A-6	40	800	20	ベンゼン	20×4	100	著者法
B	40	1200	30	ベンゼン	20×4	69	沈澱処理しない抽出法による
C	40	800	20	ベンゼン	20×4	100	同上
D	40	1000	25	ベンゼン	20×4	98	同上
E	40	600	15	ベンゼン	20×4	82	同上

実験 4. 加水分解の条件.

(a) 塩酸濃度の影響 妊馬尿 100 cc を 38% 塩酸で中和後更に 38% 塩酸を全量の 1.25 v/v%, 3.75 v/v%, 25 v/v% (HCl としてそれぞれ約 0.3%, 約1% 及び約6%) の割合に加え 2時間煮沸後著者法によりエストロンを抽出した後比色定量を行つた(第 1 図, 図中の塩酸%は v/v %の意味である).

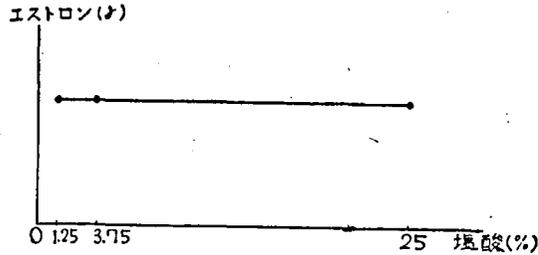


Fig 1.

塩酸の量による差異は上述の範囲内では認め得ない.

(b) 加熱時間の影響 妊馬尿 100 cc を 38% 塩酸で中和後更に 38% 塩酸を全量の 3.75 v/v% (HCl として約 1%) の割合に加え, 煮沸後エストロンを著者法により抽出した後比色定量を行つた(第 2 図).

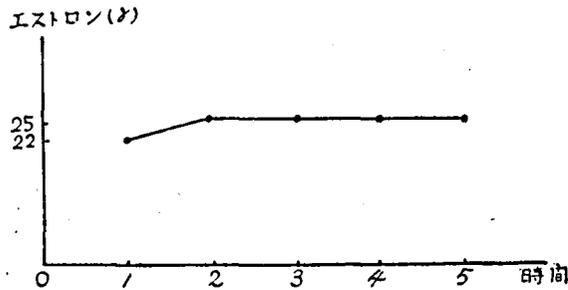


Fig 2.

2~5 時間の範囲内では差を認め得ない. 1 時間では僅かに低い値を示す.

(c) その他

塩酸で pH 3 (指示薬チモールブルー) とし, 2時間煮沸したとき, 30% 硫酸を用いて加水分解したときも完全に加水分解されるが, 硫酸を用いると硫酸カルシウムの沈澱多量を生じて操作し難くなることもあり, 塩酸の方がよい(第 8 表).

第 8 表

妊馬尿 (cc)	中和後加えた酸の量 (cc)	加熱時間 (時間)	抽出エストロン量 (γ)
100	38% 塩酸 3.75	2	2500
100	30% 硫酸 3.75	2	2500
100	38% 塩酸で pH 3.0	2	2500

実験 5. 比色操作.

(a) 試験管で比色する方法

小試験管に結晶エストロン, 検体を別々にとり, Kober 試薬 0.4 cc を加え 100° で 3 分間加熱し, 直ちに 1 分間水冷し, 水 0.4 cc を加え, 再び 100° で 1 分間加熱後水冷し, 水 1.2 cc を加え, 検体と結晶エストロンの呈色液の濃さを比較し, 結晶エストロン一定量と等しい呈色濃度を示す検体量を求め, これから検体中のエストロン量を算出する. 1 cc 中 5 γ 前後の濃度で比色するときは 15% の量差があれば識別できる.

(b) Dubosqu 比色計を用いる方法

mm

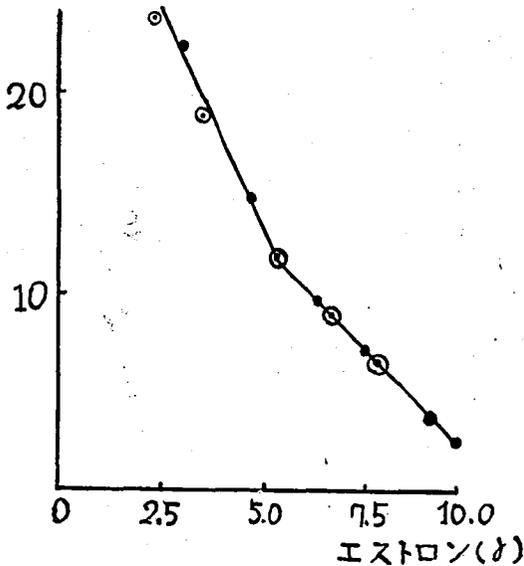


Fig 3.

1 cc 中エストロン含量 2~10 γ の範囲では 5% の量差があれば明確に識別できる.

(c) 光電比色計を用いる方法

(a) と同様に操作した呈色液を比色する. フィルターは S50, S53 がよい, 結晶エストロンの種々の濃度の呈色液を用いて予め作ったグラフを用い, これと検体とを比較して検体中のエストロン量を求める (第 4 図).

E

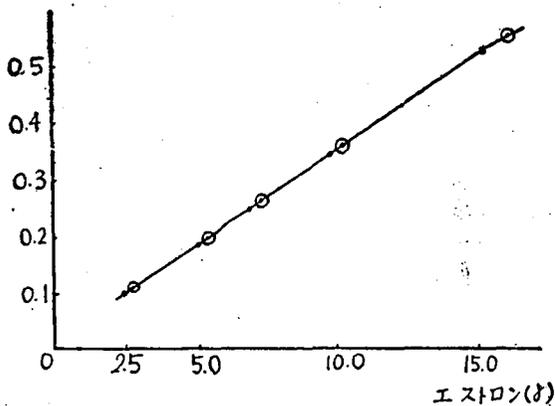


Fig 4.

(a) と同様に操作した呈色液を比色する. このとき硫酸銅溶液で濾光した光源を用いると見易くなる. 又予め色素液を標準液として種々の濃度のエストロンの呈色液と比較したグラフを作つておいてこれと比較してもよい(第3図, タテ軸は比色計の層長(mm)を示す).

◎ 印はその前の印のエストロン濃度より 5% 濃いもの.

標準色はフクシシ・ニューコクシンの混合液を用い, 硫酸銅濾光源を使用す.

◎ 印はその前のエストロン濃度より 5% 濃いもの. Filter S50, 層長 4 mm, タテ軸は吸光度この成績によれば 5% の量差があれば明確に識別できる.

実験 6. 著者等の比色定量法で定量した妊馬尿, その他の尿中のエストロン含量

著者等の方法で工業的製造原料の妊馬尿, 競馬尿, 男子尿について比色定量を行つたところ次のような結果を得た(第9表)。比重とエストロン含量は必ずしも一致しない。

第9表

エストロン含量 (γ /cc)	比 重	産 地	備 考
22.5	1.016	三里塚	
13	1.020~1.029	三里塚	
32	1.030	三里塚	
13	1.020	三里塚	
14.5	1.028	三里塚	
8		川 口	競馬尿
13		川 口	競馬尿
43	1.030	三里塚	
62.5	1.025	三里塚	
36	1.018	三里塚	
0		当 所	男子尿
24	1.038	熊 本	
50	1.030	熊 本	
19	1.038	熊 本	
25	1.020	熊 本	

実験 7. 動物試験との比較

比色試験に用いた結晶エストロン及び検体のアルコール溶液をそれぞれ一定量ずつとり, アルコールを蒸発し, 残留物を N/10 水酸化ナトリウム液で 0.8 cc 中にエストロンを 0.07 γ 含有するように溶かし, 去勢マウスに 1日 2回 2日間に 4 回皮下注射し, 陰垢反応で比較すると比色値の方がやや高いことを示した(第10表)。

第10表

第1回試験		
第1群 エストロン結晶		4 匹中 3 匹発情
第2群 検 体		5 匹中 3 匹発情
10日後交叉試験		
第1群 検 体		4 匹中 2 匹発情
第2群 エストロン結晶		5 匹中 4 匹発情
発情動物数(%)	エストロン結晶	78
"	検 体	56

結 論

1. 妊馬尿中のエストロンの加水分解, 抽出, 精製及び比色定量について研究した結果, 従来抽出できなかった部分は沈澱中に含まれていることを明らかにした. 2. この沈澱中のエストロンは単に有機溶媒で処理するだけでは抽出し難く, 沈澱を N/10 水酸化ナトリウム液に溶して処理することにより定量的に抽出し得る. 3. 比色値と動物試験値とは近いが前者がやや高い. 4. 妊馬尿中のエストロンの一定量法を考案した.

本研究は長沢が熊本薬学専門学校在職当時に開始されたもので, 熊本薬学土佐々木宛, 故長野茂両氏の実験上の絶大な助力を感謝する.

本実験に用いた貴重な原料は長期間にわたり帝國臓器製薬株式会社, 株式会社日本科学研究所, 太陽製薬株式会社等の厚意により寄贈され又は採取し得たもので厚く感謝する. 又本研究費の一部は昭和 26 年度及び昭和 27 年度厚生科学研究補助金によつたことを記して感謝する.

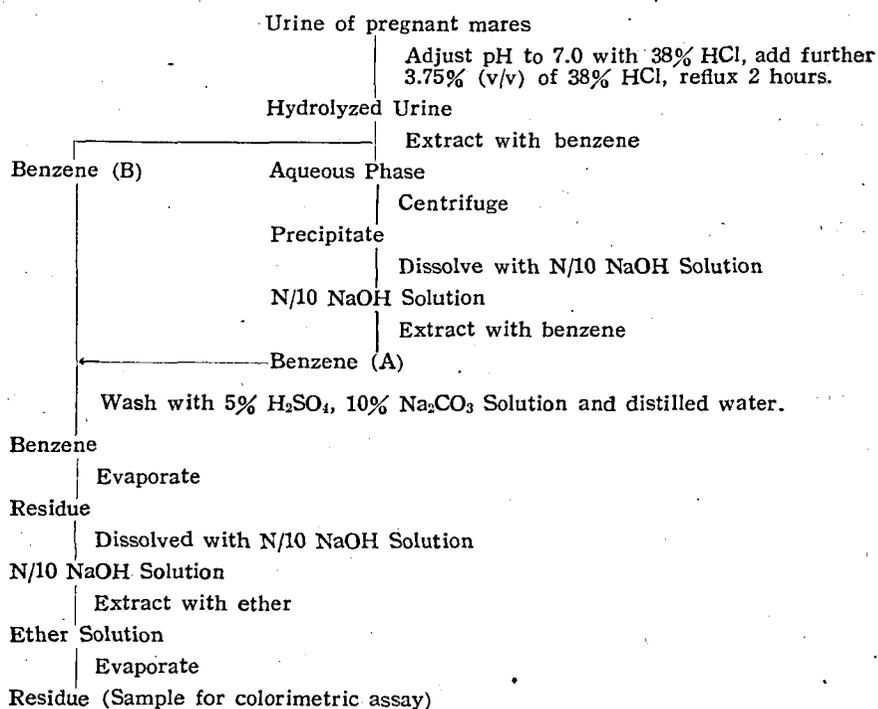
文 献

- 1) 長沢佳熊, 越村栄之助: 昭和 23 年 10 月, 日本薬剤師協会学術講演大会講演
- 2) Marrian, G. F.: *Lancet*, **228**, 674 (1935)
- 3) Schachter, B. and Marrian, G. F.: *J. Biol. Chem.*, **126**, 663 (1938)
- 4) Cohen, H. and Bates, R. W.: *Endocrinology*, **45**, 86 (1949)
- 5) Smith, G. V. and Smith, O. W.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **36**, 460 (1937)
- 6) Cohen, S. L. and Marrian, G. F.: *Biochem. J.*, **27**, 1577 (1935)
- 7) Dingemans, E., Laquer, B. and Muehlbock, O.: *Monath. Geburtsh. Gynaek.*, **109**; 37 (1937)
- 8) Edson, J.: *J. Biol. Chem.*, **130**, 575 (1939)
- 9) Cohen, H. and Bates, R. W.: *Endocrinology*, **44**, 317 (1949)
- 10) Cohen, H. and Bates, R. W.: *Endocrinology*, **45**, 86 (1949)
- 11) 長沢佳熊, 越村栄之助: 未発表 (特許申請中)
- 12) Stervenson, M. F. and Marrian, G. F.: *Biochem. J.*, **41**, 507 (1947)
- 13) Van Bruggen, J. T.: *J. Lab. Clinical Med.*, **33**, 207 (1947)
- 14) Banes, D., Casol, J. and Haenni, E. O.: *J. Biol. Chem.*, **187**, 575 (1950)
- 15) Doisy, E. A.: *Biol. Symposia*, Vol. IX, Lancaster, Pa., **1942**, Jaques Cattell, pp 21~24
- 16) Cohen, S. L.: *J. Lab. Clinical Med.*, **36**, 769 (1950)
- 17) Leiboff, S. L. and Tamis, A. B.: *J. Lab. Clinical Med.*, **24**, 178 (1938)
- 18) 長沢佳熊: 昭和 18 年工業化学会九州支部大会講演
" : 臓器薬品化学プリント, 第 1 版 20 (1949)
" : 薬学大全書補遺, **1**, 40 (昭 26) 及未発表
- 19) Mather, A.: *J. Biol. Chem.*, **144**, 617 (1942)
- 20) Stimmel, B. F.: *J. Biol. Chem.*, **162**, 99 (1946)
- 21) Girard, A., Sandulesco, G., Fridenson, A. and Rutgers, J. J.: *Compt. rend.*, **194**, 909 (1932)
- 22) Cohen, S. L. and Marrian, G. F.: *Biochem. J.*, **28**, 1603 (1934)
- 23) Talbot, N. B., Wolfe, J. K., MacLachlan, E. A., Karusch, F. and Butler, A. M.: *J. Biol. Chem.*, **134**, 319 (1940)
- 24) Szego, C. M. and Samuels, L. T.: *J. Biol. Chem.*, **151**, 578 (1943)
- 25) Reifenstein, E. C., Jr. and Dempsey, E. A.: *J. Clin. Endocrinology*, **4**, 326 (1944)
- 26) Jailer, J. W.: *Endocrinology*, **41**, 198 (1947)
- 27) Kober, S.: *Biochem. Z.*, **239**, 209 (1931)
- 28) Bates, R. W. and Cohen, H.: *Federation Proc.*, **6**, 236 (1947)
- 29) Cartland, G. F., Meyer, R. K., Miller, L. C. and Rutz, M. H.: *J. Biol. Chem.*, **109** 213 (1935)

- 30) Bachman, C.: J. Biol. Chem., **131**, 455 (1939)
- 31) Kober, S.: Biochem. J., **32**, 357 (1938)
- 32) Venning, E. H., Evelyn, K. A., Harkness, E. V., Browne, J. S. L.: J. Biol. Chem., **120**, 225 (1939)
- 33) Zimmerman, W.: Z. physiol. Chem., **233**, 257 (1933)
- 34) Jailer, J. W.: J. Clin. Endocrinology, **8**, 564 (1948)
- 35) de Gironde, R.H.: Arch. farm. y bioquin. Tucuman, **4**, 261 (1949)
- 36) Veitch, F.P. and Milone, H. S.: J. Biol. Chem., **158**, 61, (1945)
- 37) Schmulovitz, M. J. and Wylie, H. B.: J. Lab. Clinical Med., **21**, 210 (1935)
- 38) Pincus, G., Wheeler, G., Young, G. and Zahl, P. A.: J. Biol. Chem., **116**, 253 (1936)
- 39) Pincus, G. and Zahl, P. A.: J. Gen. Physiol., **20**, 879 (1937)
- 40) Stimmel, B. F.: J. Biol. Chem., **165**, 73 (1946)
- 41) 長沢佳熊, 越村榮之助: 未発表
- 42) Davis, R. and Eeckhowdt, V.: Compt. Rend. Soc. Biol., **140**, 1090 (1946)
- 43) 佐々木究: 著者に対する私信

Summary

1. Hydrolysis of estrone conjugate in urine of pregnant mares, extraction, purification, and colorimetric assay of estrone were investigated and it was found that the estrone thought to be unable to extract from urine existed in the precipitate formed by the acid hydrolysis.
2. The estrone existing in precipitate can not be extracted by ordinary extracting method with organic solvents, but it can be extracted quantitatively with organic solvents when precipitate are dissolved in N/10 sodium hydroxide.
3. Colorimetric assay values according to Kober's reaction were somewhat higher than the bioassay values, however, significant difference was not found.
4. The authors proposed a simple colorimetric assay method of estrone in pregnant mare's urine as follows:



The benzene fraction (A) contains about 6 to 25 per cent of estrone of fraction (B).

人膵臓腫瘍, Cushing 病患者膵臓のインシュリン含量について* 附, その他の
動物臓器のインシュリン含量との比較

長 沢 佳 熊, 三 橋 謙 一 高 瀬 新 三 郎**

Insulin Contents in the Tumors of Langerhans' Islands of Men and
in the Pancreas of a Patient suffering from Cushing's Disease

By Kakuma NAGASAWA, Ken-ichi MITSUHASHI, and Shinsaburô TAKASE

著者等はインシュリンの研究の過程において従来しばしば各種動物の膵臓¹⁾³⁾⁵⁾ Stannius 小体¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾ 牛の膵臓⁶⁾ 腎臓⁶⁾ 耳下腺⁶⁾ 人の膵臓及びその腫瘍⁷⁾ についてインシュリンの含量を測定する機会があつた (第 1 表参照). それ等の内既知の臓器中でインシュリン濃度が最も大きいものは、きわめて新鮮なホンマグロ *Thynnus thynnus* の Stannius 小体で、その 1g 当り 225 単位を含むことを報告した (昭和 18 年). 又昭和 12 年自発性低血糖症患者の膵臓腫瘍中のインシュリン濃度がきわめて高い事実は棟方、楠⁷⁾ によつて報告され、この種の低血糖症の原因を解明する最初の確証となつたが、この検定も著者等によつて行われたものである。

今回は自発性低血糖症患者の膵臓腫瘍 2 例, その非腫瘍部膵臓組織部分 2 例, Cushing 病患者の膵臓 1 例についてインシュリン含量を測定した結果を報告する。

抽出法は Best, Jephcott, Scott⁸⁾ 法による。

検定法は主として Marks⁹⁾ の家兎血糖低下による交叉試験法により確認したが、元來このような検定では検体量が少量で試験に困難を来す場合があり、やむなく Toronts 旧法¹⁰⁾ による算出を行つたものもある。後の場合には予めインシュリン標準液を注射し、大体インシュリン単位を示すような家兎を選んで実験し、その均質化を行つた。

以上の抽出法及び検定法は現在ならば更に適当な操作を行うことができる。例えば 検体は抽出後直ちに炭酸氷で凍結した後処理に移るとか、マウスのケイレン法による検定法を併用して予試験の手数を省くとかの方法があるが、戦後当所の設備、世情が不十分な状態で行つたものもあることを附記しておく。

第 1 表には以上の結果と共に従来著者が研究し、又は他の研究者による、各種臓器中のインシュリン含量を一括して示した。

腫瘍部分 III は非腫瘍組織に比して 26~43 倍もインシュリン含量が大きい。腫瘍立及び III の組織学的検査は東大清水外科高木忠信博士等によつていずれ報告される。

第 1 表 各種臓器中のインシュリン含量 ※交叉試験による ***実験の部参照

臓器名	1g 中の国際単位数	研究者
人膵臓	3.2※	長沢, 三橋***
同	約 2.9	高瀬, 長沢
同	0.6~3.8 (平均 1.7)	Scott, Fisher ¹¹⁾
Cushing 病膵臓	0.75※	長沢, 三橋***
糖尿病膵臓	0.4	Scott, Fisher ¹¹⁾
自発性低血糖症		
膵臓腫瘍 II	約 5~20	長沢, 三橋***
同 III	82 以上, ※ 約 138	長沢, 三橋***
同 I	約 12.5	長沢, 高瀬
同	約 27.7	棟方, 楠, 長沢 ⁷⁾
同	210 以上	Selye 引用 ¹²⁾

* 長沢佳熊: インシュリンの薬化学的研究 第 11 報, 第 10 報は昭和 27 年 4 月 30 日日本薬学会年会講演 (近く本誌に掲載の予定) ** 所員外

牛膵臓	1.7~2.5%	長沢, 高瀬 ^{1) 4) 5)}
子牛膵臓	10.4~12.8	Scott, Fisher ¹¹⁾
豚膵臓	1.8~5.0%	長沢, 高瀬 ^{1) 3) 5)}
クジラ膵臓	2.0~2.5%	長沢, 近藤 ^{2) 4)}
サメ膵臓	1.8~12%	長沢, 近藤 ^{2) 4)}
マグロ Stannius 小体	225%	長沢, 近藤 ⁴⁾
フグ Stannius 小体	218%	長沢, 近藤 ²⁾

実験の部

抽出法 Best, Jephcott, Scott 法⁶⁾にもとずいて行つた。

1. 自発性低血糖患者の膵臓腫瘍 I 昭和 21 年 9 月 9 日 東大大槻外科で手術し摘出した特発性低血糖症患者 8 の膵臓腫瘍全量 0.6695g 中 0.571 g を細切し, 酸性アルコール抽出溶媒(エタノール 75 cc+水 25 cc+濃塩酸 1.5 cc) 約 5 cc 中に入れ, 実験室に持ち帰り冷蔵庫に入れ, 翌日更に抽出を行い, 抽出液を合し, 低温で蒸留濃縮してエタノールを除き, 塩化ナトリウムを飽和するまで加えて塩析し, 析出物を試験用溶媒(石炭酸 0.1% 塩化ナトリウム 0.5% を含む N/100 塩酸) 7 cc に溶かし, 濾過して検液 I を得た. 別に腫瘍部を除いた膵臓組織 1.5 g を同様に操作して試験用溶媒 5 cc に溶かして検液 II を得た。

2. 自発性低血糖患者の膵臓腫瘍 II 昭和 25 年 6 月 10 日 東大清水外科で手術した特発性低血糖症患者 8 の膵臓腫瘍を摘出後直ちにマホウ瓶中に入れて氷詰めとし実験室に持ち帰り, その腫瘍部分 0.2801 g をナイフで細切し 1 と同様の酸性アルコール抽出溶媒, 14 cc 中に入れ, 36° の水浴中でときどきふりまぜながら抽出する. 2 時間後二重ガーゼで濾過し, 残留物は更に前記抽出液 16 cc を加え, 同様にして 2 時間抽出し二重ガーゼで濾過する. 全濾液を合し, 10%アンモニア水でリトマスアルカリ性として生じた析出物を濾去する. 濾液に 10% 塩酸を加えて pH 2 とし, 15° 以下でエタノール臭の全く消失するまで減圧濃縮する(著者考案の冷凍器使用の蒸留装置を用いた). 濃縮液に水を加えて 28 cc とし, 塩化ナトリウム 7 g を加え, 1 夜氷室に放置する. 翌朝析出物を吸引濾取し, 1 と同様の試験用溶媒 8 cc に溶かし, 濾過し濃黄色澄明の検液 III を得た。

3. 自発性低血糖患者の膵臓腫瘍 III, II と同一患者の膵臓の別の部分に生じた腫瘍 0.2928 g を細切し, 2 と同じ抽出液 14 cc, 22 cc, 22 cc を用い 2 と同様に 3 回抽出し, 全抽出液を合し, 同様な濃縮液約 10 cc を得, これに水を加えて 29 cc とし, 塩化ナトリウム 7 g を加えて塩析し, 析出物を 2 と同様に処理して試験用溶媒 8 cc に溶かして検液 IV を得た。

4. 腫瘍部を除いた人膵臓組織 2 及び 2 と同じ患者の腫瘍部を除いた膵臓組織 15 g を細切し, 1 と同様な抽出液 60 cc ずつで 2 回同様に抽出して処理し濃縮液 30 cc を得, これに水を加えて 150 cc とし, 塩化ナトリウム 37.5 g を加え以下再び 2 と同様に処理して溶媒 20 cc に溶かして微黄色澄明の検液 V を得た。

4. Cushing 病患者膵臓 Cushing 病患者(左副腎腫瘍)患者の死後の膵臓 84 g を 2 と同様な方法で処理し, 検液 1 cc 中膵臓 2 g に相当するインシュリン量を含む検液 VI を製した。

インシュリンの定量法 大体は Marks による家兎の血糖低下法にもとづくインシュリンの測定法を用いた. 家兎を同数の 2 群に分け, 国際標準品又はこれと等しい当所のインシュリン副標準品と比較交叉試験を行つた. 1 回の交叉試験で含有量を決定できなかつた腫瘍 II 及び III は検検量の不足からやむを得ず Toronto 旧法¹⁰⁾により効力の概数を求めた, その実験の詳細の資料を以下に記す。

1. 腫瘍 II 予試験として先ず家兎 1 匹に検液 III を皮下注射し, 血糖量を測定した(第 2 表)。

第 2 表

家兎番号	体重 kg	注射量 cc/kg体重	血糖量 mg %				血糖減少率 %
			注射前	1.5 時間	3 時間	5 時間	
38	2.20	0.8	110	61	84	98	26.8

※ 交叉試験で著者が決定した数字,

* 実験の部参照

上の血糖減少率 26.8% という値は、これまでこの家兎に標準液 (1cc=1 単位) 0.8 単位を注射した数回の血糖減少率と比較してやゝ低いので、次の本試験では注射量を増して家兎体重 2 kg につき 1 cc を注射し、Marks 法にもとづく交叉試験を行つたが、検液の不足のため動物数は 4 匹とした (第 3, 4 表)

第 3 表 第 1 日試験成績

家兎番号	体重 kg	注射量 cc/2 kg 体重	血糖量 mg %				血糖減少率 %
			注射前	1.5 時間	3 時間	5 時間	
12	1.80	標準液 0.8 cc	108	72	78	89	25.9
39	1.80	標準液 0.8 cc	97	64	72	73	27.8
3	1.80	腫瘍 II 1.0 cc	105	57	84	88	27.6
40	1.90	腫瘍 II 1.0 cc	106	71	75	93	24.5

第 4 表 第 2 日試験成績

家兎番号	体重 kg	注射量 cc/2 kg 体重	血糖量 mg %				血糖減少率 %
			注射前	1.5 時間	3 時間	5 時間	
12	1.80	腫瘍 II 1.0 cc	100	81	85	93	14.0
39	1.80	腫瘍 II 1.0 cc	103	75	74	82	25.2
3	1.80	標準液 0.8 cc	103	68	77	98	21.3
40	1.85	標準液 0.8 cc	97	56	58	100	26.8 ◆

両日の血糖減少率合計は検液 91.3, 標準液 101.8, 検液と標準液との血糖減少率比は $[(101.8-91.3)/101.8] \times 100 = 10.3$ で、検液 1 cc 中にインシュリン含量は 0.8 単位以下であることが明となつた。次に Toronto 旧法により単位の概数を求めた結果は第 17 表に一括して示した。

2. 腫瘍 III 検液 IV 1 cc 中に 1 単位を含むものと想定し、家兎 2 匹を用いて行つた予試験の成績を第 5 表に示す。

第 5 表

家兎番号	体重 kg	注射量 cc/2 kg 体重	血糖量 mg %				血糖減少率 %
			注射前	1.5 時間	3 時間	5 時間	
18	2.00	1.0	93	41	35	47	55.9
41	2.00	1.0	100	1.5 時間日にケイレン			—

検液 IV 1 cc は第 5 表から 1 単位以上を含むことを知つたので、検液を 2 倍にうすめて第 2 回の予試験を行つた結果を第 6 表に示す。

第 6 表

家兎番号	体重 kg	注射量 cc/2 kg 体重	血糖量 mg %				血糖減少率 %
			注射前	1.5 時間	3 時間	5 時間	
30	1.90	1.0	90	43	48	54	46.7
25	1.90	1.0	96	34	34	ケイレン	—

第 6 表から検液 IV の 2 倍稀釈液 1 cc は 1 単位以上を含むことが予想されるので、更に 3 倍稀釈液を製して本試験を行つた (第 7, 8 表)

第 7 表 第 1 日試験成績

家 番 兎 号	体 重 kg	注射量 cc/2 kg 体重	血 糖 量 mg%				血 糖 減 少 率 %
			注射前	1.5 時間	3 時間	5 時間	
17	2.10	標準液 0.8 cc	105	52	59	90	36.2
38	1.80	標準液 0.8 cc	108	45	59	91	39.7
39	1.80	検 液 0.8 cc	92	48	50	65	41.3
19	1.80	検 液 0.8 cc	92	39	43	70	44.6

第 8 表 第 2 日試験成績

家 番 兎 号	体 重 kg	注射量 cc/2 kg 体重	血 糖 量 mg%				血 糖 減 少 率 %
			注射前	1.5 時間	3 時間	5 時間	
17	2.10	検 液 0.8 cc	98	48	49	90	36.8
38	1.80	検 液 0.8 cc	104	45	52	92	39.4
39	1.80	標準液 0.8 cc	96	63	61	86	27.2
19	1.80	標準液 0.8 cc	95	58	57	82	30.6

両日の血糖減少率合計は検液 162.1, 標準液 133.7, 検液と標準液との血糖減少率比は $[(162.1-133.7)/133.7] \times 100 = 21.3$ となり, 検液 IV の 3 倍稀釈液 1 cc 中には少くとも 1 単位以上を含むと推定されるが, 検液量の不足から Toronto 旧法によつて単位の概数を知つた (第 17 表参照).

3. 膵臓組織 検液 V 1 cc は 1 単位を含むという想定で家兎 2 匹を用い予試験を行つた (第 9 表).

第 9 表

家 番 兎 号	体 重 kg	注射量 cc/2 kg 体重	血 糖 量 mg%				血 糖 減 少 率 %
			注射前	1.5 時間	3 時間	5 時間	
19	1.75	1.0	96	43	39	30	60.7
23	1.80	1.0	103	27 (採血直後ケイレン)			—

上表からこの 1 cc は 1 単位以上を含む. 次に上の検液 V を 2 倍にうすめ, この稀釈液について第 2 回目の予試験を行つた (第 10 表).

第 10 表

家 番 兎 号	体 重 kg	注射量 cc/2 kg 体重	血 糖 量 mg%				血 糖 減 少 率 %
			注射前	1.5 時間	3 時間	5 時間	
31	1.70	1.0	108	58	54	83	39.7
2	1.80	1.0	101	57	59	73	37.6

第 10 表によれば稀釈検液 1 cc は 1 単位以上を含むと推定される. そこで本試験には原検液を 3 倍にうすめて交叉試験を行つた (第 11, 12 表).

第11表 第1日試験成績

家 番 号	体 重 kg	注射量 cc/2 kg 体重	血 糖 量 mg%				血 糖 減 少 率 %
			注射前	1.5 時間	3 時間	5 時間	
39	1.80	標準液 0.8 cc	96	63	61	86	27.2
19	1.80	標準液 0.8 cc	96	58	57	82	30.6
18	2.10	検 液 1.0 cc	111	64	61	79	38.7
33	1.70	検 液 1.0 cc	92	58	69	74	30.4

第12表 第2日試験成績

家 番 号	体 重 kg	注射量 cc/2 kg 体重	血 糖 量 mg%				血 糖 減 少 率 %
			注射前	1.5 時間	3 時間	5 時間	
39	1.80	検 液 1.0 cc	93	62	66	90	21.5
19	1.80	検 液 1.0 cc	98	66	65	87	25.5
18	2.05	標準液 0.8 cc	97	56	60	86	30.9
33	1.75	標準液 0.8 cc	93	46	56	85	33.4

両日の血糖減少率合計は検液 116.1, 標準液 122.1, 検液と標準液との血糖減少率比は $[(122.1-116.1)/122.1] \times 100 \div 4.9$, 従つてこの検液 1 cc 中に 0.8 単位, 原検液 1 cc 中には 2.4 単位を含む。

4. Cushing 病患者の脾臓検液 VI (1 cc は脾臓 2g 相当量) を 3 倍にうすめ, 1 群 4 匹より成る家兎群 2 匹を用い交叉試験を行つたが, 第 1 日の結果 (第 13 表) からこの液 1 cc 中の含量は 1 単位以下であると推定されたので交叉試験を中止した。

第 13 表

家 番 号	体 重 kg	注射量 cc/2 kg 体重	血 糖 量 mg%				血 糖 減 少 率 %
			注射前	1.5 時間	3 時間	5 時間	
28	1.80	標準液 0.8 cc	88	47	48	85	31.8
27	2.20	"	91	45	48	82	36.3
1	1.80	"	93	40	48	85	37.6
30	2.10	"	89	50	59	80	29.2
11	2.40	検 液 0.8 cc	89	54	65	76	27.0
31	1.60	"	94	63	77	79	22.3
38	2.20	"	90	50	50	79	34.4
17	2.30	"	98	54	65	91	28.6

次に 2 倍稀釈液について, 標準液につき 4 匹, 検液につき 4 匹計 8 匹の家兎で交叉試験を試みたが, この稀釈液も標準液より遙かに低い血糖減少率を示した (第 14 表) ので交叉試験を中止した。

第 14 表

家 番 号	体 重 kg	注射量 cc/2 kg 体重	血 糖 量 mg%				血 糖 減 少 率 %
			注射前	1.5 時間	3 時間	5 時間	
10	2.00	標 準 液 0.8 cc	97	49	72	84	29.9
11	2.40	"	88	44	49	70	38.7
12	1.80	"	98	41	75	95	28.6
13	1.90	"	91	38	57	88	33.0
14	2.40	検 液 0.8 cc	89	66	79	83	14.6
15	1.60	"	107	63	74	92	29.0
17	2.20	"	97	68	77	88	19.6
18	2.40	"	110	54	67	84	38.2

次回の試験では 1.5 倍稀釈液で家兎 6 匹について交叉試験を行つた (第 15, 16 表)。

第 15 表 第 1 日試験成績

家 番 号	体 重 kg	注射量 cc/2 kg 体重	血 糖 量 mg%				血 糖 減 少 率 %
			注射前	1.5 時間	3 時間	5 時間	
27	2.20	検 液 0.8 cc	97	57	60	81	32.1
28	1.90	"	98	54	59	87	31.7
29	1.90	"	108	55	66	84	37.0
30	2.10	標 準 液 0.8 cc	92	56	57	86	28.3
31	1.70	"	102	61	75	93	26.4
32	1.80	"	100	53	64	83	33.0

第 16 表 第 2 日試験成績

家 番 号	体 重 kg	注射量 cc/2 kg 体重	血 糖 量 mg%				血 糖 減 少 率 %
			注射前	1.5 時間	3 時間	5 時間	
27	2.20	標 準 液 0.8 cc	98	42	41	74	47.0
28	1.95	"	87	41	52	71	36.8
29	1.90	"	107	49	59	80	41.1
30	2.15	検 液 0.8 cc	110	54	64	93	36.3
31	1.80	"	101	55	77	89	26.8
32	1.85	"	97	52	48	80	38.2

両日の血糖減少率合計は検液 202.1, 標準液 212.6, 検液と標準液との血糖減少率比は
 $[(212.6-202.1)/212.6] \times 100 = 4.9$, 従つてこの液 1 cc は 1 単位を含む。

以上の実験を総括し, 第 17 表に示す。

第17表 インシュリン含量検定成績総合表

	濃縮液 1cc 中の含有単位	組織 1g 中の含有単位	組織総量中の含有単位	備考
自発性低血糖症 I, 腫瘍部 I	約 1.02	約 12.5	約 8.3	Toronto 旧法
同 I, 非腫瘍部	約 0.85	約 2.9	—	Toronto 旧法
自発性低血糖症 II, 腫瘍部 II	1.0 以下	28.5 以下	8.0 以下	予試験
同	0.8 以下	22.8 以下	6.4 以下	交叉試験 (家兎 4 匹)
同	約 0.3	約 8.5	約 2.4	Toronto 旧法
同 II, 腫瘍部 III	0.8 以上	29 以上	6.4 以上	予試験, 約 5~20 単位と決定
同	1.6 以上	58 以上	12.8 以上	"
同	3.0 以上	82 以上	24.0 以上	交叉試験 (家兎 4 匹)
同	約 3.66	約 138	約 29.3	Toronto 旧法
同 II, 非腫瘍部膵臓組織	0.8 以上	1.1 以上	—	予試験
同	1.6 以上	2.1 以上	—	"
同	2.4	3.2	—	交叉試験 (家兎 4 匹)
Cushing 病膵臓	3.0 以下	1.5 以下	—	予試験
同	2.0 以下	1.0 以下	—	"
同	1.5	0.75	—	交叉試験 (家兎 6 匹)

ま と め

1. 自発性低血糖症患者の膵臓腫瘍 II はその 1g につき 5~20 単位のインシュリンを含み、腫瘍 II インシュリン含量は、きわめて大きく、その 1g 中 82 単位以上という驚くべき成績を示した。腫瘍 III はその非腫瘍部膵臓組織に比較して 26 倍以上もその含量が大きい。

2. 非腫瘍部膵臓組織 1g 中にはインシュリン 3.2 単位を含む。この含量は Scott, Fisher の報告の正常人の膵臓 (恐らくは死後のもの) 中のインシュリン含量 (1g 中平均 1.7 単位) の 2 倍に近いが、その差は組織の新鮮度、抽出法の優劣などに起因するものと考えられる程度のものである。

3. Cushing 病患者の死後の膵臓のインシュリン含量は 0.75 単位/g でその量は小さい。

本研究に使った人膵臓の諸検体は 東大第一外科榎方, 楠, 高木三博士, 沖中内科矢川博士等の提供されたものであり、又研究費用の 1 部は昭和 25 年度文部省科学研究費によつたことを記して謝意を表する。

文 献

- 1) 長沢佳熊: 臨床医学 30, 3 号 (昭和 17)
- 2) 長沢佳熊, 近藤政次郎: 医学と生物学 1, 378 (昭和 17)
- 3) 長沢佳熊, 近藤政次郎: 薬学雑誌 12, 287 (昭和 17)
- 4) 長沢佳熊, 近藤政次郎: 医学と生物学 4, 137 (昭和 18)
- 5) 長沢佳熊: 日本衛生化学会誌 15, 73 (昭和 18)
- 6) 長沢佳熊外: 衛生試験所報告 68 号 113 (昭和 25)

- 7) T. Kusunoki, M. Munakata: Arch. klin. Chirurgie 188, 272~78 (1937)
- 8) C. H. Best, C. M. Jephcott, D. A. Scott: Am. J. Physiol. 100, 285 (1932)
- 9) H. P. Marks: The Health Organization of the League of the Nations 1926, Biological Standardisation of Insulin, 57.
- 10) The Insulin Committee of the University of Toronto: 同上 24
- 11) D. A. Scott, A. M. Fisher: J. Clin. Investigat. 17, 725 (1938)
- 12) H. Selye: Text Book of Endocrinology 21 版 500 引用 (1949)

Summary

The authors hitherto investigated insulin content of various animal tissues¹⁾²⁾³⁾ and found the highest insulin content per gramm tissue ever known is that of the fresh Stannius' body of thunny fish having 225 units⁴⁾ (all units show that contained per 1 gramm tissue).

This time we found that of the insulin content in the pancreas tumor tissue of the patient of hyperinsulinism was exactly high, such as more than 82 units, which is about 26 fold compared with that of normal pancreas tissue of the same patient having 3.2 units.

That of the pancreas of patient suffering from Cushing's disease is low, such as 0.75 units.

The method of standardising of insulin used in this reports based upon our previous reports.³⁾

- 1) K. Nagasawa: Lecture in the Annual Meeting of the Japanese Pharmaceutical Association 1940.
- 2) K. Nagasawa and M. Kondo: J. Japanese Pharm. Assoc. 62, 287~291 (1941)
- 3) K. Nagasawa: J. Japanese Endocrinology: 18, Heft 2, 1~2 (1942)
- 4) K. Nagasawa and M. Kondo: Igaku to Seibutsugaku, 4, 137 (1942).

アヘン産地鑑別法について(第 1 報)

乾燥減量とモルヒネ含量

朝比奈晴世, 水町彰吾

Research on the Methods of Determining the Origin of Opium. I.

Loss in Weight on Drying and Morphine Content.

By Haruyo ASAHINA and Shôgo MIZUMACHI

まえがき

アヘンは産地によつて性状が異なるので、押収したアヘンについて物理的、化学的方法で分析し、その分析値によつて産地を決定することは、アヘンの不法生産を抑圧し、密売買を取締る点からも非常に重要なことである。外観、色等から産地が推測される場合もあるが、この時でも物理的、化学的方法で産地を確認する必要がある。

国際連合は 1949 年 7 月 6 日の経済社会理事会で決議を採択して、可能な限りアヘンの産地を決定する方法を更に研究することにした¹⁾。これに基づき関係諸国の間でアヘンの産地を決定する方法に関する共同研究が企てられ日本もこれに参加する機会が与えられた。この計画の一部として国際連合より、アヘン標本 33 種が寄贈されて来た。その内訳はトルコ産 15 種 (Aydin, Afyon, Çorum, Çal, Usak, Nallihan, Merzifon, Burdur, Kula, Sandikli, Aksehir, Zile, Isparta, Malatya, Export opium), イラン産 6 種 (Nehavand, Kerman, Fars, Khorassan, Kermanshah, Isfahan), インド産 3 種 (Excise opium, Banaras, Malwa), インドシナ産 3 種 (Tonkin Laokay, Laos Luang Prabang, Laos Xieng Khouang), ユーゴスラビア産 2 種, 朝鮮産 2 種, 中国産 1 種, ギリシャ産 1 種の合計 33 種である。

この問題は 1947 年以来アメリカに於て研究されていて、アヘンの産地を確認する方法として次のことがらが提唱されている。

- 1) 顕微鏡検査
- 2) ポーフィロキシン-メコニジンの比色定量
- 3) コデインの定量
- 4) モルヒネの定量
- 5) 脂肪、ゴム類、ナルコチン、パバベリン、テバイン、クリプトピン、灰分等の定量

典型的なトルコ、イラン、インド産のアヘンの間では次表のように識別が可能である。

	Turkish	Iranian	Indian
Microscopic	few particles no rods	highly cryst., some rods	highly cryst., many rods
Porphyroxine	medium	low	high
Codeine	low	high	high
Morphine	medium high	medium	medium low

このことについて多くの定量法が考察され、又これらの基準となる分析値が決定されているが、なお方法は不完全不十分であり、正確で簡単な方法が必要とされており、殊に世界各国のアヘンについての分析値が不足している²⁾。この国際共同研究に参加し、アヘンには生産される場所によつて一定の型があるのか、又押収アヘンにもこの型

が存在しているか否かを確かめ、殊に東洋産アヘンの特性及び分析値を確定し、且その方法を迅速簡単にする目的で本研究を開始した。

ここに第一報として各地産アヘンの乾燥減量とモルヒネの含量とについて報告する。

実験の部

実験材料: 本研究に用いたアヘンは前述の国際連合より寄贈の 33 種 (1~33) 及び厚生省麻薬課より分与された 6 種 (トルコ産, 満州産, 蒙古産, 朝鮮産, 中国産, 日本内地産, 34~39), モルヒネ定量試験を依頼して来たアヘン末 7 種 (40~46) の合計 46 種である。

1~39 は風乾のままのアヘンであり 40~46 は減圧乾燥して粉末としたアヘン末である。

乾燥減量

International Pharmacopoeia³⁾, 国際連盟⁴⁾の方法に従う。

定量法: アヘン約 1 g をすり合せの蓋のある秤量ビンに正確に秤り, 103~105° で 2 時間乾燥する。冷後再秤量する。更に乾燥を続け, 乾燥 1 時間後の減量が 5 mg 以下になるまで行う。この量をアヘンの % にして表示する。

この場合 1~15, 25~39 は乳鉢で出来るだけ粉末にして, 目の開き 1 mm の篩でふるつたもの, 22, 23 は 2 mm の篩でふるつたものを乾燥した。24 は出来るだけ粉末にして, 16~21 は乳鉢で粉末にならないのでそのまま乾燥した。40~46 はアヘン末なのでそのまま用いた。

いずれの場合も乾燥 2 時間後ガラス棒でよくかきまぜ粉末にして表面の固結することを防ぎ, よく乾燥出来る様にした。

乾燥減量は第一表に表示する。

第 1 表 乾燥減量

1	トルコ	Aydin D	9.36%
2	トルコ	Afyon B	9.30
3	トルコ	Çorum C	8.72
4	トルコ	Çal C	9.38
5	トルコ	Usak D	9.73
6	トルコ	Nallihan C	8.41
7	トルコ	Merzifon D	7.80
8	トルコ	Burdur B	6.77
9	トルコ	Kula B	7.36
10	トルコ	Sandikli C	7.48
11	トルコ	Aksehir B	7.81
12	トルコ	Zile D	7.84
13	トルコ	Isparta B	8.79
14	トルコ	Malatya D	7.80
15	トルコ	Export opium	6.83
16	イラン	Nehavand	10.19
17	イラン	Kerman	11.47
18	イラン	Fars	10.06
19	イラン	Khorassan	11.32
20	イラン	Kermanshah	10.11
21	イラン	Isfahan	10.51

22	インド	Excise opium	11.65
23	インド	Banaras	9.38
24	インド	Malwa	10.53
25	インドシナ	Tonkin Laokay	7.97
26	インドシナ	Laos Luang Prabang B	9.42
27	インドシナ	Laos Xieng Khouang B	8.78
28	ユーゴ	No. 1	8.93
29	ユーゴ	No. 2	9.60
30	朝鮮	No. 1	10.56
31	朝鮮	No. 2	8.87
32	中国	台湾 B	7.60
33	ギリシア		8.29
34	トルコ		8.56
35	満州		8.35
36	蒙古		9.04
37	朝鮮		9.60
38	中国		13.12
39	日本		9.55
40	蒙古		1.92
41	蒙古		2.82
42	蒙古		3.49
43	中国		2.61
44	中国		1.06
45	中国		1.74
46	中国		0.65

第 2 表 減圧乾燥減量

40	13.77%
41	13.49
42	12.13
43	10.34
44	14.87
45	13.83
46	14.67

40~46 の場合乾燥減量が特に著しく少いのは減圧乾燥して粉末にしたアヘン末のためである。これらのアヘンの減圧乾燥減量は次の通りである。

40~46 のアヘンは武田薬工で乾燥粉末にしたもので第二表の数字は同社東京工場製造部長西沢博士の御好意による。

モルヒネの定量

アヘン中のモルヒネ定量は次の方法によつた。

定量法： 篩過したアヘン末約 5 g を正確に秤り之を直径約 10 cm の口付磁製乳鉢に移し、水 10 cc を加え、5 分間充分練り合せ均等

な糊状とした後、純度 85% 以上の水酸化カルシウム 2 g、水 40 cc を加え更に 20 分間かきまぜた後濾過し、濾液約 30 cc に硫酸マグネシウム 0.1 g を加えて 1 分間、次に水酸化カルシウム 0.3 g を加えて 1 分間振りまぜて 1 時間放置後濾過し、澄明な濾液 20 cc を振盪瓶 (Fig. 1) に正確に秤り、エーテル 10 cc、塩化アンモニウム 0.3 g を加え最初 2~3 回振り、栓をとつて内圧を除いた後、手で激しく振り結晶が析出し始めたとき機械振盪機にかけ、30 分間振りまぜた後、一夜放置し、初めエーテル液を、次に水液を直径 7 cm の定量用濾紙上に注ぎ静かに濾過し、瓶に附着した結晶をエーテル飽和水 5 cc ずつで 3 回洗い毎回の洗液は濾紙上に注ぎ濾紙及び濾紙上の結晶を洗う。最後にエーテル飽和水 5 cc で、瓶口及び濾紙上辺を洗う。濾紙上の結晶は濾紙と共にビーカーに移しビン中の結晶は N/10 塩酸 15 cc に完全に溶かした後、この液は先のビーカーに入れビンは水 5 cc ずつで 4 回洗い洗液は先のビーカー中の液に合し N/10 水酸化カルシウム液で過剰の酸を滴定する。(指示薬メチルレッド試液 2 滴)。終末点は滴下 5 分間後とする。

N/10 塩酸 1 cc = 28.53 mg $C_{17}H_{19}O_5N$.

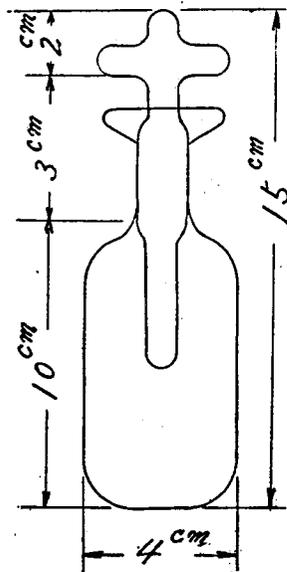


Fig. 1.

この定量法はアヘンの定量に際し出来るだけ方法を統一するために、麻薬技術会で協議決定したアヘン末定量法の実施要領暫定案であつて第六改正日本薬局方のアヘン末の項の定量法を骨子としているが、細目を詳細に規定して定量値の誤差を出来るだけ少くしたものである。

この定量法の改良点は次の諸点である。

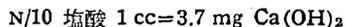
- 1) 水酸化カルシウムによるモルヒネの抽出方法の条件を明瞭にしたこと。
- 2) 水酸化カルシウムの純度をきめたこと。
- 3) モルヒネの結晶を析出させる条件をきめたこと。
- 4) 滴定する時ピーカを用いたこと。

水酸化カルシウムによるモルヒネの抽出については、乳鉢を用いて最初アヘンを水とよく練りませ均等な糊状物にする方法を採用した。第六改正日本薬局方アヘン末の定量法の項では、アヘン末 5g に水酸化カルシウム 2g を加えよく混和し水 50 cc を加え強くふりませ 2 時間冷浸することになつているが、アヘンの場合乳鉢を用い水と練り合せて糊状としなければ水酸化カルシウムとよく混和しない。A. Barbier⁶⁾ によれば水酸化カルシウム法でアヘン中のモルヒネを定量するとき、最初均等な糊状物を得るまで水と練り合わせる必要がある。糊状にしてから水酸化カルシウムを加えるべきで、そうしなければメコン酸カルシウムが出来て固まり十分にモルヒネが溶解しないで、そのためにモルヒネ定量値が低くなる。英国局方 (1948)⁷⁾ も次の如く水と練り合している。すなわちアヘン約 8g を正確に秤量し乳鉢の中で水 10 cc と練り合せて均等な糊状物にし、更に水 20 cc と水酸化カルシウム 2g を加えよく混和する。この混和物を秤量したフラスコに移し乳鉢は少量の水で繰返し洗い、フラスコに

入れ総量 90 g とする。フラスコに栓をして 30 分間ときどきふりませることになつている。アヘン中のモルヒネを溶媒によつて抽出して定量する 国際連合の一方法⁷⁾ に於ても口附の大きな乳鉢で 6g のアヘンを 20 cc の水、3g の水酸化カルシウムで練り合せ、更に 70 cc の水を加えときどき 30 分間ふりませることになつている。アメリカ麻薬局の C. C. Fulton も⁸⁾ モルヒネを十分抽出させるにはふりませるよりも練り合せることがより必要であるといつている。

水酸化カルシウムの純度の高いことも必要なことである。この純度が低い場合にはモルヒネの定量値が著しく低くなる。水酸化カルシウムは使用時酸化カルシウムから新しく調製したもので、次の定量法により 85% 以上のものを用いる。

定量法⁹⁾：水酸化カルシウムは定量試験に合格し、又使用前に 0.3 mm 以下の篩を摩擦通過するものでなければならない。本品約 0.4 g を正確に秤り容量 500 cc の目盛フラスコ中で中性グリセリン 20 cc と混和する。この混合物を新に煮沸し冷却した水約 400 cc でうすめときどき激しくふりませながら 30 分間放置する。次で先と同様な水で 500 cc にうすめよくふつた後大きなひだ折濾紙で速かに濾過する。濾液 50 cc をとり、メチルレッド試液 5 滴を加え N/10 塩酸で赤変する点迄中和する。N/10 塩酸の消費量は 9.2~10.8 cc でなければならない。



水酸化カルシウムの抽出液に塩化アンモニウムを加えて、モルヒネ結晶を析出させるとき条件を正確に守ることが大切である。この場合の抽出液は澄明でなければならない。ピペットで液を取るとき最後の残留後を出すにも口で吹かない。吹くと液が濁つて分析値が高くなる。塩化アンモニウムを加えて結晶が出始めるまで手で激しくふり、後機械振盪機にかけ細いサラサラした結晶を析出させ出来るだけ結晶の器底に固着することを防ぎ結晶と母液との分離を容易にする。

結晶を析出させるに第 1 図のビンを用いたので滴定する場合ピーカを用い第六改正日本薬局方の塩酸アヘナルカロイドの定量法を参照する。

上述の定量法によるモルヒネ定量値は第三表に表示する。

第3表 モルヒネ含量

	産地	モルヒネ含量%		
		I %	II %	
1	トルコ	Aydin D	15.62	15.55
2	トルコ	Afyon B	12.25	12.22
3	トルコ	Corum C	17.60	17.45
4	トルコ	Çal C	14.50	14.38
5	トルコ	Usak D	14.14	14.09
6	トルコ	Nallihan C	9.10	9.09
7	トルコ	Merzifon D	15.49	15.33
8	トルコ	Burdur B	13.70	13.70
9	トルコ	Kula B	13.85	13.76
10	トルコ	Sandikli C	11.73	11.67
11	トルコ	Aksehir B	12.03	12.15
12	トルコ	Zile D	13.75	13.76
13	トルコ	Isparta B	10.33	10.52
14	トルコ	Malatya D	16.41	16.17
15	トルコ	Export opium	13.62	13.60
16	イラン	Nehavand	9.34	9.38
17	イラン	Kerman	10.35	10.45
18	イラン	Fars	11.35	11.08
19	イラン	Khorassan	9.79	9.94
20	イラン	Kermanshah	10.64	10.47
21	インド	Isfahan	11.25	11.00
22	インド	Excise opium	9.98	9.97
23	インド	Banaras	10.23	9.97
24	インド	Malwa	10.69	10.63
25	インドシナ	Laokay Tonkin	11.45	11.44
26	インドシナ	Luang Prabang B Laos	6.91	6.86
27	インドシナ	Xieng Khouang B Laos	12.15	12.38
28	ユーゴスラビア	No. 1	16.26	16.30
29	ユーゴスラビア	No. 2	15.68	15.59
30	朝鮮	No. 1	2.54	2.63
31	朝鮮	No. 2	7.81	7.89
32	朝鮮	台湾 B	7.73	7.85
33	シベリア		15.84	15.86
34	シベリア		13.67	13.74
35	満州		11.05	10.97
36	蒙古		10.34	10.10
37	蒙古		11.16	11.06
38	中国		6.20	6.19
39	中国		10.27	10.31
40	蒙古		8.37	8.42
41	蒙古		11.91	11.97
42	蒙古		11.91	11.94
43	中国		10.41	10.12
44	中国		9.16	9.09
45	中国		10.14	9.92
46	中国		7.52	7.28

第4表

	モルヒネ%	
	I	II
40	7.22	7.26
41	10.30	10.36
42	10.47	10.49
43	9.33	9.07
44	7.80	7.74
45	8.74	8.55
46	6.42	6.21

1~15, 22~24, 34~39 は乳鉢で出来るだけ粉末にして定量した。16~21 は粘稠で粉末にすることが出来ないので一部分をとり定量した。25~33 は乳鉢で出来るだけ粉末にして 30 だけは目の開き 2 mm 他は 1 mm の篩を通過したものを定量した。40~46 はアヘン末なのでそのまま定量した。

1~39 は風乾のままのアヘンであり、40~46 は減圧乾燥したものであるから 40~46 について減圧乾燥しない前に換算すると第四表のようになる。

考 察

アヘン中のモルヒネ定量法を細かく規定することにより誤差を生ずる可能性を少くした。46 種のアヘンについてモルヒネを 2 回定量した結果定量値の差は 0.3% 以下であつた。

産地別によりモルヒネ含量には大きな差があるが、これを以て直ちにアヘンの産地を決定することは出来ない。

国際連合の標本中トルコ産 15 種中 1 種を除き 14 種、ユーゴ産 2 種、ギリシア産 1 種は何れも 10~17% の高含量であり、イラン産 6 種インド産 3 種は何れも 10% 程度、インドシナ産は 1 種を除き他の 2 種は 11~12% であつた。

これに反して朝鮮産、中国産は何れも低率で 7% 前後であり、殊に朝鮮の一種に至つては 3% 以下の極めて低率である。

麻薬課分与の 6 種についてもトルコ産は 13% の高率であり、満州産、蒙古産、朝鮮産、日本産は何れも 10~11% であり、中国産は 6% の低率である。アヘン末の場合も中国産、蒙古産は 10% 程度か、それ以下である。

モルヒネの含量だけではアヘンの産地を明確にすることは出来ないがモルヒネはアヘンアルカロイドの中で最も重要であるという点と他のアルカロイド殊にコデイン、パパベリン等との割合が産地を決定する上に重要な関係があると考えられるからモルヒネの定量は必要であり産地を決定するために押収アヘンについて必ず行わねばならない定量の一つである。

この研究に当りかかる機会を与えられ且終始御指導を仰いだ当所有機化学試験部長、山本允秋氏、アメリカ麻薬局 Mr. Charles C. Fulton, 前総司令部麻薬課長 Mr. Wayland L. Speer, アヘンの輸入に関し種々御高配を賜つた厚生省麻薬課の堀江、斎藤、平瀬、中田、湯島諸氏に深く感謝の意を表する。アヘンの定量法に関し協議に参加して頂き種々御教示下つた麻薬技術会の武田薬工、西沢、高橋、大野、三共製薬、恒松、桜井、大日本製薬、笠木の諸氏に厚く感謝する。

文 献

- 1) United Nations document E/1459, Resolution F. July 6, 1949
- 2) United Nations document E/CN.7/117. April 14, 1948; E/CN.7/117. Add. 2, September 22, 1948, Bulletin on Narcotics No. 1 19, 43. 1949
- 3) International Pharmacopoeia First edition Volume I. 162
- 4) Bulletin of the Health Organisation of the League of Nations. Vol. VII Extract No. 6, 10
- 5) A. Barbier: Bulletin on Narcotics Vol. II No. 3, 24
- 6) British Pharmacopoeia 1948, 387
- 7) United Nations document ST/SOA/SER. K/1
- 8) Mr. Charles C. Fulton よりの私信
- 9) Bulletin of the Health Organisation of the League of Nations Vol. VII Extract No. 6, 12

1952年9月27日

Summary

As the official representative of Japan, we are now participating in the International Program of Opium Research, which the United Nations has established to devise the methods of determining the origin of seized opium through analysis and a study on its physical properties.

The opium samples of the United Nations (33 kinds: Turkish, Iranian, Indian, Indo-Chinese, Yugoslavian, Korean, Chinese, and Greek) and other 13 kinds of opiums (Turkish, Manchurian, Mongolian, Korean, Chinese, and Japanese), we have obtained by the courtesy of the Welfare Ministry were assayed.

Here in this paper we report the morphine content and loss in weight on drying of the opiums.

A method of morphine determination in opium is proposed. It is the same in principle to the method of J. P. VI, but has some improvements.

Received September 30, 1952.

魚肉ねり製品中のニトロフラゾンの定性及び定量法

川城 巖, 福沢 富美

Detection and Determination of 5-Nitro-furfural-semicarbazone
(Nitrofurazone) in Hampen, Kamaboko, etc.

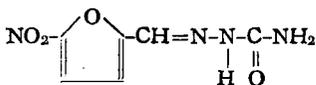
By Iwao KAWASHIRO and Fumi FUKUZAWA

緒 言

ニトロフラゾン (以下 N.F.S. と略す) は食品衛生法により, 合成保存料として特定の食品 (冷菓, 餡) に対し一定量の使用が許可されていることは既に知られている処であるが, 更に昭和 27 年 2 月 22 日厚生省告示第 30 号により, 魚肉ねり製品にも使用が許可され, その使用量は魚肉ねり製品 1 kg 中 0.03 g 以下と規定された. しかも N.F.S. 使用による魚肉ねり製品の保存性は, その優秀なることが認められ, 既に市場には N.F.S. を含有する製品も販売されている状態である. しかしこれに対する試験法は未だ確立されていないので吾々はこれら魚肉ねり製品中に添加された N.F.S. の定性並に定量法を見出すために, 二三の実験を行い, 一私案を得たのでここにその経過を報告する.

実験の部

N.F.S. は次の構造式を有し, レモン黄色の結晶性粉末¹⁾で水に僅かに溶け, 鮮黄色を呈する. 食品衛生法による使用限界は既に掲げた通りであるが, この限界量まで加えられた製品は既に微黄色を呈し, 白色であることを尊ぶ製品例えばハンペン, カマボコ等にあつては商品価値を損ずる恐れがあるので, 多くの場合, 限界を超えて使用されることは少ない様に考えられているが, チクラ, サツマアゲの類は必ずしもそうではない. そこでこの実験に於ては, 魚肉ねり製品 1 kg 中 0.03 g を中心として, その上下特に以下を含むものでも正確に検出且定量し得る様留意した. ここに報告しようとする私案によれば魚肉ねり製品 1 kg 中 N.F.S. の 6 mg~50 mg を定量することが出来. これは食品衛生法による使用限界の $\frac{1}{3}$ 倍~1.7 倍の範囲である. 又比色に用いている検液の稀釈度をませば 50 mg 以上含有する場合の測定も可能である.



多くの場合, 限界を超えて使用されることは少ない様に考えられているが, チクラ, サツマアゲの類は必ずしもそうではない. そこでこの実験に於ては, 魚肉

I 実験試料

魚肉ねり製品がつくられる場合は, 主原料である魚の生身とその他数種類の原料品の混合物中に, N.F.S. を加えて充分混和した後, これを熱湯中でゆで或は蒸す等の操作が加えられる. この間に添加した N.F.S. の一部分は使用した液中に溶出し, 添加した量のすべてが製品中に残つてはいない. 実験室に於て, 業者の製造法に従い, N.F.S. 含有のハンペンを小規模に作り, そのゆで汁中の N.F.S. を定量した結果溶出した N.F.S. の量は添加量の 23~27% であつた. 但しこれはゆでときの温度, 時間又は製品の密度等によつても異なり一定ではない. そこで実験試料としては, 正確に含量既知のものを得ることが望ましいので, ここでは全く N.F.S. を含有しないハンペンの一定量を取り, これに既知量の精製 N.F.S. を均等に混和した後約 24 時間氷室中に放置したものを実験試料とした.

II N.F.S. の定性反応及び定量法

(1) N.F.S. の定性反応としては, 次の四種の反応が既に発表²⁾されている. 即ち

a. Orcinol による蛍光反応	限界濃度	1: 25,000
b. 銀化合物の沈殿反応	"	1: 125,000
c. フェノール類と濃硫酸による反応	"	1: 2000,000
d. 強アルカリによる呈色反応	"	1: 1250,000

等である。吾々は上記 4 反応の内限界濃度の大である b, c, d, の 3 反応を定性反応として採用する予定のもとに、ハンペン、カマボコ、チクリ、ヤキイタ、ヤキチクリ、サツマアゲ等を対象としてその空試験によつて得た検液(検液調製法後出)に就いてそれぞれの反応を行つて見たが、N.F.S. と類似反応を現す様なことはなかつた。又この検液に微量の N.F.S. 水溶液を添加した後試験を行なつた処、何れも反応を妨害することなく陽性を示した。

(2) 定量法としては、上記 d. 記載の強アルカリによる呈色反応を利用し、アセトン存在のもとで呈色させ、一定時間内に光電比色計を用いてその吸光度を測定し、標準 N.F.S. 液を用いて予め作製した標準曲線により N.F.S. の定量を行なう。比色定量に用いる検液を最も効果的に且安定に発色させるためこの呈色反応に対する基本実験を次の如く行つた。

a) N.F.S. の精製:

N.F.S. 1 g にメチルアルコール 200 cc を加えて水浴中に加温し、殆んど溶解したのちこれを水 100 cc 中に保温オートを用いて濾入し、氷室中に放置し析出する結晶を濾取蒸気乾燥器中で乾燥後、更に減圧デシケータ(硫酸)で乾燥する、m. p. (分解点) 236~237°.

b) N.F.S. 標準原液:

精製 N.F.S. 0.03 g を精密に秤取し、水を加え 60~70° に温めて溶解し、20° に於て 1 l. とする。(比色に使用する際は常にこの温度に於て原液を採取した)。

c) N.F.S. の標準曲線の作製:

標準曲線作製に用いた比色液は、全容 20 cc 中に標準原液各々 1 cc (0.03 mg), 2 cc (0.06 mg), 3 cc (0.09 mg) 及び 4 cc (0.12 mg) を含む 4 種である。即ち標準原液 1 cc にアセトン 10 cc を加えよく混和し、これに N 水酸化ナトリウム液 5 cc 及び水 4 cc を加え全容を 20 cc とする。以下これにならつて標準原液 2 cc, 3 cc, 4 cc を用いて比色液をつくり、後 30 分経過後 20 分以内に島津 DF-I 型光電比色計で吸光度を測定した(濾光板 450 m μ) その結果吸光度は、Fig. 1 に示す範囲内では N.F.S. の濃度に比例することが明らかになつた。

Fig. 1. Calibration curve

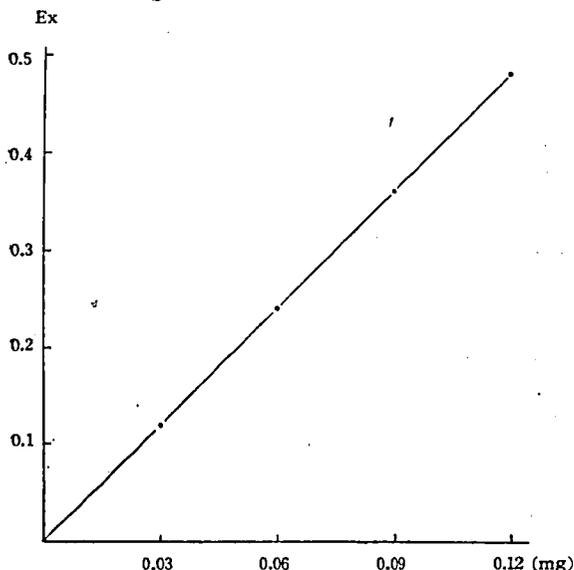


Fig. 1 に示す標準曲線はこの比色定量法を約 10 回繰返し行つた結果の平均値で、その吸光系数は標準原液 2 cc の場合は 0.255 を、3 cc の場合は 0.38 を示した。試料より抽出した N.F.S. を定量する際は、この標準曲線を基本とし、測定した吸光度よりその mg を算出した。

なお、アセトンの添加が呈色を安定化することは既に述べられているが²⁾アルカリを加える以前に添加すべきか、又はアルカリ添加後の呈色液に加うべきかを試験した結果 Fig. 2 の如く前者の方がはるかに吸光度は大であつた。

又 N 水酸化ナトリウム液の添加量については比色液 20 cc 中に本液 1 cc, 2.5 cc, 5 cc 等を含むものに就て試験を行つた結果 Fig. 3 に示す如く 5 cc が最も効果的であり、7~8 cc を添加した場合も前記載時間には略同様の吸光度を示した。

アルカリの濃度による色調の安定度を時間の経過に伴い試験した結果、N.F.S. の含量とアルカリの

濃度との関係は甚だ鋭敏で N.F.S. の含量に対してアルカリの量が多量な場合は短時間内に色調が最高に達するが、持続時間が短かく、又 N.F.S. の含量に対してアルカリの量が比較的少量の場合は最高に達する時間も永くかかるが、同色調の持続時間も永くなる。測定にあつては N.F.S. の含量は未知量であるが、この試験法によるアルカリの濃度及び時間は N.F.S. の、食品衛生法による使用許可量の前後量即ち 1 kg 中 30 mg 内外が試料中に含まれる場合に最も効果的に発色出来る様に規定した。

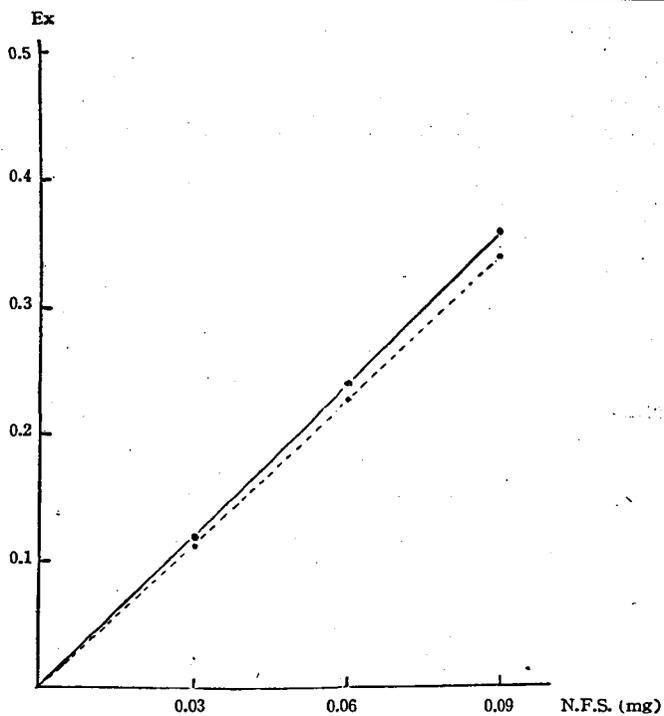


Fig. 2. Influence of alkali and acetone on the extinction.

— · — Alkalinization after addition of acetone
 - - - Alkalinization before addition of acetone

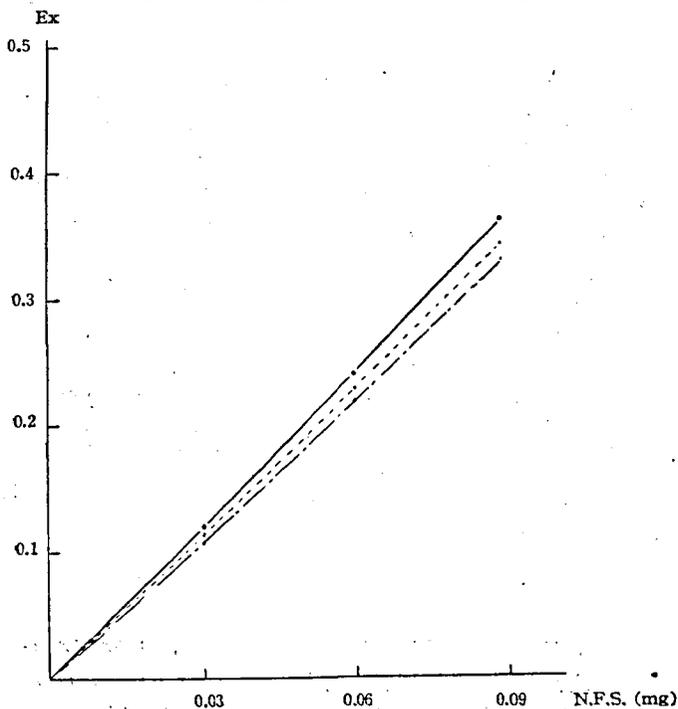


Fig. 3. Influence of alkalinity on the extinction

— · — N NaOH-soln. 5 cc
 - - - N NaOH-soln. 2.5 cc
 - · - · N NaOH-soln. 1 cc

III. N.F.S. 抽出法の検討

氷菓、留等の N.F.S. の検出定量法については従来二三の研究³⁾があるが、この場合は色素類の除去後直ちに酢酸エチル、アルコール等の溶媒を用いて N.F.S. を抽出し、更に N.F.S. の水その他の溶媒に対する溶解度の差を利用して抽出物を精製するのであるが、原料組成の極めて複雑な魚肉ねり製品の場合、上記の法をそのまま跳躍するときは溶媒分離が頗る困難で、微量検出の際その損失量は看過し難いものであることがわかり、更に或る条件下では N.F.S. の光及び熱による分解性が判明したので今回は全く別の見地から検討を加えることとした。

(1) N.F.S. に及ぼす光線の影響

N.F.S. 0.05 g ずつを無色の試験管にとりそれぞれこれに アセトン、エチルアルコール、アミルアルコール、又はメチルアルコール等を 10 cc ずつ加え、ときどきふりまぜ乍ら室温に放置するとき次第に赤色を帯び(直射日光のもとでは特に著しい)その変化の程度は溶媒の種類によつて相異した、その結果は第 1 表に示す通りである。尚同時に褐色ガラス容器を用いて同様に操作したものは全く赤変しなかつた。

Table 1.
Colour Change of Nitrofurazone by Light in Various Solvents

Solvent	Colour Change after 1 hour	Colour Change after 2 hour
$\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$	Slightly reddish	apparently reddish
$\text{CH}_3\cdot\text{CO}\cdot\text{CH}_3$	Slightly reddish	apparently reddish
$\text{C}_2\text{H}_5\cdot\text{OH}$	Slightly reddish	apparently reddish
$(\text{CH}_3)_2\cdot\text{CH}\cdot\text{CHOH}\cdot\text{CH}_3$	Very slightly reddish	apparently reddish
$\text{CH}_3\cdot\text{OH}$	Very slightly reddish	slightly reddish

光線の強弱により赤変の程度、時間等は勿論一定しないが、ここに生じた赤色物質(溶媒蒸溜残渣)は水に黄色にとけ、強アルカリによる呈色反応は、陰性か或は微弱となる。以上の結果より溶媒添加後の操作は光線を避けて行わなければならないことが明らかとなつた。

(2) 試料の乾燥法

試料中から N.F.S. を純粋の状態に抽出し、この水溶液(検液)について比色定量を行うには比色に用いる検液より N.F.S. 以外の夾雑物を完全に除去することが最も望ましい。ところが含水状態で熱時試料を抽出するときは水溶性である N.F.S. と共に他の物質も多量に抽出され、これらを N.F.S. から分離することは甚だ困難であり、又同時に N.F.S. の一部を失なうことが明らかになつたので試料を十分乾燥し、且水と混和しない溶媒を抽出に使用することが最も適当と考えられた。

試料を乾燥するには、① 真空低温乾燥、② 水浴上乾燥等を試みたが ① の場合は甚だ長時間を必要とし、ために試料は異臭を伴い変質の恐れもあり、又 ② の場合は熱により、乾燥状態に近づくに従い試料はやや赤色を帯びメチルアルコールで抽出しても、メチルアルコール層は殆んど黄色を呈さなかつたので N.F.S. は一部変化したものと想像され何れの方法も適用し難い、そこで試料の乾燥をなるべく低温で速やかに行うために試料の一定量に適当量の無水芒硝を均密に混和した後低温で送風しときどき混合してよく乾燥するようにつとめた。なお乾燥に要する時間は 1~2 時間を必要とした。

(3) 抽出溶媒の決定

III, (1) の実験によると、光線に対する障害の比較的少ない溶媒は、メチルアルコールであるが、抽出法第 1 案(後出)によつて、N.F.S. 不含の試料につき空試験を行つたところ、メチルアルコールで抽出した場合は酢酸エチル使用の場合に比し、吸光度に及ぼす影響が約 2 倍程度大であつた。これに反し、酢酸エチルは光線により前述の如き変化を来すが、褐色ガラスの容器を使用し遮光すればこの障害は簡単にのぞくことが出来るので抽出溶媒には酢酸エチルを使用することとした。

次に念のため N.F.S. を溶解しないとされている 溶媒の内精製した 石油エーテル又は ベンゾールを用いて熱時 N.F.S. の溶出する状態を試験した。即ち N.F.S. 約 0.05 g を乾燥濾紙に包みソクスレー抽出器中に入れ、石油エーテル又はベンゾールを用いて 2 時間水浴上に抽出を行い、溶媒を減圧溜去し残留物を 10 cc の水にとかして、定性反応を行つたが何れも陰性であつた。即ちこれらの溶媒は水分を含まない場合、脂肪分除去等の溶媒として使用しても N.F.S. を損失する恐れはないものと思われた。

(4) N.F.S. 抽出時の温度, 時間及び溶媒の溜去方法

N.F.S. の一定量を混和した試料について抽出時の温度, 時間及び溶媒溜去時の温度等が N.F.S. の回収率に及ぼす影響について検討した。10 g 中 N.F.S. 0.3 mg を含むハンペンを試料とし無水芒硝と共に乾燥し酢酸エチルを用いて遮光下に抽出を行ない、この際抽出時間が 30 分, 1 時間の二つの場合を比較し、酢酸エチルの溜去は常圧で行つた。その結果は第 2 表の如く N.F.S. の回収率は一定の数値を示さなかつた。

しかし抽出時間は 30 分の場合の方が比較的好結果を示しているので長時間の加熱は N.F.S. に変化を及ぼすものと考えられる。そこで抽出時間を 30 分に一定し、酢酸エチルの溜去は減圧で行なうこととした。その結果溜去時の温度の差により、第 3 表の如き成績を得た。

Table 2.

Comparison of Recovery at Different Extraction Periods

30 min	60 min
79.2%	44.2%
69.2%	61.2%

Table 3.

Comparison of Recovery of Nitrofurazone at different Temperatures in Distillation of $\text{CH}_3\cdot\text{COOC}_2\text{H}_5$

Temp. (°C)	Recovery (%)
45 ~55	94.1
45 ~55	94.1
60	87.5
60	84.1
60	84.1
70	83.5

実験の結果蒸溜を 60° 以下で行えば、N.F.S. の含量が 1 kg 中 0.03 g 前後の場合は約 94% の回収率を示した。

(5) 抽出法第 1 案

以上検討の結果次の方法を抽出法第 1 案とした。その概略を示すと試料 10 g を約 4 倍量の無水芒硝と共に均等に混和、送風して充分乾燥し、褐色ソクスレー 浸出器中で酢酸エチル 80 cc を用い、30 分間水浴上で抽出を行つた後、酢酸エチルを減圧のもとで 45°~55° の水浴中で溜去し、残留物を水に溶かして一定量とし検液とする。

次に本案により各種試料につき空試験を行なつた、即ち、全く N.F.S. を含まない試料各々 10 g を用い得られた検液について比色定量を行つた処多少の吸光度を示したので、これを N.F.S. の mg 量に換算したところ、その結果は第 4 表の通りである。

この試験法の要点は既述の通り、ここに得た検液について比色により N.F.S. の含量を測定しようとするものであるから上記の如き誤差は出来るだけ除去することが望ましい。そこで更に試料の脂肪性物質について考慮することとした。

(6) 抽出法第 2 案

III, (5) の結果は比較的脂肪分の少ない試料についても上記の如き数値を示し、脂肪分の多い試料ではそれ以外になお相当の脂肪性物質が共に抽出されてくることが認められたので III, (3) の後段で述べた実験結果を取り入れ、石油エーテルに依る前処理を行つた。(蛋白質については後述) 即ち抽出法第 1 案に於いては直ちに酢酸エチル抽出を行つたのであるが更にその前に石油エーテル 100 cc を用いてソクスレー浸出器中で 2 時間抽出した後、前記

Table 4.
Results of the Blank Test

Sample	Result (mg as N.F.S.)
Kamaboko	0.015
Yaki-ita	0.015
Hampen	0.0175
Chikuwa	0.025
Yaki-chikuwa	(fatty materials appeared)

Table 5.
Results of the Blank Test

Sample	(Result mg as N.F.S.)
Kamaboko	0.01
Hampen	0.01
Yaki-ita	0.0125
Chikuwa	0.015
Satsumaage	0.015
Yaki-chikuwa	0.02

抽出法第1案に準じ抽出することとした。この方法を抽出法第2案とする。ここに得られた残留物(N.F.S.)は水にとかして25 cc としその5 cc を用い前記の比色液作製法により全容20 cc とし、比色定量を行なった。次に各種試料について、抽出法第2案による空試験を行なった。その結果N.F.S.に換算したmg量は第5表の如く減少し第2案にまさるものと考えられる。

上記mg量は都内市販のN.F.S. 不含の魚肉ねり製品の多くの種類について夫々数度行つた結果得られたもので各種類について略一定の値を得た。

(7) 抽出法第2案によるN.F.S.の抽出結果

試料10g中に含まれるN.F.S.の定量を行なった結果本案による測定範囲及びその回収率は第6表に示す通りである。

Table 6.
Recovery of Nitrofurazone in Hampen and Chikuwa etc.

Sample	N.F.S. (Added) (mg)	Recovery (%)
Hampen	0.3	100
Hampen	0.3	93.3
Hampen	0.06	91.6
Hampen	0.06	91.6
Yaki-chikuwa	0.3	97.7
Yaki-chikuwa	0.3	93.3

即ちこの試験法によると食品衛生法による使用許可量の限度のN.F.S.を含む試料にあつてはその回収率は平均約96.1%であり、又比重により定量しうる限度は1kg中6mgでその回収率は平均91.6%であつた。

以上の試験によつて得たN.F.S.の%はすべて空試験によつて得たN.F.S.換算量を差引いたものである。

(8) 試料中の蛋白質

本試験の対象である魚肉ねり製品が、本質上多量の蛋白質を含有することは当然であるので、N.F.S.を抽出する場合蛋白質が微量にせよ夾雑して来て、ひいては定性反応、比色定量にも悪影響を及ぼすのではないかとの一応の懸念が存したのであるが、III、(7)の第2案の方法によつて求めた結果を見ると定性反応に於ても、回収率に於ても相当良好な成績が得られ、又強いて除蛋白剤(例えばトリクロル酢酸、硫酸銅試薬、酢酸鉛、昇汞、カレット試薬)を使用するときは、検液に液性、色調等の変化又は沈澱現象を来して比色定量の目的を達し得ないことを確認したので蛋白質の存在はむしろ考慮外に置くこととした。

結 論

以上の検討結果を総合して得た試験法私案を示すと次の通りである。
魚肉ねり製品中ニトロフラゾンの定性及び定量法

I. 試 薬

1. 無水硫酸ナトリウム
2. 石油エーテル (脱水精製したもの)
3. 酢酸エチル (脱水精製したもの)
4. N 水酸化ナトリウム液
5. アセトン
6. 硫酸
7. 石炭酸
8. 30% 酢酸ナトリウム液
9. 5% 硝酸銀液

II. 検液の調製

試料 10 g を秤取し、乳鉢中でよくすりつぶし、無水硫酸ナトリウム 40 g を加えて均等に混和する。次にこの混合物を送風しつつときどきまぜて速やかに乾燥した後、完全に遮光したソクスレー抽出器を用いて、石油エーテル 100 cc で 1 時間水浴上に抽出を行なう次に試料を円筒濾紙より取り出し送風して石油エーテルを揮散させ、再び別の円筒濾紙に移し、酢酸エチル 80 cc を以て水浴中に 30 分間抽出を行なう。

酢酸エチル溶液に無水硫酸ナトリウム 2 g を加えてよくふりまぜ、暫くの後、液をナス型フラスコ中に濾入し、残った硫酸ナトリウムは酢酸エチルそれぞれ 10 cc づつで 2 回洗い、洗液は前記フラスコ中に入れ、45~55° の水浴中で酢酸エチルを完全に減圧蒸溜し去る。

上記フラスコを冷却した後、残渣を水にとかして全量を 25 cc とし、乾燥濾紙を用いて濾過し、検液とする。

III. 定性試験

- a. 検液 1 cc にアセトン同容量を加え、N 水酸化ナトリウム液 2~3 滴を滴加するとき、N.F.S. が存在すれば橙赤色を呈する。
- b. 検液約 5 cc を蒸発濃縮し、殆んど水分を認めなくなつた残留物に硫酸 1 cc 及び石炭酸 1 小粒を加えて溶解するとき、N.F.S. が在すれば液は赤色~橙赤色を呈する。
- c. 検液約 5 cc を蒸発濃縮し、これに 30% 酢酸ナトリウム液 2~3 滴を加え、これに硝酸銀液を滴加すると、N.F.S. が存在すれば白色の沈澱を生じ、加熱すれば沈澱は赤色となる。

IV. 定量試験

検液 5 cc にアセトン 10 cc を添加、混和した後直ちに N 水酸化ナトリウム液 5 cc を加えよくふりまぜ呈色させる。後 30 分経過後 20 分間以内に光電比色計により吸光度を測定し、(予め作成した標準曲線により検液中の N.F.S. 量を求め、試料 1 kg 中の含量を算出する (濾光板 450 m μ))。

なお既述の如くこの試験法によれば、空試験に於ても魚肉ねり製品の種類によつて、多少の吸光度を示すからこの点注意を要する)。

標準曲線の作成

標準原液:

微細粉末とした精製 N.F.S. 0.03 g を精密に秤取し、60~70° に温めて溶解し、1 l とする。

比色法:

次の表に従つて N.F.S. を各々 0.03 mg, 0.06 mg, 0.09 mg, 0.12 mg 含む全容 20 cc ずつの標準液をつくり、

上記の方法によつて呈色させ、後30分経過後20分間以内に中心波長450m μ のフィルターを用い、吸光度を測定し、N.F.S.の重量—吸光度曲線をつくる。

比色液	標準原液 cc	(N.F.S.のmg)	アセトン cc	N水酸化ナトリウ ム液 cc	水 cc
①	1	0.03	10	5	4
②	2	0.06	10	5	3
③	3	0.09	10	5	2
④	4	0.12	10	5	1

文 献

- 1) New and Nonofficial Remedies 1952 639.
- 2) 高木誠司, 宇野豊三: 薬学研究, 20, 29 (1948)
- 3) 当所及び都衛生研究所(未発表)

Summary

The method of detection and determination of Nitrofurazone in several kinds of Japanese fish meat paste, was studied.

The fatty materials are removed by petroleum-ether from the dried sample, and then Nitrofurazone is extracted by ethyl acetate, protecting from light.

The extract is carefully evaporated under reduced pressure, and the residue is dissolved in 25 cc of water. The aqueous solution is used for the identification and determination of Nitrofurazone.

Identification

1. The fluorescence test with Orcinol.
2. Precipitation test of the silver salt (red precipitates appears in the presence of Nitrofurazone).
3. Color reaction with phenol and conc. sulfuric acid (red color appears in the presence of Nitrofurazone).
4. Color reaction with conc. sodium hydroxide (reddish-orange in the presence of Nitrofurazone).

Determination

To 5 cc of the solution are added 10 cc of acetone and 5 cc of N sodium hydroxide, then the extinction of the reddish-orange colored solution is measured by the photoelectric colorimeter with a filter of maximum transmittance 450 m μ .

Received October 10, 1952.

ルチンについて

第3報 減圧ペーパークロマトグラフィによる分離定量 (その2)

鹿島 哲, 太幡 利一

Rutin III. The Separation and Determination by Paper Chromatography
Under Reduced Pressure (2)

By Tetsu KASHIMA and Toshikazu TABATA

まえがき——ルチンが毛細血管の血液に対する抵抗性の低下(出血性紫斑病), 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)並びに白血球減少(白血病)やそれに類似した症状を呈する放射線による疾患に効力があるといわれて来たため, 1949年頃より医薬品として特に最近ではビタミンCなどとの複合剤として広く用いられているが, その薬効や薬理, 病理作用については疑問の点も多く無効であるとの報文も発表されている。

しかしルチン製剤が現実において多量に用いられているため必然的に, その定量法が種々考案されている。フラボン類がアルミニウム, 鉄, ホウ素, 鉛, 銀, トリウム及びジルコニウム⁹⁾化合物で呈色することが古くから知られていて⁹⁾, それらによりルチン溶液を発色させて比色定量することが多数行われた^{10) 11)}, しかしその呈色反応は各フラボン類について選択性及び特異性が少ないため, 定性確認することさえクロマトグラフィなどで分離してから呈色試薬或は紫外線を用いて初めて出来るのが実状である¹²⁾, ましてその呈色反応を用いて定量することは, 検体以外の類似のフラボン類が共存するときは不可能に近く, 分光分析をしてもその吸収曲線が互に近似するため極めて波長幅の狭い単色光(3m μ 以下)を用いても誤差を1%以内にするには困難なことである。

そのため各フラボンの物理的性質の差を利用してフラボン類を分離定量することが行われることとなつた。その一つの方法としてクロマトグラフィが用いられ, 特にペーパークロマトグラフィが多数の人によつて行われた¹³⁾, その中には円形クロマトグラフを用い展開された試料の面積から直接ルチンを定量している人があるが¹⁴⁾, これは凡その量を測定するに止まるものと思われる, 著者は前報¹⁾において市販ルチンを25%イソプロピルアルコール水溶液を展開液としてペーパークロマトグラフィでルチンを分離抽出した後, N.F. IX¹⁰⁾の方法でBeckman分光光度計を用いて定量したが, その回収率は84.0 \pm 1.9%であつた。今回は15%酢酸水溶液を用いてペーパークロマトグラフィで分離した後, 前回と同様な方法で比色定量した。

実験材料——検体ルチンは日本衛材, 第一製薬及び中外製薬より分与されたものを用いた。酢酸は特級品を再結晶し, それに脱水するに必要なだけの五酸化燐を加えて蒸留したもの, アルコールは純アルコールに硫酸を加え蒸留したものに, 新たに製した酸化銀を加えて1昼夜以上放置し水酸化カリウムを加え脱水後再留したものを用いた。イソプロピルアルコールは豊玉香料より分与されたものを再留し沸点82°のものを用いた。

実験方法——東洋濾紙 No. 50 を4 \times 20 cmに切り, まず酢酸15%を含む水溶液³⁾を展開液として第1図の如き装置で2時間以上展開して洗い, ついで同じ方法で水で3時間以上展開して洗つた後, 自然乾燥する。その濾紙に第2図AのSの位置で4 \times 2 cmの面積に濃度約4 g/lのルチン検体無水アルコール溶液を(原液)0.001 ccの精度を有するマイクロピペットで正確に0.2 cc(検体含量約0.8 mg)つける。この時検液は濾紙の繊維の中に完全に吸着されるように, かつ均一につけ, 乾燥してアルコールを除去する。かくの如くにして既知量の検体をつけた濾紙を第1図の如くデンケータ中で展開液(15%酢酸水溶液)を9分目に入れた蒸発皿につるす, 受け器として容量50 ccの硬質ビーカーを用いる。ついで吸引ポンプを用いてデンケータ内の圧を減ずると(約50 mm Hg)酢酸と水蒸気で飽和される。約1時間展開すると第2図BのRの位置に検体中のルチンが展開されるから, その部分を切りとり50%のアルコール溶液でルチンを抽出したものを, その切りとつたと同じ面積の濾紙をBの部分から切りとり同様な方法で抽出したものを対照として, N.F. IX (1950)の方法でBeckmanの分光光度計DU型を用いて定量した。またルチン検体にクエルセチンを加えたもの及びクエルセチンのみのものを同じ方法で定量した。

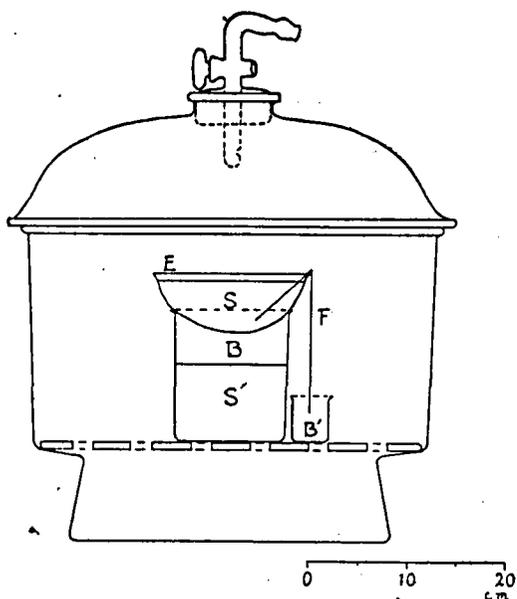


Fig. 1. Desiccator for Determination
by Paper Chromatography

B, B' : Beaker
E : Evaporating Dish
F : Filter Paper
S, S' : Developing Solvent

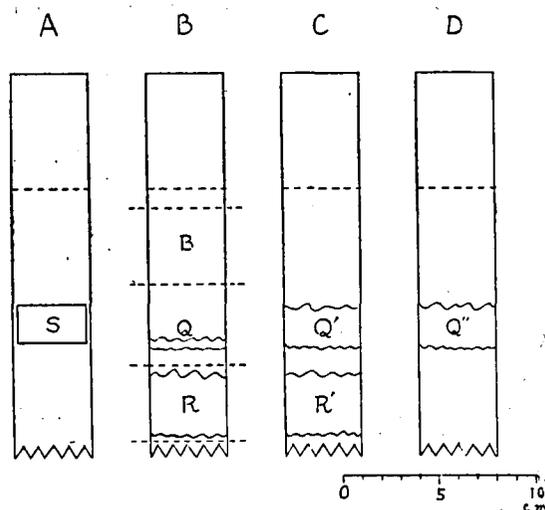


Fig. 2. Chromatogram of Rutin and
Quercetin by Quantitative Determination

S : Sample
R, R' : Rutin
Q, Q', Q'' : Quercetin
B : A Part of filter paper for blank

別に 25% イソプロピルアルコール水溶液を 展開液として、東洋濾紙製のペーパークロマトグラフ装置 C号を用い、減圧及び常圧のもとに約 40 μ g のルチン及び約 20 μ g のクエルセチンを含むアルコール 溶液を付けて多数を同時に展開し Rf 値を求めた。(第 2 表及び第 3 図)

実験結果—前記のクロマトグラフィで分離し、抽出して定量したルチンの量 (Rutin, P) と、ルチン原液をそのまま N. F. IX¹⁰⁾ の方法で定量した成績 (Rutin, K) 及びその比 (P/K) であらわした回収率を第 1 表に掲げる。

Table 1.
Rutin in Commercial Preparations and Recovery of Rutin by Paper Chromatography

Sample	A	B	C	D	E	E + 20% Quercetin	E + 33% Quercetin	Quercetin
S ₀ (g)	0.1071	0.1017	0.1026	0.1086	0.1067	/	/	0.1015
S (g)	0.0979	0.0940	0.0930	0.1000	0.1000	/	/	0.0937
$\frac{S_0 - S}{S_0} \times 100$	8.6%	7.6%	9.4%	7.9%	6.3%	/	/	7.6%
Rutin, K	96.3%	95.6%	92.4%	90.6%	94.8%	/	/	(205.7%)
K ₃₆₂₋₅	0.490	0.440	0.475	0.500	0.556	/	/	1.004
K ₃₇₅₋₀	0.430	0.415	0.422	0.444	0.501	/	/	1.15
K ₃₇₅₋₀ /K ₃₆₂₋₅	0.877	0.943	0.888	0.888	0.901	/	/	(1.15)
Rutin, P	93.1%	92.3%	91.1%	84.7%	88.5%	91.8%	92.9%	(1.2%)
K ₃₆₂₋₅	0.480	0.452	0.441	0.441	0.461	0.471	0.484	0.006
K ₃₇₅₋₀	0.420	0.397	0.386	0.384	0.402	0.414	0.425	0.007
K ₃₇₅₋₀ /K ₃₆₂₋₅	0.875	0.878	0.875	0.871	0.872	0.879	0.878	—
Recovery (P/K)	96.7%	96.5%	98.6%	93.5%	93.4%	96.8%	98.0%	(0.5%)

S₀ : Sample
S : Sample, dehydrated
Rutin, K: Rutin in the Sample, Determined by Spectrophotometry
Rutin, P: Rutin in the Sample, Determined by Paper Chromatography and Spectrophotometry

Table 2.
Rf Values of Rutin Preparations under Various Conditions (Under Reduced Pressure)

Sample	Solvent	25% Isopropyl alcohol (b.p. 82°) 75% Water		25% Isopropyl alcohol (G.R.), 75% Water	15% Acetic acid, 85% Water
		about 30°	about 20°	about 15°	about 27°
Rutin		0.74*	0.65*	0.63*	0.52*
		0.80	0.69	—	0.35
Quercetin		—	0.16*	0.03*	0.03*
		—	0.12	—	0.03
Unknown		0.80*	0.71*	0.89*	—
		0.85	0.74	—	—

* Under Atmospheric Pressure

また 25% イソプロピルアルコール水溶液及び 15% 酢酸水溶液を展開液として用いたときの常圧及び減圧下におけるペーパークロマトグラフィにおけるルチン, クエルセチン及び未知物質の Rf 値を第 2 表に掲げる. 第 3 図はそのクロマトグラムである.

考察——前報¹⁾でも述べた如くルチン検体から他のフラボン類特にクエルセチンを除去しなければ, その化学的性質の類似からルチンのみを定量することは困難であるので, 今回も 15% 酢酸水溶液を用いたペーパークロマトグラフにおけるルチンとクエルセチンの Rf 値の大きな差違

$$\begin{aligned} & \text{Rf 値 (Rutin)/Rf 値 (Quercetin)} \\ & = 0.53/0.03 = 18 \end{aligned}$$

を利用して検体からルチンのみを展開分離し, アルコールで抽出後分光光度計を用いてルチンの吸収スペクトルの吸収極大の波長 (362.5 m μ) における吸光係数の比で定量した. 第 1 表の Quercetin の項で見られる通りクエルセチンはクロマトグラフィで殆ど完全に除去されたことが明かである. それは検体ルチンにクエルセチンを加えた場合もルチンとクエルセチンの吸収極大値における吸光係数の比が減少しルチン純品として知られている値 (0.875) に近付いていることから吸光係数による定量に差支えない程度に検体が純化精製されたといえる.

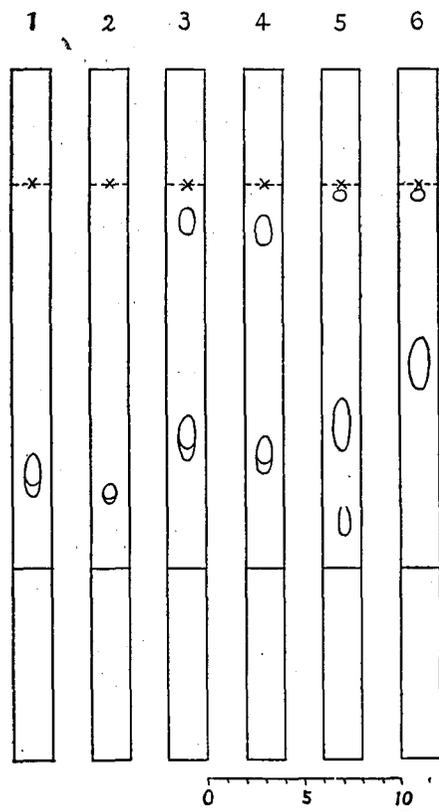


Fig. 3. Chromatogram of Rutin Preparations

- 1: 25% Isopropyl alcohol (b.p. 82°), Under atmospheric pressure, 30°
- 2: " " , Under reduced pressure, 30°
- 3: " " , Under atmospheric pressure, 20°
- 4: " " , Under reduced pressure, 20°
- 5: 25% Isopropyl alcohol (G.R.), 15°
- 6: 15% Acetic acid, 27°

この精製過程におけるルチンの回収率は N. F. IX の分光分析の値が正しいものとして $95.7 \pm 1.8\%$ であるから、前報の $84.0 \pm 1.9\%$ より一段と向上している。ペーパークロマトグラフィによる損失として 4.3% は少し大きすぎるが、その誤差 $\pm 1.8\%$ もかなり大き過ぎる。これはクロマトグラフィによるばかりでなく、分光分析操作にも起因するものがある。それは溶媒として無水アルコールを用いるため分光分析中約 3° の温度上昇を来し約 0.3% の容積変化を生ずる、また吸光係数が $0.4 \sim 0.5$ と云つた最も測定精度の高い処になるような濃度で測定を行つているが、それでも吸光係数の小数以下 3 ケタ目において $1 \sim 3$ (吸光係数で $0.001 \sim 0.003$) の程度誤差を生ずることがある、それはブランクの溶液を入れて測定したときの各容器の補正值が同様に同程度の誤差を生じ、その相互の差も同程度に不定で、この誤差は各々約 0.5% である。容器はコレックス製よりシリカ製の方が誤差が少いがこれは測定波長が短く紫外部に近いためであろう。また加えた酢酸の量は N. F. IX では一定にして測定しているが、ここで用いた方法では濾紙より抽出される酢酸の量が少々不定であり、一般に酢酸の多いほど吸光係数がやや大きく出る。この報告では検体中のルチンを分離、抽出し測定したが、不純物が大部分クエルセチンと解つているときは Nagphshi et al.⁹⁾ の行つた方法で逆にクエルセチンの量を測定することによつてルチンを定量してもよい。

クエルセチンの分子量がルチンの半分であるため、クエルセチンを多く含む不良検体が反つてルチンの含量が高く出る場合が多い、しかるにこの方法では N. F. IX の方法によるよりクエルセチンの多い検体ほどルチンの含量が少く出る。これは望ましい結果であり、真の含量に近い値を示す可能性を有している。

クロマトグラフの操作中におけるルチンの分解を防ぐため、溶媒を選択し、日光を遮断し、空気中の酸素や二酸化炭素などの影響を除くため減圧としたのである。減圧下にクロマトグラフィを行つたため酢酸と水蒸気で完全に飽和されたが (ちなみに 20° における酢酸及び水の蒸気圧はそれぞれ約 30mm Hg , 17.5 mm Hg である)、その影響は酢酸を展開液とした場合は顕著でなかつたが、イソプロピルアルコールを用いたときはルチンのクロマトグラムが明瞭にまとまる効果を挙げた、また Rf 値の増加が認められたがその原因は不明である、また濾紙繊維の間から空気が除かれたため展開速度が $10 \sim 15\%$ 増加した。いずれにしろ減圧クロマトグラフィはその構成成分及び相から不必要なものを除去するに役立つから、そのクロマト操作を一段と理想的な状態にする効果があると考えられる。

展開液として前報においては特級品のイソプロピルアルコールをそのまま用いたが、今回は特に純粋な品を分留し沸点 $82^\circ \sim 85^\circ$ のものの中で 82° のものを用いた処、ルチンの Rf 値は殆んど変化しなかつたが、クエルセチンの Rf 値は増加し、未知物質のそれは減少した。また温度の上昇につれて、ルチン及び未知物質の Rf 値が共に増加した。故にクロマトグラフィにおいては展開に用いる溶媒の精製法及びその使用条件などは明記する必要がある。

イソプロピルアルコールを展開液として用いるときはルチンの分解産物と思われる未知物質が認められるが、酢酸を用いたときはそれが認められず、その上ルチンの回収率が 12.3% ほど向上した処から見ると、この未知物質はやはりルチンのクロマトグラフィによる分解産物であろう。

ルチン検体中の糖を加水分解するか酵素によつて分離し、それを定量することによつて検体中のルチンを定量することも可能であるが、第 1 報⁷⁾ で報告した如く不純物の影響や糖そのものの定量に誤差が多いから正確な測定は望めないと思われる。

以上の結果よりこの定量法では検体中のルチンがクロマトグラフィで純粋にされるから、分離後は分光光度計を用いずともアルミニウムやホウ素の化合物を加えて呈色させ、フィルタを用いた簡単な比色計で分光分析すれば実用に用いられよう。

むすび—1. 市販ルチンを 15% 酢酸水溶液を用い減圧ペーパークロマトグラフィで分離し、 50% アルコールで抽出し、分光光度計を用いて定量した。その成績は大体実用分析に用いられるものである。この方法では N. F. IX の方法に比して、クエルセチンの多い検体ほどルチンの含量がより少く出るから真の値に近いものが得られると考えられる。

2. クロマト操作において、その展開に用いる物質の純度や温度変化によつて Rf 値、Rg 値 (相対的の Rf 値) が異常に異り必ずしも比例的関係にはない。

3. クロマトグラフィを減圧下で行なうことは、クロマトグラムの周囲を速かに一定温度における一定組成の蒸気で飽和し、空気中の酸素などの影響を除去し、展開速度を速め、クロマト操作を一段と理想化するに役立つ。

文 献

- 1) Dechene, E. B., *J. Am. Pharm. Assoc. (Scientific Ed.)*, **40**, 93~4 (1951)
- 2) 藤瀬新一郎, 立田晴雄: *日化*, **73**, 35~6. (1952)
- 3) Gage, T. B., Douglass, C. D. and Wender, S. H., *Anal. Chem.*, **23**, 1582~5 (1951)
- 4) Gage, T. B., and Wender, S. H., *Anal. Chem.*, **22**, 709~711 (1950)
- 5) Hörhammer, L. and Häsell, R., *Arch. Pharm. Berl.*, **284**, 276 (1951); cf. *J. Pharm. Pharmacology*, **4**, 588 (1952)
- 6) 刈米達夫, 橋本庸平: *薬誌*, **71**, 433~6 (1951); *薬学研究*, **22**, 108~9, 467 (1950)
- 7) 鹿島 哲: *衛試*, **70**, 59~65; 67~70 (1951)
- 8) Kipling, J. J., *J. Chem. Soc. London*, **1952**, 2858~2862.
- 9) Naghski, J., Fenske, C. S. Jr., and Conch, J. *Am. Pharm. Assoc. (Scientific Ed.)*, **40**, 613~6 (1951)
- 10) *The Nation Formulary*, Ninth Edition, 1950, p. 438~440.
- 11) 大島康義, 中林敏郎: *農化*, **25**, 212~5 (1951)

Summary

Rutin in commercial preparations is separated from quercetin and other impurities by paper chromatography under reduced pressure (about 50% mm Hg), using 15% acetic acid -85% water as a developing solvent. And the rutin in the paper is extracted by 50% alcohol. When the rutin in the extract is determined by spectrophotometry, we find that the recovery of rutin by paper chromatography is $95.7 \pm 1.8\%$.

It is remarkable that Rf value of paper chromatography is irregularly varied by the impurities in the developing solvent and temperature. The paper chromatography will be carried out under reduced pressure better than under atmospheric pressure.

Received October 10, 1952.

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(2)

Pseudomonas aeruginosa からの発熱物質の精製と人体への応用について

八田 貞 義 青山 好 作 小 沢 茂 子
宮 沢 文 雄 小 笠 原 美 知

Purification of Pyrogenic Substance from *Pseudomonas aeruginosa* and its Application to Human Body.

By Sadayoshi HATTA, Kosaku AOYAMA, Shigeko OZAWA,
Fumio MIYAZAWA, and Miti OGASAWARA

ま え が き

著者らは今日まで7種の菌株より細菌性発熱物質を精製し¹⁻³⁾、そのいずれも生体(ウサギ)注入により強烈な発熱現象を起すことを報じた。この発熱現象からみて、これらのものは発熱療法剤として臨床応用の可能なことが推定される。そこでわれらはこの目的にそう系統的な生物学的・理化学的基礎研究を行い、実験成績を集積してきた。その間、Lonsen and Liebert⁴⁾(1949)、Irvine and Robert⁵⁾(1949)の細菌性発熱物質の発熱療法への応用はわれらの注目を引くに十分であつた。先きに著者らは大腸菌の産生した発熱物質がShwartzman性をも具備するとの新知見を得⁶⁻⁷⁾、臨床応用上有益な性質を兼ねるものとの期待を述べると共に、従来の諸成績を慎重に検討し新たに*Pseudomonas aeruginosa*を使用し、これまで屢々好結果の得られた石炭酸処理法とNesset⁸⁾らのトリプシン消化の一部を改めた二つの精製法を試み強力な発熱物質を得るに至つた。この新たに精製された物質は人体にはウサギよりも微量の注射で発熱せしめるという結果を示した。以下の報告は目下行つているもののうちの一部である。

実験に使つた菌株：

実験に使つた菌は当部保存の*Pseudomonas aeruginosa*に属する菌株で普通培地にはえやすく、しかも特有の可溶性色素⁹⁻¹⁰⁾を産出する。本菌の十分な発育と色素の産生に適する培地として、以下に示す組成のものを用いた。

牛肉浸出エキス	5.0 g
ポリペプトン	10.0 g
カゼイン塩酸水解物(日之出製薬製)	1.0 g
ブドウ糖	1.0 g
グリセリン	10.0 cc
塩化カルシウム	2.0 g
硫酸マグネシウム	0.2 g
磷酸二水素カリウム	0.5 g
磷酸水素カリウム	0.5 g
食 塩	0.1 g
蒸留水	1000 cc pH 7.1

精製法及び理化学的性状：

菌株は前記培地に1月に2回継代して保存したが、実験に使うまえにはかならずクエン酸ナトリウム加血液(ウサギ)に3回連続継代しておき、これを平板にまいてS型菌を選択使用した。これを固形培地を入れたRouxのフラスコ(培地200cc、面積150cm²)に37°、48時間培養、雑菌混入のないことを確かめた後寒天をかき取りぬよう注意して菌体を集め、湿菌量20gを得た。

(1) 石炭酸処理による方法

まず菌を洗浄する目的で湿菌(20g)を生理食塩液1,500ccに悬浮させ約30分間ふりませ(1分間150~170回、

振幅 5 cm) た後遠心分離により菌体を集めた。これに氷酢酸酸性アセトン 100 cc を加え混和しながら放置し遠心分離の後、沈澱した菌体を真空乾燥した(この操作前後 2 回くりかえす)。これに 100 cc の蒸留水を加え温浴中(約 80°) で十分に熱浸し 2~3 滴トルエンを加えセロハンに包み流水中で 24 時間透析した。内容は遠心沈澱を施し集めた菌体を再び真空乾燥した。以下前記の熱浸一酸性アセトン一遠心分離の操作を反覆し、この沈澱物に 95% 石炭酸を 6 倍量加え振盪機で 1 日間ふりまぜた後石炭酸を遠心して除去、再び新しい石炭酸を加えて十分にふりまぜた。この操体を 3 回反覆し最後の沈澱にアセトンを加え石炭酸を洗浄した。これに 5 cc の蒸留水を加え温浸した後トルエンを加え 1 L の蒸留水中で 48 時間透析した。内容を遠心分離後 10 倍量の氷酢酸酸性アセトンを加え遠心沈澱させ、この沈澱物を酢酸がなくなるまでアセトン洗滌を行いこれを真空乾燥して灰白色の物質 100~120 mg を得た。

(2) トリプシン消化による方法

前記の方法で生理食塩液を用いて菌体を洗浄後この湿菌量 20g に蒸留水 1L を加えオートクレーブで 120° 20 分加圧滅菌後トリプシン (Aumour Laboratory 製) 50 mg を加え 1~1.5 日間 37° で放置 3 日目に再びトリプシン 50 mg を加え更に 2 日間保存した。そのトリプシン消化液をセロハンに包み流水中で 1 日間透析し、遠心により沈澱物を除去し、この上清液を全量が 3 cc になるまで減圧濃縮し、この濃縮液に 7% トリクロル酢酸 20 倍量を加えて 1 時間ふりまぜこの間の析出物を遠心により沈澱物を除去し、流水中で 4 日間透析した。透析液を Sevag 法で 3 回除蛋白したのちこれを減圧濃縮し 5 倍量の氷酢酸酸性アセトンを加え沈澱を集め、これにエーテルとアルコール (1:3) の混合液を加えて還流冷却器をつけて加温し、リポイド性分劃の除去に努め操作後の溶液にアセトンを加えて沈澱

Table 1. Purification of Pyrogenic Substances from *Pseudomonas* by Carbol Treatment

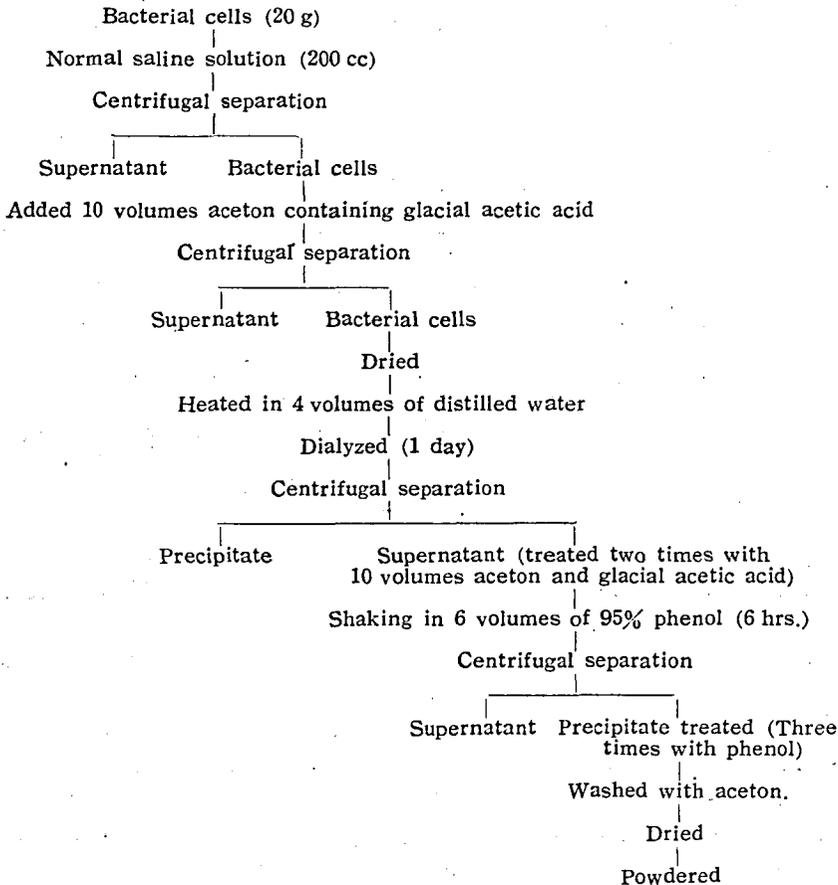
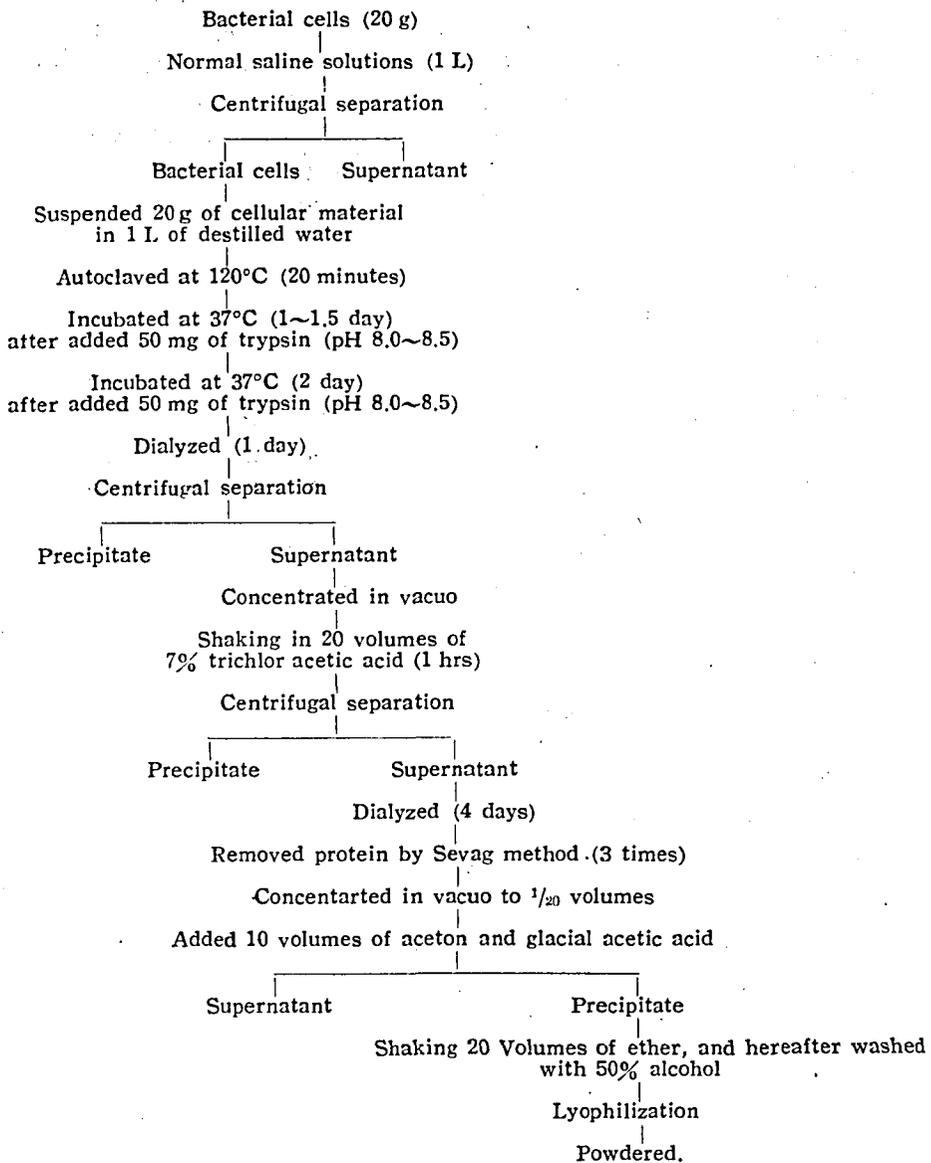


Table 2. Purification of Pyrogenic Substances from *Pseudomonas* by Trypsin Digestion

させ、再び蒸留水に溶解しこれに 50% になるように純アルコールを加え 5° の冷室内に 1 昼夜放置して析出させ、この析出物を凍結乾燥させ白色物質 150~200 mg を得た。

以上の方法によつて得た 2 種の物質の化学的性状をみると両者共に類似した定性反応がみられ蛋白反応としてのビュレット反応、ニンヒドリン反応、キサントプロテイン反応、ミロン反応、リーベルマン反応、テトラブロムフェノールフタレイン反応の呈色反応及びタンニン酸、トリクロル酢酸、100° 20 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モーリッシュ反応は陽性、フェーリング反応も塩酸による水解後はいずれも陽性である。

精製物質の毒性と発熱性：

精製物質の毒性については供試動物としてウサギ、モルモット、ハムスター及びマウスを用い、皮下、静脈注射による投与を行つた。このときウサギに大量投与 (20g/kg) のものでは体温は著しく上昇し過敏症状を呈し痙攣を起

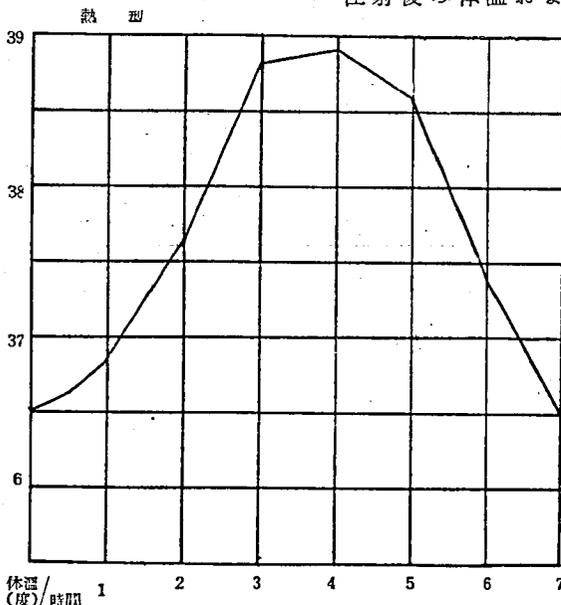
して比較的短時間で斃死したが、これは病理組織学的に生体臓器との親和性について検討を進めているので毒性の詳細は病理学的な成績をまづ改めて報告する。発熱性についてはまずウサギを基として局方試験を行い、Minimum pyrogenic dose (M.P.D.) を求めた(従来の成績との比較を試みるため便宜上ウサギ平均体温が注射前より 1° 以上上昇したものを陽性とした)。そこで各精製物質の M.P.D. をみると石炭酸処理法によつて得た精製物質は 4 µg/kg であつたが、トリプシン消化法で得た精製物質は最終操作が真空乾燥したものでは 1 µg/kg 凍結乾燥したものでは M.P.D. は上昇し 0.5 µg/kg の注射でも良好な発熱性を認め、発熱物質の精製には凍結乾燥が有効である。このウサギの成績を目安として以下の人体実験にはトリプシン消化による精製発熱物質を用いた。

人体実験は計 8 名の男女について行つたが、この注射量は最高 0.75 µg/kg (1 名) とし以下 0.5 µg (1 名), 0.3 µg (1 名), 0.2 µg (4 名), 0.1 µg (1 名) を注射した。これ以下の量については現在実験を進めているので引き続き報告する予定である。注射はいずれも所要量を静脈に直接注射し体温は注射前 2 回注射後は 30 分後に 1 回以下 1 時間間隔に数回測定した。臨床検査としては予備試験の意味で白血球数の算定、血液塗抹による血液像の観察及び尿について蛋白(スルホサリチル酸法)及びウロビリノーゲン(エールリツヒ法)反応の試験に止めた。

この成績は臨床例 1~8 に表示したがまず発熱物質注射後に現われる主な臨床症状から述べると人体に注射すると注射後 30 分乃至 1 時間前後から全身の倦怠感、頭痛を訴え発熱につれて悪感頭痛時には関節の脱力感が起り、これは発熱が最高に達し下降を初める前後まで続く。注射量が 0.5 µg/kg 以上では体温下降と共に発汗時には頭痛が数時間続いた例(0.75 g/kg)もある。発熱は皆一過性に発現し注射後に食欲減退等の影響は全く認められなかつた。次に個々の成績についてみると 0.75 µg/kg の注射例では注射後 30 分から体温の上昇が予知され 3~4 時間で最高に達し注射前 36.6° のものが 38.9° を示し 2.3° の上昇を認めた。これは注射後 5 時間前後から体温は下降し 7 時間目には全く旧に復した。0.5 µg/kg の注射例では注射 3 時間後に最高に達し 5 時間で旧に復し体温上昇は 1.1° であつた。0.3 µg/kg の注射例では注射後一時体温は下降したが後上昇し 2 時間で最高に達し体温上昇は 1.3° であつた。0.2 µg/kg の注射例は 4 例でいずれも 2~2.5 時間で最高に達し体温上昇は 0.8°, 1.1°, 0.6°, 0.4° であつた。0.1 µg/kg の注射例では注射後 4 時間で最高に達し 7 時間で旧に復し体温上昇は 0.9° であつた。同時に行つた臨床検査の結果についてみると白血球数はすべての実験者が発熱に平行して白血球数は増加し平均 1.5~3 倍に達した。個々の白血球では発熱から回復時にかけて中性嗜好白血球の顕著な増加とリンパ球の減少がみられたが、塩基及びエオチン嗜好細胞では著変がみられなかつた。

尿について試みた蛋白及びウロビリノーゲンの反応は比較的大量を注射した例では時に弱陽性にみられた。この発現本態については今後の成績をまち考察したい。

注射後の体温および血液の変化



臨床例 No. 1 工 ○ 武 ○

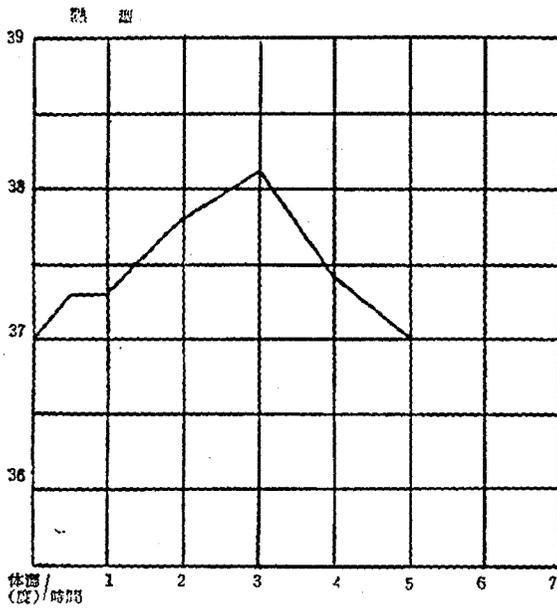
注射量 0.75 µg/kg

備考 健康者

臨床検査

	白血球数	血液像						尿反応	
		B.	Eo.	St.	Sg.	Ly.	Mo.	蛋白	エールリツヒ
注射前	6,000	0	1	2	56	38	3	-	-
注射後 3 時間	9,800	0	1	12	48	31	8	±	+

註 B=Basophile
 Eo=Eosinophile
 St=Stabkernige
 Sg=Segmenthernige
 Ly=Lymphocyten
 Mo=Monophileの略。以下の表もこれに準ず。



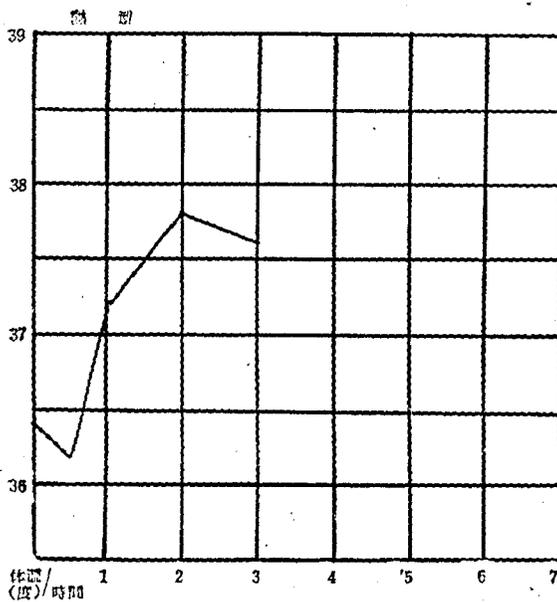
臨床例 No. 2. 工 ○ 武 ○

注射量 0.5 μg/kg

備考 健康者

臨床検査

	白血球数	血液像						尿反応	
		B.	Eo.	St.	Sg.	Ly.	Mo.	蛋白	エーデルリッヒ
注射前	6,400	0	1	3	68	24	4	-	-
注射後 (3時間)	9,800	0	2	22	56	16	4	-	±



臨床例 No. 3. 今 ○ 武 ○

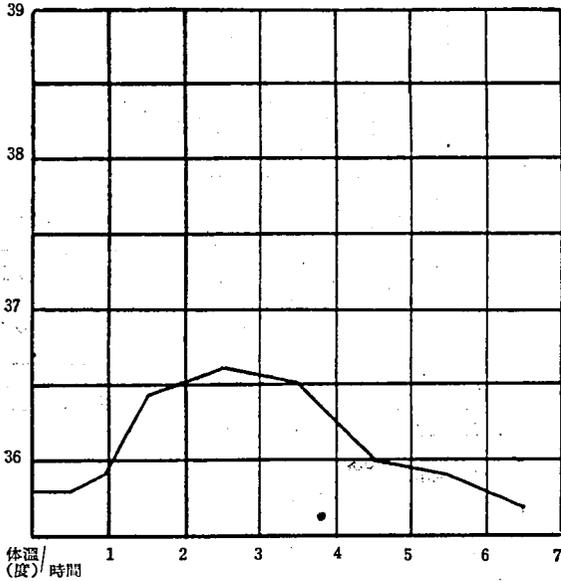
注射量 0.3 μg/kg

備考 胃潰瘍

臨床検査

	白血球数	血液像						尿反応	
		B.	Eo.	St.	Sg.	Ly.	Mo.	蛋白	エーデルリッヒ
注射前	4,400	0	2	3	62	26	9	-	-
注射後 (3時間)	9,800	0	4	16	58	12	10	±	+

熱型



臨床例 No. 4. 掘 ○ ○

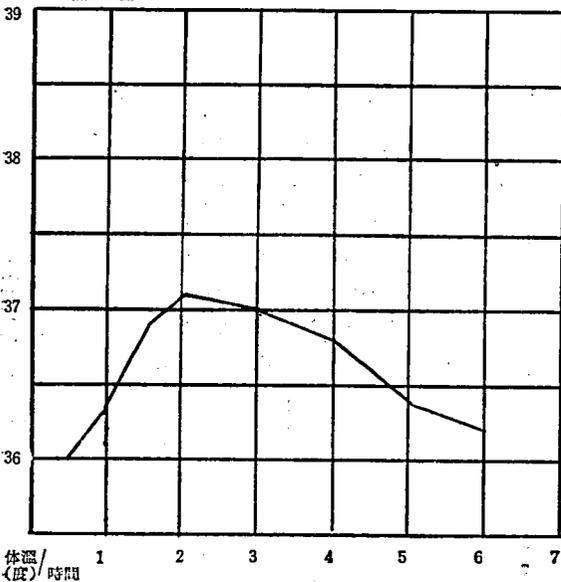
注射量 0.2 μg/kg

備考 健康者

臨床検査

	白血球数	血液像						尿反応	
		B.	Eo.	St.	Sg.	Ly.	Mo.	蛋白	エールリッヒ
注射前	5,200	0	2	2	68	26	2	-	-
注射後 (3時間)	7,800	0	1	11	54	32	2	-	-

熱型



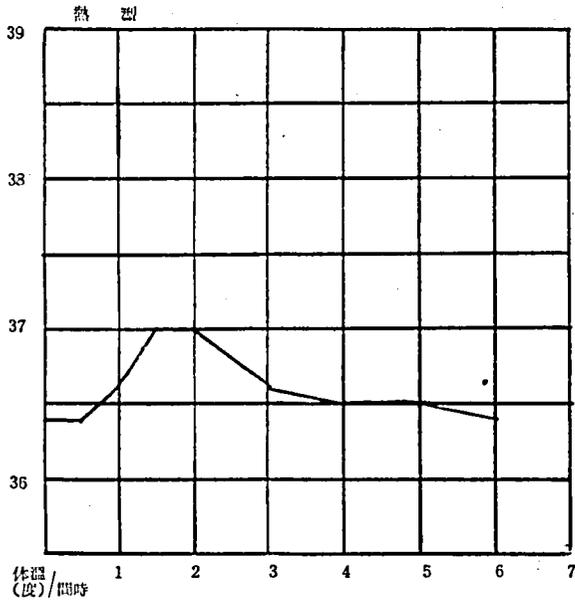
臨床例 No. 5. ○久○嘉○子

注射量 0.2 μg/kg

備考 健康者

臨床検査

	白血球数	血液像						尿反応	
		B.	Eo.	St.	Sg.	Ly.	Mo.	蛋白	エールリッヒ
注射前	4,800	0	0	3	68	26	3	-	-
注射後 (3時間)	12,400	0	0	18	56	20	6	-	-



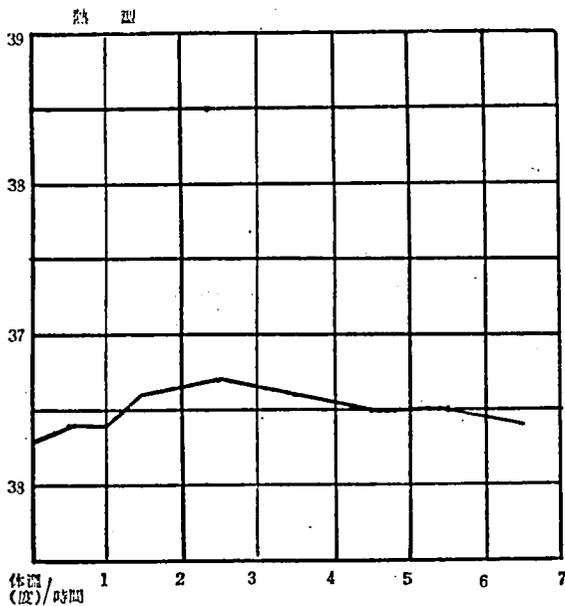
臨床例 No. 6. 山○英○

注射量 0.2 μg/kg

備考 健康者

臨床検査

	白血球数	血液像						尿反応	
		B.	Eo.	St.	Sg.	Ly.	Mo.	蛋白	エールリッヒ
注射前	5,800	0	0	3	69	26	2	-	-
注射後(3時間)	8,800	0	0	12	64	20	4	-	-



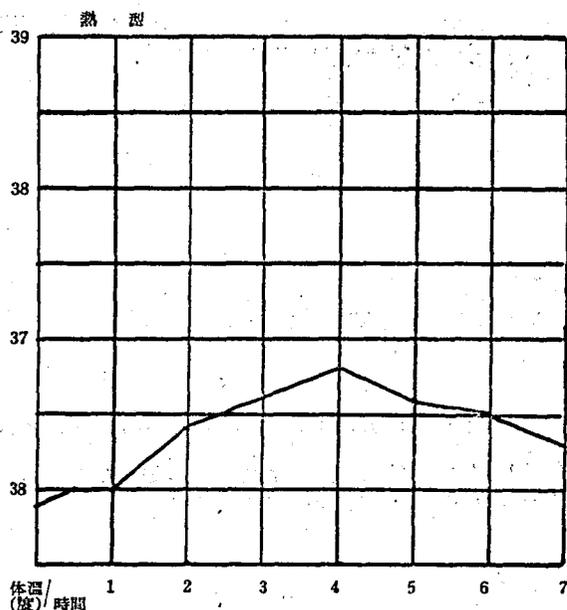
臨床例 No. 7. 伊○可○子

注射量 0.2 μg/kg

備考 健康者

臨床検査

	白血球数	血液像						尿反応	
		B.	Eo.	St.	Sg.	Ly.	Mo.	蛋白	エールリッヒ
注射前	4,800	0	1	3	60	34	2	-	-
注射後(3時間)	7,600	0	0	14	58	26	2	-	-



床 臨 例 No. 8. ○久○ 嘉○子

注 射 量 0.1 μg/kg

備 考 健康者.

臨床検査

	白血球 数	血液像						尿 反 応	
		B.	Eo.	St.	Sg.	Ly.	Mo.	蛋白	エールヒ リッヒ
注射前	4,400	0	0	2	64	35	1	-	-
注射後 (3 時間)	9,000	0	0	12	60	26	2	-	-

総括並に考察

著者らは *Pseudomonas aeruginosa* を用い石炭酸処理法と Nessel のトリブシン消化法の一部を改めた 2 通りの精製法によつて強力な発熱物質の抽出を行つた。得られた発熱物質はウサギについて試み、つぎに人体に直接使つた。日本薬局方による試験の成績は石炭酸処理法によつて得られた発熱物質の M. P. D. は 4 μg/kg で、トリブシン消化法で得られた発熱物質では真空乾燥のものは 1 μg/kg. 凍結乾燥のものでは 0.5 μg/kg で凍結乾燥の方が優れている。得られた 2 物質ともこれの化学的性状より推論すれば炭水化物系の物質といえる。

Nessets⁸⁾ も *Pseudomonas sp.* から発熱物質を抽出し、この物質は化学的には複合多糖体に属することを述べ、その発熱性は家兎では M.P.D. は 0.3 μg/kg, 毒性はマウスに対する LD₅₀ は 75,000 μg/kg で “non-protein, non-toxic” なる物質であると報じている。また武田は *Pseudomonas fluorescens* の菌体から、モリツシュ反応、カルバゾール反応、オルチン反応陽性、フェリング反応陰性、ビユレット反応、ミロン反応、坂口反応陽性、ニンヒドリン反応弱陽性の物質を抽出し、この物質が発熱性を有すること、特に脳下垂体前葉ホルモンを介して副腎皮質の機能を促す作用のあることを述べている。これらの物質と著者らの得た発熱物質とは化学的性質及び発熱生理作用の度合等は割合に類似しているが、これが全く同一物質であるかは今後実験を重ねた上で考察したい。

次に人体 (8名の男女) に応用したときの成績では全例が発熱し注射後 30分 ~1 時間で体温は上昇し初め、2~4 時間で最高に達し以後徐々に減退し注射後 7 時間前後で旧に復す一過性の熱型を示した。注射後の発熱度は注射量が 0.75 μg/kg では 2.3°, 0.5 μg/kg では 1.1°, 0.3 μg/kg では 1.3°, 0.2 μg/kg では 0.8°, 1.1°, 0.6°, 0.4°, 0.1 μg/kg では 0.9° で発熱の度合は注射量に幾分比例して増減している。これ以下の量については続報するが、いずれにしてもウサギでは発熱のみられない量でも人体では発熱しており、個体により発熱物質に対する感受性がかなり異なることを知つた。これは注目すべき事柄で現在ウサギを用いて行つている発熱試験法は微量物質の混在をも検出出来るように検討改良する必要を認める。

むすび

Pseudomonas aeruginosa から発熱物質を精製しこの化学的性状を究明するとともに発熱性をウサギについて調べついで人体に注射して観察した。この結果人体ではウサギに発熱のみられない量でも発熱することを知つた。

本実験の大部分特に人体実験については日本医科大学衛生学教室の山田義郎学士によつてなされたが、その詳細は目下進めつつある実験の終了を待つて山田によつて報告される。

本実験は文部省科学研究費の補助によつてなされたものであり、貴重な試薬を御分与下されたシオノギ製薬研究部の方々に厚く御礼申上げると共に文献蒐集に御便宜を頂いた三共株式会社試験課の皆様には深謝する。

引用文献

- 1) Hatta, S., Aoyama, K. and Tanji, S.: Japan, Med. J., 3 (2), 125, (1945).
- 2) 八田: 総合医学, 9 (6), 29, (1952).
- 3) 青山: 衛試, 68, 127, (1950).
- 4) Lonsen, W. and Liebert, E.: Med. J., 3, 96, (1949).
- 5) Irvine, H. and Robert, D.: Pub, Med. Con. Cardio, Disease, 18, 51 (1949).
- 6) 八田, 青山, 丹治, 中島, 小沢: 衛試, 70, 83, (1952).
- 7) 本多: 日本医科大学雑誌, 19 (1), 120, (1952).
- 8) Nasset, N. M. McLallin, J. Anthony, P. Z. and Ginger, L.B.: J. Am. Pharm, Assoc, 39, 456 (1950).
- 9) 武田, 河西, 土屋, 三浦, 仲田: 東京医事新誌 68 (8), 17, (1951).
- 10) 武田, 河西, 行方, 三浦, 土屋, 仲田: 総合医学 9(7), 41, (1952).

Summary

Purifying a pyrogenic substance from *Pseudomonas aeruginosa*, we studied its chemical properties and its pyrogenic effects by applying it to rabbits and human bodies.

As the results of experiments, it was noted to human bodies even in small quantities which did not show any pyrogenic effect on rabbit.

Received October 3, 1952.

拮抗現象の面から見たイソニコチン酸ヒドラジドの抗菌性と
生体臓器親和性についての研究

八田貞義, 青山好作, 丹治園枝, 宮沢文雄, 小沢茂子, 小笠原美知

Studies of Isonicotinyl hydrazine, especially on its
Antagonists and Organ Affinity.

By Sadayoshi HATTA, Kosaku AOYAMA, Sonoe TANJI, Fumio MIYAZAWA,
Shigeko OZAWA and Michi OGASAWARA

まえがき

本年初めイソニコチン酸ヒドラジド ($N \langle \text{C}_6\text{H}_4 \rangle \text{-CONH}\cdot\text{NH}_2$ 以下 I.N.A.H. と略す) の抗結核菌性がストレプトマイシン, パラアミノサリチル酸およびチオアセタゾン等よりも優¹⁻³⁾れていることが明らかにされるに及んで, 結核化学療法には再び新しい局面が展開された. その後ヒトガタ結核菌の発育阻止作用が試験管内と同様生体に直接用いた場合にも強力に作用することが実証され⁴⁻⁶⁾, 既に多くの報告にみられるようになり研究の重点も菌の薬剤耐性の⁷⁻⁸⁾ 発現に注がれるに至った. 従つて結核菌の薬剤耐性の強弱及びこの機作を究明するに先立つて I.N.A.H. の確実な投与の方法をきめることが肝要である. 単独或は数種の薬剤配合による投与技術の万全は妙味ある耐性防止の一策といえるが, 巧妙な臨床投与を行うためには薬剤の特性の把握が鍵といえる. 著者らはこの点に着目し特に拮抗物質との競り合いに主対象を求め, 薬剤の組合はせによつて起る効力の増減の度合を探つてみた. 又生体に投与した際生体諸臓器との親和性を病理組織学的に究明したのでこの成績について報告する.

II. 抗菌性及び拮抗現象についての実験

a. 実験に使つた菌株

実験に使つた菌株は国立中野療養所及び国立予防衛生研究所から分与されたる株 (ヒトガタ結核菌, ウシガタ結核菌) の外はすべて当部保存のもので結核菌は岡, 片倉培地に, その他のものは普通寒天培地に継代保存した.

b. 実験に使つた培地

実験に使つた基本の合成培地は次の 3 通りである.

1. Kirchner 培地

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	3.0 g	KH_2PO_4	4.0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.6 g	クエン酸ソーダ	2.5 g
アスパラギン	5.0 g	グリセリン	20.0 cc
蒸留水	1,000 cc	ウマ血清	10%

2. ネズミチフス菌 (S. 9) の合成培地

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.5 g	NaCl	0.05 g
K_2HPO_4	0.2 g	ブドウ糖	0.1 g
蒸留水	100 cc	pH	7.0

3. 半合成培地

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2.5 g	KH_2PO_4	0.35 g
カゼインアミノ酸 (日之出)	0.4 g	l-トリプトファン	0.02 g
l-シスチン	0.05 g	ブドウ糖	10.0 g
ニコチン酸	10^{-4}M	ビタミン B ₁	10^{-4}M
蒸留水	1,000 cc	pH	7.2

培地はそれぞれの処方にもとづいて調製し, 濾過後中試験管に最終液量が 10 cc になるように分注 100° 30 分 3 回滅菌して実験に用いた.

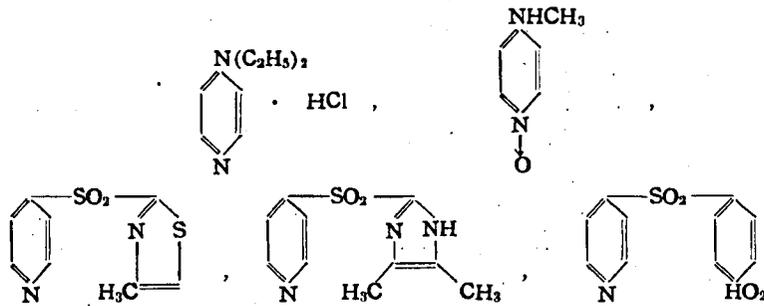
c. 菌移植と観察の方法

菌の移植は次の2通りとした。結核菌では岡。片倉培地に37°、3週間培養しその菌苔をかき取つて秤量し水晶球入り硬質コルペン内で1mg/cc量になるように生理食塩液を加えておいて手振法によつて菌液を作つた。ネズミチフス菌等の一般好気性菌は合成培地に37°、18時間培養し生理食塩液で1万倍に希釈した。すべて移植量はメスピペットの0.1ccづつとし試験培地は37°に保存し所定日数ごとに菌発育による濁度を肉眼的に測つて記録した。

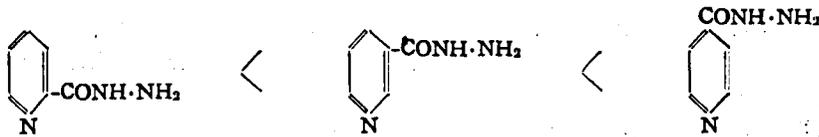
d. 実験の成績

1. 数種のピリジジン誘導体の抗菌性

まずI.N.A.H.の基本的な抗菌活性をヒトガタ結核菌H37RV, Frankfurt及び松本株の3株を選び検べた。この際8種のピリジジン誘導体(当所微量分析試験部板井博士試製)及びジヒドロストレプトマイシン(メルク製)を対照に用い化学療法効果を比較した。その結果構造がピリジジン又はピリジジン-N-オキドを母体としたものは余り強力な抗結核作用は期待できなかつた。即ち



ではいずれも1000µg/ccの濃度でも菌の発育を許したが、これに反しヒドラジドを構造にもつものは



の順に効力は増大し、N-CONH·NHが最も結核菌に対する抗菌性が強力で菌発育阻止濃度は0.5~1.0µg/ccであつた(第1表参照)。

I.N.A.H.のIn Vitro抗菌力についてはすでに多くの研究者によつて明かにされたが、この成績を詳にみると時に区々としている。これは供試培地、供試菌種、移植菌量、判定日数などの差異等がかなり影響していると考えられるが、このほかI.N.A.H.が溶液の状態でも永く放置すると変質して力価が減弱するためもある。著者らがKirchner培地を用い培養後30日目の成績をみるとヒトガタ結核菌のうちH37RV, Frankfurt, I.T.K.株を対象菌としたときは、1.25µg/cc濃度では菌は発育したが0.5~1µg/cc濃度において完全発育阻止がみられた。ところが同じヒトガタ結核菌でもH₂株はすでに強い自然抵抗性を持ち、これを完全に抑制するには50µg/cc濃度を必要とした。これと同じ抵抗現象がトリガタ結核菌(Flaming)或は非病原性抗酸菌(チモテー)にも認められ、これらには100µg/cc濃度のとき初めて有効に作用した(第2表参照)、したがつてこの薬剤が菌特異的にまた撰別的に作用することが想像された。そこでこの抗菌性を一応結核菌以外の細菌として病原性グラム陰性桿菌13種(チフス菌、シゲラ、パラ大腸菌、コレラ菌等)グラム陽性球菌9種(ブドウ球菌、溶血レンサ球菌、四連球菌等)について検べた結果、2・3の菌を除くとI.N.A.H.濃度が1,000~2,000µg/ccであれば有効的に作用することを見出した(第3表参照)。Squibb研究所の報告¹⁾にもブドウ球菌、大腸菌、シゲラなどの好気性菌に対してはI.N.A.H.は600µg/ccの濃度では菌は発育し、これを完全に阻止するにはそれ以上の濃度を要すると述べている。いずれにしても結核菌のそれに比べると遙かに大量を必要としている。又原虫、インフルエンザウイルスには無効

第1表 ピリジン誘導体の抗結核作用

供試菌	Frankfurt	H37RV	松本
薬 劑			
Dihydrostreptomycin "Merck"	1.0	1.0	1.0
<chem>Nc1ccc(cc1)CONH.NH2</chem>	1.0	0.5	1.0
<chem>Nc1ccc(cc1)C(=O)N.NH2</chem>	25.0	25.0	50.0
<chem>Nc1ccc(cc1)C(=O)N.NH2</chem>	50.0	50.0	50.0
<chem>Oc1ccc(cc1)N(Cc2ccccc2)c3ccccc3</chem>	>1000.0	>1000.0	>1000.0
<chem>Oc1ccc(cc1)NC</chem>	>1000.0	>1000.0	>1000.0
<chem>Oc1ccc(cc1)S(=O)(=O)c2ccc(cc2)[N+](=O)[O-]</chem>	>1000.0	>1000.0	>1000.0
<chem>Oc1ccc(cc1)S(=O)(=O)c2c[nH]c3c2C</chem>	>1.000	>1.000	>1.000
<chem>Oc1ccc(cc1)S(=O)(=O)c2c[nH]c3c2C</chem>	>1.000	>1.000	>1.000

註: 単位は $\mu\text{g}/\text{cc}$ とす

第2表 イソニコチン酸ヒドラジドの各種結核菌に対する抗菌活性

1. I.N.A.H.

$\mu\text{g}/\text{cc}$	Timotee			Flaming			B.C.G.			Frankfurt			H ₂			I.T.K.			H37RV		
	10	20	30	10	20	30	10	20	30	10	20	30	10	20	30	10	20	30	10	20	30
100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	-	≡	≡	-	-	≡	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	≡	≡	-	≡	≡	-	-	-	-	-	-	+	≡	≡	-	-	-	-	-	-
12.5	≡	≡	≡	-	≡	≡	-	-	-	-	-	-	+	≡	≡	-	-	-	-	-	-
10	≡	≡	≡	+	≡	≡	-	-	-	-	-	-	≡	≡	≡	-	-	-	-	-	-
5	≡	≡	≡	≡	≡	≡	-	-	-	-	-	-	≡	≡	≡	-	-	-	-	-	-
2.5	≡	≡	≡	≡	≡	≡	-	-	-	-	-	-	≡	≡	≡	-	-	-	-	-	-
1.25	≡	≡	≡	≡	≡	≡	-	-	±	-	-	-	≡	≡	≡	-	-	-	-	-	-
1	≡	≡	≡	≡	≡	≡	-	+	≡	-	-	-	≡	≡	≡	-	+	+	-	-	-
0.5	≡	≡	≡	≡	≡	≡	±	+	≡	-	+	≡	≡	≡	≡	+	+	+	-	-	+
0.25	≡	≡	≡	≡	≡	≡	±	+	≡	+	+	≡	≡	≡	≡	+	+	+	-	+	≡

2. ジヒドロストレプトマイシン

μg/cc	Timotee			Flaming			B.C.G.			Frankfurt			H ₂			I.T.K.			H37RV			
	10	20	30	10	20	30	10	20	30	10	20	30	10	20	30	10	20	30	10	20	30	
100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.5	-	-	-	±	+	+	-	-	-	±	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
1.25	-	+	+	±	+	+	-	-	-	±	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
1	±	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
0.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	+	+	-	+	+	+
0.25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	+	+	±	+	+	+

であるとの成績を照し合すと I.N.A.H. は一般的には結核菌特にヒトガタ菌に特異的に作用する薬剤であると考えるのが適当であろう。

I.N.A.H. の拮抗現象

この I.N.A.H. を臨床応用する際に単に試験管内における結核菌に対する有効量のみでは資料は不充分であつて、生体の諸因子を考慮しての薬剤の力価の低下現象即ち拮抗現象を究明することは、確実、好妙な投与を行うための重要な要素の一つとならう。そこで I.N.A.H. の種々の濃度液中に一定量の比率を保つように作用物質を加え、このときの In Vitro 抗菌力を測つて附加物質のために拮抗現象が営まれるかどうか精査してみた。作用物質としては SH 基をもつ化合物としてチオグリコール酸、塩酸システインを、還元剤として亜硫酸ソーダ及び次亜硫酸ソーダを、ビタミン類としてビタミン B₁ 及び B₂ を、このほかニコチン酸、メチオニン等を用いた。まず予試験として供試菌にネズミチフス菌を選び合成培地で試験したところ 120 時間観察において作用物質 7 種のうち、ニコチン酸とメチオニンを除く 5 種の物質が I.N.A.H. と拮抗し溶解による効力の減弱がみられた。このうち拮抗現象が最も鮮明に且つ強力に現われたのはビタミン B₂ を附加したときで、この拮抗モル濃度比は I.N.A.H. 1,000 倍では 73 (I.N.A.H.): 1 (V. B₂)、4,000 倍では 180:1 と I.N.A.H. の濃度が稀薄になるにつれて拮抗の度合は著しく増大した。V. B₂ に次いで著明であつたのはチオグリコール酸と亜硫酸ソーダとであつた。この拮抗モル濃度比はチオグリコール酸及び亜硫酸ソーダ共に I.N.A.H. が 500 倍のときは 14.6:1、4,000 倍では 18:1 と実測された (第 4 表参照)。そこでネズミチフス菌を用いた際に示された成績を基として、ネズミチフス菌を結核菌にかえても同じ現象が惹起するかを精査してみた。結核菌でも特に B.C.G. 株では I.N.A.H. が 10 万倍のときは、0.73:1、20 倍では 3.65:1、40 万倍では 18:1 と実測された。Frankfurt 及び H37RV 株は同程度に発現し I.N.A.H. が 4 万倍では 1.8:10、80 万倍では 9.1:10 でネズミチフス菌の最高 180:1 に較べるとこの拮抗度はかなり弱い。これは実験に使つた菌の菌型、菌代謝機構の差異、菌発育栄養素、生物学的性状がかならずしも等しくないなどから容易にうなずけることである。山田⁹⁾ はビタミン B₆ 群特にピリドキサルはこれを鶏卵培地に加えると培養初期に集落発生を刺激し、結核菌の生長促進に働くと述べまたピリドキサルを 0.08 μg/cc 添加により I.N.A.H. の菌発育阻止力は 1/2 に低下することを認めている。

この I.N.A.H. とビタミン類との拮抗本態を知るためには実験形式も多方面から進める必要があり、今後この目的に達つて実験が行われるが、この相互の関係は I.N.A.H. の拮抗作用機転、結核菌の生長促進因子 (ビタミン類) の問題を研究するに興味ある知見である (第 5 表参照)。

第3表 I. N. A. H. の好気性菌に対する抗菌活性

半合成培地

供試菌		判定時間		
		24	96	168
グ ラ ム 陰 性 菌	S. Paratyphi A. (S. 1)	1000	1000	1000
	S. Paratyphi B. (Java)	1000	1000	1000
	S. typhi murium (S. 9)	500	500	500
	S. typhi (S. 58)	500	500	500
	S. enteritidis (S. 64)	1000	1000	1000
	Sh. dysenteriae (Shiga)	250	500	500
	" " (K.B. III)	500	500	500
	E. coli communis	1000	1000	1000
	E. coli communiior	500	1000	1000
	A. aerogenes	500	1000	1000
	Vib. cholerae (uraga 3)	125	250	250
	Proteus (OX 19)	1000	1000	1000
	P. aeruginosa	1000	1000	1000
	S. marsescens	1000	>1000	
Gonococcus (Ozawa)	<50	<50	250	
グ ラ ム 陽 性 菌	M. p. v. albus (No. 11)	1000	1000	1000
	M. p. v. aureus (Heatley)	125	250	500
	" " (209P)	500	1000	1000
	Strept. hemolyticus (A)		<50	±125
	" " (Kita)		250	250
	" " (No. 2)		<50	±100
	" " (No. 18)	<50	500	500
" " (Maeda)	<50	250	250	

註: 表中数値の単位は $\mu\text{g}/\text{cc}$ とす。

生体臓器親和性についての実験

a. 実験の方法

実験に使った動物はマウス (平均体重 15 g) とハムスター (平均体重 50 g) で薬剤の投与は経口, 皮下或は静脈に分けて行った。このときの急性中毒致死量は Van der Waerden の面積法を基として求めた。

b. 実験の成績

I.N.A.H. の毒性¹⁰⁾ はマウス, ラット, 家兎等数種の動物では精密に決定されているが, この薬剤と臓器との親和の面については未だ完全には解明されていない, そこで供試動物としてマウスとハムスターを用い, 急性中毒量を薬剤投与法を経口, 皮下, 静脈注射と種々に変えて生体に投与し, 現われた成績を Van der Waerden の面積法

第 6 表 I.N.A.H. の急性中毒 (Van der Waerden 面積法)

〔I〕 マウス

投与方法	投与量	毒性試験	LD 50
経口	150 mg	○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	0/9
	200 mg	● ○ ● ● ● ○ ○ ○ ○ ○	4/9
	250 mg	● ● ○ ● ● ● ○ ● ○ ○	6/9
	300 mg	● ● ○ ● ● ○ ● ○ ○ ○	5/9
	400 mg	● ● ● ● ● ● ● ● ● ●	9/9
			238mg±0.0304
皮下注射	150 mg	○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	0/9
	200 mg	● ○ ● ● ○ ○ ○ ○ ○ ○	3/9
	250 mg	● ● ○ ● ○ ● ● ○ ○ ○	5/9
	300 mg	● ● ● ● ● ● ● ● ● ●	9/9
			225mg±0.0482
静脈注射	150 mg	○ ○ ○ ○ ○ ○	0/5
	200 mg	● ● ● ● ○ ○	4/5
	300 mg	● ● ● ● ● ●	5/5
			185mg±0.950

〔II〕 ハムスター

投与方法	投与量	毒性試験	LD 50
経口	200 mg	○ ○ ○ ○ ○ ○	0/5
	250 mg	○ ● ○ ○ ○ ○	1/5
	300 mg	● ○ ● ● ○ ○	3/5
	350 mg	● ● ● ● ○ ○	4/5
	500 mg	● ● ● ● ● ●	5/5
			296mg±0.0917
皮下注射	150 mg	○ ○ ○ ○ ○ ○	0/5
	200 mg	○ ● ○ ○ ○ ○	1/5
	250 mg	● ○ ● ● ○ ○	3/5
	300 mg	● ● ● ● ● ●	5/5
			258mg±0.309

註: ○ 生存, ● 斃死

I.N.A.H. を投与したとき死亡したどのマウスも脳に最も著変がみられ、それは脳の水腫と海綿状態及び神経細胞の変性、急性腫脹、空胞変性等が認められた。これも高度のものでは重篤な変化を示し Neuronophagie (神経喰現象) がみられた。心臓、肝臓、脾臓、腎臓には特に著変を認めない。肺臓もまた出血巣等はなく変化に乏しい。ただ小腸では腸粘膜に水腫変性を認めた (250 mg/Kg 経口投与マウス)。ハムスターでは皮下投与 (300 mg/kg) したものについて観察したが、このときの主な病変部位はマウスのときと同様、脳にみられた。脳には出血や軟化はないが中脳、間脳、海馬角の神経細胞に急性腫脹があり甚だしきものは空胞変性がみられた。心臓、脾臓、腎臓には著変を認めないが、肺臓では不全拡張が肝臓では肝細胞の腫脹と軽度の空胞変性がみられた。小腸の粘膜にはマウス同様粘膜は腫脹し上皮細胞は崩壊変性にかたむいていた (第 7 表参照)。

総括及びおひすび

8種のピリジン誘導体を基にしてヒトガタ結核菌の発育阻止力を較べたが、試みた誘導体のうちではイソニコチン酸ヒドロラジトが最も優れていた。合成培地、半合成培地を使って成るべく多数の菌種について抗菌力を試験したところこれの抗菌範囲は比較的狭く主に *Mycobacterium* に集注し、他の細菌に対する阻止力は低い。*Mycobacterium* に対する有効濃度はヒトガタ結核菌の Frankfurt, I.T.K. H37RV 株には 0.5~1 µg/cc, 同型 H₂ 株には 50 µg/cc, 好酸性菌チモテー株、トリガタ結核菌 Flaming 株には 50~100 µg/cc で結核菌でも菌型、菌株により選択的に作用した。この抗菌力も特定物質を附加するとそれと競り合いその効力は減弱した。ネズミチフス菌を使って予め検べた時はこの拮抗現象が最も鮮明に且つ強く現われたのはビタミン B₂ を溶存させたときで、この拮抗の

第7表 生体臓器親和性

区分 臓器	マウス	ハムスター
	250 mg/Kg 経口投与	300 mg/Kg 皮下注射
脳	変化最も甚だしく、脳の水腫と海綿状態が見られ、神経細胞の変性急性腫脹空胞変性等が認められ高度のものでは重篤な変化を示し Neuronophagie が見られる。間脳の大形神経細胞が最も変性が強いが、海馬角、小脳及び中脳の神経細胞も犯されている。	最も変化があるのは脳で、一般に軽度の水腫があり、神経細胞特に中脳、間脳、海馬角の神経細胞に急性腫脹があり、甚だしきものは空胞変性がある。しかし出血や軟化はない。
心臓	著変を認めない。	著度を認めない。
肺臓	出血巣なく著変を認めず。	肺に不全拡張がみられる。
肝臓	著変を認めない。	肝細胞腫脹と軽度の空胞変性がみられる。
脾臓	著変を認めない。	著変を認めない。
腎臓	著変を認めない。	著変を認めない。
小腸	粘膜の水腫変性を認める。	鬱血と水腫があり、粘膜は腫脹し上皮細胞は肥し大崩壊変性にかたむいている。

度合は I.N.A.H. の濃度を最高菌発育阻止濃度に近づけるにつれて増大してきた。これについて著明に認められたのがチオグリコール酸と亜硫酸ソーダであつた。同じように行つたニコチン酸及びメチオニンでは拮抗作用は起らなかった。しかしこの現象を結核菌として B.C.G. 株, H37RV 株, Frankfurt 株を選んで検べた時は、ビタミン B₂ では顕著な拮抗性がみられたがそのほかのものでは不明瞭で認むべき拮抗はみられなかつた。平出¹¹⁾ はニコチン酸とニコチン酸アミドについて拮抗性を検べたところ前者とは著者らと同様拮抗性を認めないが、後者ではかなり顕著に発現することを報告している。

次に生体臓器との親和性をマウス、ハムスターを基として病理組織学的にみたところ、マウス、ハムスター共に主病変臓器は脳であつて、脳の水腫と海綿状態及び神経細胞の変性、急性腫脹、空胞変性等が認められ、高度のものでは重篤な変化を示し Neuronophagie がみられた。しかし軟化や出血はみられない。その外の心臓、肝臓、脾臓、腎臓には特に著変を認めず、肺臓にも出血巣等はなく変化は乏しい。ただ腸粘膜に軽度の変性を認め注目せしめた。この I.N.A.H. は目下各方面に於て積極的な実験が基礎的にも臨床的にも厳密に行われており、今後臨床的な査定成績を基として結核治療により一層の有効法が見出されるであろう。

本研究の組織病理学的所見に関しては順天堂医科大学病理学教室主任教授の絶大なる助力を得た。特に記して同教授の御協力に対し深謝する次第である。本研究は厚生科学研究費の補助によつてなされた。科会長故近藤龍博士に深謝する。なお実験中ピリジン誘導体の試験について板井博士、桑原博士より御助力を得た。こゝに厚く感謝致します。

引用文献

1. Pansy, F., Stander, H., and Donovan, R., Am. Rev. Tbc, 65 (6), 761 (1952).
2. Mackaness, G. B., and Smith, N., Am. Rev. Tbc. 66 (2), 1 (1952).
3. Bermstein, J. William, A., Bernard, L., Steinberg A and Yale, H.L., Am. Rev. Tbc 65 (4), 357 (1952)
4. Grunberg, E and Schnitzer, R. J., Quart. Bull. Sea View, Hospital 13 (1), 3 (1952)
5. Elmendorf, M. F., Cowther, W.U., Mushenheim, C., Mc Dermott, W., and Bois, R., Am. Rev. Tbc, 65 (4), 429 (1952)

6. Robilzek, E.H., and Selikoff. I.J., *Am. Rev. Tbc.* 65 (4), 402 (1952)
7. 堂野前. 日本医事新報 1477, 11. (1952)
8. 小川. 日本医事新報 1477, 24 (1952)
9. 山田. 日本医事新報 1486, 26 (1952)
10. Benson, W.H, Stefko, P.L., and Roe. M.D., *Am. Rev. Tbc.* 65 (4), 392 (1952)
11. 平出. 科学化文新聞 410号より抜萃

Summary

Antituberculous action of 8 sorts of pyridine-derivatives including Isonicotinyl hydrazine (INAH) were compared mutually.

Among the compounds employed Isonicotinyl hydrazine showed the most excellent effect, but to other species of bacteria the effect was very low. Antagonistic phenomenon was observed between INAH and vitamin B₂ or several -SH compounds in synthetic media.

Rats or hamsters, to which INAH was administered per os, showed some pathological changes in their brain tissues.

Received October 3, 1952.

腸チフス・パラチフスワクチン被接種者血清の感染防禦力及び凝集価並びに接種時の副作用について

八田貞義, 山地幸雄, 田中弘子, 功刀 博, 平林磐夫,
山下 昇(所沢保健所)
宮川忠夫, 山田義郎(日医大衛生)

On the Protective Potency and Agglutinin Titer of Sera of Immunised with Typhoid-Paratyphoid Vaccine, and Ill-Effect Reactions at the Time of Administering Vaccine

Sadayoshi HATTA, Yūkiō YAMAZI, Hiroko TANAKA, Hiroshi KUNUGI, Iwao HIRABAYASHI, Noboru YAMASHITA, Tadao MIYAGAWA and Yoshiro YAMADA.

第1部 ワクチン被接種者の血中抗体

緒 言

腸チフス, パラチフスの予防接種は比較的古くから実地に応用されている免疫方法である。このワクチン被接種者の血中抗体の測定はこれまでも屢々試みられ, その方法としては被接種者血清の凝集価の測定及び, マウスの被働性防禦試験がある。

ワクチン接種後に血清の特異凝集価が上昇することについては, Mudd¹⁾ (1932), Horgan²⁾ (1932), 及び Gi-glioli³⁾ (1933) 等の研究があるが Gardner⁴⁾ (1929), Smith⁵⁾ (1932), Wyllie⁶⁾ (1932), Baettie 等⁷⁾ (1937) 及び Downie 等 (1942) は, この際 O 凝集価に較べて H 凝集価は高く上り, 且つ O 凝集素は速やかに血中より消失するに反して, H 凝集素は長時日残存することを認め, Topley の成書⁸⁾ (1946) には, ワクチン被接種者の腸チフス診断には H 凝集素よりも O 凝集素に意義があると記されてある。しかし乗木⁹⁾ (昭 24) は, ワクチン接種 6 ヶ月後には, 被接種者血清の凝集価は O, H ともに接種前と大差がないことを認めた。Vi 凝集素については, Clinie¹⁰⁾ (1942) によれば, 加熱石炭酸加ワクチンの皮下注射では, それは血中に概して現われない。

血清中に生ずる H, O 及び Vi 凝集素と感染防禦力との関係については, Felix 等¹¹⁻¹⁵⁾ (1934-1935) 及び Bhatnager¹⁶⁾ (1935) 等は, Vi 抗体がマウスにおける感染防禦試験においても, また喰菌試験においても効果的な防禦因子であり, O 抗体はチフス死菌の毒作用に対して防禦作用があると述べた。Topley¹⁷⁾ (1937) 及び Henderson¹⁸⁾ (1939) は, 免疫血清の抗菌作用は必ずしも Vi 凝集素の有無とは関係なく, V 型菌感染に対しては Vi 抗体と O 抗体との間に差異はなく, たゞ大量の菌が接種されたときには O 血清の防禦力は弱いと述べたが, 越後貫¹⁹⁾ (昭 12) は Topley の主張を否定している。

また三辺²⁰⁾ (昭 21) は, チフス患者の血清において, OH 凝集価の高低とマウスにおける感染防禦力との間には認むべき関係はなく, Vi 抗体はかなり著しい抗菌的作用をもっているが, この抗菌的意義は絶対的ではないという。

Grinnell²¹⁻²²⁾ (1930-1932) は, ワクチン接種後の血清凝集価の上昇を測定することは, 腸チフスワクチンの予防効果の判定に対して意義はないが, マウスはチフス菌による防禦試験には適当な動物であると述べた。感染防禦試験は, はじめは攻撃菌をそのまま用いる方法がとられたが, Nungester 等²³⁾ (1932), 及び Miller²⁴⁾ (1935) 等により, ムチンによる病原菌の毒力増強作用が明らかにされるに及び, Rake²⁵⁾ (1935) は予防注射を行った人の血清についてムチン浮遊液加腸チフス菌によるマウスの感染防禦実験を行い, ワクチン被接種者の血清に著しい発症阻止能力があることを認め, このマウス感染防禦試験は人体の腸チフス菌に対する免疫状態を察知する方法として Widal 反応にまさるものであるという。このムチン加菌液によるマウスの感染防禦試験が, ワクチンにより免疫された動物或は人の血清中の免疫の程度を測定する方法であることは Silver²⁶⁻²⁸⁾ (1936-1937) 等によつても認められた。Long-fellow 及び Luippold (1940) は, 腸チフス罹患と関係ある人及びワクチン接種 2 週間後の人の血清が, それらと関係のない人の血清と較べて著しく高い感染防禦力を有し, また腸チフス罹患及びワクチン接種と関係のない人の

血清においては、幼児は成人に較べて血清の感染防禦力が低いことを認めた。

吾々は腸チフスバチフスワクチン被接種者血清の感染防禦力を、マウスによる感染防禦試験により、ワクチン接種前、接種2週間後、10及び14ヶ月後に測定し、同時にそれらの凝集価、並びに接種時の副作用について観察したので、その大要を報告する。

実験方法

ワクチン接種前及び2週間後の血清の感染防禦試験においては、前処置としての注射血清は10倍稀釈液0.5ccを用いたが、この方法によると血清を大量要するのみならず、ワクチン注射前の血清にもかなりの感染防禦力が認められるので、接種10ヶ月及び14ヶ月後の血清の実験では、40倍稀釈液0.2ccを用いた。

30~40匹のマウスの腹腔内に、被験血清稀釈液を注射し、1~6時間後にS. typhi No. 63株の3~5%ムチン浮遊菌液の10倍階段稀釈液を0.5cc宛腹腔内注射し、注射後72時間マウスの生死を観察した。接種菌は1cc中1~10億を含む菌液を原液とし、 10^{-1} ~ 10^{-8} 稀釈液について行つた。死因の疑わしいマウスは、その心血を所定の確認培地に平板塗抹培養し、死因がチフス菌血症であるか否かを確かめた。

対照には血清の代りに生理食塩水を注射した。血清の感染防禦力は、 $\left[\text{感染防禦指数} = \log \frac{\text{LD}_{50}(\text{P})}{\text{LD}_{50}(\text{C})} \right]$ (但し、 $\text{LD}_{50}(\text{P})$: 血清により処置されたマウスの LD_{50} , $\text{LD}_{50}(\text{C})$: 対照マウスの LD_{50}) であらわした。

OH凝集反応は、抗原はS. typhi H 901Wの18時間ブイヨン培養を用い、血清は5~1,250倍の9本の倍数稀釈列とし、各稀釈液0.5ccに抗原を0.5cc宛混合した。判定は37°C、2時間保温後、及び1夜室温に放置したものである。

実験成績

実験に供したワクチン被接種者を及び接種方法を述べると次の通りである。

- 1) 毛呂精神病院患者、10名、41.9才(28—54才)、再接種、皮内注射0.1cc、1回。
- 2) 同上患者、10名、36.5才(21—50才)、再接種、皮下注射、1.0cc、1回。
- 3) 所沢小学校学童及び児童福祉施設収容児、17名、11.5才(7—19才)、初接種、皮内注射、0.1cc、3回。
- 4) 同上学童及び収容児、10名、10.2才(6—15才)、初接種、皮下注射、0.4cc、3回。
- 5) 同上学童、26名、9.1才(7—12才)、再接種、皮内注射、0.1cc、1回。

ワクチン接種前及び接種2週間後の血清は、実験の都合上、数件の血清を混和して実験に供した。

実験の結果得られた各々の平均値に推計学の公式²⁹⁾により検討を加え、次の事を認めた。

ワクチン接種前及び2週間後の血清についての結果は第1表に示すとおりである。毛呂病院の成人患者に再接種を行つた例では、接種前後の感染防禦力に有意の差は認められなかつた。所沢小学校学童に皮内注射により再接種を行つた例では、成人に較べて接種前後とも感染防禦力は低く、且つワクチン接種前後に有意の差を認めることはできなかつた。児童福祉施設収容児及び学童に初接種を行つたときには、接種2週間後に、接種前に較べて感染防禦力の上昇が認められた。以上を度数分布表で示すと、第2表のとおりである。

ワクチン接種後10ヶ月及び14ヶ月の血清の感染防禦力並びに凝集価は、第3表に示すとおりである。毛呂病院の成人患者に皮内或は皮下注射により再接種を行つた場合には、感染防禦力及び凝集価は、14ヶ月後には10ヶ月後に較べて低下していた。そして皮内注射と皮下注射の場合とを比較すると、10ヶ月後には両者の間に有意の差はなく、14ヶ月後には皮下注射をした人の血清の感染防禦力は、皮内注射をした人のそれに較べて低かつた。しかしいずれにしても、接種14ヶ月後の血清の感染防禦力は対照と大差がない。以上の成績を度数分布表で示すと、第4、5表のとおりである。

所沢小学校学童に皮内注射によりワクチンの再接種を行つた例では、10ヶ月後でも血清の感染防禦力は、再接種を行つた成人並びに初接種を行つた小児のそれに較べて低いが、14ヶ月後には10ヶ月後に較べて感染防禦力は更に低下していた。このこと及び前述の接種直前並びに接種2週間後の血清についての実験成績から考えて、小児では再接種1回注射のみでは、免疫効果はあまり期待できないと認められる。

Table 1.
The Protective Potency of Sera before and 2 Weeks after the Immunisation

Group		Method of Injection	Average of Protective Index*		Significance of Difference between Before and 2 Weeks After
			Before	2 Weeks After	
Adults	Re-Immunisation	Intra- or Subcutaneous	2.10	2.72	Not Significant
Children	Re-Immunisation	Intracutaneous	1.85	1.88	Not Significant
Children	First Immunisation	Intra- or Subcutaneous	1.47	2.13	Significant

* (Protective Index) = $\log \frac{LD_{50}(P)}{LD_{50}(C)}$. $LD_{50}(P)$: LD_{50} of Mice which were treated previously by Serum. $LD_{50}(C)$: LD_{50} of Control Mice.

Table 2.
Frequency Distribution of Protective Index of Sera before and 2 Weeks after the Immunisation

Protective Index	Before	2 Weeks After
0		
0.1—0.5	1	
0.6—1.0	1	
1.1—1.5	3	1
1.6—2.0	5	6
2.1—2.5	6	5
2.6—3.0	1	4
3.1—3.5		1

皮内及び皮下注射による初接種を、所沢小学校学童及び児童福祉施設収容児に行つた例では、皮内及び皮下注射の間では 10 ヶ月後には皮内注射によつたときの方が感染防禦力はやゝ大きい、14 ヶ月後では両者の間に差は認められなかつた。また 14 ヶ月後には 10 ヶ月後に較べ、被接種者の血中抗体価は皮下注射をした小児の H 凝集価の場合を除き、著しく低くなつていた。即ち小児の初接種では皮内注射と皮下注射との間に、その免疫効果に大差はなく、また 14 ヶ月後の感染防禦力はいずれの場合にも対照と大差がない程に下つてゐる。ワクチン被接種小児の 10、14 ヶ月後の血清についての実験成績を度数分布表で示すと、第 6、7 表のとおりである。

上の全例について、O 凝集価と感染防禦指数との相関を Pearson の式により検討してみると、成人ではその相関比は 0.3 であつて著しい相関は認められず、小児では 0.775 であつて、O 凝集価と感染防禦力との間にかなりの相関が認められた。

感染防禦試験に耐過生残したマウスの肝、脾、腎につき攻撃 7 日後に培養試験を行つたところ、 $10^{1.6 \sim 3.8} \times LD_{50}$ の菌量に耐過した対照マウスではその全例において、 $10^{0.2} \times LD_{50}$ に耐過したものでは約半数のマウスにおいてチフス菌が検出されたが、血清により防禦されて $10^{3.3} \times LD_{50}$ の菌量に耐過したマウスにおいては、チフス菌の検出されたものは一匹も認められなかつた。Topley³⁰⁾ (1929) は、ワクチンによる免疫により有毒鼠チフス菌の腹腔内注射に耐過したマウスの半数が、脾に菌をもつていたと述べ、また松本³¹⁾ (昭 24) は、マウスに免疫血清を注射してから 100M.L.D のチフス菌ムチン浮遊液を注射しても、注射 1 分後の腹腔内の菌数は、免疫血清を注射しない対照に

較べて著るしく少なく、且つその後時間の経過と共に腹腔の菌数は減少して、心血中に菌が現われないことから、免疫血清の防禦作用は腹腔内の菌の増殖を妨げ、菌を死滅に導くためであると推論した。これは吾々の実験成績と共に、被働性防禦と自動性防禦との機転の相違を実証しているといえよう。

Table 3

Protective Potency and Agglutinations Titer of Sera 10 and 14 Months after the Immunisation

Group	Method of Injection	Averages of Protective Index and Agglutinations Titer						Significance of Differences between 10 Months and 14 Months after	
		Protective Index		O. Aggl.		H. Aggl.			
		10 Months After	14 Months After	10 Months After	14 Months After	10 Months After	14 Months After		
Adults	Re-Immunisation	Intra-cutaneous	1.79	0.64	130×	94×	80×	42×	Significant
Adults	Re-Immunisation	Sub-cutaneous	2.11	-0.47	128×	54×	62×	30×	Significant
Children	Re-Immunisation	Intra-cutaneous	0.95	-0.04	120×	36×	40×	<23×	Significant
Children	First-Immunisation	Intra-cutaneous	1.52	0.56	130×	40×	70×	36×	Significant
Children	First-Immunisation	Sub-cutaneous	1.39	0.5	240×	80×	68×	80×	Significant except H. Aggl. Titer

Table 4.

Frequency Distribution of Protective Index of Sera in Adults 10 Months and 14 Months after the Immunisation

Protective Index	Re-Immunisation Intracutaneous		Re-Immunisation Subcutaneous	
	10 Months After	14 Months After	10 Months After	14 Months After
-2.1 - -1.6				1
-1.5 - -1.0				
-0.9 - -0.5				5
-0.4 - 0		2	1	1
0.1 - 0.5		2		3
0.6 - 1.0	1	3		
1.1 - 1.5	4	3	2	
1.6 - 2.0	1		4	
2.1 - 2.5	2			
2.6 - 3.0	1		1	
3.1 - 3.5				
3.6 - 4.0				
4.1 - 4.5			2	

Table 5

Frequency Distribution of Agglutinations Titer of Sera in Adults 10 Months and 14 Months after the Immunisation

Group Agglutinations Titer	Re-Immunisation Intracutaneous				Re-Immunisation Subcutaneous				
	10 Months After		14 Months After		10 Months After		14 Months After		
	O	H	O	H	O	H	O	H	
10×				2					3
20×			1	4			2		2
40×		2	3		1	5	3		3
80×	3	5	2	3	2	3	4		1
160×	4	1	4		6	1			
320×	1								

Table 6

Frequency Distribution of Protective Index of Sera in Children 10 Months and 14 Months after the Immunisation

Group Protective Index	First Immunisation Intracutaneous		First Immunisation Subcutaneous		Re-Immunisation Intracutaneous	
	10 Months After	14 Months After	10 Months After	14 Months After	10 Months After	10 Months After
-1.4 - -1.0		2				
-0.9 - -0.5					2	3
-0.4 - 0		2		2	1	10
0.1 - 0.5	2	1	1	1	4	5
0.6 - 1.0	2	3	2	2	3	2
1.1 - 1.5	3	5	3	2	3	
1.6 - 2.0	3	1	1		5	
2.1 - 2.5	3		1		1	
2.6 - 3.0			1			

Table 7.

Frequency Distribution of Agglutinations Titer of Sera in Children 10 Months and 14 Months after the Immunisation

Group Agglutinations Titer	First Immunisation Intracutaneous				First Immunisation Subcutaneous				Re-Immunisation Intracutaneous			
	10 Months After		14 Months After		10 Months After		14 Months After		10 Months After		14 Months After	
	O	H	O	H	O	H	O	H	O	H	O	H
10×				3						1	5	10
20×		1	5	4				4		5	6	5
40×		5	5	3		2	4	1	3	10	5	5
80×	6	3	3	3	1	5	2	2	9	3	3	1
160×	4	2			1		2	1	5			
320×	1				4				2			

む す び

ワクチン接種前及び接種 2 週間、10ヶ月、及び 14 ヶ月後の人の血清について、その感染防禦力、凝集価を測定し次の結果を得た。

- 1) ワクチン接種前及び接種 2 週間後の血清の感染防禦力は、注射された血清の量が多きにすぎたためか、成人及び小児の再接種の場合には、ワクチン接種前後に差はなかつた。小児の初接種の場合にはワクチン接種前後に差を認めた。そして小児の血清は一般に成人のそれに較べて、感染防禦力が低い。
- 2) ワクチン接種 10、及び 14 ヶ月後の血清においては、後者の抗体価は前者に較べて低下しており、14ヶ月後の血清の感染防禦力は対照と大差がない。
- 3) 凝集価は H が O に較べて高く、且つ長日月残存するということは認められなかつた。
- 4) ワクチン接種の方法として、皮内と皮下注射とでは、その感染防禦抗体生成能に大差はない。
- 5) 小児に 1 回注射の再接種を行つても、感染防禦抗体の生成はあまり期待できない。

第 2 部 ワクチン接種時の副作用

新制腸チフスパラチフスワクチン³²⁾ 接種時の副作用については、乗木³³⁾ (昭 23) の報告があり、それには新制ワクチンによる反応は旧標準ワクチンのそれに較べて強いが、0.1cc 三回皮内注射法では、ツベルクリン反応陽転者、虚弱児童等に対しても、大なる反応を示さないと記されてある。吾々は前述の実験におけるワクチン被接種者において、次の副作用を認めた。

副作用の有無については、第 8 表に示した。即ち皮下注射を 25 才以上の成人に行つた際には、10名中 9名は何等かの副作用を訴え、24才以下の被接種者では 3 回の注射に毎回 10 名中全員に副作用がみられた。皮内注射を 1 回行つたときには、14才以下の小児は 36 名中 1 名に、25 才以上の成人では 10 名中全員に副作用が訴えられた。皮内注射を 3 回行つた場合には、14 才以下では 16 名中約半数、15~24 才では被接種者 2 名共、副作用を訴えた。皮内注射を 1 回行つた所沢小学校の学童に副作用が非常に少いのは、同校養護訓練の何等かの過誤によるものと、一応疑われるが、その群を除外するも皮下注射は皮内注射に較べ、副作用出現の頻度は高い。

副作用の詳細については第 9 表に示した。副作用を全身反応と局所反応とに分けて考えると、皮下及び皮内注射のいずれの場合にも局所反応は全身反応の 6~7 倍の頻度起つている。全身反応を更に細目に分けると、悪感、皮内及び皮下注射に同じ位の頻度起つているが、皮下注射の際には発熱、全身倦怠が悪感と同じ位の人数にみられたのに反して、皮下注射では発熱、全身倦怠は悪感を訴えた人数よりかなり少ない。従つて全身反応は、皮内注射では皮下注射よりも軽いといえる。食慾不振を訴えた例は皮内及び皮下注射いずれの場合にも少なく、皮内注射に際しての全身倦怠と同じ位の頻度であつた。臥床、休業を要するような重い副作用はなかつた。そして皮内及び皮下注射を 3 回行つた人において、3 回目に全身反応を呈した例は 1 例もなかつた。

局所反応について述べると、皮下注射では殆ど全例において発赤、腫脹があり、疼痛、硬結がこれに次ぎ、リンパ腺腫脹は殆ど起らなかつた。皮内注射でも皮下注射と同様、発赤、腫脹が最も多く、疼痛、硬結がこれに次ぐが、それらを訴えた人の全被接種者に対する割合は皮下注射の際よりも低く、また皮内注射ではリンパ腺の腫脹はみられなかつた。

Table 8
Secondary Reaction of Typhoid-Paratyphoid Vaccine

Injection	Subcutaneous						Intracutaneous								
	0.4cc x 1			0.4cc x 3			0.1cc x 1			0.1cc x 3					
	<14	15~24	25<	<14	15~24	15~24	<14	15~24	25<	<14	15~24	15~24			
Secondary Reaction	First	Se- cond	Third	First	Se- cond	Third	First	Se- cond	Third	First	Se- cond	Third			
+	9	9	9	1	1	1	1	1	1	10	8	8	2	2	2
-	1						35				8	8	6		
Total	10	9	9	9	1	1	36	10	16	16	14	2	2	2	2

Table 9
Detail of Ill-Effects Reactions

Injection	Subcutaneous						Intracutaneous								
	0.4cc x 1			0.4cc x 3			0.1cc x 1			0.1cc x 3					
	<14	15~24	25<	<14	15~24	15~24	<14	15~24	25<	<14	15~24	15~24			
Detail of Reaction	First	Se- cond	Third	First	Se- cond	Third	First	Se- cond	Third	First	Se- cond	Third			
Chill	3	1	1	1	1	1				2	4	1			
Pyrexia	4	1	1	1	1	1	1	1	2						
Fatigue	4	1	1	1	1	1	1	1		1	1				
Anorexia	3								1	2					
Serious Illness															
Erythema	9	9	9	9	1	1	1	1	10	8	8	8	2	2	2
Swelling	9	9	9	7	1	1	1	1	6	6	8	8	2	2	1
Pain	8	8	5	2	1	1	1	1	4	6	4		1	2	
Induration	3	8	6	2	1	1	1	1	3	5	5	3	1		
Swelling of Lymphatic Gland	1	1													

Reactions of Whole Body

Reactions at the Part Injected

む す び

- 1) ワクチン接種時の副作用は、全身、局所共に皮内注射は皮下注射よりも軽い。
- 2) 局所反応は、年少者の方が軽いようであつたが、全身反応は年令による差異は認められない。

終りに御鞭達、御指導を与えられた本研究科会長小島三郎博士に深謝する。

本研究は文部省科学研究費の補助によりなされた。

この論文の要旨は第7回日本公衆衛生学会(昭27)において口演された。

引 用 文 献

- 1) Mudd, S. : J. Immunol. **23**, 81, (1932).
- 2) Horgan, E.S. : J. Hyg. **32**, 523, (1932).
- 3) Giglioli, G. : J. Hyg. **33**, 387, (1933).
- 4) Gardner, A.D. : J. Hyg. **28**, 376, (1929).
- 5) Smith, J. : J. Hyg. **32**, 143, (1932).
- 6) Wyllie, J. : J. Hyg. **32**, 375, (1932).
- 7) Baettie, C.P. and Elliot, G.S. : J. Hyg. **37**, 36, (1937).
- 8) Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity. 3d. Ed. (1946). London, Edward and Arnold & Co.
- 9) 乗木 : 日医大誌, **16**, 204-209, (昭24).
- 10) Climie, H. : J. Hyg. **42**, 411, (1942).
- 11) Felix, A. and Pitt, R.M. : J. Path. Bact. **38**, 409, (1934).
- 12) Felix, A., Bhatnager, S.S. and Pitt, R.M. : Brit. J. Exp. Path. **15**, 346, (1934).
- 13) Felix, A. and Pitt, R.M. : Lancet, ii, 186, (1934).
- 14) Felix, A. and Pitt, R.M. : J. Hyg. **35**, 428-436, (1935).
- 15) Felix, A. and Bhatnager, S.S. : Brit. J. Exp. Path. **16**, 422, (1935).
- 16) Bhatnager, S.S. : Brit. J. Exp. Path. **16**, 375, (1935).
- 17) Topley, W.W.C. et al. : Lancet, i, 252, (1937).
- 18) Henderson, D.W. : Brit. J. Exp. Path. **20**, 1, (1939).
- 19) 越後貫 : 細菌誌, 497, 480, (昭12).
- 20) 三辺 : 医学と生物学, **9**, 248-250, (昭21).
- 21) Grinnell, F.B. : J. Immunol. **19**, 457-464, (1930).
- 22) Grinnell, F.B. : J. Exp. Med. **56**, 907-918, (1932).
- 23) Nungester, W.J., Wolf, A.A. and Jourdonais, L.F. : Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. **30**, 120-121, (1932).
- 24) Miller, C.P. : Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. **32**, 1136-1138, (1935).
- 25) Rake, G. : Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. **32**, 1175-1178, 1523-1524, (1935).
- 26) Silver, J.F. : Am. J. Publ. Heal. **26**, 219-228, (1936).
- 27) Silver, J.F. : Am. J. Publ. Heal. **27**, 142-151, (1937).
- 28) Silber, J.F. : Am. J. Publ. Heal. **29**, 95-103, (1937).
- 29) 埴山 : 少数例の纏め方と実験計画の立て方, 33-47, (昭24), 河出書房.
- 30) Topley, W.W.C. : Lancet, i, 1337, (1929).
- 31) 松本 : 日大医誌, **8**, 26-31, (昭25).
- 32) Minimum Requirements of Biologic Products. (1952), Ministry of Health and Welfare Japan. Gov.
- 33) 乗木 : 衛試, **66**, 213-218, (昭23).

Summary

20 adults and 64 children were immunised with the Typhoid-Paratyphoid Vaccine intra- or subcutaneously. The antibody contents of the sera secured from these individuals were measured through the use of agglutination and mouse protection tests, at 4 occasions, that is before the immunisation, 2 weeks, 10 months and 14 months thereafter. The ill-effect reactions at the time of administering vaccine were observed. The results were as follows :

1) No significant difference of protective potencies was observed between the sera taken before the immunisation and that of 2 weeks after the immunisation in reimmunised individuals it might be the cause of this unexpected results, that the quantity of injected sera to mice were too much. In cases of reimmunisation on adults and children, no differences of protective potencies were seen, whereas in case of children, who had been non-immunised to typhoid or gave no history of attacks of the disease, the protective potency of the sera, secured 2 weeks after the immunisation, were greater than that of the sera secured before the immunisation. At the same time, it was pointed out that the protective potency of sera, secured from children, were generally inferior than that from adults.

2) The sera of immunised adults taken 14 months after the immunisation showed smaller amount of antibody contents than that taken 10 months after the immunisation. In the sera taken 14 months after the immunisation of individuals tested, the protective potencies were hardly observed in our experimental method.

3) We did not recognise, that the titers of H agglutinins were higher and more persistent than that of O agglutinins in the sera vaccinated.

4) According to the method, there were no differences between the subcutaneous and intracutaneous injections to get the ability of making protective potencies.

5) In case of children, it is hardly expected, that the reimmunisation with a single subcutaneous injection of the vaccine give the protective potency in sera.

6) In respect of ill-effects of vaccination of human body either whole or a part, the intracutaneous injection showed less reactions than the subcutaneous injection.

7) It was proved that younger man showed the slight partly reactions, but there was no differences of whole bodily reactions by age.

Received September 30, 1952

フラン誘導体のレプトスピラに対する作用

(実験的感染モルモットにおける作用)

山地 幸雄, 平林 馨夫

On the Action of Nitrofurantoin Derivatives against *Leptospira* with Special Reference to the Effect of the Drugs on the Guinea-Pigs Infected with *Leptospira icterohaemorrhagiae*.
By Yukio YAMAZI and Iwao HIRABAYASHI

まえがき

レプトスピラ症の治療法については種々の研究があるが、近年に至るまで効果的な化学療法剤はみべきものがなく、血清療法が一般に行われて来た。然るに 1940 年 ペニシリンが画期的な化学療法剤として認められ¹⁾、次でストレプトマイシン²⁾、クロロマイセチン³⁾、オーレオマイシン⁴⁾、テラマイシン⁵⁾等の抗生物質が報告されるに及び、これらのレプトスピラ症に対する効果についても検討が加えられた。

ペニシリンのレプトスピラに対する作用については多くの報告があり、ペニシリンがワイル病に有効なことは、一般にも認められている。ストレプトマイシンについては、Heilman⁶⁾、操等⁷⁾が *in vitro* 及び *in vivo* で有効であると述べた。クロロマイセチンについては Long 等⁸⁾ は不明であるというが、操等⁷⁾ は本剤が臨床的に期待されるとする。池見等⁹⁾ はオーレオマイシンによるレプトスピラ症感染動物の治療実験を行い、本剤による生存率が 12.5% であると述べた。また北岡等¹⁰⁻¹¹⁾ はこれら抗生物質が、いずれもレプトスピラに対し *in vitro* で有効であつて、その効力はストレプトマイシン>テラマイシン>オーレオマイシン>クロロマイセチンの順であり、そして実験的感染モルモットにおいて発熱期から治療が開始されれば、オーレオマイシン及びテラマイシンはモルモットを死から救うことが出来ると報じた。

フラン誘導体のレプトスピラに対する *in vitro* の作用については、既に山地¹²⁾ の報告がある。それによるとフラシリン、グアノフラシリン、Z-フランの完全発育阻止濃度は 3~10 mg% で、その順序はグアノフラシリン>フラシリン>Z-フランの順である。これまでの研究者の報告によると、フラシリン或はグアノフラシリンの内服或は静注後の血中濃度は、0.5~1.5 mg% であつて、前記のレプトスピラの発育阻止濃度に至らないが、化学療法剤の効果発現には必ずしも病原体の発育を阻止する血中濃度の維持が必要でないことが、肺炎、梅毒、結核等においていわれているので、今回は実験的レプトスピラ症罹患モルモットにおけるフラン誘導体の効果を検討してみた。

実 験

供試有毒レプトスピラ株は東京都内で捕獲された家鼠から分離された *L. icterohaemorrhagiae* を、実験動物としてはモルモットを用いた。動物への接種は、黄疸を發して死亡したモルモット肝臓の生理食塩水乳剤を 2,000 r.p.m. 15 分間遠沈した上清を、腹腔内に注射する方法によつた。

使用薬剤は、さきに試験管内実験¹²⁾ で使用したと同じく、フラシリン、グアノフラシリン塩酸塩及び Z-フランである。これらは 0.5 cc 中に 1 回の投与量を含有するように蒸留水で稀釈され、腹腔内注射により投与された。

実験 1: これら薬剤を腹腔内注射した際のモルモットに対する毒性を知るため、フラシリン及び Z-フラン 1 mg, グアノフラシリン 10 mg, 20 mg, 及び 30 mg を午前、午後の 2 回に分けてモルモットの腹腔内に 7 日間連続注射したところ、第 1 表に示すようにフラシリン及び Z-フラン 1 mg, 並びにグアノフラシリン 10 mg ではモルモットに何等の変化も現われず、グアノフラシリン 20 mg では、6 日後に体重の甚だしい減少を來したが、投与期間中斃死したものはなかつた。グアノフラシリン 30 mg 毎日注射により、モルモットは 4 日後に体重が減少し、7 日後に斃死した。

実験 2: これらの薬剤をモルモットに注射した際の血中濃度は、重層法によつて測定したところ、第 2 表に示すようにフラシリンの方が血中濃度は一般にグアノフラシリンに比べて高く、また両者共 3 時間後には重層法では検出されなかつた。

Table 1.
Toxicity of Nitrofurán Derivatives against
Guinea-Pigs

Drug	Daily Dosis	No. of G. P.	Significant Decrease of Weight	Death
Furacin	1 mg	18	—	—
Z-Furan	1 mg	22	—	—
Guanofuracin-HCL	10 mg	21	—	—
	20 mg	19	6 Days	(9 Days)
	30 mb	20	4 Days	7 Days

(The drugs were administered twice a day successively during 7 days.)

Table 2.
The Concentration of Nitrofurán Derivatives in the Guinea-Pigs' Blood after the Intraperitoneal Administration of the Drugs.

Drug		hrs after the Administration			
		$\frac{1}{2}$	1	2	3
Furacin	0.5 mg	0.7 mg%	0.6 mg%	0.4 mg%	0 mg%
Guanofuracin-HCL	0.5 mg	0.1 mg%	0.4 mg%	0.4 mg%	0 mg%
	5 mg	0.5 mg%	0.5 mg%	0.4 mg%	0 mg%

実験3: 家鼠より分離後モルモットに6代累代され $LD_{50}=10^{-3.0}$ の毒力を有する株の100 LD_{50} を、12匹のモルモットに接種し、眼結膜が充血を呈した日から1~7日間、前記の薬剤を午前午後の2回に注射した。その成績は第3表に示すように、対照モルモットは全部死亡したが、フランシン1mg、グアフランシン1mg 或は5mgを注射されたモルモットは生残し、Z-フランシン1mgを注射されたモルモットは2匹のうち1匹生残したが、グアノフランシン10mg 或は20mgを注射されたモルモットは死亡した。

この結果は、Z-フランシンのレプトスピラに対する *in vitro* の効果が低いこと¹²⁾ と関係があろう。またグアノフランシンを大量注射した際に、モルモットを救い得なかつたことは、薬剤の毒性のためと考えられないこともない。

実験4: 上のレプトスピラ株を、モルモットに更に数代累代して、 $LD_{50}=10^{-4.5}$ となし、モルモットに対する起病力をより安定させた株の約300 LD_{50} をモルモットに接種し、接種2日後或は眼結膜が充血を呈した日より、さきの実験と同じ要領で薬剤を注射したところ、第4表に示すように、死をまぬがれたものは1匹もなかつた。

実験5: フランシン或はグアノフランシンを腹腔内注射した際の血中濃度が、3時間後には殆ど零になることから、1日量フランシン4mg、或はグアノフランシン10mgを、8回に分けて3時間間隔で接種2日後より、モルモットに注射したが、やはりモルモットを死から救うことはできなかつた。

実験6: 実験4においてレプトスピラ接種2日後より毎日フランシン1mg、或はグアノフランシン10mgを注射されたモルモットの肝乳剤を、次のモルモットに接種し、更にフランシン、グアノフランシンを接種翌日より夫々1mg、10mg注射したところ、第2代の動物も黄疸を発生して死亡した。この第2代動物の発熱期の心血、或は死亡後の肝より分離されたレプトスピラについて、フランシン及びグアノフランシンに対する *in vitro* の感受性を検したところ、

第 5 表に示すように、耐性株の出現はみられず、ただモルモット体内においてグアノフラシンに曝露された株が、フラシンに対してやや感度性が低くなつてゐることを認めた。この際のフラン誘導体の抗菌価が、一般にさきの実験¹²⁾ に比べて高いのは、さきの実験においては数回の実験結果のうち最も低い値をとつたことと；今回は判定を肉眼で行つたためによる、と考えたい。

Table 3.

Therapeutic Effect of Nitrofuran Derivatives in Guinea-Pigs infected

with 100 LD₅₀ of the *Lepotospira Icterohaemorrhagiae*,

Which has the LD₅₀ of 10^{-3.0}.

Drug	Daily Dosis	No. of G. P.	Days after the Challenge										
			5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
Furacin	1 mg	55	W.	⊖ 340	⊖ 340	⊖ 325	⊖ 345	⊖ 340	⊖ 355	⊖ 345	⊖ 345	⊖ 345	⊖ 320
		56	W.	⊖ 425	⊖ 415	⊖ 400	⊖ 395	⊖ 400	⊖ 395	⊖ 355	⊖ 365	⊖ 380	⊖ 380
Guanofuracin-HCl	1 mg	52	W.	⊖ 325	⊖ 305	⊖ 280	⊖ 300	⊖ 300	⊖ 320	⊖ 295	⊖ 300	⊖ 320	⊖ 320
		59	W.	⊖ 425	⊖ 400	⊖ 405	⊖ 385	⊖ 375	⊖ 365	⊖ 380	⊖ 365	⊖ 350	⊖ 355
	5 mg	60	W.	⊖ 465	⊖ 480	⊖ 465	⊖ 455	⊖ 430	⊖ 385	⊖ 355	⊖ 350	⊖ 345	⊖ 340
	10 mg	45	W.	⊖ 515	⊖ 505	⊖ 500	⊖ 490	⊖ 430	⊕ 390	● 360			
	20 mg	46	W.	⊖ 365	⊖ 355	⊖ 315	⊕ 300						
Z-Furan	1 mg	47	W.	⊖ 440	⊖ 420	⊖ 425	⊖ 385	⊕ 350	⊕ 325	● 315			
		61	W.	⊖ 390	⊖ 365	⊖ 370	⊖ 380	⊖ 385	⊖ 355	⊖ 365	⊖ 385	⊖ 340	⊖ 330
Control		49	W.	⊖ 355	⊖ 310	⊕ 295							
		57	W.	⊖ 370	⊖ 350	⊖ 335	⊖ 380	⊖ 410	⊖ 365	⊖ 305	⊕ 305	● 295	
		58	W.	⊖ 475	⊖ 450	⊖ 465	⊖ 415	⊖ 380	⊕ 355	● 305			

Drugs were administered twice a day at the days which were surrounded with the thick frame in this table.

○: no finding. ⊖: Hyperemia. ⊕: Jaundice. ●: Death. W. Weight. g.

Table 4.

Therapeutic Effect of Nitrofuran Derivatives in Guinea-Pigs infected with 300 LD₅₀ of the *Leptospira Icterohaemorrhagiae*, Which has the LD₅₀ of 10^{-4.5}.

Drug		Daily Dosis No. of G.P		Days after the Challenge											
				2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Furacin	1 mg	117	T.	39.4	39.7	40.1		40.1	40.7	38.0					
			W.	375	375	340	⊖	345	345	300	●				
		118	T.	39.0	39.4	39.4		40.5	39.6	36.0					
			W.	410	415	410	⊖	380	370	355	●				
	115	T.	39.2	39.5	39.1		40.0	38.8							
		W.	365	365	375	⊖	330	335	305						
	114	T.	39.3	39.5	39.8		39.8	37.8							
		W.	325	345	345	⊖	340	300	270						
Guanofuracin-HCl	1 mg	125	T.	38.6	40.0	39.6		40.5	40.1	39.6					
			W.	375	395	410	⊖	400	385	340	●				
		130	T.	39.2	39.2	39.2	○	39.0	40.6	40.0	40.6	40.2	38.3		●
	W.		375	400	385		390	390	365	367	330	290			
	131	T.	39.2	39.3	39.2		40.2	36.2							
		W.	415	435	440	⊖	400	340	355						
	10 mg	147	T.	39.4	39.2	○	40.5	37.1	⊕●						
			W.	415	405		415	360	345						
150		T.	39.5	39.5	⊖	40.1	39.6	38.5							
	W.	400	400		405	380		●							
146	T.	39.2	39.8	○	40.0	39.8	36.6								
	W.	405	420		395	370	330	●							
Z-Furan	1 mg	136	T.	39.2	39.1	39.8		40.3	38.9						
			W.	480	485	495	○	435	415	⊕●	405				
		134	T.	39.3	39.8	39.4		39.0		●					
	W.		345	340	335	⊖	265	260							
	137	T.	39.3	39.4	39.4		39.4	39.1							
		W.	380	395	390	⊖	360	345	●						
Control	110	T.	39.1	39.6	39.5		36.4								
			W.	420	440	455	⊖	410	405						
		111	T.	39.3	39.3	39.6		40.3	40.1	38.6	35.0				
			W.	365	415	400	⊖	405	380	335	305	300			
	113	T.	39.6	39.4	40.2		40.1	39.2							
		W.	340	345	345	⊖	340	345	351						
	122	T.	38.9	39.2	39.0		36.7								
		W.	375	400	400	⊖	345	340							

Drugs were administered twice a day at the days which were surrounded with the thick frame in this table.

○: no finding. ⊖: Hyperemia. ⊕: Jaundice. ●: Death. W: Weight, g.
T: Temperature, °C.

Table 5.
Minimum Concentration of Nitrofurán Derivatives showing the Inhibition
of *L. icterohaemorrhagiae*, Which was exposed to the Drugs in vivo.

Strain	Drug	Furacin	Guanofuracin-HCl
Cultured in Korthoff's Medium Successively	W		0.6 mg%
Isolated from Control G. P.	170-2	0.6 mg%	
	170-3	0.6 mg%	0.3 mg%
Isolated from G. P. administered with Furacin	158-3	0.6 mg%	
Isolated from G. P. administered with Guanofuracin-HCl	173-1	0.3 mg%	
	174-3	0.3 mg%	0.3 mg%

む す び

吾々はフランシ、グアラフランシ、及び Z-フランの、実験的感染レプトスピラ症に対する効力を、モルモットを実験動物として検した。モルモットに数代累代されただけで、モルモットに対する病原性のあまり安定していない株を、100 LD₅₀ 接種した際には、対照動物は全部死亡したが、いくつかのモルモットは、上記薬剤により死をまぬがれた。この株をモルモットに更に 10 数代累代して強毒とした株の 300 LD₅₀ を接種した際には、これら薬剤を接種 2 日後より毎日注射してもモルモットを死から救うことはできなかった。

Schmidt 等¹³⁾は、ペニシリン治療を行いながらマウスに肺炎菌を継代すると、7 代で耐性が 4 倍になったと述べた。Spink 等¹⁴⁾はペニシリン治療に際しての、*St. viridans* の in vivo の耐性発現について報じている。Gezon 等¹⁵⁾はマウス及び孵化鶏卵培養において、ペニシリンを治療量以下に投与しても、A 群溶連菌は in vivo の耐性を生じないが、B, C 群溶連菌では鶏卵培養において、ペニシリン耐性の発現をみたすと述べ、Hartman 等¹⁶⁾は猩紅熱患者よりの A 群溶連菌において、ペニシリン治療の前後にペニシリンに対する感受性の差を認めなかった。吾々はフラン誘導体に対する in vivo の耐性発現の有無を、レプトスピラ感染モルモットについて実験したが、明らかな耐性発現を認めることはできなかった。但し、薬剤注射動物における継代を更に重ねた際の結果は今後の実験にまたなければならぬ。

終りに、御指導を与えられた恩師八田博士、並びに実験に協力された田中弘子氏に深謝する。

この論文の要旨は、第 21 回日本衛生学会 (昭 26) において口演された。

引用文献

- 1) Chain, E., et al.: Lancet, **239**, 226~228 (1940).
- 2) Shaltz, A., Bugie, E. and Waksman, S.A.: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. **55**, 66-69 (1944).
- 3) Ehrlich, J., Bartz, Q. R., Smith, R. M., Joslyn, D. A. and Barkholder, P. R.: Science, **106**, 417 (1947).
- 4) Dugger, B. M., et al.: Ann. N. Y. Acad. Sci., **51**, 175 (1948).
- 5) Finlay, A. C., et al.: Science, **111**, 85 (1950).
- 6) Heilman, F. R.: Proc. Staff. Meet. Mayo. Clinic, **20**, 169~176 (1945).
- 7) 操, 外.: 臨床と研究, **27**, 822~826 (1950).
- 8) Long, P. H., Chandlar, C. A., Bliss, E. A., Bryer, M. S. and Shoenbach, E. B.: J. A. M. A. **141**, 315 (1949).

- 9) 池見, 松田, 富谷: J. Antibio. 4, 383~384 (昭26).
- 10) 北岡, 井上, 小林, 堀田: 日本細菌誌. 6, 359~363 (昭26).
- 11) 北岡, 井上, 小林: 日本細菌誌. 6, 419~442 (昭26). 6, 415~418 (昭26). 7, 1~8 (昭27).
- 12) 山地: 衛試. 69, 118~123 (昭26).
- 13) Schmidt, L. H. and Sesler, C. L.: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 52, 353 (1943).
- 14) Spink, W. W. and Ferris, V.: J. Clin. Invest., 26, 379 (1947).
- 15) Gezon, H. M. and Collins, G. R.: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 69 312~314 (1948).
- 16) Hartman, T. L. and Weinstein, L.: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 69, 314~316 (1948).

Summary

We tested the effects of Furacin, Guanofuracin and Z-Furan against the experimental Leptospirosis of guinea-pigs. When guinea-pigs were challenged with 100 LD₅₀ of a relatively lower virulent strain of *Leptospira*, which had been passed through several guinea-pigs successively, six out of nine of infected animals were protected from developing the disease by administering these drugs twice a day successively, if the administration was initiated from the day when guinea-pigs showed the hyperemia of conjunctiva, whereas all of the control guinea-pigs died developing the typical symptoms of the disease. If guinea pigs were challenged with 300 LD₅₀ of a highly virulent strain of *Leptospira*, which had been obtained after about fifteen passages of the same strain above described through guinea-pigs, all of the test animals died showing the development of the disease.

As far as the present experiment concerns, we could not observe that *Leptospira* became resistant to nitrofurantoin derivatives by exposing to the drugs in vivo.

Received September 29, 1952

牛乳由来ブドウ球菌に関する研究

第1報 生物学的性状について特に病原株非病原株の区別

鈴木 昭

Studies on the Biological Function of *Staphylococci* from Bovine Milk.1. On the Differences of Biological Characteristics between the Virulent and Avirulent Strains of *Staphylococci*.

By Akira Suzuki

まえがき

ブドウ球菌（以下ブ菌）は広く自然界に存在する球菌で Koch (1787) がこれを発見し、Pasteur (1880) が始めて純培養に成功した。我が国でもこれに関する幾多の業績が発表され、最近特に公衆衛生、食品衛生方面に食中毒の原因菌として重大視されるに至つた。

食中毒原因としてのブ菌の研究は諸外国^(1) 2) 11) 12)は勿論、我が国でも多く^(10) 11) 12) 13) 16) 18) 19)の業績を挙げることが出来るが、最近2~3年の夏季には小麦粉中毒、学童給食⁽⁵⁾中毒、はんぺん、ちくわ中毒事件等のように大きな中毒事件から、報告され得ない一過性症状の中毒に到るまで本菌が原因と考えられるものが数多く発見されるに到つた。

更に興味ある事は内外幾多の文献^(1) 2) 10) 11)にもある通り、その原因と考えられた食品の多くが、牛乳はいうに及ばず、バター、チーズ等の乳製品、或は何らかの形で牛乳と関係をもつた食品が多いことが認められることである。

この事はブ菌中毒の原因及機転の検討に大いに意味あるところで、著者の一連の研究が乳製品の検討から加えられて来たのもかかる理由による。

まずブ菌が食中毒の原因として推定せられた最初の古典的な報告としては、Denys⁽¹²⁾ (1894)によるものがある。しかしこれは推定だけで歴史的文献としては Berber⁽¹⁾ (1914)の報告が最初である。

即ちフィリッピン⁽¹⁾の農場で牛乳を飲用した所、猛烈な急性胃腸炎の症状が数日に互り繰返され、しかもこれは牛乳が保存された場合にのみ起ることから、本原因は牛乳によるものと推定してその牝牛を良く調べた所、乳房炎に罹患しているのを認め、それを詳細検討の結果乳房よりブ菌を分離ししかも彼自身が実験的に中毒症状で以て証明している。

其の後幾多の同様な報告が続出し、又我が国では小島⁽¹⁰⁾ (1939)は急性胃腸炎に際してその原因食、シェーククリーム、柏餅よりブ菌のみ分離し、又鶴見等 (1938)^(10) 12)、児玉 (1940)もブ菌による食物中毒を報告し、最近市川 (1951)はマヨネーズよりブ菌を純粹に分離し、実験的に中毒症状を起し得たと報告している。

又著者も都下某療養所における原因不明の急性胃腸炎の症状の頻発事件に調査依頼を受け、その症状がブ菌による中毒症状と類似しておる点から、その原因を一先づ常用されている牛乳に求め、牛乳飲用を中止させたところ、同症状の頻発が止みこれを以て数本の牛乳を詳細検討し、その何れからもブ菌が純培養状に分離された例を経験した。すでにその詳細は⁽²⁰⁾ (1950)報告してある。

乳牛の乳房炎の分布^(15) 20) 23) 24)は決して少いものでなく、最近の米国では約 60% が乳房炎或は異常を分泌しておりその中の約 70% がブ菌によるものであるといわれて、その防衛を国家的研究事項の一つに取上げられている。

我が国でも、著者⁽¹⁹⁾等の調査によれば約 50%以上が罹患しており、しかも従来特に考えられていた溶血性レンサ球菌によるものよりも、ブ菌によるものの方がはるかに多く、吉田 (1948, 1950)⁽¹⁵⁾も罹患牛の過半数がブ菌によるものであると報告している。

しかもかかる蔓延度を示す異常乳の大半は直接にその家族に、或は処理場を通じて、一般に供給されている現状から、其の後の操作は完全であつたとしても、牛乳由来のブ菌による食物中毒も決して少くないだろう事は想像するに難くない。

乳牛の乳房炎は公衆衛生的見地から、重要な意義を持つばかりでなく反面生産的見地からしても、その酪農経営に及ぼす被害は甚大⁽²⁰⁾で、その額は年間十億ともいわれる。

そしてその原因菌の大半をブ菌が示し²³⁾ている現状である。しかもそのブ菌による乳房炎はペニシリン等の抗生物質によつて必ずしも治療に好結果を期待し得ない状態²⁴⁾にあり、斯る重大意義を持つブ菌の検索も決しておろそかにすべき問題でないと考え、乳房炎の原因としてのブ菌の性状に改めて詳細な検討を加え、更にそれ等が食中毒の原因となる由因のものを、分類学的に、発育生理の面から、更に代謝生産物の化学的方面から考究しようと考えた。

本報告はこれ等一連の研究の一部として、新鮮乳から検索された、ブ菌の生物学的性状について検索したものである。

第1表 供試菌の区別

菌由来物	採集材料	ブドウ球菌			レンサ球菌との混合数
		黄色	白色	レモン色	
牛	正常乳 22	0	19	3	13
"	臨床型乳 10	10	0	0	0
"	乾乳型乳 3	2	1	0	0
"	異常乳 40	1	39	0	0
"	臨床型乳 13	10	3	0	0
計		23	62	3	13

実験株及びその分離

本実験に使用のブ菌株は第1表の如く乳房炎乳(臨床型²⁰⁾ 22) 23) 25) 10株, 異常乳型 40株, 乾乳型, 3株)由来 53株に, 正常乳由来 22株と, それに加えて, 家畜衛生試験場, 吉田博士より分譲せられた乳房炎乳(臨床型)由来 13株計 88株に, 対照として, 当室宇都宮の分離した蛋白食品¹⁰⁾由来の 6株をも合せて実験に供した。

これ等のブ菌の分離方法は乳房の外表を先ず清水で良く洗い, 汚物を, 洗い落とし, 3%クレゾール石鹼液で消毒した後, 5搾り目の牛乳約 10ccを, 可及的無菌的に滅菌試験管に採取, これを普通寒天平板及びウマ, ウシ, ヒツジ, の各血液寒天平板に直接塗抹し, 37° 24時間培養にうつした。

同時に 1%糖加ブイオンに 1cc投入, 37° 24時間培養後, 前記各培地に塗抹し, 24時間培養後, ここに生ずる個々の集落を普通及グラム染色を施し, ブ菌の同定分離を行った。

得られたブ菌はヒツジ血液寒天斜面で氷室保存を行った。

実験方法

これ等の菌株についての実験方法として, 本実験は全ての分離保存株に対して若返り法を実施した。

若返り法については Evans (1948)¹⁷⁾ は諸々の生物学的性状の検査に先立ち, 特に陳旧培養株では, 5日間連続に, 24時間培養を Heart-infusion agar に移植し幼若菌株にした後, 試験に供するが良いと提唱している。

本実験においても, これを確認すべく, その指標としては, 今迄多くの報告にある如くブ菌の病原性と関連があるといわれる血漿凝固能を取上げて比較検討した。

その結果は第3表に示す通りで, 好結果を得る事が出来た。

故に以後の実験に先立つて総て若返り法を施し, 若返り法で処置した菌株について次の如き実験を実施した。

- 1). 色素産生、インドール反応及びグラム染色所見
- 2). 牛乳凝固作用.
- 3). 血漿凝固作用.
- 4). 2%血清ペプトン水培地培養所見.
- 5). ゼラチン液化作用.
- 6). クリスタル紫乳糖寒天培養所見.
- 7). B. T. B. 乳糖寒天培養所見.
- 8). 7.5% 食塩抵抗性
- 9). マンニット、乳糖、シヨ糖、ブドウ糖、ラヒノース、ソルビット、サリシン、イヌリン、キシロースの各糖分解作用.
- 10). 溶血性.

以上の検査中、特別な操作を要するものを挙げると

A). 血漿凝固作用.

Cruickshank (1937) 小島 (1937)¹²⁾ はヒト及びウサギ血漿の生理食塩水或はブイヨン 10 倍稀釈を使用し、ヒトの血漿はウサギのそれに優ると述べている。

著者も之にならない、家兎のそれと、ヒト、ウシのそれを対照にとり行つた。

即ちそれらの血液 9 に対し、5% クエン酸ソーダを 1 の割合に加え、遠心分離する。得た血漿を生理食塩水をもち、10 倍に稀釈し、各小試験管に 0.5 cc 宛分注する。これに寒天斜面 18 時間培養の 1 白金耳を移植振盪混和後 37° に 30 分、1 時間、2 時間及び 3 時間保ち、夫々の凝固状態を検する。

前記時間における成績を 冊, 冊, 冊, + と記録し、凝固しないものを - とし、その凝わしいものを土とした。

B). 2%血清ペプトン水培地培養所見

松岡¹⁴⁾ (1942) の推奨するもので、滅菌普通ブイヨンに馬血清を 2% の割に無菌的に加えたものを使用する。即ち本培地に 18 時間培養の新鮮ブ菌を培養し、18 時間後から、5 日間 適時観察するが、病原性のあるものは、その初期に透明な培地の最上部に、肉眼的に明らかな白色顆粒状物質の点在して来るのが認められ、時日の経過とともに菌膜をつくり次第に沈澱が見られるようになる。この顆粒は 5 日後になつても失われず培地はなお透明である。

非病原性のもは、時日の経過とともにますますその濁濁度を深め、顆粒状物質は認められない。なお本培地に数代植えついても同一所見が見られる。

C). 7.5% 食塩に対する抵抗性.

Chapman^{9) 17)} (1945) の提唱するもので、新鮮なブ菌を、C. B. P. マンニット寒天培地に培養し、37° 48 時間以内に黄色帯を生ずるものを陽性とする。

本培地は普通寒天 (PH 6.8) NaCl 7.5% マンニット 1% ブローム、クレゾール、パープル 0.004% の割合に加えたものである。

D). 溶血性

本実験には、ウマ、ウシ、ヒツジ、ウサギ、ヒト、ニワトリの各血液に対し、5% クエン酸ソーダを混じたものを普通寒天に 5% の割にまぜた血液寒天平板培地をつくる。これにブ菌のブイヨン 24 時間培養 10⁶ 倍稀釈液 1 cc を混積培養し、各溶血環の有無をみる。

これを更に氷室に 1 夜静置し、その溶血環の増大の有無を検する。

実験成績

実験成績は、第 2 表に示すように、大体今迄の報告のそれと類似の結果を得たが、さらに詳細検討を加えると次のようになる。

第2表 牛乳由来ブドウ球菌の生物学的性状

検査方法	産生色素			マンニト		乳糖		溶血性		血漿凝固		2% 血清 ペプトン		牛乳凝固		ゼラチン 液化		C. V. 天		B. T. B. 天	
	黄色	白色	橙黄色	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
総菌株数	23	62	3	32	56	87	1	25	63	28	60	27	61	73	15	76	12	27	61	34	54
産生色素	黄色			21	2	23	0	19	4	20	3	20	3	23	0	23	0	15	8	20	3
	白色			8	54	61	1	4	58	6	56	4	58	50	12	52	10	10	52	12	50
	橙黄色			3	0	3	0	2	1	2	1	3	0	0	3	1.	2	2	1	2	1
マンニト	+							25	7	28	4	27	5	32	0	32	0	19	13	27	5
	-							0	56	0	56	0	56	41	15	46	10	8	44	7	49
溶血性	+									25	0	25	0	25	0	20	5	16	9	22	3
	-									3	60	2	1	48	15	56	7	11	52	12	51
血漿凝固	+													26	2	27	1	17	11	20	8
	-													50	10	50	10	10	50	14	46
ゼラチン 液化	+																	25	51	32	44
	-																	2	10	2	10

1). 菌株若返り法 (Evans 法) と菌の性状の変化.

菌株若返り法実施による菌の性状の変化をブ菌の病原性と関連があるといわれる血漿凝固作用により、比較検討した。

その結果を第3表に示す。

第3表 菌株若返り法と菌の性状の変化 (血漿凝固作用に依る)

菌株名	若返り方実施		菌株名	若返り方実施		菌株名	若返り方実施	
	前	後		前	後		前	後
1 C	-	+	P 18	+	卍	P 65	+	卍
2 C	±	+	P 19	+	卍	P 66	+	卍
3 C	±	±	P 20	+	卍	P 73	-	-
P 1	+	卍	P 21	+	卍	P 76	+	卍
P 2	+	卍	P 30	±	±	P 78	+	卍
P 3	-	-	P 36	±	+	P 79	+	卍
P 4	+	+	P 51	±	+	P 80	+	卍
P 5	+	卍	P 59	±	+	P 81	+	卍
P 6	-	±	P 60	+	卍	P 82	+	卍
P 7	-	±	P 61	+	卍	P 83	+	卍
P 8	-	±	P 62	+	卍	P 85	+	卍
P 9	-	+	P 63	+	卍			
P 10	-	±	P 64	±	±			

即ち供試 37 菌株は、そのままでは陽性 22 株 (59%) にすぎないが、若返り法実施に於ては 37 株中陽性 28 株 (75%) となつた。

これを詳しくみると、黄色 23 株中 20 株 (91%) が、溶血素産生 25 株中 25 株 (100%) が、又白色 62 株中 7 株 (11%) がそれぞれ凝固を示し、又レモン色 3 株中 2 株にも凝固がみられた。

なお注意すべきことは文献にも記載のあるごとく、病原性株の大部分は少くとも、2 時間以内に血漿を凝固し、3 時間で凝固したのものの中には、レモン色株の如く一応非病原性と考えられるものも含まれていることであり、これと若返り法を施した時との関係をも知る必要がある。

第 4 表 2% 血清ペプトン水培地における発育

菌株名	※ 2% 血清ブイヨン 48 時間培養	血漿凝固	菌株名	※ 2% 血清ブイヨン 48 時間培養	血漿凝固	菌株名	※ 2% 血清ブイヨン 48 時間培養	血漿凝固
1 C	-	+	P 18	+	+	P 65	+	+
2 C	-	+	P 19	+	+	P 66	+	+
3 C	-	±	P 20	+	+	P 73	-	-
P 1	+	+	P 21	+	+	P 76	+	+
P 2	+	+	P 30	+	+	P 78	+	+
P 3	-	-	P 36	+	+	P 79	+	+
P 4	+	+	P 51	+	+	P 80	+	+
P 5	+	+	P 59	+	+	P 81	+	+
P 6	-	±	P 60	+	+	P 82	+	+
P 7	-	±	P 61	+	+	P 83	+	+
P 8	-	±	P 62	+	+	P 85	+	+
P 9	+	+	P 63	+	+			
P 10	-	-	P 64	-	±			

※ (+)……顆粒状発育 (-)……濁濁

2). 2%血清ペプトン水培地における検討

牛乳由来ブ菌の場合も、松岡¹⁴⁾の成績と同様の好結果を得、病原性株は顆粒状発育を示し、沈澱物を形成し、次いで菌膜を形成する。

これに反し、非病原性菌株は一樣に濁濁を示した。なおこの成績を、前同様血漿凝固作用と比較すると、第 4 表の如く殆んど一致する成績を示した。

即ち血漿凝固作用陽性 28 株中 27 株 (96%) に陽性を認めた。

3). 7.5% 食塩に対する抵抗性よりの検討

7.5% 食塩に対する抵抗性は第 5 表及び第 6 表に示す如くである。

これによる病原性、非病原性の区別は困難である。

4). 溶血性よりの検討

溶血性の有無は第 2 表、第 5 表、第 6 表、第 7 表に示す通りで、黄色 23 株中 19 株 (83%)、白色 62 株中 4 株 (6%) に認め、又レモン色 3 株中 2 株にも認めた。

又上の如く血漿凝固作用と溶血性とを比較すると 100% の一致が見られる。

なお溶血性の詳細については後に改めて報告する。

第5表 溶血素産生と血漿凝固作用と比較

菌株名	産生色素	溶血素	使用血漿				菌株名	産生色素	溶血素	使用血漿				菌株名	産生色素	溶血素	使用血漿			
			ヒト	ウシ	ウサギ	ウマ				ヒト	ウシ	ウサギ	ウマ				ヒト	ウシ	ウサギ	ウマ
1 C	白	-	-	-	-	P 18	黄金	卅	卅	卅	卅	卅	P 65	黄	卅	卅	卅	卅	-	
2 C	白	-	卅	卅	+	P 19	灰白	卅	卅	卅	卅	卅	P 66	黄	卅	卅	卅	卅	+	
3 C	灰白	-	+	+	±	P 20	黄金	卅	卅	卅	卅	卅	P 73	灰白	-	-	-	-	-	
P 1	黄金	卅	卅	卅	卅	P 21	黄金	卅	卅	卅	卅	卅	P 76	黄金	卅	卅	卅	卅	-	
P 2	黄金	卅	卅	卅	卅	P 30	レモン	±	-	±	±	-	P 78	黄金	卅	卅	卅	卅	+	
P 3	白	-	-	-	-	P 36	レモン	±	-	+	+	-	P 79	黄金	卅	卅	卅	卅	+	
P 4	黄金	+	卅	+	±	P 51	レモン	-	+	+	+	-	P 80	灰白	卅	+	卅	卅	-	
P 5	黄金	+	卅	卅	卅	P 59	黄白	±	+	±	±	-	P 81	灰白	卅	卅	卅	卅	-	
P 6	黄赤	-	±	-	±	P 60	黄白	±	+	卅	卅	-	P 82	灰白	卅	卅	卅	卅	+	
P 7	灰白	-	±	-	±	P 61	黄	卅	卅	卅	卅	+	P 83	黄白	卅	卅	+	卅	-	
P 8	灰白	-	-	-	±	P 62	黄	卅	卅	卅	卅	+	P 85	黄白	卅	卅	卅	卅	-	
P 9	黄	±	卅	卅	+	P 63	黄	卅	卅	+	卅	+								
P 10	灰白	-	-	-	±	P 64	黄	-	+	+	±	-								

卅 30分以内陽性 卅 1時間 卅 2時間 + 3時間 ± 凝性 - 陰性

5). 乳房炎乳 (異常乳) 及正常乳由来ブ菌の比較検討.

A). 乳房炎乳 (異常乳) 由来ブ菌の性状

乳房炎 (異常乳) 由来ブ菌の性状は第6表に示す通りである.

即ち *Staph. aureus* 及び *Staph. albus* の二種で、マニット分解、血漿凝固作用陽性、2%血清ペプトン水培地における発育状態陽性であるが、溶血性及其他の性状は区々である.

第6表 乳房炎乳 (異常乳) 由来ブドウ球菌の性状

種別	<i>Staphylococcus albus</i>				<i>Staphylococcus aureus</i>									
	マニット	血漿凝固	2%血清ペプトン	溶血性 (ヒツジ)	-	α	-	α	α'α	β	-	+	-	+
C.V 寒天	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+
B.T.B 寒天	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
7.5% NaCl	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
菌株数	2	1	1	2	2	1	6	1	1	4	2	2	2	2

C.V.; クリスタル紫 B.T.B.; ブローム、チモール、ブリュー 7.5%NaCl; 7.5% NaCl
マニット、クローム、クレゾール、パープル、寒天培地.

B). 正常乳由来ブ菌の性状

正常乳由来ブ菌の性状は第7表に示した。

即ち其の多くの株が *Staph. epidermidis* で其の他若干の *Staph. citreus*, *Staph. muscae* 等を認める。

即ちマンニト非分解、血漿凝固作用陰性、溶血性を認めない。其の他の性状は区々である。

第7表 正常乳由来ぶどう球菌の性状

種 別	※ <i>Staphylococcus citreus</i>			※ <i>Staphylococcus epidermidis</i>					※ <i>Staphylococcus muscae</i>	其の他	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+		
マンニト	+			-					+	-	
血漿凝固	-			+	-					-	-
2% 血清ペプトン	+	-	+	-	-					-	-
溶血性 (ヒツジ)	-	-	-	-					-	-	
C. V 寒天	±	+	+	-	-	+	-	-	+		
B. T. B 寒天	-	+	+	-	-	-	+	-	-		
7.5% NaCl	+	+	+	-	+	-	+	+	+		
菌株数	1	1	1	1	1	1	40	5	5	1	3

C. V: クルスタル紫

B. T. B: ブロール チモール ブリュール

7.5% NaCl: 7.5%

NaCl マンニト, プローム, クレゾール, パープル, 寒天培地

考察及結論

著者は牛乳由来ブドウ球菌 88 株につき各方面から、その生物学的性状を検討し、これから病原株、非病原株の鑑別を試みようとした。

その成績は、今までの報告とほぼ一致をみるが、生物学的性状をもつて病原性の有無を知ることはなお未だ困難である。

1). 一般的には鏡検上菌形の小さいものほど、病原性が強く、大きいものほど、弱いといわれて¹²⁾いるが、本実験でも大体同様な傾向が示された。

2). 生物学的性状の検査に先立ち、先ず若返り法 (Evans 法)⁹⁾ を行うことは個々の判定を正確ならしめるようである。

若返り法による血漿凝固作用は、非病原性株、或は人工培養により本作用を消失した病原株の一部に対して与えられるのか、その点に関してははつきりしないが、若返り法により新鮮な株となり、分離当初の状態に復帰できたものと見做してよいのではなからうか。

この点を別とするも、ブ菌は或る条件の下で血漿凝固作用を獲得できるという事実は、由来不明のブ菌を一部なりともうかがい知られるということもできよう。

3). 色素産生では黄色株に原病性がありレモン色株に少く、白色株はその中間にあるとする先人の業績^{2) 3) 7) 8) 10) 11) 13) 17) 18) 19)} と一致する。しかしこれは例外も少くない。

4). 牛乳凝固作用及クリスタル紫寒天培地、B. T. B 寒天培地上の発育状態及び色調の変化は、病原性の有無に、或る程度関係¹²⁾ するとあるが、著者の場合では余り好結果は得られなかつた。

5). ゼラチン液化とエンテロトキシン産生株との関連性は Stone,²⁾ (1935) 等により唱かれ、Cogswell, Kilbourne., 及び Kuhns (1938) もこれを認めているが、Gwatkin⁹⁾ (1938) はこれを否定している。又 Lieb, Curcio⁵⁾ (1937) は、食中毒原因陽性株の 70.5% が陽性で、陰性株の 27.6% が陽性であつたと報告している。

又 Kupchik,⁴⁾ (1939) Stritar., Jordan³⁾ (1935) 等も否定の側に立つている。

このようにこの作用と病原性の有無とは、色々の説があるが、著者の場合でも、病原性を論ずることは、不能であると考える。

生物学的性状の中で比較的病原性の鑑別拠点足り得るものにつきみると、

6). マニツト分解作用は、黄色 23 株中 21 株 (91%) が陽性を示し、或程度有力な参考となり得る。

7). 血漿凝固作用と病原性との関係については、黄色 23 株中 20 株 (87%) に陽性を見、溶血素産生株 25 株中 25 株 (100%) に陽性を見、非産生株には 1 株も陽性が認められなかつた。

この場合、小島¹²⁾ (1939) も述べているように、ウサギ血漿、或はウシ、ヒト血漿を 10 倍に生理食塩水をもつて稀釈したものが良く、ウマ血漿は余り価値がない。

成績は 2 時間以内のものに重点をおくべきで、しかも若返り法施行が望まれる。

8). 2% 血清ペプトン水での発育状態からする病原性鑑別は、血漿凝固作用同様可能であると考えられる。即ち血漿凝固作用陽性 28 株中 27 株 (96%) に陽性を示し、陰性株の総てが陰性であつた

2% 血清ペプトン水培地は操作も簡単で、しかも、長期の培養ほどその傾向は明瞭となる。血漿凝固作用に代用し得るものと考ええる。

9). 7.5% 食塩抵抗性と病原性鑑別との関連性はみとめられなかつた。

10). 牛乳由来ブ菌の生物学的性状の中、特に乳房炎由来のそれに、溶血性に特異の型を示すものが多く、興味ある問題である。

11). 乳房炎乳由来ブ菌の性状及び正常乳由来ブ菌の性状を比較すると、乳房炎乳由来株は *Staph. aureus* 及び *Staph. albus* の二種で、マニツト分解、血漿凝固作用陽性、2% 血清ペプトン水培地発育状態陽性であるに対し、正常乳由来株の場合は *Staph. epidermidis* が大部分で、上記の性状はすべて陰性である場合が多い。

上に示した成績は部長八田博士並に家畜衛生試験場北海道支場長山田博士の御指導下になされている一連の研究の一部である。ここに深く感謝の意を表するとともに、実験に際し諸々御指導戴きました日本医大衛生学教室乗木博士及び菌株分譲にあつかりました家畜衛生試験場北陸支場長吉田博士に感謝の意を表します。

文 献

- 1). Barber. M. A.,: *Philippine. J. Scie.*, **9**, 515 (1914)
- 2). Stone. R. V.,: *Proc. soc. exp. Biol. Med.*, **33**, 185~187 (1935)
- 3). Jordan. E. O.,: *J. Infect. Dis.*, **57**, 121~128 (1935)
- 4). Kupchik. G. J.,: *J. Infect. Dis.*, **61**, 320~324 (1937)
- 5). Champan. G. H., Lieb. C.W., Berens C., Crucio. L.,: *J. Bact.*, **33**, 533~536 (1937)
- 6). Gwatkin. R.,: *Canad. pub. Health. J.*, **28**, 185~191 (1938)
- 7). Cogswell. W. F., Kilbourne. B. K., Kuhns. E.,: *Canad. pub. Health. J.*, **29**, 333~336 (1938)
- 8). Champan. G. H.,: *J. Bact.*, **41**, 431~446 (1945)
- 9). Evans. J. B.,: *J. Bact.*, **55**, (6), 793~800 (1948)
- 10). 鶴見三三, 岩田 謙, 入山謙三, 前山亮東, 杉山三郎, 藤見楠彦, : *東京医事新誌*, **3102**, 2524~2530 (1938)
- 11). 小島三郎, 八田貞義, : *食物中毒菌*, 281~314, (1939) 金原商店
- 12). 小島太郎, : *細菌学雑誌*, **522**, 445~465, **523**, 593~603, **525**, 705~721, (1939)
- 13). 児玉 威, 畑 正世, 渋谷よし, : *細菌学雑誌*, **534**, 545 (1940)
- 14). 松岡辰男, : *実験医学*, **6** (8) 660~671 (1942)
- 15). 吉田信行, : *獣医学界*, **23**, 6~13: *家畜衛生*, **I**, (3) 3~9, (1948)
- 16). 八田貞義, 宇都宮則久, 春田 斎, 依田源次, : *衛生獣医学雑誌*, **I**, (1), 9~12 (1949)
- 17). 鈴木 昭, : *衛生獣医学雑誌*, **I**, (3) 16~19, (1949)
- 18). 八田貞義, 宮本晴夫, 大谷政衛, 依田源次, 鈴木 昭, : *衛生獣医学雑誌*, **I**, (3) 8~10, (1949)
- 19). 乗木秀夫, : *衛生獣医学雑誌*, **I**, (1) 13~18, (1949)
- 20). 山田俊雄, 鈴木 昭, 尾藤行雄, : *酪農事情*, **10**, (7) 14~16 (8) 18~20 (1950)

- 21). 鈴木 昭, 足立舜二, : 10月衛生獣医学集談会講演, (1950)
- 22). 鈴木 昭, 中野龍雄, : 総合医学, 7 (8) 33~35, (1950)
- 23). 鈴木 昭, 尾藤行雄, : 酪農事情, 10, (12) 17~19, (1950)
- 24). 鈴木 昭, : 第 31 回日本獣医学会講演, (1951)
- 25). 鈴木 昭, : 臨床獣医新報, 42, 1~3 (1952)

Summary

The biological characteristics of 88 strains of *Staphylococci* isolated from bovine milk were investigated, and the following results were obtained.

- 1). Both *Staph. aureus* and *Staph. albus* were isolated from bovine mastitis milk, which showed positive reactions in mannitol-fermentation, plasma coagulation and haemolysis.
- 2). Most of the *Staphylococci* from the normal milk were belonged to *Staph. epidermidis*. The abilities stated above were all negative.
- 3). The organisms which showed the coagulation of the blood plasma, granula-like growth in 2% serum-peptone-water and haemolysis, were thought to be the virulent strains.
- 4). It is difficult to expect a relationship between virulence and gelatin liquefaction or resistance to 7.5% NaCl.

Received October 8, 1952.

牛乳由来ブドウ球菌に関する研究

第 2 報 生物学的性状について

特に溶血性について

鈴木 昭

Studies on the Biological Function of *Staphylococci* from Bovine MilkII. On the Haemolysis of *Staphylococci*.

By Akira Suzuki

まえがき

第一報で牛乳由来ブドウ球菌 (以下ブ菌) の生物学的性状について報告した。其の際、特に牛乳由来ブ菌には、特異の溶血型を示すもののある事を指摘した。
本報告ではこれについて追及した結果を報告する。

実験方法

実験方法は第一報に報告した如くである。即ち、ウマ、ウシ、ヒツジ、ウサギ、ヒト、ニワトリの各血液 9 に対し、5% クエン酸ソーダを混じ、之を普通寒天に 5% の割合に含有せしめた血液寒天平板を製し、之にブ菌のブイヨン 24 時間培養液を混積培養し、37° 24 時間静置、各溶血環の有無を検し然る後、これを氷室に 1 夜静置し、その溶血環の増大の有無を検した。

なお反対に、先に氷室に入れ、次いで 37° に入れてその成績を求め、前者と比較した。

実験成績

溶血現象の大きな因子として挙げられるものは、

- 1). ブ菌株の相異。
- 2). 培養基時に含まれる血液種の相異。
- 3). 培養方法の変化。

である。

その内、ブ菌株の相異と血液種の相異との関係は第 1 表の如くである。
即ち、

- 1). ヒツジ、又はウシ血液寒天培地上においてのみ溶血を起すもの。
- 2). ウシ及びウサギ血液寒天培地上においてのみ溶血を起すもの。
- 3). ウサギ血液寒天培地上においてのみ溶血を起すもの。
- 4). ウマ血液寒天培地上においてのみ溶血を起すもの。
- 5). ヒツジ及びウシ、ウマ血液寒天培地上において溶血を起すもの。
- 6). ヒツジ及びウシ、ウサギ血液寒天培地において溶血を起すもの。
- 7). ヒツジ及びウシ、ウサギ、ウマ血液寒天培地において溶血を起すもの。

なおこれに加えて、ヒト、ニワトリの血液寒天培地に於ても溶血を起すものの7系である。

次に本報告で最も問題とする培養方法であるが、その方法として、第一報の方法と同時に、反対に先に氷室に入れ、次いで37°に入れる方法をも実施し、溶血環の状態、溶血の程度を検討した。

成績は両者はほぼ同様であるが、溶血環の直径が、前者のそれとは若干大きいし、又溶血環（二重溶血環）の形成順序は同様の傾向を示すが、明瞭な二重溶血環は認められない。

特に本実験には、ヒツジ血液とウシ血液とは必ずしも、平行しなかつた。

特にウシ血液寒天培地で、特異の溶血環を呈するものを認めた。これは今迄著者の調査した文献⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾には認めない。

尙氷室に放置する事により著明な溶血を起すものは1株も見当らず、37°に培養する事によつてのみ、その溶血状態に変化のある事を知つた。この事から溶血は菌の増殖と関係がある事がわかる。

溶血型の分類については、諸々あるが、小島(1939)は、次の如く分類してある。

α型.

37° 24時間培養後集落の周囲は一樣に完全溶血を起し、之を冷却するに変化なく、再び37°に放置する毎に増大する。

β型.

37° 24時間培養後集落の周囲は帯褐色に変化し、冷却するにその周囲に同心性の周辺極めて鋭利で血液変化のない暗赤色の輪を生ず、37°と冷却を繰返すに同心性の輪も幾重にも生じ中心の褐色部より漸次完全溶血を起す。

βα型.

37° 24時間培養後集落の周囲に完全溶血を起し、其の周囲に同心性の極めて鋭利な褐色輪を見、冷却により、周囲の完全溶血は増大するも、尙褐色部は境界を保ち、その周囲に同心性の暗褐色の輪が現われる。

再び37°、冷却を繰返す毎に褐色部の一部は完全溶血を起し、暗赤色部は褐色に変じ完全溶血と、不完全溶血が同時に生じ幾層にも達する。

本実験においては、前述の如く氷室において溶血を起すいわゆる小島のβ型、βα型に完全一致するものがなく、唯黒褐色或は赤褐色緑褐色等に変色溶血を起すもの等があり、小島の分類にしたがうのが一部において少し困難の様に思われたのでα型、α'α型、α'β型、β型の4型とした。

α型.

ヒツジ或ウシ血液寒天培地上で37° 24時間培養後之を検するに集落の周囲に完全溶血環を起し次いで氷室に24時間放置する事によつても何等変化を見ず再び37°に34時間培養により其の完全溶血環は増大し同操作を繰返す毎に直径の増大する型を云う。

α'α型.

ヒツジ、ウシ血液寒天培地上で、37° 24時間培養後これを見ると、完全溶血環を示し、次いで、氷室に24時間放置して、著明な変化を示さず、再び37° 24時間培養で不溶血帯を残し、その外側は完全溶血を起し、以下上記操作を繰返す事によつて、ちょうど年輪のような美観を呈する型をいう。

なお上記の型と殆んど同様であるが、不完全溶血環を形成し、時日の経過と共に完全溶血に変化するものをおもこの型に入れた。

α'β型.

この型はウシ血液寒天培地上でのみ観察された型で、37° 24時間培養後之を検するに、集落の周囲に不完全溶血環を起し、その外側に淡赤褐色の溶血環を残す。次いで氷室では著明に変化する事なく、再度37°に培養することにより、外側の淡赤褐色溶血環のみが増大する、以下同操作を繰返すことによつて、漸次増大する型をいう。

β型.

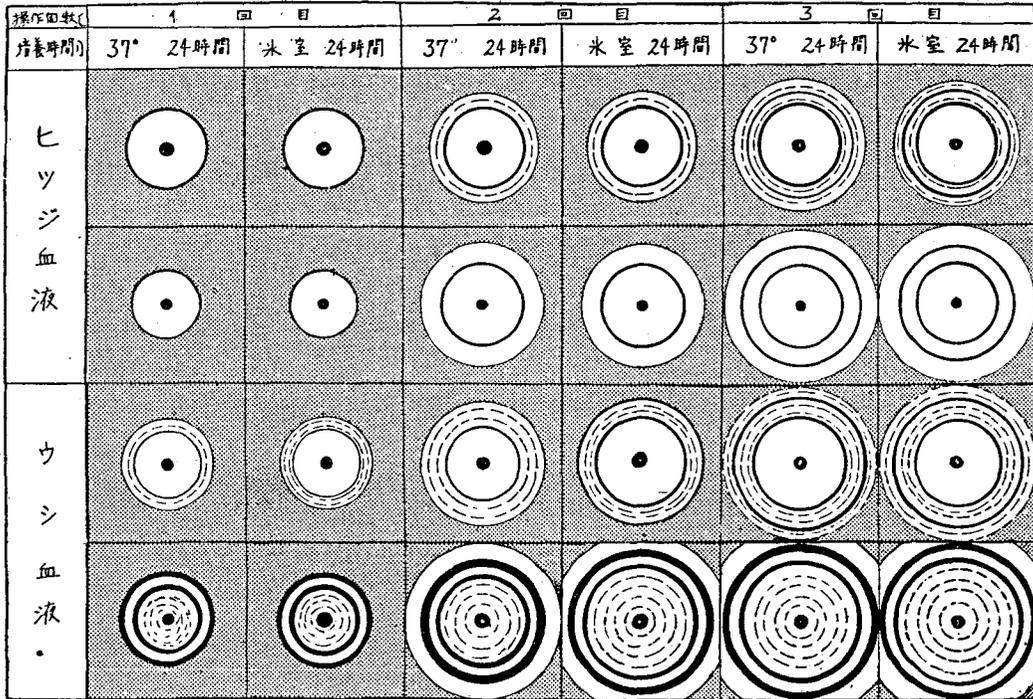
37° 24時間培養し、之を検するに、集落の周囲に、黒褐色或は赤褐色、緑褐色の変色環を見、氷室では変色環の変化なく（但し或る菌株に於ては若干増大するものもある）同操作を繰返すことにより、その変色環の増大する型をいう。

その成績は第1表及び第1図第2図の通りである。動物血液の種類により若干の差異のあるものがある。

第1表 各種血液別による溶血型の相異

菌種別 \ 動物別	ヒツジ	ウシ	ウサギ	ウマ	ニワトリ	ヒト
1 C	—	—	—	—	—	—
P 1	α	α	α	—	—	β
P 2	α	β	α	—	—	β
P 4	β	—	α	—	—	β
P 5	—	β	—	β	—	—
P 7	—	β	—	—	—	—
P 8	—	—	—	β	—	—
P 9	β	β	—	—	—	—
P 10	—	—	—	—	—	—
P 18	$\alpha' \alpha$	$\alpha \beta$	$\alpha' \alpha$	α	α	β
P 19	$\alpha' \alpha$	$\alpha' \alpha$	$\alpha' \alpha$	α	α	β
P 20	$\alpha' \alpha$	α	$\alpha' \alpha$	α	α	β
P 21	$\alpha' \alpha$	α	$\alpha' \alpha$	—	α	β
P 30	—	—	α	—	—	—
P 36	—	β	α	—	—	—
P 51	—	—	—	—	—	—
P 59	β	β	—	β	—	—
P 60	β	β	—	β	—	—
P 61	—	$\alpha' \beta$	α	—	α	—
P 62	α	$\alpha' \beta$	$\alpha' \alpha$	—	—	—
P 63	α	$\alpha' \beta$	$\alpha' \alpha$	α	α	β
P 64	—	—	—	—	—	—
P 65	α	$\alpha' \beta$	$\alpha' \alpha$	α	α	—
P 66	α	$\alpha' \beta$	$\alpha' \alpha$	α	α	—
P 73	—	—	—	α	—	—
P 76	α	α	$\alpha' \alpha$	—	α	β
P 78	α	$\alpha \beta$	$\alpha' \alpha$	—	—	—
P 79	α	$\alpha \beta$	$\alpha' \alpha$	—	—	β
P 80	α	$\alpha \beta$	$\alpha' \alpha$	—	—	—
P 81	α	α	α	—	α	—
P 82	α	$\alpha \beta$	α	—	—	—
P 83	—	—	—	—	—	—
P 85	α	α	α	—	α	—

第1図 ヒツジ及ウシ血液寒天培地における二重溶血型形成順序(平面図)



空白……完全溶血 点線……不完全溶血 黒線……不溶血部 黒点……コロニー

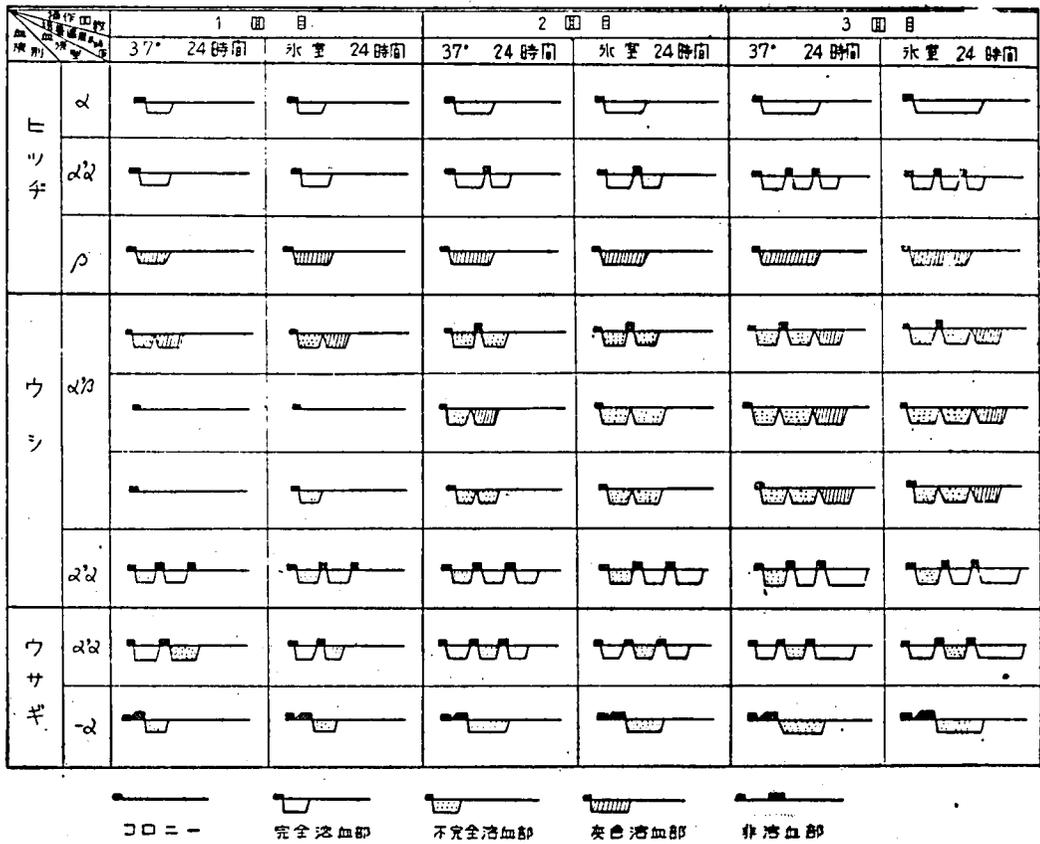
A). ヒツジ血液寒天培地上における溶血型.

その成績は第2表に示す通りである.

第2表 ヒツジ血液寒天平板培地上における溶血型

操作回数 培養時間	1 回目		2 回目		3 回目	
	37° 24時間	氷室 24 時間	37° 24 時間	氷室 24 時間	37° 24 時間	氷室 24時間
菌株番号						
1 C	—	—	—	—	—	—
P 1	完 2.5	" 2.5	" 5.0	" 5.0	" 5.5	" 5.5
P 2	完 2.7	" 2.7	" 3.0	" 3.0	" 5.0	" 5.0
P 4	褐色環 2.0	" 2.0	" 3.5	" 5.0	" 5.0	" 5.0
P 5	—	—	—	—	—	—
P 7	—	—	—	—	—	—

第2図 各種血液別による溶血型 (断面図) の比較



第2表 ヒツジ血液寒天平板培地上における溶血型 (続)

操作回数 培養時間 菌株番号	1 回目		2 回目		3 回目	
	37° 24時間	氷室 24時間	37° 24時間	氷室 24時間	37° 24時間	氷室 24時間
P 8	完 3.0	" 3.0	" 5.5	" 5.5	" 7.0	" 7.0
P 9	褐色環 1.3	" 1.5	" 1.5	" 3.5	" 5.0	" 5.0
P 10	—	—	—	—	—	—
P 18	完 2.7	" 2.7	完 2.7 不溶血環ヲ残シ二重溶血 不完 10.5 血	" 2.7 " 13.0 "	完 2.7 不溶血環ヲ残シ三重溶血 不完 13.0 " 15.0 "	" 2.7 " 13.0 " " 15.0 "
P 19	完 5.0	" 5.0	完 5.0 不溶血環ヲ残シ二重溶血 完 15.5 血	" 5.0 " 15.5 "	完 5.0 三重溶血 完 15.5 " 18.0 "	" 5.0 " " 15.5 " " 18.0 "
P 20	完 2.5	" 2.5	完 2.5 不溶血環ヲ残シ二重溶血 不完 6.0 血	" 2.5 " 6.0 "	完 2.5 三重溶血 不完 6.0 " 8.5 "	" 2.5 " " 6.0 " " 8.5 "
P 21	完 3.0	" 3.0	完 3.0 不溶血環ヲ残シ二重溶血 不完 5.5 血	完 3.0 " 5.5 "	完 3.0 " 5.5 " 8.0 "	" 3.0 " " 5.5 " " 8.0 "

第2表 ヒツジ血液寒天平板培地上における溶血型（続）

操作回数 培養時間 菌株番号	1 回目		2 回目		3 回目	
	37° 24 時間	氷室 24 時間	37° 24 時間	氷室 24 時間	37° 24 時間	氷室 24 時間
P 30	—	—	—	—	—	—
P 36	—	—	—	—	—	—
P 51	—	—	—	—	—	—
P 59	—	—	—	褐色環 3.5	〃 3.5	〃 3.5
P 60	—	—	—	褐色環 3.0	〃 3.0	〃 3.0
P 61	—	—	—	—	—	—
P 62	不完 2.0	〃 2.0	〃 4.0	〃 4.0	不完 5.0 不溶血環残 不完 5.5 血 サズ二重溶	〃 5.0 〃 〃 5.5 〃
P 63	不完 2.5	〃 2.5	〃 5.0	〃 5.5	〃 10.5	〃 10.5
P 64	—	—	—	—	—	—
P 65	不完 3.0	〃 3.0	〃 5.0	〃 5.5	不完 5.5 不溶血環残 不完 6.5 血 サズ二重溶	〃 5.5 〃 〃 6.5 〃
P 66	不完 2.5	〃 2.5	〃 6.0	〃 6.0	不完 6.5 不溶血環残 不完 9.5 血 サズ二重溶	〃 6.0 〃 〃 9.5 〃
P 73	—	—	—	—	—	—
P 76	不完 5.0	〃 5.0	完 10.0	〃 10.0	〃 12.5	〃 12.5
P 78	完 3.0	〃 3.0	完 3.0 不溶血環残 不完 8.0 サズ二重溶 血	〃 3.0 〃 〃 8.0 〃	完 10.0 不溶血環残 不完 13.0 サズ二重溶 血	〃 10.0 〃 〃 13.0 〃
P 79	不完 7.0	〃 7.0	完 10.0	〃 10.0	〃 12.5	〃 12.5
P 80	完 2.5	〃 2.5	完 2.5 不溶血環残 不完 5.0 血 サズ二重溶	〃 2.5 〃 〃 5.0 〃	完 4.5 不溶血環残 不完 7.0 血 サズ二重溶	〃 4.5 〃 〃 7.0 〃
P 81	不完 7.0	〃 7.0	〃 10.0	〃 10.0	完 12.0	〃 12.0
P 82	不完 3.5	〃 3.5	〃 5.0	〃 5.0	〃 7.0	〃 7.0
P 83	—	—	—	—	—	—
P 85	不完 2.0	〃 2.0	完 3.5	〃 3.5	完 5.0	〃 5.0

備考 完…完全溶血 数値は溶血環の直径を示す（4 平板の平均値） 〃…は右に同じを意味す。
不完…不完全溶血（次表以後第 2 表に同じ）

B). ウシ血液寒天培地における溶血型.

ウシ血液での溶血型は、ヒツジ血液の型とほぼ同様な型を呈すが、唯1株においては、特異の型を呈するのを見た。(溶血型としては α' 型に含まれる.)

即ち 37° 24 時間培養後は集落の周囲が、不完全溶血を起し、その外側に完全溶血を起し、その不完全溶血部と完全溶血部との境界に、明瞭なしかも美観な細い一線があり、その全貌はちょうど彫刻された様である。

一番外側の不溶血部との境界は全く明瞭であり、次いで氷室では変化することなく、再び 37° に培養することによって外側に不溶血環を残し、その外側に完全溶血環を起しその完全溶血環が丁度 α 型で示されると同様な態度を取り以下繰返すごとに外側のそれが増大するばかりである。

ウシ血液により成績は第3表に示す通りである。

第3表 ウシ血液寒天平板培地上における溶血型

操作回数 培養時間 菌株番号	1 回目		2 回目		3 回目	
	37° 24 時間	氷室 24 時間	37° 24 時間	氷室 24 時間	37° 24 時間	氷室 24 時間
1 C	—	—	—	—	—	—
P 1	ヤヤ完 1.5	" 1.5	完 2.0	" 2.0	" 2.0	" 2.0
P 2	褐色環 1.5	" 1.5	" 3.0	" 3.0	" 3.0	" 3.0
P 4	—	—	—	—	—	—
P 5	褐色環 1.5	" 1.5	" 1.5	" 1.5	" 1.5	" 1.5
P 7	—	—	褐色環 3.0	" 3.0	" 3.0	" 3.0
P 8	完 3.0	" 3.0	完 3.0 不溶血環 残シ二重 不完 6.5 溶血	" 3.0 " " 6.5 "	完 3.0 不溶血環 完 6.5 残シ三重 不完 10.0 溶血	" 3.0 " " 6.5 " " 10.0 "
P 9	—	—	褐色環 4.5	" 4.5	" 4.5	" 4.5
P 10	—	—	—	—	—	—
P 18	不完 1.5 不溶血環 残サズ二 褐色環 3.5 重溶血	" 1.5 " " 3.5 "	不完 2.5 " 不完 6.0 "	" 2.5 " " 6.0 "	不完 2.5 " 不完 6.0 " 褐色環 8.5 三重溶血	" 2.5 " " 6.0 " " 8.5 "
P 19	不完 3.5 細い不溶 完 5.0 血環残シ 完 7.0 三重溶血	" 3.5 " " 5.0 " " 7.0 "	不完 3.5 " 完 5.0 " 完 8.5 "	" 3.5 " " 5.0 " " 8.5 "	不完 3.5 " " 5.0 " " 13.0 "	" 3.5 " " 5.0 " " 1.3 "
P 20	不完 3.0	" 3.0	不完 3.0 不溶血環 残シ二重 不完 4.0 溶血	" 3.0 " " 4.0 "	不完 3.0 細い不溶 血環残シ 不完 5.0 二重溶血	" 3.0 " " 5.0 "
P 21	不完 2.5	" 2.5	" 2.5	" 2.5	" 2.5	" 2.5
P 30	—	—	—	—	—	—

第 3 表 ウシ血寒天平板培地上における溶血型 (続)

操作回数 培養時間 経株番号	1 回目		2 回目		3 回目	
	37° 24 時間	氷室 24 時間	37° 24 時間	氷室 24 時間	37° 24 時間	氷室 24 時間
P 36	—	—	褐色環 3.0	” 3.0	” 3.0	” 3.0
P 51	—	—	—	—	—	—
P 59	褐色環 3.5	” 3.5	” 5.0	” 5.0	” 5.0	” 5.0
P 60	褐色環 2.0	” 2.0	” 3.0	” 3.0	” 3.0	” 3.0
P 61	—	ヤヤ不完 1.5	不完 1.5 不溶血環残 サズ	” 1.5 ”	ヤヤ完 1.5 不溶血環残 不完 5.5 サズ	” 1.5 ” ” 5.5 ”
P 62	—	—	ヤヤ不完 5.5 二重溶血 不完 1.5 不溶血環残 サズ	” 5.5 ” ” 1.5 ”	褐色環 8.5 三重溶血 不完 1.5 ”	” 8.5 ” ” 1.5 ”
P 63	—	—	不完 5.0 二重溶血 不完 1.5 不溶血環残 サズ	” 5.0 ” ” 1.5 ”	褐色環 6.5 三重溶血 不完 4.5 ”	” 6.5 ” ” 5.0 ”
P 64	—	—	—	—	—	—
P 65	—	ヤヤ不完 2.0	不完 2.0 不溶血環残 サズ	” 2.0 ”	ヤヤ不完 5.0 二重溶血 不完 2.0 ”	” 2.0 ” ” 5.0 ”
P 66	—	ヤヤ不完 2.5	ヤヤ不完 5.0 二重溶血 不完 2.5 不溶血環残 サズ	” 5.0 ” ” 2.5 ”	褐色環 6.5 三重溶血 不完 6.0 ”	” 6.5 ” ” 6.0 ”
P 73	—	—	—	—	—	—
P 76	不完 7.0	不完 7.0 不溶 血環残サズ	” 7.0 ”	” 7.0 ”	不完 7.0 ”	” 7.0 ”
P 78	不完 4.0 不溶血環残 サズ	” 4.0 ”	” 4.0 ”	” 4.0 ”	不完 4.0 ”	”
P 79	褐色環 5.0 二重溶血 不完 3.0 不溶血環残 サズ	” 5.0 ” ” 3.0 ”	” 14.0 ” 不完 3.0 ”	” 14.0 ” ” 3.0 ”	褐色環 16.0 ” ” 3.0 ”	” ” ” 3.0 ”
P 80	褐色環 5.0 二重溶血 不完 3.5 不溶血環残 サズ	” 5.0 ” ” 3.5 ”	” 10.5 ” ” 3.5 ”	” 10.5 ” ” 3.5 ”	” 13.0 ” ” 3.5 ”	” 13.0 ” ” 3.5 ”
P 81	褐色環 5.0 二重溶血 不完 4.5 不溶血環残 サズ	” 5.0 ” ” 4.5 ”	” 10.5 ” 不完 4.5 完 7.5	” 10.5 ” ” 4.5 ” 7.5	” 15.0 ” ” 4.5 ” 10.5	” 15.0 ” ” 4.5 ” 10.5
P 82	不完 5.0 サズ三重溶 不完 6.5 血	” 5.0 ” ” 6.5 ”	不完 5.0 ” 不完 6.5 ”	” 5.0 ” ” 6.5 ”	” 5.0 ” ” 6.5 ”	” 5.0 ” ” 6.5 ”
P 83	—	—	—	—	—	—
P 85	ヤヤ完 3.5	” 3.5	完 3.5 不溶血環残 サズ	” 3.5 ”	” 3.5 ”	” 3.5 ”
			不完 11.5 二重溶血	” 11.5 ”	” 13.5 ”	” 13.5 ”

C). ウサギ血液寒天培地上における溶血型

ヒッジ或はウン血液寒天培地上の溶血型とウサギのそれには若干の差異が認められる。

即ち文献にもある如く、周辺部の境界が明瞭でない事である。又二重溶血を起す場合、不溶血環の中が前二者に比べ、比較的広く、全く異つている。又その場合の境界も明瞭でない。

なお唯 1 株において、37° 24 時間培養後、集落の周囲に不溶血環を残し、その外側は完全溶血を起し、氷室では変化なく、同操作を繰返すことによつて完全溶血環は、漸次増大し、 α 型として、 α 型の中に入れた。

ウサギ血液による成績は第 4 表に示す通りである。

第 4 表 ウサギ血液寒天平板培地上における溶血型

操作回数 培養時間 菌株番号	1 回目		2 回目		3 回目	
	37° 24 時間	氷室 24 時間	37° 24 時間	氷室 24 時間	37° 24 時間	氷室 24 時間
1 C	—	—	—	—	—	—
P 1	完 5.0	" 8.5	" 14.0	" 14.0	溶血平板一面ニテ測定不能	"
P 2	完 1.5 不溶血環残サズ	" 1.5 "	" 6.0 "	" 6.0 "	" 10.0 "	" 10.0 "
	不完 3.5 二重溶血	" 3.5 "	" 10.0 "	" 10.0 "	" 14.0 "	" 14.0 "
P 4	完 2.0 不溶血環残サズ	" 2.0 "	" 3.5 "	" 3.5 "	" 5.0 "	" 5.0 "
	不完 4.5 二重溶血	" 8.5 "	" 11.0 "	" 11.0 "	" 15.0 "	" 15.0 "
P 5	完 1.5 不溶血環残サズ	" 1.5 "	完 1.5 "	" 3.0 "	" 3.0 "	" 3.0 "
	不完 6.5 二重溶血	" 6.5 "	不完 6.5 "	" 6.5 "	" 6.5 "	" 6.5 "
			完 9.0	" 9.0 "	" 12.5 "	" 12.5 "
P 7	—	—	—	—	—	—
P 8	—	—	—	—	—	—
P 9	—	—	—	—	—	—
P 10	—	—	—	—	—	—
P 18	不完 1.5 不溶血環残シ	" 1.5 "	完 2.5 "	" 2.5 "	完 2.5 "	" 2.5 "
	不完 10.5 二重溶血	" 10.5 "	完 10.5 "	" 10.5 "	完 10.5 "	" 10.5 "
			不完 13.0 三重溶血	" 13.0 "	完 13.0 "	" 13.0 "
P 19	完 1.5 不溶血環残シ	" 3.0 "	完 3.0 "	" 3.0 "	" 3.0 "	" 3.0 "
	不完 10.5 二重溶血	" 10.5 "	不完 10.5 "	" 10.5 "	" 10.5 "	" 10.5 "
			完 16.0 "	" 16.0 "	" 17.5 "	" 17.5 "
P 20	不完 2.0 不溶血環残シ	" 2.0 "	ヤヤ完 5.0	" 5.0 "	" 5.0 "	" 5.0 "
	完 8.0 二重溶血	" 9.5 "	" 12.0	" 12.0 "	" 15.0 "	" 15.0 "
P 21	完 1.5 不溶血環残シ	" 1.5 "	完 1.5 "	" 1.5 "	溶血平板一面ニテ測定不能	"
	不完 8.5 二重溶血	完 9.5 "	完 8.0 "	" 8.0 "		
			完 11.5 "	" 11.5 "		
P 31	—	—	完 6.0	" 6.0	" 10.0	溶血平板一面ニテ測定不能
P 36	—	—	完 5.0	" 5.0	" 14.0	" 14.0
P 51	—	—	—	—	—	—

第4表 ウサギ血液寒天平板培地上における溶血型（続）

操作回数 培養時間 菌株番号	1 回目		2 回目		3 回目	
	37° 24 時間	氷室 24 時間	27° 24 時間	氷室 24 時間	37° 24 時間	氷室 24 時間
P 59	—	—	—	—	—	—
P 60	—	—	—	—	—	—
P 61	不完 1.5	” 1.5	不完 1.5 不溶血環 残シ 不完 9.0 三重溶血	” 1.5 ” ” 9.0 ”	” 1.5 ” ” 14.0 ”	溶血平板一面ニテ測定不能
P 62	不完 1.5 不溶血環 残シ 不完 6.5 二重溶血	” 1.5 ” ” 6.5 ”	” 1.5 ” ” 8.5 ”	” 1.5 ” ” 8.5 ”	” 1.5 ” ” 10.5 ”	溶血平板一面ニテ測定不能
P 63	完 2.5 不溶血環残シ 不完 7.5 二重溶血	” 2.5 ” ” 8.5 ”	完 4.0 ” 不完 8.5 ” 完 12.0 三重溶血	” 4.0 ” ” 8.0 ” ” 12.0 ”	” 4.0 ” ” 8.5 ” ” 14.0 ”	溶血平板一面ニテ測定不能
P 64	—	—	—	—	—	—
P 65	完 1.5 不溶血環残シ 不完 6.5 二重溶血	” 1.5 ” ” 6.5 ”	完 2.5 ” 不完 6.5 ” 完 10.5 三重溶血	” 2.5 ” ” 6.5 ” ” 10.5 ”	” 2.5 ” ” 6.5 ” ” 14.5 ”	” 2.5 ” ヤヤ完 6.5 ” 完 14.5 ”
P 66	二重溶血環ヲ作ル如ク見ユルモ明デナイ		不完 2.0 不溶血環 残シ 不完 10.0 二重溶血	” 2.0 ” ” 10.0 ”	ヤヤ完 2.5 ” 不完 7.0 ” 完 13.0 三重溶血	ヤヤ完 2.5 ” 不完 2.0 三重 完 13.0 溶血
P 73	—	—	—	—	—	—
P 76	不完 1.5 不溶血環残シ 不完 8.0 二重溶血	” 1.5 ” ” 8.0 ”	” 1.5 ” ” 9.5 ”	” 1.5 ” ” 9.5 ”	” 1.5 ” ” 13.0 ”	” 1.5 ” ” 13.0 ”
P 78	不完 2.0 不溶血環残シ 不完 8.0 二重溶血	” 2.0 ” ” 8.0 ”	” 2.0 ” ” 9.5 ”	” 2.0 ” ” 9.5 ”	不完 2.0 ” 不完 9.5 ” 不完 13.0 三重溶血	” 2.0 ” ” 9.5 ” ” 13.0 ”
P 79	不完 1.5 不溶血環残シ 不完 3.0 二重溶血	” 1.5 ” ” 3.0 ”	完 1.5 ” 完 3.0 ” 完 7.0 三重溶血	” 1.5 ” ” 3.0 三重 ” 7.0 溶血	溶血平板一面ニテ測定不能	”
P 80	不完 2.0 不溶血環残サズ 不完 5.0 二重溶血	” 2.0 ” ” 5.0 ”	不完 2.0 ” 不完 5.0 ” 完 7.0 三重溶血	” 2.0 ” ” 5.0 ” ” 7.0 ”	溶血平板一面ニテ測定不能	”
P 81	不完 2.0 不溶血環残サズ 不完 6.0 二重溶血	” 2.0 ” ” 6.0 ”	” 2.0 ” ” 8.0 ”	” 2.0 ” ” 8.0 ”	” 2.0 ” ” 13.0 ”	” 2.0 ” ” 13.0 ”
P 82	不完 3.5 不溶血環残サズ 不完 7.0 二重溶血	” 3.5 ” ” 7.0 ”	” 3.5 ” ” 14.0 ”	” 3.5 ” ” 14.0 ”	” 3.5 ” ” 15.0 ”	” 3.5 ” ” 15.0 ”
P 83	—	—	—	—	—	—
P 85	不溶血環 2.5 不完 5.0	” 2.0 ” ” 5.0 ”	” 2.0 ” ” 6.0 ”	” 2.0 ” ” 6.0 ”	” 2.0 ” ” 8.5 ”	” 2.0 ” ” 8.5 ”

D) ウマ血液寒天培地上における溶血型.

ウマ血液寒天培地上での溶血状態は、前述の三者に比較して、その成績著しく悪く唯 α 型、β 型の二種に区別されるだけで、これによる溶血性の有無を論ずるは、非常に困難である。ウマ血液による成績は第5表に示す通りである。

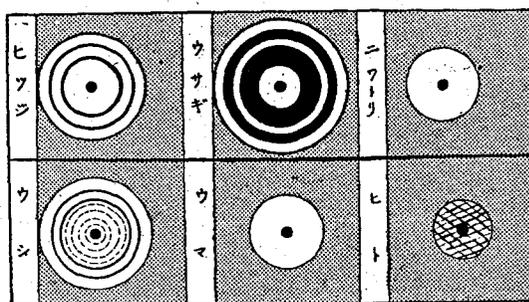
第5表 馬血液寒天平板培地上における溶血型

操作回数 培養時間 菌株番号	1回目		2回目		3回目	
	37° 24時間	氷室 24時間	37° 24時間	氷室 24時間	37° 24時間	氷室 24時間
1 C	—	—	—	—	—	—
P 1	—	—	—	—	—	—
P 2	—	—	—	—	—	—
P 4	—	—	—	—	—	—
P 5	—	—	—	—	—	—
P 7	—	—	褐色環 3.5	〃 3.5	〃 3.5	〃 4.0
P 8	—	—	—	—	—	—
P 9	—	—	褐色環 6.0	〃 6.0	〃 6.0	〃 6.0
P 10	—	—	—	—	—	—
P 18	褐色環 1.5	〃 1.5	不完 2.5	〃 2.5	〃 5.0	〃 5.0
P 19	褐色環 3.0	〃 3.0	〃 3.5	〃 3.5	〃 3.5	〃 3.5
P 20	—	—	不完 1.5	〃 1.5	〃 2.5	〃 2.5
P 21	—	—	—	—	—	—
P 30	—	—	—	—	—	—
P 36	—	—	—	—	—	—
P 51	—	—	—	—	—	—
P 59	—	—	褐色環 6.0	〃 6.0	〃 6.0	〃 6.0
P 60	—	—	褐色環 3.0	〃 3.0	〃 3.0	〃 3.0
P 61	—	—	—	—	—	—
P 62	—	—	—	—	—	—
P 63	—	—	不完 2.0	〃 2.0	〃 3.0	〃 3.0
P 64	—	—	—	—	—	—
P 65	—	—	—	—	不完 4.5	〃 4.5
P 66	0.2 不完	〃 2.0	〃 5.0	〃 5.0	〃 8.0	〃 8.0
P 73	完 3.0	〃 3.0	〃 5.0	〃 5.0	〃 5.0	〃 5.0
P 76	—	—	—	—	—	—
P 78	—	—	—	—	—	—

第5表 ウマ血液寒天平板培地上における溶血型（続）

操作回数 培養時間 菌株番号	1 回目		2 回目		3 回目	
	37° 24 時間	氷室 24 時間	37° 24 時間	氷室 24 時間	37° 24 時間	氷室 24 時間
P 79	—	—	—	—	—	—
P 80	—	—	—	—	—	—
P 81	—	—	—	—	—	—
P 82	—	—	—	—	—	—
P 83	—	—	—	—	—	—
P 85	—	—	—	—	—	—

第3図 P 19 菌株による血液別溶血型環の相異



各記号は第2図に従う

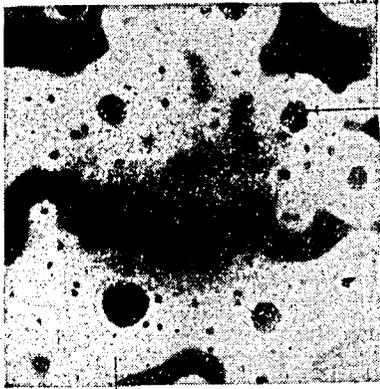
即ちヒツジ，ウシ，ウサギの血液による溶血は， α/α 型を示し，ウマ血液による溶血は α 型を示し，ヒト血液による溶血は β 型を示す。

E). ヒト血液寒天培地上における溶血型。

小島 (1939)¹²⁾らの文献によれば，ブ菌のあるものでは，特異の溶血症を示すものがある事が指摘されている。故に本実験でも，これを調べたところ β 型のみであった。

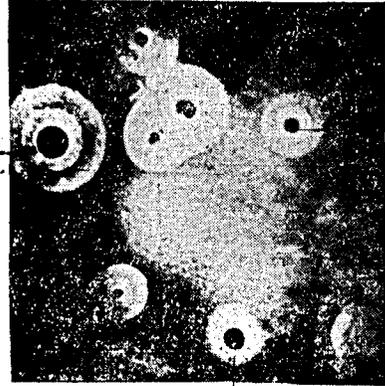
F). 代表同一菌株 (P 19) の血液別相異。

特異の溶血症を示す P 19 株につき，その成績を見るに第3図 (平面図) の如くである。



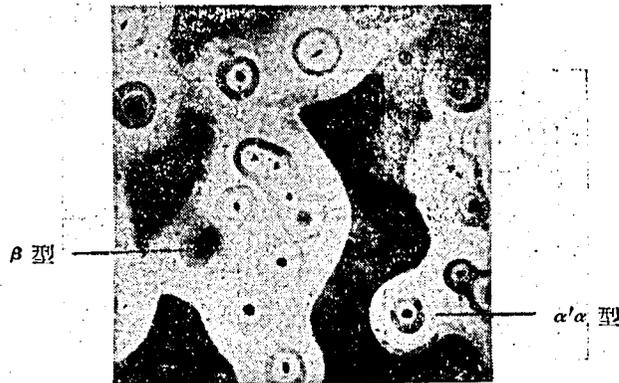
α 型

ヒツジ血液寒天平板における溶血型



α 型

ウシ血液寒天平板における溶血型



ウシ血液寒天平板における溶血型

考 察

著者は、第1報に報告した牛乳由来のブドウ球菌88株中、特にその中の35株の溶血性につき、詳細に検査した。

ヒツジ、ウシ、ウサギ、ウマ及びヒト、ニワトリ血液寒天培地上の溶血環形成を検べ、ヒツジ或はウシに於て、特異な溶血環の形成を示すもののある事を知つた。

この溶血環は、ヒツジ、ウシ、ウサギでは37°で完全或は不完全溶血を起し、氷室においては著明な変化なく、再び、37°に放置する事により、不溶血環を残し、その外側に完全溶血、或は不完全溶血又は変色を起し、同様操作を繰返す事により、年輪の如く幾層にも達する。

溶血性については、既に古くから、研究せられ、Baerthlein⁽¹⁾ (1914) は、本菌を5%綿羊血液寒天に48時間培養後、完全溶血と、不完全溶血とが同時に生ずる事を報告している。著者の場合も或株で同様な所見が見られた。

又 Kollath and Taubmann⁽²⁾ (1924) は、腹水寒天に培養後之を血液寒天に培養する時は、同心性の完全及不完全溶血を見ると。又 Kortenhaus⁽³⁾ (1929) も同様の事を見出し、9回温度をかえて、9層になし得たと。

又 小島 (1939)⁽¹²⁾ も同様の事を報告し、それを $\beta\alpha$ 型と呼称し、これは α 溶血素と β 溶血素の毒素産生量の相異によるものであらうと報告した。これ等は著者の成績と大体同様であるが、著者の場合はこれを α/β 型と名づけた。又 Naidu⁽⁹⁾ (1934) はヒツジ血液寒天を使用してその溶血の状態から、A B C D E Fの発育型に分け、A B Cは主として人由来のものに、他は動物由来のものであると。

又田中⁽¹⁰⁾ (1937) も小島⁽¹²⁾ の β 型と類似のものを報告している。著者の場合の β 型とは氷室に於て著明な溶血を示さず37°において変色溶血を起しているものを指している。

Bryce and Rountree⁽⁶⁾ (1939) はブ菌を綿羊血液寒天に培養し、その状態により、ヒト型、ウシ型、中間型の3型に分類している。

ヒト型。37° 24時間後、完全溶血を起し、氷室におくも変化を見ない。

ウシ型。37° 24時間後一部完全溶血を起し、冷却により増大する。

中間型。冷却により初めて溶血を起すものである。

小島⁽¹²⁾ はこれを α 型 $\beta\alpha$ 型 β 型としている。

著者の場合 α 型及 α' 型は人型に、 α/β 型の一部はウシ型に含まれるものであらうと考える。

ウサギ血液における溶血の場合、周辺の判然としない事に就いては、大武⁽⁹⁾ (1931) 小島⁽⁹⁾ (1939) も指摘している如く、著者の場合にでも同様であつた。

Smith and Price⁽⁷⁾ (1938) は γ 溶血素の存在について報告し、小島⁽¹²⁾ (1939) は β 溶血はHot cold溶血にして、明らかに、 α 溶血と異なり、Gleny and Stevens⁽⁴⁾ (1935) Bryce and Rountree⁽⁶⁾ (1936) のいう β 溶血素と一致し、比較的耐熱性であるといひ、又動物に対する毒性は弱いが、子ネコに対しては強毒であると報告している。又 β 溶血素とEnterotoxic Substanceとは関係があるだらうとも指摘している。

著者の場合は特に α/β 型に於て子ネコに毒性（エンテロトキシン）の強いもののある事を知つた。

著者の場合は溶血性の有無は、他の病原性鑑別法よりも優れ、特にエンテロトキシン産生株では全部が α/α 型或は α/β 型であつた。

然し Dolmann,⁽⁸⁾ Wilson and Gockroft (1936) はエンテロトキシンのみ産生し、非溶血株のもののある事を指摘し、本毒素は γ 毒素と呼んでいるが、小島⁽¹²⁾ (1939) は反対に、大体溶血性のある、或る菌株に陽性株を見、非溶血性株におけるその存在を否定しているようである。

同一菌株の血液別による溶血の状態を見るに、ヒツジ、ウシ、ウサギにおいて大体各特有の成績を示すにかかわらず、ウマ血液に於ては非常に悪く、これによる鑑別は余り効果的でない。

又溶血型に於て特異の型を示すものの中には、ヒト血液に於て面白い成績を示すことがあるというが、⁽⁹⁾ ⁽¹⁰⁾ ⁽¹¹⁾ ⁽¹²⁾ 著者は一株もみることが出来なかつた。

結 論

著者は牛乳由来ブドウ球菌 35株についてその溶血性につき詳細に検査した。

- 1). ヒツジ、ウシ、ウサギ血液寒天培地上における溶血環の形成状態により、 α 型、 α/α 型、 α/β 型、 β 型の4型に分類することが出来た。
- 2). 溶血素産生と病原性（エンテロトキシンをも含む）は密接な関係があるようである。
- 3). ウサギ血液の場合は一般に溶血環の周辺部が明瞭でない。
- 4). ウマ血液による成績は非常に悪くこれにより溶血の有無、溶血環の状況を論ずることは困難である。

文 献

- 1). Barethlin, K.,: Zbl. Bact. Paras. Inf. Krh., 74, 201~207, (1914)
- 2). Kortenhous, F.,: Ebenda.,: 113, 499~503, (1929)
- 3). Naidu, P.M.N.,: Ebenda.,: 132; 47~57, (1934)
- 4). Glenny, A.T., Stevens, M. F.,: J. Path. Bact. 40, 201~210 (1935)
- 5). Dolman, C. E., Wilson, R. J.,: Canad. Pub. Health. J., 27, 494~497 (1936)
- 6). Bryce, L.M., Rountree, P. M.,: J. Path. Bact. 43, 173~189 (1936)
- 7). Smith, M.L., Price, S.A.,: J. Path. Bact. 47, 361~393 (1938)
- 8). 大武喜代治.,: 海軍軍医学雑誌, 20, 434~454 (1931)
- 9). 児玉 威.,: 細菌学雑誌, 485, 481~490, 545, 550 (1936)
- 10). 田中愛三.,: 日本微生物病理学雑誌, 31, 1129~1146 (1937)
- 11). 滝田順吾.,: 細菌学雑誌, 468, 141~153, (1938)
- 12). 小島太郎.,: 細菌学雑誌, 522, 445~465, 523, 593~603 525, 705~721 (1939)

Summary

- 1). *Staphylococci* isolated from bovine milk may be classified in to 4 types (α , $\alpha'\alpha$, $\alpha'\beta$, β , Type) regarding to the haemolytic zone on the sheep's, cow's and rabbit's blood agar.
- 2). A close relationship between the type of haemolysis and the virulence (including ability of producing the enterotoxic substances) was recognized.
- 3). The appearance of reaction on blood agar was varied according to the species of animals which offer the blood for haemolysis.

Received October 8, 1952.

細菌の薬剤耐性についての知見補遺 (6)

黄色ブドウ球菌の人工ストレプトマイシン耐性変異について

桑原章吾, 大淵令子, 井上種子 (日本医大衛生)

Studies on the Resistance of Bacteria to Drugs (6)

On the Induced Streptomycin-resistant Strains of
Micrococcus pyogenes var. aureus

By Syōgo KUWAHARA, Reiko ŌFUCHI and Taneko INOUE

細菌のストレプトマイシンに対する耐性変異については, Klimek, Cavallito & Bailey (1948)¹⁾, 柳原 (1951)²⁾, 寺田 (1951)³⁾, 平塚 (1952)⁴⁾, 桑原, 大淵, 井上, 松島 (1952)⁵⁾ が各種の菌をつかつて, 耐性及び依存性のでき方, 生物学的性状及び栄養要求度の変化を報告している. 著者らはこの論文で病原性黄色ブドウ球菌のストレプトマイシン耐性変異, 特にその栄養要求度の変化を主眼として行なつた実験のあらましを報告する.

I. 実験の方法

a) 実験につかつた菌株: Heatley, 寺島, FDA-209P の 3 株が用いられた. 各菌株とも著者らの 1 人桑原が牛肉浸液-ポリペプトン-寒天斜面に 14 日毎に継代保存したもので, 実験をはじめるまでストレプトマイシンに接触したことがなく, 病原性を表示する生物学的性状を完全にそなえている.

b) 耐性株のつくり方: 実験にはすべて結晶ジヒドロストレプトマイシン硫酸塩 (以下これを SM と略記する) を使用した. 肉汁ブイヨンに SM を 1, 2.5, 5, 10, 20, 50, ……………, 1,000, 2,000 µg/cc, …………… にとかつた稀釈系列をつくり, 100°, 30 分, 3 回加熱滅菌して氷室に保存する (試験管はすべて 1.8×17.0 cm の型のもので, 培地量は 5 cc とした). 各菌株を普通寒天斜面に 35~37°, 20±2 時間培養後, 滅菌生理食塩液で 0.2 mg/cc の菌液をつくり, これを上記の SM 培地に駒込ピペット (2 cc) で 1 滴づつうえる. これを 35~37°, 48±3 時間培養し, 菌の増殖した試験管の中で SM 濃度の最も高いものから次の同じ系列に 1 白金耳量を移植し, 1 日おきにこの操作を続ける.

c) 生物学的性状の検査: 検査しようとする代から普通寒天に移植し 1 日培養後, これから目的の培地に移植するか, 又は必要な反応を行なつた.

d) 栄養要求度の検査: 耐性株のいろいろの時期のものについて, 増殖に必要な発育素とアミノ酸をしらべた. 基本培地としては次の 2 種の組成を用いた.

1) 水解カゼイン培地

KH ₂ PO ₄	400 mg,	NaCl	200 mg,
MgSO ₄ ·7H ₂ O	10 mg,	ブドウ糖 (無水)	100 mg,
カゼインアミノ酸 (日之出)*	200 mg,	L-シスチン	5 mg,
L-トリプトファン	10 mg,	再蒸溜水	100 cc.

N/10 水酸化ナトリウム液で pH 7.0±0.2 に修正し, 発育素群を加え, 100°, 30 分, 3 回加熱滅菌又はザイツ濃過滅菌を行つた.

増殖度試験に用いた添加物質及びその使用量は次の通り.

パラアミノ安息香酸, パラアミノフェニル酢酸, サイアミン, リボフラビン, ビリドキシン, イノシット, 酵母核酸 …………… 10 µg/cc.

ニコチン酸及びそのアミド …………… 5 µg/cc.

パントテン酸カルシウム, 葉酸, ビメリン酸 …………… 0.5 µg/cc.

* 全窒素量 14.28%, 塩化ナトリウムの含量は不明,

2) 純アミノ酸培地

KH_2PO_4	400 mg,	NaCl	200 mg,
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10 mg,	ブドウ糖 (無水)	100 mg,
グリシン	5 mg,	<i>l</i> - α -アラニン	10 mg,
<i>dl</i> -バリン	10 mg,	<i>l</i> -ロイシン	15 mg,
<i>l</i> -シスチン	2 mg,	<i>l</i> -チロシン	2 mg,
<i>l</i> -ヒスチジン \cdot HCl	5 mg,	<i>dl</i> -メチオニン	7 mg,
<i>d</i> -アルギニン \cdot HCl	5 mg,	<i>l</i> -プロリン	5 mg,
<i>dl</i> -リジン \cdot HCl	5 mg,	<i>dl</i> -スレオニン	5 mg,
<i>dl</i> -セリン	5 mg,	<i>d</i> -グルタミン酸	15 mg,
<i>l</i> -アスパラギン酸	15 mg,	<i>l</i> -トリプトファン	5 mg,
<i>dl</i> -フェニルアラニン	5 mg,	再蒸溜水	100 cc: pH 7.0 \pm 0.2

これに上と同様に添加物質を加えて試験に用いた。

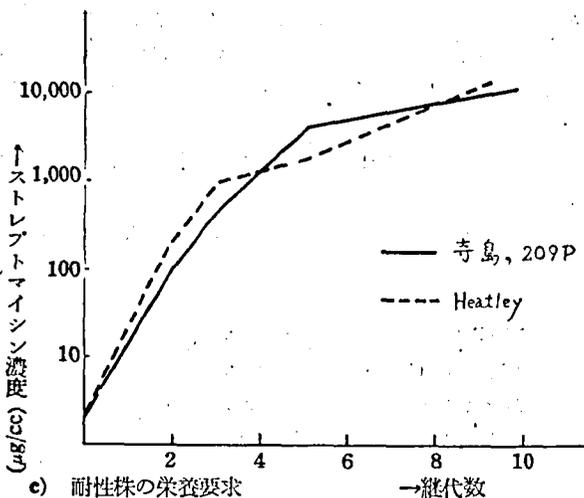
3) 菌のうえ方と増殖度の半定

調べようとする代の SM 培地から菌を普通寒天にうえかえ、20 \pm 2 時間培養後、菌苔を滅菌生理食塩液で洗い、0.2 mg/cc の菌液をつくり、2 cc 駒込ピペットで培地 5 cc に 1 滴をうえた。菌増殖度はにごりで測定し、原株の完全培地における増殖度を 100 とし培地だけの透明度を 0 とし、実験培地の増殖度を数値で表わした。

II. 実験の成績

a) 耐性のできる経過: 3 株ともほとんど同じ経過をたどつてきわめて速やかに耐性を生ずる。すなわち各菌株とも初代 2.5 $\mu\text{g}/\text{cc}$, 3 代で 500~1,000 $\mu\text{g}/\text{cc}$, 5 代では 2,000~5,000 $\mu\text{g}/\text{cc}$, 10~11 代で 20,000 $\mu\text{g}/\text{cc}$ まで上昇した。——著者の研究は耐性株の検査を目標にしているの、菌が依存性にならないように 15 代以後 SM 濃度を 5,000 $\mu\text{g}/\text{cc}$ に固定した。——以上の経過は第 1 図に示してある。

第 1 図 耐性上昇の経過



c) 耐性株の栄養要求

耐性株の 5 代, 10 代, 20 代についてそれぞれ発育素及びアミノ酸必要度の検査を行った。

1) 発育素要求度: 3 株とも原株はニコチン酸とサイアミンを必須とし、その最小有効濃度は前者は 10⁻⁷M, 後者は 2 \times 10⁻⁸M である。又ニコチン酸アミドは 3 株とも 10⁻⁸M まで有効である。

R5, R10 では 3 株とも原株と差がないが、R20 になると各菌株の態度がかなりちがってくる。Heatley-R20 ではニコチン酸 (アミド), サイアミンの他にピリドキシン, 葉酸が必須になる (ここでは前記のべた純アミノ酸培地に添加物質のすべてを加えたものを標準としてそれから 1 種づつ添加物質をとりのけて増殖度の変化をみるという、ぬきとり試験の形式を用いた) のに、209P-R20 では発育素要求度には変化がなく、寺島-R20 では標準培地で増殖が認められない。

b) 耐性株の生物学的性状

1) 形態と染色: 3 株とも原株は大きさ 0.8~1.0 μ の球菌であるが、耐性第 5 代 (R5 と略記する) では 1.0~1.2 μ , R20 では 1.5~2.3 μ と大体 2~3 倍に膨化する。209P 株だけは R30 以後菌体の染り方がわるくなり、時にメチレン青に濃染する 1~3 箇の円形、楕円形又は馬蹄形の小顆粒が認められた。

2) 糖分解作用その他の性状: パーデコウ培地をつかつて行なつた糖分解試験では、ブドウ糖、乳糖、マンニト、ガラクトース及びマンノースの分解能が相当おくれ、特にマンニトは 3 株とも全く分解できなくなつていた。又各菌株とも血漿凝固作用、塩化ナトリウム耐性、溶血能は減弱又は消失している。以上の成績は第 2 表に示してある。

第2表 耐性株の生物学的性状

菌株 検査項目	寺島		Heatley		209P		
	原	耐	原	耐	原	耐	
	球 0.8 μ	球 1.5~2.3	球 0.8 μ	球 1.0~2.0	球 0.8 μ	球 1.5~2.0	
形態	+	+	+	+	+	+	
グラム染色	+	+	+	+	+	+	
インドール反応	-	-	-	-	-	-	
カタラーゼ	+	+	+	+	+	+	
硝酸塩還元	+	+	+	+	+	+	
リトマス牛乳	+	+	+	+	+	+	
溶血	+	±	+	+	+	-	
7.5% 食塩	+	-	+	-	+	-	
血漿凝固作用	+	-	+	±	+	-	
糖及びアルコール分解能	キシロース	-	-	-	-	-	-
	アラビノース	-	-	-	-	-	-
	ラムノース	-	-	-	-	-	-
	ブドウ糖	+	⊕	+	⊕	+	⊕
	果糖	+	+	+	+	+	+
	ガラクトース	+	⊕	+	⊕	+	⊕
	マンノース	+	+	+	⊕	+	⊕
	麦芽糖	+	+	+	+	+	+
	乳糖	+	⊕	+	⊕	+	⊕
	トレハロース	+	+	+	+	+	+
	しよ糖	+	+	+	+	+	+
	ラフィノース	-	-	-	-	-	-
	テキストリン	-	-	-	-	-	-
	グリセリン	+	+	+	+	+	+
ヅルチット	-	-	-	-	-	-	
マンニット	+	-	+	-	+	-	
ソルビット	-	-	-	-	-	-	
サリシン	-	-	-	-	-	-	

(註) ⊕ は分解がおくれることを示す。

なお注目すべきことは水解カゼイン培地における各耐性株の増殖度が原株と異なる点である。すなわち Heatley, 寺島両株は程度の差はあるが、いずれも原株より増殖度がへつている (寺島-R20 は全く増殖できない) のに、209P 株では R10, R20 とともに原株より増殖度が大きくなつているという成績が得られた。

以上の発育要素要求度及び水解カゼイン培地における発育の変化は第3表, 第4図に示してある。

2) 必要なアミノ酸: ニコチン酸, サイアミン, ピリドキシン, 葉酸を含む純アミノ酸培地でぬきとり試験を行つた成績は第5表に示してある。大体において原株はアルギニン, プロリン, シスチンを含む数種のアミノ酸が必須又は重要であるのに対し、耐性株では継代の進むにつれて次第に多数のアミノ酸合成能が失われるのが認められた。変異の程度は寺島株に最も著しく、209P 株は軽微であつた。各株の合成能脱落には発育素の場合と同様、特定の律序は認められなかつた。

d) 変異の復帰: 各菌株の R20 を SM を含まない寒天培地に継代し、途中各性状を検査した。

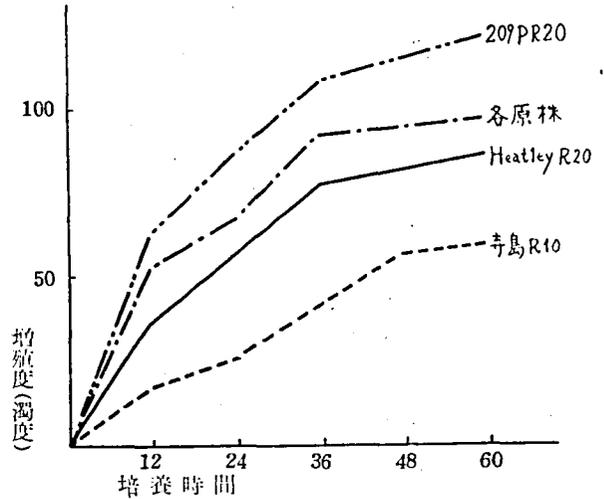
1) 形態, 生物学的性状: 菌形及び染色性はどの菌株でも 10 代で完全に復旧した。糖分解作用, 溶血作用, 塩

第3表 耐性株の発育素要求

菌 株 発 育 素	寺 島		Heatley		209P	
	原	耐	原	耐	原	耐
ニコチン酸	卍	卍	卍	卍	卍	卍
サイアミン	卍	卍	卍	卍	卍	卍
リボフラビン	—	—	—	—	—	—
ピリドキシン	—	—	—	卍	—	—
パントテン酸	—	—	—	—	—	—
葉 酸	—	—	—	卍	—	—
ピメリン酸	—	—	—	—	—	—
バラアミノ	—	—	—	—	—	—
安息香酸	—	—	—	—	—	—

(註) 卍: 菌の増殖に不可欠のもの
 —: 菌の増殖に無関係のもの

第4図 耐性株の水解カゼイン培地における増殖



第5表 耐性株のアミノ酸要求

アミノ酸	菌 株 綜 合 培 地	寺 島		Heatley		209P	
		原	耐*	原	耐	原	耐
グ リ シ ン		80	10	80	5	75	75
ア ラ ニ ン		95	5	40	0	45	40
バ リ ン		100	85	100	0	100	95
ロ イ シ ン		100	5	100	65	100	5
シ ス チ ン		10	0	5	0	0	0
チ ロ シ ン		95	80	90	60	100	90
ア ル ギ ニ ン		0	0	0	0	0	0
ヒ ス チ デ ン		5	0	85	0	100	90
メ チ オ ニ ン		90	5	85	0	30	35
プ ロ リ ン		10	0	0	0	0	30
リ ジ ン		100	95	100	65	35	30
ス レ オ ニ ン		100	10	100	5	100	85
セ リ ン		100	10	100	10	100	85
アスパラギン酸		75	0	65	0	65	85
グルタミン酸		90	0	90	0	95	0
フェニルアラニン		65	0	70	0	70	0
トリプトファン		100	90	100	60	100	100

(註) 原比で表わした二時間の発育は三株ともほとんど他の培養がない増殖度を百分

* 寺島株では R10, 他の 2 株は R20 で試験した。

化ナトリウム耐性は40代でいくらか復旧したがその後は変化なく、特にマンニト分解能、血漿凝固作用は全く復旧のしるしかない。

2) SM 耐性: 10代, 20代はともに 10,000 µg/cc, 30代では 5,000 µg/cc, 50代では 1,000 µg/cc, 90代では 100 µg/cc とゆるやかに低下しつつある。

3) 栄養要求度: 栄養要求度の変異はきわめて固定的で 80代で検査しても全く変化を示さない。

III. 得られた結果について

ストレプトマイシン耐性のでき方についての報告をみると、耐性のできる径路には大体2通りの型があることが

わかる。その 1 つは初めから毎代急速に耐性が上昇し、早く依存化の傾向を示すもの (Klimek et al, 1948; 榎原, 1951) であり、他の 1 型ははじめに数代の不変期があつて比較的耐性上昇のゆるやかなものである (寺田, 1951; 桑原, 1952)。著者らの実験したブドウ球菌は当然前者に属するもので、Klimek らの用いた 209P 株、榎原の寺島株に見られる成績はいずれも著者らの同じ株の実験と大体一致している。

Klimek らは 209P 耐性株が形の変化を示さないといっているが、榎原及び著者らの実験ではどの菌株にも染色性の変化、巨大型の発生が認められた。しかしその程度はペニシリン耐性の場合ほど強くはない。形の変化は菌と薬剤との接触を断つとたやすく復旧することから、耐性の生成にとつて本質的な変化とは考えられない。

生物学的性状の変化の中で、糖分解作用のおくれ又は消失はこれまで 2, 3 の研究者によつて報告されているが、著者らの実験で病原性を表示する各種性状(マンニト分解能, 塩化ナトリウム耐性, 溶血作用, 血漿凝固作用)がすべて消失し、ほとんど復帰のしるしがないことは重要な点であろう。Clapper & Heatherman (1950)⁶⁾ は、*Streptococcus mitis* のスルホンアミド耐性菌が腸球菌とよく似た変異を示すことを実験しているが、著者らの例とこれとは共通の傾向の変異として注目すべきことである。

耐性株はいずれも原株に比し、栄養要求がきびしい方向に変異している。これまで各種の薬剤に対する耐性株の栄養要求度の変化が追求されているが、Gale & Rodwell (1948)⁷⁾ のペニシリン耐性ブドウ球菌についての報告をのぞいては、すべてきびしい方向への変異を示している。しかしそれらの変異には薬剤に特異とみられるものはなく、大体において原株と比較的合成能のよわかつたアミノ酸が必要化の傾向を示すようである。209P 耐性株は水解カゼイン培地で原株よりも良好な増殖を示したが、この知見は English & McCoy (1951)⁸⁾ の報告とよく一致している。しかし他の 2 株では全く逆の現象が認められているので、上記の所見はむしろ 209P 株に特異とみるべきであろう。全体として栄養要求度の変異が固定的である点は興味深い。

Sevag & Rösanoff (1952)⁹⁾ は、ストレプトマイシン耐性はある種のアミノ酸(ブドウ球菌の場合はプロリン, アスパラギン酸, フェニルアラニンなど)とブドウ糖及びストレプトマイシンの共存状態に限つて発現できるもので、どの要素が欠けても耐性は生じないと説明している。この中ブドウ糖と耐性との関係はさておき、著者らの実験によると上記の各アミノ酸はいずれもブドウ球菌の栄養に必須又は重要なもので、これを欠いた培地では菌の充分な増殖は期待できないはずであるから Sevag らの理論にはかなり無理があるように思われる。アミノ酸代謝とストレプトマイシン耐性の発現との関係については別に著者らも検討中であるが、一定の法則性は認められそうもない。

IV. 結 び

著者らは 3 株の黄色ブドウ球菌の人工ストレプトマイシン耐性変異をしらべ、次の結果を得た。

1. 耐性のでき方はきわめて速やかで、各菌株とも 10 代でもとの株の 10,000 倍程度の抵抗性ができた。この速度はこれまで同じ菌種について行なわれた実験報告のそれとよく一致する。
2. 耐性株は形が原株の 2~3 倍になり、染色性がわるく、時に菌体内に小顆粒が見られた。糖分解作用の一部はおくれたり又は消失し、血漿凝固作用、溶血作用、塩化ナトリウム耐性はマンニト分解能と共に陰性化した(巨大型の生成、糖分解の抑制はこれまでの報告にもよく見られる現象である)。
3. 耐性株のあるものは発育素としてニコチン酸、サイアミンの外に、ピリドキシン、葉酸を必要とするようになり、又原株が必須とするアミノ酸(アルギニン、プロリン、シスチン、ヒスチジン)の外に、グルタミン酸、アスパラギン酸を含む数種のアミノ酸が必須になつた。
4. 209P 耐性株が水解カゼイン培地で原株よりよくはえるということは従来の報告と一致しているが、他の 2 株の耐性株ではかえつて増殖度が減るのが確認された。
5. 変異した性状の中、形の変異はもつとも早く元にもどり、栄養要求度の変異は全く復帰のしるしが見られなかつた。

終りに八田細菌試験部長に敬意を表し、御指導をいただいた秋葉朝一郎先生に深甚の謝意を表する。

引用論文

- 1) Klimek, J. W., Cavallito, C. J., and Bailey, J. H., *J. Bact.*, **55** (2), 139~145 (1948).
- 2) 榑原: *医学と生物学*, **18** (6), 336~339 (1951).
- 3) 寺田: *ストレプトマイシン協議会報告*, 1951-4-10.
- 4) 平塚: *日本細菌学雑誌*, **7** (2), 91~94, 95~98 (1952).
- 5) 桑原, 大淵, 井上, 松島: *医学と生物学*, **23** (3), 92~95 (1952).
- 6) Clapper, W. E. and Heatherman, M. E., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **73** (2), 153~156 (1950).
- 7) Gale, E. F. and Rodwell, A. W., *J. Bact.*, **55** (2), 161~167 (1948).
- 8) English, A. R., and McCoy, E., *J. Bact.*, **62** (1), 19~26 (1951).
- 9) Sevag, M. G. and Rosanoff, E. I., *J. Bact.*, **63** (2), 243~251 (1952).

Summary

The authors have investigated the variations in morphological characteristics, biological functions and in nutritional requirements of three induced streptomycin-resistant strains of *Micrococcus pyogenes var. aureus*.

The resistant variants were selected by serial transfers, incubating for 48 hours at 37°C in nutrient broth containing progressive levels of dihydrostreptomycin (SM). During successive transfers a rapid progressive increase of the resistance was obtained until, after 10 transfers, the organisms grew well even at the level of 20 mg per cc of SM. It is an increase in the resistance 10,000 times as much as that of the sensitive parents. No fluctuation was noted in the course of increase in the resistance.

The resistant strains showed the enlargement of cells, approximately 2 to 3 times as large as that of parent cells. Increase in the resistance was accompanied by a progressive suppression or loss of biological functions; some of the sugar fermentations, plasma coagulation and hemolysis were completely suppressed.

The resistant variant of Heatley strain required pyridoxine and folic acid as growth factors besides niacin and thiamin, and that of Terashima strain could not grow in casein hydrolysate media, but that of 209P strain did not show any appreciable changes in growth factor requirements.

For the growth of all the resistant cultures, several amino acids besides arginine, cystine, proline or histidine seemed to be indispensable.

Subculturing in SM-free media, reversed the morphological changes very rapidly, but the changes of the biological functions, and vitamins and amino acids requirements were remained for a considerable time.

Received September, 27, 1952.

脳下垂体後葉ホルモンの検定 (第 2 報)*

標準粉末 (日局標準品) の製造と子宮収縮成分の力価検定について

長沢 佳熊, 中山 豪一, 佐藤 浩

Bioassay of Posterior Pituitary Hormones (II)

Studies on the Preparation of the Standard Powder and
the Bioassay of Oxytocin.

By Kakuma NAGASAWA, Gōichi NAKAYAMA and Hiroshi SATO.

まえがき

日局脳下垂体後葉標準品を調製する目的で, 脳下垂体後葉標準粉末の製法¹⁾に従つて製造し, その子宮収縮成分 Oxytocin の効価を国際標準品 (後述) 及び米局参考標準品を用い, 日局 VI²⁾ 及び米局 XIII³⁾ に収載されているモルモットの摘出子宮収縮法に準拠し, 更に Burn⁴⁾ の白鼠摘出子宮収縮法, 及び米局 XIV⁵⁾ の鶏の血圧下降法 (Coon 法⁶⁾ と呼ぶもの) を併用して検定し, 且つ各検定法による効価を比較検討したので報告する. 尚血圧上昇成分 Vasopressin の含量については脳髓破壊猫の血圧上昇法によつて検定したが, これに関しては別に報告する.

従来著者等は脳下垂体後葉標準粉末を冬季に製造していたが, 今回は夏季に行い, その効力の変動を調査し, 夏季においても製造の可能なことを知つた.

標準品 国際標準品 Pituitary (Posterior Lobe) Powder (後述) 及び米局参考標準品 Posterior Pituitary を用い, これ等と著者等が製造した標準粉末と比較検定を行つた.

脳下垂体後葉標準品については, 特にその子宮収縮成分 (オキシトシン Oxytocin) の効力単位の標準設定の必要から, 1925 年国際聯盟保健部生物学的製剤設定委員会では次のような製法 (McClosky の方法) を規定し, これによつて製造された脳下垂体後葉のアセトン乾燥粉末を標準品として使用することを決議した⁷⁾.

国際標準粉末の製法: 牛 25 頭以上の脳下垂体から死後 30 分以内に後葉を分離し, 直ちに附着している他の組織を除き, 脳下垂体 1 個につきアセトン 4 cc 以上の割合で計算した量のアセトン中に投じ, 3 時間放置後取出し, ハサミで小片に裁切し, 前と等量のアセトン中に入れ 24 時間放置した後取出し, 塩化カルシウム減圧デシケータ中で 50° 以下, 5 時間乾燥した後乳鉢中ですり潰し, 米局 40 番篩を通るまで微細粉末とし, 更に塩化カルシウム減圧デシケータ中で 12 時間, 50° 以下で乾燥した後, Soxhlet 抽出器でアセトンを用いて 3 時間抽出脱脂し, 抽出残留物を再び塩化カルシウム減圧デシケータ中で 12 時間乾燥する. この粉末は冷暗所で塩化カルシウム減圧デシケータ内に貯えるか, 又は褐色アンブル中に密封して貯える (McClosky の方法¹⁾).

英局標準品製法⁸⁾: 国際標準品とほとんど同様である. 但し, 屠殺後処理する時間は「できるだけ早く」と記し, 第 2 回のアセトンに浸し放置する時間 24 時間を「翌日」とし, 篩は「英局 44 番篩」とし, 50° 以下 12 時間乾燥を「1 夜乾燥」とし, 最後の保存用に用いる減圧デシケータは塩化カルシウムでなく「五酸化磷」を用いている. この製品は英局標準品又は国際標準品と数回比較検定を行つて単位を決定することとなつている.

以上の国際標準品は製法のみを規定しただけでは製品の力価に変動があるという欠点を認めたので, 1927 年英国ではこの標準品を製造し, 英国国立医学研究所 National Institute for Medical Research が保管し, その 1 部を各国の中央研究所に配布することとなり, 我国では厚生省東京衛生試験所 (現在の国立衛生試験所) が配布を受けることになつていたが, 昭和 19 年筆者の 1 人長沢がその検明部長として引ついだときには標準品に添附された説明書は現存するが, この標準品は見当らず, 戦災によつて研究室焼失のために全く不明である. 戦後 J.H.Q. の P.H.W. の Mr. Pain の助力により昭和 25 年米局参考標準品を購入し, 更に昭和 27 年 8 月英国国立医学研究所の Dr. W.L.M. Perry の厚意により国際標準品が送附された.

著者等は昭和 25 年 McClosky の方法¹⁾ で標準品を製造し, 翌 26 年米局参考標準品を基準とした標準品をホ

* 第 1 報は本誌 70 号, 1~4 頁 (昭 27), この報告の 1 部は第 25 回日本内分泌学会総会 (昭 27.4.2) 講演.

ルモン製剤懇談会の助力を得て製造配布を行った。

国際、英局、米局参考標準品のいずれもその 1 mg 中 2 単位を含む、この単位は通例オキシトシンのみについての規定であつたが、後年バソプレッシン¹⁰⁾及び抗利尿成分¹¹⁾の効価に対しても国際標準品を基準とすることとなり、厳密に云えば単位(子宮収縮成分)、単位(血圧上昇成分)、単位(抗利尿成分)とそれぞれ記すことになっている。

効力検定法 モルモットの子宮収縮法については第 1 報にも報告し、常法であるから省略するが、鶏の血圧下降法⁹⁾及び白鼠摘出子宮収縮法⁷⁾は我が国では詳述したものが少いので次に説明する。

1. 鶏血圧下降による効力検定法(米局 XIV⁸⁾及び Coon⁶⁾, Burn¹²⁾による)。

主として米局 XIV 法を紹介し、著者等の知見をも加えて記す。

試験動物: 米局 XIV では体重 1.0~2.5 Kg の若い成熟家鶏を用いると記載しているが、Coon⁶⁾は体重 1.8~2.2 Kg の 1 才未満の白色レグホン雄鶏を用いている。著者等は体重 1.5~2.5 Kg の成熟レグホン雄鶏を用いた。

操作法: 体重 Kg 当り溶性フェノバルビタール 0.2g を腓に腸筋肉に注射すると、約 1~1.5 時間で完全に麻酔するから、固定板上に鶏の右側を下にして両方の羽と両足をくくりつけて固定する。この時鶏の足は脊柱に対し直角に位置させる。次に左大腿の外部の羽毛を除き、皮膚に長さ 7~8 cm の切開をする。切開は大腿の 1.5 cm 下で、大腿に平行し、大腿の末端に対し約 2 cm 前方から行えばよい。このようにすれば Gluteus primus 筋が現われる。下側の皮膚を引きはがすと Gluteus primus 筋の前縁が Semitendinous 筋の上側に横たわつているのが見える。この縁をはがし、Gluteus primus 筋の縁を持ち上げると坐骨動脈、神経及び股静脈が Semitendinous 筋の後縁に沿つて走つているのが見える。次に Gluteus primus 筋を真中から縁に直角にハサミで切り、カン子で左右に開き坐骨動脈と股静脈を周囲の組織から分離する。坐骨動脈には 8.5% クエン酸ナトリウム液¹³⁾を充したカニューレを挿入する。このときカニューレから心臓に近い方の支動脈を約 2 cm の距離で閉塞する。抗血液凝固剤クエン酸ナトリウム液と動脈血との交換は極めて少量であるようにし、マンメータは脈搏と血圧の変化を明かに記録できるものを使用し、血圧 2 mmHg 以下をマンメータの 1 mmHg で感ずるように調節する。検液は股静脈又は上膊静脈から注射する。

試験方法: 稀積標準液を注射したとき、急激で一過性の血圧下降 (20~40 mmHg) を示すような量を定めねばならない。必要があれば試験の始め又は試験中にその量が 0.15~0.5 cc になるように稀積標準液の濃度を調節する。稀積標準液を数回注射するとき速かに反応が減ずるようなタキフィラキシーが起つたならば、その鶏を廃棄する。

稀積検体液とその効価を比較する場合、稀積標準液を 3~10 分間の一定間隔で注射し、キモグラフ上に記録される血圧下降が 20~40 mmHg で起るような用量を定め、常にこの用量を注射する。然し動物の感受性に变化がある場合には血圧下降がこの範囲内に保たれるように用量を加減する。稀積標準液の次に稀積検体液を注射し、交互に繰返すのであるが、稀積検体液注射の始めの 2 回はその前に注射した稀積標準液による血圧下降の約 1/3、小さいような用量を、次の 2 回はほぼ等しいような用量を、最後の 2 回は約 1/3 大きいような用量を注射する。結局稀積標準液は全部で 7 回注射し、稀積検体液は 6 回注射するわけである。

2. 白鼠による効力検定法 (Burn 法⁷⁾)

子宮懸垂用の浴には下記処方によるリンゲル液 10 cc を入れる。

リンゲル液の処方:

塩化ナトリウム	45 g	塩化カリウム	2.1 g
塩化カルシウム	0.3 g	ブドウ糖	2.5 g
重炭酸ナトリウム	2.5 g	蒸留水	5 l

リンゲル液に通ずる酸素には炭酸ガスを 5% の割合に混ずる。

浴温は約 $32^{\circ} \pm 0.1^{\circ}$ とし、定量中は一定にしなければならぬ。

試験動物: 予め陰脂垢試験を行つて発情間期であることを確めた体重 140~200 g の雌白鼠を使用する。妊娠中のものは陰脂垢試験では判らないから注意を要する。妊娠の経験のあるもの又は妊娠中のものは使用できない。

Burn⁷⁾によると白鼠 11 匹の内 8 匹は試験に使用できるといふ。

白鼠子宮摘出: 白鼠を打殺し、直ちに頸動脈を切断して瀉血した後、開腹して左右の子宮角をできるだけ刺戟しないように摘出し、直ちにリンゲル液に浸ける。子宮角が太く桃色を呈するものは自動運動があるので殆ど試験に使

えない。

操作法: 先づ子宮の感度範囲を知るため、標準液を適当に稀釈した液の適当量 (普通は 0.02 単位) を浴内に注入する。薬液の作用時間は 45 秒とし、直ちに新しいリンゲル液で 3 回洗えばまもなく元の長さに弛緩する、もし 0.02 単位では収縮が強過ぎるならば、次回は 0.01 単位を注入する。用量と用量の注入間隔は 2~3 分であるが、子宮によつては 5 分間隔でよい場合もある。ただし実験中は一定間隔としなければならない。上記のようにして最大の感度範囲を求める。検定には最高収縮の 1~70% の所を用いることができる。この検定法は、収縮の高さと log 用量の間に直線的関係のあることを前提としているので、余り大きい収縮は用いることができない。普通は標準の 2 用量が最高収縮の約 10% と 60% となるように加減する。このような 2 用量は普通 4:3 なる比率であるが、3:2 又は 8:5 なる比率でもよい。ただこの比率が大きくなればなる程、結果は不正確となる。

白鼠子宮は浴内に懸垂後約 30 分で自働運動はなくなるが、もし 30 分以上たつても静止しないときは使用できない。

次に稀釈標準液の 2 用量とほぼ等しい収縮を起す検体の 2 用量を決定する。以上の操作は 30 分以内に終了しなければならない。

定量操作は稀釈標準液の 2 用量 (A, B) と稀釈検体液の 2 用量 (C, D) によつて行い、又両者の 2 用量間の比率を同様に行う。4 用量の組合せは 24 通りあるが、この内 6 組以上記録する。単位の算出法は実験 6, 第 14 表の資料により説明してある。

成績

標準品の製法: 国際標準粉末と同様であるが (前述)、屠殺後 30 分以内に処理したものと、3 時間以内に処理したものについて比較し、その力価にほとんど差のないことを認めた (実験 1 の A, B, C) ので、以後は後者の方法を採用することとし、乾燥は英局又は国際標準品の使用書 (報告書) 中に指示されているように五酸化磷上で行つた。又乾燥粉末を調製したとき容易に篩を通過する部分 (A) と粉末化が困難な部分 (B) をそれぞれ約 50% ずつ得、B は更に乳鉢中で丁寧にすり潰して篩過した。A は米局参考標準品の有する効力より強く (第 5 表第 1 図, 第 6 表第 2 図), B の効力は弱い (結締組織部分が多いためであると思う……第 7 表, 第 3 図) ので、A 及び B を適当に混和し、更に必要ならば脳下垂体後葉注射液を抽出した残留物を乾燥した粉末を加えて効力を低下させた。篩過の条件及び脱水の目的でアセトンに浸した脳下垂体後葉の貯蔵温度が高いと効力が低下するから注意を要する。

一般に冬季の製品は夏季のものより強く、その効力は国際標準品より強いから注意しなければならない。又夏季でもアセトン貯蔵を冷蔵庫内で行えば、国際標準品に相当する効力又はそれ以上の粉末は容易に調製し得る (詳細は続報にゆずる) ことが判明した。

国際標準品と米局参考標準品の効力はほぼ等しいことは実験 4 (第 8 表, 第 4 図) に示した。

3 種の検定法により、我々の製造した脳下垂体後葉乾燥粉末の効力を検定した結果、国際標準品及び米局参考標準品の効力とほぼ等しいことを知つた (実験 5 の第 9 表, 第 5 図; 第 10 表, 第 6 図; 第 11 表, 第 7 図; 第 12 表, 第 8 図; 第 13 表, 第 9 図; 実験 6 の第 14 表, 第 10 図; 第 15 表; 第 11 図; 第 16 表, 第 12 図; 実験 7 の第 17 表, 第 13 図; 第 18 表, 第 14 図; 第 19 表, 第 15 図)。

白鼠子宮収縮法、鶏血圧下降法はモルモット子宮収縮法とほぼ等しい結果を与える。白鼠子宮収縮法で得た 3 回の平均単位は後葉乾燥粉末 1 mg=2.2 単位である、従つて米局参考標準品との効力比は 1.1 となる (実験 6 の第 14 表, 第 10 図; 第 15 表, 第 11 図; 第 16 表, 第 12 図)。又鶏血圧下降法では 2 回の平均単位は 1 mg=1.93 単位である、従つて米局参考標準品との効力比は 0.965 となる (実験 7 の第 17 表, 第 13 図; 第 18 表, 第 14 図)。

実験の部

アセトン乾燥粉末の製造 原料牛脳下垂体は芝浦屠殺場で採取し、前述の方法で調製した。第 1 表に収量に関する資料を示す。

個々のアセトン乾燥粉末はそれぞれモルモット子宮収縮法により予め効力を測定した後、乳鉢中でよく混和して検体とした。

標準液の調製: 日局 VI 及び米局 XIII 規定の方法に従い、国際標準品及び米局参考標準品からその 1 cc=1 mg (2 単位) 後葉標準粉末の溶液を調製した。

製品番号	採取年月日	脳下垂体 個数	脳下垂体後葉 アセトン乾燥粉末(g)	1頭当りの 収量 (mg)	備 考
St-I	24. 1. 20	25	0.265	10.6	屠殺後 3 時間で採取
	24. 1. 21	20	0.267	13.4	屠殺後 3 時間で採取
	24. 1. 21	3	0.007	2.3	屠殺後 30 分で採取
St-II	26. 6. 27	25	0.8	32	気温 26° 屠殺後 1~2 時間で採取
	26. 8. 08	30	1.0	33	屠殺後 1~2 時間で採取
	26. 8. 17	30	1.0	33	気温 32° で一夜放置 屠殺後 1~2 時間で採取
	26. 9. 03	15	0.6	40	屠殺後 1~2 時間で採取

第 1 表

検液の調製: 標準液の調製法に従い, 各検体 1 mg=1 cc の溶液を調製した.

モルモットによる効力検定

〔実験 1〕 St-I での実験, S-1 は屠殺後 30 分以内に採取したもの. S-2 は屠殺後 3 時間で採取したもの.

(A) 体重 290 g の雌モルモット, 用量: S-1 (20 倍稀釈液) 0.2 cc, S-2 (20 倍稀釈液) 0.2 cc (第 2 表参照).

S-1 により起つた子宮収縮の高さ (mm.)	(1) 52	(3) 45	(6) 46	(7) 50 (0.22 cc)
S-2 により起つた子宮収縮の高さ (mm.)	(2) 44	(4) 53	(5) 53	(8) 52.5 (0.25 cc)

第 2 表 () 内の数字は注射順序を示す.

(B) 体重 340 g の雌モルモット, 用量: S-1 (20 倍稀釈液) 0.2 cc, S-2 (20 倍稀釈液) 0.2 cc (第 3 表参照).

S-1 により起つた子宮収縮の高さ (mm.)		(3) 13.5	(5) 9.5
S-2 により起つた子宮収縮の高さ (mm.)	(1) 14.5	(2) 11.0	(4) 11.5

第 3 表 () 内の数字は注射順序を示す.

(C) 体重 290 g の雌モルモット, 用量: S-1 (20 倍稀釈液) 0.2 cc, S-2 (20 倍稀釈液) 0.2 cc (第 4 表参照).

S-1 により起つた子宮収縮の高さ (mm.)	(2) 28	(3) 33 (0.21 cc)
S-2 により起つた子宮収縮の高さ (mm.)	(1) 35	(4) 33 (0.25 cc)

第 4 表 () 内の数字は注射順序を示す.

註: (4) は (3) 注射後他の検体を 3 回注射した後の収縮の高さ. この子宮は自動運動あり, 不良であった.

〔実験 2〕 St-II での実験, 容易に篩を通過する部分.

(A) 体重 260 g の雌モルモット, 用量: 稀釈標準液 (米局参考標準品, 50 倍稀釈液) 0.3 cc, 稀釈検体液 (50 倍稀釈液) 0.25 cc (第 5 表, 第 1 図参照).

稀釈標準液により起つた子宮収縮の高さ (mm.)	(2) 28.0	(4) 28.0	
稀釈検体液により起つた子宮収縮の高さ (mm.)	(1) 28.0	(3) 28.5	(5) 29.0 (25%増)

第 5 表 () 内の数字は第 1 図のそれぞれに対応する.

(B) 体重 260 g の雌モルモット, 用量: 稀釈標準液 (米局参考標準品, 50 倍稀釈液) 0.24 cc, 稀釈検体液 (50 倍稀釈液) 0.2 cc (第 6 表, 第 2 図参照).

稀積標準液により起つた子宮収縮の高さ (mm.)	(2) 19.5	(4) 18.0
稀積検体液により起つた子宮収縮の高さ (mm.)	(1) 19.0	(3) 17.5

第 6 表 () 内の数字は第 2 図のそれぞれに対応する。

〔実験 3〕 St-II での実験, 篩過の困難の部分。

体重 198 g の雌モルモット, 用量: 稀積標準液 (米局参考標準品, 50 倍稀積液) 0.2 cc, 稀積検体液 (50 倍稀積液) 0.3 cc, (第 7 表, 第 3 図参照)。

稀積標準液により起つた子宮収縮の高さ (mm.)	(1) 29.0	(3) 30.0	(5) 28.0
稀積検体液により起つた子宮収縮の高さ (mm.)	(2) 29.5	(4) 29.0	(6) 43.0 (25%増)

第 7 表 () 内の数字は第 3 図のそれぞれに対応する。

〔実験 4〕 国際標準品と米局参考標準品

体重 219 g の雌モルモット, 用量: 稀積標準液 (国際標準品, 150 倍稀積液) 0.3 cc, 稀積検体液 (米局参考標準品, 150 倍稀積液) 0.3 cc (第 8 表, 第 4 図参照)。

稀積標準液により起つた子宮収縮の高さ (mm.)	(1) 30.5	(3) 30.0	(5) 35.0
稀積検体液により起つた子宮収縮の高さ (mm.)	(2) 29.5	(4) 29.0	

第 8 表 () 内の数字は第 4 図のそれぞれに対応する。

〔実験 5〕 検体は St-II のアセトン乾燥粉末をよく混合し, その 1 mg=1 cc 溶液を原液とした。

(A) 体重 266 g の雌モルモット, 用量: 稀積標準液 (米局参考標準品, 50 倍稀積液) 0.15 cc, 稀積検体液 (50 倍稀積液) 0.15 cc (第 9 表, 第 5 図参照)。

稀積標準液により起つた子宮収縮の高さ (mm.)	(1) 23.5	(3) 21.0	(5) 27.5 (25%増)
稀積検体液により起つた子宮収縮の高さ (mm.)	(2) 22.5	(4) 21.5	

第 9 表 () 内の数字は第 5 図のそれぞれに対応する。

(B) 体重 266 g の雌モルモット, 用量: 稀積標準液 (米局参考標準品, 50 倍稀積液) 0.2 cc, 稀積検体液 (50 倍稀積液) 0.2 cc, (第 10 表, 第 6 図参照)。

稀積標準液により起つた子宮収縮の高さ (mm.)	(1) 21.0	(3) 20.0	(5) 23.0 (25%増)
稀積検体液により起つた子宮収縮の高さ (mm.)	(2) 20.0	(4) 20.0	

第 10 表 () 内の数字は第 6 図のそれぞれに対応する。

(C) 体重 210 g の雌モルモット, 用量: 稀積標準液 (米局参考標準品, 50 倍稀積液) 0.2 cc, 稀積検体液 (50 倍稀積液) 0.2 cc, (第 11 表, 第 7 図参照)。

稀積標準液により起つた子宮収縮の高さ (mm.)	(1) 24.0	(3) 26.0	(5) 41.0 (25%増)
稀積検体液により起つた子宮収縮の高さ (mm.)	(2) 25.0	(4) 24.0	

第 11 表 () 内の数字は第 7 図のそれぞれに対応する。

(D) 体重 198 g の雌モルモット, 用量: 稀釈標準液 (米局参考標準品, 50 倍稀釈液) 0.3 cc, 稀釈検体液 (50 倍稀釈液) 0.3 cc (第 12 表, 第 8 図参照).

稀釈標準液により起つた子宮収縮の高さ (mm.)	(1) 23.5	(3) 23.0	(5) 31.0 (25%増)
稀釈検体液により起つた子宮収縮の高さ (mm.)	(2) 23.0	(4) 22.5	

第 12 表 () 内の数字は第 8 図のそれぞれに対応する。

(E) 体重 172 g の雌モルモット, 用量: 稀釈標準液 (国際標準品, 150 倍稀釈液) 0.4 cc, 稀釈検体液 (150 倍稀釈液) 0.4 cc, (第 13 表, 第 9 図参照).

稀釈標準液により起つた子宮収縮の高さ (mm.)	(1) 20.0	(3) 19.5	(5) 24.5 (25%増)
稀釈検体液により起つた子宮収縮の高さ (mm.)	(2) 20.0	(4) 19.5	

第 13 表 () 内の数字は第 9 図のそれぞれに対応する。

白鼠の摘出子宮収縮法¹⁾

【実験 6】 St-II での実験

(A) 体重 160 g の雌白鼠, 陰脂垢 V 期, 用量: 稀釈標準液 (米局参考標準品, 100 倍稀釈液) 0.4 cc (a), 0.3 cc (b), 稀釈検体液 (100 倍稀釈液) 0.4 cc (c), 0.3 cc (d), (第 14 表, 第 10 図参照)

組 用量	I	II	III	IV	V	VI	合計	平均
a	17.0	26.0	22.0	25.0	28.0	23.0	141.0	23.5
b	4.5	11.5	13.0	6.5	8.5	4.0	48.0	8.0
c	27.0	13.0	17.0	28.0	16.0	24.0	125.0	20.8
d	11.0	8.0	7.0	5.0	7.0	6.5	44.5	7.4

第 14 表 数字はそれぞれの用量を注入したとき起つた子宮収縮の高さ (mm.)

計算: 先づ高用量で得た二つの平均の平均を求めると、即ち

$$\frac{a+c}{2} = \frac{23.5+20.8}{2} = \text{約 } 22.2,$$

次に低用量で得た二つの平均の平均は

$$\frac{b+d}{2} = \frac{8.0+7.4}{2} = 7.7$$

用量を $\frac{1}{3}$ 倍することによる収縮高の平均増加 mm. 数は

$$22.2 - 7.7 = 14.5 \text{ である。}$$

a と c, 及び b と d との効力の差はそれぞれ $23.5 - 20.8 = 2.7$ $8.0 - 7.4 = 0.6$ となる。

従つて稀釈標準液と稀釈検体液間の効力の平均差は

$$\frac{2.7+0.6}{2} = \text{約 } 1.7 \text{ となる。}$$

次に収縮の高さは用量の対数に比例するとの仮定から

$$\frac{14.5}{1.7} = \frac{\log \frac{1}{3}}{M} \text{ となる。}$$

ここに M は注入した稀釈標準液と稀釈検体液の効力比の対数である。

$$\log \frac{1}{3} = 0.6021 - 0.4771 = 0.125 \quad \text{故に} \quad M = \frac{0.125 \times 1.7}{14.5} = \text{約 } 0.015$$

Antilog 0.015 は log 1.035 である。すなわち稀釈標準液は稀釈検体液より効力が強いので $\frac{a}{c} = 1.035$

となる。稀釈標準液 1 cc は 0.02 単位を含んでいるので $0.02 = 1.035 \times \frac{\text{検体の単位数}}{100}$

故に 検体の単位数 = 1.93 すなわちアセトン乾燥粉末 1 mg = 1.93 単位となる。

英局 VIII^d により計算すると $M(\text{効価比})=1.033$; 信頼限度 ($P=0.95$) = 108.8~91.8%

(B) 体重 130 g の雌白鼠, 陰脂垢 V 期, 用量: 稀釈標準液 (米局参考標準品, 50 倍) 0.6 cc (a), 0.4 cc (b), 稀釈検体液 (50 倍稀釈液) 0.6 cc (c), 0.4 cc (d) (第 15 表, 第 11 図参照).

組 用量	I	II	III	IV	V	VI	合計	平均
a	23.0	20.0	20.0	21.0	20.0	21.0	125.0	20.8
b	15.0	13.0	14.0	16.0	15.5	15.5	89.0	14.8
c	24.0	23.0	24.0	20.0	20.5	20.5	132.0	22.0
d	18.5	21.0	15.5	14.0	15.0	16.0	100.0	16.7

第 15 表 数字はそれぞれの用量を注入したとき起つた子宮収縮の高さ (mm)

計算: [実験 6] の (A) の如く計算すると, アセトン乾燥粉末 1 mg = 2.24 単位となる.

英局 VIII^d により計算すると $M(\text{効価比})=1.118$; 信頼限度 ($P=0.95$) = 113.8~89.5%

(C) 体重 130 g の雌白鼠, 陰脂垢 V 期, 用量: 稀釈標準液 (米局参考標準品, 50 倍稀釈液) 0.4 cc (c), 0.25 cc (d), 稀釈検体液 (50 倍稀釈液) 0.4 cc (a), 0.25 cc (b) (第 16 表, 第 12 図参照).

組 用量	I	II	III	IV	V	VI	合計	平均
c	15.0	15.0	15.0	14.0	14.0	13.5	86.5	14.4
d	9.0	6.0	10.0	9.5	10.0	11.0	55.5	9.3
a	18.5	16.5	15.0	13.5	13.5	13.5	90.5	15.1
b	11.0	7.5	12.0	11.5	12.0	11.0	65.0	10.8

第 16 表 数字はそれぞれの用量を注入したとき起つた子宮収縮の高さ (mm)

計算: [実験 6] の A の如く計算すると, アセトン乾燥粉末 1 mg = 2.24 単位となる

英局 VIII^d により計算すると $M(\text{効価比})=1.116$; 信頼限度 ($P=0.95$) = 114.6~85.5%

鶏の血圧下降法

[実験 7] St-II での実験

(A) 体重 1.5 Kg の雄白色レグホン鶏, 用量: 稀釈標準液 (米局参考標準品, 10 倍稀釈液) 0.3 cc (0.06 単位); 稀釈検体液 (10 倍稀釈液) 0.2 cc, 0.3 cc, 0.4 cc. (第 17 表, 第 13 図参照).

	I	II	III	IV	V	VI	VII
稀釈標準液により起つた血圧下降 (mmHg)	(1) 26.0 (0.3)	(3) 28.0 (0.3)	(5) 26.0 (0.3)	(7) 26.0 (0.3)	(9) 26.0 (0.3)	(11) 25.0 (0.3)	(13) 22.0 (0.3)
稀釈検体液 (10 倍) により起つた血圧下降 (mmHg)	(2) 18.0 (0.2)	(4) 24.0 (0.2)	(6) 25.0 (0.3)	(8) 23.0 (0.3)	(10) 30.0 (0.4)	(12) 25.0 (0.4)	

第 17 表 上段 () 内の数字は第 13 図のそれぞれに対応する.

下段 () 内の数字は注射 cc 数.

計算: 米局 XIV 法によつて計算するとアセトン乾燥粉末 1 mg = 1.8 単位. 標準誤差 0.05 単位である.

(B) 体重 2.0 Kg の雄白色レグホン鶏, 用量: 稀釈標準液 (米局参考標準品, 20 倍稀釈液) 0.2 cc (0.02 単位), 稀釈検体液 (20 倍稀釈液) 0.15 cc, 0.2 cc, 0.25 cc. (第 18 表, 第 14 図参照).

	I	II	III	IV	V	VI	VII
稀積標準液により起つた血圧下降 (mmHg)	(1) 30.0 (0.2)	(3) 33.0 (0.2)	(5) 27.0 (0.2)	(7) 24.0 (0.2)	(9) 24.0 (0.2)	(11) 20.0 (0.2)	(13) 23.0 (0.2)
稀積検体液 (20 倍) により起つた血圧下降 (mmHg)	(2) 22.0 (0.15)	(4) 21.0 (0.15)	(6) 27.0 (0.2)	(8) 26.0 (0.2)	(10) 30.0 (0.25)	(12) 30.0 (0.25)	

第 18 表 上段 () 内の数字は第 14 図のそれぞれに対応する。
下段 () 内の数字は注射 cc 数。

計算: 米局 XIV 法によつて計算するとアセトン乾燥粉末 1 mg=2.06 単位。標準誤差 0.02 単位である。

(C) 体重 2.5 Kg の雄白色レグホン鶏, 用量: 稀積標準液 (国際標準品, 20 倍稀積液) 0.15 cc (0.015 単位), 0.2 cc (0.02 単位), 0.25 cc (0.025 単位), 稀積検体液 (20 倍稀積液) 0.2 cc. (第 19 表, 第 15 図参照)。

	I	II	III	IV	V	VI	VII
稀積検体液により起つた血圧下降 (mmHg)	(1) 32.0 (0.2)	(3) 35.0 (0.2)	(5) 33.0 (0.2)	(7) 30.0 (0.2)	(9) 27.0 (0.2)	(11) 27.0 (0.2)	(13) 25.0 (0.2)
稀積標準液により起つた血圧下降 (mmHg)	(2) 27.0 (0.15)	(4) 27.0 (0.15)	(6) 31.0 (0.20)	(8) 26.0 (0.20)	(10) 33.0 (0.25)	(12) 31.0 (0.25)	

第 19 表 上段 () 内の数字は第 15 図のそれぞれに対応する。
下段 () 内の数字は注射 cc 数。

計算: 米局 XIV 法によつて計算するとアセトン乾燥粉末 1 mg=2.03 単位。標準誤差 0.05 単位である。

〔実験 8〕 国際標準品と米局参考標準品

(A) 体重 2.5 Kg の雄白色レグホン鶏, 用量: 稀積標準液 (国際標準品 20 倍稀積液) 0.25 cc (0.025 単位), 稀積検体液 (20 倍稀積液) 0.2 cc, 0.25 cc, 0.3 cc. (第 20 表, 第 16 図参照)。

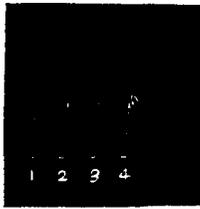
	I	II	III	IV	V	VI	VII
稀積標準液により起つた血圧下降 (mmHg)	(1) 27.0 (0.25)	(3) 31.0 (0.25)	(5) 25.0 (0.25)	(7) 27.0 (0.25)	(9) 21.0 (0.25)	(11) 23.0 (0.25)	(13) 25.0 (0.25)
稀積検体液により起つた血圧下降 (mmHg)	(2) 23.0 (0.2)	(4) 23.0 (0.2)	(6) 27.0 (0.25)	(8) 24.0 (0.25)	(10) 32.0 (0.3)	(12) 27.0 (0.3)	

第 20 表 上段 () 内の数字は第 16 図のそれぞれに対応する。
下段 () 内の数字は注射 cc 数。

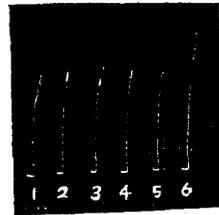
計算: 米局 XIV 法. によつて計算すると米局参考標準品 1 mg=2.06 単位。標準誤差 0.07 単位となる。



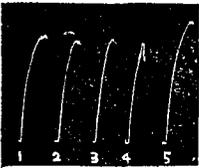
第 1 図



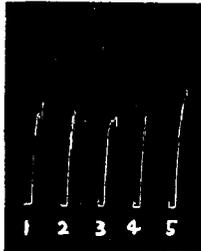
第 2 図



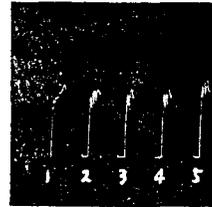
第 3 図



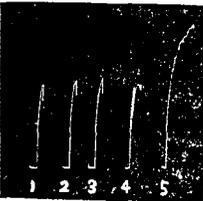
第 4 図



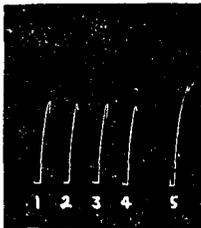
第 5 図



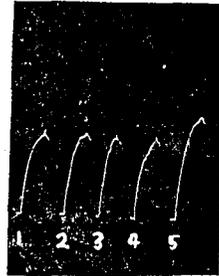
第 6 図



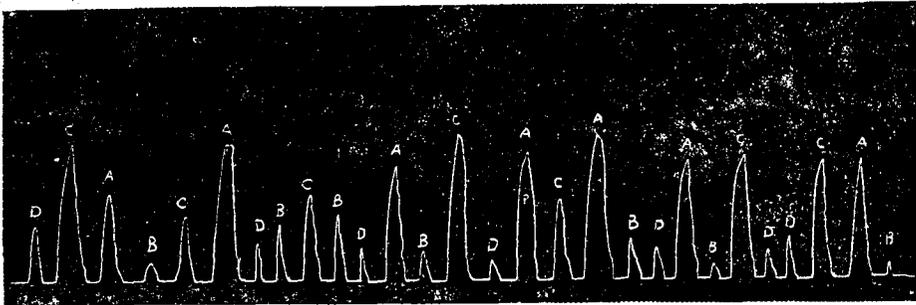
第 7 図



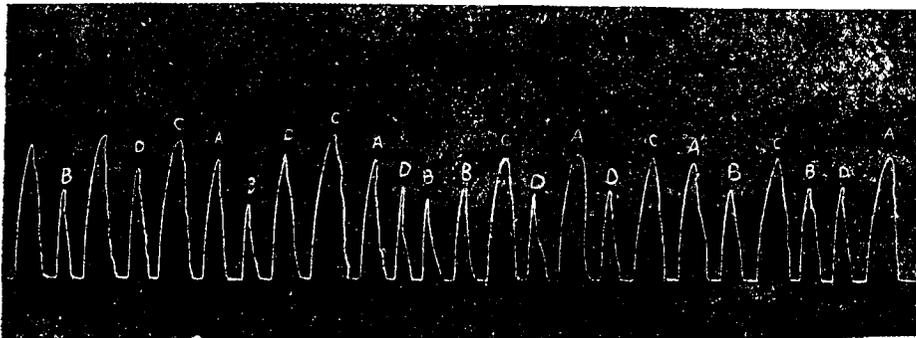
第 8 図



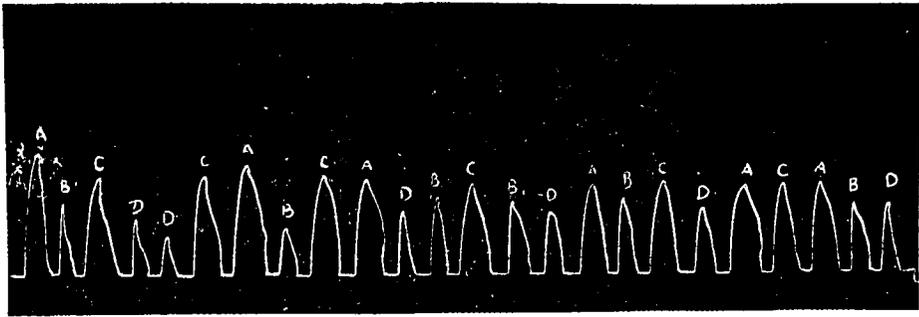
第 9 図



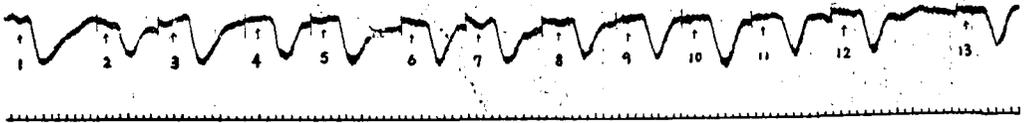
第 10 図



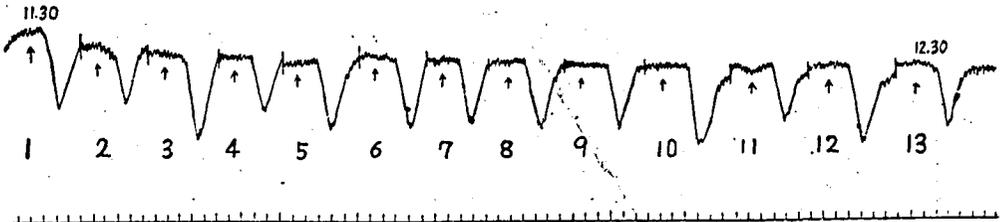
第 11 図



第 12 図

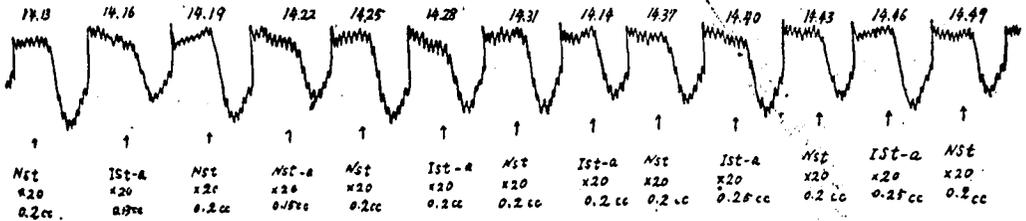


第 13 図 (1目盛: 6秒)



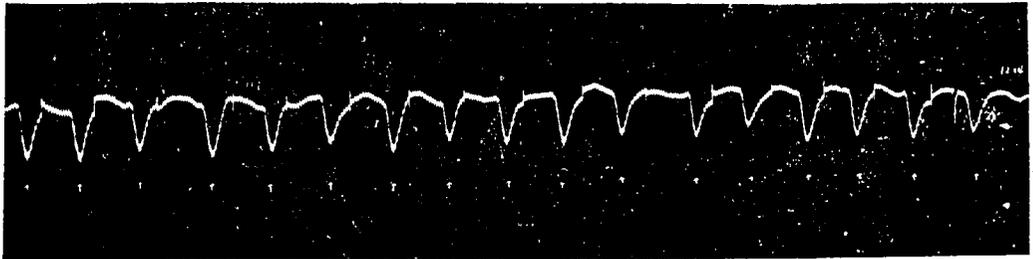
第 14 図 (1目盛: 6秒)

第 24 回鶏血圧実験 (昭 27. 11. 7, 金, 晴, 18°C)
♂ 2.5 Kg Na-phenobarbital, 0.21 Kg. (その 1)



第 15 図

第 21 回鶏血圧実験 (その 4) (昭 27 10. 6, 月, クモリ)
第 2 回標準品検定
♂ (去勢失敗したもの); 2.2 Kg Ist x10; Ast x10



Ist x10 0.15	Ast x10 0.2	Ist x10 0.15	Ast x10 0.2	Ist x10 0.15	Ast x10 0.15	Ist x10 0.15	Ast x10 0.15	Ist x10 0.15	Ast x10 0.2	Ist x10 0.15	Ast x10 0.2	Ist x10 0.15	Ast x10 0.25	Ist x10 0.15	Ast x10 0.25	Ist x10 0.15
--------------------	-------------------	--------------------	-------------------	--------------------	--------------------	--------------------	--------------------	--------------------	-------------------	--------------------	-------------------	--------------------	--------------------	--------------------	--------------------	--------------------

第 16 図

文 献

- 1) M. J. Smith, W. T. McClosky: Hyg. Lab. Bull. No. 138, 1 (1924); 緒方 章: 臓器薬品化学中巻 113 頁 (昭和 19).
- 2) 日局 VI (厚生省版), 442.
- 3) 米局 XIII, 414 (1947); 薬学大全書補遺, 1, 201~202 (昭和 26).
- 4) J. H. Burn, D. J. Finney, L. G. Goodwin: Biological Standardisation, 180~186 (1950). 英局 VIII, 822~823 (1953).
- 5) 米局 XIV, 475 (1950); 薬学大全書補遺, 1, 202~204 (昭 26).
- 6) J. M. Coon: Arch. int. Pharmacodyn., 72, 79~99 (1939).
- 7) National Institute for Medical Research, Notes on the Nature and Use of Standard Pituitary (Posterior Lobe) Powder, 1933.
- 8) 英局 VII, 275; B. P. C. 1949, 436; 英局 VII, 821.
- 9) 米局 XIV, 658; 薬学大全書補遺 1, 207~209 (昭和 26).
- 10) 英局 VII, 291; B. P. C. 1949, 439; 薬学大全書補遺 1, 209~210 (昭和 26). 英局 VII, 598, 828.
- 11) 英局 VII, 814; 薬学大全書補遺 1, 210~211 (昭和 26). 英局 VII, 823.
- 12) J. H. Burn, D. J. Finney, L. G. Goodwin: Biological Standardisation, 186~187 (1950).
- 13) Thompson: J. Pharmacol. Exp. Therap. 80, 373 (1944).

Summary

We prepared the J. P. Standard Posterior Pituitary Powder, assaying its potency comparing with that of the International Standard and the U.S.P. Reference Standard, and found that those are approximately equal in potency. Mouse uterus contraction method and chicken's blood pressure falling method give almost similar results as guinea pig's uterus contraction method.

食品工場の空気検査成績について

川城 巖, 浦久保五郎, 佐藤とし (研究生)

Investigation on the Air at Several Food-plants.

By Iwao KAWASHIRO, Gorō URAKUBO and Toshi SATō

緒 言

著者等は今夏都下の食品工場、主に罐詰工場の空気検査を行い若干の結果を得たので報告する。

調査を行った工場は次の 11 の工場である。以下所在地、作業室の広さ、作業人員、製品及び大体の衛生状況等をあげる。

1. 月島, T 工場, Fig. 1 及び 1', 約 90 坪, 70 名, まぐろ罐詰, 床はコンクリートで水と魚脂により湿っている。溝による排水は良好。天井の高さ 3 間, 天井に扇風器 4 台装置, 屋根には通風窓あり, 壁に窓多く換気状況良好, 採光普通。

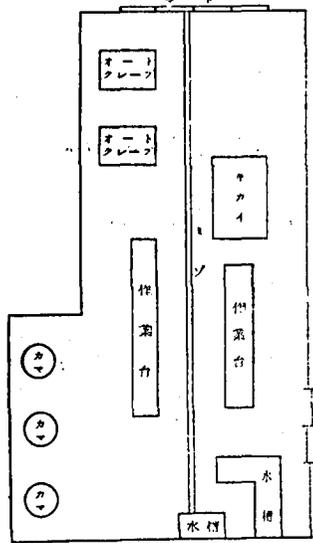


Fig. 1 T 工場

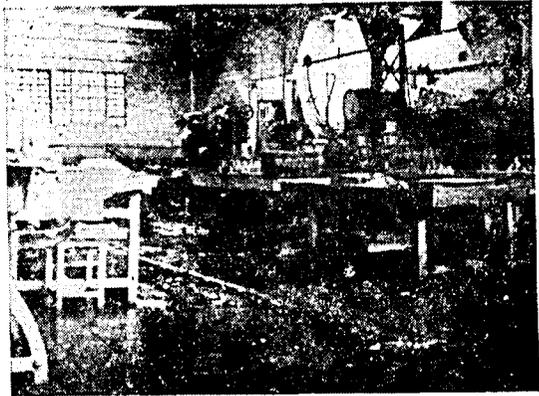


Fig. 1' T 工場

2. 神田松富町, CS 工場, Fig. 2 及び 2', 約 15 坪, 4 名, のり佃煮罐詰, 床はコンクリートで排水溝あり, 一部湿潤, 天井なく軒までの高さ 2 間, 屋根に通風窓あり, 壁には窓 4 ケ所あるも換気状態不良。室内に空箱等の堆積多く狭い, 採光状況普通。

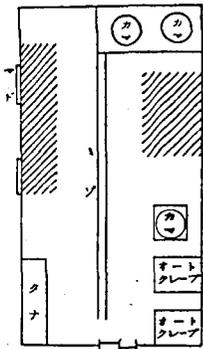


Fig. 2 CS 工場



Fig. 2' CS 工場

註 図中斜線の部分は空箱等の堆積である。

3. 日本橋蛸殻町, M工場, Fig. 3及び3', 約40坪, 14名, ラッキョウの瓶詰, 床はコンクリートで排水溝があり, 一部湿潤, 天井なく軒までの高さ2間, 屋根に通風窓があり, 壁には窓多く換気状態良好, 室内に一部空箱等の堆積があるが採光状況良好, 一般に清潔である.

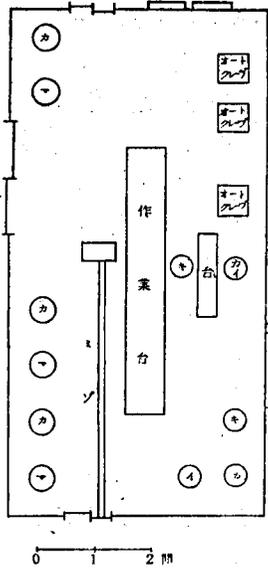


Fig. 3 M工場

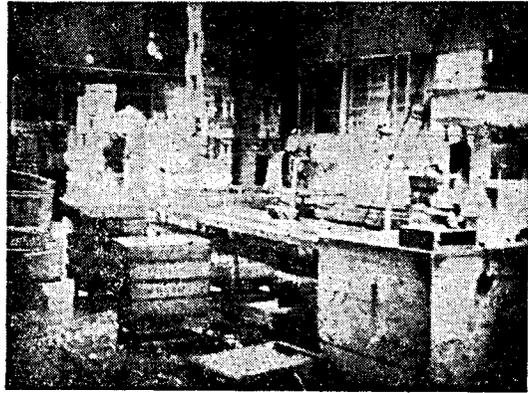


Fig. 3' M工場

4. 大森, Y工場, Fig. 4及び4', 約13坪, 5名, のり佃煮瓶詰, 床はコンクリートで大体乾燥している. 天井は中央部に金網を装置し高さ1.5間. 屋根には通風窓があり, 壁には金網をつけた窓が4ヶ所あるが天井の低いためか換気状況はさほど良好でない. 採光状況よく明るい.

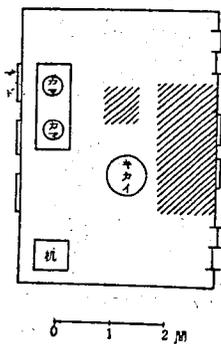


Fig. 4 Y工場



Fig. 4' Y工場

5. 大田区馬込, CK工場, Fig. 5及び5', 約50坪, 8名, 牛肉罐詰, 床はコンクリートで排水溝があるが大部分湿潤し, 天井はなく軒までの高さ2間, 屋根に通風窓があるが壁の窓が比較的小さく換気状態は良好でない. 採光悪く薄暗い.

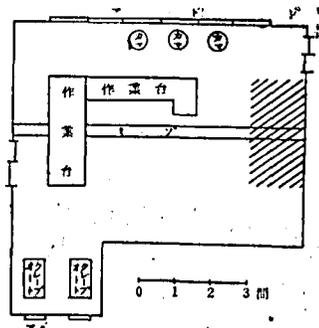


Fig. 5 CK工場



Fig. 5' CK工場

6. 新宿区戸塚町, F工場, Fig. 6 及び 6', 約40坪, 8名, リンゴジャム. 床はコンクリートで排水溝なく常に湿潤している. 室の半分に高さ1.5間の天井あり, あとの半分にはない. 窓も少く換気採光とも不良, なお室内に石油罐等の堆積物が多い.

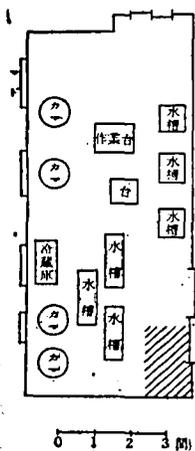


Fig. 6 F工場



Fig. 6' F工場

7. 西落合, K工場, Fig. 7 及び 7', 約60坪36名, みつ豆の罐詰. 床はコンクリート, 排水溝により排水しているが常に湿潤し, 天井はなく軒までの高さ2間, 窓の面積は小さいが換気状況よく採光もまず良好である.

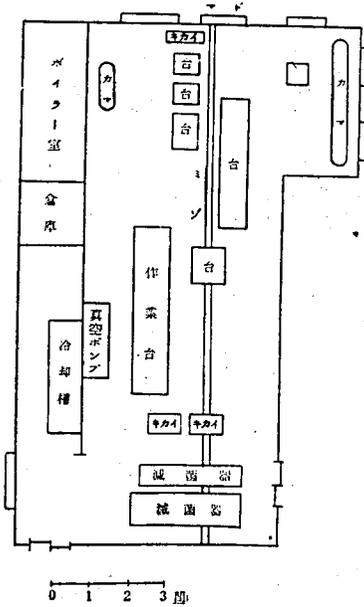


Fig. 7 K工場



Fig. 7' K工場

8. 西落合, S工場, Fig. 8 及び 8'. 約 36 坪, 7 名, イチゴジャム. 床はコンクリートで排水溝なく湿潤している. 天井はなく軒までの高さ 2 間, 窓の面積は適当であるが換気状況悪く, なほ室内で製品を煮沸滅菌しているので湿気が多く非常に暑い. 採光状況は普通.

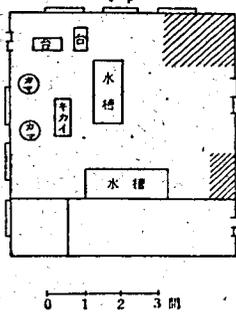


Fig. 8 S工場

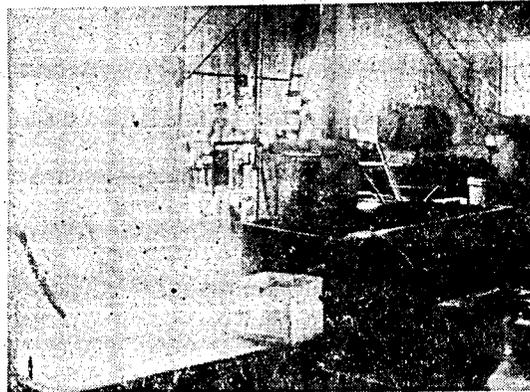


Fig. 8' S工場

9. 中野区上高田, H工場, Fig. 9 及び 9', 9', 約 90 坪, 22 名, トマトケチャップ瓶詰, 床はすべてコンクリート, 排水溝なく釜附近はやや湿潤し他は非常に乾燥している. 天井はなく軒までの高さは 2 間で一部に高さ 1.5 間の中二階を設けて物置としている. 窓の面積は小さいが, 入口をすべて開放し, 換気は良好である. 室内に木箱等の堆積物多く採光状況は普通.

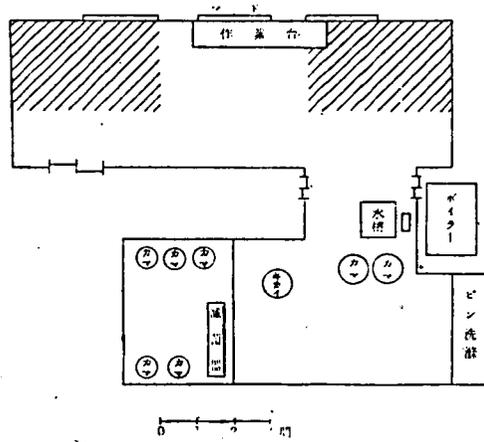


Fig. 9 H工場

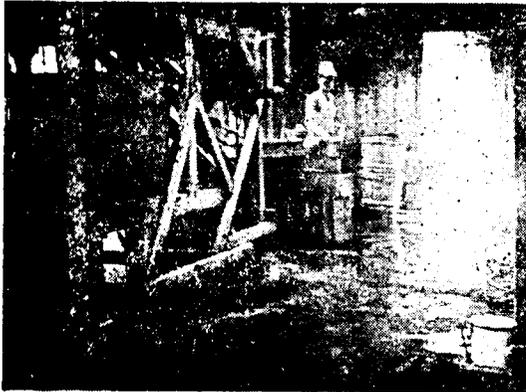


Fig. 9' H工場



Fig. 9'' H工場

10. 中野区野方町, TC工場, Fig. 10及び10', 約25坪, 15名, 桃及び鯛みそ罐詰. 床はコンクリート, 排水溝があるが湿潤している. 天井はなく軒までの高さ2間で窓の面積小さく換気状態及び採光もやや不良.

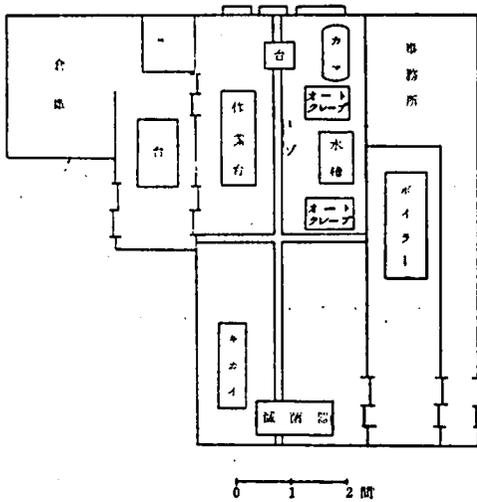


Fig. 10 TC工場



Fig. 10' TC工場

11. 品川, TA 工場, Fig. 11 及び 11', 約 25 坪, 15 名, 清涼飲料瓶詰. 床はコンクリートで排水溝なく一部湿潤している. 天井は板張りで高さ 8 尺, 金網をつけた窓が広いが換気採光状況は普通である.

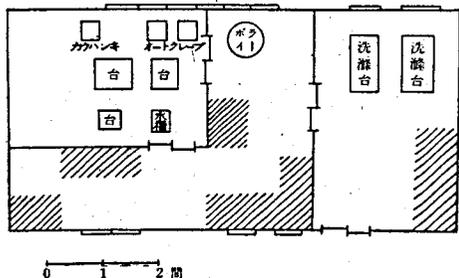


Fig. 11 TA 工場



Fig. 10' TA 工場

測定方法

室温及び気湿: アスマン通風温湿度計を用いて室の中央付近で測定した.

カタ冷却力及び気動: カタ寒暖計を用いた.

気圧: 調査実施と殆んど同時刻に本所内でフォルトン気圧計を用いて測定した値をとつた.

外気温: 調査日の正午現在における気象台発表のものを用いた.

炭酸ガス: 労研式改良型炭酸ガス測定器を用い室の中央附近 2 所において測定した.

なおこの測定器は一定容積 (約 1 l) の瓶中に空気を採取しこれを一定量 (20 cc) の水酸化バリウム溶液と振盪して炭酸ガスを吸収させ残余の水酸化バリウムを力価既知の修酸で滴定する方法によるものである.

一酸化炭素の検知: 北川式一酸化炭素検知器により検知管には一酸化炭素検知管 (A 型) を用いた.

塵埃: 労研式塵埃計を用ひ空気 1 cc 中の塵埃数を算定した. なお 検体鏡検には光源を斜横にとり倍率 200 倍を用いた.

落下細菌数: 径 9 cm の寒天平板培地 12 個を室の各所に配置し 10 分間開放した. 培養基は 6 個には普通寒天を, 他の 6 個には, 次の組成を有する Waksman 培養基を用い, 前者は 37°C に 3 日間, 後者は 25°C に 4 日間培養後集落を数えた. 前者に生育せる微生物を細菌とし, 後者に生育せるものは肉眼で糸状菌を数え糸状菌以外のものを酵母菌と見なした.

Waksman 培養基の組成

ブドウ糖 (無水)	10 g
ペプトン	5 g
KH_2PO_4	1 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5 g
H_2O	1000 cc
寒天	30 g
pH	約 5.4, 修正を行わず

測定結果

測定結果は Table 1, に示す如くであつた.

Table 1.

工場名	調査日 時刻	晴雨 及び正午 気温	気圧 (mmHg)		室温(°C)		気湿(%)		カタ冷却力		気動 (m/sec)	CO ₂ 含量 (v%)	CO 検知	塵埃数 in air/cc 3ヶ所各2回平均	落下細菌		酵母菌 平均
			乾球	湿球	乾球	湿球	乾球	湿球	細菌 平均	糸状菌 平均							
T	8.8 10.45	雨 26.5	749.8	28.2	26.0	84.04	3.53	12.84	0.378	0.092 0.059	(-)	360, 376, 385, 379 380, 384, 391,	16, 37, 76, 24,	38	23, 8, 11, 10 4, 7, 9,	35, 11, 13, 19 9, 16, 28,	
CS	8.12 13.20	< 曇り 28.2	757.4	29.1	25.4	68.61	2.12	10.10	0.048	0.034 0.056	(-)	235, 286, 247, 255 236, 275, 253,	71, 4, 11, 17 3, 7, 6,	11, 10, 19,	5, 12, 6, 10 11, 10, 19,	3, 5, 11, 7 2, 7, 1,	
M	8.14 11.05	晴 29.4	758.1	30.4	26.6	73.9	1.90	9.46	0.078	0.031 0.039	(-)	245, 276, 242, 265 286, 279, 276,	7, 6, 12, 7 8, 2, 5,	2, 41, 14	2, 41, 14 6, 9, 14,	13, 4, 11, 7 2, 7, 6,	
Y	8.15 10.30	晴 30.9	755.5	31.3	25.2	63.9	1.00	9.95	測定 不能	0.056 0.054	(-)	307, 214, 259, 268 302, 283, 273,	17, 31, 15, 18 13, 15, 13,	13, 14, 4, 10 2, 16, 13,	9, 18, 14, 10 3, 7, 9,		
CK	" " 12.05	" " "	"	31.6	26.6	68.14	1.52	8.98	0.073	0.129 0.105	(-)	216, 202, 179, 193 185, 173, 200,	11, 5, 6, 6 5, 7, 4,	5, 6, 5, 7 7, 5, 12,	29, 4, 19, 13 9, 8, 5,		
F	8.19 10.50	< 曇り 32.0	752.5	32.1	27.4	76.02	1.23	6.98	0.04	0.059 0.045	(±) 0.01% 以下	335, 192, 161, 244 343, 193, 239,	8, 7, 7, 21 69, 14,	4, 7, 6, 6	5, 4, 2, 6 9, 11,		
K	" " 13.05	" " "	750.9	32.6	28.0	72.63	0.89	7.61	0.005	0.028 0.025	(-)	374, 244, 273, 284 336, 225, 253,	41, 27, 7, 24 11, 55, 4,	5, 7, 8, 5 5, 4, 3,	10, 9, 20, 18 33, 16, 20,		
S	" " 14.10	" " "	"	34.2	29.8	71.97	-	5.47	測定 不能	0.063 0.051	(-)	325, 331, 340, 327 264, 328, 371,	31, 24, 16, 57,	32	13, 12, 15, 15 22, 12,	25, 11, 10, 24,	
H	8.20 11.10	晴 33.5	752.5	32.6 32.4	28.0 28.2	77.07 70.41	1.39 1.08	7.63 8.48	0.152 0.025	0.037 0.039	(-)	474, 503, 644, 546 758, 587, 610,	14, 29, 12, 29 16, 56, 46,	21, 12, 5, 10 11, 9, 4,	9, 18, 8, 10 7, 18,		
TC	" " 13.40	" " "	751.4	34.8	29.0	60.33	-	6.16	測定 不能	0.065 0.116	(-)	283, 270, 184, 231 255, 215,	53, 25, 7, 36, 26,	29	11, 5, 13	14, 12, 13	
TA	8.22 10.10	< 曇り 29.6	762.4	29.8	26.6	71.45	1.68	9.15	0.016	0.056 0.056	(-)	467, 457, 403, 458 477, 515, 431,	15, 21, 31, 24 16, 20, 39,	9, 1, 6, 13 26, 16, 17,	5, 9, 7, 10 15, 16,		
全体の 算術平均										0.059	(-)	314	22	10		12	

註 1. カタ冷却力空欄及び気動測定不能とあるは気動の過少と高温の為である。
 2. 落下細菌培養検査にて或る種の菌だけが著しく増殖し他の菌の生育を妨げている場合はこれを除外した。

考 察

環境衛生面の調査は当所として暫らく中絶の状態にあり、従つて、その装備もまだ充分とはいえず、調査上種々の不便もあり今回の成績に対し直ちに結論を設けることは出来ないが、大体要約して次の如き事が見られた。

1. 室温は一般に外気温よりも高く最高は 2.2°C も高いものがあつた。
2. 気温が高い。これは作業に水分を扱うことが多いためと思われる。
3. 高温のためカタ寒暖計で気動を測定する事は困難であつたが一般に換気状態は不良である。
4. 室内空気の炭酸ガス含量は大体一般の室内 (0.04~0.05%) と同じであつたが、一例だけが 0.12% に達した。
5. 一酸化炭素は一例だけが僅かに (0.01%以下) 見られたほか、検出されなかつた。
6. 塵埃数は一般に少く、これは終始床が湿潤しているためと思われる、床の乾燥している一例だけが普通一般の室内 (著者等の方法で 1 cc 中 300~400) より僅かに多かつた。
7. 落下細菌数は普通一般の室内 (著者等の経験ではペトリ皿 5 分間開放で細菌 30~40, 糸状菌 15~25) よりもやや少く、これも床の湿潤と空気の比較的静止しているためと思われる。

附 記

なおこの調査のため各工場より分与された製品について 微細異物の検査をも行つた、検査の方法は次の如くである。

ジャム、のり瓶詰、鯛みそ、みつ豆、ケチャップには 1% HCl を適当量加え 5 分間おだやかに煮沸消化した後、A.O.A.C.¹⁾ により常法通り検査した。

牛肉の罐詰、ラッキョウでは内容物をビーカに移し水を加えて適当にうすめ、ピンセットで肉片、ラッキョウ等をはさみとり水洗し、残液及び洗液を合わせ、これを濾過して濾紙を鏡検した。なお前者は脂肪が固つているので加熱溶解し、熱時に濾過した。

脱脂乳瓶詰はセディセント・ディスクで濾過し標準と比較した。

結果は Table 2 の通りであつたが、汚染の原因が当該工場にのみあるとは認め難い、なお今回の調査では製品の異物による汚染と空気検査の結果との関係性について言及することは出来なかつた。

Table 2.

製品の種類	製造所	検体採取量	混入異物
リシゴジャム	F	100 g	だに 1. 動物の毛 1. ごく僅かの砂
イチゴジャム	S	100 g	だに 1. ねずみの毛 1.
みつ豆罐詰	K	210 g (1 罐)	異物を認めず
鯛みそ罐詰	TC	50 g	昆虫破片 8. だに 1.
のり瓶詰 1.	CS	100 g	だに 1. ねずみの毛 1. わら 1. 木片 1. ごく僅かの砂
" 2.	Y	100 g	昆虫破片 1. だに 6. ごく少量の砂
ケチャップ瓶詰	H	95 g (1 瓶)	木片 1. ブラシの毛 2. 昆虫破片 1. だに 3.
牛肉罐詰	CK	210 g (1 罐)	昆虫破片 1. わら 1. 植物の繊維 3.
ラッキョウ瓶詰	M	195 g (1 瓶)	異物を認めず
脱脂乳瓶詰	TA	180 cc (1 瓶)	沈殿物 0.05 mg

終りに臨み、本調査に協力された中野、淀橋、大森、品川、神田、日本橋、中央各保健所、及び当所宮島弘衛、坂部フミ、小野謙一、竹内末久の諸技官に感謝する。

なおこの調査には千葉大学薬学部学生尾中喜代治、昭和薬科大学学生海宝美智子、同戸根木潤子、同福田知子の諸君が行動を共にした。

文 献

Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists, 7th Ed. 1950.

Summary

We investigated on the air at 11 food-plants, and reported here some results on the following subjects in the air: room temperature, relative humidity, air-mobility, CO₂-content, CO-detection, counting of dusts and micro-organisms, etc.

Received October 4, 1952.

市販紫外線燈の殺菌効力に関する研究

八田 貞義 青山 好作 丹治 園枝
 小沢 茂子 宮沢 文雄 穂坂 圭蔵
 栗栖 弘光

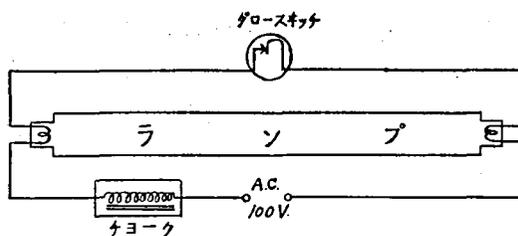
Studies on the Germicidal Action of Commercial Sterilamps.

By Sadayoshi HATTA, Kosaku AOYAMA, Sonoe TANJI, Shigeko OZAWA,
 Fumio MIYASAWA, Keizo HOSAKA and Hiromitsu KURISU

まえがき

X線, α 線, γ 線等の放射線では放射の際の線量とこの照射による微生物の傷害度との量的関係が数学的に解析の可能なことがはじめて Blau und Altenberg¹⁾ (1923) により報告され, Crowther²⁾ (1926), Glocker³⁾ (1932) らによつてこの事実が確認された。その後 Schreiber (1939) は初めて波長 2,300 Å と 2,540 Å を用いて酵母に対する傷害曲線を導くに至つた。ついで Luckiesh⁴⁾ (1946) が大腸菌について, 横山 (1950) は高圧石英水銀灯⁷⁻⁸⁾により腸チフス菌に対する傷害度について基礎的に検討し, 紫外線を照射した際にも X線等のときと同様の関係が成立つことを報告している。そこで著者らは市販紫外線殺菌灯 (Sterilamp)⁹⁾ を用いて, 生物学的には殺菌率を中心に数学的には指数関数を基として両者の相関性について吟味したのでこの成績について報告する。

実験に使つた紫外線灯の種類と性能¹⁰⁾, 3,000 Å 以下の紫外線では殺菌力が期待出来, なかでも 2,600 Å 附近が最大であるといわれる。著者らが用いた紫外線灯は放電管が石英或は特殊ガラス製のもので, 2,537 Å 線波長が最も強力に放射されている。この種類及び構造 (図 1 参照) は次の如くである。



第 1 図 紫外線灯の構造

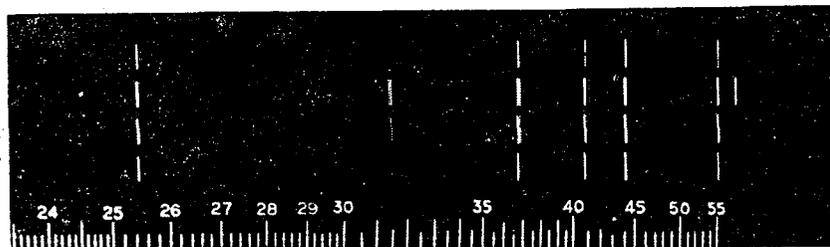


写真 (1) 紫外線灯スペクトル

- 特殊ガラス管製 (15 W)
- 石英管製 (15 W)
- 特殊ガラス管製 (15 W)
- 石英管製
- 波長目盛 (15 W)

1. 石英管製紫外線灯 三菱製 20 W (但し 電力が 50 サイクルのとき)
2. 石英管製紫外線灯 三共製 15 W

3. 特殊ガラス管製紫外線灯 三共製 15 W

4. 特殊ガラス管製紫外線灯 三共製 10 W

紫外線灯を照射すると 2,537 Å 線を中心に可視部に近い紫外線および可視光線も放射されている。それぞれの供試ランプの透過スペクトルは写真(図2)に示した。これは島津 QS 20 型分光器で富士パシクロ乾板を用い、露出時間 1 分で撮影したものである。なお試みに石英管製 15 W ランプ(三共製)の紫外線量を第1表に例示したが表にもみられるように 2,537 Å 波長がその測定量において最も多く 1.75 W を示し、この効率は 11~12% である。

第1表 紫外線量 石英管製ランプ(15 W)

紫 外 部		可 視 部	
波 長 (Å)	強 度 (W)	波 長 (Å)	強 度 (W)
2537	1.750	4046	0.091
2967	0.040	4358	0.213
3020	0.029	5470	0.190
3131	0.071	5790	0.088
3650	0.082		

実験の方法

1. 実験に使った菌株

実験に使った菌株は当部保存のもので、これらは次に示す基本培地に 2 週間に 1 回(糸状菌および放射菌は 4 週間に 1 回)ずつ継代保存した。この菌株名は第3表に詳示した。

i 嫌気性菌用培地

トシステン 0.75 g, カゼイン製ペプトン 15.0 g, 塩化トリウム 2.5 g, ブドウ糖 5.0 g, 寒天 0.75 g, チオグリコール酸 0.3 cc, 0.1% レサズリン溶液(新調製) 1 cc, 牛肉浸出液 1,000 cc, pH 7.1.

ii 好気性菌用培地

ポリペプトン 10.0 g, 塩化ナトリウム 3.0 g, 寒天 30.0 g, 牛肉浸出液 1,000 cc, pH 7.2 血清あるいは血液を必要とする菌種には 2% の割合に加えた。

iii. 糸状菌, 放線菌用培地

硝酸ナトリウム 3.0 g, 磷酸水素カリウム 1.0 g, 塩化カリウム 0.1 g, 硫酸マグネシウム 0.01 g, ブドウ糖 30.0 g, 硫酸第一鉄 0.01 g, ポリペプトン 10.0 g, 寒天 30.0 g 蒸留水 1,000 cc, pH 無修正。

2. 観察の方法

i. 好気性菌および嫌気性菌は 37°, 18 時間培養液を糸状菌, 放線菌は 25° で 7 日間培養の新鮮胞子を選び滅菌生理食塩液を所要濃度に稀釈し, この 0.5 cc をシャーレに注加し寒天平板上に均等に拡散させた。シャーレには予め水溶性有機物を除去した 2% 晒寒天で寒天平面を作った。この菌浮游液は距離 50 cm の高さに装置された紫外線灯より一定時間照射し, 照射後は基本培地(糸状菌, 放線菌も前記基本培地)を注加混和し 37°, 48 時間培養(糸状菌, 放線菌は 25° 7 日間培養)して生残菌を算定した。なお紫外線灯はスライダックを用い常に 100 V に保った。

ii. 紫外線の透過性を検べる目的で試験基体に蒸留水, 井戸水, 生理食塩液, 20%ブドウ糖液, 20% 転化糖液, 牛乳及び粉末(局方乳糖)を用い, 液体および固体では試験基体の層を 5 cm と 10 cm とに分け, これを距離 50 cm の高さから一定時間照射した。

実験の成績

1. 紫外線の透過と菌量による影響

紫外線は波長が2,600Å前後の比較的短波長のものが致死作用が強いがその透過力は少く、固体では全く透過しない。一般に固体あるいは液体の表在菌は紫外線吸収により容易に完全殺菌されるが、液体では深部に行くにしたがつて作用は減弱してくる。特に有機物が溶存すると、その量に伴つて紫外線の吸収が起り殺菌率は低下する。又一定容量内の菌量が余りにも過剰のときは、菌は死菌に被護されて生残率は増大し殺菌力の減退を示すようになる。著者らが固体、液体等7種の被検物を用いたときの成績を第2表に示したが、基体が蒸留水および生理食塩液等では紫外線の菌傷害率は最も良好で両者間には大差なく、また液層の厚さによる影響も認められない。ところが同じ液体でもブドウ糖液、転化糖液および牛乳では有機物の量および液層にかなり影響され、特に牛乳では紫外線の吸収顯著で螢光を發し、紫外線の作用の阻害が明瞭に観察された。粉末では単に表面の殺菌に止まっている。

著者らは以上の事実から紫外線照射による菌傷害(殺菌)を目的とした場合一定距離、一定時間の菌傷害率は菌量の多寡に左右されるであろうことに着目し、非芽胞菌として四連菌(G 4)、芽胞菌として枯草菌(G 66)を選び調べてみた。菌量は最高を 10^6 オーダ個として以下10 オーダずつ少くし最低を 10^1 オーダ個とする一列の菌浮游液を作り、紫外線を照射したとき、半対数グラフの縦軸に菌量を、横軸に照射時間をとり、100%殺菌率の点をつなぐと芽胞の有無は殺菌時間に強く影響するが、芽胞の有無にかかわらず供試菌数の増減は殺菌時間の長短となり相関性があるのがみられた。紫外線の殺菌力がBlunt¹³⁾らにより報告されて以来この方面の研究には輝かしいものがあるが、その成績は区々である。これは著者らが経験したように供試菌量、照射距離、基本溶媒などが殺菌力におよぼす主要な因子として働いているためと考えられるから、以下の実験はすべて 10^4 オーダ個の菌量を用い距離は50 cmとした。

第2表 殺菌力から見た紫外線の透過性

試験基体 \ 試験基体の層の厚さ	5 cm	10 cm
蒸留水	2~3	2~3
生理食塩液	2~3	2~3
井戸水	3~4	3~4
ブドウ糖液 (20%)	10~15	25~30
転化糖液 (20%)	10~15	30~35
牛乳	>100	>100
局方乳糖	>100	>100

註 数字は四連菌の90~100%殺菌を行う時間(分)

2. 生物学的にみた紫外線線量と傷害力

菌の紫外線に対する感受性をなるべく広い範囲の菌種を選び調べてみた。紫外線燈は石英管製と特殊ガラス管製の放電管とに分けて、別々に菌に照射し90~100%殺菌に要する時間を生物学的に実測した。紫外線による殺菌を、照射距離と菌量をほぼ一定にして較べると、菌種菌型の差異、病原性の有無等には殆んど関係がないが、芽胞(孢子)の有無によつて強い変化を与えている。第3表に記したようにパラチフスA菌、パラチフスB菌、チフス菌、赤痢菌、大腸菌、ブドウ球菌、靈菌、四連菌、変形菌などいずれも菌傷害時間は1~4分で類似しているが、枯草菌、ウエルチ菌、破傷風菌では15~25分で芽胞形成菌の場合にはより大きなエネルギーを必要とした。アクチノミセスは15~25分、或る種のアスペルギルス、リゾプスでは30分以上となつている。故に今芽胞形成菌を非芽胞形成菌と類似時間で殺菌しようとする場合には紫外線燈の放射エネルギーを6倍以上に増強されることが必要である。

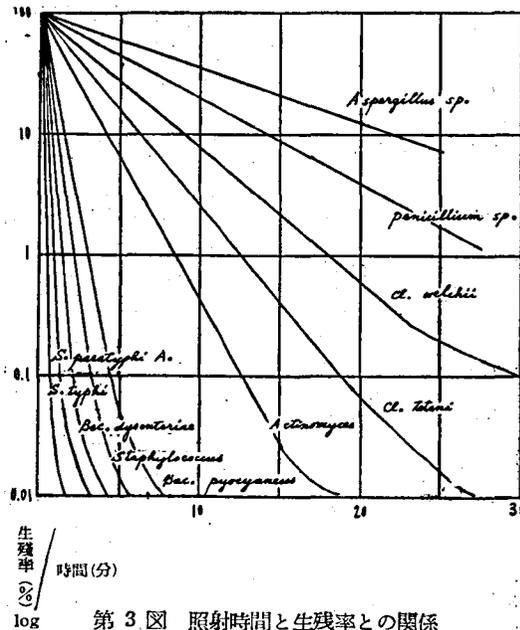
第3表 殺菌時間(単位分)

菌株	殺菌	石英管製 15 W	特殊ガラス管製 15 W
		90~100% 殺菌	
好 気 性 菌	パラチフス A 菌 (S. 1)	1~3	1~3
	パラチフス B 菌 (Java)	1~3	1~3
	鼠チフス菌 (S. 9)	1~3	1~3
	チフス菌 (S. 57)	1~2	1~2
	ゲルトネル菌 (S. 64)	1~2	1~2
	赤痢菌 (箕田九大×)	1~2	1~2
	赤痢菌 (KBIII)	1~2	1~2
	コレラ菌 (浦賀・3号)	1~2	1~2
	大腸菌	1~3	1~3
	" " (327)	1~3	1~3
	変形菌 (0×19)	1~3	1~3
	靈菌	1~3	1~3
	単球菌 (G. 10)	2~4	3~5
	四連菌 (G. 4)	2~4	2~4
	" " (G. 5)	2~4	2~4
	枯草菌 (G. 66)	15~20	15~20
	黄色ブドウ球菌 (Heatley)	2~4	2~4
	白色 " " (No. 11)	1~3	1~3
	レモン色 " " (M. 3)	1~3	1~3
溶血性連鎖球菌 (北)	3~5	3~5	
嫌 気 菌	ウェルチ菌	20~25	20~25
	破傷風菌 (陸三)	20~25	20~25
糸 放 状 菌	ペニシリウム (Q. 176)	20~25	20~25
	アスペルギルス	>30	>30
	リゾプス (R. 64)	>30	>30
	アクチノミセス (No. 20)	15~25	15~25

菌傷害度と指数函数との関係

菌は紫外線の照射により急激に傷害を受け生残菌は著減する。そこでこの傷害状況の吟味を計数的に試みるべく大腸菌とチフス菌を選び、照射後の生残菌数を基として判定を加えてみた。

この実験に用いた紫外線灯は石英管製 20 W, 石英管製 15 W, 特殊ガラス管製 15 W, 特殊ガラス管製 10 W の 4 灯である。この成績は第 4 表以下に示したが、試験結果をみると石英管製と特殊ガラス管製とでは同じ 15 W でも石英管製の方が殺菌力が高い。即ち大腸菌の生残率は照射 30 秒のとき特殊ガラス管製の 3.07% に対し、石英管製は



第3図 照射時間と生残率との関係

0.26%, 60 秒では前者が 0.08% で後者は 0.01% となっている。大腸菌とチフス菌とではチフス菌の方が紫外線に対する感受性は強くこの間の様子を照射 30 秒 (15 W) 後の傷害率から比較すると、特殊ガラス管製のものを用いた場合には、大腸菌の傷害率 96.9% に対し、チフス菌は 99.9% となっており、石英管製のものでは大腸菌の 99.7% に対し、チフス菌は 99.8% となっている。

いずれにしても菌傷害の強度は放射エネルギーに比例し $20W > 15W > 10W$ の順位を示し、石英管製と特殊ガラス管製とでは前者は後者に優る。しかしこの両者の強度の定量的な差は生物学的には明かではない。

紫外線灯ごとに各対照の発育菌数及び照射時間別の発育菌数から母平均の信頼限界を求める式で算定すると、即ち標本菌数平均 \bar{x} から母平均 m の存在範囲を危険率 α (5%) とし、自由度 $n_1=1, n_2=N-1$ とから次式によつて求めた

$$Pr\{\bar{x} + \mu\sqrt{F/N} \geq m \geq \bar{x} - \mu\sqrt{F/N}\} = 1 - \alpha$$

$$\therefore F \geq N(\bar{x} - m)^2 / \mu^2 \quad \mu^2 = \frac{1}{N-1} \left(\sum_{i=1}^N x_i^2 - N\bar{x}^2 \right)$$

$$\therefore \bar{x} + \sqrt{\frac{F \cdot \mu^2}{N}} > m > \bar{x} - \sqrt{\frac{F \cdot \mu^2}{N}}$$

これより危険率 α (5%) の発育菌数範囲を求め、これを実測値と比較してみた。この成績は第 4 表から第 7 表にわたり示した。

紫外線灯別に各対照の発育平均数に対する各照射群の生残菌数の百分率の対数を縦軸にとり、秒単位の照射量を横軸にとると第 4 図その 1 およびその 2 に示すように平均値はほぼ直線となる。ただ生残率が 0.1% 以下になると幾分曲線を示した。放射エネルギーの強度のもの程傷害度は大であり且つ線は直立した。このように紫外線の線量と細菌の傷害度との関係が半対数グラフではほぼ直線関係を示したことは両者の関係が指数関数関係にあることを示す。横山⁶⁾は紫外線の菌傷害における実験式として以下に示す関係式を与えた

$$\frac{d}{dt} (N_0 - N) = -(N_0 - N) \alpha \dots \dots \dots \text{第一式}$$

$$\therefore (N_0 - N) = N_0 e^{-\alpha t} \dots \dots \dots \text{第二式}$$

そこで N_0 を 100 とし $(N_0 - N)$ に照射群の紫外線によつて傷害されなかつた数の % を代入して作用係数を求めてみた。この係数はそれぞれの表および図に示したが各線量ごとの作用係数は大体一定していたが生残率が 0.1% 以

下の場合にはしばしば係数の動揺がみられた。この作用係数は紫外線灯が15W以上では、石英管製、特殊ガラス管製共に作用係数は0.1~0.2の間にみられたが、特殊ガラス管製10Wでは0.04~0.1の間にみられ、紫外線出力によつて幾分異つた。

第4表(その1) 紫外線(特殊ガラス管製10W)による大腸菌の傷害度

線量	発育菌数	百分率	発育平均数	発育菌数平均 =対スル百分率	作用係数	$\alpha=5\%$ ノ発 育菌数範囲
対照	32,200		39,000 ± 7,396			41,432 36,568
	36,300					
	48,700					
15秒	5,940	15.20	6,578 ± 1,751	16.93	0.118	7,349 5,807
	6,990	17.89				
	6,840	17.50				
	5,890	15.07				
	7,230	18.50				
30秒	1,095	2.80	1,618 ± 627	4.14	0.105	2,489 747
	1,946	4.98				
	2,698	6.91				
	1,066	2.72				
	1,284	3.28				
45秒	898	2.29	1,292 ± 374	3.31	0.08	1,810 774
	1,136	2.90				
	1,950	4.99				
	1,054	2.67				
	1,426	3.65				
60秒	206	0.53	198 ± 108	0.51	0.05	243 153
	209	0.53				
	178	0.46				
	152	0.39				
	247	0.63				
90秒	96	0.25	115 ± 31	0.29	0.06	199 31
	86	0.22				
	153	0.39				
	84	0.22				
	154	0.39				
120秒	42	0.11	56 ± 20	0.14	0.06	56 20
	29	0.07				
	67	0.12				
	84	0.22				
180秒	9	0.02	18 ± 9	0.05	0.04	30 6
	28	0.07				
	6	0.02				
	31	0.08				
	14	0.04				
240秒	0	0	0	0		
	0	0				
	0	0				
	0	0				
	0	0				

註: α =危険率, 以下の表もこれに準ず。

第4表(その2) 紫外線(特殊ガラス管製10W)によるチフス菌の傷害度

線量	発育菌数	百分率	発育菌数平均	発育菌数平均 =対スル百分率	作用係数	$\alpha=5\%$ ノ発 育菌数範囲
対照	57,300		53,900 ± 1,063			57,146 50,654
	49,300					
	55,100					

第4表 (その2) 紫外線 (特殊ガラス管製 10 W) によるチブス菌の傷害度 (続)

線量	発育菌数	百分率	発育菌数平均	発育菌数平均 =対スル百分率	作用係数	$\alpha=5\%$ / 発育菌数範囲
15秒	6,100	11.29	6,480 ± 1,061	12.02	0.141	8,315 4,645
	8,740	16.21				
	6,920	11.66				
	4,760	8.83				
	5,880	10.90				
30秒	1,220	2.26	1,391 ± 251	2.58	0.122	1,791 991
	1,396	2.58				
	949	1.76				
	1,734	3.21				
	1,657	3.07				
45秒	368	0.99	836 ± 1,539	1.55	0.093	1,567 105
	477	0.88				
	489	0.90				
	1,090	2.02				
	1,758	3.26				
60秒	341	0.65	144 ± 103	0.26	0.099	154 36
	141	0.26				
	95	0.17				
	52	0.09				
	93	0.17				
90秒	84	0.15	88 ± 33	0.16	0.071	133 43
	93	0.17				
	32	0.06				
	101	0.18				
	131	0.24				
120秒	24	0.04	35 ± 4	0.07	0.061	46 24
	66	0.12				
	19	0.04				
	18	0.03				
	24	0.04				
180秒	0	0	2 ± 2	0.004	0.056	4 0
	6	0.01				
	0	0				
	0	0				
	2	0.004				
240秒	0	0	0	0		
	0	0				
	0	0				
	0	0				
	0	0				

第5表 (その1) 紫外線 (特殊ガラス管製 15 W) による大腸菌の傷害度

線量	発育菌数	百分率	発育平均数	発育菌数平均 =対スル百分率	作用係数	$\alpha=5\%$ / 発育菌数範囲
対照	32,200		39,000 ± 7,396			41,432 36,568
	36,300					
	48,700					
15秒	6,000	15.35	6,572 ± 1,451	16.82	0.119	7,586 4,558
	5,400	13.87				
	5,040	12.90				
	9,050	23.16				
	7,350	18.81				
30秒	2,208	5.65	1,580 ± 826	3.07	0.107	2,726 334
	1,056	2.70				
	504	1.29				
	1,320	3.37				
	2,812	7.19				

第5表(その1) 紫外線(特殊ガラス管製 15 W)による大腸菌の傷害度(続)

線量	発育菌数	百分率	発育平均数	発育菌数平均 ニ対スル百分率	作用係数	$\alpha=5\%$ ノ発 育菌数範囲
45秒	81	0.21	± 112 69	0.28	0.130	205 19
	33	0.08				
	241	0.62				
	119	0.30				
	85	0.22				
60秒	30	0.08	± 32 11	0.08	0.118	75 0
	50	0.13				
	36	0.09				
	27	0.07				
	17	0.04				
90秒	0	0	0	0		
	0	0				
	0	0				
	0	0				
	0	0				

第5表(その2) 紫外線(特殊ガラス管製 15 W)によるチフス菌の傷害度

線量	発育菌数	百分率	発育平均数	発育菌数平均 ニ対スル百分率	作用係数	$\alpha=5\%$ ノ発 育菌数範囲
対照	57,300		53,900 ± 1,063			60,525 47,275
	40,300					
	55,100					
15秒	1,050	1.95	± 1,102 389	2.04	0.259	1,639 565
	1,730	3.21				
	820	0.34				
	610	0.11				
	1,300	2.41				
30秒	73	0.14	± 56 23	0.10	0.229	88 24
	64	0.12				
	37	0.07				
	85	0.16				
	20	0.04				
45秒	10	0.02	± 19 14	0.03	0.126	33 5
	46	0.09				
	8	0.01				
	7	0.01				
	21	0.04				
60秒	5	0.01	± 6 5	0.01	0.151	13 0
	7	0.01				
	4	0.01				
	15	0.02				
	0	0				
90秒	0	0	0	0		
	0	0				
	0	0				
	0	0				
	0	0				

第6表(その1) 紫外線(石英管製 15 W)による大腸菌の傷害度

線量	発育菌数	百分率 (%)	発育平均数	発育菌数平均 ニ対スル百分率	作用係数	$\alpha=5\%$ ノ発 育菌数範囲
対照	35,800		33,400 ± 6,986			35,525 31,275
	23,900					
	40,500					

第6表 (その1) 紫外線 (石英管製 15 W) による大腸菌の傷害度 (続)

線量	発育菌数	百分率 (%)	発育平均数	発育菌数平均 = 対スル百分率	作用係数	$\alpha=5\%$ の発育菌数範囲
15秒	5,540	16.58	6,194 ± 1,254	18.54	0.112	7,935 4,453
	5,560	16.64				
	5,560	16.64				
	5,910	17.69				
	8,500	25.44				
30秒	29	0.09	87 ± 80	0.26	0.198	199 0
	33	0.1				
	79	0.24				
	244	0.73				
	51	0.15				
45秒	3	0.009	6 ± 6	0.017	0.213	15 0
	2	0.006				
	19	0.057				
	5	0.015				
	0	0				
60秒	2	0.006	5 ± 5	0.010	0.147	13 0
	11	0.033				
	0	0				
	13	0.039				
	0	0				
90秒	0	0	0	0	0	0
	0	0				
	0	0				
	0	0				
	0	0				

第6表 (その2) 紫外線 (石英管製 15 W) によるチフス菌の傷害度

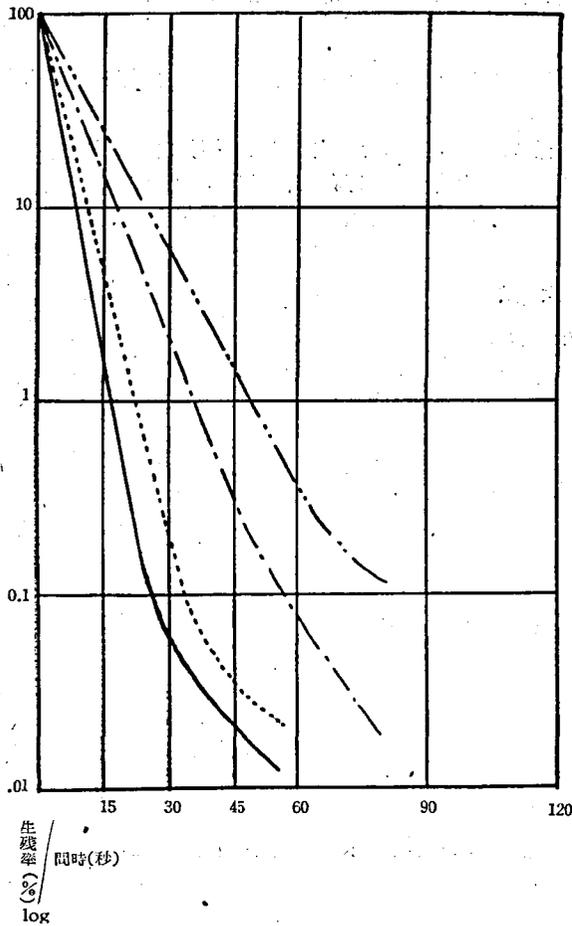
線量	発育菌数	百分率 (%)	発育平均数	発育菌数平均 = 対スル百分率	作用係数	$\alpha=5\%$ の発育菌数範囲
対照	56,100		60,600 ± 6,509			80,393 40,807
	69,800					
	55,900					
15秒	573	0.95	702 ± 174	1,158	0.297	945 459
	547	0.90				
	932	1.53				
	902	1.48				
	554	0.91				
30秒	71	0.11	118 ± 73	0.194	0.208	226 10
	54	0.09				
	206	0.33				
	207	0.34				
	54	0.09				
45秒	85	0.14	67 ± 69	0.110	0.168	193 0
	29	0.05				
	37	0.06				
	166	0.27				
60秒	3	0.01	3 ± 1	0.004	0.110	5 1
	6	0.01				
	0	0				
	0	0				
	4	0.01				
90秒	0	0	0	0		
	0	0				
	0	0				
	0	0				
	0	0				

第7表 (その1) 紫外線(石英管製 20 W) による大腸菌の傷害度

線量	発育菌数	百分率 (%)	発育平均数	発育菌数平均 ニ対スル百分率	作用係数	$\alpha=5\%$ ノ発 育菌数範囲
線量	48,100		53,466 ± 5,204			69,303 37,629
	60,500					
	51,800					
15秒	7,200	13.47	4,820 ± 3,128	9,015	0.160	9,163 477
	800	1.49				
	9,400	17.58				
	2,400	4.49				
	4,300	8.04				
30秒	300	0.56	± 215 90	0.402	0.184	480 50
	120	0.22				
	130	0.24				
	310	0.58				
45秒	34	0.06	± 20 16	0.037	0.131	40 0
	38	0.07				
	16	0.03				
	4	0.007				
	19	0.04				
60秒	3	0.006	± 5 5	0.009	0.103	13 0
	8	0.014				
	15	0.03				
	0	0				
	0	0				
90秒	0	0	0	0		
	0	0				
	0	0				
	0	0				
	0	0				

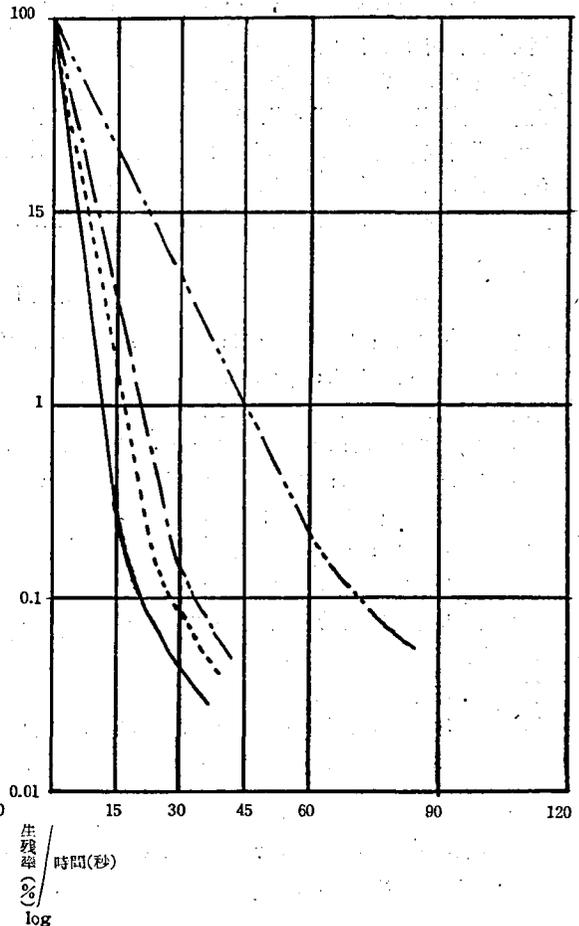
第7表 (その2) 紫外線(石英管製 20 W) によるチフス菌ノ傷害度

線量	発育菌数	百分率	発育菌数平均	発育菌数平均 ニ対スル百分率	作用係数	$\alpha=5\%$ ノ発 育菌数範囲
対照	32,200		29,100 ± 3,832			32,786 25,414
	31,400					
	23,700					
15秒	9,900	0.20	6,420 ± 3,006	22,061	0.101	10,594 2,246
	8,400	0.87				
	8,100	0.28				
	2,200	0.76				
	3,500	0.20				
30秒	39	0.14	± 21 17	0.070	0.161	53 0
	37	0.13				
	2	0.01				
	4	0.01				
45秒	7	0.02	± 10 8	0.033	0.134	21 0
	2	0.01				
	12	0.04				
	2	0.01				
	25	0.04				
60秒	0	0	0	0		
	0	0				
	0	0				
	0	0				
	0	0				
90秒	0	0	0	0		
	0	0				
	0	0				
	0	0				
	0	0				



第4図 (その1)
紫外線の傷害曲線 (大腸菌)

石英管製 20 W —————
 石英管製 15 W
 特殊ガラス管製 15 W - · - · -
 特殊ガラス管製 10 W - - - - -



第4図 (その2)
紫外線の傷害曲線 (チフス菌)

石英管製 20 W —————
 石英管製 15 W
 特殊ガラス管製 15 W - · - · -
 特殊ガラス管製 10 W - - - - -

む す び

1) 4種の市販紫外線殺菌灯 (石英管製紫外線灯, 三菱製 20 W (但し電力が 50 サイクルのとき), 石英管製紫外線灯, 三共製 15 W, 特殊ガラス管製紫外線灯, 三共製 15 W, 特殊ガラス管製紫外線灯, 三共製 10 W) を用いて紫外線による菌傷害の状態を生物学的に究明した。

2) 主として 2,537 Å 波長を放射するこれら殺菌灯は顕著な菌傷害作用を有したが, この作用は試験基体中に有機物が介在した場合, 液層が極度に深くなつた場合, 菌量が多量するときなどでは紫外線の菌傷害度は低下した。

3) 供試菌量および照射距離を一定にして菌傷害の強弱をなるべく, 菌種の異なるものを選んで較べたところ, 菌種, 菌型の差異, 病原性の有無などには殆んど関係がないが, 芽胞 (孢子) の有無はかなり強い変化を与えた。即ちパラチフス A 菌, パラチフス B 菌, 赤痢菌, 大腸菌, ブドウ球菌, 変形菌などは 1~4 分の照射で完全に殺菌されたが, 枯草菌, ウェルチ菌, 破傷風菌では 15~25 分, アクチノミセスは 15~25 分, 或る種のアスペルギルス, リゾプスは 30 分以上の照射を必要とした。

4) 紫外線の菌傷害の強度は放射エネルギーに比例し $20\text{ W} > 15\text{ W} > 10\text{ W}$ の順位を示し石英管製と特殊ガラス管製とでは前者は後者に優れていた。

5) 紫外線灯ごとに各対照の発育菌数及び照射時間別の発育菌数から母平均の信頼限界を求める式で算定すると、大部分の実測値は危険率 α (5%) の発育菌数範囲に存在した。

6) 紫外線の線量と細菌の傷害度との関係が指数関数関係にあるが、これを横山が与えた実験式から作用係数 (α) を求めたところ各線量ごとの作用係数は大体一定していたが、生残率が 0.1% 以下の場合にはしばしば係数の動揺がみられた。なお終りに臨み紫外線灯の紫外線量を測定して下さった東京都電気試験所浅野部長に深謝します。

引用文献

- 1) Blau, M. u Altenberg K: Zeitsch. physik. 12, 315, (1923)
- 2) Crowther, J. A: Proc. Roy, Soc. B. 100, 390, (1926)
- 3) Gloker, R: Zeit, physik, 77, 753 (1932)
- 4) Schreiber, H: Strahlen therapie, 49, 541, (1934)
- 5) Luckiesh D. E: Applications of germicidal erythema and infrared energy (1946)
- 6) 横山: 日本細菌学雑誌 5 (3), 151, (1950)
- 7) 星野, 吉田: 電気化学 17 (10), 221 (1949)
- 8) 星野: 日本数学物理学雑誌 17, 365 (1943)
- 9) 八田, 青山, 丹治, 中島, 森生, 本多: 東京医事新誌 67 (9), 29, (1950)
- 10) 原田: 照明学会雑誌 36 (1), 1, (1952)
- 11) 山田: 紫外線 (1938)
- 12) 増山: 少数例の纏め方と実験計画の立て方 (1949)

Summary

Employing ultra-violet ray, wave length of 2537 \AA , the authors have examined the interrelationships between the wave strength and death-rate of bacteria.

食品の新鮮度保持に関する研究

(VI) 電気漂白及び薬品漂白小麦粉中の細菌数及びその消長について

八田貞義, 青山好作, 旭 哲也, 宮沢文雄, 小沢茂子, 小笠原美知

Studies on Holding Food Fresh.

(6) On Number of Bacteria in Flour Bleached by Electricity and Chemicals.

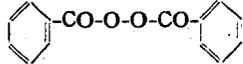
By Sadayoshi HATTA, Kosaku AOYAMA, Tetuya ASAHI,
Fumio MIYAZAWA, Shigeko OZAWA and Miti OGASAWARA

まえがき

最近電気或は薬品を用いた酸化による小麦粉の漂白が試みられ, これにより小麦粉の新鮮さは著しく向上し, 小麦粉の色調もより一層純白なものとなつた. パン類, 蛋白煉製品等の小麦粉を原料に使つた食品では, その鮮度(腐敗関係)は残存細菌数と関係があり, 製品中の細菌数は原料小麦粉中の生菌に影響されることが多い.

そこで著者は現在盛に行われている漂白小麦粉を細菌学的に試験し, 無漂白の小麦粉と較べた場合どの程度の差異が起るものか, 特に生菌数及び耐熱性菌数を基に調べてみた. 更に一定日間同じ環境に放置して生菌の消長を追究し漂白による影響をみたので, 以下この成績について述べる.

試験の方法

検体は〇〇製粉株式会社で製造された電気漂白小麦粉 8 種, 無漂白小麦粉 1 種の計 9 種と他の製粉株式会社で製造された(シロックス保土谷化学工業製造, これには Benzoylperoxide  が 17.6% 含有されている) 漂白小麦粉 3 種, 無漂白小麦粉 1 種の計 4 種で, 両者を合すと 13 検体となる.

好気性菌の菌数は標準寒天培地を用い, 37°, 48 時間培養してこれに生育する菌数を算定した. 糸状菌は Czapeck-Dox 寒天培地を使つて 25°, 7 日間培養後の生菌数を算えた. また耐熱性菌は 80°, 20 分或は 100°, 15 分湿熱で加熱を施し操作後の生残菌を標準寒天培地に発育させて算定した.

その検査日は隔日とし製造日から 30 日間を限りこの間の菌の消長を調べた. 検体の放置環境は電気漂白小麦粉は平均湿度 60% 温度 15° に, シロックス漂白小麦粉は平均湿度 60% 温度 25° である.

試験の成績

a. 電気漂白小麦粉

電気漂白は放電によつて窒素を酸化して窒素酸化物を生成し, これを小麦粉に作用させる方法で, 著者が試験した検体の含有亜硝酸量は予め化学的に定量(当所を化学試験部で実施)されこの値は表に詳記した. 各検体別に実施した生菌数算定の結果は漂白したもの(これは亜硝酸量が 3.6~1.0 p.p.m. の間のもの)も全く漂白しないものも好気性菌及び糸状菌数には大差なく, 時に無漂白小麦粉よりも生残菌が少いような検体が屢々みられたが, これは 80°, 20 分乃至は 100°, 15 分加熱して同一量中¹⁻²⁾に含まれている所謂耐熱性菌を基に算えて較べてみると, 漂白操作を加えたものも加えないものも全く菌数には認むべき顕著な差異はなく, 電気漂白は小麦粉の漂白には所期の効果を示したが, 細菌学的には特記すべき効果は見出せなかつた.

鉄本³⁾によると亜硝酸は, N/100 ではレモン色ブドウ球菌を 45 分で, チフス菌を 20 分で殺菌し, N/1000 になるとレモン色ブドウ球菌は 24 時間, チフス菌は 12 時間作用させないと殺菌出来ないという. したがつて電気漂白は漂白に使う亜硝酸の量及び漂白操作の作用時間の極く短いこと等からみると細菌学的な効果は, 余り望めないといえよう(第 1 表, その 1, その 2, その 3 参照).

第1表 好気性菌の消長(その1)

検体番号	試験日数 (日)	1	2	4	8	10	15	20	25	30	34	40
	亜硝酸量											
1	3.6 (P.P.m)	20	32	39	48	42	47	44	48	49	48	51
2	3.1 "	22	36	46	60	69	72	74	77	71	70	69
3	3.1 "	16	38	34	48	50	52	52	55	57	60	63
4	3.0 "	26	41	40	42	45	51	51	62	61	72	80
5	2.6 "	29	48	61	79	73	51	62	59	63	76	81
6	2.1 "	28	43	53	56	52	60	63	57	60	62	65
7	1.8 "	18	32	42	39	32	37	54	62	67	69	71
8	1.0 "	17	28	38	46	48	42	61	67	62	68	72
9	0.0 "	26	42	61	62	58	53	52	57	64	72	75

註: 実験値は表中数値を 1,000 倍したものとす。

第1表 糸状菌の消長(その2)

検体番号	試験日数	1	2	4	8	10	15	20	25	30
	亜硝酸量									
1	3.6 (P.P.m)	16	16	21	28	30	36	50	90	130
2	3.1 "	12	14	15	19	24	34	40	70	80
3	3.1 "	27	33	32	44	41	53	63	140	160
4	3.0 "	27	28	30	35	39	37	70	120	130
5	2.6 "	21	21	25	38	44	50	65	80	80
6	2.1 "	33	31	33	37	40	50	56	100	120
7	1.8 "	16	12	15	19	20	40	60	70	76
8	1.0 "	35	35	37	41	70	67	70	120	150
9	0.0 "	29	31	35	56	70	80	80	90	120

第1表 耐熱性菌数(その3)

作用温度及時間	検体番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	亜硝酸量	3.6 (P.P.m)	3.1 (")	3.1 (")	3.0 (")	2.6 (")	2.1 (")	1.8 (")	1.0 (")	0.0 (")
80° 20'		460	450	360	390	290	420	260	170	380
100° 15'		180	180	200	170	150	250	160	130	190
対 照	無 加 熱	32,000	36,000	38,000	41,000	48,000	43,000	32,000	28,000	42,000

b). シロックス漂白小麦粉

小麦粉中にシロックスを $1/2,000$, $1/4,000$ 及び $1/6,000$ 量に含有されるように区分けして、対照である漂白をしない小麦粉中の生菌数と比較したところ、電気漂白のときと同様好気性菌、糸状菌及び耐熱性菌の菌数には顕著な差異はみられず、ただ経過日数につれて幾分菌数の増加がみられた程度に止まった。

特にシロツクスの抗菌活性を腸チフス菌, 大腸菌, ブドウ球菌, 枯草菌, 緑膿菌, 変形菌等 19 種について調べた結果も抗菌作用は全くみられず, このものは理化学的な漂白作用は好結果が期待出来るが, 細菌学的には無影響といえる。

第 2 表 好気性菌の消長(その 1)

検体番号	試験日(日)	1	3	5	8	10	12	15	17	19	25	30
	B.P.含有量											
1	1/2.000	10	8	12	11	12	16	22	35	33	36	45
2	1/4.000	11	16	18	14	21	27	36	38	42	44	46
3	1/6.000	21	13	15	14	13	21	32	32	35	39	52
4	0	31	37	33	36	35	22	35	41	36	42	61

註: 実験値は表中数値を 1,000 倍したものとす。

第 2 表 糸状菌の消長(その 2)

検体番号	試験日(日)	1	3	5	8	10	12	15	17	19	25	30
	B.P.含有量											
1	1/2.000	18	23	48	76	88	77	131	112	96	124	
2	1/4.000	31	28	51	69	76	74	70	100	98	164	
3	1/6.000	34	39	40	76	124	138	136	129	136	152	
4	0	36	34	43	48	78	86	110	96	92	159	

第 2 表 耐熱性菌の消長(その 3)

作用温度と時間	検体番号	試験日(日)	1	3	5	8	10	12	15	17	19	25	30
		B.P.含有量											
80°	1	1/2.000	180	160	170	190	200	160	150	170	180	180	180
	2	1/4.000	150	150	130	120	130	180	160	150	170	180	160
	3	1/6.000	160	170	170	150	160	150	140	170	160	180	190
	4	0	170	190	160	180	170	190	190	190	200	220	190
100°	1	1/2.000	80	60	50	40	60	90	90	80	120	160	150
	2	1/4.000	40	40	30	30	50	80	70	60	100	100	100
	3	1/6.000	80	70	60	60	50	90	70	60	90	90	100
	4	0	70	60	60	50	70	70	80	100	100	130	150

総括及びむすび

現在英, 米で食用に供されている小麦粉の 90%以上は漂白操作が加えられているが, 漂白方法が 1% の三塩化窒素ガスを水蒸気で飽和した空気の中に通じて漂白した小麦粉は, これを食餌として犬を飼うと, 14 週以上続けるにつれてヒステリー或はテンカン様症状を現わすとして注目された。この発作の起り方はかなり個体差があるが, 漂白処理を受けた小麦粉を与えたものにのみ起り, これを止めれば, 症状は消失する。この現象は Mellanby⁴⁾により詳細に究明されたが同じ漂白小麦粉でも鼠について試験した成績では何等生体に害作用を与えず動物種属による親和性の差がみられた。したがって現実の問題としてこの漂白小麦粉が直ちに人にも害があるかは残された大きな問題とされている。

そこで最近では漂白処理法の適否は単に一種の動物による実験では決定的な資料としては不充分でなるべく多種の動物について飼養試験を行うべきとされる。

上のようなことから米英では専ら電気漂白とシロックスによる漂白が行われているという。

わが国でもこの方法により漂白処理の急速な発展が予想されるが、小麦粉の漂白は細菌の生存にはみるべき影響を与えず、漂白をしない小麦粉の細菌数と較べても有意の差を認めない。

終りに臨み本実験に当り御援助を賜った厚生省公衆衛生局食品衛生課尾崎課長、同課浜田技官、岡技官及び小麦粉漂白に特別な御便宜を頂いた、日本製粉株式会社、日清製粉株式会社の試験課の方々に深謝する。

なお本研究は文部省並に厚生科学研究費の援助をうけてなされている継続研究の一部である、特に記して御援助を深謝する。

引用文献

1. 八田, 吉田, 丹治, 長沢, 大竹, 日本衛生学雑誌 7 (2), 91 (1952).
2. 野崎, 川田, 浦久保, 渡辺, 小管, 衛試 70, 49 (1952).
3. 秋葉, 田中, 薬学領域の微生物学 (1941).
4. Mellanby, E. S., British. Med. Jour. II. 885 Dec. 14, (1946).

Summary

The viable bacterial counts in wheat flour bleached by electric treatment or by chemicals were performed. The difference of bacterial number was very little.

パラアミノサリチル酸の抗菌作用について

越沼きみえ 桑原章吾

On the Bacteriostatic Action of *p*-Aminosalicylic Acid

By Kimie KOSHINUMA and Syōgo KUWAHARA

パラアミノサリチル酸(以下PASと略す)が結核菌に対して強い発育阻止作用を示すことはよく知られているが、他の一般細菌に対しては抗菌力がよわく(吉田, 近藤, 梶本: 1949)¹⁾ 実用的価値もないので、それほどくわしく調べられていない。ところが近頃PASの注射用粉末又は注射液がつくられるようになったので、それらの無菌試験をするためにも、PASの一般細菌に対する抗菌力をかなりくわしく調べることが必要になった。

著者らはこの論文で合成培地及び無菌試験用培地について、PASの各種細菌に対する抗菌力を測つた結果を報告し、その成績に2, 3の検討を行った。

I. 実験の方法

a. 実験に使つた培地

(1) 合成培地: 各菌株に対して一律に次の組成の培地を用いた。

KH_2PO_4 400 mg, NaCl 200 mg, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 mg, ブドウ糖 100 mg, カゼインアミノ酸 300 mg, *l*-トリプトファン 10 mg, *l*-シスチン 5 mg, ニコチン酸 0.5 mg, サイアミン 0.5 mg, 再蒸留水 100 cc, pH 7.2 ± 0.2 , 100° , 30分, 3回滅菌。

(2) 無菌試験用培地: 第六改正日本薬局方に示された無菌試験用液体培地 A, カビ用培地を用いた(以下前者をTGCと略記する)。

b. 使用した菌株: 試験に用いた菌株は次の10株である。

大腸菌(コンムニカル)池田株, 志賀菌花房株, 腸チフス菌四方株, 緑膿菌大岡株, 黄色ブドウ球菌寺島株, 炭疽菌東大株, 破傷風菌陸三株, ノービ菌, *Candida albicans*, *Penicillium notatum* 各1株。

この中 *C. albicans*, *P. notatum* は Sabouroud 培地, 嫌気性菌の2株は肝々ブイオン, 他の株は普通寒天に継代保存してある。

c. 抗菌価の測定

(1) 試験用培地の作製: 試験にはすべて PAS-Na 注射用粉末を用いた。これを滅菌生理食塩液に溶かして10%溶液とし、更にこれを滅菌した培地で階段希釈して培地内のPAS希釈倍数が20倍, 50倍, 100倍, 200倍, 400倍, …… , 12,800倍になるようにする。培地量は合成培地では3cc(小試験管), 無菌試験用培地では15cc(無菌試験用試験管)とした。

(2) 菌の接種: 合成培地の試験では菌を合成培地に 37° , 24時間培養後滅菌生理食塩液で10倍にうすめ、駒込ピペットで1滴を接種した。TGCの試験では、菌を相当する液体培地(ブイオン又は肝々ブイオン)に 37° , 24~72時間培養し、滅菌生理食塩液で10倍にうすめ、同じく1滴を接種した。*Candida* 及び *Penicillium* は Sabouroud 培地 96時間培養の1白金耳量を接種した。

(3) 観察: 細菌では7日, カビでは14日観察し、それぞれの期間発育を完全に阻止した希釈倍数を抗菌価とした。

II. 実験の成績

a. 合成培地における抗菌作用

(1) 合成培地におけるPAS抗菌価

合成培地を用いた場合のPASの抗菌力試験の成績は第1表に示してある。

(第一表) 合成培地における P.A.S の抗菌作用と P.A.B.A 添加の影響

菌種菌株	大腸菌		志賀菌		ブドウ球菌		腸チフス菌		緑膿菌		炭疽菌	
	池田		花房		寺島		四方		大岡		東大	
	PABA 含量 (倍数)		PABA 含量 (倍数)		PABA 含量 (倍数)		PABA 含量 (倍数)		PABA 含量 (倍数)		PABA 含量 (倍数)	
PAS 含量 (倍数)	0	1,000	0	1,000	0	1,000	0	1,000	0	1,000	0	1,000
100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
200	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
400	+	卅	-	-	+	+	+	卅	+	卅	±	+
800	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	卅	卅	卅	+	卅
1,600	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	卅	卅	卅	卅	卅
3,200	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
6,400	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
12,800	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
対照	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅

(註) 表示はすべて 1 週間培養後の増殖度を示す。

試験に用いた好気性菌 6 株の中、志賀菌は 400 倍、緑膿菌は 100 倍、他の 4 株は 200 倍が抗菌価になっているが、緑膿菌の外の株では 1,600 倍あたりまでよわい発育阻害が認められる。培養日数による抗菌価の変動はほとんどない。

(2) パラアミノ安息香酸 (PABA と略) を加えた場合の抗菌価の変動

PAS の抗結核菌作用は PABA を加えることによつて強く阻害されるので、同じ阻害を上記の細菌について観察するため、PABA を合成培地に千倍、1 万倍、10 万倍に加えたものについて、それぞれ (1) と同じ試験を行った。そのうちで PABA 1 万倍及び 10 万倍添加の場合の成績は全く (1) と変りがないので、1,000 倍加培地についての試験結果だけを第 1 表に併記した。PABA を加えた結果、不完全阻害域における阻害はほとんど消失しているが、発育阻止濃度には全く差が認められなかった。

b. TGC における抗菌作用

TGC についての PAS の抗菌力試験の成績は第 2 表に示してある。

抗菌価は一様によくなり、大腸菌、緑膿菌、ブドウ球菌では 50 倍、ノービ菌は 200 倍、他の 4 株では 100 倍が抗菌価となっている。不完全阻害域はほとんどなく、PABA の拮抗効果は 1,000 倍添加では全く認められない。なお別に PAS 300 倍稀釈ではノービ菌に不完全阻害が認められる外は、対照と変りなく増殖が起ることが確かめられた。

c. PAS の抗カビ作用

カビ用培地について、*Candida albicans* 及び *Penicillium notatum* 各 1 株の抗カビ作用をしらべたところ、20 倍では不完全阻害が起るが、50 倍では対照と差が認められなかった。

(第2表) 無菌試験用液体培地 A における PAS の抗菌作用

菌株 PAS 濃度 (倍数)	大腸菌	志賀菌	腸チフス菌	緑膿菌	ブドウ球菌	炭疽菌	破傷風菌	ノービ菌
	池田	花房	四方	大岡	寺島	東大		
50	—	—	—	—	—	—	—	—
100	+	—	—	卍	+	—	—	—
200	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	—
400	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	+
800	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
1,600	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
3,200	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
6,400	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
対 照	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍

(註) 表示は培養 1 週後の増殖度を示す。

III. 考 え 方

上記の試験結果から、PAS の抗菌作用がスルホンアミドの場合と同じく、PABA やペプトン、酵母エキスなどの培地成分によつて拮抗されることがわかる。

鶴岡²⁾によれば、PAS の抗菌力は、菌の液体培養の 1,000 倍液を接種する場合、接種量が 0.1 cc でも 0.5 cc でも変りがないという。著者らの試験では更に大量の菌をうえているのに、試験の結果は大体共通していることから、上記の成績はかなり広い幅の接種菌量域に通用するものとみてよい。

中村³⁾は、TGC と普通ブイヨンについて、PAS-Na の抗菌力をはかっているが、両者の間には差が認められない。つまり一般試験に用いられる自然培地はすでに拮抗物質の過量を含んでいるわけで、PABA が全く無力であったことはそのためと考えられる。

次に上記の試験結果から、PAS の注射用粉末及び注射液の無菌試験の方法を考えてみよう。PAS の自然培地における抗菌力の限界は大体 200 倍とみても、現行規定通り粉末の無菌試験を行なうには、1 g 入りアンプル 1 本につき 200 cc の培地がいることになる。この点からみて、粉末の場合はまず 1 度溶液の形にした後試験を行わねばならぬことになる。これは試料の外に第 2 の菌混入源をつくることになり判定上不都合ではあるが、溶媒に用いた液（滅菌した蒸留水又は生理食塩液）の対照無菌試験を行なうことによつて過誤をさけることができよう。PAS 注射液は 10% になっているから、粉末をとかず場合 10% にしておけば以後の試験は両者共通になつて便利である。

PAS 注射液を規定通り培地 15 cc に 1 cc 接種すれば、培地の PAS 含量は約 150 倍になり、菌によつてはかなりの阻害をうけることになる。上記の実験から拮抗物質添加によつて PAS を不活化することができないことは明らかであるから、接種量を阻害濃度以下にへらす外はない。抗菌試験の成績と操作をかんたんにする意味から、接種量は 0.5 cc (PAS 稀釈度大約 300 倍) が適当であろう。

IV. む す び

著者らはパラアミノサリチル酸の一般細菌に対する抗菌作用及び抗カビ作用をしらべ、その結果からパラアミノサリチル酸注射液粉末及び注射液の無菌試験の方法を検討した。

終りに八田細菌試験部長、小川規格部長に深甚の謝意を表す。又試料を御恵与下さった三共恒松試験課長、実験につき種々御教示下さった田辺製薬鶴岡博士、武田薬工姫野、白石、中村の諸氏に厚く御礼申上げる。

引用論文

- 1). 吉田, 近藤, 梶本: 日本細菌学雑誌, 5 (4), 223 (1949)
- 2). 鶴岡正夫: 私信による.
- 3). 中村桃吉: 私信による.

(後記) この論文を公表するに先立つて厚生省業務局監視課を通じ、田辺製薬、第一製薬、フナイ薬工各会社からそれぞれパス注射薬の無菌試験の方法についての報告をうけとつたが、その内容は大体において著者らの考えと一致していた。ここに上記各会社試験関係者の皆様に感謝の意を表す。

Summary

The bacteriostatic action of *p*-aminosalicylic acid was tested both in natural and synthetic media. From the results of experiments the method of the sterility test of PAS-injections was discussed.

Received September 27, 1952.

人精子についての観察（第1報）

功 刀 博

Observation on Several Characters of Human Semen

By Hiroshi KUNUGI

避妊薬に対する国家検定の一つとして、殺精子試験が実施されている。ところで人精子を使わない2,3の方法もあるが、¹⁾²⁾人精子法が一番確実で信頼性がもたれている。ここには殺精子試験の基礎資料として、人精子について2,3の観察した点を報告する。

1. 人精液の外観 色調は大體、乳白色又は乳黄色が大多数である。採取後の時間の経過と共に次第に、外観は変化し、大體30~60分位で徐々に液化してくる。有形物質は粘液性物質及び寒天様物質である。室温放置後約2~3日で多少緑色の色調を帯びてくるものが多い。臭気については大體特有の精液臭の他に、特にとりたてていうものはない。

2. 精液量 採取法は用手法とコンドーム法とがあるが、Belding³⁾、安藤⁴⁾等はコンドーム法は精子の運動を抑制するので、用手法で大試験管に採取する方法を奨めている。私はまず予め計量してある滅菌乾燥試験管に精液を採取してその重量を秤り、その差をもつて精液量とした。精液提供者は性病を否定する健康な20~30代の人で、しかも1週間の間隔をもつて射精されたものである。

射精量は、2~3gが2人、3~4gが3人、4~5gが1人、5~6gが1人で、平均すると3.7gである。

なおBeldingは4.42~4.30g、Falk & Kaufman⁵⁾は2.9g、Hotchkiss⁶⁾⁷⁾は3g、安藤⁸⁾は5~10g、近藤⁹⁾は2~5gと記載している。

3. 精液のpH及びフタル酸時間 精液のpHは弱アルカリ性を示すのが普通であるが、Hotchkissによれば平均8.2、近藤は7.6~8.4、山口¹⁰⁾は平均8.2、又藤森¹¹⁾は受精する精液のpHは7.5~8.5であるという。私は東洋濾紙試験紙を用いてpHを測定したが、pH7.0~7.5が1人、7.5~8.0が5人、8.0以上が1人で、平均は7.7であつた。

pH値は性交回数及び採取回数、更にその時の状態で一個人を対象としても多少変動があり、特に頻回の射精ではpH値は高くなり、長い禁欲では低くなるようである。

避妊薬検定の際、試験に供する人精子のフタル酸時間を予め測定し、5分以内に不動となるような人精子は検定に用いられないことにしてある。

酸性フタル酸カリウム(C₈H₆O₄K)の0.14 Mol (2.8%)の水溶液(pH4)をつくり、これについて人精子の運動停止時間を計つた。その操作法は避妊薬検定基準による。しかしこれも採取後の経過により、成績に動きがあるので採取後1~2時間の精液について行つた。成績は平均して7分30秒であつた。フタル酸時間については個人差が左程明瞭にあらわれなかつた。

4. 精子の数 人精子の数は、Beldingは1cc中11,180万~11,080万、Falk & Kaufmanは10,070万~700万、Hotchkissは8,530万、大橋¹²⁾は1,000万~10,000万、山口は8,000万~10,000万が正常といつている。

私は白血球用メランジュールで精液を1印まで吸い、次いで精子の運動を止めるために5%塩化ナトリウム液を10印まで吸いこみ振りまぜ、血球計算盤により、1mm³中の精子数を計算し、これを1ccに換算した。

成績は、920万が1人(精液量は2gであつた)。4,000万~8,000万が4人、10,000万以上が2人で、平均は約7,000万であつた。

5. 精子の形態 精子の形態は個人により、様々の形態であるが、正常形と異常形に大別される。精子の形態は不妊症と関係があるという考で、Bromann,¹³⁾ Stiansy,¹⁴⁾ Hotchkiss, Moench,¹⁵⁾ 近藤、大橋、山口等によつて分類が試みられているが、その分類法は様々である。

異常形態の出現率については、Stiansyは20%前後、Moenchは20%以下、山口は15%以下、近藤は25%以下を正常とし、Cohn & Stein¹⁶⁾は5~50.7%の変動を認め、大橋は55%までを正常の限界としている。

私は精液の1滴を血液塗抹標本の要領で載物ガラス上に塗布、乾燥後、メタノールで固定し、次いで1%塩素水

に1分間浸し、水洗後ギムザ染色(或は単染色)を行い鏡検した。なお染色していない精子でも形態は充分観察できた。分類法は大概にならない頭部、中間部及び尾部に大別して観察した。その結果を第1表に示す。

第1表 人精子の形態

実験例	正 常 %	頭 部							中 間 部			尾 部				異 常 形 %	精 液 量 g														
		尖	細	小	大	巨	大	多	頭	畸	形	原	形	遺	残			肥	大	畸	形	遺	残	多	尾	捲	尾	長	尾	短	尾
U	82.5			5	2.5				1.5						2.5		1				3.5								1.5	17.5	2.2
N	79.5	2		8	3										4.5		0.5				2.5								20.5	6.2	
W	83.5	1.5		4							0.5				4		1.5					3.5	1.5						16.5	3.8	
S	80.5	2		5	0.5						0.5				3.5	0.5					1.5	6							19.5	2.0	
I	76.0	0.5		2.5	5.5										3.5							5.5	0.5	6				24	3.6		
O	86.5			1.5	3.5						1				2.5	0.5	1.5					4							13.5	3.6	
K	75.5			5.5	6	1.5					0.5				2.5						1.5	6.5	0.5					24.5	4.4		
平均	80.5	0.9		4.5	3.0	0.2	0.2	0.1	0.3	3.3	0.1	0.6	1.3	3.6	0.4	0.9	0.2											19.4	3.7		

私のみた異常形態精子の平均数は20%前後である。勿論これらの人は皆健康人であつた。

次に精子の大きさをその全長及び頭長に分けて測定した。操作方法は精液を血液塗抹の要領で塗抹し、固定は前述の如く行い、ギムザ染色を行い、Mikrometerで測定した。測定結果を全長は第2表、頭長は第3表(1)及び(2)に示した。湯浅¹⁷⁾によると全長は52~62 μ 、頭長は約4.5 \times 2~3 μ 、森¹⁸⁾は全長43~55 μ 、頭長3~5 μ と

第2表 精子の全長

長さ μ	26~30	31~35	36~40	41~45	46~50	51~55	56~60	61~65
精液								
K	1			2	1	3	2	1
O				1	4		3	2
M		1		1		1	6	1
I		1		1	2	4	2	
N		1		1	2	5	1	
計	1	3	0	6	9	13	14	4

第3表(1) 精子の頭長

長さ μ	3.0~3.5	3.6~4.0	4.1~4.5	4.6~5.0	5.1~5.5	5.6~6.0	6.1~6.5	6.6~7.0	7.1~
精液									
K	1		2		1		1		1
O			1	2		1			2
M			1	2		1			2
I	1	1			1	1	1		1
N			2	1	1	1			
計	2	1	6	5	3	4	2	0	6

報じているが私の観察でも大体これに近い数値がえられた。即ち全長 50~60 μ 、頭長 4~5 \times 3~4 μ であつた。特にこの実験では頭部の正常形のを比較的多くとつた関係上、実際の平均値よりやや上廻つていていると思われる。表には出してないが、頭部の特に大きなものになると、40~50 μ 位のものが屢々見受けられた。

6. 精子の速度 精子の運動速度も Mikrometer を使用し、比較的直線的に運動するものについて、秒時計で一定距離を動く時間を測定し、分速に換算した。人精子については、精液採取後 3 時間前後のものを測定した。結果は第 4 表の通りで、分速 2 mm 前後のものが多いようにみられた。

第 3 表 (2) 精子の頭幅

長さ μ	2.1~ 2.5	2.6~ 3.0	3.1~ 3.5	3.6~ 4.0	4.1~ 4.5	4.6~ 5.0	5.1~
精液 K		1	1	1	1	1	
O				6	1		
M		1	2	1		1	1
I	2		2				2
N			4			1	1
計	2	2	9	8	2	3	4

第 4 表 精子の分速度

分速度 mm	~1.0	1.0~ 1.5	1.6~ 2.0	2.1~ 2.5	2.6~
精液 K	1	3	2	4	0
O	0	3	3	3	1
M				7	3
I	2	6	0	1	1
N		3	1	3	3
計	3	15	6	18	8

7. 精子の生活力 健康人の精子は射精後は非常に活潑な運動をする。前述の如く 1 分間 数 mm の速度をもつているが、勿論時間の経過と共に衰える。

精子の運動力を不能にする物質として、Baker¹⁹⁾ 20) はモルモットの精子について述べているが、これらの物質が殺精子剤の対象となるわけである。

精子は元来、前立腺液に逢い運動力が盛んになるが、射精された精液は室温でもかなり長い時間生存力を保持している。Hotchkiss は室温で約 30 時間運動を保持していたというし、近藤も大多数は室温 24 時間で停止したといつている。私の経験によつても、大抵は室温で 24 時間以内に停止していた。

i) 低温度に対する影響

人工授精に応用するために精子を長く保存するには、その至適温度が問題になつてくる。Moench²¹⁾ は室温或は氷室で 18 時間後にも数匹生存していたと報告、Stiansy は至適温度は 8°~2° で、しかも 8° で 96 時間生存したものがあつたと述べ、Belding は 8° で 153 時間生存したものとあつたと述べている。又 Moench は精液の稀釈液の種類及び濃度により、生存力が異なることを述べている。

冷却装置不備のため、種々の低温で観察することが困難であつたから 5° の氷室に保存してみたが、結果は第 5 表の通りで、72 時間後でも運動力を保持するものが屢々あつた。

第 5 表 低温に対する精子の態度

時間	24	48	72
精液 No. 1	1 視野 = 数匹生存	1 視野 = 2~3 匹生存	数視野 = 1 匹位生存
No. 2	1 視野 = 数匹生存	1 視野 = 1~2 匹生存	全不動
No. 3	1 視野 = 数匹生存	1 視野 = 1~2 匹生存	全不動
No. 4	1 視野 = 数匹生存	1 視野 = 2~3 匹生存	10 視野 = 1 匹位生存

ii) 温度に対する感受性

次いで各温度に対する精子の感受性をみるために、0°~50° でその活動性を観察した。

方法としては各小試験管に精液 0.5 cc を分注し、綿栓を施して各温度に 5 分間浸した後、その 1 滴をとり鏡検した。材料にはフタル酸時間 5 分以内のものは用いなかつた。

その結果は第 6 表の通りで、大体 30° 前後が運動性が活潑であつた。又一旦 5° に冷却したものを 40° に加温

第 6 表 温度に対する精子の感受性

温度 C	0°	5°	10°	20°	30°	40°	50°	精子の運動性記号 冊 最活潑 冊 活 潑 冊 中等度 + 弱 度 ○ ナ シ
精液 No. 1	冊	冊	冊	冊	冊	冊	○	
No. 2	冊	冊~冊	冊	冊	冊~冊	冊	○	
No. 3	冊	冊	冊	冊	冊	冊~冊	○	

すると、運動は 5° の場合より活潑になることを知つた。これと同じような実験を梶田²²⁾ はウシの精子について行つている。又加藤²³⁾ によるとウマでは 44°~46° に 40~50 分間耐え、ウシでは 56° で、ウサギでは 45° で瞬時に死滅すると説明しているが、第 5 表の如く人精子では 50° 前後で比較的速かに死するように思われる。

iii) 2, 3 の化学療法剤及び消毒剤に対する態度。

最近の化学療法剤についても 2, 3 の実験を行つた。用いた薬品は蒸留水稀釈液で、不溶解性のものは実験直前振りまぜて用いた。成績は第 7 表の通りで、現在避妊薬の主剤として使用されている醋酸フェニール水銀及び硫酸オキシキノリンを別にすると、Baker の成績の始く、ヘキシルレゾルシン及びホルムアルデヒド以外のものは殆んど特筆すべき殺精子力を示さなかつた。

第 7 表 2, 3 の化学療法剤及び消毒剤に対する人精子態度

濃度 %	2	1	1/2	1/4	1/3	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	対 照 蒸留水
醋酸フェニール水銀	○	○	○	○	○	○	○	○	○	+	+	冊	冊	冊
ヘキシルレゾルシン	○	○	○	○	○	冊	冊	冊	冊	冊				冊
ホルムアルデヒド	○	○	○	○	○→+	+	冊	冊	冊					冊
硫酸オキシキノリン	○	○→+	冊	冊	冊	冊	冊							冊
石 炭 酸	○	+	冊	冊	冊	冊								冊
スルファチアゾール	+	+	+	+	+	冊	冊							冊
グアノフラシン	冊	冊	冊	冊	冊									冊
P.アミノサリチル酸	冊	冊	冊	冊	冊									冊
ストレプトマイシン	冊	冊	冊	冊	冊									冊

vi) 精子の再運動力

水野²⁴⁾ はウシの精子の実験で、一旦避妊薬に接して不動となつた精子を海水にもどすと、再び運動するものがあるというが、人精子とウシの精子とは本来その生活状態及受精方法を異にするので、人精子をそのままウシの精子の成績にあてはめて説明するのは危険である。それで私は次のような方法で人精子の再運動力の有無をしらべた。

避妊薬で醋酸フェニール水銀含有ゼリー及び錠剤 (検定合格のもの) の 5 倍生理食塩液稀釈液と同量の精液を 10 秒間混和したのち生理食塩液で洗い流して精子を鏡検したが、再び運動をおこした精子は見当らなかつた。勿論生理食塩液で洗わない精子は 10 秒間で完全不動になつた。

又薬剤のない発泡性錠剤 (日本衛材の助力をうけた) を用いて、CO₂ 発泡を主眼として観察したところ、CO₂ 発泡をうけた精子は生理食塩液で洗うと再び運動を始めるようにみられた。この CO₂ について Baker (モルモット精液で実験) 越智²⁵⁾ は精子は CO₂ で麻痺しても直ちに O₂ を供給すれば再び運動を始めるといつている。私も避妊薬の CO₂ 発泡の人精子に及ぼす実験を行つてみたが²⁶⁾、その際は生理食塩液で洗う実験はやらなかつた。

この事実から考えると、一旦殺精子剤にて不動になった精子は、再び運動をおこすとは考えられない。しかしCO₂発泡のみでは再び運動をはじめる可能性は否定できない。

v) 滲透圧の精子に及ぼす影響

滲透圧に関しては、Baker がモルモットの精子について、越智が白鼠の精子に対して実験を行つているが、私は人精子に対して実験を行つた。

方法としては各種濃度の食塩液及びブドウ糖液を作り、操作方法は基準によつた。その成績は第8表及び第9表の通りである。表よりわかるように食塩液では10%で完全不動となり、ブドウ糖液では20%で完全不動になつている。又運動性の活潑なところでは食塩液では0.9%、ブドウ糖液では5%であつた。又対照として用いた蒸留水中では多少運動力が弱まるのみで、1分間以内には運動を停止しなかつた。

第8表 滲透圧（塩化ナトリウム液）による精子の態度

濃度% 精液	20	10	5	2.5	0.9	0.45	対照 蒸留水
1	○	○	+	≡	≡	≡	≡
2	○	○	+	≡	≡	≡	≡
3	○	○	+	≡	≡	≡	≡

第9表 滲透圧（ブドウ糖液）による精子の態度

濃度% 精液	20	10	5	2.5	1.25	0.62	対照 蒸留水
1	○	≡	≡	≡	≡	≡	≡
2	○	≡	≡	≡	≡	≡	≡
3	○	≡	≡	≡	≡	≡	≡

8. 考察及び結論

- 1) 人精液の外観については特筆するものは見当らなかつた。
- 2) 精液量については大体諸家の成績と同様な成績であつた。
- 3) 精液のpH値を大体20~25歳の青年の精液について調査したところ、平均値pHは7.7となり、これはやや諸家の平均値より低い感がある。これは例数も少く中年層の精液が調査中に入つていないことも原因していよう。成績には出してないが、数人の30歳代の人の精液のpHについて計つてみたところ、pH8.0以上が多かつた。又フタル酸時間については、個人的に多少の差異はあつても、著しい差は見出されなかつた。
- 4) 異常形態の精子は20%前後であつたが、この数値はStiany, Moench, 近藤の成績と似ている。精子数は約7,000万であつた。
- 5) 温度に対する精子の態度については、人工授精の場合に問題となるもので、殺精子試験では、射精後3~4時間位の間では室温でさほど影響はない。人精子は又50°で殆んど完全不動になり、ウシ、ウマの精子と比較すると高温度に弱いようである。
- 6) 一旦有効濃度の酢酸フェニール水銀に接して不動になつた精子は、殆んど再運動をおこすことはない。CO₂発泡も精子の運動を抑制、或は停止させるが、再運動することは否定できない。
- 7) 人精子は滲透圧によつて、その運動性が影響されるので、この点から避妊薬を検討するのも興味あるものと思う。

終りに御指導御校閲を賜つた恩師八田貞義博士に深く感謝致します。

引用文献

- 1) 八田, 桑原, 功刀他: 公衆衛生学会発表要旨, 昭25.
- 2) 功刀: 衛試, 69, 55, 昭26.
- 3) Belding: Am. J. Obstet. & Gynecol., 26, 868, 1933.
- 4) 安藤: 基礎と臨牀, 11, 1, 昭18.
- 5) Falk & Kaufman: Fertility and Sterility, 1, 489, 1950.
- 6) Hotchkiss: Am. J. Med. Sci., 196, 362, 1938.
- 7) Hotchkiss: J. Am. Med. Assoc., 107, 23, 1936.
- 8) 安藤: 産科学, 上, 9頁, 昭4.

- 9) 近藤: 日婦誌, 34, 6, 昭 14.
- 10) 山口: 臨牀婦人科産科, 5, 73, 昭 26.
- 11) 藤森: 綜合医学, 7, 908, 昭 25.
- 12) 大橋: 臨牀婦人科産科, 18, 昭 18.
- 13) Broman: Anat. Anz., 21, 497, 1903.
- 14) Stiansy: Zentr. Gynecol., 61, 858, 1937.
- 15) Moench & Holt: Am. J. Obstet. & Gynecol., 22, 199, 1931.
- 16) Cohn & Stein: Fertility and Sterility, 2, 20, 1951.
- 17) 湯浅: 生物学, 194 頁, 昭 25.
- 18) 森, 金子: 最新組織学各論, 125 頁, 昭 18.
- 19) Baker: J. Hyg., 31, 189, 1931.
- 20) Baker: J. Hyg., 31, 309, 1931.
- 21) Moench: J. Am. Med. Asso., 94, 7, 1930.
- 22) 榎田: 畜産試験所報告, 56, 1, 昭 25.
- 23) 加藤: 畜産の研究, 2, 32, 昭 23.
- 24) 水野: 日本衛生学会雑誌, 5, 21, 昭 25.
- 25) 越智: 日新医学, 14, 1025, 大正 14.

市販の腸線について

藤井正道, 佐藤 壽, 辻 楠雄, 薩摩義一郎* (共同研究者)

Study on the Quality of Commercial Catgut

By Masamichi FUJII, Hisashi SATO, Kusuo TSUJI, and Giichirō SATSUMA

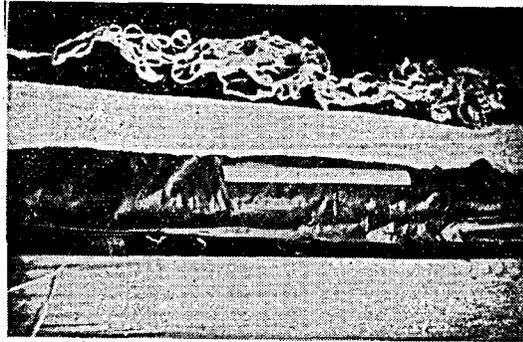
緒 言

腸線は元来小腸の長い羊又は小羊の腸管から作られるが、吾が国では羊類が少ないので、その代りに牛、馬、豚などの腸管を原料としている。これ等について調査した結果を報告する。

腸線の製造法

原料: 原料は羊、牛、馬、豚等の小腸であるが現在主として馬の小腸を使用する、これ等の小腸を、その内壁を除去した後上表面を塩漬し原料とする。馬の小腸の塩漬された原料の一束は長さ約 15 m 巾約 1.5 cm 厚さ約 3 mm の白色紐状で、伸縮性を有し、引張り上げると約 20 cm にも達する。(第 1 図参照)

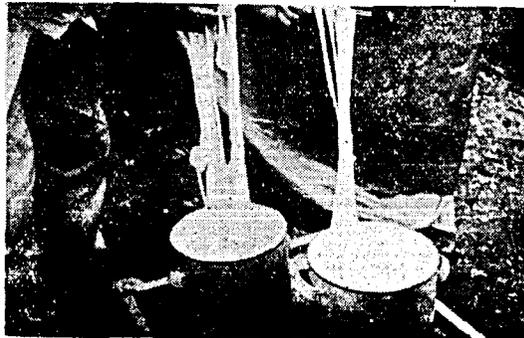
第 1 図 原 料



製造法: 塩漬原料を 2~3 日間水洗して塩分を除き、次に約 25% 水酸化ナトリウム溶液に浸漬して脱脂した後、よく水洗し裁断器にのせ巾を拡げて縦に細紐状(巾約 7~8 mm 長さ約 2 m)に裁断しこれを一本撚りにして製品としたものが厚径の相違により 0 号又は 1 号製品となる。

この細紐状のものを約 0.1% 過酸化水素液の 3~24 時間浸漬して漂白する。plain 即ち untreated 製品では漂白後、3,000~5,000 倍のオキシアン水銀液中に 8~40 時間浸漬して滅菌する。treatment 製品としての処理は主として chromic がこれに当るものであるが、chromic 製品の場合は漂白後これを約 0.01% クロム酸カリウム液中に約 12 時間浸漬した後これを 3,000~5,000 倍のオキシアン水銀液中に浸漬して滅菌する。この滅菌操作及びその後の操作は untreated 製品の場合と同様である。(第 2 図参照)

第 2 図 原料の水洗及び滅菌



* 所員外

滅菌した腸線は無菌室内の滅菌槽中から取出し1本づつに分離した後燃機にかけ、1本の紐はその一端を回転装置に装着して紐を水平に引張り他の一端は手で固定し毎分1,500~1,600回転で20~30秒間燃る。

第3図 燃機

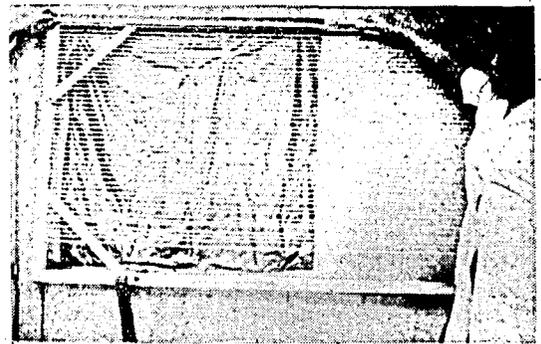


次にこれを縦約2m、横約1mの木枠に軽く張つて懸ける、この木枠は表裏両面が利用され、表裏を合して約100本懸けられる。木枠ごと温度約30°の低温乾燥器中に入れて3~6時間乾燥する。乾燥するに従つて untreated においては白色不透明の腸線は淡黄色で稍透明がかかったものとなり、treatment に属する chromic においては稍暗緑色の透明がかかったものとなる。

第4図 木枠



第5図 アンプル中に挿入



乾燥後枠にかかたままで一本ずつその表面を研磨して平滑にし木枠から取りはずして不良の部分及び両端の部分を除き一本の長さ約1.5m以上とし、これを巻き束ね一旦トルエン或はキシレン中に浸漬する。

次に一端を閉じた長さ約10cmの管状アンプルに腸線を挿入する。この際必要ならば予め滅菌したレットルを腸線と共にアンプルの中に入れ、トルエン又はキシレンは腸線が完全に浸る程度加えたのちアンプルを熔封する。但し chromic では、これをトルエン中で加熱し、いわゆる還元操作を行う。(この際、暗緑色の腸線は褐色に変ずる。)

検 査

国家検査基準

1. 本品は全長1.5米以上、一本の長さ0.75米以上なければならない。
2. 本品は変色してはならない。又保存液(キシレン又はトルエン)は無色透明で変色及び混濁してはならない。
3. 無菌試験法

(a.) 容器のあけ方

あらかじめアンプルを 70% アルコール又は 0.1% ヘキシルレゾルシン液中に浸漬した後、滅菌ピンセットではさみ滅菌ヤスリでアンプルを開き検体 (羊腸線) を無菌的に取出す。

(b.) 培養法

容器の内容を滅菌ピンセットでとり出し、之を 1% チオ硫酸ナトリウムに 1 日浸して洗い、更に 1 日間 0.85% 生理食塩液に浸漬して洗う。(この間 37° に放置)、ついで各洗液 1 cc ずつと検体 (羊腸線) とを、別に無菌試験用培地 A (好気性・嫌気性菌検出用) 及びハチミツ培地 (糸状菌及び酵母検出用) に移植する。いずれも培地の量は 15 cc とし試験管は 20×150 mm のものを用いる。洗液は培地と十分に混合させるため移植直後及び培養中時々充分ふりまぜて油がよく培地中に分散するようにしなければならない。

(c.) 無菌の判定

37° で少くとも 7 日間培養の後判定する。もし混濁等のため判定が困難なとき塗抹染色標本を検鏡するが、又は更に別の培地に移植し 37° に 3 日間培養した後判定する。糸状菌や酵母の培養のためには、ハチミツ培地を用いて 22~25° に 15 日間培養の後判定する。

米国薬局方規格

米局における検査項目としては長さ、直径、引張り強さ、クロム化合物の溶解度及び無菌試験である。

長さ: 長さにおいては製品の表示された長さの 90% より短くてはならない。

直径: 第 1 表に示す。

第 1 表 直 径

Size	Boilable				Non-Boilable			
	Millimeter		Inch		Millimeter		Inch	
	Min.	Max.	Min.	Max.	Min.	Max.	Min.	Max.
0000000 7-0	0.025	0.051	0.001	0.002	0.025	0.064	0.0010	0.0025
000000 6-0	0.051	0.102	0.002	0.004	0.064	0.113	0.0025	0.0045
00000 5-0	0.102	0.152	0.004	0.006	0.113	0.179	0.0045	0.0070
0000 4-0	0.152	0.203	0.006	0.008	0.179	0.241	0.0070	0.0095
000 3-0	0.203	0.254	0.008	0.010	0.241	0.318	0.0095	0.0125
00 2-0	0.254	0.330	0.010	0.013	0.318	0.406	0.0125	0.0160
0 1-0	0.330	0.406	0.013	0.016	0.406	0.495	0.0160	0.0195
1	0.406	0.483	0.016	0.019	0.495	0.584	0.0195	0.0230
2	0.483	0.559	0.019	0.022	0.584	0.673	0.0230	0.0265
3	0.559	0.635	0.022	0.025	0.673	0.762	0.0265	0.0300
4	0.635	0.711	0.025	0.028	0.762	0.864	0.0300	0.0340
5	0.711	0.813	0.028	0.032	0.864	0.978	0.0340	0.0385
6	0.813	0.914	0.032	0.036	0.978	1.105	0.0385	0.0435
7	0.914	1.016	0.036	0.040	1.105	1.219	0.0435	0.0480

引張り強さ：第2表に示す

第2表 引張り強さ

Size	Tensile Strength of Surgical Gut			
	Minimum Tensile Strength of Surgical Gut in Avoirdupois Pounds			
	On Straight Pull		Over a Surgeon's Knot	
0000000 7-0	0.25	(0.11 Kg)	0.125	(0.06 Kg)
000000 6-0	0.5	(0.23 ")	0.25	(0.11 ")
00000 5-0	1.0	(0.45 ")	0.5	(0.23 ")
0000 4-0	2.0	(0.90 ")	1.0	(0.45 ")
000 3-0	3.0	(1.36 ")	2.0	(0.90 ")
00 2-0	5.0	(2.26 ")	3.0	(1.36 ")
0 1-0	7.0	(3.17 ")	5.0	(2.26 ")
1	10.0	(4.53 ")	7.0	(3.17 ")
2	13.0	(5.89 ")	9.0	(4.07 ")
3	16.0	(7.25 ")	11.0	(4.98 ")
4	20.0	(9.07 ")	13.0	(5.89 ")
5	25.0	(11.34 ")	17.0	(7.69 ")
6	30.0	(13.60 ")	21.0	(9.95 ")
7	35.0	(15.74 ")	25.0	(11.34 ")

可溶性クロム化合物：腸線 5g. (出来る限り全燃線) を水 250 cc 中で時々かきまぜながら3時間放置後焔過し、濾液を蒸発皿にとり水溶上で蒸発乾固した後、残物に炭酸カリウム及び硝酸カリウムの等量ずつの混合剤 250 mg を加え熔融し、冷後、水 25cc で溶かし、この溶液を直径 25 mm の比色管にとり白板を背景にして観察するときは、黄色を帯びたり、色を呈してはならない。

無菌試験：国家検査基準と同じ

国産品の検査成績

著者等の行った国産品(主として牛、馬の腸を原料とするもの)の検査成績を次表に示す。

国産品の試験成績

Sample	Size	Diameter (mm)	Tensile Strength on Straight Pull	Soluble Chromium Compounds	Sterility
A	000	0.221	0.87	good	good
"	00	0.298	1.71	"	"
"	※ 00	0.262	1.50	"	"
"	0	0.378	1.79	"	"
"	※ 0	0.407	2.63	"	"
"	1	0.325	1.80	"	"
"	※ 1	0.390	3.09	"	"
"	2	0.493	3.37	"	"
"	※ 2	0.521	3.56	"	"
"	4	0.684	4.63	"	"
"	5	0.690	5.92	"	"
"	6	0.783	4.95	"	"
B	00	0.460	1.01	"	"
"	0	0.435	0.98	"	"
"	※ 0	0.407	1.00	"	"
"	1	0.477	1.21	"	"
"	2	0.572	1.47	"	"
"	3	0.632	1.50	"	"
C	00	0.391	0.55	"	"
"	"	0.397	0.97	"	"

※ chromic

結 論

以上の如き腸線の製造法或は製品の検査法及びその成績よりして著者等は次の如き結論を得た。

1. 製造過程において牛、馬等の小腸を使用する場合は羊腸を使用する場合よりも種々困難を伴うがこれを克服して現在製造に当たっている。
2. 国家検査における長さの規定は必要なくむしろ米局に定められた如く改めるべきである。
3. 直径が米局通り正確になり得ない原因は原料の品質の個々の相違及び製法が殆んど手工業に属する等に帰因するものであつて、その点品質の殆んど一定せる羊腸原料を使用する事は原因の一つを除く事となり有利である。
4. 引張りの強さの米局に劣る原因は原料にあるらしい。
5. 国家検査又は米局においても腸線の吸収性に対する規定がないがこれについては、本誌第70号に第1報の報告があり、吸収性について何等かの規定を設けるべきだと思ふ。
6. 現在の国産品はその引張り強さにおいて馬の小腸等を使用したものは米局に示された如き羊腸線に劣るが充分に役立つ。

終りに御協力下さつた細菌部長八田貞義氏に感謝の意を表する。

Summary

The manufacturing and testing method of commercial catgut is reported in details. Commercial goods have now fairly good quality and they will be the best commercial catgut in the world.

Received October 6, 1952.

歯科用合成樹脂について

藤井正道, 堀部 隆, 龜田 務

Study on the Resin for Dental use

By Masamichi FUJII, Takashi HORIBE and Tsutomu KAMEDA

緒 言

日本歯科材料協会, 歯科材料規格第 21 号義歯用アクリル樹脂においては, 機械的性質については抗張力及破砕抗力が規定されている。また米国歯科医師会歯科材料規格 第 11 号 Denture Acrylic Resin については, 撓み試験(Transverse test)のみが規定されている。

ここに著者等は米国及市販製品の機械的性質を測定し, これを検討して此等規格の改正を提案する。

また著者の一人は衛生試験所彙報第 66 号(昭和23年 11 月)中において義歯用アクリリックレジンが少々脆弱性を防ぐことが出来たならば理想的なものになると報告したが, この性質の為, 往々にして急激なる Shock や咀嚼力により義歯の口蓋部に亀裂を生ずることがあり, この欠点を改善することが要望されて来た。

この解決法として

A. 共重合 (Co-polymer) による方法

(イ) メタアクリル酸メチルエステルの他に更に高級アルキル基との共重合体

(ロ) アクリル酸エステルとの共重合体

(ハ) ビニール及スチロール系等の樹脂との共重合体

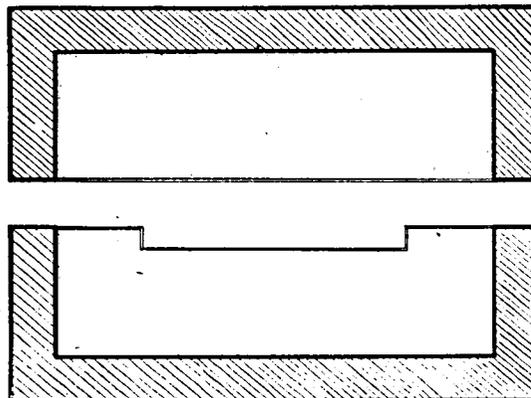
B. 可塑剤を加える方法

等が考えられるが, 著者等は先ずメタアクリル酸メチルエステルとエチルエステルとの共重合体につき, その諸性質を研究し, これを第一報として報告する。

試 験 の 部

1. 試験片の作成

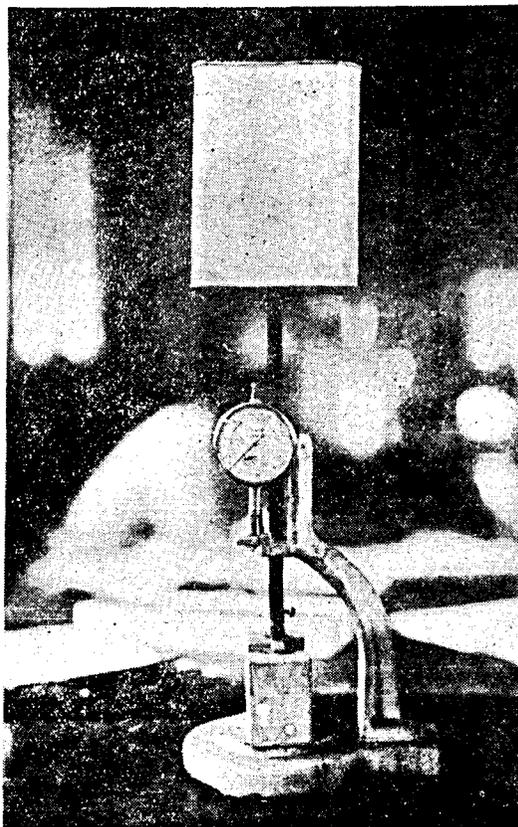
ビーカー中にアクリル酸樹脂粉末 (Polymer) と液 (Monomer) を約 2:1 の割合に取り時計皿で蓋をし, 砂状 (Damp Sand) より, 熟成させて餅状 (Daugh) にしてから取出し, あらかじめ作製したデンタルフラスク中に加圧填入し 70° に保つた水槽中に入れ, 1 時間 30 分保つた後沸騰水中で 30 分加熱し Curing を行つた後放冷し, 型より取出し Shaping Machine で先ず約 2.5 mm の厚さに平削加工し, 巾約 10 mm に突切り長さ約 65 mm に切断後, サンドペーパー〇〇及〇〇号で寸法誤差 0.03 mm 以内の精度になるように仕上げる。



第 1 図 デンタルフラスク

2. 試験機械 (Transverse testing machine)

著者は第 2 図の如き装置を作製し測定を行つた。本機の試験片を装着する支点間の距離は 50 mm, 支点及荷重点はそれぞれ直径 3.2 mm の丸棒とした。試験片の中央に鉛散弾により荷重を加え, 試験片の撓みをダイヤルインディケーターで読み取る。



第 2 図 試験機械 (Transverse testing machine)

3. 試験方法

a. 撓み試験 (Transverse test) 前記所定の寸法に切削仕上げせる試験片をあらかじめ 37° の蒸留水中に 3 日間浸漬した後, 37° の水槽中の試験機上に装置し, 中央に 1.5 Kg の荷重を加えた時のダイヤルインディケーターの読みを零とおき, 1 分間に 500 g の割合で鉛製散弾を加え, 荷重を加えた後 30 秒後の読みをその荷重における撓み (彎曲度) とする。此操作を繰返し 500 g 毎の撓みを読み, 試験片が破壊するまで測定を続け, 荷重-撓み曲線を記録する。

b. 抗張力試験 前記所定の寸法に切削仕上げた試験片をあらかじめ 37° の蒸留水中に 3 日浸漬した後取出し表面の水分をガーゼで除去し直ちにアームスター 2 種万能抗張力試験機で引張試験を行い抗張力 (単位 Kg/cm^2) を算出する。

c. 硬度試験 前記試験片の中央部及両端部を Shore 硬度計で硬度を測定し, 平均値を記録する。次に 37° の蒸留水中で 3 日浸漬した後取出し, 表面の水分をカーゼで除去し再び硬度を測定し, 同様に平均値を記録し, 温度及湿度変化による Shore 硬度を測定す。

4. 試験の結果.

上記の方法により米国製品及市販材料を試験した結果, 荷重-撓み曲線及 3.5 Kg, 5 Kg の荷重における撓み及其時における試験片の弾性係数, 破壊強度及試験片の中央における応力 (後述) の値及抗張力を第一表に示す。

第1表 歯科用アクリル樹脂の機械的性質

試料	撻み度(mm)及弾性係数 (mm · Kg/cm ²)				破損荷重 (Kg)	試験片の中央に於ける内部応力 (Kg/cm ²)	抗張力 (Kg/cm ²)
	3.5 Kg	E	5 Kg	E			
A	1.26~1.44	4.5×10 ³ ~3.2×10 ³	3.49~3.60	2.3×10 ³ ~3.2×10 ³	5.18~5.35	620~630	420.5
B	1.78~1.89		3.75~4.00		5.38~5.72	640~700	509.5
C	1.75		3.90		5.71	685	523
D	1.44		3.03		6.38	760	518
E	1.68	3.3×10 ³	3.57	2.2×10 ³	6.24	728	623
S ₁	1.87	3.3× "	3.92	2.2× "	5.50	703	
S ₂	1.93	3.4× "	3.80	2.4× "	6.50	843	661
US ₁	1.93	3.0× "	3.75	2.3× "	5.25	632	
US ₂	1.63	3.5× "	2.96	2.8× "	5.24	637	579
F	1.72	3.4× "	3.53	2.4× "	5.89	699	
G ₁	1.25		2.54				
G ₂	1.85		3.92		6.00	720	
G ₃	1.76		3.62		6.00	714	
H	1.73		3.44		5.40	648	
I ₁	1.81		3.83		5.05	628	
I ₂	1.97		4.40		5.80	733	

試験試料の温度及湿度の変化による硬度の変化は第二表に示す。

第2表 温度及び湿度変化による Shore-硬度の変化

試料	1-a	1-b	1-c	1-d	2-a	2-b	2-c
常温	84	86	88	88	70	64	70
37°C 水中	76	82	78	82	56	48	66
試料	2-d	3-a	3-b	3-c	4-a	4-b	4-c
常温	66	86	92	90	90	88	92
37°C 水中	54	84	82	84	86	66	84
試料	4-d	5-a	5-b	5-c	5-d	6-a	6-b
常温	88	86	86	90	90	92	88
37°C 水中	80	82	78	88	82	78	80
試料	6-c	6-d	7-a	7-b	7-c	8-a	8-b
常温	106	88	88	92	90	90	82
37°C 水中	98	84	82	84	82	78	76
試料	8-c	9-a	9-b	9-c			
常温	88	92	88	88			
37°C 水中	84	76	78	84			

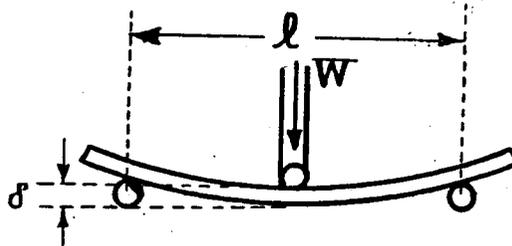
結 論

(1) 撓み試験 (Transverse test) による方法が, 抗張力及破砕抗力試験によるものよりも, 口腔内における力の加わり方が似て居り, 機械的性質の表現として, より優れていると思われる。

またアクリル樹脂においては抗張力試験による伸びは殆んど認められず, 従つて強靱なるものと脆弱なるものととの区別が抗張力及破砕抗力試験によつては判定困難であるに反し, Transverse test においては引張りの強さと伸びとを兼ねた所謂強靱性が測定できるからである。

(2) 撓み試験 (Transverse test) においては口腔内における体温 (約 37°) と湿度に近い状態において容易に試験し得るに反し, 抗張力及破砕抗力試験においてはそれが困難である。しこうして温度及び湿度の変化による機械的性質の変化は第 2 表に示す如く, Shore 硬度では 4~8 の低下を来し, 常温の試験片が 37° の水中においてはかなりの軟化が示されている。

(3) 撓み試験 (Transverse test) では荷重—撓み曲線の測定であるから, 試験片の寸法の僅かな誤差により同一荷重下においては撓みが非常に異なる結果を生ずる。そのため米国規格においては ± 0.03 mm なる厳格なる許容範囲が決められているが, この寸法許容範囲の試験片の仕上は困難で, しばしば不注意により此範囲より離脱し易い欠点がある。この欠点を補なうため著者等は試験片の中央における応力 R (Kg/cm^2) 及荷重 3.5Kg 及 5Kg の時における試験片の弾性係数 E (Kg/cm^2) で歯科用合成樹脂の機械的強度を表現することを提案する。



第 3 図

今第 3 図において,

l = 兩支点間の距離 (cm)

w = 荷 重 (Kg)

δ = 撓 み (mm)

b = 試験片の巾 (cm)

d = 試験片の厚み (cm)

とすれば

$$\delta = \frac{wl^3}{48EI} \quad \text{となる.}$$

弾性二次モーメント

$$I = \frac{1}{12}bd^3 \quad \text{を代入すれば}$$

$$\delta = \frac{wl^3}{4Ebd^3} \quad \therefore E = \frac{wl^3}{4\delta bd^3}$$

従つて E は $\delta b d w l$ を代入することにより容易に算出し得る。

又試験片の中央における応力 R は次式により求められる。

$$R = \frac{3wl}{2d^2b}$$

但し w = 破壊迄の最大荷重 (Kg)

l = 支点間の距離 (cm)

b = 試験片の巾 (cm)

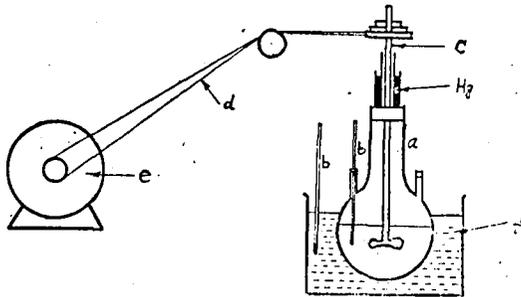
d = 試験片の厚さ (cm)

しこうして義歯用アクリル樹脂としての機械的性質の強度は抗張力及び破砕抗力に代るものとして, Transverse test の試験片の中央における応力 R が $600 \text{ Kg}/\text{cm}^2$ 以上なる限度が適当と考える。

研究の部

1. 共重合体の製造

a. 重合操作 イ, 重合装置は第4図に示す如きものである。



- a: 三頸コルベン 500cc
 b: 温度計
 c: 滑車付溶液攪拌用プロペラ
 d: ベルト
 e: モーター
 f: 湯煎

第4図 重合装置

重合溶液攪拌用の硝子製プロペラは上部滑車を通じベルトにより回転される。モーターの回転数はトランスにより随意に変化させ、コルベン中の粒状重合液の攪拌を調節出来るように装置する。又湯煎によりコルベン中の重合溶液の温度を一定に保てる様にしてある。

b. 重合液 蒸留水 300 cc 中に 1.5% 馬鈴薯澱粉及 1g の石鹼を加温して溶かしてから放冷する。次に求めるメチルエチル共重合物をそれぞれ次表の如く計 100 g とり、重合促進剤として 1g の過酸化ベンゾールを溶解した澱粉液に加えて混合する。

第3表 メチルエチル共重合体の組成

試料番号	組成	
	メタアクリル酸 メチル	メタアクリル 酸 エチル
1	100	—
2	95	5
3	90	10
4	80	20
5	60	40
6	—	100

c. 重合方法 前記混合液を 3 頸コルベン中に入れ約 180 R. P. M. で攪拌し, monomer を粒状に拡散させて 10 分後徐々に湯煎を加熱し始め, 2 時間後コルベン中の液温を 72~78° になるように操作する。この温度で数時間保つた後時々内部の液を取出し粒状 Resin の固化状態を観察し, 残留単量体がほとんど重合した時に温度を上げ約 1 時間重合液の温度を約 100° に保ち重合を完了させてから放冷する。次に重合液中の共重合粒子を充分水洗した後に濾別し, 低温で乾燥し, 次に標準篩 20 mesh, 50 mesh 100 mesh にて篩い, 粒子の大きさに従ひ篩分ける。

2. 試験方法

a. 試験片の作成 前記 Polymer 粒子の 50 mesh 篩下, 100 mesh の篩上を採り, 前記試験の部試験片の作成の操作に従い, 試験片の作成を行う。

b. 試験機械 Transverse testing Machine を用い, 荷重加えその撓みを測定し, 荷重-撓み曲線を記録する。

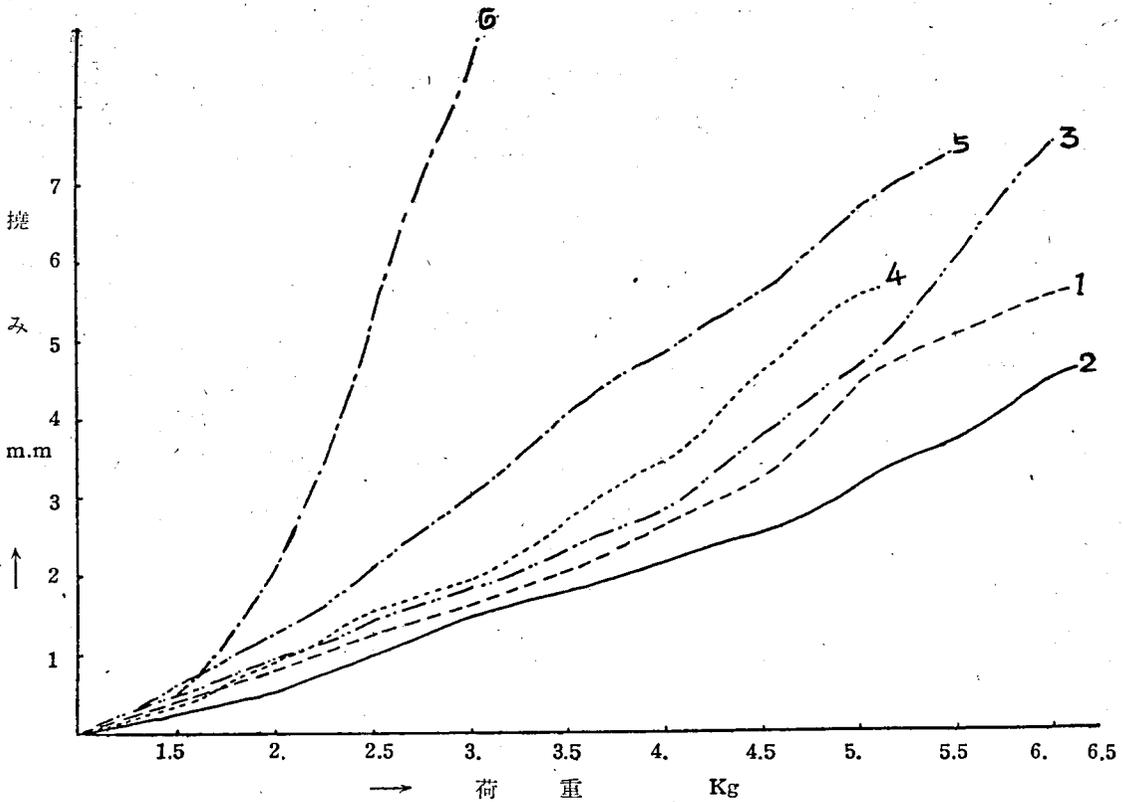
3. 試験結果

上記の方法により各組成の共重合体の試験した結果を示すと第4表の如くなる。

第 4 表 メチルエチル共重合体の荷重一撓み度

試料	寸法	荷重 (Kg)											破損時ノ 最大荷重
		1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5	
1	2.52×9.99	0	0.41	0.81	1.24	1.64	2.08	2.71	3.36	4.46	5.12	5.63	6.6
2	2.50×10.01	0	0.28	0.62	1.00	1.52	1.75	2.15	2.53	3.15	3.71	4.60	6.7
3	2.53×10.01	0	0.50	0.95	1.42	1.81	2.39	2.89	3.78	4.68	6.03	7.53	6.5
4	2.44×9.90	0	0.36	0.94	1.64	1.93	2.72	3.45	4.55	5.63			5.63
5	2.40×10.02	0	0.58	1.29	2.22	3.04	4.04	4.87	5.68	6.74			5.92
6	2.52×10.03	3.9	4.33	6.18	9.35	12.5							—

これを図示すれば第 5 図の如くなる。



第 5 図

各組成の共重合体における R (試験片の中央における内部応力), 3.5 Kg 及 5 Kg の撓み及 E (弾性係数) 及抗張力は第 5 表の如くである。

第5表 メチルエチル共重合体の機械的性質

試料	撓み度 (mm) 及び弾性係数 (mm. Kg/cm ²)				破損量 (Kg)	試験片の中 央における 内部応力 (Kg/cm ²)
	3.5 Kg	E	5 Kg	E		
1	1.64	2.40×10 ⁸	3.36	3.36×10 ⁸	6.60	784
2	1.52		2.53		6.70	790
3	1.81	3.65× "	3.78	2.54× "	6.50	762
4	1.93	3.46× "	4.55	2.38× "	5.63	718
5	3.04	2.60× "	5.68	1.99× "	5.92	683
6	8.6	0.82× "	—	—	—	—

3. 考察

上記試験結果により次の結論を得た。

メチルエチル Co-polymer はメチルエステル 100% のものに較べ、エチルエステル 20% 迄は余り R の値は低下を来さないが、それ以上エチルエステルの含量が増すと、R の値も急激に低下し、同一荷重では撓みも急激に増加する。100% エチルエステルのは 第5 図に示す如く非常に軟く、低荷重 (3.5 Kg) において破折せず非常に彎曲する。

メチルエチル共重合体中においては、第 5 表に示す如く 95% メチル-5% エチルが最も R の値が強く、100% メチル、90% メチル 10% エチル共重合体の順である。

なほこれに対する齒科的应用については目下研究中で次に報告する予定である。

なおこの研究費の一部は昭和 26 年度厚生科学研究費によるものである。

Summary

We have studied on mechanical properties of commercial dental acrylic resin and new synthetic resin (Methyl-ethyl methacrylate).

Received October 6, 1952.

麦角菌 *Claviceps* の寄主植物 (その 2)

川 谷 豊 彦

Hosts of *Claviceps* (II)*. †

By Toyohiko KAWATANI

III 麦角菌 *Claviceps* の寄主植物に対する考察 Discussions on hosts of *Claviceps*

前節に挙げた寄主植物を輯録すると 81 属 332 種^{*11} の多きに達する。(第 1 表) イネ科 75 属 316 種, カヤツリグサ科 3 属 10 種, タケ科 2 属 4 種, キ科 1 属 2 種の順である。

イネ科の 4 亜科の内最も寄生の多いのは Poaeoideae であり 41 属 196 種, 次いで Agrostoidae の 11 属 60 種, Panicoideae の 20 属 50 種, Oryzoideae の 3 属 4 種の順序である。Poaeoideae の内 Hordeae の 10 属 85 種, Festuceae は 19 属 81 種であり他より群を抜いて多いのは注意に値する。

本邦産としては 35 属 74 種である。イネ科 31 属 68 種, タケ科 2 属 4 種, カヤツリグサ科 2 属 2 種の順である。キ科には寄生は知られていない。イネ科 4 亜科の内最も寄生の多いのは Poaeoideae であり 17 属 37 種, 次いで Agrostoidae の 7 属 18 種, Panicoideae の 7 属 13 種の順序であり Oryzoideae のものは知られていない。Poaeoideae の内, Hordeae は 7 属 15 種, Festuceae は 8 属 20 種であつて, やはり他群を抜いている。

世界を通じて広義の禾本科 Gramineae の寄主植物は 77 属 320 種となるから, 世界を通じての禾本科植物の総数を 313 属 4000 種^{*12} として計算すれば, 属において 24.6%, 種において 8% が麦角菌の寄主植物となつてゐるに過ぎない。

日本産のイネ科に属する寄主植物は 31 属 68 種であるが, 一方本田 (1930) により日本産イネ科植物総数を 117 属 473 種として計算すれば, 属において 26.5%, 種において 14.4% が麦角菌の寄主植物となつてゐることとなる。

然してなお, 詳細なる観察研究及び接種試験により寄主植物の数は更に増加する可能性がある。一方において, 現在知られている麦角菌は前述の如く甚だしい。この内 *Cl. purpurea*, *Cl. microcephala* が最も普通見られるものであり, タケ科・イネ科全般に涉り驚くべき多種多様の植物に寄生する。これは麦角菌同定の基礎となるべき子嚢胞子期を検査すること無しに, たゞ単に麦角の形態のみによつて大型のものは *Cl. purpurea*, 小型のものは *Cl. microcephala*, カヤツリグサ科のものは *Cl. nigricans* として簡単に取扱つて来たことによると考えられる。PETCH (1937 a, b) の如く *Cl. microcephala* は *Cl. purpurea* の synonym とすべきであると極言する学者もあり, 又 STÄGER (1900-23) の biological form に関する貴重なる業績があるけれども, 最近発表されて来る麦角菌の種は, その寄主植物の範囲が属乃至種に限定せられている傾向が明らかである。少くとも現在言われている *Cl. purpurea* 及び *Cl. microcephala* は, 富樫 (1942 a) も指摘する如く, 総合種とも称すべきものであつて更に個々のものについて形態学的 (分類学的), 生理学的, 生態学的に詳細に検討し寄生性を調べる必要があり, 然して後総合的に biological form を論ずべきであろうと考える。

終に臨み, 懇篤なる御指導と御校閲の 労を執られたる東京大学農学部教授佐々木喬博士並に同学部明日山教授に深厚なる感謝の意を表する。

* (I): This Bulletin, No. 70, pp. 127-152 (1952).

† With English résumé, p. 171.

*¹¹ 戦時中(1941-45) 報告された新寄主植物は 7 属 15 種であるから計 88 属 347 種となる。

*¹² BENTHAM & HOOKER (1883) は 298 属 3200 種, HACKEL (1887) は 313 属 3500 種としている。

文 献 Bibliography

- (1) ANONYMOUS. Hedwigia 9: 7-10. 1870.
- (2) ANONYMOUS. Mitt. Biol. Reichanst. für Land- und Forstwirtsch. 30, 400 pp. 1927. (Rev. Appl. Myc. 6: 463.)
- (3) ANONYMOUS. Mauritius Dept. Agr. Ann. Rept. pp. 10-13. 1928. (Exp. Sta. Rec. 64: 448.)
- (4) ANONYMOUS. Reports on the work of Agricultural Research Institutes and on certain other agricultural investigations in the United Kingdom. 1929-1930. 1931. (Rev. Appl. Myc. 10: 583-584.)
- (5) ANONYMOUS. N. Dakota Sta. Bull. No. 286. pp. 35-38. 1935. (Exp. Sta. Rec. 75: 497.)
- (6) ANONYMOUS. 薬学大辞典 7: 171. 1936.
- (7) ANONYMOUS. Hawaii Agr. Exp. Sta. Rept. pp. 34-42. 1939.
- (8) ANONYMOUS. 14th. Ann. Rept. Dept. Sci. Ind. Res., N.Z. 1939-1940. 100 pp. 1940. (Rev. Appl. Myc. 19: 643-644.)
- (9) 阿部又三 (ABE, M.) 日農化 (J. Agr. Chem. Soc. Jap.) 20: 275-282. 1944 a.
- (10) —. *Ibid.* 20: 353-358. 1944 b.
- (11) —. *Ibid.* 20: 405-410. 1944 c.
- (12) ABRAMS, L. An illustrated flora of the Pacific states Washington, Oregon, and California. I. 557 pp. 1923.
- (13) ADAMS, J. Irish Naturalist 16: 167-169. 1907.
- (14) AINWORTH, G. C. The plant diseases of Great Britain. pp. 1-38. 1937.
- (15) AJREKAR, S. L. J. Ind. Bot. Soc. 5: 55-61. 1926.
- (16) AJROLDI, P. Riv. Pat. Veg. 30: 149-157. 1940. (Rev. Appl. Myc. 19: 525.)
- (17) ANDERSON, F. W. J. Myc. 5: 30-32. 1889 a.
- (18) —. *Ibid.* 5: 83. 1889 b.
- (19) ANDERSON, P. J. et al. U. S. Dept. Agr. Bull. No. 1366. 111 pp. 1926.
- (20) ANERUD, K. Landtmannen, Uppsala. 23: 1185-1188. 1939. (Rev. Appl. Myc. 19: 272-273.)
- (21) APPEL, O. Beispiele zur Mikroskopischen Untersuchung von Pflanzenkrankheiten. pp. 18-20. 1908.
- (22) —. Deutsch. Landw. Presse 60: 641. 1933. (Rev. Appl. Myc. 13: 382.)
- (23) ARMSTRONG, S. F. British grasses and their employment in agriculture. 199 pp. 1917.
- (24) ATANASOFF, D. Ergot of grains and grasses. U. S. Dept. Agr., Bur. Pl. Ind. 127 pp. 1920. (stenciled publication)
- (25) BABINGTON, C. C. Manual of British Botany. 10th. ed. 612 pp. 1922.
- (26) BARGER, G. Ergot and ergotism. 279 pp. 1931.
- (27) BARNAS, B. Math. u. Naturw. Ber. Ungarn. 24: 377. 1909. (Exp. Sta. Rec. 23: 741.)
- (28) BASTIDE et al. Bull. Off. Gouv. Gén. Algérie. No. 13. Supp. pp. 176-258. 1907. (Exp. Sta. Rec. 19: 480.)
- (29) BEAL, W. J. Grasses of North America. II. 706 pp. 1896.
- (30) BÉKÉSY, N. v. Centralbl. Bakt. Par. Infekt. II. 99: 321-332. 1938.
- (31) BENTHAM, G., & HOOKER, J. D. Genera plantarum. III. 2. pp. 1074-1215. 1883.
- (32) BESSEY, C. E. Bull. Iowa Agr. Coll. pp. 130-132. 1884.
- (33) BIFFEN, R. H. J. Agr. Sci. 4: 421-433. 1912.
- (34) —, & ENGLEADOW, F. L. Wheat-breeding investigations at the Plant Breeding Institute Cambridge. Min. of Agr. Res. Monograph 4, 114 pp. 1926. (Rev. Appl. Myc. 6: 405-406.)

- (35) BIRMINGHAM, W. A. Bull. R. Agr. Malad. Plant. 12: 1287-1288. 1921. (Centralbl. Bakt. Par. Infekt. II. 62: 491.)
- (36) BITANCOURT, A. A. Arch. Inst. Biol. Def. Agr. Animal. S. Paulo. 8: 315-322. 1937. (Rev. Appl. Myc. 17: 299.)
- (37) —. Inst. Bull. Pl. Prot. 14: 25-27. 1940. (Rev. Appl. Myc. 19: 329.)
- (38) BLARINGHEM, L. Bull. Soc. Path. Vég. France. 9: 267-276. 1922. (Rev. Appl. Myc. 2: 362-363.)
- (39) BLAS, L. é Ibiza. Mem. Réal. Soc. Española Hist. Nat. Madrid. pp. 287-341. 1912. (cited by BARGER (1931))
- (40) BONDARZEW, A. S. Morbi Plantarum, Leningrad. 18: 231-234. 1929. (Rev. Appl. Myc. 10: 22-23.)
- (41) —, & BUCHOLTZ, F. Zeitschr. f. Pflanzenkr. 13: 217-220. 1903.
- (42) BREDEMANN, G. Myc. Centralbl. 1: 359-364. 1912.
- (43) BROWN, H. B. J. Agr. Res. 7: 401-406. 1916.
- (44) —, & RANCK, E. M. Mississippi Agr. Exp. Sta. Tech. Bull. No. 6. 35 pp. 1915.
- (45) BUCHENAU, Fr. (ENGLER) Das Pflanzenreich. IV. 36. Juncaceae. 284 pp. 1906.
- (46) BUCHOLTZ, F. Korrespondenzbl. d. Naturforscher-Ver. z. Riga. 47: 57-64. 1904. (Just's Bot. Jahresber. 32 (1): 8-9.)
- (47) BUFFUM, B. C. Wyoming Agr. Exp. Sta. Bull. No. 16. pp. 223-248. 1893.
- (48) BUNTING, R. H. Rept. Agr. Dept. Govt. Gold Coast. pp. 32-33. 1926. (Rev. Appl. Myc. 6: 144.)
- (49) —. Gold Coast Dept. Agr., Bull. No. 10. 1928. (Rev. Appl. Myc. 7: 712.)
- (50) CARRUTHERS, W. J. Roy. Agr. Soc. England. (2nd. ser.) 10: 443-458. 1874.
- (51) —. J. Bot. 4: 15-23. 1875.
- (52) CESATI, V. F. v. Linnaea 21: 1-64. 1848.
- (53) CESATI, V. de. Comment. Soc. Crittogam. Ital. 1: 64. 1861. (cited by ATANASOFF. (1920))
- (54) CHARDON, C. E., MILLER, J. H., & MULLER, A. S. Mycologia 32: 172-204. 1940.
- (55) CHARLTON, J. R. N. Z. Dept. Agr., Leaflets for Farmers. No. 11. 2 pp. (Exp. Sta. Rec. 7: 67. 1895-96.)
- (56) CHIFFLOT, J. Bull. Soc. Myc. France. 34: 192-194. 1918.
- (57) COCKAYNE, A. H. J. Dept. Agr. N. Z. 5: 140-141. 1912.
- (58) COCKERELL, T. D. A. J. Myc. 5: 84-85. 1889.
- (59) CONNERS, I. L. Canada Field Nat. 51: 6-7. 1937. (Rev. Appl. Myc. 16: 492.)
- (60) —. 18th. Ann. Rept. Canadian Pl. Dis. Survey, 1938. 112 pp. 1939. (Rev. Appl. Myc. 18: 724-725.)
- (61) COOKE, M. C. Grevillea 12: 77-83. 1884.
- (62) DARNELL-SMITH, G. P., & MACKINNON, E. Dept. Agr. N. S. Wales., Farmers Bull. No. 102. pp. 3-31. 1915. (Exp. Sta. Rec. 34: 845.)
- (63) DENNISTON, R. H. Pharm. Rev. 18: 118-119. 1900.
- (64) DIETRICH, H. A. Arch. f. d. Naturk. Liv-, Ehst- und Kurlands, Dorpat. 2^e ser. 1856. 1: 216-416; 1859. 1: 487-538. (345). 1856-59. (cited by BARGER (1931))
- (65) DORPH-PETERSON, K. Tidsskr. for Planteavl. 35: 809-854. 1929. (Rev. Appl. Myc. 9: 287-288.)
- (66) —. *Ibid.* 37: 799-871. 1931. (Rev. Appl. Myc. 11: 304.)
- (67) —. *Ibid.* 38: 713-792. 1932. (Rev. Appl. Myc. 12: 294.)
- (68) DUC, L. J. Agr. Prat. 86: 360-361. 1922. (Rev. Appl. Myc. 2: 160.)
- (69) DUCELLIER, L. Bull. Soc. Hist. Nat. Afrique du Nord. 13: 98-99. 1922. (Rev. Appl. Myc. 1: 423.)

- (70) —. *Ibid.* 14: 290-29. 1923. (Rev. Appl. Myc. 3: 207.)
- (71) DUGGAR, B. M. Fungous diseases of plants. pp. 244-247. 1909.
- (72) DUSSEAU, A. Rev. Path. Vég. et Ent. Agr. 19: 236-237. 1932. (Rev. Appl. Myc. 12: 275.)
- (73) ELLIOTT, J. A. Farm and Ranch. 39: 16. 1920. (Exp. Sta. Rec. 42: 474.)
- (74) ERIKSSON, J. Die Pilzkrankheiten der landwirtschaftlichen Kulturpflanzen. 246 pp. 1913.
- (75) ESTIFEYEFF, P. G. Pamphlet of the Djetyssouy Plant Protection Station, Alma-Ata. (Verni). 14 pp. 1925. (Rev. Appl. Myc. 4: 445-446.)
- (76) EVANS, I. B. P. Union S. Africa Dept. Agr. Rept. 1912-1913. pp. 169-183. 1912-13. (Exp. Sta. Rec. 31: 539.)
- (77) FARLOW, W. G., & SEYMOUR, A. B. A provisional host-index of the fungi of the United States. 219 pp. 1888-91.
- (78) FERRARIS, T., & GABOTTO, L. Boll. Fitopat. e Ent. Agr. Min. Econ. Naz. 3, 31 pp. 1927. (Rev. Appl. Myc. 8: 432.)
- (79) FRANK, A. B. Die Krankheiten der Pflanzen. I. Aufl. pp. 639-647. 1880.
- (80) —. Die Krankheiten der Pflanzen. II. Aufl. pp. 467-474. 1896.
- (81) —. Kampfbuch gegen die Schädlinge unserer Feldfrüchte. pp. 68-72. 1897.
- (82) FYLES, F. Phytopath. 5: 186-192. 1915.
- (83) GAIN, E. Compt. Rend. Soc. Biol. 72: 189-191. 1912. (Exp. Sta. Rec. 27: 47.)
- (84) GALAMA, S. G. Verhandeling over het moederkoorn, deszelfs hoedanigheden, oorzaken, ware aard, uitwerkselen op dieren en op het menschelyk ligchaam in den gezonden toestand, alsmede deszelfs werkingen als geneesmiddel. 219 pp. 1834. (cited by BARGER (1931))
- (85) GARMAN, H. Kentucky Sta. Bull. No. 183. pp. 255-339. 1914.
- (86) GARRIGUES, A. Les plantes en médecine: le seigle et l'ergot. 254 pp. 1921. (Exp. Sta. Rec. 46: 322.)
- (87) GAUMANN, E. Landw. Jahrb. der Schweiz. 41: 319-324. 1927. (Rev. Appl. Myc. 6: 429.)
- (88) GIEGER, M. Mississippi Sta. Rept. p. 21. 1931.
- (89) GONÇALVES, R. D. Biologico 3: 74-75. 1937. (Rev. Appl. Myc. 16: 599.)
- (90) GRAM, E., JØRGENSEN, C. A., & ROSTRUP, S. Tidsskr. for Planteavl. 34: 778-836. 1928. (Rev. Appl. Myc. 8: 151.)
- (91) GRANDEAU, L. J. Agr. Prat. n. ser. 8: 202-203. 1904.
- (92) GRIFFITHS, D. Bull. Torrey Bot. Club. 28: 236-241. 1901.
- (93) —. *Ibid.* 29: 290-301. 1902.
- (94) GRISEBACH, A. Gramineae. (LEDEBOUR) Flora Rossica IV. pp. 324-484. 1853.
- (95) GROH, H. Mycologia 3: 37-38. 1911.
- (96) GÜSSOW, H. T. Phytopath. 4: 386. 1914.
- (97) HACKEL, E. Gramineae. (ENGLER & PRANTL) Die Natürliche Pflanzenfamilien. II. 2. pp. 1-97. 1887.
- (98) 原 振祐 (HARA, K.) 植雑 (Bot. Mag. Tokyo.) 27: 245-246. 1913.
- (99) HARTWICH, C. Bull. Soc. Myc. France. 11: 138-140. 1895.
- (100) 橋本 孝 (HASHIMOTO, T.) 昭和19年4月23日日本薬学会近畿特別例会に於て講演 (要旨 薬事科学 16: 205.) 1944 a.
- (101) —. 同上 (要旨 薬事科学 16: 205.) 1944 b.
- (102) —. 薬雑甲号 (J. Pharm. Soc. Jap.) 66: 22-23. 1946.
- (103) HAUMAN, L. Physis. Rev. Soc. Agr. Cienc. Nat. 5: 327-328. 1922. (Centralbl. Bakt. Par. Infekt. II. 60: 219.)

- (104) HEALD, F. D., & PETERS, A. T. Nebraska Agr. Exp. Sta. Press. Bull. No. 23. pp. 1-7. 1906.
- (105) HECKE, L. Schweiz. Apoth. Ztg. 59 (1921): 277-281, 293-296; 60 (1922): 42-51. 1921-22.
- (106) —. Wiener Landw. Ztg. 73: 3. 1923. (Bot. Abst. 13: 57. No. 387.)
- (107) HEGI, G. Illustrierte Flora von Mitteleuropa. I. pp. 165-402. 1906.
- (108) HELMER, J. J. Comp. Med. Vet. Arch. 22: 446-449. 1901. (Exp. Sta. Rec. 13: 896.)
- (109) 逸見武雄 (HEMMI, T.) 植物治病学汎論 pp. 124-126. 1926.
- (110) —, 小西全太郎 (—, & KONISHI, Z.) 病虫雑 (J. Pl. Prot.) 26: 857-868. 1939.
- (111) HENNING, E. Kungl. Landbruks-Akad. Handl. och Tidsk., år 1922. pp. 26-32. 1922. (Rev. Appl. Myc. 1: 417-418.)
- (112) HENNINGS, P. Hedwigia 38: 64, 219. 1899.
- (113) —. *Ibid.* 39: 77. 1900.
- (114) HINDMARSH, W. L., & HART, L. Vet. Res. Rept. N. S. Wales. 1937, 7: 78-88. 1938. (Rev. Appl. Myc. 18: 460.)
- (115) 平塚直秀, 小谷英二 (HIRATSUKA, N., & KOTANI, H.) 鳥取農学会報 (Trans. Tottori Soc. Agr. Sci.) 2: 57-60. 1930.
- (116) HITCHCOCK, A. S. Manual of the grasses of the United States. 1040 pp. 1935.
- (117) HONDA, M. (本田正次) J. Fac. Sci. Tokyo Imp. Univ. Sect. III. Botany (東大理学部紀要 第3類 植物学 第3冊) 3: 1-484. 1930.
- (118) HOPKIRK, C. S. M. N. Z. J. Agr. 53: 105-108. 1936.
- (119) HORNE, A. S. Dept. Sci. & Ind. Res., Food Invest. Board for the year 1931. pp. 272-289. 1932. (Rev. Appl. Myc. 12: 32.)
- (120) 出田 新 (IDETA, A.) 増訂日本植物病理学 上巻 pp. 242-245. 1911.
- (121) IMAI, S. (今井三子) Trans. Sapporo Nat. Hist. Soc. (札幌博物学会報) 14 (2): 101-106. 1935.
- (122) 伊藤 安 (ITO, Y.) 樺太庁中央試験所報告 第21号 第4類 (畜産) 第1号 (Rept. Saghalien Central Exp. Sta. No. 21. Ser. 4 (Animal Husbandry) No. 1) pp. 23-26. 1939.
- (123) IWANOFF, K. S. Zeitschr. f. Pflanzenkr. 13: 221-222. 1903.
- (124) 岩垂 悟, 佐々木三男, 内藤中人 (IWATARE, S., SASAKI, M., & NAITO, N.) 農事試験場報告 (Rept. Agr. Exp. Sta. Manchoukuo.) No. 45. 223 pp. 1943.
- (125) JAAP, O. Annal. Myc. 3: 394. 1905.
- (126) —. *Ibid.* 5: 252. 1907.
- (127) JACZEWSKI, A. (Annual reports of diseases and injuries of cultivated and wild growing useful plants in Russia.) 2: 26. 1906. (cited by ATANASOFF (1920))
- (128) 刈米達夫 (KARIYONE, T.) 薬雑 (J. Pharm. Soc. Jap.) 43: 107-110. 1923. 及び私信 (Private communication dated June 11, 1945.)
- (129) KAWATANI, T. (川谷豊彦) 衛彙 (Bull. Imp. Hyg. Lab.) 65: 81-83; 植雑 (Bot. Mag. Tokyo.) 59: 90-91. 1944 a.
- (130) —. 昭和 19 年 12 月 23 日 日本作物学会第 65 回講演会に於て発表 (印刷中) 1944 b.
- (131) —. 昭和 20 年 10 月 20 日 日本作物学会第 69 回講演会に於て発表 (印刷中) 1945.
- (132) —. 昭和 21 年 4 月 6 日 日本作物学会第 71 回講演会に於て発表 (印刷中) 1946.
- (133) 木本氏幹 (KIMOTO, U.) 昭和 18 年 3 月 第 2 回 研究発表会別刷 (樺太庁中央試験所) pp. 16-19. 1943 a.
- (134) —. 札幌農林学会報 (J. Sapporo Soc. Agr. Forest.) 36: 30-45. 1943 b.
- (135) KIRCHNER, O. v. Die Krankheiten und Beschädigungen unserer landwirtschaftlichen Kulturpflanzen. I. Aufl. 1890. 637. pp.; III. Aufl. 1923. 679 pp.
- (136) KIRK, T. W. N. Z. Dept. Agr. Rept. pp. 53-58. 1894. (Exp. Sta. Rec. 7: 39.)

- (137) 北川政夫 (KITAGAWA, M.) 大陸科学院研究報告 第3卷号外第1册 (Rept. Inst. Sci. Res. Manchoukuo. III. Appendix-I.) 487 pp. 1939.
- (138) 小林義雄 (KOBAYASHI, Y.) (朝比奈) 日本隱花植物図鑑 pp. 246-247. 1939.
- (139) KOMAROV, V. L. Flora Manshuriae. I. 559 pp. 1901.
- (140) KOSSOBUTZKY, M. I. Votyaks' Regional Pl. Prot. Sta. and Sci. Soc. for the study of the Votyaks' Region. 64 pp. 1929. (Rev. Appl. Myc. 9: 103-104.)
- (141) KREBS, J. Ber. Schweiz. Bot. Ges. 15: 71-165. 1936.
- (142) 工藤祐舜 (KUDO, S.) 北樺太植物調査書 薩哈連印政部 295 pp. (pp. 62, 254.) 1924.
- (143) KÜHN, J. Hedwigia 1: 109-111. 1856.
- (144) —. Die Krankheiten der Kulturgewächse, ihre Ursachen und ihre Verhütung. pp. 113-132. 1858.
- (145) —. Zeitschr. f. d. gesamt. Naturwissensch. 23: 64-68. 1863.
- (146) KÜKENTHAL, G. Cyperaceae-Caricoideae. (ENGLER) Das Pflanzenreich. IV. 20. 824 pp. 1909.
- (147) KUNTH, C. S. Agrostographia synoptica sive enumeratio Graminearum I. (Enumeratio plantarum I.) 606 pp. 1833.
- (148) LEFEBVRE, C. L. Phytopath. 29: 355-367. 1939.
- (149) LIND, J. Danish fungi as represented in the Herbarium of E. Rostrup. 1913. (cited by BARGER (1931))
- (150) LUDWIGS, K. Mitt. Gesellsch. Vorratschutz. 2: 47-50. 1926. (Rev. Appl. Myc. 6: 29.)
- (151) LUERSSSEN, C. Handbuch der systematischen Botanik. I. pp. 157-163. 1879.
- (152) LUTZ, L. Bull. Soc. Myc. France. 20: 211-213. 1904.
- (153) MCALPINE, D. Report on rust in wheat experiments, 1892-1893. Dept. Agr. Victoria. pp. 36-38. 1894. (cited by BARGER (1931))
- (154) MCCREA, A. Amer. J. Bot. 18: 50-78. 1931.
- (155) MCFARLAND, F. T. Phytopath. 11: 41-42. 1921.
- (156) MCNEIL, J. H., & PAMMEL, L. H. Iowa Agr. Exp. Sta. Press. Bull. pp. 1-8. 1908.
- (157) MCROSTIE, G. P. Rept. Canad. Seed Grs.' Ass. 1935-36. pp. 31-33. 1936. (Rev. Appl. Myc. 16: 112.)
- (158) MAINS, E. B. Proc. Indiana Acad. Sci. 34: 289-295. 1924. (Rev. Appl. Myc. 5: 217-218.)
- (159) 牧野富太郎, 根本堯爾 (MAKINO, T., & NEMOTO, K.) 訂正増補日本植物總覧 (Flora of Japan.) pp. 1295-1488, 1522-1529. 1931.
- (160) MALKOFF, K. Zeitschr. f. Pflanzenkr. 15: 52. 1905.
- (161) —. Annal. Myc. 6: 29-36. 1908.
- (162) MARCHIONATTO, J. B. Bol. Min. Agr. Nac. Buenos Aires. 29: 457-462. 1930. (Rev. Appl. Myc. 10: 463.)
- (163) MARKHASSEVA, V. A. Summ. Sci. Res. WK. Inst. Pl. Prot. Leningr. pp. 535-537. 1936. (Rev. Appl. Myc. 16: 31-32.)
- (164) MASSEE, G. Grevillea 15: 1-9. 1886.
- (165) 松原新之助 (MATSUBARA, S.) 植物学 p. 160. 1882.
- (166) 松村任三 (MATSUMURA, J.) 日本植物名彙 (Nomenclature of Japanese plants.) 209 pp. 1884.
- (166A) 松尾 仁, 川谷豊彦, 田村良修, 小幡利勝, 市川忠次 (MATSUO, J., KAWATANI, T., TAMURA, Y., OBATA, T., & ICHIKAWA, T.) 衛彙 (Bull. Imp. Hyg. Lab.) 65: 1-80. 1944.
- (167) 松岡義頭 (MATSUOKO, Y.) 大陸科学院彙報 (Bull. Inst. Sci. Res. Manchoukuo.) 4: 957-966. 1940.
- (168) —. *Ibid.* 6: 327-328. 1942.
- (169) MAUNDER, J. C. J. Qd. Agr. J. 45: 250-251. 1936. (Rev. Appl. Myc. 15: 504.)

- (170) MERCIER, L. *Compt. Rend. Soc. Biol.* 70: 300-302. 1911.
- (171) MITCHELL, D. T. *Union S. Africa. Dir. Vet. Res. Rept.* pp. 439-449. 1918. (Exp. Sta. Rec. 44: 78.)
- (172) —. *S. Africa J. Sci.* 16: 391-396. 1920 a.
- (173) —. *J. Dept. Agr. Union S. Africa.* 1: 422-426. 1920 b.
- (174) —. *Feedingstuffs.* 38: 46-47, 49. 1921.
- (175) 三浦道哉 (MIURA, M.) 満蒙植物誌 (List of plants in Manchuria and Mongolia.) 381 pp. 1925.
- (176) 三浦密成 (MIURA, M.) 満蒙植物誌 第3輯 隠花植物 菌類 (Flora of Manchuria and East Mongolia. Part. III. Cryptogams, Fungi.) 549 pp. (pp. 150-151, 寄主索引 p. 5.) 1928.
- (177) 宮部金吾, 三宅 勉 (MIYABE, K., & MIYAKE, T.) 樺太植物調査概報 p. 45. 1907.
- (178) 宮本三七郎, 大川徳太郎 (MIYAMOTO, S., & OKAWA, T.) 家畜有毒植物学 pp. 630-633. 1942.
- (179) MOESZ, G. v. *Bot. Közlemények.* 21: 1-3. 1924. (Rev. Appl. Myc. 4: 181-182.)
- (180) MÖLLER, A. *Phycomyceten und Ascomyceten, Untersuchungen aus Brasilien,* pp. 304-305. 1901.
- (181) MONICAULT, P. de. *J. Agr. Prat.* 86: 169. 1922.
- (182) MOROZOV, B. *La Défense des Plantes. Leningr.* 2: 592-602. 1926. (Rev. Appl. Myc. 5: 714-715.)
- (183) MORWOOD, R. B. *Qd. Agr. J.* 45: 146-147. 1936.
- (184) —. *Ibid.* 47: 478-479. 1937.
- (185) MOURASHKINSKY, K. E. *Trans. Siberian Acad. Agr. Forestry.* 6: 1-4. 1926. (Rev. Appl. Myc. 6: 293-294.)
- (186) —. (Control of cereal diseases in the arid districts of the south-east.) (Omsk District) pp. 31-36. 1940.
- (187) 中田覚五郎 (NAKATA, K.) 作物病害図編 第1版 1934, pp. 18-19.; 第2版 1937, pp. 18-19, 50-51.
- (188) —, 滝元清透 (—, & TAKIMOTO, S.) 勸業模範場研究報告 (J. Agr. Exp. Sta. Chosen.) No. 15. p. 10. 1928.
- (189) 根本堯爾 (NEMOTO, K.) 日本植物總覽補遺 (Flora of Japan. Supplement.) pp. 853-1024, 1043-1049. 1936.
- (190) NOBLE, R. J. *J. Austr. Inst. Agr. Sci.* 2: 76-78. 1936 a.
- (191) —. *Agr. Gaz. N. S. Wales.* 47: 403-405. 1936 b.
- (192) NOFFRAY *Mem. Soc. Nat. Agr. France.* 139: 501-555. 1900. (Exp. Sta. Rec. 13: 566.)
- (193) 野村 実 (NOMURA, M.) 福岡医雑 19: 1144-1157. 1926.
- (194) NORTON, J. B. S. *Rept. Md. State Hort. Soc.* 5: 90-99. 1902.
- (195) —. *Science n. ser.* 43: 894-895. 1916.
- (196) OCFEMIA, G. O. *Phil. Agr.* 19: 581-589. 1931.
- (197) —. *Proc. 6th., Congr. Int. Soc. Sugar Cane Tech., Baton Rouge 1933.* pp. 183-187. 1939. (Rev. Appl. Myc. 18: 625.)
- (198) 大森順造, 山田玄太郎 (OMORI, J., & YAMADA, G.) 植物病理学 p. 385. 1904.
- (199) 大谷文昭 (OHTANI, F.) 薬雑 (J. Pharm. Soc. Jap.) 48: 376-333. 1928.
- (200) OUDEMANS, C. A. J. A. *Enumeratio systematica fungorum. I-V.* 1919-24.
- (201) PAINE, R. *Vet. Rec.* 30: 123. 1917. (Exp. Sta. Rec. 39: 891.)
- (202) PAMMEL, L. H. *Iowa Agr. Exp. Sta. Bull. No. 18.* pp. 488-505. 1892.
- (203) —. *A manual of poisonous plants.* 977 pp. (pp. 274-279.) 1911.
- (204) PAPE, H. *Illus. Landw. Zeit.* 47: 474-475. 1928. (Rev. Appl. Myc. 8: 98.)
- (205) PETCH, T. *Naturalist* pp. 25-28. 1937 a. (Rev. Appl. Myc. 17: 104.)
- (206) —. *Ibid.* pp. 279-283. 1937 b. (Rev. Appl. Myc. 17: 269.)
- (207) PLENK, J. J. v. *Physiologia et pathologia plantarum.* 192 pp. 1794.
- (208) PONSARD, J. *J. Agr. Prat. n. ser.* 49: 413-414. 1928. (Exp. Sta. Rec. 63: 247.)

- (209) QUÉKETT, E. J. Trans. Linn. Soc. 18: 453-473. 1841.
- (210) QUÉLET, L. Mém. de la d'émulation de Montbéliard, 2e sér. 5: 487. 1876.
- (211) RANOJEVIC, N. Annal. Myc. 8: 347-402. 1910.
- (212) REHM, H. Hedwigia 28: 302. 1889.
- (213) RHIND, D. Internat. Rev. Agr. 19: 744-745. 1928. (Rev. Appl. Myc 8: 34.)
- (214) RITCHIE, A. H. Entomological report, 1925-1926, Dept. Agr., Tanganyika Territory. pp. 33-36. 1926. (Rev. Appl. Myc. 6: 398.)
- (215) ROBERTSON, H. F. Ann. Rept. Myc., Rangoon, Burma. 10 pp. 1928. (Rev. Appl. Myc. 8: 355.)
- (216) ROJDESTVENSKY, N. A. Materialui po Mikologii i Fitopatologii. 6: 123-165. 1927. (Biol. Abst. 8: 1647; Exp. Sta. Rec. 60: 29; Rev. Appl. Myc. 7: 236-237.)
- (217) ROSEN, H. R. Mycologia 12: 40-41. 1920.
- (218) ROSTOWZEW, S. J. J. Moscow Agr. Coll. 3: 1-16. 1902. (Bot. Centralbl. 90: 705-706.)
- (219) ROSTRUP, E. Bot. Tidskr. 21: 47. 1897-93. (cited by BARGER (1931))
- (220) —. Plantepatologi. pp. 503-509. 1902.
- (221) SACCARDO, P. A. Sylloge fungorum. I-XXV. 1882-1931.
- (222) SALMON, D. E. U. S. Dept. Agr. Rept. pp. 212-252. 1884.
- (223) SAMPSON, K. Welsh Pl. Breeding Sta., Aberystwyth. (Bull.) ser. C. No. 1. pp. 50-51. 1920. (Exp. Sta. Rec. 46: 239.)
- (224) SĂVULESCU, T., SANDU-VILLE, C., RAYSS, T., & ALEXANDRI, V. Inst. Cerc. Agron. al României, 19, 93 pp. 1934. (Rev. Appl. Myc. 14: 214-215.)
- (225) 沢田兼吉 (SAWADA, K.) 台湾總督府中央研究所農業部報告 (Rept. Dept. Agr. Govt. Res. Inst., Formosa, Jap.) No. 51. 1931 a.
- (226) —. 台湾産菌類目錄 (List of fungi found in Formosa.) 103 pp. 1931 b.
- (227) SCOSSIROLI, R. Riv. Ital. Essenze. 21: 442-444. 1939.
- (228) SEYMOUR, A. B. Host-index of the fungi of North America. 732 pp. (pp. 81-159, 165-168.) 1929.
- (229) SHEPHERD, E. F. S. Ann. Rept. Mauritius Dept. Agr. (for the year 1926.) pp. 15-18. 1927.
- (230) —. *Ibid.* (for the year 1928.) pp. 10-13. 1930.
- (231) 嶋田玄弥 (SHIMADA, H.) 野外博物 (J. Kyoto Nat. Hist. Soc.) 1: 57-65. 1939.
- (232) 白井光大郎 (SHIRAI, M.) 植雜 (Bot. Mag. Tokyo.) 1: 122-129. 1887.
- (233) —. *Ibid.* 6: 35-36. 1892.
- (234) —. 植物病理学 下卷 pp. 214-219. 1894.
- (235) —. 最新植物病理学 pp. 432-436. 1903.
- (236) —. 日本菌類目錄 (A list of Japanese fungi hitherto known.) 1st. ed. p. 21. 1905.
- (237) —, 三宅市郎 (—, & MIYAKE, I.) *Ibid.* 2nd. ed. pp. 143, 145. 1917. .
- (238) —, 原 根祐 (—, & HARA, K.) *Ibid.* 3rd. ed. p. 85. 1927.
- (239) SMITH, E. F. J. Myc. 5: 203-204. 1889.
- (240) SMITH, G. M. Cryptogamic botany. I. pp. 452-455. 1938.
- (241) SMITH, S., & TIMMIS, G. M. J. Chem. Soc. pp. 1390-1395, 1888. 1930-31.
- (242) SMITH, W. G. Diseases of field and garden crops. pp. 214-238. 1884.
- (243) SORIANO, S. Rev. Fac. Agron. y Vet., Buenos Aires. ser. II. 6: 89-114. 1928. (Rev. Appl. Myc. 7: 796.)
- (244) STÄGER, R. Bot. Centralbl. 83: 145. 1900.
- (245) —. Bot. Ztg. 61: 111-158. 1903.
- (245) —. Centralbl. Bakt. Par. Infekt. II. 14: 25-32. 1905.

- (247) —. *Ibid.* 17: 773-784. 1907.
- (248) —. *Ibid.* 20: 272-279. 1908 a.
- (249) —. *Natur u. Offenbar.* 54: 32-39. 1908 b.
- (250) —. *Centralbl. Bakt. Par. Infekt. II.* 27: 67-73. 1910.
- (251) —. *Myc. Centralbl.* 1: 198-201. 1912.
- (252) —. *Centralbl. Bakt. Par. Infekt. II.* 56: 329-339. 1922.
- (253) —. *Mitt. Naturf. Ges. Bern.* 1922. pp. 11-20. 1923. (Bot. Abst. 13: 282, No. 1911)
- (254) STEUDEL, E. G. *Synopsis Plantarum Glumacearum. I. Synopsis Plantarum Graminearum.* 475 pp. 1855.
- (255) STEVENS, F. L., & HAIL, J. G. *Bot. Gaz.* 50: 460-463. 1910.
- (256) STEVENSON, J. A. *Foreign plant diseases.* U. S. Dept. Agr. 198 pp. 1923.
- (257) STEYN, D. G. *Fmg. S. Africa.* 14: 69. 1939. (Rev. Appl. Myc. 18: 460.)
- (258) SUEMATU, N. (末松直次) *Syokubutu-Byorigaku.* pp. 178-179. 1926.
- (259) 菅原繁蔵 (SUGAWARA, S.) *樺太植物図誌 (Illustrated Flora of Saghalien.) I.* pp. 165-488. 1937.
- (260) 杉本重行, 松岡義頭 (SUGIMOTO, S., & MATSUOKA, Y.) *月刊臨牀大陸* 第19号 1941.
- (261) SYDOW, H. *et P. Annal. Myc.* 7: 543-547. 1909.
- (262) SYDOW, P. (SACCARDO) *Sylloge fungorum. XIII.* 1340 pp. 1893.
- (263) 竹本常松 (TAKEMOTO, T.) *日本薬報 (Pharm. Rev.)* 18 (21): 3. 1943.
- (264) —. *薬雜 (J. Pharm. Soc. Jap.)* 64: 225-228. 1944 a.
- (265) —. *Ibid.* 64: 228-231. 1944 b.
- (266) 滝元清透 (TAKIMOTO, S.) *病虫雜 (J. Pl. Prot.)* 5: 537-543. 1918.
- (267) TANNER, H. *J. Roy. Agr. Soc. England.* 19: 40. 1858. (cited by BARGER (1931))
- (268) TANRET, G. *Bull. Agr. Algérie Tunisie-Maroc, ii ser.* 28: 108-109. 1922 a. (Rev. Appl. Myc. 1: 423.)
- (269) —. *Bull. Soc. Chim.* 31: 444-448. 1922 b.
- (270) —. *Bull. Sci. Pharm.* 29: 169-175. 1923.
- (271) 栃内吉彦 (TOCHINAI, Y.) *植物病理学通論* pp. 184-185. 1938.
- (272) TOGASHI, K. (富樫浩吾) *Trans. Sapporo Nat. Hist. Soc. (札幌博物学会報)* 14: 280-285. 1936.
- (273) —. *植物及動物* 8: 179-186. 1940.
- (274) —. *植雜 (Bot. Mag. Tokyo.)* 56: 74-81. 1942 a.
- (275) —. *日本植物病理学会報 (Ann. Phytopath. Soc. Jap.)* 12: 1-13. 1942 b.
- (276) 徳永芳雄 (TOKUNAGA, Y.) *Ibid.* 4: 113-114. 1934.
- (277) TUBEUF, K. F. v. *Diseases of plants induced by cryptogamic parasites.* pp. 191-195. 1897.
- (278) TULASNE, L. R. *Ann. Sci. Nat., Part. bot. III. sér.* 20: 5-56. 1853.
- (279) VLADIMIRSKY, S. V. *Sovetsk. Bot.* pp. 77-87. 1939. (Rev. Appl. Myc. 19: 209-210.)
- (280) WARBURTON, C. W. *Bot. Gaz.* 51: 64. 1911.
- (281) WATERHOUSE, W. L. *Proc. Linn. Soc. N. S. Wales.* 62: 377. 1937. (Rev. Appl. Myc. 17: 326.)
- (282) WENIGER, W. *N. Dakota Agr. Exp. Sta. Bull. No. 166.* 92 pp. 1923.
- (283) —. *Ibid. No. 176.* 23 pp. 1924.
- (284) WHETZEL, H. H., & REDDICK, D. *Phytopath.* 1: 50-52. 1911.
- (285) WILLIAMS, T. A. *S. Dakota Agr. Exp. Sta. Bull. No. 29* pp. 29-52. 1891.
- (286) —. *Ibid. No. 33.* pp. 18-44. (Exp. Sta. Rec. 4: 924-925.) 1893.
- (287) WILSON, A. S. *Gardeners' Chronicles.* 4: 774-775, 807-808; *Pharm. J. (iii)* 6 (1876): 525-526, 545-546, 564-565. 1875-76. (cited by BARGER (1931))
- (288) WINTER, G. *Hedwigia* 21: 11. 1882.

- (289) —. *Ibid.* 26: 32-33. 1887.
 (290) WITTE, H. Medd. Frökontrollanst. Stockh. pp. 3-62. 1940. (Rev. Appl. Myc. 19: 691.)
 (291) WOLF, R., & ZOPF, W. Krankheiten der landwirtschaftlichen Nutzpflanzen durch Schmarotzerpilze. pp. 116-126. 1887.
 (292) 安田 篤 (YASUDA, A.) 植維 (Bot. Mag. Tokyo.) 28: 324-326. 1914.
 (293) ZIMMERMANN, A. Ber. Land- u. Forstw. v. Kaiserl. Gouvern. v. Deutsch-Ostafrika. 2: 11-36. 1900. (Bot. Centralbl. 97: 170; Zeitschr. f. Pflanzenkr. 16: 99.)
 (294) ZOPF, W. Die Pilze. pp. 459-461. 1890.

戦時中 (1941-45) の外国文献 Foreign literature during the World War II (1941-45)

- (295) ANONYMOUS. J. Amer. Soc. Agron. 37: 160-162. 1945.
 (296) AVIZOHAR, Z. Palestine J. Bot. Ser. R. 3: 267-269. 1940. (Biol. Abst. 19: 2483. No. 22822.)
 (297) BURTON, G. W. J. Amer. Soc. Agron. 35: 465-474. 1943.
 (298) CUNNINGHAM, I. J. N. Z. J. Sci. Tech. 23: 138A-145A. 1941.
 (299) DILLON WESTON, W. A. R., & TAYLOR, R. E. J. Agr. Sci. 32: 457-464. 1942. (Biol. Abst. 17: 1775. No. 19177.)
 (300) FOSTER, G. E., & GRANT, R. L. Analyst 69: 271-272. 1944. (Biol. Abst. 19: 565. No. 5300.)
 (301) GRAYSON, A. R. J. Dept. Agr. Victoria. 39: 441-442. 1941. (Agr. Index. 9: 640.)
 (302) GROVES, J. W. Mycologia 35: 604-609. 1943.
 (303) HASSAL, C. H. N. Z. J. Sci. Tech. 25: 169-174. 1944.
 (304) KULKARNI, G. S. Current Sci. 11: 245. 1942. (Biol. Abst. 18: 2365. No. 22390A.)
 (305) LANGDON, R. F. J. Austr. Inst. Agr. Sci. 7: 85-87. 1941 a. (Biol. Abst. 16: 458. No. 5058.)
 (306) —. Austr. J. Sci. 3: 169-170. 1941 b. (Biol. Abst. 16: 251. No. 2948.)
 (307) —. Phytopath. 32: 613-617. 1942.
 (308) LEFEBVRE, C. L. *Ibid.* 32: 809-812. 1942.
 (309) MACKIE, W. W., & SNYDER, W. C. Plant Disease Reporter. 29: 85. 1945. (Biol. Abst. 19: 1253. No. 11540.)
 (310) MASTENBROEK, C., & OORT, A. J. P. Tijdschr. Plantenziekten. 47: 165-185. 1941.
 (311) NATH, P., & PADWICK, G. W. Current Sci. 19: 488-489. 1941. (Biol. Abst. 16: 1884. No. 18983.)
 (312) NEILL, J. C., & BELL, J. E. N. Z. J. Agr. 63: 397-400. 1941.
 (313) PADWICK, G. W. Current Sci. 11: 246. 1942. (Biol. Abst. 18: 2365. No. 22395.)
 (314) —, & AZMATULLAH, Md. *Ibid.* 12: 257. 1943. (Biol. Abst. 18: 1837. No. 17160.)
 (315) PLANTE, E. C., & SUTHERLAND, K. L. Austr. Counc. Sci. Indus. Res. J. 16: 28. 1943. (Biol. Abst. 17: 2407. No. 24849.)
 (316) SCHWARTING, A. E. Ohio State Univ. Absts. Doctorial Diss. 43: 151-158. 1943. (Biol. Abst. 19: 1248. No. 11504.)
 (317) STEINMETZ, F. H., & WRIGHT, C. M. Phytopath. 33: 12-13. 1943.
 (318) THIRUMALACHAR, M. J. Current Sci. 13: 288. 1944. (Biol. Abst. 19: 1576. No. 14525.)
 (319) —. *Ibid.* 14: 22. 1945. (Biol. Abst. 19: 2203. No. 23106.)
 (320) THOMAS, K. M., RAMAKRISHNAN, T. S., & SRINIVASAN, K. V. Proc. Ind. Acad. Sci. Sect. B. 21: 93-100. 1945. (Biol. Abst. 20: 18534.)
 (321) WEST, E. Plant Disease Reporter. 27: 113-114. 1943. (Biol. Abst. 17: 2194. No. 22551.)
 (322) —. Mycologia 37: 65-79. 1945.

Résumé

The present paper herein reported consists of three chapters: first, species of *Claviceps*; secondly, host-index of *Claviceps*; and thirdly, discussions on hosts of *Claviceps*. The lists are made from reports published in Japan till 1946, and in foreign countries till 1941.

- (1) The numbers of *Claviceps* known in the world are 22 species and 2 varieties; those known in Japan, 5 sp.
- (2) Geographical distribution of *Claviceps* and their economic importance are described. The first discovery of *Claviceps* in Japan, and *Claviceps* of Saghalien, Korea, Manchuria, and Formosa are also described.
- (3) The numbers of hosts of *Claviceps* known in the world are 81 genera 332 species; those known in Japan, 35 gen. 74 sp.
- (4) Of four families of hosts of *Claviceps*, those belonging to Poaceae are most numerous, numbering 75 gen. 316 sp.; those of Japan, 31 gen. 68 sp. Of four subfamilies of Poaceae, hosts belonging to Poaeoideae are most numerous, numbering 41 gen. 196 sp.; those of Japan, 17 gen. 37 sp. Of five tribes of Poaeoideae, hosts belonging to Hordeae and Festuceae are preeminently more numerous than the others. (Tab. 1. This Bulletin No 70, p. 152.)
- (5) At least *Cl. purpurea* and *Cl. microcephala*, called like this at the present time, are thought to be collective species. Thus, concerning each host precise studies on the morphology (taxonomy), physiology, oecology, and parasitism should be made, and afterwards, their biological forms should be synthetically discussed.

November 10, 1947

Experimental Farm for the Cultivation of Medicinal Plants

(attached to the National Hygienic Laboratory)

No. 30, Kasukabe-Machi, Saitama-Ken, Japan

抄 録

インシュリン注射液の国家検定 長沢佳熊, 竹中祐典, 三橋謙一, 池田伝市: 第25回日本内分泌学会総会講演(昭27.4.1)本誌70, 5~7 参照.

脳下垂体後葉注射液の国家検定成績 長沢佳熊, 中山豪一, 佐藤 浩: 第25回日本内分泌学会総会講演(昭27.4.2)本誌70, 1~4 (昭和27) 参照.

アデノジン三リン酸 (A. T. P.) の製法と白鼠, 家兎, 猫に対する生理作用について (1) 長沢佳熊, 中山豪一, 佐藤 浩, 岡崎正彦, 斎藤十六 (日医大斎藤内科) と共著, 第25回日本内分泌学会総会講演(昭27.4.2).

プロタミン・亜鉛・インシュリン注射液の規格 長沢佳熊, 三橋謙一, 池田伝市: 昭和27年4月28日全国病院薬剤部長会議講演 薬剤部年報第12号に掲載の予定.

性腺刺激ホルモン検定法について 長沢佳熊, 越村栄之助: 昭和27年4月30日日本薬学会年会講演 本誌70, 9~11 (1952) 参照.

インシュリンの薬化学的研究 (10) カツオプロタミンを用いたインシュリンの持続作用 長沢佳熊, 中山豪一, 佐藤 浩, 三橋謙一, 池田伝市: 昭和27年4月30日日本薬学会年会講演 従来使われているサケのプロタミン(サルミン)の代りにカツオのプロタミンを用いてプロタミン・亜鉛・インシュリン注射液を製し, 家兎に注射し, 血糖降下作用は注射後9~16時間持続することを知つたので, 一般のプロタミン・亜鉛・インシュリンとして使用し得る。(本誌72号に報告の予定).

水産物臓器の薬化学的利用 (3) くじら臓器からホルモンの抽出 長沢佳熊, 中山豪一, 越村栄之助, 佐藤 浩: 第5回日本薬学大会講演(昭27.4.30).

くじらの卵巣黄体から黄体ホルモンを, 副腎皮質から副腎皮質ホルモンを, 脳下垂体後葉からオキシトシン及びバソプレッシンを, 同前葉から性腺刺激ホルモンを抽出し検定を行つた. 黄体は1個当たり3.5 Kg (240×120×160 (厚さ)mm), 2.7 Kg (200×90×220 mm), 2.95 Kg (180×120×190 mm) あり, その15gが1 Clauberg 単位を含む. アセトン漬の副腎から小山氏等の方法, Cartland, Kuizenga の方法によりアセトンエキスを製したが, その8mgは1 グリコゲン単位を有していた. 脳下垂体後葉からの乾燥粉末1mgは平均0.41 国際単位を有する. 同前葉からは英局方の方法で卵巣重量の増加を調べ陽性であつた(この脳下垂体は鮮度があまりよくない).

プロタミン・亜鉛・注射液の規格 長沢佳熊: 薬剤部長会年報 第12号23~30 (昭和28年) 昭和27年4月日本薬剤師協会学術講演大会で講演したもの, 著者の実験を加えて規格を制定し, 説明してある.

生物学的分析法 長沢佳熊: 化学の領域7, 63~72 (昭和28年) 定量分析として用いる生物学的試験法 Bioassay について著者の多年に亘る実験と研究とに基いての考え方, 方法を総合的にまとめた論文である. 生物学的分析法というのは薬品の効力検定法ではなく, その力価の検定で, 定量的分析法として標準品を使用し, これとの力価の比較により行う意味であつて, 広義には勿論定性的分析も含まれる. 統計学を使う場合の実験資料を得るときの注意などを詳細に記述した.

医薬品一般試験法 長沢佳熊: ケミカルタイムス9号138~143 (昭和27) 医薬品を試験する場合準拠する薬事法, 薬局方などの法律や規則について述べ, 薬局方一般試験法について簡単に解説した.

ペンタシアノアンミン (アリオ) フェロアートを用いる呈色反応についての二三の知見 長沢佳熊, 大熊誠一: 日本分析化学会第1年会講演 昭和27年10月30日 於京都大学

1. 水酸化アルカリ, 炭酸アルカリ性で, Hydroxylamine に対する反応について, 2. 酢酸又は炭酸アルカリ性で Hydroxylamine とチオ尿素に対する呈色反応について.

以上を探究した結果, 二三の新しい知見を得, 更に従来文献の内て了解によつて得られたと思ふ知見を訂正した. 併せてこれ等の反応機構に関する演者等の考えを述べた.

ホルモン剤の最近の進歩 長沢佳熊: ホルモンと臨床, 1, 1号 (昭和28). 綜説

ビタミンCの螢光反応 (第2報) 螢光光度計の設計 小川俊太郎 薬学雑誌: 73, 54 (1953)

デヒドロアスコルビン酸と *o*-Phenylendiamine との反応により生ずる紫藍色の螢光の強度を光電的に測るための螢光光度計を考案し, リボフラビン及びチオクロムの溶液を使い, その実用性を立証した.

本考案の特徴は水銀燈を用いぬこと, 紫外線遮断用とニトロフラゾン系化合物を使つたこと, 光電用と光電流増

幅用の定電圧装置を別々に用意して電源電流の変化に備えたこと及び 10 段可変摺動抵抗によつて感度を向上させかつ変化できるように試みたこと等である。

ビタミン C の螢光反応 (第 3 報) 濾紙クロマトグラフィへの応用 (その 1) 小川俊太郎 薬学雑誌: 73, 59 (1953) デヒドロアスコルビン酸, 酸化型レダクトン, α -ケト酸と *O*-Phenylendiamine との間に起る螢光反応の特異性と鋭敏度を濾紙クロマトグラフィの検出反応に応用して, アスコルビン酸, 其の類縁化合物及び α -ケト酸などの濾紙クロマトグラムをつくり, おのおの R_f のを決定した. その結果本反応は従来よい検出法のなかつたデヒドロアスコルビン酸の検出に極めて特異的で 5% のデヒドロアスコルビン酸を検出し得た. なお, アスコルビン酸のクロマトグラフィ用安定剤としてチオ尿素を使えば, 確認限度が 2~4 倍向上すること, 2,3-Diketo-*I*-gulonic acid の R_f は *n*-ブタノール, 氷酢, 水を使うとき, 約 0.11 で動かぬことを証明した.

ビタミン C の螢光反応 (第 4 報) 濾紙クロマトグラフィへの応用 (その 2) 小川俊太郎 薬学雑誌: 73, 94 (1953) 第 3 報の結果を応用して, デヒドロアスコルビン酸溶液につき, pH の異なるとき及びその液を放置したときの成分の変化を濾紙クロマトグラフィにより追究し, Partridge の報告を訂正した, 次で 22 種の天然並びに加工食品中の総ビタミン C を螢光反応と濾紙クロマトグラフィを応用して検出しようと試み完全に成功した. この場合インドフェノール法では区別できぬ糖のアルカリ水解液中のレダクトン様物質も全然妨害しなかつた.

ビタミン K 及びその製剤の比色定量法 小川俊太郎 ビタミン: 6, 241 (1953) 前報 (ビタミン, 4, 288 (1951)) で扱つた K 作用物質の重量乃至容量的検定法に引続きビタミン K_3 , $K_3 \cdot$ 重亜硫酸ナトリウム, ビタミン $K_4 \cdot$ ジリン酸エステルナトリウム及びこれらの物質の製剤をジニトロフェニルヒドラゾン法によつて比色定量する方法について検討した. その結果著者は米局方またはその原法たる Menotti の方法を改め, 最適の条件下に作用物質を一旦 K_3 とし, これをジニトロフェニルヒドラゾンとして沈澱させ, 定量的に濾取した後アンモニアにより呈色させて比色することにより, 上記各物質, 各製剤と共通な比色定量法を組立てることができた.

NA の新比色定量法 (硫シアン化塩を使う方法) 小川俊太郎, 広瀬朝次 ビタミン: 6, 553 (1953) 一般検体中の NA 定量法として最も重用される BrCN を用いる比色法には BrCN 液を作るために純度の不定で危険なシアン化カリウムを使う欠点が伴つたので, 我々は Ponomarev (C. A. 40, 7274 (1946)) の着想に基き高純度で無害な KSCN 又は NH_4SCN を KCN に代用する比色定量法を検討し, 原方法の欠点を改良して, ここにブロム・ロダン法と名付くべき新定量法を確立し, その実用性を市販混合ビタミンの品質検査の機会をかりて立証した.

ニコチン酸アミドの比色定量法の検討 小川俊太郎, 塚本秀子 ビタミン: 6, 449 (1953) ホフマン転位を利用するニコチン酸アミドの比色定量法を追試し, 試薬の製法, 術式等について, 補足的実験を行い, 本法が純一なニコチン酸アミド製剤の定量法として有用であることを確めた. また, ホフマン転位は酸アミドと次亜臭素酸塩とが当量比にあるとき定量的に進行する事実を比色的に立証した.

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 3 報) 改良比色法による製剤及び生薬中のサントニン定量成績 山口孝一, 太幡利一, 板東きみ子 薬誌: 73, 264 (1953) サントニン 2・4・ジニトロフェニルヒドラジンの呈色試薬として, 第 1 報の 1% 水性水酸化ナトリウム液を代え, 1% 紙アルコール製水酸化ナトリウムを使用し, 同様の条件で発現する赤紫色の 500 m μ 光に於ける吸光度 (e) を各定濃度溶液 ($\gamma/100$ cc) についてベックマン光電計を用い測定した値 ($n=18$) から最小自乗法により回帰方程式を求めた. 18 の測定値から得た標

$$\gamma = 1365e + 6.51$$

準偏差 σ は 0.0168 であり, 2σ に相当する濃度限界は $\pm 57.3\gamma$ である. 純サントニンを本法により定量した値は理論値と一致する. なおサントニン定量値に対するピサチン混在の影響は認められない. 次に 1 g のミブヨモギを用い本法によつてサントニン含量を定量した. 更に局方品, 生薬等について本法, バリタ法, 2・4・ジニトロフェニルヒドラゾン重量法等によつて得た定量値を比較した.

ベックマン光度計による麦角アルカロイドの比色定量 山口孝一, 川谷豊彦, 太幡利一, 福島清吾, 伊藤みよ子 薬誌: 73, 268 (1953) 標準物質として Dr. A. Stoll (Basel) より恵を受けた Ergotamine tartrate 及び Wellcome & Co (London) 製 Ergotoxine ethanesulfonate を使用した.

標準物質の定濃度溶液 ($\gamma/10$ cc) にパラジメチルアミノベンズアルデヒド試液 (JP VI) を加え呈する青色の

550 m μ 光に於ける吸光度 (e) をベックマン光度計を用い測定した値から最小自乗法により次の回帰方程式を求めた。

$$\text{Ergotamine tartrate: } \gamma = 1246 e + 0.32 \quad (\gamma < 1000)$$

$$\text{Ergotoxine ethanesulfonate: } \gamma = 1397 e + 0.13$$

1 g の麦角を用い本法によつて得た総アルカロイド定量値は他法による値と良く一致する。

輸出入食品の検査成績、特に不良トマトペースト罐の膨脹原因 八田貞義、青山好作、丹園治枝、宮沢文雄、大竹作左衛門、小笠原善知 総合医学：9 (5), 275~277 (1952) トマト加工食品の原料として広く利用されるトマトペースト(輸入品)の変敗の推定主因と考えられる嫌気性分裂菌を分離し、この生物学的性状を明かにすると共に加工食品に応用の際注意すべき1, 2の問題について論及した。

脈管内注射剤と副作用(発熱)発現の問題、特に細菌性発熱物質について 八田貞義 総合医学：9 (6), 315~319 (1952) 細菌性発熱物質に関する内外の研究を総合的に紹介し、更に発熱源の問題及び発熱試験の方法について論及した。

レプトスピラの培養に関する研究(第1報) 山地幸雄：日医大誌 19：(10), (昭27) 私はコルトフ培地を基礎培地として *L. icterohaemorrhagiae* の3株及び *L. hebdomadis* A, *L. hebdomadis*, *L. australis* 並びに *L. pyrogenes* の各1株の培養実験において次の知見を得、それに対して考察を加えた。(1) レプトスピラの培地に加えるペプトンとしては、必ずしもウイッテペプトンが優秀ではなく、サナギを原料としたネオペプトン或はポリペプトンがすぐれている。(2) レプトスピラの窒素源としてはペプトン、カゼイン水溶液、9種のアミノ酸混液のうちペプトンが最も優れている。(3) 活性炭末及び健康人尿はレプトスピラの発育を促進する。(4) ペプトンの透析内液はレプトスピラの発育に対する作用には、透析前と顕著な差はないが血清は透析した方がよい場合がある。(5) 血清は80°C 30分加熱しても、レプトスピラの発育を支持する作用を失わない。(6) 市販乾燥人血漿は兎血清の代りにはならない。(7) ジャガイモの芽、皮を除いた部の餾水浸液はレプトスピラの発育に明らかな変化を与えず、グリセリン水浸液は発育を著しく促進する。グリセリンはいくらか発育を促進する。(8) ジャガイモの芽、皮の餾水浸液は低濃度でレプトスピラの発育を促進する。(9) 馬鈴薯澱粉は *L. icte* の2株の発育を促進するが可溶性澱粉にはこの作用は顕著でない。(10) モルモットの肝浸液は、レプトスピラの発育を促進する。家兎の腎及び肺の浸液にもこの作用があるが動物個体により必ずしも一定でない。これらをジャガイモのグリセリン水浸液と共に培地に加えると *L. aust.* 及び *L. pyro.* は血清を加えなくても第1代は発育する。(11) 家兎の肝浸液の酸性処理液は、レプトスピラの発育を促進し、これをジャガイモのグリセリン水浸液と共に培地に加えると、血清を1~3%加えただけでも、レプトスピラは数代継代できる。(昭24.4.第22回日本衛生学会口演)。

レプトスピラの培養に関する研究(第2報) 山地幸雄：日医大誌 20：(2), (昭28) レプトスピラの発育促進物質に関し、コルトフ培地を基礎培地として実験を行ない、次の知見を得た。(1) 酵母浸液は窒素含量に換算して1.7 mg%前後の濃度で、著しくレプトスピラの発育を促進する。(2) 酵母浸液及び炭末を同時に培地に加えても血清の代りにはならない。(3) ジャガイモのグリセリン水浸液と酵母浸液とを加えた培地では、血清を1~3%加えただけでレプトスピラを数代以上継代できる。(4) 酵母浸液或はジャガイモのグリセリン水浸液に含まれる有効物質の一部は、透析膜を通過する。(5) 酵母浸液はレプトスピラの生存日数を延長する。(6) ジャガイモのグリセリン水浸液は、テラマイシンのレプトスピラに対する発育阻止力を増強する。(7) 酵母浸液はクロロマイセチンの作用を増強するが、テラマイシンに対しては、一定の影響を与えない。(昭24.4.第22回日本衛生学会口演)。

レプトスピラの電子顕微鏡像 八田貞義、山地幸雄：東京医誌 70：(2), (昭28) レプトスピラの電子顕微鏡による観察を行ない、次のように指摘、推論した。レプトスピラの微細構造としては、小線維束と、原形質の心とが攪り合さっているという、Bradfieldの見解が支持される。古い培養のレプトスピラは構造が不規則不平等である。テラマイシンを作用させたレプトスピラの波動は緩い。レプトスピラは乾燥の過程において、コロゲオン膜上で変形して奇妙な像を生ずることがある。

乳酸菌の研究 八田貞義、山地幸雄、駒崎哲郎、亀井弘子、平林啓夫：昭和27年4月第22回日本衛生学会口演。

吾々は、市販ラクトミンより分離された乳酸菌につき、生物学的性状及び栄養要求の研究を行つた。1) 被検薬剤

20 種中 3 種は乳酸菌を含有せず、17 種のうち球菌及び杆菌の両方を含むもの 8 種、球菌のみのもの 5 種、杆菌のみのもの 4 種であった。12 種の検体において、炭酸石灰溶解菌の数を測定したところ、1 g 中 500~500 万個で、平均 45 万個であった。2) 分離された球菌は Sherman の分類に従うといずれも *Streptococcus* の Lactic-Enterococcus- 或は Viridans-Group の性状を有する変異株であった。杆菌の多くは Cuaran 等のいう B 群に属するものと考えられた。3) 以上の分離菌株のうち、球菌 17 株、杆菌 2 株についてその栄養要求を調査した。これらの菌株の発育に重要な役割を有する発育素は、パントテン酸、ニコチン酸、リボフラビンで、リボ核酸がこれに次ぎ、ピリドキシン、サイアミン、葉酸、パラアミノ安息香酸は重要度が低いことが認められた。4) アミノ酸についていうと、球菌ではアスパラギン酸、グルタミン酸、アルギニン、シスチン、トレオニンが重要であり、リジン、グリシン、ロイシンがこれに次ぎ、アラニン、イソロイシン、メチオニン、プロリン、ヒスチジン、セリン、トリプトファンはそれ程重要ではなかつた。そしてイソロイシン、メチオニン、ヒスチジン、ロイシン、プロリン、セリン、リジン、トレオニンは阻止的に働く場合があつた。杆菌では、アスパラギン酸、シスチン、グリシン、プロリン、トレオニンが重要で、アルギニン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニンがこれに次ぎ、アラニン、グルタミン酸、セリン、トリプトファンは殆ど発育を促進することがなく、メチオニン、セリンは阻止的に働く場合があつた。

腸チフスワクチン被接種者の血中抗体の消長について 八田貞義、山地幸雄、亀井弘子、功力 博、平林啓夫、駒崎哲郎：昭和 27 年 8 月第 7 回日本公衆衛生学会口演。

腸チフス・パラチフスワクチン被接種者血清の感染防禦力を、マウスによる感染防禦試験により、ワクチン接種前、接種 2 週間後、10 及び 14 ケ月後に測定し、同時にそれらの凝集価、並びに接種時の副作用について観察報告した。

ミブヨモギの学名に就いて 川谷豊彦 薬誌：72 (5), 721~722 (1952) ミブヨモギは現在本邦に於ける唯一のサントニン原料植物でドイツより輸入せられたものである。然して其の学名は従来より *Artemisia monogyna* WALDST et KIT. (= *A. maritima* L. ssp. *monogyna* WALDST. et KIT.) GAMS) とされている。著者は曾つて *A. monogyna* を以てあてる事は考慮を要する事を指摘して置いた。然して著者は新サントニン原料植物育成の目的を以て広く世界的に主として *Seriphidium* 節植物を蒐集し栽培して、細胞遺伝学的、形態学的、植物化学的研究に従ううち *A. monogyna* とする事の誤謬を確認すると共に、ミブヨモギの学名は *A. maritima* L. (sensu stricto) (= *A. maritima* L. ssp. *maritima* GAMS) とすべきである事を決定した。尙著者及び大野により主要なる歐洲産 *Artemisia* 属 (*Seriphidium* 節) 植物の染色体数が決定された。

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 2 報) クラムヨモギについて (その 2) 川谷豊彦、藤田早苗之助、大野忠郎 薬誌：72 (8), 1003-1006 (1952) 第 1 報で著者等はクラムヨモギを栽培してその形態、染色体数、類似植物について詳報すると共に、栽培 1 年目 (1950) の生育並びにサントニン含量は生育期間中特に夏期の雨天日数、雨量共に例年に比し極めて多く必ずしも予期の如くではなかつたが兎も角栽培の可能なる事を認め、又発芽適温はミブヨモギより低く 10~15° であり又根に不定芽を発生しながら栽培法をも改善する必要がある事を指摘した。本報に於ては前年 (1950) 春期播種の越年株即ち生育 (栽培) 2 年株の生育を観察し、又収穫時期の合理的決定を目的として 1951 年 7 月 21 日より 11 月 2 日の間 6 回にわたり収穫して各期の収草量及びサントニン含量の時期的変化を追求し、8 月 21 日収穫のものは 10 アール当り全草風乾重 246.7 Kg, サントニン含量 2.341% で原産地に優る好成績を収めた。この含量は生薬シナ花に匹敵するものであり、又この全草風乾重はミブヨモギのそれに優っている。第 1 報に於ては 1950 年春期播種の生育 1 年株については収草量は測定しなかつたが、本報に於てはこの点をも取扱い、1951 年 2 月原産地採種の新鮮種子を用いて同年春期播種し、同様に栽培 1 年株の生育、収量、サントニン含量の時期的変化を検討した。然して栽培 2 年目に至つて収草量、サントニン含量共に著しく増加する事を認め、かくてクラムヨモギの栽培の愈々有望なる事を認め得た。尙秋期播種による育苗法に関し若干の知見を得た。1950 年、1951 年両年の栽培によつて本邦に於けるクラムヨモギの栽培の成否は夏期特に 7~8 月の雨天日数、雨量に支配される事多きを認め、1951 年は例年に比し 7~8 月の雨量少く前年に比し格段の好生育を示し、サントニン含量も極めて多く、又若干の種子の稔実が確認された事は注目に値する。

本邦において栽培されたイヌサフランから抽出したコルヒチンの效力試験 和田文吾、川谷豊彦、橋本 俊 遺伝

の総合研究: II, 139~142 (1951) 春日部圃場において栽培したイヌサフラン (*Colchicum autumnale* L.) から抽出し、精製法のことなる6種のコルヒチンについて効力試験を行った。

ムラサキツユクサの雄蕊の毛の細胞については生体観察で、エンドウおよびソラマメの根端細胞については固定染色標本で調査した。使用濃度は0.1, 0.01, および0.001%である。

生体観察の結果薬品処理にさいして前期核であつたもの、処理後核分裂を開始したものは紡錘体機構の阻止によつて染色体数の倍加を行うが、すでに前期の過程を終えたものはそのまま核分裂を完了し倍加核を作らない。

根端細胞においてはタンニン酸より精製した粗コルヒチン I (Zeisel 法) が0.1~0.01%の範囲で倍加核を作り、副作用も少い。クロロホルムコルヒチンに害作用が強く、粗コルヒチン II (Zeisel 法) は0.1%で効力を示す。マイヤー試薬から分離した粗コルヒチン化合物は各濃度において効力現れず、同法によるクロロホルムコルヒチンも同様無効、かつ副作用が著しい。副作用は使用濃度の範囲内では核分裂の連続反復発現を阻止するように作用する。

ACTH と CORTISONE 中尾 健, 大森義仁 生体の科学: 3, 101~105 (1952) 上記ホルモン二種に就て、その歴史、抽出、単離、分泌並に作用機転、生理作用及び生物検定に関する文献 91 を用いた簡単な綜説。

脳下垂体前葉副腎皮質系機能亢進時に見られる副腎 Ascorbin 酸含有量に及ぼす二三条件の影響に就て 大森義仁, 宇井 博, 佐藤陽一郎 東京慈恵会医科大学雑誌: 66, 26~30 (1952) 正常無処置白鼠を用い、性、体重及び飼育食餌の相違した際の副腎 ascorbin 酸含有量及び危険反応時に於けるその減少の程度には殆ど差を認めなかつたが、飼育温度を20~22°Cの恒温槽によらず、17°C以下とした場合には、その成績は過つたものとなり、検定動物の飼育及び実験室の温度には充分な考慮が必要である事を明らかにした。

副腎 Ascorbin 酸含有量に及ぼす二三毒物の影響に就て 大森義仁, 宇井 博, 佐藤陽一郎 同誌: 66, 70~73 (1952): コブラ毒, adrenaline を白鼠腹腔内に注射して、危険反応を惹起させ得たが、デフテリア毒素対モルモット 2MLD 量では白鼠に本反応を起させるのに失敗した。

塩化カリ及び葡萄糖の副腎 Ascorbin 酸含有量に及ぼす影響に就て 大森義仁, 大河原寛 同誌: 66, 79~81, (1952). 従来, stressor agent としての作用を疑問視されていた KCl 及び葡萄糖も鋭敏な副腎 ascorbin 酸減少法で検定する方法により、共に脳下垂体前葉副腎皮質機能を亢進する作用を有する事を明かにした。

Adrenaline 投与に際しての副腎 Ascorbin 酸及び Cholesterol 含有量に就て 大森義仁, 榎木茂徳 同誌: 66, 82~88 (1952). 危険反応時の副腎中の二種の chemical の消長を観察し、両者の減少と回復との間に、時間的ズレを見得る事実より、両物質の副腎皮質ホルモン産生分泌に対する意義に就て考察した。

正常白鼠水利尿及び尿中 Na 排泄に及ぼす Pitressin 及び DCA の作用に就て 大森義仁 同誌: 66, 136~142, (1952). 水突白鼠に対する Pitressin の抗利尿作用並に尿中 Na 排泄促進作用の中, desoxycorticosterone acetate (DCA) を同時に投与する時は、前者に影響なく後者のみ拮抗されると云う想定を実験的に証明した。更に副腎皮質ホルモンと脳下垂体後葉抗利尿ホルモンは、腎臓細尿管の逆吸収作用に於て拮抗する事を考察した。

名種条件下に於ける白鼠血清中に存する抗利尿物質に就て 大森義仁, 阪田 弘 同誌: 66, 143~146 (1952) 白鼠血清中の抗利尿ホルモン様物質検定の可能性を認め、その力価は諸条件下に極めて鋭敏に変動し、絶食後或は副腎摘出後は抗利尿物質が稍増加するが脳下垂体摘出或は水強制投与により消失する事実から、血中の抗利尿物質の大部分は、脳下垂体後葉に由来するものと考察した。

脳下垂体中の抗利尿ホルモンに関する実験的研究 大森義仁 同誌: 66, 150~155 (1952) 子宮収縮因子を含有する脳下垂体粉末中に、その後葉に由来するものと考えられる抗利尿ホルモンの存在を認め、同時にその力価を生物学的に検定した。

副腎皮質ホルモンとアスコルビン酸を絡む諸問題 大森義仁 ホルモン臨床: 1, 23~27 (1953) アスコルビン酸と皮質ホルモンの生体に対する作用の類似性、皮質分泌機能亢進時のアスコルビン酸消長に対する従来の解釈、及びその反論等々、文献 52 を引用した綜説。

国家検定、国家検査等の試験成績報告

総合調整部

昭和 27 年の当所に於ける試験、検査の状況を報告する。但し昨年と異なる処は小樽分室（昭和 26 年 8 月開設）に続いて昭和 27 年 2 月 15 日門司に分室が新設され、輸出入食品の検査を開始したこと。

特定医薬品検定品目が本年内に於てプロタミン亜鉛インシュリン注射液、イソアミルレゾルミン、同丸（以上 4 月 18 日）避妊薬、親水性坐剤、同泡発性坐剤、同泡発性粉剤、イソニコチン酸ヒドランド、同錠（以上 6 月 28 日）チオアセタゾン、同錠、同散剤、（以上 10 月 21 日）が追加指定され、合計 29 品目（昨年末 18 品目）となった。

衛生試験所における検査の状況（昭和 27 年）

品 名	試 験 機 関				合 計
	東 京	大 阪	小 樽	門 司	
特定医薬品検定	1,934	938	—	—	2,872
国 家 検 査	5,533	2,752	—	—	8,285
製 品 検 査	687	667	—	—	1,354
輸 出 検 査 (薬)	334	78	—	—	412
輸 出 検 査 (食)	246	268	108	327	949
輸 入 検 査 (薬)	19	—	—	—	19
輸 入 検 査 (食)	478	743	173	276	1,670
一 般 依 頼 試 験	629	193	—	—	822
特 行 試 験	1,076	—	—	—	1,076
特 需 試 験	276	43	—	—	319
合 計	11,212	5,682	281	603	17,778

製品検査成績(昭和27年)

月別 検査 機関	品名 種別		色素			サッカリン			ヅルチン			ニフ ト ラ ン			ニフ ラ ン			計		
			計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格
			計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格
1月	東大	京阪	12 16	12 15	0 1	36 3	36 3	0 0	9 1	9 1	0 0	—	—	—	—	—	—	57 20	57 19	0 1
2月	東大	京阪	10 7	10 7	0 0	21 21	21 21	0 0	14 6	14 6	0 0	—	—	—	—	—	—	45 34	45 34	0 0
3月	東大	京阪	29 9	28 9	1 0	29 17	29 17	0 0	7 16	6 16	1 0	—	—	—	—	—	—	65 46	63 46	2 0
4月	東大	京阪	19 35	18 35	1 0	21 1	20 1	1 0	9 4	9 4	0 0	—	—	—	—	—	—	49 40	47 40	2 0
5月	東大	京阪	24 27	24 26	0 1	13 —	12 —	1 —	12 6	12 5	0 1	—	—	—	—	—	—	49 33	48 31	1 2
6月	東大	京阪	19 34	19 34	0 0	21 23	21 23	0 0	17 22	16 22	1 0	—	—	—	—	—	—	57 79	56 79	1 0
7月	東大	京阪	8 34	7 32	1 2	29 4	29 4	0 0	10 21	10 21	0 0	—	—	—	—	—	—	47 59	46 57	1 2
8月	東大	京阪	13 23	13 22	0 1	39 21	39 21	0 0	12 44	12 44	0 0	—	—	—	—	—	—	64 88	64 87	0 1
9月	東大	京阪	13 42	13 42	0 0	42 22	42 22	0 0	17 16	17 16	0 0	—	—	—	—	—	—	72 80	72 80	0 0
10月	東大	京阪	23 8	23 8	0 0	29 33	29 33	0 0	13 20	13 20	0 0	—	—	—	—	—	—	65 61	65 61	0 0
11月	東大	京阪	15 29	15 29	0 0	26 44	26 44	0 0	11 23	10 23	1 0	—	—	—	—	—	—	52 96	51 96	1 0
12月	東大	京阪	14 31	14 31	0 0	35 —	35 —	0 —	16 —	16 —	0 —	—	—	—	—	—	—	65 31	65 31	0 0
計	東大	京阪	199 295	196 290	3 5	341 189	339 189	2 0	147 179	144 178	3 1	— 1	— 1	— 0	— 3	— 3	— 0	687 667	679 661	8 6