

No. 74

June 1956

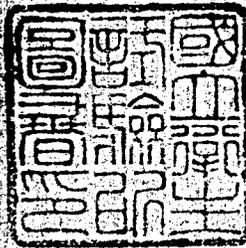
BULLETIN
OF
NATIONAL HYGIENIC LABORATORY

Tamagawa Yoga-Machi, Setagaya-Ku, Tokyo, Japan.

衛生試験所報告

第 74 号

昭和 31 年 6 月



国立衛生試験所

衛生試報

Eisci Shikenjo Hokoku

目 次

報 文

国際薬局法の試験法, 規格に関する研究 (第1報).....	
..... 板井孝信, 鈴木郁生, 大場琢磨, 関島正昭, 佐子茂, 神谷庄造, 升田望, 石垣和子.....	1
非水溶液滴定による医薬品の定量 (第13報) 氷酢酸を溶媒とするキニーネ類の滴定とその塩基性について.....	鹿島 哲..... 9
非水溶液滴定による医薬品の定量 (第14報) 氷酢酸中における 1-フェニール-3-メチルピラゾロ	
ン (5) 類の塩基性について.....	鹿島哲, 庄司初枝, 土屋雅一.....15
赤外線吸収スペクトル分析の医薬品試験における応用 (第1報) 通常法による日局クレゾール石鹼液	
中の <i>o</i> -, <i>m</i> -及び <i>p</i> -クレゾールの定量.....	板井孝信, 大場琢磨, 田中誠之.....19
赤外線吸収スペクトル分析の医薬品試験における応用 (第2報) 補償法による安息香酸中のフェノバ	
ルビタールの定量.....	板井孝信, 大場琢磨, 田中誠之.....25
赤外線吸収スペクトル分析の医薬品試験における応用 (第3報) 森永ドライミルク中毒事件の毒物の	
分析.....	板井孝信, 大場琢磨, 田中誠之.....29
バニリン及びクマリンのポーラログラフィー.....	佐藤 寿.....33
パニトロフェネトールのポーラログラフィー.....	佐藤 寿.....39
r-B.H.C. 乳剤のポーラログラフ定量法.....	藤井正道, 佐藤寿.....43
沔紙クロマトグラフィーによる亜鉛の定量法.....	岡崎精一.....51
沔紙クロマトグラフィーによるけし属植物中のモルヒネ検出について (第1報).....	
..... 朝比奈晴世, 大野昌子.....	57
沔紙クロマトグラフィーによる, 家庭麻薬製剤中のコデイン, ヒドロコデインの定量法.....	
..... 朝比奈晴世, 大野昌子.....	61
ドーフル散中のエメチンの検出について.....	朝比奈晴世, 志内賢彦, 中村良.....65
けし (<i>Papaver somniferum</i> L.) 乳液乾燥温度がモルヒネ含量に及ぼす影響について.....	木下孝三.....69
沔紙クロマトグラフィーによる <i>Ammi visnaga</i> LAM. 果実中ケリンの定量法.....	
..... 川谷豊彦, 大野忠郎, 伊藤巳代子.....	73
逆性石鹼について (第3報) 塩化ベンゼソニウムの燐タングステン酸による重量定量法及び燐モリブ	
デン酸による比色定量法.....	吉村淳, 守田実.....77
シアン化塩または硫シアン化塩を使うチオクロム法の比較検討.....	南原精一.....81
混合ビタミン剤のマイクロバイオアッセイ (続) I, ビタミンB ₁₂ の定量.....	新村寿夫.....89
ヒスチジン製剤中ヒスチジンの化学的定量法.....	平岡栄一.....95
ヒスチジン製剤中ヒスチジンの微生物定量法.....	平岡栄一..... 101
メチルエフェドリンの検出法 (覚せいアミン剤の検出法第3報).....	大熊誠一, 城戸靖雅... 105
フェニルアセトン, フェニル酢酸及びフェニルアセトアセトニトリルの検出法 (覚せいアミン剤の	
検出法, 第4報).....	大熊誠一, 城戸靖雅... 107
二酸化セレンによる呈色反応 (第1報) 二酸化セレンと硫酸によるステロイドの呈色反応.....	渡辺俊雄... 111
二酸化セレンによる呈色反応 (第2報) 二酸化セレンによるイソニコチン酸ヒドラジド中の遊離ヒド	
ラジンの検出.....	渡辺俊雄... 113
イソニコチン酸ヒドラジド (イソニアジド) 類似化合物の合成 (第1報) α -位オキシ, アルコキシ置	
換体等の合成.....	板井孝信, 小倉治夫, 神谷庄造... 115
イソニコチン酸ヒドラジド (イソニアジド) 類似化合物の合成 (第2報) α -位チオアルキルまたはス	
ルフオアルキル置換体.....	板井孝信, 関島正昭... 119
イソニコチン酸ヒドラジド (イソニアジド) 類似化合物の合成 (第3報) α -位アミノ置換体.....	
..... 板井孝信, 関島正昭... 121	

(2)

パソプレシンの新定量法 I. 脳髄破壊犬によるパソプレシンの定量法	中山豪	125
パソプレシンの新定量法 II. 脳髄破壊ラットによるパソプレシンの定量法及びその他の定量法との比較	中山豪	141
脳下垂体後葉ホルモンの研究 (第5報) 各種動物脳下垂体中のオキシトシン及びパソプレシン含量について	長沢佳熊, 中山豪一, 芹沢淳	151
脳下垂体後葉ホルモンの研究 (第6報) 牛脳下垂体後葉中のオキシトシン及びパソプレシンのイオン交換樹脂による分離について	長沢佳熊, 中山豪一, 芹沢淳	159
乾燥甲状腺中のヨウ素の定量	竹中祐典	163
インシュリンの薬化学的研究 (第14報) 鯨脾臓からインシュリン結晶の単離	長沢佳熊, 竹中祐典, 岡崎精一, 深沢真司, 芦沢宏, 柴田哲夫	167
インシュリンの薬化学的研究 (第15報) 沔紙クロマトグラフィを用いるアイソフェンインシュリン中のインシュリンの定量法	長沢佳熊, 西崎笹夫	171
インシュリンの薬化学的研究 (第18報) 魚類インシュリンの精製及び魚類, 鯨インシュリンの物理化学的性質について (その1)	長沢佳熊, 西崎笹夫	179
卵胞ホルモンの研究 (第11報) ナガス鯨卵巣中に含まれる卵胞ホルモンについて	長沢佳熊, 越村栄之助, 岡崎精一	185
銀錫アマルガムの硬化膨縮について (第2報) 充填方法の変化による銀錫アマルガムの物理的性質の影響について	藤井正道, 堀部隆	189
歯科用珪酸セメントの透明度測定について	藤井正道, 堀部隆	195
原水爆実験による放射能汚染の研究 (第2報) 緑茶の放射能汚染について	長沢佳熊, 川城巖, 鹿島哲, 河村正一, 西崎笹夫, 松島崇	201
原水爆実験による放射能汚染の研究 (第3報) 牛乳及びその製品の放射能について	長沢佳熊, 川城巖, 榎本正義, 松島崇, 河村正一	205
原水爆実験による放射能汚染の研究 (第4報) 飲料水, 野菜及び果実類の放射能汚染	長沢佳熊, 川城巖, 榎本正義, 鹿島哲, 松島崇	209
原水爆実験による放射能汚染の研究 (第5報) 魚類の放射能汚染とその放射化学分析	長沢佳熊, 川城巖, 中山豪一, 鹿島哲, 榎本正義, 芹沢淳, 大熊誠一, 河村正一, 西崎笹夫	213
原水爆実験による放射能汚染の研究 (第6報) 放射能で汚染された肝臓を原料とする肝油の製造について	長沢佳熊, 中山豪一, 芹沢淳, 西崎笹夫	231
オレンジジュース中より非イオン性界面活性剤の検出並に定量について	川城巖, 竹内未久	233
食品添加物の検出に関する研究 (第1報) 抗酸化剤の沔紙クロマトグラフィについて	川田公平, 細貝祐太郎	239
法定食用タール色素のポーログラフ的研究	北川純男, 豊田勤治	243
法定食用タール色素分析用計算図表 (第1報) 純度定量 (チタノメトリー) 用ノモグラフ	井上勲	247
法定食用タール色素分析用計算図表 (第2報) 純度定量 (チタノメトリー以外) 用及び無機塩定量用ノモグラフ	井上勲	253
法定食用タール色素分析用計算図表 (第3報) 作図及び誤差に関する考察	井上勲	259
中毒粉ミルク中砒素の検出について	川城巖	265
砒素混入による粉乳中毒事件と慢性砒素中毒における肝障害について	池田良雄	269
食品の異物検査法 (第2報)	宮島弘衛, 小川秀子, 野崎泰彦	279
浜名湖産貝類の毒成分に関する研究 (第2報)	板井孝信, 神谷庄造	283
イカの初期腐敗にみられる含窒素化合物の消長: アミン類の生成	野崎泰彦, 西村千昭	289
沔紙電気泳動法による腐敗アミンの検出	野崎泰彦, 西村千昭	295
<i>Penillium citrinum</i> THOM の分離系統と Citrinin 産生力に就いて	宇田川俊一, 橋本賢範, 平山重勝	299
病変米菌の代謝生産物に関する研究 (第1報) <i>Penicillium rugulosum</i> THOM の一類似菌の菌学的		

性質	平山重勝, 倉田浩, 坂部フミ, 稲垣尙起, 宇田川俊一, 池谷三郎	305
病変米菌の代謝生産物に関する研究(第2報) <i>Penicillium concavo-rugulosum</i> ABE の培養並に代謝生産物の分離, 精製	平山重勝, 倉田浩, 坂部フミ, 稲垣尙起, 宇田川俊一, 池谷三郎	313
牛乳由来ブドウ球菌に関する研究(第5報) 学童給食用脱脂粉乳飲用によるブドウ球菌性食中毒事例について, 特に原因菌の生物学的性状及び各種抗生物質に対する抵抗性並びにフェージ型について	鈴木昭	317
陽性石鹼と各種消毒薬及び化学療法剤との併用効果について(第1報)	栗栖弘光	331
<i>Candida</i> 症の化学療法に関する実験的研究(第1報) 特に抗生物質及び Vitamin 類の発症機転に及ぼす影響	宮沢文雄	341
<i>Candida</i> 症の化学療法に関する実験的研究(第2報) 特に <i>Candida</i> 属真菌に対する合成色素類及び各種化学療法剤の抗菌作用について	宮沢文雄	349
発熱療法剤(細菌性発熱物質)の創製並に臨床応用に関する研究(第3報) 特に吉田肉腫及び130系腹水肝癌に対する細菌性発熱物質及び各種抗腫瘍性物質の効果について	青山好作, 宮沢文雄, 栗栖弘光, 八田貞義, 新井秀男, 藤田洋一, 浦部幹雄, 酒井雄学, 青木孝好	361
発熱療法剤(細菌性発熱物質)の創製並に臨床応用に関する研究(第4報) 細菌性発熱物質をもつてする癌皮内反応について	青山好作, 栗栖弘光, 宮沢文雄, 八田貞義, 塚川光直, 藤田洋一, 浦部幹雄, 酒井雄学	375
吉田肉腫に対する各種抗腫瘍剤の併用療法に関する実験的研究(第1報)	青山好作, 宮沢文雄, 栗栖弘光, 石関忠一, 赤坂京子, 八田貞義, 藤田洋一, 浦部幹雄, 酒井雄学, 青木孝好	381
トリパンプルを注射した動物の腸炎菌感染	山地幸雄, 田中弘子, 八田貞義, 山内信	391
土壌水分がクラムヨモギ (<i>Artemisia kurramensis</i> QAZILBASH) の初期生育に及ぼす影響について	木下孝三	399
玉咲ツツラフジの試植栽培(第1報) 実生栽培について	石原活磨	407
資 料		
褐色アンプルの遮光度と鉄の溶出度について	野崎泰彦, 河村正一	421
昭和30年度日本産あへんのモルヒネ含量について	朝比奈晴世, 大野昌子, 水町彰吾, 志内賢彦, 中村良, 茂森淑	429
ビタミン標準品に関する資料. I. ニコチン酸, ニコチン酸アミド及びビタミンK ₃ の試製とその品質	広瀬朝次	431
化粧品規格検査法について(第6報) 化粧品用タール色素の確認試験法について	市川重春, 南城実, 林悦子	437
地下室内空気検査成績について	市川重春, 浦久保五郎, 山手昇, 磯部淳子	441
輸入洋酒中のメタノール含量について	川田公平, 細貝祐太郎	443
遠 報		
ウサギ脊筋及びペプシン溶液内における馬腸線の抗張力の減少について	山地幸雄, 志波剛, 石関忠一, 岩原繁雄, 宮坂清次	445
食品, 食器類, 食品従業員手指, 人の大便, 実験的伝染性下痢症患者大便, 食中毒患者吐物よりバラ大腸菌の検出について	山地幸雄, 田中弘子, 志波剛, 石関忠一, 八田貞義	446
抄 録		
業 務 報 告		
国家検定, 国家検査等の試験成績報告, 昭和30年当所における試験, 検査等の状況について		総務課 451

CONTENTS

Studies on the Test Methods and Standards of Pharmacopoeia Internationalis. I. ...Takanobu ITAI, Ikuo SUZURI, Takuma OBA, Masaaki SEKIJIMA, Shigeru SAKO, Shozo KAMIYA, Nozomi MASUDA and Yasuko ISHIGAKI.....	1
Titration of Drugs and Chemicals in Nonaqueous Solutions. XIII. Titration of Cinchona Alkaloids and their Salts, and their Basicities in Anhydrous Acetic Acid.....Tetsu KASHIMA.....	9
Titration of Drugs and Chemicals in Nonaqueous Solutions. XIV. Basicities of Derivatives of 1-phenyl-3-methyl-pyrazolone (5) in Anhydrous Acetic Acid.....Tetsu KASHIMA, Hatue SYOJI and Masakazu TSUCHIYA.....	15
Application of Infrared Absorption Spectroscopy to Examination of Drugs and their Preparations. I. Determination of <i>o</i> -, <i>m</i> - and <i>p</i> -Cresol Isomers in Saponated Cresol Solution (J.P.).....Takanobu ITAI, Takuma OBA and Shigeyuki TANAKA.....	19
Application of Infrared Absorption Spectroscopy to Examination of Drugs and their Preparations II. Determination of Phenobarbital in the Mixture with Benzoic Acid by Differential Method Takanobu ITAI, Takuma OBA, and Shigeyuki TANAKA.....	25
Application of Infrared Absorption Spectroscopy to Examination of Drugs and their Preparations. III. Analysis of the Poison in Morinaga's Milk Poisoning Incident.....Takanobu ITAI, Takuma OBA and Shigeyuki TANAKA.....	29
Polarography of Vanillin and Coumarin.....Hisashi SATO.....	33
Polarography of <i>p</i> -Nitrophenetol..... Hisashi SATO.....	39
Polarographic Assay of γ -Benzene Hexachloride (γ -B.H.C.) in Commercial Emulsions..... Masamichi FUJII and Hisashi SATO.....	43
Quantitative Analysis of Zinc by Paper Chromatography.....Seiichi OKAZAKI.....	51
Detection of Morphine in Poppy Plants by Paper Chromatography. I. ...Haruyo ASAHINA and Masako ŌNO.....	57
Quantitative Determination of Codeine or Hydrocodeine in the Antitussive and Expectorant Preparations by Paper Chromatography.....Haruyo ASAHINA and Masako ŌNO.....	61
Detection of Emetine in Dover's Powder.....Haruyo ASAHINA, Yoshihiko SHIUCHI and Yoshi NAKAMURA.....	65
Effects of the Temperature of Drying the Latex of Opium Poppy (<i>Papavers omniiferum L.</i>) upon the Morphine Content.....Kozo KINOSHITA.....	69
A Method of Estimation of Khellin in the Fruits of <i>Ammi visnaga Lam.</i> by Paper Chromatography.....Toyohiko KAWATANI, Tadarō OHNO and Miyoko ITO.....	73
Studies on Invert Soaps. III. Gravimetry and Colorimetry of Benzethonium Cholride..... Kiyoshi YOSHIMURA and Minoru MORITA.....	77
Comparative Studies of Thiochrome Method Applying Cyanide or Thiocyanate..... Sei-ichi NAMBARU.....	81
Microbiological Assay of Multiple Vitamin Preparations (continued). I. Assay of Vitamin B ₁₂ ... Toshio NIHMURA.....	89
Chemical Assay of Histidine in the Commercial Histidine Preparations.....Eiichi HIRAOKA.....	95
Microbiological Assay of Histidine in the Commercial Histidine Preparations..... Eiichi HIRAOKA.....	101
Detection of Some Nerve Stimulants. III. Detection of Methylephedrine.....Seiichi OHKUMA and Yasumasa KIDO.....	105

Detection of Some Nerve Stimulants. IV. Detection of Phenylacetone, Phenylacetic Acid and Phenylacetacetonitrile.....Seiichi OHKUMA and Yasumasa KIDO.....	107
Color Reactions by Selenium Dioxide. I. Color Reaction of Steroids by Selenium Dioxide and Sulfuric Acid.....Toshio WATANABE	111
Color Reactions by Selenium Dioxide. II. The Detection of Free Hydrazine in Isonicotinic Acid Hydrazide by Selenium Dioxide.....Toshio WATANABE.....	113
Synthesis of Isonicotinic Acid Hydrazide Analogues. I. α -Hydroxy or-Alkoxy Compounds and Several Acid Hydrazides.....Takanobu ITAI, Haruo OGURA and Shōzō KAMIYA.....	115
Synthesis of Isonicotinic Acid Hydrazide Analogues. II. α -Thioalkyl or Sulfoalkyl Compounds Takanobu ITAI and Masaki SEKIJIMA	119
Synthesis of Isonicotinic Acid Hydrazide Analogues. III. α -Amino Compounds..... Takanobu ITAI and Masaki SEKIJIMA.....	121
Bioassay of Vasopressin Using Spinal Dogs.....Goichi NAKAYAMA.....	125
Bioassay of Vasopressin Using Spinal Rat and Its Comparison with the Other Methods..... Goichi NAKAYAMA	141
Studies on Posterior Pituitary Hormones. V. Vasopressin and Oxytocin Contents in the Posterior Pituitary of Various Animals.....Kakuma NAGASAWA, Goichi NAKAYAMA and Jun SERIZAWA...	151
Studies on Posterior Pituitary Hormones. VI. Separation of Oxytocin and Vasopressin in Posterior Pituitary by Ion Exchange Resin.....Kakuma NAGASAWA, Goichi NAKAYAMA and Jun SERIZAWA	159
Application of Azotometry to Drug Tests.II. A Micro-Determination of Iodine in Thyroid... Yusuke TAKANAKA	163
Pharmaceutical and Chemical Studies of Insulin. XIV. Isolation of Insulin Crystals from Whale Pancreas.....Kakuma NAGASAWA, Yusuke TAKENAKA, Seiichi OKAZAKI, Shinshi FUKASAWA, Hiroshi ASHISAWA and Tetsu SHIBATA.....	167
Pharmaceutical and Chemical Studies of Insulin. XV. Determination of Insulin in Isophane Insulin Injection by Paper Chromatography.....Kakuma NAGASAWA and Sasao NISHIZAKI.....	171
Pharmaceutical and Chemical Studies of Insulin. XVIII. On the Purification of Fish Insulin and Physicochemical Properties of Fish and Whale Insulins. Part 1.Kakuma NAGASAWA and Sasao NISHIZAKI	179
Studies on Follicular Hormones. XI. Quantitative Analysis of Follicular Hormones in Fin Whale's Ovary.....Kakuma NAGASAWA, Einosuke KOSHIMURA and Seiichi OKAZAKI.....	185
Studies on Dimensional Change of Dental Amalgam Alloy. II. Effect of Variation in Packing Method on Physical Property of Dental Amalgam Alloy.....Masamichi FUJII and Takashi HORIBE.....	189
Study on the Opacity of the Dental Silicate Cement.....Masamichi FUJII and Takashi HORIBE... 195	
Studies on Radio-Contamination of Foodstuffs Effected by A- or H-Bomb Explosion. II. Radio-Contamination on Green Tea.....Kakuma NAGASAWA, Iwao KAWASHIRO, Tetsu KASHIMA, Shoichi KAWAMURA, Sasao NISHIZAKI and Takashi MATSUSHIMA	201
Studies on Radio-Contamination of Foodstuffs Effected by A-or H-Bomb Explosions. III. Radiation of Milk and Its Preparations	
Kakuma NAGASAWA, Iwao KAWASHIRO, Masayoshi ENOMOTO, Takashi MATSUSHIMA and Shoichi KAWAMURA	205
Studies on Radio-Contamination of Foodstuffs Effected by A- or H-Bomb Explosions.IV. Radio-Contamination of Drinking Water, Vegetables and Fruits in Japan Caused by H-Bomb Explosions at Bikini Atoll, 1954.....Kakuma NAGASAWA, Iwao KAWASHIRO, Masayoshi ENOMOTO, Tetsu KASHIMA and Takashi MATSUSHIMA	209

Studies on Radio-Contamination of Foodstuffs Effected by A-or H- Bomb Expolsions. V. Radio- Contanination of Sea Fish and Its Radio-Chemical Analysis.....Kakuma NAGASAWA, Iwao KAWASHIRO, Goichi NAKAYAMA, Tetsu KASHIMA, Masayoshi ENOMOTO, Jun SERIZAWA, Seiichi OHKUMA, Shoichi KAWAMURA and Sasao NISHIZAKI.....	213
Studies on Radio-Contamination of Foodstuffs Effected by A- or H-Bomb Explosions. VI. On the Effect upon Liver Oil Production by the Use of Radio-Contaminated Fish Liver as a Starting Material.....Kakuma NAGASAWA, Goichi NAKAYAMA, Jun SERIZAWA and Sasao NISHIZAKI	231
Detection and Determination of Non-ionic Surface-active Agents in Orange Juice..... Iwao KAWASHIRO and Hidenaga TAKEUCHI.....	233
Studies on the Detection of Food Adjuncts. I. Qualitative Analysis of Antioxidants by Paper Chromatography.....Kohei KAWATA and Yūtarō HOSOGAI.....	239
Polarographic Studies on Japanese Official Food Colors.....Sumio KITAGAWA and Kinji TOYO- DA	243
Nomographs for the Analyses of Japanese Official Food Colors. I. Nomographs for the Assay of Purity (Titanometry)Isao INOUE.....	247
Nomographs for the Analyses of Japanese Official Food Colors. II. Nomographs for the Assay of Purity (except Titanometry) and Inorganic Salts Contents.....Isao INOUE.....	253
Nomographs for Analyses of Japanese Official Food Colors. III. Graphics and Error..... Isao INOUE	259
Determination of Arsenic in the Dried Modified Milk Poisoning.....Iwao KAWASHIRO.....	265
On the Mass Poisnoing Case Caused by Arsenic Containing Powdered-Milk and the Liver Injury in Chronic Arsenic Poisoning.....Yoshio IKEDA.....	269
Microanalytical Test of Food Products. II.Hiroe MIYAJIMA, Hideko OGAWA, Yasuhiko NOZAKI.....	279
Studies on Lake Hamana Oyster and Other Shellfish for Poisonous Substances. II.Takanobu ITAI and Shōzō KAMIYA.....	283
Catabolic Products of Nitrogen Compound in the Putrification of Squid.....Yasuhiko NOZAKI and Chiaki NISHIMURA	289
Paper Electrophoresis of Some Aliphatic Amines.....Yasuhiko NOZAKI and Chiaki NISHIMURA... Comprative Studies on the Citrinin Producing Activity among the Different Isolates of <i>Penicillium</i> <i>Citrinum Thom</i>Shun-ichi UDAGAWA, Yoshinori HASHIMOTO and Shigekatsu HIRAYAMA,	299
Studies on the Metabolic Products of Fungi Isolated from Deteriorated Rice. I. Identification of <i>Penicillim</i> Species Colsely Related to <i>Penicillium rugulosum Thom</i>Shigekatsu HIRAYAMA, Hiroshi KURATA, Fumi SAKABE, Naoki INAGAKI, Shun-ichi UDAGAWA and Saburo IKETANI.....	305
Studies on the Metabolic Products of Fungi Isolated from Deteriolated Rice. II. Cultivation of <i>Penicillium concavo-rugulosum Abe</i> , Isolation and Purification of Metabolic Products..... Shigekatsu HIRAYAMA, Hiroshi KURATA, Fumi SAKABA, Naoki INAGAKI, Shun-ichi UDA- GAWA and Saburo IKETANI	313
Studies on the Biological Function of Staphylococci from Bovine Milk. V. Observation on the Staphylococcal Food-poisoning Caused by Powdered Skim Milk among the Primary School Children in Tokyo, especially on the Biological Character, Resistance to Some Antibiotics and Phage Typing of Causal Strains.....Akira SUZUKI	317
On the Joint Effect Benzethonium Chloride when Utilized with Disinfectants, or Chemother.	

apeutic Agent, or Antibiotics.....Hiromitsu KURISU.....	331
Experimental Study on Chemotherapy of Candidiasis. I. Especially Influences of Antibiotics and Vitamins upon Candida Infection.....Fumio MIYAZAWA	341
Experimental study on Chemotherapy of Candidiasis. II. Especially on Antibiotic Action of Synthetic Dyestuffs and Chemotherapeutic Agents upon Candiada Group.....	
Fumio MIYAZAWA.....	349
Studies on the Fever Treatment with Bacterial Pyrogenic Substance. III. Especially on the Effects of Bacterial Pyrogenic Substance and Antitumor Materials against Yoshida Sarcoma and Ascites Carcinom 130.....Kosaku AOYAMA, Fumio MIYAZAWA, Hiromitsu KURISU, Sadayosi HATTA, Hideo ARAI, Yoiti FUJITA, Mikio URABE, Yugaku SAKAI and Takayoshi AOKI.	361
Studies on the Fever Treatment with Bacterial Pyrogenic Substance. IV. In the Carcinoma Intracutaneous Reaction of Pyrogenic Substance.Kosaku AOYAMA, Hiromitsu KURISU, Fumio MIYAZAWA, Sadayoshi HATTA, Mitsunao TSUKAGAWA, Yoiti FUJITA, Mikio URABE, and Yugaku SAKAI	375
Experimental Studies on the Combination Chemotherapy of the Various Antitumor Agents in Yoshida Sarcoma and Ascites Carcinoma 606. I.Kosaku AOYAMA, Fumio MIYAZAKI, Hiromitsu KURISU, Tiuichi ISHIZEKI, Kyoko AKASAKA, Sadayoshi HATTA, Yoiti FUJITA, Mikio URABE, Yugaku SAKAI and Takayoshi AOKI.....	381
Salmonella enteritidis-Infektion der mit Trypanblau Vorbehandelten Tiere.....Yukio YAMAZI, Hiroko TANAKA, Sadayoshi HATTA and Makoto YAMAUCHI.....	391
Studies on the Effects of the Soil Moisture upon the Early Growth of KURAMUYOMOGI (<i>Artemisia Kurramensis Qazilbash</i>)Kozo KINOSHITA	399
Trial Cultivation of <i>Stephania cepharantha</i> HAYATA. I. Cultivation by Seeds.....	
Katsuma ISHIHARA	407
Tests for Amber Glass Ampules: Light Transmission and Resistance to Various Solutions.....	
Yasuhiko NOZAKI and Shoichi KAWAMURA	421
Morphine Content in Japanese Opiums Produced During 1954-55 Haruyo ASAHINA, Masako ÔNO, Shogo MIZUMACHI, Yoshihiko SHIUCHI, Yoshi NAKAMURA and Toshi SHIGEMORI	429
Preliminary Preparation of Vitamin Reference Standards and Their Critical Analytical Data. I. Nicotinic acid, Nicotinamide and Vitamin K ₃Asaji HIROSE.....	431
Research on the Standard Determination Method of Cosmetics. VI. On the Confirmatory Examination of Tar-Dyes in Cosmetics.....Shigeharu ICHIKAWA, Minoru NANJO and Etuko HAYASHI	437
Investigation on the Air at Several BasementsSigeharu ICHIKAWA, Goro URAKUBO, Noboru YAMATE and Atsuko ISOBE.....	441
Methanol Content in Imported Liquors.....Kôhei KAWATA and Yutaro HOHOGAI.....	443
Preliminary Reports.....	445
Abstracts.....	447
Annual Reports	451

国際薬局方の試験法, 規格に関する研究 (第1報)

板井 孝信, 鈴木 郁生, 大場 琢磨, 関島 正昭
佐子 茂, 神谷 庄造, 升田 望, 石垣 和子

Studies on the Test Methods and Standards of Pharmacopoeia Internationalis. I.

Takanobu ITAI, Ikuo SUZUKI, Takuma OBA, Masaaki SEKIJIMA,
Shigeru SAKO, Shōzo KAMIYA, Nozomi MASUDA and Yasuko ISHIGAKI.

まえがき 国際薬局方 (以下P Iと略) は World Health Organization (世界保健機構) の薬局方委員会で編輯され, 第1版第1巻が1951年, 第2巻が1955年に刊行されている。これは各国に対して強制力を有しないが, 各国の薬局方になるべく採り入れることを希望している。現在自国の薬局方としている国もあり, 将来国際貿易における規格とされる可能性もある。

1954年上記委員会より第1版改正準備のため刈米所長および板井の両委員に本報に掲げた品目について調査を依頼して来たのを機会にそれらのサンプルを集め, 試験法および規格を検討し, 主として本邦薬局方と比較した。

一般的改正要望事項について

(1) 溶解度 通則 (General Notice) の薬品各条 (Monographs on Drugs and Preparations) の記載により溶解度は当然規格の中に含まれる。このことは本邦薬局方 (以下J Pと略), 米国薬局方 (以下U S Pと略), 英国薬局方 (以下B Pと略) と趣きを異にする。今回の試験において多くのものが溶解度の項に抵触した。若し少し加温溶解した後放冷して析出しないことをもつて「溶けた」と認めるのならば抵触するものはやや少くなる。然し上述の薬局方のように純度試験に必要なある溶媒に対する溶解度又は溶状を入れ他は参考のために掲げの方がよいと思うし, これを強く希望する。

又植物油, 酸又はアルカリに「溶ける」と言う表現に“……is soluble in……”と書くのは“soluble”が30~100 partsに溶けることを意味するものと混同されるおそれがあるので“dissolve”と言うような語を用いてはどうかと考える。

(2) 沸騰範囲測定装置について 一般試験法に規定された装置は低沸点を有する液体にはよいが高沸点を有する液体 (例えばウンデシレン酸など) には不適當でむしろJ Pの方が良いと思われる。

(3) 熔融範囲, 融点測定について P Iでは融点又は熔融範囲の測定法として, 検体を入れた毛细管を加熱前予め温度計に付けて加熱を開始し, 温度の上昇をはじめに3°/分, 熔融範囲の下限より15°低い温度に達したとき特に指示のない限り1~2°/分にす。これによるときは融点の高いものは非常に長時間を要し, 且熱に不安定なものなどは低く熔融分解する危険さもある。この加熱方法の違い, および熔融範囲と融点の区別を無視して他の薬局方の数値と同じく規定したものが, それらに抵触した場合を観察したこともある。故に予めある点まで加熱した後浸す方法の方がよいと考える。

薬品各条について

今回の試験には内外の製品を問わずなるべく代表的なもの5検体以上集めることを要望されたが, あるものはその数に達しなかつた。検体はなるべく市販のため包装されたものをメーカー各社より提供して頂いた。この際厚く感謝の意を表す。

次に各医薬品につき問題のあつた試験項目と実測値のみを記す。薬品名の右肩の*は第2巻収載品を示す。

(i) スルファミン類 (鈴木担当)

(a) Sulfadiazinum

性状 検体全部が白色結晶であつたので, P I「淡紅色」は削除した方がよい。溶解度 P I, J P, U S P, B. Pとも大体「95%アルコールにわずかに溶ける」とあるが実際は全検体が「ほとんど溶けない」。熔融範囲 次表のように 251~255°であつたので 252~256°を要求したい。

	A	B	C	D	E
熔融範囲 254~257°	253~254.5°	253~255°	251~253.5°	254~255°	254~255°
乾燥減量 0.5%>	0.13	0.01	0.01	0.01	0
定 量 >99.0%	100.16	100.0	100.19	100.1	99.82

(b) Sulfadiazinum Natricum

本品はわが公定書に未収載であるし、単体で発売されるものでもないから試験の結果は良くなかった。すなわち確認試験のA項の遊離させたスルファジアジンの熔融範囲、乾燥減量に不適であつた。前者は251~256°位に訂正すべきであると思われる。

	A	B	C
確認試験 A. 252~256°	249~250°	249~250°	250~252°
乾燥減量 0.5%>	1.09	0.06	0.12
定 量 >99.0%	99.59	99.52	99.55

(c) Sulfaguanidum

溶解度 P I, J P, U S P, B Pともに同じであるが何れの検体も水約2000分に溶け、90%アルコール又はアセトンに溶け難かつた。又稀塩酸には溶けやすいとあるが、稀塩酸を用いれば塩酸塩を析出する。然し3%塩酸には溶けるので、酸の種類、濃度を定めることが望ましい。溶状 P I, J Pは同じであるが塩酸の濃度が両者でちがうのでP Iでは塩酸8cc及び水2ccを用いるよう改めるべきである。

	A	B	C	D	E
熔融範囲 189~192° (110°に乾燥後)	190.5~191.5	191.5~192	191~191.5	191~191.5	191.5~192
乾燥減量 6.0~8.0%	7.69	7.84	7.91	7.14	7.89
熱灼残留物 0.1%>	0.01	0.02	0.02	0.03	0.03
定 量 >99.0%	99.99	100.06	100.17	99.99	100.26

(d) Sulfamerazinum

確認試験(B)における昇華物の融点は実測値より見て153~160°(J P)に改正すべきである。塩化物 検液を作るときに加える硝酸1mlは硝酸3ccを用いないと溶けなかつた。

	A	B	C	D	E
確認試験 (B) 153~157°	158~158.5	159~159.5	158~159.5	158.5~159	159~159.5
熔融範囲 234~238°	235.5~236	235.5~236.5	235.5~236	235~235.5	235.5~236.5
乾燥減量 0.5%>	0.04	0.03	0.16	0.03	0.02
熱灼残留物 0.1%>	0.01	0.01	0.03	0.01	0.02
定 量 >99.0%	100.14	100.32	99.96	100.19	100.15

硫酸塩 上と同じく塩酸7ccを要した。酸性度 P Iは0.1N水酸化ナトリウム0.1ml以下と規定しているが実測値は0.15~0.2ccであつた。U S Pも0.5ml以下を規定しているので、少くも0.2ml以下に改正を要求すべきである。

(e) Sulfamerazinum Natricum

本邦公定書に収載されていない。検体もわずか1つだけであつたのでよく判らないが、乾燥減量6.02%(P I 2.5%>)もあつた。

(f) Sulfanilamidum

性状「白色結晶又は白色結晶性粉末又は顆粒」と記されているが本邦製品は皆結晶であつた。結晶をよくすりつぶして試験を行う必要がある。そうでないと極めて溶けにくい。乾燥減量 P I「1.0%以下」とあるが0.5%以下と改正すべきである。

	A	B	C	D	E
熔融範囲 164.5~166.5°	165.5~166	165.5~166.5	165.5~166.5	165.5~166.5	165.5~166.5
乾燥減量 1.0%>	0.3	0.3	0.3	0.3	0.1
熱灼残留物 0.1%>	0.06	0.05	0.03	0.04	0.03
定 量 >99.0%	98.6	98.6	99.9	99.6	100.1

(g) Sulfathiazolum

溶解度 「稀鉍酸, 水酸化アルカリ液, 炭酸アルカリ液に溶けやすい」とあるが規格としては種類, 濃度を規定すべきではあるまいか. 塩化物 検液を作るためには硝酸 3ml が必要である. もしこれでも溶けないときは加温溶解せしめて室温にまで冷却する. 硫酸塩 同じように塩酸 3cc が必要であった. 熱灼残留物 P I は 0.05% 以下で検体はこれに適合するが, P I の他のスルファ剤の熱灼残留物はすべて 0.1% 以下であるから, これも 0.1% 以下と改正すべきである.

	A	B	C	D
熔融範囲 200~204°	200.5~201	201.5~202	200.5~201	200~200.5
乾燥減量 0.5%>	0.06	0.04	0.06	0.11
熱灼残留物 0.05%>	0.03	0.04	0.03	0.02
定 量 >99.0%	100.05	100.74	100.01	100.19

(h) Sulfathiazolum Natricum

本邦公定書に収載されておらず, 検体も 1 つだけしかなかった. 性状 味は「ほとんど無味」とあるが, やや塩からい. 確認試験 (A) の遊離したスルファチアゾールの熔融範囲が 200~203° とあるが, これはむしろ 199~204° とすべきであるとする. 実測値は 199.5~200° であった. 乾燥減量は結晶水の数によつて 2 つの範囲 (7.0~11.0; 22.0~27.0%) が定められているが, 実測値は 3.77% であり, 定量は 99.53% であった.

(ii) 有機酸類

(a) Acidum Acetylsalicylicum (神谷)

溶解度 P I, B P には 300 分の水に, U S P は約 300 分の水に溶けるとあるが, J P のように「溶け難い」と表現する方がよいと思う. 熔融範囲 分解を伴うので純度試験に入れない方がよいが, これは B P の試験法を採用したと思われる. 然し, B P は P I と加熱の速度を異にしているのに B P と同じ範囲を採つた点に原因があるようである. 範囲を 136~139° (分解) と改正すべきである.

	A	B	C	D	E
熔融範囲 136~138°(分解)	136.5~139°(°)	136~137(°)	137.5~139(°)	136.5~138(°)	137~139(°)
熱灼残留物 0.1%>	≒0	≒0	≒0	≒0	0.04
定 量 >99.5%	99.8	99.7	99.8	100.0	99.9

(b) Acidum Aminoaceticum* (大場)

	A	B
乾燥減量 0.2%>	≒0	0.05%
熱灼残留物 0.1%>	0	0
定 量 >98.5%	100.5	101.7

J P, B P になく, U S P は試薬として収載している. 溶解度 水 6 分を用いないと溶けなかつた. 又 ethanol R. の濃度の記載がない.

(c) Acidum Ascorbicum (石垣)

溶解度 水 4 分でないと溶けない. (P I 3.5 分, J P, U S P 約 3 分, B P 溶けやすい) 又 95% アルコール 50 分でないと溶けない (P I 約 20 分, J P, U S P 約 30 分, B P 溶ける) 定量法 P I は中和後ヨード滴定法を行うが中和後直ちに滴定しないと低い値が出やすい. J P はメタ磷酸 (B P, U S P は硫酸) で酸性としてヨード滴定法を行うが, この方がよい値を得バラツキが少ないので酸性に改正すべきである. 次表の値はメタ磷酸を加えて行つたものである.

	A	B	C	D	E
熔融範囲 191~194°	191	192	192	191	191
比旋光度(水)+22~+23°(20°)	+22	+22	+22	+22	+22
〃(メタノール)+50~51°(20°)	+50°	+50°	+50°	+50°	+50°
乾燥減量 0.4%>	0.01	0.02	0.05	0.05	0.04
熱灼残留物 0.1%>	0.05	0.04	0.05	0.02	0.02
定 量 >98.0%	98.81	98.76	98.60	98.58	98.92

(d) Acidum Benzoicum (佐子)

BPによく似ている。溶解度「PIは水約350分に溶ける(JP, USP275分, BP, 350分(20°)」とあるが、常温でふりまぜて溶かすときは、水約500分を要する。然し水350分と検体1分を加温溶解後常温に放置すると析出しない。

	A	B	C
熔融範囲 121~122°	123~123.5	123~123.5	123~123.5°
熱灼残留物 0.05%>	0.01	0.01	0.02
定 量 >98.5%	100.0	99.9	99.7

(e) Acidum Lacticum* (神谷)

BPに近く、USP, JPはこれと異なる。純度試験“various sugars”と言う記載はBPの“Reducing Sugar”の方がよいと思う(USP, JP糖類)。含量規定がPI, BP, は $C_8H_6O_3$ として87.5v/w%以上、USP, JPは85~90%である。本邦とすれば実測値から見ても85~90%の方がよいと思われる。

	A	B	C	D
密度 約 1.20	1.212	1.216	1.204	1.208
塩化物	不適	適	不適	適
熱灼残留物	= 0	0.02	0.04	0.05
定量 $C_8H_6O_3$ >87.5%	90.09	90.38	83.62	86.92

(f) Acidum Nicotinicum (関島)

USP, JPと同じである。1検体しかなかったがその結果は次のようである。溶解度 PI水約70分, JP60分であるが、実際は溶け難い。PI, JP, USPとも熱湯に溶けやすいとあるが、実際は「溶ける」程度であった。PI95%アルコール100分(USP, JPにない)に溶けるとあるが、実際は「溶け難い」・熱灼残留物PI0.05%以下(USP, JP0.1%以下)で適合するが0.1%がよいと思う。熔融範囲233.5~237°(PI234~237°)。定量値99.9%であった。

(g) Acidum Undecylenicum* (神谷)

USP, JNF IIにある。確認試験(B)のウンデシレン酸アニリドを再結晶するとき、PIはベンゼンを用いているが、これはUSP, JNF IIのように70%アルコールを溶媒とし、且活性炭を用いて再結晶する方が早く精製品を得られる。“Other fatty acids”はむしろ“fatty substance”又は“Neutral fat”の方がよいように思う。又この濁度をJP濁度試験に準じて比較したときの0.01N塩酸のcc数を次表中に記入しておく。今回の検体は何れかの点で不適になったが、これは本邦に今まで公定規格がなかったためであろう。

	A	B	C
確認試験(B)Anilide 66-68°	66~67.5	66~67.5	66~67.5
沸騰範囲 268~280°	276~280	280	228~265(分解)
凝固点 約22°	20.9	29.0	固化せず
屈折率(25°) 1.4475~1.4485	1.4479	1.4478	1.4534
ヨード価 131~138	137	—	—
他 の 脂 肪 酸	不適(0.9cc)	不適(0.7cc)	不適(1.3cc)

	A	B	C
水溶性酸	適	適	0.5cc
熱灼残留物 0.1%>	≒ 0	≒ 0	≒ 0
定量 95.0~108.0%	93.8	94.5	98.5

(iii) 有機酸ナトリウム塩類

(a) Natrii Citras (佐子)

USPに近いと思われるが違い点もある。結晶水2分子のもの他、PIはUSP, BP, JPの何れにもない5 $\frac{1}{2}$ 分子の結晶水を有するものをも規定している。溶解度PI, USP, JPとも沸湯0.6分に溶けるとあるが0.8分でないと溶けない。又95%アルコールには溶けない。(USP, JP, BP) 今回の検体はその他の項にも抵触した。(重金属限度, 乾燥減量はJPと同じ, 塩化物硫酸呈色物はJPにない)

	A	B	C
重金属 10p.p.m以下	適	不適	適
鉛 10p.p.m以下	適	不適	適
塩化物	適	適	不適
酒石酸および硫酸呈色物	黄 褐	黄 褐	黄 褐
乾燥減量 10~13%又は25.0~30.0%	12.30	22.70	23.27
定量 >99.0%	99.4	99.3	99.1

(b) Natrii Para-amino Salicylas* (升田)

USP, BP, JNF IIとも皆異つている。又、PI, USP, はパラアミノサリチル酸を収載している。性状「白色又は微に着色した粉末又は結晶性粉末」を「白色又はほとんど白色結晶……」に改正することは本邦の現状より当然のことと思われる。重金属, はJNF II 20 p.p.m.に対してPI 10p.p.m.であるが検体は全部適合した。又遊離パラアミノサリチル酸の項は本邦にないが, これも適であつた。砒素の限度がないが5p.p.m.程度に入れるべきであると思う。

	A	B	C	D	E
確認試験熔融範囲 121~124°	122.5°~123.5	121~122	122~123	121~122.5	121.5~122.5
3アミノフェノール0.003g>	0.0003	0.0004	0.0004	0.0005	0.0003
乾燥減量 15.5~18.0%	17.06	17.09	16.89	17.06	16.99
定量 99~102.0%	99.47	99.10	100.34	99.29	99.20

(c) Natrii Salicylas (神谷)

USP, BP, JPともに異つている。全検体ともに適であつたが, 確認試験Bの遊離サリチル酸の融点は157~161°の方がよいように思われる。定量法はPIは臭素法を用いているが「ふりまぜ」その他の条件に左右されて低い値が出やすい。USP, JP, BP, のように酸で滴定する方がよい。表の定量値は酸滴定法によつたものである。

	A	B	C	D	E
乾燥減量 0.5%>	0.14	0.35	0.16	0.06	0.13
定量 >99.4%	100.1	99.6	99.9	100.2	99.5

(iv) 有機酸アミド類

(a) Nicethamidum (関島)

JPではアミノコルゲンと言う。PIはUSP, BP, JPの何れとも同一でない。確認試験はニコチン酸の部分のみ確認し, ジエチルアミンの反応がない。又, ニコチン酸の融点を正条に234~237°と規定してあるのに235~240°とあるのはおかしく, 233~237°がいいと思う。PIは凝固点22~24°(JP融点20~25°性状の項)屈折率(JPにない)密度1.061~1.065(JP比重1.058~1.066性状の項)等があるが, これ等の項に不適でも

定量 98%以上に合格するものがあつた。今後検討する積りである。又“Free acid and free diethylamine”の項に検液量の記載が落ちている。定量法では検体を予め硫酸と2時間加熱して加水分解しているが、JPのようにこの操作はなくてよい。又0.1N 塩酸に対応するニケサマイドの量は0.01782の方が正しい。

	A	B
凝固点 22~24°	固化しない	固化しない
屈折率 (20°) 1.525~1.526	1.523	1.517
有機性不純物 鮮黄色以下	微 黄	微 黄
熱灼残留物 0.1%>	0.05	0.07
定 量 >98%	99.03	98.0

(b) Nicotinamidum (関島)

JPとほとんど同一で、硫酸呈色物の項がない。

	A	B	C
熔融範囲 128~131°	128~129.5	128~129.7	128~129
乾燥減量 0.1%>	0.06	0.09	0.04
定 量 >98.5%	99.0	98.7	98.6

(v) エステル類

(a) Aethylis Aminobenzoas (石垣)

BPに近い、溶解度 水にきわめて溶け難い (JP約2500分)とあるが実際ほとんど溶けない。又、オリーブ油約35分に溶ける (JP 30~35分)とあるが実際約40分である。流動パラフィンにきわめて溶け難く、稀硝酸にも溶け難い。この際酸の種類にもよるので、この2つの記載には溶解度の程度をあらわす“soluble”と混同されるより“dissolve” (USP XIV)と書いた方がよいと思う。

	A	B	C
熔融範囲 88~90°	88~90	88~89	88~89
乾燥減量 1.0%>	0.029	0.03	0.03
熱灼残留物 0.1%>	0.08	0	0.01

(b) Benzylis Benzoas (大場)

USP, BP, JNF IIともにきわめて似ている。溶解度 水グリセリンに「溶けない」(JNF II)確認試験(A)の a colourless, oily liquid of the colourless は除いた方がよい。又この際沸点を測定しなくてもよいと思う。

凝固点 固化しなかつたが、検体が1つしかなかつたのではつきりと言えない。沸点(測定値 203°)非常に高いのでPIの沸点測定装置では分解を起す。遊離酸 0.1N NaOH 0.2ml, 以下 (JP 0.5ml 以下, USP 0.3ml 以下)であるが、検体は適であつた。その他密度 1.116 (18°), 屈折率 1.569 (20°), 熱灼残留物 0.005%, 定量 99.8%であつた。

(c) Buthacaini sulfas (大場)

USP, JPになく、国産品もなく、検体1つは外国品であつた。熔融範囲 100.5~102.7°, 熱灼残留物 0.07%

(d) Butylis aminobenzoas. (石垣)

USP, JPになく、国産品もない。溶解度 水にはほとんど溶けない。稀硝酸、植物油、流動パラフィンに“soluble”と言うのは前述のように“dissolve”の意味に解釈する。外国品を検体としたが、熔融範囲 57~59°, 熱灼残留物 0.13%。

(e) Procaini Hydrochloridum. (大場)

USP (JP) BPと細部が異なる。溶解度 エーテルにはほとんど溶けない (JPと同じ)。クロロホルムにはきわめて溶け難い (PI, JP溶け難い)。確認試験(A)で遊離塩基は結晶化せず冷却しても油のままであつた。検討するつもりである。(D) 硫酸々性過マンガン酸カリウムを加えるとき2分後無色になると書かれてあるのは淡黄色が残るから、「紫色が消える」(USP, JP)の方がよい。液性は単に液性を見るより、USP, BP,

J Pのように酸性度を見る方がよい。又熔融範囲の実測値は154~158°でJ Pに一致している。定量法はB Pにあるのみであるが、検討した結果用べき方法であることを知った。

	A	B	C	D
熔融範囲 153~157°	154~156	154~157.5	155~158	154~157
熱灼残留物 0.1%>	0.03	0	0	0

(f) Tetracaini Hydrochloridum (大場)

ほとんどUS Pに一致する。B Pは Amethocaine hydrochloride と言う。溶解度 US P, B Pの“very soluble”よりP Iの約8分の水に溶けるの方がよい。確認試験(A)の“dry at 80°”は“dry at 80° for 2 hours”の方がはつきりする。検体が1つしかなかつたが、実測値は確認試験(A)硫シアン酸塩の融点131~132°, 熔融範囲 149.5~150°, 乾燥減量 0.11%, 熱灼残留物 0.02%, 定量 100.4 %であつた。確認試験(B)はUS P, B Pにない。塩酸プロカインとは熔融範囲でも区別されるので、これを入れるならば、むしろ純度試験の項とし、4位のアルキル化されない化合物の混入をおさえるべきではなからうか。

(g) Urethanum* (大場)

B Pが骨子となりUS Pが加味されている。溶解度 グリセリンには溶ける程度(P I溶けやすい, J P約3分)。植物油にわずかに溶けるとなつているが、オリーブ油には溶け難い(J P約35分)。熱灼残留物は4局方よりきびしく0.05%以下であるが、検体は全部0であつた。

	A	B	C	D
熔融範囲 48~50°	49.5~50.5	48.0~49.0	48.0~50.0	48.0~50.0
熱灼残留物 0.05%>	0	0	0	0

(vi) 4級アンモニウム塩

(a) Acetylcholinii chloridum (関島)

US Pの試薬の項およびJ N F IIにあるが、P Iには重金属、鉛、砒素、遊離酸、トリメチルアミン、乾燥減量を有しており、乾燥減量において全部抵触した。2%位に希望したい。確認試験(B)中ピクリン酸塩が沈澱しない。熔融範囲の測定は本品が非常に吸湿性で測定困難である、その国の気候にもよると思うが毛細管中につめて乾燥後(US P), 105°減圧(乾燥五酸化磷)毛細管を熔閉して融点を測定する(J N F II) ことの何れかを規定する方がよいと思う。熱灼残留物0.1%以下(J N F II 0.2%以下)

	A	B
熔融範囲 149°~150° (110°に乾燥後)	約150°	約150°
乾燥減量 0.75%>	const にならない	同 左
熱灼残留物 0.1%>	0.05	—
定 量 98.0~102%	99.89	99.18

(b) Cholinii chloridum (関島)

US P試薬の項にあるのみである。確認試験(A)の過マンガン酸カリウムは不用である。(B)の無水燐タンゲステン酸の比が89.7%にならなかつた。この数字は理論値であるが、確認試験にこんなに精密な必要はないように思う。乾燥減量は0.5%と規定されているが1.0%以下が望ましい。

	A	B	D
確認試験(B) 無水燐タンゲステン酸 約89.7%	88.2	87.0; 87.2	86.8
融 点 乾燥後約240°(分解)	—	—	235°(分解)
乾燥減量 0.5%>	0.75	1.74	—
熱灼残留物 0.2%>	≒ 0	≒ 0	0.08

	A	B	C
定 量 N > 9.84%	9.92	9.94	9.97
Cl > 24.89%	24.5	24.5	25.15

以上の研究に御教示を賜った刈米所長にお礼申上げる。本研究の費用の1部は昭和29年度厚生科学研究費を当て検体はメーカー各位(多数のため省略させて頂く)の寄贈に仰いだ、ここに厚く謝意を表する。

総 括

- (1) 溶解度を規格よりはずして参考事項にすることを強く要望したい。又熔融範囲、融点の測定法を改正すること、沸騰範囲の測定装置を改めるか又は高沸点を持った液体に適用しないこととしたい。
- (2) 確認試験の項で数箇所改めた方がいいと思われることを挙げた。
- (3) 熔融範囲、溶状、酸性度、乾燥減量、熱灼残留物の限度、又は試薬の量など改むべきもの、又は改正希望を述べた。
- (4) 定量法中改正すべきであると思われるものが2種あつた。
- (5) 検体中殊に不適の多かつたもの3種があつた。

Summary

On the request of Pharmacopoeia Committee in World Health Organization, we investigated the allotted monographs mentioned in this report, comparing them with our own pharmacopoeia and others. The samples for tests were gathered from manufacturers and importers in our countries, they were generally products packed for sale with a few exception. The results of examinations are as follows:

- (1) Generally, solubility should be removed from requirements and be described as reference data.
- (2) It seems to be better to revise the procedure of determination of melting-point or melting-range as British or United States Pharmacopoeia, because the one of Pharmacopoeia Internationalis needs much time and sample may decompose.
- (3) The apparatus for determination of boiling-range is inconvenient to the sample which boiling point is high.
- (4) Some figures in the items of melting-range, completeness of solution, acidity, loss on drying and residue on ignition are desirable to be revised.
- (5) Revisement is desirable for the assay methods of "Natrii Salicylas" and "Acidum Ascorbicum",

Received February 29, 1956

非水溶液滴定による医薬品の定量（第13報）*

水酢酸を溶媒とするキニーネ類の滴定とその塩基性について**

鹿 島 哲

Titration of Drugs and Chemicals in Nonaqueous Solutions. XIII.

Titration of Cinchona Alkaloids and Their Salts,
and Their Basicities in Anhydrous Acetic Acid

Tetsu KASHIMA

まえがき 非水溶液滴定法はすでに昨年末から米国薬局方¹⁵⁾に採用され、また一般に広く用いられ始めた。しかしそれぞれの医薬品について定量できるというだけでまだ十分な検討がなされていないのが現状である¹⁾。またキニーネ類は初めクロロホルム中で塩酸により¹⁶⁾、ついで氷酢酸中で過塩素酸を用いて滴定²⁾されているが、指示薬によつては精度よく定量することが難かしいので研究の余地が多い。そこでシンコニン、シンコニジン、キニジン、キニーネ及びエチル炭酸キニーネ並びにそれらの塩を氷酢酸中で過塩素酸で滴定し、ガラス-甘汞電極を用いて得られた滴定曲線により、それらの測定精度や塩基性などについて検討した。

実験材料 氷酢酸¹³⁾、一級品に無水クロム酸0.5%程度加え、共通磨り合せの蒸留装置にヘンベル型の蒸留塔をつけ塩化カルシウムで防湿して徐々に蒸留し116°以上の留分をとり、氷室中で再結晶し、ついで無水酢酸2~3%を加えて再蒸留し118°の留分を用いる。

その他の無水酢酸、過塩素酸、フタル酸水素カリウム、酢酸第2水銀及び過塩素酸標準液などは前報⁴⁾に示した通りである。

塩酸シンコニン、 $C_{19}H_{22}ON_2 \cdot HCl \cdot 2H_2O$ 、特級試薬、白色結晶性粉末、 $[\alpha]_D^{15} = +176^\circ (H_2O, C = 1)$ 、 $[\alpha]_D^{17} = +205^\circ (C_2H_5OH, C = 1)$ 、120°で4時間以上乾燥。

硫酸シンコニジン、 $(C_{19}H_{22}ON_2)_2 \cdot H_2SO_4 \cdot 3H_2O$ 、最純試薬、白色絹糸様光沢の針状晶、 $[\alpha]_D^{22} = -125^\circ (C_2H_5OH, C = 1)$ 、120°で4時間以上乾燥。

硫酸キニジン、 $(C_{20}H_{24}O_2N_2)_2 \cdot H_2SO_4 \cdot 2H_2O$ 、試薬、白色絹糸様光沢の針状晶、 $[\alpha]_D^{17} = +223^\circ (C_2H_5OH, C = 1)$ 、120°で4時間以上乾燥。

塩酸キニーネ、 $C_{20}H_{24}O_2N_2 \cdot HCl \cdot 2H_2O$ 、局方品、白色絹糸様針状晶、 $[\alpha]_D^{17} = -175^\circ (C_2H_5OH, C = 1)$ 、120°で4時間以上乾燥。

硫酸キニーネ、 $(C_{20}H_{24}O_2N_2)_2 \cdot H_2SO_4 \cdot 2H_2O$ 、局方品、白色結晶性粉末、 $[\alpha]_D^{15} = -118^\circ (H_2O, C = 1)$ 、 $[\alpha]_D^{17} = -158^\circ (C_2H_5OH, C = 1)$ 、105°で4時間以上乾燥。

重硫酸キニーネ、 $C_{20}H_{24}O_2N_2 \cdot H_2SO_4 \cdot 7H_2O$ 、試薬を水から再結晶、白色結晶性粉末、 $[\alpha]_D^{15} = -168^\circ (H_2O, C = 1)$ 、 $[\alpha]_D^{17} = -146^\circ (C_2H_5OH, C = 1)$ 、120°で4時間以上乾燥。

エチル炭酸キニーネ、 $C_2H_5CO_2 \cdot C_{20}H_{28}O_2N_2$ 、局方品、やわらかい白色針状晶、 $[\alpha]_D^{15} = -52^\circ (C_2H_5OH, C = 1)$ 、mp 89~90°、デシケータ(硫酸)で24時間以上乾燥。

シンコニン、 $C_{19}H_{22}ON_2$ 、塩酸シンコニン5gを20%エタノール200ccに加熱して溶かし、濾過してから当量より僅か過剰のアンモニア水を加え、生じた沈澱を水でよく洗い乾燥する、白色結晶性粉末、 $[\alpha]_D^{19} = +230^\circ (C_2H_5OH, C = 1)$ 、デシケータ(硫酸)で48時間以上乾燥。

シンコニジン、 $C_{19}H_{22}ON_2$ 、硫酸シンコニジン5gを20%エタノール200ccに加熱して溶かし、濾過してから僅かに過剰の炭酸ナトリウム液を加え、生じた沈澱を水でよく洗い乾燥する、白色結晶性粉末、 $[\alpha]_D^{15} = -128^\circ (C_2H_5OH, C = 1)$ 、デシケータ(硫酸)で48時間以上乾燥。

キニジン、 $C_{20}H_{24}O_2N_2 \cdot 2.5H_2O$ 、硫酸キニジン2gを20%エタノール100ccに加熱して溶かし、濾過してから僅かに過剰の炭酸ナトリウム液を加え、生じた沈澱を水でよく洗い乾燥、白色結晶性粉末、 $[\alpha]_D^{17} = +259^\circ$

* 第12報、鹿島：本誌 73, 103 (1955)。

** 第75回日本薬学会講演 (1955)。

(C_2H_5OH , $C=1$), 無水物 mp 172~175°, 120° で4時間以上乾燥.

キニーネ, $C_{20}H_{24}O_2N_2 \cdot 3H_2O$, 硫酸キニーネ 2g を水 300cc に加温して溶かし, 濾過してから僅か過剰のアンモニア水を加え水でよく洗つて乾燥, 白色結晶性粉末, $[\alpha]_D^{19} = -169^\circ$ (C_2H_5OH , $C=1$), 無水物 mp 175~177°, 120° で4時間以上乾燥.

キノリン, 淡黄色液体, $n_D^{25} = 1.6233$; ピクリン酸塩, mp 202~203°.

実験方法 カールフィッシャーの水分測定装置を利用し, ベックマン pH メーター G 型に "42" 型のガラス電極と "Fiber" 型の甘汞電極とを組合せて, 恒温室で検体の 0.01M 溶液約 25cc を 0.05 N 過塩素酸標準液で滴定した. 詳細は前報⁴⁾を参照されたい. なお起電力測定の基準は溶媒陽イオンと溶媒陰イオンが等量存在する点である.

Table 1. Determination of Cinchona Alkaloids and Their Salts (0.01M Solution) in Anhydrous Acetic Acid with 0.05N Perchloric Acid

Organic base	Taken g	Equivalents	Found %	Sensitivity %
Cinchonine	0.0875	2	98.7	0.07
Cinchonidine	0.1008	2	99.3	0.07
Quinidine	0.0809	2	99.15	0.08
Quinine	0.0770	2	99.1	0.07
Quinine ethyl carbonate	0.0738	2	98.05	0.09
Cinchonine hydrochloride	0.1118	1 or 2	98.8	0.4
	0.1208*	2	99.4	0.1
Cinchonidine sulfate	0.1179	3	99.7	0.14
Quinine hydrochlorid	0.1396	1 or 2	99.1	0.4
	0.1042*	2	100.2	0.08
Quinine sulfate	0.1298	3	98.3	0.12
Quinine bisulfate	0.2507	1	99.6	0.2
Quinoline	0.0842	1	99.3	0.06

Each value is the average of three samples.

* One equivalent of mercuric acetate added.

Sensitivity = $\frac{\text{Volume of 0.05N HClO}_4, \text{ causing the change of E.M.F. of 5 mV}}{\text{Total volume of 0.05N HClO}_4}$

(At the end point)

実験結果 シンコニン, シンコニジン, キニジン, キニーネ及びエチル炭酸キニーネを氷酢酸に溶かし過塩素酸で滴定したところ, どの試料も 1モル2当量として 0.1% 以内の測定感度 (Table 1 の項参照) で土約 0.1% の再現性をもつて定量できた. その滴定曲線 (Fig. 1) から氷酢酸中ではシンコニン及びシンコニジンより, そのキノリン核の 6' の位置にメトシル基を有するキニジン及びキニーネの方が塩基性がやや強いことがわかった. エチル炭酸キニーネの塩基は以上のいずれよりも塩基性が弱い, 測定感度は大差がなかった.

塩酸シンコニン及び塩酸キニーネはそれぞれの 2つの塩基性の窒素のうち半分が塩酸によつて中和されているため 2段に滴定されるが, その測定感度はいずれも悪く⁵⁾, それに当量の酢酸第 2 水銀を加えて滴定すれば遊離塩基とほとんど同じように滴定されるが⁹⁾, 酢酸水銀が過剰にあると測定感度が悪くやや過量に定量される傾向を示した³⁾. 硫酸シンコニジン, 硫酸キニジン及び硫酸キニーネは 1モル 3当量として滴定され, その測定感度は遊離塩基よりやや悪く, また重硫酸キニーネは 1モル 1当量として滴定され, その測定感度は前の硫酸塩よりさらに悪かつた^{5) 6)}.

クリスタルバイオレットなどの指示薬を用いても滴定できるが, 終点に近づくとき色素が試料の過塩素酸塩に吸着されるため余り鋭敏な色調の変化が得られなかった.

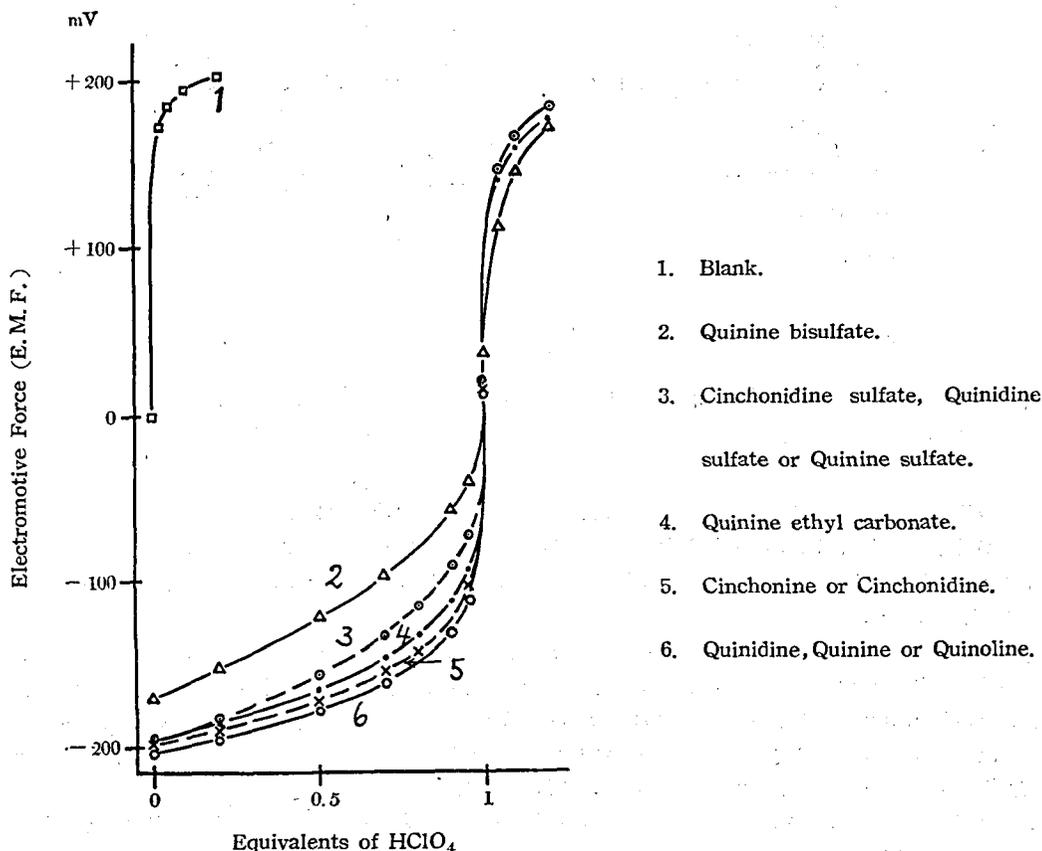
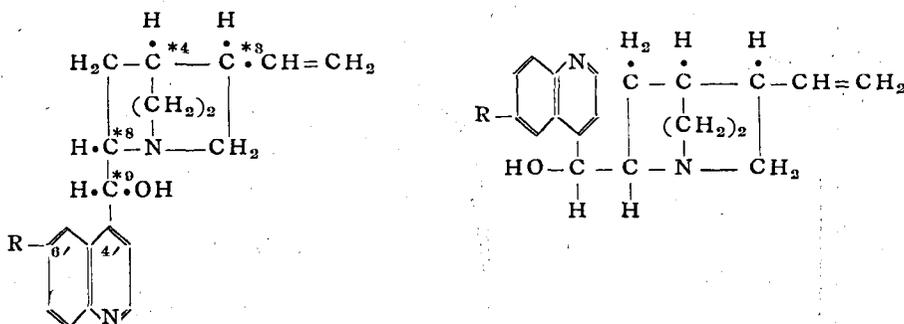


Fig. 1. Potentiometric Titration Curves of Cinchona Alkaloids and Their Salts (0.01M) with 0.05 N Perchloric Acid in Anhydrous Acetic Acid by Glass-Calomel Electrodes at $22 \pm 1^\circ$

考察 これらのアルカロイドは水溶液中では2段に解離し、その pK_b は 15° で、シンコニン ($pK_1 : 5.85$, $pK_2 : 9.92$), シンコニジン (5.80, 10.03), キニジン (5.43, 10.0), キニーネ (5.97, 9.7)⁸⁾ 及びキノリン ($pK_b : 9.5$) の値を示し、Methyl cellosolve (Ethylene glycol monomethylether) の80%溶液ではキニジン ($pK_a : 7.95$, 23° , 0.003N) 及びキニーネ ($pK_a : 7.73$, 21° , 0.003N)¹⁰⁾ であることが知られている。しかし氷酢酸中では、溶媒の水平効果¹⁾により、その構造と pK から弱いと考えられるキノリン核の塩基性もキノグリジン核のそれとほとんど同じ強さを表わすようになるから、1モル2当量として一つの中和点で滴定されるのである。しかしその終点付近では、やはり試料が強弱2種の塩基性を有するためか、起電力の飛躍の最大の点が不明瞭となり、 pK_b がこれらの物質の pK_2 に近い値を有するキノリンを滴定する場合より測定感度が僅かに低下した。そこで一応変曲点を終点として定量したが、そのため及び反応速度が終点付近で遅くなるなどに起因し定量値がやや低くてもと思われる。

次にこれらのアルカロイドの塩基性と構造との関係を考えて見よう⁷⁾。その構造については Rabe¹²⁾ や Prelog^{10) 11)} により立体配置まで解明されていて、この4者はいずれも8と9の2つの不斉炭素に対し erythro 型で3と8との炭素に対してはシンコニンとキニジンでは 3-endo-8-endo 型で、シンコニジンとキニーネでは 3-endo-8-exo 型であり、それらの構造式は図の如くなる。しかし得られた滴定曲線により塩基とその共脱酸が等量存在する点の起電力でこれらの塩基性を比較すると、キノリン核にメトキシル基を有するキニジン及びキニーネの方がやや強く、大体キノリンのそれに等しかつた。なお 3-endo-8-endo 型をとるシンコニン及びキニジンと 3-endo-8-exo 型のシンコニジン及びキニーネの塩基性はその立体構造による差がほとんどなく、僅かに測



R = H (-)-Cinchonidine
R = CH₃O (-)-Quinine

(+)-Cinchonine
(+)-Quinidine

定感度の2mV程度の差で前者の型のものがそれ後者の構造のものより塩基性が強いと云えよう。しかし2つの塩基性基が同時に滴定されるためこれ以上立入つて構造と塩基性との関係を論ずることはできない。なおエチル炭酸キニーネの塩基性がキニーネより弱いのは炭酸エチル基によると思うが、それが立体障害その他いかなる理由によるか不明である。

シンコニン及びキニーネの塩酸塩は塩基2当量に酸1当量が結合しているの、その滴定曲線は第1の中和点までの部分は塩基そのものを滴定したときの曲線に類似し、その先は塩基と酸とが同じ当量で結合した塩を滴定したときのものに類似していた³⁾。なおこれらの塩酸塩に酢酸第2水銀を当量加えて滴定すれば正確に定量できる^{5, 9)}はずであるが、少いときは勿論塩酸が中和されず、また多いと酢酸水銀とキノリン核が反応する¹⁴⁾ためか滴定曲線が乱れてやや過量に定量され、いずれにしても正確に定量するのはかなり難しい。

シンコニジン、キニジン及びキニーネの硫酸塩は塩基2分子と酸1分子との塩であるから検体は4個の塩基性窒素を有しているし、また硫酸の第1段の解離は氷酢酸中でもかなり強いが2段目の解離は弱いので^{6, 9)}、結局これらの塩は1モル3当量として滴定される。また硫酸の酸性の影響を受けて測定感度が低下し、その上終点を少し過ぎてから硫酸が遊離するため急に起電力が40~50mVほど飛躍する。また塩基1分子と酸1分子とが結合している重硫酸塩は以上のことから当然1モル1当量として滴定され、硫酸塩より硫酸の割合が多いから、それより測定感度が落ちる⁶⁾。

クリスタルバイオレットなどの指示薬を用いて滴定を行うと、終点附近における起電力の変化が比較的少いことと、検体に指示薬が吸着される傾向もあるため余り良い結果を得ることができなかった。

総 括

1. シンコニン、シンコニジン、キニジン、キニーネ並びにそれらの塩酸塩及び硫酸塩、及びエチル炭酸キニーネを氷酢酸中で過塩素酸で滴定し、ガラス-甘汞電極を用いて得られた滴定曲線によりそれらの測定感度及び塩基性について検討した。
2. 氷酢酸中ではキニジン及びキニーネの塩基性は相互にほとんど等しく、またシンコニン及びシンコニジンのそれも大体等しく、前者の塩基性は後者より幾分強く、大体キノリンと同程度である。

本研究に御指導を戴いた所長刈米達夫博士に御礼申上げると共に、御援助下さつた部長長沢佳熊博士並びに有機合成工業株式会社に謝意を表す。

文 献

- 1) Bates, R.G.: "Electrometric pH Determination", Chapter 6, John Wiley & Sons, New York, 1954.
- 2) Herd, R.L.: J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed., 31, 9(1942).
- 3) 鹿島 哲: 薬誌, 75, 332(1955).
- 4) 鹿島 哲: 本誌, 73, 103(1955).
- 5) 鹿島, 朝比奈, 志内: 薬誌, 75, 329(1955).
- 6) 鹿島, 朝比奈, 志内: 薬誌, 75, 586(1955).
- 7) Manske, H.F. & Holmes, H.L.: "The Alkaloids", Vol. III, Chapter 16, Academic Press, New York, 1953.
- 8) Merck Index VI (1952); J. M. Kolthoff: Biochem. Z., 162, 289(1925).
- 9) Pifer, C.W. & Wollish, E.G.: Anal. Chem., 24, 300(1952).
- 10) Prelog, V. & Haefliger, O.: Helv. chim. Acta, 33, 2021(1950).
- 11) Prelog, V. & Zalan, E.: Helv. chim. Acta, 27, 535(1944).
- 12) Rabe, P.: Ber., 76, 251(1943).
- 13) Riddick, J.A. & E.E. Toops, Jr.: "Organic Solvents", 2nd Ed, Interscience Publishers, New York, 1955.
- 14) 鶴銅真二: 薬誌, 51, 542(1931).
- 15) U.S.P (Pharmacopeia of United States) XV, 833(1955).
- 16) Vorlaender, D.: Ber., 67B, 145(1934).

Summary

It is shown that Cinchonine, cinchonidine quinidine, quinine, their hydrochlorides and sulfates, and quinine ethyl carbonate (0.01M solution) can be determined titrimetrically in anhydrous acetic acid with 0.05 N perchloric acid using glass-calomel electrodes, with an accuracy of 0.07~0.2%. By the potentiometric titration curves, the basic strengths of the above substances are discussed. In anhydrous acetic acid, it will be concluded that the basic strength of quinidine is about the same as of quinine and that of cinchonine as of cinchonidine respectively, and the former species are stronger bases than the latter and almost the same as quinoline, by the leveling effect of this acidic solvent.

Received February 29, 1956

非水溶液滴定による医薬品の定量 (第14報)*

水酢酸中における1-フェニル-3-メチルピラゾロン (5) 類の塩基性について

鹿島 哲, 庄司 初枝, 土屋 雅一

Titration of Drugs and Chemicals in Nonaqueous Solutions. XIV.

Basicities of Derivatives of 1-Phenyl-3-methylpyrazolone(5) in Anhydrous Acetic Acid.

Tetsu KASHIMA, Hatue SYOJI and Masakazu TSUCHIYA

まえがき 溶媒が定まっていれば、物質の酸塩基性は一定温度におけるその溶液の電気伝導度や、水素電極またはガラス電極などによる起電力の測定及び指示薬を用いて、その解離定数 (K) を測定することによってその強さを比較することができる。それは通例水溶液を用いて測定されているが、水に溶けない物質は含水アルコールなどを用いて測定され、水の酸塩基性に近い弱酸、弱塩基は水を全く含まない非水溶媒中でその比較が行われている^{1,12)}。また溶媒の水平効果²⁾により、水溶液中では OH_3^+ より強い酸は存在せず、かつ OH^- より強い塩基も存在し得ないから、それらより強い酸や塩基の比較もできない。このように溶液中における物質の酸塩基性は溶媒の性質、たとえばその酸塩基性、誘電率などによって非常に左右され、その強さの絶対値を求めることは不可能に近い、しかし一つの溶媒中における相対的の強さは定量的にはともかくとしても定性的には求めることができる。なお酸性物質の酸塩基性についてはかなり多数の報告が提出されているが、塩基性の窒素を有する物質については余り多くの報告が出されていない。ここでは水溶液中で中性ないし弱酸性を呈するフェニルメチルピラゾロン誘導体の塩基性を、両性プロトン溶媒(amphoteric solvent)ではあるが酸性の強い (protogenic) 水酢酸を溶媒として過塩素酸で滴定した結果を用いて比較検討した。なおこの中のアンチピリン及び1-フェニル-3-メチルピラゾロン(5)の塩基性については Veibel らの報告³⁾があり、アンチピリン及びアミノピリンについては著者も第2報⁴⁾で触れている。

実験材料 1-Phenyl-3-methylpyrazolone (5) (脱メチルアンチピリン)、試薬を遮光してベンゼンから再結晶、白色針状または柱状晶、mp 127 ~ 128°, pH 5.1 (0.02M 水溶液, 23°), 水に難溶。

Antipyrine (1-Phenyl-2,3-dimethyl pyrazolone (5)), 局方品をベンゼンより再結晶、無色板状晶, mp 112 ~ 112.5°, pH 6.3 (0.1M 水溶液, 23°), pH 6.0 (0.02M)。

4-Amino-antipyrine, 試薬を遮光してベンゼンより再結晶、微黄色板状または柱状晶, mp 109 ~ 109.5°, pH 7.3 (0.1M 水溶液, 23°), pH 7.0 (0.02M)。

Aminopyrine (4-Dimethylamino-antipyrine), 局方品を遮光してベンゼンより再結晶、無色柱状晶, mp 108 ~ 108.5°, pH 7.6 (0.1M 水溶液, 23°), pH 7.3 (0.02M)。

これらの試料は皆硫酸デシケートで24時間以上乾燥して用いた。

実験方法 カールフィッシャー水分測定装置を利用し、ベックマン pH メーター G型に“42”型のガラス電極と“Fiber”型の甘汞電極とを組合せて電位差滴定を行った。22.5 ± 0.5° の恒温室で試料の 0.02M 溶液約 25cc をつくり、それを 0.05N 過塩素酸標準液で徐々に滴定し、約 20 個処の起電力を測定して滴定曲線を描いた。なお溶媒のプランクは 10cc につき 1 滴以内であつた。詳細は前の報告⁵⁾を参照されたい。

実験結果 脱メチルアンチピリン、アンチピリン、4-アミノアンチピリン及びアミノピリンはいずれも 1 モル 1 当量として定量された (第 I 表)、水酢酸中ではこれらの塩基性はアミノピリンだけが非常に強く、それからアンチピリン、脱メチルアンチピリンと弱くなり 4-アミノアンチピリンの塩基性が一番弱かつた (第 I 図)、なお 0.001M から 0.2M までの種々の濃度のアンチピリンの溶液を 0.05N 過塩素酸標準液で滴定した 滴定曲線を第 2 図に示す。これらの塩基性の比較は試料を酸で半分中和した点の起電力で行っているが、その再現性は極めて良好で ± 1 mV であつた。なお測定した起電力の基準は水酢酸中における強塩基の中和点を用いた。またこれらの水溶液の pH も測定した処 4-アミノアンチピリンの塩基性が比較的強く表われた (第 I 表)。

* 第 13 報, 鹿島: 本誌 74, 9(1956)。

試料を50%エタノールに約0.5%の濃度に溶かし、これに2.5%キノヒドロソメタノール溶液を半量加え、1~2分間放置してから50%エタノールで倍量に稀釈して呈色を見ると、アンチピリン及びアミノピリンは第3級アミンとしての呈色、すなわち黄橙色を呈したが、脱メチルアンチピリン及び4-アミノアンチピリンは第2級アミンとしての呈色、すなわち赤色を呈した。⁶⁾ これに対して溶媒をすべて氷酢酸として呈色を見たところ、脱メチルアンチピリンのみが徐々に赤色を呈して来たが、その他の3者はいずれも黄橙色を帯びるに止まつた。

Table 1. Determination of Derivatives of 1-Phenyl-3-methylpyrazolone(5) (0.02 M Solution) in Anhydrous Acetic Acid with 0.05 N Perchloric Acid.

Organic base	Taken g	Found %	Sensitivity %	E. M. F. * mV	pH** (0.02M, 23°)
Phenylmethylpyrazolone	0.1008	99.6	0.2	-83	5.1
Antipyrine	0.0983	99.65	0.12	-95	
4-Aminoantipyrine	0.0970	99.4	0.15	-48	7.0
Aminopyrine	0.1099	99.7	0.1	-196	7.6

* Of the solution in which [B] is equal to [BH⁺].

** In aqueous solution.

Sensitivity = $\frac{\text{Volume of 0.05N HClO}_4, \text{ causing the change of E. M. F. of 5mV}}{\text{Total volume of 0.05N HClO}_4}$

(At the end point)

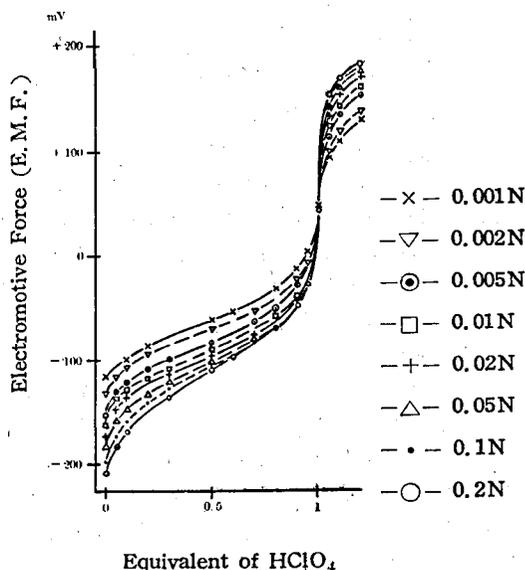
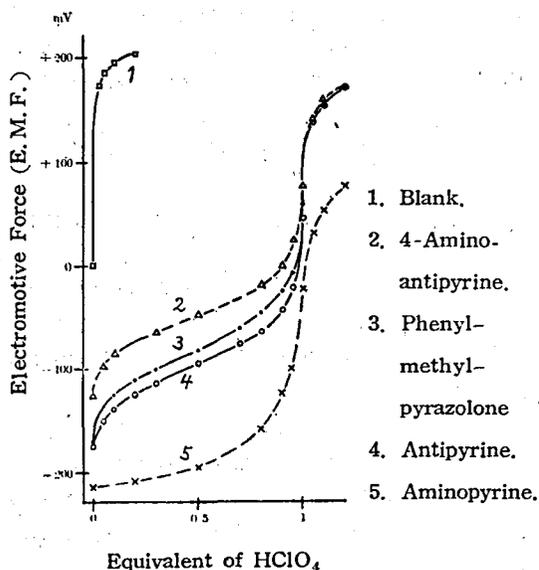
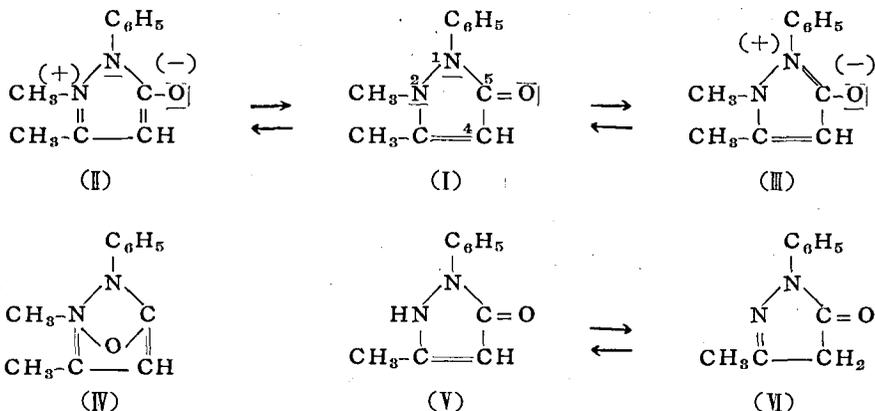


Fig. 1 Potentiometric Titration Curves of 1-Phenyl-3-methylpyrazolone (5) and its Derivatives (0.02M solution) with 0.05N Perchloric Acid in Anhydrous Acetic Acid by Glass-calomel Electrodes at 22.5±0.5°.

Fig. 2 Potentiometric Titration Curves of Antipyrine (0.001M~0.2M solution) in Anhydrous Acetic Acid at 22.5±0.5.

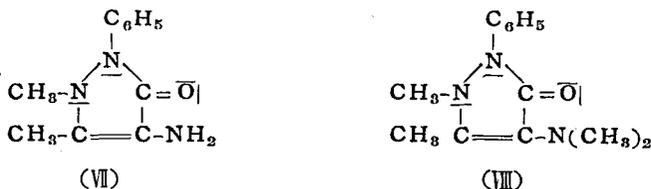
考察 アンチピリンの構造式は Knorr の式(1)⁷⁾と Michaelis の式(IV)⁸⁾の2種が提出されており、我が国においても北村⁹⁾と駒田¹⁰⁾とにより論争が行われた。しかし Michaelis の式は(II)の共鳴の式におきまえて考えることができる^{11,12)}。

アンチピリン (I) 及び脱メチルアンチピリンは図の如き共鳴などが起るため安定化されているから^{12,13,14}。その塩基性が表われ難いものと思われる。その上脱メチルアンチピリンはその呈色反応からいつでも第2級アミンの性質を有するから、その塩基性は更に弱くしか表われない。しかしそれらが氷酢酸中で過塩素酸によって滴定されるのは、C⁴の水素がN²またはC⁵の酸素に移動してピラゾールになるからだといはれ³⁾ Veibel ら³⁾は考えている。



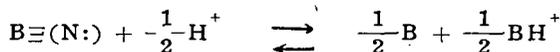
4-アミノアンチピリン (VII) は水やアルコールなどの中性溶媒中では第2級アミンの呈色反応を示し、その pH はアミノピリンについて高いが、酸性溶媒である氷酢酸中では $-NH_2$ 基による塩基性が表われにくいから塩基性が一番弱くなるのであろう。

なおアミノピリン (VIII) はそのジメチルアミノ基の I 効果により以上のような電子や水素の移動が起り難く、そのため強塩基性のジメチルアミノ基がまず滴定され、次にメチルアミノ基が滴定されると思われるが、その前に沈澱が生じ反応が定量的に進まなくなった。



0.001M から 0.2M までの種々の濃度のアンチピリンを 0.05N 過塩素酸で滴定した滴定曲線 (第2図) からわかるように、アンチピリンのみならず脱メチルアンチピリン及び 4-アミノアンチピリンはこの溶媒の水平効果を受けずにその塩基性の比較ができる。なおアミノピリンは溶媒の酸性のため強塩基性を示すが、濃度による起電力の差は他の3者と大差がなかつた。しかしその濃度が 0.05M 以上になると中和点に達する前に沈澱が生じ正確な滴定曲線を求めることができなかつた。

これらの塩基性は氷酢酸中で試料がプロトンと結合する強さによつて、つまり式の如く塩基性の窒素が過塩素酸によつて半分中和された点の起電力をガラス-甘汞電極で測定することによつて比較を行つている。この場合



一番問題なのは用いる溶媒と甘汞電極とを連絡する塩化カリウムの水溶液との間の液間電位差であるが、今回の測定においては $\pm 1mV$ の再現性を得ることができた。また用いる溶媒を変えたときは勿論、標準となる酸を変えてもその相対的の塩基性の強さは一般的にいつて幾分の変化が見られる。しかし酢酸の代りに水とかアルコールのように $-OH$ 基を有する類似の溶媒を用いたときには、試料に構造上の変化が起らないときは少くともその酸塩基性の順序はほとんど変わらないと考えられている^{1,15,16}。故に氷酢酸中で一番弱い塩基性を示した 4-アミノアンチピリンが水溶液中ではアミノピリンに次ぐ強い塩基性を示したのは、電子や水素の移動などによる分子の構造の変化が溶媒の酸塩基などによつて左右されるためと考えられるが詳細は不明である。

総 括

1-フェニル-3-メチルピラゾロン (5) の誘導体 4 種を氷酢酸中で過塩素酸で滴定し、ガラス-甘汞電極を用いてそれらの滴定曲線を求めた。それによつてアミノピリンの塩基性はそのジメチルアミノ基のため非常に強く、その他のものではピラゾロン核が共鳴によつて安定化されるなどのため塩基性が非常に弱まり氷酢酸中でも弱塩基性を呈し、その強さはアンチピリン、脱メチルアンチピリンと弱くなり、その上 4-アミノアンチピリンは溶媒の影響により塩基性が一番弱いことが解つた。しかしその pH の値から、水溶液中では 4-アミノアンチピリンの塩基性が強く表われアミノピリンの塩基性に近いと云えよう。

本研究に御指導を戴いた所長刈米達夫博士に御礼申上げると共に、御援助下さつた 部長長沢佳熊博士及び山口一孝博士に謝意を表する。

文 献

- 1) Hammett, L. P. : "Physical Organic Chemistry" (1940), Chapter II & IX, MacGraw-Hill, New York.
- 2) Hantzsch, A. : Z. Elektrochem., 29,, 221(1923).
- 3) Veibel, S., Eggersen, K. & Linoholt, S.C. : Acta Chem. Scand., 6, 1066(1952) ; C. A. 47, 2089g(1953).
- 4) 鹿島 哲 : 薬誌 74, 463(1955).
- 5) 鹿島 哲 : 薬誌 74, 103(1955).
- 6) Kroeller, E. : Sueddeut. Apoth.-Ztg., 90,, 724(1950) ; C. A., 45, 1464g(1951).
- 7) Knorr, L. & Taufkirch, H. : Ber., 25, 768(1892).
- 8) Michaelis, A. : Ann., 320, 1(1902).
- 9) 北村良一 : 薬誌., 58, 447, 613(1938), 59, 84(1939), 60, 45(1940), 61, 33(1941).
- 10) 駒田 勤 : 日化., 58, 1091, 1098(1937), 59, 412, 477, 485(1938).
- 11) Thoms, H. & Schnupp, J. : Ann., 434, 296(1923).
- 12) Brown, R.D., Hukins, A.A., LeFevre, R.J.W., Northcott, J. & Wilson, J.R. : J. Chem. Soc., 1949, 2816.
- 13) Biquard, D. & Grammaticakis, P. : Bull. soc. chim., 8, 246(1941) ; C. A., 36, 2476(1941).
- 14) Valyashko, N. A. & Bliznyukov, V. I. : J. Gen. Chem., (U.S.S.R.), 10, 1343(1941) ; C. A., 35, 3633, 5496(1941).
- 15) Bell, R.P. : "Acids and Bases" (1952), Chapter III, Methuen & Co., London.
- 16) Bates, R.G. : "Electrometric pH Determinations" (1954), Chapter 6, Quantitative Aspects of Acidity and Basicity in Nonaqueous Solutions, John Wiley & Sons, New York.

Summary

Derivatives of 1-phenyl-3-methylpyrazolone (5) (0.02M solution) can be titrated with 0.05N perchloric acid in anhydrous acetic acid using glass-calomel electrodes. One ml of each sample is determined as one equivalent with an accuracy of 0.1~0.2%. From the potentiometric titration curves, the basic strengths of these substances are discussed. Aminopyrine is shown to be the strongest base in this solvent because of its dimethylamino group. It seems that the electron transfers or hydrogen shifts occur in the pyrazolone nucleus, so antipyrine is a weak base even in anhydrous acetic acid, and phenylmethylpyrazolone is weaker, and 4-amino-antipyrine is the weakest. In aqueous solution, however, the basicity of 4-amino-antipyrine relatively increases, and it becomes near to that of aminopyrine.

Received February 29, 1956

赤外線吸収スペクトル分析の医薬品試験における応用 (第1報)

通常法による日局クレゾール石鹼液中の *o*-, *m*-, 及び *p*-クレゾールの定量

板井孝信, 大場琢磨, 田中誠之*

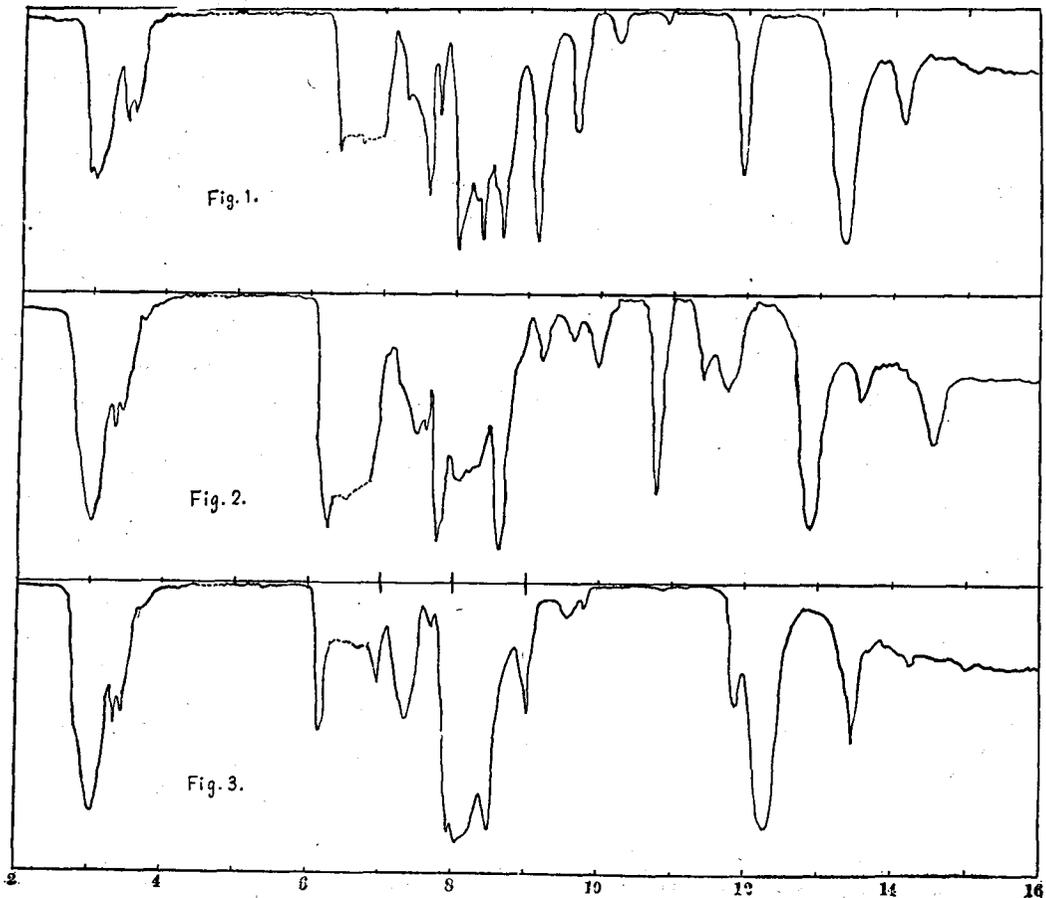
Application of Infrared Absorption Spectroscopy to Examination of

Drugs and their Preparations. I.

Determination of *o*-, *m*- and *p*-Cresol Isomers in Saponated Cresol Solution (J.P.)

Takanobu ITAI, Takuma ŌBA and Shigeyuki TANAKA

まえがき 日局クレゾール石鹼液はクレゾール約50v/v%を含むが, そのクレゾールの *o*-, *m*-, 及び *p*-異性体の分離定量は従来非常に煩雑であつた。現在の局方の規格には定量法として, それらの組成を検定する項目はなく, それに代るべきものとして蒸留試験を採用しているに過ぎない。即ち第(2)項に水蒸気蒸留して得た粗クレゾールは對温蒸留した時, 195~205°の間に86%以上留出しなければならないと規定されているが, それは主と

Fig. 1 Infrared Spectrum of *o*-cresol in CS₂Fig. 2 Infrared Spectrum of *m*-cresol in CS₂Fig. 3 Infrared Spectrum of *p*-cresol in CS₂

* 東京大学工学部工業分析化学教室

して *m*-異性体 (b. p. 202.2°) が比較的多量に含有されている必要があるためと解される。即ち *m*-異性体は他の異性体に比し消毒力が最も優れ且毒性が最も少いので、その含有量が大きであることが望ましい。しかしこの *m*-異性体に沸点が非常に近接している *p*-異性体 (b. p. 201.9°) は当然同時に留出する事が予想され又 *o*-異性体 (b. p. 191.0°) は上記の沸点範囲外ではあるが蒸留の際多少混入する事も考えられる。

最近の赤外線吸収スペクトル分析法 (以下 IR と略記) の発達により、これら異性体の定量が迅速、簡単に行えるようになったので¹⁾ 筆者等は定量法第 (2) 項により 195~205° で留出した液を試料として、IR によつて *o*-、*m*- 及び *p*- 異性体の含量比を求め、これらの変動を考察し、更に細菌の効力試験による石炭酸係数との関係を検討した。なおその際別に *o*-、*m*- 及び *p*- 各異性体の標準物質を混合した標準混合試料を、IR により定量し、Youden の方法²⁾ により検定しその標準偏差を求め、IR による時はいかなる精度で分析しうるかの検討も行った。

実験の部

(1) 実験装置 東京大学工学部総合試験所の Baird 製の記録式赤外線分光器を用いた。試料容器には岩塩の窓をもつ液層の厚さ約 0.1mm のものを使用した。

(2) 標準物質 標準物質としては、東京大学工学部工業分析化学教室所有の *o*-、*m*-、及び *p*- クレゾール標準物質を用いたが、これらの 2-16 μ 間の赤外線吸収スペクトルは Fig. 1~Fig. 3 の如くであつて本実験の目的を満足するに充分な程純粋であつた。溶媒には二硫化炭素を用いた。

(3) 試料 試料としては、日局クレゾール石鹼液定量法第 (2) 項³⁾ によつて調温蒸留した際、195~205° で留出した液を使用した。

(4) 実験操作 溶媒の二硫化炭素をそれぞれの試料容器に入れ試料光路及び補償光路に置いた場合を 100% 透過率線としこの状態のまま試料光路にのみ約 1mm の厚さのガラス板を置いた時のカーブを 0% 透過率曲線とした。先ず検量線をかくために各標準物質について次の如き濃度の二硫化炭素溶液を作つた。*o*- 体は 15, 12, 9, 6, 3mg/cc とし、*m*- 及び *p*- 体は 30, 24, 18, 12, 6mg/cc とし、これらを試料容器に入れて吸収を測定し、波長 13.32, 12.97 及び 12.27 μ における吸光度を各々算出し検量線を作製した。

次に各標準物質を秤量混合した標準混合試料を二硫化炭素に溶解し、これを試料容器に入れて吸収を測定しこれら三波長における吸光度を算出し、予め検量線より作製した三元一次方程式に入れて解くか又は検量線のグラフより Daasch の方法⁴⁾ によつて解き、この結果を Youden の方法により検定した。

全く同様にして試料を測定し各異性体の含有量を算出した。

(5) 検量線及び標準混合試料の定量結果 前記の方法で作製した検量線は Fig. 4 の如くで、*o*- 体は 15mg/cc、*m*- 及び *p*- 体は 30mg/cc 迄は Beer の法則に従う事を認めた。

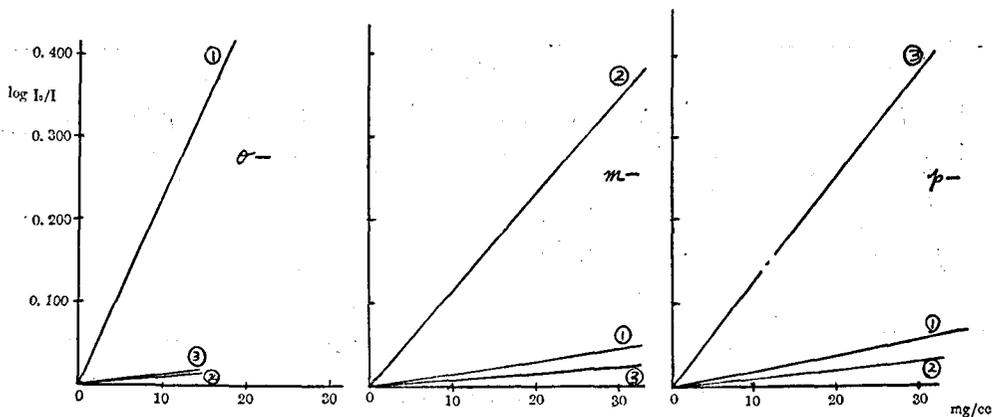


Fig. 4 Working curves of *o*-、*m*-、and *p*- cresol.

① 13.32 μ ② 12.97 μ ③ 12.27 μ

次にこの検量線を用いて標準混合試料を定量した処, Table 1 上段の如き結果を得た.

Table 1 Determination of standard mixture and its test by Youden method.

Sample No.	o-Cresol		m-Cresol		p-Cresol	
	taken	found	taken	found	taken	found
1	5.6	6.3	50.0	50.1	44.4	43.6
2	10.6	10.3	51.2	51.4	38.2	38.3
3	10.8	11.7	43.5	43.8	45.7	44.5
4	14.6	15.5	58.0	56.5	27.4	28.0
5	17.7	18.8	55.6	54.9	26.7	26.3
6	19.7	18.7	53.1	55.2	27.2	26.1
7	24.5	23.9	38.5	38.7	37.1	37.4
8	26.4	26.4	34.8	34.3	38.9	39.3
9	30.1	28.8	29.0	28.8	40.8	42.4
Test by Youden method.	a	1.30		0.16		-0.01
	b	0.930		0.997		0.999
	s _a	0.62		1.85		1.71
	s _b	0.032		0.039		0.046
	s	0.74		1.12		0.97
	t _a *	2.10		0.09		0.00
	t _b *	2.19		0.87		0.03

a: intercept.

s_a, s_b: standard deviation of a and b.

b: slope.

t_a, t_b: value of t-distribution for a and b.

s: standard deviation.

*t₇(0.05)=2.37

(6) Youden の方法による検定 前記の定量結果を Youden の方法で検定した. 即ち今横軸 (x) に秤量混合した o-, m- 又は p- 体の含有率 (%) をとり, 縦軸 (y) に前記の定量結果をとり, それらの 9 点を最小二乗法で curve fitting すれば, 分析方法に正確性がある場合には原点を通る 45° の直線即ち y=x なる直線となるべきである. そこで今 y=a+bx なる直線がえられたとして, a, b を最小二乗法で求め, これらが a=0, b=1 と見做しうるか否かを推定するのである. 第 1 表下段にその結果を示したが, o-, m- 及び p- 体のどの場合でも皆 5% 危険率で y=x 以外の直線であるとは見做し得ず, 正確性のあることが認められる. 又その標準偏差 (s) は o- 体 0.7%, m- 体 1.1%, p- 体 1.0% であつた.

(7) 試料中の各異性体の定量結果及びその考察 前記の試料中の各異性体の定量結果は Table 2 の如くである. なおこの際沸点の近接しているフェノールの混入のおそれが考えられ, この場合は 4 成分系として定量せねばな

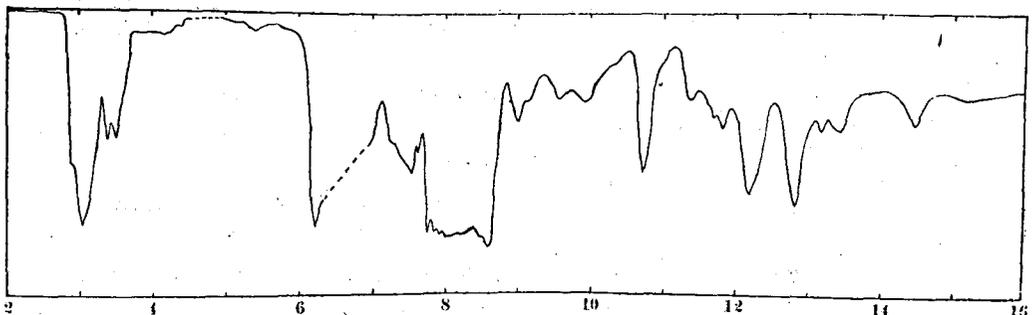


Fig. 5 Infrared Spectrum of Cresol Sample No. 7.

らず、その上フェノールの適当な key band がないために誤差も大となる傾向¹⁾があるが、本実験においては試料の赤外線吸収スペクトル (その一例を Fig. 5 に示す) より判断して、フェノールの混入は無視したので、クレゾール3異性体の3成分系として定量したものである。

Table 2 Determination of Cresol samples

Sample No	Sample taken (mg)	Found (%)		
		<i>o</i> -	<i>m</i> -	<i>p</i> -
7	43.9	7.3	54.8	37.9
8	40.2	7.6	51.8	40.6
9	45.4	10.9	55.4	33.7
10	38.2	21.1	51.0	27.9
11	42.4	16.1	54.0	29.9
12	36.8	10.8	57.0	32.2
13	36.4	8.6	57.0	34.4
14	40.5	26.1	46.3	27.6
15	42.3	7.1	55.1	37.8
16	38.2	5.8	58.6	35.7
17	40.7	6.0	57.7	36.3
18	39.2	13.9	51.3	34.8
20	41.5	20.5	49.6	29.9
21	40.7	9.8	56.4	33.8
22	40.4	9.6	56.0	34.4
*23	38.4	8.5	55.6	35.8
24	41.1	9.4	54.1	36.5
**[23]	38.6	8.0	54.7	37.3

但し上表中 *印は局方蒸留試験第(2)項において留分不足であった。

又**印は試料 No. 23 の蒸留以前のクレゾールを用いた。

これより見るに、各異性体の含量百分率の範囲は *o*-体 6~26%, *m*-体 46~59%, *p*-体 28~41% であり、留出試料中の各成分比の変動は相当の幅を示している。*o*-体が少量混入していた事は筆者等が予期した如くであるが、特に二、三の試料に関しては含有量 20% に及ぶものがあり、195~205° の調整蒸留より得た留出量のみで *m*-, *p*-異性体の含量を推定する事は困難である事を認めた。

次に No. 23 の試料の定量結果より蒸留試験不合格品であつても必ずしも *m*-体の含量が少くとは限らず、例えば No. 7, No. 24 の試料等と殆ど等量であり又 No. 14, No. 20 等より多い。そこで念のためこの不合格品の蒸留以前のクレゾール液を同様に分析した処、(No. [23]) の如き結果を得た。この結果より蒸留の前後で試料の組成は殆ど同一であり、しかも合格品と組成的に何等変らないように考えられる。不合格品の分析例が僅か一例であるので断定を下す事はできないが、蒸留試験によつて合否を判定して来た従来の試験法に *m*-及び *p*-異性体の含量を判定するとか、又は *m*-分の半定量という意味があるのであれば不適當と考えられ、他の方法例えば個人差がなく簡単に迅速正確に定量できる IR の方が望ましい。

(8) 細菌による効力試験結果 前記試料中次の5種を選び、元のクレゾール石鹼液について細菌による効力テストを消毒薬(衛生)検査指針に準拠して試みた結果は次の Table 3 の如くであつた。

Sample No.	<i>m</i> -percent. by IR	Phenol Coefficients
8	51.8	2.0
10	51.0	1.6
12	57.0	2.0
13	57.0	2.4
14	46.3	2.0

この結果より *m*-量又は三成分比と石炭酸係数との間の相関関係を見出すことができなかった。試験回数も未だ不十分であり、更に検討を続ける必要があるが石炭酸係数の測定は非常に煩雑で且長時間かかり、熟練を要する欠点があるので効力の判定の方法としては不適當と思

われ, IR によつて三成分比を定量し, 検定の基準とする方がよいと考えられる。

本研究に激励御配慮を賜つた刈米所長, 並びに赤外線分光器使用に御便宜を頂いた 東京大学工学部応用化学科 宗宮尚行教授に厚く御礼申上ます。又クレゾールの試料を提供された当所森技官に謝意を表する。

総 括

(1) 日局クレゾール石鹼液定量法第(2)項による留出液 10 数種類について, その中のクレゾール各異性体を定量した結果, その組成比の範囲は *o*-体 6~26%, *m*-体 46~59%, *p*-体 28~41% であつた。

(2) 上記蒸留試験のみで *m*-分又は *m*-及び *p*-分の含量を推定することは困難であることを認めた。

(3) 上記蒸留試験の不合格品は一例しかなかつたが, それは合格品との間に異性体の成分比の差異が認められなかつた。又, それは蒸留前のものの成分比とも殆ど差異がなかつた。

(4) 標準混合試料 9 種の定量を行つたが, その結果を Youden の方法で検定したところ標準偏差は *o*-体 0.7% *m*-体 1.1%, *p*-体 1.0% で, 偏りもなく IR は優秀な分析法であることをみとめた。

(5) 細菌による効力試験を試みたが, 試料中の *m*-含有量又は三成分の組成のいずれとも相関関係をみとめることができなかつた。

文 献

- (1) Wiffen. D. H., Thompson. H. W.: J. Chem. Soc., 268(1945).
- (2) Friedel. R. A., Pierce. L., McGovern. J. J.: Anal. Chem., 22, 1408(1950).
- (3) 武内, 倉谷; 工化, 54, 715(1951).
- (4) Youden. W. J.: Anal. Chem., 19, 946(1947).
- (5) 第六改正日本薬局方, p. 143.
- (6) Daasch. L. W.: Anal. Chem., 19, 779(1947).
- (7) 田中: 分析化学, 2, 109(1955).

Summary

By infrared spectroscopy, we examined the determination of three isomers of cresol distillates, which were gained from saponated cresol solutions of Japanese Pharmacopoeia quality by the test method described at purity test (2) in J. P.. On the other hand the phenol coefficients of these samples were determined.

As the results, we found the quantities of isomers varied in wide range such as *o*-isomer 6~26%, *m*-isomer 46~59%, *p*-isomer 28~41%, and these standard deviations were *o*-isomer 0.7%, *m*-isomer 1.1%, *p*-isomer 1.0%. One sample which failed in the above-mentioned purity test had the components ratio similar to samples complied with J. P..

We could not find any relation between the components ratio and phenol coefficients of cresols distillates.

Infrared spectroscopy seems to be excellent as the determination method of cresol isomers in accuracy, personal difference, and in time.

Received February 29, 1956

赤外線吸収スペクトル分析の医薬品試験における応用 (第2報)

補償法による安息香酸中のフェノバルビタールの定量

板井 孝信, 大場 琢磨, 田中 誠之*

Application of Infrared Absorption Spectroscopy to Examination of
Drugs and their Preparations. II.Determination of Phenobarbital in the Mixture with Benzoic Acid by
Differential Method

Takanobu ITAI, Takuma ŌBA and Shigeyuki TANAKA.

まえがき 製剤中の2成分を分離定量する事は, 一般に煩雑困難な手段を要する場合が多いが, 赤外線吸収スペクトルを利用して分析を行うと, 簡単に解決する場合がある. 本実験においては, 安息香酸とフェノバルビタールが, ある割合で混合されている試料について, この赤外線吸収スペクトル分析を適用した処, 成功した. 普通フェノバルビタール (以下Pと略記) と安息香酸 (以下Bと略記) の分離定量を行うには, 重碳酸ナトリウム溶液として, エーテルと振つて, エーテル層にPのみを移すのである. しかしこの際, 重碳酸ナトリウムの一部は分解して炭酸ガスが発生し, 炭酸ナトリウムとなり, これがPを水層に導入して, 定量を不可能にする恐れがある.

実験の部

(1) 実験装置 東京大学工学部総合試験所の Baird 製記録式赤外線分光器を用いた. 又試料容器には岩塩の窓を持つ液層約0.5mmのものを使用した.

(2) 標準物質 安息香酸 mp. 122.5° 及びフェノバルビタール mp. 175.5° を使用した.

(3) 定量法の選定 まずB及びPの標準物質の赤外線吸収スペクトルを Nujol 法により測定した処, Fig. 1 及び Fig. 2 のようになった. これにより互に重複しない特性吸収をBは8.4 μ , 10.7 μ , 及び14.2 μ に, Pは8.0 μ , 8.2 μ , 12.0 μ , 13.0 μ 及び14.0 μ に有している事が認められ, これらの波長を用いれば, その定量分析は容易であると思われた. しかるに固体試料の定量分析は一般に溶液として行うのであるが P は通常の赤外用溶媒 (例えば二硫化炭素又は四塩化炭素) には不溶であり, 僅かにクロロホルムに少量溶解するのみであつた. 止むを得ず, クロロホルム溶液を採用したのであるが, クロロホルムは Fig. 3 のような吸収を示すため, Fig. 1 より最もよい key band と思われる8.0 μ を始め, 8.2 μ , 12.0 μ , 13.0 μ 及び14.0 μ の特性吸収が溶媒の強い吸収と重複し使用不能であつた. 実際クロロホルム溶液で測定した結果は Fig. 4(a), (b) の如くである.

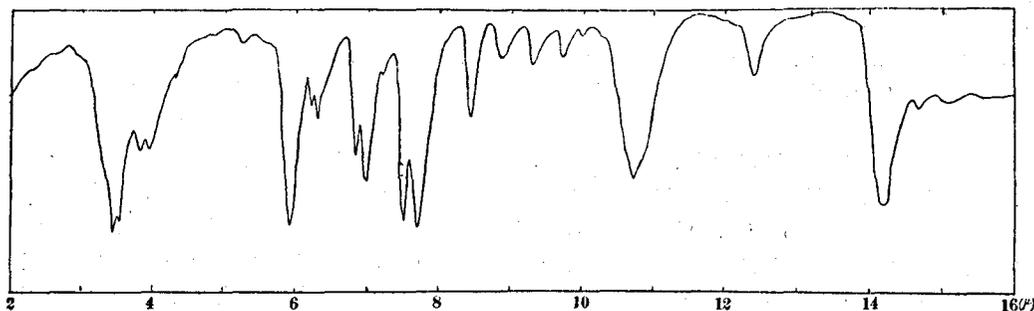


Fig. 1 Infrared Spectrum of Benzoic acid in Nujol

* 東京大学工学部工業分析化学教室

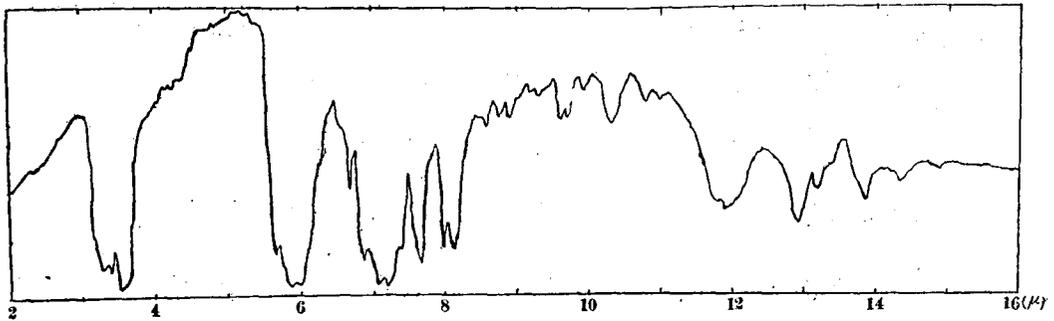


Fig. 2 Infrared Spectrum of Phenobarbital in Nujol

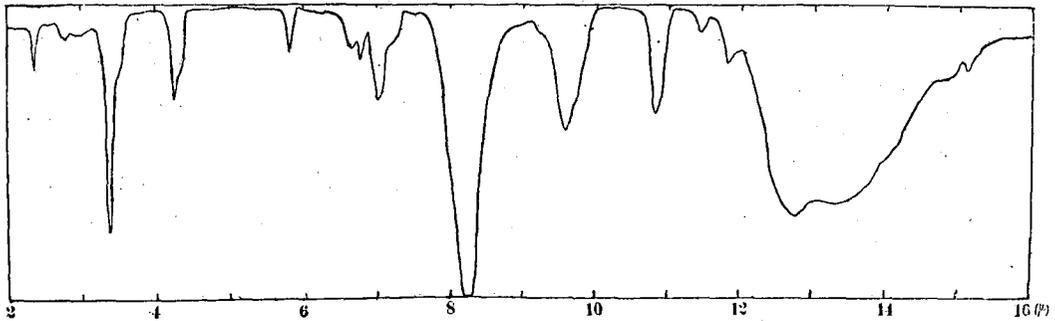
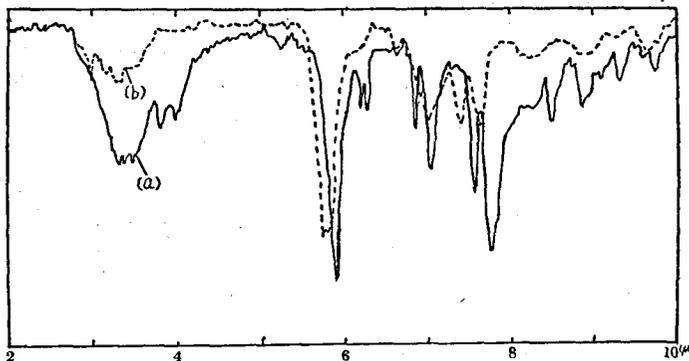


Fig. 3 Infrared Spectrum of Chloroform (cell thickness. 0.1mm)

Fig. 4 (a) Infrared Spectrum of Benzoic acid in CHCl_3 (1.25%)(b) Infrared Spectrum of Phenobarbital in CHCl_3 (2.5%)

は近接し過ぎて、通常法では殆ど重複するため使用困難であるが、補償法を適用すれば、定量可能であると思われたので、この二者を補償法により定量する事にした。

(4) 補償法による定量結果 補償法²⁾とは品位検定の際によく用いられる方法である。即ち、複光路型(ダブルビーム型)の測定装置を利用して、試料光路側に挿入した試料溶液中に含有されると思われるだけの量の純分を補償光路側にも溶液として挿入し、純分の吸収による影響を相殺して、不純分による吸収のみを明確に強く記録させ、不純分を精度よく微量迄求める方法である。本実験においては微量迄求める必要はなかつたが、大量成分即ちBの重複した吸収を消去するためにこの方法を用いた。

まず補償液の濃度を key band における透過率がほぼ 30~40%²⁾になるように定めた処、厚さ約 0.1mm の試料容器を使用した際、Bの 20mg/cc クロロホルム溶液が適当であつた。しかしPのクロロホルムに対する溶解度は極めて少なく、飽和濃度附近で操作する事は望ましくないので、試料容器は約 0.5mm の厚みのものを使用する

これよりみるにBの強い特性吸収は選べるがフェノバルビタールの方には良好な key band が見当たらない。しかも供試試料中のフェノバルビタールは15%内外と考えられるので、通常法による時はBの key band の吸光係数より大であるような波長を選ぶ必要がある。そこで通常法によりこの2成分系を定量する事は困難と思われた。しかし Fig. 4を見ると 5.8 μ 附近の二者の特性吸収が僅かずつれている事を認めた。この特性吸収

事とし, 補償液の濃度は 40mg/10cc とする事にした。

次に標準混合試料により検量線を作製した。即ち前記補償液を試料光路及び補償光路に挿入した際の測定結果を 100% 透過率線とし, この状態のまま試料光路側にガラス板を置いて, 0% 透過率線とした。次に, 補償容器はそのまましておいて, 試料光路側には, 前記補償液 5cc に P をそれぞれ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 mg 溶解させた溶液を順次挿入し, 5.85 μ における吸収を測定し, 吸光度を算出した。この際の P の量は B と P の量比が 85:15 附近である事が予め判っていたので, 丁度それを中心にした濃度比 (95:5 ~ 75:25) になるように決めたものである。その検量線は Fig. 5 の如く Beer の法則に従った。この 7 点を最小二乗法で curve fitting し, その標準偏差

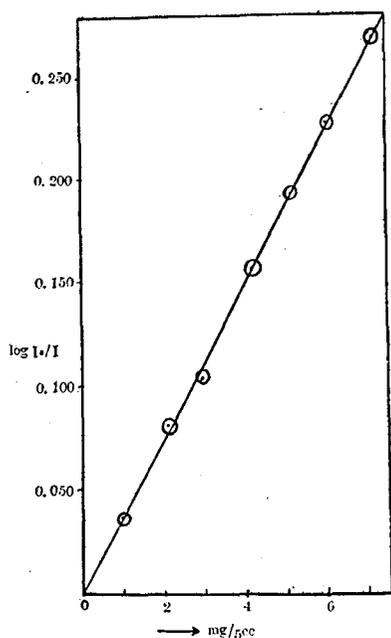


Fig. 5 Working curve of Phenobarbital

を求めた処, 吸光度にして 0.005 となつた。これは P の約 0.15 mg/5cc に当り, 試料は約 22mg/5cc の濃度であるから, この標準偏差は P 含量百分率として約 0.7% である。なおその検知限度を検討した処, B 中の P は 5.85 μ の key band を用いる時は約 0.7% 迄検知しえた。次に製剤試料中より B 及び P の混合物を抽出したもの 22.0mg をクロロホルム 5cc に溶解し, 試料中の B の濃度を補償光路側の B の濃度と略々等濃度になるようにし, 試料溶液とした。この測定結果の吸光度から第 5 図の検量線を用いれば, P の量は 2.5mg で, B の量は 22.0 - 2.5 = 19.5mg となつた。表示量より計算すると P 2.7mg 及び B 19.2mg であつた。

2 成分の組成に対し予備的な知識のない未知試料の分析が必要であつたり, 又 B 中の P の量が相当変動する時は予想した B の量が過小又は過大となるため, 一度で定量値を出す事が困難である。この時には trial and error method によつて再び, 今の結果より調製する未知試料濃度を算出して, 実験を繰返し, 更に正確な値を求める必要が生ずる。しかし測定には僅か 1, 2 分しか必要としないので, それほど煩雑ではない。現在, メトラ型直示天秤もあり, 多数の未知試料の秤量を繰返しても, それ程時間を要しない。製剤類は通常, 品質管理状態にある製品であるから, ほほ含量比は一定しておりこの手続はほとんど不要であると思われる。

この 2 成分系の定量方法としては, 他に紫外外部吸収スペクトル法によるものがあるが, その溶液の pH の調整を嚴重にしないと定量値が変動する事, もし第 3 成分としてクロモフォルを有する不純物が微量でも混入しているときは赤外法に比し重大な誤差の原因となり得る事などの欠点があるので, 赤外法の方が優れているように考えられる。

本研究に激励御配慮を賜つた刈米所長, 並びに赤外分光器使用に御便宜を頂いた東京大学工学部応用化学科宗宮尙行教授に厚く御礼申し上げます。又試料の抽出に協力された当所升田望氏に謝意を表する。

総 括

安息香酸中のフェノバルビタールを赤外線吸収スペクトルにより分析する事を試みた処, 補償法により, 5.85 μ の key band を使用して定量出来る事が判明した。その際の標準偏差は約 0.7%, 検知限度は約 0.7% であつた。

文 献

- (1) 例えば 鎌田, 田中.: 分析化学, 3, 247 (1954)
- (2) 鎌田, 田中, 林原.: 分析化学, 4, 545 (1955)

Summary

The quantity of phenobarbital in the mixture with benzoic acid could be determined by differential method of infrared absorption spectroscopy. The key band at 5.85μ was used, and we found the standard deviation was about 0.7%, the limit of detection was about 0.7%.

Received February 29, 1956

赤外線吸収スペクトル分析の医薬品試験における応用 (第3報)

森永ドライミルク中毒事件*の毒物の分析

板井 孝信, 大場 琢磨, 田中 誠之**

Application of Infrared Absorption Spectroscopy to Examination
of Drugs and their Preparations. III.

Analysis of the Poison in Morinaga's Milk Poisoning Incident

Takanobu I TAI, Takuma ŌBA and Shigeyuki TANAKA

まえがき 赤外線吸収スペクトルを利用して分析を行う際、従来その対象とされているものは主として有機化合物であり、無機化合物の分析に応用した例はあまり多くない。これは従来の化学分析法が無機化合物に対しては非常に有効であり、特に金属イオンの分析法に関しては他の方法を必要としない程完成しているためもあるが、一方赤外線吸収スペクトルの面からみても、無機化合物に対しては、その分析に利用し難い点があるためである。赤外線吸収スペクトルでは金属イオンの判定ができず、僅かに多原子よりなる陰イオンの分析は可能であるが、無機化合物は一般に有機化合物に比し特性吸収が少く、又吸収が broad である。次に無機化合物は通常主として固体であるから、測定の際何かに溶解する事が望ましい。しかし、これらは赤外的に不適當である水には簡単に溶解するが、赤外用溶媒¹⁾には不溶であり、測定の際は Nujol ペーストとして測定するよりほか方法がないので、定量的に取扱い難い。

このような理由で、一般に無機化合物に対する応用例は多くないが、時として赤外線吸収スペクトルの利用により、他の方法では解決困難な問題を容易に解く事ができる場合もある。筆者等は森永ドライミルク中毒事件の毒物の分析に、この赤外線吸収スペクトルを利用した処、迅速簡単に成果をあげる事ができたので赤外線吸収スペクトルを利用した無機化合物の分析の一例として、ここに報告する。

実験の部

(1) 実験装置 東京大学工学部総合試験所の Baird 製記録式赤外線分光器を使用した。

(2) 標準物質 第二磷酸ナトリウム ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)、第二砒酸ナトリウム ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 及び弗化ナトリウム (NaF) は特級試薬を用い、第三磷酸ナトリウム ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)、及び第三砒酸ナトリウム ($\text{Na}_3\text{AsO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) は当所に於て精製したものをを使用した。

(3) 試 験 森永ミルク中毒事件の毒物 No. B を使用した。これを固体状の無機化合物で、化学分析により磷酸ナトリウム及び砒酸イオンが検出されていた。

(4) 測定方法 所謂 Nujol 法を適用した。即ち試料及び標準物質はすべて乳鉢で細粉とし、流動パラフィンを加えてよく混じ、一様なペースト状になる迄充分にすり、それを二枚の岩塩板の間に、はさんで測定した。

(5) 実験結果及び考察

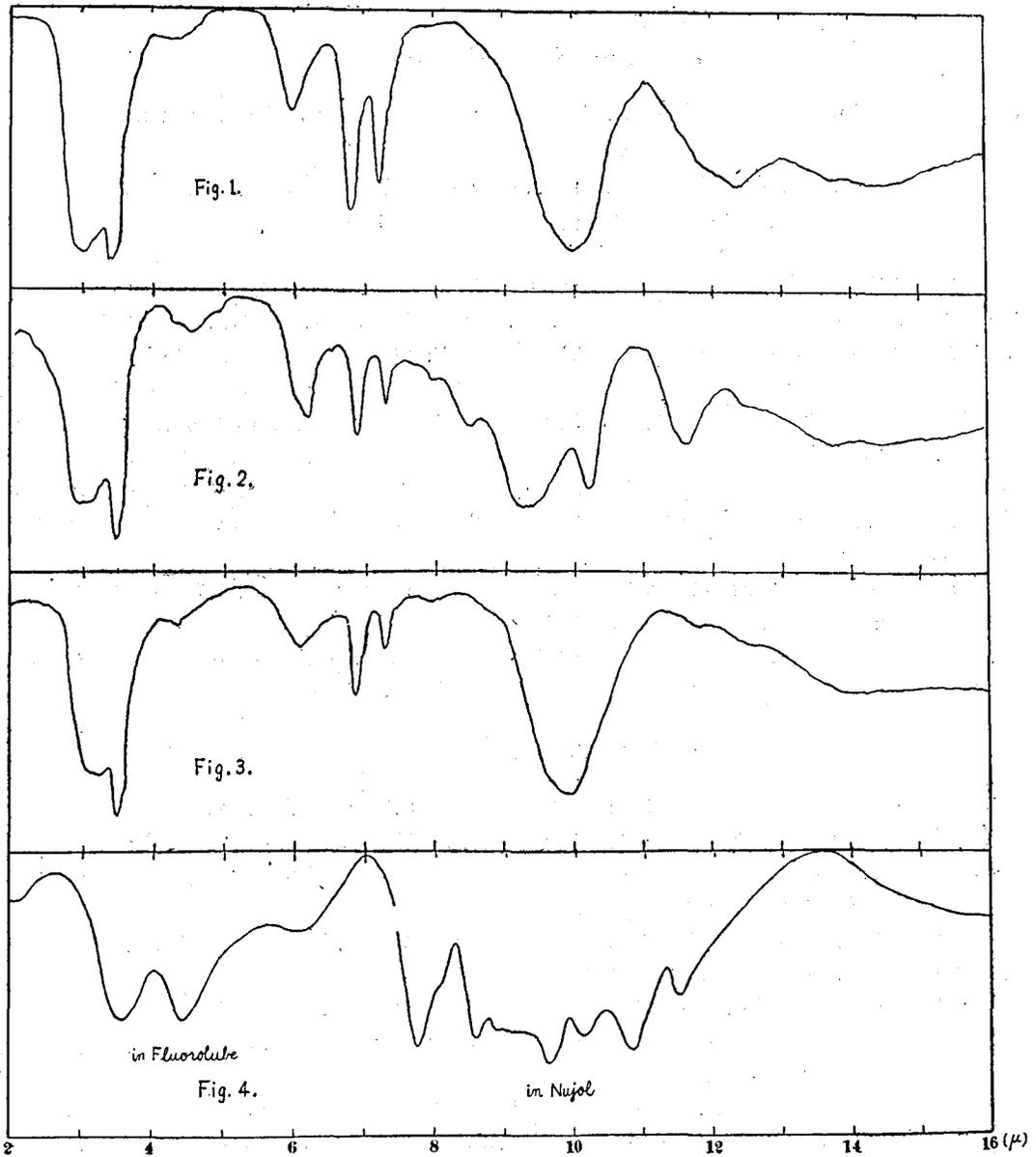
(i) 毒物の定性分析 まず試料のスペクトルを測定した処、Fig. 1 の如くであつた。この図で 3.0μ 及び 6.0μ の2吸収は結晶水によるもの、 3.4μ 、 6.8μ 、 7.2μ の3吸収は流動パラフィンによるものである。従つて 10.0μ と 12.3μ にある強い broad な吸収が毒物中の無機化合物の陰イオンによるものであらうと思われた。

一方毒物は磷酸ナトリウムが主体である事は予め判明していたので、前記磷酸ナトリウム標準物質の赤外線吸収スペクトルを測定した処、Fig. 2, Fig. 3 の如くなつた。一方、第一磷酸ナトリウムの赤外線吸収スペクトルは文献⁽²⁾によれば Fig. 4 の如くであつた。

即ち第一磷酸ナトリウムは 7.75μ 、 8.55μ 、 8.90μ 、 9.55μ 、 10.15μ 、 10.8μ 、 11.45μ 等に、第二磷酸ナトリウム

* 昭和30年中頃、森永乳業株式会社、徳島工場製の粉ミルクを飲用した四国、中国地方の乳幼児の多数が砒素中毒にかかつた事件で、粉ミルク製造の際に添加した磷酸ソーダ中に砒素の混入していた事に原因した

** 東京大学工学部工業分析化学教室。



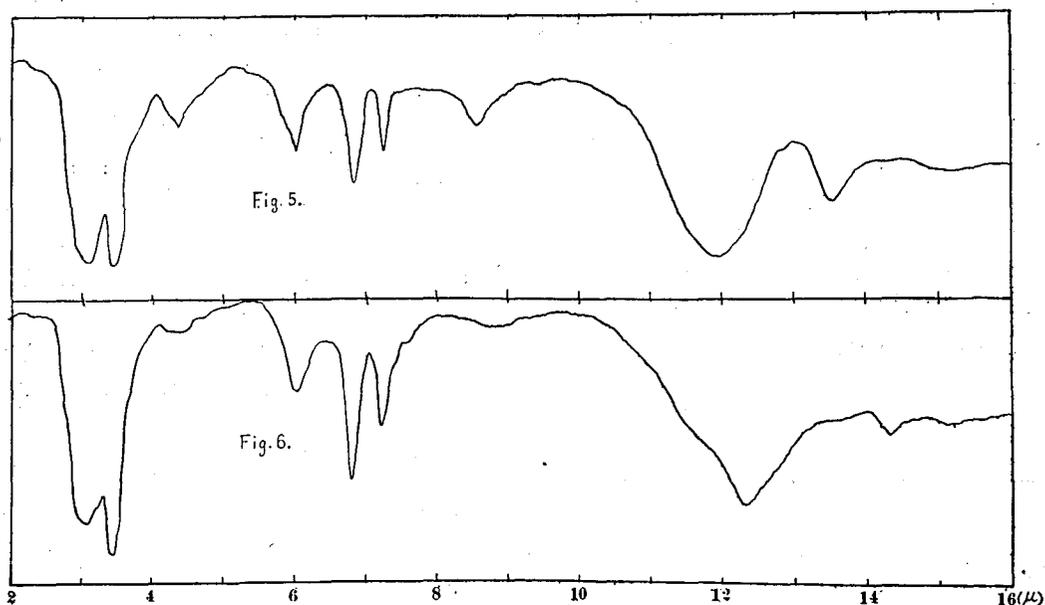
Infrared Spectrum Fig.1 Sample No.B. in Nujol ; Fig.2 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ in Nujol ;
 Fig.3 $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ in Nujol ; Fig.4 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ in Nujol and Fluorolube

には 9.35μ , 10.15μ 及び 11.55μ の 3 波長に、第三磷酸ナトリウムは 10.0μ , 1 波長だけに強い特性吸収を有していた。以上の結果より、毒物中の 10.0μ の吸収は第三磷酸ナトリウムによるものである事は明かであるから、まず毒物の主成分である磷酸ナトリウムは第三磷酸ナトリウムの形で存在していることを確認した。

次に毒物中の毒性物質が磷酸系統であることは化学分析より判明しているもので、これが如何なる形で存在しているかを決定するため検討を行った。第二磷酸ナトリウム及び第三磷酸ナトリウムの標準物質の赤外線吸収スペクト

ルを測定した処, Fig.5 及び Fig.6 の如くなつた。

即ち, 第二砒酸ナトリウムは 8.6μ に弱い吸収があり, 11.95μ 及び 13.5μ に強い吸収があつた。第三砒酸ナト



Infrared Spectrum Fig.5 $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; Fig.6 $\text{Na}_3\text{AsO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$

リウムは 12.3μ に強い吸収があるのみであつた。この2つの図から試料のスペクトル (Fig.1) の 12.3μ の吸収は第三砒酸ナトリウムによる吸収と全く一致した。又念のため Miller²⁾ 等の文献を検討した処, 第二砒酸鉛 (PbHAsO_4) (Fig.7(a)) は特性吸収が 12.5μ にありスペクトルは相当似ているが, 鉛イオンが含まれていない事が予め判明していたので不適當, メタ砒酸ナトリウム (NaAsO_4) (Fig.7(b)) も 12.0μ によく似た吸収があるが, 14.35μ に更に強い吸収があるので不適當であつた。その他 12.3μ にのみ強い吸収のあるものは見当らなかつた。

従つて以上の結果より, 毒性は主として第三砒酸ナトリウム及び第三砒酸ナトリウムよりなる事を認めた。なお他の方法でこの毒物中に弗化ナトリウム (NaF) の存在が認められたとの事であつたが弗化ナトリウムの標準物

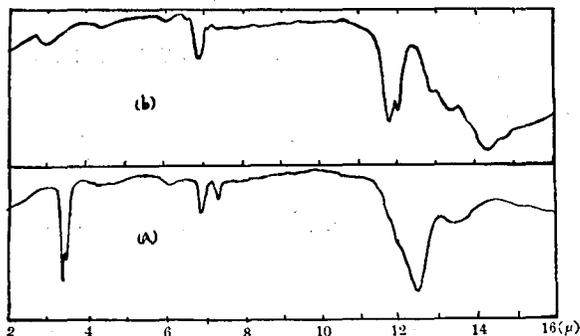


Fig.7 Infrared Spectrum (a) PbHAsO_4 ²⁾
(b) NaAsO_4 ²⁾

質の赤外線吸収スペクトルの測定結果は, $2\sim 16\mu$ の間に何等の吸収も得られなかつたので, 赤外的には存否の判定を行う事ができなかつた。

(ii) 毒物中の第三砒酸ナトリウム及び第三砒酸ナトリウムの含量比の半定量試験 固体化合物特に吸収の broad な無機物を Nujol 法で定量的に取扱う事は非常に困難である。そこで筆者等は臭化カリウム錠剤法により, この定量法を行う予定であるが, 取敢えず, 半定量的に Nujol 法により第三砒酸ナトリウム (以下 A と略記) 及び第三砒酸ナトリウム (以上 B と略記) の含量比の大略の値を出すことを試みた。即

ち, まず, A: B = 8:2 及び A: B = 7:3 の重量比で混合したもの並びに毒物の赤外線吸収スペクトルを測定し, trial and error method により, その波長 10.0μ の吸収強度が大略等しくなるように調整して, 12.3μ の吸収強度を比較した。その結果は Fig.8(a) (b) (c) の如きスペクトルを得, 毒物はこの両者の中間の組成比であつて,

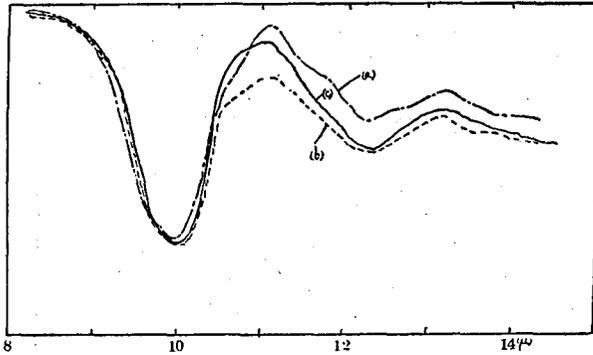
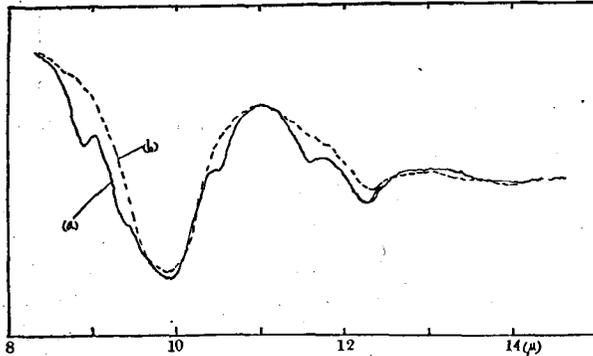


Fig.8 Infrared Spectrum (a) mixture I. (A:B=8:2) in Nujol. ; (b) mixture II. (A:B=7:3) in Nujol. ; (c) Sample No.B in Nujol.



より後者に近い事、結局概ね、A:B=7:3であろうという事が判明した。

次に念のため、第二磷酸ナトリウム(以下Cと略記)も加えた3成分系として、その含量比をA:C:B=6:1:3の重量比で混合した処、Fig.9 (a)の如きスペクトルを得て9.4 μ 、10.15 μ 、11.55 μ にCの吸収が認められた。これらの吸収は試料のスペクトルFig.1にはないものである。しかしA:C:B=6.5:0.5:3.0の如き重量比で混合したものはFig.9 (b)の如きスペクトルを与え、(a)に認められたCの3吸収は見出し得なかつた。従つてCが5%程度存在する時は、Nujol法では判定できない事になり、毒物中に第二磷酸ナトリウムが少量混在しているか否かは不明であつた。

本実験に激励御配慮を賜つた刈米所長、並びに赤外線分光器使用に御便宜を頂いた東京大学工学部応用化学科宗宮尙行教授に厚く御礼申上ます。又標準物質を提供された当所竹内技官に謝意を表する。

Fig.9 Infrared Spectrum (a) mixture III (A:C:B=6:1:3) in Nujol
(b) Infrared Spectrum of mixture IV (A:C:B=6.5:0.5:3) in Nujol

総 括

森永ミルク中毒事件の毒物の分析を赤外線吸収スペクトルにより行つた処、次の如き結果を得た。

- (1) 毒物の主成分は第三磷酸ナトリウム及び第三砒酸ナトリウムであることを確認した。
- (2) その主成分の含量比の半定量を行つた処、第三磷酸ナトリウムの第三砒酸ナトリウムに対する含量比は概ね7:3程度であつた。

この実験法による結果は化学分析の結果と、ほとんど一致し、その裏付けに役立つ。

文 献

- (1) 例えば、鎌田、田中：赤外線吸収スペクトル測定に必要な試料調製方法、化学の領域増刊 27 p.157
- (2) Miller. F.A., Wilkins. C. H.: Anal. Chem, 24, 1251 (1952)

Summary

The poison in dry milk manufactured by Morinaga, which caused a big poisoning incident, was analyzed by infrared absorption spectroscopy. As the results, (1) it was confirmed that ingredients were trisodium phosphate and trisodium arsenate. (2) After the semi-quantitative determination, we found that the ratio of two components was about 7 to 3.

The results of this examination coincided approximately with the data by chemical assay and were useful for its certification.

Received February 29, 1956

バニリン及びクマリンのポーラログラフィー

佐藤 寿

Polarography of Vanillin and Coumarin

Hisashi SATO

まえがき 1936年, Winkel 及び Proske¹⁾, Semerano 及び Chisini²⁾ は其々バニリンの還元電位を報告し, 更に 1938年, Adkins 及び Cox³⁾ も此れの還元電位について報告している。

クマリンに関しては 1950年, Harle 及び Lyons⁴⁾ 1950年, Čapka⁵⁾ 1951年, Patzak 及び Neugebauer⁶⁾ 1953年, Foffani⁷⁾ が此れの半波電位を報告している。クマリンの誘導体に関しては 1952年, 益子安⁸⁾ 1952年, Patzak⁹⁾ が此れの半波電位を報告している。

著者は高濃度アルコール中に於いて, ヨウ化カリウムを支持塩とする場合のバニリン及びクマリンのポーラログラフィーに就いて種々試みた結果を報告する。

実験の部

(1) 実験材料 バニリン (mp. 82.5°C) 及びクマリン (mp 69.5°C) の純品。

(2) 実験装置及び試薬 ポーラログラフ, 電氣的に温度を $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ に調節可能な恒温箱, 窒素ガス入ポンベ硝子電極 pH 計及び電解瓶等。

試薬は, 無水アルコール (脱アルデヒド無水アルコール), 10%ヨウ化カリウム液, 1%ゼラチン液等。

(3) 実験方法 I. バニリンのポーラログラフ測定法: バニリンの純品約 0.2g を 200cc のメスフラスコ中に秤り, 次に 10%ヨウ化カリウム液 16cc 及び新たに製した 1%ゼラチン液 4cc を加え全量を無水アルコールで 200cc とするとき, 此の原液の濃度は約 0.100% である。次に此の原液を約 0.075, 0.050, 0.025, 0.010 各% に対応する量約 37.5, 25.0, 12.5, 5.0 各 cc ずつメスピペットにて 50cc のメスフラスコへ移し, 更に 10%ヨウ化カリウム液を約 1.0, 2.0, 3.0, 3.6 各 cc ずつ其々のメスフラスコ中へ加え, 次に 1%ゼラチン液を約 0.3, 0.5, 0.8, 1.0 各 cc ずつ其々のメスフラスコ中へ加え, 無水アルコールにて其々のメスフラスコの全量を 50cc とし四つの検液とする。

五つの電解瓶に検液約 5cc を入れ, これにピロガロール液及び検液と同濃度のアルコールで洗った窒素ガスを $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ の恒温箱中で 15 分以上通じて酸素を追い出したのち, 原液を含む五つの検液に就き感度 1/20, $-0.6 \sim -1.6$ ボルト内でポーラログラフを行う。

ここに得たポーラログラムの拡散電流波の最大傾斜点においてその斜傾の方向線に切線を引き, これと残余電流の延長及び上部彎曲部における切線との交点を求め, 両交点間の垂直距離を測定して此の液の波高とする。

II. クマリンのポーラログラフ測定法: クマリンの純品約 0.2g を以下バニリンのポーラログラフ測定法と全く同様の操作で行う。但し感度 1/50, $-0.8 \sim -1.7$ ボルト内でポーラログラフを行う。

III. 半波電位の測定法: ポーラログラフに依つて得られたポーラログラム (電流電圧曲線) より上記作図に依つて得られる半波電位は見掛けの値である。即ちポーラログラムは外部加電圧と電解電流との関係を表しているもので滴下極の電位と電流との関係を示しているものではないから, 半波電位の測定には水銀池が電解液に対し有する単極電位, 即ち飽和甘汞電極に対する電位 (π_A vs. S. C. E) を測定し見掛けの半波電位に代数的補正を施す必要がある。

ポーラログラフの X 回路を使用し $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ に於いて常法に依つて π_A vs. S. C. E を測定し, 次にポーラログラムの上記作図より得られた両交点間の二等分線が傾斜の方向線に引いた切線との交点が示す見掛けの半波電位に此の π_A vs. S. C. E の値を代数的に加える。

IV. 検液の pH 測定法: 予め二点法で良く補正された硝子電極 pH 計で常法に依つて検液の pH を測定する。

(4) 実験結果 上記の方法で得たバニリン及びクマリンの各五つの検液に就いて実験した時の濃度波高 pH 其の他を Table 1. 及び Table 2. に示す。

Table 1 Polarographic Data for Vanillin*

Sample	Concentration		Wave Height, Current		Electrolyte	
	g./dl., %	$\times 10^{-3}$ mol./l., millimol./l.	mm.	μ A.	pH**	Temp. °C
I	0.011	0.72	9.8	0.96	6.9	25 \pm 0.5
II	0.027	1.80	24.7	2.36	//	//
III	0.055	3.60	48.8	4.76	//	//
IV	0.082	5.40	74.5	7.23	//	//
V	0.110	7.20	107.3	10.88	//	//

* mp. 82.5°C

** The pH values were determined with a pH meter.

Table 2 Polarographic Data for Coumarin*

Sample	Concentration		Wave Height, Current		Electrolyte	
	g./dl., %	$\times 10^{-3}$ mol./l., millimol./l.	mm.	μ A.	pH**	Temp. °C
I	0.010	0.54	10.4	2.61	7.0	25 \pm 0.5
II	0.026	1.35	23.8	5.79	//	//
III	0.052	2.70	45.8	11.45	//	//
IV	0.077	4.05	73.3	18.32	//	//
V	0.103	5.40	102.1	25.53	//	//

* mp. 69.5°C

** The pH values were determined with a pH meter.

次に Table 1. 及び Table 2. に示した各濃度に於けるバニリン及びクマリンのポーログラムの一例を Fig. 1. 及び Fig. 2. に示す。

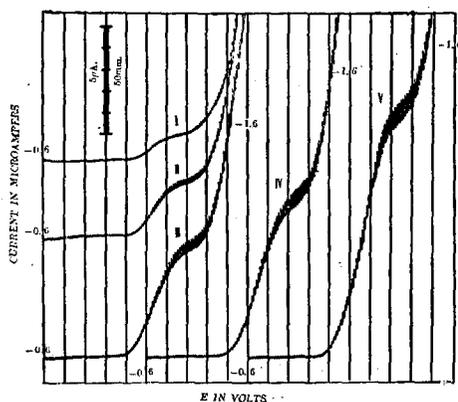


Fig. 1 Polarographic Waves of Vanillin

I.	0.011%	(0.72mmol./liter)
II.	0.027%	(1.80 " ")
III.	0.055%	(3.60 " ")
IV.	0.082%	(5.40 " ")
V.	0.110%	(7.20 " ")
Supporting Electrolyte:	0.048M. KI,	0.02% Gelatine
Sensitivity	:	1/20
Drop Time	:	3 Seconds/1 Drop
pH	:	6.9
Temp.	:	25 \pm 0.5°C

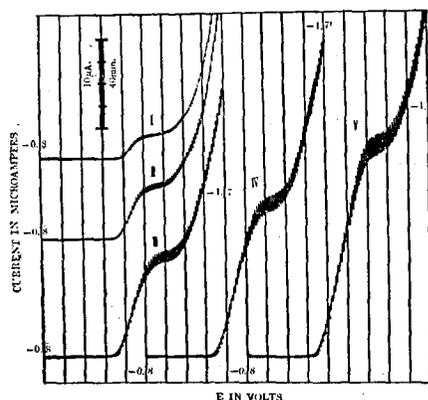


Fig. 2 Polarographic Waves of Coumarin

I.	0.010%	(0.54mmol./liter)
II.	0.026%	(1.35 " ")
III.	0.052%	(2.70 " ")
IV.	0.077%	(4.05 " ")
V.	0.103%	(5.40 " ")
Supporting Electrolyte:	0.048M. KI,	0.02% Gelatine
Sensitivity	:	1/50
Drop Time	:	3 Seconds/1 Drop
pH	:	7.0
Temp.	:	25 \pm 0.5°C

又 Table 1. 及び Table 2. よりバニリン及びクマリンの濃度と波高間の相関係数及び回帰直線を計算した結果を Table 3., Fig. 3 及び Table 4., Fig. 4. に示す。

Table 3. Calculation of Correlation and Regression Coefficients between Wave Height and Concentration of Vanillin

Sample	X	Y	XY	X ²	Y ²
I	11.0	9.8	107.8	121.0	96.0
II	27.4	24.7	676.8	750.8	610.1

Sample	X	Y	XY	X ²	Y ²
Ⅲ	54.8	48.8	2674.2	3003.0	2381.4
Ⅳ	82.1	74.5	6116.5	6740.4	5550.3
Ⅴ	109.5	107.3	11749.4	11990.3	11513.3
Total	284.8	265.1	21,324.7	22,605.5	20,151.1

X = Concentration, mg./dl. of vanillin.

Y = Wave height, mm. " "

\bar{X} = Mean of n observations of X.

\bar{Y} = " " " " Y.

r = Correlation coefficient.

b = Regression " "

Table 3. よりバニリンは n=5 であるから X 及び Y の平均値は其々

$\bar{X} = 57.0$ $\bar{Y} = 53.0$ となる, 以下 Table 3. に従つて計算する.

$(\sum X)^2/n = 16,222.2$, $(\sum Y)^2/n = 14,055.6$, $(\sum X)(\sum Y)/n = 15,100.1$, $\sum(X-\bar{X})^2 = \sum X^2$

$-(\sum X)^2/n = 6,383.3$, $\sum(Y-\bar{Y})^2 = \sum Y^2 - (\sum Y)^2/n = 6,095.5$, $\sum(X-\bar{X})(Y-\bar{Y}) = \sum XY$

$-(\sum X)(\sum Y)/n = 6,224.6$

故に求める相関係数 r は

$$r = \frac{\sum(X-\bar{X})(Y-\bar{Y})}{\sqrt{\sum(X-\bar{X})^2 \sum(Y-\bar{Y})^2}} = 0.998$$

又回帰係数 b は

$$b = \frac{\sum(X-\bar{X})(Y-\bar{Y})}{\sum(X-\bar{X})^2} = 0.975$$

従つて求める回帰直線 Y は

$$(Y-53.0) = 0.975(X-57.0)$$

$$Y = -2.58 + 0.975X$$

回帰直線による推定値 e は

$$e = \frac{\sum(Y-\bar{Y})^2 - \{[\sum(X-\bar{X})(Y-\bar{Y})]^2 / \sum(X-\bar{X})^2\}}{n-2} = 25.7$$

推定値の分散 S_E^2 及び標準誤差 SE は

$$S_E^2 = e/(n-2) = 8.567$$

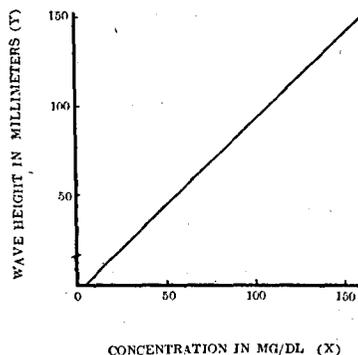


Fig. 3 Relation between Wave height (Y) and Concentration (X) of Vanillin

Regression Line : $Y = -2.58 + 0.975X$

$$SE = \sqrt{e/(n-2)} = 2.927$$

得られた回帰係数 b の有意性を確かめる為に t 検定を行うと

$$t = \frac{b\sqrt{\sum(X-\bar{X})^2}}{\sqrt{e/(n-2)}} = 26.614$$

自由度 $n-2=3$ に対する $t=26.614$ の危険率 α は分布表より $\alpha < 1\%$ であるから、従つて此の回帰係数は有意である。

Table 4. Calculation of Correlation and Regression Coefficients between Wave Height and Concentration of Coumarin

Sample	X	Y	XY	X ²	Y ²
I	10.3	10.4	107.1	106.1	108.2
II	25.8	23.8	614.0	665.6	566.4
III	51.5	45.8	2358.7	2652.3	2097.6
IV	77.3	73.3	5666.1	5975.3	5372.9
V	103.0	102.1	10516.3	10609.0	10424.4
Total	267.9	255.4	19,262.2	20,008.3	18,569.5

X = Concentration. mg./dl. of coumarin.

Y = Wave height, mm. " "

\bar{X} = Mean of n observations of X.

\bar{Y} = " " " " Y.

r = Correlation coefficient.

b = Regression " "

Table 4. よりクマリンは $n=5$ であるから X 及び Y の平均値は其々

$\bar{X} = 53.6$ $\bar{Y} = 51.1$ となる。以下 Table 4. に従つて計算する。

$$\begin{aligned} (\sum X)^2/n &= 14,354.1, & (\sum Y)^2/n &= 13,045.8, & (\sum X)(\sum Y)/n &= 13,684.3, & \sum(X-\bar{X})^2 &= \sum X^2 \\ & - (\sum X)^2/n &= 5,644.2, & \sum(Y-\bar{Y})^2 &= \sum Y^2 - (\sum Y)^2/n &= 5,523.7, & \sum(X-\bar{X})(Y-\bar{Y}) &= \sum XY \\ & - (\sum X)(\sum Y)/n &= 5,577.9 \end{aligned}$$

故に求める相関係数 r は

$$r = \frac{\sum(X-\bar{X})(Y-\bar{Y})}{\sqrt{\sum(X-\bar{X})^2 \sum(Y-\bar{Y})^2}} = 0.999$$

又回帰係数 b は

$$b = \frac{\sum(X-\bar{X})(Y-\bar{Y})}{\sum(X-\bar{X})^2} = 0.988$$

従つて求める回帰直線 Y は

$$(Y-51.1) = 0.988(X-53.6)$$

$$Y = -1.86 + 0.988X$$

回帰直線による推定値 e は

$$e = \sum(Y-\bar{Y})^2 - \{[\sum(X-\bar{X})(Y-\bar{Y})]^2 / \sum(X-\bar{X})^2\} = 11.3$$

推定値の分散 S_E^2 及び標準誤差 SE は

$$S_E^2 = e/(n-2) = 3.767$$

$$SE = \sqrt{e/(n-2)} = 1.941$$

得られた回帰係数 b の有意性を確かめる為に t 検定を行うと

$$t = \frac{bv\sqrt{\sum(X-\bar{X})^2}}{\sqrt{e/(n-2)}} = 38.241$$

由自由度 $n-2 = 3$ に対する $t = 38.241$ の危険率 α は t 分布表より $\alpha < 1\%$ であるから、従つて此の回帰係数は有意である。

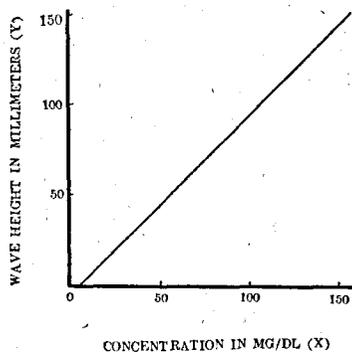


Fig. 4 Relation between Wave Height (Y) and Concentration (X) of Coumarin

$$\text{Regression Line : } Y = -1.86 + 0.988X$$

次にバニリン及びクマリンの各濃度に於ける半波電位 ($E^{1/2}$ vs. S. C. E), 波高即ち拡散電流 (i_d) 等の関係を Table 5., Table 6. に示す。

Table 5. Polarographic Behavior of Vanillin* in 90 Per Cent Ethanol

Compound	pH	$-E^{1/2}$ (vs. S. C. E), V.	i_d microamp.	C mmoles/liter	i_d/C
In 0.048M. KI-90% Ethanol**					
Vanillin	6.9	1.51	0.96	0.72	1.33
"	"	1.51	2.36	1.80	1.31
"	"	1.52	4.76	3.60	1.32
"	"	1.53	7.23	5.40	1.30
"	"	1.55	10.88	7.20	1.50
		Av. 1.52			Av. 1.35

* mp. 82.5°C

** 0.02% gelatine present.

Table 6. Polarographic Behavior of Coumarin* in 90 Per Cent Ethanol

Compound	pH	$-E^{1/2}$ (vs. S. C. E), V.	i_d microamp.	C mmoles/liter	i_d/C
In 0.048M. KI-90% Ethanol**					
Coumarin	7.0	1.63	2.61	0.54	4.83
"	"	1.63	5.79	1.35	4.29
"	"	1.63	11.45	2.70	4.24
"	"	1.66	18.32	4.05	4.52
"	"	1.68	25.53	5.40	4.73
		Av. 1.65			Av. 4.52

* mp. 69.5°C

** 0.02% gelatine present.

考 察

Table 3, Table 4 より其々バニリン及びクマリンの濃度, 波高間の相関係数は, $r=0.998$ 並びに $r=0.999$ である. 此等の相関係数の有意性を確かめると $n-2=3$ に対する危険率 α は相関係数表より何れも $\alpha < 1\%$ であるから, 両相関係数とも有意である. 即ち濃度, 波高間に充分相関々係があるから本ポーラログラフ法に依つてバニリン及びクマリンの定量は可能である. 尙此の際には Fig. 3, Fig. 4 の関係を利用すればバニリン及びクマリンを含む其々の Sample より容易に定量出来る. 但し両者が混合している Sample の場合には此れ等の半波電位が相当接近している関係上 (Table 5, Table 6 参照) 両者の分離定量は困難である.

総 括

バニリン (mp 82.5°C) 及びクマリン (mp 69.5°C) の純品の各濃度に於ける電解液 (0.048 モルのヨウ化カリウム及び 0.02 % のゼラチンを含む 90 % エタノール液) に就いて, ポーラログラフを行つた結果, 両者とも濃度, 波高間に充分なる相関々係を有し (Table 3, Table 4 参照) その回帰直線を求めて (Fig. 3, Fig. 4 参照) 両者の定量可能なる事を示した.

バニリンの半波電位は濃度 0.72~7.20 ミリモルに於いて $-1.51 \sim -1.55$ ボルト, 電解液の pH は 6.9 (Table 5 参照), 又クマリンの半波電位は濃度 0.54~5.40 ミリモルに於いて $-1.63 \sim -1.68$ ボルト, 電解液の pH は 7.0 (Table 6 参照) であつた. 尙本ポーラログラフに使用した毛細管の特性は次の通り:

$$\text{水銀流出量} = 1.80 \times 10^{-3} \text{g. sec.}^{-1}$$

$$\text{滴下時間} = 3.00 \text{sec. / 1 drop}$$

此れら及び Table 5, 6. より拡散電流恒数 ($I_d = id/Cm^{2/3}t^{1/6}$) を求めた結果, バニリンは 0.76, クマリンは 2.54 であつた.

本研究に際して種々御高配を戴いた 療品部長藤井正道博士に感謝の意を表します. 純度試験をされた柴崎利雄技官に感謝します.

文 献

- 1) Winkel, A., and Proske, G.: Ber., 69, 1917~29(1936).
- 2) Semerano, G., and Chisini, A.: Gazz. chim. ital., 66, 510~18(1936).
- 3) Adkins, H., and Cox, F.W.: J. Am. Chem. Soc., 60, 1151~59(1938).
- 4) Harle, A.J., and Lyons, L.E.: J. Chem. Soc., 1575~78(1950).
- 5) Čapka, O.: Collection Czechoslow. Chem. Commun., 15, 965~71(1950); C. A., 46, 4925f (1952).
- 6) Patzak, R., and Neugebauer, L.: Monatsh., 82, 662~70 (1951); C. A., 46, 7904e (1952).
- 7) Foffani, A.: Atti accad. nazl. Lincei, Rend., Classe sci. fis., mat. e nat., 14, 418~23 (1953); C. A., 47, 8587b (1953).
- 8) Mashiko, Y.: J. Pharm. Soc. Japan, 72, 18~21 (1952); C. A., 46, 6325g (1952).
- 9) Patzak, R., and Neugebauer, L.: Monatsh., 83, 776~85 (1952); C. A., 47, 5274h (1953).

Summary

This Paper presents the polarography of vanillin and coumarin.

Both compounds yield a well-defined polarographic wave in 90 per cent ethanol, when 0.048 M. potassium iodide is the inert electrolyte. (cf. Figures 1 and 2.)

Both wave heights are proportional to the concentrations. (cf. Tables 3 and 4, Figures 3 and 4.)

Possible applications to qualitative and quantitative analyses of both vanillin and coumarin are suggested by the polarographic results obtained.

The reductions of vanillin and coumarin were carried out at -0.6 to -1.6 volts and -0.8 to -1.7 volts.

Data obtained on vanillin and coumarin under various conditions showed in Tables 5 and 6.

The capillary had the following characteristics: $m=1.80 \times 10^{-3}$ g. sec. $^{-1}$, $t=3.00$ sec. / 1 drop.

The diffusion current constants ($id/Cm^{2/3}t^{1/6}$) of vanillin and coumarin obtained by calculations were 0.76 and 2.54.

Received February 29, 1956

パラニトロフェネトールのポーラログラフィー

佐藤 寿

Polarography of *p*-Nitrophenetol

Hisashi Sato

まえがき パラニトロフェネトールは Chloro-benzene 或は Phenol をニトロ化した後、生じた *o*, *p* 異性体中、*p* 体のみ取り出し触媒或は加圧下に Ethanol 或は Ethylhalide でエトキシ化したもので、更に還元すれば *p*-Phenetidine となり、此れよりフェナセチン或はズルチンを製する。全く同様な方法でニトロフェノールをメトキシ化したニトロアニソールのポーラログラフィーに就いては Page 等⁽¹⁾の報告があり、ニトロフェノールのみに就いては Pearson⁽²⁾の報告もある。著者は本品のポーラログラフィーに就いて種々試みた結果を報告する。

実験の部

(1) 実験材料. パラニトロフェネトール (mp 58.5°C) の純品.

(2) 実験装置及び試薬 ポーラログラフ, 電氣的に温度を $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ に調節可能な恒温箱, 窒素ガス入ボンベ硝子電極 pH 計及び電解瓶等.

試薬は, 無水アルコール (脱アルデヒド無水アルコール), 13.4%塩化アンモニウム液, 1%ゼラチン液, Britton & Robinson の緩衝液⁽³⁾等.

(3) 実験方法 I. パラニトロフェネトールのポーラログラフ測定法: パラニトロフェネトールの純品 0.1857 g (11.1 ミリモル) を 100cc のメスフラスコ中に秤り, 次に無水アルコールを加えて全量を 100cc とする. 此の Stock Soln. 中の 4.5cc をメスピペットにて五つの 50cc のメスフラスコへ移し, 次に Britton & Robinson 緩衝液 pH 2.20, 4.50, 7.50, 9.75, 11.05 のものを各 5cc ずつメスフラスコ中へ加え, 更に 13.4% 塩化アンモニウム液 5cc を加えた後, 無水アルコールにて其々のメスフラスコの全量を 50cc とし五つの検液とする.

五つの電解瓶に検液約 5cc を入れ次に 1%ゼラチン液各 2 滴を加え, これにピロガロール液及び検液と同濃度のアルコールで洗った窒素ガスを $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ の恒温箱中で 15 分以上通じて酸素を追い出したのち五つの検液に就き感度 1/50, $\pm 0 \sim -1.5$ ボルト内でポーラログラフを行う.

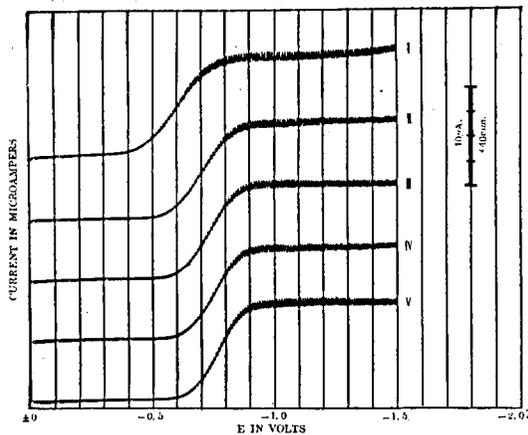
ここに得たポーラログラムの拡散電流波の最大傾斜点においてその傾斜の方向線に切線を引き, これと残余電流の延長及び上部彎曲部における切線との交点を求め兩交点間の垂直距離を測定してこの液の波高とする.

II. 半波電位の測定法: ポーラログラフに依つて得られたポーラログラム (電流電圧曲線) より上記作図に依つて得られる半波電位は見掛けの値である. ポーラログラムは外部加電圧と電解電流との関係を表しているもので滴下極の電位と電流との関係を示しているものではないから, 半波電位の測定には水銀池が電解液に対し有する単極電位, 即ち飽和甘汞電極に対する電位 (π_A vs. S. C. E) を測定し, それだけ見掛けの半波電位に代数的補正を施す必要がある.

ポーラログラフの X 回路を使用し $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ に於いて常法に依つて π_A vs. S. C. E を測定し, 次にポーラログラムの上記作図より得られた兩交点間の二等分線が傾斜の方向線に引いた切線との交点が示す見掛けの半波電位に此の π_A vs. S. C. E の値を代数的に加える.

III. 検液の pH 測定法: 予め二点法で良く補正された硝子電極 pH 計で常法に依つて検液の pH を測定する.

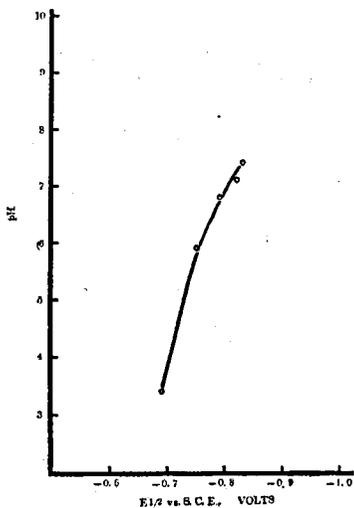
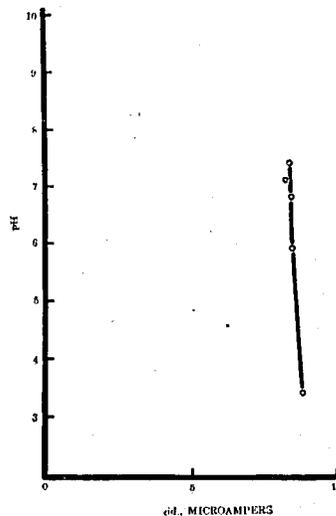
(4) 実験結果 上記の方法で得たパラニトロフェネトールの五つの検液に就いて得たポーラログラムを Fig. 1. に示す. 又 pH 及び半波電位間の関係を Fig. 2. に pH 及び拡散電流間の関係を Fig. 3. に示す.

Fig. 1 Polarographic Waves of *p*-Nitrophenetole

I.	pH 3.4,	1mmol./liter
II.	" 5.9,	" "
III.	" 6.8,	" "
IV.	" 7.1,	" "
V.	" 7.4,	" "

Supporting Electrolyte : 0.25M. NH_4Cl , 0.01% Gelatine, 0.04 M. Britton & Robinson Buffers

Sensitivity : 1/50
 Drop Time : 3 Seconds/1 Drop
 Temp. : $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$

Fig. 2 Half-Wave Potential vs. pH for:
p-Nitrophenetole. 1 mmole/literFig. 3 Diffusion Current vs. pH for:
p-Nitrophenetole. 1 mmole/liter

次にパラニトロフェネトールの1ミリモル濃度の各pHに於ける半波電位 ($E_{1/2}$ vs. S. C. E.), 波高即ち拡散電流 (i_d) 等の関係を Table 1. に示す.

Table 1. Polarographic Behavior of *p*-Nitrophenetole* in 80 Per Cent Ethanol

Compound	pH	$-E^{1/2}$ (vs. S. C. E), V.	id microamp.	C mmole/liter	id/C
In 0.25 M. NH_4Cl , 0.04 M. Britton-Robinson Buffers-80% Ethanol**					
<i>p</i> -Nitrophenetole	3.4	0.69	8.79	1	8.79
"	5.9	0.75	8.44	"	8.44
"	6.8	0.79	8.39	"	8.39
"	7.1	0.82	8.20	"	8.20
"	7.4	0.83	8.33	"	8.33

* mp 58.5°C

** 0.01% gelatine present.

考 察

Fig. 1 及び Fig. 2 よりパラニトロフェネトールの半波電位は pH に依つて変動する事は明らかである。即ち pH の値が増加するに従つて負側に移動している。又拡散電流も pH に依つていくらか影響を受けている様である。(Fig. 3 参照) 以上の結果を総合して考えると、パラニトロフェネトールはポーラログラフ法で定量出来ると思われる。

総 括

パラニトロフェネトール(mp. 58.5°C)の純品の濃度1ミリモル及び電解液0.25モルの塩化アンモニウム0.04モルの Britton & Robinson 緩衝液を含む80%エタノール液に就いて、ポーラログラフを行つた結果パラニトロフェネトールの半波電位は pH の増加と共に負側に移動し拡散電流も僅か変化する事を示した。(Fig. 1, Fig. 2., Fig. 3, Table 1. 参照)

パラニトロフェネトール、濃度1ミリモルに於いて pH 3.4~7.4 の半波電位は -0.69~-0.83 ボルト、拡散電流は 8.79~8.33 マイクロアンペアであつた。尙本ポーラログラフに使用した毛細管の特性は次の通り：

水銀流出量 = 1.80×10^{-3} g. sec. $^{-1}$

" 滴下時間 = 3.00 sec. / 1 drop

これら及び Table 1. より拡散電流恒数 ($I_d = id/Cm^{2.316}$) を求めた結果、pH 3.4 では 4.95, pH 5.9 では 4.75, pH 6.8 では 4.72, pH 7.1 では 4.61, pH 7.4 では 4.69 であつた。

本研究に際して種々御高配を戴いた療品部長藤井正道博士に感謝の意を表します。純度試験をされた柴崎利雄技官に感謝します。

文 献

- 1) Page, J. E., Smith, J. W., and Waller, J. G., J. Phys. & Colloid Chem., 53, 545~62 (1949); C. A., 44, 3378f (1950).
- 2) Pearson, J., Trans. Faraday Soc., 44, 692~97 (1948); C. A., 43, 2520d (1949).
- 3) Britton, H. T. S., and Robinson, R. A., J. Chem. Soc., 1456~62 (1931).

Summary

This paper presents the polarography of *p*-nitrophenetole, which is concerned with the study of the dependence of the position and magnitude of the wave on the pH of buffered solutions.

The reductions at the dropping mercury electrode were carried out using 0.25 M. ammonium chloride, 0.04 M. Britton & Robinson buffers in 80 per cent ethanol and voltage span of ± 0 to -1.5.

Data obtained on *p*-nitrophenetole under various conditions showed in Table 1. The flow of

mercury from the capillary was $m=1.80 \times 10^{-3} \text{g. sec.}^{-1}$ and $t=3.00 \text{ sec./1 drop}$.

The diffusion current constants ($id/Cm^{2/3} t^{1/6}$) obtained by calculations were 4.95 (pH 3.4), 4.75 (pH 5.9), 4.72 (pH 6.8), 4.61 (pH 7.1) and 4.69 (pH 7.4).

Received February 29, 1956

γ -B. H. C. 乳剤のポーラログラフ定量法

藤井正道, 佐藤 寿

Polarographic Assay of γ -Benzene Hexachloride (γ -B. H. C.)
in Commercial Emulsions

Masamichi FUJII and Hisashi SATO

まえがき

γ -B. H. C. 乳剤の定量法は W. H. O 国際規格では Stepanow 法⁽¹⁾厚生省: 殺虫剤許可基準では LaClair法⁽²⁾の改良法を用いている。

後者の原理は Cristol のアルカリ分解法⁽³⁾である。ところで市販の γ -B. H. C. 乳剤の中には上記のアルカリ分解法に依つて定量を行うとき赤褐色を呈し、為に滴定が不可能になつて了う場合が少くない、アルカリ分解法に於ける此の欠点を補う為に著者は既に発表した γ -B. H. C. 油剤のポーラログラフ定量法⁽⁴⁾を改良した本ポーラログラフ法で直接市販の γ -B. H. C. 乳剤の定量を行つた處、好成績を得たので報告する。

実験の部

(1) 実験材料 国内 A~N 社製の γ -B. H. C. 10% 乳剤、但し M 社のみは γ -B. H. C. 5% 乳剤である。

(2) 実験装置及び試薬 ポーラログラフ、電氣的に温度を $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ に調節可能な恒温箱、窒素ガス入ボンベ及び電解瓶等。

試薬は γ -B. H. C. (mp. 112.5°C) の純品、無水アルコール (脱アルデヒド無水アルコール)、10% ヨウ化カリウム液、1% ゼラチン液、N/10 アルコール製水酸化カリウム液、稀硝酸 (1:2)、N/10 硝酸銀液、ニトロベンゼン、硫酸第二鉄アンモニウム試液、N/10 硫シアン化アンモニウム液等。

別に比重測定用のピクノメータ、引火点測定用のアベルペンスキー引火点測定装置、pH 測定用の硝子電極 pH 計等。

(3) 実験方法 I. 比重はピクノメータにて常法に依り 15°C に於ける比重を測定した。

II. 引火点はアベルペンスキー引火点測定装置を用い厚生省: 殺虫剤許可基準の方法で測定した。

III. pH (液性) は試料 1 cc をとり予め補正された蒸留水 100 cc に稀釈した液について硝子電極 pH 計で測定した。

IV. ポーラログラフ定量法 (Polarographic Method): 試料 1 cc を 100 cc のメスフラスコ中にとり重量を秤る。次に無水アルコールを加えて全量を 100 cc とする。此の Stock Soln. 中の 20 cc をピペットにて 50 cc のメスフラスコへ移し 10% ヨウ化カリウム液 4 cc 及び新たに製した 1% ゼラチン液 1 cc を加え全量を無水アルコールで 50 cc とし検液とする。

次に γ -B. H. C. の純品約 100 mg を上記と同様に 100 cc の無水アルコールにとかし、此の Stock Soln. 中の 20 cc をピペットにて 50 cc のメスフラスコへ移し、10% ヨウ化カリウム液 4 cc 及び 1% ゼラチン液 1 cc を加え全量を無水アルコールで 50 cc とし標準液とする。

電解瓶に検液約 5 cc を入れ、これにピロガロール液及び検液と同濃度のアルコールで洗つた窒素ガスを $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ の恒温箱中で 15 分以上通じて酸素を追い出したのち検液、標準液に就き感度 1/100、 $-0.2 \sim -1.7$ ボルト内でポーラログラフを行う。

ここに得たポーラログラムの拡散電流波の最大傾斜点においてその傾斜の方向線に切線を引き、これと残余電流の延長及び上部彎曲部における切線との交点を求め、兩交点間の垂直距離を測定してこの液の波高とするとき、次式により試料中の γ -B. H. C. の濃度を算出する。

$$\gamma\text{-B. H. C. (w/w\%)} = \frac{(\text{標準液中の } \gamma\text{-B. H. C. mg.}) \times (\text{検液の波高 mm.})}{(\text{検液中の試料 mg.}) \times (\text{標準液の波高 mm.})} \times 100$$

V. アルカリ分解定量法 (Modified LaClair Method): 試料 1 cc をエルレンマイヤフラスコ中にとり重量を

秤る。次にN/10アルコール製水酸化カリウム液25ccを加え、還流冷却器を付して30分間静かに煮沸する、冷後稀硝酸(1:2)2cc及びN/10硝酸銀液15ccを加え、次にニトロベンゼン2ccを加えて1~2分間強くふりまぜた後過剰の硝酸銀液をN/10硫シアン化アンモニウム液で滴定する(指示薬:硫酸第二鉄アンモニウム試液)、別に同様な方法で対照試験を行うとき次式により試料中の γ -B. H. C. の濃度を算出する。

$$\gamma\text{-B. H. C. (w/w\%)} = \frac{(\text{対照試験 cc.} - \text{本試験 cc.}) \times \text{N/10硫シアン化アンモニウム液の力価} \times 0.009696}{\text{試料 g.}} \times 100$$

(4) 実験結果 上記の方法で得た市販の γ -B. H. C. 乳剤の比重、引火点、pH、ポーログラフ定量法に依る γ -B. H. C. 含量 (Fig. 1, 2, 3, 4 参照) 及びアルカリ分解定量法による γ -B. H. C. 含量並びにアルカリ分解法の定量値に対す本ポーログラフ法の相対精度等を Table 1. に示す。

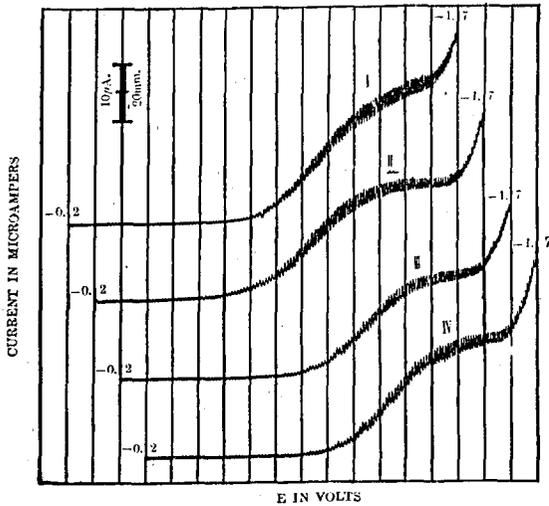


Fig. 1 Polarographic Waves of γ -B. H. C. 10% Emulsions and γ -B. H. C. Standard

- I. Maker A
- II. Maker B
- III. Maker G
- IV. 0.044w/v% Standard

Supporting Electrolyte : 0.8% KI
Sensitivity : 1/100
Drop Time : 3 Seconds/1 Drop
Temp. : 25°C

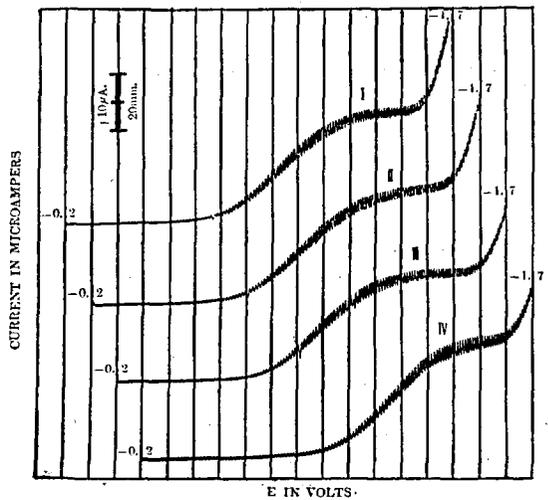


Fig. 2 Polarographic Waves of γ -B. H. C. 10% Emulsions and γ -B. H. C. Standard

- I. Maker D
- II. Maker E
- III. Maker F
- IV. 0.044w/v% Standard

Supporting Electrolyte : 0.8% KI
Sensitivity : 1/100
Drop Time : 3 Seconds/1 Drop
Temp. : 25°C

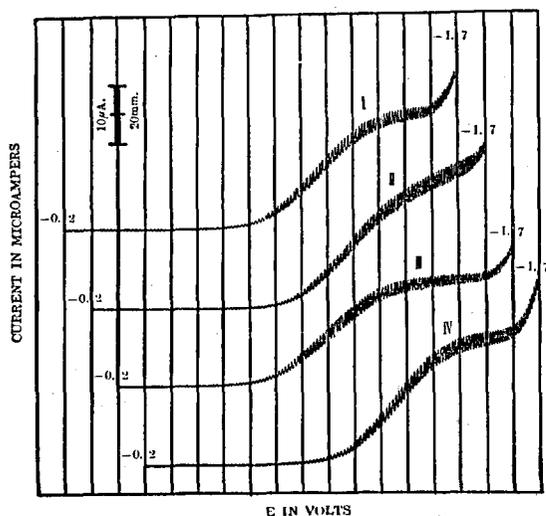


Fig. 3 Polarographic Waves of γ -B. H. C. 10% Emulsions and γ -B. H. C. Standard

- I. Maker H
- II. Maker I
- III. Maker J
- IV. 0.044w/v% Standard

Supporting Electrolyte : 0.8% KI
 Sensitivity : 1/100
 Drop Time : 3 Seconds/1 Drop
 Temp. : 25°C

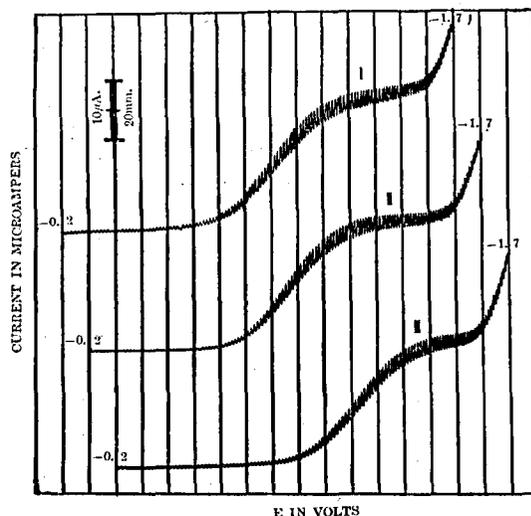


Fig. 4 Polarographic Waves of γ -B. H. C. 5% Emulsions and γ -B. H. C. Standard

- I. Maker K
- II. Maker M
- III. 0.044w/v% Standard

Supporting Electrolyte : 0.8% KI
 Sensitivity : 1/100
 Drop Time : 3 Seconds/1 Drop
 Temp. : 25°C

Table 1. Determination of γ -Benzene Hexachloride (γ -B. H. C.) in Commercial Emulsions

Sample	Maker	Specific Gravity 15°C	Flash-Point °C Abel-Pensky	pH 1% aq. Soln.	γ -B. H. C., %		Recovery, ** %
					Polarographic Method	Modified LaClair (Alkali Labile Chlorine) Method	
γ -B. H. C. 10% Emulsion	A	0.966	39.9	7.5	11.29	11.33	100
"	B	0.917	25.3	5.4	10.67	10.36	103
"	C	0.976	35.0	3.6	11.16	10.54	106
"	D	0.949	27.7	3.8	11.33	10.53	108
"	E	0.936	20.2	4.5	10.53	10.54	100
"	F	0.940	28.5	4.5	10.85	10.94	99
"	G	0.909	24.0	4.2	10.27	10.96	94
"	H	0.943	22.0	3.6	10.61	10.42	102
"	I	1.000	15.3	6.3	9.90	10.28	96
"	J	0.918	23.3	4.0	10.49	10.22	103
"	K	0.940	23.5	3.4	12.19	13.06	93
"	L	0.989	25.5	7.2	8.75*	16.27*	—
γ -B. H. C. 5% Emulsion	M	0.843	35.7	3.8	13.65*	7.56*	—
γ -B. H. C. 10% Emulsion	N	0.926	24.4	4.5	10.48	11.44	92

* Not reliable, interfering with other organic chlorinated compounds.

** % recovery by Polarographic method relative to recovery by modified LaClair method, % polarographically $\times 100/\%$ modified LaClair methodically.

次に Table 1. に於いて L, M 両社を除く他社の両定量法 (本ポーラログラフ定量法及びアルカリ分解定量法) に依る両定量値 (r -B.H.C., %) より両定量法の間に如何なる相関々係が有るか, 又両者間の回帰直線は何う引かれるか計算した処, 次の結果を得た. (Table 2., Fig. 5. 参照)

Table 2 Calculations of Correlation and Regression Coefficients between Per Cent r -B.H.C. by Polarographic and Modified LaClair (Alkali Labile Chlorine) Methods

Sample	X	Y	XY	X ²	Y ²
A	11.29	11.33	127.92	127.46	128.37
B	10.67	10.36	110.54	113.85	107.33
C	11.16	10.54	117.63	124.55	111.09
D	11.33	10.53	119.30	128.37	110.88
E	10.53	10.54	110.99	110.88	111.09
F	10.85	10.94	118.70	117.72	119.68
G	10.27	10.96	112.56	105.47	120.12
H	10.61	10.42	110.56	112.57	108.58
I	9.90	10.28	101.77	98.01	105.68
J	10.49	10.22	107.21	110.04	104.45
K	12.19	13.06	159.20	148.60	170.56
N	10.48	11.44	119.89	109.83	130.87
Total	129.77	130.62	1,416.27	1,407.35	1,428.70

X= r -B.H.C., % for polarographic method. Y= r -B.H.C., % for modified LaClair (alkali labile chlorine) method. \bar{X} =Mean of n observations of X. \bar{Y} =Mean of n observation of Y. r=Correlation coefficient. b=Regression Coefficient.

Table 2. より n=12 であるから X 及び Y の平均値は其々

$$\bar{X}=10.81 \quad \bar{Y}=10.88 \quad \text{となる.}$$

以下 Table 2. に従つて計算する.

$$(\sum X)^2/n=1,403.35, \quad (\sum Y)^2/n=1,421.80, \quad (\sum X)(\sum Y)/n=1,412.55, \quad \sum(X-\bar{X})^2=\sum X^2-(\sum X)^2/n=4.00, \quad \sum(Y-\bar{Y})^2=\sum Y^2-(\sum Y)^2/n=6.90, \quad \sum(X-\bar{X})(Y-\bar{Y})=\sum XY-(\sum X)(\sum Y)/n=3.72$$

故に求める相関係数 r は

$$r = \frac{\sum(X-\bar{X})(Y-\bar{Y})}{\sqrt{\sum(X-\bar{X})^2 \sum(Y-\bar{Y})^2}} = 0.709$$

又回帰係数 b は

$$b = \sum(X-\bar{X})(Y-\bar{Y})/\sum(X-\bar{X})^2 = 0.93$$

従つて求める回帰直線 Y は

$$(Y-10.88) = 0.93(X-10.81) \\ Y = 0.83 + 0.93X$$

回帰直線による推定値 e は

$$e = \sum(Y-\bar{Y})^2 - \{\sum(X-\bar{X})(Y-\bar{Y})\}^2/\sum(X-\bar{X})^2 = 3.44$$

推定値の分散 S_E^2 及び標準誤差 SE は

$$S_E^2 = e/(n-2) = 0.344$$

$$SE = \sqrt{e/(n-2)} = 0.587$$

得られた回帰係数 b の有意性を確かめる為に t 検定を行うと

$$t = \frac{b\sqrt{\sum(X-\bar{X})^2}}{\sqrt{e/(n-2)}} = 3.169$$

自由度 $n-2=10$ に対する $t=3.169$ の危険率 α は t 分布表より $\alpha=1\%$ であるから, 従つて此の回帰係数は有意である.

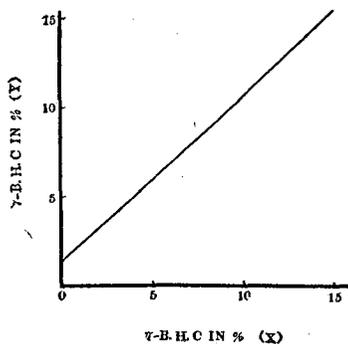


Fig. 5 Relation between Polarographic (X) and Modified LaClair (Alkali Labile Chlorine) Methods (Y) upon γ -B. H. C. Determination in Commercial γ -B. H. C. 10% Emulsions

$$\text{Regression Line : } Y = 0.83 + 0.93 X$$

考 察

γ -B. H. C. 乳剤の定量法として, W. H. O の Stepanow 法はイソプロピルアルコール中で金属ナトリウムを作用させ, γ -B. H. C. の全塩素を遊離させる関係上, 操作が厄介である, それに較べるとアルカリ分解法は γ -B. H. C. の遊離し易い三塩素だけで定量を行うので操作は比較的簡単である. 併し乍ら滴定の終点が判然としない事があるので, 此の様な場合にはポーラログラフ法を用いる方が正確である. 特に B. H. C. が γ -B. H. C. 以外の他の異性体を多量に含有している即ち低 γ -B. H. C. を用いて製られた B. H. C. 乳剤では, γ -B. H. C. の定量に際して Stepanow 法とアルカリ分解法は全 B. H. C. 異性体を定量してうから, γ -B. H. C. だけを定量する事は困難である. 従つて此の場合にも γ -B. H. C. だけ定量出来る本ポーラログラフ法を用いる法が正確である.

次に Table 1. に於いて L, M 両社の γ -B. H. C. % に就いて両定量値が甚だ相違しているのは, 此の両社の製品には γ -B. H. C. 以外の有機塩化物が混入されている為で, 此の様な場合には何れの定量法に依つても正確に γ -B. H. C. を定量する事は困難である.

尙本ポーラログラフ法で γ -B. H. C. 乳剤を定量する場合各種の γ -B. H. C. 乳剤に含まれている種々の溶剤及び乳化剤に依つて相当定量値が影響されるのではないかと思われたが, 実施結果は Table 1. に示す通り殆んど影響されていない事が判つた. 但し得たポーラログラム(還元波)の見掛けの半波電位は幾分影響を受けている様である. (Fig. 1, 2, 3, 4, 参照)

Fig. 5. に於いて市販の各社の γ -B. H. C. 10% 乳剤に含まれている γ -B. H. C. の本ポーラログラフ法とアルカリ分解法とによる定量値 X 及び Y 間の回帰直線を示している. 又両定量法の相関係数は前述の通り $r=0.709$ であり此の相関係数 r の有意性を確かめると, 即ち $n-2=10$ に対する $r=0.709$ の危険率 α は相関係数表より $\alpha < 1\%$ であるから此の相関係数は有意である. 即ち両定量法の間には充分相関々係があるから, 本ポーラログラフ定量法は従来のアルカリ分解定量法の代りに充分使用出来る事を示している.

総 括

各種市販の γ -B.H.C. 乳剤の比重, 引火点, pH について試験した (Table 1. 参照). 又本ポーラログラフ定量法で γ -B.H.C. 乳剤中の γ -B.H.C. を定量した結果, 他の有機塩化物を含む L, M 両社の製品を除く他社の製品は此等乳剤中に含有する溶剤及び乳化剤に殆んど影響されずに定量出来た (Table 1. 参照). 又此等と平行して従来 of 厚生省: 殺虫剤許可基準中にある改良されたラクレアのアルカリ分解定量法で γ -B.H.C. 乳剤中の γ -B.H.C. を定量した値と本ポーラログラフ法に依る定量値とを比較検討した結果は前述の如く両法とも充分相関々係を有する事が確かめられ, 又両法間の回帰直線を求めた (Fig. 5. 参照).

尙アルカリ分解法では定量出来ない, 発色妨害物質を含む場合及び低 γ -B.H.C. を含む場合の γ -B.H.C. 乳剤の定量には本ポーラログラフ法は好結果を与えた.

各種市販の γ -B.H.C. 乳剤より得られたポーラログラムより γ -B.H.C. の見掛けの半波電位は -1.05 ± 0.15 ボルト, 電解液の pH は約 6 であつた. 附記: 本ポーラログラフ法は γ -B.H.C. 水和剤の定量にも用いる事が出来る. 本研究の一部に協力された篠崎正, 白木勝元両氏に感謝する.

文 献

- 1) Stepanow, A.: Ber., 39, 4056~57 (1906).
- 2) LaClair, J. B.: Anal. Chem., 20, 241~45 (1948).
- 3) Cristol, S. J.: J. Am. Chem. Soc., 69, 338~42 (1947).
- 4) Fujii, M., Sato, H., Tsuji, K., and Sugawara, M.: C. A., 49, 6009a (1955);
藤井正道, 佐藤寿, 辻楠雄, 菅原実, 本誌, 72, 155~57 (1954).

Summary

This work was carried out in order to find a simple and convenient method—not subject to interference from the solvents, emulsifiers and organic chlorinated compounds—for the determination of γ -B.H.C. in commercial γ -B.H.C. emulsions. (concentrates containing 10% γ -B.H.C.)

I. Polarographic method*: Weigh accurately a weight versus 1 ml. of a sample, add 99 ml. absolute ethanol. Transfer by pipet 20 ml. of the above stock soln. into a 50-ml. volumetric flask and add 4 ml. of 10% KI aq. soln. and 1 ml. of a 1% gelatine aq. soln. and make up to the mark with absolute ethanol. Flush about 5 ml. of this soln. for 15 min. with N_2 . Polarograph at -0.2 to -1.7 volts. Calculate the concentration of γ -B.H.C. by the relation:

$$\gamma\text{-B.H.C., \% (w/w basis)} = \frac{m_0}{m} \frac{h}{h_0} \times 100$$

m_0 = γ -B.H.C., mg. in standard soln. (known concentration of pure γ -B.H.C.**)

m = Weight, mg. in test soln. of sample.

h_0 = Wave height, mm. of standard soln.

h = Wave height, mm. of test soln.

II. Modified LaClair method: Weigh accurately a weight vs. 1 ml. of a sample is refluxed 30 min. in a flask with 25 ml. of N/10 ethanolic KOH. After refluxing, the flask is cooled and the contents are made slightly acid with 1 to 2 HNO₃. A 15 ml. of N/10 AgNO₃ along with 1 ml. of 10% ferric alum soln. and 2 ml. of nitrobenzene is added. The excess AgNO₃ is then titrated with N/10 NH₄ SCN.

$$\gamma\text{-B.H.C., \% (w/w basis)} = \frac{\text{ml. of N/10 AgNO}_3 \times 0.009696}{\text{weight, grams of sample}} \times 100$$

The results obtained by polarographic method (X) are in good agreement with the modified LaClair method (Y) as indicated by 92–108% recovery in Table 1. and by a coefficient of correlation, $r=0.709$ in Table 2. and by one regression line ($Y = 0.83 + 0.93 X$) in Fig. 5. The apparent half-wave po-

tential and pH of γ -B. H. C. in the samples, using KI as base electrolyte under the above conditions, were -1.05 ± 0.15 volts and approx. 6.

* cf. C. A., 49, 6009a (1955). Polarographic assay of γ -B. H. C. in commercial sprays. M. Fujii, H. Sato, K. Tsuji and M. Sugawara, Bull. Natl. Hyg. Lab. (Tokyo), 72, 155-7 (1954).

** mp. 112.5°C

Received February 29, 1956

沱紙クロマトグラフィによる亜鉛の定量法

岡崎 精一

Quantitative Analysis of Zinc by Paper Chromatography

Seiichi OKAZAKI

無機イオンを沱紙クロマトグラフィを用いて分離した報告¹⁻³⁾及び沱紙クロマトグラフィを定量に応用した報告⁴⁻⁷⁾は多数ある。著者は卵胞ホルモン⁸⁻⁹⁾及びモルヒネ¹⁰⁾を沱紙上のスポットの面積によつて定量し得ることを報告したがこの方法を亜鉛イオンについて試みた。東洋沱紙 No. 50 を用い、ブタノール、水、塩酸 (10 : 3 : 2) の混液で展開しジチゾン・クロロホルム液により亜鉛を呈色させると、ある範囲内で亜鉛イオンの濃度の対数とスポットの面積との間に直線関係が得られる。且又呈色像の濃淡は濃度と共に増加するので波長 530m μ でその分光反射率を求めその値を Stearns¹¹⁾ の記載した式 $KC = \frac{(1-R)^2}{2R} - K'$ (R:Unit Reflectance, C:Concentration, k:Fiber absorption index, K':Absorbancy index of undyed fiber) に導入して得た値と濃度の対数とは直線関係を示すからこれを利用して 2-2 用量検定法¹²⁾ を用いプロタミン亜鉛インシュリン注射液中の亜鉛を定量して米局法¹³⁾、国局法¹⁴⁾、国薬Ⅱ法¹⁵⁾と比較し好結果を得たので報告する。

実験の部

試薬、亜鉛標準液：予め弱く熱灼した酸化亜鉛 1.245g を正確に秤り硝酸 (50w/v%) 10cc に溶かし亜鉛を含まない水を加えて 1000cc とする。本液 1cc は亜鉛 1mg を含む。

ジチゾン試液：精製ジチゾン 25mg を 50cc の精製クロロホルムに溶かし冷暗所に保存する。

展開溶媒、ブタノール：水：塩酸、(10 : 3 : 2) 但し用いた塩酸の比重は 1.18 である。

実験 1 東洋沱紙 No. 50, 1 x 40 cm の一端から 6 cm の所に亜鉛標準液をつけ室温 23° の恒温室で 14 時間展開し、乾燥後ジチゾン試液中に沱紙を 10 秒間浸しこれを 60W の電燈の下 10 cm で乾燥した。亜鉛は紅紫色の帯状に呈色しその Rf 値は約 0.6 である。これを Fig. 1 のようにして Beckman 分光光度計 B 型を用いて反射スペクトルを検した (Fig. 2)。対照として無処置の白色沱紙を用いた。

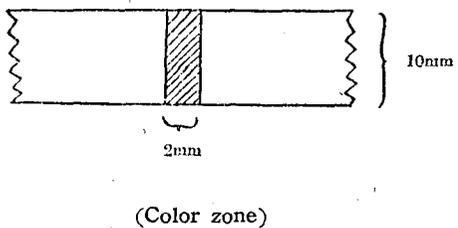


Fig. 1 The figure of developed paper which treated for reflectancy

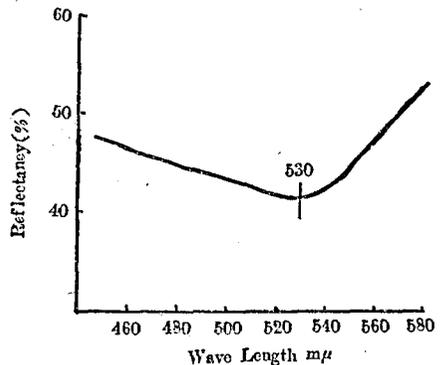


Fig. 2 Reflectance spectrum of zinc by dithizone

Fig. 2 より反射率の極小は 530m μ にあることを知った。

実験 2 0.001~0.016cc (1~16r) の亜鉛標準液を正確にマイクロピペットで沱紙に付け、実験 1 と同様に呈色させ呈色帯の上にトレーシングペーパーを置き呈色帯を複写しプランメータでその面積を測定した。(Table. 1, Fig. 3)

Table 1 Amount-Area relationship

Amount of Zn (r)	Area of spot (cm ²)
1	0.24
2	0.36
4	0.56
8	0.68
16	0.80

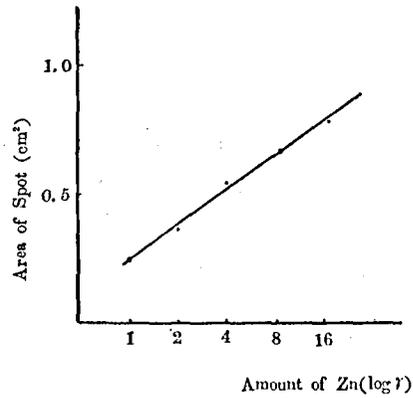


Fig 3 Amount-Area relationship

実験3 実験2と同様に亜鉛標準液を付け呈色後、実験1で述べた方法で分光反射率を測定し、その値から KC を求めた (Table. 2, Fig.4).

同一炉紙を対照に用いたため $K' = 0$, $R = 0.01 \times \text{unit reflectance}$ とした,

Table 2 Amount-Reflectance relationship

Amount of Zn (r)	Unit reflectance (%)	KC
1	61.0	0.124
2	52.0	0.226
4	48.0	0.283
8	43.0	0.378
16	40.0	0.450

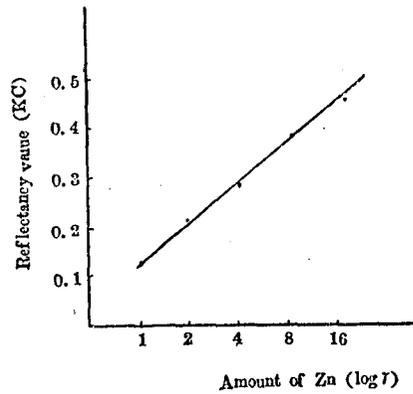


Fig. 4 Amount-Reflectance relationship

実験4a 亜鉛標準液 1, 2, 4r をそれぞれ炉紙3枚につけて展開後呈色面積を測定した (Table 3).

Table 3 Amount-Area relationship

Amount of Zn (r)	1	2	4
Area of spot (cm ²)	0.24	0.40	0.53
	0.24	0.40	0.55
	0.25	0.38	0.54
Total	0.73	2.18	1.62
Mean	0.243	0.393	0.540

Table 3 から直線性を検討する.

Adjustment for mean.....1.3830

Nature of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean squares	F
Regression	1	0.1323		
Deviation from regression	1	0.0004	0.0004	5.33
Between amounts	2	0.1327		$<F_4^1 = 7.71(5\%)$
Within amounts	2	0.0016		
Error	4	0.0003	0.000075	
Total	8	0.1346		

従つて直線性は否定できない。Table 3. をグラフに表わしたのが Fig.5 である。

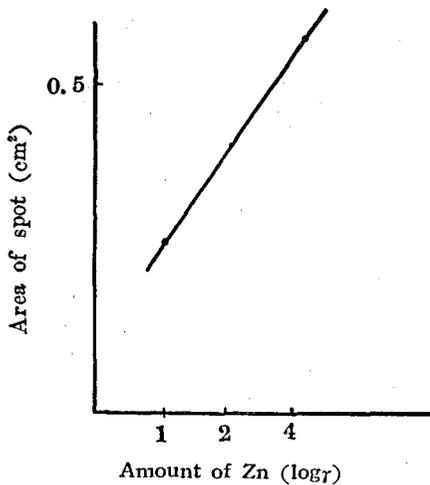


Fig.5 Amount-Area relationship

実験 4b 分光反射率から KC を求めた (Table 4).

Table 4 Amount Reflectance Relationship

Amount of Zn(r)	1	2	4
KC	1,257	2,354	2,817
	1,205	2,215	2,564
	1,257	2,049	2,734
Total	3,719	6,618	8,115
Mean	1,240	2,206	2,705

Table 4 から直線性を検討すると次の通りである。

Adjustment for mean.....37,8348

Nature of Variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square	F
Regression	1	3.2193		
Deviation from regression	1	0.1065	0.1065	5.43
Between amounts	2	3.3258		$<F_4^1 = 7.71(5\%)$
Within amounts	2	0.0035		
Error	4	0.0783	0.0196	
Total	8	3.4076		

従つて直線性は否定できない。Table 4 をグラフに表わしたのが Fig.6 である。

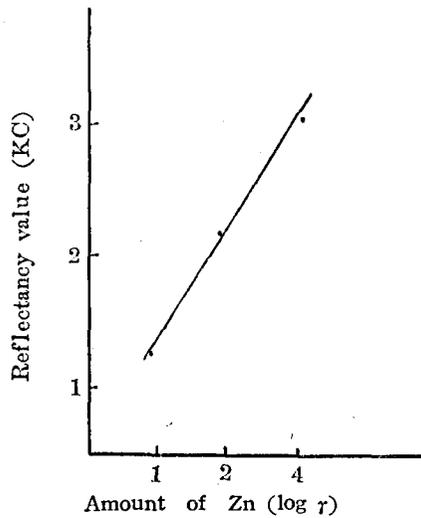


Fig.6 Amount-Reflectance relationship

実験5, 亜鉛標準品2r, 4r, 検体1.8r, 3.6rをそれぞれ炉紙につけて展開後発色させ, 効価比(R), 誤差の信頼限界(f. l. e.)等を求めた(Table 5).

Table 5. Two and Two Amount Assay of Zinc

Expt. No.	Strip No.	Standard		Standard		t* P=0.95	※ R	f.l.e. % (P=0.95)
		4r	2r	3.6r	1.8r			
		Area of spot (cm ²)						
1	1	0.60	0.44	0.56	0.36	0.66 (<<2.306** d.f. = 8)	103.0	91.5~109.2
	2	0.64	0.40	0.60	0.40			
	3	0.64	0.44	0.56	0.40			
2	1	0.68	0.48	0.60	0.44	1.47 (<<2.776** d.f. = 4)	86.0	93.8~107.1
	2	0.64	0.48	0.56	0.44			
		Reflectance value (KC)						
3	1	0.637	0.250	0.540	0.235	2.06 (<<2.306** d.f. = 8)	116.1	98.0~102.1
	2	0.640	0.262	0.609	0.252			
	3	0.659	0.258	0.594	0.242			
4	1	0.603	0.300	0.637	0.264	0.61 (<<2.776** d.f. = 4)	107.2	84.2~118.8
	2	0.565	0.295	0.536	0.270			

※ % of the theoretical value.

* in the test for difference between slopes.

**from the table of t-distribution.

実験6, 市販プロタミン亜鉛インシュリン注射液(20 u/cc) 5ccに稀塩酸 0.01 ccを加え澄明な液とし, これの 0.05 cc, 0.025 cc と亜鉛標準液の10倍稀釈液の4r, 2rを濾紙3枚につけ面積法, 分光反射率測定法で定量した

結果は次の通りである (Table 6).

Table 6 Two and Two Amount Assay of Zinc in Protamin Zinc Insulin Injection

Expt. No.	Strip No.	Standard		Sample		t*	※ R	f.l.e.% (P=0.95)
		4r	2r	0.05 cc	0.025 cc			
		area of spot (cm ²)						
5	1	0.60	0.48	0.64	0.52	0.36	1.072	92.4~108.2
	2	0.64	0.48	0.64	0.48	(<2.306 ^{**}		
	3	0.60	0.44	0.60	0.44	d. f. =8)		
		Reflectance value (KC)						
6	1	0.2545	0.0895	0.2530	0.1079	1.12	1.02	93.0~107.5
	2	0.2500	0.0942	0.2500	0.1013	(<2.306 ^{**}		
	3	0.2330	0.0904	0.2228	0.0977	d. f. =8)		

* in the test for a difference between slopes,

**from the table of t-distribution

※ Quantity Ratio.

R値より検体100単位中に含まれる亜鉛量を計算し同一検体を他の法で定量した結果と比較すると次の通りである。(Table 7).

Table 7 Comparison with other methods for quantitative analysis of Zn in Protamin Zinc Insulin Injection

Method	Amount of Zn	
	mg/100 u.	Ratio
U. S. P.	0.411	100.0
I. P.	0.417	101.9
J. N. F. II.	0.411	100.0
Area of spot *	0.428	104.1
Reflectance value *	0.407	99.0

* Our method reported here.

総 括

亜鉛をブタノール、水、塩酸(10:3:2)で展開しジチゾン、クロロホルム試液で発色させると亜鉛の濃度の対数と呈色帯の面積及び呈色度がかんりの範囲で直線関係を示しこれを利用して沔紙クロマトグラフ法で定量を行うと相当な精度で定量ができる。本法でプロタミン亜鉛インシュリン注射液中の亜鉛を定量すると米局法、国局法、国薬Ⅱ法とはほぼ同じ結果を得た。

終りに御指導並びに御校閲を賜った部長長沢佳熊博士、御助力を戴いた越村栄之助技官、反射分析に御助言を戴いた山口一孝生薬部長、福島清吾技官に感謝する。

文 献

- 1) Lederer E., Lederer, M : Chromatography, Elsevier Pub. Co. P.317~346(1954).
- 2) 田村善藏 : 分析化学, 3, 475(1954).

- 3) 田村善藏 : 日本薬剤師協会誌, 7, 2(1955).
- 4) Fischer, R. B., Parson, D. S., Morrison, G. : Nature, 161, 764 (1948).
- 5) Tennet, D. M., Florey, K., Whitla, J. B. : Anal. chem., 23, 1748(1951).
- 6) Moore, A. M., Joyce, B., : Science, 118, 19(1951).
- 7) 長沢佳熊, 西崎笹夫 : 本誌 74, 177 (1956).
- 8) Koshimuro, E, Okazaki. S. : Pharm. Bull., 2, 65(1954) ; 本誌, 72, 41(1954).
- 9) Nagasawa, K., Koshimura. E., Okazaki, S. : Pharm. Bull. 3 144(1955) ; 本誌, 73, 11(1955).
- 10) 長沢佳熊, 越村栄之助, 岡崎精一 : 本誌, 73, 53(1955).
- 11) Stearns, E. I. : Anal. chem. 25, 1004(1953).
- 12) British Pharmacopoeia : VIII, 778(1953).
- 13) United States Pharmacopoeia : XIV, 917(1955).
- 14) International Pharmacopoeia : Vol II, 274(1955).
- 15) 国民医薬品集 : II, 312(1955).

Summary

After developing zinc with butanol : water : hydrochloric acid mixture (10:3:2) on filter paper, dipping this paper in the dithizone-chloroform solution, the liner relationship between logarithm of amount of Zinc and area of spot or the reflectancy value was found, so the two and two amount assay method was available. 1-4 r of Zinc gave a succesful result.

Applying this method to the quantitative determination of Zinc in Protamine Zinc Insulin Injection, our method and the methods of the United States pharmacopoeia, International pharmacopoeia or Japanese National Formulary II gave the similar results.

Received February 29, 1956

沝紙クロマトグラフィーによるけし属植物中のモルヒネ検出について

(第1報)

朝比奈 晴 世, 大野 昌 子

Detection of Morphine in Poppy Plants by Paper Chromatography. I.

Haruyo ASAHINA and Masako ŌNO

まえがき けし属植物中にモルヒネを含有するかどうかを明確にきめることは、あへん法によるけし植物取締上必要である。モルヒネ検出方法の研究は、その微量アルカロイド検索の第一段階としても意味があるので、先づ数種のけし属植物 (*Papaver somniferum*, *P. rhoeas*, *P. orientale*, *P. setigerum*) の未熟果実からの乳液について沝紙クロマトグラフィーを試みた。なおけし属植物のモルヒネ含有及び検出法については、アメリカ麻薬局出版物¹⁾に記述されている。

実 験 材 料

A : *Papaver somniferum* : あへん法にいう「けし」であつて、一貫種と呼ばれる品種。当所薬用植物園春日部試験場で栽培された。

B : *Papaver somniferum* : 園芸品種とされていたもので、当所で試験のため作った。

C : *Papaver rhoeas* : ひなげし、園芸用に市販されている種子を播き栽培したもの。

D : *Papaver orientale* : おにげし、東京都世田谷区、戸越農園で栽培されたもの。

E~G : それぞれ東京都新宿区、港区、世田谷区弦巻町内で、あへん法違反被疑事件の鑑定材料として押収されたもの。

H : 東京都大田区内で、生花材料として作られたもの。

I : *Papaver setigerum* ; Canada, Ottawa の Food and Drug Laboratory, Dr. Charles G. Farmilo から送付された種子を、当所春日部試験場で播種、栽培したもの。

実 験 の 部

(I) 試料: 実験材料 A~I の未熟果実から得た乳液の乾燥したもの 0.1g に、約 1 cc. の N/10 塩酸を加えてときどきまきぎ、暫時放置した後その上澄液約 0.004~0.01cc をとり試料とする。

(II) 沝紙クロマトグラフィーについて: 東洋沝紙 No. 51, 巾 2.5cm, 長さ 40cm のものの、下端から 7cm の部位に試料をつける。展開液はすでに報告した²⁾ n-Bu(OH):NH₄OH(28%):H₂O=50:9:15 の上層を使用し、上昇法で約 25cm 展開する。発色試液としては塩化白金ヨウ素試液 (塩化白金酸 10% 溶液 1cc, ヨウ化カリウム 4% 溶液 25cc. に水を加えて 50cc. にしたもの) を噴霧すれば、モルヒネは 7.5r 以上で明かに濃青色に呈色する。

実 験 結 果

検体 A : *Papaver somniferum*

Table 1 Rf Values and Colouration of Spot of *Papaver somniferum*

回数	呈色	濃 青 色	藍 紫 色	紫 色
	Rf値			
1	0.71	0.71	0.88	0.94
2	0.69	0.69	0.86	—
3	0.69	0.69	0.87	0.92
4	0.71	0.71	0.86	0.91
		Morphine	Codeine	Narcotine

対照モルヒネの Rf 値 = 0.71

検体B : *Papaver somniferum*

Table 2 Rf Values and Colouration of Spot of *Papaver somniferum*.

回数	呈色	濃 青 色	紫 色	対照モルヒネ Rf値
	Rf値			
1		0.72	0.95	0.71
2		0.73	0.95	0.71
3		0.70	0.92	0.71

検体Bではモルヒネ含有が認められた。

検体C : *Papaver rhoeas*

Table 3 Rf Values and Colouration of Spot of *Papaver rhoeas*.

回数	呈色	(汚) 紫 色
	Rf値	
1		0.91
2		0.93

ひなげしでは、塩化白金ヨウ素試液で汚紫色を呈するスポット一つが認められるのみで、モルヒネは認められない³⁾。

検体D : *Papaver orientale* 13種についての実験結果は次のとおりであつた。

Table 4 Rf Values and Colouration of Spot of *Papaver orientale*

商品名	呈色	濃 青 色	青 緑 色	濃 青 色	紫 色	紫 色
	Rf値					
Mahoney		0.15	—	—	—	0.96
Perry's White		—	0.18	—	0.26	0.89
		—	0.18	0.26	0.28	0.93
Queen Alexandra		0.18	—	—	—	0.95
Feltham		—	0.17	—	0.25	0.94
Beauty of Livermere		—	0.18	—	0.25	0.96
Salmon Queen		—	—	—	—	0.95
Apricot Queen		0.18	—	—	0.26	0.92
Princess Victoria Louise		—	0.19	—	0.27	0.96
		—	0.16	—	0.23	0.96
		—	0.17	—	0.24	0.96
		—	0.17	—	0.25	0.92
Rembrandt		—	0.19	0.20	0.28	0.91
Pink Beauty		—	0.18	—	0.27	0.91
Mrs. Perry		0.19	—	—	0.29	0.93
Columbia (Olympia fl. pl.)		0.19	—	—	—	0.94
Bracteatum		0.18	—	—	0.36	0.94

おにげしのクロマトグラムには、モルヒネは認められないが、本展開液でアルカロイド数種が分離可能であることが分つた⁴⁾。

検体E~G :

Table 5 Rf Values and Colouration of Spot of Poppy E~G.

検体	呈色	濃 青 色	紫 色	対照モルヒネの Rf 値
	Rf 値			
E	0.77	0.77	0.94	0.77 (試料あへんチンキ)
F	0.78	0.78	0.96	0.77 (")
G ₁	0.72	0.72	0.94	0.71 (")
G ₂	0.70	0.70	0.92	0.71 (")

鑑定材料E~Gには全部モルヒネが含まれており, かつ形態学上からも *Papaver somniferum* であることが認められた。

検体H:

Table 6 Rf Values and Colouration of Spot of Poppy H.

検 体	呈 色	紫 色	紫 色	濃 青 色	藍 紫 色	紫 色
	Rf 値					
H	0.04	0.04	0.18	0.71	0.88	0.93
対照あへんチンキ	—	—	—	0.71	0.88	0.93

検体Hは, けし果実のみであり, 切りとられてから何日が経過したものであつたが, 相当量のモルヒネが認められた。

検体I: *Papaver setigerum*

Table 7 Rf Values and Colouration of Spot of *Papaver setigerum*

検 体	呈 色	濃 青 色	藍 紫 色	紫 色	
	Rf 値				
I ₁	0.74	0.74	0.89	0.93	I ₁ , I ₂ の対照
I ₂	0.73	0.73	0.87	0.92	
あへんチンキ	0.71	0.71	0.87	0.93	
I ₃	0.67	0.67	0.88	0.94	I ₃ の対照
あへんチンキ	0.66	0.66	0.89	0.95	

Farmilo の報告⁵⁾通り, *Papaver setigerum* はモルヒネを含有している。

考 察

以上の実験結果から, 沝紙クロマトグラフィーにより, けし属植物中 *Papaver somniferum*, *Papaver setigerum* にはモルヒネが含有され, ひなげし, おにげしには含有されないことがわかつた。又, 塩化白金ヨウ素試液を噴霧することにより, 沝紙上モルヒネは少量で濃青色に呈色するので, 容易に鑑別出来る。なお, ひなげし, おにげしには塩化白金ヨウ素試液で認められる, モルヒネ以外のアルカロイドが含有される。

本実験を行うに当り, 試験材料の御提供を賜つた Canada の Dr. Charles G. Farmilo, 戸越農園, 当所川谷, 藤田両技官に謝意を表する。

文 献

- 1) C. C. Fulton: The Opium Poppy and Other Poppies, U. S. Treasury Department, Bureau of

Narcotics, U.S. Government Printing Office, Washington, U.S.A., 1944,

- 2) 朝比奈, 大野 : 衛生試驗所報告, 73. 59(1955).
- 3) C. C. Fulton : The Opium Poppy and Other Poppies, 1944, p. 77.
- 4) C. C. Fulton : *ibid.*, p. 78.
- 5) C. G. Farmilo, H. L. J. Rhodes, H. R. L. Hart and H. L. J. Taylor : Bulletin on Narcotics, Vol. 5 No. 1, 26, (1953).

Summary

By using paper chromatography, it is possible to demonstrate the presence of morphine in certain poppy plants (*Papaver somniferum*, *Papaver setigerum*) and its absence in others (*Papaver rhoeas*, *Papaver orientale*).

The characteristic dark blue colouration of the morphine spot by potassium iodoplatinate, at the proper Rf value, is easily recognized.

Received February 29, 1956.

沝紙クロマトグラフィーによる, 家庭麻薬製剤中のコデイン, ヒドロコデインの定量法

朝比奈晴世, 大野昌子

Quantitative Determination of Codeine or Hydrocodeine in the Antitussive and Expectorant Preparations by Paper Chromatography Haruyo ASAHINA and Masako ÔNO

まえがき 従来コデイン, ヒドロコデインの定量法としては, アルカリ性でクロロホルム抽出を行い, 酸, アルカリ滴定を行っているが, これらを主剤とする家庭麻薬製剤の処方例は非常に多く, たとえ前処理を施しても抽出によつて主剤のみを分離し, 酸, アルカリ滴定を行うのが不可能な場合(例えば, エフェドリン, メチルエフェドリン, スルピリン, リコリン等を含む場合)がある. しかしエフェドリン, メチルエフェドリンは, 紫外線吸収においてコデイン, ヒドロコデインを全く妨げない¹⁾から, 抽出液中に両者のみが混在する場合は, 吸光度測定法を応用すれば定量できる. 又バナジン硫酸による比色定量法²⁾も試みられ一部解決しているが, これでもまだ定量不可能な製剤があるので, 既に報告した「沝紙クロマトグラフィーによるあへん中のモルヒネ定量法」³⁾を, これら製剤中のコデイン, ヒドロコデインの定量に応用してみることにし, 先ず家庭麻薬製剤中のシロップ剤, 錠剤について実験を行った.

実験の部

(I) 沝紙クロマトグラフィーについて

- (i) 沝紙: 均質性において優れている東洋沝紙 No. 51⁴⁾, 巾 2.5cm, 長さ 40cm のものを用いた. なお No. 51 は縦横の別がはつきりしているから注意し, 密な方を横にとつた方がスポットが短くまとまり都合がよい.
- (ii) 容器: 東洋沝紙製クロマト管C型を用い, 同一条件で展開した沝紙 8本を 1組とした.
- (iii) 展開液: n-BuOH : NH₄OH (28%) : H₂O = 50 : 9 : 15 の上層 40cc ずつを用いた.
- (iv) 展開法: 沝紙の下端から 7cm の距離の中央を原点とし, ミクロピペットを用いて試料 0.001~0.01cc をつけるが, 0.006~0.01cc をつける場合は二回に分け, 第一回目が乾いてから第二回目をつけ自然乾燥後上昇法により約 25cm 展開する. 所要時間は約 18 時間である.

(II) コデイン, ヒドロコデインの Rf 値.

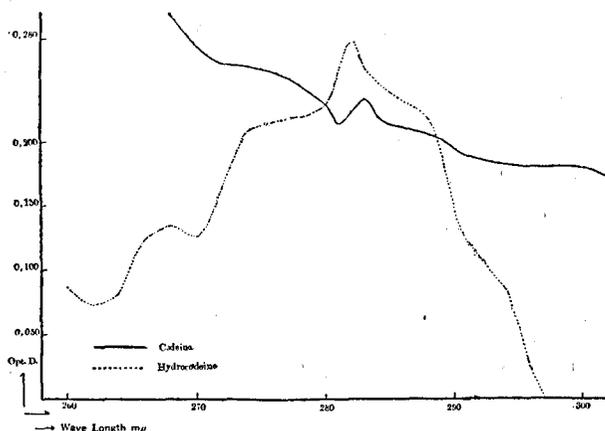


Fig. 1 Ultraviolet Absorption Spectra of Codeine and Hydrocodeine.

(I) の装置, 操作により, 磷酸コデイン, 磷酸ヒドロコデインを同一条件で展開したところ, コデインの Rf 値は 0.84, ヒドロコデインでは 0.86 であった. (発色試液: 塩化白金ヨウ素試液)

(III) Beckman D U 型分光光度計による吸光度の測定.

(i) コデイン, ヒドロコデインの吸収極大波長の測定: コデイン, ヒドロコデイン塩基の吸収極大波長文献記載値は, それぞれ 286m μ , 284~285m μ (エタノール溶液) である.⁵⁾

展開後自然乾燥した沝紙につき, われわれはコデインについては 284m μ , ヒドロコデインについては 283m μ で沝紙を移動させてその最大吸収部を求め, ここを中心として 10 \times 45mm の大きさに沝紙を切り取り, セルに入れ Spa-

cer でおさえ、波長 260~320m μ における吸 収曲線を求めたところ第 I 図, 第 I 表に示したとおり, コデイン塩基は 283m μ , ヒドロコデイン塩基では 282m μ においてそれぞれ吸収は最大であつた。

Table 1 Absorbances of Codeine and Hydrocodeine.

波 長	吸 光 度		波 長	吸 光 度	
	a	b		a	b
260	0.320	0.086	284	0.221	0.245
262	0.307	0.073	285	0.215	0.239
264	0.305	0.080	286	0.212	0.230
266	0.300	0.124	287	0.210	0.227
268	0.290	0.135	288	0.207	0.198
270	0.275	0.127	289	0.204	0.180
272	0.262	0.166	290	0.195	0.145
274	0.260	0.210	292	0.191	0.106
276	0.255	0.215	294	0.187	0.085
278	0.245	0.220	296	0.185	0.022
280	0.230	0.230	300	0.181	0
281	0.215	0.245	310	0.125	0
282	0.224	0.280	320	0.090	0
283	0.235	0.259			

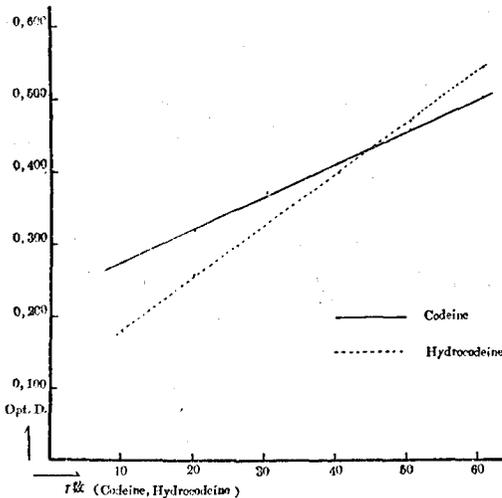


Fig. 2. Calibration Curves of Codeine and Hydrocodeine.

a: 磷酸コデイン 20r を試料とした時の吸光度。

b: 磷酸ヒドロコデイン 30r を試料とした時の吸光度。

ii) 特定波長における最大吸収部の吸光度と濃度との関係: 試料として磷酸コデイン, 磷酸ヒドロコデインの 1% 水溶液を作り, その 0.001~0.006cc (磷酸コデイン, 磷酸ヒドロコデインとして 10~60r) につき吸光度を測定したところ, 濾紙上両塩基の吸光度と濃度の間に直線関係が得られた。(第 2 図, 第 2 表)

Table 2 Absorption Data for Codeine and Hydrocodeine.

試料 r 数	10	20	30	40	50	60
吸光値						
磷酸コデイン	0.275	0.315	0.375	0.415	0.465	0.506
磷酸ヒドロコデイン	0.180	0.259	0.340	0.400	0.480	0.550

(IV) 試料. 従来の定量法による定量値と比較するため, 家庭麻薬製剤中次の処方のものについて定量を試みた。

(A) コデイン製剤

処方例(1)

桜皮エキス 1.65g

処方例(2)

磷酸コデイン 2 g

磷酸コデイン	1.0g	塩酸エフェドリン	2 g
白糖	50 g	石蒜有効成分原液	16.6g
グリセリン	5 g	アルコール	50 cc
アルコール	5.5g	白糖	300 g
安息香酸ブチル	0.02g	安息香酸	1.1g
安息香酸	0.2g	パラオキシン安息香酸エチル	0.22g
食塩	1.5g	塩化アンモン	5 g
蒸溜水	全量100cc	カラメル	25 g
		バニラエッセンス	1 g
		薄荷水	1 g
		蒸溜水	適量
		全量	1000cc

(B) ヒドロコデイン製剤

処方例(1)	処方例(2)	1錠中	処方例(3)
キキョウエキス 4 g	桜皮エキス	0.008g	磷酸ヒドロコデイン 0.2w/v%
磷酸ヒドロコデイン 0.4 g	磷酸ヒドロコデイン	0.002g	クレゾール硫酸カリ 1.5 %
塩化アンモン 1.0 g	乳糖	0.152g	クロロホルム精 2.5 %
アルコール 2.0 g	澱粉	0.035g	アルコール 2.5 %
橙皮チンキ 1.0 g	タルク	0.003g	安息香酸 0.2 %
グリセリン 5.0 g			白糖 25 %
溶性サッカリン 0.065g			溶性サッカリン 0.04 %
パラオキシン安息香酸ブチル 0.0136g			
食塩 1.0 g			
白糖蜜 25 g			
カラメル液(35~40%) 5 g			
蒸溜水 全容量 100cc			

試料は、コデイン、ヒドロコデインの含量により、0.003~0.01cc をマイクロピペットでとり、展開後、同一条件で展開を行った磷酸コデイン、磷酸ヒドロコデイン1%水溶液 0.001, 0.003, 0.006cc を試料としたものの吸光度より得た検量線から、それぞれ含量を求める。

実験結果

(A) コデイン製剤

処方例(1)について: (i) 抽出法による定量値 91.2% (ii) 吸光度測定による定量値 90.7% (第3表)

Table 3 Determination Value of Codeine Preparation (1) by Spectrophotometry.

回数	1	2	3	4	平均
磷酸コデイン r 数*	26	26.5	28	28.4	27.2
磷酸コデイン含量w/v %	0.867	0.883	0.933	0.947	0.907
磷酸コデイン含量/表示量**	86.7	88.3	93.3	94.7	90.7%

* 試料 0.003cc 中の r 数 ** 表示量、磷酸コデイン 1% 含有。

処方例(2)について: (i) 抽出法による定量値 98.5% (ii) 吸光度測定による定量値 87.5%(第4表)

Table 4 Determination Value of Codeine Preparation (2) by Spectrophotometry.

回数	1	2	3	4	平均
磷酸コデイン r 数*	17.4	17.5	17.7	17.4	17.5
磷酸コデイン含量w/v %	0.174	0.175	0.177	0.174	0.175
磷酸コデイン含量/表示量**	87.0	87.5	88.5	87.0	87.5%

* 試料 0.01cc 中の r 数. ** 表示量 磷酸コデイン 0.2w/v%.

(B) ヒドロコデイン製剤

処方例 (1) について: (i) 抽出法による定量値 93.8% (ii) 吸光度測定による定量値 110.1% (第5表)

Table 5 Determination Value of Hydrocodeine Preparation (1) by Spectrophotometry.

回数	1	2	平均
磷酸ヒドロコデイン r 数 *	38.8	31.7	35.2
磷酸ヒドロコデイン含量 w/v %	0.486	0.396	0.44
磷酸ヒドロコデイン含量/表示量 **	121.2	99.0	110.1%

* 試料 0.008cc 中の r 数. ** 表示量 磷酸ヒドロコデイン 0.4w/v%.

処方例 (2) について: (i) 抽出法による定量値 64.7% (ii) 吸光度測定による定量値 78.0% (第6表)

Table 6 Determination Value of Hydrocodeine Preparation (2) by Spectrophotometry.

回数	1	2	平均
磷酸ヒドロコデイン r 数 *	21.4	17.6	19.5
磷酸ヒドロコデイン含量 w/v %	0.214	0.176	0.195
磷酸ヒドロコデイン含量/表示量 **	85.6	70.4	78.0%

* 試料として錠剤 10 錠を粉末とし, その 1.7240g (5 錠に相当) をとり, 水 4cc を加えてかきまぜた後 (磷酸ヒドロコデインとして 0.25 w/v% 溶液) 一夜放置し, 遠心分離して上澄液 0.01cc を試料とする. ** 表示量 1 錠中磷酸ヒドロコデイン 0.002g.

処方例 (3) について: (i) 抽出法による定量値 89.4% (ii) 吸光度測定による定量値 105.0% (第7表)

Table 7 Determination Value of Hydrocodeine Preparation (3) by Spectrophotometry.

回数	1	2	平均
磷酸ヒドロコデイン r 数 *	20.5	21.5	21.0
磷酸ヒドロコデイン含量 w/v %	0.205	0.215	0.210
磷酸ヒドロコデイン含量/表示量 **	102.0	107.5	105.0%

* 試料 0.01cc 中の r 数 ** 表示量 磷酸ヒドロコデイン 0.2w/v%.

むすび 以上の実験結果から, 二, 三検討を要する点も考えられるが, コデイン, ヒドロコデインが特定波長 283, 282m μ においてそれぞれ濃度と吸光度の間に直線関係が得られることから, 適当な展開液でこれらが濾紙上で分離されさえすれば, 簡便な家庭麻薬製剤定量法として応用出来ると思われるので, なお多くの例について定量を試みるつもりである.

測定につき御援助を賜った武田薬品工業試験課の諸氏に感謝する. 又研究費の一部は厚生科学研究費より仰いだ.

文 献

- 1) 加藤: 厚科研報告, 医薬品の試験法に関する研究, その 4, 120 (1955)
- 2) 石福: *ibid*, 107 (1955)
- 3) 朝比奈, 大野: 衛生試験所報告, 73, 59 (1955).
- 4) 朝比奈, 大野: *ibid*,
- 5) Oestreicher, P.M., C. G. Farmilo and Leo Levi: *Bulletin on Narcotics*, 6, No. 3~4, 46 (1954).

Summary

The quantitative determination of codeine or hydrocodeine in the antitussive and expectorant preparations (tablets or syrups) was carried out successfully by paper chromatography and Beckman spectrophotometry.

The absorbance of codeine or hydrocodeine spot on the Toyo filter paper No.51 was measured at 283m μ (codeine) or at 282m μ (hydrocodeine).

Received February 29, 1956.

ドーフル散中のエメチンの検出について

朝比奈晴世, 志内賢彦, 中村良

Detection of Emetine in Dover's Powder

Haruyo ASAHINA, Yoshihiko SHIUCHI and Yoshi NAKAMURA

まえがき ドーフル散はアヘン末1, トコン細末1, 乳糖又は硫酸カリウム細末8を混じて製したものである。この中のトコンの成分であるエメチンの確認反応には日局Vでは塩酸とサラン粉の反応が記載されていたが削除され, 日局VI, N.F. (1955), B.P. (1953)にも記載がない。日局VIIではトコン中のエメチンの確認と同様の反応, トコンチンキの項に塩素酸カリウムによる確認試験がある。しかしこれらの反応はドーフル散とアヘン散についてはいずれも類似の呈色を示し両者の鑑別はきわめて困難である。この両者を区別し, ドーフル散中のエメチンの分離のためにドーフル散のアルコール, ベンゼン及び稀塩酸抽出物を試料として種々の展開剤について沝紙クロマトグラフィーを行つたが共存するアヘンアルカロイドのため目的を達することができなかつた。そこで分離操作をほどこして, 沝紙クロマトグラフィーを行いエメチンを確認せんとした。

実験の部

1. ドーフル散, アヘン散, トコン末, 塩酸エメチン, **Porphyroxine-Meconidine** の塩酸とサラン粉の反応及び塩素酸カリウムの反応

ドーフル散, アヘン散はそれぞれ1g, トコン末は0.5gに塩酸10ccを加えときどきふりまぜながら1時間放置して沝過した沝液, 塩酸エメチンは塩酸に溶解したもの, **Porphyroxine-Meconidine** は朝比奈, 水町¹⁾の方法に準じてアヘンからエーテルで連続抽出し塩酸に溶解したものをを用い, これらにサラン粉の小粒を加えた。塩素酸カリウムの反応はそれぞれの塩酸溶液を50%水酸化ナトリウム試液で中和後, 小片を加え水浴上で加温した。

Table 1 Colour Reaction by Chlorinated Lime or Potassium Chlorate.

	サラン粉	塩素酸カリウム
ドーフル散	微橙赤色	橙黄色
アヘン散	微橙赤色	橙黄色
トコン末	橙赤色	橙黄色
塩酸エメチン	橙赤色	濃橙黄色
Porphyroxine-Meconidine	淡橙赤色	橙黄色

ドーフル散とアヘン散とは両反応ともきわめて類似の呈色を示し両者の判定は困難であつた。アヘン中の **Porphyroxine-Meconidine** は稀酸と加温すると赤色に発色¹⁾することから, これをアヘン中から抽出し両反応を試みたものであり, 塩素酸カリウムではトコン末と全く同様, サラン粉ではやや稀薄な呈色を示した。

II. エメチンの抽出及び回収の検討

(A) 次の試料について n-ブタノール-酢酸-水 (10:1:5), アセトン-酢酸エチル-10%アンモニア水 (2:20:80), n-ブタノール-28%アンモニア水-水 (50:9:15) 等を展開剤として沝紙クロマトグラフィーを試みた。

1) ドーフル散を70%アルコールで20分間温浸後沝過, その沝液の濃縮物。2) ドーフル散を1%塩酸で1時間ふりまぜ冷浸し沝液を水酸化アルカリ性としクロロホルムで抽出, 蒸留残留物。3) アヘン散を2)と同様に処理したもの。4) ドーフル散にアンモニア試液少量とベンゼンを加えて1時間振盪後沝液を蒸留した残留物。5) 前項の沝液を1%塩酸に転溶させ水酸化ナトリウムアルカリ性としてクロロホルムで抽出, 蒸留残留物。1), 2), 4), 5), のドーフル散の場合はいずれもトコン中のエメチンのみを分離することは困難であつたので次の操作をほどこして, 沝紙クロマトグラフィーの試料とした。

ドーフル散1gを共栓マイヤースコにとりこれに強アンモニア水0.5cc次にベンゼン40ccを加えて1時

間ふりまぜる。このさいモルヒネはベンゼンに殆ど移行しない。あらかじめベンゼンで湿した汚紙で分液ロート中に汚し1% 塩酸 20, 10, 10, 5cc でふりまぜベンゼン中のアルカロイドを塩酸中に転溶する。全液を合して第2の分液ロートに入れクロホルム 20, 10, 10, 10, 5cc でふりパパベリン, ナルコチン, テバインなどを除く。水層に水酸化ナトリウム試液を加えてアルカリ性としクロホルム 20, 10, 10, 10cc で更に抽出する。この中にはエメチン, コデイン, Porphyroxine-Meconidine が存在する。クロホルム層はあらかじめクロホルムで湿した汚紙で汚して水浴上で留去しアルコールで蒸発皿に洗いこみアルコールを濃縮して汚紙クロマトグラフィーの試料とする。

約 30cm 展開後いずれの展開剤も2つのスポットが現われ Rf, 呈色共にそれぞれコデイン, エメチンに一致する。

Table 2 Rf Values of Codeine & Emetine.

	Emetine	Codeine
n-Butanol: Acetic Acid:Water (10: 1: 5)	0.70	0.52
Acetone:Ethyl Acetate:10%NH ₄ OH (2:20:80)	0.63	0.82
n-Butanol:28%NH ₄ OH:Water (50: 9:15)	0.93	0.88

アヘン散 1g を全く同様に操作展開するとコデインのスポットのみしか現われない。

(B) 塩酸エメチンの 1% 水溶液 5cc をとりアンモニアアルカリ性としてベンゼンを加え, 以下 (A) のドール散と同様に操作してえた抽出物を N/50 硫酸, N/50 水酸化ナトリウム液で滴定定量した結果は 98.0% であつた。

Ⅲ 汚紙クロマトグラフィー展開剤, 検出試薬の検討

1) 展開剤: 東洋汚紙 No. 50 を用いⅡのドール散, アヘン散の試料及びコデイン, エメチンの混合物について n-ブタノール-酢酸-水, イソプロピルアルコール-酢酸-水, イソアミルアルコール-酢酸-水などの酸性展開剤, ベンゼン-石油エーテル-水の中性展開剤, n-ブタノール-アンモニア水, アセトン-酢酸エチル-アンモニア水, 酢酸エチル-エタノール-アンモニア水, アセトン-アンモニア水, 酢酸エチル-アンモニア水, エタノール-アンモニア水などの塩基性展開剤を比較検討した。その結果, アセトン-酢酸エチル-10% アンモニア水 (2:20:80) が最も適当であつた。

三者を混合し分液ロート中でふりまぜしばらく静置してその下層をとつた。アセトンの比率が高いときやアンモニアの濃度が高いときはテーリングの傾向があり, アンモニア水の濃度は 10% が良好である。エメチン, コデイン及びアヘン中のモルヒネ, パパベリン, ナルコチン, テバイン, Porphyroxine-Meconidine, ナルセインの Rf 値は Table 3 に示す。

Table 3 Rf Value of Emetine & Opium Alkaloids.

	Emetine	Codeine	Morphine	Papaverine	Narcotine	Thebaine	Porphyroxine -Meconidine	Narceine
Rf	0.63	0.82	0.78	0.65	原点	0.02	原点	0.88

2) 検出試薬: Munier 試薬, Pauly's Diazo 試薬, 塩化白金ヨウ化カリウム試薬を用いた。

i) Munier 試薬²⁾

- a) 次硝酸ピスマス 17.0g
酒石酸 200.0g
蒸留水 800.0g
b) ヨウ化カリウム 160.0g
蒸留水 400.0g

a 液と b 液とを等量混和しその 10cc に酒石酸 20g, 蒸留水 100cc を加える。

ii) Pauly's Diazo 試薬³⁾

- a) スルフェニール酸 4.5g を塩酸 45cc に加温しながら溶解し水を以て 500cc とする。
b) 4.5% 亜硝酸ナトリウム液
c) 10% 炭酸ナトリウム液
最初に c 液噴霧後 a, b 液の用時等量混合液を噴霧する。

iii) 塩化白金ヨウ化カリウム試薬

- a) 10% 塩化白金液
b) 4% ヨウ化カリウム液
a 液 1cc に b 液 25cc を加え蒸留水で 50cc とする。

Table 4 は各試薬による呈色を示す。なお Porphyroxine-Meconidine の呈色は展開風乾ののち 1% 塩酸を噴霧, 60° に加温すると微紅色を呈する。

Table 4 Colour Reactions of Emetine & Opium Alkaloids.

	Munier 試薬	Pauly's Diazo 試薬	Potassium iodoplatinate 試薬
Emetine	橙紅色	黄褐色	赤紫色
Codeine	〃	橙 色	青紫色
Morphine	〃	暗赤色	帯青紫色
Papaverine	〃	—	帯赤紫色
Narcotine	〃	—	赤紫色
Thebaine	〃	橙 色	帯青紫色
Narceine	〃	黄 色	赤紫色

IV エメチンの抽出確認

ドーフル散に II の抽出操作を行えば抽出物にはエメチン, コデインが残るわけであり, これを展開して上記検出試薬を噴霧して現われる 2 つのスポットはエメチンとコデインの Rf に一致する. 更にエメチンとコデインの混合物を約 30cm 展開した汚紙を発色させ, 同条件でドーフル散を展開したのちエメチンのスポットにあたる部分を 3cm 切りとり細切して試験管に入れアルコール 10cc ずつで 2 回 10 分間水浴上温浸する. アルコールを蒸発皿にとり水浴上蒸発してその残留物につき呈色反応を試みエメチンを確認した. 呈色試薬はモリブデン酸アンモン硫酸試薬, バナジン酸アンモン硫酸試薬を用いそれぞれ淡黄緑色, 淡緑→緑褐色を呈した. アヘン散に抽出操作をほどこして展開したものはコデインの箇所のみしか発色しないが試薬噴霧前のエメチン部位を切りとり同様アルコールで抽出した残留物はモリブデン酸, バナジン酸両アンモン硫酸試薬で呈色は認められなかった.

むすび ドーフル散中のエメチンの検出については塩酸とサラシ粉の反応が用いられているが, この反応はドーフル散とアヘン散との鑑別に不適当な場合が多い. この両者を区別し, ドーフル散中のエメチンを検出するためドーフル散からアンモニアアルカリ性でベンゼン可溶物を集め, これを稀塩酸に転溶させ酸性のままクロロホルムでふりまぜ次に水層を水酸化ナトリウムアルカリ性としてクロロホルムでふりまぜる. これにエメチン, コデイン, Porphyroxine-Meconidine が含まれるから汚紙クロマトグラフィーを用いて分離した. 展開剤にはアセトン-酢酸エチル-10%アンモニア水 (2:20:80) が最も適当であり, エメチンの展開部位を切りとり抽出して呈色反応を試み確認した.

文 献

- 1) 朝比奈晴世, 水町彰吾: 循試, 72, 73 (1954).
- 2) 井藤義朗: 科学と捜査, 8, 141 (1955).
- 3) 梶田治稔: 生化学, 27, 458 (1955).

Summary

For the purpose of identifying emetine in Dover's powder, the reaction of chlorinated lime and hydrochloric acid to ipecac is not sufficient. Because opium powder (contains 1% morphine) gives similar color reaction, it is difficult to distinguish Dover's powder from opium powder.

So we isolate codeine and emetine from other opium alkaloids by shaking out with solvents under various conditions and detect emetine by paper chromatography. As the developing solvent, a mixture of acetone 2, ethyl acetate 20, 10% ammonia water 80 parts by volume is used.

Emetine is eluted and demonstrated by Fr hde's and Mandeline's reagents.

Received February 29, 1956,

けし (*Papaver somniferum* L.) 乳液乾燥温度がモルヒネ含量に
及ぼす影響について

木下 孝三

Effects of the Temperature of Drying the Latex of Opium
Poppy (*Papaver somniferum* L.) upon the Morphine Content

KOZO KINOSHITA

はしがき 戦後久しく禁止されていたけし栽培が1954年あへん法制定¹⁾と共に復活し農家の一産業となつて来ている。従来農家に於ては採汁したけし乳液は竹の皮の背面に均等の厚さに塗りつけ炭火を熱源として乾燥箱内で加熱乾燥するのを慣例としている。しかしこの方法では可なり高温になる場合がしばしば認められるのである。第6改正日本薬局法には70°C以下の温度で乾燥し粉末にしたものと記載されている。農家としてはけしの採汁時期は他作物の収穫期ともかさなり農繁期であり且しばしば陰湿な降雨に際会することが多いため短時間に乾燥を終了しようとして更に加温高温の状態乾燥することが多いようである。他方国の阿片収納にはモルヒネ含量が定量されその含有量に応じて収納代金が支払れることになつていたのでこれが農家の収入に多大の影響を及ぼしているのである。

若者は1955年和歌山分場に於て数種の乾燥法を試み、特に乾燥温度がモルヒネ含量に及ぼす影響を調査した。若干の成績を得たのでここにこの結果を報告する次第である。

材料及び方法

材料 本試験に供用したけし品種は一貫種系統のものであり、1954年11月13日和歌山分場圃場約3畝歩に播種し翌年5月下旬採汁期に達したものの乳液である。

方法 乳液採取の方法は各区とも上記採汁期に達したものを5月20日午後2~3時の間に坊主を切傷し分泌してきた乳液を直ちに採汁したもの(切取と称している)及び翌21日午前5~6時の間前の切傷に再び分泌してきた乳液を朝霧の未だかわかないうちに採汁したもの(朝吹と称している)とである。採集した乳液は各よく攪拌して均質にし、その一定量を採り竹の皮の背面に略同じ厚さに塗付け直ちに所定の乾燥を行つた。乾燥終了後は切取、朝吹を合して粉末にし、検体とした。乾燥完了の程度は乳液が固まり竹の皮より容易に離れ、且指先にて押すと容易にぶちぶちとわれる程度を以てした。

乾燥方法は次の8区とした。

1. 陽乾法。日光により乾燥する方法で現行あへん法によると農家では実行困難であるが古くは広く行われていた方法である。本試験に於ては硝子室内で行つた。

2. 電熱乾燥法。乾燥箱内に於て熱源として電熱器を用い加熱乾燥する。乾燥箱はブリキ製にて縦横高さ夫々約45cm、45cm、80cmの箱で前開き、金鋼6段掛、錠前付であり、上部には排気筒を有し、底部に電熱器を置くようになつている。本試験では300wt.の電熱器を使用した。

3. 炭火乾燥法。これは農家で広く一般に行われている方法である。前記の乾燥箱内で熱源として火鉢の炭火を用い加熱乾燥を行つた。

4. 60°C恒温乾燥。 60°Cの電気恒温乾燥器内で乾燥した。
5. 70°C恒温乾燥。 70°Cの電気恒温乾燥器内で乾燥した。
6. 80°C恒温乾燥。 80°Cの電気恒温乾燥器内で乾燥した。
7. 100°C恒温乾燥。 100°Cの電気恒温乾燥器内で乾燥した。
8. 120°C恒温乾燥。 120°Cの電気恒温乾燥器内で乾燥した。

モルヒネの定量は麻薬技術会で協議決定したあへん末定量法の実施要領暫定案により行つた。

1). 昭和29年4月22日。法律第71号。

実験結果

上記8種の乾燥法によつてけし乳液より阿片を乾燥調製したのであるが、乾燥温度、乾燥所要時間、乳液量、得たる阿片量等は第1表に示す通りである。

Table 1 Comparison of Temperature of Drying, Hours required for Drying and Weight of Opium obtained among Different Methods of Drying.

No.	Method of drying	Temperature of drying		Hours required for drying (day) (hour)	Weight of latex (g)	Weight of opium obtained (g)	Rate of drying (%)
		Max. (°C)	Min. (°C)				
1	Dried by sun-light in glass house	42	17	11.	150	51.2	34.13
2	Dried by 300wt heater in drying-box	65	52	17.0	150	48.8	32.43
3	Dried by charcoal fire in drying-box	60	26	23.0	150	50.7	33.80
4	Dried in thermo-stat at 60°C	62	58	18.0	150	47.8	31.86
5	Dried in thermo-stat at 70°C	71	68	15.5	150	48.7	32.46
6	Dried in thermo-stat at 80°C	81	78	12.0	150	49.1	32.73
7	Dried in thermo-stat at 100°C	103	97	6.5	150	48.8	32.43
8	Dried in thermo-stat at 120°C	122	118	5.0	150	47.5	31.66

各区の乾燥温度についてみると陽乾法は天候、気温等によつて影響されることが多く乾燥温度は最も低く且乾燥期間中の温度の変化も甚しい。乾燥箱内の乾燥では熱源300wtの電熱器の場合温度の変化は少く可なり高温になるが局法規定の70°Cを越えることはない。500wtの電熱器では70°Cを越えるものと想像される。熱源木炭の場合、これは農家で一般に行われている方法であるが、温度の変化最も甚だしく、これを防ぐには炭火の調節が必要であり、可なりの手数を要する欠点がある。恒温乾燥器内の乾燥の場合熟れの温度に於ても温度の変化は少く6~3°Cの範囲である。

乾燥所要時間についてみると陽乾法では非常に長い日時を必要とする。その他の場合は乾燥温度の高くなるに従い乾燥所要時間が短くなつてくる。特に100°C以上になると乳液は沸騰しぶつぶつと気泡を生じ急激に水分を失つて乾固してゆき乾燥時間は非常に短くなつて来る。

一定量の乳液より乾燥により調製し得たる阿片の量及びその比率（これを乾燥率と称しておく）を見るにいずれの乾燥法に於ても大差なくその差は乾燥率に於て最大2.47%に過ぎない。即ち乾燥法、乾燥温度の相違による乾燥率に及ぼす影響は殆んど認められない、次に乾燥調製して得たる阿片の乾燥減量及びモルヒネ含量を示す第2表の通りである。

Table 2 Comparison of Loss in Weight on Drying and Morphine Content of Opium obtained among Different Methods of Drying.

No.	Method of drying	Loss in weight on drying (%)	Morphine content	
			As determined (%)	Calculated on anhydrous basis (%)
1	Dried by sun-light in glass house	9.36	17.67	19.55
2	Dried by 300wt heater in drying-box	9.84	17.68	19.56
3	Dried by charcoal fire in drying-box	9.85	17.79	19.73
4	Dried in thermo-stat at 60°C	9.39	17.81	19.65
5	Dried in thermo-stat at 70°C	9.90	17.73	19.67
6	Dried in thermo-stat at 80°C	9.31	17.68	19.49
7	Dried in thermo-stat at 100°C	9.33	17.79	19.62
8	Dried in thermo-stat at 120°C	9.88	17.12	18.99

乾燥減量については各区とも10~9%内であつて大差なく乾燥法、温度による影響は殆んど認め得ない。

モルヒネ含量についても各区とも殆んど差異を認めず、ただ僅かに120°Cに於て稍低くなつてに過ぎないこれとても誤差の範囲内と推定される。分散分析の結果は第3表に示す通りである。

Table 3. Analysis of Variance of Morphine Content of Opium obtained.

Source of variance	Degrees of freedom	Sum of squares	Variance	F
Treatment	7	0.3704	0.0529	1.41
Analysis	2	0.5394	0.2697	
Error	14	1.0514	0.0751	
Total	23	1.9612		

以上の如く各乾燥法, 乾燥温度の間には有意の差異は全く認められない。

総 括

8 区の異つた温度による乾燥法によつて試験したのであるが, 乾燥所要時間は乾燥温度が高くなるほど短くなるのが認められた。乾燥調製して得たる阿片の量, 水分, モルヒネ含量等は略一様であつて乾燥法特に温度により変化をきたすことなくその影響は全く認め得ない。

農家で行う実用的乾燥法としては高温になるのは何等さしつかえないのであるから熱源として 500wt 位の電熱器を用いて乾燥箱内で速に加熱乾燥するのが最も得策であると考えられる。

文 献

- 1) 第 6 改正日本薬局法注解: (南江堂) 528. (1951).
- 2) 若林栄四郎, 藤本磯男, 弓削清一郎: 衛試彙 59, (1942).
- 3) 朝比奈晴世, 水町彰吾: 衛試報, 71, 20~26(1953).

Summary

By providing eight methods of drying, the effects of temperature dried the latex of opium poppy (*Papaver somniferum L.*) upon the morphine content were investigated in 1955. Results obtained are summarized as follows.

1. The hours required for drying become shorter according to rise in temperature of drying.
2. The effects of drying temperature upon the rate of drying, the loss in weight on drying, and the morphine content of opium obtained are not recognized at all.

Received February 29, 1956

沝紙クロマトグラフィーによる *Ammi visnaga* LAM. 果実中のケリンの定量法

川谷 豊彦, 大野 忠郎, 伊藤 巳代子

A Method of Estimation of Khellin in the Fruits of *Ammi visnaga* LAM.

by Paper Chromatography

Toyohiko KAWATANI, Tadarō OHNO and Miyoko ITO

生薬(果実)中のケリン抽出法には 1) W. S. ABD EL-MALIK (1932), 2) SPAETH & GRUBER(1937), 3) ABD EL-AZIZ ABD EL-RAHMAN (1943) 等の方法がある。さきに著者等は3)の変法を用いて, 春日部に於て1951年栽培された *Ammi visnaga* LAM. の果実中に約0.1%のケリンを証明することが出来たが¹⁾, 然るに1953年, 1954年に継続栽培したものにはケリンを証明することが出来なかつた²⁾。そこで, この原因について栽培条件の見地から検討し, 一面より少い検体で正確簡便な分析法を研究する必要に迫られた。

ケリンは硫酸で黄色のオキシニウム塩を形成し, 比較的稀薄な濃度で安定である。Fahmy(1949)等³⁾はこの色調を光電比色計で測定し, 製剤中の純ケリンの定量法として推奨し, 柴田, 原田⁴⁾は沝紙クロマトグラフィー(展開溶媒, アセトン1:水6)により果実中のケリンを分離し, 硫酸オキシニウム塩とし, ベックマン分光光度計で比色定量した。

著者等はこの方法の展開溶媒に改変を加え, 良い結果を得たので報告する。

実験の部

沝紙クロマトグラフィー 東洋濾紙 No. 50 (2×40cm) の末端より5cmのところケリンのメタノール溶液(0.01ccがケリン100rを含有する)を各々0.03cc(300r), 0.02cc(200r), 0.01cc(100r), 0.005cc(50r)をマイクロピペットでつけ, 乾燥しアセトン1:水6で上昇法により展開し, 沝紙を自然に乾燥後紫外線を照射しケリンのスポットの発する黄色の螢光を観察した。その結果0.005cc(50r)つけたものはRf=0.66でスポット

をなしたが, その他のもの(100r以上つけたもの)はすべてテイリングした。

後述する如く, ベックマン分光光度計で比色する場合の定量可能域はケリン5~30r/ccであるから, 1枚の沝紙から被検液を10cc作るためには, 1枚の沝紙に50~300rのケリンをつけなければならぬ。従つてアセトン1:水6の溶媒では1枚の沝紙につけ得るケリン量の最高限界は, 50rであるから, 1検体を定量するのに数枚の沝紙を使用せねばならぬ事になり, 多数の検体を定量する場合には操作が極めて不便である。そこで1枚の沝紙に50~300rつけた場合でもスポットになる様な溶媒を見出すため, 種々の溶媒を試みた。その結果, 酢酸6:水4で展開した場合, 東洋濾紙No. 50でRf=0.79の黄色の螢光を発するスポットをなした。沝紙につけるケリン量が300r以上になるとスポットが拡がり, 500r以上ではテイリングを示した。

呈色の吸収曲線 ケリンに10N硫酸(ケリン0.0026gに10N硫酸を加え100ccとする)を加えてオキシニウム塩(Khellin sulphate)を形成せしめるとき呈する黄色を, ベックマン分光光度計(B型)を用いて各単色光に於ける吸光係数を測定した結果は Fig. 1 の如くで410m μ に最

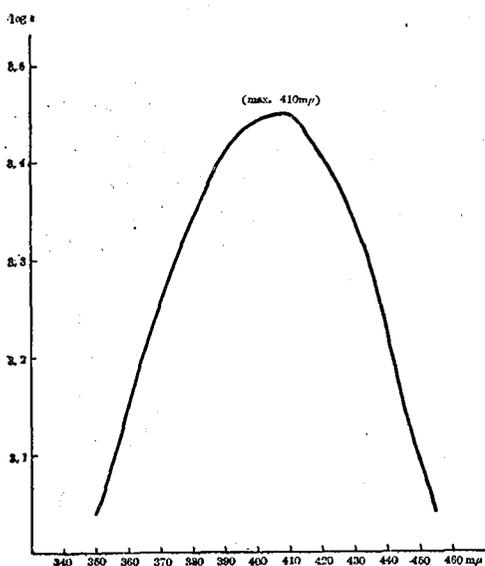


Fig. 1 Extinction Coefficient Curve of Oxonium Salt of Khellin (Khellin Sulphate) (Beckman Spectrophotometer Model B; $M/10^4$; $l=1\text{cm}$)

大吸収部がある。

回帰方程式の算出 ケリン 0.25g を 60v% エタノールに溶かし 50cc とする。この液 5cc を取り 60v% のエタノールを加えて 100cc とする。この液 (1cc は 250r のケリンを含む) の 0.2cc (50r), 0.4cc (100r), 0.6cc (150r), 0.8cc (200r), 1.0cc (250r), 1.2cc (300r) を各々取り、エタノールを溜去し、10N 硫酸を加えて 10cc とする。これらをベックマン分光光度計 (B型) を用い、410m μ 光の吸光係数を測定した結果は Table 1 の通りである。

Table 1 Extinction Coefficient of Oxonium Salt of Khellin (Khellin Sulphate)
($\lambda=410m\mu$; $l=1cm$)

Khellin concentration r in 1 cc		5	10	15	20	25	30
Extinction coefficient [ϵ]	I	0.062	0.163	0.188	0.257	0.287	0.359
	II	0.058	0.107	0.178	0.263	0.305	0.380
	III	0.072	0.130	0.192	0.262	0.327	0.385
$\epsilon=0.01249r/cc.+0.00227$		0.065	0.127	0.190	0.252	0.315	0.377

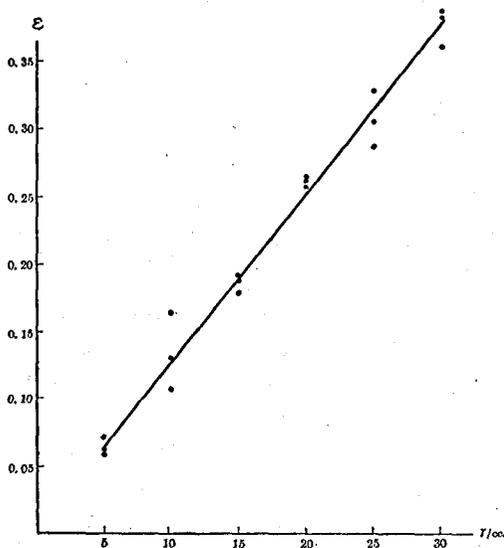


Fig. 2. Regression Line of Extinction Coefficients of Oxonium Salt of Khellin (Khellin Sulphate)

(Beckman Spectrophotometer Model B; $\lambda=410m\mu$; $l=1cm$) $r/cc.=80.0799\epsilon-0.1816$ or $\epsilon=0.01249r/cc.+0.00227$

Table 2 Recovery (%) of Khellin extracted from Dissected Paper Chromatograms

Khellin spotted at the starting point	Recovery (%) of khellin extracted from dissected paper chromatograms				
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Average
100 r	92	100	90	104	96.8
150 r	95	92	91	87	91.3
200 r	94	94	94	—	94.0
					94.0

Table 1. の実験成績 ($n=18$) を基として測定値 ϵ から濃度 r/cc を推定する回帰方程式を最小自乗法で求めると、

$$r/cc=80.0799\epsilon-0.1816 \quad (1)$$

$$\text{又は } \epsilon=0.01249r/cc+0.00227 \quad (1')$$

この式から求められる各濃度の標準吸光係数は Table 1 の最下行であり、Fig. 2 は回帰直線を中心に実験データの分布状態を示す。

なお濃度 r から逆に ϵ 値を推定する為の回帰方程式を求めれば、

$$\epsilon=0.01227r/cc+0.00613 \quad (2)$$

となり、(1)' との差異は極めて僅かである。

標準偏差の算出 比色測定操作に関する標準偏差 σ は図上 (Fig. 2) に於いて 0.00914 である。

濃度による誤差限界の算出 山口等²⁾に従い 2σ 法を採用し、 2σ に対応する濃度の誤差限界 Δr を求めると $2\sigma=0.01828$ $\Delta r=0.0234$

グラフ上 $\epsilon:r=1:100$ 故に $\Delta r=2.3r$

即ち 2σ に相当する濃度限界は図上 (Fig. 2) に於いて $\pm 2.3r$ である。

濾紙よりのケリンの回収率 ケリン 10mg を 1cc のエタノールに溶かし、この 0.01cc (100r), 0.015cc

(150r), 0.02cc (200r) を東洋沔紙 No.50 (2×40cm) の1端から5cm のところに, マイクロピペットでつけ, 乾燥後酢酸6:水4で15時間上昇法により展開し, 乾燥後紫外線を照射し, スポットの位置を確め, スポットの部分を切り取り, 毎回4ccのメタノールで4回温浸, 1回冷浸しメタノールを溜去し, 10N 硫酸を加え発色せしめ, これをベックマン分光光度計で吸光係数を測定し, 回帰方程式よりケリン量を求めて, 沔紙よりの回収率を見た. その結果は Table 2 の通りで, 平均 94% であつた.

Ammi visnaga LAM. の果実中のケリン定量 果実よりのケリンの抽出は柴田, 原田⁴⁾の方法によつた. 即ち果実 0.25g を水 50cc に懸濁させ 20 分間煮沸後沔過し, 残渣を熱湯で 2 回洗い, 沔液と洗液とを合する. これに 10% 酢酸鉛 1cc を加え 4 分間煮沸して沔過し, 沈澱を熱湯で 2 回洗い沔液と洗液とを合する. これに第二磷酸ソーダ 0.1g を加え, 再び 4 分間煮沸し冷後沔過し, 沈澱を水で 2 回洗う. この沔液, 洗液の合液を毎回 25cc のクロロホルムで 4 回抽出し, 脱水芒硝でクロロホルムの水分を除きクロロホルムを溜去し, エキスを得る. これをエタノール適当量に溶かして検体とする.

得られたエキスの一定量 (ケリン 50~300r 程度) とり, 沔紙クロマトグラフィーによりケリンを分離した. 即ち展開溶媒として酢酸 6:水 4 の混液を用い 15 時間上昇法により展開すれば, ケリンのスポットは前述のケリン結晶を用いた時と同様に $R_f=0.79$ で黄色の螢光を発する. この部分を切り取り, 同様にメタノールで抽出しメタノールを溜去し, これに 10N 硫酸を加え, この際 10N 硫酸 1cc 中にケリン量 5~30r 程度の濃度の範囲に 10N 硫酸の量を加減する. これをベックマン分光光度計 (B型) を用い, 410m μ 光の吸光係数 ϵ を測定し, 回帰方程式からケリン量を求めた. これに 10N 硫酸の cc 数を乗じ沔紙よりの回収率で除した値を検体中のケリン量とした. リスポン植物園より入手し, 春日部に於いて 1951年¹⁾以降毎年栽培をくりかえしたものを, 1954 年圃場で栽培した本植物の果実を本法で定量した結果は平均 0.14% であつた. なお, 同一検体について著者等の従来の重量法¹⁾によつて定量した結果, ケリンを検出し得なかつたことは既に述べた.

回収率試験 1955 年春日部に於いて栽培した本植物の果実抽出エキスに一定量のケリン結晶を加えて, 本定量法によつて定量し, 加えたケリン結晶の回収率を試験した. その結果は Table 3 の通りであり, 回収率は平均 96% であつた.

Table 3 Recovery (%) of Khellin Added to the Fruit Extract

Exp. no.	Khellin in fruit extract <i>r</i>	Khellin cryst. added <i>r</i>	Total khellin		Recovered khellin from added cryst. <i>r</i>	Recovery from added cryst. (%)
			calculated <i>r</i>	found <i>r</i>		
1	30	87	117	112	82	94.3
2	30	87	117	110	80	92.0
3	30	107	137	135	105	98.1
4	30	107	137	135	105	98.1
Average						95.6

本研究に対し, 懇篤な御指導を賜つた東大柴田承二教授, 屢々有益な助言と教示を与えられた野崎泰彦部長に敬意を表し, 実験を援助された西村千昭氏, ベックマン分光光度計による測定に関して教示を与えられた山口一孝部長, 福島清吾技官に謝意を表する.

総 括

沔紙 (東洋沔紙 No.50) を用い, 酢酸 6:水 4 の溶媒で果実の抽出エキスを展開して, ケリンを分離し, スポットの部分を切り取りメタノールで溶出し, 10N 硫酸を加えてオキシニウム塩を形成せしめて呈する黄色を, ベックマン分光光度計 (B型) で吸光係数を測定し, 光電比色的に定量する方法を考案した. ケリンは沔紙に 300r 以下をつけた場合によくスポットをなし, ケリン濃度と吸光係数との関係は 10N 硫酸 1cc 中に 5~30r の濃度の範囲に於いて直線関係をなし, 定量が可能である.

文 献

- 1) 川谷豊彦, 藤田早苗之助, 大野忠郎, 久保木憲人, 矢崎達雄: 薬誌, 73, 781-782(1953). 2) 川谷豊彦, 藤田早苗之助, 大野忠郎, 久保木憲人: 薬誌, 74, 558-559(1954). 3) Fahmy, I. R., Badran, N., and Messeid, M. F. : J. Pharm. Pharmacol., 1, 529-534(1949). 4) 柴田承二, 原田正敏: 日本生薬学会関東部会第4回研究発表会, 昭和30年11月19日講演; 生薬学雑誌, 投稿中. 5) 山口一孝, 太幡利一, 長沢元夫, 吉川嶺子: 薬誌, 72, 581-585(1952).

Summary

Estimation of khellin was carried out by its isolation from the fruit of *Ammi visnaga* LAM. by paper chromatography and measurement of the extinction coefficient, with a spectrophotometer, of the yellow color developed by the formation of an oxonium salt (khellin sulphate) by the addition of sulphuric acid to the paper chromatogram.

1) The pure khellin gave, on paper chromatography on Toyo Roshi No. 50 developed with acetic acid:water (6:4) mixture, a yellow fluorescent spot at Rf 0.79.

2) This chromatographic spot was cut out, eluted with methanol, and 10N sulphuric acid was added to the methanolic residue. The yellow color of the oxonium salt hereby developed was submitted to the measurement of extinction coefficient at $410m\mu$ (maximum absorption) by the Beckman Model B spectrophotometer (Table 1). Recovery of khellin from the filter paper was 94% (Table 2). The relationship between the amount of khellin (γ /cc.) and extinction coefficient (ϵ) was linear between 5 and 30 γ /cc. and the experimental formula calculated by the method of least squares was γ /cc. = $80.0799\epsilon - 0.1816$.

3) The standard deviation, σ , of this regression line, in Fig. 2, was 0.00914, and the limit of concentration corresponding to 2σ was 2.3γ .

4) A suspension of 0.25g. of powdered fruits of *Ammi visnaga* in 50cc. of water was boiled for 20 minutes, filtered, and the residue on the filter was washed twice with boiling water. The combined filtrate and washings was boiled with 1cc. of 10% lead acetate solution for 4 minutes, filtered, and the residue was washed twice with boiling water. The combined filtrate and washings, added with 0.1g. of disodium hydrogen phosphate, was boiled again for 4 minutes, cooled, and filtered. The residue was washed twice with water, and the combined filtrate and washings was extracted with four 25cc. portions of chloroform. The combined chloroform extract was dried over anhydrous sodium sulphate and evaporated. The ethanolic solution of this extract was used as the sample for paper chromatography by spotting its suitable amount (50~300 γ as khellin) on a paper and developed with acetic acid:water (6:4) mixture. Khellin appeared as a yellow spot at Rf 0.79, which was eluted with methanol, color developed by the addition of 10N sulphuric acid, and coefficient of extinction of this solution was measured with the Beckman Model B spectrophotometer. The amount of khellin was calculated from the regression line (Fig. 2).

5) Experiments were made on the amount of khellin recovered by adding a definite amount of khellin to the fruit extract containing a known amount of khellin. The results are shown in Table 3, indicating an average recovery of 96%.

Received February 29, 1956

逆性石鹼について (第3報) 塩化ベンゼンニウムの燐タングステン酸による重量定量法及び燐モリブデン酸による比色定量法

吉 村 淳, 守 田 実

Studies on Invert Soaps. III. Gravimetry and Colorimetry of Benzethonium Chloride

Kiyoshi YOSHIMURA and Minoru MORITA

まえがき われわれは先に燐タングステン酸を用いて Benzalkonium Chloride 及び N-Alkylbenzyl-NNN-trimethylammonium chloride (オロナイン) の重量分析¹⁾を報告し更に燐モリブデン酸を用いて Benzalkonium Chloride の比色定量法²⁾を報告したが、今回これ等の方法を逆性石鹼の一つである Benzethonium Chloride に応用して満足すべき結果を得た。

Benzethonium Chloride の定量法としては、U. S. P. (V³⁾ に赤血塩との結合を利用するヨウ素滴定法があり、N. N. R⁴⁾ (1953) でも同法及びケルダール法による窒素定量と塩素の定量とを規定している。又第二改正国民医薬品集⁵⁾ではケルダール法による窒素定量のみを掲げているが、これ等の方法はどれも比較的多量の試料(純品として1~2g)を必要とするので極めて稀薄な溶液にはそのまま適用出来ない。

理 論 の 部

燐タングステン酸及び燐モリブデン酸がアルカロイド及び其他の有機窒素化合物と沈澱を生じることは古くから知られているが逆性石鹼の場合にも燐タングステン酸イオン、燐モリブデン酸イオン等の陰イオンがアンモニウム化合物の陽イオンと結合して沈澱を生ずるものと考えられる。

本論 われわれは約0.25%の Benzethonium Chloride の溶液に燐タングステン酸を作用させてその際の試薬の量、放置時間、温度、酸性度、沈澱洗滌の水の量等検討し6~40mgの範囲の微量の Benzethonium Chloride の重量法を確立し、燐モリブデン酸を用いて更に微量即ち0.25~0.7mgの範囲の試料に対する比色定量法を考案した。

重量分析 Benzethonium Chloride の場合には薄い溶液でも始め酸を加えると白く濁るので先づ試料に燐タングステン酸を加え、後硫酸を加えることにした。約0.25%の Benzethonium Chloride 液5ccにつき2%燐タングステン酸液5ccを加え、ついで水、2N、3N、及び4N硫酸を5ccづつ加えて沈澱時におけるpHの影響をしらべた処、Table 1に示す結果を得た。

即ち2N以上の酸性度では沈澱の生成は一定となるが2N、3Nの場合には透明な上澄液を得るのに長時間を要し、4N硫酸の場合には比較的早く沈澱が沈着するので4N硫酸を用いることにした。又Table 2、Table 3及びTable 4よりわかるように試薬の量、温度(0°~45°Cの範囲に於て)及び放置時間はあまり影響が無い。又沈澱の水に対する溶解性を調べる為に30、50、70、及び100ccの洗滌水を用いた場合、この範囲内では差が認められなかつた。

Table 1.
Effect of Acidity

	Wt. of Ppt. (mg)
Distil. Water	36.7
2NH ₂ SO ₄	41.0
3NH ₂ SO ₄	41.2
4NH ₂ SO ₄	40.7

Table 2.
Effect of Amt. of Reagent

%	Wt. of Ppt. (mg)
1	40.3
2	40.2
4	40.4
8	40.5

Table 3.
Effect of Temp.

Temp. (C°)	Wt. of Ppt. (mg)
0	41.0
15	40.3
25	40.6
45	40.3

Table 4.
Effect of Length of Standing Period

Time(min)	Wt. of Ppt. (mg)
15	40.1
30	40.6
60	40.6
120	40.6

比色分析 この場合も重量分析の場合のように先づ硫酸を加えついで燐モリブデン酸液を加えることにした。4

N の硫酸を用いること以外は沈澱時の条件は Benzalkonium Chloride の場合に準じた。尚沈澱のアセトン溶液に塩化第一スズを加えた際の呈色度は塩化第一スズの量及び塩酸の濃度により大いに影響されるが Benzalkonium Chloride の場合に行つたのをそのまま応用した。但し呈色度は始め強く徐々に弱くなるが、全試薬を加えて後 80~100 分の間では殆んど一定でこの間に吸光度を測定することにした。

本研究を行うに当り御鞭撻戴いた刈米所長、種々便宜を計つて戴いた喜谷支所長及び中島、河内、笠原各技官又試料を提供された三共株式会社に厚く感謝する。

実験の部

重量法

試薬 (1) 2% 磷タングステン酸液 (磷タングステン酸はメルク製分析用)。

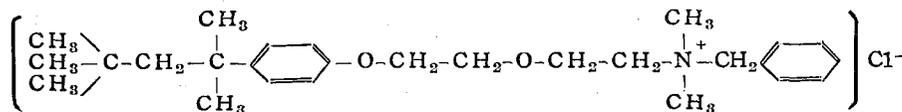
(2) 4N 硫酸

標準液 Benzethonium Chloride の 10% 水溶液を水でうすめて約 1% 液としその 10cc をとりセミミクロケルダール法で 3 回窒素を定量し、平均値をとり、逆算して (但し Benzethonium Chloride の分子量は U. S. P. XV により monohydrate として 466.11 を採用した) Benzethonium Chloride の濃度を決め順次うすめて 125.6 mg%, 251.2mg%, 520.3mg% 及び 753.5mg% の 4 種の溶液を作つた。

定量法 これ等液の 5cc 宛をとり、2% 磷タングステン酸液 5cc 宛をふりまぜながら加え、更に 4N 硫酸 5cc を加えてよくふりまぜ室温で 15 分以上放置し、予め乾燥し秤量したグラスフィルター (口径約 22mm, 高さ約 35 mm のルツボ型) に沈澱を移して後洗滌する。吸引戸過後減圧硫酸デシケータ中で乾燥し秤量する。

この様にして 4 種の濃度の Benzethonium Chloride について実験を行つて Table 5. に示す結果を得た。最小自乗法で回帰式を求めると $Y=0.3117X$ となる。

Table 5



Amt. of Bt. C. (mg)	0	6.28	12.56	25.12	37.67
	0	19.7	40.6	80.1	122.6
		20.1	40.1	80.4	120.6
		19.8	40.6	80.3	119.2
Wt. of Ppt. (mg)		19.1	40.2	81.3	122.1
		19.2	40.6	80.0	119.8
		20.2	40.3	81.1	120.8
		20.4	39.6	81.0	121.7

$Y=0.3117X$, Y: Amt. of Benzethonium Chloride,

X : Wt. of Precipitate

比色法

試薬 (1) 4N 硫酸

(2) 3N 塩酸

(3) 2% 磷モリブデン酸液: 磷モリブデン酸と水との混合物 (2:100) をはげしくふりまぜ戸越し戸液を用いる。

(4) 1% 塩化第一スズ液: 塩化第一スズ ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) を 1% の割合に 3N 塩酸に溶かして用いる。

(5) アセトン

測定装置 Beckmann Spectrophotometer B型

標準液 重量法の場合に濃度を決めた Benzethonium Chloride の溶液を更に正確に薄めて 12.56mg%, 18.

84mg%, 25.12mg%, 31.40mg% 及び 37.67mg% の5種の溶液を作った。

定量法 これ等液5cc 宛をとり2% 磷モリブデン酸液5cc をふりまぜ乍ら加え、ついで4N 硫酸5cc を加えよくふりまぜて混合し沈澱の生成を促進する。室温でしばらく放置した後グラスフィルター(重量法の場合に用いたものと同じ)を用いて吸引濾過し、水で洗つて過剰の磷モリブデン酸を除きフィルター上の沈澱にかかるく吸引し乍ら10cc の温アセトンを加えて沈澱を50cc のメスフラスコ中へ溶かし込み、フィルターは更に5cc のアセトンで洗つて同様にメスフラスコ中へ流し込む。このアセトン溶液に1% 塩化第一スズ液5cc をふりまぜ乍ら加え、ついで3N 塩酸10cc を同様にふりまぜ乍ら加え、アセトンで50cc としてはげしくふりまぜる。直ちに25°C の恒温槽に入れ80分後に730m μ で吸光度を測定する。このようにして Fig. 2 に示すような検量曲線を得た

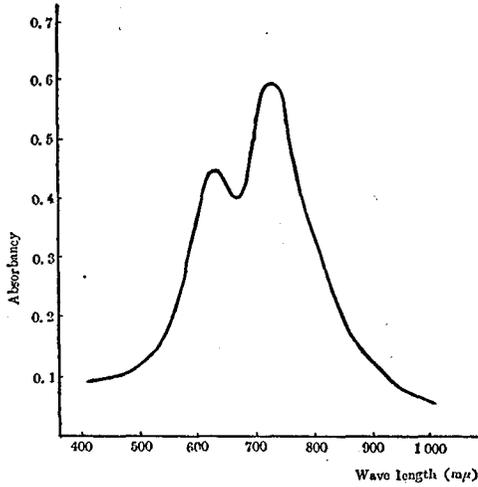


Fig. 1 Absorption Curve

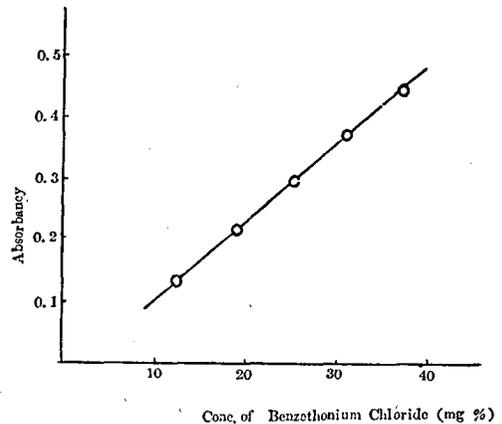


Fig. 2 Calibration Curve

総 括

重量法により定量する場合、25mg 附近で定量する場合には誤差1%以内で行い得る。又比色法の場合には0.6 mg 附近(約30mg% 5cc)で行うのが適当と思われるがこの附近の濃度で行つた場合の操作上の誤差を見出す為に15回実験を行つた結果を Table. 6 に示す。比色の場合には誤差が稍々大きくなるが5%以内の誤差で定量できる。

Table 6

0.416	0.392	0.360
0.394	0.418	0.398
0.381	0.399	0.401
0.419	0.368	0.388
0.380	0.390	0.404

n = 15
 \bar{x} = 0.394
 df = 14
 S. D. = 0.017
 Error = 4.33%

本法は微量の Benzethonium Chloride を比較的簡単に特殊の試薬を用いることなく定量出来る。

文 献

- 1) 吉村, 守田: 衛生試験所報告, 73, 141(1955).
- 2) Yoshimura K. and Morita, M: Pharm Bull, 3, 432(1955)
- 3) The Pharmacopeia of the United States of America (Fifteenth Revision), P. 86
- 4) Tests and Standardas for New and Nonofficial Remedies, (1953) p. 28
- 5) 第二改正国民医薬品集, P. 58

Summary

Benzethonium Chloride, an Invert Soap, was determined colorimetrically as well as gravimetrically, using the same principle for the determination of Benzalkonium chloride previously reported (Bull. Hyg. Lab 73, 141 (1955)). Various factors on both precipitation and coloration were also investigated.

The gravimetric or colorimetric method of assay described here is available to determine such small amount of sample as ca. 25mg or ca. 0.6mg respectively.

Received February 29, 1956

定量条件の検討

1. 濃度の一定した BrCN 液または BrSCN 液の作り方 BrCN 液または BrSCN 液製作に用いる飽和臭素水は理論上 4°C において 3.42%, 0°C において 4.3% の臭素を含むはずであるが実際には氷冷時 2.6~4.1% の間を上下し一定濃度の飽和臭素水は得にくい⁹⁾。

そこで濃度の一定した BrCN 液または BrSCN 液を作るには、Kulikow 法¹⁰⁾ に準じて、氷冷した水 25cc に臭素 0.25cc を加え (完全にはとけない) よくふりまぜながら 10% シアン化カリウムまたは 10% 硫シアン化アンモニウム液を* 臭素の色が褪色して液が丁度無色になるまで徐々に滴加する。密栓し氷冷しつつ貯える。数日間使用可能。有毒! かくしてできる BrCN 液の理論的濃度は 2%, BrSCN 液の理論的濃度は 2.7% である。

2. BrCN 液または BrSCN 液の pH の影響 1 項にのべたようにしてできた BrCN 液の pH は 5.6, BrSCN 液では強酸性であつた。因に 4% 結晶 BrCN 液では pH 5.8 である。そこでこれら BrCN 液, BrSCN 液 (以下 CN 液と総称する) の pH がチオクロム産生率に影響するのではないかと考えて次の実験を行つた。

即ち CN 液 10cc をとり種々な量の 5% 炭酸ナトリウム液を加え各種 pH の CN 液を調製し 常法に準じて実験した結果 pH 1.2~7.2 の間ではチオクロム産生率に変化はない。それ故 CN 液はそのまま用いることにした。

3. CN 液添加量の影響 B₁ よりチオクロムへ転化する反応を完全に進行させうる至適条件の検索のために次の実験を行つた。

即ち、B₁ 0.5 μ g を含む検液 5cc をとり種々の量の CN 液を加え、次に 30% 水酸化ナトリウム液 2cc を加え以下松井の方式¹¹⁾ の如く操作する。Table 2. はその成績で CN 液の添加量が 2~4cc で螢光の強度は一定し最高となり、添加量が少いと急激に減少し、多すぎる方は徐々に減少する。この CN 液が過剰のとき低い螢光度が出る理由は CN 液の絶体量の不足のためでなく、全液量が増すためにアルカリの作用濃度が低下することに起因するものであろう。その理由は Table 2. 中の副線以下の数値にみる通り、その害がアルカリの濃度を増すことにより幾分かは防げるからである。

Table 2 Effect of Varying Amount of Added BrCN (or BrSCN) Solution on Oxidation of Thiamine to Thiochrome.

Amount Added (cc)	Conc. of NaOH in Reaction Mixture (%)	Method I*		Method II*
		Matsui ¹¹⁾	Nambaru	Nambaru
0.5	8.0	91	92	74
1.0	7.5	99	98.5	88.5
2.0	6.7	100	100	98.5
3.0	6.0	100	100	100
4.0	5.5	97	100	100
5.0	5.0	93	96.5	100
6.0	4.6	—	96.5	98.5
8.0	4.0	—	95	97
13.0	3.1	—	87	88.5
8.0	4.0 (30% NaOH 2 cc added)		95	97
8.0	6.0 (45% NaOH 2 cc added)		100	100
13.0	3.1 (30% NaOH 2 cc added)		87	88.5
13.0	6.0 (60% NaOH 2 cc added)		98.5	97

* Method I : BrCN-method

* Method II : BrSCN-method

* 10% KCN 液, 10% NH₄SCN 液は 3ヶ月冷蔵しても使用にたえる。

4. 水酸化ナトリウムの濃度および添加量のえらび方 3項の実験からチオクロム産生率を左右する主因子はアルカリの作用濃度であると考えられるが、更に明確な実証を得るために、アルカリ液自身について追究した。即ち B₁0.5 γ を含む検液 5cc をとり CN 液 3cc を加えついで 10~50%の水酸化ナトリウム液 2cc を加え松井¹¹⁾の方式に従つて操作し、松井¹¹⁾の行つた 30%水酸化ナトリウム液の種々量を加えた成績と比較検討した成績が Table 3. である。表にみるごとく反応液中のアルカリの作用濃度が 10%の時チオクロム産生率は BrCN, BrSCN の何れを使つた時でも理論値に等しく、反応の進行はアルカリの濃度が高い程完全なことが判明したが実用上はアルカリ濃度 6%で充分であらう。

Table 3. Effect of Varying Concentration or Amount of NaOH on Oxidation of Thiamine to Thiochrome.

	30%NaOH Added (cc)	Conc. of NaOH in Reaction Mixture (%)	%Fluorescence Intensity Method I
Matsui ¹¹⁾	1	3.3	94 (93)
	2	6.0	100 (99)
	3	8.2	100 (99)
	4	10.0	101 (100)

	Amount of NaOH added	Conc. of NaOH in Reaction Mixture (%)	% Fluorescence Intensity	
			Method I	Method II
Nambaru	10% 2cc	2	91	85
	20% 2cc	4	94	94
	30% 2cc	6	97	95.5
	40% 2cc	8	100	97
	50% 2cc	10	100	100

Method I : BrCN-method ; Method II : BrSCN-method

5. 結晶 BrCN を用いた実験 かつて Teeri^{12) 13)} は 4%結晶 BrCN-液と pH6.6 の磷酸塩緩衝液を用い B₁ より生ずる黄色を $\lambda = 440m\mu$ において比色定量するか、ここに生ずる螢光の強度を測つて B₁ を定量しうることを報告しているの、市販の結晶 BrCN を水にとかして作つた BrCN 液と、1.の方法によつて作つた BrCN 液との効力を比較した成績を Table 4. に示す。3.の実験にみるごとく余り液量をますとその螢光度が低下するので、BrCN 液の添加量が 3cc までは 4%液を用い、それ以上は 8%液で代用することにした。

Table 4. Comparison of Two BrCN Reagents

		Amount Added (cc)	NaOH (%)	%Fluorescence Intensity
BrCN Sol. A. *	4%	2	6.7	92
		3	6	87
	8%	2	6.7	79
		3	6	69
		4.5	5.2	63
		6	4.6	56
BrCN Sol. B. *	2	6	100	

* BrCN Sol. A : 4or 8g of crystalline BrCN is dissolved in 100cc of H₂O

* BrCN Sol. B : Freshly prepared from saturated bromine water and 10% KCN solution

この実験の範囲では結晶 BrCN 液は 1. に従って作った BrCN 液に比べ優れていない。しかも試薬添加時発熱を認めた。結晶 BrCN は常温で徐々に揮散し保存しにくくもあるので採用しないことにした。

6. BrCN 液または BrSCN 液の作用時間ならびに 30% 水酸化ナトリウム液添加後ブタノール抽出に至る時間 BrCN 液の作用時間についてはすでに松井¹¹⁾ によつて報告されているので BrSCN 液について調査した成績を Table 5. (a) に示す。

Table 5 (a) Effect of Interval between Addition of BrCN or BrSCN and NaOH on Assay Value

Interval (min)	%Fluorescence Intensity	
	Method I* (Matsui)	Method II*
immediately	99	98
1	100	100
3	99	100
5	100	100
10	99	100
15	100	100

*Method I : BrCN -method

*Method II : BrSCN -method

表にみる通り 15 分後まで実験を行つたが BrCN 液と同様に 1~15 分間チオクロム産生率に変化はない。

30%水酸化ナトリウム液添加後ブタノール抽出に至る時間については松井¹⁴⁾ が N-メチルニコチンアミド共存時の B_1 定量の際に N-メチルニコチンアミドより生じる盲螢光物質をできるだけ少くするために、5~15 分後にブタノール抽出をすることをすすめているが、他の場合には別に厳格な規定はしていないので、時間的制約を特別に考慮しなくてよいのだと思われる。それ故この点について実験を行つてみたが 2~30 分間 BrCN 法 BrS

CN 法の何れにおいてもチオクロム産生率に変化はなかつたので、ブタノール抽出は 2~30 分の間に適宜行えばよい。

7. $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ・アルカリ混液添加後ブタノール抽出に至る時間 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 法において $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ とアルカリの混液を用いる方が、両液を順次に加える方法より螢光の測定値が変動しないことは能勢¹⁹⁾ により詳しく検討され、U.S.P. XV,³⁾ B.P. Codex. (1954),⁴⁾ A.O.A.C. (1955),⁶⁾ A.V.C. (1951)¹⁵⁾ 等もこの混液使用の方法を採用している。A.V.C. (1951)¹⁵⁾ に $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ・アルカリ混液を使つた添加時間についての報告があるが、この点について追試時間を 10 分後まで延長して得た成績を Table 5. (b) に示す。

Table 5 (b) Effect of Interval between Oxidation and Butanol Extraction on Assay Value. ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ -method)

Interval before Shaking (min)	%Fluorescence Intensity	
	A. V. C. 15)	Nambaru
Shaken immediatly	100	100
0.5	100	100
1.0	100	100
3.0	100	100
5.0	98	97
10.0	—	95

6., 7. で得られた成績を総合してみると、 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 法では 3 分後までは変化を認めないが既に 5 分後で変化がみられるので、U.S.P. (XV)³⁾ 等に於ても $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ・アルカリ混液添加後 2 分間でブタノール抽出することを明示している。これに反し CN 法においては、 CN 液作用時間で 1~15 分間、アルカリ添加後ブタノール抽出に至る時間で 2~30 分間変化がみられないのでこの点一度に多くの定量操作を行う場合、 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 法より CN 法の方が好都合であろう。

8. チオクロム産生率 同一量の B_1 から BrCN 法によつて得たチオクロムの螢光強度は $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 法による場合より常に強いといわれる^{16) 17)}。そこで $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 法および CN 法により、 $B_1 0.5\gamma$ より生ずるチオクロムの螢光を測定し、これを $B_1 0.5\gamma$ に相当する結晶チオクロムの理論量 0.387γ を 25%塩酸酸性塩化カリウム液 5cc 中に含む液を作りこれに水 3cc および 30%水酸化ナトリウム液 2cc を加え以下常法のごとく行つて得た螢

光と比べて、チオクロム産生率を検した成績が Table 6. である。藤原¹⁸⁾は BrSCN によるチオクロム産生率を BrCN 法と比較すると軽度に低いと述べているが、反応液中のアルカリの濃度を 10% にすれば、理論値に等しいことが判明した。なお $K_3Fe(CN)_6$ 法によるチオクロム産生率は Conner²⁰⁾ の報告値と似ていた。

Table 6 Degree of Conversion of Thiamine to Thiochrome.
Thiochrom $0.387\gamma = B_1 0.5\gamma = 100$ Scale Divisions

Oxidizing Reagent	Conc. of NaOH in Reaction Mixture%	% Conversion
BrCN+NaOH	10	100
	6	97 (100)
BrSCN+NaOH	10	100
	6	95 (98)
$K_3Fe(CN)_6$ +NaOH	5.4	70 (72)
	Conner ²⁰⁾	67 (69)

9. B_1 量 (チオクロム量) と蛍光強度との比例関係およびその変動 硫酸酸性硫酸キニーネ 0.25 γ /cc 標準液を用い、A. K. A. 蛍光光度計のスケールを 100 に調節して測定すると、0.1~2.0 γ B_1 /5 cc 25% 塩酸性塩化カリウム液でよく直線関係を示した。Phaltz & Bauer の蛍光計²¹⁾ を使うと 0.1~5.0 B_1 /5 cc 25% 塩酸性塩化カリウム液で、Klett 蛍光計²²⁾ を使うと 10 γ チオクロム/5 cc イソブタノール液以下で直線関係が成立するという。

$B_1 0.5 \sim 2.0\gamma / 5$ cc 25% 塩酸性塩化カリウム液を用い、誘出以後の操作について誤差を求めてみると Table 7. のごとくで、 $K_3Fe(CN)_6$ 法と比較して CN 法の誤差は非常に少い。なお、 $K_3Fe(CN)_6$ 法において渡辺²³⁾、藤原²⁴⁾は $K_3Fe(CN)_6$ とアルカリとを別々に加える方式、Conner¹⁹⁾、A. V. C.¹⁵⁾ および本報告では $K_3Fe(CN)_6 \cdot$ アルカリ混液を用いる方式をとつている。

Table 7 Percentage Error through "Oxidation" to "Fluorescence Measurement"
(Confer Table 1.)

	Fujiwara ²³⁾	Watanabe ²⁴⁾	Nambaru	A. V. C. ¹⁵⁾
BrCN	± 2.3	± 1.9	± 1.1	—
$K_3Fe(CN)_6$	± 4.8	± 4.5	± 3.2	$\pm 2.5^*$
n	—	20	10	—

* Percentage Error obtained through entire procedure.

10. 共存物質による影響 BrCN 法と $K_3Fe(CN)_6$ 法の特異性については藤原、藤田等によつて、還元性物質(システイン、ビタミンC)、ピリジンならびにピリミジン誘導体、タンニン酸、N-メチルニコチンアミド、金属イオン (Co, Cu, Fe) 等共存物質による影響とその妨害を克服する改良法が詳細に報告されている。一方 Teeri¹⁹⁾ はニコチン酸、ニコチン酸アミド、ピリドキシン、ピリドキサール、ピリドキサミン等の他ビタミンによる影響を調査し、ピリドキサールについては 10 倍量まで影響なく 100 倍量では微弱な蛍光を生ずると報じている。

本報では現在市販製剤中の最高混合比の共存物質ととり 吸着法におけるその影響を調査した。共存物質の混合比を次に示す。

B_1 : B_2 : B_6 : 葉酸: ニコチン酸アミド: パントテン酸カルシウム: C: ベンチルアルコール: クロレトン: ブドウ糖: グルコン酸カルシウム: タウリン = 1: 2: 1: 1: 10: 1: 50: 1: 1: 17: 13: 1

調査の結果 $K_3Fe(CN)_6$ 法、CN 法の何れにおいても共存物質による妨害を認めなかつた。それ故市販混合ビタミン剤に関する限り 他物質による妨害の点では $K_3Fe(CN)_6$ 法および CN 法間に差異はないと考える。

終りに臨み終始指導を賜わり、本稿の校閲を仰いだ小川俊太郎部長に謹んで感謝の意を表す。また結晶チオクロムを恵与された武田研究所松川泰三博士に深謝する。

総 括

CN法について種々の定量条件を検討し、チオクロム産生率を左右する主因子はアルカリの作用濃度であること、アルカリの作用濃度が10%のときはBrCN, BrSCNの何れを使つても理論値に等しいことを確めた。

$K_3Fe(CN)_6$ 法において酸化剤添加後ブタノール抽出に至る時間、およびCN法においてCN液の作用時間、30%水酸化ナトリウム液添加後ブタノール抽出に至る時間について両方を比較してみると、 $K_3Fe(CN)_6$ 法に比べてCN法は遙かに時間的余裕をもっているので操作上便利であると思う。

CN法の測定誤差百分率は $\pm 1.1\%$ (10回測定)で、 $K_3Fe(CN)_6$ 法では $\pm 3.2\%$ (10回測定)であつた。市販ビタミン混合剤に関する限り他物質による妨害の点では両方に差異はない。

またCN液製作に用いるシアン化塩または硫シアン化塩の水溶液は3ヶ月冷蔵しても使用にたえる。

文 献

- 1) 第68回, 69回ビタミンB総合研究委員会発表 (1954)
- 2) Jansen, B. C. P. : Rec. Trav. Chim., 55, 1046 (1936)
- 3) The Pharmacopeia of the United States of America, Fifteenth Revision, 1955, P. 914
- 4) British Pharmaceutical Codex, 1954, P. 1251
- 5) Pharmacopoea Internationalis, Editio Prima, Volume I, 1951, P. 362
- 6) Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemist, 1955, P. 819
- 7) 藤原: 日生化, 21, 200 (1949)
- 8) 厚生科学研究報告: 混合ビタミン剤の試験法に関する研究 (昭29) p. 75
- 9) 小川, 塚本: ビタミン, 6, 450 (1953)
- 10) Kulikow, J. W. : Z. Anal. Chem., 79, 452 (1930)
- 11) 松井: ビタミン, 6, 143 (1953)
- 12) Teeri, A. E. : J. Biol. Chem., 173, 503 (1948)
- 13) Teeri, A. E. : ibid, 196, 547 (1952)
- 14) 松井: ビタミン, 6, 458 (1953)
- 15) Association of Vitamin Chemist : Methods of Vitamin Assay, 1951, P. 112
- 16) 藤原: ビタミン, 3, 33, (1950)
- 17) 藤原: ビタミン, 3, 153 (1950)
- 18) 藤原: ビタミン, 6, 963 (1953)
- 19) 能勢, 田代: 日生化, 21, 130 (1949)
- 20) Conner. R. T. Straub. G. J., : Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 13, 380 (1941)
- 21) 松井: ビタミン, 6, 148 (1953)
- 22) 渡辺: 薬誌, 73, 1272 (1953)
- 23) 渡辺: 薬誌, 73, 1282 (1953)
- 24) 藤原: ビタミン, 6, 679 (1953)

Summary

- (1) A new thiochrom method applying cyanogen bromide as oxidizing reagent, originally reported by Fujiwara et al. (1949), was critically examined and finally compared with the usual thiochrome method using potassium ferricyanide as oxidant.
- (2) Active cyanogen bromide solution should be made before use by titrating a bromine solution (put 0.25cc of bromine in 100cc of water), kept in ice water, with 10% potassium cyanide or ammonium thiocyanate solution just until the bromine solution decolorizes. Nonpoisonous ammonium thiocyanate is easier to handle.
- (3) The pH of cyanogen bromide solution thus made, ranging from 1.2 to 7.2, has no bearing upon

assay value.

- (4) Insufficient cyanogen bromide solution retards thiochrome formation and in excess lowers the alkali concentration in oxidation step, both are detrimental to assay.
- (5) Conversion of thiamine to thiochrome is affected mainly by the concentration of alkali in oxidation step, alkali concentration up to 6~10% should be necessary.
- (6) Maximum yield of thiochrom (ca 100% to the theoretical value) is obtained when 5 cc of solution of thiamine (containing 0.1~1 γ of thiamine in 25% potassium chloride solution acidified with hydrochloric acid) is oxidized with 3 cc of cyanogen bromide and 2 cc of 30% sodium hydroxide.
- (7) Cyanogen bromide solution which can be prepared by dissolving crystalline cyanogen bromide in water has no advantage of the above mentioned, rather this crystal is poisonous, volatile and inconvenient for storage.
- (8) Little attention should be paid to the interval between addition of cyanogen bromide and alkali (ranging from 1 to 15 min.) or to the interval between alkali addition and butanol extraction (ranging from 2 to 30 min.). No serious error will be found.
- (9) Pyridoxine, folic acid, calcium pantothenate, benzyl alcohol, chloretone and taurine in equal amount, twofold of riboflavin, tenfold of nicotinamide, thirteenfold of calcium gluconate, seventeenfold of glucose and fiftyfold of ascorbic acid do not interfere the assay.
- (10) Fundamental procedure will be showed in Table 1 and linier relationship between fluorescence intensity and amount of thiamine present in 5 cc of eluate is found over a range of 0.1~2.0 γ .
- (11) Percentage error due to oxidation step, butanol extraction and fluorometry in decaplicate assays is within $\pm 1\%$.
- (12) Because of its simple manipulation, better yield of thiochrom and minor error, this method applying cyanogen bromide as oxidant is more reliable than usual thiochrom method, adopted in many official compendia using potassium ferricyanide.

Received February 29, 1956

混合ビタミン剤のマイクロバイオアッセイ（続）1. ビタミンB₁₂の定量

新村 寿夫

Microbiological Assay of Multiple Vitamin Preparations (continued).

1. Assay of Vitamin B₁₂

Toshio NIHMURA

まえがき 前号¹⁾にビタミンB₆, B₁₂, ニコチン酸, パントテン酸, 葉酸及びビオチンの微生物学的定量法について報告したが, B₁₂の定量法について, さらに若干の知見を得たので報告する。

実験方法

1. 菌株

L. leihmannii	ATCC 4797	衛生試験所保存のもの (4797E)
L. leihmannii	ATCC 4797	京都大学薬学科保存のもの (4797K)
L. leihmannii	ATCC 7830	衛生試験所保存のもの (7830E)
L. leihmannii	ATCC 7830	京都大学薬学科保存のもの (7830K)

保存(来歴)の異つた前記の2 strain 合計4株を実験に用いた。4797Eは昭和28年6月2日に American Type Culture Collection (ATCC) より, 4797Kは昭和30年8月18日に京都大学薬学科生物薬品化学教室より, 7830Eは昭和31年1月9日にATCCより, 7830Kは昭和30年12月8日に京都大学薬学科生物薬品化学教室より, それぞれ入手した。

2. 菌株の保存 米局方²⁾に準ずる。但し保存培地は15lb. 10min 滅菌する。当初は保存培地(寒天)に1週2回移植を行い, 氷室に貯えたが, 現在では接種用培地(液体)に毎日移植し, 休日のみ保存培地に移植し, 氷室に貯える。

3. 接種用培地 米局方²⁾に準ずるが, 接種培地の液量は5ccで15lb. 5min 滅菌する。接種菌懸濁用培地は基礎培地の2倍稀釈液で5cc, 10cc及び15ccづつ分注し, 15lb 5min 滅菌する。定量用菌株を接種用培地に移植し, 37°(±0.5°以内)で16~20hrs 培養後無菌的に遠心し, 上澄液を傾瀉して除く。ついで懸濁用培地5ccに菌体を懸濁させた後, 再び遠心して上澄をのぞく。この操作をさらに2回繰返した後, 菌体を懸濁用培地5ccに懸濁し, その1ccをとり, 4797Kを試験菌として用いる時は10ccの懸濁用培地に, 7830Eを用いる時は15ccの懸濁用培地に加えよく混合し, 接種菌液とする。通常この菌液をA. K. A. 光電比色計(610mμ, 1cm, sb光電管使用)で測定するときの透過度(T%)は次の如くである。

7830E 1:15 約67%; 7830E 1:10 約57%; 4797K 1:10 約60%

4. 標準液

(1) シアノコバラミン標準原液 米局方²⁾に準ずる。

(2) シアノコバラミン標準原液の一定量を取り水で稀釈し, シアノコバラミンの濃度を0.02mγ/cc及び0.04mγ/ccとする。

5. 基礎培地(以下BMと略記する)

BMa.....米局方 XV の無水酢酸ナトリウムを3分子の結晶水を含む結晶に替え同量用いた。

BMb.....米局方 XV

BMc.....米局方 XIV の無水酢酸ナトリウムを3分子の結晶水を含む結晶に替え同量用いた。

BMd.....米局方 XIV

BMe.....BMc のトマト汁50ccをフマル酸0.1gに替えた。

BMa~eのいづれにも食塩は加えない。シスチン及びトリプトファンは米局方²⁾の如く用時N塩酸に溶かし用いる。

6. 定量方法

(i) 試験管の洗滌は常水で洗滌後, 一旦乾かし, 次で65v/v% 硫酸に2hrs以上浸し, 再び常水で洗い水洗

後乾かし 250° で 2 hrs 加熱する。

(g) 培養液量は 5 cc で各濃度段階に就て 2 本づつとり、アルミニウムキャップを使用した。

(h) 滅菌及び接種: 15lb. で 5 min 滅菌し、 $\frac{1}{2}$ 皮下用注射針で 1 滴づつ接種する。

(i) 培養時間

7830E (接種菌液 1 滴) 20~24hrs; 4797K (接種菌液 1 滴) 約20~28hrs; 4797E (接種菌液 2 滴) 20~28hrs

(k) 測定: シアノコバラミン標準液を含まずかつ接種しない試験管の内容物の透過度 (T) を 100% とし、各試験管の内容物の透過度を 1 cm の液厚で A. K. A. 光電比色計で測定する (波長 540~660m μ 通例 610m μ)

実験結果及び考察

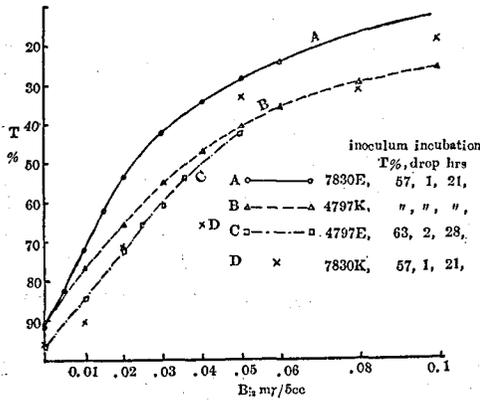


Fig. 1 Dose Response of *L. leichmannii* ATCC 7830 and ATCC 4797

影響を及ぼす因子の 1 つとして保存温度を予想しうるので、その影響をみるために、4797K を保存培地に 2 日目毎に 1 回移植し、約 2 ヶ月間 (30.10.4~30.12.8) +5°, +10° 及び -5° に保存し、次に 1 回接種培地に移植したものを、更に接種培地に移植して菌液を作った。基礎培地には Difco B₁₂ Assay Medium (U.S.P. XV) にトマト汁を加えたものを使用し、これに T. 57% (610m μ , 1cm) の菌液 2 滴を接種し、23hrs 培養後検量曲線を作つて、相互に比較した (Fig. 2)。結果としては +10° に保存した株の活性が最も高く、保存温度が下るにつれて低い、しかし、Fig. 1 の 4797E と K の間に現われた程の差異は見られなかつた。

結局現在迄のところ活性の差異を生ずる原因はつかめていないが、接種培地に毎日移植し、休日のみ保存培地に移植すれば、菌が現有する活性を保つことができる。米局方 XV²⁾ の記載に「毎日保存培地に移植すれば、接種培地に移植し、2~4 hrs 培養後明かな増殖を認める程度の菌の活性を保持できる」とあるが、現在 7830E 及び 4797K はいずれもこの程度の活性を示している。

3. 菌の活性と定量範囲 検量曲線が有効な範囲 (定量範囲と略記する) は通例曲線を書いてみれば、おおよそ知ることができる。しかし定量範囲は当然、菌の活性度の差異により、多少ずれる筈である。この事は米局方 XIV³⁾ ではシアノコバラミン濃度 0~0.1m γ /10cc の範囲で検量曲線をとるよう規定していたのに、米局方 XV²⁾ 及び A. O. A. C.⁴⁾ では一定濃度の標準液を規定せず、定量範囲に幅を持たせるようになったことでも判る。現在の米局方²⁾ は概ね標準系列の最高濃度が 0.05m γ /10cc~0.2m γ /10cc であるよう定めている。

1. 菌株の違いと検量曲線 Fig. 1. 7830E, 7830K, 及び 4797K は同時に実験し接種菌量、基礎培地等の条件は同じであるが、7830E 及び K は増殖が速いので 21hrs 培養、4797K は 7830 に比し増殖が遅いので 28hrs 培養した。4797E は前記の 3 株と同時に実験したのではないが、増殖はさらに遅く、接種菌液を 2 滴に増して 28hrs 培養した。4797K は 4797E に比べて増殖の速度も最高値も大きい。また 7830E は 7830K よりも増殖の速度も最高値も大きく、バラツキが少ない。以上の成績から試験菌としては 7830E 及び 4797K がよいが内でも 7830E の方が好ましい。

かように strain は同じでも来歴が異れば試験菌としての活性が異なるから定量用菌株の保存には特に留意する必要がある。

2. 菌株の保存温度と検量曲線 保存中に菌の活性に影響を及ぼす

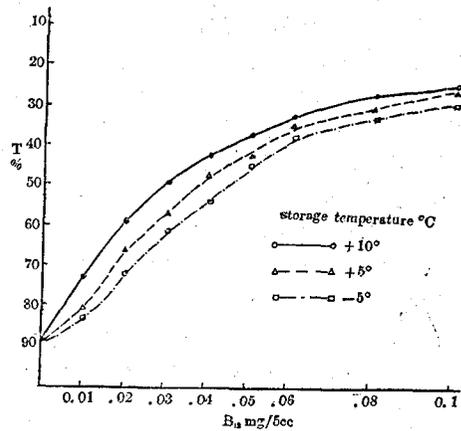


Fig. 2 Effect of Storage Temperature on Dose Response

著者の実験によると 4797E を用いて酸滴定で測定するとき、5cc 培養で、シアノコバラミンの定量範囲は 0 ~ 0.05mr/5cc¹⁾、また 4797E、4797K 及び 7830E を比濁法により測定するとき (Fig.1)、5cc 培養で 0 ~ 0.1mr/5cc であり、米局方の指示する範囲に合致した。

定量範囲の決定には盲験値と曲線の立上り方が問題になる。盲験値は低い程よく、立上り方は或る程度急であることが好ましく、逆に余り緩徐では誤差が大きくなる。この点について初め Krieger 等²⁾ はシアノコバラミンの濃度 0 ~ 0.1mr/10cc の定量範囲内で、盲験値及び最高 B₁₂ 濃度に対応するそれぞれの透過度 (T) を定めて、低活性菌による定量誤差を除去したが、同じ菌浮遊液でも測定器により T 値は多少異なるので、T 値で菌の活性を規定することはかえつて煩わしい。そこで米局方 XV³⁾、Krieger 等²⁾ 及び A. O. A. C.⁴⁾ では盲験及び盲験と最高シアノコバラミン濃度との差をある一定の乾燥菌量に対応する T 値としている。これが最も妥当なきめ方

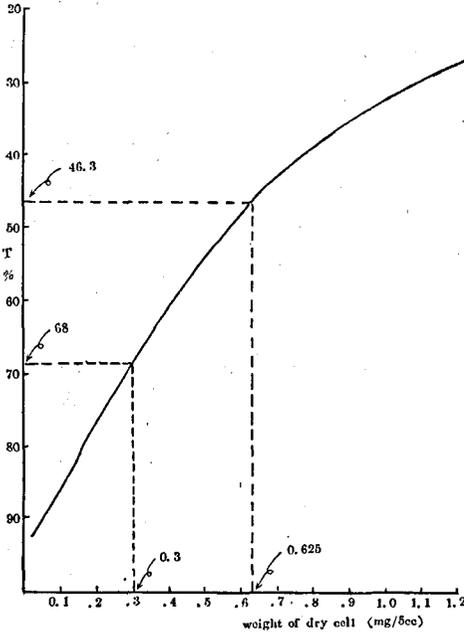


Fig. 3 Relationship between Transmittance and Weight of Dry Cell (610mμ.1cm)

であるが、それには T 値と乾燥菌量の関係を予め検定しなければならぬ。Fig. 3 は著者が A. K. A 光電比色計 (610mμ 1cm) で米局方 XV³⁾ に準じて実施した場合の乾燥菌量 (mg) と T 値の関係を示す。本図と米局方 XV³⁾ の規定を比べると、盲験 T 値 (B₁₂ を入れずに接種だけ行つた培養試験管の T 値) は乾燥菌量 0.3mg/5cc に相当する値以上ならばよいのであるから、図より T 値が 68% 以上ならばよいことになる。

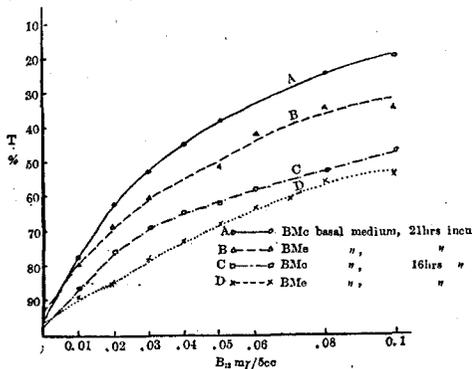


Fig. 5 Effect of Tomato Juice and Fumaric Acid on Dose Response of *L. leichmannii* 4797K

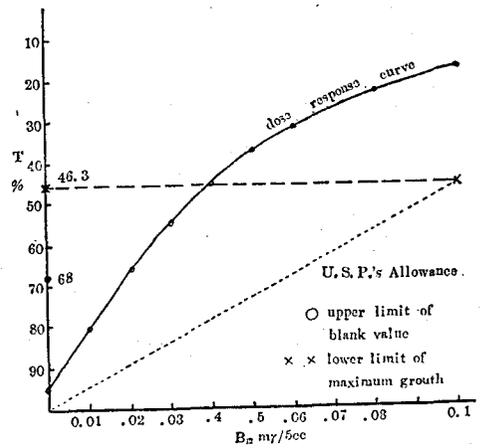


Fig. 4 Comparison of Response of 7830E and U.S.P. XV's Allowance

又盲験と最高シアノコバラミン濃度に対応する T 値の差が乾燥菌量 0.625mg/5cc に相当する値以上ならばよいのであるから、最高 T 値が 46.3% (但し米局方に従いこの場合の T 値は B₁₂ を含まず、接種した盲験の T 値を 100% として求める) 以下となればよいことになる。この米局方 XV の規定を著者の検量曲線に照してみたのが Fig. 4 であるが、7830E 及び 4797K とともに、盲験は 90% 以上、最高 T 値は 13 ~ 30% で充分米局方の規定に合致する。

4. 基礎培地の組成 米局方 XIV³⁾ で基礎培地に加えていたトマト汁が米局方 XV³⁾ 及び A. O. A. C.⁴⁾ では省かれて

いる。鈴木, 村田⁷⁾, 松田⁸⁾, H. T. Thompson⁹⁾ はトマト汁の代りにフマル酸を使用している。又著者¹⁾ が 4797 E で酸滴定した前報告では酢酸ナトリウムの少い方が酸生成量がよかつたので, これらの点をさらにくり返して調べるために前述の BMa~Me 基礎培地を作り, 4797E, 4797K 及び 7830E を用いて試験した。

基礎培地に BMC, BME を用い 4797E では 26hrs 及び 44hrs 培養, 4797K では 16hrs 及び 21hrs 培養 (Fig. 5) の場合, トマト汁とフマル酸の効果を試験したが, いずれもトマト汁を入れた BMC を用いた方が, フマル酸を入れた BME を用いたときよりも増殖がよい。次に 7830E の 22hrs 培養でトマト汁及び酢酸ナトリウムの影響を試験したが, 酢酸ナトリウムの量が変つても, トマト汁を加えた方が増殖がよく (Fig. 6 A : C, B : D), トマト汁の有無にかかわらず, 無水酢酸ナトリウムを含水の結晶に替えた方が多少増殖がよい (Fig. 6 A : B, C : D)。

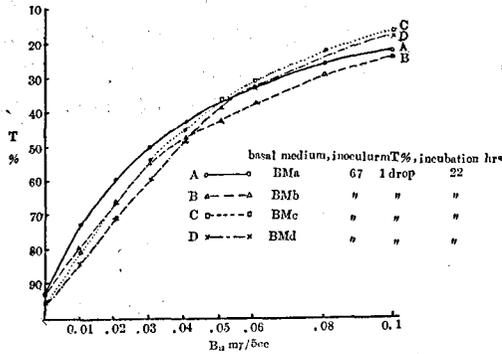


Fig. 6 Effect of Tomato Juice and Natrium Acetate on Dose Response of *L. leichmannii* 7830E

び培養時間を行い, 現在よい成績を納めている。

6. 文献との比較 *L. leichmannii* 4797 及び 7830 を用いたシアノコバミンの検量曲線は既に多く報告されている。これ等を一つの図表として比較するには測定器械, その他条件が異なる上に, 正確に写し得ない難もあるが, あえて著者の検量曲線と比較してみた。(Fig. 7)

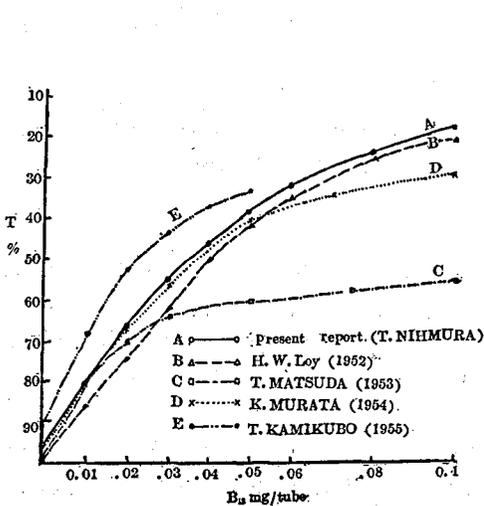


Fig. 7 Diagrammatic Comparison of Response Curves Presented by different Authors

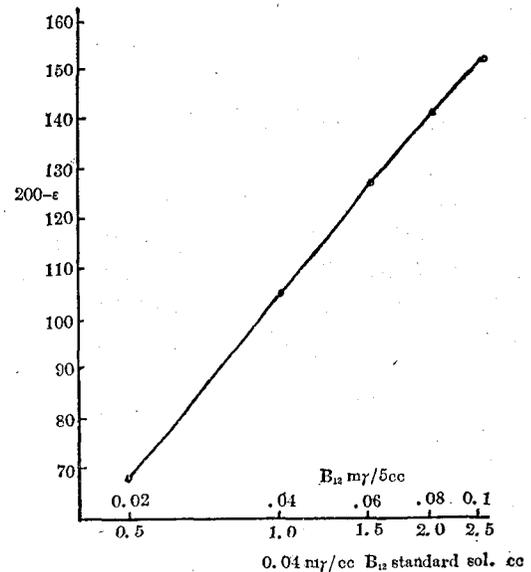


Fig. 8 Dose Response Curve with *L. leichmannii* ATCC 7830 according to U. S. P.

No.	Investigator	Strain	Incubation vol. cc	Basal Medium	Inoculum T%	Incubation hrs	Measurement
A	T. NIHMURA	7830	5	Modified U. S. P. XIV	67(1 : 15)	22	A. K. A
B	H.W.Loy, J. R. ¹⁰⁾ J. F. Haggerty	7830	10	A. O. A. C	40~50 (1:10)	16	Beckman B
C	T. MATSUDA ⁸⁾	—	5	—	85~90	40	Shimazu
D	K. MURATA ⁷⁾	4797	5	Thompsons Medium + KCN	—	40	—
E	T. KAMIKUBO ¹¹⁾ K. TANAKA	4797	5	U. S. P. XIV	50~90	24	A. K. A

また、Fig. 8 は著者が7830Eを用い、BmB (米局方XV) の基礎培地にT67%の菌液1滴を接種し、22hrs培養後610m μ で測定して、米局方XVの記載に随い検量曲線を作製したものである。

本実験を行うに当つて御指導を賜つた京都大学鈴木友二教授及び小川俊太郎部長、菌株を分与された京都大学薬学科生物薬品化学教室の各位に深謝する。

本研究費の一部は昭和30年度厚生科学研究費及びビタミン研究委員会から仰いだ。

総 括

米局方XIV, XVに準じた培地と手法によつてB₁₂をL. leichmanniiで定量するとき、菌とその活性及び基礎培地についてつぎの所見を得た。

- 1) ATCC 4797, 7830のうち、後者の方が増殖が早く、値の動揺もすくない。
- 2) しかし、保存状況が変わると菌の活性がかなりちがう。
- 3) 株の保存温度としては+10°がよく、低温ほど活性が鈍るが、これが活性を左右するおもな原因ではない。
- 4) 活性を保つには、米局方の接種用液体培地に毎日うえつぐのがよい。
- 5) 現有する4797と7830はこの培地にうえてから2~4時間で明かに増殖し、米局方が規定する活性をもつ。
- 6) 定量範囲は20~24時間培養、比濁法(A. K. A光電光度計, 610m μ , 1cm, Sb光電管)で、B₁₂相当量0~0.1m μ /5cc/管で、盲験のT値は常に90%以上、最大増殖に対するT値は13~30%で菌量をもつて定める米局方の検量曲線の規格にあてはまる。
- 7) 基礎培地中の酢酸ナトリウムは無水を用いるよりも、3分子の結晶水をもつた結晶を使用した方が多少増殖がよい。
- 8) 基礎培地にトマト汁を加えた方が、加えないもの及びフマル酸に替えたものよりも増殖がよい。

文 献

- 1) 新村寿夫, 新村和枝: 衛生試験所報告, No. 73. 81 (1955)
- 2) The Pharmacopeia of the United States of America, Fifteenth Revision, 1955, P. 885
- 3) The Pharmacopeia of the United States of America, Third Supplement, 1952, P. 15.
- 4) Methods of Analysis of The Association of Official Agricultural Chemists, 1955, P. 835
- 5) Krieger, C. H.: J. Assoc. Offi. Agri. Chemists, 37, 781 (1954)
- 6) Krieger, C. H.: J. Assoc. Offi. Agri. Chemists, 38, 711 (1955)
- 7) 村田希久, 宮本梯次郎: 大阪市立大学家政学部紀要, 2, 159 (1954)
- 8) 松田龍夫: ビタミン, 6, 49 (1953)
- 9) Thomson, H. T., Dietrich, L. S. and Elvehjem, C. A.: J. Biol. Chem., 184, 175 (1950)
- 10) Loy, H. W. Jr., Haggerty, J. F., and Kline, O. L.: J. Assoc. Offi. Agri. Chemists, 35, 161 (1952)
- 11) 上久保正, 田中欣二: ビオアッセイ集談会誌, No. 3. 26 (1955)

Summary

1. L. leichmannii ATCC No. 7830 is more adequate for microbial assay of vitamin B₁₂ than ATCC No. 4797. It grows rapidly with better response and minor fluctuation.

2. Successive transfers through pepton-yeast extract-tomatojuice-glucose liquid medium is efficient to

maintain optimum activity.

3. Activity of microorganism lowers when the storage temperature is below 0°C, 5-10°C may be preferable.

4. Excess sodium acetate hinders microbial growth, reducing its content to about 1/1.66 of U. S. P. prescription, growth enhances.

5. Tomato juice accelerates microbial growth and preferable than the addition of fumaric acid.

6. According to U. S. P. method, after incubating 20-24 hrs, blank (equivalent to 0.0mγ B₁₂ in 5 cc of assay medium) yields the transmittance of more than 90% (610mμ) and maximum growth (equivalent to 0.1mγ B₁₂/5 cc of assay medium) yields the transmittance ranging 13-30%.

Received February 29, 1956

ヒスチジン製剤中ヒスチジンの化学的定量法

平岡 栄一

Chemical Assay of Histidine in the Commercial Histidine Preparations

Eiichi HIRAOKA

まえがき 蛋白質加水分解物等に含まれるヒスチジンの化学的定量法としては *Pauli* 反応を利用する比色法が数種報告されているが、ヒスチジンのほかにもチロジンが同種の呈色をするためにまえもつて後者を除去する必要があり、この点では *Lang*¹⁾ の方法がすぐれているように思われる。ヒスチジンの比色法としては *Macpherson*²⁾ の報告がくわしく、ほかに2, 3の改良法^{3) 4)} がある。また呈色色素を有機溶媒で抽出するくわだても行なわれた。⁵⁾

著者は主としてヒスチジン含有製剤中のヒスチジンを迅速、正確に定量しようと思い、前記諸文献を追試検討し若干の改良を行い満足すべき結果をえたので報告する。なお市販ヒスチジン製剤を改訂比色法と微生物定量法により試験した結果は別に述べる。

改訂比色定量法

I ヒスチジンとチロジンの分離 チロジンを含有しない製剤に対しては、I の操作をはぶきただちに II より始める。

〔試薬〕 (1) 水銀混液 塩化第二水銀の飽和液 150cc に結晶酢酸ナトリウム 70g および塩化ナトリウム 10g を加えてとくす。

(2) 4% 硼砂液

(3) N 塩酸

(4) 5% シアン化カリウム液

〔操作〕 1cc 中にヒスチジン 1~2mg を含むように試料を水で稀釈したのち、この液 1cc を遠沈管にとり酸またはアルカリで中和する (B.T.B. pH 試験紙使用)。つぎに N 塩酸 1 滴を加えて酸性にしたのち、水銀混液 1cc および 4% 硼砂液 2cc を加えよくふりまぜる。白色沈澱が生じ始めたならば、ただちに遠心して上澄液を棄て、水 5cc を加えてよく洗つたのち再び遠心する。この操作をさらに 1 回くり返したのち、残渣に 5% シアン化カリウム液 2, 3 滴を加えて完全にとかし、これに水約 10cc を加えて 50cc のメスフラスコに移す。水 5cc で 1~2 回遠沈管を洗つて洗液をメスフラスコに合し、つぎに水を加えて 50cc にする。本液 1cc はヒスチジン 20~40 μ を含有する。

II ヒスチジンの呈色

〔試薬〕 (1) A 液. 10% 塩酸 100cc にスルファニル酸またはスルファニルアミド 1g をとくす。

(2) B 液. 5% 亜硝酸ナトリウム液。

(3) 炭酸ナトリウム液. 無水炭酸ナトリウムの 20% 水溶液。

(4) 塩基性アルコール. 75% アルコール 100cc に炭酸ナトリウム液 1cc を加える。

(5) ヒスチジン標準液. 塩酸ヒスチジンの純結晶を用いて、1cc 中にヒスチジン 100 μ 含む水溶液をつくる。

〔操作〕 ヒスチジン 10~150 μ を含む抽出液 1cc を 25cc のメスフラスコにとり、酸またはアルカリで中和し (B.T.B. pH 試験紙使用) 水を加えて約 10cc とし、A 液 1cc および B 液 1cc を加えよくふりまぜてのち 30 分間室温に放置する。つぎに炭酸ナトリウム液 3cc を加えよくふりまぜたのち、さらに塩基性アルコール 10cc を加えてよくふりまぜ、一旦 10° 以下になるように冷却する。ふたたび室温にもどし、水を加えて 25cc とし検液とする。

別にヒスチジン標準液 1cc を 25cc のメスフラスコにとり水を加えて約 10cc とし、別の 25cc メスフラスコに水 10cc をとり、以下検液のととき同様の操作を行つてそれぞれ標準液および盲検液をつくる。

盲検液を対照液に用いて、60min 以内に波長 510m μ における吸光度を測定し、検液および標準液からえた読みをそれぞれ E_1 , E_2 とする。

〔計算〕 つぎの式より抽出液 1cc 中のヒスチジン量 (T) を算出し、さらに試料のヒスチジン含量に換算する。

$$\text{抽出液 1cc 中のヒスチジン量 } (\gamma) = \frac{E_1}{E_2} \times 100$$

定量法の検討

(1) 芳香族パラアミノ化合物による呈色 (Table 1) スルファニル酸, スルファニルアミドのほか、パ

Table 1 Colour Reaction of Histidine with some Aromatic *p*-Amino Compounds

<i>p</i> -Amino Compounds	Molecular weight	Colour	Extinction *
Sulfanilic acid	173	red	0.195
Sulfanil amide	172	red	0.205
<i>p</i> -Amino acetophenone	135	turbid, mauve	—
<i>p</i> -Amino benzoic acid	137	yellow	0.275
Ethyl- <i>p</i> -Amino benzoate	165	turbid, red	0.230

* Histidine content 60 γ . Kotaki photoelectric colorimeter. $\lambda_{max.} = 530m\mu$.

ラアミノアセトフェノン, パラアミノ安息香酸およびパラアミノ安息香酸エチルエステルの5者についてⅡの操作により呈色を行つた。パラアミノ安息香酸は黄色に呈色し、吸収極大は400~430 $m\mu$ にあつて特異性にかける。パラアミノアセトフェノンおよびパラアミノ安息香酸エチルエステルの呈色物質をキシレンで抽出してみたが、水層の分離および色素の抽出が困難で実用化しにくい。スルファニル酸とスルファニルアミドの2つがもつとも実用的である。

(2) スルファニル酸およびスルファニルアミドによる呈色液の吸収スペクトル ヒスチジン100 γ のスルファニル酸およびスルファニルアミドによる呈色の吸収スペクトルをとつて見るとスルファニル酸の方の吸光値が高く、スルファニルアミドの方が約10%高いという文献²⁾と相違している (Fig. 1)。しかし両者の盲検液の吸

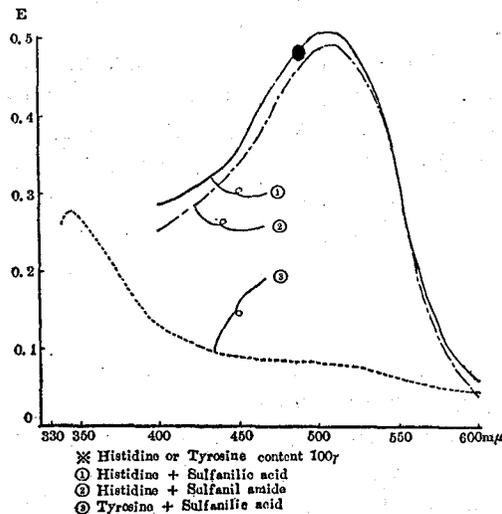


Fig. 1 Light Absorption of Reaction Mixture *

収りは殆んど同一である。なお文献²⁾では濾光板としてS53を使用しているが吸収極大は510 $m\mu$ であり、比色のときにはS50の方がS53よりも高い吸光値を示す。

(3) 検量線作成 (Fig. 2) スルファニルアミドにより検量線をつくつたが、ヒスチジン量150 γ までは直線、それ以上では上曲し、スルファニル酸でも同様の傾向がみられた。要するにどちらも定量に使用しうる。

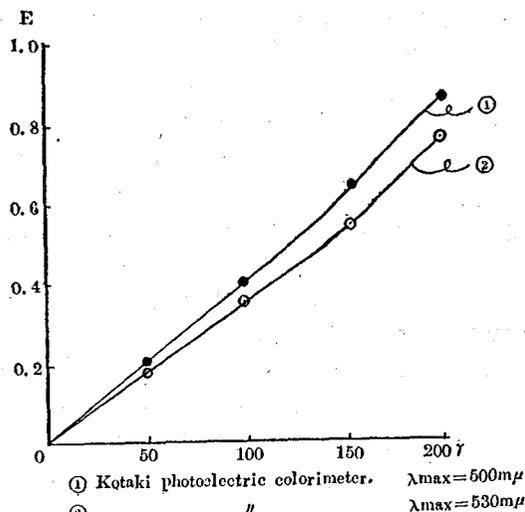


Fig. 2 Calibration Curve of Histidine

(4) 特殊調製試液による検量線作成 (Fig. 3) 前記定量法の〔操作〕にしたがうと A 液および B 液を加

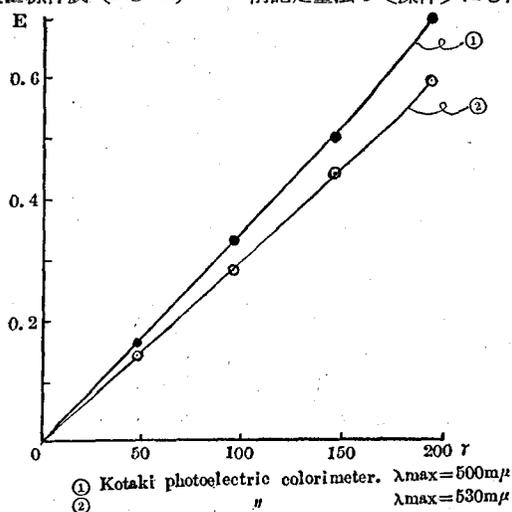


Fig. 3 Calibration Curve of Histidine

えてのち、室温に 30min 放置するのであるが、そのかわりに前もつて A 液 20cc と B 液 20cc を混和、氷中に 30min 以上貯蔵したものをつくり、この特殊調製試液 2cc を加えるようにしたら多くの試料を同時に行うときにつごうがよいと思ひ検量線を書いて見た。スルファニル酸を使用したときの検量線 (Fig. 3) はヒスチジン量 150r まで直線で充分使用することができる。ただし呈色度は常法より低い。スルファニルアミドでもほとんど同じであつた。

Table 2 Stability of Colour produced by Sulfanilamide Reagent *

Min. elapsed	Optical Density	
	λmax. = 500mμ	λmax. = 530mμ
0	0.400	0.350
15	0.400	0.350
30	0.400	0.350
60	0.400	0.345

* Histidin Content 100r.

(5) 呈色の安定度 ヒスチジン100 γ をスルファニルアミドで呈色させた液の呈色の安定度を調べたところ、少くとも60minは安定であつた。(Table 2)

(6) 共存物の影響 (I) 芳香族アミノ酸のうちチロジン、フェニルアラニンおよびプロリンにつき、おのおの100 γ の呈色度を調べた。フェニルアラニン、プロリンは呈色しないが、チロジンはヒスチジンに対して約15%の呈色度を示し共存するときには明らかに妨害する。チロジンの100 γ をスルファニルアミドを用いて呈色させた液の吸収スペクトルを Fig. 1 に示す。

文献¹⁾によればチロジンは水銀沈澱法により除きうる。著者が追試した結果、本法はヒスチジンを定量的に回収し、チロジンを完全にのぞきうることを確めた。ただし水銀混液を加えたのち放置すると液がしたいに黄変しチロジンが徐々に沈澱してくるので、定量操作中硼砂液を加えて沈澱が生じ始めたならば速やかに遠心分離を行い、硼砂液添加後10min以上放置しないことが必要である。

(7) 共存物の影響 (II) 市販錠剤中には種々の吸着剤や賦型剤が共存しており、これらが抽出に際してヒスチジンを吸着するおそれがある。この吸着物から定量的にヒスチジンを抽出回収しうる溶媒を探したところ1%炭酸水素ナトリウム液が最良であつた (Table 3)。つぎにこれらの共存物を全部加えてその影響を調べたところ

Table 3 Influence due to added Substances on Color Reaction

Extractants	Substances added					
	None *	MgO (1 mg)	Al ₂ O ₃ (1 mg)	Al ₂ (SiO ₃) ₃ (1.5mg)	Starch (0.5mg)	Anesthesine (0.05mg)
H ₂ O	100%	98	90	33	98	100
N/10-HCl	100	—	12	8	—	—
2%-CH ₃ COOH	100	—	114	102	—	—
1%-CH ₃ COOH	100	—	95	72	—	—
5%-NaHCO ₃	100	—	107	107	—	—
3%-NaHCO ₃	100	99.5	98	99	101.5	105
1%-NaHCO ₃	100	100	99	98	101	100

* Histidine content 100 γ

る、ヒスチジンのみのときと吸光度が全く一致した。すなわち吸着剤等の共存する試料にあつては抽出剤として1%炭酸水素ナトリウム液を使用すればよい。

終りに臨み御指導と御校閲を賜つた小川俊太郎部長に厚く感謝する。また実験の一部を担当された昭和薬科大学学生小野寺文子、安藤綾、佐藤朝子、大田恵美子、西内節子の諸君に謝意を表する。

総 括

ヒスチジン製剤中のヒスチジンの定量に際し、従来の比色法を改良し迅速正確な定量法をつくつた。本法はチロジン、吸着剤、賦型剤などが共存していても充分に使用することができる。

文 献

- 1) Lang, K. : Z. ph. chem., 222, 3 (1933)
- 2) Macpherson, H. T. : Biochem. J., 36, 59 (1942)
- 3) Cleaver, C. S. : J. Am. Chem. Soc., 67, 1343 (1945)
- 4) Lyman, C. M., Kuiken, K. A., and Hale, F. : J. Biol. Chem., 171, 233 (1947)
- 5) Edlbacher, S., Baur, H., and Zeller, A. : Z. ph. chem., 270, 158 (1941)

Summary

Colorimetric assay of histidine were modified so as to applicable to the quantitative assay of commercial complex histidine preparations.

Subsidiary components in commercial complex histidine preparations such as amino acids, adsorbents and binders, bear no influence upon the result.

This modified colorimetric method will be suitable for routine analysis.

Method available:

Add each 1 cc of 1% sulfanilamide solution (1 g of sulfanilamide is dissolved in 100cc of 10% hydrochloric acid) and 5% sodium nitrite solution, to 1 cc of neutral solution to be tested containing about 10~150 γ of histidine (as hydrochloride), let stand for 30min. at room temperature, add 3 cc of 20% sodium carbonate solution, shake well, then, add 10cc of alcoholic sodium carbonate solution (1 cc sodium carbonate solution is added in 100cc of 75% alcohol), mix thoroughly, once cool to below 10°C, then restore to room temperature and finally make up with water to 25cc.

Measure the optical density at 510m μ within 60min. and compare the result with the standard colour solution equivalent to 100 γ of histidine hydrochloride similarly treated as above.

Received February 29, 1955

ヒスチジン製剤中ヒスチジンの微生物定量法

平岡 栄一

Microbiological Assay of Histidine in the Commercial Histidine Preparations

Eiichi HIRAOKA

まえがき 著者は前報¹⁾において、ヒスチジン製剤中のヒスチジンを迅速、正確に定量しうる比色法を報告したが、*L. fermenti* 36²⁾、*Leuc. mesenteroides* P-60²⁾³⁾、および *St. faecalis*³⁾ などの乳酸菌を用いる微生物定量法もあるので、今回 *L. fermenti* 36 および *Leuc. mesenteroides* P-60 を使用して種々検討したところ、*L. fermenti* 36 で好結果をえた。つぎに比色法と微生物とによつて市販ヒスチジン製剤中のヒスチジンの比較定量を行つた結果を報告する。

実験方法

1. 菌株 *Lactbacillus fermenti* 36
2. 保存 11 中粉末酵母エキス 5g, ポリペプトン 10g, ブドウ糖 10g, 酢酸ナトリウム (3H₂O) 10g, 塩A液 5cc (KH₂PO₄, K₂HPO₄ おのおの 50mg/cc), 塩B液 5cc (FeSO₄·7H₂O, MnSO₄·4H₂O, NaCl おのおの 1mg/cc および MgSO₄·7H₂O 20mg/cc), 粉末寒天 20g を含む保存培地 (pH 6.8 ; 15lb. 15min 滅菌) に *L. fermenti* 36 を 37° で 20hrs 穿刺培養し, 1 カ月ごとに移植を行い氷室に貯える。
3. 接種菌液 上記保存培地より寒天を除いた液体培地 2cc を肉厚小試験管に分注し, 15lb. 15min 滅菌したものに接種し, 37° で 20hrs 培養後遠心し, 滅菌生理食塩水で 2 回洗滌遠心し, ふたたび滅菌生理食塩水約 2cc に懸濁する。この液約 0.5cc を滅菌生理食塩水 10cc に加えよくふりまぜて接種菌液とする。
4. 検液の調製 前報¹⁾ の比色法との比較上同一抽出液を使用した。すなわち抽出剤には剤型により水または 1%炭酸水素ナトリウムを使用し, 室温または加温して抽出したのち, 水で稀釈し 1cc 中ヒスチジン約 14r, 10r および 6r 含むようにしたものを検液とする。
5. 標準液の調製 塩酸ヒスチジンの純結晶を水にとかして, 1cc 中に 20r, 14r, 10r, 6r, 2r を含むようにした液をつくり, 検量線作成に用いる。
6. 基礎培地 Table 1 参照

Table 1 Basal Medium for Microbiological Assay of Histidine. 6)*

Amino acids	(mg)	Glucose	20g
DL-Alanine	200	Sodium acetate	20g
DL-Aspartic acid	400	Salts A	(mg)
L-Arginine HCl	200	KH ₂ PO ₄	500
L-Glutamic acid	500	K ₂ HPO ₄	500
L-Lysine · HCl	200	Salts B	(mg)
L-Isoleucine	100	MgSO ₄ · 7H ₂ O	200
L-Methionine	100	FeSO ₄ · 7H ₂ O	10
DL-Phenylalanine	200	MnSO ₄ · 4H ₂ O	10
L-Proline	100	Purines and Pyrimidines	(mg)
DL-Threonine	200	Adenine sulfate · 2H ₂ O	10
L-Tyrosine	100	Guanine · HCl · 2H ₂ O	10
DL-Valine	200	Uracil	10
DL-Tryptophane	100	Xanthine	10
L-Cystine	100	Vitamins	(mg)
DL-Serine	100	Thiamine · HCl	1
Glycine	100	Riboflavin	1
L-Leucine	100	p-Amino benzoic acid	1

Pyridoxine • HCl	1
Pyridoxal • HCl	0.2
Ca-DL-Pantothenate	1
Nicotinic acid	1
Biotin	0.01
Folic acid	0.01
Distilled H ₂ O to	500cc

*In assay, 1cc of basal medium described above is diluted with 1cc of H₂O or Sample solution.

7. 定量方法

- (1) 培養 2 cc 培養を行う。
- (2) 接種 前記接種菌液を 1/2 皮下用注射針で 1 滴ずつ接種する。
- (3) 測定 37° で 48hrs 培養後, B. T. B. 指示薬 (0.2%) を用い N/20 水酸化ナトリウム液で滴定する。

実験結果

1. 検量線 文献⁹⁾によれば B₆ 群をのぞいた方がよいそうであるが, 著者の実験では培養時間を 72hrs の代わりに 48hrs にすれば, べつに B₆ 群をのぞかなくても好結果を与えた。48hrs 培養における検量線を Fig. 1 に示す。

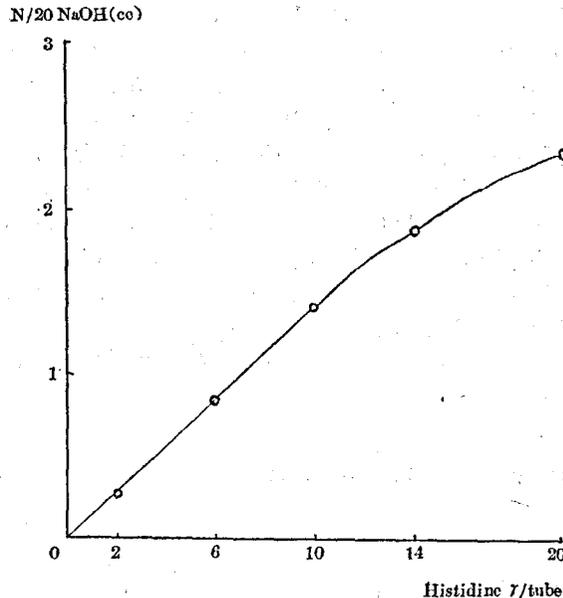


Fig. 1 Growth Response of *L. fermenti* 36 to Histidine

2. 比色法との定量値の比較 7種製剤の定量値および回収率は Table 2 に示し, 化学的方法と対照した。

Table 2 Histidine Content of Commercial Preparations.

Samples	Microbiological Assay		Chemical Assay	
	Content (%)	Recovery (%)	Content (%)	Recovery (%)
Injections				
1	103	107	98.5	98.8
2	118	99	114.5	101.5
3	103.7	104	97.5	98.3
4	101.5	93.5	96.5	103
5	110	90.5	109	102.5

Tablets				
1	77.8	107	79.2	98.8
2	83.5	92.5	81.5	101

終に臨み御指導，御校閲を賜つた小川俊太郎部長に深謝し，実験の一部を担当された昭和薬科大学学生大田恵美子君に謝意を表す。なお試料を提出された製造者各位に感謝する。

総 括

L. fermenti 36 を使用するヒスチジンの微生物法を検討し，市販ヒスチジン製剤7種について比色法と定量値および回収率を比較した。定量値は近似しているが，回収率は比色法の方がまさる。すなわち製剤中のヒスチジン定量法としては精度高く簡易な比色法がすぐれていると思う。

文 献

- 1) 平岡栄一：衛生試験所報告 74. 95 (1956)。
- 2) Dunn, M. S., Shankman, S., and Camien, M. N.: J. Biol. Chem., 161, 669 (1945).
- 3) Horn, M. J., Jones, D. B., and Blum, A. E.: *idib.*, 172, 149 (1948).
- 4) Dunn, M. S., and Camien, M. N.: *ibid.*, 159. 653 (1945).
- 5) 赤堀四郎，水島三一郎：蛋白質化学，1954 Vol.1, p 300.
- 6) 田村学造，角田俊直，他：農化，26, 460 (1952).

Summary

Microbioassay of histidine used *L. fermenti* 36 were studied so as to applicable to the quantitative assay of commercial complex histidine preparations.

Concerning seven commercial preparations, sets of analytical data (Table 2) by colorimetric assay (reported elsewhere) or microbiological one agree satisfactorily, but chemical assay surpasses the latter in recovery and convenience, thus can be recommended.

Received February 29, 1956

メチルエフェドリンの検出法* (覚せいアミン剤の検出法 第3報**1))

大熊 誠一, 城戸 靖雅

Detection of Some Nerve Stimulants. III. Detection of Methylephedrine

Seiichi OHKUMA and Yasumasa KIDO

著者等はメチルエフェドリン(I)の試験法設定の必要に迫られ, それについて検討した結果若干の知見を得たので報告する。

(I)は3級アミノ基の反応¹⁾陽性, アミノエチル基の反応²⁾陽性, フェニル核の反応³⁾陽性である。なお硫酸銅-炭酸ナトリウムの反応も陽性である(実験1)。

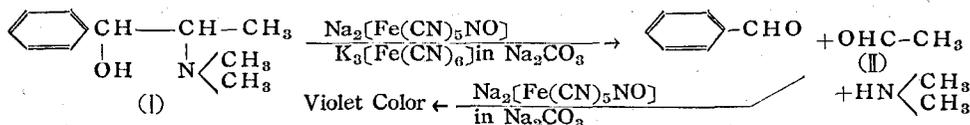
(I)にニトロプルシッドナトリウム(NP)とフェリシアン化カリウム(FC)を炭酸ナトリウム・アルカリ性下常温で作用させると青色~紫色を呈する。

1) この呈色反応はNPまたはFCを単独で使用するときには起らずNP及びFCを併用するときのみ起る。

2) (I)をNPとFCで水蒸気蒸留下酸化し, その留液を2,4-dinitrophenylhydrazine(2,4-DPH)試液に吸収させて黄色沈澱を得た。この沈澱は沓紙クロマトグラフ²⁾によりacetaldehyde-2,4-dinitrophenylhydrazoneであることが判明した(実験2)。NP又はFCのいずれかのみで酸化すると黄色沈澱の生成は極めて少量である。

3) (I)はFCによりbenzaldehydeを生成する⁵⁾。以上1)~3)から(I)はNPとFCの協力的な酸化作用によりbenzaldehyde, acetaldehyde及びdimethylamineに酸化分解されるものと推定し得る。脂肪族二級アミンがNPとacetaldehyde(II)で青色~紫色を呈するという事実⁶⁾⁷⁾と以上の酸化分解反応を考え照合すると, このNPとFCによる(I)の呈色反応機構は次のように推定できる(Fig. 1)。

Fig. 1



(I)はNPとFCの酸化作用により(II)とdimethylamineを生成し, このアルデヒド及びアミンとNPによりLewin-Feiglの呈色反応⁶⁾⁷⁾を行つて呈色する。この呈色反応は(I)の検出に應用できるが鋭敏でないので種々検討した結果, 検出法として(実験3)のような方法を考案した。呈色反応温度を高めると(II)とdimethylamineの生成量は増すが, 生成する(II)が更に酸化され減少するため(II)及びdimethylamineとNPの呈色反応は不十分となるので(II)を加えて反応し易くなるように工夫した。この方法を種々なアミン類に適用した結果を実験4に示す。この方法は一部の脂肪族三級アミン類でも類似の呈色を示すので(I)に特異的な方法とはいえないが(I)の検出法としては使用できるものと考えられる。

本研究にあたり御指導をいただいた特殊薬品部長 長沢佳熊博士に深謝する。試料の一部を提供された厚生省薬務局監視課, 富士薬品工業株式会社に感謝の意を表する。

実験の部

実験1 試料の1~2mg またはその水溶液の1滴にN/20硫酸銅溶液1滴及び炭酸ナトリウム試液1滴を加える。試料が(I)又はエフェドリンであると青紫色を呈する。

実験2 (I)塩酸塩20mgを水1ccに溶かし, これに5% NP 1cc, 5% FC 1cc及び炭酸ナトリウム試液1ccを加えて水蒸気蒸留し, 留液を2,4-DPH試液に吸収させる。橙黄色沈澱54mgを得。この沈澱を沓紙クロ

* 日本薬学会10月第2例会講演(1955)

** 本研究は長沢佳熊: 覚せいアミン剤の検出法(Kakuma NAGASAWA: Detection of Some Nerve Stimulants.)の一部である。

マトグラフ(一次元上昇法, メチルアルコール飽和ヘキサン, 2時間, $20 \pm 0.5^\circ$, 東洋沓紙 No.50)²⁾ につけ Rf 値 0.78 を得. acetaldehyde-2,4-dinitrophenylhydrazone (m.p.162°) の Rf 値 0.78 と一致した.

実験3 メチルエフェドリンの検出法

試料の少量またはその水溶液の1滴に5% NP 1滴, 5% FC 1滴及び炭酸ナトリウム試液1滴を加えよくふりまぜ, 小試験管の底部が僅かに浸る程度に小試験管を 70° の水浴に浸し, ふりまぜながら15秒間加熱した後直ちに流水中で冷却し, 50% アセトアルデヒド溶液1滴を加えると暫時の後, 青色~紫色~赤紫色を呈する.

確認限度 (0.05cc中): 塩酸メチルエフェドリン300 γ

実験4 実験3の方法を次の各種アミンに適用した結果を記す.

methylephedrine (B), 1-phenyl-1-chloro-2-dimethylaminopropane (GY), ephedrine (1-BrY), 1-phenyl-2-dimethylaminopropane (BrR \rightarrow BrRV), diethylamine (V), N-ethylpiperidine (BrR \rightarrow R \rightarrow VR), p-dimethylaminobenzaldehyde (BrOY), creatine (R), procaine (1-BrY), dibucaine (1-BrOY), atropine (1-BrOY), antipyrine (1-BrOY), triethanolamine (B), burcine (OY), quinine (OY), tribenzylamine (OY), scopolamine (OY), hordenine (BG \rightarrow dk-VB \rightarrow dk-B), narcaine (Y), codeine (OY).

dk : dark, 1 : light, B : blue, Br : brown, G : green, O : orange, R : red, V : violet, Y : yellow.

結 論

メチルエフェドリン(I)の検出法を次に示す. (I)の水溶液の1滴に5% ニトロプルシッドナトリウム(II)溶液, 5% フェリシアン化カリウム(III)溶液及び2N 炭酸ナトリウム溶液の各1滴を加え混ぜる. 約15秒間, 70° の水浴中で振りながら加熱したのち直ちに流水で冷却し50%アセトアルデヒド(IV)溶液1滴を加えると反応液は青色, 紫色又は赤紫色を呈する. この呈色反応機構を下記のように推定した. (I)は(II)と(III)により(IV)とジメチルアミンに酸化され, ついでジメチルアミンは(II)及び(IV)と反応して脂肪族二級アミンに特異的な呈色反応⁶⁾を行う. メチルエフェドリン塩酸塩の確認限度は300 γ である.

文 献

- 1) 第2報, 大熊誠一: 薬誌, 75, 1124 (1955).
- 2) 長沢佳熊, 大熊誠一: 薬誌, 74, 773 (1954). 長沢佳熊, 大熊誠一: 本誌, 73, 113 (1955).
- 3) 大熊誠一: 薬誌, 75, 1430 (1954).
- 4) 実験の詳細は省略する.
- 5) 第二改正国民医薬品集(厚生省版), 83, (1955).
- 6) Lewin, L.: Ber., 32, 3388 (1899).
- 7) Feigl, F. Anger, V.: Mikrochim. Acta., 1, 138 (1937).

Summary

The following procedure for the detection of methylephedrine (I) was proposed. Mix 1 drop of aqueous solution of (I) with each 1 drop of 5% sodium nitroprusside (II) solution, 5% potassium ferricyanide (III) solution, and 2N sodium carbonate solution. After warming the mixture in a water bath (70°) under shaking for about 15 seconds and cooling quickly with running water, adds 1 drop of 50% acetaldehyde (IV) solution to by which the reaction mixture gives blue, violet, or reddish violet color.

The mechanism of this color reactin was assumed as follow by the authors: (I) was oxidised by (II) and (III), to (IV) and dimethylamine which reacts with (II) and (IV) to give the color reaction specific to aliphatic secondary amines. 6), 7). Limit of detection: 300 γ of (I) hydrochloride.

フェニルアセトン, フェニル酢酸及びフェニルアセトアセトニ
トリルの検出法*(覚せいアミン剤の検出法, 第4報**¹⁾)

大熊 誠一, 城戸 靖雅

Detection of Some Nerve Stimulants. IV. Detection of
Phenylacetone, Phenylacetic Acid and Phenylacetoneitrile
Seiichi OHKUMA and Yasumasa KIDO

著者等はフェニルアセトン (I), フェニル酢酸 (II) 及びフェニルアセトアセトニトリル (アセチルベンジルンアニド) (III) の試験法設定の必要に迫られ, それについて検討した結果若干の知見を得たので報告する。

1) フェニルアセトンの検出法 (I) はニトロプルシッドナトリウム²⁾, メタジニトロベンゼン³⁾等による活性メチレン基の反応陽性, 次亜臭素酸ナトリウムとピリジンによるメチルケトンの反応⁴⁾は陽性である。(I) は p-nitrobenzaldehyde と水酸化ナトリウムで赤褐色を呈するが, phenylhydrazine, semicarbazide 類も類似の呈色を示す (実験1)。以上の諸反応はメチルケトン, 活性メチレン基の反応なので, これにアセトン体としての反応を補足することが必要である。この点に関し, 二, 三のケトン体がワニリン-塩酸で 赤色~紫色に呈色するという Rosenthaler⁵⁾ の方法を改良して (実験2) (I) について検討した結果青色~緑色に呈色し, (III) も同様に反応することを知った。(III) の場合はニトリルが加水分解してカルボン酸となり, ついで脱炭酸して (I) に変化し呈色するものと考えられる。この反応は芳香族ケトン体例えば benzophenone, dibenzoyl (benzil) 等及び芳香脂肪族ケトン体例えば acetophenone, phenylethylketone 等は反応陰性であるがアセトン及びその誘導体が反応陽性 (赤色, 紫色, 青色, 緑色) なので, この反応は $-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{CH}_2-$ 基の検出法として利用できる。又 thymol, resorcinol, phloroglucinol⁶⁾ 等二, 三の phenol 性化合物及び 2-methylindole, tryptophane 等の indole 類も赤色~紫色に呈色する。呈色溶液は水で稀釈すると脱色し, 酸濃度を高めると再び発色し, 所謂 HALOCHROMY の性格を有する。このワニリンと $-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{CH}_2-$, phenol, 及び indole 化合物との呈色反応機構については現在検討中である。なお (I) は 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンによるカルボニル基の反応 (実験3) 陽性, フェニル核の反応⁷⁾ 陽性である。

2) フェニル酢酸の検出法 (II) はヒドロキサム酸鉄塩反応⁸⁾ 陽性, 塩化第二鉄反応⁹⁾ 陽性, フェニル核の反応⁷⁾ 陽性である。これらの反応はカルボキシル基又はフェニル核の反応なので, これにフェニル酢酸の反応を補足することが必要である。脂肪族カルボン酸は, そのカルシウム塩を乾留してケトン体としたのちワニリン-塩酸法で検出することが可能であるが⁵⁾, 著者等はフェニル酢酸をそのカルシウム塩に誘導したのち酢酸カルシウムと乾留してフェニルアセトン(I)とし, ワニリン-塩酸によつて青色→緑色に呈色する方法を考案した (実験4)。

3) フェニルアセトアセトニトリルの検出法 (III) はメタジニトロベンゼンによる活性メチレンの反応³⁾ 陽性, ワニリン-塩酸による反応陽性 (実験2), 次亜臭素酸ナトリウムとピリジンによるメチルケトンの反応⁴⁾ 陽性, 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンによるカルボニル基の反応陽性 (実験3) である。(III) の検出にはニトリル基の定性を行うことが必要で, そのため Soloway¹⁰⁾ のヒドロキシルアミン-塩化第二鉄による方法を追試したが, 十分な結果が得られなかつたので次のような検出法を考案した (実験5)。即ち (III) にヒドロキシルアミンと酢酸ナトリウムを作用させてアミドキシム化を行つた後, 硫酸銅で銅錯塩を形成させ紫色に呈色させて検出する。又河紙上でこの反応を行う, 簡便な操作も考案した (実験5)。これらの方法を二, 三のニトリル類に行つても紫色を呈しないので, 一応 (III) の検出法として有効である。

本研究にあたり御指導をいただいた特殊薬品部長 長沢佳熊博士に深謝する。試料の一部を提供された当所公定書外医薬品部長 板井孝信博士に感謝する。

* 日本薬学会10月第2例会講演 (1955)

** 本研究は長沢佳熊: 覚せいアミン剤の検出法 (Kakuma NAGASAWA : Detection of Some Nerve Stimulants.) の一部である。

実験の部

実験1 試料のアルコール溶液2滴に5% p-nitrobenzaldehyde・アルコール溶液2滴及び水酸化ナトリウム試液1滴を加える。この方法を各種化合物について行つたとき赤色系統に呈色した化合物を次に示す。カッコ内は色調***を表わす。

phenylacetone (R~RBr), cyclohexanone (Y→BrR), semicarbazide (R~OR), thiosemicarbazide (R~OR), 4-phenylthiosemicarbazide (R), benzoic acid hydrazide (RO), p-nitrophenylhydrazine (VR), 2,4-dinitrophenylhydrazine (R), phenacylbromide (R), p-nitrophenacylbromide (R)

確認限度****: phenylacetone 4r.

実験2 試料のアルコール溶液1~2滴に5%ワニリン・アルコール溶液2滴及び塩酸3滴を加え水浴中で3分間加熱する。

この方法を各種化合物について行い -CH₂-CO-CH₂-型化合物以外に呈色した化合物を次に示す。

butylalcohol (B), amylalcohol (B), acetaldehyde (dk-G→dk-V), biacetyl (dk-B), benzylacetone (R), acetophthalene (R), p-hydroxyacetophenone (RO), p-quinone (R), thymol (V), α-naphthol (dk-R) carbazole (V), diphenylamine (R), tryptophane (V), 2,4-dinitrophenylhydrazine (R), 2-phenylsemicarbazide (I-R).

確認限度: acetone (R~RV, 7r), acetylacetone (dk-B, 9r) malonic acid (B, 100r), phenylacetone (B G→G, 1r), phenylacetacetone (BG→G, 28r), cyclohexanone (RV, 0.3r), resorcinol (R, 0.1r), hexylresorcinol (R, 0.1r), naphthoresorcinol (VR~R, 0.2r), tryptophane (V, 1r).

実験3 試料のアルコール溶液の1滴に2,4-ジニトロフェニルヒドラジン試液1滴を加え水浴中で加熱すると有色沈澱を生ずる。この沈澱を回収するか、遠心分離してよく水洗後アセトン1~2ccに溶かし、2N-水酸化ナトリウム溶液1~2滴を加える。(I)は橙黄色の沈澱を生成し、アルカリにより赤色、(II)は黄色の沈澱でアルカリにより赤紫色を呈する。

確認限度: Phenylacetone 3r, Phenylacetacetone 30r

実験4 水酸化カルシウム約80mgと酢酸カルシウム約30mgをよく混和して小試験管に入れ、これに試料のアルコール溶液5滴を加え、水浴中で加熱してアルコールを蒸発して、内容物を乾燥した後、小火炎上で暗赤色~赤色に30秒間加熱する。冷後アルコール1ccを加え水浴中で沸騰するまで加熱した後濾過する。残留物に更にアルコール0.5ccを加え同一操作を行い、濾液を合し、ワニリン5~10mgを加えて溶かした後、塩酸5滴を加えよくふりまぜると淡赤色を呈し¹⁾、これを水浴中で加熱するとき、試料がフェニル酢酸であると青色をへて緑色となる。

確認限度: phenylacetic acid. 500r

実験5 試料のアルコール溶液の1滴に塩酸ヒドロキシルアミン試液(1液)0.3cc及び酢酸ナトリウム試液(2液)0.3ccを加え小試験管の底が僅かに浸る程度に小試験管を約180°の油浴につけ、ふりまぜながら2分間加熱し、冷後N/2硫酸銅溶液1滴を加える。試料がフェニルアセトアセトニトリルであると紫色を呈する。濾紙を使用する場合は濾紙(東洋濾紙No.131を使用した)の小片上に試料のアルコール溶液1滴をとり直ちに塩酸ヒドロキシルアミン試液1滴及び酢酸ナトリウム試液1滴を加え、小火炎上で注意して殆んど乾燥状態とした後放冷し、N/2硫酸銅溶液3滴を加えるとき、フェニルアセトアセトニトリルが含まれると紫色の輪を生ずる。試液の調製: (1)液。塩酸ヒドロキシルアミン2.1gに水1ccを加え加熱して溶かし、これにプロピレングリコール水〔プロピレングリコール(米国薬局方XIV)40ccに水15ccを加えよくふりまぜる)30ccを加えて溶かす(2)液。無水酢酸ナトリウム2.4gに水2ccを加え加熱して溶かし、これにプロピレングリコール水(前出)30ccを加えて溶かす。この反応を若干のニトリル類に行つた結果を次に示す。

phenylacetacetone (V~RV), acetonitrile (I-B), ethyl cyanoacetate (BrY), malonitrile (I-BrY), acronitrile (OBr), benzylcyanide (I-G), p-nitrophenylacetone (I-G), benzoni-trile (I-GB), α-naphthonitrile (I-GB).

***呈色色調の記号は第3報のそれに準ずる。

****確認限度の液量は0.05ccである。以下同一条件。

確認限度 : phenylacetacetone nitrile (acetylbenzyl nitrile) 180 γ .

文 献

- 1) 第3報, 大熊誠一, 城戸靖雅 : 本誌・74, 109 (1956).
- 2) 石館守三, 赤塚政美, : 化学の領域, 3, 52 (1949).
- 3) 石館守三, 坂口武一 : 薬誌, 70, 309 (1950).
- 4) 長沢佳熊, 大熊誠一 : 薬誌, 74, 773 (1954).
長沢佳熊, 大熊誠一 : 本誌, 73, 113 (1955).
- 5) Rosenthaler, L. : Z. anal. Chem. 156, 292 (1905).
- 6) Hartwich, C. Minckel, M. : Arch. Pharm. 242, 462 (1904).
- 7) 大熊誠一 : 薬誌, 75, 1430 (1955).
- 8) Feigl, F. Anger, V. Frehden, O. : Mikrochimie, 15, 18 (1934).
- 9) Middleton, H. : "Systematic Qualitative Organic Analysis", 68 (1939).
- 10) Soloway, S. Lipschitz, A. : Anal. Chem., 24, 898 (1952).
- 11) 試料が少ないと呈色が弱い, 又は呈しない. これは加熱により消失する.

結 論

1) フェニルアセトン⁹⁾はワニリンと塩酸による Rosenthaler の方法⁵⁾を改良して検出した. この方法によると R-CH₂-CO-CH₂-R 型化合物, 若干のフェノール化合物及びトリプトファンを含む若干のインドール化合物が赤色, 紫色, 青色又は緑色に呈色する. フェニルアセトンの確認限度は1 γ で青色から緑色に呈色する.

2) フェニル酢酸は水酸化カルシウムと反応させてカルシウム塩としたのち, 酢酸カルシウムと焦熱してフェニルアセトンに変化させて上記の反応により検出する. この方法では0.5 mg以上のフェニルアセトンが検出できる.

3) フェニルアセトアセトニトリルは Soloway の方法¹⁰⁾を改良して検出した. この改良法においてプロピレングリコール水は溶媒として, 酢酸ナトリウムはpH調整剤として使用し, 硫酸銅は塩化第二鉄の代りに用いた. フェニルアセトアセトニトリルの確認限度は180 γ で紫色に呈色する

Summary

- 1) Phenylacetone is detected by the modified Rosenthaler's method⁵⁾ using vanillin and hydrochloric acid, by which R-CH₂-CO-CH₂-R type compound, some phenolic compounds and some indoles included tryptophane react to give red, violet, blue or green. Limit of detection : 1 γ . of phenylacetone which colors blue to green.
- 2) After converting to calcium salt with calcium hydroxide, phenylacetic acid pyrolyzed with calcium acetate to form phenylacetone which is detected by the above reaction 1). The use of this method allows the detection of up to 0.5 mg. of phenylacetic acid.
- 3) Phenylacetacetone nitrile is detected by the modified Soloway's method¹⁰⁾. In the recommended procedure, propyleneglycol-water is used as the solvent and sodium acetate is used for pH adjustment, and cupric sulfate is used instead of ferric chloride. Limit of detection : 180 γ of phenylacetacetone nitrile which colors violet.

Received February 29, 1956

二酸化セレンによる呈色反応（第1報）

二酸化セレンと硫酸によるステロイドの呈色反応*

渡辺 俊雄

Color Reactions by Selenium Dioxide. I.

Color Reactions of Steroids by Selenium Dioxide and Sulfuric acid

Toshio WATANABE

二酸化セレン及び硫酸を用いる呈色反応については、かなり多くの報告^{1),2),4)}がある。古くはアヘンアルカロイドについて Brandt³⁾ (1875) が、最近では *4⁷*-Cholesterol について Fieser⁵⁾ (1953) が、又含窒素化合物に対して綜説的には Dewey⁶⁾ 等が報告しているが、これらの呈色反応はいずれも二酸化セレンと硫酸とにより緑色を呈するという。この緑色物質⁷⁾ について Parkes⁸⁾ は、カフェインのようなきわめて安定なもの以外、多くの有機化合物が濃硫酸中で二酸化セレンに作用して生じた緑色の $S \cdot SeO_3$ であるといい、それぞれの化合物に特異の呈色反応ではないと報告した。

ステロイドと二酸化セレンとの反応については、Cholesterol の場合、無水酢酸又は氷酢酸を溶媒として二酸化セレンで酸化すると、*4⁵*-Cholestene-diol-3,4(cis)⁹⁾ 及び *4⁴*-Cholestene-diol-3,6-diacetate¹⁰⁾ を生ずる。また Fieser²⁾ は Cholesterol のベンゼン溶液に室温で二酸化セレンを加えると黄色を呈するのは、粗 Cholesterol 中に通例微量に混在する *4⁷*-Cholesterol の酸化によるものであると報告した。

一方ステロイドの比色定量法に用いられる Liebermann-Burchard 反応は、Cholesterol のクロロホルム溶液に無水酢酸及び硫酸を滴加すると、紫→青→緑と著明な呈色を示す反応であるが、この呈色液は酸性が強く、光電比色計用の通例の試料槽を損壊する心配があり、又無水酢酸の代りに氷酢酸を用いると呈色しないものも多い。著者は、この場合、ステロイドの氷酢酸溶液に微量の二酸化セレンを加え、暫時加熱し、赤色のセレンが析出するか、又は黄色を呈したとき冷却し、硫酸 1~2 滴を加えると著しい呈色反応を示すものがあることを知つた。例えば Cholesterol は、一瞬赤紫色を呈した後、直ちに青色となり、放置すると緑色から暗緑色となり、その後セレンが次第に析出する。この際の呈色は、二酸化セレンが還元されたための色の变化ではなく、ステロイド類に特異な、Liebermann-Burchard 反応などと同様な呈色反応に属するものと考えられるが、Cholesterol, Estradiol, Dehydroisoandrosterone などの呈色は全く異なる色調を示す（実験の部参照）。Fieser が報告したような二酸化セレンの室温での作用では、著者がこの実験に用いた精製 Cholesterol の 0.04~0.07w/v % 氷酢酸溶液では明かな呈色が起らない。又硫酸を加えるとき、よく冷却しないと直ちに赤色のセレンが析出する。二酸化セレンを加えて煮沸したとき、金属セレンの析出がよくないものは、多くは発色が不良である。21-Acetoxypregnenolone, Pregnenolone, Methyl-testosterone では著明で、Estrone はわずかに、Estradiol monobenzoate 及び Desoxycorticosterone acetate は全然変化なく、無色澄明のままである（その他 Table 1 参照）。濃硫酸の添加量は溶媒量の 1/10 以下で充分であり、小試験管を用いるときは 1~2 滴でよい。硫酸量は多いと発色が早く、又赤色の金属セレンが直ちに析出する。なお、Cholesterol の場合、硫酸を加える前に氷水中につけ、よく冷却しながら硫酸を加え、4 分間後 15~20° で吸収曲線を求めたところ、620m μ に極大を認めた。

終りに、部長長沢佳熊博士の御指導と御校閲を得たことを記して感謝する。

実験の部

試薬 二酸化セレン：金属セレン粉末を硝酸で酸化した後昇華させて製する。製造後 4 週間以上を経過したものは用いない。氷酢酸：沸点 115~118° の部分を取り、過マンガン酸カリウムを加えて 24 時間後蒸留し、116~118° の部分をとる。濃硫酸：JIS 特級品。

* 日本薬学会（昭和30年4月）講演

操作 各試料の微量を小試験管にとり少量の二酸化セレンを加え、氷酢酸 2 cc を加え軽く煮沸した後放冷する。管壁に赤色の金属セレンの析出を認めるか、又は黄～黄緑色を呈するまで煮沸を 2～3 回繰返す。次に共栓をして氷水中でよく冷却してから硫酸 1～2 滴を加え、ふりまぜて観察した結果を表示する (Table 1)。Cholesterol の検出確認限度は 7～10 γ /cc.

Table 1. Color Reactions of Steroids by Selenium Dioxide and Sulfuric Acid

Name of Steroids	Precipitate	Color
21-Acetoxypregnenolone	+ +	R→V→d. YR
Cholesterol	+ +	R→V→B→G
Cortisone acetate	—	v. Y
Dehydroisoandrosterone	+ +	d. YR
Desoxycorticosterone acetate	—	—
Estradiol-17 β	—	d. Y→d. Y. YG
Estradiol-17 β monobenzoate	—	—
Estrone	+	sl. d. YR→YG
Ethinylestradiol	—	v. dY
Ethisterone	—	v. YR
Methylandrosterone	+ +	V→d. RV
Methyltestosterone	—	d. YR
Pregnenolone	+ +	B→V→d. R
Progesterone	+	l. Y
Testosterone	—	l. Y

l = light

d = dark

v = very

sl = slight

Y = yellow

R = red

G = green

V = violet

B = blue

Dehydroisoandrosterone の場合、氷酢酸に溶かし、二酸化セレンを加えずに濃硫酸を加えると紫色を呈し、氷酢酸の代りに無水酢酸を用いると淡黄色～黄赤色となる。

文 献

- 1) Lafon, Ph. : Compt. rend., 100, 1543 (1885)
- 2) Ferreira da Silva, A. J. : J. pharm. chim, 24, 102 (1891)
- 3) Brandt, C. : Jahresber. Pharm., 1875 341
- 4) 岡崎寛蔵 : 薬誌, 71, 893 (1951)
- 5) Fieser, L. F. : J. Am. Chem. Soc., 75, 4377 (1953)
- 6) Dewey, B. F., Gelman, A. H. : Ind. Eng. Chem., Anal. Ed., 14, 361 (1942)
- 7) Turfitt, G. E. : Quart. J. Pharm. Pharmacol., 21, 4 (1948)
- 8) Parkes, E. B. : Analyst, 75, 448 (1950)
- 9) Ekkert, L. : Pharm. Zentralhalle, 73, 487 (1932)
- 10) Motta, A. : Pharm. Monatsh., 17, (1935)

Summary

Many color reactions of steroids have been known, especially using acids, for instance, conc. sulfuric acid, acetic anhydride, benzoic peroxide, phosphoric acid etc. The author found that though some steroids did not give the color reaction when the glacial acetic acid was used instead of acetic anhydride, in such a case, if a bit of SeO₂ was added and the reaction mixture was heated for a short time, then conc. sulfuric acid was dropped, the specific color developed. For example, cholesterol gave red→violet→blue→green and the limit of identification was 7 to 10 γ /cc, and this method can be applied for a quantitative color assay of some steroids.

Received February 29, 1956

二酸化セレンによる呈色反応 (第2報)

二酸化セレンによるイソニコチン酸ヒドラジド中の遊離ヒドラジンの検出

渡辺 俊雄

Color Reaction by Selenium Dioxide. II.

The Detection of Free Hydrazine in Isonicotinic Acid Hydrazide by Selenium Dioxide

Toshio WATANABE

イソニコチン酸ヒドラジド製品中の遊離ヒドラジンの検出法としては、国民医薬品集第二改正¹⁾ 収載のイソニコチン酸ヒドラジドの規格試験中に、サリチルアルデヒドを加えて生ずるサリチル酸ヒドラジドの析出による方法があり、本法は時間の経過につれて過量のサリチルアルデヒドとイソニコチン酸ヒドラジドが交換分解してサリチル酸ヒドラジドを生じるために、5分以内で濁つてはならないと規定している。またヒドラジドの還元性を利用する試験法には、中性の水溶液中に二酸化セレンを常温で加えその二酸化セレンの特異な被還元性質から赤色を呈することを利用した Scott²⁾ の報告がある。

著者はイソニコチン酸ヒドラジド、硫酸ヒドラジン及びヒドラジンヒドラートにつき、その各1%溶液を用いアンモニアアルカリ性で加熱後、二酸化セレンを作用させると、還元されて生成した金属セレンの析出速度にかなり差異のあることを知った。すなわち硫酸ヒドラジンとヒドラジンヒドラートでは直ちに金属セレンの濃赤色綿状沈澱が析出するが、同一条件でイソニコチン酸ヒドラジドを試みると、還元された金属セレンの析出は明らかでなく、24時間後でも白濁するが、または黄赤色を呈する程度である(実験1)。またイソニコチン酸ヒドラジド中に硫酸ヒドラジン0.05%を加えたものは、これを加えないイソニコチン酸ヒドラジド溶液と明かに区別できる赤色の濁りを認めた(実験2)。またその比率を適当に変えながら検出度を調べると、イソニコチン酸ヒドラジド水溶液の濃度がある程度濃いほど、夾雑する硫酸ヒドラジンの確認限度量は大きくなり、この夾雑試験が鋭敏となる(実験3, Table 1)。

終りに部長長沢佳熊博士の御指導と御校閲を得たことを記して感謝する。

実験の部

試薬 二酸化セレン試液：用時調製する。金属セレン粉末を濃硝酸中に少しずつ投入し、溶けてから過量の硝酸を蒸発し、乾固し、水を加え、不溶分を濾過し、濾液を濃縮後、濃硝酸少量を添加し、蒸発乾固した後、密封して乾燥保存する。この二酸化セレン1gをとり、水20ccに溶かし試液とする。なお酸化精製後4週間以上経過した二酸化セレンは酸化能力が減少するから試薬として用いられない。

イソニコチン酸ヒドラジド検体：第二改正国民医薬品集(1955)イソニコチン酸ヒドラジドの試験規格に合格したもの。

実験1 イソニコチン酸ヒドラジド検体、硫酸ヒドラジン及びヒドラジンヒドラートの各1%水溶液2ccを小試験管にとり、これに強アンモニア試液(約28%)2滴を加えふりまぜた後煮沸水浴上で約5~7分加熱後冷却し、更に二酸化セレン試液2滴を加える。硫酸ヒドラジン、及びヒドラジンヒドラートは直ちに綿状の赤色金属セレンを析出するが、イソニコチン酸ヒドラジド溶液は白濁して淡い黄赤色となるだけで、管壁に金属セレンを析出しない。

実験2 イソニコチン酸ヒドラジド検体1gを10ccのメスフラスコにとり、水を加えて10ccとし、その2ccずつを(A)、(B)両試験管にとる。硫酸ヒドラジン10mgを10ccのメスフラスコにとり、水を加えて10ccとし、この液0.1ccを、(B)試験管に加え、(A)、(B)両試験管に強アンモニア試液2滴を加え、ふりまぜながら水浴上で約7分間加熱する。冷後両者に二酸化セレン試液2滴を加えるとき、(A)は(B)より赤色の濁りが明かに強い。確認限度100r。

Table 1. Limit of Identification of Hydrazine in Isonicotinic Acid Hydrazide Preparation

Concentration of Isonicotinic Acid Hydrazide in Water Solution(%)	Limit of identification of Hydrazine Sulfate(%) in Isonicotinic Acid Hydrazide
0.65	1.36
2.0	0.53
5.8	0.05
10.0	0.04

イソニコチン酸ヒドラジドの10%以上の濃厚水溶液では飽和溶液に近くなるため行わなかつた。10%水溶液中で明確に比較できる限度は、イソニコチン酸ヒドラジドに対して硫酸ヒドラジンの含量0.05%程度である。

実験3 イソニコチン酸ヒドラジドの各種の濃度の水溶液中に夾雑する硫酸ヒドラジンの検出限度を調べた、イソニコチン酸ヒドラジド検体水溶液(A)及びこれに微量の硫酸ヒドラジン水溶液を加えたもの(B)を作り、以下実験2準用して、(A)を比較対照として(B)の赤色度を比較し、区別できる限度結果をTable 1.に示す。

文 献

- 1) 第二改正国民医薬品集35頁(昭和30年)
- 2) Scott, P.G.W.: J. Pharm. Pharmacol. 4, 681~6 (1952)

Summary

To an ammonia alkaline solution of hydrazine hydrate or hydrazine sulfate, add selenium dioxide, the red selenium appears after heating. In the case of isonicotinic acid hydrazide instead of hydrazine hydrate or hydrazine sulfate, the solution acquires only a pale yellowish red color, therefore, it is easy to distinguish isonicotinic acid hydrazide from hydrazine hydrate or hydrazine sulfate.

The small amount of free hydrazine as an ingredient in isonicotinic acid hydrazide preparation, can be detected by this method. The limit of identification is 100 γ hydrazine sulfate, and its percentage in isonicotinic acid hydrazide is 0.05%.

Received February 29, 1956

イソニコチン酸ヒドラジド (イソニアジド) 類似化合物の合成 (第1報)

 α -位オキシ, アルコキシ置換体等の合成¹⁾

板井 孝信, 小倉 治夫, 神谷 庄造

Synthesis of Isonicotinic Acid Hydrazide Analogues. I.

 α -Hydroxy or Alkoxy-Compounds and Several Acid Hydrazides.

Takanobu ITAI, Haruo OGURA and Shōzō KAMIYA

1952年 Fox が Isonicotinic acid hydrazide (以下 INAH と略) を合成し, 結核治療剤として卓効あることを発表した。著者らは直ちにその類似化合物を合成してその抗菌性を調べた。

第1報ではその中 Isonicotinic acid (以下 INA と略) の α -位にオキシ-, アルコキシ基を有するもの, Pyridine のジカルボン酸ヒドラジドおよび Thiazole-, Furancarboxylic acid hydrazide の数種を報告する。

先ず INA (I) を過酸化水素-氷酢酸により N-oxide (II) とし, 酸化塩化磷を作用せしめて α -Chloro-INA (III) を作り, これを Sodium alcoholate-alcohol と 200° 附近に加熱して α -Alkoxy-INA (IV) とした。この α -Chloro 基の活性は小さく 190° 以上に長時間加熱することを要する。ここに得られた (IV) を常法に従い Ester 化し, その Ester (V) をヒドラジンヒドラートと反応させてヒドラジド (VI) に導いた。 α -Oxy-INA (VII) は α -Ethoxy-INA を加水分解して, これより上述のようにヒドラジドに導いた。すなわち

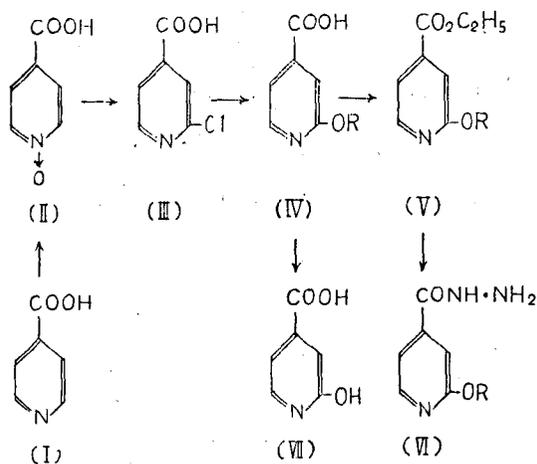


Fig. 1

又 Pyridine dicarboxylic acid の中 Quinolinic acid はキノリンの, Cinchomeronic acid はキニンの, 2,4-Lutidinic acid は α -Methyl INA をそれぞれ酸化して作った。又 Thiazole, Furan 誘導体は文献の方法に従い合成した。

これらの Hydrazide 類は中間体と共に鳥型 A₇₁₁ および人型 H_{37Rv} なる2種の結核菌に対する抗菌性を調べた。その結果 α -Allyloxy-INAH が INAH よりやや弱い程度に有効であり, α -Ethoxy-, α -Butoxy 体がやや有効であったが, その他は効力を示さなかつた。次に誘化合物の性質とその抗菌性を一括表示する (Table.1)。

Table 1.

No.	Compounds	Crystal form, mp.	Antituberculostatic activity			
			Aviantype A ₇₁ (r/cc)		Human type H ₂₇ Rv	
Pyridine						
1	α -CO.NH.NH ₂	²⁾ needles 100~101°	200	100	50	20
2	β -CO.NH.NH ₂	³⁾ needles 160~162°	100	50	20	10
3	γ -CO.NH.NH ₂ (INAH)	pillars 171~173°	20	10	2	0.02
4	$\left\{ \begin{array}{l} \alpha\text{-CO.NH.NH}_2 \\ \beta\text{-CO.NH.NH}_2 \end{array} \right\}$	powder 238°~240(decp.)	>200	200	200	100
5	$\left\{ \begin{array}{l} \alpha\text{-CO.NH.NH}_2 \\ \gamma\text{-CO.NH.NH}_2 \end{array} \right\}$	needles 257°(decp.)	>200	200	>200	100
6	$\left\{ \begin{array}{l} \beta\text{-CO.NH.NH}_2 \\ \gamma\text{-COOH} \end{array} \right\}$	powder 365~370°(decp.)	>200	200	>200	100
7	$\left\{ \begin{array}{l} \alpha\text{-OH} \\ \gamma\text{-CO.NH.NH}_2 \end{array} \right\}$	needles 245°(decp.)	—	—	—	—
8	$\left\{ \begin{array}{l} \alpha\text{-OC}_2\text{H}_5 \\ \gamma\text{-CO.NH.NH}_2 \end{array} \right\}$	flake 151°	>200	200	10	2
9	$\left\{ \begin{array}{l} \alpha\text{-OC}_4\text{H}_9 \text{ (n)} \\ \gamma\text{-CO.NH.NH}_2 \end{array} \right\}$	plate 102.5°	>200	200	10	2
10	$\left\{ \begin{array}{l} \alpha\text{-OC}_5\text{H}_{11} \text{ (iso)} \\ \gamma\text{-CO.NH.NH}_2 \end{array} \right\}$	scales 118°	>200	200	100	50
11	$\left\{ \begin{array}{l} \alpha\text{-OCH}_2\text{.CH=CH}_2 \\ \gamma\text{-CO.NH.NH}_2 \end{array} \right\}$	flake 131°	200	20	0.5	0.1
12	$\left\{ \begin{array}{l} \alpha\text{-CH}_3 \\ \gamma\text{-COOH} \end{array} \right\}$	⁴⁾ plate 291°(decp.)	>200	>200	>200	>200
13	$\left\{ \begin{array}{l} \alpha\text{-OH} \\ \gamma\text{-COOH} \end{array} \right\}$	powder ca.300°(decp.)	—	—	—	—
14	$\left\{ \begin{array}{l} \alpha\text{-OC}_2\text{H}_5 \\ \gamma\text{-COOH} \end{array} \right\}$	plate 175°	>200	>200	>200	>200
15	$\left\{ \begin{array}{l} \alpha\text{-OC}_5\text{H}_{11} \text{ (iso)} \\ \gamma\text{-COOH} \end{array} \right\}$	needles 128°~129°	>200	>200	>200	>200
16	$\left\{ \begin{array}{l} \alpha\text{-OCH}_2\text{.CH=CH}_2 \\ \gamma\text{-COOH} \end{array} \right\}$	pillars 121.5°	>200	>200	>200	200
Thiazole						
17	$\left\{ \begin{array}{l} 2\text{-NH.CO.CH}_3 \\ 4\text{-CH}_3 \\ 5\text{-COOC}_2\text{H}_5 \end{array} \right\}$	flake 220°	>200	>200	>200	>200
18	$\left\{ \begin{array}{l} 2\text{-OH} \\ 4\text{-CH}_3 \\ 5\text{-CO.NH.NH}_2 \end{array} \right\}$	powder 219°(decp.)	>200	>200	>200	>200
19	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Bis. 4-CH}_3 \\ 5\text{-CO.NH.NH}_2 \end{array} \right\}$ 2-ether	⁵⁾ thread 236°(decp.)	>200	>200	>200	>200
Furan						
20	2-CO.NH.NH ₂	⁶⁾ needles 76~78°	>200	>200	>200	100
21	$\left\{ \begin{array}{l} 2\text{-CO.NH.NH}_2 \\ 5\text{-NH.CO.CH}_3 \end{array} \right\}$	needles 201°(decp.)	>200	>200	>200	>200

以上の研究にあたり御助言を賜った東大落合教授、抗菌力試験をして下さった当所桑原章吾技官、検体の1部を提供された井下田技官にお礼申上げる。又費用の一部は昭和27年度厚生科学研究費によつたので感謝の意を表する。

実験の部

α -Ethoxy-INA

α -Chloro-INA 2g に abs. Alcohol 10cc を加え、これに abs. alcohol 15cc とナトリウム 0.75g で作った alcoh-

olate を加え, 封管中 190~200° で 5 時間加熱する. 冷後開管し反応液の Alcohol を溜去し, 残渣に少量の水を加えて溶解し, これに塩酸を加えて酸性とすると白色沈澱が析出する. これを濾取しよく水洗乾燥し, alcohol より再結晶する. 無色板状晶, mp. 175°, 1.5g (71%). 計算値 C 57.48, H 5.43; 実験値 C 57.56, H 4.88

α-Ethoxy-INAH

酸 0.55g に濃硫酸 1.5cc を加えて加温溶解し, 氷冷下 alcohol 2cc を加えよく攪拌し, 水浴上 5 時間加温する. 一夜放置し略々同量の氷片を加えてうすめ炭酸ソーダでアルカリ性として Ether で抽出する. Ether を溜去すれば無色油状物質 0.6g (93.5%) を得る. これに Hydrazine hydrate (90%) 1cc を加えて, 水浴上で加温振盪すれば液は均一となり固化する. methanol より再結晶する. 白色葉状晶, mp. 151°, 0.5g (83%) 計算値 C 53.02, H 6.12; 実験値 C 53.11, H 5.57

α-Isoamyloxy-INA

上と同じようにして合成. Ethyl acetate より再結晶, 無色針状晶, mp. 128~9°, 収率 75.2%, 計算値 C 57.48, H 5.43; 実験値 C 57.56, H 4.83

α-Isoamyloxy-INA Ester (以下 E と略す)

酸 1g, abs. alcohol 5.0cc, 濃硫酸 5.0cc より上と同じように合成, 淡黄色油, bp₄ 134~136 (bath) 0.9g (78.8%)

α-Isoamyloxy-INAH

上と同じように合成, Benzene より再結晶, 鱗片晶, mp. 117~8°, 0.7g (82.5%) 計算値 C 59.19, H 7.62; 実験値 C 59.38, H 6.9

α-n-Butoxy-INA および *α*-n-Butoxy-INAH

α-Chloro-INA E 1.0g と Natrium 0.25g を n-Butanol 15cc に溶かしたものを加え上と同様に合成. 酸として得た. これを常法で Ester 化し上と同様 Hydrazide に導く. Ethyl acetate より再結晶. 無色板状晶, mp. 100~102.5°

α-Allyloxy-INA

α-Chloro-INA 1g に Allyl alcohol 5cc を加え, これに Allyl alcohol 10cc, Natrium 0.37g より作った Alcoholate を加え封管中 190~200° に 8 時間加熱する. 冷後開管し減圧にて allyl alcohol を溜去し, 水を加えて濾過し濾液を稀硫酸で酸性とし析出する淡黄色沈澱を集める. よく水洗して Methanol より再結晶する. 淡黄色柱状晶, mp. 121.5°, 0.9g (80%). 計算値 C 60.33, H 5.06; 実験値 C 60.15, H 4.59

α-Allyloxy-INAH

酸を 10 倍量の Alcohol に溶解し之に乾燥塩酸ガスを常温にて導通する. 塩酸ガスを飽和して 24 時間放置する. 後減圧で Alcohol を溜去し水を加えて炭酸ソーダでアルカリ性として ether で抽出する. Ether を溜去すれば淡黄色油状物質を得る. これに Hydrazine hydrate (90%) を加えて加温振盪すれば全体は固化する. methanol より再結晶する. 無色葉状晶, mp. 131° 計算値 $\frac{1}{2}$ H₂O C 53.45, H 5.98; 実験値 C 52.63, H 6.18

Pyridine-2,4-dicarboxylic acid

α-Methyl-INA 0.9g を 10% 苛性カリ溶液 10cc に溶解し之を水浴上で加温しつつ過マンガン酸カリ 4g で酸化し塩酸々性となれば無色葉状晶が析出する. 水洗乾燥する. decp. 248°, 0.5g (50%)

Pyridine-2,4-dicarboxylic acid hydrazide

pyridine-2,4-dicarboxylic acid 0.4g を濃硫酸 1.2cc に溶解しこれに Alcohol 3cc を加えて 3 時間水浴上で加温する. 冷後水中にあげ炭酸ソーダでアルカリ性とし ether で抽出する. 無色油状物質を得る. これに 0.3cc の Hydrazine hydrate (90%) を加え加温振盪すると固化する. 含水 Ethanol から再結晶する. 淡黄白色針状晶, decp. 257° 計算値 C 43.07, H 4.62; 実験値 C 43.45, H 4.47

α-Oxy-INA

α-Ethoxy-INA 0.5g にブロム水素酸 (d=1.49) 10g を加え 135~140° に 4 時間加熱する. 放冷後, 倍量の水を加えてうすめると白色沈澱を生ずる. これを濾取し炭酸ソーダ水に溶解して塩酸で再沈澱せしめて精製する. mp. ca. 300° (decomp.) 0.4g (95%) FeCl₃ reaction ⊖

α-Oxy-INA E

α -Oxy-INA 0.3g に濃硫酸 1cc を加えて加温溶解し、よく冷却して Ethanol 2cc を加えて水浴上 4 時間加温し、放冷後倍量の水でうすめ炭酸ソーダでアルカリ性として酢エスで抽出する。Ethanol より再結晶し無色柱状晶、mp. 171° を得る。FeCl₃ reaction ⊖ 計算値 C 57.48, H 5.42; 実験値 C 57.88, H 5.20

α -Oxy-INAH

α -Oxy-INAE を Ethanol に溶かし 1.3mol. の Hydrazine hydrate を加え水浴上 2 時間加温して後減圧で溶媒と試薬の過剰を溜去し、残渣を含水 ethanol より再結晶する。mp. 245° (decomp.) 淡黄色針状晶。FeCl₃ reaction ⊖ 計算値 C 47.05, H 4.60; 実験値 C 47.19, H 4.30

文 献

- 1) 昭和28年日本薬学会総会に講演.
- 2) Fox, H. Herbert : J. Org. Chem., 4, 555 (1952)
- 3) Curtius, Mohr : Ber., 31, 2493 (1893)
- 4) Aetar : Ann., 237, 201 (1887)
- 5) von Zurcker : Ann., 250, 281 (1889)
- 6) Curtius, Leinbach : J. prakt. Chem., 65, 24, 26,

Summary

In 1952, just after the announcement of isonicotinic acid hydrazide as a very useful tuberculostatic, we began to synthesize its analogous compounds. Their chemical formulae, crystal forms, melting points and tuberculostatic activity (minimum growth inhibiting concentration) against avian type A71 and human type H37Rv are listed in table 1.

The synthetic approaches are written in figure 1. That is : isonicotinic acid (I) was warmed with 30 % hydrogen peroxide in glacial acetic acid, and the gained N-oxide (II) was changed into α -chloro isonicotinic acid (III) by warming with phosphorus oxychloride in water-bath. This chlorine in α -position was not active, so the reaction between the chlorine and sodium alcoholate was carried by heating at about 200°. Esterification of (IV) and the reaction to (V) were carried out by usual manners.

Quinolinic acid was synthesized by the oxidation of quinoline, cinchomeronic acid from quinine sulfate and 2,4-lutidinic acid from α -methyl isonicotinic acid. Several thiazole and furan carboxylic acid hydrazide were gained by the methods in literatures.

The results of bacteriological examination in vitro, we knew that α -allyloxy isonicotinic acid hydrazide was a little less active than isonicotinic acid hydrazide, α -ethoxy and α -butoxy compounds had weak activity, but other compounds were inactive.

Received February 29, 1956

イソニコチン酸ヒドラジド (イソニアジド) 類似化合物の合成 (第2報)

 α -位チオアルキルまたはスルフォアルキル置換体¹⁾

板井 孝信, 関島 正昭

Synthesis of Isonicotinic Acid Hydrazide Analogues. II.

 α -Thioalkyl or Sulfoalkyl Compounds

Takanobu ITAI and Masaaki SEKIJIMA

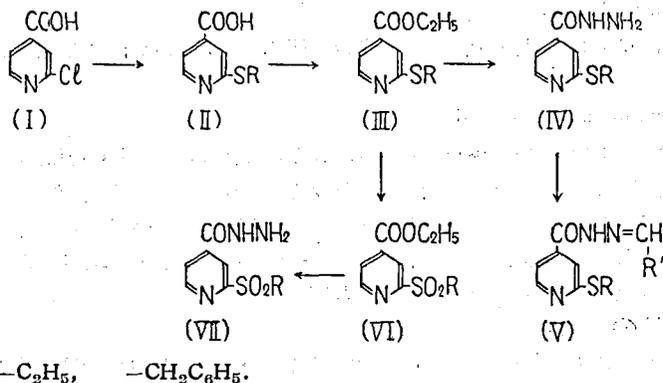
前報に引続き, α 位 -S 置換体を合成した. その合成経路は次のようである.

Fig. 1

(I) をメルカプタンの Na-塩と酒精溶液中封管 $180^\circ \sim 190^\circ$ に加熱すれば (II) となり, これを酒精-硫酸でエステル化し (III), 精製することなく直ちにヒドラジンヒドラートと水浴上加温し, (IV) を作る. これを芳香族アルデヒド (Salicyl-aldehyde, Acetophenone.) と酒精中加温するとヒドラゾン (V) を生ずる. 又 (III) を氷酢中過酸化水素で酸化すればスルフォン (VI) を生じ, これは (III) \rightarrow (IV) と同じように (VII) を得る. $\text{R} = -\text{C}_2\text{H}_5$ の場合はすべて結晶性に得られるが, $\text{R} = -\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ の場合 Ester (III) はベンゼン, アルコール, エーテルに易溶で熱時溶解して冷却したものは寒天状となり結晶性とならないが, このヒドラジドはベンゼン-石油エーテルより再結晶して結晶となり, 又このヒドラゾンは通常の結晶である. 同じく α -Benzylsulfon-isonicotinic acid hydrazide もアメ状で結晶せず, ビクラートとして証明した. これらの性質を表とすれば次のようである.

Table 1.

R	COOH 	CONHNH ₂ 	CONHN=CH
$-\text{S}\cdot\text{C}_2\text{H}_5$	mp. $152.5 \sim 153^\circ$ white needles	mp $72 \sim 73^\circ$ white needles	mp $143 \sim 144^\circ$ pale yellow needles
$\text{S}\cdot\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$	mp $195 \sim 196^\circ$ pale yellow needles	mp $92 \sim 93^\circ$ white feathered crystal	mp. $212 \sim 213^\circ$ pale yellow needles
$-\text{SO}_2\text{C}_2\text{H}_5$		mp $142 \sim 144^\circ$ white needles	

1) 昭和 29 年 4 月 日本薬学会総会で講演



picrate mp 174~5°
yellow needles

以上の元素分析は佐子茂君を煩わしたものでここに厚く感謝する。

実験の部

α-Ethyl thio isonicotinic acid

(I) 1g, Na. 0.1g, エチルメルカプタン 0.45g, 無水アルコール 15cc を混じ, 封管中 180~190° に 8 時間加熱する。放冷すれば褐色ゼラチン様に固化する。これを水にとかし, 塩酸性にすれば淡褐色の沈澱を生ずる。水層はクロロホルムで抽出, 芒硝で乾燥, 溜去すれば白色の結晶を得る。両方を合わせてクロロホルムで再結晶得量 0.9g (85%) $\text{C}_8\text{H}_9\text{NO}_2\text{S}$ 理論値 C 52.50 H 4.92 N 7.66; 実験値 C 52.28 H 4.72 N 7.51

α-Benzyl thio isonicotinic acid

醋酸エステル再結晶, $\text{C}_{18}\text{H}_{11}\text{NO}_2\text{S}$ 理論値 C 63.7 H 4.48 N 5.71; 実験値 C 63.91 H 4.52 N 5.91

α-Ethyl thio isonicotinic acid hydrazide

(II) (R=- C_2H_5) 0.5g を無水アルコール 5cc に溶かし, これに濃硫酸 5cc を加え, 常法によりエステル化を行う。放冷後水でうすめ, ベンゾールで抽出ベンゾール層を稀アルカリで数回洗滌後芒硝で乾燥, 溜去すれば黒褐色の油 0.5g を得る, これにヒドラチンヒドレート 0.4g, 無水アルコール 10cc を加え, 水浴上 5 時間加熱する。アルコールを溜去すれば白色結晶 0.6g を得。ベンゾールより再結晶 $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}_3\text{OS}$ 理論値 C 48.75 H 5.58 N 21.37; 実験値 C 48.52 H 5.19 N 21.06

α-Benzyl thio isonicotinic acid hydrazide

石油エーテル・ベンジンより再結晶, $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{OS}$ 理論値 C 60.03 H 5.03 N 16.21; 実験値 C 60.30 H 5.24 N 16.08

Salicyl aldehyde *α*-ethylthio isonicotinyl hydrazone

含水アルコールより再結晶, $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$) 理論値 N 14.05; 実験値 13.91

Salicyl aldehyde *α*-benzyl thio isonicotinyl hydrazone

メタノールより再結晶, $\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$ 理論値 N 11.57; 実験値 N 11.64

Acetophenone *α*-benzyl thio isonicotinyl hydrazone

アルコールより再結晶, $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{OS}$ 理論値 N 11.64; 実験値 N 12.10

α-Ethyl sulfonyl isonicotinic acid hydrazide

(III) (R=- C_2H_5) 0.5g を氷醋酸 10cc に溶かし, これに 30% 過酸化水素 0.5g を加え, 室温に放置すること 1 週間, この間過酸化水素 1cc を加える。溶液は淡褐色となり, 白色の沈澱が析出し浮遊する。常法に従い後処理を行えば 0.6g の褐色の結晶を得る。これにヒドラチンヒドレート 0.3g, エチルアルコール 2cc を加え水浴上 1 時間加熱する。減圧でアルコールを溜去し, ベンゾールで抽出, 芒硝で乾燥溜去すれば黄褐色の油 0.5g を得る。これに少量の石油エーテルを加えれば白色に固化する。石油エーテル・ベンジンより再結晶すれば mp. 142~144° の白色針状晶, $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ 理論値 N 18.37; 実験値 18.50

α-Benzyl sulfonyl isonicotinic acid hydrazide

アメ状物質, 結晶化困難, $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ 理論値 N 16.15; 実験値 N 15.90

Summary

Isonicotinic acid hydrazides which had thio-alkyl or sulfo-alkyl in *α*-position were synthesized by the same methods as described in the previous report. The approaches are shown in Fig. 1 and the data of the compounds in Table 1.

Received February 29, 1956

イソニコチン酸ヒドラジド (イソニアジド) 類似化合物の合成 (第3報)
 α -位アミノ置換体¹⁾

板井 孝信, 関島 正昭

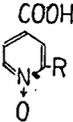
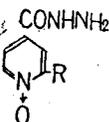
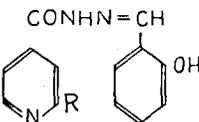
Synthesis of Isonicotinic Acid Hydrazone Analogues. III. α -Amino Compounds
 Takanobu ITAI and Masaaki SEKIJIMA

第1, 2報と同じように α -位クロル基をアミンで置換しようとし, 封管中 200° 以上に加熱し, 或は銅粉を触媒として同様加熱したが原料を回収するばかりであつた。このため α -位クロル基の活性を高める目的で N-oxide に導き, アミン, Diethylamine, の置換を吟味してみた。この結果 α -Chloropyridine の置換が 130° 位の加熱を要するに反し, α -chloropyridine N-oxide は水浴上極めて短時間で置換した。又 Benzylmercaptan とも水浴上1時間で反応した。ゆえに α -Chloroisonicotinic acid N-oxide を原料とし, 第1, 2報の合成経路に準じて α -Diethylamino および α -Piperidinoisonicotinic acid hydrazone を作り, それらの Salicylaldehyde hydrazone を合成した。これらの性質を表とすれば次のようである。

Table 1

	$-\text{SH}_2\text{C} \cdot \phi$	$-\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	$-\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}$
	mp $168\sim 169^\circ$ colorless plats	bp $6\sim 8$ $110\sim 120^\circ$ (bath) picrate mp $111\sim 112^\circ$	mp. $119\sim 120^\circ$ picrate mp. $128\sim 129^\circ$

Table 2

			
$-\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}$	mp $205\sim 207^\circ$ pale yellow needles	mp 158° colorless plates	mp $188\sim 189^\circ$ yellow needles
$-\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	oil, picrate needles mp $135\sim 136^\circ$	mp 165° yellow needles	mp $215\sim 216^\circ$ brown needles

その後文献を見ると Blümler, J²⁾ は α -Chloroisonicotinic acid とアンモニアを $180\sim 190^\circ$ 8時間加熱して α -Amino 体を得ている。

以上のものの元素分析は佐子茂君によつて行われたもので, ここに感謝の意を表す

実験の部

α -Chloropyridine N-oxide

α -chloropyridine 3.5g を水酢酸 25cc に溶かし, これに 25% 過酸化水素 8g を 3回にわけて滴下する。反応は水浴上 8時間加熱す。反応終了後溶媒を減圧で溜去し炭酸ナトリウムでアルカリ性にし, クロロホルムにて抽出, 芒硝で乾燥, 溜去すれば褐色の油 3g を得る。b. p. $115\sim 120^\circ$ Picrate, m. p. $108\sim 109^\circ$ ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), 黄色針状晶 $\text{C}_{11}\text{H}_7\text{O}_7\text{N}_4\text{Cl}$ 理論値 C. 38.57 H. 2.04 N. 16.35; 実験値 C. 38.47 H. 2.15 N. 16.39

α -Benzyl thio pyridine N-oxide.

α -chloropyridine N-oxide 0.5g をベンゼン 0.5g に混じ, これに Na0.1g, 無水アルコール 5cc と加え, 水浴上で加熱すれば直ちに反応して白色の沈澱を生じ溶液は褐色となる。水浴上 1時間加熱後 1夜放置すれば全体は

褐色に固化する10%塩酸を加えて中和しエーテルにて抽出後、水層を炭酸ナトリウムでアルカリ性にすれば淡褐色の沈澱0.4gを得、アルコールより再結晶、

$C_{12}H_{11}ONS$ 理論値 C.66.30 H.5.07 N.6.46; 実験値 C.66.10 H.4.90 N.6.64

α -Diethylamino pyridine N-oxide

$C_{15}H_{17}N_5O_8$ 理論値 N.17.71; 実験値 N.17.48

α -Piperidino pyridine N-oxide

石油ベンジン・アセトンより再結晶、 $C_{11}(H_{14}N_2O)$ 理論値 N.15.75; 実験値 N.15.49

Picrate (C_2H_5OH) m. p. 128~129° $C_{16}H_{17}N_5O_8$ 理論値 N.17.21; 実験値 N.17.58

Ethyl α -chloro isonicotinate N-oxide

Ethyl α -chloro isonicotinate 2g を氷酢酸15ccに加温して溶かし、これに30%過酸化水素10ccを3回にかけて加える。氷浴上15時間加温す。反応終了後常法に従つて処理すれば無色針状晶2gを得る。石油ベンジンアセトンで再結晶すれば m. p. 69~70° の白色針状晶

$C_8H_9NO_8Cl$ 理論値 C.47.70 H.3.90 N.6.90; 実験値 C.47.42 H.4.02 N.6.65

α -Chloro isonicotinic acid N-oxide

α -chloro isonicotinic acid 4g を氷酢酸50ccに加熱して溶かす。これに30%過酸化水素15ccを3回にかけて加え80°~90°に10時間加温す。常温通り後処理を行えば粗 N-oxide 4.1gを得る。希メタノールより再結晶すれば mp. 230~231° 無色針状晶 $C_6H_4O_8NCl$ 理論値 N.8.57; 実験値 N.8.40

α -Piperidino isonicotinic acid N-oxide

2-chloro isonicotinic acid N-oxide 0.2g を piperidine 0.6cc に加温して溶かし、100° に1時間加熱後放冷すれば全部茶褐色に固化す。過剰の Piperidine を溜去し、水5ccを加え炭酸ナトリウムでアルカリ性にし、クロロホルムにて抽出、乾燥後溜去すれば淡黄白色の結晶を得る。メタノールにて再結晶。 $C_{10}H_{14}N_2O$ 理論値 C.59.47 H.6.31 N.12.63; 実験値 C.59.40 H.6.05 N.12.88

2-Diethylamino isonicotinic acid N-oxide.

Picrate. (C_2H_5OH) $C_{15}H_{17}O_5N_8$ 理論値 N.16.54; 実験値 N.16.59

α -Piperidino isonicotinic acid hydrazide N-oxide

α -Piperidino isonicotinic acid N-oxide 0.15g をメタノール10ccに加温して溶かし、乾燥塩酸ガスを導通して飽和し、30分間70~80°に加温すれば淡黄白色の沈澱を生ずる。メタノールを溜去し、炭酸ナトリウムでアルカリ性となし、クロロホルムにて抽出、乾燥後溜去す。猶抽出クロロホルム層は著しい螢光を發す。クロロホルムを溜去後(粗油0.2g)ヒドラチンヒドラート0.2gを加え、水浴上30分加温後溜去すれば0.15gの淡褐色の沈澱状結晶を得る。酢酸エステルより再結晶 $C_{11}H_{16}O_2N_4$ 理論値 C.53.60 H.7.14 N.25.5; 実験値 C.53.30 H.7.02 N.24.61

α -Diethyl amino isonicotinic acid hydrazide N-oxide

酢酸エスより再結晶 $C_{10}H_{16}O_2N_4$ 理論値 C.55.9 H.6.78 N.23.76; 実験値 C.55.62 H.6.42 N.23.52

Salicylaldehyde 2-piperidino isonicotinyl hydrazone 1-oxide

mp. 186~189° (C_2H_5OH) 淡黄色針状晶 $C_{18}H_{20}N_4O_8$ 理論値 N.16.47; 実験値 N.16.22

Salicyl aldehyde 2-diethyl amino isonicotinyl hydrazone 1-oxide

mp. 215~216° (C_2H_5OH) 淡褐色針状晶 $C_{17}H_{20}N_4O_8$ 理論値 N.17.08; 実験値 N.16.97

文 献

- 1) 昭和29年4月 日本薬学会総会で講演
- 2) Bäumler, J. Sorkin, E. Helv. Chim. Acta., 34 496~500 (1951)

Summary

Similar to the methods in previous reports, α -chlorine in isonicotinic acid did not react with amines. So in first step, we examined the ion-reaction of α -chloropyridine and its N oxide with ethylamine and piperidine, on expecting the activation of the chlorine. The reaction of α -chloropyridine with diethyl-

amine needed to heat the mixture at 130°, but the reaction of its N-oxide occurred only by heating on water-bath. So by using α -chloroisonicotinic acid N-oxide, we could synthesize the α -amino compounds shown in table 1 and 2.

Received February 29, 1956

バソプレシンの新定量法 I. 脳髄破壊犬によるバソプレシンの定量法*

中山 豪 一

Bioassay of Vasopressin Using Spinal Dogs

Goichi NAKAYAMA

まえがき 脳下垂体後葉中の昇圧・抗利尿成分、バソプレシンの検定には脳髄破壊猫（以下 SC と略す）を用いる Dale, Laidlaw¹⁾及び Hogben 等²⁾の方法があるが、バソプレシン注射の影響から回復するまでに 30~60 分を要するので、猫 1 匹の実験では 6~10 回注射を繰返えし得るに過ぎない。従つてその結果は統計学的に処理し難く、英局 III³⁾でも誤差の信頼限界は決定し得ないと記載している。Hamilton⁴⁾, Hamilton, Rowe⁵⁾及び Kamm 等⁶⁾による麻醉犬（以下 AD と略す）を用いる方法では注射間隔が約 15 分に過ぎないので、米局 XIV⁷⁾ではバソプレシン注射液の定量法として採用し、統計学的検討を行つている。しかし AD 法では SC 法に比し、用量-反応線の傾斜（以下 b と略す）がいかに小さい（実験 B 参照）。

著者はバソプレシンに対する猫の反応が、脳髄を破壊すると、麻醉猫（以下 AC と略す）に比し増大する事実（実験 B の 1, 2 参照）に基づき、脳髄破壊犬（以下 SD と略す）を作製し、その用量-反応線を検討した結果、用量 0.025~0.4 mg 間に直線性を認め、更に AD に比しその b が約 1.7 倍大きくなることを知つた（実験 B の 3, 4 参照）ので、2-2 用量検定を行い、SD 法は AD 法より一層精度の高い定量法であることを確認したので報告する。

実験方法

(1) 脳髄破壊動物の作製法： Dale 及び Laidlaw 法¹⁾に準拠したが、著者の知見に従つて述べる。最近熊谷、油井、小川、大賀⁸⁾は頸部前面からの作製法を報告している。

実験の初期には動物をエーテルで麻醉したが、多量のヨダレを流すので、以後は溶性フェノバルビタール 0.25g/kg を背部皮下に注射して麻醉し（通例 1~1.5 時間を要する）、背位に固定し、頸部前面を広く除毛し、甲状軟骨下方から皮膚を約 5~6 cm 切開し**、筋肉を分離して気管を露出する。甲状軟骨から約 2~2.5 cm 下方で気管を横に約 2/3 切断し、適当な径の T 字型カニューレを挿入し、直ちに人工呼吸を開始する***。両側頸動脈 Arteria carotis communis を迷走神経、交感神経及び周囲の組織から分離し、甲状軟骨部からやや下方で両方とも結紮する。

次に動物を腹位に固定し、頸部背面の毛を広く除去し、大後頭結節の下方約 2 cm の所から正中線に沿つて皮膚を約 7~9 cm 切開し、脂肪層を除くと僧帽筋が現われ、正中線に相当する部分が白い線として認められる。この部分を指で圧すると第 2 頸椎の棘状突起が感ぜられる。鈍頭鉗で白い線となつた部分を注意深く切開し、更に内部の筋層をピンセットで分離すると、棘状突起の上端が現われる。これに附着する棘状筋をピンセットで剝離し****、鉤で左右に開き第 2 頸椎の上部を露出する。棘状突起*****の中央部を約 1 cm だけ骨鉗で切りとり、骨鉗子を用いて椎体を根気よくけずり、径約 1 cm の穴を開ける。次に眼科用小尖頭鉗で硬膜を切断すると、脊髄液多量が流出するから、脱脂綿で吸取ると脊髄が認められる。先ずその約 2/3 を切断する。脊髄の残部はピンセットで注意して切断する。脊髄腔の底部を脆弱な血管が走つているので、傷つけないよう注意する必要がある。脊髄が完全に切断されたことを確かめた後、切断口から径約 1~2 mm の銅線を大後頭孔を経て脳内に挿入し、数回かきまぜ

* 長沢佳熊：脳下垂体後葉ホルモンの検定（第 3 報）。〔第 2 報は本誌 71 号 103 頁（昭和 28 年）〕この報告の 1 部は昭和 29 年 2 月日本薬学会東京例会で講演した。

Kakuma Nagasawa: Studies on the Posterior Pituitary (No. 3). Paper read on February, 1954, at the Monthly Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan in Tokyo.

** 切開口から持続的に血液が滲出するから止血鉗子で止血する。

*** 毎分 28 回転。

**** このとき血液が滲出するから脱脂綿球で強く圧迫して止血する。

***** 犬では約 3.5~4.5 cm, 猫では約 1.5~2.0 cm である。

ると瞳孔は全く散大する。次に切開口にはゼラチンスポンジ (スポンゼル) を詰めた後、手早く皮膚を縫合し、脳髄破壊操作を終る。

動物を再び背位に固定し、常法により動脈カニューレをいずれか一方の頸動脈内に挿入し、10%クエン酸ナトリウム液を充たしたゴム管を介して血圧マノメータに接続する。術後30~60分で血圧は一定となる。手術操作は熟練すれば60~90分で終るが、120分位を要しても動物は死亡しない。

(2) 検液の調製法：本報では検体として日局脳下垂体後葉標準品 (以下NNStと略する) を用い、日局Ⅵ脳下垂体後葉標準液の製法に従い、1cc中1mg (2国際単位) を含む溶液を調製し検液とした。検定当日0.9%塩化ナトリウム液で適当に稀めて使用した。

実験結果

A. 脳髄破壊前後の体温と血圧の変化

(1) 脳髄破壊前後の体温 (直腸温度) の変化を Table 1 に示す。Table 1 から体温の変化は案外少なく、猫では1例のみ7°の低下を見たが、他は犬の場合とほぼ同じく0~3°である。この結果から動物は特に保温せず、25°の恒温室で実験した。

Table 1. Comparison of changes in rectal temperature (°C) of test animals before and after spinal operation

Cat		Dog	
Before operation	After operation	Before operation	After operation
38.0	—	39.0	37.0
37.5	35.4	37.0	37.0
36.0	32.0	38.5	37.5
38.0	34.5	36.0	33.0
38.0	36.0	39.0	—
37.0	31.5	39.0	—
35.5	28.5	40.0	—
36.5	—	38.0	—
38.0	37.0	38.0	37.0
36.0	33.4	37.0	—
38.1	37.5	36.0	33.0
33.5	33.5	33.7	33.0
33.7	33.7	—	37.6
33.8	33.8	—	35.0
35.5	35.5	37.0	36.5
34.0	34.0	—	37.0
—	—	35.0	33.0
—	—	35.6	35.5
—	—	34.0	33.5
—	—	35.8	35.0
—	—	34.5	32.0
—	—	36.2	34.5

(2) 脳髄破壊前後の血圧の変化を Table 2 に示す。Table 2 から脳髄破壊により血圧は相当低下することが分る。血圧の過度に低下した動物ではバソプレシンに対する反応が不鋭敏になる傾向が見られるので、検定には不適當である。

Table 2. Comparison of changes in blood pressure (mm ·Hg) of test animals before and after spinal operation

Cat		Dog	
Before operation	After operation	Before operation	After operation
—	27-36	108-125	44-78
118-131	67-78	—	30-48
—	52-58	132-150	54-75
—	46-52	124-139	—
—	70-78	116-121	—
—	31-38	76-90	58-72
—	33-39	—	30-45
—	70-80	—	39-59
112-121	—	82-97	—
130-144	—	92-118	22-42
104-116	—	96-118	—
146-160	—	70-90	—
140-150	—	144-175	—
80-100	—	100-120	—
—	58-66	116-172	—
116-129	67-79	84-100	—
122-142	48-60	—	57-74
118-138	60-72	122-145	26-43
90-98	59-66	—	38-56
100-105	55-60	—	44-63
94-104	44-51	—	56-74
121-158	60-70	—	65-81
—	—	90-101	44-61
—	—	106-126	30-52
—	—	80-98	44-64
—	—	64-78	28-48
—	—	85-95	52-69

B. 猫についての用量-反応関係の検討

同一猫について脳髄破壊前後のバソプレシンに対する反応を NNS_t を用いて比較した。Table 3 にその結果を示す。

Table 3. Dose-response relationship before and after spinal operation (Cat)

Test No.		Dose**(mg)											
		0.0125	0.017	0.025	0.034	0.05	0.068	0.1	0.125	0.15	0.175	0.2	
1	AC*	—	—	—	—	—	—	—	—	—	26	21	—
	SC	—	—	—	—	—	—	25	35	—	38	—	
2	AC*	—	6	—	10	—	17	—	—	—	—	—	
	SC	—	8	—	11	—	21	—	—	—	—	—	
3	AC*	20	—	23	—	—	—	—	—	—	—	—	
	SC	17	—	24	—	40	—	—	—	—	—	—	
4	AC*	4	—	5	—	7	—	12	—	—	—	16	
	SC	4	—	7	—	9	—	13	—	—	—	17	
5	AC*	0	—	6	—	8	—	10	—	—	—	18	
	SC	3	—	5	—	8	—	12	—	—	—	21	
6	AC*	6	—	10	—	15	—	26	—	—	—	36	
	SC	4	—	6	—	7	—	16	—	—	—	31	
7	AC*	4	—	13	—	20	—	30	—	—	—	39	
	SC	13	—	25	—	28	—	48	—	—	—	85	

* using sodium phenobarbital

** Posterior pituitary standard of Japanese pharmacopoeia was used

AC : Anesthetized cat, SC : Spinal cat

又 Table 4にそれぞれの実験条件を示す。Fig. 1, 2にそれぞれ脳髄破壊前後のキモグラフの例を示す。

Table 4. Condition of experiments on cats in Table 3.

Test No.	Body weight (kg)	Sex	Temperature (°C)	Moisture (%)	Blood pressure (mm Hg)		Rectal temperature (°C)	
					Before spinal operation	After spinal operation	Before spinal operation	After spinal operation
1	3.4	♂	24	40	116-129	67-79	38.0	37.0
2	3.6	♂	25	35	122-142	48-60	33.5	33.5
3	4.4	♂	22	64	118-138	60-72	38.1	37.5
4	4.7	♂	22	36	90-98	59-66	33.7	33.7
5	4.2	♂	22	35	100-105	55-60	33.8	33.8
6	3.2	♂	21	37	94-104	44-51	36.5	35.5
7	3.4	♂	22	40	121-158	60-70	34.0	34.0

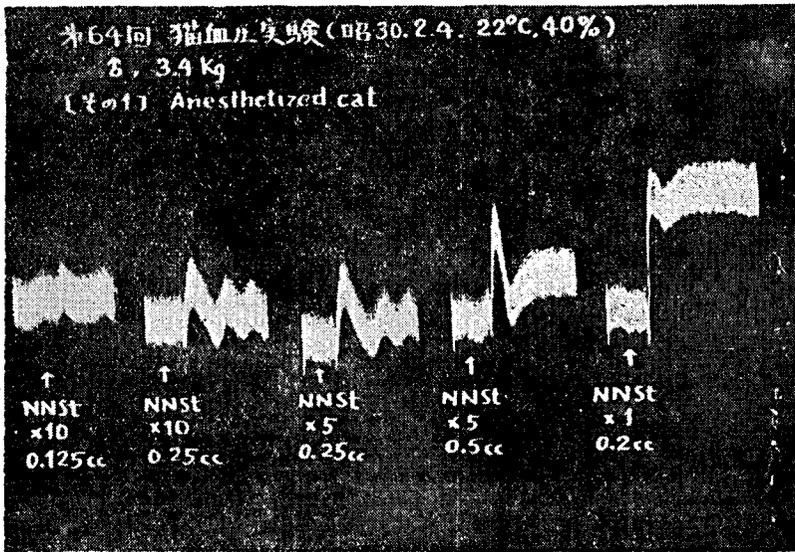


Fig. 1. Dose-response curve (Anesthetized cat)

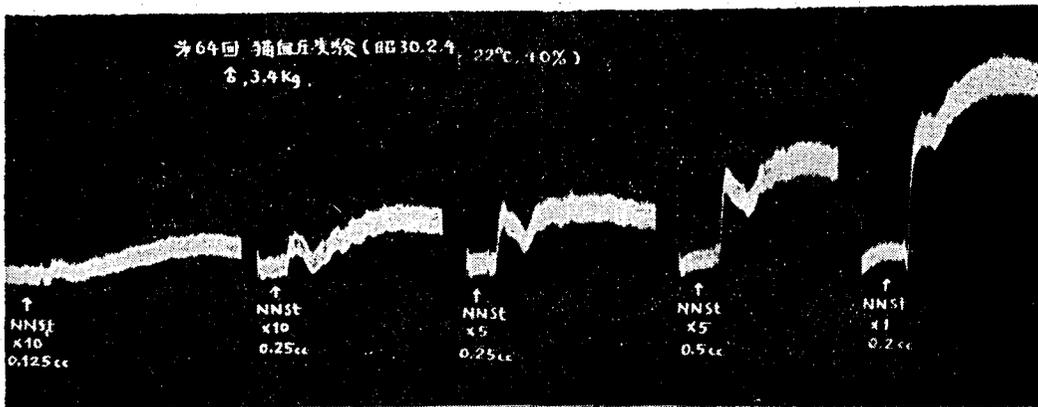


Fig. 2. Dose-response curve (Spinal cat)

(1) ACに関する用量-反応関係を検討するため、Table 3中のACで得た Test No. 4~7の反応をまとめて Table 5に示す。Table 5の資料についての分散分析表⁹⁾を Table 6に示す。その結果 $F_0 = 8.03/20.25 = 0.4$ が F表で得た値 ($F_{12}^3 = 3.49$) より小さいので、用量0.0125~0.2 mg 間に直線性が認められる。故にその回帰方程式を求め、Table 7に示す。なお Fig. 5中の直線 ACはその回帰線である。

Table 5. Dose-response relationship before spinal operation (Cat)

Dose (mg)	0.0125	0.025	0.05	0.1	0.2	Total
Response	4	5	7	12	16	44
(mmHg)	0	6	8	10	18	42
	6	10	15	26	36	93
	4	13	20	30	39	106
Total	14	34	50	78	109	285
Number of response	4	4	4	4	4	20
Mean	3.5	8.5	12.5	19.5	27.25	

Table 6. Analysis of variance for the data of Table 5

Nature of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Regression	1	1 368.90	8.03
Deviation from regression	3	24.10	
Between doses	4	1 393.00	20.25
Within blood pressures	3	655.75	
Error	12	2 43.00	
Total	19	2 291.75	

Table 7. Calculation of regression for the data of Table 5

x	y	n	nx	ny	nx ²	nxy	ny ²
- 2	27.25	4	8	109	16	218	2 970.25
+ 1	19.50	4	4	78	4	78	1 521.00
0	12.50	4	0	50	0	0	625.00
- 1	8.50	4	- 4	34	4	-34	289.00
- 2	3.50	4	- 8	14	16	-28	49.00
		20	0	285	40	234	5 454.25
					0	0	4 061.25
					40	234	1 393.00

$\bar{x} = 0,$

$y = 14.25,$

$b = 234/40 = 5.85$

$\therefore Y_{AC} = 14.25 + 5.85x$

(2) SCに関する用量-反応関係を検討するため、Table 3中のSCで得た Test No. 4~7の反応をまとめて Table 8に示す。Table 8の資料についての分散分析表を Table 9に示す。この結果から、 $F_0 = 99.47/112.76 = 0.88 < F_{12}^3 = 3.49$ であるから、用量0.0125~0.2mg間に直線性が認められる。故に(1)と同様にして回帰方程式を算出した。 $Y_{SC} = 18.7 + 7.65x$

Fig. 5中のSCはこの回帰線を示す。

Table 8. Dose-response relationship after spinal operation (Cat)

Dose (mg)	0.0125	0.025	0.05	0.1	0.2	Total
Response	4	7	9	13	17	50
(mmHg)	3	5	8	12	21	49
	4	6	7	16	31	64
	13	25	28	48	85	199
Total	24	43	52	89	154	362
Number of response	4	4	4	4	4	20
Mean	6.00	10.75	13.00	22.25	38.50	

Table 9. Analysis of variance for the data of table 8

Nature of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Regression	1	2340.90	99.47
Deviation from regression	3	298.4	
Between doses	4	2639.3	112.76
Within blood pressures	3	3167.4	
Error	12	1353.1	
Total	19	7159.8	

以上の実験からSCではACよりbが約1.3倍大きく、従つて脳髄破壊操作によりパツプレシオンに対する反応が増大することを知つた。なお脳髄破壊により血圧の基線が一定となる利点もある。

C. 犬についての用量-反応関係の検討

同一犬について脳髄破壊前後のパツプレシオンに対する反応をNNStを用いて比較した。Table 10にその結果を示す。又 Table 11にその実験条件を示す。なお Fig. 3及び4にそれぞれ脳髄破壊前後のキモグラフの1例を示す。

Table 10. Dose-response relationship before and after spinal operation (Dog)

Test No.			Dose(mg)										
			0.025	0.0375	0.05	0.075	0.1	0.125	0.15	0.175	0.2	0.4	0.8
1	AD	4	—	4	7	7	10	12	—	—	—	—	—
	SD	4	—	6	9	10	14	15	15	16	—	—	—
2	AD	5	—	5	5	6	7	—	—	—	—	—	—
	SD	2	—	5	6	7	8	9	7	10	—	—	—
3	AD	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	SD	12	—	23	29	31	36	43	40	42	—	—	—
4	AD	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	SD	6	8	11	14	23	—	—	—	29	30	38	46
5	AD	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	SD	6	—	9	—	12	—	—	—	16	20	24	28
6	AD	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	SD	4	—	5	—	9	—	—	—	19	26	—	—
7	AD	2	—	5	—	12	—	—	—	23	—	—	—
	SD	12	—	16	—	25	—	—	—	33	44	—	—
8	AD	2	—	4	—	4	—	—	—	5	8	—	—
	SD	5	—	7	—	9	—	—	—	13	14	17	—
9	AD	2	—	3	—	4	—	—	—	5	8	—	—
	SD	3	—	5	—	6	—	—	—	10	13	—	—
10	AD	4	—	6	—	10	—	—	—	12	11	—	—
	SD	3	—	7	—	8	—	—	—	12	18	—	—
11	AD	2	—	4	—	6	—	—	—	17	27	—	—
	SD	12	—	13	—	17	—	—	—	26	38	—	—

AD: Anesthetized dog, SD: Spinal dog

Table 11. Condition of experiments on dogs in Table 10

Test No.	Body weight (kg)	Sex	Temperature (°C)	Moisture (%)	Blood pressure (mm Hg)		Body Temperature (°C)	
					Before spinal operation (Anesthetized)	After spinal operation	Before spinal operation (Anesthetized)	After spinal operation
1	10	♀	24	40	108-125	44-78	37	—
2	6.2	♀	24	50	122-145	26-34	36	33
3	11	♂	24	38	—	38-56	38	37
4	15	♂	22	45	—	44-63	—	37.6
5	14	♂	22	43	—	56-74	—	37
6	9.8	♂	21.5	38	—	65-81	35	33
7	11.6	♂	22	36	90-101	44-61	35.6	35
8	10.2	♂	22.5	34	106-126	30-52	34	33.5
9	14.0	♂	23.5	35	80-98	44-64	35.8	35
10	12.3	♂	21.0	41	64-78	28-48	34.5	32
11	9.8	♂	22.3	36	85-95	52-69	36.2	34.5

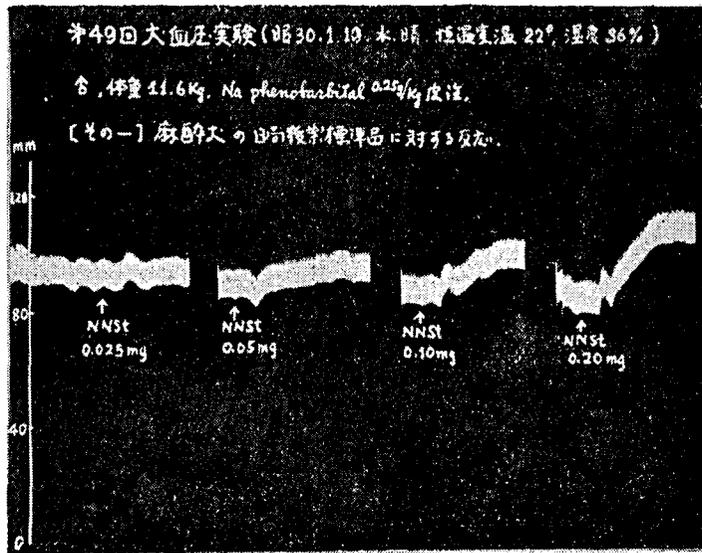


Fig. 3. Dose-response curve (Anesthetized dog)

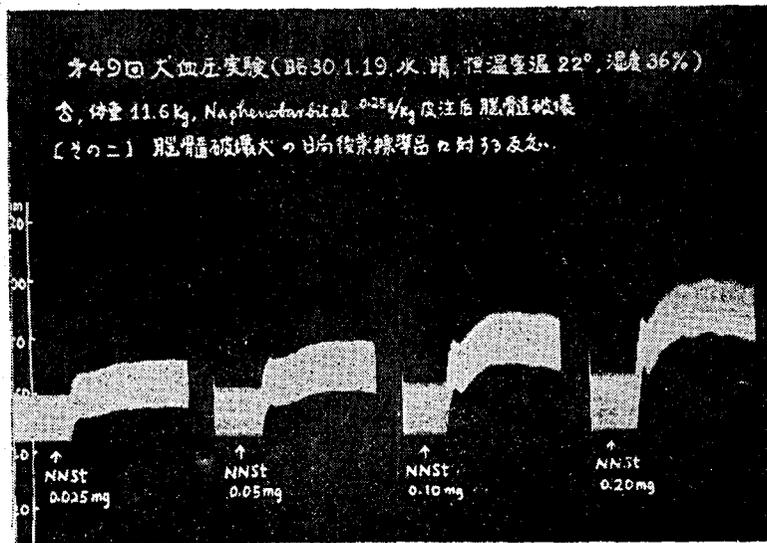


Fig. 4. Dose-response curve (Spinal dog)

(1) AD に関する用量-反応関係を検討するため, Table 10 中の AD で得た Test No. 8~11 の反応をまとめて Table 12 に示す. Table 12 の資料についての分散分析表を Table 13 に示す. この結果から $F_0 = 3.7/18.4 = 0.2 < F^2 = 3.49$ であるので, 用量 0.025~0.4mg 間に直線性が認められる. 故にその回帰方程式を算出した.

$$Y_{AD} = 7.2 + 2.85x$$

Fig. 5 の AD にその回帰線を示す.

Table 12. Dose-response relationship before spinal operation (Dog)

Dose (mg)	0.025	0.05	0.1	0.2	0.4	Total
Response	2	4	4	5	8	23
(mmHg)	2	3	4	5	8	22
	4	6	10	12	11	43
	2	4	6	17	27	56
Total	10	17	24	39	54	144
Number of response	4	4	4	4	4	20
Mean	2.5	4.3	6.0	9.8	13.5	

Table 13. Analysis of variance for the data of Table 12

Nature of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Regression	1	302.5	3.7
Deviation from regression	3	11.2	
Between doses	4	313.7	18.4
Within blood pressures	3	162.8	
Error	12	220.7	
Total	19	697.2	

(2) SC に関する用量-反応関係を検討するため、Table 10 の SC で得た Test No.7~11 の反応をまとめて Table 14 に示す。この資料についての分散分析表は Table 15 である。この結果 $F_0 = 13.12/18.82 = 0.7 < F_{16}^3 = 3.24$ であるから、用量 0.025~0.4mg 間に直線性が認められる。故にその回帰方程式は次のようになる。

$$Y_{SD} = 14.8 + 4.60x$$

Fig. 5 の SD にその回帰線を示す。

Table 14. Dose-response relationship after spinal operation (Dog)

Dose (mg)	0.025	0.05	0.1	0.2	0.4	Total
Response	12	16	25	33	44	130
(mmHg)	5	7	9	13	14	48
	3	5	6	10	13	37
	3	7	8	12	18	48
	12	13	17	26	38	106
Total	35	48	65	94	127	369
Number of response	5	5	5	5	5	25
Mean	7.0	9.6	13.0	18.8	25.4	

Table 15. Analysis of variance for the data of Table 14

Nature of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Regression	1	1 058.00	13.12
Deviation from regression	3	39.36	
Between doses	4	1 097.36	18.815
Within blood pressures	4	1 376.16	
Error	16	301.04	
Total	24	2 774.56	

以上 AD 及び SD で得た用量-反応線を比較すると、いずれも直線性が認められるが、その b はそれぞれ 2.75 及び 4.60 となり、後者の方が約 1.7 倍大きい。又脳髄破壊により血圧の基線は著しく一定となる。

(3) AC, SC, AD 及び SD法の比較

以上の実験で得た結果から、 b の大きさは SC, AC, SD, AD の順に小さいことが分る (Fig. 5 参照)。脳髄破壊により同一用量に対する反応が増大し、又血圧の基線が一定となる。SC 法は b が大きく、用量も大法に比し 1/2 でよい利点はあるが、前述のように注射間隔が長いので、統計学的処理ができない。従つてパソプレシンの定性的な検定にのみ適用し得るに過ぎない。これに反し米局 XIV で採用した AD 法では統計学的処理は可能であるが、 b が小さいので精度の高い定量法とはいえない。しかるに著者の作製した SD 法では AD 法に比し、 b が 1.7 倍も大きいので、AD 法より一層精度の高い定量法として採用し得る。Table 16 及び Fig. 5 にこれら 4 法で得た資料を示す。

Table 16. Regression lines obtained by AC, SC, AD, and SD

	Dose (mg)	Regression line	b	Ratio of b
AC	0.0125-0.2	$Y_{AC} = 14.3 + 5.85x$	5.85	2.1
SC	0.0125-0.2	$Y_{SC} = 18.7 + 7.65x$	7.65	2.8
AD	0.025 -0.4	$Y_{AD} = 7.2 + 2.75x$	2.75	1.0
SD	0.025 -0.4	$Y_{SD} = 14.8 + 4.6x$	4.60	1.7

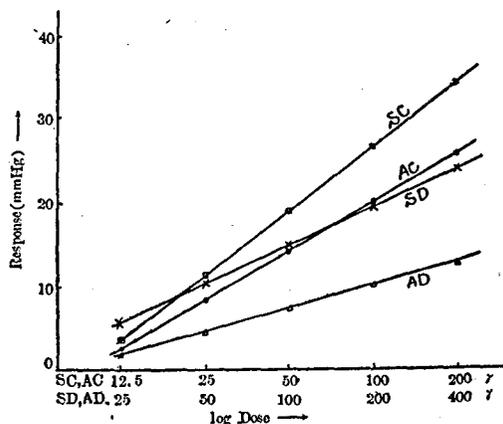


Fig. 5. Comparison of regression lines obtained by AC, SC, AD and SD

D. 2-2 用量検定

標準品及び検体としていずれも NNSt を用いて 2-2 用量検定を行つた。一般に生物学的定量法の誤差の信頼

限界 [P=0.95] として 80~125% が採用されているので、本実験でも検定の成立条件としてこれを採用した。

(1) AD 法

Fig. 3 の AD の直線部分 (NNSt 0.025-0.4 mg) 内の 4 用量を用い、2-2 用量検定を行つた。その 1 例を Table 17 に示す。なお Fig. 6 に血圧曲線例を示す。

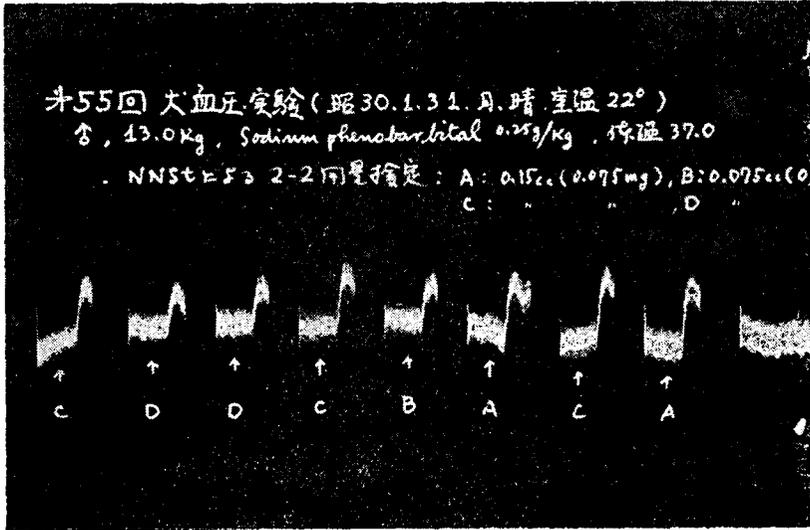


Fig. 6. two and two dose assay (Anesthetized dog)

Table 17. two and two dose assay using anaesthetized dog

Dose (mg)	S ₁	S ₂	T ₁	T ₂	Total
	0.0375	0.075	0.0375	0.075	
Response (mmHg)	12	16	12	16	56
	13	19	12	18	62
	10	20	10	20	60
	10	13	12	14	49
Total	45	68	46	68	227
Number of response	4	4	4	4	16
Mean	11.25	17.00	11.50	17.00	

Table 17 の資料についての分散分析表は Table 18 である。その結果から得た 2 直線間の平行性に有意な差を認めないので、回帰方程式及び効価比等を算出した。Table 19 にその計算例を示す。

Table 18. Analysis of variance for the data of Table 17

Nature of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Preparation	1	0.06	0.07
Regression	1	126.56	
Parallelism	1	0.07	
Between doses	3	126.69	3.9
Within blood pressures	3	24.69	
Error	9	35.06	
Total	15	186.44	

Table 19. Estimation of relative potency

Standard preparation

x	y	n	nx	ny	nx ²	nxy	ny ²
+ 1	17.00	4	+ 4	68	4	68	1 156.00
- 1	11.25	4	- 4	45	4	-45	506.25
		8	0	113	8	23	1 662.25
					0	0	1 596.23
					8	23	66.12

$\bar{x}_s = 0, \bar{y}_s = 14.125$

Unknown preparation

x	y	n	nx	ny	nx ²	nxy	ny ²
+ 1	17.00	4	+ 4	68	4	68	1 156.00
- 1	11.50	4	- 4	46	4	-46	529.00
		8	0	114	8	22	1 685.00
					0	0	1 624.50
					8	22	60.50

$\bar{x}_T = 0, \bar{y}_T = 14.250$

Sxx	Sxy	Syy
8	23	66.12
8	22	60.50
<u>16</u>	<u>45</u>	<u>126.62</u>

$$b = S_{xy}/S_{xx} = 2.81$$

$$\text{Regression equation : } Y_S = 14.125 + 2.81x,$$

$$Y_T = 14.250 + 2.81x$$

$$\text{Relative potency : } M = \bar{x}_S - \bar{x}_T - \frac{\bar{y}_S - \bar{y}_T}{b} = 0.0445$$

$$\text{Actual log relative potency} = M' = 0.0445 \times 0.1505 = 0.0067$$

$$\text{Relative potency} = R = \text{Antilog } M' = 1.02$$

$$\text{Fiducial limits of } M : g = s^2 t^2 / b^2 S_{xx} = 0.157$$

$$\begin{aligned} & \bar{x}_S - \bar{y}_T + \frac{M - \bar{x}_S + \bar{x}_T}{1-g} \pm \frac{st}{b(1-g)} \sqrt{(1-g) \left(\frac{1}{NS^*} + \frac{1}{NT^*} \right) + \frac{(M - \bar{x}_S + \bar{x}_T)^2}{S_{xx}}} \\ & = \frac{0.0445}{0.843} \pm \frac{1.97 \times 2.26}{2.81 \times 0.843} \sqrt{0.843 \left(\frac{1}{8} + \frac{1}{8} \right) + \frac{0.0445^2}{16}} \end{aligned}$$

* Total number of observations obtained by standard and unknown preparation, respectively.

$$= -0.8103 \sim 0.9159$$

Fiducial limits of M' : 1.8780~0.1378

Fiducial limits of R : 0.7551~1.374

(74.3~135.2%)

このような2回の実験結果を Table 20 に示す。

Table 20. Summarized results of 2 and 2 dose assay (AD)

	Dose (mg)		Dose ratio	Relative potency (R)	Fiducial limits of R ($P=0.95$) (%)	Slope (b)
	Low dose	High dose				
1	0.0375	0.075	1 : 2	1.016	74.3-135.2	2.81
2	0.0875	0.175	1 : 2	0.939	70.5-137.7	2.06

本実験では誤差の信頼限界 [$P=0.95$] はいずれも 80~125%より大きいので検定は成立しない。従つて得た効価比は信頼性に乏しい。この原因としては AD 法での b (本例では 2.81, 2.06) が小さいことが考えられる。故に誤差の信頼限界の規定を 80~125%より広くするか或は注射回数 (本例では何れも 16 回) を更に増加する必要がある。

(2) SD 法

AD 法の場合と同じく Fig. 3 の SD の直線部分 (NNS_t 0.025~0.4 mg) 内の 4 用量を用いて 2-2 用量検定を行つた。その 1 例を Table 21 に示す。なお Fig. 7 にその血圧曲線を示す。

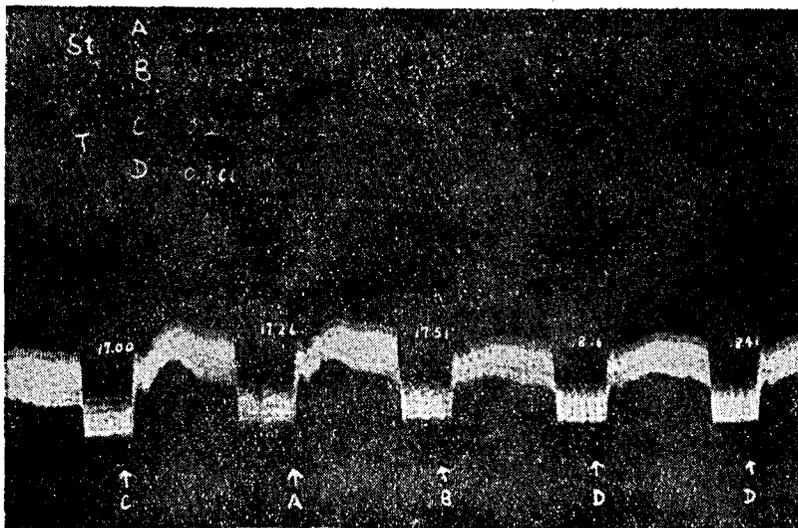


Fig. 7. two and two dose assay (Spinal dog)

Table 21 の資料についての分散分析表を Table 22 に示す。この結果から得た 2 直線間の平行性に有意な差を認めないので、実験 D の 1 のようにして回帰方程式、効価比及び誤差の信頼限界を求め次に示す。

$$Y_S = 20.4 + 4.19x,$$

$$Y_T = 21.8 + 4.19x$$

効価比=1.12, 誤差の信頼限界=90.0-111.8% ($P=0.95$)

Table 21. 2 and 2 dose assay using spinal dog

Dose (mg)	S ₁	S ₂	T ₁	T ₂	Total
	0.033	0.066	0.033	0.066	
Response (mmHg)	15	23	15	23	76
	18	26	20	30	94
	19	25	19	27	90
	15	22	14	26	77
Total	67	96	68	106	337
Number of response	4	4	4	4	16
Mean	16.75	24.00	17.00	26.50	

Table 22. Analysis of variance for the data of Table 21

Nature of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Preparation	1	7.56	5.07
Regression	1	280.56	
Parallelism	1	5.07	
Between doses	3	290.19	1.28
Within blood pressures	3	62.19	
Error	9	11.56	
Total	15	366.94	

このような3回の実験結果をまとめて Table 23 に示す。

Table 23. Summarized results of 2 and 2 dose assay (SD)

	Dose (mg) Low dose—high dose	Dose ratio	Relative potency (R)	Fiducial limits of R (P=0.95) (%)	Slope (b)
1	0.033 — 0.066	1:2	1.12	90.0—111.8	4.19
2	0.05 — 0.1	1:2	1.03	83.8—119.8	4.94
3	0.075 — 0.15	1:1.2	1.12	86.1—117.4	3.28

Table 23 から、SD 法による3例はいずれも誤差の信頼限界が80~125%内であるので、検定は成立する。これら3例では効価比の理論値に対する誤差は3~12%で、効価比の平均値は1.03となる。なおSD法ではbがAD法のそれに比し大きいので、注射回数16回で信頼性の高い定量ができる。

考察およびむすび

本報告ではAC, SC, AD及びSDのバツプレシンに対する用量-反応関係を検討し、Table 16に示した結果を得た。これら回帰方程式から分るように、脳髄破壊動物で得たbは麻酔動物で得たbに比し大きく、猫では約1.3倍、犬では約1.7倍となる。更にFig. 1, 2, 3, 4等から明らかなように血圧の基線は脳髄破壊により著しく一定となる。又同一用量の注射で得られる血圧上昇値も麻酔動物より大きい。脳髄破壊による同一用量で起る反応の増加割合は犬の方が大きく、SDのbはACのbに近づく。

次にAD, SDにより直線部分(NNSt 0.025~0.4mg)内の4用量を用いて、それぞれ2-2用量検定を行った結果、AD法ではいずれも誤差の信頼限界(P=0.95)が80~125%の範囲外となつたが、SD法ではこの範囲内の誤差の信頼限界が得られた。AD法ではbが小さいため用量比1:2では反応間に充分な差が得られないこと

を示すものである。従つて 80~125% 内の検定を行うためには、更に注射回数を増加する必要がある。これに反し SD 法では b が大きいので用量比 1:2 で反応間に充分な差が得られることを示すものである。SD 法による 3 回の実験から効価比の理論値に対する誤差は 3~12% で、効価比の平均値は 1.03 となり、信頼性の高い値であることが分る。

本実験に際し終始御協力頂いた研究生伊藤顯氏及び部員芹沢淳氏に対し御礼申上げる。

文 献

- 1) Dale, H.H., P.P. Laidlaw : J. Pharmacol. Exp. Therap., 4, 75 (1912)
- 2) Hogben, L.H., W. Schlapp, A.D. Macdonald : Quart. J. Exp. physiol., 14, 301 (1924)
- 3) 英局 VIII, 825 (1953)
- 4) Hamilton H.C. : J. Am. Pharm. Assoc., 1, 1119 (1912)
- 5) Hamilton, H.C. L.W. Rowe : J. Lab. Clin. Med., 2, 120 (1916)
- 6) Kamm, O. F.B. Aldrich, I.W. Grote, L. W. Rowe, E.F. Bugbee : J. Am. Chem. Soc., 50, 1573 (1928)
- 7) 米局 XIV, 658
- 8) 熊谷洋, 油井亨, 小川喜一, 大賀皓 : 生体の化学, 5, 132 (1953)
- 9) Burn, J.H. D.J. Finney, L.G. Goodwin : "Biological Standardization" (2nd Ed.) p. 51, 57, 62, 69. Oxford Univ. Press (1950)

Summary

For the blood pressure raising method in the vasopressin assay spinal dogs were prepared by the author in order to steepen the slope in the dose-response regression line. The linearity between log doses (from 0.025 mg to 0.4 mg of Japanese Pharmacopoeia Standard of Posterior Pituitary) and their responses, in anesthetized or spinal dogs was found. The regression coefficient obtained by anesthetized cats spinal cats, anesthetized dogs and spinal dogs were 5.58, 7.65, 2.75 and 4.60, respectively. The regression coefficient obtained by spinal dog method was approximately 1.7 times larger than that by anesthetized dog method.

Two and two dose assay with the ratio 2:1 of high and low dose was run by the author. As the result, 1.03 of average relative potency within 80-125% of fiducial limits of error ($P=0.95$) from the three experiments was obtained, against actual value was 1.00, by spinal dog method, all of the assays using anesthetized dog, however, laid off the above range.

Received February 29, 1956.

バソプレシンの新定量法 II. 脳髄破壊ラットによる
バソプレシンの定量法及びその他の定量法との比較*

中山 豪一

Bioassay of Vasopressin Using Spinal Rat and
Its Comparison with the Other Methods

Goichi NAKAYAMA

まえがき 前報¹⁾では脳髄破壊犬 Spinal Dog (以下 SD と略す) の作製法を述べ、その用量-反応線を求め、麻醉猫 Anesthetized Cat (以下 AC と略す)、脳髄破壊猫 Spinal Cat (以下 SC と略す) 及び麻醉犬 Anesthetized Dog (以下 AD と略す) のそれと比較した。即ち、AC 及び SC 法ではその回帰線の傾斜 (以下 *b* と略す) は大きい、注射と注射との間の所謂 „待ち時間” が長く、通例 30~60 分を要するので、定性的な検定法としては優れているが、統計学を用いる定量的な検定には不適當である。しかるに著者の作製した SD ではその *b* が AD のそれに比し約 1.7 倍となるので、SD 法は米局 XIV²⁾ 記載の AD 法より一層精度のよいバソプレシンの定量法であることを報告した。

最近欧米では感度のよいことと経済的に安価であることから、ラットの血圧反応により昇圧物質の検定^{3,4,5,6,7,8,9,11)}が行われ、米局 XV¹⁰⁾でもバソプレシンの定量に麻醉ラット(以下 AR と略す)の血圧上昇法を採用した。

ところで麻醉しただけではラットの血圧の基線 (basal line) は変動するので、定量を行うにはまことに工合が悪い。そこで各研究者達はこの変動を防止するため、種々の手段を講じている。Table 1 に現在までに発表された主な方法を示す。Table 1 から血圧の変動を防止するには (1) 脊髄を破壊する方法と (2) 交感神経遮断剤の注射による方法がある。

Table 1. Bioassay for pressor substances using rats

Names of the authors	Body weight (g)	Anesthetics	Method for stabilizing basal line of blood pressure
F. W. Landgrebe, M. H. Maccauley, H. Waring ³⁾	>380	Dial liquid, 0.3 cc/kg, intraperitoneal injection	Cutting off vagal and sympathetic nerves followed by destroying posterior cord
R. E. Shipley, J. H. Tilden ⁴⁾	150~300	Sodium amytal, 0.09 mg/g, intraperitoneal injection	Injecting 1.2 mg of atropin sulfate, followed by destroying spinal cord through the eye socket
J. Dekanski ^{5,6,7)}	Ca 300	Urethane, 175 mg/100 g, subcutaneous injection	Six 100r injection of Dibenzamine per 100 g of body weight with 5 minutes interval
W. S. Peart ⁸⁾	250~300	Urethane, 100 mg / kg, intraperitoneal injection	Injecting 5 mg of pentapyrrolidinium tartrate per kg of body weight
A. U. Pardoe, M. Weatherall ⁹⁾	300	Dial liquid, 0.2~0.35 cc/kg, intraperitoneal injection	Injecting 1.0~5.0 mg of hexamethonium bromide
U. S. P. XV ¹⁰⁾	275~325	Suitable anesthetics	Injecting 10 mg of phenoxybenzamine HCl per kg of body weight through tail vein
K. M. Lindquist, L. W. Rowe ¹¹⁾	340~530, 400±50	Chlorobutanol, 250 mg / kg, intraperitoneal injection	Injecting 5 mg of dibenzylamine per kg of body weight through subcutaneous injection

* この報告は長沢佳熊：脳下垂体後葉ホルモンの検定 (第4報), [第3報は本誌本号125頁] この報告の1部は昭和30年9月 日本薬学会東京例会で講演した。

Kakuma Nagasawa: Studies on the Posterior Pituitary (No.4). Paper read on September, 1955, at the Meeting of the Japan Society of Pharmacy, in Tokyo.

これらの文献や著者の行つた予備実験の結果からラットの血圧変動を防止するには先ず血圧を低下させる必要がある。又定量の目的にはこの血圧の低下状態を長時間一定に保つことが重要である。前報で犬や猫の場合、脳髓を破壊すると血圧が一定となり、しかも b が大きくなることを知つたので、ラットにも脳髓破壊術を適用し、予想したように血圧の基線を一定に保つことができた。

脳髓破壊ラット Spinal Rat (以下 SR と略す) によるバソプレシンの定量例は未だ文献に見られないので、先ずその用量-反応線を検討し、用量 1~8 r 間に直線性を認めたので、2-2 用量検定を行い、満足すべき結果を得たので報告する。

なお比較のため、Dekanski⁷⁾ が報告した Dibenamine 塩酸塩を注射して血圧基線を一定とした麻酔ラットを作製し、これについての用量-反応線を算出し、更に 2-2 用量検定をも行つた。

著者の作製した SR では第2頸椎以下の脊髄は生きていたので、Shipley 等及び Landgrebe 等の動物 (pithed rat) とはちがう。これら研究者達の方法を著者も数回に亘つて追試したが、脊髄破壊操作により出血が起つても知り得ないこと及び初期血圧が低過ぎる傾向がある上に、脊髄破壊のため椎腔に針金を挿入する際往々動物が死亡するので推奨し難い。これに反し著者の作製した SR はこのような危険性は全くなく、脳髓破壊時に死亡した例は100例中1例もなかつた。

実験方法

(1) 脳髓破壊ラット (SR) の作製法:

体重 225-412g の健康な雄ラットに溶性フェノバルビタール 0.15g/kg を腹腔内注射するか、0.2g/kg を皮下注射して麻酔し^{*}、前報に記載した SD の作製法に従つて SR を作製した。次に作製上注意を要する点を挙げる。

ラットは小動物であるため、頸動脈や股静脈は細く且つ脆弱であるから、それらの分離に当つては細心の注意を要する。わずかな出血でもラットにとつては大出血である。

第2頸椎の棘状突起の切断は犬、猫に比し簡単で、通例 1~2 回骨鉗子を使用するだけで、椎体に適当な穴を開けることができる。脊髄を切断し、脳髓を破壊した後は、椎体の切断口にゼラチン・スポンジを挿入し、次いで脱脂綿を詰め、ブルドック鉗子で皮膚を閉じるだけで充分である。著者は右側頸動脈を使用しているが左右何れでもよい。

SR の実験で最も注意を要するのは人工呼吸である。著者は毎分 55-64 回転で行つているが、肺臓内に入る空気の量はラットの胸部の動き具合と、カニューレ内の動脈血の色調**で加減する。誤つて大量の空気を入れるとラットの肺機能が障害を受け、よい実験ができなくなる。又気管カニューレ挿入時に注意しないと気管を傷つけ、粘液や血液が出て人工呼吸を不良とする。次に著者が自製して使用している用具を述べる。

a. 動脈カニューレ 外径 3.0-3.5 mm、長さ 50 mm のガラス管の一端を引延ばし、ゴム止めを作る。ゴム止めの部分の外径を約 1.0 mm として使用した。

b. 気管カニューレ 外径 7 mm、長さ 50 mm のガラス管の一端を引延ばし、ゴム止めを作る。ゴム止めの部分の外径を約 3 mm とし、このガラス管のできるだけ尖端側に長さ約 2.4 cm の同径のガラス管を直角に溶接して使用した。この側管を人工呼吸器とゴム管で接続し、ゴム止めの部分を気管内に挿入し結紮する。他端に短いゴム管をつけスクリュココックで肺臓内へ入る空気を加減した。

c. 注射用カニューレ 1/4 ツベルクリン針の注射筒との連結部をヤスリでできるだけ短かく切断し、インシュリン注射液などに使うバイアル瓶のゴム栓をかぶせる。この際注射針内に予め 0.9% 塩化ナトリウム液を充たしておく。SR 作製後、この注射針を股静脈内に挿入する。

d. 血圧マノメータ 内径 3 mm の U 字管内に水銀約 18 g を入れ、その一端からアクリル樹脂で作つた浮きをつけたガラス毛細管を挿入し、水銀面に浮かせ、毛細管の他端に記載ペンを取付ける。U 字管の他端には 0.9% 塩化ナトリウム液を充たしたゴム管を接続し、動脈カニューレと連結する。

(2) 麻酔ラット (Dibenamine 塩酸塩処置) (AR) の作製法: ラットにウレタン (175 mg/kg 体重) を皮下注射するか、溶性フェノバルビタール (0.15 g/kg 体重) を腹腔内注射して麻酔し、常法により頸動脈内にカニューレ

* 腹腔内注射では約 20 分、皮下注射では約 40 分を要す。 ** 人工呼吸が良好なときは鮮紅色を呈し、不良のときは暗赤色を呈する。

レを挿入し、血圧をキモグラフ上に記録した後、股静脈から5分間隔で Dibenamine 塩酸塩 100 r/100 g 体重を6回注射する。注射後約30分位で血圧が一定するから実験を開始する。

(3) 実験条件: 実験はすべて 22-23°C の恒温室で行った。湿度は特に定めなかつたが 55-70% であつた。

血液凝固を防止するため、動脈カニューレを挿入する前にヘパリン 200 単位/100 g 体重を股静脈内に注射した。かくしてカニューレ内に 4-6 時間凝塊を認めない。

検体の注射量は 0.05-0.15 cc とし、注射後生理食塩液 0.2 cc で流し込んだ。

注射間隔は 10-20 分とした。

(4) 検液の調製: 日局脳下垂体後葉標準品 (以下 NNS_t と略す) を検体とし、日局 VI の脳下垂体後葉標準液の製法に準拠して 1 cc 中 1 mg (2 単位) を含む溶液を調製し検液とした。実験に当り 0.9% 塩化ナトリウム液で適当に稀めて使用した。

実験結果

(1) Table 2 に SR の体重、実験前後の血圧及び実験継続時間を示す。Table 2 から SR の血圧は 30-70 mmHg のものが全実験数の約 90% である。この範囲の血圧では感度も良好であるが、これ以下では感度が低下する。一般に実験時間が長引くにつれ、血圧の基線が低下し、感度も低下する傾向がある。この傾向は動物により相当ちがいが、著者の実験で 7 時間 25 分に及んでも殆ど低下を見ない例もあつた。血圧の基線が急激に低下する動物は不適当である。検体を注射した後 0.9% 塩化ナトリウム液で流し込めば、相当程度感度の低下を防止し得るが、血圧の基線の低下を防ぐことはできなかつた。

Table 2. Blood pressure of spinal rats before and after experiment

Test No.	Body weight (g)	Blood pressure (mm Hg)		Time of experiment (min.)	Test no.	Body weight (g)	Blood pressure (mm Hg)		Time of experiment (min.)
		Before experiment	After experiment				Before experiment	After experiment	
1	380	85-87	48-49	97	29	267	59-60	36-37	248
2	311	44-45	44-45	130	30	240	58-59	44	331
3	350	46-47	43-44	94	31	298	49-50	34-37**	353
4*	290	24-25	7	91	32	245	39-40	38-40**	115
5	360	55-57	40-41	116	33	290	56-57	43-44	255
6	340	53-54	43-44	44	34	275	45-46	36-37	207
7	282	55-56	30	56	35	250	40-41	39-41	445
8	291	40-41	36	47	36	282	50-51	37-38	434
9	242	28	35	316	37	225	47-48	32-33	245
10	325	53	51	336	38	280	46-47	37-43**	195
11	402	46	38	179	39	280	44-45	29-30**	131
12	351	29-30	27	359	40	260	35	40**	175
13	318	25	27	84	41	285	40	45-46**	267
14	287	26	24	66	42	300	48-49	40-41	426
15	280	25-26	28	80	43	285	59-60	43-44	420
16	285	36	27	112	44	307	40-42	29	302
17	301	64-65	54	283	45	340	31	37-39	150
18	340	42-44	47-48	244	46	275	40	36-39	112
19	235	37	22	273	47	234	46	30	110
20	315	53-54	40	105	48	280	38-39	27-28	285
21	292	43	42	333	49	258	70-71	57-59	230
22	253	68-69	56-57	244	50	302	46-47	34	180
23	222	58	46-47	274	51	250	44	55	98
24	312	61-62	45	250	52	275	44	39-41	230
25	234	31-32	57-59	309	53	300	33-44	35-36	227
26	320	54-55	57-58	230	54	330	40-41	32-34	266
27	230	24-25	6-8**	99	55	350	34	17	226
28	303	45-46	43-44	215					

* Method destroying spinal cord through eye socket, according to Shipley and Tilden⁴⁾.

** Died during experiment.

(2) SR によるバソプレシンの用量-反応関係: 検体として NNS_t を用いて SR 6 匹について用量-反応関係を求めた。その結果を Table 3 に示す。Fig. 1 にその血圧曲線例を示す。横軸に対数用量を、縦軸に反応をと

り、Table 3 の資料をプロットして Fig. 2 に示す。この図から用量 1~8r 間に直線関係が予想されるので、この部分につき、分散分析¹¹⁾を行つた。その結果を Table 4 に示す。分散分析の結果 F_0 値 (3.22) が F 分布表の F_{15}^2 (3.68) に比し、5% の有意水準で有意な差を認めない。故に用量 1~8r 間の回帰方程式を算出して次式を得た¹¹⁾。

$$Y_{SR} = 33.96 + 7.34x$$

Fig. 3 にこの回帰直線を示す。

Table 3. Dose-response relationship (Spinal rat)

Dose (r)	0.125	0.25	0.5	1.0	2.0	4.0	8.0	Total (Dose 1~8r)
Response (mm Hg)	3	4	8	15	24	40	60	139
	4	5	8	18	31	46	58	153
	2	3	4	10	14	31	53	108
	8	10	17	17	36	56	61	170
	6	6	8	15	21	38	62	136
	3	5	6	10	17	30	52	109
Total	26	33	51	85	143	241	346	815
Number of response	6	6	6	6	6	6	6	24
Mean	4.3	5.5	8.5	14.2	23.8	40.2	57.7	

Table 4. Analysis of variance for the data of Table 3

Nature of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Regression	1	6468.60	
Deviation from regression	2	100.53	50.27
Between doses	3	6569.13	
Within blood pressures	5	741.71	
Error	15	234.12	15.61
Total	23	7544.96	

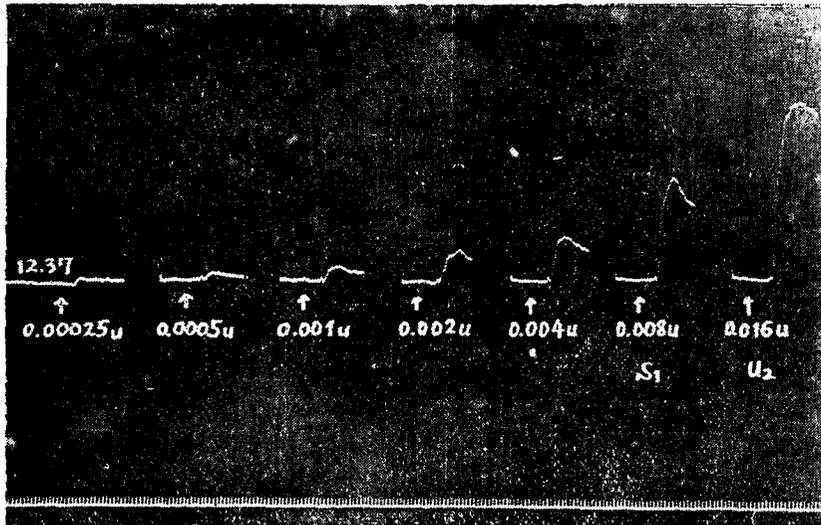


Fig. 1. Dose-response curve
(Spinal rat)

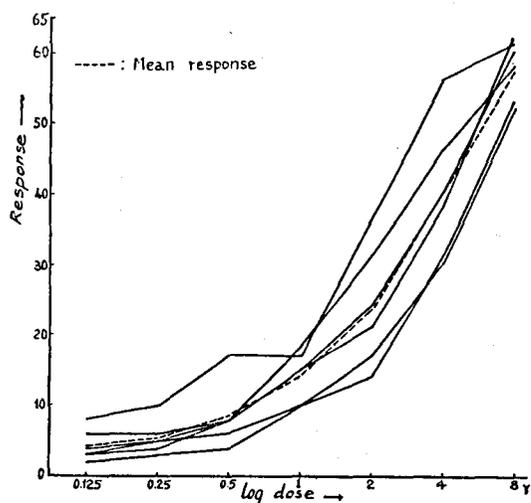


Fig. 2 Dose-response relationship (Spinal rat)

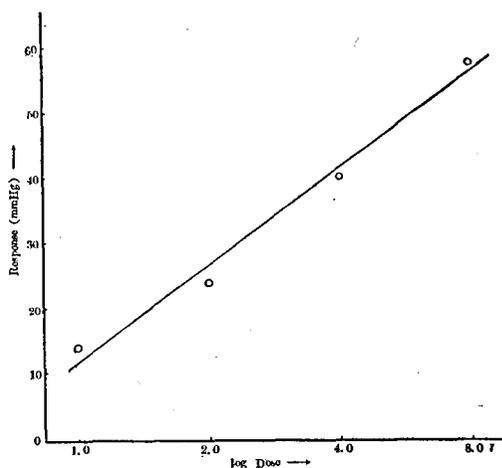


Fig. 3 Regression line (Spinal rat)

(3) AR によるバツプレシンの用量-反応関係: 検体として NNSt を用いて AR 7 匹について用量-反応関係を求めた。その結果を Table 5 に示す。又 Fig. 4 にその血圧曲線例を示す。横軸に対数用量を、縦軸に反応をとり、Table 5 の資料をプロットして Fig. 5 に示す。SR と比較するため用量 1~8r 間につき、分散分析を行った。その結果を Table 6 に示す。分散分析の結果 F_0 値 (2.38) が F 分布表の値 F_{15}^2 (3.55) より小さいので、有意水準 5% で、用量 1~8r 間に直線性が認められる。故にその回帰方程式を算出して次式を得た。

$$Y_{AR} = 25.63 + 5.71x$$

Fig. 6 にこの回帰線を示す。

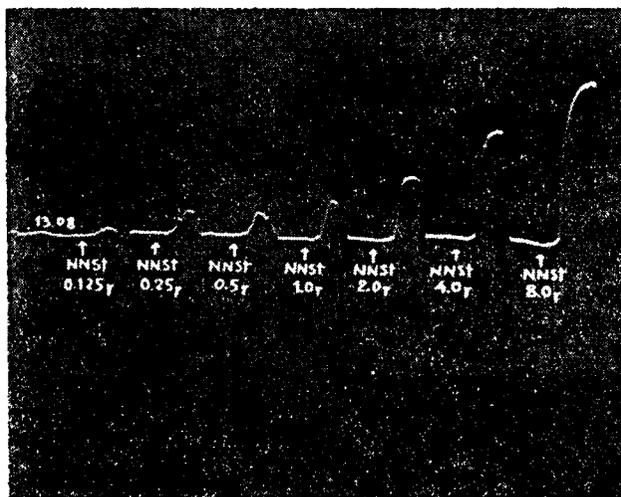


Fig. 4 Dose-response curve (Anesthetized rat)

Table 5. Dose-response relationship (Anesthetized rat)

Dose (r)	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	Total (Dose 1~8r)
	4	6	10	15	27	38	60	78	140
	0	3	5	6	10	20	37	59	73
Response	4	10	10	18	30	50	76	—	174
(mm Hg)	3	7	7	12	19	32	52	—	115
	2	3	4	6	18	16	31	53	71
	4	5	7	11	13	23	30	45	77
	1	3	4	6	11	19	31	44	67
Total	18	37	47	74	128	198	317	279	717
Number of response	7	7	7	7	7	7	7	5	28
Mean	2.6	5.3	6.7	10.6	18.3	28.3	45.3	55.8	

Table 6. Analysis of variance for the data of Table

Nature of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Regression	1	4556.6	92.35
Deviation from regressions	2	184.7	
Between doses	3	4741.3	
Within blood pressure	6	2612.0	38.74
Error	18	697.4	
Total	27	8050.7	

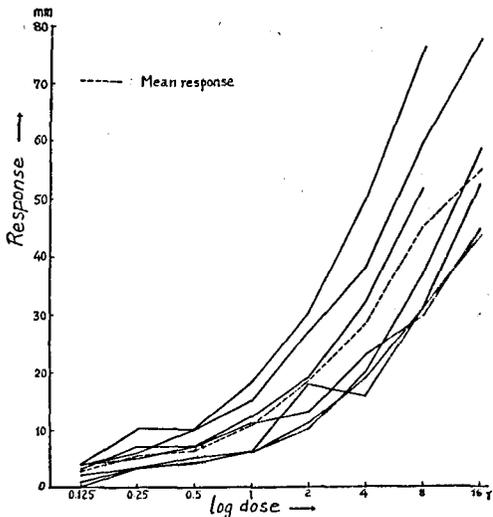


Fig. 5 Dose-response relationship (Anesthetized rat)

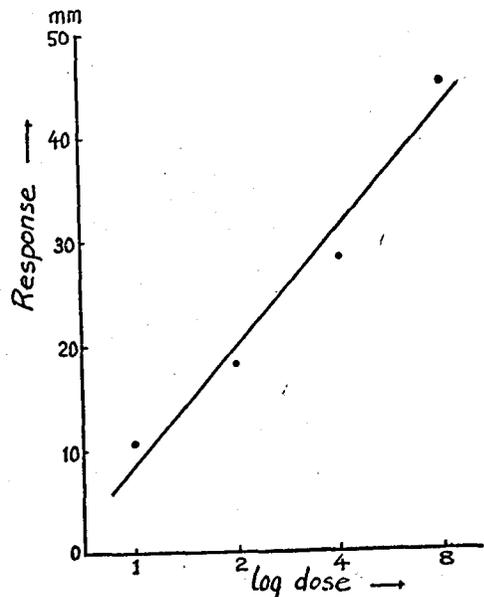


Fig. 6 Regression line (Anesthetized rat)

(4) SR による 2-2 用量検定: 著者は標準品及び検体としていずれも NNSt を用い, 米局 XV のバツプレシ注射液の検定法に準拠し, 次に示すような組合せを作り, 各組合せ内の順序を変えないで, 各組合せを無作為に注射した。

- 第1組: S_2, T_1 第2組: S_1, T_2
 第3組: T_2, S_1 第4組: T_1, S_2

ただし S_1, S_2 はそれぞれ標準品の低用量及び高用量を示し, T_1, T_2 はそれぞれ S_1, S_2 とほぼ等しい血圧上昇を起す検体の低用量及び高用量を示す。又用量比 (= 高用量/低用量) は等しくした (通例 2:1)。この一例を Fig. 7 に示す。

Fig. 7 の血圧曲線からの資料を Table 7 にまとめて示す。この資料につき分散分析を行い Table 8 に示す。この結果 F_0 値 (2.03) は F 分布表から得た F_0^* 値 (5.12) に比べて, 5% 有意水準で, 有意な差を認めない。故に標準品と検体で得た 2 直線の平行性に有意な差を認めないので, 効価比, 回帰方程式及び誤差の信頼限界を算出した。次に計算法を示す。



Fig. 7. two and two dose assay (Spinal rat)

Table 7. Two and two dose assay using spinal rat

Dose (r)	S		T		Total
	2.0	4.0	2.0	4.0	
Response (mm Hg)	26	51	34	53	164
	25	52	26	43	146
	26	46	27	49	148
	32	52	32	50	166
Total	109	201	119	195	624
No. of response	4	4	4	4	16
Mean	27.3	50.3	29.8	48.8	

Table 8. Analysis of variance for the data of Table 7

Nature of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Preparations	1	1	16
Regression	1	1764	
Parallelism	1	16	
Between doses	3	1781	7.89
Within blood pressures	3	82	
Error	9	71	
Total	15	1934	

計算—

標準品 (S₂, S₁)

x	y	n	nx	ny	nx ₂	nxy
+1	50.25	4	4	201	4	201
-1	27.25	4	-4	109	4	-109
		8	0	310	8	92
					0	0
					8	92

$\bar{x}_S = 0, \bar{y}_S = 38.75$

検体 (T₂, T₁)

+1	48.75	4	4	195	4	195
-1	29.75	4	-4	119	4	-119
		8	0	314	8	76
					0	0
					8	76

Sxx	Sxy
8	92
8	76
<u>16</u>	<u>168</u>

$\bar{x}_T = 0, \bar{y}_T = 39.25$

$b = Sxy / Sxx = 10.5$, Table 8 の分散分析でSとTで得た2直線間に平行性が認められるので、両直線の回帰方程式は次の通りである。

$Y_S = 38.75 + 10.5x, Y_T = 39.25 + 10.5x$

対数効価比 $M = \bar{x}_S - \bar{x}_T - \frac{y_S - \bar{y}_T}{b} = \bar{x}_S - \bar{x}_T + 0.0476$

M 値を常用対数に直せば, $M' = 0.0476 \times 0.1505 = 0.0072$

故に効価比 $R = \text{Antilog } M' = 1.02$

〔誤差の計算〕

$g = s^2 t^2 / b^2 Sxx = 0.023$

M の信頼限界 $= \bar{x}_S - \bar{x}_T + \frac{M - \bar{x}_S + \bar{x}_T}{1-g} \pm \frac{s_T}{b(1-g)} \sqrt{(1-g) \left(\frac{1}{N_S} + \frac{1}{N_T} \right) + \frac{(M - \bar{x}_S + \bar{x}_T)^2}{Sxx}}$
 $= -0.2563 \sim 0.3537$

M' の信頼限界 $= \bar{T}.9615 \sim 0.0532$

R の信頼限界 $= 0.9152 \sim 1.131$ 即ち 90.1~111.3% (P=0.95)

このような実験を繰返し, Table 9 に示すような値を得た。Table 9 の実験では効価比の理論値はいずれも1であるので、信頼限界80~125% (P=0.95) 内の検定で得た対価比の誤差は0~8%となる。本実験から信頼限界80~125%内で検定を行うには6~8 Pairsの注射が望ましい。

Table 9. Summarized results of 2 and 2 dose assay using spinal rat (Dose ratio=2:1)

Test No.	Potency ratio **	Fiducial limits of error (P=0.95) (%)	Slope (b)	Error of potency ratio found to actual one (%)	Number of pairs
1	0.97	86.6-115.1	12.5	2.7	4
2	0.98	88.9-112.8	10.0	2.5	6
3	1.02	80.4-125.1	8.3	2.1	4
4	0.92	87.0-114.1	11.5	7.6	8
5*	1.13	83.7-125.8	4.1	12.6	8
6	1.17	80.9-127.6	7.3	16.5	6
7	1.03	84.5-118.7	5.6	2.5	8
8	1.00	88.1-113.5	14.1	0.4	6
9	1.02	90.1-111.3	10.5	1.6	8
10	1.04	87.8-114.2	8.9	4.0	10
11	1.00	75.3-132.9	8.0	0.0	4

* Dose ratio = 3:1 ** Actual value =1.00

(5) AR による 2-2 用量検定: SR 法と同様に行つた。得た結果をまとめて Table 10 に示す。

Table 10. Summarized results of 2 and 2 dose assay using anesthetized rat (Dose ratio = 2:1)

Test no.	Potency ratio	Fiducial limits of error (P=0.95)(%)	Slope (b)	Error of potency ratio found to actual one (%)	No. of pairs
1	1.02	83.5-119.6	8.4	1.6	8
2	1.11	79.2-129.3	5.3	11.1	6
3	0.74	74.5-124.9	6.8	26.5	8
4	The rattied aftar fourinjctions.				

(6) SR 法と AR, AC, SC, AD 及び SD 法との比較: 前報の AC, SC, AD 及び SD による実験で得た回帰線は 5 用量から得たものである。SR 法で得た回帰線と比較するため、上記 4 法の最初の用量、すなわち猫では 0.0125 mg, 犬では 0.025 mg で得た反応を除いた残りの 4 用量で回帰方程式を算出した。Table 11 にこれら 5 法で得た資料をまとめて示す。なお Table 11 の回帰方程式からの作図を Fig. 8 に示す。これらの実験結果から (1) 麻酔動物より脳髄破壊動物の血圧基線が著しく一定となる。(2) 脳髄を破壊すると麻酔時に比し、回帰線の傾斜が増大する。すなわち犬では約 1.7 倍、猫では約 1.5 倍、白鼠では約 1.3 倍となることが分る。

Table 11. Summarized Dose-response relation of test animals

Animal	Range of doses (r)	Regression equation	Slope (b)	Slope ratio
Anesthetized dog	50-400	$Y_{AD}=8.4+1.6x$	1.6	1.0
Spinal dog	50-400	$Y_{SD}=16.7+2.7x$	2.7	1.7
Anesthetized cat	25-200	$Y_{AC}=16.9+3.2x$	3.2	2.0
Spinal cat	25-200	$Y_{SC}=21.1+4.6x$	4.6	2.9
Anesthetized rat (Dibenamine)	1-8	$Y_{AR}=25.6+5.7x$	5.7	3.3
Spinal rat	1-8	$Y_{SR}=34.0+7.3x$	7.3	4.7

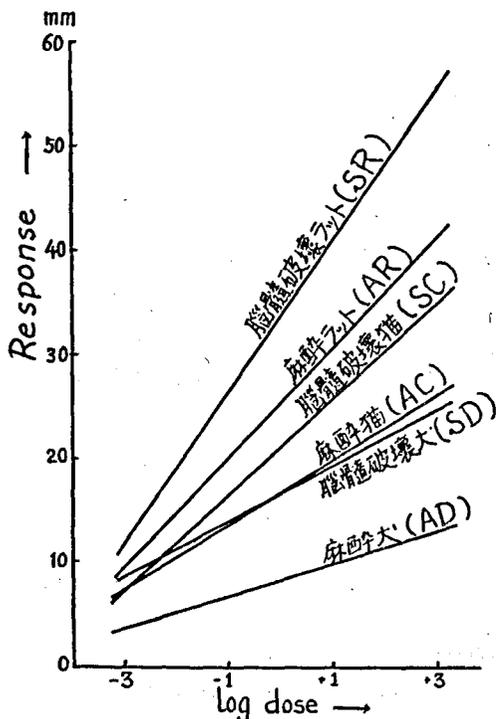


Fig. 8. Comparison of regression lines obtained by SR, AR, SC, AC, SD and AD

(3) 猫法, 特に SC 法では AD 法に比し、回帰線の傾斜は大きく、AC では 2 倍、SC では 2.9 倍であり、用量も 1/2 でよいが、注射間隔が長く、多数回の注射ができない。従つて得た結果を統計学的に処理し難いので、定性的なバソプレシン検定法として使用し得るに過ぎない。

(4) SD 法では AD 法に比し回帰線の傾斜は約 1.7 倍であり、注射間隔も 15-20 分であるので、長時間のバソプレシン定量法として AD 法に優れている。

(5) 本実験で得た資料から SR 法で得られる回帰線の傾斜は他の検定動物のそれに比し大きく、AD の 4.7 倍、SC の約 1.6 倍、AR の約 1.3 倍であり、注射用量も犬や猫のそれぞれ 1/50, 1/25 に過ぎない、米局 XV では麻酔ラット 2 匹以上で 8 組以上の観察を要求している。著者の行つた AR についての実験でも Dibenamine の適量を決定することが困難で、過量を注射することが多く、そのため動物が実験中に死亡することが多く、著者の行つた 4 回の 2-2 用量検定でも 1 回は動物が死亡してよい結果を得られなかつた。しかるに著者の脳髄破壊ラット法は 1 匹で 8 組 (=16回) 以上の注射を行えるので、経済的で、実験操作も簡単であることと相俟つて、現在知られている方法の内最も微量なしかも精度の高いバソプレシン定量法である。

本研究に際し貴重な御助言を頂いた京都大学教授・国立衛生試験所所長 刈米達夫博士並びに京都大学教授 荻生規矩夫博士に衷心から感謝し、本研究に終始熱心に協力された芹沢淳部員及びしばしば絶大な助力を与えられた西崎笹夫、岡崎精一、城戸靖雅三部員に感謝する。

なお、Dibenamine HCl を提供された東京化成工業株式会社、吉富製薬株式会社、三生製薬株式会社、米国 Research Laboratories, Smith, Klin and French Labs. に感謝する。

む す び

著者は精度の高いバソプレシンの定量法を確立するため、脳髄破壊ラット(SR)を作製し、日局脳下垂体後葉標準品(NNNSt)を用いてその用量-反応関係を検討し、更に2-2用量検定を行い次の結果を得た。(1) 用量1~8r間に直線性が認められた。(2) 脳髄破壊ラットで得た回帰線の傾斜, b, は犬, 猫で得たbに比較して著しく大きく、麻酔犬の約4.7倍、脳髄破壊猫の約1.6倍、麻酔ラット(Dibenamine処置)の約1.3倍であった。(3) 注射用量は犬, 猫のそれぞれ1/50, 1/25でよかつた。(4) 誤差の信頼限界80~125% [P=0.95]内の検定で得た効価比の、理論値に対する誤差は0~8%であった。

以上の実験結果から著者の行つた脳髄破壊ラット法は経済的で入手し易いことと相俟つて、現在知られている方法の内最も微量でしかも精度の高いバソプレシン定量法といえる。

文 献

- 1) 中山豪一：本誌，129頁(昭和31)
- 2) 米局XIV, 658
- 3) Landgrebe, F. W. M. H. Maccauley, H. Waring : Proc. roy. soc. Edinb., B62, 202 (1946)
- 4) Shipley, R. E. J. H. Tilden : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 64, 453 (1947)
- 5) Dekanski J. : Brit. J. Pharmacol., 6, 351 (1951)
- 6) Dekanski J. : ibid., 7, 567 (1952)
- 7) Dekanski J. : ibid., 9, 187 (1954)
- 8) Peart W. S. : Biochem. J., 59, 300 (1955)
- 9) Pardoe, A. U. M. Weatherall : J. Physiol., 127, 201 (1955)
- 10) 米局XV, 776 (1955)
- 11) Lindquist, K. M. L. W. Rowe : Drug Standards, 23, 153 (1955)
- 12) Burn, J. H. D. J. Finney, L. G. Goodwin : "Biological Standardization" (2nd Ed.) Oxford Univ. Press (1950) pp. 51, 57, 62, 69

Summary

The dose-response relation and 2 and 2 dose assay using Japanese Pharmacopoeia Standard of Posterior Pituitary (NNSt) was examined by the spinal rats. As the result, the following was found.

- (1) There was no reason to doubt the hypothesis of linearity between log dose (1 to 8r of NNSt) and their response (See Table 3 and 4).
- (2) The slope of regression line obtained by the experiment of spinal rats is the highest when compared with those of spinal cats and dogs etc. (See Table 11 and Fig. 8).
- (3) The dose necessary for each assay is only 1/50 times by spinal dogs or 1/25 times by spinal cats.
- (4) The error of experimental value to actual one was 0 to 8% within 80-125% of fiducial limits of error (P=0.95) from seven experiments (See Table 9).

Therefore, the author's spinal rat method is highly accurate micro-assay for vasopressin.

Received February 29, 1956

脳下垂体後葉ホルモンの研究 (第5報)*

各種動物の脳下垂体中のオキシトシン及びバソプレシン含量について

長沢 佳熊, 中山 豪一, 芹沢 淳

Studies on Posterior Pituitary Hormones. V.

Vasopressin and Oxytocin Contents in the Posterior Pituitary of Various Animals

Kakuma NAGASAWA, Goichi NAKAYAMA and Jun SERIZAWA

牛, 豚の脳下垂体後葉(以下「脳後」と略す)成分, すなわちオキシトシン(子宮収縮成分; 以下 Oxyt と略す)及びバソプレシン(血圧上昇・抗利尿成分; 以下 Vas と略す)は同一割合で含まれていると多くの研究者は云つている(すなわち $Oxyt/Vas = 1$ と考えておこう). Geiling¹⁾ はマッコウ鯨及びナガス鯨の「脳後」中の Oxyt/Vas 比を測定し, それぞれ 0.08 及び 0.4 であると報告し, 又 Coon²⁾ はマッコウ鯨, ナガス鯨及びシロナガス鯨の「脳後」中の Oxyt/Vas 比をそれぞれ 0.1, 0.4 及び 1 であると報告している. その際マッコウ鯨の「脳後」中の Oxyt 値は麻酔ニワトリ(以下 AF と略す)法^{3,4,5,6)}によるとき, モルモット摘出子宮(以下 GU と略す)法^{7,8,9,10,11)}で得た値より大きいことを知り, その原因としてそれらの Oxyt/Vas 比が牛, 豚の Oxyt/Vas 比に比べて小さいためであるとし, これを Kamm, Aldrich 法¹¹⁾で分離した Oxyt 及び Vas を人工的に種々の割合に混合して実験的に確め, Oxyt/Vas 比が 0.4 より大きいとき AF, GU 両法で得られる値が一致するが, 小さいときは AF 法で得た値が GU 法で得た値より大きくなると結論している.

以上の見地から他種動物の脳下垂体中の Oxyt/Vas 比を知ることは興味あることと考えられる. しかし他種動物の「脳後」ホルモンに関する文献は少なく, 鯨脳下垂体中の成分に関するものが前記の外 2, 3 あるに過ぎない^{12,13,14,15)}.

鳥類の脳下垂体については Herring¹⁶⁾ が始めて猫の血圧上昇作用を認め, 次に Hogben¹⁷⁾ はカモ脳下垂体のカモ血圧下降作用を報告した. 1938~9 年に至り Werle, Hoff¹⁸⁾ はニワトリ脳下垂体(以下 FH と略す)のアセトン乾燥粉末から Kamm, Aldrich 法¹¹⁾により Oxyt, Vas 部を分離し**, 牛脳下垂体製剤 Orasthin*** 及び Tonephin**** とその力価を比較し Oxyt 部の力価が AF 法によるとき, GU 法の約 10 倍の値を示すことを知り, これは FH 中に Oxyt 以外のニワトリ血圧下降成分が存在するためであろうといつている. なお彼等は Vas 部もニワトリ血圧下降を示すと報告している.

硬骨魚類の脳下垂体については著者の 1 人(長沢)は昭和 18 年, 平野四郎博士¹⁹⁾の暗視ホルモン(脳下垂体中のメラノホーレンホルモン?)の研究に際し, カツオ脳下垂体(以下 KH と略す)の採集に助力し, これが研究原料として用いられることを確めた. 昭和 19 年小山良修博士及び畑中敏三氏の協力によりカツオ脳下垂体の組織学的検索を試み, 切片を造つたが震災により資料を失い, 昭和 22 年²⁰⁾, 当所池田良雄博士の助力により再び切片についての検索を行い, 一方その抽出液にモルモットの子宮収縮作用を認めたが, 1 個当りのホルモン含量の小さいこと及び脳下垂体採集に手間がかかることから実用化の見込みは当分望めないと結論した. そのころ森田簡氏²¹⁾も同様の実験からカツオの「脳後」からのホルモン製造の企画を断念した. その後, 伊藤, 行方²²⁾は KH から Kamm, Aldrich 法により Oxyt 及び Vas 部を分け, Oxyt の力価について GU 法で検定し, 平均 0.53 単位/mg, 1.59 単位/1 個との値を得た. 又 AF 法, 家兎血圧上昇法及び脳髓破壊猫血圧上昇法により Oxyt 及び Vas 含量を定性的に検定し哺乳動物と同じらしいと述べ, 更に KH 抽出液をアルカリ処理すると子宮収縮作用が全く破壊されることから, KH 中の GU 収縮成分はヒスタミンでないことを述べた. 末広²³⁾の KH の組織切片図は公刊された最初のものである. 又大森²⁴⁾は KH の抗利尿作用を認めている. 次に Lanzing²⁵⁾はヤツメウナギ *Lampetra fluviatilis* の脳から脳下垂体部の抽出液を調製し, GU 法で Oxyt の存在を証明している.

* 第4報は長沢佳熊:脳下垂体ホルモンの検定(第4報),本誌本号114頁,表題をこの報告から改めた.

** 原料が少ないため彼等は沈澱として得ることができず,エキスについて実験している.

*** Höchst 社製オキシトシン注射液 **** Höchst 社製バソプレシン注射液

著者等はニワトリ、カツラ、メバチの脳下垂体(以下 MH と略す)及びイロシ鯨の「脳後」(以下 WH と略す)を入手したので、標準品として「脳後」国際標準品(以下 Ist と略す)を使用し、対照として牛脳下垂体全腺(以下 OH と略す)及び「脳後」日局標準品(以下 NNST と略す)を用いて、それぞれの Oxyt, Vas 値を定量し、更に Oxyt/Vas 比を求め、新知見を得たので報告する。

実験方法

(1) 実験材料： 実験に用いた脳下垂体に関する資料を Table 1 に示す。

Table 1.

Animal	Date of collection	Place of collection	Number of pituitary	Total weight of acetone dry powder (mg)	Weight of acetone dried powder per pituitary (mg)
Chicken*	May 13~31, 1955	Tokyo	181	329	1.8
Bonito (Katsuwonus vagans)*	June 1, 1955	Shimizu harbor	50	61	1.2
Tuna fish (Parathunnus sibi)*	June 13, 1954	Southern Pacific Ocean	1	13	13.0
Ox*	June 2, 1955	Tokyo	5	1890	378.0
Sei Whale (Balaenoptera borealis)**	—	Hokkaido	1	200	200.0
NNST (J. P. posterior pituitary standard)**	December 7~9, 1954	Tokyo	50	2500	50.0

* Whole pituitary

** Posterior pituitary only.

(2) 標準液及び検液： 標準液は Ist を用い、日局 VI「脳後」標準液の製法に準拠して調製した。検液も同様にして調製した。Table 2 に標準液及び検液各 1 cc 中の mg 数を示す。

Table 2. Content of pituitary powder per cc

Material	Weight of acetone dry powder per cc. (mg)	Material	Weight of acetone dry powder per cc. (mg)
Chicken (FH)	5	Sei Whale (WH)	4
Bonito (KH)	2	J. P. posterior pituitary standard (NNST)	1 (2 units)
Tuna fish (MH)	2	International standard of posterior pituitary (Ist)	1 (2 units)
Ox (OH)	5		

(3) 検定法： Oxyt 部の検定にはラット摘出子宮(以下 RU と略する)法^{26, 27, 28)}及び AF 法を、又 Vas 部の検定には脳髄破壊ラット(以下 SR と略する)法を用い、2-2 用量検定を行った。それには、米局 XV²⁹⁾に記載するバソプレシン注射液の定量法に準拠し、標準品と検体の各 2 用量ずつで次のような組合せを作り、各組合せの注射順を無作為化した。ただし各組合せ内の注射順は一定とした。

Pair 1: S₂, T₁ Pair 2: S₁, T₂

Pair 3: T₂, S₁ Pair 4: T₁, S₂

ただし S₂, S₁ はそれぞれ標準品の高用量及び低用量を示し、T₂, T₁ はそれぞれ S₂, S₁ とほぼ等しい反応を起す検体の高用量及び低用量を示す。又用量比 (S₂/S₁, T₂/T₁) は一定とした。

実験結果

A. オキシトシン含量

(1) RU 法 Table 3 に実験条件、力価、信頼限界等を示す。Table 3 の結果から、対照として用いた NNST は

2.07 単位/mg であり, 全腺を用いた OH は 0.23 単位/mg であるので, OH の力価は後葉 (NNSt) のみの力価
Table 3. Potency obtained by isolated rat uterus method (RU method)

Material*	Body weight (g)	Uterus bath temperature (°C)	Acting time (Sec.)	Dose interval (min.)	Dose ratio	No. of pairs	Slope (b)	Unit per mg	Unit/OH**	Fiducial limits of error [P=0.95] (%)
FH	170	32.5	45	3	1.5	12	6.21	0.05	0.2	97.0-100.3
KH	100	32.5	45	4	1.2	12	8.88	1.04	4.5	94.9-105.9
MH	80	31.2	45	4	1.5	14	5.46	0.88	3.8	86.2-113.0
OH	100	32.5	45	4	1.3	16	2.58	0.23	1.0	90.3-110.0
WH	135	32.0	50	3	1.3	12	2.11	0.12	0.5	83.6-118.1
WH	80	31.2	45	4	1.5	14	5.18	0.13	0.6	91.2-110.2
NNSt	100	31.0	45	4	1.5	12	5.57	2.07	9.0	84.0-116.9

* refer to Table 2.

** the ratio of unit per mg of FH, KH, MH, WH and NNSt to that of OH.

の約1/9である。OH 及び NNSt の採集条件は同じであるから, OH 中の後葉部分の Oxyt 含量は2 単位/mg と考え得る。従つて OH 中の後葉部分とその他の部分 (前葉, 中葉) との割合 (重量) は1:9 となる*。

次に FH の Oxyt 含量は予想外に少なく 0.05 単位/mg で, ISt の 1/40, OH の 1/4 に過ぎない。しかるに KH, MH の Oxyt 含量はそれぞれ 1.04 単位/mg, 0.88 単位/mg で, OH のそれぞれ 4.5, 3.8 倍も大きい。

WH の Oxyt 含量の少ないのは原料の鮮度が悪いと考えられる。本実験では単に Oxyt/Vas 比を知る目的のみで検定した。Fig. 1 に RU 法のキモグラフ図の 1 例を示す。

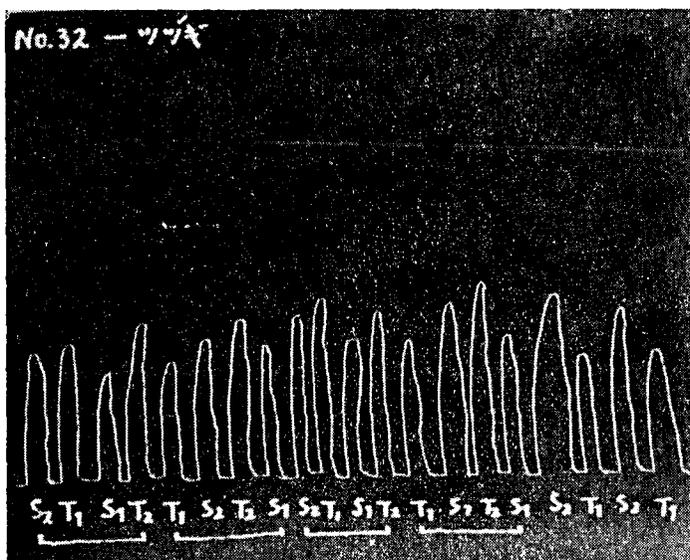


Fig. 1. Oxytocin assay (Rat uterus method)

(2) AF 法 Table 4 に実験条件, 力価, 信頼限界等を示す。この結果から NNSt, OH の Oxyt 含量はそれぞれ 2.03 単位/mg 及び 0.22 単位/mg である。この値は RU 法で得た値にほぼ等しい。しかるに FH, KH, MH 及び WH の Oxyt 含量は RU 法で得た値に比べてそれぞれ 2.2, 2.3, 1.4 及び 1.8 倍となつている。又 AF 法で得た値から OH 中の後葉部分と前, 中葉部分との割合を求めると 1:9.2 となる。Fig. 2 に AF 法のキモグラフ図の 1 例を示す。vas 含量が多いと二次上昇が強く表われる。

* C. Bomskov : Methodik der Hormonforschung II, 551 (1939) によると牛脳下垂体の後葉と前葉の割合はそれぞれ 0.4 : 2.4 である。又著者の得た割合は (100 頭分の平均値) 32 : 210 である。

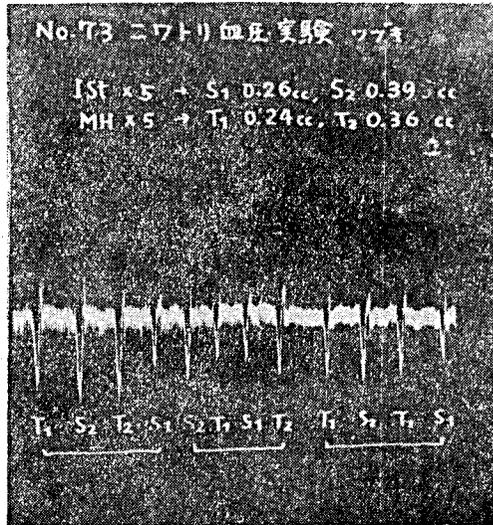


Fig. 2. Oxytocin assay
(Anesthetized chicken)

Table 4. Potency obtained by anesthetized chicken method (AF method)

* Material	Body weight (kg)	Dose interval (min.)	Dose ratio	No. of pairs	Slope (b)	Unit per mg	** Unit ratio	Fiducial limits of error [P=0.95] (%)
FH	{ 2.42 2.52	8 4	1.5	22	5.18	0.11	0.5	92.9-108.6
KH	2.28	10	1.5	8	4.25	2.36	10.7	87.2-119.9
MH	{ 2.42 2.52	6	1.5	14	4.07	1.19	5.4	90.9-111.4
OH	{ 1.92 2.48	10	1.5	8	5.19	0.20	1.0	86.4-115.9
OH	{ 1.75 2.10	10	1.5	18	3.79	0.24		Mean 0.22
WH	2.10	10	1.5	8	6.50	0.22	1.0	86.5-114.5
WH	{ 2.10 2.48	10 5	1.5	12	6.46	0.23		Mean 0.23
NNSt	2.20	4	1.5	16	7.19	2.03	9.2	93.2-107.2

* refer to Table 2. ** the ratio of unit per mg of FH, KH, MH, WH and NNSt to that of OH.

B. バツプレシソ含量

(1) SR 法 Table 5 に実験条件, 力価, 信頼限界等を示す. Table 5 によると NNSt と OH の Vas 含量は

Table 5. Potency obtained by spinal rat method (SR method)

* Material	Body weight (g)	Dose interval (min.)	Dose ratio	No. of pairs	Slope (b)	Unit per mg	** Unit ratio	Fiducial limits of error [P=0.95] (%)
FH	{ 275 250	20	1.5	10	7.00	0.04	0.3	89.4-113.3
KH	298	20	2.0	6	10.34	1.50	12.5	83.6-116.4
MH	{ 285 307	30	1.5	10	6.70	0.45	3.8	89.6-110.1
OH	{ 245 290	15	1.5	8	3.63	0.12	1.0	89.2-111.6
WH	{ 285 260 300	35	1.3	12	4.48	0.51	4.5	85.1-120.0
NNSt	{ 340 275 234 280	22	1.4	16	3.78	2.05	17.1	86.1-116.4

* refer to Table 2.

** the ratio of unit per mg of FH, KH, MH, WH and NNSt to that of OH.

それぞれ 2.05 単位/mg 及び 0.12 単位/mg であるが, KH 及び MH のそれは OH に比較してそれぞれ 12.5 及び 3.8 倍となっている. SR 法で得た値から OH 中の後葉部分とその他の部分との割合は 1:17.1 となる. Fig 3 に SR 法のキモグラフ図の 1 例を示す.

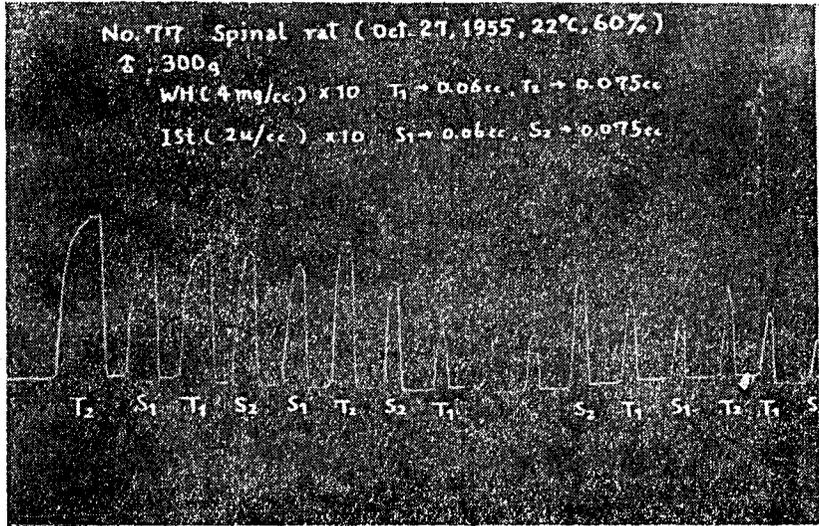


Fig. 3. Vasopressin assay (Spinal rat)

C. Oxyt/Vas 比

Table 6 に以上の結果をまとめて示す.

Table 6. Summarized results from Table 3, 4, and 5

Material*	AF method		RU method		SR method		Oxyt/Vas	Oxyt'/Vas	Error of AF method to RU method (%)
	Oxytocic unit per mg of				Pressor unit per mg of				
	Pituitary (found)	Ratio to OH value	Pituitary (found)	Ratio to OH value	Pituitary (found)	Ratio to OH value			
FH	0.11	0.5	0.05	0.2	0.04	0.3	2.75	1.25	120
KH	2.36	11.2	1.04	4.5	1.50	12.5	1.57	0.70	130
MH	1.19	5.4	0.88	3.8	0.45	3.8	2.64	1.96	40
OH	0.22	1.0	0.23	1.0	0.12	1.0	1.83	1.92	
WH**	0.23	1.0	0.13	0.6	0.51	4.3	0.45	0.25	80
NNSt**	2.03	9.2	2.07	9.0	2.05	17.1	0.99	1.01	

* refer to Table. 2.

** Posterior pituitary only

AF=Anesthetized chicken, RU=Isolated rat uterus, SR=Spinal rat
 Oxyt=Oxytocic unit obtained by AF method
 Oxyt'=Oxytocic unit obtained by RU method
 Vas=Pressor unit obtained by SR method

Table 6 から AF 法と RU 法で得た, Oxyt 値の一致するのは NNSt, OH だけである. その他の FH, KH, MH, WH では AF 法で得た値は RU 法で得た値よりそれぞれ 120, 130, 40, 80% 高い値を示している. この内 WH の両法で得た値の不一致は, Coon の報告のように Vas 値が Oxy 値に比べて大きいと考えられる. FH, KH, MH では Vas 値は Oxy 値に比べて大きくないにも拘らず, 両法で得た値が一致しない. これは Werle, Hoff¹³⁾ がいうようにこれら脳下垂体中に Oxy 以外の AF の血圧を下降させる成分の存在を意味するものであるかも知れない.

NNSt と OH の力価から算出した OH 中の後葉部分とその他の部分との割合とを, そのまま他の脳下垂体にも

適用し得ると仮定すると、硬骨魚類であるカツオ、メバチ脳下垂体中の後葉部分の Oxy, Vas 値は著しく大きく哺乳類の値に比し、Oxy 値はそれぞれ 4.5, 3.8 倍 (RU法), 又は 10.7, 5.4 倍 (AF法) であり、Vas 値はそれぞれ 12.5, 3.8 倍である。しかるに鳥類であるニワトリの脳下垂体中の後葉部分の Oxy 値は哺乳類の値に比べて 0.2 倍 (RU法), 又は 0.5 倍 (AF法), Vas 値は 0.3 倍に過ぎない。しかし切片の組織学的の検索によると魚の脳下垂体では、牛の脳下垂体に比較して、実際にはその後葉部分は、前葉部分に比して比較的大きいように思われる。この事実は著者等の得た結果と一致する。

哺乳動物 (牛, 豚) の脳下垂体後葉成分に関して 1 成分説と 2 成分説とがある。1 成分説の根拠の一つは、かなり精製して均質にしたある製品の血圧上昇及び子宮収縮作用の比が一定であるとの Van Dyke³⁰⁾ 及び Rosenfeld³¹⁾ の実験に基づく。これに対し 2 成分説では、ある種のクジラ脳下垂体では血圧上昇作用が子宮収縮作用より多く表われることを一根據としている。カツラ、メバチ及びニワトリの脳下垂体中の成分が哺乳類の脳下垂体中の oxyt 及び Vas と同一のものであるか否かは未だ確言できないが、もし同一のものであるならばこれらの比が上記各種動物で差異を示すという著者等の得た結果は 2 成分説に強力な一根據を与える。

脳下垂体 1 個当りのホルモン含量を参考のため Table 7 に示す。

Table 7. Oxytocin and Vasopressin content per a pituitary

Material *	Oxytocin unit		Vasopressin unit
	RU method	AF method	SR method
FH	0.09	0.20	0.07
KH	1.25	2.83	1.80
MH	11.44	15.47	5.85
WH	26.00	46.00	102.00
OH	86.94	83.16	45.36
NNSt	103.50	101.50	102.50

* Refer to Table 2

本実験でニワトリ 脳下垂体の採集を御願ひした農林省薬事課分室の 農林技官田中稔治氏、カツラ脳下垂体を分与された清水製薬株式会社、クジラ脳下垂体を提供された大洋漁業株式会社に深謝する。なおニワトリ脳下垂体の分離に御協力頂いた当部員城戸靖雅氏に感謝する。

文 献

- 1) Geiling, E. M. K. : Bull. Johns Hopkins Hosp. 57, 123 (1935).
- 2) Coon J. M. : Arch. Int. Pharmacodyn. 72, 79 (1939)
- 3) 米局 XIV, 475, XV, 555
- 4) 英局 VIII, 821
- 5) Burn, J. H. Finney, D. T. and Goodwin L. G. : "Biological Standardization", 186 (1950)
- 6) 長沢佳熊, 中山豪一, 佐藤浩: 衛試 70, 1 (昭27), 71, 103 (昭28)
- 7) 日局 VI, 442
- 8) 米局 XIII, 414
- 9) 英局 VII, 812
- 10) 国局 I, 346
- 11) Kamm, O. Aldrich, T.B. Grote, I. W. Rowe, and L. W. Bugbee E. P. : J. Am. Chem. Soc. 50, 573 (1928)
- 12) Valsö J. : Klin. Wschr. 14, 1183 (1935)
- 13) Valsö J. : ibid. 15, 1803 (1936)
- 14) Valsö J. : Hvalradets Skrifter Norske Videnskaps.
- 15) Bomskov, C. and Unger F. : Fette und Seifen, 45, 90 (1938)

- 16) Herring : Quart. J. Exp. Physiol. 1, 262 (1908)
- 17) Hogben L. T. : Quart. J. Physiol. 14, 238 (1928)
- 18) Werle, E. Hoff E. : Arch. Exp. Path. Pharmacol. 191, 492 (1938~9)
- 19) 平野四郎: 私信
- 20) 長沢佳熊: 文部省科学研究費報告 (昭和22)
- 21) 森田衛: 私信
- 22) 伊藤四十二, 行方正也 : 薬雑. 71, 956 (昭和26)
- 23) 末広恭雄 : 22) 引用
- 24) 大森義仁 : 慈医誌. 66, 1 (昭和26)
- 25) Lanzing T. R. : Acta Endocrinol. 16, 277 (1954)
- 26) Holton P. : Brit. J. Pharmacol. 3, 328 (1948)
- 27) Burn, J. H. Finney. D. J., and L. G. Goodwin : "Biological Standardization", 180 (1950)
- 28) 英局 XIII, 822
- 29) 米局 XV, 777
- 30) H. B. van Dyke : J. Pharmacol. Exp. Therap., 74, 190 (1942)
- 31) M. Rosenfeld : Bull. Johns Hopkins. Hosp., 66, 398 (1940)

Summary

Authors assayed Oxytocin and Vasopressin in the pituitaries of chicken, bonito fish, tuna fish, sei whale and ox. For the bioassay of oxytocin, the isolated rat uterus contraction method (RU) and anesthetized chicken blood pressure reducing method (AF) were used ; for vasopressin, the spinal rat blood pressure raising method.

The ratios of units of oxytocin to those of vasopressin in the whole pituitary of chicken, bonito fish and tuna fish were 2.75, 1.57 and 2.64, respectively, by the chicken method, 1.25, 0.70 and 1.96, respectively, by the rat uterus method.

Both AF and RU methods gave the same oxytocin potencies in whole ox pituitary and the Japanese Pharmacopoeia Posterior Pituitary Standard, but different potencies in sei whale posterior pituitary, in which vasopressin content was comparatively high. These results were coincident with Coon's report.²⁾

Both methods also gave different oxytocin potency values in chicken, bonito fish and tuna fish pituitaries in which vasopressin content was not so high.

Vasopressin and oxytocin contents in the whole Pituitary of chicken, bonito fish, tuna fish and ox were shown in the Table 6 and 7. According to authors' experiments, oxytocin or vasopressin content in the whole pituitary of bonito or tuna fish was extremely high but those in the chicken pituitary, very low.

Received February 29, 1956

脳下垂体後葉ホルモンの研究 (第6報)*

牛脳下垂体後葉中のオキシトシン及びバソプレシンのイオン交換樹脂による分離について

長沢 佳熊, 中山 豪一, 芹沢 淳

Studies on Posterior Pituitary Hormones. VI.

Separation of Oxytocin and Vasopressin in the Ox Posterior Pituitary by Ion Exchange Resin

Kakuma NAGASAWA, Goichi NAKAYAMA and Jun SERIZAWA

まえがき 脳下垂体後葉ホルモンの研究は近年 Du Vigneaud 等により著しく発展し, すでにその成分の純化及び構造の決定, 更にその合成も完成されている。然るにこれら一連の研究に於て粗製脳下垂体後葉粉末 (以下「粗脳後」と略す) からオキシトシン (子宮収縮成分: 以下 Oxyt と略す) 及びバソプレシン (血圧上昇, 抗利尿成分: 以下 Vas と略す) の予備的な分離には, Kamm, Aldrich 法¹⁾が有名であるが, この方法は多量の抽出液を減圧濃縮するなどの非常に長時間を費す面倒な操作を含んでいる。

最近迫田等¹⁾及び S.P. Taylor²⁾は Oxyt と Vas の分離について, Amberlite IRC-50 を用いたイオン交換クロマトグラフィを応用している。Taylor は Oxyt, アルギニン Vas, リジン Vas の結晶を適当に混合した物を試料として, 0.2M 磷酸塩緩衝液 (pH 6.95, 以下 PB** と略す) を溶出液に使用して三者を完全に分離している。又 P.G. Condliffe³⁾は Hyflo Super-Cel を用いたパーチジョンクロマトグラフィにより中程度の単位 (60 u/mg) を有する脳下垂体後葉粉末中の Oxyt, Vas の分離及び精製を行い, 好結果を得ている。

著者等は低単位の牛「粗脳後」に Taylor の方法を応用し Oxyt 及び Vas の分離と精製を試み好結果を得たので報告する。

実 験 の 部

(A) 樹脂の調製: C.H.W. Hirs, S. Moore, W. Stein が Ribonuclease⁴⁾ のクロマトグラフィに用いた方法に準じて行つた。すなわち Amberlite IRC-50 を乳鉢中ですりつぶし, 160 メッシュ以下の粉末 6g に水適量を加えて 30 分間かきまぜた後, 15 分間静置後上澄液が澄明となるまで, くりかえし数回洗う。次に吸引濾過し風乾する。乾燥物にアセトン 16 cc を加え, 2 時間かきまぜ, 吸引濾過し濾液が澄明となるまでアセトンで洗い, 風乾後水 20 cc を加えてよくかきまぜた後, 吸引濾過し, よく水洗して, アセトンの痕跡を除き, 風乾する。かような樹脂を再び水 20 cc と共にかきまぜ 40% 水酸化ナトリウム液 6 cc を徐々に加え, 3 時間かきまぜた後, 上澄液を傾斜し, 水を加えて吸引濾過し, 水洗後風乾する。

かくして得た樹脂のナトリウム塩を 3N 塩酸 40 cc 中にかきまぜながら加え, 3 時間かきまぜた後濾過し, 濾液が中性となるまでよく水洗する。これを風乾後, クロレトンを飽和した pH 6.95 の PB** 20 cc 中に加え, かきまぜながら pH を 5.5 とし, しばらくその pH に保つた後, pH を 6.95 とする。

(B) 樹脂柱の調製: (A) のように処理した樹脂を 0.9 × 23 cm の活栓付ガラス管に気泡が絶対に入らぬよう, 又上層と下層とが同一密度となるよう注意しながら流し込み, 次に pH 6.95 の PB 50 cc を流す。

(C) 原料物質: 「粗脳後」500 mg (約 1.5 u/mg) に 0.25% 酢酸 20 cc を加え, 90°C の水浴中で 20 分間かきまぜながら抽出し, 冷後濾過し, 残留物に再び 0.25% 酢酸 20 cc を加え, 再び加熱抽出する。両抽出液を合し 45 cc を得た。この抽出液に稀水酸化ナトリウム液を徐々に滴加して, 緩衝液と同じ pH, 即ち 6.95 とする。抽出物を濾別し, 得た濾液を検液とした。検液の一部につき, 麻酔ニワトリ血圧下降法^{5, 6, 7, 8, 9)}を用いて力価を検定し検液 1 cc 中 16.09 単位を含むことを知つた。

(D) クロマトグラフィ: (C) で調製した検液 36 cc (総単位数: 576 単位) を流速 1.5 cc/時間で樹脂柱を

* 第5報は本誌本号 155頁

** $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 16.6g, Na_2HPO_4 11.4g を水 1L に溶かし規定の pH とする。

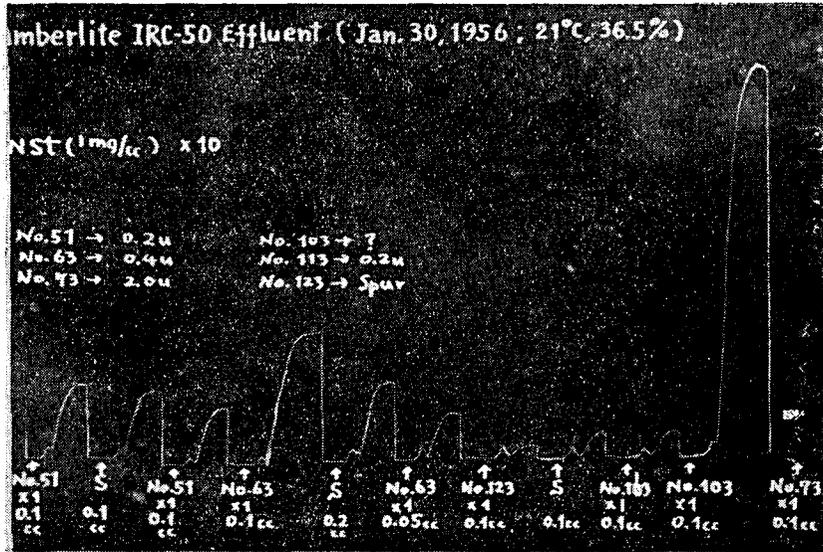


Fig. 4. Vasopressin assay

Fig. 2 に Oxyt, Fig 3, 4 に Vas を検定したキモグラフを示す。

かくの如く「粗脳後」抽出液を、ただ1回のクロマトグラフィを行つたのみで、Oxyt と Vas を相当程度分離することができた。又その成分の回収率は、Oxyt については、殆んど100%であつたが、Vas については60%であつた。

総 括

低単位「粗脳後」の多量の抽出液を Amberlite IRC-50 を用いて、イオン交換クロマトグラフィを行い、ただ1回の操作のみで、それぞれの成分を分離することができ、オキシトシン及びバソプレシンの回収率は、それぞれ100%及び60%であることを知つた。

これらの結果は、Taylor がオキシトシン、アルギニン・バソプレシン、リジン・バソプレシンの混合物について行つたイオン交換クロマトグラフィの成績と全く一致している。

本法によると、オキシトシンフラクション中のバソプレシンは1/20以下(国薬オキシトシン注射液中バソプレシン含量の規定)となるので、国薬オキシトシン注射液の製造に應用し得る。

更に本法を利用して、高単位を有するホルモンの製造法、それぞれの成分の完全な分離法について、又バソプレシンの回収率の向上について、現在検討中である。

文 献

- 1) Kamm, O., Aldrich, J. B., Grote, I. W., Rowe, L. W., and Bugbee, E. P., : J. Am. Chem. Soc. 50, 573 (1928)
- 2) Taylor, S. P. Jr. : Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 85, 226 (1954)
- 3) Condliffe, P. G. : J. Biol. Chem, 216, 455 (1955)
- 4) Hirs, C. H. W., Moore, S., and Stein, W. H. : J. Biol. Chem., 200, 493 (1953)
- 5) Coon, J. M. : Arch. Internat. pharmacodyn. Therap., 72, 79 (1939)
- 6) 国薬 II, 92 (1955)
- 7) 米局 XV, 555 (1955)
- 8) 英局 VIII, 820 (1953)
- 9) 長沢佳熊, 中山豪一, 佐藤浩: 本誌, 70 (昭和27), 71, 103 (昭和28)
- 10) 中山豪一: 本誌, 74, 145頁 (昭和31)
- 11) Sakota, N., Tukuda, T., Sasai, T. : J. Biochem., 42, 465 (1955)

Summary

Oxytocin and vasopressin in posterior pituitary extract were separated through the chromatography by Amberlite IRC-50, when the recovery of oxytocin is 100% but that of vasopressin about 60% by just only 1 procedure.

The result resembles that of the work of Taylor, who separated both pure hormone mixture by the same resin. Accordingly to above procedure, the oxytocin fraction contained about less than one twentieth of vasopressin, therefore, the method can be applied to preparing Oxytocin Injection of Japanese National Formulary or U.S. Pharmacopeia.

Received February 29, 1956

乾燥甲状腺中のヨウ素の定量*

竹中 祐典

Application of Azotometry to Drug Tests. II.
A Micro-Determination of Iodine in Thyroid
Yusuke TAKENAKA

生体内ヨウ素の化学的定量法としては、日局収載の甲状腺ヨウ素の定量法の外、ヨウ化ナトリウムに変えて硫酸セリウムで滴定する Hilty¹⁾ らの方法、クロム酸化後、特殊な蒸溜装置で捕集したヨウ素を Iodometry で定量する Matthews^{2,3)} らの方法及び比色法を利用した Chaney^{4,5)} らの方法が報告されている。

日局法については、検体消費量の大きいこと、酸化剤として用いる臭素の過剰の除去が困難なこと¹⁾、被滴定溶液が白濁し勝ちなことなど多くの難点がある。又、比色法の一つを追試した結果、試薬の調製及び操作上、これを検定法として採用するには多くの改良を要すると考えられた。

アゾトメトリ（以下AZMと略す）が微量のヨウ素の定量法として極めて正確な値を与えることは、早くから岩崎教授⁶⁾ によつて指摘されており、N/100~N/1000 範囲のヨウ素液 1 cc は Hydrazine-AZM により 1% 以内の誤差で定量されている。我々は、現日局法を微量化すると共に、正確度を高め、更に操作を簡易化すべく直接 Hydrazine-AZM 法を乾燥甲状腺中ヨウ素量の定量に適用したところ好結果を得たのでここに報告する。

操作は Hydrazine-AZM 法に準じたが、ヨウ化カリウム→ヨウ素酸カリウムへのアルカリ性過マンガン酸カリウム酸化には、灰化に用いた炭酸アルカリがそのまま使用でき、又、共存する炭化物が過マンガン酸カリウムの酸化反応を阻害することなく（実験の部 3）、更に、灰化した乾燥甲状腺中には、Hydrazine に対する酸化性物質が存在しない（実験の部 4）ために、灰化物について河過などの操作を省いて直接にアゾトメータで窒素ガスを測容し得、操作を簡易化し得た。

Table 2 に示すように、日局法に比し AZM 法の値は +0.04~0.05% を与えているが、日局法の浸出、河過操作ではいくらかの損失をとまなうと考えられる。この点については、更に多くの試料について両法による併行実験を試みるつもりである。

終りに、アゾトメトリ法を御教授下さつた金沢大学岩崎憲博士に謝意を表する。

実験の部

1) 試薬

N/10 KMnO₄ 液10N H₂SO₄M-NaN₃ 液

KI

試薬特級、微粉にする。

アルカリ性ヒドラジン液 硫酸ヒドラジンを 10N-NaOH に飽和する。

2) 操作

乾燥甲状腺約 30 mg を精密に秤り、ルツボ（なるべく底面の直径 1 cm 前後で、丈の高いものがよい。この実験では既製、底部直径 1.5 cm 長さ 4 cm のものを用いた）中で、微粉にした無水炭酸カリウム 300 mg を加えてよく混和し、更に無水炭酸カリウム 350 mg を加え、よくたたいて内容物を密にする。これを 675~700° に加熱したマッフル炉中で 25 分間熱灼し、冷後飽和食塩液 2 cc を加え、N/10 過マンガン酸カリウム 0.2 cc を滴加してよく混じ、100°, 1 分間加熱する。冷えないうちにこれに 10N 硫酸 1.8 cc を加えて酸性とし、M-窒化ナトリウム 0.1 cc

* 第 1 報は本誌 73 号 29~32 頁（昭和 30）

この報告は長沢佳熊：アゾトメトリの医薬品試験への応用（第 2 報）とする。

を加え 100°, 2 分間加熱して過量の過マンガン酸カリウムを除去後氷冷する。冷後ヨウ化カリウム約 1.5g を加え溶かしながらすばやく褐色アゾトメータ中に液を吸引し, 更に飽和食塩液約 3 cc で洗浄吸引し, メータ内の空気を完全に炭酸ガスで置換し, アルカリ性ヒドラジン液 1 cc をメータにとり約 100 回振り, 発生した窒素ガスの読みからヨウ素量を求める。

$$N_2 \text{ 33.6 mm}^3 (0^\circ, 760 \text{ mm/Hg}) = 127 \gamma \text{ I}$$

3) 炭酸アルカリ性過マンガン酸カリウムの酸化性及び共存炭化物による酸化阻害の有無。

前記ルツボ中に無水炭酸カリウム 500mg 及び炭化物約 20mg (乾燥甲状腺のみを 500° 前後のマッフル炉で熱灼しヨウ素を除去したもの) を加え, M/2000 KI 液 2 cc を加えて前記操作に従つてヨウ化カリウムを定量する。

Table 1. Recoveries of KI by Iodine-Hydrazine-Azotometry under carbonate-alkaline $KMnO_4$ oxidation

M/2000 KI 2 cc. = 33.6 mm ³ N ₂		
KI(cc)	N ₂ found [mm ³ (N ₀ V ₀)]	Recovery (%)
2	33.4	99.4
2	33.4	99.4
2	34.07	101.4
2	32.3	96.1
2	34.2	101.8
2	32.98	98.15
		Mean 99.37

4) 灰化物中のヒドラジン酸化物質の有無。

すでに, 3) によつて乾燥甲状腺灰化物中にはヒドラジンを酸化して窒素ガスを発生させる物質が混入していないことは明らかであるが, 念のため乾燥甲状腺約 30 mg を無水炭酸カリウム 500 mg とまぜ, 680° 前後のマッフル炉で熱灼したのものについて直接ヒドラジン AZM を試みたところ窒素ガス容は常に零であつた。従つて甲状腺中にはヒドラジン酸化物質が混在しないか, 混在していても約 30 mg について定量するときはヒドラジンに影響しない。

5) 乾燥甲状腺

局方乾燥甲状腺 2 種と, 鯨乾燥甲状腺 1 種について, 本法と日局法を併行して定量した。

Table 2. Iodine contents in some thyroids

J.P.-Thyroid No. 1 Iodine content 0.4% (by J.P. Method)				J.P.-Thyroid No. 2 Iodine content 0.38% (by J.P. Method)				Whale-Thyroid Iodine content 0.24% (by J.P. Method)			
Amounts of Sample (mg)	N ₂ (mm ³) (N ₀ V ₀)	Iodine		Amounts of Sample (mg)	N ₂ (mm ³) (N ₀ V ₀)	Iodine		Amounts of Sample (mg)	N ₂ (mm ³) (N ₀ V ₀)	Iodine	
		(r)	%			(r)	%			(r)	%
30.9	35.9	136.0	0.44	18.8	20.3	77.0	0.41	31.9	25.3	95.7	0.30
32.3	38.3	145.0	0.45	32.0	33.8	128.0	0.40	29.8	22.7	86.0	0.29
31.0	36.7	139.5	0.45	33.2	37.8	142.7	0.43	35.5	28.2	106.5	0.30
31.2	34.6	131.0	0.42	31.6	34.1	129.0	0.41	29.7	22.7	86.0	0.29
29.9	35.4	134.5	0.45	14.4	16.4	62.0	0.43	29.5	24.6	85.5	0.29
32.5	40.4	152.7	0.47	14.3	16.2	61.5	0.43	31.7	24.6	85.6	0.27
			mean 0.45				mean 0.42				mean 0.29

文 献

- 1) Hilty, Wilson : Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 11, 637 (1939)
- 2) Matthews, N. L., Curtis, G. M., Brode, W. R. : Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 10, 612 (1938)

- 3) Nicklaus, Tippet. : J. Amer. Pharm. Assoc., 29, 124 (1940)
- 4) Chaney, A. L. : Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 12, 179 (1940)
- 5) ケミカル タイムス 16, 262 (1955)
- 6) 岩崎憲 : 生化学, 23, No. 4. 25 (1951)

Summary

The Iodine-Hydrazine-Azotometry method was found to be suitable for micro-determination of iodine in thyroid, after the iodine in it was converted to potassium iodide by alkali carbonate-disintegration. This method was accurate and very simple comparing with Japanese or U. S. Pharmacopeia method, and the iodine content obtained by this method was 0.04~0.05% higher than that by J.P. or U.S.P. method.

Received February 29, 1956

インシュリンの薬化学的研究 (第14報)*

鯨膵臓からインシュリン結晶の単離**

長沢 佳熊, 竹中 祐典, 岡崎 精一, 深沢 真司***

芦沢 広,*** 柴田 哲夫****

Pharmaceutical and Chemical Studies of Insulin. XIV.

Isolation of Insulin Crystals from Whale Pancreas

Kakuma NAGASAWA, Yusuke TAKENAKA, Seiichi OKAZAKI,
Shinji FUKASAWA, Hiroshi ASHISAWA and Tetsuo SHIBATA

インシュリン亜鉛塩の結晶は, 1926年 Abel¹⁾, 1929年 Harington²⁾, 1931年 Scott³⁾等により牛膵臓から単離され, 1940年 Romans等⁴⁾によりその工業的製法が報告され, 欧米の各製造会社では, ほとんど凡てがこの結晶を工業的に製造している。豚膵臓からも結晶が得られるが, 結晶化がやや困難であると Scott³⁾ (1931), Lens, Evertzen (1952)^{5), 6)}が述べている。羊膵臓についても同様であるという (Scott, 1931)⁵⁾。硬骨魚類 (タラ) の Stannius 小体からは Jensen, Wintersteiner, Geiling⁶⁾によつて結晶が得られた。佐藤等⁷⁾のカツオの Stannius 小体からの製法を追試した結果, 方法がきわめてまわりくどくて収量悪く, インシュリンの結晶はほとんど得られなかつた。彼等の方法によれば結晶化してもわずかの部分のみであつたらうし, 得られた結晶の生理的力価の検定には全く科学的根拠なく, その他の恒数も明かでなく再現できる報告とは考えられない。

なおカツオ, マグロ類の Stannius 小体からのインシュリンの結晶化については, いずれ詳細に報告する予定である (一部は六角板晶又は集針晶に結晶化するが, 極微細結晶と思われる粒状物をともなう)。

次に鯨膵臓からのインシュリンの結晶化については著者等の調べた限りでは報告がない。鯨膵臓からのインシュリンの抽出については著者の1人長沢⁸⁾は既に1942年膵臓1gから2.0~2.5単位を, Jacobsen (1941)⁹⁾等は1単位弱を得た。

著者等は南水洋産シロナガスクジラ *Balaenoptera borealis*, Lesson の膵臓から工業生産的にきわめて収量よくインシュリンを結晶化することができたのでここに報告する。*****

柴田¹⁰⁾の方法によつて得た1mg 中約16単位を含む粗インシュリン粉末1gを氷酢酸2ccを含む水180ccに溶かし, アセトン120ccを加え, 10%アンモニア水2ccを含む水120ccを加えpHを6.0とし, 沈澱を汙去し, 汙液に酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 6.0) 200cc及び2.5w/v% 酢酸亜鉛液0.75ccを加え, 室温に24時間, 更に2~4°の冷室に24時間放置した後, 沈澱を遠心分離してとり, 氷酢酸5.25ccを含む水300ccに溶かし, 前記の酢酸亜鉛液3cc, 10%アンモニア水6ccを含む水300ccを加え, 更にpHを6.0に調節する。これを室温に24時間, 更に2~4°の冷室に24時間放置した後沈澱を集める。(沈澱の収量665mg)。これがインシュリンの結晶で, 写真のようにほとんどが明瞭な立方体を示す。6回の実験による収量を次に記す。回数を経過するにつれて操作が熟練したためか, 最後の2回は力価の収率は97%に達した (Table 1)。

* 第13報は本誌72, 11~19 (昭和29), 第15報は本誌, 74, 177 (昭和31)

** 昭和29年4月日本薬学会で講演 [薬学研究 26, 565~566 (昭和29) 抄録]

Paper was read by the author at the meeting of the Pharmaceutical Society of Japan, April, 1954

*** 所員外 清水製薬株式会社

**** 所員外 大洋漁業株式会社横須賀工場

***** 鯨膵臓中のインシュリンは牛膵臓からの場合と同様に結晶し易い。柴田, 伊丹によれば, 特にマツコウ鯨 *Physeter catodon*, Linné 膵臓からのものは結晶し易いという (私信), 又阿氏はその後 (昭和31年2月) シロナガスクジラ及びナガスクジラ, *Balaenoptera physalus*, Linné) の膵臓を原料としてインシュリン結晶の量産化を行つている。

Table 1. Yield of Crystalline Insulin

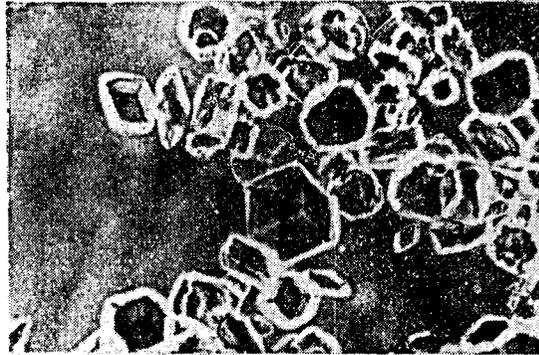
No. of experiments	Weight of crude insulin(mg)	Total units of crude insulin (units)	Yield of crystal insulin	
			in weight (mg)	in unit (%)
1	65	1040	22	46
2	50	800	25.5	70
3	478.5	7656	2.5	75
4	350	5600	142	56
5	1000	16000	700.5	97
6	1000	16000	665	97

この結晶について、米国薬局方¹¹⁾の方法で亜鉛含量を測定し、0.67%の値を得た。融点は216°で一部褐変、224°で全部褐変し、体積が著しく膨張し、231°で熔融分解し、黒色となる(融点は未補正)。

窒素含量は岩崎憲氏のアゾトメトリー法¹²⁾により測定した結果100単位につき0.67mg、生理的力価は日本薬局方インシュリン注射液の定量法に記述する方法¹³⁾で測定した結果1mg中に22.1単位を含む。

終りに昭和24年度文部省科学試験研究費の補助を得、その際御援助を得た東大菅沢重彦教授に感謝する。

鯨膵臓からのインシュリン結晶



Insulin Crystals from Whale Pancreas

文 献

- 1) Abel, J. J., Geiling, E. M. K. : J. Pharm. Exp. Therap. 25, 423 (1925)
- 2) Harington, C. R., Scott, D. A. : Bioch. J. 23, 393 (1929)
- 3) Scott, D. A. : J. Biol. Chem. 92, 281 (1931)
- 4) Romans, R. G., Scott, D. A., Fisher, A. M. : Ind. Eng. Chem. 32, 908-910 (1940)
- 5) Lens, J., Evertzen, A. : Biochemica et Biophysica Acta 3, 332 (1952)
- 6) Jensen, H., Wintersteiner, O., Geiling, E. M. K. : J. Pharm. Exp. Therap. 36, 116 (1929)
- 7) 佐藤武雄, 片野浜子 : 化学の領域 2, 132-133 (昭和23) ; 伊藤四十二, 佐藤武雄 : 化学療法とホルモン療法, 1, 24 (昭和23)
- 8) 長沢佳熊, 近藤政次郎 : 薬学雑誌, 62, 287 (昭和17)
- 9) Jacobsen, Alf. P. : HVALRADETS SKRIFTER, Scientific Results of Marine Biological Research, Oslo, 54 (1941)
- 10) 柴田哲夫 : 福岡医学会雑誌, 43, 41 (昭和27) ; 日本特許第200763号 (昭和28年8月6日)
- 11) U. S. Pharmacopeia XIV, 1950 (799)
- 12) 岩崎 憲 : 生化学, 23, 4 (昭和26)
- 13) 第六改正 日本薬局方 (厚生省版), 60 (昭和26).

Summary

In this report, the authors isolated the zinc insulin crystals from the pancreas of whales (*Balaenoptera borealis*, Lesson and *Balaenoptera physalus*, Linné) caught in the South Pole Sea, with good yield. The method was the following.

The crude insulin powder having 16 units per milligram, was obtained by Shibata's method.¹⁰⁾ This powder was dissolved in 180 cc of water containing 2 cc of glacial acetic acid, then added with 120 cc of acetone and 120 cc of water containing 2 cc of ammonia water to make pH 6.0 of the solution exactly. The precipitate caused was filtered off, and the filtrate was added with 200 cc of ammonia buffer solution to make pH 6.0 of the solution, to which 0.75 cc of zinc acetate solution (2.5w/v%) was added. After standing for 24 hours at the room temperature, the solution was kept in the cold place (2-4°) for 24 hours more.

The precipitate caused was taken by the centrifuge and dissolved in 200 cc of water containing of 5.25 cc of glacial acetic acid. To the solution 300 cc of water containing 3 cc of above zinc acetate solution and 6 cc of 10% ammonia water was added, then the solution was adjusted pH to 6.0. After standing 24 hours in the room temperature and another 24 hours in the cold place (2~4°), the precipitate was taken by centrifuge; yield was 0.665 grams, which was the zinc insulin crystals. As it is shown in the photograph (see p. 172) almost all the precipitate was crystalline, and had distinct crystal forms.

The yield of the crystals in the six experiments shown in the Table 1 (see p. 172).

These crystals have the melting points of 216° (partly color brown), and 224° (swell and turn into entirely brown), and finally decompose at 231°, turning into brownish black. The zinc content in the crystals is 0.67%¹¹⁾, the nitrogen (N), 0.67 milligram per 100 units¹²⁾, 1 milligram of the crystals has 22.1 units.

Received February 29, 1956

インシュリンの薬化学的研究 (第 15 報)*

濾紙クロマトグラフィを用いるアイソフェンインシュリン中のインシュリンの定量法**

長沢 佳 熊, 西崎 笹 夫

Pharmaceutical and Chemical Studies of Insulin. XV.

Determination of Insulin in Isophane Insulin Injection by Paper Chromatography

Kakuma NAGASAWA and Sasao NISHIZAKI

まえがき アイソフェン (NPH) インシュリン注射液の力価の検定は従来家兎の血糖量降下法¹⁾ 又はマウスのケイレン法²⁾ により行われている。Robinson 等³⁾ はプロタミン亜鉛インシュリンについて濾紙クロマトグラフィにより得たインシュリンのバンドを溶出後光電比色計により定量し、同時に保留分析法によりプロタミン量をも定量した。朝岡, 東⁴⁾ は Robinson 法を粗インシュリンに応用し、ある純度の範囲ではインシュリン純度検定が可能であることを報告し、柴田等⁵⁾ は膵臓からインシュリンの工場生産に当り、朝岡, 東の方法により粗製品のインシュリン含量の測定に適用し好結果を収めている。

著者等はインシュリン溶液を Robinson 法によるクロマトグラフィで展開したとき得たスポットの面積を我々の研究室の越村, 岡崎⁶⁾ の方法で測定し、インシュリン量 7.7~26.0 r の範囲では用量の対数値と面積とが直線関係にあることを証明し、その範囲の量において、標準液と検液とを同一濾紙上にラテン方格の順列で展開し、2-2量検定法、又は3-3量検定法を行つた結果マウスケイレン法と比較してその力価はよく似た値を得、その検定の信頼限界もより小さいことを認めたのでここに報告する。

実 験 の 部

1. 標準液及び検液の調製法 インシュリン国際標準品 (24.5 u/mg) を精密に秤り、N/100-塩酸で 200 u/cc とした液を標準液 (S) とし、アイソフェンインシュリン注射液の場合上澄液中にはほとんどインシュリンを含まないから***約 20 分間 3000 r. p. m. で遠心分離し、上澄液をなるべく完全に分離した後沈澱を N/100-塩酸で 200 u/cc と予想される濃度に稀釈した液を検液 (T) とした。

2. この実験に使用した毛細管 ガラス管を一律の太さに延ばし、各部分の断面積に有意差のないものを使用した。

著者等の用いた毛細管は吸い上げた液の長さ、その重量との関係からそれぞれの換算値を Table 1 に示す。

Table 1. Calculated Value of Capillary Used

Length of liquia in the capillary (cm)	1.50	2.00	2.25	3.00	3.38	4.00	5.06
Volume (cc×10 ⁻⁴)	8	11	12	16	18	22	27
Unit calculated from 200 u/cc (u)	0.16	0.22	0.24	0.32	0.36	0.44	0.54
Weight calculated from 24.5 u/mg (r)	7.7	10.3	11.6	15.4	17.3	20.6	26.0

* 第 14 報は本誌 74 号 173 頁, 第 16 報は本誌 73 号 1~6 頁,

** 昭和 30 年 5 月 14 日 日本薬学会東京例会で講演

*** 国際薬局方では上澄液中のインシュリンは 4% 以下と規定し、当所の検定では従来すべて 1% 以下であったので誤差の範囲とした。また標準液と検液とは同一の溶媒に溶かして濾紙につけることが望ましい。

3. 展開操作法 角形濾紙 (Whatman No. 1 又は東洋濾紙 No. 51) の一辺から 6 cm のところに引いた直線上に 2 cm 間隔で (S) と (T) とをラテン方格の順序に、2-2 検定の際は 16 個処 (4×4)、3-3 検定のときは 24 個処 (4×6) へ前記と同一の毛細管を用いてつけて原点とする。

これを n-ブタノール：酢酸：水 (3:1:4) の展開溶媒で上昇法により約 15 時間室温 (約 20°) で展開した。

展開した濾紙を風乾後 0.02% の ブロムクレゾールグリーン (B. C. G.) 水溶液中に浸し、次に 2% 酢酸水溶液中に移し、スポット以外の部分が完全に脱色するまで酢酸溶液を数回換えて洗う。再び風乾後 アンモニア蒸気に曝すとスポットの部分のみ青色を呈し、面積を測定する場合その限界が明瞭になる。Rf は約 0.3 であった。

呈色したスポットはおよそ濃淡二段の色調を有するが面積法により力価を検定するには内側の濃部の面積を測らねばならない。又東洋濾紙 No. 51 (Whatman No. 1 に比し厚手である) はスポットの面積がやや小さい。

呈色したスポットを順次直接鉛筆で囲むか又はトレイシングペーパーに写しとつて、各スポットの周囲線上の 3 点を基準として 3 回ずつ プラニメータで面積を測定し、その算術平均を 1 個のスポットの面積とした。ただし面積の数値はプラニメータの目盛で示したから表中 Area of Spots の 1.0 は 0.4 cm² に相当する。

4. 測定面積の統計学的処理⁷⁾ 著者等は濾紙の不均一性、及び展開した時溶媒の先端がやや傾斜する場合などが面積の測定値に及ぼす影響を考慮してラテン方格の順列を以てスポットし、例へば 2-2 検定の場合、一端から Shi, Sli, Thi, Tli, を 1 つの i 番目の群として統計学的に処理した。(i=1, 2, 3, 4, の整数のいずれかに属す)

a) 直線性の検討 著者等は予備実験として約 1~5 cm (毛細管中の液層の長さの用量範囲では、ほぼ直線的関係にあることを推定して 1.5, 2.25, 3.38, 5.06 cm (用量比 1.5:1) の用量について直線性の検討をした (Table 2~Table 4, Fig. 1 参照)。

Table 2. Area of Spots of Linear Test

dose (cm)	1.50	2.25	3.38	5.06	Total
Area of Spots	0.67	1.23	2.19	3.14	7.23
	0.84	1.10	2.12	2.43	6.49
	0.68	1.47	2.11	2.87	7.13
	0.77	1.47	1.79	3.33	7.36
Total	2.96	5.27	8.21	11.77	28.21
Mean	0.74	1.3175	2.0525	2.9425	

これから分散分析表を作成する (Table 3)。

Table 3. Analysis of Variance from the Data of Table 2

Adjustment for Means.....49.7378			
Nature of Variation	d, f	Sum of squares	Mean square
Regression	1	10.7825	0.0488
Deviation from Regression	2	0.0976	
Between doses	3	10.8801	0.0624
Between groups	3	0.1121	
Error	9	0.5615	
Total	15	11.5537	

Table 3 から $F = \frac{0.0488}{0.0624} = 0.78 < F_{\alpha}^2 \begin{matrix} 4.26 (5\%) \\ 8.02 (1\%) \end{matrix}$

故に少くとも 1.5 ~ 5.06 cm の用量範囲で得た面積値は直線的関係を疑うわけにはいかない。したがってこれから回帰直線方程式を求めた (Table 4)。

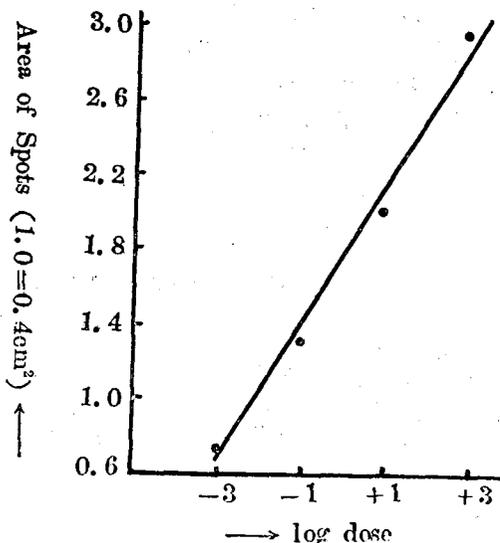


Fig. 1. Linear Test

従つて著者等は 2-2 検定の場合には低用量 (l) 2 cm, 高用量 (h) 4 cm を沓紙につけ (用量比 2: 1), 3-3 検定の場合には低用量 (l) 1.5 cm, 中用量 (m) 2.25 cm, 高用量 (h) 3.38 cm (用量比 1.5: 1) を沓紙につけた。

b) 2-2 検定の計算例 Table 9, No. 5' の検体を例にとり力価, 及びその信頼限界の算出を示す (Fig. 2 Table 5 Table 6 参照)。

Table 5. Area of Spots of 2 and 2 Amount Test

Dose	S _l	S _h	T _l	T _h	Total
Area	1.00	1.79	0.88	1.62	5.29
of	1.02	1.72	0.89	1.37	5.00
Spots	1.10	1.56	0.94	1.80	5.40
	1.02	1.49	0.81	1.53	4.85
Total	4.14	6.56	3.52	6.32	20.54
Mean	1.035	1.64	0.88	1.58	

これから分散分析表を作成する (Table 6),

Table 6. Analysis of Variance from the Data of Table 5

Adjustment for Mean.....26.3682			
Nature of variation	d. f.	Sum of Squares	Mean Square
Preparations	1	0.0463	
Regression	1	1.7030	
Parallelism	1	0.0090	0.0090
Between doses	3	1.7583	
Between groups	3	0.0485	
Error	9	0.1204	0.0134
Total	15	1.9272	

Table 4. Calculation of Regression Line

x	y	n	nx	ny	nx ²	nxy
-3	0.74	4	-12	2.96	36	-8.88
-1	1.3175	4	-4	5.27	4	-5.27
+1	2.0525	4	+4	8.21	4	+8.21
+3	2.9425	4	+12	11.77	36	+35.31
0	7.0525	16	0	28.21	80	29.37
\bar{x}	= 0				0	0
\bar{y}	= 1.763125				80	29.37
					↑ SS _{xx}	↑ SS _{xy}

$$b = SS_{xy}/SS_{xx} = \frac{29.37}{80} = 0.367125$$

The Regression equation :

$$Y = 0.367125X + 1.763125$$

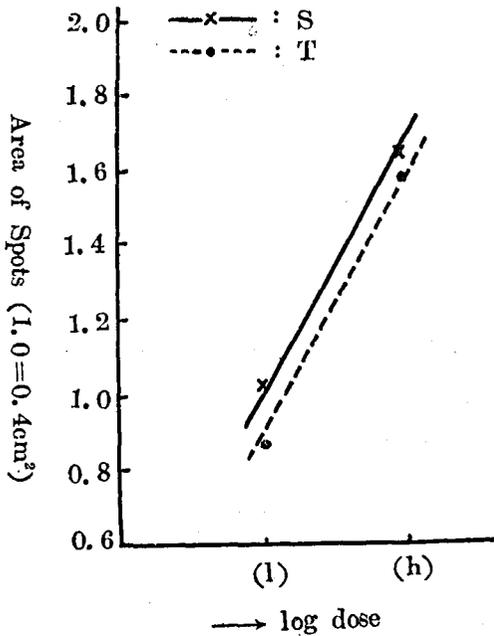


Fig. 2. 2 and 2 Amount Test.

Table 6 から $F = \frac{0.0090}{0.0134} = 0.67 < F_9^1 \begin{matrix} 5.12 (5\%) \\ 10.56 (1\%) \end{matrix}$

両者に平行性の有意な差は認められない。従つて力価及びその信頼限界を算出する。

$\bar{Y}_S = 1.33375 \quad \bar{Y}_T = 1.23$

$SS_{xx} = 16 \quad SS_{xy} = 5.22$

$b = 5.22/16 = 0.32625$

標準品及び検体の回帰方程式は

$Y_S = 0.32625X + 1.3375$

$Y_T = 0.32625X + 1.23$

$M = -\frac{1.3375 - 1.23}{0.32625} = -0.3295$

$M' = -0.3295 \times 0.1505 = -0.0496 = \bar{1}.9504$

Antilog $M' = 0.8921$

$g = \frac{2.26^2 \times 0.0134}{0.32625^2 \times 16} = 0.040$

$\frac{-0.3295 \pm 2.26 \times 0.11576}{0.96} \pm \frac{2.26 \times 0.11576}{0.96 \times 0.32625} \sqrt{0.96 \times \frac{1}{4} + \frac{(-0.3295)^2}{16}}$

$= -0.34323 \pm 0.41507$

$= -0.7583 \sim +0.07184$

両者を0.1505倍する

$-0.1141 \sim 0.0108$

Antilog をとると 0.7690~1.025

従つて力価に対する信頼限界(%)は

$86.20 \sim 114.90\%$

c) 3-3検定の計算例 Table9, No. 5の検体を例にとり力価, 及びその信頼限界の算出を示す (Fig. 3. Table7, Table 8参照).

Table 7. Area of Spots of 3 and 3 Amount Test.

Dose	S ₁	S _m	S _h	T ₁	T _m	T _h	Total
Area of Spots	0.71	1.17	1.74	0.61	1.33	1.63	7.19
	0.87	1.32	1.60	0.66	1.06	1.70	7.21
	0.80	1.06	1.89	0.67	0.91	1.56	6.89
	0.67	1.23	1.82	0.60	1.12	1.50	6.94
Total	3.05	4.78	7.05	2.54	4.42	6.39	28.23
Mean	0.7625	1.195	1.7625	0.635	1.105	1.5975	

これから分散分析表を作成する (Table 8).

Table 8. Analysis of Variance from the Data of Table 7

Adjustment for mean.....33, 2055			
Nature of Variation	d. f.	Sum of squares	Mean square
Preparations	1	0.0975	
Regression	1	3.8514	
Parallelism	1	0.0014	0.0014
Curvature	1	0.0083	0.0083
Deviation from Curvature	1	0.0042	0.0042
Between doses	5	3.9629	
Between groups	3	0.0138	
Error	15	0.2097	0.014
Total	23	4.1864	

Table 8 から $F = 0.10 < F_{5, 15}^{1, 4.54} (5\%)$
 $5, 8.68 (1\%)$

$F = 0.59 < \quad \quad \quad "$

$F = 0.30 < \quad \quad \quad "$

両者の平行性, 彎曲, 彎曲の差に有意の差は認められない。従つて力価, 及びその信頼限界を算出する。

$$\bar{Y}_S = 1.240 \quad \bar{Y}_T = 1.1125$$

$$SS_{xx} = 16 \quad SS_{xy} = 7.85$$

$$b = 7.85/16 = 0.490625$$

標準品及び検体の回帰方程式は

$$Y_S = 0.490625X + 1.24$$

$$Y_T = 0.490625X + 1.1125$$

$$M = -\frac{1.240 - 1.1125}{0.490625} = -0.2599$$

$$M' = -0.2599 \times 0.1761 = -0.0458 = \bar{1}.9542$$

$$\text{Antilog } M' = 0.8999$$

$$g = \frac{0.014 \times 2.13^2}{0.491^2 \times 16} = 0.016$$

$$\frac{-0.2599 \pm 2.13 \times 0.119}{0.984} \pm \frac{0.984 \times 0.491}{0.984 \times \frac{1}{6} + \frac{(-0.2599)^2}{16}}$$

$$= -0.2641 \pm 0.2151$$

$$= -0.0490 \sim -0.4792$$

両者を 0.1761 倍すると

$$-0.0086 \sim -0.0844$$

$$\text{Antilog をとると } 0.8233 \sim 0.9804$$

従つて力価に対する信頼限界 (%) は

$$91.49 \sim 108.95\%$$

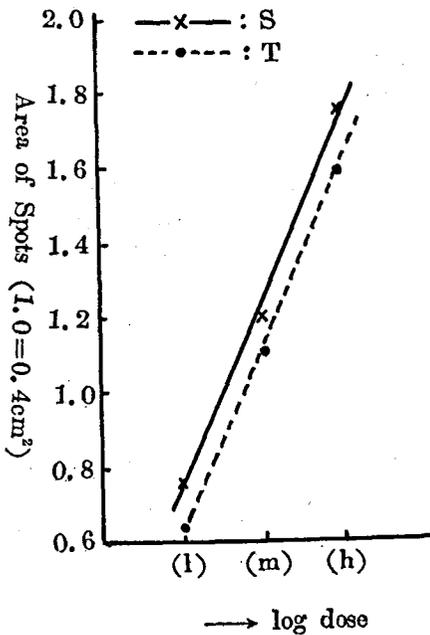


Fig. 3. 3 and 3 Amount Test.

実験結果

以上の如くして得られた実験結果をマウス・ケイレン法と比較対照して表示する (Table 9).

Table 9. Comparison of Paper Chromatography and Mouse Convulsion Method

Sample No.	Values by Paper Chromatography		Experiment Design	Values by Mouse Convulsion Method, ※	
	Factors	f. l. e (%) (P = 0.95)		Factors	f. l. e (%) (P = 0.95)
1	0.9993	87 ~ 115	2-2	0.9450	70 ~ 139
1'	0.8740	88 ~ 112	2-2	0.8494*	—
2	0.8878	97 ~ 102	2-2	1.091	56 ~ 212
3	1.028	91 ~ 110	2-2	1.197	76 ~ 141
4	0.9904	90 ~ 111	3-3	1.000**	—
5	0.8999	91 ~ 109	3-3	0.9585	68 ~ 144
5'	0.8921	86 ~ 115	2-2	0.7704	59 ~ 143
6	1.032	83 ~ 120	2-2	0.9206	71 ~ 136
7	0.9217	91 ~ 110	2-2	1.216	77 ~ 139
8	1.024	92 ~ 109	2-2	1.006	71 ~ 141
9	0.9200	94 ~ 107	2-2	0.8758	71 ~ 133
10	0.9175	94 ~ 107	2-2	0.8906	53 ~ 152

※ Showed the value observed for 90 min. with 25~30 mouse.

※※ Showed the value observed for 60 min.

* Sample diluted 85% of No. 1.Calculated Value = $0.9993 \times 0.85 = 0.8494$

** Comparison of the same Standards.....Calculated Value = 1.0000

考察とむすび

検体 No. 1' は検体 No. 1 を 85% に希釈した検液で、実験値の誤差は実際値に対し約 2.5% であった。

検体 No. 4 は同一の標準液を用いて 3-3 検定した結果で、実験値の誤差は実際値に対し約 1% であった。

検体 No. 5 及び検体 No. 5' は同一検体を 2-2 検定、3-3 検定した結果であるが、その力価の誤差は 1% 以内であり、その信頼限界は 3-3 検定の方が 2-2 検定に比して小さい値を示した。

又信頼限界はマウスケイレン法に比してはるかに小さく、力価の差の著しいものでもマウスケイレン法の英局規定の信頼限界 80 ~ 125% の範囲にすべて入った。

本法の利点として、1) 操作が簡単でしかも経済的である。2) 精度がよく検液中のインシュリンの含量を定量するときかなりの正確性がある。

しかし濾紙、溶媒、温度等の諸条件により各回の実験による Rf 値及び面積の測定値は常に一定ではないから必ず標準液と対照する必要がある。

又標準品の Rf 値と同じ部位のスポットを検体中のインシュリンのスポットと断定したが、検体中のインシュリンスポットと同一の Rf 値を示す夾雑蛋白の混入については今後検討の余地があると思われる。

文 献

- 1) 第六改正日本薬局方 (厚生省版) p. 60 (昭和26)
- 2) 第八英国薬局方, (1953) p. 78, p. 817
国際薬局方, ; 2, (1955) p. 274
長沢佳熊 ホルモン薬品学 立川図書版 p. 242 (昭和29)
- 3) Robinson, F. A. et. al. : Biochem. J., 51, 298 (1952)
- 4) 朝岡 毅, 東 克巳: 薬学雑誌, 74, 788 (昭和29)
- 5) 柴田哲夫: 私信
- 6) Koshimura, E. and Okazaki, S. : Pharm. Bull., 2, 65 (1954)

- 7) Burn, J.H., Finney, D.J., and Goodwin, L.G. : Biological Standardization; Oxford Univ. Press, 1950, p.75, p.86.

Summary

When Isophane Insulin Injection was chromatographed on filter paper, a linear relationship was found between the areas of spots and logarithms of doses within a certain range (7.7-26.0 μ) of insulin. In that range, factors and fiducial limits of errors were calculated by a statistical method.

This method gave values close to those obtained with the mouse convulsion method for insulin and less fiducial limits of errors.

Received February 29, 1956

インシュリンの薬化学的研究 (第18報)*

魚類インシュリンの精製及び魚類, 鯨インシュリンの物理化学的性質について (その1)

長沢 佳熊, 西崎 笹夫

Pharmaceutical and Chemical Studies of Insulin. XVIII.

On the Purification of Fish Insulin, and Physico-chemical Properties
of Fish and Whale Insulins. (Part 1.)

Kakuma NAGASAWA and Sasao NISHIZAKI

まえがき Abel (1926)¹⁾ は牛膵臓から, Jensen, Wintersteiner (1929)²⁾ はタラ Stannius 小体から, 長沢等³⁾ は第14報においてクジラ膵臓からインシュリン結晶を得た。我国では長沢等³⁾の研究によるマグロ, カツオなど回遊魚の Stannius 小体又は鯨膵臓からのインシュリンが臨床用目的のため製造されている。この魚類インシュリンの結晶化は現在収得量が悪く, 均質で典型的な結晶として大量に製することはむずかしい。著者等はそのインシュリンの精製, 結晶化の改良と魚類及び鯨からのインシュリンの性質を検討し先ず次のような知見を得た。

著者等³⁾ は前報において Robinson⁶⁾ 法を応用しインシュリンを定量したが, 牛インシュリンは最も Rf 値が大きく, 鯨インシュリンはやや小さく, 魚類インシュリンでは他と明かに区別できるほど小さい (実験1)。

次に魚類インシュリンの60%アセトン溶液をアルカリ性とし, pHを少しずつ酸性に移行させるとき生じた沈澱を区分して集め, マウスケイレン法⁷⁾ でその単位を検定した結果, pH=6.5~7.0附近の区分にインシュリンが集まる (実験2)。

また牛結晶インシュリン, 鯨結晶インシュリン, カツオインシュリン及びマグロインシュリンを塩酸で加水分解し, 濾紙クロマトグラフィにより構成アミノ酸の種類及び各アミノ酸のスポットの大きさと濃さを比較した結果, 鯨結晶インシュリン中にはメチオニンと推定される附近に1つのスポットが存し, 又カツオインシュリン中にはチロジンが比較的少ない (実験3)。

実験の部

実験1. 牛結晶インシュリン, 鯨結晶インシュリン及び魚類インシュリンの濾紙クロマトグラフィによるRf値の比較。

a) 試料: 牛結晶インシュリン (23.6 u/mg), 鯨結晶インシュリン (22 u/mg) 及び魚類インシュリン (20.8 u/mg, Table 2 pH 7.2~6.9 区分) を N/100-塩酸に溶かし約 200 u/cc とした。

b) 展開操作:

Whatman No. 1 濾紙の一端から 6 cm のところに引いた直線上に順次上記試料を 3 個ずつつけ, n-ブタノール: 酢酸: 水 (3:1:4) で上昇法により室温で約 15 時間展開後, ブロムクレゾールグリーン水溶液で呈色させた。それらの Rf 値を Table 1. に示す。

Table 1. Comparison of Rf Values of Insulins.

	Insulin Crystals from Ox	Insulin Crystals from Whale	Insulin from Fish
Rf values	0.30	0.23	0.15
	0.28	0.24	0.15
	0.24	0.22	0.16
Mean	0.273	0.230	0.153

* 第17報は本誌 73, 7~9 (昭和30)。

実験 2. 魚類インシュリンの pH による分割沈澱

a) 魚類インシュリン (12.5 u/mg) 1.35 g に 60% アセトンを加え塩酸酸性 (pH=2.05) にして完全に澄明とした。これに N-水酸化ナトリウム液を注意しながら徐々に加え絶えずかきまぜる。pH=4 附近より白沈を生じ、pH=6~7 で最大の濁度を示し pH=11.0 で完全に澄明となつた。

直ちに N-塩酸をかきまぜながら少量ずつ加えて pH 8.1, 7.2, 6.9, 6.3 で沈澱する区分を遠心分離して各区分の力価をマウスケイレン法により検定した (Table 2. 及び Fig. 1)。pH 6.3 で遠心分離後 pH 5.5 としたが沈澱を生じなかつたので多量のアセトンを加えて沈澱させた。

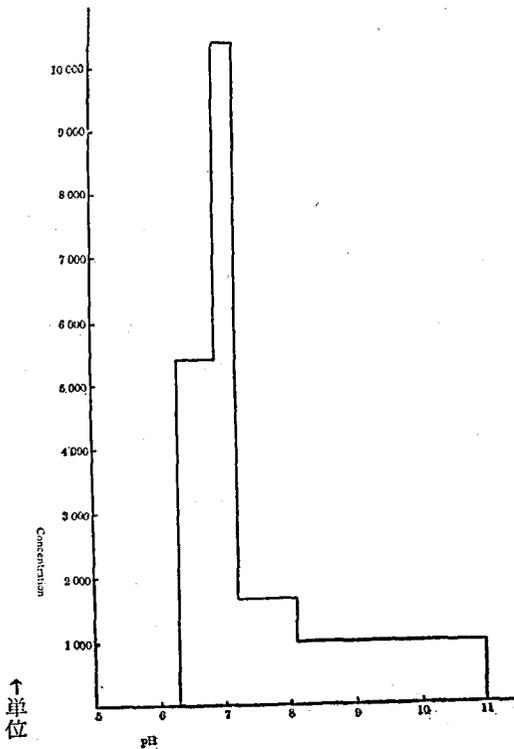
Table 2. Fractionation of Insulin through pH-precipitation
Total Units of Starting Fish Insulin : 12.4 u/(mg) × 1350(mg) = 16750 u

pH	ΔpH*	mg	u/mg and f. l. e. (%)**	Total Units	Units (%)	Concentration (units)***											
11.0	2.9	732	3.7 (78~128)	2710	16	935											
8.1							60	17.4 (71~141)	1450	9	1611						
7.2												0.3	150	20.8 (73~207)	3120	19	10400
6.9																	
6.3	—	173	—	—	—												
Recovery from mother liquor						—	—	—	—	—							
Total											—	1274	—	10480	63	—	
Unrecovery											—	76	—	6270	37	—	

* Difference between two adjacent pH's.

** "Fiducial limit of error," The method used for estimating insulin in the samples was

Fig. 1



described in our previous report.⁷⁾ In these experiments, smaller number of mice, for example, about twenty, was used, so that the f. l. e. in this column was found rather large.

*** Total Units/ΔpH

b) 魚類インシュリン (7.8 u/mg) 200 mg に 60% アセトン 30 cc を加え、a) と同様の操作をした。

この試料は pH=10.8 の溶液中で澄明となりかきまぜながら塩酸を少量ずつ加えて pH=8.8, 6.9, 6.4, 5.5 に調節し、それぞれの区分で沈澱する物質を遠心分離して取つた。

更に pH 8.8 の沈澱をそのままアルカリ性 (pH=10.8) として完全に澄明としたのち少量の塩酸を加えて pH 7.1 とし遠心分離したとき沈澱は 35 mg, 更に上澄液を pH 5.5 として沈澱物 23 mg を回収した。

各区分の検定結果を Table 3. 及び Fig. 2 に示す。

Table 3. Fractionation of Insulin through pH-Precipitation
 Total Units of Starting Fish Insulin : 7.8 u/(mg)×200(mg)=1560 u

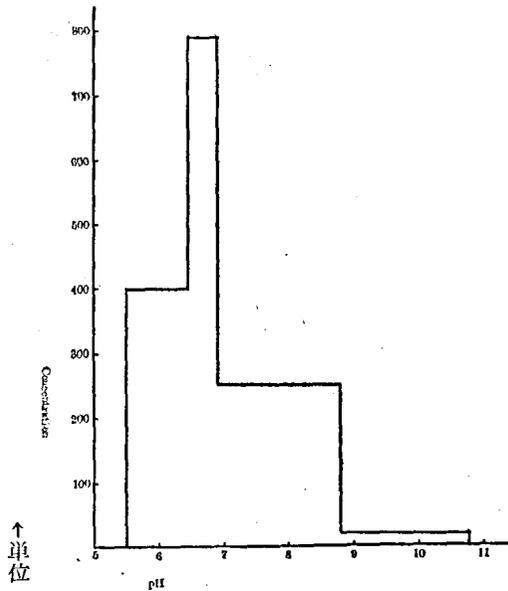
pH	ΔpH*	mg	u/mg and f.l.e * (%)	Total Units	Units (%)	Concentration (units)*
8.8 } 6.9 } 6.4 } 5.5 }	1.9 0.5 0.9	34 26 21	14.1 (95~114) 15.2 (81~127) 17.0 (***)	480 395 357	31 25 23	252 790 400
10.8 } ** } 8.8 } { 10.8 } { ** } { 7.1 } { ** } { 5.5 }	2.0 { 3.7 1.6	35 23	1 (***) —	35 —	2 —	18 —
Total	—	139	—	—	81	—
Unrecovery	—	61	—	—	19	—

* See Table 1.

** The pH 10.8~8.8 fraction was refractionated into two fractions, pH 10.8~7.1 and pH 7.1~5.5.

*** The fiducial limit of error could not be calculated because of $g > 1$.

Fig. 2



実験 3. 牛結晶インシュリン, 鯨結晶インシュリン, カツオインシュリン, マグロインシュリンの塩酸加水分解物の濾紙クロマトグラフィ⁸⁾

a) 試料の調製

各種インシュリンを 6N-塩酸に溶かし, アンプルに移して窒素ガスを封入し閉管後恒温箱中で加熱した. 各の加水分解の条件を Table 4 に示す.

Table 4. Hydrolysis Condition

	units/mg	Weight of Sample(mg)	Volume of 6N-HCl (cc)	Temp. (°C)	Time of Hydrolysis(hr)
Insulin Crystals from Ox	23.6	18	0.9	110	8
Insulin Crystals from Whale	22	6	0.3	110	8
Insulin from Bonito Fish	15.3	35	1.0	120	15
Insulin from Tunny Fish	16	30	1.0	120	18

b) 展開操作

各の加水分解物を水溶上で蒸発乾固し、数回水を加えては蒸発乾固をくり返し塩酸を除去。

東洋濾紙 No. 51 の角形濾紙に試料をつけ上昇法により最初 80% フェノールで展開し、風乾後次に n-ブタノール: 水: 酢酸 (4:5:1) で展開した。

展開濾紙を風乾後 0.2% ニンヒドリン-ブタノール溶液を噴霧し、100° に加熱して呈色させた。

別に 19 種類のアミノ酸を混合して展開し、各インシュリンの加水分解物を少くとも 3 回展開して得られたスポットの種類をアミノ酸単体のスポットを比較考察して各インシュリン中の構造アミノ酸の種類を推定した。

各インシュリン中の構成アミノ酸の種類及びその強さ (大きさ及び呈色濃度) を観察した結果を Table 5 に示す。

Table 5. Amino Acid Composition of Various Insulins

Amino acid	Color of Spot	Insulin Crystals from Ox	Insulin Crystals from Whale	Insulin from Bonito	Insulin from Tuna
Ala	RP	##	+	##	+
Gly	RP	+	+	+	+
Val	RP	##	##	##	##
Leu	RP	##	##	##	##
Ileu	RP	##	##	##	##
Pro	Y	+	+	+	##
Phe	P	+	##	##	##
Tyr	Br	##	##	±	##
Try	RP	-	-	-	-
Ser	RP	+	+	+	+
Thr	RP	+	+	+	+
Cys	RP	+	+	+	##
Met	RP	-	±	-	-
Arg	RP	+	+	+	+
His	BG	+	+	+	+
Lys	RP	+	+	+	+
Asp	RP	+	+	+	+
Glu	RP	##	##	##	+

RP : redish purple,

Y : yellow,

Br : brown,

BG : bluish gray

考 察

1. 牛、鯨及び魚類インシュリンについて第15報の方法により濾紙クロマトグラフィを行いそれらの Rf 値を比較するとき、牛インシュリンは最も高い Rf 値を示し、鯨インシュリンはそれよりやや低い Rf 値を示すが魚類インシュリンは明らかに両者より低い Rf 値を示した。

2. インシュリンを 60% アセトンのアルカリ性溶液とした後 pH を酸性に移行して種々の pH で沈澱する区分

をとつたとき Table 2, Fig. 1 の結果によると pH 7.2~6.9 区分に効力部分が最も多く集り, 又 1mg 当りの単位数は pH 11.0~8.1 区分は極めて低く, pH 8.1~7.2 区分はかなり高く, pH 7.2~6.3 区分は最も高いが pH 7.2~6.9 区分と pH 6.9~6.3 区分は同一程度の単位数と見なしてよい. 又未回収の力価 (37%) はほとんど回収物 Recovery from mother liquor 及びそのときのアセトン上澄液中に存すると思われる, 又 Table 3, Fig. 2 の結果によると pH 6.9~6.4 区分に効力部分が最も多く集り, 又 1mg 当りの単位数は pH 8.8~6.4 区分にかなり高く pH 6.4~5.5 区分で最高を示した. 又 pH 10.8~8.8 区分を再区分して 1mg = 1u で極めて単位が低いことは, この沈澱操作をくり返すことによりかなりアルカリ性夾雑蛋白を除去できると思われる.

3) 牛, 鯨インシュリンの結晶とカツオ, マグロ 無晶インシュリンについてそれらの加水分解物について浮紙クロマトグラフィを行つて比較実験をして, その中に含まれるアミノ酸の種類を想定した結果, 鯨インシュリン結晶中にメチオニンと思われる附近にスポットを発見し, * カツオインシュリン中にはチロジンのスポットが比較的うすく出た.

文 献

- 1) Abel, J. J., Geiling, E. M. K. : J. Pharm. Exp. Therap., 25, 423 (1925)
- 2) Jensen, H. Wintersteiner, O. and Geiling, E. M. K. : J. Pharm. Exp. Therap. 36, 116 (1929)
- 3) 長沢佳熊外 : インシュリンの薬化学的研究 第14報 : 本誌, 74, 171 (昭31)
- 4) 長沢佳熊, 近藤政次郎 : 薬誌, 62, 287 (昭和17)
- 5) 長沢佳熊, 西崎笹夫 : 本誌, 74, 175 (昭31)
- 6) Robinson, F. A. et al. : Biochem. J., 51, 298 (1952)
- 7) 長沢佳熊外 : 本誌, 72, 11 (昭和29)
- 8) Lederer, E. and Lederer, M. : Chromatography, Elsevier Publ. Co. 1954, p.74, p.197

Summary

1. Developing ox insulin, whale insulin and fish insulin by *n*-butanol-acetic acid-water through the paper chromatography, the R_f value of ox insulin was a little larger than that of whale insulin, while that of fish insulin, distinctly the smallest.

2. From the acetone-water solution of the crude fish insulin, several fractions were obtained through precipitating in various pH and biologically assayed by the mouse convulsion method. As a result, pH 6.5~7.2 precipitating fraction had the most activity, showing in Fig. 1 and Fig. 2.

3. The amino acid composition of insulin from whale, * bonito fish and tunny fish was preliminarily reported; the result was shown in Table 5, from which, methionine might be present in whale insulin crystals by paper chromatography and the existence of tyrosine in bonito fish insulin was doubtful.

Received February 29, 1956

* F. Sanger 博士から長沢宛での私信 (1956年6月5日附) によれば, 同博士の希望で著者等が送付した鯨インシュリン結晶は豚のものとそのアミノ酸組成と配列が同じ (グリシル鎖の 8~10 位置が Thr. Ser. Ileu) らしいという.

* According to Dr. F. Sanger's private communication (dated June 5th, 1956) in which he wrote on his study on whale insulin crystals sent from our laboratory, it appeared that the whale insulin had the same structure as the pig, namely three amino acids in position 8~10 in the glycol chain were Thr. Ser. Ileu.

卵胞ホルモンの研究 (第11報) * ナガス鯨卵巣中に含まれる

卵胞ホルモンについて

長沢 佳熊, 越村 栄之助, 岡崎 精一

Studies on Follicular Hormones. XI.

Quantitative Analysis of Follicular Hormones in Fin Whale's Ovary.

Kakuma NAGASAWA, Einosuke KOSHIMURA and Seiichi OKAZAKI

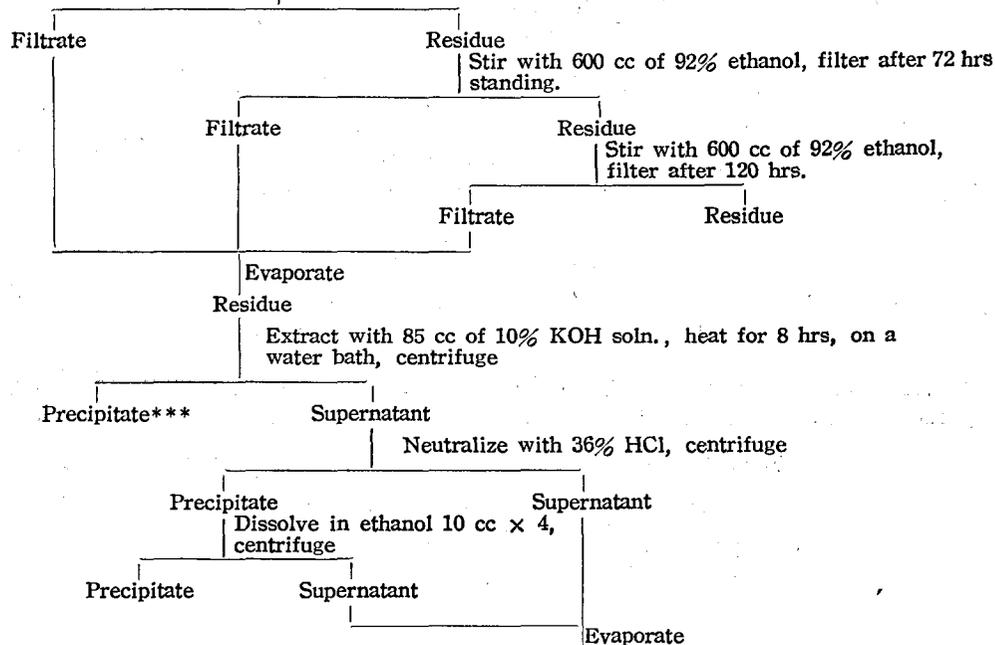
鯨卵巣中に含まれる卵胞ホルモンについては1941年 Jacobsen¹⁾ がシロナガス鯨の卵胞液にアルコール等容量を加えて抽出して Allen-Doisy 法により検定し, その11中1400国際単位を含むと報告した。

著者等はナガス鯨の卵巣をアルコールで抽出しこれを水化し, 脂肪分を除き更にベンゼンで抽出し, N/2水酸化ナトリウム溶液に卵胞ホルモンを移行させ, これをエーテルで抽出して得たエキス状物質(実験1)について第7報²⁾ で記したラットの子宮重量増加法で発情作用を確認したので, これについて第6報³⁾ で報告した。薄紙クロマトグラフィを利用して定性及び定量を行つたところ, エストロン及びエストラジオールに相当する Rf 値を有する呈色像**を確認した。

実験の部

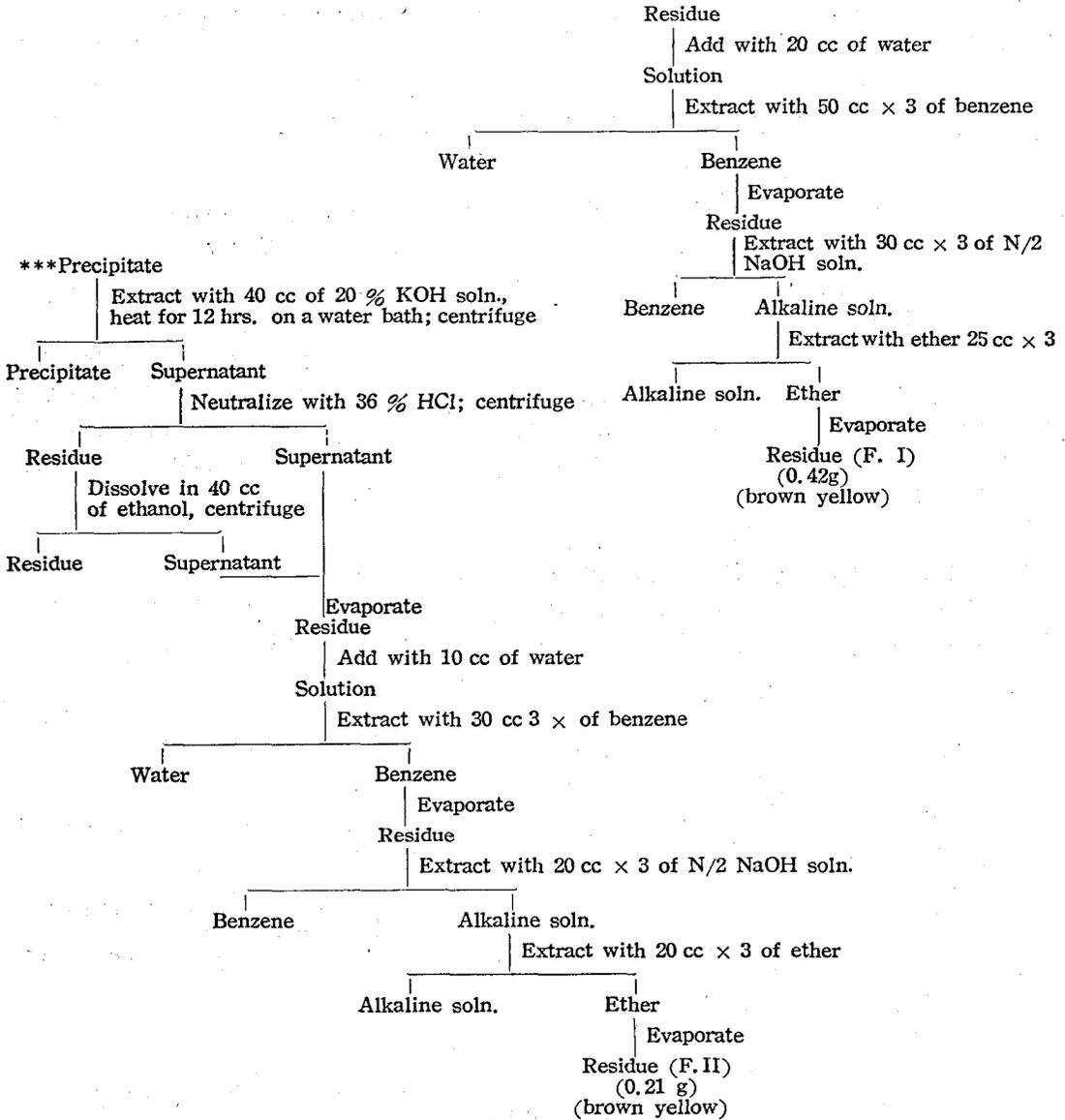
実験1 昭和30年9月16日, 北氷洋で捕獲したナガス鯨(体長66フィート)の卵巣(旧黄体8個を認めた)を直ちに冷凍し, そのままの状態で実験室に運んだ(10月7日)。冷凍を解いた後検体の中央部530gをとり細断した後 Waring Blender で完全にカユ状物とする。以下 Table 1 に示す方法で抽出した。

Table I
Homogenize fin whale's ovary : 530 g
Stir with 1200 cc of 92% ethanol, filter after 72 hrs.



* 第10報は長沢佳熊, 越村栄之助, 岡崎精一, 衛試報 73, 21 (1955)

** 但し本法ではエクイリン, エクイレニンの Rf 値はエストロンと同一であるからエストロンとして計算される。又, エストラジオール17aの Rf 値はエストラジオール 17β と等しいためこの種の化合物を含めてエストラジオールとして計算される。



実験2 残留物F.I, F.IIをそれぞれ3.0 ccのプロピレングリコールに溶かし、体重40g前後の幼若白鼠に1日2回3日間0.1ccずつ皮下に注射して4日目に子宮重量を秤ると著明な増大を示し卵胞ホルモン作用を認める。

Table 2. Uterine Weight Increasing in Rat by Whale's Ovary Extract

Sample No.	Body Weight. (g)	Uterine Weight (mg)
F. I	39.0	105.0
//	37.0	123.0
//	34.8	65.0
F. II	36.0	92.5
//	34.0	98.9
//	43.0	138.2
Control	41.5	41.4
//	38.5	44.4
//	35.5	45.0

実験3, アルミナ処理をした東洋沱紙 No. 50 (2×40cm) に動物試験に使用した検体及びエストロン, エストラジオール標準品をベンゼン (10%水酸化ナトリウム液飽和) で6時間恒温室(22°C)で展開しヨウ素試薬を噴霧してその呈色像を調べた。検体F.Iではエストロン, エストラジオールに相当する位置にそれぞれ呈色像を認め, F.IIではエストラジオールに相当する所だけに呈色像を認めたが含有量が僅少で面積が小さいため, 面積法による定量が困難なので消滅限界法⁵⁾を利用して検体中のエストロン, エストラジオールと思われるものの含量を算定した。(Table 3)

Table 3. Sensitivity of Estrone and Estradiol in Whale's Ovary
Extract by Paper Chromatography

Sample No.	Amount (cc)	Estrone	Estradiol
F. I	0.040	⊕	⊕
	0.020	+	⊕
	0.010	-	+
	0.005	-	-
F. II	0.080	-	⊕
	0.040	-	+
	0.020	-	-

+, ⊕.....Positive, -.....Negative

同時に行つたエストロン標準品の確認限度は2.5r, エストラジオール標準品は1.25rを示し, 卵巣1g中に含まれる発情物質はエストロンに相当するものは0.708r (F.Iのみに含まれる) エストラジオールに相当するものは0.708(F.I)+0.161(F.II)=0.869rである。

結 論

北氷洋で捕獲したナガス鯨の卵巣をアルコールで抽出したエキスについて卵胞ホルモン作用(白鼠の子宮重量の増加)を確認し, これについて沱紙クロマトグラフィを行い, エストロン及びエストラジオールに相当すると思われる発情物質を定量した結果卵巣1g中にエストロン0.708r, エストラジオール0.869rであつた。

終りに検体の入手その他御助力を戴いた鯨類研究所藤野和男氏に感謝する。

文 献

- 1) Jacobsen, A. P.: HVALRADETS SKRIFTER, Scientific Result of Marine Biological Research. Nr. 24, p. 68~70 (1941)
- 2) Koshimura, E. and Okazaki, S.: Pharm. Bull. 2, 65 (1954)
越村栄之助, 岡崎精一: 本誌 72, 41 (1954)
- 3) 長沢佳熊, 越村栄之助, 岡崎精一, 黒馬敏子: 本誌, 72, 45 (1954)
- 4) 北条進: 医学と生物学, 17, 85 (1950)
- 5) 武田スミ, 柴谷篤弘: 科学, 21, 136 (1951)

Summary

As the ethanol extract of the fin whale's ovary showed a uterine weight increasing effect, estrone and estradiol in the extract were determined by a paper chromatographic analysis reported previously, by which 0.708r of estrone (including equilenin, equilin etc.) and 0.869r of estradiol-17 β (including estradiol-17 α etc.) per gram of the ovary, respectively, were found.

Received February 29, 1956

銀錫アマルガムの硬化膨縮について (第2報)

充填方法の変化による銀錫アマルガムの物理的性質の影響について

藤井正道, 堀部隆

Studies on Dimensional Change of Dental Amalgam Alloy. II.

Effect of Variation in Packing Method on Physical Property of Dental Amalgam Alloy.

Masamichi FUJII and Takashi HORIBE

まえがき 銀錫アマルガム合金は歯科治療上使用操作が簡易で、且つ歯牙に充填後は長期に耐えるために歯科補綴材料として、古くから使用されているものである。充填材料としては窩洞に良く適合することが必要であり、銀アマルガムに於ては硬化後の容積変化(膨脹収縮 Dimensional Change)が問題となるものであつて、米国¹⁾ 歯科医師会規格に於ては直径約6mm 長さ約10mmの試験片の長さが試験片作製後24時間後に於て、3~13 μ 日本²⁾ 歯科材料規格に於ては1~13 μ 膨脹をすることが規定されている。

著者等は本誌第72号に於て第1報として、銀錫アマルガムの硬化膨縮測定には空気マイクロメーターが適当である事を報告したが、その後市販銀錫アマルガム合金の硬化膨縮及びその他の物理的性質に於て試験した結果を報告する。銀錫アマルガムの硬化膨脹は練和及び充填方法如何により変化するが、Ward and Scott³⁾ は充填圧による影響についてのみ報告している。

著者等は普通手による充填以外に充填器械 Pneumatic Condenser を使用して機械的充填を行った場合、及び充填時の充填圧を種々変化した場合の硬化膨縮、加圧変形、破砕抗力も測定した。

実験の部

(1) 実験試料 本実験に使用した市販歯科用銀錫アマルガム合金は国内 A. B. C. D. E. F. 社製品、米国 S. S. White, 20th Century 社製品及び独国 Bayer 社製品でその組成は第1表の如きものである。

Table 1 Chemical Composition of Dental Amalgam Alloys

Sample	Ag (%)	Sn (%)	Cu (%)	Zn etc. (%)
A	69.02	27.12	3.80	0.07
B	68.88	27.14	3.52	0.46
C	68.72	25.75	4.85	0.88
D	69.09	26.74	3.42	0.75
E	68.29	28.11	3.37	0.23
S. S. White True Dentalloy	69.99	26.61	2.59	0.81
20th Century	69.59	26.41	3.26	0.79
Bayer	64.51	31.57	2.81	0.91

又水銀は再蒸溜し、日本薬局方及び米国歯科医師会規格に適合するものを使用した。

(2) 実験装置 硬化膨縮測定: 低圧空気マイクロメーター、東京測範K. K., 破砕抗力測定: アムスラア形抗張力試験機 2ton 島津製、加圧変形測定: 著者の考案せる加圧変形測定装置

(3) 試験片作製法

(1) 練和法 製造者の指示あるものは指示に従い、指示のないものは試料及び水銀を1:1.6の比率で天秤にて秤取し、アマルガム練和用ガラス製乳鉢に入れ、毎分120~180回の割合で乳棒をペンホルダー状で練和圧約2ポンドにて(1kg)2分間練和したのち、汗水分の混入する影響をさけるため、掌上で練和せずゴム膜中に移し1分間軽く Mulling を行った後5枚重ねたガーゼを使用して、30秒間に過剰の水銀を手で搾り、出来たアマルガムを Fig. 1 に示す鉄製割型の中に充填した。

(2) 充填法

(イ) 手圧による方法

アマルガム塊を数個に分け、順次に器頭の直径 2mm のアマルガム充填器を用い、2 ポンドの圧で手で充填を可及的に均一に行う。

(ロ) プレス器械による充填法

アマルガム塊を金型中に移した後、プレス器械を持って充填を行う。3 分間に充填圧は 200, 300, 500, 1000, 2500, 3750, 6500 lb/□" につき夫々行つた。操作中割型より溢出する過剰の水銀は除去した。

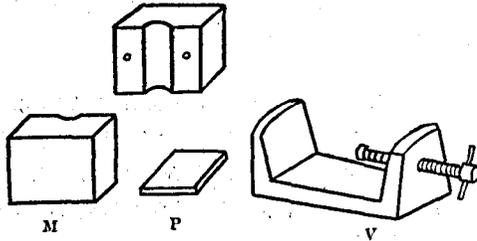


Fig. 1 Mould and Vice

- M: Iron Mould
- P: Metal Plate
- V: Vice

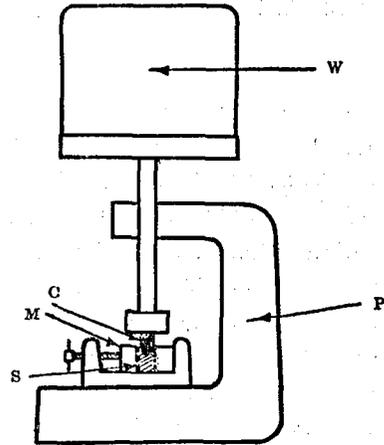


Fig. 2 Amalgam Press

- W: Load
- P: Amalgam Press
- C: Iron
- S: Amalgam Specimen
- M: Mould

(ハ) 機械的充填法

写真1に示す如き Julius Aderer 社製 Hollenback 考案の Angle Pneumatic condenser の先端に直径 3mm の小ハンマーをつけ、毎分 300 行程の速度で軽くホルダーを握り、(充填圧 500-700g) アマルガム塊を少量宛順次に充填する。この操作中溢する過剰の水銀は取り除いた。

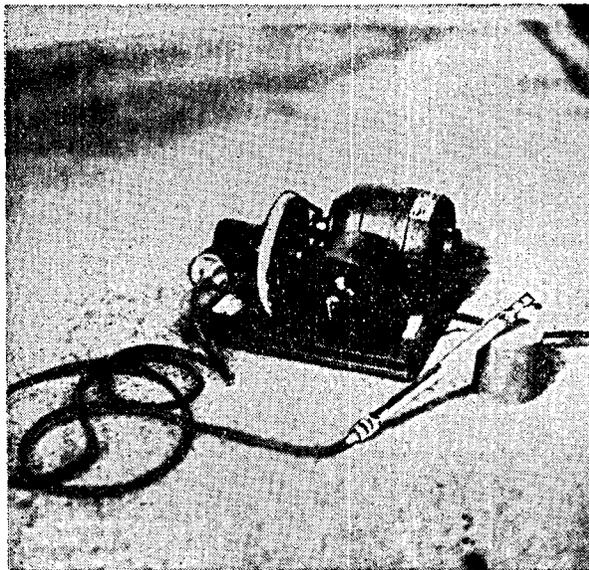


Photo. 1 Pneumatic Condenser

実験方法及び実験結果

(1) 試料7種を(1)の操作により練和し手圧による充填法により, 充填して各々硬化膨縮. 加圧変形, 破碎抗力を測定した結果は次の通りである.

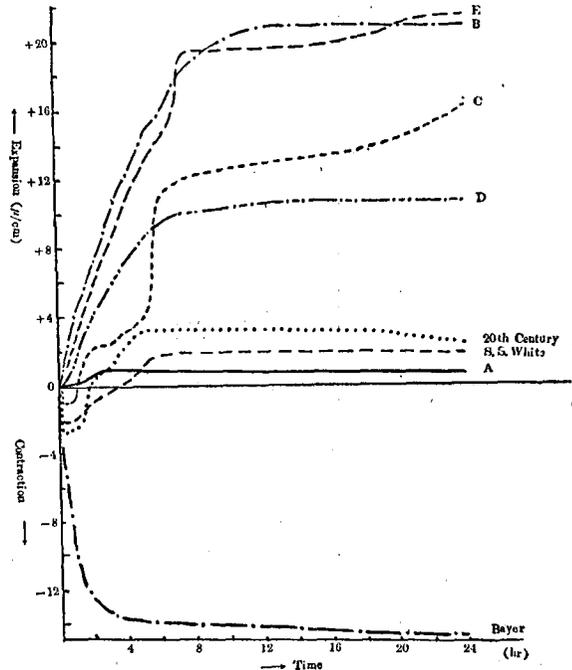


Fig. 3 Dimensional Change of Dental Amalgam Alloys

Table 2 Physical Properties of Dental Amalgam Alloys.

Sample	Powder : mercury	Dimensional Change after truturation (μ/cm)				flow (%)	Crushing Strength (kg/cm^2)
		1 hr	1 Day	2 Days	4 Days		
A	1 : 1.6	+ 0.5	+ 0.7	3.02	—	2.06	3 150
B	1 : 1.6	+ 2.6	+20.6	20.5	—	2.10	2 568
C	1 : 1.6	+ 0.6	+ 4.62	—	+ 5.76	2.54	2 530
D	1 : 1.6	+ 1.35	+10.6	—	+11.96	1.20	3 825
E	1 : 1.6	+ 4.1	+20.6	+22.3	—	—	2 524
S. S. White	1 : 1.6	- 1.7	+ 1.8	—	—	1.30	2 794
20th Century	1 : 1.6	- 2.8	+ 2.6	+ 2.3	—	—	3 040
Bayer	1 : 1.0	-10.0	-14.5	-14.5	-15.77	—	2 584

上の結果によれば 国産 A-E, 米国製品 2種及び 独国製品 1種は加圧変形及び 破碎抗力が 基準に適合している。硬化膨脹に於ては1日後独 Bayer の収縮 14 μ/cm を除いて他は膨脹を示している。初期収縮を示した後膨脹を示すものは, A, C, S.S. White, 20th Century で初期収縮をせず, 膨脹を示したものは E. B. D. で大なる初期収縮をした後, 4時間後徐々に収縮を示したものは Bayer であった。一般に硬化による容積変化はほぼ 4~10時間で完了し, その後の変化は極く僅かであることが判つた。

(2) 次に試料Aを(1)の操作により練和し, 水銀を搾らずにプレス器械で夫々 300, 500, 1000, 2500, 3750, 6250 lb/□ の充填圧で充填し. なほ参考として手圧により充填したもの及び型に流し込み充填圧を加えぬものを附した。硬化膨脹破碎抗力を測定した結果は Fig. 4. Tale 3 の如くである。

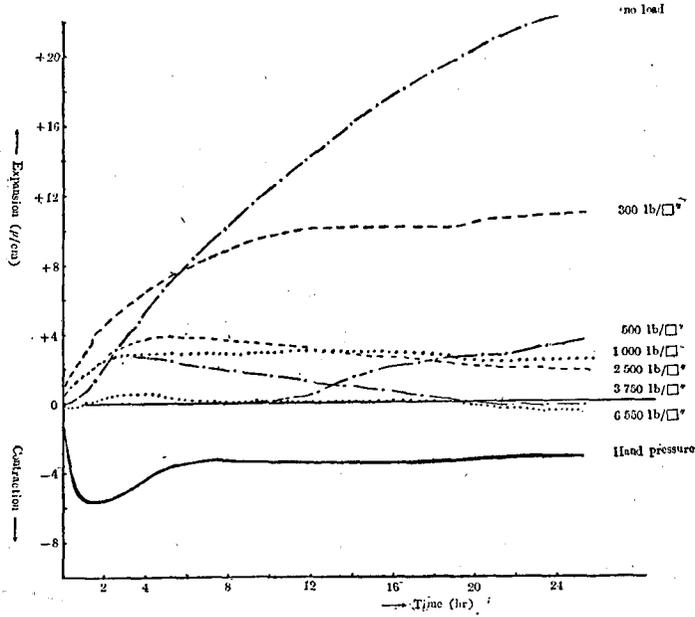


Fig. 4 Effect of variation in packing pressure on dimensional change

以上の結果によれば充填圧の加えぬ試験片が最大の膨脹を示し（1日後+22 μ /cm）充填圧の大ききに従つて順次膨脹が少く，最大の6250 lb/□'に於ては収縮し-0.3 μ /cmを示している。又手圧により充填せるものは収縮（-3.2 μ /cm）を示している。

(3) 試料 A. B. C. 3種を(1)の操作により練和した後ガーゼ中で水銀を搾り，金型中に Pneumatic Condenser を使用して 300. R. P. M の行程で4分間充填を行つた。数個に分け前の小塊の表面に水銀が湧出する迄充填を行い，次の小塊を加え充填し各小塊の充填の境界に於ける不接合を起さぬ様に注意した。充填操作終了後硬化膨脹を測定した結果は Fig. 5. 6. 7. Table 3 に示す如くである。

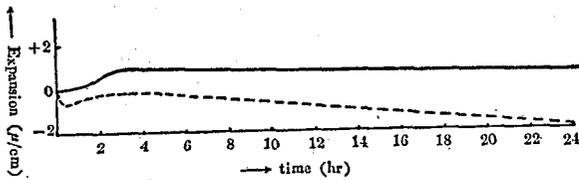


Fig. 5 Effect of variation in packing method on dimensional change :

- : Sample A amalgam condensed with Hand Pressure. Packed under 1 lb trust with 2mm smooth circular condenser.
- : condensed with Pneumatic Condenser. Packed under 1 lb.

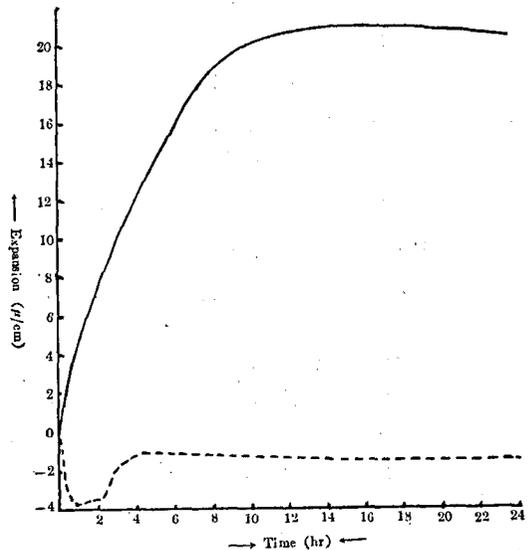


Fig. 6 Effect of variation in packing method on dimensional change :

- : B amalgam condensed with hand pressure.
- : condensed with pneumatic condenser

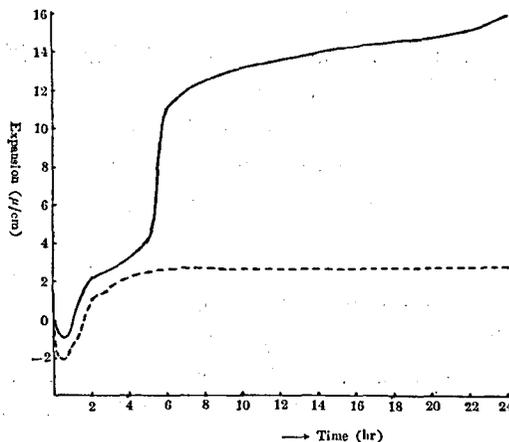


Fig. 7 Effect of variation in packing method on dimensional change :

- - : C Amalgam condensed with hand pressure
 ... : condensed with pneumatic condenser.

Table 3 Effect of variation in packing method on physical properties of dental amalgam alloys.

Sample	Packing method	Dimensional change I day (μ/cm)		Flow (%)		Crushing Strength (kg/cm)		
		Hand pressure	Mechanical Condenser	Hand pressure	Mechanical Condenser	Hand pressure	Amalgam press (1000 lb/□" pressure)	Mechanical Condenser
A		+ 0.7	-1.9	2.06	2.02	3 150	2 570	3 520
B		+20.6	-1.5	2.10	2.01	2 568	2 550	2 820
C		+15.9	-2.8	2.54	2.20	2 530	2 400	2 740

上の結果によれば A. B. のいずれも手圧による場合膨脹を示すに反し、初期収縮の後練和開始後1時間後僅か膨脹し、その後漸次収縮している。又Cもあまり膨脹せず1日後 +2.3μ/cmに終っているが、それに反し加圧変形及び破碎抗力は Table 3 に示す如く他の充填法に比べて優り機械的性質の良好となる事を示している。

考察 銀錫アマルガムの硬化理論は次の通りであると云われる。練和によりアマルガム粉末の主体 (Ag₈Sn) は、水銀に溶解する事により初期収縮が起る。r₁ (Ag₂Hg₈) は始め結晶し少し遅れて r₂ (6方晶系 Ag₇Hg) が速かに樹枝上に生長する。結晶の生長は反応に必要な水銀量の少い時 r₂ の生成は少くなる。この結晶の生長により膨脹が起り、結晶生長が完了する迄続く (これは数時間と云われる) その後 β₁ が生成し収縮を起すがこれは僅かである。Fig. 3. Table 2 に示す如く試料により膨脹の差異のあるのは、化学組成、銀錫の含有量即ち Ag₈Sn 及び β 相あるいは Sn 相の存在の量と共に粉末の表面積の大小により水銀への溶解、再結晶の時間の遅速、反応量の多少により異なるものと思われる。

一般に結晶生長による容積変化は4~10時間で完了し、その後 β₁ の生成により極く僅か収縮を示す。Fig 4 に示す如く充填圧により膨脹の変化が表われるのは、試験片に充填圧を加えぬ時は硬化の際、過剰な水銀が存在し Ag₈Sn 粒子に反応して r₁ r₂ が特に r₂ が多量に生成した結果大なる膨脹を示すのである。充填圧が大となるに従つて水銀が搾り出され、その為 r₁+r₂ の生成が減じ膨脹量が小となる様である。

Fig. 5. 6. 7. 及び Table 3 に示す如く機械的充填法により、試験片の硬化膨縮が手圧によるものより、可成少く A. B は 零に近い僅かの収縮、Cは僅かな膨脹を示した。これは予め過剰な水銀を搾り除かれ、且つ衝撃的な充填のため反応すべき水銀の一部は溢出し、その為 r₁+r₂ の生成が不十分で結果として収縮を起したものと考えられる。又加圧変形の成績の良いのは、水銀が少いため硬化が速かに起り、加圧変形を Set する練和開始後3時間に完全に結晶生長が終了したためであろう。

破碎抗力の強いのは衝撃的な充填のため試験片が緻密に充填され、且つ r₁+r₂ の樹枝上結晶生長の長さが短いためと思われる。

総 括

充填方法を変化して市販銀錫アマルガムの硬化膨脹を空気マイクロメーターにより測定した。破碎抗力・加圧変形も併せて測定した。

- (1) 手圧により充填した結果は Fig. 3., Table 2 の如くである。
- (2) 充填圧を変化して充填した結果は Fig. 4 の如くである。
- (3) Pneumatic Condenser により機械的に充填した結果は Fig. 5. 6. 7. Table 3 の如くである。

文 献

- 1) American Dental Association No. 1 Dental Amalgam Alloys : J. A. D. A., 658 (April) (1934).
- 2) 日本歯科材料協会規格 第1号
- 3) Ward, M. L. and Scott, E. O., : J. A. D. A., 19, 1683-1705(1932).
- 4) Ryge, G., Moffett, J. C., and Barkow, A. G., : J. Dent. Res., 32, 152-169 (1953).
- 5) Gayler, M. L. V., : J. Inst. Metals. 60, 407-419 (1937).
- 6) Trioiano. A. R., : J. Inst. Metals, 63, 247-259 (1938).
- 7) Gray. A. W., J. Inst. Metals, 92, 139-189 (1923).

summary

We investigate the effects of variation in condensation method on dimensional change, flow and crushing strength with air micrometer and the others in commercial dental amalgam alloys.

- (1) The results of the condensation by the hand pressure show in Fig. 3. and Table 2.
- (2) The results of variation in condensation pressure show in Fig. 4.
- (3) The results of the condensation by mechanical procedure, pneumatic condenser (designed Dr. Hollenback) show in Fig. 5 to 7, and Table 3.

Received February 29, 1956

歯科用珪酸セメントの透明度測定について

藤井 正道, 堀部 隆

Study on the Opacity of the Dental Silicate Cement

Masamichi FUJII and Takashi HORIBE

まえがき 充填材料としての珪酸セメントは色沢, 透明度が天然歯にこく似し, 且練和充填等の使用上の操作が簡易であり充填後は可成長期に耐え得る等の利点を有し, 殊に術者が患者の歯牙の色沢に応じて之に適応した色沢のものを充填出来るために, 前歯窩洞の充填材料として使用されている。

珪酸セメントの組成¹⁾²⁾については, Crowell³⁾は珪酸(SiO₂) アルミナ(Al₂O₃)及び溶剤を加熱溶融し, 出来た固塊を粉末としたもので, 溶剤は一般に珪酸ベリリウム, 螢石, 珪酸カルシウム, 硼酸カルシウム, ソーダ石灰ガラスを使うが, 之等は珪酸セメントの透明度を減ずる要素と成る。又液²⁾は正磷酸及び少量のアルミニウム, 亜鉛, マグネシウムの磷酸塩より成ると云われる。

之等粉末及び液を一定比率に採り, 練和し充填した充填物は口腔内で機械的, 化学的並びに生理的に安定であること, 又天然歯と色沢及び透明度がこく似している事が必要で, その為に American Dental Association Specification No.9 Dental Silicate Cement は粉末及び液を練和したもののひ薄度, 砒素含有量, 水溶性, 破碎抗力及び Opacity*(透明度)が規定している。

American Dental Association Specification に規定されている Opacity の測定法⁴⁾は試験片及び標準 Opal Glass 2枚(C_{0.35}及びC_{0.50})を水でぬらした後, MgO の反射率70%の白壁及び黒色の板上にのせて Opacity が2枚の標準片の間にあるか否かを肉眼的に観察するのである。それ故測定方法は非常に簡便であるが正確な方法とは考えられない。その理由としては, (1)米国規格に於ける測定方法は肉眼的観察によるものである故, 実験者による個人差はまぬかれ難い。特に試料の Opacity が何れか一方の標準 Opal Glass に近似する時, 規格の内か外かは判定出来にくい。(2)試験片の厚みの許容誤差は0.025mmとなつてはいるが, 許容誤差による透明度の差は我々の実験によれば4%に及び其の為判定の過ちを生ずる事が考えられ, 個人差を伴わない定量的な値(透明度)*を測定する事が必要である。

又 J I S⁵⁾及日本歯科材料協会規格⁶⁾は Opacity は規格されていない。よつて著者等は歯科用珪酸セメントの Opacity*測定器械を試作して市販製品及 American Dental Association Specification の Opal Glass を測定した結果, 満足すべき成績を得たので報告する。

理論の部

(1) MgO を蒸着せる標準白色板の白色度を100%とし, 白板に45°の角度より入射光度Iなる光を投射すれば, 一部は標準白色板面上に立てた垂線に対して, 入射角と相等しい角度の正反射光が出る外は, 面上に拡散反射となつて乱反射を行う。白板面の垂線の方向に受光部を設け, 拡散反射光の強度を測定する。今標準白色板の拡散反射率をβとすれば, 受光部にはIβなる光度が得られ, 此の値を100%とし, 次に黒色面上にて同様の測定を行い, 此の時の反射光を0%とする。

(2) 試料を Fig.2 の如く挿入し(1)と同じ操作を行う。標準黒体の時一部は試料を通過し黒体にて完全吸収が行われ, 一部は面上で拡散反射率αによりIαなる拡散反射を行う。此の時の受光部の読みをBとすれば

$$B = I\alpha \dots \dots \dots (1)$$

次に同試料を同一条件のまま黒の標準体を白板に換える。其の時光の一部は前と同様正反射となり, 一部はIαなる拡散光を生じ, 一部は投射光Iが透明度Tなる試料を通過し, 標準白板の表面に達し, そこでITなる光に対し, βなる拡散反射率による拡散反射が行われ, 再び透明度Tなる試料を通つてIT²βなる光が受光部に達する。従つて受光部の読みをWとすれば

$$W = I\alpha + IT^2\beta \dots \dots \dots (2)$$

* cf. Opacity (不透明度) % = 100 - Degree of Translucence (透明度) %

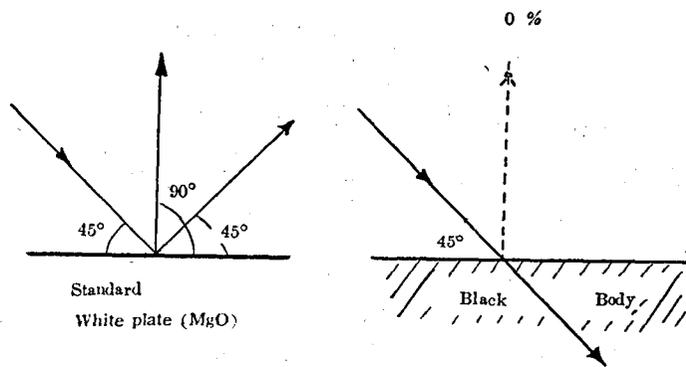


Fig. 1 principle of translucence (I)

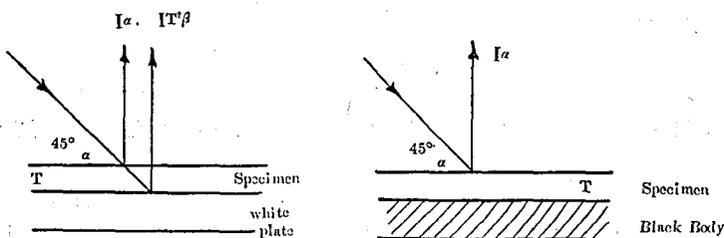


Fig. 2 Principle of translucence (II)

(2)-(1)より

$$W - B = IT^2\beta$$

今 $I = \text{Const}$, $\beta = \text{Const}$, 故 $I\beta = \text{Const} = K$ と置くと透明度を100%にて表せば, $K = 100\%$

$$W - B = K T^2 \quad T^2 = \frac{W - B}{K} = \frac{W - B}{100}$$

$$T = \sqrt{\frac{W - B}{100}} = \frac{1}{10} \sqrt{W - B} \quad T(\%) = \left(\frac{1}{10} \sqrt{W - B} \right) \times 100 \quad T(\%) = 10 \sqrt{W - B}$$

従つて透明度 T は標準白板上の試料の拡散反射光の強度 (W) と黒体上の試料の拡散反射光の強度 (B) の差の平方根より計算して求め得る。

実験の部

(1) 実験材料

実験に使用した材料は国産 G 社の歯科用珪酸セメントの13種で、番号及び色は次表の通りである。

Table 1 Sample Number and its Colour

Sample No.	Colour	Sample No.	Colour
1	White	8	Grey
2	Layte	9	Bluish Light Grey
3	Light yellow	10	Greenish Grey
4	Yellow	11	Dark Grey
5	Dark yellow	12	Yellowish Dark Grey
6	Yellowish Light Grey	13	Greyish Brown
7	Light Grey	14	Pink

(2) 器具

本測定に使用した透明度試験器の構造は Fig. 3 に示すものである。又本試験器に使用せる光源及光電管は夫々タングステン電球, Ag-Cs 光電管でその感度は Fig. 4 に示す。

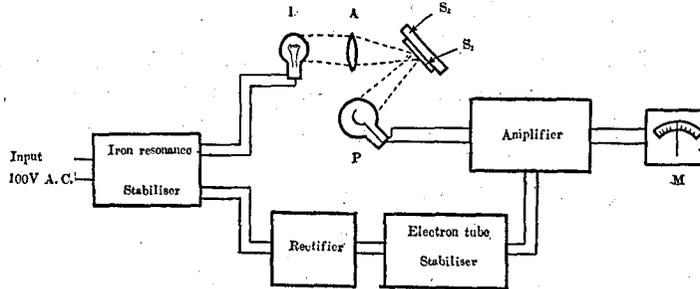


Fig. 3 Circuits for Apparatus

- I : Lamp (Light Source)
- A : Lens
- S₁ : Specimen
- S₂ : Standard Plate (white or black)
- P : Photo tube (Ag-Cs)
- M : Meter

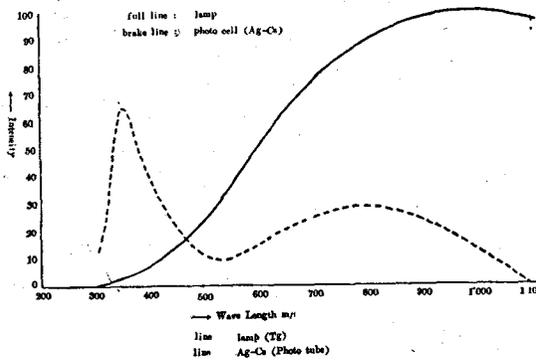


Fig. 4 Lamp & Ag-Cs photo tube's wave-length-intensity Curve

- : Lamp
- - - : Photo Cell (Ag-Cs)

(3) 試験片の作製

米国歯科医師会規格 (American Dental Association Specification No. 9) 珪酸セメント F に定める所より標

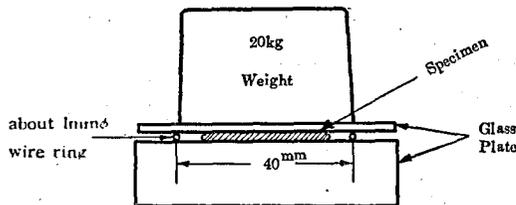


Fig. 5 Apparatus for make to transluence specimen

準稠度になる如く粉末及び液を採り、練和したセメント泥を練和終了後直ちに右図の如く平面硝子板の上に、径 0.99mm の不銹鋼線で作った直径約 40mm の円環を置き、その中に入れ上より硝子板で蓋をし、更に 20kg の重錘をのせた。練和開始 3 分後に重錘を除き、直ちに 37°100% 相対湿度中に入れ 57 分間保持した後 37° の水中に移し、練和開始 24 時間経過後水中より取り出し、透明度試験器によつて透明度を測定した。

中より取り出し、透明度試験器によつて透明度を測定した。

(4) 透明度測定方法

標準体を黒及び白色板 (MgO) に切換え、夫々メータの指針を 0 及び 100% に調整する。標準体の下部へ試料を挿入し、標準体を黒に切換える。その時のメータの読みを B とする。次に標準体を白色板に切換え、その時の読みを W とする。W 及び B より計算を行い透明度 T% を求める。此の測定を 5 回繰返しその平均値を以つて透明度とした。

試験片の厚さが 1mm より誤差があるとすれば、透明度も増加又は減少する事は当然で 1mm 前後 1 ± 0.025 mm の範囲では、透明度は厚さに逆比例すると考えても差支えない。厚さを dmm とすれば補正せる透明度 T (%) は実験的に $T(\%) = T' + 20(d-1.0)$ で与えられる。(T': 厚さ dmm の時の透明度)

実験方法及び結果

Ⅰ American Dental Association Specification No.9 所定の標準 Opal Glass 2 枚の透明度を測定した結果は次の通りである。

Table 2 The degree of translucence of the Standard Opal Glass

	W	B	$\sqrt{W-B}$	Degree of Translucence T (%)
Standard Opal Glass (thin plate)	79.2	31.2	$\sqrt{48.0}$	69.28
Standard Opal Glass (thick plate)	78.8	36.8	$\sqrt{42.0}$	64.81

Ⅱ Table 1 に示す歯科用珪酸セメントの No. 1 から No.14 (No. 8 なし) 13 種を標準稠度で練和した試験片 (厚さ 1mm 直径 30mm) につき透明度測定を行つた結果は次の通りである。

Table 3 The degree of translucence of the Silicate Cement

Sample No.	Shade	liquid : Powder (cc) (g)	W	B	$\sqrt{W-B}$	T' (%)	thickness (mm)	degree of translucence $T = T' + 20(d-1.0)$
1	White	0.4 : 1.43	77.5	36.3	$\sqrt{41.2}$	64.2	1.00	64.2
2	Layte	0.4 : 1.43	76.0	37.5	$\sqrt{38.5}$	62.0	1.195	65.9
3	Light yellow	0.4 : 1.3	73.7	35.0	$\sqrt{38.7}$	62.2	1.05	63.2
4	yellow	0.4 : 1.43	79.0	36.0	$\sqrt{43}$	65.6	1.01	65.8
5	Dark yellow	0.4 : 1.43	77.8	36.2	$\sqrt{41.7}$	64.6	1.025	65.1
6	Yellowish Light Grey	0.4 : 1.43	68.0	36.0	$\sqrt{32}$	56.6	1.045	57.5
7	Light Grey	0.4 : 1.43	56.0	28.0	$\sqrt{28}$	52.9	1.02	53.3
9	Bluish Grey	0.4 : 1.43	55.0	27.8	$\sqrt{27.2}$	52.1	1.00	52.1
10	Greenish Grey	0.4 : 1.43	55.0	29.0	$\sqrt{26}$	51.0	1.02	51.4
11	Dark Grey	0.4 : 1.43	34.0	19.0	$\sqrt{15}$	38.7	0.995	38.6
12	Yellowish Dark Grey	0.4 : 1.43	30.5	18.5	$\sqrt{12}$	34.7	1.025	35.2
13	Greyish Brown	0.4 : 1.43	29.0	17.8	$\sqrt{11.2}$	33.5	1.01	33.7
14	Pink	0.4 : 1.43	76.0	36.0	$\sqrt{40}$	63.2	1.02	63.4

上の結果によれば No. 1 から No. 5 迄は標準 Opal Glass の透明度の範囲に入るが、No. 6 から No.14 迄は透明度が少いため規格の範囲に入らない。

Ⅲ 米国歯科医師会規格 F-1 項目に準じて明色 6 種 No. 1 から No. 6 迄の、粉末を各 1.5g 宛広口瓶中に採り、2 時間振温器にかけ充分混合し、液は各々 0.5cc 宛試薬瓶に採り攪拌した。

No. 1 から No. 6 迄の混合液及び粉末を下記の如き液: 粉末を採り練和し, 透明度測定用 (厚さ 1mm 直径 30mm) に作製し測定を行った。

Table 4 The degree of translucence of the Silicate Cement Mixture (No. 1~No. 6)

Sample	liquid:Powder	W	B	$\sqrt{W-B}$	T'	thickness	Degree of Translucence $T = T' + 20(d-1.0)$
The Lightest Shade No. 1 to No. 6 Mixture	(cc) (g) 0.4 : 1.43	76.0	34.2	$\sqrt{41.8}$	64.7	(mm) 1.025	(%) 65.2
"	0.4 : 1.40	77.0	34.5	$\sqrt{42.5}$	65.2	1.005	65.3
"	0.4 : 1.35	77.0	34	$\sqrt{43}$	65.6	1.005	65.7

上の結果によれば American Dental Association の規格に準じて行つた珪酸セメントの Opacity は 2 枚の標準 Opal Glass 間にあり, 明かに適合している事が判る。

Ⅳ 珪酸セメントの厚みの変化による透明度の変化を観察するため, No. 2 (明色) No. 9 (中間色) No. 11 (暗色) の各試料につき 0.8 1.0 1.2mm と厚みを変化させ, 各透明度の測定結果は次図に示す。

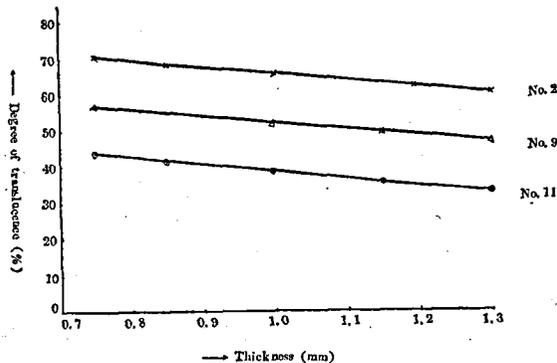


Fig. 6 Relation between thickness and degree of translucence of Silicate Cement

上の結果によれば 1mm 前後の試験片の透明度はほぼ厚みに逆比例することが判つた。

総 括

米国歯科医師協会規格第 9 号による歯科用珪酸セメント中の Opacity の測定方法の規格は, 定性的で肉眼観察によるため個人差を生ずると考えられる。その為著者等は定量的に透明度を測定し得ることを見出した。即ち投射光を物体に対し 45° で入射し, 90° の反射の強さを光電管で測定する。白色板 (蒸着せる MgO) の反射の強さを 100% 黒体の反射の強さを 0% とする。

W: 試料を白色板に重ねた時の拡散反射の強さ。B: 試料を黒色板に重ねた時の拡散反射の強さ, とし透明度 $T(\%) = 10\sqrt{W-B}(\%)$ で表わし得る。

この測定により (1) 米国歯科医師協会規格所定の標準 Opal Glass の透明度は夫々 69.28%, 64.81% である。

(2) 珪酸セメントは試料が 1.25 から 0.75mm の範囲内に於て厚さと透明度との関係が次式の如く成立する。

$$T = T' + 20(d - 1.0)$$

T: 厚さ 1mm の試験片の透明度 T': 厚さ d の試験片の透明度 d: 試験片の厚さ (mm)

(3) 国産珪酸セメントの透明度は第 3 表の通りである。

(4) 国産珪酸セメントの米国歯科医師会規格 (No. 1 から No. 6 の混合) 試料の透明度は 65.2% から 65.7% で規格に適合している。

本研究に対して御援助を賜つた而至化学工業株式会社研究部長手塚長次郎氏に対して感謝する。

文 献

- 1) Paffenbarger, G. C., Schonover, I. C., and Souder W.,: J. A. D. A., 25, 32-87 (1938).
- 2) Skinner, E. G., The science of Dental Materials.
- 3) Crowell W. S.,: J. A. D. A., 14, 1030-48 (1927).
- 4) American Dental Association Specification No. 9 Dental Silicate Cement: J. A. D. A., 40, 186-193 (1950).
- 5) 日本工業規格 J I S. T 6603 (1953).
- 6) 日本歯科材料協会規格 No. 16.

Summary

The method of Opacity Test in the American Dental Association Specification No. 9 Dental Silicate Cement is qualitative method, and caused individual error owing to observation with the naked eye.

Then, we investigated the quantitative method, that measured to the degree of translucence.

Incident-ray project to specimen surface, an angle of incidence at 45° and measure to intencity of scattering-light, an angle of reflection at 90° with the photo tube.

We determined on the intencity of reflect-light from white plate (vaporized MgO) is 100% and from black body is 0%.

The degree of Trancelucence, T (%) shows as follows

$$T(\%) = 10\sqrt{W-B}(\%)$$

W: The intencity of scattering-light, piled specimen on the White plate.

B: " " " " Black body.

As the results,

(1) The degrees of translucence of standard opal glass in the American Dental Association were 69.28 and 64.81%.

(2) Ralation between thickness and degree of translucence of silicate cement specimen were indicated by next formula in the range from 1.25 to 0.75mm.

$$T = T' + 20(d - 1.0)$$

T: Degree of translucence of specimen (thickness: 1 mm)

T': " " " (thickness: d mm)

d: Thickness of specimen (mm)

(3) The degree of translucence of the dental silicate cement, in this country shows in Table 3.

(4) The degrees of translucence of the Dental silicate cement specimen, in this country (The light-shade No. 1 to No. 6 mixture) were 65.2 to 65.7%, and passed American Dental Association Specification.

Received February 29, 1956

原水爆実験による放射能汚染の研究 (第2報) *

緑茶の放射能汚染について

長 沢 佳 熊, 川 城 巖, 鹿 島 哲, 河 村 正 一
西 崎 笹 夫, 松 島 崇

Studies on Radio-Contamination of Foodstuffs Effected
by A- or H-Bomb Explosion. II.
Radio-Contamination on Green Tea**

Kakuma NAGASAWA, Iwao KAWASHIRO, Tetsu KASHIMA, Shoichi KAWAMURA,
Sasao NISHIZAKI and Takashi MATSUSHIMA

昭和29年5月15日夜半から16日にわたつての降雨には各地でその11につき数万 c.p.m. (1分間のカウン
ト数)の放射能が検出された。谷田沢¹⁾は6月, 茶10g中に最高126 c.p.m. を認め, 塩川²⁾は静岡県産の茶106
種を検査し, 放射能のやや著しいもの7種(最高250 c.p.m./茶10g)を認めた。

著者等は茶18種(内4種は塩川教授より譲り受けたもの)(検体5~22)について試験し, 人工放射能で汚染さ
れた疑のある35 c.p.m. 以上のもの8種(検体5, 6, 7, 8, 11, 19, 20, 21)を認めた。通例茶10gから灰分約0.5gが
得られ, その内の K^{40} の天然放射能は約30 c.p.m. (計器の効率約10%)である(実験1及び第1表参照)。

我々の1日の茶摂取量は約7~10gであろう。その水浸出試験によると, 第1回煎じ中には第2回煎じの約5倍
の放射能が移行し, 茶湯中に移行する放射能は約1/3となる(実験2)(ただし, 実験中の放射能減衰を考慮に入
れていない。塩川²⁾によると約1/2が茶湯中に移るといふ)。

次に検体19の灰分をAmberlite IR-120を用いて分析した結果は, 稀土類及びカリウム部分に最も多くの放射
能を認めた(実験3)。この事実は, この実験以前に塩川³⁾により報告された成績と一致し, 同氏はその報告中で
茶中の人工放射能の元素組成は雨水中のものと似ているといひ, 5月17日以降に製茶したのから人工放射能を
認めていること, 二番茶にはあまり認められないことを述べている。著者等の場合でも二番茶(検体12), 玉露(検
体14, 15)に人工放射能はほとんど認められない。

以上の事実は, 5月中旬に降つた, かなりの人工放射能を含んだ雨が, 茶の葉, 茎などの表面に乾燥附着したも
のと推定し得る。後に蚕糸試験所⁴⁾から報告された5月26日に採取した桑葉の場合も, 放射能は一般に上部の葉
に多く, 下部の葉に少く, 葉柄基部の凹所を始め, その他凹所と思われる主葉脈に沿つた部分にラジオオートグ
ラフによる放射能の存在を認めることは, 放射能汚染が, 吸収された放射能によるものでなく, 表面に附着した
放射能によるものであると考えられる。

茶は一番茶のつみ入れが5月中旬で, その頃人工放射能をかなり含んだ降雨があつたため, 他のものに比較し
てその汚染が目立つたものと考えられる。

実 験 の 部

実験1 茶22種につき, 各約10gをとり水分及び灰分を測定し, それらの各0.5gについてのc.p.m.を測定
した成績を第1表に示す。放射能の測定は, 科学研究所製GM管, 32進型, マイカ3.16mg/cm²を用い, マイ
カと検体との距離1cmで科学研究所から貸与された標準品 No. 4910, RaD+E, 崩壊数1166.2/秒を用い, 効率
を測定したとき, 10.40±0.02%であつた。

* 第1報は本誌73, 187~190(昭和30)

** See English translation in the following publication;

Kakuma NAGASAWA and others: "Influence of the Experiments of Hydrogen Bomb at Bikini
Atoll, 1954 upon the Vegetables, Rice, Tea and Milk in Japan" in "Research on the Effects and
Influences of the Experimental Hydrogen and Atomic Bomb Explosions", Vol.I, published by
Japan Scientific and Technical Administration Council, 1956.

第1表 茶の放射能

検体 番号	品名	収月 去日	産地	水分 %	乾燥物 0.5gにつ いての c. p. m.	灰分		測定日
						%	0.5gにつ いての c. p. m.	
1	昭和10年製 パンハイヤード*	6.18	静岡	10.8	1.3	—	29.5	8.19
2	昭和10年製 煎茶*	〃	〃	12.2	1.3	5.3	31.3	〃
3	昭和27年製 煎茶*	〃	〃	6.0	1.1	—	30.0	〃
4	昭和28年製 煎茶*	〃	〃	5.7	1.5	—	31.7	〃
5	昭和29年4月24日製 煎茶	〃	〃	4.32	1.8	5.29	41.1	〃
6	昭和29年製 東京市販品	7.20	狭山	7.58	2.5	5.10	78.7	〃
7	昭和29年製 東京市販品	〃	不明	2.5	1.7	—	45.1	〃
8	昭和29年製 煎茶, 特上粉	〃	静岡, 川根	8.08	6.1	5.11	62.2	〃
9	昭和29年製 川柳	〃	静岡, 川根	7.99	3.8	5.18	22.7	〃
10	昭和29年製 番茶	〃	静岡, 川根	7.79	3.0	5.21	28.2	〃
11	昭和29年製 一番茶	〃	静岡, 庵原	6.83	1.9	5.25	36.0	〃
12	昭和29年製 二番茶	〃	静岡, 川根	7.08	3.2	5.18	26.4	〃
13	昭和29年製 天然玉露	〃	静岡, 東川 根	8.26	2.0	5.30	28.0	〃
14	昭和29年製 玉露	〃	静岡, 本山 薬科	8.18	1.9	5.17	27.5	〃
15	昭和29年製 玉露特上	〃	本山人住貝	8.05	2.5	5.01	29.8	〃
16	昭和29年製 駿河路	〃	静岡	10.61	2.1	5.01	27.0	8.6
17	昭和29年製 一番茶	〃	〃	4.35	2.3	5.16	28.2	8.7
18	昭和29年製 八千代	〃	〃	5.20	1.9	5.29	30.5	8.8
19	昭和29年製 玉緑茶**	5.19	静岡, 愛鷹 村	9.01	2.1	5.25	68.4	8.11
20	昭和29年製 玉緑茶一番茶**	5.19	静岡, 愛鷹 村	10.20	1.2	5.19	63.9	〃
21	昭和29年製 玉緑茶一番茶**	5.27	静岡, 吉原 市	8.89	1.3	5.34	53.6	〃
22	昭和29年製 煎茶**	5.15	静岡, 向笠 村	9.65	1.5	5.95	22.3	〃

* 対照検体, 国立茶業試験所から寄贈されたもの ** 塩川教授より寄贈されたもの

実験2 検体7.5gをキュウスにとり, 熱湯180ccを注ぎ2分間放置後, その100ccをとり, 水浴上で蒸発乾固し, スパーテルで試料皿内にかきとり, GM管で計測しこれを1.8倍して一番煎じのカウントとした。検体の水をできるだけ流し去り更に熱湯180ccを注ぎ, 前と同様に100ccを蒸発乾固して計測し, 1.8倍して二番煎じのカウントとした(第2表)。

第2表 茶湯中への放射能の移行

検体 番号	品名	一番煎じ			二番煎じ		
		100ccから の蒸発残物	c. p. m.	全体の c. p. m.	100ccから の蒸発残物	c. p. m.	全体の c. p. m.
2	昭和10年製 煎茶	672 mg	4.2	7.6	312 mg	—	—
5	昭和29年4月24日製 煎茶	720 〃	5.5	9.9	354 〃	1.0	1.8
8	昭和29年 東京市販品	687 〃	9.8	17.6	362 〃	2.0	3.6

実験 3 検体 19 の玉緑茶の灰分 (68.4 c. p. m. /500 mg) 1 g (130 c. p. m.) をとり, Amberlite IR-120 を用いて陽イオンの分離を試み (第 3 表), その結果 Fr. 3 (希土類部分) に最も多量の放射能を認めた。

第 3 表 茶の放射能化学分析

玉緑茶 (静岡県愛鷹村5月19日製造) の灰分 1000 mg (130 c. p. m., 68 c. p. m. /500mg……昭和 29 年 9 月 20 日計測)

10% 塩酸 5 cc に溶かし, 水 5 cc を加え, 加熱, 濾過

濾液	Amberlite IR-120 の層*を通し, 更に N/5 塩酸 300 cc を通す.	不溶物 0 c. p. m. /41 mg (29.9.21)
Amberlite 層	0.5% 塩酸 320 cc を通す.	流出液 (Fr. 1) 乾燥後 0 c. p. m. /100 mg (29.9.25)
Amberlite 層	5% クエン酸アンモニウム液 (pH 4) 340 cc を通す.	流出液 (Fr. 2) 乾燥後 0.7 c. p. m. /250 mg (29.9.25)
Amberlite 層	5% クエン酸アンモニウム液 (pH 6) 350 cc を通す.	流出液 (Fr. 3) 乾燥, 灰化後 65 c. p. m. /500 mg (29.9.27)
Amberlite 層	10% 塩酸 200 cc を流す.	流出液 (Fr. 4) 乾燥灰化後 0 c. p. m. /80 mg (29.9.27)
Amberlite 層	灰分 (Fr. 6) 2 c. p. m. /9 mg (29.10.8)	流出液 (Fr. 5) 乾燥後 0 c. p. m. /20 mg (29.10.5)

* 50~80 メッシュ, 径 1 cm, 高さ 33 cm

むすび 人工放射能を含む雨にぬれたと思われる茶 14 種について試験した結果, その内 4 種には天然放射能以上に大きい放射能を明かに認めた。別に塩川教授が人工放射能を認めたとして寄贈された検体 3 種も同様の結果を示した。

諸種の汚染現象の実験からこの放射能汚染は茶中に吸収されたものではなく, 表面に附着しているものと結論した。

終りに, 貴重な研究成果を早くから通告されてこの研究に助力された静岡大学塩川教授並びに検体の一部を提供された静岡県榛原郡金谷町国立茶業試験所に謝意を表す。

文 献

- 1) 谷田沢道彦: 放射能をもつ雨による農作物の汚染にかんする調査 (1) (1954.6) (プリント)
- 2) 塩川孝信外 4 名: 種々の放射性汚染物の調査 (第 1 報) (1954.7.6) (プリント)
- 3) 塩川孝信: 私信
- 4) 蚕糸研究所放射能調査研究班: 放射能による桑葉及桑園土壌の汚染 (1954.9) (プリント)

Summary

More radiation than those for natural ^{40}K was found in 4 of 16 samples of green tea and another 3 samples sent from Prof. Shiokawa who had found artificial radiation in them.

The authors suggested the contamination of these samples was limited just only to the surface, on which the radio-contaminated rain had dried up and not due to the absorption of tea plants. (see the foot note**on page 201)

Received February 29, 1956

原水爆実験による放射能汚染の研究 (第3報)*

牛乳及びその製品の放射能について

長沢 佳熊, 川城 誠, 榎本 正義,
松島 崇, 河村 正一

Studies on Radio-Contamination of Foodstuffs Effected
by A- or H-Bomb Explosion. III.

Radiation of Milk and its Preparations**

Kakuma NAGASAWA, Iwao KAWASHIRO, Masayoshi ENOMOTO,
Takashi MATSUSHIMA and Shoichi KAWAMURA

Bikini 環礁の水爆実験により昭和29年5月16日以来雨水中に人工放射能が検出され, その後数日間は一部の野菜も放射能によつて汚染されていることが分つた。そこで野菜と同じ状態にある汚染された雑草を食用とする牛の乳もあるいは汚染されてはいないかとの疑を生じ, 谷田沢¹⁾, 農業技術研究所畜産化学部の研究者の一部²⁾が牛乳にも放射能汚染を認めたとの新聞記事及び報告があらわれた。

検体 5月28日以来各所から採取した牛乳32種(検体1~32), 全脱脂粉乳1種(検体34), Evaporated milk (エバミルク)1種(検体33)及び対照として昭和26年に製造された Evaporated milk (検体37及び38), 昭和15年以前に製造された全脱脂粉乳1種(検体39)を試験した。この内には前述の農業技術研究所で問題となつた検体(検体14)を譲り受けて試験した結果も含まれている(表参照)。

又西脇³⁾は昭和30年森永粉ミルク中毒事件として世を騒がせたドライミルクのロット MF から放射能を検出したと云つているので, 当所食品部で試験の結果砒素の多かつたロット MF のドライミルク(検体35)及び対照として砒素を含まない製品(検体36)についても試験した。

測定方法 検体の牛乳, エバミルク又は全脱脂粉乳はいずれも蒸発した後, あるいは直接に灰化し, 灰分0.5gを用い検体とした。測定器は科学研究所製 GM管32進型, 検体との距離1cmで効率は約10%, 自然計数を差引いたc.p.m.(1分間のカウント数)を検体のカウントとした。なお参考のため, 牛乳1ccをとりそのまま又はその乾燥物あるいはエバミルク及び全脱脂粉乳の乾燥物それぞれ0.5gを検体とし, そのc.p.m.を計測した(表参照)

牛乳の放射能(測定の効率約10%)

試	料	測定月日	そのまま1cc c.p.m.	乾燥物(0.5g) c.p.m.	灰分(0.5g) c.p.m.
1.	5月28日附 保証牛乳	5.31	—	—	22
2.	6月12日附 保証牛乳	6.12~6.15	0	1.5	21
3.	6月15日附 森永牛乳	6.15~6.17	1	2	21
4.	6月16日附 保証牛乳	6.19	—	2	23
5.	6月23日附 //	6.23~6.25	0	2	20
6.	6月25日附 //	6.25	0	2	19
7.	6月29日附 //	7.01	0	2.5	22
8.	7月8日附 //	7.15	—	2	21
9.	7月13日附 //	7.17	—	1	22
10.	7月15日附 //	7.17	—	2	21

* 第2報は本誌本号 201頁

** See English translation in the following publication ; Kakuma Nagasawa and others: "Influence of the Experiments of Hydrogen Bomb at Bikini Atoll, 1954 upon the Vegetables, Rice, Tea and Milk in Japan" in "Research on the Effects and Influences of the Experimental Hydrogen and Atomic Bomb Explosions", Vol.I, published by Japan Scientific and Technical Administration Council, 1956.

試	料	測定月日	そのまま1cc c. p. m.	乾燥物(0.5g) c. p. m.	灰分(0.5g) c. p. m.
11.	7月24日附 千葉農技研採乳	昭和 29.7.26	0	1.5	18
12.	" 千葉牛乳	"	1	2	23
13.	" 新高牛乳	"	0	3	22
14.	千葉農技研で得た灰分	"	—	—	20
15.	7月26日 千葉八街採乳	7.28	1	2	21
16.	" 埼玉馬室	"	0	2	21
17.	" 群馬高崎	"	0	1	18
18.	" 埼玉比企	7.29	0	1.5	19
19.	" 神奈川高座	"	0	2	21
20.	" 埼玉本庄	7.30	0	1.5	21
21.	" 群馬伊勢崎	7.30	0	2	21
22.	" 埼玉秩父	7.31	0	2	20
23.	" 東京板橋	"	1	2	22
24.	" 埼玉大里	7.29	0	1	20
25.	" 神奈川津久井	7.30	0	2	20
26.	" 東京杉並	7.31	0	2	21
27.	" 東京北多摩	8.02	0	2	19
28.	" 東京世田ヶ谷	"	0	2	21
29.	" 東京練馬	"	0	2	20
30.	7月21日 北海道石狩町	8.04	0	1.5	21
31.	" 広島村	8.04	0	2	18
32.	" 月寒	8.04	0	2	16
33.	明治エバミルク 29.5.15製	7.15	—	1.5	20
34.	明治全脱脂粉乳 29.6.19製	7.15	—	2	22
35.	明治ドライミルクMF印	昭和 30.9.01	—	2.0(1g)	23
36.	" MC印*	30.9.01	—	—	—
37.	明治エバミルク 昭和18年2月製*	昭和 29.7.15	—	2	20
38.	" 昭和26年12月25日製*	7.17	—	1.5	20
39.	明治全脱脂粉乳 昭和15年以前製*	7.15	—	1	22

牛乳中の放射能 一般に牛乳は灰分約0.7%、灰分中のK含量は16.5~20%、従つて灰分0.5gはK 0.08~0.1g、KCl として0.15~0.19gを含み、そのカウント数は約20~30 c. p. m. (検体層の厚みのための吸収によるカウント数の減少と、その層がGM管のマイカに近づくために生ずるカウント数の増加のために生ずる計測差を考慮しない)に相当し、これを人工放射能を含まないと考えられる検体37、検体38及び検体39のそれぞれの放射能20 c. p. m.、23 c. p. m.、22 c. p. m.と対照し、それらの放射能量を灰分0.5g中の⁴⁰Kによる天然放射能と考えると、いずれの検体も、特に人工放射能が含まれると思われるほどに大きいc. p. m.を示したものはない。

更に人工放射能を精密に定量するには、著者等¹⁾が米の放射能汚染を測定した報告に準じ、各検体中のカリウム量を定量した後、それに相当する天然放射能をその報告で記述した方法で求め、検体の放射能から差引くのがよい。

むすび 人工放射能で汚染された雑草を食用としたと思われる牛の乳32種及びその製品2種及びドライミルク2種を試験したが、人工放射能を明かに証明し得たものではなく、これを認めたという若干の研究者の報告はいずれも牛乳中のカリウムによる天然放射能を人工放射能と取り違えたものである。

* 対照検体

文 献

- 1) 谷田沢道彦: 放射能をもつ雨による農作物の汚染に関する調査 (1) (1954.6) (プリント)
- 2) 読売新聞 昭和29年7月23日
- 3) 朝日新聞 昭和30年8月28日
- 4) 長沢佳熊外: 本誌 73, 187 (昭和30)

Summary

No artificial radiation was found in any of 32 samples of milk of cows fed on the weeds which were supposed to have been contaminated with fission products in the rain.

The findings of some researchers who reported to have found the artificial radiation in the milk in Japan appear to be mistaken with natural ^{40}K radiation for artificial one.

(See the foot note on page 205)

Received February 29, 1956

原水爆実験による放射能汚染の研究 (第4報)*

飲料水, 野菜及び果実類の放射能汚染

長 沢 佳 熊, 川 城 巖, 榎 本 正 義
鹿 島 哲, 松 島 崇

Studies on Radio-Contamination of Foodstuffs Effected
by A- or H-Bomb Explosions. IV.

Radio-Contamination of Drinking Water, Vegetables and Fruits
in Japan Caused by H-Bomb Explosions at Bikini Atoll, 1954**

Kakuma NAGASAWA, Iwao KAWASHIRO, Masayoshi ENOMOTO,
Tetsu KASHIMA and Takashi MATSUSHIMA

昭和29年5月16日夜半から本邦各地に降った雨は人工放射能をかなり含み, 京都大学四手井研究室では雨水11につき86,000(1分間のカウント数)を報告し, 各地で20,000~30,000 c. p. m. の降雨を認めた。このため東京や大阪附近の野菜にも明かに100 c. p. m. 以上(GM管の効率約10%)のものが現われた。その検査成績を実験1, 第1表に示す。表中に記載してあるように, この汚染は雨にかかつて乾かない内によく洗えば除去されることが分つた。

これらの調査結果によると, それらの表面に付いている放射能はGM管でよく感ずることが分つた。然しもし内部に吸収されているとすれば, その放射性元素の種類にもよるが, GM管では感じない場合があることも当然想像される。なお以上のような検査法では野菜中に存在する⁴⁰Kの天然放射能は感じない。

次に野菜を灰化し, 灰分の放射能を測定した(実験2, 第2表)。この検体の採取は, かなりの放射能雨が降つてから3カ月半経過した8月末から9月始めであつた。この成績によると, 乾燥物に放射能をほとんど認められないことから考えて, 灰分の放射能はほとんど⁴⁰Kに起因するものと考えてよからう。ネギの地下に埋つている白い部分と, 地上に露出している青い葉の部分とを計測したが, いずれも放射能があるとは思えない(実験2, 第3表)。

更に5月下旬に採取したと思われるシイタケ(ほしたのもの)では, 表面の方が裏面より強い放射能を示している(実験3, 第4表)。

放射能を含む降雨のため, 天水を飲料とする場所では, 当然飲料水が放射能で汚染された。当所で試験した飲料水の成績を実験4, 第5表に示す。その結果, 大島元村及び差木地村の飲料用天水(検体9)については, 飲料には不適当であると厚生省から指示された。これは米国, National Bureau of Standardsの基準に照し合わせて最大許容量以上である心配を生じたからである。この表中には当所屋上の降雨5検体, 東京の水道水1検体を含むが, 前者にはかなりの放射能を含み, 後者にはほとんど含まれない。

実験の部

実験1 昭和29年5月19日から5月30日に入手した野菜, 果実類をそのまま約1cmの距離でGM計測器で測つた。計測器は科学研究所製32進型, マイカ3.6mg/cm², 距離1cmで効率約10%(第2報参照)。測定時間3分。自然計数を差引いてc. p. m. (1分間のカウント数)であらわす。

* 第3報は本誌本号205頁

** See English translation in the following publication; Kakuma NAGASAWA and others: "Influence of the Experiments of Hydrogen Bomb at Bikini Atoll, 1954 upon the Vegetables, Rice, Tea and Milk in Japan" in "Research on the Effects and Influences of the Experimental Hydrogen and Atomic Bomb Explosions," Vol. I, published by Japan Scientific and Technical Administration Council, 1956.

第1表 野菜の放射能汚染

品名	産地	収去場所	収去月日	測定月日	そのまま (c. p. m.)	水洗後 (c. p. m.)	
ピ	ワ	長 崎	新 宿	29. 5.19	29. 5.19	5	—
イ	チ	静 岡	〃	〃	〃	0	—
ハ	ク	都 内	四 谷	〃	〃	0	—
コ	マ	〃	〃	〃	〃	0	—
コ	カ	〃	〃	〃	〃	11	4
サ	ラ	千 都	葉 内	〃	〃	3	—
キ	ャ	〃	〃	〃	〃	0	—
ホ	ウ	〃	〃	〃	〃	12	—
サ	ヤ	〃	品 川	〃	〃	0	—
ホ	ウ	〃	〃	〃	〃	23	1
ミ	ツ	〃	目 黒	〃	〃	0	—
シ	ユ	〃	〃	〃	〃	8	—
ビ	コ	鹿 児 島	大 井	〃	〃	0	—
コ	カ	都 千	自 由 ヶ 丘	〃	〃	0	—
サ	ヤ	千 葉 市	上 野	〃	〃	0	—
イ	シ	〃	〃	〃	〃	13	—
カ	リ	都 内 小 岩	〃	〃	〃	14	2
シ	ャ	〃	〃	〃	〃	12	4
ネ	ギ	都 内	世 田 ヶ 谷 用 賀	〃	〃	0	—
テ	ツ	世 田 ヶ 谷 用 賀	野 生	〃	〃	47	—
キ	ャ	世 田 ヶ 谷 絃 巻	昌 か ら	〃	〃	121	1
キ	ャ	都 内	昌 か ら	29. 5.23	29. 5.24	19	2
シ	ャ	〃	〃	〃	〃	15	0
サ	ラ	〃	〃	〃	〃	36	2
カ	ブ	〃	〃	〃	〃	21	3
ソ	ラ	〃	〃	〃	〃	21	0
ネ	ギ	〃	〃	〃	〃	0	0
キ	ャ	〃	〃	29. 5.30	29. 5.31	12	0
キ	ャ	〃	〃	〃	〃	10	0
キ	ャ	〃	〃	〃	〃	8	0
玉	ネ	〃	〃	〃	〃	0	0
麦	の	〃	〃	29. 6.15	29. 6.16	0	0

* 玉ねぎは皮2枚をむき去り、輪切りとしたもの。

実験2 野菜を105°で乾燥後水分を測定し、更に硝酸(比重1.4)を加え強熱し、硫酸1量と硝酸4量の混合物を加えて450~500°で灰化した。乾燥物及び灰分の放射能を実験1と同条件で測定した(第2表)。但しマイカと検体との距離1cm、そのときの効率は約10%である。

第2表 野菜の乾燥物及び灰分の放射能

品名	水分(%)	灰分(%)	測定月日	乾燥物 (c. p. m.)	灰 (c. p. m.)
ムギ茶	11.86	2.31	1954. 8.30	1.2	13.0
キャベツ(外側の葉)	94.55	0.44	8.31	0	20.0
キャベツ(内側の葉)	93.36	0.51	8.31	1.0	17.0
山東菜	85.53	0.61	9. 3	1.3	23.3

品名	水分(%)	灰分(%)	測定月日	乾燥物 (c.p.m.)	灰分 (c.p.m.)
ニンジンの葉	85.53	2.97	9. 3	1.6	17.0
ニンジンの根	81.32	1.27	9. 4	1.5	14.0
カブの葉	95.35	0.87	9. 6	1.0	21.3
カブの根	98.16	0.49	9. 7	1.0	22.0

実験3 特にネギ(葛飾産)の地下に埋つている白い部分と地上に露出している青い葉の部分を取り、乾燥灰化し実験2と同条件で放射能を測定した(効率10%), 測定時間は3分とした(第3表)。

第3表 ネギの放射能(測定日1954.8.9)

	採取量 (g)	その放射能 (c.p.m.)	乾燥物 (g)	その放射能 (c.p.m.)	灰分 (g)	その放射能 (c.p.m.)
白い部分	31.1	0 ± 4 ^{a)}	3.90	5.0 ± 4.0 ^{b)}	0.687	2.7 ± 4.0 ^{c)}
青い部分	16.8	0 ± 4 ^{a)}	1.30	6.0 ± 4.1 ^{b)}	0.167	0.4 ± 4.1 ^{c)}

a) 自然計数 20.0 ± 2.8 を差引いたもの

b) 自然計数 20.3 ± 2.7 を差引いたもの

c) 自然計数 21.6 ± 2.7 を差引いたもの

* 0.15 g の測定値

実験4 シイタケをそのまま、表面又は裏面をGM管に向けて広くひろげ、マイカとの距離を2, 5, 10 cm として放射能を測定した。次に灰化し灰分について距離3.5 cm で放射能を測定した(効率約3%) (第4表)。

第4表 シイタケの放射能

	測定距離 (cm)	放射能 (c.p.m.)
表面	2	7.6
	5	0.5
	10	0.4
裏面	2	0.7
	5	0
	10	0
灰分	3.5	8.2

実験5 雨水, 天水, 井水などいずれもその1000cc(検体1は150cc)を蒸発した後, 距離1 cm (このときのGM管の効率約10%) でGM管で放射能を測定した。

第5表 降雨と飲料水の放射能汚染

検体番号	採取場所	試料	採取日時	c.p.m./l	備考
1	用賀	当所屋上の降雨	5.21 (10時~15時)	1,000	150 cc 採取
2	用賀	当所屋上の降雨	5.21 (15時) ~22(9時)	238	
3	用賀	当所屋上の降雨	5.22 (9時~12時)	380	
4	用賀	当所屋上の降雨	5.22 (12時~17時)	379	
5	用賀	当所屋上の降雨	5.22 (17時) ~23(9時)	374	
6	用賀	東京の水道水	5.20	3	

検査番号	採取場所	試料	採取日時	c. p. m. /l	備考
7	大島(伊豆)	元村の天水 1	5.20 汲取り	60	5.21 (10時測定)
8	大島(伊豆)	元村の天水 2	5.20 汲取り	4	
9	大島(伊豆)	差木地村の天水	5.20 汲取り	93	
10	逗子	中泉博士邸の天水	5.25	115	
11	室蘭	室蘭港航路標識事務所の天水	6.9	0.6	
12	青森県	尻矢崎航路標識事務所の井水 1	6.20	5.2	
13	青森県	尻矢崎航路標識事務所の井水 2	6.20	2.0	
14	北海道	襟裳岬航路標識事務所の天水	6.22	2.0	
15	青森県	大間崎航路標識事務所の貯水槽	6.27	3.3	
16	北海道	雄冬岬航路標識事務所の天水	7.6	2.0	
17	北海道	宗谷岬航路標識事務所の天水	7.9	6.7	
18	北海道	稚内港航路標識事務所の井水	7.8	8.0	
19	北海道	焼尻島航路標識事務所の天水	7.7	2.0	
20	秋田県	入道崎航路標識事務所の井水	7.11	1.4	
21	青森県	陸奥弁天島航路標識事務所の貯水槽	7.11	4.2	
22	北海道	石崎航路標識事務所の天水	7.8	5.4	
23	山口県	見島航路標識事務所の天水	8.5	4.2	
24	東京都	品川航路標識事務所の天水	6.5	3.5	
25	静岡県	石室崎航路標識事務所の天水貯水槽	6.16	2.4	
26	静岡県	石室崎航路標識事務所の雑用水	6.16	5.5	
27	東京都	神津島航路標識事務所の天水	6.28	6.5	
28	神奈川県	観音崎航路標識事務所の天水	6.28	7.3	
29	静岡県	伊東港航路標識事務所の天水	7.16	1.6	
30	千葉県	太東崎航路標識事務所の天水	7.16	3.4	

むすび 1954年 Bikini 環礁における米国の水爆実験のため、日本各地に人工放射能を含んだ降雨があり、その雨に濡れたために野菜、果実なども汚染された。当所屋上で採取した雨水、飲料水、野菜、果実の放射能を検査した結果を報告した。

文 献

- 1) 長沢佳熊等:本誌本号, 201 (昭和31)

Summary

The vegetables collected from various parts of Japan during 19th to 30th May, 1954 were considerably contaminated with radioactivity, though they were almost free from radiation after being washed. The dried and ash samples of some vegetables collected during August 30th to September 7th, 1954 showed almost no artificial radiation.

The radiation in rain water, tank water and well water collected from various parts of Japan during May to August, 1954 were examined. In the result, two samples of rain water for drink collected at Ohshima island on May 20th were conspicuously contaminated with fission products.

(See foot note** on page 209)

Received February 29, 1956

原水爆実験による放射能汚染の研究 (第5報)*

魚類の放射能汚染とその放射化学分析

長 沢 佳 熊, 川 城 巖, 中 山 豪 一, 鹿 島 哲,
 榎 本 正 義, 芹 沢 淳, 大 熊 誠 一, 河 村 正 一,
 西 崎 笹 夫

Studies on Radio-Contamination of Foodstuffs Effected by A- or H-Bomb Explosions. V.
 Radio-Contamination of Sea Fish and its Radio-Chemical Analysis **

Kakuma NAGASAWA, Iwao KAWASHIRO, Goichi NAKAYAMA,
 Tetsu KASHIMA, Masayoshi ENOMOTO, Jun SERIZAWA,
 Seiichi OHKUMA, Shoichi KAWAMURA and Sasao NISHIZAKI.

昭和29年3月14日マグロ船第五福龍丸(約100トン筒井勲船長以下乗員23名)が焼津に入港した。この船はMarshall群島Bikini環礁東方80カイリの洋上で操業中、3月1日午前3時(現地時間)頃南西水平線に突然閃光を認め、数分後大爆音とキノコ状の原子雲を目撃し、その後1時間半頃から白い灰が降り、船体が白くなるほど積つた、この灰をがぶつた船員たちは皮膚が赤黒く水ぶくれとなり、後に黒色に変わり火傷状の症状を呈してきたので、入港と同時に焼津協立病院大井俊亮外科主任の手当を受け、比較的重症の山本忠司、増田三次郎両氏は、翌15日東京大学清水外科で診断を受けた結果原爆症であると公表された。

福龍丸に積まれた魚獲物は当然放射性降灰により汚染されているであろうと検査を受けた結果、マグロ類は数センチの距離で約200 c.p.m. (GM管による1分間のカウント数)を示した。このときの放射能汚染は恐らく魚体表面だけで、後述するような内部臓器の汚染ではなかつたと思うが確証はない。当所では16日夕刻、食品担当の川城は田中部長及び長沢と熟議し、翌17日科学研究所に豊松一郎博士を訪ね、その紹介で山崎文男博士の助力を依頼し、その研究室の平田穰氏とともに川城及び鹿間技官は翌18日焼津に急行し、食品衛生と環境衛生の領域で調査を始めた。同日厚生省は東京、三崎、塩釜、焼津、清水の5港を指定し、Bikini環礁附近一帯の区域を指定し、この指定区域で操業し、この指定港に水揚げされた魚について放射能検査を行うことを指令した。その検査員を至急編成することとなり、当所では鹿島は小幡技官とともに朝出勤したまま夕刻には検査地の焼津に急行した。その後所員数名が交代に検査員に選ばれて、指定港に駐在し、魚類を検査した。

厚生省内には原爆被害対策本部が組織され、既存の原爆症調査研究協議会が拡大されてこの問題に対処した。後者の一部会である食品衛生小委員会の委員長には川城が選ばれ、後に長沢と交代した。

魚の放射能検査の基準として、魚体表面から約10cmの距離で、100カウント以上の放射能(自然計数を含む)を認めた場合、その魚は廃棄処分をするということに暫定的に定められた。

4月8日焼津に入港した昭鷲丸が帰つたビンナガマグロではエラに放射能を認めたとの現地検査員からの報告に接し、9日長沢、川城は静岡に急行し、極秘に静岡県衛生研究所に運ばれた。検体のマグロ3匹を10日夜半に亘つて静岡県衛生部職員の手立と助力を受けて、静岡大学塩川孝信氏の計測下に、長沢は魚体解剖を担当し検査を行つた。その結果、驚くべきことには、その放射能汚染は胃内容物、幽門垂に著しいことを知り、ここに魚の放射能汚染に新しい知見を加えた。これらの魚類は放射性物質を内用したため汚染され、その放射能は魚体内

* 第4報は本誌、本号、209頁。この報告の大部分(実験1~3, 6, 8~10)は昭和29年11月13日、日本薬学会東京例会で講演、薬学研究 27, 336 (昭和30年)抄録。The most part of this report was read at the Semimonthly Meeting of the Japan Society of Pharmacy held at Tokyo on November 13, 1954.

** See English translation in the following publication: Kakuma NAGASAWA and others: "Results of Investigations and Examinations on the Influences upon Sea Foods in Japan caused by the Hydrogen Bomb Experiments at Bikini Atoll, 1954": in "Research on the Effects and Influences of the Experimental Hydrogen and Atomic Bomb Explosions,, Vol. I, published by Japan Scientific and Technical Administration Council, 1956.

に吸収されつつあることが判明し、従来考えられたような降灰による表面汚染とは別種の問題となつた。12日、三崎で水揚げされたサンマカジキとビンナガマグロについても東京大学吉川春寿教授の助力で計測した結果、同様な内臓汚染の事実を認め、この検査には米人も立会つた。14日以後は汚染のため廃棄命令を受けた魚類のうち、築地で検査を受けた分の典型的な標本は市場から当所に運ばれて、ガイガー計測器による詳細な調査が開始された。

5月1日、日本学術会議に放射線影響調査特別委員会が組織され、刈米所長は幹事に、長沢は委員に任命された。

5月13日、大阪魚市場では、大阪方面に入港した文美丸外敷隻が Bikini 環礁から遙かに隔たつたフィリッピン東方海域又は沖繩列島附近で捕えたキハダ、クロカワ、シイラ、バショウカジキの内臓にも明かに放射能汚染を認め、川城は大阪に出張してこの事実を確認し、ここに放射能汚染魚の回遊域が広汎にわたることが判明し、この問題の重要性が更に加つたのである。

5月15日水産庁の俊鶴丸は、南方海域における放射能汚染魚の調査を行うために組織された調査団員20名及び報道班員数名を載せ、2カ月の海旅に芝浦港を出帆した。これには芹沢が当所の浦久保技官と共に参加した。又長沢はこの調査団の環境衛生研究班長としてその研究と調査に協力した。

5月16日夜から全国各地に降つた雨は人工放射能をかなり含み、京都大学四手井研究室では雨水11につき86,000 c. p. m. を報告し、各地で 20,000~30,000 c. p. m. の降雨を認めた。このため野菜、茶などにも一部の放射能汚染を認めた。5月21日の原爆症調査研究協議会は緊張した空気の中に終始し、この状態が連続すれば対策を失うであろうと各委員は心配したほどであつたが、幸にもこの時期が放射能汚染の最高潮であつた。

俊鶴丸は7月4日芝浦に帰つた。その調査によつて、それまで我々が想像できなかつたほどの海水の著しい汚染海域が見付かり、水爆実験後数カ月経過しても、北赤道海流(北緯8度から10度辺りで、結局黒潮になる海流)のところどころに放射能を含む海水の塊まりがあるらしく、西方へ更に北方へと次第に拡がり、黒潮ともなつて日本近海まで押寄せる可能性もあり、7月下旬の海水浴場での検査ではそのような事実は認められなかつたが、9月下旬、駿河湾内のプランクトンの検査によると、その内に弱い人工放射能を認めたという(塩川孝信教授からの私信)。以上の事実は魚の放射能汚染の原因の一端を説明している。

7月に至り放射能汚染魚の数量は増加し、始め胃内容物、胃、幽門垂、肝臓などの消化器系統に著しかつた放射能汚染は次第に血液、腎臓などの循環系統に移り、その沈着甚だしく、北緯4°、東経140~143°で6月28日から7月8日に大正丸が捕えたキハダマグロには、腎臓全体 18,156 c. p. m. 2,533 c. p. m./g. 乾燥物 4,290 c. p. m. (新腺 1g から)、肉 40 c. p. m./g. 乾燥物 52 c. p. m. (肉 1g から) のものもあつた。

俊鶴丸調査団の9月の委員会、持帰つたカツオ肝臓から⁶⁵Znと思われるものの存在を、科研の岡野団員がシンチレーションカウンターで認めた旨報告された。長沢等は直ちに前述のキハダマグロの肉の放射性物質について分析を行い、全放射性物質の約76%が⁶⁵Znであることをイオン交換樹脂^{2),3)}による分離法で証明した(実験1~実験3, Table 5参照)。

更にその肉中の⁹⁰Srの定量分析をHarley⁴⁾から指示された方法によつて行い、その量は約0.29%以下(⁹⁰Srは約0.20%)であること(実験4及びTable 8参照)を知つた。この結果は12月25日の原爆被害対策に関する調査研究連絡協議会に報告された。

腎臓中には⁶⁵Znは約33%で、全放射能に対する割合は肉より小さかつた(実験5,6及び7, Table 10~14参照)然し陽イオン交換樹脂による分離では肉と同様にFr. 3(稀土類、アルカリ金属などの部分)が最も多く、Fr. 2(Zr, Nb, Feなどの部分)がこれにつぐ(実験6, Table 11及び12参照)。

なお実験8には、各種臓器中の放射能の減衰線を示した。実験9には、我々が計測した汚染魚検体中の放射能の強さを記し、実験10にはそれらの検体中の各臓器に沈着した放射能の強さを表示した。

従来報告された天然に棲息する魚類に関する人工放射能汚染については、Knobf⁵⁾(1951)によるWhite Oak Lake湖及びClinch河における淡水魚の放射能の研究、その続報(1954)⁶⁾、及び1948年Bikini環礁の水中で原爆実験が行われた後、数回に亘つて100カイリ離れたEniwetok又300カイリ離れたLikiep環礁での生物学的調査とこの前後にEniwetok環礁内で島の上で爆発したときの調査が調査担当者のDonaldson⁷⁾によつて報告されている。

Knobf⁵⁾によると骨中では放射能の52%が⁹⁰Sr+⁸⁹Sr, 48%が⁹⁰Yであり、ウロコでは53.5%が⁹⁰Sr+⁸⁹Sr 46.5%が⁹⁰Yであり、肉では96.8%が¹³⁷Cs, 1.7%が⁹⁰Sr+⁸⁹Sr, 1.5%が⁹⁰Yであると云う。著者等の例で

は ^{90}Sr の肉中の量は 0.20% で遙かに少い。

魚の各部分を汚染している放射能は γ 線が非常に強く、核分裂産物としては奇異であつたが、意外に核分裂産物以外の ^{65}Zn が大部分を占めていることが判明したのは科研岡野真治氏等のシンチレーションカウンターによる測定の産物であつた。以上述べた我々の定量分析の結果により肉中の全放射能の 76% を ^{65}Zn が占めている事実が判明したことは、驚くべき自然のイタズラがこの汚染魚の場合にも見られるわけである。その不可思議な汚染経路を次に推察して見る。

汚染経路 原水爆装置の構成物中に真鍮があり、その中に含まれている Zn が爆発時に生じた強力な中性子の衝撃を受け、誘導して ^{65}Zn を生成したものと信じられる。軟体動物その他下等海棲動物中にはその白色血液に含まれる例えば Hemocycotypin (これは Zn を含む有機錯化合物で、我々の血液中のヘモグロビンに相当する重要な役割を持つ化合物である) とするために選択的に Zn を集めるものがある。プランクトンにも従来かなりの放射能が検出されている。このように放射能に汚染された小動物を小さい魚がたべ、次にこれを大きなマグロやカジキ類がたべて放射能汚染を起したものと推定する。要するに食物から順次に伝つた汚染現象と考えることができる。

放射能計測条件 科学研究所製 32 進型、マイカの厚さ 3.16mg/cm² 又は神戸工業株式会社製 100 型、マイカの厚さ 3.13 mg/cm² の GM 管を用いた。その効率は第 2 報で記した方法で測定すると、検体とマイカとの距離 1 cm のとき、ほぼ 10% である (後者の方が感度はやや高い)。

終りに当り、本実験の当初御助力を頂いた科学研究所山崎文男博士、及び平田穰氏、並びに長友東大教授吉川春寿氏に感謝の意を表する。

実験の部

実験 1. マグロの白肉部の灰化 (担当者: 長沢, 大熊, 西崎)

水浴上で加熱して乾燥させたマグロ (大正丸 N4°, E140~143°, June 28~July 8 に捕獲したもの) の白肉部 2.8 kg を磁製皿にとり、濃硝酸 3 l を加え水浴上で加熱濃縮した後、更に濃硝酸 3 l を加えて濃縮する。この操作を合計 10 回繰返すと加水分解されて淡黄色の澄明溶液となる。これに濃硫酸 2 l を加え加熱を続けるとタール状の黒褐色の粘体となる。これを少量ずつ坩堝にとり、硝酸と硫酸とを加え直火で加熱し、硝酸を時々追加して灰化し微青色を帯びた白色粒状の灰分 66 g を得た。試料の白肉の新鮮なもの、乾燥したもの及びその灰分の放射能測定結果を Table 1 に示し、その減衰曲線を Fig. 1 に示す。

Fig. 1. Decay Curve of Ashes of Muscle of yellow Fin.

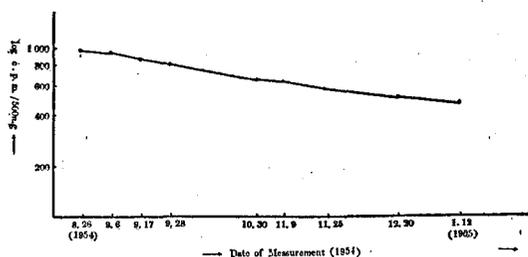


Table 1. Radiactivity of white muscle of Yellow Fin (*Neothunnus macropterus*)

	Raw muscle	Dry muscle *	Ashes**
count (c. p. m. /g)	40	158	4,500
Date of Measurement	July 20, 1954.	Oct. 19, 1954.	Oct. 30, 1954.

* 1 g of dried material from 3.3 g of fresh muscle.

** 1 g of ashes from 35.34 g of dried muscle.

実験 2. マグロ白肉灰分の陽イオン交換樹脂による放射化学分析 (担当者: 長沢, 大熊)

白肉灰分 250 mg を塩酸 (1:1) 20 cc に加熱して溶かし、不溶物は濾過し、塩酸 (1:2) で放射能がなくなるまで洗い、洗液は濾液に合せ、水浴上で約 2 cc 以下に濃縮した後、水を加えて 100 cc とする。この溶液を塩酸 (1:2) 500 cc で H 型とした Amberlite IR-120 層 (直径 1 cm, 長さ 20 cm, 50~80 mesh) に流入し、流出液をとる。次に 0.2 N 塩酸 250 cc を 0.5 cc/min の流速 (以下すべて、この流速で溶離した) で溶離し、この溶離液と流出液を合し水浴上で蒸発乾固する。蒸発残留物に塩酸 (1:200) をなるべく少量加えて溶かし試料皿に移し、水浴上で蒸発乾固した後放射能を測定する (Fr. I)。次に 0.5% 酢酸 300 cc で溶離し溶離液を蒸発乾固した後、硝酸及び硫酸を加えて強熱灰化すると赤褐色の固体が少量残る。これに塩酸を加えて水浴上で蒸発乾固し、その残留物に塩酸 (1:200) をなるべく少量加えて溶かして試料皿に移し水浴上で蒸発乾固した後放射能を測定する (Fr. 2)。次に塩酸で pH を 3.8 に調節した 5% クエン酸アンモニウム 500 cc で溶離し、溶離液を蒸発乾固した後、硝

酸及び硫酸を加えて強熱灰化すると淡褐色の固形物が少量残る。これに塩酸を加えて水浴上で蒸発乾固し、その残留物に塩酸 (1:200) をなるべく少量加えて溶かし試料皿に移し蒸発乾固した後、放射能を測定する (Fr. 3)。次にアンモニア水で pH を 6.0 にした 5% クエン酸アンモニウム 400 cc で溶離する。溶離液は pH 3.8 の 5% クエン酸アンモニウムの場合と同様に処理して放射能を測定する (Fr. 4)。

次に塩酸 (1:2) 500 cc で溶離し、溶離液を Fr. 1 の操作に準じて処理したのち放射能を測定する (Fr. 5)。Amberlite 樹脂に硝酸と硫酸を加えて強熱灰化した後塩酸に溶かして蒸発乾固し、その残留物に塩酸 (1:200) をなるべく少量加えて溶かし試料皿に移し蒸発乾固した後放射能を測定する (Fr. 6)。Fr. 1~Fr. 6 の分離操作法を一括して Table 2 に示し、同一試料について 2 回(I)(II)この操作を行つた。放射能測定結果を Table 3 に示す。

Table 3 において 1 回目の放射能の少いのは試料皿に放射性試料を移すとき塩酸を使い過ぎたためニッケル試料皿が侵されニッケル塩が多量に生成したために増加した吸収の影響によるものと考えられる。

Table 2. Group separation of radioactive elements in ashes of white muscle by the use of Amberlite IR-120

	Date of measurement	Weight (mg)	c. p. m.	
Ashes of white muscle.....	Sep. 30. 1954.	250	585 (I)	in the 1st experiment.
	Nov. 2, 1954.	250	340 (II)	in the 2nd experiment.
Dissolve in 20 cc of HCl (1:1), heat.				
Solution	Insoluble matter			
Concentrate to less than 2 cc.		(Weight and c. p. m. : negligible)		
Dilute to 100 cc with water, pass through the Amberlite IR-120* column, wash with 250 cc of 0.2 N-HCl.				
Amberlite IR-120 column	Effluent			
Wash with 300 cc of 0.5% oxalic acid.	Evaporate to dryness, ignite.		Ashes..... Fr. 1	
Amberlite column	Effluent			
Wash with 500 cc of 5% ammonium citrate. (pH 3.8).	Evaporate to dryness, ignite.		Ashes..... Fr. 2	
Amberlite column	Effluent			
Wash with 400 cc of 5% ammonium citrate. (pH 6.0).	Evaporate to dryness, ignite.		Ashes..... Fr. 3	
Amberlite column	Effluent			
Wash with 500 cc of HCl (1:2).	Evaporate to dryness, ignite.		Ashes..... Fr. 4	
Amberlite column	Effluent			
Ignite.	Evaporate to dryness, ignite.		Ashes..... Fr. 5	
Ashes	Fr. 6			

* The Amberlite column is of 1.0 cm diameter, 20 cm height. Before use, the Amberlite IR-120 (50~80 mesh) is washed with 500 cc of HCl (1:2).

Fr. 1: Anion and neutral materials. Fr. 2: Zr, Nb, Th, Hf, Fe etc. Fr. 3: Rare earth metals (La, Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Y, etc.) alkaline metals and heavy metals. Fr. 4: Alkaline earth metals (Sr, Ba, Ca, etc.).

Table 6. Determination of radio-active Sr (No.1)

Ashes of Muscle : 1,320 c. p. m. /1,000 mg. (Nov. 26, 1954)

Add 50 cc of 6N HCl, then 50 cc of H₂O, and heat gently until complete solution results.

HCl Solution

Add 20 mg Ca⁺⁺, 10 mg Sr⁺⁺, 10 mg Ba⁺⁺, and finally conc. NH₄OH until pH 6. Heat gently and add 1 g Na₂CO₃, add NH₄OH dropwise until solution attains a pH of 8. Centrifuge at 2000 r. p. m. for 30 minutes.

Precipitate

Dissolve in 10 cc of conc. HNO₃. Evaporate to dryness.Supernatant
(Fraction 1)*

Drying matter

Add 23 cc of H₂O, and 77 cc of 90% (fuming) HNO₃, stir for 30 minutes. Filter through glass fiber filter.

Precipitate

Dissolve in 10 cc of H₂O. Evaporate to dryness.

Filtrate

Drying matter

Add 23 cc of H₂O and 77 cc of 90% (fuming) HNO₃, stir for 30 minutes. Filter.

Precipitate 228 c. p. m. /281 mg (Dec. 5, 1954)

Filtrate

Add 25 cc of H₂O and 20 mg Y⁺⁺⁺.
Heat in a constant temperature bath regulated at about 90°. Adjust pH to 8 with NH₄OH, stir continuously. Centrifuge Y(OH)₃ precipitate for 5 minutes.729 c. p. m. /426 mg
(Dec. 13, 1954)
(Fraction 2)

Supernatant

Evaporate to 25 cc.
Add 20 mg of Ba⁺⁺.
Adjust pH to 8 with NH₄OH.
Add 1 cc 6 M-HC₂H₃O₂ and 2 cc of 6 M-NH₄C₂H₃O₂ (pH 5.5).
Heat gently in a constant temperature bath of about 90°, add dropwise with stirring 1 cc of 1.5 M Na₂CrO₄ solution.
Stir vigorously until precipitating completes.
Allow to cool and settle for 24 hours.
Centrifuge for 5 minutes.

Precipitate

187 c. p. m. /134 mg
(Dec. 17, 1954)
(Fraction 3)

Supernatant

Add 20 mg of Y⁺⁺⁺.
Heat gently in a constant temperature bath of about 90°. Adjust pH to 8 with NH₄OH, stir continuously, centrifuge for 5 minutes.

Precipitate

13.5 c. p. m. /116 mg.
(Dec. 18, 1954)
(Fraction 4)

Supernatant

Dilute solution to 50 cc, adjust pH to 6, then heat gently to near boiling.
Add Na₂CO₃ until complete precipitation of Sr occurs (PH 9), allow to digest then filter through glass fiber filter.

Precipitate

Add distilled water to 25cc.
Add HCl (1:1) dropwise, until hydroxide barely dissolves.
Add 15-20 drops saturated oxalic acid solution with stirring.
Allow to digest and filter through.⁹⁰Sr + ⁹⁰Sr3.6 c. p. m. /21 mg.
(Dec. 15, 1954)
3.2 c. p. m. /21 mg
(Jan. 21, 1955)
2.7 c. p. m. ** /21 mg
(April 25, 1956)

Filtrate

0 c. p. m. /47 mg.
(Dec. 15, 1954)

Precipitate*

0 c. p. m. /86 mg.
(Dec. 20, 1954)
(Fraction 5)

Filtrate

28.5 c. p. m. /955 mg.
(Dec. 21, 1954)
(Fraction 6)* This fraction should contain ⁹⁰Y built up from ⁹⁰Sr according to Harley³⁾, if let it be stood for about twelve days, but in this experiment it was submitted to the next step so quickly for some reason, that no ⁹⁰Y could be found in the fraction 5.** The count suggested that ⁹⁰Sr in the sample afforded not more than 0.2% of total radiation.

Table 3. The distribution of radiation in each fraction described in Table 2

Fr. No.	Date of measurement	weight (mg)	c. p. m.	% (c. p. m.) for the ashes used
1	(I) Oct. 4, 1954.	10	3.6	0.62
	(II) Nov. 9, 1954.	10	8.5	2.5
2	(I) Oct. 4, 1954.	360	86.7	14.79
	(II) Nov. 9, 1954.	70	103	30.3
3	(I) Oct. 4, 1954.	170	102.3	17.49
	(II) Nov. 9, 1954.	90	227	66.8
4	(I) Oct. 4, 1954.	30	0	0
	(II) Nov. 9, 1954.	50	0	0
5	(I) Oct. 4, 1954.	10	7	1.20
	(II) Nov. 9, 1954.	10	0	0
6	(I) Oct. 4, 1954.	10	0	0
	(II) Nov. 9, 1954.	10	0	0
total	(I) Oct. 4, 1954.		199.6	34.10
	(II) Nov. 9, 1954.		338.5	99.6

(I) : The result of the first experiment.
 (II) : The result of the second experiment.

実験 3. マグロ白肉灰分の陰イオン交換樹脂による放射化学分析 (担当者: 長沢, 大熊, 西崎)

稀土類及びその他の金属区分 (227 c. p. m. /90 mg, 実験 2 - Fr. 3) に 2 N 塩酸 20 cc を加え, これに担体として塩化亜鉛 14 mg を加えて溶かし, その溶液を Amberlite IRA-400 の層 (直径 1 cm, 長さ 20 cm, 50~100 mesh の樹脂粒を 1 夜 2 N 塩酸に浸した後, ガラス円筒につめ, 2N 塩酸 50 cc, 0.25N 硝酸 100 cc, 次に 2N 塩酸 100 cc で洗って Cl 型にしたもの) に注入し, 流出液をとる. 次に 2N 塩酸 150 cc で溶離し, この溶離液と前の流出液とを合し, 水浴上で蒸発乾固する. これを塩酸 (1:200) のなるべく少量に溶かして試料皿に移し蒸発乾固した後, 放射能を測定する (Fr. 1). 次に水 80 cc, 0.25 N-硝酸 120 cc で溶離し, 両溶離液を合せ水浴上で蒸発乾固する. この残留物を 0.25 N 塩酸 60 cc に溶かした後, 6N-アンモニア水でメチルレッド中性とし, 次に氷酢酸 0.1 cc, 30 w/v% 酢酸アンモニウム 6 cc を加え 60° で少し加温した後, この液に 8-hydroxyquinoline を 0.8 N-酢酸に 2% の割合で溶かした溶液を沈澱が生成しなくなるまで加え, 更に 1 cc 過剰に加えて流水中で 1 時間冷却する. 生成する淡緑黄色の沈澱を濾紙で濾過し, 濾紙と沈澱とを硝酸と硫酸を用いて強熱灰化した後塩酸を加えて水浴上で蒸発乾固する. その残留物を塩酸 (1:200) のなるべく少量に溶かして試料皿に移し蒸発乾固した後放射能を測定する (Fr. 2). 濾液は水浴上で蒸発乾固した後, 硝酸と硫酸を用いて強熱灰化し, 更に塩酸を加えて水浴上で蒸発乾固する. その残留物を塩酸 (1:200) のなるべく少量に溶かして試料皿に移し蒸発乾固した後, 放射能を測定する (Fr. 3). Fr. 1~Fr. 3 の分離操作法を一括して Table 4 に示し, その放射能測定結果を Table 5 に示す.

Table 4. Separation of ⁶⁵Zn in ashes of white muscle by the use of Amberlite IRA-400

	Date of measurement	Weight (mg)	c. p. m.
Fr. 3 of Table 2	Nov. 9, 1954.	90	227
Dissolve in 200 cc of 2N-HCl, add 14 mg of ZnCl ₂ .			
Solution	Insoluble matter		
Pass through Amberlite IRA-400 column*.	(Weight and c. p. m. : negligible)		
Amberlite IRA-400 column	Effluent		
Wash with 150 cc of 2N-HCl.	Effluent		
Amberlite column	Effluent		
Wash with 80 cc of water.	Combine, evaporat to dryness, ignite. Ashes Fr. 1		

Amberlite column	Effluent
Wash with 120 cc of 0.25 N-HNO ₃ .	
Effluent	Amberlite column
Combine, evaporate to dryness, dissolve in 60 cc of 0.25 N-HCl, neutralize with 6 N-NH ₄ OH and add 0.1 cc of glacial acetic acid, and 6 cc of 30% ammonium acetate soln., heat to 60°, then add an excess of 2%-8-hydroxyquinoline solution in N-acetic acid, filter, after standing for 1 hour.	
Precipitate	Filtrate
Ignite	Evaporate to dryness, ignite. Ashes-Fr.3
Ashes	Fr.2

* The Amberlite column is of 1.0 cm diameter, 20 cm height. Before use, the Amberlite IRA-400 (50-100 mesh) is soaked in an excess of 2N-HCl overnight, then wash with 50 cc of 2N-HCl 100 cc of 0.25 N-HNO₃ and 100 cc of 2N-HCl.

Fr.1 and Fr.3 : Contain metals except Zn; Fr.2 : Zn.

Table 5. The distribution of radiation in each fraction described in Table 4

Fr. No.	Date of measurement	Weight (mg)	c. p. m.	% (c. p. m.) for the Fr. 3 in Table 6.
1	Nov. 11, 1954.	140	16	7.05 (4.71) *
2	Nov. 11, 1954.	40	260	114.5 (76.46) *
3	Nov. 11, 1954.	20	4	1.76 (1.18) *
Total	Nov. 11, 1954.		280	123.31 (82.35) *

* % (c. p. m.) for the original ashes, of 340 c. p. m./250mg.

Table 5 に於てカッコのない%は実験 2, Table 2 の Fraction 3 (稀土類及びその他の金属区分) に対する%を示し, カッコ内の%は原試料灰分に対する%を示す。

実験 4. マグロ白肉灰分中の ⁹⁰Sr+⁸⁹Sr の定量 (担当者: 長沢, 河村) (Table 6)

マグロの肉の灰分 1,000 mg (1,320 c. p. m., 昭和 29 年 11 月 26 日計測) を塩酸 50 cc に溶かし, 水 50 cc 及び担体として Ca⁺⁺ 20 mg, Sr⁺⁺ 10 mg, Ba⁺⁺ 10 mg を加え濃アンモニア水で pH 6 とし (この際磷酸塩の沈澱を生ずる), 徐々に加熱してかきまぜながら炭酸ナトリウム 1g を加え, この液にアンモニア水を加え pH を 8 とした後, 1 分間 2,000 回転で 30 分間遠心分離して沈澱と上清とに分けた。上清は蒸発乾固して放射能を測定した (Fr.1)。沈澱を濃硝酸 10 cc に溶かし蒸発乾固し, 水 23 cc 及び 90% 硝酸 77 cc を加え 30 分間かきまぜた後濾過し, 濾液* と沈澱に分けた。沈澱は水 10 cc に溶かし蒸発乾固し更に水, 硝酸を等量加え, 同様に処理した後, 濾過し, 沈澱の放射能は直ちに測定し, 濾液は前の濾液* に合し蒸発乾固して放射能を測定した (Fr.2 Table 6)。この沈澱を水 25 cc に溶かし, 担体とし Y⁺⁺⁺ 20 mg を加え 90° の恒温槽でしばらく加温した後, かきまぜながらアンモニア水で pH 8 に調節し 5 分間遠心分離し, 沈澱の放射能を測定した (Fr.3)。上清を 25 cc に濃縮し担体として Ba⁺⁺ 20 mg を加え, アンモニア水で pH 8 とし, 6 M 酢酸 1 cc 及び 6 M 酢酸アンモニウム液 (pH 5.5) 2 cc を加え, 90° の恒温槽に入れてかきまぜながら 1.5 M クロム酸ナトリウム液 1 cc を滴加し, 沈澱がもはや析出しなくなるまで激しくかきまぜ冷所に 1 日間放置した後, 5 分間遠心分離し, 沈澱を乾燥し放射能を測定した (Fr.4)。上清に Y⁺⁺⁺ 20 mg を加え, 90° の恒温槽に入れ, アンモニア水で pH 8 に調節し 5 分間遠心分離して上清と沈澱 (十分に放置したときは ⁹⁰Sr から導かれた ⁹⁰Y の部分である。この実験では速やかに実験を終了する必要に迫られたので充分放置しなかつた。従つて稀土類部分の前段階の沈澱が完全かどうかを見るたよりとただけである) に分けた。上清を 50 cc にうすめ pH 6 とし沸騰点近くまで加熱し, Sr の沈澱が完全に析出するまで炭酸ナトリウムを加えしばらく放置し濾過する。沈澱は SrCO₃ 部分である。濾液は蒸発乾固して放射能を測定した (Table 6)。

前記の沈澱部* に塩酸 (1:1) 数滴を滴加し更に飽和醋酸溶液 15 滴をかきまぜながら滴加し, 30 分放置後濾過し Fraction 5 と Fraction 6 に分けた。分離操作法を一括して Table 6 に示す。

Fraction 1 の処理 (Table 7)

前記操作中の一部分であるが Fraction 1 中に, $^{90}\text{Sr} + ^{80}\text{Sr}$ の混入なきやを確めるため実験 4 と同じ操作をくり返した。即ち 6N 塩酸 30 cc, 水 50 cc に溶かし, 担体として $\text{Ca}^{++} 20 \text{ mg}$, $\text{Sr}^{++} 10 \text{ mg}$, $\text{Ba}^{++} 10 \text{ mg}$ を加え濃アンモニア水で pH 6 とし徐々に加熱しかきまぜながら炭酸ナトリウム 1g を加えて溶かし, アンモニア水を加え pH を 8 とした後, 2000 r.p.m で 30 分間遠心分離し沈澱と上清に分けた。この上清を濃縮し更に熱灼して放射能を測定した (Fr. 1)。沈澱は濃硝酸 10 cc に溶かし蒸発乾固し, 水 12 cc, 90% 硝酸 39 cc を加え 30 分間かきまぜた後に濾過し, 濾液* と沈澱に分け沈澱は水 10 cc に溶かし蒸発乾固し更に水, 硝酸を前記と等量加え, 同様に処理した後, 濾過し, 沈澱と濾液とに分けた。この濾液を前の濾液* と合し放射能を測定した (Fr. 2) 次にそのまま直に沈澱の放射能を測定した。この沈澱に水 25 cc を加えて溶かし担体として, $\text{Y}^{+++} 20 \text{ mg}$ を加え, 90° の恒温槽に入れかきまぜながらアンモニア水を滴加し pH 8 に調節し, しばらくかきまぜた後放置し, 5 分間遠心分離した。沈澱は Fraction 3 である。上清を 25 cc に濃縮し, 担体として $\text{Ba}^{++} 20 \text{ mg}$ を加え, アンモニア水で pH 8 とし, 6 M 酢酸 1 cc と 6 M 酢酸アンモニウム液 (pH 5.5) 2 cc とを加え, 90° の恒温槽に入れかきまぜながら, 1.5 M クロム酸ナトリウム溶液 1 cc を滴加し, 沈澱がもはや出なくなるまで激しくかきまぜ冷所に 1 日放置後, 5 分間遠心分離する。沈澱を蒸発乾固し, 放射能を測定した (Fr. 4)。

速やかにこの検定を終了する必要があつたので直ちにこの上清に, 担体として $\text{Y}^{+++} 20 \text{ mg}$ を加え, 90° の恒温槽に入れ, アンモニア水で pH 8 に調節し, 5 分間遠心分離して上清と沈澱部** に分離した。上清は 50 cc にうすめ pH 6 に調節し, 沸騰近くまで加熱し, Sr の沈澱が完全に落ちるまで, 炭酸ナトリウムを加え, しばらく放置後濾過した。この残留物は SrCO_3 の Fraction である。この Fraction も又濾液を蒸発乾固した部分も放射能を認めなかつた。

試みに前記の沈澱部** に塩酸 (1:1) 数滴を滴加し, 更に飽和酢酸溶液 15 滴をかきまぜながら滴加し, 30 分放置後濾過し Fr. 5, Fr. 6 に分けた。Fr. 5 には当然放射能は認められなかつた。分離操作を一括して Table 7 に示す。なお Table 6 及び Table 7 の放射能測定結果を Table 8 及び Table 9 に一括して示す。

Table 7. Determination of Radio-active Sr (No. 2), Reanalysis of Fraction 1 in Table 6

Fraction 1

Add 30 cc of 6 N HCl, and 50 cc of H_2O . Heat gently until complete solution results.

HCl Solution

Add 20 mg Ca^{++} , 10 mg Sr^{++} , 10 mg Ba^{++} , and add conc. NH_4OH until pH 6. Heat gently and add 1 g Na_2CO_3 and NH_4OH dropwise until solution attains a pH of 8. Centrifuge at 2000 r.p.m. for 30 minutes.

Precipitate

99 c.p.m./190 mg.
(Jan. 5, 1955)

Dissolve in 5 cc of conc. HNO_3 .
Evaporate to dryness.

Drying matter

Add 12 cc of H_2O , and 39 cc of 90% (fuming) HNO_3 , stir for 30 minutes. Filter through a glass fiber filter.

Precipitate

Dissolve in 10 cc of H_2O , Evaporate to dryness.

Drying matter

Add 12 cc of H_2O , and 39 cc of 90% (fuming) HNO_3 , stir for 30 minutes. Filter through a glass fiber filter.

Precipitate

18.7 c.p.m./30 mg.
(Jan. 17, 1955)

Supernatant

Ignite

83 c.p.m./2750 mg.
(Jan. 7, 1955)
(Fraction 1)

Filtrate

Filtrate

Evaporate to dryness.
76.7 c.p.m./126 mg.
(Jan. 17, 1955)
(Fraction 2)

Add 25 cc of H_2O , 20 mg of Y^{+++} . Heat in a temperature bath regulated at about 90° . Adjust pH to 8 with NH_4OH while stirring. Centrifuge $Y(OH)_3$ precipitate for 5 minutes.

Supernatant

Evaporate to 25 cc. Add 20 mg of Ba^{++} . Adjust pH to 8 with NH_4OH . Add 1 cc 6M-H $C_2H_3O_2$ and 2 cc. 6M- $NH_4C_2H_3O_2$ (pH 5.5).

Heat gently in a temperature bath regulated at about 90° , add dropwise with stirring 1 cc of 1.5M Na_2CrO_4 solution.

Stir vigorously until precipitation is complete. Allow to cool and settle for 24 hours. Centrifuge for 5 minutes.

Precipitate

Evaporate to dryness

2.4 c. p. m./16 mg.
(Jan. 17, 1955)
(Fraction 3)

Supernatant

Add 20 mg of Y^{+++} . Heat gently in a temperature bath regulated at about 90° . Adjust pH to 8 with NH_4OH , while stirring, centrifuge for 5 minutes.

Precipitate

0 c. p. m./36 mg
(Jan. 21, 1955)
(Fraction 4)

Supernatant

Dilute solution to 50 cc, adjust pH to 6, then heat gently to near boiling. Add Na_2CO_3 until complete precipitate of Sr occurs (pH 9), allow to digest, then filter through a glass fiber filter.

Precipitate

Add HCl(1:1) dropwise, until hydroxides dissolve. Add 15-20 drops saturated oxalic acid solution with stirring. Allow to digest then filter through.

$^{90}Sr + ^{80}Sr$
0 c. p. m./18 mg.
(Jan. 24, 1955)

Filtrate.
0 c. p. m./21 mg.
(Jan. 24, 1955)

Precipitate
0 c. p. m./26 mg.
(Jan. 25, 1955)
(Fraction 5)

Filtrate
3.2 c. p. m./15 mg
(Jan. 25, 1955)
(Fraction 6)

Table 8. The distribution of radiation in each fraction described in Table 6

Fr. No.	Date of measurement	weight (mg)	c. p. m.	% (c. p. m.) for the ashes used
1	Dec. 20, 1954.	1,740	121	9.16
2	Dec. 13, 1954.	426	729	55.22
3	Dec. 17, 1954.	134	187	14.16
4	Dec. 18, 1954.	116	13.5	1.02
5	Dec. 20, 1954.	86	0	0
6	Dec. 21, 1954.	955	28.5	2.9
$^{90}Sr + ^{80}Sr$	Dec. 15, 1954.	21	3.6	0.27
^{90}Sr	Apr. 25, 1956.	21	2.7	0.20

Table 9. The distribution of the radiation in each fraction in the reanalysis of Fraction 1 in Table 6 and 8 (The results of Table 7)

Fr. No.	Date of measurement	weight (mg)	c. p. m.	% (c. p. m.) for the usedashes
1	Jan. 7, 1955.	2,750	83	6.28
2	Jan. 17, 1955.	126	76.7	5.81
3	Jan. 17, 1955.	16	2.4 *	1.81
4	Jan. 21, 1955.	36	0 *	0
5	Jan. 25, 1955.	26	0 *	0
6	Jan. 25, 1955.	15	3.2 *	0.24
$^{90}Sr + ^{80}Sr$	Jan. 24, 1955.	18	0 *	0

* counted for 1 hour, for background, sample and background, respectively.

この結果 Fr. 1 には $^{90}\text{Sr}+^{89}\text{Sr}$ はもはや存在しないことを確めた。

実験 5. マグロ腎臓部の灰化 (担当者; 長沢, 大熊)

水浴上で加熱して乾燥したマグロの腎臓部位 2.1288g を硝酸と硫酸を加えて強熱灰化し, 淡灰白色の粒状灰分 118.2mg を得た。試料のマグロ腎臓の新鮮な状態, 乾燥状態及びその灰分の放射能測定結果を Table 10 に示す。

Table 10. Radioactivity of kidney of Yellow fin (*Neothunnus macropterus*).

	Fresh kidney	Dry kidney*	Ashes**
c. p. m./g	2,533	8,700	811,000
Date of measurement	July 20, 1954.	July 20, 1954.	July 28, 1954.

* 1 g of dried material from 3.03 g of fresh kidney.

** 1 g of ashes from 15.48 g of dried kidney.

実験 6. マグロ腎臓灰分の陽イオン交換樹脂による放射化学分析 (担当者; 長沢, 大熊)

腎臓灰分 10,493 c. p. m./68.7 mg を塩酸 (1:1) 20 cc に加熱して溶かし, 不溶物は濾過した後, 塩酸 (1:2) で放射能がなくなるまで洗い, 洗液は濾液に合し水浴上で 2 cc 以下に濃縮し水を加えて 100 cc とする。この溶液を塩酸 (1:2) 500 cc で H 型とした Amberlite IR-120 層 (直径 1 cm, 長さ 20 cm, 50~80 mesh) に流入し, 流出液をとる。次に 0.25 N 塩酸 250 cc で溶離し, この溶離液と流出液を合し水浴上で蒸発乾固する。蒸発残留物に塩酸 (1:200) をなるべく少量加えて溶かした後試料皿に移し, 水浴上で蒸発乾固し放射能を測定する (Fr. 1)。次に 0.5% 蓆酸 500 cc (Fr. 2), pH 3.8 の 5% クエン酸アンモニウム液 500 cc (Fr. 3), pH 6.0 の 5% クエン酸アンモニウム液 500 cc (Fr. 4), 次に塩酸 (1:2) 500 cc (Fr. 5) で溶離し, 各溶離液及びイオン交換樹脂 (Fr. 6) を実験 2 に準じて処理する。Fr. 1~Fr. 6 の分離操作法を一括して Table 11 に示し, その放射能測定結果を Table 12 に示す。

Table 11. Group separation of radioactive elements in Ashes of kidney by the use of Amberlite-IR-120

	Date of measurement	Weight(mg)	c. p. m.
Ashes of kidney.....	Oct. 19, 1954.	68.7	10,493
dissolve in 20cc of HCl (1:1), heat.			
Solution	Insoluble matter		
Concentrate to less than 2 cc and dilute to 100 cc with water, pass through the Amberlite column. * Wash with 250 cc of 0.2 N-HCl.	(Weight and c. p. m.: negligible)		
Amberlite IR-120 column	Effluent		
Wash with 500 cc of 0.5% oxalic acid.	Evaporate to dryness, ignite. Ashes...Fr. 1		
Amberlite column	Effluent		
Wash with 500 cc of 5%-ammonium citrate (pH 3.8).	Evaporate to dryness, ignite. Ashes...Fr. 2		
Amberlite column	Effluent		
Wash with 500 cc of 5%-ammonium citrate (pH 6.0).	Evaporate to dryness, ignite. Ashes...Fr. 3		
Amberlite column	Effluent		
Wash with 500 cc of HCl (1:2).	Evaporate to dryness, ignite. Ashes...Fr. 4		
Amberlite column	Effluent		
Ignite.	Evaporate to dryness, ignite. Ashes...Fr. 5		
Ashes.....	Fr. 6		

* The Amberlite column is of 1.0 cm diameter, 20 cm height. Before use, the Amberlite IR-120 (50-80 mesh) is washed with 500 cc of HCl (1:2).

Fr. 1: Anions and neutral materials. Fr. 2: Zr, Nb, U, Th, Hf, Fe, etc. Fr. 3: Rare earth metals (La, Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Y, etc.), alkaline metals and other heavy metals. Fr. 4: Alkaline earth metals such as Sr, Ba and Ca.

Table 12. The distribution of radiation in each fraction described in Table 11.

Fr. No.	Date of measurement	weight (mg)	c. p. m.	% (c. p. m.) for the ashes used
1	Oct. 27, 1954.	10	15	0.14
2	Oct. 27, 1954.	60	1,663	15.9
3	Oct. 27, 1954.	80	4,191	40.0
4	Oct. 27, 1954.	20	0	0
5	Oct. 27, 1954.	10	10	0.1
6	Oct. 27, 1954.	10	0	0
Total	Oct. 27, 1954.		5,874	56.14

実験 7. 腎臓灰分の陰イオン交換樹脂による放射化学分析 (担当者: 長沢, 大熊)

実験 6 で分離した稀土類及びその他の金属区分 (Fr. 3) 中の 1,538 c. p. m./40 mg を 2 N 塩酸 50 cc に溶かした後 Amberlite IRA-400 の Cl 型層 (直径 1 cm, 長さ 20 cm, 50~100 mesh) で前処理法は実験 3 に準ずる) に流入した。担体として酸化亜鉛を用い, これを放射性亜鉛を水と硝酸で溶離した液に加える以外, 各区分 (Fr. 1~Fr. 3) の処理法は実験 3 に準ずる。Fr. 1~Fr. 3 の分離操作を一括して, Table 13 に示し, その放射能測定結果を Table 14 に示す。

Table 13. Separation of ⁶⁵Zn in ashes of kidney by the use of Amberlite IRA-400.

	Date of measurement	Weight (mg)	c. p. m.
Fr. 3. of Table 11	Nov. 18, 1954.	40	1,538
Dissolve in 50 cc of 2N-HCl.			
Solution			Insoluble matter
Pass through Amberlite IRA-400 column. *			(Weight and c. p. m. : negligible)
Amberlite IRA-400 column			Effluent
Wash with 150 cc of 2N-HCl.			
Amberlite column			Effluent
Wash with 80 cc of water.			Combine, evaporate to dryness, ignite. Ashes..... Fr. 1
Amberlite column			Effluent,
Wash with 120 cc of 0.25 N-HNO ₃ .			
Effluent			Amberlite column
Combine, evaporate to dryness, add with 30 mg of ZnO then dissolve in 60 cc of 0.25 N-HCl neutralize with 6 N-NH ₄ OH and add 0.1 cc of glacial acetic acid, 6 cc of 30% ammonium acetate, heat to 60°, then add an excess of 2% 8-hydroxyquinoline solution in 0.8 N-acetic acid, filter after standing for 1 hour.			
Precipitate			Filtrate
			Evaporate to dryness, ignite. Ashes Fr. 3
Ashes.....			Fr. 2

* The Amberlite column is of 1.0 cm diameter, 20 cm height. Before use, Amberlite IRA-400 (50-100 mesh) is soaked in an excess of 2N-HCl overnight, then wash with 50 cc of 2N-HCl, 100 cc of 0.25 N-HNO₃ and 100 cc of 2N-HCl. Fr. 1 and Fr. 3 contains metals except Zn. Fr. 2 contains Zn.

Table 14. The distribution of radiation in each fraction described in Table 13

Fr. No.	Date of measurement	Weight (mg)	c. p. m.	% (c. p. m.)
1	Nov. 22, 1954.	70	22	1.43 (0.59)*
2	Nov. 22, 1954.	200	1,246	81.0 (33.2)*
3	Nov. 22, 1954.	10	158	10.3 (4.2)*
Total	Nov. 22, 1954.		1,426	92.73 (37.99)*

* % c. p. m. for the original ashes, of 10493×1538/4119 c. p. m.

Table 14 に於いてカッコのない%は実験 6, Table 11のFraction 3 (稀土類及びその他の金属区分) に対する%を示し, カッコ内の%は原試料灰分に対する%を示す。

実験8 第五油津丸が昭和29年7月上旬, 北緯3°20', 東経180° 附近で捕えたビンナガマグロ (Table 16, 第4列及び第6列参照) の各臓器各1gを乾燥した資料中, 100 c. p. m. 以上の検体を取り, 10~30日間隔で数回計測し, 横軸に計測期間 (日数) を, 縦軸に各 c. p. m. の対数値をとり減衰線を作成した (Fig 2 及び 3)。

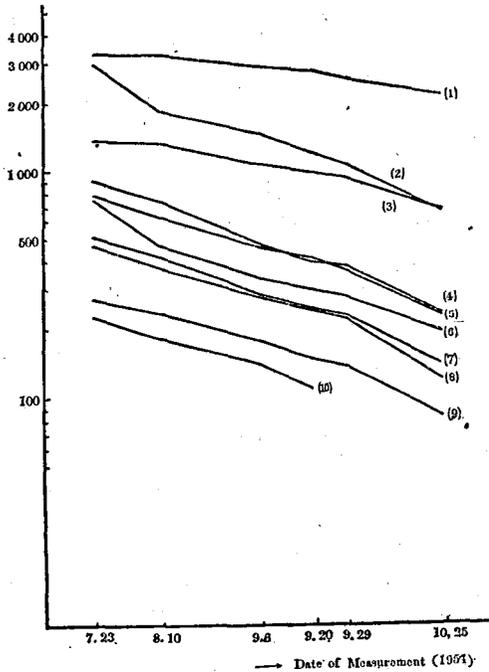


Fig. 2. Decay Curves of Fish Organs

1) Spleen. 2) Liver. 3) Kidney. 4) Pyloric caeca. 5) Stomach. 6) Blood. 7) Stomach Content. 8) Intestine. 9) Heart. 10) Testis.

Fig. 2 及び Fig. 3 の結果から, 脾臓, 腎臓, 卵巣は, いずれもそれらの半減期が100日又はそれ以上であるが, 肝臓, 腸, 幽門垂, 胃内容物, 胃, 心臓, 嚔丸はいずれも50~70日である。

以上の事実から脾臓, 腎臓, 卵巣には比較的長い半減期の放射性元素が多量に存在し, 精囊は卵巣に比較して半減期の短い元素が存在するらしい。

実験9 検体の計測成績 (第15表) 主として東京築地市場で水揚げされ, 検査の結果汚染が甚だしいとして廃棄された魚の1部を当所で詳細に放射能計測を行った。

実験10 臓器別による検体の計測成績 (第16表) 実験9の検体の主なものについて各臓器別に詳しく放射能計測を行った成績を示す。

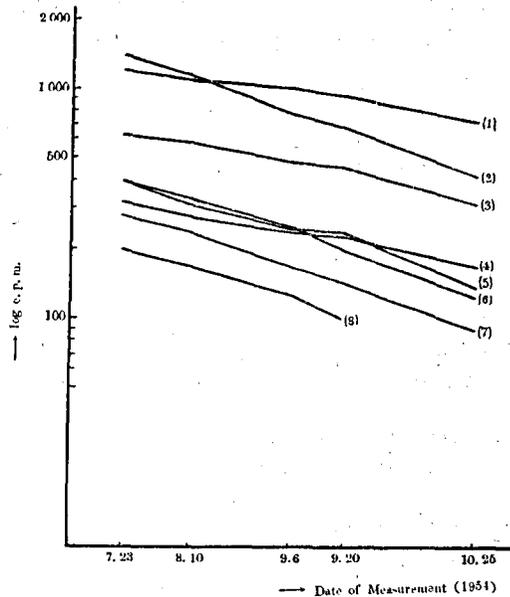


Fig. 3. Decay Curves of Fish Organs

1) Spleen. 2) Liver. 3) Kidney. 4) Ovary. 5) Intestine. 6) Pyloric caeca. 7) Stomach Content. 8) Stomach.

Table 16. Counts of Fish Organs Contaminated by Radioactivity

Name of Ship	Name of Fish*	Body Surface					Stomach				Stmoch Content				Pyloric Caeca				Liver				Intestine				Spleen				Kidney				Heart				Blood				Ov	
		Central	Back	Abdomen	Tail	Gill	Whole	w/g	Dried	Ashed	Whole	w/g	Dried	Ashed	Whole	w/g	Dried	Ashed	Whole	w/g	Dried	Ashed	Whole	w/g	Dried	Ashed	Whole	w/g	Dried	Ashed	Whole	w/g	Dried	Ashed	Whole	w/g	Dried	Ashed	Whole	w/g				
No. 3-Shinsei-mar	Thyn. ala.	1,373	-	-	-	2,590	-	168 (0.20)	-	-	-	-	-	814 (38)	205	425	-	2,136	-	-	-	-	-	-	-	-	4,649 (145)	713	1,093 (0.36)	-	-	-	-	-	-	-	-	1,922 (85)	21					
"	Thyn. ala.	395	365	1,344	167	963	311 (116)	56	148	172	50 (0.30)	73	658	132	264	-	2,201	449	803	-	190 (0.30)	1,763	529	771	2,056 (105)	246	490	186	36	85	-	-	168	-	-	-	-							
"	Scomb. chin.	91	-	-	-	-	-	89 (0.23)	-	257	-	-	2,269	800	-	-	636	136	-	-	-	-	-	-	-	282	90 (0.32)	148	-	-	-	-	-	-	-	-	-							
No. 5-Aburatsu-mar	Thyn. ala.	-	849	1,496	462	2,072	943	388 (0.30)	785	-	270 (0.30)	271	1,211	497 (0.40)	905	2,943 (0.40)	3,418	1,507	-	-	1,642	254 (0.25)	472	6,010	2,250 (0.35)	3,279	2,758	881 (0.35)	1,381	418	135 (0.35)	271	362	344 (0.40)	748	-	-	-						
"	Thyn. ala.	146	-	-	-	-	115	57 (0.25)	-	36 (0.30)	55	216	119 (0.23)	187	333 (0.35)	352	205	-	-	166	-	-	160	90 (0.40)	146	173	49 (0.25)	98	-	-	-	-	-	-	-	-								
"	Thyn. ala.	-	542	1,130	221	1,284	562	114 (0.15)	198	-	149 (0.31)	277	848	218 (0.25)	395	1,349 (0.35)	2,225	810	-	-	610	227 (0.20)	395	991	779 (0.25)	1,175	1,342	447 (0.26)	619	216	54 (0.25)	90	-	-	-	1,061	19							
"	Thyn. ala.	158	138	139	59	378	87	31 (0.19)	44	-	31 (0.09)	45	139	43 (0.18)	78	229 (0.35)	346	157	-	-	133	39 (0.25)	60	1,229	489 (0.32)	675	306	154 (0.33)	240	47	7 (0.20)	23	-	-	-	-								
"	Thyn. ala.	375	297	637	145	750	278	41 (0.23)	76	-	55 (0.35)	63	397	62 (0.25)	228	317 (0.35)	934	229	-	-	392	127	-	118	164 (0.30)	233	386	103 (0.22)	180	91	27 (0.25)	45	-	-	-	507	(
No. 15-Taihō-mar	Scomb. chin.	78	102	128	30	240	43	6	7	11 (66)	1	4	32	8	12	161	22	40	-	-	11	4	14	23	15	31	40 (80)	10	23	17	6	7	5	12	35	-	-							

() : Weight (g) of material when radioactivity was measured
 * See foot note of Table 15

Table 16. Counts of Fish Organs Contaminated by Radioactivity

Stomoch Content				Pyloric Caeca				Liver				Intestine				Spleen				Kidney				Heart				Blood				Ovary				Testis				Muscle				Red Muscle															
ed	Whole	w/g	Dried	Ashed	Whole	w/g	Dried	Ashed	Whole	w/g	Dried	Ashed	Whole	w/g	Dried	Ashed	Whole	w/g	Dried	Ashed	Whole	w/g	Dried	Ashed	Whole	w/g	Dried	Ashed	Whole	w/g	Dried	Ashed	Whole	w/g	Dried	Ashed	Whole	w/g	Dried	Ashed	Whole	w/g	Dried	Ashed	Whole	w/g	Dried	Ashed	Whole	w/g	Dried	Ashed	Whole	w/g	Dried	Ashed	Whole	w/g	Dried
	-	-	-		814 (38)	205	425		2,136	-	-		-	-	-		4,649 (145)	713	1,093 (0.36)		-	-	-		-	-	-		1,922 (85)	219	358		-	-	-		56	-	-		152	-	-																
172	-	50	73 (0.30)		658	132	264		2,201	449	803		-	124	190 (0.30)		1,763	529	771		2,056 (105)	246	490		186	36	85		168	-	-		146	44	95 (0.27)		30	5	5 (0.30)		135	12	30 (0.45)																
257	-	-	-		2,269	800	-		636	136	-		-	-	-		-	-	-		282	90	148 (0.32)		-	-	-		-	-	-		120	55	101 (0.15)		-	5	3 (0.27)		-	-	-																
-	270	271 (0.30)			1,211	497	905 (0.40)		3,418	1,507	2,943 (0.40)		1,642	254	472 (0.25)		6,010	2,250	3,279 (0.35)		2,758	881	1,381 (0.35)		418	135	271 (0.35)		362	344	748 (0.40)		474	130	244 (0.20)		94	7	14 (0.28)		378	34	60 (0.30)																
-	36	55 (0.30)			216	119	187 (0.23)		352	205	333 (0.35)		166	-	-		160	90	146 (0.40)		173	49	98 (0.25)		-	-	-		-	-	-		59	20	34 (0.25)		0	5	0 (0.35)		34	8	4 (0.30)																
-	149	277 (0.31)			848	218	395 (0.25)		2,225	810	1,349 (0.35)		610	227	395 (0.20)		991	779	1,175 (0.25)		1,342	447	619 (0.26)		216	54	90 (0.25)		-	-	-		1,061	195	316 (0.25)		48	3	3 (0.25)		245	21	-																
-	31	45 (0.09)			139	43	78 (0.18)		346	157	229 (0.35)		133	39	60 (0.25)		1,229	489	675 (0.32)		306	154	240 (0.33)		47	7	23 (0.20)		-	-	-		-	-	-		0	1	0 (0.30)		31	-	-																
-	55	63 (0.35)			397	62	228 (0.25)		934	229	317 (0.35)		392	127	-		118	164	233 (0.30)		386	103	180 (0.22)		91	27	45 (0.25)		-	-	-		507	67	97 (0.30)		7	-	-		90	17	23 (0.28)																
11 (66)	1	4			32	8	12		161	22	40		11	4	14		23	15	31		40 (80)	10	23		17	6	7		5	12	35		-	-	-		147	10	22		4	0	2		27	4	4												

() : Weight (g) of material when radioactivity was measured. Also in column „Dry”, dried weight in gram from one gram of wet material.
 * See foot note of Table 15

文 献

- 1) Honda, H., Japan Analyst 3, 368 (1954) .
- 2) Tomskins, E. R. et al. : J. Amer. Chem. Soc. 69, 2769 (1947), *ibid*, 70, 3521 (1949).
- 3) Miller, C. C., Hunter, J. A. : Analyst, 79, 483 (1954).
- 4) Print given by Harley, John H., in U. S. Atomic Energy Commission, New York Operations Office, Health and Safety Laboratory.
- 5) Knobf, V. I. : ORNL-1031 (1951) published by U. S. Atomic Energy Commission.
- 6) An Ecological Survey of White Oak Creek, 1950-1953, Conducted by T. V. T. A. for A. E. C. under contract AT (40.1) 221, February, 1954.
- 7) U. S. Atomic Energy Commission : AECD. 3446 (1950) Radiobiological Survey of Bikini, Eniwetok and Likiep Atolls. July-August 1949, July 12 (1950)

Summary

^{65}Zn was found in the muscle and kidney of the yellow fin (*Neothunnus macropterus*) caught in the west-south Pacific (N 4°, E 140-143°, Date : June 28-July 8, 1954) and radio-contaminated through H-bomb explosion tests at Bikini Atoll in 1954.

The radiation of ^{65}Zn in the muscle showed about 76%, and that in the kidney, about 33% of total activity in each, respectively.

The radiation of ^{90}Sr in the muscle showed about 0.20% of total activity.

In Table 15 and 16, the results of our investigation on the radio-contaminated samples of sea fish and their organs got from the west-south Pacific during June to October, 1954, are shown.

(See also the foot note ** on page 213)

Received February 29, 1956

原水爆実験による放射能汚染の研究 (第6報) *

放射能で汚染された肝臓を原料とする肝油の製造について

長沢 佳熊, 中山 豪一, 芹沢 淳, 西崎 笹夫

Studies on Radio-Contamination of Foodstuffs Effected
by A- or H-Bomb Explosion. VI.On the Effect upon Liver Oil Production by the
Use of Radio-Contaminated Fish Livers as a Starting Material

Kakuma NAGASAWA, Goichi NAKAYAMA, Jun SERIZAWA and Sasao NISHIZAKI

昭和29年3月1日のBikini環礁の水爆実験以来、南方海域で捕えた魚類にかなりの放射能汚染を認め、特に肝臓に著しいことが判明したので、これから製造される肝油が如何に汚染されるかを調査した。東京附近における肝油製造工場3カ所に入荷している各種の肝臓を検査したが、いずれも放射能を認めなかった。次に汚染のかなり強い肝臓を原料として製造した肝油では、人工放射能の大部分が抽出残物及び廃液中に移行し、肝油部分には汚染がほとんど認められなかった。

検査方法 工場での肝臓検査は、魚類放射能検査と同様に検体から10cmの距離にGM管をおいて100 c.p.m.以上を目標に調べた。後述する(a)の場合には科学研究所製32進型、マイカ3.6mg/cm²を用い、(b)の場合は同社製Survey Metre Model ISMAZを使った。

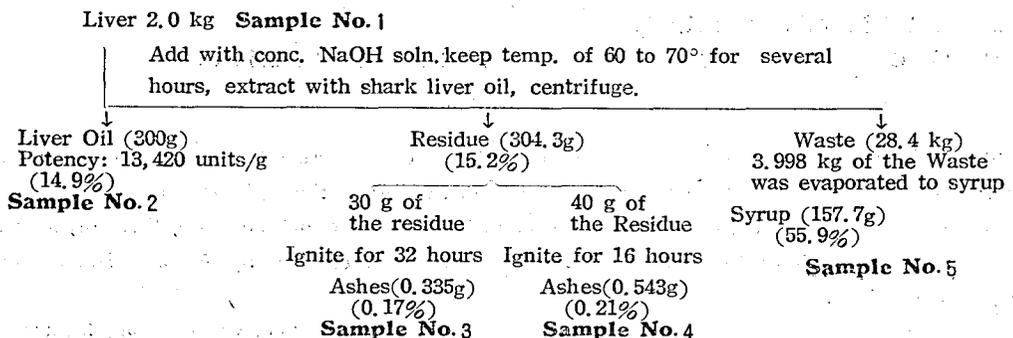
肝臓抽出物及び肝油の試験は一般に1g又は記載量を試料皿にとり、距離1cmで(a)の場合と同じGM計測器を用い10分間測定し、(効率約10%)別に天然放射能を10分間測定し、両測定数の差をc.p.m.とした。

工場調査 (a)日時: 昭和29.5.14. 場所: 川崎市大日本ビタミン油株式会社及び東京都中央区月島林兼製薬株式会社。成績: 肝油製品10種及び原料油数種を検査したが、いずれも放射能陰性。(b)日時: 昭和29.6.24. 場所: 理研ビタミン油株式会社。成績: マグロ類, カツオ, サメ, アザラシの肝臓それぞれ5~6尾分について調査したが放射能陰性、外に枕崎附近で水揚げされたサメ肝臓がやや陽性と思われたので、当所に持参後精密検査の結果陰性であった。

肝臓から肝油製造時の放射能分布 (1) New Britain 島附近で捕えたキハダマグロの肝臓2kgを原料とした。この肝臓は東京築地魚市場で採取したもので、かなり強い放射能汚染を受けていた(灰分は1.09%, Sample No.1 180 c.p.m./500mg)。

肝油の製造はなるべく常時行っている方法に従い、理研ビタミン油株式会社が行った。その大要をTable 1に示す。

Table 1. Liver Oil Extracting Procedure from Fish Liver



かくして得た Sample No. 2, 3, 4, 5 について放射能を測定した (Table 2)。

* 第5報は本誌本号213頁

Table 2. Result of Radiation of
the Sample Ashes Described in Table 1.

Sample	Weight of sample Ashes (g)	Date of Measurement	
		September 20, 1954	October 22, 1954
No. 1*	0.5	180c. p. m**	108 c. p. m**
No. 2	0.5	1	0
No. 3	0.335	68	36
No. 4	0.543	77	50
No. 5	0.5	6	6

* Ashes of the liver, the starting material.

** means count per minute, by the use of G.M. counter, having the efficiency of about 10% of total disintegrations.

(2) N 3°20', E 148° で昭和29年7月に第五油津丸が捕えたビンナガマダラの肝臓を乾燥粉末としたもの 5.0g (Sample No. 6) を原料としエーテルで抽出しエーテルを留去した後、肝油 0.2g (Sample No. 7) 及び残物 4.8g (Sample No. 8) を得、これらの放射能を測定した (Table 3).

Table 3. Result of Radiation of the Samples
Obtained by Ether Method

Sample	Weight of Samples(g) (Total Weight)	Date of Measurement	
		August 12, 1954	October 10, 1954 (Total)
No. 6*	1.0 (5.0)	...	318(1590)c.p.m. **
No. 7	0.2 (0.2)	10 c. p. m. **	2(2)
No. 8	1.0 (4.8)	654	310(1448)

* 1 g of this material showed 2240 c. p. m., when dried (0.3g) on July 21, 1954. This activity was several times as large as that of the mean of whole liver measured on August 12 and October 10 in the third and fourth column respectively in Table 3. It suggested that the radio-contamination was different in various parts of the liver.

** Refer to the foot note of Table 2.

考察と結論 (1) の結果から、試料 (Sample No. 1) 中の放射能は肝油 (Sample No. 2) にはほとんど検出されず、大部分は残物 (Sample No. 3 及び No. 4) 及び廃液 (Sample No. 5) に移行し、(2) の結果からも試料 (Sample No. 6) の放射能は肝油 (Sample No. 7) 中にはきわめて少く、大部分は残物 (Sample No. 8) 中に移行することが分つた。従つてかなりの放射能のため汚染された肝臓を使用しても、それから得られる肝油に放射能が含まれるような心配は少いと云える。

終に (1) の各部分の製造を担当された理研ビタミン油株式会社に対し厚く感謝する。

Summary

The authors measured the radiation in each fraction in the process of liver oil production by the use of radio-contaminated liver as a starting material. In the result, the radio-activity was scarcely found in the liver oil, but its most part was found in the residue and the waste, therefore, it was easy to prepare liver oil from the liver with radio-contamination effected by A- or H-bomb explosion experiments, 1954.

Received February 29, 1956

オレンジジュース中より非イオン性界面活性剤の検出竝に定量について

川城 巖, 竹内 末久

Detection and Determination of Non-ionic Surface-active Agents in Orange Juice

Iwao KAWASHIRO and Hidenaga TAKEUCHI

食品中の非イオン性界面活性剤を分離定性定量することは極めて困難であるので、われわれは先ず食品としてオレンジジュースを用い、これに含まれるポリエチレングリコール誘導体の一般の検出、定量を試みた。界面活性剤としては、Polyoxyethylene 1500 及び Tween 20 (Polyoxyethylenesorbitan monolaurate), Tween 80 (Polyoxyethylenesorbitan monostearate) を取扱つた。

Polyoxyethylene 誘導体の定性反応としては、(1) ヨウ素液による沈澱または呈色、(2) 燐モリブデン酸または珪タングステン酸による沈澱^{1,2)}、その他種々のアルカロイド試薬による反応³⁾、(3) 熱分解により発生するアセトアルデヒドを検する⁴⁾等の方法がある。(1)の反応はPolyoxyethyleneの長さにより沈澱、呈色の状態が異なり、Tween類では(2)に比べて鋭敏度に劣る。(3)の反応は鋭敏度が劣るが、(2)の反応により得た沈澱を集めて行くと陽性に出る。

また定量法としては燐モリブデン酸または珪タングステン酸による沈澱の重量法及び比色法^{1,2,5)} ヨウ素による方法⁶⁾その他⁷⁾があるが我々は鋭敏度に優る燐モリブデン酸重量法を用いることにした。

実験の部

Polyoxyethylene 誘導体の定性反応

1) ヨウ素液による呈色法 検液に N/10 ヨウ素液を注意して滴加する。Polyoxyethylene 1500 は紫黒色の沈澱を生じ、濃度小なる時は汚綠色を呈する。Tween 20 及び 80 は酒赤色を呈する。因に Poxoxyethylene 400 は緑黒色沈澱、4000 は褐黒色の沈澱を生じ、濃度小なる時は紫色を呈する。感度は Poxoxyethylene 1500 に於て 10r/cc, Tween では 100r/cc である。

2) 燐モリブデン酸による沈澱反応 検液約 1cc に 10% 塩酸 1 滴を加えて酸性とし、これに 10% 塩化バリウム液 2~3 滴を加え更に 10% 燐モリブデン酸液を滴加すると黄色沈澱を生ずる。検出限度は Tween 20, 80 及 Poxoxyethylene 1500 共に 20r/cc である。

3) 熱分解により発生するアセトアルデヒドを検する方法 2) にて生じた沈澱を遠心分離して集め、水洗を繰返し、沈澱を Fig. 1 の A 試験管に入れ、これに 85% 燐酸 0.5~1.0cc を加え、小火で熱する。B 試験管には濃硫酸 0.5cc を入れ発生するアセトアルデヒドをおさえる。A の内容が褐色になる迄加熱したら B をはずし、これに p-Oxydiphenyl の粉末を加えると暫時の後紫色を呈する。検出限度は Tween 20, 80 及び Poxoxyethylene 1500 と同約 1mg である。(Fig. 1)

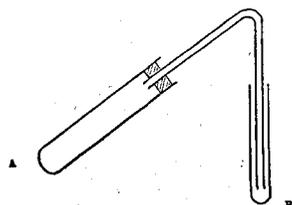


Fig Apparatus for decomposition of Polyoxyethylene

燐モリブデン酸との沈澱による定量法の検討

試薬 a. 10% 塩酸

b. 塩化バリウム液: $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10g を水にとかして 100cc とする。

c. モリブデン酸液: 燐モリブデン酸 10g を水にとかして 100cc とする。

Tween 20 5.62 mg/cc 水溶液 1cc について、燐モリブデン酸液量、10% 塩酸量、塩化バリウム液量、水洗回数を検討し、また Tween 20 5.62mg 及び 1.17mg 含有水溶液について検液量を検討した。その結果を Table 1 より Table 5 までに示す。

Table 1

Effect of Amount of Phosphomolybdic Acid Soln.

Phosphomolybdic Acid Soln. (cc)	0.25	0.5	1.0	2.0
Ppt (mg)	20.1	21.0	21.1	21.1

Table 2
Effect of Amount of 10% HCl

10% HCl (cc)	0	0.25	0.5	1.0	2.0
Ppt. (mg)	21.0	20.8	21.0	21.0	21.0

Table 3
Effect of Amount of BaCl₂ Soln.

BaCl ₂ Soln. (cc)	0	0.25	0.5	1.0	2.0
Ppt (mg)	8.9	21.1	21.0	21.1	21.0

Table 4
Effect of Washing

Times of Washing (each 5cc Water)	1	2	3	4	5
Ppt (mg)	24.2	21.4	21.0	21.0	21.0

Table 5
Effect of Concentration of Tween 20

	Ppt (mg)
Tween 20 1.17 mg/cc Soln. 1cc	4.4
" 0.117 mg/cc Soln. 10cc	4.5
" 5.62 mg/cc Soln. 1cc	21.0
" 0.562 mg/cc Soln. 10cc	21.0

以上の検討により定量操作を詳述すれば、検液一定量を予め 100° にて乾燥、秤量せる小遠沈管にとり、これに 10% 塩酸 0.5cc を加え酸性とし、更に塩化バリウム液 0.5cc、磷モリブデン酸液 1cc を加える。黄色沈澱を生じたならば、少時温浴にて温め沈澱を大きくした後遠心分離する。上澄液を捨て水 5cc を加えて細いガラス棒で沈澱をかきまぜた後再び遠心分離する。この水洗を更に 3 回繰返した後沈澱を 100° にて恒量になる迄乾燥し (約 4 ~ 5 時間) 秤量する。

次に上記の方法に依り Tween 20, 80 及び Polyoxyethylene 1500 について定量範囲を検討した。(Table 6 ~ Table 8 及び Fig 2)

Table 6
Various Amounts of Tween 20 and its Ppt.
with Phosphomolybdic Acid

Tween 20 (mg)	Ppt. (mg)	Tween 20 (mg)	Ppt. (mg)
0.238	0.8	5.95	22.2
1.19	4.6	11.9	43.6
2.38	8.4	17.9	63.7
2.98	11.0	23.8	81.7
3.57	13.2	31.0	90.9

Table 7

Various Amounts of Tween 80 and its Ppt.
with Phosphomolybdic Acid

Tween 80 (mg)	Ppt. (mg)
1.00	3.8
2.00	7.1
5.00	18.2
10.0	34.6

Table 8

Various Amounts of Polyoxyethylene 1500
and its Ppt. with Phosphomolybdic Acid

Polyoxyethylene 1500 (mg)	Ppt (mg)
0.99	3.8
1.98	7.7
4.95	18.6
9.9	34.8

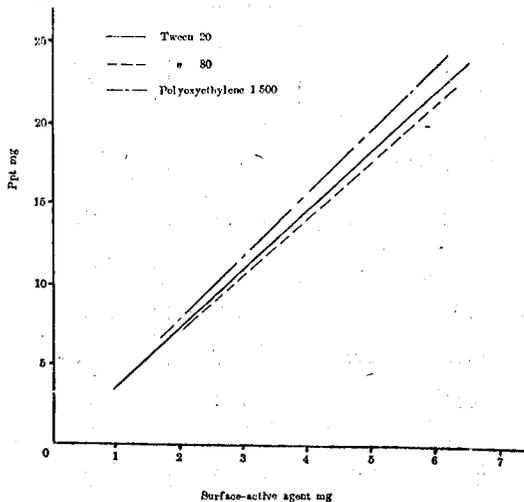


Fig 2 Calibration Curves of Surface-active Agents
加え, 10分後に450m μ で比色した。その結果をTable 9に示す。モリブデン量と(沈澱量~検体量)の間に一定の関係が見られなかった。

上記の方法を用いると界面活性剤が10mg以上のときは沈澱量と界面活性剤量とが比例しない。また界面活性剤量が1mg以下であると秤量し難いので、検体量は1mg~6mgが良い。

沈澱中のモリブデンの定量

磷モリブデン酸との沈澱量と検体量との差と、モリブデン量との間に一定の関係があれば正確な界面活性剤の定量が可能であるので Stevenson の方法⁵⁾で沈澱量とモリブデンの定量を行った。即ち Tween 20, 80 及び Polyoxyethylene 1500 の各一定量について常法により磷モリブデン酸との沈澱を作り、秤量した後、この沈澱を20ccの濃硫酸に溶かし、水にて全量を100ccとし、この10ccをとり5%(w/v)NH₄SCN液1.0cc, SnCl₂液0.5cc(35gのSnCl₂·2H₂Oを10ccの濃硫酸に溶かし、水で100ccにうすめる)を

Table 9

Mo in Ppt. of Polyoxyethylene Derivatives
with Phosphomolybdic Acid

Surface-active Agent (mg) (I)		Ppt (mg) (II)	II-I	Mo (r)
Tween 20	2.26	8.5	6.2	423
//	1.13	4.3	3.2	223
Tween 80	1.27	4.9	3.6	213
//	0.64	2.4	1.8	108
Polyoxyethylene 1500	2.08	8.7	6.6	465
//	1.04	4.4	3.4	250

抽出条件の検討

1) 沈澱妨害物質の除去 イオン性界面活性剤の存在は磷モリブデン酸との定量的沈澱を妨害する。その他硫酸塩、或種の有機酸等は沈澱による定量を妨害するので Amberlite IR-120 及び IRA-400 (共に約40メッシュ) 各3ccの層を通し除去した。Tween 20 1%水溶液 20cc を通した後各樹脂を 20cc の水で洗うと、もはや洗液より Tween 20 を検出できない。

2) 沈澱物のある場合の検討 Tween 20 1.17mg/cc 水溶液 5 cc を乾燥小戸紙で濾過し、濾液 1 cc をとり磷モリブデン酸との沈澱を作り秤量し 4.4mg を得た。Standard 4.4mg 回収率100%。

以上よりオレンジジュースよりの抽出法を次の如く行つた。オレンジジュースを必要ならば乾燥小戸紙で濾過し、その 20cc をとり、Amberlite IR-120、IRA-400 各3ccの層を順次通過せしめ、各樹脂を 20cc 以上の水で水洗し、洗液を通過液に合し、全量を 100cc とし、この 5 cc をとり磷モリブデン酸との沈澱を作り秤量する。

オレンジジュース中よりの抽出定量結果

種々のオレンジジュースについて Table 10 の結果を得た。

Table 10

Results of Assay

No.	Sample		Ppt (mg)	Standard Ppt (mg)	Recovery (%)
	Orange Juice	Added Substances (mg/cc)			
1	A	Tween 20 1.17	4.2	4.4	96
2	A	Cetylpyridinium Chloride 2 Na Laurylsulfate * 2 Tween 20 1.17	4.5	4.4	102
3	A	Tween 20 5.86	21.7	21.8	99.5
4	A	Tween 20 0.35	1.2	1.2	100
5	A	Polyoxyethylene 1500 0.83	3.2	3.2	100
6	A	Tween 80 0.76	2.5	2.7	92.5
7	B	Tween 20 1.17	4.3	4.4	98
8	B	Tween 20 1.17 Cetylpyridinium Chloride 2 Na Laurylsulfate * 2	4.4	4.4	100
9	C	Tween 20 1.17	4.4	4.4	100

※ Na Laurylsulfate was added after passed through Amb. IR-120.

Carboxymethylcellulose (C. M. C.) の共存する場合

C. M. C. はリンモリブデン酸と沈澱を生ずるが, 約 20% 塩酸々性で沸騰水浴中で 15 分間加熱すると分解してもはやリンモリブデン酸と沈澱を生じない。そこで塩酸に依る Polyoxyethylene 誘導体とリンモリブデン酸との沈澱の減少率を次の如く測定した。検液 1 cc に濃塩酸 1 cc を加え, 沸騰水浴中に 15 分, 30 分, 60 分, 夫々加熱し, これに塩化バリウム液 0.5cc 及びリンモリブデン酸液 1 cc を加え, 生じた沈澱を水洗, 乾燥, 秤量し次の結果を得た (Table 11)。

Table 11. Effect of Heating with HCl

Times of Heating (min)	Tween 20 2.68mg/cc		Tween 80 5.30mg/cc		Polyoxyethylene 1500 3.23mg/cc	
	Ppt (mg)	Decrease (%)	Ppt (mg)	Decrease (%)	Ppt (mg)	Decrease (%)
0	9.4		19.0		12.3	
15	7.6	19	19.0	0	9.8	20.5
30	7.6	19	17.3	9	9.2	25
60	7.8	17	18.0	5	9.6	23

塩酸により Polyoxyethylene 誘導体は分解されるが一応 C. M. C. の共存する場合の回収率を見た。Tween 20 2.68mg/cc, C. M. C. 0.5mg/cc 含有オレンジジュース D 20cc について常法にてイオン交換樹脂を通した後, 通過液と洗液を合して 100cc とし, その 5 cc をとり, これに濃塩酸 5 cc を加えて 15 分沸騰浴中で熱し, 冷後リンモリブデン酸との沈澱量を測定し, 6.0mg を得た。回収率は 64% であった。

総 括

オレンジジュース中より Polyoxyethylene 誘導体 (ここでは Polyoxyethylene 1500, Tween 20 及び Tween 80) を検出するには, 先ず陰陽両イオン交換樹脂を用いて妨害物質を除き, つぎにリンモリブデン酸法によつて 20r/cc まで検出できた。定量に関しては, 界面活性剤の純品が得がたく個々の界面活性剤によりリンモリブデン酸との沈澱量も異り, またその同定法が未だ確立していないので困難であるが, 含有される界面活性剤が予め知られているときはリンモリブデン酸法により定量することが出来た。この場合 Carboxymethylcellulose が共存する場合は, これの分解操作のため, 回収率が低下した。

文 献

- 1) Shaffer, C.B., Critchfield, F.H.: Anal. chem., 19, 32 (1947)
- 2) Oliver, J., Preston C.: Nature, 164, 242 (1949)
- 3) Coppini, D., Cameroni R.: Boll. chim. farm., 92, 363 (1953): Chem. Abstract, 48, 3853d (1954)
- 4) Roseu M.J.: Anal. Chem., 27, 787 (1955)
- 5) Stevenson, D.G.: Analyst, 79, 504 (1954)
- 6) MacAllister, R.V., Lisk R.J.: Anal. Chem., 23, 609 (1951)
- 7) Schönfeldt, N.: J. Am. Oil Chem. Soc., 32, 77 (1955)

Summary

The method of detection and determination of polyoxyethylene derivatives in orange juice was studied. After the removal of interfering substances by use of ion-exchange resins, polyoxyethylene derivatives were precipitated with phosphomolybdic acid and barium chloride in hydrochloric acid solution. Its precipitates were washed, dried and weighed.

食品添加物の検出に関する研究 (第1報)
 抗酸化剤の滷紙クロマトグラフィーについて

川田 公平, 細貝 祐太郎

Studies on the Detection of Food Adjuncts. I.
 Qualitative Analysis of Antioxidants by Paper Chromatography
 Kohei KAWATA and Yutaro HOSOGAI

まえがき 食用に供せられる動植物油脂製品に対しては抗酸化剤類が相当広範囲に利用されているが、法的にも昭和28年度において食品衛生法第6条の化学的合成品に合成酸化防止剤がとり上げられ、没食子酸プロピル Propyl gallate (以後 PG と略記), 及びプロトカテキニ酸エチルエステル Ethyl protocatechuate (以後 EP と略記) を油脂類又はバターにそれぞれ 1 kg につき 0.1g 以下及び 0.5g 以下添加することが認可された。

次いで昭和30年度省令改正により更に没食子酸イソアミールエステル Isoamyl gallate (以後 IAG と略記), 及びブチルヒドロキシアニソール Butylated Hydroxyanisole (以後 BHA と略記) を油脂, バター, 魚介乾製品 (煮干及び生干等) にそれぞれ 1 kg 中 0.1g 以下及び 0.2g 以下添加することが追加認可された。なお天然酸化防止剤として知られるノルジヒドログアヤレチック酸 Nordihydro guaiaretic Acid (以後 NDGA と略記) も昭和28年度に於て認可されている。以上の抗酸化剤は日常最も常用されるものであるが、単味で使用される場合は少く、例えば PG と EP との併用は PG を単味で使用した時よりも酸化防止能が増強されるといわれており、又サステーン Sustane の名称で市販されるダブレット状の酸化防止剤 (USA. Universal Oil Products Comp.) の中には、BHA を主剤とし、Synergist として PG 20%, Citric acid 13.3%, を配合してある。¹⁾ なお食品工業面における需要は今後ますます増加するものと思われるが、食品衛生法上前述のように使用基準が規定されており、その範囲外の使用は認められないので、食品衛生の立場より検知を必要とする場合がしばしばある。よつて日常最も常用される下記の5種について滷紙クロマトグラフィーによる分離確認法の検討を行つた結果二、三の知見をえたので、ここに報告する。

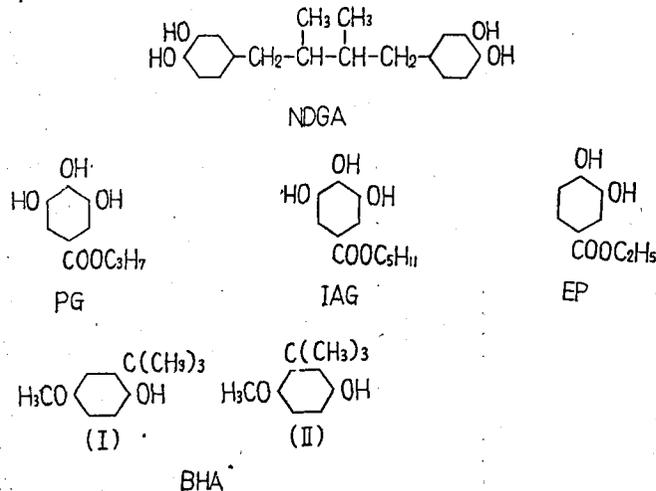


Fig.1. Antioxidants

実験の部

対象物 本実験の対象としたものは前記5種であるが BHA は普通 (I), (II) の異性体の混合物である。実験材料は高砂香料, 吉富製薬の製品を使用した。

操作法 上昇法により 20°~22° の恒温槽内で 4~5 hr (溶媒先端が 25cm 以上) 展開した。試料は 10mg/cc の 99% アルコール溶液とし、東洋滷紙 No50 (2cm×40cm) の一端から 5cm の所へマイクロピペットを使用して

つけ自然乾燥後展開した。

検出法 試薬 1. アンモニア性硝酸銀試液 (六局) を噴霧するとスポットは黒褐色~淡褐色に呈色する。BHA のみは 80°~100° に加熱して発色させた。

試薬 2. 用時硫酸第一鉄 ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.1g とロツシエル塩 ($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 0.5g を蒸溜水に溶解し 100cc としたものを噴霧すると、スポットは紫色~淡紫色に呈色する²⁾。ついで沓紙をアンモニア蒸気に触れさせるとスポットが紫色より紅色となる。なお BHA は本試薬では発色しなかつた。

試薬 3. 用時スルファニル酸 0.5g を 2% 塩酸 100cc に溶解し、等量の 0.5% 亜硝酸ナトリウム液を加えて製する。この液を噴霧すれば各スポットは淡黄色となり、ついで 10% 炭酸ナトリウム液を噴霧すれば橙黄色に呈色する³⁾。

溶媒及び確認限度 先づ Butanol 系溶媒を用い Rf 値を測定したが殆んど 0.9~1.0 を示し、分離の目的を達とすることができなかつた。これは一般に試料が水に対する溶解度より有機溶媒に対する溶解度が大であるため、Butanol 系溶媒を用いて沓紙クロマトグラフィーを行うと試料は移動相の Butanol に多量に分配され Rf 値が大となり差を生じないためと考えられる。よつてわれわれは試料相互の分離は非分配型沓紙クロマトグラフィーによるのが適当であると認め次に掲げる 4 種を選んだ。(Table 1.)

Table 1. Composition (Volume ratio) of Solvent for Development.

No.1.		
1.	Dist. Water	
2.	Dioxan : EtOH : H_2O	(2.5 : 2.5 : 19)
3.	Dioxan : H_2O	(1.0 : 9)
4.	MeOH : Me_2CO : H_2O	(1.0 : 1.0 : 8)

溶媒 I-IV を使用して求めたこれら試料の Rf 値、及び前記検出試薬による試料の確認限度を調べた結果は次の通りである (Table 2 及び Table 3)

Table 2. Rf-Value of Antioxidant

Solvent	PG	EP	NDGA	IAG	BHA
1.	0.42	0.56	0.2	0.38	0.34
2.	0.52	0.57	0.3	0.42	0.46
3.	0.62	0.66	0.31	0.55	0.54
4.	0.66	0.75	0.45	0.62	0.47

Table 3. Limit of Identificatin of Colour Reaction for Antioxidant

Antioxidants	Solvent for Development	Colour Reagent	Colour	Limit of Identification(μg)
PG	3	1	Black	10
do.	do.	2	Violet	20
do.	do.	3	Orange red	75
EP	do.	1	Black	30
do.	do.	2	Violet	30
do.	do.	3	Orange red	30
NDGA	do.	1	Black	10
do.	do.	2	Violet	20
do.	do.	3	Brown	20
IAG	do.	1	Black	10
do.	do.	2	Violet	30
do.	do.	3	Orange Yellow	50
BHA	do.	1	Black(Heat)	100
do.	do.	2	—	—
do.	do.	3	Red	30

なおいずれの溶媒によつても NDGA は若干の Tailing があつた。

応用 以上の結果を応用して輸入バターオイル 50g に上記 5 種の抗酸化剤のそれぞれ 5mg をアルコール溶液として添加しよく混和したのち、石油エーテル 100cc を加えバターオイルをよく溶解させ石油エーテル液を分液ロートにとり 72% エチルアルコール⁴⁾ 100cc を加えてよく振まぜアルコール層を分取し、乾燥沓紙で沓過し沓液を

なるべく低温度で10~5ccとなるまで減圧濃縮し, これに精製した酢酸エチル約50ccを加えてよく振りまぜて抽出する. 抽出液に脱水芒硝を加えて脱水し, 濾過し, 濾液を約1ccに減圧濃縮して検液とした. 次いで此の検液毛細管を用いて沔紙につけ前記の溶媒4で展開し次いで検出試薬1.及び3.で確認を行つたところ第2表のRf値とはほぼ同一結果を得た. なお同一溶媒で円形沔紙クロマトグラフィーも試みたがこれは短時間で展開が出来特にNDGAに特有なTailingがなかつたがRf値が長い沔紙の場合に比して若干低くなつた. この原因, 並びに検出試薬とし *aa'* ジピリヂールと塩化第一鉄⁵⁾, 及び2,6ジクロルヒノククロイミド⁶⁾等の応用や, 各種油脂類及び他種食品からの抽出例等については次回に報告することとする.

終りに本研究に際し御懇篤なる御指導を賜つた食品部長川城巖博士に深謝する.

総 括

抗酸化剤としてのPG, EP, NDGA, IAG, 及びBHA. 以上5種について沔紙クロマトグラフィーによる分離を行つたところ溶媒として, MeOH : Me₂(CO) : H₂O (1 : 1 : 8) が適当であることを知つた. 検出試薬としてはアンモニア性硝酸銀液によるのが良好と思われる.

文 献

- 1) 船橋英哉: 香料, 22, 1 (1951)
- 2) S. Kahan : J. Assoc. Offic. Agr. Chemsts, 35, 186-192 (1952)
- 3) F. Feigl : Spot Tests, Vol. II, p. 109 (1954)
- 4) R. A. Chapman : Anal. Chem., 23, 1116-1120 (1951)
- 5) S. Kahan : J. Assoc. Offic. Agr. Chemsts., 37, 828-833 (1954)
- 6) F. D. Snell : Colorimetric Methods of Analysis., Org anic-I, P. 195 (1953)

Summary

We investigated the paperchromatography of Antioxidants, Viz. propylgallate (PG), ethylprotocatecuete (EP), isoamylgallate(IAG), nordihydroguaiaretic acid (NDGA) and butylated hydroxyanisol (BHA). by ascending methods.

As the result, MeOH : Me₂(CO) : H₂O (1:1:8) is the most preferable solvent for the separation of Antioxidants. Their Rf - values are indicated in Table I.

Received February 29, 1956

法定食用タール色素のポーラログラフ的研究

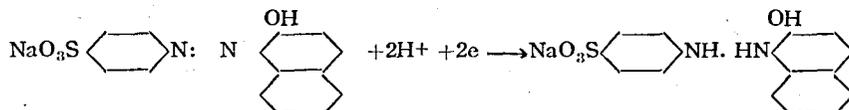
北川 純男, 豊田 勤治*

Polarographic Studies on Japanese Official Food Colors

Sumio KITAGAWA and Kinji TOYODA

食用タール色素の吸収スペクトル, クロマトグラフ等については多数の研究があるが, ポーラログラフ的還元による研究は少ない。

一般にAzo化合物はポーラログラフにより Hydrazo 化合物に還元され¹⁾, その還元は可逆的²⁾である。Nga³⁾はOrange IIが



のように還元されることを確認している。

若者は食用タール色素中, Monoazo 色素である, 赤色1号 (Ponceau 3 R), 101号 (Ponceau R), 2号 (Amaranth), 102号 (New Coccine), 黄色4号 (Tartrazine), 5号 (Sunset Yellow FCF) の6種の法定食用色素についてポーラログラフによる分離確認の可能性について研究を行った。

又半波還元電位が水素イオン濃度により1~2段階の移動を示すことを認めた。

これらの6種の色素は何れもよく類似した波型で, アルカリ溶液では2段階の還元波を示し, また著しい極大波が見られた (Fig. 1, 2)。

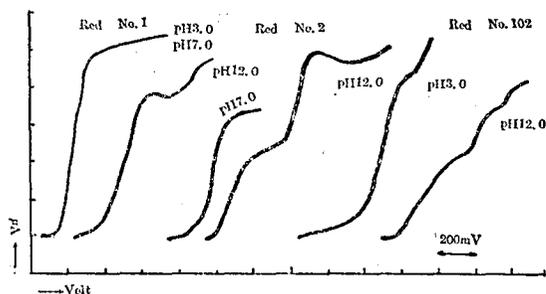
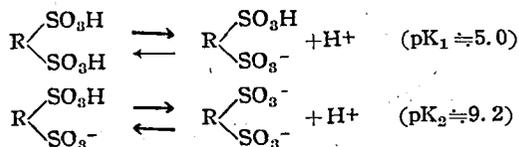


Fig. 1. Current-voltage Curves of Red Colours

これらの第1段還元波について, $\pi/2$ (v. s. S. C. E) と pH の関係を求めると平均 60~70mv/pH となり, 1ヶ又は2ヶの変曲点が認められた (Fig. 3, 4)。第1の変曲点是非解離型と一塩基性解離型との, そして第2の変曲点は一塩基性解離型と二塩基性解離型とのそれぞれ平衡点に当るもので, 例えば, 赤色1号については



基く変曲点があつて, それぞれ解離恒数として 5.0 及 9.2 が求められた。

* 厚生省公衆衛生局食品衛生課

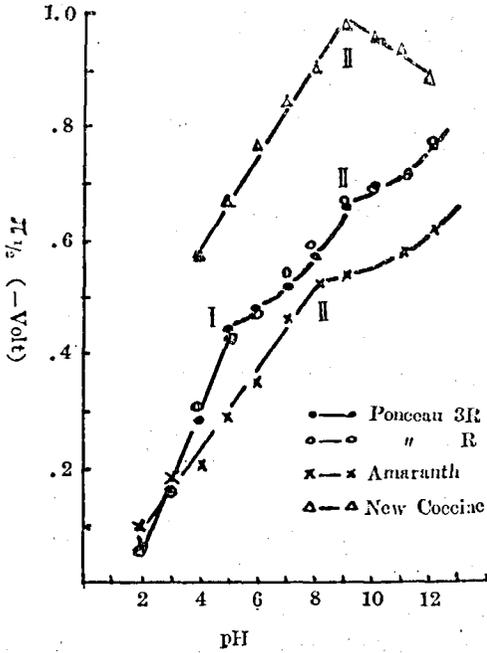


Fig. 3. $\pi_{1/2}$ -pH Curve of Red Food Colours

●-● Ponceau 3R ×-× Amaranth
○-○ " R △-△ New Coccine

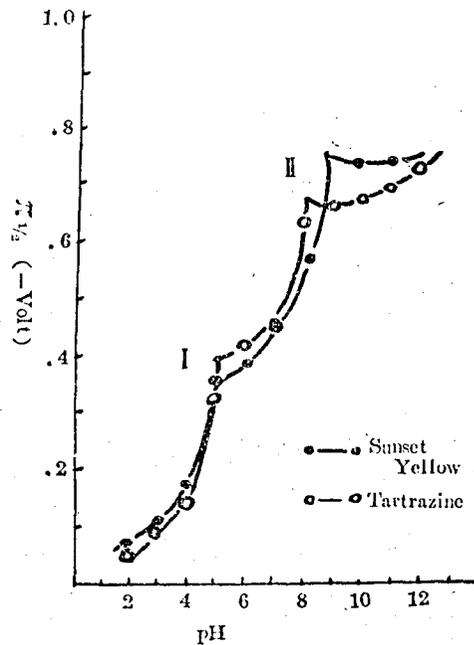
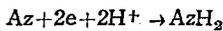


Fig. 4. $\pi_{1/2}$ -pH Curve of Yellow Food Colours

●-● Sunset Yellow
○-○ Tartrazine

一般に Azo 化合物 (Az.) が還元せられ Hydrazo 化合物 (AzH₂) を生ずる場合を、



とすると、この場合の酸化還元電位式は、

$$E = E_0 - \frac{RT}{2F} \ln \frac{[\text{AzH}_2]}{[\text{Az}]}$$

で表わされる。[Az]=[AzH₂]=Kとすると、この場合が半波還元電位に当る。即ち、

$$E_{1/2} = E_0 - \frac{RT}{2F} \ln K$$

$$\frac{dE_{1/2}}{dpH} = -2,303 \frac{RT}{2F} = 0.0591 \text{ (v) at } 25^\circ\text{C}$$

となる。

実験値は上の計算値に近い値を示し、2個の電子の消費が推定出来る。

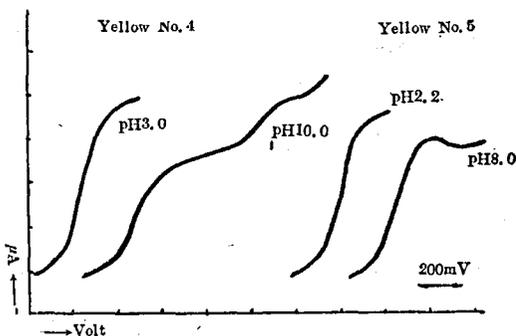


Fig. 2. Current-voltage Curves of Yellow Colours

個々の色素について見れば、赤色1号と赤色101号は、その半波還元電位に差異が見られない。又両者を混合した場合は勿論、酸で加水分解を行つて得られるAmineをNitro化したものについてもポーラログラフによる分離確認は成功しなかつた。

赤色2号と102号は、ポーラログラフ的に著しい差異が見られ、その半波還元電位の差により充分分離確認が可能である。

黄色4号と5号は、 $\pi_{1/2}$ -pH曲線は類似しているが、アルカリ性溶液では半波還元電位に差異があるので分離確認が可能である。

実 験 法

試料溶液: 赤色1号, 2号, 101号, 102号黄色4号及5号の食用色素規格に合格したものについて, それぞれ0.1%水溶液を調製した。

緩衝液: N/10 HCl, N/10 NaOH 及 pH 2.2~8.0 には McIlvaine 緩衝液を, pH 9.0~12.0 は Kolthoff 磷酸緩衝液を使用し, 夫々, ポーログラフにより想度1/10及1/5で挟雑物による還元波のないことを確めた。

電解液及電解: 0.1%試料溶液1cc, 0.6% Gelatine 溶液1ccとし H₂-gasを20~30分間通じ柳本製ポーログラフにより適当な感度(通常1/10~1/20)で還元波をとり, その半波還元電位を飽和甘汞電極に対して求めた。半波還元電位算出には切線-平行線法¹⁾により求めた。

本実験に当り, 寺島技官に種々援助を賜つたことを感謝する。

文 献

- 1) 志方, 館: 農化, 8, 958 (昭. 4)
- 2) BiiImann, E. and Blom, J.H. ; J. Chem. Soc., 125, 1719 (1924) Conannt, J. B., and Pratt, M. F. ; J. Am. Chem. Soc., 48, 2468 (1926)
- 3) Nga ; J. chim. phys., 35, 345 (1939)
- 4) 品川 ; ポーログラフ分析法, 昭. 27.

Summary

We studied on the polarographic reduction of six colours ; Poncean R, Poncean 3R, New Coccine, Amaranth, Sunset Yellow FCF and Tartrazine. These colours were reduced at two waves in the alkaline solution, and current-voltage curves showed similarity.

Amaranth and New Coccine are one point of inflection respectively, that due to the equilibrium between the mono-basic and di-basic form, on the $\pi/2$ (v.s. S. C. E.) -pH curve of first reduction, and dissociation constants (pK) were former c.a. 6.6 and other c.a. 9.2. Other colours showed also two inflectional points according to the equilibriums between non-dissociation form and mono-basic form or between mono-basic and di-basic form.

60-70mV/pH were calculated by the decline lines or tangent lines which were formed by these $\pi/2$ -pH curves, and it was confirmed that two electrons were consumed on polarographic reduction through Redoxidation equation.

Received February 29, 1956

法定食用タール色素分析用計算図表*（第1報）

純度定量（チタノメトリー）用ノモグラフ

井上 敷

Nomographs for the Analyses of Japanese Official Food Colors. I.

Nomographs for the Assay of Purity (Titanometry)

Isao INOUE

まえがき 法定食用タール色素は現在 24 種あり食品衛生試験法に基づいて検査が実施されているが、分析値の算出が相当煩雑なのでその簡易化を目的としたノモグラフを作製したので報告する。

作 図 法

この場合のノモグラフとしては作図等の面から共線図表、特に水平な一直線（基線*l*）上に直角に3本の平行線を立てる型のが最良と思われる。即ち Fig.1 に於いて $x_0, y_0, z_0; x, y, z$ を何れも対数目盛とし、かつ X, Y, Z 軸の単位の長さを、それぞれ u_X, u_Y, u_Z とすれば

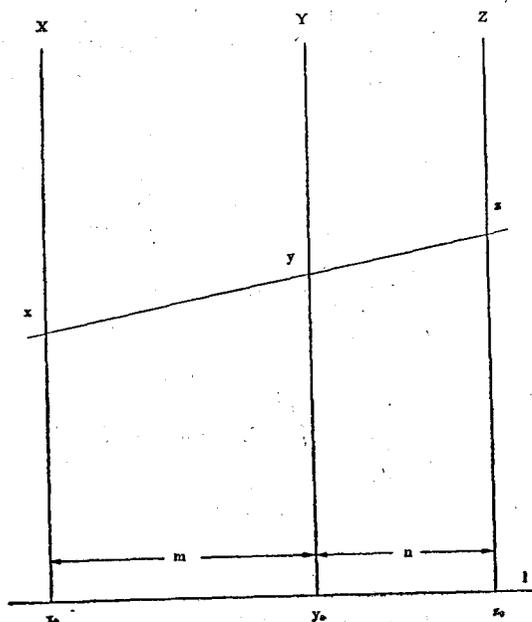


Fig. 1

図表を大きくすればそれに応じて良好な精密度を期待し得るが、大き過ぎると使用には却つて不便である。従つて縦 40cm, 横 30cm 程度になるように(1)式の $m, n; u_X, u_Y, u_Z$ の値を定める必要がある。尙著者の作図したノモグラフはその基本になる計算式が何れも 4 変数又は 5 変数であるから、3 変数の共線図表を 2 つ又は 3 つ 結合せねばならない。このため、1 本又は 2 本の補助軸を必要とする。これ等補助軸 (l, l') の目盛の範囲は容易に計算し得るが、作図に当つては各図表共、各軸の最下部の目盛が基線から余り下にずれないように考慮することが望ましい。(本稿では原点を基線と各軸との交点の意味に用い、かつ l 軸, v 軸, ……等の原点の目盛をそれぞれ $l_0, v_0, ……$ の如く表わした。従つて各軸共、原点と最下部の目盛とは区別して記載した。)

$$\pm(m+n) u_Y \log\left(\frac{y}{y_0}\right) = \pm n u_X \log\left(\frac{x}{x_0}\right)$$

$$\pm m u_Z \log\left(\frac{z}{z_0}\right) \text{ となる。}$$

但し + は正目盛 (たとえば $x > x_0$), - は逆目盛 (たとえば $y < y_0$) を表わす。故に

$$(m+n) u_Y = n u_X = m u_Z \dots\dots\dots(1)$$

となるように取れば

$$\left(\frac{y}{y_0}\right)^{\pm 1} = \left(\frac{x}{x_0}\right)^{\pm 1} \left(\frac{z}{z_0}\right)^{\pm 1} \text{ となる。}$$

従つて $y_0^{\pm 1} = x_0^{\pm 1} z_0^{\pm 1} \dots\dots\dots(2)$ となるように取れば

$$y^{\pm 1} = x^{\pm 1} z^{\pm 1} \dots\dots\dots(3) \text{ を得る。}$$

(1)式は各軸の間隔と各対数尺の単位の長さ (これは倍率を意味する)との間に満足されるべき条件を表わし、(2)式は各原点の間に満足されるべき条件を表わしている。故に(1), (2)の両条件下に(3)式の複号を適当に組み合わせれば積や商をそれぞれの場合に応じて Y 軸上又は X, Z 軸上に求めることが出来る。たとえば X: 正目盛; Y, Z: 逆目盛とすれば, $y^{-1} = x z^{-1}$ 即ち $x y = z$ となり積が Z 軸上に得られる。

* 第四回日本薬学会近畿支部総会 (1954 年 10 月に発表)

誤 差

これらのノモグラフを使用する際の誤差 (4) を本稿では、図表上に得た値 (N) と、計算値 (M) との差の意味に用いた。即ち $d=N-M$ で表わされる。各図表共70個の data を用いて d の平均値 (M') を算出した。

三塩化チタンの還元力を利用して分析する場合、純度 P は(4)式で与えられる。

$$P = \frac{F \times v \times f}{W} \times 100 \dots \dots (4)$$
 茲に F: N/10 三塩化チタン 1 cc に対する各色素の当量 (g); v, f: N/10 三塩化チタンの滴加量 (cc) 及び factor; w: 検体量 (g). F の値は Table 1 の如くであるが作図の面からこれ等を 1, 2, 3, 4 に分類した。

Table 1. $TiCl_3$ Titration Factors

Group	Color*	g color/cc 0.1N $TiCl_3$	Group	Color*	g Color/cc 0.1N $TiCl_3$		
water-soluble	1	Y-1	water-soluble	3	B-101	0.02834	
	2	O-1 Y-5 R-4 R-101 R-1 Y-4 R-2 R-102		0.00876 0.01131 0.01201 0.01201 0.01236 0.01336 0.01511 0.01511	3	G-1	0.03453
						V-1	0.03670
						B-1	0.03963
						G-2	0.03963
						G-3	0.04042
			oil-soluble			4	Y-2
					Y-3		
	R-5	0.00691					

* B: blue, G: green, O: orange, R: red, V: violet, Y: yellow; B-1: Food color blue No.1, etc.

I. Group 1 (Naphthol Yellow S)

$$P = \frac{0.00299 \times v \times f}{w} \times 100 \quad \therefore \frac{P}{0.299} = \frac{v \times f}{w} \quad \therefore \log\left(\frac{P}{0.299}\right) = -\log w + \log f + \log v$$

各値の範囲は P=75~100 (規定: 80 以上), w=0.0280~0.0400, f=0.800~1.600, v=4.00~16.00

(i) $f \div w = t$ のノモグラフ

m:n=3:1; $u_w=2,400$, $u_f=600$, $u_t=800$ が(1)式を満足するから m=21cm, n=7cm として w 軸, f 軸共正目盛を刻む。尚 t 軸の目盛は不要である。

(ii) $t \times v = P$ のノモグラフ

$\frac{P}{0.299}$ の範囲 (250.8~334.5) から m:n=3:1, $u_v=600$, $u_P=2,400$ が(1)式を満足し、従つて m=22.5cm, n=7.5cm として v 軸, P 軸を立てる。(2)式から $t_0 = \frac{0.8}{0.04} = 20$, $v_0 = \frac{334}{20} = 16.72$ となるから v 軸は v_0 を出発点として $u_v \times \log\left(\frac{16.72}{v}\right)$ を計算して目盛る。P 軸は $u_P \times \log\left(\frac{334.5}{250.8}\right) = 300.17\text{mm}$ となるから原点から 30cm 上の点を 75 として逆目盛を刻む。

Fig. 2 はこのようにして作図したノモグラフで, M' = +0.002% である。

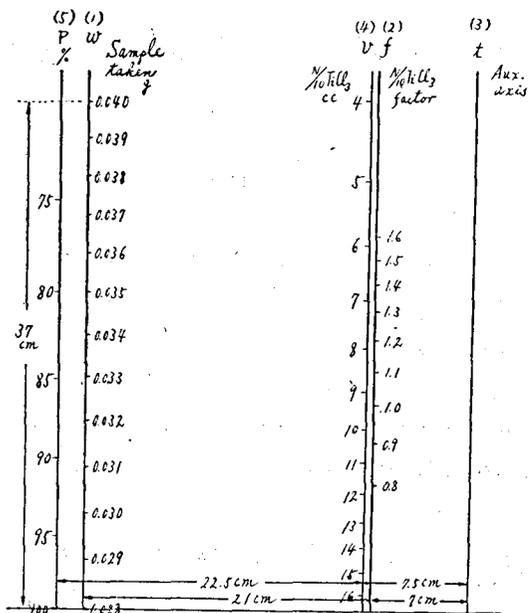


Fig. 2 Nomograph for the Assay of Purity: Y-1 (Naphthol Yellow S)

II Group 2 (O-1, Y-5, R-4, R-101, R-1, Y-4, R-2, R-102)

$$P = \frac{F \times v \times f}{w} \times 100 = \frac{F' \times v \times f}{w} \therefore \log P = -\log w + \log F' + \log v + \log f$$
 各値の範囲は $P=65 \sim 85$ (規定: 70 及び 75 以上), $w=0.1600$, $F' = 0.876 \sim 1.511$, $v=4.00 \sim 10.00$, $f=0.800 \sim 1.6000$. (w 軸は便宜上 0.1900 迄目盛つた.)

(i) $F' \div w = t$ のノモグラフ

$m:n = 1:1$, $u_w = u_{F'} = 1,000$, $u_t = 500$ が(1)式を満足するから $m=n=9$ cm とする. F 軸は $u_{F'} \times \log\left(\frac{1.600}{0.800}\right) = 301.03$ mm となるから原点から 30 cm 上の点を $F=0.00800$ ($F'=0.800$) として逆目盛を刻む. こうすれば $F_0'=1.5961$ となる. w 軸は $w_0=0.0800$ として正目盛を刻む. t の範囲は $\frac{0.876}{0.16} = 5.475 \sim \frac{1.511}{0.08} = 18.89$ となるが, w_0, F'_0 の値から $t_0 = \frac{1.5961}{0.0800} = 19.95$ が(2)式を満足する. 尚 t 軸の目盛は不要である.

(ii) $t \times v = t'$ のノモグラフ

$t'_0=40.00$ とすれば $v_0 = \frac{40.00}{19.95} = 2.005$ となり, $m:n = 1:1$, $u_t = u_{t'} = 500$, $u_v = 250$ が(1)式を満足するから $m=n=10$ cm とし $u_v \times \log\left(\frac{v}{2.005}\right)$ を計算して v 軸を目盛る. 尚 t' 軸の目盛は不要である.

(iii) $t' \times f = P$ のノモグラフ

$m:n = 6:1$, $u_P = 3,000$, $u_{t'} = 500$, $u_f = \frac{3,000}{7}$ が(1)式を満足するから $m=24$ cm, $n=4$ cm とする. $u_P \times \log\left(\frac{85}{65}\right) = 349.5$ mm となるから P 軸は原点から 35 cm 上の点を 65 として逆目盛を刻む. こうすれば $P_0=85.03$ となる. 又 t'_0, P_0 から $f_0 = \frac{85.03}{40.00} = 2.126$ が(2)式を満足するから $u_f \times \log\left(\frac{f}{2.126}\right)$ を計算して f 軸を目盛る.

Fig. 3 はこのようにして作図したノモグラフで, $M' = +0.03\%$ である.

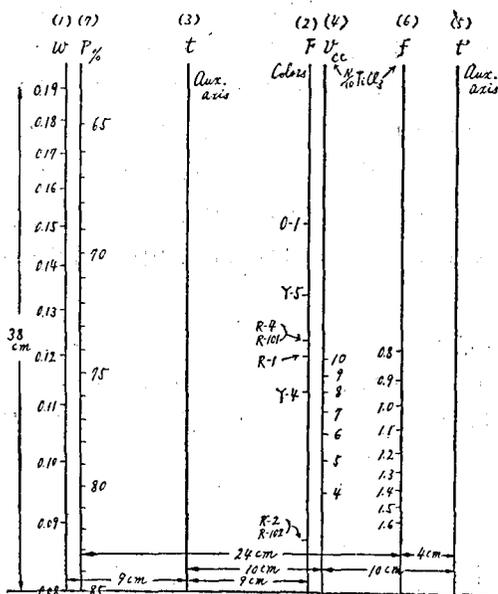


Fig. 3 Nomograph for the Assay of Purity: O-1 (Orange 1), Y-5 (Sunset Yellow FCF), R-4 (Ponceau SX), R-101 (Ponceau R,) R-1 (Ponceau SR), Y-4 (Tartrazine), R-2 (Amaranth), R-102 (New Coccine); w : Sample taken g, f : $N/10$ $TiCl_3$ Factor.

III Group 3 (B-101, G-1, V-1, B-1, G-2, G-3)

$$P = \frac{F \times v \times f}{w} \times 100 = \frac{F' \times v \times f}{w} \therefore \log P = -\log w + \log F' + \log v + \log f$$

各値の範囲は $P=65 \sim 85$ (規定: 70 及び 75 以上), $w=0.2800 \sim 0.4100$, $F'=2.834 \sim 4.042$, $v=4.00 \sim 10.00$, $f=0.800 \sim 1.600$. (w 軸は便宜上 0.5000 迄目

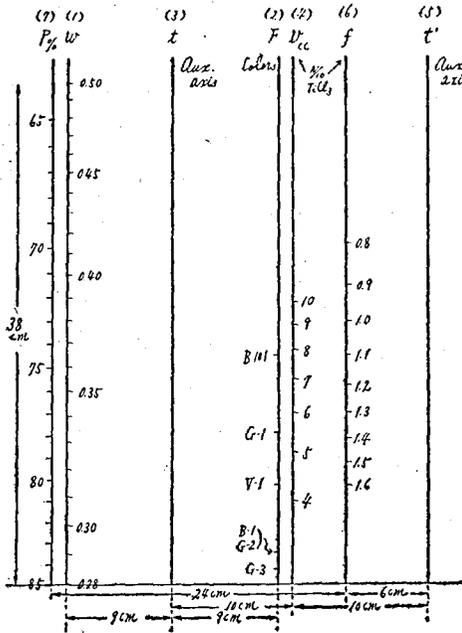


Fig. 4 Nomograph for the Assay of Purity : B-101 (Azure Blue V), G-1 (Guinea Green B), V-1 (Acid Violet 6B), B-1 (Brilliant Blue FCF), G-2 (Light Green SF yellowish), G-3 (Fast Green FCF);
 w: Sample taken g, f: N/10 TiCl₃ Factor.

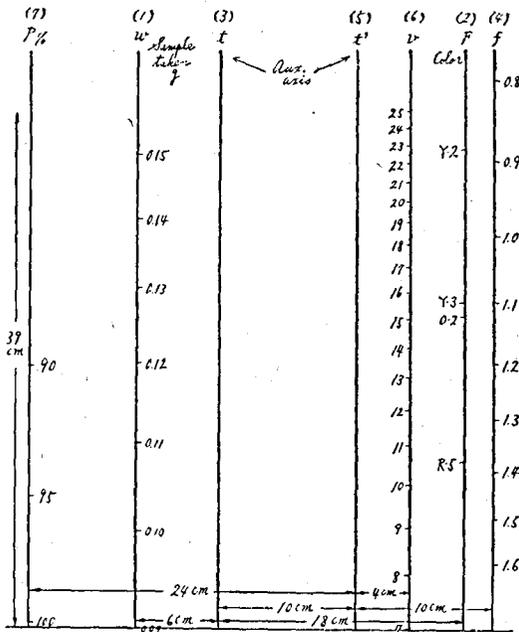


Fig. 5 Nomograph for the Assay of Purity : Oil-soluble Colors : Y-2 (Yellow AB), Y-3 (Yellow OB), O-2 (Orange SS), R-5 (Oil Red XO);
 v, f: N/10 TiCl₃ cc, Factor.

盛つた.)

(i) $F' \div w = t$, (ii) $t \times v = t'$, (iii) $t' \times f = P$ に於ける各軸の立て方は Group 2 と全く同様に考えればよい。

Fig. 4 はこのようにして作図したノモグラフで、 $M' = +0.001\%$ である。

IV Group 4: 油溶性色素 (Y-2, Y-3, O-2, R-5)

$$P = \frac{F \times v \times f}{w} \times 100 = \frac{F' \times v \times f}{w} \therefore \log P = -\log w + \log F' + \log v + \log f$$

各値の範囲は $P = 90 \sim 100$ (規定: 95~98 以上), $w = 0.0900 \sim 0.1500$, $F' = 0.618 \sim 0.691$, $f = 0.800 \sim 1.600$, $v = 7.00 \sim 25.00$.

(i) $F' \div w = t$ のノモグラフ

$m:n = 1:3$, $u_w = 1,600$, $u_{F'} = 4,800$, $u_t = 1,200$ が(1)式を満足するから $m = 6\text{ cm}$, $n = 18\text{ cm}$ とする。F 軸は $u_{F'} \times \log\left(\frac{0.700}{0.600}\right) = 321.36\text{ mm}$ とする。しかし常法通り原点から 32~33cm 上の点を $F = 0.00600$ ($F' = 0.600$) とし以下 (ii), (iii) も同様に各軸の目盛を計算すると、最後の P 軸の目盛が基線より相当下にずれることになる。従つて種々検討の結果、F 軸は原点から 42cm 上の点を $F = 0.00600$ ($F' = 0.600$) としして逆目盛を刻むのが最もよいことを知つた。こうすれば $F'_0 = 0.7339$ となる。w 軸は $w_0 = 0.0900$ としして正目盛を刻む。又 w_0, F'_0 の値から $t_0 = \frac{0.7339}{0.0900} = 8.154$ が(2)式を満足する。尚 t 軸の目盛は不要である。

以下 (ii) $t \times f = t'$, (iii) $t' \times v = P$ に於ける各軸の立て方は Group 2 と全く同様に考えればよい。

Fig. 5 はこのようにして作図したノモグラフで $M' = -0.05\%$ である。

考 察

本稿に於いてはチタノメトリーを適用する19種の食用色素すべてを対象とした。しかし実験室によつては特定の色素だけを扱う所もあるからその場合はFig. 2 と同様に考えて作図すれば補助軸は1本で済み誤差も比較的小さくて済みことになる。又これ等の色素に限らずチタノメトリーにより純度を定量出来る物質全般の分析用ノモグラフの作図に迄一般化する事が可能である。

終りに、本研究の機会を与えられ終始御激励を賜った喜谷支所長、図表論に関し有益な御助言を戴いた大阪大学井上喜郎理学士、誤差論に関し種々御教示戴いた京都大学宇野豊三、岡田寿太郎両助教授に深謝の意を表する。尚種々御支援を与えられた豊田勤治、寺島敏雄両技官、協力の労を取られた松倉秋彦技官に厚く感謝する。

総 括

法定食用タール色素の中、チタノメトリーを適用する 19 種を三塩化チタンの当量値により 4 群に分け、各色素の純度定量用ノモグラフを作製した。使用する際の誤差は何れも実験誤差に比較して遙に小でありノモグラフが充分実用に供し得ることを認めた。

Summary

Four kinds of nomographs were made for obtaining the purity of Japanese Official Food Colors in titanometry from the weight of sample and the volume of titanium trichloride solution. These could be applied to draw any nomographs for titanometry. Errors that might occur being very small, these nomographs were found to be available.

Received February 29, 1956

法定食用タール色素分析用計算図表* (第2報)
 純度定量 (チタノメトリー以外) 用及び無機塩定量用ノモグラフ

井上 勲

Nomographs for the Analyses of Japanese Official Food Colors. II. Nomographs for the Assay of Purity (exc. Titanometry) and Inorganic Salts' Contents

Isao INOUE

前報に於いてはチタノメトリーによる純度定量用ノモグラフに就いて述べた。しかし法定食用タール色素の中にはチタノメトリー以外に、過マンガン酸塩法滴定によるもの及び酸により沈澱させた色酸の重量から純度を求めるものがある。また食用水溶性タール色素の大部分は製造工程上、塩化ナトリウム (又は塩化カリウム) の混在は不可避であり、あるいはスルフオン化による硫酸ナトリウム (又は硫酸カリウム) の副生もインジゴカルミン、トリフェニルメタン系色素等に見られる。従つて両者を合して10~25%の含有が許容されている。そこでこの計算のためにノモグラフを作製した。作図法は前報同様 $(m+n)u_Y = nu_X = mu_Z \dots (1), y_0^{\pm 1} = x_0^{\pm 1} z_0^{\pm 1} \dots (2), y^{\pm 1} = x^{\pm 1} z^{\pm 1} \dots (3)$ の三式を考え (1), (2) の両条件下に (3) 式の複号を適当に組み合わせる方法を取つた。誤差についても前報と同様である。本稿に於けるノモグラフの種類を Table 1. に示す。

Table 1.

I Pure dye		Fig.
1. Potassium permanganate-oxidation		1
2. Weighing color acid precipitated		2
II Sodium chloride	Volhard method	3
III Sodium sulfate	1. Titrating with barium chloride	4
	2. Titrating with caustic alkali (fixing as a salt of benzidine)	5

I 純度定量用ノモグラフ

1. 過マンガン酸カリウム酸化の場合

インジゴカルミン(B-2)はチタノメトリーによつても定量出来る, titration factor $F=0.02332$ であるが過マンガン酸カリウムを用いてイサチンモノスルフオン酸に逆酸化分解する方法によつても定量出来る。この場合純度Pは (4) 式で与えられる。

$$P = \frac{0.01166 \times v \times f}{w} \times 100 \dots (4)$$

茲に $v, f : N/10$ 過マンガン酸カリウムの滴加量(cc)及び factor, w : 検体量 (g)である。(4)式から $\frac{P}{1.166} = \frac{v \times f}{w}$ 従つて $\log \left(\frac{P}{1.166} \right) = -\log w + \log v + \log f$ となる。各値の範囲は $P = 70 \sim 85$ (規定: 72以上), $w = 0.2000 \sim 0.3000, v = 12.00 \sim 22.00, f = 1.000 \sim 1.100$

(i) $v+w=t$ のノモグラフ

$m:n = 1:2 = 9.5\text{cm} : 19\text{cm}, u_w = 1,800, u_v = 1,200, u_t = 3,600$ として w 軸, v 軸共正目盛を刻む。 t 軸の目盛は不要である。

(ii) $t \times f = P$ のノモグラフ

$\frac{P}{1.166}$ の範囲 (60.03~72.90) から $m:n = 2:1 = 18\text{cm} : 9\text{cm}, u_f = 7,200, u_P = 2,400$ として f 軸, P 軸を立てる。(2)式から $t_0 = \frac{12.00}{0.2000} = 60.00$ 。故に $f_0 = 1.000$ とす

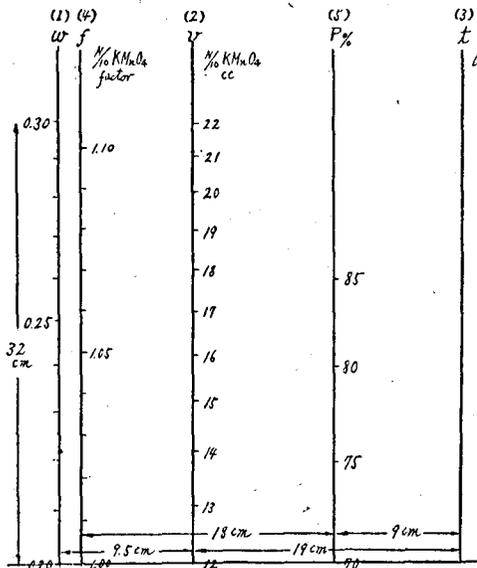


Fig. 1 Nomograph for the Assay of Purity: B-2 (Indigo Carmine); w : Sample taken g.

* 第四回日本薬学会近畿支部総会 (1954年10月) に発表。

れば $\frac{P_0}{1.166} = 60.00$ 即ち $P_0 = 69.96$ となる。従つて f 軸は $f_0 = 1.000$ として正目盛を刻む。又 P 軸は $u_P \times \log\left(\frac{P}{69.96}\right)$ を計算して目盛る。

Fig. 1 はこのようにして作図したノモグラフで、 $M' = -0.06\%$ である。

2. 色酸を析出させる場合

キサンテン系色素即ち R-3, R-103, R-104, R-105 の4種は稀酸 (普通4%硝酸) により色酸を析出させこれを秤量して (5) 式から純度 P を求める。 $P = \frac{w' \times F}{w} \times 100 = \frac{w' \times F'}{w} \dots (5)$ 茲に w' : 色酸の重量 (g), w : 検体量 (g), F : 色素及び色酸の両分子量から求めた換算係数で Table 2 の如くである。

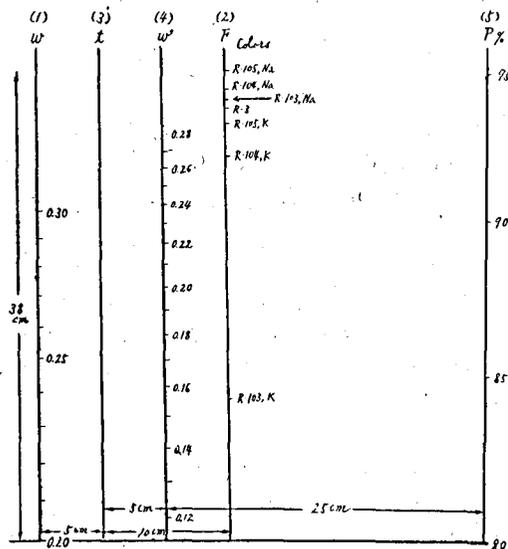
Table 2. Conversion Factors—precipitated color acids to specified salts

Color	Factor
Eosine (K salt)R-103.....	1.284
Phloxine (K salt)R-104.....	1.106
Rose Bengale (K salt)R-105.....	1.084
ErythrosineR-3.....	1.074
Eosine (Na salt)R-103.....	1.068
Phloxine (Na salt)R-104.....	1.061
Rose Bengale (Na salt)R-105.....	1.049

(5) 式から $\log P = -\log w + \log F' + \log w'$ 各値の範囲は $P = 80 \sim 95$ (規定: 85以上), $w = 0.2000 \sim 0.3000$, $F' = 104.9 \sim 128.4$, $w' = 0.1200 \sim 0.2800$

(i) $F' \div w = l$ のノモグラフ

$m:n = 1:2 = 5 \text{ cm} : 10 \text{ cm}$, $u_w = 1,500$, $u_{F'} = 3,000$, $u_l = 1,000$, $u_{F'} \times \log\left(\frac{140.0}{104.9}\right) = 376.05 \text{ mm}$ 故、



F 軸は原点から 37.61cm 上の点を $F = 1.049 (F' = 104.9)$ として逆目盛を刻む。この場合 $F'_0 = 140.00$ となる。 w 軸は $w_0 = 0.2000$ として正目盛を刻む。 l の範囲は $\frac{104.9}{0.3000} = 349.6 \sim \frac{128.4}{0.2000} = 642$ となるが、 w_0, F'_0 の値から $l_0 = \frac{140}{0.2} = 700$ が (2) 式を満足する。尙 l 軸の目盛は不要である。

(ii) $l \times w' = P$ のノモグラフ

$m:n = 1:5 = 5 \text{ cm} : 25 \text{ cm}$, $u_P = 5,000$, $u_{w'} = \frac{5,000}{6}$ 。ここで $P_0 = 80.00$ とすれば $w'_0 = \frac{80}{700} = 0.11429$ となる。従つて $u_w \times \log\left(\frac{w'}{0.11429}\right)$ 及び $u_P \times \log\left(\frac{P}{80}\right)$ を計算して w' 軸, P 軸を目盛る。

Fig. 2 はこのようにして作図したノモグラフで、 $M' = +0.02\%$ である。

II 塩化ナトリウム定量用ノモグラフ

塩化ナトリウムは脱色炭と酸とにより色素を除去しその液に就いて Volhard 法を適用して定量する。即ち一定過剰量の硝酸銀により塩化銀を沈澱させ、余剰の硝酸銀を硫シアン化アンモニウムで滴定する。この場合塩化ナトリウム%は (6) 式で与えられる。

$S = \frac{0.00585 \times (v_1 f_1 - v_2 f_2)}{w'} \times 100 \dots (6)$ 茲に v_1, f_1 は $N/10$ 硝酸銀の容量及び factor; v_2, f_2 は $N/10$ 硫シアン化アンモニウムの滴加量及び factor; w' は検体量 (wg) に、検液使用量の比率を掛けた値である。著者

等の実験室では色素を除去した液 100cc の中 20cc を一回の分析に用いるから $w' = w \times \frac{20}{100}$ である。

故に $S = \frac{0.00585 \times V}{w \times \frac{20}{100}} \times 100 = \frac{2.925 \times V}{w}$ 但し $V = V_1 - V_2$, $V_1 = v_1 f_1 = \text{const.}$ 著者等の実験室では $v_1 = 5\text{cc}$ を用いている。 $V_2 = v_2 f_2$ 従つて $\frac{S}{2.925} = \frac{V}{w}$, $\log\left(\frac{S}{2.925}\right) = \log V - \log w$ となる。各値の範囲は $S = 1 \sim 20$, $v_2 = 1.90 \sim 5.00$, $f_2 = 1.000 \sim 1.100$, $V_2 = 1.90 \sim 5.50$, $V = 0.18 \sim 3.10$, $w = 0.4500 \sim 0.5500$ 。

(i) $v_2 \times f_2 = V_2$ のノモグラフ

$m : n = 4 : 25 = 4\text{cm} : 25\text{cm}$, $u_{v_2} = 720$, $u_{f_2} = 4,500$, $u_{V_2} = \frac{18,000}{29}$ として各軸共正目盛を刻む。

(ii) $V = V_1 - V_2$

ここだけ筆算を行なつてもさほど煩雑ではないが強いて図表化を試みれば、算術目盛を施した V_1, V_2 両尺を逆方向にし V_1 の最大値例えば $V_1 = v_1 \times f_1 = 5.00 \times 1.013 = 5.065$ と V_2 の最小値 0 とを一致させ $V = V_1 - V_2$ を読み取るようにするのも一方法である。著者はすべて筆算によつた。

(iii) $V + w = S$ のノモグラフ

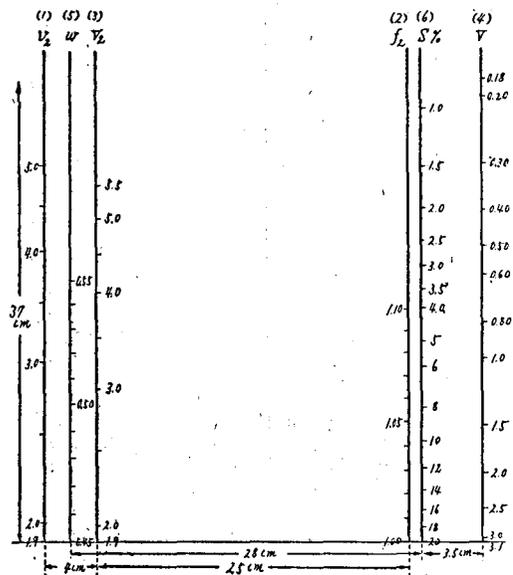


Fig. 3 Nomograph for the Assay of NaCl % in Volhard method: $V = V_1 - V_2 = v_1 f_1 - v_2 f_2$; v_2 ; v_1, f_1 : N/10 AgNO_3 cc, factor; v_2, f_2 : N/10 NH_4SCN cc, factor; w : Sample taken g; S : NaCl %.

$\frac{S}{2.925}$ (0.3419 ~ 6.8376) から $m : n = 8 : 1 = 28\text{cm} : 3.5\text{cm}$, $u_w = 2,400$, $u_S = \frac{2,400}{9}$, $u_V = 300$ とする。V 軸は $u_V \times \log\left(\frac{3.10}{0.18}\right) = 370.83\text{mm}$ 故原点から 37cm 上の点を 0.18 として逆目盛を刻む。こうすれば $V_0 = 3.0804$ となる。w 軸は $w_0 = 0.4500$ として正目盛を刻む。(2) 式から $\frac{S}{2.925} = \frac{3.0804}{0.4500} = 6.8453$, $S_0 = 20.023$ 。故に S 軸は $u_S \times \log\left(\frac{20.023}{S}\right)$ を計算して目盛る。

Fig. 3 はこのようにして作図したノモグラフで $M' = 0.003\%$ である。

III 硫酸ナトリウム定量用ノモグラフ

硫酸ナトリウムの定量は脱色炭と酸とにより色素を除去し、テトラヒドロキシヒノンの二ナトリウム塩を指示薬として塩化バリウムで滴定する方法が公定法であるが、塩酸ベンチジンを硫酸ベンチジンに変え、硫酸を水酸化ナトリウム (又は水酸化カリウム) で滴定する方法でも分析可能である。

1. 塩化バリウムによる場合

硫酸ナトリウム% (S') は (7) 式で与えられる。 $S' = \frac{0.0025 \times v \times f}{w'} \times 100 \dots (7)$ 茲に v, f は $\frac{3}{100} N$ 塩化バ

リウムの滴加量及び factor; w' は検体量 (μg) に、検液使用量の比率を掛けた値である。著者等の実験室では色素を除去した液 200cc の中 25cc を一回の分析に用いるから、 $w' = w \times \frac{25}{200}$ である。故に $S' = \frac{0.0025 \times v \times f}{w \times \frac{25}{200}}$

$\times 100 = \frac{2 \times v \times f}{w}$ 従つて $\frac{S'}{2} = \frac{v \times f}{w}$, $\log\left(\frac{S'}{2}\right) = -\log w + \log f + \log v$ となる。各値は $S' = 1 \sim 15$, $w = 1.5000 \sim 2.5000$, $f = 1.000 \sim 1.100$, $v = 0.70 \sim 18.00$ 。

(i) $f + w = l$ のノモグラフ

$m : n = 1 : 5 = 3\text{cm} : 15\text{cm}$, $u_w = 1,440$, $u_f = 7,200$, $u_l = 1,200$ 。 $u_f \times \log\left(\frac{1.100}{1.000}\right) = 298.00\text{mm}$ 故、f 軸は原点から 30cm 上の点を 1.000 として逆目盛を刻む。この場合 $f_0 = 1.1007$ となる。w 軸は $w_0 = 1.5000$ として正目盛を刻む。l の範囲は $\frac{1.0}{2.5} = 0.4 \sim \frac{1.1}{1.5} = 0.73$ となるが、 w_0, f_0 の値から $l_0 = \frac{1.1007}{1.5000} = 0.7338$ が (2) 式を満足する。尙 l 軸の目盛は不要である。

(ii) $t \times v = S'$ のノモグラフ

$\frac{S'}{2}$ (0.5~7.5) から $m:n=4:1=20\text{cm}:5\text{cm}$, $u_v=240$, $u_{S'}=300$ とする。S'軸は $S'_0=1.00$ として正目盛を刻む。(2)式から $v_0 = \frac{1}{t_0} \times \frac{S'_0}{2} = \frac{0.50}{0.7338} = 0.68138$ 。故に v 軸は $u_v \times \log\left(\frac{v}{v_0}\right)$ を計算して正目盛を刻む。

Fig. 4はこのようにして作図したノモグラフで、 $M' = -0.002\%$ である。

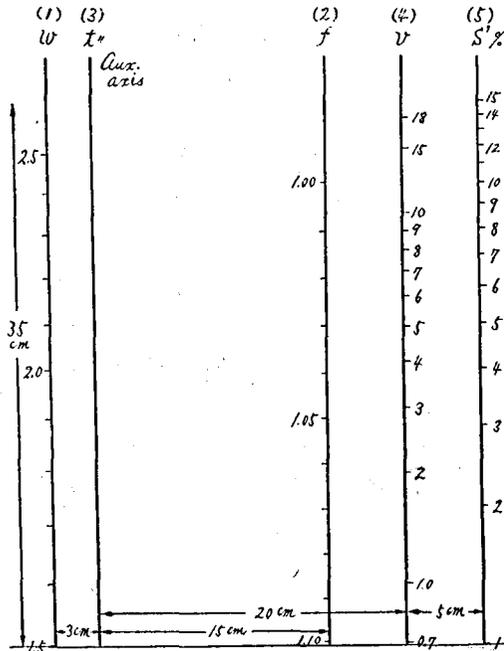


Fig. 4 Nomograph for the Assay of Na_2SO_4 : titrating with BaCl_2 ; w : Sample taken g; v, f $\text{N}/100$ BaCl_2 cc, factor; S' : Na_2SO_4 %.

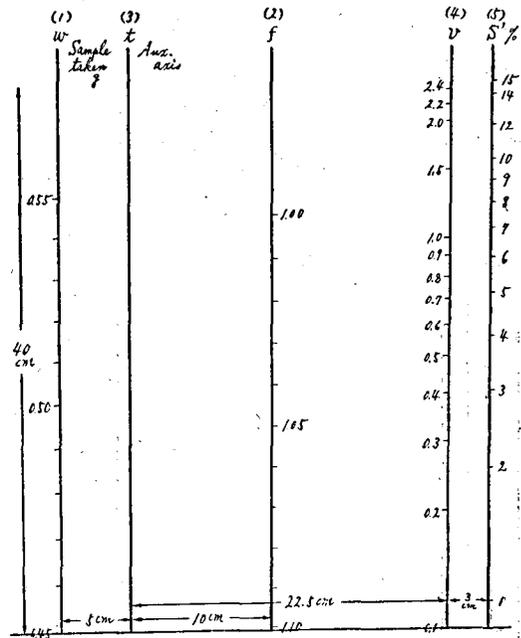


Fig. 5 Nomograph for the Assay of Na_2SO_4 % : titrating with caustic alkali; v, f : $\text{N}/10$ NaOH (or KOH) cc, factor; S' : Na_2SO_4 %.

2. ベンチジンによる場合

硫酸ナトリウム% (S') は (8) 式で与えられる。

$$S' = \frac{0.0071 \times v \times f}{w} \times 100 \dots (8)$$

茲に v, f は $\text{N}/10$ アルカリの滴加量及びfactor; w は検体量 (wg) に、検

液使用量の比率を掛けた値である。著者等の実験室では色素を除去した液 100cc の中 20cc を一回の分析に用いるから $w' = w \times \frac{20}{100}$ である。故に $S' = \frac{0.0071 \times v \times f}{w \times \frac{20}{100}} \times 100 = \frac{3.55 \times v \times f}{w}$ 従つて $\frac{S'}{3.55} = \frac{v \times f}{w}$ 、

$\log\left(\frac{S'}{3.55}\right) = -\log w + \log f + \log v$ となる。各値は $S' = 1 \sim 15$, $w = 0.4500 \sim 0.5500$, $f = 1.000 \sim 1.100$, $v = 0.10 \sim 2.40$ 。(i) $f \div w = t$, (ii) $t \times v = S'$ に於ける各軸の立て方は前項 (塩化バリウム法) と全く同様に考えればよい。

Fig. 5はこのようにして作図したノモグラフで、 $M' = -0.0006\%$ である。

終りに、本研究の機会を与えられ終始御激励を賜つた喜谷支所長、図表論に關し有益な御助言を戴いた大阪大学井上喜郎理学士、誤差論に關し種々御教示戴いた京都大学宇野豊三、岡田寿太郎両助教に深謝の意を表する。尙種々御支援を与えられた豊田勤治、寺島敏雄両技官、協力の労を取られた松倉秋彦技官に厚く感謝する。

総 括

法定食用タール色素の純度定量法としてチタノメトリー以外に、過マンガン酸塩法滴定による場合及び酸によ

り色酸を析出させ秤量する場合の計算のためノモグラフを作製した。又水溶性色素に混在する無機塩（塩化ナトリウム、硫酸ナトリウム）の定量用ノモグラフをも作製した。使用する際の誤差は何れも実験誤差に比較して遙に小であり、ノモグラフが充分実用に供し得ることを認めた。

Summary

Five kinds of nomographs for the analyses of Japanese Official Food Colors were made:

- (1) one kind for obtaining the purity by potassium permanganate oxidation,
- (2) one kind for obtaining the purity by weighing the color acids precipitated using inorganic acid,
- (3) one kind for obtaining the percentage of sodium chloride, which is found as inorganic impurity, in Volhard method,
- (4) two kinds for obtaining the percentage of sodium sulfate, which is also found as inorganic impurity, by titrating with barium chloride- or caustic alkali-solution.

Errors that might occur being very small, these nomographs were found available.

Received February 29, 1956

法定食用タール色素分析用計算図表（第3報）

作図及び誤差に関する考察

井上 勲

Nomographs for the Analyses of Japanese Official Food Colors. III.

Graphics and Error

Isao INOUE

著者は先に法定食用タール色素の分析値（純色素及び無機塩の各%）を簡易に知る目的で9種のノモグラフを作図して報告しそれを使用する際の誤差に就いても極く簡単に触れておいた。然し作図及び誤差に関しては尙詳細に述べる必要があると考えるので本報に於いてこれを概括的に述べることにする。

作 図

ノモグラフの型は非常に多種にのぼるが、作図及び応用面から共点図表及び共線図表がよく用いられる。

共点図表は対応する三つの曲線が同一の点を共有しているものであつて、それを作図するには或る関係を $f(u, v, w) = 0$ の如き函数として表わし、 (u, v) を直角座標にとり、一群の縦線 $u = a$ と一群の横線 $v = b$ 及び $w = c$ なる一群の曲線を抽く。換言すれば $f(u, v, c) = 0$ を描けばよい。この場合 $w = c$ が座標軸と或る角度をなす一群の直線となる場合も勿論あるが然し何れにせよ共点図表なる以上は線の数が多い為に図表を作ること自体が相当面倒であり、又完成された図が常に複雑であることは免れない。

これに対し共線図表は作図が比較的簡単なため共点図表よりも遙に広範に應用されている。その中でも多変数の共線図表特にその各変数の軸をすべて直線とする型、即ち、「基線上に三本の平行線を直角に立てる」型のものが最も良いと考えられるのでこの型式を採用した。尙作図法の原理は第1報に述べた通りである。

誤 差

(1) 定 義

今考察の対象とする誤差とは各実験値自体に含まれる実験誤差は一応考慮外に置き、得られた実験値を用いて計算を行う際に生ずる「読み取りの誤差」である。即ち誤差 (d) をば「図表上に読み取つて得た値 (N) と有効数字を考慮しつつ計算器を用いて得た値 (M) との差」と定義した。即ち、 $d = N - M$ で表わされる。

(2) 誤差の表現

d の表現としては信頼度95%に於ける値によるのが最も望ましいわけであるが、 d が正規分布を示さなかつたのでこの表現法によらず、平均値 (M') 及び各測定値に附随する等確誤差 (E) を用いた。即ち

$$E = 0.6745 \sqrt{\frac{\sum d^2}{n-1}}$$

で表わされる。但し d は各測定値の残差、 n は測定回数である。

(3) 誤差のグラフ

厳密な意味での誤差曲線は横軸に残差の大きさ、縦軸に残差の頻度を取るが、著者はこれと異なり $d = N - M$ を横軸に、頻度を縦軸にとつて折線グラフを描いた。このノモグラフの場合にはこの方が誤差の状況を観察するのに好都合であると考えたからである。それらのグラフは次の様になる。

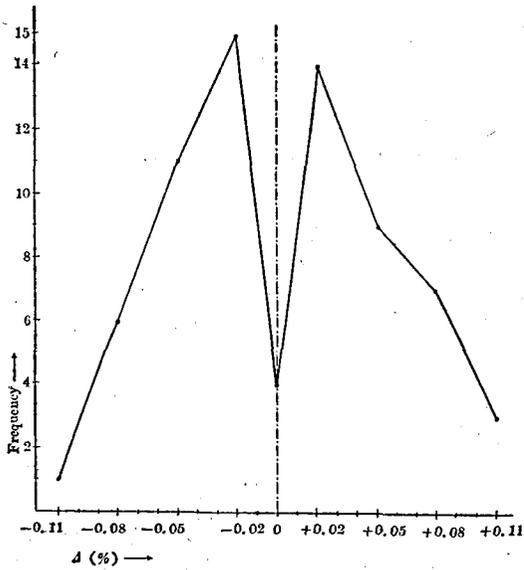


Fig. 1 Error of Nomograph
(Nomograph for Y-1)

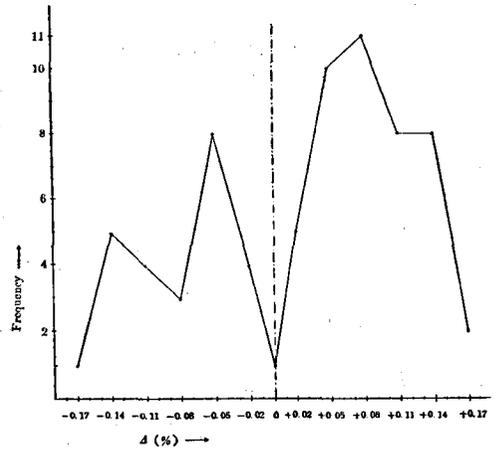


Fig. 2 Error of Nomograph
(Nomograph for O-1, Y-5, R-4, R-101,
R-1, Y-4, R-2, R-102)

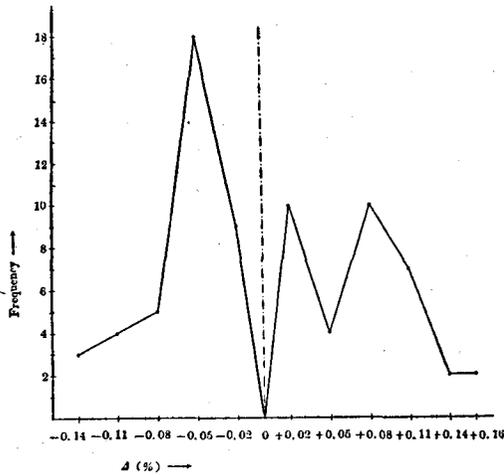


Fig. 3 Error of Nomograph
(Nomograph for B-101, G-1, V-1, B-1,
G-2, G-3)

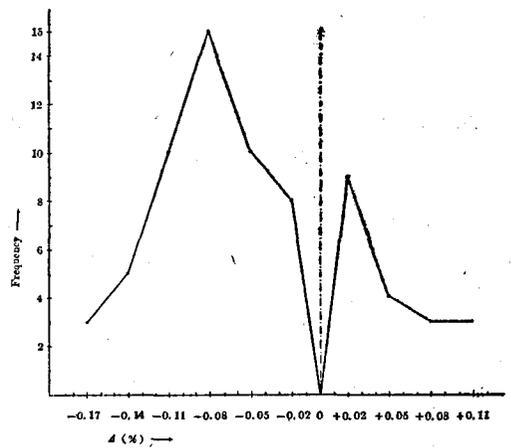


Fig. 4 Error of Nomograph
(Nomograph for Y-2, Y-3, O-2, R-5)

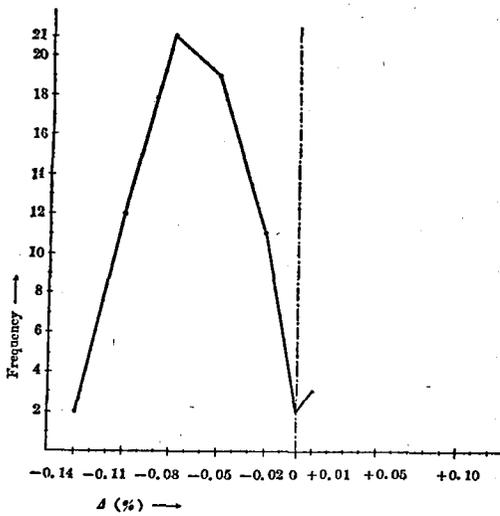


Fig. 5 Error of Nomograph
(Nomograph for KMnO_4 -Oxidation)

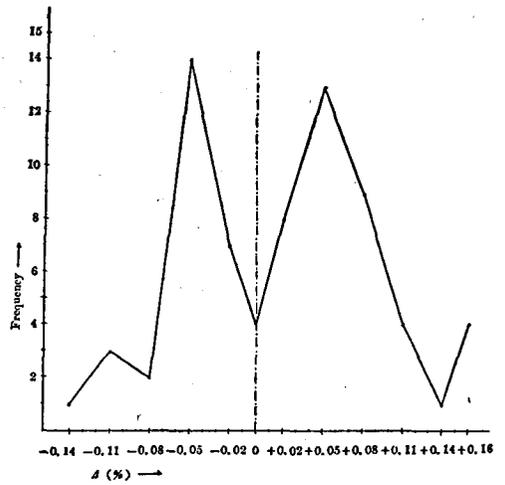


Fig. 6 Error of Nomograph
(Nomograph for R-105, R-104, R-103, R-3)

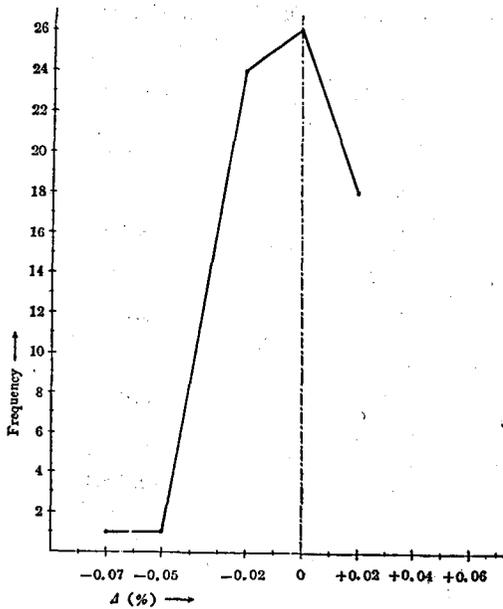


Fig. 7 Error of Nomograph
(Nomograph for NaCl %)

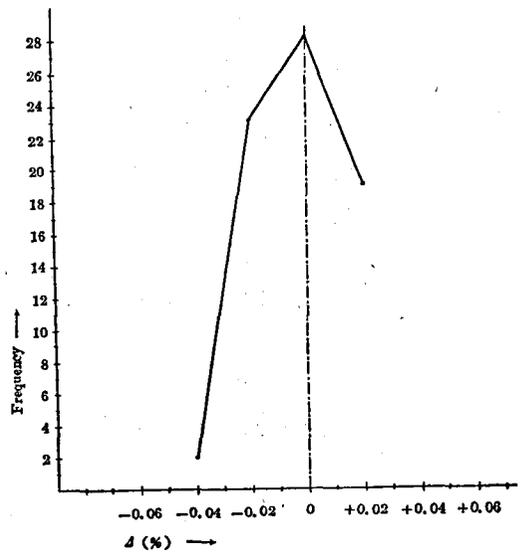


Fig. 8 Error of Nomograph
(Nomograph for Na_2SO_4 % by BaCl_2 -titration)

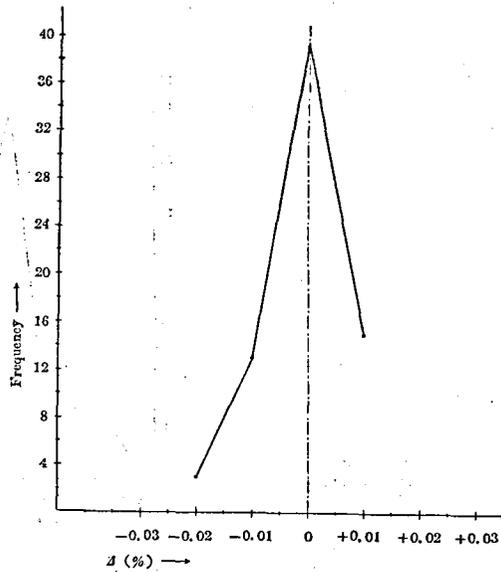


Fig. 9 Error of Nomograph
(Nomograph for $\text{Na}_2\text{SO}_4\%$ by NaOH-titration)

等確誤差及び平均値をまとめると Table 1 の如くなる。(平均値については前報で述べた。)

Table 1. Errors of Nomographs for the Analyses of Japanese Official Food Colors

Fig.	Nomograph for the Analyses of :	E (%) (Probable Error of a Single Measurement)	M' (%) Mean Value of Δ
1	Y-1	0.03	+0.002
2	O-1, Y-5, R-4, R-101, R-1, Y-4, R-2, R-102	0.05	+0.03
3	B-101, G-1, V-1, B-1, G-2, G-3	0.05	+0.001
4	Y-2, Y-3, O-2, R-5	0.03	-0.05
5	B-2 (by KMnO_4 -Oxidatio)	0.02	-0.06
6	R-105, R-104, R-103, R-3	0.04	+0.02
7	NaCl	0.011	-0.003
8	Na_2SO_4 (by BaCl_2 -titration)	0.010	-0.002
9	Na_2SO_4 (by NaOH-titration)	0.005	-0.0006

考 察

作図面から見た誤差の考察

一般的考察

生じ得る誤差の大小について作図の面から考察すれば次の如くなる。即ち Fig. 10 に於いて Y 軸上に微小のズレ d を生じた結果 Z 軸のズレが d' となるとすれば $d' = \frac{m+n}{m} \times d$ となることは明らかである。茲に $m+n = \text{const.}$ 故一定の d に対しては d' と m とは反比例の関係にある。

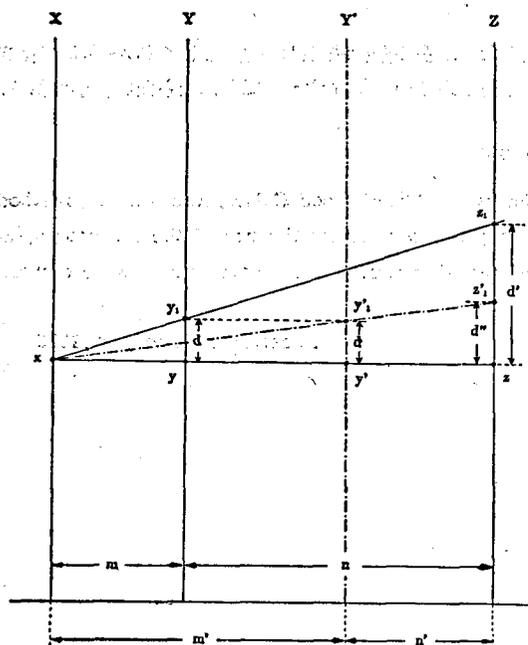


Fig 10.

の大きさ等からこれ等が制限を受けるのは勿論である。

各ノモグラフに附随する誤差の考察

1) ノモグラフ No. 1

$f+w=t$ に於いては $X, Y \rightarrow Z$ となつても m を可及的に大きくする条件は満たされるが $t \times v = P$ は $X, Y \rightarrow Z$ の型の上 $m=7.5\text{cm}$ とせねばならない。そのため誤差の状況は Fig.1 の如くなる。

2) ノモグラフ No.2→No.4

この3種は何れも補助軸2本を要し3操作の後7本目の軸に $P\%$ を求める点は共通である。 $X, Y \rightarrow Z$ の型が2回乃至1回必要で m の最小値は 4cm となる為、誤差は Fig.2→Fig.4 に見る様に相当大きくなるが止むを得ない。

3) ノモグラフ No.5

$X, Y \rightarrow Z$ の型は1回ですみ $m=9.5\text{cm}$ であるが d の状況を見ると一側への偏りが見られるから或る一定の補正を行うのも一つの方法である。然し偏りは図表自体が或る欠点をもつと言うことに基因するのも知れないからこの点は今後詳細に検討すべきであろう。

4) ノモグラフ No.6

$X, Y \rightarrow Z$ の型は1回ですむが $m=5\text{cm}$ とせねばならないから誤差は No.2→No.4 と略々同程度の大きさに達する。

5) ノモグラフ No.7

何れも $X, Z \rightarrow Y$ の型であるため誤差は略々満足すべき状況を示す。

6) ノモグラフ No.8, No.9

$X, Z \rightarrow Y$ と $X, Y \rightarrow Z$ との組み合わせであるが $X, Y \rightarrow Z$ の場合 m を約 20cm 程度に迄大きくし得るため誤差は略々満足すべき状況を示す。

従つて (i) x, y が既知でこれより解 z を求めるとき Y 軸上のズレは $\frac{m+n}{m}$ 倍に拡大されることとなり m の小なる程、換言すれば X, Y 両軸が接近している程、 Z 軸（解を求める軸）上のズレが大きくなり結局大きな誤差を生じることになる。故に $X, Y \rightarrow Z$ の如く外側の軸に解を得る様な場合には m の値がなるべく大きいことが望ましい。それはズレの大きさが同一の値 d でもそれが Y' 軸に生じた場合には $d'' = d' \times \frac{m}{m'}$ 即ち $d'' < d'$ となり得るからである。

(ii) これに反して $X, Z \rightarrow Y$ の如く両側の軸上の値 x, z が既知でこれより内側の軸 (Y) 上に解を求める場合には (i) と丁度逆になる。即ち $d = \frac{m}{m+n} \times d'$ 言い換えれば Z 軸上のズレ d' は $\frac{m}{m+n}$ 倍に縮小された形で Y 軸上に表われる。

従つて作図に当つてはなるべく解を内側に得る様（これを $X, Z \rightarrow Y$ と表わす）にすることが望ましく、又余儀なく解を外側に求める ($X, Y \rightarrow Z$ と表わす) 時はなるべく m を大きくする工夫が望ましい。然しこの要求の反面、各軸に目盛るべき値の範囲や図表全体

終りに、本研究の機会を与えられ終始御激励を賜つた喜谷支所長、図表論に關し有益な御助言を戴いた大阪大学井上喜郎理学士、誤差論に關し種々御教示戴いた京都大学宇野豊三、岡田寿太郎両助教授に深謝の意を表す。尙種々御支援を与えられた豊田勤治、寺島敏雄両技官、協力の労を取られた松倉秋彦技官に厚く感謝する。

総 括

先に作図したノモグラフの作図法と誤差とについて考察したが現在の分析法では絶対値として0.2~0.3%程度の実験誤差が許容されているからこれ等のノモグラフによる読み取りの誤差はすべて問題にならない程小である。

Summary

Concerning the nomographs for the analyses of Japanese Official Food Colors, the drawing method and errors were reviewed in detail. Errors that might occur during the use of these nomographs were found to negligibly small compared with experimental errors, so these nomographs were assured to be available.

Received February 29, 1956

中毒粉ミルク中砒素の検出について

川 城 巖

Determination of Arsenic in the Dried Modified Milk Poisoning

Iwao KAWASHIRO

まえがき 昭和30年8月岡山県下をはじめ兵庫、広島、大阪、徳島、愛媛、福岡、熊本県等主として関西以西の27府県)に亘つて森永乳業株式会社徳島工場製調製粉乳による中毒事件が発生した。これにともない昭和30年8月30日付食発第8号で厚生省公衆衛生局長から国立衛生試験所長宛に中毒原因究明のため、同工場の昭和30年1月より8月末日までの製品を主体とするものについて砒素検出の有無に関して試験の依頼があつたので、これに基づいて行つた試験の結果を報告する。

なおこの試験は食品関係三部全員によつて行われたものであることを付記する。

試料及び試験方法

(1) 試料 森永乳業株式会社徳島工場製品(MF印)、同社松本工場製品(ML印)、同平塚工場製品(MC印)、及び同福島工場製品(MN印)等の各調製粉乳並に徳島工場において使用した調製粉乳用各種添加素材、及び乳質安定剤として使用した第二磷酸ナトリウムと称するものであつて何れも公衆衛生局から送付されたものである。なお対照として他社製品数種について試験を行つた。

(2) 試験方法 調製粉乳及び添加剤にあつては各試料について常法により硫酸及び硝酸を用いて疎解を行い、硫酸アンモニウムを加えて過剰の硝酸を分解し検液となし、これについて Reinsch 法、Bettendorff 法、Marsh 法及び Gut Zeit²⁾ 法等を常法により行つた。なお第二磷酸ナトリウムと称するものの試験には常法による湿式定性定量分析法及び 濾紙クロマトグラフィーを用いるとともに、公定書外医薬品部長板井博士の協力と東京大学工学部宗宮教授の御便宜により赤外線吸収スペクトルの測定を行つた。

試験成績

第一表 調製粉乳の試験成績

(下表備考欄中の日付は特記ない限り公衆衛生局より試料を送付されたものを示す)

生産工場名	製造年月日	砒素化合物の有無	定量値 1g中 As ₂ O ₃ として	9月1日(徳島県衛生部)から直送	生産工場名	製造年月日	砒素化合物の有無	定量値 1g中 As ₂ O ₃ として	9月1日(徳島県衛生部)から直送
MF	5117	検出しない	—	9月1日	MF	5425	検出する	—	8月27日
"	5125	"	—	"	"	5427	"	—	"
"	5130	"	—	"	"	5428	"	—	"
"	5218	"	—	"	"	5429	"	—	"
"	5223	"	—	"	"	5430	"	—	"
"	5227	"	—	"	"	5502	"	—	"
"	5301	"	—	"	"	5503	"	—	"
"	5310	"	—	"	"	5505	"	—	"
"	5327	"	—	"	"	5511	"	—	"
"	5413	検出する	—	8月27日	"	5512	"	—	"
"	5414	"	—	"	"	5513	"	—	"
"	5415	"	—	"	"	5514	"	—	"
"	5416	"	—	"	"	5515	"	—	"
"	5417	"	—	"	"	5516①	"	—	"
"	5419	"	—	"	"	5516②	"	—	"
"	5420	"	—	"	"	5516③	"	—	"
"	5421①	"	—	"	"	5522	"	—	"
"	5422①	"	—	"	"	5523	"	—	"
"	5421②	"	21γ	8月24日	"	5524	"	—	"
"	5422②	"	35γ	"	"	5525	"	30γ	"
"	5423	"	—	8月27日	"	5526	"	—	"
"	5424①	"	—	"	"	5528	"	—	"
"	5424②	"	30γ	8月24日	"	5529①	"	—	"

生産工場名	製造年月日	砒素化合物の有無	定量値 1g中 As ₂ O ₃ として	9月1日 (徳島県衛生部) から直送	生産工場名	製造年月日	砒素化合物の有無	定量値 1g中 As ₂ O ₃ として	9月1日 (徳島県衛生部) から直送
MF	5529②	検出する	34r	8月24日	MF	5813	検出する	—	8月27日
MF	5530	〃	—	8月27日	MF	5814	〃	—	〃
MF	5531	〃	—	〃	MF	5815	〃	—	〃
MF	5601	〃	—	〃	MF	5816	〃	—	〃
MF	5603	〃	—	〃	MF	5818	〃	—	〃
MF	5604	〃	—	〃	MF	5819	〃	—	〃
MF	5605	〃	—	〃	MF	5820①	〃	—	〃
MF	5606	〃	—	〃	MF	5820②	〃	—	〃
MF	5607	〃	—	〃	MF	5821	〃	—	〃
MF	5608	〃	—	〃	MF	5822	〃	—	〃
MF	5609	〃	—	〃	ML	5122	検出しない	—	9月2日
MF	5610	〃	—	〃	ML	5206	〃	—	8月31日
MF	5611	〃	—	〃	ML	5407	〃	—	8月26日
MF	5612	〃	—	〃	ML	5412	〃	—	〃
MF	5613	〃	—	〃	ML	5510	〃	—	〃
MF	5614	〃	—	〃	ML	5513	〃	—	〃
MF	5615	〃	—	〃	ML	5608	〃	—	〃
MF	5619	〃	—	〃	ML	5612	〃	—	〃
MF	5620	〃	—	〃	ML	5706	〃	—	〃
MF	5621	〃	—	〃	ML	5721	〃	—	〃
MF	5622	〃	—	〃	ML	5726①	〃	—	9月2日
MF	5623	〃	8r	〃	ML	5726②	〃	—	〃
MF	5624	〃	—	〃	ML	5805	〃	—	8月26日
MF	5625	〃	—	〃	ML	5814	〃	—	9月2日
MF	5626	検出しない	—	〃	ML	5816	〃	—	8月26日
MF	5627	〃	—	〃	MC	5320	検出しない	—	9月2日
MF	5628	〃	—	〃	MC	5405A	〃	—	8月26日
MF	5629	〃	—	〃	MC	5417A	〃	—	〃
MF	5630	〃	—	〃	MC	5502A	〃	—	〃
MF	5701	〃	—	〃	MC	5514A	〃	—	〃
MF	5712	〃	—	〃	MC	5608A	〃	—	〃
MF	5716	〃	—	〃	MC	5615A	〃	—	9月3日
MF	5722	〃	—	〃	MC	5616A①	〃	—	9月15日
MF	5726	〃	—	〃	MC	5616A②	〃	—	〃
MF	5731	〃	—	〃	MC	5624A	〃	—	8月26日
MF	5804	検出する	20r	〃	MC	5701A	〃	—	〃
MF	5805	〃	14r	〃	MC	5726A	〃	—	〃
MF	5806①	〃	—	〃	MC	5805A	〃	—	〃
MF	5806②	〃	—	〃	MC	5812A	〃	—	〃
MF	5806③	〃	—	〃	MC	5816A	〃	—	〃
MF	5807	〃	—	〃	MC	5318	〃	—	〃
MF	5809	〃	—	〃	MC	5408	検出しない	—	9月2日
MF	5810	〃	—	〃	MC	5812	〃	—	8月26日
MF	5811	〃	—	〃	MC	5822	〃	—	〃
MF	5812	〃	—	〃	MC	5822	〃	—	〃

第二表 添加素剤の試験成績

試料	砒素化合物の有無	備考
ビタミンB ₁₂	検出しない	8月25日公衆衛生局から送付さる
ビタミンA	〃	〃
ビタミンAアセテート	〃	〃
ニコチン酸アミド	〃	〃
ビタミンD ₂	〃	〃
ビタミンD ₃	〃	〃
ビタミンC	〃	〃
砂糖	〃	〃
乳酸鉄	〃	〃
コロイドカルシウム	〃	〃

第三表 対照他社製品の試験成績

試料	砒素化合物の有無	備考
武田キノミール FP 5805 ①	検出しない	8月26日公衆衛生局から送付
〃 ②	〃	〃
雪印ビタミルク AU 5809 A5 ①	〃	〃
〃 ②	〃	〃
クローバー粉ミルク HD 5214 ①	〃	〃
〃 ②	〃	〃
明治ソフトカード KB 4820 B	〃	8月25日市販品を入手した

第四表 第二磷酸ナトリウムと称するものの試験成績

試料(No.)	砒酸化合物の有無	定量値 無水砒酸(As ₂ O ₅) として	備考
(1)	検出する	8.79	{ 8月28日公衆衛生局から送付のもの (徳島工場使用残品と称す)
(2)	〃	3.77	{ 食品部長徳島工場より持参のもの (同工場使用残品と称するもの)
(3)	〃	9.12	{ 〃 (在庫品と称するもの)
(4)	〃	5.18	{ 8月31日公衆衛生局から送付のもの (使用したものと称す)
(5)	〃	8.95	{ 〃 (松野製薬K. K. から収去, 生駒薬化学工業K. K. 製)
(6)	〃	8.88	{ (〃)
(7)	検出しない	—	{ 〃 (米山化学工業K. K. より収去)
(8)	〃	—	{ 〃 (米山化学工業K. K. より収去)
(9)	〃	—	{ 〃 (米山化学特級リン酸=ナトリウム)
(10)	検出する	9.17	{ 30.9.2 公衆衛生局から送付のもの (徳島県国警本部が収去)

試験成績のまとめ 第一表調製粉乳 MF 印の1月から3月末日まで及び6月26日から7月末日までの製品を除いた他の製品中から砒素化合物を検出した。定量値は As₂O₅ として 8~35r であった。ML, MC, 及び MN 印の三工場製品からは何れも検出しなかつた。

第二表添加薬剤及び第三表対照他社製品中からも検出しなかつた。

第四表第二磷酸ナトリウムと称するもの 10 種の内 7 種から何れも砒酸化合物を検出しその定量値は無水砒酸 (As₂O₅) として 3.77~9.17% であった。なお赤外線吸収スペクトルの測定値及び滴定曲線より本品中には第三磷酸ナトリウムを相当含有するものと思料された。なおその後バナヂウムを検出し、更に弗素 1~2% を定量した。

文 献

- 1) 食品衛生研究 : 5. No. 11, 17 (1955)
- 2) 食品衛生検査指針 : 1952, III p. 53
- 3) 第六改正日本薬局方 : 一般試験法中砒素試験法
- 4) Methods of Analysis of the Association of official Agricultural Chemist : 1950, P. 369

Summary

Dried modified milks (marked MF) manufactured by Morinaga Industrial Co. from April to June 25th and during August in 1955 contains arsenic of 8~35p. p. m. as As_2O_3 .

Besides we examined of the stabiliser for milk that was so called secondary sodium phosphate. Its results were 3~9% as As_2O_3 , fluorine 1~2%, and more over vanadine was detected.

Received February 29, 1956

砒素混入による粉乳中毒事件と慢性砒素中毒 における肝障害について

池田 良雄

On the Mass Poisoning Case caused by Arsenic Containing Powdered-Milk and the Liver Injury in Chronic Arsenic Poisoning Yoshio IKEDA

まえがき 昭和30年夏、岡山県を中心として発生した粉乳による乳児の砒素中毒事件は、その中毒者総数 12,159 名死亡数 131 名(昭和31年2月24日現在)で砒素による乳児集団中毒としては恐らく古今未曾有なものと考えられるが、著者は同事件に際し本試験所川城食品部長と現地へ赴いて実地調査に当たったのでその経過概要を報告すると共に、岡山大学病理学教室からいただいた死亡児肝臓標本をもとに砒素中毒時における肝障害について考察したい。

中毒事件の経過概要

昭和30年6月中旬頃から岡山県下において、生後4~12ヶ月の人工栄養児に限って発熱、黒皮、肝腫大、貧血等を主症状とする原因不明の奇病が発生し漸次その数が増加して来た。日赤岡山病院内科ではこの奇病患者の病歴を詳しく検討した所、いずれも森永製粉乳を使用していることが判明し、「M貧血」と名付け、8月中旬岡山大学小児科教室と共にその原因究明にのりだした。本病の治療に当たった小児科浜本教授の臨床所見の概要は、持続性の37~38°の発熱と共に食慾不振、下痢が永く続き、全身に麻疹様の発疹が出る。皮膚が薄黒く変色し、首のつけね、腋下、乳首、両股間等から始つて全身にひろがってくる。日時の経過するにつれて先に黒くなつた部位から剥れてくる。肝臓が腫大して腹部が膨満すると共に、顔色がわるく土色を呈し、血球検査の結果赤血球、白血球共に減少している。

このような病状を示す患者が続々入院する様になり、その内1名が原因不明のまま死亡したので8月19日同大学病理学教室で病理解剖された。翌20日の同地方新聞に「人工栄養児に奇病」なる見出しで大きく発表され始めて世人の注目を集めたのである。この特異な病徴については、当初浜本教授等は奇病初期に行われたペニシリン注射後に発生するカンヂダ症ではないかとも疑われた様であるが、病理解剖の結果、炎症性的変化及びカンヂダは認められず、むしろ中毒性的変化が見られたので本症は微生物による疾患ではなくて中毒性のものであると推定するに至つた。病理解剖に当たられた浜本教授の言によると、一般に貧血性で所々溢血を認め、肝臓は腫大して所々小出血があり中心性の脂肪変性を見る。腎臓は細尿管特にその主部に著変が見られ、石灰化しているのが特徴でこの腎臓の病変は他の臓器に比較して最も強い。心筋繊維はその配列が乱れて核の周囲に空胞変性を認め、その他、淋腺の腫張と細網細胞増殖、脾臓の小出血、腸管の滲胞性腸炎像等が見られる。

以上の様な病理所見が明らかになつたので臨床症状と照し合せて浜本教授等は重金属特に砒素による中毒を推論するに至つたのである。ひるがえつて砒素中毒特にその亜急性或は慢性砒素中毒を文献に求めると黒皮症、肝腫大、貧血等甚だしく類似し、又病理所見に見られる肝、腎の変性特に細尿管の石灰化は、対照が乳児であることから考えて中毒性病変特に重金属を思わせ、又 Arsen-myocarditis (砒素性心筋炎)の前段階と考えられる心筋繊維の変化は砒素中毒を推論する有力な手掛りであつた。

又一方、同大学法医学教室遠藤名誉教授等は屍体肝臓と患者の枕頭にあつた森永製MF印粉乳2缶について砒素の化学試験を実施中であつたが、Reinsch 反応によつて粉乳中砒素陽性なる結果を得、又25日肝臓についての結果が判明し、肝臓20g、50gからの検査では陰性、100gについては陽性と出た。

8月23日現在、死体組織からの砒素検出を実施中であり、又粉乳缶の検査も未だ2缶で且その方法も定性試験であつて定量試験を行っていない状態なので砒素による中毒死とは断定出来ないが、日々患者が激増する甚だ重大な局面となつていたので、臨床症状、病理解剖、粉乳の分析結果から総合して本症の原因は砒素による中毒と思われるとの発表を大森県衛生部長の名で公表し、翌24日新聞紙上に大々的に発表された。

同県衛生研究所ではMF粉乳について Gutzeit 氏法による砒素の定量試験を行っていたが、前記新聞発表の1 両日後結果が判明し、粉乳 5g について 0.05~0.1mg 程度の砒素が存在することが明らかとなり、又兵庫県衛生研究所においてもMF粉乳について 0.007% の砒素が混入することが発表され、本試験所食品部においてもこれ等の成績が再確認された。以上の量は、乳児が1日約100gの粉乳を摂取するとして、砒素の摂取量は1日1~2~7mgとなり当然亜急性乃至慢性中毒を起し得る量であつて、ここに本事件は森永粉乳中に混在する砒素によるものであることが決定的となつたのである。

次に問題となるのは砒素の混入経路で、当初種々の可能性が考えられたが、粉乳の添加物についても疑問が持たれ、岡山大学法医学教室、徳島県衛生研究所で試験されたが、前者ではビタミンC (5g)、カルシウム(20g)、砂糖(40g)、滋養糖(3.1g)についての Reinsch 反応は陰性、後者では各種添加物について Gutzeit 法による試験の結果、35g のカルシウムから 0.5 PPM の砒素を検出したと発表された。この発表に基いて医系の某議員の添加物中のカルシウムに混入した砒素が原因であるとの談話が新聞紙上に発表されたが、然し粉乳中に添加されるカルシウムの量は約2%であり、その 0.5 PPM とすると粉乳 100g について砒素は1 μ となり、この量で中毒を起すことは甚だ考え難く大いに疑問を持たれた。あとで聞いた所によると事実カルシウムを分析された徳島県衛生研究所当局もカルシウム中の砒素を原因と考えていなかつたのである。

この間、中毒粉乳を製造した森永徳島工場においても各添加物について検査を行っていたが、27日夜半第二磷酸ナトリウムから約3%の砒素を検出し、又同県衛生研究所においても約2%の砒素を検出、更に本試験所食品部においてもこれを再確認して遂に本中毒の原因である砒素の混入経路は粉乳添加物の一つである第二磷酸ナトリウム中の不純物としてであることが明らかとなつたのである。

第二磷酸ナトリウムは牛乳中の蛋白の安定剤として添加するものであるが、先づ原乳 1000kg に対して 100g の第二磷酸ナトリウムを入れる。

原乳 1000kg から粉乳が約113~115gとれるので1kg中の磷酸塩は約 1.1g となるがこの粉乳にその他の添加物を約 30% 入れるので最終製品 100g について第二磷酸ナトリウム量は約 0.077g となり、砒素がその3%とすると 2.3mg となり、この値は前記製品についての試験結果とよく一致する。

以上本事件の経過を振り返つてみる時、事件解決のために昼夜不眠の努力を続けられ、美事な推論を下して検査方向を定めた後、適切果敢な処置をとられて測り知れざる事件の進展を食い止められた岡山大学の各先生方、衛生部の方々又事件解明の重要な手掛りとなつた屍児の病理解剖を承諾された家族の方々に深甚の敬意を捧げる。

慢性砒素中毒における肝障碍

岡山大学医学部病理学教室の御好意により中毒死児の肝臓標本を観察する機会を得たので、その所見を記載し著者が行つた他種毒物による実験的肝障碍と比較検討する。

材料 第1例: 生後5ヶ月16日の男子、MF印粉乳約4ヶ月合計35缶摂取、昭和30年8月24日岡山大学小児科え入院し1週間BAL治療を行つた後死亡、死後6時間35分で解剖。

第2例: 生後70日の男子、MF印合計8缶摂取、死後3時間で解剖。

動物実験: *Penicillium isladicum* (有毒黄変米の原因菌) の Cgapek 液体培養菌蓋のメタノール・エキスを 5mg/10g 3日間経口投与して6日後に生存中を解剖したマウス。モノフルオール酢酸アミド ($F \cdot CH_2 \cdot CONH_2$) を夫々30及び20mg/kg皮下注射して30時間後及び4時間後死亡したラット。

顕微鏡的所見 Fig. 1: 中毒児第1例の肝臓で、一般に Sinusoid が拡張してうづ血が強く、小葉中心部から中間部にかけて著明な出血を認める。中心部では出血と共に肝細胞索全く乱れて離開し、脂肪滴と思われる中等大乃至巨大空泡が目立つ。脂肪滴周辺には扁平に圧縮せられた核を認める。個々の肝細胞は判別し難いが出血巢の間に残存して比較的形態を保っている細胞は好酸性を示す、細胞核は一般に変性を示し、濃縮、核色素減少、不正形等を示す。出血巢の中において中心静脈は殆んど判別し得ない。小葉周辺部は比較的細胞索は保たれているが、毛細管拡張して細胞索萎縮し、Dissè 氏腔拡張を認める。細胞基質消失して染色性が悪くこわれかかつている細胞が可成散在する。グリソン氏鞘の結合織及び血管壁は膨化状を示し、一部軽度の細胞浸潤を認める部分がある。

部位によつてはグリソン氏鞘近くまで小出血と細胞崩壊の及んでいる所がある。

Explanation of Figs. 1-4

Liver of children poisoned by arsenic containing powdered-milk.

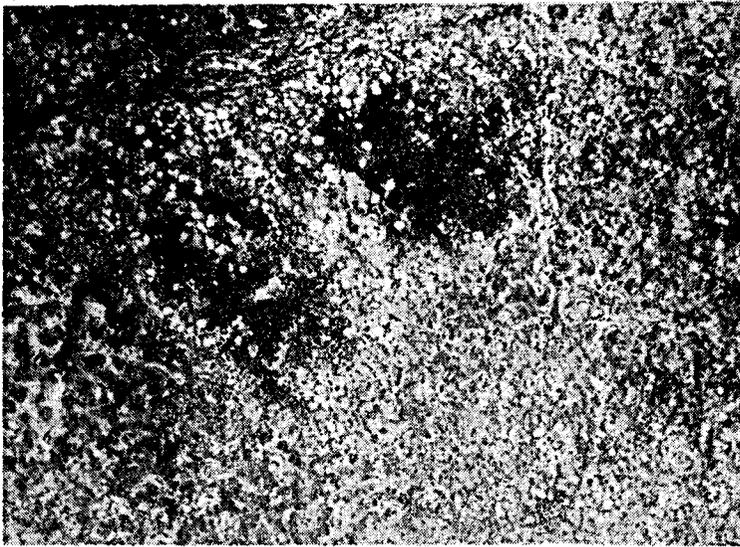


Fig. 1 Case 1. Hematoxylin-Eosin, $\times 80$

Central necrosis with marked hemorrhage and vacuolar (fatty) metamorphosis. Relatively intact liver-cell cord in the periportal zone.

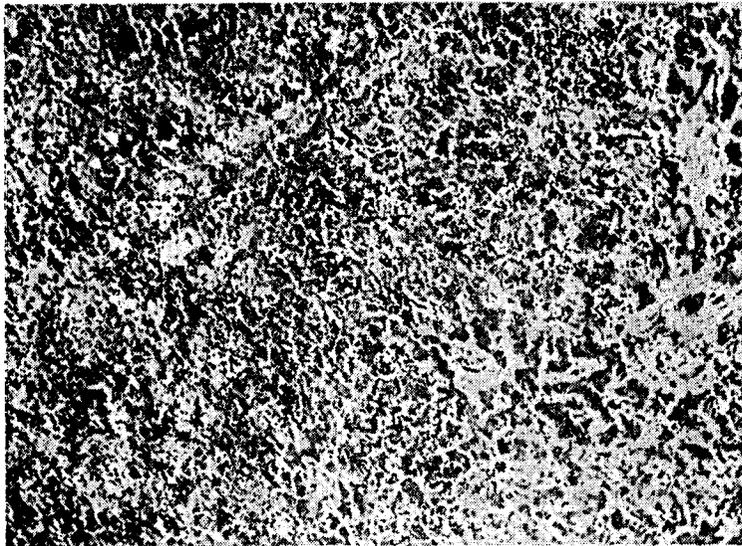


Fig. 2 Case 2. Mallory, $\times 80$

Central necrosis with marked hemorrhage, but relatively few vacuoles.

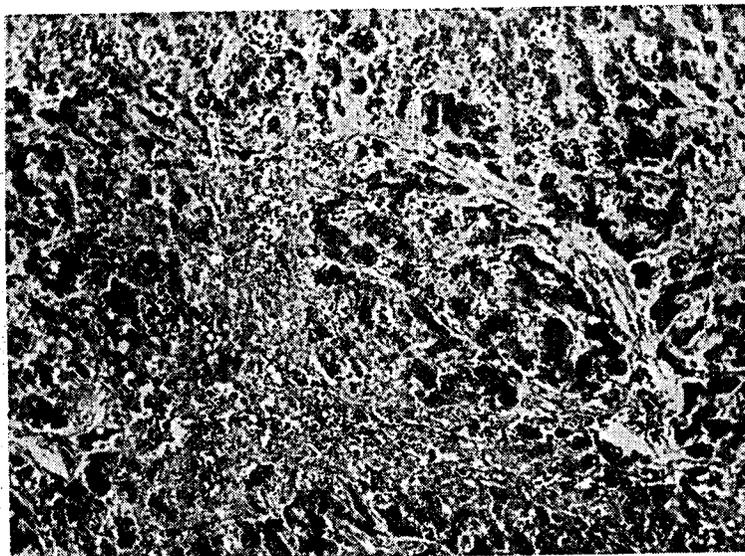


Fig. 3 Other part of the same specimen. Mallory, $\times 80$
Fibrosis connecting both adjacent central parts and central part
with periportal zone, forming pseudo-lobule.

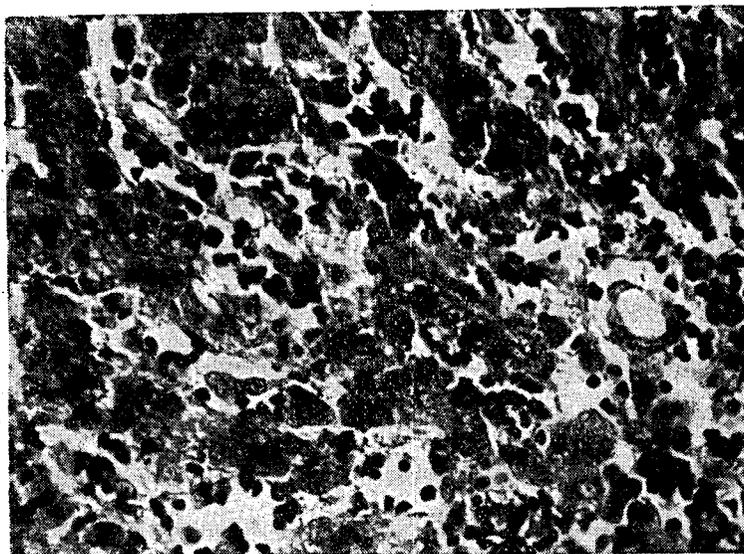


Fig. 4 Periportal field of the same case. Mallory, $\times 400$
Dilatation of Disse's space with amorphous substances. Sporadic
necrotic liver cells.

Fig. 2 (Mallory染色)： 中毒児第2例の肝臓で、本例も出血を伴う中心性壊死が主変化であるが、脂肪変性は部分的に存在するも第1例程著明ではない。

Fig. 3： 同標本の別の部分であるが、中心部の壊死巣に結合織が増殖して隣接中心部と連結し、又中心部とグ氏鞘とも連結されて偽小葉を形成し、初期硬変像を思わせる。

Fig. 4： 同標本強拡大で比較的障碍のすくない小葉周辺部を示すが、部分的に壊死が見られ Sinusoid 拡張と共に Dissè氏腔ひろがり中に無形物質の見られる所がある。

考 察

(1) 以上砒素による乳幼児の慢性中毒2例の肝臓組織所見を考察するに、高度のうつ血、出血と共に中心性壊死が主変化であり、巨大滴脂肪変性を伴う。又第2例の示す如く壊死巣に相当して、又グ氏鞘にも結合織増殖して中心部と中心部、中心部とグ氏鞘とを連結して偽小葉を形成し、肝硬変の初期像を思わせるものがある。

(2) 一般に中毒に限らず種々の病因から肝臓壊死を起すことは人体解剖例の所見から知られているが、著者の現在までの動物実験における経験及び文献に見られる記載を参考として、肝臓壊死をそのひろがりから分類すると次の如くなる。

Hepatic Necrosis

Massive necrosis (acute yellow atrophy)

Zonal necrosis	{ central midzonal periportal }
Focal necrosis	
Sporadic necrosis	

	{ dark-cell clear-cell }

古来、クロロホルム、四塩化炭素、蟻酸アリル等特に肝臓に親和性を有するものを「肝臓毒(Hepatotoxic Substance)」と称するが、肝臓毒による肝障害の形態的特徴は肝臓に壊死を起し、すくなく共 zonal necrosis 以上のひろがりを生ぜしめるものであると考えられる。一応以上の如く分類されるとしても、同一毒物でも生体に摂取される量と解剖に至るまでの時間的経過によつて上記分類のあらゆる段階をとり得るのではないかの疑問も起り、事実 Himsworth 等の説く如くに zonal necrosis に食餌性の因子が加わつて massive necrosis に移行し、又 central necrosis 中にも甚だ不完全なものから完全な輪状壊死との間に種々段階の見られることは確かである。然し乍ら又一方、毒物による肝臓壊死は zonal necrosis の形をとるものが多く、その中でも central necrosis の場合が最も多いのに反して midzonal necrosis は甚だ稀であること、focal necrosis は midzonal 形をとることが多いという様なことから、zonal necrosis と focal necrosis の間に必ずしもその連続性があるのとは考え難いのである。

今肝臓壊死を示す著者の実験例を挙げると。

Fig. 5： *P. islandicum* の菌蓋エキスをマウスに 5mg/10g 3回投与して6日目に解剖した例で、細胞浸潤と空胞変性(或は脂肪変性)を伴う強度の中心性壊死が見られ。

Fig. 6： は同じ条件下の実験例であるが極く初期の像と考えられるもので、細胞浸潤と空胞(或は脂肪)変性が主徴である。

Fig. 7： モノフルオール酢酸アミドを 30mg/kg 注射したラットの標本で、中心性の、強い eosinophile necrosis を認めるもので、この場合には細胞浸潤を見ない。

Fig. 8： は同剤 20mg/kg 注射したもので、死亡時間が早いため(注射後4時間)未だ壊死は認められず、中心部並びに中間部の滲浸性空胞変性(ズダンⅢ陰性)が主変化である。

著者のその他の経験例或は文献に見られる諸家の実験例から、zonal necrosis を起す毒物をその部位によつてわけてみると次の如くである

Explanation of Figs. 5 - 8

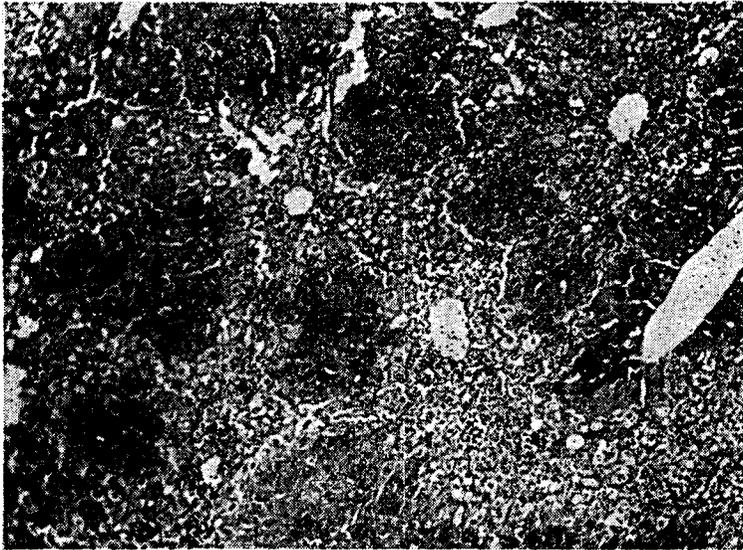


Fig. 5 Liver of a mouse poisoned by peroral administration of extracts of *Penicillium islandicum*. Hematoxylin-Eosin, $\times 80$
Central necrosis with cell-infiltration and vacuolation, forming pseudo-lobule.

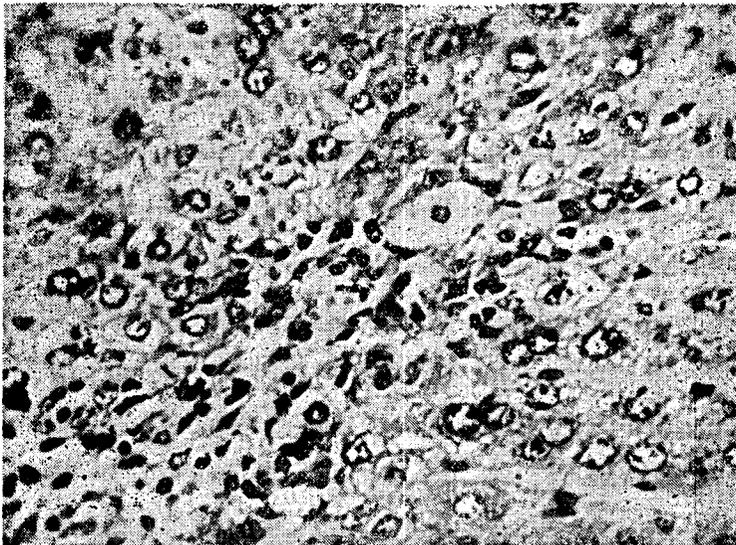


Fig. 6 Initial stadium of the same poisoning as Fig. 5. Hematoxylin-Eosin, $\times 400$
Slight vacuolation and cell-infiltration around the central vein.

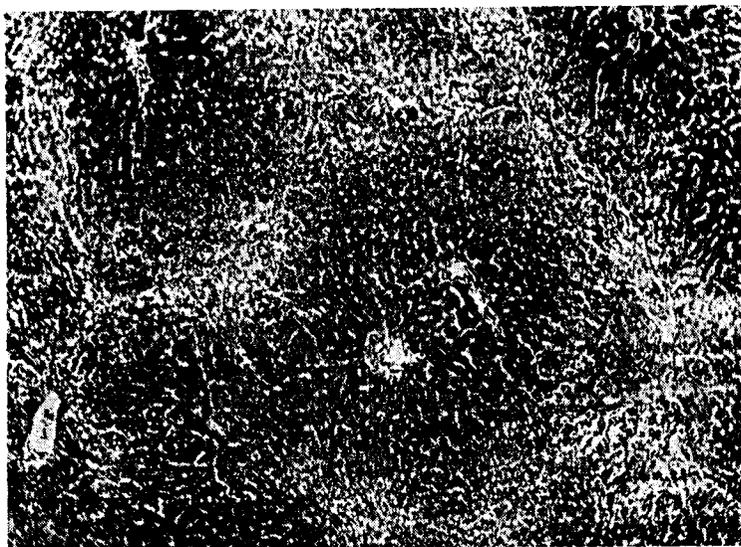


Fig. 7 Liver of a rat poisoned by
Monofluo-acetamide
Hematoxylin-Eosin, $\times 80$
Central necrosis with vacuolation, but no
cell-infiltration.

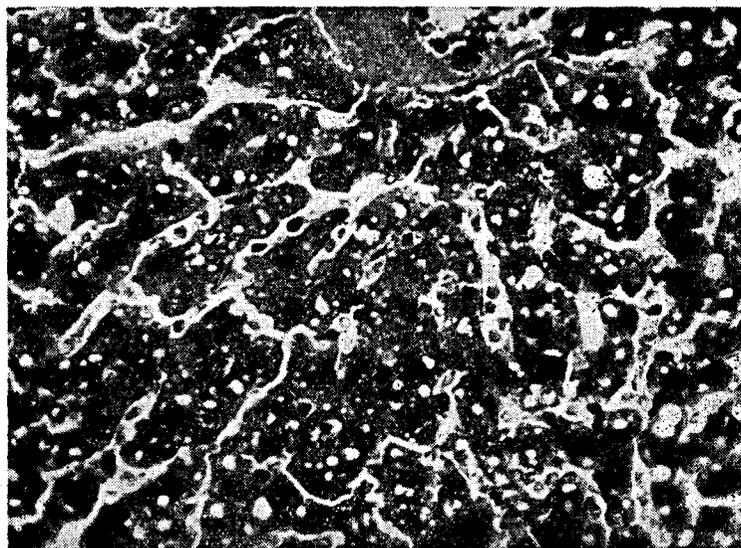


Fig. 8 Initial Stadium of the
same poisoning as Fig. 7.
Hematoxylin-Eosin, $\times 400$
Central and intermediary diffuse vacuolar
degeneration (fat-staining negative) with
dilatation of sinusoids.

(i) central necrosis

クロロホルム, 四塩化炭素, タンニン酸, 毒キノコ, *Penicillium islandicum* 毒素, モノフルオール酢酸アミド, アサリ毒, 砒素.

(ii) midzonal necrosis

クロロホルム (但, 甲状腺剤を投与してその機能亢進状態にある動物に投与した場合)

(iii) periportal necrosis

蟻酸アリル, 瘴, *Proteus vulgaris* の毒素

(3) 砒素の慢性中毒における肝臓壊死も前記の如く明らかに中心性壊死の範疇に入る.

一般に中心性壊死の原因に関しては, 直接細胞体に及ぼす毒物の epithelio-toxic な作用と共に, 近年, 小葉内血行の異常が重視される傾向にあるが, この点に関しては, *P. islandicum* の場合にはその初期の像が示す如くに, 又モノフルオール酢酸アミドの場合にはその初期像と共に本剤は強い酵素毒であること等から, 両者共 epithelio-toxic な作用が壊死の主因であろう.

本砒素中毒の場合は, その初期の像が見られないので確言し難いが, 出血が著明であること, 死戦期或は死後の影響を考慮しなければならぬが比較的障碍のすくない周辺部において Disse 氏腔の拡張と無形物質の存在, グ氏鞘血管変性等認められる所から, 中心性壊死発生には, 血管壁障碍による透過性の異常と出血のために起る血行障碍が主要な因子であると推察される.

現地調査に当り, 親しく御教示にあづかつた岡山大学小児科浜本教授, 同病理学浜崎教授, 同法医学遠藤名誉教授, 大森岡山県衛生部長, 岡山県及び徳島県衛生研究所の方々に厚く御礼申上げると共に, 貴重な標本をいただいた浜崎教授, 小田助教授に深甚の謝意を表します.

総 括

1) 昭和30年夏, 岡山県を中心として, 砒素混入粉乳による乳児集団中毒事件——中毒者総数12,159名, 死亡者131名(昭和31年2月24日現在, 厚生省食品衛生課調)——が発生したが, 著者はその発生, 経過について調査の結果を纏めた.

2) 岡山大学病理学教室の好意による中毒死児2例の肝臓標本を観察すると共に, 他種毒物による著者の実験例と比較検討した.

本中毒例における肝障碍の特徴は, 出血を伴う中心性壊死で, この中心性壊死発生には血管障碍が主要な要因と考えられ, 毒物による肝臓壊死の一つの型をなしているものと思われる. なお部分的にすでに肝線維化を起しているのが見られる.

文 献

- 1) Himsworth, H. P. : The Liver and its Diseases, (1950)
- 2) Sollmann, T. : A Manual of pharmacology (1950), Sanders.
- 3) Popper, H. : Über experimentelle Hepatitis. Virchows Arch., 298, 574 (1937)
- 4) Heinemann, K. : Experimentelle Untersuchung zur Frage der ser sen Entzündung bei Ratten, Kaninchen und Katzen. Beitr. Path. Anat., 98, 545 (1937)
- 5) Roth, G. : Beitrag zur Frage der zentralen Lebernekrose. Frankf. Z. Path. 51. 1 (1938)
- 6) Popper, H. : Significance of agonal changes in the human liver. Arch. of Path., 46, 132 (1948)
- 7) Black-Schaffer, Johnson & Gobbel : Experimental total midzonal hepatic necrosis. Amer. J. Path., 26, 397 (1950)
- 8) Wallach & Popper : Central necrosis of the liver. Arch. of Path., 49, 33 (1950)
- 9) Richter, G.W. : Parenchymatous lesions of liver and kidney of mice due to pectin. Amer. J. Path., 26, 379 (1950)
- 10) Clarke, W. T. W. : Centrilobular hepatic necrosis following cardiac infarction. Amer. J. Path., 26, 249 (1950)
- 11) Koch-Weser, Farber & Popper : Fatty liver with and without necrosis. Arch. of Path., 51, 498 (1951)

Summary

- 1) The author reported the outline of the mass poisoning case of children by arsenic containing powdered-milk, which occurred in mainly western districts of Japan in Summer 1955. According to the investigation of the Welfare Ministry as of February 24, 1956, the total number of poisoning is 12,159, among which 131 died.
- 2) The author could study the liver preparations of 2 autopsy cases, by courtesy of Dr. T. OD A, pathological department, Okayama University and described the characteristic feature of the central necrosis with marked hemorrhage in the case of chronic arsenic poisoning. The author also ascribed the etiologic factor of this central necrosis mainly to the injury of the capillaries, comparing with other experimental liver damages by poisons such as Monofluo-acetamide and *Penicillium islandicum*, which exert direct epithelio-toxic action.

Received February 29, 1956

食品の異物検査法 (第2報*)

宮島弘衛, 小川秀子, 野崎泰彦

Microanalytical Test of Food Products. II.

Hiroe MIYAJIMA, Hideko OGAWA, Yasuhiko NOZAKI

まえがき

われわれは前報¹⁾でパンの簡易異物検査法について報告した。今回更に、ビスケット、ピーナッツバター、ピーナッツクリーム、粉乳、脱脂粉乳の検査法特に界面活性剤 Tween 80 及び Ethylenediaminetetraacetic acid-4Sodium (以下 EDTA という) の応用について検討したので報告する。

実験の部

a. ビスケット (含油量 16~18%)

試料 50g をとり、割つて中へねずみの毛 5 本, こくぞう虫片 3 個を入れたものを, ワイルドマンフラスコに入れ, 50%アルコール約 200cc を加えて 1~2 時間放置する。この間更によく砕く。後 Tween 80 及び 50%アルコールの混液 100cc (1:4) を加えて混ぜ, ガソリン 40cc を加え, 直ちに EDTA の 50%アルコール液 (EDTA 2.5g を少量の水に溶かし, 水とアルコールを加えてアルコール濃度が 50%, 全量 100cc となるようにする。) を加えてかきまぜる。後 50%アルコールでワイルドマンフラスコを充たし, 分離後常法 (衛生検査指針 III, 1952, p. 106) により濾紙上に異物を集める。結果は第 1 表に示す如くである。

第 1 表

ねずみの毛 5 本, こくぞう虫片 3 個 混入した試料

実験番号		(I)			(II)			(III)			(IV)			(V)			平均
会社別	異物別	捕集回数			計			計			計			計			
		A 社	ねずみの毛	1	4	5	2	3	5	0	5	5	4	1	5	4	1
こくぞう破片	2		1	3	3	0	3	2	1	3	3	0	3	2	1	3	100%
B 社	ねずみの毛	2	3	5	2	2	4	3	2	5	3	1	4	1	4	5	92%
	こくぞう破片	3	0	3	3	0	3	3	0	3	3	0	3	3	0	3	100%

A社のビスケットでは2回の捕集で検出率 100%, B社のものではこくぞう虫片は 100% 検出し, ねずみの毛の平均検出率は 92% であるが 5 回の実験中 3 回は検出率 100% である。

b. ピーナッツバター

(1) 重い異物

試料 50g に微細な石 5 個, ねずみの毛 20 本を予め混入し, クロロホルム 50 cc を加えてかきまぜ, 20 分間放置する。沈着した重い異物を流し込まぬように注意してピーナッツ層を濾紙上に集める。底に残った食塩と重い異物に濾過水少量を加えて食塩をとかし, 別の濾紙上に残留物を集めると混入した石 5 個は, 全部検出出来た。

(2) 軽い異物

(1) パンクレアチン消化法

Yakowitz M. G.²⁾ の方法を少し変えて行つた。(1)で濾紙上に集めたピーナッツ組織から完全にクロロホルムを吸引して除いたものを, 11 のワイルドマンフラスコに移す。濾過水を加えて全量約 200cc にし, 10% リン酸

* 野崎, 宮島, 清水: 衛生試験所報告, 72, 191 (1954) を第 1 報とする。

三ナトリウム液で pH 8 にする。次にパンクレアチン 3g を加えてかきまぜ、30 分毎に 10% リン酸三ナトリウム液で pH 8 に 3 回調整し、ホルマリン数滴を加えて 1 夜 40°C で消化後 1 回過水を加えて常法通りガソリンで捕集する。

(II) Tween・EDTA 法

(I) と同様にワイルドマンフラスコに移した試料に 60% アルコール 200cc を加え、10 分間 浸した後 Tween 80 及び 60% アルコールの混液 (1:50 容量) を 100cc 加え、ガソリン 35cc を加える。後直ちに EDTA の 60% アルコール液 (EDTA 2g を少量の水にとかし、水とアルコールを加えてアルコール濃度 60%、全量 100cc とする) を加えて 2 分間かきまぜる。次に 60% アルコールで充し、ガソリン 25cc で捕集する。この方法は、(I) と同様 Yakowitz M.G.⁹⁾ 法によつた。

(I) と (II) の方法の比較は第 2 表に示す如くである。

第 2 表
ねずみの毛 20 本混入した試料

実験番号	方法別 捕集回数	パンクレアチン法			ツイーン・EDTA法		
		(I)	(II)	合計	(I)	(II)	合計
I		14	2	16	18	1	19
II		4	10	14	17	2	19
III		16	2	18	16	2	18
IV		3	11	14	13	4	17
V		18	2	30	18	2	20
平均				78%			93%

両法の平均値の差を検定すると、パンクレアチン法の不偏分散 $V_1=30420$ Tween・EDTA法の不偏分散 $V_2=43245$ $F=V_2/V_1=1.4$ F分布表より自由度 $\varphi_1=4$, $\varphi_2=4$ であるとき、有意水準 5% = 6.39 1% = 15.98 であるから、有意とは認め難い。

両者を組合せた不偏分散、 $V=36900$ 標準偏差の推定値 $6e=192.09$ $t=0.12$ $\phi=8$ の有意水準 5% = 3.35, 1% = 5.041 であるからこの差は有意とは認め難い。

以上の計算からパンクレアチン法と Tween 80・EDTA 法の間には優劣をつけがたい。しかし後者は第 1 回目の捕集で大部分が回収出来ている。

c. ピーナッツクリーム

(1) 重い異物

試料 50g 中に微細な石 5 個、ねずみの毛 20 本を予め混入したものに約 40°C の 1 回過水 25cc を加え、更に 25cc のクロロホルムを加えてよくかきまぜ、20~30 分間静置後上層のピーナッツ組織を 11 のワイルドマンフラスコに移す。この場合クロロホルムを流し込まぬよう注意する。器底の異物をクロロホルムと共に 1 回過して異物を 1 回過した紙上に集めた結果ピーナッツバターと同様全部回収出来た。

(2) 軽い異物

(I) パンクレアチン消化法

(I) のワイルドマンフラスコを水浴上で加温してクロロホルムを除去し、後 200cc の 1 回過水を加え 10% のリン酸三ナトリウム液で pH 8 にする。次にパンクレアチン 3g を加え、30 分毎に 10% のリン酸三ナトリウム液で pH 8 に 3 回調整し、最後にホルマリン数滴加えて、1 夜 40°C で消化後 400cc の 1 回過水を加え、ガソリン 25cc で常法により捕集する。

(II) Tween・EDTA 法

(I) と同じようにクロロホルムを追出し、次に 90% アルコール 100cc を加えてよく浸し、かきまぜて後、Tween 80 及び 60% アルコールの混液 (1:5 容量) 100cc を加え、ガソリン 35cc を加え、直ちに EDTA の 60% アルコ

ール液 (EDTA 2g を少量の水にとかし, 水とアルコールを加えてアルコール濃度 60%, 全量 100cc とする) を加えて 2 分間かきまぜる。次に 60% アルコールで充し, ガソリン 25cc で捕集する。

(I) と (II) の方法の比較を第 3 表に示す。この表から二つの方法の回収率の間には差がないように思われる。

第 3 表

ねずみの毛 20 本混入した試料

実験 番号	方法別 捕集回数		回収率			
	パンクレアチン消化法			ツイーン・EDTA法		
	(I)	(II)	合計	(I)	(II)	合計
I	4	12	16	11	5	16
II	3	13	16	7	11	18
III	4	10	14	10	10	20
IV	7	8	15	10	5	15
V	8	11	19	7	8	15
平均			80%			84%

d. 粉 乳

試料 100g を 500cc の温湯にとかし, 約 0.5cc の Tween 80 を加え, 15 分間かきまぜて沓過する方法を行うと温湯に溶しただけではうまく沓過出来ないような製品でも塊を沓紙上に残さないで沓過出来る。この実験には 7 種類の国産粉乳を用いた。

e. 脱脂粉乳及び粉乳

試料 100g を 2% EDTA 液 100cc に加え, よくこねまぜて後 2% EDTA 液 400cc を追加する。液はかきまぜているうちにだんだん黄色透明の液になり, 30 分後には完全にとけ, 容易に沓過出来る。輸入の脱脂粉乳は Tween 80 法では沓過出来なかつた。

考 察

ビスケットは従来パンクレアチン消化法を用いていたが, これでは時間がかかるので Tween と EDTA を用いる方法を試みたところ 実験の部に示す如く加えた異物のほとんどが回収出来る事がわかり, 時間を短縮することが出来た。

ビーナッツバターの重い異物は, 従来石油エーテルで脱脂したのち, クロロホルムで沈降させていたが, クロロホルムのみでも脱脂の目的は達せらるから, 石油エーテルを用いる必要はない。裸火を使う実験室では大きな利点である。*

軽い異物の回収率を推計学的処理するとき, パンクレアチン消化法と Tween・EDTA 法の間には差がないように思われるが, Tween・EDTA 法の方が第 1 回の捕集で大部分が捕集出来ることと, ガソリンとアルコールの境界面に食品組織が浮いてこない点で優つている。

ビーナツクリームでは両方法の間には差がないが, パンクレアチン消化法は油が残り操作が厄介である。又境界面も Tween・EDTA 法の方が明りようであること等からして後者の方法がよいと思われる。

粉乳は従来 Sediment Tester を用いていたが⁴⁾ この方法で行えば沓紙でも充分目的を達するものと思われる。

脱脂粉乳においても Sediment Tester は必要がない。又この EDTA 法は脱脂粉乳と粉乳の両方に用いられるので便利である。

終りに試料を提供された各社に対し深謝する。

** 注, 実験の終つた後 Assoc. Offic. Agr. Chemists, "Methods of Analysis", 8th ed., (1955) を入手したが著者等と同じ方法を採用していることを知つた。

文 献

- 1) 野崎, 宮島, 清水: 本誌, 72, 191 (1954)
- 2) Yakowitz. M.G: J. Assoc. Offic. Agr. Chemists, 37, 726 (1954)
- 3) Yakowitz. M.G: J. Assoc. Offic. Agr. Chemists, 36, 307 (1953)
- 4) 厚生省編纂: 衛生検査指針 (1952) III,
- 5) Assoc. Offic. Agr. Chemists, "Methods of Analysis", 1950, 7th ed.
- 6) *ibid.*, 1955, 8th ed.

Summary

It was shown that Tween 80 and ethylenediaminetetraacetate in aqueous alcoholic media could profitably be used in microanalysis of biscuit, peanut butter and cream, and dried and defatted dried milk, and that petroleum ether extraction could be eliminated in the test for heavy filth in peanut butter or cream.

Received February 29, 1956

浜名湖産貝類の毒成分に関する研究 (第2報)

板井 孝信, 神谷 庄造

Studies on Lake Hamana Oyster and Other Shellfish for Poisonous Substances. II.

Takanobu ITAI and Shozō KAMIYA

まえがき 昭和24年3月および25年3月に採集した浜名湖の八兵衛瀬, いかり瀬, 新場のアサリおよびカキの毒成分について, 八田, 板井, 宮本は第1報¹⁾においてその臨床所見, 毒力の測定法とともに貝類の肝のメタノール抽出物についてコロジオン膜による透析, 活性アルミナによる Absorption chromatography, その他を行い最少致死量 0.2mg の毒成分を得た。次で石鮎, 萩原²⁾等はカキの肝のメタノールエキスを脱水メタノールに溶かし脱水エタノールを加えて沈澱させる方法(以後この方法を MeOH-EtOH 処理と呼ぶ)を繰返した後, アルミナの Chromatography を行い M. L. D. 0.05mg の毒成分を得, この精製毒について種々の沈澱反応および呈色反応を行い, これがアミンであることを証明した。その他この貝類毒成分についての文献は秋葉教授の貝中毒又は魚介類およびその加工製品に起因する中毒に関する研究報告に挙げられている³⁾。著者らは第1報以後他の仕事に中断されつつも此の研究を行つたが, 本報では昭和24年3月採集の肝メタノール抽出物につき主として昭和28年~昭和30年の間に行つたものについて報告する。

(I) 肝エキスの変化について 第1報所載のように, 昭和24年3月採集したカキより肝を分離し, メタノール抽出後, メタノールを溜去し水を加えエーテルが着色しなくなるまでエーテルで抽出し, その水溶液をアンプルに溶閉し, 滅菌して常温に貯蔵した。その当時の pH は 5.2~5.5 (試験紙による)であつたが, この実験の頃は 4.5~4.6 (ガラス電極による)になつた。これをエーテルで入念に抽出すると, アルカリ性水溶液に移行する特異臭のある黄色酸性物質 (mp. 181~3° 針状晶)を得た。

本物質は動物試験の結果は無毒であつた。

(II) 原エキスの Paperchromatography 上記のようにエーテル抽出した後減圧濃縮して得た褐色シロップの1%水溶液を使用し, n-BuOH: EtOH: H₂O (4: 1: 1)および(4: 1: 2)の2者を使用し室温で展開した(東洋濾紙 No. 50)。次で下記の呈色反応を試みた。

a. Dragendorff 反応^{4) 5)} 鈴木⁵⁾の処方による Dragendorff 試液(以後 D. T. S. と略称)をスプレイして次のスポットを得た。

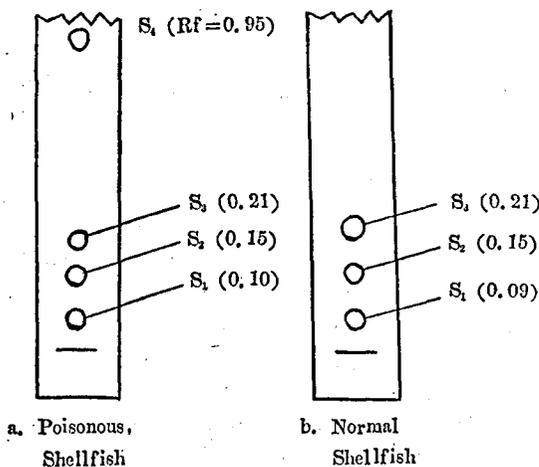


Fig. 1 Chromatograms of Betaines
n-BuOH: EtOH: H₂O (4: 1: 2)
colored by Dragendorff T. S.

Table 1. Rf Values of Betaines

Rf Value	N. M. P. H.	Homarine	Trigonelline	I. N. A. B.	N. M. P. Cl.
	0.21	0.30	0.11	0.11	0.21

註) N. M. P. H. : N-methylpyridinixylm hydroxide

Homarine : Pyridine- α -carboxylic acid betaine

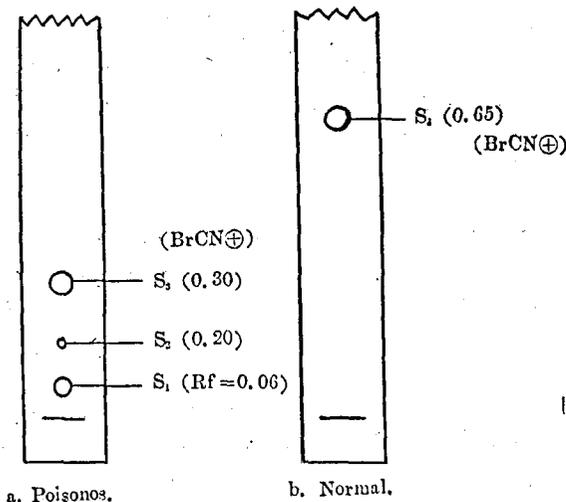
Trigonelline : Pyridine- β -carboxylic acid betaine

I. N. A. B. : Pyridine- γ -carboxylic acid betaine

即ち D. T. S. 陽性のスポットの中, S_1 と S_4 の2つは新場カキの全部に, 又いかり瀬, 八兵衛瀬の或る試料のみに検出された。市販アサリについても有毒アサリに認められた D. T. S. 陽性のものが大部分検出された。又これらの陽性部分を抽出したのについて動物試験を行つたがアサリ毒の反応を呈しなかつた。 S_3 のスポットは N-Methylpyridinium hydroxide に, 又 S_1 は Nicotinic acid betaine 即ち Trigonelline⁵⁾ に相当する故, 常法に従つて合成したこの2つの Betaine を1%水溶液とし, n-BuOH : EtOH : H₂O, n-BuOH : HAc : H₂O 等の溶媒で展開した所全く一致した。検出には D. T. S. を使用した。又 iso-nicotinic acid betaine の Rf 値と Trigonelline のそれとが同一であり, この γ -Betaine はマウスに 20mg を腹腔内に注射しても死なない。この2つの相当するスポットをやや多量に抽出し, 常法に従つて Picrate および H₂AuCl₄ 塩とし混融する時融点は降下しない。N-Methylpyridinium hydroxide (Picrate. mp 208~10°, H₂AuCl₄ 塩 245~7°C) Trigonelline (Picrate 198°C, H₂AuCl₄ 塩183°C). 更に鈴木, 萩原⁵⁾の方法で両 Betaine を定量したが有毒アサリの肝臓エキスも市販のアサリと同程度の N-Methylpyridinium hydroxide および Trigonelline を含有する。

b. 紫外線下の観察および BrCN 反応⁶⁾⁷⁾

展開し風乾した濾紙片を紫外線でみると Fig. 2 のようである。



る。即ち S_2 は試料によつて見出されないものがあり, 有毒アサリの S_1 と S_3 のスポットは特有で市販のそれになく表われるのは S_2 (Rf=0.65) のスポットのみである。即ちこの S_3 のスポットは BrCN+Benzidine (又は Aniline, p-Amino-acethophenone) により黄色を呈する。この市販アサリに見出されない S_3 (Rf=0.30) の物質を上記と同様にしてやや多量に抽出, 動物試験を行うとけいれん性毒であつて, 死亡したマウスは何れもアサリ毒特有の反応を呈しない。又この Rf=0.10 以下の部分を同様にして抽出し動物試験を行うと, 肝臓特異症状著明で, 4mg を注射したマウスは何れも 24 時間以内に死亡した。即ち毒は Rf=0.10 附近に展開されている。

Fig. 2 Comparison of chromatograms, detected with BrCN and under ultra-violet-light.

c. Ninhydrine 反応および Diazo 反応

0.1% NH₃ 水を 10% 添加した Phenol と Lutidine+Aniline (水飽和) で二次元の Paperchromatography を行うと, ほとんどすべてのアミノ酸を含有することが判つた。又 Sulfanil 酸の 2% 塩酸飽和水溶液と 5% 亜硝酸ナトリウムの等量を冷却下混和したものをスプレイし, 直ちに N-水酸化ナトリウムをスプレイすると, Rf=0.05, 0.24, および 0.31 の3つのスポットを得, この中 0.30 のスポットは先の BrCN 陽性のものに一致する。

(Ⅲ) 酸性アルミナ¹⁰⁾ による Absorption chromatography およびそれより得られた部分の Paper chromatography 上記最少致死量 60mg の新場カキエキスを先ずコロジオン膜で透析¹⁾し, その内液と外液との chromatogram を比較すると, D. T. S. 陽性物質も BrCN 陽性物質も何れも外液中にある。アンプル貯蔵エキスはコロジオン膜透析で毒力は変わらない。次でこのエキスを減圧で乾固したものを脱水メタノールで抽出, 次で脱水メタノールを充分加え一夜冷蔵庫中に設置し, 生じた沈澱を遠心分離する。この操作を 5 回行つた後 n-BuOH : EtOH : H₂O (4 : 1 : 2) で Chromatogram をつくと, D. T. S. にも BrCN にも陰性であり Ninhydrin に陽性のスポット数ヶと, 紫外線で著明な螢光を發するスポット 1ヶを生ずる。この物質を 0.8% 水溶液とし N/100 塩酸で pH 5.2 に調整し, 酸性アルミナの Absorption chromatography にかける。次で稀アンモニア水で pH を 8.0 にした水で洗浄すると Fig. 3 のようなバンドを形成する。各部分を微アンモニアアルカリ性の水で抽出し, 減圧で乾固し, 動物試験を行うと中間部無色帯にのみアサリ毒特有の症状を呈する毒物が吸着されている。市販のアサリの肝をとり上と同様にメタノールで抽出し溶媒を溜去した残渣を水に溶かして繰返しエーテルで洗

い, その水溶液をコロチオン膜で透析後, その外液を減圧で乾固し MeOH-EtOH 処理を数回繰返す. 次で酸性アルミナによる Absorption chromatography を行い pH 3.2 および 8.0 の水で洗浄しその中間部無色帯を抽出し Paperchromatography を行い前述の Paperchromatogram と比較した.

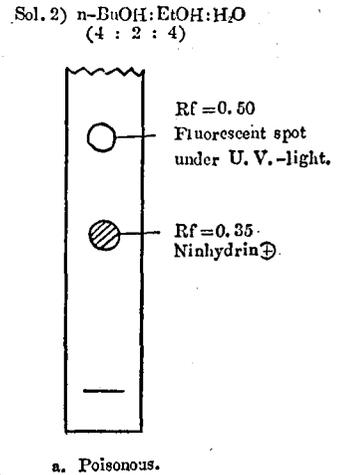
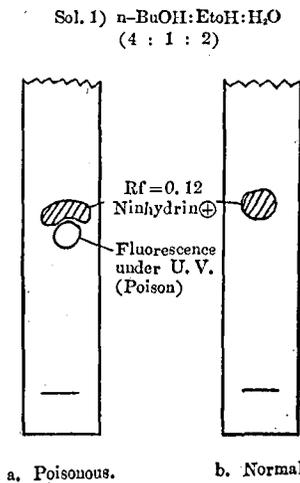
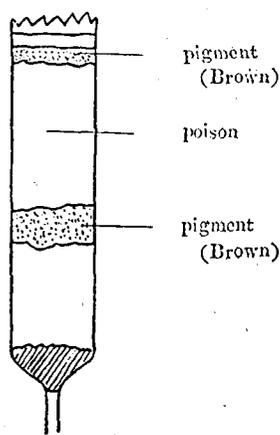


Fig. 3 Adsorption chromatogram of purified extract with acidic alumina (developed with pH 8.0 water)

Fig. 4 Chromatograms of purified extracts

即ち有毒アサリの中間部無色帯は Fig. 4 Solv. 1) のように, 毒の発光物質が Ninhydrine の陽性スポットにくいこんだ Chromatogram を呈するのに, 市販のそれは Fig. 4 のように Rf=0.12 の Ninhydrin のスポット1ヶのみである. 前者はこの溶媒を(4:2:4)にして展開すれば, Fig. 4 Solv. 2) のように両スポットは分離されて, 毒は Rf=0.50 を与える. 次でこの両者の毒性を調べるために, 精製毒 30mg を展開し発光部 11mg, Ninhydrin 陽性部分 14mg を得た. 発光部分はマウスの最少致死量 1mg 以下で著明な肝臓反応を呈し, 又 Ninhydrin 陽性部分は毒性はない. この分離された毒を無水メタノールのできる限り少量に溶解し, 2倍量の無水エタノールを加えて氷室中に二昼夜放置すると濁ってくる. これを遠心分離すると吸湿性の白色の粉末が得られる. (decomp, 182~8°). マウスの最少致死量約 0.5mg で, エキス 45g より 12mg の収量である.

(Ⅳ) 毒成分の種々の溶媒に対する Rf 値および濾紙電気泳動 Ⅱ) に於て n-BuOH:EtOH:H₂O (4:1:2) に対し Rf=0.12 の発光を有する物質が

Table 2. Rf Values for various Solvents of purified poisonous Substance

Solvents	1 2 3 4			
	U.V.-light ⊕ spot (poisonous)	0.12	0.50	0.03
Ninhydrin ⊕ spot	0.10	0.35	0.17	0.17

註) Solv. 1. n-BOH:EtOH:H₂O (4:1:2)
 2. " (4:2:4)
 3. Phenol:H₂O:NH₄OH (28%) (77.5:21.5:10.4)⁶⁾
 4. Lactic acid:i-Valerianic acid:H₂O (45:45:10)⁶⁾

アサリ毒特有の症状を呈する毒性物質であることを証明したが, その検出法として紫外線下に観察する他に, Rhodamine 5 mg を 250 cc のエタノールに溶解したものをスプレイし過剰の試液を濾紙で除き, 紫外線下にみれば橙黄色の地に暗色に検出される. 種々の溶媒に対する Rf 値は Table 2 にあげる.

次で精製毒 Sample 1 (Ninhydrin ⊕) のスポット 1ヶを有するものおよび Ninhydrin に全く陰性のスポットを与える Sample 2 を用いて, 0.2M 酸性フタル酸カリウム+0.2M 水酸化ナトリウムで pH 5.8, 0.2M 硼酸・塩化カリウム+0.2M 酸化ナトリウムで

pH 8.0, 0.2 M 酸性フタル酸カリウム + 0.2 M 塩酸で pH 3.0 および 0.2 M 硼酸 + 0.2 M 塩化カリウム + 0.2 M 水酸化ナトリウムで pH 10.0 の4ケの緩衝液を用いて沝紙電気泳動⁽¹⁾ (Fig. 5) を行つた所, 何れも発熱をともしない常に溶媒を沝紙上に適下しながら蒸発を防いで泳動を行つた. この結果 pH 5.8 および pH 8.0 における沝紙電気泳動は Fig. 5 のように1ケのスポットを得, pH を 3.0 および 10.0 の場合 Ninhydrin に陽性のスポットが数ヶ現われた. このことは先に秋葉教授等がアサリ毒は中性付近では安全であるが酸アルカリに不安定であると報告されていることより見ても分離したためでなくおそらく分解したためであろうと考える.

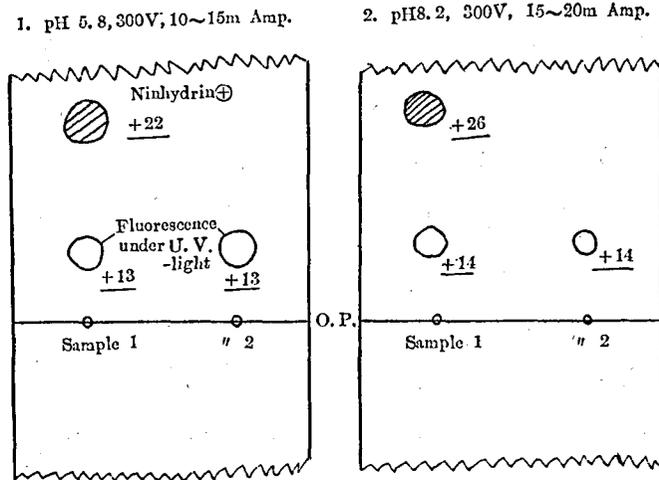


Fig. 5 Microionophoresis of purified extracts

(V) 毒成分のアチル化 以上のように分離精製した毒成分は水, メタノール以外の溶媒に溶けずシロップ液状を呈するので, アチル化して精製しようと考えた. ピリジンに毒成分を溶かして, 冷時塩化アセチル又は塩化ベンゾイルと放置してアチル化し, 有機溶媒で分離後脱アチル化を行つたが, 試料が少なくて, 動物試験で特有の症状を見ることができなかつた.

実験の部

(1) スポットのつけ方 2×40 cm (東洋沝紙 No. 50) では, エキスとして 50r 位を下端より 7 cm の点にマイクロピペットを用いて塗附し, 25cm 以上溶媒を上昇せしめた. 40×40cm の沝紙では下端より 6 cm の線に塗附して展開した. 何れも室温である.

(2) 市販アサリより対象試験試料の調製 約2貫目の少々蛤を混入したアサリを蒸気釜で殺し, むき身とし肝臓を取り出した. 収量65g. これをメタノール 500cc と 300cc で2回抽出し, 吸沝後やや厚めの沝紙で自然沝過して不溶分を完全に除く. 減圧濃縮して得られたエキスは特異臭を有し, 再び無水メタノール 100cc で温時抽出する. 次でこれを減圧で乾固すれば褐緑色のエキス 1.52g を得る. 本エキスを 50cc の水溶液としてコロジオン膜で透析し, 外液を減圧濃縮する. 収量 1.12g.

(3) D. T. S. 陽性物質の抽出およびその毒性試験 切断沝紙は微アンモニア・アルカリ性の水で振盪抽出し, 抽出液を始め 30 分水流ポンプにて吸引しアンモニアを除き, 60° 以下で減圧乾固する. 各エキス分は何れも黄褐色で, 10~20mg をマウスの腹腔内に注射しても毒性はない.

(4) BrCN による呈色反応 数片のプロムシアンンの結晶を投入したデシケーター中に, 風乾した沝紙片を 5~10 分間放置, 直ちに 0.25% Benzidine 溶液 (エタノール 1 : 水 1) をスプレーするに陽性部分は淡褐色を呈する. (附加物質としてこの他飽和アニリン水および 0.25% p-Aminoacethophenone では何れも黄色を呈する.) 同様にして抽出した 10mg を 3 匹のマウスに腹腔内注射するに, 数分以内に何れもけいれんを起し死亡した.

(5) 沝紙電気泳動 0.2 M 酸性フタル酸カリウム 50cc と 0.2 M 水酸化ナトリウム 23.7cc で pH 5.2 とし, 又 0.2 M 硼酸・塩化カリウム混合液 100cc と 0.2 M 水酸化ナトリウム 53.4cc で pH 8.2 の Buff. soln. をつくり, 幅 10

cm の沓紙で泳動させた。展開後取出し過剰の Buff. soln. を沓紙で除き呈色反応を行った。

(6) 酸性アルミナ クロマト用活性アルミナを N-塩酸で繰り返し洗滌し、同時に微粒のアルミナは傾斜で除く。次で pH 5 位になるまで蒸留水で洗滌後、ニッケルのルツボで 150° 位で 2 時間熱する。

総 括

第1報に引続いて本報では Paper chromatography を用いて分離の過程を追究して見、且つ市販アサリと比較した。それによるとアミノ酸、ペタイン類の存在を知ることができた。メタノール抽出、エーテル抽出、透析、MeOH-EtOH 処理、アルミナによる吸着クロマトグラフィー等で、最後に Partition chromatography で紫外線下に蛍光を発する酸性物質の存在を認め、動物試験の結果、毒成分であることを確認した。アチル化による精製も行ったが失敗に終り、試料を使い果して残念ながら本研究は未解決のまま中止しなければならなくなつた。

文 献

- 1) 八田, 板井, 宮本: 循試, 69, 107. (1951), “アサリおよびカキ中毒の研究 (終了報告書)”
- 2) 石館, 萩原: 東大立地研報告, No. 10, 43. (1954)
- 3) 鈴木: 薬学研究, 22, No. 12, 1
- 4) 鈴木: 薬誌, 71, 195. (1951)
- 5) 鈴木, 萩原: 薬誌, 71, 1301. (1951)
- 6) Kroner, R. C., Ettinger, M. B. and Moore, W. A.: Anal. Chem., 24, 1876. (1952)
- 7) Meight: Nature, 167, 119. (1951)
- 8) Clayton, R. A. and Strong, F. M.: Anal. Chem., 26, 1362. (1954)
- 9) Bergström, S. and Pääbo, K.: Acta. Chem. Scand., 3, 202. (1904)
- 10) Lederer, E. and Lederer, M.: “Chromatography” 1954, P. 22.
- 11) 前川, 鈴木: 薬誌, 71, 1298. (1951)

Summary

The crude liver extract had been prepared in March 1949 and 1950 by extracting the liver of oyster of Lake Hamana with methanol, evaporating solvent in vacuum, dissolving it in water, and taking off in ether soluble matter by extracting the solution with ether. The aqueous solution was stored in ampules after Pasteurization, at room temperature. Its pH value had been 5.2-5.5 at that time, but it changed into 4.5-4.6 at the period of this experiment (1953-1955).

We studied paper chromatography with this crude extract, visualized by spraying several reagents on chromatograms or by observation under ultraviolet light. By these methods, we found from the extract N-methyl pyridinium hydroxide, trigonelline (Fig. 1) and many amino acids. But none of the substances were poisonous.

By spraying cyanogen bromide and benzidine on above-mentioned chromatogram, a spot peculiar to poisonous oyster was found. Its Rf value developed with a solvent (n-butanol : ethanol : water = 4 : 1 : 2) was 0.30 (Fig. 2). Extracting this spot with water and injecting it to mice, we found it as paralytic poison.

After dialyzing the crude extract with collodion membrane, evaporating its outer solution in vacuum, repeating several times dissolving it in methanol and precipitating it with ethanol, and chromatographing with alumina (Fig. 4), the purified extract from the chromatogram was examined by paper chromatography. we found a spot fluoresced under ultraviolet light and its Rf value was 0.50 (n-butanol : ethanol : water = 4 : 2 : 4). From this spot was extracted a substance, which manifested on mice characteristic poisoning symptoms (bleeding, liver-atrophy) peculiar to poisonous oyster. This substance occurred as white powder, decomposed at 182-187° and its minimum letal dosis against mice was about

0.5mg. On microionophoresis of the purified extract, this fluorescent spot migrated to cathode (Fig. 5)

Beside these, we performed acylation of purified extract and hydrolysis of its acyl radical aiming its purification, but we entirely failed in them. On account of the lack of the sample, we are obliged to stop this study hereafter.

Received February 29, 1956

イカの初期腐敗にみられる含窒素化合物の消長: アミン類の生成

野崎 泰彦, 西村 千昭

Catabolic Products of Nitrogen Compound in the Putrifaction of Squid

Yasuhiko NOZAKI and Chiaki NISHIMURA

イカの食中毒の原因を解明するために、著者らは腐敗の初期に生成する含窒素化合物の検索と生理作用の検討をおこなった。含窒素化合物は生体中に多量に存在するアミノ酸、蛋白質の末端代謝産物としても、又これらの中には強い生理作用を有する物質の多いことから食中毒に最も深い関係を有するものと考えられる。今回はイカの腐敗初期に生成するアミン類を沝紙クロマトグラフィー及びイオン交換クロマトグラフィーを利用した微量検出法によつて確認し、それらがヒスタミン、チラミン、カダベリン及び *n*-ブチルアミンであることを知つたのでこれに関する知見を報告する。

実験の部

1. イカの腐敗条件

新鮮なスルメイカを実験材料にした。イカ肉磨砕物を 32°C のふらん器中で 10, 20, 24, 及び 48 時間自然腐敗させ、80%メタノールを3~4倍量加えて還流抽出し、得られる抽出液を遠心沝過して濃縮した。

2. 沝紙クロマトグラフィーによるアミン類の検出

二次元沝紙クロマトグラフィーには溶媒としてフェノール-水(80:20)及びブタノール-酢酸-水(3:1:4)を用いた。後者の溶媒は適当な展開条件を与えないと使用出来ない。展開は 20~25°で16時間おこなつた。個々のアミン類の Rf 値の決定は一次元クロマトグラフィーによりおこなつた。溶媒はフェノール-水(80:20)、ブタノール-酢酸-水(4:1:5)及びコリジン-水飽和を用いた。又アミン類のみを確認するためにはジチオカルバメート反応¹⁾、チアゾ反応及びドラージェンドルフ反応を利用した。その他の場合は0.2%ニンヒドリン試薬を噴霧して90°で加温し発色させた。

3. イオン交換樹脂による塩基性部分の分離及び分析

イカ肉磨砕物のメタノール抽出液を pH 3.5 とし、沈澱を除去して後、Amberlite IRC-50 (70~100メッシュ)の H 型樹脂柱、3.2×43.0 cm を通して塩基性部分のみを吸着させ、樹脂柱は白濁がなくなる迄十分水で洗滌し、0.5 N 塩酸 500~600 cc を通して溶出し、蒸発皿中で濃縮した、この部分には塩基性アミノ酸及びアミン類が存在する。この部分を分析するめに Dowex-50 (150~200メッシュ)を利用して Stein-Moore²⁾法で溶出した。著者らの場合はアミノ酸以外の塩基性物質を目的としていたので、pH 6.8 磷酸緩衝液を省略して、pH 8.3 の 0.2 M 炭酸ナトリウム緩衝液及び 0.1 M 炭酸ナトリウム溶液による溶出をおこなつた。溶出液は 5 cc 宛フラクションコレクターで捕集し、Stein-Moore³⁾法によりニンヒドリンで発色し 570 mμ で比色定量した。

4. 塩基性部分よりアミン部の抽出^{4,5)}

上記の塩基性部 15 cc をとり pH 7.0 とし、これに磷酸カリウム:硫酸ナトリウム(1:6)の混合物を飽和した温水 15 cc を加えて、エーテルで 48 時間連続抽出し、エーテルを除去して蒸留水 15 cc にとかして pH を中性乃至アルカリ性とする。これに更に磷酸カリウム:硫酸ナトリウム(1:6)混合物を飽和しブタノールで抽出する。ブタノール層は芒硝で脱水し、塩酸ガスで中和してのち減圧濃縮する。

5. 連続沝紙電気泳動操作

著者らはアミン部分分離の別な方法として Durrum⁶⁾(1951), Grassman and Hannig⁷⁾(1955)による連続沝紙電気泳動法をおこなつた。東洋沝紙 No. 50 の (45×45 cm) 下部両端に端から 4 cm の位置で高さ 7 cm に切目を入れ電極槽に接続する部分を作る。この二部分の間で沝紙の下端を電極部分から 1 cm ずつ離して 1.5 cm 巾の鋸歯状に切る。各鋸歯部の下には 5 cc の平底試験管を並べ、流下液の受器とする。沝紙の上部両端は巾 4 cm 高さ 4 cm に切りとつて残部を溶媒槽に浸す。沝紙下部の電極部はそれぞれ緩衝液を入れたビーカーに浸し、飽和塩化カリ寒天橋を経て電解槽に接続する。緩衝液にはピリジン 30 cc, 酢酸 100 cc を水で 5:1 としたものを用いた。イカ肉を 24 時間腐敗させたものを 80%メタノールで還流抽出し、濃縮液 (1 g wet/1 cc extract) 2 cc を小ビーカーにとり、

沔紙細片を通して沔紙面に注入する。試料注入位置は陽極より10 cm 高さ31 cm でおこなつた。通電は定電流3 mA, 72 時間である。

6. 沔紙電気泳動操作

Durrum の方法³⁾を応用した。水平型泳動装置の沔紙支持枠は24×24 cm, 東洋沔紙 No. 50 10×30 cm のものを使用した。緩衝液はペロナール $\mu=0.05$ PH=8.6, 通電は定電流0.5 mA/cm 60分間おこなつた。完了後沔紙を60~80°C で直ちに乾燥し, 0.2% ニンヒドリン試薬を噴霧して, 90°C に加温発色した。

結果と考察

1. 沔紙クロマトグラフィーによる微量アミン物質の検索

正常のイカ肉メタノールエキスより二次元クロマトグラフィーでアスパラギン酸, グルタミン酸, シスチン, グリシン, セリン, スレオニン, アラニン, リジン, ヒスチジン, プロリン, パリン, チロシン, アルギニン, ロイシン, イソロイシン, フェニルアラニンを検出したが, 10, 20, 及び48 時間腐敗させたものでは, エキス中に別に新しく生成する四つのニンヒドリン陽性スポットを観察する (Fig.1). 特に10 時間腐敗のものは外見上正常のイカと変化がないにも拘らずこれらの物質の中S-1 及びS-2 のスポットを観察することが出来る。これら新しく生成するスポットの中S-2 及びS-3 は Fig 2 に示す如くジアゾ反応陽性である。別にドラージェンドルフ陽性物質として Rf 0.85 (フェノール-水) のスポットが大きくなることはベタインの増加によるものと思われる (Fig.2)。

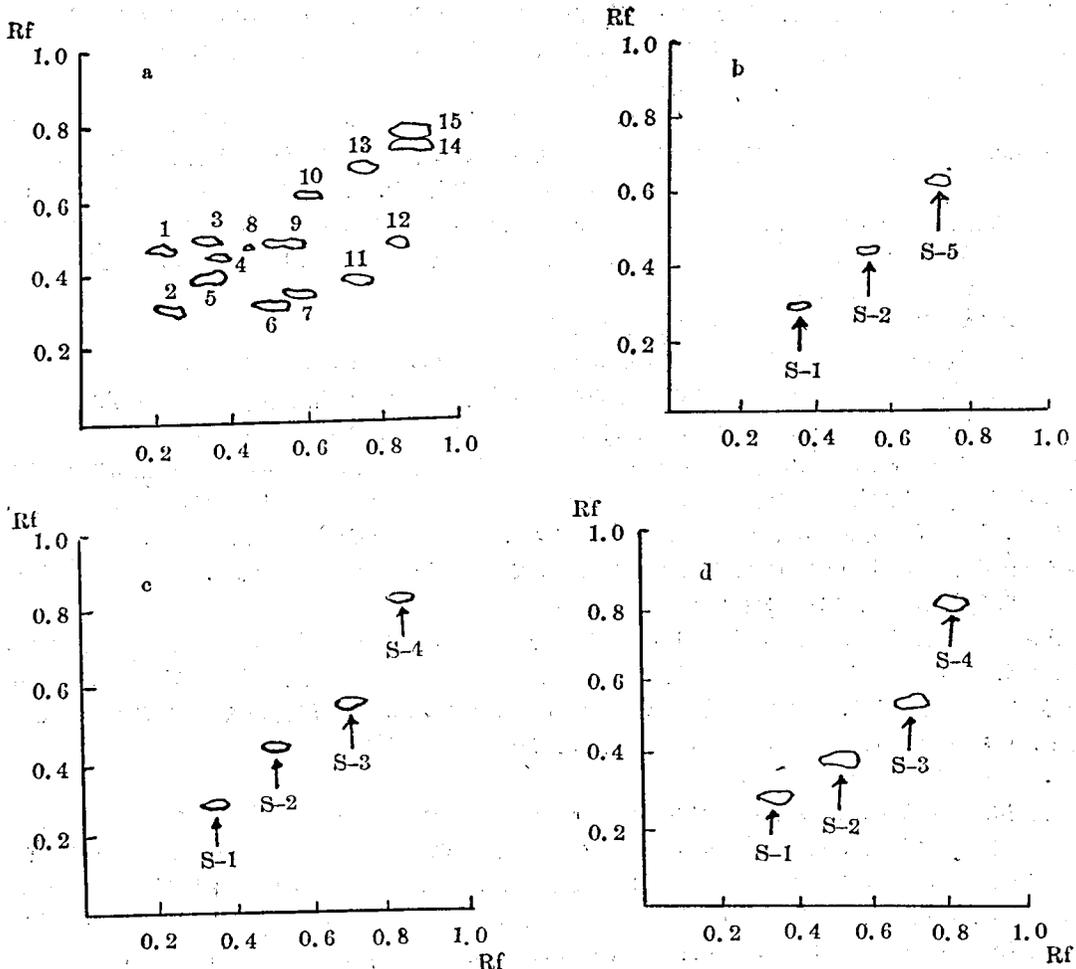


Fig 1. Two-dimension Paper Chromatograms of Extract from Putrified Squid. (Toyo Filter Paper NO.50)

Note:

1. Solvents Butanol : Acetic Acid : Water=3:1:4
Phenol : Water=80:20
2. a=control, b=10 hrs, c=20 hrs and c=48 hrs putrified, respectively.
3. In a, b, and c the spots corresponding to those in control are not shown.
4. I=aspartic acid, 2=cystine, 3=glutamic acid, 4=glycine, 5=serine, 6=histidine, 7=lysine, 8=threonin, 9=alanine, 10=tyrosine, 11=arginine, 12=proline, 13=valine, 14= phenylalanine,

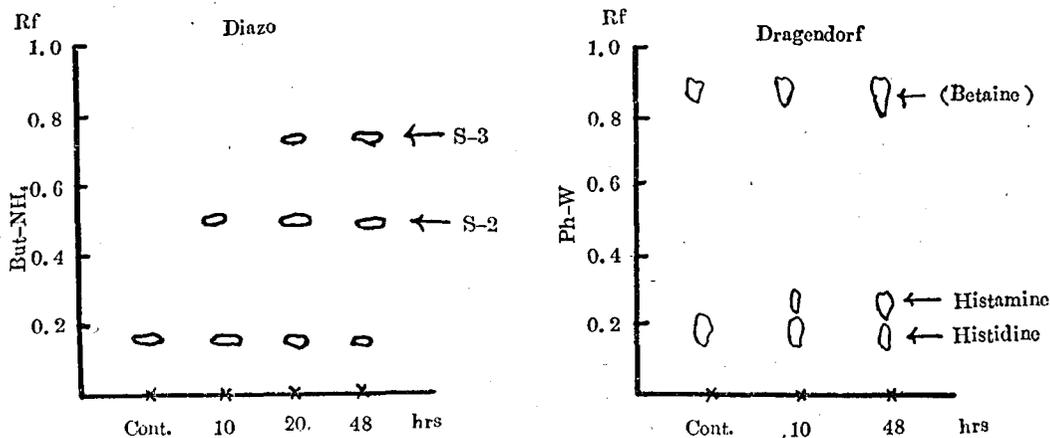


Fig 2. Paper Chromatograms of Extract from Putrified Squid with Diazo- and Dragendorff Reagents.

2. 腐敗にともなうアミノ酸の消長

腐敗時におけるアミノ酸の変化を二次元クロマトグラフィーにより半定量的に観察した結果は Table 1 に示すようにリジン, ヒスチジン, チロシン, グルタミン酸, アスパラギン酸, 及びプロリンが減少若しくは消失する。プロリンの消失は特に著明であり, イサチン試薬を噴霧することによりプロリンのみを特異的に観察することが出来る。一時的にバリンの下にスポット S-5 が出現して間もなく消失するのは腐敗過程中に於けるアミノ酸の異化代謝の面から興味ある事実である (Fig 1, Table 2)。

Table 1. Decomposition of Amino Acids in Early Stage of Putrification at 32°C

Amino acids	Control	Putrified	
		10 hrs	48 hrs
Aspartic acid	++	+	-
cystine	++	++	-
Glutamic acid	+++	++	-
Histidine	+++	++	-
Proline	+++	-	-
Threonine	+	-	-

Table 2. Ninhydrin Positive Substances obtained from Putrified Squid

Products	Control	Putrified	
		10 hrs	48 hrs
S - 1	-	+	++
S - 2	-	+	+++
S - 3	-	+	+++
S - 4	-	-	+++
S - 5	-	+	±

3. Amberlite IRC-50 樹脂による塩基性物質の分離

著者らは生成するアミン物質を分離するために, Amberlite IRC-50 カルボン酸樹脂を利用した。即ち試料のメタノールエキスを樹脂柱に通し (H-型 3.2×42 cm) 塩基性物質のみを吸着させ, 樹脂柱を十分水洗してから,

0.5N 塩酸で溶離すると塩基性物質が得られる。この部分には未知のスポット S-1, S-2, S-3, S-4 及び塩基性アミノ酸が含まれる。

4. Dowex-50 樹脂柱による塩基性物質の分析

IRC-50 樹脂柱より溶出された塩基性部分を分析するために、塩基性アミノ酸の分析に利用される Stein-Moore らの方法を多少改変しておこなった。即ち0.1Mクエン酸緩衝液でpH 5.1に buterize した Dowex-50 (0.9×16 cm) に pH 3.7~4.5 にした試料を通して吸着させ、pH 5.1 のクエン酸緩衝液で洗つて後 (チロシン及びフェニルアラニンが流出する)。pH 6.8 のクエン酸緩衝液、pH 8.3 の炭酸ナトリウム緩衝液及び pH 11.0 の 0.1M 炭酸ナトリウム溶液を用いて溶出した。溶出液は 5cc 宛フラクションコレクターで捕集し、ニンヒドリン試薬で発色させて比色した。これらの結果は Fig 3 に示す。

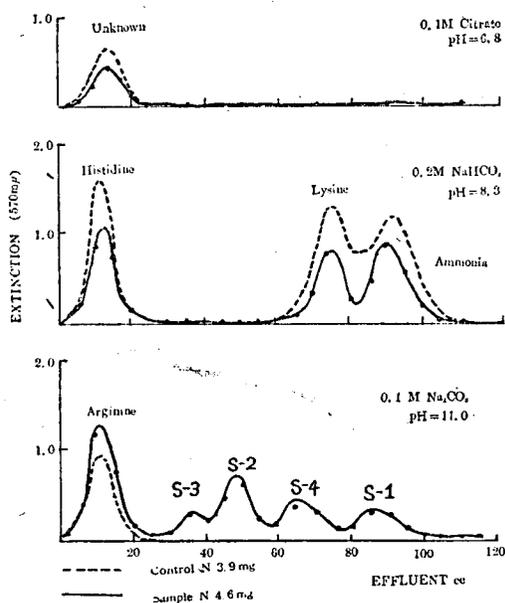


Fig 3. Ion Exchange Chromatography of Basic Substances obtained from Putrified Squid:Dowex-50 Na-form, 100-200 mesh, 10×160 mm

Table 3. Rf-Values of Amine from the Putrified Squid

Products	Rf Values		
	Ph-W	But-Ac-W	Coll-W
S-1	0.24~0.27	0.18~0.21	0.20
S-2	0.49	0.23~0.26	0.21~0.23
S-3	0.62~0.65	0.58~0.60	0.38
S-4	0.73~0.75	0.75~0.80	0.53

Ph-W., phenol : water = 80:20

But-Ac-W., Butanol : acetic acid : water = 4:1:5

Coll-W., saturatead collidine with water

Table 4. Rf-Values of Amines on Toyo Filter Paper NO.50 at Room Temperature

Amines	Rf-Values			
	Ph-W.	But-Ac-W.	Coll-W.	But-NH ₄
Ethanolamine	0.46	0.37		
<i>n</i> -Butylamine	0.73	0.69	0.38	
<i>i</i> -butylamine	0.66	0.65		
<i>n</i> -Amylamine	0.65	0.73		
<i>n</i> -Heptylamine	0.59	0.73		
Cadaverine	0.26	0.27	0.02	
Putrescine	0.22	0.25	0.02	
Tyramine	0.65	0.61	0.53	0.68
Histaine	0.56	0.23		0.45
<i>n</i> -Valine	0.76	0.35		

5. アミン部分の抽出

アミン部のみを濃縮するために Block の方法 (1951) で塩基性部分よりアミン部分のみを抽出して, 得られるブタノール層を塩酸ガスで中和し, 減圧濃縮するとアミン混合物が得られる. この物質の汚紙クロマトグラフィーは Fig. 4 に示す. ここに得られる四種のアミン類はカダベリン, ヒスタミン, チラミン及び *n*-ブチルアミンの Rf 値に一致することを標準物質と比較して確かめた.

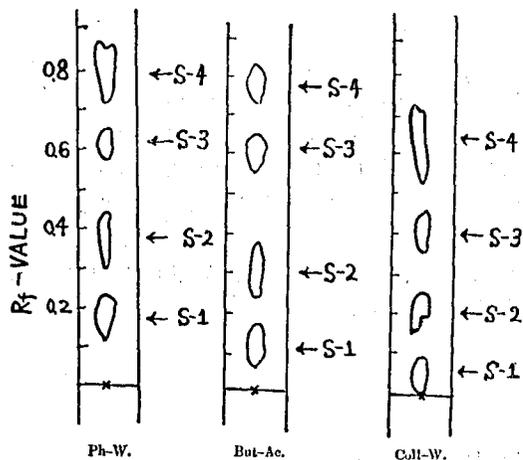


Fig 4. Paperchromatogrames of Amines Separated from Basic Fraction by Block's method.

Ph-W: Phenol-Water (80:20)

But-Ac: Butanol-Water-Acetic Acid (4:5:1)

Coll-W: Collidine saturated water

6. 連続汚紙電気泳動操作による簡易な分離法

著者らはこれらアミン物質を検索する他の方法として, Grassman 及び Hannig (1955) による連続汚紙電気泳動法を試みた. Grassman らはこの方法によつてアミノ酸を定量している. 著者らがイカ肉48時間腐敗のメタノールエキス (1g wet/cc extract) でピリジン-酢酸緩衝液 pH=3.9, 定電流 3mA で72時間通電をおこなつた結果, 陰極側からカダベリン, ヒスタミン, チラミンなどを含む塩基性アミノ酸群の発色帯, 更にどちらへも泳動しない中性アミノ酸群の帯及び陽極側に泳動するグルタミン酸帯とアスパラギン酸帯とを得る (Table 5).

Table 5. Separation of Amino Acids and Amines of the Extract of Putrified Squid with Hanging Curtain Electrophoresis according to Grassman and Hannig

Fractions*	2, 3, 4,	7, 8, 9, 10,	16, 17,	19, 20.
Rf**	Basic-I	Basic-II	Neutral	Acidic
0.9				
0.8				
0.7		<i>n</i> -butylamine (0.72)	leucine <i>i</i> -leucine(0.76) Phenylalanine (0.76) valine (0.71)	
0.6		tyramine (0.65) arginine (0.61) histamine (0.56)	alanine (0.56)	
0.5				
0.4				
0.3		lysine (0.30) histidine (0.29)	glycine (0.35) serine (0.36)	
0.2	Cadaverine (0.27)			glutamic acid(0.26) aspartic acid (0.21)
0.1				

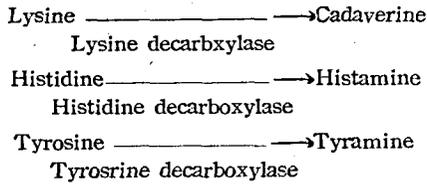
* fraction number collected from cathod side drip point

** each fraction identified by paper chromatography with phenol-water (80:20)

7. 腐敗によるアミン類の生成

既知アミン類の Rf 値 (Table 4) との比較検討により著者らは S-1, S-2, S-3 及び S-4 物質をカダベリン, ヒスタミン, チラミン及び *n*-ブチルアミン又はトリプタミンと推定したが, 腐敗初期にみられるアミノ酸の消長

と考へ合せると、少くともカダベリン、チラミン及びヒスタミンの生成は次に示すような既知の脱炭酸反応⁹⁾によつておこなわれるものと思われる。



著者らは E coli 44 アセトン乾末を用いた実験でこれらのアミノ酸は 24 時間で殆んど対応するアミンになることを認めているので、少くとも上記のアミノ酸の変化は腐敗細菌によるものである。イカ肉抽出液中にはトリプトファンが見られず、したがつて S-4 はトリプタミンとは考えられない。しかしイカの腐敗ではプロリンを始めとし、グルタミン酸、アスパラギン酸などが減少することが認められるが、この現象が新たに出現した他の一つのアミン物質と考えられる。n-ブチルアミンと如何なる関連を有するかについてなお検討を要する。

終りにのぞみ実験材料の入手に御配慮を賜つた厚生省食品衛生課上林技官、東京都衛生局魚市場分室加藤技師、貴重なるアミン類を恵与された千葉大学腐敗研究所宮木高明教授に深謝する。

文 献

- 1) 宮木, 佐竹, 林: 日新医学, 37, 256 (1950).
- 2) Moore S. and Stein W.H.: J. Biol. Chem., 192, 665 (1951).
- 3) Moore S. and Stein: W.H. J. Biol. Chem., 211, 907 (1954).
- 4) Block R.J., Durrum E.L. and Zweig G.: A manual of paper chromatography and paper electrophoresis, New York, 122 (1955).
- 5) McIntire F.C., Roth L.W. and Shaw J.L.: J. Biol. Chem., 170, 537 (1947).
- 6) Durrum E.L.: J. Amer. Chem. Soc., 73, 4877 (1951).
- 7) Grrasman W. and Hannig K.: Zeit. fur. Physiol. Chem., 299, 258 (1955).
- 8) Durrum E.L.: J. Amer. Chem. Soc., 72, 2948 (1950).
- 9) Guggenheim M.: Die Biogenen Amine, 3, Auf. (1940).

Summary

In the course of putrifaction of squid meat at 32°C the decrease or dissipation of some amino acids, lysine, histidine, tyrosine, proline, glutamic acid, aspartic acid, was recognized in the early stage of incubation for 10 to 48 hrs, and at the same time five ninhydrin positive substances were found. They were identified with paper ionophoresis, paper chromatography anion exchange Chromatography by Amberlite IRC-50 and Dowex-50 as cadaverine, tyramine, histamine and n-butylamine. It was assumed that the first three were derived from lysine, tyrosine, and histidine respectively. n-butylamine may be derived from some other nitrogen compound.

Received February 29, 1956

沝紙電気泳動法による腐敗アミンの検出

野崎 泰彦, 西村 千昭

Paper Electrophoresis of Some Aliphatic Amines

Yasuhiko NOZAKI and Chiaki NISHIMURA

アミノ酸, 蛋白質及び糖類の沝紙電気泳動法に関しては多数の報告があるが, アミン類では Weber (1951) の報告¹⁾ がみられるのみである. 彼は pH 3.8 のクエン酸緩衝液を用いているためにアミン類の泳動が速く, したがって 150 cm の沝紙を用いて実験をおこなっている. 著者らは腐敗過程に生成する微量のアミン類を最も容易に, 速やかに検出するためにアミン類の沝紙電気泳動法について, 緩衝液イオン強度及び泳動条件を検討し, 若干の知見を得た.

実験の部

1. アミン溶液

モノアミン類は東京化成株式会社の御好意により入手したもので, 試料の作製は遊離アミン 10 mg を N/10 塩酸 2~3 cc にとかしたものをういた. カダベリン, チラミン, プトレッシンは千葉大学宮本教授より恵与されたもので, 夫々の塩酸塩及び硫酸塩 10 mg を水 2~3 cc にとかして検体とした. 毛細管に試料液 0.03 cc を含ませて沝紙面につける.

2. 緩衝液

ピリジン-酢酸緩衝液²⁾; ピリジン 10 容, 酢酸 0.4 容及び水 90 容を加えてつくった. 緩衝液の pH は島津 pH メーターで測定した.

グリシン緩衝液; 1/10 M グリシン溶液 60 容, M/10 水酸化ナトリウム 40 容を混じたもの (pH 10.2) 及び M/10 グリシン 49 容, M/10 水酸化ナトリウム 51 容を混じたもの (pH 11.2) を 2 倍に稀釈して使用した ($\mu = 0.05$).

ペロナール緩衝液³⁾; ペロナールナトリウム 8.82 g, 酢酸ナトリウム 4.68 g 及び M/10 酢酸 80.8 cc を加え蒸溜水で 11 としたもの ($\mu = 0.1$), それら稀釈して $\mu = 0.05$ 及び $\mu = 0.025$ としたものをういた. 電流勾配 0.5 mA/cm で 60 分間泳動する場合の初電圧及び終電圧を Table 1 に示す.

Table 1. Voltage Change During Ionophoresis with Veronal Buffer of Various Ionic Strengths at A Current 0.5mA/cm for 60 min.

Ionic-Strength	Current-Gradient	Voltage	
		Initial	Final
0.1	0.5mA	300	240
0.05	0.5	300	240
0.025	0.5	400	400

3. 沝紙電気泳動操作

Durrum の方法⁴⁾ による水平式沝紙電気泳動装置を使用した. 沝紙固定枠 16×17cm, 東洋沝紙 No. 50, 10×30 cm, 電流勾配は 0.5 mA/cm で操作は室温 10~15°C でおこなった.

4. ニンヒドリン反応及びジチオカルバメート反応

泳動完了後沝紙を 60~80°C で乾燥し, 水飽和ブタノールにニンヒドリンを 0.2% に溶解したものを噴霧し, 90~100° で 5 分間加熱して発色させた. ジチオカルバメート反応⁵⁾ の場合は二硫化炭素-ブタノール (1:1) の混液を噴霧して, 数分後に硝酸酸性の硝酸銀 1% 溶液を噴霧した. 前者に比較すれば後者は検出感度が悪い.

結果と考察

1. ペロナール緩衝液, グリシン緩衝液及びピリジン-酢酸緩衝液による泳動値の比較

Table 1 でみられるようにペロナール緩衝液ではヒスタミンとチラミンの相互の分離が悪く, ピリジン-酢酸

緩衝液ではよく分離する。鎖状モノアミン類の分離はどの緩衝液でもよい。特にペロナル緩衝液がよく (Table 2, Fig. 3), グリシン緩衝液はモノアミン類相互の分離能力がやや劣る。塩基性アミノ酸群とチラミンの分離はどの緩衝液を用いても出来ない。

Table 2 Comparison of Ionophoretic Mobilities of Amines with Several Buffer for 60min. at A Current Gradient 0.5mA/cm.

Amines	Mobilities* to Cathod		
	Pyridine-Acetic	Veronal-Acetate	Glycine
Ethylamine	60.0	63.6	67.8
Ethanolamine	56.0	57.0	59.0
i-Butyl amine	52.9	45.0	54.0
n-Butylamine	52.5	44.2	51.0
n-Amylamine	48.9	40.5	50.0
n-Heptylamine	42.5	32.0	46.0
Cadaverine	62.8	51.8	59.5
Putrescine	62.7	51.8	59.5
Tyramine	36.6	28.6	47.6
Histamine	49.0	31.5	52.0
Glucosamine	32.0	15.3	

* shown in mm from starting point.

2. ペロナル緩衝液を用いた場合のイオン強度と泳動値

イオン強度0.05のペロナル緩衝液を用いた場合の泳動値と通電時間の関係は Fig 1 に示す如くで、イオン強度が0.1及び0.05ではアミン類の泳動値は殆んど同じであるが、0.025では明らかに大きい泳動値を示す (Fig 2.)。従つて電流勾配0.5 mA/cmで60分間泳動させてアミン類相互の分離をよくするにはイオン強度0.025のものが適当である。定電流の条件ではイオン強度が違えば電圧が変わるがその値は Table 1 に示す。

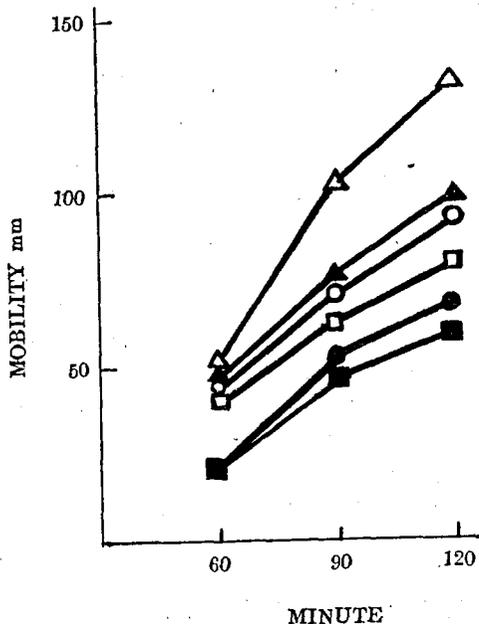


Fig. 1, Paper-electrophoretic Mobility of Amines with Veronal Buffer $\mu=0.05$ pH=8.5 at A Current 0.5 mA/cm.

- △-△ : Cadaverine and Putrescine
- ▲-▲ : i-Propylamine
- : n-Butylamine
- : n-Heptylamine
- : Tyramine
- : Lysine

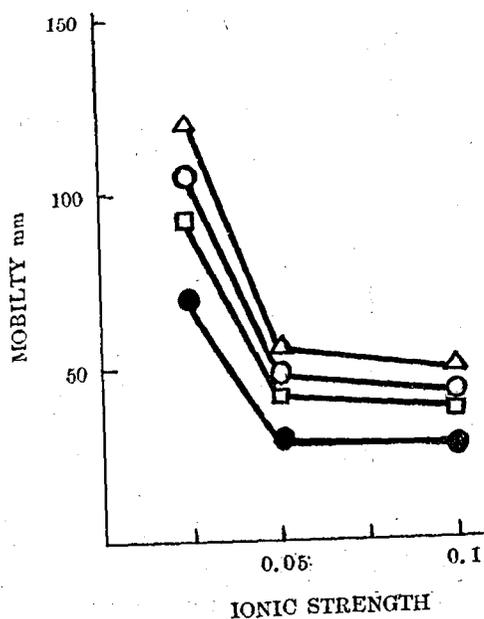


Fig. 2, Relationship between Mobility and Ionic Strength in Paper Electrophoresis of Amines with Veronal Buffer pH 8.6 for 60 minutes.

- △-△ : Putrescine and Cadaverine
- : *n*-Butylamine
- : *n*-Heptylamine
- : Tyramine and Lysine

3. 鎖状アミン類の炭素数と泳動値の関係

Fig. 4 はベロナール及びピリジン-酢酸緩衝液での鎖状アミンの泳動値と炭素数の関係を示したものである。即ち炭素鎖の長いもの程同一の泳動条件では小さな泳動値を示す (Fig. 3)。pH 11.0 のグリシン緩衝液を用いるとアミン類は殆んど泳動しないが、この現象はアミン類の pK^a がこの付近にあることから考えれば当然である。

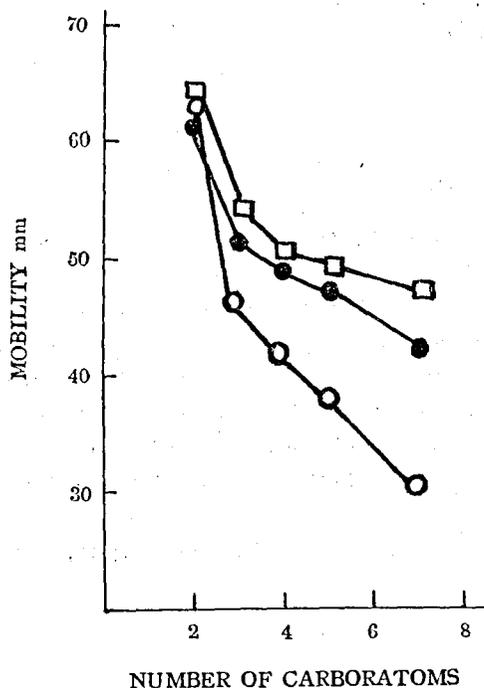


Fig. 3, Electrophoretic Movement of Some Aliphatic Amines ($C_2 \sim C_7$) With Veronal, Pyridine-Acetic Acid and Glycine Buffer for 60 min. at A Current 0.5 mA/cm.

- : Glycine Buffer $\mu=0.25$ pH=10.1
- : Pyridine-Acetic acid Buffer pH = 6.5
- : Veronal Buffer $\mu=0.05$ pH=8.6

4. イカの腐敗で生ずるアミン類の検出

著者らはイカの初期腐敗に生成するアミン類を検出するために、前報⁷⁾の方法で抽出したアミン部分をペロナール緩衝液及びピリジン-酢酸緩衝液で沝紙電気泳動をおこなつた。ペロナール緩衝液を用いた場合は泳動値-29.8の位置でチラミン及びヒスタミンが重なるが、-42.6に*n*-ブチルアミン、-61.5にカダベリンのスポットを得る。ピリジン-酢酸緩衝液を用いれば泳動値-47.5にヒスタミン、-36.6にチラミンのスポットを得る (Fig. 4.)。-62.8のスポットはカダベリンである。

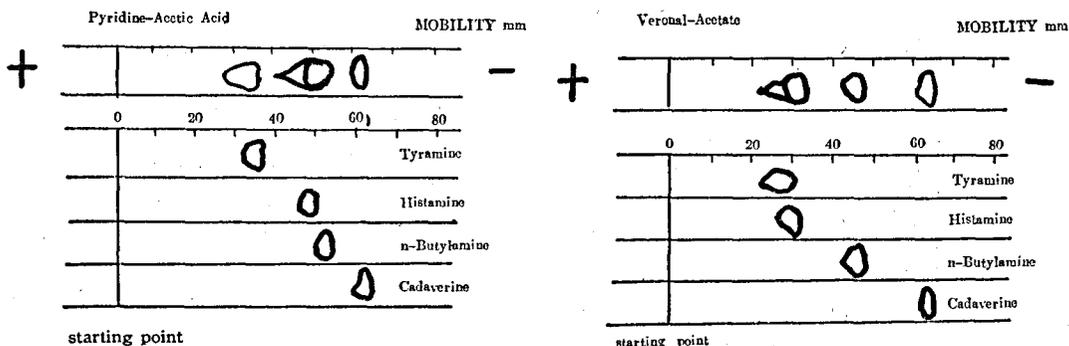


Fig. 4, Separation of A Mixture of Amines from the Extract of Putrified Squid.

以上の如く沝紙電気泳動法を利用すれば容易に且つ比較的速やかにアミン類の存在を知ることができる。又個々のアミンを分離確認するには緩衝液を選択することにより好結果を得ることができる。

終りに貴重な試料を恵与された千葉大学腐敗研究所宮木高明教授に深謝する。

References

- 1) Weber R.: Helv. Chim. Acta 34 2031 (1951)
- 2) Ryle A.P., F. Sanger, L.F. Smith et al; Biochem. J., 60, 541 (1955).
- 3) Grasmann W. and Hannig K.: Naturwiss. 37, 397, (1950).
- 4) Durrum E.L.: J. Am. Chem. Soc., 72, 2948 (1950)
- 5) 宮木, 佐竹, 林: 日新医学 37 256 (1950)
- 6) Conway: Electro Chemical Data, (1952)
- 7) 野崎, 西村: 衛試 74, 289 (1956)

Summary

The separation of eleven aliphatic amines was studied by horizontal paper electrophoresis with Toyo No. 50 filter paper at a current 0.5 mA/cm. The sequence of the amines studied is as follows: (from fastest) ethylamine, ethanolamine, *i*-butylamine, *n*-butylamine, *n*-amylamine, *n*-heptylamine and tyramine with veronal buffer $\mu=0.05$ pH=8.6 and Pyridine-acetic acid buffer pH=6.5 for 60 min. The separation of tyramine from basic amino acid and of putriscine, cadaverin and ethylamine from each other were not clear cut with these buffer solutions. Tyramine and histamine were well separated with pyridine-acetic acid buffer. A glycine buffer was shown not to be suitable for detection and separation of those amines. Cadaverine and putriscine traveled fastest to the cathode, but could not be separated from each other under the conditions studied.

Received February 29, 1956

Penicillium citrinum THOM の分離系統と citrinin 産生力に就いて

宇田川 俊一, 橋本 賢範, 平山 重勝

Comparative Studies on the Citrinin Producing Activity among the
Different Isolates of *Penicillium citrinum* THOM

Shun-ichi UDAGAWA, Yoshinori HASHIMOTO and Shigekatsu HIRAYAMA.

緒 言

糸状菌類を用いて生化学, 薬理学的研究を進める場合に, 先ず供試菌として変異性の少ない, 即ち培養を数代繰返しても正常な代謝過程に変化を示さぬ安定した株を予め吟味し用意しておくことが, 実験の再現性を期するためにも是非必要なことである。それで著者等は当所において輸入米培養検査時に屢々認められる 泰国黄変米菌 *Penicillium citrinum* THOM¹⁾ を 513 株分離保存したものの中より, その代謝産物である citrinin (C₁₃H₁₄O₅) の生産力の高く且安定した株を選抜するために比較試験を行つた処, 種々の興味ある知見を得たので茲にその概要を報告する。

実 験 の 部

(1) 菌株 Table 1 に示す如く, 1953 年 1 月より 1954 年 10 月までに行つた輸入米培養検査に於て分離した *P. citrinum* 513 株より菌学的に安定と考えられる 126 株を選択し培養実験に使用した。

Table 1. Origins of Isolated Strains. (Jan. 1953 to Oct. 1954)

Imported Regions	Number of Inspected Sample	Number of Strain
Thailand	36	86
Burma	23	207
French Indo China (Saigon)	9	26
Colombia	7	53
Iran	4	14
China	4	9
Turk	3	14
Spain	2	3
U. S. A. (California)	2	2
Ecuador	1	3
Italy	1	1
Peru	1	1
Unknown	24	94
Total	117	513

(2) 培養基 CZAPEK-DOX の液体培地 (蔗糖 3%, pH 6.0) を用いた。

(3) 培養方法 大型試験管に培養液 15cc を入れ 15 lbs., 10 分間滅菌後, 予め CZAPEK 寒天斜面に培養し十分に孢子を形成させてあるものを 10cc の滅菌水に懸濁し, よく振盪してその 0.5cc を接種した。この試験管を約 15 度に傾け液面を斜めにして, 25°C にて静置培養した。

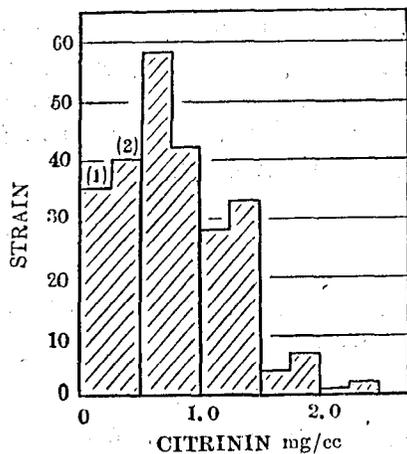
(4) citrinin の定量 2 週間及び 4 週間目に夫々培養液中の citrinin 量を定量した*。定量方法は次の通りである。

* 菌株の変性に依り 4 週間培養時に測定した株は 124 株となつた。

培養液 10cc を 50cc 容遠心分離管に採り、濃塩酸 2-3 滴を加え pH 2 以下とし、これにクロロホルム 10cc を 2 回分けて加え充分に振盪して、液中の citrinin を完全にクロロホルム層に移す。これを 4,000 r. p. m., 5 分間遠心分離して (培養液中の塩化第二鉄 FeCl₂ 陽性反応物質を除くため)、クロロホルム層と培養液層とに分離し、次に分液漏斗にクロロホルム層を移し採り、重炭酸ナトリウム 1% 溶液 10cc を加えて振盪し重炭酸ナトリウム溶液中に citrinin を移行せしめた後、平及び大和谷²⁾の方法に依り比色定量を行った。

実験結果及び考察

(1) citrinin 産生力 各菌株間の citrinin 産生力には非常に強弱があり最大 2.4mg/cc (培養液 1cc 中の citrinin mg 数) から最小 0.1mg/cc までに亘るが、Fig.1 に示す如く平均値 $\mu=0.77$ 及び $\mu=0.80$ なるポアソン分布を示した。



* μ mean value

Fig.1 Frequency distribution of isolated strains with respect to citrinin producing activity.

(1) FORMER 2 WEEKS ($\mu=0.77$)
 (2) LATER 4 WEEKS ($\mu=0.80$)

(2) 培養日数と citrinin 量の消長 2 週間培養時と 4 週間培養時に於ける citrinin 産生量及各分離菌株の citrinin 産生力に就き考察した。citrinin 産生量に関しては、Fig. 1 から 2 週間及 4 週間培養時の分布の平均値 $\mu=0.77$ と $\mu=0.80$ との間に殆んど差を認められないので、4 週間に培養を延長してもそれに伴って必ずしも citrinin 量が増加するとは結論出来なかつた。

各分離菌株間の citrinin 産生力に就いては、Table 2 に示す様に χ^2 検定法を適用して検定した結果、4 週間培養した方が citrinin の生産能が増加する株が減少する株より明らかに多いと言う結論を得た。

Table 2. Statistic Test of the Difference on Citrinin Production between 2 Weeks and 4 Weeks Incubation.

	χ^2 -test		
	(+)*-strain	(-)*strain	Total
Expectation	62	62	124
Observation	78	46	124

From the above data, it is possible to be drawn as follows:

$$\chi^2 = \frac{(78-62)^2}{62} + \frac{(46-62)^2}{62} = 8.26$$

while $\chi^2_{0.01} = 6.6349$ (D. F. = 1)

therefore $\chi^2 > \chi^2_{0.01}$

* (+), (-) indicate the increase or decrease of citrinin production from 4 weeks to 2 weeks incubation.

(3) 培養液の色調と citrinin 産生力との関係 THOM 等³⁾に依れば *P. citrinum* の系統にはその培養集落裏面 (reverse) の色調が類別上の 1 つの大きな標兆として取り上げられているが、その色調の発現には citrinin

及びその酸化物質が影響することは明らかである。分離菌の培養液には pale yellow より orange-red に亘る色調の変化が見られた。この色調の相異と citrinin 産生力との関係について考察を試みたところ、yellow 乃至 yellow-orange の色調を示す株はその他に比較して平均値が大きい、即ち Fig. 2 にて知れる通り分布の中心が右へかたよっている。またこの範囲内にある株は夫々全体の 79% (2週間培養時)、73% (4週間培養時) を占め citrinin 産生能の安定している系統と言える。orange-red 系統の培養液が citrinin 産生力が不安定なのは citrinin 酸化物質の影響によるものと考えられるが、この点に就いては次項で論議する。

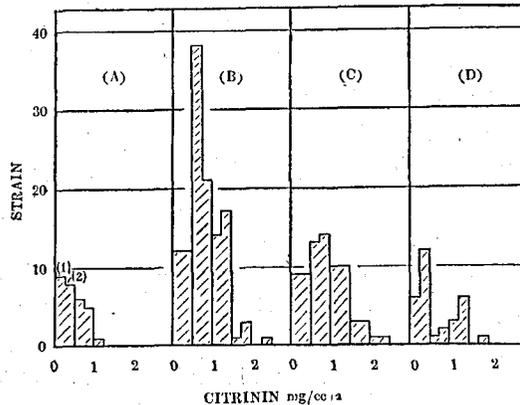


Fig. 2 Relation between color shade of cultural fluid and citrinin producing activity.

(1) FORMER 2 WEEKS (2) LATER 4 WEEKS
 (A) PALE YELLOW (B) YELLOW
 (C) YELLOW-ORANGE (D) ORANGE-RED

(4) 培養液の色調と pH との関係 培養液の pH が色調に関係すると考え培養液の pH を測定し色調(前項4段階の)と比較したが相関関係は得られなかつた。従来 citrinin は塩化ナトリウム液に溶け orange-yellow 溶液を呈し、これを静置すれば orange-red 溶液に変化すると報ぜられていたが⁴⁾、其後 HIRSCHY 等⁵⁾の報告では citrinin 水溶液の色調と pH との関係を、pH 4.6 以下で bright lemon-yellow, 4.6 で褪せし pH 5.6-5.8 で orange pink に変わり、9.9 以上で cherry red になるとしている。更に TAUBER 等⁶⁾は citrinin 水溶液は pH の変化でも yellow の状態を保ち citrinin 酸化物質の水溶液は alkali 性で wine red となること及び従来報文は濃厚な塩化ナトリウム液を加えた場合にのみいえることで微 alkali 溶液中では極めて淡い pink 色を呈し静置しても変化しないと述べている。従つて pH が alkali 性に傾くと citrinin の酸化が進み、形成された酸化物質の色調(wine red)が現われるものと推定される。培養液の色調と pH との間に、はつきりした関係が得られなかつた。これは、培養液に於ては単に pH の変化という条件だけで酸化物質が形成されるのではなく、更に複雑な因子が介在するためと考えられる。現に培養液の pH は 4.0-8.0 の範囲内であつたにも拘らずその色調は orange-red まで亘つているところからも、pH 以外に citrinin の酸化促進因子が含まれていることが暗示される。

(5) 輸入米培養検査への塩化第二鉄 FeCl_2 反応の応用 *P. citrinum* series 中 *P. citrinum* 及び *P. steckii* ZALESKI は citrinin 産生力の有無を以て区別されている。この2者の外に *P. citrinum* と形態的に類似の菌として、*P. paxilli* BAINIER, *P. chrysoeum* THOM, *P. notatum* WESTLING 等も分離されるので輸入米培養検査上それ等の判別に困難を伴う。

従つて当所では、*Asymmetrica-velutina* section に属する yellow pigment 産生菌は、紫外線照射に依る発光識別を鏡検観察と併行して行つている。この場合に更に塩化第二鉄 FeCl_2 反応を適用することをも既に実行しているが、この方法が citrinin 産生力の弱い菌に対しても適用出来るかどうか、疑問に思いこれを確かめるため以下の検討を行つた。

定量結果で得た最も citrinin 産生力の弱い分離系統(citrinin 産生量 0.1mg/cc) 6株及び対照として各段階の株 44株を夫々株別に滅菌した米粒に接種して培養米を作り、CZAPEK 培地 3cc を斜面にした小試験管 50本に上記米粒を1粒ずつ入れて 25°C にて1週間培養した。培地上に生育した集落下部の pale yellow の寒天層約 5

mm³を採り、これに penicillin 定量用の塩化第二鉄塩酸液(N/10 HCl に 10%の割合に FeCl₃を加える)⁹⁾を数滴加え反応を調べた。本実験を繰返し行つた結果、産生力の最も弱い株でも明らかに塩化第二鉄 FeCl₃溶液に依る褐色反応を呈した。従つて *Asymmetrica-velutina* section に属する yellow pigment 産生菌の中より *P. citrinum* を検出する場合の一手段として本法がたとえ citrinin の産生力の弱い株に対しても今まで通り応用し得ることに確信を得た。

本研究のため助力を賜つた三光化学戸部敬哉氏に深謝する。なお本研究は昭和 29 年度厚生科学研究費によつて行つた。

総 括

P. citrinum の分離系統 126 株に就いて citrinin 産生力の比較並にその産生力に及ぼす諸種の培養条件の影響等について実験した結果を記述した。

(1) 分離菌株間に於ける citrinin 産生力の差は非常に大きく citrinin 産生量と分離系統との関係はポアソン分布を示した。

(2) 培養日数 2 乃至 4 週間に於ける citrinin 量の消長を比較した処、citrinin 産生量に就いては 2 及 4 週間培養時の間に変化を認められなかつた。2 週間以後の培養過程で citrinin の分解に依る産生量の減少は無いものと認められる。又分離菌株間の citrinin 産生力に就いては、4 週間培養した方が citrinin 産生能の増加する株が明らかに多かつた。

(3) 培養液の色調が yellow 乃至 yellow-orange を示す系統が比較的安定した citrinin 産生力を現わすものといえる。

(4) 培養液の色調と pH との間には相関関係が得られなかつた。これは TAUBER 等の研究に依る citrinin 酸化物質の影響が pH 以外にも citrinin 酸化促進因子が培養液中に存在することに依り現われたものと推定される。

(5) citrinin 産生量最小(0.1mg/cc)の菌株に於ても塩化第二鉄 FeCl₃ 反応が明瞭に認められたので、輸入米培養検査上同定のための補助手段として *P. citrinum* 類似菌の判定に応用出来ることが確かめられた。

文 献

- 1) 角田広：日本植病会報，**XVIII** (3-4)，143 (1954)；平山重勝：日本植病会報，**XVIII** (3-4)，144 (1954)。
- 2) Taira, T., and Yamatodani, S. : J. Penicillin (J. Antibiotics, Japan), **1**, 275 (1947)。
- 3) Raper, K.B., and Thom, C. : Manual of the Penicillia, Willams & Wilkins Co., Baltimore, p. 347 (1949)。
- 4) Hetherington, A. C., and Raistrick, H. : Studies in the biochemistry of microorganisms, **XIV**, Royal Society of London, Philosophic Transactions, **B 220**, 269 (1931)。
- 5) Hirschy, H. W., and Ruoff, P. M. : J. Amer. Chem. Soc., **64**, 1490 (1942)。
- 6) Tauber, H., Laufer, S., and Goll, M. : J. Amer. Chem. Soc., **64**, 2228 (1942)。
- 7) Tauber, H., and Laufer, S. : J. Amer. Chem. Soc., **65**, 736 (1943)。
- 8) Hata, T., and Sano, Y. : J. Antibiotics (Japan), **IIA**, 26 (1949)。

Summary

Citrinin is well known as one of the metabolic substances of *Penicillium citrinum* THOM.

The authors reported herein the results of the comparative studies on citrinin producing power among 126 isolates of *P. citrinum* which were isolated from imported milled rice.

1. There were somewhat different activities in citrinin production among these isolates. On Czapek-Dox sucrose solution incubated at 25°C for 14 days, citrinin produced a maximum of 2.4 mg/cc and a minimum of 0.1 mg/cc. The relationship between the amount of citrinin yielded and different isolate sources showed statistically that they follow a poisson distribution.

2. In 4 weeks culture, the number of isolates which promote citrinin producing activity seemed to be little more than that of the 2 weeks culture.

3. The isolates appear yellow or yellow-orange and were recognized as a fairly stable strain in citrinin production. There was no correlation between pigmentation and H-ion concentration of cultural filtrates.

4. Even if the weakest strain of citrinin produced yielded 0.1mg/cc, it apparently was effected the reaction of the ferric chloride solution. This reaction can be employed in our fungus test on the solid medium.

Received February 29, 1955.

病変米菌の代謝生産物に関する研究 (第1報)*

Penicillium rugulosum THOM の一類似菌の菌学的性質

平山重勝, 倉田 浩, 坂部フミ
稲垣尙起, 宇田川俊一, 池谷三郎

Studies on the Metabolic Products of Fungi Isolated from Deteriorated Rice. I.
Identification of *Penicillium* Species Closely Related
to *Penicillium rugulosum* THOM.

Shigekatsu HIRAYAMA, Hiroshi KURATA, Fumi SAKABE, Naoki INAGAKI, Shun-ichi
UDAGAWA and Saburo IKETANI

緒 言

黄変米の問題は主食であるだけに日本中に大きな波紋を投じた。著者等は昭和28年1月頃より輸入米に対して食品衛生の立場より菌学検査を実施して来ている。現在本検査の対照は、主として *Penicillium toxicarium* MIYAKE¹⁾, *P. islandicum* SOPP²⁾ 及び *P. citrinum* THOM³⁾ の3種とされているが、検査中特に分離頻度の高い菌に就いては、その分類学的位置を明確にしておくと同時に、薬理試験を実施する前提としてその生理的性質を併せて明らかにして置く必要が生じた。斯る意味から先づ *P. islandicum* にその菌叢裏面の色調が類似し、しかも分離頻度の高い *Penicillium* 属菌の1種を取り上げ、その菌学的性質及び生理的性質を研究し同定を行つたのでその結果を報告する。

分離菌の分類学的位置

1 菌の分離及びその分布 本菌は1954年7月30日、輸入米培養検査中⁴⁾に加州米より分離した。1954年7月より1955年6月までに本菌と同種の菌が検出された輸入米及びその検出率をTable 1に示した。

Table 1. Distribution of *P. concavo-rugulosum* ABE isolated from Imported Rice
(July 1954 to June 1955)

Imported Regions	Number of Inspected Sample	Number of Strain
Thailand	16	18
U.S.A. (California)	7	100
Formosa	7	10
Burma	4	5
Spain	4	4
Italy	2	2
China	1	3
Total	41	142

2. 分離菌の各種培養基上の特徴 本菌の分類学上の位置を決定するために種々の培養基上に於ける性状を観察した結果は、Table 2, 3及びFig. 1-3に示す通りである。

* 本報告は昭和30年8月日本植物病理学会夏期大会に於いて講演した。

Table 2. Morphological Characteristics on Czapek's Solution Agar

1) Colonial Characteristics

Rate of growth	: restricted, diam. in 10 days 22-24mm. at 25°C, 1-2 mm. at 35°C.
Texture	: velvety
Characters of surface and margin	: strongly wrinkled felt, margins in white to flesh shades about 1.0mm in wide
Color and color change of conidial area	: yellowish green shade mycelium admixed in subcentral area with central area slightly raised, dark green shades
Exudate	: lacking or limited in amount
Odor	: indistinct
Colony reverse	: at first colorless, becoming yellowish orange to orange

2) Microscopic Characters

Conidiophores	: arising from the substratum, sometimes branched, mostly less than $50\mu \times 2.2-3.4\mu$, walls smooth
Penicilli	: typically biverticillate and symmetrical
Metulae	: usually in verticils of 5-7, mostly $9.6-12.0\mu \times 1.6-3.2\mu$
Sterigmata	: commonly consisting in verticils of 5-8, acuminate, about $9.6-12.0\mu \times 1.6-3.2\mu$
Conidia	: long-elliptical, $3.2-3.8\mu \times 2.4-3.0\mu$, with walls smoothed or nearly so, in tangled chain up to about $50-100\mu$ in length

Table 3. Colonial Characteristics on Various Media

Medium	Rate of Growth(cm)	Characters of Surface	Color of Conidial Area	Exudate	Reverse
Koji agar	2.8-3.5	wrinkled and raised in central area	green	indistinct	orange yellow
Malt extract agar	2.7-2.9	almost plane	dull yellow green	indistinct	orange
Potato agar	2.8-3.8	almost plane	green	limited, dark brown	pale yellow
Waksman's soln. agar	2.8-3.8	almost plane	green	limited, colorless	pale yellow

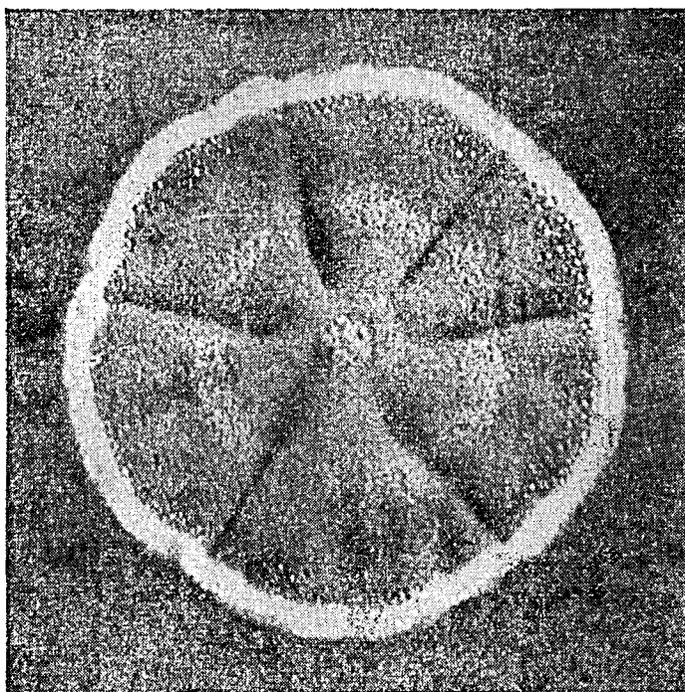


Fig. 1 Colony of *P. concavo-rugulosum* ABE on CZAPEK, 10 days, at 25°C.
($\times 3.5$)

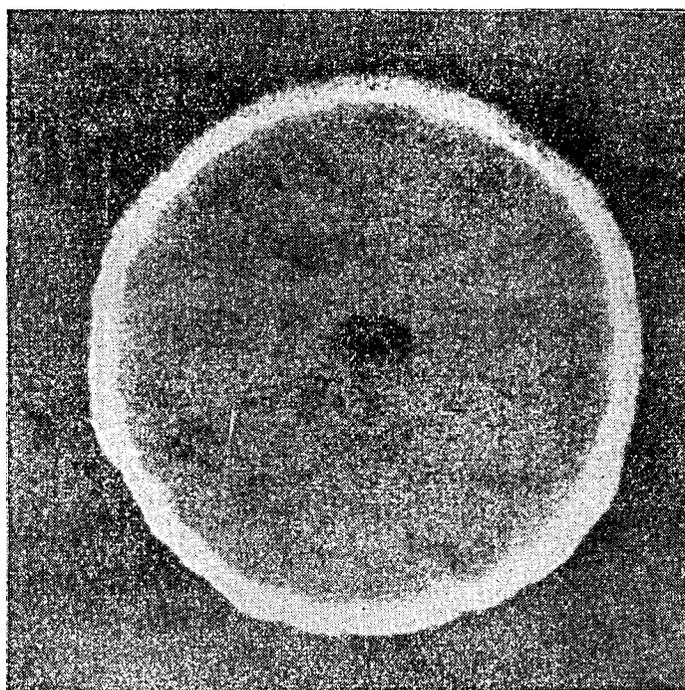


Fig. 2 Colony of *P. concavo-rugulosum* ABE on Malt Agar, 10 days, at 25°C.
($\times 3.5$)

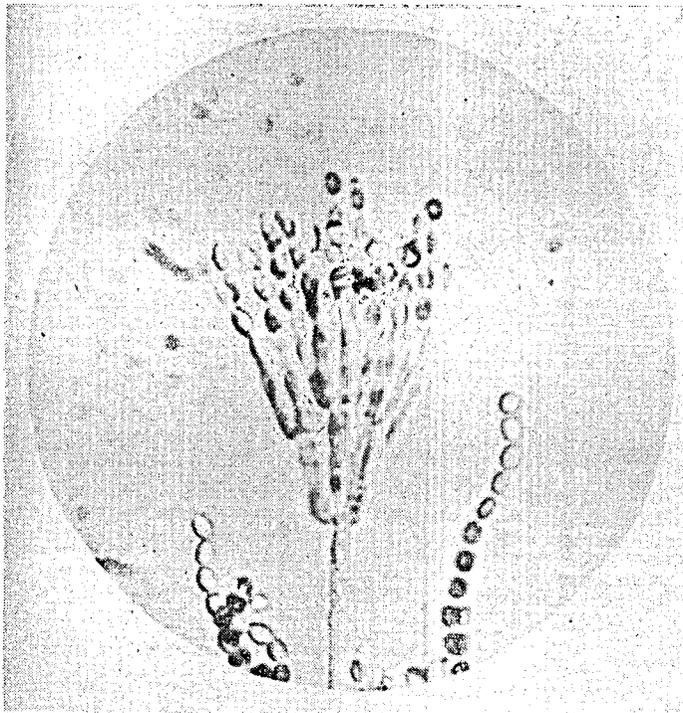


Fig. 3 Penicillus of *P. concavo-rugulosum* ABE (×約1000)

3. 分離菌の同定 本菌は Table 2 で示す形態から考察すれば、*Penicillium* 属に所属する。RAPER 及び THOM の Monograph⁵⁾ に従うと、*Biverticillate-Symmetrica* 群中の *P. rugulosum* series に属する。*P. rugulosum* series 中には *P. rugulosum* THOM, *P. tardum* THOM 及び *P. diversum* RAPER et FENNELL の3種があるが、*P. tardum* は集落周辺部が著しく submerge しているのと集落裏面が無色又は中心部輝黄色である点から本菌と異なり *P. diversum* は集落の生育速度が極端に遅く貧弱な發育を遂げる点で全く異なる。従つて本菌は *P. rugulosum* に最も類似するものの様である。併しながら、本菌の分生胞子は Table 2 及び Fig. 3 で見られる通り殆んど平滑であり又集落の生育速度が比較的速やかであることから、*P. rugulosum* の記載⁵⁾ (Colony attaining 1.0–1.5 cm. in 12–14 days; Conidial wall conspicuously roughened) と一致せず *P. rugulosum* と同一視することは困難である。阿部⁶⁾ は先に *P. rugulosum* に近似するが分生胞子の平滑な1菌株を新種となし、*P. concavo-rugulosum* ABE と学名を与えている。著者等の本菌と該菌(東大応微研株 710) とを比較するに特に区別し得る程の標兆は見当たらないので、本菌を *Penicillium concavo-rugulosum* ABE と同定した。

生理学的性質

1. 死滅温度 径1cmの小試験管にCZAPEK培養液(5% Glucose, pH 5.5)を1ccずつ入れ10 lbs, 15分滅菌後、本菌の胞子を接種して死滅温度を調べた。45°Cより75°Cまで5°C置きに各10分間処理後25°C 1週間培養した結果、45°Cでは培養後24時間以内に發育が認められ、50°Cでは48時間で發育を認めた。55°C以上では完全に死滅した。

2. 發育温度 300cc三角フラスコにCZAPEK培養液80ccを入れ10 lbs, 15分滅菌後、予めCZAPEK寒天斜面に培養して充分胞子の着生したものを10ccの滅菌水に懸濁し、良く振盪してその1ccを接種した。20, 25, 30及び35°Cの各温度に培養し、5, 10, 15及び20日後に於ける培養液のpH, 残糖量及び菌体量を測定した。pHは試験紙(東洋沓紙pH試験紙)。残糖量はFEHLING-LEHMANN-SCHOOL法、菌体量は重量法に依つた。実験結果をFig. 4から考察すると、糖消費曲線の急激な低下と菌体量の増加曲線から考へて、25°C乃至30°Cが最も良好な發育を示し20°Cがこれ等に次いで良く、35°Cでは全く異常な發育を示すことが認められる。亦本菌は若干の

有機酸を産生し酸形成は 20°C が最も良い結果示している。色素の形成は 30, 25, 20°C の順で 35°C では全く産生されなかつた。

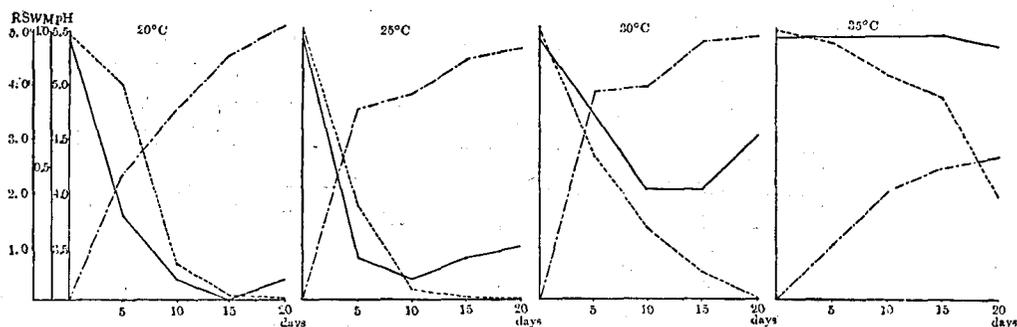


Fig. 4 Effect of Temperature on the Growth of *P. concavo-rugulosum* ABE

————— pH of Cultural Filtrate (pH)
 - - - - - Dry Weight of Mycelium g (WM)
 Remained Sugar of Cultural Filtrate % (RS)

3. Initial pH と発育 前項と同様の培養方法を用いた。pH は塩酸及び水酸化ナトリウムにて pH 2.0 より pH 9.0 まで 8 段階に調節した。25°C, 10 日間培養後, 培養液の pH, 残糖量及び菌体量を測定した結果を Table 4 に示した。一般に糸状菌は initial pH の酸性側が生育良好とされているが, 本菌の場合アルカリ性の方が寧ろ良好な結果を示した点が興味深い。培養後の pH の推移を測定した結果, initial pH がアルカリ側の場合でも本菌の発育と同時に急速に pH の低下が見られ, この低下度は却つて initial pH が酸性の場合より大であつた。本菌の生活力が旺盛であると言う理由の一つとして, 水素イオン濃度に対する抵抗力が示唆されているものといえよう。色素の産生は pH 6 以上が良好であつた。

Table 4. Influence of Initial pH on the Growth of *P. concavo-rugulosum* ABE (at 25°C, 10 days)

Initial pH	Final pH	Dry Weight of Mycelium (mg)	Remained Sugar (%)
2.0	3.2	469	0.16
3.0	3.4	489	0.09
4.0	3.6	438	1.12
5.0	3.3	420	0.20
6.0	3.8	484	0.04
7.0	4.0	585	0.09
8.0	4.2	592	0.11
9.0	4.5	618	0.14

4. 各種窒素源と発育 CZAPEK 培養液の窒素源として NH_4NO_3 , NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 尿素, ペプトンを用い, 夫々 NaNO_3 0.2% 相当の窒素量 (N=0.33%) を含む様に加えた。前項 2 に準じて 25°C, 10 日間培養後, 培養液の pH, 残糖量及び菌体量を測定した。Table 5 の結果より窒素源としてペプトンが発育良好, NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ では生育が悪い。色素の産生は尿素及び $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ が最も良かつた。

Table 5. Influence of the N-sources on the Growth of *P. concavo-rugulosum* ABE

N-sources	Dry Weight of Mycelium (mg)	pH of Cultural Filtrate	Remained Sugar (%)
NaNO	758	3.4	0.92
NH_4NO_3	713	3.9	1.92
NH_4Cl	298	2.0	3.76
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	505	2.3	0.83
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	282	1.8	3.97
Urea	745	3.0	0.13
Peptone	1456	6.3	0.14

5. 各種炭素源と発育 4と同様に炭素源として種々の糖類, 糖アルコール及びアルコール類を Glucose 5% 相当の炭素量 (C=0.33%) を含む様に加えた. 25°C, 10日間培養後, 培養液の pH 及び菌体量を測定した. 結果を Fig. 5 より Glucose を標準として考察すれば, Maltose が特に良い生育を示し以下 Glycerin, Sucrose, Mannose, Fructose が良く, Mannitol, Lactose, Ethanol, Galactose が非常に悪かった.

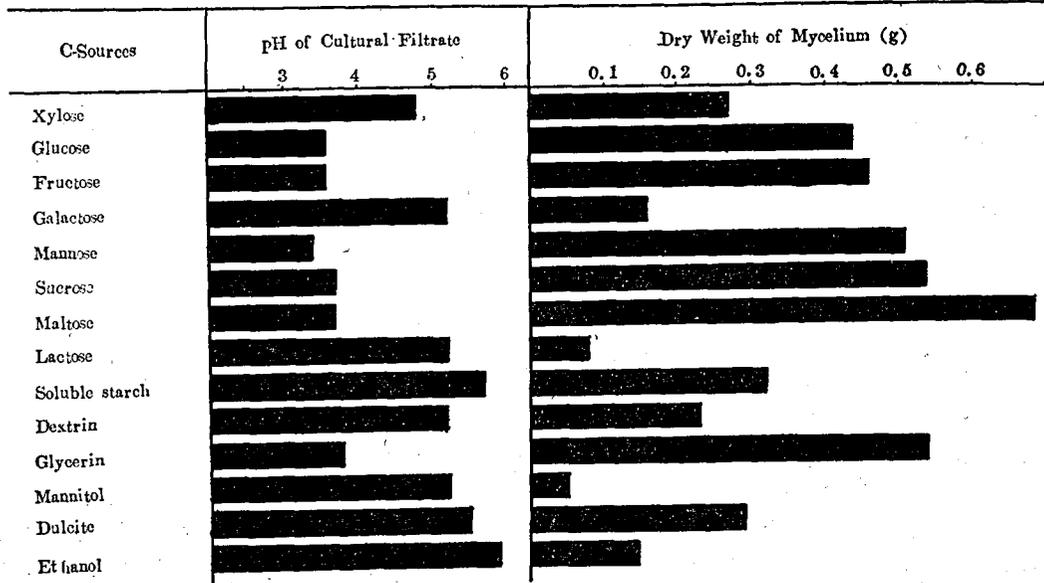


Fig. 5 Influence of the C-sources on the Growth of *P. concavo-rugulosum* ABE (at 25°C, 10 days)

6. 酵素試験 本菌の培養液を用いて定性的な酵素の存在を調べた. 結果は Table 6 に一括して示す.

Table 6. Enzyme Actions in Cultural Filtrate of *P. concavo-rugulosum* ABE

Kinds of Enzyme	Action*1)
Reductase	-
Amylase	-
Pectinase	-
Invertase	-
Lactase	-
Maltase	-
Oxydase	-
Peroxydase	-
Catalase	+
Tannase	+

*1) + Positive on testing for presence of enzyme
- negative

終りに本研究に際し御鞭撻を賜った刈米達夫所長並びに 貴重な菌株の供与及び御指導をいただいた, 協和醸酵 阿部重雄氏, 東大応微研飯塚広氏, 長尾研究所椿啓介氏に深謝する.

摘 要

輸入米培養検査時に分離頻度の極めて高い *Penicillium* 1種に就いて, その分布並びに形態, 生理学的諸性質を研究し, 同定を行ったのでその結果を報告する.

1. 輸入米培養検査上の本菌の分布を Table 1. に示した.
2. 本菌は *Penicillium* 属の *Biverticillata-Symmetrica* 群中の *P. rugulosum* series に属し, *P. rugulosum* THOM に最も近似するが, 分生胞子が滑面であり又集落の生育速度が比較的速やかであることから, 該菌の記載と一致しないので, 更に阿部の *P. rugulosum* THOM に近似するがその分生胞子が滑面である1新種 *P. concavo-rugulosum* ABE と比較を行った処, 略々一致することが判明したので, 本菌を *Penicillium concavo-rugulosum* ABE と同定した.
3. 本菌の分生胞子は 55°C, 10 分間で死滅した.
4. 本菌の発育適温は 25-30°C, 有機酸生成は 20°C, 色素産生は 25-30°C が良好であった.
5. initial pH の発育に対する影響を調べた結果, initial pH のアルカリ側が発育及び色素産生共に良好であった.
6. 各種窒素源及び炭素源と本菌の生育との関係を調べた結果, 窒素源としてペプトン, 炭素源として Maltose, Glycerin, Sucrose, Galactose, Fructose が発育上適していた. 窒素源中, 色素の産生には尿素及び $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ が最も良かった.
7. 本菌の培養液に就いて定性的に各種酵素の存在を調べ Table 6. に示した.

文 献

- 1) 三宅市郎, 内藤広, 角田広: 米穀利用研究所報告, 1, 1 (1940).
- 2) 角田広: 栄養学雑誌, 8 (6), 185; 9 (1), 1 (1951); 角田広: 食研報告, 8, 41 (1953).
- 3) 角田広: 食研報告, 8, 77 (1953); 9, 169 (1954); 日本植病会報, 17 (3.4), 191 (1953); 18 (3.4), 143 (1953); 平山重勝: 日本植病会報, 18 (3.4), 144 (1953).
- 4) 角田広: 日本植病会報, 18 (1.2), 79 (1953); 19 (1.2), 87 (1954); 平山重勝: 食品衛生研究, 5 (10), 11 (1954).
- 5) RAPER, K. B., and THOM, C.: Manual of the *Penicillia*, Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1949, p. 646.
- 6) ABE, S.: J. Gene. Appl. Microbiol. 2: 127 (1956)

Summary

Toxic effects as a result of the consumption of moldy milled rice have been observed in Japan for some time, and microbial examination of imported milled rice has been continued in our laboratory for the past several years from the standpoint of the food hygiene.

In our routine works, the authors often found some species of *Penicillium* on imported rice. It is considered to be necessary to identify these isolates before their toxicity are determined.

1. The results of these studies made on the morphological and cultural characteristics of a strain of *Penicillium* fungi isolated from the California rice reveal that this species seems to be closely related to *Penicillium rugulosum* THOM, except for its rough-walled conidia. ABE (1956, in press) is going to describe *Penicillium concavo-rugulosum* ABE upon the basis of its smooth surface and long-elliptical conidia. After the results of comparative studies between our isolate and *P. concavo-rugulosum*, the authors intend to place our species in the *P. concavo-rugulosum* ABE.

2. The optimal temperature for growth of this fungus is about 25°C, the thermal death point is 55°C for 10 minutes, and the influence of the H-ion concentration is not remarkable in the solution with exponents ranging from pH 2 to pH 9, but the maximum growth of the fungus obtained on the media having pH 7.0~9.0.

3. A survey of many carbon and nitrogen sources for growth of the fungus was made. As nitrogen sources, such as NaNO_3 , NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, are more favorable than the other sources. Pepton is the best organic nitrogen source for this fungus. The organism grows well on maltose, sucrose, glycerin, mannose, fructose, glucose, and soluble starch, and moderately well on several others.

4. Enzymes secreted by the fungus are tested by qualitative methods. The presence of 4 kinds of

enzymes such as catalase, pectinase, tannase, invertase are ascertained, but oxydase, peroxydase, amylase, lactase, maltase are not recognized.

Recieved February 29, 1956.

病変米菌の代謝生産物に関する研究 (第2報*)

Penicillium concavo-rugulosum ABE の培養並に代謝生産物の分離, 精製

平山重勝, 倉田 浩, 坂部フミ, 稲垣尙起, 宇田川俊一, 池谷三郎

Studies on the Metabolic Products of Fungi Isolated from Deteriolated Rice. II
Cultivation of *Penicillium concavo-rugulosum* ABE, Isolation and
Purification of Metabolic ProductsShigekatsu HIRAYAMA, Hiroshi KURATA, Fumi SAKABE, Naoki INAGAKI, Shun-ichi
UDAGAWA and Saburo IKETANI

緒 言

1936年, CLUTTERBUCK¹⁾ は *Penicillium rugulosum* THOM の代謝生産物として polysaccharide を分離しているが, 1955年に至り RAISTRICK等²⁾ が2種の色素 rugulosin, skyrin を報告している。又, 本菌に近縁な *P. crateriforme* GILMAN & ABBOTT に就き, RAISTRICK 等³⁾ (1934) は2種の有機酸 spiculisporic acid, succinic acid 及び polysaccharide を, CHOPRA等⁴⁾ (1939) は赤色色素の産生を報している。これ等の代謝生産物中, skyrin に関しては RAISTRICK 等⁵⁾ (1954) によつて行われた *P. islandicum* SOPP の代謝生産物に関する研究があり, 又 skyrin, rugulosin に就いては柴田等⁶⁾ (1953) が *Endothia parasitica* FR., *E. radicalis* FR. の代謝生産物として研究が行われている。

著者等は第1報⁷⁾ に輸入米より得た *Penicillium* 属菌の1種が, *P. rugulosum* THOM に近似するが, 分生孢子が平滑である点より, むしろ *P. concavo-rugulosum* ABE と同定すべき事を主張し, 併せてその菌学的性質に関し報告をなした。そこで更に本菌の代謝生産物を明らかにしておく事は, 将来その近縁菌との類縁関係を, 菌の生理化学的立場に立つて考察する上に大きな足掛りとなるであろう事を期待し, 本研究を実施した。

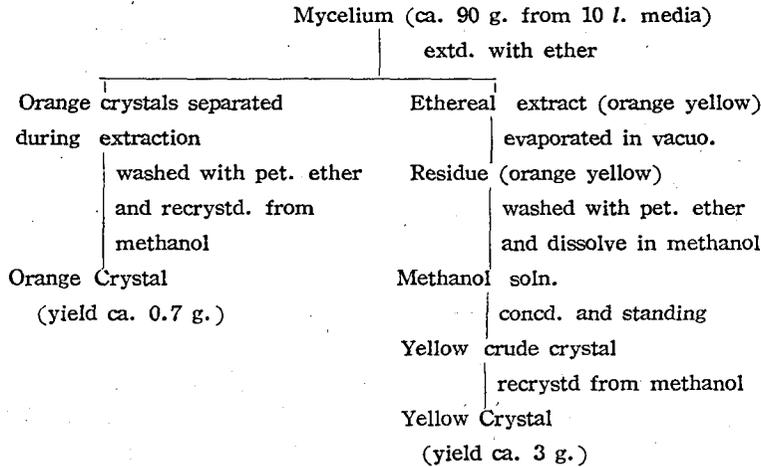
実 験

1. *P. concavo-rugulosum* ABEの培養: CZAPEK 培養液 (3% glucose, pH 5.6) を ROUX フラスコに約200cc ずつ入れ, 滅菌後本菌を CZAPEK 寒天培地に斜面培養したものからその孢子を接種し, 25°C で液の表面積をなるべく広くする様 (液層約1.5cm) にして静置培養した。振盪培養では菌体の発育, 色素の生成共に良好の様であるが, 色素が培養液に多く溶出する結果, 多量の培養液から色素を抽出せねばならぬ困難が招来するので静置培養を採用する事にした。接種後2,3日で液面は白い菌叢で覆われ, 5日後には表面は孢子で緑色となり, 菌叢裏面は次第に黄色から橙色を帯びて来る。同時に培養の色調は次第に黄色を帯び, 20-25日で色素の生成は大となり, 液の pH は最初5.6であつたのが, 2,3日後より酸性の4.5附近へと傾くが, 約1週間後より徐々に5.5附近へ移行する。

2. 代謝生産物の分離及び精製 橙色色素: *P. concavo-rugulosum* ABE を CZAPEK 培養液に25°C で20-25日間培養した後, 沝過して集めた菌体を水洗, 圧搾し約60°C で乾燥し, ソックスレー抽出器を用いエーテルで抽出する。受器には橙色の色素が結晶状となつて析出して来る。この結晶を沝別し沝液を減圧で蒸発すると橙色の残渣を得る。これを石油エーテルでソックスレー抽出器を用いて抽出し油状物を除去し, 残渣を再びエーテルに溶かし, 第二磷酸カルシウムを用い chromatography により分離精製する。Chromatography の第1層は黄色, 第2層は橙色となる。エーテルで展開すれば第2層の橙色部は溶出し, これを濃縮すれば橙色の結晶が得られる。先に得た結晶を石油エーテルにて脱脂後, 共にメタノール又はアルコールで再結晶すれば橙色棒状結晶を得る。

* 本報告は昭和30年8月, 日本植物病理学会夏期大会に於いて講演した。

Table 1 Isolation of Coloring Matters from the Mold Mycelium of *Penicillium concavo-rugulosum* ABE.



黄色色素： Chromatogram の第1層をアルコールで溶出すると黄色の液を得る。このアルコール溶液を減圧で濃縮し、放置すれば黄色の結晶が得られる。これをアルコール又はメタノールで再結晶すれば黄色柱状結晶を得る。

D-mannitol： 菌体をエーテルで抽出後、アルコールで抽出し、このアルコール溶液を活性炭で脱色して減圧濃縮すれば少量の無色針状結晶を生ずる。これをアルコールで再結晶する。

3. 代謝生産物の理化学的性質 橙色素は棒状結晶で 205-210°C にて褐変する。アセトン、エーテル、アルコール、メタノール、クロロホルム、酢酸エチルに可溶、ベンゼンに難溶、冷水、熱湯、石油エーテルに不溶、苛性アルカリ、炭酸アルカリに紫色に溶け、重炭酸アルカリに僅かに溶け 橙色を呈し、これらに酸を加えると橙

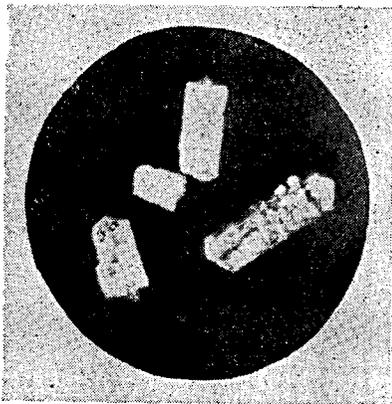


Fig.1 Crystal of Orange Coloring Matter

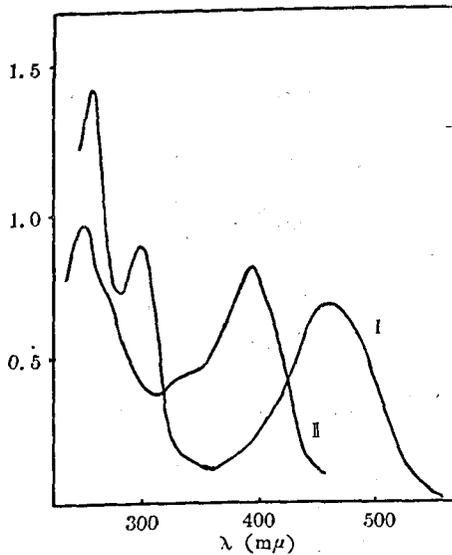


Fig.3 Ultraviolet Absorption Spectra of Coloring Matters(in ethanol)
 I. Orange coloring matter
 II. Yellow coloring matter

色の沈澱を生ずる。冷濃硫酸には紫赤色に溶け、漸次汚緑色となり、これを加熱し水で薄めると濃青色の沈澱を生じ、アンモニアを加えても変化しない。アルコール溶液に醋酸マグネシウムを加えると赤紫色を呈し、塩化第二鉄溶液を加えると橙紅色を増す。(Fig 1, Fig 3) 分析結果は、C 61.85%, H 4.30%, 黄色色素は240°Cより褐変し280°Cで分解する柱状結晶で、アセトン、エーテル、アルコール、メタノール、クロロホルム、酢酸エチルに溶解し、それらの溶液は緑色の螢光が認められる。ベンゼンに難溶、冷水、熱湯、石油エーテルに不溶、苛性アルカリ、炭酸アルカリに橙黄色に溶け、重炭酸アルカリに僅かに溶け黄色を呈し、これらに酸を加えると黄色の沈澱を生ずる。冷濃硫酸には汚黄色に溶け、漸次紫色となり、これを加熱すると濃青色となり、水で薄めると黒色の沈澱を生じ、アンモニアの過剰を加えると黒褐色を呈する。アルコール溶液は醋酸マグネシウムを加えると黄褐色となり、塩化第二鉄溶液を加えると黄褐色となる。(Fig 2, Fig 3) 分析結果はC 65.80%, H 4.41% 白色針状結晶はm.p.166°Cでアルコール、水に可溶、アセトン、クロロホルムに難溶、エーテルに不溶である。

D-mannitol と混融して融点降下せず、分析結果は次の如く D-mannitol とよく一致する。

実験値 C 39.21%, H 7.47%
計算値 $C_{16}H_{14}O_6$ として C 39.56%, H 7.74%

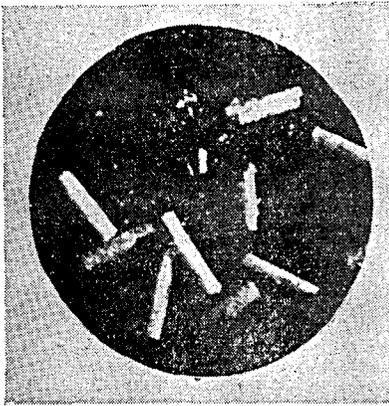


Fig.2 Crystal of Yellow Coloring Matter

4. 二色素の paper chromatography 二色素を夫々アセトン溶液となし、これを沔紙の下端より6.0 cmの所に spot し展開液を下端より1.0 cmまで入れ室温(15-20°C)に放置した。沔紙は東洋沔紙 No.50 (40.0 × 2.0 cm)を使用し、展開を終り沔紙を取り出し風乾した後、1%醋酸マグネシウム、メタノール溶液を噴霧後、90°Cで5分間乾燥し、或は1%水酸化ナトリウム溶液を噴霧し、各スポットの Rf 値を測定した。その結果は Table 2の通りである。

Table 2. Paper Chromatogram of the Coloring Matters

Developing solvent	Rf	
	Yellow coloring matter	Orange coloring matter
Benzine: Acetone: Water (5:5:3.5)	0.08	0.38
Acetone: Pet. ether: Water (1.5:2:1)	0.08	0.67
Acetone: Pet. ether: Water (1:1:3)	0.03	0.43
BuOH: NH ₄ OH (28%) (Saturated)	0.85	0.38

終りに臨み本研究に当り御鞭撻を賜った刈米達夫所長に謹謝し、併せて元素分析をお願いした 公定書外薬品部の諸氏に感謝致します。

摘 要

加州米より分離、同定した *P. concavo-rugulosum* ABE を CZAPEK 培養液に静置培養し、20-25日後の菌体を培養液と沔別し、水洗、乾燥し、そのエーテル抽出液より2種の色素と D-mannitol を分離、精製した。橙色素は205-210°Cで分解する棒状結晶で anthraquinone の性状を示し、黄色色素は240°Cで褐変し始め280°Cで分解する柱状結晶である。橙色素は skyrin, 黄色色素は rugulosin によく似た性状を示す様であり、こ

れらが夫々同一物質であるかに就いて更に検討を要するものと考えらる。

引用文献

- 1) Clutterbuck, P.W.: J. Soc. Chem. Ind., 55, 55T (1936)
- 2) Breen, J., Dacre, J. C., Raistrick, H. & Smith, G.: Biochem. J., 60, 618 (1955)
- 3) Oxford, A. E. & Raistrick, H.: Biochem. J., 28, 1321 (1934)
- 4) Chopra, N.N. & Ray, J.N.: Curvrent Sci., 8, 409 (1939)
- 5) Howard, B.H. & Raistrick, H.: Biochem. J., 56, 56 (1954)
- 6) Shibata, S., Tanaka, O., Chihara, G. & Mitsuhashi, H.: Pharm. Bull., 1, 302 (1953)
- 7) 平山等: 衛誌 74, 305 (1956)

Summary

Penicillium concavo-rugulosum ABE, belonging to *P. rugulosum* series, was isolated from California rice, cultivated on CZAPEK's sucrose solution for 20–25 days at 25°C. The mycelium was dried, extracted with ether and fractioned as shown in Table 1. The extract was purified by chromatography and then two crystallized coloring matters were isolated, and afterwards they were recrystallized by methanol or ethanol.

Orange coloring matter forms rod-crystals, darkening at 205–210°C. It is soluble in acetone, chloroform, ethanol, methanol and dissolves in sodium carbonate and caustic alkali giving a deep red solution. Ethanolic solution of this pigment gives a purple color with magnesium acetate. This orange pigment seems to be closely similar to skyrin.

Yellow coloring matter forms prism crystals, darkening at 240°C. and decomposing at ca. 280°C. It is soluble in acetone, chloroform, ethanol, and methanol. Its solution in chloroform shows bright yellow in color with slight green fluorescence. It dissolves in sodium carbonate and caustic alkali and forms a deep yellow solution. The yellow coloring matter gives a characteristic reaction with a conc. H_2SO_4 in which it dissolves in a cold solution, This yellow solution changes to brown by boiling and later to a stable purplish blue color. This pigment would be the same as ruglosin. A small quantity of D-mannitol was obtained by ethanol from extracts of mycelium.

Received February 29, 1956.

牛乳由来ブドウ球菌に関する研究（第5報）

学童給食用脱脂粉乳飲用によるブドウ球菌性食中毒事例について、特に原因菌の生物学的性状及び各種抗生物質に対する抵抗性並びにフェージ型について

鈴木 昭

Studies on the Biological Function of *Staphylococci* from Bovine Milk. V. Observation on the Staphylococcal Food-poisoning Caused by Powdered Skim Milk among the Primary School Children in Tokyo, especially on the Biological Character, Resistance to Some Antibiotics and Phage Typing of Causal Strains.

Akira Suzuki

まえがき 著者はさきに牛乳由来ブドウ球菌に関する一連の研究中¹⁻⁹⁾牛乳、乳製品が本菌による食中毒の可能性の多いことを実証し、けいこくを發して来た。又エンテロトキシンと生物学的性状との関係において、M. (C. N. H) 配列を採用することにより、その中毒の可能性を或る程度推察出来ることも提唱して来た。この方法については、新井、島田、春田¹¹⁾らも追試の結果スクリーニングテストとしての価値を認めている。

又本菌の酪農に及ぼす影響の甚大なこと、⁹⁾益々その傾向は増加の一途をたどっていること、本菌の食中毒原因菌としての歴史等¹⁻⁹⁾¹¹⁾につき詳細に系統的な報告をして来た。

昭和30年3月たまたま東京都内において小学校の学童給食用の脱脂粉乳による食中毒史上稀にみる一大中毒事例¹¹⁾がぼつ発し、著者も直に東京都の御厚意により、種々な調査の結果その原因食と推定される脱脂粉乳を入手し、その事件解決の一助にもなれば幸と次のような実験を行つたのでその結果について報告する。

実験方法

供試菌の分離方法 検体10gを無菌的に100ccのかんしょう生理食塩水中に投入し適宜稀釈を行い、牛乳標準寒天を用い、食品衛生検査指針に従い生菌数を検べると同時に、ヒツジ血液、ウサギ血液寒天を用い、表面塗法により寒天平板上の溶血性の認められるコロニーと、非溶血性のコロニーを釣菌し、グラム染色で本菌と確認したものを血液寒天斜面に移植した溶血性ブドウ球菌（以下ブ菌）13株と非溶血性ブ菌11株計24株と都衛研と同様検体より分離した溶血性ブ菌46株と非溶血性ブ菌4株計50株、総計74株を供試した。

生物学的性状の検査方法 生物学的性状の検査方法については第1～第4報に記載した通りである。前報に詳細に記載しなかつた点につき述べる。

1) Stone 反応検査法¹²⁾ この反応の検査には Difco 製の *Staphylococcus medium No. 110* を用いた。培地の組成は次の通りである。

即ち Bacto-Yeast Extract 2.5gr. Bacto-Torypton 10gr. Bacto-Gelatine 30gr Bacto-Lactose 29gr. Sodium Chloride 75gr. d-mannitol Difco 10gr. Dipotassium phosphate 5gr. Bacto-Agar 15gr. 以上組成の粉末を蒸留水 1000cc に対して 149gr. の割にまぜ溶解煮沸加熱して適当な容器に分注し、オートクラフで 15 ポンド (121°C) で 15 分間滅菌しておく。使用に際し溶かしてゆるやかに振つて沈澱をなくしてから平板とする。

本法は上記の培地に共試菌を移植し、37°C に 43 時間培養し、その平板にフラン器内においた硫酸アンモニヤの飽和溶液 5cc を加える。コロニーの周囲に明瞭なゼラテン液化の透明帯の認められる場合 Stone 反応陽性とし認められない場合陰性とした。なお 20% スルフォサリチル酸も飽和硫酸アンモニヤと同様検査に使用出来る。上記の培地の入手出来ない場合は上記処方に従つて邦製のものを使用しても検査出来る。

2) *Staphylococcus Medium No. 110* 培地による検査法¹²⁾ *Staphylococcus Medium No. 110* は本菌分離用選択培地で高濃度に含まれている食塩により、その発育に選択性を示し病原性の疑のないもの及び他菌は一応発育が抑制され、病原性ブ菌はオレンジ色を呈して発育する。それに加えて他の培地に発育菌を移植することな

しに上述の色素産生、マンニツト分解、血漿凝固能、ゼラチン液化の Stone 反応等が同時に検査することが出来る。(培地の組成は Stone 反応を参照)

検査法は先ず供試菌を平板に移植し 37°C に 43 時間培養し色素産生を検べ、オレンジ色を呈したコロニーを釣菌する。(白色の場合は一応病原性の疑なし) 次いで釣菌したコロニーの跡か或はコロニーの周囲に B.C.P か B.T.B 指示薬を 1 滴おとしてみる。接種されない培地の場合と比較して指示薬の色調の変化がマンニツト分解のしるしである。同時にオレンジ色を呈したコロニーを釣菌して血漿凝固能を検べる。その後 Stone 反応を検べればよい。(Stone 反応の項参照)

各種抗生物質に対する抵抗性検査法¹³⁾ 抗生物質に対する抵抗性検査法に用いた抗生物質はペニシリン、ストレプトマイシン、クロールテトラサイクリン、クロラムフェニコール、クロールオキシテトラサイクリン、カルボマイシン、エリスロマイシンの 7 種でどれも予研より分与を受けたものである。測定範囲はペニシリン、ストレプトマイシンは 0.1 0.5 1.5 10. 50.100.u/cc 又は γ /cc で、他のものは 0.1 0.3 1.3 10. 30.100 γ /cc である。培地、測定方法は腸内細菌研究班提案の「赤痢のストレプトマイシン、クロラムフェニコール耐性測定法」に準じて行つた。但し対照としてブドウ球菌 209 p 株を用いた。

ブドウ球菌ファーシ型による分類検査法¹⁵⁻¹⁸⁾

ブドウ球菌型別ファーシと増殖用菌株 供試ブ菌型別ファーシと増殖用菌株は Williams から予研(ブドウ球菌ファーシ研究会)に送附された各 20 種である。今回の実験に用いたものは予研より分与を受けたファーシ原液を当研究室で以下に述べるような方法で増殖検定したものである。(第 6 表参照)

即ちこのファーシ及び増殖用菌株の名前は Williams 達が Staphylococcus Reference Laboratory で用いている名前を記載し、括弧内に記入してある番号は N.C.T.C (National Collection of Type Cultures) の番号で、血清反応により A.B.F の 3 群に分けられている。

2) 型別用培地 普通細菌学で用いる牛肉で作成した肉水を用いた普通寒天を用いた。又肉水のかわりに Bacto Beef Extract (Difco Standardized) を用いた普通寒天を用いた。なお Staphylococcus Reference Laboratory では次のような処方推奨している。

Difco Bacto nutrient broth (dehydrated) 20gr. NaCl 5g Agar 11~12gr Aqu 1000cc

3) 型別に使用するファーシ液の濃度 (R.T.D., Routine Test Dilution の決定) ブ菌を型別するときにはファーシ原液を適当に稀釈し、即ち R.T.D. を検べて用いなければならない。これはファーシ液を標準対応菌上に滴下し完全溶菌を作る最高濃度倍数である。これは次のようにして検べる。先ず用意した培地をシャーレに流し込みフラン器内(37°C)で寒天表面をよく乾燥しファーシ対応増殖用菌の 18 時間培養を 0.2cc 表面に流しコンラチ棒でよく塗布した後再びよく乾燥させる。次いでピジョン 10 倍稀釈法で稀釈した各液を一滴宛前述の普通寒天平板表面におとす。そのまま放置して滴がよく乾燥したらシャーレを逆にしてフラン器(37°C)に 5~6 時間培養(夕刻フラン器内に静置し翌朝出しても可)し後室温に 1 夜静置しておく。その結果 10^4 まで完全溶菌をおこしている像がみとめられたとすれば R.T.D. は 10^4 である。

又 R.T.D. 決定の場合稀釈ファーシを寒天平板表面に滴下する方法には イ) 注射器を用いる方法。ロ) 毛細ピペットを用いる方法。ハ) 白金耳を用いる方法。ニ) 硝子棒を用いる方法等種々あるが我々は注射器を用いる方法を採用した。即ち 1cc ツベルクリン注射器に 1/5 注射針を各々用意しファーシ液を滴下するとよい。この場合余り大きく溶菌斑がならないよう注意が肝要である。(これは後述する分離菌のファーシに対する感受性(溶菌域)を検べる場合も同様である。)

ファーシ研究会において 25 コマのゴム印を作成し、それをシャーレの裏面におし、それに一連番号をつけて推奨しているが、我々の作成したのは余り効果的でなかつたので適当に○印をつけてこれにかえてる。

又実験の便宜上正式のファーシ名を略して

① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩ ⑪ ⑫ ⑬ ⑭ ⑮ ⑯ ⑰ ⑱ ⑲
3C. 3B. 3A. 70. 42E. 6. 7. 73. 47. 54. 75. 55. 71. 29. 52A. 52. 79. 53. 77. 42D.

の如く一連番号をつけている。

4) 結果の判読 結果の判読には Staphylococcus Reference Laboratory の約束に従つた。即ち \pm 溶菌斑の数が 50 個以上あり溶菌斑が互にくつつきあつていわゆる Semi confluent lysis となつているもの。+ 溶菌斑の数が 20~50 個位のもの。 \pm 溶菌斑の数が 20 個以下のもの。

更にこれ以外に次のものが追加して用いられる。卍 完全溶菌で耐性菌の二次集落のないもの。卍 耐性菌の二次集落のある完全溶菌。

型別される分離菌のフェージ感受性は上記の規準によつて記載し、その結果を報告する場合はそのフェージ名を順次記載する。例えば 3C/3B./3A. の如く、又記載の場合は上記規準の卍以上を採用する。例えば 3C. 3B. 3A. に対しては卍以上で 55. 71 に対して+以下のような場合は 3C/3B./3A. + と最後に+を附記しておく。全く溶菌しない場合は - とした。

5) 型別フェージ及び型別されたブドウ球菌の群別 使用した型別フェージ及群別は次の通りである。群 I.: 29. 52. 52A. 79 群 II.: 3A. 3B. 3C. 55. 71 群 III.: 6. 7. 42E. 47. 53. 54. 70. 73. 75. 77 群 IV.: 42D.

この群 I~IV フェージによるブ菌の溶菌域を整理してブ菌を群別するには

群 I: 群 I フェージだけによつて卍溶菌のおこるもの。

群 II: 群 II フェージだけによつて卍溶菌のおこるもの。

群 III: 群 III フェージだけによつて卍溶菌のおこるもの。

群 IV: 群 IV フェージだけによつて卍溶菌のおこるもの。

混合群: 2つ以上の群に属するフェージによつて共に卍溶菌のおこるもの。

6) 型別フェージの作り方 型別フェージのそれぞれに対応する増殖用フェージを用いる。増殖には寒天平板を用いる方法と液体培地を用いる方法とあるが、われわれは平板培地を用いる方法を採用しているのものでそれについて述べる。先づ前述した普通寒天に CaCl_2 を 100~1000r/cc の割に加えたものを用いた。

型の如くシャーレに普通寒天を流し(5mm程度)フラン器内でよく乾燥させる。次いでこれに増殖用菌の5時間培養を 0.2cc 寒天平板表面にコンラヂ棒でよく塗布し乾燥させる。これに後述する型別フェージの適当に稀釈した液 0.2cc をコンラヂ棒でよく塗布する。この場合シャーレの一部は菌液を塗布したままの部分を残しておく。これは増殖用菌株といえども溶原菌で自分自身の出すフェージが増殖して増殖しようとする型別フェージに混入する場合があるので注意する必要があり、その判別に便なるためである。このような平板は使用してはならない。

この時用いるフェージの適当ブイオン稀釈液とは血清型 A 型のものは R.T.D. の 10 倍、血清型 B 型のものでは R.T.D. の 50~100 倍のものを用いるがよい。

フェージ液を塗布しよく乾燥したシャーレは逆にして 37°C に 1 夜(夕刻入れて翌朝出す)静置し培養する。翌日フラン器から出して型の如くフェージが増殖しているか否を確認する。次いで寒天平板表面にブイオン 3~5cc 入れそのまま 20 分~30 分静置しておく。(表面の菌苔がふやけてはがれてくる)それをコンラヂ棒でよくかき取りピペットで吸取る。(フェージ粗液)これを 4000 R.P.M. 30 分遠心し上清を更にザイツ河過器で河過する。(この場合フェージ力価がおちる場合があるので、河過板は無菌的になる程度で出来るだけ薄い方がよい。)このようにして出来たフェージの力価を測定し R.T.D が 1000 倍位濃いものが望ましい。

7) フェージ原液の宿主域の検定 前述の如くして作成したフェージ原液が、信頼出来るものであるか、否かを検定し、信頼しうるに足ると確認出来たものでなければ使用出来ない。このためにイギリスの Staphylococcus Reference Laboratory では次の 22 株を用いている。

即ち 3B. 3A. 3C. 51. 29. 52. 52A/79. 31A. 31/44. 44A. 29A. 42C. 42B/47C. 47B. 7. 47. 54. 42E. 53. 6. 42D. 47A である。

われわれが溶菌域の確認をした場合の規準は予研の例にならい 卍 完全溶菌、± プラクが数個、卍と+その間の度合をあらわすようにした。

以上の如くして検定の終つたものを前述の R.T.D を測定し、それから供試菌の型別に用いる順序である。

実験成績

生物学的性状検査成績 生物学的性状の検査成績は第 1 表(其の 1)、(其の 2)に示してある。

第1表 (其の1) 著者の直接分離した供試菌の生物学的性状の実験成績

検体名	菌株名	色素産生	グラム染色	マンニツト	血凝	7.5% NaCl 抵抗	溶血性	Stone 反応	2%血清ペプトン	エンテロトキシン	耐熱性 (80~30分)
(2,0000×10 ⁴) AF4Y 08	1	黄	+	+	卅	+	a	+	+	卅	+
	2	黄	+	+	卅	+	a'β	+	+	卅	+
	3	黄	+	+	卅	+	a	+	+	+	-
	4	黄	+	+	卅	+	β	+	+	-	-
	5	黄	+	+	卅	+	a	+	+	-	-
	6	黄	+	+	卅	+	a	+	+	-	-
	7	白	+	-	-	-	-	-	+	-	-
	8	白	+	-	-	-	-	-	-	-	-
AF4Y 18	1	黄	+	+	卅	+	a	+	+	卅	+
	2	黄	+	+	+	+	a	+	+	卅	-
	3	黄	+	+	卅	+	a'β	+	+	+	-
	4	白	+	+	-	+	-	-	+	-	-
	5	白	+	+	5	-	-	-	+	-	-
	6	白	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	7	白	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	8	黄	+	-	-	-	-	-	-	-	-
AF4Y 20	1	黄	+	+	+	+	a'β	+	+	卅	+
	2	黄	+	+	+	+	a	+	+	+	-
	3	白	+	+	+	+	a	-	-	±	+
	4	白	+	+	+	+	a	-	-	-	-
	5	白	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	白	+	-	-	+	-	-	-	-	-
	7	白	+	-	-	+	-	-	-	-	-
	8	白	+	-	-	-	-	-	-	-	-

第1表 (其の2) 都研より分与をうけた供試菌の生物学的性状の実験成績

検体名	菌株名	色素産生	グラム染色	マンニツト	血凝	7.5% NaCl 抵抗	溶血性	Stone 反応	2%血清ペプトン	エンテロトキシン	耐熱性 (80~30分)
AF4Y 18	SN1	黄	+	+	卅	+	a	+	+		+
	3	黄	+	+	卅	+	a	±	+		-
	4	黄	+	+	卅	+	aβ	+	+	卅	+
	5	黄	+	+	卅	+	a	+	+		+
	6	黄	+	+	卅	+	a	+	+		+
	7	黄	+	+	卅	+	a	+	+		-
	8	黄	+	+	卅	+	a	+	-		-
	9	黄	+	+	卅	+	a	+	+		+
	10	黄	+	+	卅	+	a	+	+	卅	+
	AF4Y 08	11	白	+	-	-	-	-	-	-	-
13		黄	+	+	卅	+	a	+	+		-
14		黄	+	+	卅	+	a	+	+		+
15		黄	+	+	卅	+	a	+	+	卅	+
16		黄	+	+	卅	+	aβ	+	+		+
17		黄	+	+	卅	+	aa	+	+	卅	+

検体名	菌株名	色素産生	グラム染色	マンニット	血凝固	7.5% NaCl 抵抗	溶血性	Stone 反応	2%血清ペプトン	エンテロトキシン	耐熱性 (80~30分)
AF 4 Y 08	// 18	黄	+	+	卅	+	aβ	+	+		-
"	// 19	黄	+	+	卅	+	aβ	+	+		-
"	// 20	黄	+	+	卅	+	a	+	+		-
"	// 21	白	+	+	-	-	-	-	-		-
"	// 22	黄	+	+	卅	+	a	+	+	-	
AF 4 Y 07	// 23	黄	+	+	卅	+	a	+	+		
"	// 24	黄	+	+	卅	+	aβ	+	+	卅	-
"	// 25	黄	+	+	卅	+	a	+	+		
"	// 26	黄	+	+	卅	+	εβ	+	+		
"	// 27	黄	+	+	卅	+	a	+	-		
"	// 28	黄	+	+	卅	+	a	+	+		
"	// 29	黄	+	+	卅	+	a	+	+		
AF 4 Y 08	// 30	黄	+	+	卅	+	aβ	+	+		
"	// 32	黄	+	+	卅	+	aβ	+	+	卅	+
"	// 33	黄	+	+	卅	+	a	+	+		
"	// 34	黄	+	+	卅	+	a	+	+		
"	// 35	黄	+	+	卅	+	a	+	+		
"	// 36	黄	+	+	卅	+	a	+	+		
"	// 38	黄	+	+	卅	+	aβ	+	+	+	+
"	// 39	黄	+	+	卅	+	a	+	+		
"	// 40	黄	+	+	卅	+	a	+	+		
"	// 41	黄	+	+	卅	+	a	+	+		
"	// 42	黄	+	+	卅	+	-	+	+	-	
AF 4 Y 02	// 43	黄	+	+	卅	+	aβ	+	+	卅	+
AF 4 Y 03	// 44	黄	+	+	卅	+	a	+	+	卅	-
AF 4 Y 20	// 45	黄	+	+	卅	+	a	+	+	卅	+
"	// 47	黄	+	+	卅	+	a	+	+		-
"	// 48	黄	+	+	卅	+	a	+	-		
"	// 49	黄	+	+	卅	+	a	+	+		
不 明	// 50	白	+	-	-	-	-	-	-	-	-
"	// 51	白	+	+	-	-	-	-	-	-	-
"	// 52	黄	+	+	卅	+	a	+	+	+	-
"	// 53	黄	+	+	卅	+	a	+	+		
"	// 54	黄	+	+	卅	+	-	+	-		-
"	// 55	黄	+	+	卅	+	a	+	+		

1) 色素産生能 分離用平板上に認められたコロニーの色素産生能はいずれの検体からもその殆んどが黄色株 (約95%以上) で、白色株はわずかに5%を占め、レモン株は1株も認められなかった。

供試菌として取りあげた74株は黄色株58株(78%)、白色株16株(22%)である。マンニット分解能と比較すると黄色株全部が陽性を示し、白色株16株中6株(37%)が陽性である。同様に血漿凝固能と比較してもよく一致した成績が得られた。

2) マンニット分解能 マンニット分解能は前述の通りであるが、陽性株においてその分解日数は殆んど24~48時間以内で1株のみ5日目に陽性を示した。

- 3) 血漿凝固能。血漿凝固能は30分で陽性のもの(卅)1株, 1時間で陽性のもの(卅)35株, 2時間で陽性のもの(卅)18株, 3時間で陽性のもの(+)5株で供試菌74株中59株(80%)が陽性を示している。
- 4) 7.5%食塩抵抗性 7.5%食塩抵抗性は74株中62株(84%)で, 血漿凝固能陽性株59株は全部陽性を示し陰性株15株中3株が食塩抵抗性を有している。
- 5) 溶血性 供試菌74株中57株(77%)に溶血性が認められた。その中a型42株(74%), aa型2株(4%), 型10株(18%), α'β型3株(5%)でβ型は1株も認められなかつた。
- 6) 2%血清ペプトン水培地における発育状態 2%血清ペプトン水培地顆粒状発育は血漿凝固能と比較的よく一致するので, 病原性の鑑別参考資料の一助に用いて来たが, 今回の成績も供試菌74株中56株(76%)で, 血漿凝固能, 溶血性とよく一致している。
- 7) Stone 反応。Stone 反応は供試菌74株中57株(77%)が陽性を示している。溶血性, 血漿凝固能等ともよく一致した成績である。エンテロトキシン産生能検査に供試した41株の中エンテロトキシン陽性株20株は全部Stone 反応陽性を示し陰性株21株中3株がStone 反応陽性である。
- 8) 熱に対する抵抗性。熱に対する抵抗性を80°30分で見ると供試菌47株中16株(34%)に熱抵抗株が認められ, 31株(66%)が80°30分以下で死滅した。
- 9) Staphylococcus Medium No.110 培地による成績。Staphylococcus Medium No. 110 培地による成績は第2表に示してある。即ち供試菌74株中発育抑制の認められたもの6株(8%)が認められたが, 他の生物学的性状は実験方法でそれぞれ述べた方法の成績とよく一致し, エンテロトキシン陽性株は総て陽性を示し, Stone 反応は最も著明である。(Staphylococcus Medium No. 110 培地については詳細に検討中であるので後日報告する予定)

第2表 正規法による生物学的性状の成績と No.110 培地による成績比較

供試菌数	区 別	判 定	発育抑制	色 素 産 生 能	マンニト分解能	7.5% NaCl 抵抗性	Stone 反 応	血漿凝固能
74	正 規 法	+	—	58	63	56	56	59
	No.110 培地		6	58	59	59	56	59
	正 規 法	—	—	16	11	18	18	15
	No.110 培地		68	16	15	15	18	15

10) 色素産生。M.(C.N.H) 配列, Stone 反応とエンテロトキシンとの相関関係。前述した各成績の色素産生 M.(C.N.H) 配列, Stone 反応を取りあげ, エンテロトキシン産生有無の確認に供した41株について比較してみた。その成績は第3表(其の1), (其の2)である。

M.(C.N.H) 配列完全型にエンテロトキシン陽性株が認められ, 不完全型[M.(C.N.H)の何れかが陰性]の中には1株も認められず, Stone 反応もよく一致している。

第3表 色素産生。M.(C.N.H) 配列, Stone 反応とエンテロトキシンとの相関関係(其の1)

ロ ッ ト 別	菌 株 名	色素産生能	M.(C.N.H)	Stone 反応	エンテロトキシン
AF4Y 08	1	黄	+(+++)	+	卅
	2	黄	+(+++)	+	卅
	3	黄	+(+++)	+	+
AF4Y 18	1	黄	+(+++)	+	卅
	2	黄	+(+++)	+	卅
	3	黄	+(+++)	+	+
AF4Y 20	1	黄	+(+++)	+	卅
	2	黄	+(+++)	+	+
	3	白	+(+++)	—	±

（其の2）

ロット別	菌株名	色素産生能	M. (C, N, H)	Stone 反応	エンテロトキシン
AF 4 Y 02	SN 43	黄	+ (+++)	+	卅
AF 4 Y 03	" 44	黄	+ (+++)	+	卅
AF 4 Y 07	" 24	黄	+ (+++)	+	卅
AF 4 Y 08	" 11	白	- (---)	-	-
	" 15	黄	+ (+++)	+	卅
	" 17	黄	+ (+++)	+	卅
	" 21	白	+ (---)	-	-
	" 22	黄	+ (+++)	+	卅
	" 38	黄	+ (+++)	+	+
	" 42	黄	+ (+++)	+	-
AF 4 Y 18	" 4	黄	+ (+++)	+	卅
	" 10	黄	+ (+++)	+	卅
AF 4 Y 20	" 45	黄	+ (+++)	+	卅
不 明	" 50	白	- (---)	-	-
	" 51	白	+ (---)	-	-
	" 52	黄	+ (+++)	+	+
	" 54	黄	+ (+++)	+	-

動物試験成績

1) マウスに対する病原性。マウスに対する病原性について直接われわれが分離供試した 24 株についてのみしか行わなかったが、成績は第 4 表に示してある。供試菌 24 株中 3 株 (13%) に陽性が認められ、エンテロトキシン陽性株 9 株中 3 匹以上へい死されたもの 3 株、2 匹のもの 2 株、1 匹のもの 1 株である。

2) 仔ネコに対する病原性

第 4 表 エンテロトキシンの仔ネコによる腹腔内注射成績

	体 重	接種量	症 状			発熱	予 後	マウス に対する 毒性	
			嘔	吐	下 痢				
AF 4 Y 08	1. 520g	5.2cc	20~65分	4回	120~170分	3回	-	300分 回復	4/5
	2. 670 "	6.7 "	5~37分	3回	60~100分	2回	-	死 亡	1/5
	3. 370 "	3.7 "	30~35分	2回	-	-	-	300分 回復	2/5
AF 4 Y 18	1. 420 "	4.2 "	5~10分	2回	150分	1回	-	300分 回復	3/5
	2. 540 "	5.4 "	39分	1回	70~150分	2回	-	300分 回復	1/5
	3. 980 "	3.8 "	15分	1回	-	-	-	300分 回復	2/5
AF 4 Y 20	1. 720 "	7.2 "	90~150分	2回	200分	1回	-	400分 回復	3/5
	2. 470 "	4.7 "	27分	1回	-	-	-	300分 回復	1/5
	3. 690 "	6.9 "	-	-	48分	1回	-	300分 回復	0/5

エンテロトキシン産生能の有無を確認した 41 株についてみると 20 株 (50%) が陽性である。その成績の一部を詳細に第 4 表に示してある。表に示す如く典型的な急性胃腸炎症状を起している。エンテロトキシン陽性株 20 株中卅のもの 5 株 (25%)、卅のもの 9 株 (45%)、+のもの 5 株 (25%) で疑わしいもの 1 株 (5%) である。

各種抗生物質に対する抵抗性試験成績。各種抗生物質に対する抵抗性についての試験成績は第 5 表 (其の 1)。

(其の2) に示してある。

供試菌74株中ペニシリンに対して100u/ccの抵抗性を示すもの3株(4%)、50u/ccのもの29株(40%)、10u/ccのもの14株(19%)、5u/ccのもの8株(10%)、1u/cc以下のもの20株(27%)で、供試菌の73%が5u/cc以上の抵抗性を示している。

ストレプトマイシンに対しては10 τ /cc抵抗性を示したものが5株(7%)で他は総て対照と差が認められない。その他の抗生物質に対しては何れも対照と有意の差が認められない。

ペニシリンに対する抵抗性とM. (C.N.H) 配列とは比例し、高い抵抗性を示す菌株は総て完全型に包含され、比較的弱い、又は抵抗性の認められない菌株は総て不完全型に包含されている。

第5表 供試菌の各種抗生物質に対する抵抗性 (其の1)

	PC u/cc	SM τ /cc	AM τ /cc	CM τ /cc	TN τ /cc	CaM τ /cc	EM τ /cc
AF4Y 08							
1	100	0.1	0.3	3	1	0.3	0.3
2	50	0.1	0.3	3	1	0.3	0.3
3	50	0.1	0.3	3	1	0.3	0.3
4	50	0.1	0.3	3	1	0.3	0.3
5	50	0.1	0.3	3	1	0.3	0.3
6	5	0.1	0.3	3	1	0.3	0.3
7	0.5	0.1	0.3	3	1	0.3	0.1
8	1	0.1	0.3	3	1	0.3	0.1
AF4Y 18							
1	50	0.1	0.3	3	1	0.3	0.1
2	10	0.1	0.3	3	1	0.3	0.1
3	50	0.1	0.3	3	1	0.3	0.1
4	0.5	0.1	0.3	3	1	0.3	0.1
5	0.5	0.1	0.3	3	1	0.3	0.1
6	0.5	0.1	0.3	3	1	0.3	0.1
7	1	0.1	0.3	3	1	0.3	0.1
8	0.5	0.1	0.3	3	1	0.3	0.1
AF4Y 20							
1	10	0.1	0.3	3	1	0.3	0.1
2	5	0.1	0.3	3	1	0.3	0.3
3	50	0.1	0.3	3	1	0.3	0.3
4	5	0.1	0.3	3	1	0.3	0.3
5	1	0.1	0.3	3	1	0.3	0.3
6	0.1	0.1	0.3	3	1	0.3	0.1
7	0.5	0.1	0.3	3	1	0.3	0.1
8	0.1	0.1	0.3	3	1	0.3	0.1

供試菌の各種抗生物質に対する抵抗力（其の2）

	PC u/cc	SM γ /cc	AM γ /cc	CM γ /cc	TM γ /cc	CaM γ /cc	EM γ /cc
S N 1	100	0.1	0.3	3	1	0.3	0.1
3	10	0.1	0.3	3	1	0.3	0.1
4	50	0.1	0.3	3	1	0.3	<0.1
5	50	0.1	0.3	3	1	0.3	<0.1
6	50	0.1	0.3	3	1	0.3	0.1
7	50	0.1	0.3	3	1	0.3	0.1
8	0.5	0.1	0.3	3	1	0.3	0.1
9	50	0.1	0.3	3	1	0.3	0.1
10	10	0.1	0.3	3	1	0.3	0.1
11	<0.1	<0.1	0.3	1	1	0.1	<0.1
13	50	0.1	0.3	3	1	0.3	0.1
14	10	0.1	0.3	3	1	0.3	0.1
15	50	0.1	0.3	3	1	0.3	0.1
16	5	0.1	0.3	3	1	0.3	<0.1
17	10	0.1	0.3	3	1	0.3	0.3
18	50	0.1	0.3	3	1	0.3	0.3
19	10	0.1	0.3	3	1	0.3	0.3
20	50	0.1	0.3	3	1	0.3	0.3
21	0.5	10	1	3	3	0.1	0.3
22	50	0.1	0.3	3	1	0.3	0.3
23	50	0.1	0.3	3	1	0.3	0.1
24	10	0.1	0.3	3	1	0.3	0.1
25	50	0.1	0.3	3	1	0.3	0.1
26	50	0.1	0.3	3	1	0.3	0.1
27	50	0.1	0.3	3	1	0.3	0.1
28	50	0.1	0.3	3	1	0.3	0.1
29	100	0.1	0.3	3	1	0.3	0.1
30	5	<0.1	0.3	3	1	0.3	0.1
32	10	10	0.3	3	1	0.3	0.1
33	50	10	0.3	3	1	0.3	0.3
34	1	0.1	0.3	3	1	0.3	0.3
35	10	0.1	0.3	3	1	0.3	0.3
36	1	<0.1	0.3	3	1	0.3	0.3
38	50	0.1	0.3	3	1	0.3	0.3
39	10	10	0.3	3	1	0.3	0.3
40	5	0.1	0.3	3	1	0.3	0.3
41	5	10	0.3	3	1	0.3	0.3
42	5	0.1	0.3	3	1	0.3	0.3
43	10	0.1	0.3	3	1	0.3	0.1
44	10	0.1	0.3	3	1	0.3	0.1
45	1	0.1	0.3	3	1	0.3	0.1
47	50	0.1	0.3	3	1	0.3	0.1
48	50	0.1	0.3	3	1	0.3	0.1
49	50	0.1	0.3	3	1	0.3	0.1
50	<0.1	<0.1	0.1	0.3	1	0.1	<0.1
51	1	<0.1	0.3	3	1	0.3	0.3
52	50	10	0.3	3	1	0.3	0.3
53	50	<0.1	0.3	3	1	0.3	0.3
54	10	0.1	0.3	3	1	0.3	0.3
55	1	0.1	0.3	3	1	0.3	0.3
209 P	0.1	0.1	0.3	3	1	0.1	0.1

P.C. ペニシリン, S.M. ストレプトマイシン, A.M. クロールテトラサイクリン, C.M. クロラムフェニコール, T.M. オキシテトラサイクリン, CaM. カルボマイシン, E.M. エリスロマイシン. 数字は発育最高濃度を示す.

ファージ型による分類成績 供試型別ファージと増殖用菌株名は第6表に示してある。

予研より分与を受けたファージ原液をもとにわれわれが増殖したファージ原液の試験時の力価及びR. T. Dは第7表に示してある。

第6表 供試型別ファージと増殖用菌株の名称と分類

型別ファージ	増殖用菌株	ファージの血清型	型別群
1) 3 C(8411)	3 C(8327)	A	Ⅱ
2) 3 B(8410)	3 B(8321)	A	Ⅱ
3) 3 A(8408)	3 A(8317)	A	Ⅱ
4) 70(8425)	70(8352)	A	Ⅲ
5) 42E(8418)	42E(8357)	A	Ⅲ
6) 6(8903)	6(8509)	A	Ⅲ
7) 7(8404)	7(8510)	A	Ⅲ
8) 73(8430)	73(8360)	A	Ⅲ
9) 84(7809)	47(8325)	A	Ⅲ
10) 54(8412)	54(8329)	A	Ⅲ
11) 75(8427)	75/76(8354)	A	Ⅲ
12) 55(8429)	55(8358)	B	Ⅱ
13) 71(9316)	71(9315)	B	Ⅱ
14) 29(8413)	29(8331)	B	Ⅰ
15) 52A(8420)	52A(8363)	B	Ⅰ
16) 52(8401)	52(8507)	B	Ⅰ
17) 79(8290)	52A/79(8363)	B	Ⅰ
18) 53(8406)	53(8511)	B	Ⅲ
19) 77(8428)	77(8356)	F	Ⅲ
20) 42D(8414)	42D(8341)	F	Ⅳ

第7表 供試型別ファージ試験時の R. T. D. とファージ数

力価 ファージ名	R. T. D.	ファージ数
3 C	10×10 ³	10×10 ⁸
3 B	10×10 ³	10×10 ⁷
3 A	10×10 ⁴	10×10 ⁹
70	10×10 ²	10×10 ⁷
42E	10×10 ³	10×10 ⁹
6	10×10 ³	10×10 ⁸
7	10×10 ³	10×10 ⁷
73	10×10 ⁴	10×10 ⁹
47	10×10 ⁴	10×10 ⁸
54	10×10 ³	10×10 ⁸
75	10×10 ³	10×10 ⁸
55	10×10 ²	10×10 ⁷
71	10×10 ²	10×10 ⁸
29	10×10 ³	10×10 ⁸
52A	10×10 ⁴	10×10 ⁹
52	10×10 ³	10×10 ⁸
79	10×10 ²	10×10 ⁷
53	10×10 ²	10×10 ⁷
77	10×10 ²	10×10 ⁷
42D	10×10 ²	10×10 ⁷

第7表に示すファージ液の溶菌スペクトル測定成績は第8表に示してある。第9表の Williams 等の成績と比較すると大体一致して、ファージ型分類に使用出来得ることが確認出来た。

第8表 著者らが直接増殖したファージの溶菌スペクトルの測定成績

ファージ	3 C. 3 B. 3 A	70. 42E. 6. 7. 73. 47. 54. 75	55. 71	29. 52A. 52. 79	53	77	42D
血清型	A			B		F	
型別群	Ⅱ	Ⅲ	Ⅱ	Ⅰ	Ⅲ	Ⅳ	
3 C	###+		+##				
3 B	###+		++				
3 A	+##		+±				
70		## ± +		±			
42E		##					
6		±+##+ ####				+##	
7		±±#### +####					
73	+	##############	+ ±	±			±
47		+ ####					
54		## ##				##	
75/76							
55	###±		##+				
71	+±		##				
29				##			
52A				##++			
52				##+			
52A/79				##			
53		##		##++			
77		##++	##				
42D		+ ##				##	
51						##	##
42B/47C			++				
47B							
47A							
44A		+ ±+##					
42C		## ± ##					±

第9表 型別フェージの溶菌スペクトル (Williams)

フェージ	3 C. 3 B. 3 A	70. 42 E. 6. 7. 73. 47. 54. 75	55. 71	29. 52 A. 52. 79	53	77	42 D
血清型	A			B			F
型別群	Ⅱ	Ⅲ		Ⅱ	Ⅰ	Ⅲ	V
3 B	5 5 3			5 5			
3 A	4 3 5	1	1	4 3			
3 C	5 5 4			5 5			
51	5 2			5 5			
29					5		
52					4 5		
52A / 29					5 4 5		
31A							
31 / 44	1 2	5 4	3 3 3 3 4	1 2	4 4 4 4	3 4	3
44A		1	4 4 2 2		1 4 4 2		1
29A		2 3 3	4 2 2		4 3 3	(3)	
42C	4 3	3 3	2 2 1	2		3	
42B / 47C		2	2 2 2 1		3 2	1 2	
47B		1 2	2 2 2				1
7		3 4 5 5 4 5 4 5			3 3	5 4	
47			2 2 2 5 3 4		3 3 3	5 4	(2)
54		3 3	4 4 5 5 5			5 4	(2)
42E		5	(3)+ 2		3 3 3	2	2
53		3	4 4			5 4	
6		3 4 5 4 4 5 4 4			(3) 3	5 4	
42D		1	1 2			1	5
47A		1	1 2				

1) 供試菌のフェージ型による分類成績 供試菌74株のフェージによる分類成績は第10表に示してある。

即ち74株中Ⅲ群に属するもの42株(57%)、Ⅱ、Ⅰ群に属するもの11株(15%)、Ⅳ、Ⅴ群に属するもの1株(1%強)、型別不能のもの20株(27%)で、供試菌の73%が何れかのフェージに対して感受性を示している。

ロット別にみると02、Ⅲ群1株、03、Ⅱ群1株、07、Ⅲ群7株、08、Ⅲ群15株、Ⅰ群7株、Ⅳ群1株、^{AF4Y}1株、^{A4FY}18、Ⅲ群10株、Ⅱ群1株、型別不能6株、^{AF4Y}20、Ⅲ群7株、Ⅰ群1株、型別不能4株、ロット不明、Ⅲ群2株、Ⅱ群1株、型別不能3株である。

第10表 供試菌のフェージ群による分類

供試菌数	フェージ群		Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	Ⅲ Ⅰ	Ⅱ Ⅲ	-	計
	ロット別									
74	AF4Y	02	0	0	1	0	0	0	0	1
	AF4Y	03	0	0	0	0	1	0	0	1
	AF4Y	07	0	0	7	0	0	0	0	7
	AF4Y	08	0	0	15	0	7	1	7	30
	AF4Y	18	0	0	10	0	1	0	6	17
	AF4Y	20	0	0	7	0	1	0	4	12
	不 明		0	0	2	0	1	0	3	6
合 計			0	0	42	0	11	1	20	74

2) 供試菌のフェージによる溶菌域 供試菌のフェージによる溶菌域の成績は第11表 (其の1), (其の2) に示してある。

第11表 供試菌の型別フェージによる溶菌域

(其の1)				(其の2)				
ロット別	菌株名	フェージ群	溶菌域	ロット別	菌株名	フェージ群	溶菌域	
AF4Y 03	1	Ⅲ	73	AF4Y 02	SN 43	Ⅲ	73	
	2	Ⅲ	73	"	44	Ⅲ. I	7/73/47/29	
	3	Ⅲ	73		23	Ⅲ	73	
	4	Ⅲ	73	24	Ⅲ	73		
	5	Ⅲ. I	73/29	25	Ⅲ	73		
	6	不能	—	26	Ⅲ	73		
	7	不能	—	27	Ⅲ	73		
	8	不能	—	28	Ⅲ	73		
AF4Y 18	1	Ⅲ	73	29	Ⅲ	73		
	2	Ⅲ	73	"	11	不能	—	
	3	Ⅲ. I	73/29+		13	Ⅲ	73	
	4	不能	—		14	Ⅲ	73	
	5	不能	—		15	Ⅲ	73	
	6	不能	—		16	Ⅲ. I	73/29	
	7	不能	—		17	Ⅲ. I	7/73/29+	
	8	不能	—		18	Ⅲ. I	73/29	
AF4Y 20	1	Ⅲ	73		19	Ⅲ	73	
	2	Ⅲ	73/77+	20	Ⅲ	73		
	3	Ⅲ	73/77+	21	不能	—		
	4	Ⅲ	73	22	Ⅲ. I	73/29		
	5	不能	—	30	Ⅲ. I	73/29		
	6	不能	—	32	Ⅲ	7/47/75/77		
	7	不能	—	33	Ⅲ. I	73/29+		
	8	不能	—	34	不能	—		
AF4Y 08	36	不能	—	35	Ⅲ	73		
	38	Ⅱ. Ⅲ	3B/7/73	"	"	"	"	
	39	Ⅲ	73					
	40	Ⅲ	73					
	41	Ⅲ	7/73/47/75/77					
	42	Ⅲ	7/47/75/77					
	"	1	Ⅲ. I					73/29+
		3	Ⅲ					73
		4	Ⅲ					73
		5	Ⅲ					73
6		Ⅲ	73					
7		Ⅲ	73					
8		不能	—					
9		Ⅲ	73					
10		Ⅲ	73/77					
"		45	Ⅲ	7/73/47/75/77				
	47	Ⅲ	73/77+					
	48	Ⅲ. I	73/29					
	49	Ⅲ	73/77					
不明	50	不能	—					
	51	不能	—					
	52	Ⅲ	73					
	53	Ⅲ. Ⅲ	73/29					
	54	Ⅲ	7/73/47/75/27					
	55	不能	—					

即ち各ロット共通のフェージは73で同じⅢ群に属するものでも、この他に73/77, 7/73/47/75/77等がある。ⅢI群に属するものは73/29, ⅢⅢ群に属するものは3B/7/73であつた。われわれが直接分離供試した菌株も都研より分与を受けた菌株も全く同様のフェージ群を示した。

3) フェージ群と抗生物質 (ペニシリン) 抵抗性 フェージ群と抗生物質 (ペニシリン) 抵抗性との関係についてその成績は第12表に示してある。即ちフェージにより型別され得る54株はペニシリンに対して5u/cc以上の抵抗性のも52株(96%)であるに反し、型別不能の20株は1u/cc以下が19株(95%)である。

第12表 フェージ群とペニシリン抵抗性

	濃度				
	菌株数	50 u/cc以上	10 u/cc	5 u/cc	1 u/cc以下
フェージにより型別可能	54	32	14	6	2
フェージにより型別不能	20	0	0	1	19

考 察

今回東京都内の小学校における学童給食において発生せる脱脂粉乳中毒事例に際し、その原因食と思われる脱脂粉乳を入手し原因菌と疑いのもてるブドウ球菌 24株を分離しそれに都研で同粉乳より分離したブドウ球菌 50株の分与を受け計 74 株につき詳細に細菌学的検索を試み次の如き考察を行った。

1) 検体脱脂粉乳の何れのロットからも溶血性ブドウ球菌が検出され、その菌数は 500 万~2000 万/g の多きに達し、殆んど純培養状に検出され、食中毒を起すに充分な毒素量が産生されたであろうことは想像するに難くない。その汚染機作は如何なる経過を経てなされたものか不明で想像も出来難いが、いずれにせよ最終製品の細菌検査が厳重に行われていたなら、現行の規則で充分事件を未然に防ぐことが出来たであろうことは断言出来る。又耐熱性において 80°C30 分で死滅しない菌株の認められること、又抗生物質（ペニシリン）に対して強い抵抗性を示す菌株が認められたことは、病原性²¹⁾ がこれらの点と平行していること及び、このような菌株が益々増加の一途⁵⁾をたどっている現状から汚染機作にいくぶんかの示唆を与えるものではなからうか。

2) 生物学的性状と動物試験成績をみるとわれわれの提唱している M. (C. N. H) 配列を検査することによりその可能性を充分探知出来ることが再確認出来た。この完全型のものが原因菌の 95% 以上を占めているが、約 5% 前後不完全型のものが包含されていたことは検査に当り、特に分離の際注意が肝要である。

このいわゆる完全型に包含されない不完全型のもので、エンテロトキシン陽性でその原因となり得る菌株が認められるとすれば極めて稀な例であろう。これらの性状を知るに便利な Staphylococcus Medium No. 110 を用いて検査を行えば（多少改良の余地がある）比較的容易に原因菌と思われる菌を釣菌出来る。

3) エンテロトキシン産生能の最終決定方法として仔ネコ、仔イヌを用いることに多少の疑問と不充分さを痛感するが人又は猿が容易に実験出来難い現今これらにより決定することは致し方ないことであろう。

4) 各種抗生物質に対する抵抗性はペニシリンに対しては標準の 500~1000 倍の抵抗性を示していたことは牛乳由来菌⁵⁾が他の食品由来菌より比較的高い抵抗性を示す菌株の多いこととあわせ考えると興味深い。他の抗生物質には標準と有意の差が認められない。

5) ブドウ球菌性食中毒原因菌の汚染源の追求方法としてフェージ型による方法が¹⁷⁻²³⁾ 23-27) 菌交替症、cross infection²²⁾ 等の感染源の追求等と共に盛んに用いられ、これによる分類が行われている。われわれもブドウ球菌フェージ研究会の一員として Williams より分与を受けたフェージを当研究室で増殖検定し、これを今回の原因菌の分類に応用してみると各ロット共 73 フェージに感受性を有し III 群に属するもので Williams, Jackson,¹⁹⁾ Elwood, Fugillo 等の成績と大体一致している。最初のロットから最後のロットまで約 3 週間以上もの日数があるにもかかわらず共通フェージに感受性をもつ菌により汚染されていたことは今後の問題として充分検討すべきである。しかし原因となつた脱脂粉乳由来菌のみで、その時の原料乳、その他従業員等の各種由来菌の検索が出来なかつたのでこの原因菌の汚染源の追求は出来ず想像も出来難い。フェージに対して型別不能の菌株はいずれもペニシリンに対して抵抗性が認められないか比較的弱い抵抗性株でペニシリン耐性菌は殆んど型別可能で III 群に属しているものであつたことは興味深い。²³⁾ いずれにせよブドウ球菌フェージについては研究会を中心に今後大いに検討されるであろう。

結 論

今回東京都内の小学校学童給食の際発生せる脱脂粉乳中毒事件に際し細菌学的検索の結果次の如く結論した。

原因脱脂粉乳からはそのいずれの検体からも黄色ブドウ球菌が 500~20,000 万以上検出され、しかも M. (C. N. H) 配列完全型で、フェージ型分類により III 型に属する 73 フェージに感受性を示すこれらブドウ球菌が何らかの条件下で菌の増殖が行われ、中毒を起し得るに足るエンテロトキシンの産生が行われ、これが本中毒例の原因と推察される。

この稿を終るに当り種々御指導御校閲をいただいた日本医大八田教授、予研福見部長に深甚なる謝意を表するとともに、菌株分与をいただいた都研春田技師並びにフェージに関し種々御指導御援助をいただいた予研細菌部の方々、家畜衛生試験場南本技官に感謝の意を捧げます。

文 献

- 1) 鈴木昭：国立衛生試験所報告，71，73~81（1953）

- 2) 鈴木昭: 国立衛生試験所報告, 71, 82~93 (1953)
- 3) 鈴木昭: 国立衛生試験所報告, 72, 199~203 (1954)
- 4) 八田貞義, 鈴木昭, 林富子: 国立衛生試験所報告, 72, 205~217 (1954)
- 5) 鈴木昭, 中野龍雄: 総合医学 7, (8), 33~35 (1950)
- 6) 鈴木昭: 獣医畜産新報, 115, 8~11 (1953)
- 7) 鈴木昭: 獣医畜産新報, 113, 553~555 (1953)
- 8) 尾藤行雄, 鈴木昭: 酪農事情, 10, 1~3 (1950)
- 9) 山田俊雄, 鈴木昭, 尾藤行雄: 酪農事情, 10, 14~16, (8), 18~20 (1950)
- 10) 八田貞義, 宮本晴夫, 大谷政衛, 依田源治, 鈴木昭: 食品衛生, 1, (3) 8~10 (1949)
- 11) 東京都衛生局報中毒特集報 (1956) 東京都衛生局.
- 12) Difco. Manual 9, p. 151~154 (1953)
- 13) 福見秀雄, 中谷林太郎, 小酒井望, 広明竹雄, 小張一峰, 渡辺昌子: 日本医事新報, No. 1513, 1958 (1953)
- 14) 八田貞義, 鈴木昭, 林富子, 西田正道: 食品衛生研究, 5, 1~9 (1955)
- 15) 福見秀雄: 臨床病理, 特集 (2)68~78 (1955)
- 16) Staphylococcus Reference Laboratory, Colindale, London, N.W, 9. よりのパンフレット (1956)
- 17) Fisk R. T.,: J. Inf. D., 71, 153~165. (1942)
- 18) John E. Blair, and Miriam Carr.,: J. Inf. D., 92, 1~13. (1953)
- 19) Jackson, G.G., Dowling, H.F. and Lepper, M.H.: J. Lab. Clin. Med., 44, 14~50 (1954)
- 20) Wollmark, G.,: Acta. Path. Mic. Scand., 34 (5) 497~508 (1954)
- 21) 八田貞義, 鈴木昭, 林富子, 西田正道: 第14回日本医学会総会, 衛生学会総会発表, 京都 (1955)
- 22) 長岐佐武郎, 阿部実, 齊藤誠, 石井慶蔵, 富岡一, 南沢康雄: 日本医事新報: (1584) 9~18 (1953)
- 23) Segalove. M.,: J. Inf. D., 81. 97~111 (1947)
- 24) Wilson, G.S., and Atkinson, J.D.,: Lancet 248, 647 (1945)
- 25) McClare, W.B. and Miller, A.M.,: Canad. M.A.J., 55, 36~39 (1946)
- 26) Tanner, F., and Tanner, L.,: Food-borne infections and intoxications. (1953)
- 27) Dack, G.M.,: Food poisoning. 2nd. Ed. (1952)

Summary

58 strains of *Micrococcus pyogenes* var *aureus* were isolated from 7 lots of skim milk, and their biological properties including enterotoxin production were tested.

All strains tested were shown to belong to the M (C. N. H.) system complete type, and to be positive to kitten test. The phage type belonged to the III Type. The count of these microorganisms in the skimmilk ranged from 5×10^6 to 2×10^7 per gram.

Received February 29, 1956.

陽性石鹼と各種消毒薬及び化学療法剤との併用効果について（第1報）

栗栖 弘光

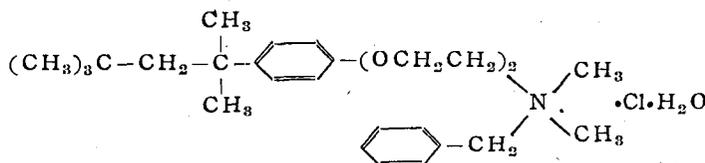
On the Joint Effect Benzethonium Chloride when Utilized
with Disinfectants, or Chemotherapeutic Agent, or Antibiotics. I.

Hiromitsu KURISU

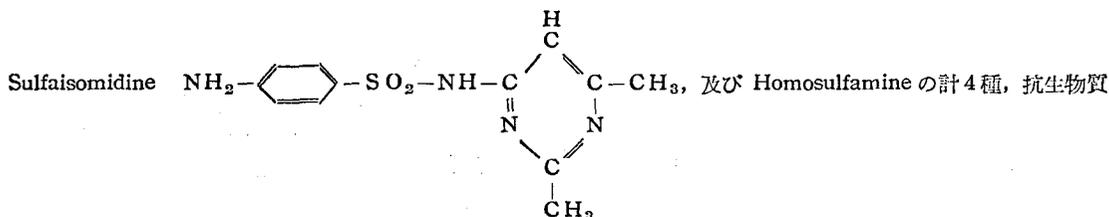
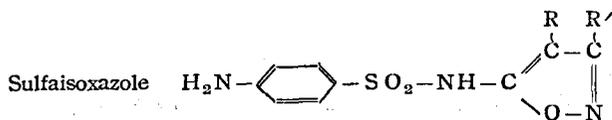
まえがき 近時陽性石鹼の消毒薬としての使用範囲がひろまるにつれて、陽性石鹼と各種薬剤とが併用して使用される機会が多くなってきたが、このうち陽性石鹼の化学的な面からの他種薬剤との併用の適否については、C.A. Lawrence¹⁾、その他の人々が広範囲の薬品について検討し、その適否を区分しているが著者は主に生物学的に殺菌及び発育抑制の面からみた各種薬剤との適合性について実験的に吟味し、相加並に拮抗現象の度合を実測してみたので以下この成績について報告する。

実験方法

1) 実験に使用した薬剤 実験に使用した薬剤は、陽性石鹼には Benzethonium chloride である Hyamine



を選び、消毒薬としては、Phenol, Cresol, Cresol 石鹼液, Methyl alcohol, Ethyl alcohol, Isopropyl alcohol (CH₃)₂CHOH. の計6種, Sulfonamide剤 (化学療法剤) としては, Sulfathiazol,



としては, Penicillin, Aureomycin, Streptomycin, の計3種である。

2) 化学 (定性) 試験 著者は Hyamine と他種薬剤との併用効果を生物学的に究明するまえに溶剤の状態を混溶した場合どのような化学反応を示すか、定性的に調べ以後の実験の参考とした。

Hyamine は 10% 溶液を母液として、これを基に所定の稀釈液を調整し、これに各試剤の所定稀釈液を等量注加し、十分、混和させたのち静置し、その後の性状の変化 (主に濁濁、着色、沈澱) を肉眼的に観察した、観察時間は反応直後と、室温 (10°C) に 48 時間放置の 2 回とし、各試剤の濃度は表に詳記せる如く、比較的高濃度を混溶した場合と、比較的低濃度を混溶した場合とに大別した。

3) 生物学的試験

1) 殺菌力試験の方法 試験方法は衛生検査指針の石炭酸係数測定法²⁾に準じて行なつた。即ち実験に使用した培地は消毒薬検査用ブイヨン培地 (ペプトン 10g, 肉エキス 5g, 塩化ナトリウム 5g, 蒸留水 1000cc, pH 6.8)

を使用した。

実験に使つた菌株は国立予防衛生研究所消毒薬検定室より分与された腸チフス菌で、このものの標準石炭酸に対する抵抗性は、石炭酸90倍液10cc中にチフス菌液(37°C24時間培養)1ccを加えて作用させると、石炭酸が菌に作用してから5分間ではまだ生存したが、10分間では死滅した。この供試菌は保存培地(ペプトン10g、肉エキス5g、塩化ナトリウム5g、寒天25g、蒸留水1000cc、pH7.2)に月2回以上継代してS型菌の保存に努めた。併用試験に使用した試剤はHyamineのほか石炭酸、Cresol、Cresol石鹼液、Methyl alcohol、Ethyl alcohol、Isopropyl alcohol、の計6種で、Hyamineは市販Hyamineの10%液を原液とし、所要の各種濃度液の2倍濃度の溶液をつくり、又、各試剤も所要の各種濃度液の2倍濃度の液をつくり、これらを各5cc宛、作用試験管に分注混和して所要の稀釈濃度液が得られるように調整した。

ii) 発育阻止試験の方法 Hyamine及びSulfonamide剤では、ブイオンを基体とする実験では、その抗菌作用が著しく減弱されるが、拮抗物質或は障害物質を含まない合成培地では、かかる障害作用は除かれ、適確な判定が得られるので、実験には合成培地を用い、HyamineとSulfonamide剤及びHyamineと抗生物質との併用効果を検べた。培地の組成は菌によつて幾分違ふが、磷酸塩、アンモニウム塩、塩化ナトリウム、ブドウ糖とそれに2.3のアミノ酸からなるもので、供試菌には、Aerobacter aerogenes(供試培地は、硫酸アンモニウム1.5g、第一磷酸カリウム1.0g、クエン酸ナトリウム2.5g、硫酸マグネシウム0.2g、蒸留水1.000cc、pH7.2)とS. typhimurium(供試培地は、硫酸アンモニウム5g、塩化ナトリウム0.5g、第一磷酸カリウム2g、ブドウ糖1g、蒸留水1000cc、pH7.0)とを選んだ。

いずれの実験の場合もHyamineの濃度は、10万、30万、50万、80万倍稀釈とし、これにSulfathiazol、Sulfaisoxazole、Sulfaisomidineでは 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 乗稀釈、Homosulfamineは 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 乗稀釈とし、各稀釈液ごとに組合せ液を作り、対照に各試剤だけを含む稀釈液を用いた。

抗生物質では表に詳記せるように試剤により組合せ濃度は異なるが、5千倍から500万倍濃度範囲とし、対照には前者同様各試剤だけを含む稀釈液を用いた。

菌の移植は合成培地に3代以上継代培養したものを生理食塩液で稀釈し、ピペットの0.1cc量(菌数5千~1万)とした。成績の判定は37°Cに培養して24時間ごとに168時間観察した。

試験結果

1) Hyamineと他種試剤とを併用したときの化学的变化 Hyamineと他種薬剤との併用効果を生物学的に究明する前にHyamineと他種試剤を混溶した場合にどのような化学的变化を示すか検べ、生物学的実験を試るときの参考とする一方、このとき示した化学的变化が殺菌効力にどのような影響を与えるか相関性を探るための資料とした。

第1表 Hyamineと各種試剤とを併用したときの化学変化

試 剤	試剤の稀 釈 濃 度 (倍)	Hyamine 稀釈濃度 (倍)			濁濁と色調 ※	沈澱の有無 ※※
		10	100	1000		
Phenol	10	卍	卍	+	白 濁	—
	100	—	—	—	—	—
Cresol	原 液	卍	卍	卍	白 濁	白色沈澱
	50	—	卍	+	白 濁	—
Saponated Cresol Solution	10	卍	卍	—	白 濁	—
	100	卍	+	—	白 濁	—
Acrinol	50	—	—	—	—	—
	1000	—	—	—	—	—
Mercury Bichloride	10	卍	卍	卍	白 濁	—
	1000	+	+	—	白 濁	—

試 剤	試剤の稀 釈 濃 度 (倍)	Hyamine 稀釈濃度 (倍)			濁濁と色調 ※	沈澱の有無 ※※
		10	100	1000		
Mercurochrome	20	卅	卅	—	桃赤濁色	—
	100	卅	卅	—	桃赤濁色	—
Merthiolate	100	卅	卅	+	白 濁	—
	1000	—	—	—	—	—
Methyl alcohol	99%	—	—	—	—	—
Ethyl alcohol	99%	—	—	—	—	—
Isopropyl alcohol	99%	—	—	—	—	—
Oxydol	30%	—	—	—	—	—
Iodine tincture	原 液	卅	卅	—	暗褐色濁濁	褐色沈澱
Hexachlorophene	1000	+	卅	±	白 濁	—
Hexylresorcinol	200	+	±	+	白 濁	—
	1000	—	—	—	—	—
Sulfathiazole	1000	—	—	—	—	—
Sulfaisoxazole	1000	—	—	—	—	—
Sulfaisomidine	1000	—	—	—	—	—
Homosulfamine	1000	—	—	—	—	—
Penicillin	10000u/cc	—	卅	+	白 濁	—
Aureomycin	1000	—	—	—	—	—
Streptomycin	1000	—	—	—	—	—
Trichomycin	1000	—	—	—	—	—

註：(1) 表中の(卅), (卅), (+), (±)は反応陽性でその強度を示す。(—)は反応陰性を示す。
 (2) ※印は作用直後の成績を示す。
 ※※印は作用48時間後の成績を示す。

この結果は第1表に示す如く、Hyamine と、Phenol では両者の濃度が比較的高濃度を組合せたときは、混溶後直ちに白濁したが、Phenol の濃度が100倍となると Hyamine は10%液と混溶しても著変を認めなかつた。Cresol 石鹼液とは Phenol の場合と同様濃度の濃淡により変化したが、Cresol 石鹼液が100倍の濃度では変化が認められず、Cresol 石鹼液では1000倍濃度にまで稀釈されると、肉眼的には変化を認めなかつた。

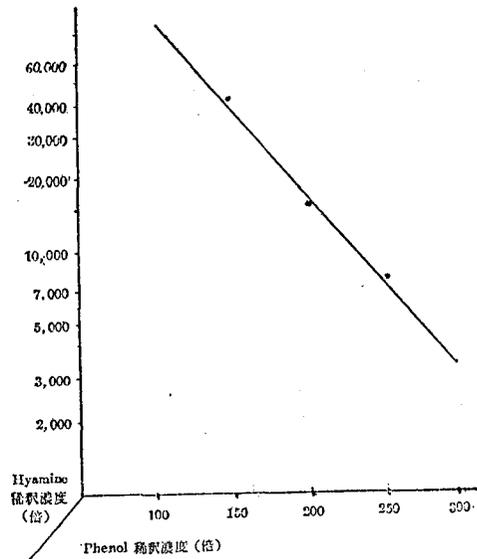
Methyl alcohol, Ethyl alcohol, Isopropyl alcohol 及び各種の Sulfonamide 剤, Aureomycin, Streptomycin などは高濃度溶液を組合せても何等の変化も認めなかつた。Penicillin は1万単位の時 Hyamine 1000倍液でもわずかに白濁した。しかし48時間後に沈澱を認めたのは Cresol と Iodine Tincture であつた。

2) Hyamine と消毒剤との併用効果 試剤中で Hyamine との間に相乗作用の認められたものは Phenol 及び Cresol であつた。今 Hyamine と Phenol を併用した場合について Hyamine の石炭酸係数の増減を比較して見ると、Phenol 150倍と Hyamine 45000倍とでは、Hyamine 単独ときの石炭酸係数(約39)の約12.8倍となり(第2表参照)、Phenol 200倍と Hyamine 16000倍とでは約5.5倍、Phenol 250倍と Hyamine 8000倍とでは約2.3倍といずれも上昇し、両者の併用は鮮明な相乗作用となつて現われ、注目された(第1図参照)。

第2表 Hyamine と Phenol とを併用した時の殺菌力

試劑 稀釈濃度		作用時間 (分)			
		2.5	5	10	15
Hyamine	2,500	-	-	-	-
	3,000	+	-	-	-
	3,500	+	+	-	-
	4,000	+	+	+	-
	4,500	+	+	+	+
Phenol	70	-	-	-	-
	80	+	-	-	-
	90	+	+	-	-
	100	+	+	+	-
	110	+	+	+	+
Hyamine 150× phenol	35,000	-	-	-	-
	40,000	+	-	-	-
	45,000	+	+	-	-
	50,000	+	+	+	-
	55,000	+	+	+	+
Standard phenol	90	+	+	-	-
	100	+	+	+	-

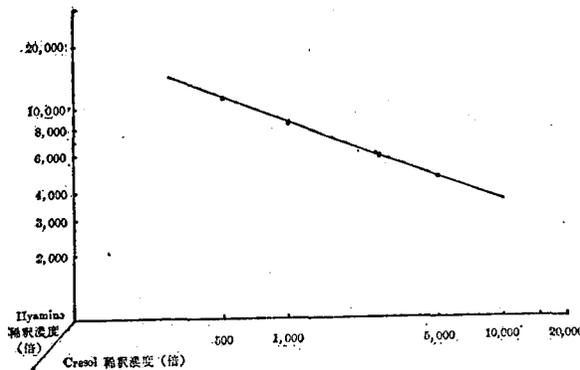
第1図 Hyamine と Phenol とを併用したときの相乗作用



陽性石鹼と Cresol との併用については Lawrence も特に障害はないと述べているが、著者の実験でも相加作用が認められた。即ち Cresol の 500 倍と Hyamine の 11000 倍と

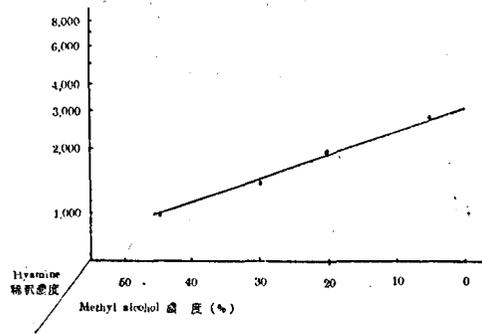
では、Hyamine 単独のときの石炭酸係数の約 3.1 倍となり Cresol の 1000 倍と Hyamine の 8500 倍では約 2.4 倍、Cresol の 5,000 倍と Hyamine の 4,600 倍とでは約 1.3 倍となり、いずれも相加作用が認められた(第2図参照)。

第2図 Hyamine と Cresol とを併用したときの相加作用



次に併用により拮抗現象を示したものは、Methyl alcohol, Ethyl alcohol, Isopropyl alcohol, Cresol 石鹼液であるが、Lawrence によると alcohol は Compatibility となつているが、Methyl alcohol と Hyamine とを併用した時には、Methyl alcohol と Hyamine との併用効果は 45% の Methyl alcohol と 1000 倍 Hyamine とでは単独の Hyamine と比較して石炭酸係数で約 0.28 倍、20% Methyl alcohol と 1,800 倍 Hyamine とでは約 0.51 倍と供試 alcohol 類中では最も強く拮抗した(第3図参照)。

第3図 Hyamine と methyl alcohol とを併用したときの拮抗作用

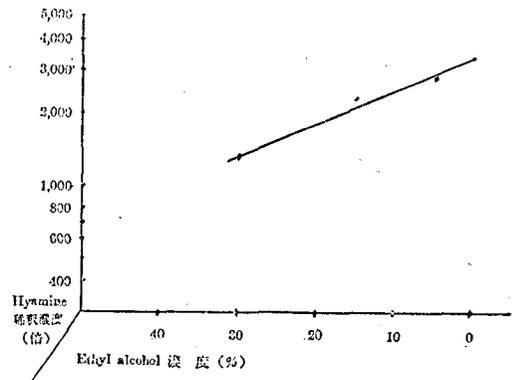


また 30% Ethyl alcohol と Hyamine 1,300 倍とでは, Hyamine の石炭酸係数の 0.37 倍となり, 15% Ethyl alcohol と Hyamine 2,200 倍とでは 0.62 倍に減弱し, 拮抗現象が認められた (第3表参照, 第4図参照).

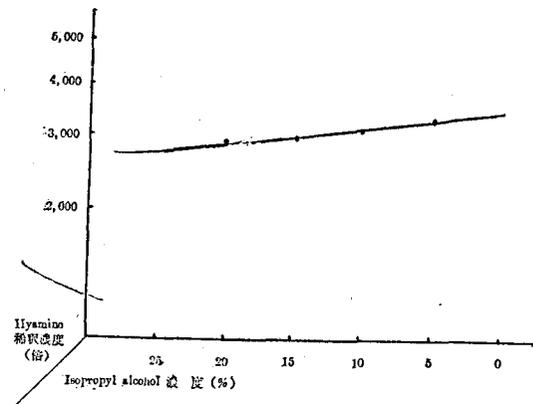
第3表 Hyamine と Ethyl alcohol とを併用したときの殺菌力

試劑 稀釈濃度	作用時間 (分)	作用時間 (分)			
		2.5	5	10	15
Hyamine	2,500	-	-	-	-
	3,000	+	-	-	-
	3,500	+	+	-	-
	4,000	+	+	+	-
	4,500	+	+	+	+
Ethyl alcohol	39%	-	-	-	-
	37%	+	-	-	-
	35%	+	+	-	-
	33%	+	+	+	-
	31%	+	+	+	+
Hyamine 30% Ethyl alcohol	900	-	-	-	-
	1,100	+	+	-	-
	1,300	+	+	-	-
	1,500	+	+	+	-
	1,700	+	+	+	+
Standard Phenol	90	+	+	-	-
	100	+	+	+	-

第4図 Hyamine と Ethyl alcohol とを併用したときの拮抗作用



第5図 Hyamine と Isopropyl alcohol とを併用したときの拮抗作用



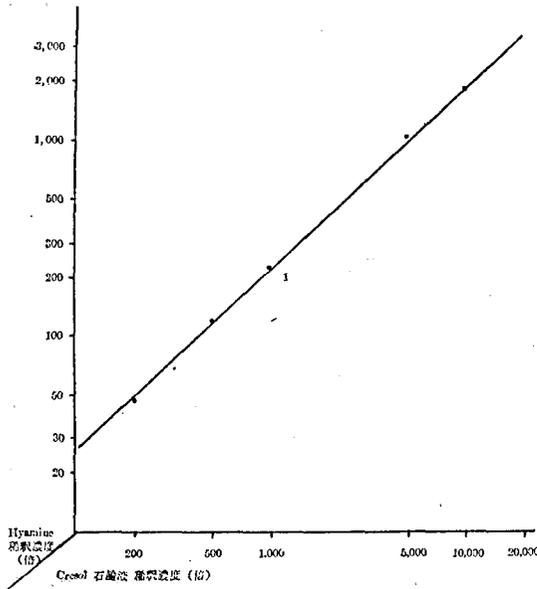
Isopropyl alcohol と Hyamine とでは, 20% Isopropyl alcohol と Hyamine 8,200 倍液と混合すると約 0.8 倍, 10% Isopropyl alcohol と Hyamine 3,100 倍液を混合すると約 0.88 倍と減弱し, 拮抗作用が見られた (第5図参照).

このように Hyamine と alcohol 類とは, 拮抗作用を示したが, この現象は Hyamine と alcohol 類の無効濃度 (Methyl alcohol では 50%以下, Ethyl alcohol では 35%以下, Isopropyl alcohol では 25%以下) と組合せた場合にのみ観察され, alcohol 類の濃度が有効濃度の場合には拮抗作用は見られず, alcohol 類の殺菌効果のみが認められた.

Cresol 石鹼液と Hyamine 液との併用は, Cresol 石鹼液に含まれる石鹼分が, 陰性の基として液中に存在

し、陽性の基を有する陽性石鹼とは拮抗作用をなすと考えられているが、著者の実験の結果も拮抗作用を示した即ち、200倍 Cresol 石鹼液と 50 倍 Hyamine 液とでは、Hyamine 単独の石炭酸係数に対して、約 0.014 倍と強い拮抗作用を示し、1000 倍 Cresol 石鹼液と Hyamine 230倍液とでは 0.065倍、10,000 倍 Cresol 石鹼液と Hyamine 1,800 倍液とでは 0.51 倍と共に強く拮抗することを示したが、Cresol 石鹼液が20,000 倍以上ではもはや拮抗作用は見られなくなった。(第6図参照)

第6図 Hyamine と Cresol 石鹼液とを併用したときの拮抗作用



結局 Hyamine は、Cresol 石鹼液及び alcohol 類と併用することにより生物学的には拮抗し、両者の殺菌力が減殺されるのは、注目すべき事柄であると考えられるが、この両者は、混合して放置しても化学的(肉眼的観察)には著変を認めることが出来なかつた。

3) Hyamine と Sulfonamide 剤及び抗生物質との併用効果 この成績は第4表その1及びその2に示す如く実験に選んだ4種の Sulfonamide 剤は供試菌として A.aerogenes 及び S.typhi murium を基に検べた時の成績によると、いずれも Hyamine との間に相加作用も拮抗作用もみられなかつた。

第4表 A. aerogenes に対する Hyamine とその1 Sulfonamide 剤との併用効果

試劑	S 剤 稀釈 濃度	Hyamine 稀釈濃度				
		100	300	500	800	対照
Sulfa-thiazole	10 ⁻⁴	—	—	—	—	—
	10 ⁻⁵	—	—	—	—	—
	10 ⁻⁶	—	—	—	—	—
	10 ⁻⁷	—	—	—	—	—
Sulfa-i-fiazole	10 ⁻⁴	—	—	—	—	—
	10 ⁻⁵	—	—	—	—	—
	10 ⁻⁶	—	—	—	—	—
	10 ⁻⁷	—	—	—	—	—
Sulfa-i-oxazole	10 ⁻⁴	—	—	—	—	—
	10 ⁻⁵	—	—	—	—	—
	10 ⁻⁶	—	—	—	—	—
	10 ⁻⁷	—	—	—	—	—
Homosuifamizine	10 ⁻⁴	—	—	—	—	—
	10 ⁻⁵	—	—	—	—	—
	10 ⁻⁶	—	—	—	—	—
	10 ⁻⁷	—	—	—	—	—
Homosuifamizine	10 ⁻²	—	—	—	—	—
	10 ⁻³	—	—	—	—	—
	10 ⁻⁴	—	—	—	—	—
	10 ⁻⁵	—	—	—	—	—
対照 (Hyamine)		—	—	—	—	—

第4表 S.typhi murium に対する Hyamine とその2 と Sulfonamide 剤との併用効果

試劑	S 剤 稀釈 濃度	Hyamine 稀釈濃度				
		100	300	500	800	対照
Sulfa-thiazole	10 ⁻⁴	—	—	—	—	—
	10 ⁻⁵	—	—	—	—	—
	10 ⁻⁶	—	—	—	—	—
	10 ⁻⁷	—	—	—	—	—
Sulfa-i-oxazole	10 ⁻⁴	—	—	—	—	—
	10 ⁻⁵	—	—	—	—	—
	10 ⁻⁶	—	—	—	—	—
	10 ⁻⁷	—	—	—	—	—
Homosuifamizine	10 ⁻⁴	—	—	—	—	—
	10 ⁻⁵	—	—	—	—	—
	10 ⁻⁶	—	—	—	—	—
	10 ⁻⁷	—	—	—	—	—
Homosuifamizine	10 ⁻²	—	—	—	—	—
	10 ⁻³	—	—	—	—	—
	10 ⁻⁴	—	—	—	—	—
	10 ⁻⁵	—	—	—	—	—
対照 (Hyamine)		—	—	—	—	—

註: (1)(#)は、菌発育を(—)は、菌発育せざるを示す以下の表もこれに準ず。

(2)Hyamine 稀釈濃度(N)にのみ1000倍するものとす

註 Hyamine 稀釈濃度(N)にのみ1000倍するものとす

Hyamine と抗生物質とは、同一抗生物質も供試菌種によつては、相加作用を観察することが出来た。即ち、Streptomycin は *A. aerogenes* に対して、streptomycin が 100 万倍のとき Hyamine は 50 万倍迄阻止し、Streptomycin が 500 万倍のとき Hyamine は 30 万倍迄発育抑制を示し、両者の最高併用濃度は単独のときの値に較べると、Streptomycin では 10 倍、Hyamine は 5 倍上昇した。又 Aureomycin が 100 万倍のとき Hyamine は 50 万倍迄発育を阻止し、Aureomycin が 500 万倍では Hyamine は 30 万倍まで発育を阻止し、結局両者の最高併用濃度は単独のときの値に較べると、Aureomycin は約 6.2 倍、Hyamine では 5 倍上昇し注目された（第 5 表その 1 参照）。

Penicillin では明らかな併用効果はみられず、また拮抗作用も現われなかつた。

S. typhi murium ではいずれの抗生物質も著変は見られず、相加、拮抗作用は共に認められなかつた（第 5 表その 2 参照）。

第 5 表 その 1 *A. aerogenes* に対する Hyamine と各種抗生物質との併用効果

第 5 表 その 2 *S. typhi murium* に対する Hyamine と各種抗生物質との併用効果

N × 1000							N × 1000						
試劑	抗生物質 濃度	Hyamine 稀釈倍数					試劑	抗生物質 濃度	Hyamine 稀釈倍数				
		100	300	500	800	対照			100	300	500	800	対照
Penicillin	5	—	—	##	##	##	Penicillin	10	—	—	—	—	—
	8	—	—	##	##	##		50	—	—	—	—	—
	10	—	—	##	##	##		100	—	##	##	##	##
	50	—	—	##	##	##		500	—	##	##	##	##
Streptomycin	100	—	—	—	—	—	Streptomycin	5	—	##	##	##	##
	500	—	—	—	—	—		8	—	##	##	##	##
	1,000	—	—	—	##	##		10	—	##	##	##	##
	5,000	—	—	##	##	##		50	—	##	##	##	##
Aureomycin	800	—	—	—	—	—	Aureomycin	80	—	##	##	##	##
	1,000	—	—	—	##	##		100	—	##	##	##	##
	3,000	—	—	##	##	##		300	—	##	##	##	##
	5,000	—	—	##	##	##		500	—	##	##	##	##
対 照 (Hyamine)		—	##	##	##		対 照 (Hyamine)		—	##	##	##	

考 察

陽性石鹼の化学構造とその殺菌力との関係については既に内外に多数の報告^{(3)~(9)}があり、陽性石鹼の殺菌力に最も大きな影響を与えるのはその長鎖アルキル基の炭素数といわれる。この化合物は一般細菌 (gram 陽性及び陰性菌)、糸状菌、原虫類など広い範囲の微生物の発育を強力に抑制するが、他の多くの消毒剤と異なり、単に殺菌作用を呈するのみならず、良好な表面活性能や、清浄作用などの利点を有しており、一般消毒薬の分野では重要な位置を確保しつつある。

最近では陽性石鹼の臨床範囲も著しく広まり、これにつれて他種薬剤と併用する機会も繁しくなり、この殺菌機作及び併用機構についての慎重な考察が望まれる殺菌機作については、Huogerheide⁽¹⁰⁾ は Cetyltrimethylammoniumbromid で研究し、陽性石鹼はまず菌体に接触し、ついで透過すると述べ、Milter らは陽性石鹼を薄い被膜とし菌に作用させると薄膜の内側は殺菌力が低いが、外側は高く、これは陽性石鹼の分子の排列が外層に Lipophilgroup が、内側に Hydrophil group が配置されるためと結論した。宮脇⁽¹¹⁾、手塚⁽¹²⁾ からもこれを確認しこの吸着現象は始め菌の周囲に陽性石鹼の分子が配置される程度となり次に相当強固に吸着し、透過殺菌するといつており、この殺菌機作についてはかなりつき進んだ実験がなされている。

陽性石鹼と他種薬剤との併用についての生物学的な面からの実験はほとんど見当たらないので著者はこの点

の解明に努め、特に薬剤併用時の殺菌力の変化について吟味し、この併用機作についての考察は次回に譲ることとした。

陽性石鹼は化学的性状に特徴があるため、配合については特に注意が払われ、Lawrence¹⁾は Compatibilities 42種、Incompatibilities 29種を具体的に指摘しているが、その濃度、並びに殺菌状態については明解でない。そこで著者は試剤ごとに Hyamine と組合せたときの化学的変化について眼的肉に検べたが、Hyamine と配合しても著変を認めなかつたのは、alcohol 類、Sulfonamide 剤、及び大部分の抗生物質の場合で、その他の試剤では配合と同時に濁濁した。しかし両者の濃度を減じてゆくと特定濃度以下では何等の変化も認めなくなつた。

消毒剤との併用では、Phenol 及び Cresol とでは鮮明な相加作用が認められ、単独のときの 3.1~12.8 倍上昇した。ところが alcohol 類、及び Cresol 石鹼液では単独のときの 0.01 倍も減弱している。alcohol 類とは有効濃度域の Hyamine と無効濃度域の alcohol とを組合すと顕著な障害作用がみられ、その拮抗度は、Isopropyl alcohol < Methyl alcohol < Ethyl alcohol の順に強まつた。しかし alcohol 類の濃度が有効域であればたとえ Hyamine 濃度が無効域、或は有効域であつても拮抗作用は見られず、また相加作用も現われず興味深い。

各種の Sulfonamide 剤及び抗生物質と併用効果を、A. aerogenes, S. typhi murium について検べたところ Streptomycin 及び Aureomycin では供試菌に A. aerogenes を選んだときには最高併用濃度は単独のときの値に較べると、Streptomycin では 10倍、Hyamine は 5倍上昇し、Aureomycin とでは、Aureomycin は 6.2倍 Hyamine は 5倍上昇し注目された。著者は主に in vitro に於ける併用効果について今日迄の成績について述べたが、この併用機序及び有機物の併用効果におよぼす影響などについては目下実験中であり後日報告する。

終りに臨み終始御懇篤なる御指導及び御校閲を賜はつた恩師八田貞義博士に深甚なる敬意を表します。又種々実験を御支援下された岩原、青山両博士、宮沢技官及び国立予防衛生研究所藤本、中野技官及び貴重な試料を提供して下さいました逆性石鹼協会に対し厚く御礼申し上げます。

む す び

著者は陽性石鹼として Hyamine を選び、消毒薬として Phenol 等 6種類、化学療法剤として Sulfathiazole 等 4種類、抗生物質として Penicillin 等 3種類を選んで Hyamine と各種薬剤との併用効果を生物学的に究明したが、この際 Hyamine と他種薬剤とを混溶した場合に起きる化学的変化を定性的に検べこの時の成績と生物学的試験として殺菌力試験及び発育阻止試験の結果を示す併用効果との相関性について考察して見た。

1) Hyamine と各種試剤とを混溶した場合その時の濃度が高濃度の場合には大部分の試剤では混溶と同時に白濁又は沈澱を生じたが、Methyl alcohol, Ethyl alcohol, Isopropyl alcohol, 及び各 Sulfonamide 剤, Aureomycin Streptomycin 等では何等の変化を認めなかつた。しかし著変を示した薬剤でもその濃度が薄まると終に変化を見なくなつた。

2) 殺菌力試験の結果、Hyamine は Phenol 及び Cresol とは相加作用が鮮明に観察されたが、Cresol 石鹼液とではむしろ拮抗的に作用し、Methyl alcohol, Ethyl alcohol, Isopropyl alcohol 類とは、これらの濃度を無効域とし Hyamine 濃度を有効域としたものを組合せた場合には強力な拮抗作用を示したが、alcohol 類の濃度が有効域の場合には拮抗作用も、相加作用も認めなかつた。この両者は併用しても肉眼的には変化はみられないが、生物学的には殺菌力に影響がみられたといえる。

3) 発育阻止試験による併用効果は、供試菌を A. aerogenes にした場合には Streptomycin 及び Aureomycin では良好な相加作用が見られたが、Penicillin では併用効果も拮抗作用も認められなかつた。供試菌が S. typhi murium に変えた場合にはいずれの試剤も相加或は拮抗作用は認められなかつた。

文 献

- 1) Lawrence, C.A. : Quaternary Ammonium Germicides, Academic Press, (1950).
- 2) 衛生検査指針 I, 細菌. 血清学的検査指針 (II) (増補及び改訂), 協同医書出版社, (1952).
- 3) Jacobs, W.A., Heidelberger, M., and Bull, C.G. : J. Exptl. Med., 23 577 (1916).
- 4) Hartman, M., and K'gi, H. : Z. Angew. Chem., 41, 127 (1928).
- 5) Domagk, G. : Deut. Med. Wochschr., 61, 829 (1935).
- 6) 田中 : 日本薬学雑誌, 62, 134 (1942).

- 7) 田中：日本薬学雑誌，64，35 (1944).
- 8) 山本，佐久間，山口：日本薬学雑誌，64，214 (1944).
- 9) 住木，山本，中山：学術月報別冊資料，10 (1952).
- 10) Huogerheide. J.C. : J.Bact., 49, 277 (1945).
- 11) 宮脇：実験医学，18，992 (1934).
- 12) 手塚：実験医学，21，705 (1937).

Summary

The author tried biological experiments to observe the effect of Benzethonium Chloride when utilized jointly with six kinds of disinfectants, or four kinds of Sulfonamides, or three kinds of Antibiotics.

As the result, it was proved that Benzethonium Chloride showed Synergistic Action when Jointly used with Phenol, or Cresol, or Streptomycin, or Aureomycin in the sterilization test. However, Benzethonium Chloride competed with Liquor Cresol Saponatus and three kinds of Alcohols.

Benzethonium Chloride and sulfonamides, when *A. aerogenes* for was used test strain, caused Synergistic action.

Penicillin did not show any change at all.

Received February 29, 1956.

Candida 症の化学療法に関する実験的研究 (第1報)

特に抗生物質及び Vitamin 類の発症機転に及ぼす影響

宮 沢 文 雄

Experimental Study on Chemotherapy of Candidiasis. I.

Especially Influences of Antibiotics and Vitamins upon Candida Infection.

Fumio MIYAZAWA

まえがき Candida 属真菌特に *Candida albicans* によつて惹起される真菌症は、1839年 Langenbeck の報告した所謂鵝口瘡に始まり、1905年 Castellani が内科領域において肺気管支 *Monilia* 症を報告後各医学領域にわたつて *Monilia* 症或は *Candida* 症として記載され又注目されてきたが、特に近年抗生物質の発達にともないこれらの長期連続投与の結果更に *Candida* 症を跳梁せしめている事は否定出来ない。しかしながら *Candida* 属真菌は健康人の口腔、腸、皮膚、上気道、膣等外界に接する殆んどあらゆる部位に常在するため、その発症機転については多方面から論じられなければならない。

著者は抗生物質に対する *Candida* 属真菌の態度のみならず、生体側及び菌自体の立場からもその感染機転について追求してみたので以下その成績について報告する。

口腔内 *Candida* 属真菌の検索 *Candida albicans* (以下 *C. albicans* と略す) による *Candida* 症 (以下 *C.* 症と略す) が内科的に肺臓、腎臓、脾臓、腸或は全身性 *C.* 症として多数報告されているが²⁾⁻⁹⁾、又抗生物質投与により口内炎及びその *C.* 症を誘発せしめた報告も少くない¹⁰⁾⁻¹²⁾。著者はまず 200 名の健康人について口腔内 *Candida* 属 (以下 *C.* 属と略す) の分布を検索して、口腔 *C.* 症の感受性を追求してみた。

試験の方法 滅菌ガーゼで口腔内全面を強く拭き採り、醋酸鉛、テルル酸カリ加サブローブドウ糖ブイヨン¹³⁾ (サブローブドウ糖ブイヨン 100.0cc, 1%テルル酸カリ水性懸濁液 4.0cc, 5%醋酸鉛水溶液 2.0cc) に入れ、37°, 24 時間培養増菌後 Littman 寒天培地 (Bacto-peptone, 10g. Bacto-Oxgall, 15g. Bacto-Agar, 20. gBacto Crystal violet 0.01g. 蒸留水 1000.0cc Streptomycin 3000 units) 及び醋酸鉛、テルル酸カリ、加サブローブドウ糖寒天培地 (前記培地に 10%亜硫酸ソーダ水溶液 1.0~1.5 cc, 寒天 3.0g を加えたもの) を用いて分離培養し、サブロー斜面寒天培地に保存した。又この際分離された菌株を Dubos の Differential diagnose of species of *Candida* をもとにその生物学的性状にて分類をおこなつた。

試験の成績 荻茂¹⁵⁾ は喀痰中より細谷等¹⁶⁾ は膣分泌液中より *C. albicans* とともに *C. tropicalis*, *C. parakrusei* 等も多数分離されたことを報告している。著者が口腔内からの *C.* 属真菌の検出状態について検べたときの成績によると、健康人 200 名中 65 名 (32.5%) から分離され、主に生物学的性状をもとに分類すると第 1 表に示すように *C. albicans* が検出菌の過半数である 61.6% に達し主位を示した。

第 1 表 口腔内検出 *Candida* 属真菌の種類

菌 種 名	分離菌株数	比 率 (%)
<i>Candida albicans</i>	40	61.6
" <i>tropicalis</i> .	6	9.2
" <i>parakrusei</i>	3	4.6
" <i>stellatoidea</i>	2	3.1
不 明	14	21.5
計	65	100.0

C. 属に対する各種抗生物質の影響

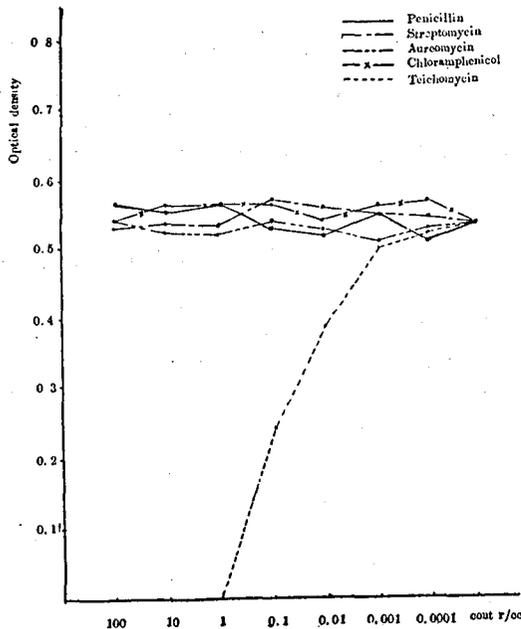
i) in vitro の実験 *C.* 症の発症機転については従来多数の説がなされているが、特に Campbell 等¹⁷⁾, Pap-

penfort 等¹⁵⁾, Moore¹⁹⁾, 美甘等²⁰⁾, 上塚等²¹⁾は Penicillin, Streptomycin, Aureomycin, Chloramphenicol (以下 Pc, SM, AM 及び CP と略す) 等の抗生物質が直接的に *C. albicans* の発育を促進すると報告している。著者は, *C. albicans* のみならず, *C. tropicalis*, *C. guilliermondi*, *C. krusei*, *C. parokrusei*, *C. pseudotropicalis*, *C. stellatoidea* の7種の菌についてその発育に及ぼす抗生物質の影響を検べた。

試験方法 あらかじめ2%ブドウ糖加サブローイオンに, Pc, SM, AM 及び CF を 0,0001 γ 乃至 100 γ /cc 迄教段階に分けて調製し, 上記各菌株を移植し, 37°, 24 時間培養後の Optical density を光電比色計にて測定した。なお近年抗真菌剤として注目されつつある Trichomycin (以下 Tm と略す) についても実験を試みた。又対照には抗生物質を含まないものを用いた。

試験成績 抗生物質の *C. 属* 真菌に対する発育促進, 或は抑制作用を論ずるには, 生体内血中濃度を考慮にいれ

第1図 *C. albicans* の発育に及ぼす各種抗生物質の影響 (培養24時間)



なければならぬが, これに大きく幅をとつて観察すると第1図に示すように *C. albicans* に対し Pc, SM, AM 及び CP 等はいずれも発育促進及び抑制作用は認められなかつた。又その他の供試菌に対しても同様の結果を示した。しかし Tm は 1 γ /cc でいずれの菌株に対しても完全にその発育を抑制した

ii) *in vivo* の実験 Foley 等²⁹⁾ は *C. albicans* を孵化鶏卵尿膜腔内に接種すると同時に Pc を注射するとその毒性が強まり死亡率を高めることから抗生物質の直接発育促進作用を支持しており, 又 Seligmann²⁹⁾ 美甘等³²⁾ は AM が, 堂野前³⁰⁾ は Tetracycline 系抗生物質が, 阿多²⁶⁾ は AM 及び SM がそれぞれ *C. albicans* をマウスの腹腔内若しくは経口感染をさせると, その敗血症死を促進するという。又田中³¹⁾ は眼科領域に於て人体実験の結果 Terramycin は眼瞼炎の治療を遅延すると述べている。そこで著者は Pc, SM, AM の影響を *C. albicans* のマウスに対する感染実験をもつて検べた。

試験方法 供試動物としては TD 系健常マウス(12-15g) 6 匹を1群とし, 予め Pc では 0.1mg/10g 量

を, SM では 0.025mg/10g を筋肉内投与し, AM では 0.2mg/10g を経口投与し, その後直ちに生理食塩浮游液とした *C. albicans* の 1mg 量を腹腔内に接種し, 15日間観察して, その敗血症死の状態を検べた。なお対照群には生理食塩液 0.2cc 量を筋肉内投与して観察した。

試験成績 SM 及び AM 投与群では対照群に比較してややその死亡率が高まるようであつたが, Pc 投与群では殆んど有意の差は認められなかつた。即ち第2表に示すように SM 投与群は最も死亡率高く4日目より死亡し始め, 15日目には84%に及んだ。次いで AM 投与群は3日目より死亡し, 15日目には67%を示し, *in vitro* では何ら影響を及ぼさなかつた SM 及び AM も *in vivo* ではその感受性を高める成績を得た。しかし Pc 投与群は9日目より, 又対照群では7日目より死亡し始め, 15日目には両者とも33%の死亡率を示した。

第2表 マウスの *Candida albicans* 感染に対する抗生物質の影響

抗生物質	投与方法	投与量 (mg/10g)	死亡マウス		
			死亡開始日数	死亡数 (15日目)	死亡率 (%)
Penicillin	筋肉注射	0.1	9日目	2/6	33
Streptomycin	筋肉注射	0.025	4日目	5/6	84
Aureomycin	経口投与	0.2	3日目	4/6	67
対照 (生理食塩液)	筋肉注射	0.2	7日目	2/6	33

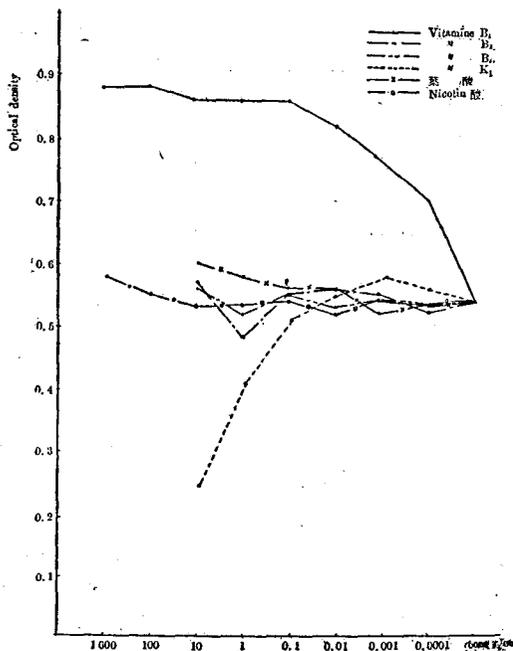
註: 表中死亡数の分母は動物数, 分子はその死亡数を示す。

C. 属に対する各種 Vitamin の影響

i) in vitro の実験 Harris¹¹⁾, Brown¹²⁾ は AM 経口投与により, 美甘³²⁾ は SM 注射により Vitamin (以下 V. と略す) 欠乏性の口内炎が誘発されたと報告している。又 Ellinger 等³³⁾ は Pc 経口投与で Nicotin amid の欠乏症状をみとめ, これが Pc 投与の中止と Nicotin 酸の投与で治癒したと述べているが, いずれにしても抗生物質を投与することにより生体の V. は著しい影響を受け, このため C. albicans の感受性が高まるとも考えられるので, 著者は各種の V. が C. 属に対して如何なる影響を与えるか先ず in vitro で実験をおこなつてみた。

試験の方法 供試薬として V. B₁, B₂, B₆, K₃ 及び Nicotin 酸, 葉酸等を 2%ブドウ糖加サッロー培地で 0.0001r 乃至 1000r/cc 迄数段階に分けて調製し, 100° で 20 分づつ間歇滅菌したのち, 前述の 7 菌株を移植し, 37° に培養した。判定は 24 時間及び 48 時間培養後光電比色計で菌の発育状態を測定した。

第2図 C. albicans の発育に及ぼす各種 Vitamin の影響 (培養24時間)



試験成績 V. B₁ は C. albicans, C. krusei, C. stellatoidea の発育には促進的に作用したが, C. guilliermondi, C. tropicalis, C. parakrusei, C. pseudotropicalis の発育には促進的にも, 抑制的にも作用しなかつた。V. B₂ は C. krusei の発育をやや促進したが, その他の菌種に対する影響は全く認められず, 又 V. B₆, 葉酸, Nicotin 酸はいずれの供試菌に対してもなんの影響をも及ぼさなかつた。又従来臨床的には血液凝固 V. として, 又抗菌スペクトルから衛生学的には防腐剤として応用されてきた V. K₃^{34) 35)} は, C. 属に対しても比較的強い抗菌性を示した。即ち 1r/cc よりその濃度を増すにつれて, その発育抑制力は増強した。

(V. B₂, K₃, 葉酸は 100r/cc 以上の濃度になると黄色を呈し, その測定に誤差を生じるので省略した。)(第2図参照)

ii) in vivo の実験 マウスに対する C. albicans の感受性について樋口等³⁶⁾ は V. B₁ 欠乏食で飼育した場合, 又堂野前³⁰⁾ は Oxythiamine をマウスに連続投与して V. B₁ 欠乏症を起させた場合に, その感染に対する抵抗力が減弱することを見出したが阿多²⁸⁾ は V. B₁ 欠乏飼料及び強力メタボリン等を用いて V. B₁ の欠乏は逆にその抵抗力を増すと述べている。著者は C. albicans のマウスに対する感染に, V. B₁, B₂ がどのように影響をするか, TD 系マウスを用いて実験的に検討した。

a) V. B₁ の影響

試験の方法 実験には純系 (TD 系) マウスを用い, 予め普通食 (碎麦及び野菜) で一定日間飼育し, 健常な発育のみられたマウス 6 匹を 1 群とし, これらに V. B₁ を体重 10g に対して 10r, 50r, 100r を投与した。実験群では V. 投与直後に C. albicans の 1mg 量を腹腔内に接種し, その後 15 日間連日 V. B₁ の所定量を背部に皮下注射し, その生存状態を観察した。なおこの際の対照群としては生理食塩水を投与した。

試験成績 Morris³⁷⁾ に依ればマウスの V. B₁ 所要量は 1 日当り 10r 程度といわれるが, その所要量程度の 10r/10g 投与群は対照群に比較してやや生存日数は延長され, その死亡率も低いようである。これに反し所要量以上の 50r 及び 100r/10g 投与群では明らかにその生存日数は短縮され, 又 100r/10g 投与群では死亡率の上昇がみられた。即ち対照群では死亡開始は 8 日目より, 又 15 日目の死亡率は 50% を示すのに対し 10r/10g 投与群は菌接種後 11 日目より, 50r 及び 100r/10g 投与群は 3 日目より死亡し始め, その死亡率も 33%, 50%, 83% となつている。

(第3表参照)

第3表 マウスの *Candida albicans* 感染に及ぼす Vitamin B₁ の影響

投与量 (r/10g)	死亡マウス		
	死亡開始日数	死亡数(15日目)	死亡率 (%)
10	11日目	2/6	33
50	3日目	3/6	50
100	3日目	5/6	84
対 照	8日目	3/6	50

注：表中死亡数の分母は動物数，分子はその死亡数を示す。

b) V.B₂ の影響

試験方法 試験の方法は V.B₁ の場合と同様であるが，V.B₂ の投与量は，体重 10g 当り 4r, 20r, 及び 40r に分けた。

試験成績 実験の成績は第4表に示す如く V.B₂ 投与群は，いずれも *C. albicans* の感染に抵抗性を強めた。即ち対照群に比較して1乃至4日の死期延長がみられ，又その死亡率も対照群 50% に対して 4r 及び 40r/10g 投与群では，いずれも 33%，20r/10g 投与群では 17% と低い値を示した。

第4表 マウスの *Candida albicans* 感染に及ぼす Vitamin B₂ の影響

投与量 (r/10g)	死亡マウス		
	死亡開始日数	死亡数(15日目)	死亡率 (%)
4	9日目	2/6	33
20	12日目	1/6	17
40	10日目	2/6	33
対 照	8日目	3/6	50

注：表中死亡数の分母は動物数，分子はその死亡数を示す。

iii) *C. albicans* の毒力に及ぼす V.B₁ の影響 V.B₁ は in vitro にて *C. albicans* の発育を促進し，in vivo にてその感染性を増大するので著者は V.B₁ と *C. albicans* とを in vitro で共存させた場合，その毒力にどのような影響を与えるか追求してみた。

試験方法 先に著者が正常健康人の口腔より分離同定した *C. albicans* の 5 菌株を選び，あらかじめ V.B₁，1 mg/cc を含む 2% ブドウ糖加サbroブイヨンに 10 代継代培養後，その菌 1mg を健常 TD 系マウス (体重 12~15g) の腹腔内に接種した。対照群としては V.B₁ を含有しない培地で培養した菌を同様に接種した。

試験成績 使用した 5 菌株のうち，4 菌株はその毒性が弱く，マウスの死亡率も少い，又 V.B₁ 含有培地に継代してもその毒性に明らかな相違がみられなかつたが，1 菌株 (No. 1) は菌接種後 15 日間の観察にて，その死亡率は V.B₁ を含有しない培地で培養したもの 40%，含有する培地に継代したもの 80% を示し，菌株によつて差異があるが，V.B₁ は菌の毒性を増加する様に思えた。(第5表参照)

第5表 口腔内より分離した *Candida albicans* の Vitamin B₁ 含有培地継代による毒性

菌種番号	Vitamin B ₁ 含有培地継代の有無	死亡マウス		
		死亡開始日数	死亡数(15日目)	死亡率 (%)
1	継代	3日目	8/10	80
	無継代	5日目	4/10	40
2	継代	7日目	1/10	10
	無継代	10日目	1/10	10
3	継代	9日目	0/10	0
	無継代		1/10	10
4	継代		0/10	0
	無継代		0/10	0
5	継代		0/10	0
	無継代		0/10	0

注：Vitamin B₁ 含有培地には10代継代した。表中死亡数の分母は動物数，分子はその死亡数を示す。

C. albicans の形態と毒力との関係

C. albicans は分類学上、糸状菌と酵母菌との中間に相当するが、その環境に応じて二つの形をとる。著者はウサギ血清中では *C. albicans* が仮性菌糸を出した糸状菌様形態をとり、サブロー寒天培地中では所謂酵母菌様形態をとるとの知見を得たので、この発育形態と毒力との関係をマウスを用いて実験した。

試験方法 あらかじめ、Seitz 濾過滅菌をしたウサギ血清に *C. albicans* を移植し、37°、48 時間培養後鏡検により糸状菌様形態を有することを確かめたのち、遠心分離して菌を集め、これを生理食塩液にて洗滌後その 1mg (湿菌量) をマウスの腹腔内に接種した。又サブロー寒天培地で培養した酵母菌様形態の *C. albicans* も同様に生理食塩液にて処理し、その 1mg (湿菌量) をマウスの腹腔内に接種した。観察期間は、いずれも 15 日とし、その生存状態を検べた。

試験成績 糸状菌様形態の *C. albicans* は酵母菌様形態のそれに比較して、明らかにその毒力は強く、このためマウスの生存日数は短縮し、又死亡率は高まつた。その成績は第 6 表に示すように、糸状菌様形態の *C. albicans* では菌接種後 3 日目より死亡し、その死亡率は 15 日観察で 90% に及んだ。これに反し酵母菌様形態では菌接種後 8 日目より死亡し、その死亡率も 40% であつた。

第 6 表 *Candida albicans* の形態による毒性の比較

菌の形態	死 亡 マ ウ ス		
	死亡開始日数	死亡数(15日目)	死亡率 (%)
糸状菌様形態	3日目	9/10	90
酵母菌様形態	8日目	4/10	40

註：表中死亡数の分母は動物数、分子はその死亡数を示す。

総 括

近年における抗生物質の発展は細菌性疾患の治療分野に著しい貢献をきたしたが、その臨床効果の上昇に伴つて新たに大きな課題が提起された。このうち特に注目されるものに①は菌の抗生物質に対する耐性獲得の問題で②は抗生物質特に生体の Pc に対する過敏症問題で、③は所謂 Broad spectrum antibiotics の使用によつて感受性のある細菌が消失し、それに代つて非感受性の菌が増殖して来る交代菌現象の問題である。その中で現在最も注目されている交代菌症として、*C. 属* 真菌特に *C. albicans* に起因する *C. 症* が挙げられる。勿も *C. 症* は Langenbeck の報告した鷲口瘡以来古くから認められ、*C. 症* と抗生物質とは無関係であると唱えるものもあるが、Geiger 等¹⁰⁾ が心内膜炎の患者を Pc で治療したところ、起炎菌が消失したにもかかわらず、二次的に *C. albicans* による心内膜炎を起して死亡したことを報告して以来、抗生物質療法によつて *C. 症* が誘発されたという報告は非常に多く、わが国に於ても美甘⁴⁾ は急性肺炎患者を Pc で治療中肺 *C. 症* を続発したと述べ、又肺結核患者の喀痰を検べたところ SM 投与群では、*C. albicans* の検出率は 60% と非常に高率を示すのに反し、対照 (非投与群) では 18% という少い比率であつたと述べている。更に堂野前等⁹⁾ は抗生物質無効の汎発性 *C. 症* を報告し、林⁷⁾ は肺結核患者に SM を投与した結果マ線所見は好転したが、咳嗽は却つて増悪し、喀痰中より *C. albicans* を検出している。その他腸 *C. 症*⁵⁾ 胆道 *C. 症*⁶⁾ 真菌性潰瘍⁸⁾ 等、その報告例は枚挙にたえない。

このように *C. 症* が抗生物質と無関係とは言いきれなく従つてその発症機転についても種々学説がなされている。即ちその代表的なものを挙げると、

- 1) 抗生物質の直接発育促進説
- 2) 抗生物質による交代菌症説
- 3) 抗生物質による Vitamin 欠乏起因説

等であるが、これらの諸説に対して多数の賛否両論があるが、未だ確定した説は出されていない様である。

著者は先ずその発症部位に関連して健康人口腔内 *C. 属* 真菌の検出を試みたところ、32.5% と比較的高い検出率を示し、更に分離菌株について、生物学的性状をもつて菌種決定を行つたが、半数以上の 61.6% は *C. albicans* に相当した。従来抗生物質を投与することによつて口腔内に影響を及ぼした報告は非常に多く、Harris¹¹⁾、

Brown¹²⁾はAMの経口投与によつて、又美甘³²⁾はSM注射によつてV. 欠乏性口内炎を、Ellinger等³³⁾はPc投与後発症したNicotin amid欠乏性口内炎を、堂野前等³⁾はSM.CPは全然無効なばかりかPcの大量投与によつて、却つて悪化する汎発性C.症に於て所謂鷓口瘡を報告しているが、先に述べた通り、口腔内C. 属真菌特にC. albicansが多数検出されることから、口腔粘膜の抵抗力が減弱を来たすと、その侵襲を受ける可能性が非常に多いといわねばならない。

次に発症機転の基本的な問題としてC. albicansに対する抗生物質の影響についてCompbell等¹⁷⁾、Pappenfort等¹³⁾、Moore¹⁵⁾、美甘等²⁰⁾、上塚等²¹⁾はin vitro或はin vivoの実験から、抗生物質の直接発育促進説を唱え、又Foley等²³⁾は孵化鶏卵を用いて漿尿管腔内にC. albicansを接種すると同時にPcを注射すると、その死亡胎仔が増すことから、この説を支持している。これに対しHesseltine等²²⁾、Huppert等²⁴⁾、秋葉等²⁵⁾、阿多²⁶⁾等はこれを否定し、抗生物質はin vitroでなんの影響をも及ぼさないと述べている。特に東郷等²⁴⁾、Lipnik等²⁷⁾はAMのカプセル中にある磷酸塩にのみ、発育促進作用があり、AM自体及びその他の抗生物質にはかかる作用はないと結論している。

著者の成績に依れば、Pc. SM. CP及びAM自体にはin vitroにて、いずれのC. 属真菌に対しても発育促進或は抑制作用は窺われず、補足的に実験した抗真菌剤であるTmだけに強い発育抑制作用がみられた。又マウスを使用したin vivoの実験では、SM及びAMがC. albicansの感染性を高める結果を得た。

又先に述べた様に抗生物質の投与に起因すると思われるV. 欠乏症についてはHarris¹¹⁾、Brown¹²⁾、美甘³²⁾、Ellinger等³³⁾多数の報告があるが、Woods等³⁸⁾は抗生物質の長期投与により拮抗状態にあつた抗生物質に感受性のある細菌群がその増殖を阻止され、或は排除されるために不感受性のC. albicansが過剰発育をきたす結果感染を起すといひ、更に環境のpHの変化及び細菌群の破壊により生じた豊富な栄養素の提供をも一因子となし、所謂交代菌症説を提示しているが、Harris¹¹⁾、Appelbaum等³⁹⁾、O'Leary等⁴⁰⁾は抗生物質により感受性のある細菌が発育阻止或は排除されるため、V. B複合体の合成力が低下し粘膜の抵抗力が弱まり、通常では侵襲されないC. albicansの感染をきたすと主張している。これに対しParker⁴²⁾は臨床的にV. 欠乏症を起し得るに充分な程にまで細菌が減少するという事はないとし、更にBierman等⁴³⁾は交代菌症があつても必ずしもV. B群欠乏が起らない事から反対している。又Leitner⁴¹⁾はV. B群欠乏症状は抗生物質投与後極めて短時間に起るので抗V. 性があると述べている。更に二宮等⁴⁴⁾はAM経口投与によつて口角炎、舌炎、下痢、鼓腸等の副作用をみて、これを追求し、AM投与者にV. B₁を負荷したところ、負荷後4時間で尿中に負荷総量の80%以上を排泄したと述べ、更にin vitro及びin vivoでV. B₁及びB₂の附磷作用を検べ、AMによるV. B₁及びB₂の欠乏は腸内細菌の死滅によるものでなく代謝障害による欠乏即ち酸化的磷酸化を抑制するために生ずるV. 欠乏であると唱えている。

いずれにしても抗生物質がV. になんらかの形で影響を及ぼしていると考えられるが、著者は種々のV. についてC. 属真菌の発育にどのような作用を有するかにつきその影響を先ずin vitroで検べたが、V. B₁は、C. albicans. C. krusei, C. stellatoideaの発育を促進する結果を得たので、更にマウスを用いてC. albicansの感染実験を行ったところ、V. B₁を大量連続投与すると、かえつてその死亡率を高めた。

堂野前³⁾、樋口等³⁶⁾はV. B₁欠乏マウスはその抵抗力が減弱すると述べているのに反し、阿多²⁶⁾は逆にその抵抗力を増すと主張しているが、著者がV. B₁を量的に分けて投与した結果マウスの必要量程度(Morris³⁷⁾によれば1日10 γ)の投与で最も抵抗力が強く、非投与群である対照よりも死期を延長し、又その死亡率も低かつたが大量のV. B₁を投与すると、却つてC. albicansに対する感受性を増した。結局生体とC. albicansが競り合ひ的にV. B₁を需要し、その必要量以下ではマウスの抵抗力が弱く、このため死亡率を高め、又必要量以上ではC. albicansの発育を促進するためにその感受性を高めると思われる。

又菌株によつてV. B₁を含む培地を通過させるとその感染性を増すものもあつたが、これは発育が非常に旺盛になるためであろう。

V. B₂は著者の実験ではin vitroでC. albicansの発育促進或は抑制作用は見られなかつたがin vivoの実験ではマウスの抵抗力を増強し、その感受性を低めた。

又C. 属真菌は分類学的に糸状菌と酵母菌の中間に位するもので、その環境に応じて糸状菌様形態或は酵母様菌形態をとるが、著者は血清中に培養したC. albicansが糸状菌様形態で増殖していることを確めたので、マウスに対する感染性を酵母菌様形態のそれと比較検討したところ、糸状菌様形態をとつたものは生存日数を短縮し、その

死亡率を高めるという成績を得て菌自体の立場からその発症機転を明らかにし得た。

む す び

著者はC. 症の発症機転について追求し、次の成績を得た。

- 1) 口腔内からのC. 属真菌の検出を行い、C. albicans が最も高率に検出された。
- 2) Pc. SM. AM 及び CP はC. 属真菌に対して直接的な発育促進作用はない。
- 3) SM 及び AM はマウスのC. albicans に対する感受性を高めた。
- 4) V. B₁ はC. albicans, C. krusei, C. stellatoidea の発育を促進する。
- 5) V. B₁ ではマウスの必要量程度の投与で最もC. albicans に対する抵抗力が強くなり、V. B₁ が過剰に存在すると却つてその感受性を増した。
- 6) V. B₂ はマウスのC. albicans に対する抵抗力を増強する。
- 7) ウサギ血清中にて培養した、糸状菌様形態のC. albicans は酵母菌様形態のそれよりもマウスに対する感染性が高い成績を得た。

終りに臨み終始御懇篤なる御指導、御校閲を賜はつた思師八田貞義博士に深甚なる敬意を表します。また種々実験を御支援下された岩原、藤井、青山三博士、並に栗栖、藤田、酒井氏らに厚く御礼申し上げます。

引用文献

1. Burrows, W.: J. B. & Text of Bact, Saunders Co., (1949).
2. 美甘, 上塚: 結核, 25, 513, (1950).
3. 林: 日本内科学雑誌, 40, 8605, (1952).
4. 美甘: 日本臨床, 10, 105, (1952).
5. 加藤, 青杉, 井上, 小出: 信州医学雑誌, 1, 179, (1952).
6. 牛尾, 武田, 楠本, 小川: 日本消化器病学会雑誌, 50, 331, (1952).
7. 東郷, 井林, 稲田, 豊田: 臨床内科小児科, 6, 561, (1952).
8. 太田: 臨床内科小児科, 7, 476, (1952).
9. 堂野前, 松本: 日本臨床, 10, 201, (1952).
10. Geiger, A. J., and Wenner, H. A.: J. Biol. and Med., 23, 332, (1946).
11. Harris, H. J.: J. A. M. A., 142, 161, (1950).
12. Brown, R. L.: Antibiot. and Chemotherapy, 2, 5, (1952).
13. 正古: 日本医事新報, 1594, 4708, (1954).
14. Dubos, R. J.: Bact. and Myco. inf. of man, (1952).
15. 蕨茂: 日医大誌, 21, 575, (1949).
16. 細谷, 添田, 中沢, 小松, 小野田: 日本化学療法学会雑誌, 1, 75, (1953).
17. Compbell, C. C., and Saslaw, S.: Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 70, 562, (1949).
18. Pappenfort, J. R., and Schnall, E. S.: Arch. Inf. Med., 88, 729, (1951).
19. Moore, M.: J. Lab. and Clin. Med., 37, 703, (1951).
20. 美甘, 上塚, 進藤, 杉野: ペニシリン, 3, 954, (1950).
21. 上塚, 荒蒔, 嶋峨: 日新医学, 39, 553, (1952).
22. Hesseltine, C. W., Hauch, M., Hagen, M. J., and Bohons, N.: J. Bact., 64, 55, (1952).
23. Huppert, M., Macpherson, D. A., and Cazin, J.: J. Bact., 65, 171, (1953).
24. 東郷, 横山, 吉川, 久保: J. Antibiotics, 6, 54, (1953).
25. 秋葉, 岩田, 牛飼: 日本細菌学雑誌, 9, 323, (1954).
26. 阿多: 総合医学, 12, 691, (1955).
27. Lipnik, M. J., Kligman, A. M., and Straus, R.: J. Invest. Dermat., 18, 247, (1952).

28. Foley, G. E., and Winter, W. D. : J. inf. Dise., 85, 268, (1949).
29. Seligmann, E. R. : Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 79, 481, (1952).
30. 堂野前 : 治療, 8, 4, (1955).
31. 田中 : 日本眼科学会雑誌, 56, 653, (1952).
32. 美甘 : 結核, 26, 522, (1951).
33. Ellinger, P., and Shattock, F. M. : Brit. Med. J., 1, 611, (1946).
34. 八田, 青山 : 公衆衛生, 14, 2, 30, (1953).
35. 山田 : 日医大誌, 19, 5, 36, (1953).
36. 樋口, 岩崎 : 皮膚科性病科雑誌, 63, 589, (1953).
37. Morris : Vitamin and Hormon, 5, 175, (1947).
38. Woods, H.P. J, W., Manning. I. H., and Patlerson, C. N. : J. A. M. A., 145, 207. (1951).
39. Appelbaum, E., and Leff, W. A. : J. A. M. A., 138, 119, (1948).
40. O' Leary. p. A., Kierland. P. R., and Herrell, W. E. : proc. Staff. meet. Mayo. Clin., 23, 574, (1948).
41. Leitner, Z. A. : Brit. Med. J. 1, 491, (1950).
42. Parker, J, A., and Wright, L. T. : Science, 116. 282, (1952).
43. Bierman : J. Lab. and Clin. Med., 37, 394, (1954).
44. 二宮, 久保, 山田, 尾山 : 綜合研究報告集録, 医学及び薬学編 (昭28), 150, (1954).

Summary

The author reported the influence of antibiotics and vitamins on Candidiasis.

The growth of *Candida albicans* is neither stimulated nor inhibited in the presence of Penicillin, Streptomycin and Aureomycin in liquid media, but the mortality of mice infected with *Candida albicans* is increased by injection of Streptomycin or Aureomycin.

The growth of *Candida albicans* is stimulated by Vitamine B₁ *in vitro* and *in vivo*.

The virulence of mould form of *Candida albicans* is severer than yeast form of it.

Received February 29, 1956.

Candida 症の化学療法に関する実験的研究 (第2報)

特に Candida 属真菌に対する合成色素類及び各種化学療法剤の抗菌作用について

宮 沢 文 雄

Experimental Study on Chemotherapy of Candidiasis. II.

Especially on Antibiotic Action of Synthetic Dyestuffs and
Chemotherapeutic Agents upon Candida Group

Fumio MIYAZAWA

まえがき 近年抗生物質の発達により所謂交代菌症の一つとして Candida 属 (以下 C. 属と略す) 真菌特に Candida albicans (以下 C. albicans と略す) による Candida 症 (以下 C. 症と略す) が注目されてきたが、まだその完全な治療法は見出されていないようである。著者は C. 属に対する強力な化学療法剤を見出す目的で、塩基性、酸性合成色素を中心に各種の Sulfonamide 剤、水銀剤、抗生物質など、なるべく広い範囲の薬剤を基に、主に *in vitro* で C. 属の発育抑制効果を実験的に検討したので以下この成績について報告する。

実 験 方 法

実験に選んだ薬剤は、合成色素では Triphenylmethan 系 30 種, Diphenylmethan 系 1 種, Thiazole 系 1 種, Azo 系 39 種, Phthalein 系 15 種, Thiazin 系 3 種, Azin 系 10 種, Acridin 系 3 種, Indigoid 系 3 種, Pyrazolon 系 4 種, Quinoline 系 2 種, Nitro 系 3 種, Oxazin 系 4 種, Cyanin 系 7 種, 計 125 種で、その他、Sulfonamide 剤 7 種, 水銀製剤 2 種, 抗生物質 1 種の合計 135 種である。本実験の供試菌は当教室保存の標準菌株で C. albicans, C. tropicalis, C. guilliermondi, C. krusei, C. parakrusei, C. pseudotropicalis, C. stellatoidea の計 7 菌株である。

供試薬剤を 2% ブドウ糖加サブローブイヨンで、試剤毎に所定濃度に数段階に稀釈した。この稀釈濃度範囲は Sulfonamide 剤を除く他の試剤では、1 万乃至 100 万倍濃度とし、Sulfonamide 剤は 2 千乃至 100 万倍濃度とした。移植菌量は予め 2% ブドウ糖加サブローブイヨンで 37°, 24 時間培養した菌を生理食塩液で稀釈し、0.1 cc (5 万~10 万個) ずつを移植し 37° に培養後 7 日間、菌の発育状態を肉眼的に観察した。

実 験 成 績

1. 各種合成色素の抗菌作用

A) 各種合成色素の試験管内抗菌性

従来ある種の合成色素が強い抗菌作用を示す事から細菌学では種々の分離或は鑑別培地として、又臨床的には治療薬等として応用されている。特に C. 症に対する治療薬としては、Stovall and Greeley¹⁾ は Gentiana violet が、Kass 等²⁾ は、Brilliant green が有効であつたと報告しているが、わが国に於ても裴茂³⁾、美甘等⁴⁾ その他多数の学者⁵⁻¹⁰⁾ に依つて、合成色素特に Malachit green, Brilliant green, Gentiana violet 等が、C. albicans の発育を抑制し、或は菌の酸素消費量を抑制する事を報告している。

著者の成績に依ると、一般に合成色素の C. 属に対する抗菌性は、その色素の種類によつて供試した 7 菌種に大体同じ程度の抗菌力を示した。以下その成績を系統的に追つて報告する。(第 1 表参照)

i) Phenylmethan 系色素の抗菌性

従来 Triphenylmethan 系色素の抗菌作用につき Eisenberg¹¹⁾ はグラム陽性菌は著しく抵抗弱く、グラム陰性菌は抵抗性が強い事を報告し、その作用についてグラム特異性 (Gramspezifität) と名付けた。これに対して Kawai¹²⁾ はグラム特異性に例外のある事から更に詳細に研究し、孢子菌に強い抗菌作用を有することを指摘して孢子特異性 (Sporogenospezifität) に作用があると唱えた。著者が実験に選んだ Triphenyl methan 系塩基性色

素もその孢子特異性にもれず、C. 属に対して強い抗菌性を示した。即ち Dimethylamin 或は Diethylamin の型をとつた Malachit green, Brilliant green, Gentiana violet, Methy I violet, Crystal violet, Victoria blue, Ethyl violet 等は100万倍乃至500万倍稀釈濃度に於ても抗菌活性を示した。しかしながら amino基の水素がalkyl基で置換されない Fuchsine 及び Parafuchsine では抗菌濃度は1万倍程度で、前者の色素群に比較してその抗C. 属作用は非常に低かつた。又塩基性色素に反して、総ての酸性色素は何れの菌に対しても1万倍稀釈濃度では抗菌性はみられなかつた。Diphenylmethan 系塩基性色素である Auramine は Dimethylamin の型をとつているが、その抗菌力は1万倍稀釈濃度以下であつた。

ii) Thiazole 系色素の抗菌性

Thiazole 系色素の製品化されているものは非常に少く、従つて供試色素は Thioflavine T (塩基性色素) 1種であつたが、その抗菌力価も5万倍稀釈濃度の時始めて有効で、Triphenylmethan 系塩基性色素よりは弱い。

iii) Azo 系色素の抗菌性

Sulfonamide 剤の発展をもたらした Azo 系色素については Monoazo 色素, Diazo 色素, 計39種について試験を行つたが、その塩基性, 酸性色素にかかわらず、いずれも1万倍稀釈濃度でも菌の発育を阻止し得なかつた。

iv) Phthalein 系色素の抗菌作用

これ等の一連の色素は化学構造上 Phenylmethan 系色素に近似しているが、いずれも抗C. 属作用は認められなかつた。即ち食品衛生上しばしば問題になる Rhodamine B¹³⁾ (塩基性色素) は往々臨床的に赤色々素尿¹⁴⁾として現われ、他の疾患とまぎらわしいものであるが、化学構造上 Phthalein 系の Diethylanilin 色素で、これに二つの Sulfon 基を有する Sulfrhodamine B と共にその抗菌作用は1万倍稀釈濃度以下で、又分子中に沃度を含む Erythrosine, Rasebengale, 臭素を含む Eosine G, Phloxine なども同様抗菌作用はみられなかつた。

v) Thiazine 系色素の抗菌性

Thiazine 系塩基性色素である Methylenblue は衛生細菌学的大腸菌群の検索に際し、E. M. B. 培地に應用されているが、一方抗C. 作用はC. albicans には5万倍濃度で、C. parakrusei, C. pseudotropicalis およびC. stellatoidea には1万倍稀釈濃度の時初めて抗菌性を示すに止まつた。しかし供試した2種の酸性色素は1万倍稀釈濃度でも抗菌作用は窺われなかつた。

vi) Azin 系色素の抗菌性

Neutral red をはじめとして10種について試験したが、塩基性色素或は酸性色素にかかわらず Candida 属に対する抗菌活性はみられなかつた。

vii) Acridin系色素の抗菌性

Acriflavine はその強い抗菌性と同時に粘膜に対する刺激性も少ないので臨床的に消毒薬として広く應用されて居り、特に淋菌には約1000万倍稀釈濃度でも抗菌性を示すといわれ、かつては尿路消毒剤として繁用されたが、C. 属真菌に対しては1万倍稀釈濃度で、その発育を完全に抑制した。

viii) Indigoid 系色素の抗菌性

Indigo の Sulfon 酸誘導体である3種の Indigoid 色素は何れもC. 属に対して認むべき抗菌性を示さなかつた。

ix) Pyrazolon 系色素の抗菌性

食品黄色色素として指定されている Tartrazine を始めとして4種の Pyrazolon 系色素はいずれも菌の発育を抑制し得なかつた。

x) Quinoline 系色素の抗菌性

Quinoline 系塩基性色素である Astraphloxine FF extra は、C. 属に対して良好な抗菌性を有した。即ちC. albicans に5万倍に、その他の菌に5万乃至10万倍稀釈濃度でその発育を阻止した。Quinoline yellow は Quinoline 系色素として繊維工業上染色に利用される唯一のものであるが、C. 属に対しては全く抗菌活性は見られなかつた。

xi) Nitro 系色素の抗菌性

Nitro 系色素の Sulfon 化された色素は毒性が少なく、特に Naphtholyellow S は食品衛生法によつて食品への利用が許されているが、供試した3種の全てが抗菌性を有せず菌の発育を許した。

xii) Oxazin 系色素の抗菌性

Oxazin 系色素としては 4 種について試験を行つたが、1 万倍稀釈濃度ではいずれも発育抑制作用を示さなかつた。

xiii) Cyanine 系感光色素の抗菌性

感光色素の医学的应用には多数の先人諸研究者により追求されており、特に細菌学的にその抗菌性を調べたものに村上等¹⁵⁻¹⁸⁾の広範な実験があるが、又 C. 症に対する化学療法剤としての価値について、平木等¹⁹⁾ 阪田等²⁰⁾により実験的に或いは、臨床的に試みられてきたが、結論としてその効果の期待性が報告されている。著者は日本感光色素から提供された NK. 19, NK. 74, NK. 91, NK. 340, NK. 342, NK. 375, NK. 376, の計 7 種についてその抗 C. 属作用を検べた。この際 NK. 19, 及び NK. 91 は水溶性であるが、他の試剤は比較的水に溶解難いので予め数滴の Ethylalcohol に溶解した後、培地で稀釈し、試験に供したが、供試感光色素中 NK. 74, NK. 340,

NK. 342, NK. 375, NK. 376 では C. 属に対する抗菌性は非常に強く、50 万乃至 100 万倍稀釈濃度で発育を完全に抑制し注目されたが、NK. 91 では 5 万乃至 10 万倍稀釈濃度で、NK. 19 は 1 万倍稀釈に止まつた。

第 1 表 Candida 属真菌に対する各種合成色素の抗菌作用

分類	番号	色素名	菌種						
			c. andida-albicans	c. tropic-alis	c. guillier-mondi	c. krusei	c. Pa-rakrusei	c. Pseudo-tropicalis	C. stellatoi-dea
Phenyl methan	1	Malachit green	500	100	100	100	100	100	500
	2	Brilliant green	100	100	100	100	100	100	100
	3	Gentiana violet	100	50	50	50	50	100	100
	4	Crystal violet	100	100	100	50	100	100	100
	5	Methyl violet	100	100	100	50	50	100	100
	6	Ethyl violet	100	50	50	50	50	100	100
	7	Victoria blue BH	100	50	50	50	50	100	100
	8	Fuchsine	1	1	<1	<1	<1	1	<1
	9	Parafuchsine	1	1	<1	<1	<1	1	<1
	10	Brilliant milling green	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	11	Guinea green B	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	12	Light green SF yellowish	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	13	Fast acid green B	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	14	Alkali fast green 2G	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	15	Alphazurine 2G	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	16	Patent blue A	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	17	Brilliant wool blue B	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	18	Soluble blue 2 B	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	19	Alkali fast green 10G	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	20	Brilliant wool blue FFR	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	21	Brilliant milling blue B	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	22	Wool green S	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	23	Wool violet 4BN	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	24	Azur blue VX	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	25	Alphazurine FG	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	26	Acid magenta	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	27	Fast blue	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	28	Wool blue S	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	29	Methyl blue	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	30	Brilliant blue 8B	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	31	Acid violet 6B	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	32	Auramine O	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Thiazol	33	Thioflavine T	5	5	5	5	5	5	

分類	番号	菌種 色素名	Candida	C.	C.	C.	C.	C.	C.
			albicans	tropicalis	guillierm ohdi	krusei	Pa- rakauei	Pseudo- tropiclis	C. stellato dea
	81	Methyl eosine	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	82	Cyanosine B	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	83	Eosine B	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	84	Phloxine B	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	85	Sulforhodamine B	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	86	Uranine conc	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	87	Violamine B	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Thiazine	88	Methylen blue	5	<1	1	<1	1	1	1
	89	Thiocarmine R	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	90	Brillint alizarin blue D	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Azine	91	Nentral red	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	92	Safranin T	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	93	Nigrosine	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	94	Wool fast blue GL	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	95	Rosindulin G	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	96	Nentral blue	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	97	Safranin B ext	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	98	Methylen violet	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	99	Indamine blue B	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	100	Neutral violet	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Acridine	101	Acriflavine	10	10	10	10	5	10	10
	102	Phosphine	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	103	Flavophosphine	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Indigoid	104	Indigocarmine	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	105	Indigosol O pat	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	106	Indigotine P	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Pyra- zolon	107	Tartrazine	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	108	Fast wool yellow 3GL conc	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	109	Wool yellow extra conc	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	110	Fast light yellow	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Qinolin	111	Astra phloxine FF extra	5	5	5	5	5	10	10
	112	Quinoline yellow conc	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Nitro	113	Naphthol yellow S conc	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	114	Brilliant yellow	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	115	English yellow	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Oxazine	116	Brilliant blue cone	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	117	New blue DA conc	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	118	Fast cotton blue CB	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	119	Printing violet R	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Cyanine	120	NK 19	1	1	1	1	1	1	1
	121	NK 74	100	100	50	50	100	100	100
	122	NK 91	10	5	5	10	10	10	10
	123	NK 340	50	10	10	50	10	10	100
	124	NK 342	100	100	50	100	100	50	100
	125	NK 375	100	10	10	50	100	10	50
	126	NK 376	100	100	50	50	100	100	100

註：表中数値は抗菌濃度 (N×10,000 稀釈) を示す。

2) 血清中の合成色素の抗菌作用

先に各種合成色素の抗菌力を基礎培地を用い試験管内で検べたが、Triphenylmethan 系塩基性色素で Dime-thyl 或は Diethylanilin の形をとつたもの及び Cyanin 系感光色素に強い抗菌作用を有する事を明らかにし得たが、次にその血清中の抗菌力について究明した。

i) 血清と Triphenylmethan 系塩基性色素及び Cyanin 系色素の抗菌力価との関係

著者は供試色素中比較的強力な抗菌力が期待された Triphenylmethan 系塩基性色素5種および Cyanin 系色素3種について血清中における抗C. 属作用を試験した。Seitz 濾過滅菌をしたウサギ血清を滅菌試験管に2cc 宛分注し、これに供試色素液を等量加えて1万乃至1000万倍稀釈濃度になる様に調製し(血清は50%になる)、37° 24時間孵卵器に放置して無菌的である事を確かめた後、あらかじめ2%ブドウ糖加サブロー培地に培養したC. albicans の約10万個を移植し37° 培養し24時間ごとに7日間観察し、この間の菌の発育状態を対照群と対比してその抗菌価を判定した。その成績によると Malachit green, Brilliant green の抗菌力は完全に消滅し、基礎培地中では100万倍乃至500万倍濃度の抗菌力を有していたのに反し、血清中では全くその発育を阻止しなかつた。Gentiana violet, Methyl violet, Crystal violet では5万倍稀釈濃度でC. albicans の発育を阻止した感光色素研究所から分与されたCyanin 系色素については比較的抗菌作用の強かつたNK.74, NK.342, NK.376 を実験に供したが、いずれも血清中の抗菌力は減少したが、1万倍乃至5万倍稀釈濃度でその発育を完全に阻止する事がみられた。(第2表参照)

第2表 Candida albicans に対する血清中合成色素の抗菌作用

供試色素名	抗菌濃度
Malachit green	< 1
Brilliant green	< 1
Gentiana violet	5
Crystal violet	5
Methyl violet	5
NK 74	1
NK 342	5
NK 346	1

註：表中抗菌濃度の数値は N×10,000 稀釈濃度を示す。

ローブイオンに10万倍稀釈色素液等量を加えたもので色素の抗菌濃度内である事を確かめた(添加時の作用濃度は20万倍稀釈になる)。Malachit green 及び Brilliant green は血清中に加えられると直ちにその色調は消滅し始め、10分後には殆んど完全に消失した。これに反し、Gentiana violet は、ややその色調は消滅したが、96時間後においても明瞭に残存した。又ブイオン中に加えられた色素の色調には全然変化は見られなかつた。この際の抗菌作用は第3表に示す如く、Malachit green 及び Brilliant green は色素液添加後菌移植迄の時間に関係なく菌の発育に対し抑制作用は見られなかつた。Gentiana violet は完全には発育抑制作用を示さなかつたが、その度合は対照に比較すると明瞭にその発育を阻害していた。本来 Gentiana violet (Grubler製)は Crystal viole, Methyl

ii) 血清と Triphenylmethan 系塩基性色素の親和性とその抗菌作用

先に Triphenylmethan 系塩基性色素が血清中ではその抗菌作用が著しく低下する事がわかつたが、脈管内に投与されたこれ等の色素がどの位の間抗菌性が存続するか時間的に追求してみた。供試色素には Malachit green, Brilliant green, Gentiana violet, Crystal violet および Methyl violet の計5種を用いた。Seitz 濾過滅菌をしたウサギ血清2cc を試験管にとり37°, 24時間孵卵器中に放置し無菌的な事を確かめたのち、等量の10万倍稀釈色素液を加え、作用直後及び作用5分、10分、20分、30分及び24時間後に約10万個のC. albicans を接種し、37°, 24時間、48時間後の菌の発育をもつてその抗菌作用を検べた。対照としては血清に等量の蒸留水を加えたものについてその発育状態を検べ、又2%ブドウ糖加サブ

第3表 血清と Triphenylmethan 系塩基性色素の抗菌性との時間的關係

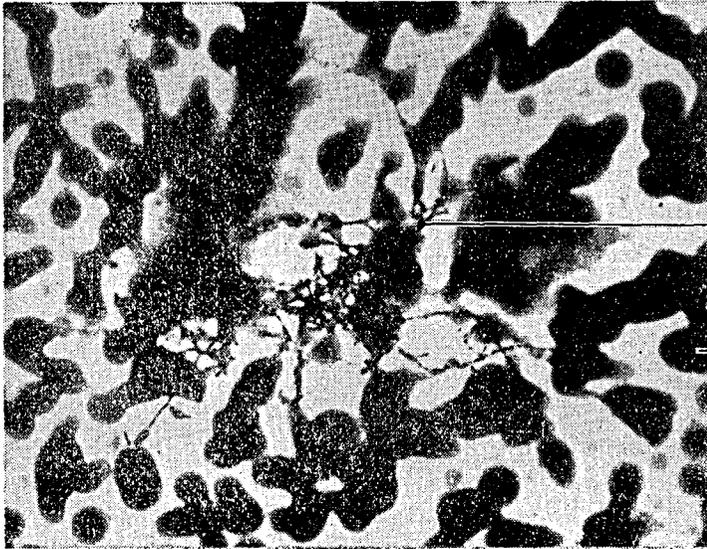
色素の種類	経過時間	0分	5分	10分	20分	30分	24時間	対 照	
								血清+蒸留水	Sab. Bouillon+色素液
Malachit green		卍	卍	卍	卍	卍	卍		—
Brilliant green		卍	卍	卍	卍	卍	卍		—
Gentiana violet		+	+	+	+	+	+		—
Crystal violet		+	+	+	+	+	+		—
Methyl violet		+	+	+	+	+	+		—

註：表中経過時間は血清に色素液添加後菌移植までの経過時間を示し、菌の発育状態は48時間をもつて—卍に分けて示す

violet の混合色素なのでペーパークロマトグラフィで定性分析をし、その事実を確めた後、各々についても実験をおこなったが、その成績は同様に両者とも *C. albicans* の発育を或る程度阻害するに止まった。

更に血清中に色素液等量を添加したものと、対照の滅菌蒸留水を添加したものの菌の発育状態を顕微鏡下で観察すると Malachit green B, Brilliant green, Gentiana violet, Crystal violet, Methyl violet 等、いずれも色素添加後、菌の移植までの時間に関係なく菌の形態が所謂酵母菌様形態を呈していた。これに反し対照では仮性菌糸を出した所謂糸状菌様形態を呈して発育しているのが見られた。著者は第一報で *C. albicans* は分類学上、酵母菌と糸状菌との中間に位するため、いずれの形態をもとり得るが、特に糸状菌様形態を呈したものがより病原性が強いと報告したが、Triphenylmethan 系塩基性色素は血清中では抗菌作用を示さないが、その形態を酵母菌形態に止める作用があり、就中 Gentiana violet, 即ち Crystal violet 及び Methyl violet 等はその抗菌作用が或る程度残存する事から、治療薬として或る程度期待され得る。(写真1, 2参照)

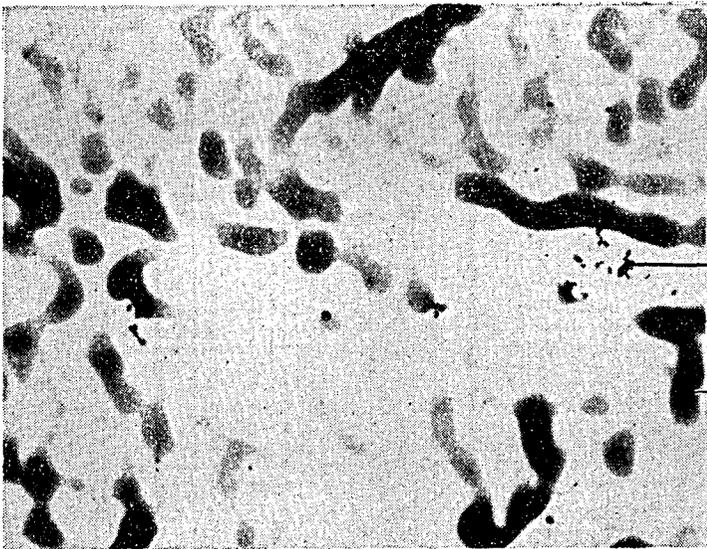
写真1.

—糸状菌様形態 *C. albicans*

—血清

血清中 *Candida albicans* の発育状態、糸状菌様形態をなす

写真2

—酵母菌様形態
C. albicans

—血清

血清中 Brilliant green 添加した際の *Candida albicans* の発育状態、酵母菌様形態

2. Sulfonamide 剤の抗菌作用

Azo 系色素であるProntosilがマウスの溶血連鎖球菌感染に対して有効である事から, Benzol 核に $\text{SO}_2 \text{NH}_2$ 基を持った抗菌作用を有する多数の Sulfonamide 剤が合成されている. 著者は前に Azo 系色素について C. 属に対する抗菌性を調べたが引き続き Sulfonamide 剤について行つた. 供試薬剤には, Sulfamine (Sulfanilamide), Sulfathiazole (2-Sulfanilamido-thiazole), Sulfadiazine (2-Sulfanilamido-pyrimidine), Oxazine (3,4-Dimethyl-5-sulfanilamido-isoxazole), Homosulfamine (p-Paminomethyl-benzene-sulfonamide), Sulfaguandine (Sulfanil-guanidine), Erycon (6-Sulfanyl-amido-2, 4-dimethyl-pyridine), の7種を選んだ. 試験の成績は第4表に示す様に, いずれの試剤も C. 属に対しては抗菌作用は認められない. しかし Erycon を除いた他の供試 Sulfonamide 剤では C. krusei の菌膜を形成せしめなかつた.

第4表 Candida 属真菌に対する各種 Sulfon amid 剤の抗菌性

供試薬剤	菌種							
	C. albicans	C. tropicalis	C. guillies- mondi	C. krusei	C. Para- krusei	C. Pseudo tropicalis	C. stella- toidea	
Sulfamine	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	
Sulfathiazole	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	
Sulfadiazine	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	
Sulfaguandine	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	
Oxazine	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	
Homosulfamine	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	
Erycon	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	

註: 表中数値は抗菌濃度 ($N \times 1,000$ 稀釈) を示す.

3. 水銀製剤の抗菌作用

従来水銀製剤は副作用が強いが, それを除くと共に抗菌作用を存続させるために種々 薬剤が合成された. 中でも Mercurochrome (Dibrom hydroxy mercurifluorescein-dinatrium) 及び, Merzonin (Ethylmercurithios-
alicyclic acid natrium) は刺激性などの副作用が弱く, 良好な浸透性を有する事などから臨床的に広く使用されている. 実験にはこの二種の水銀製剤を基にその抗 C. 作用を調べた. Mercurochrome は C. 属 7 種の菌に対して各々 1 万倍稀釈濃度で, Merzonin は 50 万乃至 100 万倍稀釈濃度で菌の発育を完全に抑制した. 又血清中 (血清濃度 50%) に於てはその抗菌作用はやや減退し C. albicans に対し 10 万倍濃度に止まつた (第5表参照).

第5表 Candida 属真菌に対する水銀製剤の抗菌作用

培養条件	菌種 薬剤名	菌種							
		C. albicans	C. tropicalis	C. guillies- mondi	C. krusei	C. Para- krusei	C. Pseudo tropicalis	C. stella- toidea	
2%ブドウ糖加サ ブローイオン	Mercurochrome	1	1	1	1	1	1	1	
	Merzonin	100	50	100	50	100	50	100	
血 清	Mercurochrome	<1							
	Merzonin	10							

註: 表中数値は抗菌濃度 ($N \times 10,000$ 稀釈) を示す.

5. 抗生物質 (Trichomycin) の抗菌性

近年特に抗微生物質として注目されてきた Trichomycin は C. 症に対して実験的に或は臨床的に有効であると報告されているが²¹⁻²³⁾, 著者もその試験管内抗菌性について実験を行つた. この結果は基礎培地である 2%ブドウ糖加サブローイオン中では 100 万倍稀釈濃度でも良好な抗菌作用が認められた. 又血清中に於ける Trichomycin の抗菌力についても調べたが, ややその作用は低下し 10 万倍程度の値を示した.

第6表 Candida 属真菌に対する Trichomycin の抗菌作用

培 養 条 件	C. albicans	C. tiopicalis	C. guilliermondi	C. krusei	C. Para-krusei	C. Pseudo-tropicalis	C. stella-toidea
2%ブドウ糖加サプロマイ オン	100	100	100	100	100	100	100
血 清	10						

註: 表中数値は抗菌濃度 ($N \times 10,000$ 稀釈) を示す。

総 括

抗生物質の発展にともなつて提起された所謂交代菌症の一つとして真菌性疾患特に *C. albicans* に起因する *C.* 症が注目されてきたが、未だその完全な治療薬は見出されていない様である。著者は第一報に於て *C.* 症の発症機転について二、三検討を加えてみたが、菌自体の病原性だけでなく、抗生物質投与によつて生体の感染防禦力の低下もその大きな一因となつていたので、その治療にあつては、その発症に起因したと思われる抗生物質の投与を中止し、且つ生体の抵抗力を強め、それと同時に *C. albicans* に直接抗菌性を有する薬剤を投与することが望まれる。現在 *C.* 属真菌中 *C. albicans* に病原性があると考えられているが、それ以外の菌種による症例も報告されているので、*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondi*, *C. krusei*, *C. parakrusei*, *C. pseudotropicalis*, *C. stellatoidea* 等計7種に対する種々の薬剤についてその抗菌作用を追求してみた。

供試薬剤としては色素剤 125 種, Sulfonamide 剤 7 種, 水銀製剤 2 種, 抗生物質 (Trichomycin) 1 種の計 135 種について、その抗 *C.* 作用を検べた。Stovall¹⁾, Kass²⁾, 美甘等³⁾, 吾孫子⁴⁾, 真下⁵⁾, 池田等⁷⁾, 田中等³⁾ 内藤等³⁾ は実験的に或は臨床的に Malachit green, Brilliant green, Gentiana violet が有効であると述べているが、特に蕨茂³⁾ は各種の色素剤について広く抗 *C.* 剤を検索し *in vitro* の実験で Triphenylmethan 系塩基性色素に強い抗 *C.* 作用を有すると結論している。又元来は写真増感剤として発展してきた感光色素が医学的にも多方面から研究され、特に網内系細胞の機能を允進し、新陳代謝を円滑化するとともに、組織の再成増殖作用があり、又ブドウ球菌、枯草菌等のグラム陽性のもとより、チフス菌、赤痢菌等のグラム陰性菌に対しても強い抗菌作用のある事¹⁵⁻¹⁶⁾ から注目せられ、その *C.* 症に対する応用についても、平木等¹⁹⁾, 阪田等²⁰⁾ の報告がみられるが、いづれも良好な治療効果が期待出来ることを報告している。

著者が検べた色素剤についての *in vitro* の成績によると、*C.* 属に対して最も高い抗菌性を有するものは Triphenylmethan 系塩基性色素である Malachit green, Brilliant green, Gentiana violet, Methyl violet, Ethyl violet, Victoria blue 等が約 100 万倍稀釈濃度で、又 Cyanin 系色素特に NK74, NK340, NK342, NK375, NK376 が 50 万~100 万倍稀釈濃度で *C.* 属の発育を完全に抑制し注目された。その他 Thioflavine, Acriflavine, Methylene blue, Astraphloxine FF extra, NK91 等 5 万乃至 10 万倍濃度で、又 Fuchsine, Parafuchrine, Nk 19 は 1 万倍濃度で抗菌性が認められた。

最も抗菌性の強かつた Triphenylmethan 系塩基性色素については Eisenberg¹¹⁾ Churchman²⁶⁾ Krumviede²⁷⁾ 等はグラム陽性菌に対して非常に鋭敏で、その抵抗性は著しく弱い、反対にグラム陰性菌は著しく強いと報告し、特に Eisenberg¹¹⁾ はこの作用をグラム特異性 (Gramspezifitit) と名付けた。更に Kawai¹²⁾ はグラム特異性に例外のある事を指摘し、広範な実験を行い、Triphenylmethan 系塩基性色素に鋭敏なるものはグラム陽性菌ではなく、孢子形成細菌であると述べ、この作用は孢子特異性 (Sporogenospezifitit) と唱えた。

元来孢子はあらゆる物理的或は化学的な障害に対して非常に強い抵抗力を有するものであるが Churchman²⁶⁾ Burke等²³⁾ によると Triphenylmethan 系塩基性色素の強力な抗菌性は、その生活形にのみ特異的に作用するので、孢子には大きな抵抗力を有すると述べているが、木暮²⁹⁾ は更に Gentiana violet, Methyl violet, Crystal violet の飽和水溶液は孢子の発芽に対する阻止作用が極めて高く、同時に殺菌作用を有すると報告している。又小林³⁰⁾ は脾脱疽菌を生活型にて培養することに成功し、Triphenylmethan 系色素の抗菌性を孢子型と比較しながら実験を行い、Fuchsine 或は Methyl violet の抗菌作用について孢子は色素の濃厚稀釈に於ても殺菌されないでその発芽に一定の関係があり、比較的稀薄溶液中で孢子が発芽しようとして、その性状を変化し、未だ完全に生活型にならない前に色素に侵襲され容易に死滅すると述べている。

Triphenylmethan 系塩基性色素の *C.* 属真菌に対する抗菌性も、その孢子特異作用の如く強い抗菌作用を示し

たが、化学構造上 Malachit green (CI. 657), Brilliant green (CI. 662), Methyl violet (CI. 680), Crystal violet (CI. 681) その他 Dimethyl anilin ( $-N(CH_3)_2$) 又は Diethyl anilin ( $-N(C_2H_5)_2$) の形をとつた Triphenylmethan 系塩基性色素に強い抗菌作用があり、Amino 基の水素を Alkyl 基で置換されない Fuchsine, 及び Parafuchsine 等の抗菌濃度は非常に低かつた。

又化学構造上非常に近似したのも、これに Sulfon 基が導入された Triphenylmethan 系酸性色素には全然抗菌力はみられない。

このように強い抗菌性を示した Triphenylmethan 系塩基性色素は外界に接した部位の C. 症に対してはその色素溶液で洗滌することにより相当期待がかけられ、又臨床的にその効果が報告されているが⁹⁾、これらの色素を皮下或は筋肉内に注射すると、局部は壊死を起すので注射方法は直接脈管内に投与されねばならない。併しなから多くの薬剤は血清と拮抗してその抗菌作用を減弱することがあるが、著者は抗菌性の強かつた代表的な Triphenylmethan 系塩基性色素の抗菌性と血清との関係について追求したところ、血清との接触により Malachit green, Brilliant green 等は完全にその抗菌作用は消失して、1 万倍稀釈濃度でも菌の発育を許した。Gentiana violet, Methyl violet, Crystal violet では稍その作用は減退するが、5 万倍稀釈濃度位にその抗菌性を示した。又この色素と血清との親和性 (拮抗性) の時間的な影響はみられず、明らかに基礎培地中で抗菌濃度範囲の色素液を混和すると Malachit green, Brilliant green 等は直ちに血清と結びついて、色素の色調は消失し、その抗菌性も無くなる。Gentiana violet, Methyl violet, Crystal violet 等ではその色調は完全には消失せず、又抗菌性も微弱であるが存続する。

しかし、この際顕微鏡下で菌の発育状態を観察したところ血清中にて培養した C. albicans は仮性菌糸を有する糸状菌様形態をもつて発育をしているのに反し Triphenylmethan 系塩基性色素を血清中に添加したものでは、明らかに酵母菌様形態をもつて発育していた。

著者は第一報において糸状菌様形態をとつた C. albicans は酵母菌様形態のそれよりも遙かに毒力が強い事を明らかにしたが、脈管内に投与されたこれらの色素は侵襲しつつある C. albicans に対し、一次的には抗菌性は示さないが、それを酵母菌様形態に止め、病勢を好転するものと推察された。

Cyanin 系色素については占部³¹⁾は色素の構造式中 Dimethylamino 基と抗 C. 作用との間に一定の関係があるように思われると言っているが、著者が実験に用いた Cyanin 系感光色素はいずれも比較的強い抗菌性を有しており、又血清と親和してその抗菌性を減弱することも少なく期待性がかけられた。

その他 Thioflavine T, Methylene blue, Acriflavine, Astra phloxine FF extra は 1 万乃至 10 万倍稀釈濃度、(2% サブローブドウ糖ブイオン中) に抗菌力を示したが、大部分の Azo 系, Phthalein 系, Azin 系, Indigoid 系, Pyrazonol 系, Nitro 系, Oxazine 系は抗菌力は 1 万倍稀釈濃度でも見られなかつた。又 Azo 系色素から発展した Sulfonamide 剤も同様に認められなかつた。

水銀製剤として著者は Mercurochrome 及び Merzonin の二種類を選んだ。元来水銀剤は強い殺菌性を有するが、毒性が強いのでそれを除去するとともに殺菌性を保持させる目的で種々合成され Mercurochrome, Merzonin 等が創製され、賞用されている。この抗 C. 作用について野口等³²⁾、内藤等⁹⁾が有効であつたと述べており、又岡崎等³³⁾は皮膚糸状菌について水銀製剤を検討し Merzonin が最もその抗菌性が強いと報告している。

著者が *in vitro* の実験でその抗菌作用を検べたという、基礎培地中では 100 万倍稀釈濃度で C. 属真菌の発育を完全に抑制したが、血清中では 10 万倍濃度に止まつた。しかしながら、水銀製剤は、酸類、重金属と化学的に反応して沈澱を起したり、生体内の SH 基化合物と拮抗したりするので、その投与方法、応用範囲については更に検討を加えねばならない。

又近年抗酵母物質として注目されて来た Trichomycin の C. 症に対する報告は非常に多く、田中⁹⁾、細谷²¹⁾、阿多²²⁾、美甘等²³⁾、岡野²⁴⁾、岸川²⁵⁾等は実験的に、或は臨床的に有効であると述べている。著者が行つた、*in vitro* の実験でも、100 万倍稀釈濃度で 7 種の C. 属真菌に対し、それらの発育を完全に抑制して、その抗 C. 剤として期待がかけられるが、血清中の抗菌作用は多少減少するのが認められた。

結 論

著者は色素剤を中心に C. 属真菌に対する抗菌性を追求して次の成績を得た。

1. Triphenylmethan 系塩基性色素は一般的に抗 C. 作用は強く、その酸性色素は全然認められない。
2. Dimethyl 又は Diethylamino の形をとった Triphenylmethan 系塩基性色素に特に強い抗菌性が認められる。
3. Triphenylmethan 系塩基性色素は血清と強く親和 (拮抗) し発育を阻止得ないが、その発育状態は糸状菌様形態でなく酵母菌様形態で増殖せしめる。
4. Cyanin 系感光色素の抗菌性は非常に強いが、血清中では多少その作用は減少する。
5. Sulfonamide 剤の抗 C. 作用は全然認められない。
6. Merzonin に強い抗菌性を認めるが、このものの持つ化学的性状のため応用範囲にはなを一考を要する。
7. Trichomycin は強い抗菌作用を有し、期待がもたれた。

終りに臨み終始御懇篤なる御指導、御校閲を賜わつた、恩師八田貞義博士に深甚なる敬意を表します。又種々実験に御支援下された岩原、藤井、青山三博士並びに栗栖、藤田、酒井氏らに厚く御礼申し上げます。

文 献

1. Stovall, W. D., and Greeley, H. P.: T. A. M. A., 91, 1346, (1928).
2. Kass, I., and Sano, K. T.: Dis. chest, 21, 205, (1952).
3. 斐茂: 日医大誌; 21, 575, (1949).
4. 美甘, 池本, 副島, 金子, 明石, 進藤: J. Antibiotics, 6, 53, (1953).
5. 吾孫子: J. Antibiotics, 6, 191, (1954).
6. 真下: 第27回日本細菌学会総会発表, (1954).
7. 池田, 河合, 星野: 小児科臨床, 17, 69, (1954).
8. 田中, 慶応医学, 30, 358, (1953).
9. 内藤, 加藤: 日本産科婦人科学会雑誌, 6, 165, (1954).
10. 水間, 古本: 第27回日本細菌学会総会発表, (1954).
11. Eisenberg, P.; Zentralblatt für Bakt. Para. und Inf. Krank., Originale 71, 420, (1913).
12. Kawai N.; Zentralblatt für Bakt. Para und Inf. Krank., Originale 115, 241, (1930).
13. 八田, 青山, 宮沢, 大竹, 小田: 公衆衛生, 6, 4, 36, (1954).
14. 田村, 東福寺: 日本医事新報, 1414, 12, (1951).
15. 村上, 市橋, 大日方, 間野, 金久: 山陽技術雑誌, 7, 51, (1953).
16. 村上, 市橋, 伴野: 感光色素, 22, 1, (1953).
17. 村上, 大日方, 高橋, 佐竹, 伴野: 感光色素, 22, 4, (1953).
18. 村上, 伴野: 感光色素, 22, 7, (1953).
19. 平木, 山口: 東京医事新誌, 71, 511, (1951).
20. 阪田, 宇治木, 檜垣: 感光色素, 34, 47, (1955).
21. 細谷, 沃田, 中沢, 岡田, 緒方: 第27回日本細菌学会総会発表, (1954).
22. 阿多: 総合医学, 12, 691, (1955).
23. 美甘, 池本, 近藤, 福島, 金児, 日本化学療法学会雑誌, 1, 77, (1953).
24. 岡野: 日本内科学会雑誌, 43, 329, (1954).
25. 岸川: 日本臨床, 13, 617, (1955).
26. Churchman: J. Exp. Med, 16, 221, (1912).
27. Krumwiede. and Pratt: J. Exp. Med, 19, 501, (1914).
28. Burke. and Skinner: J. Exp Med, 39, 613, (1924).
29. 木暮: 衛生学伝染病学雑誌, 21, 248, (1925).

30. 小林：細菌学雑誌，440, 1019, (1932).
31. 占部，檜垣：第27回日本細菌学会総会発表，(1954).
32. 野口，加藤：日本臨床，12, 41, (1954).
33. 岡崎，河口：薬学雑誌，73, 156, (1953).

Summary

The growth of *Candida* group were inhibited in the presence of Triphenylmethan basic color matters, Cyanin color matters, Merzonin and Trichomycin in liquid media.

The growth of *Candida albicans* was not inhibited by Triphenylmethan basic dye in serum, but I have found the yeast likeform of it.

Received February 29, 1956

発熱療法剤 (細菌性発熱物質) の創製並びに臨床応用に関する研究 (第3報)
特に吉田肉腫及び130系腹水肝癌に対する細菌性発熱物質及び各種抗腫瘍性物質の効果について

青山 好作, 宮沢 文雄, 栗栖 弘光, 八田 貞義*, 新井 秀男*,
藤田 洋一*, 浦部 幹雄*, 酒井 雄学*, 青木 幸好*

Studies on the Fever Treatment with Bacterial Pyrogenic Substance. I.
Especially on the Effects of Bacterial Pyrogenic Substance and
Anti-tumor Materials against Yoshida Sarcoma and Ascites Carcinoma 130,

Kosaku AOYAMA, Fumio MIYAZAWA, Hiromitsu KURISU, Sadayosi HATTA,
Hideo ARAI, Yoiti FUJITA, Mikio URABE, Yūgaku SAKAI, and Takayoshi AOKI

まえがき ある種の微生物が抗腫瘍作用をもつとの考えは幾多の臨床経験から深められ、特に丹毒感染により悪性腫瘍患者の臨床所見が好転することが観察されたが、Fehleisen¹⁾がはじめて丹毒連鎖球菌を分離してからはこの培養物の癌患者への応用が試みられ、治療剤として有益なことが報告された。Beebe 及び Tracy²⁾は、*S. marcescens* の懸濁液は単独でも *Streptococci* と併用しても、イヌに接種した淋巴肉腫を完全に消失せしめることを見出し、Baroni³⁾ は実験動物に肉腫を接種するに先立つて予め数日間、*Streptococci* 及び *Gonococci* の培養液を注射しておく、ラットの Tensen 腫瘍の成長に抑制的に作用することを報告した。以来 *Streptococci* と *S. marcescens* の混合液は Caley's toxin とよばれて永い間臨床的に応用されたが、満足な臨床効果を確立するには至らなかった。その後菌体成分中の抑制因子に細菌多糖体が関与していることが解明されたが、当時は純度の高い多糖体が得られず、そのためその成績も動搖を免れなかつた。

その後、悪性腫瘍細胞の形態学的、遺伝学的研究と相まつて、合成薬による悪性腫瘍に対する化学療法が推進されるに至つたが、この方面の研究はその後特に顕著な進展をみるに至らなかった。

著者は、純度高く毒性僅少な細菌多糖体を得たので、これが理化学的、生物学的性状を明らかにすると共に、細菌多糖体の抗腫瘍作用を吉田肉腫及び130系腹水肝癌について実験的に検討を試みた。以下その成績について報告する。

実験方法

① 実験に使つた薬剤 実験には発熱性物質 (緑膿菌より精製、詳細は後述する) および Nitrogenmustard N-oxide (Methyl-bis-β-chloroethylamine N-oxide 以下 NMNO と略す)、Sarkomycin, 8-Azaguanine (5-amino-7-hydroxy-1-H-v-triazole-[D]-Pyrimidine) などの抗腫瘍性物質を選び比較検討した。

② 一般細菌、糸状菌、放線菌などに対する抗菌性 好気性菌はブイヨン培地を基体とし、それぞれの供試薬ごとに所要濃度に稀釈し、100°C 30分間加熱滅菌した。この際、往々にして培養組成中の有機、無機物質により効力に増減がみられることがあるので鼠チフス菌、大腸菌について合成培地を用いてこの点も吟味した。移植菌量は各菌とも5~10万個とし、37°Cに培養後菌発育により生ずる培地濁濁により判定し、その観察は120時間に止めた。なお嫌気性菌はサイオグリコロイト培地を用いて試験した。又糸状菌、放線菌及び酵母菌は、供試培地として Czapeck-Dox 培地とこれに Peptone を1%に加えた培地とを用いた。孢子形成菌の移植菌量は Czapeck Dox 斜面寒天培地で25°C 7~10日培養の新鮮芽胞2白金耳量(トリコフィトンは直接鈎菌移植した)を5cc分注の生理食塩液に平等に浮遊させたものの0.1cc量とした。いずれの場合も培地液量は5ccとした。

③ 吉田肉腫および130系腹水肝癌に対する抑制効果 実験は予め10日間以上実験室内で飼育した健常ラット(体重100g前後)を用い、ラット腹腔内に600~900万個の吉田肉腫細胞を接種した。まず最初の実験として、接種5日目にそれぞれの試剤ごとに一定量を腹腔内注射し、注射前と注射後一定時間の肉腫細胞と白血球の増減

* 日本医科大学衛生教室

について算定した。即ち、無菌的に腹水を採取し白血球算定用のメランジュールで肉腫細胞と白血球の合計数を計算し、これを基礎算定数とし、両者の比率はこの際同一腹水について塗抹標本を作製ギムザ染色を施したものについて肉腫細胞 200 個を算え、この時の肉腫細胞と白血球との比率を実測し、この比率を前出の基礎算定数に乗じて実数を算出した。

またこの塗抹標本を基にして 2,000 個の細胞数 (白血球を除外して) 中の有糸分裂状態を前期 (Prophase), 中期 (Metaphase), 後期 (Anaphase) 及び終期 (Telophase) に分けて観察した。

また試剤の注射開始時期を肉腫細胞接種後 2 日目, 3 日目, 4 日目及び 5 日目で段階的に変えた場合についても実施し, 注射回数も 1 回だけでなく 5 回連続注射も行って成績を検討した (詳細については後述する)。

また 130 系腹水肝癌に対しては健常ラット 3 匹を 1 群とし, ラット腹腔内に 130 系腹水肝癌 0.02cc 量ずつを接種し, 接種 4 日目に発熱性物質では 25mg/kg および 50mg/kg, NMNO は 1.5mg/100g, 8-Azaguanine および Sarkomycin では 30mg/kg, poppy-extract は 0.3cc/100g 量を連続 5 日間投与し, その生存日数を観察した。

④ **Shwartzman 性および発熱性の試験** Shwartzman 性は供試菌に腸チフス菌 (S.58), 緑膿菌, 変形菌, 大腸菌, 黄色ブドウ球菌 (F. D. A209P) の 5 種を選び, 検体はそれぞれのブイヨン培養液 (37°C24時間培養) 並びに斜面寒天培養菌を生理食塩 (5 cc) 浮游液とし Seitz で濾過除菌をした濾液とした両者共に 10 倍稀釈液をも用いた。Sh試験にはウサギを用い定法によつたが惹起因子には緑膿菌々体精製物質 1.5mg 量を静脈内注射した。この際反応がⅣ度に現れたものについてはその表面積を Planimeter で実測した。発熱性試験はウサギを用い日本薬局方に準じて行つた。

実験成績

① **精製供試菌の選択** 細菌多糖体はいずれも Sh 活性能を有し, その作用力も菌種によつて強弱の差がある。伊藤は移植性果粒肉腫の発育に Sh 濾液が影響を与えることを, また長田は腸チフス菌, 志賀菌の濾液が吉田肉腫細胞の増殖を抑制することを報告している。そこで著者らは精製に用いる菌種の選択を Sh 作用発現の度合からきめたが, この結果は第 1 表に示す如く菌種により Sh 反応の現れ方に差異がみられ, 供試菌のうちでは緑膿菌, 変形菌などはその作用が強力で, これらは原液のほか時には 10 倍稀釈液でも良好な反応がみられた。そこで精製実験の供試菌には緑膿菌を選んだ。

第 1 表 Shwartzman 反応による精製供試菌種の選択

供試菌	供試液		ブイヨン培養液								菌体濾液							
	稀釈倍数	判定時間(時)	原液				10倍稀釈液				原液				10倍稀釈液			
			1	3	5	24	1	3	5	24	1	3	5	24	1	3	5	24
S. typhi (S.58)			I	I	I	II	0	0	0	I	I	I	I	II	0	0	0	0
Pseudomonas aeruginosa			I	IV	IV	IV	0	0	0	III	I	I	I	III	0	0	0	0
Proteus vulgaris			0	0	I	IV	0	0	0	I	I	II	II	III	0	0	0	0
E. coli communis			0	I	III	III	0	0	0	I	I	I	I	II	0	0	0	0
Micrococcus pyogenes var aureus (F. D. A. 209P)			0	0	0	I	0	0	0	0	I	I	II	II	0	0	0	0
対照 発熱性物質			I	II	III	IV					I	IV	IV	IV				

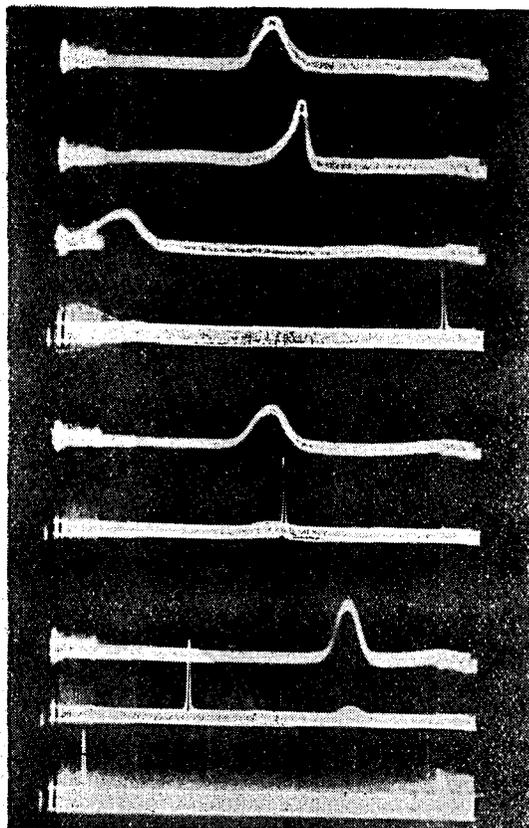
② **精製法³⁻⁷⁾ と理化学的性状** 菌体から多糖体を抽出する際, 結合している蛋白質を完全に除去することが重要で, それには Boivin の方法, Sevag 法, Topley の方法, phenol 処置法, 氷醋酸沈澱法など幾多の方法が考えられているが, この実験では消化酵素による方法を行つた。

まず予め選択された S 型菌を固形培地内で 37°C 48 時間培養後, 精密に雑菌混入のないことを確かめてから菌体をかき集め, 菌体を洗滌する目的で生理食塩液に浮游させよく振りまぜたのち, 遠心分離により菌体を集めた。

この洗滌菌に pH8.4 の磷酸緩衝液 500cc を加え懸濁させたのち, トリプシン (Aomour 製) 50mg を加え 37°C 48時間消化後, 氷室 (5°C) 内に一夜放置して不溶物を遠心により除去した. この上清液はセロハン膜に包み流水中で2昼夜透析し, この間の析出物は遠心により除去後, 減圧により1/30量に濃縮した. これに7%トリクロール酢酸を15倍量に加え1時間振盪機でふりまぜ, その上清液をセロハン膜に包み流水中で4日間透析した. これを Sevag 法により不純物を除去し, 更にエーテル処理により脂溶性成分の除去に努め, 氷酢酸々性アセトンを加え析出物を集め, のちアセトン, アルコールで洗浄し, 真空乾燥により淡灰白色物質 100~150mg を得た.

この物質は定法に従つて定性試験した結果, 蛋白反応である Biuret 反応, Ninhydrin 反応, Xanthoproteine

写真1 電気泳動図



泳動 15分

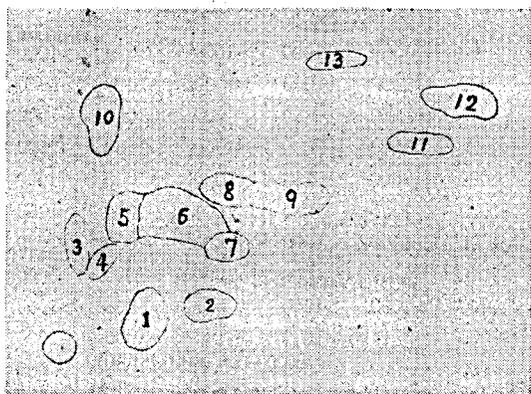
泳動 120分

泳動 60分

泳動 30分

泳動 直後

写真2 濾紙クロマトグラフィー



- 註: 1. Lysine 13. Tyrosine
 2. Arginine
 3. Aspartic acid
 4. Glutamic acid
 5. Serine
 6. Glycine
 7. Asparagine(?)
 8. Theonine
 9. Alanine
 10. (?)
 11. Valine
 12. Leucine, Isoleucine

反応, Millon 反応, Liebermann 反応の呈色反応および Tannic acid, Trichlor acetic acid, 100°C 15 分加熱などの沈澱反応は何れも陰性であつた。これに反し多糖体を検出する Molisch 反応は強陽性。Fehling 反応は水解後は陽性となり化学的には複合多糖体に属するといえた。

この物質は電気泳動装置で測定した結果, 写真〔1〕に示す如く泳動時間を最高 150 分まで試み, この間の泳動像を時間別に撮つたが, いずれの測定時に於ても単一なカーブを示し, かなり純度の高いものであることが窺われた。またこの化学的組成を沓紙クロマトグラフィーで検べた。アミノ酸は塩酸水解後, 石炭酸で一次拡散を行い, つぎにルチジン, コリジン等量混合液で二次拡散を行い, 呈色液にニンヒドリン液を用いた。

糖類の検出には 塩酸水解後, 石炭酸で一次拡散を, ブタノール醋酸液で二次拡散を行い, 呈色液にはフタル酸アニリン混合液を用いた。

この成績は写真〔2〕に示したが, 主な検出物としてはアミノ酸ではロイシン, イソロイシン, ヴァリン, チロシン, アラニン, スレオニン, グリシン, セリン, アスパラギン酸, グルタミン酸, リジン, アルギニンなどでこのほか不明斑 2 つを認めた。糖では N-アセチルグルコサミン, グルコウロン酸, ラフィノーズ (?) などであつた。

③ 細菌多糖体の生理作用 細菌多糖体の生理作用としては Sh 性と発熱性について検べたが, Sh 作用は最少発現量を試験したところ, 準備因子は 10μg 以上では反応はⅣ度に現れ, Ⅲ度には 0.1μg でも認められ良好な Sh 性を有することを確めた。

また発熱性 (実験の便宜上注射後の体温が注射前の体温より 1°C 以上, 上昇した時, 発熱陽性とした) は 1μg/kg 以上では発熱は陽性で, 注射量を増加すると体温はこれに略々比例して最高発熱度は上昇した。

④ 細菌多糖体および各種抗腫瘍性物質の抗菌力 好, 嫌気性菌に対しては Sarkomycin および NMNO を除くすべての供試薬は菌の発育を阻止し得ず, 1000μg/cc でも菌の発育を許した。即ち Sarkomycin では 18 例中 6 例が 1,000μg/cc でその発育を抑制し, 9 例が 500μg/cc 以下の微量で阻止した。NMNO は 18 例中 16 例が 1,000μg/cc 以下で菌の発育を完全に阻止し, 両者の間では前者の方が優れていた。また普通培地と合成培地とでは同一菌株に対する抗菌値が著しく異り, 試剤が培養基成分によつて, 拮抗され力価の減弱することが窺われた (第 2 表その 1 参照)。

第 2 表その 1 各種抗腫瘍物質の好, 嫌気性菌に対する抗菌力

供 試 菌	供 試 薬 判定時間(時)	Sarkomycin		Nitrosen. mus- tard N-oxide		8-Azag- uanine	Poppy extract	Polysac- charide
		24	120	24	120	24	24	24
		グ ラ ム 陽 性 菌	M. Pyogenes var aureus (F. D. A. 209P)	500	500	1000	1000	>1000
	M. Pyogenes var aureus (Heatley)	500	500	1000	1000	>1000	>1000	>1000
	M. Pyogenes var albus (No. 11)	500	500	1000	1000	>1000	>1000	>1000
	B. subtilis	1000	1000	1000	1000	>1000	>1000	>1000
	B. mesentericus	>1000		1000	1000	>1000	>1000	>1000
	Micrococcus sp	500	500	1000	1000	>1000	>1000	>1000
	※Cl. tltani	200	333	100	200			
グ ラ ム 陰 性 菌	S. paratyphi A. (S. 1)	500	1000	1000	>1000	>1000	>1000	>1000
	S. typhi-murium (S. 9)	1000	>1000	1000	>1000	>1000	>1000	>1000
	※※S. typhi murium (S. 9)	200	200	333	1000	>1000	>1000	>1000
	S. typhi (S. 58)	500	>1000	1000	1000	>1000	>1000	>1000
	S. dysenteriae (Shiga)	1000	1000	333	1000	>1000	>1000	>1000
	S. dysenteriae (K. B. Ⅲ)	1000	1000	1000	1000	>1000	>1000	>1000
	Pr. vulgaris (Ox19)	1000	1000	1000	>1000	>1000	>1000	>1000
	Past. septica	>1000		1000	>1000	>1000	>1000	>1000
	E. coli communis	1000	>1000	>1000		>1000	>1000	>1000
	A. aerogenes	>1000		>1000		>1000	>1000	>1000
	※※A. aerogenes	500	500	333	333	>1000	>1000	>1000

- 註: (1) 表中数値の単位は $\mu\text{g}/\text{cc}$ とす。
 (2) ※印は基本培地にサイオグリコレイト培地を使用した。
 (3) ※※印は基本培地にそれぞれの合成培地を使用したものを示す。

糸状菌, 放線菌および酵母菌に対しては, いずれの試剤も $1,000\mu\text{g}/\text{cc}$ で菌の発育を阻止し得なかつた (第2表その2参照)。

第2表その2 各種抗腫瘍物質の糸状菌, 放線菌及び酵母菌に対する抗菌力

供試菌		供試薬		Nitrogen. mustard N-oxide		8-Azaguanine	Poppy extract	Polysaccharide
		※	※※	※	※※	※※	※※	※※
糸状菌	Penicillium (C51)	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
	Penicillium (GH3)	>1000	>1000	>1000	1000	>1000	>1000	>1000
	Penicillium (Q176)	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
	Aspergillus niger	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
	Aspergillus oryzae (今野)	>1000	>1000	>1000	1000	>1000	>1000	>1000
	Aspergillus oryzae (星野)	>1000	>1000	>1000	1000	>1000	>1000	>1000
	Aspergillus oryzae (鬼木)	>1000	>1000	>1000	1000	>1000	>1000	>1000
	Rhizopus (R64)	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
	Monilia albicans	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
	Tricophyton purpureum	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
	Mucor (M11)	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
	酵母菌及び放線菌	Saccharomyces sake	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
Willia anomala		>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
Torula utilis		>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
Actinomyces (No. 14)		>1000	>1000	>1000	1000	>1000	>1000	>1000
Actinomyces (No. 20)		>1000	>1000	>1000	1000	>1000	>1000	>1000
Actinomyces (No. 22)		>1000	>1000	>1000	1000	>1000	>1000	>1000

- 註: (1) ※印は Czapeck-Dox (1% pepton加) 培地を使用
 (2) ※※印は Czapeck-Dox 培地を使用
 (3) 表中数値の単位は $\mu\text{g}/\text{cc}$ とし, 培地7日目の成績をもつて示した。

⑤ 細菌多糖体および各種抗腫瘍性物質の吉田肉腫に対する抑制効果

④ 注射後の細胞数および有糸分裂像の時間的变化 吉田肉腫を接種し殆んど純培養に近い時期 (接種第5日目) に, NMNO では $1.5\text{mg}/100\text{g}$, Sarkomycin では $30\text{mg}/100\text{g}$, 発熱性物質では $25\mu\text{g}/100\text{g}$, 8-Azaguanine では $30\text{mg}/100\text{g}$, Poppy-extract では $0.3\text{cc}/100\text{g}$ を1回注射し, 注射前および注射24時間以内の細胞の数的, 質的推移を検べたが, この結果は第3表その1に示す如く試みた範囲の注射量では特に目立つた細胞数および白血球数の動揺はみられなかつた。

生存日数をみると NMNO は対照に較べて7~12日の死期延長がみられ, 発熱性物質では1匹が20日以上生存したほかは余り顕著な効果を認めなかつた (第3表その1参照)。

有糸分裂像は各試剤ともに数的な差異はあるが, いずれも分裂細胞数は漸減し, 6時間前後が最も顕著で, このような時期には分裂も多くの場合, 前期および中期で抑制されていた。この現象は Sarkomycin, 8-Azaguanine, NMNO では特につきりと認められる。発熱性物質では分裂数の減少はみられるが, 分裂像は最も効果が期待される6時間前後に中期以後の分裂像の減少はみられるけれども中止の状態にまでは及んでいない。いずれの試剤でも24時間目以後は分裂数は日に復した (第3表その2参照)。

第3表その1 各種抗腫瘍性物質を1回注射した際の吉田肉腫細胞数の変化

動物番号	供試薬	体重(g)	注射量	区分	注射前及び注射後の時間							生存日数
					注射前	注射後1時間目	3時間目	6時間目	9時間目	12時間目	24時間目	
No.1	8-Azaguanine	92	30mg/100g	S	62	52	56	45	41	28	21	7
				W	7.2	6.3	7.7	8.6	9.5	3.7	2.5	
No.2		116		S	193	175	145	180	112	145	168	9
				W	6.0	7.1	5.4	4.0	3.8	6.6	7.9	
No.3	Nitrogenmustard N-oxide	106	1.5mg/100g	S	292	232	288	217	198	195	97	16
				W	12.8	14.7	15.2	12.0	12.4	13.3	13.6	
No.4		93		S	241	225	177	124	117	118	51	21
				W	22.5	18.4	20.4	17.8	15.2	14.4	10.0	
No.5	Sarkomycin	110	30mg/100g	S	141	147	151	160	137	145	115	9
				W	2.1	2.2	1.7	1.8	5.0	3.0	3.2	
No.6		115		S	299	189	177	165	156	172		9
				W	4.6	7.9	11.2	8.2	10.9	7.3		
No.7	Pyrogenic substance	120	25µg/kg	S	66	68	71	72	77	95	86	生存
				W	3.7	4.7	10.3	27.6	21.8	23.4	22.1	
No.8		103		S	180	176	190	176	184	166	169	7
				W	2.9	3.2	3.9	4.0	4.4	3.0	3.9	
No.9	Poppy-extract	103	0.3cc/100g	S	269	232	150	119	134	154	199	9
				W	14.2	8.2	7.2	10.5	8.8	9.2	9.8	
No.10		120		S	85	56	53	43	21	17	30	11
				W	4.0	7.7	11.1	11.1	10.0	14.3	7.8	
No.11	対照	106		S	224	265	232	284	327	338	354	10
				W	11.8	13.1	15.7	15.9	11.5	12.7	18.7	
No.12		125		S	71	79	50	63	59	60	65	9
				W	14.5	14.4	20.8	26.2	37.8	22.3	25.2	

註 (1) Sは吉田肉腫細胞数を, Wは白血球数を示す。(2) 表中数値の単位は千単位をもつて示す。以下の表もこれに準ず。

第3表その2 各種抗腫瘍性物質を1回注射した際の吉田肉腫細胞中の有糸分裂数

動物番号	供試薬	注射量	分裂期	注射前及び注射後の時間										
				注射前	注射後1時間目	3時間目	6時間目	9時間目	12時間目	24時間目				
No.1	8-Azaguanine	30mg/100g	Prophase	4	6			6	5	2	0	0		
			Metaphase	2				6	2	0	0			
	Anaphase	0	0	0				0	0					
	Telophase	0	0	0				0	0					
No.2			Prophase	15	38	47	24	1	6	9	20	36		
			Metaphase	12				23	16	7	1		10	6
			Anaphase	6				5	6	1	0		7	7
			Telophase	5				5	3	0	0		0	3
No.3	Nitrogen-mustard N-oxide	1.5mg/100g	Prophase	21	50	39	12	2	0	0	7	9		
			Metaphase	24				16	6	4	0		2	
			Anaphase	1				6	2	1	0		0	
			Telophase	4				4	0	0	0		0	
No.4			Prophase	15	45	5	4	1	4	3	19	23		
			Metaphase	19				3	5	2	1		6	4
			Anaphase	9				0	2	0	1		8	2
			Telophase	2				0	0	0	1		0	0
No.5	Sarkomycin	30mg/100g	Prophase	21	57	21	9	3	6	17	19	46		
			Metaphase	23				4	3	2	9		2	20
			Anaphase	10				0	0	1	0		1	4
			Telophase	3				0	1	0	1		1	3
No.6			Prophase	26	47	22	7	10	3	5	7	13		
			Metaphase	13				3	1	1	0		0	6
			Anaphase	8				2	0	2	0		1	0
			Telophase	0				0	0	0	0		0	0

動物番号	供試薬	注射量	分裂期	注射前及び注射後の時間								
				注射前	注射後1時間目	3時間目	6時間目	9時間目	12時間目	24時間目		
No. 7	Pyrogenic substance	25 µg/kg	Prophase	10	3	0	0	0	0	0	0	0
Metaphase			3	1	0	0	0	0	0	0	0	
			Anaphase	1	0	0	0	0	0	0	0	0
			Telophase	1	0	0	0	0	0	0	0	0
No. 8			Prophase	23	31	13	21	13	39	30	50	
			Metaphase	24	23	10	1	20	2	15	15	
			Anaphase	5	9	5	2	7	2	3	3	
			Telophase	2	8	0	0	4	3	2	2	
No. 9	Poppy-extract	0.3cc/100g	Prophase	4	22	10	16	11	13	14		
Metaphase			9	22	12	1	13	2	12	5		
			Anaphase	5	8	4	4	3	2	1		
			Telophase	2	3	1	1	3	0	1		
No. 10			Prophase	39	22	7	15	27	21	47		
			Metaphase	20	14	12	4	18	1	29		
			Anaphase	10	13	4	5	6	1	6		
			Telophase	10	13	0	2	2	2	3		
No. 11	対 照		Prophase	13	20	8	11	22	16	24		
Metaphase			10	23	8	1	13	3	16	16		
			Anaphase	1	1	1	2	1	1	4		
			Telophase	0	2	0	0	1	0	3		
No. 12			Prophase	20	21	18	17	15	13	14		
			Metaphase	9	7	6	7	11	8	7		
			Anaphase	2	1	0	3	2	1	2		
			Telophase	2	1	2	1	2	2	2		

⑤ 注射量と抑制効果 各試剤ごとに注射量を3~4段階に分けて抑制効果を検べた。注射は肉腫細胞接種第5日目から開始し5日間連続投与した。

1) 発熱性物質は50µg/kg, 100µg/kg, 500µg/kg および1000µg/kg 量を投与したが, 各投与群ともに細胞数の著明な抑制への期待は薄く, その投与量が500µg/kg, 1,000µg/kg という比較的大量投与群では, むしろ対照群に類似の生存日数を示したにも拘らず, 50µg/kg, 100µg/kg 投与群では各1例ずつが対照よりも6日間の死期延長を認めた。(第4表その1参照)

次に肉腫細胞の形態および有糸分裂の状態についてみると, かなり変化に富んだ所見がみられる。即ち投与1日目頃から原形質および核は濃染し, 日を経るに従って原形質は不整形となり突起(アメーバ様変化) 或は空胞を認め(写真3および4参照) この頃になると三核性細胞を認める。また細胞もIおよびII型のものが多くなり死期に近づくにつれて原形質は破壊しまた淡染となった。この所見は投与量の多い1,000µg/kg および500µg/kg 群に強度に且鮮明にみられたが, 100µg/kg, 50µg/kg 投与群でも観察出来た。従って発熱性物質投与の際の変化は核よりも原形質に目立つといえる。有糸分裂の状態をみると, 試剤投与中でも分裂は進行しているが, 分裂が抑制されたものでは死期の延長がみられた。白血球は数的にも量的にも著変を認めなかつた(第4表その2参照)

第4表その1 発熱性物質の注射量を変えて投与した際の吉田肉腫細胞数の変化

動物番号	注射量(µg/100g)	区	日													
			注 射 前	注 射 後 4 時 間 目	2 日 目	注 射 後 4 時 間 目	3 日 目	注 射 後 4 時 間 目	4 日 目	注 射 後 4 時 間 目	5 日 目	注 射 後 4 時 間 目	7 日 目	9 日 目	11 日 目	13 日 目
No. 1	50	S W	76 2.6	48 3.6	29 5.0	37 3.4	38 0.7	28 3.7	47 4.7	32 6.9	47 5.0	64 10.4	91 3.5	86 7.4	110 2.2	166 5.5
No. 2	50	S W	296 15.9	180 1.8	225 5.9	241 1.9	260 1.2	163 1.1	74 1.1	88 1.1	134 3.9	160 2.6	121 0.6			

動物 番号	注射量 ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	区分	注射前	注射後	2日	注射後	3日	注射後	4日	注射後	5日	注射後	7日	9日	11日	13日
			目	目	目	目	目	目	目	目	目	目	目	目	目	目
No.3	100	S W	179 4.2	67 6.1	126 2.6	190 1.2	212 0.8	75 1.5	60 0.3	102 3.7	55 5.5	29 4.9	22 2.1			
No.4	100	S W	59 2.4	52 5.5	49 2.7	53 1.5	79 6.0	25 2.9	43 3.8	48 4.9	29 2.5	17 3.5	73 2.7	29 2.7	32 6.1	104 2.1
No.5	500	S W	212 9.5	108 9.8	104 2.1	58 1.6	142 8.6	77 3.2	118 1.6	55 5.0	50 0.8	146 1.3				
No.6	500	S W	169 1.2	88 8.4	197 5.9	155 1.1	204 6.1	111 1.3	94 3.9	85 1.4	64 1.6					
No.7	1000	S W	162 1.6	49 4.9	105 3.2	73 0.2	137 3.1	65 3.5	94 1.7	78 4.5	59 4.0					
No.8	1000	S W	114 7.4	45 4.3	90 2.2	105 1.4	173 7.2	90 8.5	94 1.7	70 1.7	69 0.9	100 1.1	63 1.7			
No.9	対照	S W	143 1.9	170 8.0	173 2.2	170 0.5	163 0.3	174 2.7	122	94	133 7.6	91	97 1.2			
No.10	対照	S W	49 5.0	56 5.3	56 3.9	55 5.1	102 6.2	90 3.6	89 2.3	92 2.3	112 1.9	120 9.3	139 7.1			

注：紙面の都合で NMNO, 8-Azaguanine, Sarkomycin 及び Poppy-extract の実験成績は割愛した。

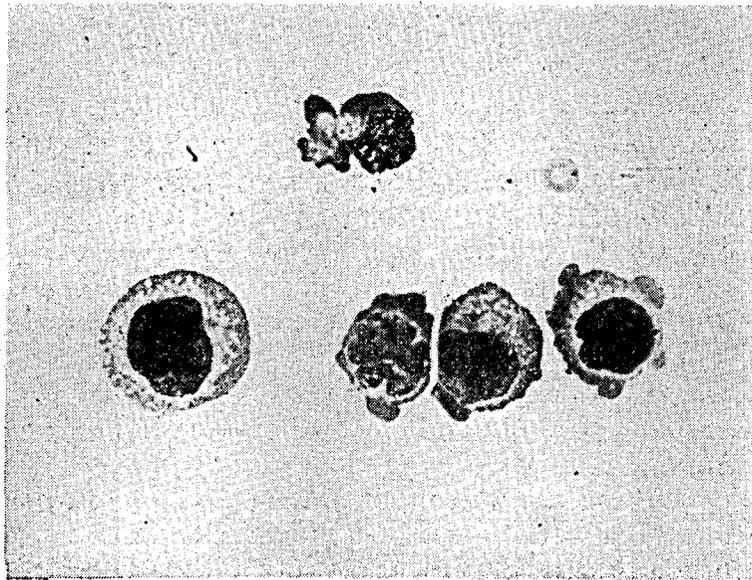
第4表その2 発熱性物質の注射量を変えて投与した際の吉田肉腫細胞中の有糸分裂数

動物 番号	供試薬 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	分裂期	注射前及び注射後の時間													
			注射前	注射後 4時間	2日	注射後 4時間	3日	注射後 4時間	4日	注射後 4時間	5日	注射後 4時間	7日	9日	11日	13日
No.1	50	Prophase Metaphase Anaphase Telophase	4 2 3 1	2 0 0 0	0 2 0 0	1 0 0 1	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	18 9 1 4	32
No.2	50	Prophase Metaphase Anaphase Telophase	6 2 4 2	6 1 3 0	12 10 4 1	23 7 23 4	22 23 1 5	19 23 5 4	16 18 1 1	4 7 0 4	4 7 0 4	7 14 2 3	12 26 13 6	32		
No.3	100	Prophase Metaphase Anaphase Telophase	5 4 3 0	14 2 3 3	17 22 4 1	19 5 3 3	23 5 6 6	17 21 5 1	5 16 2 0	4 15 2 1	4 22 15 22	4 5 12 1	0 1 0 0	1		
No.4	100	Prophase Metaphase Anaphase Telophase	5 3 1 0	1 0 0 0	1 0 0 0	1 0 0 0	1 0 0 0	2 0 0 0	1 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	1 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	7 3 0 0	12 6 2 7
No.5	500	Prophase Metaphase Anaphase Telophase	6 1 2 2	12 5 8 3	22 9 28 3	17 6 5 5	15 24 6 1	18 20 4 3	12 18 1 5	6 13 1 2	6 22 13 22	4 5 3 1	11			
No.6	500	Prophase Metaphase Anaphase Telophase	8 1 3 1	13 2 3 2	19 6 2 3	23 5 7 6	15 15 3 1	6 4 0 1	6 13 0 2	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0			

動物 番号	供試 薬 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	分裂期	注射前及び注射後の時間														
			注射 前	注射後 4時間 目	2日 目	注射後 4時間 目	3日 目	注射後 4時間 目	4日 目	注射後 4時間 目	5日 目	注射後 4時間 目	7日 目	9日 目	11日 目	13日 目	
No.7	1000	Prophase Metaphase Anaphase Telophase	18 10 7 1	36 14 3 1	41 19 6 1	26 12 7 1	22 31 2 2	15 28 1 7	14 23 0 5	2 2 1 0	2 1 0 0	0 0 0 0					
No.8	1000	Prophase Metaphase Anaphase Telophase	7 1 4 4	16 12 3 8	18 28 6 3	6 14 3 1	8 13 7 4	22 28 6 8	10 28 7 3	2 9 1 1	2 13 9 1	8 6 1 5	3 1 0 0	4			
No.9	対照	Prophase Metaphase Anaphase Telophase	25 18 4 17	64 20 14 1	45 5 7 2	32 15 6 6	30 10 7 5	42 5 2 2	13 4 1 2	20 11 2 2	23 8 2 2	23 11 2 1	19 10 1 1				
No.10	対照	Prophase Metaphase Anaphase Telophase	18 9 4 9	37 13 10 5	36 14 7 6	37 12 5 8	31 16 4 2	25 17 3 1	23 12 3 0	23 7 2 2	21 10 4 6	43 23 8 6	38 21 8 3				

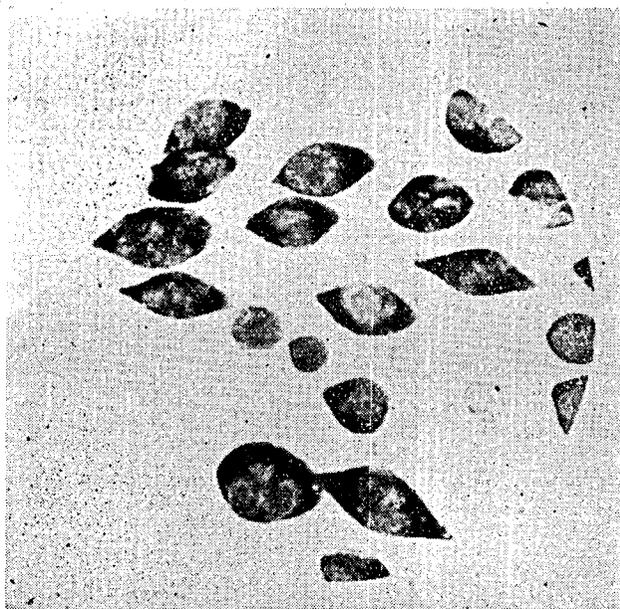
註: NMNO, 8-Azaguanine, Sarkomycin 及び Poppy-extract の実験成績は割愛した。

写真 [3] 吉田肉腫移植ラットに発熱性物質 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 量を3回投与した際の所見



原形質のアメーバ様変化および空泡化がみられ, また核の多形性を認む。

写真 [4]. 吉田肉腫移植ラットに発熱性物質 50 μ g/kg 量を4回投与した際の
所見



原形質の紡錘状変化を認む

ii) NMNO は 1.5mg/100g, 3.0mg/100g を投与したが、吉田肉腫細胞に強い障害を与え、試剤投与量に比例して細胞数は著しい減少を示した。同時に白血球も減少したが対照（接種 10 日目斃死）に較べると約 2～3 倍の生命延長が認められた。有糸分裂像は投与 4 時間目に既に分裂は中期で抑制され、投与 2 日目では僅かに分裂が認められ、3 日以後では分裂は停止の状態となった。形態も試剤との接触後は急速に小さくなり日を経るにつれて破壊像が益々増加したが、斃死近くなると幾分分裂の進行がみられた。

iii) 8-Azaguanine⁹⁻¹¹⁾ は 1.5mg/100g, 3.0mg/100g, 15mg/100g, および 30mg/100g を投与したが、試剤投与によつても肉腫細胞数には余り変動はみられず、数的抑制は不鮮明で 30mg/100g 投与群のみが対照群に較べて 2～6 日の生存延長を認めたに止まった。然し質的には異常や異常分裂像がみられ、細胞は淡染となりその形態も小さくなった。

iv) Sarkomycin¹⁰⁾ では 9mg/100g, 18mg/100g, 25mg/100g および 30mg/100g 量を投与したが、肉腫細胞を強く抑制して、これを減少させるまでには至らなかった、ただ 25mg/100g 以上を連続投与すると 2～3 日の死期延長がみられた。

有糸分裂像は 30mg/100g 投与群では中期以後の抑制がみられたが、このほかの群では対照と類似の分裂像を示した。形態では原形質融解、染色体散乱、巨態細胞、三核細胞などを比較的多数認めるが、この様な質的な変化の割には強い抑制力となつて現れなかった。

v) Poppy-extract は 0.3cc/100g 量を投与したが、期待されるような生存日数の延長はみられず、肉腫細胞、有糸分裂像も対照群に較べて遜色なく、抑制像を想像する成績は得られなかった。

◎ 注射開始時期と抑制効果 次に注射開始時期をいろいろに変え連続 5 日間投与しその抑制効果を試験した。

i) 発熱性物質 (25 μ g/kg 投与) は接種 2 日目から投与した場合は、対照肉腫群に較べて 2 日間の死期延長が、接種 4 日目から投与したとき 1 例が 5 日間死期延長したほかは類似の成績を示した。

肉腫細胞数は 前回の実験と同様顕著な数的変動はみられないが、有糸分裂像は注射に伴い幾分抑制された。細胞障害の状態は前回と同様核よりも原形質に著変を認めた (第 5 表その 1 およびその 2 参照)。

第5表その1 発熱性物質の注射開始時期を変えた際の吉田肉腫細胞数の変化

動物番号	注射開始時期	注射量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	区分	注射前及び注射後の時間					
				接種 5日目	6日目	8日目	10日目	12日目	15日目
No. 1	接種2日目より注射	25	S W	149 6.2	175 9.8	137 3.3	261 2.6	269 2.4	
No. 2	接種2日目より注射	25	S W	133 17.4	250 21.1	261 16.7	266 14.0	280 9.3	
No. 3	接種3日目より注射	25	S W	193 4.4	180 6.9	145 3.7			
No. 4	接種3日目より注射	25	S W	149 7.3	143 8.1	146 5.3	223 4.1		
No. 5	接種4日目より注射	25	S W	189 47.4	206 42.6	244 11.5	140 5.1		
No. 6	接種4日目より注射	25	S W	54 57.7	168 62.5	100 56.8	72 43.5	131 6.7	243 11.4
No. 7	接種5日目より注射	25	S W	185 8.5	224 11.8	241 10.0	258 12.2		
No. 8	接種5日目より注射	25	S W	109 10.8	200 9.2	188 12.7	211 6.5		
No. 9	対照		S W	154 3.6	215 4.8	290 2.9	308 1.2		
No. 10	対照		S W	326 14.0	349 9.3	344 8.7	364 8.3		

第5表その2 発熱性物質の注射開始時期を変えた際の吉田肉腫細胞中の有糸分裂数

動物番号	注射開始時期	注射量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	分裂期	注射前及び注射後の時間					
				接種 5日目	6日目	8日目	10日目	12日目	15日目
No. 1	接種2日目より注射	25	Prophase Metaphase Anaphase Telophase	15 27 9 5 } 56	29 7 4 3 } 43	5 4 0 1 } 10	11 7 0 0 } 18	14 6 3 3 } 26	
No. 2	接種2日目より注射	25	prophase Metaphase Anaphase Telophase	25 12 5 6 } 48	33 6 6 1 } 46	4 5 1 0 } 10	5 5 2 1 } 13	8 7 4 2 } 21	
No. 3	接種3日目より注射	25	Prophase Metaphase Anaphase Telophase	11 9 5 5 } 30	17 3 3 0 } 23	12 8 0 0 } 20			
No. 4	接種3日目より注射	25	Prophase Metaphase Anaphase Telophase	28 23 11 2 } 64	21 14 3 1 } 39	13 11 5 1 } 30	12 12 1 0 } 25		
No. 5	接種4日目より注射	25	Prophase Metaphase Anaphase Telophase	25 23 8 6 } 62	15 5 3 1 } 24	13 15 2 2 } 22	18 13 8 1 } 40		
No. 6	接種4日目より注射	25	Prophase Metaphase Anaphase Telophase	0 0 0 0 } 0	0 0 0 0 } 0	0 0 0 0 } 0	4 4 0 1 } 9	1 0 0 0 } 1	13 20 4 3 } 40

動物番	注射開始時期	注射量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	分裂期	注射前及び注射後の時間									
				接種 5日目	6 "日	8 "日	10 "日	12 "日	15 "日				
No. 7	接種5日目より注射	25	Prophase Metaphase Anaphase Telophase	18 11 1 0	30	11 8 5 2	26	23 16 3 2	44	1 0 0 0	1		
No. 8	接種5日目より注射	25	Prophase Metaphase Anaphase Telophase	31 35 6 5	77	22 12 6 0	40	8 7 0 0	15	25 19 1 1	46		
No. 9	対 照		Prophase Metaphase Anaphase Telophase	19 14 2 1	36	22 8 4 0	34	12 18 6 1	37	11 2 0 0	13		
No. 10	対 照		Prophase Metaphase Anaphase Telophase	20 9 0 1	30	21 10 2 1	34	12 14 2 2	30	10 6 1 0	17		

ii) NMNO (1.5mg/100g 投与) では注射開始時期の早いもの程効果が著明で、有効例では注射後一時肉腫細胞数は減少したが、日を経るに従つて幾分増加の傾向がみられた。即ち接種4日目およびそれより早く注射を開始した群では一部を除くと何れも101日以上生存した。接種5日目から開始した群では35日目と45日目に斃死したが、対照に較べると4~5倍の生存延長といえた(第6表その1参照)。肉腫細胞は投与2~4日頃からその形態は著しく小さくなり、有糸分裂も停止し殆んど分裂像を認めなかつた。対照肉腫群では活潑な分裂が認められた(第6表その2参照)。

第6表その1 NMNOの注射開始時期を変えた際の吉田肉腫細胞数の変化

動物番	注射開始時期	注射量 ($\text{mg}/100\text{g}$)	区 分	注射前及び注射後の時間																
				接種 4日目	6 "日	8 "日	10 "日	12 "日	15 "日	18 "日	22 "日	26 "日	30 "日	35 "日	40 "日	45 "日	66 "日	87 "日	101 "日	
No. 1	接種2日目 より注射	1.5	S	33	29	19	19	17	46	33	68	88	56	57	48	37	61	42	検液	
			W	4.9	2.9	1.7	1.5	1.7	4.8	23.0	14.9	12.5	7.8	10.0	8.7	7.4	13.5	3.3	不足	
No. 2	接種2日目 より注射	1.5	S	90	54	25	50		42	95	120	96	62	63	73	95	61	97	77	
			W	19.1	19.5	17.2	1.6		3.2	9.8	5.9	14.0	12.7	13.5	10.6	10.8	11.3	8.4	9.2	
No. 3	接種3日目 より注射	1.5	S	94	43	6	8	26	47	72	105	120	130	96	108	91	131	130	99	
			W	11.3	5.1	2.5	5.8	10.4	15.9	13.1	25.8	19.5	16.0	15.3	18.8	9.0	17.2	18.6	25.4	
No. 4	接種3日目 より注射	1.5	S	37		51	25	22												
			W	3.0		2.6	1.2	1.2												
No. 5	接種4日目 より注射	1.5	S	295	22	49	39	36					134	170	161	124	106	95	145	検液
			W	13.9	12.5	17.1	11.4	9.3						11.0	15.1	16.8	20.2	14.4	9.0	18.7
No. 6	接種4日目 より注射	1.5	S	53	56	24	10	14	12	33	28	57	50	60	65	94	92	152	121	
			W	4.9	2.9	1.5	3.1	6.8	4.9	1.4	3.6	5.7	3.8	9.3	14.5	17.3	11.2	13.8	15.4	
No. 7	接種5日目 より注射	1.5	S	157	84	13	16	28	28	72	76	79	96	70	123	153				
			W	4.2	7.6	12.1	6.6	5.2	17.2	14.2	15.5	9.0	5.0	3.9	6.1	8.7				
No. 8	接種5日目 より注射	1.5	S	252	54	24			20	40		149	140	178						
			W	18.8	19.3	13.4			9.0	7.0		17.4	18.6	17.6						
No. 9	対 照		S	293	223	212	(9日目) 294													
			W	13.5	10.5	12.0	12.7													
No. 10	対 照		S	143	354	310	(9日目) 160													
			W	1.6	3.9	14.7	6.7													

註：紙面の都合で Sarkomycin および Poppy-extract の実験成績表は割愛した。

第6表その2 NMNO の注射開始時期を変えた際の吉田肉腫細胞中の有糸分裂数

動物番号	注射開始時期	注射量(mg/100g)	分裂期	注射後及び注射後の時間																				
				接種4日目	6日目	8日目	10日目	12日目	15日目	18日目	22日目	26日目	30日目	35日目	40日目	45日目	66日目	87日目	101日目					
No. 1	接種2日 目より 注射	1.5	Prophase Metaphase Anaphase Telophase		6 0 0 0	0 6 0 0	7 1 0 0	0 8 0 0	0 0 0 0	2 1 2 0	0 5 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0							
No. 2	接種2日 目より 注射	1.5	Prophase Metaphase Anaphase Telophase		2 0 0 0	5 0 0 0	0 5 0 0	0 0 0 0	1 0 2 1	0 0 1 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	3 1 1 0	0 5 0 0	2 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0
No. 3	接種3日 目より 注射	1.5	Prophase Metaphase Anaphase Telophase	4 10 1 0	2 1 0 1	1 4 0 0	10 1 0 0	0 10 0 0	0 0 0 0	0 1 1 0	1 1 2 0	0 0 0 0												
No. 4	接種3日 目より 注射	1.5	Prophase Metaphase Anaphase Telophase	1 0 0 0	1 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0
No. 5	接種4日 目より 注射	1.5	Prophase Metaphase Anaphase Telophase	4 4 0 1	9 0 0 0	1 9 0 0	0 1 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	1 1 1 0	0 3 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	1 0 0 0
No. 6	接種4日 目より 注射	1.5	Prophase Metaphase Anaphase Telophase		3 1 0 0	4 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	1 0 2 0	0 3 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	1 0 0 0	0 1 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0
No. 7	接種5日 目より 注射	1.5	Prophase Metaphase Anaphase Telophase	0 2 0 1	2 0 0 0	0 2 0 0	0 0 0 0	2 0 0 0	0 2 0 0	3 0 0 0	0 3 0 2	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	1 2 1 0	0 4 1 1	3 1 1 6	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0
No. 8	接種5日 目より 注射	1.5	Prophase Metaphase Anaphase Telophase	11 12 1 2	26 10 1 2	21 34 0 0	2 0 0 0	2 1 0 0	0 3 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 2 0 0	0 2 0 0	0 0 0 0									
No. 9	対照		Prophase Metaphase Anaphase Telophase	14 20 0 0	34 13 5 4	10 41 8 0	18 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0
No. 10	対照		Prophase Metaphase Anaphase Telophase	23 17 0 4	44 16 5 0	13 21 0 0	15 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0

註： 紙面の都合で Sarkomycin および Poppy-extract の実験成績表は割愛した。

iii) Sarkomycin (30mg/100g 投与) では接種3日目から治療を開始した群に治療効果が最も強く現れ、対照群に較べて3~4日の生存延長を認めた。肉腫細胞をみると染色体の散乱したもの、原形質の融解或は不整形のものなどが散見された。その他の群は対照と類似の成績を示した。

iv) Poppy-extract (0.3cc/100g 投与) は肉腫細胞が或程度に発育し腹水が貯溜したような時期から投与した方が良い結果を示した。即ち接種4日目および5日目から投与した際は各1匹宛が101日以上生存した。一般的には細胞数は投与によって減少の傾向が窺われ、細胞はこれにつれて小さくなりⅠ型およびⅡ型と思われるものが多くなった。

⑥ 細菌多糖体および各種抗腫瘍性物質の130系腹水肝癌に対する抑制効果 対照群は17日目に2例、18日目に1例斃死したが、実験群では延命効果が認められ、各群ともにそのうちの1例ずつは80日間以上生存した。残余

の実験例をみると発熱物質では2~5日の生存日数の延長を示し、NMNOでは1例は34日目、他の1例は51日目に斃死して2~3倍の延長を示し、Sarkomycinでは1例は40日、他の1例は41日生存して約2.5倍の死期延長を認めた。8-Azaguanineでは約3~4倍、Poppy-extractは2~12日の死期延長を認めた。

総 括

細菌性発熱物質¹¹⁻¹³⁾が発熱作用のほかSh作用、血糖および白血球に対する刺激作用などがあることはすでに報告したが、この細菌多糖体が正常臓器には障害を与えず、腫瘍組織にのみSh反応を起すとの報告に着目し、著者らが緑膿菌々体より抽出精製した発熱性物質が吉田肉腫および130系腹水肝癌にどのような影響を与えるかを検討してみた。

ラットに吉田肉腫細胞を接種し、殆んど純培養に近い時期に試剤ごとに一定量を1回注射し、注射前及び注射後24時間以内の肉腫細胞の数的、質的推移を検べたが試みた範囲の注射量では認むべき動揺はみられなかつた。一般に薬剤のより確実な効果を期待するためには適当な薬用量、適当な投与時期及び投与回数などが重要な問題になってくるので、著者はこれらの点に留意しながら実験を進めた。発熱性物質ではこれを投与すると吉田肉腫細胞は核よりも原形質に強い障害を与え、比較的大量投与群(1,000 μ g/, 500 μ g/kg)よりも少量投与群(100 μ g/kg, 50 μ g/kg)の方が生存日数は延長した。NMNOでは試剤投与量に比例して細胞数は著しく減少し、有糸分裂も中期以後は抑制された。Sarkomycinはその量が25mg/100g以下では対照群と類似の成績であるが、30mg/100g量では有糸分裂の抑制は顕著であつたが生存日数は余り延長しなかつた。

8-Azaguanineは30mg/100g量を投与したときに肉腫細胞の質的変動がみられるが、量的には著変を認めない。Poppy-extractはこれを投与するときは肉腫細胞は割合小さくなり、I型、II型と思われるものが多くなつたが、原形質及び核には特記すべき著変を与えなかつた。130系腹水肝癌にはNMNO, Sarkomycin, 8-Azaguanineに於て効果が顕著であつた。

終りに臨み本研究に際し吉田肉腫および130系腹水肝癌を御分与下さつた佐々木研究所並に試薬を御提供下さつた吉富製薬、田辺製薬、明治製薬の學術部の方々に厚く御礼申し上げます。

参 考 文 献

- 1) Reilly, H. C.: *Cancer Research*, 13 (12). 821 (1953).
- 2) Beebe, S. P., and Tracy, M.: *J. A. M. A.* 49. 1493 (1907).
- 3) 八田: *綜合医学*, 10 (9). 2 (1953).
- 4) 八田: *日医大誌*, 20 (3). 1 (1953).
- 5) 山田: *日医大誌*, 21 (2). 149 (1954).
- 6) Mc Ginty, D. A., Wilson, M. I., and Rodney, G.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 70, 335 (1949).
- 7) Rodney, G.: *J. Bact.* 50. 129 (1945).
- 8) Kidder, G. W., and Dewey, V. C.: *J. Biol. Chem.* 179. 383 (1949).
- 9) 山元, 山田, 永田, 手嶋: 第12回日本癌学会口演(昭28.4).
- 10) Umezawa, H., Takeuchi, T., Nitta, K., Okami, Y., Yamamoto, T. and Yamaoka, S.: *J. Antibiotics*, 4, 147 (1953).
- 11) 八田, 青山, 舟治, 中島: *衛試* 70. 83 (1952).
- 12) 八田, 青山, 小沢, 宮沢, 小笠原: *衛試* 71. 40 (1953).
- 13) 八田, 青山, 舟治, 菊地: *最新医学* 5 (11). 4 (1948).

Summary

The author reported the results of the experiment that the effect of bacterial polysaccharide and anti-tumor materials of various kinds against Yoshida sarcoma and Ascites carcinoma 130. On basis of the strength of Schwartzman reaction of the filtrate, we selected *Pseudomonas aeruginosa* as a purified testing bacterium, and extracted and purified polysaccharide by digest enzyme method.

Salveing its physical, chemical and biological natures, we examined the antitumor effect of it, and at the time examined the anti-tumor materials such as NMNO, Sarkomycin, 8-Azaguanine and poppy-extract under the same condition.

Received February 29, 1956

発熱療法剤(細菌性発熱物質)の創製並びに臨床応用に関する研究(第4報) 細菌性発熱物質をもつてする癌皮内反応について

青山 好作, 栗栖 弘光, 宮沢 文雄, 八田 貞義**
塚川 光直* 藤田 洋一**, 浦部 幹雄**, 酒井 雄学**,

Studies on the Fever Treatment with Bacterial Pyrogenic Substance. IV.

In the Carcinoma Intracutaneous Reaction of Pyrogenic Substance.

Kosaku AOYAMA, Hiromitsu KURISU, Fumio MIYAZAWA, Sadayosi HATTA,
Mitsunao. TSUKAGAWA Yoiti FUJITA, Mikio URABE and Yugaku SAKAI

まえがき 癌の癌反応による診断法には幾多の報告がみられるが、このうち生物学的な癌診断法では細菌多糖体を用いた反応が、他のあらゆる血清学的反応に較べて最も鋭敏であるといわれ、松原¹⁻³⁾はマウス移植癌および妊娠10月の胎盤から得た多糖体を臨床的に応用しこれを実証した。しかしこの物質は抽出液のため生体での反応は時に動揺し勝ちである。

そこで著者らはパラチフスA菌々体成分を系統的に調分精製し、このうちの多糖体分調(B物質)を癌皮内反応に応用したところ興味ある知見を得たので以下この成績について報告する。

実験方法

① 実験に使った菌株と培地 実験に使った菌株は東京都立駒込病院より分与された、S. Paratyphi A (41-N-22) 菌で肉汁寒天培地(ポリペプトン 10.0g, 塩化ナトリウム 3.0g, 肉汁 1,000cc pH7.2)に1ヶ月に2回ずつ継代培養し、実験に使う時はその都度クエン酸ナトリウム加ウサギ血液に3代以上継代後使用した。

② 癌皮内反応 発熱性物質(B物質: 詳細は後述する)を0.85%生理食塩液で1μg/cc稀釈液を作り、この0.2cc宛を患者の前膊および上膊部に皮内注射し、対照に0.85%生理食塩液を注射した。このほか松原氏液0.2cc宛を対側の前上膊に同様術式で皮内注射をほどこし、注射後6時間までは1時間々隔で以後は24時間目と48時間目に注射局部におこる皮膚発赤の状態を詳細に観察し、その最大縦径並びに横径を知覚計を使用して実測比較した。

この皮内反応は発熱性物質を注射したものでは、その反応部位が30mm以上の場合を反応陽性、29mmを疑陽性とした。一方松原反応は規定の通り24mm以上を陽性、23mmを疑陽性として判定した。

実験成績

① パラチフスA菌々体成分の調分法 予め厳選された菌株を用い菌体成分の調分精製を行つた。まず選択されたS型菌を固形培地とした、Roux フラスコ内で37°C 48時間培養後、精密に雑菌混入のないことを確かめ培地をかき取らぬようにして菌体を掻き集め湿菌量約30gを得た。

これに0.4%フェノール加生理食塩液200ccを加え、振盪器(振盪回数1分間160~170回、振幅5cm)で約30分間振盪後、遠心分離しこの上清は更にSeitz 濾過器で除菌した。この濾液をSevag法により除蛋白を繰り返す、ついでセロハン膜に包み、流水中で2日間透析する。この透析液を1/20容に減圧濃縮し、3倍量のアセトンを加え、沈澱物を集め、これに6倍量のアセトンを加え約30分ずつ3回振盪した後、遠心分離しフェノール部と水溶部とに分けた。この水溶部にアセトンを加え沈澱を起させた上清を除き、この沈澱に蒸留水を加え全量を5cc量とした。これに倍量のエーテルを加えリポイド性成分を除き、これにエタノールが50%になるように加えて5°Cに放置し、生じた沈澱を真空乾燥によつて60mgの調分物質を得た。これをA物質とした。

次に先きに遠心分離により得た菌体を4%トリクロル酢酸200cc中で6時間振盪後、遠心分離により上清を集めSeitzで濾過した。この濾液は5日間流水で透析する。これを1/20容に減圧濃縮し、これに200mg量のトリプシン結晶(Aomour製)を加え、10%NaOHでpH8.5に修正37°C 24時間放置後、Sevag法により除

蛋白を行い、エーテルでリポイド性成分を除去した。これに3倍量のアセトンを加え生じた沈澱に50%エタノールを加え5°Cに放置して沈澱を集め、真空乾燥して80mgの劃分物質を得た。これをB物質とした。

菌体蛋白の精製は0.4%フェノール加生理食塩液およびトリクロル酢酸で多糖体を除去したものについて試みた。即ち菌体に蒸留水200ccを加え10% NaOHでpH9.6に修正し約6時間振盪後、遠心分離して沈澱を除き、上清をSeitz 濾過し流水で2日間透析する。透析液はN/10HClでpH5.0に修正後遠心により沈澱を集め、再び蒸留水100ccに溶解後N/10HClで再沈澱させた。これは再透析後pH6.0の磷酸緩衝液10ccに溶解し凍結乾燥して1gの劃分物質を得た。これをC物質とした。

② 劃分物質の理化学的性状⁽⁴⁻⁵⁾ 上記の方法で得たA, B, C3種の物質の理化学的性状をみるとAおよびB物質はXanthoproteine, Millon, Biuret, Liebermann, Ninhydrin, Tetra brom phenol phthaleinなどの呈色反応およびTannic acid, 1% CuSO₄, 中性100°30分加熱, 10%トリクロル酢酸などの沈澱反応は陰性であったが, A物質がTannic acidの試験で僅かに疑陽性を示したに止まった。多糖体反応であるMolisch反応, 糖検出反応であるFehling反応は陽性を示した。また紫外線(3,600Å)照射により青色の螢光を發し, 硫酸による処置前と処置後とはその色調に変化を認めなかつた。C物質はNinhydrinを除く総ての蛋白質反応は陽性であった。また紫外線照射に於て硫酸処置後は蛋白特有の黄金色の螢光を發した。したがってA, B物質は多糖体物質であり, C物質は蛋白様物質であるといえる。

③ ウサギおよび人体に注射したときの発熱性 まずウサギについて発熱試験を行つたが, この結果は発熱陽性(注射後の体温が注射前の体温に較べて1°C以上, 上昇したものはAおよびB物質では0.1μg/kg, C物質では100μg/kg以上を授与したときに認められた。

人体には5名について試みた。発熱物質にはB物質を選び1mg 0.1cc量を前膊に皮内注射して, 一時間おきにその発熱度, 脈搏数, 白血球, 赤血球, 血色素量などについて検べた。5名ともいずれも発熱し発熱度は注射後1~2時間で悪寒戰慄をもつて始まり漸次上昇の傾向を示し, 4~5時間で最高に達し38°~40°の最高値を示した。脈搏は発熱におくれて増加し最高Ca80~90を示した。

白血球数は注射後1~2時で1時減少し, 漸次増加の傾向を示し, 注射後5~7時間で最高値(21,000)を示し以後緩慢な減少をたどり, 24~48時間には旧態に復した。

赤血球数並びに血色素係数には著変を認めなかつた。

また肝臓機能(Bromsulphalein試験, 血清グロス反応, ウロビリノーゲン試験)および腎臓機能(蛋白質反応)には障害を与えなかつた(第1表参照)。

第1表 発熱時の生体现象

患者氏名		石 ○ 信 ○ 郎	住 ○ 友 ○ 郎	江 ○ 盛 ○	江 ○ 登 ○	池 ○ 万 ○
年 令		50	43	45	45	40
性 別		♂	♂	♂	♂	♂
最高 発熱		39.5	39	38.7	38	40
最高 脈数		105	95	85	80	95
最高白血球数		11000	21000	12000	13700	13000
最高血圧変化		-20Hg	-40	-15	-15	-30
肝機能障碍		-	-	-	-	-
腎機能障碍		-	-	-	-	-
副作用	腰痛	-	+	-	-	-
	関節痛	-	+	-	-	-
	頭痛	+	-	-	-	-
胸内苦悶		-	-	-	-	-
発熱後爽快感		+	+	+	+	+

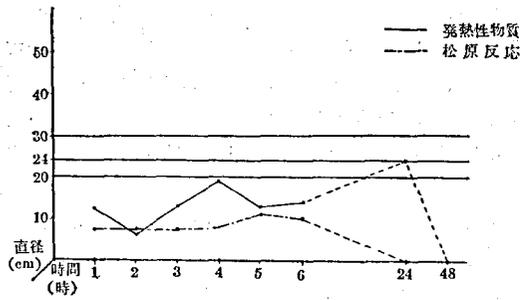
④癌皮内反応 松原⁶⁾は癌組織および妊娠10ヶ月の胎盤から、多糖体およびポリペプチド様物質を抽出、これを皮内注射することにより癌および妊娠反応に応用し得ることを証明している。この反応の本態としては平松⁶⁾は組織透過性の増加、並に色素局限現象と異なることから、Sh現象因子が関与しているのではなからうかといひ、松原は補体結合反応成績からアレルギー説が有力であると述べている。中島⁷⁾らは生体のアレルギー度を簡単に表現する方法として、コンムニン反応を行いアルテウス現象、ツベルクリン反応、蛔虫反応などと平行すると述べている。著者らは癌患者は癌産生物質により既に準備された状態にあると想像し、緒方⁸⁻⁹⁾のSh組織反応を期待したのであるが、この成績は第2表および第3表に示した。即ち胃癌、子宮癌、肝臓癌など62例について試みた結果このうちの56例が反応は陽性で、対側に同時に試みた松原反応は29例が陽性、10例が疑陽性であった。一方非癌患者では発熱性物質では75例中100例が陽性、1例が疑陽性であり、松原反応は17例が陽性、5例が疑陽性であった。したがってその陽性率は発熱性物質は癌患者では90.3%、非癌患者では13.3%となり、松原反応は癌患者では46.7%、非癌患者では22.6%を示し、発熱性物質が良好な癌皮内反応を示し注目された。反応の現れ方についてみると、発熱性物質を皮内注射すると、注射後1時間で既に発赤を現わすものが多く特に癌患者では著明である。しかも陽性に達する迄の時間的経過は3~6時間が最も多く稀に2時間で陽性を示す例もあったが、1時間で陽性を示す例はなかつた。非癌患者の中では時に6時間以後に30mmを越える反応を示す例もみられたが、これに反して6時間以内では極めて稀であった。癌患者はいずれも手術および試験切除又は死亡後病理解剖の結果、癌であることを確認したものばかりを集めた。特に結核患者では対照にツベルクリン反応を実施し相関性を検べたが、相関々係はみられなかつた。

松原は癌患者中治療中のものか、もしくは大きな腫瘍をもつたものが、しばしば松原反応陰性となり、これは陰性アレルギーで皮内反応のもつ不可避的欠点であると述べているので、本実験例で松原反応陽性率が悪いことは、癌患者例数中治療中のものに、大きな腫瘍をもつたものが多かつたためによるのであろう(第4表その1~その9参照)。

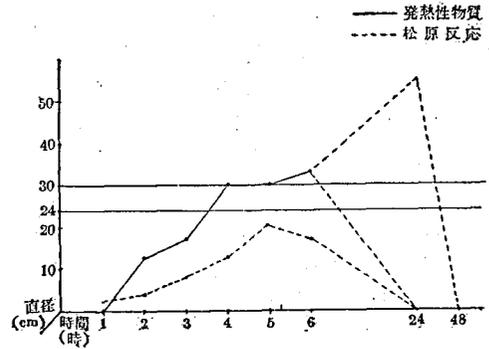
第2表 癌皮内反応の諸例

	例数	発熱性物質			陽性率(%)	松原反応			陽性率(%)	ツベルクリン陽性	
		陽性	疑陽性	陰性		陽性	疑陽性	陰性			
癌患者	胃癌	24	22	1	1	—	17	3	4	—	—
	子宮癌	8	7	—	1	—	—	2	6	—	—
	肺癌	6	6	—	—	—	2	1	3	—	—
	肝臓癌	12	10	1	1	—	5	2	5	—	—
	癌性腹膜	5	4	—	1	—	2	—	3	—	—
	直腸癌	2	2	—	—	—	1	1	—	—	—
	乳癌	2	2	—	—	—	—	1	1	—	—
	脾臓癌	1	1	—	—	—	—	—	1	—	—
	舌癌	1	1	—	—	—	1	—	—	—	—
	甲状腺癌	1	1	—	—	—	1	—	—	—	—
計	62	56	2	4	90.3	29	10	23	46.7	0	

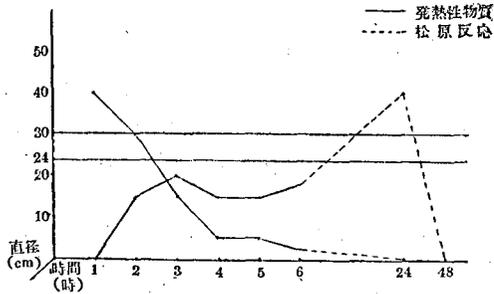
その3 姫○寒○ ♂ 25才 十二指腸潰瘍



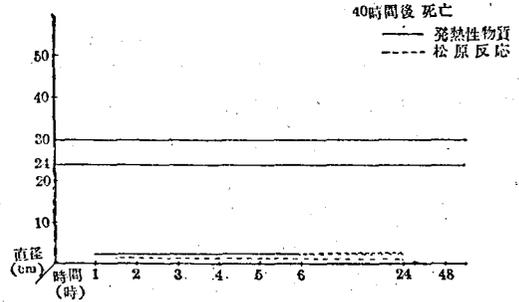
その4 武○仲○ ♂ 54才 癌性腹膜炎



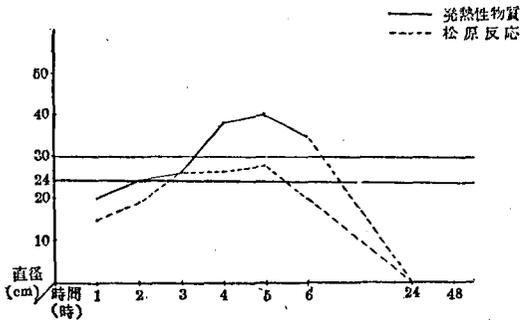
その5 鶴○竹○ ♂ 18才 十二指腸潰瘍



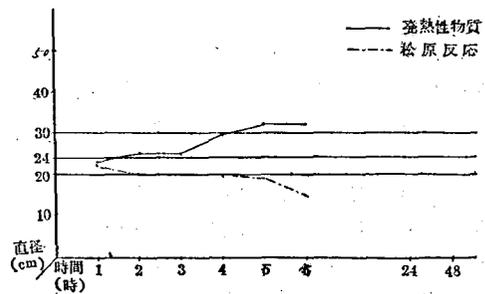
その6 甲○進○ ♂ 47才 胃潰瘍貧血(強度)



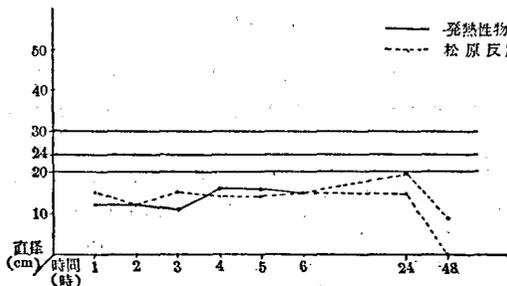
その7 古○次○ ♂ 66才 胃痛



その8 山○一○ ♂ 45才 肺癌



その9 吉○房○ ♂ 35才 肺結核



総 括

著者らはパラチフスA菌の菌体成分の生物学的特性を究明する目的で、フェノール処置、酸沈澱法を併用した劃分精製を試みA, B, C, 3種の物質を分劃した。この劃分物質は理化学的な定性試験からはAおよびB物質は複合多糖体に属し、C物質は蛋白様物質といえた。これらの物質はその一定量をウサギ或は人体の脈管内に投与すると、体温は徐々に上昇し注射後2時間前後で体温は最高に達し、以後は比較的速かに消褪し、一過性の発熱がみられた。この発熱量はAおよびB物質では0.1 μ g/kg, C物質では100 μ g/kg以上を投与したときに明瞭に観察された。

次に特にB物質を選び癌(皮内)反応に応用してみた。癌に於ける生物学的診断法では細菌多糖体を用いた反応は、他のあらゆる血清学的反応に較べ鋭敏であるといわれ、松原¹⁾はマウス移植癌から多糖体とポリペプチドを分離抽出して癌患者について皮内反応を検べた結果、多糖体は陽性反応を示すが、ポリペプチドは陽性反応を示さないことから、松原反応の作用因子は多糖類であろうと述べている。そこで著者らはパラチフスA菌から得た菌体多糖体(B物質)を癌反応に応用し、その効果を松原反応と対比してみた。即ち癌患者はすでに癌産生物質により準備された状態にあるとみて、謂所 Sh 型組織反応を期待したのであるが、実験の結果は注目すべき成績が得られた。

著者らは予試験の結果から皮内反応の判定は、注射部位の発赤が30mm以上を陽性、29mmを疑陽性とし、これ以下を陰性としたが、発熱性物質(B物質)は癌患者には特異的に反応し、注射後の反応(発赤)は著明で、癌患者では62名中56名が陽性、非癌患者は75名中10名が陽性、1名が疑陽性で、その陽性率は癌患者では90%、非癌患者では13%を示した。対照に用いた松原反応は癌患者では陽性率は47%、非癌患者では22%であった。

なお結核患者についてツベルクリン反応との相関性について検べたが、両者の間に相関々係を認めなかつた。

癌治療の要諦も結核同様、癌の早期発見と迅速確実な化学療法の実施に待つことは言を俟たないが、発熱性物質はその使用方法が簡便で所要の濃度を調製することが出来、臨床的陽性検出率は90%という高率を示すなどの点は、今時一層の臨床的応用並に臨床的査定を願うものである。

この発熱性物質は吉田肉腫細胞および腹水肝癌の発育を阻止するので、癌反応と癌治療の両面から今後益々検討されることが望まれる。

文 献

- 1) 松原：臨床病理 1 (3), 247 (1953).
- 2) 松原：総合医学 4, 18 (1947).
- 3) 松原, 阿部：総合医学 4, 23 (1947).
- 4) 八田：日医大誌 20 (3), 1 (1953).
- 5) 八田：日医大誌 20 (4), 315 (1953).
- 6) 平松：総合医学 6, 18 (1949).
- 7) 中島, 坂本, 細川：小児科診療 13 (8), 494 (1950).
- 8) 緒方：日本細菌学会特別講演集 (1949).
- 9) 緒方, 秋元：東京医事新誌 3134, 1311 (1939).

Summary

The author and his collaborators classified and purified systematically the bacterial components of paratyphi A. Solving its physical and chemical natures, its pyrogenicity was tested and examined on rabbits.

Bacterial components, especially polysaccharide was applied for carcinoma intracutaneous reaction. As the result its carcinoma intracutaneous positive reaction was higher than Matsubara reaction, was known.

Received February 29, 1956

吉田肉腫に対する各種抗腫瘍剤の併用療法に関する実験的研究(第1報)

青山 好作, 宮沢 文雄, 栗栖 弘光, 石関 忠一
赤坂 京子, 八田 貞義*, 藤田 洋一*, 浦部 幹雄*
酒井 雄学*, 青木 孝好*

Experimental Studies on the Combination Chemotherapy of the Various
Antitumor Agents in Yoshida Sarcoma and Ascites Carcinoma 606. I.

Kosaku AOYAMA, Fumio MIYAZAWA, Hiromitsu KURISU, Tiiuchi ISHIZEKI
Kyo-ko AKASAKA, Sadayosi HATTA, Yoichi FUJITA, Mikio URABE, and
Yugaku SAKAI and Takayoshi AOKI

まえがき 近時悪性腫瘍の生態に関する系統的な実験的研究方法が樹立されあまつさえ種々の作用機作を異にする抗腫瘍剤の発見と相俟つて、薬剤による従来困難視された悪性腫瘍の化学療法が確立され注目すべき幾多の業績がみられるに至つた。しかしこの方面の報告の多くは各種抗腫瘍剤の腫瘍細胞傷害機作の究明に終始される向きが強い。そこで著者等はこの点を更に慎重に再検討しながらこの成績を基に従来余り試みられない二種以上の抗腫瘍剤の組合せによる併用効果を実験的に検討し、より確実な治癒効果使用量の減量、毒性の軽減に努めてみた。又抗腫瘍剤の併用作用を細菌を基とした場合についても検討し比較を試みたので以下この成績について報告する。

実験方法

1) 実験に用いた薬剤: 実験には4種の抗腫瘍剤即ち Nitrogen Mustard N-oxide (Methyl bis (β -Chloroethyl) amine N-oxide Hydrochloride 以下 NMNO. と略す), Sarkomycin, 8-Azaguanine (5-amino-7-hydroxy-1-H-v-triazolo-[D] pyrimidine,), Triethylene Melamine (2,4,6-triethyleneimine-S-triazine以下 TEM. と略す) 並びに Urea (尿素, 精細は後述する) の計5種を選んだ。

2) 大腸菌 (*A. aerogenes*) と鼠チス菌 (*S. typhimurium*) に対する各種抗腫瘍剤並びに Urea と高級 Sulfonamide 剤との併用効果: 著者等は抗腫瘍剤の中には抗腫瘍作用のほか抗菌作用をも有するものがあるという点に着目し、悪性腫瘍に対する併用効果を探る前に NMNO, Sarkomycin, TEM, Urea 等を色々に組合せると共に三種の高級 Sulfonamide 剤 (Sulfathiazole (2-Sulfanilamidothiazole), Oxazin (3,4-Dimethyl-5-sulfanilamidoisoxazole), Erycon (6-Sulfanylamido-2,4-dimethyl-pyrimidin)) を選びこれらとも併用させ大腸菌と鼠チス菌とに対する場合の協同作用を *in vitro* で系統的に究明し、まず併用効果の発現状態を基体が細菌の場合について調べ、ついで悪性腫瘍の場合の成績と比較しその相関性について吟味してみた。

供試培地にはなるべく適確な判定が得られるように拮抗物質或いは障害物質を含まない合成培地を用いた。培地の組成は菌によつて幾分違ふがアンモニウム塩、磷酸塩、食塩、ブドウ糖とそれに 2,3 のアミノ酸からなつてゐる。組合せ濃度は Sarkomycin, NMNO. では 1,000, 3,000, 5,000, 8,000, 10,000, 30,000 倍希釈液, Urea, TEM は 100, 300, 500, 800, 1,000 倍希釈液, Sulfathiazole, Erycon および Oxazin は 100,000, 300,000, 500,000, 800,000, 1,000,000 倍希釈液としそれぞれとの組合せ液を作り、対照としてはおのおのの単独の試剤だけを含む各希釈液を用いた。移植菌量は合成培地に3代以上継代培養したものを生理食塩液で稀釈しピペットの 0.1cc 量 (10,000~50,000 個) を用いた。成績の判定は 37°C に培養して 24 時間ごとに 168 時間観察した。

3) 吉田肉腫に対する各種抗腫瘍剤並びに Urea の併用効果: 実験に用いたラットは良好な発育を示した健常雑系白ラット (平均体重 100g, 雄) のみを選んだ。吉田肉腫細胞の移植には無菌的操作により毛細ガラス管で約 600~900 万個の肉腫細胞を含む腹水を実験ラット腹腔内に注入した。次に各試剤の単独又は併用群毎に投与前及び投与後の一定時期に腹水を採取し薬剤を投与した時の肉腫細胞の数的、形態的変化の推移について検討を加えるとともに、実験動物の腫瘍死するまでの期間ひきつづき生育状態を肉眼的に観察し単独並びに併用投与群、及び

* 日本医科大学衛生学教室。

対照群との延命効果を比較してみた。

腹腔穿刺を行い採取した腹水中の腫瘍細胞数は白血球算定用のメランジュールを用い 1mm^3 中の総細胞数を算定し、同時に作製した塗抹標本 (Giemsa 染色) を基に 200 個の細胞数中より肉腫細胞と白血球の百分率を求め 1mm^3 中の総細胞数に乗じて肉腫細胞の実数を算定した。又塗抹標本により 1,000 個の肉腫細胞中の細胞分裂像を調べこれを前期 (Prophase), 中期 (Metaphase), 後期 (Anaphase), 終期 (Telophase) の四期に分類し薬物の Mitosis に及ぼす影響を検べると共に、休止細胞及び分裂細胞の形態的变化をも観察した。

(i) 併用濃度の選択: 各試剤の併用投与を行う前に併用に際しての各試剤の投与量について検討した。即ち各試剤の投与量を 4 段階に分け各群毎に吉田肉腫移植 3 日目のラット腹腔内に 1 日 1 回連続 5 日間の注射を行い、吉田肉腫に対する有効及び無効量について検索した。

各試剤の投与量はラット 100g につき NMNO. 1.5mg, 1.0mg, 0.5mg, 0.1mg, Sarkomyciu は 30mg, 20mg, 10mg, 5mg, 8-Azaguanine は 30mg, 20mg, 10mg, 5mg, TEM. は 0.2mg, 0.1mg, 0.05mg, 0.01mg, Urea は 0.25g, 0.1g, 0.05g, 0.01g とした。

(ii) 併用投与方法: 吉田肉腫に対する併用療法に関しては薬剤の組合せ方法、投与方法により幾多の併用方法が考えられるが、著者等は吉田肉腫に対し特に抑制効果の顕著な薬剤を選択して主剤とし、これに他の薬剤を副剤として組合せた。投与方法も (a), 主剤及び副剤を同時に連続的に 5 日間腹腔内投与した場合と、(b), 副剤を連続 12 日間、主剤を間歇的 (2 日間隔) に 5 日間投与した場合とに分けて実験し、併用投与の吉田肉腫に対する作用機作、抑制効果について詳細な検討を加えた。実験にはラット 5 匹を 1 群とし、このうち 2 匹は実験群として所定日毎に腹水を採取し肉腫細胞の質的、量的変化について究明し残りの 3 匹は放置群としそのまま経過観察を行った。

実験成績

1) 大腸菌、鼠チフス菌に対する各種抗腫瘍剤並びに Urea と高級 Sulfonamide 剤との併用効果: 実験の成績は第 1 表其の 1, 其の 2 に示すように協同作用のみられたのは NMNO, Sarkomycin, Urea で、このうちでも NMNO. と Urea において特に顕著であった。しかしその併用作用も主に高級 Sulfonamide 剤との間に鮮明で、抗腫瘍剤の間では僅かに NMNO. と Sarkomycin とを併用した場合のみ認められ、他の抗腫瘍剤間では併用しても効力には変化なく相乗的にも拮抗的にも作用しないようである。

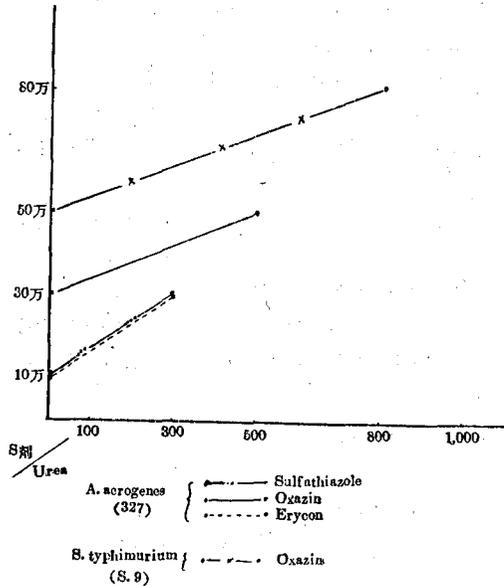
今 *S. typhimurium* を用い NMNO. と Sarkomycin とを併用した場合についてみると、Sarkomycin は単独では 3,000 倍濃度でも菌の発育を阻止し得なかつたものが併用した場合には 5,000 倍濃度でも有効的に作用し一方 NMNO. は約 1.7 倍と増強された。

しかし高級 Sulfonamide 剤とはかなり期待される相乗作用がみられる。即ち NMNO. と Oxazin との併用は *A. aerogenes* および *S. typhimurium* とともに認められ NMNO. の力価は約 2.7~5.0 倍、Oxazin では約 1.6~1.7 倍増強された。Erycon とでは *A. aerogenes* に対し NMNO. Erycon 共に約 3.0 倍、Sulfathiazole とでは *S. typhimurium* に対し NMNO. Sulfathiazole 共に約 1.7 倍増強されるのを認めた。

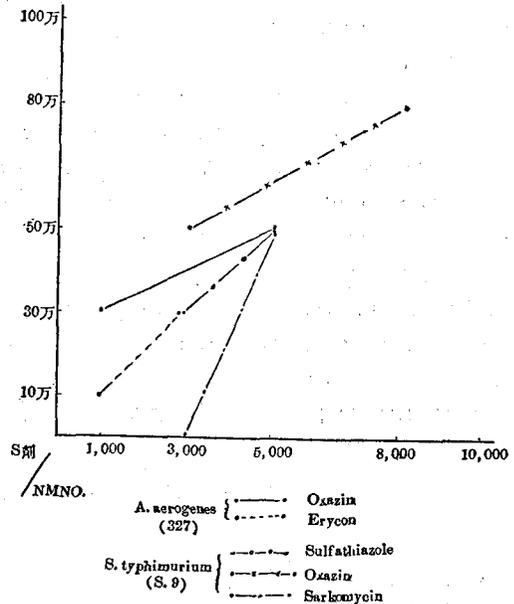
次に Urea は NMNO. Sarkomycin, TEM. とでは殆んど併用効果はみられないが、供試 Sulfonamide 剤とは鮮明な協同作用が認められる。即ち *A. aerogenes* に対し Erycon. Sulfathiazole では約 3.0 倍、Oxazin は約 1.7 倍増強しており、Urea は 100 倍濃度でも阻止し得ないものが併用により 300~500 倍稀釈濃度でも有効的に作用した。TEM. はすべての試剤に対し相加的にも相乗的にも作用しなかつた。

以上の成績から協同作用機作の一端をうかがつてみるに、臨牀領域を異にする高級 Sulfonamide 剤と良好な併用効果の現われることはこの作用において両者の細菌に対する作用力、作用点の異なることに起因するものと思われる。いずれにしても抗腫瘍剤の悪性腫瘍に対する併用効果を細菌を基体とした時の併用像で類推することはかなり困難なようである。

第1表 A. aerogenes および S. typhimurium
 其の1 に対する Urea と各種 Sulfonamide
 剤との併用効果



第1表 A. aerogenes および S. typhimurium
 其の2 に対する Nitrogen Mustard N-oxide
 と各種抗腫瘍剤および Sulfonamide 剤
 との併用効果



2) 吉田肉腫に対する各種抗腫瘍剤並びに Urea の併用効果 : 著者等は抗腫瘍剤の併用効果を細菌について検べたが抗菌性と抗腫瘍性との間にはほとんど相関性がみられなかつたので, 新たにラットを基に吉田肉腫について併用療法を実験的に行つた。

(i) 併用濃度の選択 : 各試剤の投与量を4段階に分けて注射を行つた結果(実験の成績に関する詳細は紙面の都合上割愛した), NMNO. 0.1mg/100g, Sarkomycin 20.0mg/100g, 8-Azaguanine 5mg/100g, TEM. 0.01 mg/100g 投与量では吉田肉腫に対する制癌効果は極めて減弱し, 腫瘍細胞の数的, 形態的变化或いは有糸分裂に及ぼす影響は一時的且極微であり動物の生在期間も対照群と有意の差がなく, ただ NMNO. 投与群のみが平均3.3日の延命効果を示したにすぎなかつた。又 Urea はいずれの投与群とも単独投与においては抗腫瘍性効果を殆んど認めることができなかつた。以上の成績から毒性の問題をも考慮して NMNO., Sarkomycin, 8-Azaguanine, TEM, は上記の量, Urea は 0.05g/100g 量をもつて併用投与量とした。

(ii) 併用効果 :

(A) NMNO. と他剤を連続投与した時の併用効果 : 併用投与の主剤にはこれまでの実験の成績に基づき, 抑制効果の比較的顕著であつた NMNO. を選び之に他の試剤を副剤として組合せた。試剤の投与は1日1回各群とも最初はNMNO. を次に併用副剤を注射した。なお薬剤投与を全く行わなかつた群と各試剤のみを5日間連続投与した群とを併用投与群の対照として比較検討した。

a) NMNO. 0.1mg/100g と Sarkomycin 20.0mg/100g との併用効果 : 本群においては第1回注射後より肉腫細胞数並びに有糸分裂数の減少が目立ち, 同時に腫瘍細胞の原形質, 核の変性及び分裂細胞の染色体の異常等が急激且顕著に現われた。然し注射が終了し移植13日目以降になると再び肉腫細胞が増殖し初め動物は平均生存日数16.2日を示してすべて腫瘍死した。これは NMNO. 単独投与群に比較し1.8日の死期延長を示したにすぎない。然しながら本群中の1匹は NMNO. 単独投与群中の最長生存日数16日のものより6日間の延命効果を示した。

b) NMNO. 0.1mg/100g を 8-Azaguanine 5mg/100g との併用効果 : 両試剤の併用投与により肉腫細胞並びに有糸分裂数は移植6日目頃より著明に減少し, 細胞の変性も第1回注射後より顕著であり, NMNO. 或いは

8-Azaguanine の単独投与時よりも早期に且つ稍々高度に変化が観察された。本群中の3匹の生存日数はNMNO. 単独投与群と殆んど変りなかつたが、他の2匹はそれぞれ約2.5倍以上の延命効果を示しており、細胞に対する傷害状態よりみても可成りの併用効果がうかがわれた。

c) NMNO. 0.1mg/100g を TEM. 0.01mg/100g との併用効果：本群においては肉腫細胞の数的推移については特に著しい減少をみなかつたのにかかわらず、有糸分裂数の減少は著明で、既に第1回注射後に後期、終期の分裂細胞が減少し第3回注射後には最早分裂状態を示す細胞は認められなかつた。試剤投与により肉腫細胞の蒙つた傷害変性像も可成り強度であつた。且つ腹水中の腫瘍細胞が純培養の状態となり動物が斃死する時期に至るまで、標本中においてみられた肉腫細胞は小形のものが多い間分裂細胞は認められなかつた。又その生存期間についてみても、5匹中の3匹の平均生存日数は39日でNMNO. 単独投与群よりも24.6日の死期延長を認め、他の2匹も3.0倍以上の死期延長を示した。

d) NMNO. 0.01mg/100g と Urea 0.05g/100g との併用効果：Urea 単独投与時においては薬剤非投与の対照群と略々同時期に腫瘍死し細胞に対する傷害も甚だ軽微でその抗腫瘍性は殆んど認められなかつた。しかしNMNO. と併用投与すると腫瘍細胞数の減少が一時的に、即ち移植6日目乃至は8日目頃にみられた。有糸分裂も注射期間中一時その進展が阻害され肉腫細胞も傷害を受けた。ラットもNMNO. 単独投与群に比較し4.9日の死期延長を認めその中の2匹はNMNO. 投与群の最長生存日数(16日)より7日及び12日の延命日数を示した(第2表其の1, 其の2参照)。

なお NMNO. 以外の各試剤の単独投与時の成績は紙面の都合で割愛した。

第2表 其の1 各種抗腫瘍剤を連続的に併用投与した時の吉田肉腫細胞数の変化
(検液 1mm³ 中)

供試薬及び 注射量/100g	動物 番号	注射前及び移植後の日数(N日目)											
		注射前	移植4	// 6	// 8	// 10	// 13	// 16	// 20	// 25	// 32	// 39	// 46
NMNO. 0.1mg + Sarkomycin 20mg	No. 1	317	94	116	33	22	19	40	277	—	—	—	—
	// 2	121	19	21	48	56	71	129	—	—	—	—	—
NMNO. 0.1mg + 8-Azaguanine 5mg	// 3	207	179	57	81	73	64	79	95	75	—	—	—
	// 4	222	216	55	116	185	472	—	—	—	—	—	—
NMNO. 0.1mg + TEM. 0.01mg	// 5	70	103	59	58	50	45	61	53	45	68	221	470
	// 6	133	88	85	93	100	101	89	68	32	45	180	30
NMNO. 0.1mg + Urea 0.05g	// 7	188	139	71	89	67	130	—	—	—	—	—	—
	// 8	132	123	79	44	145	—	—	—	—	—	—	—
NMNO. 0.1mg	// 9	149	81	80	72	116	503	—	—	—	—	—	—
	// 10	285	163	41	57	199	319	—	—	—	—	—	—
対 照	// 11	206	312	232	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	// 12	264	251	157	—	—	—	—	—	—	—	—	—

註：表中の腫瘍細胞数の単位は千単位で現わした。(以下の表もこれに準ず)

第2表 其の2 各種抗腫瘍剤を連続的に併用授与した時の有糸分裂数の変化
 (肉腫細胞1,000箇中) およびラットの生存期間

供試薬及び 注射量/100g	動物 番号	分裂 期	注射前及び移植後日数 (NH日)												生存 日数 (日)	平均 生存 日数	
			注射 前	移植 4	6	8	10	13	16	20	25	32	39	46			
NMNO. 0.1mg + Sarkomycin 20mg	No. 1	P	24	9	0	0	0	1	0	0	0					22	16.2日
		M	10	12	0	0	0	0	0	0	0					18	
	A	4	39	0	0	0	0	1	0	0					12		
	T	1	0	0	0	0	0	0	0	0					15		
" 2	P	13	1	2	0	0	4	4							40	※	
	M	6	7	2	0	0	3	3							16		
NMNO. 0.1mg + 8-Azaguanine 5mg	" 3	P	16	7	0	0	0	0	0	1	0					16	13.6日
		M	9	17	0	0	0	0	0	0	1	0			12		
	A	10	36	2	0	0	0	0	0	0	2	0		13			
	T	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0			13			
NMNO. 0.1mg + TEM. 0.01mg	" 5	P	12	8	0	0	0	0	0	0	0	1	8	1	35	39.0日	
		M	5	17	0	0	0	0	0	0	0	0	2	5	52		
	A	3	22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16	7			
	T	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30			
" 6	P	10	15	0	0	0	0	0	0	0	0	12	0	※	※		
	M	7	8	0	0	0	0	0	0	0	0	3	16	0			
	A	1	21	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0			
	T	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
NMNO. 0.1mg + Urea 0.05g	" 7	P	13	4	0	0	0	4							16	19.4日	
		M	12	8	0	0	0	1							13		
	A	3	29	0	0	0	0	5						17			
	T	1	0	0	0	0	0	0						23			
" 8	P	17	20	0	0	17								28			
	M	6	12	0	0	6								23			
	A	1	30	0	0	0								28			
	T	6	0	0	0	2								28			
NMNO. 0.1mg	" 9	P	22	6	0	5	8	6							14	14.4日	
		M	8	8	2	2	5	2	8						16		
	A	1	32	0	0	0	21	0						12			
	T	1	0	0	0	3	5	0						16			
" 10	P	16	11	1	2	6	0							14			
	M	5	8	0	5	6	0							14			
	A	3	26	0	1	0	14	0						16			
	T	2	0	0	1	2	0	0						16			
対 照	" 11	P	17	12	7									8	8.6日		
		M	11	11	4									8			
	A	4	35	0									7				
	T	3	4	0									7				
" 12	P	17	26	4										11			
	M	16	17	2										11			
	A	1	36	1										11			
	T	2	3	0										11			

註：① 表中のP=Prophase の略 M=Metaphase // A=Anaphase // T=Telophase // ② 生存日数は吉田肉腫細胞移植後の ③ ※印は60日以上生存日数で現わした。(以下の表もこれに準ず)

(B) NMNO. を間歇的に他剤を連続的に投与した時の併用効果: 次にこれまでの実験成績を種々検討の結果各試剤の投与量を従来と同一量とし NMNO. を間歇的に他剤を連続的に投与し併用実験を行った. この結果は前述の併用投与方法と比較し一般的に腫瘍細胞の傷害状態は少々軽度であり, 第3表其の1に示すように細胞数の変動も顕著でなく, 特に又第3表其の2にみられる如く細胞分裂像に及ぼす影響も弱かった. 生存日数については NMNO. 単独投与群と比較して NMNO. と Sarkomycin 併用群の4匹の平均生存日数は略々同日であつたが, 1匹は18日の延命日数を示した. NMNO. と 8-Azaguanine 併用群では1匹が63日生存し, 他の4匹も平均3.7日の生存日数延長を示した. NMNO. と TEM. 併用群では3.6日, NMNO. Urea 併用群では1.8日延命した. 従つて本実験においても, その組合せ濃度が無効量であつた為前実験と比較しその吉田肉腫に対する侵襲力が軽度ではあつたが, 少くとも相加作用の認められるものといえよう.

第3表 其の1 NMNO. を間歇的に他剤を連続的に併用投与した時の吉田肉腫細胞数の変化 (検液 1mm³ 中)

供試薬及び 注射量 / 100g	動物 番号	注射前及び移植後の日数 (N日目)						
		注射前	移植4	〃 6	〃 8	〃 10	〃 13	〃 16
NMNO. 0.1mg + Sarkomycin 20mg	No. 1	114	39	31	19	10	—	—
	〃 2	160	44	11	10	36	—	—
NMNO. 0.1mg + 8-Azaguanine 5mg	〃 3	189	170	154	177	132	120	100
	〃 4	83	65	157	120	190	104	110
NMNO. 0.1mg + TEM. 0.01mg	〃 5	150	126	102	47	103	140	319
	〃 6	93	50	137	166	184	—	—
NMNO. 0.1mg + Urea 0.05g	〃 7	151	75	102	50	62	—	—
	〃 8	82	86	116	24	53	—	—
NMNO. 0.1mg	〃 9	356	93	139	74	—	—	—
	〃 10	158	106	101	47	164	—	—
対 照	〃 11	104	181	212	—	—	—	—
	〃 12	195	193	193	310	—	—	—

第3表 其の2 NMNO. を間歇的に他剤を連続的に併用投与した時の有糸分裂数の変化
 (肉腫細胞 1.000 箇中) およびラットの生存期間

供試薬及び 注射量 / 100g	動物 番号	分裂 期	注射前及び移植後の日数 (N日目)							生存 日数 (日)	平均 生存 日数
			注射前	移植4	6	8	10	13	16		
NMNO. 0.1mg + Sarkomycin 20mg	No. 1	P M A T	7 7 5 2	7 8 3 1	8 7 2 1	6 2 1 1	10 3 4 0			12 12 12	12日
	" 2	P M A T	19 17 2 2	14 10 3 1	15 7 1 1	1 1 0 0	3 4 0 0			12 12 29	
NMNO. 0.1mg + 8-Azaguanine 5mg	" 3	P M A T	19 5 1 0	3 1 1 0	0 0 0 1	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	19 10 14	14.7日
	" 4	P M A T	6 1 1 4	12 3 1 2	4 10 1 1	3 3 0 0	10 7 1 2	12 3 1 0	5 4 1 0	16 10 63	
NMNO. 0.1mg + TEM. 0.01mg	" 5	P M A T	13 12 2 0	13 8 1 2	0 0 0 0	3 0 0 0	10 2 0 0	6 5 3 4	3 5 0 0	18 12 10	14.6日
	" 6	P M A T	19 9 1 1	12 16 2 0	9 6 3 1	2 0 0 0	1 0 0 0			14 19	
NMNO. 0.1mg + Urea 0.05g	" 7	P M A T	15 11 0 0	7 11 0 1	7 3 0 3	2 0 0 0	5 2 0 0			12 11 12	12.8日
	" 8	P M A T	2 0 0 0	11 12 5 0	7 5 2 3	5 1 0 0	3 9 1 1			12 12 17	
NMNO. 0.1mg	" 9	P M A T	17 4 3 0	9 9 0 0	9 7 1 0	0 0 0 0				10 10 11	11日
	" 10	P M A T	15 8 1 2	18 1 0 0	5 6 0 1	4 2 0 0	0 0 0 0			12 12	
対 照	" 11	P M A T	16 13 0 2	4 12 4 0	13 5 1 0					8 9 10	9.3日
	" 12	P M A T	18 12 1 0	23 9 1 3	5 5 0 2	1 2 0 0				10 事故死	

総括および考察

細菌領域における併用療法は抗菌力-耐性-毒性-副作用等の問題に重要な相関性と利点のあることが実験的に確認されるに及んで深い関心が払われている。しかし悪性腫瘍の治療領域にあつては最近に至つて漸くその化学療法が確立された次第であつて、なおこの方面の研究の多くは腫瘍細胞傷害機作の究明にそそがれ、この領域における併用療法に対する吟味は今後に残されている感がある。そこで著者等は NMNO. を初めとして Sarkomycin, 8-Azaguanine, TEM. 及び Urea などの諸剤を選び悪性腫瘍に対する併用療法を吉田肉腫について、細菌を基とした場合の成績と比較しながら基礎的に検討を加えてみた。

梅沢¹⁾は Sarkomycin の Ehrlich 癌に対する抗腫瘍性効果はブドウ球菌 (FDA. 209P) に対する抗菌力と略々平行関係にあると興味ある報告をしている。したがつて細菌に対する併用成績から抗腫瘍性効果を類推することが可能であるとすれば今後の実験の指針ともなりうるので、著者等は供試菌に *S. typhimurium* (S.9) と *A. aerogenes* (327) とを用い NMNO., Sarkomycin, TEM. Urea 等の4種、高級 Sulfonamide 剤3種とを組合せたときの併用効果について調べてみた。この結果併用効果のみられたのは、NMNO., Sarkomycin, Urea の3種でその併用作用も主に高級 Sulfonamide 剤との間に顕著で、抗腫瘍剤の間では僅かに NMNO. と Sarkomycin とを併用した場合にのみ認められたにすぎない。野嶽¹⁾らは NMNO., 8-Azaguanine, Penicillin, Streptomycin, Sarkomycin の5種の薬剤を用い、溶血性連鎖球菌について重層法により併用効果を測定したところ NMNO. と Sarkomycin が最も著明で 8-Azaguanine と Sarkomycin, Penicillin と Streptomycin がこれに次ぎ、Sarkomycin と 8-Azaguanine とではむしろ拮抗したと述べている。いずれにしても抗腫瘍剤の悪性腫瘍に対する併用効果を、細菌を基体とした時の併用像で類推することは時にはかなり困難のようであつた。

併用療法において試剤投与量の選択は併用効果の発現及び副作用と密接な関連があるので、まず投与量を4段階に分け吉田肉腫に対する制癌効果を吟味し併用投与量を定めた。この結果毒性の問題をも考慮して各試剤の殆んど無効に近い濃度、即ち NMNO. は 0.1mg/100g, Sarkomycin は 20.0mg/100g, 8-Azaguanine は 5.0mg/100g, TEM. は 0.01mg/100g, Urea は 0.05g/100g 量を選択し併用投与量とした。

Daniel Shapiro²⁾ は 755-tumor に対し 8-Azaguanine と Testosterone 及び Stilbestrol とを併用投与した場合、8-Azaguanine と Stilbestrol との併用は 755-tumor に対し各々の単独投与の時より遙かにすぐれた打撃的效果を示すと同時に副作用として供試動物の体重が著明に減少したが、更にこの両者の併用投与に Testosterone を加えると、8-Azaguanine と Stilbestrol の制癌作用を害することなく体重の減少を阻止し得たことを報告している。又 Dietrich & Shapiro³⁾ らは C57 female mice における 755-tumor に対する 8-Azaguanine と Flavontin の併用療法に際し効果の認められたのは、Flavontin 投与1時間後に 8-Azaguanine を投与した場合のみで同時に投与した場合若しくは Flavontin 投与前に 8-Azaguanine を投与した場合には効果がみられなかつたと述べている。これらの事は悪性腫瘍における併用療法の目的性に対し抗腫瘍剤の組合せ方法、或いは投与方法等の選択に一つの示唆を与えるものといえよう。

そこで著者等は臨牀面をも加味して吉田肉腫に対し NMNO. を中心とする併用療法を展開した。まず NMNO. 及びその他の試剤を同時に一定期間 (5日間) 連続投与したところ NMNO. と Sarkomycin との併用投与群においては、投与直後より斃死前に至るまで肉腫細胞数の減少状態を維持すると同時に注射早期より急激な休止細胞の変性、分裂細胞数の減少、分裂進行の抑制染色体の異常等の変化が惹起された。これらの急速にして且高度な著変は後述の併用投与群と共に比較的特徴づけられる所見であり、各試剤の同一量の単独注射時においては観察し得ないものであつた。動物の生存日数も5匹中の2匹は NMNO. 単独投与群中の最長生存日数 (16日) に比較し 2~6日の延命効果を認めた。

Alkylating agents と Antibiotics の併用に関しては Bateman⁴⁾ らが Mouse heart の組織培養において Nitrogen mustard (HN₂ と略す) と Aureomycin (AM と略す) との併用投与が細胞にどのような傷害を及ぼすかについて実験を行い、HN₂ 0.4 γ /ml と AM 40 γ /ml との併用により HN₂ 0.8 γ /ml 或いは AM 80 γ /ml 単独投与時と略々同程度の細胞傷害を与えたことを報告している。

一般に悪性腫瘍に対して Sarkomycin の抗腫瘍性効果を期待するには可成り大量の連続投与を必要とする傾向が強いので、侵襲力の比較的早く且つ強い NMNO. との適確な併用は、著者らの試みた実験によつても臨牀的により良い効果の可能性を暗示するものがあるのではないかと思われる。

NMNO. と 8-Azaganine との併用投与群においては移植 6 日目頃より肉腫細胞の数的形態的抑制現象が可成り明瞭にみられた。供試動物 5 匹中の 3 匹は NMNO. 単独投与群と略々同日間生存したにすぎなかつたが、残りの 2 匹はそれぞれ 40 日及び 60 日以上生存し約 2.5 倍以上の延命効果を示した。

8-Azaganine は葉酸拮抗剤と異つて癌細胞においてのみ代謝拮抗が行われ従つて癌細胞に対し選択性を有するであろうという見地から、作用機作の異なる他種抗腫瘍剤との併用が抑制効果を更に高めうるであろうという事が期待され、著者らの実験においても実証され得た。

NMNO. と TEM. との併用投与群においては特に細胞分裂が注射直後より著明に抑制され後期、終期を示す分裂細胞が減少し、第 3 回注射以後より死前に至るまで殆んど分裂像を認められなかつた。且つ細胞の形態的傷害も甚しかつた。供試動物も 5 匹中 3 匹の平均生存日数は NMNO. 単独投与群に較べ 24.5 日の延長を認め他の 2 匹は共に約 3.0 倍以上の延命効果を示した。

河北等⁵⁾は臨牀的に白血病患者に対し NMNO. と TEM. との併用療法を行つて、臨牀症状及び血液像の緩解状態を得られると共に副作用の少なかつた症例を報告しているが、著者らの行つた併用投与も吉田肉腫に対し頗る顕著な制癌作用を呈し動物の延命効果も大であつた。

次に著者らは 4 種の抗腫瘍剤と共に Urea を選び実験に供したが、この Urea は古くから細尿管下痢を作用主体とする利尿剤として慣用され若干の防腐作用を有することも知られていた。又 Holder,⁶⁾ 宮本⁷⁻⁹⁾、塩田等¹⁰⁻¹¹⁾により細菌感染治療に Sulfonamide 剤との併用が効果的であつた事も報告されている。近年抗腫瘍剤の一環物質として Urethan がとりあげられているが、著者らはこの Urethan と同系炭酸誘導体である Urea が腫瘍細胞を傷害する能力が若し乏しいとしても、化学療法剤との併用と相俟つて腫瘍患者の二次的細菌感染の防禦により患者の一般状態の改善に資するなどの点に着目し、抗腫瘍剤との併用実験を試みた。その結果 NMNO. と Urea との併用投与群では、肉腫細胞数の減少に及ぼす影響は前述の三群に較べると少なかつたが、細胞の形態的变化は一時可成り顕著であり細胞分裂の抑制も著明に認められた。平均生存日数も NMNO. 単独投与群に比較し 4.9 日の延長を認めそのうちの 2 匹は 7~12 日の延命効果を示したことは注目された。Urea 単独投与时においては対照群と略々同日に腫瘍死し肉腫細胞に及ぼす影響も極微であつたのにかかわらず、NMNO. との併用投与が相加作用を現わし、吉田肉腫に対し種々の影響を与えたことは Urea が化学療法剤との併用によつてその抗菌力を相加する事実と照合し興味あることと思われる。

次に NMNO. を間歇的に他試剤を連続的に併用投与した場合について実験を行つたが、前述の実験成績と比較すると抑制効果が劣つていたが、供試抗腫瘍剤間では投与方法を変えても併用効果を確認することが出来た。

総 括

著者らは 4 種の抗腫瘍剤並びに Urea 計 5 種を用いての併用効果をまず細菌について検討し次に吉田肉腫についてラットを基に実験的に究明した成績について報告した。

稿を終るに臨み吉田肉腫を御分与下さつた佐々木研究所の井坂先生並びに貴重なる試薬を御提供下さつた明治製薬、吉富製薬、田辺製薬の研究部の方々に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 野嶽, 服部, 栗原, 高田, 勝野, 牧野, 磯村, 鈴木, 李, 伊藤: 産科婦人科, 22 (9), 101 (1955)
- 2) Shapiro, D.M.; Cancer Res. 12(10), 713 (1952)
- 3) Dietrich, L.S., Shapiro, D.M.; Cancer Res. 13 (10), 699 (1953)
- 4) Bateman, J.C., Corman I., Grice, P.M., Konnelly, J.M., and Klopff, C. T.: Cancer, 6 (2), 275 (1953)
- 5) 河北, 橋本, 野津原, 佐分利, 福田, 鳥井, 宮津, 川辺, 松本: 新薬と臨牀, 3 (12), 1 (1954)
- 6) 第六改正日本薬局方 (1951): Holder and Mackay: Surgery, 13, 677 (1943)
- 7) 宮本: 化学療法とホルモン療法, 1 (7), 267 (1948)
- 8) 宮本: 医学と生物学, 13 (5), 344 (1948)
- 9) 宮本: 最近医学, 4 (3), 169 (1948)

- 10) 塩田; 最近医学, 3 (12), 594 (1948)
- 11) 塩田; 日医大誌, 17 (3), 17 (1950)

Summary

We reported the effect of combination therapy against bacteria and Yoshida sarcoma and Ascites carcinoma 606 by using 4 kinds of antitumor agent (NMNO., Sarkomycin, 8-Azaguanine and TEM.).

There was no relationship between antibacterial and antitumor effects.

The effect of combination therapy was stronger when used to NMNO. and TEM. than NMNO. and 8-Azaguanine or NMNO. and Sarkomycin.

Received February 29, 1956.

トリパンプルーを注射した動物の腸炎菌感染

山地 幸雄, 田中 弘子, 八田 貞義*, 山内 信*

Salmonella enteritidis-Infektion der mit Trypanblau Vorbehandelten Tiere

Yukio YAMAZI, Hiroko TANAKA, Sadayoshi HATTA* and Makoto YAMAUCHI.*

まえがき 腸炎菌をマウスなどの実験動物に経口的に、或はその他の方法で接種すると、菌が感染性を有する場合には、菌は侵入局所の所属リンパ結節、あるいは肝、脾などの網内系に到達し、更に菌の毒力の強弱により、侵襲が成立して二次敗血症となるか、あるいは侵襲は成立しない¹⁾。

コロイド物質を貪喰するという網内系細胞の性質から出発して、貪喰されるそれらの物質の大量投与により、網内系細胞の機能を失わせようとの試み、すなわち網内系填塞法は、その価値についての意見がかなり区々であり、填塞が同時に同系統の反応性機能促進を伴うなど、不都合の点があるにもかかわらず、かなり古くから行われている方法である²⁻⁸⁾。

ørskov⁹⁾は Tusche, Eisenzucker を菌接種1時間後に注射した際の、マウスの Breslauinfektion について報告し、Erbert¹⁰⁾は填塞マウスのパラチフス B 菌感染について実験を行なった。Kritschewski¹¹⁾は脾切除, Eisenzucker 及びトリパンプルー注射の、マウスの *Spir. duttoni* 感染について報告した。網内系填塞の免疫機能に及ぼす作用についても、多くの実験報告¹²⁻²¹⁾がある。

われわれ²²⁾はさきに、X 線を照射したウサギ、モルモット、マウスでは、腸炎菌強毒株の経口投与に際し、菌の侵襲性の増強と、免疫反応の減弱とが認められると報告したが、今回はコロイド色素であるトリパンプルーを注射したモルモット、ラッテ、及びマウスの実験的腸炎菌感染について実験を行なったので、その大要を報告する。

実験方法

1) 実験に使用した動物 体重 390~600g のモルモット、80~295g のラッテ、及び 15~22g のマウスを用いた。これらは実験開始前の数日間の観察により、体重、体温(但しマウスを除く)に著しい変動のないものを選んだ。

2) 実験に使用した色素 トリパンプルーの留水溶液を用いた。投与量はモルモットでは1%溶液 3cc、体重 1kg 当り約 60mg、ラッテでは0.5%溶液 1cc、体重 1kg 当り約 30mg、マウスでは0.5%及び0.05%溶液各 0.5cc、体重 1kg 当り夫々約 119mg、14mg をそれぞれ 1回量とした。注射材料はすべて 100°C、30分加熱したものをを用いた。

3) 実験に使用した菌株 これまでの感染実験に用いたと同じ腸炎菌強毒 RG3 株を用いた。

4) 実験の方法と観察 モルモットでは、15匹を3群に分け、第1群には上記の量のトリパンプルーを14日間毎日1回ずつ腹腔内注射し、注射の終つた翌日に RG3 株の普通寒天斜面 20時間培養菌 3öse ずつをなめとらせた。この菌数は約 30億である。菌投与後 20日間体重、体温を測り、血中、大便中の菌検索を随時行なった。この期間内に死んだものは血液、臓器(肝、脾)の培養試験を行ない、生残動物の一部は 20日後に殺して、同様血液、臓器の菌を検した。菌投与前、14日後、41日後に採血して RG3 株に対する血清の OH 凝集価及び、血清の殺・抗菌力を Schütze 法²³⁾に準じて検した。第2、3群の対照モルモットには上記同様メチレンブルー注射、あるいは留水注射を行ない、上と同様の感染実験を実施した。

ラッテでは 12匹を3群に分け、第1群には上記の量のトリパンプルーを14日間、毎日1回ずつ腹腔内注射し、対照の第2、3群には夫々生理食塩水及び留水を 1cc ずつ同様注射した。注射の終つた4日後に、RG3 株の普通ブイヨン 20時間培養菌 1cc、すなわち菌数約 10億個を各々のラッテに腹腔内接種した。菌投与後 13日間体重、体温を測定し、随時血中菌を培養により検し、その間の斃死動物及び生残動物は血液、臓器の培養試験を行なった。

マウスでは上記量のトリパンプルーを 30日間に 14回腹腔内注射した第1群、第2群、留水及び生理食塩水を

* 日本医科大学衛生学教室

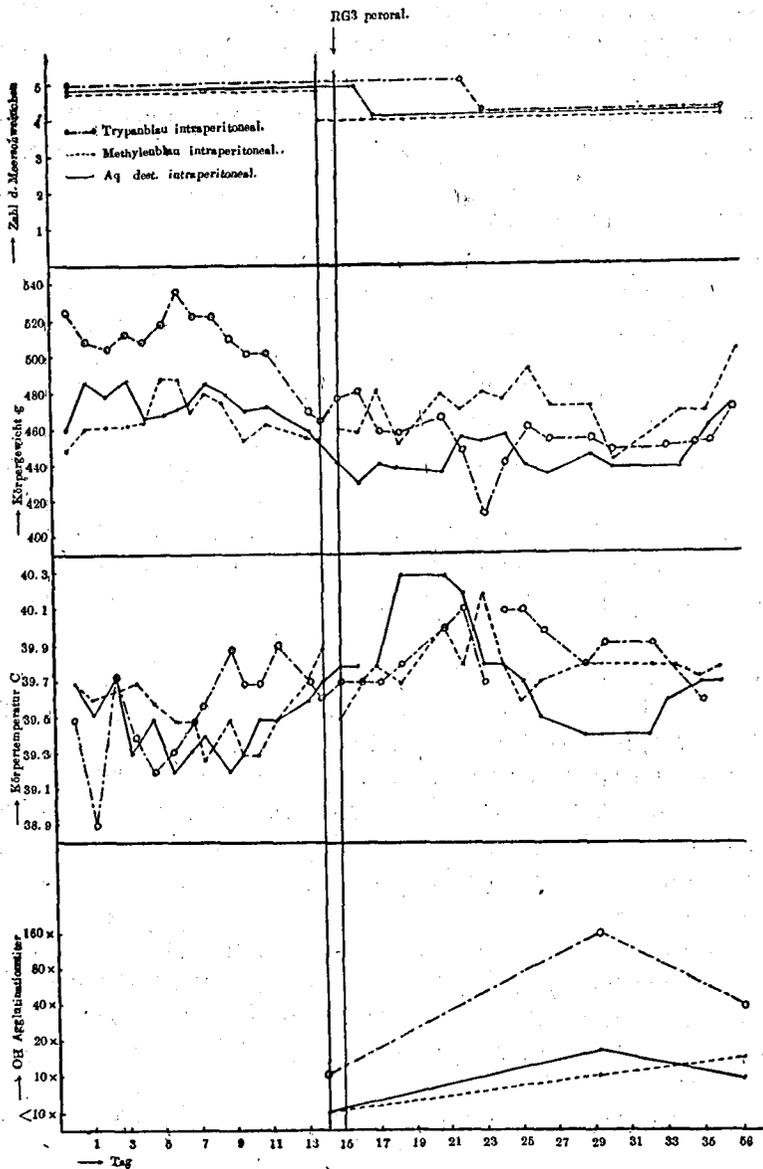
0.5cc ずつ同様に注射した第3, 第4群について実験した。各群のマウス数は夫々4匹ずつである。注射の終わった18日後に RG3 株の普通ブイヨン20時間培養液8滴, 菌数約3億個をひたしたパンを食べさせた。菌投与後16日間観察し, 斃死及び生残マウスはその血液及び臓器について菌検索を行なった。

実験成績

1) モルモットを用いた実験 各群のモルモットはトリパンプルー, メチレンブルー, 及び蒸留水注射に全部耐過生残し, トリパンプルー処理群では体重の減少がみられたが, 他の群では明らかな体重減少はなく, トリパンプルーを注射したモルモットは14日後には白色の皮膚及び鞏膜の著るしい青染がみられた。体温はこれら前処置期間に40°Cを越えなかつた。

メチレンブルー注射モルモットの1匹は菌投与前の採血に際し死んだので, 残りのモルモットに菌を経口投与

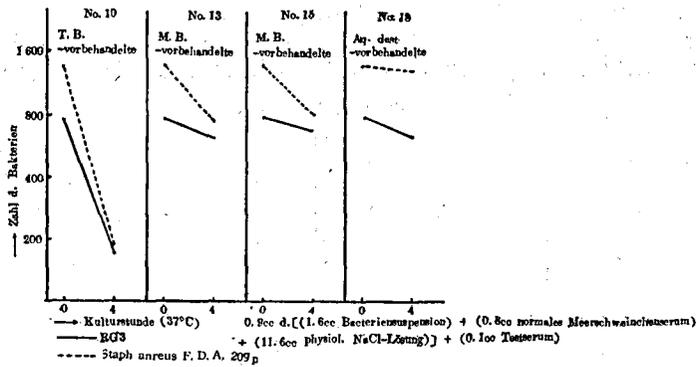
Fig I



した。トリパンプルー注射群は1匹が8日後に死に, 留水注射群は2日後に1匹死に, いずれも血液, 臓器より投与菌が検出された。他の生残モルモットの一部は20日後に剖検培養を行なったが血液, 臓器の培養は陰性に終わった。菌投与後の体重, 体温は特にトリパンプルー投与群に特異の所見は得られなかつた。血清のOH凝集価はトリパンプルー注射群において他の群より高い値が得られた。菌投与後の血液, 大便中の菌検索成績はトリパンプルー注射群に特異な点はなかつた。菌投与56日後血清のRG3株及びブドウ球菌に対する殺菌力は, トリパンプルー注射モルモットでは, 他のものより高い値が得られた。(Fig. I, Fig. II, Tab. I, 参照)

Durchschnittliche Werte werden eingeschrieben.

Fig. 1 Die Bakterizide Wirkung der Meerschweinchensera.



Tab. 1

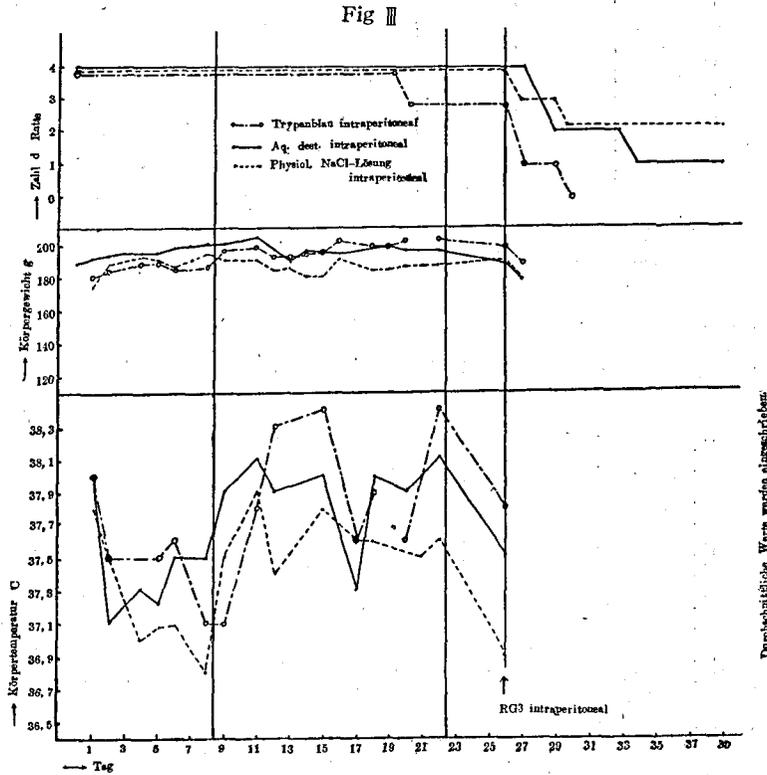
		Tage nach Fütterung d. S.ente.												
			1	2	3	5	6	7	8	9	10	12	13	
Vorbehandelte mit Trypanblau	No. 6	B. K.	- #		-	-		-		+		-		
	No. 7	B. K.			-	-			# #		-		-	
	No. 8	B. K.		-			-		- #		-		-	
	No. 9	B. K.					# #	#	Tod					
	No. 10	B. K.	- #			-				+		-		
Vorbehandelte mit Methylenblau	No. 11	B. K.												
	No. 12	B. K.	- #		-			+		+		-		
	No. 13	B. K.		-			-		-		-		-	
	No. 14	B. K.	- #		-			+		-		-		
	No. 15	B. K.		-		-			+		-		-	
Vorbehandelte mit Aq. dest.	No. 16	B. K.	- #		-	-		-		-		-		
	No. 17	B. K.	- #		-	-		-	# #				+	
	No. 18	B. K.					-		- #		-		-	
	No. 19	B. K.		-		-		-		-		-		
	No. 20	B. K.		#									Tod	

B. : Blut, K. : Kot. #, + : S. enteritidis wird nachgewissen. - : Keine S. enteritidis wird nachgewissen.

2) ラッテを用いた実験 トリパンプルー注射により, 4匹中1匹が11回の注射により死んだが, 他の群は全部耐過生残した。トリパンプルー, 留水, 生理食塩水腹腔内注射の前処置により, 体重の顕著な変動はなく, 平均体温は各群とも 38.4°Cを越えなかつたが, 注射前の観察期間中よりはいくらか高いようであつた。

菌接種後, トリパンプルー注射群は1日後, 4日後に夫々2匹, 1匹ずつ死に, 生残したものはなかつた。留

水処理群は3, 8日後に夫々2, 1匹ずつ死んで13日後には1匹生残し, 食塩水処理群は1, 4日後に夫々1匹ずつ死んで13日後には2匹生残した。斃死獣の血液, 臓器からはすべて接種菌が検出され, 生残獣は13日後に培養試験を行なつたが, 血液臓器から投与菌は検出されなかつた。接種後の血中菌培養では, トリパンプルー処理群には菌の検出されないものはなかつたが, 他の対照群では菌の検出されない個体があつた。(Fig. III Tab. II参照)



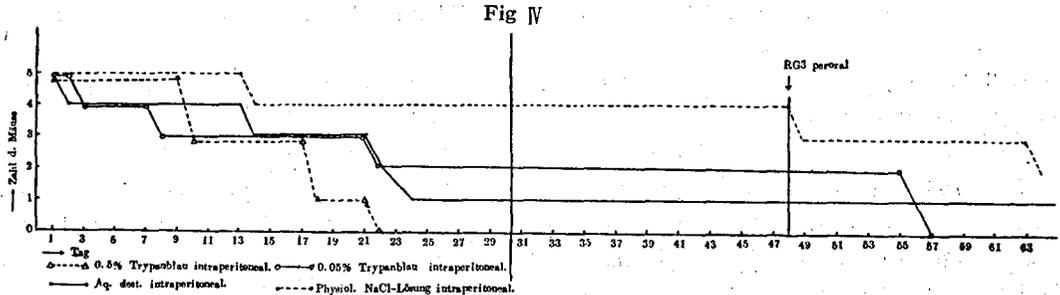
Tab. II

		Tage nach d. RG3 Inject.						
		1	2	3	4	6	8	
Ratte								
	Phys. NaCl-Lösung-Vorbereitung-Gruppe	No. 47	+			+	-	-
		No. 48	+			+Tod		
		No. 51	-			-	-	-
No. 57		+Tod						
Aq. dest.-Vorbereitung-Gruppe	No. 58	-			-	-	-	
	No. 61	+		+Tod				
	No. 64	+	+Tod					
	No. 68	+			+	-	+Tod	
Trypanblau-Vorbereitung-Gruppe	No. 71	+Tod						
	No. 72	+			+Tod			
	No. 74	+Tod						

+ : S.ente. wird im Blut nachgewissen. - : S.ente. wird im Blut nachgewissen nicht.

3) マウスを用いた実験 1回量119mgずつトリパンプルーを腹腔内注射すると、マウスは5, 9, 11回の注射により夫々2, 2, 1匹ずつが死に、それ以上耐過したものはなかつた。1回14mgずつでは1, 4, 11回の注射により夫々1匹ずつ死に、14回の注射に耐過したものは2匹であつた。留水0.5cc注射では1, 7, 11回注射により夫々1, 1, 2匹ずつ死に14回の注射に耐過したものは1匹であり、生理食塩水注射では7回注射により1匹死んだだけであつた。

注射の終わった18日後に菌を経口授与したところ、トリパンプルー注射群は2匹とも夫々8, 9日後に死に、留水注射群は1匹中1匹が16日間生残、生理食塩水注射群は1, 16日後に夫々1匹ずつ死に、2匹は生残した。斃死マウスの血液、臓器からはすべて菌が検出され、生残マウスの臓器からも授与菌が全例検出された。(Fig. IV 参照)



考 察

トリパンプルー腹腔内注射によるマウスの填塞実験において、Wallbach は1% 溶液0.5ccを、Lauros らは0.1~1% 溶液1ccを用い²⁾、Okuneff²⁴⁾ はウサギにおいて体重1kg 当り1% 溶液10ccを腹腔内注射している。われわれの実験ではこれら先人の用いた量より、全量にしてかなり大量のトリパンプルーを頻回注射した。そしてこのように繰り返す注射する場合、24時間で血中の色素は網内系に貪食されつくすから、24時間おきに注射を繰り返すのがよい²⁾とされている。われわれの実験ではマウスは毎日注射すると衰弱がひどいので、はじめの11回は隔日とし、その後の3回は2日おきとした。また菌授与も同様の意味でマウスは注射終了18日後、ラッテは4日、モルモットは1日後とした。

トリパンプルーその他の填塞物質は、生体内で網内系細胞を単に機械的に塞ぐのみでなく、個有の毒作用を呈するとされている^{2, 9)}。われわれの実験でトリパンプルー前処置に対する抵抗の度合は、授与トリパンプルーの体重kg 当りの重量ではモルモット>ラッテ>マウスの順になつてはいるが、夫々の動物の目方に対する注射液容量はマウス>ラッテ>モルモットの順で、頻回の液体の腹腔内注入の影響も無視されない。

ørskov ら⁹⁾ は Breslau 菌の静注1時間後に10% Tusche 溶液0.2ccを静注すると感染は減弱され、5% Eisenzucker 0.2cc では感染は増強されるとし、Eisenzucker では直接に細胞を障害する作用を無視し得ないといつた。Elbert¹⁰⁾ は填塞マウスではパラチフス B 菌感染は腸間膜リンパ結節にとどまらないで、更に体内にひろがると報告し、Kritschewski ら¹¹⁾ は脾切除、5% Eisenzucker 0.5cc 静注及び0.05cc トリパンプルー皮下注射によりマウスの網内系を遮断すると、これらの動物は *Spir. duttoni* に対し全く抵抗を失うが、脾切除あるいは填塞物質注射のみでは、約10%が生残すると認めた。

われわれの実験では、モルモットは体重の減少する量のトリパンプルー注射により、腸炎菌経口授与に対する抵抗は留水注射の対照にくらべていくらか強くなるようであることが動物の生残の点から認められた。ラッテでは体重を減少させないが4匹中1匹が注射期間中に死ぬ量のトリパンプルー注射により、腹腔内接種による感染は明らかに増強された。マウスでは5匹中3匹が死ぬ量によるトリパンプルー前処置により、動物の感染に対する耐過生残の点では、感染は増強されたといえようが、この場合は動物の匹数が少いから、明確な断定はできない。

網内系填塞を行なつた動物における免疫反応については、抗体生成が抑制されるとの主張^{13-16, 19, 21)} と、抗体生成に関し対照と差異がないか、あるいはいくらか促進されるという主張^{12, 17, 18, 20)} とがあるが、これについては填塞物質の種類、量、抗原量、あるいは填塞と抗原授与との時間的關係などを詳しく検討しないことには簡単な一般的判断は下せないようである。われわれの実験では、トリパンプルーを注射したモルモット血清に、より高い

凝集価が認められた。これは前記の諸条件の他に、腸炎菌は元来モルモットに対する感染性が弱いので、対照動物ではこの菌の経口投与により抗体が生成されず、トリパンブルー処理動物では感染性が高められて、従つて抗体ができ易かつたと考えるのが容易であるかも知れないが、一方血中菌の検索成績、動物の菌投与後の生死の状況では、トリパンブルー注射モルモットにおける感受性が特に高いとは考えられず、また菌投与14日後においても血清はかなり青色を呈していた、すなわちトリパンブルーというコロイド色素が血清に含有されていたことも無視できないであろう。

モルモットの菌投与41日後の血清のRG3株及びブドウ球菌に対する殺菌力が、トリパンブルー処理群では対照群にくらべて高く、一方血清凝集価の上昇が対照群より高かつたことは、このトリパンブルー前処置が、細菌感染に対する生体の抵抗をある意味において亢進させた、と考えてよいであろう。

モルモットとラットとで、相反するような印象を与える実験結果が得られたことは、腸炎菌に対する動物種による感染性、及び接種経路が異なるためと考えたい。

Capell²⁴⁾, Jaffe⁶⁾, Waddellら⁴⁾は、lithium carmine, trypanblue, 及び carbon black は動物に投与されると網内系の細胞により摂取され、これらの細胞の正常機能、例えば注射された particulate matter, 細菌, あるいは fat particles を貪食する能力を破壊すると認め、Jansco⁷⁾はコロイド銅剤による肝の星細胞の壊死を認めた。また Clemmesenら²⁵⁾は、X線被照射ウサギにパラチフスB菌に対する抗体生成の低下と、注入されたトリパンブルーまたは細菌の血中よりの消失の遅延を認め、Taliaferroら²⁶⁾によると、大量X線照射はリンパ球及び血液母細胞を破壊するので、ある重要な mesenchymal reserve は過度の貪食状態に陥り、その貪食能及び抗体生成能を失う。従つて動物の細菌感染に対する抵抗は抑制されるという。

網内系の機能が貪食のみでないことはいふ迄もないが、これらの所見あるいは説明とわれわれの実験成績とを結びつけて考えると、網内系の機能低下は、細菌感染に対する抵抗、あるいは免疫反応の低下を来らせる、すなわち網内系には、未だ明確に分析把握され尽してはいないが、生体防禦機構としての合目的作用があり、そしてこの作用はトリパンブルー注射により変動をうけると認められる。

総 括

網内系填塞の目的でコロイド色素、トリパンブルーを腹腔内注射したモルモット、ラット、及びマウスに腸炎菌強毒株を経口或は腹腔内接種し、次の所見を得た。

1) 5匹のモルモットにトリパンブルー1%溶液3ccずつを、14日間毎日注射すると、モルモットの体重は減少したが死ぬものはなかつた。注射終了の翌日腸炎菌約30億個ずつを摂食させたところ、これらの動物は感染致死、体重・体温の変動、血中菌の検出状態からみて、対照と明らかな差はなかつたが、血清凝集価の上昇は対照より顕著であつた。そして菌投与41日後の血清のRG3株及びブドウ球菌に対する殺菌力は対照動物よりトリパンブルー処置動物のそれが高かつた。

2) 4匹のラットにトリパンブルー0.5%溶液1ccずつを14日間毎日腹腔内注射したところ、体重の減少はみられなかつたが、1匹は11回の注射により死んだ。注射終了4日後に腸炎菌約10億個ずつを腹腔内接種したところ、これらのラットの感染は、動物の生残、血中菌の検出成績からいつて、対照ラットのそれに比べ、明らかに増強された。

3) マウス5匹にトリパンブルー0.5%溶液0.5ccずつを隔日に注射したところ、12回の注射に耐過したものはなかつた。他の5匹のマウスに0.05%トリパンブルー溶液0.5ccずつを11回までは隔日、次の3回は2日おきに、合計14回注射したところ、2匹が14回の注射に耐えた。このマウスに注射終了18日後に腸炎菌約3億個を摂食させたが、この実験からは明確な結論は得られなかつた。

この論文の要旨は第24回日本衛生学会(1954)において講演された。

文 献

- 1) 牛場：日本医事新報，1575，10（1954）。
- 2) Bruman, F. : Abderhaldens Handbuch d. Biolog. Arbeitsmethoden, Urban und Schwarzenberg, Berlin, 1935. Abt. VIII : T.1, H.2, p.1309.
- 3) Hyman, C. and Paldino, R. : Am. J. Physiol., 179, 594 (1954).
- 4) Waddell, W.R., Geyger, R.P., Clarke, E., and Stare, F.J. : Am. J. Physiol., 177, 90 (1954).
- 5) 石橋：解剖学雑誌，27，（総会号）90（1952）。

- 6) Jaffe, R.H. : *Physiol. Rev.*, 11, 277(1931). 7) Jansco, N.N. : *Klin. Wochenschr.*, 10, 537(1931).
 8) 清野 : 生体染色の研究, 南江堂, 1928. 9) Ørskov, A., Jensen, K.A. und Kobayashi, K. : *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, 55, 34 (1928). 10) Elbert, B.J. : *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, 65, 452 (1930). 11) Kritschewski, J. und Schapiro, L.S. : *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, 65, 264 (1930). 12) Howell, K.M. and Tower, L.E. : *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.*, 23, 759 (1926). 13) Jungblut, C.W. and Berlot, J.A. : *J. Exper. Med.*, 43, 797 (1926) ; 44, 129 (1926). 14) Lehmann, W. und Tannan, H. : *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, 45, 493 (1926). 15) Lewis, P.A. and Loomis, D. : *J. Exper. Med.*, 43, 263 (1926). 16) Meyer, H. : *Z. Hyg. Infektionskr.*, 106, 124 (1926). 17) Ross, V. : *J. Immunol.*, 12, 237 (1926). 18) Roberts, E.F. : *J. Immunol.*, 16, 137 (1929). 19) Cannon, P.R., Bear, R., Sullivan, T.L. and Webster, J.R. : *J. Immunol.*, 17, 441 (1929). 20) Kolmer, J.A. and Schamberg, J.F. : *Am. J. Syph.*, 17, 175 (1933). 21) Tuft, L. : *J. Immunol.*, 27, 63 (1934). 22) 八田, 山地, 田中, 平林, 山内, 齊藤 : 第23回日本衛生学会講演 (1953) ; 山内 : 日本細菌学雑誌, 10, 451 (1955). 23) Schütze, H., Gorer, P. A. and Finlayson, M.H. : *J. Hyg.*, 36, 37 (1936). 24) Cappell, D. E. : *J. Path. and Bact.*, 32, 595 (1929). 25) Clemmeson, J. and Anderson, E. K. : *Acta Path. et Microbiol. Scand.*, 25, 611 (1948). 26) Taliaferro, W.H. and Taliaferro, L. G. : *J. Immunol.* 66, 181 (1951).

Zusammenfassung

Wir hatten einige Versuche über der peroralen oder intraperitonealen *S. enteritidis*-infektion der mit intraperitonealer Trypanblauinjektionen vorbehandelten Meerschweinchen, Ratten und Mäuse, mit dem Rucksichte auf die Einflüsse der sogenannte Blockade des ristikulo-endothelialen Systems auf die Bakterieninfektion.

Fünf Meerschweinchen erhalteten täglich einmal 3cc 1% Trypanblauinjektionen während 14 Tage, und nach vierzehnmaligen Injektionen wir sahen die Verminderung des Körpergewichtes der vorbehandelten Tiere, aber alle Tiere überlebten die Vorbehandlung. Ein Tag nach der Vorbehandlung, die Meerschweinchen wurden mit 3 Oesen *S. enteritidis*-Agarkultur gefüttert. Dann wir fanden fast keinen Einfluss der Vorbehandlung auf die Infektion der Tiere, wenn wir die Ueberlebenszeit, die Veränderung des Körpergewichtes sowohl als der Körpertemperatur, und die Blutkulturen der vorbehandelten Tiere, mit der von der *S. enteritidis*-gefütterten Kontrollmeerschweinchen verglichen. Aber die Steigerung des Agglutinationstiter der vorbehandelten Tiere war merkwürdiger als das der Kontrolltiere.

Vier Ratten erhalteten täglich einmal 1cc 0,5% Trypanblauinjektionen während 14 Tage, und die Tiere zeigten die Veränderung des Körpergewichtes nach der vierzehnmaligen Injektionen nicht, aber eine Ratte starb nach der elfte Trypanblauinjektion, und die Ueberlebenden wurden mit 1cc *S. enteritidis*-Bouillonkultur intraperitoneal eingespritzt. Dann wir sahen, dass die Ueberlebenszeit der *S. enteritidis*-gefütterten Ratte, von der Trypanblauvorbehandlung, auffallend gekürzte wurde, wenn wir es mit der Befunde an der Kontrolltiere verglichen.

Fünf Mäuse erhalteten jeden zweiten Tag einmal 0,5cc 0,5% Trypanblauinjektionen, und alle Mäuse starb vor der zwölften Einspritzung. Andere fünf Mäuse erhalteten jeden zweiten oder dritten Tag einmal 0,5cc 0,05% Trypanblauinjektionen während 30 Tage, dann wir sahen, dass 2 Mäuse über dieser Vorbehandlung gebracht wurden. Diese Ueberlebenden wurden mit 8 Tropfen *S. enteritidis*-Bouillonkultur gefüttert, aber kein zuverlässiges Resultat wurde aus diesem Versuch gehabt, denn zu grosse Menge Flüssigkeit bei der Vorbehandlung eingespritzt wurde.

Die Betrachtungen wurden über diese Versuche angestellt.

Received February 29, 1956

土壤水分がクラムヨモギ (*Artemisia Kurramensis* QAZILBASH) の初期生育に及ぼす影響について

木下 孝三

Studies on the Effects of the Soil Moisture upon the Early Growth of "KURAMUYOMOGI" (*Artemisia Kurramensis* QAZILBASH)

Kozo KINOSHITA

まえがき クラムヨモギはパキスタン原産のサントニン原料植物であるが、我が国へは1950年始めて輸入され川谷氏等がその栽培を発表したのが始めてである。¹⁾²⁾³⁾その後厚生省に於ては1953, 54年の両年にわたつて全国1道, 13県に於てその試作を行つて今日に至つてゐる。元來この植物はその原産地パキスタン, クラム地方は石礫の多い砂漠乾燥の地であつて降雨に対してはきわめて敏感でありその量及び回数に生育に及ぼす影響はきわめて大きく往々にして枯死の原因となり, その栽培の適不適は雨量の多寡によるとさえ考えられていた。前記厚生省の全国的試作の結果を見てもこの植物の適地は西日本であり特に広島, 山口, 香川の諸県即ち瀬戸内海沿岸及び島嶼地方, 和歌山県, 長野県があげられている。上記の諸県に於ては自然状態に於て生育旺盛で莖葉も繁茂し, 採種もきわめて容易である。特に生育2年目に於てはいちじるしく繁茂し相当の収穫量をあげるのである。瀬戸内海地方は我が国でも雨量の最も少い地方に属し生育の良好なのは当然であるが独り和歌山県のみは事情を異にし多雨地帯に属し1953, 54年の両年は特に記録的な多量の降雨を見た年であるがなお且生育きわめて良好であつたのは非常に興味深い事実であつた。著者はこの事実を体験してこの植物は乾燥にきわめて強いが乾燥に強くても乾燥が生育に適しているか否かと云うことは別問題であり, 多湿の状態では如何なる生育を示すか, 又最適土壤水分は如何なる範囲内にあるか, かかる問題を明らかにすることが本植物栽培上きわめて重要な問題であると考え, 1954年和歌山分場に於て本試験を行つたのである。雨量と土壤水分とは自ら異なる事実であるが自然状態に於てはきわめて密接な関係にあることは云うまでもないことである。

材料及び方法

1. 材料 1953年当場所場で採種した種子約500粒を腐植に富める壤土を約8分目につめた長さ, 幅, 深さ, 夫々90cm, 45cm, 12cmの箱に4cm間隔の条播に1954年11月25日播種した。これを硝子室内に置き灌水は噴霧器を以て行いその他周到な管理のもとに育苗した。1955年2月15日草丈約4, 5cmの均等な苗を選び供試個体とした。

2. 方法 ポットは内径, 深さ, 夫々14cm, 14cmの磁製燂壺を用い底に風乾細砂300g, 砂壤土1.7kgを入れ, ポットの内壁に沿つて内径, 長さ, 夫々1.5cm, 15cmの硝子管を2本立てその下部が底砂に接するようにし給水管とした。ポットは実験期間中硝子室内に置き雨水の浸入を防ぐようにした。肥料としては1ポット当N, P₂O₅, K₂O, 各0.2gとし夫々硫酸, 過磷酸石灰, 硫酸加里を以てし予め土壤とよく混和して用いた。土壤水分の区別は含水量に対する%を以てし, 90%, 75%, 60%, 45%及び30%の5区とした。土壤並びに底砂の含水量は夫々47.23%及び22.79%であり, 各区の土壤水分はこれら土壤及び底砂の含水量に対する%の和である。2月15日定植し定植直後各区共土壤面より約500cc灌水し日光の直射をさけ徐々に日光にあて苗の活着をはかつた。2月22日より重量法により土壤水分の調節を始めたが45%, 30%両区は未だ水分多く前者は2月27日, 後者は3月7日に至り所定の量に調節し得るようになった。水分の調節は毎日これを行ひ試験の後期に到つて水分蒸発が大になつて来てからはなるべく調節の回数を多くし所定の量に近い値を保持するようにつとめた。供試個体数は各区共4個体とした。定植後は1週間毎に草丈, 分枝数を調査し, 5月4日に収穫し生育状態を調査し各区の比較を行つた。サントニン含量の定量は柴田, 三橋, 原岡, 川谷⁵⁾の方法に従つて行つた。本実験中の硝子室内の平均温度は最高27.5°C, 最低13.5°C, 平均20.1°Cであつた。

実験結果

1. 実験中の土壤水分の変化

各区とも水分調節可能になってから収穫までの全期間を通じて水分補給前の減少量及び補給量より算定してかなりの変化があつたが90%に於ては91.0~86.2%, 75%に於ては76.0~73.8%, 60%に於ては61.0~57.6%, 45%に於ては46.0~43.2%, 30%に於ては31.0~28.5%であつた。植物の生長にともなう植物重による補正はこれを行わなかつた。

2. 一般生育状況

先づ草丈についてみるに第1図に見られる如く最初の1ヵ月間には90%, 75%, 60%の差異は認め難く45%, 30%はかなり短く劣っている。収穫時に於ては90%, 最大で75%, 60%は殆んど差異なくこれにつき45%は稍劣り30%は更に顕著に劣っている。

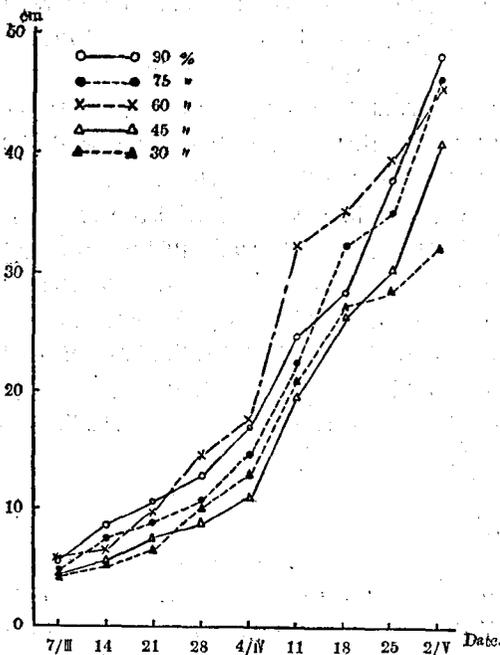


Fig. 1. Comparison of Plant Height among Different Treatments.

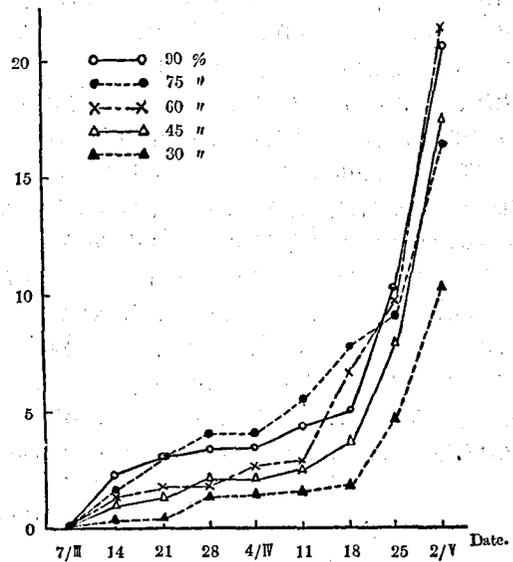


Fig. 2. Comparison of Number of Branches among Different Treatments.

分枝数については第2図の通り各区とも2週間目より発生がみとめられその数60%最大であるが90%, 75%, 45%は大差なく30%はかなり劣っている。分枝は植物の個体により生育の初期より基部から分枝し準主茎と見られる場合とある程度生長した後主茎の10cm内外の高さ以上より分枝する場合が見られるので単に分枝数のみでは比較は困難である。

その他主幹の太さ、生育の勢、葉の繁茂状態等を総合して見るに75%最も生育すぐれ、90%, 60%殆んど大差なくこれにつき、45%はかなり劣り30%は更に顕著に生育が劣っている。

3. 収穫物調査

収穫時の地上部地下部の生育状況及び収穫調査は第1表の通りである。

Table 1 Comparison of Yield of the Plant among Different Treatments.

Treatment	Fresh weight of top		Fresh weight of stems and branches		Diameter of main stem at 10 cm height (cm)	Fresh weight of leaves		Length of leaves (cm)	Fresh weight of roots		Number of lateral roots
	(g)	Ratio	(g)	Ratio		(g)	Ratio		(g)	Ratio	
90%	15.2	59.6	5.9	64.8	0.41	9.3	56.7	4.4	3.1	62.0	21.5
75%	25.5	100.0	9.1	100.0	0.41	16.4	100.0	5.9	4.9	98.0	23.8
60%	14.8	58.0	5.5	60.4	0.40	9.1	55.4	4.2	5.0	100.0	27.0
45%	11.0	43.1	3.5	38.4	0.35	7.5	45.7	4.3	3.0	60.0	18.5
30%	6.3	24.7	1.9	20.8	0.27	4.4	26.8	3.6	2.0	40.0	15.0

(Continued)

Treatment	Air-dry weight of top		Air-dry weight of stems and branches		Air-dry weight of leaves		Air-dry weight of roots		Santonin content	
	(g)	Ratio	(g)	Ratio	(g)	Ratio	(g)	Ratio	(%)	Ratio
90%	5.28	59.3	2.00	63.4	3.25	57.3	1.00	60.2	0.975	62.4
75%	8.82	100.0	3.15	100.0	5.67	100.0	1.65	99.3	1.392	89.1
60%	5.77	65.4	2.07	65.7	3.59	63.3	1.66	100.0	1.562	100.0
45%	4.53	51.3	1.43	45.3	3.19	56.2	1.21	72.8	1.450	92.8
30%	2.70	30.8	0.82	26.0	1.90	33.5	0.83	49.9	1.200	76.8

1) 地上部

a) 地上部生体重量 75%最大で90%, 60%と相次いでいるが両者の差はきわめて少い。45%ではかなり劣り30%では更に著しく劣っている。各区間の差異の有意性については第2表, 第3表の通り90%と60%, 45%, 60%と45%, 45%と30%を除く他の区間の差異は有意義で特に75%と各区間の差異はきわめて有意義である。

Table 2 Analysis of Variance of Fresh Weight of Top.

Source of variance	Degrees of freedom	Sum of squares	Variance	F
Treatment	4	820.412	200.603	13.05**
Individual	3	25.489	8.396	1.83
Error	12	184.444	15.370	
Total	19	1,012.345		

** Represents significance at the 1% level.

Table 3 Comparison of Differences of Fresh Weight of Top and Their Significance among Different Treatments.

	90%	75%	60%	45%	30%
	15.2	25.5	14.8	11.0	6.3
90%	15.2	—			
75%	25.5	10.3**	—		
60%	14.8	0.4	10.7**	—	
45%	11.0	4.2	14.5**	3.8	—
30%	6.3	8.9**	19.2**	8.5**	4.7

L.S.D. (5% level) 5.42

L.S.D. (1% level) 7.60

** Represents significance at the 1% level.

b) 分枝数及び生茎重 分枝数の時期的変化は前に述べたが収穫時に於ては65%最大であるが90%と殆んど差異は認められず45%これに次ぎ75%との差はきわめて僅少である。30%に於てのみ顕著に劣つているのが認められる。

主茎の太さについては第1表の通り90%, 75%, 60%は差異殆んど認められず最大である。45%これに次ぎ30%に於ては最も顕著に劣つている。

生茎重については地上部生体重と殆んど同様の傾向を示している。各区間の差異は第4表、第5表に示す通り90%と60%、60%と45%、45%と30%を除く他の区間は有意義である。

Table 4 Analysis of Variance of Fresh Weight of Stems and Branches.

Source of variance	Degrees of freedom	Sum of squares	Variance	F
Treatment	4	118.602	29.650	12.67 **
Individual	3	12.452	4.150	1.77
Error	12	28.069	2.339	
Total	19	159.123		

** Represents significance at the 1% level.

Table 5 Comparison of Differences of Fresh Weight of Stems and Branches and Their Significance among Different Treatments.

	90%	75%	60%	45%	30%
	5.9	9.1	5.5	3.5	1.9
90%	5.9	—			
75%	9.1	3.2**	—		
60%	5.5	0.4	3.6**	—	
45%	3.5	2.4*	5.6**	2.0	—
30%	1.9	4.0**	7.2**	3.6**	1.6
L.S.D. (5% level)	2.09				
L.S.D. (1% level)	2.93				

* Represents significance at the 5% level.

** Represents significance at the 1% level.

c) 生葉量 葉の大きさについては収穫時に葉長を調査した。第1表に示す通り75%最長で葉は大型になっている。90%、60%及び45%はこれにつきその差は殆んど認められない。30%に於ては著しく劣り相当小型になって来ている。

生葉重については地上部生体重と全く同様の傾向を示している。即ち75%最大であり90%これにつき60%と続いているが両者の差はきわめて僅少である。45%に到つてはかなり劣り30%は更に著しく劣つている。各区間の差異については第6表、第7表に示す通り90%と60%、45%、60%と45%、45%と30%を除く他の区間は有意義である。特に75%と各区間との差異は顕著できわめて有意義である。

Table 6 Analysis of Variance of Fresh Weight of Leaves.

Source of variance	Degrees of freedom	Sum of squares	Variance	F
Treatment	4	316.395	79.098	15.20 **
Individual	3	37.008	12.336	2.37
Error	12	62.417	5.201	
Total	19	415.820		

** Represents significance at the 1% level.

Table 7 Comparison of Differences of Fresh Weight of Leaves and Their Significance among Different Treatments.

	90%	75%	60%	45%	30%
	9.3	16.4	9.1	7.5	4.4
90%	9.3	—			
75%	16.4	7.1**	—		
60%	9.1	0.2	7.3**	—	
45%	7.5	1.8	8.9**	1.6	—
30%	4.4	4.9**	12.0**	4.7**	3.1
L.S.D. (5% level)	3.13				
L.S.D. (1% level)	4.39				

** Represents significance at the 1% level.

2) 地下部

a) 生根重 地下部の状態を見るに地上部とは稍異り生根重に於ては60%最大で75%と殆んど差異なく90%45%はこれに次ぎ両者の差異はきわめて僅少である。30%に於ては著しく劣つている。各区間の差異については第8表、第9表に示す通り90%と45%、30%、75%と60%、45%と30%を除く他の区間は有意義である。特に60%及び75%と各区間の差異はきわめて有意義である。

側根数については第1表に示す通り60%最大で75%、90%、45%、30%の順に少なくなつて来ている。各区間の差異も均等に減少を示している。

Table 8 Analysis of Variance of Fresh Weight of Roots.

Source of variance	Degrees of freedom	Sum of squares	Variance	F
Treatment	4	36.635	9.158	7.40**
Individual	3	4.822	1.607	1.30
Error	12	14.833	1.236	
Total	19	56.290		

** Represents significance at the 1% level.

Table 9 Comparison of Differences of Fresh Weight of Roots and Their Significance among Different Treatments.

	90%	75%	60%	45%	30%
	3.1	4.9	5.0	3.0	2.0
90%	3.1	—			
75%	4.9	1.8*	—		
60%	5.0	1.9*	0.1	—	
45%	3.0	0.1	1.9*	2.0*	—
30%	2.0	1.1	2.9**	3.0**	1.0
L.S.D. (5% level)	1.54				
L.S.D. (1% level)	2.14				

* Represents significance at the 5% level.

** Represents significance at the 1% level.

4. 風乾率

収穫物の風乾重と生体重との比率、これを風乾率と称して置く。第10表は各部分即ち地上部、茎、葉、根等の風乾率を示したものである。

Table 10 Comparison of Rate of Air-dry Weight among Different Treatments.

Treatment	Top		Stems and branches		Leaves		Roots	
	(%)	Ratio	(%)	Ratio	(%)	Ratio	(%)	Ratio
90%	34.5	80.6	33.8	78.4	34.9	80.9	32.2	77.5
75%	34.5	80.6	34.6	80.2	34.5	80.0	33.6	80.9
60%	39.0	91.1	37.7	87.4	39.6	91.8	33.3	80.2
45%	41.3	96.4	40.9	94.8	42.6	98.8	40.4	97.3
30%	42.8	100.0	43.1	100.0	43.1	100.0	41.5	100.0

地上部重量風乾率については90%, 75%最も低く両者の差異は認められない。次いで60%これにつき更に45%と高くなっている。30%に於ては最も高率となつている。土壤水分が少なくなるほど高くなる傾向を示している。各区間の差異については第11表, 第12表に示す通り90%と75%を除くすべての区間に顕著な有意の差異が認められる。

茎重, 葉重についても全く同様の傾向を示している。

Table 11 Analysis of Variance of Air-dry Rate of Top.

Source of variance	Degrees of freedom	Sum of squares	Variance	F
Treatment	4	224.192	56.048	67.51**
Individual	3	1.452	0.484	1.74
Error	12	10.148	0.854	
Total	19	235.792		

** Represents significance at the 1% level.

Table 12 Comparison of Differences of Air-dry Rate of Top and Their Significance among Different Treatments.

	90% 34.5	75% 34.5	60% 39.0	45% 41.3	30% 42.8
90%	34.5	—			
75%	34.5	0.0	—		
60%	39.0	4.5**	4.5**	—	
45%	41.3	6.8**	6.8**	2.3**	—
30%	42.8	8.3**	8.3**	3.8**	1.5*
L.S.D. (5% level)		1.26			
L.S.D. (1% level)		1.77			

* Represents significance at the 5% level.

** Represents significance at the 1% level.

地下部重量風乾率については地上部風乾率と稍異なり90%最も低く60%, 75%と相次いでいるが三者の差異は殆んど認められない。45%に至つて顕著に高率となり, 30%に於ては最も高率となつている。しかし両者の差異はきわめて少い。各区間の差異については第13表, 第14表に示す通り75%と60%を除く他の区間の差異はきわめて有意義である。

Table 13 Analysis of Variance of Air-dry Rate of Roots.

Source of variance	Degrees of freedom	Sum of squares	Variance	F
Treatment	4	307.600	76.900	214.20**
Individual	3	0.892	0.293	1.20
Error	12	4.308	0.359	
Total	19	312.900		

** Represents significance at the 1% level.

Table 14 Comparison of Differences of Air-dry Rate of Roots and Their Significance among Different Treatments.

	90% 32.2	75% 33.6	60% 33.3	45% 40.4	30% 41.5
90% 32.2	—				
75% 33.6	1.4**	—			
60% 33.3	1.1*	0.3	—		
45% 40.4	8.2**	6.8**	7.1**	—	
30% 41.5	9.3**	7.9**	8.2**	1.1*	—
L.S.D. (5% level)	0.80				
L.S.D. (1% level)	1.13				

* Represents significance at the 5% level.

** Represents significance at the 1% level.

5) サントニン含量

有用部のサントニン含量についてみるに 60%最大で 45%, 30%と相順次して減少し, 又 75%, 90%と減少している。総平均に於ては 1.316%を示している。即ち一応は 60%を頂点としてこれより土壤水分の増加或は減少するに従つて低くなつて行く傾向を示しているようであるが, 元来この植物のサントニン含量については植物自体の個体差が非常に大きいため単にこれのみを以てしてはこの傾向は土壤水分の多少によるものと決定することは出来ないと考えられる。

本試験をなすにあたりサントニン含量の定量その他につき和歌山県業務課, 同衛生試験所より多大の助力を得た。ここに深く謝意を表する次第である。

総 括

土壤容水量の 90%, 75%, 60%, 45%及び 30%の 5区について実験を行つたが, 全般的に植物の生育は 75%位が最も良好でそれより土壤水分が増加又は減少するに従い徐々に生育が劣る傾向がみとめられる。しかし 90~60%の範囲内ではその差異はあまり顕著に現われてこない。60%位に於ては地下部の生育が最もよく, 45%位になると地上部の生育は相当に劣るが地下部の生育は 90%位と大差はない。30%位になると地上部, 地下部とも更に著しく生育が劣る傾向が認められた。したがつて本実験に於ける土壤水分の範囲内では 90~60%の範囲が生育良好の土壤水分であり, 75%位が最適土壤水分であると考えられる。しかし最適土壤水分の 75%より上位にあるか, 下位にあるかは本実験では判定出来なかつた。この点については更に研究を続けることが必要である。上述の範囲内の土壤水分の変化は初期生育には余り影響を及ぼさないと考えられる。前述の如くクラムヨモギはその原産地が砂漠乾燥の地であり乾燥に強い植物であるが乾燥が適しているのではなく少くとも初期生育には相当大なる土壤水分が必要であり, その場合に於ては生育がきわめて良好であることが判明した。植物体の風乾率については地上部, 地下部とも土壤水分の減少するに従つて高率になることが判明した。即ち湿潤な土壤に生育したものより乾燥した土壤に生育したものの方が風乾率が高くこれは当然のことと考えられる。サントニン含量については一応の傾向を認め得たが個体差が非常に大きいためこれのみではその結果は判然としない。

文 献

1) 川谷豊彦, 藤田早苗之助, 大野忠郎: 薬雑, 72; 38 (1952). 2) 川谷豊彦, 藤田早苗之助, 大野忠郎: 薬雑, 72; 1003 (1952). 3) 川谷豊彦, 藤田早苗之助, 大野忠郎: 薬雑, 73; 886 (1953). 4) 中山包: 農及園, 29; 559 (1954). 5) 宮崎幸男: 衛試報, 72; 241 (1954). 6) 柴田承二, 三橋博, 原岡通晴, 川谷豊彦: 薬雑, 71 161 (1951).

Summary

By providing five plots of soil moisture, 90%, 75%, 60%, 45% and 30% of the water capacity, the effects of the soil moisture upon the early growth of KURAMUYOMOGI (*Artemisia Kuramensis* QAZILBASHI) were investigated in 1954. Results obtained are summarized as follows.

1. In generally, the growth of plant is best at about 75% plot, and it becomes worse according to the increase or decrease of the soil moisture. But within range from about 90% to about 60% the growth of plant is good.

2. At about 60% plot, the growth of the plant is somewhat inferior to that at about 90% plot, and the difference of the growth between at about 90% plot and at about 60% plot is hardly recognized. But the growth of root is best, not inferior to that at about 75% plot.

3. At about 45% plot, the growth of top and roots are both obstructed tolerably.

4. At about 30%, the obstruction of growth is more remarkably.

5. It is recognized that the air-dry rate of top and roots are both higher according to the decrease of the soil moisture.

6. About the santonin content the results obtained are not distinctly.

Received February 26, 1956.

玉咲ツヅラフジの試植栽培（第1報） 実生栽培について

石原 活磨

Trial Cultivation of *Stephania cepharantha* HAYATA. I.

Cultivation by Seeds

Katsuma ISHIHARA

まえがき この植物は明治44年(1911)台湾中央研究所佐々木舜一によつて基隆附近において発見され大正2年(1913)早田文蔵により命名された。初めは台湾特産植物とされていたが、台北大学山本由松の研究によつて浙江省、貴州省、福建省、広東省にも自生することが判明した。台湾人の間にはその塊根を毒蛇の咬傷治療に効果あるとして用いられている。大正15年(1926)頃から近藤平三郎の研究によつてセフアランチン Cepharanthin $C_{27}H_{35}N_2O_6$ なるアルカロイドが含まれていることが判り、その後慶松一郎により純粋抽出に成功し構造式を明かにされた。その後長谷川秀治、富田真雄等により肺結核患者に注射して菌の活動を防止する力の顕著であることが立証され、この応用分野で胃酸過多症による胃の障害及び喘息患者に対し治療実験が進められている。現在では Biscoclaurin 型アルカロイドの研究にまで進展し業績をあげつつある。

台湾における栽培研究は相当大規模に行われたのであるが、実生法(有性繁殖栽培)も塊根の切断分割法(無性繁殖栽培)も共に試験結果がよくはなかつた。

よつて筆者は本植物の内地における實際的栽培を企図実施した。台湾を失つた今日、玉咲ツヅラフジの栽培は一段と重要さを加えて来た。前述の目的を達するために実生による調査を行つたが試植成績は良好であつたのでこの結果を公表して栽培当事者の参考に供する次第である。

植物性状 玉咲ツヅラフジはオオツヅラフジ科 ハスノハカヅラ属の多年生蔓生草本植物である。本植物の生育は 14.5°C に始まり 33°C 位で略停止する。生育最適気温は 22°C 内外である。生薬原料となる地下塊根の形はカブラ状、ジャガイモ状、サツマイモ状等種々あるが、製薬原料としては肥太塊根よりも細長形をなした岐根の方がアルカロイドの含量が高いので、肥太生長を計るよりも伸長生長を計る方が有利なのである。

毎年4月下旬に生育を開始し、11月下旬頃の降霜期に至つて地上の茎葉は自然枯死する。塊根の大きなものは往々3kgに達することもあるが、普通は10g程度の種塊根を1ヶ年育成して80g内外に達するし、又実生の場合には4月に播種し、11月に収根して80g内外となる。時として1年生の塊根が200g乃至300gに達する場合もある。

茎は円形、横断面は顕著なる脈管より放射状の紋理を表す。茎葉は無毛緑色で左巻の纏繞性である。葉は蔓茎より長柄を出し互生す。広卵形又は広卵三角状で、柄脚より7条乃至9条の葉脈あり、長さ8cm、幅8.5cm、葉柄の長さ10cm位である。葉の裏面は類白色である。

草の外観は繊細で雌雄異株である。本植物の開花及び結実の盛期は8月下旬から11月上旬までである。開花後の漿果は初め緑色であるが、稔実は鮮紅の美玉である。三年生中等株1株よりの収実量は大約1,500粒、4.5g内外である。

試植区設定

試植区分	試験区状況	試植区分	試験区状況
第1	砂壤土、三分陰地	第6	壤土低湿地半陰
第2	腐葉土、七分陰地	第7(南区)	粘重地、低湿半陰潤地
第3	砂壤土、低地半陰	第7(北区)	粘重低湿地、半陰地
第4	砂壤土、低地半陰	第8(南区)	粘重地、高陽地
第5	壤土、低地半陰	第8(北区)	火山灰質壤土、陽地

調査事項

1. 試植区別地上部茎葉の發育と収塊根量に関する調査。
2. 試植区別土壌の乾湿及び光線の強弱、気温の高低に関する調査。
3. 播種時期別と収塊根量との関係。
4. 支柱立の有無と収塊根量との関係。
5. 種子貯蔵方法の差と發育に関する調査。
6. 増殖用優良苗の確保についての考察

実験結果並びに考察

1. 第1試植区 本区は排水のよい半陰砂質壤土で行った。試植地は2月中旬に清掃深耕して置いて、3月下旬播種に先立ち再び深耕碎土した。同時に畑地全面に腐熟堆肥600貫、硫酸アンモニア3貫、過磷酸石灰7貫、魚肥20貫、硫酸加里4貫を元肥として施用した。

4月上旬気温の上昇を待つて、畦巾90cm、高さ30cmの高畦を作り、畦上に条間距離20cmの二条の播条を作った。播種量は6畦12条で600粒とした。供試種子は透明硝子瓶中に貯蔵したものをを用いた。覆土は清潔な河砂を用い覆土後軽く鎮圧し、土表面の過乾を防ぐため薄く敷葉をなし、如露を用いて多量灌水した。

本区の成績は第1表に示すとおり最良生育株1株平均重82.92g、全区総収の1株平均重は25.73gを示した。総収株に対して収株率の多かつたのは第4位(中等株)の17.29%で、最下位は第7位(最小株)の6.03%であった。

次に収根株大小順位別による収根重比率を観察すると、最大根株重24.80%が最上位を示し、最下位は(最小根)の0.82%を示した。

1株平均重比率は(最大根)の40.28%を最高とし、以下順次下向して(最小根)の1.13%最下位の割合を示した。この調査示数と示率は次年以後に栽培する玉咲ツツラフダの量的、質的に深い関連がある。

第1表 収 根 量

株 順	収 株 数	収 全 重	一 株 平 均 重	生 育	総収に対する百分率 (%)		
					収 株	収 重	根 重
最 大	4.00株	331.67g	82.92g	良	6.89%	24.80%	40.28%
1	6.83	254.83	37.31	中	11.77	19.05	18.12
2	8.83	276.67	31.33	中	15.22	20.69	15.22
3	9.00	183.33	20.37	中	15.51	13.71	9.90
4	10.03	158.33	15.79	下	17.29	11.84	7.67
5	9.00	80.00	8.89	下	15.51	5.98	4.32
6	6.83	41.67	6.10	下	11.77	3.12	2.97
最 小	3.50	11.00	3.14	不 良	6.03	0.82	1.53
計	58.02	1337.50	205.85		100.00	100.00	100.00
平 均			25.73				

第2表は本区の生育に関する調査成績である。本表に示す如く本区1株平均重は27.53g、根長は15.74cm、根

第2表 生 育

株 順	根 重	根 長	根 径	大 枝 根			葉 数
				根 数	根 長	根 径	
最 大	81.28g	21.06cm	2.81cm	2.25本	27.13cm	1.47cm	1.06本
1	40.62	26.29	1.90	3.29	34.22	1.28	1.00
2	34.67	20.29	1.65	3.53	31.63	1.15	1.00
3	25.22	23.58	1.39	3.00	32.65	0.99	1.00
4	18.72	12.42	1.63	2.17	23.21	0.87	1.06
5	10.06	12.38	1.35	1.58	18.13	0.64	1.50
6	6.61	5.10	1.35	1.42	19.08	0.24	1.06
最 小	3.08	4.83	1.10	0.83	10.50	0.26	1.00
平 均	27.53	15.74	1.65	2.38	24.57	0.86	1.09

径は 1.65cm である。次に枝根發育状況を考察するに、大枝根数の最多は 3.53 本、各株平均 2.38 本、根長の最長は 34.22cm、各株平均根長は 24.57cm である。また根径最肥大のものは 1.47cm、各株平均は 0.86cm である。

第 2 試植区 本区は針葉樹蔭地にして適湿腐植質土である。5 月 1 日播種、5 月 11 日発芽初め、5 月 24 日発芽揃い、発芽歩合 87.00 % である。

本区収根成績は第 3 表に示すように最大生育 1 株平均重 80.00g であり、総収 1 株平均重 27.06g、総収に対する収株率の多いものは(4)の 28.04 % を示し、最下位のものは（最大根）の 13.74 % である。次に収根の大小順位別による根収重比率を觀察すると、(2)の 22.20 % 最上位を示し、最下位は（最小根）の 0.51 % であつて、1 株平均重比率は（最大根）の 36.96 % を最高とし、以下順次下向し、（最小根）の 0.69 % が最下位であつた。

第 3 表 収 根 量

株 順	収 株 数	収 全 重	一 株 平 均 重	生 育	総数に対する百分率 (%)		
					収 株	収 重	根 重
最 大	4.00株	320.00g	80.00g	良	3.74%	13.66%	36.96%
1	10.00	510.00	51.00	中	9.35	21.78	23.56
2	14.00	520.00	37.14	中	13.08	22.20	18.08
3	20.00	470.00	23.50	中	18.69	20.07	10.86
4	30.00	380.00	12.67	下	28.04	16.23	5.85
5	15.00	110.00	7.33	下	14.02	4.70	3.39
6	6.00	20.00	3.33	不 良	5.61	0.85	1.54
最 小	8.00	12.00	1.50	不 良	7.48	0.51	0.69
計	107.00	2345.00	216.47		100.00	100.00	100.00
平 均			27.06				

第 4 表は本区の生育に関する調査成績である。本表に示すように本区 1 株平均重 29.33g、根長 11.56cm、根径 1.82cm である。次に枝根發育状況を考察するに大枝根数の最多は 5.33 本、各株平均 2.48 本であり、根長の最長は 66.00cm、各株平均根長 29.83cm、根径最肥大のものは 1.97cm、各株平均は 0.98cm であつた。

第 4 表 生 育

株 順	根 重	根 長	根 径	大 枝 根			莖 数
				根 数	根 長	根 径	
最 大	84.00g	4.75cm	1.60cm	5.33本	66.00cm	1.77cm	1.00本
1	53.33	14.25	2.75	3.00	32.67	1.97	1.33
2	40.33	14.00	2.50	4.50	50.00	0.90	1.00
3	26.67	5.50	2.25	3.50	30.00	1.15	1.00
4	14.33	26.75	1.35	1.00	34.00	1.00	1.00
5	10.33	11.75	1.85	1.50	16.00	0.55	1.00
6	4.00	10.83	1.00	0	0	0	1.33
最 小	1.67	2.67	1.23	1.00	10.00	0.50	1.00
平 均	29.33	11.56	1.82	2.48	29.83	0.98	1.08

第 3 試植区 本区は低湿半陰の砂壤土地である。4 月 1 日種子 100 粒を播付した。播付方法は第 1 試植区と同様である。発芽初めは 5 月 1 日、発芽揃いは 5 月 15 日である。発芽歩合は 68.00 % を示す。収根成績は第 5 表のとおりである。

第 5 表に示すとおり本区の最大根は 1 株重 145g を示し、総収 1 株当りの平均重は 53.37g である。又全区中収

株率の高いのを示したものは小根にして(5), (6)株は全収株数の22.06%乃至17.65%である。収株率の低いのは(最大根)及び(最小根)にして収株数の2.94%乃至5.88%である。しかるに根収重の比率は(1)株の26.82%最上位を示し(3)及び(2)これに次ぎ(最小根)の0.53%最下位を示した。次に収根量比率を見るに(最大根)の33.95%最大にして、(最小根)の0.85%最下位で、本区成績は各区中の最優位を示した。

第5表 収根量

株 順	収株数	収全重	一株平均重	生 育	総収に対する百分率 (%)		
					収 株	収 重	根 重
最 大	2.00株	290.00g	145.00g	優	2.94%	10.51%	33.95%
1	8.00	740.00	92.50	優	11.76	26.82	21.66
2	6.00	405.00	67.50	良	8.82	14.68	15.81
3	10.00	455.00	45.50	中	14.71	16.49	10.65
4	10.00	355.00	35.50	中	14.71	12.86	8.31
5	12.00	290.00	24.60	中	17.65	10.51	5.76
6	15.00	204.00	12.75	下	22.06	7.39	2.99
最 小	14.00	14.50	3.63	下	5.88	0.53	0.85
計	68.00	2,759.50	427.08		100.00	100.00	100.00
平 均			53.37				

第6表は本区の生育に関して調査を行つた成績である。根塊の發育順位により(最大根)から(最小根)に至る8位に分けて実施した。本表における成績を観察するに本区の1株平均重は50.67g, 根長9.64cm, 根径4.42cmである。次に枝根發育状況を考察するに大枝根数最も多いのは4.33本, 各株平均数は2.31本で, 根長の最長は36.33cm, 各株平均根長26.15cmであり, 根径の最肥大のものは1.75cm, 各株平均0.92cmであつた。

第6表 生 育

株 順	根 重	根 長	根 径	大 枝 根			莖 数
				根 数	根 長	根 径	
最 大	156.67g	7.23cm	4.67cm	4.33本	36.33cm	1.75cm	1.00本
1	100.67	15.33	4.17	3.50	21.33	1.50	1.00
2	8.67	5.75	3.75	3.67	31.00	1.33	1.00
3	47.67	17.33	2.83	3.00	28.00	1.00	1.00
4	39.00	13.67	2.33	2.00	31.00	0.25	1.00
5	33.33	12.17	3.10	1.00	31.50	1.00	1.00
6	15.67	3.67	2.17	1.00	30.00	0.50	1.00
最 小	3.67	4.00	12.33	0	0	0	1.00
平 均	50.67	9.64	4.42	2.31	26.15	0.92	1.00

第4試植区 本区は低湿半陰の砂壤土地で行つた。4月1日種子200粒を播種した。栽培方法は1試植区と全く同様である。本区は前区に比べ腐葉土加用量は3分の1である。発芽初め5月1日, 発芽揃い5月19日, 発芽率62.50%である。(調査成績第7表参照)

第7表に示すように本区の最大根は1株平均重66.60g, 総収株1株平均重26.64gである。又全区中収株率の多いのは(4)及び(5)にして16.80%を示し, 少いのは(最大根)の4.00%である。次に根の大小順位別による収根重比率を観察するに, (1)及び(2)の29.45%乃至18.64%が最高を示し, (6)及び(5)の1.57%乃至7.56%が最低である。更に一株当平均重の比は(最大根)の31.24%を最高とし, (最小根)の1.47%が最低である。

第7表 収根量

株 順	収株数	収全重	一株平均重	生 育	総収に対する百分率 (%)		
					収 株	収 重	根 重
最 大	5.00株	333.00g	66.60g	良	4.00%	11.87%	31.24%
1	17.00	826.00	48.59	中	13.60	29.45	22.79
2	15.00	523.00	34.87	中	12.00	18.64	16.36
3	16.00	383.00	23.94	中	12.80	13.65	11.23
4	21.00	366.00	17.43	下	16.80	13.04	8.18
5	21.00	212.00	11.16	下	16.80	7.56	5.24
6	16.00	119.00	7.44	下	12.80	4.24	5.49
最 小	14.00	44.00	3.14	不 良	11.20	1.57	1.47
合 計	125.00	2,806.00	213.17		100.00	100.00	100.00
平 均			26.64				

第8表は生育に関する調査成績である。塊根の发育順位により（最大根）より（最小根）までの8位に分けて調査した。本表に示すように、本区一株の平均重は28.42g、根長9.53cm、根径2.43cmである。次に枝根发育状況を考察するに大枝根数は最多4.00本、各株平均1.71本である。根長の最長は40.50cm、各株平均根長26.17cmで、根径最肥大のもの1.25cm、各株平均は0.69cmである。

第8表 生 育

株 順	根 重	根 長	根 径	大 枝 根			莖 数
				根 数	根 長	根 径	
最 大	70.00g	21.33cm	3.50cm	1.00本	40.50cm	1.25cm	1.00本
1	51.67	4.57	3.00	4.00	35.67	1.00	1.00
2	34.67	5.33	3.17	2.00	26.38	0.57	1.00
3	29.00	4.67	3.33	1.67	19.33	0.53	1.00
4	20.00	5.00	2.33	1.00	30.00	0.90	1.00
5	11.67	3.67	1.50	1.00	30.50	0.75	1.00
6	6.67	12.67	1.33	3.00	27.00	0.50	1.00
最 小	3.67	19.00	1.25	0	0	0	1.00
平 均	28.42	9.53	2.43	1.71	26.17	0.69	1.00

第5試植区 この調査は玉咲ツヅラフジの実生育成の場合における種子貯蔵硝子瓶色の差が塊根发育に及ぼす影響を知るために行つたものである。種子貯蔵方法の差による発芽及び発芽後の生育状況は第9表に示すとおり、その成績は(1)適湿河砂中貯蔵のもの最優位を示し、発芽率97.50%、生育率94.95%である。(2)着色硝子瓶中貯蔵のもの最優位を示し、黄色瓶では発芽率65.41%、生育率63.26%である。(3)次位は赤褐色(2位)褐灰色(3位)青色(4位)の順位である。(4)最下位は純白色瓶中のもので発芽率18.75%、生育率13.55%である。(5)黒色、赤色、透明瓶は生育率概ね40%内外を示した。

第9表 発芽調査

畦順	貯蔵瓶色	発芽期			発芽		生育	
		始期日	発芽月日	終期日	発芽数	発芽率 百分比	生育数	生育率 百分比
標準	土中貯蔵	5月1日	5月7日	5月19日	97.50	100.00%	94.95	100.00%
1	透明硝子瓶	5月19日	6月1日	6月24日	47.90	49.13	40.80	42.97
2	赤褐色瓶	5月17日	6月8日	6月24日	49.90	51.18	44.68	47.06
3	褐灰色瓶	5月17日	6月8日	6月29日	47.90	49.13	43.54	45.86
4	鮮黄色瓶	5月17日	5月31日	6月21日	65.41	67.09	63.26	66.62
5	鮮青色瓶	5月14日	6月8日	6月20日	46.10	47.28	42.00	44.23
6	鮮赤色瓶	5月17日	6月8日	6月25日	42.00	43.08	40.00	42.13
7	純白色瓶	5月11日	6月8日	6月22日	18.75	19.23	13.55	14.27
8	黒色瓶	5月14日	6月1日	6月20日	43.00	44.10	40.00	42.13
計					360.96	370.22	327.83	345.27
平均		5月9日	5月17日	6月22日	45.12	46.278	40.979	43.159

第10表は収根塊量について調査を行った。本表を考察するに標準貯蔵種子区1株平均重は94.95gであるのに対し、着色硝子瓶中の優位を占める青色瓶区1株平均重は52.48gである。最下位は黒色瓶の21.50gである。なお、各区1株平均重は37.22gである。次に各区収根比率は標準区を100とした場合、青色瓶区73.64%を示し黄色、赤色、灰褐色の順位で最下位は純白色瓶である。

第10表 収根量

区順	貯蔵瓶色	一区総重	収根一株平均重	収根比率	生育順位
標準区			94.95g	100.00	◎
1	透明瓶	1,110.00g	39.64	23.70	8
2	赤褐色	995.74	22.29	27.12	7
3	灰褐色	1,787.09	41.04	56.17	4
4	鮮黄色	2,907.00	45.84	65.12	2
5	鮮青色	2,204.00	52.48	73.64	1
6	鮮赤色	1,774.00	44.35	64.07	3
7	純白色	415.25	30.63	28.40	5
8	黒色	860.08	21.50	34.54	5
計		12,046.08	297.76	372.75	
平均		1,505.76	37.22	46.59	
標準生育を百とした場合の生育比率				94.95	

第11表は生育についての調査成績である。本表に示すように、標準区に対し貯蔵瓶区の生育を比較考察するに根長の最大を示すものは鮮青色区22.89cm (標準区39.47cm) にして、平均11.94cmである。根径の最大は鮮青色区にして3.12cm (標準区2.97cm) 平均2.50cmである。大枝根については、純白色最大にして3.00 (本標準区3.14本)、根長の最長は黒色区の31.73cm (標準区32.71cm) にして平均は27.75cm、根径の最長は

1.17cm（標準区 1.17cm）平均は 0.76cm である。

第 11 表 生 育

区 順	貯 蔵 瓶 色	根 長	根 径	叢生茎数	大 枝 根		
					根 数	根 長	太 さ
標準区		39.47cm	2.97cm	1.00本	3.14本	32.71cm	1.71cm
1	透 明 瓶	7.33	1.77	1.00	2.33	26.83	0.70
2	赤 褐 色	14.12	2.00	1.00	1.00	28.50	0.35
3	灰 褐 色	9.33	2.56	1.00	2.50	31.20	1.00
4	鮮 黄 色	14.55	2.64	1.00	2.90	27.85	0.73
5	鮮 青 色	22.89	3.12	1.00	2.33	25.83	0.98
6	鮮 赤 色	8.79	2.87	1.00	2.90	28.20	1.17
7	純 白 色	9.99	2.68	1.00	3.00	21.83	0.70
8	黒 色	8.53	2.33	1.00	2.64	31.73	0.47
計		95.53	19.97	8.00	19.60	221.97	6.10
平 均		11.94	2.50	1.00	2.45	27.75	0.76
標準生育を百とした場合の百分率		30.25	84.18	100.00	78.03	84.84	44.44

第 6 試植区 A 区（無支柱立区）本区は稍肥沃の低温半陰地の粘重植土地である。5 月 1 日播種した試植の目的は本植物の実際的大栽培を行う場合における参考資料を得るがために A、B 両区における生産能力を究明しようとした。

第12表に示すように本区 1 株当平均重は 24.48g（最大根重 62.00g），根長は 7.81cm（最大根長 8.0cm），根径は 2.17cm（最大根の太さ 3.0cm）を示した。更に本区塊根生育状況を観察するに、主として枝状棒形及び細糸根の発育するを認めた。生育概況は実生栽培標準区に比し中等級である。

第 12 表 収 根 量 と 生 育

株順	主 根			大 枝 根			茎 数	生 育	根 状
	収根重	根 長	根 径	根 数	根 長	根 径			
1	62.00	8.00	3.00	4.0	26.00	0.80	1.00	良	主として枝根発育
2	57.00	10.00	2.00	5.0	30.00	0.80	1.00	中	主として枝根発育
3	39.00	4.00	3.50	2.0	42.00	0.80	1.00	中	主として枝根発育
4	35.00	7.50	3.00	3.0	17.00	0.50	1.00	中	頭部肥大枝根発育
5	34.00	8.00	2.50	3.0	30.00	0.50	1.00	中	頭部肥大枝根発育
6	32.00	5.00	2.50	5.0	30.00	1.00	1.00	中	頭部肥大枝根発育
7	29.00	6.00	2.00	3.0	38.00	0.60	1.00	中	頭部肥大枝根発育
8	27.00	9.00	1.50	2.0	30.00	0.50	1.00	中	頭部肥大枝根発育
9	27.00	4.50	3.00	2.0	33.00	1.00	1.00	中	頭部肥大枝根発育
10	27.00	7.00	2.00	2.0	26.00	0.50	1.00	中	頭部肥大枝根発育
11	27.00	2.50	2.50	3.0	32.00	1.00	1.00	中	頭部肥大枝根発育
12	22.00	3.00	2.50	2.0	22.00	0.50	1.00	中	棒状根発育
13	20.00	2.25	1.80	0.0	0.0	0.0	1.00	中	棒状根発育
14	17.00	0.0	0.0	2.0	7.00	0.80	1.00	下	主として枝根発育
15	15.00	7.00	1.60	2.0	22.00	0.30	1.00	下	棒状根発育
16	14.00	12.00	1.30	0.0	0.0	0.0	1.00	下	棒状根発育
17	12.00	5.00	1.50	2.0	13.00	0.50	1.00	下	主として枝根発育
18	5.00	5.00	1.00	0.0	0.0	0.0	1.00	不良	主として棒状根発育
19	5.00	3.00	1.50	0.0	0.0	0.0	1.00	不良	主として枝根発育
20	4.00	19.00	1.00	0.0	0.0	0.0	1.00	不良	主として枝根発育
21	4.00	16.00	0.80	0.0	0.0	0.0	1.00	不良	頭部肥大
計	514.00	143.75	40.50	42.00	418.00	10.10	21.00		
平均	24.48	6.85	1.73	2.00	19.91	0.48	1.00		

B区(支柱立区)栽培地及び育成方法はA区に同じ、支柱用竹は高さ2.5m、直径1.8cm位のものを使用した。調査成績第13表のとおり。

第13表 収根量と生育

株順	主 根			大 枝 根			茎 数	生 育	根 状
	収根重	根 長	根 径	根 数	根 長	太 さ			
1	189.00	27.00	4.50	4.0	30.00	1.00	1.00	優	棒状根発育
2	117.00	0.0	0.0	2.0	27.00	2.50	1.00	優	枝根発育
3	82.00	9.00	3.50	2.0	30.00	0.50	1.00	良	頭部肥大細糸根発育
4	77.00	16.00	3.50	3.0	33.00	1.00	1.00	良	棒状根発育
5	72.00	6.00	4.00	1.0	20.00	0.80	2.00	良	頭部肥大枝根発育
6	67.00	5.50	4.00	3.0	29.00	0.80	1.00	良	頭部肥大枝根発育
7	55.00	10.00	4.50	0.0	0.0	0.0	1.00	良	頭部肥大
8	50.00	2.50	2.50	6.0	40.00	1.00	1.00	中	主として枝根発育
9	40.00	5.00	3.50	0.0	0.0	0.0	1.00	中	主として枝根発育
10	39.00	4.50	2.50	1.0	32.00	1.50	1.00	中	頭部肥大
11	37.00	8.00	2.50	2.0	25.00	0.40	1.00	中	棒状根発育
12	37.00	33.00	2.00	0.0	0.0	0.00	1.00	中	主として枝根発育
13	30.00	7.00	2.50	1.0	2.50	0.40	1.00	中	頭部肥大細糸根発育
14	24.00	4.00	3.00	0.0	21.00	0.50	1.00	中	主として枝根発育
15	22.00	7.00	2.00	1.0	21.00	0.50	1.00	中	主として枝根発育
16	17.00	4.00	2.50	2.0	20.00	0.80	1.00	下	頭部肥大
17	7.00	12.00	1.00	0.0	0.0	0.00	1.00	下	棒状根発育
18	7.00	1.00	1.50	1.0	17.00	0.50	1.00	下	頭部肥大
合計	979.00	161.50	49.50	29.00	347.50	12.20	18.00		
平均	54.39	8.94	2.75	1.61	19.31	0.68	1.00	中	

以上調査成績を考察するに、A区(無支柱立区)に比しB区(支柱立区)の塊根発育状況は下表のようにその優劣を比較できる。本植物の実際の栽培に当つては、資金、労力、資材に支障のない範囲内において支柱立を行うのが有利であるように思われる。

A区(無支柱立)とB区(支柱立)の比率

区 分	収根重	根 長	根 径	大 枝 根			茎 数
				根 数	根 長	太 さ	
A 区	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
B 区	45.01	87.36	62.18	124.22	103.11	70.59	100

次に両区の最大発育根を比較するとき次表の結果を示す。

区 分	収根重	根 長	根 径	大 枝 根			茎 数
				根 数	根 長	太 さ	
A 区	62.00g	8.00cm	3.00cm	4本	26.00cm	0.80cm	1本
B 区	189.00	27.00	4.50	4	30.00	10.00	1

更に最大根発育百分率を比較すれば次表のように支柱立区が特に良好であることが判る。

区 分	収根重	根 長	根 径	大 根 枝			莖 数
				根 数	根 長	太 さ	
A 区	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
B 区	304.84	337.50	150.00	100.00	115.38	125.00	100

第7試植区：南区 本区の収根成績は第14表に示すように最大生育株1株平均重36.00g、総収1株平均重17.92gである。総収に対する収株率の高いのは(6)及び(5)で29.20%乃至18.25%を示し、最下位は(最大根)の11.82%である。次に収根の大小順位別による収根重比率を観察すると、(5)の18.45%が最上位を示し、最下位は(最小根)の1.79%である。1株平均重比率は(最大根)の25.12%を最高とし、以下順次下向し(最小根)の1.19%が最下位である。

第14表 収 根 量

根 順	収株数	収全重	一株平均重	生 育	総収に対する百分率 (%)		
					収 株	収 重	根 重
最 大	5.00株	280.00g	36.00g	中	1.82%	8.33%	25.12%
1	11.00	340.00	30.90	中	4.01	10.12	21.56
2	22.00	590.00	26.83	中	8.03	17.56	18.72
3	31.00	580.00	18.71	下	11.31	17.26	13.05
4	33.00	430.00	13.03	下	12.04	12.80	9.09
5	50.00	620.00	10.40	下	18.25	18.45	7.26
6	80.00	460.00	5.75	下	29.20	13.69	4.01
最 小	34.00	60.00	1.71	不 良	12.41	1.79	1.19
計	274.00	3,360.00	143.33		100.00	100.00	100.00
平 均			17.92				

第15表は本区の生育に関する調査成績である。本表に示すように本区1株平均重40.21g、根長6.80cm、根径2.05cmである。枝根発育状況は、大枝根数の最多は4.00本、各株平均は2.08本にして、根長の最長は31.00cm各株平均根長は13.98cmであり、根径最肥大のもの1.00cmで各株平均は0.58cmである。

第15表 生 育

株 順	根 重	根 長	根 径	大 枝 根			莖 数
				根 数	根 長	根 径	
最 大	58.00g	11.07cm	3.00cm	4.00本	31.00cm	0.80cm	1.00本
1	97.33	9.83	2.81	3.33	3.00	0.75	1.00
2	97.33	9.00	2.50	3.33	23.33	0.93	1.00
3	24.67	10.67	2.00	2.50	22.25	0.80	1.00
4	22.33	8.67	1.83	2.00	30.00	1.00	1.00
5	15.67	13.33	2.00	1.50	2.25	0.35	1.00
6	4.70	6.83	1.33	0	0	0.0	1.00
最 小	1.67	9.00	0.93	0	0	0	1.00
平 均	40.21	9.80	2.05	2.08	13.98	0.58	1.00

第7試植区：北区 本区収根成績は第16表に示すように、最大生育株1株平均重53.75g、総収1株平均重

17.20gである。総収に対する収株率の高いものは(6)及び(3)にして27.15%乃至26.22%を示し、最下位は(最大根)の1.50%である。次に収根の大小順位別による収根重比率を観ると、(3)の36.04%が最上位を示し、最下位は(最小根)の5.41%である。1株平均重比率は(最大根)の39.07%を最高とし、以下順次下向し(最小根)の1.19%が最下位である。

第16表 収 根 量

株 順	収 株 数	収 全 重	一株平均重	生 育	総収に対する百分率 (%)		
					収 株	収 量	根 重
最 大	8.00株	430.00g	53.75g	中	1.50%	7.75%	39.07%
1	24.00	550.00	29.92	中	4.50	9.91	16.66
2	32.00	800.00	25.00	中	5.99	14.41	18.17
3	140.00	2,000.00	14.29	下	26.22	36.04	10.39
4	98.00	720.00	7.35	下	18.35	12.97	5.34
5	64.00	450.00	7.03	下	11.99	8.12	5.11
6	145.00	570.00	5.93	下	27.15	10.27	4.31
最 小	23.00	30.00	1.30	不 良	4.31	5.41	0.94
計	534.00	5,550.00	137.57		100.00	100.00	100.00
平 均			17.20				

第17表は本区の生育に関する調査成績である。本表によれば1株平均重25.75g、根長11.92cm、根径2.65cmである。次に枝根発育状況を考察するに、大枝根数の最多は4.67本、各株平均は2.27本である。根長の最長は31.00cm、各株平均根長は17.58cmで、根径最肥大のもの1.50cm、各株平均は0.76cmである。

第17表 生 育

株 順	根 重	根 長	根 径	大 枝 根			莖 数
				根 数	根 長	根 径	
最 大	73.67g	23.50cm	2.67cm	4.67本	26.67cm	1.00cm	1.00本
1	41.33	4.70	2.25	4.50	22.50	1.15	1.00
2	33.00	20.50	2.00	3.00	31.00	1.50	1.00
3	20.33	4.17	9.00	2.00	15.50	0.40	1.00
4	13.00	9.67	15.17	1.00	20.00	1.00	1.00
5	11.33	1.57	1.23	0	0	0	1.00
6	7.00	15.50	1.40	3.00	25.00	1.00	1.00
最 小	2.33	2.17	1.07	0	0	0	1.00
平 均	25.75	11.92	2.65	2.27	17.58	0.76	1.00

第8試植区：南区 本区は粘重植土の陽光地で排水も佳良である。第18表に示すように、本区の最大根は1株平均重76.25g、総収1株当たり平均重26.64gで、全区中収株率の高いものは(4)の26.87%、低いものは(最小根)の4.48%である。次に収重量比率では(1)及び(2)の23.01%乃至20.25%が高く、(6)及び(最小根)の0.31%が最下位である。1株平均重比率は(最大根)の35.77%を最高とし、以下順次これに次ぎ最小根は0.87%である。

第 18 表 収 根 量

株 順	収 株 数	収 全 重	一株平均重	生 育	総収に対する百分率 (%)		
					収 株	収 重	根 重
最 大	8.00株	610.00g	76.25g	良	5.97%	18.71%	35.77%
1	15.00	750.00	50.00	中	11.94	23.01	23.46
2	19.00	660.00	34.74	中	14.18	20.25	16.30
3	23.00	550.00	23.91	中	17.16	16.87	11.22
4	36.00	510.00	14.17	下	26.87	15.64	6.65
5	15.00	110.00	7.40	下	11.94	3.37	3.47
6	12.00	10.00	5.00	不 良	8.96	0.31	2.35
最 小	6.00	10.00	1.67	不 良	4.48	0.31	0.78
計	134.00	3,210.00	213.14		100.00	100.00	100.00
平 均			26.64				

第 19 表は塊根発育順に従い最大根から最小根まで 8 位に分けて本区の生育状況を示した。本表に示すように最大根重 80.33g, 根長 14.89cm, 根径 2.83cm で, 総収平均生育は根重 28.75g, 根長 11.38cm, 根径 1.98cm であり, 大枝根の発育状況は発生根数 2.06 本, 根長 20.29cm, 根径 0.66cm である。

第 19 表 生 育

株 順	根 重	根 長	根 径	大 枝 根			菌 数
				根 数	根 長	根 径	
最 大	80.33g	14.89cm	8.83cm	5.50本	36.50cm	1.00cm	1.00本
1	49.67	16.50	2.33	2.50	26.00	0.75	1.33
2	36.33	14.33	2.67	1.50	26.00	0.70	1.00
3	26.67	9.17	2.17	2.50	18.83	0.75	1.00
4	20.00	16.00	1.75	2.50	37.00	0.90	1.00
5	7.33	9.67	1.33	1.00	2.50	0.20	1.67
6	5.67	7.50	1.33	1.00	16.00	1.00	1.00
最 小	4.00	3.00	1.43	0	0	0	1.00
平 均	28.75	11.38	1.98	2.06	20.29	0.66	1.13

第 8 試植区：北区 栽培地及び栽培方法は南区試植区と同様にして収量調査の結果は第 20 表のとおりである。この調査によれば, 最大生育 1 株平均重 90g で総収 1 株平均重は 35.53g である。総収に対する収株率の高いのは(3)及(4)で 18.37% を示し, 最下位は(最小根)の 4.08% である。次に収に収根の大小順位別による収根重比率では(最大根)の 21.05% が最上位で, 最下位は(6)の 2.34% である。1 株平均重比率は(最大根)の 31.09% を最高とし以下順次下向し(最小根)の 1.04% が最下位である。

第 20 表 収 根 量

株 順	収 株 数	収 全 重	一株平均重	生 育	総収に対する百分率 (%)		
					収 株	収 重	根 重
最 大	4.00株	360.00g	90.00g	優	8.16%	21.05%	31.09%

株 順	収 株 数	収 全 重	一株平均重	生 育	総収に対する百分率 (%)		
					収 株	収 重	根 重
1	4.00株	280.00 g	70.00 g	良	8.16	16.37	24.18
2	7.00	330.00	47.14	中	14.29	19.30	16.28
3	9.00	330.00	36.67	中	18.37	19.30	12.67
4	9.00	200.00	22.00	中	18.37	11.70	7.60
5	8.00	110.00	13.75	下	16.33	6.43	4.69
6	6.00	40.00	1.67	下	12.24	2.34	2.30
最 小	2.00	60.00	3.00	不 良	4.08	3.51	1.04
計	49.00	1,710.00	284.23		100.00	100.00	100.00
平 均			35.53				

本区の生育について第21表による調査の結果を見ると最大根は1株平均重73.00g, 根長14.50cm, 根径4.00cmで, 総収1株当平均重27.51g, 根長9.56cm, 根径2.14cmであり, 大枝根の发育状況を見ると発生根数3.33本, 根長28.33cm, 根径1.20cmである。総収根平均2.17本, 根長21.69cm, 根径0.56cmである。

第21表 生 育

株 順	根 重	根 長	根 径	大 枝 根			茎 数
				根 数	根 長	根 径	
最 大	73.00g	14.50cm	4.00cm	3.33本	28.33cm	1.20cm	1.00本
1	39.67	9.00	2.67	2.67	29.33	0.40	1.00
2	35.67	5.17	2.00	1.67	23.67	0.53	1.00
3	28.00	14.00	2.00	4.00	20.50	0.90	1.00
4	23.00	9.50	2.60	1.00	25.67	0.57	1.00
5	12.00	5.33	1.67	3.00	21.00	0.50	1.00
6	8.67	11.50	1.50	1.00	25.00	0.40	1.00
最 小	2.00	7.50	0.70	0.63	0	0	1.00
平 均	27.51	9.56	2.14	2.17	21.69	0.56	1.00

本試験の実施に当り懇篤な指導を賜った松尾仁先生に深厚の敬意を表する。本稿の作成に当り御指導をいただいた川谷分場長, 援助された大野忠郎技官, 黒岡一夫事務官に謝意を表する。

総 括

本試験成績を考察すれば大要次のとおりである。

- 1) 8, 9月頃採種した種子を適湿の砂中に貯蔵し, 4月頃催芽後に播種したものは発芽率85%以上で, その後の生育も良好であることを認めた。
- 2) 稔実果を採り水洗後布袋に入れ木箱中に貯蔵したものは発芽揃いまで60日以上を要し, 発芽率も45%以下であつて, その後の生育も甚だ不良であつた。
- 3) 着色硝子瓶中に入れ密閉貯蔵した種子の発芽と生育は各々興味ある結果を得たが, これは今後と同法を数回反覆して確めた上でなければ良否の決定ができない。
- 4) 試植区の高低, 乾燥, 陽陰各地においての実験は5ヶ年間行つたが, 次のように結論し得ると思う。
 - a. 高地, 陽乾地での栽培は殆ど不能に近いと推定する。
 - b. a.に反して低温陰地での栽培は発芽生育が特によいことを認めた。

- 5) 資材費と労力を多く要するが、支柱立は絶対必要である。
要約すれば本試験の実施によつて内地露地栽培の大半は確立できたと思考する。
ちなみに、この栽培の実際化は静岡県、埼玉県、滋賀県、千葉県、栃木県の5県で行つた。

Summary

Results obtained are summarized as follows :—

- 1) The seeds which, obtained in August and September and stored in suitably moist sand, were sown after natural sprouting in April, showed more than 80 per cent of germination. The plants from this showed favorable growth.
- 2) The seeds which, from ripe fruits, were packed in the cloth sack after washing and stored in the wooden box, required more than 60 days till perfect germination, the latter being less than 45 per cent. The plants from this showed weak growth.
- 3) Very interesting results were obtained concerning the germination and the growth of seeds which were stored incoloured bottles under air-tight conditions. This method of storatation requires further experiments.
- 4) Cultivation experiments were made during five years, under conditions of high and low, dry and wet, and sunny and shady places. a) It is assumed that the cultivation is impossible in the high land and in sunny dry places. b) Contrary to the former, the cultivation is preferable in the low land and in shady places.
- 5) For the cultivation of this plant support is absolutely necessary on which the twining stems grow, although this requires much labour and cost. It is thought that, according to the present studies, the method of cultivation in Japan is practically established. In this connection, practical cultivation was carried out in five prefectures, namely, Shizuoka, Saitama, Shiga, Chiba, and Tochigi.

Received February 29, 1956

褐色アンプルの遮光度と鉄の溶出度について

野崎 泰彦, 河村 正一

Tests for Amber Glass Ampules: Light Transmission and Resistance to Various Solutions

Yasuhiko NOZAKI, Shoichi KAWAMURA

まえがき 米国薬局方 XV では遮光容器の光の吸収を平面ガラスを作つて測定しているが、この方法ではガラス生地は吸収は測れるが、成形された容器の吸収は測れない。又平面ガラスを作ることはやつかいである。容器に当る光の状態はさまざまであつて、たとえ物理的にはつきり解釈できる透過率の測定を試みても実用的な価値は少いと思われる。そこでわれわれは簡単にアンプルそのままの吸収をあり合せの器械で測つた場合にどの程度の再現性があるかをしらべてみた。又褐色ガラスは鉄 Fe (III) によつて色がつけられているが、この鉄が中の溶液に溶け出して薬品に変化を与える場合が知られているから鉄の溶出度を二三の条件の下でしらべてみた。従来この目的によく使われた単純なうすい酸やアルカリは抽出の間に pH が変わるので、われわれは pH 4 及び 9 の緩衝液を用いた。又薬品のあるものは鉄と錯化合物ないし Chelate を作るから、これに対応して Ethylenediaminetetraacetic acid (以下 E. D. T. A. と略称する) 液による抽出を試みた。

実験方法と結果

1 透過率の測定 東日本硝子株式会社の同一原料ガラスから作られた三段階に着色度の異なる褐色アンプル (以下一重という) 及び、鉄などの溶出を防ぐためにこれらと同じ材料の内側に無色ガラスを重ねて作つた 3 種類のアンプル (以下二重という) 及び対照として無色のアンプル各 500 個のロットから 10 個宛無作為にとり、丸のまま及び、縦半分に割つて透過率を測定した。割る時はガラス切りできずをつけ、ここに水滴をたらして赤熱した鉄の針金を当てて切つた。日立分光光度計 EPU-2 型で、各波長における空気を対照とする透過率を測定した。結果は Table 2a~g に示してある。得られた結果は半切した試料では 2 個の、そのままの試料では 4 個の境界面における反射と吸収による光の強さの減少を示す。又個々のアンプルの測定値のばらつきを示すために標準偏差をも掲げた。用いた褐色ガラスの組成は Table 1. に示す。

Table 1 Composition of Ampule Glasses

Component m μ	%	No. 1 Colorless	No. 2 \dagger & 5* Light brown	No. 3 \dagger & 6* Medium brown	No. 4 \dagger & 7* Dark brown
SiO ₂		74.60	67.60	64.00	59.50
Al ₂ O ₃		4.70	4.81	4.55	4.23
B ₂ O ₃		11.86	12.20	11.50	10.70
Na ₂ O		7.78	6.60	6.25	5.80
K ₂ O		0.91	0.82	0.78	0.73
Fe ₂ O ₃		trace	2.22	4.40	6.06
MnO ₂		0	5.71	8.43	13.01

\dagger Single-wall * Double-wall (colorless glass inside)

褐色アンプルはすべて 405m μ 辺に小さい肩を示すが、実験目的の上からはあまり重要であると思われないので示してない。

Table 2a-g Transmission of Various Ampules

a) No. 1 Colorless

wave length m μ	270	280	300	320	340	350	370	400	500	550	600	650	700	750	800
Cut	0	8.0	52.5	80.8	88.2	88.4	89.0	90.0	92.0	92.2	92.0	92.3	92.1	92.0	92.3
Whole	0	1.5	24.5	62.0	76.2	81.0	82.5	83.0	83.0	82.7	83.0	82.8	82.5	83.0	83.0

b) No. 2 Light amber glass (Single-wall)

Wave Length $m\mu$		330	360	380	400	450	500	550	600	650	700	800
Cut	Mean	0	11.5	22.8	40.1	62.5	73.2	81.1	84.6	86.8	88.4	89.8
	Standard deviation	0	4.0	7.1	7.6	4.8	3.3	2.5	1.7	1.4	1.0	0.7
	%	0	34.8	31.0	18.9	7.6	4.5	3.1	2.0	1.6	1.1	0.7
Whol	Mean	0	1.4	5.2	16.2	39.0	52.1	64.3	71.0	74.8	77.8	80.5
	Standard deviation	0	0.8	2.6	4.2	4.0	6.4	4.9	3.4	2.8	2.4	1.3
	%	0	59.3	49.1	26.2	10.2	12.2	7.6	4.7	3.7	3.1	1.6

c) No. 3 Medium amber glass (Single-wall)

Wave length $m\mu$		350	400	450	500	550	600	650	700	800
Cut	Mean	0.3	18.9	40.2	61.1	73.4	79.4	82.7	85.3	87.3
	Standard deviation	0.2	2.3	1.4	3.4	3.5	3.3	3.6	3.9	3.2
	%	66.7	12.8	3.5	5.6	4.7	4.1	4.4	4.6	3.7
Whole	Wave length	360	400	450	500	550	600	650	700	800
	Mean	0	3.8	16.8	38.3	55.0	64.9	70.2	74.4	77.5
	Standard deviation	0	0.7	1.1	2.4	3.1	2.8	3.2	3.7	4.2
	%	0	18.4	6.5	6.3	5.6	4.3	4.6	4.9	5.4

d) No. 4 Dark amber glass (Single-wall)

Wave length $m\mu$		410	450	500	550	600	650	700	800
Cut	Mean	0.3	3.1	19.8	42.4	59.5	70.4	76.5	81.7
	Standard deviation	0.3	0.9	3.2	3.1	1.7	1.5	1.0	3.5
	%	100.0	28.1	16.4	7.2	2.9	2.1	1.4	4.2
Whole	Wave length	460	480	500	550	600	650	700	800
	Mean	0	1.4	4.0	18.8	36.3	50.1	59.1	66.1
	Standard deviation	0	0.3	0.7	1.1	2.2	2.2	1.5	1.5
	%		21.2	17.5	6.1	6.1	4.4	2.5	2.2

e) No. 5 Light amber glass (Double-wall)

Wave Length $m\mu$		330	370	400	450	500	550	600	650	700	800
Cut	Mean	0.2	17.5	38.9	57.5	73.6	81.4	85.2	87.8	89.1	90.1
	Standard deviation	0.2	4.7	5.8	4.5	2.4	1.4	0.9	0.8	0.5	2.4
	%	100.0	26.9	14.9	7.8	3.4	1.8	1.1	0.9	0.6	0.4
Whole	Wave length	346	400	450	500	550	600	650	700	800	
	Mean	0	16.2	34.2	55.2	67.3	73.2	77.0	79.6	81.1	
	Standard deviation	0	3.6	3.9	3.1	2.2	1.9	1.1	0.9	0.8	
	%	0	22.5	11.6	5.7	3.3	2.6	1.5	1.1	0.9	

f) No. 6 Medium amber glass (Double-wall)

Cut	Wave length $m\mu$	350	400	450	500	550	600	650	700	800
	Mean		0.9	23.0	47.5	64.3	75.9	81.8	84.9	87.8
Standard deviation		0.4	3.6	0.8	2.9	1.9	1.3	0.8	0.5	0.3
%		44.5	16.3	1.7	4.5	2.5	1.6	0.9	0.5	0.4

Whole	Wave length	370	400	450	500	550	600	650	700	800
	Mean		0.2	5.3	22.5	41.1	58.6	67.1	71.4	76.9
Standard deviation		0.2	2.1	2.1	1.0	2.7	1.9	2.4	1.1	0.7
%		100.0	39.7	8.9	2.5	4.6	2.9	3.4	1.4	0.9

g) No. 7 Dark amber glass (Double-wall)

Cut	Wave length $m\mu$	395	400	450	500	550	600	650	700	800
	Mean		0	0.3	6.6	27.7	50.3	65.7	74.7	80.1
Standard deviation		0	0.3	2.3	4.4	4.0	2.8	1.9	1.6	1.0
%		0	100.0	34.4	15.7	7.9	4.3	2.5	1.9	1.2

Whole	Wave length $m\mu$	445	450	460	500	550	600	650	700	800
	Mean		0	0.4	0.8	7.5	25.3	43.3	56.4	63.9
Standard deviation		0	0.2	0.4	1.9	3.5	3.5	4.7	2.2	1.6
%		0	50.0	50.0	24.8	13.9	8.1	8.3	3.4	2.3

各種アンプルを縦割した Transmission (Table 2a-g) を Fig. 1 に図示す。

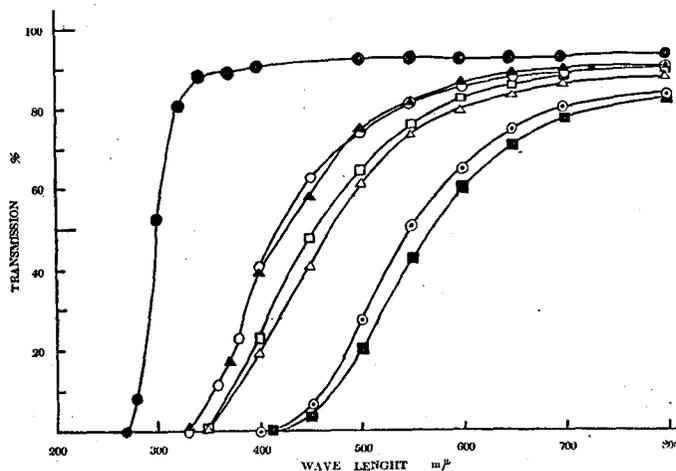


Fig. 1 Transmission Spectra of Various Cut Ampoules

- Colorless
- Light brown (Single-wall)
- △ Medium brown (Single-wall)
- Dark brown (Single-wall)
- ▲ Light brown (Double-wall)
- Medium brown (Double-wall)
- ⊙ Dark brown (Double-wall)

The curves show the transmission spectra of ampoules cut into two.

アンプルそのままの Transmission と縦割の Transmission の関係は Table 4. に示してあるが、この中 No. 4 を Fig. 2 に図示す。

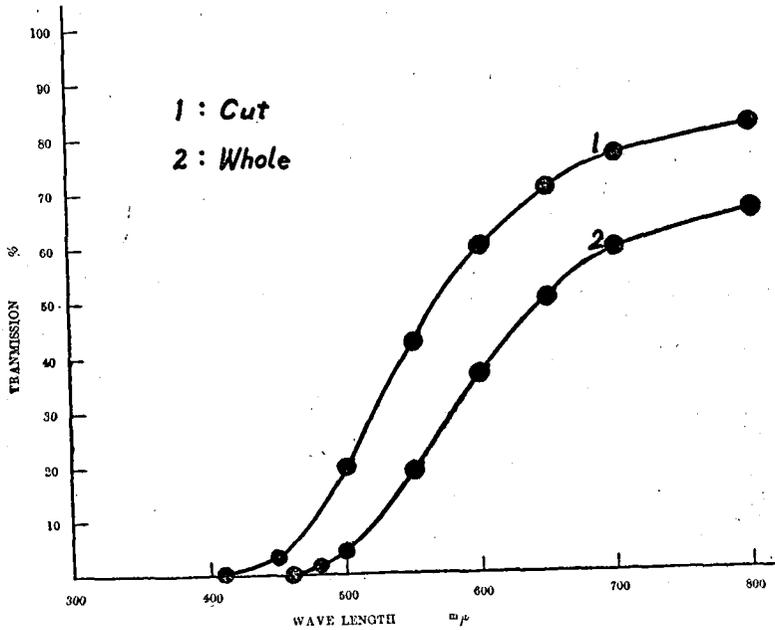


Fig. 2 Transmission Spectra of Dark amber glass (Single-wall)

1個のアンプルでも光の通過する位置によつて透過率の異なることが考えられるので3つの互に約120度ずつ異なる方向で測定した結果を Table 3. に示す。

Table 3 Transmission of Amber Glass Ampules Measured at Three Different Positions

mμ	Ampule*			No. 2			No. 3			No. 4			No. 5			No. 6			No. 7		
	Position			1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
340	0	0	0	—	—	—	—	—	—	0	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—
360	0.3	0.2	0.3	0	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
370	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	0	0	—	—	—	—
380	2.3	2.2	2.1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
400	10.5	11.0	10.5	3.0	3.0	3.2	—	—	—	12.5	13.7	12.0	2.6	2.7	2.6	—	—	—	—	—	—
445	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	0	0	—
450	26.7	27.0	26.8	15.5	18.0	17.6	0	0	0	30.2	30.4	30.0	12.8	13.0	12.6	0.5	0.8	0.4	—	—	—
500	48.1	49.8	48.1	39.0	40.0	38.7	4.2	4.9	4.6	51.8	51.0	51.0	34.4	34.5	34.2	9.0	8.8	9.1	—	—	—
550	62.0	62.0	62.1	56.7	57.3	56.0	19.0	20.0	19.6	65.0	65.4	65.3	52.7	52.9	52.8	28.1	27.9	28.2	—	—	—
600	69.3	70.0	68.9	67.2	67.8	67.0	36.1	37.8	37.0	71.0	71.3	71.1	63.8	63.6	63.7	45.5	45.5	45.3	—	—	—
650	74.1	73.3	74.2	73.0	72.5	73.2	50.2	51.2	50.8	75.0	75.3	75.6	70.2	70.0	70.0	57.1	56.8	57.4	—	—	—
700	76.9	77.3	76.3	78.0	77.5	77.9	59.8	60.4	60.0	78.0	78.1	78.6	75.3	75.5	75.5	65.0	64.8	65.3	—	—	—
800	79.2	80.0	79.2	80.0	80.2	79.8	66.8	67.0	67.0	79.8	80.3	81.0	79.2	79.3	79.0	71.5	71.4	71.6	—	—	—

Positions, 1, 2, and 3, are apart by approximately 120 from each other.

* Refer to Table 1.

アンプルのばあいは平面ガラスと異り、そのままの形で測定する時は第1の壁と第2の壁とでは光のあたる条件

が違うので、アンプルそのままで測つた値と半切した試料について測つた値とどんな関係にあるかを調べた結果を Table 4. に示す。

Table 4 Comparison of Transmission of Whole and Cut Ampules

Ampule* m μ	No. 1			No. 2			No. 3			No. 4			No. 5			No. 6			No. 7			
	W	C ²	C																			
300	24.5	27.5	52.5																			
330				0		0																
360				1.4	1.3	11.5																
380				5.2	5.1	22.8																
400	83.0	81.0	90.0	16.2	16.0	40.1	3.8	3.5	18.9				16.2	15.1	38.9	5.3	5.2	23.0				0.3
450				39.0	39.0	62.5	16.8	16.1	40.2				34.2	23.0	57.5	22.5	22.5	47.5	0.4	0.4	6.6	
500	83.0	84.6	92.0	52.1	53.5	73.2	38.3	37.3	61.1	4.0	3.9	19.8	55.2	54.1	73.6	41.1	41.3	64.3	7.5	7.6	27.7	
550	82.7	85.0	92.2	64.3	65.7	81.1	55.0	53.8	73.4	18.4	17.9	42.4	67.3	66.2	81.4	58.6	57.6	75.9	25.3	25.4	50.3	
600	83.0	84.6	92.0	71.0	71.5	84.6	64.9	63.0	79.4	36.3	35.4	59.5	73.2	74.8	85.2	67.1	66.9	81.8	43.3	43.1	65.7	
650	82.8	85.1	92.3	74.8	75.3	86.8	70.2	68.3	82.7	50.1	49.5	70.4	77.0	77.0	87.8	71.4	72.0	84.9	56.4	55.8	74.7	
700	82.5	84.8	92.1	77.8	78.1	88.4	74.4	72.7	85.3	59.1	58.5	76.5	79.6	79.3	89.1	76.9	77.0	87.8	63.9	64.1	80.1	
800	83.0	85.1	92.3	80.5	80.6	89.8	77.5	76.2	87.3	66.1	66.7	81.7	81.1	81.1	90.1	80.3	80.1	89.6	70.4	69.8	83.6	

* W: Transmission of whole ampule, C: Transmission of cut ampule, C²: Square transmission of cut ampule.

II 鉄の溶出量

A) 炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.00, 22.5°C)

緩衝液は Mallinckrodt Reagent Grade, Sodium carbonate から作った M/10 炭酸ナトリウム 50 cc に N/10 塩酸 50 cc を加え, 更に塩酸を加えて Beckman G pH メーターで pH を 9.00 に調整した。2 cc のアンプルに 2.2 cc ずつ緩衝液を入れ, 加圧滅菌器で 2 気圧, 45 分ずつ 1 回及び 2 回加熱して抽出した。

B) 酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 3.96, 22.5°C) 緩衝液は氷結して精製した酢酸を用いて作った M/5 酢酸 80 cc に特級水酸化ナトリウムを用いて作った M/5 水酸化ナトリウムを加え, Beckman G pH メーターで pH 3.96 に調整した。この緩衝液をアンプルに 2.2 cc ずつ入れ, A) と同じ条件で抽出した。

C) M/100 E. D. T. A. -2 ナトリウム液

アンプルに 2.2 cc ずつ入れ A) と同じ条件で抽出した。尚 E. D. T. A. 帝国化学産業株式会社の製品を用いた。

D) 鉄の定量¹⁾

緩衝液で抽出したばあいは冷後抽出液から 1 cc をとつて試料とし, E. D. T. A. のばあいは 2 cc をとつて白金皿中で蒸発, 灰化し, 0.5N 硫酸に溶かして試料とした。炭酸ナトリウム緩衝液を用いた時の試料には 0.15N 硫酸 2 滴を加えて酸性とした。このばあい液の増量に対しては補正をしなかつた。この試料に 10% 塩酸ヒドロキシルアミン 0.5 cc, 20% 酢酸アンモニウム 1 cc, 0.1% ジピリジル溶液 0.5 cc を加え, 522 m μ で吸光度を測定し, 検量線より鉄の含量を定めた。検量線の作成にはモル塩標準液に用いた。すなわち特級モル塩 7.0223 g を一旦煮沸し冷却した水にとかし硫酸 (1:5) 100 cc を加え全量を 1 l とし過マンガン酸カリウムで標定したものを鉄標準液として用いた。この鉄標準液は 1000 γ /cc の二価鉄を含む。検量線の誤差は 1 γ /cc 以下では $\pm 10\%$ であり, これ以上 20 γ /cc までは $\pm 2\%$ である。定量の結果を Table 5. に示す。表中の数字は抽出液 1 cc についての鉄の含量を μg で表したものである。

Table 5 Determination of Iron Extracted with Sodium Carbonate Buffer
(pH 9.00) by Heating at 2 atm. for 45 min. Once and Twice.

No. of Procedure	1				2			
No. of Sample*								
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.4
3	0.1	0.1	0	0	0.1	0	0	0
4	0.1	0.3	0.6	0.6	0.3	0.3	0.8	0.5
5	0	0	0	0	0	0.2	0	0
6	0	0	0.1	0.1	0	0.1	0	0.1
7	0.2	0.2	0	0	0	0	0	0

Note: The amount of iron extracted is expressed in μg per ml portion taken out of 2.2 ml of the solution.

* Refer to Table 1.

Table 6 Determination of Iron Extracted with Acetate Buffer (pH 3.96)
by Heating at 2 atm. for 45 min. Once and Twice.

No. of Procedure	1				2			
No. of Sample*								
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0.2	0.1	0.2	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1
3	0	0	0	0	0.1	0.1	0.1	0.1
4	0.1	0.2	0.1	0.2	0.1	0.1	0.2	0.2
5	0	0	0	0	0.1	0	0.1	0.1
6	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2
7	0	0.1	0	0.1	0	0.1	0.1	0.1

Note: The Amount of iron extracted is expressed in μg per ml portion taken out of 2.2 ml. of the solution.

* Refer to Table 1.

Table 7 Determination of Iron Extracted with 0.01 M EDTA Solution by
Heating at 2 atm. for 45 min. Once and Twice.

No. of Procedure	1		2	
No. of Sample*				
1	0.7	0.1	0.1	0.1
2	1.0	0.7	0.6	0.2
3	0.3	0	2.1	0.8
4	1.3	0.7	13.0	2.0
5	0.8	0.2	3.0	2.3
6	0.9	0.2	7.5	3.0
7	3.0	0.2	3.6	0.4

Note: The amount of iron extracted is expressed in μg per ml portion taken out of 2.2 ml of the solution.

* Refer to Table 1.

考 察

I 遮光度

注射薬の製造及び貯蔵中にアンプルに光の当る状態は、さまざまであり、又内容薬液の種類と組成による光の感受性も著しく異なるから実際に近い状態で遮光度を測定するのは不可能であるし意味もない。従つてわれわれは再現性あり、しかも簡単な測定法を採用しようと考えた。幸い日立分光光度計のセル保持器は供試アンプル (2 cc) を入れるのにちょうど十分であつたので、これによる透過率を、アンプルそのまま及び、縦に半切した試料各 10 個ずつについて測定したところ、Table 2 b-g に示したように褐色アンプルでは透過率の低いところを除いて大体標準偏差が 5 % 以内に止まることを知つた。同じアンプルを 120° ずつ異なる角度で光を当てて測定した場合の透過率の変化は Table 3. にみるように、透過率の非常に小さいところで偏差 5 %, 多くは 2~3 % に止まり、異なる試料間のばらつきより小さいから、各個の試料間の測定値のばらつきは試料毎の壁の厚みのばらつきによるものと思われる。又 Table 4. に示すように、アンプルを半切した試料の透過率の自乗値はそのまま²⁾の場合と 2 % 以内の誤差で一致するからこの場合にも Beer の法則は成立つことが示されアンプルを半切して測定する必要は上に示した測定条件ではないように思う。液体試料の測定用に設計された光度計は平面のセルを使うから曲率をもつた試料の測定には光の当る位置による試料の厚さと反射の変化を考慮しなければならない。われわれの用いた器械では巾約 5 mm の略々平行な光束を使つていることと、アンプルの直径 (約 12 mm) とから、光束の最外側でも中心に比べて光路の長さの差、従つて吸収の差は約 2 % にすぎないから、角形セルと同様に扱つてよいことがわかる。しかしアンプルが更に小形であるか又は光束の巾が広いが、平行でないような場合には適当な考慮が払われねばならない。吸収を測定する波長を細かくとる必要はないと思うが、どの波長をとるか波長巾をどの位にするかは充分検討を要する。吸収の測定値は特に吸収曲線の屈曲の大きいところで波長巾によつて大いに左右されるからである。吸収のはじまる波長、吸収の最大に達する波長及びその中間の、曲線が直線に近い部分の吸収をアンプルの直径の 1/3 以下の巾の平行又はそれに近い光束を用いて測定するのがよいのではなからうか。但し前に述べたように褐色アンプルでは 405 m μ に小さい肩があることは考慮されねばならない。透過率は最大の場合 (無色アンプル) でも一重壁について約 92 % であるのは 2 個の界面での反射によるものであつて、従来の知見と一致する。

II 鉄の溶出度

従来よく行われた稀薄な酸、アルカリによる溶出試験は操作中に液の pH が著しく変化するので実際的でない。われわれは pH 9 の炭酸ナトリウム緩衝液及び pH 4 の酢酸塩緩衝液を用いた。無色アンプルについては鉄の溶出はみられないのは当然であるが、二重壁のものでも僅か乍ら鉄の溶出がみられる (Table 5-7)。又 No. 3 の溶出度が No. 2 より少し傾向がみられるのは不思議である。一般にアルカリ性の場合には酸性より鉄の溶出が多いが、何れにしても 2.2 ml ずつ入れた緩衝液の 1 ml 当り十分の数 μ g をこえない。又 2 気圧 45 分間の加熱滅菌器による加熱抽出の条件では 2 回抽出をくり返しても鉄の溶出量は増加しないから加熱は 45 分間で十分であろう。薬品及び溶解補助剤の中には金属イオンと錯化合物乃至 Chelate をつくるもの——例えばサリチル酸——が多数あるから単に錯生成能力の小さい緩衝液で抽出するのも実際的でない。そこで 0.01 M E. D. T. A. 2 ナトリウム液で抽出を行つたところ、緩衝液の場合の数倍乃至十数倍の鉄が溶出した。この場合には鉄の定量値のばらつきが非常に大きい。この理由はまだよくわからないが、更に検討して再現性のある条件で錯生成能力のある抽出液による溶出度の測定を行うことが望ましい。

研究費の一部は厚生科学研究費によつた。

文 献

- 1) Moss. M. L. and Mellon M. G. : Ind. Eng. Chem., Anal. Ed., 14, 862 (1942)
- 2) 渡辺厚, 山岸正治, 寺尾求馬, 神尾英雄, 増田亨, 朝日豊: 武田研, 11, 35 (1952)

Summary

The transmissions of 2 ml glass ampules, colorless and brown in three different darkness, were measured with whole and cut into two samples using Hitachi EPU-2 (Beckman Model DU type) Spectrophotometer.

It was shown that the transmission may be measured with whole ampule with an error of $\pm 5\%$ except at very low transmission.

Emphases were placed in that the iron (and probably other heavy metals) should be extracted with buffer solutions and chelating agents in place of dilute acids or alkalies, considering that the pH of the latter may be greatly changed in the course of extraction, and that there are many solutions for injection which contain substances of complexing or chelating ability.

Actually M/100 E. D. T. A. solution elutriated much more iron from brown ampules than sodium acetate and carbonate buffer solutions did.

Received February 29, 1956

昭和30年度日本産あへんのモルヒネ含量について

朝比奈 晴 世, 大野 昌 子, 水町 彰 吾
志内 賢 彦, 中村 良, 茂森 淑

Morphine Content in Japanese Opiums Produced During 1954~55

Haruyo ASAHINA, Masako ŌNO, Shōgo MIZUMACHI,
Yoshihiko SHIUCHI, Yoshi NAKAMURA and Toshi SHIGEMORI

まえがき 我々はあへん法第32条により, 昭和30年度に収納された, けし耕作者納付あへん1,523検体についてモルヒネの含量試験を行ったので, その結果を報告する。

試験材料 長野, 愛知, 大阪, 和歌山, 広島, 岡山, 兵庫の一府六県で生産されたあへんを用いた。

モルヒネ定量法 収納あへんについては, 日本薬局方 VI 「あへん未定量法」を応用した。

試験成績 昭和30年度収納あへんのモルヒネ含量は, 次のとおりである。

Table 1 Morphine Content of Japanese Opiums Produced During 1954~55.

府 県 名	場 所	検 体 数	平 均 量 モルヒネ含量	モルヒネ含量 最 低 ~ 最 高
長 野	埴 科 郡	18	11.50	9.94~12.62
	更 級 郡	19	12.81	10.47~16.07
	小 県 郡	20	11.01	8.47~13.91
	小 計	57	11.77	8.47~16.07
愛 知	渥 美 郡	276	11.73	0~18.86
大 阪	吹 田 市	2	9.12	8.82~9.42
	茨 木 市	143	10.84	8.00~16.76
	高 槻 市	35	10.69	7.59~13.87
	三 島 郡	65	11.00	8.59~14.65
	小 計	245	10.85	7.59~16.76
和 歌 山	日 高 郡	108	12.50	5.93~16.00
	有 田 郡	721	11.76	4.07~16.54
	小 計	829	11.85	4.07~16.54
広 島	賀 茂 郡	2	11.05	10.23~11.87
	佐 伯 郡	16	10.72	7.76~17.42
	府 中 市	21	9.62	6.55~12.73
	御 調 郡	13	10.94	7.96~16.25
	小 計	52	10.34	6.55~17.42
岡 山	英 田 郡	30	10.79	7.50~17.51
兵 庫	宍 粟 郡	34	9.74	6.96~13.12
総 計		1,523	11.55	0~18.86

又各府県別収納あへんのモルヒネ含量と, 検体数との関係は次のとおりであつた。

Table 2 Classification of Opiums from All the Producing Provinces According to Morphine Content

モルヒネ含量		4%以下	4%	5%	6%	7%	8%	9%	10%	11%	12%	13%	14%	15%	16%	17%	18%
府県別																	
長野	野	—	—	—	—	—	3	6	10	11	17	5	4	—	1	—	—
愛知	知	1	—	2	—	—	13	27	59	64	48	23	19	9	6	4	1
大阪	阪	—	—	—	—	2	12	50	76	59	34	7	4	—	1	—	—
和歌山	歌山	—	1	2	1	3	16	36	161	243	184	127	41	11	3	—	—
広島	島	—	—	—	3	6	9	6	7	10	6	3	—	—	1	1	—
岡山	山	—	—	—	—	2	3	5	8	8	1	1	1	—	—	1	—
兵庫	庫	—	—	—	1	5	4	8	10	3	1	2	—	—	—	—	—
計		1	1	4	5	18	60	138	331	398	291	168	69	20	12	6	1

表で明かなように、昭和30年度収納あへんのモルヒネ含量は、長野、愛知産では10～12%のものがそれぞれ67%、62%をしめ、大阪では9～11%のものが76%、広島産は7～12%のものが90%、岡山、兵庫産ではそれぞれその53%が10～11%の含量であるが、和歌山産では、県別平均モルヒネ含量が最も高く、その86%が10～13%のモルヒネを含むあへんであり、地区別に見ても日高郡のものが長野県更級郡で栽培されたものに次ぎ平均モルヒネ含量が高かつた。

考察 昭和30年度収納あへん1,523検体についてモルヒネ含量試験を行つたところ、最高は18.86%であつて、15%以上39検体、13～15% 237、10～13% 1,020、8～10% 198、7%以下は29で、和歌山、長野産のものが平均して含量高く良好であつた。なおあへの生産については、栽培反別収量も考慮に入れなければならない。

Summary

We determined the morphine content in Japanese opiums produced by poppy cultivators during 1954-1955 in seven provinces of Nagano, Aichi, Osaka, Wakayama, Hiroshima, Okayama and Hyogo.

Morphine percentages obtained thus far are as follows:

Total number of samples		1,523
Below	7%	29
	8-10%	198
	10-13%	1,020
	13-15%	237
Above	15%	39

Received February 29, 1956

ビタミン標準品に関する資料

I. ニコチン酸, ニコチン酸アミド及びビタミン K₃ の試製とその品質

広瀬 朝次

Preliminary Preparation of Vitamin Reference Standards
and Their Critical Analytical Data. I.

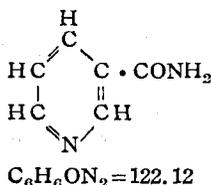
Nicotinic acid, Nicotinamide and Vitamin K₃

Asaji HIROSE

まえがき 現在ビタミン類の試験用標準品としては、公定書標準品（肝油標準品、B₆ 結晶標準品）及び国立衛生試験所標準品（B₁、B₂ 及び C 結晶標準品並びに B₁ 液標準品）があるが、既に公定書に記載された他のビタミン類即ちニコチン酸、ニコチン酸アミド、ビタミンD、ビタミンK₃（メナジオン）葉酸及びビタミンB₁₂（シアノコバラミン）に対しても同様の標準品が用意されることが望ましい。かような見地から、今回まずニコチン酸、ニコチン酸アミド及びビタミンK₃（メナジオン）をとりあげ、目的にかなうような純品を準備できたので以下その経過を報告する。なお近い将来ニコチン酸及びニコチン酸アミドは新標準品として製品化するであろう。

I. 結晶標準品の合成

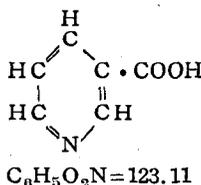
1. ニコチン酸アミド



セレンを触媒とし、キノリンを硫酸中 300° で酸化し、液中に生じたニコチン酸にそのままメタノールを加えて、メチルエステルとし、過剰の酸をアンモニアで中和し、生じたエステルをベンゼンで抽出する。抽出液より溶媒を溜去し、エステルを分割蒸溜し、溜分を -20° に冷却して、析出する異性体を分離し、目的とするエステルを同量の濃アンモニア水に溶かし、0° でアンモニアガスを冷却しつつ吹きこみ、アミドを析出させる。アミドは精製メタノール及び活性炭を用いて数回再結晶して純品とする。

この合成には、東京都板橋区志村前野町 1111 番地有機合成工業株式会社の協力を得た。

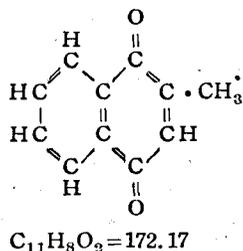
2. ニコチン酸



1. で合成したアミドを 10% 過剰の 20% 水酸化バリウム液で鹼化し、アンモニアを去り、水を加えて加熱し、ニコチン酸を溶かし、煮沸しつつ、硫酸を滴加して、生ずる硫酸バリウムを熱時濾し、完全に硫酸バリウムを除いた後、冷却してニコチン酸を析出させ、メタノール（精製）及び活性炭を用いて数回再結晶して、純品とする。

本品の合成には、東京都板橋区志村前野町 1111 番地有機合成工業株式会社の協力を得た。

3. ビタミン K₃（メナジオン）



武田薬品工業株式会社大阪工場で製造したビタミン K₃ 注射液用の結晶、純度 98% 以上の品を精製メタノールより 3 回再結晶し、暗所で乾かして、純品とする。

この合成には、大阪市東淀川区十三西之町武田薬品工業株式会社研究所の協力を得た。

II. 試験項目及び試験法

標準品の試験項目及び試験法を選定するために、現行米薬局方標準品の分析成績（U.S.P. Reference Standards. 46 Park Avenue, New York 16, New York）及び日本、英国、米国、国際並びに独国の薬局方又はそ

の試案を参照した。

1. 米薬局方標準品の分析成績

(イ) ニコチン酸アミド

外観：白色，結晶性粉末

沸状：10%水溶液は無色澄明，5%水溶液のpHは6.6

融点以下各項目の分析成績は Table 3. B欄を見よ。

(ロ) ニコチン酸

外観：白色，結晶性粉末

溶状：10%炭酸ナトリウム液に10%の濃度に溶かしたとき液は澄明で殆んど無色

融点以下各項目の分析成績については Table 4. B欄を見よ。

(ハ) ビタミンK₃ (メナジオン)

外観：黄色，結晶性粉末

融点以下の成績は Table 5. B欄を見よ。

2. 日，英，米，国際及び独（試案）薬局方に掲げる試験項目または想限量 (Table 1)

+印は当該項目に対する規格があることを示す。

***印の最高限はそれぞれ100.4%

Table 1 (a) Specifications of Pharmacopoeial Nicotinamide Preparations

Pharmacopoeia	J. P. ¹⁾	B. P. ²⁾	U. S. P. ³⁾	I. P. ⁴⁾	G. P. ⁵⁾
Description	+	+	+	+	+
Solubility	+	+	+	+	+
Melting range	128~131°	128~131°	128~131°	128~131°	128~131°
Loss on drying	0.5%	0.5%	0.5%	0.5%	0.5%
Residue on ignition	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.25%
Chloride	-	-	-	-	+
Sulfate	-	-	-	-	+
Ammonium salt	-	-	-	-	+
Nitrate	-	-	-	-	+
Heavy metals	+	+	+	+	+
Lead	-	+	-	+	-
Arsenic	-	+	-	+	-
Readily carbonizable substances	+	-	+	-	+
Assay	98.5%①	98.5%①	98.5%①	98.5%①	*98.5%① *min

① Kjeldahl method

Table 1 (b) Specifications of Pharmacopoeial Nicotinic Acid Preparations

Pharmacopoeia	J. P.	B. P.	U. S. P.	I. P.	G. P.
Description	+	+	+	+	+
Solubility	+	+	+	+	+
Melting range	234~237°	234~237°	234~237°	234~237°	231~234°
Loss on drying	1%	1%	1%	1%	1%
Residue on ignition	0.1%	0.2%	0.1%	0.05%	0.25%
Chloride	+	-	+	+	+
Sulfate	+	-	+	+	+
Ammonium salt	-	-	-	-	+

Pharmacopoeia	J. P.	B. P.	U. S. P.	I. P.	G. P.
Specifications					
Nitrate	—	—	—	—	+
Heavy metals	+	+	+	+	+
Lead	—	+	—	+	—
Arsenic	—	+	—	+	—
Pyridyl nitroimidazol	—	+	—	—	—
Readily carbonizable Substances	—	—	—	—	+
Assay	99.5%②	99.5%②	99.5%②	99.5%②	**99.0%② **min

② Acidimetry

Table 1 (c) Specifications of Pharmacopoeial Vitamin K₃ Preparations

Pharmacopoeia	J. N. F. ⁶⁾	B. P.	U. S. P.	I. P.
Specifications				
Description	+	+	+	+
Solubility	+	+	+	+
Melting range	105~107°	105~107°	105~107°	105~107°
Loss on drying	0.3%	0.2%	0.3%	0.3%
Residue on ignition	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%
Heavy metals	—	+	—	—
Assay	98.5%③	98.5%④	98.5%③	98.5%③

③ Cerimetry ④ Titanometry

Ⅲ. 本研究に於ける試験項目及び試験法 Ⅱ. を参照して次の如く定めた。(Table 2)

Table 2 Analyses applied to Present Preparations

	Nicotinamide	Nicotinic Acid	Vitamin K ₃
Description	J. P.	J. P.	J. N. F.
Solubility, pH	U. S. P. with Beckman pH meter	U. S. P.	—
Melting range	J. P. with standard thermometer	J. P. see left	J. N. F. see left
Loss on drying	J. P. over H ₂ SO ₄ for 4 hrs.	J. P., 105° for 1 hr.	J. N. F. over H ₂ SO ₄ for 4 hrs.
Residue on ignition	U. S. P. (nonsulfated)	see left	J. N. F.
Chloride	J. P.	J. P.	—
Sulfate	J. P.	J. P.	—
Heavy metals	J. P.	J. P.	B. P. detection of Chromium
Readily carbonizable substances	G. P.	G. P.	—
Nitrogen	Dumas method	see left	—
Assay	J. P. plus Nonaqueous Titration, Azotometry	J. P. plus Nonaqueous Titration	U. S. P.
Infra-red Spectro photometry	Compared with U. S. P. Reference Standard	see left	—

非水滴定 (Nonaqueous Titration) には、試料の氷酢酸溶液を N/10 過塩素酸氷酢酸溶液で滴定し、指示薬としては、電位差法または色素法を採用した。

IV. 試験成績

1. ニコチン酸アミド

本研究試製品及び製剤用輸入結晶の試験成績を米薬局方標準品の分析成績と比較すれば次の如くである。
(Table 3)

Table 3 Critical Analytical Data on Present Nicotinamide Preparation

Samples	A	B	C
Specifications			
Description	good	good	good
Solution pH	6.6	6.6	6.5
m. p. (°C)	129.0~129.7	129.1~129.7	129.0~129.5
Loss on drying (%)	0.01	0.0	0.09
Residue on ignition (%)	0.0	0.02	0.02
Chloride (%)	0.001>	—	0.001>
Sulfate (%)	0.005>	—	0.005>
Heavy metals (%)	0.001>	—	0.002>
Readily carbonizable Substances	good	good	good
Nitrogen (%) (theory 22.94%)	22.9	22.7	—
Assay (%)	99.9 100.8* 99.8**	99.27 — 99.8**	99.22 — —

* Nonaqueous Titration

** Azotometry

A : Standard preparation under test

B : U.S.P. Reference Standards

C : Commercial preparation for Pharmaceutical manufacturing (prepared in U.S.A.)

2. ニコチン酸

本研究試製品及び製剤用輸入結晶の試験成績を米薬局方標準品の分析成績と比較すれば次の如くである。
(Table 4)

Table 4 Critical Analytical Data on Present Nicotinic Acid Preparation

Samples	A	B	C
Specifications			
Description	good	good	good
Solution	good	good	good
m. p. (°C)	236.0~236.5	235.6~235.8	235.0~236.0
Loss on drying (%)	0.01	0.02	0.17
Residue on ignition (%)	0.0	0.01	0.03
Chloride (%)	0.001>	0.005	0.001>
Sulfate (%)	0.005>	0.01	0.005>
Heavy metals (%)	0.001>	—	0.002>
Readily carbonizable Substances	good	good	good
Nitrogen (%) (theory 11.38%)	11.22	—	—
Assay (%)	99.99 99.8**	99.73 —	99.76 —

** Nonaqueous Titration

A : Standard Preparation under Test

B : U.S.P. Reference Standard

C : Commercial Preparation prepared in U.S.A. for Pharmaceutical Manufacturing.

3. ビタミン K₃ (メナジオン)

本研究試製品の試験成績を米薬局方標準品の分析成績と比較すれば次の如くである。(Table 5)

Table 5 Critical Analytical Data on Present Vitamin K₃ Preparation

Specification	A	B
Description	good	good
m. p. (°C)	105.8~107.0	105.5~106.5
Loss on Drying (%)	0.01	0.0
Residue on ignition (%)	0.01	0.02
Detection of Chromium	negative	—
Assay	99.6	99.6

A : Standard preparation under test

B : U.S.P. Reference standard

なお、試製品を現行国立衛生試験所標準品用の容器に分封して、室温及び37°に1カ年放置したが、Table 6に示す如く純度には殆んど変化が認められぬ。

Table 6 Stability of Vitamin K₃ on Standing (%)

after month at	0	1	2	3	4	8	12
room temp	100.2	99.7	99.7	99.6	101.0	99.7	99.8
37°C	100.2	99.6	98.8	99.6	99.6	99.9	99.7

終りに臨んで、御指導を賜った長沢佳熊部長、小川俊太郎部長に感謝し、非水滴定、アゾトメトリー及び元素分析について鹿島技官、細貝技官及び関島技官より御協力を得たことを感謝する。

なお本研究費の一部は昭和28年度厚生科学研究費より仰いだ。

総括並びに結論

ニコチン酸アミド、ニコチン酸及びビタミン K₃ の結晶標準品の試験的製造を実施し、試製品の合成試験項目及び試験法の調査並びに選定を行い、これらより得られた試験成績を米薬局方標準品の分析成績等と比較した。

上掲の試験成績の示すところに持れば、今回の試製品は標準品として使用可能であると認められる。

なお、試製品と同程度と純結晶は今後とも必要なとき、必要な量だけ製造することができるが、近くニコチン酸及びニコチン酸アミドを新製品として販布したいと思う。

文 献

- 1) Pharmacopoeia Japonica (J.P.) : (第6改正) 日本薬局方
- 2) British Pharmacopoeia (B.P.) : 英国薬局方 (1953)
- 3) Pharmacopoeia of The United States (U.S.P.) : (第15改正) 米国薬局方
- 4) Pharmacopoea Internationalis (I.P.) : 国際薬局方 (1951)
- 5) Deutsches Arzneibuch (G.P.) : 独国薬局方 (第6版追補試案, 1952)
- 6) Formulae Nationles Japonicae (J.N.F.) : (第2改正) 国民医薬品集

Summary

Data on preliminary preparation and critical analyses of three forthcoming vitamin reference standards i. e. Nicotinamide, Nicotinic Acid and Vitamin K₃ are presented.

Analyses applied to these preparations or data on the specifications obtained thereof are tabulated in Table 3, 4 or 5 together with corresponding information concerning the U. S. P. Reference Standards.

Received February 29, 1956.

化粧品規格検査法について (第6報)

化粧品用タール色素の確認試験法について

市川 重春, 南城 実, 林 悦子

Research on the Standard Determination Method of Cosmetics. IV.
 On the Confirmatory Examination of Tar-Dyes in Cosmetics
 Shigeharu ICHIKAWA, Minoru NANJO and Etuko HAYASHI.

まえがき 化粧品用タール色素につき、薬事法収載の22種のみでは不十分であり、その使用範囲拡大の必要性を強調してきたが、昭和30年2月化粧品工業会より米国家定色素中緊急最少限度の品目として37種の追加使用許可申請が薬務局長宛提出せられた。よつてその使用の可否及び規格、試験法を検討し、試案の作製をした。

尙試験品目は新たに収載を予定される79品目中医薬品及び化粧品用タール色素については、食品衛生法収載品目と同じで既にその確認試験法もきまつているので、これを除外した。同種類の品目については代表的な品目については代表的な品目につき試験を行つた。尙検体はすべて米国家定の保証色素を用いた。入手出来なかつたものについては、適格品が入手出来次第試験を続行する予定である。

現在薬事法に収載されている品目と新たに追加を予定されている品目は次の通りである。

1. 医薬品及び化粧品用タール色素
28品目
 2. 外用医薬品及び化粧品用タール色素
41品目
 3. 外用医薬品及び化粧品（粘膜に使用するものを除く）用タール色素
10品目
- 計 79品目

実験成績 (別表)

総括

近く薬事法に追加収載を予定されている化粧品用タール色素の各々についてその性状及び特性を究めると共に、その性状に基いて最も適当と思われる溶媒を研究して、ペーパークロマトグラフィーを行い、これらの実験成績を総合することにより未知のタール色素を確認することができた。

文献

- (1) 薬学大全書；第6巻；昭24, 11, 25. (非凡閣)
- (2) The principles and practice of modern cosmetics, Vol, 2, Cosmetic Materials

Summary

We investigated on the character of unknown Coal-Tar dyes for cosmetics. According to the results identified unknown Coal-Tar dyes by the experiments of Paperchromatography.

Received February 29, 1956

色素名	性 状							水 溶 液 の 反 応							ペーパークロマトグラフィー			毛糸染色試験	染色毛糸の試薬に対する反応						
	外 観	水溶液	アルコール溶液	硫酸	硫酸+水	塩 酸	ナトリウム溶液	塩 酸	アルカリ溶液	塩化バリウム液	塩化カルシウム液	次酢酸鉛液	重クロム酸カリ液	タンニン酸溶液	ピクリン酸溶液	I	II		III	硫 酸	塩 酸	硝 酸	アンモニア水	アルカリ溶液(10%)	酸性塩化第一錫液
テトラクロロテトラプロモフルオレッセン	明るい赤	一部分溶、ピンク;	赤味だいたい(螢光あり)	だいたい	沈、だいたい;	一部分溶、ピンク;	赤	脱色	赤	ピンク	ピンク	赤紫	だいたい	濃色化	黄	0.72	0.65	0.69	ピンク	うすだいたい	うすだいたい	黄	幾分退色	幾分退色	うすだいたい
アゾルビンエキストラ	暗い赤	赤	赤	暗い紫	濃色化	赤紫	赤	沈、赤;	=	沈、赤;	沈、赤;	沈、赤;	黄味赤	=	黄味赤	0.1	0.1	0.73	紫味赤	紫	紫味赤	黄だいたい	=	赤	紫味赤
ウ ラ ニ ン	赤味だいたい	黄だいたい(螢光あり)	黄	黄	黄	黄	暗い黄だいたい(螢光あり)	螢光消失	だいたい	=	=	沈、赤味だいたい;	黄だいたい→沈、赤;	螢光消失	黄; 螢光消失	-	-	0.84	赤味黄	黄	黄	黄	だいたい	だいたい	黄
キノリンイエローWS	赤味黄	うす黄	難 溶	赤	除々に沈、黄;	黄だいたい	一部分溶、黄だいたい;	=	黄; 沈;	沈;	沈;	沈;	黄味だいたい	黄	=	0.42	0.54	0.71	うす黄	濃色化	濃色化	濃色化	=	=	=
アリザリンシアニンググリーンF	青味黒	緑	緑	暗い緑	緑	暗いオリブ緑	難	=	=	=	=	沈、緑;	黄 褐	緑	緑	0.71	0.64	0.87	にぶい青緑	緑	僅かに退色	黄	=	=	僅かに退色
アンッドファーストグリーン	暗い紫	明るい青	明るい青	赤味だいたい	黄 緑	赤	不	うすだいたい	青 緑	=	=	青; 濁濁す;	緑	青 緑	緑	0.75	-	0.94	青 緑	黄味だいたい	だいたい	黄	脱色	脱色	だいたい
ナフトールグリーンB	暗い茶紫	緑	緑	赤味だいたい	赤	赤	難	黄 褐	僅かに退色	=	=	=	暗色化	緑	緑	0.74	0.65	0.92	青味緑	黄 緑	だいたい	黄	脱色	脱色	だいたい
アリズロールパープル	紫味黒	青味紫	青味紫	暗い紫	沈、青;	うす紫	難	僅かに退色	僅かに退色	僅かに退色	僅かに退色	僅かに退色	暗い赤→黄褐色	僅かに紫	紫	0.80	0.87	0.90	紫	青	僅かに退色	黄	明るい青	明るい青	=

II 水に不溶性のもの

色素名	性 状										ペーパークロマトグラフィー		
	外 観	アルコール	ベンゾール	ブタノール	クロロホルム	硫 酸	酢 酸	油 脂	ワックス	その他の溶媒	溶 媒	展 開 溶 媒	Rf.
リゾールルビンBCA	鮮 紅 色	不	不	僅	不	溶: +水, 沈;	水, 溶;	不	不	gly, glyc, 不; mal, 溶, 橙赤色; 稀HCl(1+9)+アルコール, 溶, 赤; (+熱, 易);	水 酢 酸	70%酢酸溶液	0.72
レーキレッドC	暗 赤 色	溶	-	溶	不	-	溶, 赤紫色;	不	不	Bal, mal, act, 溶; 熱湯, 僅; HCl, NaOH, 沈, 赤;	メタノール	メタノール: 稀塩酸(1+9), 1:1	0.37
レーキレッドCBA	橙 赤 色	溶, 淡黄橙色	不	僅かに溶, 淡黄橙色	-	溶, 青赤色;	水, 少量溶,	不	不	Bal, 少量溶, 淡黄橙色;	水 酢 酸	70%酢酸溶液	0.69
リゾールレッドCA	赤 色	熱, 溶;	-	僅, 淡橙色	不	濃, 溶, 紫色;	-	不	不	熱湯, 僅, 淡橙色;	メタノール	メタノール	0.49
オイルレットOS	純品 淡赤色不定形 不純品 暗褐色或は黒色	少量溶;	溶	-	溶, 紫赤色;	濃, 溶, 鮮青色	水, 溶, 紫赤色;	溶	溶	石油ベンゼン, act, ジェチレン glyc, 少量溶, 鮮赤色; ジクロロヒドリン, 溶;	クロロホルム	クロロホルム; ベンゾール, 7:3 氷酢酸: ベンゾール, 1:1	0.96 0.89
ディープマルーン	-	不	不	不	不	濃溶, 深赤紫色	溶, 鮮赤色	-	-	アルカリ性アルコール, 褐赤色; アルカリ性 act, 赤; アルカリ性ジオキサソ, 褐橙色;	水 酢 酸	70%酢酸溶液	0.64
トルイジンレッド	橙 赤 色	不	溶, 橙赤色;	-	-	-	溶, 橙赤色;	不	不	稀酸, 石油ベンゼン, am al, 不; m al, 溶, 橙赤色; et, 溶;	水 酢 酸	70%酢酸溶液	0.83 0.98
ジプロモフルオレッセン	橙 色	溶	-	-	-	-	水, 溶;	不	不	稀アルカリ, 溶; 稀酸, 不; gly, glyc, 僅;	水 酢 酸	70%酢酸溶液	0.82
パーマメントオレンジ	橙 色	僅, 95%;	溶	-	溶解度, 25°C, 100cc, 20mg	溶, 紫色;	水, 溶;	不	不	gly, glyc, 不; トルエン, 溶; アルコール性 NaOH, 易, 紫;	アルコール性苛性カリ液	クロロホルム: ベンゾール, 7:3 氷酢酸: ベンゾール, 1:1	0.96 0.92
フルオレッセン	帯黄褐色	易	-	-	-	-	-	不	不	水, 僅, 緑色螢光有; alkali, 溶;	-	-	-
キノリンイエローSS	黄 色	少量, 溶;	-	-	-	-	水, 溶, 黄色;	-	-	-	-	-	-
ハンサイエロー	黄 色	溶	-	-	溶, 黄	-	僅	-	-	トルエン, キシレン, 四塩化炭素, 溶, 黄; act, 僅; et, alkali, 溶;	-	-	-
インヂコチン	暗 青 色	不	-	-	不	溶, 帯黄緑色	水, 僅;	不	不	et, 不; 熱アニリン, 溶, 紫青色; クロールヒドリン, 溶	-	-	-
カルバンスレンブリュー	青 色	不	僅	-	僅, 青;	溶, 鈍い黄色	水, 不;	不	不	gly, glyc, HCl, NaOH, 不;	-	-	-

【註】 易: 易溶, 溶: 溶解, 微: 微溶, 難: 難溶, 不: 不溶, 沈: 沈澱を生じたもの, act: アセトン, am al: アミールアルコール, et: エーテル, gly: グリセリン, glyc: グリコール, m al: メチルアルコール, I: ブタノール: アルコール: N/2アンモニア, 6:2:3
II: ブタノール: アルコール: N/2酢酸, 6:2:3 III: 70%酢酸 = 変化なし, ペーパークロマトグラフィー: 濾紙: 東洋濾紙 No. 50 1.5cm×40.0cm 展開時間: 15時間, トルエン, キシレン, 酢酸アミル, シオキサソ, 溶, 橙赤色;

地下室空気検査成績について

市川重春, 浦久保五郎, 山手昇, 磯部淳子

Investigation on the Air at Several Basements.

Sigeharu ICHIKAWA, Goro URAKUBO, Noboru YAMATE and Atsuko ISOBE

まえがき

営業などのため多数の集合所として地下室を用いることは都市に多く見られ、これについて衛生上の問題もあるように思はれるが現在適当な資料が少い。著者等は都内の地下室について昭和30年8月及び昭和31年1月の夏冬2回にわたり空気検査を行った。対象としてはキャバレー3, 食堂1, 喫茶店1, の合計5ヶ所をえらび、検査は大休閉店直後、中間の時刻、閉店直前の3回を行った。これによつて得た若干の結果について報告する。

測定方法

気温及び気湿：アスマン通風温湿度計を用いて室の中央附近の机上で測定し、外気については出入口附近の道路上約0.5~1.0mの高さで測定した。

気動：カタ寒暖計を用いた。

気圧：検査日の同日同時刻に中央气象台で測定した地上の値をとつた。

炭酸ガス含量：日本薬学会協定空気試験法に収載の水酸化バリウムを用いる法によつた。

塵埃：労研式塵埃計を用い同上試験法によつた。

落下細菌：同上試験法の落下法を行った。

照度：光電池照度計を用い卓上に水平におき測定した。

測定結果

結果は Table 1 及び 2 にそれぞれ夏冬を総括して示す。

Table 1 Results of investigation on the air at 5 basements. Summer in 1955

Basement	Date & Weather	Time	Atmospheric pressure mmHg	Outdoor temperature °C	Room temperature °C	Outdoor relative humidity %	Room relative humidity %	Room Air-mobility m/sec	Room effective temperature °C	Carbon dioxide content cc/l	Dust counts in lcc of air	Counts of micro-organism in each Petri's dish	Reading of the Lux-meter
Cabaret A at Sibuya Tokyo	Aug. 11 Fine	17.30	754.1	30.0	27.9	67	77.0	0.46	24.4	0.42, 0.36	400, 500	40, 77, 62, 100, 162	under 10
		20.30	755.3	27.7	28.5	79	81.0	0.49	25.2	0.74, 0.76	750, 630	72, 83, 168, 131, 111	
		22.05	755.8	27.2	28.3	84	82.0	0.35	25.5	0.87, 1.07	1010, 860	118, 126, 134, 117, 291	
Cabaret Bat Sibuya Tokyo	Aug. 15 Fine	18.00	755.5	26.6	28.0	57	54.0	0.20	23.4	0.91, 0.92	500, 540	49, 61, 41, 45, 90	under 10
		20.30	756.5	—	—	—	—	—	—	1.34, 1.00	960, 980	103, 73, 78, 162, 246	
		21.30	756.7	24.8	27.0	74	74.0	0.06	24.8	1.23, 1.38	1090, 1140	319, 340, 235, 283, 223	
Cabaret C at Sinjuku	Aug. 22 Fine	28.00	756.2	25.6	26.6	78	86.0	0.64	23.1	0.60, 0.70	660, 810	61, 39, 37, 35, 45	under 10
		20.00	757.0	24.2	26.0	77	75.0	0.64	22.8	0.76, 0.73	730, 770	80, 50, 65, 63, 73	
		22.00	757.2	24.2	26.6	80	73.0	0.68	23.3	0.77, 1.11	710, 890	54, 72, 51, 64, 88	
Restaurant A	Aug. 24 Fine	11.00	758.4	29.6	24.6	54	67.0	0.08	21.7	2.66, 2.39	580, 650	90, 102, 72, 40, 50	10~70
		15.30	757.8	30.4	25.2	44	60.0	0.05	22.0	3.02, 2.38	1370, 1250	105, 136, 54, 55, 109	
		18.00	758.3	27.8	25.6	56	66.0	0.14	22.6	3.07, 2.61	1170, 1010	57, 67, 64, 56, 66	
Tea-room A	Aug. 26 Rain	11.30	761.9	22.6	27.4	91	85.0	0.17	25.5	1.34, 0.70	1180, 1050	35, 57, 28, 26, 42	about 10
		15.30	761.1	22.4	28.2	93	83.0	0.46	25.0	1.59, 1.77	1280, 1480	61, 54, 85, 53, 50	
		19.00	761.7	22.6	28.6	91	80.0	0.28	25.9	1.37, 0.86	1470, 2120	79, 174, 93, 78, 95	

Table 2 Results of investigation on the air at 5 basements. Winter in 1956

Basement	Date & Weather	Time	Atmospheric pressure mmHg	Out door temperature °C	Room temperature °C	Out door relative humidity %	Room relative humidity %	Room Air-mobility m/sec	Room effective temperature °C	Carbon dioxide content cc/l	Dust counts in lcc of air	Counts of micro-organism in each Petri's dish	Reading of the Lux-meter
Cabaret A at Sibuya Tokyo	Jan. 12 Fine	17.30	761.9	6.2	14.7	71	88	0.04	14.2	1.13, 1.09	1420, 1490	10, 13, 28, 19, 20	under 10
		20.00	762.0	6.8	24.4	74	71	0.11	21.8	1.46	1140, 990	32, 52, 17, 19, 16	
		22.00	762.5	3.8	21.6	90	80	0.03	20.2	1.84, 1.86	2430, 2040	22, 18, 53, 65, 47	
Cabaret B at Sibuya Tokyo	Jan. 13 Fine	17.40	758.3	7.8	15.1	55	68	0.04	13.7	1.84, 1.86	1780, 1900	5, 6, 6, 8, 8	under 10
		20.00	758.5	7.0	18.8	72	65	0.07	16.5	4.86, 4.25	3130, 2750	6, 4, 4, 5, 2	
		22.00	758.6	3.8	19.8	93	67	0.06	17.4	4.22, 4.70	2010, 2420	10, 5, 8, 6, 7	
Cabaret C at Sinjuku	Jan. 23 Snow	18.00	753.8	2.2	14.6	87	64	0.06	12.1	0.67, 0.80	860, 870	22, 29, 26, 34, 25	under 10
		20.00	754.2	2.6	18.6	84	52	0.05	15.8	1.52, 1.47	1020, 1250	11, 11, 1, 6, 3	
		22.00	754.2	1.6	18.4	87	52	0.06	15.6	1.31, 1.48	1140, 1060	2, 5, 12, 4, 9	
Restaurant A	Jan. 20 Cloud	11.30	764.0	9.4	18.6	60	76	0.04	17.0	2.38, 1.80	910, 880	8, 11, 12, 11, 15	10~80
		15.00	764.0	10.8	18.8	57	68	0.04	16.9	1.69, 1.91	810, 860	8, 13, 21, 13, 19	
		17.30	765.3	8.8	18.0	67	60	0.08	16.5	1.26, 1.20	770, 1070	26, 15, 30, 41, 34	
Tea-room A	Jan. 19 Snow	11.00	762.5	6.4	19.2	91	61	0.09	16.6	2.32, 1.88	1280, 1040	21, 4, 24, 31, 3	10~20
		15.00	760.7	8.4	20.8	87	71	0.06	18.6	3.99, 2.92	1520, 2260	3, 16, 20, 12, 10	
		18.00	761.0	8.0	21.6	85	68	0.05	19.5	3.30, 4.31	2300, 1670	5, 12, 9, 3, 12	

考察及び結論

測定結果は各場所により異り、また時刻によつても変化があるので、総括した明快な結論を出すことは出来ないが、大体次のようなことが見うけられる。

1 夏季の結果について、① 外気と室内気温の差が小さく冷房装置の効果はあまりないが、冷房装置に伴う換気気流のため室内の気動は良好な成績を示している。そのため感覚温度は外気温にくらべてかなり低く（最高差約8°）涼しく感ぜられ、これは地上の室内にくらべてすぐれている。② 炭酸ガス含量、塵埃数、落下細菌数においても各1.2.の例を除いてはさほどの空気汚染が見られない。これは地下室としての特別な条件によるものでなく、室内面積に対する人の密度がうすかつたためと思われる。③ 照度は一般に低く屋間は勿論夜間においても地上の室内と同様の室内照明では暗い。

2 冬季の結果について、① 室内の温度条件はいずれも良好な成績を示し、冬季の暖房には地下室の方が効果的であることが認められた。なおキャバレー A 及び B についての測定は晴天の日であつたが、夕刻より深夜にかけて外気温は急激に降下するため、外気湿が増加し、室内湿度を外気湿度と比較するに夕刻では高く深夜では低くなつているのは興味あることである。また室内温度の3回の測定値が1例を除いてかなり変動があり、建築上の問題があるようである。② 測定時、人の密度が低いにも拘らず炭酸ガス含量及び塵埃数が相当に多く、これは暖房のため外気との交流換気を活発に行わないためであろう。③ 落下細菌数は極めて少い、これの原因は何とも考えられない。地上の室内においても冬季は少いが、事実それよりもやや少いようである。

終りに臨み、本調査に協力された淀橋、渋谷両保健所、中央气象台広瀬元孝技官並びに明治薬科大学の学生諸君に感謝する。

Summary

We investigated on the air at 5 basements (cabaret 3, restaurant 1, tea-room 1) twice in summer 1955 and winter 1956. We reported here full data, and briefly made some discussion.

Received February 29, 1956

輸入洋酒中のメタノール含量について

川田 公平, 細貝 祐太郎

Methanol Content in Imported Liquors

Kohei KAWATA and Yutaro HOSOGAI

まえがき 酒類中のメタノール定量法は、主としてフクシン 亜硫酸法であるが我々は輸入検査品として、シャンペン、ブドウ酒、及びウイスキー等の洋酒約21種についてメタノール含量を定量する機会を得たので前記フクシン亜硫酸法と秋谷、笹尾のクロモトロブ酸法の両者を比較した定量結果について報告する。

実 験 の 部

定量方法

1. 食品衛生検査指針中アルコール飲料検査法¹⁾によつた。
2. 秋谷、笹尾のクロモトロブ酸による酒類中メタノールの定量についての方法²⁾によつた。

定量結果 試料 1 cc 中のメタノール含量は次の表の通りである。

Table I Methanol Content in Imported Liquors

No.	Sample	Volume (cc)	Specific gravity	Methanol Content (mg/cc)	
				Method I	Method II
1.	CHMPAGNE C. Lefevre	750	1.05	0.2	0.4
2.	RAISIN VIN Macon	750	0.99	0.6	0.4
3.	RAISIN VIN Hanappier	750	0.996	0.1	0.05
4.	ARMAGNAC Castagnon	760	0.944	0.2	0.3
5.	LIQUEUR Cointreau	520	1.054	0.3	0.4
6.	CHAMPAGNE Pommery	330	1.68	0.2	0.2
7.	LIQUEUR Chartreuse	760	1.071	0.8	1.2
8.	SLOE GIN Mispelblom	740	1.02	0.2	0.1
9.	CALVADOS Boulard	760	0.942	1.0	1.0
10.	SCOTCH WHISKY J. D. Stewart	750	0.94	0.2	0.1
11.	SCOTCH WHISKY Old Argyll	750	0.94	0.1	0.05
12.	CALVADOS Boulard	350	0.94	1.2	1.4
13.	SLOE GIN Mispelblom	740	1.022	0.1	0.2
14.	GREEN ANISETTE Bootz	760	1.124	0.1	0.2
15.	CALVADOS Boulard	350	0.94	1.2	1.2
16.	GRAND VIN Hanappier	750	0.94	0.4	0.4
17.	LIQUEUR Izarra	720	1.046	0.3	0.2
18.	LIQUEUR Izarra	720	1.08	0.2	0.2
19.	ADOVOCAAT Bootz	720	1.200	0.1	0.2
20.	WHITE ANISETTE Bootz	760	1.124	0.2	0.3
21.	VIN Dopff. Irion	720	0.992	0.1	0.2

考察 輸入洋酒21種についてメタノール含量を定量したところ 1 cc 中フクシン亜硫酸法で最高 1.2mg, クロモトロブ酸法で最高 1.4mg, であつた。ウイスキー、シャンペン等に比し果実酒が大体含量が多かつた。なお定量方法のフクシン亜硫酸法、クロモトロブ酸法の両者とも大略同じ結果を示した。

文 献

1. 衛生検査指針 1951, , III, p.209
2. 薬誌 57, 1325 (1951)

Summary

We determined the methanol-content in various imported Liquors. Numbers of samples. 21

Methanol content

Fuchsin method • Cromotropic acid method

0.05-0.5mg

16 samples.

17 samples.

0.6-0.9 mg

2 samples.

0 samples.

1.0-1.4 mg

3 samples.

4 samples.

Received February 29, 1956

速 報

ウサギ背筋及びペプシン溶液内における馬腸線の抗張力の減少について

山 地 幸 雄, 志 波 剛, 石 関 忠 一
岩 原 繁 雄, 宮 坂 清 次*

腸線は、絹糸のように長年月殆んどそのまま生体内に残るものと異り、生体内で消化吸収され、また臨床家にとつては滅菌のための複雑な操作を要しない優れた外科的縫合材料である。わが国では羊が入手し難いので、腸線は馬の腸より作られている。腸線の消化吸収についてはいくつかの実験報告があるが、馬腸線の生体内及び試験管内における消化による抗張力の減少については、再現性のある実験報告はあまりみられない。われわれは馬腸線を縫合材料として用いた場合の抗張力の減少、すなわちその縫合糸としての能力が生体内でどのように失われてゆくか、また試験管内での消化によるその抗張力減少が、生体内におけるそれとどのような関係にあるかを Type の異なる腸線について追究しているが、今回はウサギ背筋内縫い込み、及びペプシンによる試験管内消化の実験成績を報告する。

実験方法 被検腸線は日腸工業会社製の Type A (Plain) 及び Type C (Chromic) で、Size はいずれも No. 0 であり、はじめの抗張力はわれわれの測定方法では、A: 4,680g, C: 5,525g であつた。体重 2kg 前後のウサギ背筋内に腸線を直径約 3cm の輪に縫い込み、筋膜及び皮膚は絹糸で縫合して創面を閉ざし、13 日間にわたり経日的に取出して抗張力を測定した。腸線の試験管内消化実験の酵素としては、Kraissl, 本間, 八田らはトリプシンあるいはパングレアチンを用いたが、腸線の主成分であるコラーゲンはトリプシンにより消化されず、ペプシンにより消化されるとされているので、われわれはペプシンを用いた。使用ペプシンはミクニ製の濃厚粉末で、その 1g は 1.6 単位 (萩原) であつた。このペプシンを pH2.2 の N/5 塩酸酢酸ソーダ緩衝液に 0.2% に溶解し、この 10cc を収めた共栓中試験管に、腸線 15cm を輪に結んで浸し、50°C に保つてその抗張力の減少を経時的に測定した。

実験成績 ウサギ背筋内での腸線の抗張力の経日的減少については、ウサギによる個体差が甚だしいためか、その減少曲線を得ることは困難であつたが、C でははじめの抗張力の 90% が 12 日後にも保持されており、95% 以下となるのは 4 日以後であつた。A では C より抗張力の減少が急速であつたが、個体差が甚だしかつたので、明確な数字による表現は後日の報告に譲る。試験管内消化実験では、はじめの抗張力の半分になるのが A: 0.5~1 時間後、C: 2~3 時間後であり、またペプシンを加えない緩衝液中でも A 及び C の抗張力は夫々 1~3、及び 4~5 時間後にはじめの半分以下となつた。更に長時間後の観察では、A はペプシン 4 時間消化により結び目及びよりが戻つて測定不能となつたが、緩衝液のみでは 7 時間後にも 710g の抗張力を有し、18 時間後にも糸の形を保つていた。C の 19 時間後の抗張力はペプシンを作用させたものでは 20g 以下、緩衝液のみでは 480g であつた。

考 察 ウサギ背筋に腸線を縫い込んだ実験では、Type C-Chromic 腸線は、Type A-Plain 腸線より抗張力の低下が遅いとみとめられた。しかしこの実験はウサギによる個体差が著るしかつたから、詳細な点については更に検討を要する。八田教授らは、羊腸線は馬腸線にくらべ吸収が早いとし、この実験でも背筋内縫込み 12 日後の抗張力減少が著るしくなかつたことは、馬腸線では羊腸線ほど“Chromic”の意義が臨床上重要でないと示唆するとも受取れるが、人の種々の手術個所に応用した際と、ウサギ背筋内とは条件が異なり、組織内吸収では個体差を考慮に入れなければならないから“Chromic”の意義は無視できない。試験管内消化実験により腸線の Type を評価判定することは種々の点で、生体を用いる実験よりかなり容易である。

本研究は厚生科学研究費の補助によりなされた。

Received February 29, 1956.

* 日腸工業株式会社。

食品, 食器類, 食品従業員手指, 人の大便, 実験的伝染性下痢症患者大便,
食中毒患者吐物よりのパラ大腸菌の検出について

山地 幸雄, 田中 弘子, 志波 剛
石 関 忠 一, 八 田 貞 義*

1) 生菓子, 豆腐, 豆腐漬水, 氷菓, 納豆, その他の食品, 飲食店及び集団給食の食器, すし屋のふきん並びに水, 食品業者手指など約2,500検体, 2) 学童44名, 及び成人1名の大便, 3) 実験的伝染性下痢症患者1名の大便, 4) 日教飯食中毒患者1名の吐物, よりパラ大腸菌の分離を試み, 分離株の生物学的並びに血清学的性状, 溶血性, 壊疽性について検討した。

実験方法 マッコンキー寒天, BGLB, EMB, を用いて分離された株につき, 硫化水素産生能(クリグラー寒天培地及びSIM培地による), IMViC, 及びバジコフ培地, ゼラチン培地などにおける態度を検し, *Escherichia freundii* (Kauffmann 1954) と思われるもの120株を得たが, Arizona は得られなかった。この *E. freundii* と思われるもの120株につき, 上記以外の生物学的性状を検し, 更に Edwards(1954)の Bethesda-Ballerup 属標準株抗血清による抗原分析を行なった。溶血性はウサギ血球加ペプトン水を用い, 壊疽性はウサギ皮内接種により検査した。

実験成績 分離された120株の *E. freundii* は: 1) 食品関係(1955年夏, 秋季)の約2,500検体中の106例より89株, 2) 学童44名より分離(1955年7月)した222株の腸内細菌中, 3名よりの4株, 成人1名(1955年10月)につき21日間に7日検菌して得た腸内細菌24株中の2株(被検大便は下痢便もあつたが, *E. freundii* の得られた便は普通便であつた), 3) 実験的伝染性下痢症患者のビールズ服用3, 7日後(1955年10月)の水様便より得た腸内細菌36株中の22株, 4) 食中毒患者吐物(1955年10月)よりの腸内細菌8株中の3株であつた。分離株のうち, 硫化水素は産生するが, Bethesda-Ballerup 属に定型的な生物学的性状を示さないものが, 成人大便, 実験的伝染性下痢症患者大便, 食中毒患者吐物よりの株に屢々みられた。抗原構造は, Edwards の標準菌抗原を有するものは, O 抗原では34株(12a, 12c. 16株; 3a, 3b, 1c. 3株; 16. 3株; 2a, 1b. 2株; 11. 2株; 1a, 1b, 1c. 1株; 1c, 3b, 7. 1株; 4b, 5b, 6. 1株; 9a, 9b. 1株; 22. 1株; 25. 1株; 29. 1株), H 抗原では12株(44, 46. 2株; 77. 2株; 35, 36. 1株; 45. 1株; 57. 1株; 68. 1株; 73. 1株; 74. 1株; 75. 1株; 85. 1株)であり, 大多数の株は Edwards の標準菌にない抗原を有した。溶血性は被検菌88株中, +3, -95で, 壊疽性は被検菌95株中, 卍1, +2, (+)4, -88であり, 両者の間には相関はみられなかつた。

考 察 Bethesda-Ballerup 属の病原性は, あるとしても極めて弱く, 人では個体の抵抗の弱まつたとき胃腸症状を惹起すると考えられている。この実験において *E. freundii* 検出率が食品関係では約4%, 人の大便では約%で, これら陽性例は食中毒, 下痢などとは直接関係がなかつたことは, 上述の主張と一致する。分離菌は Edwards の標準菌株にない抗原を有するものが大多数で, 溶血性と壊疽性とは関係が認められなかつたこと, 被検例数は少ないが実験的伝染性下痢症患者大便, 食中毒患者吐物より *E. freundii* 類縁菌が検出されたこと, ならびに生物学的性状が定型的でない株の同定については, 更に検討を要すると思う。

本研究は厚生科学研究費の補助によりなされた。実験に際し御援助を与えられた農林省家畜衛試坂崎利一技官ら, 都衛研北村久寿夫技師, 日医大第一医院内科及び同衛生学教室の各位に御礼申し上げる。

本研究の要旨は第29回日本細菌学会総会において講演された。

Received February 29, 1956

* 日本医大衛生学教室。

抄

非水溶液滴定による医薬品の定量(第10報)氷酢酸を溶媒とする有機塩基と無機及び有機酸との塩の滴定に及ぼす酸の影響について 鹿島哲, 加納宏一郎: 薬誌, 76, 50 (1956) 有機塩基の塩を氷酢酸を溶媒として過塩素酸で直接滴定するとき, その塩を構成している酸がその滴定に及ぼす影響を, ジフェニヒドミンの種々の塩をガラス-甘汞電極を用いて滴定した結果に基づいて検討した。それにより無機酸はその影響が大きく, 有機酸は修酸, ピクリン酸及びマレイン酸を除いてはその影響がほとんど見られなかつた。氷酢酸中での酸の強さは水溶液中での強さとその順序はほとんど変わらないから, 水溶液における酸の強さで表わすとその解離恒数が 10^{-3} より弱い酸はこの滴定にほとんど影響を及ぼさないが, それより強い酸はその測定精度を低下させると云えよう。またこの方法により氷酢酸中での酸の強さの比較ができる。

逆性石鹼について(第2報)機モリブデン酸を使用する塩化ベンザルコニウムの比色定量 吉村淳, 守田実: 第5回日本薬学会近畿支部総会講演(昭和30.10.15); Pharm. Bull., 3, 432 (1955)

塩化ベンザルコニウムが機モリブデン酸と沈澱を生ずる事を利用して生じた沈澱のアセトン溶液に SnCl_2 を加えここに生じた青色を比色することにより塩化ベンザルコニウムの微量を定量する比色法を確立した。

約200 γ /ccの塩化ベンザルコニウムの溶液5ccに4N硫酸5ccを加えて氷水で冷却し, 2%機モリブデン酸液5ccを加えてふりませ暫く放置して沈澱を完成させる。これをグラスフィルターで濾取し水洗後10ccの温アセトンで50ccのメスフラスコ中に流し込み, フィルターは更に5ccのアセトンで洗つて洗液は前のアセトン溶液に合し, このアセトン溶液に1% SnCl_2 の3N塩酸溶液5ccと3N塩酸10ccを加え, アセトンで50ccとして25°Cで80分間放置後, 730 μ mで吸光度を測定し検量曲線により濃度を求める。

製剤中のメチオニンの化学的定量法 I 小川俊太郎 平岡栄一, 中路幸男: 第8回日本薬学会大会講演(昭30.4.10)メチオンおよびメチオン注射剤についての定量法はN. N. R. と国民医薬品集に収載されているが, 市販メチオン製剤中には B_1, C などのようにこれらの定量法を妨害するものを含有しているものが多い。これらの製剤について, 白土吸着法およびその他の方法を併用して充分その目的を達した。

また別にニトロプルシッドナトリウムを使用する比色法を研究し, 若干の改良を加えて簡易正確な定量法

録

をつくつた。さらに両定量法を市販製剤に応用しその比較を行つたところ極めてよく一致した。

安定剤を含むビタミンC製剤の定量 II 小川俊太郎 平岡栄一: 第8回日本薬学会大会講演(昭30.4.10)

市販のビタミンC製剤には種々の安定剤が加えられているが, これらの妨害を除く方法として昨年本大会で H_2O_2 を用いるインドフェノール法を提出した。今回の報告は錠衣その他による着色試料に対しても十分に用いる方法として, インドフェノールキシレン抽出法を提出する。この方法によれば市販ビタミンC製剤(総合ビタミン剤を含む)はもちろん人参, トマト, ブドウ等の着色天然試料についても簡易に正確に定量できる。

ミネラルを含むビタミンC剤の定量法の検討 小川俊太郎, 平岡栄一: 日本ビタミン学会第7回大会講演(昭30.5.6) Cl は Fe^{+++} , Cu^{++} 等により酸化されやすいのでこれらの金属イオンを多量に含むC製剤中のC定量においてかなりの酸化を伴うものと思われる。EDTAやEDTA-Caは多種の無機イオンと配位化合物を作ることが知られているので, $(\text{NaPO}_3)_6$, $(\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10})$, $(\text{NaPO}_3)_3$ のメタ磷酸類とともにどの程度安定効果があるかをインドフェノール滴定法により調べた結果は今までのメタ磷酸, 酢酸混液が最良で, $(\text{NaPO}_3)_6$, EDTAがこれにつぐただしメタ磷酸, 酢酸混液でも正確な値はえられなかつた。

石灰窒素のレプトスピラに対する作用(II) - 石灰窒素浮遊液の試験管内におけるレプトスピラ殺滅作用の汙過並びに放置による減弱, グアニルシアナミド及び青酸についての検討 八田貞義, 山地幸雄, 田中弘子 山内信: 公衆衛生, 18, (3) 52~56 (1955) 石灰窒素浮遊液の2号汙紙汙液を100°C, 30分加熱したものをコルトフ培地に培養した *L. icterohaemorrhagiae* 及び *L. pyrogenes* に加えた際の殺レプトスピラ作用は, 汙過前の加熱浮遊液のそれよりやや劣っていた。石灰窒素浮遊液またはその汙液の, 100°C, 30分加熱液を18日間氷室に保存すると, pHの低下と, 不溶性白色沈澱の増加とがみられ, その殺レプトスピラ作用は甚だしく低下した。石灰窒素浮遊液の滅菌用アスベスト層通過汙液の殺レプトスピラ作用は, 前記の2号汙紙汙液の100°C, 30分加熱液よりやや劣っていたが, 後者の18日間氷室放置液よりは強かつた。アスベスト層通過液を18日間氷室に放置すると, その殺レプトスピラ作用は甚だしく低下した。グアニルシアナミド(ジシアンジアミド)をレプトスピラのコルトフ培

養液に加えても、レプトスピラは減少しなかつた。青酸ガスをレプトスピラ培養液に接触させたところ、レプトスピラは3日後に死滅したと認められた。しかしわれわれは石灰窒素浮遊液より青酸を検出し得なかつた。

上の所見より、1) 石灰窒素1%浮遊液の、不溶性の部分も殺レプトスピラ作用に関与する、2) 石灰窒素浮遊液の殺レプトスピラ作用を呈する因子の一部は生石灰である、3) カルシウムシアナミドの、pH 8~12の浮遊液及び土壤中における分解産物であるグアニルシアナミドには殺レプトスピラ作用はない、4) 石灰窒素の殺レプトスピラ作用の本態を青酸に求めるといふ説は正しくない、との結論を得た。

嚢特に病変米菌の免疫学的研究 (第1報) 八田貞義* 中村正夫, 上山栄一*: 第7回日本細菌学会関東支部例会講演要旨 (1955. 6. 18) 嚢に対する免疫成立の経過及び免疫方法を家兎について検討し、この免疫血清による嚢の分類を沈降反応及び凝集反応を用いて行つた。

免疫には病変米嚢 *Penicillium toxicarium*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium islandicum* を用いた。Czapek 培地に7~10日間培養した菌体をホモジナイザーで細挫し20~40mg/ccの濃度に生食水浮遊液としたものを抗原として、家兎の静脈内に1週2回総計10回の注射を行つた。この免疫血清を用い、各種 *Penicillium* 25株の培養液或は煮沸法による菌体抽出液と沈降反応を行つた結果抗原価は対応菌に対しては高い価を示すが、類属反応も強くみられ *P. islandicum* の場合についてみると *P. rugulosum*, *P. spiculisporum*, *P. divaricatum* 等にも同程度の価を示した(32~64倍)

併し *P. islandicum* 免疫血清を *P. divaricatum* 菌体で吸収した結果、吸収血清は殆んど特異的に *P. islandicum* に陽性を示した。*P. citrinum* 免疫血清は、*P. fluitans* で吸収する事により同様の結果を得た。この吸収血清を用いる事により米から分離される各種の類似嚢と病変米嚢を鑑別する事が可能であると考える。

次に菌体から Boivin 法により多糖類分劃を分離し、これと各種 *Penicillium* 免疫血清との沈降反応をみると *P. islandicum* 多糖類を抗原として用いた場合対応血清では 5 γ /cc まで陽性を示し、*P. toxicarium*, *P. citrinum*, *P. spiculisporum*, *P. fluitans* は 1000 γ /cc で尙陰性或は弱陽性を示したに過ぎず特異性がみられた。

凝集反応は菌体をホモジナイザーで細挫し更に遠心

分離する事により得られた平等な菌体浮遊液を抗原として用いた。*P. islandicum* 免疫血清は対応菌に対し160倍まで陽性、*P. rugulosum* に対しても同様の凝集価を示したが、吸収試験を行う事により両者を鑑別する事が出来た。

サントニン含有 *Artemisia* 属植物の研究特にその栽培について (第5報) クラムヨモギについて その5 川谷豊彦, 藤田早苗之助, 大野忠郎: 薬誌, 75, (12), 1456-1460 (1955). 1) 経年株(2, 3, 4, 5年株)のサントニン含量の時期的変化を1954年7月1日より8月21日の間追求め、含量最高の時期は8月上中旬であり既報(衛生試報73, 389)より約1箇月の遅延を示した。これは本年(1954)の7月特にその上中旬が例年になく冷涼で雨天日数が多く生育が進まず、その後に至つて気温が上昇して平年並となり順調な生育を示した為と考えられる。2) 1, 2, 3年株何れに於ても、生育、収草量、サントニン含量総て、馴化区は対照区に比し著しく優れており、既報と同様に馴化株の優秀性を示した。馴化の世代を重ねたもの程、越冬後の生存率が高く、馴化株の優秀性は過去3箇年の試験により確認された。3) 3, 4, 5年株のサントニン含量の時期的変化は、2年株のものと概ね同様の傾向を示し、又含量自体も2年株のものと大差を認めなかつた。4) 1年株の区に於て、高含量を示す優秀株相互間の人工交配による種子を用いた馴化第1世代のものが最も高く2.42%を示し、著者等が1年株に於て曾つて経験したことのない高含量を示した。これは交雑育種法の可能性を示すものである。5) 原産地種子による2年株100個体につき個体別にサントニン定量を行つた結果、分布範囲0.00~3.00%, 平均1.486 \pm 0.052%, モード1.01~1.25% (総数の25%) であつた。このことは栄養系分離による育種の必要性和有望性を示すものである。6) 冬期間殊に12月の頃挿木したものが最もよく活着(16~22%)した。本植物はミブヨモギに比較して著しく発根が困難であり、更に技術的検討を要する。7) 本植物は短日性植物であることが確認された。8) 生育に対する最適の土壤水分の範囲は容水量の70~90%にあるようである。9) サントニン含量に対する土壤pHは、酸性側よりもアルカリ性側(pH7.0~8.5)の土壤が好適する傾向が認められた。しかして広範囲の土壤pH(3.5~8.5)によく耐えて生育することが認められた。

Chenopodium 属植物の染色体数 II 川谷豊彦, 大野忠郎: 遺伝雑, 31, (1), 15-17(1956). 1) 1950年から1952年まで著者等により染色体数を決定された *Chenopodium* 属植物は11種で、*Chenopodium*

* 日本医科大学衛生学教室

属植物の染色体数には8を基数とするものと、9を基数とするものがある。

2) *Ch. murale* L. 及び *Ch. vulvaria* L. の根端細胞に於て mixoploidy の現象が見られた。Mixoploidy を示す細胞は総て原初皮層 (Periblem) であ

り、倍数染色体数を持つ細胞は $2n$ の染色体を持つ細胞より大きい、*Ch. murale* L. ($2n=18$) に於ては $4n$ を持つ細胞、*Ch. vulvaria* L. ($2n=18$) に於ては $6n$ を持つ細胞の混在が見られた。

国家検定，国家検査等の試験成績報告

昭和30年当所における試験，検査等の状況について

総 務 課

国家検定については1月14日付避妊薬液剤，8月12日付アイソフェンインシュリン注射液グロビン亜鉛インシュリン注射液，12月21日付ピラジナミドの4品目が追加指定され現在におよんでいる。取扱件数では昨年同様ブドウ糖注リンゲル液等が最も多く，大阪支所においてはイソニアジド，同錠は最も多く取扱われている。

国家検査については5月16日一斉検査の結果新に追加となつたものは，イクタモール，ジアスターゼ，サントニン製剤グリセリン浣腸剤の4品目でその他脱脂綿，ガーゼ等製造業者で不合格となつた業者に対して厚生大臣から検査命令が発せられた。取扱件数としては脱脂綿，ガーゼ，クレゾール石鹼液等が依然多い。

製品検査については昨年に引続いて過酸化ベンゾイルが多い。

その他特行試験はケシの栽培による麻薬試験が著く増加し，一般依頼試験は森永のミルク事件以後における添加物の増加が目立つ，輸出検査の激減は輸入検査を主としたものである。

試験成績としては国家検定，製品検査の取扱件数の増加に比べ不合格件数の減少が目立ち国家検査は逆に不合格件数特に大阪支所の増加が著しく，一斉検査における40%の不合格は一考の価値あると思う。総取扱件数は年毎に増加の傾向にあるが本年も又昭和28年の記録を1,600余件更新し，過去5年間の最高を記録した。

国立衛生試験所の検査状況 (昭和30年)

種 別	試 験 機 関			合 計
	東 京	大 阪	門 司	
国 家 検 定	1,742	284	—	2,026
国 家 検 査	2,777	780	—	3,557
製 品 検 査	6,525	2,544	—	9,069
輸 出 検 査	薬 品	—	—	—
	食 品	—	33	8
輸 入 検 査	薬 品	116	—	116
	食 品	1,716	1,597	134
特 行 試 験	3,316	703	—	4,019
特 需 試 験	43	25	—	68
一 般 依 頼 試 験	989	560	—	1,549
計	17,224	6,526	142	23,892

国 家 検

品 名	種 別 試験機関	月 別															
		1			2			3			4			5			
		計	合格	不合格													
インシュリン注射液	東京 大阪	3	3	0	5	5	0	6	5	1	5	5	0	2	2	0	5
プロタミン注射液	東京 大阪	-	-	-	1	1	0	3	3	0	2	2	0	-	-	-	1
グロブリン注射液	東京 大阪	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
インシュリン注射液	東京 大阪	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
インシュリン注射液	東京 大阪	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
脳下垂体後葉注射液	東京 大阪	3	3	0	2	2	0	5	5	0	3	3	0	3	2	1	3
ヘキシルレゾルシン丸	東京 大阪	2	2	0	1	1	0	4	4	0	1	1	0	5	5	0	1
避妊薬錠剤	東京 大阪	1	1	0	3	3	0	4	4	0	3	2	1	4	4	0	3
〃ゼリー剤	東京 大阪	9	9	0	17	17	0	14	13	1	1	1	0	2	2	0	19
〃クリーム剤	東京 大阪	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
〃坐剤	東京 大阪	-	-	-	-	-	-	1	1	0	-	-	-	-	-	-	-
〃親水性坐剤	東京 大阪	-	-	-	1	1	0	-	-	-	1	1	0	1	1	0	2
〃泡発坐剤	東京 大阪	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
〃泡発性粉剤	東京 大阪	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
〃液剤	東京 大阪	-	-	-	1	1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ブドウ糖注射液	東京 大阪	50	49	1	56	56	0	57	54	3	55	54	1	64	61	3	66
リンゲル液	東京 大阪	22	22	0	20	20	0	19	19	0	21	21	0	30	29	1	30
ロツク液	東京 大阪	-	-	-	1	1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
転化糖注射液	東京 大阪	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
イソニアジド	東京 大阪	7	7	0	4	4	0	8	8	0	10	10	0	4	4	0	9
イソニアジド錠	東京 大阪	17	17	0	14	14	0	12	12	0	12	12	0	12	12	0	8
イソニアジド錠	東京 大阪	4	3	1	4	4	0	2	2	0	7	7	0	2	2	0	2
〃注	東京 大阪	11	11	0	5	5	0	10	10	0	11	11	0	10	10	0	12
イソニアジド	東京 大阪	3	3	0	-	-	-	1	1	0	2	2	0	2	2	0	2
メタン sulfon 酸ナトリウム	東京 大阪	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
イソニアジド錠	東京 大阪	3	3	0	2	2	0	3	3	0	5	5	0	4	4	0	6
チオアセタゾン	東京 大阪	12	12	0	3	3	0	3	3	0	2	2	0	1	1	0	3
〃散	東京 大阪	-	-	-	4	4	0	-	-	-	1	1	0	2	2	0	-
〃錠	東京 大阪	1	1	0	-	-	-	1	1	0	-	-	-	-	-	-	1
チーエチルスルホニルペンズルデヒドチオセミカルパゾン	東京 大阪	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
〃錠	東京 大阪	-	-	-	2	2	0	1	1	0	1	1	0	-	-	-	-
〃散	東京 大阪	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ピラジナミド	東京 大阪	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
計	東京 大阪	121	119	2	124	124	0	131	126	5	119	117	2	124	119	5	152
		29	29	0	23	23	0	23	23	0	24	24	0	24	24	0	21

定																					(昭和30年) 国立衛生試験所					
6		7			8			9			10			11			12			合計						
合格	不合格	計	合格	不合格																						
5	0	7	7	0	3	3	0	6	6	0	6	6	0	5	5	0	3	3	0	56	55	1				
1	0	1	1	0				2	2	0				1	1	0				11	11	0				
																	2	0	2	2	0	2				
								3	3	0	1	1	0	2	2	0	3	3	0	9	9	0				
3	0	3	3	0	1	1	0	3	3	0	1	1	0				3	3	0	30	29	1				
1	0	2	1	1				1	1	0	2	1	1	2	2	0	3	2	1	24	21	3				
3	0	2	2	0	2	2	0	4	4	0	4	4	0	4	4	0	3	3	0	37	36	1				
19	0	18	18	0	21	20	1	5	3	2	16	15	1	11	4	7	25	25	0	158	146	12				
																				1	1	0				
														1	1	0				2	2	0				
2	0																1	1	0	6	6	0				
																				1	1	0				
64	2	69	69	0	68	68	0	71	71	0	69	67	2	73	72	1	77	77	0	775	762	13				
29	1	28	27	1	26	24	2	24	22	2	33	33	0	21	21	0	23	20	3	297	287	10				
																				1	1	0				
9	0	10	10	0	9	9	0	8	8	0	18	18	0	14	14	0	16	16	0	117	117	0				
8	0	15	15	0	13	13	0	8	8	0	13	13	0	17	17	0	11	11	0	152	152	0				
2	0	1	1	0	2	2	0	3	3	0	2	2	0	6	6	0	5	5	0	40	39	1				
12	0	8	8	0	6	6	0	8	8	0	13	13	0	14	14	0	9	9	0	117	117	0				
2	0	2	2	0	2	2	0	3	3	0	3	3	0				5	5	0	25	25	0				
6	0	10	10	0	7	7	0	10	10	0	7	7	0	7	7	0	11	11	0	75	75	0				
3	0	2	2	0	7	7	0	8	8	0	5	5	0	3	3	0	3	3	0	52	52	0				
		1	1	0	1	1	0							1	1	0	1	1	0	11	11	0				
1	0				1	1	0													4	4	0				
		1	1	0																5	5	0				
																	16	16	0	16	16	0				
149	3	156	154	2	148	145	3	151	147	4	167	163	4	150	142	8	199	193	6	1,742	1,696	44				
21	0	24	24	0	21	21	0	16	16	0	26	26	0	32	32	0	21	21	0	284	284	0				

国家検査 (昭和30年)

品名	種別	試験機関	1			2			3			4			5			計
			計	試験済	不適													
脱脂綿	東京	50	49	1	50	48	2	70	62	8	64	57	7	47	43	4	33	
	大阪	28	28	0	38	29	9	21	20	1	30	30	0	28	28	0	17	
ガゼー	東京	17	15	2	20	17	3	25	25	0	22	21	1	21	21	0	10	
	大阪	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
歯科材料	東京	33	33	0	10	9	1	27	25	2	6	6	0	16	13	3	25	
	大阪	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
注射筒	東京	6	5	1	19	15	4	10	10	0	53	46	7	3	2	1	-	
	大阪	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
注射針	東京	14	14	0	12	12	0	6	5	1	12	12	0	15	15	0	3	
	大阪	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
縫合針	東京	-	-	-	8	8	0	5	5	0	3	3	0	5	5	0	-	
	大阪	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
縫合糸	東京	1	1	0	2	2	0	-	-	-	1	0	1	9	2	7	4	
	大阪	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
羊腸線	東京	4	4	0	1	1	0	2	2	0	-	-	-	1	1	0	2	
	大阪	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
コンドーム	東京	6	3	3	11	8	3	9	9	0	12	12	0	6	5	1	10	
	大阪	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ビタミンB1注	東京	10	10	0	4	4	0	8	8	0	4	4	0	10	7	3	5	
	大阪	-	-	-	-	-	-	2	2	0	-	-	-	-	-	-	2	
オキシドール	東京	-	-	-	1	1	0	1	1	0	1	1	0	-	-	-	-	
	大阪	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
マーキユロクロム	東京	5	5	0	3	3	0	-	-	-	2	2	0	-	-	-	-	
	大阪	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
稀ヨードチンキ	東京	-	-	-	2	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	2	
	大阪	1	0	1	4	3	1	4	3	1	1	1	0	1	1	0	3	
麻酔用エーテル	東京	-	-	-	2	2	0	1	1	0	1	1	0	2	2	0	-	
	大阪	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
アセチルサリチル酸	東京	-	-	-	2	2	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	大阪	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
クレゾール石炭液	東京	8	8	0	14	13	1	18	18	0	17	16	1	13	13	0	10	
	大阪	2	2	0	2	2	0	4	4	0	2	2	0	3	3	0	1	
安息香酸ナトリウムカプフェイン	東京	2	2	0	-	-	-	1	0	1	-	-	-	-	-	-	-	
	大阪	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	-	
サリチル酸ナトリウムテオブロミン	東京	-	-	-	1	1	0	2	2	0	2	2	0	1	1	0	-	
	大阪	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
タンニン酸アルブミン	東京	-	-	-	1	1	0	1	1	0	-	-	-	-	-	-	-	
	大阪	-	-	-	1	0	1	2	0	2	-	-	-	-	-	-	-	
マーキユロ液	東京	6	5	1	9	9	0	7	5	2	10	10	0	8	7	1	7	
	大阪	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
純アルコール	東京	9	9	0	5	5	0	5	5	0	6	6	0	3	3	0	9	
	大阪	-	-	-	1	0	1	-	-	-	1	0	1	-	-	-	1	
消毒用アルコール	東京	10	10	0	7	7	0	7	7	0	7	6	1	5	5	0	8	
	大阪	-	-	-	1	1	0	5	4	1	1	1	0	-	-	-	1	
アルコール	東京	5	2	3	7	5	2	8	5	3	5	5	0	12	12	0	9	
	大阪	-	-	-	1	0	1	4	2	2	1	1	0	-	-	-	-	
公定書外ヨードチンキ製剤	東京	2	2	0	1	1	0	1	1	0	-	-	-	1	0	1	4	
	大阪	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
イクタモール	東京	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	大阪	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ジアスターゼ	東京	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	大阪	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
サントニン製剤	東京	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	大阪	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
グリセリン浣腸剤	東京	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	大阪	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ヨードチンキ	東京	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	大阪	2	2	0	1	1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
含糖ペプシン	東京	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	大阪	-	-	-	1	1	0	1	1	0	-	-	-	-	-	-	1	
合計	東京	188	177	11	192	175	17	215	198	17	229	211	18	179	158	21	141	
	大阪	34	33	1	51	38	13	45	40	5	37	36	1	35	35	0	27	

国 立 宿 生 試 験 所

6		7			8			9			10			11			12			合 計		
試験済	不適	計	試験済	不適																		
31	2	36	33	3	39	37	2	39	37	2	39	37	2	96	92	4	509	495	14	1,072	1,021	51
17	0	9	9	0	16	16	0	5	4	1	12	12	0	123	89	34	218	180	38	545	462	83
9	1	27	26	1	26	23	3	18	16	2	18	18	0	23	12	11	76	72	4	303	275	28
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23	16	7	70	64	6	93	80	13
25	0	19	18	1	22	21	1	11	10	1	11	11	0	16	16	0	9	8	1	205	195	10
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	33	30	3	7	5	2	17	16	1	12	10	2	12	11	1	10	8	2	182	158	24
3	0	21	19	2	1	1	0	3	3	0	3	2	1	2	2	0	8	7	1	100	95	5
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	7	7	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12	12	0	-	-	-	40	40	0
3	1	1	1	0	2	2	0	-	-	-	-	-	-	4	4	0	1	1	0	25	16	9
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	1	11	9	2
6	4	11	4	7	10	7	3	3	3	0	6	6	0	9	9	0	7	7	0	100	79	21
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	0	-	-	-	2	2	0	1	1	0	-	-	-	-	-	-	9	9	0	53	50	3
2	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	4	0
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	3	0
-	-	1	1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	11	0
2	0	-	-	-	1	1	0	1	1	0	1	1	0	-	-	-	2	2	0	12	11	1
3	0	1	1	0	3	2	1	3	2	1	1	1	0	3	3	0	1	1	0	26	21	5
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	6	0
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	2	2	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	3	0
10	0	22	22	0	20	20	0	10	10	0	8	8	0	11	10	1	10	10	0	161	158	3
1	0	1	1	0	1	1	0	-	-	-	1	1	0	4	4	0	2	2	0	23	23	0
-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	5	4	1
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	5	0
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	6	0
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2	0
-	-	2	1	1	1	0	1	-	-	-	2	0	2	2	1	1	-	-	-	10	4	6
6	1	8	8	0	12	12	0	12	12	0	12	11	1	8	8	0	6	6	0	105	99	6
-	-	2	2	0	-	-	-	1	1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	3	3	0	
8	1	1	1	0	11	10	1	-	-	-	11	5	6	4	4	0	3	3	0	68	58	10
0	1	1	1	0	2	1	1	3	3	0	-	-	-	2	2	0	-	-	11	8	3	
8	0	11	11	0	6	5	1	5	5	1	5	5	0	7	7	0	2	2	0	79	76	3
1	0	-	-	-	1	1	0	1	1	0	-	-	-	1	1	0	-	-	11	10	1	
9	0	9	8	1	9	9	0	8	8	0	6	5	1	5	5	0	3	3	0	86	78	8
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	3	3	
4	0	6	6	0	5	3	2	10	8	2	2	1	1	1	1	0	6	4	2	39	31	8
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0	2	1	1	0	3	1	2
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	0	3	3	0	3
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	1	1	0	1	2	0	2
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	8	0	83	83	0
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	3	0	3	3	0
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	4	0	19	19	0	23	23	0
-	-	-	-	-	1	0	1	-	-	-	1	1	0	1	0	1	-	-	1	1	0	0
1	0	1	1	0	-	-	-	-	-	-	3	3	0	-	-	-	-	-	-	6	4	2
130	11	213	195	18	173	158	15	140	131	9	134	120	14	222	202	20	751	725	26	2,772	2,580	197
26	1	17	16	1	25	21	4	13	11	2	20	18	2	163	120	43	313	266	47	780	660	120

製 品 検

品 名	月 別 種 別 試験機関	1			2			3			4			5			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	
ズ ル チ ン	東京 大阪	17 14	17 10	0 4	17 10	17 10	0 0	30 23	30 23	0 0	37 20	37 20	0 0	22 46	21 46	1 0	39 44
溶 性 サ ッ カ リ ン	東京 大阪	72 4	72 4	0 0	65 16	65 16	0 0	100 38	100 38	0 0	82 59	82 59	0 0	67 22	67 22	0 0	93 40
食 用 色 素	東京 大阪	54 102	54 101	0 1	28 70	28 67	0 3	72 85	72 84	0 1	67 124	66 119	1 5	68 87	68 80	0 7	46 144
繊 維 素 グ リ コ ー ル 酸 ソ ー ダ	東京 大阪	-	-	-	1	1	0	1	1	0	1	1	0	6	6	0	6 6
過 酸 化 ベ ン ゾ イ ル	東京 大阪	207 -	207 -	0 -	345 -	345 -	0 -	313 -	313 -	0 -	303 -	303 -	0 -	332 -	332 -	0 -	396 -
ニ ト ロ フ ラ ゾ ー ン	東京 大阪	- 2	- 2	- 0	- 2	- 2	- 0	- 2	- 2	- 0	- 7	- 7	- 0	- 9	- 9	- 0	- 5
〃 製 剤	東京 大阪	- -	- -	- -	- 3	- 3	- 0	- 7	- 7	- 0	- 15	- 15	- 0	- 6	- 6	- 0	- 12
ニ ト ロ フ リ ル ア ク リ ル 酸 ア ミ ド	東京 大阪	- -	- -	- -	- 1	- 1	- 0	- -	- -	- -	- 2	- 2	- 0	- -	- -	- -	- 1
〃 製 剤	東京 大阪	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- 5	- 5	- 0	- 8	- 8	- 0	- 11	- 11	- 0	- 8
計	東京 大阪	350 122	350 117	0 5	456 102	456 99	0 3	516 160	516 159	0 1	490 235	489 230	1 5	495 181	494 174	1 7	580 260

査

(昭和30年) 国立衛生試験所

6		7			8			9			10			11			12			合計		
合格	不合格	計	合格	不合格																		
38	1	27	27	0	27	27	0	26	26	0	31	31	0	25	25	0	41	41	0	339	337	2
44	0	53	53	0	37	37	0	19	19	0	15	14	1	42	42	0	23	23	0	346	341	5
93	0	92	92	0	52	52	0	95	95	0	91	91	0	79	79	0	138	138	0	1,026	1,026	0
40	0	27	27	0	15	15	0	49	49	0	27	27	0	66	66	0	66	61	5	429	424	5
46	0	80	80	0	90	89	1	52	51	1	67	67	0	63	62	1	109	108	1	796	791	5
144	0	147	138	9	112	110	2	153	149	4	136	133	3	148	142	6	279	279	0	1,587	1,546	41
6	0	2	2	0	2	2	0	6	5	1	3	3	0	6	6	0	9	9	0	43	42	1
6	0	-	-	-	-	-	-	4	4	0	-	-	-	4	4	0	-	-	-	14	14	0
396	0	367	367	0	300	300	0	439	439	0	461	461	0	436	436	0	422	419	3	34,321	34,318	3
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	0	-	-	-	2	2	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	29	29	0
12	0	15	15	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	58	58	0
1	0	-	-	-	1	1	0	-	-	-	-	-	-	1	1	0	-	-	-	6	6	0
8	0	14	14	0	15	15	0	4	4	0	3	3	0	2	2	0	5	5	0	75	75	0
579	1	568	568	0	471	470	1	618	616	2	653	653	0	609	608	1	719	715	4	46,525	46,514	11
260	0	256	247	9	182	180	2	229	225	4	181	177	4	263	257	6	373	368	5	52,544	52,493	51

昭和 31 年 6 月 25 日 印 刷
昭和 31 年 6 月 30 日 発 行

東京都世田谷区玉川用賀町2ノ203

著作者 国立衛生試験所

東京都新宿区市ヶ谷本村町15

印刷所 大蔵省印刷局