



CODEN: ESKHA 5

# 衛生試験所報告

第 96 号

昭和 53 年

---

**BULLETIN**  
**OF**  
**NATIONAL INSTITUTE OF**  
**HYGIENIC SCIENCES**

No.96 1978

---

国立衛生試験所

衛生試験所  
Eisei Shikenjo Hokoku

衛生試報96号正誤表

ページ	位置, 行	誤	正
II	目次上, 1	木村俊男	木村俊夫
III	" 12	Medical	Medical
3	左下, 8	クロロフェン加用薬用クリーム	クロロフェン加薬用クリーム
5	左表上, 13	$50 \times 10^3 \sim 2 \times 10^4$	$50 \times 10^3 \sim 2 \times 10^6$
6	右下, 4	増菌の傾向もうかがえない	増菌の傾向もほとんどうかがえない
7	左下, 14	それでも $10^3$ が4/58	それでも $10^3$ 以上が4/58
8	表下, 6	酵素・臓器製剤 直後 2 6	酵素・臓器製剤 直後 3 5
"	" 5	8 1カ月後 2 6 2	8 1カ月後 2 6 3
10	右下, 2	真菌のそれは 1/59 (17%)	真菌のそれは1/60 (1.7%)
11	左下, 12	試料から検出されたが,	試料から検出されなかった。
12	表上, 4	点眼剤 直後 50 1 1	点眼剤 直後 59 1 1
"	右下, 20	総説	総説
"	右下, 12	親水性軟膏の全試料から	親水性軟膏の一部試料から
14	左下, 8	ほとんどの	多くの
16	右上, 16	表14-2のとおり	表13-2, 14-2のとおり
"	" 17	30/70 (42.8%) であった	40/70 (57.1%) であった
22	左下, 11	総説	総説
35	下, 7	fabrics,	fabrics.
56	左上, 14~15	60 mm + シャーレ	60 mm のシャーレ
59	Table 上, 2	Final judge	Final judge*4
61	"	"	"
75	左下, 11	武田ら <sup>5)</sup>	武田ら <sup>4)</sup>
"	右下, 7	残留農薬国際勧告基準値 <sup>6)</sup>	残留農薬国際勧告基準値 <sup>5)</sup>
77	Table 上, 11	WHO <sup>6)</sup>	WHO <sup>5)</sup>
115	" 8	Dexamethasone	Dexamethasone
"	" 9		0.09
118	右下, 9	衛生試報, 96,	衛生試報, 96, 105 (1978)
136	Table 左下, 16	1957 July	1975 July
153	Table, 脚注	counts of completely spoiled samples.	completely spoiled samples and their microbial counts.
154	"	"	"
"	Table 上, 6	$< 10^2$	$< 10^2$
162	左上, 3	アトニック 0.3%	アトニック (0.3%)
188	左上, 2	支部長	支所長
189	本文左下, 1	(本文 ページ参照)	(本文 138 ページ参照)
190	左上, 10	1.134g/kg% SO <sub>2</sub>	1.134g/kg の SO <sub>2</sub>
192	右下, 12	マルチ区が最高ウズ32.5 g	マルチ区が最高 (ウズ32.5 g
196	左上, 1	(AWXI 4-53-6)	(AW×I 4-53-6)
"	左下, 16	13系統	1系統
"	右下, 10	'74, '75, '77	'75, '77
"	右下, 7	AWXI	AW×I
"	" 6	IXAR	I×AR
197	左上, 1	AWXI 4-53-6	AW×I 4-53-6
"	" 8	分譲種子	分譲用種子
"	左下, 4	英および	英および
223	左下, 15	生薬学雑誌, 162 (1978)	生薬学雑誌, 32, 162 (1978)



# 衛生試験所報告

第 96 号

昭和 53 年

---

**BULLETIN**  
**OF**  
**NATIONAL INSTITUTE OF**  
**HYGIENIC SCIENCES**

No. 96 1978

Published by  
National Institute of Hygienic Sciences  
Tokyo, Japan

---

国立衛生試験所

## 目 次

## 総 説

医薬品の微生物汚染の現状と微生物的規制への課題……………倉田 浩・石関忠一・宇田川俊一…… 1

## 報 文

バルピタールおよびジアセバムのヒト唾液への排泄

……………緒方宏泰・堀井幸江・柴崎利雄・青柳伸男・鹿庭なほ子・江島 昭……27

メトトレキサートの液体クロマトグラフィー……………徳永裕司・太田美矢子・木村俊夫・川村次良……32

医療用具の放射線滅菌に関する研究(第5報)  $\gamma$  線照射による医療用不織布の化学・物理的影響  
ならびに滅菌効果について

……………辻 楠雄・飯田和子・菊池寛・水町彰吾・柳町きみゑ・栗栖弘光・倉田 浩・大場琢磨……35

Tris (1-aziridiny) phosphine oxide (APO) で防炎加工した綿製品の新鑑別法

……………中村晃忠・小嶋茂雄・鹿庭正昭……42

安息香酸ナトリウムの Wistar ラットの次世代に及ぼす影響について……………小野寺博志・荻生俊昭・

松岡千明・古田京子・竹内正紀・大野裕子・窪田友子・宮原美知子・前川昭彦・小田嶋成和……47

医薬品類の細胞毒性一培養細胞に対する染色体異常誘発性について

……………石館 基・林 真・沢田 稔・松岡厚子・大野昌子・中館正弘……55

## ノ ー ト

ガスクロマトグラフィーおよび高速液体クロマトグラフィーによる塩酸アヘンアルカロイド製剤

中の他のアルカロイドの定量……………大野昌子・島峯望彦・高橋一徳……63

向精神剤に関する研究 TLC-F1D Analyser によるメプロバメートの定量

……………大野昌子・島峯望彦・高橋一徳……67

食用タール色素中のマンガンの定量……………上田清子・外海泰秀・慶田雅洋……71

輸入穀類中のヘプタクロル, ヘプタクロルエポキシド, クロルダン, エンドスルファンの定量

……………鈴木英世・中村恵三・慶田雅洋……73

自動ラジオメトリーによる医薬品中の真菌検出法について……………宇田川俊一・坂部フミ・成田紀子・倉田 浩……78

シクロヘキシルグルクロナイドの低温酸加水分解法……………時枝利江・新村寿夫・山羽 力……83

ステビア (*Stevia rebaudiana* BERTONI) の栽培に関する研究(第3報) 2年生植物の収量と

ステビオサイド含量……………宮崎幸男・渡辺宏之・渡辺照行……86

## 資 料

合成化学研究部で合成した化合物の抗腫瘍効果(II)

……………宮原美知子・神谷庄造・中館正弘・末吉祥子・丹野雅幸・宮原誠・鈴木郁生・小田嶋成和……91

国立衛生試験所標準品(日本薬局方標準品)“血清性性腺刺激ホルモン標準品(第6回, Control

771)”の製造……………川村次良・佐藤 浩・木村俊夫・横田椅江……95

国立衛生試験所標準品第6回“リゾチーム標準品”について

……………谷本 剛・横田椅江・中路幸男・木村俊夫・川村次良……98

国立衛生試験所標準品(日本薬局方標準品)“メトトレキサート標準品”について

……………太田美矢子・徳永裕司・木村俊夫・川村次良…… 100

市販リゾチーム製剤の力価について……………谷本 剛・横田椅江・中路幸男・川村次良…… 103

「健菜」等健康食品中のグルココルチコイドの検索: 1. 生物活性試験による結果……………川村次良・佐藤 浩

中路幸男・木村俊男・福田秀男・早川堯夫・太田美矢子・徳永裕司・横田椅江・ 谷田部かね子・中村とし子…	105
「健葉」等健康食品中のグルココルチコイドの検索：2. 薄層クロマトグラフ法, 高速液体クロマ トグラフ法及びびガスクロマトグラフ法による結果……………川村次良・佐藤 浩・中路幸男・木村俊夫・ 福田秀男・早川堯夫・太田美矢子・徳永裕司・横田椅江・谷田部かね子・中村とし子……………	108
副腎皮質ホルモンを添加した「自然食品」について……………柴田 正…	112
東京都内 3 カ所の国設自動車排出ガス常時測定所における大気汚染測定結果の概要 (1977 年 1 月～12 月)……………山手 昇・松村年郎・井上哲男・樋口英二…	119
鶏肉中の残留ナイカルバジンの分析……………神蔵美枝子・江口浩子…	124
Determination of Sulphites and Sorbic Acid in Imported Wines …………… M. TOYODA, S. OGAWA, Y. ITO and M. IWAIDA…	128
Determination of Sulphites and Borates in Imported Frozen Prawns, Frozen Shrimps and Salted Jelly Fish…………… S. OGAWA, M. TOYODA, Y. ITO and M. IWAIDA…	130
Contents of Diphenyl (DP), o-Phenylphenol (OPP) and Thiabendazole (TB) in Imported Citrus Fruits and Citrus Fruit Products ……………Y. ITO, Y. TONOGAI, M. TOYODA, H. SUZUKI, S. OGAWA and M. IWAIDA…	133
Results of the Product Examination of Coal-Tar Dyes (including Dye Aluminum Lakes) from April in 1977 till March in 1978 (on the Product Examination of Coal-Tar Dyes XVII)…………… M. IWAIDA, K. NAKAMURA, H. SUZUKI, Y. MINEMATSU and T. WATANABE…	138
つくだ煮の保存性に対するソルビン酸の有効性について ……………河西 勉・鈴木 昭・小沼博隆・高山澄江・水島久美子…	140
味噌の保存性に対するソルビン酸の有効性について ……………河西 勉・鈴木 昭・小沼博隆・高山澄江・水島久美子…	148
人工臓器の滅菌法に関する研究 (第 1 報) 人工腎臓ダイアライザーの高圧蒸気滅菌用 Biological Indicator について……………栗栖弘光・柳町きみゑ・倉田 浩…	155
薬用植物の栽培試験 (第 10 報) 道北地方におけるケシの栽培基準について ……………本間尚治郎・石崎昌吾・堀越 司…	158
薬用植物の栽培試験 (第 11 報) 植物生長調節剤処理が, ミシマサイコの生育・収量に及ぼす影 響について……………堀越 司・三浦忠一・本間尚治郎…	161
業務報告……………	167
誌上发表……………	200
学会発表……………	224
衛誌例会……………	231
昭和 52 年度研究課題……………	236
国家検定, 国家検査などの試験状況報告……………	237
国立衛生試験所標準品……………	246

## CONTENTS

### Review

- H. KURATA, C. ISHIZEKI and S. UDAGAWA: Recent Aspects of the Microbiological Contamination of Pharmaceutical Product and its Microbiological Specification..... 1

### Originals

- H. OGATA, S. HORII, T. SHIBAZAKI, N. AOYAGI, N. KANIWA and A. EJIMA: Salivary Excretion of Barbitol and Diazepam in Human .....27
- H. TOKUNAGA, M. ÔTA, T. KIMURA and J. KAWAMURA: Liquid chromatography for methotrexate .....32
- K. TSUJI, K. IIDA, H. KIKUCHI, S. MIZUMACHI, K. YANAGIMACHI, H. KURISU, H. KURATA, and T. ÔBA: Radiosterilization of Medical Products. V Effects of  $\gamma$ -Radiation on Chemical and Physical Properties, and Sterility of Non-Woven Fabrics for Medical Uses .....35
- A. NAKAMURA, S. KOJIMA and M. KANIWA: A New Method for Identification of Fire-resisting Cotton Fabrics Treated with Tris(1-aziridinyl) phosphine oxide (APO) .....42
- H. ONODERA, T. OGIU, C. MATSUOKA, K. FURUTA, M. TAKEUCHI, Y. OONO, T. KUBOTA, M. MIYAHARA, A. MAEKAWA and S. ODASHIMA: Studies of Effects of Sodium Benzoate on Fetuses and Offspring of Wistar Rats .....47
- M. ISHIDATE, JR., M. HAYASHI, M. SAWADA, A. MATSUOKA, K. YOSHIKAWA, M. ÔNO and M. NAKADATE: Cytotoxicity Test on Medical Drugs—Chromosome Aberration Tests with Chinese Hamster Cells In Vitro .....55

### Notes

- M. ÔNO, M. SHIMAMINE and K. TAKAHASHI: Gas-and High-Speed Liquid Chromatographic Determinations of the Other Alkaloids in Opial Preparations .....63
- M. ÔNO, M. SHIMAMINE and K. TAKAHASHI: Studies on Psychotropic Drugs Determination of Meprobamate by Means of TLC-FID Analyser .....67
- K. UEDA, Y. TONOGAI and M. IWAIDA: Addition of Manganese Test as One of the Purity Tests of Food Coal-Tar Dyes .....71
- H. SUZUKI, K. NAKAMURA and M. IWAIDA: Determination of Heptachlor, Heptachlor epoxide, Chlordane and Endosulfan in Imported Grains .....73
- S. UDAGAWA, F. SAKABE, N. NARITA and H. KURATA: Evaluation of an Automatic Radiometric System for the Detection of Fungi in Pharmaceutical Preparations .....78
- T. TOKIEDA, T. NIIMURA and T. YAMAHA: Method of Cyclohexylglucuronide Hydrolysis by the Acid at a Low Temperature .....83
- Y. MIYAZAKI, H. WATANABE and T. WATANABE: Studies on the Cultivation of *Stevia rebaudiana* BERTONI. III Yield and Stevioside Content of 2-Year-Old Plants .....86

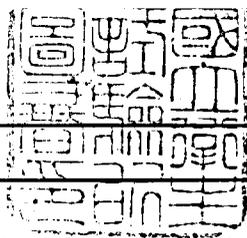
### Technical Data

- M. MIYAHARA, S. KAMIYA, M. NAKADATE, S. SUEYOSHI, M. TANNO, M. MIYAHARA, I. SUZUKI and S. ODASHIMA: Antitumor Effect of Compounds Synthesized in the

Division of Synthetic Chemistry. II .....	91
J. KAWAMURA, H. SATO, T. KIMURA and I. YOKOTA: Preparation of the Japanese Pharmacopoeia Standard Serum Gonadotrophin (6th, Control 771).....	95
T. TANIMOTO, I. YOKOTA, Y. NAKAJI, T. KIMURA, and J. KAWAMURA: On the National Institute of Hygienic Sciences Standard 6th "Lysozyme Standard" .....	98
M. OHTA, H. TOKUNAGA, T. KIMURA and J. KAWAMURA: On the National Institute of Hygienic Sciences Standard (The Japanese Pharmacopoeia Standard) "Methotrexate Reference Standard" .....	100
T. TANIMOTO, I. YOKOTA, Y. NAKAJI and J. KAWAMURA: On the Determination of Potency of Commercial Lysozyme Preparations .....	103
J. KAWAMURA, H. SATOH, Y. NAKAJI, T. KIMURA, H. FUKUDA, T. HAYAKAWA, M. OHTA, H. TOKUNAGA, I. YOKOTA, K. YATABE and T. NAKAMURA: On the Detection of Glucocorticoid in "Health Pill" I. The Results obtained by Bioassay .....	105
J. KAWAMURA, H. SATO, Y. NAKAJI, T. KIMURA, H. FUKUDA, T. HAYAKAWA, M. OHTA, H. TOKUNAGA, I. YOKOTA, K. YATABE and T. NAKAMURA: On the Detection of Glucocorticoid in "Health Pill" II. The Results obtained by Thin-layer Chromatography, High-speed Liquid Chromatography, and Gaschromatography.....	108
T. SHIBATA: Studies on so-called "Natural Food (Shizen Shokuhin)" added corticosteroid .....	112
N. YAMATE, T. MATSUMURA, T. INOUE and E. HIGUCHI: Summary of Air Pollutants Levels at the Three Locations of the National Autoexhaust Monitoring Station in Tokyo from January to December 1977.....	119
M. KAMIKURA and H. EGUCHI: Analysis of Nicarbazin Residue in Chicken Tissue .....	124
M. TOYODA, S. OGAWA, Y. ITO and M. IWAIDA: Determination of Sulphites and Sorbic Acid in Imported Wines.....	128
S. OGAWA, M. TOYODA, Y. ITO and M. IWAIDA: Determination of Sulphites and Borates in Imported Frozen Prawns, Frozen Shrimps and Salted Jelly Fish .....	130
Y. ITO, Y. TONOGAI, M. TOYODA, H. SUZUKI, S. OGAWA and M. IWAIDA: Contents of Diphenyl (DP), o-Phenylphenol (OPP) and Thiabendazole (TB) in Imported Citrus Fruits and Citrus Fruit Products .....	133
M. IWAIDA, K. NAKAMURA, H. SUZUKI, Y. MINEMATSU and T. WATANABE: Results of the Product Examination of Coal-Tar Dyes (including Dye Aluminum Lakes) from April in 1977 till March in 1978 (on the Product Examination of Coal-Tar Dyes. XVII) .....	138
T. KAWANISHI, A. SUZUKI, H. KONUMA, S. TAKAYAMA and K. MIZUSHIMA: Effects of Sorbic Acid (Food Additive) on Preservation of "TSUKUDANI" .....	140
T. KAWANISHI, A. SUZUKI, H. KONUMA, S. TAKAYAMA and K. MIZUSHIMA: Effects of Sorbic Acid (Food Additive) on Preservation of "Miso" .....	148
H. KURISU, K. YANAGIMACHI and H. KURATA: Studies on the Sterilization of Artificial Organs. I A Search of the Biological Indicator sufficient to be used in Autoclave Sterilization of Artificial Kidney, at 115° for 30 min. ....	155
N. HOMMA, S. ISHIZAKI and T. HORIKOSI: Studies on the Cultivation of Medicinal Plants. X Standard cultivation method of <i>Papaver somniferum</i> L. in Northern Hokkaido .....	158
T. HORIKOSHI, T. MIURA and N. HOMMA: Studies on the Cultivation of Medicinal	

---

Plants. XI Influence of Growth Regulators on the Growth and Yield of <i>Bupleurum falcatum</i> L. ....	161
Annual Reports of Divisions.....	167
Summaries of Papers Published in Other Journals .....	200
Titles of Speeches at Scientific Meetings .....	224
Semminars .....	231
Survey of the Results of National Tests .....	237
Refere Standards Prepared by National Institute of Higienic Sciences.....	246



## 医薬品の微生物汚染の現状と微生物的規制への課題

倉田 浩・石関忠一・宇田川俊一

## Recent Aspects of the Microbiological Contamination of Pharmaceutical Products and their Microbiological Specification

Hiroshi KURATA, Chuichi ISHIZEKI and Shun-ichi UDAGAWA

## はじめに

1966年、スウェーデンで甲状腺腺の *Salmonella* 汚染が原因となり 237 名に及ぶ婦人患者がサルモネラ症に罹患するという不測の事故が起きた。原因を詳細に究明したところ、原料の甲状腺末が *S. muenchen* などによって汚染されていたのを気付かずに製剤としたもので<sup>1)</sup>、病院内における第 2 次的な汚染ではなかった。

この事故がきっかけとなって、いわゆる非無菌製剤の微生物汚染に対する関心が急速に高まり、スウェーデン<sup>2)</sup>、デンマーク<sup>2-7)</sup>、イギリス<sup>8-13)</sup>などのヨーロッパ諸国をはじめとし、アメリカ<sup>14-19)</sup>、オーストラリアなども自国の非無菌製剤の微生物汚染調査に乗り出した。

こうした機運が基盤となって、1968年 WHO<sup>20)</sup> が医薬品の製造および品質管理に関する基準の勧告を行い、世界各国の製造衛生 (GMP) の確立に対する本格的な準備作業が始められた。

勿論、それまでも衛生的な環境のもとで医薬品が製造されていたに違いないが、注射薬以外の各種製剤の微生物汚染問題をそう深刻に考える必要に迫られていなかったのである。わが国も同じような客観状況にあったけれども、幸にしてスウェーデンのような本格的な医薬品由来の感染が起きたという症例報告は今までに見当たらない。ただ、医療従事者の医薬品の取扱いの不注意による交叉汚染が起きたという事故は相変わらず発生している。それらも確実な汚染源に対する追究を製品自体の微生物的チェックを実施してまで検討していない場合が多い。現実にはそうした余裕がないわけである。

薬事法第 46 条によって、医薬品は病原菌を混入してはならぬ規定になっている。今までに心配される事故がないことがこのことの唯一の証明であるといつて、積極的な製剤の微生物的評価を試みる必要はない

といい切れるであろうか。現に諸外国の調査では医薬品の中から、緑膿菌、ブドウ球菌、病原性大腸菌などの病原菌類が検出され問題になっている。

著者らは、昭和 48 年以来厚生省の医薬品菌数限度基準作成のための研究課題による調査を都府県、ならびに製薬業界の好意的な援助により進めてきた。

現在まだ整理中のものもあるが、これらの諸成績と諸外国の関連データとを総合的に考按し、非無菌製剤の微生物汚染の現況と微生物学的基準の設定への諸外国の動きと、それに対する考え方などを併せてここに論説してみることにした。まだ多くの未解決の課題にとり組まねばならぬが、一人でも多くの関係者の問題提起を期待する意味からも未完成的な調査をここに披露した。忌憚のないコメントをいただくことができれば洵に幸甚である。

## 医薬品由来感染とその事例

医薬品由来感染とは、医薬品が病原微生物の汚染を受けているのに気付かずに使用したために起る感染である。本来、病気の治療を目的に適用する薬剤が病原菌の運び屋となるということは、患者にとってはこれ程迷惑なことではない。このようなことがあり得る筈がないと誰れしもが思うだろうが、事実はそうでないのである。

医薬品は原料が既に幾多の微生物で自然汚染をうけているし、製造工程中も完成品でも滅菌操作を加えない限りは微生物の存在を許している。無菌製剤でない限りは、製造工程中や完成品の開封後は何時でも汚染の危険にさらされている。注射薬のような無菌製剤であっても、滅菌処理後にビンホールやふたのゆるみなどの製造ミスから汚染を招くことがある。しかし近代の技術からいって、また無菌試験による自主的な検査が励行されている昨今では注射薬そのものの汚染によって起る感染は絶無に等しい。ただ、病院薬局などで行われる注射剤の混合操作やバルクからの薬剤の小分

けなどに際して、不測の汚染を惹き起すことは十分に考えられる。今日のように混注<sup>21)</sup>が多用されると、使用する注射器や輸液セットなどの微生物管理が十分でなければ環境からの汚染を容易に受け入れてしまうことになる。

このように製剤そのものが無菌であっても、また非無菌製剤の病原菌の存在していないのもであっても、生体に注入されたり服用されるまでの過程において病原菌の侵入する機会は数多く考えられる。

しかし、一般には、無菌製剤に対しては製造する側も取扱う側も、それ相当の注意を払って来ているが、非無菌製剤に対する微生物汚染とそれによって起る可能性のある感染については、今迄に果してどれ程の予防対策が講ぜられてきたであろうか。非無菌製剤の汚染にもとづく感染症の発生が、それ程多くなく致死的でないという理由で、長い間顧みられなかったと思われる。

医薬品、化粧品が病原菌で汚染されていたために発生した感染症に関する報告は、国の内外を問わず小さな事故の報告が散発的に行われているが、1966年 Kallings ら<sup>1)</sup>によって報告されたスウェーデンの例は、最も注目すべき事例である。すなわち、ハンガリーおよびデンマークから輸入された甲状腺粉末で作った錠剤が *Salmonella muenchen* および *S. bareilly* によ

って、それぞれが汚染されていたのが原因で *Salmonella* 症が発生し、1次患者202名、2次患者35名、計237名の婦人が罹患するという怖ろしい事故が報告されている。この汚染錠剤からは1g中に約100万個の大腸菌が検出されたという。同年に、米国FDA<sup>14)</sup>は、デンマークから輸入した同じ甲状腺粉末のパルク中から *Salmonella* を発見したために広汎な調査を実施したところ、脾臓粉末、顆粒ペブシン、ゼラチン、ラクトアルブミンなどの動物原料の製剤から次々に血清型の異なる *Salmonella* を検出したために、それらの製剤の一斉収去を行っている(表1)。

次に、医薬品由来感染症の事例の多くは眼科領域で起っている。すなわち、先の Kallings ら<sup>1)</sup>の報告によると、ステロイド眼軟膏の緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* の汚染が原因で感染が起り2名の失明者が出たという注目すべき事例が挙げられている。この1966年の報告以前からも、米英両国では点眼剤の汚染による感染症がしばしば記録されている。主な事例を挙げると、1927年に米国の Garreston ら<sup>22)</sup>が緑膿菌で汚染したホウ酸点眼液で16名の患者が感染を起した疑いがあると報告し、1942年には Lepard<sup>23)</sup>が、角膜検査に使用するフルオレセイン液が緑膿菌の汚染を受け、それがため2名の角膜潰瘍を起した患者が出たという発表を行っている。また同様の4症例を

表1. 輸入臓器製剤より検出された *Salmonella*

製 剤	生 産 国	<i>Salmonella</i> 血清型
甲 状 腺 粉 末	ア ル ゼ ン チ ン	<i>S. newport</i>
	〃	<i>S. derby</i>
	イ タ リ ア	<i>S. newport</i>
	ア ル ゼ ン チ ン	<i>S. bovis morbificans</i>
	ウ ル グ ア イ	<i>S. anatum</i>
	カ ナ ダ	<i>S. anatum</i>
	〃	<i>S. anatum</i>
	デ ン マ ー ク	<i>S. bareilly</i>
	イ タ リ ア	<i>S. anatum</i>
	ア ル ゼ ン チ ン	<i>S. typhimurium</i>
〃	オ ラ ン ダ	<i>S. typhimurium</i>
脾 臓 粉 末	カ ナ ダ	<i>S. tennessee</i>
	〃	<i>S. anatum</i>
ゼ ラ チ ン	西 ド イ ツ	<i>S. senftenberg</i>
肝 臓 粉 末	ア ル ゼ ン チ ン	<i>S. derby</i>
	オ ラ ン ダ	<i>S. cubana</i>
ラクトアルブミン	オ ラ ン ダ	<i>S. bredeney</i>
肝 臓 粉 末	ウ ル グ ア イ	<i>S. bredeney</i>
乾 燥 肝 臓	オ ラ ン ダ	<i>S. typhimurium</i>

Cooper<sup>24)</sup> が発表し、1943年に MuCulloch が<sup>25)</sup>、5,000名の眼疾病患者のうち明らかに緑膿菌による感染を起こしている者が18名あり、その中の5例は汚染点眼剤によるものではなからうかとの考えを述べている。1951年になって米国の Theoder<sup>26-28)</sup> は、緑膿菌が高度に汚染した市販のコーチゾンおよびサルファ剤添加の点眼液を使用したために起った重篤な眼の感染症を報告している。

1953年にFDA<sup>29)</sup> は、以上の不慮の事故の頻発にかんがみ眼薬の無菌性と1回使い捨て容器の使用を勧告した。その後、1964年には目の付近に適用する化粧品類やコンタクトレンズ用の洗滌液などを無菌とする要求を提出した。

イギリス<sup>31)</sup>でも、1968年にはイギリス薬局方で点眼剤の無菌性を規定するに至ったが、1951年に Bignell<sup>30)</sup> は、汚染ペニシリン点眼液が原因と考えられる眼の角膜炎を報告し、次いで1964年には、これはまた典型的な院内感染のケースと考えられるが、Ayliffe<sup>32-33)</sup> は Birmingham and Midland の眼病院で手術中に角膜をうるおす食塩水が緑膿菌に汚染を受けているのに気付かず使用し、15名の患者が発生し、その中の6名が視力を失うという注目すべき事例が報告された。

眼科領域のほかでの主な症例を挙げてみると、意外に殺菌消毒剤の緑膿菌汚染に原因するものが多い。すなわち、1966年に英国の Mitchell ら<sup>34)</sup> によって泌尿器科治療に用いたクロールヘキシジン液中の *Pseudomonas* 菌によって7例の尿路感染症が報告され、また別に気管内カテーテルに使用されたリドカイン軟膏の緑膿菌により4例の肺感染症をひき起したとの報告もある。米国では<sup>35)</sup>、ニューヨークの病院で、血管カテーテルに用いた抗生物質添加の消毒剤が緑膿菌の汚染を受けていたために6名の入院患者が菌血症にかかり、60歳の男子1名が死亡している<sup>36)</sup>。1968年には、ある病院でクロールヘキシジン、またはヘキサクロロフェン液剤中に含まれていた同じく緑膿菌により13名の新生児が感染を起こしている<sup>37-38)</sup>。

以上のほか、ニュージーランド、英国では、ヘキサクロロフェン加用薬用クリームおよびポディーションが緑膿菌や *Candida albicans* などに汚染されていたのが原因で皮膚感染症が発生したとの記録がある<sup>39-43)</sup>。

わが国内における医薬品由来の感染事故に関する報告は、ほとんどなされていない。

1963年に岩手県の大船渡病院で新生児のブドウ球菌による菌血症が発生し4名が死亡する事故があり<sup>44)</sup>、

詳細な調査が行われたが、この事件のはっきりした原因はつかめられぬままに終わっている。このように院内感染が、いわゆる交叉汚染によって起きた事例は多数にのぼるとみられるが、正式の報告として発表されている例は極めて少ない。このほか最近、九州でベビーパウダーの真菌汚染により新生児が真菌感染を起こし死亡するという報告が新聞などでも報道されたが、真相は報告されていない。また、病院内で患者の間で発生する食中毒の報告も稀れに報道されているが、原因は食品であり医薬品由来で起ったという報告は今まで全く聞いていない。

食中毒の場合でも、現在その30%近くは原因不明事件として終わっている。多分、これまでに医薬品の汚染による発症例は、わが国でも全くないわけではなからうと思うが、その原因を明確につかむことの困難さ、また外部に公表することのためらいなどの理由で不問に付せられているケースが多々あるものと考えられる。特に院内感染の場合は、数多くの予想される汚染源がとりまいているために、主たる要因を決めることは食中毒の原因究明以上に難かしい事柄と考えられる。しかし、予防医学の立場からは疑わしいケースも含めて記録し、しかるべき機関に集積しておくことが望ましい。また現在まで集められている症例報告があるとすれば、それらを新しい微生物学的な立場で検討を加えておくことも重要な課題の1つではなからうか。

### 非無菌製剤の微生物汚染

前述したように、非無菌製剤は製造工程中に特別な滅菌操作が加えられていない製剤であるから、原料や製造用水や製造環境から自然に持ち込まれた微生物が完成品の中に必ずといっていい位、存在している。これを汚染という言葉で示すことに何となく抵抗を感じる。この場合は微生物の存在とか分布という用語で表現するのが適当であろう。一般の微生物が生存していることがあっても、必ずしも病原微生物が存在しているわけではないからである。若し病原菌が2次的に侵入したというならば汚染といえるだろうが、本来、汚染という言葉のもつニュアンスは化学物質などで汚れるという意味なので微生物の場合に用いるのは、ほんとうは適切でないのだが、ほかに現在適当な用語がないので止むを得ずこれを使用している。

さて、非無菌製剤中の微生物分布を調査した成績は、特に微生物的規準を考えることの必要性が指摘された1966年頃以降は、各国で盛んに進められている。それらの結果から、用途別、剤型別に製剤中の分布を比

較考察することは分布の概念を把握する上に意義ある試みであるが、調査研究者によって微生物学的試験方法が必ずしも一致するものではないばかりでなく、サンプルの内容も変化に富むものであるから、単純な考えでこれらをまとめるわけにはいかない。諸家によるデータを比較し得たとしても、一応の傾向を掴むことに役立つものであることを承知した上で比較的信頼のおける内容のデータのみを拾いあげて考察を試みることになる。

先ず国外の調査では、Kallings ら<sup>1)</sup>の行ったスウェーデンにおける市販の錠剤、軟膏剤など約600点の非無菌製剤の大規模な微生物調査を皮切りに、デンマーク、英、米各国でも、比較的詳細な調査が何年かの間引続いて行われ、非無菌製剤の微生物分布の大要が明らかにされている。

わが国の調査は割合に古くから手掛けられている。それは、1926年に石井<sup>45)</sup>により眼軟膏基剤中の微生物の分布が調べられ、その後は、時々ビタミン製剤、丸剤(主として生薬類の)などの調査が行われた<sup>46-47)</sup>。1966年以降は点眼薬を主体とする各種製剤が調べられ、その他の広範囲の調査を含め高木<sup>48)</sup>、八島<sup>49)</sup>の固型剤、石関<sup>50)</sup>の点眼剤、米虫<sup>51)</sup>の局方生薬剤、特に横山<sup>52)</sup>の大阪府下でサンプリングした無菌製剤を含む各種製剤などの微生物調査結果は最近のわが国の医薬品の微生物分布の現状を指摘する成績として価値あるものである。

また紀氏<sup>53)</sup>は、医薬品の微生物汚染の簡易テスト法を創案し、これによる調査結果を3年置きに実施し、医薬品の微生物的な品質が改善の方向にあることを示唆する成績を発表している。

そのほか、微生物汚染に関する総説は、岩原<sup>54)</sup>、倉田<sup>55-56)</sup>、米虫<sup>51)</sup>をはじめとし、1977年には医薬品の微生物試験法と諸外国におけるその規制の動向などを

論説した著書が倉田、石関、宇田川<sup>57)</sup>によって刊行された。

以上の各調査の進展に併行して前述したように、1973年より厚生省薬務局審査課と国立衛生試験所衛生微生物部によって、非無菌製剤の微生物的調査が医薬品メーカーの協力を得て開始され、1973年(昭48)は対象品目として点眼薬、内用液剤のうちシロップならびにドリンク剤、X線造影剤、1974年(昭49)は生薬、臓器、ならびに酵素製剤、1975年(昭50)には沈殿剤、親水性軟膏、含嗽剤およびトローチなど、1976(昭51)には解熱剤などの錠剤、顆粒剤、散剤など、1977年(昭52)には点耳鼻薬、生薬・酵素・臓器含有製剤の追加などの収集品についての細菌、真菌の調査が実施され、これらに併行してそれら製剤の製造工程における環境の微生物的チェックが実施された。

昭和48年から52年に至る5カ年の私共の調査成績は、厚生省に報告しただけでまだ一般に公表されていない<sup>58-61)</sup>。本総説では、この成績を中心に既往の諸家の成績を考按し、微生物の分布の実態とそれが意味するものについて剤型別に記述して行きたい。

### 内用固型剤

散剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、丸剤などの内服薬がこの中に含まれる。英国の Public Health Laboratory Service<sup>6)</sup>が医薬品の剤型の相違による微生物汚染の実状を調べている。結果は、表2に示すごとく乾燥性の固型剤は、アルコール性、またはゲル化した製剤と同様に汚染率は極めて低いが、水性または油性の製剤は汚染率が高い。

一般に無機薬剤を主体にした製剤や合成医薬品は、高熱、酸、アルカリなどの処理を経て製造されることと、もともと微生物の栄養源になる物質が含まれていないこともあって、通常生菌数はg当たり10個以

表2. 賦形剤の相違による医薬品の微生物汚染状況

賦形剤別	検体数 (%)	検出生菌数/g または ml			汚染率 (%)
		<500	500~10 <sup>4</sup>	>10 <sup>4</sup>	
乾 燥 性	42 (3)	28 (67)†	11 (26)	3 (7)	14 (33)
水 性	862 (71)	562 (65)	114 (13)	186 (22)	300 (35)
油 性	243 (20)	179 (74)	41 (17)	23 (10)	64 (26)
アルコール性	32 (3)	31 (97)	—	1 (3)	1 (3)
ゲル 性	41 (3)	27 (66)	8 (20)	6 (15)	14 (34)
計	1220 (100)	827 (68)	174 (14)	219 (18)	393 (32)

† カッコ内数字は %

表 3. 原料の別による薬剤の微生物汚染

薬品の種類	検出生菌数の範囲/g
無機薬品：	
Magnesium trisilicate	c 500
Magnesium carbonate	0~10×10 <sup>3</sup>
Sodium carbonate	10 <sup>4</sup>
Magnesium sulphate	10 <sup>5</sup>
Calcium phosphate	50~10×10 <sup>4</sup>
Calcium lactate	真菌のみ検出
天然物原料：	
Aloes powder	20~300
Acacia	300~18×10 <sup>3</sup>
Carmine	50×10 <sup>3</sup> ~2×10 <sup>4</sup>
Digitalis leaf	160×10 <sup>3</sup>
Gelatin	<10~500
Food casein	8×10 <sup>3</sup> ~2×10 <sup>4</sup>
Ginger powder	50×10 <sup>3</sup> ~2×10 <sup>6</sup>
Rhuharb powder	<10~1400
Liquorice powder	<10
Starch (Maize)	<10~1140
Starch (Potato)	100
Senna fruit	16×10 <sup>3</sup> ~60×10 <sup>3</sup>
Senna powder	200×10 <sup>3</sup> ~>10 <sup>6</sup>
Tragacanth	40~1400
Thyroid powder	3×10 <sup>3</sup> ~16×10 <sup>4</sup>
鉱物原料：	
Kaolin	600~>10 <sup>6</sup>
Chalk	200~400
Talc (Chinese)	100~>10 <sup>6</sup>
Talc (Italian, Indian)	<10~5×10 <sup>3</sup>
Bentonite	90~>20×10 <sup>3</sup>

Colindale ら, 1971

下, 多くても 10<sup>4</sup> ほどでありである。

さらに, 原料の項で後述するけれど, その前に全般の医薬品原料の汚染状況を表 3 に掲げておいた。これは, 英国薬剤協会における総合調査をまとめた成績である<sup>6)</sup>。

微生物の汚染が全般に高いのは, 動植物など天然物を原料とした薬剤である。すなわち, トラガント, ジキタリス, センナなどの生薬原料, 甲状腺末, ゼラチン, カゼイン, デンプン, 特にトウモロコシデンプンなどや, また薬用パウダーなどの原料に用いるカオリン, タルクなどは土壌由来の微生物が多量に存在して

いることがわかる。したがって, これらを原料とした散剤, 丸剤などが最も汚染率が高くなること, 次いで顆粒, カプセル錠, 糖衣錠は加工の工程中に多くの微生物は死滅するために汚染率はやや低いものになるとみられる。

#### 錠剤ならびに散剤

1953年, 川崎ら<sup>46)</sup>はビタミンおよびジアスターゼの錠剤について調査し, 後者は錠剤 1 個当り 5,000~50,000 個の菌数が検出されることと, 原料に用いるバレイショデンプンが多量 (1,200~1,800 個/g) の微生物を含んでいることを指摘したが, 病原菌の検出は認めていない。

青木<sup>61)</sup>は含糖ペブシンの製剤がロットによって汚染の変動がみられることから, 製品の微生物学的な検査を実施すべきであると述べている。

前述したように 1966 年, Kallings ら<sup>1)</sup>は甲状腺錠剤中に *Salmonella* の汚染を報じたが, そのほかの錠剤の汚染調査結果では 1g 中に 10<sup>6</sup> 以上の生菌数を認めた製品が約 6% を占めていたといい, その中のジキタリス, アルカロイド, トランキライザーなどを原料とする錠剤からは, 大腸菌を検出している (表 4)。

先のスウェーデンに *Salmonella* 汚染の甲状腺錠を輸出したデンマークでは自国の製剤を即刻調査したが約 700 バッチの錠剤からはすべて *Salmonella* 陰性であったという<sup>5-6)</sup>。226 バッチ中 84 点の原料を調査した結果では, 7 点の大腸菌汚染試料がみつけれられたが, しかしながら *Salmonella* は検出されていない<sup>4)</sup>。

Schiller らの 1967 年の調査によると<sup>62)</sup>, オーストラリアの動植物を原料とする錠剤とその原料を詳細に調べているが, 植物を原料とした完成品のうちの糖衣錠中には生菌数が g 当り 10 以下になるが, 原料のセンナ, ジキタリス, ヤボランディなどからは, そのエキスも含めて約 25 万個/g 以上の菌数が検出されること, これに対し脾臓, 甲状腺などを原料とする動物製剤では, 中間製品で 15~86 万個/g, 完成品でもなお 100~700 個/g 程が存在し, 多い例では 30 万個/g 以上の汚染がみられることを報告し, 医薬品の生菌数を少なくとも食品の規格基準以上にすべきことを警告している。

わが国では, 1969 年高木ら<sup>48)</sup>が, 各種の粉末製剤の微生物調査を行い, ジアスターゼ, ゲンチアナ末, ロートエキス散の汚染度が著しく高いことを指摘したのを始め, 横山<sup>62)</sup>の 1972~74 年の 3 カ年間の大阪府下の市販薬品についての詳細な調査では, 解熱剤を主体とする錠剤では 10<sup>4</sup>/g 以上の細菌および真菌を検出した検体がそれぞれ 4.7% と 3.7%, ビタミン錠, そ

表 4-1. スウェーデンにおける動植物原料医薬品の微生物調査 (1970 年 2~5 月)

原料	検体数	生 菌 数					<i>Clostridium perfringens</i>	その他の <i>Clostridium</i>	グラム陽性好気桿菌	<i>Pseudomonas</i>	グラム陽性球菌	真菌
		$10^2$	$10^3$	$10^4$	$10^5$	$10^6$						
動物:												
骨	2			1	1				2			2
脾臓	24	1	10	8	2	1	2	7	5	24		7
甲状腺	6		5	1				2		5	1	1
植物:	4		2	1		1			4			2

Kallings, 1972

表 4-2. 錠剤 1g 中の総生菌数

培養温度	総 生 菌 数				
	<1	$1 \sim 10^2$	$10^2 \sim 10^4$	$10^4 \sim 10^6$	$>10^6$
35°	115	8	14	10	4
22°	104	10	15	22	6

\* 157 バッチ調査

Kallings, 1972

表 4-3. 錠剤 1g 中の大腸菌群の検出状況

	総 生 菌 数				
	<1	$1 \sim 10$	$10 \sim 10^3$	$10^3 \sim 10^5$	$>10^5$
<i>Escherichia coli</i>	128	5	12	12	3
大腸菌群	122	3	17	16	2

Kallings, 1972

他のカプセル、散剤、顆粒剤などでは同様の汚染検体がそれぞれ 10.2% と 6.1% 存在していたと報告し、さらに局方生薬製剤の 76 点の調査結果はその 44% の試料が  $10^4/g$  以上の汚染を示したといい、かつ少数の検体からは大腸菌、ブドウ球菌などを検出している。

米虫<sup>51)</sup>も生薬製剤 20 品目の汚染度調査で、一般細菌数が 10 万個/g を越すものが 5 品目 (25%)、1 万個/g 以上が 8 品目 (40%) を認め、この中 6 品目が大腸菌群陽性であったとし、その他の検出細菌の多くが 80°, 15 分間でも死滅しない芽胞形成菌である旨を指摘している。

紀氏らは<sup>52)</sup>、生薬製剤を含む錠・散剤の調査を 3 年の間をおいて行なった結果、3 年前は  $10^4$  以上の生菌数を示すものが 3 品目、 $10^3 \sim 10^4$  が 8 品目と計 11 品目が認められたのに対し、3 年後ではやや減少の傾向がうかがえたが、大腸菌群の検出はやはり 2 品目に認

めている。

著者らが厚生省薬務局審査課と協同で実施した調査では、かぜ薬、解熱鎮痛剤、生薬、臓器、酵素製剤などの散剤、錠剤などを調べた<sup>53-61)</sup>。

昭和 52 年までに得られた細菌と、真菌の生菌数分布は表 5-1 と 5-2 に示すとおりである。生菌数は製造直後と室温に 1 カ月保存のものとの両者を調べた。

かぜ薬 39 点、解熱鎮痛剤 41 点、ビタミン剤 16 点の細菌数は、 $10^4$  以上は全く検出されず、その大部分が  $10^2$  以下であった。また 1 カ月保存のものでも増加の傾向は認められなかった。真菌数は全般に汚染試料は極めて少なく、 $10^3$  以上検出されたものはない。

1 カ月後に増菌の傾向もうかがえない。

酵素、生薬、臓器製剤は、それぞれの単剤または混合のもの、剤型としては散剤、錠剤のほか生薬製剤の中に煎剤が含まれている。

表 5-1. 内用固型剤：細菌試験

製品の種類 と総試料数	検査の時期と試 料採取後の日数	試料中の生菌数 (gあたり)						
		$<1.0 \times 10^2$	$1.0 \times 10^2$	$1.0 \times 10^3$	$1.0 \times 10^4$	$1.0 \times 10^5$	$1.0 \times 10^6$	$>1.0 \times 10^7$
			$\sim 1.0 \times 10^3$	$\sim 1.0 \times 10^4$	$\sim 1.0 \times 10^5$	$\sim 1.0 \times 10^6$	$\sim 1.0 \times 10^7$	
かぜ薬	直後	32	5	2				
39	1カ月後	33	4	2				
解熱鎮痛剤	直後	40	1					
41	1カ月後	40	1					
ビタミン剤	直後	13	3					
16	1カ月後	15	1					
酵素製剤	直後	3	10	2	1	0	1	
17	1カ月後	3	11	0	3	0	0	
生薬製剤 66	直後	11	20	11	4	7	8	5
(煎剤 8 を含む)	1カ月後	9	21	13	3	6	11	3
臓器製剤	直後	2	5	2	0			
9	1カ月後	2	4	2	1			
酵素・生薬製剤	直後	5	4	5	3	2	0	1
20	1カ月後	5	5	3	4	1	1	1
酵素・臓器製剤	直後	1	4	3	0			
8	1カ月後	0	5	2	1			
生薬・臓器製剤	直後	2	1	5	3	2		
13	1カ月後	2	0	5	4	2		
酵素・生薬・臓器	直後	0	0	1	0	0	2	
3	1カ月後	0	0	1	0	0	2	

細菌、真菌共に生薬製剤に汚染度が高く、細菌では、 $10^7$ 以上の試料が5/66(7.6%)もあった。全般には $10^2$ が20/66(30.3%)、 $10^3 \sim 10^4$ が15/66(22.7%)認められた。真菌は、細菌にくらべて全般に菌数は少ないが、それでも $10^3$ が4/58(6.9%)も認められた。臓器、酵素製剤は、生薬製剤に比べると全体に汚染は低くなる。生薬製剤の汚染度が高いために、酵素・生薬製剤では細菌を $10^7$ 以上認めた試料が1/20(5.0%)得られている。真菌では、生薬・臓器製剤に $10^3$ 以上のものが4/13(30.7%)認められているが、臓器製剤の細菌・真菌の汚染状況は、生薬製剤のそれと比べてかなり低いものであった。混合剤では、生薬製剤が入らなければ細菌では $10^5$ 以下、真菌では $10^2$ 以下が通常生菌数とみられた。

酵素製剤のうちには、原料に微生物を、特に真菌、酵母などを用いたものがあり、それらが生存している場合には生菌数が高くなるのでその点を考慮しなくてはならない。

検出菌種は表6に示すとおり、かぜ薬などではグラム陽性菌の *Bacillus* などが検出され、グラム陰性菌で検出された試料は認められていない。

酵素、生薬、臓器製剤ならびにそれらの混合剤では、やはり全体に *Bacillus*, *Micrococcus* が多く、特に生薬製剤からは広い範囲の種類が検出されている。なかでも、大腸菌群の陽性であった試料が数少ないが存在していた。また *Proteus* がグラム陰性菌のうちでは最も高頻度に検出されている。嫌気性菌もわずかに検出されているが種属の決定を行っていない。

検出真菌の種類は、錠剤、散剤としては一括して示していないが、表14-1,2(後述)の原料の検出状況から判るとおり、その菌種の主な構成は、*Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Paecilomyces*, *Scopulariopsis* など、および酵母であった。

#### 内用液剤(経口液剤)

経口液剤としては、各種の乳化懸濁液、シロップ、

表 5-2. 内用固型剤：真菌試験

製品の種類 と総試料数	検査の時期と試 料採取後の日数	真菌汚染の有無		試料中の生菌数 (g あたり)			
		非検出	検出	<10	10~10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup> ~10 <sup>3</sup>	>10 <sup>3</sup>
かぜ薬	直後	30	9	6	2	1	
39	1カ月後	35	4	3	1	0	
解熱鎮痛剤	直後	34	7	2	5		
41	1カ月後	32	9	9	0		
ビタミン剤	直後	9	7	4	0	3	
16	1カ月後	12	4	1	2	1	
酵素製剤	直後	6	11	7	2	1	1
17	1カ月後	9	8	3	4	0	1
生薬製剤	直後	18	40	15	17	4	4
58	1カ月後	23	35	14	7	11	3
生薬製剤 (煎剤)	直後	1	7	6	0	0	1
8	1カ月後	1	7	6	0	0	1
臓器製剤	直後	5	4	2	2		
9	1カ月後	5	4	2	2		
酵素・生薬製剤	直後	6	14	7	3	3	1
20	1カ月後	5	15	6	6	1	2
酵素・臓器製剤	直後	2	6	3	1	1	
8	1カ月後	2	6	2	2	1	
生薬・臓器製剤	直後	2	11	2	4	1	4
13	1カ月後	1	12	2	5	1	4
酵素・生薬・臓器 製剤 3	直後	0	3	1	1	0	1
	1カ月後	1	2	1	0	0	1

ドリンク剤など治療と栄養を目的に利用する製剤であるが、この中のシロップ、ドリンク剤などは糖濃度が高く高張液性で、かつ全般に pH が低いので細菌の生育には適当でないが、真菌類の生育には比較的良好とみられる。最近では、小児用のシロップ剤を除いては、内用液剤の利用は全般に減少している。

Brennan<sup>65)</sup> による内用液剤 400 バッチの調査では 46 バッチが微生物陽性で、このうち 43 バッチ (93.5%) は 10<sup>2</sup>/ml 以下で、残りの 3 バッチ (0.75%) は濃厚汚染しているものであったという。

Hirsch ら<sup>66)</sup> は、75 品目の内用液剤を調べたところシロップ剤に汚染が高いこと、Beveridge ら<sup>11)</sup> および Meghji<sup>12)</sup> の英国での調査では、検出生菌数の幅は 10~10<sup>3</sup>/ml で、そのほとんどが 10 個以下であると述べているが検出菌種の検討を行った結果、緑膿菌が陽性と認められた液剤は小児用の吐根 ipecacuanha 液、センナのシロップ液などのほかにペパーミント液

や色素液のアマラント、タートラジン液などであった(表7)。このほか、*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Leuconostoc* 様の細菌、*Staphylococcus* などの細菌群や、酵母のほか、*Penicillium* や *Cladosporium* などの真菌類が多数検出された。

わが国の成績では、横山は本剤 20 点中 7 点が 10<sup>2</sup>~10<sup>5</sup>/ml の微生物を含み、シロップまたはけん濁液では 14 点中 8 点が 10~10<sup>4</sup>/ml の汚染を認めている。

著者らが昭和 48 年に実施した内用液剤のシロップ剤とドリンク剤の調査結果では<sup>58)</sup> (表 8-1, 8-2), 細菌はドリンク剤の場合多くて 10<sup>3</sup>, ほとんどの検体は菌が検出されないが、陽性検体では 10<sup>2</sup> のものがほとんどを占めていた。真菌ではほとんどの検体が無菌に近いもので、検出されたものでも 10 個/ml 以下とみられる。シロップ剤は細菌に関していうと、1カ月後に菌数の減少を示す傾向が示唆されている。

表 6. 非無菌製剤から検出された細菌の種属

製剤別 細菌の属名	内 用 固 型 剤										内 用 液 剤		外 用 剤						計	
	かぜ薬	解熱鎮痛剤	ビタミン剤	酵素製剤	生薬製剤	臓器製剤	酵素・生薬製剤	酵素・臓器製剤	生薬・臓器製剤	酵素・生薬・臓器	シロップ剤	ドリンク剤	点眼剤	点鼻点耳剤	含嗽剤	親水軟膏	トローチ剤	洗腸剤		殺菌消毒剤
グラム陰性菌：																				
<i>Achromobacter</i>					1	1						1	1					1	1	6
<i>Acinetobacter</i>					1															1
<i>Aerobacter</i>											1	1	1							3
<i>Alcaligenes</i>					1									1						2
<i>Citrobacter</i>					7			1												8
<i>Enterobacter</i>					7		3			2										12
<i>Escherichia</i>					2															2
<i>Flavobacter</i>					11			1			3								2	17
<i>Klebsiella</i>					1			1												2
<i>Proteus</i>					10						4									14
<i>Pseudomonas</i>											1		3		1					5
<i>Serratia</i>					2		1	1			2		1							7
グラム陽性菌：																				
<i>Bacillus</i>	13	2	4	18	56	9	13	9	1	6	17	7	5	1	3	4	1	4	1	174
<i>Micrococcus</i>	3			2	5	2	2	2			3				1				2	22
<i>Sarcina</i>						1					1									2
その他																				
嫌気性菌					2						2									4
未同定好気性菌					2	2							1					2		7
分離菌株総数	16	2	4	22	108	13	19	15	1	9	35	9	11	0	1	5	4	2	9	3 288

<sup>1)</sup> 臨床診断試薬

\* 表中数値は分離菌株数を示す。

検出菌種として、多いのは *Bacillus*, *Micrococcus*, *Proteus* などであるが、シロップ剤からは *Pseudomonas*, *Serratia*, *Flavobacter* などが目立って認められている。食中毒菌の存在を懸念される成績は得られていない。また、真菌は殆ど検出されていないので species をここでは特にあげないで置く。

## 外 用 剤

外用の粉剤、液剤、軟膏とその類似薬剤などがこの中に含まれるが、いわゆる局所剤と称する手術時またはその後の本来無菌状態と考えられる体腔内に適用するもの、粘膜の表面、例えば眼、耳、鼻腔内や新生児の臍部および成人の尿道などをはじめとして、そのほ

か、創傷、火傷、潰瘍、腫瘍またはその他の炎症部位に適用される薬剤であるから、微生物の汚染に対しては特別な注意を必要とするものである。

### 1. 点眼ならびに点耳鼻剤

点眼剤は、その pH または浸透圧などを涙液のそれらに近い状態に調整するために緩衝液を用いている関係から微生物が生育し易く、そのために保存中にしばしば微生物が発生する。したがって従来の製造のほとんどに保存料が用いられている。最近、有機水銀化合物などの防菌防黴効力の高い殺菌剤が使用できなくなったために、代わるべき殺菌剤の開発が急がれている。前述したように、第九改正日局から点眼剤は無菌製剤に指定されているので、使用中の二次汚染防止が

表7. 主として内用液剤またはシロップなどの微生物汚染

薬 剤	生菌数/ml
Borax glycerin	<10
Chloral syrup	<10
Codeine phosphate syrup	6 : 30 × 10 <sup>3</sup> : 380
Compound thymol glycerine	<10 : 20
Liquid paraffin emulsion	100 : 300
Ephedrine elixir	<10
Pholcodine linctus	60 : 10 < 10
Solution for potassium bromide mixture	<10
Solution of sodium sulphate 25%	20 × 10 <sup>3</sup>
Squill opiate linctus	<10
Syrup	300 : 3 × 10 <sup>3</sup>

Sykes ら, 1977

表8-1. 内用液剤：細菌試験

製品の種類 と総試料数	検査の時期と試 料採取後の日数	細菌汚染の有無		試料中の生菌数 (g または ml あたり)		
		非検出	検出	<1.0 × 10 <sup>2</sup>	1.0 × 10 <sup>2</sup> ~ 1.0 × 10 <sup>3</sup>	>1.0 × 10 <sup>3</sup>
シロップ剤 63	直後	39	24	18	5	1
	1カ月後	53	10	8	1	1
ドリンク剤 30	直後	24	6	6		
	1カ月後	29	1	1		

表8-2. 内用液剤：真菌試験

製品の種類 と総試料数	検査の時期と試 料採取後の日数	真菌汚染の有無		試料中の生菌数 (g または ml あたり)	
		非検出	検出	<10	10 ~ 10 <sup>2</sup>
シロップ剤 63	直後	60	3	3	0
	1カ月後	60	3	2	1
ドリンク剤 30	直後	27	3	2	1
	1カ月後	30	0	0	0

研究課題の1つである。

点眼剤は、点耳鼻剤と共に調査したスウェーデンの成績では無菌ではなかったが、全般に汚染は極めて低い。これは1966年の時点における調査であって、最近では、石関らの調査では138検体中7検体(5.1%)に微生物の検出が認められ、その一部からは緑膿菌が検出されている。そのほとんどに殺菌剤が用いられているが、緑膿菌に対しては効果が少ないものとみられる。そのほか、青木<sup>67)</sup>、高橋ら<sup>67-69)</sup>の報告があるが、

調査した点眼剤の約35%は微生物が陽性試料であったといい、開封使用1週間では約50%以上の試料が汚染を受けること、フルオレセイン液のほか、アトロピン、テールカイン、チンクホなどから緑膿菌を検出している。

当部での調査は、先の石関、岩原らの調査について2回目であるが(表9-1, 9-2)、点眼剤の細菌は検出率3/60(5%)、真菌のそれは1/59(17%)と、ほとんど無菌に近いものであった。点耳鼻剤は現在一部の

表 9-1. 外用剤：細菌試験

製品の種類 と総試料数	検査の時期と試 料採取後の日数	細菌汚染の有無		試料中の生菌数 (g または ml あたり)				
		非検出	検出	$<1.0 \times 10^2$	$1.0 \times 10^2$ ~ $1.0 \times 10^3$	$1.0 \times 10^3$ ~ $1.0 \times 10^4$	$1.0 \times 10^4$ ~ $1.0 \times 10^5$	$1.0 \times 10^5$ ~ $1.0 \times 10^6$
点眼剤	直後	59	3	3	0	0		
62	1カ月後	57	5	4	0	1		
点鼻点耳剤	直後	14	0					
14	1カ月後	14	0					
含嗽剤	直後	15	1	15	1			
16	1カ月後	15	1	15	1			
親水性軟膏	直後	18	2	18	1	0	1	0
20	1カ月後	18	2	18	0	1	0	1
トローチ剤	直後	10	4	10	4	0	0	
14	1カ月後	10	4	10	3	0	1	
浣腸剤	直後	11	2	13				
13	1カ月後	11	2	13				
殺菌消毒剤	直後	20	6	20	2	1	2	1
26	1カ月後	20	6	20	2	0	3	1
X線造影剤*	直後	11	2	2				
13	1カ月後	13	0	0				

\* 臨床検査用試薬 (内用)

試験を実施中であるが、私共の用いた試料からは菌が検出されていない。点眼剤の細菌陽性サンプルから *Pseudomonas*, *Serratia* などが分離されたが、緑膿菌の検出されたものはなかった。

### 2. 浣腸剤

浣腸剤の微生物調査成績は、今までに報告がないと思われる。著者らが<sup>60)</sup>、昭和50年に12点を採集して行った成績を表9-1, 9-2に示す。

細菌はすべての試料から検出されたが、その大部分が $10^2$ 以下と少なく、真菌は唯の1試料が陽性であったに過ぎない。細菌の種類(表6)をみても、問題とする菌種は分離されていない。

### 3. トローチおよび含嗽剤

これらも、今までに調査された成績がない。

著者らがトローチ剤14点、含嗽剤18点を昭和50年に調査した結果では(表9-1, 9-2)、両剤ともに細菌、真菌の検出はそれぞれ $10^2$ 以下または10個以下で、汚染度は極めて低いものと認められた。検出細菌もグラム陽性菌の *Bacillus* を主体とするものであった(表6)。

### 4. 軟膏剤とその他の半固型外用剤

眼軟膏剤はもともと水分含量が少なく、かつ殺菌剤や抗生物質などが添加されているもので、製造業者の微生物汚染に対する認識は極めて低いものであった。Kallings が1966年に調査した当時は78%の汚染率を示し、*Pseudomonas* 陽性のものがほとんどで、その陽性試料の50%からg当たり2000個以上の生菌を検出している(表10-1, 10-2, 10-3)。

Van der Wyk & Grauston<sup>69)</sup> は、83品日中に菌の検出されなかったのは12品目(14.5%)であったといい、またBowman & Holdowsky<sup>70-71)</sup> は抗生物質添加眼軟膏の10メーカー、19バッチ、46試料を検査したところ汚染率は10%と低く、10年後に再び調査した結果では114点中7点で汚染率は6.1%と低下していることを明らかにしている。

著者らは、眼軟膏剤に関しては現在試験法の検討を行っている段階であり、その調査結果を公表できるまでまとまっていない。

眼以外の耳鼻科、皮膚科領域に適用される、いわゆる局所剤や、広い意味ではパスター、薬用クリーム、ローションなどを含めた大規模な調査報告がある。

表 9-2. 外用剤：真菌試験

製品の種類 と総試料数	検査の時期と試 料採取後の日数	真菌汚染の有無		試料中の生菌数 (g または ml あたり)		
		非検出	検出	<10	10~10 <sup>2</sup>	10~10 <sup>3</sup>
点眼剤	直後	50	1	1		
60	1ヵ月後	60	0	0		
点鼻点耳剤	直後	14	0			
14	1ヵ月後	14	0			
含嗽剤	直後	18	0	0		
18	1ヵ月後	17	1	1		
親水軟膏	直後	20	0	0	0	
20	1ヵ月後	17	3	2	1	
トローチ剤	直後	13	1	1		
14	1ヵ月後	14	0	0		
浣腸剤	直後	12	1	0	1	
13	1ヵ月後	11	2	1	1	
殺菌消毒剤	直後	26	0	0	0	
26	1ヵ月後	25	1	0	1	
X線造影剤*	直後	13	0			
13	1ヵ月後	13	0			

\* 臨床検査用試薬 (内用)

Harman<sup>72)</sup> の報告によれば病院薬局に在庫の 56 種の軟膏から, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Sarcina*, *Paracolonbacterium*, *Aerobacter* などの細菌や, *Hormodendron*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Scopulariopsis*, *Paecilomyces* などの真菌を多数検出している。以上の報告によれば, 抗生物質が配合されていると否とにかかわらず全般に油脂性軟膏のほうが親水性のものより汚染がかなり少ないという傾向が明らかである。

1973 年, Wargo<sup>73)</sup> は 180 点の軟膏剤を試験したが, 開封前のものが 11% 汚染をうけ, 病院内で使用中の製剤は 93% という驚くほど高率の汚染が認められると述べている。汚染菌種はグラム陽性の Cocci と Diplococci が大部分で, グラム陰性の桿菌は菌数は少なかったが全試料から検出された。

Berezovskaya<sup>74)</sup> によるソ連の医薬品の微生物汚染についての総説によると, 軟膏 849 点のうち病原菌は 7.6%, 非病原菌が 9.5% の試料に検出された旨を報告している。それらの微生物の構成種は黄色ブドウ球菌, 緑膿菌, 八連球菌のほか多種類の酵母類などであったとしている。

このほか, 軟膏基材に用いられているワセリン, カ

ーボワックス, 豚脂, ラノリンなどの微生物汚染を調査した報告も行われている。

高野<sup>75)</sup> は製剤の微生物汚染に関する広範な総説を述べ, 軟膏剤に適用する防腐剤は微生物を一時に急速に死滅させるにたる十分な濃度を用いなければ, かえって微生物の増殖に利用される旨を指摘している。

軟膏剤の多くは油脂類を含むものであるから, まだ生菌数測定技術の満足な方法が確立されていない。したがって著者らの調査では<sup>60)</sup>, 親水性軟膏 20 点についてだけの調査が終っている (表 9-1, 9-2)。

親水性軟膏の全試料から細菌が検出されたのに対して真菌は全く検出されなかったが, 一ヵ月保存の 3 試料からのみ真菌が検出されている。

生菌数は 10<sup>4</sup> 程度の汚染検体が 2, 3 認められるに過ぎなかった。検出菌種を検討した結果では, 特に注意を払うべき種類は見当たっていない。

以上の軟膏剤の基材に用いられている動植物性の油脂, 鉱物油, パラフィン, ワセリンなどはそれ自身に抗菌性のある物質もあるといわれているが, 微生物にとってはむしろ良好な栄養源となるものも多く微生物によって汚染され易い<sup>76-80)</sup>。局所剤の目的としては, 無菌的な製造が可能ならば, 特に眼軟膏などは<sup>81-82)</sup>,

表 10-1. 眼剤の微生物汚染の状況

	調査検体数	生菌数/g			検出微生物の種類
		<1	1~10	10~100	
眼軟膏	28	17	6	5	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus albus</i>
Lamella	2	1	1	5	<i>Alcaligenes</i> に属する桿菌 (1検体)
眼洗浄液	4	1	2	1	<i>Bacillus subtilis</i>
計	34	19	9	6	<i>S. albus</i> , <i>Rhodotorula minuta</i> (1検体), <i>Candida guilliermondii</i>
			15		
点眼薬	20	20			

Kallings ら, 1966

表 10-2. 点耳鼻剤の微生物汚染の状況

製剤	調査検体数	生菌数/g					検出微生物の種類
		<1	1~10	10~10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup> ~10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup> ~10 <sup>4</sup>	
点耳剤	5	4	1	0	0	0	真菌
点鼻剤	15	10	4	0	0	1	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus albus</i>
鼻軟膏	2	1	1	1	0	0	<i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i>
計	22	15	6	1	0	1	

Kallings ら, 1966

表 10-3. 局所製剤ならびに化粧品などを汚染する微生物の種類とその検出菌数

汚染菌	検出率 (%)	検出菌数/g
<i>Pseudomonas</i>	3.6	3,800~160,000
その他のグラム陰性桿菌	7.7	100~99,000
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	検出されず
その他のグラム陽性球菌	1.2	100~44,000
グラム陽性桿菌	9.5	370~18,000
酵母	1.2	14,000
カビ類	1.2	300

Dunnigan &amp; Evans, 1970

その方向にもって行くべきであるが、現在、まだ技術的な障害があって実施されていない(表 11)。

軟膏剤の類似品として薬用クリーム、ローションや外用粉剤として薬用パウダーまたはベビーパウダーなども、時に高度に微生物汚染をうけた製品が報告され、汚染菌種も枯草菌、ブドウ球菌、大腸菌、その他の腸内細菌群、緑膿菌、*Candida*, *Torulopsis*, *Absidia* などの真菌類など極めて多彩である。

FDA の調査でも、緑膿菌が 300 万個/g も検出された例があり<sup>83-85)</sup>、このほか、レンサ球菌、肺炎菌などの病原菌が検出され、再々回収措置がとられている点は注目すべきである。

軟膏類は局所剤の中でも微生物汚染の問題は比較的重視されているにもかかわらず、わが国での調査はほとんど行われていない。方法論の確立に関する研究を進めて汚染の実態を早急に把握する必要がある。

##### 5. 殺菌・消毒剤

消毒、殺菌剤、保存料などは、本来微生物を殺滅、またはその生育を抑制する目的で用いられる製剤であるから、微生物汚染とは無関係と思われ勝ちであるが、実際には前述したようにこれらが病原菌に汚染されていて、眼科、泌尿器科領域などで感染源になることがある。

表 11. 軟膏剤, クリームなどの微生物汚染

	検体数	生菌数が 1 万個/g 以上の検 体数	2 週間後の調査 (生菌数/g)		
			<500	500~ 10,000	>100,000
Aqueous cream	2	0	1	0	1
PT cream	1	0	0	0	1
Oily cream	1	0	0	1	0
Silicone cream	2	1	1	1	0
Hand cream	2	2	1	1	0
Hibitane obstetric cream	2	0	0	2	0
Compound malic acid cream	2	0	2	0	0
Betnovate	3	0	3	0	0
Betnovate 1/4 strength	2	0	2	0	0
Synalar	1	0	1	0	0
Synalar 1/2 strength	4	0	3	1	0
Hydrocortisone in imulsifying ointment	2	0	0	2	0
Hydrocortisone in ointment of wool alcohol	1	1	0	0	1
Siopel	4	0	3	2	0
E45	2	0	0	2	0
計	31	5	17	11	3

Colindale, 1971

これは原液の汚染というより、誤った使用法、例えば使用濃度、回数、長期保存などによって汚染の動機が与えられる場合が多い。病原菌が原液から由来したのか、第 2 次汚染なのかを正確に把握することは難しい。

現在、使用されているヘキサクロロフェン、クロールヘキシジン、およびそのほかのフェノール系殺菌剤やこれを主剤とする消毒剤が、各種薬剤に抵抗力の強い緑膿菌や *Klebsiella* などに汚染されたために感染が起り死亡したという事故が現実にある以上、これに対する警戒と細心の注意を払うべきである。特にグラム陰性の桿菌の汚染に対して適当な防止策を講ずるよう望みたい。

著者らが、昭和 52 年度に市販の殺菌・消毒剤 26 点について微生物の検出を試みたところ、表 9-1, 9-2 に示すようにほとんどの製品から細菌が検出され、多いものでは  $10^4 \sim 10^9/\text{ml}$  が検出された。真菌は採取直後のものはすべて陰性であったが、1 カ月保存のもの 1 検体に  $10$  個/ $\text{ml}$  が検出された。細菌の種類は *Achromobacter*, *Flavobacter*, *Bacillus* などが検出されたが、病原菌による汚染試料はなかった。

内用の抗生物質製剤は一般に無菌製剤と思われているが、実際には White (1968)<sup>86)</sup> らの調査によると、

抗真菌剤のあるものではかなり高度の細菌汚染を認めたと (表 12)。これらは、乳糖などの賦形剤に由来するものと考えられる。実態はどのようであるか、著者らは調査していないので不明である。内服用の製剤は他の一般製剤と同様に考えるべきであろう。

#### 6. 臨床診断用薬剤

前述したとおり各種の臨床診断試薬の緑膿菌の汚染により菌血症や敗血症の発生を起したり、*Klebsiella* の汚染で肺炎にかかる者が出るという事故報告から、この領域の薬剤に対する規制も考えなければならない。

著者らは<sup>86)</sup>、この種の薬剤としては経口的に用いられる X 線造影剤の 13 点について調査した。表 9-1, 9-2 に示すように、細菌はそのほとんどが  $10^2$  以下、真菌は全く検出されなかった。検出細菌も病原菌の検出はなく、僅かに腐敗細菌が検出されただけであった。

この成績から後述するように内用の X 線造影剤に対する微生物基準が設定された。

そのほかの診断薬についても、早い時期に調査し実態をつかんでおきたいと考えている。

#### 7. 製薬原料の汚染

医薬品の原料は無機、有機化合物にまたがって、そ

表 12. 抗生物質製剤（非無菌性）中の微生物の汚染状況

抗 生 物 質	細 菌 数/g	真 菌 数/g
抗 真 菌 剤 A	$6.7 \times 10^4$	ND
B	400	ND
C	200	ND
D	80	15
E (旧製造法)	$9.4 \times 10^6$	2
E ( // )	$1.0 \times 10^6$	ND
E (新製造法)	$3.0 \times 10^3$	ND
E ( // )	$2.0 \times 10^3$	ND
抗 細 菌 剤		
ナ フ シ リ ン	ND	ND
パ シ ト ラ シ ン	ND	ND
ネ オ マ イ シ ン	18	ND
パ シ ト ラ シ ン	2	38
ベ ニ シ リ ン	12	ND
チ ロ ス リ シ ン	ND	3

ND-検出されず.

White ら, 1968

表 13-1. 医薬品原料：細菌試験

原料の種類 総試料数	試料中の g または ml 当りの菌数					
	$<10 \times 10^2$	$1.0 \times 10^2$ ~ $1.0 \times 10^3$	$1.0 \times 10^3$ ~ $1.0 \times 10^4$	$1.0 \times 10^4$ ~ $1.0 \times 10^5$	$1.0 \times 10^5$ ~ $1.0 \times 10^6$	$>1.0 \times 10^6$
酵素原料						
32	8	7	8	4	2	3
生薬原料						
79	12	7	26	15	10	9
臓器原料						
15	8	4	3	0	0	0
一般原料 (48 品目)						
153	118	26	8	1	0	0

\* 表中数値は試料件数を示す.

の種類は極めて広範である。その中には動植物由来の天然物もあり、食品とその素材に関しては何等変るところがないものも含まれる。

各種剤型別の製剤の項の如く既にふれたが、無機原料では一般に  $10^2/g$  前後の汚染が認められるが、有機物質では、例えばデンプン、白糖、乳糖、ブドウ糖、生薬エキス、油脂などは全般に汚染度が高く、 $10^3/g$  程度が普通に認められる。特に動物臓器または植物性の原料は  $10^5 \sim 10^6/g$  と汚染が高率に認められる (表 13-1, 13-2)。

表 13-2. 医薬品の植物性生薬原料：真菌試験

総試料数	真菌検出試料数			
	$<10$	$10 \sim 10^2$	$10^2 \sim 10^3$	$>10^3$ *
70	10	7	13	40

\* 生菌数/g

酵素製剤などもホルモン製剤のようになるべく熱をかけたくない製剤なので、微生物汚染の少ない原料の

使用が望ましい。生薬類でも煎剤などは、必ず長時間加熱するから微生物の存在は余り気にする必要はないが、煎剤以外として利用するものでは、食中毒菌の汚染を予防する措置が当然必要となると思われる。これは、すべての経口薬について無視できぬ問題である。

製造に用いる用水も汚染源の1つであるから、これも上水道の規格にあわせた微生物学的なチェックを厳重に実施することが必要である。

今までに製薬原料の微生物調査を広範囲に行った報告はそう多くはなく、先に述べたデンマークやイギリス<sup>8)</sup>、オーストラリア<sup>63)</sup>およびドイツ<sup>87)</sup>での調査が代表的な業績と考えられる。これらの成績を通覧すると、やはり天然物原料はタルク、カオリンなどに土壌由来の多量の微生物の存在が証明されている。

著者らは<sup>58-61)</sup>、完成品の調査に並行して酵素、生薬、臓器製剤の原料と、その他の一般の薬剤の原料、賦形剤について、細菌および真菌の生菌数、また真菌は検出菌種の検討を行った。

生薬、酵素原料は $10^6$ 以上の細菌数を含む試料がみられたが、臓器原料および一般の原料はほとんどが

$10^4$ 以下であった。

調査原料中、細菌が $10^3$ 以上汚染しているものは次の品目であった。

① 酵素原料：12品目。

② 生薬原料：ダイオウ、タクシヤ、ボタンビ、当归、蒼朮、芍薬、柴胡、茯苓、甘草、山梔子、薄荷、センナ末、松葉末、オーレン、オウゴン末、人參、オオバク、ケイヒ末、ボレイ、キキョウ末、セネガ末、白朮末、山梔末、忍冬末、ニガキ、ウイキョウ、カン皮末、肉ズク末、セン骨、香附子、楨榔子、防風、エンゴサク、乾姜、小茴香、ゲンノショウコなど。

③ 臓器原料：肝臓末、動物の胆、心臓エキス、肝臓心臓エキス、肝臓水解物、ゼラチンなど。

④ 一般原料：ビタミン、タルク、チタン、デンプン、アラビヤゴムなど。

植物性生薬原料の真菌検出状況は、表14-2のとおりで $10^3$ を越えるものが30/70(42.8%)であった。

植物性生薬原料以外の原料の真菌の検出数は表14-1に示す。

表 14-1. 医薬品原料の真菌による汚染

品目(生菌数)*	主要汚染真菌
アラビアゴム末 (<10→10 <sup>2</sup> )	<i>Aspergillus</i> ( <i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i> , etc.), <i>Chaetomium</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Eurotium</i> , <i>Paecilomyces</i> , <i>Phoma</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Trichoderma</i> , Yeasts
塩化リゾチーム (10 <sup>2</sup> )	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Penicillium</i> sp., etc.
カルボキシメチルセルロース, セルロース (<10)	<i>Aspergillus</i> ( <i>A. flavus</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. spp.</i> ), <i>Chaetomium globosum</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Epicoccum</i> , <i>Eurotium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Memnoniella echinata</i> , <i>Myxotrichum</i> , <i>Paecilomyces</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Phoma</i> , <i>Stachybotrys atra</i> , Yeasts, etc.
乾燥酵母 (>10 <sup>3</sup> )	<i>Aspergillus</i> ( <i>A. flavus</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. restrictus</i> ), <i>Eurotium</i> , <i>Penicillium</i> ( <i>P. viridicatum</i> , <i>P. sp.</i> ), <i>Mucor</i> , <i>Scopulariopsis</i> ( <i>S. brevicaulis</i> )
ケイ酸アルミニウム, 合成 (<10)	<i>Penicillium</i> ( <i>P. citreo-viride</i> , <i>P. frequentans</i> , <i>P. rugulosum</i> )
結晶セルロース (<10) カルボキシメチルセルロースの項を参照	
酸化チタン (<10→10)	<i>Penicillium</i>

表 14-1. Continued

ジアスターゼ, アミラーゼ (<10→10)

*Alternaria*, *Penicillium* (*P. citreo-viride*, *P. frequentans*, *P. puberulum*, *P. purpurogenum*,  
*P. roquefortii*, *P. viridicatum*, *P. sp.*, etc.)

脂肪消化酵素剤 (<10→10<sup>3</sup>)

*Aspergillus* (*A. flavus*), *Cladosporium*, *Mucor*, *Penicillium* (*P. citreo-viride*), etc.

消化酵素剤 (複合) (10→>10<sup>3</sup>)

*Alternaria*, *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. sydowii*, *A. versicolor*), *Cladosporium*, *Geotrichum*, *Mucor*,  
*Penicillium* (*P. citrinum*, *P. spp.*), *Phoma*, *Scopulariopsis* (*S. brevicaulis*, *S. candidus*),  
*Syncephalastrum*, *Ulocladium*, Yeasts

ステアリン酸マグネシウム (<10→10)

*Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Penicillium*, etc.

ゼラチン (<10)

*Cladosporium*, *Penicillium* (*P. citreo-viride*)

タルク (<10→>10<sup>3</sup>)

*Aspergillus* (*A. candidus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. versicolor*), *Chaetomium* (*C. globosum*, *C.*  
*spp.*), *Chrysosporium*, *Cladosporium*, *Doratomyces*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Penicillium* (*P.*  
*cyclopium*, *P. notatum*, *P. roquefortii*, *P. spp.*), *Phialophora*, *Rhizopus*, *Scopulariopsis*,  
*Stachybotrys*, *Trichoderma*, *Tritirachium*, *Wallemia*, etc.

タンパク分解酵素剤 (10→10<sup>2</sup>)

*Arthrinium*, *Aspergillus versicolor*, *Cladosporium*, *Eurotium*, *Mucor*, *Trichoderma*

沈降炭酸カルシウム (<10)

*Aspergillus*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Penicillium*

デンプン, コムギデンプン, トウモロコシデンプン, パレイショデンプン (<10→>10<sup>3</sup>)

*Acremonium*, *Aspergillus* (*A. candidus*, *A. fumigatus*, *A. versicolor*, etc.), *Candida*,  
*Cladosporium*, *Mucor*, *Paecilomyces variotii*, *Penicillium* (*P. roquefortii*, *P. spp.*),  
*Pseudeurotium*, *Rhizopus*, *Scopulariopsis*, *Trichoderma*, *Trichocladium*, Yeasts, etc.

動物臓器末, 動物臓器エキス末 (<10→>10<sup>3</sup>)

*Cladosporium*, *Penicillium*, *Trichoderma*, Yeasts

乳糖 (<10)

*Aspergillus versicolor*, *Paecilomyces variotii*, Yeasts

ハチミツ (<10→>10<sup>3</sup>)

*Aspergillus niger*, Yeasts

パンクレアチン (<10→10)

*Aspergillus versicolor*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Eurotium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, etc.

ペクチン (<10)

*Penicillium*

マクロゴール (ポリエチレングリコール) (<10)

*Cladosporium*

\* g または ml 中の真菌数

表 14-2. 主として生薬原料の真菌による汚染

品目	主要汚染真菌*1
ウイキョウ*2	<i>Aspergillus</i> ( <i>A. fumigatus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. restrictus</i> , <i>A. sydowii</i> , <i>A. versicolor</i> ), <i>Eurotium</i> , <i>Paecilomyces</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Rhizopus</i>
エイジツ	<i>Aspergillus</i> ( <i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. ochraceus</i> ), <i>Mucor</i> , <i>Paecilomyces</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Syncephalastrum</i>
エンゴサク	<i>Aspergillus</i> ( <i>A. candidus</i> , <i>A. versicolor</i> ), <i>Cladosporium</i> , <i>Eurotium</i> , <i>Mucor</i> , <i>Penicillium</i> , Yeasts, etc.
オウゴン	<i>Absidia</i> , <i>Aspergillus</i> ( <i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. spp.</i> ), <i>Mucor</i> , <i>Penicillium</i> ( <i>P. cyclopium</i> , <i>P. spp.</i> ), <i>Rhizopus</i> , <i>Trichoderma</i>
オウバク	<i>Aspergillus</i> ( <i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. tamarii</i> , <i>A. versicolor</i> ), <i>Eurotium</i> , <i>Mucor</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Ulocladium</i>
オウレン	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Chaetomium</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Eurotium</i> , <i>Mucor</i> , <i>Penicillium</i> ( <i>P. cyclopium</i> , <i>P. spp.</i> ), <i>Rhizopus</i>
乾シヨウキョウ*2	<i>Aspergillus</i> ( <i>A. candidus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. versicolor</i> ), <i>Paecilomyces</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Trichoderma</i>
カンゾウ	<i>Aspergillus</i> ( <i>A. candidus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. tamarii</i> , <i>A. terreus</i> , <i>A. versicolor</i> ), <i>Chaetomium</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Emericella nidulans</i> , <i>Eurotium</i> , <i>Mucor</i> , <i>Paecilomyces</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Syncephalastrum</i> , <i>Talaromyces flavus</i> , <i>Trichoderma</i> , Yeasts
カン皮	<i>Mucor</i>
キキョウ	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Mucor</i> , <i>Rhizopus</i>
ケイヒ	<i>Absidia</i> , <i>Aspergillus</i> ( <i>A. niger</i> , <i>A. restrictus</i> , <i>A. terreus</i> ), <i>Chaetomium</i> , <i>Eurotium</i> , <i>Paecilomyces</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Syncephalastrum</i>
ゲンノシヨウコ*2	<i>Aspergillus</i> ( <i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i> ), <i>Penicillium</i> , <i>Rhizopus</i>
コウブシ	<i>Aspergillus</i> ( <i>A. fumigatus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. spp.</i> ), <i>Drechslera</i> , <i>Paecilomyces</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Syncephalastrum</i>
ゴレイ*2	<i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>Penicillium</i>
サイコ	<i>Rhizopus</i>

表 14-2. Continued

## サイシン

*Aspergillus* (*A. flavus*, *A. niger*, *A. sydowii*), *Eurotium*, *Paecilomyces variotii*, *Penicillium* (*P. rugulosum*, *P. sp.*), *Rhizopus*

## サンキライ

*Aspergillus* (*A. candidus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. ochraceus*), *Eurotium*, *Paecilomyces lilacinus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Syncephalastrum*

## サンシン\*2

*Chaetomium*

## サンシュユ

*Absidia*, *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. niger*, *A. versicolor*, *A. sp.*), *Chaetomium*, *Emericella*, *Eurotium*, *Rhizopus*, *Scopulariopsis*, *Trichoderma*

## ジャクヤク

*Aspergillus* (*A. niger*, *A. tamarii*), *Eurotium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus*

## センコツ

*Aspergillus niger*, *Chaetomium*, *Eupenicillium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus*

## センナ

*Aspergillus* (*A. versicolor*, *A. spp.*), *Cladosporium*, *Eurotium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus*

## ソウジュツ

*Aspergillus* (*A. flavus*, *A. niger*), *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Eurotium*, *Penicillium*, *Rhizopus*

## ダイオウ

*Aspergillus* (*A. candidus*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. restrictus*, *A. versicolor*), *Eurotium*, *Mucor*, *Penicillium* (*P. cyclopium*, *P. martensii*, *P. spp.*), *Rhizopus*, *Syncephalastrum*

## チンピ

*Aspergillus ochraceus*, *Mucor*, *Rhizopus*, etc.

## トウキ

*Aspergillus* (*A. flavus*, *A. niger*), *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Phoma*

## ニガキ

*Neurospora*, *Rhizopus*

## ニクズク

*Aspergillus niger*, *Mucor*

## ハツカ

*Aspergillus* (*A. niger*, *A. terreus*, *A. versicolor*), *Chaetomium*, *Eurotium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Trichoderma*

## ビヤクジュツ

*Aspergillus* (*A. flavus*, *A. niger*), *Emericella nidulans*, *Eurotium*, *Mucor*, *Penicillium* (*P. cyclopium*, *P. spp.*), *Rhizopus*, *Ulocladium*

## ビンロウジ

*Aspergillus* (*A. flavus*, *A. niger*), *Rhizopus*

## ブクリョウ\*2

*Aspergillus niger*

表 14-2. Continued

ボウフウ

*Aspergillus niger, Mucor, Rhizopus*

ポタンビ

*Absidia, Aspergillus (A. flavus, A. fumigatus, A. niger, A. sydowii), Chaetomium, Emericella, Eurotium, Mucor, Paecilomyces, Rhizopus, Syncephalastrum*

ボレイ

*Aspergillus candidus, Mucor, Penicillium*

コクイニン\*2

*Penicillium*

リュウキョウ\*2

*Aspergillus (A. candidus, A. niger, A. versicolor), Chaetomium, Cladosporium, Eurotium, Paecilomyces, Penicillium, Yeasts*

\*1 生薬原料は多くの場合、真菌生菌数 10<sup>3</sup>/g 以上を示し、特に粉末生薬について菌量が多い傾向がみられる。

\*2 汚染量の比較的低い品目。

全般に *Penicillium, Aspergillus* のほかに、*Cladosporium, Phoma, Rhizopus* などが普遍的に検出されている。アラビヤゴム末、セルローズ、消化酵素剤(複合)、デンプン類、タルクからは極めて多種類の真菌が検出されている。タルクでは明らかに *Trichoderma, Chaetomium* など土壌菌が多く検出されているのが特徴である。生薬原料の真菌検出で最も注目すべきことは、全般に *Aspergillus flavus* の検出率が高いことである。アフラトキシン汚染の有無について化学的な検定を行う必要がある。

#### 特定菌の汚染とその意義

医薬品の原料ならびに製剤が多くの微生物を包含しているという意味はどのように解釈すべきであろうか。無菌製剤は論外であるが、非無菌製剤については微生物の存在がどの程度許されるのかを判断することは難しい。なるべく微生物の存在を許さないという考え方では意見の一致を得るが、どの位の生菌数、またどのような種類の菌種の検出が不適であるかの明確な基準を設定するのは、安易に考えるわけにはいかない。

汚染菌数が異常に多いということは、衛生学的には次の2点が考えられる。その1つは病原微生物の存在する確率が高いという危険性が予測できる。今1つはその製剤の原料が不良のものであったか、またはそれらが衛生的な環境下でつくられたものではないとする

判断である。前者については、製造工程中の取扱いのミスによる第2次汚染を受けた場合は総菌数は必ずしも多くないことがある。後者については、業者が改めて製造衛生を改善したときに製品の汚染菌数が著明に減少したという経験がよく述べられている。

微生物基準設定の基本方針は、生菌数に関しては許される限りの手段で菌数をおさえるが、例えば動植物原料を主体する製剤などは、むしろ菌数よりもその中に包含される微生物の菌種で規制するという考えで、いわば二本立で行くべきであろう。

後述する各国の規制の動きをみても、この基本線にしたがって進行している。

菌数は、その製剤の常在菌数を詳細に、かつロングランで調べ、その平均的な数量を知って決めることがよいわけで、これは業者の自社試験によって、自社の製品の菌数限度は自主的に決めることもできる。

今日、問題になるのは検出されてはならない菌の種類をどう決めるかである。

近年、感染学の領域で常に論議の中心になっているのは病原菌と非病原菌の位置づけの問題である。特に、伝染病病原菌と指定されている菌種は考慮の余地はないが、最近いわゆる日和見感染 opportunistic infection の起因为菌が数多く知られ、その重要性のランクは専門家の間でも統一的な見解を欠いている現状である。屢々、この総説でもとりあげられている緑膿菌、セラチアなど、いわゆるグラム陰性桿菌に属す

表 15. 各国における特定菌の選定概況

国 別	ス ウ エ ー デン	チ ニ コ	ス イ ス	ア メ リ カ	ベル ギー	デン マ ーク	西 ド イ ツ	日 本	W H O
用 途 別	M	M	T O	T O	M	T O	T O	T O	T O
Pathogenic bacteria		○			○				
Enterobacteriaceae		○	○ ○	○					
Coliform	○		○					○ ○	○
<i>Escherichia coli</i>				○ ○		○ ○	○ ○		
<i>Klebsiella</i>				○					
<i>Salmonella</i>	○		○	○ ○		○	○ ○	○	○
<i>Shigella</i>			○						
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	○		○ ○	○ ○		○	○	○ ○	○ ○
<i>P. maltophilia</i>				○					
<i>P. multivorans</i>				○					
<i>P. putida</i>				○					
<i>Proteus</i>				○				○	
<i>Acinetobacter anitratum</i>				○					
<i>Serratia marcescens</i>				○					
<i>Bacillus cereus</i>									○
<i>Staphylococcus aureus</i>	○		○ ○	○		○	○	○ ○	○ ○
<i>S. aureus</i> (enterotoxigenic)				○					
<i>Clostridium</i> (proteolytic)				○					
<i>Clostridium botulinum</i>									○
<i>C. perfringens</i>									○
<i>Candida albicans</i>				○					
Molds (mycotoxin 生産菌)				○					

M：医薬品として示されているもの，T：外用薬（化粧品も含む），O：経口薬

る細菌も、日和見感染を起因する平素無害菌または通性病原体 opportunistic pathogen といわれるもので、真菌の *Candida*, *Aspergillus*, *Trichophyton* (白癬菌) などは、このカテゴリーに入れられるものである。特定菌として規制するならば、経口薬ならば当然食中毒菌もこの中に入れねばならぬ。どの位のものを指定するかは、専門家や国によっても異なってくるのは止むを得ないが(表 15)、およその基本的なものは現在考え方がまとまりつつある。それは、伝染病原菌は既に薬事法に決められているので特に指定しないが、これ以外の菌では緑膿菌、ブドウ球菌や肺炎菌、*Klebsiella* などのグラム陰性菌群と、そのほかのグラム陽性菌がある。

特定菌の設定に関し、基本的な考え方を FDA の Bruch<sup>15)</sup> が提案している。それは次のとおりである。

#### (1) 経口剤

##### A 常に好ましくない菌種

1. *Salmonella* sp.
2. *Escherichia coli*

##### B 時によって好ましくない菌種

1. *Enterobacter* sp.
2. *Pseudomonas* sp.
3. *Staphylococcus aureus* (外毒素産生性)
4. *Clostridium* sp. (たん白分解性)
5. マイコトキシン生産カビ
6. *Candida albicans*

#### (2) 局所製剤

##### 1. 耳鼻および呼吸器領域に適用する製剤

- (1) *Pseudomonas aeruginosa*, *P. putida*, *P. multivorans*, *P. maltophilia*, (2) *Serratia marcescens*, (3) *Escherichia coli*, *Proteus* sp., (4)

*Enterobacter* sp., *Klebsiella*, (5) *Staphylococcus aureus*, (6) *Candida albicans*

## 2. 眼に適用する製剤

(1) 常に好ましくない菌種: *Pseudomonas aeruginosa*

(2) 時に好ましくない菌種: その他の *Pseudomonas*, *Staphylococcus aureus*

## 3. 泌尿, 生殖器官に適用する製剤

(1) 常に好ましくない菌種: *Escherichia coli*, *Pseudomonas mirabilis*, *P. aeruginosa*, *P. multivorans*, *Serratia marcescens*

(2) 時に好ましくない菌種: *Klebsiella* sp., *Acinetobacter anitratum*

## 4. 皮膚適用の製剤 (特に新生児用)

(1) 常に好ましくない菌種: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella* sp.

(2) 時に好ましくない菌種: *Pseudomonas multivorans*, *P. putida*, *Clostridium perfringens*, *C. tetani*, *C. novyi*

著者らも、以上の考え方に異議をとなえる必要はないと考える。特定菌も薬剤の適用性の違いによって変わることは当然であるし、感染学の発展にしたがって将来対象菌が変わってくることは予想できる。

現在、先進国においてはかなり多種類の特定菌を規制する考え方で進んでいるようであるが(表 15)、他の国々が、また製薬メーカーが直ちにこれを取り入れようとしても、微生物学的な技術がこれに伴わないし、また余り意味のない特定菌を決めても、実質的な効果がなくては無駄なことになる。わが国でも製薬界における微生物学的レベルの向上を着実に図ることが現在の課題といえることができる。

## 医薬品の微生物学的規制への動向

最近 10 数年間の諸外国における医薬品の微生物学的規制の推移は、Krüger<sup>21)</sup> の綜説に示されている事項を岩原<sup>89)</sup> が紹介している。詳細は省略するが、米国は 1962 年に欧州諸国に先がけて、食品、薬品、化粧品法の改正中に GMP の思想を織込んでいるが、翌 1964 年には点眼剤ならびにその容器の無菌性を打ち出し、実施に踏み切っている。それから 5 年後の 1969 年には、特定の製剤に対する菌数限度の規定と経口剤では *Salmonella*, 大腸菌など、外用剤に対しては緑膿菌および病原ブドウ球菌を含有してはならないとした。USP 18 局<sup>89)</sup> ではこの規定が上載され、そのほか 16 品目の薬品に対する菌数かまたは特定菌の指定が

行われ、19 局改正 (1975 年) では<sup>90)</sup> 49 品目に急増するなど米国は規制を強化する方向が極めて積極的である。

1972 年、Evans らは<sup>19)</sup> アメリカにおける各種製剤の微生物学的ガイドラインを発表し、同国のメーカーに対する自主規制の方向を指示している。

現在、WHO<sup>91)</sup> で審議中の規制案のほか、国際薬学連盟 (FIP)<sup>92)</sup> の提案した規制が最も新しい。まだ最終決定に至らぬものであるが、現時点で考えられる規制の基本線を示したものであるといえる(表 16)。

表 16 に示す WHO と FIP 両案は、基本的にはほとんど変りのない案である。

両者共に、局所製剤に対する規制は厳格でほとんど無菌製剤と同じような規制が指示されている。カテゴリーの 1b は点眼薬、2 は点耳鼻薬、創傷火傷薬などはこの中に入れられる。特定の皮膚、粘膜部位に用いる外用剤は 1b, 2 のいずれかとし、製剤技術的に許されるならば 1b に該当すべきものである。

FIP 案の 1b と 2 との区別を確然とするのは頗る難かしいと考えられるが、出来ることならば 1b に近づく努力を払うということである。特定菌を腸内細菌類 *Enterobacteria* とばく然と指定するのは科学的でない感じがするが、WHO 案の *Enterobacteriaceae* とするのは、対象が余りにも大きくなり過ぎて、实际的でない。この辺は、食中毒菌の代表として *Salmonella* とか、*Clostridium perfringens* などと明確な species を指定した方が適切と考えられる。この点は、先の表 16 でみられるようにこれを受けて立つ国の自主性にまかせるといふ含みが感ぜられる。

微生物規制の立案に当たって考慮すべき事項は、余りに菌数限度を厳しくし過ぎると無理な滅菌手段を強行し却って薬効を損失するばかりでなく、そのために有害物質の副生が問題になってくる。また特定菌種を細い種のレベルで数多く指定することは、それが意義のあることならば経費や労力を惜まらずに強行すべきであるが、その辺の決断がつかかねるし、また全般の微生物検出技術がある程度に向上しないと実行不能となったり間違った結果による損失が出てくる。したがって、良識と科学性の豊かな統一見解が得られるように時間をかけて審議することが行われるよう望みたい。

以上の諸外国の規制は、まだ政府レベルの規準として最終的に設定されているものはそう多くない。わが国は J-GMP (1973)<sup>93)</sup> の施行にしても米英両国よりかなり遅れをとっているし、菌数限度に対する規制はやや遅れをとっている。ことに、生薬製剤が多く使用されているというわが国の特質を考えると、今後研究

表 16. 医薬品の菌数限度基準と特定菌の指定に関する最近の提案

WHO 提案 (1972)			FIP 提案 (1976)		
カテゴリー	菌数限度ならびに特定菌		カテゴリー	菌数限度ならびに特定菌	
1	注射剤	無菌 <sup>†1</sup>	1 a	注射剤	無菌 <sup>†1</sup>
2	眼剤, もしくは無菌状態と考えられている体腔, または激甚な火傷または潰瘍などの局所に適用する局所製剤	製剤の 1g または 1ml 中に生菌を含有してはならない.	1 b	左欄の WHO 案のカテゴリ - 2 に相当する製剤	製剤の 1g または 1ml 中から生菌を検出してはならない.
3	その他の局所剤 (障害のある皮膚, 耳鼻, 咽喉などの粘膜患部に適用)	生菌が $10^2/g$ または $ml$ 以上と下記の菌種が存在してはならない. <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	2	左欄の WHO 案のカテゴリ - 3 に相当する製剤	製剤の 1g または 1ml 中から $10^2$ 以上, および下記の菌種を検出してはならない. <i>Enterobacteria</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>
4	以上のほかの製剤全般 <sup>†2</sup>	細菌 : 生菌が $10^3/g$ または $ml$ 以上を含有してはならない. また下記の菌種が 1g または 1ml 中に含有してはならない. <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> 真菌 (カビ・酵母) : 生菌が $10^2/g$ または $ml$ 以上を含有してはならない.	3	以上のほかの製剤全般	菌数限度 : $10^3 \sim 10^4$ 好気性細菌数/g または $ml$ $10^2$ 酵母またはカビ数/g または $ml$ 特定菌の指定 : <i>E. coli</i> を 1g または 1ml 中より検出してはならない. 特定の製剤では次の菌種を検出してはならない. <i>Salmonella</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> 1g または 1ml. その他の enterobacteria $10^2/g$ または $ml$ 以下

<sup>†1</sup> 局方の無菌試験を適用

<sup>†2</sup> 生薬製剤については別に考慮中.

を重ね慎重な判断が必要と思われるのである.

わが国では, 点眼剤が第九改正日局<sup>94)</sup>で無菌性が要求され, 眼軟膏については日抗基 (1974, 各条)<sup>95)</sup>では g 当り 50 個以下と指示されている. 無菌とすることについては現在論議中である.

厚生省は今までに, 昭和 46 年 10 月 4 日に X 線造影剤 (硫酸バリウム製剤) の規制を行い<sup>96)</sup>, 生菌数

1,000 個/ml 以上を不適とし大腸菌を認めてはならないことを通達し, 昭和 47 年 12 月 28 日にアイライナーの微生物試験法を指示したが, 菌数は日本化粧品工業連合会の自主規制にまかせるとした.

次いで, 昭和 51 年 4 月 1 日には, 内用液剤および X 線造影剤に関する試験法と菌数限度基準などの通達を行っている<sup>97)</sup>. この通達で, 先の昭和 46 年の X 線造

影剤に関する通達は廃止されたわけである。これがわが国の医薬品の微生物に関する基準を設定した最初のケースである。現在、内用の固型剤、外用剤の一部について逐次検討が行われているが、特に動植物を原料とする経口剤は特定菌の指定は急ぐべきであるが、菌数の基準は既に述べた著者らや諸外国の成績のみからはどの程度の基準にするかは容易に決められない。また局所剤の軟膏とその類似剤についても同様に、一きよに無菌性を要求することが技術的に難点がある。これらの問題の解決がいつの時点で、やはり微生物基準を設定する必要があると考えられる。

以上、ここに述べた微生物管理の手法として菌数限度の規範を実行に移すことにすると、かなり高度な微生物試験法をこなしうる能力をそなえる必要が生じてくる。それ以前に、これらを各企業の自主的な規制を作って実行に移し、自社製品の微生物的品質を保証することがなされるべきは当然であり、またそれを既に実行している企業も多いと聞いている。こうした良心的な対策に日々努力を重ねている担当者に、この資料が何らかの役に立てば幸いである。

#### おわりに

最後に一言ふれるが、医薬品の汚染がどの程度まで許されるかは企業にとって大きな関心事であろう。諸外国の例をみても判るとおり、病原菌の混在に対しては比較的意見の一致が得やすいものの、一般生菌数の許容限度については、かなりの意見の対立が起きて当然である。しかし、一般生菌数を可及的に低く抑えることの基本的な意義は、次第に認識されてきていると思われる。現在、考えられる菌数の許容限度は企業側の最大限の努力によって到達し得る限度との関連において決められるべきであろう。今日決められた限度は不変のものでなく、いずれかは無菌剤とする方向に向って日々の努力を積み重ねるべきである。

医薬品投与の対象は病人であることを片時も忘れるわけにはいかない。そうなれば、当然のことながら食品の微生物基準より厳しいチェックが行われて然るべきとする専門家のコメントに今直ちに従うことこそがGMPの精神につながることを銘記すべきである。

今後は、さらに細かい剤型別の実態調査を企業の協力を得て実施し、医薬品の安全性評価の一端に役立ちたいと考えるものである。

稿を終るに当たり、私共の微生物調査に理解と協力を惜まれなかった都府県の薬事担当官、各企業の専門家の心からの援助に対し衷心より感謝の意を表します。なお、本プロジェクトの協同研究者として、調査プロ

グラムの設定と調査の準備を担当された前厚生省薬務局審査課長山田幸孝技官および審査課の諸氏、ならびに当所衛生微生物部、坂部、一戸、藤原、鈴木、成田の各技官および変異原性部吉川技官の多大の御助力に感謝します。

#### 文 献

- 1) L.O. Kallings, O. Ringertz and L. Sliverstolpe : *Acta Pharm. Suecica*, 3, 219 (1966)
- 2) National Health Service Laboratories in Denmark : *Dansk Tidsskr. Farm.*, 42, 1 (1968)
- 3) E.A. Pedersen and L. Szabo : *ibid.*, 42, 50 (1968)
- 4) E.A. Pedersen and K. Ulrich : *ibid.*, 42, 71 (1968)
- 5) A. Fischer, B. Fuglsang-Smidt and K. Ulrich : *ibid.*, 42, 125 (1968)
- 6) B. Fuglsang-Smidt and K. Ulrich : *ibid.*, 42, 257 (1968)
- 7) K. Ulrich, B. Fuglsang-Smidt, B. Hastrup, H. Hansen and A. Fischer : *ibid.*, 45, 39 (1971)
- 8) Public Health Laboratory Service Working Party (Chairman : J.T. Colindale) : *Pharm. J.*, 207, 91 (1971)
- 9) Public Health Laboratory Service Working Party (Chairman : J.T. Colindale) : *ibid.*, 207, 96 (1971)
- 10) N. Westwood and B. Pin-Lim : *ibid.*, 207, 99 (1971)
- 11) E.G. Beveridge and I.A. Hope : *ibid.*, 207, 102 (1971)
- 12) Y.A. Meghji, J.K. Buddle and E.W. Cherryman : *ibid.*, 207, 103 (1971)
- 13) Public Health Laboratory Service Working Party (Chairman : G. Sykes) : *ibid.*, 207, 400 (1971)
- 14) K.R. Lennington : *Drug & Cosmetic Ind.*, 100, 42 (1967)
- 15) C.W. Bruch : *ibid.*, 109, 26 (1971)
- 16) E.C. Brennan : *Am. J. Hosp. Pharm.*, 25, 302 (1968)
- 17) C.W. Bruch : *Drug & Cosmetic Ind.*, 110, 32 (1972)
- 18) C.W. Bruch : *ibid.*, 111, 51 (1972)
- 19) J.R. Evans, M.M. Gilden and C.W. Bruch : *J. Soc. Cosmetic Chemists*, 23, 549 (1972)
- 20) P. Blanc, "Summary Report about the WHO Conference on the Quality Control of Pharmaceutical Preparations", Helsinki, 25~29, Nov. (1968)
- 21) D.M. Poretz et al. : *Am. J. Hosp. Pharm.*, 31, 726 (1974)

- 22) W.T. Garreston and K.W. Cosgrove : *J. Am. Med. Assoc.*, 88, 700 (1927)
- 23) C.W. Lepard : *Arch. Ophthalmol.*, 28, 180 (1942)
- 24) E.L. Cooper : *ibid.*, 28, 183 (1942)
- 25) J.C. McCulloch : *ibid.*, 29, 924 (1943)
- 26) F.H. Theodore : *Am. J. Ophthalmol.*, 34, 1764 (1951)
- 27) F.H. Theodore and R.R. Feinstein : *ibid.*, 35, 656 (1951)
- 28) F.H. Theodore and H. Minsky : *J. Am. Med. Assoc.*, 147, 1381 (1951)
- 29) C.W. Bruch : *Drug & Cosmetic Ind.*, 109, 26 (1971)
- 30) J.L. Bignell : *Brit. Ophthalmol.*, 35, 419 (1951)
- 31) D. Krüger : *Pharm. Ind.*, 32, 259 (1970)
- 32) G.A.J. Ayliffe, E.J.L. Lowbury, J. G. Hamilton, J.M. Small, E.A. Asheshov and M.T. Parker : *Lancet II*, 365 (1965)
- 33) G.A.J. Ayliffe, D.R. Barry, E.J.L. Lowbury, M.J. Roper-Hall and W.M. Walker : *Lancet I*, 7447 (1966)
- 34) R.G. Mitchell and A.C. Hayward : *ibid. I*, 793 (1966)
- 35) I. Phillips : *ibid. I*, 903 (1966)
- 36) S.A. Plotkin and R. Austrian : *Am. J. Med. Sci.*, 235, 621 (1958)
- 37) L.J. Morse, H.L. Williams, F.P. Green, Jr., E.E. Eldridge and J.R. Rotta : *New Engl. J. Med.*, 277, 472 (1967)
- 38) L.J. Morse and L.F. Schornbeck : *ibid.*, 278, 376 (1968)
- 39) L.O. Kallings : *Secretariat of the European Free Trade Association*, Stockholm, 18~20 th, April 17 (1972)
- 40) H.T. Knights and J. Harvey : *New Zealand Med. J.*, 63, 653 (1964)
- 41) D.R. France : *ibid.*, 67, 552 (1968)
- 42) W.C. Noble and J.A. Savin : *Lancet I*, 347 (1966)
- 43) G.A.J. Ayliff, D.F. Barrowcliffe and E.J.L. Lowbury : *Brit. Med. J.*, 1, 505 (1969)
- 44) 川名林治 : 医科器械学雑誌, 44, 26 (1974)
- 45) 石井生夫 : 日眼, 30, 403 (1926)
- 46) 川崎近太郎 : 公衆衛生年報, 1, 50 (1953)
- 47) 米山 稔 : 28年度文部省総合研究報告集 (医学及び薬学編), (1953)
- 48) 高木敬次郎, 杉原正泰, 木村真太郎 : 薬剤学, 29, 250 (1969)
- 49) 八島弘昌 : 薬局, 21, 571 (1970)
- 50) 石関忠一, 秋山喜彦, 岩原繁雄 : 衛生試験報, 90, 131 (1972)
- 51) 米虫節夫 : 防菌防黴, 3, 321 (1975)
- 52) 横山 浩, 大阪医薬品協会々報, 325, 1 (1976)
- 53) 紀氏汎恵 : 医薬ジャーナル, 10月号 p.168, (1974)
- 54) 岩原繁雄 : 薬局, 24, 481 (1973)
- 55) 倉田 浩, 石関忠一 : 防菌防黴, 2, 249 (1974)
- 56) 倉田 浩 : フレグランスジャーナル, 20, 9 (1976)
- 57) 倉田 浩, 石関忠一, 宇田川俊一 : 医薬品・化粧品品の微生物試験法 (1977) 講談社サイエンティフィック
- 58) 国立衛生試験所 衛生微生物部 : 昭和48年度, 点眼薬, ドリンク剤, シロップ剤およびレントゲン造影剤の菌数限度基準作成実態調査結果について, 厚生省薬務局審査課報告. 未発表 (1974)
- 59) 国立衛生試験所 衛生微生物部 : 昭和49年度 酵素・臓器・生薬含有製剤の菌数限度基準作成実態調査結果について, 厚生省薬務局審査課報告. 未発表 (1975)
- 60) 国立衛生試験所 衛生微生物部 : 昭和50年度, 浣腸剤, 含嗽剤, トローチ剤および親水軟膏剤の菌数限度基準作成実態調査結果について, 厚生省薬務局審査課報告. 未発表 (1976)
- 61) 国立衛生試験所 衛生微生物部 : 昭和51年度, 解熱, 鎮痛剤, かぜ薬, および栄養剤の菌数限度基準作成実態調査結果について, 厚生省薬務局審査課報告. 未発表 (1977)
- 62) 青木 大 : 薬局, 9, 401 (1958)
- 63) I. Schiller, H. Kuntscher, A. Wolff and M. Nekola : *Appl. Microbiol.*, 16, 1924 (1968)
- 64) 紀氏汎恵ら : 病院薬学, 3, 92 (1977)
- 65) J.I. Hirsch, A.T. Canada and E.L. Randall : *Am. J. Hosp. Pharm.* 26, 625 (1969)
- 66) 青木 大 : 眼科, 8, 683 (1966)
- 67) 高橋禎二 : 眼の臨床, 62, 850 (1967)
- 68) 高橋禎二, 金井 淳 : 日本コンタクトレンズ学会誌, 9, 108 (1967)
- 69) R.W. Van der Wyk and A.E. Granston : *J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed.*, 47, 193 (1958)
- 70) F.W. Bowman and S. Holdowsky : *ibid.*, 48, 95 (1959)
- 71) F.W. Bowman : *J. Pharm. Sci.*, 58, 277 (1969)
- 72) G.A. Harman : *Arch. Dermatol.*, 85, 510 (1962)
- 73) E.J. Wargo : *Am. J. Hosp. Pharm.*, 30, 332 (1973)
- 74) И.В. Березовская : *Фармацевт.*, 25, 74 (1976)
- 75) 高野正彦 : 薬局, 21, 49 (1970)
- 76) 宮崎順一, 高野正彦, 吉野美子 : 同上, 9, 1275 (1958)
- 77) 佐野十九, 奥村裕子 : 同上, 4, 146 (1953)
- 78) 内村揚三 : 京都薬大学報, 2, 12 (1954)
- 79) 内村揚三 : 薬剤学, 14, 33 (1954)
- 80) 内村揚三 : 同上, 17, 268 (1957)
- 81) 高野正彦 : 日皮会誌, 67, 125 (1957)
- 82) H.J. Langner *et al.* : *Drugs Made in Germany*, 17, 80 (1974)
- 83) Anonymous : *FDA Case Study*, No. 83 (1970)

- 84) Anonymous : *Drug & Cosmetic Ind.*, 108, 38 (1970)
- 85) Anonymous : *FDA Case Study*, No. 88 (1970)
- 86) M. White, F.W. Bowman and A. Kirshbaum : *J. Pharm. Sci.*, 57, 1061 (1968)
- 87) D. Krüger : *Drugs Made in Germany*, 16, 109 (1973)
- 88) 岩原繁雄 : 調査月報, 国立衛生試験所, 5 (2), 13 (1972)
- 89) USP XVIII (1970)
- 90) USP XIX (1975)
- 91) WHO/PHARM/74.477, *Microbiological Purity of Non-Compulsorily Sterile Pharmaceutical Preparations*, Joint Report by the Committee of Laboratories and Official Drug Control, 1972.
- 92) Second Joint Report of the Committee of Official Laboratories and Drug Control Services, and Section of Industrial Pharmacists FIP : *Pharm. Acta Helv.*, 51, 33 (1976)
- 93) GMP : 医薬品の製造及び品質管理に関する基準, 厚生省 (1975)
- 94) 日本薬局方 IX (1976)
- 95) 日本抗生物質医薬品基準解説 : 薬業時報社 (1974)
- 96) 造影剤の微生物学的試験法 : 薬監第 496 号, (昭和 46 年 10 月 4 日付) 厚生省
- 97) 内用液剤及びX線造影剤の菌数の限度及び試験法について : 薬発第 297 号 (昭和 51 年 4 月 1 日付) 厚生省

## バルビタールおよびジアゼパムのヒト唾液への排泄

緒方宏泰・堀井幸江・柴崎利雄  
青柳伸男・鹿庭なほ子・江島 昭

## Salivary Excretion of Barbitol and Diazepam in Human

Hiroyasu OGATA, Sachie HORII, Toshio SHIBAZAKI,  
Nobuo AOYAGI, Nahoko KANIWA and Akira EJIMA

The salivary excretion of barbitol and diazepam in human was investigated. 114 mg of barbitol in two formulations, aqueous solution and powder, and 5 mg of diazepam in plain tablet were administered orally after over night fasting to healthy male volunteers. The barbitol concentration in the serum, mixed saliva and urine were determined by means of high performance liquid chromatography (HPLC), and the diazepam concentration in the serum and mixed saliva were determined by means of gas chromatography (GC) with ECD ( $^{63}\text{Ni}$ ). A significant relation between the concentrations of both drugs in serum and saliva and/or urinary excretion rate was observed. The Salivary/serum concentration ratio of barbitol was 0.999, and on the other hand, that of diazepam was 0.014. As these drugs are thought to be almost un-ionized form in blood and saliva, the difference of these ratios may be attributed to that of fraction of protein-bound drug in blood. On the conclusion, barbitol and diazepam, seem to be excreted in the saliva according to the mechanism that both un-ionized free drug are transported by simple diffusion from blood to saliva.

(Received May 31, 1978)

近年、治療における薬剤の適正な投与という立場から、テオフィリン<sup>1)</sup>、ジフェニルヒダントイン<sup>2)</sup>などの、有効濃度領域がせまく、また、血中濃度の個体間変動が著しい薬物の投与にあたって、個々の患者の血中薬物濃度をモニタリングしながら、投与量、投与間隔を調節することが行われてきている。しかし、患者からの繰り返しの採血は負担を大きくすることから、血液にかわる体液として唾液が注目されてきている。血液から唾液への薬物の移行は、一般には、pH 分配則に従って行われることが明らかにされてきているが<sup>3)</sup>、いまだ不明な点も多い。

我々は薬物のヒトにおける bioavailability の検討を加えてきた<sup>4)</sup>が、被験者からの繰り返しの血液あるいは尿の採取は実験の実施の上で大きな障害となっているため、それらにかわる方法として、唾液中薬物濃度測定による bioavailability test を行うための基礎的検討を行った。

## 実 験

## 1. 試料・試薬

バルビタール粉末は日本薬局方品をそのまま用いた。ジアゼパム粉末は山之内製薬より提供をうけたも

のを、ジアゼパム錠は市販錠剤（ジアゼパム 5 mg 含有）をそれぞれ用いた。また、試薬は特に明記したもの以外は試薬特級品を用いた。

## 2. バルビタールのヒトにおける血清・唾液中濃度および尿中排泄速度

## a) ヒトにおける実験

バルビタール粉末 114 mg およびそれを水 100 ml に溶かしたものを試料とした。健康成人男子 5 名を被験者とし、一晚絶食後、試料を経口的に服用させた。水溶液の場合、さらに水 200 ml で口腔内をよくゆすぎながらその水も飲ませた。粉末の場合は水 300 ml を同様な方法で飲ませた。服用後 2 時間目に水 100 ml、4 時間目に食事をとることとし、その後の飲食はアルコール類を除いて被験者の自由にまかせた。被験者 1 名については、血液、唾液、尿の採取を、被験者 4 名については唾液、尿の採取を経時的に行った。血液、唾液は服用後 0.25, 0.75, 1.25, 1.75, 2.5, 3.5, 4.5, 5.5, 7, 9, 11, 14, 24, 36, 48, 60, 72, 96, 120 および 144 時間目に採取し、尿は服用後 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 16 および 24 時間目に採取し、以後 120 時間目まで採取を続けた。

唾液はテフロン製の薄板を被験者にかませることにより唾液の分泌を促進させ、口腔内にたまった唾液を広口ビンに採取した。約5分間で3 ml以上の唾液を採取したが、3 mlに満たない場合は採取時間を延長し、3 ml以上になるようにした。採取した唾液はただちにそのpHを測定し、その後、定量を行うまで冷蔵庫中で保存した。このようにして得た唾液は混合唾液である。

血液は約6 mlを採取し、血清を定量を行うまで冷蔵庫中で保存した。

なお、バルビタールの服用は一ヶ月の間隔を置いて行った。

### b) バルビタールの唾液中、血清中および尿中濃度の測定

i) 唾液中バルビタール濃度 唾液 2 ml に 1 N 塩酸 0.2 ml, クロロホルム 10 ml を加え、20 分間振とうし、遠心分離後、有機層 8 ml をとり、それに pH 12 ホウ酸緩衝液 0.4 ml を加え、再び振とうした。遠心分離後、水層 26  $\mu$ l を精確にとり、齊藤らが報告している高速液体クロマトグラフィー (HPLC)<sup>5)</sup>の方法に変更を少し加え、バルビタールの定量を行った。

#### HPLC の条件:

カラム; HITACHI GEL 3011-N

10 cm  $\times$  0.5 cm 内径

検出波長; 254 nm

検出感度; 0.04 AFU, レコーダー 2 mV

移動相; メタノール 960 ml, 1 N 水酸化ナトリウム液 55 ml, 1 M 硝酸ナトリウム液 40 ml および 1 M 塩化ナトリウム液 40 ml の混液に水を加えて全量 2000 ml にしたもの

移動相流量; 0.9 ml/min

なお、定量にあたっては、標準バルビタール溶液につき同様に操作して得た検量線からバルビタール濃度を決定した。

Fig. 1 に唾液中バルビタールの HPLC によるクロマトグラムの一例を示す。

ii) 血清中バルビタール濃度 血清 2 ml に 0.1 N 塩酸 10 ml, クロロホルム 30 ml を加え、15 分間振とうし、遠心分離後、有機層 25 ml をとった。それに pH 12 ホウ酸緩衝液 0.5 ml を加え再び 10 分間振とうを行い、遠心分離後、水層 26  $\mu$ l を精確にとり HPLC 法により定量を行った。HPLC の条件は唾液中濃度測定の場合と同じである。ただし、検出感度は 0.04 AFU, レコーダー 1 mV で行った。

iii) 尿中バルビタール濃度 尿 10 ml に 1 N 塩酸 1 ml, クロロホルム 25 ml を加え 20 分間振とうし、

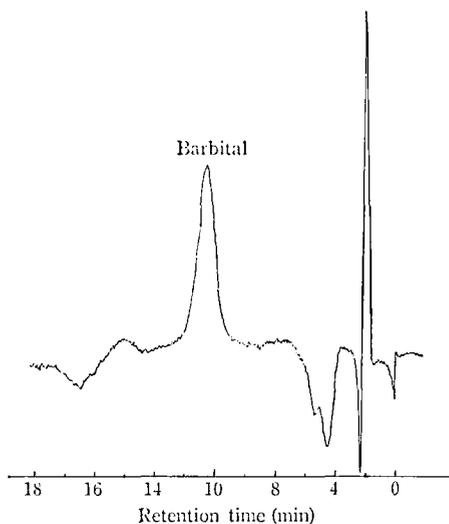


Fig. 1. HPLC chromatogram of barbital in saliva

遠心分離後、有機層 20 ml をとり、それに pH 12 ホウ酸緩衝液 3 ml を加え再び 20 分間振とうを行った。遠心分離後、水層 15  $\mu$ l を精確にとり HPLC 法により定量を行った。HPLC の条件は、移動相組成以外は唾液中濃度測定の場合と同じである。

移動相; メタノール 960 ml, 1 M 硝酸ナトリウム液 64 ml および 1 N 水酸化ナトリウム液 110 ml の混液に水を加えて全量 2000 ml にしたもの

### 3. ジアゼパムのヒトにおける血清および唾液中濃度

#### a) ヒトにおける実験

健康成人男子 1 名に一晩絶食後、ジアゼパム錠 1 錠を水 200 ml と共に経口服用させた。血液および唾液は服用直前 (0) および服用後 0.25, 0.75, 1.25, 1.75, 2.5, 3.5, 5, 7, 9, 24, 48, 72 および 120 時間目に採取し、定量を行うまで冷蔵庫中で保存した。唾液は 0 時間目は 10 ml 以上、他は 5 ml 以上採取した。他はバルビタールの場合と同じである。

#### b) ジアゼパムの血清中および唾液中濃度の測定

i) 血清中ジアゼパム濃度 血清 0.5 ml に塩化ナトリウム 0.15 g, ベンゼン (残留農薬分析用, キンダ化学) 3 ml を加え 10 分間振とうした。遠心分離後、有機層 2 ml をとり、窒素ガスを吹きつけながら微温湯中で蒸発乾固させた。それにベンゼン 100  $\mu$ l を正確に加え残留物をよく溶解させたのち、その 10  $\mu$ l を

正確にとりガスクロマトグラフィー (GC) により定量を行った。

GC の条件：

検出器；ECD ( $^{63}\text{Ni}$ )

カラム；3% OV-17

120 cm × 0.4 cm 内径

カラム温度；230°

注入口および検出部温度；245°

キャリアーガス流量；窒素ガス 70 ml/min

なお、定量においては標準ジアゼパム溶液を用いて同様に操作して得た検量線から濃度を決定した。

ii) 唾液中ジアゼパム濃度 唾液 5 ml に pH 7.8 リン酸緩衝液 0.5 ml, ベンゼン 20 ml を加え 10 分間振とうした。遠心分離後、有機層 18 ml をとり、それに 1 N 塩酸 10 ml を加え再び 10 分間振とうした。遠心分離後、水層 9 ml をとり、それにブロムチモールブルー試液 (日局) を 1 滴加え、5 N 水酸化ナトリウム液 1.5 ml を加えたのち、指示薬の変色 (黄→青) を指標にしながら、1 N 水酸化ナトリウム液で中和した。その後、ベンゼン 5 ml を加え、10 分間振とうし、遠心分離後、有機層 4 ml をとり、それを窒素ガスを吹きつけながら微温湯中で蒸発乾固させた。残留物を 50  $\mu\text{l}$  のベンゼンでよく溶解させたのち、その 10  $\mu\text{l}$  を正確にとり、GC 法で定量を行った。GC の条件は血清中濃度測定の場合と同じである。ただし、唾液の場合、被験者によってジアゼパム

ピークの近くにわずかながら妨害するピークがあらわれる場合があったので、標準ジアゼパム溶液はその被験者の服用直前の唾液にジアゼパムの既知量を添加したものをを用いた。

Fig. 2 に唾液中ジアゼパムの GC によるクロマトグラムの一例を示す。

## 結果と考察

Table 1 は被験者 4 名について、5 日間にわたって 17 回唾液を採取し、その pH を測定したものの平均値を示したものである。個々には pH 6.4-8.0 の間の値をとり、各被験者の平均値は pH 7.5 前後の値を示した。

Table 1. Mean pH value of saliva in human

Subject	Mean pH value <sup>b)</sup>	S.D.
1	7.31 (6.42-8.03) <sup>a)</sup>	0.42
2	7.45 (6.94-7.94)	0.34
3	7.53 (7.21-7.89)	0.21
4	7.68 (6.98-8.04)	0.36

a) Values in bracket represent the range of pH values

b) Saliva was sampled 17 times for 5 days

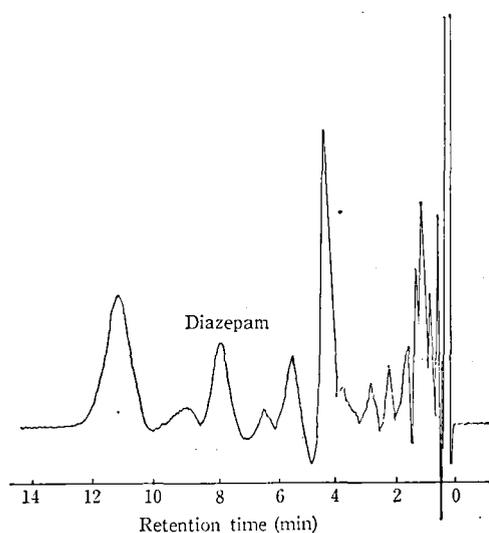


Fig. 2. GC chromatogram of diazepam in saliva

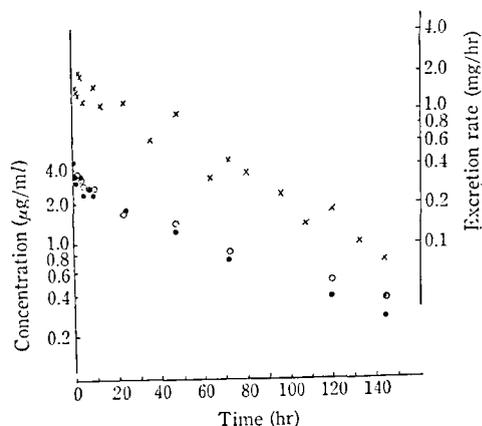


Fig. 3. Barbital concentration in the serum and saliva and urinary excretion rate as a function of time after oral administration of 114 mg barbital in solution

○ ; concentration in saliva  
● ; concentration in serum  
× ; urinary excretion rate

Fig. 3はバルビタール水溶液を経口的に服用した後のバルビタールの血清中、唾液中濃度および尿中排泄速度の時間的経過を示したものである。また、これら三者間の関連性を検討したのが Fig. 4 および Fig. 5 である。

血清中濃度-唾液中濃度間では相関係数  $r=0.9827$  と有意に高い相関性が認められ、しかも、その回帰直線の勾配が約1.0の値であり、またほぼ原点を通っていることより、唾液中バルビタール濃度は血清中バルビタール濃度をそのまま直接に反映していることが明らかとなった。これは、バルビタールの pKa が 7.91<sup>6)</sup> であり、血漿中での蛋白結合がわずかである<sup>7)</sup> ことを考え合わせると、バルビタールは pH 分配則<sup>8)</sup> に従って唾液中に移行しているものと考えられる。

従来、血液中濃度に比例するパラメーターとして尿中排泄速度がしばしば用いられてきたが、バルビタールについても血清中濃度-尿中排泄速度間に有意な関係が認められたが、唾液中濃度にくらべ尿中排泄速度の場合はばらつきが大きく、誤差を含みやすいパラメーターであることを示している。

また、Fig. 4 において、唾液中濃度の 0.25 時間目の値が回帰直線から大きくはずれて高い値を示しているが、これは他の報告にもあるように<sup>9)</sup>、バルビタールを経口服用後、一部口腔内に残存したバルビタールのためと考えられ、唾液によるモニタリングの際、特に注意を要する点と考えられる。

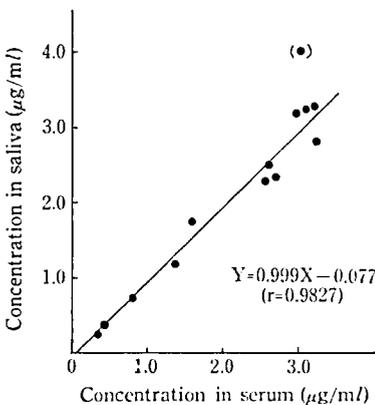


Fig. 4. Relation between barbitone concentration in serum and saliva  
The point in parentheses in this figure is the observed value at 0.25 hr after administration. This point is omitted in the calculation of the regression line

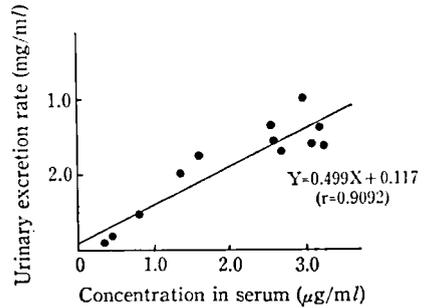


Fig. 5. Relation between barbitone concentration in serum and urinary excretion rate

Table 2. Pharmacokinetic parameters of barbitone determined by means of saliva concentration

Subject	Powder	Aqueous solution	
	$t_{1/2}^{a)}$ (hr)	$t_{1/2}$ (hr)	Excretion rate $C_{salliva}$ (ml/hr)
1	42.05	41.20	$0.66 \times 10^3$
2	39.38	33.77	$0.76 \times 10^3$
3	41.87	36.92	$0.67 \times 10^3$
4	58.48	61.38	$0.48 \times 10^3$
5	51.22	43.64	$0.61 \times 10^3$

a) value of  $\beta$  phase

被験者5名について、バルビタール水溶液および粉末を経口服用後の唾液中バルビタール濃度から求めた  $\beta$  phase の半減期および尿中排泄速度/唾液中濃度比の値を Table 2 に示した。唾液中バルビタール濃度が血清中バルビタール濃度をあらわすことから、尿中排泄速度/唾液中濃度比の値はバルビタールの腎クリアランス値をあらわすものと考えられる。

半減期を見ると個人間にはやや変動が大きいが、同一個体では投与剤型が異なってもほぼ同じ値を示した。また、腎クリアランス値にも個人差が認められたが、それは半減期が大きい被験者ほど腎クリアランス値が小さい傾向を示しており、それらの関係は道理になかったものとなっている。

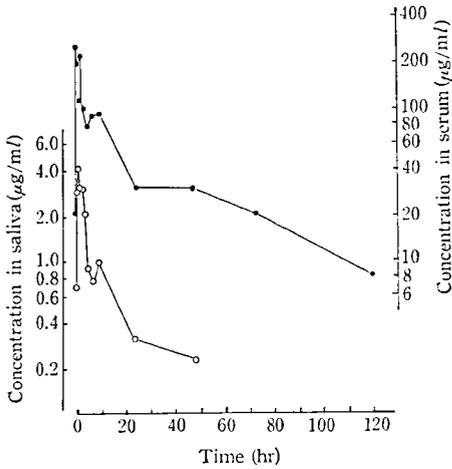


Fig. 6. Diazepam concentration in the serum and saliva as a function of time after oral administration of 5 mg diazepam in plain tablet

○ ; concentration in saliva  
● ; concentration in serum

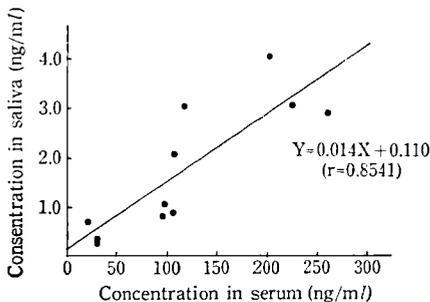


Fig. 7. Relation between diazepam concentration in serum and saliva

Fig. 6 はジアゼパム錠を経口服用後のジアゼパムの血清中および唾液濃度の時間的経過を示したものである。ジアゼパムはヒトの場合、未変化体では尿中に排泄されないために尿中排泄速度は求められなかった。Fig. 7 はジアゼパムの血清中-唾液濃度間の関係を検討したもので、ジアゼパムの場合もバルビタールの場合と同様に両者間に有意の関係が認められた。

しかし、回帰直線から求めた唾液/血清濃度比は 0.014 と非常に小さい値となった。ジアゼパムの pKa

の値は 3.3<sup>9)</sup> であることより、血清中、唾液中ではほぼ 100% 非解離型で存在しているが、蛋白結合についてはバルビタールとは異なり<sup>7)</sup>、ジアゼパムの蛋白結合は強く、血液中で 96~99% が蛋白と結合しており<sup>10)</sup>、このために濃度比が非常に小さな値となったと考えられる。

唾液中ジアゼパム濃度は血清中濃度の約 1.4% にしか示さないため、今回用いた定量法ではジアゼパム 5 mg を一回投与した条件においては 48 時間までの値しか求められなかった。そのため  $\beta$  phase における速度定数などの pharmacokinetic parameter を算出することは不可能であり、また、bioavailability についてもその速度をあらわす最高血中濃度およびその到達時間は求められても、bioavailability の量をあらわす血中濃度-時間曲線下面積 (AUC) は得ることができない。このような挙動を示す薬物について唾液でモニタリングを行うには定量法の改良が必要となる。

以上、バルビタールとジアゼパムについて唾液への排泄を検討したが、排泄機構はこれら二薬物ともに血清中で遊離の形で存在する薬物が pH 分配則に従って唾液中に移行する形をとることが明らかとなった。それ故、ジアゼパムのように蛋白結合の強い薬物や、血清中でほとんどイオン型で存在する薬物など、血液への排泄量がわずかである薬物については定量法の改良などを必要とする場合もあるが、その点が解決されるならば、このような機構で排泄される薬物については唾液中濃度を測定することにより、血液あるいは尿によるモニタリングと同程度の情報を得ることが明らかとなった。

## 文 献

- 1) G. Levy, E.F. Ellis, R. Koysooko : *Pediatrics*, 53, 873 (1974)
- 2) F. Bochner, W.D. Hooper, J.M. Sutherland, M.J. Eadie, J.H. Tyrer : *Arch. Neurol.*, 31, 57 (1974)
- 3) S.A. Killman, J.H. Thaysen : *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 7, 86 (1955)
- 4) H. Ogata, T. Shibazaki, T. Inoue, A. Ejima : *J. Pharm. Sci.*, 投稿中 ; H. Ogata, T. Shibazaki, T. Inoue, A. Ejima : *Chem. Pharm. Bull.*, 投稿中 ; 緒方宏泰, 鈴木澄男, 柴崎利雄, 江島 昭, 井上哲男, 薬誌, 98, 823 (1978)
- 5) 斉藤恵美子, 柴崎利雄, 井上哲男, 石橋無味雄 : 日本薬学会 96 年会講演要旨集, p. 51, 7L 2-3 (1976)
- 6) K. Kakemi, T. Arita, R. Hori, R. Konishi :

- Chem. Pharm. Bull.*, **15**, 1534 (1967)  
 7) P. Lous : *Acta Pharmacol. Toxicol.*, **10**, 147 (1954)  
 8) R. Koysooko, E.F. Ellis, G. Levy : *Clin. Pharmacol. Ther.*, **15**, 454 (1974)

- 9) S.A. Kaplan, M.L. Jack, K. Alexander, R.E. Weinfeld : *J. Pharm. Sci.*, **62**, 1789 (1973)  
 10) U. Klotz, K.H. Antonin, P.R. Bieck : *Europ. J. Clin. Pharmacol.*, **10**, 121 (1976)

## メトトレキサートの液体クロマトグラフィー

徳永裕司・太田美矢子・木村俊夫・川村次良

### Liquid Chromatography for Methotrexate

Hiroshi TOKUNAGA, Miyako ÔTA, Toshio KIMURA and Jiro KAWAMURA

A liquid chromatography followed by a spectrophotometric method of analysis at 265 nm is reported for the preparation of highly-purified methotrexate. The methotrexate was separated from each impurity by a linear gradient elution from 0.1 M to 0.5 M ammonia-ammonium bicarbonate buffer (pH 8.3) into DEAE cellulose column (1.4×25 cm). Five ml of eluent was collected at the rate of 2 ml/min. Four peaks of impurities didn't contain *p*-amino benzoyl glutamic acid and folic acid. Purities of a bulk of methotrexate, a highly-purified methotrexate, and a material of methotrexate reference standard by chromatographic determination were found to be 86.6%, 99.1%, and 96.5%, respectively.

(Received May 31, 1978)

メトトレキサートは、葉酸の類縁物質であり、葉酸の11位の水素がメチル基に置換された化合物で、Seeger ら<sup>1)</sup>により1947年に合成された化合物である。この化合物は、葉酸の代謝拮抗薬として女性の絨毛上皮癌および非転移性の栄養細胞層腫瘍ならびに小児の急性リンパ芽性白血病の治療に用いられており、第九改正日本薬局方<sup>2)</sup>に新収載された化合物である。

我々は、日局九メトトレキサート標準品を製造する目的で、Gallèlli ら<sup>3)</sup>が行ったメトトレキサートの液体クロマトグラフィーをメトトレキサートの精製に応用し、メトトレキサート精製品の製造、原末中に含まれている不純物について考察および液体クロマトグラフィーによるメトトレキサートの純度測定を行ったので報告する。

### 実験の部

#### i) 試薬

メトトレキサート原末：レダリー社製の85%以上の純度を有するもの。

メトトレキサート標準品原料：レダリー社より購入したもので、97.4%の純度表示があるもの。

0.1 M および 0.5 M 重炭酸アンモニウム溶液：重炭酸アンモニウム（試薬一級）79.06 g を量り、水を

加えて溶かし、1 l とする (1 M)。この液一定量を量り、水を加えて希釈し、0.1 M および 0.5 M の溶液を調整する。

0.1 M および 0.5 M アンモニア・重炭酸アンモニウム緩衝液：0.1 M および 0.5 M 重炭酸アンモニウム溶液 1 l に濃アンモニア水を加え、pH を 8.3 に調整する。

ジエチルアミノエチル (DEAE) セルロース：ワットマン社製 DE52 を 0.5N 塩酸で洗い、水洗し、pH を約 5~6 にする。0.5N 水酸化ナトリウムで洗い、水洗し、ほぼ pH 8 にし、0.1 M アンモニア・重炭酸アンモニウム緩衝液に懸濁しておく。

その他の試薬は、試薬特級品を使用する。

#### ii) 装置

東洋科学産業製 SF-200A 型フラクションコレクター、ミツミ科学製 SJ-1210 型ベリスタミニポンプ、日立 139 型分光光度計および J122 型日立デジタルリーダー、タケダ理研製 HG3 型デジタル pH メーターおよび電気科学計器製アンモニア電極を使用する。

#### iii) 液体クロマトグラフィーの操作

メトトレキサート 10~50 mg の一定量を 0.1 M アンモニア・重炭酸アンモニウム緩衝液 5 ml に溶解する。この液を DEAE セルロースを 25 cm の高さに

充てんした内径 1.4 cm, 長さ 30 cm のカラム上に層積し, 緩衝液を自然流出させたのち, カラム壁面を少量の緩衝液で洗う。次に, 0.1 M および 0.5 M 緩衝液 500 ml を用い, 緩衝液のモル濃度を直線的に増加させるグラジエント液体クロマトグラフィーを行う。流速は, ペリスタミニポンプを用いて 2 ml/min に保ち, 流出液は, フラクシオンコレクターにて 5 ml ずつ試験管に分取する。各試験管について, 層長 1 cm の石英セルを用い, 波長 265 nm で吸光度の測定を行う。なお, 流出液のモル濃度の測定には, 各試験管から正確に 2 ml ずつを量り, 別の試験管に入れ, 水を加えて正確に 20 ml とし, アンモニア電極を用い, アンモニアの測定を行い, 各試験管のモル濃度を求める。

#### iv) メトトレキサート精製品の製造

iii) の操作により得られたメトトレキサートのフラクシオンⅢをナスコルベンに集め, 減圧下で溶媒を除く。この際, 突沸の危険性があるので十分に注意する。溶媒除去後, 残査に適量のメタノールを加え, 溶解させる。この液を別のナスコルベンに取り, 減圧下で溶媒を除く。残査に 0.5 N 塩酸 5 ml を加え, 溶解後, 冷蔵庫に一夜放置する。折出した淡黄色の沈殿を東洋ろ紙製メンブランフィルター TM-300 を用いてろ取し, 水で充分に洗浄する。洗浄後, 水に懸濁し, 凍結乾燥する。

#### v) メトトレキサートの純度測定

メトトレキサート約 10 mg を精密に量り, 0.1 M アンモニア・重炭酸アンモニウム緩衝液を加えて正確に 25 ml とし, 試料原液とする。試料原液 5 ml を正確に量り, カラムに層積し, iii) の操作法に従い液体クロマトグラフィーを行う。各フラクシオンの吸光度を測定し, メトトレキサートの溶離部分に相当するフラクシオンを 200 ml のメスフラスコに集め, 水を加えて 200 ml とし, 試料溶液とする。別に, 試料原液 5 ml を正確に量り, 水を加えて 200 ml とし, 試料標準溶液とする。波長 265 nm における試料溶液および試料標準溶液の吸光度  $A_T$  および  $A_S$  を測定する。

$$\text{メトトレキサートの純度 (\%)} = A_T / A_S \times 100$$

#### 結果および考察

iii) の操作法に従い, メトトレキサート 50 mg を用いたときのクロマトグラムを Fig. 1 に示す。

Fig. 1 から, 試験管数 35~45 (フラクシオン I), 63~80 (フラクシオン II), 83~110 (フラクシオン III), 135~155 (フラクシオン IV) および 158~170

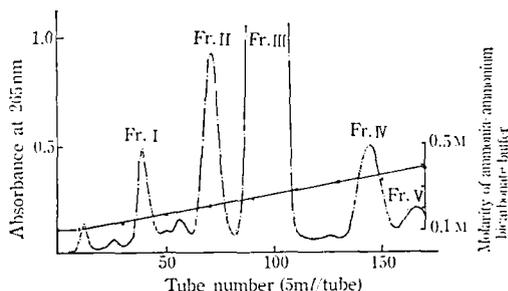


Fig. 1. Liquid chromatogram for 50 mg of methotrexate from DEAE cellulose column by a linear gradient elution from 0.1 M to 0.5 M ammonia-ammonium bicarbonate buffer (pH 8.3)

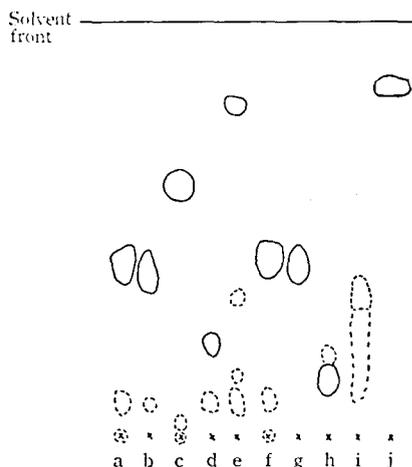


Fig. 2. Thin-layer chromatogram for methotrexate and impurities from each fraction separated by liquid chromatography

absorbent: Merk Co., TLC plate cellulose pre-coated (without fluorescent indicator), thickness 0.1 mm

solvent system: 5 w/v% citric acid solution was adjusted to pH 8.0 with strong ammonia water

detection: ultraviolet light

a, f: material of methotrexate reference standard  
b: bulk of methotrexate  
c: fraction IV  
d: fraction II  
e: fraction I  
g: highly-purified methotrexate  
h: folic acid  
i: 6-amino puterin  
j: p-amino benzoyl glutamic acid

(フラクシオン V) に大きなピークが認められた。試

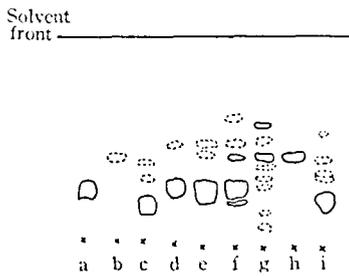


Fig. 3. Thin-layer chromatogram for methotrexate and impurities from liquid chromatography

absorbent : Merk Co., TLC plate silica gel GF<sub>254</sub> pre-coated, thickness 0.25 mm  
solvent system : n-butanol/10% ammonia water (75 : 25)  
detection : ultraviolet light

a : p-amino benzoyl glutamic acid b : 6-methyl puterin c : folic acid d : highly-purified methotrexate e : material of methotrexate reference standard f : bulk of methotrexate g : fraction I h : fraction II i : fraction IV

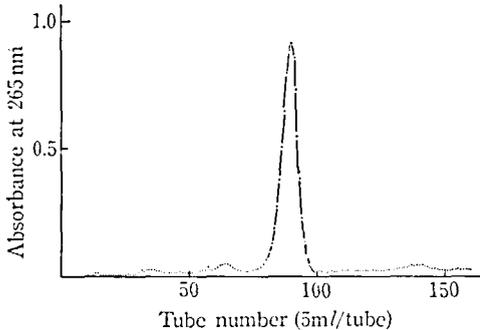


Fig. 4. Liquid chromatogram for 2 mg of bulk of methotrexate from DEAE cellulose column by a linear gradient elution from 0.1 M to 0.5 M ammonia-ammonium bicarbonate buffer

験管数 7~16 のものは、カラムの素通り部分であり、フラクションⅢはメトトレキサートに由来するピークである。

フラクション I~V の出始めの緩衝液のモル濃度は、アンモニア電極を用いるモル濃度測定の結果、それぞれ、0.15, 0.19, 0.23, 0.33 および 0.37 M であった。

次に、各フラクション中の成分を検討するため、薄層クロマトグラフィーを行った。その結果を Fig. 2 に示す。

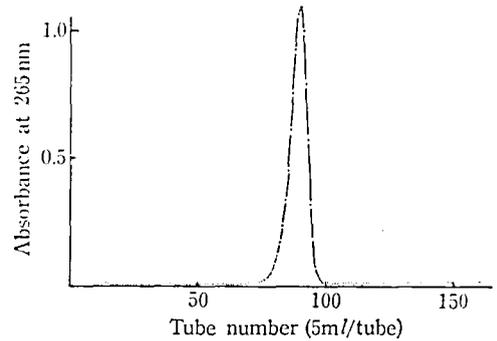


Fig. 5. Liquid chromatogram for 2 mg of material of methotrexate reference standard from DEAE cellulose column by a linear gradient elution from 0.1 M to 0.5 M ammonia-ammonium bicarbonate buffer

実線は、メルク社製プレコーティングセルロース薄層板上で、波長 254 nm の紫外線照射で青暗色に観察される部分、破線は、366 nm の紫外線照射で、けい光を生じる部分である。

Fig. 2 から、フラクションⅢのメトトレキサート部分 (g : highly-purified methotrexate) は、青暗色の 1 個のスポット以外は認められなかった。フラクション I, II および IV には、青暗色の 1 個のスポット以外に数個のけい光スポットが観察された。また、どのフラクションにも葉酸に相当するスポットは認められなかった。しかし、フラクション I には、p-アミノベンゾイルグルタミン酸 (葉酸の分解物) に相当する部分にスポットが認められた。そこで、メルク社製プレコーティングシリカゲル GF<sub>254</sub> 薄層板 (けい光剤入り) を用い、薄層クロマトグラフィーを行った。その結果を Fig. 3 に示す。

Fig. 3 から、フラクション I には、p-アミノベンゾイルグルタミン酸が含まれていないことが明らかになった。しかし、この展開溶媒では、メトトレキサートと p-アミノベンゾイルグルタミン酸および葉酸の分離が困難であることがわかった。

次に、メトトレキサートの純度測定を、メトトレキサートのカラム精製品、メトトレキサートの原末および標準品原料について行った。

メトトレキサート原末および標準品原料についての液体クロマトグラムを Fig. 4 および 5 に示す。

Fig. 4 のメトトレキサート原末に比べ、Fig. 5 の標準品原料の方が、クロマトグラフ的には品質が良いことがわかった。また、メトトレキサート精製品の純度は 99.1% (n=2)、原末は 86.6% (n=2) 及び標

準品原料は 96.5% (n=2) であった。精製品の純度が 99.1% というのは、液体クロマトグラフィーによる損失と考えることができるので、原末の純度は 87.5%、標準品原料の純度は 97.4% と考えられる。また、液体クロマトグラフィーによる純度測定のかわりに、J.P 9 法<sup>2)</sup>及び USP XIX 法<sup>4)</sup>を用いて標準品原料について測定を行ったところ、精製品の純度を 100% としたとき、それぞれ 99.1% 及び 98.0% であり、液体クロマトグラフィーによる純度測定も充分可能であることが明らかになった。

認められなかった。又、メトトレキサートの精製品中には、メトトレキサート以外のものは認められなかった。

メトトレキサートの純度測定を、原末、精製品及び標準品原料について行ったところ、各々、86.6%、99.1% 及び 96.5% であった。J.P 9 法<sup>2)</sup>及び USP XIX 法<sup>4)</sup>で標準品原末の測定を行ったところ、精製品を 100% としたとき、各々、99.1% 及び 98.0% であった。

終わりに、メトトレキサート原末を提供していただいたレダリー社に感謝します。

## 結 論

## 文 献

メトトレキサート原末から、高純度なメトトレキサート精製品を製造する目的でメトトレキサートの液体クロマトグラフィーを行った。原末中には、メトトレキサート以外に 265 nm に吸収を持つ大きな 4 個のピーク I、II、III 及び IV が認められ、ピーク I、II 及び IV には、p-アミノベンゾイルグルタミン酸及び葉酸は

- 1) D.R. Seeger, J.M. Smith, M.E. Hulquist : *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, 2567 (1947)
- 2) 第九改正日本薬局方, p.573 (1976)
- 3) J.F. Gallelli, G. Yokoyama : *J. Pharm. Sci.*, **56**, 387 (1967)
- 4) 米国薬局方第 19 版, p.315 (1975)

## 医療用具の放射線滅菌に関する研究（第5報）

### γ線照射による医療用不織布の化学・物理的影響ならびに滅菌効果について

辻 楠雄・飯田和子・菊池 寛・水町彰吾  
柳町きみゑ・栗栖弘光・倉田 浩・大場琢磨

## Radiosterilization of Medical Products. V

### Effects of γ-Radiation on Chemical and Physical Properties, and Sterility of Non-Woven Fabrics for Medical Uses

Kusuo TSUJI, Kazuko IDA, Hiroshi KIKUCHI, Shōgo MIZUMACHI,  
Kimie YANAGIMACHI, Hiromitsu KURISU, Hiroshi KURATA  
and Takuma ŌBA

For the application of gamma-ray sterilization of non-woven fabrics for surgical use, irradiation effects on their changes in the physical and chemical properties, and a survival of sporeforming bacterium, *Bacillus pumilus*, were studied. The radiation was done on 14 different samples of the fabrics at a dose rate of 1, 2.5, 5 and  $10 \times 10^6$  R respectively.

Chemically, a decrease of pH values of their water extracts, and increases of consumption of potassium permanganate, evaporating residue of the extracts and formation of formaldehyde were found as effects of increasing radiation dose on the fabrics. Physically, a decrease of tensile strength and yellowish change in the fabrics were also observed. Results of the survival tests were shown in Table 4. From the data, the irradiation above  $2.5 \times 10^6$  R might be necessary to kill all sporeforming bacteria in the fabrics.

From these observations, it was concluded that gamma-ray radiation for  $2.5 \times 10^6$  R is suitable for the sterilization of non-woven fabrics for surgical use.

(Received May 31, 1978)

## まえがき

従来の衛生材料の主材料は、ガーゼ、脱脂綿など綿製品が大部分を占めていたが、化学繊維を織ることなしに、化学的又は機械的に処理して布状とした不織布が生産され、その応用分野は医療用にも進出してきた<sup>2)</sup>。医療用不織布の主な用途として、手術用ガーゼ、創傷用当てガーゼ、産褥パット、生理用ナプキン<sup>3)</sup>などの外に人工臓器の分野にも用いられているが、特に外科用の不織布は手術や治療のため滅菌されたものが要求される。このため医療用不織布の組成ならびに使用目的から、滅菌法としては、前報<sup>1)</sup>の実験結果より $\gamma$ 線の照射が適当と考え、これらの繊維に $\gamma$ 線を照射した場合、材質の劣化あるいはその分解の促進などの見地から、照射による化学的、物理的影響について検討を行った。すなわち、 $\gamma$ 線照射線量を1, 2.5, 5および $10 \times 10^6$  Rと変えて照射を実施したのち、化学試験として、pH、あわだち、過マンガン酸カリウム還元性物質、色素、蒸発残留物、ホルムアルデヒド、重金属、灰分、さらに物理試験として引張試験、白度および臭気、けい光増白剤の変化とともにその滅菌効果について研究を行ったので、その結果を報告する。

## 実験方法および結果

## 1. 試料

実験に用いた試料は、医療用を目的とした不織布14種で、それらは Table 1 に示すように結合剤としてバインダーを使用したタイプの製品6種と、使用しない8種に分けられる。

それぞれの試料は、化学・物理試験用として $50 \times 50$  cmに裁断した同種の試料4枚を1組とし、細菌試験用には $1 \times 5$  cmのものを5枚1組にして試料別にそれぞれの滅菌パックに封入した。

## 2. 照射線量

$^{60}\text{Co}$ を線源とする $\gamma$ 線の照射線量を1, 2.5, 5および $10 \times 10^6$  Rとし、別に照射線量による影響を比較検討を行うために未照射試料を用意した。

## 3. 実験方法およびその結果

## (1) 化学試験

## a 溶出物試験

(i) 試験液の調製：照射した試料を約 $1 \text{ cm}^2$ の大きさに細片としたのち、その $3.0 \text{ g}$ を $500 \text{ ml}$ のフラスコに正確に量り入れ水 $300 \text{ ml}$ を加え還流冷却器をつけて、30分間おだやかに煮沸、冷却後抽出液をガラスろ過器(G2)を用いてろ過し、このろ液を試験液とする。別に水につき同様の方法で空試験液を調製し

Table 1. Components of non-woven fabrics for medical uses.

Sample No.	Fabric material	Binder
1	Rayon staple	Acrylic
2	Rayon staple	Acrylic
3	Rayon staple	Acrylic
4	Rayon staple	Vinyl acetate-Acrylic
5	Vinylon staple	Acrylic
6	Viscose rayon	Acrylic
7	Viscose rayon	none
8	Viscose rayon	none
9	Viscose rayon	none
10	Cupra rayon	none
11	Polyester	none
12	Polypropylene	none
13	Cupra rayon-Polyolefin	none
14	Viscose rayon	none

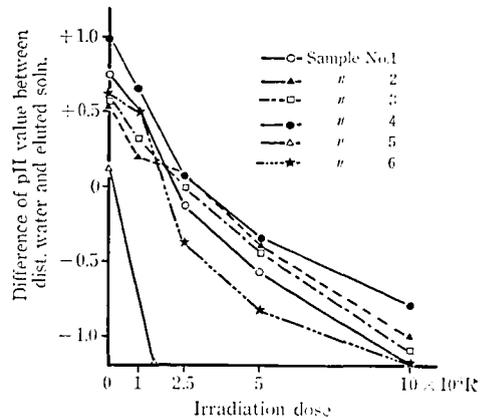


Fig. 1. Effects of irradiation dose on pH of the solution eluted from non-woven fabrics containing binder

試験液および空試験液について以下の試験を行った。

(ii) pH：試験液および空試験液各 $20 \text{ ml}$ にそれぞれ塩化カリウム溶液(1→1000) $1 \text{ ml}$ を加え、JP IXのpH測定法により試験を行い、両液のpHの差を求めた。その結果をFig. 1, 2に示す。

(iii) あわだち：試験液約 $5 \text{ ml}$ を内径 $15 \text{ mm}$ 、長さ約 $200 \text{ mm}$ の共栓試験管中に入れ、3分間激し

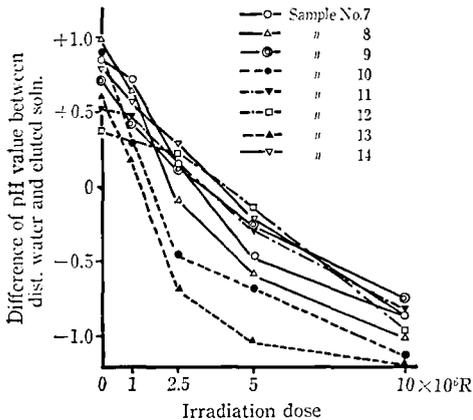


Fig. 2. Effects of irradiation dose on pH of the solution eluted from non-woven fabrics not containing binder

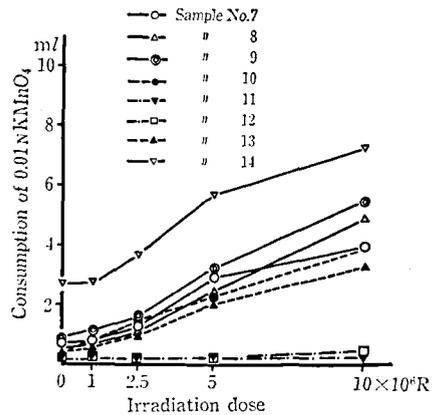


Fig. 4. Effects of irradiation dose on reducing matter in the solution eluted from non-woven fabrics not containing binder

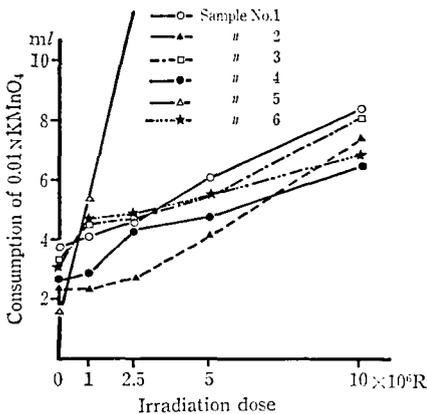


Fig. 3. Effects of irradiation dose on reducing matter in the solution eluted from non-woven fabrics containing binder

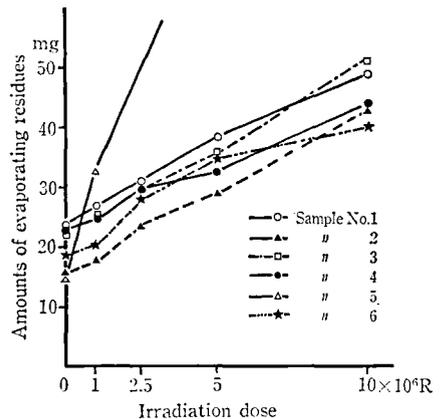


Fig. 5. Effects of irradiation dose on evaporating residues in the solution eluted from non-woven fabrics containing binder

くふりませた後静置し、目視により液の表面に浮遊するあわが消える時間を求めたところ、結合剤を含む試料は10分以上で、照射線量の増加に伴い、短縮されていった。

(iv) 過マンガン酸カリウム還元性物質：試験液 5 ml を共栓三角フラスコにとり、0.01N 過マンガン酸カリウム液 20 ml および希硫酸 1.0 ml を加え、3分間煮沸し、急冷後（15°位にする）直ちにヨウ化カリウム 0.1 g および溶性デンプン試液 5 滴を加え 0.01 N チオ硫酸ナトリウム液で滴定する。試験液の代りに空試験液 5 ml を用い、同様の操作を行い、両者の過マンガン酸カリウム液の消費量の差を求めた。その結

果を Fig. 3, 4 に示す。

(v) 色素：試験液 50 ml をネスラー管にとり、上方から観察を行った。結果はいづれの場合も、液の着色は認められなかった。

(vi) 蒸発残留物：溶出物試験と同一方法で試験液を作製し、その液 200 ml をとり、蒸発濃縮後はかりびんに入れ 105° で恒量になるまで乾燥し、残留物を測定する。同様の方法により空試験液について行い補正した。その結果を Fig. 5, 6 に示す。

#### b ホルムアルデヒド

(i) 試験液の調製：試料を約 1 cm<sup>2</sup> に細片とした

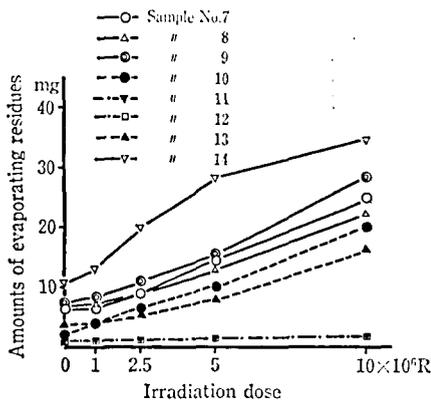


Fig. 6. Effect of irradiation dose on evaporating residue in the solution eluted from non-woven fabrics not containing binder

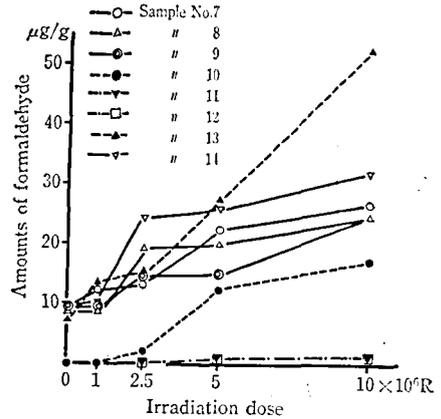


Fig. 8. Effects of irradiation dose on formaldehyde in the solution eluted from non-woven fabrics not containing binder

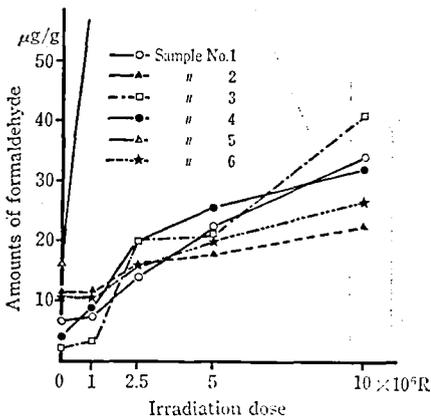


Fig. 7. Effects of irradiation dose on formaldehyde in the solution eluted from non-woven fabrics containing binder

のち、その 2.50 g を 200 ml の共栓フラスコに正確に量り採り、水 100 ml を正確に加えたのち、密栓し、40° の水中で時々振り混ぜながら 1 時間抽出する。次に、この液をガラスろ過器 (G2) を用いて温時ろ過し、これをホルムアルデヒド用試験液とする。

(ii) 試験：試験液 5.0 ml を正確に量り、家庭用品の規制に関する法律中ホルムアルデヒドの項目<sup>5)</sup> を準用し試験を行った。その結果を Fig. 7, 8 に示す。

#### c 重金属

試料 1 g を石英製又は磁製のつばに量り、ゆるくふたをし、弱く加熱して炭化する。冷却後、硝酸 2

ml および硫酸 5 滴を加え、白煙の生じるまで注意して加熱したのち、450~500° で強熱し、灰化する。以下 JP IX の重金属試験法第 2 法により試験を行った。比較液には、10 ppm の鉛標準液 1.0 ml を加えたところ、いずれも照射線量に関係なく試験液の濃度は比較液以下であった。

#### d 灰分

未照射試料 5.0 g をとり、JP IX の生薬試験法中の灰分を準用して定量を行ったところ、Table 2 に示すような結果となった。また、これらに照射を行ったときも定量値の変動は認められなかった。

#### (2) 物理的試験

##### a 引張試験

JIS. L-1085 不織布芯地試験法により、引張強度を測定した。未照射の試料を 100 とした場合の照射による強度の影響を Fig. 9, 10 に示す。

##### b 白度および臭気

未照射の試料と目視ならびに官能で比較した場合、白度については 2.5 × 10<sup>6</sup> R 以上の照射で少し黄変が見られるようになり、臭気においても 2.5 × 10<sup>6</sup> R 以上で異臭を感じた。

##### c けい光増白剤

各試料を暗所で紫外線 (365~366 nm) を照射したが、いずれもけい光は認められなかった。

##### d 脱落繊維

試料 1 g を 200 ml の共栓フラスコに入れ、水 100 ml を加え 5 分間静置後、30 秒間静かに振とうして再び 10 分間放置したのち、その上澄液 50 ml をネスラ

Table 2. Residues on ignition for original samples of non-woven fabrics for medical uses

Sample No.	Residues (%)
1	0.77
2	0.81
3	0.77
4	0.85
5	0.19
6	0.51
7	0.91
8	0.88
9	0.94
10	0.06
11	0.60
12	0.12
13	0.12
14	0.89

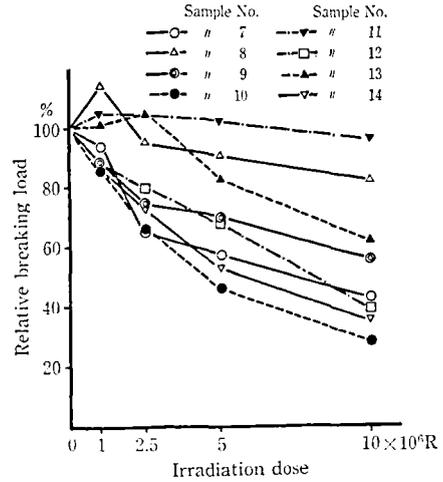


Fig. 10. Effects of irradiation dose on breaking load of non-woven fabrics not containing binder

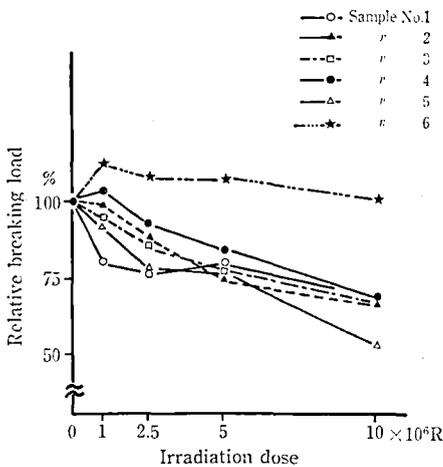


Fig. 9. Effects of irradiation dose on breaking load of non-woven fabrics containing binder

一管にとり、上方ならびに側方から観察したところ、大部分の試料に照射線量に関係なく脱落繊維が認められた。

e 沈降速度と吸水量

試料 5g をとり、8×3 cm の大きさに切りとり、JP IX のガーゼならびに脱脂綿の沈降速度および吸水量試験によって測定したところ、照射線量には関係な

く、ほぼ一定であった。

(3) 細菌試験

滅菌前の試料につき汚染菌数を測定するために、未照射の各試料 5 枚を 50 ml の滅菌食塩水中に加えてポリトロンでホモジナイズしたのち、その 5 ml について Tryptic soy agar 平板培養で菌数を測定した。結果は Table 3 に示すようにいずれも 10<sup>2</sup> 以下であった。

また、No. 1, 7, 10, 14 の 4 試料に Biological Indicator として、*Bacillus pumilus* E601<sup>6-8)</sup> の芽胞を約 3×10<sup>8</sup> づつ接種後、乾燥させ空気中で規定の線量を照射したのち、各試料について JP IX を準用して、無菌試験を行った。また各試料中の残存生菌数の測定は、試料を 50 ml の滅菌食塩水中に加え、ホモジナイザーにより細かく砕き、その 1 ml 中の菌数を Tryptic soy agar を用いた平板培養法により測定した。その結果は、Table 4 に示すように、1×10<sup>8</sup> R の照射では 3×10<sup>2</sup>~2×10<sup>4</sup> の生存菌が検出されたが、2.5×10<sup>8</sup> R 以上の照射試料はすべて完全に滅菌されていることが認められた。

考 察

医療用不織布は衛生材料としての新しい応用分野を広げつつある新製品で、繊維の種類や組合せなどその製法あるいは形態によって、従来の脱脂綿、ガーゼとは全く異なり、外観の多様性、強度範囲の広さ、良好な通気性、創面のはく離性などの特性を有し、し

Table 3. Bacterial counts of pre-irradiated non-woven fabrics

Sample No.	Bacterial counts
1	0
2	10
3	20
4	0
5	0
6	0
7	0
8	0
9	10
10	0
11	0
12	0
13	20
14	0

Sample : Five pieces of each 10×50 mm square  
Medium and incubation times : Tryptic soy agar 35°, 72 hr.

かも医用材料としての適応性のあるものが作られるようになった。

これらの製品の滅菌は、材質の性質上低温滅菌を必要とし、現実的には $\gamma$ 線の照射か、エチレンオキシドによる滅菌が最適であると考えられる。

$\gamma$ 線の照射にあたっては、その滅菌効果と繊維あるいは結合剤の安定性のかねあいが非常に重要である。このため結合剤を有する試料と結合剤のない試料に分類して実験を行った。

化学的試験について検討してみると、いずれの試料も、照射線量の増加に伴い、溶出液においては、pHの低下、過マンガン酸カリウム消費量、蒸発残留物およびホルムアルデヒドの生成量が増加し、それらは照射線量に比例する傾向が認められた。

結合剤の有無について、これらの傾向を検討してみると、結合剤を有する試料の方が過マンガン酸カリウム消費量、蒸発残留物、ホルムアルデヒドの生成量は多く、特にアクリル系の結合剤を有する試料 No. 5 (ビニロンステープル) の、 $\gamma$ 線滅菌は不適当と考えられる。

医療用不織布に $\gamma$ 線を照射した場合、これらの物質が増加あるいは生成される理由は、繊維の構成成分である繊維素が崩壊し、その結果重合度が低下し、水溶解性が增大することに原因するものと思われる。

Table 4. Sterilization of non-woven fabrics with a biological indicator by  $\gamma$ -radiation

Sample No.	Survival numbers of <i>B. pumilus</i> in a piece after irradiation treatments (Mrad) and sterility effects			
	1	2.5	5	10
1	2×10 <sup>4</sup> (+)	0 (-)	0 (-)	0 (-)
7	3×10 <sup>3</sup> (+)	0 (-)	0 (-)	0 (-)
10	5×10 <sup>3</sup> (+)	0 (-)	0 (-)	0 (-)
14	1.5×10 <sup>4</sup> (+)	0 (-)	0 (-)	0 (-)

Biological indicator : *Bacillus pumilus* E 601  
Inoculum amounts of spores : 3.5×10<sup>8</sup>/piece  
Sample size : a piece of 10×50 mm square  
Sterility test : (+) positive, (-) negative.  
Medium and incubation times  
Survival numbers tests : Tryptic soy agar 35°, 72 hr.  
Sterility tests : Tryptic soy broth 35°, 7 days.

これらの現象は Blouin および Arther<sup>9)</sup> の実験により既に知られていた。このことは後述の白度や、臭気にも影響しているものと思われる。また、結合剤自身についても $\gamma$ 線の照射によって分解生成物が生じるものと思われ、さらに結合剤として使用されているアクリル系接着剤には現在毒性などで問題になっているアクロニトリル系単量体が混入する恐れがあり<sup>10)</sup>、今後の衛生面の検討が望まれる。医療用としては一般に溶出物が多い製品を避けることが特に肝要であり、これからは生物学的試験も必要と思われる。

物理的試験についてみると、化学試験の場合と同様やはり照射による影響があらわれた。すなわち照射線量の増加にとまない引張強度の低下がみられ、一般に結合剤のある試料はこの傾向が大であったが、試料 No. 6 (ビスコース・レイヨン) および結合剤のない試料 No. 8, 11 (ビスコース・レイヨン, ポリエステル) はその影響が少かった。白度および臭気に関しては、いずれも照射線量の増加に伴い黄変および臭気の増加がみられ、いずれも照射による化学的变化と思われる。沈降速度と吸水量は照射線量による影響は少なく、未照射においても脱脂綿、ガーゼと異っているものは、その外科用という使用目的や化学繊維としての

特性からくるものである。

細菌試験については、製造工程による初期汚染も少なく、Biological indicatorを用いたとき、 $2.5 \times 10^6 R$ の照射で完全に滅菌が行われた。

### 結 論

バインダーで結合されている医療用不織布 6 種およびバインダーを使用しない医療用不織布 8 種について、 $^{60}Co$  による  $\gamma$  線を 1, 2.5, 5 および  $10 \times 10^6 R$  照射したところ、次の結果が得られた。

溶出物については、一般的傾向として照射線量の増加に伴い、その pH はいずれも減少し、過マンガン酸カリウム消費量および蒸発残留物は増加した。遊離のホルムアルデヒドの生成量は照射線量の増加に正比例し、いずれの試験項目でも試料 No. 5 (ビニロン・ステープル) は、 $\gamma$  線の照射による影響が顕著に認められた。しかし試料 No. 11, 12 (ポリエステル, ポリプロピレン) については、照射線量の影響が少いのは、両試料とも撥水作用を有するため溶出が充分に行われなかったものと思われる。

引張試験でも照射による強度低下がみられた。脱落繊維、沈降速度、吸水量については、照射線量とは無関係であった。

各試料に Biological indicator として、*Bacillus pumilus* E601 の芽胞を  $3 \times 10^8$  接種した結果、 $2.5 \times 10^6 R$  以上の照射線量で各試料とも完全に滅菌された。したがって不織布を  $\gamma$  線滅菌する場合、 $2.5 \times 10^6 R$  の照

射線量で十分であるところから、その際の化学的および物理的影響を検討したところ、材質によってはそれらの変化が少なく、 $\gamma$  線による照射滅菌可能なものも認められた。

本研究は、昭和 50, 51 年度国立機関原子力試験研究費によった。

おわりに、本研究にあたりご協力頂いた INDA 日本支部に感謝の意を表します。

### 文 献

- 1) M. Martin : *Disposable Soft Goods*, 2, 16 (1971)
- 2) 療 品 研 究 会 : 医 療 用 機 器 基 準 解 説, p. 431 (1976), 薬業時報社
- 3) 生理処理用品自主規格, p.1 (1976), 日本衛生材料工業連合会
- 4) 大場琢磨ら: 衛生試報, 90, 15 (1972)
- 5) 有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律施行規則, III. ホルムアルデヒド (昭和 49 年 9 月 26 日厚生省令第 34 号)
- 6) USP XIX, p. 711
- 7) 日本公定書協会: 第 9 改正日本薬局方解説書, p. B-523 (1976), 広川書店
- 8) 綿貫 喆ら: 滅菌法・消毒法第 4 集, p.170 (1975), 光文堂
- 9) F.A. Blouin, et al. : *Text. Res. J.*, 28, 198, 204 (1958) (高分子学会編: 放射線高分子化学 p.113 (1966), 地人書館より引用)
- 10) 谷村頭雄: 衛生試報, 95, 173 (1977)

## Tris(1-aziridinyl)phosphine oxide (APO) で防炎加工した 綿製品の新鑑別法

中村晃忠・小嶋茂雄・鹿庭正昭

### A New Method for Identification of Fire-resisting Cotton Fabrics Treated with Tris(1-aziridinyl)phosphine oxide (APO)

Akitada NAKAMURA, Shigeo KOJIMA and Masa-aki KANIWA

A new method to identify the flame-resisting cotton fabrics treated with tris(1-aziridinyl)phosphine oxide (APO) was investigated. The method was based on hydrolysis of P-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-cellulose linkage by refluxing with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-HBr, conversion of the resulting 2-bromoethylamine to aziridine by distillation in a strong alkaline medium, and the color reaction of aziridine with 4-(p-nitrobenzyl)-pyridine (NBP) on a silica gel thin layer plate. The procedure was recommended as follows: To 5 ml of concentrated sulfuric acid was added 1g of the chopped sample, allowed to stand at room temperature overnight, added 20 ml of 47% hydrobromic acid carefully, and refluxed gently for 1 hr and then vigorously for 2 hr. After cooling to room temperature, the mixture was poured on 200 ml of ice-water, neutralized with anhydrous sodium carbonate, made alkaline with 20 g of sodium hydroxide and distilled on free flame. The first 75 ml of the distillate was collected, made alkaline with 10 g of sodium hydroxide, extracted with 5 ml of dichloromethane and the extract was dried over anhydrous sodium sulfate. On a silica gel plate, 200 μl of the extract was spotted by a syringe and the chromatogram was developed in ethyl acetate until the solvent front was travelled 5 cm from the base-line. The plate was dried. The NBP reagent was applied to the chromatogram by spraying it on to the plate. The plate was heated at 105° for 5 min and cooled to room temperature. The spot was visualized by spraying the tetraethylenepentamine solution. The blue-violet spot at the original point showed the APO treating.

(Received May 31, 1978)

### 緒 言

Tris(1-aziridinyl)phosphine oxide (APO) は綿製品の耐久性防炎加工剤として 1960 年代後半に、主に米国で用いられたものであるが、1970年代に入って経済的な理由から消費量は減少した<sup>1)</sup>。また、日本では 1970 年代前半に年間数百 kg が生産されたといわれるが、1977 年 9 月に厚生省は毒性上の見地から APO の防炎剤としての使用を規制した<sup>2)</sup>。すなわち、炎光光度型検出器 (FPD) 付のガスクロマトグラフにより未反応の APO が検知されてはならないとするものである。しかし、その後の各方面の検討によると、ガスクロマトグラム上に APO らしいピークが出現した場合、それだけで、元の製品が本当に APO で加工されたかと断定するには不安な事例もあり、APO 加工を確実に証明する方法が望まれた。一方、繊維上の防炎加工剤を定性分析する方法として多重反射赤外分光法<sup>3)</sup>、走査型電子顕微鏡を用いて燃焼前後の状態を観察する

方法<sup>4)</sup>、熱分解-FPD-GC 法<sup>5)</sup>および塩酸加水分解-円型ろ紙クロマト法<sup>6)7)</sup>が報告されているが、APO 加工を確実に証明するものとしてはいずれも不十分である。著者らはその点を克服することを目的として本研究を行った。

APO による綿製品の防炎加工には種々の処方があるが、いずれにしてもその時の主反応は Chart 1 のようにセルロースの水酸基とアジリジン環との反応 (I→II) であり、このような -O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-NH- という結合をするリン系防炎剤は他にはない。従って、セルロース系の防炎加工布でリン系の防炎剤を使用していることが判っている場合 (この証明には AATCC 法がある)<sup>8)</sup>、-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-NH- 結合が証明できれば APO によって防炎加工したことが証明されたことになる。そこで著者らは APO と反応したセルロースのエーテル結合を切断して、さらに生成物をアジリジンに導いて証明することとした。エーテル結合の切断には、通常、臭化水素酸が用いられ、その条件で O-

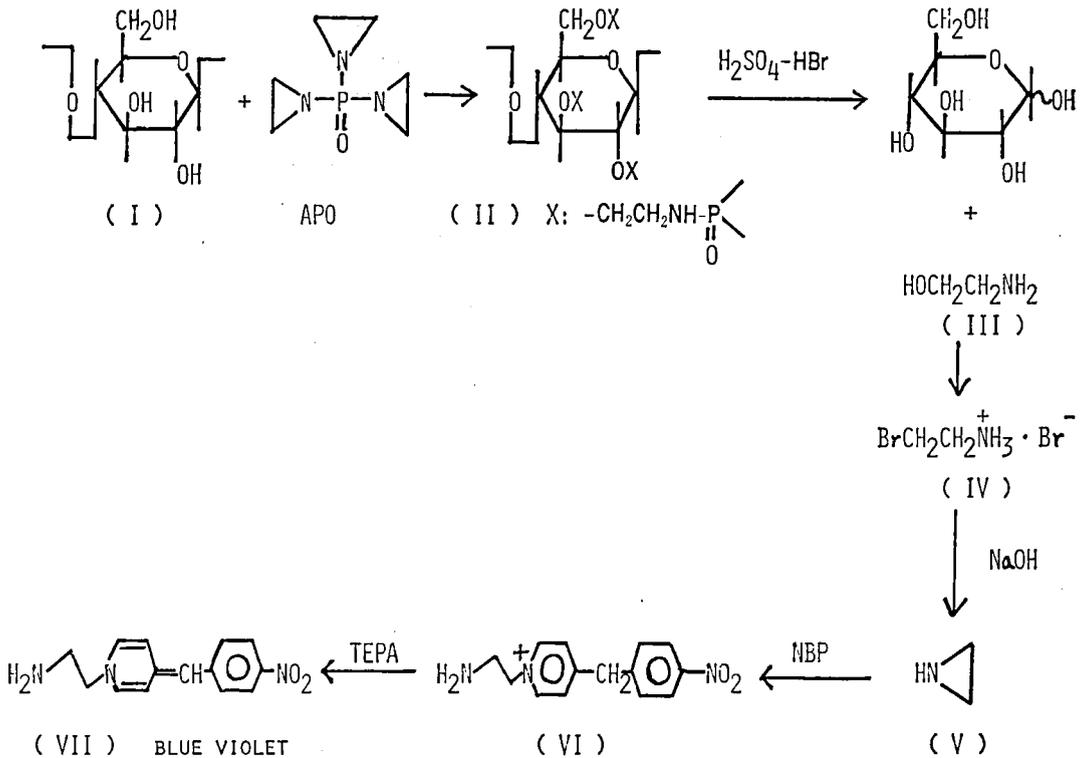


Chart 1

methylcellulose は d-glucose を生成するが<sup>8)</sup>、他方、非常に加水分解されにくい tetrahydropyran も硫酸・臭化水素酸の混液によって pentamethylenedibromide に分解されることが分っているので<sup>9)</sup>、両条件を比較したところ後者の方がよいことが分った。また、ここに生成する 2-bromoethylamine (IV) はアルカリ性になるとアジリジン (V) を生成するので<sup>10)</sup>、これを利用して加水分解液を氷水で希釈後、水酸化ナトリウムで強アルカリ性とし水蒸気蒸留し留液中のアジリジンをジクロロメタンで抽出後、4-(p-nitrobenzyl)-pyridine perchlorate (NBP-過塩素酸塩) を用いる呈色 (V→VII) によって確認することで所期の目的を達した。以下に検討の結果を報告する。

### 実験方法

#### 1. 試薬および器具

別に指定するもの以外の試薬は特級試薬を用いた。また、防災加工剤および界面活性剤は工業用製品を精製せずに用いた。

##### a. 防災加工剤および界面活性剤一

- Tris(1-aziridinyl) phosphine oxide (APO, 相互薬工製)

- Tetrakis(hydroxymethyl) phosphonium chloride (THPC, 日本化学工業製)
- N-Methylol-3-(dimethylphosphono)propionamide (Pyrovatex CP, CIBA-GEIGY 製)
- Phosphorylamide (VICTAMIDE, Stauffer Japan 製)
- ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル (n = 8.5) (花王石鹼製)
- ポリアミド有機酸塩 (花王石鹼製)

##### b. 試薬一

- NBP・過塩素酸塩：NBP 2g を Preussmann 等の方法<sup>12)</sup>によって過塩素酸塩とした。収量 2.6g。無色葉状晶。mp 175-176° (lit. 175-177°)<sup>12)</sup>
- NBP 溶液：NBP 過塩素酸塩 0.5g をエチレングリコールジメチルエーテル 100 ml に水浴上加温してとかし、冷後、不溶の結晶をろ過し、ろ液を用いた。
- テトラエチレンペンタミン (TEPA) 溶液：TEPA 2 ml をアセトンにとりかして 100 ml とした。

##### c. 加工液一

- 加工液 A：チオ尿素 1.3g, ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル 0.5g, ポリアミド有機酸塩 0.1g を水にとりかして 100 ml とした。

・加工液B：トリエタノールアミン 0.045 gを加工液A 10 ml にとかした。

・加工触媒：borontrifluoride etherate ( $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ) 10 滴を冷やしながらジメチルホルムアミド 0.5 ml に滴下して製した。用時調整。

d. 器具

・薄層板：メルク製薄層クロマト用シリカゲル HF 254+366 を常法により 250  $\mu$  の厚さに塗布し、105° で1時間乾燥したものを用いた。

・シリンジ：容量 0.5 ml の注射筒を用いた。

## 2. 防災加工用紙および防災加工布

a. 実験室における APO 加工用紙および加工布の製造—APO による防災加工には種々の条件があるが、ここでは Drake 等の報文<sup>13)</sup>を参考にして次のように行った。

加工用紙①：東洋ろ紙 No. 5A, 直径 7 cm のもの3枚 (約 1 g) に APO 203 mg, 尿素 141 mg および水 1 ml の混液を全量滴下してしみこませたのち、室温で1時間放置、ついで乾燥機中で 150—160° で7分間加熱反応させ製した。

加工用紙②：①と同様のろ紙に APO 205 mg, THPC 220 mg, トリエタノールアミン 60 mg および水 1 ml の混液を全量滴下してしみこませ、75° で5分間乾燥、ついで 160—170° で7分間加熱反応させ製した。

加工布①：APO 200 mg を加工液A 1 ml に加え、加工触媒1滴を加え、ただちに綿メリヤス地 1 g に全量滴下してしみこませ、室温で1.5時間放置し、ついで 85° で5分間乾燥、さらに 165° で5分間加熱反応させ、冷後、温水でよく洗い、しばったのち一晚風乾して製した。

加工布②：APO 100 mg を加工液A 1 ml に加え、以下、加工布①と同様に処理した。

加工布③：APO 50 mg を加工液A 1 ml に加え、以下、加工布①と同様に処理した。

加工布④：THPC 100 mg を加工液B 1 ml に加え、さらに APO 100 mg を加えたのち、以下、加工布①と同様に処理した。

b. モデルプラントによる APO 加工布の製造—工業技術院繊維高分子材料研究所において以下の加工布を作成した。加工は綿ブロードを用い、2 dip, 2 nip, 80% 紋りの後、90° で5分間乾燥、150° で4分間キューリングの条件で行い、加工後、0.5% 石鹼液で90°、5分間、ついで温水で40°、10分間洗浄した。各加工布中の主成分の量を以下に記す。

加工布⑤：APO 12% o.w.f., トリメチロールメラ

ミン (TMM) 7% o.w.f.

加工布⑥：APO 12% o.w.f., THPC 10% o.w.f.

加工布⑦：TMM 15% o.w.f.

c. 他の防災剤による加工布—加工布⑧—⑩は繊維高分子材料研究所のモデルプラントにおいて通常の方法<sup>14), 15), 16)</sup>で加工したものであり、主成分の量は以下に示す通りである。加工布⑩は市販の製品である。

加工布⑧：Proban 法による加工布, THPC 30% o.w.f.

加工布⑨：Pyrovatex CP による加工布, Pyrovatex CP 27.5% o.w.f.

加工布⑩：Phosphorylamide による加工布, VICTAMIDE 20% o.w.f., 尿素ホルマリン樹脂-エチレン尿素樹脂併用,

加工布⑪：Fyrol 76 による加工布, Stauffer Japan 社より入手。

加工用紙および加工布①—⑥は、省令の方法で測定した時、洗液中に APO が検出されなくなるまでメタノールでよく洗ったのち、風乾して実験に供した。

## 3. 実験操作

100 ml のナス型フラスコに 5 ml の濃硫酸をとり、これに細切した検体 1 g を加えて一夜放置する。これに注意して 47% 臭化水素酸 20 ml を加え、還流冷却器をつけ直火で、始めはおだやかに、泡立ちが少くなったら強く加熱し 2—3 時間還流する。冷後、氷水 200 ml を入れた 500 ml のナス型フラスコに反応液をあげ、無水炭酸ナトリウムで中和し、ついで水酸化ナトリウム 20 g を加えてとかし、沸騰石を入れ、Fig. 1 のように蒸留装置に接続する。受器の 200 ml の三角フラスコにはあらかじめ蒸留水 20 ml を入れ、冷却器の末端が蒸留水につかるようにしておく。ナス型フラスコを直火で加熱し、留出液約 75 ml をとる。留出液に水酸化ナトリウム 10 g を冷却しながら加えてとかし、分液ロートに移し、ジクロルメタン 5 ml で抽出、ジクロルメタン層を分取し無水硫酸ナトリウムで乾燥し検液とする。検液 200  $\mu$  l をシリンジで薄層板にスポットし、酢酸エチルで 5 cm 展開し、乾燥後、NBP 溶液を噴霧する。乾燥後、この薄層板を乾燥機中で 105°、5分間加熱し、冷後、TEPA 溶液を噴霧する。APO 加工の場合は原点に青紫色のスポットを示す。

## 実験結果および考察

1. アジリジンの検出限界—アジリジン標準液 (66  $\mu$ g/ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) 1—5  $\mu$  l を薄層板に塗布し、酢酸エチルで 5 cm 展開し、以下、実験操作に従って操

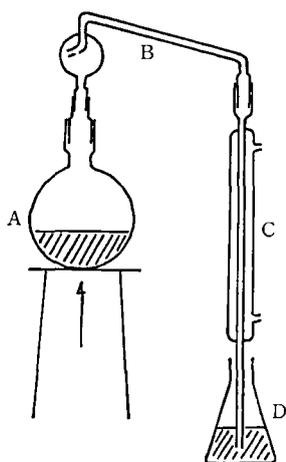


Fig. 1. Distillation apparatus

A : round-bottomed flask (500 ml)

B : adapter

C : Liebig's cooler

D : Erlenmeyer flask (100 ml)

作したところ、薄層板上のアジリジン量として約 0.1  $\mu\text{g}$  が検出限界であった。次に水溶液からジクロロメタンへの抽出効率について検討した。アジリジンの 250, 25, 5, 1, 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  水溶液をつくり、その 50 ml に 5g の水酸化ナトリウムを加えてとかし、ジクロロメタン 5 ml で抽出、以下、実験操作に従って操作した。アジリジン全量が水溶液からジクロロメタンに抽出されるとして計算した時の薄層板への塗布量は 500, 50, 10, 2, 0.2  $\mu\text{g}$  となり、アジリジンの検出限界以上の量を塗布したことになるが、実際は、水溶液の濃度として 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  以上の濃度では呈色は陽性であるが、0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  では陰性であった。従って、アルカリ性でジクロロメタン抽出する本条件での抽出率は約 1/10 程度であると思われる。

2. モノエタノールアミンとしての検出限界——モノエタノールアミン 2.00 g をとり 1N-硫酸 10 ml にとかし、この溶液を水で希釈して 200, 20, 2, 0.2 mg/ml の標準液をつくった。この 1 ml を 100 ml のナス型フラスコにとり、以下、実験操作に従って操作したところ、モノエタノールアミンとして 2 mg の量があれば呈色は陽性であったが、0.2 mg では陰性であった。呈色の度合いからみて、全操作をした時のモノエタノールアミンの検出限界は約 2 mg と思われる。従って、本実験操作中のモノエタノールアミンからアジリジンへの反応のおよその収率を検出限界より推定すると約 0.2% ときわめて悪い。しかし、APO

による防炎加工は通常 5—20% の量が用いられ、5% 以下では防炎性の上から意味なく、その点を考慮すれば、本試験法は APO 加工を検知するには充分の感度を持っている。それは後述の加工布による実験で証明された。

3. ジエタノールアミンおよびトリエタノールアミンの妨害の検討——通常、ジエタノールアミンは加工の補助剤として使うことはないが、トリエタノールアミンは助剤として使われることがある。その一例は実験方法の加工布の製造で述べた。そこで、モノエタノールアミンと構造類似のジエタノールアミンおよびトリエタノールアミンを同様に処理した時にどうなるかを検討した。両者について、200 mg をとって実験操作どおり行ったが、薄層の原点には青紫色のスポットを示さず、 $R_f$  値 0.24 に青紫色のスポットを示すのみであった。酢酸エチルによる展開を行わずに発色操作を行うと、ジエタノールアミンもトリエタノールアミンもスポットの周辺部が青紫色で中心が紅色の呈色を示し、モノエタノールアミンと区別し難い。しかし展開操作を加えることで、この妨害は除去することができた。

4. 加工汚紙および加工布による検討——加工ろ紙①を用いて加水分解の条件二種について検討した。すなわち、実験操作の方法 ( $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-HBr}$ ) と臭化水素酸のみの場合である。臭化水素酸のみで分解した時には呈色は陰性または疑陽性であるのに対し、硫酸臭化水素酸の時は陽性であったので以後、この操作条件を用いた。次に種々の加工ろ紙および加工布について実験を行った結果を Table 1 に示す。これから次のことがわかる。すなわち、

- i) APO が 5% 以上用いられれば呈色は陽性である。なお、加工布③は AATCC のマッチテスト<sup>2)</sup>では防炎性は不良で燃えてしまう。従って、5% 以下の加工は通常あり得ない。
- ii) THPC や TMM と併用しても陽性である。
- iii) 他の主なリン系加工剤による防炎加工布で陽性を示すものはなかった。

## 結 び

防炎加工綿製品の防炎剤を鑑別する一つの試みとして、APO 加工の鑑別法について研究した。原理は加工時にセルロースの水酸基にエーテル結合して生成した  $-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-$  の部分構造を硫酸-臭化水素酸により切断、ついでアジリジン環をアルカリ性で再生させ、さらにそのアジリジンを NBP によって呈色させて証明する三段階の反応に基づいている。本反応の

Table 1. Results of the tests for identification of APO-treating on various samples

Sample	Treating agent (% o.w.f.)	Result*1
Processed paper		
1	APO*2 (20)	+
2	APO (20) THPC*3 (20)	+
Processed cotton fabrics		
1	APO (20)	+
2	APO (10)	+
3	APO (5)	+
4	APO (10) THPC (10)	+
5	APO (12) TMM*4 (7)	+
6	APO (12) THPC (10)	+
7	TMM (15)	-
8	THPC (30)	-
9	Pyrovatex CP*5 (27.5)	-
10	VICTAMIDE*6 (20)	-
11*7	Fyrol-76 (?) *7	-

\*1 When observed a blue-violet spot at the original point in TLC, it was considered that the sample must be treated with APO, and this was shown positive (+) in the Table. The lack of such spot represented negative (-).

\*2-6 The abbreviations show as follows : APO, tris(1-aziridinyl)-phosphine oxide ; THPC, tetrakis(hydroxymethyl)phosphonium chloride ; TMM, trimethylolmelamine ; Pyrovatex CP, N-methylol-3-(dimethylphosphono)propionamide ; VICTAMIDE, Phosphorylamide.

\*7 The processed fabrics was supplied by Stauffer Japan Ltd.

原理から見て、この方法は APO 加工に特異的なものであり、従来法の欠点を補うものである。反面、操作がはん雑で検出感度も低いという問題点もある。しかし、通常の加工法がとられる限り、APO による防炎加工を確認する手段としては十分に役に立つものであ

る。省令の方法で遊離の APO を検出した場合、さらに本法で APO 加工を確認することによって、より確実な判定をすることができる。

終りに、各種防炎加工布の製造に御協力いただいた、工業技術院繊維高分子材料研究所、古屋匡蔵主任研究官に感謝いたします。

### 文 献

- 1) IARC Monograph, Vol. 9, 75 (1975)
- 2) 昭和 52 年 9 月 24 日付、政令第 280 号および厚生省令第 40 号
- 3) B. LeBlanc, P.A. Helms, J.C. Barry, K.P. Clark, H.J. Northup, P.A. Wilks, Jr., M.V. Zellar, *Text. Chem. Color.*, 5, 279 (1973)
- 4) M.K. Tomioka and S.H. Zeronian, *Text. Res. J.*, 44, 1 (1974)
- 5) J.E. Cope, *Anal. Chem.*, 45, 562 (1973)
- 6) T.D. Miles, A.C. Delasanta, *Anal. Chem.*, 31, 2051 (1959)
- 7) *Technical Manual of the American Association of Textile Chemists and Colorists*, Vol. 51, p.78 (1975)
- 8) T. Araki, Y. Hasi, *Nippon Kagaku Zasshi*, 60, 774 (1939)
- 9) *Org. Syn.*, Col. Vol. 3, p. 692 (1955), John Wiley, Sons, New York.
- 10) S. Gabriel, *Chem. Ber.*, 21, 2665 (1888) ; S. Gabriel, R. Stelzner, *ibid.*, 28, 2929 (1895) ; W.A. Reeves, G.L. Drake, Jr., C.L. Hoffpauir, *J. Amer. Chem. Soc.*, 73, 3522 (1951)
- 11) J. Epstein, R.W. Rosenthal, R.J. Ess, *Anal. Chem.*, 27, 1435 (1955) ; R. Preussmann, H. Schneider, F. Epple, *Arzneimittelforschung*, 19, 1059 (1969)
- 12) R. Preussmann, H. Henry, H. Druckrey, *Ann. Chem.*, 684, 57 (1965)
- 13) G.L. Drake, Jr., J.V. Beninate, J.D. Guthrie, *Amer. Dyestuff Reporter*, 1961, 129 ; G.L. Drake, Jr., J.D. Guthrie, *Text. Res. J.*, 1959, 155.
- 14) 古屋匡蔵, 生活と環境, 18, 27.
- 15) Pyrovatex CP カタログ (CIBA-GEIGY 社 J-018/71)
- 16) VICTAMIDE カタログ (Stauffer Chemicals Product Data Sheet), U.S. Pat. 2, 122, 122.

## 安息香酸ナトリウムの Wistar ラットの次世代に及ぼす影響について

小野寺博志・荻生俊昭・松岡千明・  
古田京子・竹内正紀・大野裕子・窪田友子  
宮原美知子・前川昭彦・小田嶋成和

Studies on Effects of Sodium Benzoate on Fetuses  
and Offspring of Wistar Rats

Hiroshi ONODERA, Toshiaki OGIU, Chiaki MATSUOKA,  
Kyoko FURUTA, Masaki TAKEUCHI, Yuko OONO, Tomoko KUBOTA,  
Michiko MIYAHARA, Akihiko MAEKAWA and Shigeyoshi ODASHIMA

Pregnant Wistar rats, 15 to 17 weeks old, were given sodium benzoate throughout their whole gestation period. The concentration of the chemical in diet was 1, 2, 4 and 8%, respectively. Effects of the chemical on pregnant rats, prenatal fetuses and offspring rats were studied.

In 4 and 8% groups, food consumption of pregnant rats was much lower than those of the other experimental and control groups. The body weight of rats in 8% group decreased, and that in 4% group increased slightly. Many abnormalities of organs and skeletal systems were found in fetuses in these 2 groups. Rate of perinatal death was 100% in both groups.

In 1 and 2% groups, organ abnormality was found in few fetuses and bone abnormality was observed in some offspring rats. No significant statistical difference was detected, however, between control and these 2 experimental groups. Growth of offspring rats in these 2 groups was similar to that of the control.

(Received May 31, 1978)

安息香酸は 1875 年, Salkowski によって防腐作用が認められ, 日本では 1948 年に食品添加物として指定された。我が国における食品保存料としての使用はキャビア, 炭酸を含まない清涼飲料水及び醬油に限定されている。各々における添加許容量は, キャビアでは 2.5 g/kg (0.25%), 清涼飲料水および醬油で 0.6 g/kg (0.06%) となっているが, 通常は 0.05% 程度で使用されている。尚, FAO/WHO の専門委員会では許容 1 日摂取量を条件付で 5~10 mg/kg としている<sup>1,2)</sup>。

本品は酸型保存料であるので pH 領域によって効果に大差があり pH 2 で 2%, pH 3 で 5%, pH 4 で 40%, pH 4.5 で 70%, pH 5 では 87% 分解し効果を失う。したがって食品に影響を与えない範囲で適当に pH を低く調節することにより本品の効果を増大することができる。

各種動物に対する急性毒性試験での LD<sub>50</sub> はカエル 2.5 mg/g (リンパ腔内投与), ラット 2.7 g/kg (経口投与), イヌ 2 g/kg (経口投与) ウサギ 2 g/kg (経口又は皮下投与) およびモルモット 1.4 g/kg (腹腔

内投与) などである。

本品は水に難溶なため実際には, 安息香酸ナトリウムの形で使用する。この場合安息香酸と同等の効果をj得るためには約 1.2 倍の添加増量を必要とする。

今回妊娠全期間にわたり Wistar 系ラットに安息香酸ナトリウム添加飼料を投与し, 母体の変化, 胎仔への催奇形作用ならびに出産仔の発育に及ぼす影響について観察を行った。

## 実験材料および方法

## 1. 検体

日本クレア製の一般飼料 (CE-2) に安息香酸ナトリウムを, 1%, 2%, 4% または 8% の割合で添加した固型飼料を実験に供した。

## 2. 実験動物

Wistar 系ラット (日本ラット KK) を雄 8~9 週令, 雌 7~10 週令で購入し, 約 4 週間飼育した後交配に用いた。

## 3. 妊娠成立の判定

未経産雌ラット 5 匹に対し, 原則として, 雄ラット

2匹を終夜同居させ、翌朝陰栓の認められたもの、または検鏡により、陰垢中に精子を認めたものを妊娠0日とし実験に供した。

#### 4. 投与方法

妊娠ラットを5群(各群 27~30 匹)に分け1群を対照群、他の4群を検体投与群とした。検体投与群は妊娠全期間にわたり検体添加飼料を与え、対照群にはCE-2を与えた。検体投与期間中は毎日飼料摂取量を測定し、水は水道水を任意に摂取させた。

#### 5. 胎仔の観察

妊娠 20 日目(分娩予定日前日)に各群の 22~25 匹を、エーテル麻酔により屠殺し、直ちに開腹、生存胎仔数、死亡胎仔数、吸収胚数、胎盤遺残数、着床痕数、胎仔体重、胎盤重量および卵巣重量を記録し、母体における諸臓器の異常ならびに胎仔の外形異常の有無を観察した。

生存胎仔の約 3/4 については、アリザニンレッド S 染色を行い、骨格標本を作製した後、骨格異常の有無ならびに化骨進行の状態を観察した。他の 1/4 については、ブアン氏液で固定した後、Wilson 氏法の変法による粗大切片標本を作製し、頭部、胸部、腹部における諸臓器の異常の有無を双眼実体顕微鏡下で観察した。

#### 6. 出産仔の観察

各群5匹の妊娠ラットは、自然分娩させ、出産時に出産仔数および生存率を記録し外形異常の有無の観察ならびに体重測定を行った。幼若ラットは、3週後に離乳し、眼瞼開裂の有無、被毛状態および四肢の異常を観察した。この時約半数の幼若ラットをエーテル麻酔により屠殺、解剖し、諸臓器の異常を観察した後、その全例について胎仔と同様に、骨格標本を作製した。同時に母体を屠殺、解剖し着床痕数を記録した後、同様に骨格標本を作製した。離乳した残りの半数の幼若ラットは雄雌を分け8週令まで飼育観察した。この間1週間に1回ずつ体重と飼料摂取量を測定した。これらの動物はエーテル麻酔によって屠殺、解剖し、主要臓器の重量を測定した後、骨格標本を作製した。

### 実験結果

#### 1. 母体に及ぼす影響

妊娠全期間にわたる母体の体重変化を Fig. 1 に示した。1% 群及び 2% 群は対照群に比べ、体重は少ない傾向にあったが有意差は認められなかった。4% 群は妊娠しているにもかかわらず体重曲線は横ばいであり、8% 群では減少していた。尚、4% 群では 10 日目と 20 日目に各 1例が、8% 群では 17 日目に 1

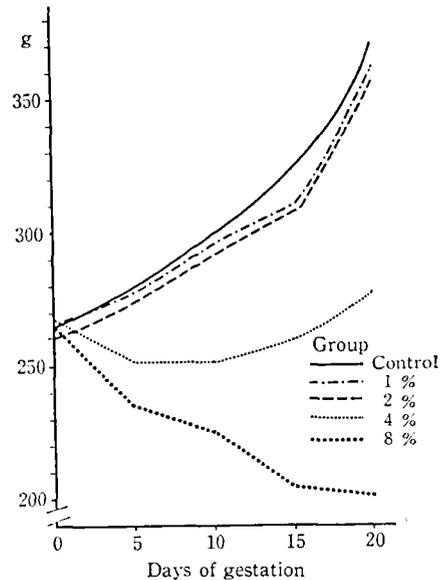


Fig. 1. Average body weight of pregnant rats

例、20 日目に 2 例が死亡した。これらの動物はいずれも運動の抑制、強直性痙攣が見られたが死因は不明であった。又、4% 群の 20 日目死亡例では浸軟胎仔 14 匹が認められたが、他の死亡例はすべて不妊であった。

妊娠期間中の検体飼料の摂取量を Fig. 2 に示した。

#### 2. 胎仔に及ぼす影響

検体投与各群における着床総数、着床総数に対する死亡胎仔・吸収胚の出現率、生存胎仔数、性比、生存胎仔平均体重などを Table 1 に示した。平均着床数は各群間において大差は認められなかったが、4% 群および 8% 群で死亡胎仔や吸収胚の増加、および生存胎仔平均体重の減少が見られた。

外形および内臓に見られた異常を Table 2 に示した。外形観察において 4% 群および 8% 群に軽度の全身性浮腫が見られた。

次に Wilson 氏法の変法による観察を行った結果、1% 群に両側無眼球症が 1 例、2% 群に左腎盂拡張が 1 例、4% 群においては右又は左側の小眼球症 5 例、両側小眼球症 1 例、右又は左側の無眼球症 2 例、脳室拡張 3 例、腎盂拡張 2 例、及び左側腎发育不全 1 例が見られ、8% 群で右又は左側の小眼球症 6 例、左側無眼球症 1 例、脳室拡張 3 例、大脳形成不全 1 例、腎盂拡張 2 例が観察された。

化骨進行状態については主に仙椎数、胸骨数を指標とした。検体添加濃度が高くなるにつれて胎仔の重

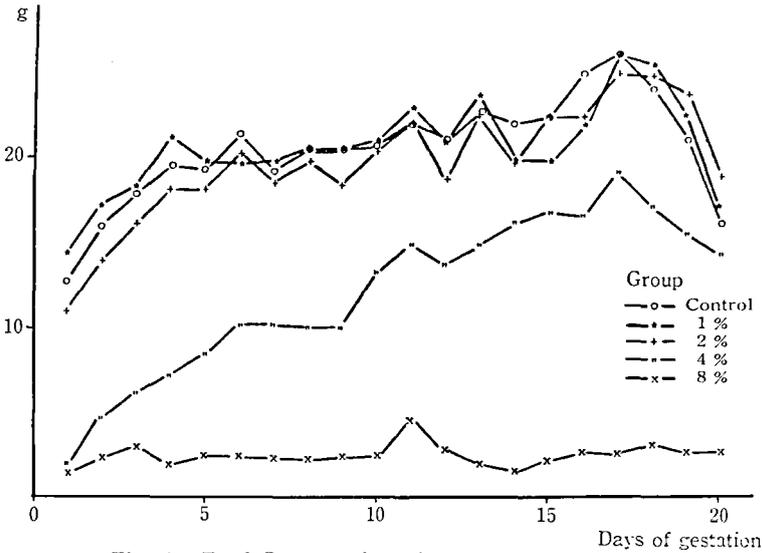


Fig. 2. Food Consumption of pregnant rats

Table 1. Observation of mother rats and fetuses at the 20th gestation day

Group	No. of mother rats	No. of implants		No. of dead fetus & resorbed embryo	No. of viable fetuses	Sex ratio (Male : Female)	Av. body weight of viable fetuses (g±S.D.)
		Total	Average±S.D.				
Control	15	194	12.93±1.73	13 ( 6.7%)	181	0.95 (88 : 93)	3.70±0.40
1%	15	179	11.93±3.66	20 (11.2%)	159	1.15 (85 : 74)	3.71±0.37
2%	16	194	12.13±3.80	11 ( 5.7%)	183	1.18 (99 : 84)	3.68±0.35
4%	18	213	11.89±4.09	62 (29.1%)	151	1.25 (84 : 67)	2.62±0.32
8%	12	141	11.75±2.62	24 (17.0%)	117	0.98 (58 : 59)	2.22±0.42

量が減少し、また骨格の化骨進行状態にも遅延が認められた。

変異のうち多く見られたものは腰肋および胸骨の形成異常であった。腰肋については、対照群で 32 匹 (1 個体で 2 本を有するもの 14 匹)、1% 群で 29 匹 (1 個体で 2 本を有するもの 9 匹)、2% 群では 45 匹 (1 個体で 2 本を有するもの 22 匹)、4% 群では 49 匹 (1 個体で 2 本を有するもの 13 匹)、8% 群では 15 匹 (1 個体で 2 本を有するもの 6 匹) であった。腰肋のうち長さが幅の 2 倍以上有するものは対照群にはなく、1% 群に 1 例、2% 群に 6 例、4% 群に 4 例、8% 群に 1 例見られた。胸骨の異常の中には数の異常と形の不整形とがあり、それらが見られた頻度は対照群で 35.7%、1% 群で 37.3%、2% 群で 35.9%、4% 群で 96.5%、8% 群では 100% であった。

その他の異常として、対照群では第 5 仙椎の左側に 1×1 (mm) 大の小骨片が認められたもの 1 例、右第

7~9、左第 3~4 および左第 7~8 胸椎弓癒合 1 例、両恥骨の短小 1 例が見られた。2% 群では左第 1~2 胸椎椎弓癒合 1 例、左第 4 頸椎椎弓短小 1 例、右第 7~10 および右第 12 肋骨波状 1 例、4% 群では頸椎の異常 6 例 (椎弓の癒合 5 例、右第 5 椎弓欠損 1 例)、波状肋骨 4 例 (左右全部波状 3 例、右第 2~13 肋骨波状 1 例)、胸椎の異常 3 例 (第 12 椎体欠損 1 例、第 9~12 椎体の欠損および縮小 1 例、第 2 椎体形成不全 1 例)、左第 8~9 肋骨癒合 1 例、8% 群では右第 5~6 頸椎椎弓癒合 1 例、第 4 胸椎椎体の縮小 1 例、右第 2 肋骨の短小と欠損がそれぞれ 1 例ずつ観察された。

### 3. 出産仔ラットに及ぼす影響

自然分娩させた際の各濃度における分娩率、周産期死亡率、哺乳率、および 8 週令時の生存率を Table 4 に示した。

分娩率は対照群、1% 群、2% 群間には差が認めら

Table 2. External and internal observation of fetuses

Group	External observation			Internal observation		
	No. of fetuses examined	No. of fetuses with abnormality	Type and No. of abnormality	No. of fetuses examined	No. of fetuses with abnormality	Type and No. of abnormality
Control	181	0		41	0	
1%	159	0		33	1	B-AO 1
2%	183	0		41	1	U-PE 1
4%	151	17	slight edema 17	36	12*	U-MO 5 B-MO 1 U-AO 2 HC 3 B-PE 2 U-RHP 1
8%	117	1	slight edema 1	26	11**	U-MO 6 U-AO 1 HC 3 CHP 1 B-PE 2

Key to abbreviation : B-AO, bilateral anophthalmia; U-PE, unilateral pyclectasis; U-MO, unilateral microphthalmia; U-AO, unilateral anophthalmia; B-MO, bilateral microphthalmia; HC, hydrocephalus; B-PE, bilateral pyclectasis; U-RHP, unilateral renal hypoplasia; CHP, cerebral hypoplasia.

\* One had U-AO and HC, and another one had U-AO and U-MO.

\*\* One had B-PE and HC, and another one had U-AO and HC.

れず、4% 群で 50.0%、8% 群で 8.2% と高濃度になるにしたがい低下した。周産期死亡率は対照群、1% 群、2% 群では 0% であったが、4% 群、8% 群ではいずれも 100% であった。

哺乳率は、対照群および 1% 群では 100%、2% 群で 97.8% (離乳前、45 匹中 1 匹死亡) であった。又 8 週令時生存率は、対照群および 1% 群では 100%、2% 群では 95.5% (離乳後、22 匹中 1 匹死亡) であった。

分娩時、離乳時および 8 週令時の雄雌別の平均体重を Table 5 に示した。分娩時の体重は一匹ずつつけるのが困難だったため、全同腹仔ごとに計量し、胎仔の平均体重を記載した。各群間における差は見られなかった。

次に 3 週令および 8 週令における幼若ラットの骨格の観察結果ならびに解剖所見を Table 6 に、8 週令における雄雌の平均臓器重量をそれぞれ Table 7、8 に示した。

3 週令時には内臓異常は認められなかったが 2% 群で両側閉眼遅延 3 例、左側閉眼遅延 1 例が見られた。8 週令時の解剖所見では、1% 群で発育不全 1 例、2% 群で膀胱結石 1 例が見られた。

骨格の所見では、対照群 3 週令で片側腰肋 2 例、8 週令で両、片側頸肋 8 例、両側腰肋 1 例が見られた。1% 群は 3 週令で片側頸肋 2 例、両側腰肋 1 例、胸骨不整形 2 例、8 週令で両、片側頸肋 19 例であった。2% 群では、3 週令に頸椎背結節癒合不全 1 例、8 週令に両側頸肋 17 例が見られた。しかし、Wilcoxon の順位和検定法を行ったところ、各群間に有意差は認められなかった。

各臓器の平均重量では、雄雌共に対照群と実験群の間に有意差は見られなかった。

#### 考 察

15~17 週令の妊娠 Wistar ラットの妊娠全期にわたり、1, 2, 4 ないし 8% の濃度で安息香酸ナトリウ

Table 3. Skeletal observation of fetuses

Group	No. of mother rats	No. of fetuses examined	Ossification state	No. of fetuses with abnormal bones			
			No. of ossified sacral and caudal vertebrae (Average±S.D.)	Lumbar ribs	Cervical ribs	Varied sternebrae	Others
Control	15	140	8.61±0.92	32	0	50	Spicule 1 Fusion of thoracic arches 1 Small pubis 1
1%	14	126	8.48±0.84	29	0	47	
2%	15	142	8.47±0.69	45	0	51	Fusion of thoracic arches 1 Shortning of cervical arches 1 Waved rib 1
4%	15	115	5.58±1.60	49	5	112	Fusion of cervical arches 5 Lack of cervical centrum 1 Waved rib 4 Deformed centurms 3 Fusion of ribs 1
8%	12	91	4.89±1.68	15	4	91	Fusion of cervical arches 1 Deformed centurms 1 Shortning of rib 1 Lack of rib 1

Table 4. Delivering rate, lactation rate, and survival rate at 8-week-old in offspring rats

Group	No. of mother rats	No. of implants	No. of born offspring rats (delivering rate)	Rate of perinatal death	Lactation rate	Survival rate at 8-week-old
Control	5	64	48 (75.0%)	0%	100%	100%
1%	5	61	49 (80.3%)	0%	100%	100%
2%	4	55	45 (81.8%)	0%	97.8%	95.5%
4%	4	52	26 (50.0%)	100%	0%	0%
8%	5	49	4 ( 8.2%)	100%	0%	0%

Table 5. Average body weight of offspring rats (g±S.D.)

Group	Birth*	Sex	3-Week-old	8-Week-old
Control	5.44 (52)	M	39.4±6.1 (30)	242.8±45.5 (15)
		F	40.0±5.6 (18)	190.0±23.9 (9)
1%	5.80 (51)	M	39.5±7.0 (28)	245.5±39.0 (12)
		F	39.5±7.8 (21)	187.8±25.8 (13)
2%	5.29 (49)	M	39.4±5.5 (23)	254.5±22.4 (8)
		F	37.3±4.5 (21)	184.0±16.9 (12)

Values in parentheses are number of animals examined.

\* Total body weight of newborn rats/number of newborn rats

Table 6. Abnormality of skeletal systems and other pathological findings in offspring rats

Group	Animal No. (mother rat)	No. of offspring rats examined	No. of offspring rats with abnormality	Skeletal abnormality and No. of rats	Pathological findings
Control	1	9	1 (11.1%)	cervical rib	1
	2	12	2 (16.7%)	cervical rib	2
	3	12	6 (50.0%)	cervical rib	5
				lumbar rib	1
	4	4	1 (25.0%)	lumbar rib	1
5	11	1 (9.1%)	lumbar rib	1	
1%	6	8	3 (37.5%)	cervical rib	3
	7	11	2 (18.2%)	cervical rib	2 inhibited growth 1
	8	12	9 (75.0%)	cervical rib	7
				varied sternbrae	2
	9	12	7 (58.3%)	cervical rib	6
			lumbar rib	1	
10	6	3 (50.0%)	cervical rib	3	
2%	11	10	4 (40.0%)	cervical rib	4
	12	12	4 (33.3%)	cervical rib	4
	13	12	6 (50.0%)	cervical rib	6 delay of opening eyelids 3 urinary bladder stones 1
	14	8	4 (50.0%)	cervical rib detachment of dorsal nodules of cervical vertebra	3 1

ムを添加した飼料を投与し、妊娠母体、胎仔、および出産仔への影響を調べた。4% 群および 8% 群では、妊娠ラットの飼料摂取量は他の実験および対照群に比べ著明に少なく、4% 群ではわずかに増加した程度であったが、8% 群では妊娠の進行にもかかわらず体重

が減少した。これらの群の胎仔には多数の骨および臓器の異常が認められ、周産期の胎仔死亡率は 100% であった。一方、1% 群および 2% 群では、臓器の異常が少数例の胎仔に、また骨の異常が数例の出産仔に観察された。出生後の体重の増加率は、対照群および

Table 7. Average organ weight of 8-week-old male offspring rats

Organ	Side	Group		
		Control	1%	2%
Thymus		0.714±0.179	0.866±0.342	0.801±0.157
Spleen		0.616±0.114	0.594±0.105	0.730±0.092
Heart		0.939±0.182	0.958±0.158	1.034±0.100
Lung		1.597±0.448	1.519±0.416	1.311±0.085
Liver		14.22±3.54	14.95±3.17	15.43±2.08
Adrenal	Right	0.018±0.005	0.022±0.004	0.027±0.005
	Left	0.021±0.004	0.026±0.007	0.026±0.004
Testis	Right	0.991±0.095	1.023±0.105	1.008±0.059
	Left	1.011±0.100	1.072±0.167	1.011±0.077
Kidney	Right	1.197±0.270	1.187±0.300	1.251±0.128
	Left	1.233±0.253	1.231±0.259	1.253±0.150

\* g±S.D.

Table 8. Average organ weight of 8-week-old female offspring rats

Organ	Side	Group		
		Control	1%	2%
Thymus		0.717±0.228	0.590±0.183	0.604±0.126
Spleen		0.509±0.071	0.465±0.088	0.548±0.070
Heart		0.772±0.063	0.731±0.132	0.760±0.073
Lung		1.264±0.243	1.181±0.280	1.175±0.162
Liver		11.37±2.04	11.06±1.69	10.93±1.63
Adrenal	Right	0.024±0.007	0.028±0.004	0.028±0.004
	Left	0.024±0.004	0.029±0.006	0.028±0.005
Ovary	Right	0.028±0.005	0.032±0.010	0.034±0.009
	Left	0.030±0.005	0.029±0.010	0.031±0.010
Kidney	Right	0.852±0.122	0.873±0.122	0.872±0.087
	Left	0.834±0.084	0.870±0.114	0.862±0.098

\* g±S.D.

1% 群, 2% 群の間で差が認められなかった。

検体投与期間の 1 匹当りの飼料摂取量は, 対照群 413.3g, 1% 群 415.5g, 2% 群 394.5g, 4% 群 242.0g, 8% 群 54.1g で, 検体投与期間中の各群の平均体重は, 対照群 307.1g, 1% 群 297.7g, 2% 群 301.6g, 4% 群 258.3g, 8% 群 223.9g であった。この事より, 各群毎の体重 1kg に対する検体摂取量は, 1% 群 14.0g/kg, 2% 群 26.2g/kg, 4% 群 37.5g/kg, 8% 群 19.3g/kg であった。

4% および 8% 両群での母体の体重増加率および分

娩率の減少, 周産期死亡率の増加, 胎仔の平均体重の減少, あるいは, 小眼球症等の臓器の異常の増加などは, 飼料摂取量の減少によるものと考えられる。また検体投与期間中の母体の死亡も, 飼料摂取量の減少によるものと考えられる。死亡時に見られた強直性痙攣は, 飼料摂取量の減少に伴い全身栄養状態が悪かったため, 検体の毒性が顕著に出現したものと考えられる。

胎仔の胸骨の異常は対照群, 1% 群および 2% 群で 3 割程度見られたのに対し, 4% 群および 8% 群では殆んど全例に見られた。これには発育遅延に伴う化骨

進行状態の遅延,あるいは染色状態の差等が考えられる。

対照群, 1% 群および 2% 群では分娩率, 胎仔の平均体重, 飼料摂取量, 出産後の体重増加率等で殆んど差は認められなかった。対照群では, 胎仔の外形および内臓とも異常が見られなかったが, 他の 2 群では 1 例ずつの異常が見られた。また 3 週令時および 8 週令時でも対照群では外形および内臓の異常は見られなかったが, 1% 群に 1 例, 2% 群に 5 例の異常が見られた。

骨格標本検査では各群に異常が見られたが, 同腹仔単位で比率を求め, Wilcoxon の順位和検定法を行ったところ, 各群間で有意差は認められなかった。

ラットにおける安息香酸ナトリウムの急性毒性試験では, 経口投与での  $LD_{50}$  は 2.7 g/kg であった<sup>3)</sup>。本実験での検体摂取量は, 4% 群では総量 37.5 g/kg であり, 1 日当りの摂取量は約 1.9 g/kg である。即ち, この量は  $LD_{50}$  の約 70% に相当する。同様に, 1% 群では  $LD_{50}$  の約 25%, 2% 群では約 48%, また 8% 群では 35% である。一方, 21~90 日間安息香酸ナトリウム添加飼料を投与した場合, 5% 以上の濃度では, 体重増加の抑制, 動物の死亡が観察されている。また 2~3% 添加飼料の場合には, 特に影響は見られていない<sup>3-6)</sup>。これらの事から, 今回の実験では, 4% および 8% 検体添加飼料の投与は, 実験方法としては不相当であったと考えられる。

1972 年, FDRL で, ラット, マウス, ハムスター, ウサギを使い, 催奇形性試験を行なっている<sup>7)</sup>。ラットでは, 妊娠 6 日目から 15 日目まで, 1.75, 8.0, 38.0 または 175.0 mg/kg を強制経口投与, 即ち最大用量投与群では総量 1.75 g/kg を投与しているが, いずれの群でも, 対照群と比較して差が認められていない。これに比較し, 本実験での 2% 群の検体摂取量は, FDRL での最大用量投与群の 15 倍に相当するが, この用量でも対照群と比較し, 殆んど差が認められていない。

他方, マウスでは妊娠 6~15 日目の間, 175.0 mg/kg を, ハムスターでは妊娠 6~10 日目の間, 300 mg/kg を, ウサギでは妊娠 6~18 日目の間, 250 mg/kg を最大投与量とし, 各種属 4 段階の濃度で強制投与しているが, いずれの場合にも対照群と比較し, 差が認められていない。この事から, ラットのみならず他の種属においても, 催奇形作用が無いと考えられる。

種々の動物に安息香酸を経口投与すると, Free の安息香酸として, あるいは Hippuric Acid (HA), Benzoyl Glucuronide (BG), Ornithuric Acid (OA)

等に代謝されて, 糞尿中に排泄される<sup>8)</sup>。排泄までの時間あるいは, その代謝産物の比率は動物の種によって異なり, ラット, ハムスター等では投与後 24 時間以内に 99~100% が排泄され, その 97~99% は HA の形で 1~2% が安息香酸あるいは BG の形で排泄される。またヒトでは投与後 24 時間以内に 99% 以上排泄され, 100% HA に代謝されている。その他ニワトリでは 2 日ぐらいで殆んどが, OA, 安息香酸, HA の 3 種類の形で, 海ガメ, トカゲ, ヤモリ等では 2~3 日以上必要とし, OA, HA あるいは Free の安息香酸の形で, 赤毛猿では 2 日ぐらいで主に HA として排泄される。

この様に安息香酸を投与した場合, 種により排泄される時間, 物質に違いがあるが, 代謝経路の違い, あるいはグリシン抱合における肝臓, 腎臓の活性度の相違等によると考えられている<sup>9-11)</sup>。しかし, いずれの種属においても経口投与された安息香酸は完全に排泄されてしまい蓄積性は無いと考えられている。

以上の様な亜急性毒性試験, 催奇形性試験あるいは代謝, 排泄の結果と今回の結果を考え合せ, FAO/WHO の基準 5~10 mg/kg の許容範囲内での使用には, 催奇形性の面から見て特に危惧すべきものは無いと考えられる。

終りに, 実験の指導をいただいた, 当試験所薬理部 田中悟室長, 毒性部, 川俣一也技官, 門馬純子技官, ならびに実験結果の評価および本稿の起草に御援助いただいた実中研顧問, 西村秀雄先生, 当試験所センター長, 池田良雄先生, 薬理部長, 大森義仁先生に深謝の意を表します。

## 文 献

- 1) 深間内久雄: 食品添加物公定書注解, 第三版, p. 63 (1974) 金原出版
- 2) 食品添加物公定書解説書, 第三版, p. B-81 (1973) 広川書店
- 3) H.J. Deuel, et al.: *Food Res.*, 19, 1 (1954)
- 4) G.M. Fanelli, S.L. Halliday: *Arch. Inst. Pharmacodyn.*, 144, 120 (1963)
- 5) W. Kieckebusch, K. Lang: *Arzneimittel. Forsch.*, 10, 1001 (1960)
- 6) W.H. Griffith: *J. Biol. Chem.*, 82, 415 (1929)
- 7) Food and Drug Research Labs.: *Teratologic Evaluation of FDA 71-37 (Sodium Benzoate)*, (1972), Natl. Technical Information Service, U.S. Department of Commerce, Springfield
- 8) J. Bridges, M.R. French: *Biochem. J.*, 118, 47 (1970)
- 9) T. Runyan: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 138, 671 (1971)

10) N.R. Sirahl, W.H. Barr: *J. Phar. Sci.*, **60**, 278 (1971)

11) J.W. Putney, Jr., J.F. Borzelleca: *J. Pharmacol. Exptl. Ther.*, **186**, 600 (1973)

## 医薬品類の細胞毒性—培養細胞に対する染色体異常誘発性について

石館 基・林 真・沢田 稔・松岡厚子  
吉川邦衛・大野昌子・中館正弘

### Cytotoxicity Test on Medical Drugs—Chromosome Aberration Tests with Chinese Hamster Cells *In Vitro*

Motoi ISHIDATE, JR., Makoto HAYASHI, Minoru SAWADA  
Atsuko MATSUOKA, Kunie YOSHIKAWA, Masako ONO  
and Masahiro NAKADATE

Chromosome aberration tests *in vitro* were carried out on medical drugs and their related compounds using Chinese hamster fibroblast cells in culture. Each drug of different doses was exposed directly to the cells and chromosome preparations were made 24 h and 48 h after treatment. Forty two out of 71 were negative even at the dose when cell proliferation was remarkably reduced. Remaining 29 compounds produced more or less chromosome aberrations, in which compounds also positive in mutation assays with bacteria were included. Several compounds were pointed out as mitotic poisons, which produced polyploid cells rather than cells with morphological changes in chromosomes.

(Received May 31, 1978)

#### 目 的

医薬品、食品添加物、その他の生活関連諸物質の生体に対する安全性を評価する上で、微生物あるいは哺乳動物細胞を用いる変異原性試験の重要性が指摘されつつある<sup>1)</sup>。その主な理由は、従来の動物個体を用いる遺伝毒性あるいは発癌試験に比べ、短期間で多くの物質についてスクリーニングを行うことが出来る点にあり、しかも、これまでの基礎的研究によって、これらの短期スクリーニングで陽性結果を示すものの中に既知発癌性物質の多くが含まれている、という事実によるものである。哺乳動物細胞に見られる染色体異常そのものは直接、突然変異誘発性を示すものではない。しかし、発癌物質のうちには、微生物試験では陰性であっても、哺乳動物の染色体に数的あるいは形態的变化を誘起するものも存在する<sup>2)</sup>。

我々は上記の事実に基き、現在使用されている薬品類およびそれらの関連化合物、計 71 種類について染色体異常誘発性の有無を検索したのでその結果について報告する。

#### 実験材料および方法

##### 1. 細胞

チャイニーズ・ハムスターの肺から分離された線維芽細胞株 (CHL) を更に単一細胞からクローン化した亜系を用いた。染色体モード数は 25 本であり、細胞数倍化所要時間は約 15 時間である。培養シャーレの底に単層状に増殖する。

##### 2. 培養条件

仔牛血清 10% を含むイーグル培養液 (GIBCO, F-11) を用い、5% 炭酸ガス存在下で 37° で培養する。細胞の継代には小型ガラス培養びんを用い、原則として 4 日目毎に再播種する。検体の細胞増殖抑制試験および染色体異常誘発性試験には、それぞれ直径 30 mm および 60 mm のプラスチックシャーレを使用する。

##### 3. 検体

合計 71 種類の検体名、および、それぞれの検体に使用した溶媒は Table 2 に示す。検体は、当所合成化学研究部 および 薬品部から供給を受けたものである。なお、検体中には色素などの添加物も含まれている。

## 4. 細胞増殖抑制試験

各検体がどれだけの濃度でどの程度細胞の増殖を抑制するかを予め知るために行う。細胞を約  $1 \times 10^4$  個/培養液 2 ml の割合に 30 mm のシャーレに挿いて、3日後に数段階の濃度 (2倍希釈をくり返す) の検体を加える。更に2日間培養し、シャーレのまま 10% ホルマリンで 10 分間固定し、0.1% クリスタルヴァイオレット液で 5 分間染色する。水洗後、乾燥し、細胞層の染色度合から細胞密度を測定する。この測定には、著者らが考案した細胞密度計を用いる。無処理細胞群の値を基準として各検体の約 50% 増殖抑制濃度を算出する。

## 5. 染色体異常誘発試験

細胞を約  $2 \times 10^4$  個/培養液 5 ml の割合に 60 mm + シャーレに挿き、3日後に検体を加える。検体の濃度は、上記の 50% 増殖抑制濃度およびその前後の3濃度 (原則として2倍希釈) を選択する。対照として、無処理、および、溶媒のみを加えたシャーレを用意する。検体を加えてから 24 時間および 48 時間後に染色体標本作製する。標本の作製にあたっては、まず  $0.2 \mu\text{g/ml}$  のコルセミドで 2 時間処理した後、0.25% トリプシンによって細胞を剥離し、遠沈管中で 0.075 M の塩化カリウム溶液で 13 分間低張処理を施し、次に、遠心した細胞を氷酢酸メタノールで固定する。エアードライ法によって作製シグマザ液で染色した標本から、100 個の中期分裂像を観察し、倍数体細胞の出現率と染色体異常を持つ細胞の出現率を記録する。形態異常は、染色分体ギャップ (g)、切断 (b)、転位 (t)、環状形成 (r)、および断片化 (f) に分類し、いずれかの異常を持つ細胞が 5% 未満の場合を (-)、5~10% 未満を ( $\pm$ )、10~20% 未満を (+)、20~50% 未満を (++)、50% 以上を (+++) と判定した。

## 実験結果

## 1. 対照群に見られた染色体異常出現率

各実験毎に、未処理細胞および溶媒のみ加えた細胞について同時に観察したが、それらの結果をまとめて Table 1 に示す。いずれの群でも、倍数体の出現率は 2% を越えず、また、染色体異常を持つ細胞の出現率も 2% を越えることはなかった。

## 2. 種々の医薬品による染色体異常出現率

各検体について3濃度に渡って検索したが、このうち、染色体像が観察され得る最高濃度で得られた結果のみを Table 2 に示す。原則として各濃度についてシャーレ1枚で実験を行ったが dose-response が得られない場合、あるいは、結果が ( $\pm$ ) に終わった検体については再度実験を繰り返した。

表中、溶媒の種類は、生理食塩水 (S)、エタノール (E)、DMSO (D)、CMC (C) で示されている。また、倍数体出現率は 48 時間目のもののみを示す。検体はアルファベット順に並べてあるが、濃度に示される如く、細胞に対する毒性効果 (増殖抑制効果) は、検体間でかなり異なることがわかる。例えば、chlorpromazine-HCl、および、hydralazine-HCl は極めて強く (共に  $0.0075 \text{ mg/ml}$ )、acid red, dextran, hexamethonium bromide などは弱く ( $12.0 \sim 15.3 \text{ mg/ml}$ )、その差は約 2000 倍にも及んでいる。

染色体数に異常を来し、倍数体細胞の増加を見たものは、diethylstilbestrol, noscipine-HCl, 5,5-ethyl-phenylbarbiturate、および、ethionamide の4検体であった。特に、前二者では、80% 以上の出現率を示した。形態異常では、hydralazine-HCl が最も低濃度で高率に異常を誘発し、次いで、propyl gallate, acetaminophen の順であった。Methyclothiazide, hydrogen peroxide, caffein, phenylbutazone, sodium benzoate などでは、濃度はやや高目ではあるが比較

Table 1. Chromosome tests on solvents used for dilution of each agent—Control

Solvent	Final dose	Polyploid cells (%) <sup>*2</sup>		Chromosome aberration (%) <sup>*2</sup>	
		24 h	48 h	24 h	48 h
Untreated	—	0.8 $\pm$ 0.8	0.8 $\pm$ 0.6	0.9 $\pm$ 0.8	1.1 $\pm$ 1.0
Saline	—	1.0 $\pm$ 0.7	0.8 $\pm$ 0.7	0.8 $\pm$ 0.4	0.6 $\pm$ 0.8
Ethanol	1.0%	0.4 $\pm$ 0.5	0.6 $\pm$ 0.5	1.4 $\pm$ 0.8	1.2 $\pm$ 0.7
DMSO	0.5%	0.8 $\pm$ 1.0	0.0 $\pm$ 0.0	1.0 $\pm$ 0.9	1.0 $\pm$ 0.6
CMC sodium	1.0 mg/ml	— <sup>*1</sup>	0.2 $\pm$ 0.4	— <sup>*1</sup>	1.2 $\pm$ 1.1

<sup>\*1</sup> Not tested <sup>\*2</sup> Mean $\pm$ S.D. of 5~10 experiments

の高率に異常が出現した。

表中に示した  $D_{20}$  値は、検体の各濃度別に得られた実験値から、染色体異常を 20% 誘発し得る濃度を算出したものである。従って、この数値が小さい程低濃度で異常が出現し易いことになる。なお参考までに、各検体について、*Salmonella* を用いた突然変異試験の結果、並びに、発癌性について現在までに報告されている結果を表右端に付記する。

## 考 察

細菌に対して突然変異誘発性を示す化学物質の大部分は、同時に哺乳動物細胞に対しても染色体異常誘発能があることが知られている<sup>3)</sup>。本実験で用いた化合物については、少数を除いて、*Salmonella* を用いた突然変異試験の結果が、すでに得られているが、それによれば、acid red, hydralazine-HCl, nitrofurantoin, phencyclidine-HCl, retinol acetate, sodium erythorbate, sulpyrin などの9検体が陽性となっている。

染色体試験で陽性であったものは、71検体中 25種類であるが、このうち、少なくとも、細菌による突然変異性を示したのものについては、今後他の試験システムによって更に検討を加える必要があろう。

今回著者らが行った染色体試験では、検体を直接作用させた。発癌性物質のなかには、nitrosamine 系化合物あるいは 2-acetylaminofluorene や benzo[a]-pyrene のように、代謝活性化によってはじめて生物活性を生ずるものが多い。染色体試験でもこれらの化合物は直接効果はなく、ラット肝マイクロゾーム (S9 mixture) を加えてはじめて異常が出現してくる<sup>4)</sup>。細菌試験で陽性を示し、染色体試験で陰性であった場合には、こうした理由に基くことが多いと思われる。

細菌による変異原性試験、あるいは哺乳動物細胞による染色体試験は、種々の環境変異原物質の短期スクリーニング法として有用性の高いものである。しかし、DNA に傷害を及ぼす物質のすべてが変異原性を

示すとは限らないと同様に、変異原性あるいは染色体異常誘発性を示す物質が必ずしも発癌性や催奇形性を有するとは限らない。おそらく、染色体異常誘発性物質の中に、細菌に突然変異を誘発する物質が含まれ、更にその中に、発癌性物質、あるいは催奇形性を含む遺伝毒性物質が含まれるのであろう。従って、上記短期スクリーニングによって検出された疑わしい物質は、更に実験動物レベルで再検討されなければならない。

更に、diethylstilbestrol (DES) のように、染色体の形態的变化を伴わずに、染色体数の変化を起こさせる物質(細胞分裂毒)は、DNA 損傷と言うよりも細胞内蛋白質成分の機能に関与していると考えられる<sup>5)</sup>。これらの物質では、細菌の突然変異は起こらない。DES は既に発癌性が認められている物質である。また phenacetin は染色体異常が陽性であったために発癌試験が実施された物質である。その結果は陽性であった。細菌の突然変異試験では最初、陰性であったがラット肝 S9 をハムスター肝 S9 に代えて、はじめて陽性となったという実験もある<sup>6)</sup>。これらの事実を考慮すると、短期スクリーニング法では、複数の試験システムによって得られた結果を総合的に評価する必要があるものと思われる。

(本研究の一部は、厚生省がん助成金による)。

## 文 献

- 1) WHO Scientific Group : WHO Technical Report Series, No. 546 (1974)
- 2) M. Ishidate, Jr., S. Odashima : *Mutation Res.*, 48, 337-354 (1977)
- 3) 石箱 基 : 癌と化学療法, 4 (Suppl.) 161-170 (1977)
- 4) 金子厚子ら : 第 36 回日本癌学会 (1977)
- 5) M. Sawada and M. Ishidate, Jr. : *Mutation Res.*, 57 (2), 175 (1978)
- 6) 松島泰次郎らの私信による (1978)

Table 2. Chromosome tests on medical

Compound	Solvent* <sup>1</sup>	Dose* <sup>2</sup> (mg/ml)	Polyploid % (48 h)
Acetaminophen	S	0.06	0.0
Acetanilide	E	1.60	0.0
Acid red	S	12.00	0.0
Amaranth (Food red No. 2)	S	1.00	0.0
Aminopyrine	S	2.00	4.0
Atropine-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	S	0.25	1.0
Barbital	S	2.00	1.0
Buformin-HCl	S	0.03	0.0
<i>i</i> -Butyl- <i>p</i> -hydroxybenzoate	E	0.06	2.0
<i>n</i> -Butyl- <i>p</i> -hydroxybenzoate	E	0.06	2.0
Caffeine	S	1.00	1.0
Chlorpromazine-HCl	S	0.0075	0.0
Chlorpropamide	E	2.00	1.0
Clofibrate	C	0.25	0.0
CMC-sodium	S	2.80	
Dextran	S	15.30	2.0
Diazepam	E	0.125	0.0
Diethylstilbestrol	E	0.015	81.0
2,5-Dimethoxy-4-methyl-amphetamine (STP)	S	0.03	0.0
N,N-Dimethyltryptamine (DMT)	D	0.125	3.0
Ethenzamide	D	0.50	15.0
Ethionamide	D	0.40	0.0
Ethyl <i>p</i> -hydroxybenzoate	E	0.25	1.0
Ethinylestradiol	S	0.004	2.0
5,5-Ethylphenylbarbiturate	S	2.00	13.0
Furosemide	C	2.00	0.0
Glibenclamide	D	0.25	0.0
Haloperidol	E	0.015	3.0
Hexamethonium bromide	S	12.00	0.0
Hydralazine-HCl	S	0.0075	0.0
Hydrogen peroxide	S	0.25	2.0
Imipramine-HCl	S	0.01	0.0
Indomethacin	E	0.25	0.0
Isoniazid	S	3.00	0.0
<i>d</i> -Lysergic acid diethylamide (LSD)	S	0.125	0.0
Mecamylamine	S	0.25	1.4
Mescaline-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	S	0.25	0.0
Methamphetamine	S	0.25	1.0
Methyclothiazide	D	0.25	4.0
Methyl <i>p</i> -hydroxybenzoate	E	0.50	0.0
Morphine-HCl	S	0.50	2.0

## drugs and their related compounds

Chromosome aberration			Final judge	D <sub>20</sub> *5	Note*6	
%	(Time)	Type*3			C	M
46.0	(48 h)	g.b.t.f.	++	0.023		-
3.0	(24 h)	g.	-			-
17.0	(24 h)	g.b.t.	+	12.0		+
5.0	(48 h)	g.b.t.	±			-
4.0	(48 h)	g.b.	-			-
1.0	(24 h)	g.b.	-		-	-
12.0	(48 h)	g.b.r.	+	6.6		-
1.0	(48 h)	g.	-			-
1.0	(48 h)	g.	-			-
2.0	(48 h)	b.	-			-
84.0	(48 h)	g.b.t.r.	+++	0.36	±	
2.0	(24 h)	g.t.	-		-	-
19.0	(48 h)	g.b.t.	+	2.4		-
2.0	(48 h)	g.	-			-
0.0	(48 h)		-			-
0.0	(24 h)		-			-
3.0	(48 h)	g.b.	-			-
2.0	(24 h)	g.b.	polyploid, -		+	-
1.0	(48 h)	g.	-			-
2.0	(24 h)	t.r.	-			-
14.0	(48 h)	g.b.t.	polyploid, +	1.0		-
18.0	(48 h)	g.b.t.r.	+	0.54	+	-
11.0	(48 h)	g.b.t.r.	+	0.19		-
2.0	(48 h)	g.f.	-		+	-
4.0	(48 h)	g.b.t.	polyploid, -		-	-
14.0	(24 h)	g.b.	+	2.9		-
4.0	(48 h)	g.b.r.	-			-
4.0	(24 h)	g.b.	-			-
2.0	(24 h)	g.t.	-			-
75.0	(48 h)	g.b.t.f.	+++	0.003		+
46.0	(24 h)	g.b.t.	++	0.11	-	-
4.0	(24 h)	g.b.t.	-			-
4.0	(24 h)	g.b.	-			-
34.0	(24 h)	g.b.t.r.	++	2.1	+	
2.0	(24 h)	g.	-			+
1.4	(24 h)	g.	-			-
2.0	(48 h)	g.b.	-		-	-
0.0	(48 h)		-			-
88.0	(48 h)	g.b.t.f.	+++	0.14		-
15.0	(48 h)	g.b.t.	+	0.96	-	-
3.0	(48 h)	g.	-			-

Table 2.

Compound	Solvent* <sup>1</sup>	Dose* <sup>2</sup> (mg/ml)	Polyploid % (48 h)
New cocchine (Food red No. 102)	S	2.00	0.0
Nitrofurantoin	D	0.06	0.0
Nitrofurazone	E	0.02	0.0
Noscapine-HCl	S	0.06	97.0
Papaverine-HCl	S	0.125	2.0
Phenacetin	E	0.80	0.0
Phencyclidine-HCl	S	0.03	0.0
Phentolamine	S	0.03	1.0
Phenylbutazone	D	1.00	0.0
Potassium sorbate	S	4.00	1.0
Progesterone	E	0.03	0.0
Propyl gallate	S	0.04	0.0
<i>i</i> -Propyl <i>p</i> -hydroxybenzoate	E	0.125	3.0
Reserpine	D	0.03	1.0
Retinol acetate	D	0.03	1.0
Rose bengal (Food red No. 105)	S	0.40	0.0
Saccharin sodium	S	8.00	1.0
Simfibrate	C	2.00	0.0
Sodium benzoate	S	2.00	1.0
Sodium dehydroacetate	S	0.50	1.0
Sodium erythorbate	S	0.25	0.0
Sulpyrin	S	0.75	2.0
Sunset yellow FCF (Food yellow No. 5)	S	4.00	0.0
Tartrazine (Food yellow No. 4)	S	4.00	0.0
Tocopherol	D	0.25	1.0
Tolbutamide	E	1.00	2.0
Trichlormethiazide	D	0.75	0.0
Trimethidinium methosulfate	S	8.00	0.0
Tween 60	S	0.20	1.0
Tween 80	S	0.10	0.0

\*<sup>1</sup> Solvent : S : saline, E : ethanol, D : DMSO, C : CMC

\*<sup>2</sup> The maximum tolerated dose on cells.

\*<sup>3</sup> Aberration type : g : gap, b : break, t : exchange, r : ring, f : fragmentation

\*<sup>4</sup> Judgement : (-) less than 4%, ( $\pm$ ) 5~9%, (+) 10~19%, (++) 20~49%, (+++) more than 50%

Continued

Chromosome aberration			Final judge	D <sub>20</sub> * <sup>5</sup>	Note* <sup>6</sup>	
%	(Time)	Type* <sup>2</sup>			C	M
4.0	(24 h)	g.b.	—		—	—
19.0	(48 h)	g.b.t.f.	+	0.062	—	+
1.0	(20 h)	g.	—		+	+
14.0	(48 h)	g.b.t.r.f.	polyploid, +	0.13		—
15.0	(48 h)	g.b.t.	+	0.34		—
14.0	(24 h)	g.b.t.	+	1.32	+	—
0.0	(48 h)		—			+
2.0	(48 h)	g.	—			—
34.0	(48 h)	g.b.t.	++	0.83		—
11.0	(48 h)	g.b.t.	+	17.0		—
4.0	(24 h)	g.b.t.r.	—		+	—
69.6	(24 h)	g.b.t.f.	+++	0.023	—	—
3.0	(24 h)	b.	—			—
1.0	(24 h)	g.	—		—	—
2.0	(24 h)	g.	—		—	+
4.0	(24 h)	g.b.t.	—			—
14.0	(48 h)	g.b.t.	+	11.0	±	—
1.0	(24 h)	g.	—			
38.0	(48 h)	g.b.t.f.	++	1.0		—
2.0	(24 h)	g.b.	—			—
1.0	(24 h)	b.	—		—	+
17.0	(24 h)	g.b.t.	+	0.98		+
4.0	(48 h)	g.b.	—			—
4.0	(24 h)	g.b.	—		—	—
1.0	(24 h)	b.t.	—		—	—
3.0	(24 h)	g.b.	—			—
26.0	(48 h)	g.b.t.	++	0.56		—
0.0	(24 h)		—			—
1.0	(48 h)	g.	—		±	—
1.0	(48 h)	g.	—			—

\*<sup>5</sup> D<sub>20</sub> : The dose (mg/ml) at which 20% aberrations were observed.\*<sup>6</sup> C : Carcinogenicity in animals according to the data established in 'Survey of compounds which have been tested for carcinogenic activity', U.S. Department of Health, Education, and Welfare, N.I.H. M : Mutagenicity in bacteria according to the data obtained by Dr. K. Yoshikawa in our laboratory.

ガスクロマトグラフィーおよび高速液体クロマトグラフィーによる  
塩酸アヘンアルカロイド製剤中の他のアルカロイドの定量

大野昌子・島峯望彦・高橋一徳

Gas- and High Speed Liquid-Chromatographic Determinations of the  
Other Alkaloids in Opial Preparations

Masako ÔNO, Mochihiko SHIMAMINE and Kazunori TAKAHASHI

The studies on the other alkaloids in Opial and its preparations were carried out by chromatographic methods of GC and HLC since the availability of these alkaloids is under discussion.

In these methods these alkaloids were extracted with chloroform from the sodium hydroxide solution and chloroform extracts were used as the sample solution.

These methods were simple and rapid, and not affected by atropine and scopolamine combined with Opial preparations.

The contents of these alkaloids were calculated using the equation formulas obtained from their calibration curves. The coefficient of variation of these alkaloids were not exceed 1.5% by GC and below 0.7% by HLC.

(Received May 31, 1978)

日局 9 に記載されている塩酸アヘンアルカロイド (オピアル) には、製剤としてその注射剤およびこれに塩酸パバベリン、硫酸アトロピンあるいは臭化水素酸スコポラミンを配合したものがある。オピアルのモルヒネ含量は 47.0~52.0%、他のアルカロイドの含量は重量法で総量として 33.0~38.5% と規定されておりとくに効果を期待して加えられた微量配合剤についての含量規定もない。混合製剤についてはとくに品質、効力の評価の点などを考慮して有効成分の定量の必要性が生じてきている今日、これらの製剤中のモルヒネ以外のアルカロイドについても含量の割合を求める方法の確立は急務である。われわれはすでにガスクロマトグラフィー (GC) による麻薬類の定量<sup>1,2)</sup>および麻薬に配合されたアルカロイドの定量<sup>3)</sup>を行い、これらの製剤中の他のアルカロイドを定量するための公定法としての GC 適用の可能性を検討してきたが、ここではオピアル製剤中の他のアルカロイドについてさらに高速液体クロマトグラフィー (HLC) による定量を試み、重量法、GC との比較を行った。オピアル製剤中の他のアルカロイドは水酸化ナトリウムアルカリ性でクロロホルムに抽出され、抽出液を蒸発して得られた残留物について、直接 GC および HLC で定量できた。

実 験 方 法

I 定量用アルカロイド塩基の精製 コデイン、テバイン、パバベリン、ノスカピン：前報<sup>1)</sup>の方法に従った。

II ガスクロマトグラフィー

測定条件をつぎに表示する。

1) Condition

i) GC Apparatus : Shimadzu GC-4BMPF

Detector : FID

Column : OV-1, 3%, Gas chrom Q (60~80 mesh), glass, I.D. 3mm, L. 2m

Temp. : Column 265°, Detector 270°

Carrier gas : N<sub>2</sub>, Flow rate : 50 ml/min

ii) Digital integrator : Takeda Riken TR-2221

Slope sense 40  $\mu$ V/min

Peak width 6 sec

Valley time 3 sec

Height factor 10

Minimum area 1000  $\mu$ V/sec

Delay time 60 sec

P. change time 0

Stop time 40 min

2) GC用標準溶液の調製 コデイン約 20 mg, テバイン約 15 mg, パパベリン約 25 mg およびノスカピン約 50 mg をそれぞれ精密に量り, 無水エタノールに溶かし 100 ml とする。

3) GC 用内部標準溶液 *n*-酪酸コレステロール約 25 mg を精密に量り, 無水エタノールに溶かし 100 ml とする。

### III 高速液体クロマトグラフィー

測定条件をつぎに表示する。

#### 1) Condition

Detector : UV Detector NS-310 (Nihon Scimitsu)

Recorder : Ohkura, Model D2R2M1

Column : Porous styrene-divinyl benzene polymer (Iatrobeads 6CP-2020), glass, I.D. 5 mm, L. 50 cm

Eluent : Methanol-*n*-Hexane-28% Ammonia water = 97 : 2 : 1

Flow rate : 2 ml/min

Detector range : 8 Wave length : 284 nm

Recorder range : 10 mV Chart speed : 2 mm/min

2) HLC用標準溶液の調製 コデイン約 40 mg, テバイン約 12.5 mg, パパベリン約 40 mg およびノスカピン約 600 mg をそれぞれ精密に量り, メタノールに溶かし 100 ml とする。

IV 試料の調製 塩酸アヘンアルカロイド約 1 g を精密に量り, 水 20 ml を加えて溶かし, 水酸化ナトリウム試液 25 ml を加え, クロロホルム 50 ml, 40 ml, 30 ml および 20 ml で抽出する。全抽出液を合わせ, 水 10 ml で洗ったのち, あらかじめクロロホルムで潤したろ紙でろ過する。洗液はクロロホルム 5 ml で抽出し, 抽出液をさきのろ紙でろ過し, さきのろ液に合わせる。ろ紙はクロロホルムで洗い, 洗液をろ液に合わせ, 水浴上で蒸発乾固し, メタノール・アセトン混液 (3 : 2) 60 ml を正確にとり, 残留物に加えて溶かし, 重量法, GC 法および HLC 法による定量用試料溶液とする。

### V 定量

1) 重量法 IVで得られた試料溶液 50 ml を正確に量り, 水浴上で蒸発乾固し, 残留物を 105° で 4 時間乾燥し, その重量を量り, 他のアルカロイドの量とする。

2) GC 法 IVで得られた試料溶液 1 ml を正確に量り, 水浴上で蒸発乾固し, 残留物に GC 用内部標準溶液 2 ml を加えて溶かし, その 1.0 μl をとり, 前記条件で測定を行い, ピーク面積比 (x) を求め, 次式により各アルカロイド量を算出する。

コデイン含量 (mg) = 0.571 x + 0.008

テバイン含量 (mg) = 0.693 x + 0.003

パパベリン含量 (mg) = 0.648 x + 0.011

ノスカピン含量 (mg) = 0.928 x + 0.206

3) HLC 法 IVで得られた試料溶液 10.0 μl をとり, 前記条件で測定し, ピークの高さ mm (x) を求め, 次式により各アルカロイド量を算出する。

コデイン含量 (mg) = 0.051 x - 0.003

テバイン含量 (mg) = 0.022 x + 0.006

パパベリン含量 (mg) = 0.027 x + 0.020

ノスカピン含量 (mg) = 0.110 x + 0.057

### 実験結果および考察

#### 1. 他のアルカロイドの GC および HLC

IV によって調製した試料は GC (Fig. 1) および HLC (Fig. 2) によりコデイン, テバイン, パパベリンおよびノスカピンを分離定量することができる。なお GC 法において, OV-1 のカラムを用い, カラム温度 265° で操作するとき,  $t_R$  の小さいコデインとテバインのピークは溶媒のテーリングと重なるが, デジタルインテグレーターの前記設定条件によれば, 面積計算に大きな誤差を与えないことがわかった。

#### 2. 検量線の作成

i) GC 法による検量線 GC 用標準溶液をそれぞれ一定量ずつとり, 蒸発乾固して得た残留物に正確

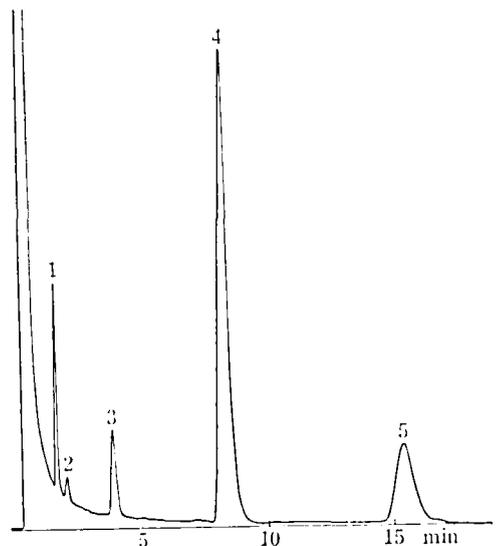


Fig. 1. Gas chromatogram of Opial powder condition : above-mentioned

1 : codeine, 2 : thebaine, 3 : papaverine,

4 : noscapine, 5 : cholesterol n-butyrate (I.S.)

Table 1. Determinable ranges, equation formulas and coefficients of correlation of codeine, thebaine, papaverine and noscapine by means of GC

	determinable range alkaloids (w)/I.S. (w)	equation formula	r
Codeine	0.192~1.022	$1.167x + 0.017$	0.9999
Thebaine	0.051~0.409	$1.417x + 0.006$	0.9999
Papaverine	0.192~1.022	$1.324x + 0.023$	0.9999
Noscapine	1.278~10.221	$1.897x + 0.421$	0.9999

Table 2. Determinable ranges, equation formulas and coefficients of correlation of codeine, thebaine, papaverine and noscapine by means of HLC

	determinable range mg/ml	equation formula	r
Codeine	0.1 ~0.4	$y = 0.054x - 0.003$	0.9999
Thebaine	0.05~0.125	$y = 0.022x + 0.006$	0.9998
Papaverine	0.1 ~0.4	$y = 0.027x + 0.020$	0.9999
Noscapine	3.0 ~6.0	$y = 0.110x + 0.057$	0.9999

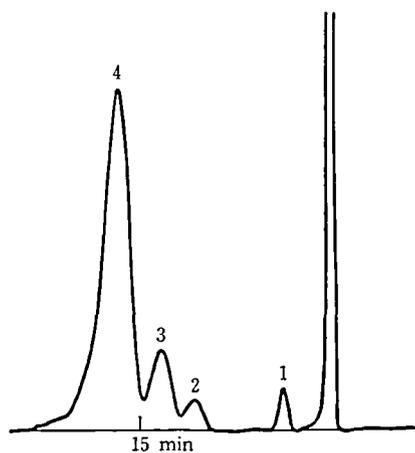


Fig. 2. High speed liquid chromatogram of Opial powder  
condition : above-mentioned  
1 : codeine, 2 : thebaine, 3 : papaverine,  
4 : noscapine

に量った 2 ml の GC 用内部標準溶液を加えて溶かし、その 1.0  $\mu$ l ずつにつき GC を行う。たて軸にアルカロイドと内部標準物質との重量比 (y) を、横軸にデジタルインテグレーターを用いて得られたピーク

面積比 (x) をとる。

コデイン、テバイン、パバペリンおよびノスカピンの定量可能範囲、回帰方程式および相関係数は Table 1 に示すとおりで、いずれも定量可能範囲におけるピーク面積比の再現性に関する試験で変動係数はいずれも 1.5% 以下 (n=7) を示した。

ii) HLC 法による検量線 HLC 用標準溶液の一定量ずつをとり、メタノールを加えて 10 ml とした溶液の 10.0  $\mu$ l ずつにつき HLC を行う。たて軸にアルカロイド量 (y) を、横軸に得られたピークの高さ mm (x) をとり検量線を作成した。

コデイン、テバイン、パバペリンおよびノスカピンの定量可能範囲、回帰方程式および相関係数はいずれも Table 2 に示すとおりで、いずれも定量可能範囲におけるピーク高さ mm の再現性について、得られた変動係数はいずれも 0.7% 以下 (n=7) であった。

3. 回収率の検討 各アルカロイドの一定量をとって、試料の場合と同様に操作して、得られたピーク面積比 (x) (GC 法) およびピーク高さ mm (x) (HLC 法) から含量 (mg) を算出し、それぞれの回収率を求めた (Table 3)。

4. オピアル製剤への適用 オピアル 1g を精密に量り、本法により定量して得た結果を Table 4 に示す。

なお、オピアル製剤に塩酸パバペリン、硫酸アトロピンおよび臭化水素酸スコポラミンを配合した注射剤

Table 3. Recovery of codeine, thebaine, papaverine and noscapine by means of GC and HLC

GC				HLC			
codeine	thebaine	papaverine	noscapine	codeine	thebaine	papaverine	noscapine
97.3%	90.4%	94.5%	92.6%	97.3%	90.4%	100.3%	97.6%
97.3	90.4	93.1	94.7	97.3	90.4	100.3	97.6
101.8	95.1	102.8	96.4	95.9	95.1	96.6	95.9
100.6	95.1	101.7	96.4	95.9	95.1	100.0	95.9

Table 4. Contents of codeine, thebaine, papaverine and noscapine in the different, four commercial Opial preparation by means of GC and HLC

Sample	GC				HLC				Gravimetry
	codeine	thebaine	papaverine	noscapine	codeine	thebaine	papaverine	noscapine	
A	1.71%	0.36%	1.71%	29.79%	1.60%	0.37%	1.73%	31.53%	35.74%
B	1.72	0.36	1.70	30.48	1.60	0.37	1.73	31.47	35.58
C	1.71	0.45	1.66	28.68	1.59	0.38	1.69	30.00	34.78
D	1.67	0.45	1.93	28.17	1.58	0.45	2.02	30.51	34.43

について、これらのアルカロイドがコデイン、テバイン、パバベリンおよびノスカピンの定量に与える影響を検討したが、硫酸アトロピンおよび臭化水素酸スコポラミンはいずれも GC によって得られる  $t_R$  が、もっとも  $t_R$  の小さいコデインの場合よりさらに小さく、また HLC の場合にはいずれもピークが得られなかったため、日局 9 のオピアル全製剤中のあへんの副アルカロイドは、これらの方法で分離定量が可能である。

オピアル製剤中のコデイン、テバイン、パバベリンおよびノスカピンの定量に、迅速かつ精度のよい GC 法および HLC 法を確立した。両者とも共存するアトロピンおよびスコポラミンの影響を受けず、また検量線作成時にピーク面積比 (GC 法) およびピーク高さ mm (HLC 法) がもっとも大きくばらついた場合で

も、その変動係数は 1.5% 以下 (GC 法) および 0.7% 以下 (HLC 法) であり、定量法として十分満足できるものである。これらの定量法にしたがって、市販のオピアル製品を定量した結果、ノスカピンの含量は副アルカロイド全体の約 90% であった (Table 4)。

#### 文 献

- 1) 大野昌子, 島峯望彦, 高橋一徳: 衛生試報, 95, 4 (1977)
- 2) 大野昌子, 島峯望彦, 高橋一徳: 衛生試報, 93, 92 (1975)
- 3) 麻薬技術委員会: 医薬品研究, 5, No. 4, 420 (1974)

## 向精神剤に関する研究 TLC-FID Analyser によるメプロバメートの定量

大野昌子・島峯望彦・高橋一徳

### Studies on Psychotropic Drugs Determination of Meprobamate by Means of TLC-FID Analyser

Masako Ōno, Mochihiko Shimamine and Kazunori Takahashi

Very small amounts of meprobamate was determined quantitatively using TLC-FID Analyser after the separation of its acetone extract on the special silica gel rods "Chromarod-S". The coefficient of variation (CV) of this method was about 2% (Table 1). This method also brought about good results when applied to the film-coating tablets without any disturbances, and CV was about 2% (Table 3).

(Received May 31, 1978)

著者らは「向精神剤の鑑定法」に関する研究を行ってきたが<sup>1)</sup>、向精神剤のメプロバメートの定量法として検討したガスクロマトグラフィーでは単一ピークを示す条件を求めることができず、またそのメタノール溶液は紫外部に吸収を示さないため、UVによる測定法はもちろん UV 検出器を用いる高速液体クロマトグラフィーの適用も不可能である。われわれは薄層板のかわりに特殊なシリカゲル焼結薄層棒を用いクロマトグラフィーを行ったのも、水素炎イオン化検出器で分離後の物質を検出させ記録する機器 TLC-FID Analyser (Iatroscan TH-10 TLC Analyser) を用いた分析法によりメプロバメートおよびその製剤(錠)の含量測定を行った。

#### 実験方法および結果

##### 1. 装置

TLC-FID Analyser : Iatroscan TH-10 TLC Analyser

Recorder : Ohkura, Model D2R2M1

##### 2. 試料および試液

メプロバメート末、メプロバメート錠(1錠中メプロバメート 200 mg 含有)：これらの末および錠は国内でアトラキシンという商標で市販されているものを使用した。錠剤は緑色のフィルムコーティング錠である。

1,3,5-トリフェニルベンゼン：試薬特級

アセトン：試薬特級

クロロホルム：試薬特級

##### 3. 定量法

末は約 85 mg をとり、また錠剤については 20 個以上をとりその重量を精密に量り、粉末としてメプロバメート約 85 mg に対応する量を精密に量り、10 ml のメスフラスコに入れ、内部標準溶液 5 ml およびアセトンを加えよく振り混ぜ、さらにアセトンを加えて正確に 10 ml としこれを試料溶液とし、また錠剤の場合は吸引ろ過し、このろ液を試料溶液とする。

試料溶液 1  $\mu$ l ずつをシリカゲル焼結薄層棒(クロマロッド-S) 10 本にスポットし、展開溶媒(クロロホルム：アセトン=9：1)で 10 cm 展開し、50°の乾燥器中で 5 分間乾燥後、TLC-FID Analyser を用いて測定する。内部標準物質とメプロバメートとのピーク面積比を求め、あらかじめ作成した検量線から得た 回帰方程式によりメプロバメートの含量を求める。得られる 10 のピーク面積比のうち両極端値を除く。

内部標準溶液 (I.S.) : 1,3,5-トリフェニルベンゼン 約 700 mg を精密に量り、アセトンに溶かして正確に 100 ml とする。

##### 4. 検量線の作成

メプロバメート 57.0~154.0 mg の範囲を 4 点選びそれぞれ精密に量り 10 ml のメスフラスコに入れ、それぞれに内部標準溶液 5 ml およびアセトンを加えて溶かし正確に 10 ml とし標準溶液とする。これらの溶液 1  $\mu$ l ずつをとり、試料溶液と同様に操作し、たて軸には内部標準物質に対するメプロバメートの重量比 ( $Y$ ) を、横軸には内部標準物質に対するメプロ

バメートのピーク面積比 (x) をとり検量線を作成する。

### 5. 検量線および再現性の検討

内部標準溶液: 1,3,5-トリフェニルベンゼン 652.0 mg をアセトンに溶かし正確に 100 ml とした。

標準溶液: メプロバメート 57.0, 85.0, 115.0, 154.0 mg それぞれに内部標準溶液 5 ml およびアセトンを加えて溶かし正確に 10 ml とし, 各標準溶液を  $S_1 \sim S_4$  とする。

前記標準溶液  $S_1 \sim S_4$  を用い定量法に従い操作を行なった結果を Table 1 に, またクロマトグラムを Fig. 1 に示す。

装置および測定条件

Iatroscan TH-10 TLC Analyser

$H_2$ : 160 ml/min, Air: 2000 ml/min

Scanning speed 2.9 sec/cm

Table 1. Reproducibility of TLC-FID analysis with the meprobamate standard solutions of  $S_1 \sim S_4$

Standard solution	y	$\bar{x}(n=32)$	S.D.	CV (%)
$S_1$	1.75	0.65	0.027	4.2
$S_2$	2.61	0.97	0.025	2.6
$S_3$	3.53	1.40	0.025	1.8
$S_4$	4.72	1.96	0.044	2.2

n: the sum of the frequency

y: amount of meprobamate (mg)/amount of I.S. (mg)

x: mean value of the ratio of peak areas, meprobamate/I.S.

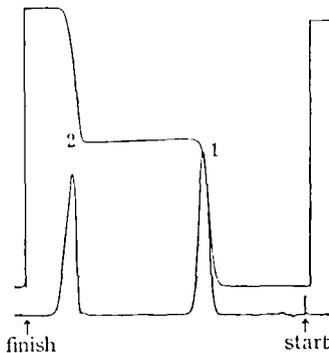


Fig. 1. Chromatogram of the standard solution  $S_2$   
1: I.S. 2: meprobamate

Recorder

Range: 0.2 V, Chart speed: 300 mm/min

1つの標準溶液に対しクロマロッド-S 40本を使用した。その再現性は Table 1 に示したように標準溶液  $S_1$  は CV 値が高いが, 他はほぼ一定であった。検量線を作成して得た回帰方程式はつぎのとおりで相関係数(r)は 0.999 であった。  $y=2.24x+0.36$

### 6. 回収率について

検量線より得た回帰方程式を用い内部標準溶液およびメプロバメートの採取量を変えて回収率を検討した。

試料溶液 A: メプロバメート 92.7 mg に内部標準溶液 (1,3,5-トリフェニルベンゼン 756.0 mg をアセトンに溶かし正確に 100 ml とする) 5 ml, およびアセトンを加えて溶かし正確に 10 ml とする。

試料溶液 B: メプロバメート 84.3 mg に内部標準溶液 (1,3,5-トリフェニルベンゼン 700.0 mg をアセトンに溶かし正確に 100 ml とする) 5 ml, およびアセトンを加えて溶かし正確に 10 ml とする。

Table 2. The recovery of meprobamate in the sample solutions A and B

Sample solution	$\bar{x}(n=8)$	y	$y \times z$	%
A-1	0.92	2.42	91.5	98.7
2	0.91	2.40	90.7	97.8
3	0.92	2.42	91.5	98.7
4	0.95	2.49	94.1	101.5
		Mean		99.2
		S.D.		1.4
		CV		1.4%
B-1	0.93	2.44	85.4	101.3
2	0.95	2.49	87.2	103.4
3	0.89	2.35	82.3	97.6
4	0.93	2.44	85.4	101.3
		Mean		100.9
		S.D.		2.1
		CV		2.1%

$\bar{x}$ : mean value of the ratio of peak areas, meprobamate/I.S.

y: amount of meprobamate (mg)/amount of I.S. (mg)

z: amount of I.S. (mg) in 5 ml of its solution

Table 3. The recovery of meprobamate in the meprobamate tablets by the methods I and II

Sample solution	$\bar{x}$ (n=8)	y	$y \times 32.6 \times 283.0/a$	%
C-1	1.09	2.80	209.0	104.5
2	1.05	2.71	202.3	101.2
3	1.08	2.78	207.5	103.8
4	1.04	2.69	200.8	100.4
			Mean	102.5
			S.D.	1.7
			CV	1.7%
D-1	1.01	2.62	194.0	97.0
2	1.07	2.76	204.4	102.2
3	1.03	2.67	197.7	98.9
4	1.09	2.80	207.3	103.7
			Mean	100.5
			S.D.	2.6
			CV	2.6%
E-1	1.02	2.64	196.9	98.5
2	1.10	2.82	210.3	105.2
3	1.04	2.69	200.6	100.3
4	1.06	2.73	203.6	101.8
			Mean	101.5
			S.D.	2.5
			CV	2.5%
F-1	0.99	2.58	200.0	100.0
2	1.03	2.67	207.0	103.5
3	1.02	2.64	204.7	102.4
4	1.04	2.69	208.6	104.3
			Mean	102.6
			S.D.	1.6
			CV	1.6%

$\bar{x}$  : mean value of the ratio of peak areas, meprobamate/I.S.

y : amount of meprobamate (mg)/amount of I.S. (mg)

a : amount (mg) of powdered meprobamate tablets

試料溶液AおよびBについて定量法に従い、4回くり返し操作を行った。その結果を Table 2 に示した。

## 7. 錠剤への適用

### A. 試料溶液の調製法の検討

#### I 法

定量法に従い粉末にして量った試料を 10 ml のメスフラスコに入れ、内部標準溶液 5 ml およびアセト

ンを加えよく振り混ぜ、さらにアセトンを加え正確に 10 ml として吸引ろ過し、このろ液を試料溶液とする。

#### II 法

定量法に従い粉末にして量った試料をフラスコに入れ、内部標準溶液 5 ml を加えてよく振り混ぜたのち、10 ml のメスフラスコ中にろ過して不溶物を除きフラ

スコおよびろ紙上の残留物をアセトンを用いてよく洗いながらろ過し、洗液とろ液を合わせて正確に 10 ml とし、これを試料溶液とする。

I, II法で調製した試料溶液C, D (I法), E, F (II法) 1 μl ずつをとり定量法に従って錠剤中のメプロバメートの含量を測定した。

メプロバメート錠 20 個の重量 5.6600 g

1錠の平均重量 283.0 mg

試料溶液C : 粉末とした試料 123.6 mg, I法

“ D : “ 124.6 “, II法

“ E : “ 123.7 “, I法

“ F : “ 119.0 “, II法

内部標準溶液 : 1,3,5-トリフェニルベンゼン 652.0 mg をアセトンに溶かし正確に 100 ml とした。

試料溶液C~Fについて4回くり返し行った測定結果を Table 3 に示した。

Table 3 に示したとおり I法とII法による定量値の間に差が認められないので試料の調製法としてはI法がよい。またクロマトグラムは Fig. 1 と同様で他のピークは現われなかった。

#### B. USP および JP による定量

試料溶液調製法の検討において使用した同一錠剤から得た粉末試料を用い、USP XIX および JP VIII (JP IX で削除) の定量法により含量を測定した。

USP XIX

1. 99.3%

JP VIII

1. 105.1%

2. 100.5

3. 99.5

Mean 99.8

2. 105.1

3. 105.6

Mean 105.3

JP VIII の方法はエタノール抽出によって得た抽出物を重量法で定量するもので、色素を加えてある錠剤ではメプロバメートのほかにこれが他のエタノール可溶性物質とともにエタノールに溶出されるので定量値は大きい値を示した。

#### 考 察

TLC-FID Analyser を用いてメプロバメートの定量法を確立することができた。原末の場合だけでなく、フィルムコーティングの錠剤についても適用することも確かめることができた。さらにこの方法によれば製剤中に他成分が入っていたとしても、TLC の段階で分離が可能ならば抽出操作は不要で、直接定量ができる利点もある。

この方法の結果の変動係数は比較的大きくなるが1つの試料溶液について10本のクロマトロードーSを用いて測定して得た値の両極端を除き、また測定回数を増すことにより改善される。測定は1回に10試料が可能で、連続4回行って所要時間は約2時間である。

#### 文 献

- 1) 大野昌子, 島峯皇彦, 高橋一徳: 衛生試験, 95, 38 (1977)

## 食用タール色素中のマンガンの定量

上田清子・外海泰秀・慶田雅洋

Addition of Manganese Test as One of the Purity Tests  
of Food Coal-Tar Dyes

Kiyoko UEDA, Yasuhide TONOGAI and Masahiro IWAIDA

Some dye manufacturers began to use potassium permanganate in place of potassium bichromate. Accordingly, it was undertaken by us to add manganese test as one of the purity tests of these dyes. The procedure proposed is as follows.

Ten millilitre of sample solution containing 500 mg of dye were evaporated, 5 ml of sulphuric acid and 40 ml of water were added to dissolve the residue, 3 ml of phosphoric acid and 0.3 g of potassium periodate were added in the next place, then the content was heated for one hour on water bath shaking occasionally, and finally the total volume was made up to 50 ml. Besides, various quantities of  $\text{KMnO}_4$  solution (0.01 mg Mn/ml) were added, separately, to 10 ml of incinerated dye solution prepared from a dye which had been known to contain no manganese, and their optical densities were measured at the wavelength of 525 nm against control solution processed by the same procedure. A linear calibration curve, passing the origin, was obtained within the manganese content of 0~2000 ppm. The results carried out on 9 lots of Brilliant Blue FCF were compared with those obtained by atomic absorption spectrometry (Table 1). Two lots contained more than 50 ppm of manganese. No Acid Red contained detectable amount of manganese.

(Received May 31, 1978)

## まえがき

食品、添加物等の規格基準では、「添加物の部 色素試験法」にクロムの試験法が定められており、食用タール色素の正条でクロム含量が規制されている。これは製造工程の酸化の過程で重クロム酸カリウムを使用した場合（食用赤色 106 号，食用緑色 3 号，食用青色 1 号など），製品中の残留を規制するものであり，その限度はクロムとして食用青色 1 号および同緑色 3 号は 50 ppm，その他は 25 ppm と定められている。ところが，排水や産業廃棄物中の六価クロムの規制が厳しいので，重クロム酸カリウムを過マンガン酸カリウムに切り替えるメーカーも現れ，昭和 48 年度の製品検査<sup>1)</sup>では，食用青色 1 号の申請品に 95~140 ppm のマンガンを含む製品が存在した。

色素試験法には，重金属の試験にマンガンの項はなく，重金属として一括して規制される。しかし，硫化マンガンの呈色はマンガンとして 1000 ppm 程度存在しないと限量濃度に到達しないので，より特異的かつ鋭敏な試験法の設定について検討した。

一般にマンガンの比色定量法には過マンガン酸イオンとして比色する方法，ホルムアルドキシム法，有機

試薬を用いる方法（ベンジジン，ロイコマラカイトグリーン，p,p-テトラメチルジアミノジフェニルメタンなど）があるが，実用上適していると考えられるヨウ素酸カリウム酸化による過マンガン酸イオン呈色法について原子吸光法によるマンガンの実測値と比較検討した。

## 実験の部

## 1. 試薬

亜硫酸ナトリウム（無水），過マンガン酸カリウム，硫酸およびリン酸は試薬特級を，過ヨウ素酸カリウムは試薬 1 級をそれぞれ使用した。

## 2. 標準溶液

マンガン標準溶液<sup>2)</sup>：過マンガン酸カリウム 287.6 mg を水 100 ml および硫酸 1 ml に溶かし，無水亜硫酸ナトリウム 0.5 g を加えて煮沸し，冷後水を加えて 200 ml とし，その 20 ml をとり，水を加えて 1000 ml とした。この液 1 ml は Mn 0.01 mg を含む。

## 3. 試料

重クロム酸塩を製造工程に使用する前述の 3 種食用タール色素中，緑色 3 号は西日本で全く生産されてい

ないので、食用赤色 106 号と食用青色 1 号について、昭和 48 年 10 月から 49 年 3 月まで当所に製品検査の申請のあったものを試料として使用した。試料の灰化および試験溶液の調製は色素試験法、重金属の項<sup>3)</sup>に従って行った。

#### 4. 使用機器

分光光度計：日立製作所製 181 型：原子吸光光度計：日本ジャレルアッシュ製 AA-1 型。

#### 5. 測定方法

原子吸光法による測定は外海<sup>4)</sup>の方法によって行った。

#### 6. マンガンの過マンガン酸イオンへの酸化

試験溶液 (色素 0.5g に相当) 10 ml をビーカーにとり、加熱して蒸発乾固した後、残留物に硫酸 5 ml および水 40 ml を加えて溶かし、さらにリン酸 3 ml および過ヨウ素酸カリウム 0.3g を加え、時計ガラスでおおい、水浴上でときどき振り混ぜながら加熱し、冷後水を加えて 50 ml とし、A 液とした。別に試料を用いないで試料の場合と同様に操作して作った空試験溶液についても上記の操作を行った。

#### 7. 過マンガン酸呈色法の検量線

あらかじめ、原子吸光法でマンガンをほとんど含まないことを確かめた色素 (食用青色 1 号) をとり、その灰化物に元の色素に対して 400~2000  $\mu\text{g/g}$  のマンガンを相当するマンガン標準溶液を添加し、前項によって操作し、空試験溶液を対照として波長 525 nm で光路幅 1cm のガラスセルを用いて吸光度を測定した。

マンガン量 0~2000 ppm の範囲で原点を通る直線が得られた (Fig. 1)。実際にはマンガンの測定は 100 ppm 前後で行うことが多いので、0~160 ppm のレベルで添加し、拡大スケールで測定した場合にも良好な

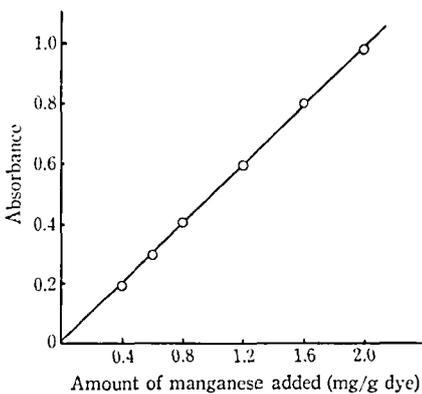


Fig. 1. Calibration curve of manganese

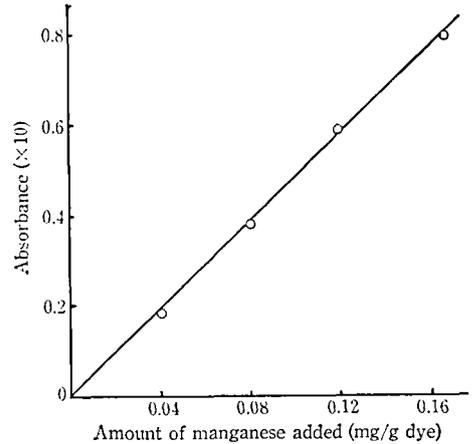


Fig. 2. Calibration curve of manganese (expanded scale)

Table 1. Comparison of the determination values of manganese in Brilliant Blue FCF

Lot	Manganese content (ppm Mn)	
	Atomic absorption spectroscopy	Colourimetry
No. 1	18	20
2	100	98
3	80	104
4	nd*	nd
5	nd	nd
6	nd	nd
7	nd	nd
8	nd	nd
9	nd	nd

\* nd : not detected

直線性を示した (Fig. 2)。かりにマンガンの限度量を 50 ppm とするとこれは Fig. 1 の検量線からよみると吸光度 0.023 に相当するが、肉眼的には呈色度を十分に比色判定しうる濃度である。

#### 8. 色素による測定成績

3 の項で示した期間に食用赤色 106 号として申請のあった 4 検体については、過マンガン酸呈色法、原子吸光法ともに全くマンガンを検出しなかった。食用青色 1 号として申請のあったもの (ブリリアントブルー FCF) 9 検体についての測定結果は Table 1 の通りである。

検体の灰化物がうすいピンク色に着色していたロット No. 3 を除いては原子吸光法と過マンガン酸呈色法の測定値はよく一致した。

### 9. 規格基準の試験法への組入れ

色素試験法にマンガンの項を組入れる場合には、クロムの項と同様に肉眼で呈色度を比較する限度試験法の形が望ましい。マンガンの限度量を 50 ppm とするならば、空試験溶液 10 ml にマンガン標準溶液 2.5 ml を加え、試験溶液と同様に操作して B 液を作製し、前述の A 液の呈色度を B 液と比較し、“A 液の呈する色は B 液の呈する色より濃くしてはならない”と表現する

のが適当である。

なお、ここに示した過マンガン酸呈色法は色素レーキを除いた全食用タール色素に適用可能である。

### 文 献

- 1) 慶田雅洋, 伊賀宗一郎, 中村恵三, 田中清子, 外海泰秀, 金田吉男: 衛生試報, **92**, 105 (1974)
- 2) JIS K0102 (1974)
- 3) 厚生省編纂: “第3版食品添加物公定書”, p. 491 (1974)
- 4) 外海泰秀, 野村幸雄: 衛生試報, **88**, 139 (1970)

## 輸入穀類中のヘプタクロル、ヘプタクロルエポキシド、クロルダン (Chlordane), エンドスルファン (Benzoepin) の定量

鈴木英世・中村恵三・慶田雅洋

### Determination of Heptachlor, Heptachlor Epoxide, Chlordane and Endosulfan in Imported Grains

Hideyo SUZUKI, Keizo NAKAMURA and Masahiro IWAIDA

A method for the detection and determination of residual heptachlor, heptachlor epoxide, chlordane ( $\alpha$  and  $\gamma$  isomers) and endosulfan ( $\alpha$  and  $\beta$  isomers) in wheat, corn and soybean, rich in fats, was pursued. After ground sample had been extracted with acetone and benzene, the concentrated extract was dissolved in 15 ml of *n*-hexane, and then extracted with 50 ml of acetonitrile saturated with *n*-hexane three times to remove fats. The solution prepared was cleaned up on Florisil column chromatograph using mixture of ether and *n*-hexane (80 ml + 20 ml) as elution solvent. An aliquot of the eluate was injected into an ECD-gas chromatograph equipped with 2% OV-1 column etc. The detection limit of the pesticides is around 0.02 ng.

(Received May 31, 1978)

有機塩素農薬は我が国においては最も繁用されて来た農薬であったが、昭和 46 年に農薬取締法施行令<sup>1)</sup>により残留性の強い BHC 異性体, DDT 異性体およびドリノ剤 (アルドリノ, エンドリン, デイルドリノ) の使用が制限され、有機塩素農薬の使用は急激に減少した。我が国で現在使用されている塩素化環状ジエン系農薬の大部分はエンドスルファンで、クロルダンおよびヘプタクロルの使用は少ない。しかし海外においては農薬の使用状況が異なり、上記塩素剤はしばしば穀類の殺虫に用いられている。したがって輸入される穀類についてはこれら農薬の残留試験を行なう必要があると考えられる。今回は小麦、とうもろこしおよび大豆についてその分析法を検討した。

### 実験方法

#### 1. 試料

小麦: 米国, カナダ, オーストリア産  
とうもろこし: 米国, 南アフリカ, モザンビーク産  
大豆: 米国, ブラジル産  
試料は、20 メッシュの標準ふるいを通るように粉碎した。

#### 2. 試薬

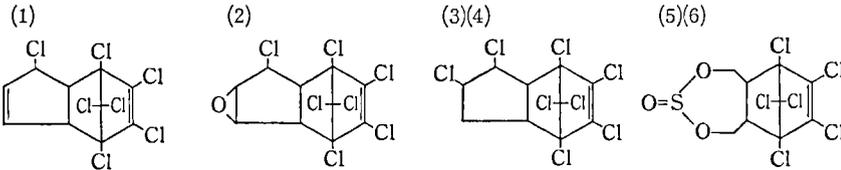
クロルダン西尾工業製、本品はガスクロマトグラム上で、9 本以上のピークの出現があり、実際の定量には  $\alpha$  ならびに  $\gamma$  異性体の単品を用いた。  
ヘプタクロル、ヘプタクロルエポキシド、エンドス

Table 1. Gas chromatographic conditions and  $t_R$  value of each pesticide

Condition*	I	II	III
Liquid phase	2% OV-1	5% SE-30	2% QF-1
Solid phase (60-80 mesh)	Chromosorb W	Chromosorb G	Chromosorb W
Carrier rate (ml/min)	25	17.5	25
Column temp. (°)	200	170	170
Injection temp. (°C)	222	222	222

	$t_R$ (min)		
Heptachlor (1)	2.0	1.3	1.3
Heptachlor epoxide (2)	3.1	4.5	3.6
Chlordane $\gamma$ -isomer (3)	3.6	4.6	3.5
$\alpha$ -isomer (4)	4.1	4.8	3.9
Endosulfan $\alpha$ -isomer (5)	4.0	5.6	4.7
$\beta$ -isomer (6)	5.4	20.7	9.5



\* All tubes are of glass 0.3 cm  $\phi$   $\times$  150 cm. Carrier gas was  $N_2$  in all cases.

ルファン ( $\alpha$ ならびに  $\beta$  異性体) : いずれも和光純薬工業製残留農薬試験用を用いた。

フロリジル : 和光純薬工業製 60~80 メッシュを使用し, 450°, 10 時間活性化したのちデシケーター中に放冷し, 使用前に 110°, 3 時間乾燥したものを用いた。

有機溶媒はいずれも残留農薬分析用を使用した。

### 3. 装置および器具

ガスクロマトグラフ (GC) : 柳本製 G-80 型電子捕獲型 ( $^{63}Ni$ ) 検出器 (ECD) 付を用いた。

精製用クロマト管 : 内径 2 cm, 長さ 35 cm のコック付ガラス管の下部にガラス綿を詰めて用いた。

### 結果および考察

本定量法 (Fig. 1 参照) の概略は, 抽出-脱脂-カラム精製-GC 分析の各行程から成立しており, 以下各行程について検討した。

#### 1. 農薬のガスクロマトグラフィー

各種液相を用いた時のガスクロ条件ならびに各種農薬の保持データを Table 1 に示した。これら条件で表記農薬を測定し, 検量線を作製したところ, いずれも原点を通り, 0.2 ng 以下で直線性が得られた。ま

たそれらの検出限界は約 0.02 ng であった。

#### 2. 抽出方法

穀類から各農薬の抽出は, 米の有機塩素剤試験法<sup>2)</sup>にしたがった。この方法は後述する農薬の添加回収実験の結果から見て適当なことが確かめられた。

#### 3. $n$ -ヘキサン-アセトニトリル分配

小麦, とうもろこし, 大豆には, いずれも脂質が多く含まれ<sup>3)</sup>, 搾油原料ともなり, その油脂分が分析を妨害するので, カラム精製にかかる前に予め除去する必要がある。簡便な脱脂法として衛生試験法<sup>4)</sup>の  $n$ -ヘキサン-アセトニトリル分配の適用を検討した。分配法は, 抽出  $n$ -ヘキサン溶液から各農薬のアセトニトリルへの移行操作, およびアセトニトリル層に食塩水と  $n$ -ヘキサンを加えて振り混ぜることによる農薬の  $n$ -ヘキサンへの再移行操作よりなるが, 後者の操作は食塩水希釈率が大きいため表記農薬はほとんど,  $n$ -ヘキサン層へ再移行して来るものと考えられるので, 前者の操作について検討した。

各標準農薬 1  $\mu$ g を含む  $n$ -ヘキサン溶液 15 ml をとり, そこに  $n$ -ヘキサン飽和アセトニトリルを加え, 5 分間振とうをし, 下層を分取した。さらに  $n$ -ヘキサン層は上記同様アセトニトリルで数回分配抽出し,

Table 2. Distribution of the pesticides between *n*-hexane and acetonitrile saturated with *n*-hexane

Method	I*	II	III	IV
Volume of CH <sub>3</sub> CN (ml)	30	30	50	50
Times of extraction	3	4	2	3
Transfer rate (%)				
Heptachlor	78.9	82.8	77.8	96.3
Heptachlor epoxide	79.7	80.7	82.2	97.1
Chlordane $\gamma$ -isomer	80.1	88.7	91.0	95.8
$\alpha$ -isomer	85.9	92.5	96.0	96.2
Endosulfan $\alpha$ -isomer	87.0	90.6	81.8	95.5
$\beta$ -isomer	100.1	99.9	93.8	98.1

Each value is the average of three trials.

\* By "Standard Methods of Analysis for Hygienic Chemists-With Commentary"<sup>4)</sup>

1  $\mu$ g of each pesticide was dissolved in 15 ml of *n*-hexane, and the solution was extracted with CH<sub>3</sub>CN saturated with *n*-hexane. The extract was concentrated to 10 ml and then an aliquot was injected into GC.

アセトニトリル層を合わせて 10 ml に減圧濃縮した。GC を用いてこれを定量し、各農薬の *n*-ヘキサン層からアセトニトリル層への移行性を検討した結果を Table 2 に示した。衛生試験法では極性の低いヘプタクロルおよびヘプタクロルエポキシド等で十分な回収が得られておらず、改変法IVが最も良好な回収率となった。したがって以後、*n*-ヘキサノン-アセトニトリル分配では試料抽出液を *n*-ヘキサン 15 ml に溶かし、それを *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 50 ml で3回抽出することにした。

#### 4. カラム精製

塩素化環状ジエン系殺虫剤は、従来用いられて来た一般の有機塩素系農薬に較べて極性が高く、フロリジルカラムからの溶出には比較的極性のある溶媒が必要であると考えられる。この場合、同時に妨害物質の溶出が考えられ、武田ら<sup>5)</sup>はフロリジルカラムに活性炭を積層したカラムの使用を検討しているが、活性炭は製造会社間ならびにロット間の品質に差異が大きく、条件の設定が困難である。したがって比較的妨害の少ない果実、野菜および穀類などではこの使用を省くことができると考えられる。本試験ではフロリジルのみのカラムを用いて溶離液の検討をした。カラムはフロリジル 10 ないし 20 g を *n*-ヘキサンを用いて湿式法で詰め、無水硫酸ナトリウム (粒状) 8 g を層積した。標準農薬は各々 1  $\mu$ g を *n*-ヘキサン 5 ml に溶かしてカラムに吸着させ、Table 3 に示した溶媒を用いて

溶出操作を行った。その結果、公定法<sup>2)</sup>の 15% エーテル含有 *n*-ヘキサンでは  $\beta$ -エンドスルファンの溶出が極度に悪いことが判明した (Table 3)。酢酸エチルでもかなり良好な回収率が得られたが、*n*-ヘキサノン-エーテル (1:4) に比べ多くの妨害物質が溶出されると考えられる。以後カラム精製にはフロリジル 10 g を用い、溶離液として *n*-ヘキサノン-エーテル (1:4) 100 ml を用いることにした。

#### 5. 全行程の確立

以上の検討から小麦、とうもろこし、大豆中のこれら農薬の定量法は Fig. 1 に示すように確立された。

#### 6. 穀類からの添加回収

回収試験の結果を Table 4 に示した。試料を用いないで各農薬につき全行程の操作を行なったときの回収率はいずれも 90% 以上と良好であった。穀類への農薬の添加回収実験は、粉碎試料 150 g をアセトン 100 ml に分散させ、そこに各農薬のアセトン溶液を添加し、1時間放置した後、所定の操作にしたが行なった。なお今回の標準農薬の添加量は、WHO の残留農薬国際勧告基準値<sup>6)</sup> (Table 4 参照) を考慮して 0.02 ppm とした。この際いずれの場合も満足できる回収率となった。しかしその 1/10 量添加ではやや回収率が低かった。

#### 7. 試料穀類の分析結果

確立された方法により、小麦 6 検体、とうもろこし 9 検体、大豆 8 検体を測定したが、いずれからもヘプ

Table 3. Recoveries of the pesticides by Florisil chromatography

Method	I*	II	III
Florisil amount (g) ratio (ml)	Et <sub>2</sub> O- <i>n</i> -Hexane (3 : 17) 300	AcOEt 100	Et <sub>2</sub> O- <i>n</i> -Hexane (4 : 1) 100
	Recovery (%)		
Heptachlor	98.3	101.1	97.4
Heptachlor epoxide	100.0	95.6	96.0
Chlordane $\gamma$ -isomer	99.1	95.7	107.7
$\alpha$ -isomer	98.7	98.9	101.1
Endosulfan $\alpha$ -isomer	95.0	94.4	93.2
$\beta$ -isomer	28.5	93.1	100.0

Each value is the average of three trials.

\* By Notification No. 370, December 28, 1959<sup>2)</sup>

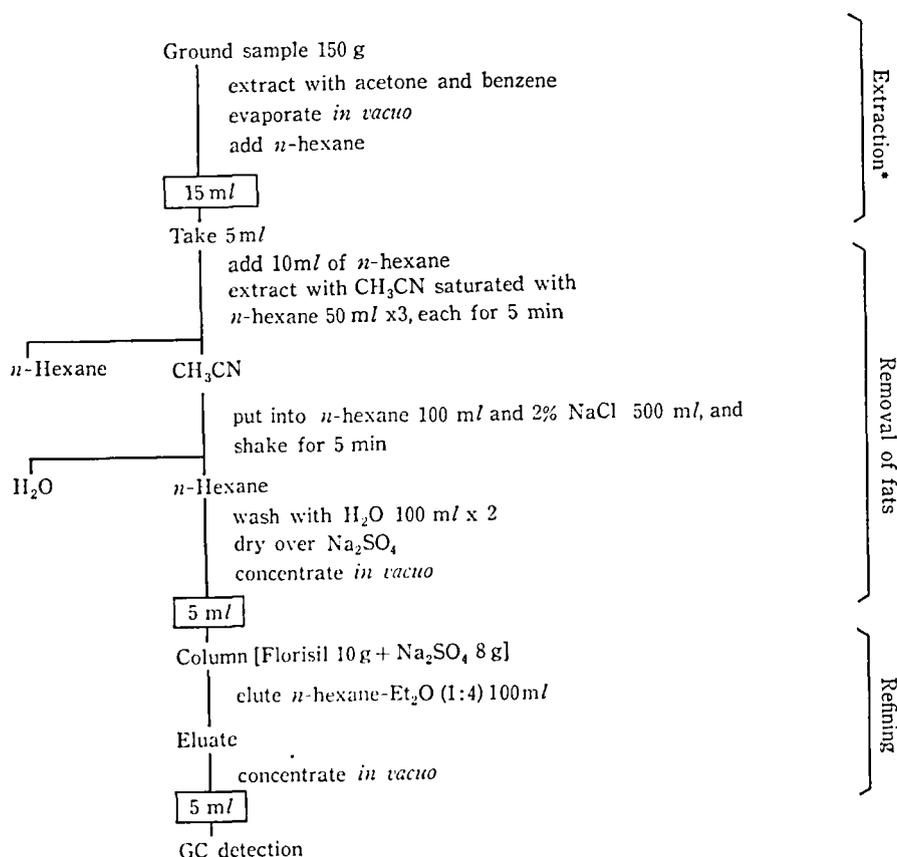


Fig. 1. Determination procedure of the pesticides in the grains

\* By "the Notification regarding the Standards and Specifications of Food, Food Additives etc." (Ministry of Health and Welfare Notification No. 370, December 28, 1959)<sup>2)</sup>

Table 4. Recoveries of the pesticides in the grains

Fortified level (ppm)	Wheat	Wheat	Corn	Soybean	Control*
	0.02	0.002	0.02	0.02	
Recovery (%)					
Heptachlor	88.3	74.1	76.9	70.2	97.4
Heptachlor epoxide	87.2	66.6	79.7	72.5	96.0
Chlordane $\gamma$ -isomer	80.1	71.2	80.3	78.2	90.2
$\alpha$ -isomer	81.5	71.3	83.7	81.7	92.2
Endosulfan $\alpha$ -isomer	84.8	63.6	82.3	70.8	99.7
$\beta$ -isomer	90.8	65.9	88.9	70.6	93.2
Recommendation values of WHO <sup>6)</sup> (ppm)					
	Wheat		Corn		Soybean
Chlordane	0.05		0.05		0.02
Heptachlor	0.02		—		0.02

Each recovery value is the average of three trials.

\* Each pesticide was dissolved in 5 ml of *n*-hexane, and Procedure in Fig. 1 was carried out.

タクロル，ヘプタクロルエポキシド，クロルダン ( $\alpha$ ならびに  $\gamma$ 異性体)，エンドスルフアン ( $\alpha$ ならびに  $\beta$ 異性体) は検出されなかった。

### 結 論

油脂分を多量に含む小麦，とうもろこしおよび大豆中の表記塩素化環状ジエン系農薬 6 種の残留分析法を検討し，満足できる結果を得た。

- 抽出 *n*-ヘキサン溶液からのアセトニトリル分配は *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 50 ml で 3 回抽出を行ない，良好な結果が得られた。
- フロリジルカラム精製において，溶離液として *n*-ヘキサン-エーテル (1:4) 混合液 100 ml を用いたところ，いずれの農薬も十分良好な回収率が得られ，妨害物質も除去された。

- 上記輸入穀類の残留分析の結果はいずれの農薬も検出されなかった。

最後にクロルダンの  $\alpha$ ， $\gamma$  両異性体を恵与下さいました当所食品部武田明治博士に深謝いたします。

### 文 献

- 政令第 56 号 (昭和 46 年 3 月 30 日)
- 食品添加物等の規格基準第 1 食品 D 各条米 (玄米をいう) 参照
- M.A.M. Shafer, M.E. Zubik, *J. Food Science*, **43**, 375 (1978)
- 武田明治：衛生化学，**22**，112 (1976)
- 食品衛生法規必携，p. 893 (53 年版)，中央法規出版

## 自動ラジオメトリーによる医薬品中の真菌検出法について

宇田川俊一・坂部フミ・成田紀子・倉田 浩

## Evaluation of an Automatic Radiometric System for the Detection of Fungi in Pharmaceutical Preparations

Shun-ichi UDAGAWA, Fumi SAKABE, Noriko NARITA  
and Hiroshi KURATA

A new radiometric method for the automatic detection of fungal contamination in pharmaceutical preparations has been evaluated with inoculation tests of the following two yeasts and seven moulds under different cultural conditions. Test organisms are *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*, *Chaetomium globosum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Eurotium repens*, *Fusarium moniliforme*, *Penicillium expansum*, and *Rhizopus stolonifer*. The release of  $^{14}\text{CO}_2$  by fungal metabolism was checked daily for 4 or 5 days, with a Bactec model R 301 instrument. The data obtained by these tests are shown in Tables 1-2 and Fig. 1.

Based on the preliminary evaluation of the system, some model experiments have been carried out on three pharmaceutical preparations: digestants powder, ointment (solubilized), and an integrant, potassium bitartrate. In the respect of rapid detection of the fungal contamination in the pharmaceuticals, our results (in Tables 3-4) suggest that the radiometric method as a kind of routine techniques is more advantageous than conventional techniques.

(Received May 31, 1978)

1974年、わが国においても医薬品の製造及び品質管理に関する基準 (GMP) が制定され、以来各種医薬品およびその原料の微生物学的な品質管理が注目されている。医薬品中に存在する微生物の検出法としては、無菌製剤を対象とした無菌試験法<sup>1)</sup>が確立されているが、生菌数測定に関しては従来から慣用されてきた液体培地段階希釈法、混積平板法などがそのまま適用されている現状である。しかしながら、剤型や原料の種類によっては必ずしもこれらの諸方法がそのまま適用できるとは限らない。また、現行の無菌試験法についてもより迅速に判定できるよう要望されている。

放射性同位元素を利用した自動ラジオメトリーによる微生物量の測定は上記の各試験法とは計測の内容が本質的に異なり、 $^{14}\text{C}$  で標識した基質を含む培地中に試料を接種し試料中に存在する微生物の代謝によって生じた  $^{14}\text{CO}_2$  の放射能を測定するという手法であって、きわめて短時間に一定の系における微生物量をより正確に計測できる利点があるといわれている。われわれは本法の各種医薬品に対する微生物試験、とくに真菌を対象とした無菌試験および生菌数測定への適用性を検討するため、基礎資料作成を目的として実験を行い、若干の知見をえたので報告する。なお、本研究は昭和 50~52 年度科学技術庁原子力試験研究費の一

部によって行った。

## 実験方法

1. 装置  $^{14}\text{CO}_2$  の放射能測定装置として Johnston Laboratories (U.S.A.) 製の Bactec model R 301 を用いた。

2. 培地 真菌量測定には、同社製 Bactec 用培地として供給されている好気培養バイアル No. 6A (容器 50 ml, 培地量 30 ml, 成分: tryptic soy broth, hemin, menadione, sodium polyanethol sulfonate,  $^{14}\text{C}$  標識物質 (1.5  $\mu\text{Ci}$ ),  $\text{CO}_2$  ガス, かくはん回転子, pH 7.3 $\pm$ 0.2) を使用した。

3. 試験用標準菌株 試験菌として次の真菌を使用した。

1) 酵母類 *Candida albicans* NHL 4019, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763

2) 糸状菌類 *Aspergillus niger* ATCC 6275, *Chaetomium globosum* ATCC 6205, *Cladosporium cladosporioides* IAM 517, *Eurotium repens* NHL 5015, *Fusarium moniliforme* 信州大学繊維学部保存株 M, *Penicillium expansum* IFO 7604, *Rhizopus stolonifer* ATCC 10404

4. 医薬品試料 次の3種類を入手、使用した。

1) A 社粉末胃腸薬 (生薬散剤), 2) B 社親水性軟膏 (局所用軟膏剤), 3) 酒石酸水素カリウム (医薬品原料, 食品添加物)

5. 培養 上記の試験菌株をジャガイモ・ブドウ糖寒天斜面 (PDA) 上に培養し接種菌とした. 各菌ともこの斜面からえた胞子または細胞懸濁液を滅菌生理食塩水または 5% tween 80 液を用いて  $10^{-1} \sim 10^{-5}/\text{ml}$  まで希釈し, 接種用菌液として調製した. また, 医薬品試料についても同様の操作によって試料希釈液を調製し, 供試した.

次に, これらの接種原を培地 30 ml 入りバイアル瓶に滅菌注射器を用いて各々 1 ml/瓶あて接種, 25° で静置, かくはん (マグネチックスターラーによる), または振とう培養 (往復型, 115 rpm) を行った. 医薬品試料の場合は共存細菌の生育を抑制するため, 試料液注入の際に滅菌クロラムフェニコール (0.1 mg/ml 量) を添加した.

接種原については, 各希釈段階ごとにそれぞれ 1 ml を PDA 培地平板上に塗抹培養し, 25°, 2~5 日後に出現したコロニーを計測して, 希釈液中の菌量を確認した.

6. 測定 測定は生育の誘導期を経た 24 hr または 48 hr 経過時より開始し, 24 hr ごとに 4 日~5 日まで Bactec 装置によって発生する  $^{14}\text{CO}_2$  量を求めた. 本装置においては, バイアル瓶中の微生物によって生じた  $^{14}\text{CO}_2$  の放射線量が Growth Index (GI, 100 GI は  $^{14}\text{C}=25 \text{ n Ci}$  量を示す) としてメーター上に表示される. また, 本装置使用の場合のバックグラウンド

放射線は GI 20~30 以下とされている. 通常 GI 50 以上が有効測定値で, 最大 GI 3000 までが測定範囲である.

### 実験結果および考察

#### 1. 静置培養における計測

代表的な真菌として *Aspergillus niger*, *Penicillium expansum* の両試験菌を用いた結果を Table 1, Fig. 1 に示す. 両者とも生育の対数増殖期に入った 2~4 日では直線的な増殖 (Fig. 1) が示された. 一般に接種菌量  $10^3 \sim 10^4/\text{ml}$  では 2~3 日間培養後に GI 値は十分な測定範囲に到達した. この結果から, GI 50 以上において測定するとして菌量  $10 \sim 10^2/\text{ml}$  を接種し確認できるまでに要する培養日数は両種とも約 4 日, 菌量  $10^3 \sim 10^4/\text{ml}$  の場合は 2~3 日と判断された.

#### 2. 生育を異にする酵母・糸状菌を用いた振とう培養における計測

酵母として *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, 糸状菌として *Chaetomium globosum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Eurotium repens*, *Fusarium moniliforme*, *Rhizopus stolonifer* を試験菌として選んだ. これらの菌はそれぞれ生育速度, 生育条件などを異にし, 実際の各種医薬品製剤・原料中に汚染または混入する可能性の大きい真菌である. 混積平板法による各菌の最小接種量は *S. cerevisiae*, *C. cladosporioides* において  $<10/\text{ml}$ , *C. albicans* において  $10^2/\text{ml}$ , *R. stolonifer* において  $>10^3/\text{ml}$ , その

Table 1. Results of radiometric growth indexes from stationary cultures of *Aspergillus niger* and *Penicillium expansum* in trypticase soy broth

Fungus	Growth index*1				Concentrations of inoculum (organisms/ml)
	Detection time in days				
	1	2	3	4	
<i>Aspergillus niger</i>	10	11	35	65	$3 \times 10$
	10	20	49	78	$3 \times 10^2$
	10	33	76	120	$3 \times 10^3$
	10	40	97	143	$3 \times 10^4$
	28	90	160	170	$3 \times 10^5$
<i>Penicillium expansum</i>	10	10	22	42	$1 \times 10$
	10	29	58	88	$1 \times 10^2$
	17	59	101	153	$1 \times 10^3$
	26	85	143	185	$1 \times 10^4$

\*1 Average number for three vials.

Table 2. Results of radiometric growth indexes from shaking cultures of some yeasts and fungi in trypticase soy broth

Microorganism	Growth index* <sup>1</sup>				Concentrations of inoculum (organisms/ml)
	2	Detection time in days		5	
		3	4		
<i>Candida albicans</i>	17	134	184		10 <sup>2</sup>
	42	150	207		10 <sup>3</sup>
	103	184	228		10 <sup>4</sup>
	112	186	227		10 <sup>5</sup>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8	10	39		<10
	9	11	129		10
	10	36	237		10 <sup>2</sup>
	11	137	263		10 <sup>3</sup>
<i>Chaetomium globosum</i>	9	29	128		10
	23	120	255		10 <sup>2</sup>
	54	154	285		10 <sup>3</sup>
	78	213	300		10 <sup>4</sup>
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	11	9	10		<10
	11	10	15		10
	10	14	41		10 <sup>2</sup>
	11	24	55		10 <sup>3</sup>
<i>Eurotium repens</i>	8	10	11	11	10
	10	10	13	18	10 <sup>2</sup>
	10	11	15	26	10 <sup>3</sup>
	10	19	38	55	10 <sup>4</sup>
<i>Fusarium moniliforme</i>	9	60	232		10
	16	94	250		10 <sup>2</sup>
	47	198	280		10 <sup>3</sup>
	80	250	292		10 <sup>4</sup>
<i>Rhizopus stolonifer</i>	30	93	148		} >10 <sup>3</sup>
	46	110	158		
	81	157	203		
	85	160	181		

\*<sup>1</sup> Average number for three vials.

他の菌において 10/ml であった。

培養4日後まで (*E. repens* のみ5日まで延長) における各菌の増殖を測定し, Table 2 に示すような結果をえた。

#### 1) 酵母類

*Candida*, *Saccharomyces* とも, 10~10<sup>2</sup>/ml 量の接種で4日間培養し, 十分に測定可能となった。すなわち, *C. albicans* は 10<sup>2</sup>/ml の場合に3日目の計測値が GI 50 を越え, 一方 *S. cerevisiae* では接種量が

*Candida* に比し少なかったことも影響し, 3日目では 10<sup>3</sup>/ml のみが GI 50 を越える結果となった。

#### 2) 糸状菌類

*C. globosum* では, 菌量 10<sup>2</sup>/ml 以上がすべて3日目に GI 50 を越え, 10/ml も4日目には十分測定可能となった。同様に, *F. moniliforme* も3日目に GI 50 以上となり, 4日目には全菌量とも測定可能範囲に到達した。

*R. stolonifer* では培養3日目の GI 値がいずれも十

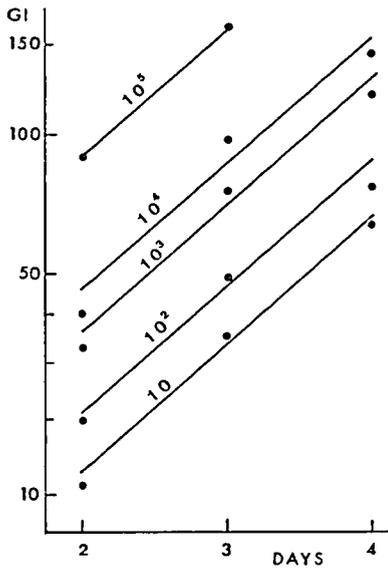


Fig. 1. Growth curves of *Aspergillus niger* by radiometric method

分に測定可能であることを示した。検出限界の面からは最低接種菌量が  $>10^3/ml$  以上であった点に問題があると思われるが、このことから本法の感度が劣ると速断することはできない。すなわち、*Rhizopus* で代表される接合菌類の菌量計測に混積平板法の適用がきわめて困難な事情もあって、接種量の基礎算定が *Rhizopus* については十分といえないことを考慮しなければならないからである。

*Cladosporium* の場合は *Saccharomyces* と同様に接種量が著しく少なかったため、4日目に  $10^3/ml$  のみがようやく測定範囲内の GI 値に到達した。*C. cladosporioides* については接種量  $10 \sim 10^2/ml$  のレベルで再試験する必要があるものと思われる。糸状菌の中で最も測定結果が悪かったのは *E. repens* で、培養日数を1日延長し5日間としたが、菌量  $10^4/ml$  のみがようやく測定範囲内となったほかはいずれも GI 値が低く測定不能のままに終わった。この結果は本実験に使用した好気培養 No. 6A 培地の塩類濃度が *Eurotium* のような好乾性菌類の生育に対して不適當であること

Table 3. Model experiments for radiometric detection of fungal growth in pharmaceutical preparations (1)

Pharmaceutical preparation	Condition of incubation	Growth index*1				Broth dilution results (organisms/ml)
		Detection time in days				
		2	3	4	5	
Oral preparation (Digestants Powder, Brand A)	stationary	5	21	61	87	$0.5 \times 10$
		5	23	49	67	$1 \times 10$
		5	15	47	110	$5 \times 10$
	continuous agitation	5	8	24	90	$0.5 \times 10$
		4	8	72	232	$1 \times 10$
		4	6	83	164	$5 \times 10$
		5	9	116	246	$0.5 \times 10$
shaking culture	5	62	207	293	$1 \times 10$	
	5	58	213	237	$5 \times 10$	
Integrand (Potassium Bitartrate)	stationary	5	7	14	21	1
		6	15	30	37	$1.8 \times 10$
		9	25	38	44	$1.3 \times 10^2$
	continuous agitation	6	5	17	65	1
		5	13	40	106	$1.8 \times 10$
	8	28	77	196	$1.3 \times 10^2$	
	shaking culture	6	7	24	65	1
		6	21	45	150	$1.8 \times 10$
	12	33	81	233	$1.3 \times 10^2$	

\*1 Average number for three vials.

Table 4. Model experiments for radiometric detection of fungal growth in pharmaceutical preparations (2)

Pharmaceutical preparation	Condition of incubation	Growth index*1			Concentrations of inoculum of <i>Aspergillus niger</i> (organisms/ml)
		Detection time in days			
		2	3	4	
Topical preparation (Ointment solubilized, Brand B) ( $10^{-1}$ /ml in concentrations)	stationary	6	6	6	0
		21	62	82	$7 \times 10$
		21	60	82	$7 \times 10^2$
	continuous agitation shaking culture	47	74	85	$7 \times 10^3$
		4	6	5	0
		46	220	188	$7 \times 10^3$
		6	6	7	0
		25	158	216	$7 \times 10$
		42	180	208	$7 \times 10^2$
		40	247	220	$7 \times 10^3$
Topical preparation (Ointment solubilized, Brand B) ( $10^{-2}$ /ml in concentrations)	stationary	6	7	6	0
		10	36	64	$0.7 \times 10$
		14	50	79	$7 \times 10$
		36	63	85	$7 \times 10^2$
	continuous agitation shaking culture	5	6	4	0
		58	215	204	$7 \times 10^2$
		13	9	8	0
		6	58	160	$0.7 \times 10$
		20	90	193	$7 \times 10$
		47	180	208	$7 \times 10^2$

\*1 Average number for three vials.

に起因しているものと思われる。いずれにしても、この種の菌類の生理的性質からして通常の培地以外に10% ショ糖を含む好気培養 No. 8A 培地を用いるか、または10% 食塩添加条件下で試験を行う必要性があると示唆された。

### 3. 医薬品試料を対象とした各種培養条件下における計測

医薬品製剤及び原料への本試験法適用を目的として、静置、かくはん、振とうの各培養条件を比較した。

1) 粉末胃腸薬 各種の製剤中で最も真菌汚染をうけやすい生薬製剤を試料として実験を行った結果を Table 3 に示す。供試試料は混積平板法によるとき  $10^3$ /g の菌数が測定され、種々の真菌による複合汚染が認められた。各希釈段階とも振とう培養でいずれも4日目に GI 50 を越し十分測定可能となった。かくはんおよび静置培養条件下では5日目にほぼ測定範囲の GI 値に到達した。

2) 酒石酸水素カリウム 医薬品原料の1つとして混積平板法により *A. niger* の汚染がおおよそ  $2 \times 10^3$  量を示す酒石酸水素カリウムを取りあげた。振とう、かくはん両培養条件とも接種量 10/g のレベルは5日目 GI 100 以上となった。しかし、静置培養では5日後も測定困難であった。これらの結果を Table 3 に示す。

3) 親水性軟膏 軟膏剤は各種製剤中で最も微生物試験の難しい剤型であり、とくに慣用されてきた混積平板法を適用するとき水に対する分散が困難な製品では乳濁化のため判定に支障をおこす。今回供試の軟膏試料はほぼ無菌的な製品であったため、人為的に標準菌 *A. niger* ATCC 6275 を分生子懸濁液として  $10 \sim 10^3$ /ml 添加し汚染状態を設定した。また、試料中に含まれる殺菌性成分の影響を考慮し、試料濃度を  $10^{-1}$  および  $10^{-2}$  に希釈し実験を行った。Table 4 のように結果として製品自体の無菌性が実証され、また

*A. niger* 接種区の測定値は静置培養 4 日目において GI 80 程度を示したのに対し、振とう培養、かくはん培養とも 3 日後には GI 150 以上となり、明らかにこれらの培養方法が汚染真菌量測定上有利であることを示した。

Bactec 装置はすでにアメリカの病院において血液の無菌試験に採用されている<sup>2)</sup>。今回の実験を通じて自動ラジオメトリーに振とう培養を組合せることによって検出時間の短縮化、判定の簡便性などの有利点が

認められ、また従来の方法と比較し難分散性の局所製剤に対する無菌試験、複合汚染をはらんだ製剤試料に対する真菌量測定などに、より効果的であることがうかがわれた。

## 文 献

- 1) 第九改正日本薬局方, p. 695 (1976), 厚生省
- 2) H.J. DeBlanc *et al.*: *Appl. Microbiol.*, **22**, 846 (1971)

## シクロヘキシルグルクロナイドの低温酸加水分解法

時枝利江・新村寿夫・山羽 力

### Method of Cyclohexylglucuronide Hydrolysis by the Acid at a Low Temperature

Toshie TOKIEDA, Toshio NIIMURA and Tsutomu YAMAHA

A method is presented for improved hydrolysis of glucuronide.

This new technique has been applied to the determination of cyclohexylglucuronide in the biological samples.

The outline of procedure is as follows. Ten volumes of concentrated hydrochloric acid are added to one volume of urine containing cyclohexylglucuronide in a glass-stoppered tube, and the mixture is stood at 20° for 24 hr.

This method is superior to those so far presented with regard to accuracy, simplicity and cost.

Further, it is capable of more general application, effectively to the hydrolysis of the conjugates consisted of acid-stable volatile compounds for the following reasons: preventing the hydrolyzate from evaporation and further decomposition owing to a temperature as low as 20°.

(Received May 31, 1978)

Cyclamate はヒト及び動物に摂食される時、脱硫酸され、毒性の明らかな cyclohexylamine (CHA) に転換される。CHA をヒト及び動物に経口投与すると、cyclohexanone, cyclohexanol (CHnol) 及び cyclohexylglucuronide (CHG) 等が尿中に排泄される<sup>1,2)</sup>。

CHA の生体における代謝を研究するにあたり、尿中の主代謝産物である CHG を定量する必要を生じた。

CHG は加水分解して生じた CHnol を、ガスクロマトグラフィー (GLC) で定量する。

加水分解は、従来、酵素あるいは酸による加温処理によって行われている。CHnol は加温下で揮散し、熱酸にも不安定なため、従来の酸加水分解法では、精度よく定量できない。

著者らは、低温で加水分解する事により、好結果を

得た。この方法は、他の抱合体の加水分解にも応用できると思われるので報告する。

## 実 験 方 法

### 1. 実験試料

日本白色種、雄ウサギ (体重 2.5~3.5 kg) に、CHA hydrochloride を 0.34% 水道水に溶解して、飲料水とし、任意に摂取させた。その 24 時間尿を摂取して実験に使用した。

### 2. 試 薬

CHG は、当部において常法<sup>3)</sup>に従って合成した (mp 140~142.5°, 文献値: 137.5~139<sup>3)</sup>)。β-glucuronidase (*Helix pomatia*) は、Boehringer Mannheim Co. 製を使用し、その他は市販特級試薬を使用した。

### 3. GLC

カラム：3 mm×200 cm.

充填剤：10% Carbowax 20M と 2.5% 水酸化ナトリウム液でコーティングした Chromosorb G (60~80 メッシュ).

カラム温度：160°. 検出器温度：280°.

試料注入口温度：250°.

キャリアガス (窒素) 流速：28 ml/min.

水素圧：0.5 kg/cm<sup>2</sup>, 空気圧：0.9 kg/cm<sup>2</sup>.

ガスクロマトグラフ：Shimadzu GC-4APF.

### 4. 試料の加水分解

a) 還流法：ナス型コルベン (50 ml) に、CHNol 2 mg, 濃塩酸 4 ml をとり、水を加えて全量 20 ml とする。次に、ガラスあるいは素焼板を沸石として加え、冷水を通した Dimroth 冷却器 (長さ：25 cm) を垂直に接続後、直火で、4 時間還流する。

b) 封管・塩酸・100°法：CHG 水溶液 (20 µg/ml) 1 ml を Pyrex 製ガラス管 (5.5 mm×20 cm) にとり、種々の濃度の塩酸溶液 1 ml を加え、封管後、沸とう水中で 4 時間加熱する。充分冷却後、開管し、試料を採取する。

c) 酵素法：共栓試験管に CHG 水溶液 (38.6 µg/ml) を、0.5 ml あるいは 1 ml とり、0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.5) 及び glucuronidase (0.5 U) を加えて全容 2 ml とする。ガラス栓をし、37°, 24 時間反応させる。

d) 塩酸・20°法：試料溶液 1 ml 及び濃塩酸 10 ml を、共栓試験管にとり、ガラス栓をした後、20°の水浴に 24 時間浸す。

### 5. 定量操作

4-d) 処理試料 0.5 ml を共栓試験管にとり、水冷しながら、水 1 ml, 6N 水酸化ナトリウム溶液 1.5 ml 及び塩化ナトリウム 1.5 g を、順次加える。次にイソプロピルエーテル (内部標準：0.04% *n*-ペンタデカンを含む) 0.5 ml を加え、ガラス栓をした後、サーモミキサー (サーモニクス株式会社製) で 1 時間振り混ぜ、エーテル層を分取し、これを CHNol の GLC 分析用試料とした。他の試料 [4-a), b), c)] は、その一部をとり、水及び 6N 水酸化ナトリウム液を加え、pH 13 で全容 3 ml とし、上記と同様に抽出し、分析用試料とした。

### 結果および考察

#### 1. 還流法における CHNol の残存性

従来の還流法を CHG の加水分解法に適用した場合、還流中に遊離した CHNol が、揮散したり、分散

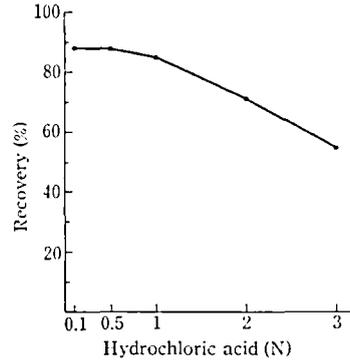


Fig. 1. Effects of hydrochloric acid concentration on the hydrolysis of CHG

したりしてはならない。

そこで、還流処理前後の CHNol 量を比較した。その結果 CHNol の還流後の残存量は、わずか 31% (沸石：ガラス) あるいは 10% (沸石：素焼板) であった。これは還流中に、CHNol が揮散または分解したためと思われる。

#### 2. 沸とう水中での封管酸加水分解

封管・塩酸・100°法に従い、グルクロナイドを加水分解した。その時の塩酸濃度の影響を Fig. 1 に示す。

0.1N 及び 0.5N 両塩酸濃度で回収率 88% であったが、1N 以上では逆に低下した。

100°の加熱では、塩酸濃度が高くなるにつれて、生じた CHNol が分解されるものと思われる。

#### 3. 酵素による加水分解

封管・塩酸・100°法は、操作が煩雑なため、酵素法を検討した。

CHG 19.3 µg 及び 28.6 µg を酵素法により加水分解した結果、それぞれ CHNol が 5.8 µg 及び 11.5 µg を得られた。

以上の結果より抱合体の 83% 及び 82% が分解された。

#### 4. 各種温度での CHNol の揮散

CHNol は揮発性物質であるため、酵素法により遊離した CHNol が、反応中に揮散する可能性がある。

そこで、上述の酵素法の条件に従って、CHNol を 20°, 30° 及び 37° で、24 時間インキュベーションした。その結果を Table 1 に示す。

20°では、CHNol は 100% 回収されるが、30°以上では回収率が低下した。このことより、本実験条件では 30° 及び 37° にて数%の CHNol が揮散するものと思われた。

このような揮散は、測定値の再現性を低下させる原因となる。また、低濃度の CHG を酵素法に適用した

Table 1. Recovery of CHnol after 24-hr incubation at the various temperatures

Temp.	CHnol	
	$\mu\text{g}/\text{Incub. mix.}$	%
20°	8.06 $\pm$ 0.13	100.8 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>
30°	7.73 $\pm$ 0.10	96.6 $\pm$ 1.3
37°	7.73 $\pm$ 0.13	96.6 $\pm$ 1.6

a : Average of 3 determinations ( $\pm$  standard deviation)

Added amounts : CHnol 8.00  $\mu\text{g}$  in 2 ml of 0.1 M acetate buffer pH 4.5.

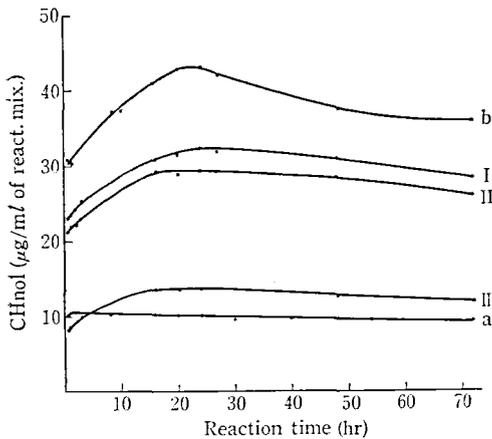


Fig. 2. Acid hydrolysis at 20°

I, II, III : with the urinary samples from three rabbits excreting CHG

a : with 360  $\mu\text{g}$  of CHG added to the water solution

b : with 360  $\mu\text{g}$  of CHG added to the urinary sample I

場合、揮散の影響はさらに大きくなる可能性もある。

### 5. 20°での酸加水分解

CHnolの揮散及び分解を共に防ぎ、かつ簡便な加水分解条件をえるため、反応温度は、揮散のみられな

った20°(Table 1)に限定し、10倍容の濃塩酸を試料に加えて処理時間を検討した。その結果をFig. 2に示す。

塩酸水溶液における加水分解は、2時間の処理で、最高値を示し、分解率は89%であった(曲線a)。しかし、ウサギ(3匹)の尿試料では、いずれも24時間近辺で最高値を示した(曲線I, II, III)。

又、尿Iに、CHG(360  $\mu\text{g}$ )を添加して、加水分解した場合(曲線b)も、この添加量での最高分解率は24時間処理後に得られ、89%であった。

次に、CHnolを10.5N塩酸に溶かし(18  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )20°におけるCHnolの安定性を検討した。

24時間及び46時間では、それぞれ添加量の99%及び88%が回収され、CHnolは24時間以内では安定であることがわかった。

以上の結果より、本法は、酵素及び封管内酸加水分解の両法と同等もしくはそれ以上の高分解率を示したので、CHnolのような、揮発性物質からなる抱合体の加水分解法として、適用できる事がわかった。

### 結 語

本加水分解法(濃塩酸中、20°にて)は、従来の酵素法及び酸による還流法に比べ、安価で、精度も良くかつ簡便である。

本法は、酸に安定な揮発性物質の抱合体を、定量的に加水分解する場合に応用できると思われる。

本研究を行うに当たり、cyclohexyl glucuronideを供与された国立衛生試験所、医化学部田中彰博士に深謝します。

### 文 献

- 1) M. Asahina *et al.* : *Chem. Pharm. Bull.*, **19**, 628 (1971)
- 2) M. Asahina *et al.* : *Chem. Pharm. Bull.*, **20**, 102 (1972)
- 3) B. Helferich, A. Berger : *Chem. Ber.*, **90**, 2492 (1957)

ステビア (*Stevia rebaudiana* BERTONI) の栽培に関する研究 (第3報)

## 2年生植物の収量とステビオサイド含量

宮崎幸男・渡辺宏之・渡辺照行

Studies on the Cultivation of *Stevia rebaudiana* BERTONI. III

## Yield and Stevioside Content of 2-Year-Old Plants

Yukio MIYAZAKI, Hiroshi WATANABE  
and Teruyuki WATANABE

A study on the yield and stevioside content of 2-year-old plants of *Stevia rebaudiana* BERTONI grown in the field was made in 1973 under the two harvesting plots, i.e. a plot of two times of cutting per year and another of one cutting.

Regarding the average yield of crop per year, the one-cutting plot exceeded considerably the two-cutting plot, the former giving 62.6 g of air-dry leaves and the latter 40.4 g, respectively. In the two-cutting plot, the yield of the first crop was inferior remarkably to that of the second crop.

The stevioside content of leaves from the first harvest in the two-cutting plot was considerably lower than that from the second harvest and also than that from the one-cutting plot. Further, the stevioside contents in the dead leaves and stems were confirmed to be very low, especially in the latters.

(Received May 31, 1978)

前報<sup>1-2)</sup>でステビアの繁殖や生育、ステビオサイド含量の概要について報告したが、実際の見地からすればほ場栽培での植物の収量が重要な課題となることはいうまでもない。当初わが国では本植物のほ場での栽培や収穫に関する報告はほとんどなかったので、著者らは一先ず南伊豆地域におけるほ場での栽培法や収穫法などの概要を明らかにすることを目的として一連の研究を行ってきた。そして1973年にはほ場栽培2年生植物の生育、収量のほかステビオサイド含量についても若干の成績がえられたので、本報ではこれらの結果を報告する。

## 材料および方法

1. 材料 1971年11月加温ビニールハウス内で挿種、育成した苗で草丈約20cmのもの84本を1972年8月1日は場に定植した。初年度は収穫することなく自然の生育に任せ、1973年にこれら2年生植物の一部を供試し収量調査を行った。

2. 方法 栽培間隔は60×50cmとし、上記の苗を1本植えにした。肥料は基肥として1株当たり堆肥500gを施し、加リン硝安(13:10:11)15gを生育期に大体月1回の割合で追肥した。収穫の時期や回数については未経験のため植物の生育をみながら適宜

行うこととし、結果的には収穫回数について年2回と1回の2区を設けることになった。前者では第1回を6月23日、第2回を8月21日とし、後者では8月20日に収穫した。両区とも12個体を任意に選び、すべて地上15cmで刈取った。

ステビオサイドの定量は前報<sup>2)</sup>の方法とは異なるが、短時間に行えることに目標をおきつぎのような簡易定量法を試みた。風乾した試料をデシケーターで乾燥後粉末とし、その500mgに水10mlを加え、沸騰水浴上で1時間加温抽出後、濾過してえた検液の一定量(ステビオサイド量として40~100μg程度)を薄層にスポットする。薄層クロマトグラフィーは吸着剤

Kieselgel GF 254 nach Stahl (Type 60)、厚さ0.3mmを1時間、110°加温活性化後使用した。溶媒系は酢酸エチルエステル:イソプロパルルコール:水(11:4:2)で展開した。展開後ヨウ素蒸気で発色させ、ステビオサイド部分に印をつけた後ドライヤーの冷風でヨウ素を除去する。(上記溶媒系におけるステビオサイドの $R_f$ は約0.50である)。ステビオサイド部分のシリカゲルをかきとり、これを2mlのメタノールでけんたくし、濾過、さらにシリカゲルは約5mlのメタノールで洗う。洗液を合せ減圧濃縮乾固し残渣を正確に4mlの水溶液とする。アンスロン試液

(アンソロン 200 mg を特級濃硫酸 100 ml に溶かしたものを) 4 ml を試験管にとり、氷を入れた水浴中に冷却しておき、上記のサンプル水溶液 2 ml を静かに管壁に注ぎこむ。十分冷却後激しく振とう混和し、再び冷却する。ついで  $90^{\circ}$  ( $\pm 2^{\circ}$ ) で 15 分間加熱発色させる。冷却後波長 620 nm の吸光度を測定し、同時に行ったブランク値との差を求め、予め標準品よりえられた検量線からステビオサイドの含量を算出した。各収穫ごとに 4 個体を任意に選び、健全葉、枯死葉、茎の 3 部位に分けて定量した。また比較のため入手したバラガイ産葉の 1 サンプルについても定量を行った。

## 実験結果

### 1. 生育の概要

植付初年度は定植時期が遅かったため年内の生育は十分でなかったが、前報<sup>2)</sup>で述べたように本植物のほ場での越冬は容易で、2年生株の初期生育も大体順調であった。そして6月下旬には草丈は 50 cm 以上になり、茎の下位節の葉は老化してやや黄褐色を呈し始めた。そこで一部の個体について第1回の収穫を行なうことにした。これら収穫株はその後すべて再萌芽し比較的良好的な生育を示した。そして8月20日ころには草丈は 80 cm 前後に達し、新生茎の下位葉は褐色に枯死するようになり、一部着蓄も始まった。一方、未収穫個体はこのころには草丈は 1 m 以上になり、株張りも既収穫個体に比べてはるかに大きく、隣接株の周縁部は互に重なり合うようになっていた。また着蓄も始まり、下位葉の枯死は既収穫個体よりはるかに多くなった。従って未収穫、既収穫ともに全個体を収穫することにした。これらは収穫後何れも再萌芽し、新茎はかなり伸長したが、着蓄期に当たっていたため節間が長く、葉は小形で数も少なかった。続いて9月上旬～中旬には開花が始まったのでこのころから新葉の発生はほとんどなくなり、従って再収穫を行っても収量

量は極めて少ないことが明白であった。それ故年内の再収穫は行わないことにしたので、年収穫回数について2回区と1回区の両区が設けられる結果になった。各区の収穫時の生育状態の概要をに Table 1 示した。

初年度 1 本植えにした場合冬季地上部は枯死するが、翌春株の地下部から 7~8 本の新茎が発生するわけである。つぎに6月下旬の第1回収穫では草丈もまだ低いが、株張りも十分でなかったことがわかる。しかし葉の大きさは第1回収穫では第2回収穫のみならず年1回収穫の場合よりも大きく、長、幅ともに後二者に優ることが認められる。これは前報<sup>2)</sup>で述べたように本植物では生育の中期以降の葉は比較的初期のものに比べてむしろ小形となり、とくに着蓄が近づくところの傾向が強くなるからである。なお年1回収穫の8月の収穫時には株張りは大きくなり既述のように株間は完全に塞がれていたが、年2回収穫では第2回でも株間はかなり空いていることが注目された。

### 2. 地上部の収量

地上部の収量については葉を健全葉と枯死葉に分け、これらと茎の3部位の別に収量調査を行った。各収穫時の収量とともに年2回収穫区では年間収量をも計算しあわせて Table 2 に示した。

年2回収穫では第回は第1回に比べて収量が著しく低く、葉、茎ともに前者は後者の約半分にすぎない。ただ第1回では全地上部のなかでしめる健全葉の比率が相対的に高いことが注目される。風乾重でのこの比率は第1回収穫で約 63% となるのに対し、第2回収穫では約 47% に低下する。これは主として前報<sup>2)</sup>で述べたように生育が進むにつれ、とくに開花が近づくとき茎の量が相対的に多くなることによるが、一部枯死葉の増えることにもよる。

つぎに年2回刈りと1回刈りの年間収量を比較すると、本実験では1回刈りの方がはるかに高くなっており、Table 2 から1回刈りに対する2回刈りの収量の

Table 1. Growth status of 2-year-old plants of *Stevia rebaudiana* BERTONI at different times of harvesting

Harvest		Plant height cm	Plant spread cm	Number of stems	Diameter <sup>1)</sup> of stem mm	Leaf size <sup>2)</sup>	
Number per year						Length cm	Width cm
2	1st	55.3 $\pm$ 1.5	29.6 $\pm$ 2.4	7.9 $\pm$ 1.3	5.6 $\pm$ 0.4	7.2 $\pm$ 0.4	2.9 $\pm$ 0.2
	2nd	80.2 $\pm$ 3.1	45.5 $\pm$ 1.8	7.3 $\pm$ 1.1	4.2 $\pm$ 0.2	5.5 $\pm$ 0.3	2.3 $\pm$ 0.1
1		120.0 $\pm$ 4.4	76.2 $\pm$ 5.2	7.7 $\pm$ 1.3	8.7 $\pm$ 0.4	6.3 $\pm$ 0.2	2.5 $\pm$ 0.1

<sup>1)</sup> Mean of the longest 2 stems

<sup>2)</sup> Mean of the largest 5 leaves

Table 2. Yield of 2-year-old plants of *Stevia rebaudiana*

Harvest	Whole parts			Healthy leavy					
	Fresh wt. W <sub>1</sub> g	Air-dry wt. W <sub>2</sub> g	W <sub>2</sub> / W <sub>1</sub> %	Fresh wt. L <sub>1</sub> g	Air-dry wt. L <sub>2</sub> g	Dry wt. L <sub>3</sub> g	L <sub>2</sub> / L <sub>1</sub> %	L <sub>3</sub> / L <sub>2</sub> %	
2	1st	104.1±10.6	20.7± 2.0	20.0±0.4	56.5± 5.7	13.0±1.2	11.3±1.0	23.2±0.4	87.2±0.1
	2nd	206.7±12.8	57.9± 3.5	28.1±0.3	95.5± 6.7	27.4±1.9	24.6±1.7	29.9±0.3	89.9±0.2
	Total	310.9±18.5	78.7± 4.3	25.5±0.3	152.0±10.6	40.4±2.7	36.0±2.4	26.7±0.3	89.1±0.1
1		513.0±43.7	164.8±13.4	32.5±0.6	197.5±14.4	62.6±4.5	56.4±4.1	32.7±0.7	90.1±0.6

比率を計算すると全地上部風乾重で約 48% となる。ただこの場合も風乾葉については約 72% となり、両区間の差は相対的に少なくなる。

### 3. ステビオサイド含量

各収穫における植物の部位別のステビオサイド含量と比較のためのパラガイ産葉の値をもあわせて Table 3 に示した。

まず本実験のステビオサイド含量は前報<sup>2)</sup>の値に比べ全体的にかなり高いことが注目されるが、これは主として分析法の相違によるものであろう。ただ本実験では各収穫間あるいは植物部位間の相互関係を知ることには重点をおいており、この点についてはかなり明確な結果がえられたとみてよい。まず年2回収穫の場合第1回は第2回に比べ健全葉のステビオサイド含量が著しく低いことが注目される。そして第2回収穫とこれと同時期に行われた年1回収穫との間にはステビオサイド含量の差はほとんどないことがわかる。つぎに枯死葉のステビオサイド含量は枯死の程度により異なることが当然考えられるが、何れにしても健全葉に比べて著しく低く、さらに茎では一層低いことが確認されるが、これらは前報<sup>2)</sup>の結果と全く一致するものである。なお本実験に供したパラガイ産葉のステビオサイド含量は第1回収穫葉よりもやや劣り、予想外に低かったが、これがパラガイ産を代表するものと決めることはもちろんできない。

### 老 察

本実験結果から幾つかの問題点が考えられるが、まず栽植間隔があげられる。未経験のため本実験では試みとして 60×50 cm としたが、これは既述のような生育、株張りなどから、実際栽培の間隔としては明らかに広すぎる。50×30 cm 位でよいように思われる。つぎに収穫の時期ないし回数であるが、まず第1回収穫を6月下旬としたことについて、結果的にやや早すぎたきらいがある。この第1回が早すぎたため第2回

も必然的にやや早目にせざるをえなかったといえる。この場合第3回の収穫を行なうだけの生育量はないので、第2回収穫を開花始めの9月上旬ころに合せた方がよいと思われる。そして第1回を7月中～下旬とすれば両収穫のバランスがとれて年間収量も増大するのではないかと想像される。さらに第1回収穫でステビオサイド含量が著しく低かったことは問題点で、これは生育初期の気温がまだ低すぎることが主な原因ではないかと思われるが、このような観点からも第1回収穫は7月中～下旬がよいように思われる。従って収穫を年2回とすれば、第1回7月中～下旬、第2回9月上～中旬が適当と思われる。なお当地域では年2回以上の収穫は無理とみななければならない。つぎに年1回だけの収穫とすれば時期はやはり8月下旬～9月上旬であろう。なお年2回と1回のいずれがよいかについてはなお今後の研究を要する。この場合生育期間が余り長びくと葉が老化し、また茎の量が相対的に多くなり、これらはステビオサイド含量低下の要因となることに留意する必要がある。なお当場産とパラガイ産とのステビオサイド含量の比較については前報<sup>2)</sup>を含め分析例がまだ極めて少ないので結論的なことはいえないが、当場産がとくに劣るといふ心配はほとんどなさそうである。

### 摘 要

1. ステビアのは場栽培2年生植物について年2回収穫と1回収穫の収穫回数の異なる両区のもとで、植物の収量とステビオサイド含量について1973年に研究を行った。

2. 植物の平均年間収量については年1回収穫区が2回収穫区に優り、風乾葉重は前者で62.6g、後者で40.4gであった。また2回収穫区では第1回収穫は第2回収穫に比べ収量が著しく低かった。

3. 葉のステビオサイド含量は2回収穫区の第1回収穫では第2回収穫ならびに年1回収穫に比べて著し

## BERTONI at different times of harvesting

Dead leaves			Stems				
Initial wt. DL <sub>1</sub> g	Air-dry wt. DL <sub>2</sub> g	DL <sub>2</sub> / DL <sub>1</sub> %	Fresh wt. S <sub>1</sub> g	Air-dry wt. S <sub>2</sub> g	Dry wt. S <sub>3</sub> g	S <sub>2</sub> / S <sub>1</sub> %	S <sub>3</sub> / S <sub>2</sub> %
0	0		47.6 ± 5.2	7.7 ± 0.9	7.0 ± 0.8	16.2 ± 0.4	90.2 ± 0.1
4.4 ± 0.5	3.6 ± 0.5	80.5 ± 3.1	106.8 ± 7.1	27.0 ± 1.9	24.0 ± 1.7	25.1 ± 0.3	89.0 ± 0.1
4.4 ± 0.5	3.6 ± 0.5	80.5 ± 3.1	154.5 ± 9.0	34.6 ± 2.0	30.9 ± 1.8	22.5 ± 0.4	89.3 ± 0.0
9.3 ± 1.0	8.7 ± 0.9	93.8 ± 0.8	303.8 ± 31.2	93.5 ± 9.7	82.7 ± 8.5	30.9 ± 0.6	88.4 ± 0.2

Table 3. Stevioside content of different parts of 2-year-old plants of *Stevia rebaudiana* BERTONI at different times of harvesting

Harvest		Healthy leaves %	Dead leaves %	Stems %	Leaves from Paraguay %
Number per year					
2	1st	16.0 ± 0.8		1.4 ± 0.5	12.8
	2nd	22.5 ± 1.0	10.7 ± 1.4	1.4 ± 0.3	
1		22.6 ± 1.2	4.2 ± 1.1	6.7 ± 2.3	

く低かった。また枯死葉および茎ではステビオサイド含量は著しく低く、とくに後者で低いことが確認された。

本研究を行なうに当りステビオサイドの定量に協力された協和醸造東京研究所、またパラガイ産葉の入手に協力された国際協力事業団移住海外事業部農牧課に

深く謝意を表す。

## 文 献

- 1) 宮崎幸男, 渡辺宏之: 熱帯農業, **17**, 154 (1974)
- 2) 宮崎幸男, 兼松明子, 渡辺宏之: *ibid.*, **17**, 158 (1974)

## 合成化学研究部で合成した化合物の抗腫瘍効果 (II)

宮原美知子・神谷庄造・中館正弘  
末吉祥子・丹野雅幸・宮原 誠  
鈴木郁生・小田嶋成和

Antitumor Effect of Compounds Synthesized in the  
Division of Synthetic Chemistry. (II)

Michiko MIYAHARA, Shozo KAMIYA, Masahiro NAKADATE  
Shoko SUEYOSHI, Masayuki TANNO, Makoto MIYAHARA  
Ikuo SUZUKI and Shigeyoshi ODASHIMA

As an extension of this series the antitumor activity of new 63 compounds synthesized in the Division of Synthetic Chemistry was tested with Donryu rats bearing AH-13 cells and also with CDF<sub>1</sub> mice bearing L-1210 cells. These compounds were divided into four groups of nitrosoureas, heterocyclic triazenes, heterocyclic azides and miscellaneous compounds.

Some of the nitrosourea derivatives were highly effective against AH-13 and L-1210 cells.

(Received May 31, 1978)

病理部の協力を得て、昭和 47 年 11 月から始めた抗腫瘍性化合物のスクリーニングは、現在迄に 162 種の化合物についてスクリーニングを終了した。最初の 99 種<sup>1)</sup>についてはすでに本誌に報告した。今回は新しく合成された 63 種 (E-100~E-162) のスクリーニング結果を報告する。

## 1. スクリーニング方法

## 〔1〕 AH-13 スクリーニングシステム

実験方法は前報に従った。ただし、効果判定基準は下記のように変更した。

AH-13 スクリーニングの効果判定基準

評 価	生 存 率	
	30日	60日
—	No Survivors	No Survivors
±*	0/6~6/6	0/6~1/6
+	2/6~6/6	2/6~3/6
++	4/6~6/6	4/6~6/6

\* 但し、±には 30 日生存動物がないものでも、30日以内での生存延長のみられたものを含めた。

## 〔2〕 L-1210 スクリーニングシステム

実験方法は前報<sup>1)</sup>に従った。

## 2. 化合物

今回スクリーニングを行なった化合物は、4系統に分類し、その分類、化学名、および融点または分解点はずきの通りである。

## (1) ニトロソ尿素誘導体

E-101: 1-(2-Chloroethyl)-3-cyclopropyl-3-nitrosourea, dp 65°

E-102: 1-Methyl-1-nitroso-3,3-tetramethyleneurea, mp 50°

E-142: 1-(2-Chloroethyl)-3-(3-pyridinyl)methyl-1-nitrosourea N-oxide, dp 141-142°

E-143: 1-(2-Chloroethyl)-3-(3-pyridinyl)methyl-3-nitrosourea N-oxide, dp 112°

E-144: 1-Nitro-3-nitroso-3-(3-pyridinyl)methylguanidine N-oxide, dp 180°

E-145: 1-Cyclohexyl-3-nitroso-3-(3-pyridinyl)methyl-3-nitrosourea N-oxide, dp 131°

E-146: 1-Cyclohexyl-1-nitroso-3-(3-pyridinyl)methyl-1-nitrosourea N-oxide, dp 106°

E-149: 1-Methyl-1-nitroso-3-(3-pyridinyl)methylurea N-oxide, dp 118°

E-158: 1-(2-Chloroethyl)-3-nitroso-3-pyridinylurea, dp 127°

E-103: 1, 1'-Ethylene-bis(1, 3-dimethyl-3-

- nitrosoarea), mp 49°
- E-108 : 1,1'-Hexamethylene-bis(3-methyl-3-nitrosoarea), mp 101°
- E-119 : 1,2-Cyclohexylene-bis(3-methyl-3-nitrosoarea), mp 125-126°
- E-120 : 1,2-Propylene-bis(3-methyl-3-nitrosoarea), mp 90-91°
- E-106 : 1,1'-(4-Methyl-4-azaheptylene) bis(3-methyl-3-nitrosoarea), mp 68-70°
- E-141 : 1,3-Bis(3-methyl-3-nitrosoareido)-2-hydroxypropane, dp 127°
- E-125 : 1,1,4,4-Tetramethyl-1,4-butylene-bis(3-methyl-3-nitrosoarea), mp 115°
- E-124 : 1,1,4,4-Tetramethyl-1,4-butylene-bis(3-ethyl-3-nitrosoarea), mp 115°
- E-123 : 1,1,4,4-Tetramethyl-1,4-butylene-bis[3-(2-Chloroethyl)-3-nitrosoarea], mp 98°
- E-121 : 1,1'-Ethylene-bis(3-isopropyl-3-nitrosoarea), mp 69-70°
- E-112 : 1,1'-Ethylene-bis[3-(2-chloroethyl)-1-nitrosoarea], mp 141°
- E-122 : 1,1'-Hexamethylene-bis[3-(2-cyanoethyl)-1-nitrosoarea], mp 116°
- E-113 : 1,1'-Hexamethylene-bis(3-allyl-1-nitrosoarea), mp 55-56°
- E-118 : 1,1'-Hexamethylene-bis[3-(2,6-dimethylphenyl)-1-nitrosoarea], mp 88-89°
- E-114 : 1,1'-Ethylene-bis(3-t-butyl-1-nitrosoarea), dp 130°
- E-117 : 1,1'-Ethylene-bis(3-cyclohexyl-1-nitrosoarea), mp 125-126°
- E-104 : 1,1'-Hexamethylene-bis(3,3-tetramethyleneimino-1-nitrosoarea), dp 56-57°
- E-111 : 1,1'-Ethylene-bis[3-(p-tolyl)-1-nitrosoarea], mp 242°
- E-107 : 1,1'-Ethylene-bis[3-(2-chloroethyl)urea], mp 189-190°
- E-105 : 1,1'-Hexamethylene-bis[3-(1-ethyleneimino)urea], mp 95°
- E-110 : 1,1'-Hexamethylene-bis[3-(2-chloroethyl)-urea], mp 168-170°
- (2) 複素環トリアツェン誘導体
- E-126 : 3,6-Dimethyl-4-(3-cyano-1-triazeno)-pyridazine 2-oxide potassium salt, dp 215-216°
- E-127 : 4-(3-cyano-1-triazeno)pyridazine 1-oxide potassium salt, dp 224-226°
- E-128 : 1-Methoxy-4-(3-cyano-1-triazeno)-1,4-dihydropyridine, dp 152-154°
- E-129 : 4-(3-Cyano-1-triazeno)pyridine potassium salt, mp >300°
- E-133 : 4-(3-Bromo-3-cyano-1-triazeno)pyridine 1-oxide, mp >300°
- E-134 : 4-(3-Bromo-3-cyano-1-triazeno)pyridine, mp >300°
- E-135 : 4-(3-Hydroxyamidyl-1-triazeno)pyridine-1-oxide, dp 180-181°
- E-136 : 4-(3-Hydroxyamidyl-1-triazeno)pyridine, dp 197-198°
- E-137 : 1-Methyl-4-(3-hydroxyamidyl-1-triazeno)-1,4-dihydropyridine hydrochloride, dp 195-196°
- E-138 : 1-Methoxy-4-(3-hydroxyamidyl-1-triazeno)-1,4-dihydropyridine, dp 179-180°
- E-139 : 3,6-Dimethoxy-4-(3-cyano-1-triazeno)-pyridazine 1-oxide potassium salt, dp 193°
- (3) 複素環アジド誘導体
- E-147 : 4-Azidopyridine 1-oxide, dp 142°
- E-148 : 4-Azidoquinoline 1-oxide hydrochloride, dp 178°
- E-150 : 1-Ethoxy-4-azidoquinolinium nitrate, dp 98°
- E-151 : 4-Azidoquinoline nitrate, dp 176°
- E-152 : 2-Cyano-4-azidoquinoline 1-oxide, dp 168°
- E-153 : 4-azido-7-chloroquinoline hydrochloride, dp 168°
- E-154 : 4-Azido-7-chloroquinoline 1-oxide hydrochloride, dp 151°
- E-155 : 2-Cyano-4-azido-7-chloroquinoline, dp 187°
- E-156 : 3,6-Dimethoxy-4-azidopyridazine 1-oxide, dp 89°
- E-159 : 1-Methyl-4-azidoquinolinium iodide, dp 125-126°
- E-160 : 1-Methoxy-4-azidoquinolinium tosylate, dp 144-145°
- (4) その他の化合物
- E-109 : O-Methyl hydroxylamine hydrochloride, mp 143-146°
- E-115 : 1,2-Di(4-pyridyl)ethylene dimethiodide, dp 290°
- E-116 : 1,2-Di(4-pyridyl)ethylene monomethiodide, dp 222°

E-161 : 4-Hydrazinoquinoline 1-oxide hydrochloride, dp 235°
E-162 : 4-(2-Nitrofurfurydene)hydrazinoquinoline 1-oxide, dp 235°
E-100 : 3-Hydroxy-4-bromo-6-bis(2-chloroethyl)- aminomethylpyridazine 1-oxide, dp 185°
E-140 : 3-Hydroxy-6-piperidinomethylpyridazine 1-oxide hydrochloride, dp 219-222°
E-157 : 3-Hydroxy-6-morpholinomethylpyridazine 1-oxide hydrochloride, mp 185°

## Results

Compound number	AH-13 screening	L-1210 screening Max. T/C
(1) Nitrosoarea Derivatives		
E-101	±	196
E-102	—	109
E-142	+	>417
E-143	++	>417
E-144	—	111
E-145	—	
E-146	—*	
E-149	—	164
E-158	+	>385
E-103	—	122
E-108	—	125
E-119	—	129
E-120	—	130
E-106	—	136
E-141	—	162
E-125	—	101
E-124	—	102
E-123	+	>370
E-121	++	167
E-112	++	>291
E-122	++	119
E-113	++	104
E-118	+	121
E-114	—	103
E-117	—	100
E-104	—	114
E-111	±	
E-107	+	108
E-105	+	>273
E-110	—	92

Compound number	AH-13 screening	L-1210 screening Max. T/C
(2) Triazene Derivatives		
E-126	—*	
E-127	—*	
E-128	—	
E-129	—*	
E-133	—*	
E-134	—*	
E-135	—*	
E-136	—*	
E-137	—*	
E-138	—*	
E-139	—	
(3) Azido Derivatives		
E-147	—	
E-148	—	
E-150	—	
E-151	—	
E-152	—	
E-153	—	
E-154	—	
E-155	—	
E-156	—	
E-159	—	
E-160	—	
(4) Others		
E-109	—	
E-115	—	
E-116	—	
E-161	—	
E-162	—	
E-100	±	>354
E-140	—	127
E-157	—	

\* Anti-AH-13 effect was evaluated by MED (minimum effective dose) test.<sup>2)</sup>

## 3. スクリーニング結果

以上の化合物のスクリーニング結果はつぎのようにまとめられた。

	AH-13 スクリーニング ≥ ±	L-1210 Max. T/C ≥ 125
(1) ニトロソ尿素誘導体	13/30	14/28
(2) 複素環トリアツェン誘導体	0/11	
(3) 複素環アジド誘導体	0/11	
(4) その他の化合物	1/8	2/2

前回の報告においては、AH-13 に効果を示した化合物が 32/93、L-1210 には 13/32 であり<sup>3)</sup>、今回の報告分では AH-13 に対して効力を示したものが減少した。当部で合成している化合物の多くは、アルキル化の可能性が考えられ、一般には AH-13 に効力を示しやすいと考えられたので<sup>3,4)</sup>スクリーニングに AH-13 を使ってきたが、今回のスクリーニングの結果では L-1210 に対して効力を示す化合物が多かった。L-1210 に対する効果は E-100、E-140 を除きすべてニトロソ尿素誘導体についてのみ検討したため、トリアツェン、アジドやその他の化合物の L-1210 に対する効果は不明であるが、ニトロソ尿素誘導体の中に L-1210 にだけ効力を示すものがかなりみられた。このことについては Gann にすでに発表した<sup>5)</sup>。

今回のスクリーニング結果よりわかるように、AH-13 は高感受性、L-1210 は低感受性と単純には考えられない。当部で行なっているように、性質のかなり違う 2 種類の腫瘍細胞を使ってスクリーニングをすることは必要であると考えられる。

また、AH-13 に効力を示すものが減少したことには、トリアツェンやアジド誘導体のように新しい抗腫瘍性化学官能基を求めて合成したものが、スクリー

ングにかからなかったことがあげられ、ランダム合成による新活性物質発見の難しさがうかがわれた。構造修飾により、徐々に活性の高いものをみつけていく方法の方が効力の高い化合物をみつけやすいが、従来の制癌剤とは違った効力を示すものはなかなかみつけれない。構造修飾と新しい抗腫瘍性化学官能基のためのランダム合成との二本立によって、新しい制癌剤の追求をしていきたい。

なお、AH-13 と L-1210 の両方に高い抗腫瘍性を示した水溶性のニトロソウレア化合物については更に抗腫瘍性について検討する予定である。

本研究の一部は文部省がん特別研究費によった。

## 文 献

- 1) 安齊美知子ら：衛生試報，94，148 (1976)
- 2) Michiko Miyahara *et al.* : *Gann*, 68, 573 (1977)
- 3) 佐藤博，市村宏子：日本臨床，29，1818 (1971)
- 4) 市村宏子：癌と化学療法，2，605 (1975)
- 5) Michiko Miyahara *et al.* : *Gann*, 69, 187 (1978)

## 国立衛生試験所標準品（日本薬局方標準品）“血清性性腺刺激ホルモン標準品（第6回，Control 771）”の製造

川村次良・佐藤 浩・木村俊夫・横田椅江

### Preparation of the Japanese Pharmacopoeia Standard Serum Gonadotrophin (6th, Control 771)

Jiro KAWAMURA, Hiroshi SATO, Toshio KIMURA and Isue YOKOTA

The Japanese Pharmacopoeia Standard Serum Gonadotrophin (6th, Control 771) was prepared and assayed against to 2nd International Standard by rat ovarian weight method in collaboration with three laboratories. The potency of the new Standard thus obtained is defined as 10.9 international units per milligram.

(Received May 31, 1978)

1972年に製造した日本薬局方血清性性腺刺激ホルモン標準品（第5回）の残部が僅少となったため、1976年12月に血清性性腺刺激ホルモン（PMSG）の原末を入手し、新ロットの標準品（第6回）を製造するための準備を開始した。

従来までの標準品は原末を乳糖と粉末状態で混合し、稀釈していたが、製品の均一性を確実にするために、胎盤性性腺刺激ホルモン標準品の場合<sup>1)</sup>と同様に、PMSG原末と乳糖を溶液状態で混合したのち凍結乾燥して新標準品の原料とした。また生物学的定量法によりホルモンの力価を検定する場合に大きな誤差を伴うことが多いので、帝國臓器製薬株式会社および三共ゾーキ株式会社に検定の分担を依頼し、国立衛生試験所生物化学部を加えた3箇所による共同検定を行い、新標準品の力価を10.9単位（国際単位）/mgと決定することができた。

### 実験方法

1. PMSG原末 三共ゾーキ株式会社から購入した。同社による自家試験成績は、1100単位/mgである。
2. 新標準品原料の調製 乳糖（キンダ化学製，試薬特級）90gを蒸留水1500mlに溶かした液に、PMSG原末900mgを加えて溶かした。この溶液をメンブランフィルター（ザートリウス SM 11306，ポアサイズ0.45 $\mu$ ，径47mm）に250mlずつ6回に分けて通した後、2個のステンレス製パットに750mlずつ入れ、凍結乾燥を行った。約60時間を要した。凍結乾燥粉末は、良く混合後、5酸化リンデシケータ

一中でさらに60時間減圧乾燥した。この粉末約100mgずつアンプルに量り入れ、融封し、新標準品とした。なお、これらのアンプルのうちから任意に15本を抜き取り、開封し、それらの乾燥減量を測定（80°C，減圧，4時間）した結果、1.58%であった。

3. 定量 第9改正日本薬局方血清性性腺刺激ホルモンに採用されている幼若ラットの卵巢重量増加法により行なった。ただし第2回国際標準品<sup>2)</sup>（1966年，1600単位/アンプル）を標準品とし、新標準品原料を試料とした。

4. 共同検定 参加各試験機関には国際標準品5本，新標準品原料10本をそれぞれ配布した。検定に当たっては、実験日，動物の系統名，生後日数，納入業者名，標準溶液および試料溶液の調製方法，投与量とその濃度，個々の動物のと殺時の体重と卵巢重量を記録することを依頼した。

投与量は必ずしも薬局方記載の卵巢重量（高用量で50~90mg，低用量で30~50mg）の範囲内でなくても，良好な用量反応関係を示すような用量ならば差支えないこととした。

### 結果と考察

1977年10月までに各機関から寄せられたデータを集計し，検討を行った。

実験に用いたラットは各機関共ウィスター系であったが，機関Aでは静岡県実験動物農業協同組合から，BおよびCは(株)日本医科学動物資材研究所から購入した。

投与量は機関AおよびCでは高用量が20単位，低

Table 1. Combined Results of the Assays for PMSG Standard Preparation

Exp No	Lab	Dose	mean body weight initial (mg)	body weight autopsy (mg)	no of animal	mean ovarian weight (mg)	log potency ratio	found potency (IU/mg)	L value	s <sup>2</sup>	F'
1	A	SH	47.8	66.8	12	128.7	-0.0143	10.64	0.1708	796	1.9516
		SL	47.1	65.1	12	56.9					
		TH	46.3	65.1	12	114.6					
		TL	46.9	64.5	12	65.4					
2	A	SH	49.2	69.5	12	122.8	-0.0018	11.04	0.1832	988	0.0892
		SL	49.2	68.6	12	62.4					
		TH	48.8	66.3	12	125.8					
		TL	49.3	69.3	12	60.1					
3	A	SH	51.3	71.4	12	152.3	-0.0247	10.39	0.1112	737	0.0918
		SL	49.7	70.8	12	67.9					
		TH	49.8	71.4	12	147.5					
		TL	50.7	69.8	12	58.4					
4	A	SH	48.9	74.5	12	101.3	-0.0281	10.31	0.1612	595	0.3790
		SL	48.3	73.4	12	41.6					
		TH	48.1	72.0	12	91.8					
		TL	48.7	74.4	12	40.8					
5	A	SH	48.2	70.0	12	127.3	0.0547	12.47	0.1810	1134	0.0040
		SL	46.4	70.9	12	60.1					
		TH	46.8	71.5	12	141.9					
		TL	47.3	71.0	12	70.7					
6	B	SH	44.9	69.9	10	91.2	0.0026	10.06	0.2296	973	0.0174
		SL	44.9	69.1	10	36.2					
		TH	45.0	71.3	10	97.3					
		TL	44.9	69.0	10	39.7					
7	B	SH	44.0	73.4	11	86.8	0.0414	11.00	0.1456	617	0.3446
		SL	44.0	73.1	10	30.9					
		TH	43.9	72.5	11	99.6					
		TL	44.0	71.7	10	34.7					
8	B	SH	48.7	78.9	11	95.4	0.0052	11.13	0.1334	519	0.6125
		SL	48.9	77.6	10	44.0					
		TH	48.9	79.9	11	101.0					
		TL	48.9	79.9	10	39.5					
9	B	SH	47.5	75.1	10	98.1	-0.0142	10.64	0.1562	513	2.2667
		SL	47.4	73.6	10	33.0					
		TH	47.4	76.5	11	85.0					
		TL	47.5	76.8	10	41.2					
10	B	SH	49.5	81.1	11	129.3	0.0026	11.07	0.1130	720	0.1143
		SL	49.5	79.1	10	46.1					
		TH	49.2	80.3	11	127.2					
		TL	49.6	80.0	10	49.6					

Table 1. Continued

Exp No	Lab	Dose	mean body weight		no of animal	mean ovarian weight (mg)	log potency ratio	found potency (IU/mg)	L value	s <sup>2</sup>	F'
			initial (mg)	autopsy (mg)							
11	C	SH	38.0	59.5	11	50.3	0.0233	10.52	0.2725	332	0.0175
		SL	37.0	56.8	11	24.0					
		TH	34.3	56.2	11	53.1					
		TL	38.3	58.5	11	25.4					
12	C	SH	46.2	70.9	13	79.4	0.0643	10.38	0.1316	707	3.8398
		SL	50.0	67.7	11	26.4					
		TH	45.8	64.1	13	108.8					
		TL	47.5	66.9	12	26.0					
13	C	SH	45.7	77.1	17	131.5	0.0011	10.81	0.1044	754	0.1340
		SL	45.6	79.8	18	59.8					
		TH	45.8	78.2	18	134.2					
		TL	45.8	73.8	16	57.7					
14	C	SH	47.0	74.6	19	110.8	0.0209	11.54	0.1442	1167	0.3413
		SL	47.0	75.1	19	45.8					
		TH	47.0	75.6	18	120.3					
		TL	47.0	75.9	18	46.0					

SH, TH : High dose of standard or test preparation

SL, TL : Low dose of standard or test preparation

Weighted mean potencies and their confidence limits in laboratory A, B and C were 10.82 (9.97-11.8), 10.91 (10.1-11.8) and 10.82 (10.0-11.7) units per mg respectively.

Weighted grand total mean potency is 10.86 units/mg with confidence limits of 10.4-11.3 units (P=0.05).

用量が10単位であった。Bでは20, 10, 5単位を用いて3-3用量検定を行ったが、直線性にやや難点があったため、用量反応関係のより急峻な20単位および10単位の結果のみを用いて、2-2用量検定として計算した。いずれの機関も卵巣はブアン液固定を行わず、そのまま秤量した。

機関AおよびBでは毎回1群10~12匹の動物を用い、5回の検定を行った。Cでは4回の検定のうち2回は1群16~19匹を用いた。

以上の結果をTable 1に示す。

各検定はいずれもL値が日局の限界0.3以下であり、しかも平行性も十分に認められたので、この14回の検定結果を全部採用できると判断した。

各機関別の重みつき平均値も互いに接近し、信頼度も高いので、全検定を合算した重みつき平均値を算出したところ10.86単位/mgの値を得た。その信頼限界の幅は10.4~11.3単位 (P=0.05, 平均値±

約4%)であった。そこで共同検定参加各機関の合意の下に、3桁までの数字を採用し、日本薬局方血清性性腺刺激ホルモンの新標準品(第6回)の力価は10.9単位(国際単位)/mgと決定した。

この標準品はControl 76シリーズとして1978年5月から配布を開始した。

終りに共同検定に御協力戴いた帝國機器製薬株式会社および三共ゾーキ株式会社に厚く感謝いたします。また国際標準品を分与されたWHOに感謝いたします。

## 文 献

- 1) 川村次良ら：衛生試験，94，88 (1976)
- 2) D.R. Bangham, P.M. Woodward : *Bull. Wld Hlth Org.*, 35, 761 (1966)
- 3) C.I. Bliss : *Drug Standard*, 24, 33 (1956)

## 国立衛生試験所標準品第6回“リゾチーム標準品”について

谷本 剛・横田椅江・中路幸男・木村俊夫・川村次良

### On the National Institute of Hygienic Sciences Standard 6th “Lysozyme Standard”

Tsuyoshi TANIMOTO, Isue YOKOTA, Yukio NAKAJI,  
Toshio KIMURA and Jiro KAWAMURA

The sixth “Lysozyme Standard” (Control : 771) of the National Institute of Hygienic Sciences was prepared. On the basis of a results of the test of its potency, amino acid composition and loss on drying, the “Lysozyme Standard” (Control : 771) containing 1 mg (potency) of lysozyme per 1 mg was authorized.

(Received May 31, 1978)

国立衛生試験所リゾチーム標準品 (Control : 771) を製造したので報告する。

#### 1. 活性測定

リゾチーム標準品原料の活性をリゾチーム標準品 (Control : 741) を対照として、次に示す定量法-1 および定量法-2 によって測定した。

##### I-1 試薬：

(1) リン酸塩緩衝液 (pH 6.2)

規格試験法<sup>1)</sup>に記載された方法に従って調製した。

(2) 基質液

*Micrococcus lysodeikticus* の乾燥菌体 (生化学工業株式会社製) を用いて、規格試験法<sup>1)</sup>に記載された方法で調製した。

I-2 定量法-1：試料および標準品 (Control : 741) をデシケーター (シリカゲル) で2時間減圧乾燥し、その約 50 mg (力価) に対応する量を精密に量り、それぞれに pH 6.2 のリン酸塩緩衝液を加えて正確に 100 ml とする。その 2 ml ずつを正確に量り、pH 6.2 のリン酸塩緩衝液を加えてそれぞれを正確に 100 ml とする。両液から 2 ml (低用量) および 3 ml (高用量) ずつを正確に量り、pH 6.2 のリン酸塩緩衝液を加えて正確に 50 ml とした液をそれぞれ低用量試料溶液、高用量試料溶液、低用量標準溶液および高用量標準溶液とする。基質液 3 ml ずつを正確に量り、試験管 4 本にとり、35° で3分間加温する。別に 35° で3分間加温した低用量試料溶液、高用量試料溶液、低用量標準溶液および高用量標準溶液 3 ml ずつを正確に量り、それぞれをさきの基質を入れた試験管に加え、35° で 10±1 分間放置した液につき、水を対

照として層長 10 mm、波長 640 nm における吸光度を測定する。この実験を3回繰返し、それぞれの液について得られた3回の測定値の合計を ETL, ETH, ESL および ESH とし、次式によって力価を計算した。

試料 1 mg 中のリゾチーム量 [mg (力価)]  
= 力価比

$$\times \frac{\text{標準品 (Control : 741) の量 [mg (力価)]}}{\text{試料の重量 (mg)}}$$

ただし、力価比 =  $\text{Antilog} \frac{F \cdot I}{E}$

$$F = 1/2 (ESH + ESL - ETH - ETL)$$

$$E = 1/2 (ESL + ETL - ESH - ETH)$$

$$I = \log 1.5$$

I-3 定量法-2：規格試験法<sup>1)</sup>に記載された定量法を準用した。

I-4 定量結果：定量法-1 および定量法-2 で求められた試料 1 mg 中のリゾチーム量 [mg (力価)] を Table 1 に示した。

#### II アミノ酸分析

アミノ酸分析は Spackman らの方法<sup>2)</sup>に従って行った。すなわち、リゾチーム試料約 3 mg を硬質試験管にとり、6N 塩酸 1 ml を加えて減圧融封し、これを 110° で 24 時間加水分解した。加水分解後、内容物を水浴上で蒸発乾固し、残留物について日立 KLA-3B 型アミノ酸分析計で分析した。結果を Table 2 に示した。

#### III 乾燥減量

リゾチーム試料約 0.5 g を精密に量り、デシケーター (シリカゲル) に入れ、4 時間減圧乾燥したときの

Table 1. Activities of the lysozyme preparation (Control : 771)

Exp. No.	Activity [mg (potency)]	
	Method-1	Method-2
1	0.997	0.961
2	0.976	0.980
3	1.016	0.974
4	0.969	1.062
5	0.971	0.964
6	1.009	0.998
7	1.074	0.984
8	0.997	0.915
9	1.016	0.960
10	1.053	1.027
11	1.065	1.052
12	1.066	1.052
Mean±S.D.	1.016±0.0398	0.994±0.0453

乾燥減量は 1.8% であった。

考察および結論

リゾチーム試料の力価は定量法-1 で 1.016±0.0398 mg (力価), 定量法-2 で 0.994±0.0453 mg (力価) であり, 両法でよく一致した. 定量値のばらつきも両法の間にはほとんど差は認められなかった. 試料のアミノ酸分析の結果は標準品 (Control : 691) の分析値と差はなく, 理論値ともよく一致した. 以上の結果から本試料をリゾチーム標準品 (Control : 771) とし, その 1 mg はリゾチーム 1 mg (力価) を含むものと認定した.

文 献

- 1) 医薬品の規格及び試験法, p.17 (1967), 厚生省薬務局製薬課
- 2) D.H. Spackman, W.H. Stein, S. Moore:

Table 2. Amino acid composition of the lysozyme preparation (Control : 771)

Amino acid	Preparation (Control : 771)	Lysozyme standard (Control : 691)	Theoretical <sup>3)</sup>
Lys	6.05	6.08	6
His	0.93	1.03	1
Arg	11.3	11.1	11
Asp	21.3	21.1	21
Thr	6.85*	6.68*	7
Ser	8.72*	8.77*	10
Glu	4.94	4.86	5
Pro	2.04	2.16	2
Gly	12.3	12.1	12
Ala	12.3	11.8	12
Cys	1.68	1.75	4
Val	5.80	5.88	6
Met	1.90	2.00	2
Ile	5.75	5.88	6
Leu	8.07	8.16	8
Tyr	3.00, 2.91**	2.68	3
Phe	3.01	3.02	3
Trp	5.89**	****	6
CySH	0.0***	****	0

\* Uncorrected

\*\* Determined spectrophotometry<sup>4)</sup>

\*\*\* Determined colorimetrically with 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)<sup>5)</sup>

\*\*\*\* Detected only qualitatively

*Anal. Chem.*, 30, 1190 (1958)

- 3) R.E. Canfield, A.K. Liu : *J. Biol. Chem.*, 240, 1997 (1965)
- 4) T.W. Goodwin, R.A. Morton : *Biochem. J.*, 40, 628 (1946)
- 5) G.L. Ellman : *Arch. Biochem. Biophys.*, 82, 70 (1959)

国立衛生試験所標準品（日本薬局方標準品）

“メトトレキサート標準品”について

太田美矢子・徳永裕司・木村俊夫・川村次良

On the National Institute of Hygienic Sciences Standard  
(The Japanese Pharmacopoeia Standard)  
“Methotrexate Reference Standard”

Miyako OHTA, Hiroshi TOKUNAGA, Toshio KIMURA  
and Jiro KAWAMURA

The material was examined for the first preparation of the Japanese Pharmacopoeia Standard, “Methotrexate Reference Standard”. The material was assayed against to the highly purified methotrexate, prepared in our laboratory, and gave results of 99.4% and 98.4% by paper chromatographic and thin layer chromatographic method, respectively.

From the assay result and other analytical data, the material is authorized as the Japanese Pharmacopoeia Standard.

(Received May 31, 1978)

第九改正日本薬局方 (JP IX) に、新たに収載されたメトトレキサートの確認試験および定量法に用いる国立衛生試験所標準品（日本薬局方標準品）を製造したので報告する。

1. 標準品原料 日本レダリー株式会社より購入  
2. 試料および試薬 英国薬局方メトトレキサート標準品 (Batch No 639), 精製メトトレキサート<sup>1)</sup>, 精製メトトレキサートのアセトン再結晶品: 本品 30 mg を少量の 10% アンモニヤに溶かし, 少しずつアセトンを加え結晶を析出させる。析出した結晶はろ取り, アセトンで充分洗浄する。洗浄後, 減圧, シリカゲル, 室温で8時間乾燥する。

標準品原料の塩酸再結晶品<sup>1)</sup>: 本品 50 mg をメタノールを加え溶かし, この液をナス型コルベンにとり, 減圧下で溶媒を除去する。残渣に 0.5N 塩酸試液 5 ml を加え溶かした後, 冷蔵庫に一夜放置する。析出した淡黄色沈殿をメンブランフィルター (3 $\mu$ ) にろ取り, 水で充分洗浄する。洗浄後, 水にけん濁させ, 凍結乾燥する。

アンモニヤ・メタノール試液: 10% アンモニヤ試液 1 ml にメタノールを加え 100 ml とする。(pH 11.0)

0.015Nアンモニヤ試液: 強アンモニヤ水 10 ml に水を加えて 100 ml とし, その 10 ml をとり 1000 ml とする。

薄層クロマトグラフ法の展用溶媒: クエン酸 10 g

に水を加えて溶かしたのち, さらに水を加え 200 ml とする。この溶液に, 強アンモニヤ水を少しずつ加え, pH 8.0 に調整する。

3. 装置 分光光度計 (島津製 QV-50 型), 高感度自記分光光度計 (ユニオン製 SM 401 型), デジタル微量水分測定装置 (平沼産業製 AQ-1 型), 赤外分光光度計 (日本分光製 DS-403G 型), 自動旋光計 (応用電気研究所製 MP-1 型)

4. 試験方法 特に記すもの他は, JP IX の一般試験法および医薬品各条 “メトトレキサート” の試験法を準用した。

1) 紫外吸収スペクトル測定法~原料約 2 mg を, アンモニヤ・メタノール試液 1 ml にとかず, その 0.100 ml を, 2 コの 20 ml メスフラスコに入れ, それぞれに, 0.1N 塩酸試液 (pH 1.2), 0.1N 水酸化ナトリウム試液 (pH 12.6) を加えて, 正確に 20 ml とする。(各溶液の液性は変わらない)。それぞれの溶液につき, 波長 220~440 nm における紫外吸収スペクトルを測定する。

2) 水分 本品 10 mg を用い, 抽出時間 2 分, 待ち時間 20 秒で測定する。

3) 定量法

i) 試料溶液および標準溶液の調製: 原料および各種標準品約 20 mg を精密に量り, アンモニヤ・メタノール試液を加えて, 正確に 10 ml とし, 試料溶液および標準溶液とする。

ii) ろ紙クロマトグラフ法による分離：ろ紙（40 mm×550 mm）の一端から約 100 mm の所に線を引き原線とする。試料溶液、各種標準溶液および空試験用のアンモニア・メタノール試液の 0.050 ml を微量ピペットを用いて、おのおの 4 枚のろ紙の原線に送風乾燥しながらスポットする。ついで、底に水を入れた、横 350 mm、たて 220 mm、高さ 720 mm の木製の展開容器に、それぞれの溶液をスポットしたろ紙を、水につけないようにつり下げ、容器にふたをして、平衡に達するまで放置する（16 時間）。ついで、水酸化ナトリウム試液で pH を 5.8 に合せた 0.1 M リン酸二水素ナトリウム試液を展開ざらに入れ、下降法で展開溶媒の先端がろ紙の先端近くなるまで展開する。ろ紙をとり出し、風乾し、紫外線照射下でメトトレキサートのスポットを確認する。メトトレキサートのスポットの部分（約 10 cm）を細片に切り、10 ml の試験管に入れ、0.1 N 塩酸試液 10 ml を正確に加え、密栓して、15 分間振とう器を用いて振とうし溶出する。おのおのの液をメンブランフィルター（3 $\mu$ ）を用いてろ過し、それぞれの液につき、0.1 N 塩酸を対照として層長 10 mm で、波長 306 nm における吸光度を測定したのち、原料および各種標準品の水分含量より乾燥物に換算し定量する。

iii) 薄層クロマトグラフ法による分離：メルク製プレコーディングセルロースプレート（200 mm×200 mm、厚さ 0.1 mm）を用い、たてにみぞを入れ、6 つの等しい幅にプレートを分割する。プレートの底から 3 cm の所に線を引き原線とする。試料溶液、各種標準溶液および空試験用のアンモニア・メタノール溶液の 0.030 ml を微量ピペットを用いて、6 つの分割部分の原線に、それぞれスポットする。同じプレートを 6 枚作成し、あらかじめ、展開溶媒を 150 ml 入れて 1 時間飽和させた 3 つの展開容器の中に 2 枚ずつ入れて展開する。約 15 cm 展開させたのち、プレートを取り出し、風乾し、紫外線照射下で、メトトレキサートの黒色スポットを確認する。メトトレキサートのスポット部分（約 3.5 cm）をかきとり、50 ml の共栓遠沈管に入れ、それぞれに 0.015 N アンモニア試液 10 ml を加え、振とう機で 15 分間振とうする。振とうしたのち、それぞれの試験管に 6 N 塩酸溶液 0.1 ml を加え、再び 3 分間振とうする。ついで、5 分間、3000 rpm で遠沈し、おのおの上澄液を 10 ml の共栓試験管にとり、それぞれの液につき、0.015 N アンモニア試液を対照として、層長 10 mm で、波長 306 nm における吸光度を測定したのち、原料および各種標準品の水分含量より乾燥物に換算し、定量する。

### 5. 試験成績

- 1) 性状：黄かつ色の結晶性の粉末
- 2) 赤外吸収スペクトル：原料の赤外吸収スペクトルを Fig. 1 に、原料を塩酸から再結した時のそれを Fig. 2 に示す。塩酸で、再結したメトトレキサートでは、原料と異なり、1300  $\text{cm}^{-1}$  に特異的な吸収があらわれる。しかし、この吸収は 10% アンモニア試液にとかし、アセトンから再結すると消失する。
- 3) 紫外吸収スペクトル：原料の酸性、アルカリ性における紫外吸収スペクトルを Fig. 3 に示す。

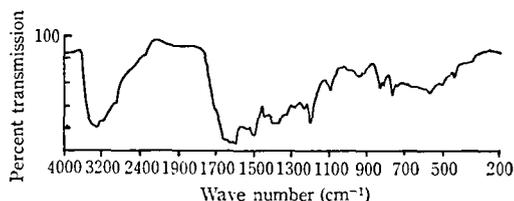


Fig. 1. Infrared spectrum of material for methotrexate reference standard

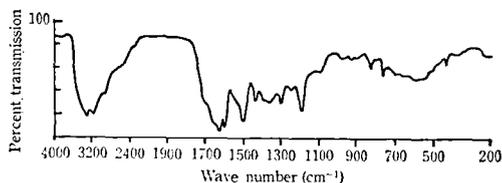


Fig. 2. Infrared spectrum of material for methotrexate reference standard recrystallized from 0.5 N hydrochloric acid

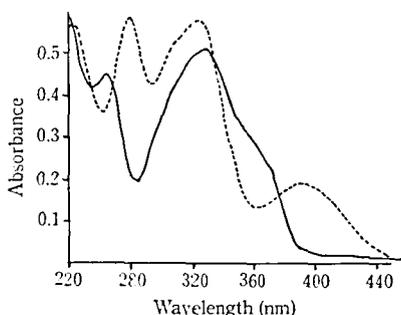


Fig. 3. Ultraviolet absorption spectra of material for methotrexate reference standard (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )  
 — at pH 1.2 ---- at pH 12.6

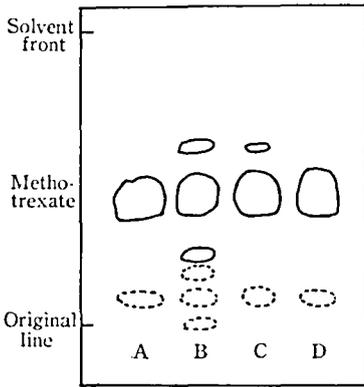


Fig. 5. Thin layer chromatogram of methotrexate

- (A) Highly purified methotrexate
- (B) British pharmacopoeia standard
- (C) Material for methotrexate reference standard
- (D) Highly purified Methotrexate recrystallized from acetone after dissolving in a slight amount of 10% ammonia water.

Conditions

Adsorbent; precoated cellulose plate (without fluorescent indicator, Merck Co.,) Layer thickness 0.1 mm

Solvent system; 5 w/v% citric acid solution adjusted to pH 8.0 with strong ammonia water.

Detection; ultraviolet light. ---- fluorescent spots, — black spots

Developing distance; 15 cm

applied amounts of sample; 100 µg.

4) 水分: 標準品原料; 5.78% (n=5), 精製メトトレキサート; 7.70% (n=2), 英国薬局方標準品 7.39 (n=1), アセトン再結した精製メトトレキサート; 12.60% (n=1).

5) 旋光度: 標準品原料約 0.1g を 0.1N 水酸化ナトリウム試液 10 ml に溶かし, 層長 100mm で測定するとき, 旋光度は次の通りであった.

$$[\alpha]_D^{20} : +21.0^\circ (n=2)$$

$$[\alpha]_{589}^{20} : +20.5^\circ (n=2)$$

$$[\alpha]_{548}^{20} : +25.5^\circ (n=2)$$

6) 炎色反応: 塩素の存在を確認するため, 日本薬局方一般試験法の炎色反応 (2) によって, 塩化物の試験をした.

- 標準品原料 ⊖
- 精製メトトレキサート ⊕
- 英国薬局方標準品 ⊕

Table 1. The content percents of methotrexate in various samples by two assay Methods

Samples	Method A*	Method B**
A	100.0% (n=13)	100.0% (n=16)
B	96.8% (n=9)	95.2% (n=10)
C	99.4% (n=20)	98.4% (n=27)
D	99.4% (n=6)	100.4% (n=6)

Samples are identical to those described in Fig. 4.

\*; Methotrexate was assayed after separating by paper chromatography.

\*\*; Methotrexate was assayed after separating thin layer chromatography.

アセトン再結した精製メトトレキサート ⊖

7) 薄層クロマトグラフ: 標準品原料, 精製メトトレキサート, 英国薬局方標準品および精製メトトレキサートのアセトン再結晶品のそれぞれ 2 mg を 1 ml のアンモニア・メタノール試液に溶かし, その 50 µl (100 µg) をスポットし, 展開した結果をに示す.

8) 定量: 精製メトトレキサートを 100% としたときの定量値を Table 1 に示す. また, 炎色反応, 赤外吸収スペクトルの結果から, 精製メトトレキサートが塩酸塩を形成している可能性があり, 定量値に影響を与えている事も考えられる. このことから, 精製メトトレキサートを 10% アンモニア試液にかしたのち, アセトンから再結晶したものと比較した. その定量値を Table 1 のサンプル D の項に示す. ろ紙クロマトグラフ法, 薄層クロマトグラフ法により分離定量した結果は, それぞれ 99.4%, 100.4% であり, 精製メトトレキサートに含有していると思われる塩酸量は, メトトレキサートの定量値に影響を与える程ではなかった.

結 論

標準品原料として入手したメトトレキサートを精製メトトレキサート, 英国薬局方メトトレキサート標準品と比較検討した. 標準品原料の定量値は, 精製メトトレキサートに対して, ろ紙クロマトグラフ法による分離定量法では, 99.4%, 薄層クロマトグラフ法による分離定量法では, 98.4% を示した.

得られた試験成績より, 今回入手した標準品原料が国立衛生試験所標準品 (日本薬局方標準品) に適した品質を有することを認めた.

最後に、標準品製造にあたり協力して頂いた日本  
レダリー株式会社、英国薬局方委員会に感謝します。

文 献

- 1) 徳永祐司ら：衛生試報，96，32 (1978)

## 市販リゾチーム製剤の力価について

谷本 剛・横田椅江・中路幸男・川村次良

### On the Determination of Potency of Commercial Lysozyme Preparations

Tsuyoshi TANIMOTO, Isue YOKOTA, Yukio NAKAJI  
and Jiro KAWAMURA

This paper was described the results of the assay for the lysozyme potency in the commercial preparations (tablets : 49 samples) collected for the official inspection in 1977.

The potencies of 13 samples were not more than 90% of the labeled potencies, when the all samples were determined by the method described in the text. These low potency samples, however, showed the potencies of 90-110%, when 0.4 M sodium chloride solution was used instead of phosphate buffer for enzyme extraction. We could not indicated any special component that may interfere the assay or extraction of the enzyme.

(Received May 31, 1978)

著者らは消炎酵素製剤として市販されているリゾチーム含有製剤について昭和 52 年度医薬品等一斉取締試験を行ったのでその結果を報告する。

今回取去された検体は 10 mg (力価) 含有製剤 : 27 検体, 30 mg (力価) 含有製剤 : 22 検体, 合計 49 検体であり, すべて錠剤であった。取去されたこれら検体には糖衣を施したものはなく, フィルムコーティングしたものが 1 検体あり, 他はすべて裸錠であった。

力価測定にあたってはまず全検体について, 3(1)に従って試料溶液を調製し, 4 : 定量操作法に従って測定した。これらのうち, 申請書の含量規格に適合しなかった検体については更に 3(2)に従って試料溶液を調製し, 4 : 定量操作法に従って再度その力価を測定した。

#### 1. 試薬

##### (1) リン酸塩緩衝液, pH 6.2

リン酸二水素ナトリウム 10.4 g に水を加えて 1000 ml とした液 815 ml に, 無水リン酸一水素ナトリウム 9.465 g に水を加えて 1000 ml とした液 185 ml を加える。必要ならばさらにいずれかの液を加えて pH 6.2 に調節する。調製後, 冷所に保存し, 1 週間以内に使用した。

##### (2) 0.4 M 塩化ナトリウム溶液

塩化ナトリウム 23.4 g に水を加えて 1000 ml とす

る。

##### (3) 基質液

*Micrococcus lysodeikticus* の乾燥菌体 (生化学工業社製) 適量に pH 6.2 のリン酸塩緩衝液を加えて振り混ぜ, 懸濁したのち, 水を対照として層長 10 mm, 波長 640 nm における透過率が 10% となるように, さらに基質または pH 6.2 のリン酸塩緩衝液を加える。基質液は保存条件によって感度が低下することがあるので, 用時調製した。

#### 2. 検体の前処理

錠剤 20 個をとり, その重量を精密に量り, 1 個あたりの平均重量をあらかじめ算出しておき, それを乳鉢ですりつぶして粉末とした。

#### 3. 試料溶液および標準溶液の調製

(1) 塩化リゾチームの規格試験法<sup>1)</sup>に準拠した方法で調製した。すなわち, 粉末試料および標準品をデシケーター (シリカゲル) 中で 2 時間減圧乾燥し, その約 50 mg (力価) に対応する量を精密に量り, それぞれに pH 6.2 のリン酸塩緩衝液を加えて正確に 100 ml とする。この液 2 ml ずつを正確に量り, pH 6.2 のリン酸塩緩衝液を加えて 100 ml とし, この液 2 ml ずつを正確に量り, pH 6.2 のリン酸塩緩衝液を加えてそれぞれ正確に 50 ml とし, 試料溶液および標準溶液とする。

(2) 粉末試料をデシケーター (シリカゲル) 中で 2 時間減圧乾燥し、その約 50 mg (力価) に対応する量を精密に量り、0.4 M 塩化ナトリウム溶液を加えて正確に 100 ml とする。この液 2 ml を正確に量り、以下 (1) と同様に操作して試料溶液とする。

4. 定量操作法

基質液を振り混ぜながら正確に 3 ml ずつ量り、試験管に入れ、氷水中に没し、実験開始直前に 35° で 3 分間加温する。別に 35° で 3 分間加温した試料溶液、標準溶液および pH 6.2 のリン酸塩緩衝液 3 ml ずつを正確に量り、それぞれを先の基質液に加えてから、35° で 10±0.1 分間、放置したのち、水を対照として層長 10 mm、波長 640 nm における吸光度を測定する。各試料溶液、標準溶液および対照液について、実験を 3 回繰り返す、各液の吸光度の平均値を AT, AS および AO とし、次式によって試料 1 mg 中のリゾチーム量を算出した。

試料 1 mg 中のリゾチーム量 [mg (力価)]

$$= \frac{AO - AT}{AO - AS} \times \frac{\text{標準品の量 [mg (力価)]}}{\text{採取した試料の重量 (mg)}}$$

なお含量%は次式によって算出した。

検体 1 錠当りの含量%

$$= \frac{\text{試料 1 mg 中のリゾチーム量 [mg (力価)]}}{\text{検体 1 錠の平均重量 (mg)}} \times 100$$

5. 試験結果

試験結果を Fig. 1 に示す。10 mg (力価) 含有錠剤、30 mg (力価) 含有錠剤とも全検体の 70% 以上が 90% 以上のリゾチーム含有率を示した。しかし 10 mg (力価) 含有錠剤には 10~20% のリゾチーム含有率しか示さない検体も 2 例存在した。

前回の医薬品等一斉取締試験 (昭和 47 年度) の結果報告<sup>2)</sup> に述べてあるように、リゾチーム製剤の錠剤は、試料溶液の調製 (1) の方法では低力価しか示さない検体も (2) の方法、すなわちある濃度の塩化ナトリウム溶液で抽出することによって高力価を示すようになる。これは一種の塩溶効果によるものと考えられている。そこで今回も試料溶液の調製 (1) の方法で試験した結果が申請に記載の含量規格に適合しなかった検体について、試料溶液の調製 (2) の方法を準用して試験した。その結果を Fig. 2 に示す。この方法によれば規格に不適であった検体も全て 90% 以上のリゾチーム含有率を示した。

なお申請書にみられる処方成分について定量あるいは抽出を妨害する成分について検討したところ、特定の妨害成分が含まれていることを明らかにできなかった。

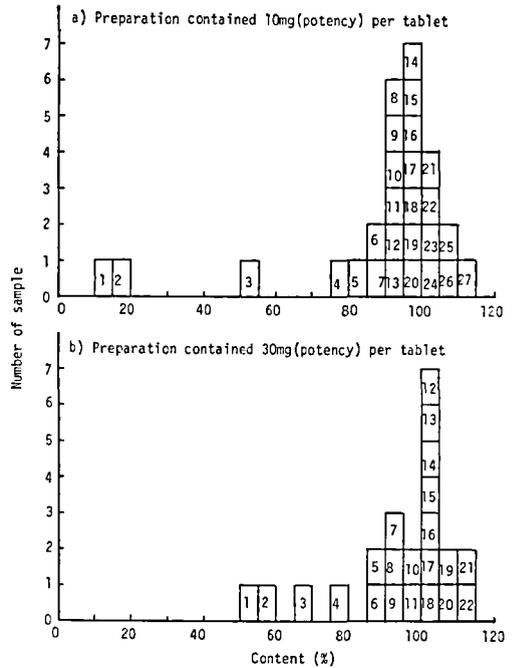


Fig. 1. Contents of lysozyme in the commercial preparations collected for the official inspection

Lysozyme potency was assayed with sample solution prepared by the method of I-3(1).

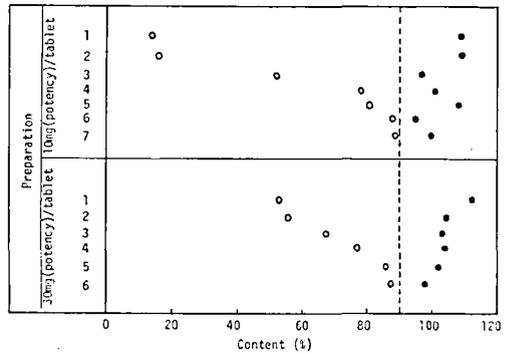


Fig. 2. Determination of lysozyme potency of the sample extracted with 0.4 M sodium chloride solution

○ : Assayed with sample solution extracted with phosphate buffer  
 ● : Assayed with sample solution extracted with 0.4 M sodium chloride

った。

ま と め

昭和 52 年度医薬品等一斉取締試験の対象として、

市販リゾチーム含有製剤（錠剤：49 検体）の試験を行なった。全検体についてリゾチームの規格試験法に準拠した方法で試験を行なった。そのうち 13 検体は申請書の含量規格に適合しなかった。しかし、0.4 M 塩化ナトリウム溶液を抽出溶媒とすることによって、これら 13 検体はいずれも含量規格に適合する含有率を、

示した。

## 文 献

- 1) 医薬品の規格及び試験法, p. 17 (1967), 厚生省薬務局製薬課,
- 2) 西崎笹夫ら：衛生試験, 91, 53 (1973)

## 「健菜」等健康食品中のグルココルチコイドの検索：

### 1. 生物活性試験による結果

川村次良・佐藤 浩・中路幸男・木村俊夫  
 福田秀男・早川堯夫・太田美矢子・徳永裕司  
 横田椅江・谷田部かね子・中村とし子

## On the Detection of Glucocorticoid in "Health Pill"

### I. The Results obtained by Bioassay

Jiro KAWAMURA, Hiroshi SATOH, Yukio NAKAJI, Toshio KIMURA,  
 Hideo FUKUDA, Takao HAYAKAWA, Miyako OHTA, Hiroshi TOKUNAGA,  
 Isue YOKOTA, Kaneko YATABE, and Toshiko NAKAMURA

As adverse effects produced by so-called "Health Pill", KENSAI, were very similar to those by glucocorticoid and so that presence of glucocorticoid in the health pills was suspected, the bioassay, which are based on the effects of the steroid on the weight of rat thymus and adrenal glands, and on glycogen contents in rat liver, were performed for the detection of the steroid. As the results, relatively larger contents of glucocorticoid-like substance than that expected in the natural products have been found in two in five samples.

(Received May 31, 1978)

昭和 52 年、「健菜」などの健康食品による副作用が社会的に問題化され、これら食品中に副腎皮質ホルモンの混入する疑いが指摘された。本資料は、この問題の解明にあたって行った試験のうち、生理作用を分析手段の指標として行った試験の結果である。

検体中には、その副作用の発現状況からグルココルチコイドの含有が疑われたが、グルココルチコイドには強い胸腺ならびに副腎の退縮作用と肝グリコーゲン蓄積作用のあることが知られている。したがって、これら 3 つの生理作用の有無を調べることは、グルココルチコイドの存在の検知に役立つと考えられた。そこで、入手した 5 検体につき、ラットを用いてこれらの作用につき検査したところ、その中の 2 検体にグルココルチコイド作用を認めたので報告する。

## 試験材料および試験方法

試料溶液：試料は「健菜」2 種 (No. 1, 2), 「白蜂蜜」2 種 (No. 3, 4) および「白桃泉」1 種 (No. 5) の 5 検体で、それぞれの平均一丸重量 (各 10 丸より測定) は Table 1 のとおりである。各試料 3~6 粒をとり、できるだけ細切し、50 ml の共せん遠心沈殿管に入れ、水 10 ml を加え、ガラス棒でかき混ぜながら 60° で 10 分間加温する。次にガラス棒を洗いながらメタノール 5 ml を加えてさらに 10 分間加温する。冷後、n-ヘキサン 10 ml を加えて激しく振り混ぜたのち、3000 rpm で 5 分間遠心分離する。上澄液を捨て、さらに n-ヘキサン 5 ml を加えて同様に操作する。次にジクロロメタン 10 ml を加えて激しく振り混ぜ、3000 rpm で 5 分間遠心分離し、抽出液を

Table 1. Mean weight of the test sample tablet determined from ten tablets

Test sample	Mean weight (mg)
No. 1	429
No. 2	359
No. 3	442
No. 4	425
No. 5	424

駒込ビベットを用いて採取し、あらかじめ0.1N塩酸2mlを入れた50mlの分液漏斗に移し、激しく振り混ぜたのち、下層を、綿せん上に置いた無水硫酸ナトリウム層を通して100mlのナス型フラスコに入れる。さらにジクロロメタン10mlずつで2回同様の操作を繰り返し、ジクロロメタンで無水硫酸ナトリウム層を洗い、洗液は抽出液に合わせ、減圧下で蒸発乾固する。残留物に最終濃度1% (v/v) に相当するtween 80を加えて十分に混和したのち、1ml当り検体225mg分の抽出物量の濃度になるよう生理食塩液を加えてよく懸濁し、胸腺および副腎退縮試験用の試料溶液とした。この試料溶液に生理食塩液を加えて2倍に希釈したものを肝グリコーゲン増加試験用の試料溶液とした。

デキサメタゾン溶液：デキサメタゾン (Roussel-Uclaf社製) を精秤し、エチルアルコール1滴を加え溶解させたのち、tween 80を1% (v/v) 含む生理食塩液を加えて1ml当りデキサメタゾン90 $\mu$ g, 30 $\mu$ gおよび10 $\mu$ gを含む溶液を調製し、胸腺および副腎退縮試験用のデキサメタゾン溶液とした。この溶液に

生理食塩液を加えて2倍に希釈したものを肝グリコーゲン増加試験用のデキサメタゾン溶液とした。

アントロン試液：アントロン0.2gに95%硫酸を加えて溶かし100mlとした。

胸腺および副腎退縮試験：生後4~5週のWistar系雄性ラット5匹を一群とし、試料溶液およびデキサメタゾン溶液を体重kg当り2mlの割で1日1回3日間皮下注射し、4日目の朝にラットを断頭して胸腺および副腎の重量を測定した。なお、対照群には同容量のtween 80を1% (v/v) 含む生理食塩液を投与した。

肝グリコーゲン増加試験：生後4~5週のWistar系雄性ラット7匹を一群とし、18時間飲水のみを与えて絶食したのち、試料溶液およびデキサメタゾン溶液を体重kg当り2mlの割で皮下注射した。対照群にはtween 80を0.5%含む生理食塩液を同様に投与した。7.5時間後にラットを断頭し速やかに約1gの肝臓を摘出し精秤したのち、30%水酸化カリウム2mlを加え沸騰水浴中で20分間加熱し、冷後、硫酸ナトリウムの飽和溶液1mlおよび95%エチルアルコール3mlを加え、再び沸騰水浴中で約30秒間加熱したのち冷却した。次に遠心分離(3000rpm, 10分間)して上清液を捨て、沈殿物を水2mlに溶かし、これに95%エチルアルコール2.5mlを加え、再び遠心分離(3000rpm, 10分間)して沈殿物を集めた。この沈殿物に水を加えて溶解させ50mlとし、試験液とした。試験液はろ過したのち、1ml中にグリコーゲンを約20 $\mu$ g含むように水で希釈し、試験希釈液とした。別に1ml中グリコーゲン約20 $\mu$ gを含む水溶液を調製し、これをグリコーゲン標準液とした。試験希釈液およびグリコーゲン標準液各1mlを別々

Table 2. Weights of thymus and adrenal glands of the rat treated with dexamethasone or test sample tablet for 3 days

Treatment	Dose (mg/kg)	Thymus wt. (mg)	Adrenal wt. (mg)	
Control		436.2 $\pm$ 34.2	22.88 $\pm$ 2.12	
Dexamethasone	0.18	104.2 $\pm$ 21.1	16.42 $\pm$ 1.33	
	0.06	216.1 $\pm$ 22.5	15.72 $\pm$ 3.54	
	0.02	288.0 $\pm$ 43.2	17.96 $\pm$ 2.62	
Test sample No. 1	450.0	171.6 $\pm$ 23.6**	16.04 $\pm$ 1.75**	
	No. 2	450.0	333.7 $\pm$ 52.7*	18.50 $\pm$ 2.65
	No. 3	450.0	341.9 $\pm$ 55.0*	20.16 $\pm$ 1.11
	No. 4	450.0	368.6 $\pm$ 53.5	20.38 $\pm$ 2.11
	No. 5	450.0	187.2 $\pm$ 29.9**	14.05 $\pm$ 1.12**

\* (p&lt;0.02), \*\* (p&lt;0.01)

にとり、これにアントロン試液 2 ml を加えて混和し、80°C で 25 分間加熱したのち、波長 620 nm における吸光度  $A_T$  および  $A_S$  を測定した。これらの値を次式に代入して肝臓 1 g 中のグリコーゲン量を求めた。

肝臓 1 g 中のグリコーゲン量 (mg)

$$= \frac{A_T}{A_S} \times \frac{A \times C}{B} \times 50$$

$A_T$  : 試験希釈液の吸光度

$A_S$  : グリコーゲン標準液の吸光度

A : 試験液から試験希釈液を調製した時の希釈倍数

B : 肝臓の採取量 (g)

C : グリコーゲン標準液 1 ml 中のグリコーゲンの量 (mg)

### 試験結果

胸腺および副腎退縮作用

各投与群の胸腺および副腎の重量を Table 2 に示す。検体 No. 1 と No. 5 の投与群では対照群に比較して明らかに胸腺および副腎の両者が退縮していることがわかった。検体 No. 2 と No. 3 の投与群では胸腺は対照群に比べて退縮している傾向はみられたものの、その有意性は小さく、副腎の重量減少には有意の差が認められなかった。また、検体 No. 4 の投与群では胸腺、副腎の両者で対照群との間に有意差はみられなかった。

一方、デキサメタゾン投与群の副腎重量は、投与量との間に相関性を認めることはできなかったが、胸腺重量はその投与量の対数との間の用量反応曲線に直線性が認められ ( $p > 0.05$ )、次式が得られた。

$$Y = -192.64 X + 545.30$$

そこで、明らかに胸腺および副腎退縮作用物質を含有すると思われる検体、No. 1 と No. 5 についてデキサメタゾンで得られた用量反応式を用いてその含有する生理活性物質量をデキサメタゾンとして算出すると、検体 No. 1 は 1 g 中 193  $\mu$ g、No. 5 は 1 g 中 160  $\mu$ g を含有することになる。ただし、これらの値はあくまでも概算である。

肝グリコーゲン増加作用

各投与群の肝臓 1 g 当りの平均グリコーゲン量を Table 3 に示す。検体 No. 1 と No. 5 の投与群では対照群と比較して明らかに肝グリコーゲンの増加が認められた ( $p < 0.01$ ) が、その他の検体 No. 2, No. 3, No. 4 の投与群では対照群との間に有意の差は認められなかった。本実験でのデキサメタゾン投与群に

Table 3. Influence of test sample and dexamethasone on the deposition of glycogen in the liver of rats

Treatment	Dose (mg/kg)	Glycogen (mg/g) ( $\pm$ S.D.)
Control		0.49 $\pm$ 0.18
Dexamethasone	0.09	18.24 $\pm$ 3.07
	0.03	12.01 $\pm$ 2.02
	0.01	4.21 $\pm$ 1.96
Test sample No. 1	225.0	8.27 $\pm$ 1.80*
	No. 2	1.60 $\pm$ 1.66
	No. 3	1.83 $\pm$ 1.62
	No. 4	0.58 $\pm$ 0.31
	No. 5	5.90 $\pm$ 1.59*

\* ( $p < 0.01$ )

おける肝グリコーゲン量は投与量の対数との間に直線の関係が認められ ( $p > 0.05$ )、次式の用量反応式が得られた。

$$Y = 14.70 X - 10.23$$

この式から、検体 No. 1 および No. 5 に含有される肝グリコーゲン増加作用物質をデキサメタゾンとして概算すると、それぞれ 1 g 中 81  $\mu$ g および 56  $\mu$ g であった。

### 考察

検体 No. 1~5 の抽出物について試みたラットにおける胸腺退縮作用ならびに肝グリコーゲン増加作用の試験は、いずれもデキサメタゾンによる用量・反応関係で直線性が認められ、本来ならば 2-2 検定法としての平行性なども吟味した上でより精度の高い方法を利用すべきであろうが、入手した検体量に制約をうけ、深く検討する余地がなかったため、一応本法による生物検定法を利用して半定量的に検討を行った。

この試験結果から、検体 No. 1 および No. 5 には明らかにグルココルチコイドの含有がうかがわれ、デキサメタゾンとしてそのおよその含有量を算出するとき、胸腺退縮法ではそれぞれ 1 g 中に 193  $\mu$ g および 160  $\mu$ g、また、肝グリコーゲン増加法では 81  $\mu$ g および 56  $\mu$ g であった。また、この両検体の投与群においては副腎重量の減少率も対照群に比べて明らかに高いことが示され、これらを総合するとき、これら両検体は自然混入量とは考えられない比較的多量のデキサメタゾン様物質を含有することはほぼ確実と思われる。一方、検体 No. 2, No. 3, No. 4 については、胸腺および副腎重量法、肝グリコーゲン法のいずれに

においても、本試験条件においてはグルココルチコイドの含有は確認しえなかった。なお、検体 No. 1 および No. 5 中の生理活性物質の同定については、他の

いくつかの物理化学的分析手段の総合結果によって解決されよう。

## 「健菜」等健康食品中のグルココルチコイドの検索：2. 薄層クロマトグラフ法，高速液体クロマトグラフ法及びガスクロマトグラフ法による結果

川村次良・佐藤 浩・中路幸男・木村俊夫  
 福田秀男・早川堯夫・太田美矢子・徳永裕司  
 横田椅江・谷田部かね子・中村とし子

### On the Detection of Glucocorticoid in "Health Pill"

#### II. The Results obtained by Thin-layer Chromatography, High-speed Liquid Chromatography, and Gas chromatography

Jiro KAWAMURA, Hiroshi SATO, Yukio NAKAJI, Toshio KIMURA,  
 Hideo FUKUDA, Takao HAYAKAWA, Miyako OTA, Hiroshi TOKUNAGA,  
 Isue YOKOTA, Kaneko YATABE and Toshiko NAKAMURA

In the previous paper<sup>1)</sup>, glucocorticoid-like substance was detected by bioassay in two within five samples of "Health Pill". In this paper, the identification of the glucocorticoid in the same five samples of "Health Pill" was attempted by thin-layer chromatography, high-speed liquid chromatography, and gas chromatography. Consequently, dexamethasone was identified in two samples which have been confirmed to be positive by bioassay.

(Received May 31, 1978)

昭和52年、「健菜」などの健康食品による副作用が社会的に問題にされ、これら食品中に副腎皮質ホルモンの混入が指摘され、既に、生理作用を分析手段とする試験を行ない、健康食品5検体中2検体にグルココルチコイドの混在を認めたり<sup>1)</sup>。

そこで、今回、化学的な分析手段、薄層クロマトグラフ法 (TLC)、高速液体クロマトグラフ法 (HSLC) 及びガスクロマトグラフ法 (GC) を用い、健康食品5検体中に混在が予想されるグルココルチコイドについて試験を行ない、生物試験<sup>1)</sup>の場合と同様に健康食品5検体中2検体にデキサメタゾンの混在を認めたので報告する。

### 実験の部

#### 1. 試料および試薬

前報<sup>1)</sup>で用いた「健菜」A, B (試料 No. 1, No. 2), 「白蜂菜」A, B (試料 No. 3, No. 4) 及び「白桃泉」(試料 No. 5) を使用した。

コルチゾン、ヒドロコルチゾン、プレドニゾン、

酢酸プレドニゾン、酢酸コルチゾン、酢酸ヒドロコルチゾンは、日局標準品を使用し、メチルプレドニゾン、デキサメタゾン、ベタメタゾン、コルチコステロン、酢酸デキサメタゾン、酢酸ベタメタゾン、吉草酸ベタメタゾン、安息香酸ベタメタゾン、トリアムシノロンジアセテート及びフルオンノロンアセトニドは市販品を使用した。

その他の試薬は、試薬特級品を使用した。

TLC 用薄層板は、メルク社製プレコーティングシリカゲル GF<sub>254</sub>、厚さ 0.25 mm のものを 110° で1時間活性化して使用した。

アルカリ性ブルーテトラゾリウム試液 (BT 試液) は、ブルーテトラゾリウムのメタノール溶液 (1→200) 1容量に水酸化ナトリウムのメタノール溶液 (3→25) 3容量を加えて調製した。

2,4-ジニトロフェニルヒドラジン試液 (DNPH 試液) は、塩酸 10 ml とエタノール 90 ml の混液に DNPH 100 mg を加えて調製した。

## 2. 試料溶液の調製

### i) TLC 用試料溶液

試料 3~6 粒をとり、できるだけ細切し、50 ml の共せん遠沈管に入れ、水 10 ml を加え、ガラス棒でかき混ぜながら 60° で 10 分間加温する。次に、ガラス棒を洗いながらメタノール 5 ml を加えてさらに 10 分間加温する。冷後、*n*-ヘキサン 10 ml を加えて激しく振り混ぜたのち、遠心分離する。上澄液を捨て、さらに *n*-ヘキサン 5 ml を加えて同様に操作する。次に、ジクロロメタン 10 ml を加えて激しく振り混ぜ、遠心分離し、抽出液を 50 ml の分液漏斗に移し、0.1 N 塩酸 2 ml を加える。激しく振り混ぜたのち、下層を綿栓上に置いた無水硫酸ナトリウム層を通して 100 ml のナスフラスコに入れる。さらにジクロロメタン 10 ml ずつで 2 回同様の操作を繰り返し、ジクロロメタン層を合し、減圧下で溶媒を除く。残留物にメタノール 1 ml を加えて溶かす。必要ならば遠心分離する。

### ii) HSLC 及び GC 用試料溶液

i) の TLC 用試料溶液 1 ml を薄層板に帯状にスポットする。同時に、その薄層板の両端 2ヶ所にブレドニゾン及びコルチゾンの標準溶液 2 µl をスポットする。次に、ジクロロメタン・メタノール混液 (90:8) を展開溶媒として約 13 cm 展開したのち、さらに同じ展開溶媒で同様の操作を行なう。展開後、紫外線 (254 nm) を照射し、ブレドニゾン及びコルチゾンのスポット間と酢酸ブレドニゾン及び酢酸コルチゾンのスポット間に相当する部分の吸着剤をかき取り、それぞれ 50 ml の共せん遠沈管に入れ、メタノールを加えて加温しながらときどき振り混ぜたのち、遠心分離する。上澄液を 100 ml のナスコルベンに移し、さらに 10 ml ずつで 2 回同様の操作を行ない、その溶液を合し、減圧下で溶媒を除去する。除去後、残査にメタノール 1 ml を加えて溶かす。

## 3. 標準溶液の調製

### i) TLC および HSLC 用標準溶液

おのおののグルココルチコイド約 10 mg を精密に量り、クロロホルム・メタノール混液 (1:1) を加えて溶かし、正確に 10 ml とする。

### ii) GC 用標準溶液

コレステロール約 10 mg を精密に量り、ジクロロメタンを加えて溶かし、正確に 100 ml とする。

## 4. 装置および測定条件

### i) HSLC

装置：日立 635 型高速液体クロマトグラフ装置、検出器：波長可変流動光度計 (波長 242 nm)、分離管：

リクロソルブ RP-18 (5 µm) を 15 cm × 4 mm i.d. のカラムに充てんしたもの、溶離液及び流速：水・アセトニトリル混液 (6:3)、0.5 ml/min、レンジ：0.04~0.64 AUFS。

### ii) GC

装置：島津製 GC-4BM 型ガスクロマトグラフ装置、検出器：水素炎イオン化検出器、分離管：1.5% OV-17 on Shimalite (80~100 メッシュ) を 1 m × 3 mm i.d. のガラスカラムに充てんしたもの、分離管温度：270°、検出器及び試料注入部温度：300°、キャリアーガス：窒素 20 ml/min、空気：1 kg/cm<sup>2</sup>、水素：0.7 kg/cm<sup>2</sup>、チャートスピード：5 mm/min

## 5. 操作法

### i) TLC

薄層板 2 枚に TLC 用試料溶液 20 µl を 1 カ所、TLC 用標準溶液 2 µl を 2 カ所にスポットする。(Fig. 1 参照) 次に、ジクロロメタン・メタノール混液 (90:8) を一次元展開溶媒として約 13 cm 展開したのち、風乾し、さらに酢酸エチルを二次元展開溶媒として同様に操作する。これに紫外線 (254 nm) を照射して認められる全ての紫外外部吸収物質のスポットに印をしたのち、1 枚の薄層板には BT 試液、他の 1 枚には DNPH 試液を均等に噴霧し、一夜放置する。

### ii) HSLC

HSLC 用標準溶液および HSLC 用試料溶液の一定量を HSLC 装置に注入し、測定する。

### iii) GC

操作法 I：GC 用試料溶液及び GC 用標準溶液 2 µl ずつを GC 装置に注入し、測定する。

操作法 II：試料 No. 1 及び No. 5 の GC 用試料溶液を、それぞれ 0.1 ml 及び 0.05 ml ずつ正確に量り、マイクロ試験管に入れる。別に、デキサメタゾンの GC 用内部標準溶液 0.5 ml を正確に量り、マイクロ試験管に入れる。水浴中で窒素ガスを送りながら蒸発乾固する。次に、酢酸ナトリウム 10 mg 及び N, O-ビストリメチルシリルアセトアミド (BSA) 0.2 ml を加えて密封し、50° で 2 時間トリメチルシリル化 (TMS化) を行ない、試料 No. 1 及び No. 5 は 5 µl、デキサメタゾンは 2 µl を GC 装置に注入して測定する。

## 結果及び考察

4)-i) の TLC 操作法に従い測定した結果、試料 No. 2~4 について、TLC 用標準溶液に用いたグルココルチコイドの *R<sub>f</sub>* 値に相当する部分に BT 試薬及び DNPH 試薬の両者に反応陽性なスポットは認めら

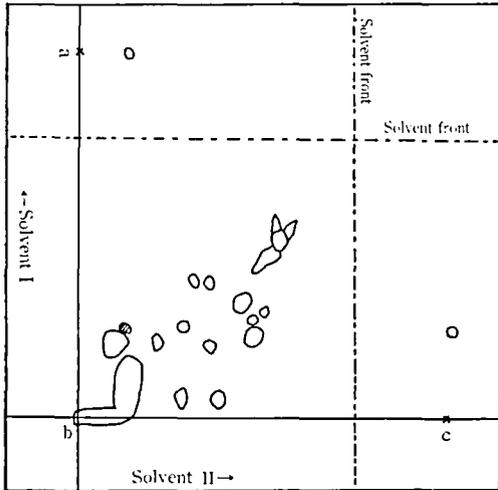


Fig. 1. Two-dimensional thin-layer chromatogram of extract of Sample No. 1  
a, c: dexamethasone 2  $\mu$ g, b: extract of Sample No. 1

Condition: plate; Merk Co., TLC plate silica gel 60 F<sub>254</sub> pre-coated, thickness 0.25 mm, solvent system; solvent I, dichloromethane/methanol (90:8), solvent II, ethylacetate, detection; UV light (254 nm) and both BT and DNPH reagent

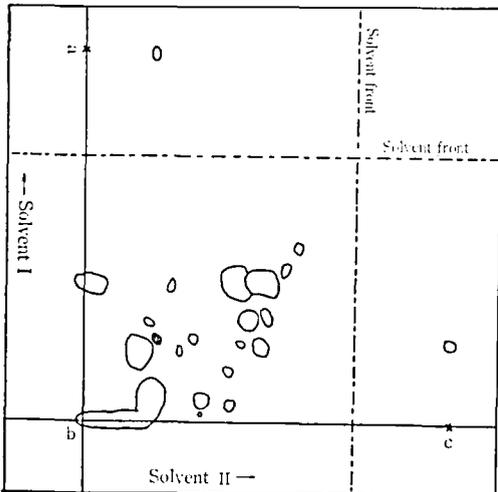


Fig. 2. Two-dimensional thin-layer chromatogram of extract of Sample No. 5  
a, c: dexamethasone 2  $\mu$ g, b: extract of Sample No. 5

れなかった。しかし、試料 No. 1 及び No. 5 では、Fig. 1 及び Fig. 2 に示すようにデキサメタゾンの  $R_f$  値に相当する位置に紫外外部吸収を持ち、BT 試薬

Table 1. Retention time of some glucocorticoids

name	Retention time (min)
Hydrocortisone	6.3
Prednisolone	5.9
Dexamethasone	10.3
Betamethasone	9.7
Hydrocortisone Acetate	15.8
Prednisolone Acetate	14.5
Cortisone Acetate	20.5

Condition: LiChrosorb RP-18 (5  $\mu$ m), 4 mm (i.d.)  $\times$  150 mm.

Acetonitrile: Water (3:6), 0.5 ml/min, UV (242 nm), 0.64 AUFS.

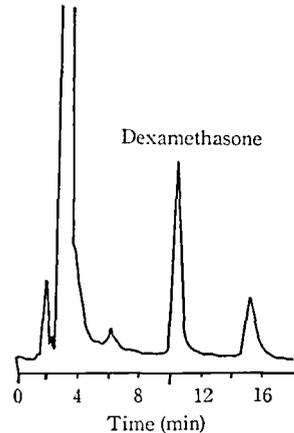


Fig. 3. High-speed liquid chromatogram of extract of sample No. 1 purified by thin-layer chromatography

Condition: column; LiChrosorb RP-18 (5  $\mu$ m), 4 mm  $\times$  150 mm, eluent; acetonitrile/water (3:6), flow rate; 0.5 ml/min., detector; UV (242 nm), 0.08 AUFS, sample volume; 2  $\mu$ l

で赤紫色、DNPH 試薬で橙色を呈するスポットを認めた。(Fig. 1 及び Fig. 2 の斜線の部分)

4)-ii) の HSLC の操作法により試料 No. 1~No. 5 について検討を行った。HSLC 用標準溶液 1  $\mu$ l を HSLC 装置に注入したときに得られる各種グルココルチコイドの保持時間を Table 1 に示す。

試料 No. 1 及び No. 5 のクロマトグラムを Fig. 3 及び Fig. 4 に示す。両者とも Table 1 のデキサメタゾンの保持時間も同じ位置にピークを認めた。

そこで、デキサメタゾンの確認のためにデキサメタ

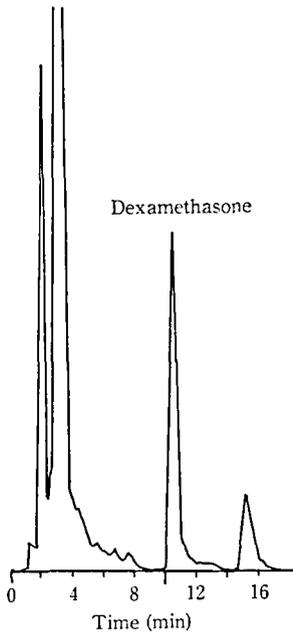


Fig. 4. High-speed liquid chromatogram of extract of sample No. 5 purified by thin-layer chromatography

Table 2. Retention time ( $t_R$ ) of dexamethasone, hydrocortisone, prednisolone, and compounds in No. 1, 2, 3, 4, and 5

	$t_R$ (cm)
Dexamethasone	4.26
Hydrocortisone	3.60
Prednisolone	4.07
No. 1	4.25, 4.51, 9.18
2	N. D
3	N. D
4	6.17
5	4.28, 4.56, 6.38, 9.36

N.D : none detect

ゾンの標準溶液を試料 No. 1 及び No. 5 の試料溶液に加え、HSLC 装置に注入し、測定を行った。その結果、デキサメタゾンのピークのみが増強されることが観察されたので、デキサメタゾンであることを確認した。試料 No. 2~4 について HSLC 装置で測定を行ったが、各種グルココルチコイドの保持時間に相当す

Table 3. Retention time ( $t_R$ ) of dexamethasone-TMS and compounds-TMS obtained from dexamethasone, No. 1 and No. 5

	$t_R$ (cm)
Dexamethasone	1.31*, 2.43, 3.92, 5.18
No. 1	1.34*, 2.45, 3.98, 5.20
5	1.35*, 2.50, 3.99, 5.26

\*retention time of cholesterol-TMS : 1.31 (2.62 min)

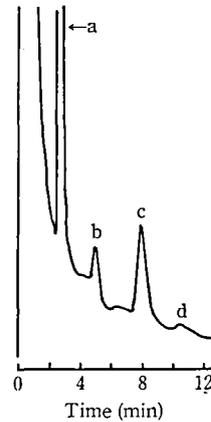


Fig. 5. Gas chromatogram of TMS derivatives of extract from sample No. 1

a : cholesterol-TMS, b, c, d : dexamethasone-TMS

Condition : 1.5% OV-17 on shimalite W (80-100 mesh), glass column; 3mm×1 m, column temp.; 270°, detector temp.; 300°, N<sub>2</sub>; 20 ml/min., H<sub>2</sub>; 0.7 kg/cm<sup>2</sup>, air; 1 kg/cm<sup>2</sup>, range; 16, sensitivity; 10<sup>3</sup> chart speed; 5mm/min

る位置にピークをみつけることができなかった。

4)-iii) の GC 操作法 I で試料 No. 1~5 について検討を行った。その結果を Table 2 に示す。

試料 No. 1 及び No. 5 についてデキサメタゾンの保持時間と一致する位置にピークが観察された。そこで、デキサメタゾンの確認のため試料 No. 1 及び No. 5 について、4)-iii) の操作法 II を用い、デキサメタゾンの TMS 化体について検討を行った。その結果を、Table 3 及び Fig. 5, 6 に示す。

デキサメタゾンの TMS 化体は、この条件では3個のピークが認められるが、試料 No. 1 及び No. 5 に

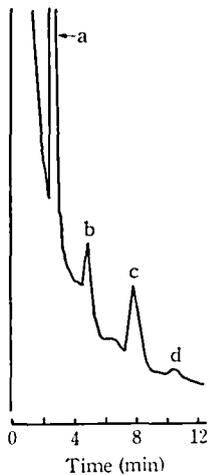


Fig. 6. Gas chromatogram of TMS derivatives of extract from sample No. 5  
a : cholesterol-TMS, b, c, d : dexamethasone-TMS

も同様のピークが認められ、保持時間も同一であつ

た。

従つて、試料 No. 1 及び No. 5 にはデキサメタゾンが混入していることを確認した。又、別に試料 No. 2~4 については、各種のグルココルチコイドに相当する位置にピークを認めることができなかった。

### 結 論

今回入手した健康食品である「健菜」2種 (試料 No. 1, No. 2), 「白蜂菜」2種 (試料 No. 3, No. 4) 及び「白桃泉」(試料 No. 5) 中に混入が予想された各種グルココルチコイドについて、薄層クロマトグラフ法、高速液体クロマトグラフ法及びガスクロマトグラフ法により検討を行った。その結果、試料 No. 1 及び No. 5 中にはデキサメタゾンの存在が確認され、それ以外の試料ではグルココルチコイドの存在を確認することができなかった。

### 文 献

- 1) 川村次良ら：衛生試験報，96，105 (1978)

## 副腎皮質ホルモンを添加した「自然食品」について

柴田 正

### Studies on So-called "Natural Food (Shizen Shokuhin)" Added Corticosteroid

Tadashi SHIBATA

Corticosteroids and medical drugs added intentionally in so-called "Natural Food (Shizen Shokuhin)", Hakuhosai (I, II) and Hakutosen (III) were determined.

Samples were extracted from the pilules and purified by preparative thin layer chromatography (TLC) and high speed liquid chromatography (HSLC). Corticosteroids in fractions were silylated to TMS-enol TMS derivatives, and identified to prednisolone and dexamethasone by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). These corticosteroids were assayed by HSLC.

While using a portion of the extracts, acetaminophen, buccetin, caffeine and phenylbutazone in the pilules were determined by TLC and assayed by gas chromatography (GC).

The results were described in Table 1.

(Received May 31, 1978)

### ま え が き

自然食品の「健菜」服用者に moon face の症状が観察されたので、水島<sup>1)</sup>、川村<sup>2)</sup>は bioassay によって合成副腎皮質ホルモンを故意に添加した事実を明ら

かにした。

一方五郎丸らは輸入漢方製剤よりアミノリン、フェニルブタゾンおよびデキサメタゾンを確認している<sup>3,4)</sup>。

そこで、著者らはその合成副腎皮質ホルモンおよび

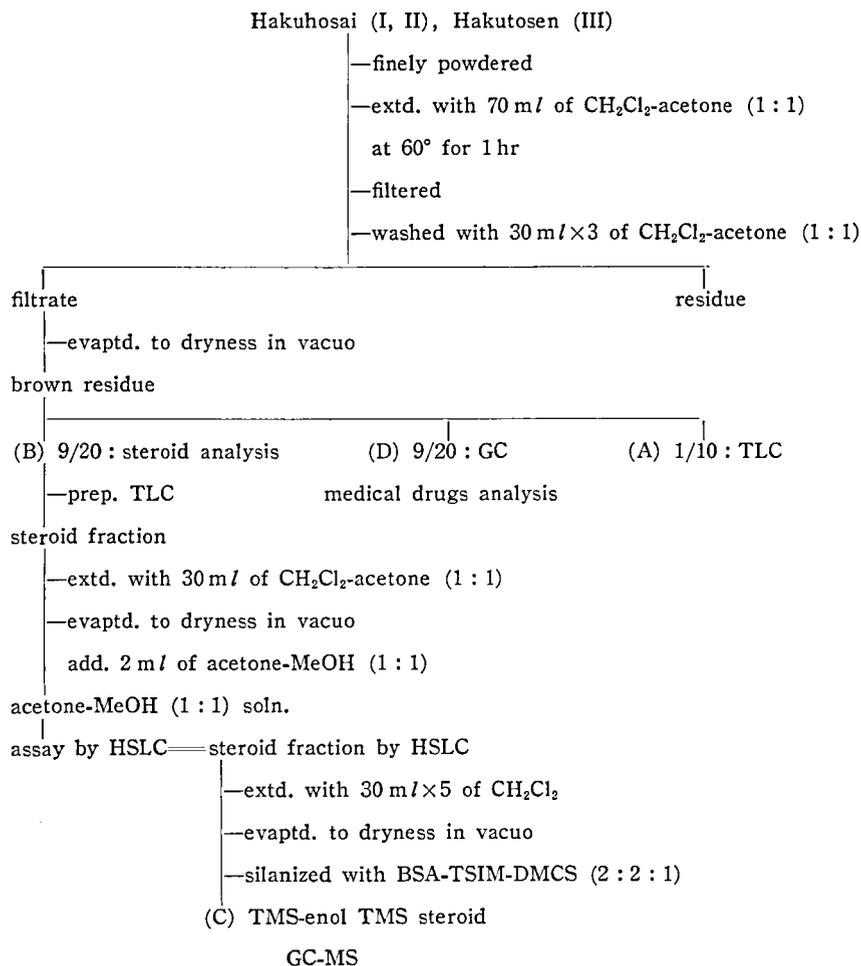


Chart 1 Preparations

他に添加された合成医薬品についてその種類の確認と分離定量をおこなった。

## 実験方法

### 1. 試料

白蜂菜 (I, II) および白桃泉 (III) の三種で平均重量は約 0.4 g の褐色の糖衣丸剤である。

### 2. 装置

高速液体クロマトグラフィー (HSLC) : ウォーターズ製, 440 型。

ガスクロマトグラフィー質量分析計 (GC-MS) : 島津 LKB9000 型質量分析計。

ガスクロマトグラフィー (GC) : 島津製 GC-5A 型 (ITG-4A 型デジタルインテグレーター付)。

### 3. 試薬

薄層クロマトグラフィー (TLC) : メルク製シリカ

ゲル GF<sub>254</sub>。

メタノール, エタノール, ジクロロメタン, エーテル, アセトンは試薬特級品を精製した。

アルカリ性ブルーテトラゾリウム試液 : 日局 9 試液。

シリル化剤 : ピストリメチルシリルアセトアミド (BSA), トリメチルシリルイミダゾール (TSIM), ジメチルジクロロシラン (DMCS) は東京化成製を用いた。

デキサメタゾン, プレドニゾロンは USP 標準品を用いた。

カフェイン, フェニルブタゾン は局方品, またブセチン, アセトアミノフェンは保栄薬工製を用いた。

### 4. 実験操作

1) 副腎皮質ホルモンの同定と定量

Chart 1 に示すように, 丸剤各 5 粒を粉末とし, ジ

クロルメタン-アセトン (1:1) 混合溶媒 70 ml を加え、60° で1時間還流する。冷後ろ過し、残渣を混合溶媒 30 ml で3回洗浄する。濾液を減圧下で留去し、得られた残渣を混合溶媒 2 ml に溶かし、その1/10をTLC(A)の、また9/20をGC(D)の試料溶液とした。

この試料溶液(A)につき、TLC(シリカゲルGF<sub>254</sub>, 0.25 mm, 展開溶媒: ジクロルメタン-エーテル-メタノール-水 (77:15:8:1.2))により展開したのち、アルカリ性ブルーテトラゾリウム試液を噴霧し、紫色のコルチコステロイドのスポットを検出した。また試料液(B)を同様に調製TLC(厚さ0.5 mm)に展開し、UV照射下検出されるステロイド画分をかきとり、アセトン-メタノール(1:1)を用いて抽出した。この液につき、HSLC(カラム:  $\mu$  Bondapack C 18, 4 mm  $\times$  30 cm, 溶媒: メタノール-水 (55:45), 流速: 2 ml/min)によりプレドニゾンおよびデキサメタゾンを分離した。この条件でステロイド画分を分取し、溶媒を留去し、精製した。

また一方、標準のプレドニゾンおよびデキサメタゾンのそれぞれ1 mg および試料にBSA-TSIM-DMCS (2:2:1) 混合シリル化剤<sup>5)</sup> 0.2 ml を加え、プレドニゾンは室温で一晩放置し、またデキサメタゾンは80°で3時間加熱し、GCおよびGC-MSの試料溶液(C)とした。

## 2) 他に含有される医薬品の確認と定量

Chart 1 に示したように混合溶媒を用いて抽出した試料の9/20(D)をとり、内部標準物質(IS: ジエトシフェニルまたはトリフェニルメタン)の一定量を加え、GC法(GC-5A, FID, OV-1 (3 mm  $\times$  2 m, ガラスカラム), 200°, N<sub>2</sub>: 60 ml/min, デジタルインテグレーター)により測定した(アセトアミノフェン, プセチン, カフェイン)。

しかし、フェニルブタゾンは加水分解を受けやすいため、加熱による溶媒留去を避け、各丸剤を粉末とし、共栓遠沈管にとり、それぞれにジクロルメタンを正確に30 ml を加え、よく振りまぜ、遠心分離し、上澄液から正確に20 ml をとり、ISを一定量加えてGC用の試料溶液とした。

## 結果と考察

丸剤の薄層クロマトグラムをFig. 1に示す。TLC板にアルカリ性ブルーテトラゾリウム試液を噴霧するとき、試料IIにはプレドニゾンに、またIIIにはデキサメタゾンに相当する $R_f=0.53$  および $0.60$ の赤紫色に呈色するスポットが認められた。

そこで調製TLCで展開したのち、紫外線照射下、標準品と同じ $R_f$ 値を示す画分をかきとり、抽出した溶液のHSLCのクロマトグラムをFig. 2に示す。

試料溶液にそれぞれ標準のプレドニゾンおよびデキサメタゾン(ベタメタゾン)を添加しても1ピークを示した。

しかし、16位メチル基の $\alpha$ ,  $\beta$ 異性体であるデキサメタゾンとベタメタゾンは逆相の $\mu$  Bondapack C<sub>18</sub> (ODS) カラムでは分離出来ないため、吸着性のシリカゲル( $\mu$ Porasil) カラムを用いて分離した。そのクロマトグラムをFig. 3に示す。この条件で両者は分離され、試料にデキサメタゾンを添加した場合も1ピークを示した。

以上の結果から、それぞれプレドニゾンおよびデキサメタゾンと推定された。

GC-MSにより同定を行なうためには、不純物によるフラグメントピークを可能な限り少なくすることが必要である。このためにHSLCを用いて分取精製した試料をシリル化し、TMS-enol-TMS誘導体とし<sup>5,6)</sup> GC-MSを測定した。そのTotal ion current chromatogram (TIC クロマトグラム) およびMSをFig. 4, 5に示す。Chambazら<sup>5)</sup>の変法の混合シリル化剤を用いるとプレドニゾンは室温条件で徹底的にシリル化され、GCで1ピークを示す。しかしデキサメタゾンは通常のシリル化では6つのピークを示

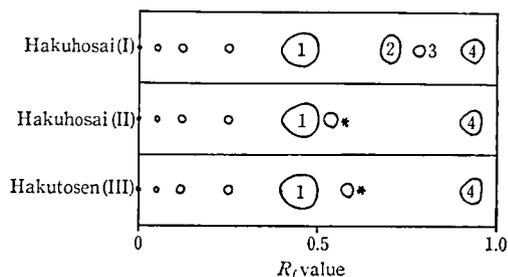


Fig. 1. Thin-layer chromatograms of Hakuhosai (I, II) and Hakutosen (III)

Plate: Silicagel GF<sub>254</sub>

Solvent: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Et<sub>2</sub>O-McOH-H<sub>2</sub>O (77:15:8:1.2)

Detection: UV (254 nm)

1) acetaminophen

2) buccetin

3) caffeine

4) phenylbutazone

\* ) corticosteroid

blue spot developed by spraying alkaline-blue tetrazolium TS

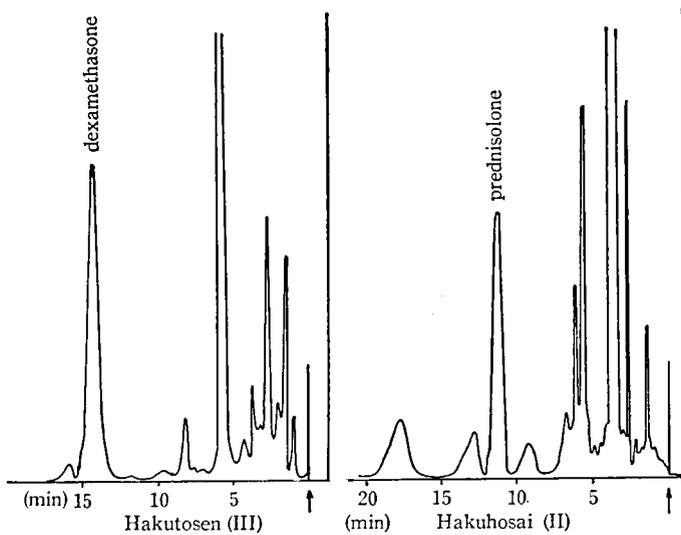


Fig. 2. High speed liquid chromatograms of extract

Instrument : Waters Model 440

Condition

packing :  $\mu$  Bondapak C<sub>18</sub>

column : 4 mm  $\times$  30 cm

solvent : MeOH-H<sub>2</sub>O (55 : 45)

flow rate : 2 ml/min

detector : UV (254 nm) 0.02 AUFS

Table 1. Assay of corticosteroids and other medical drugs in Hakuhosai (白蜂菜) and Hakutosen (白桃泉)

	Corticosteroid	Acetaminophen	Bucetin	Caffeine	Phenylbutazone
Hakuhosai (白蜂菜 I)	ND	18.8	26.8	2.4	24.0
Hakuhosai (白蜂菜 II)	Prednisolone 0.12	22.7	ND	ND	10.5
Hakutosen (白桃泉 III)	Dexamethasone	34.2	ND	ND	13.0

(mg/Tab.)

し、80°, 3時間加熱のシリル化条件で二つのピークを示した。その主ピークの MS は分子ピーク M<sup>+</sup> の 680<sup>6)</sup>、および各フラグメントイオンは標準品と一致し、試料 II はプレドニゾロン、III はデキサメタゾンを含有することが同定された。

それぞれの含有量は HSLC を用い、絶対検量線法により測定した。検量線を Fig. 6 に定量結果を Table 1 に示した。

さきに五郎丸らは輸出漢方製剤中に解熱鎮痛剤、抗炎症剤を含有していると報告したが<sup>3,4)</sup>、「自然食品」

にも類系の医薬品を添加した疑いが考慮されたので以下に検討した。

まず、抽出液の TLC のクロマトグラムを Fig. 1 に示す。アセトアミノフェン、ブセチン、カフェインおよびフェニルブタゾンの各標品と R<sub>f</sub> 値が一致し、また GC のクロマトグラムを Fig. 7 に示すが、各ピークは標品と一致した。試料 I にはアセトアミノフェン、ブセチン、フェニルブタゾンに対応する部分が、II、III にはアセトアミノフェン、フェニルブタゾンに対応するスポットおよびピークが認められた。

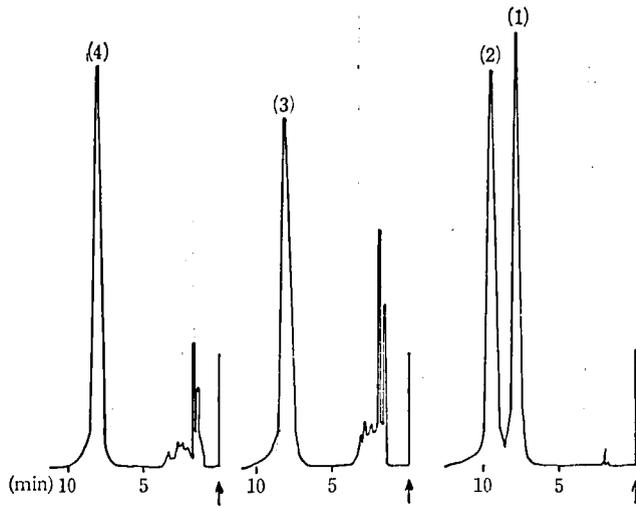


Fig. 3. High speed liquid chromatograms of dexamethasone, betamethasone and extract from Hakutosen (III)

- (1) dexamethasone
- (2) betamethasone
- (3) extract (Hakutosen)
- (4) extract+dexamethasone

Instrument : Waters Model 440

Condition

packing :  $\mu$ Porasil

column : 4 mm  $\times$  30 cm

solvent :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -EtOH (98 : 2)

flow rate : 2 ml/min

detector : UV (254 nm) 0.1 AUFS

chart speed : 4 mm/min

そこでGCを用いて試料中に添加された各成分を定量した。内部標準法による検量線を Fig. 8 に、含有量を Table 1 に示す。カフェインは他の成分に比べて含有量が少なく、添加されたものか、原料の根茎由来によるかは不明である。

### ま と め

「自然食品」の白蜂菜、白桃泉の三種類について、分離定量、固定をおこなった結果、白蜂菜 (I) には副腎皮質ホルモンは存在せず、アセトアミノフェン、カフェイン、プセチン、フェニルブタゾンを、白蜂菜

(II) にはプレドニゾロン、アセトアミノフェン、フェニルブタゾンを、白桃泉 (III) にはデキサメタゾン、アセトアミノフェン、フェニルブタゾンを確認したが、同じ名称の自然食品にも異なる製品が存在した。

以上の結果は川村らの Bioassay の結果<sup>2)</sup>とよく一致した。

試料を提供いただいた和歌山衛生研究所横山 剛部長、兵庫県衛生研究所畑中久勝技官、兵庫県衛生部薬務課下平 卓係長に深謝いたします。

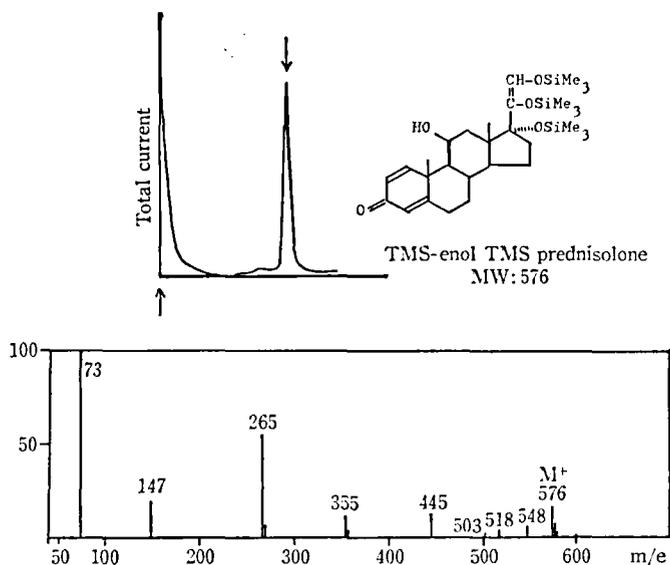


Fig. 4. TLC chromatogram and mass spectra of the TMS-enol TMS derivative of prednisolone  
GC-MS conditions : 3% SE 30/Chromosorb W (60~80 mesh), carrier gas : He 30 ml/min., column temp. : 290°, injection temp. : 350°, electron energy : 70 eV. emission current : 120  $\mu$ A, accel. volt. : 3.5 KV. ion source temp. : 290°, separator temp. : 270°, instrument : Shimadzu LKB-9000.

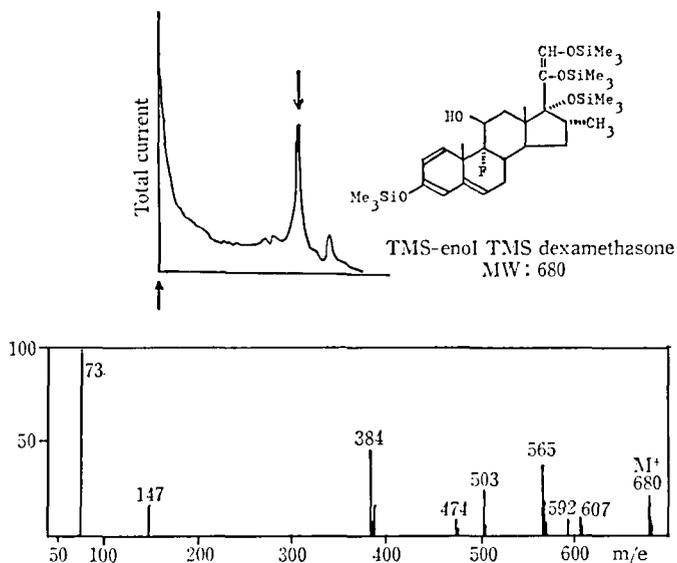


Fig. 5. TIC chromatogram and mass spectra of the TMS-enol TMS derivative of dexamethasone  
GC-MS conditions : 3% SE 30/chromosorb W (60~80 mesh), carrier gas : He 30 ml/min., column temp. : 290°, injection temp. : 350°, electron energy : 70 eV, emission current : 120  $\mu$ A accel. volt. : 3.5 KV. ion source temp. : 290°, separator temp. : 270°, instrument : Shimadzu LKB-9000

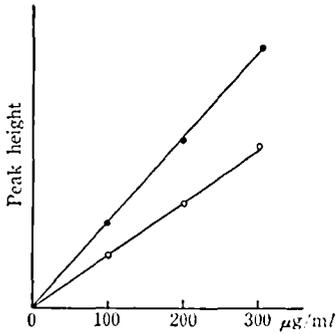


Fig. 6. Calibration curves for prednisolone and dexamethasone by HSLC

●—● prednisolone  
○—○ : dexamethasone

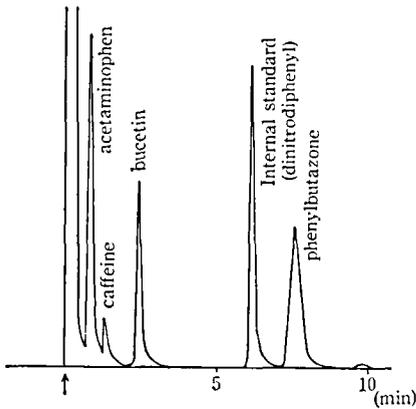


Fig. 7. Gas chromatogram of extract from Hakuhosai

Instrument : Shimadzu GC-5A, FID.

Condition : Column, OV-1/chromosorb W (80 ~100 mesh) 3mm×2m glass column temp., 200°, injector and detector temp., 220°, carrier gas, N<sub>2</sub> 60 ml/min.

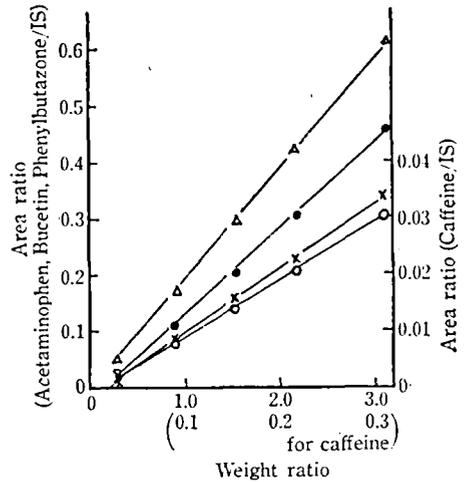


Fig. 8. Calibration curves by GC  
Internal standard (IS) : Dinitrodiphenyl (1.8 mg/ml)

●—● : Acetaminophen  
×—× : Buccetin  
○—○ : Caffeine  
△—△ : Phenylbutazone

## 文 献

- 1) 水島 裕, 東 威, 横張竜一: 第20国リウマチ学会, 東京 (1976)
- 2) 川村次良, 佐藤 浩, 中路幸男, 木村俊夫, 福田秀男, 早川堯男, 太田美矢子, 徳永裕司, 横田椅江, 中村とし子, 谷田部かね子: 衛生試験報, 96,
- 3) 五郎丸毅, 西内律格, 井口定男, 奥江 章, 塚本行男: 医薬品研究, 5 (4), 407 (1974)
- 4) 五郎丸毅, 三原真理, 井口定男, 水島 裕: 医薬品研究, 8 (2), 212 (1977)
- 5) E.M. Chambaz, E.C. Horning: *Anal. Lett.*, 1, 201 (1967)
- 6) E.M. Chambaz, G. Defaye, C. Madani: *Anal. Chem.*, 45, 1090 (1973)

## 東京都内3カ所の国設自動車排出ガス常時測定所における 大気汚染測定結果の概要 (1977年1月～12月)

山手 昇・松村年郎・井上哲男・樋口英二

### Summary of Air Pollutants Levels at the Three Locations of the National Autoexhaust Monitoring Station in Tokyo from January to December 1977

Noboru YAMATE, Toshiro MATSUMURA, Tetsuo INOUE  
and Eiji HIGUCHI

This report presents the summarized data of air pollutants levels at three national autoexhaust monitoring stations (Kasumigaseki, Itabashi and Shinjuku) in Tokyo from January to December 1977. The data were shown in Table 1 and Fig. 1~Fig. 9.

(Received May 31, 1978)

前報<sup>1)</sup>に引き続き1977年1月から12月までの測定結果の概要について報告する。

#### 測定方法

##### 1. 測定地点

前報<sup>1)</sup>に同じ。

##### 2. 自動計測器の種類

オゾン自動計測器(紫外線吸収法, 測定日盛範囲0~0.5ppm)を新規に板橋測定所に設置し1977年1月から測定を始めている。その他の自動計測器については前報に同じ。

#### 測定結果及び考察

1977年1月から12月に得られた1時間単位の全測定データは、各汚染物質及び交通量について、測定時間数、測定日数、1時間値、時刻別平均値、日平均値、月平均値、年平均値ごとにまとめ、それらを一括してTable 1に示した。また、各汚染物質及び交通量の経年的状況を知るために1964年から1977年にいたる14年間の各年平均値をFig. 1~Fig. 9に示した。

なお、前年度との比較において前年度と5%以内の差を横ばい、15%以内をやや増加又はやや減少、16%以上を増加又は減少として評価した。

##### 1. 二酸化硫黄

77年における二酸化硫黄の1時間値の年平均値は、霞ヶ関測定所0.035ppm、板橋測定所0.023ppm、新宿測定所0.027ppmである。二酸化硫黄濃度は、76年に比して霞ヶ関、新宿の両測定所は増加、板橋測定所

は横ばい傾向を示している(Fig. 1)。

77年の測定値を環境基準の条件、①1時間値の日平均値が0.04ppm以下であること、②1時間値が0.1ppm以下であること、にそれぞれ対比すると①の条件を超えた日数と頻度は、それぞれ霞ヶ関測定所84日、24.1%、板橋測定所9日、2.7%、新宿測定所7日、2.2%、②の条件を超えた時間数と頻度は、それぞれ霞ヶ関測定所22時間、0.26%、板橋測定所2時間、0.02%、新宿測定所4時間、0.05%であり、3測定所とも環境基準に不適合であった。

##### 2. 浮遊粒子状物質

77年における浮遊粒子状物質の1時間値の年平均値は、霞ヶ関測定所 $53 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、板橋測定所 $66 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、新宿測定所 $56 \mu\text{g}/\text{m}^3$ である。浮遊粒子状物質濃度は、76年に比して3測定所ともやや減少傾向を示している(Fig. 2)。

77年の測定値を環境基準の条件、①1時間値の日

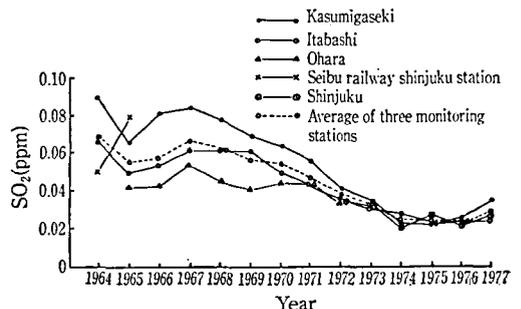


Fig. 1. Yearly variation of sulfur dioxide concentration in Tokyo (1964~1977)

Table 1. Summary of air pollutants

Pollutants	Monitoring station	Number of hours	Number of days
Sulfur dioxide (ppm)	Kasumigaseki	8306	349
	Itabashi	8084	338
	Shinjuku	7525	313
Dust ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	Kasumigaseki	8759	365
	Itabashi	8656	361
	Shinjuku	8759	365
Carbon monoxide (ppm)	Kasumigaseki	8391	350
	Itabashi	7328	307
	Shinjuku	6957	291
Nitrogen monoxide (ppm)	Kasumigaseki	7918	331
	Itabashi	8342	348
	Shinjuku	7198	301
Nitrogen dioxide (ppm)	Kasumigaseki	8118	339
	Itabashi	8350	348
	Shinjuku	7535	315
Formaldehyde (ppm)	Kasumigaseki	4718	197
Oxidants (ppm)	Kasumigaseki	7398	312
Ozone (ppm)	Itabashi	7123	297
	Shinjuku	8077	337
Total hydrocarbon (ppm $\text{C}_3$ )	Kasumigaseki	6800	285
	Itabashi	6590	275
	Shinjuku	7111	297
Unsaturated hydrocarbon (ppm $\text{C}_3$ )	Kasumigaseki	5311	222
	Itabashi	5299	221
	Shinjuku	5882	246
Traffic volume (cars/hour)	Kasumigaseki	7364	309

平均値が  $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$  以下であること、② 1時間値が  $200 \mu\text{g}/\text{m}^3$  以下であること、にそれぞれ対比すると①の条件を超えた日数と頻度は、それぞれ霞ヶ関測定所 36 日、9.9%、板橋測定所 58 日、16.1%、新宿測定所 40 日、11.0%、②の条件を超えた時間数と頻度は、それぞれ霞ヶ関測定所 189 時間、2.2%、板橋測定所 349 時間、4.0%、新宿測定所 196 時間、2.2%であり、3 測定所とも環境基準に不適合であった。

### 3. 一酸化炭素

77年における一酸化炭素の1時間値の年平均値は、

霞ヶ関測定所 2.9 ppm、板橋測定所 2.8 ppm、新宿測定所 2.4 ppm である。一酸化炭素濃度は、76年に比して霞ヶ関測定所は増加、板橋測定所はやや増加、新宿測定所は横ばい傾向を示している (Fig. 3)。

77年の測定値を環境基準の条件、① 1時間値の日平均値が 10 ppm 以下であること、② 1時間値の8時間平均値が 20 ppm 以下であること、にそれぞれ対比すると3測定所とも①の条件を超えた日数及び②の条件を超えた回数はいずれも0であり、3測定所とも環境基準に適合している。

levels in Tokyo (Jan.~Dec., 1977)

Hour value		Hourly-average		Day-average		Month average		Annual average
min.	max.	min.	max.	min.	max.	min.	max.	
0.01	0.23	0.022	0.056	0.015	0.069	0.031	0.042	0.035
0.01	0.10	0.010	0.048	0.010	0.050	0.018	0.033	0.023
0.01	0.14	0.016	0.042	0.010	0.048	0.024	0.032	0.027
2	548	29	100	11	271	36	87	53
7	617	34	144	16	365	41	121	66
3	603	30	106	12	294	37	89	56
1	14	1.1	5.4	1.1	7.8	2.5	4.0	2.9
1	14	1.1	5.8	1.1	7.6	1.9	4.4	2.8
1	12	1.0	5.1	1.0	7.9	1.6	4.1	2.4
0.01	0.35<	0.015	0.120	0.011	0.169	0.034	0.094	0.057
0.01	0.35<	0.022	0.153	0.011	0.223	0.034	0.084	0.057
0.01	0.35<	0.011	0.134	0.010	0.172	0.031	0.096	0.046
0.01	0.15	0.012	0.057	0.010	0.080	0.024	0.045	0.032
0.01	0.15	0.016	0.053	0.010	0.073	0.022	0.045	0.034
0.01	0.16	0.012	0.063	0.010	0.089	0.022	0.050	0.033
0.001	0.032	0.0024	0.0117	0.0023	0.0158	0.0044	0.0077	0.0061
0.001	0.274	0.011	0.064	0.009	0.069	0.022	0.039	0.030
<0.005	0.130	<0.005	0.042	<0.005	0.036	0.006	0.017	0.011
<0.005	0.070	<0.005	0.020	<0.005	0.024	0.006	0.010	0.008
0.4	3.6	0.64	1.14	0.54	1.71	0.75	0.99	0.86
0.7	4.4	1.07	1.73	0.80	2.28	1.13	1.46	1.30
0.5	3.3	0.82	1.39	0.62	1.89	0.86	1.32	1.06
<0.05	0.9	0.07	0.39	<0.05	0.51	0.12	0.25	0.19
<0.05	1.8	0.09	0.40	0.06	0.57	0.14	0.29	0.21
<0.05	0.7	0.06	0.28	<0.05	0.47	0.12	0.19	0.14
40	2400	59	1903	320	1238	888	1034	965

#### 4. 窒素酸化物（一酸化窒素と二酸化窒素）

窒素酸化物は、人体影響ならびに光化学大気汚染の原因物質として注目されている汚染物質である。

測定は、ザルツマン試薬を用いる吸光光度法で行っており、この測定方法において、二酸化窒素 (NO<sub>2</sub>) の亜硝酸イオン (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) への転換係数、すなわちザルツマン係数は、1964年から1973年までの測定値には0.5を、1974年からの測定値には0.72を用いている。

77年における一酸化窒素 (NO) の1時間値の年平

均値は、霞ヶ関測定所 0.057 ppm、板橋測定所 0.057 ppm、新宿測定所 0.046 ppm、また、二酸化窒素 (NO<sub>2</sub>) の1時間値の年平均値は、霞ヶ関測定所 0.032 ppm、板橋測定所 0.034 ppm、新宿測定所 0.033 ppmである。一酸化窒素及び二酸化窒素の各濃度は、76年に比して一酸化窒素は新宿測定所では増加、霞ヶ関測定所では横ばい、板橋測定所では減少、二酸化窒素は3測定所ともやや増加傾向を示している (Fig. 4, Fig. 5)。

77年の二酸化窒素の測定値を環境基準の条件“1時

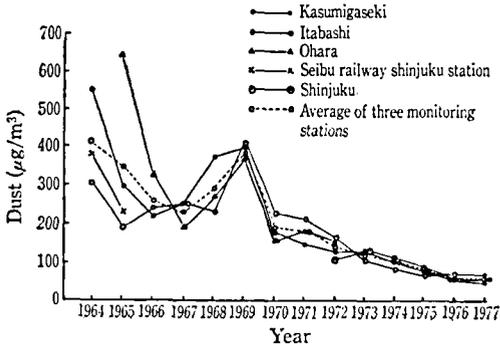


Fig. 2. Yearly variation of dust concentration in Tokyo (1964~1977)

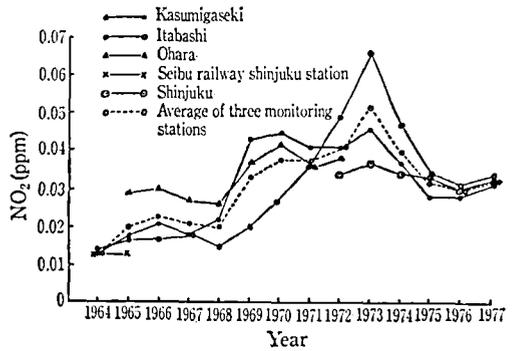


Fig. 5. Yearly variation of nitrogen dioxide concentration in Tokyo (1964~1977)

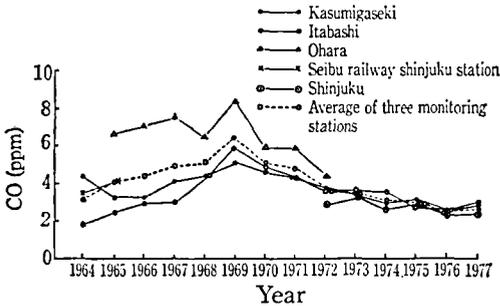


Fig. 3. Yearly variation of carbon monoxide concentration in Tokyo (1964~1977)

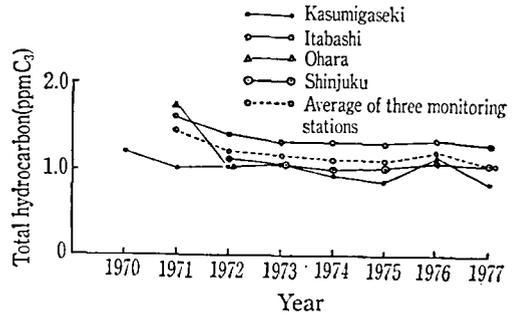


Fig. 6. Yearly variation of total hydrocarbon concentration in Tokyo (1970~1977)

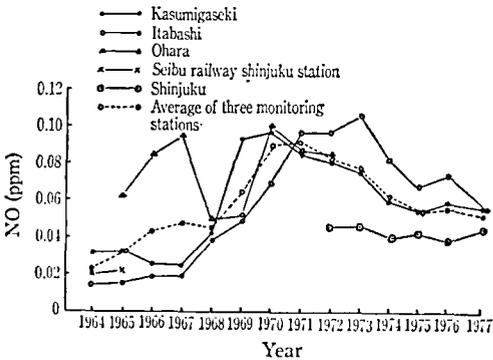


Fig. 4. Yearly variation of nitrogen monoxide concentration in Tokyo (1964~1977)

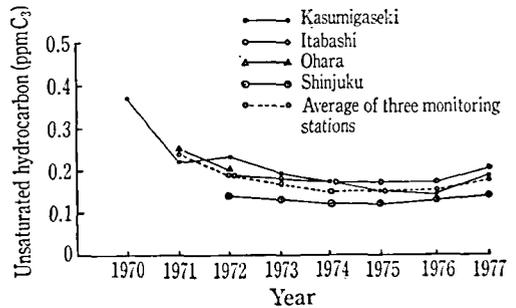


Fig. 7. Yearly variation of unsaturated hydrocarbon concentration in Tokyo (1970~1977)

間値の日平均値が 0.02 ppm 以下であることを”に対比すると、この基準値を超えた年間の日数と頻度は、それぞれ霞ヶ関測定所 302 日、89.1%、板橋測定所 305 日、87.6%、新宿測定所 283 日、89.8% であり、3 測定所とも環境基準に不適合であった。

5. 炭化水素

炭化水素は、光化学反応による大気汚染の主要な原

因物質であるが、特に不飽和炭化水素は、光化学反応性が高い点で注目されている。

77年における 1 時間値の年平均値は、霞ヶ関測定所では全炭化水素 0.86 ppm C<sub>3</sub> (ppm C<sub>3</sub> はプロパン基準にして表わした ppm 値)、不飽和炭化水素 0.19 ppm C<sub>3</sub>、板橋測定所は、全炭化水素 1.30 ppm C<sub>3</sub>、不飽和炭化水素 0.21 ppm C<sub>3</sub>、新宿測定所は、全炭化

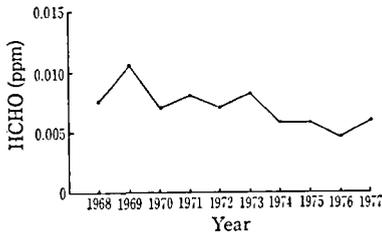


Fig. 8. Yearly variation of formaldehyde concentration at Kasumigaseki in Tokyo (1968~1977)

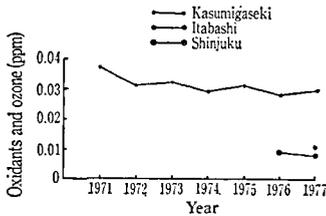


Fig. 9. Yearly variation of oxidants and ozone concentration in Tokyo (1971~1977)

水素 1.06 ppm C<sub>3</sub>, 不飽和炭化水素 0.14 ppm C<sub>3</sub>である。76年に比して全炭化水素濃度は、霞ヶ関測定所では減少、板橋、新宿の両測定所では横ばい、不飽和炭化水素濃度は、霞ヶ関、板橋の両測定所では増加、新宿測定所ではやや減少傾向を示している (Fig. 6, Fig. 7)。

#### 6. ホルムアルデヒド

自動車用燃料の不完全燃焼、潤滑油の酸化分解、大

気汚染物質の光化学反応によって生成する汚染物質である。

77年におけるホルムアルデヒドの霞ヶ関測定所の1時間値の年平均値は、0.0061 ppm であり、76年に比して増加傾向を示している (Fig. 8)。

#### 7. オキシダント及びオゾン

オキシダントは全オキシダント、光化学オキシダント、オゾン等の総称である。全オキシダントはオゾン、二酸化窒素、PAN (パーオキシアセチルナイトレイト) 及びその同族体、過酸化物等の酸化性物質であって、中性よう化カリウム溶液からよう素を遊離する物質である。全オキシダントから二酸化窒素を除いた物質が光化学オキシダントであり、光化学オキシダントの大部分はオゾンと見なされている。

77年における全オキシダントの1時間値の年平均値は、霞ヶ関測定所 0.030 ppm、オゾンの1時間値の年平均値は、新宿測定所 0.008 ppm、板橋測定所 0.011 ppm である。76年に比して霞ヶ関測定所の全オキシダント濃度はやや増加、新宿測定所のオゾン濃度はやや減少傾向を示している (Fig. 9)。

#### 8. 交通量

77年における霞ヶ関測定所の年平均交通量は、965台/時であり、76年に比して横ばい傾向を示している。

また、板橋測定所の交通量は、警視庁において1970年から毎年1回24時間調査を行っているが、同調査によると1977年における平均交通量は、1956台/時であり、76年に比してやや増加傾向を示している。

#### 文 献

- 1) 山手 昇, 松村年郎, 井上哲男, 樋口英二: 衛生試験, 95, 84 (1977)

## 鶏肉中の残留ナイカルバジンの分析

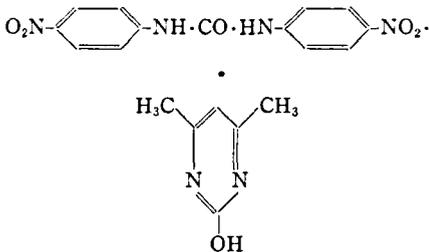
神蔵美枝子・江口浩子

## Analysis of Nicarbazin Residue in Chicken Tissue

Mieko KAMIKURA and Hiroko EGUCHI

Nicarbazin from homogenated chicken tissue was extracted with ethyl acetate, and clean up by alumina column chromatography, and then eluted with chloroform+methyl alcohol (9:1). Determination of Nicarbazin obtained from chicken tissue was carried out with spectrophotometric and polarographic methods. Detection limit in chicken tissue was 0.08 ppm (spectrophotometric) and 1 ppm (polarographic) respectively.

ナイカルバジンは飼料添加物として、農林大臣が指定している合成抗菌剤で、つぎのような化学構造を有する。



本質物は鶏用（ブロイラーを除く）中、中すう用（ふ化後おおむね4週間を超え10週間以内の鶏用飼料）として100~200g/トン、ブロイラー用として前期用（ふ化後おおむね4週間以内のブロイラー用飼料）に100~200g/トンの限度で使用することができる。

飼料添加物は家畜の疾病の予防、生産性の向上等を目的として飼料に常時添加されるもので、飼料を通じて常に家畜が摂取するものであり、これらの畜産物を介して人体にとりいられるおそれがある。したがって、これらの物質の畜産物への残留性が最も重要視される。

厚生省においては、かねてより乳肉衛生課が中心となり、畜産物の安全対策として、畜産物中の残留物質の検査法についての作業を行なっており、その一環として、鶏肉中の合成抗菌剤、とくにナイカルバジンの分析について検討を行なったので、それらの結果について報告する。

## 実験の部

## 1. 使用機器

光電分光光度計：島津 UV-200.

ポーログラフ：柳本 P-8 (直流)。

ホモジナイザー：超高速ホモジナイザー (スイス、バイオト罗纳社製バイオトロン (Biotron))。

## 2. 器具

ポーログラフ用電解セル：かっ色H型。

測定用セル：4×10mm (ライトパス 10mm)。

## 3. 試薬および試液

過塩素酸テトラエチルアンモニウム (和光特級)

ジメチルスルホキシド (DMSO) (特級)

カラムクロマト用アルミナ：メルク、アルミナ 90 活性型、塩基性、活性度 1 pH 10~10.5.

pH の測定：本品 10g をとり、250 ml の共セン三角フラスコに入れ、水 100 ml を加え、2分間激しく振り混ぜたのち、アルミナが沈降するまで静置し、上層をとり、ガラス電極法で pH を測定する。

水酸化ナトリウム溶液：水酸化ナトリウム 50g をとり、水 50 ml を加えて溶かす。冷却し、センをして静置する。上澄液を用いる。

アルコール製水酸化ナトリウム溶液：水酸化ナトリウム溶液 0.5 ml をとり、エチルアルコール 100 ml を加える。用時調製し、濁りが認められる場合は遠心分離する (3500 rpm, 10 分)。

ジメチルスルホキシド支持電解液：過塩素酸テトラエチルアンモニウム 2.3g および安息香酸 0.024 g をとり、ジメチルスルホキシドに溶かし、正確に 100 ml とする。

## 4. 分離用カラム

カラム管は内径 1 cm、長さ 20 cm のものを用い、その狭細部にあらかじめガラス綿をつめておく。別にアルミナ 5g をクロロホルム約 25 ml に懸濁させ、

よくかき混ぜて空気を除き、垂直に保持したカラム管に、漏斗を用いて流し込む。吸着柱の上部に残留する過量のクロロホルムが柱内にしみ込んでから、さらにクロロホルム約 30 ml を流しておく。なお、本操作における溶媒の流出速度は 2 ml/min の割合になるように調整する。

### 5. 標準品および標準溶液

ナイカルバジン

フラゾリドン

ナイカルバジン標準溶液 比色用：ナイカルバジン 10 mg を正確にとり、酢酸エチルに溶かして 500 ml とする。この液 25 ml を正確にとり、酢酸エチルを加えて 100 ml とする。本液 1 ml はナイカルバジン 5  $\mu$ g を含む。

ポーラログラフ用：ナイカルバジン 10 mg を正確にとり、ジメチルスルホキシドに溶かして 100 ml とする。本液 1 ml はナイカルバジン 100  $\mu$ g を含む。

### 6. 分析法

〔比色法〕

試料（鶏肉）25 g を 50 ml の遠心管にとり、酢酸エチル 25 ml を加え、約 1 分間ホモジナイズしたのち、3000~3500 rpm で、5 分間遠心分離し、上澄液を 200 ml の共通すり合せナス型フラスコにとる。ついで、遠心管内の残留物に酢酸エチル 20 ml を加え、同様にホモジナイズし、遠心分離したのち、上澄液をさきの上澄液に合わせる。この操作は、さらに 1 回繰り返す。酢酸エチル抽出液はロータリーエバポレーターで溶媒を除去する。得られた残留物はクロロホルム 5 ml に溶かしたのち、分離用カラムに静かに流し込み、液を流下させたのち、フラスコをクロロホルム 3 ml ずつで 2 回洗い、洗液を分離用カラムに加え、液を流下させたのち、さらにクロロホルム 100 ml を流下させる。ついで、カラムに 10% メチルアルコール含有クロロホルム溶液 25 ml を加え、溶出し、溶出液は 50 ml の共通すり合せナス型フラスコに集め、ロータリーエバポレーターで溶媒を除去する。残留物にアルコール製水酸化ナトリウム溶液 3 ml を加え、試験溶液とする。ここに得た試験溶液は波長 426 nm 付近における吸収極大の吸光度 (A) を測定する。ついで酢酸 0.05 ml を加え混和し、ふたたび 426 nm 付近における吸収極大の吸光度 (B) を測定する。得られた吸光度 (A) から (B) を差引いた値をナイカルバジンの吸光度とし、あらかじめ作成した検量線から試験溶液中のナイカルバジン濃度 ( $\mu$ g/3ml) を求め、この数値を 25 で除して試料中のナイカルバジン濃度

(ppm) とする。

〔ポーラログラフ法〕

試料（鶏肉）25 g をとり、〔比色法〕の抽出操作にしたがい、酢酸エチル抽出液はロータリーエバポレーターで溶媒を除去し、得られた残留物にジメチルスルホキシド支持電解液 5 ml を正確に加え、溶解させ試験溶液とする。試験溶液は 50 ml の遠心管に移し、フラスコは n-ヘキサン 5 ml および 2 ml で洗い、n-ヘキサン洗液は遠心管に加える。遠心管はセンをして 10~15 秒間、内容物をよく振り混ぜ、3000~3500 rpm で 10 分間遠心分離したのち、下層をポーラログラフ用電解セルに移し、窒素ガスを約 20 分間通じたのち -0.7~-1.3V 間のポーラログラムを描かせ、-0.98V にある波高を測定し、あらかじめ作成した検量線から試験溶液中のナイカルバジン濃度 ( $\mu$ g/5 ml) を求め、この数値を 25 で除して試料中のナイカルバジン濃度 (ppm) とする。

〔検量線〕

比色法：ナイカルバジン標準溶液 1, 2, 3, 5 および 10 ml を正確にとり、ロータリーエバポレーターで溶媒を除去し、残留物にアルコール製水酸化ナトリウム溶液を加えて溶かし、吸収極大における、それぞれの吸光度を測定し、検量線を作成する。

ポーラログラフ法：ナイカルバジン標準溶液 0.1, 0.25, 0.5 および 0.75 ml をとり、全量が 5 ml となるようにジメチルスルホキシド支持電解液を加え、これらの液をポーラログラフ用電解セルに移し、窒素ガスを約 20 分間通じたのち、-0.7~-1.3V 間のポーラログラムを描かせ、-0.98V にある波高によって検量線を作成する。

### 実験結果および考察

ナイカルバジンは 4,4'-ジニトロカルバニリド (DNC) と 2-ヒドロオキシ 4,6-ジメチルピリミジン (HDP) との分子化合物であり、標識ナイカルバジンについての水と酢酸エチルとの間における二成分の分配をみると、DNC-carbonyl-<sup>14</sup>C 体は酢酸エチル 96, 水 4, HDP-ring-<sup>14</sup>C 体は酢酸エチル 8, 水 92 である。DNC はアルカリによって黄色を呈し、このものは吸収極大波長が 426 nm 付近にあり、分光測光法による定量が可能である。また、ニトロ基を有するためポーラログラフ法によって測定することができる<sup>2)</sup>。本法は飼料およびプレミックス中のナイカルバジンについてのメルク原法<sup>1)</sup>にカラム法を組み合わせ、試料から抽出される黄色色素の除去を目的とした。また、ポーラログラフ法では直流ポーラログラフによる

方法の検討を行った。

鶏肉から酢酸エチルで抽出されてくる黄色色素はアルミナカラムを通し、クロロホルムを流すことによって、カラムから溶出される。鶏肉 25 g を用いた場合、クロロホルム 50 ml の使用でほとんど大部分の色素が溶出され、つぎの 20 ml, 2 回で 426 nm における吸収は認められなくなる。クロロホルム溶出液の吸収スペクトルは Fig. 1 に示すように典型的なカロチノイド系色素のスペクトルを与え、酢酸を添加してもスペクトルの形態は変化しない。

アルミナカラムに残留するナイカルバジンは 10% メチルアルコール含有クロロホルムによって溶出されるが、25 ml の使用で約 97% が回収される。溶出液は溶媒を除去したのち、残留物にアルコール製水酸化ナトリウム溶液を加えると黄色を呈し、Fig. 2 に示すスペクトルを与えるが、この溶液に酢酸を加えて酸性にすると吸収は短波長側にシフトし、426 nm における吸収は消失する。したがって、仮りに妨害物質が存在しても酸添加前後の吸光度の差からナイカルバジンの量が求められる。ナイカルバジンの比色法による検量線は Fig. 3 に示すとおりで直線性を示した。鶏肉 25 g にナイカルバジンを添加した場合の回収率は 86% (0.2 ppm 添加), 96% (2 ppm 添加) であり、検出限界は 0.2 ppm であった。なお、動物用医薬品として指定されているフランソリドンは、アルカリによって 440 nm に吸収極大を示すがカラムによるクリーンアップの段階で除去でき、比色法を妨害しない。

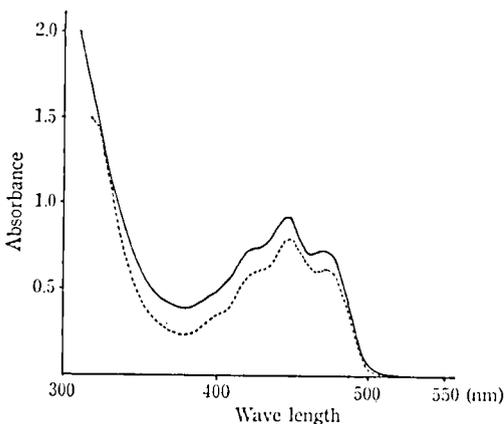


Fig. 1. Absorption spectra of chloroform fraction  
— Chloroform fraction, sodium hydroxide solution (alcoholic)  
---- 0.05 ml glacial acetic acid added to the above solution

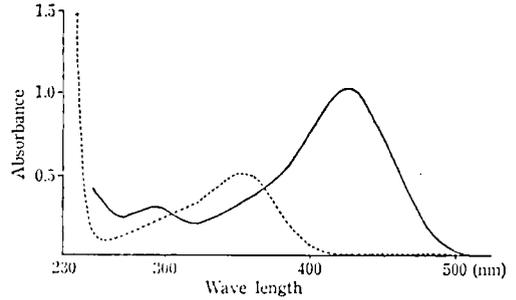


Fig. 2. Absorption spectra of Nicarbazine  
— 50 µg/6 ml Sodium hydroxide solution (alcoholic)  
---- 0.05 ml glacial acetic acid added to the above solution

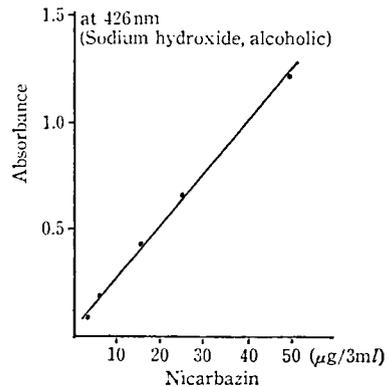


Fig. 3. Calibration curve of Nicarbazine (spectrophotometric method)

比色法における検出限界を高めるために、アルコール製水酸化ナトリウム溶液 1 ml を用いて残留物を溶かし、特殊なセルを用いて測定することにより、鶏肉 25 g 中 2 µg のナイカルバジンが検出できた (0.08 ppm)。

直流ポーラログラフ法については、鶏肉についてのブランクは  $-0.7 \sim -1.3$  V 間に波高を示さず、ナイカルバジンの 1 ppm 添加レベルでも  $-0.98$  V 付近に明らかな波高を示した (Fig. 4)。ポーラログラフ法における検量線は直線性を示し (Fig. 5)、鶏肉 25 g にナイカルバジンを添加した場合の回収率は 85% (1 ppm 添加), 95% (2 ppm) であり、検出限界は 1 ppm であった。

## 結 論

鶏肉に残留するナイカルバジンは従来の飼料中の分析方法にカラム法を組み合わせることにより、クリーン

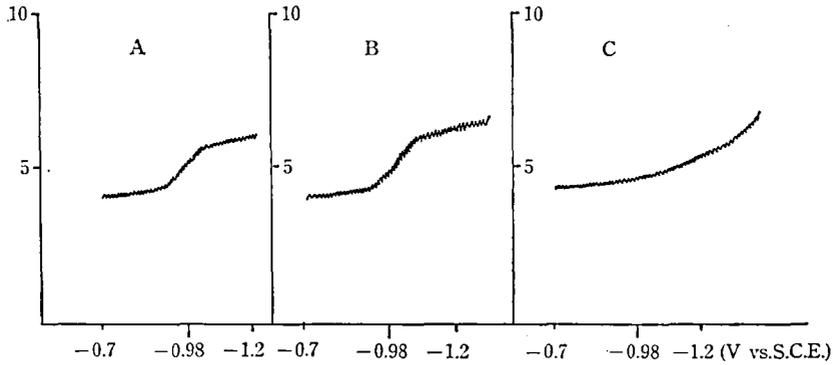


Fig. 4. Polarograms of Nicarbazine recovered from chicken tissue (A), standard Nicarbazine (B) and nonmedicated chicken tissue (C)

Samples : A Added Nicarbazine 25  $\mu$ g (1 ppm level in tissue, 5 ppm level in DMSO supporting electrolyte solution)

B Standard Nicarbazine, 5 ppm

C Chicken tissue blank

Polarograph : Yanagimoto P-8 (direct current)

Solution : DMSO supporting electrolyte solution

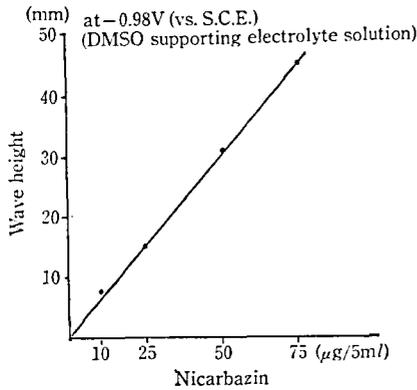


Fig. 5. Calibration curve of Nicarbazine (polarographic method)

アップを容易にして妨害物質の除去ができた。本法におけるナイカルバジンの検出限界は比色法において、

0.08 ppm であった。直流ポーログラフ法はニトロ化合物に対して特異的な分析方法ではあるが、検出限界は 1 ppm にとどまるため、オキシログラフによるポーログラフ法あるいは高速液体クロマトグラフィの検出器としてボルタムメトリ検出器の応用が考えられ、それによって、さらに感度が高められるものと思われる。

終りに、ポーログラフの測定に御協力いただいた本所、食品添加物部、辰濃隆主任研究官に御礼申し上げます。

### 文 献

- 1) メルク社 : Veterinary & agricultural TECHNICAL SERVICE, 鶏 No. 12, 昭和 48 年 8 月 3 日.
- 2) R.F. Michielli : Nicarbazine, Tissue Residue Assay Method, Merck & Co., Inc., 1972.

## Determination of Sulphites and Sorbic Acid in Imported Wines

Masatake TOYODA, Shunjiro OGAWA, Yoshio ITO  
and Masahiro IWAIDA

Fifty-one samples of imported wines were inspected for sulphites and/or sorbates in this period. Five samples of white wine were rejected for their over level of sulphites. The levels of sorbic acid were permissible in all samples inspected. Three samples imported from Portugal and West Germany contained rather high level of sorbic acid and sulphites compared with other samples.

(Received May 31, 1978)

In Japan, sulphites and sorbate for food additives in wine are allowed to use within the permissible level of less than 0.350 g/Kg as residual sulphur dioxide and of not more than 0.200 g/Kg as sorbic acid, respectively.

In the fiscal year 1977, from April in 1977 to March in 1978, our department inspected 51 samples of imported wine from 5 countries, France, Portugal, Spain, West Germany and Italy as shown in Table 1. In 51 samples, 38 samples were white wine and 13 samples were red wine.

### Materials and Methods

Forty-eight samples were inspected for sulphites and 46 samples for sorbate (Table 1).

Residual sulphites were determined by the Modified Rankine's Method with the alkaline titration method<sup>1)</sup>, and determination of sorbic acid was carried out by the determination method of preservatives established by us<sup>2)</sup>.

### Results and Discussion

#### 1. Sulphites

Results of sulphites contents of white wine and red wine were summarized in Table 2.

Sulphites contents of white wine and red wine imported from Portugal, West Germany and Italy were within the permissible level (less than 0.350 g/Kg). Three samples of white wine in 36 samples imported from France contained excess sul

Table 1. A List of The Inspected Wine

Exporting Countries	Number of Samples	SO <sub>2</sub>	Sorbic Acid	Total	
France	White Wine 28	36	36	36	72
	Red Wine 8				
Portugal	White Wine 4	5	5	5	10
	Red Wine 1				
Spain	White Wine 2	4	3	1	4
	Red Wine 2				
West Germany	White Wine 2	2	2	2	4
	Red Wine —				
Italy	White Wine 2	4	2	2	4
	Red Wine 2				
Total	White Wine 38	51	48	46	94
	Red Wine 13				

Table 2. Sulphites Contents of Red Wine and White Wine

SO <sub>2</sub> (g/Kg)	Exporting Countries									
	France		Portugal		Spain		West Germany		Italy	
	Red Wine	White Wine	Red Wine	White Wine	Red Wine	White Wine	Red Wine	White Wine	Red Wine	White Wine
0.001~0.099	5	10	—	4	1	—	—	—	1	—
0.100~0.199	—	6	—	—	—	—	—	—	—	—
0.200~0.299	3	5	1	—	—	—	—	2	—	—
0.300~0.349	—	4	—	—	—	—	—	—	—	—
≥0.350	—	3	—	—	—	2	—	—	—	—
Total	8	28	1	4	1	2	0	2	1	1
	36		5		3		2		2	

Permissible level of SO<sub>2</sub> : less than 0.350 g/Kg

Table 3. Sorbic Acid Contents of Red Wine and White Wine

Sorbic Acid (g/Kg)	Exporting Countries									
	France		Portugal		Spain		West Germany		Italy	
	Red Wine	White Wine	Red Wine	White Wine	Red Wine	White Wine	Red Wine	White Wine	Red Wine	White Wine
not detected	8	19	—	4	1	—	—	—	—	—
0.001~0.099	—	9	—	—	—	—	—	—	—	—
0.100~0.199	—	—	1	—	—	—	—	1	—	—
≥0.200	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Total	8	28	1	4	1	0	0	2	1	1
	36		5		1		2		2	

Permissible level of sorbic acid : not more than 0.200 g/Kg

Table 4. Sorbic Acid Contents and Sulphites Contents of Wine Imported from Portugal and West Germany

Exporting Countries	Wine	Sorbic acid (g/Kg)	SO <sub>2</sub> (g/Kg)
Portugal	Red	0.114	0.262
West Germany	White	0.104	0.269
	White	0.094	0.287

phites of 0.364, 0.365 and 0.379 g/Kg and these were rejected. It was noted that 2 samples of white wine imported from Spain contained high level of sulphites contents (0.442 and 0.454 g/Kg). All samples of red wine were within the per-

missible level of sulphites. While 5 samples in 38 samples of white wine were rejected for their over level of sulphites contents.

## 2. Sorbic acid

No or the permissible level of sorbic acid (less

than 0.200 g/Kg) were detected in all of red wine and white wine imported from 5 countries (Table 3). However, as shown in Table 4, it was noted that one sample from Portugal and 2 samples from West Germany contained rather high level of sorbic acid contents compared with other samples (0.003 g/Kg~0.032 g/Kg). Further, these samples were also determined considerably high

level of sulphites contents.

#### References

- 1) K. Fujita *et al.* : *Z. Lebensm. Untersuch. u. Forsch.* submitted
- 2) M. Toyoda *et al.* : *J. Hyg. Chem.*, **23**, 100 (1977)

## Determination of Sulphites and Borates in Imported Frozen Prawns, Frozen Shrimps and Salted Jelly Fish

Shunjiro OGAWA, Masatake TOYODA, Yoshio ITO  
and Masahiro IWAIWA

In Japan, seven kinds of sulphite chemicals have been allowed since 1973 to use for the treatment of prawns and shrimps within the permissible level of 0.100 g of residual SO<sub>2</sub> per kilogramme of shelled sample. The use of borates as a preservative of prawns, shrimps and jelly fish is strictly forbidden. In the fiscal year 1977, we inspected 185 samples of frozen prawns and shrimps from 18 countries, while the number of salted jelly fish inspected were 11 in all. Four samples of frozen prawns and shrimps were disqualified because they contained excess sulphites, while thirteen samples of frozen prawns and shrimps were rejected because they contained borates (natural content of borates in prawns and shrimps is temporarily settled to be not more than 0.150 g as H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> per kilogramme of whole sample). Borate contents of salted jelly fish were within the range of 0.042 ~0.115 g/kg.

Concludingly, the disqualification ratio of frozen prawns and shrimps by either sulphites or borates amounted to 9.2%. No salted jelly fish was rejected.

(Received May 31, 1978)

In Japan, seven kinds of chemically synthesized substances, i.e. potassium metabisulphite, potassium sulphite, sodium bisulphite, sodium hypsulphite, anhydrous sodium sulphite, sodium sulphite hydrate and sulphur dioxide, are specified as food additives, being enlisted in Table 2 of the Enforcement Regulation of Food Sanitation Law (Ministry of Health and Welfare Ordinance No. 23, July 13, 1948). Since April 28 in 1973, these sulphites have been allowed to use on shelled prawn within the permissible level of less than 0.100 g of residual sulphur dioxide per kilogramme. Japan imports quantities of frozen shrimps and prawns from Far East, South-East Asia, Middle or Near East countries and so on and each lot of

these are subjected to the determination of residual sulphites by the government institute or other designated laboratories. Besides, an illegal use of boric acid and/or borate (probably by fishers) on prawns and shrimps as well as jelly fish as preservative was detected in 1973<sup>1)</sup> and, since then, such imported foods have been checked for borate, the permissible level being temporarily settled to 0.150 g as H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> per kilogramme.

#### Materials and Method

In the fiscal year 1977, covering from April in 1977 to March in 1978, our department inspected 185 samples of frozen prawns and shrimps from 18 countries, while salted jelly fish inspected were

Table 1. The list of the frozen prawns and shrimps inspected

Exporting Country	Number of samples	Inspection item		
		Sulphites	Borates	Total
Australia	7	7	0	7
Brazil	2	2	0	2
China	9	7	2	9
Hong Kong	60*	34	54	88
India	12*	12	0	12
Indonesia	9	9	0	9
Iran	4	4	0	4
Kwait	4	4	0	4
Liberia	4	4	0	4
Malaysia	3	3	0	3
North Korea	1	1	0	1
Phillipine	12	12	0	12
Singapore	6	6	0	6
South Korea	4	4	0	4
Srilanka	3	3	0	3
Taiwan	37	27	10	37
Thailand	2	2	0	2
Viet Nam	6	2	4	6
Total	185	143	70	213

\* Note. 5 samples from India and 1 sample from Hong Kong were imported in peeled form.

11 in all, the inspection items amounting 224 in total (213 items for frozen prawns and shrimps, while 11 for salted jelly fish). Most prawns and shrimps were imported with shells only six samples being in peeled form. Two samples were imported from Brazil. The details are as shown in Table 1. As for salted jelly fish, six samples were imported from Thailand, three from Malaysia, one from Singapore, the origin of the rest one being unknown.

Residual sulphites were determined after peeling by the modified Rankine's method<sup>2)</sup>, colourimetric microdetermination<sup>3)</sup> is carried out on samples containing less than 30 ppm of sulphur dioxide. For the determination of borates, samples with shells were not peeled but the determinations were carried out on whole samples by adoption

of the modified curcumin method established by Ito and Iwaida<sup>4)</sup>.

## Results and Discussion

### 1. Sulphites.

No or minute quantity (less than 0.01 g/kg) of sulphites were detected from prawns and shrimps of Australia, China, India, Indonesia, Kwait, Liberia, Malaysia, North Korea, Singapore, South Korea, Srilanka, Thailand and Viet Nam. One sample from Brazil contained no sulphite while the other contained as low as 0.016 g SO<sub>2</sub>/kg. Sulphites contents of prawns from Iran were relatively small being within the range of 0.011~0.027 g/kg. Results of the sulphites determinations on prawns and shrimps from Hong Kong and Taiwan are as shown in Table 2. Favourable results were obtained with prawns and shrimps from Hong Kong. Contrary to this, 16 samples (59.3%) of the prawns and shrimps from Taiwan contained not less than 0.025 g/kg of sulphites, indicating that sulphite treatment had been carried out. Four samples were disqualified because of the excess content of sulphites, the disqualification rate being 14.8%.

### 2. Borates.

Borates contents were examined for the first time on prawns and shrimps from China (2 samples) and Viet Nam (4 samples). The borates content of one sample from China was as low as

Table 2. Sulphites contents of the frozen prawns and shrimps imported from Hong Kong and Taiwan

Sulphites (SO <sub>2</sub> g/kg)	Hong Kong	Taiwan
not detected	15	0
0.001~0.024	19	11
0.025~0.049	0	9
0.050~0.074	0	2
0.075~0.099	0	1
≥0.100	0	4*
Total	34	27

\* Obtained values were 0.271, 0.259, 0.259 and 0.156.

Table 3. Borates contents of the frozen prawns and shrimps imported from Hong Kong and Taiwan

	Borates (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> g/kg)	Hong Kong	Taiwan
Pass	not detected	2	0
	0.001~0.019	23	9
	0.020~0.049	8	0
	0.050~0.099	6	0
	0.100~0.149	2	0
Disqualified	0.150~0.199	2	0
	0.200~0.299	9	0
	≥0.300	2	0
Total		54	9

Table 4. Borates contents of the salted jelly fish

Origin	Number of samples	Borate (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> g/kg)
Malaysia	3	0.053~0.086
Singapore	1	0.084
Thailand	6	0.042~0.115
Unknown	1	0.096

0.020 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>/kg, while considerably high value of 0.109 was obtained from the other, though both of them were within the permissible level. Three samples from Viet Nam contained no borates while the rest one contained 0.051 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>/kg. Since it had been confirmed by the preliminary

examinations that prawns and shrimps from those countries except China, Hong Kong, Taiwan and Viet Nam had low level of borates, the goods from them were excluded from the official inspection of borates. The results on samples from Hong Kong and Taiwan are summarized in Table 3. From the results it became clear that twenty-five (46.3%) of the samples from Hong Kong contained not more than 0.020 g/kg of borates, but 13 samples were disqualified because they contained excess borates the disqualification rate being as high as 24.1%. Moreover, it must be noted that 11 of them contained not less than 0.200 g/kg of boric acid. The borate contents of samples from Taiwan were known to be low. Concludingly, no prawns or shrimps except from Hong Kong were rejected because of the excess content of borates.

The results on jelly fish are summarized in Table 4. No jelly fish contained excess (not less than 0.150 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>/kg) of borates, though one sample from Thailand showed a relatively high value of 0.115 g/kg.

#### References

- 1) M. Iwaida, Y. Kaneda, Y. Ito, Y. Tonogai, M. Ogawa, M. Matsuoka, K. Nakamura: *Bull. Nat. Inst. Hyg. Sci.*, 92, 86 (1974)
- 2) K. Fujita *et al.*: *Z. Lebensm. Untersuch. u.-Forsch.*, submitted
- 3) S. Ogawa *et al.*: *Z. Lebensm. Untersuch. u.-Forsch.*, submitted
- 4) Y. Ito, M. Iwaida: *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 16, 41 (1975)

## Contents of Diphenyl (DP), o-Phenylphenol (OPP) and Thiabendazole (TB) in Imported Citrus Fruits and Citrus Fruit Products

Yoshio ITO, Yasuhide TONOGAI, Masatake TOYODA,  
Hideyo SUZUKI, Shunjiro OGAWA  
and Masahiro IWAIDA

The residual levels of DP, OPP, and TB in imported 140 samples of lemon, 33 samples of oranges, 63 samples of grapefruit, one sample of lime, 12 samples of citrus oils etc. were revealed. OPP contents in citrus fruits were within the range of 0~4.34 ppm. Since the use of OPP was permitted, OPP contents in all the fruits were within the permissible level of 10 ppm. Nine out of 25 grapefruit samples inspected in December 1977 contained excess quantity of DP. More than 0.1 ppm of TB was detected from only one sample of orange. From 2 samples of orange peel TB was detected and high level of DP was detected from 2 samples of lemon oil.

(Received May 31, 1978)

DP, OPP and TB are widely used in the producing countries as the preservatives of citrus fruits. In Japan DP was allowed to use only for grapefruit, lemon and oranges in 1971 within the maximal residual level of 70 ppm. Since April 30 in 1977 OPP and its sodium salt were added to the list of food additives and they are allowed to use for citrus fruits within the permissible level<sup>1</sup> of 10 ppm as OPP. The use of TB, however, is strictly prohibited. The authors developed a systematic determination of these three preservatives in 1975 that could inspect these three simultaneously.<sup>1)</sup> A modified method for the determination of the three in citrus oils was also represented in 1977.<sup>2)</sup> Although the results of our inspection were reported previously,<sup>3)</sup> it was impossible to show their precise residue levels at that time. This report reveals the contents of DP, OPP and TB in citrus fruits, citrus oils etc. during the period covering from January in 1975 till December in 1977.

### Materials and Methods

1. Sample : 116 samples of lemon, 31 samples of oranges, 61 samples of grapefruit, and one sample of lime imported from the United States, 21 samples of lemon (Nos. 1~2 and 110~130 in Table 1) imported from Israel, one sample of

lemon (No. 131) imported from Italy, 2 samples of oranges (No. 1 and 2) and 2 samples of grapefruit (No. 1 and 2) imported from Israel were subjected to the inspection.

2. Methods : The determination of DP, OPP and TB in citrus fruits, their peels and citrus drinks was carried out by the systematic procedure<sup>1)</sup>, while the determination in citrus oils was performed by the modified method<sup>2)</sup>.

### Results

The residual levels of DP, OPP and TB in citrus fruits are shown in Table 1. OPP contents are known to be within the range of 0~4.34 ppm. Before 30th of April in 1977, the fruit was judged to have been treated with OPP in case more than 0.5 ppm of OPP was present in it, and the import of the fruit was not permitted. Since the use of OPP was permitted, OPP contents in all the fruits were within the permissible level no OPP being detected in recent samples. Contrary to this, 9 out of 25 (36%) grapefruit samples inspected in December 1977 contained excess quantity of DP, indicating that DP was used as the preservative instead of OPP in case of grapefruits. More than 0.1 ppm of TB was detected only from one sample of orange.

Table 2 shows the contents of DP, OPP and TB

Table 1. Contents of diphenyl (DP), o-phenylphenol (OPP) and thiabendazole (TB) in citrus fruits

(ppm)					
Kind	No.	DP	OPP	TB	
1975 January					
Lemon	1	9.3	0.60	0.08	
	2	9.2	0.52	0.16	
	3	10.4	ND	ND	
	4	9.7	0.16	ND	
Oranges	1	37.7	0.63	0.70	
	2	38.9	0.42	0.95	
	3	32.0	3.96	0.70	
	4	34.9	4.34	0.84	
Grapefruit	1	7.8	0.10	ND	
	2	8.9	0.08	0.10	
	3	9.3	0.20	0.03	
	4	8.4	0.13	0.08	
	5	10.8	ND	ND	
	6	10.1	ND	0.03	
1975 April					
Lemon	5	9.2	1.50	ND	
	6	12.4	1.40	ND	
	7	24.7	0.10	0.21	
	8	94.2	0.72	ND	
	9	28.7	1.84	0.10	
	10	22.0	3.60	ND	
	11	24.1	1.31	ND	
	12	17.2	0.52	ND	
	Oranges	5	39.5	0.50	ND
		6	24.2	0.10	ND
		7	46.1	0.65	ND
		8	15.6	0.34	ND
9		18.9	1.36	ND	
1975 May					
Lemon		13	2.8	0.35	ND
	14	13.0	1.24	ND	
	15	8.8	1.90	ND	
	16	11.8	1.53	ND	
	17	15.7	0.63	ND	
	18	17.0	0.42	ND	
	19	9.5	3.30	ND	

Table 1. Continued

Kind	No.	DP	OPP	TB
Lemon	20	10.1	1.77	ND
	21	11.5	0.62	ND
	22	13.0	0.10	ND
	23	24.4	1.13	ND
	24	19.1	1.52	ND
	25	24.2	3.20	ND
	26	23.6	2.14	ND
	27	31.5	2.06	ND
	28	13.2	0.29	ND
	29	9.3	0.18	ND
	30	11.6	0.11	ND
	31	6.6	ND	ND
	32	28.7	0.32	ND
	33	34.6	0.40	ND
	34	31.0	0.44	ND
	35	27.3	0.32	ND
	36	53.1	0.45	ND
	37	40.5	0.37	ND
	38	45.5	0.31	ND
	39	38.0	0.40	ND
	40	21.2	0.35	ND
	41	25.2	0.76	ND
	42	12.9	0.52	ND
	43	25.0	0.42	ND
	44	8.4	0.25	ND
	45	23.9	0.31	ND
	46	37.8	0.40	ND
	47	26.8	0.31	ND
	48	29.6	1.33	ND
	49	9.0	0.27	ND
	50	13.3	0.18	ND
	51	1.0	0.20	ND
	52	11.2	0.11	ND
	53	11.9	0.24	ND
	54	7.5	0.12	ND
	55	17.2	0.27	ND
	56	29.5	0.39	ND
	57	27.3	0.40	ND
	58	16.4	0.21	ND
	59	25.0	0.25	ND
	60	34.1	0.15	ND
61	48.2	0.11	ND	

Table 1. Continued

Kind	No.	DP	OPP	TB
Lemon	62	10.0	0.22	ND
	63	30.0	0.34	ND
	64	28.2	0.17	ND
	65	48.6	0.30	ND
	66	24.5	0.11	ND
	67	49.1	0.61	ND
	68	58.6	0.24	ND
	69	20.5	0.13	ND
	70	23.6	0.10	ND
	71	24.5	0.10	ND
	72	35.0	0.11	ND
	73	14.1	ND	ND
	74	37.3	0.12	ND
	75	28.2	0.11	ND
	76	5.3	ND	ND
	77	14.4	0.14	ND
	78	17.6	0.62	ND
	79	8.6	0.15	ND
	80	14.3	0.34	ND
	81	17.3	0.10	ND
82	15.5	0.10	ND	
Grapefruit	7	7.8	0.22	ND
	8	—	0.20	—
1975 June				
Lemon	83	7.8	0.42	ND
	84	5.6	0.12	ND
	85	8.4	0.15	ND
	86	7.7	0.27	ND
	87	9.0	0.19	ND
	88	14.4	0.20	ND
	89	14.4	0.42	ND
	90	7.8	0.25	ND
	91	11.3	0.23	ND
	92	2.3	0.20	ND
	93	10.0	0.30	ND
	94	14.5	0.11	ND
	95	12.6	0.27	ND
	96	19.7	0.19	ND
	97	4.2	0.30	ND
	98	2.8	0.15	ND
	99	6.4	0.33	ND

Table 1. Continued

Kind	No.	DP	OPP	TB
Lemon	100	6.1	0.20	ND
	101	8.7	0.82	ND
	102	11.1	0.42	ND
	103	12.7	0.21	ND
	104	18.3	0.23	ND
	105	12.4	ND	ND
	106	—	0.09	—
	107	—	0.08	—
	108	—	0.12	—
	109	—	0.15	—
	110	—	0.16	—
	111	—	0.18	—
	112	—	0.22	—
	113	—	0.26	—
	114	—	0.27	—
	115	—	0.28	—
	116	—	0.28	—
	117	—	0.33	—
	118	—	0.35	—
	119	—	0.35	—
120	—	0.37	—	
121	—	0.38	—	
122	—	0.42	—	
123	—	0.43	—	
124	—	0.43	—	
125	—	0.52	—	
126	—	0.61	—	
127	—	0.68	—	
128	—	1.20	—	
129	—	1.47	—	
130	—	1.94	—	
Oranges	10	20.2	ND	ND
	11	9.2	0.11	ND
	12	23.1	ND	ND
	13	16.4	0.12	ND
	14	19.2	0.11	ND
	15	17.8	0.11	ND
	16	—	0.06	—
	17	—	0.07	—
	18	—	0.06	—
	19	—	0.07	—
20	—	0.04	—	

Table 1. Continued

Kind	No.	DP	OPP	TB	
Grapefruit	9	—	ND	—	
	10	—	ND	—	
	11	—	ND	—	
	12	—	ND	—	
	13	—	ND	—	
	14	0.9	ND	ND	
	15	6.2	ND	ND	
	16	6.9	ND	ND	
	17	5.8	ND	ND	
	18	4.7	0.24	ND	
	19	4.0	ND	ND	
	20	10.7	0.11	ND	
	21	7.9	0.13	ND	
	22	—	0.02	—	
	23	—	0.04	—	
	24	—	0.05	—	
	25	—	0.01	—	
	26	—	0.01	—	
	27	—	0.01	—	
	28	—	0.04	—	
	29	—	0.04	—	
	30	—	0.03	—	
	31	—	0.10	—	
	1957 July				
	Oranges	21	17.3	0.10	ND
		22	4.0	ND	ND
		23	11.0	ND	ND
		24	16.0	0.12	ND
	Grapefruit	32	ND	ND	ND
		33	ND	ND	ND
		34	3.1	0.42	ND
35		1.9	0.34	ND	
1975 August					
Lemon	131	9.0	ND	ND	
	132	9.0	ND	ND	
	133	6.0	0.13	ND	
	134	6.0	ND	ND	
	135	ND	ND	ND	
	136	3.0	ND	ND	

Table 1. Continued

Kind	No.	DP	OPP	TB	
Oranges	25	2.0	ND	ND	
	26	3.0	ND	ND	
	27	ND	ND	ND	
	28	5.0	ND	ND	
	Grapefruit	36	3.0	ND	ND
		37	0.3	ND	ND
		38	ND	ND	ND
	1975 September				
Lime	1	10.6	ND	ND	
1975 December					
Oranges	29	12.4	2.24	ND	
1976 April					
Lemon	137	9.7	ND	ND	
1976 June					
Oranges	30	17.2	ND	1.10	
	31	19.8	ND	0.08	
	32	20.9	ND	0.07	
1977 April					
Lemon	138	7.0	ND	ND	
1977 October					
Lemon	139	—	ND	ND	
	140	—	ND	ND	
Oranges	33	—	ND	ND	
1977 December					
Grapefruit	39	74.2	—	—	
	40	96.5	—	—	
	41	126.1	—	—	
	42	84.4	—	—	
	43	104.0	—	—	
	44	114.5	—	—	
	45	77.5	—	—	
	46	57.7	—	—	
	47	25.2	—	—	
	48	23.8	—	—	

Table 1. Continued

Kind	No.	DP	OPP	TB
Grapefruit	49	72.0	—	—
	50	26.2	—	—
	51	71.2	—	—
	52	43.0	—	—
	53	20.5	—	—
	54	31.4	—	—
	55	43.5	—	—
	56	30.7	—	—
	57	53.0	—	—
	58	21.1	—	—
	59	38.5	—	—
	60	18.5	—	—
	61	23.0	—	—
	62	37.9	—	—
	63	42.1	—	—

in citrus fruit products. TB was detected only from 2 samples of orange peel, while considerably high level of DP was detected from 2 samples of lemon oil.

References

- 1) Y. Tonogai, H. Sano, Y. Ito, M. Iwaida : *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 16, 397 (1975)
- 2) Y. Ito, M. Toyoda, H. Suzuki, M. Iwaida : *ibid.*, 18, 450 (1977)
- 3) M. Iwaida *et al.* : *Bull. Nat. Inst. Hyg. Sci.*, 94, 120 (1976)

ND, not detected

Table 2. Contents of diphenyl (DP), o-phenylphenol (OPP) and thiabendazole (TB) in citrus fruit products

Sample No.	Kind	The place of produce	Year and month	DP	OPP	TB	
1	Concentrated grapefruit drink	United States	1976 April	ND	ND	ND	
				No. 1	ND	ND	ND
2		"	"	ND	ND	ND	
3	Sliced navel orange peel	"	July	—	—	0.2	
4	Lemon oil	F.R. Germany	"	3150	ND	ND	
				No. 1	130	ND	ND
5		"	"	ND	ND	1.1	
6	Orange peel	"	August	ND	ND	ND	
7	Lemon oil	"	September	ND	ND	ND	
8	Lemon oil	United States	"	ND	ND	ND	
9	Orange oil	Switzerland	1977 April	ND	ND	ND	
				No. 1	ND	ND	ND
				2	—	ND	ND
10		"	"	—	ND	ND	
11		United States	"	—	ND	ND	
12	Lemon oil	Italy	"	—	ND	ND	
13	Thyme oil	"	"	—	ND	ND	
14	Bergamot oil	"	"	—	ND	ND	
15	Lime oil	United States	"	ND	ND	ND	
				No. 1	ND	ND	ND
16		"	"	ND	ND	ND	

ND, not detected

Results of the Product Examination of Coal-Tar Dyes  
(including Dye Aluminum Lakes) from April in 1977  
till March in 1978 (on the Product Examination of  
Coal-Tar Dyes XVII)

Masahiro IWAIDA, Keizo NAKAMURA, Hideyo SUZUKI,  
Yoko MINEMATSU and Takako WATANABE

The number of dyes inspected in this period was 377 in total amounting 108,774.5 kg in quantity. Since March 11th in 1978, manganese test was added as one of the items of tests on Food Red No. 106, Food Green No. 3 and Food Blue No. 1, the permissible level being 50 ppm. No dye was disqualified during this period.

(Received May 31, 1978)

The number of dyes inspected in the fiscal year 1977/1978 was 377 in all (including dye aluminum lakes) showing a decrease of 70 (15.7%) compared with the previous period<sup>1)</sup> and a decrease of 50 (11.7%) compared with two years ago<sup>2)</sup>. Numbers of dyes tested in each month are summarized in Table 1. The following dyes were not sent to our laboratory during the period for product examination; Food Red No. 2 Aluminum Lake, Food Red No. 104 (Phloxine), Food Red No. 105 (Rose Bengale), Food Green No. 3 (Fast Green FCF) and Food Green No. 3 Aluminum Lake. The production of Food Red No. 2 was restored to 2,400 kg compared with the previous period (330 kg); on the contrary, the production of Food Red No. 3 fell from 10,020 to 5,700 kg. The food coal-tar dye produced in the largest quantity in this period was Food Yellow No. 4 the same as in other years, occupying 39.5% of all the food coal-tar dyes produced in this period. Food Yellow No. 5 and Food Red No. 102 were the dyes produced in the second and the third largest quantity produced in this period, respectively.

The production of total dye aluminum lakes were 10,950 kg, being 10.1% of the food coal-tar dyes produced. As for the inspection method, confer the previous report<sup>2)</sup>. No lot of dye was disqualified during this period, the passing ratio arriving at the maximum level of 100%.

Since potassium permanganate is sometimes

used as the oxidizing agent instead of potassium bichromate during the manufacture of these dyes, test of manganese was added to the Coloring Matter Tests of the Notification regarding the Standards and Specifications of Foods, Food Additives etc. (Ministry of Health and Welfare Notification No. 370, December 28, 1959) as one of the test items of heavy metals contained in Food Red No. 106, Food Green No. 3 and Food Blue No. 1 on the 11th of March in 1978. Accordingly, this test was carried out on the dyes arrived since then, too. The procedure for manganese test adopted is as follow.

"Take 10 ml of the sample solution for the tests of heavy metals (corresponds to 500 mg of dye)<sup>3)</sup>, evaporate to dryness by heating, then add 5 ml of sulfuric acid and 40 ml of water to dissolve the residue. Furthermore, add 3 ml of phosphoric acid and 0.3 g of potassium periodate, cover with watch glass and heat for one hour on water bath, shaking occasionally. Cool, and add water to make 50 ml (solution A). Add 2.5 ml of manganese standard solution to 10 ml of control solution and perform in the same manner as the sample to prepare solution B. The color of solution A is not darker than that of solution B."

Note. Manganese standard solution: Dissolve 287.6 mg of potassium permanganate in 100 ml of water and 1 ml of sulfuric acid, boil after the addition of 0.5 g of sodium bisulfite, cool, and

Table 1. Numbers of coal-tar dyes tested in each month

Classification	1977					1978					Total	Quantity (kg)		
	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1			2	3
<b>Food Red</b>														
No. 2 (Amaranth)	0	0	3	2	0	0	0	0	1	0	2	0	8	2,400
No. 3 (Erythrosine)	3	2	1	1	2	1	3	2	1	1	1	2	20	5,700
No. 3 Aluminum Lake	0	2	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	4	1,200
No. 102 (New Coccine)	6	5	5	8	5	8	4	2	15	0	2	6	66	19,330
No. 106 (Acid Red)	0	2	2	0	1	1	1	1	0	0	1	1	10	1,766
<b>Food Yellow</b>														
No. 4 (Tartrazine)	15	11	15	8	14	12	12	14	21	4	9	9	144	42,996
No. 4 Aluminum Lake	2	0	7	0	0	3	0	0	2	0	5	0	19	5,550
No. 5 (Sunset Yellow FCF)	8	7	11	6	6	7	2	6	7	3	4	6	73	21,552.5
No. 5 Aluminum Lake	1	0	2	2	0	0	0	0	0	3	0	2	10	2,850
<b>Food Blue</b>														
No. 1 (Brilliant Blue FCF)	2	2	1	1	1	0	3	1	2	0	1	0	14	3,030
No. 1 Aluminum Lake	0	0	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	4	1,050
No. 2 (Indigo Carmine)	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	4	1,050
No. 2 Aluminum Lake	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	300
<b>Total</b>	<b>38</b>	<b>31</b>	<b>49</b>	<b>29</b>	<b>31</b>	<b>33</b>	<b>26</b>	<b>28</b>	<b>49</b>	<b>11</b>	<b>26</b>	<b>26</b>	<b>377</b>	<b>108,774.5</b>

then dilute to 200 ml. One ml of this solution contains 0.01 mg Mn.

Therefore, the permissible level of manganese in the three dyes is settled to 50 ppm.

#### References

1) M. Iwaida, K. Nakamura, Y. Tonogai, Y. Matsumoto, T. Kanamori : *Bull. Nat. Inst.*

*Hyg. Sci.*, **95**, 126 (1977)

2) M. Iwaida, K. Nakamura, A. Yamaji, H. Suzuki, Y. Matsumoto, M. Nishikawa, Y. Kaneda : *Bull. Nat. Inst. Hyg. Sci.*, **94**, 124 (1976)

3) Ministry of Health and Welfare : *The Japanese Standards of Food Additives*, 3rd Ed., p.601 (1974)

## つくだ煮の保存性に対するソルビン酸の有効性について

河西 勉・鈴木 昭・小沼博隆・高山澄江・水島久美子

## Effects of Sorbic Acid (Food Additive) on Preservation of "TSUKUDANI"

Tsutomu KAWANISHI, Akira SUZUKI, Hirotaka KONUMA,  
Sumie TAKAYAMA and Kumiko MIZUSHIMA

The preservative efficiency of Sorbic acid (SoA) was re-evaluated by microbiological tests for four kinds of "Tsukudani" (hosokirikobu, kobumaki, kiriiika and kohnago). The "Tsukudani" is a Japanese food boiled down in soy sauce. Fishes, shellfishes and seaweeds are most frequently used as raw materials of the "Tsukudani".

The tests were carried out in commercial packs of the "Tsukudani" using a series of three concentrations of SoA, 0, 0.05, and 0.1%, under a preservation for 2 months at 30° and 10°. In the case of the preservation for 2 months at 10°, all "Tsukudani" samples did not show any sign of spoilage regardless of the addition of SoA. Therefore, the following results were generally obtained from the storage tests at 30°:

At the level of 0-0.05% SoA, the safe preservation of the "Tsukudani" was varied throughout the storages from 2 weeks to 2 months, depending on its components and amounts of contaminated micro-organisms. The addition of SoA at the level of allowable concentration (0.1%) into the "Tsukudani" was effective for extension of its storage life up to about 2 months.

For the purpose of clarifying a correlation between water requirements of micro-organisms and food storages, water activities ( $a_w$ ) of retailed "Tsukudani" were measured by Conway's units. From the data, the  $a_w$  of samples was in the range of 0.70-0.96. In general, most micro-organisms are inhibited in the productions with  $a_w$  of 0.80. Therefore, measurements of  $a_w$  were very useful to estimate the storage life of the "Tsukudani".

From the above results, it may be supposed that the extension of its storage life enough for the preservation in a practical circulation can be accomplished by the addition of SoA at the level of allowable concentration (0.1%) into the "Tsukudani".

(Received May 31, 1978)

## まえがき

つくだ煮は魚貝藻類を主原料とし、それをしょう油、砂糖、水あめ、化学調味料などの濃厚な調味液で煮込んだもので、古くから保存性の高い食品と考えられているものである<sup>1)</sup>。しかし、近年一般消費者の食品に対する嗜好性が一般に昔のように塩味の濃いものより、むしろ淡白な味を求めるようになってきている。この傾向はつくだ煮についても同様である。この味の変化はつくだ煮の保存性にも大きく影響し、最近のものは一般的に保存性が低下の傾向にあるといわれている<sup>2)</sup>。

保存性の延長を目的として、以前は保存料としてメチルナフトキノン (0.03 g/kg) の使用が許可されていたが、抗菌性が弱いため、また使用に不便があったため、これに代って昭和 39 年からソルビン酸およ

びその塩類 (SoA) が製品 1 kg に対して 1 g 以下 (ソルビン酸として) が使用許可されるようになり現在に及んでいる<sup>3)</sup>。SoA のつくだ煮に対する保存効果についての成績は過去多く報告され、保存性の延長に有効であることが認められている<sup>4-7)</sup>。

最近の世相はこれら食品添加物の使用に対してきびしい批判がむけられ、有効性に対しても、とくに最少有効量と必要性の両面から再検討すべきであるといわれている。このような世論を反映し昭和 49 年度から実施された厚生省食品添加物使用基準再点検の一環として、つくだ煮に許可されている SoA が製品の保存性の延長に有効か否かについて再検討したのでその結果について報告する。

## 材料および実験方法

## 1. 供試品: 多くの種類のつくだ煮のなかから比較

Table 1. Some characteristic data of tested "Tsukudani"

Kind of Tsukudani	Concentrations of SoA (%)	Degree of sugar (Bx) (%)	Direct reducing sugar (%)	Total sugar (%)	Amounts of salts (%)	Amounts of moisture (%)	pH	Salts rate (%)	Water activity (a <sub>w</sub> )
Hosokirikobu	0	57	4.62	24.4	10.3	52.5	4.63	19.6	0.790
	0.05	59	6.06	24.0	9.83	48.3	4.65	20.4	
	0.1	58	6.14	25.4	10.11	50.8	4.58	19.9	
Kobumaki	0	63	10.1	41.6	4.43	42.2	4.40	10.5	0.787
	0.05	60	10.2	39.8	4.27	43.7	4.38	9.8	
	0.1	61	8.34	39.0	3.85	42.25	4.32	9.1	
Kiriika	0	75	8.0	22.4	4.55	28.4	6.20	16.0	0.752
	0.05	73.5	7.0	22.0	4.55	28.8	6.28	15.8	
	0.1	75	8.48	23.8	5.13	25.5	5.80	20.1	
Kohnago	0	72.5	3.20	30.2	8.7	28.2	5.60	30.8	0.720
	0.05	75	3.40	30.0	8.83	25.6	5.60	34.4	
	0.1	75	3.12	30.5	8.7	26.4	5.60	32.9	

Table 2. Sensory evaluation of tested "Tsukudani" during storages at 30°

Kind of Tsukudani	Concentrations of SoA (%)	Result of sensory test and pH*1								
		Storage period (weeks)								
		0	1	2	3	4	5	6	7	8
Hosokirikobu	0	-(5.1)	-(5.0)	±(5.0)	##(5.0)	##(5.0)	##(4.8)	cs	cs	cs
	0.05	-(5.0)	-(5.0)	-(5.0)	-(5.0)	±(4.9)	±(4.9)	cs	cs	cs
	0.1	-(5.1)	-(5.0)	-(5.0)	-(5.0)	-(5.0)	-(5.0)	-(5.0)	-(5.0)	-(5.0)
Kobumaki	0	-(4.9)	-(5.0)	-(5.0)	-(5.0)	-(4.9)	±(4.8)	cs	cs	cs
	0.05	-(4.9)	-(5.0)	-(4.9)	-(4.9)	-(5.0)	±(4.8)	cs	cs	cs
	0.1	-(4.9)	-(5.0)	-(5.0)	-(5.0)	-(5.0)	-(5.0)	-(5.0)	-(5.0)	-(5.0)
Kiriika	0	-(6.5)	-(6.5)	-(6.6)	-(6.5)	-(6.4)	-(6.3)	-(6.3)	ND	-(6.3)
	0.05	-(6.6)	-(6.5)	-(6.5)	-(6.5)	-(6.5)	-(6.3)	-(6.3)	ND	-(6.2)
	0.1	-(6.6)	-(6.5)	-(6.6)	-(6.5)	-(6.3)	-(6.3)	-(6.3)	ND	-(6.3)
Kohnago	0	-(6.2)	-(6.1)	-(6.2)	-(6.1)	-(6.0)	-(6.1)	-(6.1)	ND	-(6.0)
	0.05	-(6.2)	-(6.1)	-(6.1)	-(6.1)	-(6.0)	-(6.0)	-(6.0)	ND	-(6.0)
	0.1	-(6.2)	-(6.0)	-(6.1)	-(6.0)	-(6.0)	-(6.0)	-(6.0)	ND	-(6.0)

\*1 Symbols, - : non-spoilage, ±~## : degree of spoilage, cs : complete spoilage, and ND : no data. Each pH value indicates in parentheses. Bold symbols indicate spoilages.

的変敗性の高いもの、タンパク成分の高いもの、塩分濃度の高いものおよび低いもの等の諸条件を考慮して4種類の品目を選定、供試品とした。すなわち、(1)細切昆布、(2)昆布巻、(3)切りいか、(4)小女子などである。これら供試品の一般的性状をTable 1に示す。

2. 供試品の製造とSoAの添加量：供試品は東京都内のつくだ煮メーカーの協力を得て市販品の製法に

準じて製造されたものである。SoAの添加は製品1kgに対して法定許可量、すなわち1g添加(0.1%)、許可量の1/2量添加(0.05%)および無添加の対照(0%)である。それぞれを2分し、一方はそのまま(非接種試験区)、他方にはそれぞれ後述する方法で微生物を接種(接種試験区)した。

Table 3. Results of microbiological

Kind of Tsukudani	Concentrations of SoA (%)	Storage period (weeks)											
		0				1				2			
		SPC	Lactic acid bacteria	Coliforms	Molds & yeasts	SPC	Lactic acid bacteria	Coliforms	Molds & yeasts	SPC	Lactic acid bacteria	Coliforms	Molds & yeasts
Hosokirikobu	0	+	+	-	+	4.0	+	-	1.5	+	+	-	500
	0.05	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
	0.1	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
	0	4.5	+	-	+	4.0	+	-	+	6.0	+	-	+
Kobumaki	0.05	3.5	+	-	+	8.0	+	-	+	4.0	+	-	+
	0.1	2.5	+	-	+	8.5	+	-	+	2.5	+	-	+
	0	4.5	+	-	+	8.0	+	-	+	+	+	-	+
Kiriika	0.05	4.0	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
	0.1	4.5	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
	0	9.5	+	-	+	11.0	4.0	-	+	5.6	+	-	+
Kohnago	0.05	7.0	+	-	+	7.5	+	-	+	4.1	+	-	+
	0.1	9.9	+	-	+	5.0	+	-	+	+	+	-	+

\*1 SPC, standard plate counts. All figures of bacterial and fungal counts indicate under the omission of  $\times 10^2/g$ . Symbols; + of SPC and Lactic acid bacteria : counts are less than 300/g; +

Table 4-1. Successive changes of bacterial counts in "Tsukudani" inoculated artificially

Kind of Tsukudani	Concentrations of SoA (%)	Storage			
		Inoculated with			
		0	3	7	14
Hosokirikobu	0	$5.0 \times 10^4$	$1.5 \times 10^3$	$4.0 \times 10^2$	+
	0.05	$7.5 \times 10^4$	$3.0 \times 10^2$	+	+
	0.1	$1.5 \times 10^4$	$4.5 \times 10^2$	+	+
Kobumaki	0	$2.5 \times 10^4$	+	+	+
	0.05	$7.5 \times 10^4$	+	+	+
	0.1	$1.0 \times 10^4$	+	+	+
Kiriika	0	$1.0 \times 10^4$	$1.0 \times 10^3$	+	+
	0.05	$7.0 \times 10^3$	$7.5 \times 10$	+	+
	0.1	$5.4 \times 10^4$	+	+	+
Kohnago	0	$2.1 \times 10^4$	$2.7 \times 10^3$	+	+
	0.05	$1.0 \times 10^4$	$4.1 \times 10^2$	+	+
	0.1	$1.5 \times 10^4$	+	+	+

\*1 Symbol, + : bacterial counts are less than 300/g. All bacterial counts indicate per g of samples.

examination of "Tsukudani" at 30°

and microbiological examination\*1

3				4			5			6			7			8			
SPC	Lactic acid bacteria	Coliforms	Molds & yeasts	SPC	Lactic acid bacteria	Coliforms	Mold & yeasts	SPC	Lactic acid bacteria	Coliforms	Molds & yeasts	SPC	Lactic acid bacteria	Coliforms	Molds & yeasts	SPC	Lactic acid bacteria	Coliforms	Molds & yeasts
+	+	-	1000<	+	+	-	1000<	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs
+	+	-	+	+	+	-	40	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs
+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
4.5	+	-	+	4.0	+	-	+	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs
3.0	+	-	+	3.5	+	-	+	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs
6.0	+	-	+	4.0	+	-	+	3.0	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
+	+	-	+	+	+	-	+	4.0	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
+	+	-	+	+	+	-	+	4.0	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
+	+	-	+	+	+	-	+	2.2	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
+	+	-	+	8.1	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+

of Molds & yeasts : counts are less than 10/g; and cs : complete spoilage. Bold figures and symbols indicate spoilages.

with *Bacillus subtilis* or *Staphylococcus aureus* and stored at 30°

period (days)\*1

<i>B. subtilis</i>		Inoculated with <i>S. aureus</i>					
21	28	0	3	7	14	21	28
+	+	1.1×10 <sup>4</sup>	+	+	+	+	+
+	+	6.3×10 <sup>4</sup>	+	+	+	+	+
+	+	2.1×10 <sup>4</sup>	+	+	+	+	+
+	+	2.2×10 <sup>4</sup>	+	+	+	+	+
+	+	6.8×10 <sup>3</sup>	9.1×10 <sup>2</sup>	+	+	+	+
+	+	7.1×10 <sup>4</sup>	+	+	+	+	+
+	+	7.5×10 <sup>3</sup>	4.6×10 <sup>2</sup>	+	+	+	+
+	+	8.5×10 <sup>3</sup>	9.1×10 <sup>2</sup>	+	+	+	+
+	+	7.1×10 <sup>4</sup>	8.6×10 <sup>2</sup>	+	+	+	+
+	+	4.4×10 <sup>4</sup>	4.1×10 <sup>3</sup>	1.0×10 <sup>3</sup>	+	+	+
+	+	8.5×10 <sup>4</sup>	1.0×10 <sup>3</sup>	9.0×10 <sup>3</sup>	+	+	+
+	+	7.1×10 <sup>4</sup>	7.5×10 <sup>3</sup>	7.5×10 <sup>2</sup>	+	+	+

Table 4-2. Successive changes of sensory evaluation in "Tsukudani"

Kind of Tsukudani	Concentrations of SoA (%)	Results Storage period				
		<i>A. repens</i>				
		1	2	3	4	5
Hosokirikobu	0	—	##	##	##	##
	0.05	—	—	—	##	##
	0.1	—	—	—	—	—
Kobumaki	0	—	##	##	##	##
	0.05	—	—	—	—	—
	0.1	—	—	—	—	—
Kiriika	0	—	—	—	—	—
	0.05	—	—	—	—	—
	0.1	—	—	—	—	—
Kohnago	0	—	—	—	—	—
	0.05	—	—	—	—	—
	0.1	—	—	—	—	—

\*1 Symbols, — : non-spoilage, ±~## : degree of spoilage. Bold symbols indicated spoilages.

### 3. 保存試験

#### 3-1. 非接種試験区

各濃度に SoA を添加した供試品を2分し、一部はガラスシャーレに50~100gを入れたものをビニール袋に入れ輪ゴムで封じ、常温流通を想定して30°ふ卵器に、また低温流通を想定して10°の冷蔵庫にそれぞれ入れ、2ヵ月間の保存試験をおこなった。

#### 3-2. 接種試験区

2分したもう一方の供試品に人為的に細菌およびカビ・酵母すなわち、*Bacillus subtilis* PCI-219, *Staphylococcus aureus* 209P, *Aspergillus repens* NHL 5015, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, *Saccharomyces rouxii*, *Debaryomyces hansenii* 標準株と市販つくだ煮由来分離株, *Debaryomyces* sp. を接種し、それぞれガラスシャーレに50~100gを入れたものをビニール袋に入れ輪ゴムで封じ、30°, 5週間保存試験を実施した。各接種菌量は、細菌の場合トリプトソイブイオン培地“榮研”, 24時間培養物の3mlを、またカビ・酵母の場合はポテト・デキストロース寒天培地“榮研”斜面培養の1斜面量を10mlの滅菌生理食塩水に懸濁し、その3mlを用いた。

両試験区とも保存試験中1週間ごとに取出し、非接種試験区では官能検査(異臭、カビの発生の有無、pHの測定)と微生物学的検査(一般生菌数、乳酸菌数、大腸菌群、カビ・酵母の測定)を、一方、接種試験区では、細菌を接種したものでは細菌数の消長を、

カビ・酵母を接種したものでは官能検査(異臭、カビ・酵母の発生の有無)を実施した。

#### 4. 水分活性( $a_w$ )の測定

$a_w$  はコンウェイの微量拡散ユニットを用い、Landrockのグラフ挿入法<sup>9)</sup>により測定した。標準試薬として $K_2Cr_2O_7$ ,  $KNO_3$ ,  $KCl$ ,  $KBr$ ,  $NaCl$ の5試薬を用いた。

#### 5. 分離菌株の同定

菌数測定をした平板から各検体について3~5個のコロニーを無作為に釣菌し、純培養したあと常法に従い菌株を同定した。

### 結果および考察

#### I. 保存試験の結果

保存試験の結果をTable 2~4に示す。

##### I-1. 非接種試験区の結果

###### (A) 30°保存の場合

###### 1) 細切昆布つくだ煮

Table 2, 3に示すように、SoA 0%群では保存1週後半から酸臭が強くなり酵母数が $10^4$ オーダーに達し商品価値が失われた。0.05%群では4週目頃から酸臭が強くなり風味が損われた。一方、0.1%群では2ヵ月間の保存期間でも官能的にも、微生物学的にも異常が認められず保存性が保たれた。

###### 2) 昆布巻つくだ煮

SoA 0%, 0.05%群では4週後半から官能的に酸

inoculated artificially with fungi and stored at 30°

of sensory test  
(weeks) and inoculated with :

<i>S. cerevisiae</i>					<i>S. rouxii</i>					<i>D. hansenii</i>					<i>Debaryomyces</i> sp.				
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
-	-	-	-	+	-	##	##	##	##	-	##	##	##	##	##	##	##	##	##
-	-	-	-	-	-	-	±	+	##	-	-	-	-	+	+	##	##	##	##
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
-	-	-	-	+	+	##	##	##	##	±	##	##	##	##	##	##	##	##	##
-	-	-	-	-	-	-	+	+	##	-	-	-	±	+	-	-	-	-	+
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

臭が認められ、5週目では完全に可食性が失われた。それに対して0.1%群では2カ月間の保存期間でも異常を示さず保存性を有した。

3) 切りいかつくだ煮

2カ月間の保存試験中、0.1%、0.05%群はもちろんのこと0%群でも全く異常を示さず可食性を保っていた。

4) 小女子つくだ煮

切りいかつくだ煮の場合と同様0%群のものでも2カ月間の保存期間中風味を損わず可食性を保っていた。

(B) 10° 保存の場合

10°で保存した場合は、30°保存で高い変敗性を示した0%の細切昆布、昆布巻つくだ煮でも2カ月間の保存期間で全く異常が認められず保存性を有していた。

I-2. 接種試験区の結果

1) 細菌を接種した場合

Table 4-1 に示すように10<sup>4</sup>オーダーの菌数を接種し保存中の菌数の消長を調べたところ、SoAの添加の有無に関係なく接種菌は増殖せず減少の傾向をたどった。

2) カビ・酵母を接種した場合

Table 4-2 に示すように、接種菌種によって供試品の保存性に相違が認められた。すなわち、*A. repens*の場合では細切昆布や昆布巻の0%群では2週目で、

また細切昆布の0.05%群では4週目に、いずれも異臭とカビの発生が確認された。一方、切りいかや小女子では0%群でも異常が認められなかった。*S. rouxii*の場合では、細切昆布、昆布巻つくだ煮の0%群と0.05%群では1~3週目で酸臭を生じ異常を認めたのに対して、0.1%群では5週間の保存期間中では異常が認められなかった。切りいかつくだ煮では0%群が3週目から酸臭を生じたが、0.05%や1%群では異常を示さなかった。*D. hansenii*や分離 *Debaryomyces* sp. 株の場合では *S. rouxii*の場合と同様の成績を示した。*S. cerevisiae*の場合では細切昆布、昆布巻つくだ煮の0%群では4週後半から酸臭を生じたが、0.05%、0.1%群やその他の製品の0%群でも5週間の保存期間では異常を示さなかった。以上のように濃厚に菌接種をおこなってもSoAの0.1%添加したもので高い保存性を有することが確認された。

II. つくだ煮の水分活性 (aw)

つくだ煮の保存性とawとの関係を知るため供試品および市販品についてawを調べた結果をTable 5に示す。

供試した4種のつくだ煮のaw値(Table 1)は小女子では0.720、切りいかでは0.750、昆布巻では0.787、細切昆布では0.790と上述の保存試験で保存性の高かった小女子のawは低く保存性とaw値との間に相関性があるような結果が得られたので、市販品30種についてaw値を調べたところTable 5に示

Table 5. Water activity ( $a_w$ ) of retailed "Tsukudani"

Kind of Tsukudani	$a_w$	Moisture contents (%)	Food additives contained* <sup>1</sup>	Kind of Tsukudani	$a_w$	Moisture contents (%)	Food additives contained* <sup>1</sup>
Hosokirikobu	0.75		?	Surume-2	0.76		?
Shiokobu	0.71		?	Kiriika	0.80		—
Amakuchikobu-1	0.96	56.9	+	Shirasu-1	0.81		?
Amakuchikobu-2	0.92	58.5	+	Shirasu-2	0.84		—
Kobumaki	0.95	50.4	+	Kohnago-1	0.72		—
Tarako kobu-1	0.86		?	Kohnago-2	0.75	25.6	+
Tarako kobu-2	0.81		?	Kakuni-1	0.74		+
Ami-1	0.75		?	Kakuni-2	0.71	39.7	?
Ami-2	0.75		?	Chazuke	0.74		+
Ami-3	0.70		?	Hanakatsuo	0.81	30.4	?
Ami-4	0.74		?	Kidenbu	0.73	18.8	?
Namaami-1	0.70		+	Noritsukudani	0.92	71.3	?
Namaami-2	0.75		+	Asari-1	0.79		—
Surume-1	0.79		?	Asari-2	0.79	36.6	+

\*<sup>1</sup> Symbols: +, added, —, not added, and ?, uncertain.

Table 6. Floral changes of micro-organisms in tested "Tsukudani" during storages at 30°

Group of micro-organisms	Kind of Tsukudani, storage period and SoA concentrations* <sup>1</sup>											
	Hosokirikobu			Kobumaki			Kiriika			Kohnago		
	Before storage	After 3 weeks storage		Before storage	After 3 weeks storage		Before storage	After 3 weeks storage		Before storage	After 3 weeks storage	
	0%	0%	0.1%	0%	0%	0.1%	0%	0%	0.1%	0%	0%	0.1%
<i>Bacillus</i>	20-30	20-30	20-30	20-30	20-30	20-30	20-30	20-40	20-40	20-40	20-40	20-40
<i>Streptococcus</i>	20-30	10-20	20-40	40-50	40-60	40-60	30-40	20-30	20-40	10-20	10-20	20-30
<i>Lactobacillus</i>	10-20	0	0	5-10	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus</i>	<5	<5	5-10	<5	<5	5-10	5-10	5-10	5-10	10-20	10-20	10-20
Coryneforms	0	<5	5-10	<5	0	5-10	5-10	5-10	5-10	5-10	5-10	5-10
<i>Sarcina</i>	0	0	0	0	0	0	5-10	<5	0	5-10	5-10	<5
Yeasts	20-30	30-40	0	0	10-20	0	0	0	0	0	0	0
Others	0	0	<5	<5	0	0	0	0	0	0	0	0

\*<sup>1</sup> Figure indicates a percentage of each group of micro-organisms for total micro-organisms.

すやうに塩昆布のような塩分の高いものは  $a_w$  は 0.71, また甘口昆布の  $a_w$  は 0.92~0.96, のりつくだ煮の  $a_w$  は 0.92 と, それぞれ製品の性状によって異っていたが, 後藤ら<sup>9)</sup>の報告のように,  $a_w$  が 0.70 以上では  $a_w$  の低下とともに保存性は直線的に増加するという成績から, つくだ煮の保存性を予測する上で  $a_w$  測定は有意義と思われる。

### III. 供試つくだ煮の細菌叢

供試品から分離した細菌を同定し SoA 添加の影響による細菌叢を検討した結果を Table 6 に示す。

検出菌は全てがグラム陽性菌でその約 80% 以上が *Bacillus* と *Streptococcus* で占められていた。 *Bacillus* と同定された菌株のうちの約 80% 以上は *B. subtilis* と *B. licheniformis* であり, その他は *B. polymyxa*, *B. cereus*, *B. firmus*, *B. circulans* 等であった。こ

Table 7. Inhibitory effects of sorbic acid (SoA) on the growth of bacterial isolates from tested "Tsukudani"

Group of micro-organisms	Numbers of tested isolates	Minimum inhibitory concentration of SoA at:	
		pH 5.5	pH 7.2
<i>Bacillus</i> spp.			
<i>B. subtilis</i>	31	1 : 500	1 : 125<
<i>B. licheniformis</i>	29	1 : 250	1 : 125<
<i>B. polymyxa</i>	8	1 : 2000-1000	1 : 125<
<i>B. cereus</i>	6	1 : 1000	1 : 125<
<i>B. firmus</i>	2	1 : 500	1 : 125<
<i>B. circulans</i>	2	1 : 250-125	1 : 125<
<i>Streptococcus</i> spp.	50	1 : 125<	1 : 125<
<i>Lactobacillus</i> spp.	17	1 : 125<	1 : 125<
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	13	1 : 125<	1 : 125<
Coryneforms	4	1 : 125<	1 : 125<
<i>Sarcina</i> spp.	3	1 : 500	1 : 125<
Total	165		

れら菌種の製品中の分布はどの製品でも変らなかった。なお昆布製品から検出された酵母は *Debaryomyces* spp. と同定された。

分離株のうちの細菌の代表株について試験管法で SoA の発育阻止効果を検討したところ、Table 7 に示すように SoA が高い抗菌力<sup>10,11)</sup>を発揮する酸性域の pH 5.5 においても *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Coryneforms*, *Sarcina* に対しては 0.1% 濃度の 4~8 倍でも発育阻止効果が認められなかった。*Bacillus* では菌種によって発育阻止濃度が異なり *B. polymyxa*, *B. cereus* に対しては 0.1% 濃度で阻止効果を示したが、*B. subtilis*, *B. licheniformis* に対しては 0.1% 濃度の 2~4 倍以上でなければ阻止効果が認められなかった。この点は SoA 0.1% 添加されたものからこの種の菌株の検出率が高かったこととよく一致していた。

### 要 約

つくだ煮の保存性に対する SoA の有効性を市販品の製法に準じて製造された 4 品目 (細切昆布, 昆布巻, 切りいか, 小女子) に SoA の現行許可量 (0.1%), 許可量の 1/2 量 (0.05%) をそれぞれ添加したものおよび無添加のもの (0%) を試作し、常温流通を想定して 30° に保存したものと低温流通を想定して 10° 保存においたものについてその保存性を約 2 カ月間にわたり検討した。このうち、これら供試品に人為的に細菌, カビ・酵母を接種したものにあっては菌数の消長

およびカビ・酵母の発生の有無について、更に水分活性, 細菌濃について検討した。その結果つぎのような成績が得られた。

1. 常温保存 (30°) においては、SoA 無添加のものおよび 1/2 量添加のものにあっては製品の種類および汚染菌種とくにカビ・酵母の菌数の多少によって保存性は大きく左右され保存日数に長短が認められ一定した結果が得られなかったのに対し、現行許可量 (0.1%) では何れの製品においても約 2 カ月間の保存期間で異常が認められず SoA の有効性が確認された。
2. 低温保存 (10°) においては、無添加群 (0%) でも約 2 カ月間の保存性が認められたが、つくだ煮の流通の現状から低温保存は現実的ではないので、SoA の現行許可量 (0.1%) の添加はやむを得ないものと思われる。
3. つくだ煮の  $a_w$  は 0.71~0.95 で製品によって区々であったが、つくだ煮の保存性を予測するのに  $a_w$  の測定は有効な一手段と思われる。

4. 供試つくだ煮から分離された菌種の大部分は *Bacillus*, *Streptococcus* で占められ、ついで *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Coryneforms*, *Sarcina* などでいずれもグラム陽性菌であった。

終りに保存料添加試料の製造にあたり御協力いただいた全国調理食品工業協同組合 (瀬戸 貞氏) および真菌・酵母の試験菌株の分与を賜った東京農大小崎教授、当部真菌室宇田川室長、坂部主任研究官、また酵母の同定をお願いした小島技官に対して感謝いたします。

- す.
- 文 献
- 1) 露木英男, 瀬戸 貞: つくだ煮の化学と製造法, p.260 (1969), 光琳書院
  - 2) 戸谷哲雄, 前重静彦: 加工食品と食品衛生, p. 283 (1972), 新思湖社
  - 3) 厚生省編: 食品衛生関係法規集, 中央法規
  - 4) 梅村生男ら: *New Food Industry*, 6, (3), 70 (1964)
  - 5) 戸谷哲雄ら: *Japan Food Sciences*, 3 (3), 69 (1964)
  - 6) 戸谷哲雄ら: 食品工誌, 13 (4), 125 (1966)
  - 7) 工藤日出男ら: 愛知県食工試報, No. 5, 47 (1964)
  - 8) A.H. Landrock *et al.*: *Food Technol.*, 5, 332 (1951)
  - 9) 後藤康夫ら: 食品衛生研究, 27, 239 (1977)
  - 10) 若井英男ら: *New Food Industry*, 7, 48 (1965)
  - 11) 若井英男ら: *New Food Industry*, 7, 75 (1965)

### 味噌の保存性に対するソルビン酸の有効性について

河西 勉・鈴木 昭・小沼博隆・高山澄江・水島久美子

#### Effects of Sorbic Acid (Food Additive) on Preservation of "Miso"

Tsutomu KAWANISHI, Akira SUZUKI, Hirota KAWANISHI, Sumie TAKAYAMA and Kumiko MIZUSHIMA

The preservative efficiency of Sorbic acid (SoA) was re-evaluated by microbiological tests for two kinds of "Miso", viz. light yellow type and koji type. The "Miso" is a Japanese food made by fermentation of barley or rice and soy-beans. The tests were generally carried out in polyethylene packs of the "Miso" using a series of three concentrations of SoA, 0, 0.05, and 0.1%, under a preservation for 60 days at 30°, 20° and 10°. Similarly, the efficiency of ethyl alcohol (EtOH) which is recently used as a preservative instead of SoA in the "Miso" production was also evaluated.

In the case of the preservation at 10°, all samples of the light yellow type did not show any sign of spoilage irrespective of the addition of the preservatives. Although the efficiency was not so conspicuous, occurrence of swelling in the koji type package was prevented satisfactorily in the same condition (see Table 2). Therefore, the following results were generally obtained from the storage tests at 30° and 20°.

In the packed samples at 30°, the addition of SoA at the level of 0.05-0.1% or EtOH at the level of more than 2% into the light yellow type was effective for extension of its storage life up to about 7 days. In the same condition, the addition of SoA at the same level into the koji type was also effective for the extension up to about 3 days.

In the packed samples at 20°, the addition of SoA or EtOH into the light yellow type was extremely effective even at 30 days or more. Similarly, the addition of SoA or EtOH at the level of 3% into the koji type was also resulted the extension of its storage life up to 8 days.

On the other hand, when the preservatives did not added, all packages of "Miso" were swollen within 1-5 days (in the light yellow type) or 1-2 days (in the koji type) and then completely spoiled due to the growth of microorganisms. The results on unpacked samples of both types were summarized in Table 3.

From the above results, it may be supposed that the extension of its storage life enough for the preservation in a practical circulation can be accomplished by the addition of SoA at the level of allowable concentration (0.1%) or EtOH at the level of 2-3% into the "Miso".

(Received May 31, 1978)

#### ま え が き

味噌は比較的高濃度に食塩を含有するために腐敗細菌

菌やその他の病原菌による被害を受けず長期間保存できる食品であるが、夏季のような品温が上ると、いわゆる“湧き現象”がみられ、見かけ上商品価値を損う

Table 1. Preservative efficiency of sorbic acid and ethyl alcohol on packed, light yellow type "Miso"

Temperature of storage	Kind of food preservative and its concentration (%)	Preservation test*1																
		Storage periods (days)																
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	15	20	25	30	45	60	
30°	SoA 0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	##	cs	cs	cs	cs	cs	cs	
		-	-	-	-	-	-	-	-	+	##	cs	cs	cs	cs	cs	cs	
	EtOH	0	+	##	cs													
		3	-	-	-	-	-	-	-	-	##	cs						
		2	-	-	-	-	-	-	-	-	##	cs						
		1	-	-	+	+	+	##	cs									
		0	+	##	cs													
20°	SoA 0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	##	cs
	EtOH	0	-	-	-	-	-	+	##	##	cs							
		3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		0	-	-	-	-	-	+	##	##	cs							

\*1 Symbols, - : non-swelling, + ~ ## : degree of swelling, and cs : completely spoilage. Bold symbols indicate spoilages. In tests at 10°, results of all cases are negative.

ものである。この湧きは味噌の熟成の相違によって異なり長期熟成型のものには少なく、比較的短期熟成型のものに多いといわれている<sup>1)</sup>。

味噌の湧き防止としては現在、加熱殺菌や保存料添加などの処理がなされている。保存料としては、古くはデヒドロ酢酸、もしくはその Na 塩が製品 1 kg 当り 0.2 g 以下の範囲で許可されていたが、この許可量では効果がなかったことから、現在はソルビン酸カリウム (SoA)、製品 1 kg に対して 1 g 以下 (ソルビン酸として) が使用許可されている<sup>2)</sup>。また、その保存効果は、すでに多くの報告によって確認されているが<sup>1)3-5)</sup>、近年、こうした食品添加物の使用に対して、きびしい批判が向けられてきた。このような背景をふまえて昭和 49 年度から厚生省により食品添加物使用基準の再点検が計画され、その一環として味噌に使用許可されている SoA が製品の保存性の延長に有効か否かについて再検討した。また同時に、近年 SoA に代ってアルコール (EtOH) の添加が広く用いられているので、その効果についても合わせて検討したので、それらの結果について報告する。

### 材料および実験方法

1. 供試品と SoA および EtOH の添加濃度：供試味噌は都内某味噌メーカーの協力を得て市販品と同

じ製法で製造された淡味噌とこうじ味噌で、それぞれ SoA 無添加 (0% 群)、0.5 g/kg 添加 (0.05% 群)、1 g/kg 添加 (0.1% 群) のものと、EtOH の無添加 (0% 群)、10 ml/kg 添加 (1% 群)、20 ml/kg 添加 (2% 群)、30 ml/kg 添加 (3% 群) のものを調製した。それらを 100~150 g ずつビニール袋に袋詰めし、3 袋を 1 群として試験区を設定した。

2. 方法：保存性については各濃度添加の 3 袋 1 群を、常温流通を想定して 20°, 30°, また低温流通を想定して 10° のふ卵器に入れ、2 カ月間保存試験を行なった。また、発カビ性を検討するために、各濃度添加の検体 50 g ずつをガラスシャーレに入れ、約 3~4 hr シャーレの蓋をとり室内で開放したのち、蓋を閉めたものを上記の各温度に保存し、カビの発生の有無を 30 日間にわたり観察した。保存中の各検体の官能試験および pH、細菌数および酵母数の測定、分離菌株の同定などは常法に従って行なった。また、水分活性量の測定は前報<sup>6)</sup>に準じた。

## 結 果

### I. 袋詰品の保存試験

#### (A) 淡味噌について

淡味噌の場合の保存試験結果を Table 1 に示す。30° における保存性では、SoA 0% 群の場合、最大

Table 2. Preservative efficiency of sorbic acid and ethyl alcohol on packed, Koji type "Miso"

Temperature of storage	Kind of food preservative and its concentration (%)	Preservation test*1															
		Storage periods (days)															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	15	20	25	30	45	60
30°	SoA	0.1	-	+	+	##	cs										
		0.05	-	-	+	##	cs										
		0	+	##	cs												
	EtOH	3	-	-	+	##	cs										
		2	-	-	+	##	cs										
		1	-	-	+	##	cs										
		0	+	##	cs												
20°	SoA	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	##	cs	cs	cs	cs	
		0.05	-	-	-	-	-	-	-	-	+	##	cs	cs	cs	cs	
		0	-	-	##	cs											
	EtOH	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	##	cs	cs	cs	cs	cs
		2	-	-	-	-	##	cs									
		1	-	-	-	-	##	cs									
		0	-	-	##	cs											
10°	SoA	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	##	cs	cs	cs	
		0.05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	##	cs	cs	cs	
		0	-	-	-	-	-	##	cs								
	EtOH	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
		2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
		1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
		0	-	-	-	-	-	##	cs								

\*1 Symbols, - : non-swelling, +~## : degree of swelling, and cs : completely spoilage. Bold symbols indicate spoilages.

限1日で膨脹が著しく、シール漏れが起るのに対して、0.05%、0.1% 群では最大限9日まで、湧きによる膨脹が起らず、保存性が延長された。

20° 保存においては、SoA 0% 群の場合7日目ごろから膨脹による異常が認められたのに対して、0.05% 群では30日前後まで、0.1% 群では60日間の試験期間中でも湧きによる膨脹が認められなかった。しかしながら、0.05% および0.1% 群においても保存後半ごろより製品の表面が褐変化するようになり、見かけ上の品質が悪化した。

10° 保存では、SoA 0.05%、0.1% 群はもちろんのこと0% 群においても試験期間の60日間では湧きも、製品表面の褐変も認められず長期の保存性が可能であった。

一方、EtOH 添加の場合、30° 保存、2% 以上添加したものにあっては6日以上、20° 保存、1% 以上添加したものにあっては60日以上も保存性が延長し、それぞれ無添加のものが1日(30° 保存)、7日前後

(20° 保存) であったのに対し顕著に保存性延長効果がみられた。10° 保存では無添加群でも60日間異常がみられなかった。

#### (B) こうじ味噌について

こうじ味噌の場合の保存試験結果を Table 2 に示す。

30° 保存では、SoA 0% 群で最大限1日の保存性、0.05%、0.1% 群でも最大限3日前後の保存性に止まった。20° 保存では SoA 0% 群の場合2日前後で膨脹が認められたのに対して、0.05%、0.1% 群では7~10日前後まで保存性が延長された。さらに、10° 保存では SoA 0% 群で5日前後しか保存性がないのに、0.05%、0.1% 群では15日前後まで保存性が延長された。

なお、EtOH 添加の場合では1% 以上添加したとき、SoA 添加の場合と同様保存性が延長され、保存性延長効果のあることが認められた。

Table 3. Sensory evaluation of unpacked "Miso" during storages at 30° and 20°

Kind of "Miso"	Temperature of storage	Food preservative and its concentration (%)		Result of sensory test*1																
				Storage periods (days)																
				0	3	5	7	10	13	15	17	20	23	25	27	30				
Light yellow type	30°	SoA	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			0.05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		EtOH	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Not added	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	20°	SoA	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			0.05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		EtOH	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Not added	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Koji type	30°	SoA	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			0.05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		EtOH	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	≡
			2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	≡
			1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	≡
	Not added	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	
	20°	SoA	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			0.05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		EtOH	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	≡
			2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	≡
1			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	≡	
Not added	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	≡	≡	≡	≡		

\*1 Symbols, - : non-spoilage, -, + : indicates an occurrence of browning on sample surface, and ≡ : indicates an occurrence of both browning and yeast-like colonies on sample surface. All results on storage at 10° were negative.

II. 開放試験区における保存試験

袋詰品の保存試験とは別に一般家庭で使用される状態を想定してシャーレに入れたものを室内で開放したあと所定の温度で保存し、検体の表面についてカビ・酵母の発生の有無を観察し、保存料添加の効果を検討した。その結果を Table 3 に示す。

すなわち、SoA 無添加群の淡味噌の場合では 30° 保存においても 30 日間の観察期間ではカビ・酵母の発色が認められなかったが、こうじ味噌の場合では 30° および 20° 保存の一部の検体の中に 20 日前後から白色、酵母様コロニーの発色が認められた。それに対して SoA 添加群 (0.05%, 0.1%) では 30 日間の観察期間には、このような現象が二種類の味噌ともに認められなかった。

一方、EtOH 添加群の場合では、30° および 20° 保存のこうじ味噌に 30 日目前後に一部の検体の表面に白色、酵母様コロニーの発色が認められたが、淡味噌では認められなかった。なお、10° での保存では両方の味噌とも無添加群においてもこのような現象が認められなかった。

III. 保存試験中の pH, 微生物数の変化

供試製品の保存試験前における主な性状を Table 4 に示す。

各温度で保存した袋詰品について、保存後 10 日目までの製品の pH と細菌および酵母数を測定し、保存料添加の影響を検討した。結果の一部を Table 5, 6 に示す。

すなわち、淡味噌の場合、pH は保存料の添加の有

Table 4. pH, microbial counts, water activity and moisture contents of tested "Miso" before storage

Kind of "Miso"	Food preservative and its concentration (%)	pH	SPC*1 (per g)	Yeast counts (per g)	Water activity (aw)	Moisture contents (%)
Light yellow type	SoA 0.1	5.4	$9.0 \times 10^4$	$1.5 \times 10^2$	0.795	51.6
	0.05	5.4	$2.0 \times 10^5$	$2.5 \times 10^2$		
	EtOH 3	5.2	$2.0 \times 10^5$	$3.0 \times 10^2$	0.811	
	2	5.3	$1.7 \times 10^5$	<100		
	1	5.4	$1.2 \times 10^5$	$5.5 \times 10^3$		
	Not added	5.4	$2.6 \times 10^5$	$1.5 \times 10^3$		
Koji type	SoA 0.1	5.3	$5.5 \times 10^4$	$1.6 \times 10^3$	0.899	53.0
	0.05	5.3	$4.8 \times 10^4$	$1.8 \times 10^3$		
	EtOH 3	5.3	$2.4 \times 10^4$	$3.1 \times 10^3$	0.910	
	2	5.3	$3.9 \times 10^4$	$3.5 \times 10^3$		
	1	5.3	$4.9 \times 10^4$	$2.9 \times 10^3$		
	Not added	5.3	$5.8 \times 10^4$	$1.0 \times 10^3$		

\*1 SPC : standard plate counts.

無、保存温度に関係なく、ほとんど変化がみられなかった。また、細菌数では製造直後の  $10^{4-5}$  が常温保存 (20°, 30°) 10 日でも増加がみられなかった。検出された菌種は大部分がグラム陽性の好気性芽胞桿菌の *Bacillus* 属であった。酵母数は、一部、無添加群の 20°, 30° 保存のものに多少の菌数の増加がみられたのに対し、添加群では減少の傾向がみられ保存料添加の影響であると思われた。

一方、こうじ味噌の場合、pH、細菌数とも淡味噌と同様、ほとんど変化がみられなかった。酵母数についてみると、官能的に膨脹を示したにもかかわらず、菌数の増加が少なかった。しかし、淡味噌に比べ製造直後の菌数が多かった。

#### 考察および結論

味噌は原料配合の違いや醸造の長短によって多くの種類のものが製造されており、それぞれ含有する食塩量も約 4~17% と広い巾になっている<sup>2)</sup>。このため、味噌は比較的長期の保存性を有する食品であるが、ときに夏季などのように品温が上がった場合に“湧き”および膨脹が生じ商品価値を損うことがある。そのため現在使用されている SoA やアルコールなどの保存効果を今回再検討した。

1. 袋詰品についての常温 (20°, 30°) における保存性は淡味噌についてみると、無添加では 1~5 日程度の保存が期待されるにすぎないが、0.05~0.1% の

SoA 添加によって 7~30 日間も膨脹を起こさず安全な保存が可能であると思われる。一方、こうじ味噌についてみると無添加では 1~2 日しか正常を保持できないのに比べ、0.05~0.1% 添加により 2~3 倍保存性が延長され、3~8 日間正常に保存することが可能となるであろう。

保存料の添加を軽減する方法の一つとして低温 (10°) における保存性を検討した結果では、無添加でも常温で SoA を添加した場合以上に異常を示さず保存性がきわめて良くなることが明らかにされた。このことは、味噌の腐敗微生物の増殖を抑える上で低温保持がいかにも有効であるかを物語るものであるが、味噌の低温流通は現状からみて必ずしも実際的に適用できる方法とは思われない。

はじめに述べたように、“湧き”および膨脹発生の難易は味噌の熟成度によって異なり、長期熟成型のもの (淡味噌) が保存性が良く、短期熟成型のもの (こうじ味噌) が保存性が悪いことは、製品中の酵母の活性度および菌数の多少によるものと思われる。いずれにせよ、常温 (20°, 30°) での保存性に対する SoA の効果が、味噌の醸造の熟成度によって異なるとはいえ、無添加に比べて著しく保存性が延長されるということから、現状では味噌に現行許可量 (1g/kg) の SoA 添加が止むをえないものと思われる。

2. 近年、SoA の代わりに 2~3% のアルコール添加が広く用いられている。常温 (20°, 30°) の淡味噌で

Table 5. Change of microbial counts of packed, light yellow type "Miso" during storage

Food preservative and its concentration (%)	Bacterial counts per g							Yeast counts per g													
	Storage period (days)							Storage period (days)													
	0	3	5	7	10	0	3	5	7	10											
Storage at 30°	SoA	0.1	9.0×10 <sup>4</sup>	4.0×10 <sup>4</sup>				1.5×10 <sup>2</sup>	<10 <sup>2</sup>												
		0.05	2.0×10 <sup>5</sup>						2.5×10 <sup>2</sup>												
		3	2.0×10 <sup>5</sup>						3.0×10 <sup>2</sup>												
	EtOH	2	1.7×10 <sup>5</sup>		1.7×10 <sup>5</sup>				<10 <sup>2</sup>												
		1	1.2×10 <sup>5</sup>		2.8×10 <sup>5</sup>				5.5×10 <sup>3</sup>												
		Not added	2.6×10 <sup>5</sup>	2.2×10 <sup>5</sup>	2.6×10 <sup>5</sup>				1.5×10 <sup>3</sup>	3.4×10 <sup>3</sup>	9.1×10 <sup>3</sup>										
Storage at 20°	SoA	0.1	9.0×10 <sup>4</sup>																		
		0.05	2.0×10 <sup>5</sup>																		
		3	2.0×10 <sup>5</sup>	3.8×10 <sup>4</sup>																	
	EtOH	2	1.7×10 <sup>5</sup>																		
		1	1.2×10 <sup>5</sup>																		
		Not added	2.6×10 <sup>5</sup>	4.0×10 <sup>4</sup>	2.1×10 <sup>5</sup>				1.5×10 <sup>3</sup>	3.1×10 <sup>3</sup>	6.8×10 <sup>3</sup>										
Storage at 10°	SoA	0.1	9.0×10 <sup>4</sup>	4.0×10 <sup>4</sup>																	
		0.05	2.0×10 <sup>5</sup>																		
		3	2.0×10 <sup>5</sup>																		
	EtOH	2	1.7×10 <sup>5</sup>																		
		1	1.2×10 <sup>5</sup>																		
		Not added	2.6×10 <sup>5</sup>	3.1×10 <sup>4</sup>	4.2×10 <sup>4</sup>				1.5×10 <sup>3</sup>	1.1×10 <sup>2</sup>	<10 <sup>2</sup>										

\*1. Symbol, cs : completely spoilage. Bold figures indicate counts of completely spoiled samples.

Table 6. Change of microbial counts of packed, koji type "Miso" during storage

Food preservative and its concentration (%)	Bacterial counts per g						Yeast counts per g					
	Storage period (days)						Storage period (days)					
	0	3	5	7	10	10	0	3	5	7	10	
Storage at 30°												
SoA	0.1	5.5×10 <sup>4</sup>	es*1	4.5×10 <sup>4</sup>	es	es	1.6×10 <sup>3</sup>	<10 <sup>2</sup>	es	<10 <sup>2</sup>	es	es
	0.05	4.8×10 <sup>4</sup>	es	es	es	es	1.8×10 <sup>3</sup>	<10 <sup>2</sup>	es	es	es	es
	3	2.4×10 <sup>4</sup>	es	es	es	es	3.1×10 <sup>3</sup>	<10 <sup>2</sup>	es	es	es	es
	2	3.9×10 <sup>4</sup>	6.0×10 <sup>4</sup>	es	es	es	3.5×10 <sup>3</sup>	<10 <sup>2</sup>	<10 <sup>2</sup>	es	es	es
	1	4.9×10 <sup>4</sup>	4.0×10 <sup>4</sup>	es	es	es	2.9×10 <sup>3</sup>	<10 <sup>2</sup>	<10 <sup>2</sup>	es	es	es
	Not added	5.8×10 <sup>4</sup>	8.0×10 <sup>4</sup>	es	es	es	1.0×10 <sup>3</sup>	6.1×10 <sup>2</sup>	es	es	es	es
Storage at 30°												
SoA	0.1	5.5×10 <sup>4</sup>		2.5×10 <sup>4</sup>	es	es	1.6×10 <sup>3</sup>		3.8×10 <sup>3</sup>		es	es
	0.05	4.8×10 <sup>4</sup>	1.3×10 <sup>5</sup>		es	es	1.8×10 <sup>3</sup>	7×10 <sup>2</sup>			es	es
	3	2.4×10 <sup>4</sup>			es	es	3.1×10 <sup>3</sup>				es	es
	2	3.9×10 <sup>4</sup>	5.5×10 <sup>4</sup>		es	es	3.5×10 <sup>3</sup>	<10 <sup>2</sup>			es	es
	1	4.9×10 <sup>4</sup>		4.4×10 <sup>4</sup>	es	es	2.9×10 <sup>3</sup>		1.2×10 <sup>5</sup>		es	es
	Not added	5.8×10 <sup>4</sup>	5.8×10 <sup>4</sup>	es	es	es	1.0×10 <sup>3</sup>	5×10 <sup>2</sup>	es	es	es	es
Storage at 10°												
SoA	0.1	5.5×10 <sup>4</sup>			6.5×10 <sup>4</sup>		1.6×10 <sup>3</sup>				9.1×10 <sup>3</sup>	
	0.05	4.8×10 <sup>4</sup>			4.1×10 <sup>4</sup>		1.8×10 <sup>3</sup>				1.4×10 <sup>3</sup>	
	3	2.4×10 <sup>4</sup>			9.0×10 <sup>4</sup>		3.1×10 <sup>3</sup>				<10 <sup>2</sup>	
	2	3.9×10 <sup>4</sup>			8.0×10 <sup>4</sup>		3.5×10 <sup>3</sup>				<10 <sup>2</sup>	
	1	4.9×10 <sup>4</sup>			8.1×10 <sup>4</sup>		2.9×10 <sup>3</sup>				9.6×10 <sup>3</sup>	
	Not added	5.8×10 <sup>4</sup>	4.9×10 <sup>5</sup>	1.0×10 <sup>5</sup>	7.7×10 <sup>4</sup>	es	1.0×10 <sup>3</sup>	5×10 <sup>2</sup>	6.0×10 <sup>3</sup>	es	4.0×10 <sup>3</sup>	

\*1 Symbol, es : completely spoilage. Bold figures indicate counts of completely spoiled samples.

はアルコール添加によって10日以上保存性が延長された。また、こうじ味噌では淡味噌に比べてアルコール添加による保存効果は少なかったが、それでも無添加に比べれば長い保存性が得られた。さらに低温(10°)と組合せることによってその効果が一層顕著であった。アルコール添加はSoAの場合と異なり味噌の製品の形態による効果の差が著しかった。すなわち、こうじ味噌の開放実験区では味噌の表面に白色酵母様コロニーの発生するものが多かったのに対して、袋詰品では全く認められなかった。これらの知見から味噌の保存性に対してアルコール2~3%添加がある程度有効であると思われる。

味噌の品質保全を実用的な手法で期待するにはSoAの法定許可量あるいは、その代替品としてのアルコール添加(2~3%)が有効であることは上記のように確認されたが、基本的には原料および製品の取扱以上の衛生管理の徹底や可能な限りの低温保存あるいは熱処理による微生物汚染の除去など総合的な対策が

重要であり、添加物の効果をより発揮させるためにもこれらの基本的条件についてさらに関心をもつべきである。

終りに、保存料添加試料の製造にあたり、ご協力いただいた全国味噌工業協同組合に対し感謝いたします。

## 文 献

- 1) 望月 務：加工食品と食品衛生, p. 198 (1972), 新思潮社
- 2) 厚生省編：食品衛生関係法規集, 中央法規
- 3) 伊藤 寛ら：食糧研報告, 17, 38 (1963)
- 4) 海老根英雄ら：食糧研報告, 17, 42 (1963)
- 5) 農林省食糧研編：食糧技術普及シリーズ, 4, 37 (1966); 5, 40 (1967)
- 6) 河西 勉ら：衛生試報, 96, 140 (1978)
- 7) 農林省食糧研編：食糧—その科学と技術—, 14, 61 (1971)

## 人工臓器の滅菌法に関する研究（第1報） 人工腎臓ダイアライザーの高圧蒸気滅菌用 Biological Indicator について

栗栖弘光・柳町きみゑ・倉田 浩

### Studies on the Sterilization of Artificial Organs. I A Search of the Biological Indicators sufficient to be used in Autoclave Sterilization of Artificial Kidney, at 115° for 30 min

Hiromitsu KURISU, Kimie YANAGIMACHI  
and Hiroshi KURATA

In the application to a biological indicator for autoclave sterilization of disposable "Hollow Fiber-type Dialyzer" in artificial kidney, the heat resistance of *Bacillus stearothermophilus* has been measured from 113 to 117° using spore suspension of  $10^3$ ,  $10^4$  and  $10^5$  in an autoclave. Similarly the heat resistance of *B. subtilis* var. *globigii* has been also measured at 110° and 115°.

From the data (shown in Table 1 and Figures 1-2), *B. stearothermophilus* could not be sterilized at 115°, 30 min, while the estimation of *B. subtilis* var. *globigii* that is the commercial "Biological indicator for ethylene oxide sterilization" was adequate for the application because of its thermal death at 115°, 10 min.

(Received May 31, 1978)

人工腎臓の Hollow Fiber 型 Dialyzer は、透析膜および合成樹脂を主とした支持体からなり、その滅菌は、formalin 滅菌, ethylene oxide gas 滅菌

(E.O.G), あるいはγ線による放射線滅菌が行われている。最近, 115°, 30 min の高圧蒸気滅菌<sup>1,2)</sup>に耐える Dialyzer が開発され用いられるようになった。

この Dialyzer のような Disposable 医療用具を製造する過程で、滅菌を行う場合、その滅菌操作が十分確実に行われたことを確認する方法の一つに biological indicator を用いた試験が重要視されている。高圧蒸気滅菌の biological indicator として、USP<sup>3)</sup> では *Bacillus stearothermophilus* の芽胞が用いられており、さらにその性状として 121°, 5 min では生存し、15 min では死滅するものを使用することを推奨しているが、この芽胞の 115° の Decimal Reduction Time (D 値) は約 14 min であるとされ<sup>4)</sup>、したがって、115°, 30 min の biological indicator に用いたとき、 $10^2$  個以上のときには死滅しないものと考えられる。この点から、115°, 30 min の高圧蒸気滅菌用の biological indicator に、*B. stearothermophilus* を用いることの適否について検討し、同時に市販の E.O.G 滅菌用 biological indicator を用いて実験を行い、*B. subtilis* var. *globigii* を本滅菌方法の indicator 菌に使用する可能性についても検討した。

### 実験方法

1. 供試菌株：実験には、*B. stearothermophilus* IFO 12550 を用い、また *B. subtilis* var. *globigii* には、市販の biological indicator である AMSCO 社の Spordi を用いた。

2. 器具：高圧蒸気滅菌器にはトミー製 S90N 型を用い、温度の測定は、留点温度計および千野製作所製熱電対型温度計を用いた。ホモチナイザーは、IKA Werk 社の Ultra-Trrax を用いた。

3. 培地：菌数測定用培地には tryptic soy agar を用い、希釈水にはリン酸緩衝生理食塩水を用いた。Biological indicator の菌数測定には、滅菌した 0.1% tween 80 加生理食塩水<sup>5)</sup>を用いた。

4. *B. stearothermophilus* 芽胞液：供試菌を普通寒天平板培地に、55°, 120 hr 培養したのち、遠心沈澱により集菌し、ついて滅菌希釈水で3回洗浄遠沈したのち菌浮遊液とする。この液を 100°, 20 min 加熱して栄養細胞を除いたのち、滅菌希釈水に、 $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ /ml の割合で再浮遊させ、その各 2 ml ずつを中試験管に分注して試験に用いた。

5. 高圧蒸気滅菌：試料を入れた試験管に、約 2 ml の生理食塩水中に熱電対温度計の感温部を入れた中試験管を密着させて、所定の時間滅菌処理を行った。また Spordi の滅菌試験は、2 枚の Spordi の間に熱電対の感温部をはさみ、密着させたものをベトリざらに入れ、これを硫酸紙でつつんだものを滅菌処理した。各滅菌処理で、設定した滅菌温度に達するまで

に要した時間は、50° より 110° までは約 4 min 30 sec, 115° までは約 4 min 45 sec を要した。滅菌時間経過後は、直ちに蒸気圧を排出し、急速に冷却させたが、約 50° までに降下させるに要した時間は約 5 min であった。

6. 菌数測定：滅菌前および滅菌後の菌数測定は、10 倍希釈法を用い寒天平板培養法により行なった。Spordi の菌数測定は、20 ml の滅菌した 0.1% tween 80 加生理食塩水の中に入れ、ホモチナイザーにより磨砕したのち、前記と同様に菌数測定を行った。*B. stearothermophilus* は 55°, 72 hr, *B. subtilis* var. *globigii* は 35°, 48 hr 培養したのち、出現した菌集落数から菌数を算定した。

### 実験結果

*B. stearothermophilus* IFO 12550 株について、 $10^4$ /ml の芽胞液を用いて、114°, 115°, 116° の各 D 値を求めたところ、22.7 min, 16.3 min および 10 min であった。また 113°~117°, 30 min 高圧蒸気滅菌を行ったときの菌濃度と殺菌効果について調べた結果、113° では 10/ml 以下、114°, 115° および 117° では  $10^2$ /ml 以下のときに死滅することが認められた。

次に、Spordi を用いて *B. subtilis* var. *globigii* の熱抵抗性について実験したところ、110° の滅菌では、5 min で約 10%, 10 min で約 0.5% 生存し、15 min では死滅した。115° では、5 min で生存菌が認められ

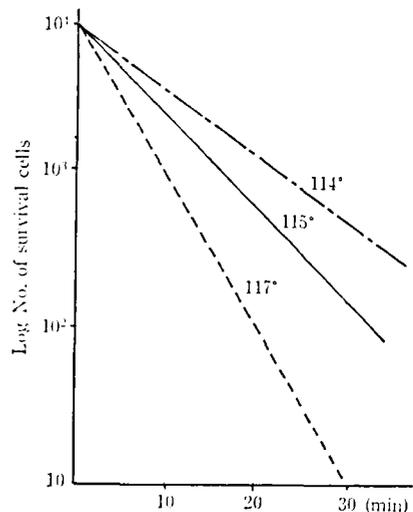


Fig. 1. Thermal death curve for *B. stearothermophilus* IFO 12550 that was steamd at 114°, 115° and 117°

Table 1. Survivor numbers of *B. stearothermophilus* IFO 12550 in experiments of autoclave sterilization at five temperatures, 30 min

Temperature of sterilization (°C)	Initial population (per ml)			
	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>
113		1.8×10 <sup>3</sup>	2×10 <sup>2</sup>	10
114		5×10 <sup>2</sup>	2×10 <sup>2</sup>	0
115		1.5×10 <sup>2</sup>	7×10	0
116		1×10 <sup>2</sup>	10	0
117	4×10	10	0	0

たが、10 min では死滅することが認められた。

結 論

高圧蒸気滅菌用 biological indicator に広く用いられている *B. stearothermophilus* が、115°, 30 min の高圧蒸気滅菌の biological indicator に使用できるか否かについて、通常の高圧蒸気滅菌器を用いて実験した結果、115°, 30 min の D 値は 16.3 min で、滅菌前の芽胞数の 1/100 に減少したのみであり、完全に滅菌するには、10<sup>4</sup>/ml の芽胞液の場合でも約 50 min 以上を必要とすることが認められた。したがって、この結果から、*B. stearothermophilus* は、115°, 30 min の高圧蒸気滅菌の biological indicator には適当でないと考えられる。同時に市販の biological indicator を用い、E.O.G 滅菌に用いられている *B. subtilis* var. *globigii* についても、高圧蒸気滅菌を行って検討した結果、10<sup>5</sup> の芽胞数のとき、115°, 5 min では生存菌が認められるが、10 min では死滅することが認められるため、指標菌として使用しうる可能性がある

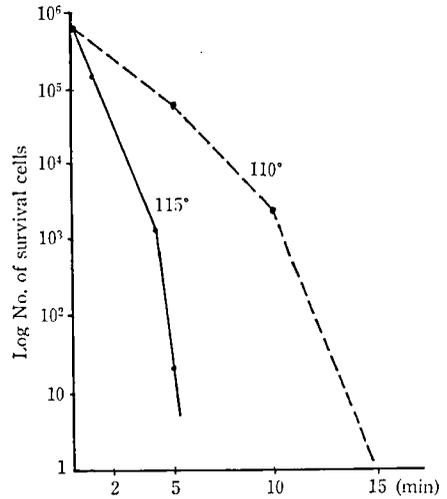


Fig. 2. Thermal death curve for *B. subtilis* var. *globigii* that was steamed at 110° and 115°

ものと考えられる。

文 献

- 1) 秋沢忠男ら：高圧蒸気滅菌方式による中空糸型透析器 TF-15 の開発とその臨床評価，第 15 回日本人工臓器学会大会発表論文集 (3)，人工臓器，7 (2)，266 (1978)
- 2) 第 9 改正日本薬局方解説書，B-521 (1976)，廣川書店
- 3) USP XIX, p. 711
- 4) 薬品研究会：医療用機器基準解説，p. 565 (1976)，薬業時報社
- 5) FP IX, II-212-6

薬用植物の栽培試験(第10報)  
道北地方におけるケシの栽培基準について

本間尚治郎・石崎昌吾・堀越 司

Studies on the Cultivation of Medicinal Plants. X  
Standard Cultivation Method of *Papaver somniferum* L.  
in Northern Hokkaido

Naojiro HOMMA, Shogo ISHIZAKI  
and Tsukasa HORIKOSHI

Authors make the standard cultivated method of *Papaver somniferum* L. in the northern districts of Hokkaido. For this method, the cultivated examination had been continued during 14 years.

1. It is adequate that seeding time is early in May and seeding rate is 400 gr. per 10 a, and so it is suitable to take 60 cm for row width and 10 cm for intrarow spacing.
2. Recommended rate of fertilizer application is 15 kg. of nitrogen, 6 kg. of phosphate and 9 kg. of potassium per 10 a, distributing a quarter of amount to basal dressing and three quarter of amount to topdressing. Topdressing carryout twice, at end of May and middle of July.
3. Opium harvesting time is late in July, and seed harvesting time is early in August.

(Received May 31, 1978)

北海道の道北地方は積雪寒冷地帯であって、例年4月下旬まで積雪があり農耕の開始は早くて4月下旬、普通は5月上旬である。当地方は5月中は晩霜がありケシ栽培の適地とはいえない。このような気象条件下においてケシを栽培するには暖地とは自ら異った栽培基準が要求される。われわれは当地方における全草抽出のケシ栽培については既に報告したが<sup>2)</sup>、技術ならびに種子保存の目的で一貫種を用い、1964年以来慣行法に準じて行って来た栽培試験の結果から次のような基準を設定した。その概要は次の如くである。

#### 1. 播種時期・播種法

当地方における播種期は5月上旬であって、5月10日前後が播種適期である。もちろんその年によって差異はあるが原則として融雪後なるべく早く播種することが望ましい。ただし積雪の少なかった1968年は4月20日に播種したところ発芽不揃いとなり、間引その他の管理作業に支障を来たし良い結果が得られなかった。また、5月中旬以降になると当地方は乾燥期に入り土壌の表面は水分が不足して固結し発芽不良となるので注意を要する。暖地では秋播を行っているが、当地方においては秋播は無理である。すなわち、発芽しても冬期間に枯死し越冬しない(Table 1)。整地は出来るだけ念入りに碎土することが大切で、碎土が不

十分の場合は発芽不良の原因となり生育収量が低下する。整地の方法は土質によって異なるが、当場のような砂質壤土では次のような方法がよい。堆肥、キノックス(土壌改良剤)を散布してトラクターにて耕起した後2回ロータリーハーローにて碎土する。基肥を施用してさらにハーローをかけて土塊を砕き、同時に肥料を土壌とよく混和させる。播種は畦巾60cmの一条播とし、播種量は10a当400gを基準とする。播種後、覆土は行わず強く鎮圧しておく。なお土壌表面が乾燥するおそれのある場合は鎮圧した上に薄くもみがらを散布する。また、畑地かんがいは発芽を早め生育収量を高めるので実施する方が望ましい。Table 2は1972年から3ヶ年間試験した結果である。その方法はスプリングラーによる散水かんがいで、播種期からアヘン採取期まで畑の状態を観察して1日1回30分間散水した。

#### 2. 施肥

施肥の基準は10a当窒素15kg、リン酸6kg、加里9kgとする。窒素肥料の多用が生育収量を高める効果のあることは、木下ら<sup>3)</sup>によって報告されているが道北地方のような生育期間の短い寒冷地では特に速効性の窒素肥料の多用が有効である。ただし病害の発生には注意を要する。施肥にあたっては地力によって考

Table 1. Growth and wintering of *Papaver somniferum* L. "Ikkanshu" seeded in fell (Period of continuous snow cover : Nov. 17th, 1965~Apr. 30th, 1966)

Plot	Seeding time	Date of germination	Plant height (Oct. 18th' 65 cm)	Number of wintering
I	Aug. 3rd	Aug. 9th	35	0/20
II	" 13th	" 21th	21	0/20
III	" 23th	Sept. 1st	10	0/20
IV	Sep. 4th	" 14th	7	0/20
V	" 13th	" 21th	3	0/20
VI	" 24th	Oct. 18th	1	0/20

Table 2. Effect of Upland irrigation on the growth and yields of *Papaver somniferum* L. "Ikkanshu"

Year	Plot	Date of germination	Plant height (cm)	Yield per 6 m <sup>2</sup>		Seeding time
				Opium (g)	Seed (g)	
'72	Irrigation	May 16th	87.4	8.80	145.0	May 6th
	Control	21	84.0	6.00	134.0	"
'73	Irrigation	" 22	92.3	2.06	53.6	May 10th
	Control	27	61.9	0.13	3.1	"
'74	Irrigation	" 17	97.0	8.40	—	"
	Control	17	95.0	7.25	—	"

慮する必要がある。当場の畑は砂質で有機質が不足しているため窒素肥料は基準より多く 10a 当ナタネ油粕 100 kg, 魚粕 100 kg を播種前に全面に散布し, 硫酸 75 kg, 過磷酸石灰 25 kg, 硫酸加里 20 kg の単肥配合を基肥に 4 分の 1, 残り 4 分の 3 を 2 回に分けて追肥する。追肥の時期は第 1 回は 5 月下旬, 第 2 回は 6 月中旬とする。

### 3. 間引・中耕・除草・腋芽摘除

播種後約 14 日間で発芽揃の状態となり, 5 月下旬本葉 4~5 枚となった頃が間引きの適期である, 株間は 10 cm とする。暖地に比べて草丈が低く倒伏のおそれがないので, なるべく密植にした方がよい。中耕, 除草は普通 2 回とし追肥の時期に行う。すなわち第 1 回は 5 月下旬に管理機で畦間を中耕し, 株間は間引と同時に進行。第 2 回目は止肥を施した後軽く中耕し, 除草を行って培土をする。6 月下旬になると抽苔を始め, 7 月上旬開花始, 7 月 15 日頃には開花盛期となる (Table 3)。その頃になると腋芽が発生するので摘除して主軸果の肥大をはかる。

### 4. 病虫害の防除

例年 5 月中下旬になるとキスジノミハムシ(ジノミ)が発生する。特に降雨が無く晴天の日が続くと大発生

をして生育初期に思わぬ被害を受けるので, 注意して早目に防除する必要がある。葉枯病, 菌核病等の予防は 5 月下旬より 7~10 日間隔で 4-4 式ボルドー合剤を 5~6 回散布する。また年によって 6, 7 月になるとウリハムシモドキ, ヨトウムシが発生するので, その時は殺虫剤をへい用する。

### 5. アヘン・種子の採取

当地方におけるアヘン採取は 7 月下旬, 種子の収穫は 8 月上旬とする (Table 3)。アヘンの採取適期はおよそ 7 月 22 日から 25 日の間で, 適期を失わず第 1 回目の採取を行う。普通アヘン採取は 3 回~4 回であるが, 当地方では 3 回目から急激に収量が低下するので, 実際栽培ではその年の分泌状況によって 2 回ないし 3 回が適当である。採取の方法は 2 回目までは切取法, 3 回目以降は青切掻法による。天候等の都合で適期採取が困難な場合は, 早目に着手した方がよい。

種子の採取は, 例年 8 月 10 日頃には種子が成熟するので株を抜き取ってビニールハウス内にて 1 週間位乾燥させ, さく果が良く乾燥したら種子を調製し, けしからは規定に従って焼却する。当地方では, 一貫種はその特性<sup>9)</sup>を充分に発揮せず, 草丈は暖地では 120~150 cm に達するのに対し 50~95 cm (Table 3) で

Table 3. Growing process of *Papaver somniferum* L. "Ikkanshu" in Northern Hokkaido

Year	Seeding time	Date of germination	Date of flowering	Date of incision	Date of seed maturity	Plant height (cm)
'64	May 12th	Jun. 1st	Jul. 10th	Jul. 25th	Aug. 3rd	51.5
'65	15	May 26th	7	29	20th	56.2
'66	" 20	—	—	—	" 25	50.0
'67	" 4	May 18	—	Jul. 21	" 5	76.4
'68	Apr. 20	" 9	Jul. 2nd	" 20	" 7	74.9
'69	May 9	" 20	" 13	" 28	" 8	82.2
'70	" 7	" 17	" 7	" 28	" 10	68.9
'71	Apr. 30	" 16	" 6	" 23	" 6	78.3
'72	May 6	" 16	" 10	" 24	" 5	84.0
'73	" 10	" 22	" 13	" 29	" 10	61.9
'74	" 10	" 17	" 8	" 25	" 10	95.0
'75	" 8	" 17	" 4	" 22	" 7	91.9
'76	" 10	" 18	" 7	" 25	" 10	88.5
'77	" 12	" 23	" 7	" 24	" 12	88.7

Table 4. Yield of Opium of *Papaver somniferum* L. "Ikkanshu" in Northern Hokkaido

Year	Yield of opium kg/10 ares	Yield of opium mg/capsule	Morphine content in opium (%)
'67	—	90.09	12.26
'68	0.64	82.80	11.91
'69	0.76	94.13	—
'70	0.26	76.80	15.80
'71	0.56	—	—
'72	1.00	—	—
'73	0.02	—	13.40
'74	1.21	—	6.02
'75	0.74	—	10.66
'76	1.27	—	9.37
'77	0.97	—	8.78

ある。Table 4 は単位面積当りのアヘン収量とそのモルヒネ含量を示したもので、年による変動が大きく10a 当アヘン収量は1kg 前後でおよそ暖地の3分の1である。

### 摘 要

北海道の道北地方におけるケシ（一貫種）の栽培基準について14年間の栽培試験の結果から次のように設定した。

1. 播種期は5月上旬、畦巾60cm、株間10cmとし、播種量は10a当400gとする。

2. 施肥量は10a当窒素15kg、リン酸6kg、加里9kgとし、基肥1/4、追肥3/4とする。追肥は2回（5月下旬、6月中旬）に施用する。間引は5月下旬、病虫害防除は5~6回（5月下旬~7月下旬）行う。

3. アヘン採取期は7月下旬、採種期は8月上旬とする。

### 文 献

- 1) 本間尚治郎, 堀越 司, 逸見誠三郎: 衛試報告, 92, 57 (1974)
- 2) 厚生省薬務局麻薬課編: けし栽培の実際(1955)

3) 木下孝三, 中川雄三, 伊坂 博: 衛試報告, 77  
267 (1959)

4) 川谷豊彦, 藤田早苗之助, 大野忠郎: 衛試報告,  
75, 151 (1957)

## 薬用植物の栽培試験（第 11 報）

植物生長調節剤がミシマサイコの生育, 収量に及ぼす影響について

堀越 司・三浦忠一・本間尚治郎

### Studies on the Cultivation of Medicinal Plants. XI Influence of Growth Regulators on the Growth and Yield of *Bupleurum falcatum* L.

Tsukasa HORIKOSHI, Tadakazu MIURA  
and Naojiro HOMMA

One of the important medicinal plants, *Bupleurum falcatum* L. were examined for the growth stimulation and the fructification by the method of foliar spraying with two kind of plant growth regulator; gibberellin and 'Atonik' (sodium 5-nitro guaiacolate). The examination was carried on two different age. One was tested in the first year and another tested in the second year.

(1) On the result of one year old plants, growth of the arial part was more excellent increase when sprayed with 100 ppm gibberellin, mixture of 10 ppm gibberellin and atonik and pure atonik than control.

(2) On the result of two year old plants, the plants treated with 100 ppm gibberellin and mixture of 100 ppm gibberellin and atonic was grown higher than control. Atonic (Plot I) is effective of root weight increasing. The fructication was succeeded only 15% at the plot II, gibberellin 10 ppm and 10% at the plot III, the mixture of 10 ppm and atonic.

(Received May 31, 1978)

## ま え が き

先に筆者らは北海道道北地方におけるミシマサイコの栽培化を目標に行った試験の概要について報告した<sup>1,2)</sup>。

ミシマサイコは関東以西に広く自生する植物であって、北海道道北地方に栽培すると種子の生産を目的とした場合には日照時間や積算温度の不足により採種は非常に困難である。

ジベレリンの農業への応用は野菜類や種子なしブドウなどに見られるが、薬用植物ではオウレン、センブリ、オタネニンジン等の発芽<sup>3-5)</sup>、オウレンの促成的栽培<sup>6)</sup>などの報告があるが、ミシマサイコの開花促進や種子の生産の目的での報告は見当たらない。そこでわれわれは今回ミシマサイコの種子の生産を目的に2種類の植物調節剤を用いて葉面散布を実施したので、その概要について報告する。

## 1. 材料および方法

供試種子は1年生の試験には京都産、2年生の試験には東京産をそれぞれ用いた。

耕種法は沖積性砂質壤土の畑 2a に堆肥 650 kg を全面に散布し、耕起し整地後畦巾 60 cm とし、作条に基肥施用、攪拌後軽く鎮圧してから条播し、その上にモミガラを散布被覆した。播種は1年生が 1977 年 5 月 23 日、2年生が 1976 年 5 月 19 日行った。肥料は2年生1年次は基肥に過石 3 kg, ナタネ油粕 12 kg, 264 化成 10 kg (1976 年 5 月 18 日)、2年次の追肥は過石 3 kg, ナタネ油粕 12 kg, 264 化成 10 kg, 鶏糞 12 kg (1977 年 5 月 20 日) と過石 3 kg, 鶏糞 12 kg (1977 年 7 月 10 日) をそれぞれ施用した。

1年生では基肥に過石 3 kg, ナタネ油粕 12 kg, 264 化成 10 kg (1977 年 5 月 23 日)、追肥は過石 3 kg, 鶏糞 12 kg (1977 年 7 月 10 日) をそれぞれ施用した。除草や抜草作業は2年生の1年次では、10回

(6月～10月), 2年次では4回(6月～8月), 1年生は4回(6月～8月)それぞれ実施した。

植物生長調節剤としてジベレリンとアトニック 0.3% 5-nitroguaiacol Natium) を用い5試験区を設け葉面散布を行った (Table 1)。

葉面散布は手押し噴霧器にて '77年7月4日から10日おきに8月27日まで6回実施した。なお Table 2～9までの数値は各試験区とも20株の平均値である。

## 2. 結果および考察

### 1) 1年生の生育

(1) 地上部の生育: Table 2, 5によれば, 植物生長調節剤の葉面散布後120日では, 全般に地上部の生育は葉面散布区が対照区に比し高い傾向を示した。特にジベレリン単用の100 ppm区が目立ち, これに次いでジベレリン10 ppmとアトニックの混合区, アトニック単用区の順であった。第1次分枝数, 地上部生体重なども大体同様の傾向を示し, 抽苔数についてはジベレリン10 ppmとアトニックの混合区が特に多くなっているのが注目されるほか, 対照区に比し葉面散布区は抽苔が促進される。

このことは, 山田氏が「ジベレリンに対する植物の

最も典型的なそして顕著な反応は伸長促進である。」<sup>9)</sup>と述べていることと一致する。

(2) 地下部の生育: Table 3, 4によれば一定の傾向は認め難いが, 根長は抽苔数と同様にジベレリン10 ppmとアトニックの混合区が断然長く, 根張や第1次分枝根数, 根径ではアトニックの単用区が他に優り, いずれも葉面散布区は対照区を凌駕する傾向を示した。根の収量についても大体同様の傾向であるが, 草丈と同様にジベレリン単用の100 ppm区が他区をはるかに凌駕していることが注目される。根の乾燥歩留りは前記の傾向とは全く異なり, 対照区が最も高く33.3%であって, ジベレリン単用の10 ppmは17.4%の最低であった。

上記のことからミシマサイコの1年生に植物生長調節剤を葉面散布すると, 全般に生育, 収量は若干優る傾向を示すが根の乾燥歩留りは対照区に劣ることが認められた。なお抽苔数の増加する傾向は, 西氏はジベレリンのように明らかな伸長促進作用をもつものが花芽の分化に直接関与するかは不明であるが, 現象的に伸長促進の結果から開花調節に入れると述べている<sup>9)</sup>このことからミシマサイコの1年生における植物生

Table 1. Experimental Plot

Plot	Name of Plant Growth Regulator	Concentration	
		Sodium 5-nitro guaiacolate	Gibberellin
I	'Atonik'	5 ppm	—
II	Gibberellin	—	10 ppm
III	'Atonik' & Gibberellin	5 ppm	10 ppm
IV	Gibberellin	—	100 ppm
V	'Atonik'	5 ppm	—
VI	Control	—	—

Table 2. Growth of one-year-old plants of *Bupleurum falcatum* L.

('77. 10. 30)

Plot	Plant height (cm)	Hill spread (cm)	Number of stem	Diam of main stem (mm)	Number of primary branch	Fresh weight of top (g)	Number of bolting
I	35.7	21.7×15.6	1.0	4.3	0.4	8.2	10/20
II	32.2	21.7 14.1	1.3	4.3	0.9	8.6	10//
III	39.5	22.3 18.4	1.1	4.0	0.3	6.2	20//
IV	50.5	29.7 20.7	2.6	4.2	1.8	13.2	13//
V	31.7	21.6 15.1	1.9	4.4	0.8	7.9	10//
VI	26.8	17.2 10.2	1.2	3.3	0.4	4.5	2//

Table 3. Yield of one-year-old plants of *Bupleurum falcatum* L.

('77. 10. 30)

Plot	Root length (cm)	Root spread (cm)		Diam of main root (mm)		Number of primary branched root	Root weight	
							Fresh (g)	Dry (g)
I	16.2	8.6×4.9		6.1×5.5		10.8	2.3	0.5
II	16.0	7.7	4.2	5.3	5.0	9.5	2.3	0.4
III	18.3	6.1	4.0	5.1	4.7	7.5	1.5	0.3
IV	16.1	7.7	4.8	5.7	5.3	7.9	3.0	0.7
V	15.7	6.5	3.8	5.2	4.8	7.7	2.0	0.5
VI	13.7	4.2	2.0	4.7	4.3	5.4	0.9	0.3

Table 4. Yielding percentage and T-R ratio of one-year-old plants of *Bupleurum falcatum* L.

('77. 10. 30)

Plot	Fresh weight		T-R ratio	Dry weight of root (g)	Relative dry weight	Yielding percentage (%)
	Top (g)	Root				
I	8.2	2.3	28.0	0.5	21.7	166.7
II	8.6	2.3	26.7	0.4	17.4	133.3
III	6.2	1.5	24.2	0.3	20.0	100.0
IV	13.2	3.0	22.7	0.7	23.3	233.3
V	7.9	2.0	25.3	0.5	25.0	166.7
VI	4.5	0.9	20.0	0.3	33.3	100

Table 5. Effect of regulators on plant height of one-year-old plants of *Bupleurum falcatum* L.

('77. 10. 30)

Plot	Before treatment	After treatment	Increment of height (cm)	Relative increment
	('77. 7. 4) (cm)	('77. 10. 30) (cm)		
I	4.6	35.7	31.1	132.3
II	3.4	32.2	28.8	122.6
III	5.0	39.5	34.5	146.8
IV	3.8	50.5	46.7	198.7
V	3.2	31.7	28.5	121.3
VI	3.3	26.8	23.5	100

長調節剤の葉面散布による抽苔促進は開花促進の可能性を示唆するものと思われる。

## 2) 2年生の生育

(i) 地上部の生育：Table 6~9 によれば、特に一定の傾向は認め難いが、草丈ではジベレリン単用の 100 ppm 区とジベレリン 100 ppm とアトニックの混合区が対照区に優るほかはいずれも劣っていた。なお

地上部生体重ではアトニック単用区およびジベレリン 10 ppm とアトニックの混合区が優る傾向を示した。種子生産株数については、成績不良であったが、ジベレリン単用の 10 ppm 区やジベレリン 10 ppm とアトニックの混合区のみには結実が認められたことは種子の生産の可能性を残したものと思われる。

植物生長調節剤の葉面散布後 120 日における草丈は

Table 6. Growth of two-year-old plants of *Bupleurum falcatum* L.

('77. 10. 30)

Plot	Plant height (cm)	Hill spread (cm)		Number of stem	Diam of main stem (mm)	Number of primary branch	Fresh weight of top (g)	Number of plant with seed-setting
I	125.5	48.1×35.6		1.7	9.0	22.9	236.7	0/20
II	141.1	48.8	34.8	1.2	7.3	22.1	124.4	3//
III	128.6	54.1	40.0	1.4	7.6	24.6	192.0	2//
IV	176.1	54.0	42.5	1.4	6.1	25.4	131.0	0//
V	163.2	48.5	36.6	1.2	5.9	24.0	79.5	0//
VI	140.9	54.1	44.0	1.2	7.0	27.8	155.0	0//

Table 7. Root yield of two-year-old plants of *Bupleurum falcatum* L.

('77. 10. 30)

Plot	Root length (cm)	Root spread (cm)		Diam of root (mm)		Number of primary branched root	Root weight	
							Fresh (g)	Dry (g)
I	21.7	12.2×6.9		11.6×10.4		12.7	9.9	3.4
II	22.0	11.5	7.4	9.8	9.0	12.2	6.7	2.5
III	20.9	12.7	7.1	10.3	9.0	14.6	6.6	2.7
IV	20.0	10.9	6.6	9.1	8.5	10.7	4.1	2.0
V	19.7	9.6	5.6	8.0	7.4	9.2	3.2	1.6
VI	22.5	13.0	7.8	10.9	9.7	9.9	7.3	2.5

Table 8. Yielding percentage and T-R ratio of two-year-old plants of *Bupleurum falcatum* L.

('77. 10. 30)

Plot	Fresh weight		T-R ratio	Dry weight of root (g)	Relative dry weight	Yielding percentage (%)
	Top (g)	Root (g)				
I	236.7	9.9	4.2	3.4	34.3	136.0
II	124.4	6.7	5.4	2.5	38.8	100.0
III	192.0	6.6	3.4	2.7	40.9	108.0
IV	131.0	4.1	3.1	2.0	48.8	80.0
V	79.5	3.2	4.0	1.6	50.0	64.0
VI	155.0	7.3	4.7	2.5	34.2	100

薬剤の濃度により差異はあるが、特にジベレリン単用の100 ppm区およびジベレリン10 ppmとアトニックの混合区が対照区に優ることが確認された。

(2) 地下部の生育: Table 7, 8によれば、根長、根張などは対照区が優り、根径、第1次分岐根、地下部重などでは葉面散布区が一部を除き対照区に多少優る傾向を示した。根径、地下部重ではアトニック単用

区、第1次分岐根数ではジベレリン10 ppmとアトニックの混合区、アトニック単用区、ジベレリン単用10 ppm区、100 ppm区の順にそれぞれ対照区に優っていたが、ジベレリン100 ppmとアトニックの混合区のみが劣っていた。これらの傾向からアトニックの影響が大きいに思われるし、根の乾重でも多少上記と異なるが、アトニックの影響が出ているように思われ

Table 9. Effect of regulators on plant height of two-year-old plants of *Buplerum falcatum* L. ('77. 10. 30)

Plot	Before treatment ( '77. 7. 4 ) (cm)	After treatment ( '77. 10. 30 ) (cm)	Increment of height (cm)	Relative increment
I	37.7	125.5	87.8	88.4
II	42.8	141.1	98.3	99.0
III	36.4	128.6	92.2	92.8
IV	40.4	176.1	135.7	136.7
V	40.6	163.2	122.6	123.5
VI	41.6	140.9	99.3	100

る。根の乾燥歩留りではいずれも葉面散布区が対照をはるかに凌駕し一定の傾向を示したことは注目される。即ち、ジベレリン 100 ppm とアトニックの混合区が最高で 50%、ジベレリン単用の 100 ppm 区 48.8%、ジベレリン 10 ppm とアトニック混合区 40.9%、ジベレリン単用の 10 ppm 区 38.8%、アトニック単用区 34.3% とそれぞれ対照区に優っていた。

上記のことからミシマサイコの 2 年生に植物生長調節剤を葉面散布すると、濃度により多少の差異はあるが、生育、収量の増大につながるようである。

以上の結果を要約すると次のように考えられる。即ち、草丈は 1 年、2 年生ともにジベレリン単用の 100 ppm 区が高く、根の重量は 1 年生ではジベレリン単用の 100 ppm 区が大きく、2 年生ではアトニック単用区が大きくしかも 2 年生のものは、1 年生のものに比し根径の肥大が認められる。しかし抽苔促進にはジベレリン 10 ppm とアトニックの混合区がよく、結果的にはジベレリン単用の 10 ppm 区およびジベレリン 10 ppm とアトニックの混合区がよい。ミシマサイコの種子の生産を目的とする場合には、1 年生に植物生長調節剤を葉面散布するよりも 2 年生に行う方が望ましいようである。

### 摘 要

ミシマサイコの生育促進と種子の生産の目的で 1 年生、2 年生について植物生長調節剤の葉面散布による生育、根の収量に及ぼす影響を検討した。

1) 1 年生では、全般に地上部の生育はジベレリン単用の 100 ppm 区が目立ち、次いでジベレリン 10 ppm とアトニックの混合区、アトニック単用区の順であった。抽苔数の増加する傾向を示したのはジベレ

リン 10 ppm とアトニックの混合区であった。ただし根の乾燥歩留りはジベレリン単用の 10 ppm 区が最低であった。

2) 2 年生では、草丈はジベレリン単用の 100 ppm 区、ジベレリン 100 ppm とアトニックの混合区が対照区に優る傾向を示した。地下部の生育では、アトニックの影響が大きく、根の乾燥歩留りは葉面散布区が対照区をはるかに凌駕し一定の傾向を示したことは注目される。

本試験の遂行にあたり供試のミシマサイコの種子を快よく御恵与賜りました東京都薬用植物園の小林正夫氏ならびに武田薬品工業 K. K.、福知山農場川西史明氏、また植物生長調節剤を御恵与賜りました各位に対し、感謝の意を表します。

### 文 献

- 1) 堀越 司ほか：衛生試報 94, 163, 166 (1976)
- 2) 堀越 司ほか：衛生試報 95, 129, 134 (1977)
- 3) 池永敏彦ほか：日本生薬学会第 23 回年会（広島大会）講演要旨集 1 (1976) 日本生薬学会
- 4) 井上和秀ほか：生薬学雑誌 Vol. 31, No. 179 (1977) 日本生薬学会
- 5) 栗林登喜子ほか：生薬学雑誌 Vol. 29, No. 161 (1975) 日本生薬学会
- 6) 三鍋昌俊ほか：オウレンの作物、栽培的研究（第 2 報）肥料三要素、微量三要素、微量要素およびジベレリンの促成的効果について、日本作物学会紀事第 36 卷 11 (1967) 日本作物学会
- 7) 松永英輔ほか：日本生薬学会東京大会講演要旨集 11 (1969) 日本生薬学会
- 8) 山田 登：作物のケミカルコントロール 122 (1975) 農業技術協会
- 9) 西 貞夫：園芸作物とケミカルコントロール 112 (1975) 家の光協会

# 業 務 報 告

## Annual Reports of Divisions

### 昭 和 52 年 度 業 務 概 況

所 長 下 村 孟

近年における科学技術の著しい進歩や医療産業のめざましい発展は多種多様の医薬品、食品、家庭用品等を生み出し、国民生活に多大の利益をもたらしたが、その反面これら化学物質に起因する健康被害が多発し、大きな社会問題となったため、その安全対策は極めて重要な課題となってきた。

当所においては、従前より理化学部門と生物部門が互いに緊密な連携のもとに一致協力してこれら物質の試験研究を行ってきたが、両部門を活用できるという特長と強みを十分に発揮するためには、特に薬理、毒性、病理などの生物系分野を早急に充実する必要が生じてきた。

とりわけ生物系部門の施設は、種々の面で能力の限界にきていたためどうしても長期かつ大量の実験に耐え得るような動物実験施設並びに近代的な機械器具を具備した研究施設の設置が強く望まれていた。

このため、数年前からいわゆる安全センター構想を打ち出し鋭意努力の結果、昭和50、51年度において、センター建設予算が認められた。

昭和51年2月25日敷地調査に着手し、同年6月16日には本工事に着手した。所内においては、本工事遂行のため一時的な研究室の移転や厚生施設の使用中止などを余儀なくされたが、所の周辺に居住する人々に対しては、できるだけ迷惑をかけないよう最善の努力を払った。

昭和52年度においては、本工事を年度内に終了すべく所をあげて建設工事に伴う各種障害の除去に努めるとともに、施工関係者に協力した結果、昭和53年2月末日約7,200 m<sup>2</sup>の庁舎が竣工し、3月には毒性部、病理部等の新庁舎移転が開始された。

これに対応して、昭和53年1月1日付で、仮称「食品医薬品等安全センター」の名称を「安全性生物

試験研究センター」と呼称することとし、関係法令の改正が行われた。センター長には池田良雄研究調整官が就任し、毒性部(6室)、薬理部(4室)、病理部(4室)の3部14室の機構と73名の職員をもってスタートした。百有余年の伝統を有する国立衛生試験所の新しい発展の大きな礎となるこのセンターの発足を今回私が報告できることは大変感慨深いものがある。

なお、昭和53年度には変異原性部の設置が認められており、5月12日には落成式を挙行することとしている。このほか特記すべき事項として、廃棄物処理施設が同時に落成したこと、1号館庁舎が撤去されたことなどを挙げておきたい。

次に、筑波研究学園都市に建設することになっている薬用植物研究施設(仮称)は、特定国有財産整備特別会計において2,572 m<sup>2</sup>の規模査定を受け、昭和52年度においては当該施設の基本設計を完了した。

今後の計画としては、昭和53年秋頃には本工事に着手し、翌54年11月頃完成の予定である。

当所においては、この機会に薬用植物の栽培、研究業務の充実強化を図るため、春日部薬用植物栽培試験場を廃止し、筑波の薬用植物研究施設においては、従来の春日部における業務のほか、薬用植物の育種、生理、病理昆虫に関する業務を新たに実施するとともに、北海道、伊豆、和歌山、種子島の各試験場を統轄するセンター的な役割をもたせるべくその組織、増員を要求する予定にしている。

ところで、昭和52年度中の試験研究業務については、後続の各部報告によってその詳細を把握願いたいだが、このうち若干の項目について触れてみると、年度当初には最近ブームとなっている健康食品にからむ皮膚障害や中毒事件が発生し、これに即応して関係部がその試験研究にあたった。

また、薬価基準が銘柄別収載に切替えられたため、いわゆる同種、同効品の生物学的同等性が関係者間でより注目されてくると思われるが、これに対応して本年度からより簡易で、かつ、客観性の高い試験法を確立するための研究が開始された。そのほか漢方生薬製剤についても保険適用に伴ってその需要が著しく増大してきているが、これら製剤の原料生薬のうち局外生薬の規格作成に関する研究も前年に引続き続行している。

家庭用品関係では衣類中の防炎加工剤等の規制が告示されたことに伴い、地方衛生研究所、国民生活センターとの協体制の強化に努めた。

なお、国際的にも所ならびに所員の活躍が益々活発となり、特に国際機関での会議出席、国際学会への参加、海外留学等が頻繁に行われ、当所の業務は国内だけに止まらなくなってきたが、特に“FAO/WHO 共同の食品及び飼料汚染物モニタリングプログラム”の共同研究センターに当所が本年指定されたことを報告すると共に、今後益々全国の地方衛生研究所等の協力を願う次第である。

本年度における当所の業務報告の概要は以上のとおりであるが、最後に昭和28年5月から昭和40年12月まで12年有年にわたり所長として当所の発展に尽力された刈米達夫博士が死去されたことを報告しなければならないのは甚だ残念である。昭和52年6月22日の葬儀には故人の内輪のみという御意志にもかかわらず多くの所員が焼香の列に加わった。

ここに謹んで哀悼の意を表する次第である。

## 総務部

部長 今村 泰一

### 1. 組織

昭和52年度においては、等級別定数の改訂により業務課に課長補佐が設置されたほか主任研究官の定数が41名から45名と4名の増が認められた。(昭和52年4月1日国立衛生試験所組織細則の一部改正)

また、昭和53年1月1日から医薬品等の安全性に関する試験研究部門の充実を図るため、薬理部、毒性部、病理部の3部から成る安全性生物試験研究センターの設置が認められ厚生省組織規程及び国立衛生試験所組織細則の一部改正が行われた。(研究調整官をセンター長に振替、センターの内部組織の整備等)

### 2. 定員

昭和51年度末の定員は305名であったが、昭和52

年度当初に第4次定員削減計画に基づき4名の定員が削減された。一方昭和53年1月1日から安全性生物試験研究センターの設置に伴い研究員14名の増員が認められたので、昭和52年度末の定員は、指定職2名、行政職(一)53名、行政職(二)41名、研究職219名計315名となった。

なお、昭和53年度において安全性生物試験研究センターの強化に伴う増員2名が認められた。

### 3. 予算

昭和52年度予算総額は、1,919,511千円で前年度の3,364,458千円に比較して1,444,947千円の減額となっている。減額となった最大の理由は、安全性生物試験研究センター新築工事関係の予算措置が、51年度で終了したためである。

なお、このセンター運営費として278,576千円(機械器具整備費226,376千円を含む)が計上された。

おって、昭和52年度予算額の事項別内訳は資料1のとおりである。

### 4. 安全性生物試験研究センター等の建設概要

医薬品、食品等の各種化学物質の安全性確保のための動物実験による試験研究施設である安全性生物試験研究センターが落成し、当所における生物系の試験研究体制は飛躍的に強化された。さらに当所から排出される研究汚水、動物汚水などは、あわせて建設した廃棄物処理施設ですべて浄化され構外に放流されるようになった。

これらの施設は、建設費が約25億円で昭和51年6月に着工し、昭和53年2月に竣工した。

その施設概要は、次のとおりである。

#### ○ 安全性生物試験研究センター

鉄筋コンクリート造、地下1階地上6階建(一部4階建) 延床面積7,221.195 m<sup>2</sup> 建築面積1,559.035 m<sup>2</sup>

床面積 地下1階 1,283.618 m<sup>2</sup> ……調和機室、受電室、ボイラー室、自家発電室等

1 階 412.664 m<sup>2</sup> ……玄関、器材庫、会議室、応接コーナー等

2 階 1,458.321 m<sup>2</sup> ……洗浄室、飼料倉庫、動物管理室、研究実験室等

3 階 1,423.041 m<sup>2</sup> ……マウス室ラット室、標本室、

資料 1. 昭和 52 年度予算額

	昭和51年度 (A)	昭和52年度 (B)	対前年度差 引増△減額 (B)-(A)	備 考
	千円	千円	千円	
(組織) 厚生本省試験研究機関	3,297,377	1,843,249	△1,454,128	
(項) 厚生本省試験研究所	1,331,597	1,739,256	407,659	
人当経費	1,091,789	1,195,187	103,398	研究職の定員14名増のほか、 定期昇級及びベースアップによる増
一般事務費	48,870	56,791	7,921	
研究費	171,711	188,274	16,563	人当研究費単価の増 @980千 円→1,050千円
特別研究費	15,920	16,917	997	1. 製剤技術の進歩に伴う 医薬品の安全性の確認 に関する研究 (7,786千円)
標準品製造費	3,307	3,511	204	
安全性生物試験研究センター運営費	—	278,576	278,576	2. 生活関連諸物質の微量 分析新技術の開発研究 (9,131千円)
(項) 血清等製造及び検定費	96,399	100,166	3,767	
(項) 厚生本省試験研究所施設費	1,869,381	3,827	△1,865,554	
(組織) 厚生本省試験研究機関	67,081	76,262	9,181	
(項) 国立機関原子力試験研究費	38,261	38,957	696	
(項) 放射能調査研究費	11,520	5,861	△ 5,659	
(項) 国立機関公害防止等試験研究費	17,300	31,444	14,144	
計	3,364,458	1,919,511	△1,444,947	
(注) 振替予算額を除く				

解剖室, 研究  
実験室等

4 階 1,423.041 m<sup>2</sup> ……ラット室, 中央機器実験室, 機器分析室, 研究実験室等

5 階 772.648 m<sup>2</sup> ……ウサギ室, サル室, イヌ室, 手術・解剖室等

6 階 447.862 m<sup>2</sup> ……空調機器室, ダクト室等

○ 廃棄物処理施設

鉄筋コンクリート造, 地上2階建延床面積 593.33 m<sup>2</sup> 建築面積 397.32 m<sup>2</sup>

○ 厚生棟

鉄筋コンクリート造, 地上2階建延床面積 883.69 m<sup>2</sup> 建築面積 441.84 m<sup>2</sup>

5. 薬用植物研究施設(仮称)の建設計画

昭和52年度特定国有財産整備特別会計において,

廃棄物処理施設分担金及び設計料等 45,083 千円の子算が計上された。

廃棄物処理施設分担金については, 国立予防衛生研究所筑波医学実験用霊長類センター内に共用施設として廃棄物処理施設を新設するために必要な経費であり, 同所に当該施設の施工方を委託していたが, 本年度完成した。

また, 設計料については, 薬用植物研究施設(仮称)の基本設計を作成する経費であるが, 建設省筑波推進本部, 当所薬用植物研究施設小委員会等で種々検討を行い, 当初別棟で計画した研究本館, ファイトロン, 植物成分抽出蒸留所をそれぞれ研究本館に包括するなど, 研究業務の円滑化等を配慮した基本設計を完了した。

なお, 今後の計画としては, 昭和53年上半年期において実施設計を行い, 秋頃から建設工事に着手する予定である。

## 合成化学研究部

部長 神谷 庄造

合成化学研究部は、医薬品の合成研究、発がん物質を含む各種有害化学物質の物理化学的ならびに有機化学的研究、各種研究用化学試料の提供を通して当所の試験・研究に寄与して行きたい。これらの研究は、いずれも生物系の部との共同研究のもとに行うものであり、化学を武器として生物系との接点を目ざしたい。

## 研究業績

1) 抗腫瘍性官能基を有する化合物の合成とスクリーニングに関する研究

現在、抗腫瘍性官能基として知られているものが数種あるが、このうち 2-chloroethylnitrosourea 基  $[\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{NO})\text{CONH}-]$  と bis(2-chloroethyl)-amino 基  $[(\text{ClCH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}-]$  を有するピリジンおよびピリダジン誘導体を 20 種合成し、ラット腹水肝がん AH-13 およびマウスリンパ白血病 L-1210 を用いてスクリーニングを行った。その結果、両腫瘍細胞に有効な化合物が数種出て来た。なかでも 1-(2-chloroethyl)-1-nitroso-3-(3-pyridinyl) methylurea N-oxide が最も顕著な効果を示した。目下、この化合物と関連化合物 4 種を第 2 次スクリーニングに提出中である。(一学会発表 1; 特許出願受付番号: 53-031026)

本研究のなかで、ある種のニトロソ尿素のニトロソ基が転位することを見出したので、このタイプの転位反応が他のニトロソ尿素誘導体で起きるかどうかをその転位機構を含めて検討中である。 $[\text{RN}(\text{NO})\text{CONHR}^2 \rightarrow \text{RNHCON}(\text{NO})\text{R}^2]$

新しい抗腫瘍性官能基を見出すための研究として、シアノトリアツエノベンゼン誘導体  $(\text{RC}_6\text{H}_4\text{N}=\text{N}-\text{NH}-\text{CN})$  および 4-azidoquinoline 誘導体を 15 種合成し、AH-13 細胞に対する抗腫瘍性を調べたが有効なものなかった。(一学会発表 2, 3)

4-azidopyridine 1-oxide にシアン化カリウムの付加した化合物の構造は、その各種スペクトルおよび化学反応より、そのシアノ基はアジド基の末端窒素に結合していると推定していた。今回 X 線構造解析により推定構造の正しいことが分った。アジド基  $(-\text{N}_3)$  の 3 個の窒素原子は、ほとんど一直線上にあるが、シアノトリアツエノ基  $(-\text{N}=\text{N}-\text{N}(\text{K})\text{CN})$  では一直線上にない。

すなわち、C(4)-N(8)-N(9), N(8)-N(9)-N(10), N(9)-N(10)-C(11) のそれぞれの結合角は、113.5°、

111.2°, 110.1° であり、これらの値は  $sp^2$  混成軌道の結合角 120° よりも、 $sp^3$  混成軌道の結合角 109°28' に近い。(一学会発表 4) この間、丹野雅幸技官は X 線結晶構造解析法を習得した。

1, 1'-ethylene-bis(1-nitrosourea) (EBNU) 誘導体の抗腫瘍性についての構造・活性相関(一誌上発表 1) を、また各種ニトロソ尿素誘導体による AH-13 および L-1210 細胞に対する感受性の相違についての研究を発表することが出来た。(一誌上発表 2) これら生物試験評価に関しては、いずれも病理部の熱心な協力のもとに行ったものであり、所内で合成も出来、また所内で評価も出来ることを大変力強く思っている。

2) がん原性物質の化学反応に関する研究

発がん性アシル型 N-ニトロソ化合物  $[\text{RN}(\text{NO})\text{C}(=\text{X})\text{Y}]$  のアルキル化能およびアシル化能の新らしいパラミーターを得る目的で、これらの化合物とピペリジンとの反応を種々の条件下で試みた。ここに得られた結果と、別に (4-nitrobenzyl)pyridine による呈色反応より得られるアルキル化能パラミーターを比較し、これらのニトロソ化合物の生体内反応を推定した。(一学会発表 5)

また、1, 3-diarylnitrosourea 類の化学反応を検討した。なかでも、1, 3-diphenyl-1-nitrosourea はニタノールと加熱することにより N-phenylurethane, すなわち ethyl N-phenylcarbamate に変換する。

$[\text{C}_6\text{H}_5\text{N}(\text{NO})\text{CONHC}_6\text{H}_5 \rightarrow \text{C}_6\text{H}_5\text{NHCOOC}_2\text{H}_5]$

3) その他

厚生省がん特別研究の「突然変異性物質の動物発がんテストに関する研究」および「遺伝変異原性を主とする発がん物質スクリーニングの技術開発」の 2 グループに各々 7 種および 35 種の検体を配布した。

## 薬品部

部長 江島 昭

概要 前年度までに準備して来た溶出試験法とヒトの bioavailability との相関についての研究は本年度から厚生省薬務局審査課の業務の一環として生物学的同等性の判定基準作成に関する研究として出発した。これは医薬品製剤の bioavailability 評価法のより簡易にして科学的な方法の確立を目的としたものであり、ヒト(一部、国療東京病院など)、動物(東西両薬協製剤技術懇談会メンバー)、in vitro の三者の同一サンプルによる実験として、このような試みは未だ類を見ず、結果の成否については不明であるが、我々としてはで

きるだけ客観性と応用性の高い試験法が確立されるよう努力する覚悟である。

新規に開始した研究としては、この他、安定性の予測法に関する研究（審査課、星薬大、東西両薬協）、麻薬及び向精神薬の突然変異原性に関する研究（変異原性部との共同研究）、無毒化大麻成分の研究がある。

高速液体クロマトグラフ法による医薬品製剤の分析は、最新の充填剤の適用を試みることによって（東大生産技研試作品など）かなりの成果を得、混合製剤の公定分析法への導入はもとより、すべての新薬についての構造別分析体系の作成も可能な見通しとなった。またこの方法は生体試料中の分析及び安定性などの応用面にも多大の威力を発揮しており、今後の発展に期待する所大である。

又第九改正日本薬局方の英文翻訳にも協力した。

4月1日付で薬品第三室に京都大学大学院修士課程を終えた勝鳥りえ子技官が採用された。

#### 業務成績

1) 国家検定 総件数は 888 件で前年度より 122 件の増加 (16%) である。これは主としてブドウ糖注射液の増加 (55%) によるもので、逆に他の品目は減少した。不適はブドウ糖注射液 4 件 (0.7%)、リンゲル液 8 件 (42%) で、いずれも異物による。ブドウ糖注射液にはポリ塩化ビニル容器を用いたものが 8 件含まれている。モノマー及び添加物の溶出及びそれらの経時変化等を検討するのに長期間を要した。幸い大阪支所薬品部の協力を得ることができたのでポリエチレン、ポリプロピレンとの差も明らかとなり、これらの成績を合せて監視課へ 2 回報告を行った。

2) 特別審査試験 総件数 327 件で、前年度より 146 件の増加 (81%) である。解熱鎮痛剤におけるピリン系薬の他成分への変更が多かったことと新医薬品の若干の増加が原因である。殺虫剤は減少している。

3) 特別行政試験 スルピリン及び鎮咳剤シロップの同定と定量試験 (2 件)、フルオレセインナトリウムの純度に関する試験 (3 件)、ヨード化レシチン製剤中の遊離ヨウ素及びヨウ化物、及びヨウ素含量に関する試験 (1 件)、国産あへん (7 件) 及び輸入あへん (17 件) の試験を行った。

4) 一斉取締試験 フロセミドを含有する顆粒及び錠剤 (27 件) の定量、崩壊及び重量偏差の各試験及び塩酸メクロフェノキサートを含有する錠剤 (6 件) の定量、崩壊及び重量偏差の各試験を行い、フロセミド錠中崩壊不良の不適品が 1 件あった。

5) その他 日本薬局方フルオレセインナトリウムの規格改正についての実験データ及び同スルファミン

類の薄層クロマトグラフ法による純度試験法報告 (安全課)、殺虫剤指針の改定に関する資料提出 (66 品目、審査課)、医薬品添加物 (ジブチルヒドロキソトルエンほか 4 品目) の規格及び試験法、ならびに安定性に関する調査報告 (審査課)、向精神薬の簡易鑑定法に関する研究第 2 年度報告 (麻薬課)、生物学的同等性判定基準作成に関する研究第 1 年度報告 (審査課) 及び厚生省癌特別研究「突然変異原性物質の動物発癌テストに関する研究」のための 35 種の検体の溶解性、安定性、LD<sub>50</sub>、含量を報告した。

#### 研究業績

##### 1) 医薬品の分析化学的研究

i) 二波長クロマトスキャナ法による展開薄層板上での発けい光性を利用したノスカピンの定量法を確立した (→誌上发表 3)。

ii) 高速液体クロマトグラフィーによりスルホンアミド類の分離定量、感冒剤成分の分析、クーロメトリックモニターを用いたスルホンアミド類の分析 (→学会発表 7)、混合製剤中の鎮咳剤、祛痰剤及び抗ヒスタミン剤の定量 (→誌上发表 4, 5, 学会発表 9)、新医薬品の定量 (→学会発表 8)、フェノチアジン系薬剤の定量 (→学会発表 10)、メクロフェノキサート及び  $\mu$ -クロルフェノキシ酢酸の定量 (→学会発表 11) に関する研究を行い、医薬品の迅速、簡易分析を多数確立した。

iii) ガスクロマトグラフィーにより微量配合成分の定量を研究し、マレイン酸クロルフェニラミンのアルカリフレームイオン化検出器法を確立した (→学会発表 12)。

##### 2) 医薬品の安定性に関する研究

i) スルピリンの銅イオン存在下での分子状酸素による酸化分解を研究し、4-アミノアンチピリンを経てアンチピリニルパーオキシドに至ることを発見した。

ii) ジブチルヒドロキソトルエン、トリエタノールアミン、マクロゴール 400、チモール、塩化ベンゼトニウムなど医薬品添加物の安定性について調査した (→審査課)。

iii) 安定性予測に関する研究として室温における長期の安定性を短期の苛酷試験によって予測することは長年種々試みられているが、この標準法を確立する目的で審査課による研究班が設けられ、実験計画を検討し、研究を始めた (→審査課)。

iv) ブドウ糖注射液中に生じた 5-ヒドロキシメチルフルフラールが一部フルフラールに変化することを発見した。

## 3) 医薬品の安全性に関する研究

i) アスピリンの副作用を現す不純物の一つとして無水アスピリンが考えられているため、この定量法を確立し、市販アスピリン錠中の無水アスピリンの量を測定した〔衛生試報 95, 1, 35 (1977)〕。

ii) ポリ塩化ビニル製容器の輸液中には 2~5  $\mu\text{m}$  の微粒子がガラス容器に比べて 10~50 倍多く、オートクレーピングの時間に比例して増大することがわかった。今後この本体について検討すべきであろう。

## 4) 医薬品の有効性に関する研究

i) 固形製剤の溶出試験法の検討 (vi, vii), ジアゼパム錠及びフルフェナム酸カプセルの溶出試験法と bioavailability について研究し、ヒト胃内の酸度にかんがりの幅 (pH 1~5) があることからジアゼパム (pKa 3.3) の溶出試験液の pH としては 1 付近より 5 付近の方が好ましいことがわかった。またフルフェナム酸については溶出試験液に界面活性剤を加え、かつ pH を短時間 1.2 に保ったのち上昇させる方法が最も bioavailability と相関することがわかった (一学会発表 13, 14)。イソニコチン酸ヒドラジド錠、クロラムフェニコール錠についても成果が得られた。

また血液及び尿の採取には自ら制限があるため他の体液として唾液を検査し、バルビタール及びジアゼパムについての血中及び尿中排泄との相関を検討した〔衛生試報, 96, 27 (1978)〕。

## 5) 麻薬及び習慣性薬物に関する研究

i) GC 及び LC によるオピオイド製剤中の副アルカロイドの定量を検討し、現行試験法と比較した〔衛生試報, 96, 63 (1978)〕。

ii) 向精神剤の簡易鑑定法に関する研究〔衛生試報 95, 38 (1977)〕、麻薬課へ報告及びメプロバメート錠の定量について報告を行った〔衛生試報 96, 67 (1978)〕。

iii) あへん中の主要アルカロイドの組成比によるあへん産地の推定を行うため GC による分析法を検討した〔衛生試報 95, 4 (1977)〕。

iv) 麻薬及び向精神薬の突然変異原性に関する研究〔衛生試報 96, 55 (1978)〕

## 生物化学部

部長 川村 次良

概要 年度頭初、グルココルチコイドを含有する所謂“健康食品”の問題が起り、その分析法などの検討に努力した。又、特別研究課題にとりあげ第2年次の研

究に入ったカリクレイン製剤、ウロキナーゼ製剤など酵素製剤の有効性、安全性に関する研究及びインシュリン製剤など臓器抽出製剤の種特異性の問題やペプチドホルモンに付随する不純ペプチドの検出法とその活性などについて検索したが、十分な結論を得られなかったものもある。したがって、これらの問題は免疫原性の問題も含めて今後も継続しなければならない研究課題であると考えている。

昭和 52 年 8 月 1 日付で谷本 剛技官が採用され、酵素室に配属された。

## 業務成績

1) 国家検定 インシュリン製剤 100 件及び脳下垂体後葉関係製剤など 53 件について検定を行ったが、いずれも合格品であった。

2) 特別審査試験 47 件の試料のうち、ステロイドホルモン製剤が 36 件で大半を占めているが、そのほか酵素、ペプチドホルモン、ムコ多糖類や豚皮などの特殊な製剤も含まれている。規格・試験法については、確認試験及び純度試験を含めて生物活性試験を導入し、製剤規格の意義付けをする方向で検討した。

3) 一斉収去試験 リゾチーム錠の 49 件について定量試験を行った。塩溶効果と考えられる定量法について検討し、一部製剤についてはこの方法を適用することが必要であることを監視指導課へ報告した。〔衛生試報, 96, 103 (1978)〕

4) 特別行政試験 成長ホルモン 2 件、健康食品関連試料 5 件について試験を行った。〔衛生試報, 96, 105 (1978)〕〔衛生試報, 96, 108 (1978)〕

5) 標準品製造 昭和 52 年度の標準品製造品目及びその出納状況などについては、巻末の表を参照されたい。なお、新告示品目のメトトレキサート標準品は赤外吸収スペクトルについて検討中であるが、53 年度中には交付できる予定である。

又、51 年度から継続して行ってきた WHO のオキシトシン、アルギニンバソプレシン及びリジンバソプレシンの国際標準品設定のための共同検定を終わり、その結果を WHO へ報告した。

6) その他 i) 医薬品の再評価に伴う実態調査を行うため、それに必要なカリジノゲナーゼ又は脾臓製循環系作用物質に関する試験項目及び試験方法について検討し、その結果を安全課へ報告した。

ii) 昭和 52 年度版医薬品の規格及び試験法を作成し審査課へ報告した。

## 研究業績

1) コルチコイドの定量法に関する研究

血中ステロイドの定量法に関する研究の一環とし

て、ガスクロマトグラフ法によるコルチコイドの分離定量におけるトリメチルシリル化の条件などについて検討した。(→学会発表 15)

#### 2) 錠剤などの含量均一性試験に関する研究

ジギトキシン錠及びジゴキシン錠の含量均一性試験法を作成するための共同研究を行った。(厚生科学研究 昭和 52 年度)

#### 3) 向精神薬の免疫学的検出法に関する研究

Phenobarbital-<sup>3</sup>H, Hexobarbital-<sup>3</sup>H を用いて抗体の特異性とその結合能の強さを調べ、その結果から血球などを利用した凝集反応への応用を検討中である。

#### 4) たん白製剤の純度に関する研究(特別研究)

たん白製剤の純度と物理化学的及び免疫学的性状の相関について研究するため、カリクレイン製剤を経口、腹腔内及び腸管内に投与してその純度と抗原性試験との相関について検討中である。

#### 5) 標準品の品質規格に関する研究

i) メトトレキサート標準品原料につき、液体クロマトグラフ法を用いてその不純物の検索を行い、又、精製品を調製するための手段として利用することを検討し、メトトレキサートの高純度の基準品を調製することができた。〔衛生試験報, 96, 32 (1978)〕

ii) 新たに調製したリゾチーム標準品について、2種類の定量法による力価測定、アミノ酸組成及び乾燥減量の測定について検討し、1 mg (力価)/mg と認定した。〔衛生試験報, 96, 98 (1978)〕

iii) 血清性腺刺激ホルモン標準品の新ロットの力価について、国際標準品を対照として3施設で共同検定を行い、10.9国際単位/mg と認定した。〔衛生試験報, 96, 95 (1978)〕

## 放射線化学部

部長 鈴木 郁 生  
前部長 浦 久 保 五 郎

概要 昭和 52 年 4 月 1 日付で浦久保五郎部長は、15 年 1 カ月におわたる放射線化学部長として多数の業績を残し退官され、鈴木郁生副部長が事務取扱いを命ぜられた。

当部においては、科学技術庁原子力予算について、そのテーマおよび予算の概算要求の取りまとめを行っている。53年度には、放射性医薬品に関する研究、放射線滅菌に関する研究、照射食品の安全性に関する研究、放射能調査に関する研究など 8 テーマが認められている。また RI 実験室については、52年度に液体シ

ンチレーション計数器、RI 貯蔵冷蔵庫、排液処理装置などを購入し、より一層その整備が行われた。

放射性医薬品基準については、52年度に公布が予定されたが、作業が遅れ新しく認可された放射性医薬品をでき得る限り包含して、53年秋頃の公布を目途に作業を続行している。

### 業務成績

放射性医薬品の特別審査試験

放射性化合物製剤, *in vitro* テスト用キット, 用時標識用非放射性試薬など 25 品目について、必要な化学試験および書類審査を行った。

<sup>47</sup>Ca 標識診断用化合物製剤: 1 品目

<sup>57</sup>Co, <sup>58</sup>Co 標識診断用化合物製剤: 1 品目

<sup>99m</sup>Tc 用時標識用試薬: 4 品目

<sup>3</sup>H 標識 *in vitro* テスト用キット: 1 品目

<sup>75</sup>Se 標識 *in vitro* テスト用キット: 1 品目

<sup>125</sup>I 標識 *in vitro* テスト用キット: 17 品目

### 研究業績

#### 1) 短半減期放射性医薬品の品質に関する研究

ヒト血清アルブミン標識用キットを用い、ジェネレータから得られた <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> を加えて pH 2.0 および 4.2 で標識し、得られた製品の純度をペーパクロマトグラフィー (PPC), 薄層クロマトグラフィー (TLC), ゲルろ過法, TCA 沈澱ろ過法により検討した。又, <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> 溶出液について, Ge(Li) 検出器による  $\gamma$  線スペクトル測定で <sup>99</sup>Mo 混入率および異核種の検出を行った。

PPC, TLC では標識率 83~93% の結果を得たが、展開溶媒の種類により値が変動する点が今後の課題として残されている。ゲルろ過, 沈澱ろ過でも 87~99% とふれが大きい。<sup>99</sup>Mo 混入率は溶出 15 日目で <sup>99m</sup>Tc の 0.0052% と極めて低かったが、未確認核種一種の混在を認めた。

#### 2) DOM 代謝物のラジオイムノアッセイに関する研究

幻覚剤 DOM の主代謝物である 2,5-dimethoxy-4-carboxyamphetamine (I) のラジオイムノアッセイ (RIA) を検討する目的でこれを合成した。一方、別途合成した p-hydroxyanisole hemisuccinate (II) の N-hydroxysuccinimide ester を I と反応させて I-II の縮合物を得、更に Greenwood-Hunter の方法でヨウ素化して <sup>125</sup>I 標識化合物を得た。

#### 3) セレン中毒と貧血の関係

セレン中毒の動物においては貧血が知られている。52年度はセレン貧血ラットにおける生体内の鉄およびコバルトの動態を調べた。その結果、血液、血清、肝、

脾、腎および骨について鉄およびコバルト含量の低下を来たしたことにより、これらの金属代謝の異常が示唆された。(→誌上発表7)

4) 妊娠ラットにおけるマンガンの分布と胎仔移行について

妊娠10~19日目のラットに $^{54}\text{MnCl}_2$  0.5 mg/kg, 10 mg/kg を静注し、各3時間後と20日目の母体および胎仔内分布を測定した。

兩用量群とも投与3時間後の胎盤濃度は妊娠17, 19日目の方が、10, 13日目よりも著明に高かったが、母体臓器、胎仔では妊娠時期による分布の差はなかった。本研究は薬理部と共同で行った。(→誌上発表62)

5) 2-Mercaptobenzothiazole の吸収、分布、代謝  
 $^{14}\text{C}$ -2-mercaptobenzothiazole を合成し、モルモットを用いて経皮吸収、体内分布、代謝について実験を行った。

塗布後24時間で正常皮膚動物では、その4.6%が、そして表皮を剝離した動物では、19.4%が尿から排泄された。また塗布部位には、それぞれ15%および10%が残留しているのが認められた。

$^{14}\text{C}$ -2-mercaptobenzothiazole を皮下注射すると、投与後6時間で投与量の92%が、グルクロナイドおよびサルフェイトの形で尿中に排泄された。(厚生省へ報告)

6) Diphenylguanidine の吸収、分布、代謝

$^{14}\text{C}$ -diphenylguanidine を合成し、モルモットを用いて経皮吸収、体内分布、代謝の実験を行った。

正常皮膚面からの吸収は、塗布後24時間で0.23%、48時間で0.70%であった。創傷皮膚面からは、24時間で6.17%、48時間で18.30%が吸収された。また吸収された $^{14}\text{C}$ -diphenylguanidine の放射能は、肝、腎、副腎、肺に分布しているのが認められた。排泄は尿に60%、糞に40%であり、尿中代謝物として少なくとも5種類存在することが認められた。(厚生省へ報告)

7) 環境試料中の天然放射性核種の分析に関する研究

前年度に引き続き、岐阜県東濃地方の井水について $^{226}\text{Ra}$  および $^{228}\text{Ra}$  の調査を行った。これらの調査の結果、この地方の井水には、つねに $^{226}\text{Ra}$  が含まれることが明らかとなった。また $^{228}\text{Ra}$  については、測定器の検出感度から、1箇所のみしか検出されなかったが、その他の井水にもわずかながら含まれていることが予想された。

8) 環境試料中の人工放射性核種の分析に関する研究

i) 核燃料再処理施設周辺の $^{129}\text{I}$  の放射能調査を目的とするための分析法が、陸産食品について検討された。

ii) 科学技術庁が主宰する放射能測定基準化委員会に協力し、大気中のプルトニウム分析法の検討を行った。その結果は科学技術庁に報告された。

## 生 薬 部

### 部 長 名 取 信 策

#### 業務成績

1) 特別審査：従来通り生薬を含有するカゼ薬(93件)について審査を行った。本事務の効果として、含有する生薬の確認試験および一部の定量法の設定が完備してきたことと、設定についての実験例の添付が徹底してきたことがあげられる。生薬を含有する製剤の場合、配合生薬の種類および配合量が千差万別のため統一試験法を決めることは極めて困難であるので、これら審査に当たっては製造業者による試験法の設定理由および実験例などの資料が必要となる。

2) 局方生薬の規格設定：本年度より第10改正の作業が始り、9局収載生薬の基原(学名)を全面的に再検討し、また油脂の過酸化物、抗酸化剤などの試験法についても調査した(厚生省薬務局へ報告)。

3) 局方外生薬の規格設定：昨年度に引き続き、局方外生薬の規格設定について、東京都衛研、東京薬大、津村研究所との共同で、研究を進めた。本年度は昨年度の継続分としてイレイセンなど16品目の規格設定を行い、新たにイヌゼンショウ末など45品目の規格設定を完了した(厚生省薬務局へ報告)。

4) 本年度は一斉取締試験、特行試験などの該当品目はなかった。

#### 研究業績

1) 生薬・生薬製剤の規格・試験法の基礎研究：前記2)、3)と並行して研究を行ったが、セリ科生薬とくに中国産、韓国産キョウカツについて形態学的、化学的研究を行った(→学会発表19, 20)。

2) 植物資源の医薬的利用に関する研究：主要薬用植物の原種(純系)の研究、医薬資源植物調査、栽培薬用植物の資源的評価について研究継続中である。

3) 揮発性成分含有生薬の保存中の経時変化に関する研究：題記の厚生科学研究に協力した。

4) 天然有害物質の化学的研究

i) マイコトキシンの研究：従来の研究の際追及を行わなかった5種の菌について有毒物質の代謝の有無

を検討した（→学会発表 25）。cytochalasin 系の細胞毒 chaetoglobosins の産生の有無を広く *Chaetomium* 属 56 株について検討した（→誌上发表 14, 15, 学会発表 26）（衛生微生物部, 東大医科研, 横浜市大医などとの共同研究, 文部省および厚生省がん特別研究費による）。

ii) ワラビの変異・発がん物質の研究：本年度は主として変異原性の試験による追及を行ったが、その間にワラビの成分として分離されているもののうち kaempferol が可成り強い変異原性を示すことが判ったので、フラボノイド全般について変異原性の有無を検討し、発がん実験を行うための材料の抽出分離等も行った（→誌上发表 13, 学会発表 17, 21, 22, 23, 24）。一方従来の知見の整理も行った（聖マリアンナ医大, 国立がんセンター等と共同研究, 文部省がん特別研究費による）。

iii) 各種食品に存在する青酸化合物の調査研究：食品衛生調査研究（厚生省環境衛生局へ報告）。

## 療 品 部

### 部 長 大 場 琢 磨

**概要** 当所内の安全性生物試験研究センター建設工事の進行に伴い、図書館等の付属棟の建設が急にきまり療品室は昭和 52 年 9 月再び 1 号館から新館 3 階北側へ引越しを行った。

昭和 52 年 2 月アメリカ環境保護庁はエチレンオキシサイド (EO) の使用禁止を呼びかけたが、EO は医療器具類の滅菌に不可欠のものであるため、FDA は医療器具についての禁止措置を除外した。この間 EPA は発がん性を始めとする各種毒性試験結果を収集し、近く EO の使用にあたっての環境濃度及びプラスチック類に残留する最低濃度を定めて規制することとなった。われわれは既にプラスチックに残留する EO の分析法の研究を行っているので、この事態には即応することができた。

衣類中の防炎加工剤 APO 及び防虫剤デルドリンの規制は昭和 52 年 9 月 24 日付で告示された。家庭用品第一室では昭和 52 年 6 月から東京都, 神奈川県, 横浜市, 川崎市, 岐阜県の衛生研究所及び国民生活センターなどの家庭用品試験担当者らと隔月研究会を開き、化学試験の情報交換, 文献紹介などを続けている。小人数ではあるが同じ目的をもった研究会の横の連絡体制ができたことは相互の発展につながるものと期待される。

昭和 53 年 1 月をもって安全性生物試験研究センターの組織が発足したため、家庭用品第 2 室の鈴木康雄室長始め内藤, 鎌田, 会田, 池田技官らは療品部から毒性部へ移った。この室は昭和 48 年新規に設置されて以来当部において家庭用品に関する慢性毒性を主とした動物実験を非常な努力をもって推進してきたものであり、また一つの部の中で化学系と生物系の研究者が共存して貴重な効果を発揮できたことに対し、ここに多年の労に深甚の謝意を表するものであり、今後も協同研究体制が持続されることを願うものである。

また人事移動により昭和 52 年 8 月から新谷技官が理化学試験室に入った。

### 業務成績

#### 1) 医療用具の基準作成

前年に引続いて「人工腎臓装置基準」は調査会において血液ポンプ及びヘパリン注入器の規格を追加することで検討したが、これらは別扱いとすることに決定したので近く案文をまとめ今年内に告示することになった。本年 4 月シカゴの人工臓器学会に出席後サンフランシスコ及びクリーブランドの透析センターをみる機会を得、参考となった。

#### 2) 家庭用品の試験検査

昭和 52 年度の試験品目は蛍光増白剤, 防炎剤, 染色助剤及びゴム加硫促進剤各 1 品目の合計 4 品目で、このうち当部で担当するものは防炎剤の急性, 慢性, 発がん性, 及び加硫促進剤の催奇形性の各 4 項目のみで他の各種試験は信州大学など 9 カ所へ, 51 年度継続の試験は広島大学など 3 カ所へ委託した。

#### 3) 輸出検査

腸線縫合糸の輸出検査は昭和 36 年に輸出検査法が実施されて以来、継続して今日まで当所で行っているが、行政管理庁は合理化方策のため昭和 52 年度にその必要性について調査を行った。

その結果、54 年度を目途に削除できるよう努めることとの回答を厚生省から提出した。

昭和 52 年度の輸出検査件数は 55 件 (70,250 ダース) で不適は包装密封不良で 11 件認められた。

#### 4) 理化学試験室のコンピューター能力の拡充と機器分析の依頼測定

従来のミニコンピューターの能力を拡充させるために、コア・メモリを 28K とし、さらに紙カード・パンチャー, 同リーダー, ディスクメモリ (4.8M 語), 出力用テレタイプをリースにより購入したので、マスマスベクトルのデータ処理能力の向上と共に給料計算にも使えることになった。

所内での依頼測定は質量スペクトル約 200 件, 核磁

気共鳴スペクトル約100件、ガス・マス分析20件であった。

#### 研究業績

1) 繊維素材の放射線照射によるオキシセルロースの生成並びに残留エチレンオキサイドに関する研究

主な繊維素材に大量のガンマー線を照射したとき、あるいは二酸化窒素処理によりある程度酸化させたものにガンマー線を照射してオキシセルロースを生成させ、これを滴定法及び多重反射赤外スペクトル法によって確認した。オキシセルロースは止血作用をもった衛生材料であるが、この方法によれば滅菌も同時にできる利点がある。(原子力研究、衛生微生物部と共同)

また衛生材料に使われる繊維素材をエチレンオキサイドガスにより滅菌するとき吸着されるガスの量をガスクロマトグラフィーで定量する場合の溶液法、ヘッドスペース法について比較を行うと共に、エチレンオキサイドの標準溶液の安定性について検討を行った。(→学会発表 28)

#### 2) 歯科材料に関する研究

各種アマルガムについて生理食塩液中に溶出する水銀、錫、亜鉛、銅の量を原子吸光分析並びにポーラログラフィーにより定量し、材質の比較検討を行った。(→学会発表 27)

3) 家庭用品に含まれる化学物質の分析化学的研究  
繊維製品の防菌・防黴剤に使われるジオルガノ錫、トリオルガノ錫及びフェニル錫化合物の分離分析法を確立した。(→学会発表 29)

また羊毛製品に加工された防虫剤の鑑別法としてディルドリン、ミチン FF、ミチン LA、及びオイラン U33 の系統的分離分析法を検討し、満足すべき結果をえた。(→学会発表 30)

4) 機器分析におけるコンピューター利用に関する研究

ミニコンピューター・システムによるマスキロマトグラフィー、マスフラグメントグラフィーのプログラムの整備並びに Fortran 言語による量子化学計算などのプログラムの改良、整備を行った。

## 環境衛生化学部

部長 井上 哲男

#### 業務成績

##### 1) 一斉取締試験

アルコール 50% 以上を含有する頭髪用化粧品中のメタノールの定量試験を 251 検体について実施した。

いずれも基準値をこえるものは認められなかった。

#### 2) 特別行政試験

##### i) 厚生省庁舎水道水調査

前年と同様、建築物における衛生的環境の確保に関する法律にもとずき、庁舎給水施設(地下受水槽、高架タンク、各階給水柱)の定期的検査を実施した。11 検体につき、年 2 回合計 22 検体(各試験項目 26)を処理した(厚生省官庁会計課へ報告)。

##### ii) 皇居外苑深瀬水調査

前年に引続き、11 地点の水質につき調査した(業務局を経て環境庁自然保護局へ報告)。

##### iii) 皇居内苑深瀬水調査

宮内庁からの依頼により、10 地点の水質につき、年 4 回四季別調査を実施した(宮内庁管理部へ報告)。

##### iv) 国立衛生試験所排水調査

前年と同様、生物系および化学系の各排水(各試験項目 22)につき、毎月 1 回調査した(総務部会計課へ毎月報告)。

##### v) 国立衛生試験所庁舎水道水調査

所内各棟別の試験室 12 ケ所の水質について試験した。これは近年、給水タンクおよび給水管の保守管理、さらに工事関係などにより、各部において試験に使用される水の水質低下が問題とされ、実態を把握するために実施したものである(部長会議へ報告)。

##### vi) 輸入食品試験

輸入食品としてのミネラルウォーター 1 件につき、水道法第 4 条に規定する水質基準の 25 項目につき試験した。

#### 3) 調査業務

##### i) 国設自動車排出ガス測定所における大気汚染の常時測定

52年度に引続いて、東京都内 3 ケ所の測定所において、各種自動計測器により、大気汚染の常時測定を実施した。調査項目はつぎの 8 項目である。一酸化炭素、窒素酸化物、二酸化硫黄、炭化水素、浮遊粒子状物質、オキシダント、アルデヒド、交通量。[環境庁大気保全局へ報告、衛生試験 95, 84 (1977)]

#### 研究業績

##### 1) 環境空気の衛生化学的研究

##### i) 建築物における空気の衛生管理基準の設定に関する研究

室内空気汚染の実態調査を行い、主として建築物内外における窒素酸化物濃度の推移について検討した(厚生省環境衛生局企画課へ報告)。

##### ii) 空気中における有害物質の検出と生成機構に関する研究

空気中の N-ニトロソ化合物の測定法について検討した (→学会発表 36)

### iii) 空気に含まれるガス状および粒子状物質の微量分析に関する研究

空気に含まれる汚染物質の微量分析法として、溶液導電率法による大気中の二酸化硫黄の自動計測について検討した [→学会発表 37, 衛生試験 95, 75 (1977), 衛生試験, 95, 80 (1977)].

### 2) 化粧品分析化学的研究

化粧品原料基準に追加が予定される原料の規格および試験法の検討を行った (厚生省薬務局審査課および化粧品原料基準委員会へ報告)。

### 3) 水道水質基準および試験方法設定に関する研究

#### i) 水道水の標準分析法の開発に関する研究

水道水質基準の追加または改定のため、東京大学薬学部ほか 4 大学と共に、水道水質基準策定に係る水質試験法に関する研究を行った (厚生省環境衛生局水道環境部へ報告)。

#### ii) 水道水質基準の設定ならびに水質分析方法の作成に関する研究

水道法にもとづく水質基準ならびに水道水質分析法(案)を作成した (厚生省環境衛生局水道環境部へ報告)。

#### iii) 温泉の衛生化学的研究

温泉分析法の全面改定に伴い、温泉分析法原案を作成した (環境庁自然保護局温泉分析法に関する委員会へ報告)。

#### iv) 水道水中の有機塩素化合物の指標に関する研究

ヘッドスペース法による水道水中の低沸点有機塩素化合物の分析法の検討を行った。東京大学、東京医科歯科大学など 9 機関との共同研究である (厚生省環境衛生局水道環境部へ報告)。

### 4) 水道用品に関する研究

#### i) 水道用品等規格設定に関する研究

浄水場において用いられる水処理剤としてポリ塩化アルミニウム、液体硫酸アルミニウムなどの規格設定と、タールエナメル、タールエポキシ系樹脂塗料の溶出物質の試験を行った (厚生省環境衛生局水道環境部へ報告)。

### 5) 水利用に関する衛生化学的研究

#### i) 水道原水中の発がん物質に関する研究

環境汚染物質の染色体異常に関する研究として、3 価および 6 価クロムの染色体異常について検討した (厚生省がん特別研究石館班へ報告, Mutation Research in press)。

#### ii) 陸水の浄化に関する研究

皇居外苑濠水質の衛生化学的研究を行った (→誌上発表 16)。

### 6) 有害性金属の衛生化学的研究

#### i) 有害性金属の環境中毒学的研究

カドミウムの連続投与(ラット)後の骨中におけるカルシウムの挙動について検討した (Toxicol. Appl. Pharmacol. in press)。

また、カドミウムによる腸管カルシウム吸収抑制作用について検討した (→学会発表 33)

#### ii) クロム化合物の生体運命に関する研究

ラットの血液および肝臓における 6 価クロム、3 価クロムの挙動について比較研究を行った (→学会発表 34)。

#### iii) 環境汚染物質としての有害性金属の分析技術の開発に関する研究

ニッケルの生体・環境試料からの微量分析法を検討し、無炭化原子吸光法および電気透析法を用いて、環境試料としての茶葉中のニッケルの化学形について研究した (→学会発表 32)。

## 食 品 部

### 部 長 内 山 充

概要 食品中の人工汚染物質と天然有害物質、および食品成分の変質に関する従来からの試験・研究業務に加えて、年度当初からクロレラ、コイ等による新しい中毒事例が続いたため、毒性部と協力してそれらに対応する体制をとった。さらに 6 月には、当部が FAO/WHO の飼料および食品汚染モニタリング計画に関する collaborating centre として指定を受けたため、全国の地方衛生研究所および統計情報部の協力を得て、過去、現在、将来に亘る我が国全体の食品汚染物分析データの集計、保存、電算機処理、情報提供のためのシステム作りとそれに関連した諸業務を新たに発足させた。

前年度に本体の設置を見た GC/MS に引き続き本年付属部分の充実が行われた。

#### 業務成績

1) 輸入食品検査：本年度は PVP (ポリビニルピロリドン)、EDTA 等添加物基準に関するもの (36 件)、メチレンクロリド等 (4 件)、除草剤 (3 件)、アフラトキシン (7 件) の化学検査と若干の異物検査を行った。うち不可 4 (EDTA および安息香酸各 2) であった。

2) 特行試験：食品残留農薬実態調査は、本年度よ

り新たな構想での計画に入り、数年前の実態と現在とを比較する意味での国内食品の再調査（米、トマト、ブドウ、キュウリ、リンゴ、72 検体）と、輸入食品中の農業残留の実態調査（大豆、小麦、トウモロコシ、65 検体）が開始された。

特殊調製粉乳は 10 検体につき重金属 8 種類の含有量試験と異物検査を行った。

#### 研究業績

##### 1) 農薬の残留分析及生体活性に関する研究

i) 食品中の残留農薬分析法の開発と改良については、動物性食品中のオキシテトラサイクリンの化学分析法を開発し（→誌上発表 18）、次いでカルバメート系殺虫剤の分析法の改良につき検討中である。また、多数の有機リン系農薬の系統的一斉分析法を確立した（→学会発表 39）。

ii) 日常食品中の汚染物の実際摂取量の調査研究（total diet study）のため、89 種類 13 群の調理食品からの有機塩素剤、有機リン剤等の分析法を検討し、1977 年度試料の分析を行った（環境衛生局委託研究）。

iii) 有機リン剤の特異的反応として、たん白質との結合解毒を構造類似農薬を用いて検討しその毒性的考察を行った。さらに有機リン剤の肝ミクロソーム P-450 への作用を解明した（→誌上発表 19）。

##### 2) 食品中の人工汚染物に関する研究

i) PCT の長期投与後のマウスの体内での分布、蓄積および代謝物について検討した（毒性部と共同研究、業務局行政研究）。

ii) 食品中のフタル酸エステルは、米および畜肉についての汚染実態を全国 7 衛研の協力を得て調査し結果の解析を行った（環境衛生局委託研究）。

iii) 食品の重油汚染に関する研究は、ベンゾ（a）ピレンの新分析法の確立、パラフィン類の GC-CIMS による定性定量法の開発、および石油中の含窒素成分の分析法の検討と研究を進め、同時に自然環境や魚体内での石油成分の変化について実験を行った（国立機関公害防止総合研究、→誌上発表 20、学会発表 40、41、42、43）。

iv) 食品中の重金属の化学形態についての研究（環境衛生局委託研究、→誌上発表 21）。

v) 汚染物の免疫活性への影響検討としてブラック形成細胞法（PFC 法）を用いて、重金属および塩素系化合物について影響を検討した。

##### 3) 食品中の天然汚染物に関する研究

i) かび毒の化学分析法とその応用に関しては、多種多系統のかび毒の一斉分析法の確立と、高速液体クロマトグラフィーによるかび毒の分析についてさらに

発展を見た。またかび毒特にステリグマトシスチンの動物体内動態の検討の基礎実験や、オクラトキシン A、デオキシニバレノール等の標品製造に関する検討を行った（厚生省がん研究、→学会発表 44、45、46）。

ii) 食品のかび毒汚染の調査研究は市販食品、輸入食品（特に香辛料）のステリグマトシスチン、アフラトキシン類の調査および前記 total diet study のかび毒分析を行った。（環境衛生局委託研究）。また、赤かび毒汚染については分析法の改良と全国調査網の設定および実態調査が行われた（科学技術庁特調研究）。

iii) コナダニを用いた研究として、かびによるダニの誘引、かびのみによるダニの繁殖、ダニによるかびの伝播等につき研究を続行中である（文部省試験研究）。

##### 4) 食品成分およびその変質に関する研究

i) 照射食品の研究としては、カマボコの  $\gamma$ -線照射あるいたその他の処理によって生じる遊離基量の変動とその性質につき追究した（科学技術庁原子力研究、→学会発表 47）。

ii) 食品成分の微量分析に関しては、TLC におけるけい光濃度法に際して、粘性有機溶媒を噴霧して感度や精度を上昇させる方法を見出した（→誌上発表 22, J. Chromatog. in press）。

iii) 脂質の過酸化に関する研究では、TBA 法を生体組織ホモジネートに用いるに当たっての最適条件等につき新知見を得、TBA 発色物質の特性等を検討した。さらに老化、絶食、その他の病態時の組織 TBA 値の変動を求め、解析を加えた（科学技術庁特調研究、→誌上発表 23, 24、学会発表 48, 49）。

iv) 植物多糖質の生体活性をしらべる目的で、ササ、米ヌカ、フスマ等よりヘテログリカン分画を単離し、それらの免疫賦活作用を検討した。

##### 5) 食品の規格、基準に関する基礎的研究

i) 動物性食品の酸敗の検査方法および実態調査を行った（環境衛生局委託研究）。

ii) 食品中の重金属の基準設定の基礎資料としてのバックグラウンド調査に関して分析法の吟味を行った（→学会発表 50, 51）。

6) 輸入食品の簡易検査法の開発に関しては本年もいくつかの検討がなされた。かんきつ類表皮のクマロン・インデン樹脂の特殊分析法、ビール中のポリビニルピロリドンの分析法、マヨネーズ中の EDTA の分析法の改良、およびピーナッツのアフラトキシン検査におけるミニカラムの利用等である。それぞれ満足すべき結果を得た。

## 7) 食中毒に関する研究

i) クロレラによる光過敏症性皮膚炎の原因解明と予防対策確立のため、発症原因物質の単離、およびその生成条件の解明を行った(毒性部と共同研究、環境衛生局委託研究)。

ii) 鯉による麻痺性中毒の原因を究明し、発生防止法の検討のため、原因物質の単離と生成機序の解明を急いでいる(毒性部と共同研究、環境衛生局委託研究)。

## 8) 食品汚染物に関する情報処理システムの確立(環境衛生局委託研究)

i) 我が国における食品中の各種汚染物の分析データの集計、保存、電算機処理および情報解析と提供に関し、過去7カ年分の整理と、将来の体制を確立するため、全国67カ所の衛生研究所との間の調査網を作り、データの集計を行った。

ii) 1977年の食品試料を未来の需要のために永久保存する food sample bank として、 $-30^{\circ}\text{C}$  冷凍庫中に total diet study に用いた全国4地区の試料を保存した。

## 食品添加物部

部長 谷 村 顕 雄

## 業務成績

## 1) 製品検査(昭和52年1月~12月)

食用色素: 検体数 414

合格 413 不合格 1

2) 洗浄剤の残留試験 ショ糖脂肪酸エステル、カリ石鹼、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルの四品目の家庭用食器、野菜等への残留試験を実施中である。

## 3) 食品添加物標準分析法の作製

「食品中の食品添加物分析法」は昭和49年に第一集が、昭和51年に第二集が作製された。昭和52年度には、亜硝酸ナトリウム、硝酸カリウム、同ナトリウム、BHT、BHA、セルロースグリコール酸ナトリウム、タール色素の分析法を第三集としてまとめた。さらに第四集収載分として、亜硫酸塩、臭素酸カリウム、プロピオン酸塩、タール色素、BHA、BHT、没食子酸、OPP について検討中である。(→誌上発表25)

## 4) 畜産食品に含まれる合成抗菌剤検査法の作製

飼料添加剤として指定されている合成抗菌剤のうち、カプリロヒドロキサム酸、カルバドックスについ

て、豚肉、鶏肉中の残留中の残留分析法を確立した。(→誌上発表26)

## 研究業績

## 1) 硝酸塩の吸収、排泄に関する研究

生体内で生成する N-ニトロ化合物の前駆物質の1つである硝酸塩について、ヒトにおける摂取量と尿中排泄量との相関性について検討した。成人の24時間における摂取量は44~864 mg、尿中排泄量は45~237 mg でありその排泄率は27~134% である。また同時に秋田、山形、長野、宮城、愛知の各県衛生研究所との共同研究により、農村地区及び都市地区の住民についても同様な比較調査を実施した。(→誌上発表27, 28, 学会発表52)

## 2) 医薬品のニトロ化に関する研究

アミノピリンを経口摂取した場合に、生体内で生成すると予想される N-ニトロソジメチルアミン(NDMA) について各種の条件下でその生成率を検討した。亜硝酸濃度が10 ppm を超える高濃度では、きわめて速やかに NDMA を生成し、またその生成率も高い。しかし実際の胃内における亜硝酸濃度はきわめて微量であり1 ppm を超えることは殆んどあり得ないが、アミノピリンを1 ppm の亜硝酸と反応させた場合の NDMA の生成は微量である。さらに胃内に食品が共存すれば、NDMA の生成はさらに40% 程度に低下することが明らかとなった。その他、スルピリン、アンチピリン、ある種の抗生物質についてのニトロ化についても検討を行った。

## 3) 食品添加物、農薬のニトロ化に関する研究

N-メチルアンスラニル酸メチル(着香料)と亜硝酸との種々の条件下におけるニトロ化反応を試み、対応するニトロ化体を得た。また N-メチルカーバマイト系農薬と亜硝酸とから対応するニトロ誘導体を作り、アンスラニル酸メチルのニトロ化体と同様、変異原性部との共同研究により突然変異性試験を行った。(→誌上発表29, 30, 学会発表53)

## 4) ニトロ化反応に影響を及ぼす諸因子について

クエン酸、酒石酸、リンゴ酸、乳酸、トリカルバル酸などによるウレイド化合物のニトロ化速度の促進について種々の条件下で実験を行った。またピロカテコール、ピロガロール、没食子酸などのポリフェノール類がジエチルアミンのニトロ化に及ぼす影響を種々の条件下で検討した。

(→誌上発表31, 32, 学会発表54)

## 5) 着色料に関する研究

食品添加物に含まれる不純物の微量分析新技術の開発について、単離した付随色素につき機器分析のうち、

とくに二波長分光測光法を利用しての分析法について研究を行った。単離した付随色素は食用青色1号とスペクトルが全く重なることがないため、2つの波長 $\lambda_1$ ,  $\lambda_2$ の適当な組合わせを用いて定量することができた。とくにエチル化体については低濃度レベルまでの測定が可能であった。また微分スペクトルを応用しての分析は1次微分では妨害成分の除去が難しく、2次微分の必要があった。なお高速液体クロマトグラフィーを応用しての分離、定量に関する検討を現在進めている。

6) 昨年度に引き続き、スチレンやアクリロニトリルの包装材料から食品への移行を検討して、前者の移行は現状でのポリスチレンでは非常に微量であることを確認した。後者は昨年度における材質中の分析値より、本年度の分析値は大きく減少している結果を得、食品への移行量も同様に少なくなっていることを確認した。陶磁器類では、硫化カドミウムが紫外線によって硫酸カドミウムに変化し溶出することが報告されているので、この点についての検討と市販品についての現状を検討したが、市販ではカドミウムの溶出は見られなかった。漆器類については、溶出物の検索、現在の合成樹脂衛生規格の準用による成績などを求め、その安全性に関する検討を行っている。(→誌上発表 33 34, 学会発表 55, 56)

## 衛生微生物部

部長 倉田 浩

概要 ほとんどの試験、研究の内容は、昨年引続きのものであるが、本年度において特に重点的に実施した業務は、生薬、臓器などの製剤の微生物汚染調査、即席食品類の微生物基準設定のための調査研究、また保存料などの有効性の再検討、各種環境化学物質の突然変異原性に関する試験、カビ毒など、マイコトキシン産生菌の食品汚染の調査などである。昨年度より進行されていた新しいシステムによる無菌室の設置が、このほど完成し、業務の精度、能率の向上化などが一段と高められたのは幸いであった。

### 業務成績

#### 1) 国家検定

ブドウ糖、リンゲル、インシュリン、その他の注射剤など 746 件 (細菌・真菌の両者のテストで計 1492 件) について無菌試験が行われ、また 45 件の避妊薬の殺精子試験が行われたが、いずれも不合格品は認められなかった。

#### 2) 輸入食品検査

家禽類、冷凍全卵、乾燥卵、冷凍魚介類そのほかの冷凍食品、クロレラ粉末、穀物類などの細菌・真菌検査が実施され、前者は 545 件 (うち不可率 7.5%)、後者は 13 件 (不可率 53.9%) であった。検体数は漸減の傾向にあるが、対象食品の種類が多様化し、それに対応する試験法の検討が行われた。

#### 3) 輸出検査

腸線縫合糸の微生物試験が 45 件 (細菌・真菌を合わせると 90 件) が実施され、真菌検査で 2 件の不合格品が出ている。

### 研究業績

1) 医薬品および化粧品衛生微生物学的研究 (厚生省審査課要望課題)

医薬品および化粧品などの微生物限度基準の設定を目的とする調査研究であって、本年度、継続4年目である。本年度、継続年の最終年度で、酵素、臓器、生薬剤、外用剤のうち消毒剤、点鼻・点耳剤など 83 検体について新規または追加試験が行われた。胃腸系から大腸菌、緑膿菌などが検出され、消毒剤のあるものに高い微生物汚染が認められた。

以上5年間の成績がどのように行政に反映されるかが注目される。

2) 医療用具などの滅菌その他の微生物試験法に関する研究

i) 放射性同位元素を利用する無菌試験法の開発を目的に、Bactec 301 機器による無菌試験法の適正を検討した結果、一応好気性細菌、または代表的な真菌類を用いての試験を繰返した結果、まだ嫌気性細菌を用いるテストが十分に行われていないので確実とはいえないが、一応 24 時間以内での実用の見通しはついた。

ii) 人工臓器の滅菌法に関する研究

ホローファイバー型ダイアライザー (人工腎臓) の滅菌に、指標菌として *Bacillus stearothermophilus* IFO 12550 を用い、高圧滅菌 (115°, 30 分) の検討がなされたが、この条件では  $10^2$ /ml 以下でない滅菌が完全にいかないことが判明した。

3) 微生物を用いる変異原性の検定に関する研究

アミノ基およびニトロ基置換ベンゼン誘導体、スチレンおよびそれらの肝マイクロゾーム代謝物、ニトロソメチルカーバメイト系農薬およびがん原性物質 20 種類について、ラット肝 9,000 g 上清による代謝活性化を加えた Ames 系による突然変異原性試験を実施した。(→誌上発表 34, 35, 学会発表 58, 59)

## 4) 食品の衛生微生物学的研究

i) 殺菌料、保存料などの使用基準の再点検（厚生省食品化学課要望課題）

継続4年目であるが、本年度は、水あめ、糖蜜、甘納豆、ゼラチン、乾燥果物、乾燥うろこしいもなどの亜硫酸、酸化防止剤等の有効性に関する再検討が行われ、現行通り必要性のあるものと、軽減可能なものなどに分けることができた。

ii) 即席食品の微生物学的規格の検討（厚生省食品衛生課要望課題）

スープ類、ライス類、イミテーションミルクなどの細菌、真菌試験を実施し、微生物の汚染状況の調査が行われた。ほとんどの試料は市販品である。

iii) 生カキの微生物叢の生態

本年度は、生食用カキを摂取し、下痢症を起した者の下痢便とその原因性カキの両者について食中毒原因菌の検索を行った。この結果から、*E. coli* の動態を注目する必要が新たに認められ、現在病原大腸菌としての検索が詳細に進められている。（→誌上発表 38, 学会発表 61, 62）

iv) 腸管内微生物による食品添加物、薬物等の分解、代謝に関する研究（当所特別研究）

サルを用いて、N-ニトロソ化合物の生体内生成に関与する微生物の役割に関する検討が進められ、まず、硝酸塩を投与したサルの口腔、胃内における微生物の活性についての検討を細菌ならびに化学的手法を併用してつづけられている。

v) 食品中の有害真菌に関する研究

輸入香辛料の真菌フローラーを検索し、検出された *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* のアフラトキシン産生性を調べ、陽性菌の存在を確かめた（→学会発表 66）。*Chaetomium globosum* の1株が O-メチルステリグマトシスチンを産生することをつきとめ、同種株を集めてその産生株を検索した。マイコトキシン産生かびの調査では、輸入落花生について、特に産地別の汚染状況の検討を行い、スーダン産のものが高率に汚染されていることが判明した（→学会発表 73）。トリコセセンかび毒の汚染を、四国、九州または石川県産などのムギ類について引続き調査を行った。（→誌上発表 47）

5) 微生物の分類、同定に関する研究

i) 国内で発生した食中毒に関連して検出された *Salmonella* の菌型、フェージ型別などの記録、ならびに文献的な調査を進めている（→誌上発表 39）。

ii) 酵母の分類、同定、分布に関する研究

主として食品、または患者材料から検出された酵母

類の同定、分布などの調査が行われた（→学会発表 74）。

iii) *Bacillus cereus* の同定、分布調査

主として食品由来の *B. cereus* の分布と毒素産生性の検討を行い、食中毒起因菌としての意義を究明する目的の研究が新たに計画された。

iv) 真菌、特に日本産子のう菌の調査

土壌に由来する環境微生物としての真菌類（→誌上発表 41, 42, 43, 44, 学会発表 65, 68, 69）、農作物の病害に関連する子のう菌、不完全菌（→誌上発表 46, 学会発表 67, 70）について同定と分類学的研究が行われた。みかん生果汁中からエンドミセス科に属する子のう酵母である *Cephaloscyus fragrans* を検出した（→誌上発表 45, 学会発表 64）。

## 医 化 学 部

部 長 山 羽 力

概要 本年度当部で行った業務としては、行政的要請に基づく食品添加物、家庭用品等の代謝に関する研究、発がん性物質、制がん剤の生化学的研究、放射性腎診断薬に関する研究のほか、ビタミンを含む製剤の特別審査試験を行った。人事面では、52年4月1日付で佐藤道夫技官が当部に配属された。

## 業務成績

1) 特別審査試験

解熱鎮痛薬7件についてビタミン B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, C などの試験法および規格に関する審査を行ったところ、結果はいずれも可であった。

## 研究業績

1) 食品添加物の代謝に関する研究（厚生省環境衛生局行政研究）（→誌上発表 52, 53）

前年より引き続き着色料、酸化防止剤、保存料等の安全性評価に対する基礎データとして、その代謝ならびに生化学的研究を行った。

i) トリフェニルメタン系食用色素の代謝

<sup>3</sup>H でラベルした緑3号をラットに経口投与し、特定な組織における放射活性の分布および半減期を調べ、発癌性の認められた紫1号（使用禁止）の場合と比較した。

ii) BHA の代謝

<sup>3</sup>H でラベルした BHA をラットに経口投与し、臓器、血液、尿中の代謝物（硫酸およびグルクロン酸抱合）の量比を比較検討した。

iii) ジフェニルの代謝

$^{14}\text{C}$  でラベルしたジフェニルをラットに投与し、その臓器、血液、尿中の代謝物（水酸化体およびその抱合体）のパターンを比較し、また肝ミクロソームによる *in vitro* での代謝過程での代謝物と生体成分との結合性について若干の検討を行った。

#### iv) メタ重亜硫酸カリウムの代謝

ラット肝、腎の遊離細胞を用いる細胞レベルでの代謝試験法を確立し、メタ重亜硫酸カリウムの細胞毒性ならびにその代謝活性を検討した。

#### v) 代謝における宿主臓器と腸内菌叢の相関に関する研究

食品添加物の腸内菌叢による代謝と宿主臓器による代謝の相関性を明らかにする目的で、サイクラミン酸の腸内微生物による代謝物シクロヘキシルアミンの脱アミノ過程を、腸内嫌気性菌と肝ミクロソームについて比較検討を行った。

#### 2) 家庭用品に含まれる化学物質の代謝に関する研究（厚生省環境衛生局行政研究）（→誌上発表 54）

家庭用品に含まれる化学物質の安全性評価に対する基礎データを得るため、可塑剤、難燃剤、染色助剤等の代謝ならびに生化学的研究を行った。

#### i) フタル酸エステル系可塑剤の代謝（→誌上発表 55, 学会発表 75）

$^{14}\text{C}$  でラベルした di-isoheptyl phthalate (DIHP) を合成し、ラットに経口投与後、その吸収、分布、排泄を調べ、尿中の代謝物の同定を行った。

#### ii) アジピン酸エステル系可塑剤の代謝

di-2-ethylhexyl adipate (DEHA) を始めとする種々のアジピン酸エステルについて、ラット肝、腸粘膜、脾のエステラーゼによる加水分解を比較した。

#### iii) リン酸エステル系可塑剤の代謝（→学会発表 76）

リン酸トリクレジル (TCP) のうちバラ体について、 $^{14}\text{C}$  でラベルしたものを合成し、ラットに経口投与後、その吸収、分布および尿中代謝物について検討した。

#### iv) 助染剤の代謝

1,2,4-トリクロロベンゼンの代謝について若干の検討を行った。

#### v) 難燃剤の代謝

tris(2,3-dibromopropyl) phosphate (TRIS) の代謝について若干の検討を行った。

#### 3) 発がん性物質の生化学的研究

#### i) N-ニトロソ尿素誘導体の生化学的研究（文部省がん研究）

$^{14}\text{C}$ -N-ニトロソプロピル尿素のラットによる代謝を研究するとともに、*in vitro* でのタンパク質、核酸と

の結合性について検討した。

#### 4) 制がん剤の生化学的研究

#### i) 1,1'-ethylenebis(1-nitrosourea) (EBNU) の生化学的研究（→学会発表 77, 誌上発表 56）

尿素炭素およびエチレン炭素を  $^{14}\text{C}$  でラベルした EBNU を合成し、L-1210 細胞への取り込みと、その生体高分子への結合を検討した。

#### 5) 放射性腎診断薬に関する研究

99mTc-標識 DMS (dl-dimercaptosuccinic acid) を合成し、動物実験、臨床実験（東京慈恵会医科大学泌尿器科）の結果、腎診断薬として臨床上使用しうることが分った。

## 安全性生物試験研究センター

センター長 池田良雄

昭和 53 年 1 月 1 日、毒性部に 3 室、薬理部および病理部にそれぞれ 2 室が増設され、この 3 部を構成メンバーとする安全性生物試験研究センターが発足した。また、同年 4 月 5 日、病理部の変異原性研究室が独立して細胞変異研究室と微生物変異研究室からなる変異原生部が新設され、病理部石館基室長が変異原性部長に昇格した。センター新庁舎の竣工に伴って同年 3 月下旬、毒性部および病理部が旧庁舎より移転し、5 月 12 日に新庁舎の落成式が盛大に行われた。

なお、センター組織の構想として、以上の 4 部のほかに器械・動物管理部の新設を要求したところであるが、53 年度においてはこれは認められなかったため、引続き毒性部の機器室および動物管理室として業務を行うこととなった。しかしながら機器室はともかくとして、動物管理室の業務は新庁舎での動物実験が始まるとともに大幅に増加するとともに、きわめて複雑なものになることは必定であるので、その円滑な業務遂行のため、組織上は別として運営上動物管理室を副所長直属として独立せしめるということが、5 月の部長会で了承された。

昭和 52 年度においてセンター各部で行われた業務を概観すると、試験研究の対象物質は、医薬品、医薬品添加物、化粧品、照射食品、食品添加物、食品汚染物質、化学性食中毒検体、家庭用品に含まれる化学物質、一般産業界で使用される化学物質、農薬、合成発がん物質などその範囲はきわめて広い。安全性試験法からいうと、一般薬理試験と、毒性試験として知られる急性・亜急性・慢性毒性、依存性、発がん性、催奇形性、生殖能および後世代に及ぼす影響、変異原性

に関する各試験が行われているとともに、これら各試験法に関する基礎的研究も活発に行われている。これら各試験の中で、慢性毒性、発がん性、催奇形性を含む後世代に及ぼす影響、および変異原性に関する試験研究が当センターで大きなウエイトを占めている。多くの試験研究は単体についてであるが、物質の相互作用についても慢性毒性あるいは生化学の立場から研究されている。業務の種類としては、国家検定、特許試験、厚生省薬務局および環境衛生局の委託研究、厚生省がん特別研究、文部省がん特別研究、環境庁水質保全局委託研究、科学技術庁原子力研究、同庁特別研究促進調整費による研究など、厚生省のみならず、他省庁とも広く関連して行政的ならびに基礎的研究が精力的に行われた。なお、その他予算を伴わない自主的研究もいくつか行われている。

## 毒 性 部

部 長 戸 部 満 寿 夫

概要 4月都内で、所謂健康食品の1種クロレラに起因すると見られる皮膚障害が発見され、急拠クロレラの光毒性の研究を、また10月には九州地方で発生した座学を主徴とする鯉中毒に関連して、被疑体について急性毒性を検索した。これらは、いずれも食品部との共同で進められ、短期日のうちに可成りの成果が得られた。

その他の研究については、比較的短期間のテーマを除いてすべて継続研究であり順調に遂行された。

53年1月センター設置に伴う組織変更があり、当部は従来の3室から6室になり、更に3月には待望の新庁舎への移転が関係各位、部員の協力によって無事行われた。

### 研究業績

#### 1) 医薬品

i) 精神幻覚剤の依存性に関する研究(薬務局行政研究)

THC (Tetrahydrocannabinol) および parahexyl について、マウス・ラットおよびウサギによる急性毒性を、またメスカリン、LSD および STP をウサギに投与した場合の体温上昇を指標として、diazepam 等の抗うつ剤の併用の影響を検討した。(薬務局へ報告)

ii) 医薬品添加物の毒性に関する研究

ジメチルアセタミドおよび塩化ベンザルコニウムの慢性経皮毒性、ラウロマクロゴールの亜急性経皮毒性、

さらにチモールについて急性毒性および眼粘膜刺激試験を行った。

iii) 注射剤の安全性に関する研究(薬務局委託研究)

厚生省による「注射剤の局所障害性に関する試験法」基準作成に関連する研究で、昭和50年度以来継続研究中

#### 2) 化粧品

タール色素の毒性に関する研究(薬務局委託研究)

赤色201, 213, 220, 221号, 黄色204, 205号について主に慢性毒性試験を継続して行った。

3) 照射食品の安全性に関する研究(原子力研究)

i) 照射米のサルによる長期毒性試験、マウスによる世代および催奇形性試験、およびマウスによる発がん性試験

ii) 照射小麦のマウスによる発がん性試験

iii) 照射かまぼこのラットに慢性毒性および世代・催奇形性試験

4) 食品添加物(環境衛生局行政研究)

i) 食用赤色102号の催奇形性、慢性毒性および発がん性に関する研究

48年度より催奇形性および次世代に及ぼす影響について検索し、F<sub>2</sub>動物について長期慢性毒性試験を行い、本年度は病理組織学的検査を行った。(食品化学課へ報告)

ii) 着色料の相乗毒性に関する研究

赤色3号と106号の相乗毒性について、前年度に引き続きラットで検索した。

iii) DABの発がん性に及ぼすDHA-Naの影響に関する研究(自主研究)

#### 5) 家庭用品

蛍光増白剤のFBA-351, 防虫加工剤のミチンLA, ゴム加硫促進剤のジフェニルグアニジンおよびメルカプトベンゾチアゾールについて各々経皮慢性毒性試験を実施した。

#### 6) 既存化学物質

既存化学物質の毒性に関する研究(薬務局行政研究および委託研究)

ジイソプロピルナフタレン, ドデカクロロドデカヒドロジメタノベンゾオクテン, スチリルキシレンおよびヘキサクロロベンゼンについて長期毒性および発がん性試験を実施している。

#### 7) 食品汚染物質

i) サルにおけるメチル水銀の長期毒性研究(環境衛生局委託研究)

臓器内セレン含量を測定した。(一学会発表81)

ii) マレイン酸マンガンの慢性毒性研究(環境衛生

## 局委託研究)

iii) PCB の生体機能に及ぼす影響に関する研究

iv) PCB 様物質の毒性に関する研究

PCT (polychlorinated terphenyl) についてマウスによる亜急性毒性試験を行った。(→学会発表 80)

v) 流出油の安全性に関する研究(環境衛生局・環境庁水質保全局委託研究)

8) その他

クロレラ中毒および鯉中毒に関連して各々環境衛生局からの委託研究を行った。

## 薬 理 部

## 部長 大森 義 仁

概要 昭和48年以降漸減傾向をたどっていたブドウ糖注射液の国家検定件数は急増を示し昨51年度に比べ約50%多い件数を処理した。一方リンゲル液については、ここ数年來と大きな変化はみられなかった。

本年度より厚生省特別研究の一つとして薬務局で取り上げられた薬物性腎障害の予防・治療に関する研究に参加し、慈恵医大附属研究施設形態部門教授、鈴木昭男部長と協力研究を開始し、また科学技術庁・特調費による化学物質毒性簡易試験法の開発総合研究の一環である発生生物研究班に参加し、本年度は中枢抑制薬の発生期における生体障害の検索に着手した。この研究では東京大学医学部薬理学教室、星薬科大学薬理学教室との共同研究を当分の間続行する予定である。

新しい機器としては、分光光度計ならびにクロマトスキャナー、それぞれ1台を購入した。

1昨年1月より1年半にわたりミシシッピ大学メディカルセンターに留学中の高仲正室長は所期の業績を遂げて帰国し、さらに53年1月には小野田欽一主任研究官が同じセンターの薬理毒性学教室において研究のため出張した。また、53年1月、東京大学薬学部生理化学教室で博士課程を終了した講上敬之助博士が採用された。

尚53年1月より安全性生物試験研究センターに入る組織として当部の4室構成が認められ、中枢薬理、末梢薬理(高仲正室長)、後世代影響(田中悟室長)及び生化学薬理(高橋惇室長)の4研究室に拡張され、従来以上に広範囲にわたり薬理学的に化学物質の生体への影響に関する試験研究を分担することになった。

## 業務成績

## 国家検定

ブドウ糖注射液561件、リンゲル液12件を処理し

たが、ブドウ糖注射液2件が発熱性物質試験で不適と判定された。

## 研究業績

1) 医薬品・食品添加物などの後世代に及ぼす影響に関する研究

i) 胎児の男性化に関する研究

従来、妊娠中のラット(F<sub>0</sub>)に各種ステロイドを投与しそのメス胎仔の男性化能を定量的に求める方法を確立したが、本年度は強力な胎仔男性化作用を現わすメチルテストステロンを妊娠後半期に3日間母体に投与し、分娩後の新生仔の発達と男性化を中心に、F<sub>2</sub>まで各種パラメタについて検討を加えたところ、F<sub>1</sub>メスでは5μg/日及び50μg/日の薬物処理群での体重増加は用量依存的に大となり、とくに4週以後の肛門生殖器間距離の延長が著明にみられた。これら50μg群のメス新生仔の陰開口は遅延するとともに、生後3カ月を過ぎる頃から持続発情を示すようになり、F<sub>1</sub>の交配で妊娠は成立したが、その分娩直前のメス胎仔の泌尿器・生殖器中隔の計測からは男性化を認め、F<sub>0</sub>の薬物処理が、F<sub>2</sub>にまで及ぶことを観察した。(→誌上発表60)

ii) フリルフラマイドの妊娠期投与に関する研究

妊娠20日のラットに<sup>14</sup>C-フリルフラマイド70μCi/kg経口投与し3,6時間後の体内分布を検討したところ母体の肝・腎は血清よりも高い計数値を示し胎盤は母仔間移行の障壁となっていると考えられ、胎仔の各器官での計数値は母体側よりいずれも低く各器官とも3時間よりも6時間値は低かった。また妊娠期間中フリルフラマイドを0.02~0.6%の割合で含有する食餌で飼育したラットでは肝肥大がみられ、0.6%群では体重減少も現われ胎仔数も減少したが、胎仔の形態異常はみられず生後発達も0.6%群の発育遅延以外はとくにみられず、仔の肝重量も増加は認められなかった。(→誌上発表61)

iii) 食品添加物、家庭用品に関する研究

食用赤色106号ならびに衣料加工剤TRISの2検体を用いたラットについて催奇形性試験を行った。(厚生省行政研究)

2) 有害金属の生体内運命に関する研究

放射線化学部との協同研究で昨年に引き続き行ったマンガンの分布では、妊娠母体の骨、脳と子宮での分布後の減衰の遅れがみられ胎仔でも妊娠13日処理群での脳でも同様な知見が認められた。(→誌上発表62) カドミウムではその半減期から著明な種差の存在について検討した。(→誌上発表8)

## 3) 医薬品等の薬理学的研究

## i) 医薬品添加物の一般薬理的研究

塩化ベンゼトニウムは心・血管や平滑筋に直接作用し血圧下降や筋弛緩を起こすが、とくに消化管平滑筋への直接作用が発現し、抗アセチルコリン、抗ヒスタミン作用を認め、*in vitro*、*in vivo* 試験での溶血作用をも観察した(薬務局報告)。

ii) 解熱鎮痛薬の胎仔移行と生後発達に関する研究  
妊娠ラットにアスピリン、サリチル酸の投与により、胎仔移行と両者の大量投与により外形内臓に形態変化を起こし、生後の発育にも遅延を認めた(科学技術庁報告)。

## iii) 薬物性腎障害の発生機序に関する研究

インドメタンをラットに経口投与するとき尿中のカテプシン D 排泄増加を認めたほか、他の尿中酵素の変動と共に形態的にもライソゾームの変性を認めた(薬務局報告)。

## iv) 医薬品の溶血性に関する研究

昨年度に続いて、解熱鎮痛薬、抗生物質その他添加物の溶血性につき検討した(薬務局報告)。

## 4) 医薬品・食品添加物の相互作用に関する研究

## i) 亜硝酸と薬物の相互作用に関する研究

昨年に引き続き、アミノピリンを亜硝酸の併用に伴う肝酵素活性の変動を検討し、両薬物単独での薬物代謝酵素活性の上昇はラットでは雌が大であるが、両者の併用によるこれらに関するパラメタの抑制は雄では強く雌では弱く、性差が認められた(一学会発表 82)。

さらに食品添加物部との共同研究で、これら両薬物の併用は胃内でジメチルニトロソアミン(DMN)を生成することを確かめ、上記肝酵素への影響も DMN 投与時と類似することをも認めた。モルモットの DMN 生成はラットより大で、胃の pH の差によると考えられ、さらにジメチルアミノ基を有する抗生物質類と抗ヒスタミン薬と亜硝酸との併用についても検討を加えた(一学会発表 83)。

また、上記のラットにみられたアミノピリンと亜硝酸の併用または DMN の投与による肝酵素活性の変動についてモルモットで検討を加えたところ、ラットに比べアミノピリンと亜硝酸併用で血清 GOT、GPT や  $\gamma$ -GTP 活性の上昇は弱く、とくに肝  $\gamma$ -GTP はラットで 2.7 倍に上昇したのに反し、モルモットでは 0.5 倍と低下し、さらに肝ライソゾーム酵素活性でも同様な傾向を示し、著明な種差の存在を確認した(一学会発表 84)。

## 5) 発がん性薬物の薬理学的研究

合成化学研究部との共同研究として、各種ニトロソ

尿素の幼若期ラット脳に及ぼす影響を観察した。神経細胞の増殖期に投与するとミエリン生成や脳発達に対しメチル、エチル、プロピル及びブチルニトロソ尿素の順で抑制効果を見出すことを認めた(一学会発表 86)。

## 病 理 部

部 長 小 田 嶋 成 和

概要 昨年度末の研究業務を継続すると共に、合成化学研究部、薬品部、食品添加物部、衛生微生物部等と協力し、文部省がん特別研究班の一員として活動すると共に、厚生省がん研究助成金による指定研究「突然変異原性物質の動物発癌テストに関する研究」班の中心的役割を果たした。

一方、昭和 53 年 1 月、安全性生物試験研究センターの開設に伴い、薬品病理部(細胞病研究室、組織病理研究室)は、4 室構成の病理部(腫瘍病理研究室、一般病理研究室、病理組織診断室、変異原性研究室)に拡充強化され、室長 2 名、研究員 4 名の増員が認められた。室長には東北大学医学部から黒川雄二君(1 月)および名古屋市立大学医学部から高橋道人君(4 月)が着任した。なお、前川室長は 1 年 4 ヶ月に及ぶ留学(西独癌研究センター、ハイデルベルグ市)を終り、5 月始め帰任した。

昭和 53 年 3 月下旬 センター新庁舎の完成に伴い、病理部 4 室は新庁舎に移転した。又、4 月、変異原性部が新設され、変異原性研究室は病理部から新設の部に移り、同室長石館基枝官が部長に就任した。

## 研究業績

## 1) 実験動物の自然発生腫瘍に関する研究

[文部省がん特別研究 (I)]

呑竜、ウィスター、フィッシャー系ラットの長期飼育中に発生する腫瘍を病理組織学的に検索した。

## 2) 化学物質の癌原性と標的臓器との相関に関する研究 [文部省がん特別研究 (I)]

## i) ニトロソ化合物の癌原性に関する研究

各種ニトロソ化合物(ニトロソ尿素、ニトロソウレタン、ニトロソアミン等の誘導体)をラットに長期間経口投与し、発癌性について病理学的検索を行った。(一誌上発表 65, 66, 68, 学会発表 89, 93)

## 3) 食品添加物、農薬、医療用材料等の安全性に関する研究

i) 亜硝酸塩、硝酸塩の慢性毒性及び癌原性の研究(厚生省依頼)

ii) 安息香酸の催奇形性に関する研究(厚生省依頼)  
 iii) チラムの慢性毒性及び癌原性の研究(厚生省がん特別研究)

iv) 臭素酸ナトリウムの慢性毒性及び癌原性の研究(厚生省がん特別研究)

5) 実験動物による発癌性試験法の開発に関する研究〔文部省がん特別研究(Ⅰ)〕

i) 新生仔投与方法に関する研究

新生仔マウス, ラットの皮下に各種化合物を投与し, 腫瘍の発生の有無を病理学的に検索した。

ii) 経胎盤に関する研究

各種化合物を妊娠ラットに投与し, 出産後の個体に腫瘍が発生するかについて検索した。

6) 哺乳動物培養細胞を用いる染色体異常誘発性試験

i) 癌原性物質のスクリーニング(厚生省)

各種癌原性物質について, チャイニーズ・ハムスター培養細胞に対する染色体異常誘発性の有無を検討した。(→学会発表 94)

ii) 食品添加物類に関する検索(厚生省)

チャイニーズ・ハムスター及びラット肝培養細胞を用いて染色体異常誘発性の有無を検討した。

iii) 農薬及びそのネトロソ体に関する検索

〔文部省がん特別研究(Ⅰ)〕

カルバメイト系及びトリアジン系農薬について, チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いて, 増殖抑制率及び染色体異常の誘発性について検討した。

iv) 染毛剤の変異原性に関する検索(厚生省)

各種染毛剤及びそれらの原料の中で, 細菌突然変異性があるものについて, チャイニーズ・ハムスター培養細胞に対する染色体異常誘発性を検索した。(業務局に報告)

v) 薬物代謝酵素系を用いる試験法の開発

〔文部省がん特別研究(Ⅰ)〕

ネトロソアミン系化合物の中で, 従来の方法では染色体異常を誘発し得なかった物について, これを誘発し得る方法の開発を試みた。(→学会発表 88, 90)

7) 動物生体細胞を用いる染色体異常誘発性試験

i) 骨髄細胞による染色体異常誘発性試験

ラットあるいはマウスの腹腔内に薬物を投与し, 経時的に骨髄細胞の染色体異常の有無を検索した。

ii) 胎仔細胞による染色体異常誘発性試験の開発

妊娠中期ラットに薬物を2回腹腔内投与, 胎仔の各臓器構成細胞を初代培養し, 染色体異常を検索した。

8) 白血病の発生機序に関する研究

化学物質の投与により誘発される白血病をモデルと

し白血病の発生機序を解明する。(→学会発表 92, 95)

9) 原発性白血病の核型分析〔文部省がん特別研究(Ⅰ)〕

白血病を誘発したラットの骨髄細胞について, 染色体構成を検索した。(→学会発表 91)

10) 可移植生腫瘍の細胞病理学的研究

i) 可移植性白血病細胞の増殖, 浸潤及び転移に関する研究〔文部省がん特別研究(Ⅰ)〕

種々の条件下に腫瘍細胞を移植し, 体内における増殖, 浸潤, 転移の状態を観察した。

ii) 培養系白血病細胞の各種薬剤に対する感受性

ラット白血病株 EDEN/TC 細胞を用い, 各種制癌剤の感受性を比較検討した。

ii) 制癌剤のスクリーニングに関する研究〔文部省がん特別研究(Ⅰ)〕

合成化学研究部で合成された各種化合物について, 第1次及び第2次スクリーニングを行い, それらの癌性について検索した。(→誌上発表 1, 2, 学会発表 1)

## 変異原性部

部長 石 館 基

概要 昭和53年4月5日, 変異原性部が新設され, 細胞変異研究室と微生物変異研究室の2室が設けられた。部長には病理部変異原性研究室の石館基室長が任命され, 同室員も同時に配置換えとなった。細胞変異研究室長は石館部長が併任し, 微生物変異研究室長には衛生微生物部第一室の吉川邦衛技官が任命された。また前年度の増員として, 4月5日付で, 微生物変異研究室に新しく能美健彦技官が採用された。

医薬品, 食品添加物, その他の生活関連化合物の安全性を評価するうえで, 変異原性に関する試験研究業務を充実することは社会的急務でもある。当部では, 哺乳動物細胞を用いる検索, 並びに, 微生物を用いる検索を通じて, 種々の化合物のスクリーニングを行うとともに, 試験システムの開発およびそれらの学術的裏付けを行う。

昭和52年度の業務内容については, 病理部および衛生微生物部の報告にゆずる。

## 附属図書館

館長 石 居 昭 夫

昭和52年度における附属図書館の図書購入費は次

の通りであった。( )内は 51 年度。

外国図書購入費	45万円	(117万円)
外国雑誌購入費	1042万円	(980万円)
国内図書購入費	9万円	(16万円)
国内雑誌購入費	75万円	(58万円)
合計金額	1171万円	(1171万円)

52年度における図書および雑誌の購入価格も前年度に引続いて7%程度の値上りを示したが、全体の図書購入費は前年と変らなかった。従って、外国雑誌の購入を前年通り維持するためには他の図書の購入を減らさざるを得なかった。そのため、かねてから図書購入費の増額が望まれていたが、53年度は若干増額される予定である。この増額を機会に今後は、今まで非常に少なかった一般図書の購入も考慮すべきであろう。

昭和 52 年 3 月 9 日から同月 20 日までの間、業務を一時休止して、図書館を従来の本館 3 階の場所から、安全性生物試験研究センターの附属棟に移転した。多くの蔵書を手順よく運び、しかも整理よく書架に収納することは非常に困難であるにも拘らず、図書委員会を中心に全所員あげての強い協力によって、無事完了することができた。誌上をかりて厚く感謝したい。

昭和 52 年度の図書委員会は、鈴木副所長の委員長のもとに、8 回開かれた。ここで検討された主な事項は、(1) 雑誌総合目録の作成、(2) 昭和 53 年度図書購入について、(3) 図書館の移転に関する事、などであった。特に図書館の移転に関しては、ワーキンググループがつくられ、図書の配置をどうするか、図書館のスペースの節約および図書収納の効率化を考えて、新しく電動書架を入れること、など多くの問題について基本的な考え方が検討された。移転実施に際しての手順などの作成も行われた。この結果、移転に際して電動書架が設置され、図書収納容積が一段とアップした。

また、衛生試験所報告第 95 号が図書編集委員会のもとで作成され、同時に川村部長を中心に衛生試験所報告の投稿に関する規定が再検討され、その一部が改められた。

附属図書館は日本薬学図書館協議会に加盟しており、昭和 52 年度は、関東地区における研究会(7 月 15 日)および全国研究集会(10 月～11 月 1 日)に参加した。

昭和 52 年度における当所図書館への外来閲覧者は延 222 名、外部からの文献依頼は 54 ケ所、292 件であった。

昭和 52 年度における調査室の活動の主なものは次の通りである。

#### 1) 調査月報の発行

10 巻 3・4・5 号から 11 巻 1・2・3 号まで合計 6 冊(通巻第 91 号)を発行し、それぞれ約 500 部を所内および関連機関等に配布した。

月報に収載された主な内容は次の通りである。

タートラジン等色素添加物の過敏性

低カロリーたんぱく質ダイエットの有害性

外国の毒性研究機関活動状況

毒性資料紹介

#### 2) WHO 国際医薬品モニターセンターへの協力

国内副作用情報(760076-770041) 87 件のインプット資料を作成した。

#### 3) 所内および行政部門に対する照会/回答サービス

調査室は日常業務として、所内および行政部門からの照会に応じて、文献等の調査を行い、それに対する回答を行っている。昭和 52 年度の主なものとしては、「ワラビ着色剤、塩化第二銅の毒性」、「クロロホルムの発癌性」、「プールの水に対する各国の規格」、「西独におけるジオキサン規制状況」などがある。

#### 4) 米国環境催奇因子情報センター (Environmental Teratology Information Center, ETIC) に対する国内催奇形文献情報の提供。

センターからもアウトプットの提供をうけた。

#### 5) 外国毒性研究機関発行の毒性モノグラフの収集 NIOSH Current Intelligence Bulletin No. 1-18, NCI Carcinogenesis Technical Report Series を入手した。

#### 6) 厚生科学研究費による「医薬品情報の伝達システムの改善に関する研究」に参加。

#### 7) JOIS の導入

日本科学技術情報センターが行っているオンライン文献検索サービス (JOIS) の昭和 53 年度での導入を検討した。そのため JOIS に関する講習会、シンポジウム研究会等に積極的に参加した。

国立衛生試験所における試験研究の効率化のためには、附属図書館における図書関連業務とともにそれぞれのニーズに応じた情報の収集が重要な課題である。社会的にも化学物質の安全性に対する要求は今後さらに高まるのが当然考えられるので、それにとまらぬ情報の収集や管理面での強化が望まれる。

なお、昭和 52 年 6 月 21 日付で副所長の附属図書館長兼務が解かれ、専任の附属図書館長が発令された。また、昭和 53 年 5 月 1 日、長い間図書館業務に専念していた高師秀男事務官が退職した。

## 大阪支所

支部長 朝比奈晴世

大阪支所は、国家検定、製品検査、一斉収去試験、特別行政試験、輸入食品検査などを行い、その処理件数は、昨年度に比べて多かった。

この業務以外にも特別研究、厚生科学研究を行った。以下各部別に詳述する。

## 薬品部

部長 持田研秀

**概要** 次期薬局方改正を控えて、懸案の製剤技術の評価にかかわる溶出性、含量均一性試験法の設定などの課題を積極的に推進した。さらに当部で実施中の向精神薬の構造と活性相関やレクチンの生理活性などの研究の進展に伴って、新しい測定系の技術開発が試みられ、その応用化が期待されている。その一つは脂質単分子膜系であり、他は酵素標識・スピニン標識免疫学的な超微量分析法である。とくに後者の実施にあたり、簡易型 ESR の早急な購入が切望される。

昭和 53 年 4 月 1 日付で松田裕子技官が退職し、同日付で大路千佳子技官が採用された。

### 業務成績

1) 国家検定 年度内の処理件数はブドウ糖注、リンゲル液 1387 件と前年同期に比べ 313 件の大幅な増加をみた。その主な理由は 20 ml プラスチック容器入り 20% ブドウ糖注の検定再開によるもので、検定は支障なく実施された。因みにブドウ糖注の検定総量に対するプラスチック容器の占める割合は 500 ml 35%、20 ml 46.5% である。さらに本所薬品部と協力し、500 ml 塩ビ容器入り 5% ブドウ糖注の塩ピモノマー、フタル酸エステルおよびステアリン酸塩の溶出などを対象とした試験項目の設定、光や熱などによる薬液と容器の安定性を考慮した虐待試験を実施した(監視指導課へ報告)。別にプロチオナミド原末 2 件、同錠 16 件の理化学試験を行った。

2) 一斉取締試験 向精神薬 ペルフェナジン錠 12 件、十二指腸潰瘍薬メトクロプラミド錠 8 件の重量偏差、定量および含量均一性試験を実施し、全て適品であった。

### 3) 特行試験

i) 国内産収納あへん 12 件(内訳、和歌山 3 件、

岡山 9 件) のモルヒネ含量試験を実施した。

ii) 52 年 5 月、宮崎県に端を発した副腎皮質ホルモンを故意に添加した疑いのある自然食品(市販名、健菜、白蜂菜、白桃泉)について、本所生物化学部に協力し、副腎皮質ホルモンにはデキサメタゾン、解熱鎮痛成分はブセチン、アセトアミノフェン、抗炎症薬にはフェニルブタゾンが添加されたことを同定確認した(衛生試験 96, 112, 1978, 監視指導課へ報告)。

### 研究業績

1) “薬物と生体膜脂質との相互作用、京大薬学部中垣教授と共同研究”水溶液中における薬物の溶存状態を明らかにすることは、弱電解質に限らず強電解質、非電解質性医薬品の重要な課題となっているが、とくに会合性薬物の物性を製剤的な興味のみにとどめずに、薬物活性との相関を評価する方法に進展させることに期待が寄せられている。その一環として、向精神薬フェノチアジン水溶液の導電率(→誌上発表 69)、塩酸クロルプロマジン水溶液の活量測定(→誌上発表 70)、塩酸フェノチアジン水溶液の塩素イオン活量の測定(→誌上発表 71)、弱塩基-強酸型の塩である塩酸フェノチアジンの会合体形成時の部分的加水分解について(→学会発表 96)が報告されている。さらに公定書収載の脂肪消化力試験の規格洗い直しと新測定系(脂質単分子膜系)の開発ならびに高分子医薬品・添加物の分子量測定の見直しなどが進められた。

2) “生理活性物質の超微量分析法の開発”すでに継続中のレクチンの作用機序の解明にあたって、宮崎医科大学石川栄治教授ならびに薬理微生物部と共同し、ricin, concanavalin の酵素標識免疫学的分析法による超微量化(フェムトモル,  $10^{-17}$ )に成功した。現在、インシュリン、アンギオテンシンなど治療用医薬品の臨床検査に応用範囲が広まりつつあるが、当部ではステロイド系抗炎症剤の細胞膜安定化作用の機序に対する解明とそれに併行して、きわめて近い将来応用範囲の拡大されるスピニン標識免疫学的分析法の開発を行っている。とくに後者はラジオリジオイムノアッセイに替わる超微量定量法として期待されている。

3) “製剤の含量均一性試験法の設定に関する研究、52 年度厚生科学研究”すでに対象 11 品目が選定され、当所ではマレイン酸エルゴメトリン錠とマレイン酸メチルエルゴメトリン錠の 2 製剤を担当し、JP 9 のマレイン酸メチルエルゴメトリン錠の定量法を改訂し、NF XIV 法に準じたアルカリ性クロロホルム抽出法にした。含量均一試験法は簡便で再現性の良い塩析操作による抽出法を採用した(→誌上発表 72)。

4) 漢方製剤の品質評価に関連して、“揮発性成分含

有生薬の保存中の経時変化，52年度厚生科学研究”は，麻黄漢方湯液の調製時の有効成分，エフェドリンおよびメチルエフェドリンの挙動と煎剤中への移行率を問題として，とくに甘草，桂皮，杏仁を配合した製剤は，単味の60～80%のみしか移行しないことがわかった。その理由にアルカロイドの再吸着による損失がある（→誌上発表73，74）。

5) 第2次“製剤技術の進歩に伴う医薬品の安全性確認に関する研究”は，前年度に引き続き溶出装置ならびに溶出溶媒の選択を中心に進められ，新たに提案された USP XX comment proof の paddle 法，大薬協案の single basket 法について，rotary basket 法と比較された。Single basket 法は易溶解型または分散溶解型の製剤には rotary basket 法と匹敵し，分散沈降型製剤にはばらつきも大きく，溶出速度を低下させる。一方 paddle 法は攪拌の外力が rotary basket 法より大きく，溶出速度も rotary の倍に増加するので，溶出しにくい製剤，カプセル剤に適用しうることを確めた。

## 食 品 部

部長 慶 田 雅 洋

概要 昭和52年7月1日付で小川俊次郎技官を採用した（食品第一室に配置）。

### 業務成績

1) 製品検査：タール色素377検体について試験を行った。不合格と判定されたものはなかった。詳細は本号に資料として報告した（本文 ページ参照）。

2) 輸入食品検査：本年度も厚生省食品衛生課の依頼により，大阪港（花房 実），神戸港（渡辺寿之）及び大阪空港（前田米太郎）の食品衛生監視員の研修を実施した（各2か月）。

本年度は輸入食品の行政検査依頼が著しく多く，542検体，827件に達した。検体数はこれまでの最高であった昭和50年度（468検体）を凌駕したが，件数では同年度（1,142件）よりも少なかった。全体の約半数を占める415件が11，12月に集中し，約1/4の205件が2，3月に集中したのが特徴であった（表1）。海空港別の検体数及び件数の分布は表2に示した通りである。検体数・件数ともに神戸港が半数近くを占めていることが知られる。検体の内容は大部分が冷凍えび亜硫酸，ホウ酸の試験）及び果実酒（ソルビン酸，亜硫酸，異物の試験）であった。門司港が検体数で31%，件数で37%を占めて，大阪港・大阪空港を抑えて第2位に躍進したのが特徴であった。内容は塩蔵たらこ・明太子（亜硝酸，合成着色料），乾カワハギ（ソルビン酸，サッカリン），おもちゃなどが多かった。四日市港，名古屋港，福岡空港及び鹿児島港からの検体の送付はなかった。

不合格と判定されたものは68検体であって不合格率は12.5%であった。冷凍えび（ホウ酸，亜硫酸）18検体，グレープフルーツ（ジフェニル）12検体，果実酒（亜硫酸）5検体が不合格であった。中華料理用絵皿3検体から32～44ppmの鉛が検出された。ペーパーナブキン2検体およびカマンベールチーズ（併詰）3検体の内装紙からけい光物質の溶出が認められた。西独産ホエーチーズ4検体から0.149～0.219g/kgの安息香酸が検出された。米国産パルメザンチーズ2

表 1. 月別輸入食品化学検査処理件数

月	52 年											
	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3
件数	74	1	30	15	16	20	24	127	288	27	124	81

表 2. 厚生省食品衛生監視員事務所別検体数

事務所別	大 阪	大阪空港	神 戸	門 司	博 多	那 覇	合 計
検 体 数	74	28	261	168	5	6	542
分 布 (%)	13.7	5.2	48.2	31.0	0.9	1.1	100.1
件 数	98	53	355	306	5	10	827
分 布 (%)	11.9	6.4	42.9	37.0	0.6	1.2	100.0

検体から 1.52~1.55 g/kg のソルビン酸が検出された。メキシコ産冷凍ライム果汁より亜硫酸 (0.084 g/kg) と安息香酸 (0.454 g/kg) が検出された。西ドイツ産ジャム (apricot, strawberry, gooseberry, orange marmalade) 6 検体より 0.508~0.752 g/kg のソルビン酸が検出された。米産ジャムより不許可保存料 allura red AC 及びボンソー SX が検出された。小麦胚芽油 2 検体からわが国で不許可の保存料バラオキシン安息香酸メチルが検出された。韓国産乾燥やまいもから 1.134 g/kg の  $\text{SO}_2$  が検出された。沖縄より送付されたスイート・レリシュ 2 検体から 0.52~0.6 g/kg の安息香酸が検出された。同じく沖縄より送付されたスイートプラム 2 検体からサクカリンナトリウム 12.20 及び 22.00 g/kg, ズルチン 0.385 及び 2.71 g/kg を検出した。同じく沖縄のプリザーブプラム (開胃薬) より 1.30 g/kg のサクカリンナトリウムを検出した。台湾産の人形からレーキレッド C が溶出した。溶出は赤色のプラスチック製靴に由来するものであった。

### 3) 特別行政試験

i) 国内産食品の残留農薬実態調査：生産地調査は、とまと (愛知県), ぶどう (長崎県), きうり (高知県) の 3 品目 18 検体, 市場調査はとまと (兵庫県), ぶどう (兵庫県), きうり, りんご, 米 (玄米) (以上大阪府) の 5 品目 30 検体, 合計 48 検体について実施した。試験項目は次の通りである。

有機塩素農薬：アルドリノ, デイルドリノ, エンドリン,  $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ -BHC, pp'-DDT, pp'-DDE, ヘプタクロルエポキシサイド, ジョホール

有機リン農薬：ジクロロボス, ダイアジノン, ホレート, マラチオン, パラチオン, フェントロチオン, フェンチオン, フェントエート, ジメトエート, クロルフェンピホス, EPN

試験結果は昭和 53 年 4 月に厚生省食品化学課に報告した。

ii) 輸入農産物残留農薬実態調査：本年度から国内産の他に外国産農産物について試験することになった。当初は対象品目として小麦, とうもろこし, 大豆の 3 品目各 11 検体について実施する予定であったが, 実際に入手できたのは小麦 6 (米 4, カナダ 1, オーストラリア 1), とうもろこし 9 (南アフリカ 3, 米 4, モザンビーク 2), 大豆 8 (米 7, ブラジル 1) の合計 23 検体であって 10 検体が未到着であった。試験項目はクロルデン, ヘプタクロル, エンドスルファンの 3 種の有機塩素農薬について行った。結果は昭和 53 年 5 月に厚生省食品化学課に報告した。

### 研究業績

1) 食品中の亜硫酸に関する研究：食品添加物として使用した各種亜硫酸塩は食品成分と結合して食品中では一部が結合型亜硫酸として存在することを確かめた。糖, アルデヒド, ケトンなどとの結合強度について比較した。食品中の亜硫酸の分別定量のための改良ランキン法を確立し, 数種食品中の亜硫酸の存在形態について比較した (一誌上発表 76, 78, 学会発表 97 98)。

2) 製糖工場において使用される希釈二酸化炭素 (炭酸飽和ガス) の成分規格と試験法の作成：製糖工場では原料糖液の脱色, 清浄化のために糖液に石灰乳と二酸化炭素を吹込んで炭酸カルシウムと一緒に共沈させる方法を採用している。この際に使用する二酸化炭素は煙道ガスまたはコークス炉による発生炉ガスを使用したものであって,  $\text{CO}_2$  含量は 8~40% と低く, 現行の二酸化炭素の規格に合わないため, 厚生省食品化学課の依頼により作業を開始した。精糖工業会の協力により, 東京・神戸の精製糖 4 工場, 北海道の甜菜糖 3 工場について実態調査を行い, その結果に基づいて規格及び試験法を作成し, 昭和 53 年 1 月に報告した。ただし純度試験法中 3, 4-ベンゾピレンの試験については, 新設の衛生試験法空気試験法の適用について検討したが良好な結果を得ることができず保留した。

3) 清涼飲料水中のリン酸塩の試験法について：ソフトドリンクス類には光沢の賦与, 混濁性の維持などの目的でリン酸塩が添加されることが少なくない。このうち正リン酸塩については, 果汁中に天然に存在するものと添加リン酸を識別することは困難であるが, ポリリン酸塩 (縮合リン酸塩) は天然に存在することはないので, その薄層クロマトグラフィーによる定性法及び Dowex 1×4 カラムによるイオン交換を利用した定量法について考案し, 昭和 52 年度衛生試験法に追加された (一学会発表 102)。

4) かんきつ類中のチオ尿素の定量：チオ尿素のかんきつ類に対する防腐効果はよく知られているが, FDA では最近, 安全性の面から見て問題があるとして, その食品添加物としての使用を禁止した。わが国ではジフェニル及びオルトフェニルフェノールが輸入かんきつ類の保存料として許可されているがチオ尿素については許可されておらず, 試験法も確立されていないので, その分析法について検討した。酢酸エチル・アセトン混液で果皮を抽出した後, 不活性化アルミナカラムでクリンアップし, ベンゾイル誘導体とした後, ガスクロマトグラフィーを行う方法を確立した。

(→学会発表 100)。

5) 冷凍えび及び塩蔵くらげ中のホウ酸の迅速定量法の開発：冷凍えびのホウ酸については当部で1975年にクルクミン改良法(仄化法)による微量定量法(食衛誌, 16, 41)を開発した。本法は冷凍むきえびの試験に適用され、良好な結果を得たが、その後冷凍えびの検査が殻付きに変わったことから回収率の低下が認められ、また塩類の多いくらげにも適用できる方法の開発の必要性に迫られた。そこでキレート剤 2-エチル-1,3-ヘキサジオールを使用してホモジネートから直接ホウ素を抽出する迅速改良法を設立し、良好な回収成績を得た(→学会発表 103)。

6) その他：食品衛生法に基づく近畿地区の指定検査機関と、食品分析上の諸問題について意見を交換し、試験法、試験成績の表わし方の統一などをかためるために昭和52年12月に指定検査機関連絡会(仮称)を発足させ53年3月に第2回、5月に第3回会合を開いた。現在8か所の食品衛生検査機関が参加している。

前年度から実施していた亜硫酸試験法研究会(神戸市環境保健研究所他2機関参加)は一応その目的を達したので52年10月に解散し、新たに滋賀衛研の参加を得て食用色素分析研究会を発足させ、食品中の色素の定量法について検討を行っている。

衛生化学調査委関西支部食品分科会は52年7月～53年3月にかけて毎月開催し、80年版衛生試験法の原案作成などを行った。

昭和50～52年度にかけて行った「かんきつ類に使用される添加物・農薬の分析法に関する研究」に対して伊藤誉志男室長に日本食品衛生学会より53年5月に奨励賞が授与された。

昭和51～52年度に当部で行い厚生省に報告した食品添加物の規格・試験法の改訂原案は食品衛生調査会で審議の上、53年3月11日に厚生省告示第45号により告示された。

## 薬理微生物部

部長 加納晴三郎

昨年6月に当部岩崎技官が退職し、後任に京大薬剤学教室より小室技官が入所した。

従来から主要な研究テーマであった pyrogen の研究は、すでに分子生物学の段階に入り、多くの新知見が生れつつあり、今年度新たに厚生科学研究テーマとなった発熱物質試験に関する研究に重要な貢献をなし

得るであろう。

さらに行政当局による依頼研究の基礎を固めるための胎生薬理学に関する研究は、さらに進展し研究と行政両面に大いに寄与し得る態勢となった。

### 業務成績

国家検定であるブドウ糖及びリンゲル注射液の無菌試験及び発熱物質試験の処理件数は1387件であったが、不合格品は1件も認められなかった。なお、輸入食品の細菌検査は、15件であったが特に問題となる点を認めなかった。

### 研究業績

1) Pyrogen の作用機序に関する研究は急速に進み、中枢のレセプターと考えられる脳プロテオリピッド、アポプロテインを分離し、これが *in vitro* で pyrogen と結合することが、ゲル浮過および二波長測定により確定し、約数  $\mu\text{g}$  のオーダーで構造の変化がおこることを確かめ、新しい分子生物学的立場を確立することが出来た(→誌上発表 85, 学会発表 104, 111, 113)。

2) 胎生薬理学に関する研究は、薬物の毒性の指標として細胞内 ATP レベルが有力なマーカーとなり得ることを見出し、妊娠期間中の各臓器の ATP レベルを測定した。その結果、内毒素または各種薬物を投与すると、ATP レベルの変動が胎仔毒性、ことに形態学的所見と平行することを見出した(→誌上発表 86, 87, 88, 学会発表 105, 106, 108, 109, 110, 112)。

3) Pyrogen の *in vitro* の検出方法として有力な Limulus test (カプトガニの血液成分と pyrogen との凝固反応)は、従来試料中の inhibitor の除去が難点であったが、クロロホルム・メタノール(2:1)でよく除くことが出来、*in vitro*, *in vivo* とともによく相関性が認められ、この分野での研究の発展が期待された。

4) Bioavailability に関する研究では、病態の型式により活性が異なり、ことに pyrogen 投与によってスルファミン類は血中濃度が上昇し、また解熱剤などでは毒性が著しく上昇することを認め、薬物の効果は単に剤型のみでなく、生体の病態に支配されることを見出し、この点から、bioavailability の新しい展開が期待された。

5) レセルピンに関する研究は、発熱機構の解析と胎仔毒性の両面に有力な薬物であることが明らかにされた。すなわち、レセルピンの解熱作用は pyrogen の target とは異なることを見出し(→誌上発表 91)、また、胎仔毒性に関しては、胎盤機能を直接抑制することにあることを明らかにした(→誌上発表 86, 87,

学会発表 105, 109, 112)。

その他、行政研究としては、食品添加物（メタ重亜硫酸カリウム）などの催奇形性などを検討したが、認むべき毒性を見出し得なかった（厚生省報告）。

## 北海道薬用植物栽培試験場

場長 本間尚治郎

**概要** 昭和 52 年の融雪期は 4 月 30 日（前年より 8 日遅い）、耕起始は 5 月 10 日であった。5 月 19 日に降雪があり昭和 13 年以来 40 年振りの異常気象であったが被害は認められなかった。前半 5 月～7 月の気象の特長はオホーツク高気圧の影響を受けて気温は上昇せず特に 6 月は低温（最低気温 10°C 以下の日数 19 日間）で、降水量（19 mm）も少なかった。寡雨のため畑は 7 月中旬まで旱魃状態が続いた。低温の影響かトウキの抽苔が目立った（ホッカイトウキ 10%）。7 月下旬より一時夏型の高温となったが 8 月上旬後半よりまた低温となり晴冷型の天気となる。その頃からシャクヤクにウドソコ病が発生した。後半 9 月～10 月にかけては移動性高気圧と低気圧の影響で天気と気温は周期的に変化した。例年当地方は 10 月天気が悪く収穫作業に支障が多いが、本年は比較的順調に経過した。11 月 8 日初雪、11 月 12 日根雪。

種子交換は入手 87 件延 735 種、配布 47 件 303 種であった（春日部扱分除く）。ホタルサイコ、ハマボウフウ、ミツガンソウ、コウホネ等について犬牛別沙留、種咲内で自生地を調査した。栽培期間を通じレッドビート、ミシマサイコ、キバナオウギ、ハナトリカブト、センキュウ、トウキ等について現地指導または講習会等に出席して薬用植物の栽培法について講習指導を行った。主なるものは名寄森林植物愛好会（52, 5, 23）、キハダ勉強会（52, 7, 17）、トウキ、センキュウ栽培研究会（53, 3, 6）、道南薬草生産組合研修会（53, 3, 25）である。一般見学、栽培農家、関係研究機関、市町村等多数の来場者があった。

施設整備として、大雨や集中豪雨によって生ずる畑の冠水を防止するため圃場の周囲約 500 m の築堤工事を実施した。

### 研究業績

#### 1) シャクヤク

##### i) 本畑 5 年生の生育収量

目的：実生苗、株分苗について苗の大小と生育収量の関係を明らかにする。

内容：'72, 9, 12 定植した実生苗、株分苗を '77,

8, 30 掘上げ生育収量を調査した。苗の大きさ別についてみると、生育収量共に安定しているのは株分苗で大苗>中苗>小苗の傾向が認められた。これに対し実生苗は、苗の大きさとは直接関係せずむしろ苗のもつ特性即ち雑種性が強く変異が大きいために一定の傾向は認められなかった。根の生産を目標とする場合は株分苗の方が栽培しやすく収量も多い。1 株当り株分苗（大苗）の草丈は、80.4 cm、生根重は 286.3 g であった。

##### ii) 系統比較

目的：株分苗を用いて花色別、花卉数別、開花期別に生育収量品質について比較する。

内容：'73 年秋に白一重、白八重、赤混合の区分で定植した 4 年生シャクヤクの地上部の生育を調査した結果、生育の良いのは赤混合区で草丈や茎長では白八重区が僅に優っているが、赤混合区>白八重区>白一重区の傾向が認められた。'74 年秋に定植した 3 年生のものは、開花期別では中生、花色別では桃色、花卉数別では八重が概して生育良好である。'75 年秋に定植した 2 年生のものは開花期別では中生、花色別では赤、花卉数別では八重が生育良好の傾向が認められた。また個体選抜によって増殖したもので '72 年に定植した白花 8, 桃花 4, 赤花 2, 計 14 系統について生育収量、特性を調査し、目下、成分について検討中である。

#### 2) ハナトリカブト

##### i) 栽培条件による生育収量と品質

目的：栽培法の改良

内容：ビニールマルチ、摘花、不摘花、春移植、春定植の区分で '75 年秋、'76 年春定植したものを '77 年 10 月に掘り上げ調査した結果、マルチ区の生育は草丈、株張り、茎数、茎の太さ等他区に比べて最も良好で、春定植区は最も劣る傾向を示した。摘花区は草丈以外是对照区に優る傾向を示した。収量も地上部の生育と同様の傾向を示しマルチ区が最高ウズ 32.5 g、ブシ 152.6 g（乾重）であった。

##### ii) 系統比較

目的：当地方における優良系統の育成

内容：当場（水谷系）、伊達 2 号、伊達 3 号、伊達 4 号、福島系を '75 年 11 月定植、'77 年 10 月に掘り上げ調査したところ地上部の生育は前年同様に全般に伊達 3 号が良好であった。その他のものは当場系より劣り伊達 4 号は最低であった。また系統中伊達 2 号（丸葉早生系）のみが採種可能で 20 株中 16 株から 676 粒の種子が得られ、目下、発芽試験中である。

##### iii) 収穫年次による生育収量と品質

## 目的：栽培法の改良

内容：'75年11月定植した当場系を用い本年は2年次のものについて掘り上げ1年次のものと比較した。1年次のものは草丈21.0cm、ブシ乾重31.5gに対し2年次は草丈68.8cm、ブシ乾重128.5gと生育収量共に歴然と優っていることが認められた。

## 3) ケン

## 標準栽培

目的：技術および種子保存と当地方における生育収量の調査。

内容：発芽は前年に比べ数日遅れたが、生育は前年とはほぼ同様であへん採取適期は7月24日、草丈88.7cm、30m<sup>2</sup>当あへん収量は29.0gであった。あへん収量を回数別にみると3回採取のうち第1回と第2回で91%を占め第3回は急激に減少した。

## 4) ミシマサイコ

## i) 発芽試験

目的：当場産および産地別種子の発芽比較

内容：当場で2年株より採取した2系統10種類、産地別では種子島、茨城、京都産の種子について'77年5月21日植木鉢(耕上)に播種し7月19日に締切って調査した結果、暖地系のものほど良い傾向がみられ、採種法や種子調製法により、また豊凶の差異によって影響される。当場で採種したものでは種子島系のA-Ⅲが最高(36.7%)であった。

## ii) 生長促進剤試験(一部簡試報告96号投稿中)

生長促進剤(ジベレリン、アトニック)によって開花促進と種子生産および生育収量にどのような影響があるか試験した。1年生に葉面散布すると抽苔が促進され、生育収量も増加するが乾根の歩留は劣る傾向が認められた。2年生の場合は1年生のような一定の傾向は認められず、草丈や乾根重、歩留りの増加することがわかった。

## 5) キバナオウギ

## i) 除草剤試験

目的：栽培法の改良

内容：ニップ乳剤50倍、100倍、200倍、無散布の区分で1年生のキバナオウギに6月30日、7月11日、8月2日に計3回散布した結果除草剤の効果が認められた。除草剤の濃度により雑草の繁茂に差異が生じ効果は50倍区>100倍区>200倍区の順であった。

## ii) 採種株令と生育収量

直播2年生および直播4年生株から得られた種子について生育、収量の差をみるため'76年に播種した2年生のものを10月17日掘り上げ調査した。地上部の生育(草丈、株張、莖数、莖の太さ、地上部重)は前

者が優る傾向がみられたが、収量は殆んど差はなく、採種株令による影響が認められなかった。

## 6) ハマボウフウ

## i) 摘花(蕾)試験

目的：栽培法の改良

内容：3年生のものについて抽苔期に蕾を切除して生育収量について検討した結果、乾根重は摘花已15.9gに対し対照区は5.5g全般に摘花区は生育収量ともに優る傾向を示した。摘花することによって根茎の肥大生長を促進させる効果が認められたので摘花時期や方法等について更に検討する必要がある。

## ii) 系統比較

目的：当地方の優良系統の育成

内容：北海道サルル海岸に自生するハマボウフウの種子を播種育成したものと、当場にて数代育成したものの3~4月生について生育収量を比較した結果、当場系(乾根重19.3g)に比べてサルル系(乾根重16.3g)のものは生育収量ともに劣る傾向がみられた。種子島系、稚咲内系、浜益系、武田系および公社系の種子を'76年春に播種し'77年春発芽した当年生について11月2日に掘り上げ調査したものは、全般に種子島系のものは生育が早く、稚咲内系は他より優る傾向が見られた。ただし収量は区により差が認められるので今後の結果を待ちたい。また、当場で育成した株から採種した武田系および公社系の種子を'76年秋に播種し'77年春発芽した当年生について11月2日に掘り上げ調査した結果、両者間に特に差異は認められなかった。

## 7) トウスケボウフウ

当地方における栽培の可否を知るため'75年および'76年に長野県で生産された種子を用いて種子検定、発芽試験および畑に'77年5月21日播種し1年目の生育収量を調査(11月2日)した。発芽試験の結果は'75年産2.7%に対し'76年産は51.3%で後者が歴然と優っていた。畑地における生育収量も発芽試験と同様の傾向を示した。

## 8) その他

コガネバナについて種子検定、発芽試験、ハンゲについて種球の大きさ別、レッドビートについては12品種の比数および播種法の比較についてそれぞれ調査を実施した。

## 春日部薬用植物栽培試験場

場長 小島 康平

**概要** 前年度に引き続き、ハカマオニゲシについては栽植密度と生育、収量との関係および肥料三要素と生育の関係の試験を、ハブソウについては多収性をもつ早、中、晩生系統の選抜育成を、ミシマサイコについては多収、良品の品種育成の第一段階として目標とする選抜形質を決定するため各特性間の相関の調査を、それぞれ行った。このほかケンについては晩生種育成のための交配試験を引き続き実施しているほか、さく果の切傷とアルカロイド含量の変化についての検討を薬品部と協力して行っている。

種子交換については、5栽培試験場共同で作成した交換用リストを世界各国310カ所の関係機関に発送した。種子交換は入手70件、延べ300種、配布100件、延べ550種であった。

昭和54年度に予定されている筑波薬用植物施設への移転に関しては、現場の外構工事が実施されたので圃場の整備を現地谷田部町農協に委託して実施したほか、春日部よりの移植植物の検討を行った。なお研究棟、温室その他の付属建物などについては基本設計が行われた。

**研究業績**

## 1) ハカマオニゲシ

栽培法確立の基礎資料を得るため、栽植密度と生育収量との関係についての試験および肥料三要素と生育の関係についての試験を行った。

## i) 栽植密度試験

1975年10月に播種したWG-1(西ドイツより入手した系統)を、1976年3月に間引きを行い、疎植(60×30cm, 約500株/アール)、密植(30×30cm, 約1000株/アール)および不間引き(30×—cm, 約4500株/アール)の3試験区を設け、第1年次は4月下旬、第2年次は9月中旬から毎月2回、合計24回の生育調査を行ったほか、1977年5月には開花調査を、6月にはさく果について収穫物調査を行った。

その結果、草丈、葉長、葉幅は全生育期間を通じて不間引区が他に比べやや大きい傾向を示したが、株当たりの生葉数、萌芽数は不間引区がもっとも小さかった。疎植区と密植区の間では草丈に差異は認められないが、葉幅、生葉数、萌芽数は生育後期に密植に密植区では増大または増加が緩慢となり、疎植区の方が大であった。また収穫さく果については、一株さく果数

一株さく果重、平均一さく果重、果こう径、さく果の大きさのいずれも疎植区が最大、不間引区が最小であった。しかしアール当りのさく果の乾物収量は、単位面積当りの株数、さく果数の多かった不間引区が最大であった。

## ii) 三要素試験

砂耕法により、三要素施用区(NPK)、窒素欠除区(-N)、リン酸欠除区(-P)、カリ欠除区(-K)、窒素単用区(-PK)、リン酸単用区(-NK)、カリ単用区(-NP)および三要素欠除区(-NPK)におけるUNB-21の生育試験を行った結果、草丈、最大葉長、最大葉幅、生葉数とも、窒素欠除の-NPK、-NP、-NK、-Nの各区において小さく、NPKおよび-K区が最も優れ、カリの肥効は認められなかった。

## 2) ハブソウ

多収性を持つ早、中、晩生品種の育成のため、1976年に供試した5系統より選抜した白花早生3個体、白花中生4個体、早生8個体、中生7個体、晩生4個体につき開花始を調査した。その結果、中生以外の各系統の開花始の分布はバラツキが大きく、固定があまり進んでいないように思われた。中生の開花始は正規分布に近い形を示したが、個体のバラツキはやはり大きかった。

## 3) ミシマサイコ

多収、良品の品種を育成するための第一段階として、目標とする選抜形質を決定するための各特性間の相関の調査を行うこととし、栽培した在来種につき、開花期に採取した個体についての調査を行った。その結果は次のとおりである。

主茎長は主茎節数および一次分枝数との相関は強いが、茎重、葉重など他の地上部各器官との相関は必ずしも強くない。また、根径、根重との相関もバラツキが比較的大きい。従って、耐倒伏性系統育成のため短程の個体を選抜しても、必ずしも1株収量の減少にはつながらないことが推測された。

一次分枝数は他器官との相関が非常に強い。一次分枝数の多い個体は二次分枝数も多く、従って1株当たり分枝数、節数なども多い。また茎葉重、根重との相関も強く、1株収量を左右する大きな要因であることが推測された。

二次分枝数は一次分枝数以外、他の器官との相関に見るべきものはなかった。

分枝長(一次分枝長+二次分枝長)は一次分枝数と相関が強く、分枝性の強い個体は、その伸長も盛んである。分枝長の大きい個体は茎葉重、根重も大きい。

茎重、葉重は上述のように一次分枝数、一次分枝長

と強い相関を示し、根重とも相関が強い。従って、これらが収量を決定する主要因と思われ、その相互関係を把握することが収量増加の検討のため必要と考えられる。

根重は根径と強い相関を示した。

## 伊豆薬用植物栽培試験場

場 長 宮 崎 幸 男

**概要** 51年の青野川の氾濫による水害に対し、激甚災害緊急特別対策整備事業に基づく河川改修工事が5カ年計画で実施されることになったが、本工事施工までの応急対策として、同河川のとくに狭隘な数箇所の幅を至急行うことになった。当場地区はこの狭隘箇所に該当しており応急工事に協力する立場から、工事に伴う補償は全て本工事の際一括して行うとの条件のもとに、ほ場の一部 533.935 m<sup>2</sup> を割譲することになり、年度内に工事が完了した。

業務の主体は下記のような栽培に関する試験研究であるが、このほかつぎのような調査研究を行った。

1) 植物調査 伊豆地域でミシマサイコその他腹地性植物の採集調査を行った。

2) 種苗交換

採集種子 45 種

入手 33 件延べ 301 種

配布 24 件延べ 157 種

### 研究業績

1) ズボイシアの栽培試験

目的：優良系統の育成および栽培法の確立

実績：51年の水害で生残った植物を主体として鉢栽培を行い、52年8月上旬 *leichhardtii* 1個体、*myoporoides* 30個体より分析のための採葉を実施した。これら試料について葉形、乾物率などを調査したが、試料が少量であるため、53年度に再度採葉し分析に供する予定である。

2) ハカマオニゲシの栽培試験

目的：環境条件および栽培法の概要を明らかにする。

実績：土壌粒子の大きさと生育、収量との関係について2実験を行い、実験1は終了し、実験2は継続中である。実験1では土壌粒子の大きさにより冬季幼苗の枯死率に大きな差異のあることが認められたが、植物の収量については収穫個体数が極めて少ないうえパラツキが大きく、土壌粒子の大きとの関係は明らかでなかった。実験2は52年11月播種し、現在地上部

の生育過程を調査中であるが、小粒区では中粒、大粒の2区に比べて生育がかなり劣る傾向がみられる。

3) ステビアの栽培試験

目的：栽培法および甘味成分含量の概要を明らかにする。

実績：52年4月下旬 60×30 cm 間隔には場に定植した場合の1年生植物の生育、収量の概要について調査した。生育については8月以降枯死率の高くなることが注目された。代表的な5個体の平均年間収量は7月中旬、9月中旬の年2回刈りで、全地上部風乾重 45.6 g、全葉風乾重 25.2 gであった。

4) ミシマサイコの栽培試験

目的：暖地栽培の立場からの栽培法の確立

実績：戸外 (A)、無加温ビニールハウス (B)、加温ビニールハウス (C) の温度条件の異なる3区のもとで、ポット栽培により51年12月上旬同時に播種し、1年生植物の生育、収量の比較を行った。発芽はCで最も早く12月末に始まったが、Bでは1月上旬、Aでは2月中旬と温度の低下に伴い遅れた。生育もCで最も進み、B、Aの順に遅れた。平均収量においても地上部、地下部ともにAはCないしBに比べてやや劣っていたが、3区間の差の有意性は認められなかった。

5) センナの栽培試験

目的：環境条件の解明および栽培法の確立

実績：当場産種子の発芽ならびに温度条件の異なる2区のもとでの幼植物の生育について研究した。完熟した種子は採取後2~3月以内であれば90~100%の高かい発芽率のえられることが確認された。ついで1年生植物を無加温ビニールハウス (B) と加温ビニールハウス (C) の温度条件の異なるもとで鉢栽培を行ったところ、Cでは冬季も生育を続けたが、Bでは12月中旬ころ生育が停止し、翌年1月下旬~2月上旬に地上部は完全に枯死した。4月以降になっても再萌芽はみられず、地下部も全部枯死していることがわかった。従って本植物は耐寒性が比較的弱く、露地での越冬は不可能とみななければならない。

## 和歌山薬用植物栽培試験場

場 長 大 野 忠 郎

**概要** 昭和52年度の気象状況は初めはきわめて順調で、ケシー貫種系統の採汁期である5月下旬において日照時間がやや不足であった以外は、ケシのモルヒネ生産に好適するものであり、モルヒネ収量は早生系統

(AWX I 4-53-6) では平年に比し 26% 増し、一貫種では 17% の増収で豊作の年であった。その後 7 月、8 月に降水量が少なく、11 月上中旬に降水量が可なり多かった外は順調に経過し、ハカマオニゲシ、オウレン、ミンマサイコ等その他の試験植物および標本植物は生育良好であった。

#### 業務成績

- 1) 薬用植物栽培質疑応答 31件
- 2) ケンその他薬用植物種苗分譲 22件
- 3) 植物調査採集採種 近隣の和歌山県内で3回実施、計 61 種採集
- 4) ケン耕作者栽培講習会 2回  
和歌山県、岡山県各 1 回

#### 研究業績

##### 1) ケンに関する試験

目的：優良品種の育成，栽培法の改善，栽培技術の保存ならびに生育上の基礎資料を得ようとする。

内容：次の 12 の試験を行った。

##### i) 品種および系統の保存，特性調査

目的：各地の品種および系統を栽培し，その特性を調査し，これを保存し，品種改良の材料に供する。

内容：62 系統を栽培し，全系統を保存した。

##### ii) 系統選抜試験

目的：栽培地より観察により優良な系統を選抜し，その生産力を検討する。

内容：昨年選抜した南広 9 号は本年度もモルヒネ含量が一貫種に比し高かった。

##### iii) 一貫種個体選抜系統検定試験

目的：一貫種の個体選抜により得た系統につきその生育，生産力を検定する。

内容：あへん収量が一貫種に比し多いもの 13 系統，モルヒネ収量が一貫種に比し多いもの 9 系統を選抜した。

##### iv) 早生型育成交配系統選抜検定試験

目的：愛知系統と一貫種との交配によって得られた系統につき，その生産力を検定し，早生で多収の系統を育成する。

内容：あへん収量が一貫種に比して多いもの 19 系統を選抜した。

##### v) 耐病性育成交配系統選抜検定試験

目的：トルコ系統と一貫種との交配により得られた系統につき，耐病性，多収の系統を育成する。

内容：あへん収量が一貫種よりも多いもの 11 系統，モルヒネ収量が一貫種よりも多いもの 10 系統あることを確認した。〔衛生試報 95, 30 (1977)〕

##### vi) 耐寒性育成交配系統選抜検定試験

目的：トルコ系統と一貫種との交配により得られた系統につき，耐寒性，多収の系統を育成する。

内容：あへん収量が一貫種より多いもの 5 系統，モルヒネ収量が一貫種より多いもの 8 系統を確認した。

##### vii) 採汁時期

目的：採汁時期の変化が収量，品質におよぼす影響を調査する。

内容：1966 年から 1977 年までの 12 カ年のうち，気象条件が良く豊作であった年は '67, '68, '69, '74, '74, '75, '77 の 6 か年で，その他の '66, '70, '71, '72, '73, '76 の 7 か年は気象条件が悪く凶作の年であった。豊作の年と，凶作の年と別々に，採汁開始時期が生産力におよぼす影響について検定した。豊作の年は開花後採汁開始時期が遅れてもモルヒネ収量は低下しないから，採汁開始は可なり遅れて，開花後 21 日頃になっても差しつかえない。これに反して凶作の年は採汁開始が開花後 21 日以後になると明らかに（有意に）モルヒネ収量が低下するから，遅くとも開花後 18 日頃までに採汁を開始すべきである。

##### viii) 採汁方法試験

目的：切取法と宵切朝掻法を比較し，労力関係を考慮し再検討する。

内容：あへん収量，モルヒネ収量共に宵切朝掻法と切取法との間に大差を認めなかった。

##### ix) 農薬の種類に関する試験

目的：病害に対する防除法として現在市場にある代表的な農薬の効果を比較する。

内容：本年度もボルドー合剤，マンネブダイセン，トップジン，ジュネブダイセン，ダコニール，オーソサイドについて試験した。本年度はあへんおよびモルヒネ収量共にダコニール区，オーソサイド区は多くなかった（1975, 1976 年は多かった）。さらに試験をくり返す必要がある。

##### x) 早生多収型育成 F<sub>2</sub> 検定試験

目的：早生型系統の交配により早生で生産力の高い系統の育成をはかる。

内容：播種した 49 系統中，44 系統が生育良好で，あへん収量が一貫種に比し多かったもの 34 系統，モルヒネ収量が一貫種に比し多かったもの 25 系統あった。開花期は AWXI と一貫種との戻し交雑のすべての系統と IXAR と一貫種との戻し交雑のうちの 3 系統とは一貫種に比し差がなく，その他のすべての系統は一貫種に比し早いことがわかった。

##### xi) 気象感応試験

目的：気象要因とケンの生産力との関係を明らかにする。

内容：早生系統 AWWX 4-53-6 においては、開花期前半（4月第5半旬）の平均気温較差によって、その年のモルヒネ生産の豊凶を予測することが可能である。4月第5半旬（4月21～25日）または実際の開花期前半の平均気温較差が大きければ大きいほど、あへんおよびモルヒネの収量は多い。

#### xii) 優良系統の増殖

目的：一貫種よりも生産力の高い系統の分譲種子の増殖をはかる。

内容：耐病性系統は 1.412 kg, 耐寒性系統は 1.511 kg の種子を得た。耐寒性系統は岡山県の耕作者の要請によりその大部分を分譲した。

#### 2) 大麻に関する試験

目的：系統を保存し、鑑定の資料とする。

内容：12 系統共結実し保存の目的を達した。

#### 3) ミシマサイコに関する試験

目的：当地方における栽培法を確立する。

##### i) 除草剤試験

目的：最も適する除草剤を決定する。

内容：ニップ乳剤、クロロ IPC, トレファノサイド乳剤、ロックスについて試験しいずれも除草効果を認めた。

##### ii) 肥料3要素試験

目的：肥料3要素が生育、収量におよぼす影響を明らかにする。

内容：生育1年目の生育には窒素の肥効が最も著しかった。

#### 4) オウレンに関する試験

目的：当地方における栽培法の確立

内容：1976年12月に播種したものに病害が認められた。

#### 5) ハカマオネゲンに関する試験

目的：栽培法の確立

内容：1975年播種のものも、1976年播種のものも夏期には地上部は枯死したが、秋には全株ほう芽した。ただし UNB-24 を春に本圃に移植したものは秋になってもほう芽しなかった。

#### 6) ハブソウに関する試験（春日部試験場に協力）

目的：選抜系統の特性調査。

内容：春日部試験場で選抜育成した早生、中生、晩生の3系統の生育ならびに収量の比較を行った。収穫時の節数は早生より中生が、中生より晩生がそれぞれ多い。英および種子収量は共に早生系統は中生および晩生系統に比し劣っていた。

#### 7) 標本薬用植物栽培

目的：一般に展示し、試験の材料とする。

内容：熱帯、亜熱帯産 37 種、温帯産 181 種を栽培。

## 種子島薬用植物栽培試験場

場長 高城正勝

概要 年間を通じて気温は例年よりやや高めで残暑きびしく、雨量は平年より僅かに少なく 2,330 mm を観測した。台風は小型が2個接近した程度で、このようなことは異例である。従って試験植物、展示植物等順調な生育を示した。

栽培試験は前年に引続き ミシマサイコに重点をおき、サンピロート、ハズ、ハブソウおよびニッケイ属等について行い、系統保存および展示栽培としては Rauwolfia 属植物、ガジュツ、ウコ、ンクミスクテン、ウィタニア、ステビア、ココおよびキナ等であった。

ミシマサイコおよびステビアについては、種子分譲および栽培指導の依頼多く、文書回答 11 件、畑での指導依頼は 6 件を数えた。そのほか水田の減反政策に伴い、薬用植物の導入を考えている農家が増えてきている。

交換用種子および野生植物の採集調査は島間全域および奄美大島において実施し、交換用種子は 43 種採集した。

### 研究業績

#### 1) ミシマサイコの栽培試験

##### i) 春播5年生植物の生育及び収量

目的5年生植物の生育、収量を知り、暖地における栽培法を確立する。

内容：耕種概要は前報に同じ。

追肥は基準量の 1/2 量を 3月29日に、残量 1/2 を 5月10日及び7月5日に施した。

1畦2条計 198 株定植のうち 98.32% 枯死し、収穫本数は僅か 3.3 株であった。

トビロヒヨウタンゾウムシの防除に4月11日にディブテックス 1,000 倍液、4月22日にダイアジノン微粒剤を散布したが効果は認められなかった。

収穫は 53年1月23日に実施。1/17 a 当りの乾燥根重は 52.2 g, うち主根重が 45.7 g, 細根重 6.5 g を秤量した。

本試験をもって年次別生育及び収量については一応明らかな結果を得た。すなわち地下部収量比は1年生を1とすると、2年生 1.355, 3年生 2.247, 4年生 1.217, 5年生は僅か 0.166 で、経済栽培は 2~3 年生が望ましいと考えられる。

## ii) 摘花試験

目的：暖地における栽培法の確立

内容：51年8~10月自然落下した種子から発芽した苗を52年3月27日2千分の1aポットに1株宛植付けた。

試験区は4区とし、A区は地表10cmで切除、B区は30cmで切除し、C区は花序のみ蕾時に摘花、C区は放任とした。

収穫は53年1月26日に実施した。乾燥根重はA区8.47g、B区13.03g、C区13.11g、D区11.8gで、主根重はA区5.46g、B区6.52g、C区4.93g、D区4.76gであった。

本試験の結果、抽苔を切除した区の方が、抽苔を伸ばした摘花区および放任区に比し、僅かに多収穫を得ることが認められた。

## iii) 秋播栽培試験

目的：従来の栽培法はすべて春播法を基準としていたが、暖地では秋播法が多くので有利だと考えられるので栽培法を改善する。

内容：51年9月中旬までに栽培株から採種した種子を9月25日に播種、試験区は5区とし、各区の面積は1/10a、10月6日に発芽開始、52年1月中旬に発芽が完了した。2月28日に株間約10cmに間引きした。3月中旬頃からトビロヒョウタンゾウムシが異常に発生し稚苗の喰害が目立ったので殺虫剤ディブレンックス及びダイアジノン微粒剤を散布したが効果は認められなかった。1/10a当り成虫の捕殺数は3月17日に181.3匹、3月31日に68.8匹、4月7日に69.6匹、4月14日に25.8匹、4月21日に34.4匹、4月28日に41.6匹、5月6日に40.8匹、5月19日に33.6匹を数えた。3月17日には抽苔し、6月30日には草丈75.8cmを記録した。

収穫は53年1月20日に実施した。すなわち播種後約16か月で乾燥主根重は1/10a当り77.5gで1株平均1.635gの収量を得た。

秋播栽培においては雑草の繁茂がないこと、短日月に収穫できることなど有利な点がある反面、3月は稚苗期に当り、また害虫も繁殖期に当る関係上幼苗の喰害がはなはだしいので薬剤散布を実施して完全に防除すれば、春播栽培より希望がもてるものと考えられる。

## 2) サンピロートの栽培試験

## i) 発芽試験

目的：種子島における栽培法の確立

内容：供試種子はガラス室内で自然発芽した苗を鉢植え育成した母株から51年10月~52年2月に採種した種子を用いた。

3区設け、各区とも30cmの平鉢に100粒宛52年5月6日に播種、発芽調査は6月14日~7月3日まで実施、発芽始めは6月14日で、率はA区58%、B区80%、C区が62%を示し、平均66.7%で、発芽日数は約40日であった。発芽には高温多湿を好むことが判明した。

## 3) ハズ(巴豆)の栽培試験

## i) 発芽試験

目的：種子島における栽培法の確立。

内容：供試種子は52年8~10月当場圃場で採種した種子を選別し、52年11月9日に100粒宛3箱に播種し、ガラス室内で管理調査した。発芽率はA区67%、B区35%、C区39%で平均47%であった。

## 4) ハブソウの栽培試験

## i) 種子島における生育及び収量調査

目的：南西諸島における栽培法の確立

内容：供試種子は春日部試験場にて採種された早生種0310系、中生種0513系及び晩生種0620系を用い、52年3月11日砂質壤土の圃場に播種、畦幅は早生系が80cm、中生系が90cm、晩生系1mとした。

肥料は当場の慣行に従い基準量を用いた。生育調査は3系統とも5月6日から毎日実施した。収穫は完熟した莢から逐次切りとった。

草丈の最高は早生系が8月12日に95.2cm、中生系が同日106.4cm、晩生系は8月19日に118.3cmを記録した。葉数の最高は早生系が7月22日に83.1枚、中生系は7月29日に145.0枚、晩生系は8月26日に185.0枚を数えた。開花は早生系が5月27日、中生系5月10日に、晩生系が6月17日に初見され、総開花数は1株平均早生系355.4花、中生系432.1花、晩生系467.3花を数えた。1株当りの結実数は早生系が78.2個、中生系94.7個、晩生系128.1個で、1株当り種実の収量は早生系46.4g、中生系79.5g、晩生系が112.6gで、開花数に対する結実率は早生系22.01%、中生系26.38%、晩生系27.4%であった。

## 5) セイロンニッケイの栽培試験

## i) 生育調査

目的：南西諸島における栽培法の確立。

内容：本種は耐寒性がなく種子島では越冬不可能であるのでビニール被覆にて生育を調査した。

樹高は53年2月25日に96.9cmに伸び、葉数は234枚に増え、樹冠の長径97.5cm、短径55.0cmに広がり、枝数は19本を数え、幹径は12.2mmを測定した。

## 6) シナニッケイ(Cinnamomum Cassia)の栽培

## 試験

目的：南西諸島において生産を奨めるに当り，栽培法を確立する。

内容：本種は種子島で露地越冬は可能である。46年4月伊豆試験場から送付を受けた種子からの実生株を48年春鉢植え後，49年ガラス室内に植え，他は露地

植えとし，冬季はビニールハウスとして栽培した。

樹高は調査開始当初は 57.7 cm であったが，53年2月には 93.5 cm に達し，葉数は8月に最高 75 枚に増えたが，その後 11 枚脱落し，樹冠は長径 70.5 cm 短径 50.9 cm を測定し，枚数は 15 本を数え，幹径は 15.85 mm を記録した。

### 1 Antitumor Effect of 1,1'-Polymethylene-bis(1-nitrosourea) and Related Compounds

Michiko MIYAHARA, Masahiro NAKADATE, Makoto MIYAHARA, Ikuo SUZUKI, Motoi ISHIDATE, Jr. and Shigeyoshi ODASHIMA: *Gann*, 68, 573 (1977)

Polymethylene-bis(1-nitrosourea), polymethylene-bis(1-nitroso-3-nitroguanidine), and polymethylene-bis(1-nitroso-p-toluenesulfonamide) derivatives were tested for antitumor effect against rat ascites hepatoma AH-13 and mouse leukemia L-1210. Bisnitrosoureas were effective against AH-13 and L-1210, bisnitrosoguanidines were effective against AH-13 alone, and bisnitrosotoluenesulfonamides were ineffective against both tumor lines. Of all these compounds, 1,1'-ethylene-bis(1-nitrosourea) (EBNU) was the most effective.

The antitumor effect of EBNU was compared with that of 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea (BCNU). Intraperitoneal administration of EBNU according to the schedule, day 1, days 1 and 5, and days 1,5, and 9 after intraperitoneal inoculation of L-1210 showed marked prolongation of host survival, although the effective doses used were a few times higher than those used in BCNU to obtain a similar effect. The minimum effective dose (MED) of EBNU on AH-13 cells was estimated as 1 mg/kg, which was 10 times less than that of BCNU, suggesting that EBNU was more effective than BCNU against AH-13

### 2 Sensitivity Difference of Rat Ascites Hepatoma AH-13 and Mouse Leukemia L-1210 to Nitrosourea Derivatives

Michiko MIYAHARA, Makoto MIYAHARA, Masahiro NAKADATE, Ikuo SUZUKI and Shigeyoshi ODASHIMA: *Gann*, 69, 187 (1978)

The structure-activity relationship in different sensitivity of AH-13 and L-1210 to nitrosourea and related derivatives was examined. N-Methyl-N-nitrosourea derivatives, such as 1-methyl-1-nitrosourea (MNU) and 1,1'-polymethylene-bis(3-substituted 3-nitrosourea), were inactive against AH-13 and slightly active against L-1210. On the

contrary, 1,1'-polymethylene-bis(3-substituted 1-nitrosourea) derivatives were more active against AH-13 than against L-1210. The nitrosourea which had bis(2-chloroethyl) group at the terminal were highly active against AH-13 and L-1210. One of denitrosated derivatives, 1,1'-ethylene-bis[3-(2-chloroethyl) urea], was active against AH-13 alone.

In addition, diisocyanates, nitrourea, ammonium carbamate and 1-methyl-1-nitrourea, which are related to the nitrosourea compounds, were also tested for their activity against AH-13 and L-1210. Diisocyanates and nitrourea were active against AH-13 alone, while other compounds were all inactive.

### 3 薄層クロマトグラフ法による混合製剤の定量 (第4報) 薄層けい光デンストメトリーによるノスカピンの定量

橋場茂子, 立沢政義, 江島 昭: 分析化学, 26, 804 (1977)

混合製剤中のノスカピンを薄層クロマトグラフ法で分離し, けい光デンストメトリーにより定量を行った。

ノスカピン 0.4 mg に対応する量を量り 0.1 N 塩酸 2 ml を加えて混和し, さらにアンモニア試液 1 ml を加えてアルカリ性とし, ベンゼン 5 ml を加えて振り混ぜたのち遠心分離する。

上澄液を試料溶液とし, この 5  $\mu$ l を薄層板 (Kieselgel 60 pre-coated plate, メルク社製, 20  $\times$  20 cm) にスポットする。クロロホルム, ベンゼン, アセトン (3 : 3 : 1) を用いて展開し, 10cm 上昇した時取り出して風乾し, さらに 120° で 5 時間加熱する。けい光性のスポットを励起波長 365 nm, けい光波長 450 nm でクロマトスキャナにより測定し, 定量を行った。

検量線は 0.2~1.0  $\mu$ g の範囲内で原点を通る直線を得た。又製剤の定量では, 96.3~105.1% の値を示した。

この方法により各種感冒剤中のノスカピンの精度良い定量が可能であり, 又含量均一性試験に際し本法を用いば多数の試料を同一プレート上で同時に簡便に実施出来る利点がある。

#### 4 高速液体クロマトグラフィーによる混合製剤の分析 (第1報) 高速液体クロマトグラフィーによる総合感冒剤中の鎮咳剤, 祛痰剤および抗ヒスタミン剤の定量

立沢政義, 橋場茂子, 江島 昭: 衛生化学, 23, 282 (1977)

高速液体クロマトグラフィーによる, 総合感冒剤中の鎮咳剤, 祛痰剤及び抗ヒスタミン剤の分離定量のため, スケレンジビニルベンゼン共重合体 (日立ゲル 3011) 及びポリメチルメタアクリレートゲル (日立ゲル 3030) を固定相とし, アンモニアアルカリ性メタノールを移動相として分離する方法を行った。

マレイン酸クロルフェニラミンおよびグリセリルグアヤコールエーテルは日立ゲル 3011 を固定相とし, メタノール・28%アンモニア水 (99:1) を移動相とし, 流速 1 ml/min で, 又ノスカピン及びジフェンヒドรามミン (塩酸塩及びサリチル酸塩) は同条件で流速 1.5 ml/min で分離した。酒石酸アリメマジン及びメチレンジサリチル酸プロメタジンは日立ゲル 3030 を固定相とし, メタノール・水・28%アンモニア水 (90:8:2) を移動相とし, 塩酸イソチベンジルは, 同じ固定相で, メタノール・水・28%アンモニア水 (80:16:4) を移動相とし, 流速 1 ml/min で流し分離した。

dl-塩酸メチルエフェドリンは, 分離性及び感度の点でこれらの条件では分離不可能であるから, アンパライト CG50 (100~200 メッシュ) を固定相とし, 水を移動相として他成分を除去し, さらに 0.1N 塩酸を流して試料溶液とする。試料溶液の一部をとり, 10%フェリシアン化カリウム溶液及び10%炭酸ナトリウム溶液を加えて30分間放置し, これをマレイン酸クロルフェニラミンと同様の条件で分離する。これらの成分の定量は 254 nm の測定波長を用いたためマレイン酸クロルフェニラミン及びジフェンヒドรามミンなど感度が悪く, 高濃度の試料溶液の調製を必要とした。

#### 5 高速液体クロマトグラフィーによる混合製剤の分析 (第2報) 高速液体クロマトグラフィーによる総合感冒剤中の鎮がい剤, きょたん剤及び抗ヒスタミン剤の定量

立沢政義, 橋場茂子, 江島 昭: 分析化学, 26, 706 (1977)

高速液体クロマトグラフィーによる, 総合感冒剤中の鎮がい剤, きょたん剤及び抗ヒスタミン剤の分離定量のため, スチレン・ジビニルベンゼン共重合体 (日立ゲル 3011) 及びこれに親水基を導入したポリマー (日立ゲル 3011-0 及び 3011-c) を固定相とし, アン

モニアアルカリ性メタノールを移動相として分離する方法を行った。クエン酸チベピジン, 塩酸ジフェンヒドรามミン, 及び塩酸アロクラミドは日立ゲル 3011 を固定相とし, メタノール・28%アンモニア水 (99:1) 又はメタノール・水・28%アンモニア水 (95:3:2) を用いた。ノスカピン, 酒石酸アリメマジン, メチレンジサリチル酸プロメタジン及び塩酸イソチベンジルは, 日立ゲル 3011-0 を固定相としメタノール・28%アンモニア水 (99:1) を移動相とし, 又臭化水素酸デキストロメトルファンは日立ゲル 3011-c を固定相とし同様の溶媒を移動相とし分析した。これらの方法を用いることにより感冒剤や他に配合される解熱鎮痛剤との分離が可能であり, かつ測定波長を短波長域に設定することによりこれら微量成分の定量が可能となった。これら成分の 0.2~1.2 µg の範囲で作成した検量線は, 原点を通る直線となり, 既知濃度における試料の回収率 99.2~100.7%, 標準偏差 0.82~2.26 で良好な結果を得た。

#### 6 セレン化合物の衛生化学的研究 (第5報) セレン投与ラットの尿および代謝物について

長谷川 明, 浦久保五郎: 衛生化学, 23, 277 (1977)

<sup>75</sup>Se-亜セレン酸ナトリウムまたは <sup>75</sup>Se-セレン酸ナトリウムを投与したラットの尿および肝について, 陰イオン交換樹脂を用いて有機セレンと無機セレンに分離し, その比率を求め, また, 尿の有機セレン分画中の代謝物の組成について調べた。

その結果, セレン化合物の1回および連続投与ともに, 有機セレンが多量に排泄され, 尿中セレン代謝物の70~80%であった。また, 肝ホモジネート上清の分析においても同様の結果を得た。

尿中有機セレンの代謝物の組成については, 全尿の約55%がジメチルセレノオキサイドであり, 約10%がトリメチルセレン化合物であることを明らかにした。

#### 7 セレン化合物の衛生化学的研究 (第6報) セレン投与ラット生体内鉄およびコバルトにおよぼす影響

長谷川 明: 衛生化学, 23, 307 (1977)

亜セレン酸ナトリウムおよびセレン酸ナトリウムを連続投与したラットの血液, 血清, 肝, 脾, 腎および骨について鉄およびコバルトの含量を原子吸光分析によって定量した。

鉄の含量は, 血液, 血清, 肝, 脾で低下を示したが, 特に脾で対照群にくらべ亜セレン酸ナトリウム投与群

で約50%,セレン酸ナトリウム投与群で約40%に低下し,血清ではそれぞれ約70%,約60%に低下した。

コバルトは,血液,肝,骨で含量の低下を示し,特に血液では亜セレン酸ナトリウム投与群で約30%に低下した。肝では亜セレン酸ナトリウム投与群およびセレン酸ナトリウム投与群は対照群にくらべ約80%に低下した。

#### 8 Studies on the Fate of Poisonous Metals in Experimental Animal (VIII). Species Difference on Biological Half Life of Cadmium

Goro URAKUBO, Akira HASEGAWA, Hideharu IKEBUCHI, Kin-ichi ONODA, Shinsuke NAKAURA and Yoshihito OMORI: *J. Food Hyg. Soc.*, 19, 224 (1978)

About 30~60  $\mu\text{Ci}/0.15 \text{ mg Cd/kg}$  of cadmium chloride solution containing  $^{115\text{m}}\text{Cd}$  was injected intraperitoneally to mice, rats, guinea pigs, rabbits and quails, and thereafter the whole body retention of Cd was measured continuously for 60~92 days in order to find the biological half lives of the metal in these animals. The whole body retention was determined by whole body counting of radioactivity in mice, rats, guinea pigs and quails, but in the case of rabbit it was determined by counting rates of excreta.

The biological half lives thus obtained in mouse, rat, guinea pig, rabbit and quail were 220, 150 and 181, 334, 299 and 367 days, respectively, namely, an apparent species difference was observed even under the same conditions such as sex of animal, dose of metal per kg and dosing route.

#### 9 Studies on Radioimmunoassay for 2,5-Dimethoxy-4-methylamphetamine

Kunisuke NAGAMATSU, Yasumasa KIDO and Goro URAKUBO: *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), 25, 3390 (1977)

A sensitive and specific method of radioimmunoassay for 2,5-dimethoxy-4-methylamphetamine (DOM) was developed, using anti-DOM antiserum obtained by immunizing guinea pig with DOM-glutaraldehyde-HSA conjugate and  $^{125}\text{I}$ -N-succinyl-DOM-tyrosine methylester ( $^{125}\text{I}$ -DOM) as a labeled hapten.

DOM,  $^{125}\text{I}$ -DOM and antibody came up to equi-

ilibrium over 15 hours at 4° of the incubation time in the radioimmunoassay system at pH 7.4 in phosphate buffer. Bound  $^{125}\text{I}$ -DOM was precipitated with satd.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  and the radioactivity of the bound labeled hapten was determined by  $\gamma$ -counting.

The displacement curve was linear when the percentage binding of  $^{125}\text{I}$ -DOM was plotted against logarithmic increase of unlabeled DOM from 1 to 100 ng.

The antiserum showed less affinity for various phenylisopropylamine derivatives and biogenic amines and there was no interfering substance in a normal serum.

#### 10 Metabolic Fate of 2,5-Dimethoxy-4-methylamphetamine in the Guinea Pig and Rabbit

Kunisuke NAGAMATSU, Yasumasa KIDO and Goro URAKUBO: *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), 26, 1267 (1978)

Metabolic fate of 2,5-dimethoxy-4-methylamphetamine (DOM) was investigated in the guinea pig and rabbit.

DOM concentration in serum decreased rapidly after a subcutaneous injection and DOM was scarcely obtained at 3 to 4 hours later by radioimmunoassay and thin-layer chromatography.

As the metabolites of DOM, 2,5-dimethoxy-4-hydroxymethylphenyl-2-aminopropane and 2,5-dimethoxy-4-carboxyphenyl-2-aminopropane were confirmed in the urine of guinea pig and rabbit. 2,5-Dimethoxy-4-methylphenyl-2-propanol and 2,5-dimethoxy-4-methylphenyl-2-propanone, which had not been detected in rat urine but in the incubation mixture of DOM with rabbit liver microsome, were identified in guinea pig and rabbit urines. 2,5-Dimethoxy-4-methylbenzoic acid was firstly detected as a minor metabolic product of DOM in the urine of both species of animals.

Principal metabolic pathway of DOM in guinea pig was not regarded as the side-chain oxidation but as the oxidation of methyl group on benzene ring as well as in rabbit.

11 生体試料中  $^{210}\text{Pb}$  の定量法について

池淵秀治, 亀谷勝昭: 衛生化学, 23, 290 (1977)

$^{210}\text{Pb}$  をトレーサーとして動物実験に用いることを目的として, 生体内試料中の  $^{210}\text{Pb}$  の定量法を検討した。 $^{210}\text{Pb}$  を含む動物組織を  $\text{HNO}_3$ -60%  $\text{HClO}_4$  で湿式酸化し, 十分に酸化して得た残留物を 0.1 N  $\text{HCl}$  に溶して陰イオン交換樹脂に通し, 0.1 N  $\text{HCl}$  10 ml で  $^{210}\text{Pb}$  を溶出した。 $^{210}\text{Pb}$  の放射性娘核種からの分離は完全であり, その回収率は定量的であった。また,  $^{210}\text{Pb}$  の放射能を液体シンチレーション計数装置により測定した結果は計数効率約37%を示し,  $^{210}\text{Pb}$  の  $r$  線を測定する方法にくらべて十分すぐれたものであった。

以上検討した  $^{210}\text{Pb}$  の定量法は, 操作が簡単で娘核種からの分離も十分であり, かつ  $^{210}\text{Pb}$  の測定効率が著しく向上したこと, さらに多試料中の  $^{210}\text{Pb}$  を一度に分離することができるなどから, 本分析法が  $^{210}\text{Pb}$  を用いた動物実験, 例えば長期間の生体内挙動の検討などに十分応用し得ることが, 明らかとなった。

12  $^{210}\text{Pb}$  のラット体内分布, 蓄積および排泄について

池淵秀治, 亀谷勝昭: 衛生化学, 23, 295 (1977)

$^{210}\text{Pb}$  をトレーサーとして硝酸鉛 ( $\text{Pb}^{2+}$  1 mg/kg) をラットの股静脈内に1回投与して体内における鉛の分布および排泄の経時的变化を求め次のような結果を得た。

1) 臓器組織における分布では投与後1日目に  $^{210}\text{Pb}$  は脊椎骨に最も高く, 次に骨髄, 大腿骨, 肝, 腎に高濃度を認め, 中枢神経系組織, 睪丸と筋肉には低濃度であった。血液, 肝, 腎中の  $^{210}\text{Pb}$  は投与後急速に減少する。骨組織では投与後3日目に最高に達し, その後は緩やかに減少する。中枢神経組織中の  $^{210}\text{Pb}$  は投与後14日目に最高値になり, その後緩やかに減少した。投与後92日目の  $^{210}\text{Pb}$  分布は骨組織に最も高く, 次に骨髄, 脾, 小脳, 延髄の順であった。

2) 投与した  $^{210}\text{Pb}$  は92日間に 58.13% が糞尿を通じて排泄され, このうち糞に 51.87%, 尿に 6.26% であった。胆汁中の  $^{210}\text{Pb}$  は投与後6時間で投与した  $^{210}\text{Pb}$  の 20%, 48時間で27%を認めた。

3)  $^{210}\text{Pb}$  の臓器中の BHL は大腿骨 79.5 日, 脊椎骨 62.3 日, 肝 53.3 日, 血液 37.3 日, 腎 20.1 日と計算された。 $^{210}\text{Pb}$  の排泄率から算出したラット全身の残留率は次に示す3つの部分より構成される結果を得た。

$$R = 36.37 e^{-0.370t} + 12.57 e^{-0.0246t} + 51.57 e^{-0.000993t}$$

以上のように今回の長期間にわたる動物実験の結果

により, 鉛中毒特有な症状を呈する貧血症および神経症状に密接な関係のある組織への鉛の分布および蓄積が明らかにされた。また, 鉛の排泄経路についても十分な結論が出された。しかし, 主要臓器の鉛の BHL のより詳細な検討および全身における残留率との関係については, さらに長期間の実験が必要であろうことが今後の課題として残された。

## 13 Mutagenicity of Flavone Derivatives

Takashi SUGIMURA,\*<sup>1</sup> Minako NAGAO,\*<sup>1</sup>

Taijiro MATSUSHIMA,\*<sup>2</sup> Takie YAHAGI,\*<sup>1</sup>

Yuko SEINO,\*<sup>1</sup> Atsuko SHIRAI,\*<sup>2</sup> Mutsuko

SAWAMURA,\*<sup>2</sup> Shinsaku NATORI, Kunitoshi

YOSHIHIRA, Masamichi FUKUOKA and Ma-

sanori KUROYANAGI: *Proc. Japan Acad.*, 53,

Ser. B, 194 (1977)

Examination of more than twenty compounds isolated from carcinogenic plant, *Pteridium aquilinum*, for mutagenicities employing *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA 100 revealed the potent mutagenicity of kaempferol (3,5,7,4'-tetrahydroxyflavone). The mutagenicity was tested for several flavones, flavonols, flavanones, flavanols, and isoflavones and it was shown that the flavonol derivatives bearing free hydroxyl groups at 3 and 5 positions, such as kaempferol, quercetin, and galangin, exhibit the mutagenicity for the both strain after preincubation with S-9 Mix. Since the flavonols are commonly distributed among the vascular plants, the effects to experimental animals should be tested.

\*<sup>1</sup> National Cancer Center Research Institute

\*<sup>2</sup> Institute of Medical Sciences, University of Tokyo.

## 14 Toxic Cytochalasins

Shinsaku NATORI: 'Mycotoxins in Human and Animal Health', Pathotox Publishers,

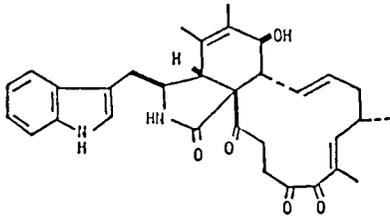
Inc., Park Forest South, Ill., U.S.A., p. 559 (1977)

Chemistry of cytochalasins, especially of chaetoglobosins, biosynthesis, cytotoxic effects on mammalian cells, and toxicities in experimental animals are reviewed. The structures, fungal sources, and references of 23 cytochalasins so far known are tabulated.

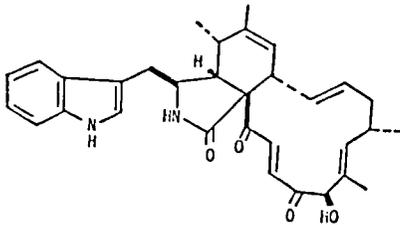
15 **Chaetoglobosins G and J, Cytotoxic Indol-3-yl[13]cytochalasans from *Chaetomium globosum***

Setsuko SEKITA, Kunitoshi YOSHIHIRA, Shinsaku NATORI and Harumitsu KUWANO\*: *Tetrahedron Letters*, 2771, (1977)

Further works on the cytotoxic metabolites of the mold have been conducted and the proposed structures of chaetoglobosins E and F were confirmed by correlation reactions. Two new congeners were isolated and characterized by their physical properties. Again the structures were confirmed by the correlation with known compounds as 1 and 2.



(1)



(2)

\* Sankyo Co., Ltd.

16 **皇居外苑藻水質の衛生化学的研究 (第4報) 藻水の栄養塩類の収支と藻水質との関係**

佐谷戸安好, 安藤正典, 中室克彦, 松井啓子: *衛生化学*, 23, 211 (1977)

著者らは前報において、皇居外苑藻水質が富栄養化していることを報告した。そこで今回、本藻の水質浄化方法のプランをたてる目的で、藻類中への栄養塩類の取り込みおよび、四季における栄養収支について検討を行った。

藻に流入する地下水、雨水および藻からの流出水などの検体は年4回採水した。そしてこれらの検体はろ紙でろ過し、ろ過水および未ろ過の検体を作製し、栄養塩類の分析を行った。その結果、藻類中の有機体窒素は他の季節に比較して、夏期に著明な増加が認めら

れた。これに反して、亜硝酸および硝酸性窒素などの可溶性無機体窒素は夏期に認めることはできなかった。また、本藻における窒素化合物の供給源は栄養収支の結果から、流入地下水ばかりでなく、底質からの窒素の溶出によっても供給されていることが示唆された。さらに、本藻水の夏期におけるリン酸の藻類への取り込みは顕著であり、その供給源は流入する地下水によると考えられる。

17 **有害性金属の衛生化学的研究 第7報 カドミウム連続経口投与時の骨構成成分ならびに酵素活性について**

安藤正典, 佐谷戸安好, 大沢利昭\*: *衛生化学* 24, 19 (1978)

カドミウムの連続経口投与によるラット骨構成成分ならびに bone resorption に関与する酵素活性について研究した。シアル酸、ヘキサソース量はカドミウム処理ラットにおいて、control 群より増加していることがみられたが、ヘキササミン、ウロン酸量は両者の間に差を認めることはできなかった。また、カルシウム、リンでは6ヶ月間のカドミウム処理ラットにおいて顕著に低下することが観察された。

6ヶ月間のカドミウム処理ラットの acid phosphatase,  $\beta$ -glucuronidase,  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase,  $\beta$ -galactosidase などの骨酵素活性は骨幹部において顕著に増加することが認められた。このことから、カドミウムの6ヶ月間の処理によってラット骨幹部で bone resorption が起るものと考えられる。

\* 東京大学薬学部

18 **動物性食品中の残留オキシテトラサイクリンの化学的分析法**

佐々木久美子, 武田明治, 内山 充, 食衛誌: 18, 149 (1977)

食肉および魚肉中の残留 OTC の化学的分析法を検討した。

1. 本法は希塩酸による抽出、アンバーライト XAD-8 カラムによる分離、apo-OTC への変換、けい光法による測定より成る。

2. OTC の酸処理によって生成する apo-OTC は OTC よりけい光が強く、ホウ酸ナトリウム-水酸化ナトリウム緩衝液を使用することにより apo-OTC のけい光を安定化し、再現性を高めた。

3. 定量はけい光波長 447 nm における励起光強度の差 ( $Ex_{390} - Ex_{350}$ ) により行い、試料由来のけい光物質による妨害を除くことができた。

4. 本報における添加回収率は 0.25 ppm 添加で 33~37%の範囲にあり, 最小検出量は 0.015 ppm であった.

#### 19 Effect of Organophosphorus Insecticides on Hepatic Microsomal Cytochrome P-450 in Mice

Takemi YOSHIDA\*, Keiko HOMMA\*, Yasuo SUZUKI\* and Mitsuru UCHIYAMA: *J. Pesticide Sci.*, 3, 21 (1978)

A single intraperitoneal injection of fenitrothion (100 mg/kg) to mice brought a biphasic effect on microsomal drug metabolism and cytochrome P-450 content. A slight decrease in protoheme was observed, whereas fenitrothion did not affect microsomal cytochrome *b<sub>5</sub>* content.

Pretreatment of mice with SKF 525-A, an inhibitor of drug metabolism, afforded some prevention against the decrease in cytochrome P-450 owing to fenitrothion injection. On the other hand, there was the marked decrease in cytochrome P-450 when some organothiophosphates were incubated with microsomes under the presence of NADPH-generating system *in vitro*. The decrease was observed as long as organophosphates contained P=S group.

These results reveal that the depression of cytochrome P-450 in an earlier stage might be coupled with the oxidative metabolism of sulfur compound. Recovery from the decrease in cytochrome P-450, which ordinary take place within 24 hr, was delayed by the concomitant treatment of mice with cobalt chloride indicating that the heme synthesis may be involved in recovery and rebounded increase in cytochrome P-450 in the later stage after the treatment with fenitrothion.

\* Pharmaceutical Institute, Tohoku University, Aobayama, Sendai 980, Japan

#### 20 Determination of Benzo(a)pyrene in Foods

Yukio SAITO, Hiroshi SEKITA, Mitsuharu TAKEDA and Mitsuru UCHIYAMA: *Journal of the AOAC*, 61, 129 (1978)

An analytical method was developed for determining benzo(a)pyrene in foods, suitable for routine use. The method consists of 4 cleanup steps:

(1) alkali cleavage of sample, (2) preliminary silica gel column chromatography, (3) selective extraction with concentrated sulfuric acid, and (4) further silica gel column chromatography. Recoveries of benzo(a)pyrene added to 50 g (or 10 g) food at levels of 0.4 ppb (or 2 ppb) ranged from 70% for short-necked clam and mackerel to 85% for chicken meat. The sulfuric acid extraction step affords a simple method for isolating benzo(a)pyrene from various kinds of interfering substances which could not be separated by existing methods.

#### 21 食品中のカドミウムの化学形について(第1報) 米の中の化学形の検討

鈴木 隆, 武田明治, 内山 充: 衛生化学, 23, 345 (1977)

1) 精白度の増加はCdの減少と平行はしているが, この割合は必ずしも大きくなく, 18%減量する迄精白してもCd濃度の減少はせいぜい10%減にとどまった. 一方, 四塩化炭素を用いた分画遠心により得たアリューロン顆粒部分は多量のPと同時にCdも濃縮されていることが判明したが, これは必ずしもフィチン酸とCdが結合していることを意味するものではなく, 一部分はフィチン酸との結合も考えられるが, 他のCdは別の形態, すなわち, 蛋白と結合しているものと考えられる.

2) 酸ならびに塩溶液による溶出実験から酢酸溶液は米粒から容易にCd溶脱する. 一方, 塩との併用により, さらに溶出の割合は増加する. この実験からCdとPもしくは蛋白との間に一定の相関は認められなかった.

3) 中性付近では米中のCdはフィチン酸および蛋白と結合し, ほとんど水に不溶性である. しかしながら, 酸性条件下においてCdは無機の形で存在しており, アルカリ性条件下では一部は高分子蛋白と結合したCdと遊離のCdの共存が推定される.

#### 22 薄層クロマトグラフィー- けい光濃度法における粘性有機溶媒を用いる増けい光法

内山貞夫, 近藤龍雄, 内山 充: 分析化学, 26, 726 (1977)

薄層クロマトグラフィー(TLC)-けい光濃度法において, 展開後のプレートに流動パラフィンやグリセリンのような揮散性のなく粘度の高い有機溶媒を噴霧することによってけい光スポットを増けい光させ定量感

度を高める方法を開発した。定量に当たって目的のスポットに等量噴霧するために、プレート上原点から等  $R_f$  値を示す位置に均一噴霧が可能な装置を開発した。その結果流動パラフィン溶液を噴霧することにより DNS-アミン{DNS: 5-(dimethylamino)-1-naphthalenesulfonyl} のけい光スポットを増けい光させジメチルアミンなど揮発性アミンの定量限界を10倍下げることが可能となった。更に本法はベンゾ(a)ピレンのけい光強度を35倍も増加させるなど他のけい光物質にも有効であり、有力の増けい光法として大いに期待できる。

### 23 Age Related Alterations in Chain Elongation and Mono-Unsaturation of Fatty Acyl CoA in Rat Liver Microsomes

Mitsuru UCHIYAMA and Yoichi KAWASHIMA\*: *Exp. Geront.* Vol. 13. pp. 57-61. Pergamon Press 1978. Printed in Great Britain.

Chain elongation of palmityl CoA to stearyl CoA and monodesaturation of stearyl CoA to oleic acid were investigated for age related changes using liver microsomes of young (4 weeks) and aged (50 weeks) male Wistar rats. Specific activity of acyl CoA elongation was low in aged rats and induction by starve-refeed was not observed in aged rats. The degree of inhibition produced by co-existing stearyl CoA was lower in aged rats than young ones. On the contrary, monodesaturation of stearyl CoA was not affected by aging, namely specific activity did not change with age and starve-refeed induced activity in both young and old rats in almost the same manner. The extent of inhibition by oleyl CoA added in the reaction media was the same, showing that desaturation is still regulated normally in aged rat liver. It is very likely that these alterations accelerate the tendency to an increase in palmitic and palmitoleic acids in the fatty acid profile of aged rat liver.

\* Pharmaceutical Institute, Tohoku University

### 24 Determination of Malonaldehyde Precursor in Tissues by Thiobarbituric Acid Test

Mitsuru UCHIYAMA and Midori MIHARA: *Anal. Biochem.*, 86, 271 (1978)

Running Title: TBA Test for Tissue Homogenate

Abstract: An attempt to establish a TBA test procedure with reasonable reproducibility, applicable to assay of lipoperoxides in various animal tissue homogenates was performed.

It was concluded that the deproteinization of homogenate prior to coloration is not needed, but double wavelength measurement is necessary to avoid the interference and the reaction should be performed with phosphoric acid at a definite pH in the vicinity of 2.0.

The most reproducible procedure is as follows: To 0.5 ml of 10% homogenate of the tissue sample, add 3 ml of 1%  $H_3PO_4$  and 1 ml of 0.6% TBA aqueous solution; stir and heat the mixture on a boiling water bath for 45 min. After cooling, add 4 ml of n-butanol, shake, and separate the butanol layer by centrifuge; determine the optical density of the butanol layer at 535 and 520 nm; and calculate the difference of optical density between the two determinations to be taken as TBA value.

### 25 かんきつ類中のジフェニルおよびオルトフェニルフェノールの定量法

原田基夫, 川崎洋子: 食品衛生研究, 27, 1079 (1977)

かんきつ類の保存料として新たにオルトフェニルフェノール (OPP) が許可され、従来から使用されていたジフェニル (DP) との同時定量法を企画した。まず、分析法に関する内外の文献36件について解説し、それらの結果として最良と思われる方法を次のように提案した。

試料の前処理として精油定量器を用いる水蒸気蒸留法を採用する。DP および OPP はシクロヘキサン中に捕集し、捕集液はアルカリ溶液で処理して OPP を抽出し、DP と分離させる。シクロヘキサン層は一定容としたのち 5% DEP 20 M などの極性カラム GC を行い、内部標準法により定量する。アルカリ層は食塩を飽和させたのち、*n*-ヘキサンで抽出し、抽出液を注意して 1~2 ml まで濃縮後、内部標準法により定量する。

### 26 畜産食品中における合成抗菌剤の検査法について

神蔵美枝子: 食品衛生研究, 27, 1091 (1977)

飼料添加物として指定されている合成抗菌剤のうち、カプリロヒドロキサム酸、カルバドックスについ

て、豚肉、鶏肉中の残留分析法を示し、分析上の問題点などについて解説した。

27 **Metabolic Fate of the Precursors of *N*-Nitroso Compounds (I) Gastro-intestinal Absorption of *N*-Nitrosodimethylamine and Its Precursors in Guinea-pigs**

Hajime ISHIWATA, Hiroko MIZUSHIRO, Akio TANIMURA, Atsushi TAKAHASHI, Yoshito OMORI and Toshiro MURATA\*: *J. Food Hyg. Soc. Japan.*, 18, 524 (1977)

The gastro-intestinal absorption of *N*-nitrosodimethylamine (NDM) and its precursors in guinea-pigs were studied. NDM, dimethylamine (DMA) and nitrate were quite stable in the contents of stomach and small intestine when they were incubated *in vitro* at 37°C for 60 min. Nitrite was stable in the contents of small intestine, but not in those of stomach. DMA and nitrate disappeared from the ligated small intestine, but not from the ligated stomach. Nitrite rapidly disappeared from the ligated stomach, and the rate of disappearance was more rapid than that of decomposition. The disappearance curves of NDM from the ligated stomach and small intestine were monoexponential. NDM rapidly disappeared from the small intestine, and slowly from the stomach.

\* Shizuoka College of Pharmacy

28 **Metabolic Fate of the Precursors of *N*-Nitroso Compounds (II) Salivary Secretion and Urinary Excretion of Nitrosatable Compounds in Man**

Hajimu ISHIWATA, Hiroko MIZUSHIRO, Akio TANIMURA and Toshiro MURATA\*: *J. Food Hyg. Soc. Japan.*, 19, 91 (1978)

Levels of nitrosatable compounds in saliva and urine were determined. The mean value, which was calculated as equivalent to dimethylamine (DME) in 25 human saliva samples collected from 11 subjects was  $0.3 \pm 0.2$  ppm. When a subject ingested the foods containing low levels of volatile nitrosatable compounds the concentration of nitrosatable compounds in saliva was less than 0.2 ppm over the day, but increased to 1.0 ppm 1 hr after the ingestion of 100 mg of DMA·HCl with 100 ml

of water. DMA remaining in the oral cavity after the ingestion of DMA·HCl disappeared within 20 min. No change in the concentration of nitrosatable compounds was observed when the saliva collected 1 hr after the ingestion of DMA·HCl was incubated at 37°C for 2 hr. DMA was identified as the main nitrosatable compound in saliva, which was collected after the ingestion of DMA·HCl, by thin-layer chromatography and gas liquid chromatography. The pattern of the time course of urinary excretion of nitrosatable compounds after the ingestion of DMA·HCl was almost similar to that of the salivary secretion. About 95% of DMA ingested was presumed to be excreted as nitrosatable compounds into 24-hr urine.

The mean value of the amounts of nitrosatable compounds excreted in the 24 hr urine collected from 9 subjects was  $21.1 \pm 9.3$  mg and that of volatile nitrosatable compounds contained in the foods and beverages ingested for the experimental period was  $10.4 \pm 6.9$  mg.

\* Shizuoka College of Pharmacy

29 **Nitrosation of Methyl *N*-Methylantranilate**  
Ayako SAKAI, Kunie YOSHIKAWA, Hiroshi KURATA and Akio TANIMURA: *J. Food Hyg. Soc. Japan.*, 19, 85 (1978)

The nitrosation of methyl *N*-methylantranilate (MMA), which is permitted to be used to foods as flavor in Japan, with equimolar nitrite was measured at 37°C at the concentrations of  $10^{-1} \sim 10$  mM of both reactants. MMA was nitrosated very easily, and when 0.1 mM of MMA was reacted with equimolar sodium nitrite at pH 2.0 for 5 min and at pH 3.0 for 20 min, the yields of methyl *N*-methyl-*N*-nitrosoantranilate (NO-MMA) were 89.5% and 82.6%, respectively. The rate of nitrosation was found to be dependent on the acidity of reaction mixture and the highest yields of NO-MMA was obtained below pH 2.0 at the MMA concentration of 0.2 mM for 5 min. A mutation test of NO-MMA was carried out, but NO-MMA was non-mutagenic to *Salmonella typhimurium* tester strain TA 100 and TA 98 in the presence and absence of the metabolic activation system (S-9 mix).

30 **Studies on *N*-Nitroso Derivatives of *N*-Methylcarbamate Insecticides (III) Mutagenicity of *N*-Nitroso Derivatives of 3-Methylphenyl *N*-Methylcarbamate, 3,4-Dimethylphenyl *N*-Methylcarbamate and Naphthyl *N*-Methylcarbamate for *Salmonella typhimurium***

Ayako SAKAI, Kunic YOSHIKAWA, Hiroshi KURATA and Akio TANIMURA: *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 19, 122 (1978)

*N*-Methylcarbamate insecticides, 3-methylphenyl *N*-methylcarbamate, 3,4-dimethylphenyl *N*-methylcarbamate and naphthyl *N*-methylcarbamate, and their *N*-nitroso derivatives were tested for mutagenic activity to *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA 100 in the presence and absence of metabolic activation system (rat liver microsomal preparation, "S-9 mix"). The nitroso derivatives were mutagenic for strain TA 100 without S-9 mix but not for strain TA 98, indicating that the nitroso derivatives were potent base-change mutagens. The mutagenic activity of nitroso derivatives for strain TA 100 was found to disappear in the presence of S-9 mix. Neither strain TA 100 nor strain TA 98 responded to *N*-methylcarbamate insecticides with or without S-9 mix.

31 **Studies on the Formation of Nitrosamines (VI) The Effects of Organic Acids on the Rate of Nitrosation of Ureido Compounds**  
Miyako YAMAMOTO, Takashi YAMADA and Akio TANIMURA: *J. Food Hyg. Soc., Japan*, 18, 509 (1977)

The effect of various organic acids, such as citric acid, tartaric acid, malic acid, tricarballic acid and so forth, on the rates of nitrosation of hydantoic acid (HA) and methylurca (MU), which were ureido compounds, was studied. These organic acids accelerated the rate of nitrosation of the ureido compounds. Extents of accelerating effect of the organic acids were greater in the compounds which have more carboxyl groups or hydroxy groups. The rate of nitrososarcosine formation from creatine, one of guanido compounds, and nitrite was accelerated by citric acid,

tartaric acid and sodium thiocyanate.

The reaction of HA and sodium nitrite in presence of citric acid was first order with respect to each substance, and the following equation was set up:  $\text{rate} = k_1[\text{HA}][\text{nitrite}] + k_2[\text{citrate}][\text{HA}][\text{nitrite}]$ . The rate of carboxymethyl nitrosourea (CMNU) formation from HA and nitrite was increased with lowering pH, and this pH dependence was not remarkably affected in the presence of citric acid.

32 **Studies on the Formation of Nitrosamines (VII) The Effects of Some Polyphenols on Nitrosation of Diethylamine**

Takashi YAMADA, Miyako YAMAMOTO and Akio TANIMURA: *J. Food Hyg., Soc., Japan*, 19, 224 (1978)

The effects of pyrocatechol, pyrogallol, 4-methylcatechol (4-MC), and gallic acid (GA) on the nitrosation of diethylamine were studied. At pH 3 and 37°C, all 4 polyphenols in concentrations more than 5 mM inhibited the nitrosation. In low concentrations, no effects were observed. At pH 4, the effects of all polyphenols except GA were similar to those at pH 3. However, 20 mM of GA somewhat accelerated the nitrosation. The effect of pH was examined with 10 mM of 4-MC. 4-MC inhibited nitrosodiethylamine formation at pH 2.0~4.5.

33 **塩化ビニル樹脂中の鉛およびカドミウムの分析について**

辰濃 隆: 食品衛生研究, 28, 75 (1978)

塩化ビニル樹脂製器具および容器包装の規格のなかに、鉛およびカドミウムの試験項目がある。この試験法は鉛とカドミウムを同時に測定するためにポーログラフ法を採用しているが、原子吸光法を併用するための基礎実験として、種々条件を設定して検討を行った。

最近プラスチックの廃棄物処理時熱量の高いことから、プラスチックに無機質を入れて燃焼時の熱量をおとす工夫がなされ、プラスチックの灰化時に吸着による分析値の低下ということも併せて検討した。

その結果、無機質の多いものについては、硫酸添加量を多くすることによって、損失を少なくすることができた。

分析法上では、ポーログラフ法、原子吸光法とも

回収率は90%程度であった。

### 34 微生物を用いた発癌物質の検索

吉川邦衛：感染・炎症・免疫，7，223 (1977)

今日，変異原物質は癌原物質としてあるいは遺伝毒性を誘起する化学物質として注視され，特に癌原物質としての相関性を考慮した観点から，突然変異試験法は癌原物質の第一次スクリーニングとして重要な役割を占めている。突然変異試験法の検出材料としてファーヂ，細菌，酵母，あるいは哺乳動物細胞らが使用されているが，細菌細胞による突然変異試験法は迅速かつ確実な実験結果を導くことから，変異原物質および癌原物質の第一次スクリーニング法として現在もっとも有益な試験法であると言えよう。本文は主に細菌細胞による突然変異の規定，試験法および癌原物質の変異原性について記載した。

### 35 Photodynamic Action of Fluorescein Dyes in DNA-Damaging and *in Vitro* Inactivation of Transforming DNA in Bacteria

Kunie YOSHIKAWA, Hiroshi KURATA, Shigeo IWAHARA and Tuneo KADA: *Mutation Res.*, 56, 359 (1978)

Nine fluorescein dyes were studied by means of rec-assay and inactivation of transforming DNA *in vitro* using *Bacillus subtilis* Marburg strains with or without light. Although halogenated fluorescein dyes did not damage DNA in rec-cells as well as *in vitro* transforming DNA without light, they showed markedly some effects under light. The results were effected by the number of halogen atoms, the kinds of those and their substituted positions in the parents fluorescein. Accordingly, all halogenated fluorescein dyes may be mutagenic under light.

### 36 A Radioresistant Gram-positive Asporogenous Rod Isolated from the Faeces of a Giant Panda (*Ailuropoda melanoleuca*)

Michiko KOBATAKE, Hiroshi KURATA and Kazuo KOMAGATA\*: *J. Gen. Microbiol.*, 43, 100 (1977)

A highly radioresistant bacterium was isolated from the faeces of a giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*). When the organism was subjected to gamma irradiation in phosphate buffer, the

induction dose and  $D_{10}$  values were 846 and 345 krad, respectively, for cells grown on PCNZ agar, and 700 and 460 krad, respectively, for the enlarged cells grown on 5% (v/v) horse blood brain heart infusion agar. The  $D_{10}$  value of the former cells was about 1.8 times higher than that of *Micrococcus radiodurans* grown on PCNZ agar.

\* Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo

### 37 ビフィズス菌を含有する発酵乳の生菌数測定法について

島田清弘\*, 馬田三夫\*, 務台方彦\*, 鈴木 昭, 小沼博隆：食衛誌，18，537 (1977)

ビフィズス菌を含有する発酵乳の生菌数測定法の確立を目的に検討を行い，次の結論を得た。試料の段階希釈に用いる希釈水は0.1%酵母エキスおよび0.1%コーンステープリカーが優れていた。測定用培地は，変法 Rogosa および BL 寒天培地が適し，培養にあたっては，嫌気ジャー，ガスパックおよびパウチ法のいずれかを用いて嫌気培養することが必須であった。一般のビフィズス菌は，上記の条件で37°Cで48～96時間培養すると直径0.5～3.0mmの菌集落を形成した。ビフィズス菌の菌集落のみを形成する選択培地とBCP加プレートカウント寒天培地を用いてビフィズス菌と乳酸菌の混在するカルチャー中から両菌を分別して測定する方法を確立した。

\* (株)ヤクルト本社研究所

### 38 生カキの大腸菌汚染と分離菌株のエンテロトキシン産生性

小久保弘太郎\*, 松下 秀\*, 甲斐明美\*, 山田 満\*\*, 小沼博隆：食衛誌，19，117 (1978)

1976年10月から1977年3月の間に，主として東京都中央卸売市場に入荷した生カキ405検体の大腸菌による汚染状況をECテストにより調査した。その結果229検体(56.5%)が陽性で39検体(9.6%)は230/100g以上の菌数値を示し，産地別では広島県産が，入荷月別では12月に汚染が高かった。分離した大腸菌138株のエンテロトキシン産生能を調べたところ，広島県産カキ由来の1株がLTを，岩手および三重県産カキ由来の3株がSTを産生した。これらの血清型は，LT産生株がO型別不能H2，ST産生株がO25：H42，O20：H- およびO型別不能H-であった。

\* 東京都立衛生研究所

\*\* 東京都市場衛生検査所

39 **Biochemical Characteristics and *In Vitro* Drug Sensitivity of *Salmonella typhimurium*, Copenhagen Variety isolated from Domestic and Feral Pigeons, Crows, a Kite, Chickens and Animals in Japan**

Gihei SATO\*<sup>1</sup>, Naotaka ISHIGURO\*<sup>1</sup>, Masayoshi ASAGI\*<sup>1</sup>, Chiaki OKA\*<sup>1</sup>, Tsutomu KAWANISHI and Tsuneki INOUE\*<sup>2</sup>: *Jap. J. Vet. Sci.*, 39, 609 (1977)

*Salmonella typhimurium*, Copenhagen variety was isolated from 13 domestic pigeons (*Columba livia domestica*) of 4 pigeonries in which clinical salmonellosis occurred during the period of 1970 to 1975. Of 58 composite fecal samples collected from feral pigeons (*Columba livia domestica*) in 13 districts of Honshu and Hokkaido in 1975 and 1976, 12 (20.7%) from 3 districts gave the same antigenic form. The antigenic form was also isolated from the tissues of 2 (1.8%) feral pigeons (*Columba livia domestica*) caught at one site among a total of 110 feral pigeons (80 *Columba livia domestica* and 30 *Streptopelia orientalis orientalis*) caught in 3 districts of Hokkaido in 1976. No *Salmonella* other than *S. typhimurium* Copenhagen variety was obtained from pigeons. These isolates fermented maltose, and belonged to biovar 10. All the isolates from feral pigeons and most of those from domestic pigeons showed *in-vitro* drug sensitivity. *S. typhimurium*, Copenhagen variety having the same characteristic was isolated from animals, chickens and wild birds, though the antigenic form originating from hosts other than pigeons was drug resistant with variable frequencies, and different biovars were found in some hosts. This appears to indicate that pigeons have a role in the epizootiology of salmonellosis in animals and birds in Japan.

\*<sup>1</sup> Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine

\*<sup>2</sup> Nara Prefectural Institute of Public Health

40 **Coprophilous Pyrenomyces from Japan IV**  
Kouhei FURUYA\* and Shun-ichi UDAGAWA:  
*Trans. Mycol. Soc. Japan*, 17, 248 (1976)

The present paper, fourth in the series deals with eight additional: *Arnium irregulare* sp. nov.,

*A. japonense* sp. nov., *Coniochaeta polysperma* sp. nov., *Delitschia orientalis* sp. nov., *Podosordaria jugoyasan* (Hara) comb. nov., and the other three species as reported for the first time from Japan.

\* Sankyo Co., Ltd.

41 **New species of *Gelasinospora* and *Anixiella***

Kouhei FURUYA\* and Shun-ichi UDAGAWA:  
*Trans. Mycol. Soc. Japan*, 17, 313 (1976)

Three species of *Gelasinospora* and *Anixiella* are described from Japanese and Thailand soils: *G. mirabilis* sp. nov., *G. varians* sp. nov., and *A. sublineolata* sp. nov.

\* Sankyo Co., Ltd.

42 **Contributions to a monograph of *Microthecium***

David L. HAWKSWORTH\* and Shun-ichi UDAGAWA: *Trans. Mycol. Soc. Japan*, 18, 143 (1977)

*Microthecium beatonii* D. Hawksw. sp. nov. and *M. perplexum* D. Hawksw. sp. nov. are described from Tuberales in Australia, and *M. foveolatum* Udagawa and Horie sp. nov. is described from soil in Japan. *M. episphaerium* (Phill. and Plover.) Höhn. is shown to be the correct name for *M. epimyces* (Höhn.) Höhn. and a revised key to the thirteen species and one variety accepted in *Microthecium* is presented. A synopsis of published studies on the genus since the revision of Udagawa and Cain (1969) is included.

\* Commonwealth Mycological Institute, New, England

43 **ピーナツ畑土壌のマイコフローラと収穫されたピーナツ殻及び種実における土壌菌の汚染について**

堀江義一\*, 山崎幹夫\*, 宇田川俊一: 日菌報, 18, 203 (1977)

Warcup の土壌プレート法および土壌熱処理法を用いて、わが国のピーナツ栽培畑土壌の菌類分布をその変遷とともに収穫後のピーナツ殻および種実への土壌菌侵入との関連から調べた。供試試料として千葉県習志野市ピーナツ畑土壌をもちい、根圏および一般土壌に区分してマイコフローラを評価した。

全体で43属, 接合菌類3属, 子のう菌類17属, 不完全菌類23属が得られ, 優先種は *Talaromyces flavus*, *T. trachyspermus*, *Aspergillus fumigatus*, *A. ustus*, *Fusarium* spp., *Paecilomyces lilacinus*, *Penicillium purpurogenum*, *Trichoderma* spp. などであった。*Aspergillus flavus* 群はほとんど認められなかった。種実へ侵入したものと思われる土壌菌はいずれも *Fusarium* であった。

\* 千葉大学生物活性研究所

44 Notes on some Japanese Ascomycetes XV  
Shun-ichi UDAGAWA and Kouhei FURUYA\*:  
*Trans. Mycol. Soc. Japan*, 18, 302 (1977)

The new, monotypic, sordariaceous genus *Rhexosporium* is described to accommodate *R. terrestre* Udagawa and Furuya sp. nov. from Japanese soil. It is characterized by cylindrical asci with a small apical ring and broadly ellipsoid, two-celled ascospores with a dark-colored, sculptured upper cell and a hyaline pedicel. The sculpturing of ascospore is composed of striate ridges and numerous irregular warts. In addition, new records for Japan are described as follows: *Arthroderma curreyi*, *Boothiella tetraspora* and *Leiothecium ellipsoideum*.

\* Sankyo Co., Ltd.

45 日本産みかん生果汁から分離された *Cephaloascus fragrans* Hanawa  
宇田川俊一, 小島満子, 吉村建治\*: 日菌報,  
18, 399 (1977)

市販果実飲料における微生物相について食品衛生学的な立場から調査研究中に, 子のう酵母 (エンドミクス目, エンドミクス科) *Cephaloascus fragrans* Hanawa が愛媛県産みかん生果汁の汚染菌として,  $10^3$ /ml 量の密度で発見された。本菌は1920年に中国東北部 (満州国大連市) において堀によりヒト外聴道から分離, 新属新種として報告されたものである。今回, 日本での分離記録として分離株の形態・生理的諸性質を調べ記載した。

\* 東京大学医科学研究所

46 The taxonomical identity of the perfect state of *Pyricularia grisea* and its allies  
Hiroshi YAEGASHI\* and Shun-ichi UDAGAWA: *Can. J. Bot.*, 56 180 (1978)

*Magnaporthe grisea* is proposed as a comb. nov. for *Ceratosphaeria grisea* Hebert, the perfect state of *Pyricularia grisea* (Cke.) Sacc. *Pyricularia grisea* is very close morphologically to *P. oryzae* Cav., well known as the causal agent of blast disease on rice. *Magnaporthe* was recently established in the Diaporthales to accommodate a single species, *M. salvinii* (Catt.) Krause and Webster, which was described as the cause of stem rot of rice with conidial state known as *Nakataea sigmoidea* Hara. Based on a review of the taxonomic characters of *Ceratosphaeria grisea*, the desirability is discussed of its inclusion in the genus *Magnaporthe*.

\* The Tohoku National Agricultural Experiment Station

47 Toxicological Approaches to the Metabolites of Fusaria. XI. Trichothecenes and Zearalenone from *Fusarium* species Isolated from River Sediments

Yoshio UENO\*, Kenji ISHII\*, Megumi SAWANO\*, Kohichiro OHTSUBO\*\*, Yoshio MATSUDA\*\*\*, Toshitsugu TANAKA\*\*\*, Hiroshi KURATA and Masakatsu ICHINOE: *Japan. J. Exp. Med.*, 47, 177 (1977)

Fifty isolates of *Fusarium* species from river sediments were examined on their producibility of mycotoxins such as trichothecenes and zearalenone. The most frequent fungal isolates was *Fusarium oxysporum*, followed by *F. solani* and *F. lateritium*. When cultured on Czapek-Dox medium supplemented with peptone, more than half of these strains were suspected to produce trichothecene mycotoxins through toxicity to mice and reticulocyte assay method.

One of the toxic isolates, *F. lateritium* 5036, was proved to produce the following five kinds of trichothecenes; diacetoxyscirpenol, 7 $\alpha$ -hydroxydiacetoxyscirpenol, 7,8 $\alpha$ -dihydroxydiacetoxyscirpenol, 8 $\alpha$ -hydroxydiacetoxyscirpenol (neosolanol) and diacetylivalenol. Three strains produced zearalenone on rice grain culture.

\* Tokyo University of Sciences

\*\* Institute of Medical Science, University of Tokyo

\*\*\* Institute of Environmental Science, Kobe

## 48 数種糸状菌のカイコに対する毒性

村越重雄\*, 磯貝 彰\*\*, 鈴木昭憲\*\*, 一戸正勝: 農化, 51, 409 (1977)

各種の農作物より分離した糸状菌29種65株の培養液および菌体をカイコ人工飼料に添加して, 3令蚕に6日間摂取させて, その間の成育度合により毒性検定を行った。供試株のうち経口毒性の認められたものが14種24株あった。毒性株のうち共通した中毒症状を示した *Arthrinium* sp. *Penicillium cyclopium*, *P. puberulum* をそれぞれ大量培養して分画したところ, 活性物質として  $\beta$ -ニトロプロピオン酸が単離された。

\* 神奈川県蚕業センター

\*\* 東京大学農芸化学科

49 Productivity of Aflatoxines and Some Biological Effects in *Aspergillus flavus* Link Isolated from Cadaver of the Silkworm, *Bombyx mori* L.

Shigeo MURAKOSHI\*, Masakatsu ICHINOE, Hiroko KUMATA and Hiroshi KURATA: *Appl. Ent. Zool.* 12, 255 (1977)

Fifteen strains of *Aspergillus flavus* isolated from naturally infected cadaver and feces of the silkworm (*Bombyx mori* L.) showed strong pathogenicity and oral toxicity of their culture broths to the larvae, and high tolerance to formaldehyde. All strains produced aflatoxin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> on a liquid medium. Also, some strains produced high yields of B<sub>1</sub> and G<sub>1</sub> on rice, and one isolate (SP-4) among them formed the highest level of B<sub>1</sub> (624  $\mu$ g/g) and G<sub>1</sub> (560  $\mu$ g/g). Aflatoxins were detected in living worms artificially infected with SP-4 isolate of *A. flavus*.

\* Kanagawa-ken Sericultural Research Center

50 Bassianolide, a New Insecticidal Cyclodepsipeptide from *Beauveria bassiana* and *Verticillium lecanii*.

Akinori SUZUKI\*, Masaharu KANAOKA\*, Akira ISOGAI\*, Shigeo MURAKOSHI\*\*, Masakatsu ICHINOE and Saburo TAMURA\*: *Tetrahedron Let.* 25, 2167 (1977)

A new insecticidal cyclodepsipeptide, bassianolide, was isolated from the mycelia of two entomophagous fungi and its structure was determined. In addition to bassianolide, beauvericin, which was

known toxic compound, was also isolated from the *Beauveria bassiana*.

\* The University of Tokyo

\*\* Kanagawa-ken Sericultural Research Center.

51 Bassianolide, a New Insecticidal Cyclodepsipeptide from *Beauveria bassiana* and *Verticillium lecanii*.

Masaharu KANAOKA\*, Akira ISOGAI\*, Shigeo MURAKOSHI\*\*, Masakatsu ICHINOE, Akinori SUZUKI\* and Saburo TAMURA\*: *Agric. Biol. Chem.*, 42, 629 (1978)

A new insecticidal cyclodepsipeptide, bassianolide, was isolated from the mycelia of two entomophagous fungi and its structure was elucidated. Silkworm larvae exhibited an atonic symptom and were killed by administration of bassianolide.

\* The University of Tokyo

\*\* Kanagawa-ken Sericultural Research Center

## 52 細菌酵素および肝ミクロゾームとサイトゾルによる AF-2, パラニトロ安息香酸ならびにニューコクシン還元と比較

南原精一, 出羽 力: 薬誌, 98, 17 (1978)

細菌酵素による AF-2 およびパラニトロ安息香酸の還元は, NADPH と NADH に同程度の依存性をもつが, FMN 添加による促進作用は, NADPH に依存性をもつパラニトロ安息香酸還元の場合にのみ認められた。一方ニューコキシンの還元は NADH>NADPH で, この場合も FMN による促進作用は NADPH を電子供与体としたときのみ見られた。

今回得られた結果から, ミクロゾームと細菌酵素における AF-2 のニトロ基の還元は, パラニトロ安息香酸とやや異っているのに対し, サイトゾルにおける AF-2 とパラニトロ安息香酸の還元は, 類似した機構で反応が進行し主としてキサンチンオキシダーゼにより還元されることが考えられた。

## 53 Excretion and distribution of morpholine salts in rats

Akira TANAKA, Toshie TOKIEDA, Seiichi NAMBARU, Mutsuo OSAWA and Tsutomu YAMAHA: *J. Food Hyg. Soc. Japan*: 19, 329 (1978)

Elimination, distribution and metabolism of morpholine salts were investigated in the rat by

chemical analysis and/or radioassay. Gas-liquid chromatography was devised for chemical analysis of morpholine in the rat urine and faeces and the analytical results of the excreta accorded with these by the tracer technique.

When rats were given morpholine-HCl or -palmitate, it was found that about 90% of the does was excreted in the urine and the remaining in the faeces over a period of 3 days. The faecal excretion of morpholine palmitate appeared to be a little more than that of morpholine-HCl after an oral dose of each labelled compound.

Morpholine was largely excreted unchanged in the urine. The elimination of morpholine from organs, tissues and blood was generally rapid and specific organ-affinity was not observed in other organs except the intestine. The lowest affinity was found for adipose regardless of routes of administration.

#### 54 合成洗剤のヒト赤血球の溶血性および解糖系に及ぼす影響

新村寿夫, 高村二三知, 時枝利江, 山羽 力 :  
食衛誌, 18, 529 (1977)

合成洗剤の安全性研究として, 各種洗剤によるヒト赤血球の溶血性および赤血球の解糖に及ぼす影響を *in vitro* で検討した. 高希釈血液の50%溶血は7~73 ppm の洗剤で生じたが, 血液の2倍希釈に当たる低希釈血液の50%溶血には, 約100倍高濃度の洗剤を必要とした. この溶血性の強さは洗剤の表面張力低下作用とはほぼ平行関係にあった. またあらかじめ赤血球を洗剤で処理しても, 解糖に影響は見られなかったが, 溶血した赤血球の解糖は陰イオン性洗剤により50~70%阻害され, 非イオン性洗剤により30~100%促進された. この阻害は解糖系酵素と陰イオン性洗剤が複合体を形成したため, また促進は非イオン性洗剤によるアルドラーゼ活性の促進が寄与していると思われた.

#### 55 Chemical Stability, Alkylating, Activity, and Lipophilicity of 1,1'-Ethylene-bis (1-nitrosourea) and Related Compounds

Kazushige MORIMOTO, Tsutomu YAMAHA, Masahiro NAKADATE and Ikuo SUZUKI :  
*Gann*, 69, 139 (1978)

1,1'-Ethylene-bis(1-nitrosourea) (EBNU) possesses antitumor activity against leukemia L-1210.

Chemical stability, alkylating activity, and lipophilicity of EBNU and related compounds were compared. EBNU was the most unstable among several bis-N-nitrosoureas and mono-N-nitrosoureas tested. The alkylating activity of EBNU was the same as that of 1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea (CCNU), but higher than those of other bis- and mono-N-nitrosoureas except 1-methyl-1-nitrosourea. Lipophilicity of EBNU was extremely low compared with 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea (BCNU) and CCNU.

#### 56 Biochemical Studies on Phthalic Esters. III. Metabolism of Dibutyl Phthalate (DBP) in Animals

Akira TANAKA, Akiyo MATSUMOTO and Tsutomu YAMAHA : *Toxicology*, 9, 109 (1978)

The excretion, distribution and metabolism of DBP were studied in rats. More than 90% of the dose was excreted in the urine within 48 h following intravenous or oral administration, but the faecal excretion was low. Biliary excretion was remarkably higher than that in the faeces when DBP was given orally.

No significant retention was observed in organs and tissues at 24 h after dosing.

*In vitro* experiments showed that DBP was hydrolysed very rapidly to MBP by the esterase of rat liver microsome. DBP was found to be a strong inhibitor for the succinate dehydrogenase of rat liver.

DBP and its metabolites, MBP and phthalic acid, did produce any striking effect upon hepatic and serum enzyme activities *in vitro*.

Urinary metabolites of orally ingested DBP were investigated in 3 species, namely, rats, hamsters and guinea pigs. MBP was a common major metabolite in all 3 species. A further increment was apparently excreted as the glucuronide in the rat, hamster and guinea pig together with a small amount of phthalic acid and unchanged DBP.  $\omega$ - or  $\omega$ -1 oxidation products of MBP were also detected in the urine.

57 **One-Electron and Two-Electron Reductions of Acceptors by Xanthine Oxidase and Xanthine Dehydrogenase**

Masao NAKAMURA\*, Hideo KUREBAYASHI and Isao YAMAZAKI\*: *J. Biochem.*, 83, 9 (1978)

The percentage of one-electron reduction of *p*-benzoquinone and oxygen was measured in various reactions of xanthine-oxidizing enzymes using cytochrome *c* as a scavenger. The mechanism of *p*-benzoquinone reduction was different in milk xanthine oxidase (pancreatintreated) and chicken liver xanthine dehydrogenase when xanthine was used as an electron donor. Similar differences in the reduction mechanism were observed in the type O and type D forms of the reversibly convertible enzyme prepared by the method of Battelli *et al.* ((1973) *Biochem. J.* 131, 191-198). The mechanism changed when xanthine was replaced by NADH. When NADH was used as the electron donor, no significant difference was observed in the mechanism of *p*-benzoquinone reduction among the four enzymes.

Sulfhydryl groups were found to play a crucial role in the xanthine-NAD<sup>+</sup> reductase activity of the type D enzyme and xanthine dehydrogenase. The reductase activity disappeared upon treatment with pCMB. The reductase activity was sensitive to DTNB in the type D enzyme but not in the xanthine dehydrogenase. The oxidase activity of the type D enzyme was restored by autoxidation of the sulfhydryl groups but not by reaction of the enzyme with DTNB or pCMB. It was concluded that the formation of S-S bond(s) was essential for the oxidase activity and also for the oxidase-type mechanism of *p*-benzoquinone reduction in the xanthine-*p*-benzoquinone reactions.

\* Research Institute of Applied Electricity, Hokkaido University

58 **Blasticidin S の長期運用と Alkaline Phosphatase**

鈴木幸子: 東邦医会誌, 24, 877 (1977)

イネのイモチ病の殺菌用抗生物質ブラストサイジン S (BS) のラットによる急性および長期毒性実験を行い、毒性の指標になるものを捜し特異的な反応として

血清アルカリ性フォスファターゼ活性の低下が最も鋭敏な指標となりうることを見出した。

59 **凍結粉碎法を前処理とした生体試料からのメチル水銀の測定に関する知見**

鈴木幸子, 川崎 靖, 松本清司, 萩野恵子, 戸部満寿夫: 衛生化学, 24, 60 (1978)

凍結粉碎法は毛あるいは硬組織の様な生体試料からの有機化合物を測定するための前処理として次の様な利点を見出した。

- (a) 短時間に粉碎し抽出する事ができる。
- (b) 熱に不安定な化合物の分析に利用できる。
- (c) 5~60 μm の微粉末になる。

この装置を用いて、塩化メチル水銀を投与したサルの中のメチル水銀の測定を行った。凍結粉碎した試料を一昼夜浸折後測定した値と、粉碎後すぐに測定した値との間には差を認めなかった。しかし、細切した試料の場合には細切後すぐに測定した値は一昼夜浸折した後に測定した値の 1/2~1/4 の値であった。

60 **Virilizing Effect of Methyltestosterone on Female Descendants in the Rat**

Kunio KAWASHIMA, Shinsuke NAKAURA, Shigeyuki NAGAO, Satoru TANAKA, Tsukasa KUWAMURA and Yoshihito OMORI: *Endocrinol. Japan*, 25, 1 (1978)

Pregnant rats were given daily a subcutaneous injection of methyltestosterone for 4 days from the 17th to the 20th day of gestation, and were allowed to be delivered to their offsprings (F<sub>1</sub>) which were used for the examination of later reproductive functioning. When observed for 21 weeks after birth, the growth rate of F<sub>1</sub> from methyltestosterone-treated groups was higher than that of F<sub>1</sub> from the control group. The anogenital distance in 50-μg-treated F<sub>1</sub> females started to become significantly longer on the 14th day and in 5-μg-treated F<sub>1</sub> females on the 23th day after birth than that in F<sub>1</sub> from the control. The day on which vaginal opening took place in 50% of females was 34.4 days of age in both the control and the 5 μg groups, but it delayed until 40.7 days in the 50 μg group. Furthermore, persistent estrus was observed after about 90 days of age in the 50 μg group. This persistent estrus disappeared by placing these females with males,

resulting no pregnancy. In the 5  $\mu$ g group females could be pregnant, but their female fetuses ( $F_2$ ), when examined on the 21st day of gestation, had significantly shortened the length of the urovaginal septum. The observations show that virilization can be induced in the third generation.

61 **Studies on the Teratogenicity of Furylfuramide in Fetuses and Offspring of Rats in Relation to Fetal Distribution**

Satoru TANAKA, Kin-ichi ONODA, Kunio KAWASHIMA, Shinsuke NAKAURA, Shigeyuki NAGAO, Tsukasa KUWAMURA and Yoshihito OMORI: *J. Toxic. Sci.*, 2, 149 (1977)

Pregnant Wistar rats received a single oral dose of 70  $\mu$ Ci/20 mg/3 ml/kg of  $^{14}$ C-labelled furylfuramide on the 20th day of gestation, and the radioactivity in maternal and fetal tissues was measured. High radioactivity was observed in the maternal liver and kidney at 3 hours after the administration, and the radioactivity of the maternal serum was lower than that of these two organs, but higher than that in other organs including placenta. The fetal body level of the radioactivity was about one-seventh of the maternal serum and about 0.4% of the dosed radioactivity was distributed in the fetuses.

Dietary furylfuramide at the levels of 0.02, 0.06, 0.2 and 0.6% was given to pregnant Wistar rats *ad libitum* during pregnancy, and its teratogenic effects were examined in the fetuses and offspring. With the highest dose level a marked suppression in the maternal weight gain and food and water consumptions, and a considerable retardation in the embryonic developments were observed. A dose-dependent increase in the maternal liver weights was also noticed in the furylfuramide treated groups compared with the control. However, no evidences of increase in fetal death as well as malformation to be attributable to the treatment of furylfuramide were obtained, and the postnatal developments of the newborns were well maintained without any disorders in morphological and functional examinations.

62 **Studies on the Fate of Poisonous Metals in Experimental Animal (VII) Distribution and Transplacental Passage of Manganese in Pregnant Rat and Fetus**

Kin-ichi ONODA, Akira HASEGAWA, Momoko SUNOUCHI, Satoru TANAKA, Akira TANAKA, Yoshihito OMORI and Goro URAKUBO: *J. Food Hyg. Soc.*, 19, 208 (1978)

Solution of  $^{54}$ MnCl<sub>2</sub> (0.5 mg manganese chloride/kg, low dose; 10 mg manganese chloride/kg, high dose) were intravenously injected to groups of pregnant rats on the 10th, 13th, 17th and 19th days of gestation, and the manganese distribution in maternal and fetal tissues were examined 3 hours after each injection and on the 20th day of gestation.

Three hours after the injection, placental distribution of the metal was predominantly higher in the 19th and the 17th days treated groups than in the 13th and the 10th days groups. However, the difference related to the stage of gestation was not evident concerning the manganese distribution in other maternal organs. The stage-linked difference of manganese distribution was also not recognized in fetal whole body.

The distribution pattern of the metal in the whole body of pregnant rats at the 20th day of gestation showed rather rapid decrease in the high dose group than in the low dose group. In maternal brain, bone and ovary of both dose groups, accumulation and/or slow elimination of manganese was observed. In all of the fetal organs of both dose groups, the earlier the stage of administration, the lower the distribution of manganese was observed, and, as compared with the maternal organs, remarkably higher concentrations of the metal were detected in fetal brain, heart, lung, liver and bone in the groups treated after the 13th day of gestation.

63 **化学物質の催奇形性**

大森義仁: 医学のあゆみ, 103, 927 (1977)

医薬品, 食品添加物その他の化学物質による奇形発生に関する総説. その発現機構の問題点として突然変異, 染色体異常, 核酸合成やその障害, 諸酵素障害や細胞分裂障害をとり上げ, さらに化学物質の胎児移行

と胎盤との関連, 世界各国における試験研究の現状を紹介した. 文献45篇

#### 64 催眠薬の化学構造と活性相関

藤森観之助: 薬局, 29, 23 (1978)

現在知られている催眠作用を有す化合物を化学構造上から分類し, 化学構造と薬理活性, 化学構造と物性について例を挙げて解説した.

#### 65 Induction of Tumors of Peripheral Nervous System in Female Donryu Rats by Continuous Oral Administration of 1-Methyl-1-nitrosourea

Toshiaki OGIU, Masahiro NAKADATE, Kyoko FURUTA and Shigeyoshi ODASHIMA: *Gann*, 68, 491 (1977)

Groups 1, 2, and 3 of female Donryu rats were given continuously 400, 200, or 100 ppm solution of 1-methyl-1-nitrosourea (MNU) as their drinking water. The incidence of neurogenic tumors was 12/27 (44%), 30/33 (91%), and 33/36 (92%) in Groups 1, 2, and 3, respectively. Among the neurogenic tumors, neurinomas developing from the spinal nerve roots were the most frequent. In addition, tumors of the digestive tract were found in 12, 1, and 2 rats in Groups 1, 2, and 3, respectively, and tumors in hematopoietic tissues developed in 6 rats. Tumors in other organs were infrequent.

#### 66 Induction of Tumours by Administration of N-Dibutylnitrosamine and Derivatives to Infant Mice

Keiji FUJII\* and Shigeyoshi ODAJIMA: *Br. J. Cancer*, 35, 610 (1977)

Pulse doses of N-dibutylnitrosamine (DBN), N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (BBN) and N-butyl-N-(3-carboxypropyl)nitrosamine (BCPN) suspended in 1% gelatine, were administered s.c. to infant CDF<sub>1</sub> mice, and the experiment terminated at one year of age. Tumours were induced in lungs and liver. The incidences of lung adenomas were 73-95% in all treated mice, with no sex differences. Hepatocellular adenomas and a carcinoma were found with an incidence of 81% (21/26) in DBN, 59% (13/22) in BBN, and 32%

(9/28) in BCPN-treated males and the incidence was 23% (5/22) in DBN-treated females. Only one papilloma of the fore-stomach was induced in mice treated with DBN. These results indicated that the s.c. administration of DBN, BBN, and BCPN induced tumours of the lung and liver, but no tumours of the urinary bladder, under these experimental conditions. The carcinogenic effect on mice at the treated dose level was DBN>BBN>BCPN.

\* Institute of Basic Medical Science, University of Tsukuba, Ibaraki.

#### 67 化学物質と発癌

小田嶋成和: 新内科学大系, 60 A, 20(1977)

新内科学大系の分担執筆として, 化学物質と発癌の関係について述べた. 始めに, 化学物質の癌原性の検索法およびスクリーニング法について記し, 次に, 化学物質による発癌の機構について考察した. 次に, 主に発癌実験に使われている化学物質を(A)芳香族炭化水素, (B)芳香族アミンおよび関連ニトロ化合物, (C)芳香族アゾ化合物およびその複素環式類縁体, (D)複素環式化合物, (E)脂肪族化合物, (F)N-ニトロ化合物, (G)無機物, (H)その他, に大別し, その化学的性状, 標的臓器などを記載した. 最後に, 職業癌を例として人類の癌の原因と考えられている化学物質を列記した.

#### 68 ニトロソ化合物と発癌

小田嶋成和: 臨床科学, 13, 1119 (1977)

ニトロソ化合物と発癌の関連性について概説したもので, N-ニトロソ化合物はその前駆体である(亜)硝酸と各種アミン類が広く生活環境中に存在しており, 多くの種族の動物に対し癌原性を有し, 経胎盤発癌効果が強く, ほとんど全臓器の腫瘍を実験動物に造りうること等々により重視されている. 最初にN-ニトロソ化合物の毒性, 催奇形性, 変異原性について簡単にふれ, 次に, 肝, 腎, 膀胱, 鼻腔, 呼吸器, 食道, 胃, 腸, 神経系, 造血臓器, その他の各臓器毎に腫瘍を発生させるのに用いられるニトロソ化合物を記載した. 次に, ニトロソ化合物の経胎盤発癌効果について述べ, 最後に, 生体内におけるN-ニトロソ化合物の生成に言及した.

### 69 フェノチアジン系向精神薬に関する研究 (第 1 報) 水溶液中の導電率

岡田敏史, 中垣正幸\*: 薬学雑誌, 97, 495(1977)

水溶液中におけるフェノチアジン塩酸塩の電解質としての挙動を明らかにするため, 5, 15, 25 および 35°C における導電率の測定をおこなった. 10 mM 以下での当量導電率と平方根濃度の関係は Fuoss-Onsager の極限式に従う. それ故, このような低濃度領域においてはすべての塩酸フェノチアジン (PTZ·HCl) は 1:1 型の強電解質として完全解離する.

一方, 100 mM までの導電率測定の結果によるとクロロプロマジン・スルフォキサイドを除くすべての PTZ·HCl で  $\kappa-c$  あるいは  $A-\sqrt{c}$  プロット上に明瞭な屈折点が観察された. この点は界面活性剤におけるミセル形成臨界濃度(cmc)に相当するものと考えられた. cmc と会合体の対イオン解離度からミセル形成の熱力学的パラメーターが計算された.

その結果, 会合体形成にあたり PTZH<sup>+</sup> イオンの周囲に形成される iceberg の崩壊に伴うエントロピー効果が重要な役割を果たしていることがわかった. 同時に, エンタルピー効果もかなりの寄与をしており, 特にクロロプロマジンおよびトリフルプロマジンでその効果の著しいことが明らかとなった.

\* 京都大学薬学部

### 70 塩酸クロロプロマジン水溶液の活量測定

岡田敏史, 中垣正幸\*: 薬学雑誌, 98, 82(1978)

塩酸クロロプロマジン (CPZ·HCl) 水溶液中の CPZH<sup>+</sup> イオン活量 ( $a_{CPZH^+}$ ) および Cl<sup>-</sup> イオン活量 ( $a_{Cl^-}$ ) を陽イオン交換膜を用いた濃淡電池およびと Cl<sup>-</sup> と可逆的に反応する銀—塩化銀電極を用いた別の濃淡電池の起電力測定より求めた.

陽イオン交換膜中の CPZH<sup>+</sup> 輸率は 1 ではなく, 濃淡電池の起電力の濃度依存性より求めた輸率は  $t_+ = 0.82$  であった.

イオンの活量, 活量係数およびそれらの平均イオン量を求めた. 臨界ミセル濃度 (cmc) 以下ではカチオン, アニオンの活量とも濃度とともに増加し, Debye-Hückel 理論から期待される理論線にほぼ従う. 一方, cmc 以上では  $a_{CPZH^+}$  は漸次減少するのに対し,  $a_{Cl^-}$  は cmc のすぐ上の濃度領域で急に増加しその後はゆるやかな増加となる. また, 平均イオン活量  $a_{\pm}$  は cmc 以上で必ずしも一定とならずゆるやかに増加する.

CPZ·HCl 水溶液の表面張力が cmc 以上でなお減少することが  $a_+$  のゆるやかな増加傾向によって説明

された. また, 会合体形成の機構としては質量作用則に従うものと推定された.

\* 京都大学薬学部

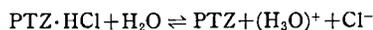
### 71 塩酸フェノチアジン水溶液の塩素イオン活量の測定

岡田敏史, 中垣正幸\*: 薬学雑誌, 98, 744 (1978)

6 種の塩酸フェノチアジン (PTZ·HCl) 水溶液の塩素イオン活量 ( $a_{Cl^-}$ ) を銀—塩化銀電極の起電力測定より求めた. 各 PTZ·HCl に特有なある濃度以上では PTZ·HCl の電極表面への吸着が起こり, その時測定される起電力はバルク溶液中の  $a_{Cl^-}$  を反映する真の起電力を与えない. したがって, 真の起電力を求めるためには吸着にもとづく効果を適当な方法で消去する必要がある.

臨界ミセル濃度 (cmc) は  $\log a_{Cl^-}$  vs. PTZ·HCl 濃度曲線上の弯曲点より決定された. 各 PTZ·HCl 水溶液について, この弯曲点は, pH vs. PTZ·HCl 濃度曲線の折点に相当する.

この結果 PTZ·HCl の会合体形成においては弱塩基—強酸型塩の加水分解反応



が同時に進行するものと推定された. この加水分解反応を考慮すれば, cmc のすぐ上の濃度領域における  $a_{Cl^-}$  の異常性が熱力学的に説明されることを示した.

\* 京都大学薬学部

### 72 医薬品製剤の含量均一性試験法の確立に関する研究

持田研秀, 伊阪 博, 柴田 正, 中原 裕: 昭和52年度厚生科学研究報告

1) マレイン酸エルゴメトリン錠: JP IX の定量法に準ずる方法により良好な結果を得た.

2) マレイン酸メチルエルゴメトリン錠: JP IX の定量法はカラムによる溶離操作で約 2~3% の損失が認められることから, NF XIV(1975) の定量法に準ずる炭酸水素ナトリウム溶液でクロロホルム抽出する定量法を提案した. 改良点は試料採取量を 300  $\mu$ g とし, 標準溶液ならびに試料溶液を同様に 4 回抽出操作して調製すること, また *o*-ジメチルアミノベンズアルデヒド・塩化第二鉄試液の Fe<sup>3+</sup> 量を 4 倍量とし, 545 nm で測定することなどである.

含量均一性試験は塩化ナトリウム, アンモニア試液アルカリ性でクロロホルムの 1 回抽出で, 遠心分離により透明な標準溶液ならびに試料溶液を調製し, 以下

同様に操作し定量する簡便かつ経済性の高い方法を採用した。

3) 一般試験法の判定基準については、表示量の中心値を採り、USP XIX に準ずる方法ならびに規格を提案した。

73 漢方製剤の薬剤学的品質評価に関する研究(第1報) 黄連のアルカロイドと甘草および大黄の成分との漢方湯液中での沈殿反応について

野口 衛, 久保道徳\*ほか: 生薬, 32, 104 (1978)

黄連と大黄あるいは甘草を配合した漢方処方より煎剤を調製すると、沈殿を形成し、湯液は、ベルベリン型アルカロイドに由来する苦味と抗菌性が消失し、マイヤー試薬による沈殿反応は陰性となった。また、甘草中のグリチルリチンと大黄中のタンニン様物質が沈殿反応に関与することが、塩化ベルベリン沈殿反応を指標とする分画により明らかとなった。

19種の市販大黄について本反応を行うと、市場で良品とされるものほど沈殿量が多くなることから、本反応は大黄の簡易品質鑑別法に用いられ得る。

\* 近畿大学薬学部

74 漢方製剤の薬剤学的品質評価に関する研究(第4報) 麻黄中のアルカロイドの漢方湯液調製時の挙動について

野口 衛, 久保道徳\*, 仲 容理子\*: 薬誌, 98, 923 (1978)

麻黄配合漢方製剤の品質基準を定めるため、原料麻黄中のアルカロイドの煎剤調製時の挙動と煎剤中への移行率を検討した。

まず、麻黄を煎剤を調製する条件で熱水抽出し、JP法に準じてアルカロイドを定量したところ、ether(JP法)、MeOH抽出法とほぼ等しい値を得た。しかし、甘草、桂皮、杏仁を配合すると、アルカロイドは麻黄単味の場合の60~80%しか煎剤中に移行せず、ephedrine-HCl水溶液をこれらの生薬に添加しても、ほぼ同程度の回収率の低下が認められた。しかし、煎剤残渣麻黄中には、アルカロイドは殆んど含まれていなかった。Ephedrine, methyl ephedrineはpH12以上で水蒸気蒸留するが、この煎剤のpHは5.5附近であり、煎剤加工過程での揮散は考えられない。以上の結果から、麻黄湯中へのアルカロイドの移行率の低下の原因は、一たん熱水抽出されたアルカロイドの生薬への再吸着に起因すると推定される。

\* 近畿大学薬学部

75 漢方製剤の品質評価をめぐって

野口 衛: 漢方研究, 1978 122

漢方製剤の品質は、原料生薬の品質、製剤技術、保存流通過程における問題等多くの要因により規定されるが、製剤の品質規格を決定する立場からは、生薬中の有効成分の製剤加工時の挙動と最終製品中への移行率が問題となる。

この移行率は、それぞれの生薬の成分の物理化学的な性質に対応して、熱水への溶出と析出、再吸着、揮散と水蒸気蒸留、分解、成分相互の化学反応などの物理化学的な過程によって規定される。そこで、これらの現象について、最近の研究データを引用して考察した。

76 食品中の亜硫酸とその分析法

伊藤啓志男, 豊田正武, 鈴木英世, 慶田雅洋: 食品衛生研究, 27, 808 (1977)

I. 現在使用されている亜硫酸の定量法の解説

1. 酸化法(改良 Monnier-Williams 法)
2. よう素法
3. 微量拡散法
4. 蒸留比色法
5. 直接比色法
6. 各種定量法の比較検討

II. 遊離型及び結合型亜硫酸の分別定量法(ランキン法)の導入

III. 亜硫酸の長期摂取の生理学的影響

77 しいたけの二硫化炭素、加熱調理による生成

豊田正武: 化学と生物, 15, 707 (1977)

干しいたけの水摩砕液を蒸留し、留液を冷アセトン中に捕集して、20% TCEP カラムを用いた FPD-GLC にて定量する方法により、CS<sub>2</sub> 量を測定したところ、輸入干しいたけから 1.64~72.5 ppm の CS<sub>2</sub> を検出した。しかしこの CS<sub>2</sub> は燻蒸剤としての残留 CS<sub>2</sub> ではなく、しいたけ成分に由来する内因性のものと考えられた。すなわち、CS<sub>2</sub> の形成は、干しいたけの水浸漬による戻し操作中におこり、加熱調理中に減少することが認められ、CS<sub>2</sub> はしいたけの香気成分であるレンチオニンの分解により生成されるものと推定された。

78 食品中の亜硫酸の数種定量法の比較検討

鈴木英世, 豊田正武, 伊藤啓志男, 慶田雅洋, 野々木裕子\*, 福家田鶴\*, 長島千恵子\*, 足立忠夫\*, 藤田紘一\*\*, 生沢真起子\*\*, 河崎孝

子\*\*, 泉 哲男\*\* : 食衛誌, 18, 290 (1977)

食品中の亜硫酸の定量法としては種々の方法が報告されているが、亜硫酸は不安定な化合物であり、定量操作中に分解すること等から各定量法での値は一致せず、食品中の真の値は得難い。そこで亜硫酸の定量法として広く使用されている酸化法、ヨウ素法、蒸留比色法、微量拡散法および直接比色法について、数種の食品に適用し、比較検討した。その結果、いずれの食品にも適用できる万能的な方法を見いだすことはできなかったが、50 ppm 以上の亜硫酸を含む食品の場合には酸化法を使用するのが適当であり推奨することができる。検体の種類（固形食品の場合）によって、酸化法の適用が困難な場合には、蒸留法またはヨウ素法を用いてもよいが、ある程度測定値が低めにすることに留意する必要がある。50 ppm 未満の微量の亜硫酸を含む食品の場合には、例えば冷凍むきえびのようにはほとんど遊離型亜硫酸の場合には直接比色法が優れた方法として推奨できる。微量の結合型および遊離型亜硫酸の測定法については目下のところ推奨できる方法はない。微量拡散法は信頼できる測定値を得ることはできないので、食品中の亜硫酸の分析に使用することは好ましくないことなどが明らかとなった。

\* 日本食品分析センター大阪支所

\*\* サントリー(株)中央研究所

#### 79 Enzymatic Determination of Lactic Acid and/or Lactate in Milk and Milk Powder

Masahiro IWAIDA and Yoshio KANEDA : *J. Hyg. Chem.*, 23, 216 (1977)

For lactate determination in milk and milk powder, application of enzymic method using lactic dehydrogenase (LDH) was studied.

After clarification of milk (or reconstituted milk) with zinc sulphate and potassium ferrocyanide, the test solution thus obtained was mixed with pH 9.5 buffer composed of 1.0 M glycine and 0.4 M hydrazine. NAD, and L- and D-LDH were added, mixed, and incubated for 30 min at 37°. The lactic acid/lactate content was estimated from NADH formed which was determined by spectrometry at 340 nm.

Although the results from contemporary international standard method (colourimetry) and the present method were not significantly different, the enzymic method was found to be better than the former in reproducibility.

Comparative results on 16 kinds of commercial milk and milk powder are shown for reference.

#### 80 かんきつ精油に含まれるジフェニル、*o*-フェニルフェノールおよびチアベンダゾールの系統的分析

伊藤晋志男, 豊田正武, 鈴木英世, 慶田雅洋 : 食衛誌, 18, 450 (1977)

天然着香料であるかんきつ油中に含まれる DP, OPP および TB の分別定量法を確立する目的で研究を行った。方法の検討に当たっては、かんきつ中の 3 種保存料の系統的分析法（既報）を基礎とした。

かんきつ油は濃縮不能であり、アルミナカラムにそのままのせるならば、試料採取量は大きい方がよいが、過量となると夾雑物とともに DP も溶出するので 0.5 ml とした。

溶離液の種類は前報どおり、*n*-ヘキサン、酢酸エチルおよびアンモニア水・メタノール混液とし、使用量は各 30 ml と定め、溶出液は 30 ml ずつの 3 区分を集めた。

アルミナカラムクリンアップに当たっては、DP, OPP および TB の回収を確実にするためにトレーサー色素の使用について検討し、DP 用として  $\beta$ -カロチンを、OPP および TB 用としてスダングを選んだ。GC 用カラム完てん剤は FID-GC では 3% SE-30/クロモソルブ W (60~80) または 5% DEGS+1% リン酸/クロモソルブ W (60~80) を、FPD-GC では 0.1% OV-17/ネオソルブ NG (40~80) を使用した。レモンオイルに対する DP 100, OPP 5, TB 20 ppm の添加の際の回収率はそれぞれ 98.2, 98.0 および 98.5% であった。各保存料の検出限界は約 5 ppm であった。

最終的に確定した方法によって輸入かんきつ油 34 件の試験を行った結果、レモン油 2 件から多量の DP を、オレンジ油の 1 件から比較的多量の OPP を検出した。TB は全く検出しなかった。

#### 81 Determination of Nitrate and Nitrite in Whey Cheese

Yoshio KANEDA\* and Masahiro IWAIDA : *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 18, 470 (1977)

Three lots of Mysost-type whey cheese were subjected to the determination of nitrate and nitrite. Nitrite content was measured by use of the well-known diazotization-coupling reaction, while cadmium column reduction method by use

of metallic cadmium was applied for the determination of nitrate. The results revealed that nitrite contents were within the range of 1.8~2.7 mg NO<sub>2</sub>/kg cheese, while nitrate contents were 48.6, 100.0 and 390.0 mg/kg cheese, respectively. No difficulty was encountered during the application of cadmium column reduction method formerly settled for the analysis of natural and processed cheese on Mysost-type whey cheese.

\* The Public Health Institute of Hyogo Prefecture

### 82 Nitrate Determination in Cheese by Use of Ion Selective Electrode

Yoshio KANEDA\*, Takako KANAMORI and Masahiro IWAIDA: *J. Hyg. Chem.*, 23, 301 (1977)

The application of nitrate ion-selective electrode was examined to establish a simple and rapid method for the routine determination of nitrate in cheese. Removal of fat and protein from the cheese suspension was carried out by heating and cooling method, followed by the aluminum resin treatment. Of the anions present in cheese, only chloride was found to affect the potential of nitrate solutions. Such interference was controlled by the use of silver resin, the treatment being carried out simultaneously with aluminum resin treatment. Potential measurements were carried out on thus prepared test solutions. Addition of known amount was used on all samples for the elimination of residual background responses. The established method was successfully applied for the nitrate determination in Samsoc, Cheddar, whey and processed cheese, the detection limit being 5 mg of NO<sub>2</sub>/kg cheese. The method has the advantage of simplicity, rapidity and accuracy.

\* The Public Health Institute of Hyogo Prefecture

### 83 ホエーチーズの化学組成の試験法について

慶田雅洋, 金田吉男\*: *栄養と食糧*, 31, 91 (1978)

ホエーチーズの成分の試験法について検討した。

1. 固形分は国際標準法では混砂法により 88±2°C で測定することになっているが, この方法ではホエーチーズの固形分 (恒量) を求めることは不可能であっ

た。また, 本品は乳糖を多量に含むので, チーズ全般の固形分の測定温度 (105°C) では内容物が焦げてしまうので 102°C で行るのが適当であった。ホエーチーズの固形分は 74~77% であって, 一般のチーズにくらべて著しく高いことが知られた。

2. 脂肪含量の測定に当たっては, S. B. R. 法 (塩酸加熱分解法) の適用は不適当であった。レーゼゴットリーブ法 (アンモニア変性法) を用いると良好な結果が得られた。供試ホエーチーズ中の脂肪含量は固形物中 2.8~4.1% であって, すべて脱脂ホエーチーズ (脂肪分 10% 未満) に属することが知られた。

3. 塩化物含量は改良 Volhard 法によって測定した。含量は全量中塩素として 0.6~0.7%, 塩化ナトリウムに換算すると 0.9~1.2% に相当し, 製品に適当な塩から味を与えるのに役立っている。なお, ホエーチーズの製造に加塩の工程はないので, 塩素は原料乳に由来するものと考えられる。

\* 兵庫県衛生研究所

### 84 燻製鶏肉の理化学的性状について

大野木利成\*, 豊田正武: *食品工誌*, 21, 158 (1978)

白色レグホーン種成鶏 (10カ月令), ロードアイランドレッド種成鶏 (10カ月令) および廃鶏 (22カ月令) の燻製鶏肉についてその理化学的性状を比較した。pH, 水分, 可溶性窒素, TBA 値および遊離アミノ酸組成は供試鶏間で大きな差はなかったが, ロードアイランドレッド種のプロテオース・ペプトン態窒素およびロードアイランドレッド廃鶏の揮発性塩基態窒素はやや少なかった。テクスチャーの面からは廃鶏もも肉で硬い傾向が示された。

\* 山形県立農業経営大学校

### 85 Studies on the Interaction between Pro-teolipid and Bacterial Pyrogen

Yoshiyuki OGAWA and Seizaburo KANOH: *Japan. J. Med. Sci. Biol.*, 31, 186 (1978)

In the previous report (Kanoh and Ogawa, 1977), we compared pyrogenicity of LPS in the rabbit, rat and chicken by intravenous injection. By intracasternal injection, the responses of the three species were nearly equal to one another, but by intravenous injection it decreased in the following order; the rabbit, rat and chicken. We confirmed that the results were in parallel to the rates of inactivation of LPS pyrogenicity upon incubation

with proteolipid extracted from the cerebrums of the three species. The mechanism of the interaction between proteolipid and LPS was clarified by using a Sephadex LH-20 column. In the present publication, we report further experiment on the interaction between cerebral proteolipid and LPS by the same method. From the present studies, it is suggested that the species specificity in a febrile response to LPS might depend on the difference of affinity of cerebral proteolipid-protein for LPS or lipid A among certain species. However, further comparative studies should be required on the physico-chemical properties of the cerebral proteolipid-protein of the three species.

86 レセルピンによる実験的 SFD の発症について  
森山 郁子\*, 加納晴三郎: 日本産科婦人科学会  
雑誌, 30, 161 (1978)

正常分娩であっても著しく低体重であるものを small for date (SFD) と呼ぶが, その発症機構は未解決である。著者らはその発症機構を解析するため, 日常, 降圧または鎮静剤として使用され, その主な薬理作用は交感神経性アミンの枯渇作用にあるとされる reserpine 1 mg/kg を, ウイスター系妊娠ラットに, 妊娠第 5, 10, 18 日目にそれぞれ 1 回投与し, 体温, 体重ならびに各臓器 ATP 含量を測定した。その結果, 母体には低体温, 体重減少および鎮静作用が現われ, 妊娠末期に連続 3 日間投与した群に重症 SFD の発症を認めた。またその時期の胎盤 ATP 含量も著しく低下した。これらの成績から, SFD の発症には明らかに母体→胎盤→胎仔系における能動輸送に関する胎盤機能が関与するものと考えられた。

\* 奈良医科大学, 産婦人科学教室

87 Effects of Endotoxin on the Pregnant Rat:  
2nd report.

Seizaburo KANO and Takafumi ITAMI:  
*Teratology*, 16, 110 (1977)

In the previous report at the 16th Annual Meeting of this association, we described that endotoxin could produce abortion in the pregnant rat, and suggested that the uncoupling action of endotoxin in mitochondrial oxidative phosphorylation might be an important factor. In this paper, acetylsalicylic acid (ASA), known to be an uncoupler, was used with endotoxin in pregnant

rats. We obtained the following results:

1) ASA given orally was mostly converted to salicylic acid (SA) and existed for a long period in the blood stream. 2) ASA and SA could be transferred into the placenta and fetus. 3) Concentrations of ASA and SA in three organs were markedly enhanced with endotoxin. 4) Fetal mortality increased in a dose-related manner at 125, 250 and 500 mg/kg po. of ASA, and it was enhanced markedly by endotoxin. 5) Endotoxin decreased ATP concentration of the placenta and fetus as well as maternal organs.

88 Effect of Reserpine on the Pregnant Rat:  
2nd report.

Seizaburo KANO and Ikuko S. MORIYAMA:  
*Teratology* 16, 110 (1977)

In our previous report at the 16th Annual Meeting of this association, we described that SFD could be produced by injection of reserpine in the 3rd trimester of pregnancy in the rat. The phenomenon was further studied morphologically. We obtained the following results:

1) Injection of reserpine (1 mg/kg×3) induced retardation in the ossification of the skull and an increase in extra 14th ribs in fetuses. 2) As compared with controls, the organization of the brain in experimental fetuses was immature, and deformities were noted in the 3rd and lateral ventricles. 3) Hydronephrosis was observed with high frequency. 4) ATP concentrations in various organs were estimated during pregnancy. Placental ATP reached the maximum on the 16th day of gestation. Reserpine decreased the maximal concentration of placental ATP to 30% of the control level. 5) Postnatal growth of the young prenatally treated with reserpine was markedly affected. Reserpine given to lactating dams also affected growth of the young.

89 各種 Pyrogen による家兎の発熱に対する Acetylsalicylic acid および Salicylic acid の解熱機構

伊丹孝文, 加納晴三郎: 日薬理誌, 73, 683  
(1977)

Aspirin および Salicylic acid の解熱機構を明らか

にする目的で両薬物の可溶化を試み、それらの Na 塩 (Na-ASA, Na-SA) を各種 Pyrogen で発熱せしめた家兎に投与し、その効果を比較検討し、次の成績を得た。1) 両薬物を静注した時の血中濃度の半減期は発熱時と正常時に差が認められた。2) 両薬物は正常体温には影響が認められなかった。3) Lipopolysaccharide (LPS) 0.2 µg/kg による発熱家兎では、Na-ASA 解熱効果は LPS と同時あるいは2時間後に静注した時最も強く、Na-SA はわずかに1, 2, 3時間後の投与時に効果が認められた。4) 両薬物の大槽内投与による解熱効果は、Na-ASA にのみ著しい効果が認められた。5) Leucocytic pyrogen で発熱させた家兎に両薬物を静注する時、Na-ASA にのみ著しい効果が認められた。6) 2,4-dinitrophenol の発熱に対して両薬物の効果は認められず、むしろ発熱を増強させた。

以上より、ASA は Lipopolysaccharide の中槽での作用を阻害することにより、また SA は主として Leucocytic pyrogen の遊離または合成を阻害することにより解熱効果を示すものと考えられた。

90 発熱時における薬物の吸収・代謝に関する研究 (III) Pyrogen による発熱家兎に Acetylsalicylic acid および Aminopyrine を併用した時の解熱効果とそれらの血漿中濃度  
伊丹孝文, 加納晴三郎: 日薬理誌, 73, 829 (1977)

解熱剤を併用した時の解熱作用の機序を明らかにするために、Acetylsalicylic acid (ASA), Aminopyrine (AMI) およびそれらの配合剤を Lipopolysaccharide (LPS) による発熱家兎に経口投与し、解熱効果と血漿中濃度について検討し、以下の成績を得た。1) 発熱家兎に ASA (500 mg/kg) を投与した時、血漿中 ASA 濃度は対照家兎に比し高いが、代謝産物である Salicylic acid の濃度には変化が認められなかった。2) AMI (100 mg/kg) では発熱家兎における血漿中濃度は対照に比し低かった。3) ASA と AMI の配合比の異なる三種の製剤 (ASA 375 mg/kg+AMI 25 mg/kg, ASA 250 mg/kg+AMI 50 mg/kg, ASA 125 mg/kg+AMI 75 mg/kg) を発熱家兎に経口投与した時のそれぞれの血漿中濃度は、対応する用量を単独投与した時の濃度よりも低かった。4) 解熱効果は ASA で 125~500 mg/kg, AMI で 25~100 mg/kg の範囲では用量に対応した効果が認められた。5) (3) でのべた三種の製剤の解熱効果における相乗作用は認められなかった。

91 内毒素による体温上昇とレセルピンの体温降下作用との関係について  
加納晴三郎, 西尾 晃: 日薬理誌, 75, (1978)

ウサギを用いて内毒素による発熱機構をその媒体と考えられる内因性発熱物質の産生について検討すると共にレセルピンによる体温降下が内因性発熱物質と如何なる関係があるかについて研究を行い、以下の結果を得た。

1) ウサギに内毒素を静注すれば発熱に伴って内因性発熱物質が遊離された。2) 内毒素を微量 (0.01 µg/body) 大槽内に注射すれば著しい発熱をおこすが内因性発熱物質の産生はみとめられなかった。3) 内毒素を大槽内 0.01 µg/body) 又は静脈内 (0.5 µg/kg) に注射しておこる発熱に対してレセルピン (1 mg/kg, iv.) は著しい解熱効果を示した。この度合は正常ウサギに対する効果より大であった。4) レセルピン (1 mg/kg, iv.) 前処置したウサギに内毒素 (0.5 µg/kg) を静注したときは体温上昇作用は認められなかったが、明らかに内因性発熱物質の存在は対照群と同程度に認められた。

以上の結果から内因性発熱物質は内毒素による発熱における主要な媒体であるか否かについて二三の考察を加えた。

92 Effects of Polychlorinated Biphenyls (PCBs) on the Developmental Toxicity of Methylmercury in Mice.  
Makoto EMA and Takashi TANIMURA: *Teratology* 16, 103 (1977)

Female JCL-ICR mice were fed either a diet containing PCBs (Kanechlor 500) at 500 ppm or a normal diet from day 0 of gestation to the day of weaning (21 days after delivery), and were treated orally with methylmercuric chloride suspended in corn oil at daily dosage of 4, 0.4 or 0 mg/kg (as Hg) from day 15 of gestation to the day weaning. Pregnant mice were allowed to litter spontaneously. The offspring were fed a normal diet after weaning.

No effects on mothers were observed with regard to death, intoxication or duration of pregnancy in any group. The number of liver or dead neonates and mortality of the offspring until weaning were similar among all the groups. Although the offspring from mothers receiving

PCBs (with or without Hg) or Hg at 4 mg/kg alone showed slow postnatal body weight gain, the growth reached the level of the control (normal diet, oil treated) offspring by 8 weeks of age in those groups except for the two groups which received Hg at 4 mg/kg with or without PCBs. In three groups fed PCBs, a significant number of offspring died in the first week after weaning. The developmental toxicity was most striking in the group which received Hg at 4 mg/kg with PCBs. Some behavior tests performed before weaning such as appearance of visual placing and hindlimb support retardation in this group. Results of open-field tests indicate that the offspring exposed to Hg at 4 mg/kg alone showed hyperactivity compared with the group given Hg at 4 mg/kg with PCBs or the controls. No consistent tendency was observed on water-T maze learning ability among the groups.

### 93 薬用植物種子の研究 (第7報) シャクヤクの実生苗の育成について

米田該典\*, 米田喜代\*, 本間尚治郎, 堀越 司:  
生薬学雑誌, 162 (1978)

目的 北海道において, シャクヤク種子が発芽に2年を要する原因は, 温度不足による発根の遅延にあることはすでに明らかにした。

そこで発根を人為的に促進することにより発芽を1年に短縮することが可能であると考え, 採種後1年で実生苗を得ようとして実験を試みた。

方法 (I) 1974年~1975年, 1974年産種子を選粒し, 1974年10月31日に木箱(発芽床)に川砂区, 川砂とパーミキュライトの2区に各1,000粒を播種し温室に入れ  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  に保温した。45日経過後木箱(発芽床)を野外に出し雪中に埋蔵し越冬させた。対照は同じ日に播種し, そのまま野外に置き越冬させた。1975年8月9日に発芽および苗の調査を行った。

(II) 1975年~1976年, 1975年産種子を選粒し, 1976

年2月2日に木箱(発芽床)川砂区に100粒を播種し, 温室内  $17 \sim 20^\circ\text{C}$  に保温した。

54日経過後の3月27日に野外に出し雪中に埋蔵した。1976年8月25日に発芽および苗の生育調査を行った。

結果 (I) 1974年~1975年, 1974年12月14日温室から野外に出す段階において温度処理区では発根が認められたが対照区では発根が認められなかった。播種後の温度処理により採種後1年以内での育苗が可能であることが確認された。

(II) 1975年~1976年, 1976年3月7日温室から野外に出す段階において, 温度処理区では発根が認められ, 1976年7月4日に展葉が認められた。温度処理区は80%の発芽率を示し得られた苗は全て健全であって, I(45日)よりもII(54日)は長い温度処理により高率の発芽であった。この方法はシャクヤク種子の1年以内の育苗に有効であると確認した。

\* 大阪大学薬学部

### 94 ケシ (*Papaver somniferum* L.) の生産力におよぼす気象要因の影響 (第1報) 一貫種の生産力と気象要因との相関

大野忠郎, 木下孝三\*, 小峰常行: 生薬学雑誌, 31, 44 (1977)

和歌山薬試における1955年から1974年までの20カ年のケシ一貫種の生産力と当场において観測した各種気象要因との相関を検定した。

あへん収量と5月の合計降水量, 平均湿度および平均曇量との間には負の相関が認められる。あへん収量と5月の平均最高気温, 平均気温較差および日照時間との間には正の相関がある。一般にあへん中のモルヒネ含量と各種気象要因との相関はあへん収量と各種気象要因との相関に比し正負逆である。開花期とさく果生育期の降水量少なく, 開花期の最高気温高く, 開花期と採汁期の気温較差大きく, さく果生育期と採汁期の日照時間長く, 採汁期の湿度低く, 曇量が少ないほどケシ一貫種のモルヒネ生産力は高い。

\* 前和歌山薬用植物栽培試験場長

1. 神谷庄造, 宮原美知子, 鈴木郁生, 小田嶋成和: 1-(2-Chloroethyl)-1-nitroso-3-(3-pyridinyl) methyl-urea N-Oxide および関連化合物の抗腫瘍作用について  
日本薬学会第 98 年会 (1978.4.3)
2. 神谷庄造, 末吉祥子, 宮原美知子, 中島利章\*: 4-Azidoquinoline 1-Oxide 誘導体および関連化合物の合成  
日本薬学会第 98 年会 (1978.4.3)  
\* エスエス製薬中央研究所
3. 丹野雅幸, 神谷庄造: パラ置換シアノトリアツエノベンゼン誘導体の合成と反応について  
日本薬学会第 98 年会 (1978.4.4)
4. 畑 忠\*, 佐藤定男\*, 相場君江\*, 田村千尋\*, 丹野雅幸, 神谷庄造: 4-Azidopyridine 1-oxide の KCN 付加 2 水加物の結晶および分子構造  
日本化学会第 37 春委年会 (1978.4.3)  
\* 三共中央研究所
5. 中館正弘, 神谷庄造: 発がん性アシル型ニトロ化合物とアミン類の反応  
日本薬学会第 98 年会 (1978.4.3)
6. 宮原 誠, 神谷庄造: 1, 3-ジ置換尿素類のニトロソ化について  
日本薬学会第 98 年会 (1978.4.3)
7. 石橋無味雄, 柴崎利雄, 江島 昭, 武藤義一\*: ケーロメトリックモニタを用いたスルホンアミド類の定量  
日本分析化学会 26 年会 (1977.10.11)  
\* 東京大学生産技術研究所
8. 勝島りえ子, 立沢政義, 江島 昭: 高速液体クロマトグラフ法による新医薬品の分析 (第 1 報) 高速液体クロマトグラフ法による新医薬品の定量  
日本分析化学会 26 年会 (1977.10.13)
9. 立沢政義, 山宮卓二, 江島 昭, 高井信治\*: 高速液体クロマトグラフ法による混合製剤の分析 (第 3 報) 高速液体クロマトグラフ法による鎮咳剤, 祛痰剤および抗ヒスタミン剤の定量  
日本分析化学会 26 年会 (1977.10.13)  
\* 東京大学生産技術研究所
10. 立沢政義, 山宮卓二, 江島 昭, 高井信治\*: 高速液体クロマトグラフ法による混合製剤の分析 (第 4 報) 新充填剤を用いた高速液体クロマトグラフィーによるフェノチアジン系薬剤の定量  
日本薬学会第 98 年会 (1978.4.4)  
\* 東京大学生産技術研究所
11. 勝島りえ子, 立沢政義, 江島 昭: 高速液体クロマトグラフ法による新医薬品の分析 (第 2 報) 高速液体クロマトグラフィーによるメクロフェノキサートおよび p-クロールフェノキミ酢酸の定量  
日本薬学会第 98 年会 (1978.4.4)
12. 鯉淵昌信, 江島 昭: ガスクロマトグラフィーによる製剤の定量分析 アルカリフレームイオン化検出器による微量配合剤マレイン酸クロルフェニラミンの定量  
日本分析化学会 26 年会 (1978.10.11)
13. 緒方宏泰, 堀井幸江, 青柳伸男, 柴崎利雄, 鯉淵昌信, 江島 昭, 川津泰仁\*: 固定製剤の溶出試験法の検討 (6) ジアゼパム錠の溶出試験法と Bio-availability  
日本薬学会第 98 年会, (1978.4.4)  
\* 国立横須賀病院
14. 鹿庭なほ子, 相原圭子, 緒方宏泰, 柴崎利雄, 鯉淵昌信, 江島 昭, 渡辺 康\*, 本橋 清\*: 固形製剤の溶出試験法の検討 (7) フルフェナム酸カプセルの溶出試験法と Bioavailability  
日本薬学会第 98 年会 (1978.4.4)  
\* 国立療養所・東京病院
15. 徳永裕司, 木村俊夫, 川村次良: コルチコイドのトリメチルシリル化  
日本薬学会第 98 年会 (1978.4.3)
16. 池淵秀治, 長谷川明, 山根靖弘\*: ラットの鉛毒

- 性における亜鉛の影響について  
日本薬学会第 98 年会 (1978.4.5)
- \* 千葉大学薬学部
17. Kunitoshi YOSHIHIRA, Masamichi FUKUOKA, Masanori KUROYANAGI and Shinsaku NATORI : **Constituents of Bracken Fern (*Pteridium aquilinum* var. *latiusculum*)**  
26th International Congress of Pure and Applied Chemistry (1977.9.6)
18. Tsutomu SHIMOMURA (read by Kazumitsu NISHIMOTO) : **Specification of Crude Drugs and Preparations**  
WHO Seminar on the Use of Medicinal Plants in Health Care (1977.9.15)
19. 佐竹元吉, 神田博史 : **市場生薬「羌活」について (その 1)**  
日本生薬学会第 24 回年会 (1977.10.1)
20. 神田博史, 佐竹元吉 : **市場生薬「羌活」について (その 2) 韓国産羌活**  
日本薬学会第 89 年会 (1978.4.5)
21. 長尾美奈子\*<sup>1</sup>, 矢作多貴江\*<sup>1</sup>, 清野祐子\*<sup>1</sup>, 名取信策, 義平邦利, 福岡正道, 黒柳正典, 松島泰次郎\*<sup>2</sup>, 白井厚子\*<sup>2</sup>, 沢村睦夫\*<sup>2</sup>, 梅沢一夫\*<sup>2</sup>, 杉村隆\*<sup>1,2</sup>, 高山昭三\*<sup>3</sup>, 加藤洋一\*<sup>3</sup>, 田中真知子\*<sup>3</sup> : **フラボン誘導体の突然変異原性について**  
第 36 回日本癌学会総会 (1977.10.12)
- \*<sup>1</sup> 国立がんセンター  
\*<sup>2</sup> 東京大学医科学研究所  
\*<sup>3</sup> 癌研究所
22. 長尾美奈子\*<sup>1</sup>, 矢作多貴江\*<sup>1</sup>, 清野祐子\*<sup>1</sup>, 杉村隆\*<sup>1</sup>, 森田直賢\*<sup>2</sup>, 清水岑夫\*<sup>2</sup>, 黒柳正典, 福岡正道, 義平邦利, 名取信策 : **フラボノイドのサルモネラ菌に対する突然変異原性について**  
日本薬学会第 98 年会 (1978.4.4)
- \*<sup>1</sup> 国立がんセンター  
\*<sup>2</sup> 富山医科薬科大学
23. 黒柳正典, 福岡正道, 義平邦利, 名取信策 : **ワラビの研究 (第 10 報)**  
日本薬学会第 98 年会 (1978.4.4)
24. 福岡正道, 黒柳正典, 義平邦利, 名取信策, 長尾美奈子\*<sup>1</sup>, 杉村 隆\*<sup>1</sup> : **ワラビの研究 (第 11 報) 癌原性物質の検索その 2**  
日本薬学会第 98 年会 (1978.4.4)
- \*<sup>1</sup> 国立がんセンター
25. 大坪浩一郎\*<sup>1</sup>, 石河利隆\*<sup>2</sup>, 梅田 誠\*<sup>3</sup>, 宇田川俊一, 坂部フミ, 倉田 浩, 関田節子, 義平邦利, 名取信策 : **食品由来の *Epicuccum nigrum* 等穀穀種の糸状菌の毒性検索について**  
第 6 回マイコトキシン研究会 (1977.9.3)
- \*<sup>1</sup> 東京大学医科学研究所  
\*<sup>2</sup> 関東通信病院  
\*<sup>3</sup> 横浜市立大医学部
26. 名取信策 : **Cytochalasin 関連化合物の化学とその作用**  
第 7 回マイコトキシン研究会 (1978.2.4)
27. 辻 楠雄, 菊地 寛, 堀部 隆\*, 川口政広\* : **歯科材料の機器分析に関する研究 (第 7 報) 原子吸光法による各種アマルガムの溶出**  
第 35 回日本歯科材料器械学会 (1977.11.26)
- \* 福岡歯科大学
28. 辻 楠雄, 飯田和子, 水町彰吾, 大場琢磨 : **エチレンオキサイド標準液の安定性について**  
第 53 回日本医科器械学会 (1978.5.27)
29. 小嶋茂雄, 中村晃忠, 鹿庭正昭 : **有機錫化合物の分離分析法について**  
第 4 回環境汚染物質とそのトキシコロジーシンポジウム (1977.10.7)
30. 鹿庭正昭, 小嶋茂雄, 中村晃忠, 佐藤洋子\* : **羊毛防虫加工剤の系統分析法**  
日本薬学会第 98 年会 (1978.4.4)
- \* 横浜市衛生研究所
31. 叶多謙蔵, 阿部久人 : **On a method of Sensitivity Enhancement of Head-space analysis**  
26th International Congress of Pure and Applied Chemistry (1977.9.9)

32. 中室克彦, 松井啓子, 佐谷戸安好, 井上哲男: ニッケルの生体・環境試料からの微量分析に関する研究  
日本薬学会第98年会(1978.4.5)
33. 安藤正典, 佐谷戸安好, 井上哲男: 有害性金属の衛生化学的研究 第8報 カドミウムによる腸管カルシウム吸収抑制作用について  
日本薬学会第98年会(1978.4.5)
34. 佐谷戸安好, 中室克彦, 安藤正典, 松井啓子, 井上哲男: クロム化合物の生体運命に関する研究, 血液および肝臓における6価クロム, 3価クロムの挙動について  
第4回環境汚染物質とそのトキシコロジーシンポジウム(富山)(1977.10.7)
35. 山手 昇: NO<sub>x</sub> の環境測定  
環境分析に関するパネル討論会(1977.11.30)
36. 山手 昇, 井上哲男, 松村年郎, 坂田 衛\*, 松居正己\*: 空気中のN-ニトロソ化合物の測定  
第18回大気汚染研究全国協議会大会(1977.11.11)  
\* 島津製作所東京研究所
37. 山手 昇他6名: 溶液導電率法による大気中の二酸化硫黄自動計測器に関する研究(第1報)  
第18回大気汚染研究全国協議会大会(1977.11.10)
38. 山手 昇他6名: 溶液導電率法による大気中の二酸化硫黄自動計測器に関する研究(第2報)  
第18回大気汚染研究全国協議会大会(1977.11.10)
39. 武田明治: 有機りん剤の multiresidue analysis の試み  
シンポジウム 残留農薬のマルチアナリシス 日本農薬学会第3回大会(1978.3.30)
40. 斎藤行生, 武田明治, 内山 充: 食品中の石油系炭化水素について魚体内等における石油成分の変化  
日本食品衛生学会第34回学術講演会(1977.10.14)
41. 斎藤行生, 武田明治, 内山 充: 食品中の石油成分の分析法および自然環境中の石油成分の変化  
第4回環境汚染物質とそのトキシコロジーシンポジウム(1977.10.6)
42. 斎藤行生, 武田明治, 内山 充: 石油中のチッソ成分の分析について  
日本食品衛生学会第35回学術講演会(1978.5.18)
43. 斎藤行生, 武田明治, 内山 充: 石油中の石油系炭化水素について—GC-CI-MSによるパラフィン類の分析—  
日本薬学会第98年会(1978.4.3)
44. 五十畑悦子, 内山 充: 高速液体クロマトグラフィーによるマイコトキシン分析  
第21回液クロ研究会(1978.2.17)
45. 武田由比子, 五十畑悦子, 天野立爾, 内山 充: マイコトキシンの化学分析に関する研究 XII  
マイコトキシンの同時分析について  
日本食品衛生学会第35回学術講演会(1978.5.18)
46. 五十畑悦子, 武田由比子, 天野立爾, 内山 充: マイコトキシンの化学分析に関する研究 XIII  
高速液体クロマトグラフィーによる生体試料中のマイコトキシン分析  
日本食品衛生学会第35回学術講演会(1978.5.18)
47. 内山貞夫, 近藤龍雄, 内山 充: ESRによるタンパク食品中のラジカル量変動の検討  
日本薬学会第98年会(1978.4.5)
48. 内山 充: 生体組織ホモジネート中の過酸化脂質の測定  
第一回過酸化脂質研究会(1977.9.27)
49. 三原 翠, 近藤龍雄, 内山 充: 臓器中のマロンアルデヒド様物質の検討  
日本薬学会第98年会(1978.4.3)
50. 鈴木 隆, 武田明治, 内山 充: 溶媒抽出—無炎原子吸光法による食品中の重金属の分析(1)  
日本食品衛生学会第35回学術講演会(1978.5.18)
51. 鈴木 隆, 武田明治, 内山 充: 溶媒抽出—無炎原子吸光法による食品中の重金属の分析(2)  
日本食品衛生学会第35回学術講演会(1978.5.18)
52. 石綿 肇, 水城弘子, 谷村顕雄, 村田敏郎\*: N-

- ニトロソ化合物前駆物質の生体内挙動(III) ヒトにおける硝酸塩の尿中排泄  
日本食品衛生学会第 35 回学術講演会 (1978.5.18)  
\* 静岡薬科大学
53. 酒井綾子, 吉川邦衛, 倉田 浩, 谷村顕雄: N-メチルアンスラニル酸メチルのニトロソ化  
日本食品衛生学会第 34 回学術講演会 (1977.10.13)
54. 山田 隆, 山本 都, 谷村顕雄: ニトロソ化合物生成に及ぼすポリフェノール類の影響について  
日本食品衛生学会第 34 回学術講演会 (1977.10.13)
55. 辰濃 隆, 佐藤美恵子, 谷村顕雄: レトルト用包装材料と油脂の変敗について  
日本食品衛生学会第 34 回学術講演会 (1977.10.14)
56. 辰濃 隆, 井上たき子, 谷村顕雄: ニトリルゴムからのアクリロニトリルの溶出について  
日本薬学会第 98 年会 (1978.4.5)
57. 加藤三郎, 掛川邦男\*, 井元勝恵\*, 岡田憲三\*: 高速液体クロマトグラフィーによるグリチルリチンの定量  
日本薬学会第 98 年会 (1978.4.5)  
\* 丸善化成 (研)
58. 内野晴美, 吉川邦衛, 倉田 浩: ベンゼン誘導体の突然変異原性  
第 6 回日本環境変異原研究会 (1977.9.17)
59. 渡部 烈, 磯部和彦, 吉川邦衛, 高島英伍: 代謝活性化法によるスチレンの突然変異原性  
日本薬学会年会 (1978.4.5)
60. 下平富士, 中館正弘: 発癌性ニトロソ化合物に及ぼす血液の影響  
第 6 回日本環境変異原研究会 (1977.9.17)
61. 小沼博隆, 鈴木 昭, 高山澄江, 水島久美子, 山田 満\*, 田中久四郎\*: カキ食中毒予防に関する衛生細菌学的研究 (V) 冷凍カキの微生物叢  
日本食品衛生学会第 34 回学術講演会 (1977.10.14)  
\* 東京都市場衛生検査所
62. 小久保弥太郎\*, 松下 秀\*, 甲斐明美\*, 山田 満\*\*, 小沼博隆: 生カキの大腸菌汚染と分離菌株のエンテロトキシン産生性  
日本食品衛生学会第 34 回学術講演会 (1977.10.14)  
\* 東京都立衛生研究所  
\*\* 東京都市場衛生検査所
63. 指原信廣, 水谷 宏, 小沼博隆, 鈴木 昭, 高山澄江, 水島久美子, 今井忠平\*: 液卵(凍結卵)の細菌汚染に関する衛生細菌学的研究  
日本食品衛生学会第 35 回学術講演会 (1978.5.17)  
\* キュービー(株)研究所
64. 宇田川俊一, 小島満子, 吉村建治\*: みかん生果汁より再分離された *Cephaloscybus fragrans* Hanawa  
第 21 回日本菌学会大会 (1977.5.29)  
\* 東京大学医科学研究所
65. 宇田川俊一: Some terrestrial Sordariaceae and their ascospore ornamentation  
The second International Mycological Congress (1977.8.30)
66. 高島浩介\*, 渡辺恵子\*, 宇田川俊一, 倉田 浩: 香辛料のカビおよびカビ毒に関する研究 I. 輸入香辛料のカビフローラと香辛料成分の各種真菌に対する生育阻害効果  
第 6 回マイマトキシン研究会 (1977.9.3)  
\* 食品薬品安全センター
67. 石破知加子\*, 谷 利一\*, 宇田川俊一, 一戸正勝: 外観健全なキュウリ根から分離される糸状菌  
日本植物病理学会昭和 53 年度大会 (1978.4.4)  
\* 香川大学農学部
68. 森永 力\*, 箕浦久兵衛\*, 宇田川俊一: 東南アジア産土壌微小菌類 (II)  
第 22 回日本菌学会大会 (1978.4.14)  
\* 広島大学工学部
69. 古谷航平\*, 宇田川俊一: 東南アジア産子のう菌類知見 (2)

- 第22回日本菌学会大会(1978.4.14)
- \* 三共醸造研
70. 森 悦男\*, 萩原俊司\*, 須崎六生\*, 頭本藤雄\*, 一戸正勝, 倉田 浩: 市場を流通する果実類の糸状菌分布とマイコトキシンについて  
日本食品衛生学会第31回学術講演会(1977.10.14)
- \* 川崎市中央卸売市場検査所
71. 直江史郎\*, 神田実喜雄\*\*, 一戸正勝: 肺アスペルギルス症(*A. fumigatus*)に砒酸カルシウムに沈着を認めた一剖検例  
第21回日本医真菌学会総会(1977.11.8)
- \* 聖マリアンナ医科大学  
\*\* 昭和大学医学部
72. 直江史郎\*, 原 正道\*\*, 森 浩志\*\*\*, 神田実喜雄\*\*\*\*, 一戸正勝: 砒酸カルシウム沈着をみた肺アスペルギルス症の3剖検例  
第67回日本病理学会総会(1978.4.6)
- \* 聖マリアンナ医科大学  
\*\* 横浜市立大学医学部  
\*\*\* 愛媛大学医学部  
\*\*\*\* 昭和大学医学部
73. 一戸正勝, 内山 茂, 前田協一\*, 倉田 浩: 輸入落花生のマイコフロラ  
日本菌学会第22回大会(1978.4.14)
- \* マイコトキシン検査協会
74. 小島満子, 宇田川俊一, 一戸正勝, 倉田 浩, 駒形和男\*: 低温管理食品の微生物に関する研究 鮮魚介類およびそうざい類における酵母の分布  
日本食品衛生学会(1977.10.14)
- \* 東京大学応用微生物研究所
75. 佐藤道夫, 足立 透, 田中 彰, 山羽 力: フタル酸エステル類に関する生化学的研究(第5報) Di-isoheptyl phthalate のラットによる代謝  
日本薬学会第98年会(1978.4.4)
76. 紅林秀雄, 田中 彰, 出羽 力: Tri-p-cresyl phosphate のラットによる吸収, 分布, 排泄  
日本薬学第98年会(1978.4.4)
77. 森本和滋, 山羽 力, 宮原美知子, 中館正弘, 鈴木郁生: 1,1'-Ethylene bis(1-nitrosourea)(EBNU)に関する生化学的研究(第4報) (<sup>14</sup>C-EBNU)のL1210細胞への取り込みとその生体高分子への結合  
日本癌学会第36回総会(1977.10.13)
78. 赤坂雄一郎\*, 町田豊平\*, 田中 彰: 各種泌尿器科疾患における尿中ポリアミン値  
第377回日本泌尿器科学会東京地方会(1978.3.16)
- \* 東京慈恵会医科大学
79. 赤坂雄一郎\*, 町田豊平\*, 田中 彰: 各種泌尿器科疾患における尿中ポリアミンの消長  
日本泌尿器科学会第66回総会(1978.4.5)
- \* 東京慈恵会医科大学
80. 金子豊蔵, 山下敬三, 高村二三知, 西垣久美子, 堀内茂友, 戸部満寿夫, 池田良雄: Polychlorinated Terphenyl (PCT) の毒性に関する研究(第1報)  
日本薬理学会第57回関東部会(1977.10.29)
81. 鈴木幸子, 小林和雄, 降矢 強, 川崎 靖, 関田清司, 松本清司, 安原加寿雄, 小川幸男, 萩埜恵子, 戸部満寿夫, 池田良雄: サルによるメチル水銀の長期慢性毒性に関する研究(第7報)  
日本薬理学会第51回総会(1978.3.26)
82. 大野泰雄, 高橋 惇, 簾内桃子, 小野田欽一, 大森義仁: 亜硝酸と薬物との相互作用(II) 4-dimethylaminoantipyrine との併用による肝酵素活性変動の性差  
第56回日本薬理学会関東部会(1977.6.11)
83. 高橋 惇, 大野泰雄, 大森義仁, 石綿 肇, 谷村顕雄: 亜硝酸と薬物との相互作用(III) ラットおよびモルモット胃内におけるニトロソアミンの生成  
第57回日本薬理学会関東部会(1977.10.29)
84. 大野泰雄, 高橋 惇, 大森義仁: 亜硝酸と薬物との相互作用(IV) Aminopyrine との併用によるモルモット肝酵素活性の変動  
第51回日本薬理学会総会(1978.3.26)
85. 川島邦夫: Testosterone およびその代謝化合物の男性化作用

- 東京獣医畜産学会 (1977.8.11)
86. 藤森観之助, 策内桃子, 高仲 正, 大森義仁, 中館正弘: 幼若期ラット脳におよぼすニトロソウレア化合物等の影響  
第 51 回日本薬理学会総会 (1978.3.28)
87. 大森義仁: 医薬品の評価をめぐる諸問題—とくに前臨床薬理・毒性試験の面から  
第 9 回薬物代謝と薬効・毒性シンポジウム (1977.11.14)
88. 金子厚子, 林 真, 吉川邦衛, 石館 基: ラット肝 S-9 代謝活性化による *in vitro* 染色体異常誘発性試験について  
第 6 回日本環境変異原研究会 (1977.9.16)
89. 荻生俊昭, 多田敬三\*, 古田京子, 小田嶋成和: 1,3-ジブチル-1-ニトロソ尿素 (B-BNU) による Donryu ラット乳腺腫瘍の発生  
日本癌学会第 36 回総会 (1977.10.12)  
\* 共立薬科大学
90. 金子厚子, 林 真, 吉川邦衛, 石館 基, 小田嶋成和: 癌原性物質の *in vitro* スクリーニングに関する研究 (IV) ラット肝 S-9 代謝活性化による染色体異常誘発  
日本癌学会第 36 回総会 (1977.10.12)
91. 林 真, 沢田 稔, 荻生俊昭, 石館 基, 小田嶋成和: ニトロソ尿素によって誘発された Donryu ラット原発性白血病の核型分析  
日本癌学会第 36 回総会 (1977.10.13)
92. 荻生俊昭, 小田嶋成和: Donryu ラットにおけるエチルニトロソ尿素 (ENU) の投与期間と白血病発生の相関  
日本癌学会第 36 回総会 (1977.10.14)
93. 広瀬雅雄\*, 前川昭彦, 神谷庄三, 小田嶋成和: N-エチルおよび N-アミルニトロソウレタンによる Donryu ラット上部消化管腫瘍について  
日本癌学会第 36 回総会 (1977.10.14)
94. 渡辺光夫\*, 石館 基, 吉川邦衛, 三谷玄悟\*\*:  
\* 名古屋市立大学医学部
- トリプトファン代謝産物および人尿の染色体異常および細菌突然変異誘発性について  
日本癌学会第 36 回総会 (1977.10.12)  
\* 帝京大学薬学部  
\*\* 東京医科歯科大学医学部
95. 荻生俊昭, 竹内正紀, 小田嶋成和: ニトロソ尿素白血病の発生に対する考察—プロピルニトロソ尿素 (PNU) 連続経口投与による雌 Donryu ラット白血病発生に対する PNU 一回大量胃内前投与の影響を中心として  
第 67 回日本病理学会総会 (1978.4.5)
96. 岡田敏史, 中垣正幸\*: 塩酸フェノチアジンの水溶液中における加水分解  
第 27 回日本薬学会近畿支部総会 (1977.11.20)  
\* 京都大学薬学部
97. 三ツ橋幸正\*, 浜野 孝\*, 長谷川明彦\*, 田中喜作\*, 松本幸夫\*, 尾立忠夫\*\*, 小原一雄\*\*, 野々木裕子\*\*, 福家田鶴\*\*, 須藤美砂子\*, 生沢真起子\*, 藤田祐一\*, 泉 哲男\*, 小川俊次郎, 鈴木英世, 豊田正武, 伊藤啓志男, 慶田雅洋: 食品中の亜硫酸の定量法に関する研究—VI ランキン法およびヘッドスペース FPD-GC 法による各種食品中の遊離型・結合型亜硫酸の定量の比較  
日本食品衛生学会第 34 回学術講演会 (1977.10.13)  
\* 神戸市環境保健研究所  
\*\* 日本食品分析センター大阪支所  
\*3 サントリー(株)中央研究所
98. 小川俊次郎: 食品中の亜硫酸定量法の問題点  
第 14 回全国衛生化学技術協議会総会 (1977.9.30)
99. 豊田正武: しいたけ中の二硫化炭素に関する研究  
第 14 回全国衛生化学技術協議会総会 (1977.9.30)
100. 豊田正武, 小川俊次郎, 伊藤啓志男, 慶田雅洋: ガスクロマトグラフィーによるかんきつ中のチオ尿素の定量  
日本薬学会第 98 年会 (1978.4.5)
101. 外海泰秀, 慶田雅洋, 小瀬洋喜\*: タール色素の光分解と分解物の TLm 試験

日本薬学会第98年会 (1978.4.5)

\* 岐阜薬科大学

102. 外海泰秀, 渡辺孝子, 慶田雅洋: 清涼飲料水中の正りん酸塩及び縮合りん酸塩の分別定量法  
第32回日本栄養・食糧学会総会 (1978.5.20)

103. 小川俊次郎, 豊田正武, 外海泰秀, 伊藤菅志男, 慶田雅洋, 前田米太郎\*: キレート剤 2-エチル-1, 3-ヘキサジオールを使用する食品中のホウ酸の迅速定量法について  
日本食品衛生学会第35回学術講演会 (1978.5.18)

\* 厚生省大阪空港食品衛生監視員事務所

104. 小川義之, 加納晴三郎: 内毒素とプロテオリビッドの相互作用  
第24回毒素シンポジウム (1977.7.15)

105. 森山郁子\*, 加納晴三郎: レセルピンの妊娠ラット及び胎仔に及ぼす影響 (第II報)  
第17回日本先天異常学会総会 (1977.7.13)

\* 奈良医科大学

106. 加納晴三郎, 伊丹孝文: 内毒素のラット胎仔に及ぼす影響 (続報)  
第17回日本先天異常学会総会 (1977.7.13)

107. 江馬 真, 谷村 孝\*: マウスにおけるメチル水銀の発生毒性に及ぼす polychlorinated biphenyls (PCBs) の影響  
第17回日本先天異常学会総会 (1977.7.13)

\* 京都大学医学部

108. 加納晴三郎, 伊丹孝文: 発熱物質を投与されたラット母体および胎仔系における Acetylsalicylic acid の代謝と毒性について  
第9回薬物代謝と薬効・毒性シンポジウム (1977.11.14)

109. 加納晴三郎, 伊丹孝文, 吉田 稔: レセルピン

のラット胎生期発育に及ぼす影響 (I)  
第52回日本薬理学会近畿部会 (1977.11.19)

110. 伊丹孝文, 加納晴三郎: 発熱物質を投与された妊娠ラットに対するアスピリンの影響について  
第27回日本薬学会近畿支部総会 (1977.11.20)

111. 小川義之, 加納晴三郎: 内毒素の発熱作用よりみた種属特異性とその決定因子について  
第27回日本薬学会近畿支部総会 (1977.11.20)

112. 伊丹孝文, 江馬 真, 加納晴三郎: レセルピンのラット胎生期発育におよぼす影響 (II)  
日本薬学会第98年会 (1978.4.4)

113. 小川義之, 小室徹雄, 加納晴三郎: 内毒素による発熱反応の種属特異性と その決定因子について (続報)  
日本薬学会第98年会 (1977.4.4)

114. 本間尚治郎, 堀越 司, 三浦忠一, 畠山好雄: 薬用植物の栽培研究 (6) ゲンチアナ・ルテアの短期密植栽培について  
日本生薬学会第24回年会 (東京大会) (1977.9.30)

115. 堀越 司, 三浦忠一, 山岸 喬\*, 森三佐雄\*: 北海道産 (黄柏) の品質について (第3報)  
日本生薬学会第24回年会 (東京大会) (1977.10.1)

\* 北海道立衛生研究所

116. 堀越 司: キハダについて  
日本生薬学会北海道支部キハダ勉強会 (1977.7.17)

117. 大野忠郎, 木下孝三\*, 小峰常行: ケシ (*Papaver somniferum* L.) の生産力におよぼす気象要因の影響について (II) 早生型系統の生産力と気象要因との相関  
日本生薬学会第24回年会 (東京大会) (1977.9.30)

\* 前和歌山薬用植物栽培試験場長

所員の研究，試験および検査に関する発表を主とする「衛試例会」は，昭和26年から原則として毎月第2火曜日，本所講堂において開催されているが，昭和52年4月から昭和53年3月までの演題等は下記のとおりである。

第185回（昭和52年4月12日）

1. ビス N-ニトロソ尿素類の抗腫瘍性について  
合成化学研究部 宮原 誠  
中館 正弘  
宮原美知子  
鈴木 郁生
2. ポリスチレン容器から内容物へ吸着されるスチレン (SM) 量について  
食品添加物部 辰 濃 隆  
佐藤美恵子  
谷村 顕雄
3. ヘッドスペース分析法に関する研究 (Ⅲ) 溶媒転溶法による検出限度の向上について  
療 品 部 阿 部 久 人
4. カイコのコウジカビ病とアフラトキシン  
衛生微生物部 一 戸 正 勝
5. マイコトキシンの研究 (西ドイツ出張報告)  
食 品 部 天 野 立 爾

第186回（昭和52年5月10日）

1. 合成洗剤に関する研究 (第3報) 各種洗剤のヒト赤血球の溶血性および解糖系に及ぼす影響 (15分)  
毒 性 部 °高村二三知  
医 化 学 部 新 村 寿 夫  
時 枝 利 江  
山 羽 力
2. 塩酸フェノチアジン水溶液の塩素イオン活量の測定 (15分)  
大阪支所薬品部 岡 田 敏 史
3. GC 内部標準物質 (および食品添加物など) の保持指標とその簡易算出 (10分)  
食品添加物部 加 藤 三 郎
4. Chaetomium globosum の代謝する細胞毒性物質 chaetoglobosins の構造 (Ⅳ) (15分)  
生 薬 部 °関 田 節 子  
義 平 邦 利
5. 温泉水，井水中の  $^{228}\text{Ra}$  および  $^{226}\text{Ra}$  について

(15分)

放射線化学部 亀谷 勝 昭

6. 亜硝酸と薬物との相互作用 (I) 4-dimethyl-aminoantipyrine との併用による肝薬物代謝系の阻害 (15分)  
薬 理 部 大 野 泰 雄
- 第187回（昭和52年6月14日）
1. ラット，モルモットの発癌種属差と肝リソゾーム酵素の変動  
薬 理 部 高 橋 惇
  2. 繊維製品に含まれるトリブチル錫およびジブチル錫化合物の分離定量  
療 品 部 小 嶋 茂 雄
  3. 海藻中の放射性ヨウ素 129 の分析法について  
放射線化学部 °亀谷 勝 昭  
河 上 一 美
  4. Alkylating N-nitroso carcinogens の *in vivo* での変異活性の消長と *in vitro* での追試実験  
衛生微生物部 下 平 富 子

第188回（昭和52年7月12日）

1. Chlorpromazine 等中枢作用薬の行動薬理学的研究  
薬 理 部 長 尾 重 之
2. 食品中の亜硫酸の定量法に関する研究  
大阪支所食品部 慶 田 雅 洋  
伊 藤 誉 志 男  
豊 田 正 武  
°鈴 木 英 世
3. スルピリンの安定性 (Ⅱ) 水溶液における加水分解について  
薬 品 部 吉 岡 澄 江
4. PCT のマウスにおける毒性研究 (第1報)  
毒 性 部 °山 下 敬 三  
金 子 豊 蔵  
高 村 二 三 知  
西 垣 久 美 子
5. PCT のマウスにおける毒性研究 (第2報)  
毒 性 部 °金 子 豊 蔵  
山 下 敬 三  
高 村 二 三 知  
西 垣 久 美 子

第189回（昭和52年9月13日）

1. 1,1'-Ethylene bis(1-nitrosourea) に関する生化学的研究 (第3報) *in vitro* における EBNU の

- 核酸およびタンパク質との結合  
 医化学部 °森本和滋  
 山羽力  
 合成化学部 中舘正弘  
 鈴木郁生
2. しいたけの中の二硫化炭素に関する研究  
 大阪支所食品部 豊田正武
3. 亜硝酸と薬物との相互作用 (II) アミノピリンとの併用による肝酵素活性変動の性差  
 薬理部 大野泰雄
4. 有機水銀化合物の毒性に関する研究 (第8報) — サルによる塩化メチル水銀の長期慢性毒性に関する研究 —  
 毒性部 川崎靖
5. カドミウムの生物学的半減期の動物種差について  
 放射線化学部 浦久保五郎
- 第190回 (昭和52年10月11日)
1.  $\gamma$ 線照射ウイナーソーセージの次世代におよぼす影響  
 毒性部 関田清司
2. テストステロン及びその関連化合物の男性化作用  
 薬理部 川島邦夫
3. Dibutyl Phthalate (DBP) のラットによる代謝  
 医化学部 田中彰
4. 国際標準品について  
 生物化学部 木村俊夫
5. Platinum Complexes の研究  
 (南カルフォルニア大学留学報告)  
 環境衛生化学部 木嶋敬二
- 第191回 (昭和52年11月8日)
1. 解熱、鎮痛、かぜ薬の微生物汚染に関する一考察  
 衛生微生物部 石関忠一
2. 市場生薬「羌活」について  
 生薬部 °神田博史  
 佐竹元吉
3. マウスによる $\gamma$ 線照射小麦の次世代に及ぼす影響  
 毒性部 松本清司
4. 代謝活性化による染色体異常誘発試験  
 薬品病理部 金子厚子  
 石館基
- 第192回 (昭和52年12月13日)
1. 脱硫 TC (Topped Crude) の毒性に関する研究  
 毒性部 小川幸男
2. クロム化合物の生体運命に関する研究  
 環境衛生化学部 °中室克彦
3.  $\gamma$ 線照射玉ねぎの安全性に関する研究 (第2報)  
 毒性部 °川俣一也  
 門馬純子  
 高田幸一
4. トリフェニルスズアセテート (TPTA) の経皮吸収, 体内分布, 排泄について  
 放射線化学部 永松国助
5. スルピリンの安定性 (III) 酸分解について  
 薬品部 吉岡澄江
- 第193回 (昭和53年1月17日)
1. 皮膚適用による二三薬物の毒性に関する研究 (第2報)  
 毒性部 °三原康夫  
 児玉幸夫  
 吉本浜子
2. アミノピリンと亜硝酸塩とからのニトロソジメチルアミンの生成  
 食品添加物部 °山田隆  
 石綿肇  
 酒井綾子  
 山本都
3. 含量均一性試験—ジゴキシン錠およびジギトキシン錠について  
 生物化学部 徳永裕司
4. 有機錫化合物の分離分析法  
 療品部 小嶋茂雄
5. マレイン酸マンガンの毒性に関する研究  
 毒性部 萩埜恵子
6. 各種尿素誘導体のニトロソ化とその方向について  
 合成化学研究部 °神谷庄造  
 宮原誠
- 第194回 (昭和53年2月14日)
1. カドミウムの衛生化学的研究—カドミウム連続経口投与時の骨中カルシウム挙動について  
 環境衛生化学部 °安藤正典  
 佐谷戸安好
2. 高等動物における四炭糖の代謝—ウシ肝臓のD-エリスロース還元酵素の性質とその活性調節  
 生物化学部 谷本剛
3. 硝酸塩投与における唾液中の硝酸ならびに亜硝酸イオン濃度の経時的变化について (15分)

- 衛生微生物部 °林 長 男 第195回(昭和53年3月15日)
- 渡 辺 幸 一 1. 固形医薬品の溶出試験と Bioequivalence 試験
- 倉 田 浩 薬 品 部 江 島 昭
- 食品添加物部 石 綿 肇 2. ジアゼパム錠の溶出試験法と Bioavailability
- 水 城 弘 子 薬 品 部 緒 方 宏 泰
- 谷 村 顕 雄 3. フルフェナム錠カプセルの溶出試験法と Bio-availability
4. 1,1'-Ethylenbis (1-nitrosourea) (EBNU) に関する生化学的研究(第4報)  $^{14}\text{C}$ -EBNU の L-1210 細胞への取り込みとその生体高分子への結合 薬 品 部 鹿 庭 奈 保 子
- 医 化 学 部 °森 本 和 滋 4. ヘッドスペース法による残留エチレンオキシド
- 合成化学研究部 宮 原 美 知 子 ガスの定量について 療 品 部 飯 田 和 子
5. 肝ミクロゾームの薬物代謝酵素活性に及ぼすモルヒネ錠埋没の影響 辻 楠 雄
- 薬 理 部 高 仲 正 5. ヒトにおける硝酸塩の尿中排泄
6. 老化の化学的指標としての TBA 法の検討 食 品 添 加 物 部 °石 綿 肇
- 食 品 部 三 原 翠 水 城 弘 子
- 谷 村 顕 雄

---

支 所 例 会

---

昭和 52 年 6 月 30 日

1. 副腎皮質ホルモンを添加した「自然食品」について

柴 田 正

2. 食品中の亜硫酸の定量法に関する研究(2) 亜硫酸と食品成分(アルデヒド, ケトン及び糖)との結合について

鈴 木 英 世

3. 妊娠ラットにおける臓器内 ATP レベルと薬物に

よる毒性との相関について

伊 丹 孝 文

4. マウスにおけるメチル水銀の発生毒性におよぼす PCBs の影響

江 馬 真

5. 発熱時におけるスルファミン剤の代謝について

吉 田 稔

6. 内毒素と大脳プロテオリビドの相互作用

小 川 義 之

---

 所内講演会
 

---

- |   |  |
|---|--|
| 1. コンピュータの入門について<br>昭和52年5月20日<br>日本情報処理開発協会<br>難波正之  | Medizinische Hochschule Hannover<br>Prof. Dr. Med. Ulrich Mohr |
| 2. ニトロフラン誘導体の発癌性について<br>昭和52年6月16日<br>Massachusetts University<br>Dr. Samwel, M. Cohen                                  | 5. 突然変異性と発癌性について<br>昭和53年2月21日<br>国立ガンセンター副所長<br>河内 卓          |
| 3. PCB の代謝と毒性<br>昭和52年6月23日<br>九州大学薬学部教授<br>吉村英敏  | 6. 行動的手法の毒性学への応用<br>昭和53年3月10日<br>実験動物中央研究所<br>安藤 潔            |
| 大 阪 支 所   |  |
| 4. Toxicologic and pathologic data on polycyclic aromatic hydrocarbons and automobile exhaust condensate<br>昭和52年12月13日 | 1. 脊髓温度刺激による自律機能の変化について<br>昭和52年7月28日<br>永井正則 東京都老人総合研究所       |

---

 昭和52年度に行った主な研究課題
 

---

## 特別研究

- 1) 製剤技術の進歩に伴う医薬品の安全性の確認に関する研究
- 2) 生活関連物質の微量分析新技術の開発研究

## 国立機関原子力試験研究費関係（科学技術庁）

- 1) 標準医薬品等の合成と代謝に関する研究
- 2) 有害金属の毒性発現機構に関する生化学的研究
- 3) 中毒患者血清中の幻覚剤、麻薬類など習慣性薬物の定量に関する研究
- 4) 短半減期放射性医薬品の品質に関する研究
- 5)  $\gamma$ 線照射によるウインナーソーセージの毒性試験
- 6)  $\gamma$ 線照射によるかまぼこの毒性試験
- 7) 電子線照射によるみかんの毒性試験
- 8) 衛生材料の放射線利用に関する研究
- 9) 放射性同位元素を利用した注射薬等の無菌試験に関する研究
- 10) かまぼこの照射殺菌に伴う成分変動に関する研究

## 放射能調査研究費関係（科学技術庁）

- 1) 環境試料中の天然放射性物質の調査に関する研究
- 2) 環境試料中の微量放射性ヨウ素の分析法に関する研究

## 特別研究促進調整費関係（科学技術庁）

- 1) 免疫及び脂質代謝機構と老化に関する総合研究

- 2) 赤かび毒による造血器障害等の発生機構に関する総合研究

## 国立機関公害防止等試験研究費関係（環境庁）

- 1) 海洋の油汚染と海産食品の汚染との関連性に関する研究
- 2) PCBの生体機能に及ぼす影響に関する研究
- 3) 環境汚染物質の生体影響に対する共存化学物質の効果に関する研究

## 科学研究費補助金関係（文部省）

- 1) アミン系化合物（特に医薬品及び農薬）のニトロ化及びその変異原性に関する研究（がん特別研究）
- 2) 食品害虫に対する誘引物質に関する基礎研究（試験研究）
- 3) 日本における化学製品の規制と規制の根拠になる化学物質の発がん性、突然変異性の試験法（一般研究）

## がん研究助成金関係（厚生省）

- 1) 生活環境における化学的発がん因子の研究
- 2) 突然変異原性物質の動物発がんテストに関する研究
- 3) 遺伝変異原性を主とする発がん物質スクリーニングの技術開発
- 4) ヒトのがん発生に関連する環境物質の変異・癌原性の研究

## 国家検定および検査等の処理状況

## Survey of the Results of National Tests

昭和52年度における検定および検査等の処理状況は次のとおりである。

国家検定については、総件数では前年度に比べて21% (420件) の増加となった。検定品目中ではブドウ糖注射液がもっとも多く全体の79%を占め、そのほかでは塩酸エタンプトール錠が6%、塩酸エタンプトールが4%となっており前年度とほぼ同様な状況であった。

つぎに輸出検査は28%、特別審査試験は66%、輸入食品検査は7%と前年度に比べてそれぞれ増加している。反面、製品検査は0.5%、特別行政試験は16%、一斉取締試験は64%の減少となった。

なお、総処理件数は5,932件(下表のとおりで前年度に比べて356件、6%の増加)であった。

国家検定および検査等の処理実績表(次頁以下に掲載)は次のとおりである。

○昭和52年度国家検定品目別月別判定別実績表	238頁
○昭和52年度製品検査月別判定別件数実績表	240頁
○昭和52年度輸出検査月別判定別件数実績表	240頁
○昭和52年度特別審査試験月別判定別件数実績表	240頁
○昭和52年度輸入食品検査品目別月別判定別件数実績表	242頁
○昭和52年度輸入食品検査月別判定別件数実績表	244頁
○昭和52年度特別行政試験月別件数実績表	245頁
○昭和52年度一斉取締試験判定別件数実績表	245頁

区 分	52 年 度 試 験 件 数		
	東 京	大 阪	合 計
国 家 検 定	1,033	1,405	2,438
製 品 検 査	444	377	821
輸 出 検 査	55	—	55
特 別 審 査 試 験	431	—	431
輸 入 食 品 検 査	704	561	1,265
特 別 行 政 試 験	553	15	568
一 般 依 頼 試 験	1	0	1
一 斉 取 締 試 験	333	20	353
計	3,554	2,378	5,932

昭和52年度国家検定品目別

区 分	4 月			5 月			6 月			7 月			8 月			9 月			
	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	
プロチオナミド	東京 大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
プロチオナミド錠	東京 大阪	—	—	—	—	—	1	0	1	—	—	—	1	0	1	—	—	—	—
塩酸エタンブトール	東京 大阪	11	0	11	15	0	15	8	0	8	10	0	10	10	0	10	14	0	14
塩酸エタンブトール錠	東京 大阪	15	0	15	18	0	18	10	0	10	18	0	18	19	0	19	9	0	9
避妊用ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテルゼリー	東京 大阪	2	0	2	2	0	2	4	0	4	—	—	—	2	0	2	1	0	1
避妊用ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル錠	東京 大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	0	1
避妊用メンフェゴールクリーム	東京 大阪	—	—	—	—	—	2	0	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
インシュリン注射液	東京 大阪	—	—	—	2	0	2	1	0	1	2	0	2	1	0	1	—	—	—
プロタミンインシュリン亜鉛水性懸濁注射液	東京 大阪	1	0	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
インソフェンインシュリン水性懸濁注射液	東京 大阪	—	—	—	3	0	3	4	0	4	2	0	2	2	0	2	1	0	1
インシュリン亜鉛水性懸濁注射液	東京 大阪	3	0	3	1	0	1	6	0	6	3	0	3	6	0	6	1	0	1
結晶性インシュリン亜鉛水性懸濁注射液	東京 大阪	—	—	—	—	—	—	2	0	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—
無晶性インシュリン亜鉛水性懸濁注射液	東京 大阪	—	—	—	—	—	—	1	0	1	1	0	1	—	—	—	—	—	—
二相性インシュリン水性懸濁注射液	東京 大阪	2	0	2	—	—	—	—	—	—	1	0	1	—	—	—	—	—	—
中性インシュリン注射液	東京 大阪	—	—	—	—	—	—	1	0	1	—	—	—	1	0	1	—	—	—
オキシトシン注射液	東京 大阪	5	0	5	2	0	2	6	0	6	2	0	2	6	0	6	—	—	—
タンニン酸バソプレシン油性懸濁注射液	東京 大阪	—	—	—	1	0	1	—	—	—	—	—	2	0	2	1	0	1	—
フェリブレン注射液 (塩酸プロピトカインを含まないもの)	東京 大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
フェリブレン注射液 (塩酸プロピトカイン3%を含む)	東京 大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ブドウ糖注射液	東京 大阪	43 102	1 0	44 102	39 107	1 0	40 107	41 122	4 0	45 122	47 135	0 0	47 135	51 117	0 0	51 117	35 104	1 0	36 104

月別判定別件数実績表 (No. 1)

10 月			11 月			12 月			1 月			2 月			3 月			合 計		
合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	0	2	—	—	—	2	0	2
—	—	—	—	—	—	1	0	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3	0	3
1	0	1	2	0	2	2	0	2	—	—	—	2	0	2	3	0	3	16	0	16
4	0	4	12	0	12	—	—	—	—	—	—	5	0	5	11	0	11	100	0	100
10	0	10	17	0	17	9	0	9	12	0	12	8	0	8	12	0	12	157	0	157
2	0	2	2	0	2	2	0	2	2	0	2	2	0	2	—	—	—	21	0	21
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	0	1	2	0	2
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3	0	3	5	0	5
2	0	2	2	0	2	2	0	2	2	0	2	—	—	—	3	0	3	17	0	17
1	0	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	0	2
—	—	—	2	0	2	4	0	4	1	0	1	1	0	1	3	0	3	23	0	23
3	0	3	5	0	5	5	0	5	2	0	2	2	0	2	3	0	3	40	0	40
1	0	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3	0	3
—	—	—	—	—	—	1	0	1	1	0	1	1	0	1	—	—	—	5	0	5
1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	—	—	—	8	0	8
—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	0	1	—	—	—	—	—	—	3	0	3
2	0	2	4	0	4	2	0	2	6	0	6	1	0	1	2	0	2	38	0	38
—	—	—	1	0	1	—	—	—	—	—	—	1	0	1	—	—	—	6	0	6
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	4	0	4	—	—	—	4	0	4	—	—	—	8	0	8
50	0	50	54	0	54	54	0	54	46	0	46	48	0	48	46	0	46	554	7	561
129	2	131	92	0	92	121	0	121	113	0	113	111	0	111	114	0	114	1,367	2	1,369

## 昭和52年度国家検定品目別

区 分	4 月			5 月			6 月			7 月			8 月			9 月		
	合格	不合格	計															
リングル液	12	0	12	—	—	—	11	0	11	11	0	11	—	—	—	11	0	11
バツプレシン注射液	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
避妊用メソフェゴール錠	—	—	—	—	—	—	3	0	3	—	—	—	9	0	9	—	—	—
計	84	1	85	83	1	84	91	4	95	89	0	89	109	0	109	63	1	64
合 計	190	1	191	192	1	193	214	4	218	230	0	230	229	0	229	168	1	169

## 昭和52年度製品検査月別

区 分	4 月			5 月			6 月			7 月			8 月			9 月		
	合格	不合格	計															
東 京	37	0	37	52	0	52	2	0	2	53	0	53	46	0	46	52	0	52
大 阪	38	0	38	31	0	31	49	0	49	29	0	29	31	0	31	26	0	26
合 計	75	0	75	83	0	83	51	0	51	82	0	82	77	0	77	78	0	78

## 昭和52年度輸出検査月別

区 分	4 月			5 月			6 月			7 月			8 月			9 月		
	合格	不合格	計															
東 京	1	0	1	4	0	4	1	1	2	5	1	6	4	0	4	7	0	7

## 昭和52年度特別審査試験月別

区 分	4 月			5 月			6 月			7 月			8 月			9 月		
	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計									
東 京	68	0	68	13	0	13	42	0	42	51	0	51	6	0	6	32	0	32

月別判定別件数実績表 (No. 2)

10 月			11 月			12 月			1 月			2 月			3 月			合 計		
合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計
1	0	1	1	1	2	1	0	1	2	0	2	—	—	—	2	0	2	11	1	12
2	0	2	1	0	1	2	0	2	—	—	—	3	0	3	1	0	1	18	0	18
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	3	0	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	15	0	15
78	0	78	104	1	105	86	0	86	76	0	76	76	0	76	86	0	86	1025	8	1033
132	2	134	95	0	95	125	0	125	113	0	113	116	0	116	118	0	118	1403	2	1405
210	2	212	199	1	200	211	0	211	189	0	189	192	0	192	204	0	204	2428	10	2438

判定別件数実績表

10 月			11 月			12 月			1 月			2 月			3 月			合 計		
合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計
4	1	5	55	0	55	52	0	52	7	0	7	42	0	42	41	0	41	443	1	444
33	0	33	28	0	28	49	0	49	11	0	11	26	0	26	26	0	26	377	0	377
37	1	38	83	0	83	101	0	101	18	0	18	68	0	68	67	0	67	820	1	821

判定別件数実績表

10 月			11 月			12 月			1 月			2 月			3 月			合 計		
合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計
2	1	3	7	0	7	5	0	5	3	1	4	6	0	6	6	0	6	51	4	55

判定別件数実績表

10 月			11 月			12 月			1 月			2 月			3 月			合 計		
合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計
62	0	62	38	0	38	38	0	38	7	0	7	32	0	32	42	0	42	431	0	431

昭和52年度輸入食品検査

区分	4月			5月			6月			7月			8月			9月										
	合格	不合格	要 注 計	合格	不合格	要 注 計	合格	不合格	要 注 計	合格	不合格	要 注 計	合格	不合格	要 注 計	合格	不合格	要 注 計								
農産物	東京	8	1	10	7	—	7	8	3	5	16	11	—	3	14	—	—	3	3	10	—	—	10			
	大阪	4	—	[3]	7	—	—	4	—	—	4	4	2	—	6	—	—	—	—	—	—	—	—			
水産物	東京	9	—	9	2	—	2	36	2	—	38	5	—	5	5	—	—	5	5	—	—	5				
	大阪	6	—	6	—	—	—	—	—	—	1	—	—	1	—	—	—	—	17	—	—	17				
畜産物	東京	12	—	12	6	—	6	31	2	—	33	—	10	6	16	17	5	—	22	35	5	—	40			
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	2	—	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—			
かんびん詰類	東京	—	—	—	—	—	—	—	8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—			
	大阪	—	—	[2]	2	—	1	—	1	8	—	—	8	—	—	—	—	—	[1]	1	1	—	—	1		
添加物	東京	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—			
	大阪	9	—	9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—			
酒精飲料	東京	1	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—			
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	5	5	—	—	—	—			
清涼飲料	東京	—	—	—	—	—	—	—	—	—	5	—	—	5	—	—	—	—	—	—	—	—	—			
	大阪	—	—	—	—	—	—	1	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	—	—	2		
その他の飲料	東京	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—			
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—			
器具・容器包装 おもちゃ	東京	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—			
	大阪	5	—	5	—	—	—	1	3	—	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—			
上記いずれにも 属さないもの	東京	1	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—			
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—			
東京	31	1	1	33	15	—	15	75	7	5	87	21	10	9	40	22	5	3	30	50	5	—	55			
大阪	24	—	—	[5]	29	—	1	14	5	—	19	5	2	—	7	—	—	5	[1]	6	20	—	—	20		
計	55	1	1	[6]	62	15	1	—	16	89	12	5	106	26	12	9	47	22	5	8	[1]	36	70	5	—	75

[ ] 印内数字は無判定

品目別月別判定別件数実績表

10 月			11 月			12 月			1 月			2 月			3 月			合 計								
合 格	不 合 格	要 注 意	合 格	不 合 格	要 注 意	合 格	不 合 格	要 注 意	合 格	不 合 格	要 注 意	合 格	不 合 格	要 注 意	合 格	不 合 格	要 注 意	合 格	不 合 格	要 注 意						
—	—	—	8	—	—	8	12	13	—	25	3	—	—	—	—	5	—	5	72	17	12	101				
4	—	—	4	8	—	8	20	9	—	29	5	—	—	—	10	3	2	5	58	17	—	[3] 78				
—	3	—	3	25	—	25	2	—	—	2	—	—	—	—	[3] 53	91	—	12	103	230	5	[3] 250				
—	—	—	—	72	—	72	98	10	—	108	10	8	[1] 19	34	8	[5] 47	19	3	[25] 47	257	29	[31] 317				
8	13	3	24	26	—	26	74	13	—	87	13	—	13	13	18	—	31	10	11	—	21	245	77	9	331	
—	4	1	5	2	—	2	1	3	—	4	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	1	4	9	1	14
—	—	—	—	6	—	6	1	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	7	—	—	7
—	—	—	—	4	—	4	1	6	—	7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	14	7	[3] 24	
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	9	—	—	9
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	1	—	—	—	—	2	—	—	2
—	—	—	—	12	—	12	29	3	—	32	—	—	—	—	—	—	2	—	—	—	2	41	5	5	51	
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	5	—	—	5
—	1	—	1	1	—	1	—	—	—	—	—	—	3	—	—	—	3	—	—	—	—	—	7	1	—	8
—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	1
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3	—	—	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3	—	—	3
—	—	—	—	—	2	2	3	7	—	10	—	—	—	—	9	9	11	—	—	—	11	29	12	—	—	41
—	—	—	—	—	—	—	3	—	—	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4	—	—	4
—	—	—	—	12	—	12	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	[2] 3	3	—	—	—	—	3	17	—	[2] 19
8	16	3	27	65	—	65	92	27	—	119	19	—	19	64	18	—	[3] 85	106	11	12	—	129	568	100	33	[3] 704
4	5	1	10	111	2	113	152	38	—	190	16	8	[1] 25	54	11	—	[7] 72	36	8	—	[25] 69	436	80	6	[39] 561	
12	21	4	37	176	2	178	244	65	—	309	35	8	[1] 44	118	29	—	[10] 157	142	19	12	[25] 198	1004	180	39	[42] 1,265	

昭和52年度輸入食品検査月別判定別件数実績表

区 分	4 月					5 月					6 月					7 月				
	可	不 可	要 注 意	無 判 定	計	可	不 可	要 注 意	無 判 定	計	可	不 可	要 注 意	無 判 定	計	可	不 可	要 注 意	無 判 定	計
東 京	31	1	1	—	33	15	—	—	—	15	75	7	5	—	87	21	10	9	—	40
大 阪	24	—	—	5	29	—	1	—	—	1	14	5	—	—	19	5	2	—	—	7
計	55	1	1	5	62	15	1	—	—	16	89	12	5	—	106	26	12	9	—	47

区 分	8 月					9 月					10 月					11 月				
	可	不 可	要 注 意	無 判 定	計	可	不 可	要 注 意	無 判 定	計	可	不 可	要 注 意	無 判 定	計	可	不 可	要 注 意	無 判 定	計
東 京	22	5	3	—	30	50	5	—	—	55	8	16	3	—	27	65	—	—	—	65
大 阪	—	—	5	1	6	20	—	—	—	20	4	5	1	—	10	111	2	—	—	113
計	22	5	8	1	36	70	5	—	—	75	12	21	4	—	37	176	2	—	—	178

区 分	12 月					1 月					2 月					3 月				
	可	不 可	要 注 意	無 判 定	計	可	不 可	要 注 意	無 判 定	計	可	不 可	要 注 意	無 判 定	計	可	不 可	要 注 意	無 判 定	計
東 京	92	27	—	—	119	19	—	—	—	19	64	18	—	3	85	106	11	12	—	129
大 阪	152	38	—	—	190	16	8	—	1	25	54	11	—	7	72	36	8	—	25	69
計	244	65	—	—	309	35	8	—	1	44	118	29	—	10	157	142	19	12	25	198

区 分	合 計				
	可	不 可	要 注 意	無 判 定	計
東 京	568	100	33	3	704
大 阪	436	80	6	39	561
計	1004	180	39	42	1,265

昭和52年度特別行政試験月別件数実績表

区 分	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	計
東 京	16	219	0	141	9	7	21	28	41	* 3	0	68	553
大 阪	0	0	0	12	0	0	0	0	0	* 0	0	3	15
計	16	219	0	153	9	7	21	28	41	* 3	0	71	568

\* は残留農業試験

昭和52年度一斉取締試験判定別件数実績表

区 分	合 格	不 合 格	計
東 京	332	1	333
大 阪	20	0	20
計	352	1	353

国立衛生試験所において製造し、交付している標準品は別表のとおりである。

## 別表

## 日本薬局方標準品

	標準品名	包装単位	価 格	使 用 目 的
1	アスコルビン酸	1g入 1本	7,900	アスコルビン酸散、同注射液、注射用コルチコロビン、持続性コルチコロビン注射液の定量法
2	安息香酸エストラジオール	20mg入 1本	6,900	安息香酸エストラジオールの純度試験、同注射液、同水性懸濁注射液の確認試験および定量法
3	インシュリン	20mg入 1本	7,600	インシュリン注射液、インシュリン亜鉛水性懸濁注射液、結晶性インシュリン亜鉛水性懸濁注射液、無晶性インシュリン亜鉛水性懸濁注射液、プロタミンインシュリン亜鉛水性懸濁注射液、イソフェンインシュリン水性懸濁注射液の定量法、イソフェンインシュリン水性懸濁注射液の純度試験
4	エストラジオール	20mg入 1本	6,500	エストラジオールの純度試験
5	塩酸チアミン	200mg入 1本	7,900	塩酸チアミン、同散、同注射液、乾燥酵母の定量法
6	塩酸ピリドキシン	200mg入 1本	9,200	塩酸ピリドキシン注射液の定量法
7	含糖ペプシン	20g入 1本	8,400	含糖ペプシンのたん白消化力試験
8	ジゴキシン	20mg入 1本	5,500	ジゴキシン、同錠、同注射液の純度試験
9	血清性性腺刺激ホルモン	1,000単位入 1本	17,100	血清性性腺刺激ホルモン、注射用血清性性腺刺激ホルモンの定量法
10	酢酸コルチゾン	100mg入 1本	6,600	酢酸コルチゾンの確認試験および純度試験、同水性懸濁注射液の確認試験
11	酢酸ヒドロコルチゾン	100mg入 1本	3,100	酢酸ヒドロコルチゾンの確認試験および純度試験、同水性懸濁注射液の確認試験
12	酢酸ブレドニゾン	100mg入 1本	4,500	酢酸ブレドニゾンの確認試験
13	シアノコバラミン	20mg入 5本	6,900	シアノコバラミン、同注射液の定量法、酢酸ヒドロキシコバラミンの純度試験および定量法
14	ジギタリス	1g入 3本	6,600	ジギタリス、同末の定量法
15	ジギトキシン	50mg入 1本	9,700	ジギトキシンの確認試験および定量法、同錠の純度試験および定量法
16	ジゴキシン	50mg入 1本	10,200	ジゴキシンの確認試験および定量法、同錠、同注射液の定量法
17	酒石酸水素エピネフリン	20mg入 1本	5,100	エピネフリン、酒石酸水素エピネフリンの純度試験
18	酒石酸水素ノルエピネフリン	20mg入 1本	5,700	エピネフリン、酒石酸水素ノルエピネフリンの純度試験、同注射液の定量法
19	G-ストロファンチン	100mg入 1本	10,500	G-ストロファンチンの定量法、同注射液の確認試験および定量法

## 日本薬局方標準品

	標準品名	包装単位	価格	使用目的
20	胎盤性性腺刺激ホルモン	1,000単位入 1本	16,000	胎盤性性腺刺激ホルモン、注射用胎盤性性腺刺激ホルモンの定量法
21	チロジン	500mg入 1本	4,300	パングレアチンのたん白消化力試験
22	デスラノシド	100mg入 1本	11,100	デスラノシドの純度試験および定量法、同注射液の確認試験および定量法
23	トロロンビン	500単位入 2本	12,600	トロロンビンの定量法
24	ニコチン酸	500mg入 1本	6,300	ニコチン酸注射液の定量法
25	ニコチン酸アミド	500mg入 1本	6,700	ニコチン酸アミド注射液の定量法
26	脳下垂体後葉	10mg入 2本	4,300	オキシトシン注射液、バソプレシン注射液の純度試験および定量法
27	薄層クロマトグラフ用酢酸レチノール	10,000単位入 10カプセル	3,100	酢酸レチノールおよびバルミチン酸レチノールの確認試験、ビタミンA油、同カプセルの定量法
28	薄層クロマトグラフ用バルミチン酸レチノール	10,000単位入 10カプセル	3,100	酢酸レチノールおよびバルミチン酸レチノールの確認試験、ビタミンA油、同カプセルの定量法
29	パラアミノベンゾイルグルタミン酸	500mg入 1本	11,100	葉酸の純度試験
30	ヒドロコルチゾン	100mg入 1本	6,300	ヒドロコルチゾンの確認試験および純度試験
31	ブレドニゾン	100mg入 1本	5,500	ブレドニゾン、同錠の確認試験
32	プロゲステロン	10mg入 1本	7,000	プロゲステロンの確認試験
33	ヘパリンナトリウム	1,200単位入 1本	11,000	ヘパリンナトリウム、同注射液の定量法、硫酸プロタミン、同注射液の抗ヘパリン試験
34	マレイン酸エルゴメトリン	20mg入 1本	6,700	マレイン酸エルゴメトリンの純度試験および定量法、同錠、同注射液、マレイン酸メチルエルゴメトリン、同錠の定量法
35	メトトレキサート	200mg入 1本	12,500	メトトレキサートの確認試験および定量法
36	葉酸	500mg入 1本	7,400	葉酸、同錠、同注射液の定量法
37	ラナトシドC	100mg入 1本	11,600	ラナトシドCの純度試験および定量法、同錠の確認試験および定量法
38	リボフラビン	200mg入 1本	8,300	リボフラビン、同散、リン酸リボフラビンナトリウム、同注射液の定量法
39	硫酸プロタミン	100mg入 1本	10,300	イソフェニンシュリン水性懸濁注射液の純度試験
40	リン酸ヒスタミン	20mg入 1本	3,400	注射用コルチコトロピン、持続性コルチコトロピン注射液の純度試験
41	レセルピン	50mg入 1本	11,000	レセルピン、同散、同錠、同注射液の定量法

国立衛生試験所標準品

	標準品名	包装単位	価 格	使 用 日 的
1	エ ス ト ロ ン	20mg入 1本	5,200	エストロン製品の確認試験および定量法
2	塩 酸 チ ア ミ ン 液	1mg入 10本	2,500	チアミン製品の定量法
3	酢 酸 デ ス オ キ シ コ ル ト ン	20mg入 1本	3,600	酢酸デスオキシコルトン製品の確認試験および定量法
4	ジエチルスチルベストロール	20mg入 1本	2,100	ジエチルスチルベストロール製品の確認試験および定量法
5	バ レ イ シ ョ デ ン プ ン	100g入 1本	10,500	バンクレアチン、ジアスターゼ製品のデンプン消化力試験の参考
6	ヒ アル ロ ニ ダ ー ゼ	500mg入 1本	7,600	注射用ヒアルロニダーゼの定量法
7	ビ タ ミ ン A 油 (ビ タ ミ ン A 検 定 用)	1g(10,000単位)入 10本	9,400	ビタミンA製品の定量法
8	プ ロ ビ オ ン 酸 テ ス ト ス テ ロ ン	20mg入 1本	4,300	プロピオン酸テストステロン製品の定量法
9	融 点 測 定 用 {アセトアニリド, アセトフェネチジン, カフェイン, スルファニルアミド, スルファピリジン, ワエリン}	各1g入 6本	18,100	融点測定用温度計, 同装置の補正
10	リ ゾ チ ー ム	500mg入 1本	10,400	リゾチーム製品の定量法
11	ル チ ン	500mg入 1本	6,000	ルチン製品定量法
12	ア シ ッ ド バ イ オ レ ッ ト 6 B	1g入 1本	2,230	食品, 医薬品, 化粧品および製剤中のアシッドバイオレット6Bの確認試験
13	ア シ ッ ド レ ッ ド	1g入 1本	1,480	食品, 医薬品, 化粧品および製剤中のアシッドレッドの確認試験
14	ア ズ ル ビ ン エ キ ス ト ラ	1g入 1本	1,640	粘膜以外医薬品, 化粧品および製剤中のアズルビンエキストラの確認試験
15	ア マ ラ ン ス	1g入 1本	1,270	食品, 医薬品, 化粧品および製剤中のアマランスの確認試験
16	イ ン ジ ゴ	1g入 1本	1,700	外用医薬品, 化粧品および製剤中のインジゴの確認試験
17	イ ン ジ ゴ カ ル ミ ン	1g入 1本	1,080	食品, 医薬品, 化粧品および製剤中のインジゴカルミンの確認試験
18	エ オ シ ン	1g入 1本	1,190	食品, 医薬品, 化粧品および製剤中のエオシンの確認試験
19	エ リ ス ロ シ ン	1g入 1本	1,220	食品, 医薬品, 化粧品および製剤中のエリスロシンの確認試験
20	オ イ ル エ ロ ー A B	1g入 1本	1,110	粘膜以外医薬品, 化粧品および製剤中のオイルエローABの確認試験
21	オ イ ル エ ロ ー O B	1g入 1本	1,140	粘膜以外医薬品, 化粧品および製剤中のオイルエローOBの確認試験
22	オ イ ル オ レ ン ジ S S	1g入 1本	1,070	粘膜以外医薬品, 化粧品および製剤中のオイルオレンジSSの確認試験
23	オ イ ル レ ッ ド X O	1g入 1本	1,130	粘膜以外医薬品, 化粧品および製剤中のオイルレッドXOの確認試験
24	オ レ ン ジ I	1g入 1本	1,200	粘膜以外医薬品, 化粧品および製剤中のオレンジIの確認試験
25	オ レ ン ジ II	1g入 1本	1,650	外用医薬品, 化粧品および製剤中のオレンジIIの確認試験

## 国立衛生試験所標準品

	標準品名	包装単位	価 格	使 用 目 的
26	ギネアグリーン B	1g入 1本	1,970	粘膜以外医薬品,化粧品および製剤中のギネアグリーンBの確認試験
27	サンセットエロー FCF	1g入 1本	1,090	食品,医薬品,化粧品および製剤中のサンセットエローFCFの確認試験
28	タートラジン	1g入 1本	1,270	食品,医薬品,化粧品および製剤中のタートラジンの確認試験
29	テトラクロルテトラブromフルオレセイン	1g入 1本	1,470	外用医薬品,化粧品および製剤中のテトラクロルテトラブromフルオレセインの確認試験
30	テトラブromフルオレセイン	1g入 1本	1,400	外用医薬品,化粧品および製剤中のテトラブromフルオレセインの確認試験
31	トルイジンレッド	1g入 1本	1,320	外用医薬品,化粧品および製剤中のトルイジンレッドの確認試験
32	ナフトールエロー S	1g入 1本	1,070	粘膜以外医薬品,化粧品および製剤中のナフトールエローSの確認試験
33	ニューコクシン	1g入 1本	1,270	食品,医薬品,化粧品および製剤中のニューコキシンの確認試験
34	パーマネントオレンジ	1g入 1本	1,330	外用医薬品,化粧品および製剤中のパーマネントオレンジの確認試験
35	ハンサエロー	1g入 1本	1,320	外用医薬品,化粧品および製剤中のハンサエローの確認試験
36	ファストグリーン FCF	1g入 1本	2,840	食品,医薬品,化粧品および製剤中のファストグリーンFCFの確認試験
37	ファストレッド S	1g入 1本	1,860	粘膜以外医薬品,化粧品および製剤中のファストレッドSの確認試験
38	ブリリアントブルー FCF	1g入 1本	2,180	食品,医薬品,化粧品および製剤中のブリリアントブルーFCFの確認試験
39	フルオレセイン	1g入 1本	1,370	外用医薬品,化粧品および製剤中のフルオレセインの確認試験
40	フロキシシン	1g入 1本	1,270	食品,医薬品,化粧品および製剤中のフロキシシンの確認試験
41	ボンソー R	1g入 1本	1,210	粘膜以外医薬品,化粧品および製剤中のボンソーRの確認試験
42	ボンソー SX	1g入 1本	1,170	粘膜以外医薬品,化粧品および製剤中のボンソーSXの確認試験
43	ボンソー 3R	1g入 1本	1,190	粘膜以外医薬品,化粧品および製剤中のボンソー3Rの確認試験
44	リソールルピン BCA	1g入 1本	1,230	外用医薬品,化粧品および製剤中のリソールルピンBCAの確認試験
45	レーキレッド C	1g入 1本	1,230	外用医薬品,化粧品および製剤中のレーキレッドCの確認試験
46	レーキレッド CBA	1g入 1本	1,370	外用医薬品,化粧品および製剤中のレーキレッドCBAの確認試験
47	レーキレッド DBA	1g入 1本	1,370	外用医薬品,化粧品および製剤中のレーキレッドDBAの確認試験
48	ローズベンガル	1g入 1本	1,190	食品,医薬品,化粧品および製剤中のローズベンガルの確認試験

## 昭和52年度国立衛生試験所標準品出納状況

(医薬品等試験用標準品)

標準品名	前年度末 在庫数量	製造数量	売払数量	自家消費 数量	年度末 在庫数量	備考
	個	個	個	個	個	
アスコルビン酸	159	200	186	7	166	
安息香酸エストラジオール	50	0	7	0	43	
インシュリン	25	100	19	8	98	
エストラジオール	45	0	3	0	42	
エストロン	1	50	3	1	47	
塩酸チアミン	78	532	515	0	95	
塩酸チアミン液	0	0	0	0	0	
塩酸ピリドキシン	151	50	169	0	32	
含糖ペブシン	0	54	24	2	28	
ギトキシン	41	0	0	0	41	
血清性性腺刺激ホルモン	71	0	13	0	58	
酢酸コルチゾン	47	0	12	3	32	
酢酸デスオキシコルトン	0	0	0	0	0	
酢酸ヒドロコルチゾン	31	70	45	3	53	
酢酸ブレドニゾロン	28	0	3	3	22	
シアノコバラミン	132	194	167	0	159	
ジエチルスチルベストロール	15	0	1	0	14	
ジギタリス	43	0	0	0	43	
ジギトキシン	11	50	43	3	15	
ジゴキシン	57	0	40	3	14	
酒石酸水素エピネフリン	0	0	0	0	0	
酒石酸水素ノルエピネフリン	3	0	2	0	1	
G-ストロファンチン	42	0	0	0	42	
胎盤性性腺刺激ホルモン	30	70	41	1	58	
チロジン	33	200	47	0	186	
デスラノンド	28	0	19	0	9	
トロンピン	41	0	27	0	14	
ニコチン酸	79	0	10	0	69	
ニコチン酸アミド	41	200	87	5	149	
脳下垂体後葉	35	0	22	0	13	
薄層クロマトグラフ用酢酸レチノール	57	0	6	0	51	
薄層クロマトグラフ用パルミチン酸レチノール	91	0	8	0	83	
パラアミノベンゾイルグルタミン酸	39	0	12	0	27	
バレイショデンプン	3	0	3	0	0	
ヒアルロニダーゼ	24	0	7	0	17	
ビタミンA油	0	0	0	0	0	
ヒドロコルチゾン	17	70	16	3	68	
ブレドニゾロン	30	0	11	3	16	
プロゲステロン	0	0	0	0	0	
プロピオン酸テストステロン	46	0	0	13	33	
ヘパリンナトリウム	58	100	108	0	50	
マレイン酸エルゴメトリン	81	199	107	21	152	
融点測定用	29	0	26	0	3	

標準品名	前年度末 在庫数量	製造数量	売払数量	自家消費 数量	年度末 在庫数量	備考
葉酸	188個	0個	26個	0個	162個	
ラナトシドC	17	33	47	0	3	
リゾチーム	113	160	254	0	19	
リボフラビン	23	460	320	1	162	
硫酸プロタミン	25	0	4	0	21	
リン酸ヒスタミン	60	100	70	0	90	
ルチン	40	0	22	0	18	
レセルピン	2	152	128	0	26	
メトトレキサート	0	0	0	0	0	
計	2,260	3,044	2,680	80	2,544	

## (色素等試験用標準品)

標準品名	前年度末 在庫数量	製造数量	売払数量	自家消費 数量	年度末 在庫数量	備考
アシッドバイオレット6B	158個	0個	9個	0個	149個	
アシッドレッド	66	0	18	2	46	
アズルビンエキストラ	169	0	13	0	156	
アマランス	0	0	0	0	0	
インジゴ	173	0	13	0	160	
インジゴカルミン	93	0	20	3	70	
エオシン	168	0	11	0	157	
エリスロシン	106	0	19	9	78	
オイルエローAB	302	0	11	0	291	
オイルエローOB	312	0	12	0	300	
オイルオレンジSS	310	0	10	0	300	
オイルレッドXO	295	0	11	2	282	
オレンジI	360	0	11	0	349	
オレンジII	198	0	10	0	188	
ギネアグリーンB	157	0	11	0	146	
サンセットエローFCF	25	0	20	2	3	
タートラジン	31	0	22	2	7	
テトラクロルテトラブROMフルオレセイン	196	0	15	0	181	
テトラブROMフルオレセイン	164	0	15	0	149	
トルイジンレッド	116	0	14	0	102	
ナフトールエローS	266	0	15	0	251	
ニューロクシン	2	0	2	0	0	
パーマネントオレンジ	79	0	15	0	64	
ハンサエロー	111	0	13	0	98	
ファストグリーンFCF	161	0	22	3	136	
ファストレッドS	233	0	12	0	221	
ブリリアントブルーFCF	78	0	22	2	54	
フルオレセイン	226	0	8	2	216	
フロキシソ	499	0	18	6	475	
ボンソーR	295	0	10	0	285	
ボンソーSX	241	0	11	0	230	
ボンソー3R	256	0	10	5	241	
リソールルビンBCA	416	0	16	0	400	
レーキレッドC	426	0	11	0	415	
レーキレッドCBA	164	0	11	0	153	
レーキレッドDBA	189	0	9	0	180	
ローズベンガル	65	0	18	7	40	
計	7,106	0	488	45	6,573	

# 衛生試験所報告への投稿について

## 投 稿 規 定

1. 投稿資格：国立衛生試験所所員とする（共著者はこの限りでない）。
2. 内 容：原稿は報文、ノート、資料とする。そのほか誌上発表、学会発表、業務報告、総説などを収載する。
  - 報 文：独創性に富み、新知見を含むまとまった研究業績。
  - ノ ー ト：断片的な研究業績で、独創性や新知見が認められるもの。
  - 資 料：試験、製造または調査などで、記録しておく必要のあるもの。
  - 誌上発表：衛生試験所報告以外の雑誌に発表したもの。
  - 学会発表：学会で講演したもの。
  - 業務報告：所長、各部長（支所も含む）及び各薬用植物栽培試験場の長が過去1年間（前年度）の業務成績、研究業績をまとめた報告。
  - 総 説：所員の調査又は研究を中心とした総説で、図書委員会が執筆を依頼したもの。
3. 用紙及び枚数の制限：衛生試験所所定の原稿用紙を用い、原則として下記の規定に従う。
  - 報 文：図表を含めて20枚以内。
  - ノート及び資料：図表を含めて15枚以内。
  - 誌上発表：1題目について1枚程度。
  - 業務報告：各部及び各薬用植物栽培試験場について8枚以内。
  - 総 説：原稿を依頼するとき別に定める。
4. 原稿の提出：原稿は表紙（第1ページとする）、英文要旨、本文、文献、英文要旨の和文（参考）、最後に図表を入れた封筒の順に左上をひもでとじ、表紙右上に報文、ノート、資料のうち希望する分類を朱書きし、所長宛の報告書を表紙の上に添えて、定められた原稿〆切期日までに図書館宛に提出する。
5. 原稿の審査：図書委員会は提出された原稿の採否及び分類を決定する。又、必要ならば字句や表現の部分的な訂正、図表の書き直しなどを求める。

## 執 筆 規 定

1. 文 体：現代かなづかい、新送りがな、ひらがなまじり口語文とし、簡潔で理解しやすい表現にする。止むを得ぬ学術用語以外は当用漢字を用いる。必要ならば全文を外国語で書いてもよい。なお、外国文はタイプライター（ダブルスペース）で打つこと。
2. 学 術 用 語：学会の慣例に従う。文中では物質はその名称を記し、化学式は用いない。例えば塩酸と書き、HCl としない。又、化学名を英語で書く場合、文中では原則として小文字で始める。
3. 略記、略語、記号：次の例示のほかは学会の慣例に従う。又、物質名あるいは分析法などを略記するときは、和文、英文とも最初は正式な名称とともに示す。例えば、イソニコチン酸(INA)、示差熱分析法ーガスクロマトグラフィー (DTA-GC) と書き、(以下 INA と略す) などとしない。

### 3・1 単位のべき指数表記には、次の記号を用いる。

テ	ラ (tera)	$10^{12}$	T	ミ	リ (milli)	$10^{-3}$	m
ギ	ガ (giga)	$10^9$	G	マイ	クロ (micro)	$10^{-6}$	$\mu$
メ	ガ (mega)	$10^6$	M	ナ	ノ (nano)	$10^{-9}$	n
キ	ロ (kilo)	$10^3$	k	ピ	コ (pico)	$10^{-12}$	p
デ	シ (deci)	$10^{-1}$	d	フェ	ムト (femto)	$10^{-15}$	f
セ	ンチ (centi)	$10^{-2}$	c	ア	ト (atto)	$10^{-18}$	a

## 3・2 物理量, 化学量, 物性などの単位及び定数の記号又は略号は, 次に掲げるものを用いる.

メートル	m	度(セルシウス)	°	parts per billion	ppb
マイクロメートル	μm	(°Cとしない)		モル濃度	M
ナノメートル	nm	ケルビン度	K	規定濃度	N
(mμ を用いない)		キュリー	Ci	旋光度	α
オングストローム	Å	カウント毎分	cpm	吸光度	A
平方メートル	m <sup>2</sup>	(cpsは用いない)		水素イオン指数	pH
アール	a	ラド	rad	pK 値	pK
リットル	l	レム	rem	ミハエリス定数	K <sub>m</sub>
(Lを用いない)		レントゲン	R	R <sub>f</sub> 値	R <sub>f</sub>
ミリリットル	ml	サイクル	cycle	保持時間	t <sub>R</sub>
(cc を用いない)		回毎分	rpm	50%致死量	LD <sub>50</sub>
マイクロリットル	μl	ヘルツ	Hz	50%有効量	ED <sub>50</sub>
(λ を用いない)		キャンデラ	cd	経口投与	p.o.
立方メートル	m <sup>3</sup>	ルクス	lx	静脈投与	i.v.
グラム	g	ダイン	dyn	腹腔投与	i.p.
マイクログラム	μg	気圧	atm	皮下投与	s.c.
(γ を用いない)		トル	Torr	筋肉投与	i.m.
時	hr	水銀柱ミリメートル	mmHg	標準偏差	S.D.
分	min	毎センチメートル (カイザー)	cm <sup>-1</sup>	標準誤差	S.E.
秒	sec	融点	mp		
(時間は複数でも s をつけない)		分解点	dp	紫外吸収	UV
アンペア	A	沸点	bp	赤外吸収	IR
ボルト	V	凝固点	fp	核磁気共鳴	NMR
オーム	Ω	比重	d	電子スピン共鳴	ESR
ガウス	G	屈折率	n	旋光分散	ORD
エルステッド	Oe	重量パーセント	%	円偏光二色性	CD
ジュール	J	容量/重量パーセント	v/w%	マススペクトル	MS
カロリー	cal	parts per million	ppm		

4. 句読点: , . を用い, 、 。 としない.

5. 数字: アラビア数字を用いる. 千の単位にコンマをつけない. 但し, 成語となっている数字は漢字とする.

6. 字体の指定: 黒鉛筆で次のように記す.

ゴシック体~~~~例: 見出しなど 試薬  
 イタリアック体——例: 学名など Papaver somniferum L.  
 スモールキャピタル=====例: 著者名など Masato ASAHINA

7. 報文, ノート, 資料の記載要領:

7・1 記載順序: 7・2~7・5 の順に書く.

7・2 題名, 著者名: 次の例に従い, 表紙(用紙1枚全部)をこれに当てる.

例:

医薬品の確認試験法に関する研究(第2報)

鎮痛剤のクロマトグラフィー

用賀 衛・世田一郎・東京子

Studies on the Identification of Drugs. II

Chromatographic Methods for the Analgesics

Mamoru YOGA, Ichirō SETA and Kyōko AZUMA

7・3 英文要旨：論文の内容を簡潔にまとめ、タイプライターで打つ。参考のため別紙に書いた和文を文献の次に添える。

7・4 本文：新しいページから書き始める。本文のスタイルは特に規定しないが、内容の重複を避ける。凸版にする図、又は原稿用紙に書き切れない表がある場合、それらの所入位置に若干の余白を設け、図表の番号を明記する。

7・5 文献：本文の引用箇所の右肩に<sup>3)</sup>,<sup>2,5)</sup>,<sup>1-4)</sup>のように記し、終わりに文献として引用順に書く。

雑誌名は Chemical Abstracts 及び日本化学総覧の略記法による。外国雑誌名はイタリック体で表し、単行本は書名を省略しない。

例：

- 1) 神蔵美枝子, 谷村顕雄：衛生試報, 88, 112 (1970)
- 2) 菅野三郎ら：衛生化学, 17, 19 (1971)
- 3) M.D.Hollenberg, D.B. Hope: Biochem.J., 106, 557 (1968)
- 4) A.White et al.: Principles of Biochemistry, 4th Ed., p.937 (1968), McGraw-Hill Inc., New York
- 5) 佐々木慎一：マスマスペクトル解説, p.61 (1967) 広川書店
- 6) USP XVIII, p.321
- 7) JIS K 1234 (1970)

7・6 図表：図又は複雑な構造式など、凸版にする必要のあるものは厚手白色紙か青色方眼紙に黒インク又はすみで書き、図中の数字、記号又は説明などの文字は黒鉛筆で記す。図の大きさは原則として原稿用紙 1/2 枚とする。表の画線はできるだけ少なくし、左右両端の縦線を省く。簡単な表はなるべく本文中に書く。

図の番号は Fig.1., Fig.2., ……とし、表題、説明はともに図の下に、表の番号は Table 1., Table 2., ……とし、表題は表の上に、説明は表の下に記す。なお、表題、説明は原則として英語で書き（資料の場合はこの限りでない）、表題は大文字で始め、最後に、をにつけない。

例：

Fig.1. Influence of enzyme concentration on reductive sugar production

Table 2. Reaction of ephedrine and pseudoephedrine with acetone as a function of time

図及び別紙に書いた表は、その裏に題名、著者名、本文中の所入ページを記す。提出するときは一括して封筒に入れ、そのおもてに論文題名、著者名、並びに図、表のそれぞれの枚数を記し、原稿の最後にとじる。

8. 誌上発表の記載要領：題名の次に改行して著者名、雑誌名、巻数、ページ数、年号の順に記す。更に改行して論文の要旨のみを記す。

9. 学会発表の記載要領：演者名に続いて演題名を記す。改行して学会名、日付け〔例：(1972.4.5)〕を記す。各演題ごとに余白 2 行を設ける。

## 校 正

初校は著者が行う。人名、化学名、数値、文献などは特に綿密に校正する。内容の追加、行数の増加は認めない。凸版の原図は黒鉛筆で校正する。

国立衛生試験所図書委員会

昭和 53 年度 図書 編集 委員

鈴木 郁生	川村 次良	石居 昭夫
中館 正弘	斉藤 恵美子	徳永 裕司
永松 国助	佐竹 元吉	中村 晃忠
安藤 正典	斉藤 行生	川崎 洋子
宇田川 俊一	南原 精一	松本 清司
藤森 観之助	荻生 俊昭	沢田 稔
川崎 浩之進	畠山 好雄	

衛生試験所報告 第 96 号

昭和 53 年 11 月 25 日 印刷

昭和 53 年 11 月 30 日 発行

発行所 国立衛生試験所附属図書館  
東京都世田谷区上用賀 1 丁目 18 番 1 号

印刷所 サンコー印刷株式会社  
東京都文京区後染 2-21-8