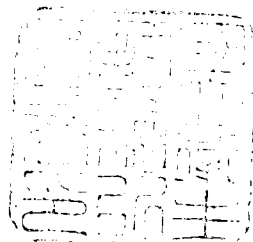


ISSN 0077-4715
CODEN: ESKHA 5

衛生試験所報告



第 100 号

昭和 57 年

BULLETIN
OF
NATIONAL INSTITUTE OF
HYGIENIC SCIENCES

No.100 1982

国 立 衛 生 試 験 所

衛 生 試 報 Eisei Shikenjo Hokoku

衛生試報 100 号正誤表

ページ	位 置, 行	誤	正
Ⅲ	上 27行	S. NAMBARA	S. NAMBARU
21	左下 6 行	心理学上の	生理学上の
25	表 1 上 5 行	Ijmmunogenicity	Immunogenicity
"	表 1 上 15行	Mobilizarion	Mobilization
"	右下 9 行	第二峰は血液の	第二峰は血中の
26	図 4 3 行	RP: レセルピン	RP: レセルピン, ASA: アスピリン
"	左下 11行	結合体	結合性
27	左上 2 行	筋足動物	節足動物
"	右上 7 行	応用種並びに	応用面並びに
28	左下 22行	0.7~1259 ng/ml	0.7~1.250 ng/ml
"	右下 11行	グラム陰性菌	グラム陽性菌
30	表題	Limulu	Limulus
32	右上 25行	Pharmacol	Pharmacol
48	左 12行	池田康和ら……(1982)	池田康和ら……(1981)
"	右 2 行	免疫実験作法	免疫実験操作法
70	Fig. 3 実績表	……(μg/nipple)	……(ng/nipple)
122	右上 8 行	上に述した	上述した
125	上 2 行	M ⁺⁺	Mg ⁺⁺
128	上 5 行	Hheir	Their
139	右下 4 行	……× $\frac{1}{100}$	……× $\frac{1}{100} \times \frac{105}{100}$
S 2	表左下15行	光剤水料	光熱水料
"	表左下 4 行	原子炉試験研究費	原子力試験研究費
S 25	右下 3 行	装置の装置	装置の設置
S 35	右上 13行	簡便な~換方式	簡便な変換方式
S 39	右 15行	(GCTEA にを接続……)	(GC に TEA を接続……)
"	右 22行	結果がら得れ	結果が得られ
"	右 26行	N ₂ +CO ₂ Cl ₂	N ₂ +CH ₂ Cl ₂
S 40	左 4 行	(2) 前処理物	(2) 前処理法
"	右下 文献	木嶋敬三	木嶋敬二
S 42	右 12行	条設定	条件設定
S 43	右 4~5 行	環境庁による環境庁による	環境庁による
"	右 13行	標の作製	標本の作製
S 45	右下 5 行	ネスラー質に	ネスラー管に
S 46	表上 14行	as SO ppm	as SO ₂ ppm
S 77	左 84, 7 行	シクロペンテル	シクロペンチル
"	左 84, 18行	かり速い	かなり速い
"	左 85, 14行	EBU	EBNU
S 97	左 61, 2 行	Nitrate and Experim-	Nitrate in Humans and Experim-
S 101	右 129, 20行	小板	小核
S 105	右上 1 行	WIKSTROFMIA	WIKSTROEMIA
S 106	左下 15行	分ゼ・除去法に	分解・除去法に
"	右下 8 行	川崎浩之進	中原裕

衛生試験所報告

第 100 号

昭和 57 年

BULLETIN OF NATIONAL INSTITUTE OF HYGIENIC SCIENCES

No. 100 1982

Published by
National Institute of Hygienic Sciences
Tokyo, Japan

国立衛生試験所

衛生試験所報告第 100 号の発刊に当たって

下 村 孟

当所の歴史は明治 7 年（1874）に東京司薬場が設立されたことに始まるので、本年は当年にとって 108 歳ということになる。さてこの衛試報告がいつ発足したのかを、当所の百年史を開いてみると明治 19 年（1886）に衛生試験所報第 1 号を発刊するとある。したがってそれから 96 年を経ているので、毎年 1 号ずつというわけではないことがわかる。さらに巻を追ってしらべてみると、明治の中頃に何年か休刊しているがその理由は財政的なことであるとなっている。当時のことはよく解らぬが日清・日露の 2 大戦争の影響であろう。また年に数巻を出している年もあるが、昭和 20 年以降は毎年 1 冊ずつ定期的に発刊している。

さて明治 19 年という年は昔の薬学にとっては画期的な事業が行われた年である。第一版日本薬局方が制定され、また当時のくすりの花形であったサフランと除虫菊が日本に入りその栽培を始めた年でもある。この薬学の初期における活発な動きの中で衛試報告が発刊され、その後の紆余曲折を経ながらも今日まで続いてきたのも、それぞれの時代に献身的に編纂に当られた諸先輩の御努力に他ならぬもの考える。

第百号の発刊に際し今後さらに内容の充実を目標として励んで行きたいので、何分の御協力、御鞭達を頂きたい。

昭和 57 年 11 月

目 次

総 説

医薬品固形製剤の生物学的同等性について……………	江島 昭………… 1
Pyrogen test と Limulus test —その相関性について……………	加納晴三郎………… 20

報 文

覚せい剤の微量分析法に関する研究 (第1報)

……………高橋一徳・島峯望彦・大野昌子・川崎 靖・関田清司・降矢 強…………	35
--	----

dl-ノルエピネフリンの水溶液中での安定性……………	徳永裕司・木村俊夫・川村次良………… 40
----------------------------	-----------------------

エチレンチオ尿素のリンパ球の機能に及ぼす影響について……………	手島玲子・池淵秀治・寺尾允男………… 44
---------------------------------	-----------------------

医療用具の放射線滅菌に関する研究 (第8報) 7線照射による PHEMA コーティングした活性

炭の化学的, 物理的性質の変化並びに滅菌効果について

……………辻 楠雄・新谷英晴・水町彰吾・菊池 寛・栗栖弘光・柳町きみゑ・倉田 浩・大場琢磨…………	48
---	----

清涼飲料水の規格規準作成のためのヒ素及びアンチモンの分析に関する検討

……………鈴木 隆・武田明治・内山 充…………	53
-------------------------	----

ヘキサクロルベンゼン (HCB) 投与ラットにおける過酸化脂質の生成とそれに伴う諸変化につい

て……………三原 翠・萩原博和・近藤龍雄・内山 充…………	58
-------------------------------	----

ゴム製乳首に関する衛生学的検討 (第1報) 市販ゴム製乳首からの第2級アミン類の溶出並びに

ニトロソアミン類の生成……………辰濃 隆・井上たき子・山田 隆・谷村顕雄…………	62
--	----

ゴム製乳首に関する衛生学的検討 (第2報) 授乳による乳児のニトロソアミン摂取量の推定

……………辰濃 隆・井上たき子・山田 隆・谷村顕雄…………	68
-------------------------------	----

サル胃液並びにその沈澱物の *In Vitro* におけるニトロソジメチルアミン生成と pH の影響

……………林 長男・小高秀正・寺岡葉子・牛嶋峰子・谷村顕雄・倉田 浩…………	72
--	----

食品添加物の代謝研究における等速電気泳動技術の利用: ヒドロキニピフェニル抱合体の分離定

量……………南原精一・山羽 力…………	77
---------------------	----

Induction of Forestomach Tumors in Mice Fed Furylfuramide, 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)

acrylamide(AF-2)…………… Toshiaki OCHIAI, Tsuyoshi FURUYA, Kiyoshi SEKITA, Osayuki UCHIDA,

Katsuji NAITO, Kazuya KAWAMATA, Shigetomo HORIUCHI, Masuo TOBE and Yoshio IKEDA…………	80
---	----

Bis(2,3-dibromopropyl)phosphate magnesium の器官形成期投与におけるラットの胎仔及び出産

仔発育に及ぼす影響…門馬純子・高田幸一・会田喜崇・川俣一也・吉本浜子・鈴木康雄・戸部満寿夫…………	85
---	----

臭素酸カリウムのラットにおける癌原性について

……………大野裕子・小野寺博志・高村直子・今沢孝喜・前川昭彦・黒川雄二…………	93
---	----

鼻腔構造の動物種差とその組織学的特性

……………長野嘉介・宮川義史・高橋道人・古川文夫・小久保 武・林 裕造…………	101
---	-----

照射食品 (カマボコ・ウィンナーソーセージ・ミカンジュース) の微生物に対する突然変異試験

……………吉川邦衛・能美健彦・宮田ルミ子・石館 基…………	110
-------------------------------	-----

Pyrogen Test と Limulus Test の相関性Ⅲ ブドウ糖注射液に添加された LPS の Limulus

Test における反応性に対する加熱処理の影響……………	川崎浩之進・加納晴三郎………… 120
------------------------------	---------------------

Luciferase 法による組織内 ATP の定量……………	伊丹孝文・加納晴三郎………… 124
---------------------------------	--------------------

妊娠ラット及び妊娠ウサギに対する浸透圧ミニポンプによる内毒素の持続投与の影響

……………江馬 真・伊丹孝文・加納晴三郎…………	128
--------------------------	-----

ノ ー ト

1-フェニルアゾ-2-ナフトール類の ^{13}C -NMR スペクトルによる構造解析……………	宮原 誠………… 135
---	--------------

ワルファリンカリウム錠の自動含量均一性試験……………	柴崎利雄・妹尾真砂子・江島 昭………… 138
----------------------------	-------------------------

酵素製剤の品質に関する研究 (第3報) 市販プロメライン製剤の製剤学的検討

……………谷本 剛・福田秀男・川村次良…………	141
-------------------------	-----

市販乳首中の重金属の定量	鈴木 隆・武田明治・内山 充	145
逆相型高速液体クロマトグラフィーにおける保存料、サッカリン及び関連物質の保持時間に 及ぼす移動相の pH の影響について	加藤三郎	147
温泉の細菌試験法に関する研究	倉田 浩・栗栖弘光・柳町きみゑ・小出悟郎・浅見吉之・東海林雄悦	149
Cyclohexanone の 2,4-dinitrophenylhydrazine による比色定量	土屋利江・山羽 力	159
資 料		
合成化学研究部で合成した化合物の抗腫瘍効果 (VI)	宮原美知子・神谷庄造・中館正弘・末吉祥子・丹野雅幸・宮原 誠	163
国立衛生試験所アスコルビン酸標準品 (Control 811)	徳永裕司・木村俊夫・川村次良	166
国立衛生試験所塩酸チアミン標準品 (Control 811)	太田美矢子・木村俊夫・川村次良	167
国立衛生試験所ルチン標準品 (Control 731)	太田美矢子・木村俊夫・川村次良	168
国立衛生試験所リン酸ヒスタミン標準品 (Control 761)	木村俊夫・太田美矢子・川村次良	170
国立衛生試験所リボフラビン標準品 (Control 811)	徳永裕司・木村俊夫・川村次良	172
国立衛生試験所リゾチーム標準品の安定性	谷本 剛・福田秀男・木村俊夫・川村次良	173
国立衛生試験所リゾチーム標準品 (Control 811)	谷本 剛・福田秀男・木村俊夫・川村次良	175
国立衛生試験所葉酸標準品 (Control 741)	太田美矢子・木村俊夫・川村次良	177
国立衛生試験所フルオシノロンアセトニド標準品 (Control 801)	太田美矢子・木村俊夫・川村次良	179
国立衛生試験所ニコチン酸標準品 (Control 811)	太田美矢子・木村俊夫・川村次良	182
国立衛生試験所塩酸ピリドキシン標準品 (Control 801)	徳永裕司・木村俊夫・川村次良	184
市販輸入柑橘類中の臭素の定量	鈴木 隆・武田明治・内山 充	185
市販焼肉のタレ中の鉛、カドミウム、銅のバックグラウンド調査結果について	鈴木 隆・武田明治・内山 充	186
市販ドレッシング中のスズ、ヒ素、及び鉛のバックグラウンド調査結果について	鈴木 隆・武田明治・内山 充	188
食品中の残留農薬分析に関する研究 (第37報) コンピュータ付きガスクロマトグラフィー・ マススペクトロメトリーによる 2,4,5-TP [2-(2,4,5-trichlorophenoxy) propionic acid] の測定法	関田 寛・武田明治・斎藤行生・内山 充	190
食品中の残留農薬分析に関する研究 (第38報) 輸入農産物中のフェノキシ系除草剤の残留実態 調査 (昭和55年度)	関田 寛・佐々木久美子・河村葉子・武田明治・内山 充	193
食品中の三二酸化鉄の定量について	神蔵美枝子・平田正子	195
発がん性実験に使用するトリエタノールアミンの安定性及び純度試験	石綿 肇・金子久美・加藤三郎・谷村顕雄	198
輸入食肉由来サルモネラの抗生物質感受性について (その4) 昭和54年~55年度分離株について	河西 勉・鈴木 昭・小沼博隆	200
動物実験におけるデータ処理法について	鈴木幸子・斎藤 実・中路幸男・戸部満寿夫	204
ジュズダマ属 (Genus Coix) 生薬の研究 (第1報) 輸入「ハトムギ」の栽培特性について	佐竹元吉・飯田 修・宮崎幸男	212
以下の報告は衛生試験所報告第100号分冊に収録		
業務報告		S 1
特別研究報告		S 33
誌上発表		S 61
学会発表		S 94
衛試験例		S 103
昭和56年度に行った主な研究課題		S 108
国家検定及び検査等の処理状況		S 111
国立衛生試験所標準品		S 120

CONTENTS

Review

A. EJIMA: Bioequivalence of Solid Drug Preparation	1
S. KANO: Pyrogen test and Limulus test—On the relationship between the two tests—	20

Originals

K. TAKAHASHI, M. SHIMAMINE, M. ONO, Y. KAWASAKI, K. SEKITA and T. FURUYA: Microanalysis of Amphetamines. I	35
H. TOKUNAGA, T. KIMURA and J. KAWAMURA: Studies of Stability for <i>dl</i> -Norepinephrine in Solution	40
R. TESHIMA, H. IKEBUHI and T. TERAOKA: Effects of Ethylemethiourea on the Functions of Mouse Lymphocytes	44
K. TSUJI, H. SHINTANI, S. MIZUMACHI, H. KIKUCHI, H. KURISU, K. YANAGIMACHI, H. KURATA and T. OBA: Radio-sterilization of Medical Products. VIII Studies on Chemical and Physical Properties of PHEMA-Coated Charcoal Irradiated by γ Ray of ^{60}Co , and on the Sterilization Efficiency	48
T. SUZUKI, M. TAKEDA and M. UCHIYAMA: Investigation on the Analysis of Arsenic and Antimony for Establishing Refreshing Drinks Standards	53
M. MIHARA, H. OGIHARA, T. KONDO and M. UCHIYAMA: Lipid Peroxidation and Related Changes in Rats by Oral Administration of Hexachlorobenzene (HCB)	58
T. TATSUNO, T. INOUE, T. YAMADA and A. TANIMURA: Hygienic Studies on Rubber Nipples (I) Secondary Amines in Commercial Rubber Nipples and Formation of Nitrosamines	62
T. TATSUNO, T. INOUE, T. YAMADA and A. TANIMURA: Hygienic Studies on Rubber Nipples (II) Estimation of Nitrosamine Intake by a Baby by Sucking	68
N. HAYASHI, H. KODAKA, Y. TERAOKA, M. USHIJIMA, A. TANIMURA and H. KURATA: <i>In Vitro</i> Formation of Nitrosodimethylamine in the Brain Heart Infusion Containing Gastric Juice and Its Sediment of the Monkey under the Different pH of the Medium	72
S. NAMBARA and T. YAMAHARA: Application of Isotachopheresis Technique in the Metabolic Study of Food Additives; Separation and Determination of Hydroxybiphenyl Conjugates	77
T. OCHIAI, T. FURUYA, K. SEKITA, O. UCHIDA, K. NAITO, K. KAWAMATA, S. HORIUCHI, M. TOBE and Y. IKEDA: Induction of Forestomach Tumors in Mice Fed Furylfuramide, 2-(2-Furyl)- 3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (AF-2)	80
J. MOMMA, K. TAKADA, Y. AIDA, K. KAWAMATA, H. YOSHIMOTO, Y. SUZUKI and M. TOBE: Effect of Oral Administration of Bis(2,3-dibromopropyl)Phosphate to Pregnant Rats on Prenatal and Postnatal Developments	85
Y. OHNO, H. ONODERA, N. TAKAMURA, T. IMAZAWA, A. MAEKADA and Y. KUROKAWA: Carcinogenicity Testing of Potassium Bromate in F-344 Rats	93
K. NAGANO, Y. MIYAKAWA, M. TAKAHASHI, F. FURUKAWA, T. KOKUBO and Y. HAYASHI: Comparative Studies on Anatomical and Histological Structures of Nasal Cavity in Rodents	101
K. YOSHIKAWA, T. NOHMI, R. MIYATA and M. ISHIDATE, Jr.: Bacterial Mutagenicity Tests on Irradiated Foods (Fish-Meat Cake, Wiener and Orange Juice)	110
H. KAWASAKI and S. KANO: Studies on The Relationship between Pyrogen Test and Limulus Test III. Effect of Heat Treatment on The Limulus Gelation Activity of LPS in Glucose Solutions ...	120
T. ITAMI and S. KANO: Determination of ATP in tissue sample by firefly <i>Inciferase</i> Iuminescence	124
M. EMA, T. ITAMI and S. KANO: Effects of Continuous Administration of Endotoxin by Osmotic	

Minipump on Pregnant Dams and Their Offspring in Rats and Rabbits.....	128
--	-----

Notes

M. MIYAHARA: Structure Chemistry of 1-Phenylazo-2-naphthols-A ¹³ C-Nuclear Magnetic Resonance Study	135
T. SHIBAZAKI, M. SENOO and A. EJIMA: Automated Content Uniformity Test of Warfarin Potassium Tablets	138
T. TANIMOTO, H. FUKUDA and J. KAWAMURA: Studies on the Quality of Enzyme Preparations (III) Pharmaceutical Studies on Commercially Available Bromelain Preparation	141
T. SUZUKI, M. TAKEDA and M. UCHIYAMA: Determination of Heavy Metals in Nipple.....	145
S. KATO: Effect of pH of Mobile Phase on the Retention Times of Preservatives, Saccharin and Their Related Substances in Reversed-phase High Performance Liquid Chromatography	147
H. KURATA, H. KURISU, K. YANAGIMACHI, G. KOIDE, Y. ASAMI and Y. TOKAIRIN: Studies on the Bacteriological Examination Methods of Hot Spring Water	149
T. TSUCHIYA and T. YAMAHA: Spectrophotometric Determination on Cyclohexanone by the Use of 2,4-Dinitrophenylhydrazine	159

Technical Data

M. MIYAHARA, S. KAMIYA, M. NAKADATE, S. SUEYOSHI, M. TANNO and M. MIYAHARA: Antitumor Effect of Compounds Synthesized in the Division of Synthetic Chemistry (VI)	163
H. TOKUNAGA, T. KIMURA and J. KAWAMURA: Ascorbic Acid Reference Standard (Control 811) of National Institute of Hygienic Sciences	166
M. OHTA, T. KIMURA and J. KAWAMURA: Thiamine Hydrochloride Reference Standard (Control 811) of National Institute of Hygienic Sciences.....	167
M. OHTA, T. KIMURA and J. KAWAMURA: Rutin Reference Standard (Control 731) of National Institute of Hygienic Sciences	168
T. KIMURA, M. OHTA and J. KAWAMURA: Histamine Phosphate Reference Standard (Control 761) of National Institute of Hygienic Sciences	170
H. TOKUNAGA, T. KIMURA and J. KAWAMURA: Riboflavin Reference Standard (Control 811) of National Institute of Hygienic Sciences	172
T. TANIMOTO, H. FUKUDA, T. KIMURA and J. KAWAMURA: Stability of the Lysozyme Reference Standard of National Institute of Hygienic Sciences.....	173
T. TANIMOTO, H. FUKUDA, T. KIMURA and J. KAWAMURA: Lysozyme Reference Standard (Control 811) of National Institute of Hygienic Sciences	175
M. OHTA, T. KIMURA and J. KAWAMURA: Folic Acid Reference Standard (Control 741) of National Institute of Hygienic Sciences	177
M. OHTA, T. KIMURA and J. KAWAMURA: Fluocinolone Acetonide Reference Standard (Control 801) of National Institute of Hygienic Sciences	179
M. OHTA, T. KIMURA and J. KAWAMURA: Nicotinic Acid Reference Standard (Control 811) of National Institute of Hygienic Sciences	182
H. TOKUNAGA, T. KIMURA and J. KAWAMURA: Pyridoxine Hydrochloride Reference Standard (Control 801) of National Institute of Hygienic Sciences.....	184
T. SUZUKI, M. TAKEDA and M. UCHIYAMA: Investigation on the Content of Bromine in Commercially Available Citrus Fruits	185
T. SUZUKI, M. TAKEDA and M. UCHIYAMA: Investigation on the Content of Lead, Cadmium and Copper in the Commercially Available Sauces for the Baked Meat	186
T. SUZUKI, M. TAKEDA and M. UCHIYAMA: Investigation on the Content of Tin, Arsenic and Lead	

in Commercially Available Dressings	188
H. SEKITA, M. TAKEDA, Y. SAITO and M. UCHIYAMA: Studies on Analysis of Pesticide Residues in Foods (XXXVII) Measurement of 2,4,5-TP [2-(2,4,5-Trichlorophenoxy) propionic Acid] by Gas Chromatography-Mass Spectrometry with Computer.....	190
H. SEKITA, K. SASAKI, Y. KAWAMURA, M. TAKEDA and M. UCHIYAMA: Studies on Analysis of Pesticide Residues in Foods (XXXVIII) Surveillance of Chlorinated Phenoxy Herbicide Residues in Imported Agricultural Crops in 1980.....	193
M. KAMIKURA and M. HIRATA: Studies on Determination of Iron Sesquioxide in Food	195
H. ISHIWATA, K. KANEKO, S. KATO and A. TANIMURA: Stability and Purity Tests of Triethanolamine used for a Carcinogenicity Test.....	198
T. KAWANISHI, A. SUZUKI and H. KONUMA: Antibiotic-Sensitivity <i>in vitro</i> of Salmonellae Isolated from Imported Meats (IV) Results of the Isolates in 1979 and 1980.....	200
S. SUZUKI, M. SAITO, Y. NAKAJI and M. TOBE: On the Data Processing in Animal Experiment.....	204
M. SATAKE, O. IIDA and Y. MIYAZAKI: Studies on the Crude Drugs of Genus <i>Coix</i> I On the Cultivating Characteristics of Imported <i>Coix</i> Fruits	212

**The following reports are collected in the separate volume of Bulletin of
National Institute of Hygienic Sciences.**

Annual Reports of Divisions	S 1
Reports of Collaborative Study	S 33
Summaries of Papers Published in Other Journals	S 61
Titles of Speeches at Scientific Meetings Semminars.....	S 94
Semminars	S 103
Main Research Projects Carried Out in 1981.....	S 108
Survey of The Results of National Tests.....	S 111
Reference Standards Prepared by National Institute of Hygienic Sciences	S 120

医薬品固形製剤の生物学的同等性について

江島 昭

Bioequivalence of Solid Drug Preparation

Akira EJIMA

医薬品の有効性及び安全性, 更に薬価にまで bioavailability が深く関連する時代になった。製剤学での関心の多くは物理化学的分野から生物学的研究へ移り, 生物薬剤学 (biopharmaceutics) が生れた。bioavailability に関する研究は, その生物薬剤学の入口に当たるものと言える。生物薬剤学は医薬品の生体への取り入れから始めてその排泄に至る迄の各部分に關与する製剤の諸性質と働きに関する学問であるからである。

生物学的同等性とは, 医薬品摂取後の吸収速度及び吸収量に関する生物学的利用性が標準的医薬品に比べて等しい時に使用されている言葉であるが, 実際にはこの生物学的利用性が等しいということを統計的に示すことは非常に難しい。生物学的同等性を示す必要性は, 勿論, 医薬品の有効性と安全性についての治療上の保証, これをもっと感覚的に言えば, 医薬品による治癒の確信又は安心を得るためのものと言うことができる。

医薬品はそもそも, 必ず効くものと信じられて来た。食品と同様, 長い歴史的な経験のもとに生れ, そして近代化学と医学の進歩によって, 人間へ大きな福音を齎した数々の光榮を担っている。所が, その使用法と適用法においては, 必ずしも人間の智慧はその物質のもつ価値に及ばず, その価値を十分發揮させ, 利用することができないままにいることもしばしばである。

医薬品は, これを体内に取り入れれば必ず効くと信じられて来た。これは取りも直さず体内に入った医薬品は, 殆んど吸収され, その医薬品のもつ神秘的な力が薬効と時には毒作用を現わすことは間違いないこととされ, 古来, 薬は宝物としてあがめられて来た。それだけに, にせ物或は粗悪品も出回った。精製が不十分であるために不純物が多く入っていると, 十分に乾燥されていないとか, 偽和物が添加されているとか, 分解が進んでいるとかなどの粗悪品もあるが, これらを除けば, 医薬品は神から与えられた宝物とさえ信じることが出来る。

しかしながら, 人間の智慧の至らざる所により, 折角の宝物が宝物でなくなっている場合も多くある。医薬品についてもこれは例外でなく, 主としてその製造法, 特に製剤化や適用法によって元来有していた有用性がなくなってしまうことがあることに注意を向け始めたのは, 約20年くらい前の最近のことであろう。崩壊試験法は, 固形製剤の消化管内吸収の1つの推定的な検査方法として1950年に米国薬局方第14版に採用され, 崩壊によって主成分の溶解が保証されるであろうと考えたことは1つの卓見であったと思われる。しかし, その前にすでに physiological availability (生理的な利用率) という言葉で bioavailability の概念は生れていた。1945年, ニューヨークの Food Research Laboratory の Oser ら^{1),2)}が, 総合ビタミン剤中のチアミン, リボフラビン, アスコルビン酸, ニコチン酸アミドなどの水溶性ビタミンのヒトの消化管からの吸収量に対して physiological availability という用語を使用している。これは主成分が医薬品製剤の中に販売会社の表示する量だけ正確に入っているだけでなく, ヒトが服用したとき, 完全に available な状態で製剤中に含有されているかどうかを問題とした最初のものといえる。この available というのは, 体内へ吸収されるという意味で, 体内へ吸収されてからの生理的な活性迄は意味していない。体内へ吸収される標準的製剤, 例えば静脈注射或は水溶液の経口摂取と比べて, これを100としたとき, 被験製剤の体内吸収率が何%であるかということの意味している。体内吸収率は血中濃度の推移又は尿中排泄量から計算される。

医薬品の公定書では固形製剤の有用性に關連した試験法として前述の崩壊試験法が用いられていたが, physiological availability と崩壊試験或は X 線透視を観察する方法との関連は, 米国の War Food Administration で実施され, その後カナダの厚生省の食品薬品研究所の Chapman, Morrisson 及び Campbell からもリボフラビン糖衣錠について崩壊試験と physio-

gical availability との関係进行研究し、60分以内に崩壊しないものは available でないとした。しかしながら、崩壊しても、主成分が消化液に溶解し、消化管を通して体内に吸収される状態となる保証はなく、又逆に崩壊に60分以上かかっても、崩壊途中に主成分が溶解すれば、60分以内に崩壊して粒子状になった後主成分が容易に溶け出さないものに比べれば physiological に available となることも考えられ、まことに錠剤などの製剤化という process が如何に吸収ということから遠くに置かれていたかを深く考えさせられるものである。このように主成分は人体にとって有用なものである。これに人工的な過程を加えることによって、利用性が低下させられていることに対して、かなり長い間、手をつけずに放置していたかという点で大いに反省させられる。しかし当然この種の誤りと逆行がなくとも不足な行為は多々あるであろう。これらについては人間の智慧と努力によって将来次々と解決されることも想像にかたくない。

経口投与による bioavailability を静脈注射乃至は100% 身体内へ吸収されるものと同等の程度迄に高める方法は、製剤学分野の専門家によって種々工夫され、その進歩も近年著しいものであることは、学界での発表、市販製剤の新しい剤形そのものを見てもよく理解できる。

以上のような開発や、製造面での積極的な研究と共に行政面での処置も特に米国で次々と行われ、米国における新薬の許可制度は日本へも大きな影響を及ぼした。薬事行政は薬害と共に大きな衝撃を受け、急速な対応がとられた。

生物学的非同等性の事例

次に米国を始めとする各国で報告された非同等性に関する事例の中から数例を挙げてみる。

(1) 1963年、米国、プレドニゾン錠³⁾：Table 1に見られるように、disk を用いた崩壊試験では、効力のあるものも無効な製剤もいずれも6分間以内に崩壊が見られるのに対し、disk を用いない方法では明らかに無効錠では崩壊が遅れる、しかし disk なしの崩壊試験で差の現れない例もあるため、溶出試験の方がより医薬品の溶解の検出に対しては安全である。この例では明らかにこの錠剤の難崩壊性が原因となってプレドニゾンの溶解を遅らせ、効果を減じている。

(2) 1968年、オーストラリア、フェニトインカプセル：フェニトインカプセル中の添加剤を $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ から乳糖に変更した所、フェニトインの吸収量が増大し、51名の中毒患者が発生した。

Table 1. Disintegration and dissolution time of clinically active and inactive prednisone tablets³⁾

	Disintegration time		Dissolution time $t_{50}\%$
	with disk	without disk	
Active	<6 min	<6 min	4.3 ± 1.3 min
Inactive	<6 min	1-2 hrs	100 ± 53 min

(3) 1968年、米国、クロラムフェニコール錠：パークディビス社以外の会社の製剤の示す血中濃度が、パークディビス社の製品の示す血中濃度より低いことが示され、製品の回収が行われた。

(4) 1969年、米国、オキシテトラサイクリンカプセル：米国での10社の製剤中7種はファイザー社の製品の約半分の血中濃度しか示さず、44万カプセルが回収された。

(5) 1970年、米国、PAS 錠：リリー社が、自社のパラミノサリチル酸錠が、製剤技術上の点から起こると考えられる吸収の不確実性のため、520万錠を回収した。

(6) 1971年、英国、ジゴキシン錠：数箇月間安定した治療を受けていた患者19人が他社のジゴキシン錠に切替え、投与されたところ15人の患者に血中濃度の上昇が見られ、このうち3人は中毒症状が発現した。前のジゴキシン錠に戻したところ、血中濃度は前のレベルに下った。更に商標名の異なる製剤を4人の健康人に投与して、その血中濃度を測定したところ、4人の最高血中濃度に4～7倍の差が見られ、また同一商標の製品でも、ロットの違いにより5倍の差が見られた。

(7) 1973年、日本、クロラムフェニコール錠：15製剤中2製剤に血中濃度及び吸収量の低いことが発見された⁴⁾。

(8) 1977年、日本、エリスロマイシン腸溶錠：16製剤中2製剤に非同等性が発見された⁵⁾。

Bioavailability 及び生物学的同等性に影響を及ぼす要因

以上のような生物学的非同等性を生じる原因としては、主として製剤上の事柄が多いが、服用する生体側の生理的な要因もある。今迄に挙げられている各要因を Table 2 及び Table 3 に示した。

bioavailability に影響を及ぼす要因は各種のものがあ、これはとりもなおさず bioequivalence を評価することが如何に単純には実行できないかを示している。またこれらの要因に影響を受ける医薬品が多く存在する可能性もうなずける。生物学的同等性を評価す

Table 2. Primary factor derived from dosage form

Physicochemical Property
Water Solubility, Fat Solubility, pKa, Stability
Property of Preparations
Disintegration Time, Dissolution Time (Surface Area, Polymorphism of Crystal, Solvent Solvation, Salts, Excipients)
Manufacturing Process of Preparations
Granulation, Property of Granules, Lubricants, Compressing Pressure, Coating

Table 3. Principal factor caused by physiological condition

Gastrointestinal Secretion
pH, Digestive Juice, Bile
Migration of Gastrointestinal Contents
Gastric Excretion Time, Effect of Food, Peristalsis, Posture (Clinostatic etc.)
Absorption Site
Specificity of Site, Permeability at Gastrointestinal Tract, Metabolism at G-I Tract
Gastrointestinal Peripheral Blood Flow
First Pass Effect

る方法は bioavailability の測定法とその結果の評価法からなっている。

bioavailability 測定における実験動物

bioavailability の測定は原則的にはヒトで実施されるべきであるが、これには困難が伴う。薬理試験は主として動物で実施され、これからヒトでの作用を推論する。bioavailability の測定を動物で実施して、その結果をヒトにあてはめて同等性を評価することができれば大変便利であるが、予め、ヒトと動物との相関性を求めておかねばならない。更に *in vitro* の方法が開発されることが望ましい。しかしこの場合もヒトとの相関性が求められていることが前提となる。

動物に対する評価は端的にいえば、ヒトを使用しなくてよいという利点がある一方、生理と感情が全くヒトに類似している動物が得られないという欠点がある。動物に対する評価は現在のところ、イヌについては、その飼育と実験のし易さについてはいう迄もないが、実験については体格が比較的大きいこと、従順であることなどがあげられる。大きな欠点は肉食動物であるため、ヒトに比べて消化管内容物の通過が早いことである。兎は、イヌよりも小さいが一回以上の実験に使

用できる。最も大きな欠点として胃及び腸内容物滞留時間が長くかつその時間の個体差が大きいことである。最近これを克服した兎による bioavailability 測定法が開発された^{6),7)}。

兎又はそれより小さい動物では含量の多い製剤の場合、1個投与でも吸収部位において飽和以上の量が存在し、血中濃度が投与量に比例しなくなる可能性が出てくる。勿論大動物又はヒトでも用量と吸収量との比例性は予め確かめておかねばならない。

ブタは単胃、雑食性で、肝、腎、循環器などがヒトに近い特性を有するといわれている。ゲッテンゲン大学で小形化へ改良育種されたミニブタGは成長時(約2年)で体重約50kgで、体脂肪が少なく、体重あたりの臓器重量が普通の豚にくらべて大きく、米国等でも bioavailability 実験への導入について検討されていたようである。日本での検討はまだ少ないが⁸⁾、ヒトに比べて最高血中濃度到達時間(T_{max})が長く、胃内容排泄が遅いと考えられる。このため吸収初期での相関性はよくない。また吸収量(AUC)では製剤間の差がヒトに比べて小さくあらわれる傾向にあり、腸管が長く、吸収部位が広範囲であることが示唆される。

in vitro 法は現在 bioavailability の範囲が吸収の速度と量迄に限っていることを前提とすれば、先ず消化管内で医薬品が溶解していることが必須であることから、物質の溶解速度と量をみる溶出試験は非常に的を得ているといえることができる。ただし生体が有する多数の因子をカバーできないことが大きな欠点であるが、動物との比較において総合的に評価すれば優るとも劣らないといえる。

bioavailability 試験の対象医薬品

対象医薬品は Table 2 及び 3 に示した各要因から影響を受ける医薬品ということになるが、これを対象医薬品の側から大別すると、(1)医薬品の原薬そのものに個有な因子、(2)製剤法又は製造方法に由来する因子、(3)服用者側の生理的要因及び(4)(1)、(2)及び(3)が関連しているものということになる。(1)についていえば、そのものの溶解度と生体膜通過性に関係する。水溶性であっても、油/水間の分配比が小さいものでは受動輸送が小さくなる。(2)は、最初に述べたように原薬そのものが効力の大きな物質であっても、消化管内での放出性の低下や分解を引起す可能性をもっており、非同等性の大きな原因となるものである。前述の非同等の事例に見られるような今迄に起った有効性と安全性に与えた影響の例の中で最も多い事例はこの要因に由来するものが殆んどである。

Table 4. 米国 FDA によって *in vivo* bioavailability の試験資料を要求されることがある薬剤⁹⁾

抗不整脈薬製剤	• Sulfadiazine Na bicarbonate susp.	強心薬製剤
• Procainamide HCL caps	• Sulfadiazine, sulfamethazine, & sulfamerazine (triple sulfa) (& susp.)	• Acetyldigitoxin
• Quinidine polygalacturonate	• Sulfadiazine	副腎皮質ホルモン製剤
抗凝固薬製剤	• Sulfadimethoxine (& drops & susp.)	• Betamethasone
• Bishydroxycoumarin (& caps)	• Sulfamerazine	• Cortisone acetate
• Warfarin, sodium & potassium	• Sulfamethoxypyridazine acetyl (& susp.)	• Dexamethasone
抗てんかん薬製剤	• Sulfaphenazole susp.	• Fluorocortisone acetate
• Ethosuximide caps	• Sulfapyridine	• Fluprenisolone
• Ethotoin	• Sulfisomidine	• Hydrocortisone acetate (& powder)
• Mephentoin caps	• Sulfisoxazole acetyl susp.	• Hydrocortisone
• Methsuximide	• Sulfisoxazole	• Methylprednisolone
• Paramethadione caps		• Paramethasone acetate
• Phenacemide	抗マラリヤ薬製剤	• Prednisolone
• Phensuximide caps & susp.	• Pyrimethamine	• Prednisone
• Phenytoin susp.		• Triamcinolone
• Primidone (& susp.)	抗腫瘍薬製剤	卵胞ホルモン製剤
• Trimethadione caps	• Chlorambucil	• Dienestrol
降圧利尿薬製剤	• Methotrexate	• Diethylstilbestrol diphosphate
• Alseroxylon	• Triethylene melamine	• Diethylstilbestrol
• Bendroflumethiazide	• Uracil mustard caps	• Ethinyl estradiol
• Benzthiazide	抗甲状腺薬製剤	血糖降下薬製剤
• Chlorothiazide	• Propylthiouracil	• Tolbutamide
• Deserpidine		甲状腺補給薬製剤
• Hydrochlorothiazide	抗結核薬製剤	• Liothyronine Na
• Hydroflumethiazide	• Aminosalicic acid & isoniazide	精神神経薬製剤
• Methyclothiazide	• Aminosalicic acid (& powder & resin)	• Chlordiazepoxide HCl caps
• Polythiazide	• Aminosalicic Ca (& granules & caps)	• Chlorpromazine
• Quinethazone	• Aminosalicic K (& caps & granules)	• Fluphenazine HCl
• Rauwolfia serpentina	• Aminosalicic Na (& powder & granules)	• Perphenazine
• Rescinnamine	• Benzoylpas Ca (& powder)	• Prochlorperazine
• Reserpine	• Para-aminosalicylate Na & isoniazid	• Promazine
• Trichlormethiazide	• Phenylaminosalicylate (& powder)	• Promethazine
複合降圧利尿薬製剤	気管支拡張薬製剤	• Thioridazine
• Chlorothiazide & reserpine	• Aminophylline	• Trifluoperazine
• Hydralazine & reserpine	• Dyphylline	• Triflupromazine
• Hydralazine HCl & hydrochlorothiazide	• Oxtriphylline	• Trimeprazine
• Hydrochlorothiazide & deserpidine	• Theophylline Na glycinate	ビタミンK製剤
• Hydrochlorothiazide & reserpine	炭酸脱水酵素阻害薬製剤	• Menadione
• Hydroflumethiazide & derpidine	• Acetazolamide	• Phytonadione
• Methyclothiazide & deserpidine	• Dichlorphenamide	
• Reserpine, hydralazine HCl & hydrochlorothiazide	• Ethoxzolamide	その他
• Spironolactone & hydrochloromethiazide	• Metazolamide	• Imipramine HCl
• Trichloromethiazide & reserpine		• Isoproterenol sublingual tablets
抗感染薬製剤		• Methyltestosterone
• Nitrofurantoin (& susp.)		• Probenecid
• Salicylazosulfapyridine		• Sodium sulfoxone

すべての剤形は特に記載のないかぎり錠剤を示す。錠剤以外の剤形が含まれる場合には括弧内の&に続く剤形名で示す。(例: caps=capsules susp.=suspension) (鈴木徳治: 薬物の Bioavailability, 薬業時報社より)

Table 5. §320.52 生物学的同等性の資料を要求する基準⁹⁾

FDA 長官は、証拠となる報告の裏付けがある場合、生物学的に同等でない、あるいはその可能性のある「製剤学的に同等な薬剤」および「製剤学的に相互に交換できる薬剤」を確認するため、また、これらの薬剤に対する「生物学的同等性の資料の要求」の規制案を提案し公示するため、次に挙げる事柄を判断の基準とする。

- [a] 精密かつ客観的な臨床試験や対照群をおいた患者での観察から、同等な治療効果が認められないという証拠。
- [b] 確実な生物学的同等性の試験から、生物学的に同等と判断できないという証拠。
- [c] 薬剤の治療係数 (therapeutic ratio) が低いこと (例えば、致死用量の中央値 (LD_{50}) が有効用量の中央値 (ED_{50}) の 2 倍以下の差であるか、あるいは中毒が発現する最小血中濃度が最小有効血中濃度の 2 倍以下の差に相当し、その薬剤を安全にしかも有効に使うためには、患者の容態を監視しながら注意深くその用量を調節しなければならない薬剤) を示す証拠。
- [d] 重篤な病気、症状の治療や予防に使われる薬剤で、その生物学同等性の欠陥が深刻な事態をひき起こすことがあるという医学的判断。
- [e] 薬剤の物理化学的性質が次に挙げる場合に相当する証拠。
 - (1) 水に対する薬効成分の溶解度が低い。例えば、5 mg/ml 以下あるいは、その薬剤の消化管吸収に胃中の溶解性が重要な因子となる場合には、1 回の用量を溶かす胃液の体積が、実際に胃中に存在する液体量 (成人においては 100 ml、幼児・小児ではそれ相応に少なく考える) に比べかなり多い。
 - (2) 薬剤の溶出速度が遅い。例えば、公定書で指定されている一般的な方法かパドル法 (paddle method, 水かきの付いた攪拌棒を備えた溶出試験器) を用いて測定した場合 (30°C で 900 ml の蒸留水か脱塩した水の中で 50 回転/分の条件)、30 分間に 50% 以下であるか、あるいは NDA で承認された同一の薬剤と比べて、溶出速度が有意に遅い。
 - (3) 薬効成分の粒子および/あるいは表面積が、その薬剤の bioavailability に顕著な影響を与える。
 - (4) 結晶多形、溶媒和化合物、およびコンプレックス (複合体) など薬効成分と、物理的構造が異なるある物質の溶解性が劣り、この性質のため、その物質の消化管吸収が影響を受けることがある。
 - (5) 製剤中の添加剤と薬効成分の重量比が、5:1 より大きい。
 - (6) 処方中の薬理活性を持たない成分 (親水性あるいは疎水性の添加剤や滑沢剤) が、薬効成分、治療有効成分あるいはそのどちらかの吸収に必要であったり、逆にそれらが存在すると吸収が阻害されることがある。
- [f] 薬剤の薬物速度論 (pharmacokinetics) の上の性質が次に挙げる場合に相当する証拠。
 - (1) 薬効成分、治療有効成分、あるいはその前駆物質 precursor が、消化管の特定の部位や限局された部分から大部分吸収される。
 - (2) 薬効成分、治療有効成分、あるいはその前駆物質 precursor の吸収量が少ない。例えば、その薬物を水溶液で投与しても、静脈注射で投与したときに比べると 50% 以下の吸収量である。
 - (3) 治療有効成分が消化管壁や肝臓を通過する吸収過程で速やかに代謝を受け (first-pass metabolism, 初回通過による代謝)、薬剤の治療効果および/あるいは毒性が、吸収量によることは勿論のこと、吸収速度によって影響を受ける。
 - (4) 治療有効成分が、体内で速やかに代謝を受け、また排泄されるので、治療効果を発揮するためには、薬剤の速やかな溶出と吸収が必要である。
 - (5) 薬効成分あるいは治療有効成分が、消化管の特定の部分で不安定なため、確実な消化管吸収を保証する目的で、特殊な処方や剤皮 (緩衝剤、腸溶剤皮、フィルムコーティングなど) を必要とする。
 - (6) 対象となる薬剤が治療に使われる用量範囲で、非線形な速度過程 (用量に依存する速度過程, dose dependent kinetics) を示し、吸収量や吸収速度が薬剤の生物学的同等性に対しとりわけ重要となる。

Table 6. §320.53 生物学的同等性の資料の内容⁹⁾

- [a] 「生物学的同等性の資料の要求」に対するデータは、FDA によって指定された、次に挙げる1つあるいは2つ以上の資料である。
- (1) ヒトにおける *in vivo* (生体を用いた) 試験。
 - (2) ヒトにおける成績と相関があるとされている、動物における *in vivo* 試験。
 - (3) ヒトにおける成績と相関が認められていない、動物における *in vivo* 試験。
 - (4) *In vitro* (試験管内) の生物学的同等性の規格 (biocquivalence standard)、この規格はヒトにおける bioavailability のデータと相関が認められる *in vitro* の試験である。
 - (5) ヒトにおける bioavailability のデータと相関が認められない現行の *in vitro* 試験 (通常、溶出試験を意味する)。
- [b] 通常、ヒトにおける *in vivo* 試験は、「製剤学的に同等な薬剤」あるいは同じ治療効果に対し相互に交換して使用できる「製剤学的に相互に交換できる薬剤」に、次に示す条件の1つに該当する確実な報告があれば、要求される。
- (1) これらの薬剤が、同等な治療効果を示さない。
 - (2) これらの薬剤が、生物学的に同等な薬剤ではない。
 - (3) これらの薬剤の治療係数 (therapeutic ratio) が低い。例えば、LD₅₀ が ED₅₀ の2倍以下である、あるいは最小中毒発現血中濃度が最小有効血中濃度の2倍以下の差である場合に相当し、その薬剤を安全にしかも有効に使うため、患者の容態を監視しながら注意深く用量を調節しなければならない薬剤。

(鈴木徳治：薬物の Bioavailability, 薬業時報社より)

錠剤やカプセル剤或は散剤などは、医薬品の摂取方法を簡便にした有用な方便であるが、これらの製剤化に使用された製剤用添加物と製造方法は必ずしも原薬の有用性を保証して来たとはいえない。しかしこれらの製剤によってもたらされた利益と便利性の大きさを考えると、これらの製剤に化学的な品質の保証が賦与されるだけでなく bioavailability の保証も完全であることが是非望まれる。(3)は最も解決され難い要因である。個体差を如何に克服するかは、製剤の有用性を高める上での今後の大きなテーマの一つである。適切な用法・用量が平均的なヒトの群に対するだけでなく、幅広く設定されるためにも生理的要因についての解明は是非必要となる。胃液酸度という因子が如何に bioavailability を変化させているか、それによって生物学的同等性の判断を誤らせるかについては後述したい。また胃内容排泄速度、食事、初回通過効果等から受ける変動も大きい。これらは今後の研究成果に大いに期待されるところである。(4)の(1)、(2)及び(3)の組み合わせた例は実際に起る例であり、原薬主成分の化学的・物理化学的性質、製剤上の問題及び服用者側の条件を総合的に判断し解決して行かねばならない。

Table 4 は米国 FDA が示した bioavailability の試験が要求されることがある薬剤のリストである。これを見ると過去に問題となった医薬品又はその製剤は除外されており、その他の主として原薬に問題の起った又は起り易いと考えられる例えば結晶多形のあるものあるいは治療上の観点 (作用及び毒性が強く用法・用量の指定が難しいもの) から選ばれており、製剤的な

特徴は薄いように思われる。このリストに掲載されていない医薬品の製剤は問題としなくてもよいと断言している訳ではないが、前述のように生物学的同等性で問題の起こった原因の多くは製剤化と製造方法にあったことから考えると、米国ではこの点に関しては、かなりメーカーの技術の改善が行き渡っていると判断されていることと、*in vitro* 法でのチェックにかなりの信頼を置くことができるという自信が持てるようになったからであろう。一方 USP では現在、市販の固形製剤のすべての試験規格の中に溶出試験を加える作業を積極的に進めているが、これは物理化学的品質の均一性に重点を置いたもので、bioavailability との直接の相関性を見るためのものではないと思われる。

FDA が Table 4 に掲載した薬剤を同等性試験の候補に上げた根拠は、Federal Register¹⁰⁾ にある生物学的同等性の資料を要求する基準の中からくみ取ることができ、この文章は生物学的同等性に影響を及ぼす各因子とその複雑性について知ることができるので Table 5 として引用した。

また、米国 FDA による生物学的同等性の資料の内容は、同じく Federal Register¹⁰⁾ に Table 6 で示したように記載されている。

米国 FDA の行政対応

前節に掲げた Table 5 及び Table 6 に見られるように FDA は1977年から bioavailability 及び生物学的同等性に関する規則¹⁰⁾を公表し、用語の定義、bioavailability データの要求権限、測定法に関する基

Table 7. 医薬品の製造（輸入）承認申請における資料の提出について（昭和46年6月29日付，薬発第589号）

製品の吸収，分布，代謝および排泄等に関する資料（医療用医薬品に限る。）

- (1) 吸収（組織内または血中移行）されることによって効果を期待する製品にあっては，血中濃度の時間的推移を示す比較試験成績（既承認の同種製品を対照薬とすること，以下同じ。）に関する資料。ただし，尿中排泄量から血中濃度の時間的推移を推定できる場合は，尿中排泄量の比較試験成績に関する資料をもってこれにかえることができ，また，適切な溶出試験による結果と臨床効果との間に相関関係があることが文献により明らかな場合は，その溶出試験についての比較試験成績に関する資料をもってこれにかえることができる。
- (2) その他の製品にあっては，効力を裏づける薬理作用についての比較試験成績に関する資料。
- (3) (1)または(2)の試験が技術的に実施できないことが明らかな製品にあっては，(1)または(2)にかかわらず，主要効能について有効性を証明するに足る精密かつ客観的な臨床試験成績に関する資料。

本的な内容，試験法のデザイン，実施方法，評価法などについて発表すると同時に生物学的同等性データの要求権限及び目的等についても規定し，この方針に基づいて Table 4 に掲げた医薬品製剤の中から順次個別に生物学的同等性の規準の発表とデータの要求を行っている。例えば

1977年 抗けいれん薬：フェニトイン，フェニトインナトリウム，エトトイン，メフェニトイン，エトサクシミド，メトサクシミド，フェンサクシミド，フェナセミド，プリミドン，パラメタジオン，トリメタジオン

1978年 三環系抗うつ薬：塩酸イミプラミン，塩酸デシプラミン，塩酸アミトリプチリン，塩酸ノルトリプチリン，塩酸ドキシピン

1980年 炭酸脱水酵素阻害薬：アセタゾラミド，ジクロルフェナミド，エトキシゾラミド，メタゾラミド；ビタミンK形血液凝固薬：メナジオン，メナジオールナトリウム二リン酸，フィトナジオン；痛風治療薬：プロベネシド；スルファミン系化合物：ダブソン，スルフォクソンナトリウム；フェノチアジン系化合物：マレイン酸アセトフェナジン，マレイン酸ブタペラジン，マレイン酸カルフェナジン，クロルプロマジン，塩酸クロルプロマジン，塩酸フルフェナジン，ベシル酸メソリダジン，パーフェナジン，ピペラセタジン，プロクロルペラジン，マレイン酸プロクロルペラジン，塩酸プロマジン，塩酸プロメタジン，チオリダジン，塩酸チオリダジン，塩酸トリフロペラジン，トリフルプロマジン，塩酸トリフロプロマジン，酒石酸トリメブラジン

などである。

これらの薬剤に対して，溶出試験では，標準製剤と比べて30分以内に60%以上，60分以内に85%以上の溶出を規定し，ヒトでの同等性試験では，標準製剤と比

べて(1)被験者の平均値が標準製剤の80%以上の bioavailability を示すか(2)被験者の75%以上が標準製剤の75%以上の bioavailability を示すとき，生物学的に同等性であると規定している（75/75 rule, Table 17）。

日本での行政対応

医薬品の副作用による被害の発生に伴い，厚生省は医薬品の安全性と有効性の見直しを行うこととし，医薬品の承認に関しても基本方針を昭和42年に発表した。これに基づいて承認申請書に添付すべき資料も大幅に増加した。

吸収，分布，代謝及び排泄に関する資料については，後発医療用医薬品は，1971年に昭和46年6月29日付薬発第589号に示されたように（Table 7），原則として既承認の同種製品を対照として血中濃度の推移又は尿中排泄あるいは臨床効果と相関性のある適切な溶出試験の資料を提出しなければならないこととなった。この通知は後発医療用医薬品の承認に対して生物学的同等性のデータを要求したものであり，その行政対応の的確さは評価すべきものとする。この試験では，対象とする動物種は特に指定しておらず，当時兎以上の大動物10匹以上で実施されるのが普通であったが，この時既に動物での吸収がはたしてヒトと相関しているかについての研究の，また溶出試験の適用を拡大することについての必要性が痛感されていた。このため1976年に厚生省薬務局審査課（当時山田幸孝課長）は，より科学的であってかつ簡易な生物学的同等性判定基準作成のための準備検討を行い，翌1977年に研究班を組織して，これらの解決に向けて研究を進めることとなった。

研究の骨子は，ヒトとビーグル犬及びヒトと溶出試験との相関性を見ることにあり，これによって生物学的同等性判定へのビーグル犬の有用性及び溶出試験法

Table 8. 生物学的同等性に関する試験基準(昭和55年5月30日, 薬審第718号)

I 目 的

新医薬品として承認を与えられた医薬品(又はそれに準ずる医薬品)と生物学的に同等であることを証明するために実施する。

II 試験方法

1 吸収されることによって効果を期待する医薬品にあつては、次によること。ただし原則として静脈内注射のみを投与経路とする医薬品は除外する。

(1) 対 象: 原則として健康人

(2) 例 数: 適切な統計的処理が可能となる例数

(3) 検 体: 最終製品

(4) 投 与 量: 臨床常用量

(5) 投与方法: 臨床投与経路による一回投与を原則とする。

(6) 比較方法: 適切な休業期間をおいた交叉試験(cross over)法

(7) 比較項目: 血中濃度(AUC, T_{max} , C_{max} 等)

(注) 1 尿中排泄量から血中濃度の時間的推移が推定できる場合、又は、適切な溶出試験による臨床効果との間に相関関係があることが文献等により明らかな場合等にあつては、当該比較試験によることができる。

2 健康人を対象とすることが適当でないと考えられる医薬品にあつては、動物を対象とする等適切な試験を行うこと。

2 その他の医薬品にあつては、効力を裏付ける薬理作用についての比較試験によること。

3 1又は2の試験が技術的に実施できないことが明らかな医薬品にあつては、1又は2にかかわらず、主要効能についての精密かつ客観的な臨床試験によること。

の適応性を可能なかぎり一般化することを目標とした。

研究班で最初に問題となったことの一つは、同等性の評価のための各医薬品製剤の有する bioavailability の因子は、各成分及び各製剤毎に異なるため到底一般的に通用する判定法は作成できないであろうということであった。しかし動物又は溶出試験のヒト代替性についての確たる説明を持たないまま、それらを採用していれば、後へ問題を残すこととなり、また逆に相関性が不明であるからといって永久にヒトを対象としていなければならないとすることも大きな問題である。このため医薬品成分の化学的及び物理化学的性質、製剤処方及び製造方法の大きな分類によって現われる結果を大きく整理することが可能かどうかを試みることを念頭に置いて先述の目標に進むこととなった。

品目は主として文献、溶解性、pKa、剤形上の特徴、分析法、半減期、安全性、市販銘柄数などを考慮して選び、ヒトと *in vitro* 法の試験は国立衛生試験所で行い、イヌについては研究班参加の各製薬会社10社が1品目ずつ担当した。

その後1979年に薬事法の改正が行われたのに伴い、後発医療用医薬品の承認事項に関する整備の一環として生物学的同等性資料の要求と試験基準を示すこととなり、翌1980年に昭和55年5月30日付薬発第698号として医療用後発医薬品及び剤型追加に係る医薬品の承

認申請に対し、生物学的同等性試験の資料の要求がなされ、同日付の薬審第718号中に試験基準が示された。この試験基準は、Table 8に見られるように、原則として健康人を対象とし、適切な統計的処理が可能な例数を用い、検体は最終製品を選びその臨床常用量を臨床投与経路により、1回投与を行うこととなっている。また比較方法は交叉試験により先発医薬品と、血中濃度の推移を測定し、医薬品の吸収速度を現す C_{max} , T_{max} 及び吸収量を現す AUC の値を比較する内容からなっている。

この基準は、生物学的同等性試験の既略を示したもので、実施にあたっては更に詳細な説明が必要とされる。また当初の目的であった溶出試験又はビーグル犬のヒト代替性についての結論を出す必要もあることから、更に研究班での研究が続行され、Table 9に示すように昭和57年5月31日付で薬審第452号において内服固形製剤(徐放性製剤を除く)についての一部変更の承認申請に際し、申請時既に臨床試験又はヒトを対象とした生物学的利用性が確認されている品目においては、一部溶出試験に代えても差し支えないこととなった。溶出試験で代替できる条件は、作用緩やかな成分のみを有効成分とする品目または製剤用添加物の指定された変更の範囲内にある場合とされている。

Table 9. 承認事項一部変更承認申請に係る生物学的同等性に関する試験（昭和57年5月31日付，薬審第452号）

次の1又は2のいずれかの条件を満たす場合は健康人を対象とした試験を別紙基準による溶出試験に代えて差し支えない。溶出試験の結果，別紙基準に適合しなかった場合は，適切な対照薬において，健康人を対象とした生物学的同等性試験を行うこと。

1又は2のいずれかの条件を満たす場合であっても，有効成分自体の水に対する溶解性が低いことにより別紙基準による溶出試験が実施できない場合には，ビーグル犬又はこれに代わりうる大動物を用いた生物学的同等性試験に代えて差し支えない。ただし，この場合にあっては，動物試験の結果と，臨床効果の関係を十分考察すること。

1 作用緩和な成分のみを有効成分とする品目

2 変更内容が以下の項目又はその組合せの範囲の品目

- (1) 着色剤，光沢剤，防腐剤，流動化剤，帯電防止剤，矯味剤，安定剤として製剤中の含有率が1%未満の添加剤成分の変更
- (2) 適量表示が可能な添加剤成分の変更
- (3) 結合剤，崩壊剤，滑沢剤及びコーティング剤それぞれの製剤中の含有率の変動幅が5%未満の変更。
ただし，過去の実績等により，当該有効成分のヒトにおける吸収，分布，代謝，排泄に影響を与えないことが学問的に明らかにされている添加剤成分の変更に限る。

〔注〕 結合剤，崩壊剤，滑沢剤及びコーティング剤とは次のようなものとする。

結 合 剤	顆粒，錠剤等を製する際，顆粒，錠剤等に十分な機械的強度をもたすため，使用成分間の結合力を補う目的で加える添加剤。
崩 壊 剤	成形された製剤が服用された時，口中又は胃腸内で粉末状に崩れやすくする目的で加える添加剤。
滑 沢 剤	錠剤及びカプセル剤を製する際，粉末が杵，臼，充填，ノズル等に付着するのを防ぎ，成形圧力の伝達を良くしたり，粉末の流れを良くする目的で加える添加剤。
コーティ ング 剤	錠剤，顆粒剤等の外観を良くしたり，防湿，遮光，腸溶化，徐放化等のために皮膜を施す目的で加える添加剤。

別 紙

溶出試験法に関する基準

1 試験方法

ア 対照薬は，承認事項一部変更前の製品とすること。

イ 検体は，試験薬，対照薬とも3ロットとし，各ロット3検体，合計各9検体とすること。

ウ 試験方法は次によること。ただし，適切な理由を付して変更することができる。

(ア) 第10改正日本薬局方，一般試験法44，溶出試験法の第1法又は第2法による。ただし，回転数は100 rpm とする。

(イ) 溶出液は37℃，900 ml，pH は次の通りとする。

(i) 酸性物質 1.2，6.5，7.2 の3種。

(ii) そ の 他 1.2，4.0，6.5 の3種。

(iii) 腸溶性製剤 6.5，7.2 の2種。

〔注〕 pH 1.2 一日局10崩壊試験法第1液，pH 4.0=0.1 M 酢酸緩衝液，pH 6.5 及び 7.2=0.05 M リン酸緩衝液

2 判定方法

A及びBの両条件を満たす場合，本基準に適合するものとし，生物学的に同等であることを推定する。

A. 少なくとも1種のpHの溶出液で対照薬の $T_{75\%}$ （表示量，以下同じ）の平均値が60分未満であること。

B. いずれの溶出液における試験結果も，次の(ア)～(イ)のいずれかに適合すること。

(ア) 対照薬の $T_{75\%}$ の平均値が20分未満の場合，対照薬及び試験薬の個々の $T_{75\%}$ 値がすべて30分未満であること。

(イ) 対照薬の $T_{75\%}$ の平均値が20～60分の場合，対照薬と試験薬それぞれの $T_{75\%}$ 平均値の差が10分未満で，かつ，個々の $T_{75\%}$ 値がそれぞれの $T_{75\%}$ 平均値から±10分未満に7検体以上，15分未満に9検体が入ること。

(イ) 対照薬の $T_{75\%}$ の平均値が60分をこえる場合（ $D_{60分}$ の平均値が75%未満）

対照薬と試験薬それぞれの $D_{60分}$ 平均値の差が10%（絶対値，以下同じ）未満で，かつ，個々の $D_{60分}$ 値がそれぞれの $D_{60分}$ 平均値から±10%未満に7検体以上，±15%未満に9検体が入ること。

〔注〕 $T_{75\%}$ ：有効成分が表示量の75%まで溶出する時間。

$D_{60分}$ ：60分の時点で溶出した有効成分の量（百分率による）。

Table 10. Correlation coefficients of *in vivo* parameters between human and dog (indomethacin capsules)¹¹⁾

Human	Dog	r	Human	Dog	r
C _{0.5}	C _{0.3}	0.955*	C ₂	C _{0.3}	0.887*
	C _{0.7}	0.933		C _{0.7}	0.943*
	C ₁	0.794		C ₁	0.965*
	C _{1.5}	0.659		C _{1.5}	0.893*
C ₁	C _{0.3}	0.973**	C _{max}	C _{max}	0.812
	C _{0.7}	0.951*	T _{max}	T _{max}	0.724
	C ₁	0.823	AUC ₂₄	AUC ₂₄	0.285
	C _{1.5}	0.700			

C_T: Serum level at time hr

* p<0.05. ** p<0.01

Table 11. Correlation coefficients of *in vivo* parameters between human and dog (nalidixic acid tablets)¹⁴⁾

Human	Dog	r	Human	Dog	r
C _{0.5}	C _{0.5}	0.466	AUC ₈	AUC ₁₀	0.794
C ₁	C _{0.5}	0.580		AUC _∞	0.798
C ₂	C ₂	0.945*	AUC _∞	AUC ₁₀	0.681
C _{max}	C _{max}	0.895*		AUC _∞	0.690
			AUC ₈	C _{max}	0.905*

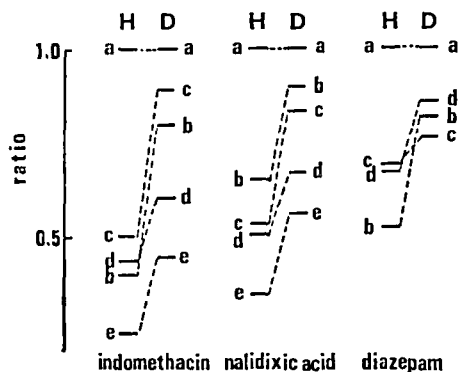
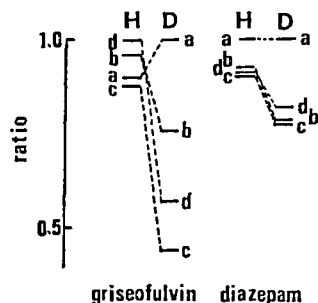
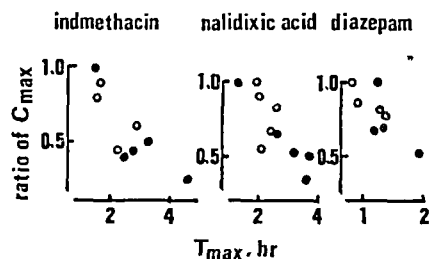
C_T: Serum level at time hr * p<0.05生物学的同等性試験における問題点^{11), 12), 13), 14)}

先述の厚生省薬務局審査課が組織した研究班で実施した生物学的同等性試験に関する研究結果を中心として当該試験における問題点について以下に述べる。

(1) ビーグル犬とヒトとの相関性

インドメタシン 25 mg 含有カプセル5製剤を、ヒト及びイヌそれぞれ10例に対し、絶食時に投与したときの平均血中濃度推移から求めた相関性は¹¹⁾、Table 10に見られるように、投与初期の吸収 phaseにおいてヒトとイヌとは有意な相関性を示すが以後時間の経過と共に相関性は劣ってくる。C_{max}、T_{max}ではやや劣り、AUCについては全く相関性が認められない。

この傾向は他の医薬品製剤においても観測される。Table 11はナリジクス酸 250 mg 錠5製剤をヒト及びイヌそれぞれ10例に対し、絶食時に投与したときの平均血中濃度推移から求めた相関性を示している¹⁴⁾。この場合は初期血中濃度の相関性が低い点がインドメタシンと異なっていたが、AUC及びT_{max}での相関性の低さはインドメタシンと同様である。ただし、2時間目の血中濃度C₂、C_{max}間及びヒトAUCとイヌ

Fig. 1. Comparison of relative C_{max} values of three drugs, indomethacin, nalidixic acid and diazepam, formulations between human (H) and dog (D)¹²⁾Fig. 2. Comparison of relative AUC values of two drugs, griseofulvin and diazepam, formulations between human (H) and dog (D)¹²⁾Fig. 3. Relation of T_{max} and relative C_{max}¹²⁾
●: human, ○: dog

のC_{max}間には相関性が認められ、この点に関してはイヌのヒト代用の可能性が示唆される。

次に製剤間の bioavailability パラメーター順位と差の大きさについてヒトとイヌを比較してみると¹²⁾、Fig. 1, Fig. 2 及び Fig. 3 のようになる。ヒト及びイヌで最も大きな値を示した製剤を1として他の製剤の示す相対値を表わした。Fig. 1 のC_{max}についてはイヌはヒトの場合に比べて製剤間の差が縮小されている。

Table 12. Bioavailability parameter remarkables of dog

Parameter	Correlation with human	Gap among preparations
Blood conc. in absorption phase	High	—
C_{max}	Comparatively high	Human > Dog
T_{max}	—	Human $\gg$ Dog
AUC	Low	Human < Dog

Table 13. Criteria for selection of human test subjects for bioavailability studies

normal healthy adult
age: 20-40 years
body weight: within 10 of their ideal body weight
physical examination
Hematology: hemoglobin, hematocrit
WBC, platelet estimate, differential count
Blood Chemistry: BUN, serum alkaline phosphatase, serum total bilirubin, SGPT, SGOT, gasting blood sugar, serum creatinine
Urinalysis: specific gravity, pH, albumin, sugar, bile, RBC, WBC, granular casts
disease history
additional test
from APhA: Guidelene For Biopharmaceutical Studies in Man

しかし Fig. 2 の AUC についてみると、逆にイスの方に製剤間の差が大きく表われている。これを更に Fig. 3 で T_{max} についてみると、イスでは製剤間の差が小さく、ほぼ同じ値を示しているのに対し、ヒトの場合には製剤間の差が大きく表われている。

以上の結果をまとめると、ヒトに対するイスの相関性は、ア) 吸収 phase での血中濃度は相関性は高い、イ) C_{max} では相関性はやや悪い、ハ) AUC では相関性はかなり低い。また相関性とは別に製剤間の差の大きさについて比較してみると、ア) C_{max} 及び T_{max} ではイスはヒトより差が小さく表われ、ロ) AUC の差は逆にイスで大きく表われるということが出来る (Table 12)。これはヒトとイスの消化管の生理的な違いによるものと考えられ、比較的生理的要因の影響が少ない投与初期においてのみ、ヒトイス間の相関性が高く出たと考えられる。

イスとヒトとの消化管の生理的な相異のうち bioa-

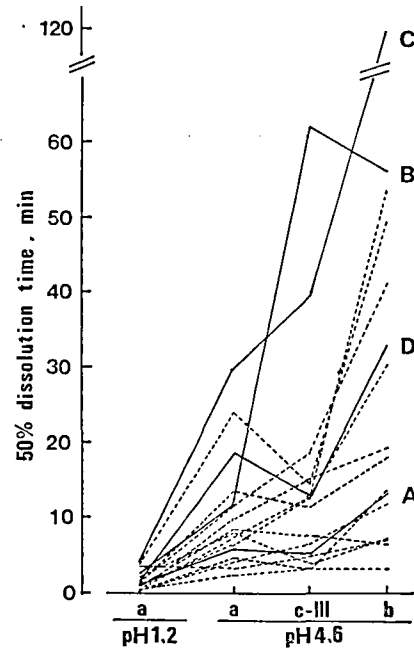


Fig. 4. Diazepam dissolution rates from 15 commercially available plain tablets determined by three methods in two media. Solid lines show dissolution rates of tablets used for the bioavailability test.

vailability に差を生じる原因としては、イスはヒトに比べて胃内容物の通過速度が大で、腸管が短く、胃液 pH の変動が大きいことがあげられる。物質が胃中で溶け始める際には胃液の pH が影響するが、溶け始めではヒトとイスでその速度に殆んど差がないと考えられる。このため初期血中濃度での相関性が高い。次に胃内容物の通過速度が大きいと充分溶けていない状態で腸管へ輸送され、イスのように腸管が短いと吸収部位も小さくなることから、吸収部位に特異性の少ない物質を除いては、溶解が完全に終わらないまま糞中に排泄される割合が大きくなり、胃中又は腸管内で溶解する速度の僅かな差が AUC に大きく影響してくることが製剤間の AUC 差を大きくしている原因と考えられる。また同様の原因からイスの T_{max} に製剤間の差が見られず、 C_{max} についての製剤間の差もヒトに比べて縮小されるものと考えられる。ヒトでは胃内通過速度がイスに比べて遅い上、腸管はやや長いいため C_{max} が低い製剤でも、長い滞留時間内に溶解し、長い吸収時間の間に AUC を回復させる結果を生じ、溶解の早い製剤と遅い製剤との間の差が小さくなる傾向にある。

(2) ヒト被験者の選択基準と胃液酸度¹⁸⁾

Table 13 にアメリカ薬学会が作成した bioavailability 研究のための正常健康人選択の基準を示した。我

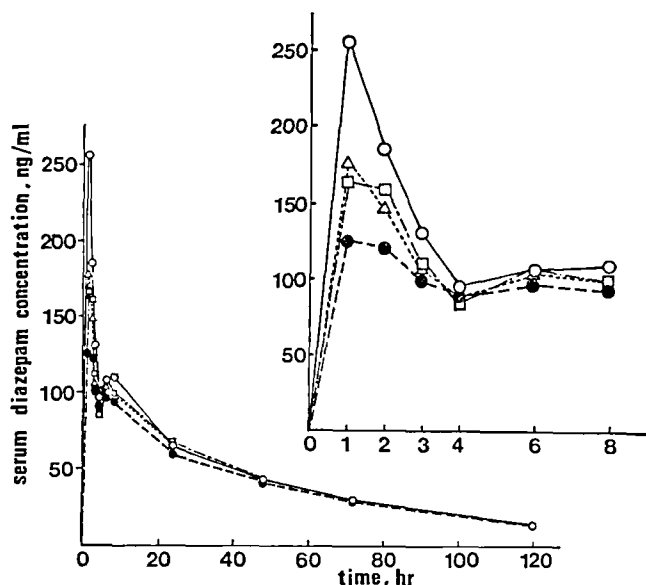


Fig. 5. Mean serum concentrations of diazepam after oral administration of four preparations of diazepam tablets (5 mg), tablet A (○), tablet B (●), tablet C (□) and tablet D (△).

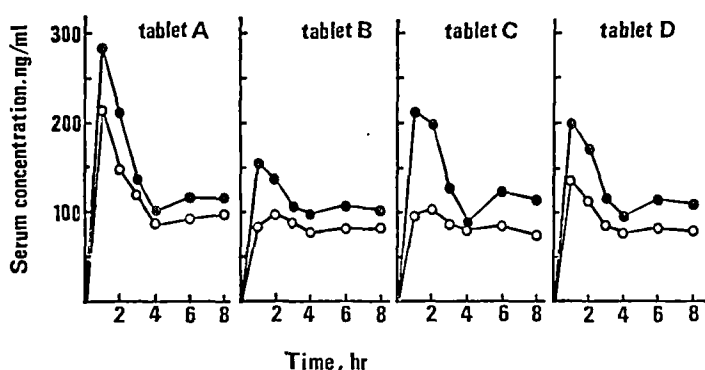


Fig. 6. Mean diazepam serum concentration of high gastric acidity group (●) and low acidity group (○) after oral administration of four preparations of diazepam tablets (A, B, C and D). Vertical bars show S.E.M.

が国でも大体にしてお様な項目を選んでいるようである。

被験者を選ぶ場合、分析精度は個体差の少ない集団とすることによって高められるため、そのような選択基準を取りがちである。製剤の比較という点から考えると、生理的要因をできるだけ消去することが望ましい。被験者の生理的要因の中から、我々の実験で得られた胃液酸度の影響について述べてみたい。一般的にはヒトの胃液の酸性度は年齢に従って小さくなり、また若年者でもやせ形の人の一部には酸性度の少ない場合が観察される。それらのヒトの割合は統計的には調べていないが、かなりの割合でいることが想像される。

我々の実験結果に対して被験者を強酸群と低酸群の2群に分けて解析すると、個人差によって生じるバラツキが縮小し製剤間の差が検出されるようになった例が多く、その原因をなすものは主成分及び被膜等の酸又はアルカリに対する溶解性であることがわかった。

Fig. 4¹⁵⁾ は市販ジアゼパム 5 mg 含有の素錠についての溶出試験の $T_{50\%}$ を示している。この溶出試験の結果から市販製剤には Fig. 4 に示したようにどの pH でも溶解速度があまり変らないものと、pH が4以上になると溶出時間が遅くなるものの2群があることがわかる。被験者12人の平均血中濃度推移を製剤で比較したのが Fig. 5¹⁶⁾ であり、被験者を強酸群と低酸群の

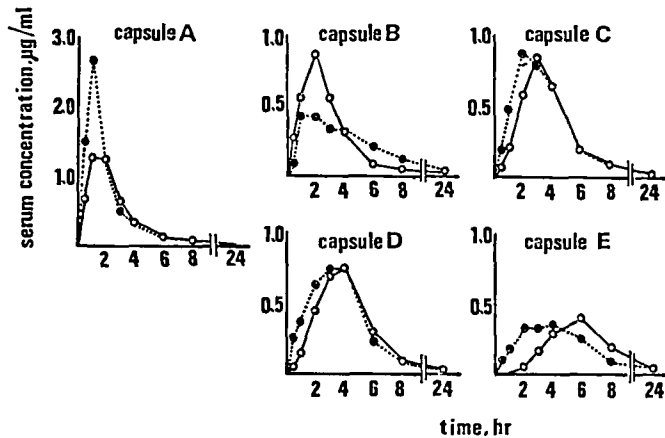


Fig. 7. Mean indomethacin serum concentration of high gastric acidity group (○) and low gastric acidity group (●) after oral administration of five preparations of indomethacin capsules.

2群に分けて表わしたのが Fig. 6¹⁶⁾である。

どの製剤においても強酸群の方が低酸群より高い血中濃度を示しており、ジアゼパムが弱塩基性であることから、この傾向はうなずける。しかしながら溶出試験液の pH 1~5 の範囲ですみやかな溶出を示したA製剤が、低酸群でもかなりの吸収を示し、強酸群とは有意差は見られず、また酸性溶液ではAと殆んど同程度にすみやかに溶出するB, C, D製剤が強酸群においてもA製剤より血中濃度が低く、低酸群は更に低い血中濃度の推移を示したということは、ジアゼパムの弱塩基性の性質からだけでは説明され難く、製剤上の違いによるものと考えられる。即ち、B, C, D錠は、その製速に使用されたジアゼパムの粒子径がAの場合より大きく、また pH 4~5 において溶解性を悪くする添加物又は製造方法が選ばれているのではないと思われる。結論としては、溶出試験において pH が4~5の溶解液で溶出の遅い製剤は、ヒト特に胃液が低酸性のヒトの bioavailability を悪くすることがあり得るので注意せねばならないということになる。

次に弱酸性医薬品としてのインドメタシンに対する胃液酸度の影響について述べてみたい。試験はインドメタシンカプセル 25 mg, ヒト10名について血中濃度を測定した例についてみると¹¹⁾, Fig. 7 に実線で示した強酸群と点線で示した低酸群の各々でのインドメタシンの平均血清濃度の時間的推移の曲線からジアゼパムとは反対に低酸群が強酸群に比べB以外のカプセル剤において投与初期に高い血清濃度を示していることがわかる。これはインドメタシンが低酸群においてより速く溶け出し、吸収されたことを示している。低酸被験者の胃内容排出速度が強酸の被験者より特に速い

とは考えられないので、低酸群での速かな吸収は、中性付近の液性を示す低酸群の胃の中での速かなインドメタシンの溶出によるものと考えられる。特に溶出速度の早かったAでは両群間の差が約倍と顕著である。

同じく酸性薬物であるナリジクス酸について考察してみる。ナリジクス酸は錠剤として市販されており、1ケ中の含量はインドメタシンカプセルの10倍の 250 mgである。この1錠を10名の被験者に絶食時投与したときの低酸群と強酸群における bioavailability をみると、吸収速度及び吸収量において相異が見られない¹⁷⁾。インドメタシンは pH 1~5 において 37° で約 20 µg/ml の溶解度を示し、ナリジクス酸は同じ条件で約 40 µg/ml であり、いずれも胃中では極めて溶解度が低く、小腸に移行して pH が中性付近に上昇することによって始めて吸収されることが考えられる。しかしながらインドメタシンは低酸群で吸収が早く、明らかに強酸群との差が観察されたのに対し、ナリジクス酸で両群間の差がみられない。その理由は明瞭でないが、両医薬品の酸性領域での溶解度の違いと投与量（錠剤1ケ中の原薬の量）の大幅な違いが関係していると考えられる。

次に中性医薬品であるグリセオフルビンについて胃液の酸性度による bioavailability に及ぼす影響を見てみる。125 mg 錠4製剤を被験者12名に投与したときの bioavailability の各 parameter を Table 14^{18), 19), 26)} に示した。これからわかるように AUC, C_{max} 及び T_{max} のいずれも低酸群の間に有意な差は認められない。グリセオフルビンは極難溶性で、溶解性には pH 依存性はないので、ジアゼパムやインドメタシンの場合に見られたような胃液の酸性度による影響は殆んど受けなかったものと考えられる。

Table 14. Effects of acidity of gastric juices on AUC, C_{max} , T_{max} of griseofulvin

		AUC _{47.5} ($\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$)		C_{max} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		T_{max} (hrs)	
		High*	Low**	High	Low	High	Low
Formulation	A	9.708 $\pm$ 2.972 ^{a)}	11.764 $\pm$ 2.764	0.510 $\pm$ 0.133	0.491 $\pm$ 0.227	3.43 $\pm$ 0.79	7.90 $\pm$ 8.79
	B	10.496 $\pm$ 2.005	13.018 $\pm$ 2.872	0.675 $\pm$ 0.123	0.640 $\pm$ 0.215	3.14 $\pm$ 0.38	4.30 $\pm$ 1.48
	C	8.449 $\pm$ 2.082	10.900 $\pm$ 2.524	0.405 $\pm$ 0.129	0.382 $\pm$ 0.133	4.29 $\pm$ 1.89	8.30 $\pm$ 8.54
	D	11.272 $\pm$ 2.646	11.773 $\pm$ 2.021	0.551 $\pm$ 0.181	0.542 $\pm$ 0.339	5.14 $\pm$ 1.46	12.20 $\pm$ 10.52

a) Means $\pm$ S.D. * High acidity of gastric juices

** Low acidity of gastric juices

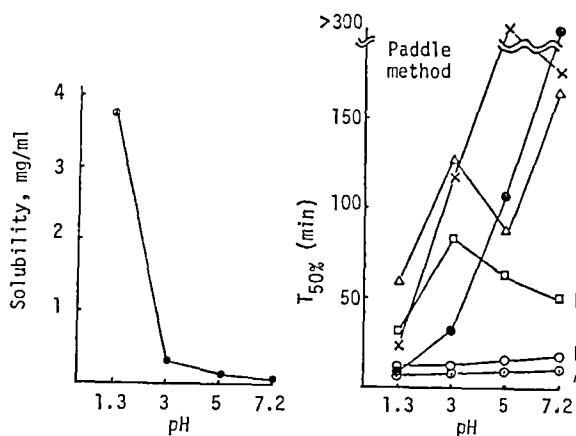


Fig. 8-a. Solubility of thiamine disulfide (TDS)

Fig. 8-b. Dissolution of TDS from the sugar coated tablets

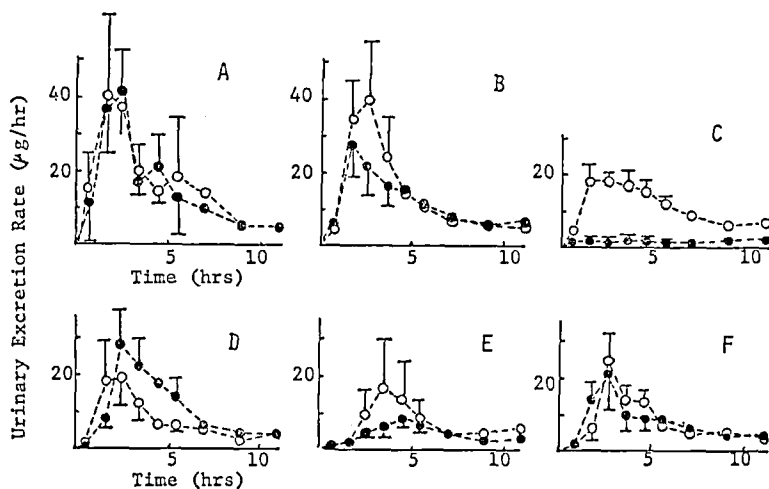


Fig. 9. Mean urinary excretion rates of thiamine after oral administration of TDS tablet to humans having high acidity (○) and low acidity (●) of gastric fluid. The vertical bars show S.E.M.

Table 15. Lag times of dissolution of PAL-P tablets (min)

Number of products		Content (mg)	pH					
			1.2	4.5	5.5	6.6	7.5	
I	3	A	11.03	×	×	×	87	28
		B	12.00	×	×	×	35	21
		C	12.30	×	×	×	15	9
II	39	D	10.10	×	×	5	5	14
III	6	E	10.38	×	21	7	8	7
Sug.	5	F	10.79	7	--	—	—	7

A, B, C, D, E: Enteric coated tablets

F: Sugar coated tablet

Dissolution test method: Oscillating basket method

×: did not dissolve within 3 hrs

—: no determination

以上の結果から、pH に依存した溶出を示す医薬品の bioavailability はそれを服用した被験者の胃液酸度により影響を受けていることが示唆される。特に中性からアルカリ性で溶解度が小さい塩基性薬物の bioavailability には、それらの薬物の溶解が胃内で完了していることが吸収に必要であることから、胃液酸度は大きく影響すると考えられる。

以上、薬物それ自体の主として物理化学的性質の観点から数例を示したが、次に製剤上の因子、特に被膜の性質が胃液酸度との関連において bioavailability に及ぼす影響について述べてみたい。

防水膜や腸溶性被膜に用いられている高分子物質が pH に依存した溶解性を示すことはよく知られている。しかしながら製剤の bioavailability にとってどのような pH 依存性を高分子が持っているべきかは充分には明らかになっていない。そこで成分としては水易溶性薬物を含む糖衣錠と腸溶錠についての実験結果について考察してみることとする。

Fig. 8 はサイアミンダイスルファイド (TDS) の溶解度と市販 TDS 10 mg 含有糖衣錠についてのパドル法による *in vitro* 溶出試験の結果¹⁸⁾を示している。この結果から pH によって変らない速かな溶出を示した A 及び B, pH 3 から 4.5 で非常に遅い溶出を示した D, E 及び F, pH 7.2 で 2 時間以上全く溶出しない C が選ばれ、12 人の被験者に対してそれぞれ各 1 錠を経口投与したときの尿中排泄速度を強酸群と低酸群の平均値で示したのが Fig. 9 である¹⁸⁾。

A に対する両胃酸群及び B の強酸群での尿中排泄は他に比べて高く、その他は低い bioavailability を示しており、*in vitro* の溶出試験の結果を反映している。

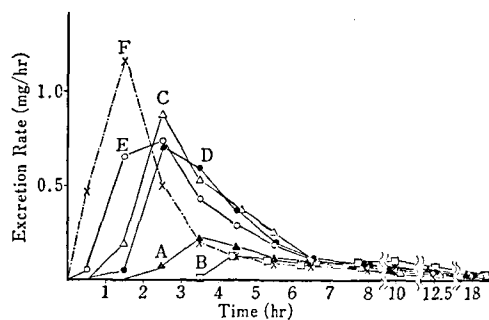


Fig. 10. Mean urinary excretion rates of pyridoxic acid after oral administration of PAL-P (10 mg) enteric coated tablets

胃酸度による差を見ると D は低酸群の方が高い値を示しているが、B, C 及び E は低酸群の方が低い値を示している。特に C は低酸群で殆んど吸収されていない。

次に腸溶錠としてリン酸ピリドキサル (PAL-P) について見てみたい²⁰⁾。試料は市販の PAL-P 10 mg 含有腸溶錠 5 種と比較のための糖衣錠 1 種である。これらの崩壊試験器を使用した場合の溶出が始まる迄の時間 (lag time) を各 pH の試験液についてみてみたのが Table 15 である。×印は 3 時間以内に全く溶出しなかった場合を示している。F は糖衣錠で pH 1.2 で溶出する。E は溶出臨界 pH が 4.5 に、D は 5.5 に、A, B 及び C は 6.6 となっている。bioavailability の実験は 12 人の被験者に PAL-P 錠 1 錠を経口投与し、その尿中に排泄された 4-pyridoxic acid を定量して行った。

Fig. 10 は各製剤の 12 人の被験者の平均尿中排泄を示したもので、糖衣錠 F は吸収の lag time なしに速

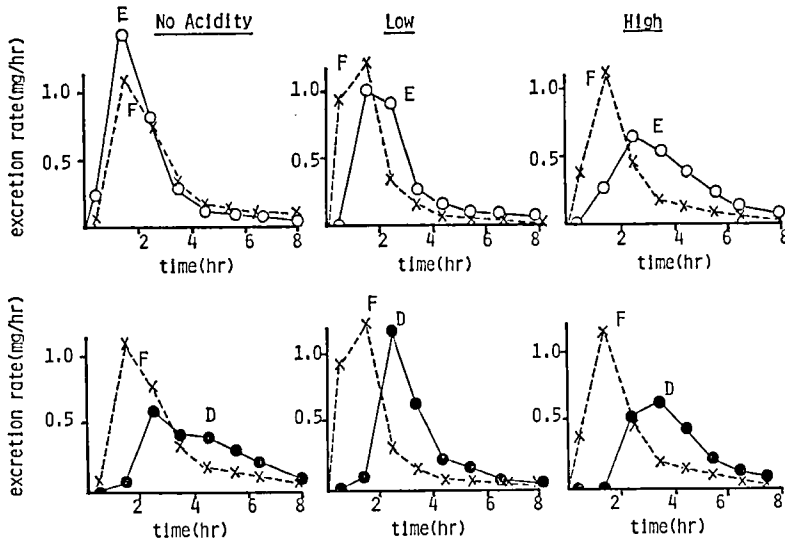


Fig. 11. Mean excretion rates of pyridoxic acid after oral administration of PAL-P tablets D, E and F
D and E: enteric coated tablet
F : sugar coated tablet

かに吸収され、最も高い排泄速度を示しているのに対し、腸溶錠では臨界 pH が 4.5 である E が最も速かな吸収を示し、臨界 pH が 6.6 であり、溶出の lag time が比較的に長かった A 及び B は bioavailability の速度・量共に悪いことがわかる。pH 4.5 未満では溶出しない E 又は pH 5.5 未満では溶出しない D は強酸群の胃中では溶解が起らないと考えられるのに対し、低酸群では胃中で溶解が始まる可能性があり、この E 及び D を糖衣錠 F と比べて、無酸群、弱酸群及び強酸群の 3 群に分けてそれらの尿中排泄をみると Fig. 11 に見られるように、E は無酸群において糖衣錠と殆んど同じ 4-pyridoxic acid の排泄速度を示し、他の群では吸収が遅れ、特に強酸群で著しく遅れているのがわかる。これは無酸群では、E 錠からの溶出が胃中で起っていることを示し、強酸群では腸に移行してから溶出していると考えられる。臨界 pH が E より若干上にある D では、無酸群においても胃で溶出が起らないことが下段のグラフからわかる。

以上のことから pH 4.5 で溶解する物質でコーティングされた腸溶錠は強酸群以外では、腸溶の目的をはたしておらず、また pH 5.5 ないし 6.6 以上で溶解が起る被膜物質でコーティングされた D, C, B 及び A の各腸溶錠は腸溶の目的はたしていても bioavailability が著しく劣る可能性があるということが出来る。

我々の生物学的同源性試験の例においては、年齢が

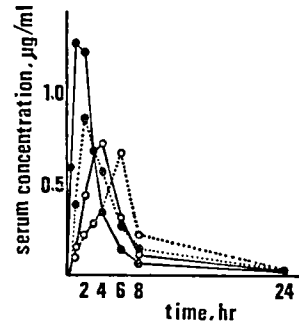


Fig. 12. Mean indomethacin serum concentration after oral administration of two preparations of indomethacin capsules A (●) and B (○) in fasting state (—) and non-fasting state (...)

大きくなるに従って胃酸度が低くなる傾向がみられ、また若くてもやせ形の人の中には胃酸度の低い人がかなり多いことがわかっており、低酸の人の割合は少ないといえる。以上の例から被験者への固形製剤の投与に際しては、胃液の酸度の違いが bioavailability へ与える影響は大きく、被験者を胃液の酸度の違いによって少なくとも 2 群以上に分けて bioavailability を測定しておくことが、固形製剤の特性を把握するのに必要であるばかりでなく、実際に患者に投与する際のその製剤の有用性を知る上に必要であると思われる。

Table 16. クロラムフェニコール粉末と錠剤(F)の Bioavailability への食事の影響²¹⁾

パラメータ ¹⁾	粉		末		錠		F
	絶食時	食事摂取時	対になった t-検定	絶食時	食事摂取時	対になった t-検定	
排泄遅延時間 (hr)	0.13 ²⁾	0.50	NS ³⁾	5.20	2.60	NS	
最高排泄速度 (mg/hr)	15.00	15.15	NS	3.44	14.95	P<0.025	
最高排泄速度到達時間 (hr)	1.63	2.53	NS	15.45	4.06	P<0.025	
28時間累積排泄量 (mg)	76.73	89.55	NS	41.76	82.85	P<0.05	

1) 未変化体の尿中排泄から求めた

2) 4人の被験者の平均値

3) 有意差なし

例えば塩基性薬物を投与する際、低酸の患者に対しては塩基の酸塩としたものに変えるか、酸の同時投与を行う、また酸性薬物を胃が強酸性である患者に投与する際には酸の塩基性塩としたものに変えるなどの工夫がすすめられる。

腸溶性製剤では少くとも pH 6 以上で溶解する被膜を用い、しかも bioavailability が低下していないことを充分確かめておく必要があると考えられる。

以上の点をふまえ、*in vitro* の溶出試験から bioavailability を推算する場合には、溶出試験液の pH を 1.2, 4.0, 6.5, 7.2 の中から 3 点を選んで行えば推算が可能であろうと考えられる。

(3) 服用条件

製剤の評価という観点から服用条件や、個体の条件をできるだけ簡単にするために、絶食事に服用させ、その後 3～4 時間は絶食を続けさせるという条件が一般によくとられている。Fig. 12¹¹⁾ はインドメタシンカプセルの 2 製剤 (インドメタシン 25 mg 含有) について、絶食時及び標準朝食 (食パン 100 g (8 枚切り 2 枚)、ゆで卵 1 箇、バター 20 g、きゅうり半本、牛乳 200 ml) を摂取後 15 分に服用させた場合の血中濃度の推移を示したもので、A 製剤は絶食時服用では非常に速やかな吸収が観察され、D 製剤の約 2 倍高い C_{max} を示しているが、食後服用では C_{max} は低くなっている。一方 D 製剤の C_{max} は食後でも変わらないが、 T_{max} は約 2 時間遅れている。空腹時投与では C_{max} において両製剤間に有意差が認められるのに対し、食後服用の場合には C_{max} に差がなく、 T_{max} に差があらわれているに過ぎない。

クロラムフェニコール糖衣錠²¹⁾ の場合では、Table 16 において F 製剤は防止膜の崩壊性が悪いことから絶食時服用の場合、粉末の約 50% の吸収量しか示さないのに対し、食後服用では bioavailability が改善され、吸収量は粉末と同程度になっている。以上の例は服用

Table 17. General Elements of a Bioavailability Study Submission

(A) Protocol
(a) Study Objectives
(b) Study Design
(c) Subject Selection Criteria
(d) Subject Exclusion Criteria
(e) Types of Biological Samples
(1) Sampling Times
(2) Description of Sample-Handling Procedures
(f) Sample Inclusion and Exclusion Criteria
(g) Ethical Considerations
(1) Subject Informed Consent Form
(2) Emergency Procedures
(B) Data
(a) Case Reports
(b) Analytical Data for Validation of Assay Method
(c) Analytical Data from Biological Samples
(C) Results
(a) Summary of Individual Subject Data
(b) Statistical Analysis along with Summary Statistics
(1) For each Individual's Sample Times
(2) For AUC, C_{max} , absorption rate (K_a), and elimination rate (K_{el})
(3) For T_{max} with Appropriate Method
(c) Detectable Differences at $\alpha=0.05$ and power=0.80
(d) 95% Symmetrical Confidence Interval
(e) Application of 75/75 Rule to C_{max} and AUC
(D) Summary and Conclusion

Table 18. Confidence Intervals and Hypothesis Testing Compared²³⁾

Test formulation	Results of experiment: Comparative bioavailability of test formulation to standard formulation with 95% confidence limits (statistical)	Confidence limit (95%) Criterion for acceptance and decision reached by a knowledgeable pharmacologist or physician, etc.	Decision based on hypothesis testing $\alpha=0.05$
		Drug A: Lower limit must be 80% or more.	One-sided test
A-1	92% (82% or more)	Acceptable	Acceptable
A-2	92% (85% or more)	Acceptable because lower limit exceeds 80%	Unacceptable
A-3	100% (55% or more)	100% looks good but data are very insufficient, unacceptable	Acceptable

条件が異なると、製剤に対する同等性の評価が全く異なることを示している。

この他の例でも同様な傾向が観察されており、製剤の崩壊・溶出といった特性が原因で bioavailability に差がある場合に、食後服用を行うと、良い製剤の血中濃度は空腹時服用と同じか、やや低くなり、悪い製剤は bioavailability の改善が起り、両製剤間の差が縮まる傾向が認められる。

生物学的同等性試験は製剤特性の評価が目的である事から考えると、空腹時服用という条件は試験条件の同一性を得るとする試験方法での統一と、製剤間の bioavailability 差を検出し易いという意味をもって考えると考える。しかしながら、主薬自体が極難溶性の医薬品の場合には、微粉末、非結晶性または液状であっても吸収速度と量に関する個体差が大きく現れ、吸収の大きい被験者と全く吸収を示さない被験者が現れることがある。このような場合には、主薬の消化管内における乳化を増大させるための製剤学的な工夫が必要な場合があり、一方、生物学的同等性試験においては、服用条件を、特に規定した高脂肪食摂取後にするなど、の考慮が払われなければならない。

(4) 統計的評価

FDA は先述のように、同等であるとは標準製剤に対し80%以上の bioavailability を有する場合と規定し、Table 17²²⁾に見られるように、統計的処理法として分散分析では $\alpha=0.05$, $1-\beta \geq 0.8$ の検出力を持つ条件で行うか又は95%の対応信頼限界、75/75 rule の適応などを並記している。Table 18²³⁾は分散分析などの帰無仮設にもとづく判定と95%信頼限界にもとづく判定との比較を行ったもので、左から2番目のカラムは試

験製剤の標準製剤に対する相対的な bioavailability の値とその95%信頼限界の値をカッコの中に示し、3番目のカラムは95%信頼限界のデータからの判定を、4番目のカラムは帰無仮設からの判定を示している。95%信頼限界による判定においては、例えば同等であるための範囲を80%以上でなければならないと設定すると、A-1 と A-2 は平均値では、その bioavailability は92%と同じであるが、95%信頼限界が82%以上、85%以上と異なっている。両者共に95%信頼限界からは、下限が80%以上の値であるから同等と判定されるが、帰無仮設検定からは A-1 のデータのパラッキが大きく、A-2 の方が小さいことから、例えば、A-1 は有意差なしとなり、同等、A-2 は有意差ありで非同等と判定される可能性がある。このように仮設検定では、あくまでデータの分散に依存して判定され、しかも消極的に同等と判定されるという面を持っている。A-3 は極端な例であるが、パラッキが大きく、95%信頼限界は55%以上であるにも拘らず平均値は100%の例である。この場合、95%信頼限界からは非同等と判定されるのに対し、仮設検定ではパラッキが大きいことから有意差は認められなくなり、同等と判定される。

次に我々の行った実験の中から一部を抜き出し、上記の両者の方法で検定した結果を Table 19 に示してみる¹¹⁾。80%以上を同等と仮定して判定すると、ジアゼパム錠¹⁶⁾ 及びフルフェナム酸カプセル^{24), 25)} では非常によくまとまったデータが得られたため両者の判定が一致しているが、TDS 製剤¹¹⁾ ではパラッキが大きく、分散分析では有意差なしで同等、95%信頼限界では80%以下となって非同等となった。

Table 19. Comparison of Hypothesis Testing and Confidence Intervals¹¹⁾

Drug & parameter	Observed difference	Residual mean square	Number of subjects	ANOVA	95% Confidence interval
Diazepam: AUC	9.2%	154.4%	12	$F_{calc}=3.29 < F_{11}(p<0.05)=4.84$ N.S. ($1-\beta=0.945$)	$116.1 \geq \mu_n \geq 83.9$ N.S.
Thiamine disulfide: CUE ₂₂	8.5%	7158%	12	$F_{calc}=0.061 < F_{11}(p<0.05)$ N.S. ($1-\beta \ll 0.30$)	$165.8 \geq \mu_n \geq 34.2$ Significant difference
Flufenamic acid: AUC ₈	16.4%	286%	15	$F_{calc}=7.05$ $F_{14}(p<0.05)=4.69$ Significant difference ($1-\beta=0.83$)	$124.8 \geq \mu_n \geq 75.2$ Significant difference

Table 20. Minimum Detectable Differences (%)¹¹⁾ $(\alpha=0.05 \quad 1-\beta=0.6)$

Drug product	C _{max}		T _{max}		AUC _∞	
	Man	Dog	Man	Dog	Man	Dog
Griseofulvin	19	< 31	73	> 58	17	< 38 ^{a)}
Diazepam	15	< 23	79	> 24	16	< 20
Nalidixic acid	25	< 29	41	< 51	27	< 31
Indomethacin	25	< 37	25	< 40	24	23
PAL-P	37	> 34	—	—	29 ^{b)}	< 33 ^{a)}

^{a)} AUC_{24hr}^{b)} Urinary amount excreted for 22 hr

医薬品を使用する医師の立場からは、95%信頼限界が示されている方が、その薬理効果の上から同等性を評価しやすいといわれているが、製造者側からは、積極的に同等であることを証明するには、実験例数の増大をしいられることになる。

一方、分散分析では先に述べたように、有意差ありと証明できなかった時その裏返しとして、同等となるわけであるから、例えば、有意差ありと結論できないような精度の悪い実験（ばらつきの大きい実験）が行われた場合に同等となり、よく管理された精度のよい実験が行われた場合に有意差ありと結論されるような矛盾の起る可能性がある。これらを防止するためには、検定の検出力 ($1-\beta$)、最小検出差 (Δ : minimum detectable difference) 及び信頼限界を規定する必要がある。

Table 20¹¹⁾は我々の実験データーを用い、何%の差が検出されたかを計算したものである。ただし、 $\alpha=0.05$ 、 $1-\beta=0.6$ で行ってある。ヒトのデーターで見

ると、AUC_∞では、グリセオフルビンの試験では、17%以上差があったとき、PAL-Pでは29%以上差があったとき、有意差ありと検出することになる。つまり前者では両製剤間の差が17%未満のとき、後者では29%未満のとき同等と判定されることになる。 $1-\beta=0.6$ というのは、検出力としては低い。分散分析では、通常、 $\alpha=0.05 \sim 0.1$ 、 $1-\beta \geq 0.8$ 、 $\Delta \leq 0.2$ とするのが望ましい。しかしながら、bioavailabilityの各パラメーター値に個体差の出やすい医薬品では、bioavailability試験の実施に十分な管理が行われ、かつばらつきの少ない化学的分析方法が用いられている場合でも、これらの精度が達成できない場合もあると思われる。この場合には、その医薬品の適用が、重篤な疾患に対するものであるかどうか、用量の僅かな差による副作用が問題となるかどうかなどを慎重に考慮し、その理由をできるだけ明確にした上、 $1-\beta$ 又は Δ を決め、必要又は不可能な実験でない適切な実験計画(特に例数)を選ぶべきであろう。また標準製剤との差が小さくと

も精度のよい実験が行われたために分散分析で有意差が出た場合、95%信頼限界の範囲の計算も行い、この値での考察も重要となるであろう。

以上経口用固形製剤中、錠剤及びカプセル剤の生物学的同等性に関する諸問題について我々の研究班で得られた結果を中心として述べた。懸濁剤、坐剤、軟膏剤及びその他の剤形についても当然同等性について検討されねばならないが、これらは将来のテーマとしたい。ヒトに代る試験法としての溶出試験及び動物モデルのヒトとの相関性については更にデータの集積が必要であろう。

最後に、以上の研究に対して御協力を戴いた厚生省生物学的同等性判定基準作成に関する研究班の各位、犬の実験への協力又は試料の提供をされた関係製薬会社、並びにボランティアとなられた多数の方々から感謝する。

上記研究班がまとめた生物学的同等性に関する考え方と試験法の詳細な解説が日本公定書協会から出版される予定であることを付記する。

文 献

- 1) D. Melnick *et al.*: *J. Nutrition*, **30**, 67 (1945).
- 2) B.L. Oser *et al.*: *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, **17**, 405 (1945)
- 3) F.A. Campagna *et al.*: *J. Pharm. Sci.*, **52**, 605 (1963)
- 4) 渡辺 康ら: 薬学雑誌, **95**, 599 (1975)
- 5) 渡辺 康ら: 薬学雑誌, **97**, 791 (1977)
- 6) T. Maeda *et al.*: *J. Pharm. Sci.*, **66**, 69 (1977).
- 7) T. Maeda *et al.*: *J. Pharm. Sci.*, **68**, 1286 (1979),

- 8) 青柳伸男ら: 日本薬学会第101年会講演要旨集 p.610 (1981), 熊本
- 9) 鈴木徳治: 薬物の Bioavailability, 資料 7(1976) 薬業時報社
- 10) *Federal Register*, **42**, 1924 (1977).
- 11) 江島 昭: 臨床薬理, **13**, 199 (1982)
- 12) 厚生省生物学的同等性研究班 江島 昭ら: 第13回薬物代謝と薬効・毒性シンポジウム講演要旨集 p.77 (1981), 西宮市武庫川
- 13) 鹿庭なほ子ら: 日本薬学会第102年会講演要旨集 p.609 (1982), 大阪
- 14) 緒方宏泰ら: 日本薬学会第102年会, 講演要旨集 p.609 (1982), 大阪
- 15) H. Ogata *et al.*: *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.*, **20**, 159 (1982).
- 16) H. Ogata *et al.*: *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.*, **20**, 166 (1982).
- 17) H. Ogata *et al.*: 投稿中
- 18) 緒方宏泰ら: 第11回薬物代謝と薬効・毒性シンポジウム講演要旨集 p. 105 (1979)
- 19) A. Ejima: The First Japanese-American Conference on Pharmacokinetics and Biopharmaceutics (1981), 東京
- 20) 鹿庭なほ子ら: 第12回薬物代謝と薬効・毒性シンポジウム講演要旨集 p. 54 (1980)
- 21) H. Ogata *et al.*: *J. Pharm. Sci.*, **68**, 712 (1979).
- 22) E. Purich: *Drug Absorption and Disposition*, p. 121 (1980), Academy of Pharm. Sci., A.Ph.A., U.S.A.
- 23) C.M. Metzler: *Biometrics*, **30**, 309 (1974).
- 24) N. Kaniwa *et al.*: *J. Pharm. Dyn.*, **5**, 187 (1982).
- 25) N. Kaniwa *et al.*: *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.*, in press.
- 26) N. Aoyagi *et al.*: *J. Pharm. Sci.*, in press.

Pyrogen test と Limulus test

—その相関性について—

加納晴三郎

Pyrogen test and Limulus test

—On the relationship between the two tests—

Seizaburo KANOII

ま え が き

Pyrogen test は輸液中に混在する発熱物質 (Pyrogen) をウサギに注射してその体温の上昇度によって検出する *in vivo* の bioassay の一つである。これは古くから注射液の安全性を確認する方法として各国の薬

局方に記載されている重要な試験法であり、我国では第VI版より記載されてきた。

Limulus test はカブトガニ (*Limulus polyphemus*) の血球成分が細菌内毒素 (endotoxin) と反応して凝固する現象を利用して内毒素を半定量的に測定する *in vitro* の bioassay の一つである。

従って本稿では細菌内毒素の構造と活性, 特に発熱性との関係について現在までの研究を述べると共に, カプトガニの血球成分と細菌内毒素との反応機構とその応用的側面について述べ, 両者における内毒素の意義と相関性が明らかにされるように記述するものである。

Pyrogen とは一般に微量で恒温動物の体温を上昇せしめる物質の総称である。古くからさまざまな Pyrogen が知られているが, その主なものを列記すれば, 無機物としては硫黄又は亜鉛コロイドがあり, 有機物質としては同じく脂肪コロイド, nitrofurantoin, 2, 4, dinitrophenol 及び LSD などが知られている。生体成分としてはある種の血液型物質, 植物多糖体, また各種の炎症性物質などが知られている¹⁾。しかし, 発熱物質として最もよく一般的に知られているものは細菌毒素である。これらのうちでもグラム陰性菌の細胞壁を構成するリポ多糖 (Lipopolysaccharide: LPS) が $1\sim 0.01\text{ }\mu\text{g/kg iv}$ でウサギに発熱を起こすことができることから, 一般に発熱物質 (Pyrogen) は内毒素 (endotoxin), 又は LPS とほぼ同じ意味に用いられている。

[I] 細菌内毒素

多細胞生物の発生とその進化の過程は現在でもなお明らかとは言えないが, 物理的要因としての各種の放射線や温度などの影響を除けば単細胞生物である細菌との相互作用ないしは戦いが重要な意義をもつものと推測される。DNA や RNA などは各種の放射線に対して鋭敏に反応するし, また温度は各種の酵素反応速度に対して最も強い影響力をもっていることなどはよく知られているところである。

機能として完成された細胞は細菌内毒素に対して防御的な膜機能をそなえており, この情報に対して各種の抗体産性細胞の機能が発揮されるように構築されている。従って哺乳動物は細菌内毒素に対して体温の異常上昇という形で反応する。

体温は熱の産生と放散の平衡の上に成り立つもので, 変動のない一定の温度範囲内で生体の諸機能を円滑に行わせしめることを目的として中枢神経の支配を受けている。この体温調節の支配中枢は視床下部前葉部に位置し, 食欲, 性欲などの中枢に隣接している。体温の異常上昇は疼痛とともに心理学上の重要な問題点であるが, 生体の異常を示す最も鋭敏な症候の一つであり, 同時に生体の防御反応の一つとも考えられる。

一般に細菌内毒素は細菌の種属により異なるものであるが大別すると外毒素と内毒素とに分けられる。外毒素はグラム陽性菌により産生され菌体外に放出される

毒素でその多くはタンパク質である。従って非透析性で加熱によって不活化され易く, ホルマリンによってトキシイド (もとの抗原性を保ちながらその毒性のみが減弱されているもの) 化される。抗原性は強くまた致死毒性も強い。しかし一般に発熱性は弱い又は欠如している。外毒素産生菌の主なものはボツリヌス菌, 破傷風菌, ウエルシュ菌, 溶血性連鎖球菌などが挙げられるが, 一般的には外毒素は抽出精製が比較的容易であり, それらの物性論は近年急速進展してきた。これに対して内毒素はグラム陰性桿菌の菌体内毒素で前述のように細菌細胞壁を構成するリポ多糖である。すなわち, リピドと多糖体より成る両親媒性をもつ複合高分子であり, ミセルを形成してその分子量は数百万に及ぶものがある。一般に加熱に対して抵抗性を示し, ホルマリンによってトキシイド化されず, 抗原性は弱く非透析性であり, 毒性は一般に外毒素に比べて弱い。しかし発熱性は極めて強く, いわゆる Pyrogen と通称されるゆえんである。内毒素に関する近年の研究の総説は Landy, Braun らによりまとめられている²⁾。

i) グラム陰性菌の構造

グラム陰性菌細胞内における各種の構成成分の分布と形態との関係を Costerton ら³⁾は次の図 1 のように示した。すなわち, 夾膜は LPS を含む細胞壁の外側に存在し, 細胞壁と細胞質膜との間に明確な区別があって periplasmic space を作っていることが特徴である。この LPS は膜の表在性の機能タンパク, 例えば各種の酵素などを外界の直接的影響より保護すると共に, 細胞質内の構成成分が菌の増殖に伴って変化する諸物質の外部との交換を調節していると考えられている。このことは LPS 分子の脂肪酸部分を還元して飽和脂肪酸とすると物質の透過性が昂進する現象や, 外層の LPS を欠如した菌は透過性の調節が細胞質のみで行われるようになったり, 抗生物質や lysozyme に対する感受性が高まる現象などから推定されるところである⁴⁾。

LPS はまたファージレセプターでもあって, 各種のファージを用いることにより細胞壁の O 抗原特異性多糖体の構造研究も行われてきた⁵⁾。膜構造の安定化には Ca^{2+} , Mg^{2+} イオンが役立っているものであり, LPS を phospholipid の人工膜に加えると膜内に取り込まれ, 輸送系に与する酵素もよく配位されて菌体の外膜と同じような構造を示すことが *in vitro* で確かめられてきた⁶⁾。

要するに菌体における LPS の意義は菌の生存上欠くべからざるものであって, 二重膜構造の表層部に位置し, hydrophobic radical を外側におくことによ

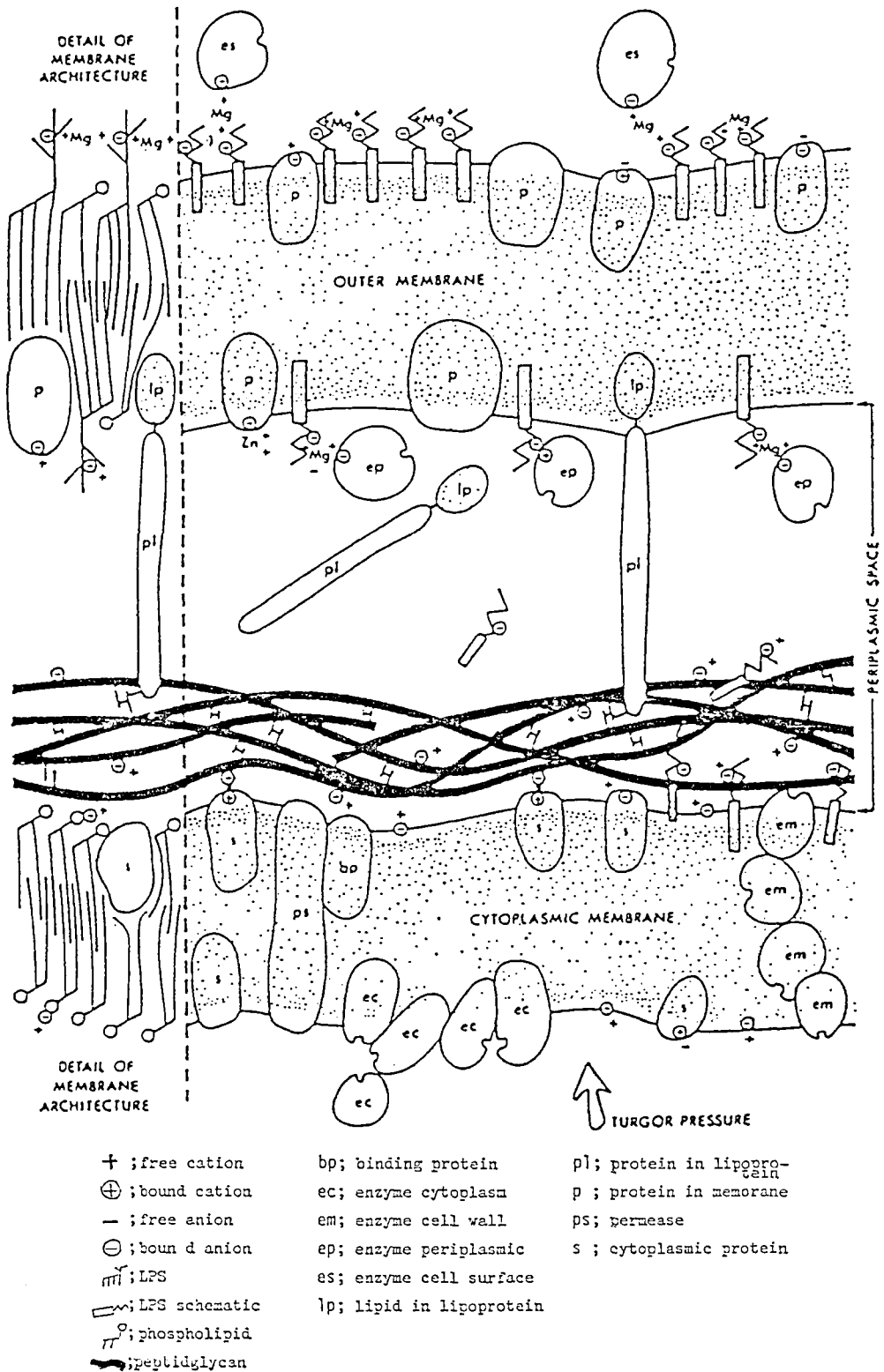


図1. 細菌細胞の構造模型

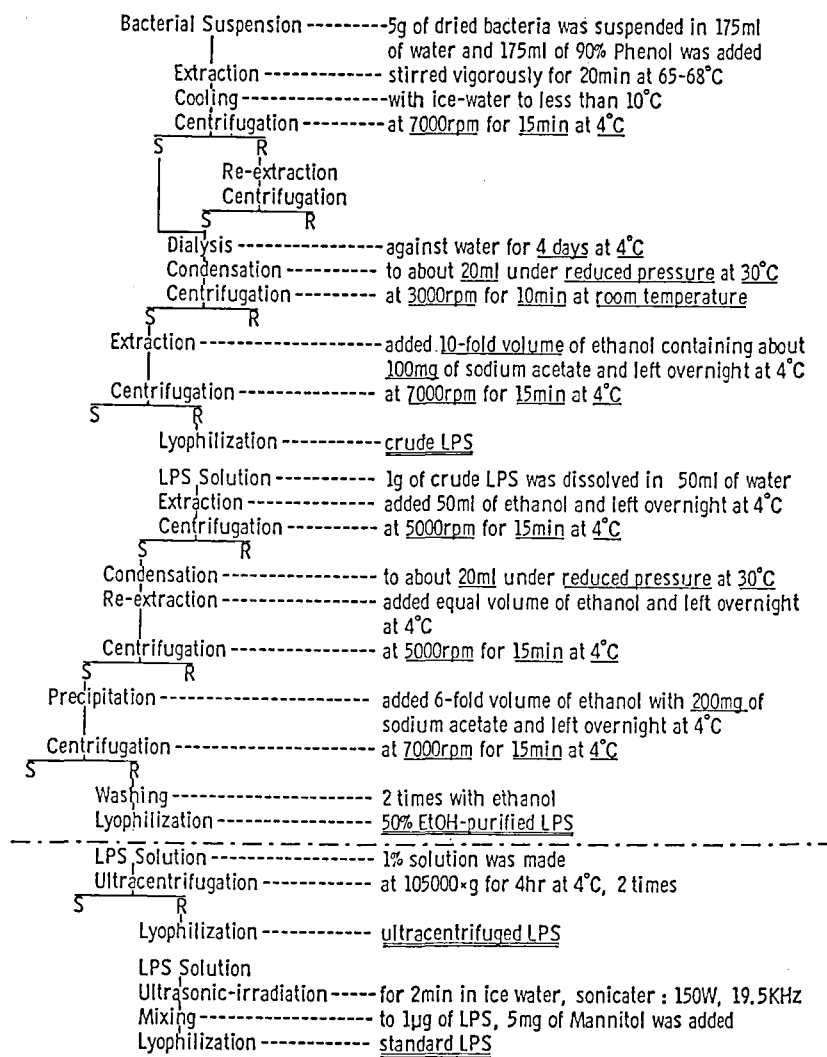


図 2. 内毒素 (LPS) の標準抽出法

て barrier となし、菌の抗体を排除するために役立つものであり、更に物質の透過性の調節作用をもつものと言える。細菌細胞壁の構造と機能の研究はまた、病理学的立場から毒性の問題でもあるが、この点については他の総説に詳述されている⁷⁾。

ii) 毒素の抽出と分析

上述のごとく細菌の膜構造は複雑であり、構成成分を抽出すること自体が多く困難を伴うものである。したがって細菌化学として毒素の研究はかなり後れて出発した。

1933年 Boivin がトリクロール酢酸 (TCA) を用いてネズミチフス菌より抗原性毒素を抽出したことが始めであり、いわゆる Boivin 抗原と呼ばれた。これは複合タンパク質、LPS、核酸及び Lipid B (菌体より

脂溶性溶媒で抽出されるリビドを言い、これに対して Lipid A は多糖体と結合しており、溶媒では抽出されないものをいう) より構成されている。

1954年 Westphal は LPS がフェノールに溶け、また除タンパクの効果があることから、フェノール-水系で菌体より LPS を抽出したが、この系は核酸をも溶解することから、更にアルコールによって核酸を除き、精製 LPS を得た⁸⁾。この時点から細菌内毒素の化学が進歩し、多糖体の構造やリビドの化学が展開し、内毒素の構造と機能の関係がしだいに明らかにされてきている⁹⁾。

Westphal の原法はその後改良が加えられ、現在我々が使用している方法を図 2 に示した。得られた LPS の構造を図 3 に示した。すなわち、この方法によって

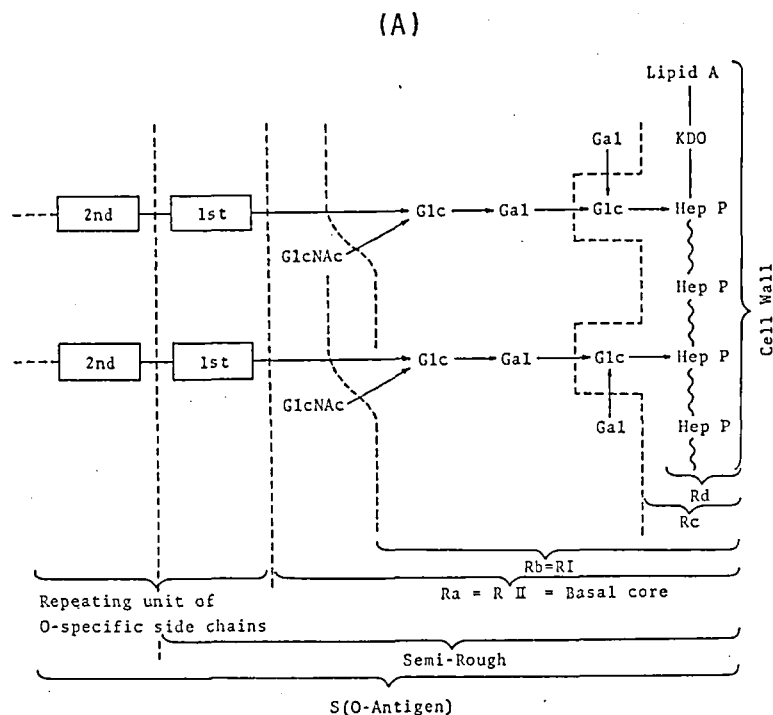


図 3. サルモネラ属O抗原構造 (A) と *Salmonella minnesota* R595 lipid A の推定構造 (B)

得られた LPS は基本的にはグルコース (Glc), ガラクトース (Gla), ヘプトース (Hep), N-アセチルグルコサミン (NAc・Glc) を基本骨格とする多糖体部分と, これに 2-ケト-3 デオキシオクトン酸 (KDO) を介して Lipid A が結合しており, 特にリン酸が糖部分に結合して単位構造をなし, これが重合して巨大分子として数百万の分子量をもつに至ると考えられている。菌

の種類により脂肪酸の種類と数, ならびに結合位置が異なるものとされているがなお今後の詳細な研究が必要である。

iii) LPS の生理作用

LPS は感染症における宿主のさまざまな生理的変化を起こす主役と考えられているが, 実験的に LPS の生理作用が研究され, 化学構造と生体反応が分子レ

表 1. 内毒素の主な生理活性

No.	Endotoxin Reaction	References
1	Pyrogenicity	10)
2	Release of endogenous pyrogen	11)
3	Immunogenicity	12)
4	Adjuvant effect and inhibition of antibody production	13)
5	Effect on "properdin" or natural antibody levels	14)
6	Leukopenia and leukocytosis	15)
7	Protection against irradiation	16)
8	Effect on RES	17)
9	Development of tolerance	18)
10	Enhancement of nonspecific resistance	19)
11	Mobilization of interferon	20)
12	Changes in blood clotting	21)
13	Metabolic changes	22)
14	Endocrinological changes	23)
15	Release of and sensitization to histamine	24)
16	Vascular effects	25)
17	Sanarelli-Shwartzman phenomenon	26)
18	Cytotoxicity	27)
19	Abortion	28)
20	Tumor-necrotizing effect	29)
21	Interaction with complement	30)
22	Shock and lethality	31)

ベルで解析し得るまでに進展した。感染症がしだいに影をひそめつつある一面、毒素の生理作用を解明することは生命の謎を解く鍵として重要視され、再認識が始まっている。

LPS の生理作用のうち、主要な項目について記述し、それらの主な文献と共に表-1 に総括して掲げた。表にみられるように LPS の生理作用は多岐にわたり、その作用を一つずつ詳述することは煩雑となるため、それぞれの主要な文献を参照されたい。これらの反応系は動物の種属差、年齢及び性別にも差がみられ、また投与量や投与時期などによっても変化があり、その統一的解釈は容易ではない。しかし、これらのうちでもっとも特徴的な性質は発熱作用であって、LPS が Pyrogen と呼ばれる所以である。以下 LPS による発熱作用について詳述する。

iv) 発熱作用

発熱作用は全身反応であるため多くの局所反応系の集約であると考えることができる。一般に体温は熱の産生と放散との平衡の上に成立っているものであり、

この調節は温熱中枢によることはすでに記述した。体温に関する本邦における研究水準は高く、その全般的記述は中山³²⁾によってなされている。

熱の産生は主として食物の摂取などによる栄養源の分解過程における熱エネルギーの獲得である。従って物質代謝は生命現象として食物の化学的自由エネルギーの代謝を意味するもので熱力学の法則に含まれることになる。しかし、個々の生体反応系を *in vitro* で測定することは困難で、一般には生体内の反応系をブラックボックスとして考え摂取された食物の内部エネルギーを仕事量と熱の産生量との和として求めることができる。このブラックボックスは消化、吸収、代謝及び排泄の過程を含みこの調節機構として神経及び内分泌系が関与する。

LPS が直接中枢神経に作用して体温上昇をもたらすことは各種の実験において確められており、この機構には次のような説が提唱されて来た。

a) セットポイント説

Nakayama 及び Hardy ら³³⁾が実験的にウサギの脳幹に存在する温度感受性ニューロンを証明した。その機構は恒温槽におけるレギュレーターのような役目をするもので、冷ユニットニューロンが作働すれば体温は上昇的に働き、温ユニットニューロンが作働すれば体温は下降的に働き、結局この2つの感受性ニューロンによって体温が一定範囲内に保たれていると考える説である。

b) ナトリウムポンプ説

1970年に Feldberg ら³⁴⁾はネコの脳室を0.9%のNaClで灌流すると急激な体温上昇がおり、灌流液にCa²⁺を添加するとこれが抑制されることを見出した。この知見をもとにK⁺及びMg²⁺は体温上昇に影響を及ぼさないが、Na⁺とCa²⁺の比が重要であって、Na⁺が細胞内に流入すると神経の興奮による体温上昇がおけると考える説である。

c) 白血球性発熱物質媒体説

ウサギにLPSを注射すると二峰性の発熱曲線がえられる。第一峰はLPSが直接中枢に作用しておこる発熱であり、第二峰は血液の多核白血球に作用して産生される白血球性発熱物質が再び中枢に作用しておこる持続的発熱であると解釈されている。この説はAtkins らによって提唱されたもので白血球性発熱物質は分子量 4×10^4 のリボタンパクであり、この化学的並びに生物学的特性については多くの研究が行われて来た¹⁰⁾³⁵⁾。

d) 直接作用説

Atkins 一派をのぞく多くの学派はLPSが直接中枢

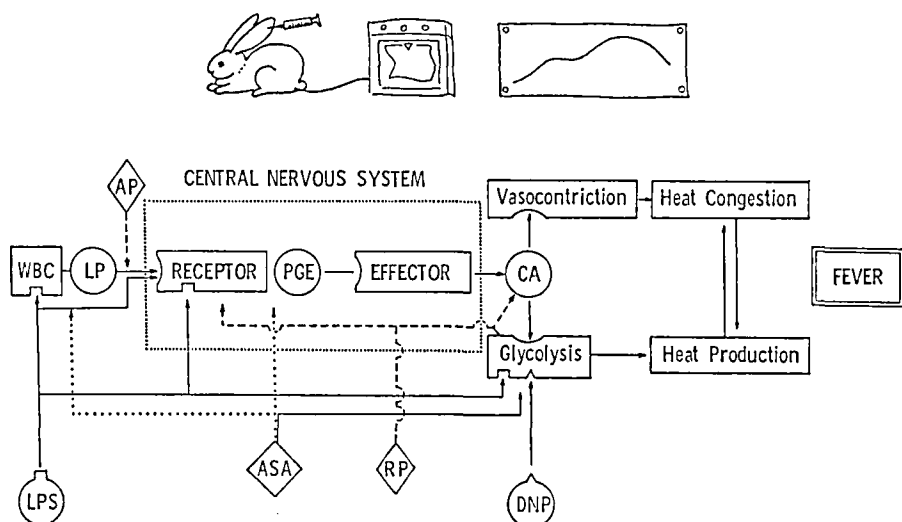


図4. 発熱物質による発熱機序と解熱剤の作用部位 (推定)

LP: 白血球性発熱物質, PGE: プロスタグランジンE, CA: カテコールアミン
AP: アミノピリン, RP: レセルピン

に作用するものと考えている。実験的発熱反応は動物の種属により異なり、また、体位により大きく変動する。後者の問題は Nishio 及び Kanoh³⁶⁾ により拘束状態の差により LPS による反応性は異なるが、心拍数に差はみとめられないという成績がえられ、また、Kawasaki 及び Kanoh³⁷⁾ はこれらの点をさらに巾広く検討し、解析を行った。

LPS が直接中枢に作用することは血液脳関門 (B. B. Barrier) を通過するか又は何らかの相互作用が考えられる。LPS の発熱反応に種属特異性が存在することから神経鞘 myelin の構成成分である proteolipid と LPS との間に何らかの相互作用があるものと考えられる。Kanoh 及び Ogawa³⁸⁾ はこの点に着目し、大脳 proteolipid を発熱反応の強い順にウサギ、ラット及びニワトリより抽出し、これと LPS の反応性を検討した。in vitro での不活化度は発熱反応性と逆の関係がえられ、LPS との結合体に依存することが明らかとなった³⁹⁾。また、LPS と proteolipid の混合物をクロマトで検討したとき、proteolipid apoprotein が LPS と結合していることが明らかにされた。これらの分析結果は種属特異性の解析として興味ある知見と考えられている⁴⁰⁾。

e) その他

その他カテコールアミン媒体説やプロスタグランジン (PGE₂) 媒体説などが提唱されているがいずれも統一の見解に欠けていることが指摘されている⁴¹⁾。

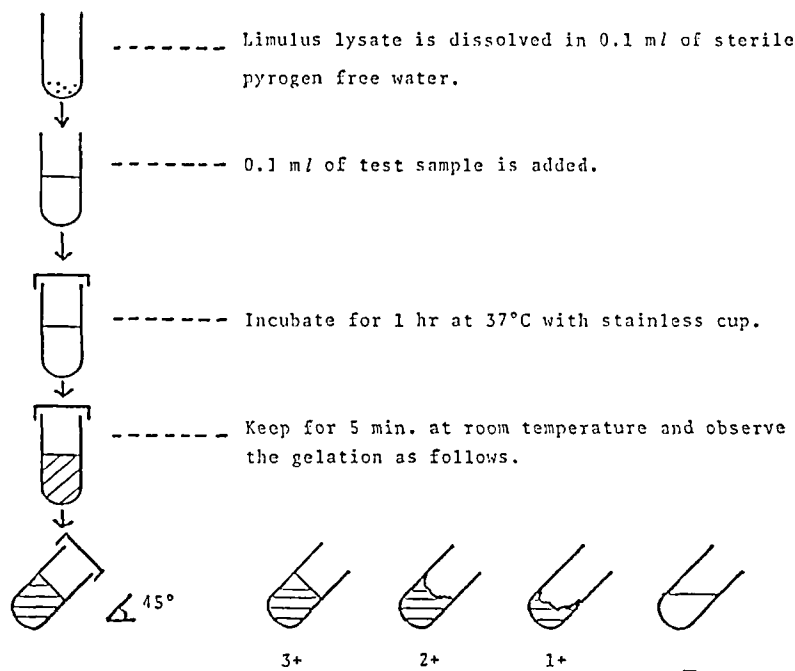
発熱物質による発熱機序には解熱剤の作用機構を併

せて考えることも可能である。ウサギを用いて発熱物質による発熱と解熱剤の作用点を推定すると図4のごとく示すことができよう。すなわち、LPS は血中において多核白血球 (WBC) に吸着されとりこまれたのち白血球性発熱物質 (LP) を放出し、血液脳関門を通過して中枢に至りレセプターと結合する。このとき PGE が放出され、温熱中枢に働きカテコールアミン (CA) が結合型から遊離型となって血中に遊離する。CA は血管収縮と共に解糖系を促進する。この結果グルコースの消費が充進して発熱が起こるものと解釈されている。

アスピリン (ASA) の解熱作用は末梢においては解糖系を抑制すると共にまた、PGE の合成を阻害することにより温熱中枢の作働が抑制され、結果として解熱効果をもたらすものと解釈される。ジニトロフェノール (DNP) による発熱は末梢における解糖系の充進をもたらすものであるが、レセルピン (RP) は末梢における CA を溜めせしめるために DNP と拮抗的に作用し体温の下降をもたらすものと説明されている。

[II] Limulus test

1964年 Bang は海辺にカブトガニが多数死んでいるのを観察し、いずれも血液が凝固した血中に多数のグラム陰性桿菌を発見した。このことから、カブトガニの血液成分が細菌内毒素により凝固するものであることをたしかめ、研究の結果、カブトガニのリンパ球の成分に内毒素によって凝固しうるタンパクの存在を確認し、この反応が内毒素の定量に使用しうることを



Various gelation forms as the reference.

図 5. Limulus test の方法及び判定

発表した⁴²⁾。

カブトガニは筋足動物、鋏角類、剣尾目に属し、三葉虫を祖先として現代まで世界各地に生棲するもので生きた化石といわれている。分類学上は4種知られており、*Limulus polyphemus* は北米東海岸及びメキシコ湾岸に生棲している。*Tachypleus tridentatus* は日本及び東南アジア地方にあり、我国では佐賀県伊万里海岸や北九州海岸一帯及び瀬戸内海では岡山県笠岡市の海岸一帯に生棲している。この地方は天然記念物指定地区となっている。また、*Tachypleus gigas* は東マレーシア及びベンガル湾にすみ、*Carcinoscorius rotundicauda* はタイ、ビルマ及びベトナム海岸に分布している。アフリカ、地中海及びヨーロッパの海岸には生棲しないことは興味がある。これらの4種は形態においては大同小異であり、これらから得られる血球 lysate の LPS による反応性もほぼ等しいものとされている。

i) Limulus test の手法

カブトガニの血球は amoebocyte としてヘモシアニンを含み単一な細胞として存在する。内毒素と反応するタンパクは細胞質にあって血清成分は反応しない。LPS との反応成分は血球を破壊してえられる lysate を凍結乾燥したものである。この試験は Levin らにより改良された⁴³⁾が著者ら⁴⁴⁾の研究室で行われている

術式を図5に示した。

判定法は各種市販品により多少異なる。これは反応液の容量やゲルの濃度又は反応容器の形態などによるもので一定の方式は定め難いのが現状である。

ii) Limulus test の反応機構

この反応機構は内外の研究者により最近10年間に急速に進展した。反応機構やその応用種並びにカブトガニの生態学を含む研究は1978年 Wood Hole (Ma) で開かれたシンポジウム要旨集にまとめられている⁴⁵⁾。

Young ら⁴⁶⁾は Limulus lysate 中には LPS と初めに反応する凝固酵素とそれによってゲル化をおこすコアギュローゲンの2つの系が存在し、LPS がプロ凝固酵素を初めに活性化し、それによって凝固酵素が作動し、コアギュローゲンがゲルに転化するものと考えた。コアギュローゲンは、分子量 1.8×10^4 の一本のポリペプチドでアミノ酸残基175よりなり、フェニルアラニン、シスチン及びリジン含量が高い。この構造はA—C—Bの3つの部分よりなり、A—C及びC—Bの間は Arg—Gly 結合をなすが、この2つの部分が切断されてC部分が遊離するとゲル形成がおこるものとされている。岩永ら⁴⁷⁾は、この点を更に研究し、酵素の水解される部分を発色基を含む合成基質で置換し、LPS によって遊離した発色基を比色定量すれば LPS

の量を測定しうることを示した。従って、微量の LPS はこの方法により 0.5~2.5 ng/ml の間で直線性を示すことを明らかにした。

iii) Limulus test の応用

Limulus test は LPS に対する反応性が極めて鋭敏であり、特異的である。また、測定が簡単であることから各方面への応用が考えられている。特に後述するように Pyrogen test との相関性が注目されているが、なお解決さるべき多くの問題点が残されている。

応用面として第一にあげられる点は水質検査への応用である。川崎と加納⁴⁴⁾は、近畿地方における河川や湖水の細菌学的汚染度を本法によって詳細に検討すると共に、総菌数の測定並びに大腸菌群の測定を行ってその相関度を比較した。その結果、琵琶湖の水質は $\times 10^{-2}$ に希釈しても Limulus test で陽性となるが、それを源流とする淀川の下流では $\times 10^{-3}$ においてもなお陽性を示し、細菌数は 24×10^6 /ml より 15×10^3 個/ml に上昇していることを認めた。更に各地の水道水について検討したところ、生菌は検出されなかったがいずれも Limulus test 陽性であることを認めた。各地の井戸水は、いずれの地方においても生菌数は $10 \sim 10^3$ 個/ml であり、Limulus test では10倍に希釈しても陽性となることを示した。

同様の実験例では Jorgensen ら⁴⁵⁾は、各種の飲料水中には 0.7~1259 ng/ml 程度に Limulus test 陽性物質を認めたが、同時に行った生菌数の測定結果とは対応しないと述べている。これは恐らく検体の種類により含まれている細菌の種類が異なったり、水の処理法の差異に基づくものであろうといっている。同様の例として Evans ら⁴⁶⁾の研究もある。

食品衛生上の応用については、同じく川崎と加納⁴⁴⁾は、各種の輸入食品、例えば冷凍エビ、コーンビーフ、ソーセージ等8種、トマトジュース、牛乳等3種類について前述と同様の検討を加えたところ、検体のホモゲナイズ上清を10倍に希釈しても Limulus test 陽性となった。しかし、冷凍エビでは検討した6例はいずれも 1g 当り $10^4 \sim 10^5$ 個の生菌数を認めた。このように生菌数に対して Limulus test における LPS の検出度の低いことは、恐らく冷凍エビの成分中に Limulus 反応の inhibitor が含有されているものと考えられた。同様のことが食肉についても認められることから、食品中の LPS の検出法としての Limulus test の応用は、なお検討を要するものと考えられた。

しかし、Jay ら⁵⁰⁾は、凍結ミンチについて検討した成績では、Limulus test の反応性とグラム陰性菌数とはよく平行しており、 5° より 30° にもどしたときは

菌数の増加に伴い、Limulus 反応性も上昇したと述べている。さらに多くの食品について検討したところ、よい相関性が認められ、Limulus test が食品の細菌汚染度を測定するよい指標となると述べている^{51), 52)}。

しかし、これらの報告は直接 LPS を定量しているもので、inhibitor 除去の操作を欠いていることから、なお再考の余地がある。

更に、ワクチンや血液成分などの検定における応用例がある。これはもとより Pyrogen test の代用として考えられている問題である。

Gardi 及び Arpagaus ら⁵³⁾は、血清アルブミン製剤 345 lot について Pyrogen test と平行して適用したところ、333 例が両 test に陰性であったが、残りの12検体はそれぞれの test に反対の結果が現れた。このことから彼らは、Limulus test は Pyrogen test の代用としてよりむしろ工程上のチェックに用いるべきだと述べている。

Kreeftenberg ら⁵⁴⁾は、この方法を更にマイクロ化した方法を提案した。ワクチン類について、Geier ら⁵⁵⁾は、0.3 ng/ml 以上の LPS を含むものが20検体中16検体見出され、これが副作用の原因であろうと述べている。

抗生物質製剤のうちペニシリン製剤については、本法が Pyrogen test と比較的良好に対応したが、2, 3のものには Limulus 反応を阻害する例もみられたことから⁵⁶⁾、これらの製剤に本法を適用するためには、なお充分な検討が必要であると考えられた。

臨床診断上の応用としては、エンドトキシン・ショックまたはエンドトキセミア(内毒素血症)の研究に利用されて来た。

Levin ら⁵⁷⁾は、内毒素血症を疑われた患者98名の血液について血清を分離して、これよりクロロホルムで inhibitor を除去し⁵⁸⁾、本法を適用したところ、グラム陰性菌の感染症においては、Limulus test の結果と菌の検出結果との間により相関性が認められた。しかし、肺炎菌やその他のグラム陰性菌によると思われる場合には、Limulus test は陰性であったと述べている。Garibaldi ら⁵⁹⁾は、39例の患者血清について本法を適用し71%の割合で陽性となり、いずれも桿菌が検出されたが、残りの29%は陽性となっても菌の検出は認められなかった。また、Limulus test に対する反応性の強さは、必ずしも菌数や症状とは対応せず、診断の有力な決め手とはならないと警告している。

更に、Elin ら⁶⁰⁾は、病気の種類によっては本法は無効であると批判している。

従って、本法をもってエンドトキシン・ショックや

内毒素血症その他の感染症の血清診断を行うためには、なお多くの困難な問題点があり、特に反応系における inhibitor の除去や検体採取の時間的問題などさまざまな未解決の問題が残されている。

Limulus test の反応阻害物質についての研究は、小林ら^{61), 62)}により行われており、また、放射性医薬品製剤については、村田ら⁶³⁾及び Cooper ら⁶⁴⁾により研究が進められている。

注射用医薬品、特に輸液への Limulus test の適用については、加納及び川崎⁶⁵⁾が、リンゲル液及びブドウ糖注射液について詳細に検討を行っている。すなわち、ブドウ糖液 5, 20, 50% 及びリンゲル液 (いずれも Pyrogen test 及び Limulus test 陰性のもの) に 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ または 0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の LPS を加え、それぞれ加熱滅菌の前後に両 test を行って比較検討したところ、滅菌前のものの発熱度はいずれも高いが、Limulus test ではブドウ糖濃度が 5 あるいは 20% から 50% と高くなると、最小ゲル化活性 (M. G. D) が 10^{-4} $\mu\text{g}/\text{ml}$ から 10^{-3} $\mu\text{g}/\text{ml}$ へと 1/10 に低下した。これに通常の滅菌操作 (121°, 30分) を施すと、0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の LPS 添加群では滅菌によりいずれも両 test に陰性となった。しかし、0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS 添加群では、発熱度は多少の低下を示すが、Limulus test におけるゲル化活性は 1/100 に低下した。従ってブドウ糖は明らかに Limulus test に阻害的に作用するとともに、加熱滅菌により更に阻害作用は強く現われるようである。

この点について川崎及び加納⁶⁶⁾は更にその原因を詳細に検討した結果、ブドウ糖液の加熱によって生成する 5-hydroxymethylfulfural, レブリン酸及びギ酸等の影響を調べ、*in vitro* におけるこれらの物質の Limulus test に対する反応阻害は極くわずかであり、むしろブドウ糖の加熱により分解生成する上記物質等による pH の低下が大きな要因であると推定している。

さらに、一定の条件下で LPS 溶液を加熱して経時的に一定量を取り Pyrogen test と Limulus test を行うとき、両 test で示される LPS の活性は、ほぼ対応して低下し、ある限定した阻害物質のない条件下では、両 test の平行性はほぼ認められている⁶⁷⁾。

一方、Pearson と Weary⁶⁸⁾ は、各種注射液について Pyrogen test と Limulus test を行った結果、LPS のみが存在する場合には、両 test の結果はよく対応することを認めたが、他の薬物が混在するときは、反応が阻害されることもあり、予め test の条件を厳密に規定しておくべきだと述べている。

さらに、Limulus test の非特異的反応性について Elin ら⁶⁹⁾は、各種の生体高分子、特に nucleotide や

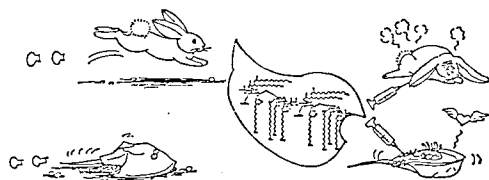


図 6. LPS (Lipid A) 検出のための Pyrogen test と Limulus test

タンパクなどに陽性に反応するものがあることを指摘している。

同様に Pyrogen test との比較においても他の物質の混在しない場合に対応性がよいことは Ronneberger と Stärk⁷⁰⁾により述べられている。その他この問題に関しては多数の報告があり、非特異性があるため一般化すべきでないとする意見と、Pyrogen test とはよく対応するため代用しようという意見がある。

結論的に言えば、比較的簡単な成分を持つ注射液では、LPS を添加した場合でも、ある程度 Pyrogen test との平行性を認めることができる。従って、Limulus test には更に広く inhibitor の研究が必要であろう。製造、工程管理上 Pyrogen test が不可能である場合には代用となりうるが、最終製品についてはむしろ、両者を併用することにより、一層安全性が確保されるものと考えられる。

[III] Pyrogen test と Limulus test との相関性

Pyrogen test と Limulus test との相関性を論ずるためには 2, 3 の前提となる条件が満たされなければならない。巨視的に見れば極めて簡単な図として図 6 に示したごとくであるが、なお微視的には無数の問題点がある。前述のごとく、Pyrogen test は Pyrogen の有無をウサギに注射してその発熱度をもって指標とする検定法で、*in vivo* の bioassay である。これに対して Limulus test はカブトガニの血球成分が LPS によって凝固する度合を指標とする *in vitro* の bioassay である。前者の LPS に対する感受性はおおよそ μg オーダーの単位であるのに対して後者のそれは $\text{ng} \sim \text{pg}$ オーダーの単位である。

一般にある物質の *in vitro* における活性が *in vivo* の効果と 1:1 で対応することは殆んどないといつてよい。両者の実験系が *in vitro* と *in vivo* の差であることは勿論のことであるが、反応系は全く異質のもので成立っている。従って両者の相関性を論ずるためにはこの点が克服されなければならない。さらに重要な点は Pyrogen の質の問題である。LPS はそれ自体両者に強い活性を示すが、さらに次の諸点が解決されな

表 2. 各種発熱物質のウサギに対する発熱性と Limulu test への反応性

Materials	Pyrogen test M.P.D.* ¹	Limulus test M.G.D.* ²
<i>E. coli</i> UKT-B		
LPS (A)	10 ⁻² µg/kg	10 ⁻³ µg/ml
" (B)	10 ⁻² "	10 ⁻³ "
<i>Strep. pyogenes</i> T-12		
LPS	10.0 µg/kg	0.0 µg/ml
M-protein	10.0 "	10 ⁻¹ "
Mucopeptide	10.0 "	10.0 "
<i>Staph. aureus</i> 209p LPS	100.0 "	1.0 "
<i>Staph. B.</i> enterotoxin	10.0 > "	10.0 "
<i>C. welchii</i> enterotoxin	10.0 > "	10.0 "
Aflatoxin	N.D.* ³ "	10 ² "
Ricin	10 ⁻¹ "	10 ² "
Baker's yeast LPS (Boivin type)	10.0 "	1.0 "

*¹ M.P.D.: Minimum pyrogenic dose*² M.G.D.: Minimum gel formation dose*³ N.D.: Not done

ければならない。(i) LPS の構造と活性は菌の種類によって異なるか否か。(ii) LPS の活性を示す最少単位が存在するか否か。(iii) LPS 以外の物質が活性に関与するか否か。などの問題である。

第一の問題に対して加納及び川崎⁶⁹⁾は各種の細菌から毒素を抽出し、Pyrogen test と Limulus test を行い、それぞれの活性を比較したところ、表 2 に示す結果を得ている。このことから、両者に対して強い活性を示すものは大腸菌の LPS のみであり、他の毒素の発熱性は相対的には弱いことが示された。しかし、両者の活性が平行しない例も認められ、必ずしも一定の傾向は認められないと言ってよいであろう。また、LPS は高分子集合体であるため、それより分子量に従って分画すると分子量の大なるものほどよく両者の活性が高くなることを認めた。このことは両 test に対して LPS のみが特異性が高いことを示しているものである。と共に、すべての毒素は量の差はあっても両方又は一方にのみ反応性を示すこともありうることを示している。第二の問題に対しては、LPS のもつさまざまな生物活性が同一の分子構造によるものでないことは古くから示されて来た。例えば、シュワルツマン反応性と発熱性及び鶏胚に対する毒性とはそれぞれ無関係であるとされており、酸又はアルカリ処理を施した LPS は元の LPS 抗体とは多糖体部分のみが沈降線を作るが、その毒性は失なわれていることなどが知られて来た。また、宿主側についてもコーチゾンを与えた動物は LPS に対して抵抗性を示すが局所シェ

ワルツマン反応性は殆んど変化しないことなどが知られている。

その他、酸又はアルカリ処理によって LPS を分解したのち、得られた物質について各種の生物活性を測定して、それらの構造と活性を推定しようとする試みが数多く行われて来た。しかし厳密な意味では LPS が高分子電解質であることから、LPS の分解はそれぞれの構成する単分子の数と種類並びにそれらの重合性を考察すれば系は無数の因子を含むこととなる。古くから LPS の分解については多くの試みがなされて来た。例えば、Nowotny⁷¹⁾ は TGA より調製した Bovine 抗原を (i) HBF₃-CH₃OH で加熱する方法、(ii) CH₃OH-KOH で還流する方法、(iii) ピリジンとギ酸 (2:1) で水浴上で加熱する方法などで毒素を処理し、これらを別々に致死毒性と免疫原性について比較したところ、前者は著しく低下したが後者は不変であったと述べている。また Oroszlan ら⁷²⁾ はラウリルサルファイト (SLS) を *Serratia marcescens* (霊菌) の内毒素に作用させると subunit に分解し、ガン細胞破壊作用が失われるが SLS を除くと再び凝集して毒性が見られるようになることを報告した。Ribíら⁷³⁾ は大腸菌やその他の数種の菌体より LPS を調製し、それらにデオキシコール酸ソーダ (DOC) を加えてその相互作用を検討した。LPS は DOC によって解離し、分子量 2×10⁴ 程度の単位粒子と考えられるものになり、これは発熱性を欠いていた。この系より DOC を除くと再び凝集をおこして分子量 5×10⁵~10×10⁵ の

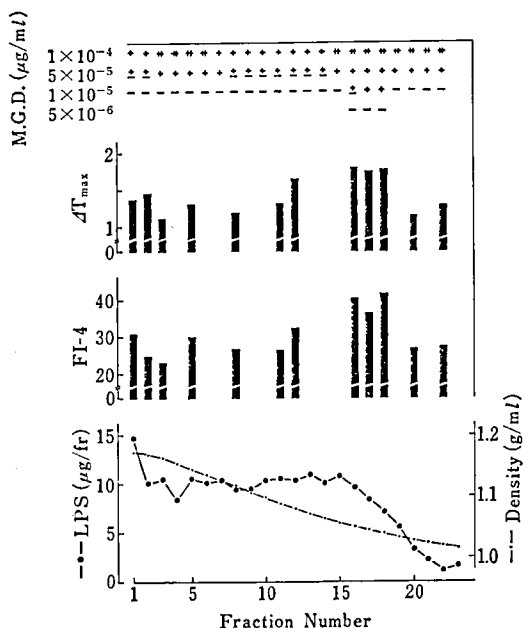


図 7. LPS のシヨ糖密度勾配遠心パターンと発熱及び LAL 活性

巨大分子となり、同時に発熱性は回復するようになる。血清を予め添加すれば凝集は抑制されることから、LPS の分子は単位分子量 2×10^4 程度の両親媒性を有するものがミセル構造をとるものであろうと推論した。しかし、これが活性単位であり得るか、なお検討が必要とされていた。この点に関し、著者らは上述の如き化学的方法によらず物理的手段によって LPS の構造変化と活性変化を明らかにしようと試みた。小室と加納⁷⁴⁾はシヨ糖密度勾配遠心分析を行い各画分について LPS を Carbocyanine 色素によって定量し⁷⁵⁾同時に Pyrogen test と Limulus test とを測定したところ、図 7 に示す成績を得た。すなわち、精製した LPS は密度 1.0~1.2 の間に広く分散しているが、発熱性は (FI-4 は注射後 4 時間までの発熱曲線の積分値を示し、 ΔT_{max} はその間における最高体温上昇度を示す) と LAL 活性 (Limulus test におけるゲル活性) は密度の 1.03~1.05 間に強いことが明らかにされた。また LPS に 3 分間超音波処理を施すと発熱及び LAL 活性は有意に増大し、巨大分子が一定の分子サイズに収れんすることが示された。このことはまた電子顕微鏡による観察でも確認された。これらの結果から、さらに活性の最小単位についての詳細な研究が期待される。

また、加熱等による LPS の物性と生物活性の変化については、Kanoh と Ogawa⁷⁶⁾は詳細に各種の条件下で行った結果、120°—30 分の加圧滅菌操作を施し、

クロマトグラフィーを行えば LPS は 3 つのピークが出現し、それぞれ糖組成及びリピド組成の異なる画分が得られた。これらの画分について発熱性、マウスの致死毒性、シュワルツマン活性、及び血管透過性などを比較検討した結果、分子サイズが小さくなるに従い、それらの活性は低下した。同様の知見はすでに Kanoh ら⁷⁷⁾が Biogel を用いた無菌カラムによって証明したところである。しかしこれらの成績はなお厳密には生物活性が特定の活性基に依存するという知見には至っていない。発熱活性の低下は加熱温度、時間及び LPS の濃度などにより異なるものであり、LPS が希薄溶液の場合には 56° で 90 分の加熱でも発熱性は半減することが確認された。川崎ら⁷⁸⁾は上述の各種の加熱条件下における LPS 溶液の Limulus test を行ったが発熱活性の低下とよく対応していることを認めている。このことは発熱性の担手であると考えられている Lipid A が Limulus 反応の担手でもあることを推察させるが、Yin ら⁷⁹⁾は LPS をアルカリで水解して得た Lipid A について牛血清アルブミンと結合させた Lipid A/BSA が元の LPS の Limulus 活性に近い値を示したことから、Lipid A が Limulus 活性の担手であろうと推論した。

おわりに

以上、Pyrogen test と Limulus test とについて、それらの意義を述べると共に、LPS の両 test に対する問題点を解説した。この記述から厳密な意味での相関性を求めることは困難である。前者は *in vivo* の反応系であり後者は *in vitro* の反応系であることは勿論であるが、LPS 自体においても活性の単位はなお不明であり、また、各種の菌体より得られる LPS もまた活性を異にすることから、あくまでも巨視的な相関性として限定された範囲内で考えられるべきである。また、同一菌種の LPS でも遺伝子工学によって得られた菌の LPS がどのような構造と活性を示すかという点も全く不明であり、今後興味ある視点となるであろう。

LPS の種類により、また Limulus test における市販品の試薬にかなりの活性の差があることからこの test の結果の判定は必ずしも容易ではない。従ってこれらの煩雑な結果を整理するために Reference endotoxin を設定する作業が行われつつある。米国における Reference toxin は現在数回改良が加えられているが⁸⁰⁾、なお活性及び再現性の点において、我々の調製した日本の標準品には遠く及ばない⁸¹⁾。

結論として、Limulus test をもって Pyrogen test

に代用することは時期尚早であり、かつ薬物の安全対策上好ましくないといえよう。ただし、製剤における工程管理上又は最終製品について Pyrogen test と併用することは好ましいことと考える。

文 献

- 1) 加納晴三郎: 総合臨床, **29**, 453 (1980)
- 2) M. Landy and W. Braun: *Bacterial Endotoxin* (1964). Rutgers University Press, New Brunswick, N.J.
- 3) J.W. Costerton, J.M. Ingram and K.J. Chang: *Bacterial Rev.*, **38**, 87 (1974)
- 4) S. Schect und O. Westphal: *Z. Bakteri.*, **213**, 356 (1970)
- 5) A.A. Linderberg and C.G. Hellerquist: *J. Bakteri.*, **105**, 57 (1971)
- 6) D. Romeo, D. Girard and L. Rothfield: *J. Mol. Biol.*, **53**, 475 (1970)
- 7) H. Smith: *Bacteriol. Rev.*, **41**, 475 (1977)
- 8) O. Westphal: *Angew. Chem.*, **66**, 407 (1954)
- 9) E.T. Rietschel: *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **287**, 73 (1975)
- 10) E.A. Atkins: *Physiol. Rev.*, **40**, 580 (1960)
- 11) S. Kanoh et al.: *Jap. J. Pharmacol.*, **17**, 125 (1967)
- 12) M. Landy, R.P. Sanderson and A.L. Jackson: *J. Exp. Med.*, **122**, 483 (1965)
- 13) A.G. Johnson: *Bacterial Endotoxin*, p. 252 (1964), ed. by M. Landy and W. Braun, Rutgers University Press, New Brunswick, N.J.
- 14) M. Landy and L. Pillermer: *J. Exp. Med.*, **103**, 823 (1956)
- 15) G.J. Fruhman: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **102**, 423 (1959)
- 16) E.J. Ainsworth and H.B. Chase: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **102**, 483 (1959)
- 17) B. Benacerraf and M.M. Sebestyen: *Fed. Proc.*, **16**, 860 (1957)
- 18) P.B. Beeson: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **61**, 248 (1946)
- 19) A.I. Braude and J. Siemieniowski: *Bull. N.Y. Acad. Med.*, **37**, 448 (1961)
- 20) M. Ho: *Science*, **146**, 1474 (1964)
- 21) M.H. Hörder, B. Kickhofen and F. Wendt: *Klin. Wochenschr.*, **36**, 164 (1958)
- 22) M. Hamosh and B. Shapiro: *Brit. J. Exptl. Pathol.*, **41**, 372 (1960)
- 23) W.F. Windle: *Anat. Record*, **106**, 94 (1950)
- 24) S.E. Geisman: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **103**, 628 (1960)
- 25) R.P. Gilbert: *Physiol. Rev.*, **40**, 245 (1960)
- 26) G. Schwartzman: *J. Exp. Med.*, **48**, 247 (1928)
- 27) W. Braun and R.W.I. Kessel: *Bacterial Endotoxin*, p. 397 (1964), ed. by M. Landy and W. Braun, Rutgers University Press, New Brunswick, N.J.
- 28) S. Kanoh and M. Ema: *Cong. Anom.*, **20**, 151 (1980)
- 29) M.J. Shear, A. Perrault and J.R. Adams: *J. Natl. Cancer Inst.*, **4**, 99 (1943)
- 30) H.A. Bladen, H. Gewurz and S.E. Mergenhagen: *J. Exp. Med.*, **125**, 767 (1967)
- 31) J.G. Brunson, C.N. Gamble and L. Thomas: *Am. J. Pathol.*, **31**, 489 (1955)
- 32) 中山昭雄編: 温熱生理学. (1981), 理工学社 (東京)
- 33) T. Nakayama and J.D. Hardy: *J. Appl. Physiol.*, **27**, 848 (1969)
- 34) W. Feldwerg, R.D. Meyer and W.L. Veale: *J. Physiol.*, **207**, 403 (1970)
- 35) 本間 遼ら: 細菌内毒素, p. 376 (1973), 講談社 (東京)
- 36) A. Nishio and S. Kanoh: *Jap. J. Pharmacol.*, **30**, 568 (1980)
- 37) H. Kawasaki and S. Kanoh: *J. Toxicol. Sci.*, **5**, 271 (1980)
- 38) S. Kanoh and Y. Ogawa: *Jap. J. Pharmacol.*, **31**, 419 (1981)
- 39) Y. Ogawa and S. Kanoh: *Jap. J. Pharmacol.*, **31**, 425 (1981)
- 40) Y. Ogawa and S. Kanoh: *Jap. J. Pharmacol.*, **32**, 189 (1982)
- 41) 加納晴三郎: フアルマシア, **6**, 397 (1971)
- 42) J. Levin and F.B. Bang: *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, **115**, 265 (1964)
- 43) J. Levin, T.E. Poore, N.P. Zauber and R.S. Oser: *New Eng. J. Med.*, **283**, 1313 (1970)
- 44) 川崎浩之進, 加納晴三郎: 食衛誌, **18**, 266 (1977)
- 45) E. Cohen et al.: *Biomedical Applications of the Horseshoe Crab (Limulidae)* (1979), Alan R. Liss, Inc., New York
- 46) N.S. Young, J. Levin and R.A. Prendergast: *J. Clin. Invest.*, **51**, 1790 (1972)
- 47) 岩永貞昭: 代謝, **14**, 271 (1977)
- 48) J.H. Jorgensen et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**, 928 (1979)
- 49) T.M. Evans, J.E. Schilling and D.G. Stuart: *Appl. Environ. Microbiol.*, **35**, 376 (1978)
- 50) J.M. Jay: *J. Appl. Bacteriol.*, **43**, 99 (1977)
- 51) J.M. Jay and S. Margitic: *Appl. Environ. Microbiol.*, **38**, 879 (1979)
- 52) J.A. Seiter and J.M. Jay: *Appl. Environ. Microbiol.*, **40**, 177 (1980)
- 53) A. Gardi and G. Arpagaus: *Develop. Biol. Standard.*, **34**, 21 (1977)
- 54) J.G. Kreeftenberg et al.: *Develop. Biol. Standard.*, **34**, 15 (1977)
- 55) M.R. Geier: *Appl. Environ. Microbiol.*, **36**, 445 (1978)
- 56) P.M. Newsome: *J. Pharm. Pharmacol.*, **29**, 704 (1977)
- 57) J. Levin et al.: *J. Lab. Clin. Med.*, **75**, 903

- (1970)
- 58) P.B. Reinhold and J. Fine: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **137**, 334 (1971)
- 59) R.A. Garibaldi et al.: *J. Infect. Dis.*, **128**, 551 (1973)
- 60) R.J. Elin et al.: *J. Infect. Dis.*, **137**, 505 (1978)
- 61) 小林正義, 森本武男, 山元正昭: 薬学誌, **95**, 720 (1975)
- 62) 小林正義, 山元正昭: 薬学誌, **100**, 500 (1980)
- 63) 村田 啓, 小林正義ら: *Radioisotopes*, **24**, 32 (1975)
- 64) J.F. Cooper et al.: *Bull. Parenteral Drug Assoc.*, **26**, 153 (1972)
- 65) 加納晴三郎, 川崎浩之進: 衛生試報, **98**, 76 (1980)
- 66) 川崎浩之進, 加納晴三郎: 衛生試報, (印刷中)
- 67) 川崎浩之進: 未発表
- 68) F.C. Pearson and M. Weary: *J. Parenteral Drug Assoc.*, **34**, 103 (1980)
- 69) R.J. Elin and S.M. Wolff: *J. Infect. Dis.*, **128**, 349 (1973)
- 70) V.H. Ronneberger and J. Stärk: *Arzneim. Forsch. (Drug Res.)*, **24**, 933 (1974)
- 71) A. Nowotony: *Nature*, **197**, 721 (1963)
- 72) S.L. Oroszlan and P.Y. Mora: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **12**, 345 (1963)
- 73) E. Ribí et al.: *J. Bacteriol.*, **92**, 1493 (1966)
- 74) 小室徹雄, 加納晴三郎: 第29回毒素シンポジウム予稿集, p.53 (1982)
- 75) P. Zey and S. Jackson: *Appl. Microbiol.*, **26**, 129 (1973)
- 76) S. Kanoh and Y. Ogawa: *Biken J.*, **13**, 233 (1970)
- 77) S. Kanoh, H. Kohlhaage and R. Siegert: *J. Bacteriol.*, **96**, (1968)
- 78) 川崎浩之進, 加納晴三郎: 未発表
- 79) E.T. Yin et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **261**, 284 (1972)
- 80) A.S. Ouschoorn: *Pharmaceutical Forum*, **8**, 1743 (1982)
- 81) 加納晴三郎: 簡易内毒素試験法の研究, p. 6 (1981), 厚生科学研究報告

覚せい剤の微量分析法に関する研究 (第1報)

高橋一徳・島峯望彦・大野昌子・川崎 靖・関田清司・降矢 強

Microanalysis of Amphetamines. I

Kazunori TAKAHASHI, Mochihiko SHIMAMINE, Masako ŌNO, Yasushi KAWASAKI,
Kiyoshi SEKITA and Tsuyoshi FURUYA

This work was done after due consideration about the establishment of the applicable methods for the human beings addicted to amphetamines.

3 or 5 mg/kg of methamphetamine hydrochloride was administered subcutaneously to four monkeys (*Macaca irus*), and metabolism of the drug and duration of metabolites excreted into the sweat, saliva and urine were studied.

The FID-GC and NP-FID-GC procedures are described for the confirmation of the presence of metabolites in these biological fluids.

Methamphetamine and its demethylated metabolite, amphetamine, were detected in these biological fluids of monkeys respectively and determined quantitatively by these procedures.

Methamphetamine was excreted about 54 hours in the case of sweat and saliva, and about 72 hours in urine. The maximum amounts of amphetamine was found in the samples collected between 6 and 12 hours after administration, and decreased the amounts gradually until 78 hours in the case of saliva, and 174 hours in sweat and in urine samples respectively.

(Received May 31, 1982)

近年、覚せい剤の不正使用による種々の社会悪が注目されている。乱用による依存性、耐性、中毒等の諸問題解決の一環として、中毒者を診断する方法の確立に着手し、すでに尿を試料としてマイクロクリスタルテストによる覚せい剤の検出法の研究を行った¹⁾。尿から抽出した覚せい剤の確認、定量には薬毒物化学試験法として、水素炎イオン化検出器付ガスクロマトグラフ法 (FID-GC) が用いられている²⁾。また窒素、リン化合物に特異的に高感度を有する熱イオン化検出器 (FTD) が開発され³⁾、覚せい剤の分析にも用いられている^{4,5)}。われわれは引き続き尿の採取が困難な場合に対処するため、より容易に採取できる体液として汗、唾液等を取り上げ、中毒者から採取したこれらの試料からも NP-FID-GC 法により覚せい剤とその代謝物を検出したが^{6,7)}、摂取した覚せい剤の排せつ状況の確認が困難であったので、実験動物にサルを用い、塩酸メタンフェタミンを投与して、メタンフェタミンとその代謝物であるアンフェタミンの汗、唾液、尿中への排せつ量及び排せつ持続時間を明らかにし、ヒトの場合に、これらをいかにして、最も有効な試料として役立てることができるかについて考察を加えた。

実 験 方 法

I 実験動物

カニクイザル (*Macaca irus*) 雄, 4頭

体重: No. 1 6.45 kg

No. 2 5.27 kg

No. 3 2.87 kg

No. 4 3.63 kg

II 塩酸メタンフェタミンの投与及び採取条件

投与量: No. 1, No. 2 及び No. 3 のサルには 5 mg/kg ずつ1回, No. 4 のサルには 3 mg/kg を1回それぞれ皮下に投与する。

採取条件: 動物室の室温は平常の $25 \pm 1^\circ$ から $30 \pm 1^\circ$ に昇温し、湿度は $55 \pm 5\%$ とした。

サルはいずれもモンキーチェアに保定し、四肢をギブス包帯で保定し、四肢の自由を束縛する。

III 試料の採取

(1) 方法

汗: 左右の手掌及び足底に約 10×10 cm のガーゼを握らせ、ビニール袋で包み、その上にセロテープを巻き6時間にわたって排せつされる汗を吸着させる方

法で採取.

唾液: 6時間ごとに、ガーゼではは袋を清拭して採取.

尿: 小児用採尿バック (アトム) を用いて、汗と同様に6時間にわたって排せつされる尿を採取.

(2) 採取期間

第1法: 6時間を1採取とし、連続保定の状態で30時間.

第2法: 6時間の保定による採取を行ったのち、保定をとき、平常の飼育にもどし、翌日ふたたび6時間保定する方法で10日間.

IV 試料溶液の調製

(1) 試料からの覚せい剤の抽出 汗、唾液付着のガーゼは1%塩酸15mlを加えて溶出し、溶出液をろ過したのち、ろ液に6N水酸化ナトリウム液2mlを加えてアルカリ性にし、また尿は2mlをとり、6N水酸化ナトリウム液0.5mlを加えてアルカリ性にし、それぞれクロロホルム20mlずつで2回抽出する。クロロホルム液はいずれも水10mlずつで洗い、氷酢酸2滴を入れたフラスコ中にもろ過し、ろ液を減圧で蒸発乾固する。

(2) GC試料の調製 (1)で得た蒸発残留物をそれぞれ酢酸エチル0.5mlに溶かし、トリフルオール酢酸(TFA)0.5mlを加えて、60°の水浴中で20分間加温してTFA化し、冷後、減圧で蒸発乾固する。得られた残留物を酢酸エチル1mlに溶かし、GCの試料とする。

(3) 標準溶液の調製 塩酸メタンフェタミン(市販品)及び硫酸アンフェタミン(自製品)をそれぞれメタノールに溶かし、0.1, 0.2, 1.0, 2.0, 50, 100, 150 µg/mlの溶液を調製し、標準溶液とする。

(4) 内部標準溶液 アゾベンゼン約15mgを精密に量り、酢酸エチルに溶かし、正確に100mlとした溶液。

V ガスクロマトグラフィー

測定条件

Apparatus: Yokokawa Hewlett Packard YHP

5710A

Detector: FID, NP-FID

Column: OV-101 2% (Chromosorb W HP, 100~120 mesh), glass, ID 2 mm, L. 4 ft

Temp.: Injection port 250°

Column 150°

Detector 300°

Carrier gas: N₂ 30 ml/min

	FID	NP-FID
H ₂	30 ml/min	3 ml/min
Air	240 ml/min	60 ml/min
Sens	10×8	1×16
Chart speed	10 mm/min	
Digital integrator:	Takeda Riken TR-2221	

	FID	NP-FID
Slope sense	40 µV/min	20 µV/min
Peak width	6 sec	6 sec
Valley time	3 sec	0 sec
Height factor	10	0

VI 検量線の作成

(1) FID-GCによる検量線 標準溶液 50, 100, 150 µg/mlのそれぞれ1mlずつをとり、減圧で蒸発乾固し、残留物をIV-(2)にしたがってTFA化し、冷後、減圧で蒸発乾固する。得られた残留物に内部標準溶液1mlを正確に加えて溶かし、その1µlずつをとり、前記Vの条件でGCを行い、たて軸にインテグレーターを用いて得られたピーク面積比を、横軸にメタンフェタミン及びアンフェタミンの量を取り検量線を作成する。

(2) NP-FID-GCによる検量線 標準溶液 0.1, 0.2, 1.0, 2.0 µg/mlのそれぞれ1mlずつをとり、減圧で蒸発乾固し、残留物をIV-(2)にしたがってTFA化し、冷後、減圧で蒸発乾固する。得られた残留物に酢酸エチル1mlを正確に加えて溶かし、その1µlずつをとり、前記Vの条件でGCを行い、たて軸にインテグレーターを用いて得られたピーク面積値を、横軸にメタンフェタミン及びアンフェタミンの量を取り検量線を作成する。

実験結果

I 塩酸メタンフェタミンの投与及び試料の採取

No. 1, No. 2のサルはⅢにしたがって試料を採取し、採取回数5回の試料を得た。No. 3のサルは投与後約4時間で死亡したため1回採取におわった。No. 3のサルが死亡し、かつNo. 1, No. 2のサルについても連続30時間保定のため疲労の増加が観察され、死の徴候が認められたので、No. 4のサルでは、投与量を3 mg/kgに下げ、また室温も25±1°にして、投与後6時間保定したのち、保定をとき、18時間平常飼育にもどし、翌日6時間保定する方法で試料を採取したが、4日目にサルの疲労が認められたので、2日間平常飼育にもどし7日目及び10日目に試料を採取した。

塩酸メタンフェタミン投与後のサルの一般症状は、いずれも投与直後より6時間目までは瞳孔散大、不安、

Table 1. Amount of the sweat, saliva and urine collected within 30 hours and during 10 days

Experimental animal	Time, collected	Sweat	Saliva	Urine
No. 1	0～ 6 hr	994.9 mg	86.4 mg	20.0 ml
	6～ 12	226.7	343.2	20.0
	12～ 18	142.6	380.3	28.0
	18～ 24	189.0	787.9	22.0
	24～ 30	176.8	651.4	26.5
	Total	1,730.0	2,249.2	116.5
No. 2	0～ 6	186.6	108.0	26.0
	6～ 12	137.5	100.5	26.8
	12～ 18	123.6	195.0	30.0
	18～ 24	124.0	230.0	64.0
	24～ 30	129.6	119.7	49.0
	Total	701.3	753.2	195.8
No. 3	0～ 4	198.8	151.4	13.0
No. 4	0～ 6	931.2	267.5	13.2
	24～ 30	267.7	179.2	8.5
	48～ 54	262.2	262.5	13.5
	72～ 78	285.9	105.7	15.5
	168～174	193.0	108.3	9.0
	240～246	168.7	87.6	16.0
	Total	2,108.7	1,010.8	75.7

攻撃性、神経過敏などが主であったが、24時間後には回復を示した。

採取試料の量を Table 1 に示す。

II 試料の TFA 化について

メタンフェタミンとアンフェタミンは V に示した GC の条件では分離しないので、これらを分離するために TFA 化を試みた。これらは IV-(2) の条件により、いずれも完全に TFA 化され、かつ互いに分離し、感度も上がり、テーリングも認められなかった。TFA 化したメタンフェタミンとアンフェタミンの t_R はそれぞれ 1.69 分、1.04 分であった。

III ガスクロマトグラム

(1) 投与前採取の汗、唾液、尿の場合

投与前にサルを 6 時間保定して採取した汗、唾液、尿（ブランク）を IV の方法にしたがって得たものがメタンフェタミンとアンフェタミンの検出に影響を与えるピークを有するかどうかについて検討したが、Fig. 1 に示すように、クロマトグラムはいずれもこれらの検出を妨げるピークを示さなかった。

(2) 投与後同上試料の場合

投与後に採取した試料の汗、唾液、尿を IV の方法にしたがって処理したもののについては Fig. 2 に示すクロ

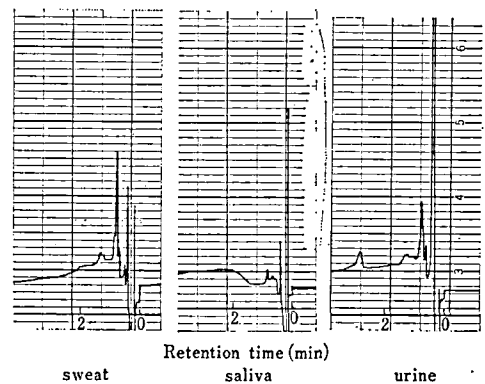


Fig. 1. GC chromatograms of sweat, saliva and urine of monkeys before the administration of methamphetamine hydrochloride

マトグラムが得られた。

IV 検量線及び検出限界について

(1) FID-GC による検量線

VI-(1) の方法で得たメタンフェタミンとアンフェタミンの検量線は Fig. 3 に示すように、いずれの場合も $110 \mu\text{g/ml}$ まで原点を通る直線性を示し、その検出限界は 8 ng であった。

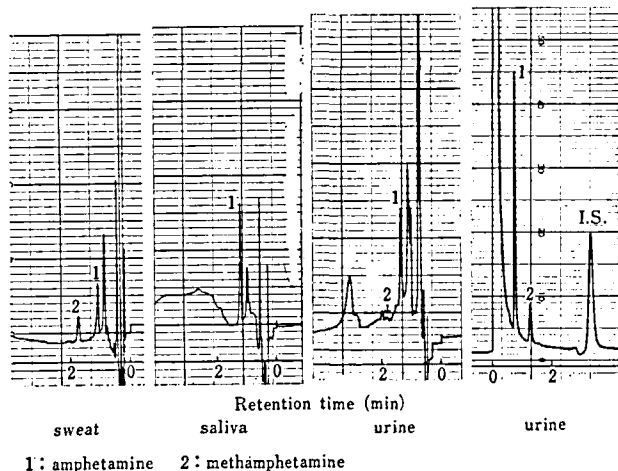


Fig. 2. GC chromatograms of sweat, saliva and urine of monkeys after the administration of methamphetamine hydrochloride subcutaneously

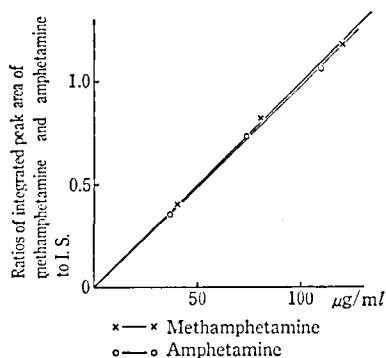


Fig. 3. Calibration curves of methamphetamine and amphetamine by FID-GC

(2) NP-FID-GCによる検量線

VI-(2)の方法で得たメタンフェタミンとアンフェタミンの検量線は Fig. 4 に示すように $1.6 \mu\text{g/ml}$ まで原点を通る直線性を示し、その検出限界はメタンフェタミンでは 8 pg 、アンフェタミンでは 15 pg であった。

V 回収率

覚せい剤投与前に保定したサルをとり、その 2 ml に塩酸メタンフェタミン及び硫酸アンフェタミンそれぞれ $1 \mu\text{g}$ ずつを添加して、IVの方法にしたがって操作し、その回収率を求めたところ、塩酸メタンフェタミンの回収率は 95.3% ($n=2$)、硫酸アンフェタミンの回収率は 92.8% ($n=2$) であった。

VI 体液中への排泄分量

塩酸メタンフェタミンを投与した4頭のサルから採取した汗、唾液、尿中に排泄されたメタンフェタミン及びアンフェタミンの量はIV及びVの方法にしたが

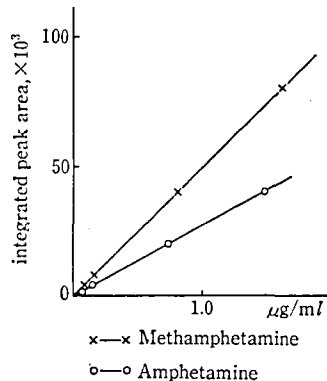


Fig. 4. Calibration curves of methamphetamine and amphetamine by NP-FID-GC

って測定したところ Table 2 に示すとおりであった。

Table 2 に示したように、塩酸メタンフェタミン投与後、メタンフェタミンとその脱メチル代謝物であるアンフェタミンがいずれも汗、唾液、尿中に排泄されており、その量は前者では、いずれの試料の場合にも時間の経過とともに漸減し、後者は6~12時間の間に最も多く認められそののち漸減した。メタンフェタミンの排泄は汗、唾液中には54時間、尿中には72時間まで認められた。またアンフェタミンは唾液には78時間、汗、尿にはこれより数日後の174時間まで排泄が持続した。

アンフェタミンをメタンフェタミンに換算し、比較的異常の少なかったNo.2のサルについてみると、30時間内に各試料中に排泄された代謝物の量の比はおおよそ汗：唾液：尿=1:0.3:2000であった。また各実験動物ごとに採取した全部の汗、唾液、尿中に排

Table 2. Amounts of methamphetamine and amphetamine containing biological fluids excreted within 30 hours and 10 days

Experimental animal	Time, collected	Sweat		Saliva		Urine	
		M	A	M	A	M	A
No. 1	0~ 6 hr	572.1 ng	105.0 ng	19.1 ng	18.4 ng	1,694.0 μ g	403.7 μ g
	6~ 12	83.4	108.7	10.0	339.5	225.0	880.8
	12~ 18	94.4	101.3	6.0	51.4	89.9	873.5
	18~ 24	52.2	110.6	4.0	7.3	35.3	662.1
	24~ 30	1,467.5	81.1	—	—	—	204.2
	Total	2,269.6	506.7	39.1	416.6	2,044.2	3,024.3
No. 2	0~ 6	349.3	171.4	8.0	—	1,565.9	248.1
	6~ 12	152.6	143.1	7.2	86.6	161.4	737.7
	12~ 18	102.4	119.3	—	154.1	—	242.2
	18~ 24	92.3	247.7	—	177.6	—	187.9
	24~ 30	49.0	269.4	—	68.3	—	30.6
	Total	745.6	950.9	15.2	486.6	1,727.3	1,446.5
No. 3	0~ 4	176.7	—	658.5	22.0	944.7	81.1
No. 4	0~ 6	242.8	5.2	68.8	—	694.2	644.3
	24~ 30	69.5	457.9	45.9	150.3	1.2	113.1
	48~ 54	27.9	230.7	3.5	64.7	—	7.4
	72~ 78	—	49.6	—	38.5	0.2	2.2
	168~174	—	9.5	—	—	—	0.8
	240~246	—	—	—	—	—	—
	Total	340.2	752.9	118.2	253.5	695.6	767.8

M: methamphetamine A: amphetamine

せつされた全メタンフェタミン量(換算値を含む)の投与量に対する割合は No. 1 のサルでは 19.82%, No. 2 では 24.93%, No. 4 では 17.63% であった。

考 察

ヒトの体液を試料として覚せい剤中毒の有無を診断するため、メタンフェタミン及びその代謝物の汗、唾液、尿中への排泄状態を動物実験により明らかにするために、汗腺分布ができるだけヒトに類似し、かつ入手が可能な動物としてカンクイザルを選んだ。

サルの汗腺は手掌、足底部、有毛部体表に存在しているが⁸⁾、手掌、足底部の汗を試料として採取したのは

① ヒトのほとんど全身に分布するエクリン腺が、サルでは手掌、足底及び指の腹側面に限られていること

② 有毛部でないため、より容易に汗だけを採取できる

ということであった。しかしヒトの場合と異なり、これらの部分は小さいので、発汗を促進させるために室

温を平常の $25 \pm 1^\circ$ から $30 \pm 1^\circ$ にまで昇温させ、単位時間内の汗をできるだけ完全に採取するためにガーゼを握らせ更にビニール袋で四肢を包むバック法を適用した。この方法により塩酸メタンフェタミン投与前に保定したサルから6時間以内に得られた汗の量は使用した4頭の平均で約 200mg であった。塩酸メタンフェタミン 5mg/kg を投与した3頭のサルのうち1頭が投与後約4時間で死亡したが、その理由として、平常より 5° 高い室温と使用したサルの体温調節反応性との関係、保定によるストレス及びメタンフェタミンに対する感受性等の因子を考え、最後のサルについては投与量も 3mg/kg に下げ、採取方法も実験結果で示したように連続保定を止め、保定をとき、かつ間隔をあけての採取を試みたが、これでもまだ死亡の危険性がみられ、実験例が少ないことから最もよい条件の設定はできなかった。しかし実験結果にはいづれも同じ傾向がみられ、微量の試料から明らかに検出、定量できる代謝物は未変化のメタンフェタミンとメチル基のはずれたアンフェタミンで pg 単位での検出が必要とされた。

GC-Mass を使用せずに、両者を迅速、確実に検出、確認するための有効な手段は NP-FID-GC の適用であろう。NP-FID-GC による両者の分離、定量は TFA 化により非常に精度よく行うことができる。TFA 化したものはピークの分離、再現性ともにすぐれている。メタンフェタミンとアンフェタミンの検出は FID の場合の 1/500~1/1000 の量があれば十分であるといえる。

サルを実験動物とした今回の研究で30時間までに採取した汗、唾液、尿中に排せつされた総メタンフェタミン量(アンフェタミン換算値を含む)は投与量に対して約20~25%で尿中への排せつがほとんどではあったが、ヒトの場合、メタンフェタミンは投与量の78~90%が48時間にわたり、尿中に排せつされると報告されており⁹⁾、この間の相違については検討の余地がある。尿への排せつに比べヒトでも唾液、汗等への排せつ量は少ないが、今回のサルを用いた実験でも、連続30時間保定して得た試料に含まれた代謝物の量の割合はおおよそ汗:唾液:尿=1:0.3:2000 であり、この点に関する限りは類似していた。

この方法を中毒者の判定手段として適用するために

は更に夾雑物の存在、中毒者と決定するための基準とされる最低検出量を考慮することのほか、他の微量分析法との組合せによる必要があり、またこの方法を適用するために、試料として最も確実に、適当な体液はこれら3種のうち78時間以内の尿あるいは48時間以内の汗であろうと思われる。

文 献

- 1) M. Ōno, B.F. Engelke, C.C. Fulton: Bull. on Narcotics, **XXI**(2), 31 (1969)
- 2) 薬毒物化学試験法注解, 第2版: p. 237 (1982), 南山堂
- 3) A. Karmen, L. Giuffrida: *Nature*, **201**, 1204 (1964)
- 4) 山元俊憲, 寺田 賢, 吉田武美, 吉村三郎, 黒岩幸雄: 衛生化学, **27**, 326 (1981)
- 5) 高橋節典, 松原和夫, 間瀬田千香咲, 福井有公: 日法医誌, **36**, 176 (1982)
- 6) 体液中の覚せい剤検出法研究報告 (1980)
- 7) 体液中の覚せい剤検出法研究報告 (1982)
- 8) 黒住一昌: 医学のあゆみ, **110**(10) (1979)
- 9) J. Caldwell, L.G. Pring, R.T. Williams: *Biochem. J.*, **129**, 11 (1972)

dl-ノルエピネフリンの水溶液中での安定性

徳永裕司・木村俊夫・川村次良

Studies of Stability for dl-Norepinephrine in Solution

Hiroshi TOKUNAGA, Toshio KIMURA and Jiro KAWAMURA

After keeping dl-norepinephrine (NE) solution at 106°, 116° for 1-7 days, residual amounts of NE were determined by high performance liquid chromatographic method (HPLC method) and by colorimetry. Residual percent of NE at 106° and 116° gave an apparent zero order degradation until third day, and their regression equations by HPLC method were $y = -8.12x + 98.0$ ($r = -0.998$) and $y = -13.15x + 97.7$ ($r = -0.986$), respectively. In case of NE solution containing sodium bisulfite, residual percent of NE at 106° gave a same apparent zero order degradation until seventh day, and its regression equation was $y = -6.90x + 99.7$ ($r = -0.993$). Therefore it was found that sodium bisulfite protected the degradation of NE. The analytical values by HPLC method were compared with those by colorimetry, and the relationship between both values gave a very good correlation.

(Received May 31, 1982)

dl-ノルエピネフリン(NE)の水溶液は、一般に不安定なことが報告されている¹⁾。そこで、NEの水溶液中での安定性を検討することを目的に、NEの0.01N塩酸溶液を106°, 116°, 及び亜硫酸水素ナトリウムの存在下、106°で1~7日間加熱し、残存するNE量を高速液体クロマトグラフ法(HPLC法)及び比色定量法で定量し、各温度におけるNEの分解パターン、

HPLC法及び比色定量法で得られた値の比較、分解産物の薄層クロマトグラフ法(TLC法)での検討を行った。

実験の部

1. 装置及び分離条件 装置は、日本精密製高圧ポンプ、アトー製UV検出器、ベックマン・島津製記

録計，及び三田村理研製加水分解炉を使用した。

HPLC 装置の分離条件は，4×250 mm のカラムにリクロソルブ RP-18 (5 μm) を充てんした後，溶液アセトニトリル・0.17M 酢酸 (1:4) 混液，カラム温度 30°，流量 1 ml/min とした。検出波長は，280 nm，フルスケール 0.08 AUFS，チャートスピード 2.5 mm/min であった。

2. 試薬及び試液 酒石酸水素ノルエピネフリン標準品は日本薬局方標準品，NE の粉末は，シグマ社製のものを用了。その他の試薬は，試薬特級品を用いた。TLC 板でセルロースは，フナコシ製のもの，シリカゲルは，メルク社製のもので，20×20 cm を用いた。

内部標準溶液 (IS)：安息香酸約 50 mg を精密に量り，アセトニトリル・0.17M 酢酸 (1:4) 混液 10.0 ml に溶解する。

0.17M 酢酸：氷酢酸 10 ml に水を加えて 1 l とする。

3. 定量法 I (HPLC 法) NE を乾燥した後，その約 100 mg を精密に量り，100 ml のメスフラスコに入れる。0.01 N 塩酸を加えて溶かした後，0.01 N 塩酸を加えて 100 ml とする。この液 5 ml を試験管にとり，試験管上部を熔封し，各種温度にて 1～7 日間放置する。得られた溶液を綿栓ろ過し，ろ液 50 μl，IS 20 μl，及びアセトニトリル・0.17M 酢酸 (1:4) 混液 30 μl を加えて混和する。この液 5 μl を HPLC 装置に注入し，保持時間 (t_R) 7.5 分の NE 及び t_R 11.2 分の IS のピーク高さの測定を行う。NE の量は，あらかじめ作成した検量線より求める。

4. 定量法 II (比色定量法) 第十改正日本薬局方の方法を準用する²⁾。ただし，HPLC 法で，綿栓ろ過後に得られたろ液 1 ml を正確に量り，試験管に入れ，これに水 4 ml を正確に加えて試料溶液とした。

5. TLC 法 NE の 0.01 N 塩酸溶液 (1 mg/ml) 10 μl を薄層板上にスポットし，セルロースの場合には，展開溶媒として，ブタノール・酢酸・水・ピリジン混液 (38:8:20:24)，シリカゲルの場合には，ブタノール・酢酸・水混液 (4:1:2) を用いて，原線より約 10 cm 展開を行う。展開した後，風乾し，うすめたフォリン試液 (1→4) を噴霧し，約 5 分後，アンモニア蒸気中に数秒間置き，生じたスポットの検出を行う。

結果及び考察

1. HPLC 法による検量線及び再現性 NE の 0.01 N 塩酸溶液 (1 mg/ml) 5～60 μl をサンプル管に

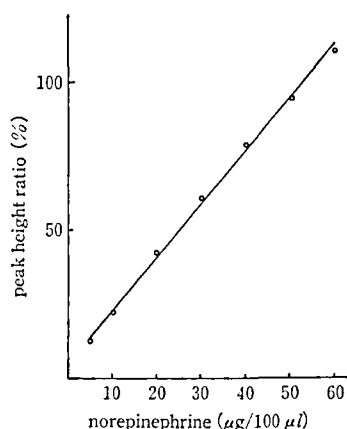


Fig. 1. Working curve for norepinephrine by HPLC method

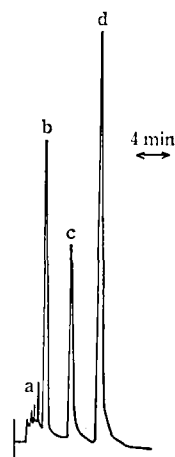


Fig. 2. High performance liquid chromatogram of norepinephrine solution after heating for 7 days at 106°

a, b: decomposition products, c: norepinephrine, d: internal standard

入れ，IS 20 μl を加え，アセトニトリル・0.17M 酢酸混液を加えて全量を 100 μl とする。この混液 5 μl を HPLC 装置に注入し，検量線の作成を行った。その結果を Fig. 1 に示す。

得られた検量線は，この範囲において良好な直線性を示し，その方程式は， $y = 1.81x + 4.9$ で，相関係数は 0.999 であった。NE 5 μg 及び 50 μg/100 μl の溶液 5 μl を繰り返して 6 回，HPLC 装置に注入し，再現性の検討を行った。ピーク高さ比の平均値は，それぞれ，12.7%，91.4%，変動係数は，それぞれ，3.27%，2.63% であった。

2. 比色定量法による検量線及び再現性 NE 0.1

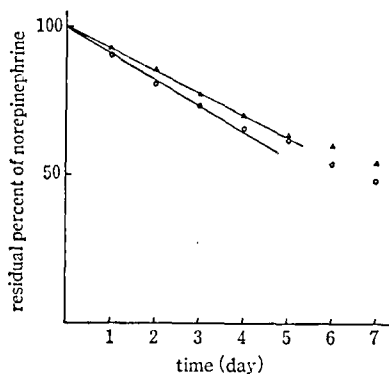


Fig. 3. Relationship between time and residual percent of norepinephrine at 106°

△—△: HPLC method, ○—○: colorimetry

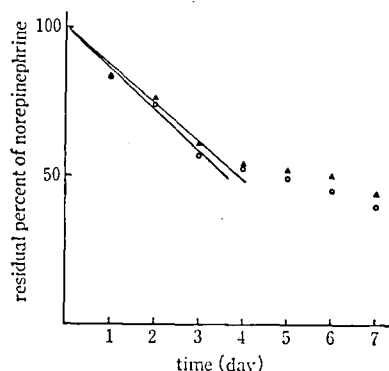


Fig. 4. Relationship between time and residual percent of norepinephrine at 116°

○—○: HPLC method, △—△: colorimetry

～1.2 mg/ml を含有する 0.01 N 塩酸溶液を調製し、比色定量法に従い検量線の作成を行った。その結果、NE 濃度と吸光度の間には、ゼロを通る良好な直線関係が成立した。NE 0.2 mg 及び 1.0 mg/ml の溶液を調製し、同一操作を 6 回繰り返し、再現性の検討を行った。その結果、吸光度の平均値は、それぞれ、0.114 及び 0.600 であり、変動係数は、それぞれ、1.03% 及び 0.21% であった。

3. 安定性の検討 NE 1 mg/ml を含有する 0.01 N 塩酸溶液を調製し、この液 5 ml を試験管にとり、試験管上部を熔封する。106°, 116° で 1～7 日間加熱した後、HPLC 法及び比色定量法で残存する NE の測定を行った。106° で 7 日間加熱したときの HPLC クロマトグラムを Fig. 2 に示す。

時間の経過とともに t_R 7.5 分の NE ピーク c が減少

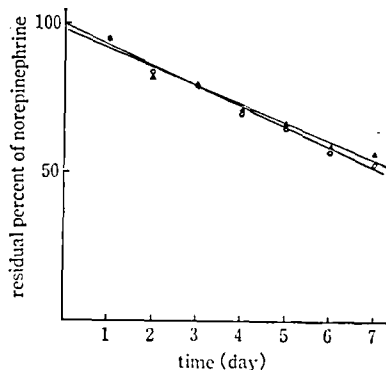


Fig. 5. Relationship between time and residual percent of norepinephrine at 106° after adding sodium bisulfite

○—○: HPLC method, △—△: colorimetry

し、それに伴って、 t_R 3.2 分付近のマルチピーク a のピーク高さの増加、及び t_R 4.4 分のピーク b のピーク高さが増加することが観察された。106°, 116° で加熱したときの NE の残存率を HPLC 法及び比色定量法で求めたものを Fig. 3 及び Fig. 4 に示す。NE の安定性には、106° 及び 116° の両者の温度で、残存率 50～60% までみかけ上ゼロ次反応で分解し、それ以後は、みかけ上ゼロ次反応より離れることが明らかになった。

市販の NE の注射液には、安定化剤として亜硫酸水素ナトリウムが添加されている。そこで、NE の 0.01 N 塩酸溶液 1 ml に亜硫酸水素ナトリウム 0.3 mg を含有する溶液を調製し、106° で 1～7 日間加熱した。その時の NE の残存率の測定を HPLC 法及び比色定量法で求めた。その結果を Fig. 5 に示す。

NE の分解は、7 日目までの範囲ではみかけ上ゼロ次反応で進行し、HPLC 法で得られた直線の方程式は、 $y = -6.90x + 99.7$ 、相関係数は、 -0.9933 、比色定量法で得られた直線の方程式は、 $y = -6.22x + 98.0$ 、相関係数は、 -0.9858 であった。Fig. 3 での亜硫酸水素ナトリウムを添加しないものと比較して、両者のみかけ上ゼロ次反応での傾き、すなわち分解速度には差が認められ、加熱による NE の分解の際には、分解の初期段階で、亜硫酸水素ナトリウムが NE の分解を抑制する作用が認められた。しかし、亜硫酸水素ナトリウムを含有しない場合、分解の後期段階 (5～7 日) では分解速度の低下が認められ、7 日目での NE の残存率は、亜硫酸水素ナトリウムの添加の有無にかかわらず、ほぼ同じ値を与えた。

室温で NE の 0.01 N 塩酸溶液を放置した場合、7

Table 1. R_f values of norepinephrine and decomposition products obtained from norepinephrine solution for 1-4 days at 106°

	norepinephrine	decomp. A	decomp. B
cellulose plate	0.50	0.45	0.95
silica gel plate	0.39	0.28	0.70

日目でも、NE の残存率は、98% であり、ほとんど NE の分解は認められないことがわかった。

4. TLC による分解産物の検討 NE の 0.01 N 塩酸溶液 (1 mg/ml) を 106° で 1~4 日間分解させたもの、10 μ l をセルロースあるいはシリカゲル板にスポットし、展開を行った。その結果を Table 1 に示す。

セルロース板での分解物 B は、溶媒先端 (R_f 0.95) であるのに対し、シリカゲル板では、 R_f 値 0.70 で、スポットの広がりも小さいので、シリカゲル板を用いた場合には、良好な結果が得られた。TLC クロマトグラム上での分解物のスポットと HPLC クロマトグラム上でのピークとの関係を調べるため、セルロース板における分解物 A 及び B を TLC 板よりかき取り、0.01 N 塩酸で溶出させ、HPLC 装置に注入した。分解物 B は、HPLC クロマトグラムでの保持時間 3.7 分に現われ、これは Fig. 2 のマルチピーク a 中の成分に相当するが分解物 A は、セルロース板上での量が少ないためか、あるいは、TLC 板からの抽出が不十分のためか、HPLC クロマトグラム上にピークを観察することができなかった。

5. HPLC 法及び比色定量法での定量値の相関性の検討 NE の 0.01 N 塩酸溶液を 106° 及び 116° で 1~7 日間加熱して得られた試料溶液及び亜硫酸水

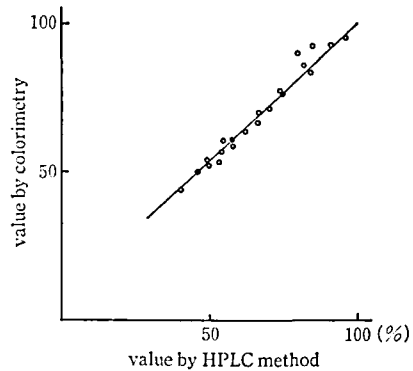


Fig. 6. Correlation of values of norepinephrine by HPLC method and colorimetry

素ナトリウムの存在下、106° で 1~7 日間加熱して得られた試料溶液を用い、HPLC 法及び比色定量法で測定したときの定量値の検討を行った。その結果を Fig. 6 に示す。

両者の定量値の間には、十分な相関性が認められ、その一次方程式は、 $y=0.922x+7.8$ 、相関係数は、0.993 であった。しかし、比色定量法で得た値が、HPLC 法で得た値に比べ若干高い値を与えるが、これは、加熱分解した時、NE 溶液が黄褐色に着色しており、その着色が比色定量の際に正の妨害を与えたものと考えられる。したがって、比色定量法を使って NE の分解性を検討する場合には、対照溶液として、NE の分解後の溶液を使用すべきものとする。

文 献

- 1) I.E. Hughes, J.A. Smith: *J. Pharm. Pharmacol.*, **30**, 124 (1978); J. Haggendal, G. Johnsson, *Acta Pharmacol.*, **25**, 461 (1967)
- 2) 第十改正日本薬局方, p. 479 (1981), 厚生省版

エチレンチオ尿素のリンパ球の機能に及ぼす影響について

手島玲子・池淵秀治・寺尾允男

Effects of Ethylenethiourea on the Functions of Mouse Lymphocytes

Reiko TESHIMA, Hideharu IKEBUCHI and Tadao TERAO

Effects of ethylenethiourea (ETU), the principal degradation product of ethylenbisdithiocarbamates and a well-known vulcanization accelerator of neoprene rubber, on the functions of mouse lymphocytes were studied.

ETU suppressed both primary and secondary immune responses *in vivo* at the dose of 460 mg/kg, and also weakly suppressed *in vitro* primary immune response and mitogenic proliferation of lymphocytes by mitogens.

Detailed studies on the effects of ETU on T cell functions, revealed that ETU suppressed both helper and suppressor T activities.

In cultured mammalian cells, ETU inhibited DNA and RNA synthesis with less effect on protein synthesis.

(Received May 31, 1982)

はじめに

農薬として使用されている Ethylenbisdithiocarbamate の分解物として、また、ゴム加硫促進剤として知られているエチレンチオ尿素 (ETU) は、ラット及びマウスにおいて、甲状腺がん、肝臓がん、白血病を引き起こすこと¹⁻²⁾、弱いながら、突然変異誘起能のあること³⁻⁵⁾、ラットで催奇形成作用のあること⁶⁾、更に胸腺・脾臓重量の減少、及び、血液中のリンパ球数の減少を引き起こすこと⁷⁾などが報告されている。

今回、われわれは、マウスリンパ球のもつ免疫機能に及ぼすETUの影響を、*in vivo* 及び *in vitro* の両方で検討したところ、抑制的に働くという結果が得られたので報告する。

実験材料及び方法

本実験において、薬剤の投与は、*in vivo* では、薬剤の生理食塩水溶液を、*in vitro* では、培養液に溶かしたものを使用した。マイトーゲン及び放射性物質は、培養液にとかしたものをを用いた。羊赤血球 (SRBC) は、生理食塩水に懸濁したものを投与した。細胞培養液は、5~10%の FCS を含む RPMI-1640 を用いた。

1. 実験動物

7~8週令の BDF₁ マウス (静岡実験動物より購入) を用いた。

2. *in vivo* での一次免疫応答

ETU (東京化成・試薬特級) を、30, 115, 460 mg

/kg の割合で、腹腔内投与し、1日後に、 5×10^8 個の羊赤血球を腹腔内投与した後、4日後に脾摘し、脾リンパ球 1×10^6 個あたりの plaque forming cell (PFC) 数を、スライドクラス法にて測定した。

3. *in vivo* での二次免疫応答

460 mg/kg の ETU を、Fig. 2 に示すスケジュールで、5回腹腔内投与し、その間、 5×10^8 個の羊赤血球を2回腹腔内投与し、羊赤血球最終投与後4日目に、脾摘を行い、PFC 数を間接法にて測定した。

4. *in vitro* での一次免疫応答

Mishell and Dutton⁸⁾の変法で行った。10% FCS を含む培養液 0.2 ml 中に、脾リンパ球が 2×10^6 個、羊赤血球が 1×10^6 個 (又は非添加)、ETU が 0.1~20mM になるように加え、ビダール管中で、5.5日間、37°で CO₂ 培養器内で培養し、各管あたりの PFC 数を測定した。

5. マイトーゲンによるリンパ球幼若化試験

脾リンパ球 2×10^5 個に、コンカナバリン A (ConA)⁹⁾ 2.5 µg/ml 又は、リボポリサッカライド (LPS) (Difco 社) 12.5 µg/ml になるように加え、更に、各種濃度の ETU 等の薬物を加えたのち、マイクロタイタープレート中で培養した。48時間後、³H-チミジンを 0.5 µCi 加え、更に24時間培養してから、オートハーベスタ (LABO Science 社) にて¹⁰⁾、細胞を、ガラスフェイバー上に捕集し、DNA にとりこまれた放射能を、液体シンチレーションカウンタにて測定した。

6. 培養細胞における蛋白、RNA 及び DNA 合成

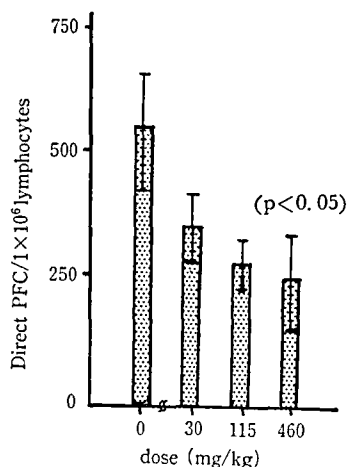


Fig. 1. Effect of ETU on primary response to SRBC *in vivo*

に及ぼす影響

対数増殖期の NS-1 細胞（マウス骨髓腫細胞） 5×10^5 個に、各種濃度の薬物を加え、全量 1 ml とし、2 時間培養後、 ^3H -ロイシン、 ^3H -ウリジン、又は、 ^3H -チミジンを $1 \mu\text{Ci}$ 加え、更に 1 時間培養を行った後、遠心（1000rpm, 5 分間）し、上清を除いて細胞を集め、これに 5% TCA 1 ml を加え、沈澱物への放射能のとりこみを液体シンチレーションカウンタにて測定した。

7. ヘルパー T 細胞への影響

生理食塩水又は、ETU (460 mg/kg) を 3 回、羊赤血球 5×10^8 個を 1 回、Fig. 6 に示すスケジュールで投与したマウスから、脾臓を摘出し、Nylon-Wool column に通し、T 細胞 fraction を分画した¹¹⁾。一方、正常マウス脾臓から、フィコールウログラフィン法¹²⁾で分画したリンパ球を培養液に懸濁し、抗 T 細胞抗体 (Cederline 社) と補体で処理し、T 細胞を除去し、B 細胞のみとした。上記 T 細胞 (4×10^5 個) と、B 細胞 (1.6×10^6 個) を混ぜ、更に、 1×10^6 個の羊赤血球を加え、全量 0.2 ml とし、37° で、3 日間培養し、PFC 数を測定した。

8. サプレッサー T 細胞への影響

生理食塩水又は、ETU (460 mg/kg) を 3 日おきに 5 回投与したマウスの脾臓からリンパ球を分画し、培養液で希釈し、細胞数を $2 \times 10^7/\text{ml}$ にあわせ、等量の ConA ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) 溶液を加え、全量 8 ml で、37°、40 時間培養を行い、サプレッサー T 細胞を誘導した¹³⁾。培養終了後、 α -メチル-D-マンノシドで 3 回洗った後、リンパ球を、フィコールウログラフィン法で分離した。

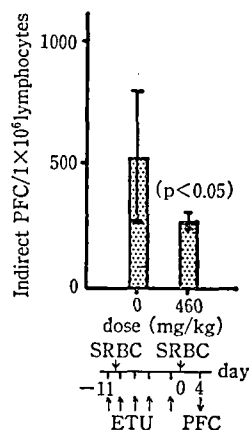


Fig. 2. Effect of ETU on secondary response to SRBC *in vivo*

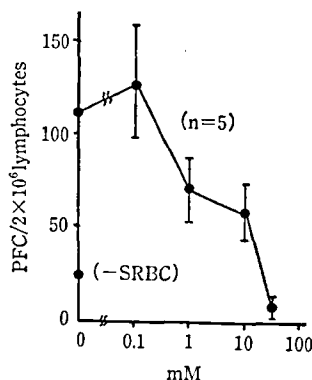


Fig. 3. Effect of ETU on primary response to SRBC *in vitro*

—SRBC; the PFC number in the absence of antigen (SRBC)

このサプレッサー T 細胞 $1 \sim 2 \times 10^5$ 個と、正常脾リンパ球 1×10^6 個及び羊赤血球 5×10^5 個を混ぜ、全量 0.2 ml で、5.5 日間、37° で培養し、PFC 数を測定した。

実験結果

1. 一次及び二次免疫応答に及ぼす ETU の影響

ETU の、*in vivo* での一次免疫応答に対する影響を Fig. 1 に示した。用量依存的に、PFC 数の減少がみられ、Student *t* 検定を行ったところ、460 mg/kg の割合で投与した時、対照群に比べ、有意の差がみられた。

In vivo での二次免疫応答に対する影響を、Fig. 2 に示した。この場合も、ETU 投与によって、対照群に比べ、有意の差がみられた。

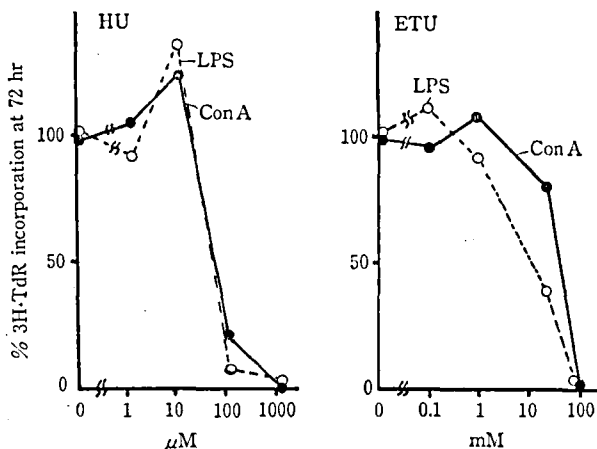


Fig. 4. Dose-response of mitogen responsiveness

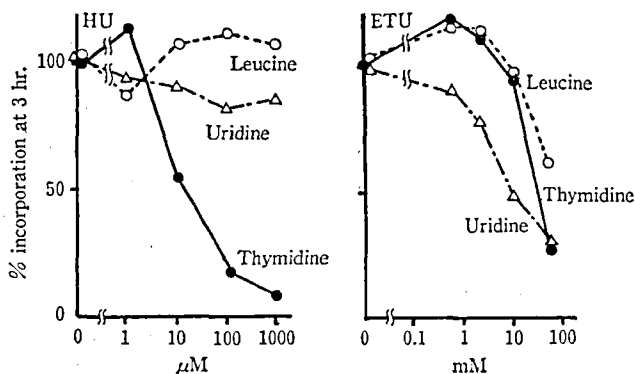


Fig. 5. Effect of HU and ETU on NS-1 Mouse Myeloma Cells

Table 1. Drug Concentration of 50% Inhibition of Thymidine Uptake by Mitogen-activated Lymphocytes

mitogen	drug			
	ETU	HU	Ara-C	6-MP
ConA (2.5 $\mu\text{g/ml}$)	40 mM	66 μM	53 nM	66 nM
LPS (12.5 $\mu\text{g/ml}$)	6 mM	66 μM	170 nM	148 nM

このことから、IgM 産生細胞ばかりでなく、IgG 産生細胞にも、ETU が抑制的に働くことが示唆された。なお、脾細胞中の、T細胞とB細胞の比率については、対照群と ETU 投与群で差はみられなかった。

In vitro の抗体産生に対する影響については、Fig. 3 に示した。ETU 約 5 mM で、PFC 数が対照の約 50% に抑えられ、ETU に、直接的な抗体産生抑制作用のあることが示唆された。

2. マイトーゼンのリンパ球幼若化に及ぼす ETU の影響

リンパ球のマイトーゼンによる幼若化に及ぼす ETU の影響については、Fig. 4 に示した。なお、Seiler ら¹⁰⁾が、ヒドロキシウレア (HU) と ETU に、類似した作用のあることを示唆しているので、対照として、HU を用い、それとの比較を行ってみた。ETU の場合、B細胞マイトーゼンである LPS によるチミジンとりこみは、6 mM で 50% に抑えられ、Con A によるそれは、40 mM で 50% に抑えられた。HU の場合は、両マイトーゼンによる反応を、66 μM で、50% に抑えた。なお、ETU や HU は、ここに示す濃度では、細胞生存率に影響を与えなかった。

ETU 及び種々の代謝拮抗剤について、マイトーゼンによるリンパ球の幼若化を 50% 阻害する濃度を Table 1 に示した。シトシンアラビノシド (Ara-C)、6-メルカプトプリン (6-MP) では、阻害効果が強く、ついで、HU、ETU の順であった。

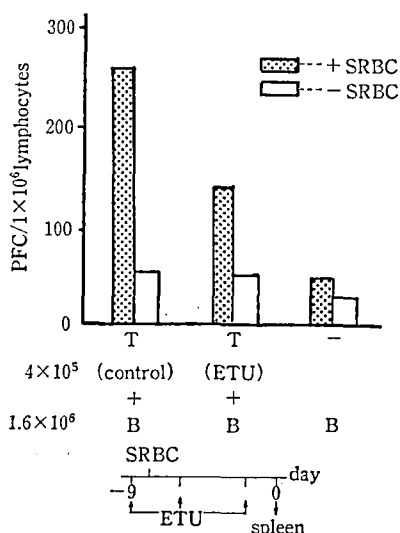


Fig. 6. Effect of ETU on helper T cells

3. 高分子物質の生合成に及ぼす影響

培養細胞を用いた、DNA、RNA、及び蛋白合成に及ぼす影響については、Fig. 5 に示した。この場合も、HU を対照として用いた。HU の場合は、DNA 合成のみが抑えられ、RNA 及び蛋白合成に影響はみられないが¹⁵⁾、ETU の場合には、RNA と DNA 合成の阻害が観察された。このことから、ETU は、HU とは、作用部位の異なることが示唆された。

4. T リンパ球の機能に及ぼす影響

ヘルパーT細胞に及ぼす影響について、Fig. 6 に、サブプレッサーT細胞に及ぼす影響については、Fig. 7 に示した。Fig. 6 から、ETU 投与されたマウスのヘルパーT細胞活性は、生理食塩水を投与したマウスのそれに比べ、約54%に減少していることが観察され、

Fig. 7 から、ETU 投与したマウスのサブプレッサーT細胞活性は、生理食塩水投与したマウスのそれに比べ、やはり抑制されていることが観察された。

考 察

ETU は、*in vivo* において、460 mg/kg 以上の用量で、一次及び二次免疫応答を抑制し、弱いながら、免疫抑制的に働くことが示された。また、*in vitro* でも、弱いながら、直接的に一次抗体産生を抑制すること、及び、マイトジェンによるリンパ球幼若化を抑制することが示された。この ETU の効果を、細胞レベルで調べてみると、RNA 合成、DNA 合成を阻害することが示された。T リンパ球の種々の機能に及ぼす効果として、ETU は、ヘルパーT細胞にも、サブプレッサーT細胞にも抑制的に作用することが示された。

ETU には、T 及び B リンパ球のマイトジェンあるいは、特異抗原刺激による分裂に対し、直接的に作用し、免疫抑制作用があることが推測される。

ところで、ETU の生体内の代謝については、種々報告されており、ラット¹⁶⁻¹⁷⁾、マウス¹⁸⁾及びモルモット¹⁹⁾において、大部分、未変化体として排泄されることが明らかとなっている。上記に示したように、ETU に、直接的な生理活性があるとする実験結果は、上記の代謝実験の結果と矛盾しない。

なお、青木ら²⁰⁾は、甲状腺機能低下と、T細胞機能の低下に、相関関係があると報告しているが、ETU は、甲状腺に蓄積され^{16,19)}、甲状腺機能低下を引き起こす²¹⁾ことが知られているので、ETU の持つ *in vivo* での免疫抑制作用は、リンパ球に対する直接作用ばかりでなく、甲状腺機能低下による間接的な作用も関係している可能性も考えられる。

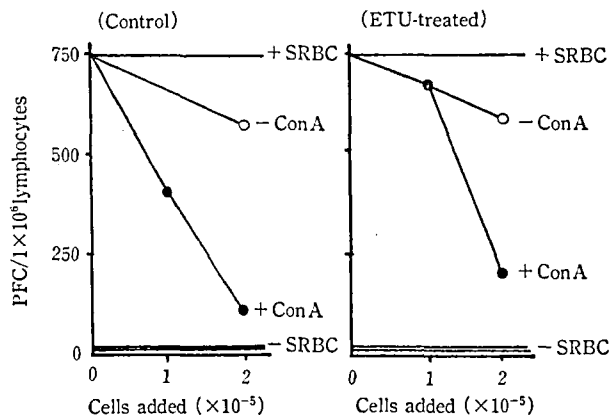


Fig. 7. Effect of ETU on suppressor T cells

文 献

- 1) B.M. Ulland *et al.*: *J. Natl. Cancer Inst.*, **49**, 583 (1972)
- 2) J.R.M. Innes *et al.*: *J. Natl. Cancer Inst.*, **42**, 1101 (1969)
- 3) J.P. Seiler: *Mutation Research*, **26**, 189 (1974)
- 4) S. Teramoto *et al.*: *Mutation Research*, **56**, 121 (1977)
- 5) M. Schiipbach *et al.*: *Mutation Research*, **56**, 111 (1977)
- 6) K.S. Khera: *Teratology*, **7**, 243 (1973)
- 7) 池田康和ら: 第8回日本毒科学会講演要旨集, p. 56 (1982)
- 8) R.I. Mishell *et al.*: *Science*, **153**, 1004 (1966)
- 9) M.O.J. Olson *et al.*: *Biochemistry*, **6**, 105 (1967)
- 10) 大野竜三ら: 医学のあゆみ, **97**, 66 (1976)
- 11) M.H. Julius *et al.*: *Eur. J. Immunol.*, **3**, 645 (1973)
- 12) 笠原 忠: 免疫実験作法, B, 1251
- 12) : B, 1251
- 13) T. Nakano *et al.*: *J. Immunol.*, **125**, 1928 (1980)
- 14) J.P. Seiler: *Experientia*, **31**, 724 (1975)
- 15) C.W. Young *et al.*: *Cancer Research*, **27**, 535 (1967)
- 16) F. Iverson *et al.*: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **18**, 541 (1977)
- 17) F. Iverson *et al.*: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **52**, 16 (1980)
- 18) K. Savolainen *et al.*: *J. Agric. Food Chem.*, **27**, 1177 (1979)
- 19) R. Teshima *et al.*: 衛生化学, **27**, 85 (1981)
- 20) N. Aoki *et al.*: *Acta Endocrinologica*, **81**, 104 (1976)
- 21) S.L. Graham *et al.*: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **7**, 19 (1972)

医療用具の放射線滅菌に関する研究 (第8報)
 γ 線照射による PHEMA コーティングした活性炭の化学
 的、物理的性質の変化並びに滅菌効果について

辻 楠雄・新谷英晴・水町彰吾・菊池 寛・
 栗栖弘光・柳町きみゑ・倉田 浩・大場琢磨

Radio-sterilization of Medical Products. VIII
 Studies on Chemical and Physical Properties of PHEMA-Coated Charcoal
 Irradiated by γ -Ray of ^{60}Co , and on the Sterilization Efficiency

Kusuo TSUJI, Hideharu SHINTANI, Shogo MIZUMACHI, Hiroshi KIKUCHI, Hiromitsu KURISU,
 Kimie YANAGIMACHI, Hiroshi KURATA and Takuma OBA

The petroleum pitch charcoal of spherical granule type, coated with polyhydroxyethyl methacrylate (PHEMA) membrane, is used as the adsorbent for the artificial liver by direct hemoperfusion.

The influences of γ -ray irradiation on the chemical and physical properties and the sterilization efficiency of the coated charcoal were investigated.

(1) Elution test and adsorption efficiency test of the coated charcoal were performed, and the number of free particles released from the charcoal was counted. The surface of the charcoal was observed by scanning electron microscopy. As the results, any damage could not be found even at ten Mrad irradiation.

(2) The sterilization efficiency by the γ -ray irradiation at 0.5 to 2.5 Mrad was studied by using 10^8 or 10^{10} of *B. pumilus* attached to the coated charcoal under wet or freeze-dried conditions. The sterilization was completed at 2.5 Mrad irradiation under wet condition and at 1.5 Mrad irradiation under freeze-dried condition.

The coated charcoal irradiated at 2.0 to 2.5 Mrad was proved to be sterile and to keep quality and function as the adsorbent for the artificial liver by direct hemoperfusion.

(Received May 31, 1982)

ま え が き

活性炭吸着剤は、薬物中毒における血液中の毒性成

分の除去、急性肝炎の治療、のための吸着療法に人工
 肝臓として用いられている。

活性炭は、ヤシガラ炭と石油ピッチ炭に大別される

が、前者は吸着能は優れているが、形状が不定で炭じんなどが発生するために、後者が多く用いられているのが現状である。この石油ピッチから作られた活性炭は、吸着能が優れ、硬度も高く、しかも円に近いビーズ状にすることができる特性をもっている。

吸着療法においては、血液が直接活性炭と接触するので、溶血、血栓形成や血小板減少などの血液に与える障害を少なくし、かつ、炭じんの流出を防ぐための被膜が必要で¹⁻⁴⁾、このため活性炭に生体適合性のよいポリ-2-ヒドロキシエチルメタクリレート(PHEMA)を被覆した吸着剤が使用されるようになって来た。

また、この吸着剤は血液と接触するため滅菌が必要であるが、活性炭や PHEMA などを用いているため、エチレンオキサイドや高圧蒸気による滅菌よりも、コバルト60による γ 線照射が適当と考え、その照射線量が吸着剤の化学的性質、吸着能や表面状態などに与える影響並びに滅菌効果について検討し、照射の最適線量を求めた。

実 験

1. 実験試料

実験に用いた吸着剤は、石油ピッチを原料とした多孔性のビーズ状活性炭で、その表面には PHEMA を被覆してあり、平均粒径は 0.6 mm である。

2. 照射線量

物理化学試験用には吸着剤を約 100 g ずつ容器に入れ、コバルト60の γ 線を 1 Mrad から 10 Mrad の範囲で、また無菌試験用には約 2 g ずつ容器に入れ、0.5~2.5 Mrad の範囲で照射を行ったのち、各線量ごとに実験を行い、未照射品と比較検討した。

3. 装置

吸着能試験に使用した装置は、島津高速液体クロマトグラフ LC-3A 型で、検出器は紫外分光光度計 SPD-2A 型を用い、クロマトバック C-R1A 型でデータ処理を行った。

吸着剤中の微粒子測定にはコールターエレクトロニクス社のコールターカウンターD型を用いた。

走査型電子顕微鏡は日本電子 JSM-T-20 型を用い、蒸着は JEC-1100 型イオンスパッタリング装置を使用した。

4. 実験方法

(1) 溶出物試験

試料約 15 g を正確に秤り採り、水 150 ml の入った丸底フラスコに入れ、還流冷却器をつけて沸騰水浴中で30分間加温した。冷却後、孔径 5.0 μ m のメンブランフィルターで吸引ろ過し、ろ液を 150 ml 定容と

して試験溶液とした。試験法はディスポーザブル輸血セット及び輸液セット基準⁵⁾を準用した。試験項目は次の通りである。

- (i) pH
- (ii) 過マンガン酸カリウム還元性物質
- (iii) 紫外吸収スペクトル
- (iv) 蒸発残留物
- (v) 重金属

各試験項目ごとに試験溶液 10 ml をとり、前報⁶⁾で報告した試験法により測定した。

(vi) あわだち

試験溶液 10 ml をとり、毎分 160 回で2分間水平振とうしたのち、あわだちの様子を観察した。

(2) 吸着能試験

γ 線の照射線量と活性炭の吸着能との関連を求めるために次の実験を行った。

試液A-Eは、尿素 1000mg、尿酸 10mg、クレアチニン 100mg、ビタミンB₁₂ 30mg 及びブロモスルホフタレイン (BSP) のナトリウム塩 75mg をそれぞれ水 1000 ml に溶解したものである。試液Fは、上述の5種の物質を試液A-Eと同一濃度になるように水 1000 ml に溶解した混合溶液である。

吸着能試験の方法は次のとおりである：

試液A-Fを 50 ml ずつ入れた6個のフラスコのそれぞれに正確に秤量した照射あるいは未照射の試料約 1 g を加え、室温で毎分 100 回、2 時間水平振とうした。それらの上澄液を孔径 0.45 μ m のフィルターでろ過し、ろ液について高速液体クロマトグラフ (HP-LC) を用い、下記の分析条件に従って各物質の定量を行った。ろ液中の各物質の濃度の測定値から活性炭への吸着率を求め、照射線量との関係を検討した。

HPLC の分析条件：

カラム ODS SS 10A (日本分光製)

カラム温度 室温

移動相 アセトニリル-水 (1:4) の混液に、0.01 M になるように過塩素ナトリウムを溶かしたもの。

圧力 40 kg/cm²

流速 1 ml/min

測定波長 260 nm (尿素のみ 210 nm)

感度 0.04

各化合物の保持時間 尿素, 3.3分; 尿酸, 2.8分; クレアチニン, 4.35分; ビタミン B₁₂, 12分; BSP, 21分

(3) 微粒子計測

活性炭に γ 線を照射し、照射線量と炭じんの発生との関係を検討した。

Table 1. Results of elution tests of PHEMA-coated activated petroleum carbon irradiated with γ -ray

Test items	Irradiation doses (Mrad)				
	0.0	1.0	2.5	5.0	10.0
pH	6.22	6.43	6.30	6.25	6.26
Consumption of KMnO_4 Solution (ml)	3.75	3.90	4.18	3.95	5.02
Absorbance at 220 nm	0.032	0.038	0.033	0.038	0.042
Nonvolatile (mg)	1.6	1.3	1.7	1.6	2.3
Heavy metals	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

1) N.D. means not detected

照射後の試料約 10g を秤り採り、あらかじめ無じん 0.9% の食塩水 100 ml を入れておいた 200 ml の共栓三角フラスコに加え30分間放置する（この際、微小の気泡が多量に発生する）。ついで毎分 160 回で 30 分間水平振とうしたのち、250 メッシュの局方フルイで 63 μm 以上の粒子を取り除いたのち、食塩水を加えて総量を 200 ml とし、これを炭じんなどの微粒子測定試験液とした。

次に試験液をよく振り混ぜたのち、そのうち約 150 ml をコールターカウンターのセルにとり、攪拌しながら試験液中の微粒子を測定した。測定は同一液について 4~5 回行い、測定液量は 0.5 ml とした。微粒子の粒度分布を知るために粒径を 2~63, 5~63, 30~63 μm の 3 段階に分けて測定を行った。

(4) 電子顕微鏡による観察

γ 線を用いて 2.5 と 10 Mrad の線量で照射滅菌を行った場合、活性炭粒子の表面 PHEMA の被覆及び活性炭粒子自身がどの様な損傷を受けるかを電子顕微鏡により観察した。試料はイオンスパッタリング法により金蒸着 (1200 V, 10 mA, 4 分) した。試料の観察は、PHEMA 被覆の活性炭粒子の表面及び断面を 100~5000 倍で観察し、照射によって生じた膜面の変化を検べた。

(5) 滅菌効果及び無菌試験

試料 2g をとり、指標菌として *B. pumilus* E 601 株の芽胞液 (3×10^8 個/ml あるいは 3×10^9 個/ml 含むもの) を加え、湿潤状態のままのものと、凍結乾燥を行ったものの 2 系統について、0.5, 1, 1.5, 2 及び 2.5 Mrad の照射を行った。生残菌数の測定には Trypticase Soy Agar を、無菌試験には Trypticase Soy Broth を用い、35°, 48~72 時間培養後判定した。

結果並びに考察

1. 溶出物試験

結果を Table 1 に示す。

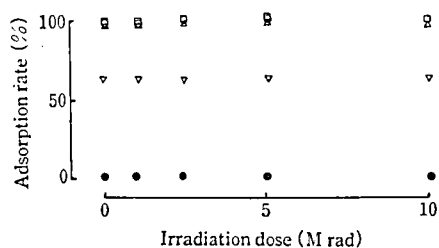


Fig. 1. Effect of γ -ray irradiation on the adsorption of chemical substances by PHEMA-coated activated petroleum carbon

Concentration of substances in the solution for adsorption test are as follows:

Symbol	Substance	Concentration (mg/l)
●	uric acid	1,000
○	creatinine	10
△	bromosulphophthalein	100
▽	uric acid	75
□	vitamine B ₁₂	30

pH, 紫外吸収スペクトル, 蒸発残留物及び重金属については、照射による影響はみられなかった。これに対して、過マンガン酸カリウム還元性物質は、照射線量の増加に伴い増加する傾向を示した。また、あわだちについても振とうをやめたのち、10秒以内にすべて消滅した。このように、石油ピッチ系活性炭吸着剤に γ 線照射を行っても、人工腎臓用ダイアライザーのカプロハン膜についてみられた⁷⁾ ほどの大きな変化はみられなかった。

2. 吸着能試験

実験の結果を Fig. 1 に示した。

5 種の物質を試液 A-E のように単一溶液とした場合と、試液下のように混合溶液とした場合との間で、これらの物質の活性炭への吸着率に差は認められなかった。

照射、未照射にかかわらず、活性炭による尿素の吸着はほとんど認められなかった。また、BSP は各線

Table 2. Effect of γ -ray irradiation on the release of free particles from PHEMA-coated activated petroleum carbon

Diameter of free particles (μm)	Irradiation dose (Mrad)				
	0	1	2.5	5	10
	Number of particles				
2 — 63	2,220	1,139	822	752	800
5 — 63	278	128	32	40	44
30 — 63	0	0	0	0	0

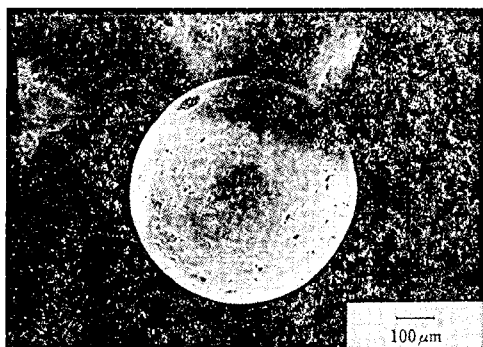


Photo. 1. Electron microphotograph of PHEMA-coated activated petroleum carbon ($\times 100$)

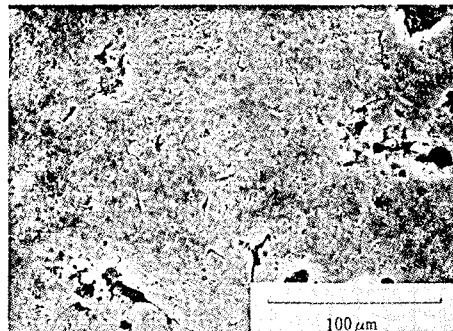


Photo. 3. Electron microphotograph of PHEMA-coated activated petroleum carbon irradiated with 2.5 Mrad of γ -ray ($\times 500$)

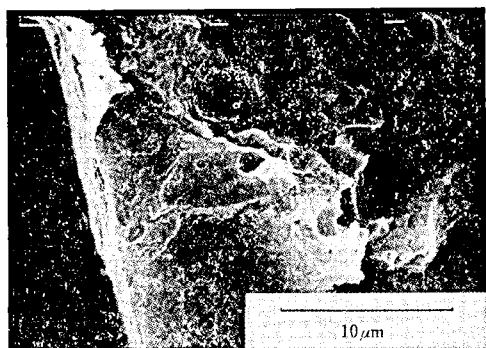


Photo. 2. Electron microphotograph of PHEMA-coated activated petroleum carbon (sectional surface, $\times 5000$)

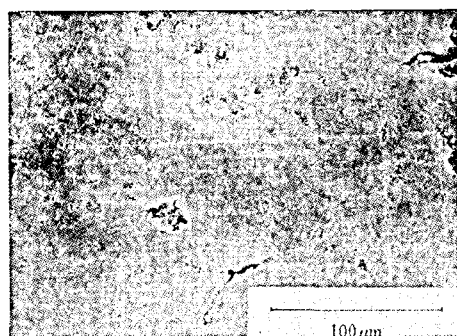


Photo. 4. Electron microphotograph of PHEMA-coated activated petroleum carbon irradiated with 10 Mrad of γ -ray ($\times 500$)

量とも約63%が吸着されただけであるが、尿酸、クレアチニン及びビタミン B₁₂ は、各線量とも活性炭によく吸着されることがわかった。このようにいずれも γ 線照射の影響は認められなかった。

3. 微粒子計測

結果を Table 2 に示す。

試験液中の微粒子の粒径は大部分が 2~5 μm で、5~30 μm のものはそのほぼ 1/10 以下であり、30 μm

以上のものは認められなかった。この粒子分布は BP⁹⁾の結果とよく一致している。また、 γ 線照射による影響は認められなかった。

4. 電子顕微鏡による観察

PHEMA 被覆した活性炭粒子の表面には微細な凹凸や深い溝が存在する。未照射試料の観察像と比較検討した結果、10 Mrad の照射線量でも PHEMA 被覆の表面変化は見られなかった (Photo. 1~4)。

Table 3. Sterilization and sterility tests of PHEMA-coated activated petroleum carbon with *B. pumilus* by γ -ray irradiation

Irradiation dose (Mrad)	Number of spores before irradiation ¹⁾	Freezed dry sample		Wet sample	
		Survival* number of spores	Sterility** test	Survival* number of spores	Sterility** test
0.5	10^8	2.4×10^4	+	1.5×10^7	+
	10^{10}	...	..	3.6×10^8	+
1	10^8	8×10	+	1.1×10^5	+
	10^{10}	2.4×10^2	+	1.4×10^7	+
1.5	10^8	0	—	2.9×10^3	+
	10^{10}	0	—	1.2×10^5	+
2	10^8	0	—	0	—
	10^{10}	0	—	4.9×10^2	+
2.5	10^8	0	—	0	—
	10^{10}	0	—	0	—

*) Number of spores/g

**) +: Sterility test positive

—: Sterility test negative

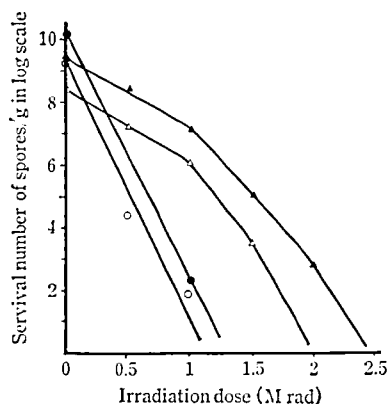
また、実験に用いた PHEMA 被覆活性炭粒子の被覆の厚さは、断面の高倍率写真像より測定したところでは約 $0.2 \mu\text{m}$ の程度であった (Photo. 2).

PHEMA の被覆が一般にいわれている約 $0.5 \mu\text{m}$ より低い値となった原因としては、Photo. 1~4 に示すような表面の細い凹凸や、深くて複雑な形状をもつ溝などにより、表面積が広がったことが原因しているものと思われる。

5. 滅菌効果及び無菌試験

結果を Table 3 に示す。凍結乾燥した試料では、1.5 Mrad 以上の照射線量では生存芽胞を認めなかったが、1 Mrad では 8×10 個/g (10^8 個/g 添加の場合) 及び 2.4×10^2 個/g (10^{10} 個/g 添加の場合) が生存し、0.5 Mrad では 10^8 個/g 添加の試料で 2.4×10^4 個/g が生存していた。湿潤状態で照射滅菌した試料は、2.5 Mrad の照射では生存芽胞を認めなかった。しかし 2 Mrad では、 10^8 個/g 添加の試料では生存芽胞を認めなかったが、 10^{10} 個/g 添加した試料では 4.9×10^2 個/g が生存していた。1.5 Mrad 以下の照射では、いずれも多数の芽胞が生存していた。

以上のように、無菌試験の結果は、凍結乾燥試料では 1.5 Mrad 以上の照射ではいずれもの菌の発育は認められず陰性であったが、1.0 Mrad 以下では菌の発育を認めた。また、湿潤状態の試料では、2.5 Mrad 照射の試料及び 2 Mrad 照射の 10^8 個/g 添加の試料では陰性であったが、2 Mrad 照射の 10^{10} 個/g 添加の試

Fig. 2. Sterilization tests of PHEMA-coated activated petroleum carbon with *B. pumilus* by γ -ray irradiation

- Freezed dry sample
(Initial number of spores $10^{10}/\text{g}$)
- Freezed dry sample
(Initial number of spores $10^8/\text{g}$)
- ▲— Wet sample
(Initial number of spores $10^{10}/\text{g}$)
- △— Wet sample
(Initial number of spores $10^8/\text{g}$)

料及び 1.5 Mrad 以下の照射線量の試料では滅菌されず、菌の発育を認めた。また、生存菌数の対数を照射線量に対してプロットした死滅曲線 (Fig. 2) は、凍結乾燥試料ではテストピースと同様に直線性を示し、その 90% 死滅線量 (Decimal reduction dose) すなわち D

値は約 0.13 Mrad であった。しかし、湿潤状態の試料では線量の増加につれて漸次減菌効果が上昇していく曲線を示し、1 Mrad 以下の低線量側のデータから求めたD値は 0.42~0.45 Mrad、また 1.5 Mrad 以上の高線量側のデータからのD値は 0.20~0.22 Mrad と線量によって異なったD値を示した。したがって PHEMA を被覆した活性炭吸着剤を湿潤又は加水状態で減菌する場合、D値として乾燥状態の試料より大きな値を用いる必要があると思われる。

なお、無菌試験法においては、試料が活性炭粒を主材としているため、培地成分の吸着による菌の発育への影響が考えられた。通常の活性炭末では、培地の 1/40 量でも培地成分の強い吸着が認められるが、本試料では、PHEMA の被覆により培地成分の吸着が抑制され、弱い吸着現象が認められただけであったので、試料の約 100 倍量の 200 ml の培地を用い吸着による菌の発育に及ぼす影響を防いだ。

結 論

石油ピッチ系のビーズ状活性炭吸着剤に PHEMA を被覆したものに、 γ 線を照射し、未照射の試料と比較検討した結果、次のような結論が得られた。

(1) 溶出物試験、吸着能の評価に用いられる5種の化学物質を用いた吸着能試験並びに照射による活性炭の損傷を検討するための微粒子計測及び電子顕微鏡による観察の試験項目については、1~10 Mrad の照射範囲ではいずれも照射による影響は認められなかった。

(2) 吸着剤に指標菌を 10^8 あるいは 10^{10} 個/g 付着させたものについて、湿潤状態と凍結乾燥状態で 0.5~2.5 Mrad の γ 線を照射したところ、湿潤状態ではそれぞれ 2.0 及び 2.5 Mrad 以上、凍結乾燥状態ではどちらも 1.5 Mrad 以上で減菌効果が認められた。

(3) 以上の結果、活性炭吸着剤は凍結乾燥状態で 1.5 Mrad、湿潤状態で 2.0~2.5 Mrad の照射線量で品質と機能並びに減菌の安全性が確保されるものと考えられる。

本研究は、昭和55年度科学技術庁、国立研究機関原子力試験研究費によった。

文 献

- 1) 今西幸男, 高倉孝一, 丹沢 宏: バイオメディカルポリマー, 化学増刊 84, p. 148 (1980), 化学同人
- 2) 中村宜男, 増原英一, 中川成之輔, 越川昭三: 高分子論文集, 36, 279 (1979)
- 3) 中島俊秀, 高倉孝一: 第7回医用高分子シンポジウム講演要旨集, p. 5 (1977)
- 4) 高比良英雄, 寺戸国昭, 佐藤長保: 薬学雑誌, 98, 1578 (1978)
- 5) 厚生省告示第301号, 昭和45年8月10日
- 6) 辻 楠雄, 新谷英晴, 菊池 寛, 水町彰吾, 柳町きみえ, 栗栖弘光, 倉田 浩, 大場琢磨: 衛生試験, 98, 21 (1980)
- 7) 辻 楠雄, 飯田和子, 菊池 寛, 水町彰吾, 柳町きみえ, 栗栖弘光, 倉田 浩, 大場琢磨: 衛生試験, 96, 35 (1978)
- 8) B.P. Vol. II, Appendix XIII. A 120 (1980)

清涼飲料水の規格基準作成のためのヒ素及びアンチモンの分析に関する検討

鈴木 隆・武田明治・内山 充

Investigation on the Analysis of Arsenic and Antimony for Establishing Refreshing Drinks Standards

Takashi SUZUKI, Mitsuharu TAKEDA and Mitsuru UCHYAMA

As the results of examination of the Gutzeit method and colorimetric analysis by silver diethyl dithiocarbamate for the analysis of arsenic in the refreshing drinks, both methods gave the recovery more than 80%.

The analysis of antimony by colorimetry with sodium iodide and L-ascorbic acid was interfered in the presence of tin, but the one by atomic absorption was not. It became possible to analyse the level of 0.02 ppm of antimony in the refreshing drinks by these method and the recovery test by these methods gave about 100%.

(Received May 31, 1982)

ま え が き

清涼飲料水の規格基準作成に鑑み、ヒ素、アンチモンの試験法作成のため基礎的検討を行った。すなわちヒ素については添加回収率がグットツァイト法とジエチルカルバミン酸銀法とでどの程度異なるか、また食品衛生法規集の容器包装の項に記載されたアンチモンのヨウ化カリウム・L-アスコルビン酸法¹⁾が清涼飲料水中のアンチモンに応用できるか否か、更に原子吸光法の実験面における適用性について検討を行ったのでその結果について報告する。

実験器具、試薬

1. 試料

試料は市販50%オレンジ果汁入(つぶ入、アルミカン入)を用いた。

2. 試薬

硫酸、硝酸、アンモニア水(1:1)、飽和シュウ酸アンモニウム溶液、6N 塩酸、酢酸鉛、臭化水銀、エタノール、10%硫酸、塩酸(1:1)、30%過酸化水素水、希硫酸(1:5)、希硫酸(1:2)は市販の精密分析用試薬又は特級品を用いるかあるいはこれらを用いて調製した。

ヨウ化カリウム溶液、塩化第一スズ溶液、亜鉛、酢酸鉛ガラス綿、臭化水銀紙、亜ヒ酸標準溶液：前報参照²⁾。

ジエチルジチオカルバミン酸銀・ピリジン溶液・ジエチルジチオカルバミン酸銀 1g をピリジン 200 ml に溶かした。

ジエチルジチオカルバミン酸銀によるヒ素定量用亜鉛：20~30メッシュの亜鉛を1%硫酸銅溶液に黒化する迄浸し洗浄したのち乾燥した。

ヨウ化カリウム・L-アスコルビン酸(比色用)：ヨウ化カリウム 22g, L-アスコルビン酸 4g を水で 100 ml とした。

TOPO・MIBK 溶液：TOPO(トリノルマルオクタフルオスフィンオキسد) 1g を MIBK(メチルイソブチルケトン)に溶かして 100 ml とした。

ヨウ化カリウム・L-アスコルビン酸溶液(原子吸光分析用)：ヨウ化カリウム 30g 及び L-アスコルビン酸 10g に塩酸 10 ml 及び水を加えて 100 ml とした。

アンチモン標準溶液：和光純薬製アンチモン標準原液(mg アンチモン/ml)を適宜希硫酸(1:5)を用いて希釈調製した。

3. 器具及び装置

原子吸光度計：Varian 社製、775 型、重水素放電

Table 1. Operating Condition of Atomic Absorption Spectrometer

Wave length (nm)	217.6
Lamp current (mA)	10
Slit width (nm)	0.2
Air (l/min)	8
Acetylene (l/min)	0.8

管によるバックグラウンド補正付, double beam.

アンチモン中空陰極ランプ：日立製作所製

ヒ素定量装置：衛生試験法³⁾記載のヒ素定量装置

熱板：東洋科学製

分光光度計：日立 556 型

ホモジナイザー：ポリトロン

実験方法

1. 試料の前処理

開かん後、全量をポリトロンを用いてビーカー中で均一化した。

a) 湿式灰化

試料 150g をビーカーに採り水浴上加温して蒸発濃縮してシロップ状とする。これを水約 10 ml を用いて分解フラスコに移し、硫酸 12 ml 及び硝酸 15 ml を加え、加熱しながら硝酸 1~2 ml をときどき補充し液がほとんど無色又は淡黄色となるまで加熱を続ける。次に水 15 ml 及びシュウ酸アンモニウム溶液 15 ml を加えフラスコのけい部に白霧が現われるまで再度加熱する。冷後水で分解液をメスフラスコに移し全量を 50 ml とし試験溶液を作成した。

2. 定量

ヒ素：④グットツァイト法—湿式灰化液 5 ml を用い衛生試験法³⁾に準じて処理した。⑧ジエチルジチオカルバミン酸銀法—試験溶液 10 ml を用い衛生試験法³⁾に準じて操作した。

アンチモン：①比色法—試験溶液 20 ml を 50 ml のビーカーに採り、これに 1 ml の過酸化水素水を加え熱板上赤外線ランプ照射下白煙が生ずる迄加熱する。これを合計 4 回繰り返す、完全に有機物を分解したのち水でメスフラスコに移し 20 ml とした。この 2 ml を 10 ml の目盛付試験管に採り希硫酸(1:1) 2 ml, ついでヨウ化カリウム・L-アスコルビン酸試液 2 ml を加え水で 10 ml とする。別に空試験溶液 2 ml にアンチモン標準溶液を加えたのち試験溶液と同様に操作して検量線用の溶液を作成し、波長 330 nm で吸光度を測定した。②原子吸光法—試験溶液及び空試験溶液 20 ml を各々 100 ml 入分液ロートに採りこの各々に

Table 2. Recovery of Arsenic fortified to Canned Juice

Method	Recovery (%)
Gutzeit	83—87 (n=3)
DDTC-Ag	80 (n=3)

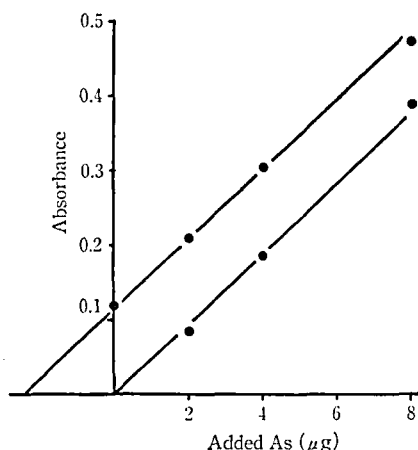


Fig. 1. Determination of Arsenic by Standard Addition Method (DDTC-Ag)

塩酸 10 ml 及びヨウ化カリウム・L-アスコルビン酸溶液 10 ml を加え数分間放置したのち TOPO-MIBK 溶液 10 ml を加えて 30 秒間振りまぜる。MIBK 層を分取し、波長 217.6 nm において原子吸光度法により測定した。別に作成した検量線によりアンチモンの含有量を求めた。なお原子吸光測定条件を Table 1 に示した。

結果及び考察

1. ヒ素の添加回収実験

ヒ素 15 μg をオレンジジュース 150 g に添加 (0.1 ppm)、灰化後全量を水で 50 ml とし、このうちその 5 ml をとりグットツァイト法もしくはジエチルジチオカルバミン酸銀法により回収率を求め、この結果を Table 2 に示した。回収率はいずれも 80% を超えていたがグットツァイト法による方が幾分高い値を示した。この理由は明らかでないがグットツァイト法による肉眼判定の不明確さによるものかも知れない。なおジエチルジチオカルバミン酸銀法では試験溶液 10 ml を用い標準添加法により回収率を求めた。これを Fig. 1 に示した。本法によれば吸光度 0.05 を示すのに必要なヒ素量は約 1 μg であることから清涼飲料水中約 0.033 ppm が吸光度 0.05 に相当する。従ってこの程

Table 3. Effect of Colored Sample on Colorimetric Analysis of Antimony

Sample No	Color rate ¹⁾	Times of treatment with H_2O_2		
		0	1	2
1	—	0.050 ²⁾	0.035	0.012
2	+++	0.42	0.165	0.030
3	—	0.158	0.086	0.018
4	++	0.252	0.142	0.030
5	++	0.244	0.113	0.020
6	—	0.065	0.050	0.022

- 1) Color rate of sample (judgment with the naked eyes): —, not identified as positive; +, faintly positive; ++, positive; +++, clearly positive.
- 2) Absorbance at 330 nm

Table 4. Interference of Other Elements on Colorimetric Analysis of Antimony

Elements	Added compound	Interference (%)		
		200 fold	1000 fold	2000 fold
Na	NaCl	0	0	+21
Fe	FeSO_4	+3	+7.5	+7.5
Cu	CuSO_4	0	0*	+5
Mn	MnSO_4	+10.6	+3.0	0
Zn	ZnSO_4	+4.5	+3.0	+7.6
Mg	MgSO_4	0	+6.0	+4.5
Ni	NiSO_4	+12.1	+4.5	+9.8
Sn	SnCl_2	+47.7	+229.5	+461

* As turbidity was observed, it was determined after centrifuge.

度の濃度のヒ素の検出は十分可能と考えられる。

2. アンチモンの比色法に及ぼす種々の影響

食品衛生関係法規集、第一章食品衛生関係食品添加物等の規格基準第三、器具及び容器包装Aの項にアンチモンの比色による定量法についての記載¹⁾があるが、この方法が清涼飲料水中のアンチモンの定量に応用できるか否かについて検討を行った。

(a) 灰化液の色調

まず通常の硫硝酸での灰化液をそのまま比色法に適用し得るか否かについて検討し、この結果を Table 3 に示した。すなわち、オレンジジュースの硫硝酸灰化液 (通常の原子吸光分析用検液程度の灰化液) の色調 (肉眼観察) がヨウ化カリウム・L-アスコルビン酸処理後の吸光度に及ぼす影響について調べた。いずれもわずかに残っている色調が吸光度に大きく影響し、ま

Table 5. Interference of Acids on Colorimetric Analysis of Antimony

Added compounds	Interference (%)		
	0.1M*	0.01M	0.001M
HNO ₃	+1620	+271	+81.8
HCl	-1.5	+2.3	-2.3

* It means molar concentration of acids

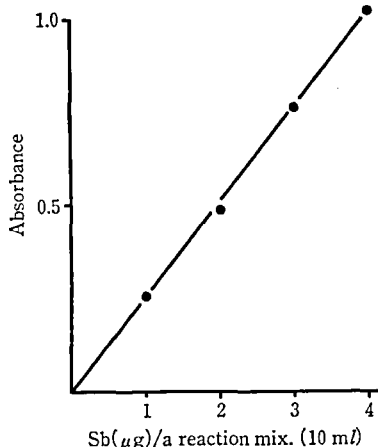


Fig. 2. Calibration curve of antimony by colorimetric analysis

た肉眼で陽性と判定されなくてもかなりの影響を及ぼす事が判明した。そこで過酸化水素による分解を試みたところ3回の過酸化水素処理を繰り返すことによってほぼ試料由来の妨害を除くことが出来た。したがって以後の実験では少なくとも3回以上過酸化水素処理を行うこととした。

(b) 共存塩の影響

湿式灰化を行ったのち、定量法の操作の項に従って比色法によりアンチモンの定量を行う場合、通常清涼飲料水中に含有される種々の金属並びに塩類、酸類の影響について検討した。この結果スズについて特に著しい妨害があることが判明した (Table 4)。例えばアンチモンが 0.2 ppm の濃度で存在する場合、この濃度の 200 倍即ち 40 ppm のスズを清涼飲料水が含むことは現実問題としてあり得ることであり、この場合アンチモン量は実際よりも約50%見かけ上増加することになる。従って本法はスズが共存しない場合においてのみ使用し得ると考えられる。他の金属、塩類については特に強い影響を与えるものは認められなかったが、反応液中に硝酸の混入は避ける必要がある (Table 5)。

3. 比色法の検量線

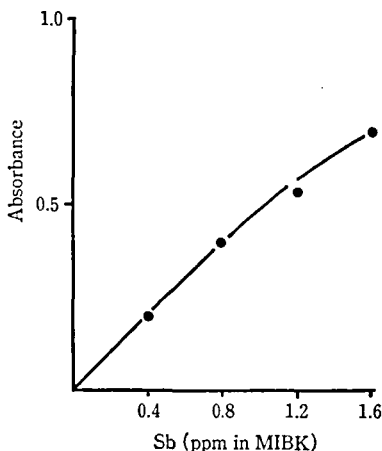


Fig. 3. Calibration curve of antimony by atomic absorption spectrometry

Table 6. Interference of Tin and Copper on Atomic Absorption Spectrometry of Antimony

Elements	Added compound	Interference (%)		
		500 fold	1000 fold	5000 fold
Sn	SnCl ₂	0	-2	-10
Cu	CuSO ₄	0	0	0

ヨウ化カリウム・L-アスコルビン酸法による比色の検量線を図に示した (Fig. 2)。

絶対量として少なくとも 4 μg 迄直線関係が成立した。従っての定量の項に従って反応試験液 2 ml を使用した場合、反応液中に含まれるアンチモンの量は 1.2 μg であるからこれは Fig. 2 から算出すると吸光度 0.27 に相当する。これは 2 の (a) 反応液の色調の項の3回過酸化水素処理を行った場合のバックグラウンドの吸光度がほぼ 0.03 であることからその約9倍に相当する。従って 0.2 ppm のアンチモンを検出するのに本法は感度の面では十分といえる。

4. アンチモンの原子吸光法による検量線並びに検出感度

原子吸光法によるアンチモンの定量については衛生試験法⁴⁾に記載があるが、これが清涼飲料水に適用し得るか否かについて検討を行った。すなわちヨウ素イオンで錯体を形成させたあと TOPO でイオン会合系を生成させ、これを MIBK で抽出し原子吸光法で測定する方法である。まず、アンチモンの分析線に関しては、他の分析線の感度は良くなかったが 217.6 nm で測定することにより最小検出量は MIBK 中 0.05

Table 7. Recovery of Antimony fortified to Canned Orange Juice

	Residue (ppm)	Added (ppm)	Found (ppm)	Recovery (%)
Colorimetric analysis	ND	0.2	0.228±0.016	104±6 (n=3)
Atomic absorption spectrometry	0.009	0.2	0.211±0.01	105±5 (n=3)

ppm (S/N=3) が得られ又検量線も 0.8 ppm 迄直線関係が成立した (Fig. 3). したがって検液 20 ml を使用することによりジュース中約 0.02 ppm 迄測定が可能である.

5. アンチモンの原子吸光測定に及ぼすスズ、銅の影響

酸性溶液中ヨウ化カリウムによりアンチモンは SbI_6^- を形成し、TOPO と溶媒和したのち MIBK 層に抽出されるが、同様に鉛、ビスマス、スズも抽出される。又銅は部分的に MIBK に抽出されこの共存はアンチモンの原子吸光を妨害することが知られている⁴⁾。しかしながら鉛、ビスマスが現実にアンチモンの測定を妨害する濃度に共存することはまず考えられないのでこの場合スズ及び銅の共存が最も問題となるものと思われる。以上のことからスズ及び銅がアンチモンの測定に対して及ぼす影響について調べ、その結果を Table 6 に示した。

銅は黄白色のヨウ化物の沈澱として反応系外に除去されるので問題とならない。また、スズは 5000 倍の共存下で -10% の妨害を示したが、これは 0.2 ppm のアンチモンに対して 1000 ppm のスズが共存した場合に相当し、現実問題としてあり得ないと考えられる。したがって本法によりスズ共存の場合、比色では不可能であったスズ共存下におけるアンチモンの定量が可能となった。

6. 添加回収実験

150 g のオレンジジュースに 0.2 ppm の濃度にア

ンチモンを添加、試料の前処理、定量の項に従い操作を行って回収率を求めた (Table 7). 回収率はいずれも 100% 近くあり満足すべき結果であった。なお本実験に使用したオレンジジュースは予めスズの分析を行い、検出限界以下であることを確かめておいた。

結 語

(1) ヒ素の添加回収率はグットツァイト法、ジエチルジチオカルバミン酸銀法いずれにおいても 80% 以上の回収率が得られた。

(2) 比色法によるアンチモンの定量はスズの共存下ではスズ自身の発色により測定不可能であった。又硝酸の残留も測定を妨害した。

(3) 原子吸光法によればスズの共存下においても清涼飲料水のアンチモンは 0.02 ppm 迄測定し得る。

(4) 比色法並びに原子吸光法によるアンチモンの添加回収率はいずれも約 100% で定量的に回収された。

参 考 文 献

- 1) 厚生省食品衛生課, 乳肉衛生課, 食品化学課共編: 食品衛生関係法規集, p. 3418, 中央出版
- 2) 鈴木 隆, 武田明治, 内山 充: 衛生試験, 99, 126 (1980)
- 3) 日本薬学会編: 衛生試験法注解, p. 44 (1973), 金原出版.
- 4) 日本薬学会編: 衛生試験法注解, p. 424 (1973), 金原出版.

ヘキサクロルベンゼン (HCB) 投与ラットにおける過酸化脂質の生成とそれに伴う諸変化について

三原 翠・萩原博和*・近藤龍雄・内山 充

Lipid Peroxidation and Related Changes in Rats by Oral Administration of Hexachlorobenzene (HCB)

Midori MIHARA, Hirokazu OGIHARA, Tatsuo KONDO and Mitsuru UCHIYAMA

The effect of feeding diets containing hexachlorobenzene (HCB) to rats was investigated with emphasis on lipid peroxide formation and related problems. Rats in an experimental group were fed 500 ppm HCB for 6 weeks and kept under normal conditions for further 6 weeks after the end of feeding with HCB. Organs (liver, kidney, spleen, brain, testis) were excised for measurements of their weight, thiobarbituric acid (TBA) value and HCB concentration. Subcellular fractions of liver homogenate were subjected to analyses for lipid peroxidation indices (TBA value, peroxide value) and fatty acid profiles. The results were compared with those in the case of carbon tetrachloride (CCl_4) intoxication.

HCB seemed to induce lipid peroxidation only in the liver. In contrast to carbon tetrachloride intoxication, HCB produced relatively mild changes of fatty acid composition in the membrane lipid.

(Received May 31, 1982)

Hexachlorobenzene (HCB) は、我が国では農薬としては許可された事はないが、欧米諸国では小麦の種子殺菌剤として使用された事のある物質である。HCB は多価ハロゲン化合物である事から、PCB と同等の物性と毒性を有しており、特定化学物質に指定されている¹⁾。しかし我が国の環境における汚染は PCB に比べてはるかに低く、多いものでも PCB の 1/10 といわれている。HCB の毒性として最も知られているのは、ヘムたん白合成阻害によるポルフィリアである²⁻⁴⁾。更に多くの有機塩素系化合物と同じように、HCB も投与によりチトクローム P-450 の増加が認められ、また、NADPH-チトクローム c レダクターゼ活性の増加、リボヌクレアーゼ活性の抑制等^{5,6)} フェノバルビタールと似た性質も示している。従って PCB やフェノバルビタールで報告されている過酸化脂質の生成も⁷⁻⁹⁾ 充分予想できるところから、我々は HCB をラットに投与した時の過酸化脂質の生成について検討した。また、過酸化脂質の生成が HCB 蓄積量、臓器重量の変化あるいは膜構成脂肪酸の変化等とどのように関連して起こっているかについても実験し、すでに得られている四塩化炭素 (CCl_4) 中毒時の諸変化と比較検討した¹⁰⁾。

実験方法

動物とその処理：Wistar 系雄性ラット 4 週令 (70~80 g) 80 匹を 2 群にわけ、HCB 群には 500 ppm HCB 含有粉末飼料 (船橋農場製・粉末飼料 F II) を与え、control 群は無添加の粉末飼料を与えた。6 週間粉末飼料投与後一部のラットは固型飼料 MM-1 (船橋農場製) に切りかえて 6 週間経過後の変化をみた。

測定法：過酸化脂質の測定は過酸化価 (POV) 法とチオバルビツール酸 (TBA) 法の 2 法を行い、方法は前報¹⁰⁾に準じた。肝分画は $800 \times g \cdot 10$ 分間、 $9000 \times g \cdot 10$ 分間、 $105000 \times g \cdot 60$ 分間の遠心分離を順次行つて得た。不溶性部分とは $105000 \times g$ までの沈澱物の和相当部分である。脂肪酸分析は既報¹¹⁾に従った。HCB の分析は組織ホモジネートを *n*-ヘキサンを用いて 3 回抽出し、脱水後ヘキサンにて 1000~10000 倍 (control 群は 50 倍) に薄めて、OV-17 (5%, 1.5 m) カラムを付した ECD 付ガスクロマトグラフ (カラム温度 230°) にて行った。値は脂質量当たりで表わし、脂質量は別途重量法で測定した。ビタミン E の測定は阿部ら¹²⁾の血清中のビタミン E の定量法を行った。

実験結果

HCB 投与による臓器重量の変化と HCB 蓄積量：

* 日本大学農獣医学部食品工学科

Table 1. Effect of HCB Feeding on Body Weight, Organ Weights and Liver Lipid Content of Rats

	0 Week	3 Weeks		6 Weeks		Recovered*	
		Control	HCB	Control	HCB	Control	HCB
Body Weight (g)	85.0±7.9	187.5±6.6	202.8±11.1	253.3±11.9	258.3±16.7	322.3±13.0	321.6±17.8
Liver Wt. (g)	4.4±0.5	8.1±0.5	13.1±0.9**	10.3±0.6	18.2±1.1**	11.6±0.7	15.4±1.5***
Kidney Wt. (g)	—	—	—	1.8±0.1	2.4±0.1**	2.1±0.1	2.4±0.4
Spleen Wt. (g)	—	—	—	0.4±0	0.8±0	0.6±0	0.6±0.1
Testis Wt. (g)	—	—	—	2.6±0.1	2.6±0.1	2.7±0.1	2.8±0.1
Liver/Body Weight (%)	5.2	4.3	6.5	4.0	7.0	3.4	4.8
Liver Lipid Content (mg/g)	25.5±0.2	27.8±0.8	36.4±0.6**	25.9±0.4	35.1±0.4**	31.1±1.9	31.6±1.6

Male wistar rats weighing 80–90 g were divided into control and HCB-fed group. Experimental diet containing 500 ppm of HCB was given ad lib. for 6 weeks. Values are the mean±SD of 3 (organs) or 10 (body weight) experiments.

* After the feeding with 500 ppm HCB for 6 weeks, rats were fed by normal diet for additional 6 weeks.

** P<0.01 *** p<0.05

Table 2. Retention of HCB in Various Organs after Oral Administration

Organ	Control	6 Weeks Administration	Recovered
Liver	0.01	10.87±0.18	2.63±0.07
Kidney	0.05	16.23±0.73	4.93±0.78
Spleen	0	4.16±0.36	1.08±0.12
Testis	0.01	4.36±0.66	1.01±0.05
Brain	0.01	12.12±1.28	2.19±0.09
Adipose Tissue	0	9.13±2.36	1.24±0.15

The experimental design was shown in Table 1. Values were expressed as μg per mg lipid and the means $\pm$ SD of 3 rats.

Table 1 はラットに HCB 500 ppm 含有飼料を 3 週間及び 6 週間投与した時の体重と臓器重量の変化及び肝重量の体重比、肝 1 g 当たりの脂質量を示している。また 6 週間投与後更に 6 週間普通固型食で飼育した時の各値の回復の様子も示した。なおこの間の 1 日の 1 匹当たりの摂餌量は、3 週間後で control 群 17.1 g、HCB 群 17.0 g、6 週間後では control 群 18.8 g、HCB 群 19.6 g であり、HCB 投与群における HCB の総摂取量は 1 匹当たり 3 週間後で 0.157 g、6 週間後で 0.364 g であった。

Table 1 から明らかなように、HCB の投与により体重の増加傾向がみられるが有意ではない。臓器重量の増加は絶対値でも体重比でも、肝臓、脾臓、腎臓において顕著であった。これらの変化は HCB の投与を中止すると回復する事が認められる。表より明かなように体重はほぼ正常に、臓器の重量増加も肝においてやや影響が残るほかは正常に回復した。なお表には

示さなかったが、肝の脂質量は投与後 1 週間で増加したが、それ以後は同程度の値を維持した。

次に各臓器内の HCB 量を測定し、脂質量当たりで表わした。

Table 2 より明らかなように、HCB は各臓器に広く分布し、投与中止によりかなり減少した。臓器の中では特に腎臓に高く特に投与中止により減少する割合が低い。また control 群で腎臓のみが他臓器に比べ HCB 含量が高い事は、HCB と腎臓との親和性を想像させる。しかし Table 1 より明らかなように、HCB 含量の高い腎臓より肝臓の方が臓器重量の変化が大きく、これは投与時にも、回復時にも共通している。

HCB 投与による過酸化脂質の増加：HCB 投与による生体内の過酸化脂質の生成を知るため、投与 6 週間後の各臓器の TBA 値を調べたのが、Table 3 である。

表から明らかなように過酸化脂質の増加は肝臓にのみ認められた。肝臓について更に詳しくみると、肝摘

Table 3. TBA Value of Various Organs in Control and HCB fed Rats

Animals	Liver		Brain	Kidney	Spleen	Tesis
	Perfused	Not Perfus.				
Control	4.1±0.1	3.8±0.5	5.4±0.1	3.0±0.3	1.9±0.1	2.6±0.1
HCB	7.6±1.0**	11.1±0.3*	5.3±0.1	2.9±0.1	0.9±0.1*	2.1±0.2**

Organs were isolated from rats fed for 6 weeks as shown in Table 1. Tissue homogenate was subjected to TBA test according to the method reported previously.¹⁰⁾ TBA value was expressed as nmol malonaldehyde per 0.05 g liver and the mean±SD of 3 rats.

* P<0.01 ** P<0.05

Table 4. Lipid Peroxidation Indices of Whole Liver Homogenate, Soluble Fraction and Insoluble Fraction prepared from Control and HCB fed Rats

Samples		TBA value		POV	
		3 weeks	6 weeks	3 weeks	6 weeks
Whole	Control	3.1±0.6	4.1±0.2	4.9±0.3	2.8±0.1
	HCB	4.1±0.1	7.8±1.0	4.7±0.8	1.6±0
Soluble Fr.	Control	0.1	0	2.0±0.3	1.5±0.2
	HCB	0.1	0	3.8±0.5	1.1±0.2
Insoluble Fr.	Control	3.3±0.2	3.7±0	3.7±0.2	2.3±0.4
	HCB	2.4±0.4	4.6±0	2.0±0.5	1.8±0.3

Liver homogenate was centrifuged for 60 min at 105000 xg. Values were expressed as means ± SD of 3 experiments and as nmol per 0.05 g liver.

Table 5. Fatty Acid Profiles in Total Lipid obtained from Liver Subcellular Fractions of Control and HCB Fed Rats

	C _{16:0}	C _{16:1}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{20:4}	C _{22:6}
9000×g Pellet							
Control	23.9±1.2	1.9±0.3	18.8±1.0	9.3±0.6	16.7±0.6	22.2±2.6	6.0±0.8
HCB	19.4±0.4	0.6±0.2	23.6±0.6	7.6±0.3	20.1±0.5	21.2±0.4	5.8±0.6
105000×g Pellet							
Control	24.2±0.6	1.7±0.4	21.3±0.9	9.0±0.4	15.6±1.1	21.4±0.7	4.9±0.7
HCB	19.0±0.3	0.5±0.3	25.2±0.2	7.4±0.4	19.4±0.2	22.6±0.1	4.8±0.7

Each subcellular fraction was prepared from liver homogenate of rats fed HCB for 6 weeks as shown in Table 1. Total lipid was obtained by conventional extraction with CHCl₃:MeOH(2:1), esterified 10% HCl-MeOH and analyzed by GLC. All values were expressed as percentage of total fatty acids.

出後に灌流脱血したものと血液の共存している状態のものとを比較すると、脱血により control の値はやや高くなり、HCB 投与群は低くなるので HCB 投与による値の上昇幅が小さくなる。これは CCl₄ 投与肝における結果¹⁰⁾と一致しているが、理由は不明である。

過酸化脂質の増加が肝にのみ認められた事から、次に肝臓の過酸化脂質の変化を詳細に検討した。

過酸化脂質の測定は TBA 法と POV 法を行い、それぞれ投与 3 週間後と 6 週間後のものについて、whole

ホモジネートと超遠心分離によって可溶性部分と不溶性部分にわけたホモジネートとを測定した。表から明らかのようにいずれの場合も TBA 値は上昇したが POV は逆に減少の傾向であった。また、遠心分画で膜構成部分と可溶性部分にわけた場合の測定値の和は、TBA 値においては小さくなり、POV では大きくなった。TBA 値は分画する事で値が小さくなる事は前報¹⁰⁾でも認められており、また、表 4 より過酸化脂質の生成が膜構成部分に存在する事がわかる。

HCB 投与による膜構成脂肪酸の変化：膜構成成分中の脂質の過酸化によって、構成脂肪酸に変化がおこっているのかどうかを知るため、投与6週間後の9000×g分画、105000×g分画について総脂質の脂肪酸分析を行ったのがTable 5である。

表より明らかなように、リノール酸(C_{18:2})の増加は認められたものの、CCl₄投与や老化で認められたアラキドン酸(C_{20:4})の減少¹¹⁾は認められず、HCB投与による膜への作用は、CCl₄のようなフリーラジカルを生成して直接過酸化脂質を生成させる場合とは異なる事が明らかであった。

血清中ビタミンE量の変化：過酸化脂質の増加は生体の抗酸化性因子の減少をもたらすと考えやすいが、PCB投与の場合には印南¹³⁾によりビタミンE量が増加する事が報告されている。それ故HCB投与においても同様の傾向となるのではないかと考え、血清中のビタミンE量を測定したところ、6週間投与後でcontrol 0.37±0.05 mg %, HCB投与群 0.58±0.04 mg % と投与群の方が高い結果となった。

考 察

HCBは肝臓の過酸化脂質を増加させる事が明らかとなったが、他の臓器(腎臓、脳、脾臓、精巣)にはほとんど認められなかった。肝臓の過酸化脂質の生成は膜構造部分に認められており、一方脂肪酸構成比の変化は、膜の崩壊ではなく膜の安定化の傾向を示した。この理由はHCB投与による過酸化脂質の増加が、HCBの直接作用によるものではなく、肝での薬物代謝促進による二次的作用の結果、過酸化脂質生成酵素であるNADPHチトクロームcレダクターゼ活性の増加^{5,6)}によって、引き起こされているためと考えられ、CCl₄投与の場合と異なるところである。

HCB投与肝においてTBA値と異なりPOVがcontrolよりも低かった理由は明らかではないが、1

つの理由としてはPOVがヒドロパーオキシドの測定法であるため、ヒドロパーオキシドを消去あるいは分解する因子の増加が、POVの減少をもたらしているのかもしれない。いずれにせよ、過酸化脂質の測定指標が異なる事で逆の結果が得られている事は、おのおのの測定対象物が異なっている事に起因している。従って組織内の過酸化を評価するに当たっては単なる過酸化脂質の測定だけでなく、他の多くの因子も測定し総合的に判断する事が必要と思われる。

謝 辞

本研究の遂行に当たり、御協力下さいました当所動物管理室堀内茂友室長、児玉幸夫技官に深謝致します。

文 献

- 1) 政令第225号(昭和54年8月14日)
- 2) D.L. Grant, F. Iverson, G.V. Hatina, D.C. Villeneuve, *Environ. Physiol.*, **4**, 159 (1974)
- 3) R.K. Ockner, R. Schnid, *Nature*, **4763**, 499 (1961)
- 4) C. Can, G. Nigogosyan, *J.A.M.A.*, **90**, 88 (1963)
- 5) C. Rajamanicham, G. Padmanaban, *Indian J. Biochem. Biophys.*, **111**, 119 (1974)
- 6) J.A. Goldstein, M. Friesen, T.M. Scotti, P. Hickman, J.R. Hass, H. Bergaman, *Toxicol. Appl. Pharm.*, **46**, 633 (1978)
- 7) 伊東保之, 村田敏郎: *Bull. Jpn. Soc. Scient. Fisheries*, **40**, 261 (1974)
- 8) 赤坂 進: 大阪府立公衛研所報, **17**, 23(1979)
- 9) H.K.J. Hahn, D.J. Tuna, A.J. Barah, M.F. Sorrell, *Biochem. Pharm.*, **25**, 769 (1976)
- 10) 三原 翠, 内山 充: 薬誌, **101**, 221 (1981)
- 11) 三原 翠, 近藤龍雄, 内山 充: 衛生試報, **98**, 94 (1980)
- 12) 阿部皓一, 勝井五一郎: 栄養と食糧, **28**, 277, (1975)
- 13) 印南 敏, 小野 悟, 中村敦子, 池上幸江, 永山スミ子, 西出英一: 福岡医誌, **70**, 102(1979)

ゴム製乳首に関する衛生学的検討 (第1報)
市販ゴム製乳首からの第2級アミン類の溶出並びにニトロソアミン類の生成

辰濃 隆・井上たき子・山田 隆・谷村顕雄

Hygienic Studies on Rubber Nipples (I)
Secondary Amines in Commercial Rubber Nipples and Formation of Nitrosamines

Takashi TATSUNO, Takiko INOUE, Takashi YAMADA and Akio TANIMURA

Determination of secondary amines (sec-amines) migrated from commercial rubber nipples and formed nitrosamines in nitrite-containing simulated saliva was performed.

Twenty to ninety five ppb of total nitrosamines were found in 5 out of 8 commercial rubber nipples produced before 1980. Amounts of total nitrosamines found in rubber nipples produced in March 1981 were less than the regulatory limit in West Germany (10 ppb).

Sec-amines found in recently produced nipples were dimethylamine and diethylamine, and not piperidine nor dibutylamine.

The ratios of the quantities of sec-amines migrated from laboratory-made nipples and those of nitrosamines formed in the simulated saliva were measured. These ratios were smaller in natural rubber nipples than in isoprene rubber nipples.

(Received May 31, 1982)

緒 言

1982年1月から西独ではゴム製哺乳用乳首(以下、乳首と略す)について、ニトロソアミン類の溶出規制(総量が pH 7 で 10 ppb 以下, pH 1 で 200 ppb 以下)を設けている¹⁾。わが国でも乳首中にニトロソアミンが含まれていることは石綿らによって確認されているが²⁾、この原因はゴムの加硫促進剤の一種であるジメチルジチオカルバメートやチウラムなどが分解して生ずる第2級アミン(sec-Amine)が窒素酸化物と反応することにあるといわれている³⁾。

更に、乳首のように乳幼児がしゃぶるもの場合は、しゃぶることによって乳首から溶出する sec-Amine と唾液中に含まれる亜硝酸との反応で、ニトロソアミンが生成し、胃内の酸性下では更に反応が進むと考えられることから、sec-Amine を生成する加硫促進剤の使用には注意しなくてはならない。

本報では、西独における規格試験法を準用し、わが国の乳首についてニトロソアミンを測定するとともに、その前駆物質であると考えられる sec-Amine も併せて測定し、その関連を求めた。また水洗による sec-Amine の除去法も検討した。

ニトロソアミンの測定には石綿らの用いた熱エネルギー検出器付ガスクロマトグラフ (TEA-GC) を用い、

また sec-Amine の分析には窒素・リン検出器付ガスクロマトグラフ (NPD-GC) を用いた。

実 験 の 部

1. 試薬

試薬は特級又はそれと同等以上のものを用いた。

sec-Amine 標準溶液: ジメチルアミン (DMA), ジエチルアミン (DEA), ジブチルアミン (DBA) 及びピペリジン (Pip) 各 100 ppm の人工唾液溶液

ニトロソアミン標準溶液: ニトロソジメチルアミン (NDMA), ニトロソジエチルアミン (NDEA), ニトロソジブチルアミン (NDBA) 及びニトロソピペリジン (NPip) 各 400 ppb ジクロルメタン溶液

人口唾液: 炭酸水素ナトリウム 4.2 g, 塩化ナトリウム 0.5 g, 炭酸カリウム 0.2 g 及び亜硝酸ナトリウム 0.03 g を水に溶かして 1000 ml とする。ただし標準溶液に用いる人工唾液には亜硝酸ナトリウムは含まれない。

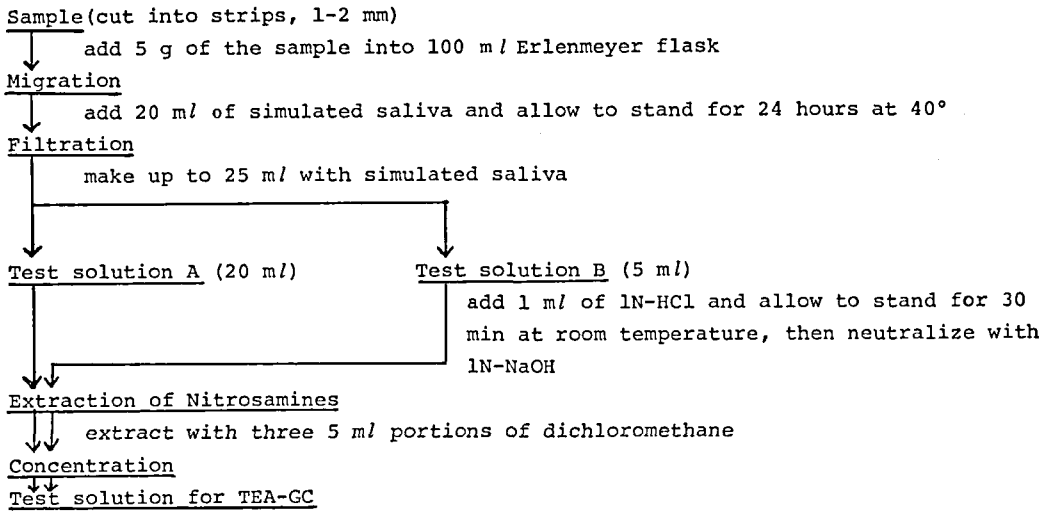
ジクロルメタン

1N 塩酸

1N 水酸化ナトリウム溶液

2. 試料

市販品: Table 1 に示す 1~8 までのものは昭和55年以前に製造されたもの、他のものは昭和56年3月以



Scheme 1. Procedure of Hygienic Test in West Germany

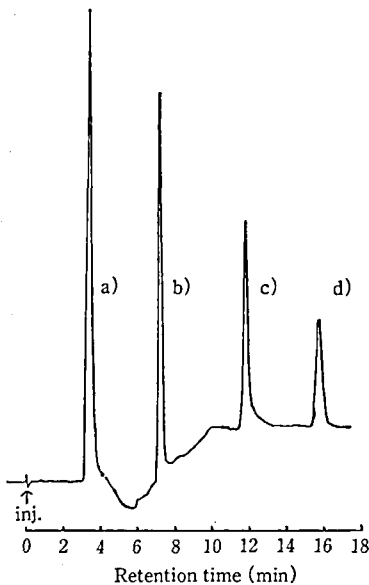


Fig. 1. NPD-Gas chromatogram of sec-Amines
Conditions: gas chromatograph, Hewlett Packard 5710A
column, Amipack 124 (80-100 mesh) 1.8 m × 4 mm i.d.
column temp., programmed to keep at 80° for 4 min after injection, and risen to 210° at thr rate of 32°/min, the hold.
detector, nitrogen phosphorus detector
carrier gas, nitrogen 30 ml/min
a) dimethylamine, b) diethylamine, c) piperidine and d) dibutylamine

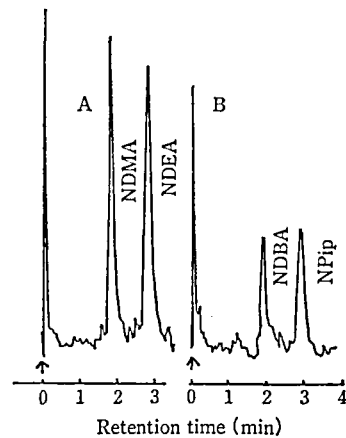


Fig. 2. TEA-Gas chromatograms of Nitrosamines
Conditions: gas chromatograph, Shimadzu GC-6AM
column, 10% PEG 20M on Gaschrom P, 1.5 m × 3 mm i.d.
column temp., A 110° (NDMA, NDEA), B 160° (NDDBA, NPip)
detector, Thermal Energy Analyzer
carrier gas, nitrogen 25 ml/min

Table 1. Analytical Results of sec-Amines Migrated from Commercially Available Nipples and Nitrosamines Formed from Those sec-Amines at pH 7 and 1¹⁾

No. ²⁾	Material	Vulcanization accelerator ³⁾	Amount of sec-Amine (ppm)	Amount of nitrosamine (ppb)	
				pH 7	pH 1
1	IR	BZ	DBA 79	NDBA 6	440
		TRA	Pip 99	NPip 6	380
2	IR	BZ	DBA 1	NDBA — ⁴⁾	10
		TRA	Pip 32	NPip 95	205
3	IR	BZ	DBA 0.5	NDBA —	85
		TRA	Pip 57	NPip 50	565
4	IR	EZ	DEA 10	NDEA —	—
		TRA	Pip 25	NPip —	—
5	NR	EZ	DEA 25	NDEA 4	15
		BZ	DBA 12	NDBA 30	265
6	NR	EZ	DEA 5	NDEA —	—
		BZ	DBA 15	NDBA —	—
7	NR	EZ	DEA 30	NDEA —	—
		BZ	DBA 7	NDBA —	—
8	NR	PZ	DMA 10	NDMA 10	35
		EZ	DEA 12	NDEA 10	30
		TRA	Pip 10	NPip —	—
9	IR	PZ	DMA 7	NDMA 4	25
		EZ	DEA 18	NDEA 2	75
		TRA	Pip —	NPip 1	1
10	IR	PZ	DMA 5	NDMA 4	29
		EZ	DEA 10	NDEA 2	65
		TRA	Pip —	NPip 2	2
11	IR	PZ	DMA 27	NDMA 3	50
		EZ	DEA 35	NDEA 4	120
12	NR	PZ	DMA 5	NDMA 1	6
		EZ	DEA 15	NDEA —	43
		BZ	DBA 10	NDBA —	70

1) Abbreviation used: IR, isoprene rubber; NR, natural rubber; BZ, zinc dibutyldithiocarbamate; TRA, di-pentamethylenethiuram tetrasulfide; EZ, zinc diethyldithiocarbamate; PZ, zinc dimethyldithiocarbamate; DBA, dibutylamine; Pip, piperidine; DEA, diethylamine; DMA, dimethylamine; NDBA, N-nitrosodibutylamine; NPip, N-nitrosopiperidine; NDEA, N-nitrosodiethylamine and NDMA, N-nitrosodimethylamine.

2) Samples No. 1-8 and 9-12 were obtained in 1980 and 1981, respectively.

3) Confirmed by thin layer chromatography (Ref.: Untersuchung von Bedarfsgegenständen aus Gummi Franck, Kunststoffe im Lebensmittelverkehr, B II, XXI 26. Lfg. Oktober 1979)

4) —: not detected. The limits of detection are as follows amine, 0.5 ppm and nitrosamine 1 ppb.

後に製造されたものである。

試作品 : Fig. 4 及び 5 の 8 種の試料は天然ゴムラテックス製品 (NR) で、加硫促進剤にはジメチルジチオカルバミン酸亜鉛 (PZ) 及びジエチルジチオカルバミン酸亜鉛 (EZ) を添加したものである。(1)及び(2)群の違いは処方によるもので、加硫条件は室温、40~50°の温度の相違、6時間、16時間の放置時間の差異を見ている。

Table 2 の試料はイソブレンゴム (IR) に EZ 及びシクロペンタメチレンチウラムテトラスルフィド (TRA) 又はジブチルジチオカルバミン酸亜鉛 (BZ)

を添加したものである。

3. 使用機器

TEA-GC : Thermo Electron Co. 製, TEA-502 型を島津製, GC-6AM 型に連結したもの。

NPD-GC : Hewlett Packard Co. 製, 5710 A 型に NPD を付属させたもの。

4. 実験操作

(1) 乳首から溶出する sec-Amine 量並びにニトロソアミン量の測定

ニトロソアミンの定量は Scheme 1 に示した西独法に従って行った。また sec-Amine の溶出量は Sche-

me 1 の A の溶液を用い、直接 NPD-GC に適用した。それぞれのガスクロマトグラム、測定条件を Fig. 1 及び 2 に示す。

(2) 乳首からの sec-Amine の除去法の検討

乳首中に sec-Amine が含まれないようにするには、これらを生成しないような加硫促進剤を用いればよいわけであるが、物性や味などの点で無理と考えられる。そこで水洗処理によって、sec-Amine を除くことができるかを検討した。

試料は NR 及び IR 製のもので、前者は加硫期間の長短、加硫温度の高低で更に分けられる。また NR 製乳首は水中に室温で16時間、60°の温湯中6及び12時間浸漬し、ときどき攪拌する。

水洗を行い、よく水をきり、このものを試料として Scheme 1 の操作を行う。

また IR 製乳首については、水浸漬しないものと、50°で20時間浸漬したものを試料とした。

(3) sec-Amine 量とニトロソアミン量との関連の検討

種々な乳首（加硫条件、水洗条件の異なるもの）を用いて、Scheme 1 の操作により sec-Amine 量とニトロソアミン量を測定し、両者を比較する。

実験結果及び考察

1. 市販品について

市販品（IR 製7種、NR 製5種）について sec-Amine 及びニトロソアミン量を測定した結果を Table 1 に示す。

乳首に用いられる加硫促進剤は、ニトロソアミン問題が生じた1昨年以前はジブチルジチオカルバメート類やジヘキサメチレンチウラム テトラスルフィド (TRA) が主に用いられていたが、昨年以後は、ガスクロマトグラムから見ると PZ や EZ を主に用いているようである。

溶出した sec-Amine 量は、DBA が最高 79ppm、Pip では 99 ppm、DEA は 35 ppm、また DMA は 27 ppm であった。

pH 7 におけるニトロソアミン量は1昨年以前のものには 95 ppb と大きな値を示すものがあったが、昨年3月以後の製品ではニトロソアミンは 4 ppb 以下、総量でも 7~8 ppb であった（西独の規格値は pH 7 におけるニトロソアミン量は 1 ppb 以下）。

pH 1 におけるニトロソアミン量も昨年製造されたものでは最高 120 ppb（西独の規制値は 200 ppb 以下）であったが、問題発生以前は 565 ppb という大きな値を示すものがあった。

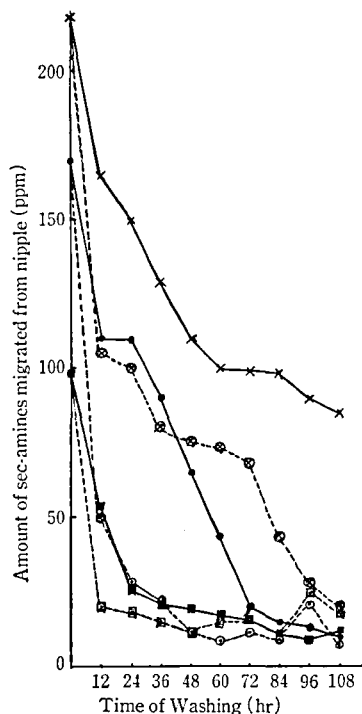


Fig. 3. Effect of Washing on the Amount of sec-Amines Migrated from Natural Rubber Nipples

Condition of Washing: DMA DEA DBA
water ●—● ×—× ■—■
water at 60° ○····○ ⊗····⊗ □····□

2. 水洗による乳首からの sec-Amine の除去効果について

(1) NR 製品について

Fig. 3 に示すように、1試料について108時間の浸漬を行った結果、洗浄処理を行うことによって、顕著ではないが、sec-Amine は減少した。冷浸（室温）と温浸（60°）では、前者の方が除去率は高い。その理由としては温度が高いと、残存する加硫促進剤が分解して、sec-Amine を生成することが考えられる。ジメチル、ジエチル及びジブチルのジチオカルバメート塩の温度差の洗浄効果は前2者は後者と比較して、冷浸法の方がよい。後者では大きな差は認められていない。

Fig. 4-5 から、DMA については、3つの水洗条件のうち、60°の温水に12時間浸漬しておく方法が他の2つの方法より sec-Amine の除去率はやや高いが、Fig. 3 の結果を加えると加硫促進剤を全分解させる必要が生じる。したがって高温で処理して、できるだけ早く加硫促進剤を分解させ、短時間に溶出させる方法を考えればよい。

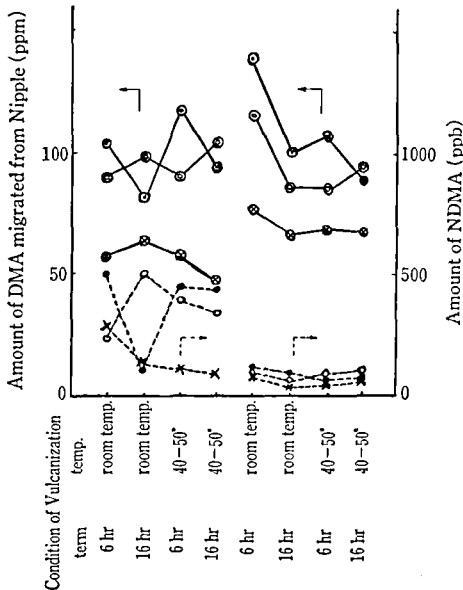


Fig. 4. Effect of Washing on the Amount of DMA Migrated from Natural Rubber Nipples

Condition of Washing:	DMA	NDMA
water, for 16 hr	○	○
water at 60°, for 6 hr	⊙	●
water at 60°, for 12 hr	⊗	×

Fig. 5 から、DEA については、3つの水洗条件の間にははっきりとした効果は見られないが、Fig. 3 の結果から、DMA と同様のことが必要であろう。

また、生成したニトロソアミンについてはこの方法では除去する効果は少なかった。

このことから、sec-Amine の生成を少なくして、ニトロソアミンが生じなくすることが必要である。

(2) IR 製品について

Table 2 に示したように IR 製品の場合には水洗による sec-Amine の減少は見られなかった。

この理由は NR の方が IR より吸水性が大きいことが考えられる。

しかし、pH 1 におけるニトロソアミンの生成量は水洗によってやや減少する傾向を示したが、この理由は判然としない。

3. sec-Amine 量とニトロソアミン量との関連

乳首から溶出する sec-Amine 量に対する塩酸々性下で生成するニトロソアミン量の比率を Table 3 に示す。生成率の平均値は IR 製品の方が NR 製品より高い傾向を示した。その理由は推測ではあるが、NR の成分中にニトロソアミンの生成を抑制するものが含まれているのではないかと考えられる。

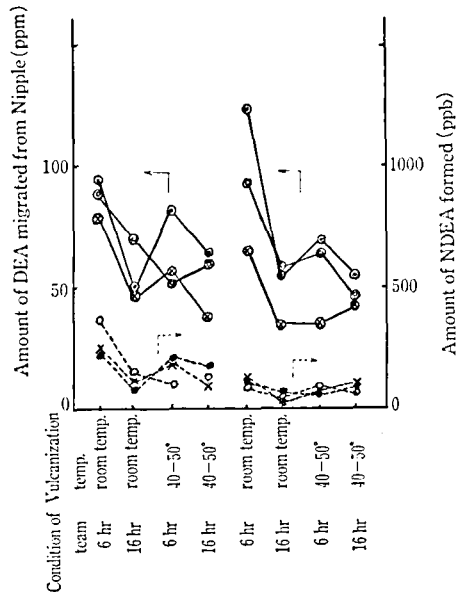


Fig. 5. Effect of Washing on the Amount of DEA Migrated from Natural Rubber Nipples

Condition of Washing:	DEA	NDEA
water, for 16 hr	○	○
water at 60°, for 6 hr	⊙	●
water at 60°, for 12 hr	⊗	×

結 語

西独のニトロソアミン規制以後、乳首中から検出される sec-Amine は主に DMA 及び DEA になってきている。したがって、用いられている加硫促進剤は PZ, EZ, テトラメチルチウラムジスルフィド (TT) あるいはテトラエチルチウラムジスルフィド (TET) などが推測されるが、加硫条件などの諸因子から前2者が用いられていると考えられる。

著者らの検討した結果では、水洗によって徐々に sec-Amine は除去されるが、顕著ではなかった。

また、sec-Amine 量に対するニトロソアミン量の比率を検討したところ、一般に IR 製品の方が NR 製品よりニトロソアミンの生成率が高いことがわかった。

現在、国内で生産されている乳首は Table 1 の No. 9~12 のものであり、ニトロソアミンの測定値はいずれの場合も西独の規制値を満足していた。

今後の問題としては、加硫促進剤を変更するか、加硫の工程、手段を再検討することにより、有害なニトロソアミンを生ずるような sec-Amine を含まない乳首を作るようにすべきであろう。

なお、この研究は昭和56年度厚生科学研究費によ

Table 2. Effect of Washing on the Amounts of sec-Amines Migrated from Isoprene rubber nipples and Those of Nitrosamines formed from sec-Amines at pH 7 and 1.

sample	condition of washing	amount of sec-Amine (ppm)	amount of nitrosamine (ppb)		
				pH 7	pH 1
IR-12	none	DEA 15	NDEA	—	141
		Pip 45	NPip	7	343
IR-13	50°, 20 hr	DEA 25	NDEA	—	46
		Pip 39	NPip	14	88
IR-14	none	DEA 24	NDEA	1	130
		DBA 36	NDBA	1	318
IR-15	50°, 20 hr	DEA 25	NDEA	—	45
		DBA 57	NDBA	1	182

1) Abbreviation used: see Table 1.

2) The samples as those in Table 3.

3) —: not detected.

Table 3. Relationship between the Amounts of sec-Amines Migrated from Nipples and those of Nitrosamines Formed from sec-Amines at pH 1

sample	ratio (%)				sample	ratio (%)			
	NDMA/DMA	NDEA/DEA	NDBA/DBA	NPip/Pip		NDMA/DMA	NDEA/DEA	NDBA/DBA	NPip/Pip
IR-1	0.86	0.66	— ²⁾	—	NR-1	—	0.06	2.21	—
IR-2	—	0.47	—	—	NR-2	0.35	0.25	—	—
IR-3	0.58	0.88	—	—	NR-3	0.12	0.29	0.70	—
IR-4	0.73	1.26	—	—	NR-4	0.26	0.41	—	—
IR-5	0.72	1.18	—	—	NR-5	0.49	0.26	—	—
IR-6	0.80	1.19	—	—	NR-6	0.50	0.34	—	—
IR-7	0.64	1.38	—	—	NR-7	0.51	0.23	—	—
IR-8	0.81	2.10	—	—	NR-8	0.14	0.19	—	—
IR-9	0.36	0.71	—	—	NR-9	0.18	0.25	—	—
IR-10	0.73	1.33	—	—	NR-10	0.13	1.19	—	—
IR-11	0.65	1.45	—	—	NR-11	0.47	0.27	—	—
IR-12	—	0.91	—	0.77	NR-12	0.16	0.22	—	—
IR-13	—	0.55	—	0.22	NR-13	0.33	0.22	—	—
IR-14	—	0.44	0.88	—	NR-14	0.47	0.29	—	—
IR-15	—	0.60	0.31	—	NR-15	0.19	0.29	—	—
IR-16	—	—	0.56	0.38	NR-16	0.09	0.10	—	—
IR-17	—	—	0.10	0.64	NR-17	0.09	0.09	—	—
IR-18	—	—	1.70	0.99	NR-18	0.12	0.19	—	—
IR-19	0.35	0.41	—	—	NR-19	0.08	0.07	—	—
IR-20	0.58	0.65	—	—	NR-20	0.09	0.11	—	—
IR-21	0.19	0.34	—	—	NR-21	0.11	0.20	—	—
IR-22	0.12	0.29	0.70	—	NR-22	0.11	0.14	—	—
					NR-23	0.08	0.12	—	—
					NR-24	0.12	0.22	—	—
					NR-25	0.12	0.21	—	—
					NR-26	0.11	0.17	—	—
					NR-27	0.10	0.15	—	—

1) Abbreviation used: See Table 1

2) —: not detected

た。

文 献

- 1) BGBL. IS., p. 1945-1946 (1981)
- 2) 石綿 肇, 山本 都, 川崎 洋子, 酒井 綾子, 山

田隆, 谷村顕雄: 衛生試験, 99, 135 (1981)

- 3) B. Spiegelhalter and R. Preusmann: Proceeding of the 7th International Meeting on Analysis and Formation of Nitroso-compound, 講演要旨 0-21, Tokyo (1981)

ゴム製乳首に関する衛生学的検討 (第2報) 授乳による乳児のニトロソアミン摂取量の推定

辰濃 隆・井上たき子・山田 隆・谷村顕雄

Hygienic Studies on Rubber Nipples (II) Estimation of Nitrosamine Intake by a Baby by Sucking

Takashi TATSUNO, Takiko INOUE, Takashi YAMADA and Akio TANIMURA

By using a sucking simulator, an estimation of secondary amine (sec-amine) and nitrosamine intake by a baby from a commercial rubber nipple was attempted. Amounts of sec-amines migrated from the rubber nipples prepared with various vulcanization accelerators were also measured.

From a result with isoprene rubber nipples produced before the regulation in West Germany in 1982, the following estimation was made: 230 ng/day of total amount of nitrosamines could be taken by a baby by sucking a nipple.

(Received May 31, 1982)

緒 言

加硫ゴムに用いられるジチオカルバメートやチウラムなどの加硫促進剤は加硫時や成形時に分解して, 第2級アミン(sec-Amine)を生成する。このsec-Amineはニトロソアミンの前駆物質として注目されている。

ゴム製哺乳乳首(以下乳首と略す)の材質は JIS T-9106 (1981) によれば天然ゴム(NR), イソプレンゴム(IR)及びシリコンゴム(Si)に規定されている。前2者は加硫ゴムであり, これらのゴムでつくられた乳首中には sec-Amine の存在が予想される。

西独では乳首やゴム製おしゃぶりを人工唾液中に浸漬し, 溶出する加硫促進剤分解物と唾液中の亜硝酸によって pH 7 及び pH 1 における液中で生ずるニトロソアミン量を1982年1月から規制している。

著者らは, 市販の乳首や種々の加硫促進剤を用いて試作した乳首を実際に近い授乳条件で使用したとき溶出する sec-Amine 量並びに塩酸性下で生ずるニトロソアミン量を推定するために模擬授乳装置(シミュレーター)を用いて実験を行った。

実 験 の 部

1. 使用機器及び試薬

次に記すものの他は前報¹⁾と同じものを用いた。

シミュレーター: ビジョン製の試作機 (Fig. 1)

人工唾液: 炭酸水素ナトリウム 4.2 g, 塩化ナトリウム 0.5 g, 炭酸カリウム 0.2 g を水に溶かして 1000 ml とする。

エチルフェニルアミン (EPA) 標準溶液 (100 ppm)

2. 試料

市販品 (昭和56年3月製造の IR 製のもの) 及び Table 1 に示す処方で作した乳首

3. 実験操作

1) 試験溶液の調製

10個の乳首を流水で20秒ずつもみ洗いする。1 l 中の水中に洗浄した乳首10個を浸漬し, 5分間煮沸する。この液の一部を用いて煮沸による乳首からの sec-Amine の溶出量を 2) の操作により測定する。次に煮沸後の乳首を 200 ml の哺乳ビン (40° に加温した人工唾液を満たしたもの) につけ, Fig. 1 の装置にとりつける。40° に保温し, 吸引圧 80 mmHg, 吸吸サイクル 1 回/秒の条件で15分間作動する。15分後, 新しい乳首をとりつけて同じ操作をする。乳首10個を同一人工唾液を用いて操作を行う。以上を「授乳」1回とし, 哺乳ビンの内容液中の sec-Amine 及びニトロソアミン量を 2) の操作により測定する。以上の水洗,

Table 1. Laboratory-made Nipples used for the Test

No.	Material	Content of vulcanization accelerator (PHR)						
		PZ	EZ	BZ	TT	TET	PX	TRA
1	IR	0.2	— ¹⁾	0.5	—	0.2	—	—
2	IR	—	0.2	0.5	0.2	—	—	—
3	IR	—	—	0.1	—	—	0.2	0.4
4	NR	0.3	0.3	—	—	—	—	—
5	NR	—	0.3	0.3	—	—	—	—
6	NR	0.3	—	0.3	—	—	—	—

IR: isoprene rubber, NR: natural rubber, PZ: zinc dimethyldithiocarbamate, EZ: zinc diethyldithiocarbamate, BZ: zinc dibutyldithiocarbamate, TT: tetramethylthiuramdisulfide, TET: tetraethylthiuramdisulfide, PX: zinc ethylphenyldithiocarbamate and TRA: dipentamethylenethiuramtetrasulfide

1) —: not added.

煮沸、「授乳」の操作を同じ乳首10個の組について、5回繰り返し、sec-Amine 及びニトロソアミン量の変化を検討する。

2) sec-Amine 及びニトロソアミンの測定

sec-Amine 及びニトロソアミンの測定は前報¹⁾と同じ方法によった。ただし、ニトロソアミンを測定する場合には、1) の「授乳」操作終了後の哺乳びんの内容液に NaNO_2 を 30 ppm になるように加え、40°で15分間放置後2分し、一方はスルファミン酸を加えてニトロソ化の反応を停止する。他方は 1 N-HCl を加えて pH 1 とし、40°で30分間放置後、スルファミン酸を加える。更に 1 N-NaOH で中和する。これらの液を用いて前報¹⁾に従って抽出操作を行いニトロソアミンを測定する。

実験結果及び考察

1. 授乳時における市販 IR 製乳首からの sec-Amine の溶出量並びに胃内におけるニトロソアミンの生成量の推定

Fig. 2 にシミュレーターを用いた場合の乳首からの sec-Amine の溶出量が煮沸及び「授乳」の回数によってどう変化するかを示した。Fig. 2 に見られるように煮沸時並びに「授乳」時の sec-Amine の溶出量は乳首の使用回数に伴って次第に減少した。「授乳」時の溶出量は1回目にピペリジン (Pip) 16 μg /乳首、ジブチルアミン (DBA) 7 μg /乳首であったのが、3回目には Pip, 8 μg /乳首, DBA 1 μg /乳首以下となった。一方 Fig. 3 に示すようにニトロソアミン量については、pH 7 (口腔中を想定) の条件では1回目に N-ニトロソピペリジン (NPip) 9 ng/乳首を検出したが、4回目では 1 ng/乳首以下となった。また N-ニトロソジブチルアミン (NDBA) は1回目に 2 ng/乳首を検出

したが、2回目以後は検出不可能であった。しかし、pH 1 (胃内へ移行したときを想定) の条件では NPip は5回目まで 40 ng/乳首前後のほぼ一定の量が検出された。また、NDBA は3回目までほぼ 6 ng/乳首と一定であったが、4回目以後は減少していた。

以上の結果より、1日の授乳回数を5回とした場合には、乳児は NPip を 200 ng/日、NDBA を 30 ng/日程度、摂取したこととなる。

前報¹⁾で述べたように、現在の市販の乳首から人工唾液中に溶出する sec-Amine は主にジメチルアミン (DMA) 及びジエチルアミン (DEA) であり、その溶出量も少なくなっていることから、授乳時における乳児が摂取する sec-Amine 量も小さく、その結果、ニトロソアミンの生成も少なくなっていると考えられる。

2. シミュレーターによる試作乳首からの sec-Amine の溶出パターンの検討

Fig. 4 及び5に見られるように、IR と NR とではシミュレーターによる sec-Amine の溶出パターンが異なっている。IR では、成型時に熱が多くかけられるために加硫促進剤の分解による sec-Amine の生成も多く、1回目には多量の sec-Amine が溶出するが、2回目以後急激に減少していく傾向が見られた。

NR では、sec-Amine の溶出量は IR に比べて少なく、次第に漸減していく傾向が見られた。

結 語

乳首の使用は水洗、煮沸消毒、授乳というくり返しであり、煮沸消毒時に「授乳」時より多くの sec-Amine が溶出する。この実験においての乳児の授乳によるニトロソアミンの摂取量は次のようになる。一般に乳児の授乳回数は1回 200 ml, 1日5回が標準であることから、ニトロソアミン問題の生ずる以前の IR 製

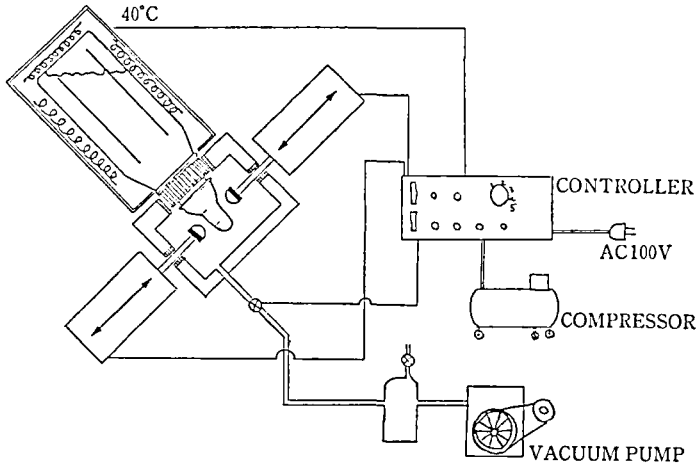


Fig. 1. Sucking Simulator

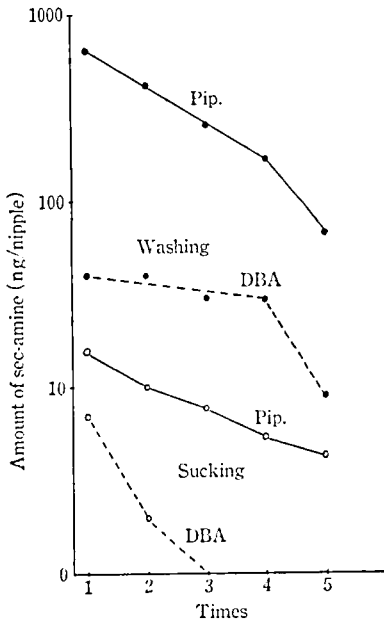


Fig. 2. Changes of the Amounts of sec-Amines Migrated from a Commercial Isoprene Rubber Nipples

DBA: Dibutylamine, and Pip: Piperidine

品 (昭和56年3月以前) で NPip 200ng, NDBA 30ng を新しく使い出した1日目で与えたことになる。しかし、漸時減少していくことで、毎日のニトロソアミンの摂取量は少なくなっていくと見られる。

また、試作した乳首を用いて実験をしたところ、IR は成型時に加熱されるので、加硫促進剤が分解されて

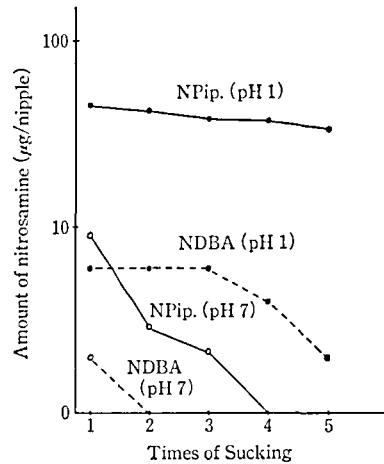


Fig. 3. Changes of the Amounts of Nitrosamines Formed from sec-Amines at pH 7 and 1.

NDBA: N-nitrosodibutylamine, and NPip: N-nitrosopiperidine

sec-Amine が多量に生じ、シミュレーターによる溶出も多いことがわかった。一方 NR はラテックスを用いているので、成型時の温度は低く、加硫促進剤は IR 程分解されないの、シミュレーターによる sec-Amine の溶出量は IR より少ない結果が得られた。

この実験は昭和56年度厚生科学研究費によった。

謝辞

この実験に当たり、シミュレーターの使用の便宜を計らい下さいましたビジョン(株)に感謝致します。

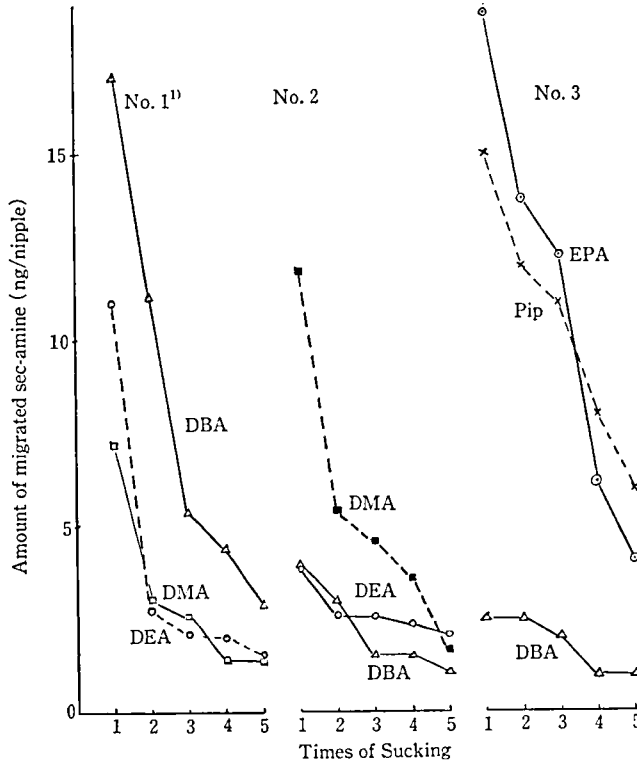


Fig. 4. Migration of sec-Amines from Isoprene Rubber Nipples by Sucking Simulator
DMA: dimethylamine, DEA: diethylamine, DBA: dibutylamine, EPA: ethyl-phenylamine and Pip: piperidine

1) The same samples as those listed in Table 1.

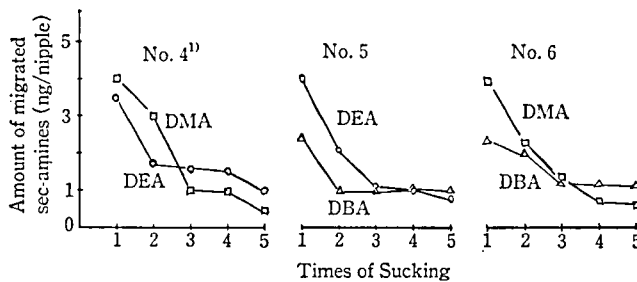


Fig. 5. Migration of sec-Amines from Natural Rubber Nipples by Sucking Simulator
DMA: dimethylamine, DEA: diethylamine, DBA: dibutylamine

1) The same samples as those listed in Table 1.

文 献

- 1) 辰濃 隆, 井上たき子, 山田 隆, 谷村顕雄:
衛生試験, 100, 62 (1982)

サル胃液並びにその沈澱物の *In Vitro* におけるニトロソ
ジメチルアミン生成と pH の影響

林 長男・小高秀正*¹・寺岡葉子・牛嶋峰子*²・谷村頭雄・倉田 浩

In Vitro Formation of Nitrosodimethylamine in the Brain Heart
Infusion Containing Gastric Juice and Its Sediment
of the Monkey under the Different pH of the Medium

Nagao HAYASHI, Hidemasa KODAKA,*¹ Yohko TERAOKA, Mineko USHIJIMA,*²

Akio TANIMURA and Hiroshi KURATA

In a series of the study on the intragastric formation of nitrosodimethylamine (NDMA) by bacteria presenting in the gastrointestinal tract of monkey, *in vitro* formation of NDMA from NO_2^- and DMA was carried out in the brain heart infusion (BHI), adjusted at pH 6, with gastric juice containing 5000 ppm of sodium nitrate and 1000 ppm of dimethylamine hydrochloride (DMA).

As the results of this experiment, it indicated that the nitrite formation was apparently found by the activity of the nitrate-reducing bacteria which presented in the stomach content of the monkey, and clear relationship was seen between the concentration of NO_2^- and the amount of NDMA.

In vitro formation of NDMA was investigated in the BHI-medium, adjusted at pH 5 and 6 with gastric juice containing 1000 ppm of sodium nitrite and 500 ppm of DMA. A sharp increment of the NDMA formation showed at pH 6 of the medium. More good formation of NDMA was observed in the medium containing the gastric juice of the monkeys than in the medium of BHI alone (blank test), but in the blank test, the NDMA formation seemed to be rather good at the pH 5 of the medium than at pH 6.

A little higher formation of NDMA was noted in the case of 3 hr incubation of the medium compared with the blank test and this formation was accounted for 370 ppb.

(Received May 31, 1982)

ま え が き

N-ニトロソ化合物は、実験動物^{1,2)}に強力なガン原性を有する化学物質の一つであり、近年、この物質の生体内生成の主要な場を胃内とみなした実験が数多く報告³⁻⁶⁾され、著者らも、サル胃内におけるニトロソジメチルアミン (NDMA) 生成についての詳細な実験を行い、既に、これらを実証する報告⁷⁾を行ってきた。

一方、食品^{8,9)}あるいは糞便^{10,11)}由来の細菌が NDMA 生成の活性を有し、しかもその生成能は、中性域の pH でも失活しないなどの報告がなされているにもかかわらず、胃内微生物と NDMA 生成との関連を微生物学的に追求した実験はほとんど行われていない。そこで、著者らはサル胃内微生物の NDMA 生成菌種検索の手掛りを得るために、まず *in vitro* で、胃内微生物を含む胃内容物による NDMA 生成並びに、その

生成と pH との関連について検討した。

実験材料並びに方法

1. 使用動物

供試動物のサルは、神奈川県小田原動物園から分与を受けた5匹、並びに有竹鳥獣店(株)から購入した輸入カニクイサル8匹、計13匹(体重2.5~5.5kg)を使用した。これらのサルは、いずれも当所内で一定期間飼育して健康、栄養状態ともに良好と判定したものである。

2. サル胃内容物の採取方法

サルの胃液採取は、特に胃内微生物を考慮して brain heart infusion (BHI) (Difco 製)を使用した。供試サルは、あらかじめ胃液採取の前日1日間絶食させ、当日、短時間全身麻酔を施した後、滅菌100ml用注射器並びにネラトンカテーテル No.8 を用いて、胃内に滅菌 BHI 20 ml/kg を経口投与し、胃内にカテーテルを挿入したままの状態、注射器の pumping

*¹ 日本大学農獣医学部

*² 実践女子大学

を数回繰り返して、サル胃液と BHI をじゅうぶんに混和した後、注射器の吸引により、この BHI (BHI 胃内洗浄液) を回収し、あらかじめ設置した三口フラスコに注入し、試薬を添加、pH 調整後、直ちに実験を開始した。

3. 試料の調整並びに培養方法

実験は、実験 I, II 並びに III の 3 つに分けて行った。すなわち、実験 I は硝酸ナトリウム 5000 ppm を含む BHI 20 ml/kg の胃内径口投与を行ったサル胃内亜硝酸 (NO_2^-) 生成実験で¹²⁾、 NO_2^- 胃内生成の良好であったサル M1, M3, M5 のそれぞれの BHI 胃内洗浄液 98 ml を用い、それらに実験当日、ろ過滅菌を行った硝酸ナトリウム (試薬特級、キンダ化学(株)製) 並びにジメチルアミン塩酸塩 (東京化成工業(株)製) (DMA) の水溶液それぞれを 5000 ppm, 1000 ppm になるように 1 ml ずつ添加後、塩酸により pH を 6 に調整し、これを実験 I の試料液とした。

実験 II は、なるべくサルの個体差を僅少にするため、BHI 20 ml/kg を投与したサル 4 匹の BHI 胃内洗浄液を採取、混和し、2 つの三口フラスコに 98 ml ずつ分注し、それぞれにろ過滅菌を行った亜硝酸ナトリウム (試薬特級、国産化学(株)製)、DMA 水溶液をそれぞれ 1000 ppm, 500 ppm になるよう 1 ml ずつ添加し、塩酸を用いて pH を 5 と 6 に調整、これを実験 II の試料液とした。なお、実験 II は同様の操作を 3 回反復し、pH 5 と 6 の NDMA 生成量を比較した。

試料液の培養は、嫌気的条件下で、37°, 7 hr 行った。すなわち、あらかじめ 37° の振とう恒温水槽中に設置した三口フラスコの一方向の口に、ボンベからの炭酸ガスを、電気炉(石塚電気製作所製)を通じて無菌的に噴射させ、常にフラスコ内を陽圧にして置く。BHI 胃内洗浄液を分注し、一定量の試薬溶液を投入後、別口に挿入してある滅菌ガラス電極(昭栄科学産業(株)製)で測定しながら pH を調整、5 回振とう後の試料液を零時間とし、以後の試料は、0.5, 1, 3, 5, 7 の各時間ごとに 7 ml ずつ採取し、5 ml を NDMA 定量用に、1 ml を NO_2^- 定量用に、1 ml を微生物生菌数測定用とした。また、培養中の試料液の pH は試料採取ごとに塩酸、30% 水酸化ナトリウム水溶液を用いて所定の pH を維持するように調整した。

実験 III は、採取したサル 4 匹の BHI 胃内洗浄液を混和、pH を 6 に調整、遠沈 (11200 G, 30 min) し、上澄液と沈澱物とに分離し、上澄液では、更にミリポアフィルター (Type HA, 0.45 μm) により吸引ろ過 (無菌洗浄ろ液) した後、この無菌洗浄ろ液に実験 II と同濃度の亜硝酸ナトリウム、DMA を無菌的に添加

し、これを培養液として用いた。沈澱物は 1/4 量を培養液 10 ml に懸濁し、37°, 3 hr, 好気的条件下で振とう培養を行った。

4. NDMA 並びに NO_2^- の定量

試料液からの NDMA 定量は、前報⁷⁾に記載した胃内容物中の NDMA 抽出、定量並びに測定器械、条件と全く同一の方法で行った。また、試料液からの NO_2^- 定量は、実験 I についてのみ前報¹²⁾に記載した胃内容物試料の調整・ NO_2^- 定量と全く同一方法で行った。

5. 微生物の検索方法

試料液中の微生物検索は実験 II の総生菌数についてのみ行った。すなわち、3 の項に記載した各時間ごとの試料液の希釈は、9 倍量の希釈液を加え、これを試料液 10^{-1} の希釈液として順次 10 段階階希釈を行った。なお希釈液は 0.05% 寒天加 trypticase soy broth (BBL 製) を使用した。

培地は、好気性菌検索用に Eugon チョコレート寒天 (BBL 製)、嫌気性菌用には EG 並びに BL 寒天平板を使用し、これらの各種寒天平板培地に試料液の各段階希釈液 0.05 ml をコンラージ棒で塗抹、好気性菌では 37°, 1～3 日間培養、嫌気性菌ではガスパック法(ガスパック 100 システム, BBL 製)を使用して 37°, 4 日間培養を行った。

実験成績並びに考察

1. 硝酸ナトリウム 5000 ppm 並びに DMA 1000 ppm を含む BHI 胃内洗浄液中における NO_2^- 及び NDMA 生成

著者らは、前報¹²⁾で硝酸ナトリウム 5000 ppm を含む BHI 20 ml/kg のサル胃内径口投与を行い、 NO_2^- 胃内生成の良好なサル M1, M3, M5 の胃内 NO_2^- 濃度は、それぞれ最高 96.6, 69.1, 377.9 ppm を示し、そのときの胃内 pH の平均は、6.2, 5.8, 6.6 で、 NO_2^- 胃内生成と pH との間には明瞭な相関性の認められることを報告した。

一方、*in vitro* における NDMA 生成を試みる場合、NDMA の前駆物質である NO_2^- が多量に生成されることは望ましい条件の一つでもある。そこで、実験 I はこれら NO_2^- 生成の良好なサル胃液を用いて、前報¹²⁾のサル胃内 NO_2^- 生成を *in vitro* で再現するとともに、NDMA 生成との相関を確認するため、 NO_2^- 生成の良好なサル胃内 pH の平均を 6 とし、前報¹²⁾の *in vivo* の実験に近い条件を設定した。

Fig. 1 は、pH を 6 に調整した硝酸ナトリウム 5000 ppm 並びに DMA 1000 ppm を含む NO_2^- 生成の良好なサル 3 匹の BHI 胃内洗浄液中における NO_2^- 及

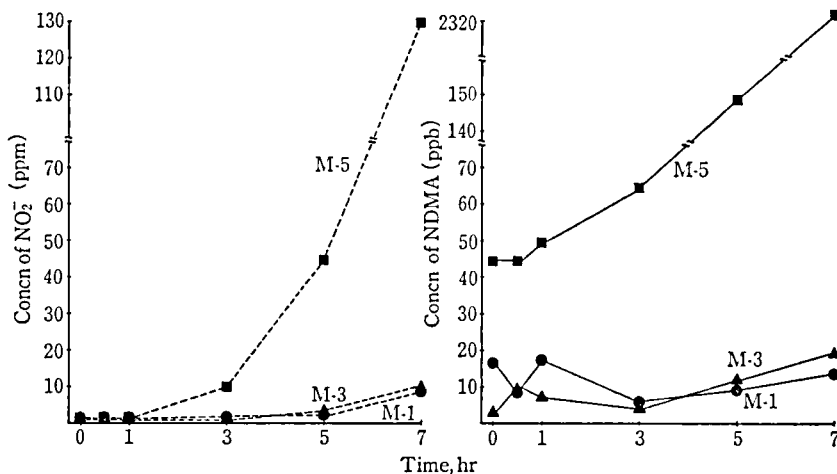


Fig. 1. *In vitro* formation of nitrite and nitrosodimethylamine in the gastric contents* containing sodium nitrate of 5000 ppm and dimethylamine of 1000 ppm.

* Aspirated following the introduction of 20 ml/kg of brain heart infusion broth into the stomach of three monkeys (M-1, 3, 5) and adjusted pH 6.

び NDMA 生成の経時的変化を示したものである。

Fig.1 に示すとおり、*in vitro* における BHI 胃内洗浄液中の NO_2^- は、サル M1, M3 が培養 7 hr 目にそれぞれ 8.9, 10.0 ppm を生成したのに対し、M5 では、培養 3 hr 目より顕著な生成が認められ、7 hr 目には 129.7 ppm まで上昇した。

また、NDMA 生成では、 NO_2^- 生成の良好なサル M5 が培養 3 hr 目 66.4 ppb, 5 hr 目 148.8 ppb, 7 hr 目 2.3 ppm を生成し、 NO_2^- 濃度の上昇に伴う NDMA 生成が顕著であったのに対し、 NO_2^- 生成の不良な M1, M3 には NDMA 生成の明らかな経時的増加が認められなかった。

今回の硝酸ナトリウム及び DMA を添加した BHI 胃内洗浄液の *in vitro* における実験は、*in vivo* と同様に、サル胃内に生存する硝酸塩還元菌の活性を示唆するとともに、生成される NO_2^- はサル個体の内因的な条件によって著しく異なり、かつ、 NO_2^- 濃度と NDMA 生成量との間には相関が認められることを明らかにした。

2. 亜硝酸ナトリウム 1000 ppm 並びに DMA 500 ppm を含む BHI 胃内洗浄液中における NDMA 生成と pH 値の影響

著者らのサル胃内における *in vivo* の実験では、 NO_2^- 及び NDMA 胃内生成の良好なサル胃内 pH の平均は 6 に近く、これに対し不良なサルは 5 に近いことを報告⁷⁾ した。そこで、実験 II は、これらの相違点を明らかにする目的で、1. の項で行った実験結果を基

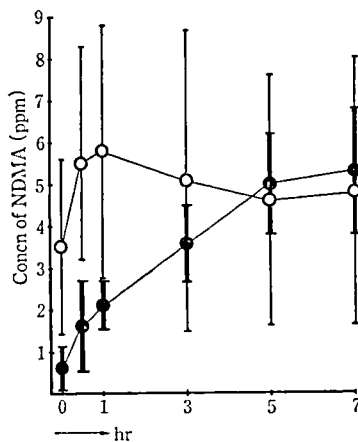


Fig. 2. *In vitro* formation of nitrosodimethylamine in the gastric contents* containing 1000 ppm of sodium nitrite and 500 ppm of dimethylamine.

* After the introduction of 20 ml/kg of BHI-broth into the stomach of four monkeys, taken out by syringe, mixed and adjusted as pH 6 (●—●) and pH 5 (○—○).

Vertical bars represent mean $\pm$ SD of produced NDMA in the three times experiments.

にして pH 5 と 6 に調整した亜硝酸ナトリウム 1000 ppm 並びに DMA 500 ppm を含む BHI 胃内洗浄液の NDMA 生成と pH との関係について比較検討を行

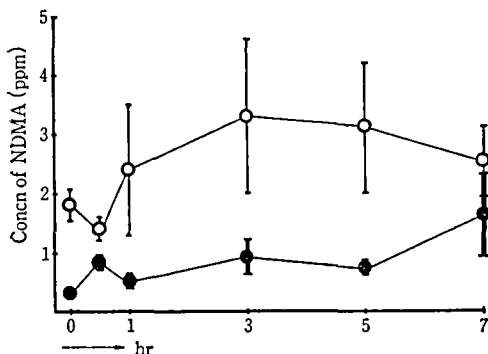


Fig. 3. *In vitro* formation of nitrosodimethylamine in the BHI-broth sterilized containing 1000 ppm of sodium nitrite and 500 ppm of dimethylamine adjusted as pH 6 (●—●) and pH 5 (○—○).

Vertical bars represent mean $\pm$ SD of produced NDMA in the three times experiments.

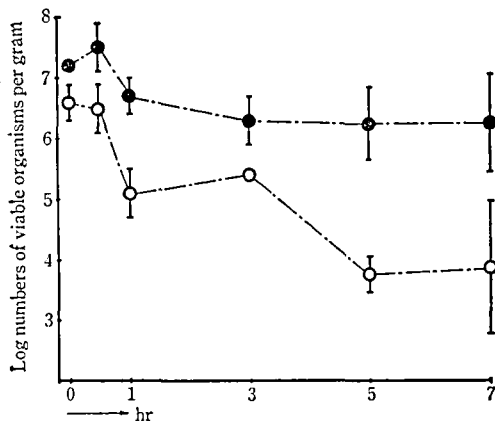


Fig. 4. *In vitro* reduction of the microorganisms of pH 6 (●—●) and pH 5 (○—○) in the gastric contents shown in Fig. 2.

った。その成績を Fig. 2 に、また、そのときのブランクを Fig. 3 に示す。

Fig. 2 に示すように、pH 6 では、培養零時間に NDMA が $\bar{x}$ 0.6 ppm 検出されたのみであったが、その後は時間の経過とともに NDMA 濃度の上昇が顕著に認められ、培養 5 hr 目に 5.0 ppm、7 hr 目には 5.3 ppm が検出された。これに対し、pH 5 では、NDMA 生成が培養零時間に $\bar{x}$ 3.5 ppm、1 hr 目には 5.8 ppm まで上昇したが、それ以後は、緩やかな下降線を辿り、培養 5、7 hr 目には pH 6 の場合よりも低下し、その $\bar{x}$ は 4.6、4.8 ppm であった。

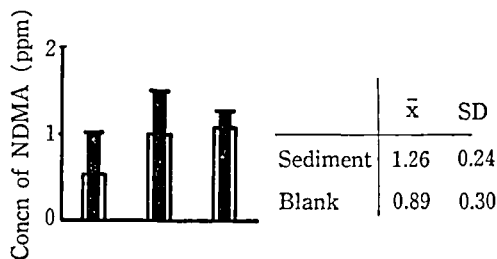


Fig. 5. *In vitro* formation of nitrosodimethylamine (NDMA) with the sediment (■) and the sterilized filtrate (□) of stomach contents containing 1000 ppm of sodium nitrite and 500 ppm of dimethylamine·HCl incubated at 37° for 3 hr.

これに対し、Fig. 3 のブランクの滅菌 BHI では、pH 5 が 6 よりも良好な NDMA 生成を示し、pH 5 dependent を示唆する成績が得られた。

3. BHI 胃内洗浄液中における総生菌数と pH の影響

次に、Fig. 2 に示した pH 5 と 6 の BHI 胃内洗浄液中各時間ごとの総生菌数を検索し、その経時的変化の比較検討を行った。その成績を Fig. 4 に示す。

pH 6 の BHI 胃内洗浄液では、培養零時間に $\bar{x}$ 2×10^7 /ml 検出された総生菌数が、培養 1 hr 目より減少傾向を示し、3 hr 目には 3×10^6 /ml まで低下した。しかしながら、それ以後の各時間ごとにおける総生菌数は 3×10^6 /ml を維持したのに対し、pH 5 では培養零時間に $\bar{x}$ 6×10^6 /ml 検出された総生菌数が、7 hr 目には 9×10^3 /ml まで減少し、総生菌数に対する pH の影響が顕著に認められた。

4. サル胃内沈澱物の *in vitro* における NDMA 生成

NDMA 生成菌種検索の一手段として、pH 6 に調整したサル胃内沈澱物による NDMA 生成の検討を行った。その成績を Fig. 5 に示す。

図に示すように、3 回の反復実験は、3 回とも沈澱物による NDMA 生成が明瞭に認められ、ブランクの無菌培養液との差異は、 $\bar{x}$ 370 ppb を示し、胃内沈澱物中における好気性 NDMA 生成菌種の存在を強く示唆する成績が得られた。

5. NDMA の *in vitro* 生成に關与するサル胃内容物並びに pH の効果

In vitro における NO_2^- と DMA の化学反応から生ずる NDMA の至適 pH は 3.4¹³⁾ とされている。実験 II のブランクの滅菌 BHI における pH 5 と 6 を比

較した場合、pH 5 が6よりも良好に NDMA を生成し、明らかに pH dependent を示唆する成績が得られた。しかしながら、このブランクとサル胃内容物を含む BHI 胃内洗浄液を比較した場合、同じ pH でも、後者に NDMA 生成が良好に認められ、更に、後者の pH 6 では、NDMA 生成の経時的上昇が顕著であるのに対し、ブランクのそれは、ブロードピーク状の低いカーブを現したのみで、この両者間には、サル胃内容物中の因子、例えば、生体内因子の NDMA 生成促進物質であるチオシアン酸塩¹⁴⁾、胃内 NDMA 生成菌種の存在などの考慮すべき差異が明らかに認められた。

次に、pH を5と6に調整した Fig. 2 の BHI 胃内洗浄液中における総生菌数の経時的検索結果では、培養 5, 7 hr 目の菌数は、pH 6 が $3 \times 10^6/\text{ml}$ 、pH 5 が $9 \times 10^3/\text{ml}$ まで減少し、この両者間に明らかな差異が認められた。この成績を培養 5, 7 hr 目の NDMA 生成と比較すると、pH 6 では、サル胃内沈澱物による実験結果でも明らかなごとく、サル胃内容物中に生存する NDMA 生成菌種の酵素あるいは代謝物に含まれる NDMA 生成促進物質が *in vitro* でも活性を示し、NDMA 生成に顕著な経時的上昇を導いたものと考察される。

以上の *in vitro* における実験成績から、著者らの *in vivo* における NO_2^- 並びに NDMA 胃内生成の良好なサルと不良なサルを微生物学的見地から考察すると、良好なサルは、胃内容物中に含まれる NDMA 生成促進物質の作用に加えて、胃内 pH が硝酸塩還元菌種に作用し、 NO_2^- 生成の活性を促すとともに、NDMA 生成菌種の活性をより促進し、顕著な NO_2^- 並びに NDMA 生成をもたらすものと解釈される。

ま と め

サル胃内容物の *in vitro* における NO_2^- と NDMA 生成との相関 (実験Ⅰ)、NDMA 生成と pH 並びに pH と胃内微生物との関連 (実験Ⅱ)、胃内沈澱物による好氣的条件下での NDMA 生成 (実験Ⅲ) について検討した。

1) 実験Ⅰの NO_2^- 生成は、3匹いずれのサルにも経時的上昇が認められ、その最高濃度は、培養 7 hr 目 8.9, 10.0, 129.7 ppm を示した。NDMA 生成では、サル M5 が培養 7 hr 目 2.3 ppm を示し、 NO_2^- 濃度の上昇に伴う NDMA 生成が顕著に認められた。

2) 実験Ⅱの NDMA 生成は、pH 5 では明瞭な経

時的生成が認められず、培養 1 hr 目 5.8 ppm まで上昇した NDMA が、3 hr 目より緩やかな下降線を通り、培養 5, 7 hr 目には、pH 6 のそれよりも低下した。これに対し、pH 6 では、NDMA 生成の経時的上昇が顕著に認められ、培養 5, 7 hr 目には、それぞれ 5.0, 5.3 ppm が検出され、明らかに胃内微生物の関与を示唆する成績が得られた。また、BHI 胃内洗浄液は、ブランクの滅菌 BHI に比べ、相対的に良好な NDMA 生成を示し、*in vitro* でも、 NO_2^- 並びに NDMA 生成には、サル胃液の存在と、その pH が大きな影響を及ぼす因子となることが明らかになった。また、ブランクにおける pH 5 と6の比較では、pH 5 に NDMA 生成が良好に認められ、pH dependent を示唆する成績が得られた。

3) サル胃内沈澱物の NDMA 生成は、ブランクの無菌培養液のそれに比べ 370 ppb 多く認められた。

なお、本研究は科学技術庁昭和54年度特別研究促進調整費並びに昭和54年度厚生省ガン研究助成金の一部によって行われた。

文 献

- 1) P.N. Magee, J.M. Barnes: *Br. J. Cancer*, **10**, 114 (1956)
- 2) H. Druckrey, R. Preussmann, S. Ivankovic, D. Schmahl: *Z. Krebsforsch.*, **69**, 103 (1967)
- 3) J. Sander, F. Seif: *Arzneim-Forsch.*, (drug res.) **19**, 1091 (1969)
- 4) B.S. Alam, I.B. Saporoschetz, S.S. Epstein: *Nature*, **232**, 199 (1971)
- 5) N.P. Sen, D.C. Smith, L. Schwinghamer: *Fd Cosmet. Toxicol.*, **7**, 301 (1969)
- 6) R.P. Lane, M.E. Bailey: *ibid.*, **11**, 851 (1973)
- 7) 林 長男, 寺岡葉子, 小高秀正, 牛嶋峰子, 谷村顕雄, 倉田 浩: 食衛誌, **21**, 273 (1980)
- 8) D.L. Collins-Thompson, N.P. Sen, B. Aris, L. Schwinghamer: *Can. J. Microbiol.*, **18**, 1968 (1972)
- 9) Y.Y. Fong, W.C. Chan: *Nature*, **243**, 421 (1973)
- 10) P. Klubes, W.A. Jondorf: *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **2**, 24 (1971)
- 11) G. Hawksworth, M.J. Hill: *Biochem. J.*, **122**, 28 (1971)
- 12) 林 長男, 小高秀正, 谷村顕雄, 倉田 浩: 食衛誌, **20**, 370 (1979)
- 13) S.S. Mirvish: *J. Nat. Cancer Inst.*, **44**, 633 (1970)
- 14) E. Boyland, E. Nice, K. Williams: *Fd Cosmet. Toxicol.*, **9**, 639 (1971)

食品添加物の代謝研究における等速電気泳動技術の利用：ヒドロ キシビフェニル抱合体の分離定量

南原精一・山羽 力

Application of Isotachopheresis Technique in the Metabolic Study of Food Additives; Separation and Determination of Hydroxybiphenyl Conjugates

Seiiti NAMBARU and Tsutomu YAMAHA

The basic conditions for separatory determination of the glucuronides and sulphates of 2- and 4-hydroxybiphenyls by means of isotachopheresis were investigated.

These hydroxybiphenyl conjugates were separated satisfactorily by the use of the leading electrolyte containing 0.01 M hydrochloride, β -alanine and triton x-100 (pH 3.0) and the terminal electrolyte containing 0.01 M caproic acid.

Under this electrolyte system the calibration curves for 4-BG and 4-BS were obtained with straight lines which intersect the origin in the range of $5-30 \times 10^{-9}$ moles. Furthermore it was found that the hydrolysis of the hydroxybiphenyl glucuronides with β -glucuronidase can be determined rapidly.

(Received May 31, 1982)

緒 言

食品添加物のあるものは体内に摂取されると水酸化などの代謝的变化を受けたのち、各種の抱合体として排泄される。これら抱合体の多くは水溶性の陰イオンとして挙動するので、そのままの形でイソタコホレンスにより相互に分離定量できれば、いちいち加水分解してからアグリコンを定量する必要がない。

そこでビフェニルの代謝により尿中に排泄される各種抱合体¹⁻⁴⁾を例にとり、それらの分離定量の基礎的な条件を検討した。

実 験 方 法

1. 試料及び試薬

2-ヒドロキシビフェニルグルクロニド(2BG)、4-ヒドロキシビフェニルグルクロニド(4BG)は、それぞれのヒドロキシビフェニルをウサギに経口投与し、その3日尿から Kamil ら⁵⁾の方法を参考にして精製した。

これらの調製品について高速液体クロマトグラフィー(HPLC)(カラム：PH-01, 4.6 mm ϕ ×250 mm, 溶離液：メチルアルコール 100%, 流量 0.5 ml/min, 検出器：UV-100, 260 mm)を行ったところ、何れも単一ピークを示した。また β -グルクロニダーゼの作

用で、それぞれ対応するアグリコンとグルクロン酸を薄層クロマトグラフィー(TLC)により同定した。

2-ヒドロキシビフェニルサルフェート(2BS)、4-ヒドロキシビフェニルサルフェート(4BS)は Astill ら⁶⁾の方法を参考にして、化学的に合成した。これら合成品について上記分析条件で HPLC を行ったところ、何れも単一ピークを示した。また IR は 3400 cm^{-1} 付近の OH 基の吸収が消失し、新たに 1070 cm^{-1} , 1240 cm^{-1} の付近に $-\text{SO}_3^-$ の存在を示唆する2本の吸収が認められた。

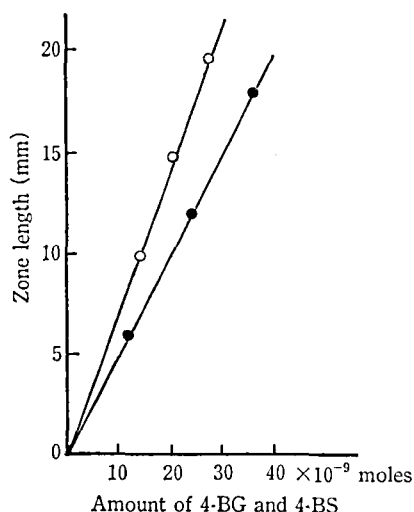
dl-ビフェニルメルカプブレート(BM)は次の方法により合成した。

4-メルカプトビフェニル 476 mg, 2-アセタミドアクリル酸 243 mg, ピペリジン 3 滴をジオキサン 4 ml 中に溶解し、1.5 時間還流、ジオキサンを減圧溜去した残渣をクロロホルム：アセトン(1:1)の混液より再結晶し、mp 167~170°の結晶を得、これをエーテルと混合し、エーテル可溶部を除去すると mp 160~160.5°の白色結晶となる。(NMR によりピペリジン塩の構造確認)このピペリジン塩 183 mg をとり 2% 水酸化カルウムにとかし、汙過、濃塩酸を加えて生じる白色結晶を汙取し、室温で風乾 100 mg の結晶を得た。mp 199~200.5°

dl-フェニルメルカプブレート(PM)は市販品を用

Table 1. PUV of hydroxybiphenyl conjugates and the related compounds

Compounds	PUV
2-hydroxybiphenyl glucuronide (2BG)	0.36
4-hydroxybiphenyl glucuronide (4BG)	0.37
2-hydroxybiphenyl sulphate-K (2BS)	0.17
4-hydroxybiphenyl sulphate-K (4BS)	0.16
dl-phenylmercapturic acid (PM)	0.33
glucuronic acid (G)	0.32

Fig. 1. Calibration curves of 4-BG and 4-BS
—●— 4-BG; —○— 4-BS

いた。

β -グルクロニダーゼは Sigma 社製品の type H-1, *Helix pomatia* 及び type B-1, Bovine liver の標品を用いた。

2. 装置及び測定条件

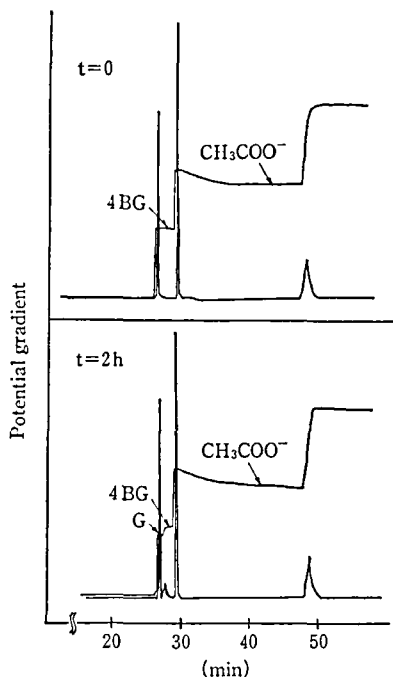
島津細管式等速電気泳動分析装置 IP-1B (電位勾配検出器) を用い、泳動管 (PTFE 製) は内径 0.5 mm, 長さ 20 cm. 恒温槽温度 20°, chart speed は 5 mm/min とした。

リーディング液は 0.02% トリトン X-100 を含む 0.01M 塩酸- β アラニン (pH 3.0), ターミナル液は 0.01M カブロン酸を使用した。

結果及び考察

1. 各種抱合体の Potential unit values (PUV)

多くのイオン化合物はその解離度による易動度に変化する。従って試料イオンの易動度は特にリーディング液の pH に大きく影響される。本実験における各種

Fig. 2. Isotachopherograms of a reaction mixture of 4-hydroxybiphenyl glucuronide (4BG) and β -glucuronidase

Reaction mixture: 4BG 10 mg, β -glucuronidase (*Helix pomatia*) 2 mg (800U), 20 mM acetate buffer (pH 5.0) 12 ml 37°, 2 hr.

Condition of isotachopheresis: leading electrolyte, 0.01 M HCl- β -alanine (pH 3.0) with 0.02% Triton X-100; terminating electrolyte, 0.01 M *n*-caproic acid; injection volume 10 μ l

抱合体はすべて酸性物質で、酸性領域での易動度の相違を期待して pH 3.0 と 3.8 のリーディング液について各化合物の PUV を調べたところ、余り差がなかったので、下限の方をとり pH 3.0 のリーディング液を以下の実験に供した。

この電解液系による各種抱合体の PUV を Table 1 に示す。なお本条件下では BM は溶解度が小さいため測定ができなかったため、参考までに PM の PUV を示した。

またグルクロン酸 (G) の PUV も抱合体の PUV と明らかに違うので、後述の β -グルクロニダーゼ処理においても十分定量に使える。2BG と 4BG, 2BS と 4BS 異性体間の分離はできなかったが、グルクロニドとサルフェート間では良好な分離を示した。Fig. 1 に示す通り、4BG と 4BS の検量線は $5 \sim 30 \times 10^{-9}$ moles の範囲で原点を通る直線が得られ、それぞ

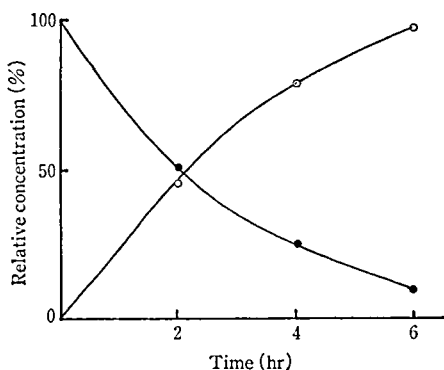


Fig. 3. Time course of β -glucuronidase activity. Reaction mixture and condition of isotachopheresis are as described in Fig 2.
● Decrease of 4BG ○ Formation of glucuronic acid

れ同時定量が可能である。

2. 2BG 及び 4BG に対する β -グルクロニダーゼの作用

2BG と 4BG 異性体に対する β -グルクロニダーゼの作用について検討した。

その反応組成は 4BG 10mg, β -グルクロニダーゼ (*Helix pomatia*, Sigma 社) 2mg (800 U), 20 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 12 ml, 37° でインキュベートし、一定時間ごとにその 2 ml を分取し、沸騰水浴中で 4 分間加熱後、遠心上清の一定量 (10 μ l) をイソタコホレスで分析した。反応 0 時間と 2 時間のイソタコフエログラムを Fig. 2 に、また 4BG の減少と G の生成の time course を Fig. 3 に示す。

本酵素は 2BG に対して 24 時間後でも全く作用しな

かった。一方 Bovine liver 起原の β -グルクロニダーゼ (type B-1, Sigma 社) を用いたところ、4BG に対しては *Helix pomatia* 標品と全く同じ活性を示したのに対して、2BG に対しては 24 時間後で 34~40% の分解しか起らなかった。すなわち 2BG は 4BG に比して β -グルクロニダーゼ作用に著しい抵抗性を示し、特に *Helix pomatia* 標品ではほとんど反応しなかった。

以上イソタコホレスを用いてグルクロニドとサルフェートの分別定量並びに β -グルクロニダーゼによるグルクロニドの分解が迅速に定量できることがわかった。なお今後の問題点として尿中試料を直接定量する場合、目的とする抱合体の PUV を妨害する他物質の影響を除去するため更に条件の検討が必要である。

BM は当所、医化学部田中彰博士によって合成されたもので、ここに深甚の謝意を表します。なお、本研究は所内特別研究費によって行った。

参 考 文 献

- 1) C. Mitoma, H.S. Posner, H.C. Reitz, S. Udenfriend: *Arch. Biochem. Biophys.*, **61**, 431 (1956)
- 2) W.D. Block, H.H. Cornish: *J. Biol. Chem.*, **234**, 3301 (1959)
- 3) P. Raig, R. Ammon: *Arzneim. Forsch.*, **20**, 1266 (1970); *ibid.*, **22**, 1399 (1972)
- 4) T. Meyer, J. Arbakke, R.R. Scheline: *Acta Pharmacol. Toxicol.*, **39**, 412, 419, 433 (1976); *ibid.*, 193 (1977)
- 5) I.A. Kamil, J.N. Smith, R.T. Williams: *Biochem. J.*, **42**, 357 (1948)
- 6) B.D. Astill, D.W. Fassett, R.L. Roudabush: *Biochem. J.*, **75**, 543 (1960)

Induction of Forestomach Tumors in Mice Fed Furylfuramide, 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (AF-2)

Toshiaki OCHIAI, Tsuyoshi FURUYA, Kiyoshi SEKITA, Osayuki UCHIDA,
Katsuji NAITO, Kazuya KAWAMATA, Shigetomo HORIUCHI,
Masuo TOBE and Yoshio IKEDA*¹

Groups of 44 or 45 male ddY mice were fed diets containing 0, 0.05, 0.15 or 0.45% furylfuramide for 18 months. Eight animals of each group at 6 months, each 10 animals at 12 months and all survivors at 18 months, as well as those died during the feeding period, were subjected to pathological examinations.

Malignant tumors developed in the forestomach of the mice fed furylfuramide. The incidences of the tumors were 0, 12.1, 44.4 and 58.8% in the 0%, 0.05%, 0.15% and 0.45% groups, respectively. Most of the tumors were squamous cell carcinoma though leiomyosarcoma was found in one and 4 animals of the 0.15% and 0.45% groups, respectively. Many of the cases showed metastases to other organs such as the lymph node, liver, lung, spleen, kidney or subcutis. Besides these malignant tumors, papilloma and hyperplasia of the epithelium of the forestomach were also noted in the animals fed the compound. The first squamous cell carcinoma was found in an animal of the 0.15% group, died at 8 months.

(Received May 31, 1982)

Introduction

In Japan, nitrofurazone (5-nitro-2-furaldehyde semicarbazone) and nitrofurylacrylamide (5-nitro-2-furyl-acrylamide) had been used as antimicrobes in foods such as fish sausage, mixed meat sausage and soybean curd (TOHFU) since 1950. In 1965, these two compounds were replaced by furylfuramide, 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (AF-2), because of its less chronic toxicity as reported by Aiso *et al.*^{1,2)}.

However, since induction of chromosome aberration by AF-2 in cultured human lymphocytes was shown by Tonomura and Sasaki³⁾, and its mutagenicity was reported with *Escherichia coli* by Kondo and Ichikawa-Ryo⁴⁾, Kada⁵⁾ and Yahagi *et al.*⁶⁾, it became necessary to reassess the chronic toxicity of this compound in spite of its negative carcinogenicity in the earlier reports^{1,2,7)}.

The authors carried out a chronic toxicity study of AF-2 in male mice, using higher dose levels.

Materials and Methods

The test compound, AF-2 (Fig. 1) was supplied

from the Ueno Seiyaku Co. This material was shown to have a purity of 99.66% by a chemical analysis conducted in the Division of Food Additives of our institute.

Four-week-old male ddY (SPF) mice were obtained from Shizuoka Agricultural Cooperative Association for Laboratory Animals. Mice were kept in an animal room conditioned to $24 \pm 1^\circ$ in temperature and $55 \pm 5\%$ in humidity. They were allowed a free access to a commercial diet, MM-1 (Funabashi Farms Co.) and water.

After a taming for a week, the animals divided into 4 groups each consisting 44 or 45 and were fed diets containing AF-2 in concentrations of 0 (control), 0.05, 0.15 or 0.45% for 18 months. Animals were housed in plastic cages, 5 to a cage until the 6 months and individually thereafter. Body weights and food consumptions were estimated once a week until 3 months and thereafter twice a month. Eight animals of each group at

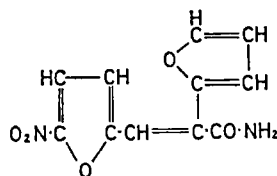


Fig. 1. Chemical structure of furylfuramide

*¹ Kohoku-ku, Hiyoshi-Honcho 33, Yokohama-city, Kanagawa-prefecture

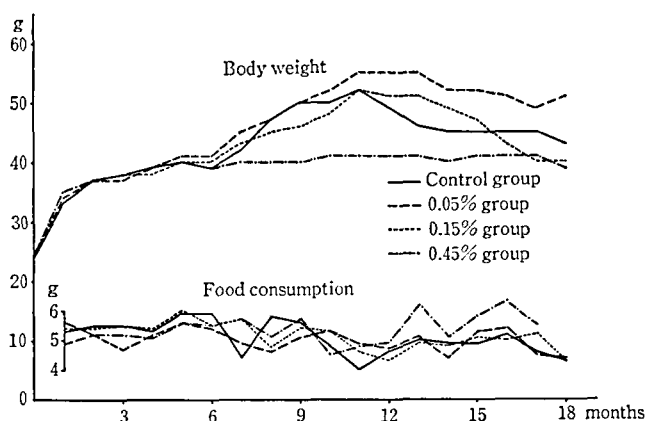


Fig. 2. Body weight and food consumption curves of male mice fed AF-2 at dietary levels of 0.05–0.45% for 18 months

Table 1. Mortality of male mice fed AF-2 at dietary levels of 0.05–0.45% for 18 months

Group	Months																		Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
Control			1									3	4	1	1	3	1	3	17
0.05%						2	2	1	1		1	3			4			3	17
0.15%				1				2		1	6	2	3	1	3	1	3		23
0.45%				1			1			2		5	2	6	4		1	2	24

Table 2. Incidence of nodules found in the forestomach of male mice fed AF-2 at dietary levels of 0.05–0.45% for 18 months

Group	Animals sacrificed at			Dead animals	Total
	6 M	12M	18M		
Control	0 (8)	0 (10)	0 (10)	0 (17)	0 (45)
0.05%	0 (8)	3 (10)	6 (10)	3 (17)	12 (45)
0.15%	0 (8)	8 (10)	3 (4)	15 (23)	26 (45)
0.45%	0 (8)	9 (10)	2 (2)	20 (24)	31 (44)

Figures in parenthesis indicate no. of animals.

6 months, 10 animals at 12 months, all surviving animals at 18 months and also all animals died during the experimental period were autopsied for pathological examination. After macroscopic observation, sections from organs and tissue masses were fixed in 10% neutral formalin. Paraffin sections of the tissue were cut at 3 μ and stained with hematoxylin-eosin for histological

examination.

Results

1) Body weight, food consumption and mortality

The control, 0.05% and 0.15% groups did not show any growth retardation throughout the feeding period (Fig. 2). The 0.45% group also grew

Table 3. Incidence of tumors in male mice fed AF-2 at dietary levels of 0.05-0.45% for 18 months

Tumors	Control	0.05%	0.15%	0.45%
Forestomach				
Hyperplasia		4	2	4
Papilloma		4	7	4
Squamous cell carcinoma		4	16	19
Leiomyosarcoma			1*	4(3*)
Glandular stomach				
Adenoma	1			
Intestine				
Adenocarcinoma				1
Lung				
Adenoma	15	13	10	15
Liver				
Nodular hyperplasia	2	4	1	
Adenoma			1	

*: Cases mixed with squamous cell carcinoma.

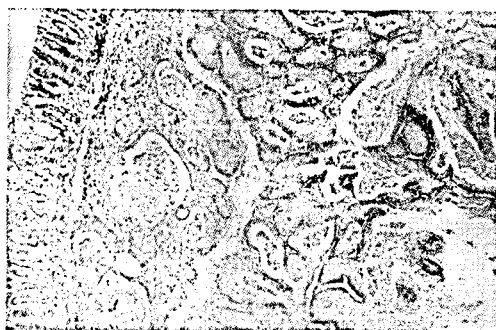


Fig. 3. Squamous cell carcinoma in a mouse of the 0.15% group, died at 8 months. Submucosal layer of the glandular stomach was entirely replaced by the tumor. H-E staining, $\times 16$

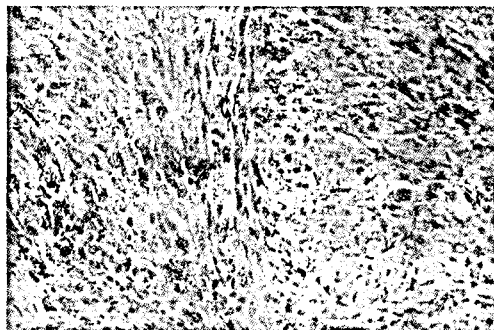


Fig. 4. Leiomyosarcoma in a mouse of the 0.45% group, died at 10 months. The tumor consists of spindle cells with marked pleomorphism. H-E staining, $\times 40$

in parallel with the control group until 6 months but thereafter, the body weight increase was ceased exhibiting a plateau growth curve. The food consumption was not different among the groups.

During the feeding period, death occurred sporadically in each of the groups, and total numbers of deaths by 18 months reached 17 in the control group, 17 in the 0.05% group, 23 in the 0.15% group and 24 in the 0.45% group (Table 1). At autopsy, most of the dead animals were shown to have pneumonia, and in 3 of the 0.05% group, 15 of the 0.15% group and 20 of the 0.45% group, there were development of various-sized nodules in the forestomach.

2) Gross findings

The most characteristic feature in gross findings was development of nodules in the forestomach. The nodules were seen only in the experimental groups and their incidence was clearly dose-related (Table 2). The nodules were varied in size ranging from tiny projections at the epithelial surface to a large mass of 20 mm $\times$ 30 mm, extending to the whole lumen of the stomach. The large masses were milky-white in color, elastic in consistency, sometimes abundant in vascularization and mostly encapsulated with a thick fibrous wall. In some cases, these stomach lesions were accompanied by presence of nodules

in the neighboring tissues including the regional lymph nodes and diaphragm.

The forestomach lesion was first found in a mouse of the 0.15% group, which died at 8 months, and it was histologically diagnosed as a squamous cell carcinoma.

3) Histological findings (Table 3, Fig. 3 and Fig. 4)

The nodules grossly observed in the forestomach included simple hyperplasia of the epithelium, papilloma, squamous cell carcinoma and leiomyosarcoma.

Squamous cell carcinomas were found in 4, 16 and 19 animals of the 0.05%, 0.15% and 0.45% groups, respectively. Leiomyosarcoma was seen in 5 cases; 4 of which were found to be mixed with squamous cell carcinoma. Among the total 39 cases of squamous cell carcinoma, 22 cases revealed metastases in the regional lymph nodes, diaphragm, liver, lung, kidney, spleen or subcutis. Leiomyosarcoma had also metastases in liver, pancreas or kidney in 3 cases.

In the glandular stomach, there were no changes suggestive of tumor arising from its own epithelium. There were no tumorous lesions in the esophagus except hyperplasia of the epithelium in a few cases. In other viscera, development of tumors attributable to the feeding of AF-2 was not evident.

Discussion

Since the first forestomach tumor appeared in a mouse of the 0.15% group, which died at 8 months, the effective numbers of animals for the assessment of carcinogenic potency of the test compound will be those of animals sacrificed or died after 8 months, that is, 33, 36 and 34 of the 0.05%, 0.15% and 0.45% groups, respectively. These would give 12.1, 44.4 and 58.8% in the 0.05%, 0.15% and 0.45% groups, respectively as the incidences of malignant tumors of the forestomach.

Because of rarity of occurrence of spontaneous tumor of the forestomach in various strains of the mouse as reported by Tubura *et al.*^{8,9,10} and Jones¹¹, dose-related and high incidences of

malignant tumors at higher dose levels in the present experiment clearly indicates a carcinogenicity of AF-2 to the forestomach in mice.

Miyaji⁷ fed groups of 30 ICR mice of both sexes with diets containing 0, 0.0125, 0.05 or 0.2% of AF-2 for two years. There was no difference in incidences of tumors between the control and experimental groups. As regards the stomach, epidermoid carcinoma was found in a male and a female of the control, and there was papillary growth in a male and a female of the 0.05% group. Kanisawa *et al.*¹² fed a group of 20 ICR mice with a diet containing 0.02% AF-2 for 50 weeks with a control group of 10 animals. Although they noted some changes including cystic dilation in the epithelium of the glandular stomach in some animals fed AF-2, they did not find development of tumors due to AF-2 in any organs. Yokoro *et al.*¹³ reported that ICR mice of both sexes fed diets containing 0.08% or 0.4% AF-2 developed squamous cell carcinomas and papillomas of the forestomach in dose-dependent high incidences within one year.

Sano *et al.*¹⁴ fed 10 male ddY mice with a diet containing 0.25% AF-2 for 308 days and then maintained the animals on a basal diet until 616 days, using 10 animals as the control. Squamous cell carcinoma of the forestomach was observed in 6 animals and papilloma in one animal of the experimental group. They also fed 16 male golden hamsters with a diet containing 0.25% AF-2 for 565 days, using 10 animals as the control. In the experimental group, 4 out of 6 animals sacrificed between 71 days and 434 days had papilloma of the forestomach, and 7 animals died or sacrificed after 496 days developed squamous cell carcinoma of this organ.

In a study by Kato¹⁵, in which groups of 25 female Wistar L rats were fed diets containing 0, 0.0032, 0.0125 or 0.05% AF-2 for 2 years, there were no differences between the control and experimental groups in the incidence of tumors. No noticeable changes were present in the digestive organs. Takayama and Kuwabara¹⁶ fed groups of 50 Wistar rats of both sexes with diets

containing 0, 0.08 or 0.4% AF-2 for 18 months and then maintained the animals on basal diets until 24 months. Dose-dependent increases in the incidences of mammary adenocarcinoma were observed in the female rats, and multiple papillomas appeared in the forestomach in a significant number of the 0.4% group of both sexes.

Nomura¹⁷⁾ studied the effect on fetal and newborn animals using ICR/JCL mice. Offspring derived from mothers which received three subcutaneous injections of 50 $\mu\text{g/g}$ AF-2 during pregnancy developed a significantly higher incidence of pulmonary adenoma than controls. Furthermore, young mice received three subcutaneous injections of 50 $\mu\text{g/g}$ on days 21, 22 and 23 after birth showed a significantly higher incidence of pulmonary adenoma, whereas those received a single injection of 100 $\mu\text{g/g}$ on day 21 did not.

The carcinogenicity of AF-2 for the forestomach of the mouse was first suggested in the interim report¹⁸⁾ of the present study, which dealt with the results up to 12 months, and it was ascertained by the following studies in the same species of animals by Yokoro *et al.*¹³⁾ and Sano *et al.*¹⁴⁾.

From the fore-going references of studies made in three kinds of animal species, the mouse seems to be most sensitive to development of the forestomach tumors by AF-2.

Negative reports for the carcinogenicity of AF-2 in mice¹²⁾ and rat^{1,2,15)} may be partly due to low dose levels employed.

AF-2 was deleted from the Food Additive List in 1974 after the interim report of the present study was reviewed by the Food Sanitation Council.

References

- 1) Aiso, K. *et al.*: *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **3**, 365 (1962)
- 2) Aiso, K. *et al.*: *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **5**, 120 (1964)
- 3) Tonomura, A. and M. S. Sasaki: *Jap. J. Genetics*, **48**, 291 (1973)
- 4) Kondo, S. and H. Ichikawa-Ryo: *Jap. J. Genetics*, **48**, 295 (1973)
- 5) Kada, T.: *Jap. J. Genetics*, **48**, 301 (1973)
- 6) Yahagi, T. *et al.*: *Cancer Res.*, **34**, 2266 (1974)
- 7) Miyaji, T.: *Tohoku J. exp. Med.*, **103**, 331 (1971)
- 8) Tsubura, Y. *et al.*: *Exp. Anim.*, **15**, 82 (1966)
- 9) Tsubura, Y. *et al.*: *IGAKU NO AYUMI*, **78**, 677 (1971)
- 10) Tsubura, Y.: *IGAKU JIKKENHO KOZA*, Vol. 7 *GAN* p. 11 edited by Y. Tsubura, Nakayama Shoten Co. Tokyo (1973)
- 11) Jones, S.R.: *Handbook of Laboratory Animal Science*, Vol. III, p. 221 edited by E.C. Melby Jr. and N.H. Altman, CRC PRESS Inc., Ohio (1976)
- 12) Kanisawa, M. *et al.*: Unpublished data presented to the Ministry of Health and Welfare (1974)
- 13) Yokoro, K. *et al.*: *Proceedings of the Japanese Cancer Association*, **35**, 26 (1976)
- 14) Sano, T. *et al.*: *Z. Krebsforsch.*, **89**, 61 (1977)
- 15) Kato, K.: Unpublished data presented to the Ministry of Health and Welfare (1974)
- 16) Takayama, S. and N. Kuwabara: *Toxicology Letters*, **1**, 11 (1977)
- 17) Nomura, T.: *Nature*, **258**, 610 (1975)
- 18) Uchida, O. *et al.*: *Folia Pharmacol. Japon.*, **35**, 80 (1975)

Bis(2,3-dibromopropyl)phosphate magnesium の器官形成期投与に おけるラットの胎仔及び出産仔発育に及ぼす影響

門馬純子・高田幸一・会田喜崇・川俣一也・吉本浜子
鈴木康雄・戸部満寿夫

Effect of Oral Administration of Bis(2,3-dibromopropyl)phosphate to Pregnant Rats on Prenatal and Postnatal Developments

Junko MOMMA, Koichi TAKADA, Yoshitaka AIDA, Kazuya KAWAMATA,
Hamako YOSHIMOTO, Yasuo SUZUKI and Masuo TOBE

Effect of bis(2,3-dibromopropyl)phosphate magnesium (Bis-BP·Mg) on the prenatal and postnatal development of Wistar rat was examined. The agent was administered orally to pregnant rats by gavage for 9 days from the 8th to the 16th day of gestation at the daily dose of 167, 300 and 540 mg/kg. Control rats were treated in same way with solvent, olive oil alone.

The results were as follows.

1) Effects on the dams: In the group of 540 mg/kg, no change was observed in their general appearance, but some suppression was observed in their food consumption and body weight gain. The mortality also increased. A significant increase was noted in water intake and kidney weight in every experimental group with a good dose response.

2) Effects on the fetuses: In the group of 167 and 300 mg/kg, no significant change was observed in the number of live fetuses, sex ratio, body weight, number of dead implants, external and internal findings and skeletons. The number of dead implants increased significantly in the group of the highest dose, 540 mg/kg.

3) Effects on the offspring: No change was observed in litter size, viability index on the 4th day, and lactation index on the 4 weeks, and survival index, body weight or organ weight on the 8 weeks as well.

From those findings it was concluded that the Bis-BP·Mg had neither teratogenic effects nor inhibitory effects on the growth of fetus and offspring of Wistar rats under the present experimental conditions.

(Received May 31, 1982)

結 言

防炎加工剤の一種である Bis(2,3-dibromopropyl)phosphate magnesium (Bis-BP·Mg) の毒性検索の一環として、本物質を妊娠ラットの器官形成期に経口投与し、胎仔発生及び出産仔の生後発育に及ぼす影響を検索した。

実験材料及び方法

1. 検体

使用した Bis-BP·Mg は、丸菱油化製の工業品で、Bis 体 62%、mono 体 38% の混合物で純度は 90% である。その性状は、白色微粉末で、水、エタノール、メタノール及びその他の有機溶媒にほとんど不溶である。

検体は、遠心式ボールミルを用いて、Bis-BP·Mg 加アラビアゴム（5%液）懸濁液を調製し投与液とした。

2. 使用動物及び飼育条件

ウィスター系ラット（SPF、静岡県実験動物農業協同組合）を雌は 10 週令、雄は 9 週令で購入し、室温 23 ± 1°、相対湿度 55 ± 5%、点灯 12 時間、消灯 12 時間の照明の動物室で、ラット飼育用固型飼料（MM-1、船橋農場製）と水を自由に与え飼育した。2 週間予備飼育した後、妊娠母体を得るために未経産雌と雄（2:1）を一夜同居させた。翌朝腔拵中に精子を認めたものを妊娠母体とし、妊娠 0 日と起算して実験に供した。

3. 投与方法

Bis-BP·Mg の投与量は、妊娠母体を用いた予備試験で、LD₅₀ 量（261 mg/kg）を妊娠 8 日目より 16 日まで投与を行ったが母体への影響をまったく認めず、更に、高用量の投与を行ったところ 540 mg/kg/day の投与で妊娠母体の体重増加抑制と若干例の動物の死亡を認めたので、この用量を本試験の最高用量とした。

本試験では、0、167、300 及び 540 mg/kg/day の

Table 1. Effects of oral administration of Bis-BP·Mg on pregnant rats

Dose (mg/kg)	0	167	300	540
No. of dams examined	29	28	28	42
No. of not implanted dams	1 (3.3)	2 (7.1)	1 (3.6)	2 (4.8)
No. of dead dams	0	0	0	6 (14.3)
No. of dams with all dead implant	0	0	0	2 (4.8)
No. of dams with live fetuses	28	26	27	32
No. of dams for fetal examination	17	17	18	25
No. of dams for postnatal examination	11	9	9	9

Numerals in parentheses indicate the ratio (%) to number of dams examined

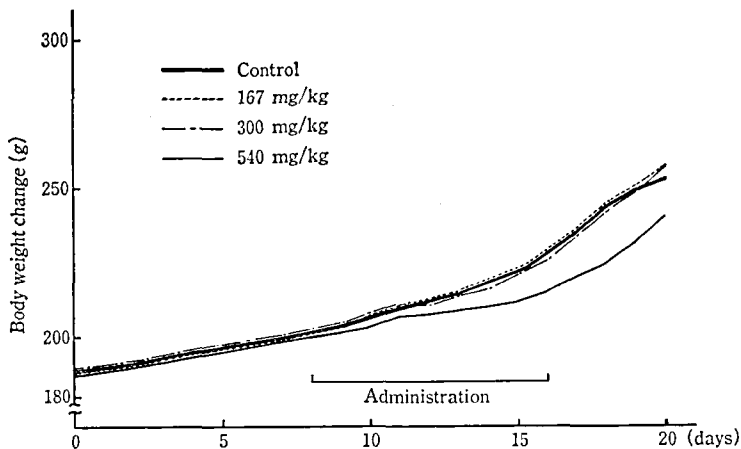


Fig. 1. Effect of oral administration of Bis-BP·Mg on body weight change of pregnant rats

用量を1群28～42匹のラットに妊娠8日目から16日目までの9日間、1日1回体重を測定し、投与量を算出して、胃ゾンデを用いた強制経口投与を行った。

4. 観察方法

各群の妊娠動物は、その約2/3を帝王切開による末期胎仔の観察に、残りの1/3を自然分娩させ出産仔の観察に供した。

1) 母体の観察

母体については、各群とも全妊娠期間を通して毎日、動物の一般症状の観察、体重、摂餌及び摂水量の測定を行った。更に、妊娠末期に帝王切開した母体は主要臓器を肉眼的に観察し、また、Bis-BP·Mgの類縁化合物で妊娠ラットの腎重量を増加させることが知られている¹²⁾ので、本実験でも妊娠ラットの腎重量を測定した。

2) 胎仔の観察

各群17～25匹の妊娠母体を分娩予定日の前日（妊娠20日目）にエーテル麻酔下で開腹して子宮を摘出し、黄体数、着床数、生存胎仔数及び胎仔死亡数などを調べた。

生存胎仔については、口腔を含む外形検査を行った後、体重を測定し、各母体の同腹生存仔の約2/3を任意に抽出して90%エタノール液で固定後、Dawson法¹³⁾に準じてアリザリンレッドS染色骨標本を作製して骨格検査を拡大鏡下で行った。残り約1/3の胎仔はブアン固定液で固定した後、ウィルソンの方法²⁾に従って臓器形態検査を行った。

3) 出産仔の観察

各群9～11匹の妊娠母体を自然分娩させ、出産仔数、生死仔数、出産仔の外形異常の有無及び一般症状を調べた。その後、出産仔を生後28日目まで母体に哺育させ、哺育率を算出した。なお、母体はこの時点で屠殺

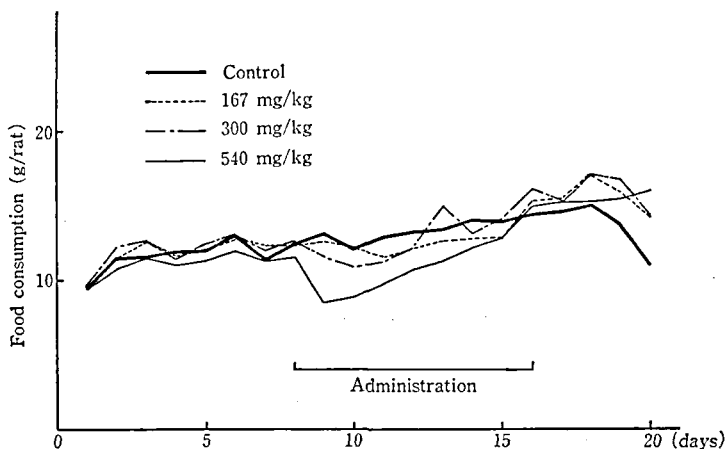


Fig. 2. Effect of oral administration of Bis-BP·Mg on food consumption of pregnant rats

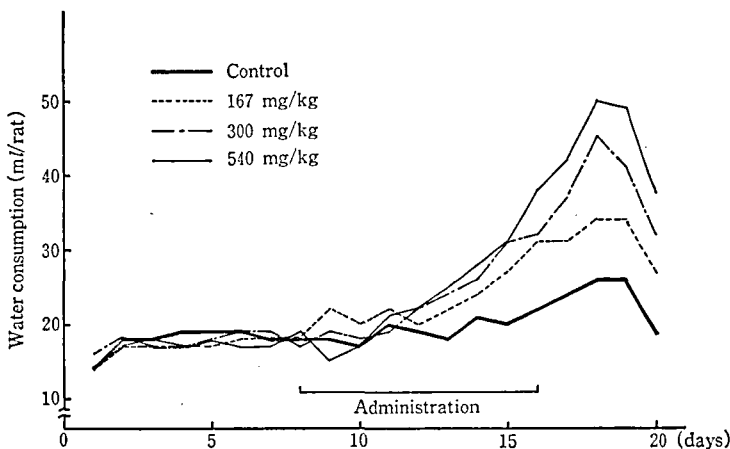


Fig. 3. Effect of oral administration of Bis-BP·Mg on water consumption of pregnant rats

し、肉眼的観察を行った。また、出産仔の哺育にあたり、生後4日目に出産仔数が10匹以上の母体については哺育仔数を10匹に調整した。

出産仔は離乳後、雌雄に分け、生後56日目まで飼育した。その間、毎週1回、体重を測定するとともに生存仔数を調べて生存率を算出した。生後56日目に仔の全例を屠殺して剖検所見を記録した後、臓器重量を測定した。

出産仔の哺育及び飼育期間中に生後分化として、耳介展開、歯芽萌出及び開眼を、また、性分化として、精巣下降及び陰開口を観察した。

5. 統計処理

性比、哺育率、生存率については χ^2 検定³⁾、胎仔死亡率、骨格異常の出現率については、Wilcoxon の順位和検定⁴⁾、臓器重量については、Weil の t 検定⁵⁾、その他の結果はすべて t 検定を行った。

実験成績

1. 母体に及ぼす影響

1) 一般症状並びに死亡

対照群及び各処置群とも一般症状に著変は認められないが、540 mg/kg 群で検体投与を始めて2日目より死亡する動物がみられ、妊娠19日目までに42匹中6匹の死亡を認める (Table 1)。

2) 体重の推移

Fig. 1 に各群の平均体重の推移を示した。167 及び 300 mg/kg 群では、対照群と差のない体重増加を示すが、540 mg/kg 群では、検体投与開始より、対照群に比較して体重増加抑制が認められる。

3) 摂餌量の推移

Fig. 2 に示すとおり、540 mg/kg 群の検体投与の初期において、摂餌量の低下が著明である他は対照群と

Table 2. Effects of oral administration of Bis-BP·Mg on pregnant rats

Dose (mg/kg)	0	167	300	540
No. of dams	17	17	18	23
Uterine weight with fetuses (g)	(45.63 ± 13.26)	(47.62 ± 7.85)	(49.01 ± 9.23)	(41.00 ± 11.72)
No. of corpora lutea	208 (12.24 ± 1.56)	207 (12.18 ± 1.07)	226 (12.56 ± 1.82)	292 (12.70 ± 1.52)
No. of implants	179 (10.53 ± 3.08)	182 (10.71 ± 1.57)	193 (10.72 ± 1.90)	240 (9.60 ± 2.97)

Numerals in the parentheses indicate mean±S.D.

Table 3. Effects of oral administration of Bis-BP·Mg on kidney weight of pregnant rats

Dose (mg/kg)	No. of rats	Body weight (g)	Kidney weight	
			Absolute weight (g)	Relative weight (g/100g B.W.)
0	17	248.41 ± 12.63	1.22 ± 0.33	0.49 ± 0.04
167	17	255.71 ± 8.33	1.33 ± 0.10**	0.52 ± 0.04*
300	18	255.06 ± 17.93	1.40 ± 0.14**	0.55 ± 0.04**
540	25	236.04 ± 20.66	1.60 ± 0.32**	0.68 ± 0.16**

Numerals indicate mean±S.D.

* : P<0.05 ** : P<0.01

各処置群との間に差は認められない。

4) 摂水量の推移

Fig. 3 に示すとおり、各処置群とも検体投与4日目以降、用量関係のみられる摂水量の増加が認められる。この増加は検体投与終了後2日目最大となり以後漸次減少する。

5) 剖検所見

各群の母体を妊娠20日目に屠殺して得られた成績を Table 2 に示す。胎仔を含む子宮重量、黄体数及び着床数は各処置群とも対照群との間に差は認められない。主要臓器の肉眼的所見では、全群とも特に異常は認められなかったが、腎臓重量では、各処置群で対照群と比較して用量関係のみられる重量の増加が有意に認められる (Table 3)。

2. 胎仔に及ぼす影響

Table 4 に示すとおり、平均生存胎仔数は、各処置群とも対照群に比較して差は認められない。

生存胎仔体重では、167 及び 300 mg/kg 群で対照群に比較して有意な増加を認めるが、540 mg/kg 群では差を認めない。

胎仔死亡率では、167 及び 300 mg/kg 群は対照群との間に差を認めないが、540 mg/kg 群では有意に高い値を示す。なお、この高用量群では全胎仔の早期死亡の認められた母体が2例観察されている (Table 1)。

胎仔の外形異常例は Table 4 に示すとおり、対照群を含め各処置群に1例も認められない。

胎仔の臓器形態検査においても異常は対照群を含め各処置群に1例も観察されない。

Table 4. Effects of Bis-BP·Mg given orally in pregnancy on the fetal development

Dose (mg/kg)	0	167	300	540
No. of dams	17	17	18	25
No. of total implants	179	182	193	240
No. of live fetuses ^{a)}	171	174	182	212
	10.06 ± 3.15	10.24 ± 1.82	10.11 ± 2.19	8.48 ± 3.68
Sex ratio ^{b)}	91 / 80	83 / 91	93 / 89	112 / 100
Body weight ^{a)} (g)	3.12 ± 0.16	3.25 ± 0.17 *	3.37 ± 0.20 **	3.04 ± 0.38
No. of fetuses with anomaly	0	0	0	0
No. of dead implants	8 (4.6)	8 (4.7)	11 (6.1)	27 (12.4) **
early death	8 (4.6)	7 (4.1)	8 (4.5)	23 (11.2) **
late death	0	1 (0.6)	3 (1.6)	4 (1.2)

a) mean±S.D.

b) male/female

Numerals in the parentheses indicate the percentages

* : P<0.05 ** : P<0.01

Table 5. Effects of Bis-BP·Mg given orally in pregnancy on skeletal development of the fetuses

Dose (mg/kg)	0	167	300	540
No. of dams	17	17	18	23
No. of fetuses examined	112	112	118	136
Scoliosis	0	0	0	1 (0.9) ^a
Incompletely ossified occipital bone	0	0	0	8 (5.4)
Incompletely ossified cervical vertebral arches	0	0	0	6 (4.4)
Cervical rib	0	0	0	1 (0.7)
Asymmetry of sternbrae	2 (1.7)	3 (2.8)	5 (7.0)	5 (7.5)
Splitting of thoracic vertebral bodies	0	4 (3.6)	1 (1.1)	5 (3.0)
14th rib	1 (1.2)	1 (0.8)	0	5 (4.0)
Absence of 1st left lumbar vertebral arch	0	0	0	1 (0.9)
Average number of metacarpus	8.0±0.09	8.1±0.16	8.0±0.10	7.9±0.35
Average number of metatarsus	8.0±0.07	8.1±0.16	8.0±0.07	8.0±0.42
Average number of caudal vertebrae	8.7±0.34	9.1±0.48	9.6±0.40	9.0±0.92

a: complicate 14th rib, splitting of thoracic vertebral bodies and absence of 1st lumbar vertebral arch

Numerals in the parentheses indicate the percentage

生存胎仔の骨格検査成績を Table 5 に示した。540 mg/kg 群で左第1腰椎椎弓の欠損、胸椎椎体分離及び第14肋骨を合併した脊椎側彎が1例認められる。後頭骨形成不全(分離、染色性の低下)が540 mg/kg 群に8例観察される。また、頸椎椎弓形成不全(短小、一部欠損及び一部分離)が540 mg/kg 群に6例観察される。これらの所見を有する胎仔はいずれも体重が1.4~2.0 g であり、他の胎仔体重に比べ約 2/3~1/2

と軽量であった。

痕跡状の頸肋が540 mg/kg 群に1例観察される。胸骨核の非対称(最長胸骨核で左右の核の間に、その長さの1/2以上ずれのあるもの)は、対照群を含む各群に2~8%前後観察されるが群間に差は認められない。胸椎椎体あるいは腰椎椎体の分離した胎仔が各処置群に1~5例認められるが対照群に比較して有意な差は認められない。第14肋骨は、300 mg/kg 群を除く

Table 6. Effect of Bis-BP·Mg given orally in pregnancy on postnatal development of the offspring

Dose (mg/kg)	0	167	300	540
No. of dams	11	9	9	9
No. of newborns at birth	119 (10.8±1.3)	98 (10.9±3.3)	101 (11.2±1.6)	99 (11.0±1.5)
No. of offspring at 4 days	94 (8.5±1.1)	96 (10.7±3.2)	87 (9.7±3.8)	98 (10.9±1.5)
Viability index	79.0%	98.0%	86.0%	99.0%
No. of offspring at 4 days after selection	88 (9.8±0.4)	82 (9.1±2.3)	78 (9.8±0.5)	87 (9.7±0.7)
No. of offspring at 4 weeks	87 (9.7±0.5)	82 (9.1±2.3)	77 (9.6±0.5)	80 (8.9±2.3)
Lactation index	98.1%	100%	98.7%	92.0%
No. of offspring at 8 weeks	87 (9.7±0.5)	82 (9.1±2.3)	77 (9.6±0.5)	80 (8.9±2.3)
Survival index	100%	100%	100%	100%

Numerals in parentheses indicate mean±S.D.

$$\text{Viability index} = \frac{\text{No. of offspring at 4 days}}{\text{No. of newborns at birth}} \times 100$$

$$\text{Lactation index} = \frac{\text{No. of offspring at 4 weeks}}{\text{No. of offspring at 4 days after selection}} \times 100$$

$$\text{Survival index} = \frac{\text{No. of offspring at 8 weeks}}{\text{No. of offspring at 4 weeks}} \times 100$$

Table 7. Effect of Bis-BP·Mg given orally in pregnancy on body weight of the offspring

Dose (mg/kg)	0		167		300		540	
No. of dams	9		9		8		9	
Sex	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
at 4 days	6.3±1.0	6.2±1.6	6.8±1.0	6.2±0.8	7.2±0.5	6.8±0.5	6.5±0.7	6.1±0.5
at 4 days after selection	6.6±1.6	6.2±1.6	6.8±1.0	6.4±0.6	7.2±0.5	6.8±0.5	6.5±0.7	6.0±0.5
at 4 weeks	48.3±4.9	46.0±3.9	49.6±4.5	46.9±3.3	47.6±6.3	46.9±3.0	44.3±5.1	41.3±5.9
at 8 weeks	191.0±15.7	134.5±8.4	191.1±17.6	135.8±10.5	189.6±13.3	136.5±6.5	177.0±18.5	128.7±10.2

Numerals indicate mean±S.D. in gram

各群に1～4%認められるが各群間に有意な差は認められない。

化骨状態では、中手骨、中足骨及び尾椎骨の化骨数を調べたが各群間に差は認められない。

3. 出産仔に及ぼす影響

各群9～11匹の妊娠母体を自然分娩させ、出産仔の生後発育に及ぼす Bis-BP·Mg の影響を調べた。

Table 6 に示すとおり、平均出産仔数は各群間で特に差を認めない。

対照群及び 300 mg/kg 群で、4 日令時生存率 (Viability index) が他の群より低い値を示した。このことは、両群に出産後 1～3 日以内に生出仔の死亡及び母

体による喰殺が多数例認められたことに起因している。哺育率 (Lactation index) 及び実験終了時生存率 (Survival index) では各群間に差は認められない。

出産仔の体重の推移は Table 7 に示すとおり、雌雄ともに各群間に差は認められない。

8 週令時に屠殺した出産仔の臓器重量は Table 8 及び 9 に示すとおり、雌雄ともに各群間に有意な差は認められない。なお、生後分化及び性分化においても各群間に差は認められない。

考 察

Bis-BP の毒性については、変異原性を示すとする

Table 8. Effect of Bis-BP·Mg given orally in pregnancy on absolute organ weight of the offspring

Dose (mg/Kg)	0		167		300		540	
Sex	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
No. of offspring examined	49	38	41	41	43	34	42	38
Brain (g)	1.69±0.06	1.58±0.07	1.68±0.05	1.58±0.04	1.69±0.03	1.59±0.04	1.64±0.06	1.54±0.07
Pituitary (mg)	5.32±0.82	5.72±1.06	4.89±0.82	5.79±1.52	4.86±0.82	5.86±0.96	4.75±0.64	5.60±0.91
Thyroid (mg)	10.49±2.12	8.14±2.07	10.18±2.24	7.79±2.30	10.46±2.04	8.56±1.87	11.15±2.27	8.57±1.24
Thymus (g)	0.44±0.05	0.37±0.04	0.46±0.05	0.40±0.04	0.46±0.04	0.40±0.04	0.48±0.04	0.41±0.04
Heart (g)	0.62±0.06	0.46±0.04	0.63±0.06	0.47±0.04	0.62±0.04	0.47±0.03	0.59±0.07	0.45±0.04
Lung (g)	0.86±0.09	0.67±0.10	0.82±0.08	0.68±0.10	0.83±0.07	0.66±0.04	0.77±0.07	0.62±0.06
Liver (g)	8.29±1.10	5.46±0.57	9.21±0.98	5.31±0.61	7.64±1.17	5.07±0.43	7.61±0.81	5.02±0.63
Spleen (g)	0.49±0.04	0.36±0.03	0.49±0.05	0.35±0.03	0.48±0.05	0.36±0.03	0.47±0.04	0.35±0.03
Kidney (g)	1.32±0.15	0.95±0.09	1.30±0.14	0.93±0.08	1.28±0.12	0.93±0.06	1.23±0.14	0.90±0.07
Adrenal (mg)	22.77±2.73	27.24±2.94	23.10±2.91	28.09±3.41	24.14±2.49	28.77±2.71	23.08±2.67	27.25±3.16
Ovary (mg)		44.22±6.48		43.84±9.99		42.65±7.30		42.52±6.17
Testis (g)	2.06±0.19		2.06±0.35		2.05±0.27		1.88±0.28	

Numerals indicate mean±S.D.

Table 9. Effect of Bis-BP·Mg given orally in pregnancy on relative organ weight of the offspring

Dose (mg/Kg)	0		167		300		540	
Sex	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
No. of offspring examined	49	38	41	41	43	34	42	38
Body weight (g)	191.0±15.7	134.5±8.4	191.1±17.6	135.8±10.5	189.6±13.3	136.5±6.5	177.0±18.5	128.7±10.2
Brain (g)	0.89±0.07	1.18±0.05	0.89±0.08	1.17±0.09	0.89±0.06	1.17±0.06	0.93±0.08	1.20±0.07
Pituitary (mg)	2.79±0.41	4.25±0.77	2.58±0.48	4.25±1.03	2.57±0.42	4.30±0.69	2.69±0.35	4.35±0.80
Thyroid (mg)	5.50±1.05	6.05±1.55	5.37±1.18	5.75±1.60	5.56±1.03	6.28±1.41	6.43±1.70	6.72±1.15
Thymus (g)	0.23±0.03	0.28±0.03	0.24±0.03	0.30±0.04	0.24±0.03	0.30±0.03	0.27±0.03	0.32±0.03
Heart (g)	0.32±0.02	0.34±0.03	0.33±0.02	0.34±0.02	0.33±0.02	0.34±0.02	0.34±0.02	0.35±0.03
Lung (g)	0.46±0.08	0.50±0.06	0.43±0.03	0.51±0.10	0.44±0.02	0.49±0.03	0.44±0.02	0.49±0.03
Liver (g)	4.37±0.33	4.06±0.31	4.29±0.24	3.91±0.27	4.01±0.40	3.67±0.26	4.31±0.23	3.91±0.41
Spleen (g)	0.26±0.02	0.27±0.02	0.26±0.02	0.26±0.01	0.25±0.02	0.26±0.02	0.26±0.01	0.27±0.02
Kidney (g)	0.69±0.06	0.71±0.06	0.68±0.03	0.69±0.03	0.68±0.05	0.68±0.04	0.70±0.04	0.70±0.05
Adrenal (mg)	11.97±1.62	20.27±1.92	12.13±1.44	20.70±1.99	12.80±1.62	21.14±2.39	13.05±1.45	21.26±2.55
Ovary (mg)		32.99±5.14		32.16±6.31		31.33±5.61		33.17±4.90
Testis (g)	1.08±0.08		1.07±0.11		1.08±0.10		1.06±0.08	

Numerals indicate mean±S.D.

報告⁶⁻⁷⁾があるにすぎないが、この類縁物質である Tris(2,3-dibromopropyl) phosphate (Tris-BP) は、ラット及びマウスで腎腫瘍を生ずるとされ⁸⁻¹⁰⁾、更に、その代謝産物として Bis-BP が生体内に生ずることが知られている。Tris-BP の催奇形性については、

Seabugh¹¹⁾ 及び川島ら¹²⁾によりラットで陰性であったと報告されている。

Bis-BP·Mg の5週令ラットでの LD₅₀ とその信頼限界は、雄で 282(253~314)mg/kg、雌で 261(219~310) mg/kg であった¹³⁾ が、12週令の妊娠ラットに

261 mg/kg を毎日1回, 9日間投与を行ってもほとんど影響はみられなかった。増量した約2倍量の 540 mg/kg で5例中の2例が2日目と5日目で死亡した。この様な妊娠動物での毒性の弱まりの原因として, 年令差と投与時の動物の食餌状態(絶食あるいは飽食)が考えられた。そこで, Bis-BP・Mg を26週令の雄ラットを用い, 絶食及び飽食の条件下で1回投与実験を実施したところ, LD₅₀ は絶食時では 460 mg/kg, 飽食時では 760 mg/kg で, 明らかに飽食時が高値を示した。更に, 15週令の雌ラットの絶食時の LD₅₀ は 370 mg/kg であった。これらのことから, 加齢が進むにつれ, Bis-BP・Mg の毒性は低く, また, 絶食時に比べ飽食の方が同じ様に低く出現することが示唆された。

胎仔の骨格異常として, 540 mg/kg 群で左第1腰椎椎弓の欠損, 胸椎椎体分離及び第14肋骨を合併した脊椎側彎が1例認められたが, その同腹仔に変化が認められないことから, この変化は偶発的と考えられ, 薬物による直接的な影響とは考え難い。また更に, 540 mg/kg 群では, 後頭骨及び頸椎椎弓の形成不全が多数例にみられたが, これらの症例の胎仔は体重が正常な胎仔体重に比較し, 約2/3ないし1/2と軽く, 矮小であった。したがって, これらの変化は, 540 mg/kg 群での母体の体重抑制などによる二次的な影響と考えられる。なお, 催奇形性の1つの指標とされている¹⁴⁾ 腭肋は1例も認められなかった。

出産仔への影響については, 特に検体投与の影響は認められなかった。

Bis-BP・Mg の妊娠母体への9日間の投与で摂水量と腎重量が, いずれも用量に相関して増加した。腎重量の増加については, 川島ら¹²⁾が行った Tris-BP の妊娠ラットへの投与実験で最高用量の 200 mg/kg 群で約1.6倍の増加が示されており, また, Tris-BP とその代謝産物である Bis-BP 及び 2,3-dibromopropyl phosphate(BP) の三者のラット腎への影響を比較した報告^{7,15)}では, Bis-BP は Tris-BP よりも尿量増加及び腎毒性が強く, 一方, BP は明らかな腎毒性を生じなかったとされている。今回の実験で, 高用量群での摂水量の増加は対照群の約2倍量を示した。Bis-BP・Mg を投与した妊娠及び妊娠不成立ラットでの摂水量及び腎重量を比較したところ, 摂水量では, 妊娠ラットの様な増加は認められなかったが, 腎重量では, 妊娠ラットと同様な増加を示した。このことは, Bis-BP・Mg は, 腎重量を明らかに増加させるが, 摂水量の増加は, 妊娠状態であることが1つの要因となることを示唆している。

ま と め

Bis(2,3-dibromopropyl)phosphate magnesium(Bis-BP・Mg) の 167, 300 及び 540 mg/kg を妊娠ラットに妊娠8日目から16日目までの9日間, 毎日1回強制経口投与し, 妊娠末期の胎仔及び出産仔の生後発育に及ぼす影響について検討した。

1. 母体への影響: 540 mg/kg 群で一般症状に変化は認められなかったが, 摂餌量の減少, 体重増加抑制及び死亡率の増加が認められた。また, 各処置群において, 摂水量及び腎重量が用量に関連した増加を示した。

2. 胎仔への影響: 167 及び 300 mg/kg 群では, 生存胎仔数, 性比, 胎仔体重, 胎仔死亡率, 胎仔の外形, 内部器官及び骨格に異常は認められなかった。540 mg/kg 群では, 胎仔死亡率が有意に高く認められた以外に変化は認められなかった。

3. 出産仔への影響: 各処置群ともに, 出産仔数, 4日令時の生存率, 哺育率, 8週令時の生存率, 体重及び器官重量に変化は認められず, 外形検査でも異常は認められなかった。

以上の結果から, 本実験条件下での Bis-BP・Mg は胎仔の発育の抑制及び催奇形性は認められず, また, 出産仔の生後発育にも影響を及ぼさないものと考えられる。

文 献

- 1) A.B. Dawson: *Stain. Technol.*, **1**, 123 (1926)
- 2) J.G. Wilson and J. Workany: *Teratology Principles and Techniques*, p. 262 (1964) Chicago Univ. Press.
- 3) 佐久間昭: 生物検定法, p. 234(1975) 東大出版
- 4) 佐久間昭: 簡便統計手法, p. 5(1965) 日本レダリー
- 5) C.S. Weil: *Food Cosmet. Toxicol.*, **8**, 177 (1970)
- 6) A. Nakamura: *Mutation Res.*, **66**, 373 (1979)
- 7) R.K. Lynn: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **63**, 105 (1982)
- 8) NCI: *Carcinogenesis Technical Report Series*, No. 76 (1978)
- 9) G. Reznik, J.M. Ward, J.F. Hardisty, and A. Russfield: *J. Nat. Cancer Inst.*, **63**, 205 (1979)
- 10) G. Reznik: *Lab. Invest.*, **44**, 74 (1981)
- 11) V.M. Scabugh: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **45**, 361 (1978)
- 12) 川島邦夫ら: 衛生試験, **98**, 50 (1980)
- 13) 未発表データ
- 14) 安田峯生, 前田広由: 先天異常, **13**, 25(1973)
- 15) W.C. Elliott: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **62**, 179 (1982)

臭素酸カリウムのラットにおける癌原性について

大野裕子・小野寺博志・高村直子

今沢孝喜・前川昭彦・黒川雄二

Carcinogenicity Testing of Potassium Bromate in F-344 Rats

Yuko OHNO, Hiroshi ONODERA, Naoko TAKAMURA, Takayoshi IMAZAWA,
Akihiko MAEKAWA and Yuji KUROKAWA

A bioassay of potassium bromate, used as food additive or neutralizer in permanent wavings, for possible carcinogenicity was conducted by oral administration to Fischer-344 rats in their drinking water for 110 weeks.

Potassium bromate was given at the concentrations of 500, 250 ppm to the experimental groups and distilled water was given to the control groups. Each group consisted of 53 male and female rats. Inhibition of body weight increase was relatively marked in both sexes given 500 ppm. The mean survival time was the shortest in males given 500 ppm (88.1 ± 18.1 weeks). The survival times of other groups were between 101 and 104 weeks. The survival ratios in weeks 104 of treated rats were relatively high and those of controls were 77.4% in males and 66.0% in females, respectively.

As the result, the high incidences of renal cell tumors (male and female rats given 500, 250 ppm), mesotheliomas of peritoneum (male rats given 500, 250 ppm) and tumors of the follicular epithelium of thyroid (male and female rats given 500 ppm) were observed. The incidences were all significantly different from those of control. It was concluded that under the conditions of this bioassay, potassium bromate was carcinogenic in Fisher-344 rats by oral administration.

(Received May 31, 1982)

臭素酸カリウム (Potassium bromate, KBrO_3 , 以下臭カと略す) はその酸化剤としての作用を利用して、食品添加物^{1,2)} (小麦粉改良剤, 魚肉ねり製品品質向上剤) 及びパーマネント用第二液³⁾ として、欧米諸国、日本において広く用いられているものである。

1964年以前の臭カに関する毒性データは、FAO/WHO の合同会議において検討されているが⁴⁾、現在の実験レベルから考えると満足すべきデータではない。発癌性に関しては、英国の Fisher 及び Ginocchio によるラット⁴⁾ 及びマウス⁵⁾ を用いての実験がある。彼らは、臭カを50及び75 ppm の濃度で添加したパンを実験動物の餌として104週間投与した結果、発癌性を示す何らの所見も得られなかったとしている。

一方、厚生省がん助成金による研究班「遺伝変異原性を主とする発癌物質スクリーニングの技術開発」(班長・河内卓) の研究成果⁶⁾ によれば、臭カの変異原性は、Ames 法では TA-100 株を用い S9 添加した場合、3 mg/plate で、32 mutants/mg で陽性を示した。TA-98 株では陰性であった。染色体異常誘発試験⁷⁾ ではチャイニーズハムスター肺由来線維芽細胞

を用いた場合、0.25 mg/ml で陽性であった。マウスを用いた小核試験では、腹腔内投与では 25 mg/kg、経口投与では 100 mg/kg で陽性であった。一方、Rec-assay と Silk worm test では陰性であった。これらの結果から、変異原性においては強陽性とされ、発癌性試験が必要とすると決定されたものである。

本研究は従って、厚生省がん研究助成金による研究班「突然変異原性物質の動物発癌テストに関する研究」(班長、故小田嶋成和) の分担研究として、昭和52年度より国立衛生試験所において開始されたものである。

実験材料及び方法

検体：臭カ (KBrO_3 , 分子量 167.02) は、食品添加物用 (松永化学製) を用いた。食品添加物公定書によって、国立衛生試験所薬品部で行われた検定結果では、酸度、アルカリ度、臭素、ヒ素、重金属含有量などは適合であり、純度99.5%以上の合格品であった。

動物：6週令の雌雄 Fischer 344 ラットを日本チャールスリバー (株) より購入して2週間の予備飼育期

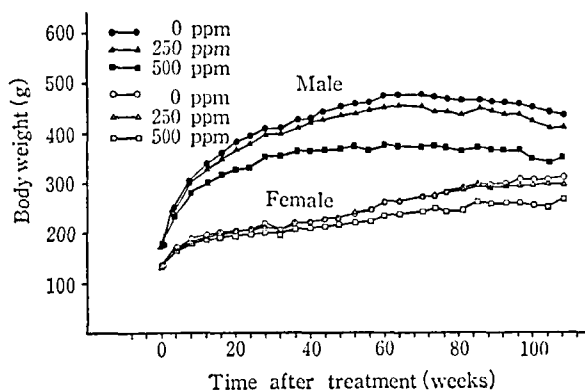


Fig. 1. Growth curve of male and female rats

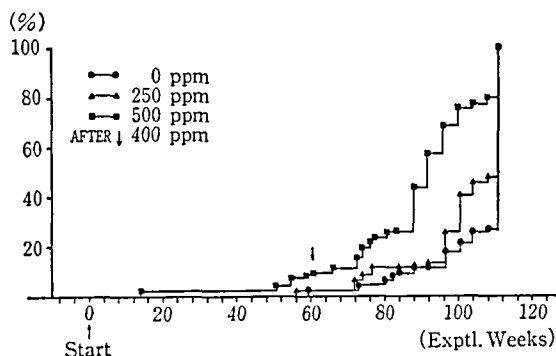


Fig. 2. Cumulative mortality curve of male rats

間後に用いた。

基本食：飼育用固型飼料として、CRF-1（日本チャールスリバー（株））を自由摂取させた。

飼育条件：発癌性試験はハンギング型プラスチックケージに、ホワイトフレックを床敷として用い、5頭を1ケージに収容した。動物飼育室は、セミバリアシステムで、室温 24 ± 1 度、湿度 55 ± 5 ％、換気18回/時間（オールフレッシュエアー）、照燈12時間、消燈12時間の条件下であった。なお急性及び亜慢性毒性試験はコンベンショナルの条件で行った。

統計学的処理は、Fischer's exact probability test 又は χ^2 -test によった。

実験結果

I. 急性毒性試験

6週齢 Fischer 344 ラット、各群雌雄5頭を用い、18時間絶食後オリーブ油に懸濁した臭カを胃ゾンデにより強制経口投与し、14日間観察した。濃度は、611, 489, 391, 313, 250, 200 mg/kg（公比1.25）である。死亡は2～18時間以内で611 mg/kg（雄5/5、雌5/5）、

489 mg/kg（雄4/5、雌5/5）、391 mg/kg（雄1/5、雌5/5）、313 mg/kg（雌1/5）、250 mg/kg（雌1/5）にみられた。

LD₅₀（Bliss 法により算定）は、雄430（358—528）mg/kg、雌321（265—373 mg/kg）である。

一般症状では、投与直後から自発運動抑制、失調性歩行、呼吸促進を示し、更に体温下降、下痢、流涙、立毛を生じ、チェンストークス呼吸、チアノーゼを呈して2～18時間で死亡した。剖検所見では、肺うっ血、腺胃粘膜の出血が認められた。

II. 亜慢性毒性試験

6週齢 Fischer 344 ラット各群雌雄10頭を用い、飲料水中濃度10000～0 ppm（第1回実験）、600～0 ppm（第2回実験）で10週間自由摂取させた。

その結果、第1回実験では雌雄共に1250 ppm以上の濃度では全例7週までに死亡した。第2回実験では、全例10週まで生存した。

体重増加抑制は、雄600 ppm群で有意差がみられた。臓器重量では、心及び肝重量の減少（雄600 ppm群）、脾重量の増加（雄300 ppm群）が有意差を示し

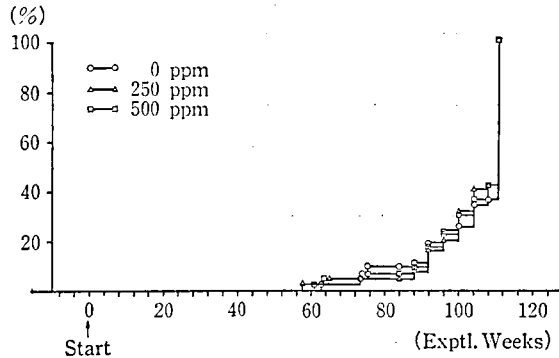


Fig. 3. Cumulative mortality curve of female rats.

Table 1. Mean survival times and survival ratios

	Conc. of potassium bromate (ppm)	Mean survival (weeks $\pm$ SD)	Range (weeks)	No. of rats at 104th wk (survival ratio in %)
Male	500	88.1 $\pm$ 18.1	14-109	11(20.8)
	250	101.1 $\pm$ 12.5	56-111	30(56.6)
	0	104.5 $\pm$ 11.3	59-111	41(77.4)
Female	500	103.2 $\pm$ 11.7	62-111	35(66.0)
	250	103.2 $\pm$ 11.4	58-111	32(61.5)
	0	103.6 $\pm$ 11.6	63-111	35(66.0)

た。

血液生化学的検査では、GOT 値の上昇（雄 600, 300, 150 ppm 群，雌 150 ppm 群）GPT 値の上昇（雄 300, 150 ppm 群），アルカリ性フォスファターゼ値の上昇（雄雌 600 ppm 群），尿素窒素値の上昇（雌 300 ppm 群） N_a 値の上昇（雄 300, 150 ppm 群），コリンエステラーゼ値の上昇（雄 300 ppm 群），低下（600 ppm 群）が，いずれも有意差を示した。

病理組織学的には，腎で尿細管上皮の変性像，コレステリン結晶，eosinophilic body などが認められた。

以上の成績から，体重増加抑制を考慮して発癌性試験には，500 及び 250 ppm の濃度が決定された。

III. 発癌性試験

検体投与方法：臭気は，蒸留水で溶解して週 2 回新たに調製し，500, 250 ppm の濃度で，飲料水として自動給水装置により自由摂取させた。対照群には，脱イオン水のみを同様に与えた。動物は，各群雌雄 53 頭を用いて実験を開始した。

実験期間：検体投与は 110 週間とし，以後 1 週間脱イオン水のみを投与し，111 週目に生存動物全例をエーテル麻酔下に屠殺剖検した。

観察及び検査：動物の観察は連日朝夕 2 回行い，死亡動物及び瀕死動物は可及的速かに剖検した。検体摂水量測定は週 2 回，体重測定は週 1 回行った。生存動物は屠殺時に採血して血液生化学的検査を行った。臓器重量測定は，脳，唾液腺，肺，心，肝，脾，副腎，腎，睪丸及び腫瘍について行い，前記を含む他の諸臓器は，10%中性ホルマリンで固定後，4 μ パラフィン切片を作成し，ヘマトキシリン-エオジン染色を施し，病理組織学的に検索した。

実験結果

体重増加：雄 500 ppm 投与群では，開始後 20 週より体重増加抑制が著明となったため，60 週以降より濃度を 400 ppm に減少して 110 週目まで投与した。しかし，体重増加抑制は継続していた。同様に雌 500

Table 2. Incidence of tumors and preneoplastic lesions

	Male			Female		
	500ppm	250ppm	0ppm	500ppm	250ppm	0ppm
No. of rats at start	53	53	53	53	53	53
No. of rats effective	52	53	53	52	52	52
No. of rats with tumor	52(100)	53(100)	53(100)	43(83)	48(92)	44(85) ^a
Cerebrum	1(2)	0	2(4)	1(2)	1(2)	0
Cerebellum	0	0	0	0	1(2)	0
Spinal cord	1(2)	0	0	0	0	0
Pituitary	3(6)	8(15)	12(23)	12(23)	15(29)	21(40)
Ear duct	3(6)	0	0	0	1(2)	1(2)
Salivary gland	0	1(2)	0	0	0	0
Mammary gland	3(6)	7(13)	15(28)	6(12)	9(17)	4(8)
Thyroid	15(29)	15(28)	12(23)	12(23)	10(19)	4(8)
Pancreas	1(2)	2(4)	8(15)	1(2)	0	3(6)
Adrenal	9(17)	7(13)	6(12)	1(2)	3(6)	9(17)
Lung	6(12)	5(10)	5(10)	3(6)	4(8)	0
Mediastinum	0	0	1(2)	0	0	0
Tongue	3(6)	0	0	0	0	2(4)
Forestomach	0	1(2)	0	0	0	0
Glandular stomach	0	0	0	0	1(2)	0
Duodenum	0	0	1(2)	0	1(2)	0
Small intestine	0	1(2)	1(2)	0	1(2)	0
Large intestine	3(6)	2(4)	0	4(8)	3(6)	2(4)
Liver	19(37)	18(34)	22(42)	7(13)	17(33)	8(15)
Urinary bladder	0	2(4)	0	0	0	0
Seminal vesicle	2(4)	0	0	0	0	0
Prostate	3(6)	1(2)	0	0	0	0
Testis	52(100)	50(94)	52(98)	-	-	-
Epididymis	0	0	1(2)	-	-	-
Ovary	-	-	-	0	0	0
Uterus	-	-	-	11(21)	6(12)	12(23)
Lymph node	0	0	1(2)	0	0	0
Spleen	11(21)	12(23)	9(17)	12(23)	14(27)	13(25)
Skin	6(12)	2(4)	2(4)	0	1(2)	0
Subcutis	1(2)	0	0	1(2)	2(4)	0
Preputial gland	2(4)	5(9)	3(6)	-	-	-
Clitoral gland	-	-	-	3(6)	4(8)	2(4)
Kidney	48(92) ^{**}	31(59) ^{**}	4(8)	37(71) ^{**}	27(52) ^{**}	0
Peritoneum	28(54) ^{**}	17(32) [*]	6(11)	0	0	0

^{**} P<0.01, ^{*} P<0.05, ()^a; percentage.

ppm 投与群でも体重増加抑制がやや日立った。250 ppm 投与群雌雄では、著明ではなかった (Fig. 1)。

死亡率及び平均生存期間：雄 500 ppm 投与群では、14週より死亡がみられ、70週より増加しはじめ、90週前後で50%に達した。雄 250 ppm 及び雌 500, 250 ppm 投与群では、対照群に比べて差が生じていなかった (Fig. 2, 3)。平均生存期間では、雄 500 ppm 投与群で88.1±18.1週間と他の群に比して著明に短縮していた (Table 1)。104週での生存率は雄 500 ppm 群で、20.8%と低下したが、他の投与群、対照群では57~77%と高い生存率を示した。

飲料水及び検体摂取量：飲料水摂取量は、雄では投与群の方が対照群に比して多く、雌ではやや対照群の

方が投与群に比して多い傾向があった。

臭カの1日当たりの摂水量より求めた1日平均検体摂取量(mg/kg/day)は、雄 500 ppm 群 27.7, 雄 250 ppm 群 12.5, 雌 500 ppm 群 25.5, 雌 250 ppm 群 12.5であった。

腫瘍発生率：14週目で雄 500 ppm 群の動物が腫瘍を伴って死亡したので、それ以後死亡動物を全て有効動物としたが、組織学的に検査不可能であった例を除くすると、最終有効動物数は、雄 500 ppm 群52例、250 ppm 群53例、対照群53例、雌 500 ppm 群52例、250 ppm 群52例、対照群52例である。何らかの腫瘍性病変を発生した動物数は、雄 500 ppm 群 52/52 (100%)、250 ppm 群 53/53 (100%)、対照群 53/53 (100%)

Table 4. Incidence of renal cell tumors

	Conc. of potassium bromate (ppm)	No. of rats kidney histo- logically examined	Renal cell tumors (%)	Other tumors
Male	500	52	47 (90.4) *	1 ^a
	250	53	31 (58.5) *	0
	0	53	3 (5.7)	1 ^b
Female	500	52	36 (69.2) *	1 ^a
	250	52	26 (50.0) *	1 ^c
	0	52	0	0

* $P < 0.005$ (Fischer's exact probability test) compared to controls.

a. Transitional cell carcinoma. b. Liposarcoma. c. Angiosarcoma.

%), 雌 500 ppm 群 43/52 (83%), 250 ppm 群 48/52 (92%), 対照群 44/52 (85%) であった (Table 2).

腫瘍性病変の臓器別発生率: Table 2 に示す如く投与群, 対照群共に広範な部位に腫瘍性病変がみられた。この内, 統計学的有意差をもって対照群に比し発生率の高かった臓器は, 第一に腎臓 (癌) で, その発生率は, 雄 500 ppm 群 (90%), 250 ppm 群 (59%), 対照群 (6%), 雌 500 ppm 群 (69%), 250 ppm 群 (50%), 対照群 (0%) であった。第二は, 腹膜 (中皮腫) でその発生率は, 雄 500 ppm 群 (54%), 250 ppm 群 (32%), 対照群 (11%) であった。その他, 対照群, 投与群共に高い発生率を示した臓器は, 下垂体, 乳腺, 甲状腺, 副腎, 肝, 睪丸, 脾などであったが, 統計学的有意差は生じていない。

腫瘍性病変の病理組織学的検討: 各臓器において, いわゆる前癌性病変から癌に至る様々な組織像が観察された (Table 3)。大部分の臓器では組織像は対照群と投与群の間で特に著しい差はみられなかった。しかし, 甲状腺では C-cell 由来の腫瘍性病変は雌雄共に対照群と投与群の間で差がみられなかったのに反し, 浮胞上皮由来の腫瘍では, 雄 500 ppm 群 13/52 (25%), 対照群 3/53 (6%), 雌 500 ppm 群 8/52 (16%), 対照群 0/52 (0%) で統計学的有意差を生じている。高頻度で観察された腫瘍は, 下垂体腺腫, 乳腺腺腫, 副腎褐色細胞腫, 肝前癌病変, 睪丸間細胞腫, 脾白血病などであった。

腎腫瘍の発生について: 腎腫瘍は早期より剖検時に肉眼的に高率に観察されたので, 組織学的検索は特に全動物について 1 個の腎当り 10~15 切片を作製して鏡

検した。

腎腫瘍の発生は, 14週で死亡した雄 500 ppm 群の 1 頭に先ず観察された。平均発生期間は, 雄 500 ppm 群 89.7 ± 18.2 週, 250 ppm 群 104.0 ± 8.9 週, 対照群 111 週, 雌 500 ppm 群 107.7 ± 5.9 週, 250 ppm 群 107.7 ± 6.1 週であった。組織学的には, ほとんど大部分が腺癌であり, 他に投与群に移行上皮癌 2 例, 血管肉腫 1 例, 対照群に脂肪肉腫 1 例をみたのみであった。形態学的には, 乳頭状, 管状などを呈する明細胞癌及び暗細胞癌であった。腫瘍細胞は多形形で細胞分裂も多く, 腫瘍組織内には, 出血, 壊死を伴い, コレステリン結晶もしばしば観察された。肺転移が, 雄 500 ppm 群に 1 例認められた (Table 4)。

血液生化学的検査成績: 統計学的に対照群に比し有意差を示した検査値は, 雌 500 ppm 群における GPT 値の低下, A/G の低下, 血清カリウムの低下, コリンエステラーゼの低下, 赤血球数の増加, 雌 250 ppm 群における血清クレアチニン値の低下であった。雄は 250 ppm 群のみの検索であったが, 異常を示す検査値はなかった。

考 察

ラットを用いて, 急性及び亜慢性毒性試験の結果に基づき, 発癌性試験を施行した。本実験の規模, 期間, 死亡率等は, 日本及び欧米諸国の発癌性試験ガイドライン^{8,9,10,11)}に照らし合わせてみた場合, その実験結果は十分に評価に耐え得るものと考えられる。

対照群と統計学的有意差をもって高い発生率を示した腫瘍は, 雌雄 500, 250 ppm 投与群での腎癌, 雄

Table 3. Histopathological diagnosis of tumors and preneoplastic lesions

	Male			Female		
	500ppm	250ppm	Oppm	500ppm	250ppm	Oppm
No. of rats at start	53	53	53	53	53	53
No. of rats effective	52	53	53	52	52	52
Cerebrum						
Granular cell tumor	1	-	-	-	-	-
Astrocytoma	-	-	2	1	-	-
Glioma	-	-	-	-	1	-
Cerebellum						
Glioblastoma multiforme	-	-	-	-	1	-
Spinal cord						
Oligodendroglioma	1	-	-	-	-	-
Pituitary						
Adenoma(chromophobic)	3	8	12	12	15	21
Ear duct						
Squamous cell carcinoma	3	-	-	-	1	1
Salivary gland						
Mixed tumor(?)	-	1	-	-	-	-
Mammary gland						
Lobular hyperplasia	-	-	1	4	3	1
Fibroma	2	4	4	1	-	1
Fibroadenoma	-	-	7	-	3	2
Adenoma	-	3	3	-	3	-
Adenocarcinoma	1	-	-	1	-	-
Thyroid						
C-cell hyperplasia	-	1	2	-	-	1
C-cell adenoma	2	5	7	4	6	2
C-cell adenocarcinoma	-	-	-	-	1	1
Follicular adenoma	2	-	-	1	1	-
Follicular adenocarcinoma	5	2	2	2	-	-
Papillary adenoma	1	2	-	-	-	-
Papillary adenocarcinoma	5	5	1	5	2	-
Pancreas						
Ductal hyperplasia	-	-	1	-	-	-
Acinar cell adenoma	-	-	1	-	-	-
Insuloma	1	2	4	1	-	2
Malignant insuloma	-	-	2	-	-	1
Adrenal						
Pheochromocytoma	8	7	6	1	1	4
Malignant pheochromocytoma	1	-	-	-	-	-
Cortical hyperplasia	-	-	-	-	1	-
Cortical adenoma	-	-	-	-	1	3
Ganglioneuroma	-	-	-	-	-	1
Ganglioneuroblastoma	-	-	-	-	-	1
Lung						
Adenoma	6	4	4	2	4	-
Adenocarcinoma	-	1	1	1	-	-
Mediastinum						
Squamous cell carcinoma	-	-	1	-	-	-
Tongue						
Papillary hyperplasia	2	-	-	-	-	1
Papilloma	1	-	-	-	-	1
Forestomach						
Papillary hyperplasia	-	1	-	-	-	-
Glandular stomach						
Adenocarcinoma(?)	-	-	-	-	1	-
Duodenum						
Adenocarcinoma	-	-	-	-	1	-
Fibrosarcoma	-	-	1	-	-	-

Table 3. Continued

	Male			Female		
	500ppm	250ppm	Oppm	500ppm	250ppm	Oppm
Small intestine						
Adenomatous hyperplasia	-	1	-	-	-	-
Adenoma	-	-	1	-	-	-
Adenocarcinoma	-	-	-	-	1	-
Large intestine						
Adenomatous hyperplasia	-	-	-	1	-	1
Adenoma	3	-	-	1	2	-
Adenocarcinoma	-	2	-	2	1	-
Fibrosarcoma	-	-	-	-	-	1
Liver						
Preneoplastic foci	13	11	20	5	16	6
Neoplastic nodule	5	5	2	2	1	2
Hepatocellular carcinoma	1	1	-	-	-	-
Cholangioma	-	1	-	-	-	-
Kidney						
Adenoma	3	5	-	3	5	-
Adenocarcinoma	44**	26**	3	33**	21**	-
Transitional cell carcinoma	1	-	-	1	-	-
Liposarcoma	-	-	1	-	-	-
Angiosarcoma	-	-	-	-	1	-
Urinary bladder						
Papilloma	-	2	-	-	1	-
Seminal vesicle						
Glandular hyperplasia	2	-	-			
Prostate						
Glandular hyperplasia	3	1	-			
Testis						
Interstitial cell tumor	52	50	52			
Epididymis						
Hyperplasia	-	-	1			
Uterus						
Endometrial stromal polyp				2	3	9
Adenomatous hyperplasia				5	2	2
Adenoma				1	1	-
Squamous cell hyperplasia				2	-	-
Fibrosarcoma(?)				1	-	1
Lymph node						
Reticulum cell sarcoma	-	-	1	-	-	-
Spleen						
Leukemia(Mononuclear)	11	12	9	11	14	13
Malignant hemangioendothelioma	-	-	-	1	-	-
Skin						
Epidermal cyst	1	-	1	-	-	-
Squamous cell hyperplasia	1	1	-	-	-	-
Squamous cell papilloma		-	1	-	-	-
Squamous cell carcinoma	1	-	-	-	1	-
Leiomyosarcoma	1	-	-	-	-	-
Hemangiosarcoma	-	1	-	-	-	-
Lipoma	2	-	-	-	-	-
Subcutis						
Fibroma	1	-	-	-	1	-
Fibrosarcoma	-	-	-	1	1	-
Preputial gland						
Adenoma	2	5	2			
Squamous cell carcinoma	-	-	1			
Clitoral gland						
Adenoma				3	4	2
Peritoneum						
Mesothelioma	28**	17*	6	-	-	-

**P<0.01, * P<0.05.

500, 250 ppm 投与群での腹膜中皮腫及び雌雄 500 ppm 投与群での甲状腺濾胞上皮由来の腺腫、腺癌であった。

国立衛生試験所病理部における F-344 ラットの自然発生腫瘍のバックグランドデータを通覧しても、腎、腹膜、甲状腺腫瘍の発生率は低率である¹²⁾。一方、英国でのマウス、ラットによる発癌性試験^{4,5)}の結果が陰性であったのは、飼料として投与したパン中の臭カが 50, 75 ppm と低い濃度であったこと及びパン製造工程中での臭カの分解による結果と思われる。

最近、米国の Squire¹³⁾ により、発癌性試験の結果に対する評価方法の一試案が示され、ヒトへの外挿及び行政的措置の観点から注目をあびている。これによると、先ず発癌性試験の結果から5つの因子を選択し、それぞれ因子の強さに従って15~0の点数を与える。更にその総合点数を5段階にランキングして、行政的判断の参考にしようとするものである。

臭カによる発癌性は、雌雄ラットで陽性、雌マウスで陰性の結果が、雄マウスでの発癌性は未知である¹⁴⁾。しかし試みに、臭カの発癌性の評価を上記の Squire の方法に従って行ってみると、Class II のランキングとなり、強い発癌性を示す物質に分類されることになる。

今後、臭カのプロモータ作用についての実験、更に広く各種酸化剤の発癌性に関する実験が必要とされるであろう。

なお、特に腎腫瘍に関しては、短報としてすでに発表した¹⁵⁾。

結 語

F-344 ラット各群雌雄53頭を用い、臭素酸カリウムを濃度 500, 250, 0 ppm で、飲料水として110週間経口自由摂取させ、発癌性試験を行った。

その結果、雌雄 500, 250 ppm 投与群で腎癌が、雄 500, 250 ppm 投与群で腹膜中皮腫が、雌雄 500 ppm

群で甲状腺濾胞上皮由来腫瘍が対照群に比し高率に発生し、いずれも統計学的有意差を示した。したがって、本実験により臭素酸カリウムは経口投与によりラットに発癌性を有すると結論された。

謝 辞

本研究遂行に際して色々と御教示をいただいた。国立衛生試験所谷村、山羽、柴崎、中館の諸先生に感謝致します。

文 献

- 1) WHO Technical Report Series, **281**, 164 (1964)
- 2) The Japanese Standards of Food Additives, p. 361 (1974)
- 3) J.A. Norris: *Fd. Cosmet. Tox.*, **3**, 93 (1965)
- 4) M. Fisher, et al.: *Fd. Cosmet. Tox.*, **17**, 33 (1979)
- 5) A.V. Ginocchio and V. Waite: *Fd. Cosmet. Tox.*, **17**, 41 (1979)
- 6) 厚生省がん研究助成金による研究報告集, p. 744 (1976)
- 7) M. Ishidate, et al.: "Gann Monograph on Cancer Research 27", p. 95, ed. N. Inui, et al., Japan Scientific Societies Press (1981). Tokyo.
- 8) 小田嶋成和「化学物質の癌原性検索法指針」(1976)
- 9) IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemical to Humans, **22**, 11 (1980). International Agency for Research on Cancer, Lyon.
- 10) R.A. Griesemer and C. Cueto: "IARC Scientific Publications. No. 27", p. 259, ed. Montesano R. et al., (1980). International Agency for Research on Cancer.
- 11) Guidelines for Carcinogen Bioassay in Small Rodents, National Cancer Institute Carcinogenesis Technical Report Series, No. 1.
- 12) 前川昭彦, 未発表データ (1982)
- 13) R.A. Squire: *Science*, **214**, 877 (1981)
- 14) 高山昭三, 未発表データ (1982)
- 15) Y. Kurokawa, et al.: *Gann*, **73**, 335 (1982)

鼻腔構造の動物種差とその組織学的特性

長野嘉介・宮川義史・高橋道人・古川文夫
小久保武・林 裕造Comparative Studies on Anatomical and Histological
Structures of Nasal Cavity in Rodents.Kasuke NAGANO,*1 Yoshifumi MIYAKAWA,*2 Michihito TAKAHASHI,
Fumio FURUKAWA, Takeshi KOKUBO and Yuzo HAYASHI

Anatomical and histological structures of the nasal cavity were examined in rats, mice and hamsters for the purpose of toxicological assessment of pathological examination. Cross-section of the head were prepared on the basis of the dorsal appearance of the oral cavity, and determined the feature of turbinates and distribution of the epitheliums lining on the nasal cavity. The principal structure of the nasal cavity is similar among these species with a few exceptions. Differences were the number of ectoturbinates and anatomical distribution of the epitheliums. On the basis of these results, we proposed practical marker of the trimming position employed for pathological examination of nasal cavity.

(Received May 31, 1982)

緒 言

近年、ガス体又は粉塵等の吸入毒性試験が実施される機会が多くなり、我国においても吸入試験を実施できる研究機関が増えつつある。吸入試験においては、従来、下部気道並びに肺が病理組織学的検索の主要な対象とされているが、投与された化学物質が最初に暴露され、最も接触する可能性が高いのは鼻腔であり、特に粒子状の物質をげっ歯類に吸入させると、そのほとんどが鼻腔に沈着してしまうことが知られている¹⁾²⁾。更に、種々のニトロソアミンは経気道以外の投与方法によっても鼻腔に腫瘍を発生させる³⁾。従って、これらの研究分野では、鼻腔の検索が不可欠であると共に、十分な精査が必要とされる。しかしながら、他臓器に比べ、鼻腔においては病理学的検索の手法の標準化が立ち遅れているが現状である。

げっ歯類の鼻腔の解剖学的構造については、既にいくつもの報告があるが⁴⁻⁷⁾、鼻腔の切断面の部位によって出現する鼻腔の形態が異なり、また、内腔を覆う上皮も扁平上皮、呼吸粘膜及び嗅粘膜がそれぞれの部位で出現場所を変える。したがって、鼻腔を病理学的に検査するに当たっても、切断部位によって観察され

る鼻腔の形状あるいは上皮の分布を把握することは極めて重要なことである。

本報告では、ラット、マウス及びハムスターについて、切断位置の設定が容易である口腔背側壁の外表構造を指標とし、鼻腔から鼻咽頭に至る鼻腔全域について、多切片から成る前額断面による組織標本作製し、そこで観察される各部の形状と上皮の分布について検索した。

実験材料並びに方法

実験に使用した動物は、静岡実験動物農業協同組合より購入した雄 Wistar 系ラット、雄 ddY 系マウス（6週令、体重 28~32 g）、及びシリアンゴールドンハムスター（12週令、体重 133~157 g）である。ラット及びマウスは温度 24 ± 1 度、湿度 $55 \pm 5\%$ の SPF 環境下で飼育し、ハムスターは温度 24 ± 1 度、湿度約 50% の Conventional 環境下で実験に使用するまで飼育した。動物はベントバルビタールナトリウム（大日本製薬（株）、ネンブタール注射液）麻酔下で放血屠殺し、頭部を摘出した。下顎を取り除いた後、あらかじめ咽頭より鼻腔内に 10% 緩衝ホルマリン液を注入し、10% 緩衝ホルマリン液中に保存、7 日間以上固定した。頭部は固定後、Plank & Rycho の急速脱灰法により脱灰した。すなわち、脱灰液（塩化アルミニウム 70 g、塩酸 85 ml、及びギ酸 50 ml に蒸留水を加えて 1 l と

*1 中央労働災害防止協会、日本バイオアッセイ研究センター

*2 日本専売公社、中央研究所生物実験センター

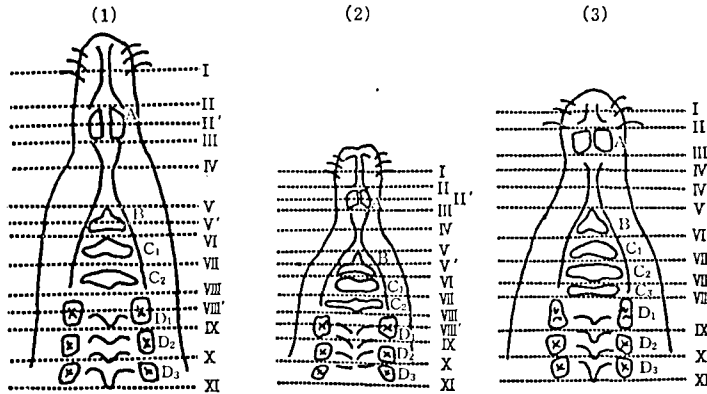


Fig. 1. Orientation of Section for Histology of Nasal Tissues in (1) Rat, (2) Mouse and (3) Hamster

A; incisor. B; papilla incisiva. C; rugae palatinae. D; molar teeth.

する)の中に、ラットは3日間、マウスとハムスターは24時間殺し、脱灰後、ミクロトーム用替刃(フェザー、MICROTOME BLADES, C35 タイプ)にて切り出しを行った。切り出しは、すべて口腔の背側壁面に対して垂直に横断した。切り出し部位は、Fig. 1に示した如く、口腔背側壁の諸構造(切歯、切歯乳頭、口蓋ひだ及び臼歯)を指標として、ラットとマウスは14箇所、ハムスターは13箇所とした。切り出し後、5%硫酸ナトリウム水溶液で中和し、通常の如くパラフィン包埋し、各断面より薄切標本を作製、5%硫酸ナトリウム水溶液で再中和した後、H-E 染色をほどこして光学顕微鏡にて観察した。

結 果

各断面における鼻腔の形状及び鼻腔の内面を覆う上皮の分布について、順を追って動物種別に下に記載する。

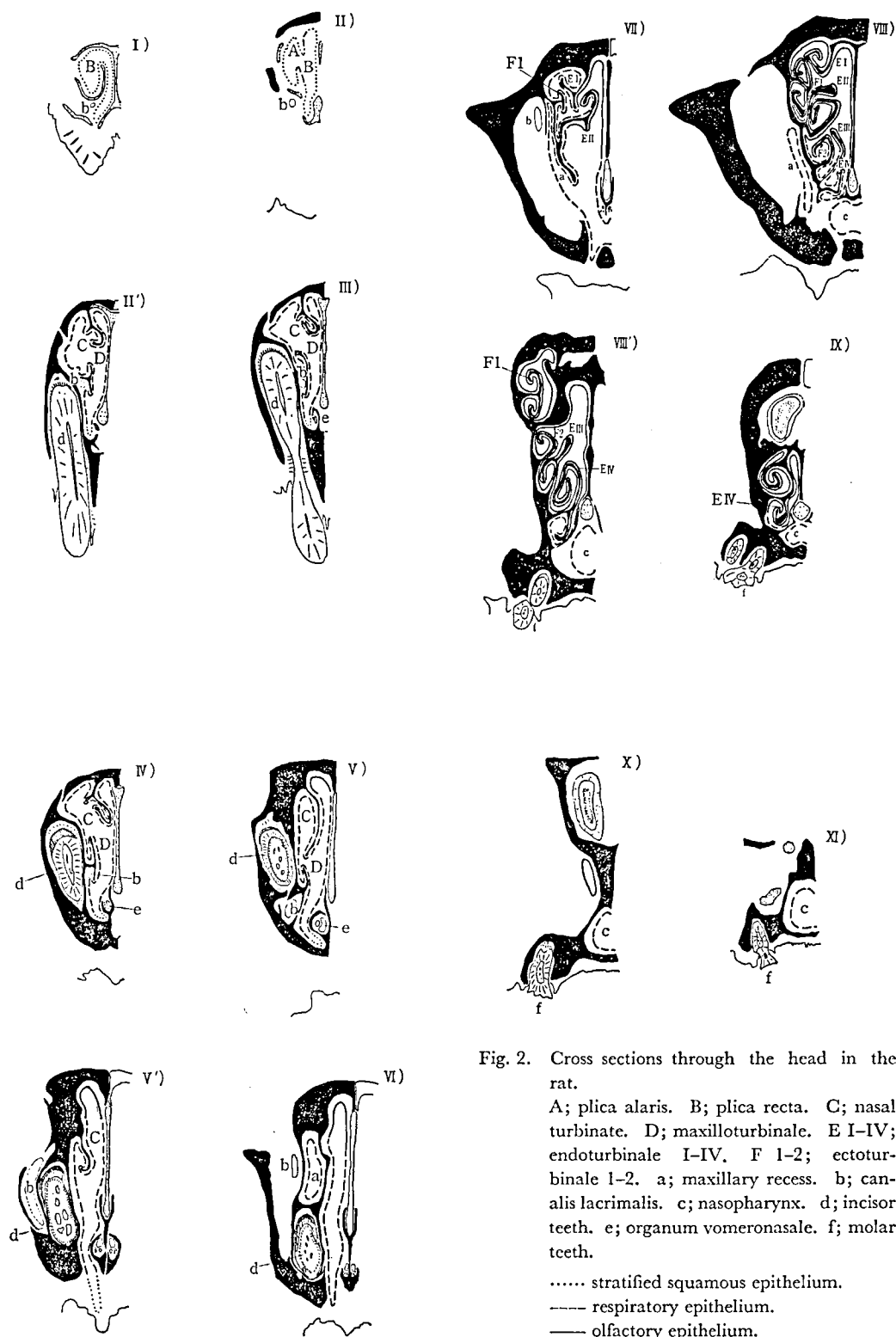
1. ラット (Fig. 2)

Iの断面では、plica rectaだけが観察され、鼻腔の表面を覆う上皮はすべて扁平上皮(Fig. 5-1)であった。IIではplica recta及びplica alarisが見られ、上皮はほとんどの部分が扁平上皮であるが、背側鼻道に面したplica alasisの基部から呼吸粘膜が現われる。

IIからVまでは、nasal turbinate(鼻甲介)とmaxilloturbinate(上顎甲介)が見られ、V'ではnasal turbinateの小部分のみが現われる。各部の上皮の種類は、ほとんどの部分が呼吸粘膜(Fig. 5-2)である。しかし、腹側鼻道の底部はIIからV'まで扁平上皮であり、呼吸粘膜がV以降に背側鼻道の背側壁から出現し、鼻中隔の上部も呼吸粘膜に移行する。

VIは、甲介がほとんど見られない部位であり、背側鼻道の背側壁及び鼻中隔の上部が嗅粘膜である以外は呼吸粘膜に覆われている。また、maxillary recess(上顎洞)がIVより出現し、VIII'まで見られ、その上皮はどの断面とも呼吸粘膜である。

VIIからIXにかけて、endoturbinale及びectoturbinaleが見られ、上皮の分布は呼吸粘膜に覆われる部分が、側壁と鼻中隔では上から下へ、甲介では先端から基部に向って、順次嗅粘膜に移行する。すなわち、endoturbinale IとII及びectoturbinale 1がVIIの断面から観察される。ectoturbinale 1はVIII'まで見られ、endoturbinale Iはendoturbinale IIとVIII'で接合する。VIIIからはendoturbinale IIIとIV及びectoturbinale 2が現われ、endoturbinale IIIとectoturbinale 2はVIII'まで見られ、endoturbinale IVは、VIII'でdorsal lamellaとventral lamellaに分かれIXまで見られる。上皮の分布は、VIIではendoturbinale Iとendoturbinale IIのdorsal lamellaの一部、背側鼻道の側壁、鼻中隔の上部が嗅粘膜であり、その他の部分は呼吸粘膜である。VIIでは多くの部分、特に甲介の上皮が嗅粘膜(Fig. 5-3)に移行し、呼吸粘膜はendoturbinale IIIとectoturbinale 2の一部、endoturbinale IV、中鼻道の側壁の一部及び腹側鼻道に見られる。VIII'では呼吸粘膜がendoturbinale IVのventral lamellaの一部と腹側鼻道に見られ、IXでは腹側鼻道にだけ残っている。Xは甲介が見られず、上皮は全て嗅粘膜である。nasopharynx(鼻咽頭)はVIII以降に現われ、IX以降では鼻腔は現われずnasopharynxだけが観察される。nasopharynxの上皮は全ての場所とも呼吸粘膜である。



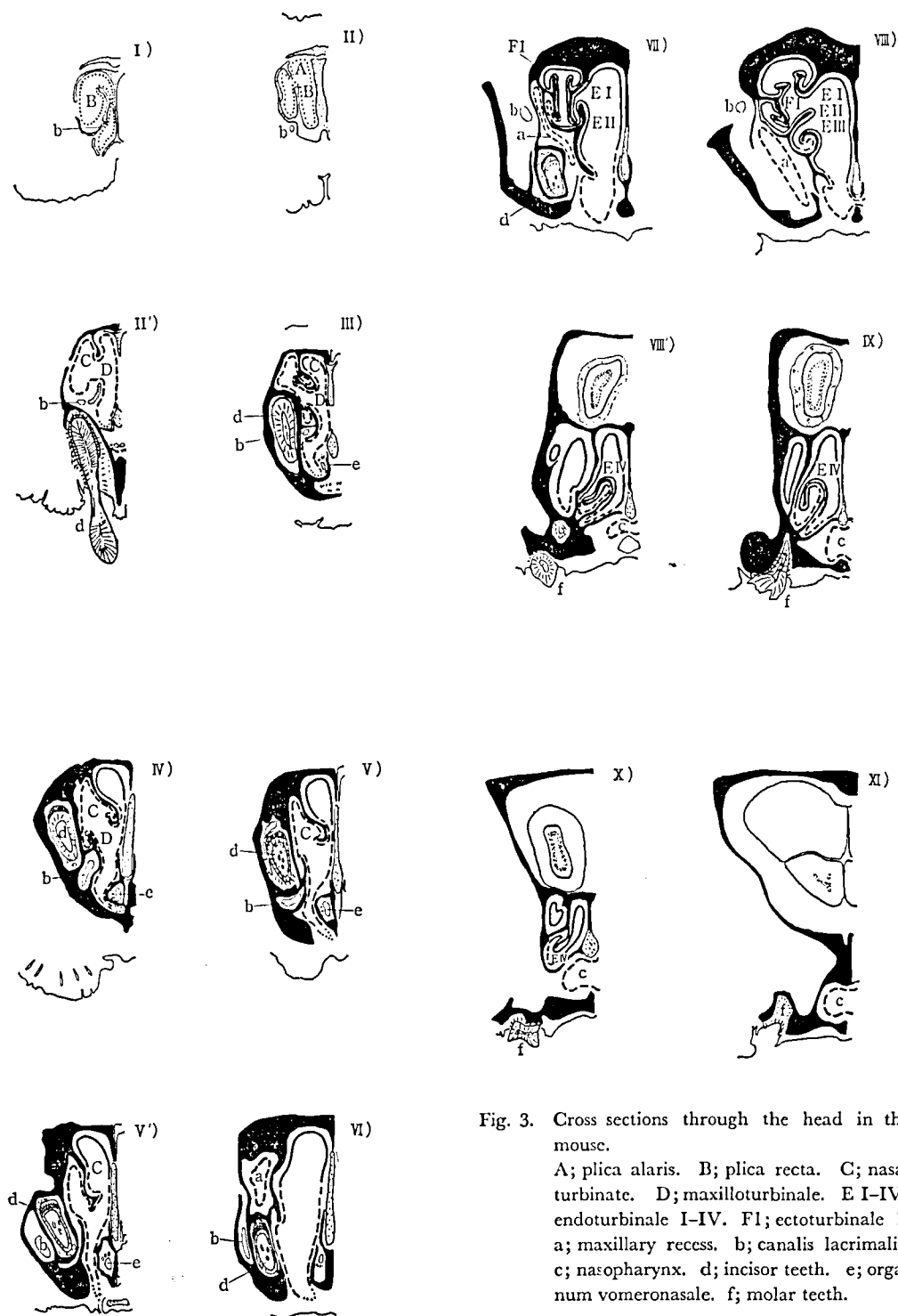


Fig. 3. Cross sections through the head in the mouse.

A; plica alaris. B; plica recta. C; nasal turbinate. D; maxilloturbinate. E I-IV; endoturbinale I-IV. F1; ectoturbinale 1. a; maxillary recess. b; canalis lacrimalis. c; nasopharynx. d; incisor teeth. e; organum vomeronasale. f; molar teeth.

..... stratified squamous epithelium.
 ---- respiratory epithelium.
 —— olfactory epithelium.

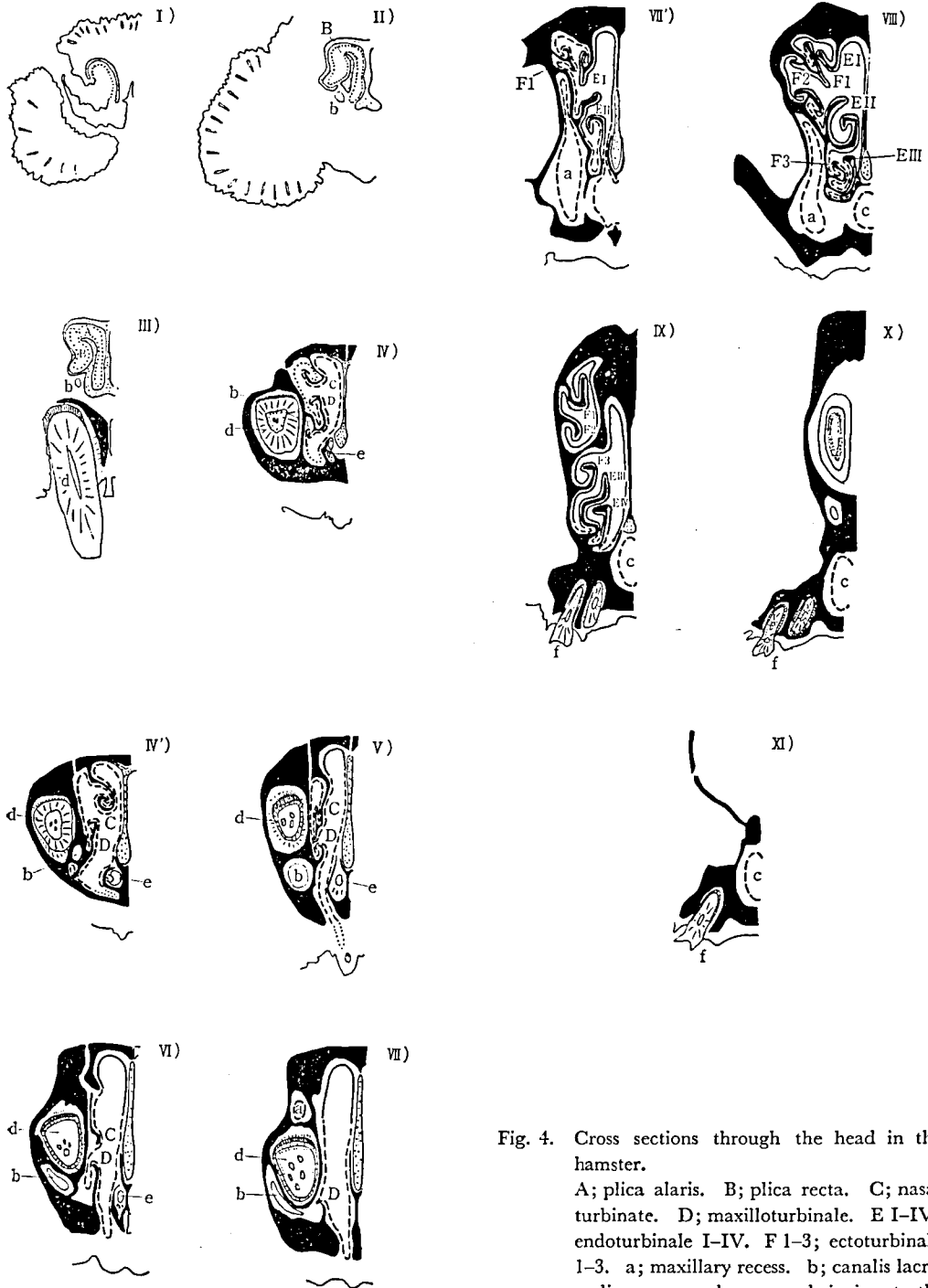


Fig. 4. Cross sections through the head in the hamster.

A; plica alaris. B; plica recta. C; nasal turbinate. D; maxilloturbinate. E I-IV; endoturbinale I-IV. F 1-3; ectoturbinate 1-3. a; maxillary recess. b; canalis lacrimalis. c; nasopharynx. d; incisor teeth. e; organum vomeronasale. f; molar teeth.

..... stratified squamous epithelium.

----- respiratory epithelium.

—— olfactory epithelium.

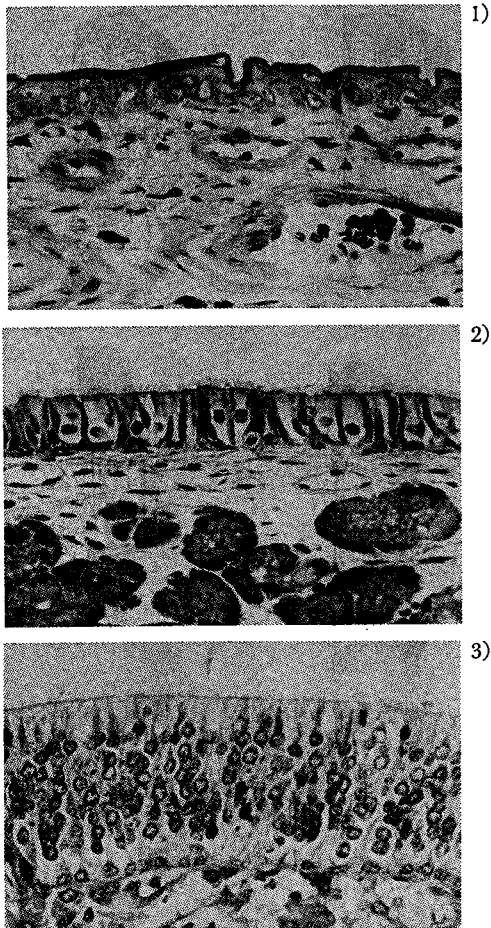


Fig. 5. Photomicrographs of various types of epithelium from nasal cavity in a rat. H-E stain. 1) Stratified squamous epithelium; 2) Respiratory epithelium; 3) Olfactory epithelium.

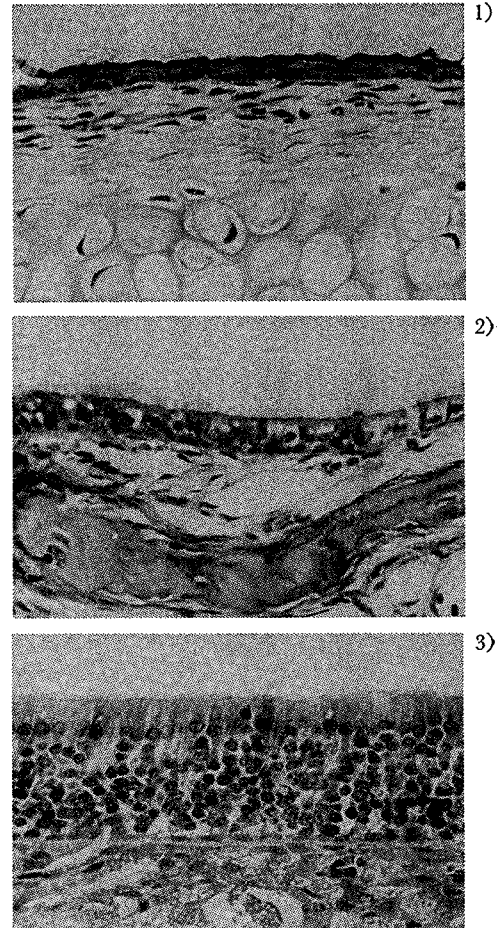


Fig. 6. Photomicrographs of various types of epithelium from nasal cavity in a mouse. H-E stain. 1) Stratified squamous epithelium; 2) Respiratory epithelium; 3) Olfactory epithelium.

その他の器官としては、canalis lacrimalis (涙管) がⅠからⅦまで見られ、organum vomeronasale (鋤鼻器, Jacobson's organ) がⅢからⅤまでの鼻中隔の基部に現われる。

2. マウス (Fig. 3)

Ⅰの断面では、plica recta だけが見られ、Ⅱでは plica recta 及び plica alaris が見られる。この部の上皮はすべて扁平上皮 (Fig. 6-1) である。

Ⅱ'からⅤにかけては nasal turbinate と maxillo turbinate とが見られ、Ⅴ'では nasal turbinate の小部分のみが見られる。この部の上皮は、ほとんどの部分が呼吸粘膜 (Fig. 6-2) であるが、嗅粘膜がⅢの nasal turbinate の基部及び鼻中隔の上部から出現し、ⅣからⅤ'にかけては背側鼻道の背側壁も嗅粘膜に覆われ

る。また、腹側鼻道の底部はⅤ'まで扁平上皮である。

Ⅳは甲介が見られず、上皮は鼻中隔の上部及び背側鼻道の背側壁が嗅粘膜、腹側鼻道の底部が扁平上皮である以外は呼吸粘膜である。また、maxillary recess がⅥより観察されⅧまで見られる。上皮はどの断面とも呼吸粘膜である。

ⅦからⅩにかけて、endoturbinale と ectoturbinale が観察され、上皮は、順次、呼吸粘膜から嗅粘膜 (Fig. 6-3) に移行し、扁平上皮は見られない。すなわち、Ⅶから endoturbinale Ⅰ, Ⅱ 及び ectoturbinale Ⅰ が現われ、ectoturbinale ⅠはⅧで終わり、endoturbinale ⅡはⅧで dorsal lamella と ventra lamella に分かれ、Ⅷ'で endoturbinale Ⅰと接合する。endoturbinale ⅢはⅧの断面にだけ観察された。Ⅶ以降の断面

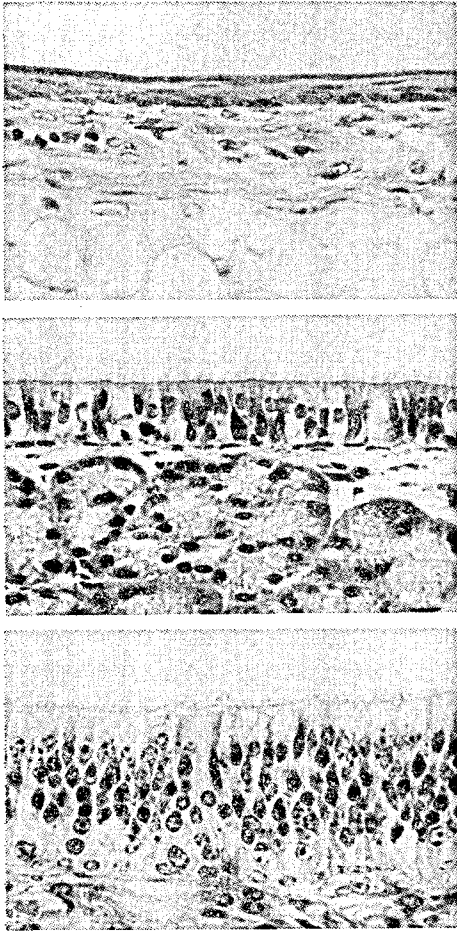


Fig. 7. Photomicrographs of various types of epithelium from nasal cavity in a hamster. H-E stain. 1) Stratified squamous epithelium; 2) Respiratory epithelium; 3) Olfactory epithelium.

は、上皮の分布は多くの部分が嗅粘膜に覆われ、呼吸粘膜は腹側鼻道がすべての断面とも呼吸粘膜であるほかはⅦの断面における ectoturbinale 1 の ventral lamella の一部と鼻中隔の下部、Ⅷ'とⅨの endoturbinale IVの一部に見られるだけである。

nasopharynx はⅧ'から現われ、Ⅺ以降では鼻腔が終わり、nasopharynx だけが見られる。上皮はすべての部位とも呼吸粘膜である。

その他の器官としては、canalis lacrimalis がⅠからⅧまで見られ、organum vomeronasale がⅢからⅤまでの鼻中隔の基部に現われる。

3. ハムスター (Fig. 4)

Ⅰの断面は鼻前庭の部分であり、一部に現われた鼻腔の上皮は扁平上皮である。Ⅱは plica recta だけが

1) 現われ、Ⅲでは plica recta と plica alaris が観察される。上皮はⅡ、Ⅲともに扁平上皮 (Fig. 7-1) である。

ⅣからⅥにかけて、nasal turbinate と maxilloturbinale が見られ、Ⅶでは maxilloturbinale だけが見られる。上皮の分布は、ほとんどの部分が呼吸粘膜 (Fig. 7-2) であるが、Ⅳの nasal turbinate の一部と中鼻道の側壁及びⅣ-Ⅴの腹側鼻道の底部が扁平上皮であり、嗅粘膜はⅤの背側鼻道の背側壁と鼻中隔の上部から出現する。また、maxillary recess がⅦから観察され、Ⅷまで見られ、その上皮は全ての断面とも呼吸粘膜である。

ⅦからⅨにかけて endoturbinale と ectoturbinale が見られ、上皮の分布は呼吸粘膜から、側壁と中隔では上から下へ、甲介では先端から基部へ向かって順次嗅粘膜 (Fig. 7-3) に移行していく。すなわち、Ⅶ'から endoturbinale Ⅰ、Ⅱ及び ectoturbinale 1 が現われる。endoturbinale ⅠとⅡは、Ⅸで接合する。ectoturbinale 1 はⅧで2つの lamella に分かれⅨまで見られる。endoturbinale Ⅲ、ectoturbinale 2 及び 3はⅧから始まりⅨまで見られる。endoturbinale ⅣはⅨにのみ見られる。上皮の分布は、Ⅶ'では嗅粘膜が endoturbinale ⅠとⅡの一部、背側鼻道の背側壁及び鼻中隔の上部に見られ、他の部分は呼吸粘膜である。Ⅷ以降では多くの部分が嗅粘膜となり、Ⅷでは呼吸粘膜は endoturbinale Ⅲ及び ectoturbinale 1 と 2、中鼻道の側壁の一部、並びに ectoturbinale 3 と腹側鼻道に見られる。Ⅸでは呼吸粘膜は腹側鼻道にだけ残る。Ⅹでは甲介は見られず、鼻腔の上皮は嗅粘膜である。

nasopharynx はⅧ以降に見られ、Ⅺ以降では鼻腔が終わり、nasopharynx だけが見られる。上皮は全ての部分とも呼吸粘膜である。

その他の器官としては、canalis lacrimalis がⅡからⅧまで見られ、organum vomeronasale がⅣからⅥまでの鼻中隔の基部に現われる。

考 察

ラット、マウス及びハムスターの頭部を、口腔の背側壁の外表面構造を指標として多数の前額横断切片を作製し、各断面における鼻腔の形状及び上皮の分布を観察した結果、いくつかの知見が得られた。

各動物の鼻腔の構造と上皮の分布を比較してみると、基本的には大差がなく、鼻前庭に近い部分では plica alaris と plica recta が上下に現われる。この部位の上皮は扁平上皮である。次に nasal turbinate と ma-

xilloturbinale が上下に現われ、この部位の上皮はほとんどが呼吸粘膜であり、扁平上皮は腹側鼻道の底部にのみ見られ、嗅粘膜は後方になって背側鼻道の壁側面から見られる。nasale turbinate と maxilloturbinale が終わるとその後方に種々の endoturbinale と ectoturbinale とが現われ、上皮は呼吸粘膜から嗅粘膜へ移行していく。移行の経過は鼻腔側壁と鼻中隔では背側から腹側へ、また甲介では先端から基部に向かって嗅粘膜に移行していく。また、副鼻腔としては maxillary recess があり、上皮は呼吸粘膜である。

また、鼻腔の附属器官として、organum vomeronasale (Jacobson's organ と呼ばれる) と canalis lacrimalis が見られる。organum vomeronasale は、ヒトには存在せず、嗅覚の発達した動物に発達しており、系統発生学的には水棲期における水中嗅器が陸上生活に適應して変化したものとされ、ラット、マウス、ハムスター共に鼻中隔の前半部の腹側基部に認められその上皮は腹側部は繊毛に富み、背側部では重層化が見られた。canalis lacrimalis は、ヒトでは涙点に始まり、涙小管を経て涙嚢に入り鼻涙管を通して下鼻道に開口する涙液の流出路であるが、ラット、マウス、ハムスターでは鼻前庭までの広い範囲にわたり認められる。その表面は後方は繊毛上皮、前方は扁平上皮に移行していた。これらの器官については今回の報告においては深く追求しなかったが、鼻腔検索の際には無視することができないと考えられ、今後の詳細な検討が必要であろう。

しかしながら、細部の構造に関してはいくつかの点で次の如き動物種差が認められた。

1. 甲介の位置

1) ハムスターは、ラットやマウスに比較して、各甲介の出現部位が、やや後方にずれる。

2) endoturbinale IV は、ラットは先端が dorsal lamella と ventral lamella に分かれるが、マウスとラットでは分けない。

3) ラットの ectoturbinale は2対あり、ectoturbinale 1 が endoturbinale I と II の間に、ectoturbinale 2 が endoturbinale II の腹側に存在する。マウスでは1対で、ラットと同位置に ectoturbinale 1 が存在する。これに対して、ハムスターには3対あり、ectoturbinale 1 と2が、endoturbinale I と II の間に位置し、ともに先端が dorsal lamella と ventral lamella に分れており、ectoturbinale 3 が endoturbinale II の腹側に存在している。

2. 上皮の分布状況

1) nasal turbinate と maxilloturbinale が現われる部位の腹側鼻道の底部に見られる扁平上皮は、ラッ

トとマウスでは各断面に認められるが、ハムスターでは前半部のみ認められる。また、ハムスターではこの部位の前半部、中鼻道の側壁に扁平上皮の部分が存在する。

2) nasal turbinate の上皮は、ラットとハムスターではほとんど全てが呼吸粘膜であるが、マウスでは一部に嗅粘膜の部分が見られる。endoturbinale と ectoturbinale の名称は、報告者によって異なっていると思われる。次にその命名の仕方について述べてみたい。報告者による名称の差異は、主に最も背側に位置する甲介(本報では endoturbinale I としている甲介)の名称の付けかたに差があるためである。Hebel & Stromberg⁴⁾は、この甲介を ectoturbinale 1 としてあつかい、これより腹側にある ectoturbinale に順次番号を付けており、endoturbinale I は彼らが引用した図中には記載されていない。U. Mohr⁵⁾は、前者と同様に ectoturbinale 1 としてあつかい、したがって ectoturbinale の名称は同じであるが、前者が endoturbinale II とした甲介を I として endoturbinale に順次番号をつけている。これに対して、Kuramoto⁶⁾は、この甲介を endoturbinale I として扱いかい、その腹側にある甲介を ectoturbinale 1 として順次腹側に向かって番号をつけている。

我々は最も背側にある甲介が、各動物種共に内側に面していることから、この甲介は endoturbinale I とするのが適当であると考え、Kuramoto らの方式に従い、内側に面する甲介を endoturbinale として背側から腹側に向かって番号を付け、内側に現われない甲介を ectoturbinale として同様に番号を付けた。

本報告では、鼻腔の横断面をつくり観察したが、実験に先立って頭部を縦方向に切断した面について検討しており、正中断では鼻中隔だけが現われ、鼻中隔を取り除いても観察できる部位は背側鼻道と腹側鼻道、甲介の一部及び鼻腔の最後部だけである。また、左右にずらした縦断面でも斜めに切れた甲介が見られるだけで、しかもこの甲介は上皮が一見して厚くなった様に見え、上皮の変化を評価する目的の実験には用いることの出来ないものであった。したがって本報では、全て横断面として観察を行った。従って毒性試験等において鼻腔の詳細な観察を必要とする場合には、横断面で観察すべきであろう。

化学物質による鼻腔の障害は、化学物質によって障害部位に差がある場合が多い。例えば、タバコをハムスターに吸入させた実験では、炎症が呼吸粘膜の部分にだけ起こり、嗅粘膜には起こらないことが知られている⁸⁾。また、Hexamethylphosphoramide をラットに

吸入させると鼻腔に腫瘍が発生するが、その発生部はほとんどが扁平上皮及び呼吸粘膜の部分からである⁹⁾。これに対して、1,2-Dibromo-3-chloropropane によるラットの腺腫は嗅粘膜から発生するとされる¹⁰⁾。また、ラットに bis(chloro-methyl) ether を暴露させた場合には、殆んどが鼻腔内神経上皮腫 (ethesioneuroepithelioma) が発生し、鼻腔の扁平上皮癌の発生は少ない¹¹⁾。更に、ホルムアルデヒドをラットに吸入させた場合は、腫瘍の発生に先立ち、鼻腔の特定な部位 (nasal turbinate) の呼吸粘膜が扁平上皮化生をする⁹⁾。

したがって、吸入試験等の鼻腔の観察が要求される実験においては、鼻腔の各部の形態と上皮の分布を把握して、特殊な場合を除いては規定された断面について観察することが必要で、routine の観察においても適した断面を考慮する必要がある。病理学的に検索するための横断部位の選択に当っては、各上皮において最大断面が得られる部位、言い換えれば多くの甲介を観察し得る断面であることが望ましい。以下に本実験で得られた結果に基づいて、観察に適した断面が得られる部位について述べる。

1. ラット

扁平上皮が優勢である断面はⅠ-Ⅱであり、その最大断面はⅡである。呼吸粘膜は主としてⅡ'-Ⅴの断面に見られ、その最大断面はⅢ-Ⅳで得られる。嗅粘膜はⅦ-Ⅹであり、最大断面となるのはⅧである。

2. マウス

扁平上皮が優勢である断面はⅠ-Ⅱであり、その最大断面はⅡである。呼吸粘膜は主としてⅡ'-Ⅴ'の断面に見られ、その最大断面はⅢ-Ⅳで得られる。嗅粘膜はⅦ-Ⅹであり、最大断面となるのはⅧである。

3. ハムスター

扁平上皮が優性である断面はⅠ-Ⅲであり、その最大断面はⅢである。呼吸粘膜は主としてⅣ-Ⅶの断面に見られ、その最大断面はⅤで得られる。嗅粘膜はⅦ-Ⅹであり、最大断面はⅧである。

ま と め

ラット、マウス及びハムスターの鼻腔の解剖学的並びに組織学的形態を把握する為に、口腔の背側壁の外表面構造を指標として頭部の脱灰切断標本作製し、甲

介の形状と鼻腔を覆う上皮の分布を観察した。各動物種の解剖学的基本構造は類似していたが、いくつかの種差が見られた。その主な差異は、ectoturbinal の数及び上皮の分布の細部にあった。すなわち、ectoturbinal はハムスターが3対であるのに対し、ラットは2対、マウスは1対であった。上皮の分布に関しては、鼻腔前半部の腹側鼻道の底部に見られる扁平上皮がラットとマウスでは広範に見られるのに対してハムスターでは前半の短い範囲にしか分布していない。また、nasal turbinate の上皮は、ラット及びハムスターはほとんど全てが呼吸粘膜であるのに対して、マウスでは一部に嗅粘膜が出現していた。鼻腔の解剖学的特徴を明確にすると共に、鼻腔の病理学的検索の際に用いる切り出し部位の指標と組織学的に現われる鼻腔構造の相関の重要性につき提案した。

文 献

- 1) U. Mohr and G. Reznik: *Pathogenesis and Therapy of Lung Cancer*, p. 263 (1978), Marcel Dekker Inc., New York and Basel
- 2) The Third CIIT Conference on Toxicology, Formaldehyde toxicity, Nov.; 20-21, 1980 at the Missio Valley Inn and Conference Center, Raleigh, North Carolina
- 3) H. Plugge and G. Petrazzulo: *Nasal Oncogens - A Review*, JRB Associates Inc., Contract No. CPSC-C 79-1052 (1980)
- 4) R. Hebel and M.W. Stromberg: *Anatomy of the Laboratory Rat*, p. 55 (1976), The Williams & Wilkins Company, Baltimore
- 5) J.P. Schreider and O.G. Raabe: *The Anatomical Record*, **200**, 195 (1981)
- 6) J.P. Schreider and O.G. Raabe: *J. Environmental Pathology and Toxicology*, **4**, 427 (1980)
- 7) K. Kuramoto et al.: *Jap. J. vet. Sci.*, **40**, 51 (1978)
- 8) P.K. Basrur and T. Harada: *Progress in Experimental Tumor Research* **24**, *The Syrian Hamster in Toxicology and Carcinogenesis Research*, p. 283 (1979), S. Karger, Basel, Munchen, London, New York, Sydney
- 9) K.P. Lee and H.J. Trochimowicz: *JNCI*, **68**, 157 (1982)
- 10) G. Reznik et al.: *Br. J. Cancer*, **42**, 772 (1980)
- 11) M. Kuschner et al.: *Arch. Environ. Health*, **30**, 73 (1975)

照射食品（カマボコ・ウィンナーソーセージ・ミカンジュース）の 微生物に対する突然変異試験

吉川邦衛・能美健彦・宮田ルミ子・石館 基

Bacterial Mutagenicity Tests on Irradiated Foods (Fish-Meat Cake, Wiener and Orange Juice)

Kunie YOSHIKAWA, Takehiko NOHMI, Rumiko MIYATA and Motoi ISHIDATE, Jr.

In Japan, the shallow radiation of a food can be effectively accomplished for sterilizing fish-meat products (0.3 Mrad/hr, 2 hr), wiener (0.3 Mrad/hr, 2 hr) and oranges (0.5 eV, 150 Krad), using the low doses of gamma-ray and/or cathode-ray irradiation in place of bactericidal agents. However, the results of mutagenicity on irradiated fish-meat products, wiener or oranges have been insufficient for publication. We examined, therefore, the mutagenic response of the extracts prepared with several organic solvents and distilled water such as: 70% methanol for fish-meat cake; chloroform-methanol mix (2:1) and distilled water for wiener; as well as acetone and methanol for orange juice, after the similar irradiation conditions described above, on streptomycin dependence of the *Salmonella typhimurium* TA100 SM^d strain developed by Dr. T. Kada.

Our results obtained by the use of this bacterial indicator showed no significant differences between any irradiated and unirradiated samples with or without S9 mixture taken from PCB-induced rat livers. The data showed only a killing effect with all samples used in this study.

(Received May 31, 1982)

はじめに

食品に対する照射は、食品の流通過程の安定化並びに食品衛生上の観点から極めて大きな利点がある。すなわち、玉ねぎや馬鈴薯の場合は発芽防止として、カマボコ、ウィンナーソーセージ、ミカンジュースの場合には殺菌処理として、その効果が著しいことである。

しかし、照射食品の利用並びに普及に対しては、事前にその健全性をじゅうぶんに検討する必要がある。今回、 γ 線照射カマボコ、 γ 線照射ウィンナーソーセージ、電子線照射ミカンジュースの各種有機溶媒抽出画分について、*Salmonella typhimurium* TA100 SM^d 株を指標にした突然変異試験を実施したので報告する。

試験方法

1. 試料

γ 線照射カマボコ：科学技術庁食品照射運営会議指定の紀文カマボコ（スケトウダラ無塩冷凍すり身 SA 級）を、原子力研究所・高崎研究所において γ 線照射（0.3 Mrad/hr で 2 hr）後、宮坂醸造（東京都東久留米市前沢）にて凍結乾燥したものを試料として用いた。対照として、非照射カマボコを同一工程で処理したもの

のも作製した。

γ 線照射ウィンナーソーセージ：科学技術庁食品照射運営会議指定のウィンナーソーセージ（高崎ハム製造）を原子力研究所・高崎研究所において γ 線照射（0.3 Mrad/hr で 2 hr）後、宮坂醸造（東京都東久留米市前沢）にて凍結乾燥したものを試料として用いた。非照射ウィンナーソーセージを同一工程で処理したものを対照試料とした。

電子線照射ミカンジュース：科学技術庁食品照射運営会議指定の和歌山県産 L 級温州ミカンを、日本原子力研究所・大阪研究所で電子線照射（0.5 eV で 150 Krad）し、その後ジュース加工工場で濃縮ジュース（濃縮率 1/5、水分含有率約 50%）にしたものを、試料として用いた。対照として、非照射ミカンを同一工程で処理したものも作製した。

2. 抽出方法

γ 線照射カマボコ：照射及び非照射カマボコの試料 500 g を、各 3 l の 70% methanol に懸濁し、室温にて 2 hr 抽出した。抽出後、濾過し抽出画分と残渣に分け、各々をエバポレーター又はデシケーターを用い乾燥させ、試験標品とした（Fig. 1）。

γ 線照射ウィンナーソーセージ：照射及び非照射ウ

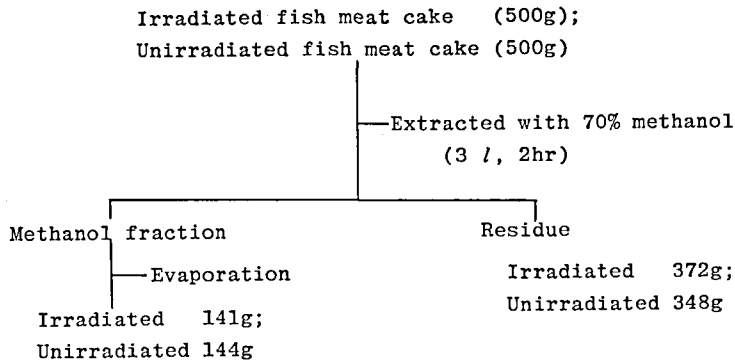


Fig. 1. Preparation of the sample of irradiated or unirradiated fish meat cake

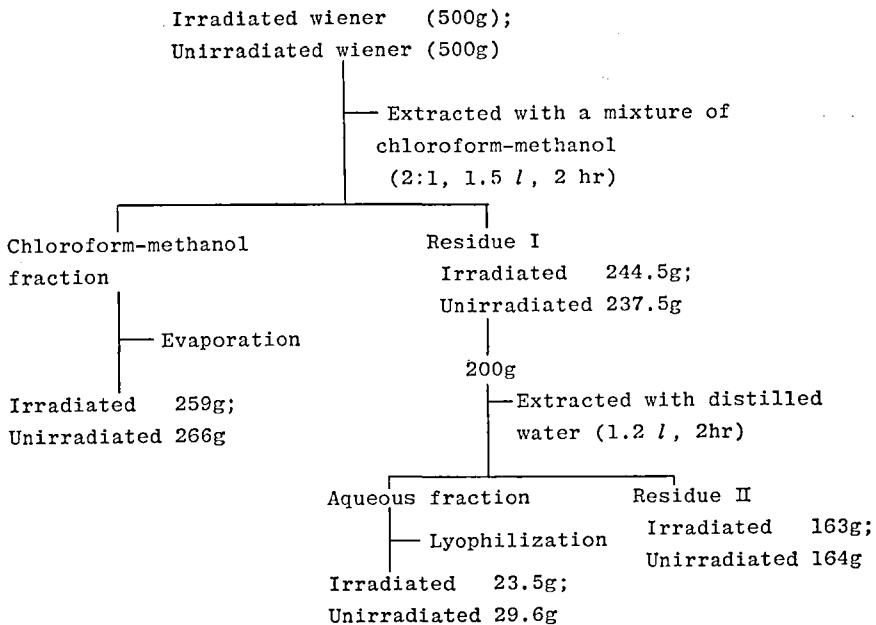


Fig. 2. Preparation of the sample of irradiated or unirradiated wiener

インナーソーセージの試料 500 g を、各 1.5 l の chloroform-methanol 混液 (2:1, v/v) に懸濁し、室温にて 2 hr 抽出を行った、濾過により抽出画分と残渣に分け、残渣は乾燥後その 200 g に蒸留水 1.2 l を加え、室温にて 2 hr 抽出した。抽出後濾過し抽出画分と残渣に分け、抽出画分は更に凍結乾燥を行い試験標品を調製した (Fig. 2)。

電子線照射ミカンジュース：照射及び非照射ミカンジュースを、各々蒸留水で 4 倍 (v/v) に希釈後、凍結乾燥し粉末状を呈したものを、ミカンジュースの凍結乾燥粉末標品とした。以下 Fig. 3 に示すごとく、凍結乾燥粉末標品をソックスレー抽出器を用い acetone 及び methanol で抽出した。各抽出画分及び残渣は、

エバポレーター、あるいはデシケーターを用い乾燥させ、試験標品とした。

各標品は、1/15 M リン酸緩衝液 (pH 6.8) あるいは dimethylsulfoxide (DMSO) に懸濁後、メンブランフィルター (pore size=0.45 μ m) で濾過し、突然変異試験に用いた。

3. 突然変異試験

指標菌株には、賀田恒夫博士 (国立遺伝学研究所) より分与された streptomycin 依存性株 *Salmonella typhimurium* TA100 SM⁴ を用いた。指標菌株を 37° で 48 hr 培養後、遠心分離して集菌し、上述のリン酸緩衝液で洗浄後、OD 600 nm が 0.1 になるように同上の緩衝液に懸濁した。調製した菌液 0.4 ml に、

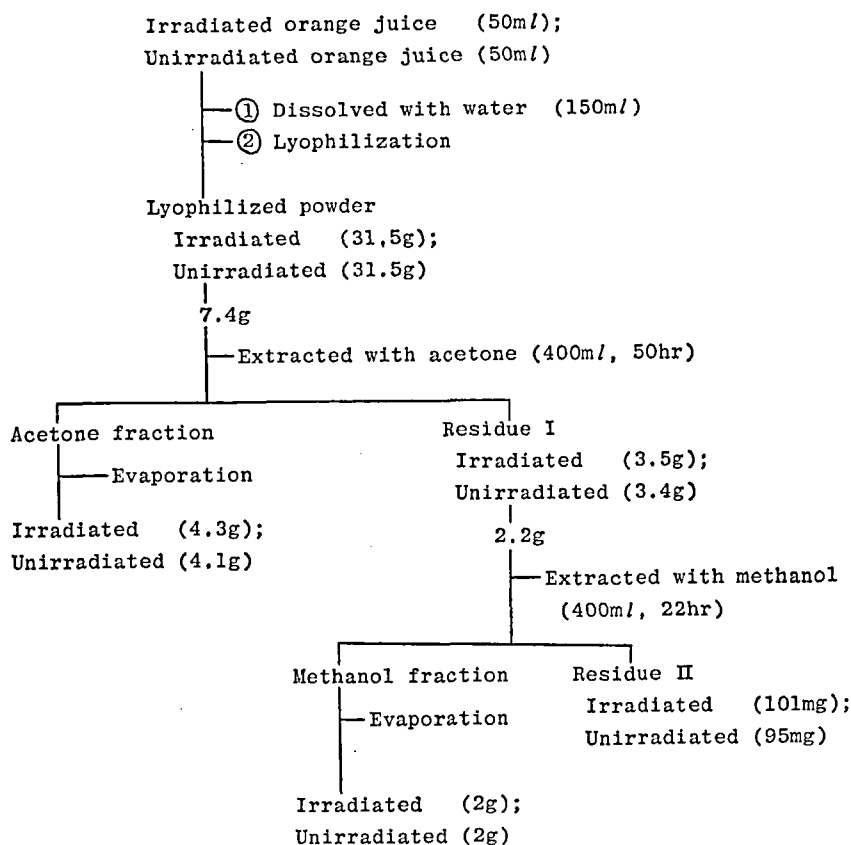


Fig. 3. Preparation of the sample of irradiated or unirradiated orange juice

S9 mix¹⁾あるいは同上の緩衝液 0.4 ml を加え、2. で調製した標品を 0.2 ml ずつ5段階又は3段階の濃度で添加し、37°で 30 min インキュベーションを行なった。インキュベーション後、混液 0.1 ml を突然変異検出用培地²⁾に重層し、37°で2日間培養後、突然変異株数を計測した。生存菌数の測定は、インキュベーション後の混液 0.1 ml を同上の緩衝液で希釈後、streptomycin 20 µg/ml を含む前述の培地上に 0.45% 軟寒天を用いて重層し、37°で2日間培養後、生存菌株数を計測した。誘発突然変異頻度の算出は、既述の方法に従った³⁾。

陽性対照として、S9 mix 非存在下では、N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) を、S9 mix 存在下では 2-aminoanthracene (2-AA) を用いた。陰性対照としては、kanamycin を用いた。

実験結果

γ線照射カマボコ

S9 mix 非存在下における照射・非照射カマボコ各

画分の突然変異試験結果を Table 1 に示す。照射・非照射にかかわらず各抽出画分及び残渣は殺菌作用を示し、最高濃度 20 mg/ml で 10~15% の生存菌数の減少が観察された。しかし、照射・非照射いずれの標品においても、誘発突然変異株数の増加は認められなかった。本実験と同時に行った対照試験の場合には、MNNG (陽性対照) において、誘発突然変異頻度の上昇が認められ、kanamycin (陰性対照) においては殺菌作用のみが認められた。

S9 mix 存在下における照射・非照射カマボコ各画分の、突然変異試験結果を Table 2 に示す。照射・非照射いずれの場合も、各抽出画分及び残渣は殺菌作用を示し、70% methanol 抽出画分の場合は最高濃度 20 mg/ml で 5~10% の生存菌数の減少が観察され、残渣の場合には同濃度で約 50% の生存菌数減少が観察された。しかし、いずれの標品においても、誘発突然変異株数の増加は認められなかった。本実験と同時に行った対照試験の場合には、2-AA (陽性対照) において誘発突然変異頻度の上昇が認められ、一方 kanamycin

Table 1. Mutagenicity test of irradiated or unirradiated fish meat cake by *Salmonella typhimurium* TA100 SM^d strain in the absence of S9 mix

Sample	Dose (mg/ml)	Survival cells per ml	Remaining survival (%)	Mutant colonies per plate	Induced mutation frequency ($\times 10^{-6}$)
Irradiated					
70% Methanol fraction	0	5.3×10^7	100	160 ± 9.9	
	1	4.6×10^7	87	130 ± 4.9	—
	2	4.3×10^7	81	127 ± 0.7	—
	5	4.3×10^7	81	147 ± 16.3	—
	10	4.8×10^7	90	153 ± 5.7	—
	20	4.4×10^7	83	134 ± 4.2	—
Residue	0	4.7×10^7	100	164 ± 8.5	
	1	3.9×10^7	82	107 ± 7.8	—
	2	4.4×10^7	93	145 ± 0.7	—
	5	3.8×10^7	81	139 ± 11.3	—
	10	3.3×10^7	70	130 ± 15.6	—
	20	3.3×10^7	70	141 ± 18.4	—
Unirradiated					
70% Methanol fraction	0	5.0×10^7	100	170 ± 7.0	
	1	4.6×10^7	92	166 ± 2.8	—
	2	4.8×10^7	96	165 ± 3.4	—
	5	5.2×10^7	104	167 ± 1.0	—
	10	5.0×10^7	100	168 ± 1.0	—
	20	4.4×10^7	88	165 ± 7.7	—
Residue	0	4.9×10^7	100	164 ± 2.9	
	1	5.3×10^7	108	89 ± 7.1	—
	2	4.7×10^7	96	106 ± 14.4	—
	5	4.0×10^7	82	133 ± 9.9	—
	10	4.1×10^7	84	152 ± 13.4	—
	20	4.0×10^7	82	159 ± 9.9	—
MNNG	0	7.1×10^7	100	109 ± 0.7	
	0.005	4.9×10^7	69	383 ± 21.3	56.1
KM	0	4.0×10^7	100	145 ± 3.4	
	0.1	3.0×10^7	75	89 ± 8.8	—

Induced mutation frequency (I.M.F.) is expressed per 10^6 survivors; cell survivals are relative to either dimethylsulfoxide or phosphate buffer controls. (—) indicates that it is impossible for calculating I.M.F.
MNNG: N-Methyl-N-nitro-N'-nitrosoguanidine.
KM : Kanamycin.

Table 2. Mutagenicity test of irradiated or unirradiated fish meat cake by *Salmonella typhimurium* TA100 SM^d strain in the presence of S9 mix

Sample	Dose (mg/ml)	Survival cells per ml	Remaining survival (%)	Mutant colonies per plate	Induced mutation frequency ($\times 10^{-6}$)
Irradiated					
70% Methanol fraction	0	4.5×10^7	100	184 $\pm$ 5.7	
	1	4.6×10^7	102	181 $\pm$ 19.8	—
	2	4.2×10^7	92	169 $\pm$ 9.2	—
	5	4.7×10^7	105	174 $\pm$ 6.4	—
	10	4.3×10^7	96	181 $\pm$ 3.4	—
	20	4.3×10^7	96	179 $\pm$ 5.1	—
Residue	0	5.3×10^7	100	175 $\pm$ 2.8	—
	1	3.4×10^7	64	122 $\pm$ 12.0	—
	2	2.8×10^7	53	122 $\pm$ 6.4	—
	5	3.3×10^7	62	129 $\pm$ 2.1	—
	10	3.5×10^7	66	143 $\pm$ 8.4	—
	20	3.0×10^7	57	149 $\pm$ 2.1	—
Unirradiated					
70% Methanol fraction	0	4.7×10^7	100	185 $\pm$ 5.1	
	1	4.7×10^7	100	181 $\pm$ 6.8	—
	2	4.3×10^7	91	171 $\pm$ 8.3	—
	5	4.4×10^7	94	175 $\pm$ 3.7	—
	10	4.2×10^7	89	177 $\pm$ 3.7	—
	20	4.3×10^7	91	172 $\pm$ 6.0	—
Residue	0	5.3×10^7	100	187 $\pm$ 2.8	
	1	2.3×10^7	61	182 $\pm$ 22.6	—
	2	2.9×10^7	54	180 $\pm$ 14.8	—
	5	2.8×10^7	53	159 $\pm$ 3.5	—
	10	3.0×10^7	57	166 $\pm$ 8.5	—
	20	2.9×10^7	56	156 $\pm$ 9.9	—
2AA	0	7.0×10^7	100	145 $\pm$ 3.4	
	0.02	5.6×10^7	81	351 $\pm$ 14.3	8.32
KM	0	5.9×10^7	100	184 $\pm$ 10.6	
	0.1	4.6×10^7	78	100 $\pm$ 1.4	—

Induced mutation frequency (I.M.F.) is expressed per 10^6 survivors; cell survivals are relative to either dimethylsulfoxide or phosphate buffer controls. (—) indicates that it is impossible for calculating I.M.F.

2AA: 2-Aminoanthracene.

KM: Kanamycin.

Table 3. Mutagenicity test of irradiated or unirradiated wiener by *Salmonella typhimurium* TA100 SM^d strain in the absence of S9 mix

Sample	Dose (mg/ml)	Survival cells per ml	Remaining survival (%)	Mutant colonies per plate	Induced mutation frequency ($\times 10^{-6}$)
Irradiated Chloroform-methanol fraction	0	4.9×10^7	100	132 $\pm$ 14.5	
	1	4.4×10^7	90	112 $\pm$ 7.1	—
	2	4.2×10^7	85	109 $\pm$ 4.2	—
	5	3.2×10^7	66	123 $\pm$ 22.5	—
	10	3.6×10^7	73	107 $\pm$ 3.5	—
	20	1.7×10^7	34	115 $\pm$ 6.4	—
Residue I	0	5.6×10^7	100	176 $\pm$ 3.5	
	1	5.1×10^7	91	172 $\pm$ 5.9	—
	2	5.1×10^7	91	141 $\pm$ 9.2	—
	5	5.3×10^7	95	149 $\pm$ 22.2	—
	10	4.9×10^7	88	156 $\pm$ 15.6	—
	20	4.8×10^7	86	132 $\pm$ 14.5	—
Aqueous fraction	0	5.3×10^7	100	153 $\pm$ 9.9	
	1	3.8×10^7	75	111 $\pm$ 19.1	—
	2	4.4×10^7	83	142 $\pm$ 21.1	—
	5	4.6×10^7	87	149 $\pm$ 6.4	—
	10	3.9×10^7	72	137 $\pm$ 2.1	—
	20	4.0×10^7	75	141 $\pm$ 7.2	—
Residue II	0	4.9×10^7	100	150 $\pm$ 9.9	—
	1	4.3×10^7	89	140 $\pm$ 6.9	—
	2	4.5×10^7	92	144 $\pm$ 6.4	—
	5	3.8×10^7	77	139 $\pm$ 9.9	—
	10	3.6×10^7	74	135 $\pm$ 21.9	—
	20	3.5×10^7	71	132 $\pm$ 14.8	—
Unirradiated Chloroform-methanol fraction	0	4.9×10^7	100	172 $\pm$ 15.6	—
	1	4.4×10^7	89	157 $\pm$ 17.0	—
	2	3.5×10^7	71	142 $\pm$ 12.7	—
	5	3.0×10^7	62	132 $\pm$ 14.5	—
	10	3.1×10^7	63	124 $\pm$ 19.1	—
	20	1.4×10^7	28	105 $\pm$ 2.1	—
Residue I	0	5.7×10^7	100	100 $\pm$ 3.5	—
	1	5.7×10^7	100	175 $\pm$ 3.6	—
	2	5.4×10^7	95	167 $\pm$ 13.4	—
	5	5.1×10^7	89	169 $\pm$ 34.6	—
	10	4.8×10^7	84	148 $\pm$ 23.7	—
	20	4.8×10^7	84	164 $\pm$ 17.9	—
Aqueous fraction	0	5.3×10^7	100	168 $\pm$ 4.9	—
	1	3.9×10^7	74	150 $\pm$ 15.6	—
	2	4.8×10^7	91	140 $\pm$ 9.9	—
	5	4.5×10^7	85	122 $\pm$ 4.2	—
	10	4.2×10^7	79	111 $\pm$ 4.9	—
	20	3.5×10^7	67	104 $\pm$ 12.7	—
Residue II	0	4.9×10^7	100	148 $\pm$ 18.3	—
	1	4.9×10^7	100	135 $\pm$ 3.5	—
	2	4.3×10^7	89	116 $\pm$ 6.4	—
	5	3.6×10^7	73	109 $\pm$ 6.4	—
	10	4.4×10^7	89	123 $\pm$ 9.1	—
	20	4.3×10^7	89	130 $\pm$ 7.4	—
MNNG	0	7.1×10^7	100	109 $\pm$ 7.4	—
	0.01	4.9×10^7	69	464 $\pm$ 11.3	72.0
KM	0	5.4×10^7	100	140 $\pm$ 8.5	—
	0.05	5.1×10^7	94	64 $\pm$ 0	—

Induced mutation frequency (I.M.F.) is expressed per 10^6 survivors; cell survivals are relative to either dimethylsulfoxide or phosphate buffer controls. (—) indicates that it is impossible for calculating I.M.F.
MNNG: N-Methyl-N-nitro-N'-nitrosoguanidine.
KM : Kanamycin.

Table 4. Mutagenicity test of irradiated or unirradiated wiener by *Salmonella typhimurium* TA100 SM⁴ strain in the presence of S9 mix

Sample	Dose (mg/ml)	Survival cells per ml	Remaining survival (%)	Mutant colonies per plate	Induced Mutation frequency ($\times 10^{-6}$)
Irradiated					
Chloroform-methanol fraction	0	5.8×10^7	100	180 ± 2.1	
	1	3.3×10^7	58	175 ± 9.9	—
	2	3.7×10^7	63	160 ± 19.8	—
	5	4.2×10^7	72	170 ± 2.3	—
	10	3.3×10^7	58	153 ± 6.4	—
	20	4.9×10^7	85	165 ± 30.4	—
Residue I	0	5.0×10^7	100	186 ± 4.9	—
	1	4.5×10^7	90	181 ± 23.3	—
	2	3.5×10^7	70	176 ± 8.5	—
	5	3.4×10^7	68	178 ± 28.3	—
	10	3.3×10^7	66	179 ± 9.5	—
	20	3.5×10^7	70	160 ± 13.4	—
Aqueous fraction	0	4.9×10^7	100	176 ± 5.7	—
	1	4.7×10^7	96	170 ± 1.4	—
	2	4.8×10^7	98	174 ± 7.2	—
	5	4.5×10^7	92	162 ± 7.8	—
	10	4.4×10^7	90	155 ± 13.9	—
	20	4.5×10^7	92	160 ± 3.3	—
Residue II	0	5.8×10^7	100	201 ± 9.2	—
	1	4.3×10^7	75	191 ± 9.2	—
	2	5.1×10^7	89	191 ± 0.7	—
	5	4.3×10^7	75	186 ± 0.8	—
	10	2.9×10^7	50	185 ± 29.0	—
	20	3.5×10^7	61	148 ± 8.5	—
Unirradiated					
Chloroform-methanol fraction	0	5.8×10^7	100	189 ± 14.1	—
	1	5.6×10^7	97	186 ± 31.1	—
	2	4.5×10^7	78	179 ± 9.2	—
	5	3.9×10^7	67	172 ± 9.9	—
	10	3.5×10^7	61	162 ± 0.3	—
	20	1.4×10^7	24	148 ± 8.5	—
Residue I	0	4.7×10^7	100	156 ± 14.8	—
	1	4.3×10^7	91	153 ± 19.1	—
	2	3.5×10^7	74	148 ± 8.5	—
	5	3.4×10^7	72	134 ± 21.1	—
	10	3.3×10^7	72	147 ± 0.7	—
	20	3.1×10^7	66	112 ± 3.5	—
Aqueous fraction	0	4.5×10^7	100	155 ± 5.7	—
	1	3.7×10^7	83	136 ± 4.2	—
	2	3.9×10^7	86	142 ± 14.8	—
	5	3.8×10^7	85	150 ± 3.5	—
	10	3.7×10^7	83	148 ± 15.6	—
	20	3.7×10^7	83	131 ± 1.4	—
Residue II	0	6.0×10^7	100	148 ± 8.5	—
	1	5.6×10^7	96	127 ± 1.4	—
	2	5.0×10^7	84	134 ± 14.8	—
	5	4.7×10^7	79	132 ± 24.0	—
	10	4.1×10^7	69	131 ± 10.6	—
	20	5.0×10^7	84	134 ± 2.1	—
2AA	0	6.5×10^7	100	126 ± 14.1	
	0.005	5.6×10^7	86	344 ± 12.4	3.9
KM	0	5.4×10^7	100	140 ± 8.5	
	0.1	4.6×10^7	85	100 ± 1.4	—

Induced mutation frequency (I.M.F.) is expressed per 10^6 survivors; cell survivals are relative to either dimethylsulfoxide or phosphate buffer controls. (—) indicates that it is impossible for calculating I.M.F.

2AA: 2-Aminoanthracene.

KM: Kanamycin.

Table 5. Mutagenicity test of irradiated or unirradiated orange juice by *Salmonella typhimurium* TA100 SM^d strain in the absence of S9 mix

Sample	Dose (mg/ml)	Survival cells per ml	Remaining survival (%)	Mutant colonies per plate	Induced mutation frequency ($\times 10^{-6}$)
Irradiated					
Lyophilized powder	0	2.9×10^7	100	91 ± 2.8	
	10	2.5×10^7	86	87 ± 9.2	—
	20	2.0×10^7	69	90 ± 9.9	—
	50	1.8×10^7	62	55 ± 5.7	—
Acetone fraction	0	2.5×10^7	100	88 ± 9.9	
	10	1.8×10^7	72	80 ± 13.4	—
	20	1.7×10^7	68	80 ± 15.6	—
	50	1.4×10^7	56	56 ± 29.0	—
Residue I	0	3.2×10^7	100	85 ± 7.1	
	10	2.8×10^7	88	80 ± 0	—
	20	2.6×10^7	81	80 ± 19.8	—
	50	2.6×10^7	81	79 ± 3.9	—
Methanol fraction	0	2.4×10^7	100	84 ± 4.9	
	10	2.2×10^7	92	71 ± 0.7	—
	20	2.3×10^7	93	77 ± 4.9	—
	50	2.1×10^7	88	75 ± 11.3	—
Residue II	0	2.4×10^7	100	70 ± 28.3	
	1	2.5×10^7	104	67 ± 6.4	—
	2	2.4×10^7	100	50 ± 21.9	—
	5	2.2×10^7	92	46 ± 1.4	—
Unirradiated					
Lyophilized powder	0	3.7×10^7	100	135 ± 71.4	
	10	3.7×10^7	100	90 ± 2.8	—
	20	3.2×10^7	86	85 ± 4.2	—
	50	2.8×10^7	76	74 ± 38.3	—
Acetone fraction	0	3.9×10^7	100	129 ± 23.3	
	10	3.4×10^7	87	110 ± 0	—
	20	2.8×10^7	72	124 ± 19.1	—
	50	2.4×10^7	62	50 ± 1.4	—
Residue I	0	3.1×10^7	100	127 ± 14.8	
	10	2.5×10^7	81	101 ± 4.9	—
	20	2.7×10^7	87	68 ± 11.3	—
	50	2.4×10^7	77	64 ± 41.7	—
Methanol fraction	0	3.0×10^7	100	104 ± 13.4	
	10	2.2×10^7	73	84 ± 1.4	—
	20	1.8×10^7	60	82 ± 0.7	—
	50	1.8×10^7	60	72 ± 17.0	—
Residue II	0	4.5×10^7	100	105 ± 9.2	
	1	3.5×10^7	78	90 ± 11.3	—
	2	2.9×10^7	64	81 ± 14.4	—
	5	3.2×10^7	71	80 ± 9.2	—
MNNG	0	7.1×10^7	100	109 ± 0.7	
	0.02	3.7×10^7	53	507 ± 5.3	10.64
KM	0	5.4×10^7	100	140 ± 8.5	
	0.1	4.5×10^7	83	87 ± 4.9	—

Induced mutation frequency (I.M.F.) is expressed per 10^6 survivors; cell survivals are relative to either dimethylsulfoxide or phosphate buffer controls. (—) indicates that it is impossible for calculating I.M.F.

MNNG: N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine.

KM : Kanamycin.

Table 6. Mutagenicity test of irradiated or unirradiated orange juice by *Salmonella typhimurium* TA100 SM^d strain in the presence of S9 mix

Sample	Dose (mg/ml)	Survival cells per ml	Remaining survival (%)	Mutant colonics per plate	Induced mutation frequency ($\times 10^{-6}$)
Irradiated					
Lyophilized powder	0	2.8×10^7	100	86 $\pm$ 3.5	
	10	2.4×10^7	86	79 $\pm$ 7.8	—
	20	2.4×10^7	86	70 $\pm$ 3.5	—
	50	2.1×10^7	75	61 $\pm$ 27.6	—
Acetone fraction	0	3.4×10^7	100	115 $\pm$ 7.1	
	10	1.8×10^7	53	86 $\pm$ 19.8	—
	20	2.3×10^7	68	105 $\pm$ 7.1	—
	50	2.0×10^7	59	80 $\pm$ 6.0	—
Residue I	0	2.8×10^7	100	125 $\pm$ 29.0	
	10	2.9×10^7	103	119 $\pm$ 5.7	—
	20	2.3×10^7	82	100 $\pm$ 16.3	—
	50	2.3×10^7	82	120 $\pm$ 14.8	—
Methanol fraction	0	2.3×10^7	100	99 $\pm$ 4.2	
	10	1.7×10^7	74	83 $\pm$ 9.9	—
	20	1.9×10^7	83	95 $\pm$ 6.4	—
	50	1.4×10^7	61	77 $\pm$ 8.5	—
Residue II	0	2.7×10^7	100	124 $\pm$ 8.5	
	1	2.4×10^7	89	100 $\pm$ 31.1	—
	2	2.4×10^7	89	79 $\pm$ 4.9	—
	5	2.4×10^7	89	85 $\pm$ 21.2	—
Unirradiated					
Lyophilized powder	0	4.0×10^7	100	110 $\pm$ 9.9	
	10	4.3×10^7	108	57 $\pm$ 5.7	—
	20	3.8×10^7	95	55 $\pm$ 16.3	—
	50	3.3×10^7	83	53 $\pm$ 7.8	—
Acetone fraction	0	4.4×10^7	100	154 $\pm$ 53.0	
	10	4.3×10^7	98	79 $\pm$ 20.5	—
	20	3.9×10^7	89	81 $\pm$ 22.6	—
	50	2.6×10^7	59	72 $\pm$ 0.7	—
Residue I	0	3.3×10^7	100	127 $\pm$ 14.8	
	10	2.6×10^7	79	112 $\pm$ 12.7	—
	20	2.3×10^7	70	102 $\pm$ 2.8	—
	50	2.1×10^7	64	105 $\pm$ 15.6	—
Methanol fraction	0	2.6×10^7	100	116 $\pm$ 5.7	
	10	2.7×10^7	104	82 $\pm$ 11.3	—
	20	2.2×10^7	85	97 $\pm$ 4.9	—
	50	2.2×10^7	85	92 $\pm$ 27.1	—
Residue II	0	4.2×10^7	100	111 $\pm$ 7.8	
	1	3.8×10^7	90	90 $\pm$ 22.6	—
	2	3.2×10^7	66	86 $\pm$ 11.3	—
	5	3.3×10^7	79	99 $\pm$ 8.5	—
2AA	0	7.0×10^7	100	146 $\pm$ 12.0	
	0.02	3.8×10^7	54	557 $\pm$ 58.7	10.84
KM	0	5.9×10^7	100	184 $\pm$ 10.6	
	0.2	4.5×10^7	76	37 $\pm$ 7.8	—

Induced mutation frequency (I.M.F.) is expressed per 10^6 survivors; cell survivals are relative to either dimethylsulfoxide or phosphate buffer controls. (—) indicates that it is impossible for calculating I.M.F.

2AA: 2-Aminoanthracene.

KM: Kanamycin.

（陰性対照）においては、殺菌作用のみが認められた。

γ線照射ウィンナーソーセージ

S9 mix 非存在下における照射・非照射ウィンナーソーセージ各画分の突然変異試験結果を Table 3 に示す。照射・非照射いずれの場合も、各抽出画分及び残渣は殺菌作用を示し、chloroform-methanol 画分の場合、20 mg/ml の濃度で約70%の生菌数の減少が観察され、その他の画分及び残渣では、同濃度で11~33%生菌数の減少が観察された。しかし、照射・非照射いずれの画分・残渣においても誘発突然変異株数の増加は認められなかった。本実験と同時に行った対照試験の場合には、MNNG（陽性対照）において誘発突然変異頻度の上昇が認められ、kanamycin（陰性対照）においては殺菌作用のみが認められた。

S9 mix 存在下における照射・非照射ウィンナーソーセージ各画分の、突然変異試験結果を Table 4 に示す。照射・非照射いずれの場合も、各抽出画分及び残渣は殺菌作用を示したが、特に非照射ウィンナーソーセージの chloroform-methanol 画分は最も強い殺菌作用を示し、20 mg/ml の濃度で生菌数が76%減少した。その他の画分及び残渣は、同濃度で8~39%生菌数の減少が観察された。しかし、照射・非照射いずれの画分・残渣においても誘発突然変異株数の増加は認められなかった。本実験と同時に行った対照試験の場合には、2-AA（陽性対照）において誘発突然変異頻度の上昇が認められ、kanamycin（陰性対照）においては殺菌作用のみが認められた。

電子線照射ミカンジュース

S9 mix 非存在下における照射・非照射ミカンジュース各画分の、突然変異試験結果を Table 5 に示す。照射ミカンジュースの抽出画分及び残渣は、残渣Ⅱ>acetone 画分≥methanol 画分>凍結乾燥粉末≥残渣Ⅰの順に殺菌作用を示した。非照射群の殺菌作用の強さの順は、残渣Ⅱ>acetone 画分≥凍結乾燥粉末>残渣Ⅰ≥methanol 画分であった。しかし、照射・非照射いずれの標品においても、誘発突然変異株数の増加は認められなかった。本実験と同時に行った対照試験の場合には、MNNG（陽性対照）において誘発突然変異頻度の上昇が認められ、kanamycin（陰性対照）にお

いては殺菌作用のみが認められた。

S9 mix 存在下における照射・非照射ミカンジュース各標品の、突然変異試験結果を Table 6 に示す。照射各標品の殺菌作用の強さの順は、残渣Ⅱ>acetone 画分>残渣Ⅰ>methanol 画分=凍結乾燥粉末であり、非照射各標品の場合には、残渣Ⅱ>acetone 画分≥methanol 画分>凍結乾燥粉末>残渣Ⅰの順であった。しかし、照射・非照射いずれの画分においても、誘発突然変異株数の上昇は認められなかった。本実験と同時に行った対照試験の場合には、2-AA（陽性対照）において誘発突然変異頻度の上昇が認められ、kanamycin（陰性対照）においては殺菌作用のみが認められた。

ま と め

γ線照射カマボコ、γ線照射ウィンナーソーセージ、電子線照射ミカンジュースの微生物に対する突然変異原性を、streptomycin 依存性株 *Salmonella typhimurium* TA100 SM^d を用いて試験した。各試料は凍結乾燥後、各種有機溶媒を用いて抽出し試験に供した。照射カマボコ・ウィンナーソーセージ・ミカンジュースの抽出画分及び残渣は、非照射群と同様、指標菌株に対し殺菌作用のみを示し、誘発突然変異株数の増加を示さなかった。以上の事実に基づき、γ線照射カマボコ、γ線照射ウィンナーソーセージ、電子線照射ミカンジュースの本指標菌株に対する変異原性を、陰性と判断した。

本研究は、科学技術庁原子力局技術振興課からの研究費により実施した。試料の供給にあられた科学技術庁食品照射運営会議、財団法人食品薬品安全センター秦野研究所、並びに抽出方法の選定にあたり御助言をいただいた当試験所環境衛生化学部義平邦利部長、食品部内山貞夫主任研究官に感謝いたします。

文 献

- 1) K. Yoshikawa et al.: *J. Toxicol. Sci.*, **4**, 317 (1979)
- 2) B.N. Ames et al.: *Mutation Res.*, **31**, 347 (1975)
- 3) K. Yoshikawa et al.; *Mutation Res.*, **54**, 283 (1978)

Pyrogen Test と Limulus Test の相関性 III
ブドウ糖注射液に添加された LPS の Limulus Test における反応性に対する加熱処理の影響

川崎浩之進・加納晴三郎

Studies on The Relationship between Pyrogen Test and Limulus Test

III. Effect of Heat Treatment on the Limulus Gelation

Activity of LPS in Glucose Solutions

Hironoshin KAWASAKI and Seizaburo KANOHI

We investigated the effect of heating of glucose solutions on the Limulus gelation activity of LPS and the following results were obtained.

- 1) The activity of LPS solutions on Limulus test were decreased by heating. The degree depended on the temperature and the time of heating.
- 2) The decrease of activity of LPS in various glucose solutions were paralleled to the increase of heating time (121°) and glucose concentration.
- 3) Addition of LPS after heating at 121° of glucose solutions reduced the activity on Limulus test according to the increase of heating time and glucose concentration. During the heating of the solutions, decrease of pH and decomposition of glucose were observed.
- 4) There was a little decrease of the activity of LPS by the adjustment of pH of the heated 20% glucose solution to 6.8.
- 5) The activity of LPS was not interferred by 5-HMF but levulinic acid and formic acid inhibited slightly the activity even by the adjustment of pH.

From above results, it should be concluded that the activity on Limulus test of LPS might be mainly interferred by decrease of pH owing to the decomposition of glucose.

(Received May 31, 1982)

まえがき

細菌内毒素 (LPS) は各種の興味ある生物活性を有し、中でも特徴的なのは発熱性であり、LPS を混在する注射液は強い発熱反応やショックを起こすことはよく知られている。この LPS による発熱性を不活化するために、酸、アルカリ、界面活性剤などによる処理が行われているが、加納¹⁾は既に LPS の加熱による不活化について詳細に検討し、加熱時間と温度に依存して発熱性 (Pyrogen Test における反応性) が低下することを報告した。著者らも前報²⁾において、Pyrogen Test (P. T.) と Limulus Test (L. T.) との相関性について検討し、阻害物質のない限られた条件下では LPS に限って、両 test における反応は比較的良好に相関することを示した。しかし、ブドウ糖注射液に添加された LPS については、加熱処理により両 test における反応性が平行して低下するわけではなく、ブドウ糖濃度の増加につれて、L. T. における反応性の低下が著しい傾向が認められ、ブドウ糖注射液中に加熱により L. T. の反応性を阻害する因子の生起することを示唆した。しかしその機序は明らかではなかった。

今回、この点を明らかにするため、加熱による LPS の失活の time course、ブドウ糖濃度との関係、ブドウ糖の加熱分解生成物及び pH の低下との関連について、L. T. での反応性 (ゲル化活性) を中心に検討した。以下にその成績について報告する。

実験材料と方法

1. 内毒素 (LPS): *E. coli* UKT-B 株より 90%—温フェノール法を改良した加納³⁾の方法により抽出精製したものを用いた。
2. ブドウ糖注射液: 注射液製造 4 社の 5, 20 及び 50% 注射液 (ガラスアンプル入) を用いた。
3. 加熱処理: 250° 及び 180° 加熱は電気式乾熱滅菌器を用いた。

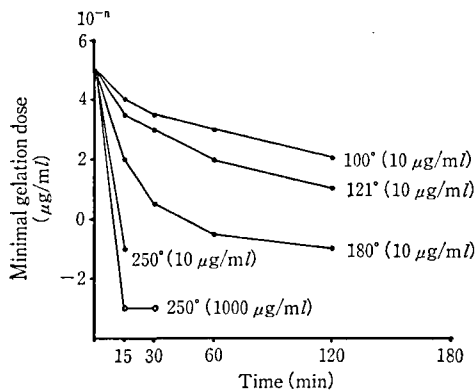
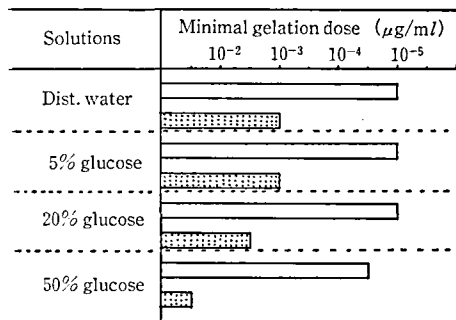


Fig. 1. Decrease of Minimal gelation dose of LPS treated with various conditions of heating
() : conc. of LPS



LPS was added into each solution at the final conc. of $10^{-1} \mu\text{g/ml}$.
Heating condition : at 121° for 30 min.
□ no heating, ■ heating.

Fig. 2. Decrease of Limulus gelation activity by heating of LPS in various glucose solutions

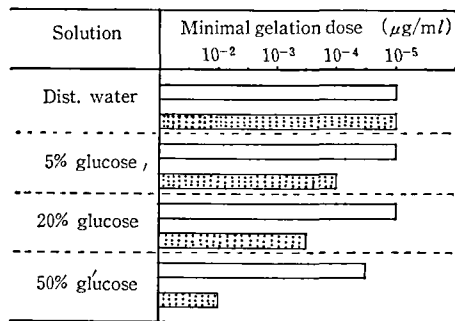
菌器で、 121° 及び 100° 加熱は加圧式湿熱滅菌器を用いた。またブドウ糖注射液に対する加熱実験ではブドウ糖注射液、注射用生理食塩水及び蒸留水はそのまま、あるいは LPS 添加後融封して、 121° で処理した。

4. UV 吸収の測定：ブドウ糖注射液を加熱後、10 あるいは 20 倍に希釈して測定した。

5. Limulus Test：カプトガニ血液成分は、pregel (生化学工業製) を用い、常法に従いゲル化の度合が +1 を示す LPS 濃度を最小ゲル化濃度 (Minimal gelation dose, M.G.D.) として表示した。用いた LPS の M.G.D. は、 $10^{-5} \mu\text{g/ml}$ であった。

実験結果

1. 各種加熱条件下における LPS 水溶液のゲル化



LPS was added into heating and no heating solution at the final conc. of $10^{-1} \mu\text{g/ml}$.
Heating condition : at 121° for 30 min.
□ no heating, ■ heating

Fig. 3. Inhibitory effect of the heated glucose solution in the Limulus gelation activity of LPS

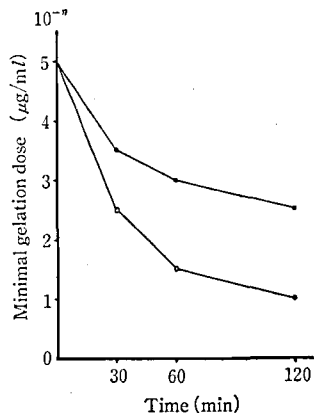


Fig. 4. Effect of heating time of LPS in 20% glucose solution on the Limulus gelation activity

LPS was added into 20% glucose solution at the final conc. of $10^{-1} \mu\text{g/ml}$.

○—○ heating after addition of LPS
●—● heating before addition of LPS
Heating condition: at 121°

活性の変化

加熱処理による LPS の L. T. におけるゲル化活性の変化を検討するため、L. T. に対してネガティブの注射用蒸留水に LPS を $1000 \mu\text{g}$ 及び $10 \mu\text{g/ml}$ の濃度に溶解し、 100° 、 121° 、 180° 及び 250° で、15、30、60、120 及び 180 分加熱後直ちに常温に戻し、それぞれ L. T. におけるゲル化活性を測定したところ、Fig. 1 に示す成績が得られた。

すなわち、 $10 \mu\text{g/ml}$ 濃度の LPS を 250° 、15 分加熱すると、加熱前の $10^{-5} \mu\text{g/ml}$ (M.G.D.) のゲル化活

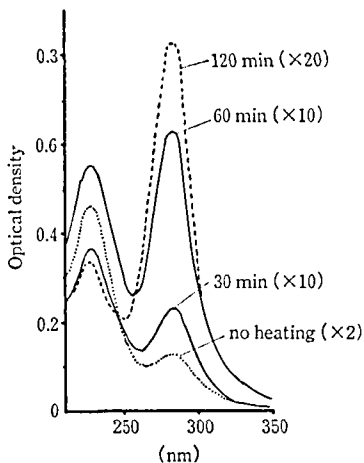


Fig. 5. Changes of UV spectra of glucose solutions heated by various conditions
Heating condition: at 121° for 30, 60 and 120 min respectively.

性が、 $10\mu\text{g/ml}$ (M. G. D.) に激減し、 $1000\mu\text{g/ml}$ 濃度の場合には、 250° 、30分加熱しても、なおゲル化活性が +1 で残存することを認めた。しかし、 $10\mu\text{g/ml}$ 濃度では加熱時間の長くなるにつれてゲル化活性の減少度は大きくなり、加熱温度の高くなるにつれてゲル化活性の減少は一層著明であった。

2. 各種濃度のブドウ糖注射液に対する加熱処理の影響

a) LPS 添加後加熱のゲル化活性に及ぼす影響

加熱処理によるゲル化活性の低下とブドウ糖濃度との関連を明らかにするために、ブドウ糖注射液 (5, 20及び50%) にそれぞれ LPS を最終濃度 $10^{-1}\mu\text{g/ml}$ になるように添加後、微生物及びそれらの毒素による汚染物の滅菌に汎用される、 121° 、30分の加熱によるゲル化活性の変化を検討した。その成績を Fig. 2 に示した。

すなわち、LPS を加えて加熱した試料は、いずれも対照に比べて著しいゲル化活性の低下が認められ、活性の低下は糖濃度に依存していた。しかし、50%ブドウ糖注射液においては、非加熱の対照群でもゲル化活性の抑制が認められた。なおこれらの成績は注射液製造4社の製品についてほぼ同様であった。

b) ブドウ糖注射液加熱後、LPS 添加のゲル化活性に及ぼす影響

上述したゲル化活性の低下には、加熱による LPS の失活のほか、糖の分解生成物やそれに起因する pH の低下の影響も考えられる。これらの点を明らかにするために、まず各種濃度のブドウ糖注射液を 121° 、

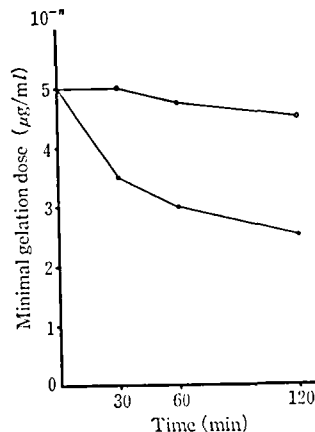


Fig. 6. Effect of pH adjustment on inhibitory effect of heated 20% glucose solution in Limulus gelation activity of LPS
LPS was added into 20% glucose solution at the final conc. of $10^{-1}\mu\text{g/ml}$.
pH was adjusted to 6.8 with 1N NaOH.
○—○ pH adjustment
●—● pH no adjustment
Heating condition: at 121° for 30, 60 and 120 min respectively.

30分加熱後直ちに常温に戻し、LPS を最終濃度 $10^{-1}\mu\text{g/ml}$ になるよう添加し、ゲル活性に対する影響を検討した結果を Fig. 3 に示した。

すなわち、蒸留水の場合には何らゲル化活性の低下は認められないが、ブドウ糖濃度の増加に伴って、ゲル化活性の低下が大きくなることを認めた。

c) ゲル化活性の低下と加熱時間との関係

次に、上に述べたゲル化活性低下の time course を明らかにするために、20%ブドウ糖注射液を15, 30, 60及び120分、 121° で加熱し、LPS を加熱前あるいは後に添加して同様の検討を行い、Fig. 4 に示した。

すなわち、添加後加熱あるいは加熱後添加のいずれの場合も、加熱時間の長くなるにつれて、ゲル化活性の低下が大きくなるのを認めたが、LPS 添加後加熱の方が常にゲル化活性の低下の度合いが大きかった。

3. 20%ブドウ糖注射液の加熱による UV 吸収スペクトルの変化

上述の実験に用いた加熱された20%ブドウ糖注射液の UV 吸収スペクトルを測定し、加熱時間とブドウ糖分解産物の生成との関係を検討し、Fig. 5 に示した。

すなわち20%ブドウ糖注射液を30, 60及び120分、 121° で加熱し、同一チャートに乗るよう2, 10及び20倍に希釈し測定した結果を示した。各試料とも228及び284 nm に極大吸収を示す物質の生成と増大が認め

Table 1. Effect of various decomposition products of glucose solution by heating on Limulus gelation activity

Samples	Conc. (mol)	pH of solution	*pH adjustment	Minimal gelation dose ($\mu\text{g/ml}$)			
				10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
5-HMF	10^{-3}	4.6		+	+	+	—
	10^{-2}	3.8		+	+	±	—
	10^{-2}		6.8	+	+	+	—
Levulinic acid	10^{-3}	4.4		+	+	+	—
	10^{-2}	3.2		—	—	—	—
	10^{-2}		7.0	+	+	±	—
Formic acid	10^{-5}	3.4		+	±	—	—
	10^{-4}	2.8		—	—	—	—
	10^{-3}	2.3		—	—	—	—
	10^{-2}	1.7		—	—	—	—
	10^{-4}		6.8	+	+	+	—
	10^{-3}		6.8	+	+	±	—
	10^{-2}		6.8	+	±	—	—
**LPS control				+	+	+	—

LPS was added into each solution at the final conc. of $10^{-1} \mu\text{g/ml}$ and diluted with each solution.

* pH was adjusted by 1N NaOH

** LPS control was diluted by saline.

られ、対照の吸収と比べて加熱時間の増加とともに、ブドウ糖分解産物の生成の割合が大きくなることを示している。なおこの際に、加熱前と30, 60及び120分加熱後のpHを測定したところ、それぞれ、 4.32 ± 0.16 , 3.90 ± 0.09 , 3.78 ± 0.07 及び 3.68 ± 0.08 ($n=12$) という値を示し、明らかにpHは低下していることを認めた。

4. 加熱後、pH 調整された20%ブドウ糖注射液に添加された LPS のゲル化活性

そこで次に、20%ブドウ糖注射液を 121° , 30, 60及び120分加熱後、1N-水酸化ナトリウムでpHをL. T. の至適pHである6.8に調整し、LPSを最終濃度 $10^{-1} \mu\text{g/ml}$ になるよう添加して、同様にゲル化活性の変化を検討し、その結果を Fig. 6 に示した。

すなわち、加熱後 pH 未調整の場合の成績は Fig. 4 と同様であるが、pH 調整後 LPS を添加した場合は、30分加熱のものではゲル化活性は低下せず、120分加熱のものでも pH 未調整のものに比べて活性の低下はわずかであった。この成績は、加熱後 LPS を添加した場合のゲル化活性の低下が、大部分ブドウ糖注射液のpHの低下に依存していることを示している。

5. 5-hydroxymethyl furfural(5HMF), レブリン酸及びギ酸による LPS のゲル化活性の阻害

上述の実験で、60及び120分加熱において認められ

たゲル化活性の低下は、pH 以外の要因としてブドウ糖の加熱による分解産物によるのではないかと考えられることから、5HMF 及びその分解生成物としてのレブリン酸及びギ酸による LPS のゲル化活性の阻害の程度について検討し、その成績を Table 1 に示した。

すなわち、5HMF は 10^{-2}M でもゲル化活性を阻害しないが、レブリン酸及びギ酸はそれぞれ 10^{-2} 及び 10^{-5}M で阻害を示した。しかし、pHを6.8あるいは7.0に調整すれば、両者とも 10^{-2}M でわずかに反応阻害を示すにとどまった。

考 察

以上の結果から、Fig. 1 に示すように LPS の L. T. におけるゲル化活性は、加納¹⁹⁾による発熱活性についての報告と同様に、加熱温度と時間に依存して低下することが明らかであった。又、ブドウ糖注射液に添加された LPS のゲル化活性は、Fig. 2 に示すように加熱処理により、ブドウ糖濃度の増加に対応して低下した。一方、加熱によるブドウ糖の分解と反応生成物の産生及びそれらによるpHの低下についてはよく知られている^{4,5)}。そこでブドウ糖液を加熱後、LPSを加えたところ、Fig. 3 及び 4 に示したようなゲル化活性の低下が認められた。

この成績と加熱しない50%注射液での活性の抑制とを考え合わせると、ブドウ糖注射液に添加された LPS の加熱によるゲル化活性の低下には、加熱による LPS 自身の失活 (Fig. 1) のほかに、加熱による糖分解生成物とそれらによる pH の低下が関与しているものと推定された。

岡田ら⁶⁾は、加熱ブドウ糖液の UV 吸収スペクトルで観察される 228 と 284 nm の極大吸収は、3-deoxy-glucosone と 5HMF と推定している。Fig. 5 に示した 228 と 284 nm における極大吸収の増大は、これら反応生成物が加熱処理により増加したことを示唆している。岡田ら⁶⁾は更に 5HMF が分解して生成される酸性物質により pH が著しく低下することを報告している。今回の実験においても20%ブドウ糖注射液の加熱後の pH は明らかに低下しており、pH を調整した結果、ゲル化活性の低下はわずかであった (Fig. 6)。このことから加熱ブドウ糖注射液に添加した LPS のゲル化活性の低下は、大部分加熱によるブドウ糖の分解に起因する pH の低下によると考えられるが、なお pH 調整後もわずかながら活性の抑制が認められた。

このためブドウ糖の分解生成物による反応阻害について検討したところ、Table 1 に示したように、pH 調整後はレブリン酸及びギ酸ともに $10^{-2}M$ で反応阻害を示すにすぎなかった。したがって、ブドウ糖注射液に添加された LPS の加熱によるゲル化活性の低下は、LPS の加熱による失活のほかに、pH の低下が大きな原因であるが、なお上記以外の分解生成物による反応阻害についても今後更に検討の必要があろう。

文 献

- 1) S. Kanoh, K. Mochida, and Y. Ogawa: *Biken J.*, **13**, 233 (1970)
- 2) 加納晴三郎, 川崎浩之進: 衛生試報, **98**, 76 (1980)
- 3) S. Kanoh, Y. Ogawa, T. Komuro, and H. Kawasaki: *Japan J. Med. Sci. Biol.*, **35**, 112 (1982)
- 4) M.L. Wolfrom, R.D. Schuetz, and L.F. Cavalieri: *J. Amer. Chem. Soc.*, **70**, 514 (1948)
- 5) C.J. Moye: *Rev. Pure and Appl. Chem.*, **14**, 161 (1964)
- 6) 岡田敏史, 伊賀完一郎, 植岡澄子, 伊坂 博: 衛生試報, **89**, 87 (1971)

Luciferase 法による組織内 ATP の定量

伊丹孝文・加納晴三郎

Determination of ATP in tissue sample by firefly luciferase luminescence

Takafumi ITAMI and Seizaburo KANOH

A specific and rapid method was developed for the determination of ATP in tissue sample. The method involves perchloric acid extraction, neutralization by sodium phosphate and measurement of bioluminescence with firefly luciferin-luciferase system.

In this method, the pretreatment was simplified and the luminescence by luciferin-luciferase was stabilized by adding phosphate ion of high concentration in reaction medium.

A good linearity between ATP concentration and luminescent intensity was observed in the range from 50 to 3500 $\mu g/g$, and the recovery of ATP added to rat liver ranged from 98 to 103% with an average of about 101%.

In addition, it was observed that tissue was stored in dry ice-petroleum ether without loss of ATP.

(Received May 31, 1982)

序

Adenosine-5'-triphosphate (ATP) は生体の主要なエネルギーの伝達体であり、各種の細胞の活動に重要な役割を演じている。したがって、細胞あるいは組織の ATP レベルはそれらの生理的活性度を理解する上で重要な鍵となる¹⁻³⁾。

しかしながら、従来の組織の ATP 定量法^{4,5)}は、共存する他の Nucleotide triphosphate を同時に測定し、10%以上の誤差を与える^{6,7)}ことが報告されている。また、分解酵素の共存のため複雑な前処理操作^{4,8)}を必要とし、迅速な試料の処理が困難である上に試料の保存方法も確立されていない。

今回、著者らは ATP に最も特異性が高いとされる

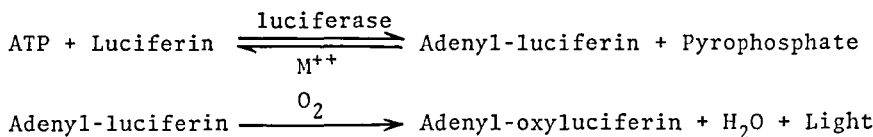


Chart 1. Principle of luminescent reaction

Luciferin-Luciferase 系による Bioluminescence (Chart 1) を利用した Strehler の方法⁶⁾に検討を加え、組織内 ATP を簡単な操作で迅速に定量する方法を考案すると共に保存方法についても検討した。

実験材料及び方法

1. 試薬

Firefly lantern (真空乾燥品, FFT) 及び ATP (Disodium, Crystalline) は Sigma 社より購入した。その他の試薬は特級を用いた。

2. Luciferase 溶液

100mg の FFT に 10 ml のヒ酸緩衝液 (0.1 M, pH 7.4) を加え, Potter の Glass Homogenizer でホモジナイズする。次に遠心分離(3000rpm, 10min 4°)し, その上澄をろ過(東洋, No.5 ろ紙)した。このろ液に 50 mg の無水硫酸マグネシウムを加えた後, 20 ml の精製水及び 10 ml のリン酸緩衝液 (0.2 M, pH 7.4) で希釈した。

リン酸イオンの影響を検討する実験には精製水のみで希釈した溶液を用いた。

3. 組織の前処理

動物を断頭, 瀉血し, 直ちに組織を摘出し, ドライアイス・石油エーテル中で凍結した。

凍結した組織を秤量し, 10倍容の水冷した8%過塩酸溶液を加え, 直ちに Ultra-turrax (TP18-10, Janke & Kunkel, Staufen, i. B) でホモジナイズした。氷冷下に15分放置し, 遠心分離 (3000 rpm, 10 min 4°) した。上澄 0.5 ml に精製水 10 ml を加え希釈した後, 氷冷下で中和量のリン酸三ナトリウム (0.2 M) を加えた。(あらかじめ8%過塩素酸溶液 0.455 ml を pH 7.4 にするに必要なリン酸三ナトリウム液の量を求めておく)。次に水で 15.5 ml に定容し, 組織抽出液とした。

リン酸イオンの影響を検討する実験では上記の中和を水酸化ナトリウム溶液で行った。

4. 定量操作

組織抽出液 1 ml をとり, Luciferase 溶液 2 ml を加え, 蛍光用セル内で反応させる。反応後 30~180 秒内の一定時間に発光を測定した。組織中の ATP 濃度

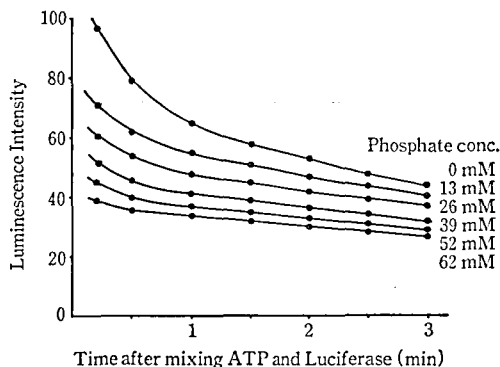


Fig. 1. Time course of luminescence intensity in various concentration of phosphate ion

は標準添加法により求めた。

5. 発光量の測定

日立蛍光分光光度計 MPF-2A に高感度用セルホルダーを付属させ, 分光せず全光量を測定した。

実験結果

1. 発光強度に及ぼすリン酸イオンの影響

Luciferase 溶液に ATP を加えたときの発光強度の経時変化はヒ酸又はリン酸イオンの存在下で抑制される⁸⁾ことが知られているが, その詳細については明確でない。そこで, リン酸イオンが組織内に含まれていることを考慮して, 発光強度及びその経時変化に及ぼす反応液中のリン酸濃度の影響について検討した。ATP 溶液 (1000 µg/ml) について, 組織におけると同様な操作を行った後, 種々のリン酸濃度下で反応させ Fig. 1 に示す結果を得た。

即ち, リン酸イオンが存在しない時には, 反応開始直後に強い発光を示すが以後急激に減少した。一方, 反応液中のリン酸濃度を増加するに従い発光強度は抑制されたが発光減弱速度は緩やかとなった。特に 39 mM 以上では 30 秒以後の減弱速度はほぼ一定で 30 秒後の発光強度に対して 1 分当たり 13% 以下と緩やかであった。またリン酸イオンの存在で発光強度も抑制されるが, 生体組織内の ATP 濃度は充分高い⁷⁾ことから測定の障害にはならないと考えられた。そこで測

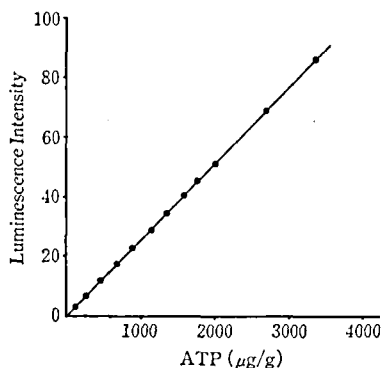


Fig. 2. Relationship between luminescence intensity and ATP concentration

定時間のずれ及び内因性リン酸による誤差を防ぐため、反応液中のリン酸濃度を約 40 mM とした。即ち、組織抽出液の中和の成績を考慮し、Luciferase 溶液中のリン酸濃度は 50 mM とした。また測定は反応後 30~180 秒内に行うこととした。

2. ATP 濃度と発光強度

既知濃度の ATP 溶液を用いて測光を行い、Fig. 2 に示す結果を得た。図に示されるように原点を通り 3500 µg/ml まで直線性を示した。

また、反応液にリン酸緩衝液を加え、リン酸濃度を 2 mM 上昇させた時も同様な直線を示した。このことから、2 mM のリン酸濃度の上昇は測定に影響を及ぼさないことが明らかになった。

3. 組織の前処理法の検討

組織から ATP を抽出する従来の方法^{4,8)} は、粉末状の凍結組織片に粉末状の凍結過塩素酸溶液を加え、凍結状態を保ちつつ磨砕混合した後、徐々に溶解させる方法である。

本報の抽出法（実験方法の項）と上記の抽出法について同一個体のラット肝について測定したところ、ATP 濃度はそれぞれ $870 \pm 15 \mu\text{g/g}$ (SE, $n=6$) と $885 \pm 18 \mu\text{g/g}$ ($n=6$) であり有意な差は認めなかった。

また、この酸抽出物の中和には、あらかじめ過塩素酸量に対応するリン酸三ナトリウム溶液量を求め、それを加える方法を採用した。そこでこの方法における、組織の影響を知る目的で、ラットの肝、子宮及び胎盤の抽出物について、上記の方法で中和し、pH を測定したところ、いずれの場合も pH は 7.4 ± 0.1 の範囲内になり十分な精度で中和できることが明らかとなった。

4. 定量の再現性及び回収率

再現性の検討のため、ラット肝ホモジネートを凍結

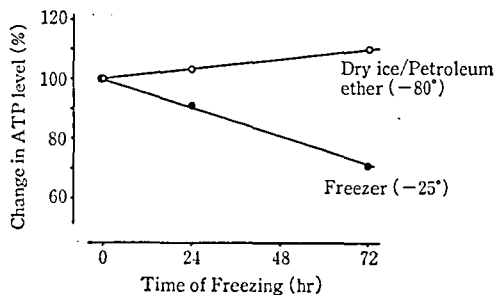


Fig. 3. Change of rat liver ATP levels in two conditions

し、同一のプールについて 6 回の定量を行ったところ、 $597 \pm 6.9 \mu\text{g/g}$ (SE) であり SE は平均値の約 1% と良好な再現性を示した。

また上記のホモジネート 1 g に $1 \mu\text{mol}$ の ATP を添加した時の回収率は 98~103% であった。

5. ドライアイス・石油エーテル (CO₂-PE) 中における組織内 ATP の経時変化

組織を CO₂-PE (-80°) で凍結保存した時の ATP 濃度の経時変化を知るため、7 葉のラット肝について、凍結直後、24 時間及び 72 時間後にそれぞれの肝葉の一部を取り ATP 濃度を測定した。対照として、冷凍庫 (-25°) で保存した場合についても測定した。その結果を Fig. 3 に示した。

即ち、対照群 (-25°) では ATP 濃度の低下が著しく、3 日後では 21% に達した。しかし、実験群 (-80°) では低下が認められず、むしろ微増する傾向を示した。

6. 屠殺方法の影響

ATP は種々の酵素系に共役しており、摘出までの操作を考慮する必要があると考えられる。そこで、関係する酵素が多いと思われる肝を用いて検討した。

250 g 前後の雄ラット 3 匹を一群として、それぞれエーテル麻酔、頸椎脱臼及び断頭により屠殺し、肝の ATP 濃度を測定した。平均値と SE はそれぞれ 700 ± 50 , 1090 ± 144 及び $1028 \pm 125 \mu\text{g/g}$ であり、断頭による方法が値が高く誤差も小さかった。

考 察

Luciferin-Luciferase 法は ATP に高い特異性を持ち、操作が単純である特徴⁹⁾ を有する。しかしながら組織中の ATP レベルの測定にはさまざまな困難がある。その第一は、反応速度を測定する方法であるため、種々の共存物質⁹⁾、特に組織内阻害物質の存在や測定時間の影響⁹⁾ を受けやすいこと。第二は ATP が組織内の多くの酵素の基質であり、更に自己分解も起こしやすく、その保存が困難であることである。

今回著者らは、第1の点に関しては、反応を高濃度のリン酸イオンの存在下で行うことにより改善をはかった。即ち、リン酸濃度を 40 mM とし、発光強度の経時変化を抑制し、操作上の障害を除いた (Fig. 1)。この時、発光強度はリン酸の存在しない場合に比べ 1/2 程度に低下した (Fig. 1) が、組織中の ATP 濃度は一般に 100 $\mu\text{g/g}$ 以上と高く⁷⁾、障害にはならなかった。また、反応液中でのリン酸濃度を 2 mM 増加させても発光強度に変化を認めなかったことは試料中に 1800 mM のリン酸濃度まで許容されることを示している。リン酸濃度は血清中で 3~5 mM である⁸⁾ことから、組織中のリン酸濃度は充分許容範囲内にあるものと推定される。このことは、肝ホモジネートに対する ATP 添加回収実験で良好な成績を得たことからも首肯される。

第2点の保存の問題では、ドライアイス・石油エーテル中に組織を保存することが可能であることが明らかとなった。この方法は抽出後中和し保存する Strehler の方法⁸⁾に比べ、はるかに操作上有利である。しかし、24時間で3%の測定値の増加を示す (Fig. 3) ことから、長期間の保存には、更に検討を要するものと思われる。測定値の微増の原因については不明であるが、水分の喪失と関係があるのかも知れない。

これらの他、ホモジナイズに高速回転の Ultra-tur-rax を用い、また酸の中和に一定量のリン酸ナトリウム溶液を用いることにより、より迅速な定量が可能になった。

また、この定量法により求めた ATP 濃度は雄ラッ

ト肝で 1028 μg (約 2 μmol)/g であったが、これは他の研究者の測定値⁷⁾よりやや低い。しかし彼らの値が他の Nucleotide triphosphate による正誤差を 10~15% 含んでいる^{6,7)}ことを考慮するとよく一致する。

以上の結果より、本法は組織内 ATP に特異性が高くかつ迅速な定量法であると考えられる。

文 献

- 1) A. Mancini, B. Galantini and G. Giusti: *Enzymol. Biol. Clin.*, **6**, 279 (1966)
- 2) 佐藤温重, 小沢和子: ATP の新しい測定法とその応用 (講演要旨集), アムコ, 12 (1978)
- 3) 伊丹孝文, 加納晴三郎: 日薬理誌, **79**, 357 (1982)
- 4) W. Lamprecht and I. Tautschold: *Method of Enzymatic Analysis* (ed. by H. U. Bergmeyer), Academic Press, vol. 4, p. 2101 (1974)
- 5) D. Jaworek, W. Gruber and H. U. Bergmeyer: *Method of Enzymatic Analysis* (ed. by H. U. Bergmeyer) Academic Press, vol. 4, p. 2097 (1974)
- 6) W. Gruber, H. Möllering and H. U. Bergmeyer: *Method of Enzymatic Analysis* (ed. by H. U. Bergmeyer) Academic Press, vol. 4, p. 2078 (1974)
- 7) D. H. Williamson and J. T. Brosnan: *Method of Enzymatic Analysis* (ed. by H. U. Bergmeyer) Academic Press, vol. 4, p. 2266 (1974)
- 8) B. L. Strehler: *Method of Enzymatic Analysis* (ed. by H. U. Bergmeyer) Academic Press, vol. 4, p. 2112 (1974)
- 9) 井上 硬, 市原 硬, 吉川春寿編: 臨床生化学, vol. 1, 朝倉書店 (1958)

妊娠ラット及び妊娠ウサギに対する浸透圧ミニポンプによる 内毒素の持続投与の影響

江馬 真・伊丹孝文・加納晴三郎

Effects of Continuous Administration of Endotoxin by Osmotic Minipump on Pregnant Dams and Their Offspring in Rats and Rabbits.

Makoto EMA, Takafumi ITAMI and Seizaburo KANOH

Fetal toxicities induced by continuous subcutaneous administration of endotoxin (LPS) were studied in Wistar rats and Dutch rabbits by using the osmotic minipump. The osmotic minipump can deliver the prefilled solution at its flow rate of 1 μ l/hr for 170 hours. The minipump prefilled with LPS solution (1 mg/ml) or sterile saline was implanted subcutaneously on day 8 of pregnancy in rats and rabbits. The effects on fetal toxicities were examined at day 20 of pregnancy in rats and day 29 in rabbits. Body temperature of pregnant rats decreased after implantation of minipump, especially at 1 and 24 hours later in both groups. Increased body temperature of pregnant rabbits was observed after the treatment until 6 hours later but not at 24 hours later in LPS-treated group. No maternal toxicities including death, abortion and the decreased body weight gain were observed in any group of rats and rabbits. There were no differences in fetal and placental weights and numbers of implantations, resorptions and live fetuses between LPS-treated and control groups of both species. No external anomalies in fetuses of rats and rabbits were observed in both groups. Skeletal and internal examinations of fetuses revealed no effects of LPS in both species. From these results, it is concluded that continuous administration of LPS to pregnant dams induced no fetal toxicities in rats and rabbits.

(Received May 31, 1982)

ま え が き

浸透圧ミニポンプは Fig. 1 に示した如き構造をもつものであり、これを体内に埋め込むと充填液が一定の流速で体内に流出するように設計されたカプセルである。したがって、薬液を持続的に体内に保持させてその作用を観察するためには、手術による侵襲を除けば最適な方法であるといえる。

Alzet® 浸透圧ミニポンプはこの目的のために作られた器具の一つであり、1 μ l/hr の流速で170時間持続的に作動するとされている。

著者らは今回、ミニポンプに細菌内毒素 (Lipopolysaccharide: LPS) を充填し、従来 LPS を注射器で投与することのみによって、さまざまな立場から観察されて来た反応系と、上述のように持続的に LPS を投与した場合とにどのような差があるかを明らかにしようと試みた。対象動物としてラット及びウサギ、特に妊娠動物を用いて、細菌感染又はそれによる LPS が妊娠母体とその胎仔にどのような影響を及ぼすかという点を指標として実験を行い、興味ある成績が得られたので以下に報告する。

実験材料と方法

1. 使用動物

Wistar ラット及び Dutch ウサギを使用した。室温 $24 \pm 1^\circ$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ に調整した動物室にて固型飼料 (ラット: 日本農産工業ラボ MR-スタンダード、ウサギ: オリエンタル酵母工業 GC-4) と水道水を自由に与えて飼育した。

体重 260—290 g の成熟処女ラットを雄ラットと1対1で夕刻より同居させ、翌朝膣栓及び膣内に精子を認めたものを交配成立とみなし、この日を妊娠0日と定め以後個別ケージにて飼育した。

生後25—30週の雌ウサギで外部生殖器官の腫脹により交配適期とみられるものを雄ウサギと同居させ、交尾が観察され、膣内に精子の認められたものを交配成立とみなし、この日を妊娠0日と定め以後個別ケージにて飼育した。

妊娠ラット及び妊娠ウサギの体重測定及び一般症状の観察は毎日行った。

2. 細菌内毒素 (LPS)

大腸菌 UKT-B (阪大微研株) より常法¹⁾により分

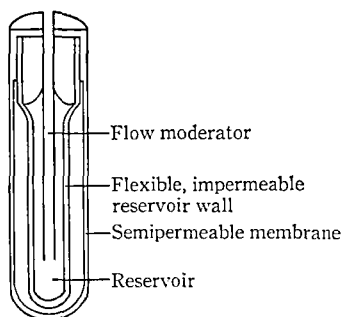


Fig. 1. Cross section of Alzet® osmotic minipump

離精製を行った。本 LPS のウサギ（日本白色種）に対する量小発熱量（ 0.6° 上昇させる量）は $0.01 \mu\text{g}/\text{kg}, \text{i.v.}$ であった。

3. LPS の投与

LPS は $1 \text{ mg}/\text{ml}$ の割に滅菌生理食塩水に溶解し、Alzet® osmotic minipump model 1701 (Alza Corporation, Palo Alto, California) に充填し、一方、対照群として滅菌生理食塩水を充填して、妊娠 8 日のラットにエーテル麻酔下で、また、妊娠 8 日のウサギに無麻酔下で背部皮下に埋設して薬液を持続的に皮下投与した。

ミニポンプは Fig. 1 に示したように、長さ 25 mm 、直径 6 mm のカプセル状で、容量 $170 \mu\text{l}$ の薬液リザーバー、これを包むセルローズエステルからなる外筒メンブラン及び薬液排出用のフローモデレーターより構成されている。ミニポンプは動物体内に埋め込まれると、外筒メンブランを通して取り込んだ体内水分が薬液リザーバーに水圧として作用し、リザーバー内の薬液をフローモデレーターを通じて $1 \mu\text{l}/\text{hr}$ の一定の流速で 170 時間にわたって動物体内に持続的に流出させるように設計されている。

4. 体温の測定

ラットの直腸温の測定は互換形式 H 型テルモファイナー（仁丹テルモ）によって行った。ミニポンプ埋設前に 15 分毎に直腸温を 5 回測定し平均体温を平常体温とし、ミニポンプを皮下に埋め込んだ後 1 時間毎に直腸温を 6 時間まで測定し、24 時間後に再び測定した。

ウサギの直腸温はサーミスター式体温自動記録装置（飯尾電気）により、手術前 2 時間から記録した。

5. 妊娠末期の母体及び胎仔の観察

ラットは妊娠 20 日に頸椎脱臼により、ウサギは妊娠 29 日に耳静脈より空気を注入して屠殺した。母体を開腹して着床数、吸収胚数及び胎仔の生死数などを記録した。胎仔は摘出し体重測定、雌雄の判別、外表異常の有無の観察を行った。なお、ウサギ胎仔の雌雄の判

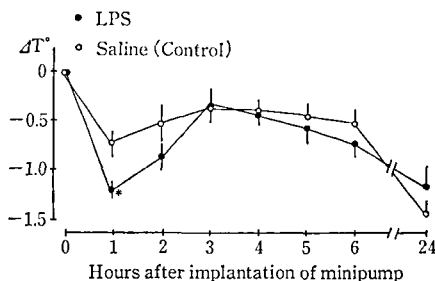


Fig. 2. Body temperature of pregnant rats given LPS by osmotic minipump

LPS ($1 \mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{hr}$) or saline ($1 \mu\text{l}/\text{hr}$) was subcutaneously administered for 170 hours by osmotic minipump implanted on day 8 of pregnancy. Each point with vertical bar represents mean $\pm$ S.E.

* $p < 0.05$

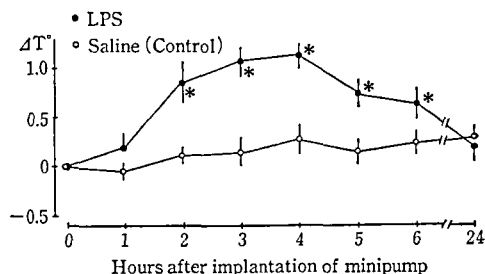


Fig. 3. Body temperature of pregnant rabbits given LPS by osmotic minipump

LPS ($1 \mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{hr}$) or saline ($1 \mu\text{l}/\text{hr}$) was subcutaneously administered for 170 hours by osmotic minipump implanted on day 8 of pregnancy. Each point with vertical bar represents mean $\pm$ S.E.

* $p < 0.05$

別は実体顕微鏡下にて内部生殖器の観察によって行った。

ラット胎仔は 1 腹の胎仔を 2 分して、約半数を Bouin 液に固定し、Wilson²⁾ 法により内臓異常の有無を調べた。残りの半数の胎仔は 95% アルコールにて固定し、Dawson³⁾ 法により透明骨格標本作製し、骨格異常の有無を調べた。

ウサギ胎仔は全例について、脳、胸部内臓、肝、腎及び生殖器などの異常の有無を調べた後、95% アルコールに固定しラットと同様にして骨格異常の有無を調べた。

6. 統計処理

胎仔の体重、胎盤重量及び異常胎仔の出現頻度などについては 1 腹当たりの値を単位として順位和検定⁴⁾又は t 検定を行った。

Table 1. Observations of dams and fetuses in rats given LPS by osmotic minipump

	Treatment ^a	
	LPS	Saline (Control)
No. of dams	4	6
Body weight gain (g, M±S.D.)	105±10	110±8
No. of implants	49	70
(M±S.D.)	(12.3±1.5)	(11.7±1.6)
No. of resorptions	3	4
No. of dead fetuses	0	0
No. of live fetuses (Male/Female)	18/28	36/30
(M±S.D.)	(11.5±1.0)	(11.0±1.7)
Fetal weight (g, M±S.D.)		
Male	4.45±0.27	4.18±0.24
Female	4.16±0.28	4.00±0.20
Placental weight (g, M±S.D.)	0.49±0.05	0.46±0.03

^a LPS (1 µg/µl/hr) or saline (1 µl/hr) was subcutaneously administered for 170 hours by osmotic minipump implanted on day 8 of pregnancy.

Table 2. External, skeletal and internal examinations of rat fetuses from the dams given LPS by osmotic minipump

	Treatment ^a	
	LPS	Saline (Control)
External examination		
Anomalies/Examined fetuses	0/46	0/66
Skeletal examination		
No. of fetuses examined	25	36
Cervical rib	1	0
Shortened 13th rib	2	0
14th rib	0	1
Asymmetry of sternocbrae	0	1
No. of caudal vertebrae (M±S.D.)	5.54±0.37	5.17±0.51
Internal examination		
No. of fetuses examined	21	30
Dilatation of renal pelvis	1	0

^a See Table 1.

実験結果

1. 妊娠ラット及び胎仔への影響

妊娠8日に LPS 溶液を充填したミニポンプを皮下に埋め込まれたラットの体温の変化を Fig. 2 に示した。処置後1時間の LPS 投与群の体温は対照群よりも有意に下降したほかは、両群とも同様な体温の変化がみられた。

両群のラットを妊娠20日に屠殺し、胎仔への影響を検討した結果を Table 1 に示した。すなわち、母体

重増加、着床数、子宮内死亡率、生存胎仔の数及び体重、胎盤重量に LPS 投与群と対照群との間に差は認められなかった。

両群の生存胎仔の外表、骨格及び内臓検査の結果を Table 2 に示した。外表異常例はいずれの群にも観察されず、骨格検査でも変異例が両群に散見されただけであり、化骨の進行度として両群の胎仔の尾椎骨数を比較したが、差はみられなかった。また、内臓検査では LPS 投与群に腎盂拡張が1例認められただけであった。

Table 3. Observations of dams and fetuses in rabbits given LPS by osmotic minipump

	Treatment ^a	
	LPS	Saline (Control)
No. of dams	5	6
Body weight of dams (g, M±S.D.)		
Day 0 of pregnancy	1804±222	1805±153
Day 29 of pregnancy	2056±150	2070±106
Gain	252±104	265±115
No. of corpora lutea	28	37
(M±S.D.)	(5.6±1.1)	(6.2±1.5)
No. of implants	20	29
(M±S.D.)	(4.0±1.4)	(4.8±2.6)
No. of resorptions	3	4
No. of dead fetuses	0	0
No. of live fetuses (Male/Female)	8/9	9/16
(M±S.D.)	(3.4±1.7)	(4.2±2.6)
Fetal weight (g, M±S.D.)		
Male	35.2±5.1	32.4±5.4
Female	33.4±2.4	34.5±5.3
Placental weight (g, M±S.D.)	4.47±0.81	4.36±1.04

^a LPS (1 µg/µl/hr) or saline (1 µl/hr) was subcutaneously administered for 170 hours by osmotic minipump implanted on day 8 of pregnancy.

Table 4. External, skeletal and internal examinations of rabbit fetuses from the dams given LPS by osmotic minipump

	Treatment ^a	
	LPS	Saline (Control)
External examination		
Anomalies/Examined fetuses	0/17	0/25
Skeletal examination		
No. of fetuses examined	17	25
Fusion of sternebrae	1	0
13th rib	13	14
Extra lumbar vertebra	2	1
Bipartite sternebrae	4	9
Asymmetry of sternebrae	0	1
No. of caudal vertebrae (M±S.D.)	14.52±0.17	14.94±0.55
Internal examination		
Anomalies/Examined fetuses	0/17	0/25

^a See Table 2.

2. 妊娠ウサギ及び胎仔への影響

妊娠8日にLPS溶液を充填したミニポンプを背部皮下に埋め込まれたウサギの体温の変化はFig. 3に示したように、LPS投与群で手術後1時間より体温が上昇し始め、4時間では体温の上昇度は約 1.1° となり、6時間まで体温の上昇がみられた。しかし、24時間後では平常体温に回復していた。対照群では体温の変化は認められなかった。

LPS投与群及び対照群のウサギを妊娠29日に屠殺し、胎仔への影響を検討した結果をTable 3に示した。母体重増加、黄体数、着床数、生存胎仔数、胎仔体重、胎盤重量などに両群の間の差は認められなかった。

両群の生存胎仔の外表面、骨格及び内臓検査の結果をTable 4に示した。外表面異常はいずれの群にも認められなかった。骨格検査では胸骨核の癒合がLPS投与群に1例観察され、また、13肋骨と胸骨核の分葉が両群に高頻度に見られ、そのほか過剰腰椎、胸骨核の非対称も観察されたが、これらのいずれの出現頻度にも両群間の差はなかった。化骨進行度として両群の尾椎骨数を比較したが、差は認められなかった。また、内臓異常はいずれの群にも観察されなかった。

考 察

妊娠ラットにLPSを持続的に皮下投与したときの体温の変化はFig. 2に示したように、全般的に下降したが、対照群とはほぼ同様の体温の変化がみられ、LPSの持続投与による影響は認められなかった。LPS投与によるラット体温の変化に関しては相反する成績が報告されている。すなわち、LPSの静脈又は腹腔内投与により体温が下降したという報告⁵⁻⁹⁾もあるが、また一方、体温が上昇したという報告¹⁰⁻¹²⁾もある。これらの結果の不一致はラットにおける体温測定の問題を示すものと考えられる。今回の実験においてもラットの体温は不安定であり、個体差も大きかった。また、手術の侵襲及びエーテル麻酔の体温への影響も無視することはできない。LPS投与によるラット体温の変化については、持続投与をも含めて更に検討を要する問題である。

一方、ウサギではLPS投与群で手術後1—6時間に体温の上昇がみられたが、24時間後には平常体温に回復していた(Fig. 3)。LPSを頻回投与されたウサギでは発熱反応が低下し、耐性現象を示すことが知られており¹³⁾、今回の実験結果もLPSの持続投与による発熱反応の耐性化を示唆している。

ラットの妊娠12日に $10\mu\text{g/kg}$ 以上のLPSを1回

静注したとき著しい胎仔致死作用が認められ¹⁴⁾、ウサギでは妊娠中期以後にLPS $10\mu\text{g/kg}$ を3日間連続皮下投与したとき胎仔死亡の増加や胎仔体重の低下の傾向がみられたこと¹⁵⁾が報告されている。一方、今回の実験では、ラット及びウサギともに投与量は $24\mu\text{g/body/day}$ であり、ラットでは $85.1\mu\text{g/kg/day}$ 、ウサギでは $13.5\mu\text{g/kg/day}$ に相当するが、ラット及びウサギともに妊娠母体及び胎仔に対する毒性はみられなかった(Table 1-4)。このような結果の相違は投与方法又は投与量の差によるのかも知れない。しかしながら、LPSの頻回投与により発熱反応のほか、致死作用、白血球減少作用、Shwartzman現象惹起作用などのLPSの種々の作用にも耐性現象の認められること¹⁶⁾が知られており、今回の実験では、妊娠8日からLPSの持続投与を開始したためにLPSの胎仔への作用が著明に発現する妊娠中期までに、母体又は胎仔にLPSに対する耐性現象が生じて、LPSの胎仔毒性が発現しなかったものと考えられる。

浸透圧ミニポンプは容量が小さく、充填液の溶解度によって投与量が制限されるために、投与量の面からは皮下投与方法として用いるよりも、ミニポンプにカニューレを取り付けて静脈内あるいは脳内に投与する方法がより適しているのかも知れない。ミニポンプの利点は長時間にわたって血中や組織内の薬物濃度を一定に保たせ得ることであり、細菌感染の実験モデル動物を作製することも可能である。

細菌感染においては生体は長時間LPSにさらされるので、LPSの本質的な作用は持続投与によって解明されるべきである。今後更に、LPSの妊娠動物に対する作用以外の持続投与による影響についても検討を進める予定である。

結 論

Alzet® 浸透圧ミニポンプは $1\mu\text{l/hr}$ の流速で170時間にわたって持続的に薬液を動物体内に流出するように設計されたものである。LPS溶液(1mg/ml)を充填したミニポンプを妊娠8日のラット及びウサギの皮下に埋め込み、LPSを持続的に皮下投与して妊娠母体及び胎仔への影響について検討し、以下の成績を得た。

1) LPS投与群の妊娠ラットの体温は下降したが、対照群でもほぼ同様の体温の変化がみられた。

2) LPS投与群の妊娠ウサギの体温はミニポンプ埋設後6時間まで上昇したが、24時間後には平常体温に復した。

3) LPS投与群のラット及びウサギともに母体の

死亡及び流産はみられず、妊娠中の母体重の増加にも投与による影響は認められなかった。妊娠末期に母体を屠殺して胎仔への影響を検討したところ、ラット及びウサギともに吸収胚数、生存胎仔数、胎仔体重及び胎盤重量に LPS 投与群と対照群との間の差は認められず、いずれの群にも外表異常胎仔は観察されなかった。胎仔の骨格及び内臓検査でもラット及びウサギともに LPS 投与による影響はみられなかった。

文 献

- 1) O. Westphal and O. Lüderitz: *Angew. Chem.*, **66**, 407 (1954)
- 2) J.G. Wilson: *Teratology: Principles and Techniques*, J.G. Wilson and J. Warkany eds., p. 262 (1965), Univ. of Chicago Press, Chicago
- 3) A.B. Dawson: *Stain Technol.*, **1**, 123 (1926)
- 4) F. Wilcoxon and R.A. Wilcox: 簡便統計手法, 佐久間昭訳, (1965) 日本レダリー, 東京
- 5) J.E. Holmes, and N.E. Miller: *J. Exp. Med.*, **118**, 649 (1963)
- 6) J.P. Filkins and N.R. DiLuzio: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **129**, 724 (1968)
- 7) R.F. Kampschmidt and H.F. Upchurch: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **131**, 864 (1969)
- 8) L.A. Pohorecky, R.J. Wurtman, D. Taam, and J.F. Fine: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **140**, 739 (1972)
- 9) W. Feldberg, and P.N. Saxena: *J. Physiol.*, **249**, 601 (1975)
- 10) C.A. Winter and G.W. Nuss: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **5**, 247 (1963)
- 11) 滝野勝行, 山田 肇: 日薬理誌, **61**, 192 (1965)
- 12) M. Székely and Z. Szelényi: *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.*, **53**, 265 (1979)
- 13) S. Kanoh, A. Nishio and H. Kawasaki: *Biken J.*, **20**, 69 (1977)
- 14) S. Kanoh and M. Ema: *Cong. Anom.*, **20**, 151 (1980)
- 15) 加納晴三郎, 江馬 真, 川崎浩之進, 西尾 晃: 第27回毒素シンポジウム予講集, 61 (1981)
- 16) H. Rašková and J. Vaněček: *Pharmacol. Rev.*, **16**, 1 (1964)

1-フェニルアゾ-2-ナフトール類の ^{13}C -NMR スペクトル による構造解析

宮原 誠

Structure Chemistry of 1-Phenylazo-2-naphthols —A ^{13}C -Nuclear Magnetic Resonance Study

Makoto MRYAHARA

Carbon-13 magnetic resonance spectra of several 1-phenylazo-2-naphthols in chloroform- d_1 were observed. Substitution effects on the chemical shifts were examined. The signals due to naphthalene ring show good correlation with σ_p and σ_p . While the signals due to benzene ring show good correlation with σ_R and σ_R . Solvent effects on the chemical shifts of 1-phenylazo-2-naphthols in the mixtures of acetic acid and chloroform- d_1 were also examined. No remarkable effect was observed.

(Received May 31, 1982)

ま え が き

前報¹⁾において 1-フェニルアゾ-2-ナフトール類のジメチルスルホキシド (DMSO) 中での可視吸収スペクトル, 赤外吸収スペクトル, 及び ^1H -NMR スペクトルについて検討しそれぞれのスペクトルデータに対する置換基効果, 並びに互変異性との関連性について報告した。

1-フェニルアゾ-2-ナフトール類は, Fig. 1 に示す互変異性を有しその平衡はフェニル基上の置換基効果を受けることが報告されている²⁾。更にこの平衡は溶媒効果を受けて変化するので, この性質を利用して, アゾ/ヒドراز型を計算する試みがなされている³⁾。

今回, 1-フェニルアゾ-2-ナフトール類の ^{13}C -NMR スペクトルについてその帰属を行ない, 各共鳴シグナルに対するフェニル基上の置換基による影響について検討したので報告する。

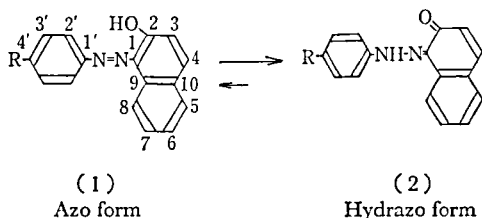


Fig. 1. Tautomerism of 1-Phenylazo-2-naphthols

実 験

試料: 既報のとおり合成し¹⁾ たものを用いて, 同様に測定用試料を調整した。濃度は約 0.5 mmol/2 ml で, 市販の重クロロホルムをそのまま用いた。なお, 化学シフトに対する濃度効果は, 0.5~0.25 mmol/2 ml の範囲でみられなかった。

^{13}C -NMR の測定条件: JEOL-FX200 を 50.1 MHz で運用した。測定周波数範囲, 200 ppm; サンプリングポイント, 16K; パルス角, 45°; 積算回数約 5000 回; 測定温度, 室温; フィルターの幅, 5000 Hz; デジタル分解能, 0.01 ppm。

結 果・考 察

1. 1-フェニルアゾ-2-ナフトール類の ^{13}C -NMR スペクトル

1-(4-クロロフェニルアゾ)-2-ナフトールのプロト

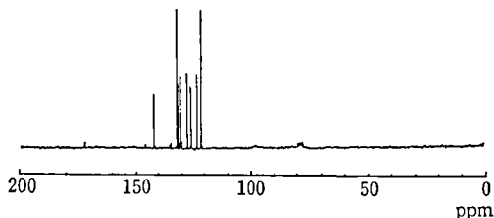


Fig. 2. Wide-band ^1H decoupled ^{13}C -NMR spectrum of 1-(4-chlorophenylazo)-2-naphthol

Table 1. ^{13}C Chemical Shifts of 1-Phenylazo-2-naphthols 1 (Naphthalene Ring)

R	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CH_3O	133.32	161.40	121.40	136.66	124.70	122.16	128.27	128.10	126.30	129.53
CH_3	133.62	167.87	121.70	138.68	125.30	123.89	128.56	128.49	128.12	129.87
H	133.66	171.38	121.80	139.85	125.69	124.70	128.83	128.58	128.15	130.16
F	133.42	165.87	121.67	138.63	125.33	123.21	128.63	128.53	128.24	129.94
Cl	133.18	170.09	121.82	139.94	125.88	124.25	128.94	128.70	128.31	130.33
CN	133.18	178.55	122.33	142.86	127.22	126.03	129.05	129.61	128.56	131.58
NO_2	— ^{a)}	188.74	122.55	143.32	127.54	126.27	129.14	129.75	— ^{a)}	— ^{a)}

a) not observed in our experimental conditions

Table 2. Correlation Coefficients of SCS^{a)} with σ_p^+ and σ_p° (Naphthalene Ring)

parameter ^{b)}	2	3	4	5	6	7	8	9	10
σ_p^+	0.9296	0.9175	0.9849	0.9744	0.9519	0.9781	0.9637	0.8452	0.9335
σ_p°	0.8950	0.9370	0.9280	0.9585	0.8453	0.8831	0.9538	0.6353	0.9279

a) substituent-induced ^{13}C -chemical shiftb) see ref¹⁾.

ン完全デカップルスペクトルを1つの例として Fig. 2 に示す。フェニル基及びナフタレン環由来のシグナルが、低磁場領域に観測された。

各共鳴シグナルの帰属の結果を Table 1 に示す。これらの帰属は、シグナルの吸収位置と強度「化学シフトの加減性の経験則」、他のナフタレン環をもつ化合物についての共鳴シグナルの帰属と矛盾しない⁴⁾。

2. 各共鳴シグナルに対する置換基効果

前報¹⁾で、可視吸収スペクトルのデータと各種置換基定数との相関性について検討したが、今回、同様に ^{13}C -NMR スペクトルについておこなった。ナフタレン環の各共鳴シグナルについては、前報でとり上げた十種の置換基定数*のうち、良い相関が見られたのは、 σ_p° と σ_p^+ で他のパラメータについては有意な相関が認められなかった。上記二種の置換基パラメーターとナフタレン環の各共鳴シグナルとの相関係数を Table 2 に示す。

いずれの共鳴シグナルとも、二種のパラメーターと

良い相関関係がみられ、フェニル基の4位の置換基効果がナフタレン環全体に及んでいることが判明した。

その置換基をメトキシ基からニトロ基へと変えるとき、その化学シフトが最も大きく変化する位置はナフタレン環の2位と4位で、それぞれ、27及び7 ppm の変化である。これは、Fig. 1 に示す平衡の位置が置換基によって異なり、二つの異性体の比率が変化するためという、ナフタレン環自身の構造的な変化に起因するの、あるいは、フェニルアゾ基としての置換基効果のいずれか、あるいは両方が原因と考えられる。ナフタレン環の他の位置(3, 5, 6, 7, 8, 9, 10位)の炭素の共鳴シグナルについては、置換基効果は2-3 ppm 以内であったが、 σ_p° や σ_p^+ に対して非常に良い相関係数を示すことから、わずかながらフェニル基のパラ位置置換基の影響を受けていると思われる。また1位の炭素については、ほぼ一定で、その化学シフトの変化は実験誤差と同程度であった。

以上のように ^{13}C -NMR スペクトルにおいても、フェニル基上の置換基によりナフタレン環そのものも置換基効果を受けるが、この効果の影響は、前報で報告した可視吸収スペクトルのデータに与えるような大きなものではない。

次にフェニル基上の置換基を種々導入した場合のベンゼン環の炭素の各共鳴シグナルに対する置換基効果を検討した。各共鳴シグナルに対する帰属は「化学シフトに対する加減性の経験則」を用いて行い、その結果を Table 3 に示す。

* 注: σ_p : Hammett's constant for para substitution; σ_p° : normal substitution constant for para substitution; σ_p^+ : electrophilic substituent constant; σ_I : Taft's inductive parameter; σ_R° : Taft's normal resonance parameter; σ_R : Taft's resonance parameter; σ_R : Taft's resonance parameter for para substitution; X : electronegativity of substituent; σ_x : Yukawa-Tsuno's resonance parameter; σ_I : Yukawa-Tsuno's inductive parameter. 数値は文献1の Table 2 を参照。

フェニル基の 1' 位の炭素の共鳴シグナルに対しては、前報で報告した ^1H -NMR スペクトルでの活性プロトンに対する置換基効果と同様に、 $\sigma_{\text{R}}^{\circ}$ 、及び σ_{R}^{+} との高い相関係数 ($\sigma_{\text{R}}^{\circ}$ に対して、 $r=0.9301$ 、 σ_{R}^{+} に対しては $r=0.9066$) が得られた。しかしながら、他の位置の炭素の共鳴シグナルに対しては、いずれの置換基パラメーターとも有意な相関は得られなかった。

このように、ナフタレン環とベンゼン環とでは、その置換基効果の受け方が異なり、前者では $\sigma_{\text{p}}^{\circ}$ や σ_{p}^{+} 、後者では $\sigma_{\text{R}}^{\circ}$ や σ_{R}^{+} との間に良い相関関係を示す。このことは、ナフタレン環はフェニル基の 4' 位の置換基効果を直接ではなく間接的に受けており、いいかえれば、ナフタレン環の炭素の共鳴シグナルはフェニルアゾ基 (実際には、大部分フェニルヒドラゾ基として存在すると考えられるが習慣上ここではフェニルアゾ基と呼ぶ。) の電子供与性の変化によって影響されるのではなく、むしろアゾ-ヒドラゾの平衡の変化によっていることを示すものである。このことは、可視吸収スペクトルの吸収極大波長が $\sigma_{\text{p}}^{\circ}$ や σ_{p}^{+} と高い相関をもつこと、及び、ナフタレン環の 2 位の炭素の化学シフトと吸収極大波長 ($\lambda_{\text{max}} 480\text{--}510\text{ nm}$) との間に良い相関関係 ($r=0.9465$) があることから支持される。

しかしながら、フェニルアゾ基の直接的な電子的な影響をまったくナフタレン環は受けていないわけではない。

Table 3. ^{13}C Chemical Shifts of 1-phenylazo-2-naphthols 2 (Phenyl Ring)

R	1	2	3	4
CH_3O	141.81	121.99	114.77	160.64
CH_3	143.91	119.32	130.19	138.41
H	145.12	118.75	129.58	127.49
F	144.17	121.27	116.53	162.52
Cl	144.17	120.07	129.80	133.50
CN	146.63	117.39	133.72	118.00
NO_2	148.09	125.71	116.71	143.42

1-フェニルアゾ-2-ナフトール類のなかで、すべての分子がヒドラゾ型をとっているものがあるとすれば、その 2 位の炭素の化学シフトの位置は 1,2-ナフトキノンのそれ (180.125 ppm) に近いと考えられる。しかも、フェニルアゾ基の影響がまったくないとすれば、その仮想の 1-フェニルアゾ-2-ナフトールの 2 位の炭素の共鳴シグナルは、1,2-ナフトキノンの 2 位のシグナルより低磁場に観測されることはないと考えられる。

しかしながら、実際には 1-(4-ニトロフェニルアゾ)-2-ナフトールの 2 位の共鳴シグナルは 188.74 ppm で、約 8 ppm だけ 1,2-ナフトキノンのより低磁場に観測された。これは、4-ニトロフェニルアゾ基 (4-ニトロフェニルヒドラゾ基) の電子的影響と考えられる。

また、活性プロトンの化学シフトと ^{13}C -NMR でのフェニル基上の 1' 位の炭素との間にも、比較的良好な相関がみられる ($r=0.8269$) ことから、よりフェニル基上の置換基効果を受けやすいヒドラゾ型の構造寄与が大きいと考えられる。

3. 溶媒効果について

重クロロホルムと酢酸を用い、その混合比を変えて、 ^{13}C -NMR スペクトルを測定した。その結果を Table 4 に示す。

このような溶媒効果はナフタレン環の 2 位炭素がもっとも大きく受けたが、その他の共鳴シグナルはほとんど影響を受けていない。このように、極性官能基のついた炭素について (すなわち 2 位の炭素)、溶媒の極性の変化につれて、連続的な化学シフトの変化がみられないのは、酸濃度の変化により、プロトンネーションがおきてくるためと考えられるが、さらに検討が必要である。

結 論

1-フェニルアゾ-2-ナフトール類の ^{13}C -NMR スペクトルは Fig. 1 に示す互変異性体の混合物であるので、その共鳴シグナルの位置はそれら二つの異性体の共鳴シグナルの重心に観測される。1-フェニルアゾ-2-ナフトール類に対するフェニル基上の置換基効果は、

Table 4. Solvent effects on the ^{13}C Chemical Shifts of 1-Phenylazo-2-naphthols

$\text{CH}_3\text{COOH}:\text{CDCl}_3$ (%)	Naphthalene Ring										Phenyl Ring			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1'	2'	3'	4'
0 : 100	133.66	171.28	121.79	139.84	125.69	124.69	128.83	128.58	128.14	130.16	145.12	118.75	129.53	127.49
20 : 80	133.31	172.72	121.27	140.83	125.48	124.29	128.40	128.71	127.84	129.69	143.89	118.13	129.27	127.13
50 : 50	133.38	172.77	121.39	140.83	125.55	124.43	128.47	128.79	127.89	129.78	143.97	118.21	129.35	127.21
80 : 20	133.24	177.89	121.22	140.80	125.43	124.26	128.35	128.67	127.77	129.59	143.75	118.04	129.58	127.06

その互変異性体のアゾ/ヒドロゾ比を変化させる。主としてこれに起因して、ナフタレン環の ^{13}C -NMR スペクトルの共鳴シグナルはシフトをおこしている。その一方で、フェニル基由来の共鳴シグナルは直接的な置換基効果を受けており、互変異性に伴う影響はほとんどないと考えられる。

謝辞：本研究に際し、御指導下さった中館正弘室長に感謝する。

文 献

- 1) 宮原 誠, 中館正弘, 衛生試報, **99**, 17(1981)
- 2) 番匠吉衛, 有機合成化学, **27**, 325 (1969)
- 3) 安部和久, 広田 稔, 有機合成化学, **38**, 258 (1980)
- 4) M. Suzuki, Y. Sasaki and M. Sugiura: *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 1797 (1979)
- 5) 日本化学会編, 新実験化学講座, **13**, 有機化合物の合成と反応 **V**, p. 2608 (1978), 丸善.
- 6) 稲本直樹, 増田昭三, 化学の領域, **33**, 4(1979)

ワルファリンカリウム錠の自動含量均一性試験

柴崎利雄・妹尾真砂子・江島 昭

Automated Content Uniformity Test of Warfarin Potassium Tablets

Toshio SHIBAZAKI, Masako SENOO and Akira EJIMA

An automated content uniformity test of warfarin potassium tablets has been carried using solid-prep-sampler, peristaltic pump, and UV-spectrophotometer.

One warfarin potassium tablet and 100 ml of 0.01 M sodium bicarbonate solution was added into the vessel of solid-prep-sampler, and warfarin was extracted with shattering, automatically. The extract was carried to UV-spectrophotometer cell from well with peristaltic pump, and the absorbance was determined at 308 nm.

In the test of the tablets, average value of the content and its CV were 103.8% and 1.4%, respectively.

(Received May 31, 1982)

固形製剤(錠剤)の含量均一性試験法はすでに米国薬局方, 英国薬局方にあるが, 第十改正日本薬局方にも新設された。これにともない個々の製剤中の成分含量に関してより注目されるようになった。この試験には少なくとも同一ロットの10個の試料の個々の成分を定量するため, 労力と時間の省力化が望まれている。著者はこのような見地から, Technicon Instruments 社製の固体試料溶解装置, 比例定量ポンプ, 紫外分光

光度計を組合せて含量均一性試験の自動化を検討した。試料として選んだワルファリンカリウム錠は米国薬局方 XIX, XX, 第十改正日本薬局方に含量均一性試験が規定されている。

I 試薬及び装置

1. 試薬

ワルファリンカリウム：日本薬局方適品(含量, 99.7%)。ワルファリンカリウム錠：日本薬局方適品(1mg

Table 1. Conditions of automated content uniformity test for warfarin potassium tablet

1. Programmer of solid-prep-sampler (SPS-II)	
Frequency of analysis	15 times/hour
Homogenizing speed	6500 rpm
Homogenizing time	135 seconds
Stirring speed after homogenation	200 rpm
Sample aspirating time	40 seconds
Flush	0.01 M NaHCO_3 solution, 100 ml $\times$ 2
2. Diluent	0.01 M NaHCO_3 solution, 100 ml
3. Diagram of peristaltic pump	Fig. 1.
4. UV-spectrophotometer	set at 308 nm

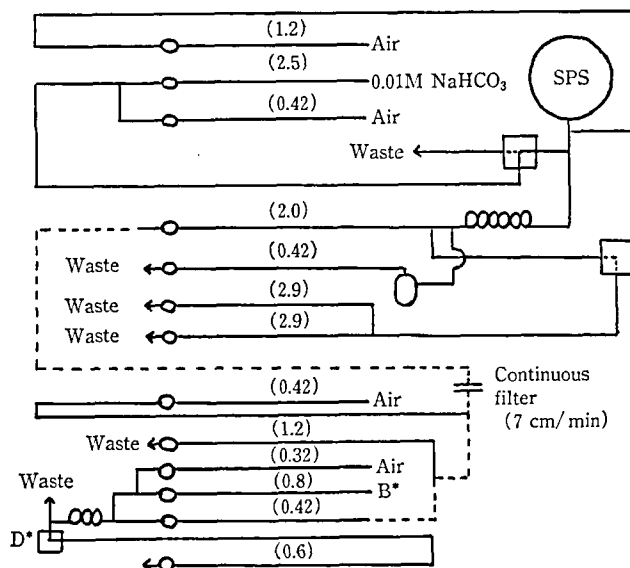


Fig. 1. Diagram for automated content uniformity test for warfarin potassium tablet

B*: 0.03% Polyoxyethylene (23) lauryl ether-0.02 M Na_2CO_3

D*: UV-Spectrophotometer (at 308 nm)

— Tygon tube

— Polyethylene tube (i.d. 0.8 mm)

() Flow-volume (ml/min)

素錠，エーザイKK製）。

その他は試薬特級品を使用した。

2. 装置

固体試料溶解装置：Technicon SPS-II 形。ポンプ：Technicon 比例定量ポンプⅢ形。検出器：Technicon UV-分光光度計。記録計（以上，Technicon Instruments 社製）

II 分析法

1. 標準液

ワルファリンカリウム（以下，WK）を 105° で3時間乾燥し，その約 100mg を精密に量り，0.01 M 炭酸ナトリウム液 5 ml 及び水を加えて溶かし 100 ml とする。この液を正確に水で5倍にうすめて，標準液とする。

2. 操作条件

Table 1 及び Fig. 1 に示したように装置を連結，調整し，約20分間，WK を用いず空作動させたのち，SPS-II の試料カップに標準液 5 ml を加えて作動させ，記録紙上のピーク高さが約70目盛（16 cm）になるように検出器の感度を調整する。次に再び空試験を行い WK の検出される位置にピークが認められないことを確めたのち，試料カップに WK 錠，標準液 5.0 ml，

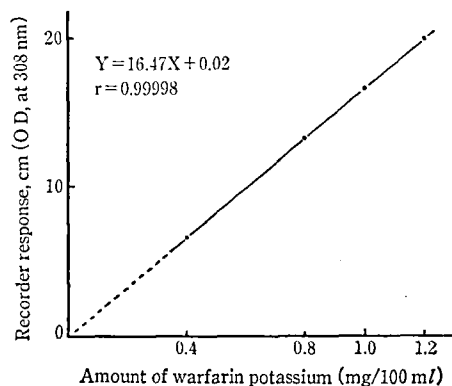


Fig. 2. Calibration curve for warfarin potassium

WK 錠 1 ケずつ10ケ，標準液 5.0 ml をこの順序に加えて作動させ，含量均一性試験を行う。

WK ($\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{KO}_4$) の量 (mg) = 標準品の量 (mg)

$$\times \frac{\text{試料から得たピーク高さ (cm)}}{2 \text{ つの標準液から得たピーク高さ (cm) の平均}} \\ \times \frac{1}{100}$$

初めのピークは用いない。

III 定量条件の検討

Table 1. 及び Fig. 1 にしたがって，次の諸条件を検

Table 2. Results of content uniformity test of warfarin potassium tablets (1 mg)

	Weight of 1 tablet (g)	Recorder response (cm)	Results (%)
	0.2507	17.6	104.7
	0.2528	17.6	105.0
	0.2483	16.9	100.8
	0.2541	17.4	103.5
	0.2489	17.0	101.4
	0.2521	17.5	104.1
	0.2508	17.6	105.0
	0.2530	17.6	105.1
	0.2567	17.6	104.7
	0.2544	17.4	103.7
Mean	0.2522		103.8
C.V. (%)	0.97		1.4

討した。

1. 試料溶解液及び吸光度測定条件

溶解液は、WK が水又はアルカリ性水溶液に極めて溶けやすいことから、0.01 M 炭酸水素ナトリウム液 100 ml を使用することとした。

吸光度の測定条件は、WK のアルカリ性水溶液中の吸収極大波長 308 nm を選んだ。この波長における比吸光度 $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ は 400(pH 10), 408(pH 12) であった。この結果から、Fig. 1 に示すように、UV 分光光度計の手前で 0.02 M 炭酸ナトリウム液を追加することとした。

2. 錠剤の粉碎溶解強度

操作条件に従がい、SPS-II の粉碎翼の回転数 1900, 3900, 4700 及び 6500(r, p, m) で 2 分間、錠剤を粉碎し、WK を溶解させたところ、記録紙上のそれぞれのピーク高さは、16.40, 16.45, 16.40 及び 16.45 cm であった。何れの回転数においても WK は水溶液中に十分に溶解されるものと考えられる。

3. 検量線

WK の 80, 160, 200 及び 240 ppm の水溶液のそ

れぞれを 5.0 ml を試料カップにとり、溶解液の量を 95 ml とし、検量線を作成した。その結果は、Fig. 2 に示すように、回帰直線の相関係数 r は 0.99998, 切片 b は 0.02(cm) で満足すべき結果であった。

4. 繰返し精度

WK の 200 ppm 水溶液の各 5.0 ml を 7 ケの試料カップセルにとり、検量線の作成時の条件で操作したところ、記録紙上のピークの高さは初めのピークを除いては、次のように同様な値が得られた。16.4(初回), 16.7, 16.65, 16.7, 16.7, 16.6, 16.65(cm)。

IV 含量均一性試験の結果

Table 2 に示したように、この WK 素錠の含量均一性試験の結果は表示量に対する平均値 103.8%, 変動係数 1.4% であった。

V 結 語

Technicon Instruments 社製の固体試料溶解装置、比例定量ポンプ、紫外吸光度計を連結し、ワルファリンカリウム錠の含量均一性試験の自動分析を行った。この結果から、この装置は他の製剤の含量均一性試験にも適用できるものと信ずる。

酵素製剤の品質に関する研究（第3報） 市販ブロメライン製剤の製剤学的検討

谷本 剛・福田秀男・川村次良

Studies on the Quality of Enzyme Preparations (III) Pharmaceutical Studies on Commercially Available Bromelain Preparation

Tsuyoshi TANIMOTO, Hideo FUKUDA and Jiro KAWAMURA

The results of the assay for bromelain potency, and the disintegration, weight variation and dissolution tests carried out on commercially available bromelain preparations (coated tablet: 7 samples) were described. When samples were extracted with the aqueous solution containing 30 mM cystein and 6 mM EDTA (pH 4.5), three of the seven samples contained less bromelain than 80% of their labeled amounts. However, the bromelain potency of these low potent preparations was increased when the preparations were extracted with the same aqueous solution containing 0.4 M NaCl. The disintegration test for enteric coated tablet defined in J.P. IX was applied for the bromelain preparations, and these preparations complied with the criterion of the disintegration test in J.P. Although the weight variation test in J.P. is not defined for any coated tablet, this test just applied to the bromelain preparations for fact-finding, and five of the seven samples were found to be in the deviation range defined for "Tablet" in J.P. X. From the results of the disintegration and dissolution tests, it was presumed that the maximum dissolution time for bromelain preparation may be correlated to the average disintegration time for the preparation.

(Received May 31, 1982)

我々は市販されている酵素製剤の製剤学的品質についての検討を行っている。現在までに塩化リゾチーム製剤¹⁾、ブロメライン製剤²⁾、キモトリプシン製剤³⁾及びトリプシン製剤⁴⁾についての検討を行い、その結果はすでに報告している。ブロメライン製剤に関しては、前回（昭和53年度）の検討において不適品に相当する製剤が多く見い出されているので、今回、再度ブロメライン製剤を検討の対象品目に選定し、その製剤学的品質についての検討を行った。

実 験 方 法

1. 試料・試薬・試液

i) 試料：今回入手したブロメライン製剤（7種類）はすべて単味の製剤であり、糖衣を施した腸溶性の錠剤であった。

ii) 酵素希釈液：塩酸システイン5.27 g及びエチレンジアミン四酢酸ナトリウム2.23 gを水に溶かし、1 N 水酸化ナトリウム試液を用いて pH を 4.5 に調整した後、水を加えて全量を 1000 ml とする。用時製する。

iii) 基質液：ハンマーステン法による精製カゼイン 0.6 g を 0.05 M リン酸一水素ナトリウム液 80 ml に

溶かし、1 N 塩酸で pH 7.0 に調整し、水を加えて 100 ml とする。用時製する。

iv) 沈殿試薬：0.11 M トリクロル酢酸、0.22 M 酢酸ナトリウム及び 0.33 M 酢酸を含む液を製する。

v) チロジン標準品：日本薬局方標準品チロジンをを用いる。

vi) 第1液及び第2液：第9日本薬局方一般試験法 33、崩壊試験法の項に従って調製する。

2. 重量偏差試験

日本薬局方一般試験法20. 重量偏差試験法、錠剤の項に準じて試験した。

3. 崩壊試験

日本薬局方一般試験法 36. 崩壊試験法(6) 腸溶性の製剤 (i) 顆粒剤及び顆粒状の形で充てんしたカプセル剤以外の製剤の項に従って試験する。

4. 溶出試験

日本薬局方一般試験法44. 溶出試験法の第1法（回転バスケット法）によって試験した。試験液には 0.2 mM テトラチオン酸ナトリウムを含む第2液を用いた。液の温度は $37 \pm 0.5^\circ$ に保ち、試料4個をとり、バスケットに入れ、連結盤にはめ込んだ後、試験器を $37 \pm 0.5^\circ$ に調節した容器中の試験液に浸し、直ちに

100 rpm で回転を始める。回転開始後、15分間隔で溶出液の 10 ml を採取する。溶出液を採取すると直ちに採取した量と同量の試験液を加える。採取した溶出液は遠心分離し、その上澄液 9 ml に 300 mM 塩酸システイン及び 60 mM EDTA を含む水溶液 1 ml を加え、30分間放置した後、プロメラインの力価を 5. 力価試験, ii) 操作法に準じて測定する。

5. 力価試験

i) 試料溶液の調製

A法：試料20個をとり、水で糖衣層などの皮膜を洗い落とし、水分をろ紙で除き、乳鉢に入れ、酵素希釈液 2 ml を加えてすりつぶし、粥状とした後、メスフラスコに移す。乳鉢は酵素希釈液 100 ml を用いてよく洗い、洗液はメスフラスコに合わせ、更に酵素希釈液を加えて正確に 200 ml とする。この液を遠心分離し、得られた上澄液を試料抽出液とする。試料抽出液の適量を正確に量り、酵素希釈液を加えて 1 ml 中に 30～50プロメライン単位を含む液を調製し、試料溶液とする。

B法：A法における遠心分離の操作を省略し、均一に懸濁した液の適量を正確に量り、以下A法と同様に操作する。

C法：酵素希釈液の代りに 0.4 M 塩化ナトリウムを含む酵素希釈液を用いてA法と同様に操作する。

ii) 操作法

試料溶液 1 ml を正確に量り、試験管に入れ、 $37 \pm 0.5^\circ$ に 5 分間保つ。別に $37 \pm 0.5^\circ$ に予温した基質液 5 ml を試験管中の試料溶液に速やかに加え、酵素反応を開始する。正確に 10 分間経過後、沈殿試薬 5 ml を加え、よく振り混ぜ、 $37 \pm 0.5^\circ$ に 40 分間放置した後、定量用ろ紙を用いてろ過する。ろ液につき 2 時間以内に波長 275 nm における吸光度 A を水を対照として測定する。別に試料溶液 1 ml に沈殿試薬 5 ml を加えた後、基質液 5 ml を加えて、以下同様に操作し、吸光度 A_0 を測定する。別にクロジンを標準品を精密に量り、0.1 N 塩酸に溶かし、その 1 ml 中にクロジン 50.0 μg を含む液を調製し、その吸光度 A_s を水を対照として測定する。

プロメライン力価 (単位/錠)

$$= \frac{A - A_0}{A_s} \times 50 \times \frac{11}{10} \times \frac{\text{試料抽出液の希釈倍数} \times 200}{20}$$

ただし、1プロメライン単位は上記反応条件で1分間にクロジン 1 μg に相当する生成物を与える酵素量である。

結果と考察

1. 重量偏差試験

今回試験したプロメライン製剤は腸溶性の錠剤であり、しかも糖衣を施したものであった。日局には腸溶性皮膜や糖衣などの剤皮を施した製剤についての重量

Table 1. Results of the weight variation test for commercially available bromelain preparations

Sample number	Average weight (mg)	Range of weight (mg)	Number of tablet having the deviation of more than 10, 7.5 or 5%	C.V.*
1	197.9	219.0 ~ 174.5	4 (>7.5%)	5.45
(1)	125.1	129.3 ~ 120.0	0 (>7.5%)	2.02
2	254.1	263.3 ~ 245.5	0 (>7.5%)	2.08
(2)	145.8	148.3 ~ 142.3	0 (>7.5%)	1.00
3	404.6	420.5 ~ 378.8	1 (>5%)	2.17
(3)	218.3	224.6 ~ 210.2	0 (>7.5%)	1.55
4	205.9	219.2 ~ 195.3	0 (>7.5%)	3.22
(4)	110.7	113.8 ~ 108.2	0 (>10%)	1.16
5	211.6	230.7 ~ 199.9	1 (>7.5%)	4.13
(5)	114.4	120.5 ~ 109.6	0 (>10%)	2.80
6	302.1	318.9 ~ 281.4	3 (>5%)	3.13
(6)	172.2	179.0 ~ 164.5	0 (>7.5%)	2.33
7	316.8	331.6 ~ 300.2	1 (>5%)	2.53
(7)	172.6	180.0 ~ 164.1	0 (>7.5%)	2.40

Samples designated in parentheses are preparations which sugar coat is removed by washing with water.

* coefficient of variation: (standard deviation/average weight) x 100

Table 2. The potency of bromelain in commercially available bromelain preparations

Sample number	Labeled amount (units/tablet)	Bromelain potency (% of labeled amount)		
		Method-A	Method-B	Method-C
1	10000	107.9	121.0	114.2
2	16666	77.6	86.9	87.6
3	20000	113.9	-	151.4
4	10000	72.2	81.0	79.6
5	10000	57.2	70.6	71.6
6	10000	94.4	97.0	93.6
7	31000	98.9	102.1	106.0

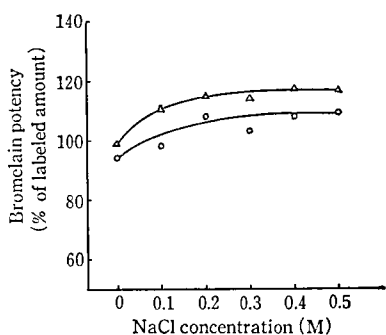


Fig. 1. Effect of concentration of sodium chloride on the extraction of bromelain from preparations

偏差試験法の規定はないが、剤皮を施した錠剤の重量偏差の実態を把握する目的で日局一般試験法、重量偏差試験法の錠剤の項に準じて試験を行った。Table 1に示すように、検体2及び4には偏差の基準を越えるものは存在しなかったが、検体1, 3, 5, 6及び7には偏差の基準を越えるものがそれぞれ4, 1, 1, 3及び1個存在した。ただ、偏差の基準の2倍を越えるものはなかった。一方、糖衣層を水で洗い落とし、一昼夜自然乾燥したものについて試験を行ってみると、すべての検体において偏差の基準を越えるものは存在しなかった。さらに変動係数は1.00~2.80の範囲になり、糖衣層を除く前の検体での変動係数に比べて著しく小さくなった。この結果から、糖衣を施すことによって重量偏差のパラツキが大きくなる製剤もあるが、糖衣を施す前の素錠の段階ではその重量偏差はよく管理されていることがうかがわれた。

2. 力価試験

7種の検体のブロメライン力価をi) 試料溶液の調製の項に記した3種類の方法で調製した試料溶液につ

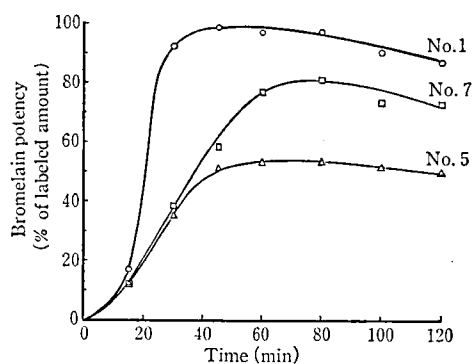


Fig. 2. Dissolution profile of various bromelain preparations in 2nd fluid containing 0.2 mM sodium tetrathionate

いて測定し、その結果をTable 2に示した。

試料溶液をA法で調製した場合には、検体1, 3, 6及び7は表示力価の90%以上の力価を示したが、検体2, 4及び5は80%以下の力価しか示さなかった。ところがA法の操作中の遠心分離操作を省略して、懸濁状態の抽出液を試料溶液とするB法で試験を行うと、すべての検体においてA法で得た力価より高い力価が得られた。例えば、A法では57%の力価しか示さなかった検体5でもB法では71%の力価を示した。一方、抽出に用いる酵素希釈液を0.4 M 塩化ナトリウムを含む酵素希釈液に代えて抽出を行い、以下A法と同様に遠心分離して得た上清を試料溶液とするC法で試験してみるとB法と同様にすべての検体においてA法で得た値より高い値が得られた。しかもこのC法で得た値はB法で得た値とほとんど同じであった。

既報⁴⁾でも述べたように、この結果は酵素希釈液を用いた抽出ではブロメラインの一部が製剤中の不溶性物質に吸着し完全に抽出されないが、0.4 M 塩化ナト

Table 3. Results of the disintegration test for commercially available bromelain preparations

Sample number	Disintegration time						Average disintegration time	C.V.*
	1	2	tablet number		5	6		
			3	4				
1	10'20"	11'45"	12'00"	12'25"	13'00"	14'00"	12'22"	10.6
5	20'40"	20'45"	22'00"	22'35"	26'55"	30'40"	23'59"	15.3
7	31'15"	32'40"	33'50"	34'00"	38'50"	39'30"	35'01"	8.8

リウムを含む酵素希釈液を使用すればそこに含まれる塩の効果によって不溶性物質からもブロメラインが抽出されてくるためであると考えられる。

したがって、ブロメライン製剤の力価試験は、B法あるいはC法で試料溶液を調製して行うのがA法で試料溶液を調製して試験するよりも優れていると考えられる。しかし、B法は試料溶液が懸濁状態であることから、ピペッティング操作が煩雑となり、このことが値にバラツキを与える原因となる。一方、C法は塩溶効果を利用して抽出を完全にしているために、遠心分離で不溶物を除きその上澄液を使用することができ、B法で懸念されるようなバラツキは無視することができる。この点からB法よりC法の方がブロメライン製剤の力価試験としては好ましい。

塩化ナトリウムによる塩溶効果を利用した試料溶液の調製法が優れていることを述べたが、その際の塩濃度について検討してみた。2種類の製剤を用いて調べてみた限りにおいては0.2M以上の塩化ナトリウム濃度で最大の力価を示した(Fig. 1)。したがって、0.4M塩化ナトリウムを含む酵素希釈液で抽出を行えば十分満足すべき値が得られるであろうと推察された。

3. 溶出試験

検体1, 5及び7の3種類の製剤について、それらの溶出速度を回転バスケット法で比較検討した。溶出液には0.2mMテトラチオン酸ナトリウムを含む第2液を使用した。それぞれの溶出速度をFig. 2に示したが、その横軸は時間(分)を、縦軸は溶出したブロメライン力価の表示量に対する%を示してある。検体

1は約40分で、検体5は約60分で、検体7は約80分でそれぞれ最大の溶出が認められた。いずれの検体も溶出が最大に達した後は徐々に力価の低下がみられた。これはブロメラインが酸性に比較してアルカリ性では不安定である⁵⁾ためと考えられる。検体5の溶出率が低いのはTable 2の力価試験結果から明らかなように製剤中の含量が低いためである。

一般に、水に易溶性の製剤の場合にはその最大溶出時間と崩壊時間との間には平行性が認められることが予想される。ブロメライン製剤の場合は、検体1, 5及び7の崩壊試験の結果をTable 3に示してあるが、それぞれの最大崩壊時間は約15分、30分及び40分であり、また平均崩壊時間は約12分、24分及び35分であり、それぞれの最大の溶出を示す時間はそれらの最大あるいは平均崩壊時間の約2倍となり、溶出時間と崩壊時間との間にはよい相関のあることが推察された。溶出時間が崩壊時間より長いのは、崩壊試験器の下面の網の網目の開き2mmがであるのに対して溶出試験に使用するバスケットの網目の開きが0.42mmであるためであろうと考えられる。

文 献

- 1) 谷本 剛ら: 衛生試験, 96, 103 (1978)
- 2) 谷本 剛ら: 衛生試験, 97, 29 (1979)
- 3) 谷本 剛ら: 衛生試験, 99, 84 (1981)
- 4) 谷本 剛ら: 衛生試験, 98, 91 (1980)
- 5) 長沢佳彦ら: 衛生試験, 85, 121 (1967)

市販乳首中の重金属の定量

鈴木 隆・武田明治・内山 充

Determination of Heavy Metals in Nipple

Takashi SUZUKI, Mitsuharu TAKEDA, Mitsuru UCHIYAMA

The contents of lead, cadmium and zinc in the commercially available nipples were examined by the method of atomic absorption spectrometry. The levels of lead were for the most part between 1 and 5 ppm in the nipples which were made from isoprene or natural gum, and on the other hand the ones which were made from silicone gum were less than 1 ppm. In addition to lead, the presence of cadmium was shown though its contents were just a little. The contents of zinc in the nipples which were made from isoprene or natural gum, were between 0.2 and 5.9 mg/gum (g). The results suggested a weak correlation between the contents of cadmium and lead. Migration test showed that the contents of lead and cadmium in water were less than the detection limit.

(Received May 31, 1982)

まえがき

重金属のバックグランド調査の一環として市販乳首中の鉛、カドミウム、亜鉛の定量を行ったのでその結果について報告する。

実験器具、試薬

1. 試料、試薬

試料は市販の乳首（イソプレンゴム製6検体，天然ゴム製3検体，シリコンゴム製5検体）を分析に供した。

硫酸，塩酸，0.5 N 硝酸：市販の精密分析用試薬を用いるか又はこれを用いて調製した。

亜鉛，鉛，カドミウム標準液：和光純薬（株）製（mg/ml）を適宜希釈して用いた。

2. 装置

原子吸光光度計：Varian 社製775型，double beam，重水素放電管によるバックグランド補正装置並びにフレイムレス原子吸光装置つき。

鉛，カドミウム，亜鉛中空陰極ランプ：日立製作所製

電気炉：池田理化製 MFP 400N 型

その内の2.0 gを50 mlの硬質ビーカーに秤量し，硫酸2 mlを加え熱板上250°に加熱しながら赤外線ランプ照射下に炭化させる。初期に激しく発生したガスは約6～8時間後には穏やかになる。次に480°の電気炉中24時間加熱する。冷後2 mlの塩酸を加え赤外線ランプ下で加熱して塩を揮散させる。残渣を0.5 N硝酸50 mlを加え加熱したのちガラスフィルターで不溶物をろ去した。ろ液を熱板上で水をとばしたのち熱0.5 N硝酸に溶かして5 ml定容とした。

b) 定量操作

鉛は上記検液を直接フレイム原子吸光光度計に導入する事により測定した。またカドミウムはフレイムレス原子吸光法により行った。亜鉛は検液を適宜希釈して0.1 ppmから0.8 ppmの濃度範囲でフレイム原子吸光法により定量した。なお各金属の原子吸光測定条件をTable 1に示した。

2. 溶出試験

乳首1 gにつき20 mlの割合で脱イオン水を加え時計皿で覆ったビーカー中40°で24時間加温した。乳首を除いた溶出液に硝酸1 mlを加え熱板上で濃縮して6 ml定容として検液を調製した。以後の定量操作は1, b) 定量操作により行った。

実験方法

1. 乳首中の重金属の分析

a) 試料の前処理

乳首（1個約5 g相当）2個を細切混合したのち、

結果及び考察

1. 添加回収実験

細切した乳首に鉛1 ppm，カドミウム10 ppb，亜鉛1000 ppmの濃度になるように各金属標準液を添加し、

Table 1. Operating Condition of Atomic Absorption Spectrometry

	Metal		
	Pb	Cd	Zn
Wave length (nm)	217.0	228.8	213.9
Lamp current (mA)	5	3.5	5
Slit width (nm)	1.0	0.5	1.0
Air (l/min)	9	—	9
Acetylene (l/min)	1.0	—	1.0
Drying temp. (°C)	—	100	—
Drying time (sec)	—	15	—
Ashing temp. (°C)	—	500	—
Ashing time (sec)	—	10	—
Atomizing temp. (°C)	—	1200	—
Atomizing time (sec)	—	2	—
Injection vol. (μl)	—	5	—

Table 2. Recovery of Metals fortified to Nipple

Metals	Residue ¹⁾	Added ¹⁾	Found ¹⁾	Recovery (%)
Pb	2.94	1.0	4.08	104
Cd	ND ²⁾	10	8.8	88
Zn	700	1000	1660	96

1) Pb, Zn: ppm, Cd: ppb

2) ND means not detected (<0.5 ppb)

Table 3. Contents of Lead, Cadmium and Zinc in Nipple and their Migration into Water¹⁾

Sample		Pb (ppm)	Cd (ppb)	Zn (mg/g)	Migration into water			
					Pb (ppm)	Cd (ppb)	Zn (ppm) ⁴⁾	(%) ²⁾
Isoprene gum	1	ND ³⁾	ND	0.5	ND	ND	4.8	(0.96)
	2	2.5	ND	0.2	ND	ND	2.5	(1.3)
	3	ND	ND	0.7	ND	ND	7.7	(1.1)
	4	1.1	3.7	0.95	ND	ND	7.1	(0.75)
	5	2.7	7.2	5.9	ND	ND	7.3	(0.12)
	6	2.9	6.0	5.0	ND	ND	5.6	(0.11)
Natural gum	7	1.1	8.5	0.85	ND	ND	2.6	(0.30)
	8	3.5	6.9	1.2	ND	ND	2.5	(0.21)
	9	4.1	8.3	1.5	ND	ND	2.3	(0.26)
Silicone gum	10	0.54	0.8	0.1	ND	ND	1.9	(1.9)
	11	0.41	0.8	0.06	ND	ND	ND	(0)
	12	0.41	ND	0.02	ND	ND	0.15	(0.75)
	13	0.27	0.8	0.4	ND	ND	1.7	(0.43)
	14	1.0	2.0	0.04	ND	ND	0.44	(1.1)

1) Migration test into water was carried out using 20 ml of water/gum (g) at 40 for 24 hr.

2) % means the per centage of the migrated zinc into water.

3) ND means not detected (Pb<0.05 ppm, Cd<0.5 ppb, Zn<0.2 ppm)

4) ppm means part of migrated zinc per million part of gum.

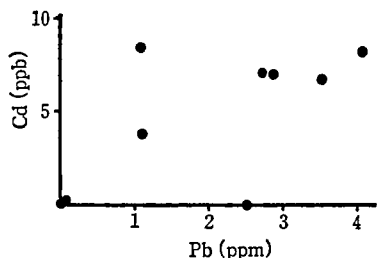


Chart 1. Correlation between lead and cadmium contents in nipple

以下前項の操作条件に従って処理して各金属の添加回収率を求めた (Table 2).

いずれも満足すべき結果が得られた。

2. 測定結果及び考察

乳首14検体の測定結果を Table 3 に示した。

鉛に関して，イソブレン及び天然ゴム製品については不検出検体，2 検体が存在したが，不検出以外のものはいずれも 1 ppm 以上のレベルで鉛が存在してい

た。しかしながらシリコンゴム製品では 1 ppm のものを 1 検体見出した以外いずれも 1 ppm 以下であった。この分析結果からイソブレン及び天然ゴム中の鉛は架橋剤，促進剤として加えた亜鉛華に由来すると予想される。一方カドミウム及び亜鉛含量はイソブレンゴム及び天然ゴム製品で共に高い。なおイソブレンゴム，天然ゴム製品の鉛含量とカドミウム含量との間に幾分かの相関が認められた (Chart 1)。一般に亜鉛とカドミウムは環境中で同一行動を示すことは良く知られているが，乳首中に検出された鉛が，添加された亜鉛華に由来するとすればこのことは理解出来る。

24時間の水による溶出試験では鉛，カドミウムは検出限界以下であり乳首中に含まれている鉛及びカドミウムはほとんど水で溶出されない事を見出した。この事実は乳首での低レベルの鉛及びカドミウム汚染は実際問題として衛生上問題にならないと考えられよう。また亜鉛の水への移行は平均して 1 % 未満であった。

逆相型高速液体クロマトグラフィーにおける保存料，サッカリン及び関連物質の保持時間に及ぼす移動相の pH の影響について

加藤三郎

Effect of pH of Mobile Phase on the Retention Times of Preservatives, Saccharin and Their Related Substances in Reversed-phase High Performance Liquid Chromatography

Saburo Kato

The effects of the pH of the mobile phase in reversed-phase high performance liquid chromatography on the retention times of dehydroacetic acid, sorbic acid, benzoic acid, saccharin and their related substances were examined.

The retention times of carboxylic acids increased remarkably with lowering the pH, but the increase in the retention times of saccharin and sulfonic acids was relatively small. The retention times of o-toluene-sulfonamide and other amides were not influenced by the pH.

(Received May 31, 1982)

逆相型カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) はすでに保存料及び人工甘味料にも応用されている。そこに用いられる移動相としては，AOAC 法¹⁻²⁾はサッカリン (Sac)，安息香酸 (BA) 及びカフェインの同時分析のために 20% 酢酸 (酢酸ナトリウムにより pH 3) を用い，これを北田³⁾は 5% メタノール/0.03 M 酢酸・酢酸ナトリウムに改良しており，い

ずれも Sac のあとに BA などが溶出する。しかし，Leuenberger ら⁴⁾はリン酸緩衝液 (K_2HPO_4 2.5 g + KH_2PO_4 2.5 g / 1 l) を用いて，BA，ソルビン酸 (SoA) 及び Sac をこの順に分離溶出している。この溶出順位の逆転について系統的な検討の報告はみられない。

そこで保存料である数種のカルボン酸及び Sac，並びに関連物質について系統的に溶離条件を検討するう

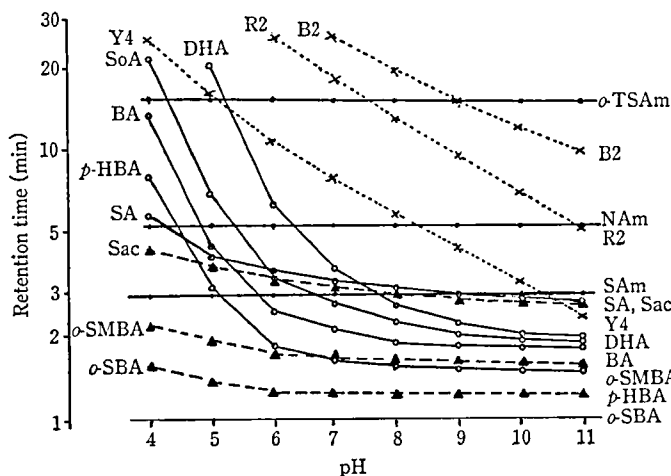


Fig. 1. Effect of pH of mobile phase on the retention times of preservatives, saccharin and their related substances on reversed-phase column

Condition: column: Nucleosil 5C₁₈ $\phi 4 \times 150$ mm, mobile phase: methanol-0.025 M phosphate buffer (10:90), flow rate: 1 ml/min, detector: Shimadzu UVD-2 (254 nm) and SPD-1 (280 nm).

DHA: dehydroacetic acid, SoA: sorbic acid, BA: benzoic acid, *p*-HBA: *p*-hydroxybenzoic acid, SA: salicylic acid, Sac: saccharin, *o*-SMBA: *o*-sulfamoylbenzoic acid, *o*-SBA: *o*-sulfobenzoic acid, *o*-TSAm: *o*-toluenesulfonamide, Y4: tartrazine, R2: amaranth, B2: indigocarmine, NAm: nicotinamide, SAm: sulfanilamide.

ち、これら物質の保持値は移動相の pH に最も大きく関連していることがわかった。

実験方法

1. 試薬及び試液

安息香酸 (BA), ソルビン酸 (SoA), デヒドロ酢酸 (DHA), サッカリン (Sac), 食用黄色 4 号 (Y4), 食用赤色 2 号 (R2), 食用青色 2 号 (B2): 食品添加物。

オルトスルホアミノ安息香酸 (*o*-SMBA): サッカリンを塩酸で加水分解して調製⁵⁾。

その他のカルボン酸類, スルホン酸類, 酸アミド類: 東京化成試薬。

試料溶液: 上記諸物質をそれぞれ, おおむね 0.1% メタノール溶液とした。

リン酸緩衝液: 0.025 M KH₂PO₄ 及び 0.025 M K₂HPO₄ を調製し, 適宜に混合して所定の pH とした。

2. 装置

高速液体クロマトグラフ: 島津 LC-3A, 検出器: 島津 LCD-2 (254 nm) 及び島津 SPD-2 (可変波長)。

3. HPLC 条件

3.1. カラム: Nucleosil 5C₁₈ (M & Nagel 社) をポリエチレングリコール 400・ジクロロメタン (3:4)

混液によるスラリーとして, $\phi 4 \times 150$ mm ステンレス製管に充てんした。

3.2. 移動相: メタノール・0.025 M リン酸緩衝液 (10:90), 流速: 1 ml/min, 室温。

実験結果及び考察

移動相に用いた緩衝液の pH を段階的に変え, それぞれの pH の移動相による各物質の保持時間を測定した。これらの結果をまとめて, Fig. 1 に示した。

なお, カラム交換あるいは移動相を新たに調製して補給したときには, 保持時間に若干の変動を生ずることがあったが, pH の変化に影響されないアミド類を指標として補正し, また確認のため流速をかって測定した結果もこれらを指標として換算した。

Fig. 1 にみられるように, パラオキシ安息香酸 (*p*-HBA), BA, SoA, DHA などの保持値は弱酸性領域から pH の低下にしたがって急激に増大する傾向がみられた。これらの物質の分離には本実験の条件では pH 5 附近が適当であるが, より酸性領域ではメタノール濃度を高め, 逆にアルカリ性領域ではメタノール濃度を低下させれば, 適当な時間に溶出させられると考えられる。なお参考に試みた数種の芳香族モノカルボン酸も同様な傾向を示した。ただし, サリチル酸 (SA)

はこれらのカルボン酸類とは異なって、pH の影響が小さく、保存料類よりも pH 4.5 以下ではより前に、pH 7.5 以上ではより後に溶出した。

サッカリン及びその分解物であるスルホン酸類は、弱酸性領域ではカルボン酸類に比して pH の影響が小さいので、これらとの相対関係は大きく変化し、サッカリンは保存料類より pH 4.5 以下ではより前に、pH 8 以上ではより後に溶出した。なお参考に試みた数種の芳香族モノスルホン酸も同様な傾向がみられ、より強酸性において pH の影響が増大してくる傾向がみられた。

なお、本条件では30分以内に溶出する数種の食用タール色素について、同様な測定結果を Fig. 1 のなかを示しておいたが、これらがさきのモノスルホン酸類とは異なった pH の影響を示すのは、多塩基性酸であるためとも考えられるが、更に検討中である。

ま と め

逆相型カラムにおいてメタノール・リン酸塩緩衝液

(10:90)を移動相に用いるとき、保存料などのモノカルボン酸類は移動相の液性が弱酸性の領域から pH の低下するほどそれらの保持時間が著しく増大する。しかしサッカリン及びモノスルホン酸類の保持値は弱酸性領域では増加するが僅かである。このため、サッカリンと保存料であるカルボン酸との溶出順位は、移動相が酸性の場合とアルカリ性の場合では逆転する。

文 献

- 1) B.B. Woodward, G.P. Heffelfinger and D.I. Ruggles: *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.*, **62**, 1011 (1979)
- 2) Official Methods of Assoc. Offic. Anal. Chem., 13th ed., **12,050** (1980)
- 3) 北田善三, 玉瀬喜久雄, 佐々木美智子, 西川喜孝, 谷川 薫: *食衛誌*, **21**, 480 (1980)
- 4) U. Leuenberger, R. Gauch and E. Baumgartner: *J. Chromatog.*, **173**, 343 (1979)
- 5) O. Degarmo, G.W. Ashworth and C.M. Eaker: *J. Am. Pharm. Assoc.*, (Sci. Ed.), **41**, 17 (1952)

温泉の細菌試験法に関する研究

倉田 浩・栗栖弘光・柳町きみゑ・小出悟郎*
浅見吉之*・東海林雄悦*

Studies on the Bacteriological Examination Methods of Hot Spring Water

Hiroshi KURATA, Hiromitsu KURISU, Kimie YANAGIMACHI,
Goro KOIDE*, Yoshiyuki ASAMI* and Yuetsu TOKAIRIN*

For the examination of coli-form group and heterotrophic bacteria in hot spring and drinking hot spring water, fermentation tube method and standard plate count method were investigated using artificial hot spring water, respectively. The artificial hot spring water was prepared with 23 inorganic salts, based on the chemically analysed data of natural hot spring water. For the test organisms, *Escherichia coli* train IFO 3972 was cultured in tryptose broth for 20 hr, while the river water in which bacteria are usually counted at level of 1,000–3,000 per ml was used as an inoculum of heterotrophic bacteria. As the bacteriological examination of hot spring water, except for strongly acidic or strongly alkaline one, applicable possibility of both methods was confirmed.

(Received May 31, 1982)

ま え が き

温泉の化学成分の試験は、温泉法に定められた試験法に基づいて行われているが、衛生細菌学的な分野の試験法は定められていない。飲料水などの試験法に、

* 神奈川県広域水道企業団水質試験所

人為的汚染による病原細菌の危険性を予知するための試験法として、広く一般に用いられている衛生細菌学的大腸菌群試験法及び一般細菌試験法^{1,2)}がある。温泉水のうち、飲用泉とその源泉について公衆衛生学的な調査を行うとき、これらの試験法が、種々の化学成分を高い濃度に含有する温泉水の試験に適用可能で

Table 1. Components (ml) of artificial hot spring

Salt concentration (M)	Artificial hot spring No. & name							
	1 Fukuroda	2 Hakone Yumoto	3 Ikaho	4 Shima	5 Ajiro	6 Hakone Ashinoyu	7 Kusatsu	8 Shuzenji
0.01 KCl	2	6	23	184	265	29	50	15
0.01 NaF	10				1			6.5
1.0 NaCl	1	10		24	174		1.6	
0.1 NaHCO ₃	19	14	40	10	26	48		83
0.1 Na ₂ SO ₄	13							
0.1 CaSO ₄	1	6	33	39		40		
0.01 MgSO ₄	8			32		1.6		
0.1 FeSO ₄	1 drop						20	1.5
0.01 Na ₂ CO ₃	0.3	0.5						6
0.1 HBO ₂	1	4	2.2	15	1.5	1	2.4	1
0.1 SiO ₂	3	12	33	30	10	31	4.1	7
0.01 MgCl ₂		37	145		400		135	37
0.1 Al ₂ (SO ₄) ₃		1 drop	0.2	0.05			31	
0.1 Fe ₂ (SO ₄) ₃			1.6	0.1	0.05			
0.01 MnSO ₄			3	4	5.3			
NaHPO ₄				0.1			10	
HASO ₄				2.5				0.2
1.0 CaCl ₂					10		2.5	0.15
0.1 MgSO ₄					125			
0.01 CuSO ₄					0.1			
0.01 NaBr					29			
0.01 Na ₂ S						70	10	
0.01 NH ₄ Cl							5.6	
0.1 HCl							307	
0.1 H ₂ SO ₄							221	

あるか否かについて検討した。

実験方法及び結果

1. 試料

1) 温泉水の溶解化学成分

基本的成分には、NaCl, Na₂SO₄, NaHCO₃, CaCl₂, CaSO₄, MgCl₂, MgSO₄, FeSO₄, Fe₂(SO₄)₃ 及び Al₂(SO₄)₃ を蒸留水に所定の濃度に溶解したものを用いた。微量成分として、CuSO₄, MnSO₄, NH₄Cl, NaBr, KI, NaF, Na₂S₂O₃, NaHPO₄ 及び AsO₂ を蒸留水に所定の濃度に溶解して用いた。半微量成分は、SiO₂, KCl, HBO₂ 及び Na₂S の4種を用いた。

2) 人工温泉水

人工温泉水は、中央温泉研究所で作成した人工鉱泉化学成分表*に基づいて、基本成分溶液、微量成分溶

液及び半微量成分溶液を調合して各人工温泉水を製造した (Table 1)。

3) 天然温泉水

天然温泉水は、それぞれ現地で無菌的に採取し、研究室に持ち帰り試料とした。試験に用いた温泉水は、原泉別に13温泉水である。

2. 供試菌

大腸菌群試験は *Escherichia coli* IFO 3972 株を用い、Tryptosoy broth で 20 hr 培養した菌液を希釈して用いた。

一般細菌には、供試菌液として河川水 (酒匂川) を用いた。河川水中の一般細菌数は、通常 1 ml 中、1000~3000 なので平板培地で発生する菌集落数が、100 程度になるよう接種菌液 (河川水) 量を調節した。また河川水中の一般細菌数は、採取時ごとに異なるため、実験時ごとに対象とした河川水の培養試験を行った。

* 温泉中の細菌等試験法の策定に関する研究資料

3. 培地

大腸菌群試験には、乳糖ブイヨン培地 (L.B 培地) を用い Difco 社製を使用した。

一般細菌試験用培地には、Difco 社製 Plate Count agar を使用した。

4. 実験方法及び結果

1) 大腸菌培養試験

(1) 大腸菌群試験法は、乳糖ブイヨン醗酵管法に準じて行った。すなわち、2 倍濃厚 L.B 培地 (10 ml 用) 10 ml 及び 3 倍濃厚 L.B 培地 (50 ml 用) 25 ml

を作成し、10 ml 用と 50 ml 用 L.B 培地醗酵管に分注し滅菌する。この醗酵管に高圧蒸気滅菌又はメンブランフィルターろ過滅菌した各々の化学成分溶液、人工温泉水及び天然温泉水を 10 ml 又は 50 ml ずつ添加した後、*E. coli* 希釈液を各醗酵管に約 10^4 個ずつ接種し、35°, 24~48 hr 培養後の菌の発育を観察した。

(2) 大腸菌に対する化学成分の発育を阻止する最小濃度 (Minimum inhibitory concentration) 及び大腸菌の発育を許容する最大の濃度 (Maximum growth

Table 2. Bacteriostatic action of salts in hot spring on growth of *E. coli* (1)
(Fermentation tube method)

Salt		Inoculation number/test tube	Growth of <i>E. coli</i> in salt solution			
Name	Concentration g/l		50 ml		10 ml	
			A	B	A	B
NaCl	360	9000	—	—	—	—
	100	9000	—	—	—	+
	50	9500	+	+	+	+
	10	9000	+	+	+	+
Na ₂ SO ₄	10	9000	+	+	+	+
	1	9000	+	+	+	+
	0.1	9000	+	+	+	+
CaCl ₂	10	9000	+	+	+	+
	1	9000	+	+	+	+
	0.1	9000	+	+	+	+
CaSO ₄	1	9500	+	+	+	+
	0.1	9500	+	+	+	+
MgCl ₂	10	9500	+	+	+	+
	1	9500	+	+	+	+
	0.1	9500	+	+	+	+
MgSO ₄	10	9000	+	+	+	+
	1	9000	+	+	+	+
	0.1	9000	+	+	+	+
Al ₂ (SO ₄) ₃	10	9000	—	—	—	—
	1	9000	—	—	+	+
	0.1	9000	+	+	+	+
H ₃ BO ₃	1	9000	+	+	+	+
	0.1	9000	+	+	+	+
	0.01	9000	+	+	+	+
	0.001	9000	+	+	+	+
KCl	1	10000	+	+	+	+
	0.1	10000	+	+	+	+
	0.01	10000	+	+	+	+

A: 24 hours incubation.

B: 48 hours incubation.

Table 3. Bacteriostatic action of salts in hot spring on growth of *E. coli* (2)
(Fermentation tube method)

Salt		Inoculation number/test tube	Growth of <i>E. coli</i> in salt solution			
name	Concentration g/l		50 ml		10 ml	
			A	B	A	B
Na ₂ S	1	10000	—	—	—	—
	0.1	10000	+	+	+	+
	0.01	10000	+	+	+	+
Na ₂ SiO ₃	10	10000	+	+	+	+
	1	10000	+	+	+	+
	0.1	10000	+	+	+	+
	0.01	10000	+	+	+	+
CuSO ₄	0.1	10000	+	+	+	+
	0.01	10000	+	+	+	+
	0.001	10000	+	+	+	+
NaF	0.1	10000	+	+	+	+
	0.01	10000	+	+	+	+
	0.001	10000	+	+	+	+
MnSO ₄	0.1	9500	+	+	+	+
	0.01	9500	+	+	+	+
	0.001	9500	+	+	+	+
NH ₃ Cl	0.1	9500	+	+	+	+
	0.01	9500	+	+	+	+
	0.001	9500	+	+	+	+
NaBr	0.1	9500	+	+	+	+
	0.01	9500	+	+	+	+
	0.001	9500	+	+	+	+
Na ₂ PHO ₄	0.1	9500	+	+	+	+
	0.01	9500	+	+	+	+
	0.001	9500	+	+	+	+

A: 24 hours incubation.

B: 48 hours incubation.

allowance concentration) の試験は、大腸菌群酸酵管試験で用いた方法と同様に試験液を調整し、大腸菌を接種した後、自記微生物光度計 Bio-log II photometer (日本分光製) を用いて測定し、得られた増殖曲線より大腸菌の発育増殖濃度を調べ、その発育度を Optical Density で求めた。

化学成分別の培養成績は Table 2, 3 に示した。

大腸菌の発育が阻止されたのは、NaCl 100 g/l, Al₂(SO₄)₃ 10 g/l 及び 1 g/l (50L.B 培地のみ)、Na₂S 1 g/l の 3 種の基本成分であり、他の成分は試験した最大濃度でも、それぞれ大腸菌の発育を阻害せず、また微量成分は、いずれも 100 mg/l まで大腸菌の発育に支障は認められなかった。大腸菌の発育増殖に及ぼ

す影響について、各化学成分別の最小発育阻止濃度及び最大発育許容濃度について調べた成績は Table 4 に示すとおりである。大多数の化学成分が示す最小発育阻止濃度及び最大発育許容濃度は、通常の温泉成分濃度より高く、その結果、温泉水を乳糖ブイヨン培地に加えて培養したとき、大腸菌及び大腸菌群の発育を阻害することはないものと考えられる。

各化学成分溶液を 2 倍及び 3 倍濃度乳糖ブイヨン酸酵管に 10 ml 及び 50 ml を加え、大腸菌を接種して培養し、最大発育許容濃度について試験した結果、いずれの化学成分も、通常の温泉含有成分濃度では、大腸菌の発育増殖に影響を与えないものと考えられる (Table 5)。

Table 4. Minimum growth inhibitory concentration and maximum growth allowance concentration of *E. coli* in various salts broth

Salt name	Minimum growth inhibitory concentration		Maximum growth allowance concentration	
	M	g/l	M	g/l
NaCl	1.7	100	0.17	10
Na ₂ SO ₄	0.7	100	0.52	75
NaHCO ₃	0.59	50	0.12	10
CaCl ₂	0.2	29.4	0.1	14.7
CaSO ₄ ·2H ₂ O	>0.07	>10	>0.07	>10
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.25	50.8	0.1	20.3
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.75	184	0.5	123
FeSO ₄ ·7H ₂ O	1.7 mM	0.5	0.8 mM	0.25
Fe ₂ (SO ₄) ₃ ·XH ₂ O	2 mM	0.79	1 mM	0.39
Al ₂ (SO ₄) ₃ ·18H ₂ O	<0.2 mM	<0.16	<0.2 mM	<0.16
KI	0.5	83	0.25	41.5
NaF	>0.04	>1.6	0.04	1.6
As ₂ O ₃	1 mM	0.19	0.5 mM	0.1

Table 5. Maximum growth allowance concentration of *E. coli* in various salts broth

Salt name	Maximum growth allowance concentration			
	Inoculation 10 ml		Inoculation 50 ml	
	M	g/l	M	g/l
NaCl	2.05	120	1.71	100
Na ₂ SO ₄	>0.7	>100	>0.7	>100
NaHCO ₃	>1	>84	>1	>84
CaCl ₂	0.09	10	0.09	10
CaSO ₄ ·2H ₂ O	>0.07	>10	>0.07	>10
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.25	50.8	0.25	50.8
MgSO ₄ ·7H ₂ O	>1	>246.5	>1	>246.5
FeSO ₄ ·7H ₂ O	1.7 mM	0.5	1.7 mM	0.5
Fe ₂ (SO ₄) ₃ ·XH ₂ O	3.1 mM	1.25	3.1 mM	1.25
Al ₂ (SO ₄) ₃ ·18H ₂ O	<12.5 mM	<8.33	<12.5 mM	<8.33
KI	>0.1	>16.6	>0.1	>16.6
NaF	>0.04	>1.6	>0.04	>1.67
As ₂ O ₃	0.5 mM	0.09	<0.25 mM	<0.05

人工鉱泉 8 種類と天然温泉水 6 種類（内飲用泉 2 種類）について、発育増殖曲線の吸光度法により、蒸留水を対照として比較検討した結果、草津温泉水を除いて、いずれも対照と大きな差は認められなかった。草津温泉水では、1 N NaOH 溶液を用い、pH 値を 7.5 に修正したものについて検討した結果、対照に比較して大きな差は認められなかったため、大腸菌の発育を阻害したのは強酸性が主であったと思われる（Table 6, 7）。

（5）加温した温泉水の大腸菌培養試験は、大腸菌を

$5 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ 個接種した人工温泉水及び天然温泉水を $51.5^\circ \sim 52^\circ$ に 10 min 加温した後、大腸菌群試験と同様に酸酔管に加え、24~48 hr 培養した。加温により大腸菌の発育が阻止されたものは単純泉（箱根湯本人工温泉水）、石膏泉（伊香保人工温泉水）、弱食塩泉（四万人工温泉水）、酸性明礬緑礬泉（草津人工温泉水）及び硫黄泉（芦の湯人工温泉水）の 5 試料であった（Table 8, 9）。

2) 一般細菌試験

（1）化学成分別試験

Table 6. Effects on growth of *E. coli* by artificial hot spring water

Artificial hot spring		Growth of <i>E. coli</i> (Optical density)	
No.	Model name	24 hr	48 hr
1	Fukuroda	0.78	0.75
2	Hakone Yumoto	0.80	0.80
3	Ikaho	0.70	0.70
4	Ajiro	0.73	0.73
5	Shima	0.65	0.65
6	Kusatsu (pH 1.4)	0	0
	Kusatsu (pH 7.5)*	0.80	0.80
7	Hakone Ashinoyu	0.80	0.80
8	Shuzenji	0.80	0.80
	control (Distilled water)	0.83	0.83

24 hr: Incubation time is 24 hours.

48 hr: Incubation time is 48 hours.

*: pH adjusted by 1 N NaOH.

Table 7. Effects on growth of *E. coli* by natural hot spring water

Hot spring name	Growth of <i>E. coli</i> (Optical density)	
	A	B
Ikaho (Drinking)	0.60	0.56
Shima (Drinking)	0.75	0.70
Atagawa	0.70	0.65
Hakone Yumoto	0.65	0.62
Hakone Ashinoyu	0.80	0.75
Control (Distilled water)	0.80	0.80

A: Sample water 10 ml inoculated to 10 ml of double concentration of L.B medium.

B: Sample water 50 ml inoculated to 25 ml of three times concentration of L.B medium.

Table 8. Effects of heating on growth of *E. coli* in artificial hot spring water

Artificial hot spring		Inoculation number	Inoculated salt solution			
No.	Model name		50 ml		10 ml	
			24 hr	48 hr	24 hr	48 hr
1	Fukuroda	5600	+	+		
		1100			+	+
2	Hakone Yumoto	5600	+	+		
		1100			—	—
		10000	+	+		
		2100			+	+
3	Ikaho	5600	—	+		
		1100			—	—
		10000	+	+		
		2100			+	+
4	Ajiro	5600	+	+		
		1100			+	+
5	Shima	5600	—	+		
		1100			—	—
		10000	+	+		
		2100			+	+
6	Kusatsu	5600	—	—		
		1100			—	—
7	Hakone Ashinoyu	5600	—	—		
		1100			—	—
8	Shuzenji	5600	+	+		
		1100			—	+

Heating temperature: 52°, Heating time: 10 min.

24 hr: Incubation time is 24 hours.

48 hr: Incubation time is 48 hours.

Table 9. Effects of heating on growth of *E. coli* in natural hot spring water

Hot spring name	Inoculation number	Inoculated hot spring water			
		50 ml		10 ml	
		24 hr	48 hr	24 hr	48 hr
Kanbayashi 1	10000	+	+		
	3500			+	+
	10000	+	+		
Fukuroda	10000	+	+		
	2100			+	+
Control (distilled water)	5600	+	+		
	1100			+	+
	10000	+	+		
	2100			+	+

Heating temperature: 52°, Heating time: 10 min.

24 hr: Incubation time is 24 hours.

48 hr: Incubation time is 48 hours.

一般細菌に及ぼす影響については、供試菌に河川水中の一般細菌を使用した。そのため接種菌数が明確でないで、試験ごとに試料に変えて蒸留水を用い、得られた培養菌数を100とし、相対的比率をもって表示した。

化学成分では、 CaCl_2 、 MgSO_4 では 50 g/l、 NaCl 、 Na_2SO_4 、 NaHCO_3 、 MgCl_2 、 HBO_2 及び $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ では 10 g/l で、 Na_2SiO_3 、 SiO_2 が 1 g/l で、 Na_2S 、 NaBr 、 NaOH が 0.1 g/l で、また FeSO_4 、 $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 、 $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ 、 HCl 、 KI 、 Na_2HPO_4 が 0.01 g/l で、 CuSO_4 が 0.0001 g/l の濃度で、いずれも菌の発育が抑制され、蒸留水の測定値との間に統計学的な有意差が認められた (Table 10, 11)。

(2) 人工温泉水の影響

人工温泉水及び天然温泉水が一般細菌の培養試験に及ぼす結果を Table 12, 13 に示した。人工温泉水では、24 hr 培養で単純泉 (袋田)、強食塩泉 (網代) 及び酸性明礬緑礬泉 (草津) が発育菌数が少なく、統計的有意差が生じ、48 hr では、更に弱食塩 (四万) と重曹泉 (修善寺) で有意差が生じた。

天然温泉水では、菌数が蒸留水を試料としたときよりも少なく、統計的に有意差の生じたものは、上林温泉水、熱川温泉水、芦の湯、箱根湯本など7試料 (48 hr) であった。

(3) 加温した温泉水が一般細菌に及ぼす影響

一般細菌を接種した人工温泉水 No. 5 及び天然温泉水の上林温泉水の2試料は対照と大差がみられなかったが、ほかはいずれも減少傾向にあった。しかし、48 hr 培養後の成績では、人工温泉水 No. 3 の様に発育

菌集落が増加したものもあった (Table 14)。

考 察

西ドイツの温泉水及び薬用鉱泉の微生物学的試験³⁾では、大腸菌群の試験法として MaConky 培地、Endo 培地などを用いる方法に触れているが、我が国では、いまだ検査の指針がない。したがって、衛生細菌学的な細菌試験法の策定に際し、温泉水中の大腸菌 (群) 検出、あるいは一般細菌数の測定に、乳糖ブイヨン酸酵管による大腸菌群試験法及び標準寒地培地平板を用いた一般細菌試験法が、適用可能であるか否かについて検討した。

温泉水中に溶解するそれぞれの化学成分による大腸菌の発育阻害を検討するため、17種の化学成分を用いて培養試験を行ったところ、 NaCl 100 g/l と $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ 10 g/l 並びに Na_2S 1 g/l で発育阻害が生じた。このうち、 $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ では、試料と培地の混合時に混濁を生じ、沈澱物ができたことから、培地組成が変わった可能性がある。また、 Na_2S では pH が 12 以上の強アルカリ性となったことが発育阻害の原因であろう。そのほかの15種の化学成分では、大腸菌の発育阻害はなく、じゅうぶんに発育増殖した。更に13種類の化学成分について最小発育阻止濃度及び最大発育許容濃度も検討した。その結果では、各濃度とも通常の温泉水に含まれる溶解成分濃度より高く、実際の温泉水の試験に影響は少ないものと考えられる。しかし、本試験で低い濃度を示した $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 及び $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ は、前者の 2 mM の pH は 2.5 であり、1 mM で pH 2.6 を示し、後者は 0.2 mM で pH 3.9 を示した。この

Table 10. Effect on growth of heterotrophic bacteria by salts in natural hot spring water (1) (Standard plate count)

Salt name	Concentration g/l	pH	%*
Distilled water		7.0	100
NaCl	100	5.9	29
	10		70
	1		93
	0.1		92
Na ₂ SO ₄	10	6.0	58
	1		86
	0.1		87
NaHCO ₃	10	8.9	45
	1	8.4	113
	0.1	7.6	100
CaCl ₂	50	7.0	35
	10		90
	1		84
	0.1		91
CaSO ₄	2.1	6.4	96
	1		109
	0.1		91
MgCl ₂	10	6.2	64
	1		85
	0.1		84
MgSO ₄	50	7.0	44
	10		84
	1		84
	0.1		85
FeSO ₄	10	3.5	1
	1	4.4	30
	0.1	4.7	46
	0.01	5.6	48
	0.001	5.6	98
Fe ₂ (SO ₄) ₃	9	1.8	1
	0.9	2.4	12
	0.09	2.9	17
	0.01	4.6	40
	0.001	5.8	81
Al ₂ (SO ₄) ₃	10	3.4	1
	1	3.4	12
	0.1	3.4	17
	0.01	4.1	45
	0.001	5.7	92
Na ₂ SiO ₃	1	10.7	5
	0.1	9.0	98
	0.01	7.3	85
KCl	10	5.4	90
	1	5.9	83
	0.1		90
	0.01		82

* : $\frac{\text{sample count}}{\text{distilled water count}} \times 100$

Table 11. Effect on growth of heterotrophic bacteria by salts in natural hot spring water (2) (Standard plate count)

Salt name	Concentration g/l	pH	%*
HBO ₂	10	4.9	23
	2	5.6	111
	1	5.8	83
	0.1		90
	0.01		82
Na ₂ S	1	12	11
	0.1	10	81
	0.01	6.9	95
SiO ₂	1	9.8	50
	0.1	9.0	96
	0.01	7.0	104
MnSO ₄	1	6.2	93
	0.1		86
	0.01		105
	0.001	6.6	82
Na ₂ S ₂ O ₃	10	6.8	79
	1		105
	0.1		114
	0.01		106
HCl	1	1.5	3
	0.1	2.9	16
	0.01	4.6	77
	0.001	6.6	91
NaOH	1	10.5	2
	0.1	9.7	82
	0.01	8.7	102
	0.001	7.0	102
CuSO ₄	100	5.0	1
	10	6.1	2
	1	6.4	6
	0.1		83
	0.01		106
NH ₄ Cl	100	6.6	91
	10	7.1	101
NaBr	100	6.4	79
	10		90
KI	100	6.5	35
	10		71
NaF	100	7.2	98
	10	6.8	103
H ₃ AsO ₃	10	6.8	101
	1		106
	0.1		94
Na ₂ HPO ₄	100	7.6	31
	10	7.0	66

* : $\frac{\text{sample count}}{\text{distilled water count}} \times 100$

Table 12. Growth of heterotrophic bacteria by artificial hot spring water (Standard platet count)

Artificial hot spring		pH	24 hr incubation	48 hr incubation
No.	Model name		$\frac{\text{sample}}{\text{distilled water}} \times 100$ %	$\frac{\text{sample}}{\text{distilled water}} \times 100$ %
1	Fukuroda	8.8	81	81
2	Hakone Yumoto	8.4	89	89
3	Ikaho	8.2	89	89
4	Ajiro	7.0	67	67
5	Shima	8.2	91	81
6	Kusatsu	1.4	1	1
7	Hakone Ashinoyu	8.0	91	88
8	Shuzenji	9.3	86	83

Table 13. Growth of heterotrophic bacteria by hot spring water (Standard plate count)

Hot spring name		pH	24 hr incubation	48 hr incubation
			$\frac{\text{sample}}{\text{distilled water}} \times 100$ %	$\frac{\text{sample}}{\text{distilled water}} \times 100$ %
Kanbayashi	1	7.2	84	83
	2	8.2	84	90
	3	7.0	84	86
Fukuroda	1	8.8	102	101
	2	9.1	85	89
Atagawa	1	8.6	92	90
	2	8.8	75	75
Ashinoyu	1	8.2	54	46
	2	8.2	81	61
Hakone Yumoto	1	8.8	79	77
	2	8.8	92	79

Table 14. Effect of heating on growth of heterotrophic bacteria in artificial hot spring water and natural hot spring water

Artificial hot spring		pH	24 hr incubation	48 hr incubation
No.	Model name		$\frac{\text{sample}}{\text{distilled water}} \times 100$ %	$\frac{\text{sample}}{\text{distilled water}} \times 100$ %
1	Fukuroda		71	79
2	Hakone Yumoto		64	72
3	Ikaho		57	85
4	Ajiro		39	57
5	Shima		89	83
6	Kusatsu		10	7
7	Hakone Ashinoyu		68	85
8	Shuzenji		39	62
Kanbayashi			71	89

Heating temperature: 52°, Heating time: 10 min.

両者が低い濃度を示した原因の一つに、添加により培地の pH が酸性になったことも関係があると考ええる。また As_2O_3 は培地に添加すると混濁を生じたため、混濁が測定に支障をきたすので、メンブランフィルターを用いて沈澱をろ過したのち試験した結果、培地組成に変化を起こしたこともその一因ではないかと考える。

人工温泉水と天然温泉水の培養試験でも、pH が 1.4 と強酸性の人工温泉水 No. 6 (草津) 以外は大腸菌の発育は良好であった。一方、温泉水は多くの場合、温水あるいは熱水であり、人為的汚染を受けたときにも水温が汚染菌に何等かの影響をあたえるものと考えられる。そこで人工温泉水及び天然温泉水を 50° 附近の中温に 10~20 min 加温した場合の大腸菌の発育状態を試験したところ、温泉水の種類によっては発育が抑制された。加温しても大腸菌がじゅうぶんに発育する温泉水もあることから、発育抑制は熱による菌の死滅ではなく、溶解成分と関係があると考えられるが、その原因は不明である。

以上の試験から温泉水の人為的汚染を大腸菌群を指標として推定することは、強酸性かあるいは強アルカリ性泉を除いて、大腸菌の生存が可能であることから、じゅうぶん意味があると考ええる。天然温泉中に存在する細菌としては、*Chromatium* 属の種が最も多く、*Thiobacillus* 属の種が最も広く分布していることが知られている³⁾。しかし、ここでいう一般細菌とは、aerobic 及び facultative anaerobic heterotrophic bacteria を指し、標準寒天培地を用い、36° で 24 hr 培養した場合、培地上に集落を形成する生菌をいい、特定の菌種を指すものでない。したがって一般細菌は、水中に常在する菌、土壌細菌、人畜由来の腸内細菌など、その種類は多岐にわたっている。一般細菌による化学成分別培養試験、人工及び天然温泉水試験、加温試験のいずれもが、大腸菌の場合に比較して発育阻害を多く受けている。これは前述のごとく、一般細菌が

多種類の菌を含むため、一部の種類が化学成分や熱の影響を受けやすいと、全体の菌数にその影響が生じるからであろう。しかし、発育阻害が生じた場合でも一般細菌の発育が完全に抑制されるのは、強酸泉、強アルカリ泉のほか CuSO_4 のみであり、人為的汚染の指標として一般細菌の培養試験は意味があると考えられる。

結 論

温泉水の公衆衛生学的管理のための、細菌試験法を策定する目的で、従来、飲料水などで採用されている大腸菌群並びに一般細菌試験の温泉水への適用の可否について検討した。

温泉の溶解成分別での培養試験の結果、大腸菌は、強酸、強アルカリの場合以外の大腸菌の大部分の溶解成分中で発育が可能であり、一般細菌は発育阻害がみられ菌数の減少が起こるものの CuSO_4 の以外は生育可能である。

人工温泉、天然温泉でも強酸性の草津温泉水以外は、大腸菌、一般細菌とも生育した。また草津温泉水も pH を中性に修正することにより大腸菌の発育は可能であった。以上の結果から、温泉水においても人為的汚染の指標として大腸菌群と一般細菌はじゅうぶん意味があり、その試験方法は、飲料水などにおける試験方法の一部を改変することで可能であると考えられる。

本研究は環境庁昭和56年度委託研究、温泉中の細菌等試験法の策定に関する研究（委託先：中央温泉研究所）研究費により行った。

文 献

- 1) APHA: *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 15th Ed., p. 789 (1980), Washington
- 2) 日本水道協会：上水試験方法, p. 531 (1978)
- 3) L. Acker et al.: *Handbuch der Lebensmittelchemie*, p. 1150 (1969), Springer-Verlag, Berlin
- 4) 江本義数：温泉研究, 14, 20 (1958)

Cyclohexanone の 2,4-dinitrophenylhydrazine による比色定量

土屋利江・山羽 力

Spectrophotometric Determination of Cyclohexanone
by the Use of 2,4-Dinitrophenylhydrazine

Toshie TSUCHIYA and Tsutomu YAMAHA

Cyclohexanone (CHnone) was simply determined as its hydrazone formed by the reaction with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNP). The wine red color, which appeared after the addition of alkaline solution to the reaction mixture containing the hydrazone, was stable within 60 min.

Linear relationship between the absorbance at 430 nm and the concentration of CHnone was observed with the analytical method described below; To 3 ml of the sample solution (CHnone, 0.5–4.0 μ moles), 1 ml of 0.15% DNP resolved in 1.5 N HCl was added in a stoppered test tube, the mixture was heated at 70° for 35 min, and cooled at about 15° for 15 min. Then, 6 ml of 1.5 N NaOH in 80% ethanol was added to the cooled reaction mixture (4 ml), stood for 10 min, and diluted 8-folds with water. The absorbance of the diluted sample was determined at 430 nm.

(Received May 31, 1982)

ま え が き

Cyclohexylamine の代謝産物である Cyclohexanone (CHnone) の定量は、既にガスクロマトグラフィーによる方法^{1,2)}があるが、定量操作に比較的時間がかかる。また、2,4-dinitrophenylhydrazine (DNP) を使用して、カルボニルやアルデヒド化合物を比色定量する方法も報告³⁾されているが、反応系が有機溶剤であり、発色後の色の安定性も悪い。

今回、著者らは、水溶液中の CHnone をそのまま試料として DNP と反応させ、アルカリ添加後発色した安定な呈色液を比色定量する方法を検討したので報告する。

実 験 方 法

1. 試薬

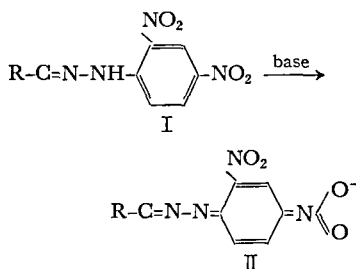
DNP は和光純薬工業製、特級試薬を、CHnone は東京化成工業製、特報試薬を使用した。エタノールは和光純薬工業製、特級試薬 500 ml に対して DNP を約 5 g、更に 2～3 滴の濃塩酸を加えた後、蒸留して得られた Carbonyl free のものを使用した。

2. 装置

分光光度計は日立製作所製、MODEL 101 を使用した。

3. 原理及び操作法

原理：DNP とカルボニル化合物を塩酸酸性下で反応させる。生じた 2,4-dinitrophenylhydrazone (I) にアルカリを加えて、液性をアルカリ性にする、resonating quinoidal ion (II) になり、この化合物の示す wine red color の呈色度を吸光度で測定する。



操作法：CHnone 水溶液 3 ml を共栓付試験管（内径 16 mm，高さ 180 mm）にとり、0.15% DNP 溶液（1.5 N 塩酸に溶解後ろ過した液）1 ml を加えて栓をした後、70° で 35 分間加熱した。流水下で 15 分間冷却後、1.5 N 水酸化ナトリウム溶液（80% エタノールに溶解）6 ml を加え、攪拌後 10～60 分間放置し、水で適当に希釈し、430 nm における吸光度を測定した。

CHnone 溶液のかわりに蒸留水 3 ml を使用し、以後同様の操作に従って得られた試料を対照として、各 CHnone 試料の吸光度を測定した。

結果及び考察

1. 吸収曲線

0.2 mM CHnone 水溶液 1.5 ml 及び 0.025% DNP (エタノール: 5 N 塩酸=2:1 の混液に溶解) 1.5 ml を共栓付試験管に入れ, 50° で30分間反応後, 流水下で15分間冷却し, 1.5 N 水酸化カリウム溶液 (80% エタノールに溶解) 3 ml を加えた。10分間放置後, 390~470 nm の吸光度を測定した (Fig. 1)。

アルカリ溶液中での Cyclohexylhydrazone の吸収極大は 430 nm 付近で, Jordan らの結果³⁾と一致した。430 nm での吸光度を測定することに定めた。

2. 反応時間

CHnone (2 μ moles) 水溶液 3 ml に, 0.15% DNP 溶液 (1.5 N 塩酸に溶解) 1 ml を加え, 70° にて 10~60分間水浴にて反応後, 流水下で15分間冷却した。以後, 操作法に従って発色後, 蒸留水で5倍に希釈し, O. D. _{430nm} を測定した (Fig. 2)。

反応時間20分で, ほぼプラトーに達し, 60分では吸光度の減少がみられた。30~40分の間に最高の吸光度を示したので, 反応時間は35分と定めた。

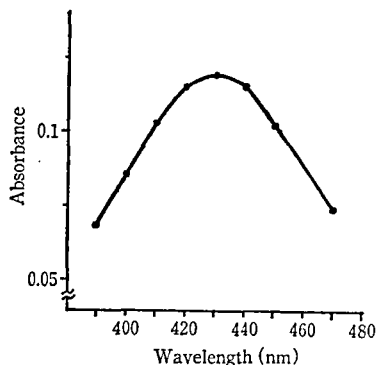


Fig. 1. Absorption spectrum of cyclohexylhydrazone in alkali solution

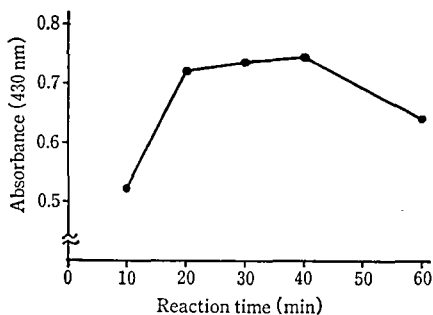


Fig. 2. Relationship between the reaction time and OD_{430nm}

3. 安定性

CHnone (4 μ moles) 水溶液 3 ml を前述の操作に従って DNP と反応後, 1.5 N 水酸化ナトリウム溶液を加え, 最高 120 分間放置した。対照には, 前述の通り CHnone 溶液のかわりに蒸留水を使用した。

アルカリ添加後経時的に抜取り, 蒸留水で12倍に希釈し, O. D. _{430nm} を測定した (Fig. 3)。

アルカリ添加後10~60分の間に最高の吸光度を示し, 120 分後には, 14%の吸光度の減少がみられた。したがって, 10分間放置後, 60分以内に測定することに定めた。

4. DNP 及び水酸化ナトリウム溶液の濃度

DNP (分子量: 198.14) の濃度は, CHnone (分子量: 98.14) を最高 4 μ moles まで測定するために, 最低等 mole (4 μ moles) を加えなければいけない。一方, 反応を速く, 完全に進行させることは, 定量法にとって重要なことなので, 約2倍量の DNP (1500 μ g = 7.6 μ moles) を CHnone 溶液に加えることとした。

次に, DNP と CHnone との反応は, 酸性下で進行するので, DNP を塩酸に溶かして使用することにした。前述した 1500 μ g の DNP を 1 ml の塩酸溶液に溶かすためには, 約 1.5 N 以上の塩酸濃度が必

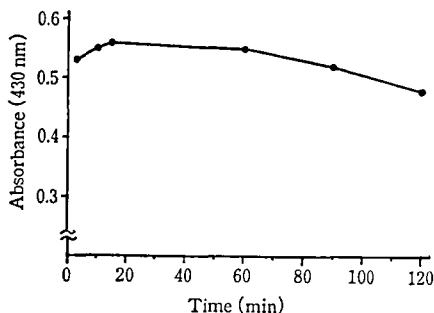


Fig. 3. Stability of the color (OD_{430nm}) after the addition of alkali solution

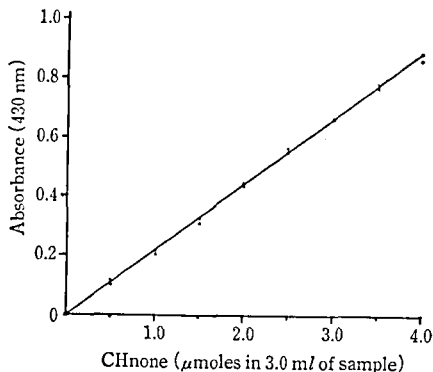


Fig. 4. Calibration curve of CHnone

要であった。塩酸を過剰に濃くした場合、呈色時に必要なアルカリの量も増加するので、塩酸濃度は 1.5 N と定めた。

アルカリ液として、1.5 N 水酸化カリウム、14%アンモニア及び 1.5 N 水酸化ナトリウムの 3 種について比較した所、水酸化ナトリウムに比べて、水酸化カリウムを用いた時、対照の示す吸光度（盲検値）が 2 倍程度高くなり、アンモニアの場合には、CHnone 試料による吸光度が、水酸化ナトリウムに比べ、70%の低下がみられた。

また、水酸化ナトリウム濃度 2 N では、添加後コロイド沈澱を生じ、1 N では 1.5 N に比べ 20%程度吸光度が低く、発色に不充分と考えられたので、1.5 N 水酸化ナトリウムを使うことにした。更に、水酸化ナトリウム溶液の液量も、反応液(DNP と CHnone 混液)に対して、1～2 倍容が、定量的に発色させるためには必要であることが判明した。したがって、1.5 倍容、6 ml（反応液 4 ml×1.5 vol）の 1.5 N 水酸化ナトリウム溶液を使用することにした。

5. 検量線の作製

検討して定められた操作法（実験方法、3）に従って検量線を作製した。

アルカリ添加した試料を 10 分間放置後、蒸留水で 8 倍に希釈して吸光度を測定した結果、Fig. 4 に示したように、Sample 3 ml 中の CHnone 量 (x) と O. D._{430nm} (y) との間に直線性が認められ ($y=0.224x-0.012$; $r=0.999$)、本実験操作により CHnone の定

量を行えることが判明した。

Jordan³⁾は hydrocarbon や organic ester 中のケトンやアルデヒドの分析法を検討し、DNP を使用して、480 nm での吸光度により測定している。かれらは、ヘキサソーアルコール混液中に濃塩酸を滴下し、アルデヒドやケトン化合物と DNP との反応を行わせている。またかれらの実験では、反応後の hydrazone 溶液にアルカリ添加後発色した呈色液の吸光度が時間とともに減少した。したがって、正確に再現性よく測定するために、 $\lambda_{\max}$ での吸光度ではなく、減少度のより小さい 480 nm における吸光度を、アルカリ添加後 8～15 分以内に測定することを勧めている。

かれらの方法では一度に多数の試料を測定したい場合に大きな支障をきたす。

著者らの方法では、 $\lambda_{\max}$ である 430 nm での吸光度を、アルカリ添加後 1 時間以内に測定すれば、再現性の良い結果を得る。

また Jordan³⁾は、水溶液中で DNP と Sample とを反応させた液を用いた比色定量について検討していない。著者らは、水溶液中の CHnone を測定する目的があったため、本定量法の検討を行った。

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) D.E. Jordan *et al.*: *Anal. Chem.*, **36**, 120 (1964)

合成化学研究部で合成した化合物の抗腫瘍効果 (VI)

宮原美知子・神谷庄造・中館正弘・末吉祥子
丹野雅幸・宮原 誠

Antitumor Effect of Compounds Synthesized in
the Division of Synthetic Chemistry (VI)

Michiko MIYAHARA, Shozo KAMIYA, Masahiro NAKADATE, Shoko SUEYOSHI,
Masayuki TANNO and Makoto MIYAHARA

As an extension of this series, the antitumor activity of 310 compounds synthesized in the Division of Synthetic Chemistry was tested with Donryu rats bearing AH13 cells and also with CDF₁ mice bearing AH13 cells. Forty eight compounds of these were divided into five groups consisting of 1,3,4-thiadiazoles, 1,3-diphenyl-1-nitrosoureas, phenylisocyanates, phenyldiazonium salts and other compounds.

Some of 1,3,4-thiadiazoles were active against L1210. Whereas, some of 1,3-diphenyl-1-nitrosoureas were active against AH13. Phenyldiazonium salts were cytologically effective against AH13 cells.

(Received May 31, 1982)

合成化学研究部は、昭和47年11月より、当部で合成した化合物を中心に、その抗腫瘍性を2種の方法を用いてスクリーニングを行っているが、現在まで310種の化合物についてのスクリーニングを終了した。これらのうち、255種の化合物についてのスクリーニング結果は本誌で既に報告した¹⁻⁵⁾。今回、既知化合物も含め新しく合成した39種及び関連化合物として市販品の9種の48種(E-256~E-310)の化合物について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] AH13 スクリーニングシステム

10⁶個のAH13細胞をドンリュウラットの腹腔内に移植し、3日後に腹水を採取し、培養状態を確かめた上でテストに使う動物を決めた。細胞効果をみる場合には、1投与量に1匹の動物を用い、腹腔内投与後、翌日、翌々日そして翌々々日と腹水を採取し、染色して、顕微鏡下で細胞効果を観察した。連続投与の実験の場合は、1群6匹とし、処置群は2~3群とした。移植後3日目より毎日1回計5回連続投与により、効力を検討した。効力の評価は移植後60日での生存率によった。判定基準は次のように定めた。

[2] L1210 スクリーニングシステム

10⁶個のL1210細胞をCDF₁マウスの腹腔内に移植し2日目と6日目に腹腔内に化合物を投与した。1

AH13 スクリーニングの効果判定基準

評 価	60日生存率
—	0/6
±*	0/6~1/6
+	2/6~3/6
++	4/6~6/6

* ただし、60日生存動物がないものでも、60日以内での生存延長のみられたものを含めた。

群3匹で3~4群の処置群を使った。効果は最高 T/C (処置群の平均生存日数/対照群の平均生存日数) %により表示した。T/C%≥125 を有効の日安とした。

2. 化合物

今回スクリーニングを行った化合物は5系統に分類できる。その分類、化学名及び融点又は分解点は次のとおりである。

(1) 1,3,4-チアジアゾール類

E-256: Phthalic acid di(1,3,4-thiadiazole-2-yl) amide,
mp 192°.

E-259: 2-(4-Methoxybenzoyl)amino-1,3,4-thiadiazole,
mp 227—228°.

E-260: 2-(4-Nitrobenzoyl)amino-1,3,4-thiadiazole,
mp>280°.

E-264: 2-(4-Chlorobenzoyl)amino-1,3,4-thiadiazole,

- mp 258—259°.
- E-265: 2-Propanoylamino-1,3,4-thiadiazole, mp 224—227°.
- E-266: 2-Butanoylamino-1,3,4-thiadiazole, mp 174—175°.
- E-268: Sulfamethizole. 市販品 mp 208—211°.
- E-270: 2-Mercapto-5-(2-pyridylthio)-1,3,4-thiadiazole, mp 177°.
- E-271: 2-Methylsulfonylamino-3-methylsulfonyl-5-methyl-1,3,4-thiadiazole, mp 194—195°.
- E-272: 2-Azido-5-methyl-1,3,4-thiadiazole, mp 89.5—90.5°.
- E-273: 1,3-Bis(5-methyl-1,3,4-thiadiazole-2-yl) triazene, mp 243—244°.
- E-274: 2,5-Di (5-uracilmethyl)thio-1,3,4-thiadiazole, mp 263—264°.
- E-276: 2-Acetamido-5-benzylthio-1,3,4-thiadiazole, mp 167—169°.
- E-278: 2-Mercapto-5-(4-pyridyl)thio-1,3,4-thiadiazole hydrochloride, dp 178—180°.
- E-279: 2-Methylcarbamoylthio-4-methylcarbamoyl-5-thio-carbonyl-1,3,4-thiadiazole, dp 208°.
- E-280: 6-(4-Bromophenyl)imidazo[2,1-b]-1,3,4-thiadiazole, mp 184—185°.
- E-281: Tris[(1,3,4-thiadiazole-2-yl) amino]phosphate, mp 255—260°.
- E-282: 2-Hydroxy-5-methyl-1,3,4-thiadiazole, mp > 300°.
- E-300: 2-Mercapto-5-methylurcido-1,3,4-thiadiazole, dp 243—244°.
- E-303: 2,5-Bis(1-oxido-4-pyridyl)-1,3,4-thiadiazole, mp > 250°.
- E-304: 2,5-Bis(4-pyridyl)-1,3,4-thiadiazole dimethosulfate, dp 222—223°.
- E-308: 2-Phenylacetylamino-1,3,4-thiadiazole, mp 223°.
- (2) 1,3-ジフェニル-1-ニトロソ尿素類
- E-257: 1,3-Di(4-chlorophenyl)-1-nitrosourea, dp 134°.
- E-261: 1-(4-Methoxyphenyl)-3-phenyl-1-nitrosourea, dp 111°.
- E-262: 1-(4-Tolyl)-3-(4-chlorophenyl)-1-nitrosourea, dp 115°.
- E-263: 1-(4-Methoxyphenyl)-3-(4-chlorophenyl)-1-nitrosourea, dp 139°.
- E-296: 1,3-Di (4-methoxyphenyl)-1-nitrosourea, dp 101°.

- E-299: 1,3-Di(4-tolyl)-1-nitrosourea, dp 105°.
- (3) フェニルイソシアナート類
- E-290: Phenylisocyanate. 市販品 mp -30°.
- E-291: 4-Chlorophenylisocyanate. 市販品 mp 31°.
- E-292: 4-Methoxyphenylisocyanate. 市販品
- E-293: 4-Nitrophenylisocyanate. 市販品
- (4) フェニルジアゾニウム塩類
- E-258: 4-Chlorophenyldiazonium hexafluorophosphate. 市販品
- E-288: 4-Nitrophenyldiazonium fluoroborate. 市販品
- E-309: Phenyldiazonium hexafluorophosphate. 市販品
- (5) その他
- E-267: Indolo[3,2-b]carbazole, mp > 250°.
- E-269: 1-Methoxy-2,4-dimethylbenzo [g] quinolinium methosulfate, dp 171—172°.
- E-275: 1-(4-Bromophenyl)-3-cyano-3-methyltriazene, mp 75—76°.
- E-283: 5H-Indeno[1,2-b]pyridine hydrochloride, dp 250°.
- E-284: 1-Methyl-5H-indeno[1,2-b]pyridinium iodide, mp > 270°.
- E-285: 1-Nitroso-2-imidazolidithion, mp 49°.
- E-286: 1-Methylbenzo[f]quinolinium iodide, mp 196°.
- E-287: 3-Hydroxyflavon, mp 99—100°.
- E-297: Diphenylcarbamoyl chloride, mp 83°. 市販品
- E-301: 1-Methyl-1-(3-pyridylmethyl)-3-(4-tolyl)triazene, bp 170°/1 mmHg.
- E-302: 3-Hydroxymethyl-4,5,6,7-tetrahydropyrido [3,4-d]imidazole-6-carboxylic acid, dp 190°.
- E-306: 2-Imino-3-(4-bromophenacyl)-2,3-dihydro-2-thiazoline hydrobromide, mp 213°.
- E-307: 6-(4-Bromophenyl)-2,3-dihydroimidazolo-[2,1-b]thiazole, mp 178°.
- E-310: 1-Methyl-1-(3-pyridylmethyl)-3-(4-tolyl)-3-nitrosourea, unstable solid.

Results

Compound number	AH13 screening	L1210 screening Max. T/C%
(1) 1,3,4-Thiadiazoles		
E-256	—	97
E-259	—	123
E-260	—	136
E-264	—*	134
E-265	—*	166

E-266	—*	134
E-268	—*	105
E-270	—*	96
E-271	—*	96
E-272	—*	124
E-273	—*	114
E-274	—*	112
E-276	—*	129
E-278	—*	
E-279	—*	112
E-280	—*	114
E-281	—*	133
E-282		103
E-300		113
E-303		98
E-304		107
E-308		113
(2) 1,3-Diphenyl-1-nitrosoureas		
E-257	+	115
E-261	+	123
E-262	±	115
E-263	—	116
E-296	+	113
E-299	+	129
(3) Phenylisocyanates		
E-290	—	
E-291	±	
E-292	—	
E-293	—	
(4) Phenyl diazonium salts		
E-258	±	
E-288	±	104
E-309	—, +*	105
(5) Miscellaneous compounds		
E-267	—*	
E-269		100
E-275	+*	
E-283	—*	
E-284	—*	
E-285	—*	
E-286	—*	
E-287	—*	
E-297	—	
E-301	—*	
E-302		99
E-307		99
E-310	—*	

3. スクリーニング結果のまとめ

以上の結果を次のように集計した。

化合物群	AH13 スクリーニング ≥ ±	L1210 スクリーニング Max. T/C% ≥ 125
(1) 1,3,4-チアジアゾール類		
	0/17	6/21
(2) 1,3-ジフェニル-1-ニトロソ尿素類		
	5/6	1/6
(3) フェニルイソシアナート類		
	1/4	
(4) フェニルジアゾニウム塩類		
	3/3	0/2
(5) その他	1/10	0/3

これらの1,3,4-チアジアゾール誘導体は動物体内において2-アミノ-1,3,4-チアジアゾールに分解され、このものを活性本体として抗腫瘍性を発揮すると考え、合成デザインされた化合物であった。これら誘導体は、2-アミノ-1,3,4-チアジアゾールと同様にL1210にのみ効力を示したことから、想定通りであると考えた。ただし2-アミノ-1,3,4-チアジアゾール以上の抗L1210作用を示したものはE-265のみであった。

1,3-ジフェニル-1-ニトロソ尿素類は主として抗AH13作用を示した。これらの作用本体としてはフェニルジアゾニウムカチオンが考えられ、フェニルジアゾニウム塩類の示すAH13に対する細胞効果が、1,3-ジフェニル-1-ニトロソ尿素類の示す細胞効果と同様であることから裏付けられた。

その他の化合物群においては特筆すべき抗腫瘍活性を示したものはなかった。

文 献

- 1) 安齊美知子ら：衛生試験，**94**，148 (1976)
- 2) 宮原美知子ら：衛生試験，**96**，91 (1978)
- 3) 宮原美知子ら：衛生試験，**97**，107 (1979)
- 4) 宮原美知子ら：衛生試験，**98**，123 (1980)
- 5) 宮原美知子ら：衛生試験，**99**，111 (1981)

* 細胞効果を顕微鏡下で判定

国立衛生試験所アスコルビン酸標準品 (Control 811)

徳永裕司・木村俊夫・川村次良

Ascorbic Acid Reference Standard (Control 811)
of National Institute of Hygienic Sciences

Hiroshi TOKUNAGA, Toshio KIMURA and Jiro KAWAMURA

A material of ascorbic acid was tested for the preparation of "Ascorbic Acid Reference Standard". Analytical data obtained were as follows; loss on drying: 0.02%, optical rotation: $[\alpha]_D^{20} = +21.5^\circ$, melting point: 189.2° (decomposition), infrared spectrum: same as the Ascorbic Acid Reference Standard (control 781), and assay: 99.6% by iodometry, 100.5% by 2,6-dichlorophenol indophenol method.

This material was authorized as the Japanese Pharmacopoeia Standard.

(Received May 31, 1982)

第十改正日本薬局方(JPX)アスコルビン酸散、及び同注射液の定量に用いる国立衛生試験所標準品(日本薬局方標準品)“アスコルビン酸標準品”(control 811)を製造したので報告する。

1. 原料

武田薬品工業株式会社より購入した。

2. 参照物質及び試薬

日本薬局方標準品(control 781)。試薬は試薬特級品を用いた。

3. 装置

ヤマト科学製融点測定装置、応用電気研究所製旋光計、及び日本分光 AS-102 型赤外分光光度計を用いた。

4. 試験方法

i) 乾燥減量、旋光度、定量は、JPX アスコルビン酸、及び同散の試験法を準用し、融点(分解点)は、JPX 一般試験法を準用した。

ii) 赤外吸収スペクトル：臭化カリウム錠剤法を用いた。

5. 試験成績

i) 性状：白色の結晶ではない。

ii) 乾燥減量：0.02% (1g, シリカゲル, 24時間)

iii) 旋光度： $[\alpha]_D^{20} = +21.5^\circ$ (1g, 水, 20 ml, 100 mm)

iv) 融点： 189.2° (分解)

v) 赤外吸収スペクトル：Fig. 1 に示す。標準品(control 781)と同一のスペクトルを与えた。

vi) 定量：ヨウ素法—99.6%, 2,6-ジクロロフェノールインドフェノール法—100.5%。

結 論

標準品原料として入手したアスコルビン酸を日本薬局方標準品(control 781)と比較検討した。各種の試験の結果、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。

終わりに、標準品の製造にあたり協力いただいた武田薬品工業株式会社に感謝いたします。

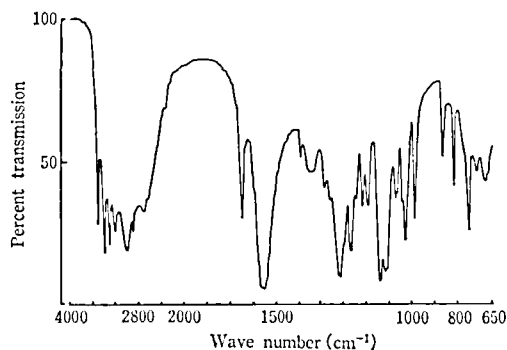


Fig. 1. Infrared spectrum of Ascorbic Acid

国立衛生試験所塩酸チアミン標準品 (Control 811)

太田美矢子・木村俊夫・川村次良

Thiamine Hydrochloride Reference Standard (Control 811)
of National Institute of Hygienic Sciences

Miyako OHTA, Toshio KIMURA and Jiro KAWAMURA

“Thiamine Hydrochloride Reference Standard (Control 811)” for the Japanese Pharmacopoeia was prepared. The following analytical data were obtained; melting point: 238. 7°, infrared spectrum: same as the Japanese Pharmacopoeia Standard (Control 781), pH: 3.3 (1% in water), loss on drying: 0.4%, water content: 0.4%, nitrogen: 16.7%, thin-layer chromatography: no contaminant, assay: 100.7% by the JP-X method (thiochrome method), 99.5% by UV method (246 nm) and 99.7% by total chloride method. On the basis of these results, the material was authorised as the Japanese Pharmacopoeia Standard (Control 811).

(Received May 31, 1982)

第十改正日本薬局方 (JPX) の塩酸チアミン、同散、同注射液、硝酸チアミン、乾燥酵母の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 武田薬品工業株式会社より購入した (JPRS-M)。

2. 参照物質及び試薬 日本薬局方標準品 (Control 781, JPRS), 試薬は試薬特級品を用いた。薄層板はメルク製プレコートシリカゲル 60 F₂₅₄ を用いた。

3. 装置 分光光度計 (島津製 QV-50 型), 赤外分光光度計 (日本分光製 A-102 型), 微量水分測定装置 (平沼産業製 AQ-1 型), 窒素分析装置 (コールマン製 29A 型) を用いた。

4. 試験方法 特に記すもののほかは, JPX の一

般試験及び医薬品各条 “塩酸チアミン” の試験方法を準用した。定量法は, 局方記載のチオクロム法 (JPX 法) のほか, 246 nm の吸光度を測定する方法 (UV 法) 及び 0.01 N 硝酸銀液による滴定法 (総塩素法) も合わせて行った。

5. 試験成績

1) 性状 白色の結晶性の粉末で, わずかに特異なにおいがある。

2) 融点 238. 7° ($n=8$, C. V.=0.34%), なお JPRS は 240. 7° ($n=5$, C. V.=0.31%) であった。

3) 溶状 JPRS-M 1 g を水 5 ml に溶かすとき, 液は無色透明であった。

4) pH 3.3 (1% 水溶液)

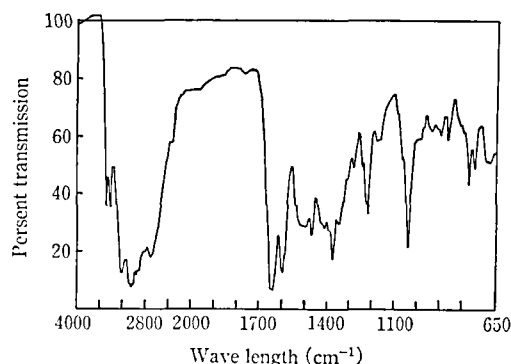


Fig. 1. Infrared spectrum of material for “Thiamine Hydrochloride Reference Standard”

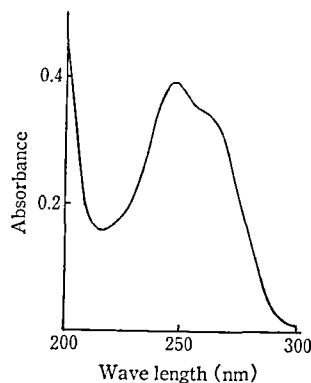


Fig. 2. Ultraviolet spectrum of material for “Thiamine Hydrochloride Reference Standard”

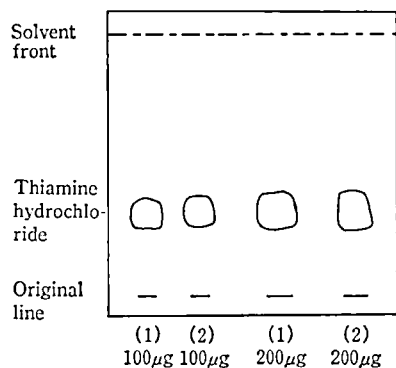


Fig. 3. Thin-layer chromatogram of thiamine hydrochloride

Conditions: TLC plate silica gel 60 F₂₅₄ (Merck, pre-coated, 0.25 mm), lower layer of the mixture of 10% sodium acetate-benzene-acetone-methanol (5:3:1:1), detected under UV light (254 nm). (1) JPRS-M, (2) JPRS

5) 赤外吸収スペクトル KBr 錠剤法で測定した JPRS-M の赤外吸収スペクトルを Fig. 1 に示す。これを JPRS のスペクトルと比較するとき、両者の吸収は同一波数のところで認め、またそれらの吸収強度は等しかった。

6) 紫外吸収スペクトル JPRS-M を塩酸溶液に溶かしたときの紫外吸収スペクトルを Fig. 2 に示す。JPRS-M 2.5mg を量り、0.001 N 塩酸溶液 (pH 3.0) を加えて溶かし 250 ml とし、測定した。極大波長は 246 nm であった。

7) 乾燥減量 0.4% (0.1 g, 105°, 2時間)

8) 水分 0.4% (0.5 g)

9) 窒素 16.7% ($n=3$, C. V.=0.28%, 理論値: 16.61%)

10) 薄層クロマトグラフ法 JPRS-M 及び JPRS のそれぞれ 5mg にメタノール 1 ml を加えて溶かし、その 20 μ l 及び 40 μ l を用いて薄層クロマトグラフィーを行った結果を Fig. 3 に示す。なお、検出は 254 nm の紫外線を照射して観察した。いずれも 40 μ l (200 μ g) の塗布量でも、主スポット以外に不純物のスポットは認められなかった。

11) 定量 JPRS-M は JPX 法 (チオクロム法)、UV 法、総塩素法により定量を行うとき、それぞれ 100.7% ($n=10$, C. V.=0.87%), 99.5% ($n=8$, C. V.=0.37%), 99.7% ($n=3$, C. V.=0.29%) であった。ただし、JPX 法と UV 法は JPRS を 100.0% としたときの値である。

結 論

標準品原料として入手した塩酸チアミンを日本薬局方標準品 (Control 781) と比較検討した。その結果、各種試験方法での値は良好であり、特に定量値はこの標準品と良く一致した。これらの試験結果により、今回入手した標準品原料は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、Control 811 として配布を開始した。終わりに標準品を製造するに当たり協力して頂いた武田薬品工業株式会社に感謝いたします。

国立衛生試験所ルチン標準品 (Control 731)

太田美矢子・木村俊夫・川村次良

Rutin Reference Standard (Control 731) of National Institute of Hygienic Sciences

Miyako OHTA, Toshio KIMURA and Jiro KAWAMURA

"Rutin Reference Standard (Control 731)" was prepared as the National Institute of Hygienic Sciences Standard. The following analytical data were obtained; water content: 8.2%, infrared spectrum: same as the Japanese Pharmacopoeia Standard (Control 671, JPRS) and National Formulary Reference Standard (NFRS), thin-layer chromatography: one contaminant (quercetin), assay: 100.7% by the JP VIII method (JPRS: 99.4%, NFRS: 100.0%). On the basis of these results, the material was authorised as the National Institute of Hygienic Sciences Standard (Control 731).

(Received May 31, 1982)

ルチン製品を定量するとき行う、「測定器の調整」^{1,2)}に用いる国立衛生試験所標準品を製造したので報告する。

1. 標準品原料 アルプス薬品工業株式会社より購入した (RS-M)。

2. 参照物質及び試薬 日本薬局方標準品 (Control 671, JPRS), N. F. ルチン標準品 (Control ERRL-226-39, NFRS), 試薬は試薬特級品を用いた。

3. 装置 分光光度計 (島津製 QV-50 型及び島津製 D-40R 型), 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) を用いた。

4. 試験方法 特に記すもののほかは, 第八改正日本薬局方 (JPⅧ) の一般試験及び医薬品各条“ルチン”の試験方法を準用した。

薄層クロマトグラフ (TLC) 法: (I) メルク製プレコートセルロース薄層板を 80° で 1 時間活性化し, 15% 酢酸溶液を用いて展開した。(II) ワコーゲル F₂₅₄ を用いて調製した薄層板 (300 μ) を, 105° 1 時間活性化後, ベンゼン・ピリジン・ギ酸混液 (36:9:5) で展開した。(I), (II) と, RS-M, JPRS, NFRS 10mg を無水エタノール 2 ml に溶かし, その 30 μ l を薄層板に塗布した。検出は 15% 三塩化アンチモン・クロロホルム溶液を噴霧し, 105° で 5 分間加熱し, 自然光及び紫外線 (366 nm) 下で観察した。

5. 試験成績

1) 性状 淡黄色の結晶性粉末で, わずかに特異なおいがある。

2) 赤外吸収スペクトル KBr 錠剤法で測定した RS-M の赤外吸収スペクトルを Fig. 1 に示す。これを JPRS, NFRS のスペクトルと比較するとき, 3 者の吸収は同一波数のところで認め, またそれらの吸収強度は等しかった。

3) 水分 8.2% ($n=7$, C. V.=1.37%), なお, JPRS は 6.8%, NFRS は 7.3% であった。

4) 紫外吸収スペクトル 定量法で得た RS-M の

試料溶液の紫外吸収スペクトルを Fig. 2 に示す。極大波長は 259 nm と 262.5 nm にあり, 262.5 nm における $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ は 327.6 ($n=4$, C. V.=0.37%) であった。

5) 吸光比 定量法で得た試料溶液につき, 波長 362.5 nm と 375.0 nm (クエルセチンの極大波長) に

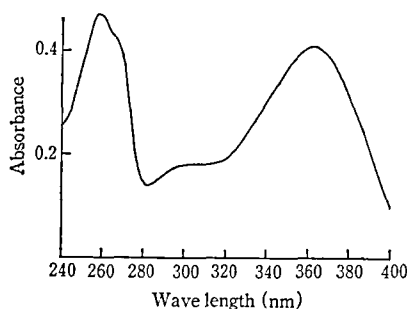


Fig. 2 Ultraviolet spectrum of material for "Rutin Reference Standard"

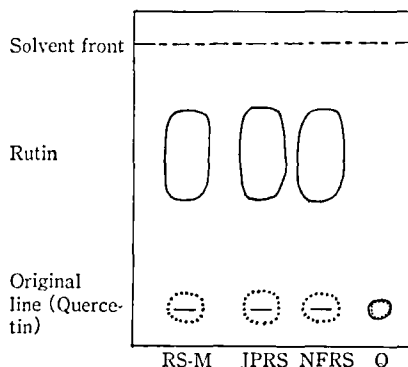


Fig. 3. Thin-layer chromatogram of rutin
Conditions, TLC plate cellulose (Merck, pre-coated, 0.25 mm), water-acetic acid (85:15), detected under visible light (yellow spots, solid lines) and under UV light at 366 nm (yellow fluorescent spots, dotted lines) after spraying 15% antimony trichloride in chloroform
Q: Quercetin

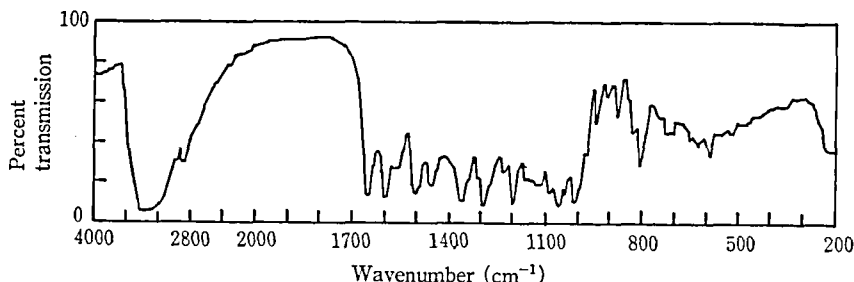


Fig. 1. Infrared spectrum of material for "Rutin Reference Standard"

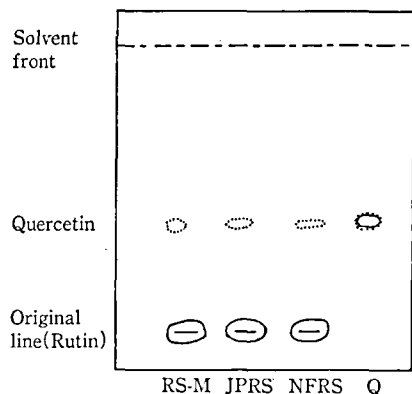


Fig. 4. Thin-layer chromatogram of rutin
Conditions, Wako-gel F₂₅₄ (0.3 mm), benzene-pyridine-formic acid (36:9:5). Other conditions are same as Fig. 3.

おける吸光度 A_1 及び A_2 をそれぞれ測定し A_2/A_1 を求めた。その結果、RS-M は 0.875 ($n=4$, C. V. = 0.24%), JPRS は 0.874 ($n=4$, C. V. = 0.31%) 及び NFRS は 0.872 ($n=4$, C. V. = 0.06%) であった。各試料とも、吸光比は 0.875 ± 0.004 の範囲内にあった^{1,2)}。

6) TLC 法 (I) 及び (II) の方法により展開したクロマトグラムを Fig. 3, Fig. 4 に示す。両者とも、不純物スポットは可視では認めないが、紫外線を照射

すると1つ認められ、その R_f 値はクエルセチンと一致した。

6) 定量 各試料とも、吸光比が 0.875 ± 0.004 の範囲内にあることから、 362.5 nm の吸光度 A_1 を測定し、ルチンの量は次の式のように計算した。

$$\text{ルチンの量 (mg)} = \frac{A_2}{325.5} \times 20000$$

その結果、RS-M は 100.7% ($n=4$, C. V. = 0.34%), JPRS は 99.4% ($n=4$, C. V. = 0.26%) 及び NFRS は 100.0% ($n=4$, C. V. = 0.70%) であった。

結 論

標準品原料として入手したルチンを JPRS 及び NFRS と比較検討した。その結果、各種試験方法での値は良好であり、定量値もじゅうぶんな値を得た。これらの試験結果により、今回入手した標準品原料は国立衛生試験所標準品に適した品質を有することを認め、Control 731 として配布した。終りに、標準品を製造するに当たり、協力していただいたアルプス薬品工業株式会社に感謝いたします。

文 献

- 1) 日本公定書協会, 第八改正日本薬局方第一部解説書, C-1876 (1971), 廣川書店。
- 2) 長沢佳徳, 鹿島 哲, 土屋雅一: 衛生試験, 75, 108 (1957)

国立衛生試験所リン酸ヒスタミン標準品 (Control 761)

木村俊夫・太田美矢子・川村次良

Histamine Phosphate Reference Standard (Control 761) of National Institute of Hygienic Sciences

Toshio KIMURA, Miyako OHTA and Jiro KAWAMURA

A material for histamine phosphate reference standard was analysed. The material contained 99.9% and 100.9% of histamine phosphate when determined by the BP (1973) method and nitrogen content, respectively. Other data are as follows; melting point: 133.7° , water: 5.65% , histidine: not detected, infra-red spectrum: same as former standard (control 701). From these results, the material is authorized as the Japanese Pharmacopoeia Reference Standard.

(Received May 31, 1982)

本標準品は、日本薬局方注射用コルチコトロピンを始めとし、各種の生物製剤における血圧下降性物質(ヒスタミン様物質)試験の標準品として用いられてい

る。昭和43年4月に第1回の標準品 (Control 611) の配布を開始し、46年10月には第2回 (Control 701) を製造した。今回は第3回 (Control 761) の標準品を製

造したので報告する。

2. 標準品原料 東京化成工業株式会社の製品を購入した。

2. 試薬 標準アミノ酸混合溶液は宝興産製品を、ニトラニール酸は東京化成工業製品を、その他は特級品を用いた。

3. 装置及び試験方法

1) 融点：ヤマト科学製融点測定装置 MP-21 型に (株) レスカ製プログラム式温度調節器を接続して用いた。未乾燥の結晶をガラス乳鉢で粉末とし、ガラス毛细管に固く詰め、118°で浴中に入れ、昇温速度は124°までは1分間に3°、それ以上では1分間に1°とした。

2) 水分：ガラス乳鉢で粉末とした後、その30~40 mg を精密に量り、平沼製作所製微量水分測定装置 AQ-1 型に投入した。装置の待ち時間は20秒、抽出時間はゼロとし直ちに滴定した。

3) ヒスタジン：日立 835 型アミノ酸分析計に SIC 7000A データ処理装置を接続して測定した。標準品原料 62 mg を正確に量り、0.01 N 塩酸に溶かして 10 ml とし、試料溶液とした。この溶液 1 ml 中にはリン酸ヒスタミンとして 19 μ mol 含む、標準溶液は、標準アミノ酸混合溶液を 0.01 N 塩酸でうすめ、1 ml

中に各アミノ酸を 60 nmol (ただしプロリンは 120 nmol) 含む液とした。試料溶液又は標準溶液はそれぞれ 50 μ l を装置に注入した。

4) 赤外吸収スペクトル：日本分光 403 G 型赤外分光光度計を用い、臭化カリウム錠剤法により測定した。

5) 定量：(i) ニトラニール酸による沈でん反応を利用する BP (1973 年版) の定量法により行った。

(ii) 窒素含量をコールマン 29 型窒素分析装置により測定し、理論値 (13.68%) に対するパーセントを求めた。

いずれの方法の場合でも無水物に換算して結果を求めた。

4. 試験成績

1) 性状 無色の結晶で、においはない。

2) 融点 湿潤点 125.6°, 収縮点 127.0°, 崩壊点 128.3°, 液化点 130.3°, 融解終点 133.7° であった (いずれも $n=6$)。

3) 水分 5.65% ($n=5$) であった。なお、試料投入時のブランク水分値及び測定時間中のブランク水分値を全測定値から差引いた。

リン酸ヒスタミンは結晶水を 1 分子含み、その理論値は 5.535% である。したがって前記の結果から、結晶水以外の付着水が 0.1% 程度含まれている。なお、乾燥減量 (105°, 6 時間) は 1.91% ($n=3$) であった。

4) ヒスタジン 試料溶液及び標準溶液のアミノ酸分析計におけるクロマトグラムを Fig. 1 に示す。標準溶液の 300 倍のモル濃度にも拘らず、試料からは微量のアノモニアのピークが検出されたのみで、ヒスタミンの製造原料であるヒスタジンのピークは見出されなかった。

5) 赤外吸収スペクトル Fig. 2 に示した。前回の標準品 (Control 701) のスペクトルと比較するとき、各吸収は同一波長のところで認めた。

6) 定量 BP 法により 99.93% ($n=4$)、窒素法により 100.86% ($n=9$) であった。

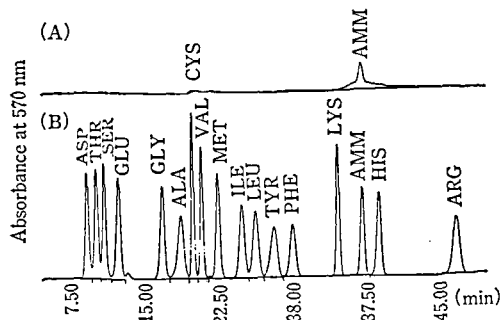


Fig. 1. Amino acid analysis of Histamine Phosphate Reference Standard. Histidine was not detected in 950 nmol of the Standard (A). Chromatogram of amino acid mixture (3 nmol) is in (B).

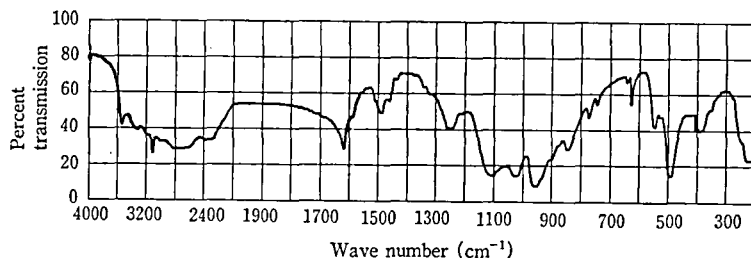


Fig. 2. Infrared spectrum of Histamine Phosphate Reference Standard

結 論

以上の結果から、本原料は日本薬局方リン酸ヒスタミン標準品として十分な品質を有すると認め、Control 761 として配布を行うこととした（注：昭和57年5月現在、Control 765 の配布を行っているが、同一ロット

のものである）。

なお、リン酸ヒスタミンの脱水物 1mg はヒスタミン塩基として 0.34mg を含むが、本標準品には、主として結晶水に由来する 5.65% の水分を含むので、1mg はヒスタミン塩基として 0.32mg 含むことをラベルに記載してある。

国立衛生試験所リボフラビン標準品 (Control 811)

徳永裕司・木村俊夫・川村次良

Riboflavin Reference Standard (Control 811)
of National Institute of Hygienic Sciences

Hiroshi TOKUNAGA, Toshio KIMURA and Jiro KAWAMURA

A material of riboflavin was tested for the preparation of "Riboflavin Reference Standard". Analytical data obtained were as follows; loss on drying: 0.05%, optical rotation: $[\alpha]_D^{20} = -132.5^\circ$, melting point: 287.4° (decomposition), infrared spectrum: same as Riboflavin Reference Standard (control 771), thin-layer chromatography: three contaminants, solubility: less than 16 minutes, nitrogen: 14.93% (theoretical value 14.89%), assay: 99.2%.

This material was authorized as the Japanese Pharmacopocia Standard.

(Received May 31, 1982)

第十改正日本薬局方(JPX)リボフラビンの定量法、同散の定量に用いる国立衛生試験所標準品（日本薬局方標準品）“リボフラビン標準品” (control 811) を製造したので報告する。

1. 原料 東京田辺製薬株式会社より購入した。
2. 参照物質及び試薬 日本薬局方標準品 (control 711)、試薬は試薬特級品を用いた。薄層板はメルク製プレコーテッドシリカゲル60を用いた。
3. 装置 日立139型分光光度計、応用電気製旋光計、コールマン29型窒素分析計、日本分光 A-102 型赤外分光光度計を用いた。
4. 試験方法 i) 乾燥減量、旋光度、定量は、JPX リボフラビンの試験法を準用し、融点（分解点）は、JPX 一般試験法を準用した。
- ii) 赤外吸収スペクトル：臭化カリウム錠剤法を用いた。

iii) 薄層クロマトグラフ法：標準品 (control 771) 及び原料を乾燥し、その約 1mg を精密に量り、希水酸化ナトリウム試液 (0.1 N) 0.1 ml を加えて溶解後、メタノール 4.8 ml 及び 0.1 N 塩酸 0.1 ml を加え、標準溶液、試料溶液とする。標準溶液及び試料溶液10

及び 20 μ l ずつを薄層板にスポットする。次にベンゼン・メタノール・アセトン・酢酸混液 (70:20:5:5) を展開溶媒として約 10cm 展開した後、薄層板を風乾する。長波長紫外線 (366 nm) を照射下、生じたけい光スポットを観察する。

iv) 溶解度：標準品及び原料を乾燥し、その約 10 mg を精密に量り、5% 酢酸 100 ml を加え、 $75 \pm 1^\circ$ に加熱し、リボフラビン粉末の溶解を観察する。

v) 窒素：原料を乾燥し、その約 5mg を精密に量り、窒素測定用アルミポートに入れ、窒素分析計にて窒素の定量を行う。

5. 試験成績 i) 性状：だいたい黄色の粉末で、わずかににおいがある。

ii) 乾燥減量：0.05% (0.5 g, 105° , 2 時間)

iii) 旋光度： $[\alpha]_D^{20} = -132.5^\circ$

iv) 融点： 287.4° (分解)

v) 赤外吸収スペクトル：Fig. 1 に示す。

標準品 (Control 771) と同一のスペクトルを与えた。

vi) 薄層クロマトグラフ法：Fig. 2 に示す。原料では 3 個、標準品では 4 個の不純物のけい光スポットが観察された。

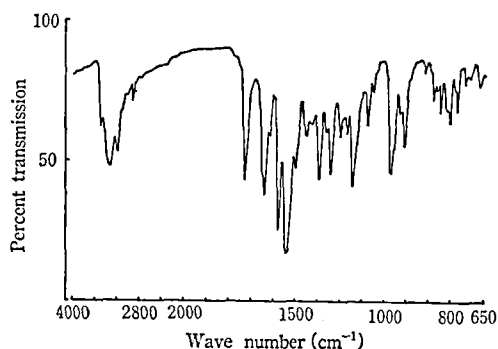


Fig. 1. Infrared spectrum of Riboflavin

vii) 溶解度：原料は16分以内，標準品は19分以内で完全に溶解した。

viii) 窒素：14.93%（理論値：14.89%）

ix) 定量：99.2%

結 論

標準品原料として入手したリボフラビン（日本薬局方標準品（control 771））と比較検討した。薄層クロマトグラフ法により，原料中には3個のけい光性不純物が検出され，その定量値は99.2%であった。その他の

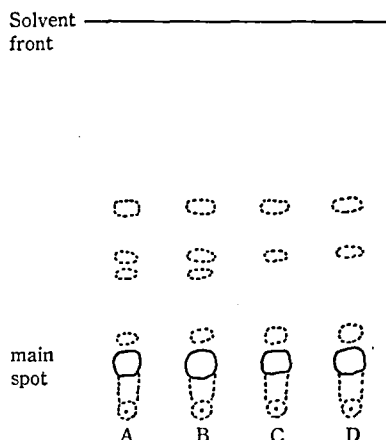


Fig. 2. Thin-layer chromatogram of Riboflavin

A,B: Japanese Pharmacopoeia Standard 10, 20 μ g

C,D: material 10, 20 μ g

測定結果より，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。

終わりに，標準品の製造にあたり協力いただいた東京田辺製薬株式会社に感謝いたします。

国立衛生試験所リゾチーム標準品の安定性

谷本 剛・福田秀男・木村俊夫・川村次良

Stability of the Lysozyme Reference Standard of National Institute of Hygienic Sciences

Tsuyoshi TANIMOTO, Hideo FUKUDA, Toshio KIMURA and Jiro KAWAMURA

The stability of the Lysozyme Reference Standard of National Institute of Hygienic Sciences was investigated. Although "Lysozyme Standard" was kept for a long time in a desiccator at -5° , the decrease of the potency was not observed. Therefore, "Lysozyme Standard" was stable in prolonged storage (over a 10-year period).

(Received May 31, 1982)

国立衛生試験所リゾチーム標準品が制定されたのは1967年であり，制定後，今年で14年を経過した。その間，およそ1～2年の間隔で合計9回のロットの更新が行われた。初回制定リゾチーム標準品の力価を1mg（力価）/mg とし，以後，前回標準品を対照にして各ロットの力価を決定してきたが，各ロットの力価はい

ずれも1mg 当たり1mg（力価）のリゾチームを含有するものであった。

今回，リゾチーム標準品の安定性を調べる目的で，国立衛生試験所に保存されていた各ロットのリゾチーム標準品の力価を測定したのでその結果を報告する。

実験方法

試料：試液

1. 試料：Control 691 (1970年4月製造), 731 (1974年5月製造), 771 (1977年10月製造) 及び 811 (1981年11月製造) の4ロットを使用した。各ロットはデシケータ(シリカゲル)中で -5° に保存していた。

2. リン酸塩緩衝液：リン酸二水素ナトリウム(2水塩) 10.40gに水を加えて1000mlとした液 815mlに、無水リン酸一水素ナトリウム 9.464gに水を加えて1000mlとした液 185mlを加える。必要ならば更にいずれかの液を加えてpH 6.2に調節する。

3. 基質液：Micrococcus lysodeikticusの乾燥菌体(生化学工業社製)約50mgにリン酸塩緩衝液120mlを加え、ゆるやかに振り混ぜて均一な懸濁液とする。この懸濁液の、水を対照とした層長10mm、波長640nmにおける透過度が10%になるように更に基質又はリン酸塩緩衝液を加える。用時調製する。

力価測定

1. 水分含量の測定：カールフィシャー法によって各ロットの水分含量を測定した。装置は平沼微量水分測定装置(AQ-1型)を使用し、試料を投入後、10分間かき混ぜたのちに測定した。各ロットの水分含量は次の値であった。Control 691: 6.66%, Control 731: 10.99%, Control 771: 7.05%, Control 811: 6.59%。

2. 試料溶液の調製：各ロットの約50mg(力価)に対応する量を精密に量り、それぞれにリン酸塩緩衝液を加えて正確に100mlとし、この液の2mlを正確にとり、これにリン酸塩緩衝液を加えて正確に100mlとする。更に、この液の2mlを正確にとり、リン酸塩緩衝液を加えて正確に50mlとし試料溶液とする。

3. 力価測定操作法：基質液を均一な懸濁液になるようにゆるやかに振り混ぜながら正確に3mlずつを量り、試料溶液及び対照液について5回測定するのに必要な本数の試験管(肉厚：内径16mm、高さ16.4ml)に移し、氷水中に浸し、測定開始直前に順次 $35 \pm 0.5^{\circ}$ で3分間加温する。別に $35 \pm 0.5^{\circ}$ で3分間加温した試料溶液及びリン酸塩緩衝液を正確に3mlずつ、先に加温した基質液に加え、 $35 \pm 0.5^{\circ}$ で 10 ± 0.1 分間放置する。次いで、水を対照として層長10mm、波長640nmにおける吸光度を測定する。試料溶液及び対照液について各々5回測定を繰り返し、各液の平

Table 1. Potency of various lysozyme standards

Lot No.	Storage period (year)	Potency [mg(potency)/mg]
811	0	1.000
771	4.1	1.036
731	7.5	0.999
691	11.6	0.987

均値を A_T 及び A_0 とする。

Control 811の1mg中のリゾチーム量[mg(力価)]を1mg(力価)としたときの各ロットの1mg中のリゾチーム量は次式で算出した。

各ロット1mg中のリゾチーム量[mg(力価)]

$$= \frac{A_0 - A_T}{A_0 - A_T^{811}} \times \frac{x}{y}$$

ただし、

A_T^{811} : Control 811の吸光度の平均値

x : 乾燥物に換算したControl 811の量[mg(力価)]

y : 採取した各ロットの乾燥物に採算した重量(mg)

結果と考察

最も新しいロットであるControl 811(1981年更新)はその1mg中に1mg(力価)のリゾチームを含有するものであり¹⁾、このロット(Control 811)の力価を1.000としたときの各ロットの力価をTable 1に示した。

製造時においては各ロットともその1mgは1mg(力価)のリゾチームを含有する^{2,3)}と認定されたものであるが、11年間以上保存したControl 691においてもその1mgは0.987mg(力価)のリゾチームを含有し、7年間及び4年間保存したControl 731及び771においても0.999mg(力価)及び1.036mg(力価)のリゾチームを含有していた。従って各ロットとも経時的な力価の低下は全く無いと考えられ、国立衛生試験所リゾチーム標準品は乾燥下、低温(-5°)に保存しておくかぎり、相当の長期間にわたって安定であることが確認された。

文 献

- 1) 谷本 剛ら：衛生試験報, 100, 175 (1982)
- 2) 長沢佳熊ら：衛生試験報, 88, 84 (1970)
- 3) 谷本 剛ら：衛生試験報, 96, 98 (1978)

国立衛生試験所リゾチーム標準品 (Control 811)

谷本 剛・福田秀男・木村俊夫・川村次良

Lysozyme Reference Standard (Control 811) of
National Institute of Hygienic Sciences

Tsuyoshi TANIMOTO, Hideo FUKUDA, Toshio KIMURA and Jiro KAWAMURA

The ninth "Lysozyme Reference Standard" (Control 811) of the National Institute of Hygienic Sciences was prepared. On the basis of results obtained in the test of its potency, amino acid composition, loss of drying and polyacrylamide gel electrophoresis, "Lysozyme Standard" (Control 811) containing 1 mg (potency) of lysozyme per 1 mg was authorized.

(Received May 31, 1982)

国立衛生試験所標準品“リゾチーム標準品”(第9回, Control 811)を製造したので, その結果を報告する。

I 力価

リゾチーム標準品原料(生化学工業社製)の力価をリゾチーム標準品(Control 781)を対照として, 下記の力価測定法-1及び-2によって測定した。

I-1 試液

(1) リン酸塩緩衝液: 既報¹⁾の方法に従って調製した。

(2) 基質液: *Micrococcus lysodeikticus* の乾燥菌体(生化学工業社製)を用いて, 既報¹⁾の方法に従って調製した。

I-2 力価測定法-1

標準品原料及び標準品(Control 781)の約50mg(力価)に対応する量を精密に量り取り, その重量を乾燥減量から乾燥物重量に換算したのち, それぞれにリン酸塩緩衝液を加えて正確に100 mlとする。以下, 既報²⁾の定量法-1の方法に従って測定した。

I-3 力価測定法-2

標準品原料及び標準品(Control 781)の約50mg(力価)に対応する量を精密に量り取り, その重量を乾燥減量から乾燥物重量に換算したのち, それぞれにリン酸塩緩衝液を加えて正確に100 mlとする。以下, 規格試験法³⁾に記載された定量法に従って測定した。

I-4 測定結果

力価測定法-1及び-2で測定したリゾチーム標準品原料1mg当たりのリゾチーム量[mg(力価)]をTable 1に示した。いずれの力価測定法においても, 今回の

リゾチーム標準品原料の1mgは1mg(力価)のリゾチームを含有することが示された。

II アミノ酸組成

リゾチーム標準品原料のアミノ酸分析を行い, リゾチーム標準品(Control 781)と比較した。アミノ酸分析はSpackmanら⁴⁾の方法に従って行った。すなわち, リゾチーム標準品原料約3mgを硬質試験管にとり, 6N塩酸1.5 mlを加えて減圧下で封管し, 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。リゾチーム標準品原料のアミノ酸組成はシスチンを除いて文献値⁵⁾とよく一致し, またリゾチーム標準品(Control 781)のアミノ酸組成⁶⁾ともよく一致していた(Table 2)。

なお, リゾチーム標準品原料のシスチン含量が文献値と一致しないのは, 一般にたんぱく質を酸加水分解した場合, シスチンは定量的に回収されないからである。

III 乾燥減量

リゾチーム標準品原料及びリゾチーム標準品(Control 781)の約150mgを精密に量り取り, 105°で2時間乾燥した。この条件でのリゾチーム標準品原料及びリゾチーム標準品(Control 781)の乾燥減量はそれぞれ4.88%及び4.92%であった(Table 3)。

IV ポリアクリルアミドゲル電気泳動

Reisfeldら⁷⁾の方法に従って, pH 4.3用ゲルを調製した。分離用ゲルのゲル濃度は15%とした。泳動した試料の量は6.25, 12.5, 25, 50, 100及び200 µgである。上部緩衝液槽を陽極に, 下部緩衝液槽を陰極に

Table 1. Potency of the material for lysozyme standard

Exp. No.	Potency [mg(potency)/mg]	
	Method-1	Method-2
1	1.030	1.084
2	1.011	1.076
3	1.007	1.021
4	0.990	1.021
5	1.047	1.040
6	1.019	1.033
7	1.041	1.015
8	1.009	1.022
9	0.999	0.947
10	0.961	0.914
11	0.990	0.922
12	0.968	0.908
Mean $\pm$ S.D.	1.006 $\pm$ 0.0265	1.000 $\pm$ 0.0617

Table 2. Amino acid composition of the material for lysozyme standard

Amino acid	Material	Lysozyme standard (Control 781)	Theoretical
Lys	5.97	6.02	6
His	0.81	0.88	1
Arg	11.41	11.29	11
Asp	21.34	21.75	21
Thr	6.96*	6.85*	7
Ser	9.59*	9.62*	10
Glu	5.09	5.13	5
Pro	2.08	2.16	2
Gly	12.31	12.56	12
Ala	12.16	12.53	12
Cys	2.04	2.45	4
Val	6.19	5.87	6
Met	1.97	2.01	2
Ile	5.71	5.91	6
Leu	7.73	8.19	8
Tyr	3.05	3.00	3
Phe	3.00	3.03	3

* Uncorrected.

接続し、ゲル1管当り 3mA の電流を通じて60分間泳動し、泳動後、1%アミドブラック10B溶液で2時間染色した。Fig.1に示すように、大量の試料を泳動しても単一の染色帯しか認められず、本標準品原料は電気泳動的に均一なものであった。

Table 3. Loss of drying of the material for lysozyme standard

Exp. No.	Loss of drying (%)	
	Material	Lysozyme standard (Control 781)
1	4.90	4.83
2	4.79	4.91
3	4.94	5.02
Mean S.D.	4.88 $\pm$ 0.076	4.92 $\pm$ 0.094

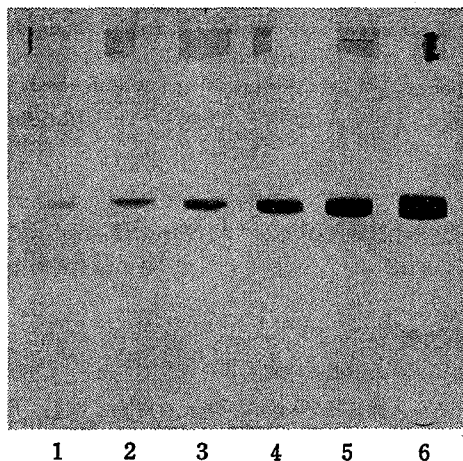


Fig. 1. Polyacrylamide gel electrophoresis of the material for lysozyme standard

Electrophoresis was carried out in 15% polyacrylamide gel at pH 4.0.

1, 6.25 μ g; 2, 12.5 μ g; 3, 25 μ g; 4, 50 μ g; 5, 100 μ g; 6, 200 μ g.

ま と め

国立衛生試験所標準品第9回“リゾチーム標準品”を製造するにあたり、標準品原料の力価を前回リゾチーム標準品 (Control 781) を対照として測定したところ、力価測定法-1及び-2で測定した力価は標準品原料 1mg 当り、1.006 $\pm$ 0.0265 及び 1.000 $\pm$ 0.0617mg (力価)であり、両法の値はよく一致した。標準品原料の乾燥減量は 4.88% であり、前回リゾチーム標準品 (Control 781)のそれと大差はなかった。標準品原料のアミノ酸組成は前回リゾチーム標準品 (Control 781) のアミノ酸組成及び文献値 (シスケンを除く) とよく一致した。また標準品原料の純度をポリアクリルアミドゲル電気泳動法で調べてみたが、電気泳動的には均一なものであった。以上の結果から、本標準品原料を国立衛生試験所標準品第9回“リゾチーム標準品

(Control 811)”とすることにし、その 1mg はリゾチー ム 1mg (力価) を含むものと認定した。

文 献

- 1) 谷本 剛ら：衛生試験報，98，87 (1980)
- 2) 谷本 剛ら：衛生試験報，96，98 (1978)
- 3) 医薬品の規格及び試験法，p. 17 (1967)，厚生

省薬務局製薬課

- 4) D.H. Spackman, W.H. Stein and S. Moore: *Anal. Chem.*, **30**, 1190 (1958)
- 5) R.E. Canfield and A.K. Liu: *J. Biol. Chem.*, **240**, 1997 (1965)
- 6) 谷本 剛ら：衛生試験報，97，115 (1979)
- 7) R.A. Reisfeld, U.J. Lewis and D.E. Williams: *Nature*, **195**, 281 (1962)

国立衛生試験所葉酸標準品 (Control 741)

太田美矢子・木村俊夫・川村次良

Folic Acid Reference Standard (Control 741) of
National Institute of Hygienic Sciences

Miyako OHTA, Toshio KIMURA and Jiro KAWAMURA

“Folic Acid Reference Standard (Control 741)” for the Japanese Pharmacopoeia was prepared. The following analytical data were obtained; water content: 7.8%, nitrogen: 22.3%, free amines: 0.2%, free pteridines: 0.04%, infrared spectrum: same as the Japanese Pharmacopoeia Standard (Control 701), thin-layer chromatography: four contaminants, assay: 100.8% by the JP IX method. On the basis of these results, the material was authorised as the Japanese Pharmacopoeia Standard (Control 741).

(Received May 31, 1982)

第九改正日本薬局方 (JPIX) の葉酸，同錠，同注射液の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 武田薬品工業株式会社より購入した (JPRS-M)。

2. 参照物質及び試薬 日本薬局方標準品 (Control 701, JPRS)，試薬は試薬特級品を用いた。薄層板はメルク製プレコーテッドシリカゲル 60F₂₅₄ を用いた。

3. 装置 分光光度計 (日立製 139 型及びユニオン技研製 SM-401 型)，分光けい光光度計 (日立製 MPF-2A 型)，窒素分析装置 (コールマン製 29A 型)，赤外分光光度計 (日本分光製 DS-403 型)，微量水分分析装置 (平沼産業製 AQ-1 型) を用いた。

4. 試験方法 特に記すもののほかは，JP IX の一般試験法及び医薬品各条“葉酸”の試験法に準じて行った。ただし，遊離プテリジン，硫酸呈色物については太田ら¹⁾の方法を準用した。薄層クロマトグラフ法は，JPRS-M 及び JPRS 5mg (乾燥物換算量 4.6mg) をメタノール・アンモニア水 (9:1) の溶液 1 ml に溶かし，その 10 又は 40 μ l をスポットし，*n*-プロパノール・10%アンモニア水 (7:3) の混液を用いて展開

した。風乾後，紫外線下 (254 nm 及び 366 nm) で観察した。

5. 試験成績

1) 性状 黄色の結晶性の粉末で，においはない。

2) 溶状 JPRS-M 0.2 g に希水酸化ナトリウム試液 10 ml を加えて溶かすとき，液は黄色澄明であった。

3) 赤外吸収スペクトル KBr 錠剤法で測定した JPRS-M の赤外吸収スペクトルを Fig. 1 に示す。これを JPRS と比較するとき，両者の吸収は同一波数のところで認め，それらの吸収強度は等しかった。

4) 紫外吸収スペクトル JPRS-M を希水酸化ナトリウム試液 (15 μ g/ml) に溶かしたときの紫外吸収スペクトルを Fig. 2 に示す。波長 256 nm，284 nm 及び 365 nm に吸収の極大を示し，それぞれの波長における吸光度を A_1 及び A_2 とするとき， A_1/A_2 は 2.93 であった。

5) 硫酸呈色物 76% ($n=3$)

6) 窒素 22.3% ($n=4$ ，理論値 22.22%)

7) 水分 7.8% ($n=10$ ，C. V. = 1.73%)

8) 遊離アミン 0.2% ($n=6$)，なお JPRS は 0.5

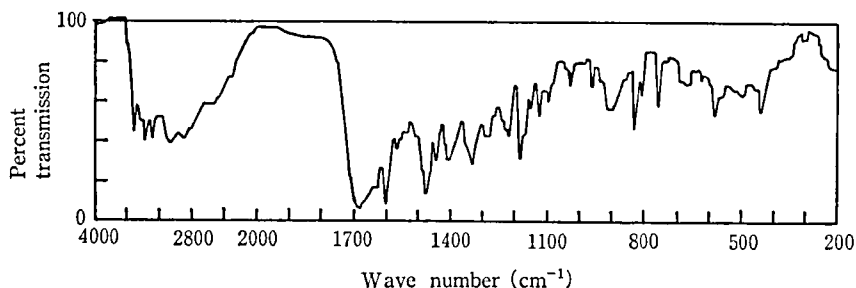


Fig. 1. Infrared spectrum of material for "Folic acid Rereference Standard"

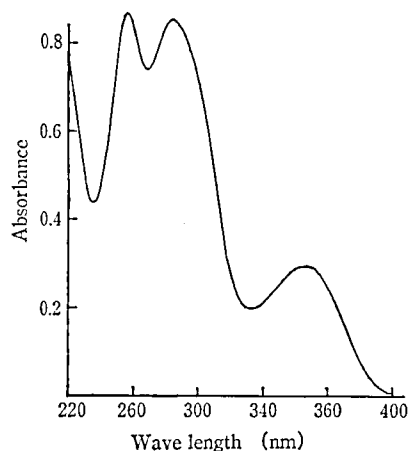


Fig. 2. Ultraviolet spectrum of material for "Folic Acid Reference Standard"

% ($n=6$) であった。

9) 遊離プテリジン 0.04% ($n=4$), なお JPRS は 0.27% ($n=4$) であった。

10) 薄層クロマトグラフ法 254 nm では葉酸のほかに2つの黒色スポット (遊離アミン類), 366 nm では2つのけい光スポット (遊離プテリジン類) が観察された。

11) 定量 JPRS を標準として定量するとき, JPRS-M は 100.8% ($n=5$, C. V. = 1.26%) であった。

結 論

標準品原料として入手した葉酸を JPRS と比較検

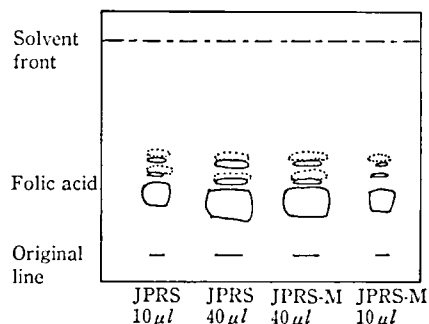


Fig. 3. Thin-layer chromatogram of folic acid

Conditions: TLC plate silicagel 60 F₂₅₄ (Merck, pre-coated, 0.25 mm), *n*-propanol·10% ammonia solution (70:30), detected under UV light (solid lines at 254 nm, dotted lines at 366 nm)

討した。その結果、各種試験方法の値は良好であり、定量もじゅうぶんな値を得た。これらの試験結果により、今回入手した標準品原料は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、Control 741として配布した。終わりに、標準品を製造するに当たり、協力していただいた武田薬品工業株式会社に感謝いたします。

文 献

- 1) 太田美矢子・川村次良: 衛生試験, 90, 93 (1969)

国立衛生試験所フルオシノロンアセトニド標準品 (Control 801)

太田美矢子・木村俊夫・川村次良

Fluocinolone Acetonide Reference Standard (Control 801)
of National Institute of Hygienic Sciences

Miyako OHTA, Toshio KIMURA and Jiro KAWAMURA

“Fluocinolone Acetonide Reference Standard (Control 801)” for the Japanese Pharmacopoeia was prepared. The following analytical data was obtained; melting point: 131.0°, optical rotation: $[\alpha]_D^{20} = +102.5$ (1% in methanol), loss on drying: 0.15%, infrared spectrum: same as the BP Reference Standard (BPRS), thin-layer chromatography: no contaminant, high performance liquid chromatography (HPLC): six contaminants same as BPRS, assay: 101.4% by HPLC method and 100.4% by UV method against BPRS, 99.3% by fluorine (oxygen flask combustion method) against the theoretical value. On the basis of these results, the material was authorised as the Japanese Pharmacopoeia Standard (Control 801).

(Received May 31, 1982)

第十改正日本薬局方 (JPX) のフルオシノロンアセトニドの定量法として、新たに高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法が採用された。それに伴い、フルオシノロンアセトニド標準品が用いられることになり、国立衛生試験所標準品 (日本薬局方標準品) フルオシノロンアセトニド標準品を製造したので報告する。

1. 標準品原料 田辺製薬株式会社より購入した (JPRS-M)。

2. 参照物質及び試薬 英国標準品 (F-90, BPRS), 試薬は試薬特級品を用いた。薄層板はメルク製プレコートッドシリカゲル 60F₂₅₄ を用いた。

3. 装置 分光光度計 (島津製 QV-50 型及びユニオン技研製 SM-401 型), 自動旋光計 (応用電気研究所製 MP-1T 型), 赤外分光光度計 (日本分光製 DM-403G 型) を用いた。

4. 試験方法 特に記すもののほかは、JPX の一般試験及び医薬品各条 “フルオシノロンアセトニド” の試験方法を準用した。ただし、薄層クロマトグラフ (TLC) 法は、JPRS-M 及び BPRS のそれぞれ 5mg をメタノール 1 ml に溶かし、その 20 μ l 又は 40 μ l をスポットし、クロロホルム・酢酸ブチル・アセトン (2:2:1) で展開した。検出には紫外線 (254 nm) を用いた。HPLC 法は著者らが検討した改良法を用いた¹⁾。

1) HPLC 法の条件 装置は LDC 製のポンプ、UV モニター及び記録計 (モデル 330) を組み立てて用いた。カラムはリクロソルブ RP-18 (5 μ m, プレ

バックド, 4 ϕ ×250 mm) で、カラム温度は 30° とし、溶離剤は水・アセトニトリル・ジクロルメタン混液 (70:30:0.9), 流量は 0.7 ml/min, 検出は 254 nm, 感度は 0.16 O. D. とし、記録紙速度は 2.1 mm/min で行った。

2) 定量方法 JPRS-M 及び BPRS をそれぞれ 0.01 g を精密に量り、メタノールを加えて溶かし、正確に 20 ml とし、それぞれ試料原液及び標準原液とする。

(i) HPLC 法 試料原液及び標準原液それぞれ 10 ml に内部標準溶液 2 ml を加えメタノールで 20 ml とし試料溶液及び標準溶液とする。この溶液 20 μ l を注入する。ただし、内部標準溶液はエチルパラベン 0.013 g を量り、メタノールを加えて溶かし、正確に 50 ml とする。

(ii) UV 法 試料原液及び標準原液をそれぞれ 2 ml ずつとり、メタノールを加えて正確に 100 ml とし、この液につき 238 nm における吸光度を測定する。

5. 試験成績

1) 性状 白色の結晶性の粉末で、においはない。

2) 融点 271.3° ($n=7$, C. V.=0.22%)

3) 赤外吸収スペクトル KBr 錠剤法で測定した JPRS-M の赤外吸収スペクトルを Fig. 1 に示す。これを BPRS のスペクトルと比較するとき、両者の吸収は同一波長のところで認め、またそれらの吸収強度は等しかった。

4) 赤外吸収スペクトル JPRS-M をメタノール

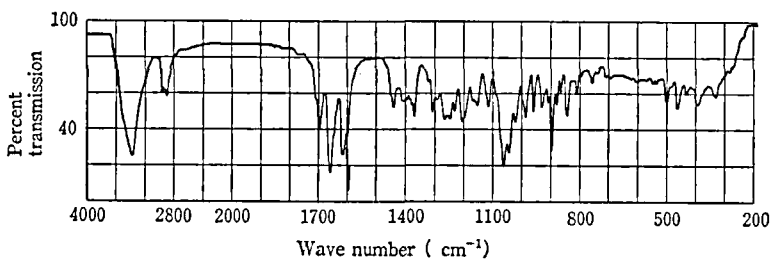


Fig. 1. Infrared spectrum of material for "Fluocinolone Acetonide Reference Standard"

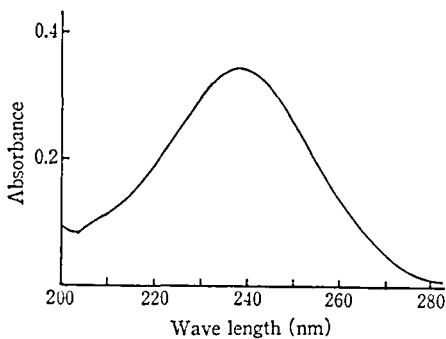


Fig. 2. Ultraviolet spectrum of material for "Fluocinolone Acetonide Reference Standard"

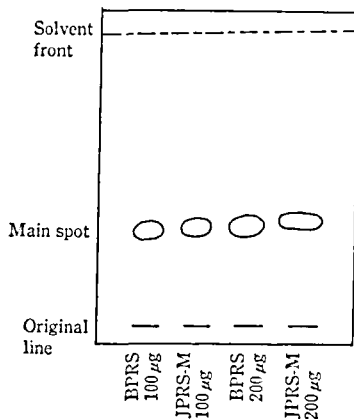


Fig. 3. Thin-layer chromatogram of fluocinolone acetonide

Conditions: TLC plate silica gel 60 F₂₅₄ (Merck, pre-coated, 0.25 mm), chloroform-*n*-butyl acetate-acetone (2:2:1), detected under UV light (254 nm).

に溶かしたときの紫外吸収スペクトルを Fig. 2 に示す。試料溶液は 10 μg/ml のメタノール溶液とし、測定した。極大波長は 238 nm で、 $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ は 357 であった。

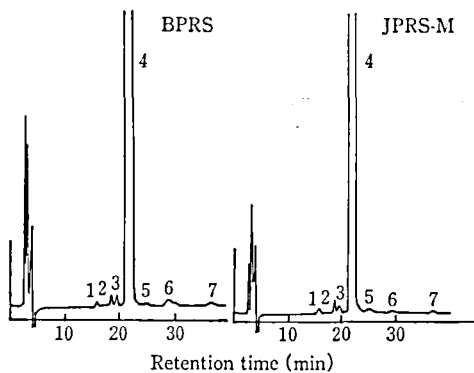


Fig. 4. High performance liquid chromatogram of fluocinolone acetonide

Column: LiChrosorb RP-18 (5 μm, pre-packed), 4φ×250 mm, column temp.: 30°, solvent: water-acetonitrile-dichloromethane (70:30:0.9), detector: 254 nm, 0.16 O.D., Chart speed: 2.5 mm/min, applied amount: 40 μg in methanol.

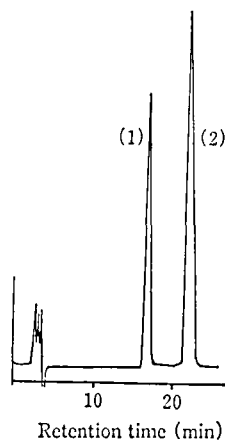


Fig. 5. High performance liquid chromatogram of fluocinolone acetonide and ethyl paraben (internal standard)

(1) ethyl paraben, (2) fluocinolone acetonide

5) 旋光度 $[\alpha]_D^{20} = +102.5$ (乾燥後, 0.1 g, メタノール, 10 mL, 100 mm, $n=3$, C. V.=0.3%)

Table 1. Assay results of fluocinolone acetonide and the impurities in BPRS and JPRS-M by HPLC*

Peak No.	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
BPRS	0.1	0.2	0.2	98.8	0.1	0.5	0.1
JPRS-M	0.1	0.2	0.2	99.1	0.2	0.1	0.1

* These assay results are shown as percent content of each component against total electric signals of fluocinolone acetonide and the impurities by integrator.

HPLC conditions are same as Fig. 4.

Peak No. 4 is fluosinolone acetonide and others are impurities as shown in Fig. 4.

6) 乾燥減量 0.15% (0.1 g, 減圧, 105°, 3時間)

7) TLC 法 JPRS-M 及び BPRS 共に, 200 µg の塗布でも不純物のスポットは認められなかった (Fig. 3).

8) HPLC による純度試験 JPRS-M 及び BPRS のメタノール溶液を 40 µl (40 µg) 注入したときのクロマトグラムを Fig. 4 に示す. 不純物ピークは, 両試料とも同一位置に 6 個認められた. ピーク (4) はフルオシノロンアセトニドであり, 類縁物質でピーク位置を確認した結果, (5) は 11-ケト体, (6) は 9, 11-エポキシ体, (7) は 6-クロル体¹⁾であった. これらの 6 個の不純物とフルオシノロンアセトニドのピークの和を 100% として, 各ピークの含量パーセントを算出したものを Table 1 に示す. 各不純物は 0.5% 以下であり, フルオシノロンアセトニドの量は, BPRS が 98.8%, JPRS-M が 99.1% で良好な値を示した.

9) HPLC における検量線 20 µl 注入したとき 0.025~0.200 mg の間で直線関係が成立し, 最小二乗法により回帰式を求めたところ, $y = 20.385x + 0.013$ の式を与え, 相関係数は 0.9999 であった. なお, x は注入量 (mg), y は内部標準に対するフルオシノロンアセトニドの面積比である. また, このときのクロマトグラムを Fig. 5 に示した.

10) 定量 JPRS-M を HPLC 法及び UV 法によ

り BPRS を標準として定量するとき, それぞれ 101.4% ($n=8$, C. V.=1.14%) 及び 100.4% ($n=4$, C. V.=1.23%) であった. また, フッ素を定量した結果は, 理論値に対して 99.3% ($n=12$, C. V.=2.34%, フッ素の理論値は 8.34%) であった.

結 論

標準品原料として入手したフルオシノロンアセトニドを BPRS と比較検討した. その結果, 各種試験方法での値は良好であり, 定量値もじゅうぶんな値を得た. また, TLC 法や HPLC 法による不純物の検索でも, Fig. 3~4 及び Table 1 に示すように, BPRS と同等以上の品質を有することが明らかになった. これらの試験結果より今回入手した標準品原料は, 国立衛生試験標準品 (日本薬局方標準品) に適した品質を有することを認め, Control 801 として配布を開始した. 終りに標準品を製造するに当たり, 協力して頂いた田辺製薬株式会社, 英国薬局方コミッションに感謝いたします.

文 献

- 1) 太田美矢子：医薬品研究, 12, 456 (1981)

国立衛生試験所ニコチン酸標準品 (Control 811)

太田美矢子・木村俊夫・川村次良

Nicotinic Acid Reference Standard (Control 811)
of National Institute of Hygienic Sciences

Miyako OHTA, Toshio KIMURA and Jiro KAWAMURA

"Nicotinic Acid Reference Standard (Control 811)" for the Japanese Pharmacopocia was prepared. The following analytical data were obtained; melting point: 237.7°, pH: 3.6 (1% in water), loss on drying: 0.03%, nitrogen: 11.5%, infrared spectrum: same as the Japanese Pharmacopocia Standard (Control 691), thin-layer chromatography: no contaminant, assay: 100.4% by non-aqueous titration, 100.3% by the König method, 99.8% by UV method (262 nm). On the basis of these results, the material was authorised as the Japanese Pharmacopocia Standard (Control 811).

(Received May 31, 1982)

第十改正日本薬局方 (JPX) のニコチン酸注射液の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 有機合成薬品工業株式会社より購入した (JPRS-M)。

2. 参照物質及び試薬 日本薬局方標準品 (Control 691, JPRS), 試薬は試薬特級品を用いた。薄層板はメルク製プレコーテッドシリカゲル 60F₂₅₄ を用いた。

3. 装置 分光光度計 (ユニオン技研製 SM-401 型), 赤外分光光計 (日本分光製 DS-403G 型), 窒素分析装置 (コールマン製 29A 型), 電位差滴定装置 (東亜電波製 HA-2A 型, pH スタット)

4. 試験方法 特に記すもののほかは, JPX の一般試験及び医薬品各条 "ニコチン酸" "同注射液" の試験方法を準用した。

薄層クロマトグラフ (TLC) 法は JPRS-M 及び JPRS の各 5mg をメタノール 1 ml に溶かし, その 20 μ l 及び 40 μ l をスポットした。ベンゼン・メタノール・アセトン・酢酸混液 (70:20:5:5) 又は *n*-ブタノール・水・クロロホルム・酢酸・メタノール混液 (25:11:10:9:5) を用いて展開し, 風乾後, 紫外線 (254 nm) 下で観察して検出した。

5. 試験成績

1) 性状 白色結晶性の粉末で, においはない。

2) 融点 237.7° ($n=4$, C. V.=0.05%), なお JPRS は 237.5° ($n=4$, C. V.=0.08%) であった。

3) pH 3.6 (1% 水溶液)

4) 赤外吸収スペクトル KBr 錠剤法で測定した JPRS-M の赤外吸収スペクトルを Fig. 1 に示す。これを JPRS のスペクトルと比較するとき, 両者の吸収は同一波数のところで認め, またそれらの吸収強度は等しかった。

5) 紫外吸収スペクトル JPRS-M を水に溶かしたときの紫外吸収スペクトルを Fig. 2 に示す。試験溶液は JPRS 0.02 g を量り, 水を加えて溶かし, 1000 ml とし測定した。極大波長は 262 nm, 極小波

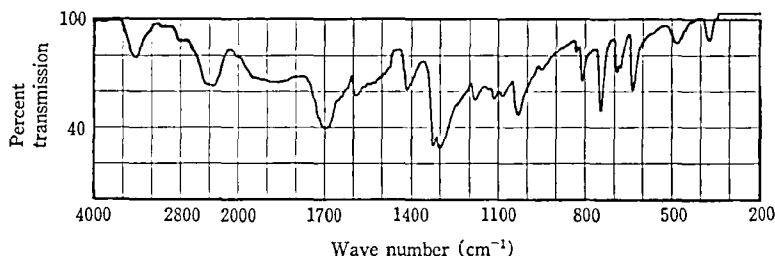


Fig. 1. Infrared spectrum of material for "Nicotinic Acid Reference Standard"

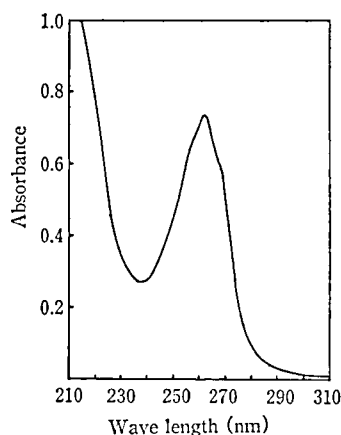


Fig. 2. Ultraviolet spectrum of material for "Nicotinic Acid Reference Standard"

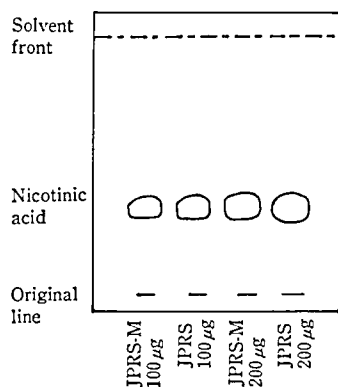


Fig. 3. Thin-layer chromatogram of nicotinic acid

Conditions: Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck, pre-coated TLC plate, 0.25 mm), benzene-methanol-acetone-acetic acid (70:20:5:5), detected under UV light (254 nm).

長は 238 nm で、各々の波長における吸光度を A_1 , A_2 とするとき、 A_2/A_1 は 0.362 であった。また、極大波長における $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ は 358.3 ($n=4$, C. V. = 1.15%) であった。

6) 乾燥減量 0.03% (1 g, 105°, 1 時間)

7) 窒素 11.5% (理論値 11.38%, $n=3$, C. V. = 0.31%)

8) TLC 法 ベンゼン・メタノール・アセトン・

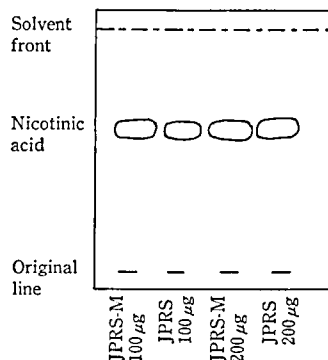


Fig. 4. Thin-layer chromatogram of nicotinic acid

Solvent: *n*-buthanol-water-chloroform-acetic acid-methanol (25:11:10:9:5), other conditions are same as Fig. 3.

酢酸混液 (70:20:5:5) 又は *n*-ブタノール・水・クロロホルム・酢酸・メタノール混液 (25:11:10:9:5) で展開したときのクロマトグラムを各々 Fig. 3 と Fig. 4 に示す。JPRS-M 及び JPRS 共に、いずれの場合も不純物スポットは認められなかった。

9) 定量 標準品原料を非水滴定法、König 法 (JPX の注射液の定量法) 及び UV 法 (262 nm) により定量を行うとき、それぞれ 100.4% ($n=5$, C. V. = 1.04%), 100.3% ($n=4$, C. V. = 2.68%) 及び 99.8% ($n=4$, C. V. = 1.15%) であった。ただし、König 法と UV 法は JPRS を 100.0% とした時の値である。

結 論

標準品原料として入手したニコチン酸を JPRS (Control 691) と比較検討した。その結果、各種試験法での値は良好であり、定量値は JPRS と良く一致した。また、TLC 法では JPRS と同様に不純物スポットは認められなかった。今回入手した標準品原料は、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、Control 811 として配布を開始した。終わりに、標準品を製造するに当たり、協力して頂いた有機合成薬品工業株式会社に感謝いたします。

国立衛生試験所塩酸ピリドキシン標準品 (Control 801)

徳永裕司・木村俊夫・川村次良

Pyridoxine Hydrochloride Reference Standard (Control 801)
of National Institute of Hygienic Sciences

Hiroshi TOKUNAGA, Toshio KIMURA and Jiro KAWAMURA

A material of pyridoxine hydrochloride was tested for the preparation of "Pyridoxine Hydrochloride Reference Standard". Analytical data obtained were as follows; loss on drying: 0.018%, pH: 2.84, melting point: 204.7° (decomposition), infrared spectrum: same as the Pyridoxine Hydrochloride Reference Standard (Control 761), thin-layer chromatography: no contaminant, nitrogen: 6.81% (theoretical value 6.81%), assay: 100.3% by titration, 99.9% by UV absorption method, 101.3% by total chloride method.

This material was authorized as Japanese Pharmacopoeia Standard.

(Received May 31, 1982)

第十改正日本薬局方 (JPX) 塩酸ピリドキシン注射液の定量に用いる国立衛生試験所標準品 (日本薬局方標準品) “塩酸ピリドキシン標準品” (control 801) を製造したので報告する。

1. 原料 第一製薬株式会社より購入した。

2. 参照物質及び試薬 日本薬局方標準品 (control 761), 試薬は試薬特級品を用いた。薄層板はメルク製濃縮ゾーン付きシリカゲル GF₂₅₄ を用いた。

3. 装置 島津 QV50 型分光光度計, 東亜電波 HM-20B 型 pH メーター, ヤマト科学製融点測定装置, 日本分光 DS-403G 型赤外分光光度計, コールマン29型窒素分析計を用いた。

4. 試験方法

i) 乾燥減量, pH 測定は, JPX 塩酸ピリドキシンの試験法を準用し, 融点 (分解点) は, JPX 一般試験法を準用した。

ii) 赤外吸収スペクトル: 臭化カリウム錠剤法を用

いた。

iii) 薄層クロマトグラフ法: 標準品及び原料を乾燥し, その約 25mg を精密に量り, メタノール 5ml を正確に加えて溶解し, 標準溶液及び試料溶液とする。標準溶液及び試料溶液のそれぞれ 20 及び 40 μ l を薄層板にスポットする。次に, ジオキサン・アセトン・アンモニア水混液 (45:45:10) を展開溶媒として約 10cm 展開した後, 薄層板を風乾する。短波長紫外線 (254 nm) を照射し, 生じたスポットを観察する。

iv) 窒素: 原料を乾燥し, その約 10mg を精密に量り, 窒素測定用アルミボートに入れ, 窒素分析計にて窒素の定量を行う。

v) 定量: 非水滴定法—JPX 塩酸ピリドキシンの定量法を準用する。吸光度法—JPX 塩酸ピリドキシン注射液の定量法を準用する。塩素法—原料を乾燥し, その約 150mg を精密に量り, 水 50ml を加えて溶かし, クロム酸カリウム試液 1ml を加え, 振り動かし

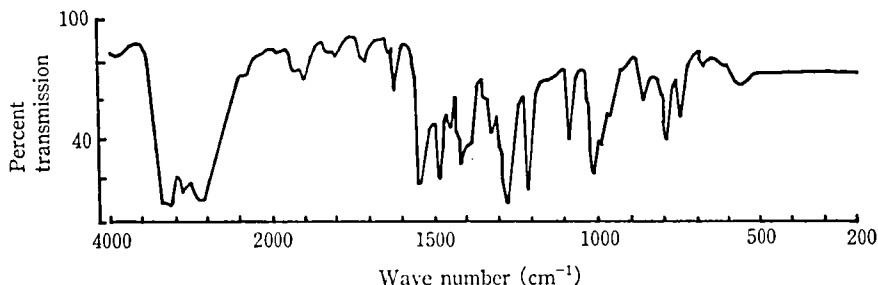


Fig. 1. Infrared spectrum of Pyridoxine Hydrochloride

Solvent _____
front

main spot

A B C D

Fig. 2. Thin-layer chromatogram of Pyridoxine Hydrochloride

A,B: Japanese Pharmacopoeia Standard 100, 200 μ g
C,D: material 100, 200 μ g

ながら、0.1 N 硝酸銀液で持続する淡赤かつ色を呈するまで滴定する。

0.1 N 硝酸銀液 1 ml = 20.564mg $C_8H_{11}NO_3 \cdot HCl$

5. 試験成績

- i) 性状：白色の結晶性粉末で、においはない。
- ii) pH: 2.84
- iii) 融点：204.7° (分解)
- iv) 乾燥減量：0.018% (1 g, 減圧, シリカゲル, 4時間)
- v) 窒素：6.81% (理論値 6.81%)
- vi) 赤外吸収スペクトル：Fig. 1 に示す。標準品 (Control 761) と同一のスペクトルを示す。
- vii) 薄層クロマトグラフ法：Fig. 2 に示す。不純物のスポットは観察されない。
- viii) 定量：非水滴定法—100.3%, 吸光度法—99.9%, 塩素法—101.3%

結 論

標準品原料として入手した塩酸ピリドキシンを日本薬局方標準品 (control 761) と比較検討した。各種の試験の結果、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。

終わりに、標準品の製造にあたり協力いただいた第一製薬株式会社に感謝いたします。

市販輸入柑橘類中の臭素の定量

鈴木 隆・武田明治・内山 充

Investigation on the Content of Bromine in Commercially Available Citrus Fruits

Takashi SUZUKI, Mitsuharu TAKEDA and Mitsuru UCHIYAMA

The analytical results of imported citrus fruits showed that the contents of bromine in peel of orange were between 4.2 and 58 ppm and those in edible portion were between 2.6 and 8.0 ppm. It was expected that there was a correlation between the contents of bromine in peel and those of edible portion. Those in lemon and grapefruit were not more than 7 ppm and iodine was not detected.

(Received May 31, 1982)

ま え が き

我が国のアメリカ、カルフォルニア産の柑橘類の輸入に当たり、植物防疫上、地中海シバエ防除のために使用されたエチレンジプロミド (EDB) の残留が食品衛生上注目された。EDB 自身は比較的容易に揮散分解され¹⁾、最終的に消費者の手元にとどくまでには柑

橘類中には殆んどが臭素塩として残留するものと考えられる。

著者らは残留臭素の食品衛生上の問題に鑑み、輸入オレンジ、レモン、グループフルーツについて残留臭素量の定量を行ったのでその結果について報告する。

Table 1. Analytical Results of Citrus Fruits

Sample		Br (ppm)		I (ppm)
Orange	1	E ¹⁾ P ²⁾	8.0 58	ND ⁴⁾
	2	E P	4.2 34.4	ND ND
	3	E	2.6	ND
Lemon	1	W ³⁾	5.8	ND
	2	W	6.5	ND
	3	W	2.7	ND
Grape Fruits		E	1.9	ND

1) E: Edible portion 2) P: Peel

3) W: whole 4) ND: not detected (<1 ppm)

実験器具, 試薬

1. 試料, 試薬

試料は市販のオレンジ 3 検体, レモン 3 検体グレープフルーツ 1 検体を実験に供した。試薬は前報参照²⁾。

2. 装置, 器具

前報参照²⁾。

実験方法

1. 試料の前処理

へタを中心に 4 等分したのちその対角の部分を用い、

オレンジは皮と可食部とに分けレモンは全体を, グレープフルーツは可食部のみについて各々ホモジナイズしたのち, その内 7.0 g を実験に供した。以後前報²⁾に従って処理, 定量を行った。

結果及び考察

各々の定量結果を Table 1 に示した。

オレンジの皮については 58 ppm, 34 ppm とかなり大きな値が得られた。一方可食部については皮の臭素含量の高い方が 8.0, 低い値の方が 4.2 ppm であり可食部では皮に対して臭素含量は前者では 13.7%, 後者では 12.3% とわずか 2 検体の結果ではあるがかなり高い相関があるものと予想される。またレモン並びにグレープフルーツではいずれも 7 ppm 以下であったが, これらについても臭素は皮の部分に集中しているものと予想される。

なおヨウ素についても定量を行ったがいずれも不検出であった。

参考文献

- 1) J.R. King, D.L. von Windeguth, and A.K. Burditt, Jr.: *J. Agr. Food Chem.*, **28**, 1049 (1980)
- 2) 鈴木 隆, 武田明治, 内山 充: 衛生試報, **98**, 97 (1980).

市販焼肉のタレ中の鉛, カドミウム, 銅のバックグラウンド
調査結果について

鈴木 隆・宅田明治・内山 充

Investigation on the Content of Lead, Cadmium and Copper in
the Commercially Available Sauces for the Baked Meat

Takashi SUZUKI, Mitsuharu TAKEDA and Mitsuru UCHIYAMA

The method of determination of lead, cadmium and copper in the sauces for the baked meat was investigated by dry ashing followed by sodium diethyldithiocarbamate (DDTC)-methylisobutylketone (MIBK) extraction and then by atomic absorption spectrometry. By the method, 1.0 ppm of lead, 0.1 ppm of cadmium and 0.5 ppm of copper in the sauces could be determined in 98, 87.5 and 91.2% of recovery, respectively. The analytical results of 14 commercially available sauces for the baked meat showed that the contents of lead were not more than 0.43 ppm, those of cadmium were not more than 0.03 ppm, and those of copper were between 0.01 and 2.4 ppm.

(Received May 31, 1982)

ま え が き

重金属のバックグラウンド調査の一環として市販焼肉のタレ中の鉛，カドミウム，銅の実態調査を行ったので，その分析方法の検討及び調査結果について報告する。

実験器具，試薬

1. 試料，試薬

試料としては市販焼肉のタレ，焼き鳥のタレ，バーベキューソース及び蒲焼のタレ，計14種類を購入し分析に供した。

硝酸，アンモニア水(1:1)，飽和シュウ酸アンモニウム溶液，メチルイソブチルケトン(MIBK)，10%クエン酸アンモニウム溶液，10%塩酸ヒドロキシルアミン溶液，飽和硫酸アンモニウム溶液及び1%ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム(DDTC)溶液：市販の精密分析用試薬もしくは特級品を用いるか，又はこれらを用いて調製した。

2. 装置

原子吸光度計：Varian社製775型，double beam，重水素放電管によるバックグラウンド補正付。

鉛，カドミウム，銅中空陰極ランプ：日立製作所製。電気炉：池田理化製MFP-400N型。

実験方法

1. 試料の前処理

乾式灰化法により行った：試料10gを100mlの硬質ビーカーに採り赤外線ランプ照射下に熱板上250°で炭化させカルメラ状とした。次に電気炉中350°で3時間，ついで温度を上げ470°で15時間加熱した。水5mlを加えガラス棒で残査を細かく砕き，再び電気炉中470°に加熱した。灰化後，硝酸2mlを加え残査を溶かしたのち，赤外線ランプ照射下熱板上で乾固した。残査を熱1N塩酸に溶かしグラフフィルターでろ過したのち，1N塩酸で10ml定容とし試験溶液とした。また別に試料を加えないで同様な処理を行うことにより空試験溶液を作成した。

2. 定量操作

試験溶液10mlを100mlの分液ロートに採り水10ml，クエン酸アンモニウム溶液10ml及び塩酸ヒドロキシルアミン溶液2mlを加えたのち，メタクレゾールパープル試液2滴を指示薬として液が微紫色を呈するまでアンモニア水を加えた。次にこれに飽和硫酸アンモニウム溶液10ml及びDDTC溶液10mlを加えて軽く振り混ぜ，10分間放置する。これに

Table 1. Operating Conditions in Atomic Absorption Spectroscopy

	Metals		
	Pb	Cd	Cu
Wave length (nm)	217.0	228.8	342.8
Lamp current (mA)	5	3.5	3.5
Slit width (nm)	1.0	0.5	0.5
Air (l/min)	9.5	9.5	9.5
Acetylene (l/min)	1.0	1.0	1.0

Table 2. Recovery of Lead, Cadmium and Copper from the Sauces for the Baked Meat

Metal	Residue (ppm)	Added (ppm)	Found (ppm)	Recovery + C.V.* (%)
Pb	0.03	1.0	1.01	98 ± 1.4 (n=3)
Cd	0.008	0.1	0.095	87.5 ± 2.0 (n=3)
Cu	2.34	0.5	2.80	91.2 ± 1.2 (n=3)

* C.V.: Coefficient of variation

Table 3. Analytical Results of Lead, Cadmium and Copper in the Sauces for the Baked Meat

Sample (manufacturer)		Metals (ppm)		
		Pb	Cd	Cu
1	(A)	0.03	<0.01	2.4
2	(A)	0.05	<0.01	0.01
3	(A)	0.04	0.01	0.95
4	(B)	0.08	0.01	0.35
5	(A)	<0.02	<0.01	0.64
6	(A)	0.02	0.01	1.0
7	(C)	0.22	0.03	2.0
8	(D)	0.02	<0.01	0.15
9	(E)	0.43	0.02	0.15
10	(B)	0.14	0.01	0.25
11	(A)	0.19	0.01	0.23
12	(A)	<0.02	<0.01	0.74
13	(D)	0.06	<0.01	0.93
14	(E)	0.04	<0.01	0.01

MIBK 10mlを加え激しく振とうして抽出した。MIBK層を分取し原子吸光度法により吸光度を求める。同時に空試験溶液を同様に操作して得たMIBK層の吸光度を求め，これらの値の差を用いて別に作成した検量線から濃度を求めた。

原子吸光度法の測定条件をTable 1に記した。

結果及び考察

1. 添加回収実験

鉛は 1 ppm, カドミウムは 0.1 ppm また銅は 0.5 ppm の濃度になるようにタレに添加し, 乾式灰化を行ったのち回収率を求めたところ, 鉛は98%, カドミウムは87.5%, 銅は91.5%といずれも満足すべき結果が得られた (Table 2).

2. 測定結果及び考察

14種の試料について測定した結果を Table 3 に示した.

鉛は最高 0.43 ppm, またカドミウムは最高 0.03 ppm といずれも低い値であった. 一方銅は最高が 2.4 ppm, 最低 0.01 ppm で試料間のバラツキが大きかった.

市販ドレッシング中のスズ, ヒ素, 及び鉛のバックグラウンド
調査結果について

鈴木 隆・武田明治・内山 充

Investigation on the Content of Tin, Arsenic and Lead
in Commercially Available Dressings

Takashi SUZUKI, Mitsuharu TAKEDA and Mitsuru UCHIYAMA

The method of determination of tin, arsenic and lead in the dressings was investigated. Tin was analyzed by dry ashing followed by direct atomic absorption spectrometry, arsenic by wet digestion following by the Gutzeit method, and lead by dry ashing followed by sodium diethyldithiocarbamic acid (DDTC)-methylisobutylketone (MIBK) extraction and then by atomic absorption spectrometry. By the method, more than 88% of recoveries were given for 50 ppm of tin, 0.5 ppm of arsenic, and 1.0 ppm of lead in the dressings. The results of examination of 14 commercially available dressings showed that the content of lead was not more than 0.22 ppm, and that tin and arsenic were not detected.

(Received May 31, 1982)

ま え が き

今回著者らは, 重金属のバックグラウンド調査の一環として, 市販ドレッシング中のスズ, ヒ素及び鉛の実態調査を行ったので, その分析法の検討及び調査の結果について報告する.

実験器具, 試薬

1. 試料, 試薬

試料としては市販ドレッシング14検体 (乳化型4件, 分離型 (10件) を1982年4月に購入 (分析) に供した.

硫酸, 硝酸, アンモニア水 (1:1), 飽和シュウ酸アンモニウム溶液, 10%クエン酸アンモニウム溶液, 飽和硫酸アンモニウム溶液, 6N-塩酸, 酢酸鉛溶液, 臭化水銀, エタノール, 10%硫酸, 60%過塩素酸, 1%ジエチルジチオサルバミン酸ナトリウム (DDTC) 溶液, 及びメチルイソブチルケトン (MIBK): 市販の精

密分析用試薬もしくは特級品を用いるか, 又はこれらを用いて調製した.

α -コーンスターチ: オリエンタル酵母 (株) 社製.

2. 装置

原子吸光光度計: Vavian 社製 775 型, double beam, 重水素放電管によるバックグラウンド補正付.

電気炉: 池田理化製 MFP-400N 型

実験方法

1. 試料の前処理

試料をじゅうぶんに振り混ぜて均一化したのち, その 10g をすばやく秤量し, 湿式灰化又は乾式灰化に供した.

a) 湿式灰化

試料 10.0g を 100 ml のケールダールフラスコに採り, 硝酸 10 ml を加え穏やかに加熱する. 反応がおさまり亜硝酸ガスの発生が穏やかになった時点で硫酸

Table 1. Operating Conditions in Atomic Absorption Spectrometry

	Metals	
	Pb	Sn
Wave length (nm)	217.0	235.5
Lamp current (mA)	5	5
Slit width (nm)	1	0.5
Air (l/min)	10	10
Acetylene (l/min)	0.9	2.5

Table 2. Recovery of Tin, Arsenic and Lead fortified to Dressings

Metals	Residue (ppm)	Added (ppm)	Found (ppm)	Recovery $\pm$ C.V. ²⁾ (%)
Sn	ND ¹⁾	50	44.0	88.1 $\pm$ 3.2 (n=3)
As	ND	0.5	0.47	93.4 $\pm$ 5.8 (n=3)
Pb	ND	1.0	0.91	90.8 $\pm$ 3.5 (n=3)

1) ND means not detected. The limits of detections are as follows: Sn, 2 ppm; As, 0.1 ppm and Pb, 0.05 ppm.

2) C.V.: Coefficient of variation

Table 3. Analytical Results of Commercially Available Dressings

Sample (Manufacturer)	(type) ¹⁾	Pb (ppm)	Sn (ppm)	As (ppm)
1	(A) (S)	0.05	ND ²⁾	ND
2	(B) (S)	0.22	ND	ND
3	(C) (S)	ND	ND	ND
4	(A) (S)	ND	ND	ND
5	(D) (E)	ND	ND	ND
6	(D) (E)	ND	ND	ND
7	(D) (S)	ND	ND	ND
8	(D) (S)	ND	ND	ND
9	(D) (S)	ND	ND	ND
10	(D) (S)	0.05	ND	ND
11	(D) (S)	0.05	ND	ND
12	(D) (S)	0.05	ND	ND
13	(D) (E)	0.10	ND	ND
14	(D) (E)	ND	ND	ND

1) S: Separates type, E: Emulsified type.

2) ND: not detected.

3 ml を加えて更に加熱する。炭化の始まる直前に硝酸 10 ml を追加する。放冷後過塩素酸 2 ml を加え穏やかに加熱し、炭化の始まる直前に再び硝酸 5 ml を追加し放冷する。これに過塩素酸 2 ml を追加してゆるやかに加熱を続け、炭化直前に硝酸 1 ml を追加する。液が完全に無色透明となり、白煙が生ずるまでこの操作を繰り返す。

冷後飽和シュウ酸アンモニウム溶液 3 ml を加え、白煙が生ずるまで加熱したのち、放冷する。アンモニア溶液 3 ml を加えて弱酸性としたのち、水で 50 ml 定容とした。また空試験溶液は試料を加えず同様に処理して調製した。

b) 乾式灰化

100 ml の硬質ビーカーに試料 10 g を採り、これに α -コーンスターチ 10 g を加え、ガラス棒でよくかき

混ぜて均一化したのち赤外線ランプ照射のもとに熱板上 250° で炭化しカルメラ状とした。次に電気炉中 350° で 3 時間、ついで 470° で 16 時間加熱する。冷後、水 5 ml を加えガラス棒で残査を細かく砕き、再び電気炉中で 470° で 4 時間加熱する。灰化終了後塩酸 2 ml を加えて残査を溶かし、グラスフィルターでろ過したのち 10 ml 定容とした。

2. 定量

ヒ素については湿式灰化液 10 ml を用いてグットツアイト法¹⁾により定量した、スズは乾式灰化液を用いて原子吸光法により定量した。また鉛は乾式灰化液 8 ml を採って DDTc-MIBK 抽出操作²⁾を行い、この抽出液を用いて原子吸光法により定量した。なお原子吸光測定の際の条件を Table 1 に示した。

結果及び考察

1. 添加回収実験

スズは 50 ppm, ヒ素は 0.5 ppm, また鉛は 1 ppm の濃度になるようにドレッシングに添加し, それぞれ湿式灰化あるいは乾式灰化を行って回収率を求めた (Table 2). いずれもほぼ満足すべき結果が得られた.

2. スズの定量に対する灰分の影響

ドレッシング中の灰分がスズの分析に与える影響を検討した: 10 g のドレッシングに 10 g の α -コーンスターチを添加し, 加熱炭化後乾式灰化を行い 10 ml 定容とした. この溶液に 50 ppm の濃度になるようにスズを添加し, その吸光度を 50 ppm のスズ標準液の吸光度と比較した. その結果 2 % の吸光度の減少を認めただけで直接法によってマトリックスの影響なしに定量し得ることが判明した.

3. 測定結果及び考察

ドレッシングは油層と水層の 2 層に分離しているのので乾式灰化の際には突沸防止及び灰化補助の目的で α -コーンスターチを加えた. これにより液の突沸を完全に抑えることができた. なお α -コーンスターチの重金属含量はスズ, 鉛のいずれも検出限界以下であった.

14種の市販試料の測定結果を Table 3 に記した. 鉛の分析値は検出限界 (0.05 ppm) 以下から 0.22 ppm の範囲にあり, 一般カン詰食品に比して低いことを見出した. なおスズ及びヒ素は検出されなかった.

文 献

- 1) 鈴木 隆, 武田明治, 内山 充: 衛生試験, 99, 125 (1981)
- 2) 鈴木 隆, 武田明治, 内山 充: 食衛誌, 20, 198 (1979)

食品中の残留農薬分析に関する研究 (第 37 報)

コンピュータ付きガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリーによる 2,4,5-TP [2-(2,4,5-trichlorophenoxy) propionic acid] の測定法

関田 寛・武田明治・斎藤行生・内山 充

Studies on Analysis of Pesticide Residues in Foods (XXXVII)
Measurement of 2,4,5-TP [2-(2,4,5-Trichlorophenoxy)propionic Acid]
by Gas Chromatography-Mass Spectrometry with Computer

Hiroshi SEKITA, Mitsuharu TAKEDA, Yukio SAITO and Mitsuru UCHIYAMA

The conditions for the measurement of 2,4,5-TP [2-(2,4,5-trichlorophenoxy)propionic acid], which had been used as a herbicide and/or a plant growth regulator for fruit-falling protection at one time in Japan and in foreign countries, were investigated by gas chromatography-mass spectrometry with the computer (GC-MS-COM) to identify this compound in the fruit samples, when 2,4,5-TP had been illegally applied for the purpose of fruit-falling protection and when this compound was detected in fruit samples. 2,4,5-TP could be analyzed at the minimum amount of 2 ng in point of the finding of its molecular ions at m/e 282 in the mass range of 150-300 for identification.

(Received May 31, 1982)

緒 言

2,4,5-TP [2-(2,4,5-trichlorophenoxy)propionic acid] は 2,4,5-T (2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid) と同様に諸外国をはじめ, わが国でもかつては除草剤としての外に, りんご等の落果防止を目的とした植物生長調節剤 (植物成長調整剤) として農薬取締法に規定さ

れる農薬に登録されていた時期があった¹⁾.

しかしながら, これらの工業原体中には急性毒性が極めて高い上に, 極めて強い発癌性及び催奇形性を有する tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) が不純物として微量含まれていることが明らかにされており^{2,3)}, このため上記 2 農薬は昭和49年に登録農薬から除外された.

しかるに昭和56年2月、無登録農薬となって農薬として販売禁止となった2,4,5-TP製剤が、山形県などのりんご産地で「フルチオン TP」の名で違法に販売されていた事実が明るみに出された⁴⁾。もしも、このような極めて毒性の高いTCDDを含む可能性のある2,4,5-TP製剤が、りんご等の落果防止剤に使用さ

れていたとしたら、それらの果実中に 2,4,5-TP ひいては TCDD が残留することが懸念され、食品衛生上極めて重大な問題となることは明白であった。

これを契機として、著者らはりんご等の果実類中に 2,4,5-TP が残留している場合を想定して、これらの果実中の 2,4,5-TP の残留分析法を検討し、日常的業務として実用性のある試験法を確立することが出来、前報⁵⁾に報告した。また、TCDD の残留分析法については、著者らは既に魚介類中に残留する TCDD の ECD ガスクロマトグラフィーによる微量分析法並びに GC-MS を利用したマスフラグメントグラフィーによる超微量定量法を報告している⁶⁾。したがって、果実類中の TCDD の残留分析はこの方法を応用して行うことが可能である。

今回、著者らはりんご等の果実から ECD ガスクロマトグラフィーによって 2,4,5-TP が検出された場合を想定して、微量の 2,4,5-TP の確認同定法としてコンピュータ付きガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリー (GC-MS-COM) による測定条件を検討したので報告する。

実験方法

1. 試薬

有機溶媒：和光純薬工業(株)製の残留農薬試験用。

ジアゾメタン試薬：同社製の *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG).

2,4,5-TP: 東京化成工業(株)製の特級品.

2. 標準溶液の調製

2, 4, 5-TP 10mg を 100 ml のメスフラスコに精密に秤取し、アセトン 2~4 ml を加えて溶解した後、ヘキサンで定容としたものを保存溶液とした(2, 4, 5-TP 100 ppm 溶液)。この保存溶液 1 ml (2, 4, 5-TP 100 μ g) を 30 ml の共栓付試験管に取り、常法に従って

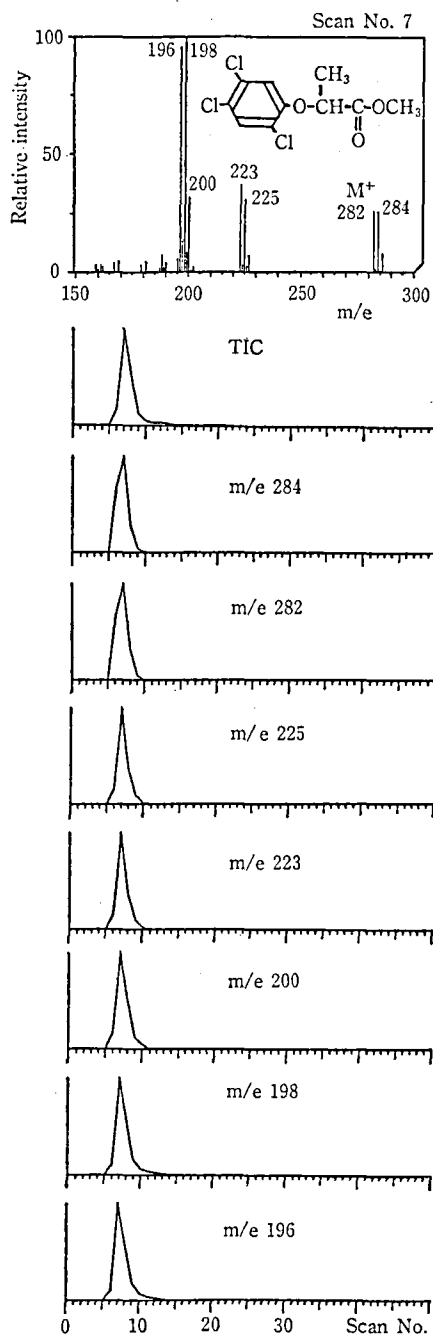


Fig. 1

Fig. 1. Mass spectrum, total ion chromatogram (TIC) and mass chromatograms of 2,4,5-TP standard (methyl ester) by GC-MS-COM.

2,4,5-TP; 50 ng

Apparatus: Du Pont Dimaspec 321 with Du Pont Data System 320, Column: 3 mm i.d. $\times$ 50 cm (glass), Packing: 2% OV-17/Chromosorb W-HP (100–120 mesh), Inlet temp.: 200°C, Column temp.: 180°C, Separator temp.: 200°C, Ion source temp.: 180°C, Ionization voltage: 70 eV, Ionization current: 500 μ A, Carrier gas: He (3.6 kg/cm²), Integration time: 8 msec, Samples/AMU: 5, Delay time: 40 sec

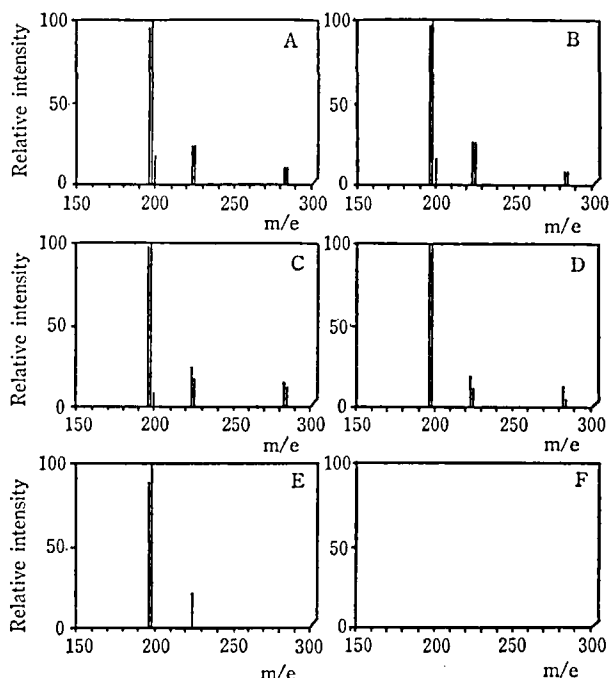


Fig. 2. Mass spectra of 2,4,5-TP standards (methyl esters) for minimum detection by GC-MS-COM

Conditions: See Fig. 1.

A: 5 ng, B: 4 ng, C: 3 ng, D: 2 ng, E: 1.5 ng, F: 1 ng

調製したジアゾメタンのエーテル溶液を用いて 2,4,5-TP のメチル化を行い、エーテルを留去した後、ヘキサン 10 ml を加えて溶解した(2,4,5-TP 量として 10 ppm 溶液)。この溶液を 1 ml 取り、更にヘキサンで 10 倍希釈溶液を調製した(2,4,5-TP 量として 1 ppm 溶液)。

3. GC-MS-COM の操作条件

今回の 2,4,5-TP の GC-MS-COM による検討の際に使用した装置並びにその操作条件は、Fig. 1 の注に記した。

結 果

前報⁵⁾において 2,4,5-TP は、2,4,5-T や 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) と同一条件で ECD ガスクロマトグラフィーにより分離定量できることが見出されている。また、同時に米国産レモン中に残留する 2,4-D の確認同定のために GC-MS-COM による検討を行っており、2,4,5-TP も 2,4-D とほぼ同一条件で測定できると、予測された。

即ち、前報⁵⁾における 2,4-D の GC-MS-COM の操作条件のうち、カラム温度を 180℃に上げ、測定質量数範囲を 150—300 とし、試料注入からコンピュ

ータへのデータのインプット開始時までの待ち時間を 40 秒間に変更して 2,4,5-TP (メチル体) の GC-MS を検討したところ、Fig. 1 に示したようなマススペクトル、全イオンクロマトグラム(TIC)及びマスクロマトグラムが得られた。

質量数範囲 150—300 における 2,4,5-TP のマススペクトルでは、m/e 282 に分子イオンピーク (M^+) が観察されたほか、m/e 284 に ($M+2$) の塩素の同位体由来するイオンピーク、その他主要なフラグメントイオンとして m/e 225, 223, 200, 198 (基準ピーク) 及び 196 の計 7 個のピークが観察された。これら 7 個のイオンの質量数におけるマスクロマトグラムではそれらのピークの位置が、すべて TIC におけるピークの位置 (Scan No. 7) と完全に一致していた。

次いで、今回の測定条件下における 2,4,5-TP の最小検出量を検討したところ、Fig. 2 に示したように、2,4,5-TP (メチル体) の M^+ が観察されるか否かを判定基準とした場合、その最小検出量は 2 ng であった。したがって、もし果実等の試料から ECD ガスクロマトグラフィーにより 2,4,5-TP が万一検出された場合、本測定条件下で試料由来の夾雑ピークが m/e 198 の基準ピークよりも大きなものでない限り、GC-

MS-COMにより 2 ng 程度の検出限界で、2,4,5-TP を確認同定することが出来る。

なお、現在までのところ、りんご等の果実類から 2,4,5-TP が検出されたとする報告はない。

文 献

- 1) 日本植物防疫協会：農薬便覧，pp. 312, 336 (1970年版)

- 2) E.A. Woolson, R.F. Thomas and D.J. Enson: *J. Agr. Food Chem.*, **20**, 351 (1972)
- 3) J.S. Contrelland, N.C. Nebb and A.J. Mabis: *Acta Crystallog. Sect.*, **25**, 150 (1969)
- 4) 昭和52年2月19日付朝日新聞(東京版朝刊22面) その他
- 5) 関田 寛，武田明治，斎藤行生，内山 充：衛生化学，**28**, 219 (1982)
- 6) 福原克治，武田明治，内山 充，田辺弘也：衛生化学，**21**, 318 (1975)

食品中の残留農薬分析に関する研究（第38報） 輸入農産物中のフェノキシ系除草剤の残留実態調査（昭和55年度）

関田 寛・佐々木久美子・河村葉子・武田明治・内山 充

Studies on Analysis of Pesticide Residues in Foods (XXXVIII) Surveillance of Chlorinated Phenoxy Herbicide Residues in Imported Agricultural Crops in 1980

Hiroshi SEKITA, Kumiko SASAKI, Youko KAWAMURA,
Mitsuharu TAKEDA and Mitsuru UCHIYAMA

The surveillance of the residues of four kinds of chlorinated phenoxy herbicides, 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid), 2,4-DB (2,4-dichlorophenoxybutyric acid), 2,4,5-T (2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid) and 2,4,5-TP [2-(2,4,5-trichlorophenoxy)propionic acid] in three kinds of agricultural crops imported from various countries in 1980 was carried out. These herbicides were analyzed by gas chromatography with ECD after methylation with diazomethane and clean up by column chromatography on silica gel. The minimum detectable residues of these herbicides were 0.01 ppm of 2,4-D, 0.05 ppm of 2,4-DB, 0.002 ppm of 2,4,5-T and 0.001 ppm of 2,4,5-TP. In this surveillance none of these herbicides was detected in all samples of the wheat imported from Australia, Canada and U.S.A., in the maize (corn grains) imported from South Africa and U.S.A. and in the soybeans imported from Canada, China and U.S.A. (total 30 samples of 10 samples in each agricultural commodity).

(Received May 31, 1982)

緒 言

著者らは前々報¹⁾において、2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid), 2,4,5-T (2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid) 及び 2,4,5-TP [2-(2,4,5-trichlorophenoxy)propionic acid] の3種のフェノキシ系農薬がりんご、レモン等の果実類に落果防止剤又は鮮度保持剤として使用された場合を想定して、これらのフェノキシ系農薬の残留分析法を検討し、日常的業務として実用性のある試験法を確立した。

これらの農薬のうち 2,4,5-T 及び 2,4,5-TP は、これらの工業原体中に含まれている微量の不純物（ポリ塩化ジベンゾジオキシン）が強力な発癌性及び催奇

形性を有していることが判明したために、昭和49年に登録農薬から削除されたが、2,4-D は現在でも除草剤として各国で使用されている。また外国では、これら以外に 2,4-DB (2,4-dichlorophenoxybutyric acid) が除草剤として使用されている。

厚生省食品化学課所管の昭和55年度食品残留農薬調査に係わる分担業務として、著者らはフェノキシ系除草剤の残留実態調査を担当した。そこで、前々報¹⁾における分析法が上記4種のフェノキシ系除草剤の残留分析に実際に応用出来るか否かを検討し、充分実用性のあることを確認した後、諸外国より輸入した小麦、とうもろこし及び大豆について上記4種のフェノキシ系除草剤の残留実態を調査した。

Table 1. Overall recovery of chlorinated phenoxy herbicides fortified to powdered samples

Phenoxy herbicide	Fortified level (ppm)	Recovery (%)		
		Wheat	Maize	Soybean
2,4-D	0.10	89.8	86.8	96.5
2,4-DB	0.50	86.0	88.5	96.5
2,4,5-T	0.020	90.9	83.3	89.1
2,4,5-TP	0.010	88.2	89.3	87.0

Each recovery value represents the mean of 5 samples in each crop.

Acetone solution containing the mixture of methyl esters of 4 phenoxy herbicides (2,4-D; 5.0 μ g, 2,4-DB; 25.0 μ g, 2,4,5-T; 1.0 μ g and 2,4,5-TP; 0.5 μ g) was fortified to each powdered sample (50 g), and 1 hr after the fortification the extraction procedure was started.

試験方法

1. 試料

今回の調査品目である小麦（オーストリア産，カナダ産各3検体，米国産4検体），とうもろこし粒（メーゾ）（南アフリカ産4検体，米国産6検体）及び大豆（カナダ産，中国産各2検体，米国産6検体）は，日本油料検定協会等を通じて各10検体計30検体入手した。

なお，実際の分析には残留農薬分析公定法²⁾の規定に合致するように粉碎した粉末試料を用いた。

2. 試薬及び装置

前々報¹⁾に従った。

3. 標準溶液の調製

前々報¹⁾に従った。

4. 抽出及びクリーンアップ

シリカゲルカラムによるクリーンアップにおける溶出条件を一部変更しただけで，その他の操作は前々報¹⁾に従った。即ち，シリカゲルカラムの溶出条件は，最初にエーテル-ヘキサン（2：98）50 ml で溶出し，この溶出液を除外した後，同混合溶媒系（5：95）50 ml で溶出される画分を2,4,5-TP 画分とし，次いで同溶媒系（10：90）100 ml で溶出される画分を2,4-D, 2,4-DB 及び 2,4,5-T 画分とした。

なお，各溶出液は10 ml に濃縮してガスクロマトグラフィー用供試液とした。

5. ガスクロマトグラフィー

前々報¹⁾に従った。

結 果

1. 添加回収実験

前々報¹⁾における果実類中のフェノキシ系農薬の残留分析法が，今回の調査品目である穀類及び豆類に対しても適用し得るか否かについて検討した。

まず，シリカゲルカラムによるクリーンアップにお

いて未検討であった2,4-DBの溶出条件を検討したところ，2,4-DBは2,4-D及び2,4,5-Tと同一画分に溶出されることがわかった。

次いで，今回の調査品目である小麦，とうもろこし及び大豆の粉末試料について分析操作全体におたるフェノキシ系除草剤の添加回収実験を検討した。即ち，小麦，とうもろこし及び大豆の粉末試料各50 gに2,4-D 5.0 μ g，2,4-DB 25.0 μ g，2,4,5-T 1.0 μ g及び2,4,5-TP 0.50 μ gを添加し，添加1時間後にこれら4種のフェノキシ系除草剤を前々報¹⁾に準じて抽出を開始し，シリカゲルカラムによりクリーンアップした後，ECD ガスクロマトグラフィーにより定量した。結果はTable 1に示したように3品目について平均83%以上のほぼ満足すべき回収率が得られた。したがって，本法は今回の調査における試験法として充分実用性のある方法であると判断した。

2. 残留実態調査

昭和50年度に諸外国より輸入された農産物のうち小麦，とうもろこし（メーゾ）及び大豆各10検体，計30検体について前々報¹⁾及び試験方法の項に記載した方法に従って2,4-D, 2,4-DB, 2,4,5-T 及び 2,4,5-TP の4種のフェノキシ系除草剤の残留分析を行ったところ，これらの除草剤は今回調査したいずれの試料からも検出されなかった。

なお，本試験法におけるこれら4種の除草剤の検出限界は，2,4-D が0.01 ppm，2,4-DB が0.05 ppm，2,4,5-T が0.002 ppm，また2,4,5-TP が0.001 ppmであった。

文 献

- 1) 関田 寛，武田明治，斎藤行生，内山 充：衛生化学，28，129（1982）
- 2) 食品衛生関係法規集，第1分冊，pp. 1179, 1211, 1214（1978）日本法規出版

食品中の三二酸化鉄の定量について

神蔵美枝子・平田正子*

Studies on Determination of Iron Sesquioxide in Food

Mieko KAMIKURA and Masako HIRATA

A procedure and results were given for the determination of iron sesquioxide in Aka-Konnyaku and a carpophore of Banana. Iron concentrations were determined directly on the solutions prepared after decomposition of the samples with nitric and perchloric acid by atomic-absorption spectrophotometry. Iron sesquioxide in commercial Aka-Konnyaku was determined in the range of 0.100 to 0.163 per cent.

(Received May 31, 1982)

三二酸化鉄（ベンガラ）は昭和32年12月28日、厚生省告示第420号¹⁾をもって、食品添加物に指定された。当初は使用基準がなく、食品全般への使用が認められていたが、昭和46年2月26日厚生省告示第39号²⁾をもって、使用実態に合わせての改正が行われ、使用基準が設定された。

すなわち、「三二酸化鉄及びこれを含む製剤は、バナナ（果柄の部分に限る）及びコンニャク以外の食品に使用してはならない」とされた。三二酸化鉄をバナナに使用するのには、バナナの果柄にパラオキシン安息香酸エステル類の保存料を使用した場合の識別のために使用するものであり、コンニャクへの使用は、滋賀県下の特産品である「赤コンニャク」のみを対象としている³⁾。

三二酸化鉄は顔料の1つで、天然に産する鉄酸化物の1つである。鉱物としての赤鉄鉱は古くから弁柄（ベンガラ）(rouge) と称し、赤色えのぐとして使用されている。昭和の初期より硫酸鉄を原料として製造するようになった。三二酸化鉄は C. I. 77491, C. I. Pigment Red 101 及び 102 である。

食品中の三二酸化鉄の定量分析法としては、原子吸光法のほか、オルトフェナントロリンによる比色法、過マンガン酸カリウム滴定による容量法がある。本研究においては、バナナの果柄並びにコンニャクに使用

された三二酸化鉄を原子吸光法によって分析することについての検討を行った。

使用の実態

三二酸化鉄を使用した「赤コンニャク」の生産は、滋賀県下、特に大津、彦根を中心として近江八幡に因み「八幡コンニャク」の名称で販売されており、年間生産量は約300トンといわれる。使用方法はコンニャクこなこん（精粉）を水溶きする段階で三二酸化鉄を加え、色付けが行われる。

バナナの果柄を保存料で処理するのは、産地からの輸送中における切口からの微生物による汚染、変質等を防ぐ目的で行われるが、この処理を行ったバナナの輸入例は見当たらない。また、国内で同目的のために三二酸化鉄を加工した製剤の流通もみられない。

実験の部

1. 使用機器

原子吸光光度計 日立 518 型。

2. 試薬

過塩素酸、硝酸は有害金属用、市販品を、塩酸、塩化第二鉄は試薬特級品を用いた。

3. 標準液

塩化第二鉄 4.838 g を正確にはかり、塩酸溶液(9.5→100) 100 ml に溶かし、水を加えて正確に 1000 ml とする。この液 20 ml を正確にはかり、塩酸溶液(9.5

* 東京家政大学

→1000)を加えて正確に 200 ml とする。この液 1 ml は Fe 100 μ g を含む。しゃ光して保存する。

3. 試験法

定量法の原理は、試料中の有機物等を濃硝酸で加熱分解後、更に過塩素酸処理を行って完全に分解し、鉄の分析線 371.99 nm を用い、アセチレン・空気炎によって試料中の三酸化鉄を測定する⁴⁾。すなわち、試料を細切し、均質とした後、約 2 g を正確にはかり、250~300 ml の分解フラスコに入れ、硝酸 20 ml を加えて穏やかに加熱する。最初の激しい反応が弱まるにつれ、加熱を強めて均一な黄色液となるまで加熱する。つぎに、過塩素酸 5 ml を加えて穏やかに加熱して二酸化窒素の発生が終わり、発泡が激しくなり、液が黄〜黄かっ色になったとき、加熱を止め、硝酸約 2 ml を極めて静かに加えて、再び加熱し、過塩素酸の白煙が生じ、液が微黄色〜無色になったとき、加熱をやめる。冷後水約 30 ml を加え、再び加熱し、過塩素酸の白煙が生じてから、更に20~30分間加熱を続ける。冷後、分解液を水を用いて定量的に 100 ml のメスフラスコに移し、水を加えて正確に 100 ml とし、試験溶液とする。

別に、水 2 ml を用い、試料の場合と同様に操作し、空試験溶液を調製する。

試験溶液及び空試験溶液につき、次の測定条件にしたがって、原子吸光度を測定する。両者の吸光度の差を求め、その値から検量線により試験溶液中の鉄濃度(μ g/ml)を求め、次式によって試料中の鉄含量(g/kg)を計算する。

$$\text{鉄含量 (g/kg)} = \frac{C}{W} \times 0.1$$

C: 検量線によって求めた試験溶液中の鉄濃度(μ g/ml)

W: 試料採取量(g)

三酸化鉄含量(g/kg) = 鉄の含量(g/kg) $\times$ 1.430

〔測定条件〕

原子吸光光度計を用い、次の条件で測定する。

アセチレン・空気フレイム:

アセチレン 3.0 ml/min

空気 13 l/min

測定波長 371.99 nm

〔検量線〕

標準液 0, 1, 5, 10, 30 及び 50 ml をそれぞれ正確にはかり、水を加えて正確に 100 ml とし、検量線用標準液とする。この液につき、それぞれ原子吸光度を測定し、検量線を作成する。

結果及び考察

1. 原子吸光法による鉄の検量線

鉄標準溶液 0~50 μ g/ml の検量線は Fig. 1 のとおりである。

2. 三酸化鉄の添加、回収結果

コンニャク及びバナナの果柄について三酸化鉄の添加、回収並びにコンニャク、バナナの果柄中に含まれる鉄の量を調べた結果は、Table 1 のとおりである。

3. 滋賀県下の特産品「赤コンニャク」の分析結果

滋賀県下の特産品である「赤コンニャク」は、外観がレンガのような赤かっ色の物質である。このものについて鉄の分析を行った結果は Table 2 のとおりである。

コンニャク、バナナの果柄は硝酸で加熱分解後、更に過塩素酸処理を行い、原子吸光法により、鉄の分析線 371.99 nm を用いて試料中の鉄を定量し、係数を乗じて三酸化鉄の量とした。本法はバックグラウンドの少ない分析線を用いており、アセチレン・空気炎で行っているため、他物質の干渉をほとんど受けない。なお、最高感度を示す分析線としては 248.33 nm があるが、この線には炎のバックグラウンドがある。

本法による三酸化鉄 (90.07%, 原子吸光法) の添加、回収結果はコンニャク 90.80~92.35%, バナナ 91.38% であった。コンニャク中の鉄の含量は、日本食品成分表⁶⁾により計算すると 100 g 中 0.2~2.5 mg または 0.4 mg⁷⁾ といわれ、分析値は 1.34 mg を示し、バナナの果柄についてはその値が明確ではないが、生果については 0.4 mg⁷⁾ また、果実類に例をとると 100 g 中 0.1~4.0 mg⁸⁾ といわれ、分析値 2.45 mg と、いずれもその範囲内に入っている。

「赤コンニャク」中の三酸化鉄の分析値は 1 g 中

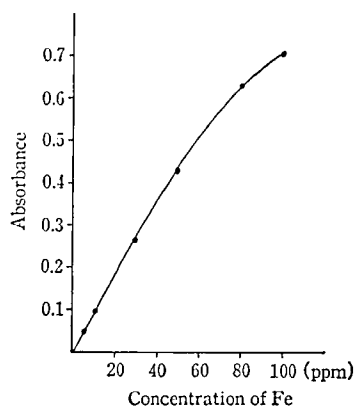


Fig. 1. Calibration curve of Iron

Table 1. Recoveries of Iron Sesquioxide added to Konnyaku, a carpophore of Banana, and iron content in their samples by atomic-absorption spectrophotometry

Sample	(g)	Added		Found As Fe (mg)	Recovery (%)
		As Fe ₂ O ₃ (mg)	As Fe (mg)		
Konnyaku	10.001	—	—	0.135	—
	9.958	9.750	6.142	5.577	90.80
	10.000	10.020	7.008	6.472	92.35
Carpophore of Banana	9.996	—	—	0.245	—
	10.770	9.720	6.123	5.595	91.38

Table 2. Amounts of Iron Sesquioxide in commercial Aka-Konnyaku by atomic-absorption spectrophotometry

Sample	(g)	Found		Fe ₂ O ₃ Content	
		As Fe (mg)	As Fe ₂ O ₃ (mg)	In 1g (mg)	g/kg
Aka-Konnyaku No. 1	1.013	0.700	1.000	1.000	1.000
	10.000	7.125	10.187	1.019	1.019
No. 2	5.071	4.950	7.077	1.396	1.396
No. 3	10.000	7.525	10.759	1.076	1.076
	9.990	7.525	10.759	1.076	1.076
No. 4	1.001	1.140	1.630	1.630	1.630

1.00～1.630mg (0.100～0.163%)であった。「赤コンニャク」の製法については前述したが、その詳細について調べると、水100分に対して三二酸化鉄が0.2～0.3分の割合で使用されている。コンニャク精粉10kgに対して水は300l使用されるといわれるが、これから製造される「赤コンニャク」が、1ヶ400gのもの1000ヶと推定すると、「赤コンニャク」1ヶ当たりの三二酸化鉄量は0.6～0.9gとなり、1g当たり1.5～2.25mgとなる。「赤コンニャク」製造中において三二酸化鉄は100%コンニャク中に固定されるものではなく、凝固後の熱湯による煮沸、水洗等の操作により⁶⁾、「赤コンニャク」中より水中へ移行するものがある。これらのことを考慮すると、分析値1.00～1.630mg/1gは計算値とよく適うものと考ええる。

バナナの果柄については、三二酸化鉄が通常の塗料と同程度の濃度で使用されるとすれば、製剤中の濃度は40～50%と考えられる。そして、仮りに塗料中の三二酸化鉄濃度を40%とし、また、バナナの果柄への同製剤の塗布量を1g/5g(果柄)としたとき、三二酸化鉄量は400mg(鉄として299.76mg)、10%濃度では100mg(69.94mg)となる。しかし、ブランク値をみると、鉄含量は極めて低く、バナナの果柄には特に保存料が使用されていないものと判断される。なお、バナナには防カビ剤としてチアベンダゾールが使用され

ているが、このものが果柄から微量検出(0.37ppm)されるケースがあった。

ま と め

原子吸光法による食品中の三二酸化鉄の分析方法を設定した。本法により滋賀県下の特産品である市販の「赤コンニャク」につき三二酸化鉄の分析を行ったところ、その含量は0.100～0.163%であることがわかった。しかし、バナナの果柄については、鉄の分析値が通常のそれと類似しており、これらの結果から三二酸化鉄が使用されているとは考えられず、したがって、特に保存料で処理されているとも思われない。

文 献

- 1) 食品添加物の規定に基づき、食品添加物、器具及び容器包装の規格及び基準の一部を改正する件、昭和32年12月28日、官報号外第85号
- 2) 食品添加物の規定に基づき、食品、添加物等の規格基準の一部を改正する件、昭和46年2月26日、官報第13253号
- 3) 厚生省食品化学課：食品衛生研究，21，379(1971)
- 4) 武者宗一郎，下村 滋：原子吸光分析，p.119(1974) 共立出版
- 5) 小原哲二郎，鈴木隆雄，岩尾裕之編：食品分析ハンドブック，p.253(1969) 建邦社

6) 食品製造ハンドブック刊行会編：食品製造ハンドブック, p. 181 (1963) 地球出版

7) 科学技術庁資源調査局編：日本食品標準成分表 3訂補 p. 24, 628 (1980) 大蔵省印刷局

発がん性実験に使用するトリエタノールアミンの安定性及び純度試験

石綿 肇・金子久美・加藤三郎・谷村顕雄

Stability and Purity Tests of Triethanolamine used for a Carcinogenicity Test

Hajimu ISHIWATA, Kumi KANEKO, Saburo KATO and Akio TANIMURA

Purity and stability of triethanolamine were examined prior to a carcinogenicity test. Triethanolamine used in the tests contained 1.9% of diethanolamine as a contaminant. Both of triethanolamine and diethanolamine in a 1% or 2% triethanolamine solution kept in an animal breeding room maintained at 23° were stable for a month under a room light or a dark condition.

(Received May 31, 1982)

厚生省は、食品添加物をはじめとする環境中の化学物質の発がん性試験を継続的に行っている¹⁾。昭和57年度に試験開始予定の被験物質の1つであるトリエタノールアミン (TEA) は、合成洗剤、乳化剤、界面活性剤などに使用されている。性質は、微アンモニア臭を有し室温ではやや粘稠な液体である²⁾。事から被験動物の飼料への添加が難しく、飲料水に溶解して投与方法が計画されている。

長期間の動物試験において、被験物質を飲料水に溶解して投与する場合、用時調製は困難を伴ない、通常一時期に大量に調製されている。

そこで、発がん性試験に先立ち、TEAの水溶液中での安定性をみると共に、TEA中に混在するジエタノールアミン (DEA) の定量を行ったのでその結果について報告する。

実験方法

1. 試薬及び試料

TEA 溶液：和光純薬特級 TEA を蒸留水で2%及び1%に調製し使用。

DEA 溶液：和光純薬特級

エリスリット：東京化成

2. 装置及び測定条件

ガスクロマトグラフ：島津 GC-6A 型

(共通条件)

検出器：FID

カラム：長さ 1 m, 内径 3 mm (ガラス製)

充填剤：TENAX-GC(60~80 mesh)

キャリアーガス：N₂, 60 ml/min

(TEA の分析条件)

Table 1. Stability of triethanolamine (TEA) solution

day	1% TEA solution		2% TEA solution	
	light	dark	light	dark
0	100%	100%	100%	100%
1	96.0	95.8	95.4	95.4
3	96.2	90.9	93.3	94.9
7	98.5	97.5	95.9	97.5
10	94.0	97.7	96.4	100.0
16	100.2	102.0	97.3	104.0
24	94.4	99.3	101.0	106.1
28	105.1	100.6	101.8	107.8

Table 2. Stability of diethanolamine (DEA) in triethanolamine (TEA) solution

day	DEA in 1% TEA solution		DEA in 2% TEA solution	
	light	dark	light	dark
0	100%	100%	100%	100%
1	95.3	93.8	98.3	95.5
2	105.1	103.4	98.5	96.2
6	106.7	95.2	103.7	107.5
9	95.0	100.0	96.8	105.9
15	100.6	98.1	95.8	97.8
22	96.3	102.3	101.5	103.7
29	103.1	109.9	101.5	107.8

Changes of DEA concentration in TEA solution were shown as per-cent for the concentration of DEA (1.9% in TEA) on the 0 day.

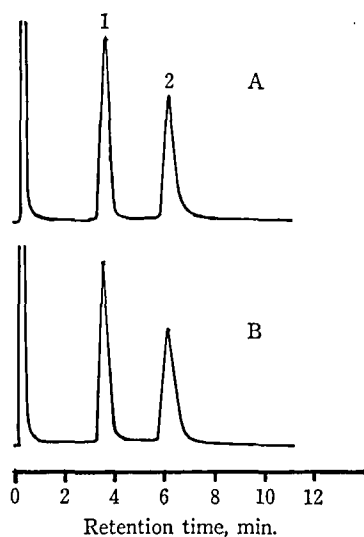


Fig. 1. Gas chromatograms of triethanolamine (TEA)

Samples; 1% TEA solution at 0 day (A) and after 28 days (B) in the light. peaks; (1): erythrite (I.S.), (2): TEA. conditions; gas chromatograph: Shimadzu GC-6A, column: TENAX-GC, 1 m × 3 mm i.d., carrier gas: N₂ 60 ml/min, column temperature: 240°, injection port: 300°

カラム温度: 240°

注入口温度: 300°

注入量: 1 μl

(DEA の分析条件)

カラム温度: 200° で 15 min 保持後, 20°/min で 300° まで昇温

注入口温度: 220°

注入量: 5 μl

3. 操作

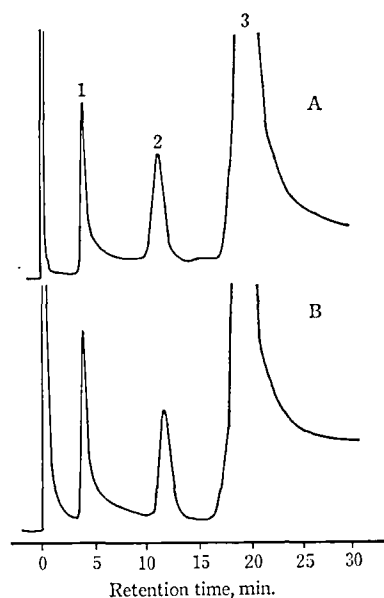


Fig. 2. Gas chromatograms of diethanolamine (DEA) in triethanolamine (TEA)

Samples; 1% TEA solution at 0 day (A) and after 29 days (B) in the light. peaks; (1): DEA, (2): erythrite (I.S.), (3): TEA. conditions; injection port: 220°, column temperature: 200°. Column temperature was held at 200° for 15 min and programed 20°/min to 300°. Other conditions were the same as shown in Fig. 1.

2%及び1% TEA 溶液を透明三角フラスコ又はアルミホイルで全体を覆ったかっ色三角フラスコに入れ, 密栓し室温 (23°) に放置し, TEA 及び DEA の経時変化をガスクロマトグラフィー³⁾により測定した. TEA 及び TEA 中の DEA の測定は, エリスリットを用いた内部標準法により行った. TEA 及び DEA の標準溶液については, 試薬を冷蔵し用時希釈して使

用した。

結果及び考察

1. TEA の安定性

被験溶液の放置場所は動物飼育室内であり温度が23°に調整されており、28日間の放置では遮光の有無に関係なく1%及び2%溶液共に安定で濃度の低下は認められなかった (Table 1)。また、ガスクロマトグラム上の変化や新たなピークの出現は認められなかった (Fig. 1)。

なお、放置期間中の溶液の外観の変化も特に認められなかった。

2. TEA 中の DEA の含有量及びその安定性

TEA 中には DEA が存在することはすでに知られている⁴⁾。DEA は亜硝酸と反応することにより既知発がん性物質である N-ニトロソジエタノールアミンとなる⁵⁾ためその定量を行った。本実験に用いた TEA 中の DEA 含量は1.9%であった。TEA の1%及び2%溶液を室内光下又は、遮光下で29日間放置したが、混在する DEA の濃度変化は認められず (Table 2)、また、ガスクロマトグラム上の変化及び新たなピークの出現も認められなかった (Fig. 2)。したがって、TEA 溶液中に存在する DEA は本実験条件下で安定

であり、かつ、TEA 溶液の保存中に DEA が生成する可能性はほとんどないと考えられる。

なお、DEA の測定を行う場合、注入口温度を300°で行うと DEA のピーク直前又は直後に異常なピークが認められる場合があった。ただし、注入口温度を220°に設定した場合には、この現象は認められなかったのでこの条件において測定を行った。

以上の結果から動物に与える飲料水中に1%又は2%の濃度で TEA を溶解し動物飼育室内に保存しても1カ月は使用に耐えるものと考えられる。

終わりに、本実験を行うに当たり御助言をいただきました環境衛生化学部木嶋敬二技官に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 国立がんセンター：厚生省がん研究助成金による研究報告書, p. 955 (1980)
- 2) 日本化学会編：化学便覧応用編, p. 644 (1980) 丸善
- 3) 河村太郎, 木嶋敬二：未発表
- 4) 日本公定書協会：第8改正日本薬局法第一部解説書, C-1205 (1971), 廣川書店
- 5) P-A. Zingmark and C. Rappe: *Ambio*, 5, 80 (1976)

輸入食肉由来サルモネラの抗生物質感受性について (その4)

昭和54年～55年度分離株について

河西 勉・鈴木 昭・小沼博隆

Antibiotic-Sensitivity *in vitro* of Salmonellae

Isolated from Imported Meats (IV)

Results of the Isolates in 1979 and 1980

Tsutomu KAWANISHI, Akira SUZUKI and Hirofuka KONUMA

A total of 111 strains of *Salmonella* isolated from various meats, which were imported in 1979 and 1980, were identified for their serovars, and examined for sensitivity to several antibiotics such as TC, SM, CP, KM, APC, NA and CL, using the agar plate method.

All the strains, except for unidentified 10 strains, were identified to 18 serovars. Of these serovars, *S. typhimurium*, *S. infantis*, *S. heidelberg* and *S. concord* were detected with most frequency (over 70%) in the proportion of all the strains. As compared with the previous reports, serovars which do not belong to B-E group could not be detected in this survey.

Almost all the strains tested were inhibited by antibiotics used at a concentration of less than 25 µg/ml, but 12 strains possessed a high resistance to TC or SM, and a transferable R-plasmid was detected in three (25%) of these ones. The serovars of the above three strains were *S. heidelberg* and *S. stanley*, both isolated from chicken meats, and *S. anatum* from horse meats, respectively.

(Received May 31, 1982)

海外から輸入されるサルモネラ（サ菌）汚染食肉の防止処置として輸入時に厳重な検査を行い、できるだけサ菌の汚染している食肉が輸入されないように行政指導がとられている。その結果、輸入食肉のサ菌汚染率は年々低下の傾向にあるが、依然として数%の汚染率¹⁾を示している。

このようなサ菌汚染肉の輸入によるわが国への侵入は国内食品への2次汚染源となるばかりか、種々の菌型増大の一因ともなり、疫学的にも生態学的にも重要な問題を提起している。

また、家畜の肥育促進及び治療の目的に広く使用されている抗生物質（薬剤）の使用の増大はサ菌を含む各種細菌の耐性菌出現に大きな影響を及ぼし、薬剤に対する耐性菌の増加は世界的な傾向として注目されている。

このような背景から欧米においても食肉のサ菌の汚染、菌型及び耐性菌の調査が広く実施され、わが国においても国内品については多くの調査報告があるが、輸入時における輸入食肉に関する成績は比較的少ない。

そこで輸入時における食肉のサ菌汚染状態及び分離株の菌型、薬剤に対する感受性に関する資料を得ることが行政的にも学問的にも必要と考え、1965年以來、業務の一環として調査を進め、過去数回²⁻⁸⁾にわたって報告してきた。

今回はその後（昭和54年、55年）の分離株について、その菌型及び薬剤感受性について調査した結果について報告する。

Table 1. Distribution of serovars of *Salmonella* isolates in 1979 and 1980

Serovars and No. of strains			Chicken meats					Horse and other meats						Frog legs	
			USA	Thailand	Hungary	Taiwan	Uncertainty	USA	Brazil	Argentina	Mexico	Guatemala	Australia	India	Cuba
B	<i>S. typhimurium</i>	28								28					
	<i>S. heidelberg</i>	9	6(1)*			2	1								
	<i>S. schwarzengrund</i>	8	6(6)	2											
	<i>S. derby</i>	4								4					
	<i>S. stanley</i>	3	3(1)												
	<i>S. java</i>	2									2				
	<i>S. chester</i>	1						1							
	<i>S. saint-paul</i>	1	1(1)												
C ₁	<i>S. infantis</i>	14	6	1	1		3	2							2
	<i>S. concord</i>	9											3	6	
	<i>S. oranienburg</i>	3		1								2			
	<i>S. isangi</i>	2													2(2)
C ₂	<i>S. muenchen</i>	5													5
	<i>S. blockly</i>	3	3												
	<i>S. manhattan</i>	1											1		
	<i>S. newport</i>	1	1												
	<i>S. C₂:—:1</i>	1	1												
D	<i>S. D₁:—:1</i>	8													8
E	<i>S. anatum</i>	5						2(1)	3						
	<i>S. lexington</i>	2				2									
	<i>S. E₁:—:—</i>	1							1						
Total		111	27(9)	3	1	4	4	2(1)	7	32	2	2	4	6	17(2)

* (): No. of drug-resistant strains.

材料及び方法

供試株：本実験に用いた菌株は昭和54、55年度に輸入検査として当所に持ち込まれた各種の食肉から分離された111株である。これら菌株の由来別は Table 1 に示した。

供試薬剤、薬剤感受性試験及び耐性伝達試験：供試薬剤はテトラサイクリン (TC)、ストレプトマイシン (SM)、クロラムフェニコール (CP)、カナマイシン (KM)、アンピシリン (APC)、ナリジキン酸 (NA)、コリスチン (CL) の7薬剤を用いた。試験法は既報の方法^{7,8)}に準じた。

結果及び考察

1. 血清型の分布

供試株の血清型は Table 1 に示した。

111株のうち10株の型別不能を除いて合計18血清型に型別され、これらはいずれも B, C1, C2, D 及び E 群に属するものであった。既報²⁻⁵⁾では B~E 群以外に属するものが約25%ほど検出されたのに対し、今回では1血清型も検出されなかった。

高頻度に検出された血清型は *S. typhimurium*, *S. infantis*, *S. heidelberg*, *S. concord* など、これら血清型で分離株の70%以上を占めていた。

血清型の分布を、まず国別からみるとアメリカ由来株から合計8血清型と最も多く検出されたが、その他

の国からは多くて4血清型と非常に少なかった。そのため国別による分布の違いを明らかにすることができなかった。一方、肉種別では鶏肉からは *S. heidelberg*, *S. schwarzengrund*, *S. infantis* が、馬肉からは *S. typhimurium*, *S. derby*, *S. anatum* が高率に検出され、この傾向は今までのものとあまり変らなかったが、両肉種から検出された血清型を比較してみると共通するものは、わずか *S. infantis* だけで共通性がみられず各々の特徴的な汚染実態を知った。

更に、*S. typhimurium* の宿主との関連性を知るため菌株の生物型を調べたところ全株が O-5 抗原を保有し、かつイノシトール分解性であり、Brandis¹⁰⁾ の生物型1型また Duguid¹¹⁾ の一次生物型1型に属する、いわゆる Wild 型で鶏肉などから高い頻度で検出される Copenhagen 型 (O-5 抗原非保有株) でなかったことから一層特徴的であることを知った。

一般にサ菌の菌型分布の特色は、主として地域性による傾向が強いと考えがちであるが、今回の成績から、今までの考え方に加えて動物種の特異性もかなり影響することが示唆され、今後サ菌の生態を考える上でこの点を加味することが必要と思われる。

2. 薬剤感受性分布

供試株の最小発育阻止濃度 (MIC) の結果及び耐性伝達性試験の結果は Table 2, 3 に示した。

供試薬剤に対する MIC は TC では 100 µg/ml に耐性を示した8株を除いて約80%が 1.56~3.13 µg/ml

Table 2. Sensitivity of 111 strains of Salmonellae to various antibiotics

Drugs tested	Minimum inhibitory concentration (MIC) µg/ml										
	0.20	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25.0	50.0	100.	200.
TC			9	20	65	9					8
SM						12	70	25			4
CP					23	47	41				
KM				19	54	20	18				
APC		15	75	13	6	2					
NA		14	20	53	20	4					
CL	12	35	52	10	2						

TC: tetracycline, SM: streptomycin, CP: chloramphenicol, KM: kanamycin, APC: ampicillin, NA: nalidixic acid, CL: colistin.

Table 3. Resistant pattern and R-plasmid frequency

Resistant pattern	No. of strains	No. of strains possessed R-plasmid	Origin and serovars
[TC]	8	1 (12.5%)	Horse meats, <i>S. anatum</i>
[SM]	4	2 (50.0%)	Chicken meats, <i>S. stanley</i> , <i>S. heidelberg</i>

に、SM では 100 $\mu\text{g/ml}$ に耐性を示した4株を除いて約85%が12.5～25 $\mu\text{g/ml}$ に、CP では約80%が6.25～12.5 $\mu\text{g/ml}$ に、KM では全株が1.56～12.5 $\mu\text{g/ml}$ に、APC では約93%が0.39～1.56 $\mu\text{g/ml}$ に、NA では約96%が0.39～3.13 $\mu\text{g/ml}$ に、CL では約90%が0.20～0.78 $\mu\text{g/ml}$ に分布しており比較的感受性の高いものが多かった。しかし、TC 及び SM に高度耐性を示した12株（11%）が検出され、これら菌株の大部分が鶏肉に由来するものであって、その傾向は既報^{3,6,7)}のものと変らなかった。

耐性を示したこれら菌株の伝達性試験の結果は Table 3 に示したように、25%（3株）が伝達性Rプラスミドを保有していた。この頻度は過去の80%前後^{7,8)}の頻度に比べ非常に低率であった。これら菌株はアメリカの鶏肉由来 *S. heidelberg*, *S. stanley* と馬肉由来 *S. anatum* であった。なお、馬肉由来株からこのような高度耐性でRプラスミドを保有するものが分離されたのが今回初めてである。

以上の結果から、輸入食肉から多数の菌型が検出され、特にその分布は国別もさることながら肉種別に特徴的であったことは既報¹⁻⁷⁾の結果とよく似ており、輸入食肉における特色のように思われた。また、分離株の薬剤感受性の傾向は既報^{6,7)}のものに比べ耐性菌の検出頻度が低かったが、馬肉由来株から高度耐性株が検出されたことは、耐性菌の分布が世界的に拡大していることを物語っているものと思われる。

これらのことから輸入食肉のサ菌汚染問題に対する対策を世界的レベルで考えなければならない昨今、その基礎資料としてこの種の調査研究が大いに意義を有するものと考えられ継続的に実施されることが望まれる。

ま と め

昭和54、55年度に輸入され当所に検査のため持ち込まれた各種の食肉から分離されたサルモネラ111株の同定と薬剤感受性について試験したところ、以下に示すような結果が得られた。

18種の血清型に型別され、そのうち高頻度に検出されたものは *S. typhimurium*, *S. infantis*, *S. heidelberg*, *S. concord* など、これら血清型で全分離株の70%以上を占めていた。このうち、*S. typhimurium* は馬肉のみから分離され全株がO-5抗原を保有し、イノシトール分解能を有する Wild 型のものであった。*S. infantis*, *S. heidelberg* は鶏肉のみから検出され、両肉種における血清型の共通性が認められなかった。

供試株111株中12株（11%）は TC 又は SM に高度耐性（100 $\mu\text{g/ml}$ ）を示し、いずれも単剤耐性であった。そのうち3株（25%）が伝達性Rプラスミド保有株で、これらは鶏肉由来 *S. heidelberg*, *S. stanley*（いずれもSM耐性）と馬肉由来 *S. anatum*（TC 耐性）であった。

文 献

- 1) 鈴木 昭：モダンメディア，25，37（1979）
- 2) 鈴木 昭ら：衛生試報，85，188（1967）
- 3) 鈴木 昭ら：同上，89，129（1971）
- 4) 鈴木 昭ら：同上，91，88（1973）
- 5) 河西 勉ら：同上，92，95（1974）
- 6) 鈴木 昭ら：食衛誌，15，159（1977）
- 7) 河西 勉ら：衛生試報，95，99（1977）
- 8) 河西 勉ら：同上，98，99（1977）
- 9) 河西 勉：日本公衛誌，22，29（1975）
- 10) H. Brandis: Zentbl. Bact. Parasitkde. I., 222, 232（1970）
- 11) J.P. Duguid et al.: J. Med. Microbiol., 8, 149（1975）

動物実験におけるデータ処理法について

鈴木幸子・斉藤 実・中路幸男・戸部満寿夫

On the Data Processing in Animal Experiment

Sachiko SUZUKI, Minoru SAITO, Yukio NAKAJI and Masuo TOBE

In our laboratory, the experimental data obtained in toxicity tests are memorized partly in diskettes A of minicomputer FACOM U-1100 and partly in diskettes B of microcomputer DEC PDP-11 with different formats. These data can be combined with a format conversion program by using minicomputer NOVA A 01, and memorized in diskettes (A+B).

These combined data are possible to classify and process to various form by using MUMPS language. This data processing system is applied to the data from the control groups of animals. For example, the biochemical values in rat serum are shown in figures or tables by five classification methods.

(Received May 31, 1982)

はじめに

最近の毒性試験においては、検査対象が莫大な数に上り、もはや人力ではこれらの検査を行い、更にデータを処理することが極めて困難になってきた。そこで、分析の自動化が進み、種々な機器が用られるようになった。これらの自動分析機には、小型で独自のデータ処理機構を有するコンピュータを備えたものが発売されている。

コンピュータを組込んだ毒性試験の検査システムとしては、一台のコンピュータを用いてすべての測定機器をオンラインで作動させることが、データの管理及び統計的処理の上で理想的であるが、当初から明確な計画をもって検査機構を整備しない限り、その実現はなかなか難しい。著者らも製造会社を異にする測定装置に附属した2台のコンピュータを別個に利用して毒性試験のデータ処理を行っている。そのため、実験データの統一的な処理が極めて複雑化している。これを改善する目的で、片方のコンピュータによって処理されたデータを変換し、もう一方の容量の大きいコンピュータにすべてのデータを読み取らせる方法、及びその結果まとめられたデータを種々の目的に沿ったデータが引き出せるように分類用プログラムを用いて区別する方法を検討した。

具体的には、著者らが過去3年間に行った毒性試験における無処置の対照群のデータのうち生化学的データを集積し、分類して引き出す方法を考案したので紹介する。

実験データの格納

毒性試験においては、通常薬物を投与されたラットあるいはマウス等の小動物は2年以内に屠殺され、種々の検査が行われる。それらの分析結果を対照群における結果と比較することにより薬物による影響が把握される。

著者らの実験室では、この屠殺時における検査を次の手順で行っている。あらかじめ番号を付した動物の体重を自動天秤で測定する。次いで、定められた部位から採血したのち、動物を直ちに解剖し、各臓器の重量を前記天秤で測定する。ここで動物番号、体重、各臓器の重量が紙テープに打ち出される。血液の一部は多項目血球計数装置で12項目のパラメータを測定し、その結果は紙テープに打ち出される。これら2種類のデータはオフラインでミニコンピュータ FACOM U-1100 (FACOM) のディスク (A) に格納させる。血液の別の一部は自動血球形態分析装置により血球の形態を測定し、この結果はオンラインで FACOM のディスク (A) に格納される。残りの血液について血清を分離し、その一部を多項目自動分析装置により20~30項目の成分を測定し、その結果はオンラインでマイクロコンピュータ DEC PDP11 (DEC) のディスク (B) に格納される。また血清の一部は電解質分析装置により3項目の成分を測定し、このデータは DEC のコンソールタイプライターのキーボードから手操作でディスク (B) に格納される (Fig. 1)。以上のように著者らは毒性試験のデータのうち体重、臓

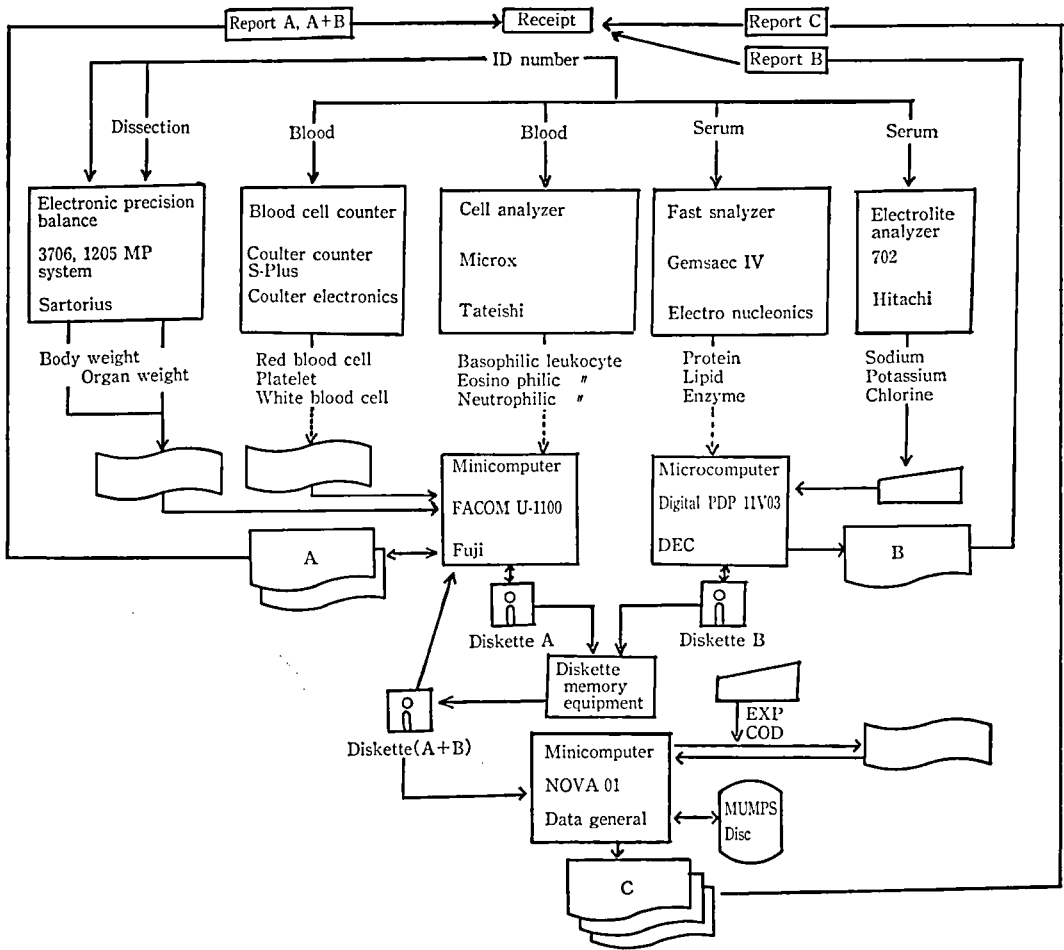


Fig. 1. Data processing system of toxicity tesin our laboratory

器重量、血球数及び血液形態のデータをディスク (A) に、また、血清成分のデータをディスク (B) に格納していることになる。

しかしながら、これらの 2 枚のディスクのうち、ディスク (A) には FACOM 形式で、またディスク (B) には DEC 形式で、それぞれデータが読み込まれているため、FACOM のディスク (A) は DEC で読み取ることができず、また DEC のディスク (B) は FACOM では読み取れない難点がある。このように実験データが 2 枚のディスクに分かれて記憶され、しかも互換性がないことは、データの処理に極めて都合が悪く有用性に乏しいものとなっている。

そこで、DEC のディスク (B) に納められた血清成分のデータを記憶容量の大きい FACOM のディ

スケットに移し、1 枚のディスクに一連の実験データを格納し保存することを試みた。このため NOVA 形式変換用プログラムを購入し、次のような構成のコンピュータ (療品部所有) を用いて、ディスク (A) 及び (B) に記録された実験データの結合を行った。

中央演算処理装置：

日本データセネラル NOVA-01 型 (32KW)

周辺機器装置：

ディスク装置 (日本データセネラル 5924A 型)

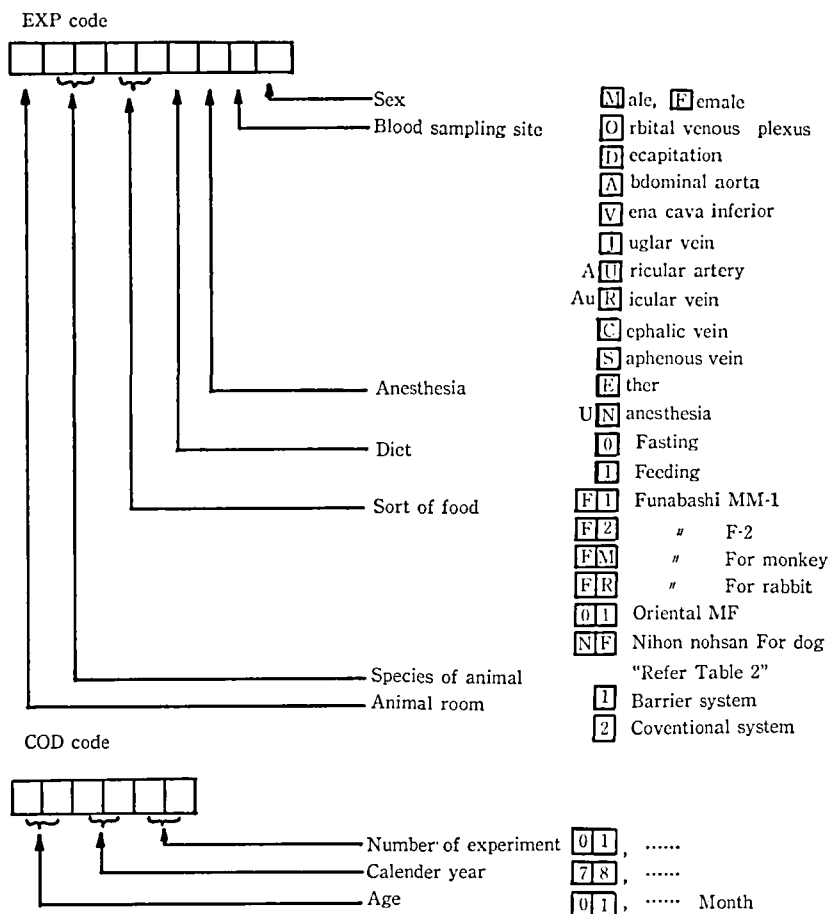
磁気ディスク (三菱 5947, 2.4 MW)

コンソールタイプライター (ARS33)

プリンター

先づディスク装置にディスク (A) をセットし、FACOM 形式で記憶されたデータを NOVA 形

Table 1. Coding guide for classification of experimental data



Level 0

(File name : Serum)

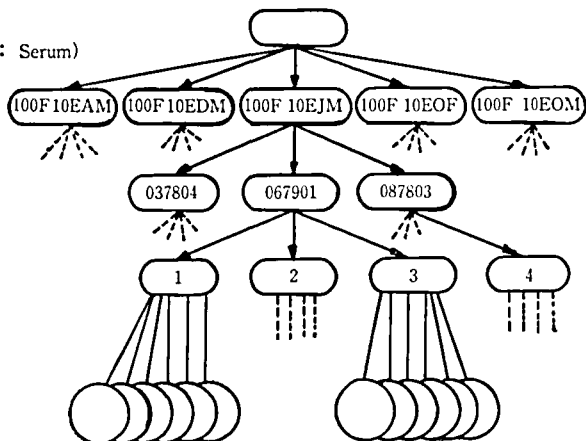
Level 1
(EXP)Level 2
(COD)Level 3
(Data)

Fig. 2. Tree structure of data filing in programming language, MUMPS

Table 2. Coding number for species and strains of animals

00 Slc-wistar	20 Slc-ddy	40 CRJ-B6C3F ₁	60	80 Japanese white rabbit
01 Slc-wistar/ST	21 F-ddy	41	61	81 Newzealand white rabbit
02 JCL-wistar	22	42	62	82 Dutch
03	23	43	63	83
04	24	44	64	84
05 Slc-Sprague-Dawley	25 Slc-ICR	45	65	85
06 JCL-Sprague-Dawley	26 JCL-ICR	46	66	86
07 CRJ-Sprague-Dawley	27 CRJ-ICR	47	67	87
08	28	48	68	88
09	29	49	69	89
10 Slc-Fisher	30 Slc-C3H/He	50	70 Std-Hartley	90 Mongrel
11 JCL-Fisher	31 JCL-C3H/He	51	71	91 Beagle (EDM)
12 CRJ-Fisher	32 CRJ-C3H/HeNCrj	52	72	92 Beagle (HRA)
13	33	53	73	93 Beagle
14	34	54	74	94
15 HOS-Donryu	35	55	75 Std-Golden hamster	95 Macaca fascicularis
16	36	56	76 HOS-Chinese hamster	96 Macaca mulatta
17	37	57	77	97
18	38	58	78	98
19	39	59	79	99

Supplier of animals: Slc and Std, SHIZUOKA Lab. Animals; JCL, CLEA; CRJ, Charles River; HOS, HOSHINO Lab. Animals; F, FUNABASHI.

式に変換しながら NOVA-A01(NOVA) に一旦記憶させ、次いでディスク(B)について DEC 形式で記憶されたデータを同様に NOVA 形式に変換しながら NOVA に記憶させる。以上の操作ののち、これらのデータを NOVA 形式から FACOM 形式に変換しながら新たなディスクに記憶させることにより、全データを格納した一枚のディスク(A + B)を作成することができた。これによってディスク(A + B)は FACOM によって全データの出力が可能である。

実験データの分類及び検索

分類の方法としては現在多くの病院で使用されている臨床データ管理システム、即ち1967年頃より開発されたデータ分類用コンピュータ言語、マンプス (Massachusetts General Hospital Utility Multi Programming System の略) を採用した。

各実験データがどのようなデザインの毒性試験から得られたかを分類するには、Table 1 のような EXP

及び COD コードを用いる。

EXP コードとしては動物舎、動物及び飼料の種類、屠殺時の絶食あるいは飽食の処置、採血時の麻酔あるいは無麻酔の処置、採血部位そして性の区別を9桁の英数字で示し、COD コードは年令(月数)、測定年度及び実験番号を6桁の数字で示した。

動物は実験目的によって、いろいろな種及び系統の動物を使用しているので Table 2 に従って分類した。

飼料は製造会社ごとに、成分が多少異なっているの で区別した。

絶食と飽食の区別は採血 16 時間前に除餌したものを絶食とし、採血直前まで摂餌させたものを飽食とした。

麻酔の有無については、同時に麻酔薬の区別を薬品名の頭文字で示した。

採血部位については、条件により眼窩静脈など種々の部位から採血が行われるので、それぞれの部位の頭文字で区別した。

実際に実験データを分類するには、先づすべてのデ

Table 3. Age distribution of control animals filed their data in the diskette (A+B)

*** CONTROL DATA LIST *** DATE: 05/24/82

CLSS	1M	2M	3M	4M	5M	6M	7M	8M	9M	10M	11M	12M	13M	14M	15M	16M	17M	18M	19M	20M	21M	22M	23M	24M	25M
100F10EOM		25				10		8				8						8							6
100F20NOF		37	8	5	5		5				6	7	5					5						7	11
100F20NOM		34	8	5	5		5		8		7	20	5					8	5					9	12
120F11NDF		6		6			6	10				6	10					7			15				
1-25M mean 1-25 months old																									

Table 4. Serum component values of individual rats at nine months old

*** DATA LIST ***

EXP	COD	ID	T-PRO g/dl	ALB g/dl	A/G	BUN mg/dl	CRN mg/dl	UA mg/dl	GLU mg/dl	NEFA mEq/t	PL mg/dl	T-GLY mg/dl	T-CHO mg/dl	F-CHO mg/dl	T-BIL mg/dl	ALD mu/ml	ALP mu/ml	AMY mu/ml	CHE mu/ml
100F20NOM	027909	19	6.6	4.0	1.59	17	0.49	1.03	127	0.47	181	182	48				838		615
"	"	20	6.8	4.2	1.57	17	0.50	1.29	125	0.52	184	208	46				910		768
"	"	407	7.2	4.7	1.84	18	0.66		108	0.50	132	147	39	9		24.9	732		806
"	"	403	6.9	4.5	1.86	19	0.64		136	0.44	131	109	37	9		19.2	641		615
EXP	COD	ID	CK mu/ml	GOT mu/ml	GPT mu/ml	GGTP mu/ml	HBDH mu/ml	ICDH mu/ml	LAP mu/ml	LDH-P mu/ml	CA mg/dl	PI mg/dl	NA mEq/t	K mEq/t	CL mEq/t	MG mg/dl	G6PDH mu/ml	GLDH mu/ml	GPDAP mu/ml
100F20NOM	027909	19	702	80	33		389		50	1748	11.6	9.3	144	6.5	104	2.5	2.78		6.5
"	"	20	623	69	23		304		50	1364	11.3	9.2	142	5.5	103	2.4	2.83		5.6
"	"	407	596	78	36			6.4	56	975	9.5	9.2					8.00		
"	"	403	389	65	29			2.7	48	591	9.3	8.1					3.84		

Table 5. Mean values of serum components of two months old

*** STATISTICS DATA LIST ***

* EXP NUMBER: C100F20NOM * MONTH: 2 * YEAR: ALL TEST NO.: ALL

TEST	N	TOTAL	MEAN	MAX	MIN	SD	USD	LSD	CV%
TPR	34	223.30	6.57	7.30	5.70	0.44	7.45	5.69	6.71
ALB	34	145.00	4.26	4.70	3.80	0.23	4.72	3.81	5.36
AG	34	64.25	1.89	2.63	1.48	0.27	2.43	1.35	14.31
BUN	22	386.00	17.55	21.00	14.00	1.92	21.39	13.70	10.97
CRN	17	10.28	0.60	0.71	0.46	0.07	0.74	0.47	11.32
UA	9	14.23	1.58	2.62	1.09	0.48	2.54	0.63	30.21
GLU	22	2696.00	122.55	144.00	108.00	9.49	141.53	103.56	7.74
NEFA	17	8.77	0.52	0.80	0.32	0.12	0.75	0.28	22.93
PL	22	3242.00	147.36	184.00	102.00	25.38	198.12	96.61	17.22
TG	22	3018.00	137.18	208.00	101.00	29.95	197.08	77.28	21.83
T-CHO	29	1499.00	51.69	83.00	37.00	11.76	75.20	28.18	22.74
F-CHO	8	78.00	9.75	11.00	9.00	0.66	11.07	8.43	6.78
T-BIL	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ALD	8	171.50	21.44	32.80	12.30	6.82	35.07	7.80	31.81
ALP	34	26737.00	786.38	1157.00	468.00	202.01	1190.41	382.35	25.69
AMY	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
CHE	17	11036.00	649.18	941.00	474.00	116.51	832.19	416.17	17.95
CK	17	9547.00	561.59	1381.00	196.00	331.01	1223.61	-100.44	58.94
GOT	34	2650.00	77.94	116.00	54.00	14.64	107.22	48.66	18.78
GPT	34	1234.00	36.29	48.00	23.00	6.71	49.72	22.86	18.50
GGTP	14	2.12	0.15	1.05	0.01	0.29	0.73	-0.43	191.08
HBDB	9	1736.00	192.89	389.00	54.00	109.65	412.19	-26.41	56.85
ICDH	8	38.10	4.76	8.90	1.90	2.24	9.24	0.29	47.00
LAP	22	1169.00	53.14	58.00	48.00	3.36	59.86	46.41	6.33
LDH-P	21	18316.00	872.19	1872.00	226.00	449.37	1770.93	-26.55	51.52
CA	22	248.80	11.31	14.80	9.10	1.65	14.62	8.00	14.63
PI	17	147.70	8.69	9.60	7.00	0.68	10.05	7.33	7.84
NA	17	2390.00	140.59	153.00	128.00	6.38	153.35	127.83	4.54
K	17	112.10	6.59	8.90	4.50	1.20	9.00	4.19	18.25
CL	3	311.00	103.67	104.00	103.00	0.47	104.61	102.72	0.45
MG	9	19.50	2.17	2.50	1.80	0.21	2.58	1.76	9.48
HGB	13	1.37	0.11	0.16	0.07	0.03	0.16	0.05	26.74
G6PDH	22	157.64	7.17	46.95	1.53	9.72	26.61	-12.27	135.65
GLDH	9	83.70	9.30	20.50	5.60	4.25	17.80	0.80	45.70

Table 6. Influence of aging on serum component values of rat

*** MONTHLY STATISTICS (CLASS: 100F20NOM) ***

DATE: 05/31/82 PAGE: 3-1

MONTH	2M			4M			7M			12M			18M			24M		
TEST	N	MEAN	SD	N	MEAN	SD	N	MEAN	SD	N	MEAN	SD	N	MEAN	SD	N	MEAN	SD
TTPR	34	6.57	0.44	5	7.26	0.22	5	7.18	0.39	20	7.42	0.37	8	7.69	0.29	9	7.53	0.32
ALB	34	4.26	0.23	5	4.68	0.16	5	4.16	0.20	20	4.27	0.17	8	4.30	0.24	9	4.19	0.23
AG	34	1.89	0.27	5	1.81	0.05	5	1.38	0.06	20	1.36	0.06	8	1.27	0.11	9	1.26	0.14
BUN	22	17.55	1.92	5	17.20	0.98	5	16.00	1.41	20	17.30	1.19	8	16.38	1.93	9	25.11	19.17
CRN	17	0.60	0.07	5	0.65	0.04	5	0.68	0.05	20	0.66	0.05	8	0.71	0.09	9	1.13	0.85
UA	9	1.58	0.48	5	1.63	0.10	5	1.75	0.64	20	1.92	0.96	8	1.44	0.36	9	1.25	0.14
GLU	22	122.55	9.49	5	111.20	5.04	5	118.40	8.78	20	123.05	11.23	8	122.63	11.49	9	115.89	10.29
NEFA	17	0.52	0.12	5	1.12	0.04	5	0.52	0.18	20	0.52	0.11	8	0.46	0.12	9	0.73	0.17
PL	22	147.36	25.38	5	157.60	7.31	5	158.20	16.22	20	165.55	11.50	8	210.13	29.57	9	257.00	46.46
TG	22	137.18	29.95	5	169.20	16.79	5	184.40	49.91	20	239.80	49.15	8	336.63	51.07	9	381.56	77.68
T-CHO	29	51.69	11.76	5	45.20	3.66	5	59.20	8.08	20	63.75	6.83	8	86.88	26.00	9	123.89	44.31
F-CHO	8	9.75	0.66													9	62.78	25.83
T-BIL	8	0.46	0.15													9	0.98	0.33
ALD	8	21.44	6.82													9	12.00	2.21
ALP	34	786.38	202.01	5	287.20	22.01	5	198.20	24.04	20	204.05	20.54	8	185.75	24.93	9	146.11	32.90
AMY																		
CHE	17	649.18	116.51	5	661.40	98.30	5	929.20	216.29	20	978.50	186.72	8	1403.38	225.87	9	1799.11	336.57
CK	17	561.59	331.01	5	164.20	73.33	5	380.00	195.06	20	159.20	168.12	8	92.63	32.55	9	129.78	65.70
GOT	34	77.94	14.64	5	85.20	10.17	5	93.00	15.89	20	130.80	40.75	8	69.75	11.79	9	53.00	8.03
GPT	34	36.29	6.71	5	52.60	10.42	5	48.00	5.87	20	91.10	23.03	8	60.38	9.60	9	39.56	11.20
GGTP	8	0.25	0.35				5	0.36	0.30	20	0.99	0.39	8	0.71	0.23			
HBDH	9	192.89	109.65	5	64.80	18.69	5	160.60	60.53	20	64.19	27.10	8	44.25	12.94	9	70.44	14.94
ICDH	8	4.76	2.24										8	3.43	1.65	9	3.27	1.11
LAP	22	53.14	3.36	5	51.00	0.89	5	46.00	3.16	20	50.75	3.21	8	50.25	1.20	9	43.89	3.54
LDH-P	21	872.19	449.37	5	241.40	90.32	5	679.60	245.56	20	273.15	97.48	8	145.25	51.18	9	248.22	67.24
CA	22	11.31	1.65	5	11.78	0.75	5	11.22	0.29	20	11.59	0.59	8	10.09	1.05	9	12.74	0.47
PI	17	8.69	0.68	5	6.44	0.36	5	7.34	0.86	20	6.80	1.21	8	5.89	0.51	9	6.10	1.93
NA	17	140.56	6.38	5	143.00	1.26	4	146.25	1.48	20	143.05	2.13	8	148.38	1.49	9	145.89	1.52
K	17	6.59	1.20	5	4.92	0.17	4	5.50	0.29	20	5.92	0.35	8	6.11	0.40	9	5.91	0.21
CL	3	103.67	0.47	5	123.00	1.41	4	105.25	1.79	20	107.15	1.65	8	106.75	1.20	9	104.33	1.89
MG	9	2.17	0.21	5	2.46	0.20	5	2.46	0.14	20	2.23	0.16	8	2.33	0.20	9	2.60	0.39
HGB	13	0.11	0.03													9	0.21	0.08
G6PDH	22	7.17	9.72	5	7.99	1.92	5	3.31	1.79	20	3.38	2.21	8	8.08	5.38	9	4.71	1.21
GLDH	9	9.30	4.25	5	43.74	14.43				20	71.88	28.72	8	45.21	7.22	9	24.87	13.23
TOTAL	34			5			5			20			8			9		

*** DISTRIBUTION CHART (EXP : 100F20N0M, COD : 027909) ***

DATE : 05/24/82

T-PRO(G/DL) (N=23, MEAN=6.65, SD=0.38)

KAIKYU	DOSU	SOTAI	DOSU	DISTRIBUTION
5.70 --- 6.00	1	.04		**
6.00 --- 6.30	3	.13		*****
6.30 --- 6.60	5	.22		*****
6.60 --- 6.90	9	.39		*****
6.90 --- 7.20	1	.04		**
7.20 --- 7.50	4	.17		*****

T-CHO(MG/DL) (N=23, MEAN=50.00, SD=12.64)

KAIKYU	DOSU	SOTAI	DOSU	DISTRIBUTION
36.00 --- 44.00	10	.43		*****
44.00 --- 52.00	5	.22		*****
52.00 --- 60.00	3	.13		*****
60.00 --- 68.00	2	.09		****
68.00 --- 76.00	2	.09		****
76.00 --- 84.00	1	.04		**

GOT(MU/ML) (N=23, MEAN=72.96, SD=10.82)

KAIKYU	DOSU	SOTAI	DOSU	DISTRIBUTION
51.00 --- 59.00	2	.09		****
59.00 --- 67.00	5	.22		*****
67.00 --- 75.00	6	.26		*****
75.00 --- 83.00	6	.26		*****
83.00 --- 91.00	2	.09		****
91.00 --- 99.00	2	.09		****

Fig. 3. Distributions of some serum constituent values of rats at nine months old

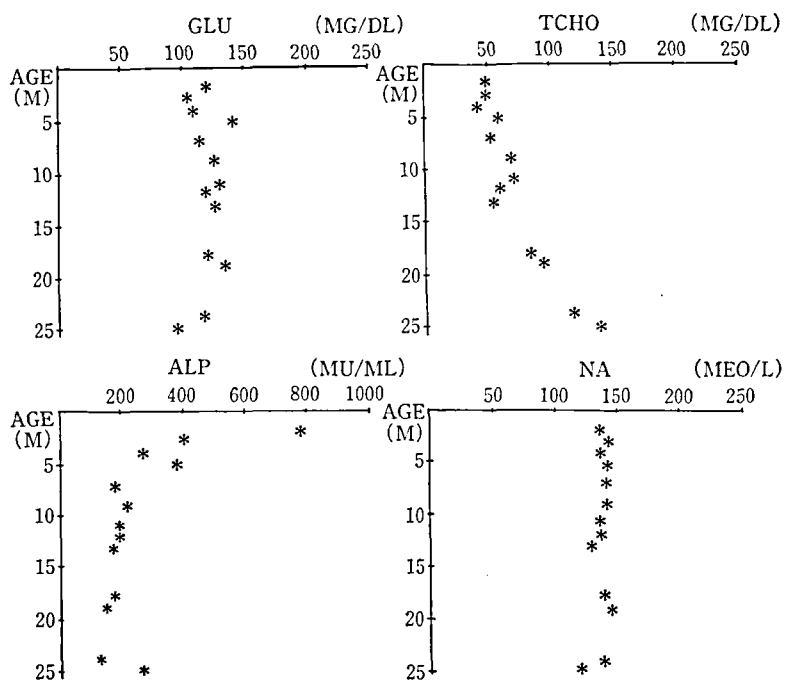


Fig. 4. Influence of aging on some serum component values in rat

ィスケット (A+B) のデータを NOVA で読み取る。次いで、それらの毒性試験の EXP 及び COD コードをコンソールタイプライターから手操作で入力したのち、紙テープに EXP コード、COD コード及び対照群のデータの順に出力させる。次にマンプスを用いてデータの分類や検索を行うため、これらすべての紙テープに出力されたデータを NOVA の磁気ディスクに格納した。

Fig. 2 に示すようにマンプスのデータ構造は樹形構造をしており、0 レベルにはファイル名 (例えば、血清、血球数など) を登録したのち、第1レベルに EXP コード、第2レベルに COD コード、第3レベルには ID 番号と共にデータが格納される。この場合には第3レベルまでしか使用していないが、更にその他の検索項目を必要とする場合には、最高15レベルまでとする事が出来る。

磁気ディスクに格納されたデータ中の任意のデータは EXP 及び COD コードを指定するだけで、配列順序に関係なく取り出すことができる。例えば、Barrier system の動物舎 (I) で飼育し、動物は SPF-Wistar 系ラット (00)、飼料は船橋 (F) の MM-1 (I)、絶食 (0)、エーテル麻酔 (E)、頸静脈採血 (J)、雄 (M) で生後6箇月 (06)、1979年度 (79)、実験番号1 (01) の対照動物の値を必要とする場合 EXPコードに "100 F10EJM" を、CODコードに "067901" を指定することによって、そのデータを取り出すことができる。

過去3年間に蓄積された対照群のデータは動物数にして1417例で、その内容は Table 3. に示す通りである。この表に見られるように、それぞれの条件別の動物数は非常に少なく、最高でも EXP コード "100F20 NOF" の12箇月令の37例に過ぎない。そのため現時点では条件別の対照群の値を互いに比較することは難かしいが、必要に応じてそれぞれの条件別のデータを検索することは可能である。

一例として血清成分の測定値についてデータの検索を行う場合、現在は次の5通りのデータリストを出力させることができる。

1. EXP 及び COD コードを指定した場合の動物番号順のデータリスト。(Table 4)
2. EXP 及び COD コードを指定した場合の対照群全体の平均値及び標準偏差。(Table 5)
3. 2の結果を度数分布図で表わしたもの。(Fig. 3)
4. EXP コードのみを指定した場合の月令ごとの測定値の平均値。(Table 6)
5. 4の結果をグラフで表わしたもの。(Fig. 4)

今後、更にデータを蓄積し、様々な条件下での対照群の値のパターンを解析し、毒性試験の評価に寄与する尺度の一部としたい。

終りに臨み、コンピュータについて終始便宜と助言を戴いた当所療品部叶多謙蔵技官、マンプスプログラム作成について御協力頂いたマンプスシステム研究所大野欽司氏に深甚の謝意を表します。

ジュズダマ属 (Genus *Coix*) 生薬の研究 (第1報) 輸入「ハトムギ」の栽培特性について

佐竹元吉・飯田 修・宮崎幸男

Studies on the Crude Drugs of Genus *Coix* I On the Cultivating Characteristics of Imported *Coix* Fruits

Motoyoshi SATAKE, Osamu IIDA and Yukio MIYAZAKI

Five *Coix* fruits "Hatomugi" imported from China (2), Korea (2) and Thailand (1), were cultivated on the open field at the Tsukuba Station and the growing characteristics were reported in detail. From the results of the cultivation, the shape variations of the market fruits are caused by the different strains of plants.

(Received May 31, 1982)

ジュズダマ属 (Genus *Coix*) (Gramineae) 植物で薬用となるものは、ハトムギ *Coix lachryma-jobi* L. var.

ma-yuen STAFF とジュズダマ *Coix lachryma-jobi* L. の2種類である。前者の種子は「ヨクイニン」¹⁾、果実は

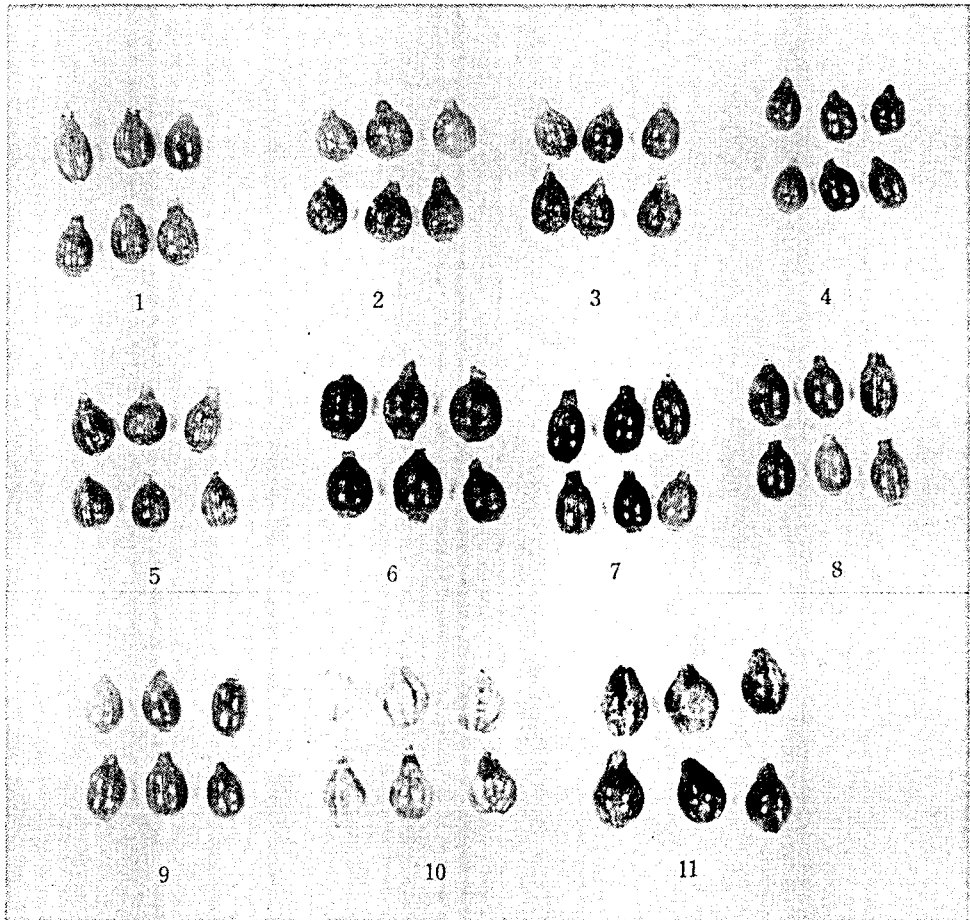


Photo 1. *Coix* fruits:

Market samples (2 imported from China A, 3 from China B, 4 from DPR Korea A, 5 from DPR Korea B, 6 from Thailand)

Coix lachryma-jobi var. *ma-yuen* (1 Tsukuba, 7 Okayama, 8 Brazil A, 9 Brazil B)

Coix lachryma-jobi (10 Tsukuba, 11 USSR)

「ハトムギ」²⁾ として繁用されており、後者は川穀³⁾として少量用いられている。

「ヨクイニン」と「ハトムギ」の多くは輸入品で、その品質は均一ではない。市場品のこれらには、大粒のものから小粒のものまで見られ、国内で古くから栽培されているハトムギ *Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* STAFF の果実や種子とも異なるものが多い。

今回、入手した市場品「ハトムギ」の中で発芽能力を有していたものを Photo. 1 に示したが、大きさ、形及び苞鞘の色等が国内在来種と異なっている。発芽能力を有していた生薬を播種し栽培調査を行い、生薬と原植物の栽培特性との関係を明らかにした。

発芽能力のあった「ハトムギ」は5種類で、それぞ

れ異なる形質があり (Table 4)、それらは中国 (2種)、朝鮮民主主義人民共和国 (2種) 及びタイ (1種) からの輸入品で、国内市場で流通しているものである。これらの植物の特性を調査するために、比較系統として、国内薬用在来種³⁾ (春日部薬試で栽培されていた系統) 及び特性の明らかな3系統⁴⁾ [岡山系、ブラジル系 (2種)] を用いた。同時に、ハトムギ *Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* STAFF の母植物であるジュズダマ (*Coix lachryma-jobi* L.) の国内在来種及びソ連種も播種して観察した。

材料及び方法

供試した *Coix* 属系統は Table 1 に示した。1981年

Table 1. Strains and accession data of *Coix*

Strain	Accession from	Date of accession
<i>Coix lachryma-jobi</i> var. <i>ma-yuen</i>		
Tsukuba	Kasukabe strain	Nov. 1980
P.R. China* A	Market in Japan	Aug. 1980
P.R. China B	Market in Japan	Mar. 1981
D.P.R. Korea** A	Market in Japan	Oct. 1980
D.P.R. Korea B	Market in Japan	Mar. 1981
Thailand	Market in Thailand***	May 1979
Okayama	Nat. Inst. Agr. Sci.****	Jan. 1981
Brazil A (RIO GRAND DI SAL)	Nat. Inst. Agr. Sci.	Jan. 1981
Brazil B (MAT GROSSO)	Nat. Inst. Agr. Sci.	Jan. 1981
<i>C. lachryma-jobi</i>		
U.S.S.R.	Nat. Inst. Agr. Sci.	Jan. 1981
Tsukuba	Kasukabe strain	Nov. 1981

* People's Republic of China

** Democratic People's Republic of Korea

*** Cultivated in the greenhouse at Tsukuba Station

**** National Institute of Agricultural Sciences

Table 2. Growing characteristics of *Coix* plant cultivated

Strain	Leaf color of young plant		Beginning of flowering time Date	Harvest		Final leaf no.
	Sheath	Blade		Date	Plant height cm	
<i>Coix lachryma-jobi</i> var. <i>ma-yuen</i>						
Tsukuba	Green	Green	8 Aug.	15 Oct.	128.6	20
China A	Light red	Light red	8 Aug.	27 Oct.	198.5	19
China B	Red brown	Red brown	8 Aug.	30 Sep.	143.4	18
Korea A	Green, Light brown	Light brown	23 Jul.	28 Sep.	120.2	15
Korea B	Red brown	Red brown	24 Jul.	29 Sep.	114.6	15
Thailand	Red brown	Red brown	—	2 Nov.	273.9	—
Okayama	Green	Green	8 Aug.	8 Oct.	137.4	19
Brazil A	Green	Green	8 Aug.	9 Oct.	131.0	19
Brazil B	Green	Green	8 Aug.	12 Oct.	136.2	19
<i>C. lachryma-jobi</i>						
U.S.S.R.	Green	Green	14 Jul.	25 Sep.	56.6	9
Tsukuba	Red brown	Light brown	8 Aug.	12 Oct.	131.7	19

4月23日に当场畑に播種した。供試種子は黒穂病予防のため播種前に、50℃、16時間の温湯浸漬処理を行った。施肥は基肥として、N 546 g, P₂O₅ 390 g, K₂O 507 g/a を化成肥料 (14-10-13) を用い、施用した。追肥は8月6日に、N 280 g, P₂O₅ 280 g, K₂O 380g/a を施用した。間引きは5月19日、6月16日の2回行い、条間 90 cm, 株間 30 cm, 1株1本植えとした。除草は適宜手取りで行った。各系統とも果実がほぼ7割熟した頃に収穫し、特性調査を行った。

なお、調査株数は中国B系統のみ5株で、その他の系統はすべて10株であった。

結果及び考察

1. 生育特性

供試系統の生育は成熟初期に、中国Aの系統に約2割の黒穂病の発生がみられたほかは、ほぼ順調であった。

(1) 幼植物の葉色

幼植物時における各系統間の特異的な差異は、葉鞘と葉身の色にみられた (Table 2)。1) 筑波の系統は葉鞘、葉身とも緑色であり、2) 中国B、北朝鮮B及びタイの系統は葉鞘、葉身とも赤色の強い赤かった。また、中国A、北朝鮮Aの両系統は1)と2)のほぼ中間色で、淡赤〜淡かった。その他の系統では、筑波ジュズダマが葉鞘、葉身とも赤かった、残りの系統はすべて、葉鞘、葉身とも緑色であった。

(2) 草丈及び葉位

草丈の生育調査結果を Fig. 1 及び Table 1 に示した。筑波系統を標準とすると、中国の2系統は草丈が高く、北朝鮮の2系統はやや低かった。供試した全系統中ではタイ系統が最も長稈で、逆に最も短稈なものはソ連のジュズダマであった。

供試したほとんどの系統は、出穂、開花期に達すると草丈の伸長がみられなくなるが、中国の系統は開花後も草丈の増加がみられ、栄養生長と生殖生長を同時に行う特異な系統であった。特に、中国Aの系統にその傾向が強かった。

栄養生長の程度をみる一つのめやすとなる出葉数を調査した結果、最多止葉葉位はほとんどの系統が19葉であったが、北朝鮮の系統は2系統とも15葉、ソ連のジュズダマでは9葉と少なく、高緯度地帯に産する系統ほど栄養生長期間が短い傾向が認められた (Table 2)。

(3) 早晚性

北朝鮮A、B系統とも筑波系統に比べ、開花、収穫期が早かった。一方、中国系統AとBでは、開花から

収穫までの成熟期間に著しい差異が認められた。すなわち、両系統とも開花始めは8月8日と同時であったが、収穫日は、系統Bが9月30日、系統Aが10月27日と約一箇月間のひらきがあった (Table 2)。

タイの系統は降霜の始まる11月2日まで露地で栽培したが、1株も出穂せず、そのため当地での露地栽培では採種が不可能であった。しかしながら、温室栽培

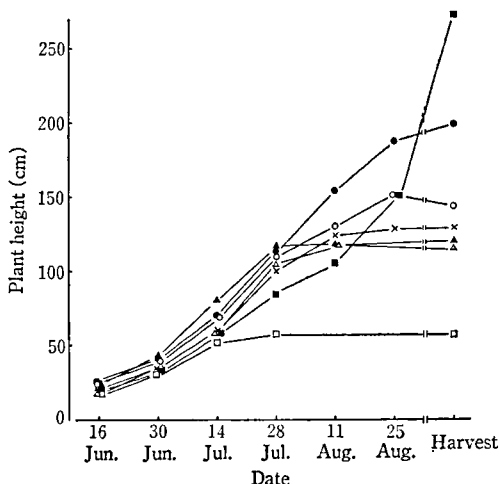


Fig. 1. Growth curve of plant height of *Coix lachryma-jobi* var. *ma-yuen*
×; Tsukuba, ●; China A, ○; China B
▲; Korea A, △; Korea B, ■; Thailand
Coix lachryma-jobi
□; U.S.S.R.

Table 3. Number and weight of involucre per plant

Strain	Total no. of involucre (A)	Ripening no. (B)	$\frac{B}{A}$ Percent %	Total weight* of involucre (C) g	Weight* of ripened involucre (D) g	$\frac{D}{C}$ Percent %	No. of sheath bract	No. of involucre per sheath bract
<i>Coix lachryma-jobi</i> var. <i>ma-yuen</i>								
Tsukuba	1117.0	824.0	73.8	99.1	86.6	87.4	282.7	4.0
China A	1104.3	773.7	70.1	109.0	92.6	85.0	372.1	3.0
China B	1586.0	1060.0	66.8	131.0	110.1	84.0	476.3	3.3
Korea A	777.1	496.0	63.8	60.9	47.2	77.5	216.2	3.6
Korea B	962.4	604.4	62.8	74.3	60.9	82.0	293.9	3.3
Thailand	—	—	—	—	—	—	—	—
Okayama	1319.9	1096.4	83.1	125.4	113.3	90.4	300.4	4.4
Brazil A	1246.8	1046.5	83.9	114.3	101.8	89.1	334.3	3.7
Brazil B	1046.9	842.9	80.5	83.2	75.1	90.3	293.8	3.6
<i>C. lachryma-jobi</i>								
U.S.S.R.	265.0	176.4	66.6	38.5	34.5	89.6	78.6	3.4
Tsukuba	783.5	541.4	69.1	102.5	88.9	86.7	245.0	3.2

* Air dry weight

Table 4. Characteristics of involucre

Strain	100 grains weight		Hardness kg	Size*		
	Involucres g	De-hulled kernel g		Length mm	Major axis mm	Minor axis mm
<i>Coix lachryma-jobi</i> var. <i>ma-yuen</i>						
Tsukuba	10.09	6.49	1.92	10.0	6.00	5.32
China A	12.17	6.95	3.20	9.6	6.57	5.49
China B	10.20	6.66	2.67	9.9	6.45	5.59
Korea A	10.00	6.17	3.14	9.5	5.99	5.16
Korea B	10.42	6.41	2.90	9.9	6.33	5.53
Thailand**	17.70	—	—	11.7	8.02	6.70
Okayama	10.49	9.72	2.14	10.6	5.96	5.27
Brazil A	9.37	6.21	1.97	9.8	5.95	5.25
Brazil B	9.03	5.88	2.10	9.7	5.79	5.13
<i>C. lachryma-jobi</i>						
U.S.S.R.	20.15	5.18	10<	10.2	7.61	6.82
Tsukuba	16.57	7.16	10<	10.9	7.89	6.65

* The sizes were measured about the accession samples

** Grown in the green house

では採種が可能であった。なお、ソ連ジュズダマの収穫は適期をすぎた9月25日に行ったが、実際の収穫適期は8月下旬～9月上旬で、かなり早熟であった。

これらのことから、当地における露地栽培では前述した止葉の葉位同様、高緯度地帯に産する系統は栄養生長期間が短く、早熟性であるが、タイ系統のごとく、低緯度地帯に産する系統は栄養生長期間が長いので、生殖生長の開始前に霜等寒さにより枯死となり、採種が不可能な生態的特性を有することが明らかとなった。

(4) 1株当たりの粒数及び粒重

1株当たりの全着粒数は中国A、B両系統では筑波系統とほぼ同程度が多く、北朝鮮の2系統は筑波系統より少なかった。

稈実粒数歩合は中国、北朝鮮の4系統とも筑波系統より低かった。

全果実重、稈実果実重歩合についても、粒数と同様の傾向であった (Table 3)。なお、供試ハトムギ中、最も収量性の高いのは岡山の系統であった。

2. 果実の形質

(1) 100粒重

果実の100粒重は中国A、B、北朝鮮A、B及びタイのち系統とも筑波系統より大きく、特に、タイ系統は供試ハトムギ中最も大きかった。なお、タイ系統の果実は、温室内で栽培した株から採種したものをを用いた。

果実から総苞を除いた種子100粒重は、中国の2系

統は筑波系統より大きく北朝鮮の2系統は小さかった。

ジュズダマについては、両系ともハトムギより果実が大きく、種子100粒重においても、筑波系統は供試全系統中最も大きかった (Table 4)。しかしながら、ハトムギに比べ、果実に対する種子の割合は小さかった。

(2) 硬度

総苞の硬度は硬度計 (木屋式) を用いて測定した。測定値は果実の背面に圧力を加え、総苞が割れた時の圧力値であり、kg で示した (Table 4)。その結果、中国、北朝鮮の4系統は総苞が硬く、筑波の1.4～1.7倍であった。

また、ジュズダマの総苞は使用した測定器の測定限界値である10kgの圧力では割れず、実際の硬度値は不明であった。

なお、Table 4. に示した果実形状の数値は、播種前の入手時の果実の測定値である。今後、今回収穫した果実についても同様の調査を行うと同時に、品質について、更に詳細な検討を行いたい。

ま と め

今回の栽培実験の結果から、市場品「ハトムギ」は学名としては *Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* STAPP であるが、生育特性の異なる植物の果実であることが明らかになった。

生育特性で区別性のあったのは、1)幼植物の色、2)収穫期の草丈、3)止葉葉位、4)開花・成熟の早晩性、5)株当たりの着粒数等である。これらの区別性は長期間の栽培によって栽培国の自然条件に適合した形質に淘汰されたためと思われる。

Coix 類の分化はインドを中心に熱帯アジアでおこり、北へ伝播されたもので⁵⁾、大型のタイ種が母種に近く、中型の中国種、小型の北朝鮮種とに淘汰され、筑波のものは北朝鮮種に近いと思われる。

収穫した果実及び種子の形質については、おって報告する。

文 献

- 1) J.P.X, p. 1234 (1980)
- 2) 日本薬局方外生薬規格集, p. 47 (1978) 薬事日報社
- 3) 藤田路一：植物研究雑誌, **13**, 683 (1937)
- 4) 石田喜久男ら：農業及び園芸, **57**, 467 (1982)
- 5) S.G. Watt: *Agricultural Ledger*, **13**, 513 (1904)

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、製造又は調査などで、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：衛生試験所所定の下記の原稿用紙を用い、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。また、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。また、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—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}	μ	
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 ²	(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 _m
(L を用いない)		レントゲン	R	R _f 値	R _f
ミリリット	ml	サイクル	cycle	保持時間	t _R
(cc を用いない)		回毎分	rpm	50%致死量	LD ₅₀
マイクロリットル	μl	ヘルツ	Hz	50%有効量	ED ₅₀
(λ を用いない)		キャンドラ	cd	経口投与	p. o.
立方メートル	m ³	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 ⁻¹	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%	マスマスペクトル	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 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、それらのそう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^{3), 2, 5), 1-4)}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：衛生試験, 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：マスマスベクトル解説, 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、説明とともに図の下に、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、本文中のそう入ページを記す。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に記す。

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 57 年度 図書 編集 委員

鈴木 郁生	神谷 庄造	竹中 祐典
緒方 宏泰	木村 俊夫	沢田 純一
関田 節子	小嶋 茂雄	斎藤 恵美子
武田 由比子	神藏 美枝子	宇田川 俊一
福岡 正道	鈴木 康雄	川島 邦夫
小久保 武	沢田 稔	豊田 正武
飯田 修		

衛生試験所報告 第100号

昭和 57 年 11 月 25 日 印刷

昭和 57 年 11 月 30 日 発行

発行所 国立衛生試験所化学物質情報部
東京都世田谷区上用賀1丁目18番1号

印刷所 サンヨー印刷株式会社
東京都文京区後楽 2-21-8