

ISSN 0077-4715
CODEN: ESKHA 5

衛生試験所報告

第 102 号

昭和 59 年

BULLETIN
OF
NATIONAL INSTITUTE OF
HYGIENIC SCIENCES

No. 102 1984

国立衛生試験所

衛生試験所
Eisei Shikenjo Hokoku

衛生試験所報告

第 102 号

昭和 59 年

BULLETIN
OF
NATIONAL INSTITUTE OF
HYGIENIC SCIENCES

No. 102 1984

Published by
National Institute of Hygienic Sciences
Tokyo, Japan

国立衛生試験所

目 次

総 説

N社透析器による限障害の原因化学物質について……………大場琢磨・戸部満寿夫………… 1

報 文

- 覚せい剤の微量分析に関する研究(第3報)メタンフェタミンを投与したサル体毛中の代謝物の検出……………高橋一徳・島峯望彦・大野昌子・川崎 靖・関田清司・降矢 強…………21
- Kinetics of Hydrolysis of 4-Methylumbelliferyl Tetra-N-Acetyl- β -Chitotetraoside by Hen Egg White Lysozyme and pH Dependence of Its Kinetic Parameters……………谷本 剛…………25
- 酵素製剤の品質に関する研究(第6報) β -ガラクトシダーゼ製剤……………谷本 剛・福田秀男・川村次良…………29
- 高速液体クロマトグラフィーによるウシインシュリンとブタインシュリン製剤中のインシュリンの定量……………太田美矢子・徳永裕司・木村俊夫・佐藤 浩・山羽 力…………33
- ヒトTリンパ球幼若化反応に及ぼす各種抗炎症剤の影響……………押沢 正・早川堯夫・山村雅一…………36
- モルモット多形核白血球の食作用に伴う酸素代謝に及ぼす各種抗炎症剤の影響……………早川堯夫・押沢 正…………40
- 医用材料の適合性に関する化学的研究(第3報)試作血液回路の DEHP 溶出防止効果について……………辻 楠雄・新谷英晴・菊池 寛・大場琢磨・和田義品…………45
- 新しく考案した4分画フラット寒天平板の Spiral System への応用……………小沼博隆・尾上洋一・倉田 浩…………49
- Zinc diethyldithiocarbamate 妊娠期投与における母ラット, 胎仔及び出産仔の発育に及ぼす影響……………中浦慎介・田中 悟・川島邦夫・高仲 正・大森義仁…………55
- N-ブチル-N-ニトロソ尿素(BNU)による白血病発生に対する免疫抑制剤及び同系骨髄細胞移植の影響(I)初期の変化について……………古田京子・荻生俊昭・松岡千明・前川昭彦…………62
- N-ブチル-N-ニトロソ尿素(BNU)による白血病発生に対する免疫抑制剤及び同系骨髄細胞移植の影響(II)長期発癌実験による白血病発生への影響……………荻生俊昭・古田京子・松岡千明・前川昭彦…………66
- 肝癌プロモーターの検索方法の確立に関する実験的研究——フェノバルビタール, プチルヒドロキシトルエン, バルビタールのプロモーション作用について……………古川文夫・豊田和弘・小久保 武・高橋道人・林 裕造…………71
- ガス状及び揮発性化学物質の哺乳動物細胞に対する細胞遺伝学的影響 I. 培養細胞を用いる染色体異常試験……………祖父尼俊雄・林 真・松岡厚子・沢田 稔・畑中みどり・石館 基…………77
- ガス状及び揮発性化学物質の哺乳動物細胞に対する細胞遺伝学的影響 II. マウスを用いる小核試験……………祖父尼俊雄・林 真・松岡厚子・沢田 稔・畑中みどり・石館 基…………84
- 細菌内毒素による家兎の末梢血管透過性因子について……………長谷川隆一・川崎浩之進・加納晴三郎…………90
- アミド系局所麻酔薬の水溶液中における安定性……………岡田敏史・中原 裕・加納晴三郎…………94
- 分光学的方法によるトリバンブルーと牛血清蛋白との結合の測定……………伊丹孝文・江馬 真・加納晴三郎…………99

ノ ー ト

- 3-Nitro-1-nitroso-1-(4-pyridylmethyl) guanidine 及び関連化合物の合成……………神谷庄造………… 105
- トリ置換 N-ニトロソ尿素の分解反応によって生ずるニトロ化合物及びトリアゼン類の¹³C核磁気共鳴……………末吉祥子・丹野雅幸………… 108
- 低濃度投与レベルでの連続投与時におけるクロルデン類のラット体内分布……………武田明治・関田 寛・佐々木久美子・河村葉子・内山 充・高橋 惇・大野泰雄・川西 徹・高仲 正………… 113
- ケシの優良系統の選抜 一貫種のアヘン採取時におけるモルヒネ, コデイン含有量の関係について……………佐竹元吉・栗原孝吾・畠山好雄・堀越 司・高橋一徳・島峯望彦・大野昌子………… 117
- 薬用植物の栽培試験(第13報)ハナトリカブトの道南, 道北における生育, 収量, 品質について……………堀越 司・坂東英雄・本間尚治郎・石崎昌吾………… 120
- 薬用植物の栽培試験(第14報)ハナトリカブトの栽植法と生育, 収量, 品質について……………堀越 司・坂東英雄・本間尚治郎・石崎昌吾………… 123

資料

国立衛生試験所リゾチーム標準品 (Control 831)	谷本 剛・福田秀男・木村俊夫・山羽 力	127
塩ビ食品衛生協議会が提案したポリ塩化ビニル製食品容器包装中のジブチルスズ化合物 のガスクロマトグラフィーによる試験法の検討	山崎 壯・石綿 肇・谷村顕雄	129
マーマレード、ジュース中のオルトフェニルフェノールの定量	川崎洋子・酒井綾子・山田 隆・谷村顕雄	133
たらこの亜硝酸塩処理とニトロソアミン量について	川崎洋子・山崎 壯・山本 都・山田 隆・谷村顕雄	134
BHA 添加ラット飼料における変異原性物質生成の可能性の検討	酒井綾子・宮田ルミ子・谷村顕雄	137
中国製クリスタルカットガラスからの鉛及びヒ素の溶出試験	石綿 肇・井上たき子・山田 隆・谷村顕雄	140
ガラス製器具からの鉛、カドミウム、ヒ素及びアルカリの溶出——現行規格試験法と国 際規格試験法による比較	井上たき子・石綿 肇・山田 隆・谷村顕雄	141
規格基準設定のためのソース、あん(餡)類の真菌試験	宇田川俊一・坂部フミ・鈴木明子・成田紀子・倉田 浩	144
乾燥加工食品の品質に関する真菌試験	宇田川俊一・坂部フミ・鈴木明子・成田紀子・倉田 浩	147
和歌山薬用植物栽培試験場植物目録	堀越 司・木下孝三	150
業務報告		159
誌上发表		191
学会発表		223
衛試験例会		232
昭和58年度に行った主な研究課題		238
国家検定及び検査等の処理状況		241
国立衛生試験所標準品		252

CONTENTS

Review

- T. OBA and M. TOBE: Studies on Chemical Substances responsible for causing Eye Lesions in Patients treated with NAC-Dialyzer..... 1

Originals

- K. TAKAHASHI, M. SHIMAMINE, M. ÔNO, Y. KAWASAKI, K. SEKITA and T. FURUYA: Microanalysis of Amphetamines III Detection of Amphetamines in the Hair of Monkeys treated with Methamphetamine21
- T. TANIMOTO: Kinetics of Hydrolysis of 4-Methylumbelliferyl Tetra-N-acetyl- β -chitotetraoside by Hen Egg White Lysozyme and pH Dependence of Its Kinetic Parameters25
- T. TANIMOTO, H. FUKUDA and J. KAWAMURA: Studies on the Quality of Enzyme Preparation (VI) β -Galactosidase Preparation29
- M. OHTA, H. TOKUNAGA, T. KIMURA, H. SATOH and T. YAMAHA: Determination of Insulins in Bovine and Porcine Insulin Preparations by High-Performance Liquid Chromatography33
- T. OSHIZAWA, T. HAYAKAWA and M. YAMAMURA: Effect of Anti-inflammatory Drugs on Transformation of Human T-lymphocytes to Blast-like Cells Induced by PHA and on One-way Mixed Lymphocyte Reaction36
- T. HAYAKAWA and T. OSHIZAWA: Effects of Anti-inflammatory Drugs on Oxygen Metabolism associated with Phagocytosis by Guinea Pig Polymorphonuclear Leukocytes40
- K. TSUJI, H. SHINTANI, H. KIKUCHI, T. OBA and Y. WADA: Chemical Studies on Compatibility to Medical Application III Prevention of Migration of DEHP from Blood Tubings45
- H. KONUMA, Y. ONOUE and H. KURATA: Devised Four Compartments Flat Agar Plate applicable to the Spiral Plating System for counting Bacteria49
- S. NAKAURA, S. TANAKA, K. KAWASHIMA, A. TAKANAKA and Y. OMORI: Effects on Zinc diethyldithiocarbamate on the Prenatal and Postnatal Developments of the Rats55
- K. FURUTA, T. OGIU, C. MATSUOKA and A. MAEKAWA: Effects of Azathiopurine-feeding or Bone Marrow Transplantation on Leukemogenic Activity of N-Butyl-N-nitrosourea (BNU) in Donryu Rats (I) Sequential Observations of Immunological and Histological Changes in the Subacute Stage.....62
- T. OGIU, K. FURUTA, C. MATSUOKA and A. MAEKAWA: Effects of Azathiopurine-feeding or Bone Marrow Transplantation on Leukemogenic Activity of N-Butyl-N-nitrosourea (BNU) in Donryu Rats (II) Effects on the Induction of Leukemia.....66
- F. FURUKAWA, K. TOYODA, T. KOKUBO, M. TAKAHASHI and Y. HAYASHI: Establishment of Test Methods for examining Promoters of Hepatocarcinogenesis—Promoting Effects of Phenobarbital, Butylated Hydroxytoluene and Barbital.....71
- T. SOFUNI, M. HAYASHI, A. MATSUOKA, M. SAWADA, M. HATANAKA and M. ISHIDATE, Jr.: Cytogenetic Effects of Gaseous and Volatile Chemicals on Mammalian Cells *In Vitro* and *In Vivo*. I. Chromosome Aberration Tests in Cultured Mammalian Cells77
- T. SOFUNI, M. HAYASHI, A. MATSUOKA, M. SAWADA, M. HATANAKA and M. ISHIDATE, Jr.: Cytogenetic Effects of Gaseous and Volatile Chemicals on Mammalian Cells *In Vitro* and *In Vivo*. II. Micronucleus Tests in Mice.....84
- R. HASEGAWA, H. KAWASAKI and S. KANO: Studies on Vascular Permeability Factor induced by Bacterial Endotoxin in Rabbits.....90
- S. OKADA, H. NAKAHARA and S. KANO: Studies on the Stability of Local Anesthetics of Amide Series in Aqueous Solutions94
- T. ITAMI, M. EMA and S. KANO: Spectrophotometric Measurement of the Binding of Trypan Blue with Bovine Serum Proteins99

Notes

S. KAMIYA: Synthesis of 3-Nitro-1-nitroso-1-(4-pyridylmethyl) guanidine and Related Compounds	105
S. SUEYOSHI and M. TANNO: ¹³ C-Nuclear Magnetic Resonance of Nitro Compounds and Triazenes produced by Decomposition of Trisubstituted Nitrosoureas	108
M. TAKEDA, H. SEKITA, K. SASAKI, Y. KAWAMURA, M. UCHYAMA, A. TAKAHASHI, Y. OJINO T. KAWANISHI and A. TAKANAKA: Distribution of Chlordane Components in Rat Tissues after Daily Oral Administration of Technical Chlordane at Low Levels	113
M. SATAKE, K. KURIHARA, Y. HATAKEYAMA T. HORIKOSHI, K. TAKAHASHI M. SHIMAMINE and M. ONO: Selection of Opium Poppy On the Relation of Incision Time of Poppy (Ikkanshu) Capsule to Morphine and Codeine Yields.	117
T. HORIKOSHI, H. BANDO, N. HOMMA and S. ISHIZAKI: Studies on the Cultivation of Medicinal Plants (XIII) Growth, Yield and Quality of <i>Aconitum Chinense</i> Sieb. et Zucc. in Southern and Northern Hokkaido.....	120
T. HORIKOSHI, H. BANDO, N. HOMMA and S. ISHIZAKI: Studies on the Cultivation of Medicinal Plants (XIV) Growth, Yield and Quality on the Transplanting Pattern of <i>Aconitum chinense</i> Sieb. et Zucc.	123

Technical Data

T. TANIMOTO, H. FUKUDA, T. KIMURA and T. YAMAHARA: Lysozyme Reference Standard (Control 831) of National Institute of Hygienic Sciences.....	127
T. YAMAZAKI, H. ISHIWATA and A. TANIMURA: Study on the Gas Chromatographic Determination of Dibutyltin Compounds in Food Containers and Packing Materials made of Polyvinyl Chloride, Which was proposed by Japan Hygienic PVC Association	129
Y. KAWASAKI, A. SAKAI, T. YAMADA and A. TANIMURA: Determination of <i>o</i> -Phenylphenol (OPP) in Marmalade and Juice.....	133
Y. KAWASAKI, T. YAMAZAKI, M. YAMAMOTO, T. YAMADA and A. TANIMURA: Determination of Nitrosamines in Salted Pollack Roe treated with Nitrite.....	134
A. SAKAI, R. MIYATA and A. TANIMURA: Study on the Possibility of Mutagen Formation in Rat Feed containing Butyl Hydroxy Anisol	137
H. ISHIWATA, T. INOUE, T. YAMADA and A. TANIMURA: Migration Tests of Lead and Arsenic from Crystal Cut Glasses made in China.....	140
T. INOUE, H. ISHIWATA, T. YAMADA and A. TANIMURA: Migration of Lead, Cadmium, Arsenic and Alkali from Glasswares—Comparison of Existing Japanese Methods and International Standard Method	141
S. UDAGAWA, F. SAKABE, M. SUZUKI, N. NARITA and H. KURATA: Mycological Survey of Worcester and Fruits Sauces and "An" (Bean jam) for Standardization Purpose.....	144
S. UDAGAWA, F. SAKABE, M. SUZUKI, N. NARITA and H. KURATA: Mycological Quality of Dehydrated Food	147
T. HORIKOSHI and K. KINOSHITA: List of Plants: Wakayama Experiment Station of Medicinal Plants	150
Annual Reports of Divisions	159
Summaries of Papers Published in Other Journals	191
Titles of Speeches at Scientific Meetings Semminars	223
Semminars	232
Main Research Projects Carried Out in 1983	238
Survey of The Results of National Tests	241
Reference Standards Prepared by National Institute of Hygienic Sciences	252

N 社透析器による眼障害の原因化学物質について

大場琢磨・戸部満寿夫

Studies on Chemical Substances responsible for causing Eye Lesions
in Patients treated with NAC-Dialyzer

Takuma OBA and Masuo TOBE

ま え が き

昭和56年11月頃から昭和57年3月はじめにかけて、日本医工(備製ホローファイバー型人工腎臓透析器(以下、NAC透析器と称する))を使用した医療機関において、眼の充血、痛み、耳痛などの症状を訴える患者が多発し、主に強膜炎あるいは虹彩炎などと診断された。これが昭和57年3月13日の日刊紙に報道され、眼障害を起した者は173名にのぼり、人工透析始まって以来、世界でも例のない事故のため、わが国の透析患者約4万人に大きな衝撃を与えた。厚生省は、滋賀県薬務課の協力により、直ちに当該製品を収去するとともに、事故原因の究明を当所に依頼した。そこで、療品部が化学分析を、毒性部が動物実験を分担し、適宜、衛生微生物部及び薬理部の協力を得て原因究明を行った結果、この難問題を解決することができた。すでに、本研究の概要は、昨年的人工臓器学会で発表するとともに、国際人工臓器学会誌 (*Artificial Organs*) に報文として投稿中であるが^{1,2)}、この事件の性格上、詳細を公表しておく必要があると考えたので、ここに、そのとき行った手技、順序、思考及び実験結果を記すことにした。

発症の経緯

我々とは別に、厚生省の要請により、メーカー側は事故究明のための“NAC副作用調査委員会(委員長 越川昭三 昭和大教授)”(以後、NAC委員会と略す)を組織し調査研究を行ったが、その厚生省への報告³⁾のうちから事故の実態調査結果を以下に要約して紹介する。調査は医師及び患者へのアンケートによったもので、このアンケートは患者173名中167名を捕捉しているので充分信頼することができる。

a. 発症率は使用患者数308名中167名(54.2%)であった。

b. 発症は使用開始後2,3回目が最も多いが、1回目ですでに発症したものが18.6%にもなっている。また、その障害は透析中か透析後10時間以内に発現し、2~3週間続いた。

c. 症状は強膜炎と診断されたものが最も多く(43.9%)、虹彩炎、角膜炎などを含めると56.1%になる。主訴としては眼球発赤が最も多く、眼痛、流涙などもあり、かなりの割合で耳鳴り、耳痛を伴った。

d. NAC透析器の使用開始時期によって発症率に有意の差があった。

e. 透析器の血液側予洗液の量が1l以上であった機関での発症率は、1l以下であった機関での発症率より有意に低かった。

特に、d項とe項の事実は、原因物質究明の良い手掛りとなったので、更に詳しく記すことにする。

1) NAC製造時期と発症率の関係

Table 1のデータはNAC透析器の使用開始時期と発症率の関係(NAC委員会報告書より)を示したものである。

我々は、このデータをもとにして、製造ロットと発症率の関係を明らかにするため、他の資料を含め以下の検討を行った。

“発症率は使用開始時期とは無関係に各群に均一である”を帰無仮説としてカイ二乗検定を行ったところ⁴⁾、この帰無仮説は1%の危険率水準で否定された。すなわち、発症率は使用開始時期とは無関係ではない、と考えられる。次に、1群と2群、3群と4群、5群と6群の3通りのペアについてカイ二乗検定を行ったところ、それぞれのペアの発症率は危険率5%で有意では無いことが分った。更に、1,2,3群と4,5,6群の二つのセットに分けて検定したところ、1,2,3群のセット発症率は危険率1%で、4,5,6群のセットの発症率は危険率5%で有意差があることが分った。なお、3,4,5,6群について検定すると危険率5%

Table 1. 使用開始時期別発症率

群	使用開始時期	使用患者数	発症数	率 (%)
1	12月15日以前	24	4	16.7
2	12月16日～12月31日	18	6	33.3
3	1月1日～1月15日	29	17	58.6
4	1月16日～1月31日	35	16	45.7
5	2月1日～2月15日	88	62	70.5
6	2月16日～2月28日	107	62	57.9
7	3月1日～3月15日	7	0	0.0
8	3月16日以降	0	0	0.0
合計		308	167	54.2

で有意では無いという結果になった。

以上のことから、“群1, 2群と3, 4, 5, 6は明らかに区別され、群3及び群4は群5, 6に近いが多少異なった要素を持つ群と考えられる。”

日本医工は事故の起きた透析器のロット番号と、その納入、使用時期を追跡し、25件についてデータを集めている。その資料には、使用の時期は不確かな場合が多いが、製造及び納入時期については比較的正確に記述されている。この資料によると、

i) 製造されてから病院へ納入されるまでには、最も短かくて8日、最も長いのは3箇月以上（ただし、1件のみで例外的）、平均13.7日が経っている。

ii) 納入後、使用されるまでの期間に関するデータは少なく、短い順に記すと、0～11日、4日、7日、6～12日、9～16日、11～18日、9～30日、2箇月であった。（日数に巾のあるのは使用した日の記憶が不確かで、*月*日～*月*日の間のように記されているため）およそ、約1週間は納入から使用までに経過すると見てもよいのではなからうか。

このように、製造されてから使用されるまでには平均約3週間が経過すると考えてよからう。

薬務局監視指導課における昭和57年3月23日の会議にメーカーから提出された資料によると⁵⁾、NAC透析器の製造、出荷状況は以下の通りである。

昭和56年9月～10月に製造されたロットは、(ア)透析器の最重要部分の中空糸の腰が柔らかく外筒の中心にうまく納まらなかった。(イ)中空糸支持体のポリウレタンの硬化にバラツキがあった、の理由で回収された（ただし、一部は使用された）。11月～12月は製造方法の検討をしていたので、その間の製品は出荷されていない（したがって、使用されていない）。そして、昭和56年12月26日から本格的な生産、出荷が始まった。その時点から、中空糸製造工程中の洗浄槽の殺菌

Table 2. 血液側の洗浄液量と発症率

洗浄液量 (ml)	使用患者数	発症患者数	発症率 (%)
1000 未満	181	115	63.5
1000～1500	89	41	46.1
1500～2000	21	9	42.9
2000 以上	9	1	11.1

法が、塩化ベンザルコニウムによるものから紫外線による方法に変更された。

したがって、本格生産品が使用されはじめたのは、1月10日以降であると推定される。

NAC透析器による眼障害発症率が Table 1 の群3, 4を中間群として、群5, 6にいたって有意に高くなったことは、この本格生産品の使用開始時期と良く符号する。すなわち、眼障害事故は主に昭和56年12月末以降の本格生産ロットによって起こったものと考えられる。しかし、昭和57年4月23日付の日本医工の薬務局監視指導課への医療用具副作用症例調査報告書によれば⁶⁾、昭和56年11月、12月にすでに発症しているケースもあるので、昭和56年9月～10月の製品によっても事故がおきていたことは確実である。ただし、その発症率は本格生産品より低いものであり、本格生産品の使用開始とともに発症率が増加したものと推定された。

なお、全国腎臓病患者連絡協議会（全腎協）は人工透析患者に種々の項目についてアンケート調査を行い、それを1982年8月に実態調査報告集としてまとめているが⁷⁾、今回の事故と類似の合併症は記載されていない。また、文献にも記載はない。したがって、今回の様な眼障害の発症率はNACの9月、10月製品においても、一般の透析患者の眼障害発症率よりも高かった、と考えられる。

2) 予洗液量と発症率との関係

透析器に血液を送りこむ前に、透析器の血液側及び透析液側を洗浄することになっている。NAC透析器の場合、規定の洗浄液量は500～1000 ml とされていた。Table 2 はNAC委員会による透析器の血液側の洗浄液量と発症率の調査結果である。カイ二乗検定を行ったところ、危険率1%で有意であった。発症率は洗浄液量に反比例していることがわかる。

なお、NAC透析器の構造は Fig. 1 に示した通りである。Table 3 に各部位の名称と材質を記した。

このうち血液が接触する部位は2, 6, 7, 8である。2の材質は固く、これからの溶出物はほとんどない。後に述べるが、溶出物はいずれも6～8の部位から由

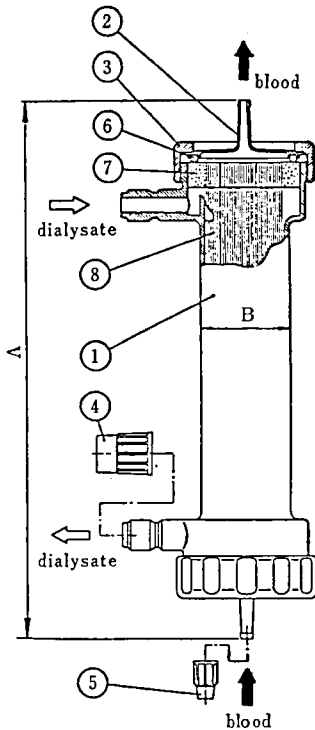


Fig. 1. NAC Dialyzer

Table 3. 部位と材質

番号	名称	材質	面積 (cm ²)
1	本体ケース	ポリカーボネート	...
2	血液トラップ	ポリプロピレン	30
3	押えキャップ	ポリカーボネート	...
6	O-リング	シリコンゴム	10
7	中空糸支持体	ポリウレタン	25
8	中空糸 (接着部)	セルロースアセテート	9000~17000

来したものであった。Table 4 に、部位 6～8 に使われた化学物質名を示した。

原因化学物質の究明

1. 規格試験、それに準ずる試験、及び犬による透析実験

1.1 透析型人工腎臓装置基準の規格試験—特に“あわ立ち”について

取去され当所に送られた NAC 透析器について、まず、厚生省透析型人工腎臓装置基準の試験を実施した。この基準は、当時は (案) であったが、NAC 透析器は、この基準案に基づいて承認されていた。なお、本

Table 4. 使用された化学物質

部位	物質
6	シリコンゴム
7	ヒマン油誘導体 プロピレンオキシド付加体 ジフェニルメタンジイソシアネート (MDI) MDI とヒマン油誘導体の付加体
8	セルロースアセテート (CA) グリセリン ポリプロピレングリコール (PPG) 流動パラフィン N-メチルピロリドン エチレングリコール ベンザルコニウム クロリド
組立時	フレオン 113 エチレンオキシド (EO) MDI-グリセリン 付加体

(注) グリセリンは中空糸に塗布されたもので、親水化剤である。

PPG はグリセリン中の不純物

流動パラフィンは中空糸の紡糸時に中空糸内部に封入されたもので、組立時にフレオンで除去される。

N-メチルピロリドン及びエチレングリコールは CA 紡糸時の CA の溶媒で、水洗などによって除去される。

ベンザルコニウムクロリドは、昭和56年製の中空糸の製造時に洗浄槽の殺菌剤として使用されたものであり、昭和57年製では使用していない。

EO は組立後の滅菌剤

MDI-グリセリン付加体は、組立時に中空糸のグリセリンと7の成分である MDI が反応して生成したものである。

案は昭和58年6月20日付薬発第494号の局長通知で正式に承認基準となった。

NAC 透析器を切断して中空糸を取り出し、基準の透析膜の溶出物試験を行ったところ、水溶液の外観、pH、亜鉛、銅、紫外吸収スペクトルの各項目には適合したが、1～2月製造の場合は“あわ立ち”試験で激しいあわ立ちを示し、不適であった。なお、9月製造の場合、あわ成ちは3分以内に消えたので、基準に適合していた。

この“あわ立ち”の原因物質については、はじめは界面活性剤 (特に、塩化ベンザルコニウム) を疑って、界面活性剤の分析を行ったが、カチオン活性剤は検出されなかった。更に、“あわ立ち”の激しい溶出液をメチレンブルー法¹⁾で分析したところ、中性ではクロロホルムに青色が抽出されてくるが、酸性にするとク

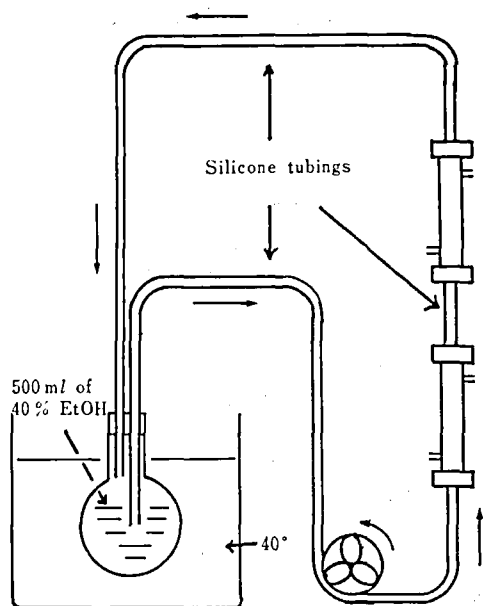


Fig. 2. Extraction Apparatus

ロホホルム層は無色になった。また、この水溶出液をカチオン交換樹脂を通して、あわ立ちは消えないが、アニオン交換樹脂を通した場合はあわ立ちは消失した。これらの事実から、溶出液には弱い酸性物質があり、それが“あわ立ち”と関係があることが分った。

この“あわ立ち”物質は眼障害の原因物質と同じくセルロースアセテート (CA) 由来の糖質であり、その量は9月製品より1~2月製品中のほうが多いことが分ったが、これについては後に詳しく述べる。

1.2 エチレンオキシドの残留、及び無菌試験

NAC 透析器は寒冷の秋田県大館市に新設された工場で作られた新製品であり、1~2月の寒い季節の製品で障害がでたところから、滅菌に使ったエチレンオキシド・ガス (EO) の揮散が不十分だったのではないかと考えられた。そこで、製品部が開発した分析法で⁹⁾ 残留 EO を測定したが、1月末の製品でその濃度はわずかに 10 ppm にすぎなかった。また、微生物汚染も考えられたので、1月下旬から2月上旬の製品の無菌試験を行ったが、細菌試験及び真菌試験とも無菌であった。

1.3 犬による透析実験

人での事故発生状況に可能な限り類似する条件下で動物の眼に対する影響を調べる目的で、3頭のビーグル犬に尿管結さつによる急性腎不全を惹起させた後、NAC 透析器を用いて外シャントより、それぞれ2、4、6回の透析を施した。なお、本実験で腎機能障害

の指標である尿素窒素及びクレアチニンが透析前には異常に高く、透析後に急激な減少を示していることから、この実験は腎透析モデルとみなしうる。しかし、実験の結果、人の場合の眼症状発現に必要な平均透析回数2.7回を上回る透析を行ったにもかかわらず、人で見られたような眼症状の発現は3頭ともに認められなかった。これは人と犬の間の感受性の差によるものと思われる。

2. 透析器からの抽出物に関する検討

2.1 実験方法

原因化学物質追求のために我々は次のような方法をとった。すなわち、予備実験として、透析器の本数、前洗浄の時間、抽出溶媒などを変えて透析器から抽出を行い、その抽出液を濃縮して動物に投与し、動物によく症状を再現する抽出条件を設定した。次に、抽出物を分画し、それぞれの分画を動物実験に供して眼の反応を見ると同時に、その分画中に含まれる物質を分析、確認した。また、主な原材料も動物実験に供して眼の反応を観察した。動物実験方法は以下に示す通りである。

イ) 動物

体重 2~2.5 kg の雄ウサギ (日本白色種一馴化飼育1週間) 及び体重約 10 kg の雄ビーグル犬 (馴化飼育1ヶ月) を使用した。

ロ) 投与方法

ウサギの場合は、試料を 30 ml の生理食塩液に溶かし、溶けない場合は超音波で均一分散させ、この液を輸液セットを用いて約15分から35分かけて耳介静脈へ点滴投与した。また、イヌの場合は、生理食塩液 20 ml に溶かし、約3分間かけて前腕静脈内へ投与した。

ハ) 観察方法及び症状判定基準

投与時から6時間目までは連続して、その後24時間目毎にスリットランプを用いて眼の充血の有無とその程度を検査した。ウサギの場合は、瞬膜、結膜、強膜、虹彩大環と虹彩の放射動脈について観察したが、イヌでは虹彩大環と虹彩放射動脈については虹彩の色が黒色のため観察できなかった。

これらの部位の充血の程度及びその持続時間を総合的に判断して、次のような判定基準で結果を表すこととした。

- A: 充血の程度が強く、5時間以上持続した場合
- B: 充血の程度は強いが、5時間未満で消退した場合 (一過性の強い充血)
- C: 充血の程度が軽度の場合
- D: 充血がほとんど認められない場合

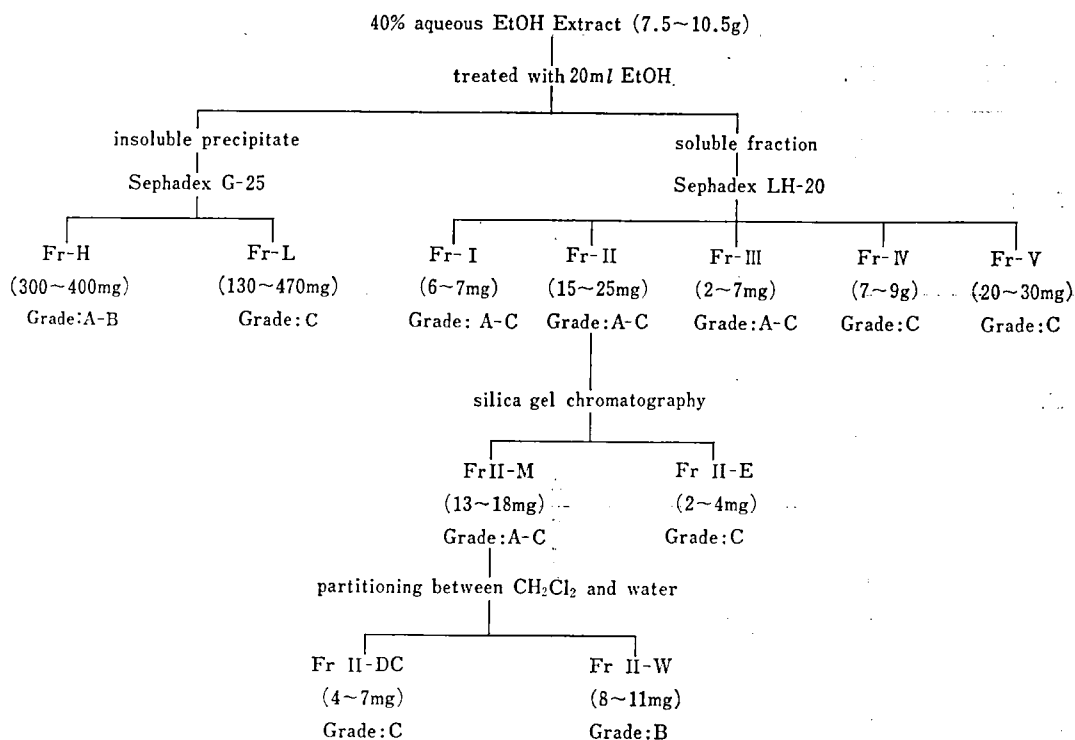


Fig. 3. Separation Procedure of the Extracts and Results of Animal Tests on Rabbit

2.2 予備実験

1) 透析器一本を切断して中空糸をとりだし、これを水 200 ml で 70°, 6 時間抽出後、ろ過、濃縮し、濃縮残留物をウサギによる動物実験に供した。判定は D であった。

2) 透析器の透析液側に 30 分間水道水を流して洗って、グリセリンを除いた後、切断して中空糸をとり出し、水 200 ml で 70°, 5 時間抽出後、ろ過、濃縮した。この濃縮残留物 6 本分を動物実験に供した。判定は C であった。

3) 透析液側に 20 分間水道水を流して洗った後、2 本の透析器を Fig. 2 のようにシリコンチューブで連結して、40° に加温した 500 ml の 40% エタノールを 250 ml/min の流速で 2 時間循環し、透析器を新しい 2 本と取りかえて、更に 2 時間循環した後、この抽出液から溶媒を留去して得たシロップを動物実験に供した。判定は A であった。これと同様の実験をくりかえした結果は以下の通りであった：透析器本数計 4 本の場合（判定； A, B, A）；計 5 本の場合（判定； B, B）。

これらの予備実験の結果、(3) のように、40% エタノールを溶媒として抽出した時ウサギに頻度高く症状

を再現できることが分かったので、以後の実験は(3)の条件で抽出することにした。

2.3 抽出、分画方法と動物実験結果

透析器 10 本からの抽出物の量は 7.5~10.5 g であって、これを家兎に投与すると投与開始後 30 分から虹彩に強い充血が見られ、この充血は 5 時間以上持続した（判定； A）。この反応の再現性は非常に良かったので、以後は 10 本分を単位として抽出物をいろいろな方法で分画し、それぞれの分画を動物実験に供した。分画の方法は Fig. 3 に示した通りであり、2 月製造の NAC-09 10 本分の各分画の重量及び分画の動物実験の判定結果の概略も記載してある。分画についての詳しい動物実験結果は Table 5 及び Table 6 に示した。黒線は強い充血を表している。破線は消退傾向を示している。

2.2 3) の方法で得た抽出液をエバポレーターで水浴温度約 60° で乾固し、残留物にエタノール 20 ml を加えてよくふりまぜ、更に 60° の水浴上で加温しながら振とうし、室温で一晩放置後、洗殿をガラスフィルターでろ過した。ここで得られたエタノール不溶物及びエタノール溶液は、それぞれセファデックス G-25 及び LH-20 によるゲルろ過によって分画した。

Table 5. エタノール可溶分の投与結果 (ウサギ)

分 画	No.	投与量 (mg/animal)	相当透析器本数	判定	充 血 時 間															
					0	1	2	3	4	5	6	7	24							
Fr-I	1	5	5	B																
	2	5	5	B																
	3	6	10	C																
	4	7	10	C																
	5	20	4	C																
	6	40	4	B																
Fr-II	7	8	5	C																
	8	8	5	C																
	9	19	13	A																
	10	19	13	A																
	11	23	10	C																
	12	30	4	A																
	13	48	4	A																
Fr-III	14	5	5	C																
	15	5	5	A																
	16	7	10	C																
	17	9	10	A																
Fr-IV	18	1500	4	C																
	19	1860	4	B																
Fr-V	20	60	6	C																
Fr-IV+V	21	2780	5	C																
	22	2780	5	C																
	23	6720	10	B																
FrII-E	24	4	20	C																
FrII-M	25	46	20	A																
	26	57	4	A																
FrII-DC	27	21	30	C																
FrII-W	28	35	30	A																
	29	35	30	B																

ゲルろ過は以下の条件で行った。溶媒で膨潤させたセファデックス・ゲルを内径 26 mm のファルマシア C-カラムに充てんし、試料をロードした後、SHODEX RI SE-II 示差屈折計でモニターしながら、流速 1 ml/min で溶離した。なお、エタノール不溶物を分画する場合は、カラム長 46 cm、ベッド高 30 cm、溶離液は水を用い、エタノール可溶物を分画する場合は、カラム長 70 cm、ベッド高 60 cm、溶離液はエタノールを用いた。それぞれのゲルろ過パターンを Fig. 4 に示した。また、分画の範囲も図示した。LH-20 によって得られた各分画はエバポレーターでエタノールを留去した後、残留物を生理食塩液に溶かして動物実験に供した。また、G-25 による分画は凍結乾燥し、残留物を生理食塩液に溶かして動物実験に供した。

エタノール可溶物の分画のうち、Fr-IV 及び Fr-V は動物実験で活性を示さなかったが、Fr-I, II, III は活性を示す場合があった（ただし、再現性に乏しく、用量-反応関係が成立しなかった。詳しくは後述）。これらのうち Fr-II が量も比較的多く、動物実験で陽性を示す率も高かったため、これを更に分画して検討した。

Fr-II をシリカゲルカラム (Kieselgel 60, Merck, 70~230 mesh, 5 g, 内径 1 cm, エーテルによる湿式法で充てん) にロードし、エーテル 50 ml、メタノール 50 ml で順次溶離した。エーテル溶離液はエバポレーターで留去した (Fr II-E)。メタノール溶離液はエバポレーターで留去した後 (Fr II-M)、水 20 ml に溶かし、ジクロルメタン 20 ml で 3 回抽出し、水

Table 6. エタノール不溶分の投与結果

分画	動物	投与量 (mg/animal)	相当透析器本数	判定	充 血 時 間											
					0	1	2	3	4	5	6	7	24	48	72	
Fr-H	ウサギ	50	1.7	C												
	"	50	1.7	C												
	"	150	5	B	—											
	"	150	5	B		—										
	"	300	10	A	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	"	300	10	B	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	"	450	15	A	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	"	450	15	A	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
イヌ	1350	45	A	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Fr-L	ウサギ	470	10	C												
	"	500	10	C												
	"	500	10	C												

層は凍結乾燥し (Fr II-W), ジクロロメタン層はパウ
 硝で乾燥後エバポレーターで留去した (Fr II-DC).

イ) エタノール可溶分の分画の動物実験結果
 結果は Table 5 の通りである。

投与量とその量を抽出するのに用いた透析器の本数
 (相当透析器本数) とが比例していないのは, 抽出物
 から完全に水を取り去ることができず, エタノールで
 沈殿させる操作の再現性が良くないためと思われる。

Fr-I では, 5 及び 40 mg 投与の時に B の判定が得
 られた. 反応は投与量にも透析器本数にも比例してい
 ないように見える。

Fr-II では, 反応は投与量 (8~48 mg) に比例して
 いるようであるが, 透析器本数には比例していない。

Fr-III では, 同じ量を投与してもかけ離れた判定が
 得られたが, 5~10 mg で活性を示すことがある, と
 いえる。

Fr-IV, Fr-V は, それぞれを分画して投与しても,
 また, 同時に投与しても, 5本相当ではほとんど活性
 をしめさないことが分る. 10本分でも, 充血の継続時
 間は僅かに2時間にすぎなかった。

Fr-II を更に分画したもののうち, 無極性溶媒分画
 (Fr II-E 及び Fr II-DC) は活性を示さなかったが,
 極性溶媒分画 (Fr II-M 及び Fr II-W) は判定A又
 はBを示した。

以上の結果, エタノール可溶分のうち, Fr-I から
 Fr-III に微量ながら活性を示す物質があり, それは,
 特に Fr-II に多いように見える. 更に, Fr-II を分画
 すると, その活性物質は最後には Fr II-W に移行す
 ることが分った。

しかし, 全体に結果のバラつきが大きく, 透析器本

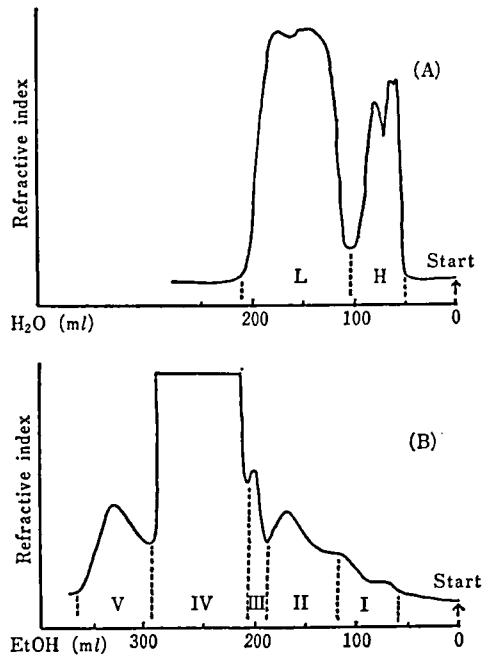


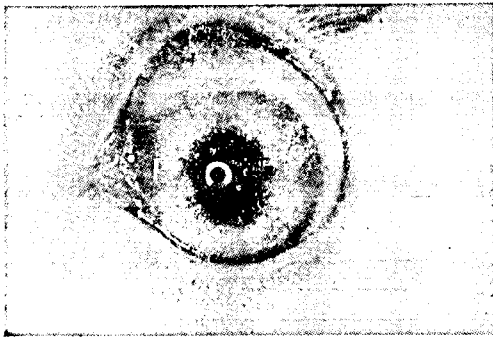
Fig. 4. Gel Filtration Patterns of Ethanol-Insoluble
 Precipitate (A) and Ethanol-Soluble Fraction
 (B)

chromatographic conditions

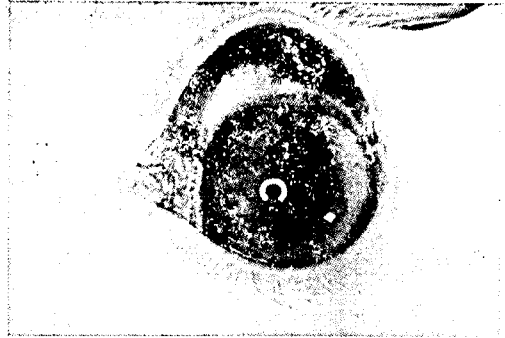
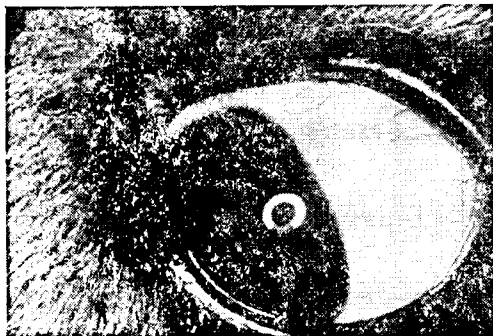
- A: Sephadex G-25, 30 cm 1. x 266 mm i. d.
 (solvent; water 1 ml/min)
- B: Sephadex LH-20, 60 cm 1. x 26 mm i. d.
 (solvent; ethanol 1 ml/min)

数と動物実験結果に良い相関関係が見られなかった。

ロ) エタノール不溶分の分画の動物実験結果
 結果は Table 6 に示した。



1. ウサギ: Fr-H 450 mg/animal 投与前

2. ウサギ: Fr-H 450 mg/animal 投与3時間後
瞬膜, 結膜, 虹彩大環及びその放射動脈の強い充血を認める。

3. イヌ: Fr-H 1350 mg/animal 投与前

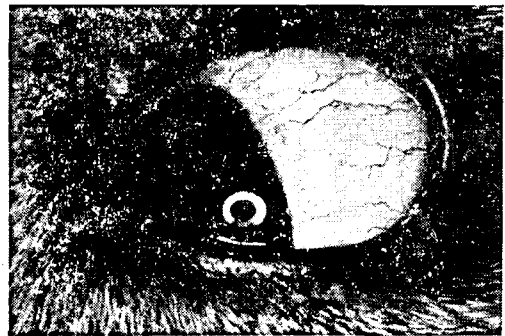
4. イヌ: Fr-H 1350 mg/animal 投与3時間後
結膜の強い充血を認める。

Photo 1. Fr-H 投与による眼症状

低分子量分画 (Fr-L) は透析器10本分でも不活性であったが, 高分子量分画 (Fr-H) は再現性よく強い充血を示した。そこで, Fr-H の投与量を調べて実験した結果, 明らかな用量-反応関係が認められた。更に, 1350 mg の Fr-H をイヌに静注 (135 mg/kg) したところ, 明瞭な結膜の充血を示し, この症状は48時間以上持続した。

なお, ウサギ及びイヌの典型的な眼の症状を Photo 1 に示した。

2.4 各分画の化学組成

1) エタノール可溶部について

Fr-IV はエタノール可溶分画中で最も多量であり, 淡黄色の粘ちょうな液体である。IR スペクトルによりグリセリンであることが分った。無水酢酸-硫酸によってアセチル化した後, ガスクロマトグラフィー (3% SE-30, 1.5 m, Col. Temp. 90°, N₂ 20 ml/min) によってグリセリンをアセテートとして確認すると同時にエチレングリコールのアセテートも確認した (Fig. 5)。その量はグリセリン中に 1000 ppm 程度と

考えられた。その他に, 微量の成分が共存するかもしれないが, この分画は活性がないので深く追求しなかった。エチレングリコールは滅菌に使用した EO から生成したものと思われる。

Fr-V は淡黄色粉末である。IR 及び NMR スペクトルはそれぞれ Fig. 6 及び Fig. 7 の通りであり, ウレタン化合物であることが考えられた。グリセリンと 4,4'-ジフェニルメタンジイソシアネート (MDI) より合成した MDI-グリセリン付加物の IR スペクトルは Fr-V のそれと一致した。また, 二種の分離モード [センシューパック N-5C8 (逆相) 及びセンシューパック DIOL (GPC)] による液体クロマトグラフィーでもクロマトグラムは合成品と一致した。Fig. 8 に逆相の HPLC クロマトグラムを示した。Fig. 9 に示すように, UV スペクトルも合成品と一致した。以上の事実よりこの Fr-V は MDI-グリセリン付加物であることがわかった。

Fr II-E は, シリコン樹脂とウレタン化合物らしいものが含まれていることが分った。しかし, 量的に

は極微量であり、活性もないので詳しくは述べない。

Fr II-W の IR スペクトルは Fig. 10 の通りであり、CA のそれとよく似ている。このものの FD-MS スペクトルは m/z 412 と 538 に強いピークを示した

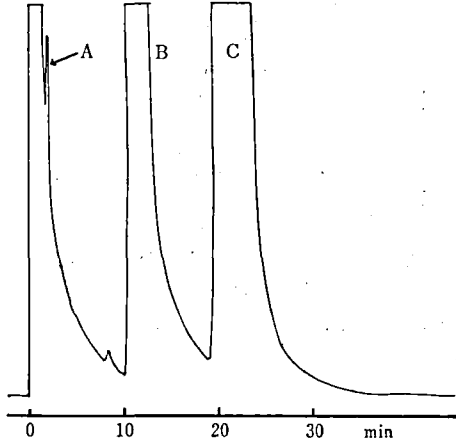


Fig. 5. Gas Chromatogram of Acetylated Fr-IV

GLC conditions:

3% SE-30 on Gas Chrom Q (80-100 mesh)
1.5 m × 3 mm i. d.

Col. Temp. 90°

nitrogen flow rate; 20 ml/min

Acetylation Condition:

0.1 g sample + 0.6 ml acetic anhydride

+ 0.3 ml sulfuric acid, 90°, 5 hr

peak A... ethyleneglycol diacetate

peak B... glycerol diacetate

peak C... glycerol triacetate

(Fig. 11). ヘキソース又はベントースを母体とする糖の誘導体で、アセチル基がつき、一部がカルボン酸、アルデヒド又はケトンに酸化される可能性を考慮して上の分子量に合致する構造を考えると、次の数種類のみに限定された。

m/z 412

a) ヘキソースのジサッカライドの場合の構造:

イ) アセチル基 1 個, 6 位-COOH 1 個, 1 位-COOH 1 個, カルボニル 1 個; ロ) アセチル基 1 個, 6 位-COOH 2 個

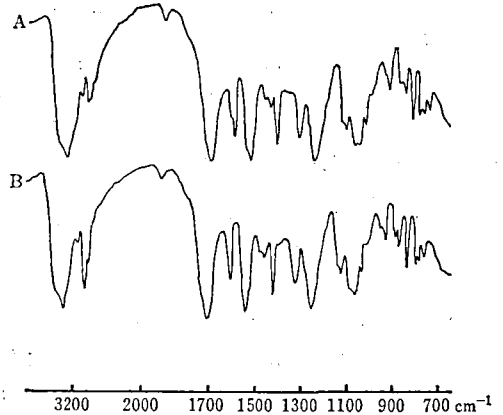


Fig. 6. Infrared Spectra of Fr-V and Authentic MDI-Glycerol Adduct

A: Fr-V

B: authentic MDI-Glycerol (MID-G)

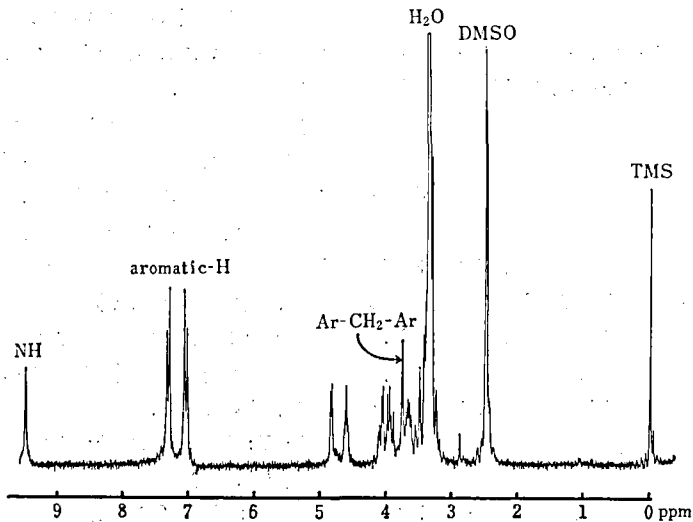


Fig. 7. Proton Magnetic Resonance Spectrum of Fr-V

solvent: DMSO- d_6

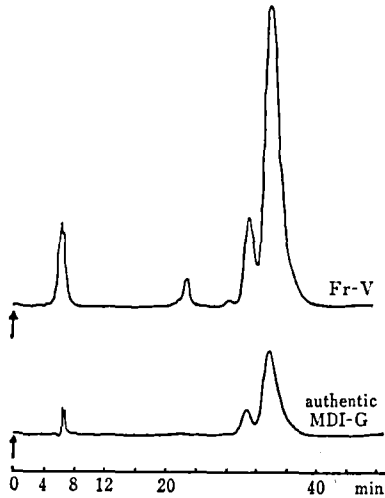


Fig. 8. High Performance Gel Permeation Chromatograms of Fr-V and Authentic MDI-G

conditions: SENSHU-PAK DIOL (30 cm 1., 8 mm i. d.)

Mobile Phase; water (0.9 ml/min)

Detection; UV 245 nm)

b) ヘキソースとペントースのジサッカライドの場合の構造: イ) アセチル基 2 個, 1 位 -COOH 1 個

c) ペントースのトリサッカライドの場合の構造: イ) アセチル基なし, COOH なし, カルボニル 1 個 m/z 538

a) ヘキソースのジサッカライドの場合の構造: イ) アセチル基 4 個, 6 位 -COOH 1 個, 1 位 -COOH 1 個, カルボニル 1 個; ロ) アセチル基 4 個, 6 位 -COOH 2 個

b) ヘキソース 1 個とペントース 1 個のジサッカライドの場合の構造: イ) アセチル基 5 個, 1 位 -COOH 1 個

c) ペントースのトリサッカライドの場合の構造: イ) アセチル基 3 個, COOH なし, カルボニル 1 個

このように、カルボン酸やアルデヒド又はケトン等の酸化された基とアセチル基を導入すると、観測された分子量を糖の誘導体として説明することができた。以上に加え、アンスロン法¹⁰⁾で青色を呈すること、UV スペクトルは 200 nm 以上に吸収極大のないことも、Fr II-W が糖の誘導体であるとするのと矛盾しない。

Fr II-DC は IR スペクトル, NMR スペクトル, マススペクトル (EI) より PPG の構造が考えられた (Fig. 12, 13, 14)。更に, Fr II-DC は Fig. 15 のガ

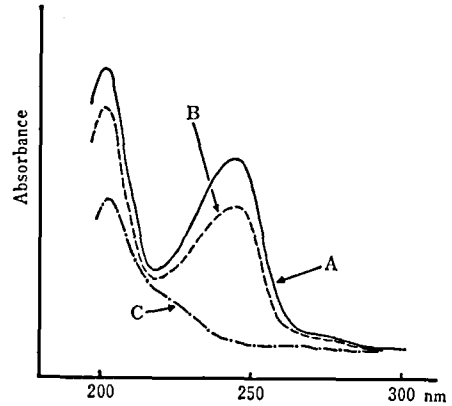


Fig. 9. UV Spectra of Authentic MDI-G, Fr-V and the Extract from Cordis-Dow Dialyzer

A: authentic MDI-G B: Fr-V

C: extract from Cordis-Dow dialyzer

スクロマトグラムに示すように、重合度 $n=3-7$ の PPG と保持時間が一致した。LH-20 によるゲルろ過法で、種々の重合度の異なる PPG を標準として平均分子量を測定したところ、約 275 であった。また、Fr II-DC を 50% 臭化水素酸-酢酸と封管中 150°, 3 時間加熱したところ、プロピレンジプロマイドの生成が確認された (Fig. 16)。以上の事実より、Fr II-DC は PPG であることが明らかとなった。メーカー側もほとんど同時に PPG を検出し、それがグリセリン中の不純物であることを当所へ示唆した。我々も、別項で述べる方法で透析器に塗布されたグリセリン中の PPG を定量することができた。ただし、全体の GLC パターンは市販 PPG のいずれにも一致せず、どうしてグリセリンにこのような PPG が存在したのかは未だに不明である。

以上、Fr-II について述べてきたが、Fr-III の成分も同様にして調べたところ、Fr-II とほとんど同じ成分が含まれていることが分った。しかし、Fr-II の成分に加えてグリセリンが混じっていた。Fr-II 及び Fr-III について主成分を定量した結果を以下に示す。なお、定量法は 2.5.イ) で述べるように、PPG はガスクロマト法、ウレタン系化合物は UV 吸収法、糖質はデンプンを標準物質としてアンスロン法によって定量したものである。

Fr-II: PPG (42.5%); ウレタン誘導体 (0.8%); 糖質 (57.3%)

Fr-III: PPG (23.1%); ウレタン誘導体 (2.5%); 糖質 (36.0%)

残りは、グリセリンである。

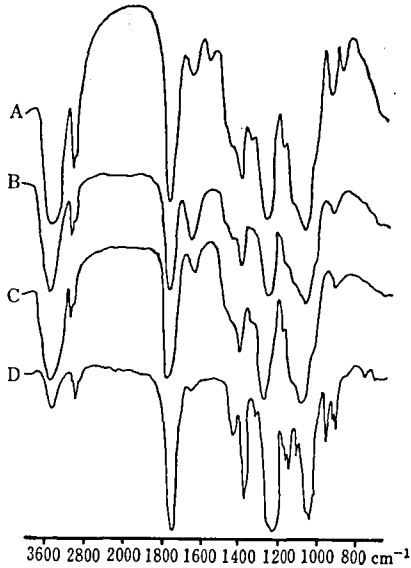


Fig. 10. Infrared Spectra of Various Fractions

A: Fr II-W B: Fr-H
C: Fr-I D: cellulose triacetate

なお、Fr-I は IR スペクトルが CA と良く似ていること (Fig. 10)、アンスロン法で青色を呈することにより、やはりアセチル化糖質が主体と考えられる。

2) エタノール不溶部、特に Fr-H の化学的性質について

Fr-L は IR スペクトル及びガスクロマトグラム、FD-MSによって、グリセリンであることが分った (スペクトル等は省略する)。ろ別とエタノールによる洗浄だけでは完全には分離できずに、沈殿部に混入してきたものである。なお、Fr-L はアンスロン法でかすかに青色を呈するので、少量の糖質も含まれていると思われる。

Fr-H の IR スペクトルは Fr-I 及び Fr II-W とおなじく、CA と良く似ている (Fig. 10)。NMR スペクトル (Fig. 17) は、1.8~2.2 ppm にアセチル基のシグナル、2.8~5.5 ppm に糖の CH のシグナルが見られるが、アルキル基やベンゼン環のシグナルは見られず、アセチル化された糖質 (AC) と解釈される。なお、C-13-NMR スペクトルでも、アセチル基と糖のシグナル以外は観測されなかった。Fr-H はアンスロン法で吸収極大 620 nm の青色を呈した。デンプンやコットン・リントー由来のセルロースアセテートはヘキソースのみから構成されており、アンスロン法による至適加熱時間は 7~10 分であるが、Fr-H の場合は約 2 分ですぐ強く呈色したのち急速に退色し、再

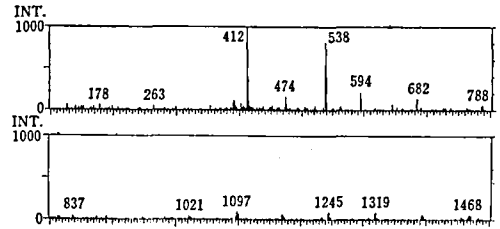


Fig. 11. FD Mass Spectrum of Fr II-W

び約 10 分で吸光度を増す、という挙動が見られた (Fig. 18)。ペントースであるキシロースのアンスロン試薬による至適加熱時間は約 2 分であったので、Fr-H はペントースとヘキソースの混じった多糖類と考えられた。そこで、Fr-H を 2N-硫酸で 5 時間加水分解したのちに水酸化バリウムで中和し、常法にしたがって¹¹⁾糖の組成を調べたところ、本分画はキシロースとグルコースからなり、その比は 2.3:1 であることが分った。この結果はアンスロン法による推定を良く裏づけるものである。一方、カルバゾール法¹²⁾で Fr-H は紫色を呈するのでウロン酸の部分構造の存在が示唆されるが、キシロースがプラスの妨害を与えるので正確な定量はできなかった。なお、このものを水に溶かして振りまぜると激しい泡立ちを示した。1.1 で述べた“泡立ち物質”が弱酸性物質であるということは、ウロン酸の部分構造によるものとして説明できよう。また、アセチル化された多糖類が水に溶けるためには、やはりウロン酸あるいはその塩などの構造が必要と思われる。しかし、確証はない。FAB-MS スペクトルでは m/z 3000 以下にピークは見られず、分子量はかなり大きいものと推定された。Fr-H は当然ながら純粋なものではない。現在、更に詳細な検討中であるが、以上の事実、特に、キシロースが多いということから、“Fr-H は、中空糸の原料セルロースとして使用した木材パルプ中のヘミセルロースの一種であるキシラン¹³⁾に由来したものである”と考えている。

2.5 NAC 透析器の製造時期による差異、及び他社の同種製品との比較

— 溶出物に差はあるか? —

このようにして、40%エタノール還流抽出物中には、グリセリン、ポリプロピレングリコール (PPG)、アセチル化糖質 (AC)、ウレタン誘導体、主に MDI-グリセリン付加体 (MDI-G) が含まれていることが分った。これらの物質は中空糸及び中空糸支持体であるポリウレタン部分 (それらはいずれも血液と接触する面積が大きく、かつ比較的軟らかい素材である) からの溶出物である。

発症の経緯で述べたように、この事件のような透析器による眼の障害の発症率は NAC-昭和57年製品 > NAC-昭和56年製品 >> 同種他社製品の順であった。では、これらの製品の間に溶出物の差はあるのだろうか。その点を明らかにするために、次に40%エタノール還流抽出液中の上記物質の定量を実施した。

イ) 定量法

動物実験のための試料を調整する時、2.3 の冒頭にも述べたように、10本の透析器からの抽出物をワンセットとして処理したが、その時に得られた抽出液 500 ml のうち 5 ml を保存しておき、これを分析用の試料とした。

1) グリセリン

抽出液からエタノールを留去した残留物の重量から、PPG, AC, MDI-G の定量値を差し引いてグリセリンの量とした。

2) MDI-G

試料の一部をエタノールで25倍に希釈し、245 nm

の吸光度を測定した。その吸光度と合成した MDI-G の吸光度を比較して、抽出液中の MDI-G の量を算出した。なお、合成 MDI-G 溶液の吸光度 1.0 は 11.29 ppm に相当する。

3) PPG

PPG はプロピレンオキシドの重合物であって、その平均分子量(重合度)の違いで PPG 200, 400, 750, 及び 1000 などが使われている。重合度が大きい場合の分析は GPC によらねばならないが、PPG 750 までなら次の2種の条件によるガスクロマトグラフィーによって定性、定量が可能であった(検出器: FID)。

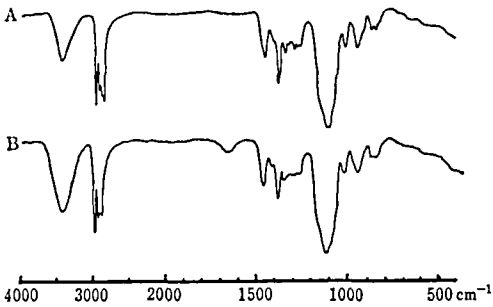


Fig. 12. Infrared Spectra of PPG-400 and Fr II-DC
A: PPG-400 B: Fr II-DC

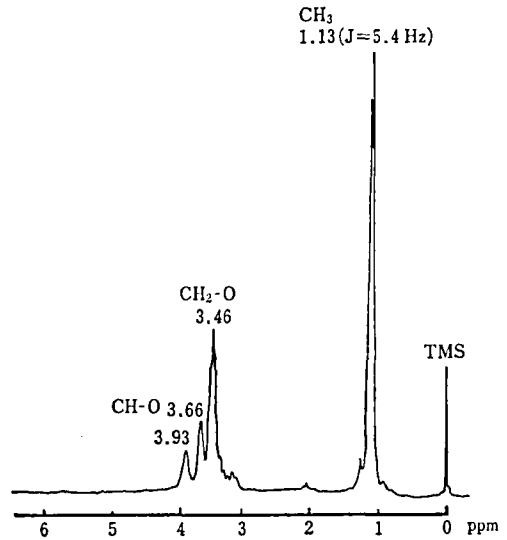


Fig. 13. Proton Magnetic Resonance Spectrum of Fr II-DC

When irradiated at 3.16 or 3.93 ppm, the doublet at 1.13 ppm changed to singlet.

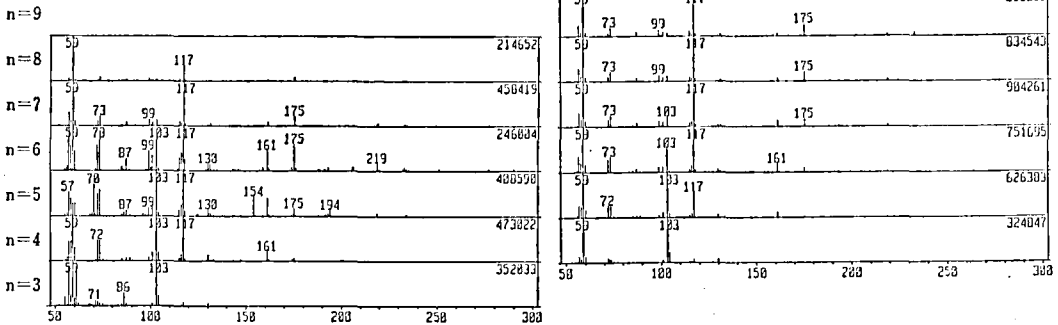


Fig. 14. Mass Spectra of PPG-400 and Fr II-DC
left: Fr II-DC right: PPG-400

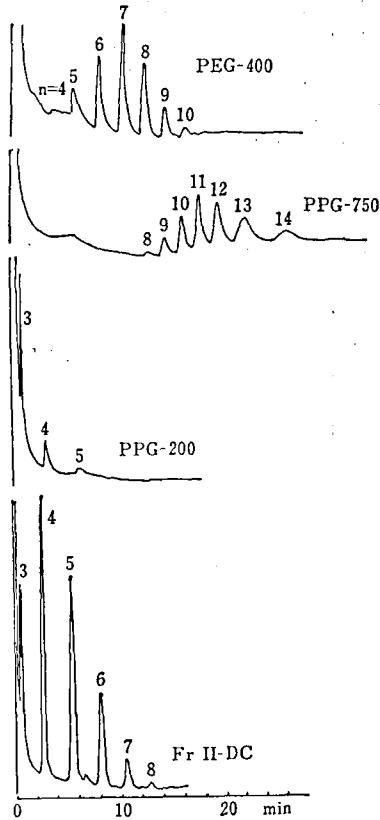


Fig. 15. Gas Chromatograms of Fr II-DC and PPGs of Various Polymerization Numbers

- 条件 i) 3% OV-1 on Gas Chrom Q
(80~100 mesh) 30 cm × 3 mm i. d. col.
temp.: 100~275° (10°/min) carrier gas
(N₂); 60 ml/min
- 条件 ii) 15% OV-1 on Gas Chrom Q
(80~100 mesh) 50 cm × 3 mm i. d. col.
temp.: 100~275° (15°/min) carrier gas
(N₂); 60 ml/min

Fig. 15 に示したように、透析器から得られた PPG (Fr II-DC) のピークひとつひとつの位置は重合度 3~7 の PPG に一致したが、パターンは市販 PPG のどれとも一致しなかったので、Fr II-DC を標準物質として定量することとした。重合度 4~7 のピークの総面積和で書いた検量線は Fig. 19 の如くに原点を通る直線となった。

40%エタノール抽出液をエバポレータで留去した後、水に溶かしジクロロメタンで抽出し、一定量にメスアップしてガスクロマトグラフィーで定量した。

4) アセチル化糖質 (AC)

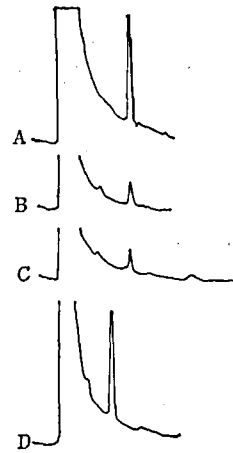


Fig. 16. Gas Chromatograms of Propylenedibromide, Ethylenedibromide and Degradation Product of Fr II-DC with HBr-Acetic Acid at 150°

- A: propylenedibromide
B: degradation product of PPG-400
C: degradation product of Fr II-DC
D: ethylenedibromide

GLC condition:

15% DC-550 on Chromosorb W-AW-HMDS
2.0 m × 3 mm i. d.
col. temp. 90°
carrier gas flow rate: 40 ml/min

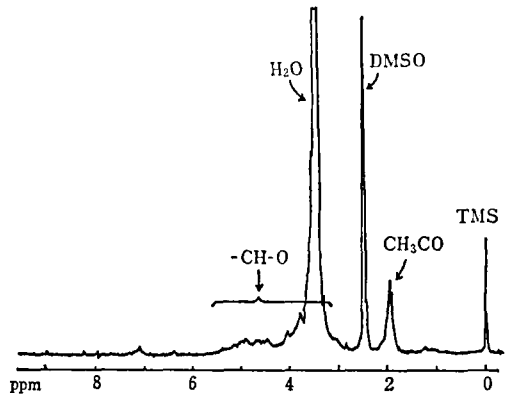


Fig. 17. Proton Magnetic Resonance Spectrum of Fr-H

試料 2 ml をとり、水で 50 ml とし、この 1 ml をとって氷冷、かくはん下にアンスロン試液 6 ml を加え、一定時間沸騰水浴中で加熱した後、ただちに氷水で冷した。別に 1 ml の水にアンスロン試液 6 ml を加え、同様に処理したものを対照液として、620 nm で比色定量した。2.4 2) で述べたように、アンスロ

ン法による糖類の呈色の至適加熱時間はヘキソースとペントースで異なったので、ヘキソースの定量にはデンプンを標準として加熱時間10分、ペントースの定量にはキシロースを標準として加熱時間2分とした。検量線は原点を通る直線となった。

ロ) 定量結果

Table 7 に定量結果を示した。“NAC-昭和57年製品”は昭和57年1, 2月製造のものであり、これについて13回の実験(すなわち, 130本の透析器を使用)

をくりかえした。“NAC-昭和56年製品”は昭和56年9, 10月製造のもので、これについては8回の実験をくりかえした。なお、対照の製品としては Cordis-Dow4000 10本、一セットを用いた。この製品は、セルロースアセテート中空糸(セルロースの原料はコットンリントナー)を使用しているもので、今までに眼障害事故の報告はない。

グリセリン量は(C)に多かった。PPGは(A)のみ

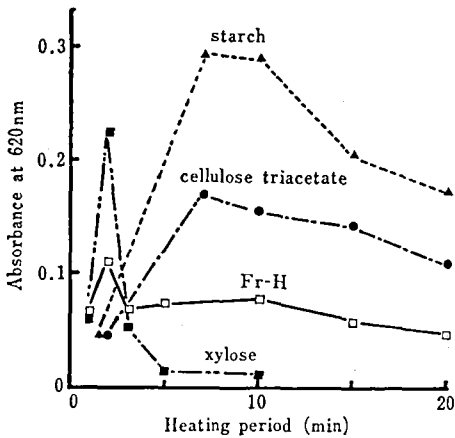


Fig. 18. Effect of Heating Period on Color Development: 30ppm solution of each compound was used.

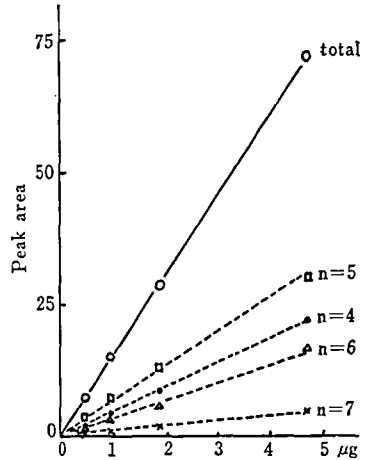


Fig. 19. Calibration Plot for Fr II-DC
n: number of polymerization; See also Fig. 15

Table 7. 透析器10本からの抽出物中の各成分量

物質	(A) NAC-57年製	(B) NAC-56年製	(C) Cordis-Dow 4000
グリセリン (g)	7-9	7-9	29
PPG (mg)	7.7-9.9	検出せず	検出せず
MDI-G			
n	13	8	1
平均 (mg)	100.6	111.7	検出せず
標準偏差	26.0	28.3	
AC			
n	13	8	1
a) ペントース			
平均 (mg)	203.8	114.8	検出せず
標準偏差	25.8	11.5	
b) ヘキソース			
平均 (mg)	157.0	122.8	検出せず
標準偏差	16.4	16.1	
Fr-H			
n	2	2	1
収量 (mg)	306, 323	160, 110	なし
Xyl : Glu	2.3 : 1	1.6 : 1	

Table 8. 使用原材料などの投与結果

動物	No.	物質名	投与量 (mg/animal)	判定	充 血 時 間														
					0	1	2	3	4	5	6	7	24						
ウサギ	1	グリセリン	6000	C															
"	2	MDI-G + グリセリン	20+5000	C															
"	3	"	20+5000	C															
"	4	"	40+5000	C															
"	5	"	40+5000	C															
"	6	流動パラフィン	9	D															
"	7	"	78	D															
"	8	PPG-400	5	D															
"	9	"	12	C															
"	10	"	31	C															
"	11	"	32	C															
"	12	"	40	C															
"	13	"	49	B															
イ ス	14	"	100	D															
"	15	"	100×5日間	D															
"	16	"	200	D															
ウサギ	17	ポリウレタン硬化剤(EDTP)	33	D															
"	18	トリメチロールプロパン(TMP)	31	C															
"	19	"	60	D															
"	20	"	100	C															
"	21	ポリウレタン原料 N-4224	30	C															
"	22	"	30	B															
"	23	"	29	C															
"	24	"	60	C															
"	25	"	100	B															
"	26	リシノール酸	31	D															
"	27	TMP-MDI 付加物	3.5	C															
"	28	PPG-MDI 付加物	81(μ g)	C															
"	29	ポリウレタン部エタノール抽出物																	
"		分画Q-I	21	B															
"	30	分画Q-II	22	C															
"	31	分画Q-III	25	B															
"	32	分画Q-IV	10	C															

から検出された。MDI-G については(A)と(B)の間には有意差はなく、(C)からは検出されなかった。Fr-H の収量は(A)が(B)の約2倍であったが、(C)からは取れなかった。AC については、ペントースもヘキソースも、(A)が(B)より有意に(危険率1%)定量値が大であり、その差はペントースの方が大きかった。(C)については、AC の量は定量限界以下であった。ガスクロマト法¹³⁾で測定して得た Fr-H のキシロースとグルコースの比も(A)の方が(B)より大であり、アンスロン法による結果とよく符合する。なお、平均値の差の検定は文献 4), p.18 にしたがった。

3. その他の関連化学物質に関する検討

3.1 ポリウレタン接着部分(中空糸支持体)につ

いて

2.5 で述べたように、NAC 透析器からの溶出物中のウレタン系化合物の量は、Cordis-Dow 透析器に比べて異常に多かった。そこで、透析器の両端の接着部分を電動鋸で切断して取りだし、NAC 透析器と Cordis-Dow を含む他社の透析器を比較観察した。NAC 透析器の接着部分は、その製造時期と関係なしに軟らかく湿潤状態を呈していた。他方、他の製品では、硬く光沢があり、すべすべしていた。この切り出した接着部分を約 1 cm 角の細片とし、40° の水で抽出したのち抽出液を減圧濃縮した。NAC 透析器からの抽出液は 245 nm に吸収極大を示したのに対し、他社の透析器ではこの極大は全くみられなかった。この

245 nm の吸収がすべて MDI-G によるものと仮定して計算すると、NAC 透析器 2 本分の接着部からは約 15~20 mg の MDI-G が水で溶出されたことになる。

NAC のポリウレタン系接着剤は、本来 MDI と改質ヒマン油との間で硬化反応を起すべきものであるが、この場合、中空糸に塗布されたグリセリンと MDI の反応も起っており、その重合度が低いために溶出したことが明らかである。Cordis-Dow 透析器は NAC 透析器以上に多量のグリセリンが塗布されているにもかかわらず、ウレタン系化合物の溶出がなかったことから、NAC 透析器の接着部の硬化条件が不適当であったといえよう。

3.2 使用原材料などによる眼症状

中空糸及び中空糸支持体で使用された化学物質と、透析器組立の時に生成する可能性のある物質についての動物実験結果を Table 8 に示した。

No. 17-26 は中空糸支持体のポリウレタン原料であり、No. 27 と No. 28 は MDI と他のポリオール成分 (PPG, TMP) との反応物である。これらは NAC 透析器の中空糸支持体メーカーである日本ポリウレタン工業㈱から入手したものである。No. 27, 28 は水に極めて溶けにくく、これ以上用量を高めることはできなかった。(実際の透析の際も、これらがあっても溶出は極めて少ないと思われる。) No. 29~32 は中空糸支持体部分を切り出し、小片に刻んだのち、室温でエタノール抽出し、それを LH-20 で分画したものである。透析器からの抽出物の分画、Fr-I から Fr-III には、No. 29~32 が混在する可能性があるので実験したものである。

これらの物質は記載した投与量の範囲では、一部に B の判定を示すものがあるものの、Fr-H などにみられるような顕著な反応は観察されなかった。

考 察

—原因物質はなにか?—

発症の経緯で述べたように、透析時の発症率は NAC-昭和57年製品 > NAC-昭和56年製品 >>> 他社製品の順に高かった。このことを考慮しながら、2 章の実験結果を基にして考察する。

NAC-昭和57年製品の10本分の40%エタノール抽出物の動物実験の判定は A であった。また、5本分では A 又は B であった。この実験の再現性は良かったので、異なる5ないし10本の透析器で原因物質の量が大きく異なることはない、といえる。

この抽出物中には、グリセリン、PPG、ウレタン系化合物、アセチル化糖質が存在することが分かったが、

各成分単独でこの活性は説明可能だろうか。また、製品による発症率の差を説明できるだろうか。

グリセリンが障害と無関係なことは、イ) Cordis-Dow 製品のグリセリン塗布量が NAC の3倍近いにもかかわらず事故の報告の無いこと、ロ) グリセリン 6g の投与では判定は C であったこと、から明らかである。

PPG は、特に NAC-昭和57年製品のみから見い出された。これを主要原因物質とすると NAC-昭和56年製品でも事故の起っていることを説明できない。また、Table 8 に示したように、PPG-400 をイヌの場合には 200 mg、ウサギの場合には 40 mg を単独投与しても眼の症状を示さず、ウサギの場合に 49 mg を投与した時に B の判定が得られたが、10本中の PPG 量は約 8~10 mg (Table 6) であることを考慮すれば、PPG が原因物質とは考えられない。

ウレタン系化合物も次の事実から主な原因物質とは考えられない。すなわち、イ) 透析器 6 本の 40% エタノール抽出液から分離した Fr-V の判定は C であった (Table 5, No. 20)、ロ) MDI-G の定量値は NAC-昭和57年製品と NAC-昭和56年製品との間に差がなく、両者による発症率の差を説明できない。ただし、MDI-G 単品は生理食塩液 30 ml に約 20 mg しか溶解せず、均一な分散状態でも 60 mg 以上の投与は無理であったので (Table 5, No. 20 判定 C)、10本分の抽出液中の定量値に相当する量 (約 100 mg) を投与した場合にどうかは不明である。MDI-G が副次的役割を演じた可能性は否定することはできなかった。

ポリウレタン原料 N-4224 の投与実験 (Table 8, No. 22, 25) で B の判定が得られたことがあるが、透析器からの 40% エタノール抽出物中にはこのものは見出されなかったので N-4224 は原因物質ではない。

Fr-H を含むアセチル化ヘミセルロースが以下の理由から主原因と考えられる。

イ) 分画の動物実験では、糖質を含む分画 (Fr-H, Fr-I, Fr-II, Fr-III, Fr II-M, Fr II-W) のみが活性を示した。

ロ) Fr-H は家兎に虹彩炎様の充血を示し、その反応には用量-反応関係が見られた (5本分で B, 10本分で A の結果で、これだけでも 40% エタノール抽出物の実験結果を説明できる。)

ハ) Fr-H は犬で強膜炎とよく似た結膜の充血を示した。

ニ) Fr-H の量及びアンスロン法による糖質の定量値は、NAC-昭和57年製品が NAC-昭和56年製品に比べて有意に多く、同種の製品である Cordis-Dow 製

品からは検出されない、という事実は発症率の違いをよく説明できる。

ホ) 洗浄液量に反比例して発症率が減少したことも、比較的水に溶けやすい糖質を原因とすれば説明がつく。

なお、Fr II-W は Fr-H とよく似た低分子量のアセチル化糖質であることは 2.4 で述べた通りである。この両者に共通した糖のユニットがあり、それが活性の本体であろうと考えているが、解明に至っていない。

Fr-I から Fr-III の動物実験結果の再現性が Fr-H に比べて悪いのは、エタノールで沈殿させる分離操作がすっきりしたものではないために、Fr-I から Fr-III の組成がばらばらしているものと思われる。

NAC 委員会は中空糸のメーカーである東洋紡の協力を得て我々が検出した抽出、分画手法で原因究明をし、その結果を報告している^{3,4)}。それによると、次の事実をもとにして“MDI とセルロースアセテートのオリゴマーの反応生成物が原因”と結論づけている。

1) 40%エタノール還流抽出物が家兔の眼に症状を呈した。(我々の結果と一致)

2) その抽出物の分画のうち、LH-20 による分画 5, 6 (我々の場合の Fr-II, III に相当) が比較的頻度高く活性を示した。(我々の結果と一致) なお、NAC 委員会はエタノール不溶部については全く検討していない。

3) 接着部を切出し、細切して40%エタノールにより 50° で抽出したものが活性を示すので、この抽出物を LH-20 で分画し、その分画を家兔に投与したところ、その分画番号 5, 6 (上の分画 5, 6 の溶出位置より遅い) が 6 回の実験で 3 回プラスの結果を与えた。この分画 5, 6 はウレタン系化合物である。

4) 透析器に組み立てる前の中空糸を水抽出した液を家兔に投与 (約 25 mg/kg の糖質に相当) したが、活性を示さなかった。したがって、中空糸からの溶出物は原因と関係がない。

5) MDI-G を家兔に 23 mg/kg 投与したが、活性を示さなかった。(我々の結果と一致) したがって、MDI-G は単独では活性をしめさない、と考える。

6) 4) で得た糖質 (CA オリゴマーと称している) と MDI とを反応させて得たものを投与したところ、それほど頻度は高くないが数匹が眼の症状を呈した。この事実から 3) の事実は説明できる。

以上のほぼ 6 点である。

我々は、この結論は誤っていると考える。その理由は次の通りである。

a) 3) の実験方法より 1) の方法の方が実際の透析

により近いから、1) の事実を重視すべきである。

b) 我々の実験では、Table 8 の No. 29~32 が上記の 3) と類似したものである。しかし、この事実と 6) によって Fr-II (NAC 委員会では分画 5, 6) の活性を説明することは無理である。なぜなら、我々の実験では、10本分の Fr-II の量は 15~25 mg であり、その僅かに 0.8% (0.12~0.2 mg) がウレタン誘導体であった。No. 29~32 の実験結果からは、この程度の量で活性を呈するとは考えられない。また、我々の場合の Fr-II (NAC 委員会では分画 5) の活性物質は糖質 (Fr II-W) であって、ウレタン系化合物ではない。

c) 1), 2) の事実及び、我々の得た Fr-H の活性を 6) によって説明することは出来ない。

d) Fr-H 20 mg/kg の投与のとき判定 C であったという我々の実験結果から見て、4) の実験は投与量が少ないので、反応が出ないのは当然である。この事実のみから、中空糸からの溶出物を除外すべきではない。

e) 6) で合成したものを透析器の 40%エタノール抽出物中に証明していない。

NAC 透析器からの糖質の溶出が多いのは原料に木材パルプ由来の酢酸セルロースを使用したためと考えられる。昭和56年製品より昭和57年製品でその量が多い理由は不明であるが、56年製品で中空糸の腰が弱かったため、製法を変えたこととなんらかの関係がある。

PPG は眼障害の原因物質ではないが、犬に静注 (PPG-400, 20 mg/kg) したとき、ケイレン、よだれを流す、震える、などの中枢神経系に作用したと思われる症状を呈したことは注目すべきである。Shideman らは既に種々の重合度の PPG で同様の実験結果を報告しており¹⁵⁾、注意が必要である。

眼障害の主原因ではないことが明らかなウレタン系化合物も、眼以外に対する毒性は明らかではないので軽視はできない。溶出を極力少なくする必要があり、承認基準の中に“中空糸接着部分の溶出物試験”が追加設定された。

事故からの教訓、その後の対策など

今回の事故は上述のように使用した中空糸からの溶出物に起因するもので、製造承認申請書に記載されていた透析器の溶出物試験の“あわ立ち”の項に明らかに適合していなかった。もし、製造工程において品質管理を普通に行っていれば、試験結果の異常に気づき、少なくとも昭和57年製品による事故は未然に防ぐことができた筈である。

この違反に基づいて、厚生省は昭和57年11月19日、N社に対し20日間の業務停止処分を行った。更に、N社の透析器の製造販売は業務停止期間経過後も安全性が確認されるまで中止された。

これに対し、メーカー側は(1)中空糸原料として、従来の木材パルプから作った酢酸セルロースから、コットンリッターから製造した酢酸セルロースに変える、(2)中空糸の紫外線による劣化を防ぐために紫外線殺菌装置の使用を止める、(3)ポリウレタン系接着剤を改良し硬化を十分に溶出物をなくす、(4)ポリプロピレングリコールを含まないグリセリンを使用する、などの改善を行い、かつ、品質管理体制を整備して新製品を作り、臨床治験を3箇所の大学病院で実施した。その結果の報告書(昭和58年4月)には、88回の透析を行ったが眼障害は勿論のこと、その他の発熱、平衡障害など透析器に由来するとみなされる症状及び愁訴は全く観察されなかったと記されている。

このような透析器の改善に加えて、透析前に良く洗浄する必要があることを今回の事故は示している。経費節減のために極力洗浄水量を抑えたいのが医療従事者の心理であり、透析器の取り扱い説明にも500~1000 ml というようなアイマイな表現があった。今後はすべての透析器は1000 ml以上の洗浄を行うように改められた。

今回の事故発生前からも透析において生ずる副作用として吐き気、発汗、カユミ等の症状は知られていたが報文は少なく、鈴木ら¹⁶⁾はこれを補体系の活性化によるものとしていた。1982年にPopliらは¹⁷⁾、米国内イリノイ州のVeterans Administration Hospitalにおいてカプロファン中空糸透析器を使用した4人の透析患者が、透析開始後1~5分間で5回の重篤な副作用をおこしたことを報告した。これらの副作用はいずれも生命にかかわるもので、透析器の即時使用中止と救命処置によっておさめたが、1人は死亡した。この原因として、透析前の透析器の洗浄不足でなんらかの物質が残留していたものであろうと述べているが、それ以上のことは不明である。

この死亡報告から、1983年7月米国において、“血液透析における過敏症に関するシンポジウム”が開かれた。このときFDAのVillaruelは¹⁸⁾、アメリカで販売されたセルロース系中空糸型透析器10万本当り3.5件の割合で、処置が遅れると死にいたるような重篤な過敏反応が起こったという届けが出されていると述べている。この計算では週3回の透析を続けると約200人に1人が1年間に1回の割合で重篤な副作用を起こすことになる。この驚くべき事実は、透析器からの溶

出物に関して一層の追求が必要であることを示している。同様の過敏反応の厚生省への届け出はあまり見当たらないが、わが国でもかなりの症例があるものと思われる。

このシンポジウムでは、この他にPearsonは¹⁹⁾、セルロース系透析器からの溶出物のなかで分子量24000の分画がリムラス・テストで強い陽性を示したが、ウサギでは発熱しないことを述べた。その他、エチレンオキシドの残留、急性アレルギー反応の機構などの報告がなされたが、溶出物と副作用との関係は不明であるという結論であった。

Nichollsらも1981年9月から翌年3月までに、血液ろ過、血液透析、血しょう分離の処置を受けた患者15人に予期されない激しいアナフィラキシー様症状が起こったが、原因は不明と述べている²⁰⁾。

今後、これらの透析時におこる副作用の原因究明には化学者の積極的な参加が必要である。

今回、日本で初めて経験した173人という多くの患者に発症した眼障害事件の原因を当所内だけで短期間で解決できた要因は、

- (1) 事故該当製品の透析器約1000本を入手できたこと
- (2) ウサギを使って眼障害を再現できたこと
- (3) 溶出物及びその分画の分離分析の手技が揃っており、比較的多くの予算に恵まれたこと
- (4) 多人数が腹藏なく議論し協力したこと
- (5) 事故に関する資料(特に、NAC委員会のアンケート調査)の総てを見ることができたこと、であらう。

他方、この透析器の材料のメーカーのうちの1社がなかなかその成分を明らかにしない等、非協力的であったことが部分的には究明の障害になった。

本研究の担当者は以下の通りである。

化学領域：辻 楠雄、中村晃忠、新谷英晴、菊池寛、水町彰吾、鹿庭正昭、小嶋茂雄、叶多謙蔵、栗栖弘光

毒性領域：降矢 強、川崎 靖、松本清司、内藤克司

終りに、御協力いただいた当所衛生微生物部並びに薬理部、及び順天堂大学医学部中島章教授、更にFD-MSを測定された三井東圧化学(株)中央研究所齊藤純氏に対し深謝致します。

文 献

- 1) 大場琢磨、辻 楠雄、中村晃忠、新谷英晴、水町

- 彰吾, 菊池 寛, 鹿庭正昭, 小嶋茂雄, 叶多謙蔵, 川崎 靖, 降矢 強, 松本清司, 戸部満寿夫: 人工臓器, **13**, 792~795 (1984)
- 2) T. Oba, K. Tsuji, A. Nakamura, H. Shintani, S. Mizumachi, H. Kikuchi, M. Kaniwa, S. Kojima, K. Kanohta, Y. Kawasaki, T. Furuya, K. Matsumoto, and M. Tobe: *Artificial Organs*, in press.
 - 3) 越川昭三, 小暮三津子, 前川正信, 三村信英, 中村宣男, 太田和夫: NAC 副作用調査委員会報告, 1982年9月.
 - 4) カイニ乗検定は, 大崎 純: “公衆衛生における実践統計学”, p.6 (1979), 講談社サイエンティフィク, によった.
 - 5) “ディスプレイザブル透析器使用患者に発生した結膜炎様障害事故について”, 57-3-23, 薬務局監視指導課.
 - 6) 医療用具副作用症例調査報告書一副作用転帰状況の報告一, 昭和57年4月23日, 日本医工株式会社.
 - 7) 全国腎臓病患者連絡協議会: “人工透析患者・実態調査報告集”, 1982年8月
 - 8) 日本薬学会編: 衛生試験法・注解, p. 773 (1980), 金原出版.
 - 9) 大場琢磨, 辻 楠雄, 水町彰吾, 菊池 寛, 新谷英晴, 飯田和子, 目黒賢二: 医科器械学, **52**, 134 (1982)
 - 10) 阿武喜美子, 瀬野信子: 蛋白質・核酸・酵素, 別冊, “生物化学実験法 XI”, p.15 (1968), 共立出版
 - 11) 三浦義彰編: 生化学実験法・上巻, 糖質分析法 (前田昌徹, 西沢一俊), p.86 (1978), 文光堂
 - 12) 同上, p.91
 - 13) 江上不二夫, 左右田徳郎編: 多糖類化学, p.265 (1955), 共立出版
 - 14) 越川昭三, 小暮三津子, 前川正信, 三村信英, 中林宣男, 太田和夫: 人工臓器, **12**, 943~948 (1983)
 - 15) F. E. Shideman and L. Procita: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **103**, 293~305 (1951)
 - 16) 鈴木好夫, 岡崎祐子, 二瓶 宏, 三村信英: 第18回補体シンポジウム, 1981, 大津市
 - 17) S. Popli, T. S. Ing, J. T. Daugirdas A. O. Kheirbek, G. W. Viol, R. M. Vilbar, and V. C. Gandhi: *Artificial Organs*, **6**, 312 (1982)
 - 18) F. Villarroel: Symposium on Hypersensitivity in Hemodialysis, Louisville, Kentucky, 1983
 - 19) F. C. Pearson: *ibid*
 - 20) A. J. Nicholls and M. M. Platts: *British Medical J.*, **285**, 1607 (1982)

覚せい剤の微量分析に関する研究 (第3報)

メタンフェタミンを投与したサル体毛中の代謝物の検出

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 III

Detection of Amphetamines in the Hair of Monkeys treated with Methamphetamine

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

It is said the metabolic pathway of methamphetamine (MA) in the monkey is very similar to that in human being, so that our study was carried out using monkey as the test animal.

Three mg/kg of MA-HCl was administered subcutaneously to three monkeys (*Macaca irus*) 5 days continuously a week for 3 weeks and the metabolites, MA and amphetamine (A), in the hair and its washings followed up for 40 weeks after administration by gas chromatographic methods (NP-FID-GC) described in our previous report.

Hair from part of the monkey's back was removed before administration to obtain newly growing hair for this experiment. MA and A found in the newly growing hair of about 5 mm and in the old hair were compared. The largest amounts of MA and A in the newly growing hair were found at the 1st week after withdrawal as in the case of the old hair, but decreased very rapidly and had almost all disappeared within 8 weeks.

As a result of this study, it is concluded that the hair sample can be extremely valuable in diagnosing drug addicts.

(Received May 31, 1984)

覚せい剤中毒者の体液から覚せい剤及びその代謝物を検出する確実な方法を確立するため、メタンフェタミン (MA) の代謝経路がヒトに類似しているサルに塩酸メタンフェタミン (MA-HCl) 3 mg/kg を連続投与し、熱イオン化検出器付ガスクロマトグラフィー (NP-FID-GC) によりその汗、唾液、尿中への MA 及びアンフェタミン (A) の排せつ量及び排せつ持続時間等について得られた結果を報告したが¹⁾、引続きヒトにおいて体液よりもより容易に採取できるものとして毛髪が試料になり得るかどうかを検討するため、MA-HCl を長期にわたって投与したサルの体毛を試料として、MA 及び A の検出及びこれらの蓄積を追跡し、その有用性を評価することができた。

実験方法

I 実験動物

カニクイザル (*Macaca irus*) 雄, 3頭

体重: M1 4.75 kg

M2 5.30 kg

M3 4.20 kg

II 塩酸メタンフェタミンの投与及び飼育条件

投与量及び投与方法: 1日1回, 3 mg/kg を1週間に5日間連続, 皮下投与し, 2日間投与を中断する方法を3週間にわたって繰り返す (計15回)。

飼育条件: 保定せず, 平常の飼育状態とする。

動物室の室温 25±1°

湿度 55±5%

III 試料の採取方法

背部の毛を基部よりバリカンで刈り取ったもの、及びあらかじめ MA-HCl 投与前に刈っておいた部分から投与開始後に新たに伸長した毛を基部より刈り取ったものを試料とする。

IV 試料中の MA 及び A の抽出方法

体毛約 200 mg を精密に量り, 水 15 ml ずつで3回, エタノール・アセトン混液 (1:1) 15 ml ずつで2回, 毎回5分間超音波洗浄を行う。水洗液, 混液をろ別し, 毛は風乾したのち, 精密に量り, 1%塩酸 20 ml を加え, 超音波洗浄器を用いて5分間溶出を行

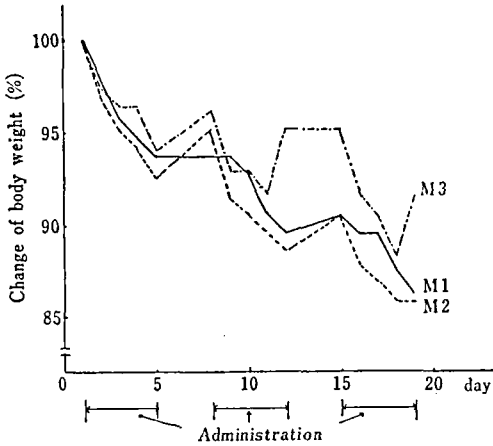


Fig. 1. Changes of body weight of M1, 2 and 3 during administration of methamphetamine hydrochloride

い、一夜放置する。溶出液をろ過し、ろ紙上の毛を水で洗い、洗液をろ液に合わせる。ろ液に6N水酸化ナトリウム液を加えてアルカリ性にし、クロロホルム10mlずつで2回抽出する。クロロホルム抽出液は毎回少量の水で洗い、氷酢酸2滴を入れたフラスコ中に入ろ過し、減圧で蒸発乾固する。

先にろ別した毛の水洗液についても6N水酸化ナトリウム液を加えてアルカリ性にしたのち、同様の方法で抽出を行う。

V ガスクロマトグラフィー

1) 溶液の調製

試料溶液：第1報²⁾に述べた方法に従い、実験方法IVで得た蒸発残留物に無水トリフルオロ酢酸(TFA)を加えてTFA化して調製する。

標準溶液：第1報²⁾

2) 測定条件

Apparatus: Yokokawa Hewlett Packard YHP 5710A

Detector: NP-FID

Column: OV-101 2% (Chromosorb W HP, 100~120 mesh), glass, ID 2 mm, L. 1.2 m

Temp.: Injection port 250°

Column 150°

Detector 300°

Carrier gas: N₂ 30 ml/min H₂ 3 ml/min

Air 60 ml/min

Sens.: 1 × 16

Digital integrator: Takeda Riken TR-2221

Slope sense 150 μV/min

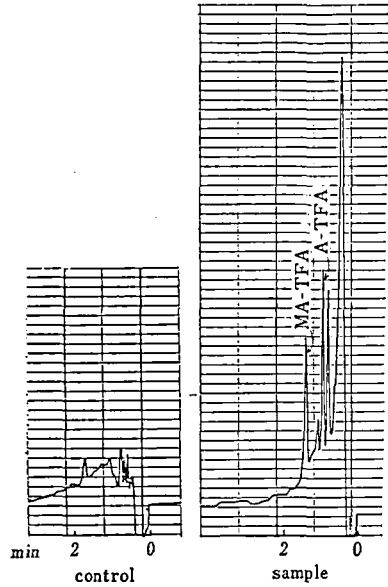


Fig. 2. Chromatograms of monkey's hair before administration (control) and after administration of methamphetamine hydrochloride (the 5th week's hair)

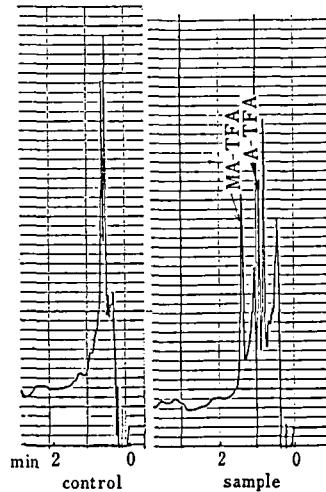


Fig. 3. Chromatograms of aqueous washings of monkey's hair before administration (control) and after administration of methamphetamine hydrochloride (5th week's hair)

Peak width 1 sec

Valley time 0

Height factor 0

3) 検量線の作成

GCによって得られるMA及びAのピーク面積を測定し検量線を得る(第1報²⁾。

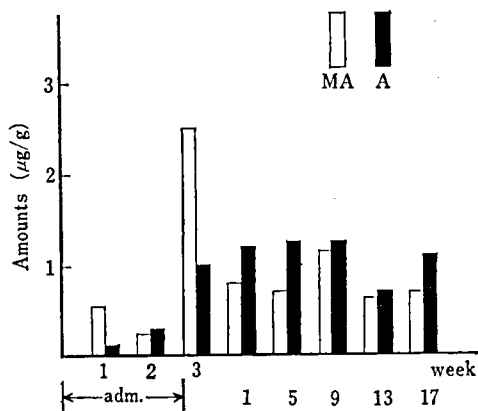


Fig. 4. Amounts of methamphetamine and amphetamine detected in 1g of monkey's hair during and after administration of methamphetamine hydrochloride

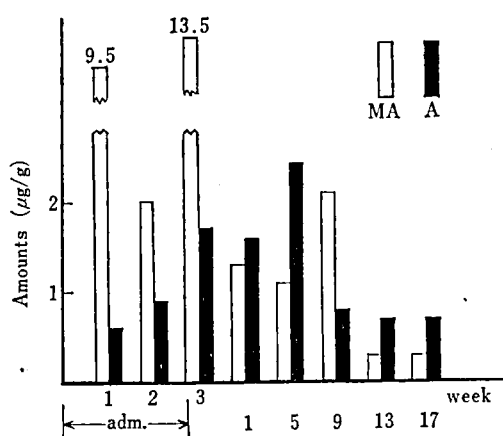


Fig. 5. Amounts of methamphetamine and amphetamine in the washings using 1g of monkey's hair during and after administration of methamphetamine hydrochloride

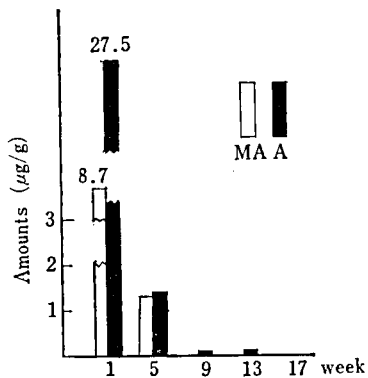


Fig. 6. Amounts of methamphetamine and amphetamine in the newly growing hair after administration of methamphetamine hydrochloride

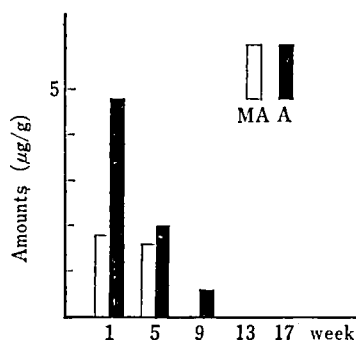


Fig. 7. Amounts of methamphetamine and amphetamine in the washings of newly growing hair after administration of methamphetamine hydrochloride

実験結果

I 塩酸メタンフェタミンの投与及び体毛の採取

実験方法II, IIIにしたがって3頭のサル, M1, M2, M3にMA-HClを投与し, 投与開始から1週間間隔で20週目まで背部の毛を毎回約600mgずつ採取した。またあらかじめ刈っておいた部分から, 4週間毎に約5mm伸長してくる毛約400mgずつを投与終了後1週目から17週目まで計5回採取した。

食欲減退作用のあるMA-HClの投与が長期にわたるとサルにおいても明らかな食欲減退がみられ, 体重に変動をきたしたので, この変動を投与前の体重100に対する変動率で表わし, 変動の傾向を観察した (Fig. 1)。

体重はいずれの場合にもMA-HCl投与により下降し, 2日間の投与中断で体重は一時上昇するが, 15回投与後の体重減少率は約8~14%であり, 減少した体重が投与前の体重に回復するのに約4週間を必要とした。

II ガスクロマトグラム

1) MA-HCl投与前採取の体毛 (Control) の場合
投与前, 基部より刈り取った体毛及びその水洗液の抽出物中にMA及びAの検出に影響を与えるピークがあるかどうかについて検討したが, Fig. 2及び3に示すように, いずれもMA及びAと同一の t_R を有するピークは認められなかった。

2) MA-HCl投与後採取の体毛 (Sample) の場合
投与後の体毛及びその水洗液のそれぞれの抽出物に

ついでに次に述べるように投与開始1週目から投与終了後17週目まで MA 及び A を検出することができたが、Fig. 2 及び 3 には投与終了後5週目の試料から得られたクロマトグラムを例示した。

III 体毛中の MA 及び A の検出量

MA-HCl を投与したサル M1, M2, M3 から採取した体毛及びその水洗液の抽出物についてそれぞれ MA 及び A の量を測定し、得られた値を Fig. 4 及び 5 に示した。

投与開始第1週目の体毛及びその水洗液いずれからも検出された MA 及び A は投与終了後17週目まで両者中に明らかに検出することができたが、40週目の試料からは両者いずれも検出されなかった。投与期間中である第1, 3週目において水洗液中の MA 量は明らかに他に比べて高い値を示した。

あらかじめ刈りとった部分から MA-HCl 投与後新たに伸長してきた毛については投与終了後1週目から4週間間隔で17週目まで採取し、前記と同様にして得た抽出物中の MA 及び A の量を測定し、その結果をそれぞれ Fig. 6 及び 7 に示した。

Fig. 6 で明らかなように体毛中の MA 及び A 量は投与終了後1週目に高く、とくに検出された A 量は MA 量の約 3.2 倍に達した。投与終了後1週目に比べて5週目になるとこれらの含量は著しく減少し、9, 13週目に至り MA は消失し、2例から検出できた A も17週目には消失した。

水洗液についても Fig. 7 に示したように毛と同様の傾向を示し MA 及び A 量は投与終了後1週目に最も多く、A 量については MA 量の約 2.6 倍であった。また9週目には A だけを検出したが、13週目以降いずれも完全に消失が確認された。

考 察

毛髪中の MA の分析については、ラットに MA-HCl を経口投与した Niwaguchi らの報告³⁾ があるが、われわれは体液の場合と同様に毛髪への覚せい剤蓄積についても、その代謝経路がヒトに類似している動物を選択することとしサルを用いて実験を行った。

今回は背部の体毛を試料としたため、平常飼育の状態下で保定によるストレス等の影響を受けることなく、MA-HCl の長期投与を行うことができたが、食欲を減退させる MA の作用が長期投与で明らかになり、体重の減少を招いた。しかしこの体重の減少は投与中止により4週後に回復しており、行った実験の範囲内ではとくに結果に影響を及ぼすものではないと思

われる。

用いたサルの背部の体毛の長さは約 45 mm であり、MA-HCl 投与開始時より1週間間隔で投与終了後17週目まで、その後40週目のものを毎回背の異なる部分から採取したが、狭い範囲内のできるだけ近い部分のものであり、部位による差はないものとした。

生えている体毛及び投与前に刈りとった部分から新たに伸長してくる体毛への MA 及び A の蓄積には明らかな差がみられた。すなわち既存の体毛を追跡した結果では MA 及び A 量及び割合が投与後1週間から17週目までほとんど変わらない (Fig. 4) のに反し、新たに伸長する毛については、投与終了後第1回目得た 5 mm の毛の中に多量の MA 及び A を検出したのち激減し、5週目には既存の第1~17週目までの体毛中のものと同様同量が認められたのちは、13週目まで毛 1 g 当たり約 100 ng の A だけが検出されたにすぎなかった。

これらの事実は覚せい剤の連続使用者については毛髪が長短にかかわらず非常に有用な試料になりうることを示し、最近になって、実際に覚せい剤中毒者の毛髪について Aoki ら⁴⁾ はエンザイムイムノアッセイにより、MA 3.1~75.4 µg/g を検出し、Ishiyama ら⁵⁾ は GC により、MA 4.8~125.9 µg/g が検出されたという報告がある。また鈴木ら⁶⁾ はマスフラグメントグラフィーにより MA 0.7~67.5 µg/g と扱った9名のうち6名から A 0.1~8.4 µg/g を検出したと述べている。

これらはいずれも可成り高い値であるが、毛髪を試料とする場合には、投与中断後の剃髪の有無を考慮に入れなければならない。

毛の水洗液、有機溶媒可溶部分については例数をふやし引続き、蓄積分との関係を検討する必要があると思われる。

文 献

- 1) 高橋一徳, 島峯望彦, 大野昌子, 川崎 靖, 関田清司, 降矢 強: 衛生試験, 101, 14 (1983)
- 2) 高橋一徳, 島峯望彦, 大野昌子, 川崎 靖, 関田清司, 降矢 強: 衛生試験, 100, 35 (1982)
- 3) T. Niwaguchi, S. Suzuki and T. Inoue: *Arch. Toxicol.*, 52, 157 (1983)
- 4) K. Aoki and Y. Kuroiwa: *J. Pharm. Dyn.*, 6, 33 (1983)
- 5) I. Ishiyama, T. Nagai and S. Toshida: *J. Forens. Sci.*, 28, 380 (1984)
- 6) 鈴木真一, 井上堯子, 安田年博, 丹羽羽徹吉, 堀均, 稲山誠一: 衛生化学, 30, 23 (1984)

Kinetics of Hydrolysis of 4-Methylumbelliferyl Tetra-N-acetyl- β -chitotetraoside by Hen Egg White Lysozyme and pH Dependence of Its Kinetic Parameters

Tsuyoshi TANIMOTO

The kinetics of hydrolysis of 4-methylumbelliferyl tetra-N-acetyl- β -chitotetraoside by hen egg white lysozyme and its pH dependence were investigated. The K_m value for the substrate was 29 μ M, and the k_{cat} value was $1.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. The pH dependence of kinetic parameters showed that the binding of the substrate perturbed two ionizable groups in the enzymes. A group of $pK=6.5$ in the free enzyme was perturbed to 6.7 in the enzyme-substrate complex, and another group of $pK=4.2$ in the free enzyme was perturbed to 3.5. The groups with $pK=6.5$ and $pK=4.2$ in the free enzyme have been identified as Glu-35 and Asp-101, respectively.

(Received May 31, 1984)

Recently, the synthesis of 4-methylumbelliferyl tetra-N-acetyl- β -chitotetraoside(4-MU-(GlcNAc)₄) (Fig. 1) and the possibility of the application of this compound in an assay of lysozyme activity were reported by Inaba *et al.*¹⁾ A new fluorometric assay method using 4-MU-(GlcNAc)₄ as a substrate was established subsequently by Tanimoto *et al.*²⁾ Lysozyme assay using 4-MU-(GlcNAc)₄ could be carried out by measuring the fluorescence intensity of 4-methylumbelliferone released from the substrate after enzymatic hydrolysis.

Meanwhile, the kinetics of hydrolysis of 4-MU-(GlcNAc)₄ by lysozyme have not yet been investigated. This paper deals with kinetic studies on the interaction of 4-MU-(GlcNAc)₄ with lysozyme.

Experimental

Materials—Lysozyme ($\times 6$ crystallized) from hen egg white was purchased from Seikagaku Kogyo Co., Ltd. 4-MU-(GlcNAc)₄ was kindly donated by Dr. Hasegawa, Fundamental Research Laboratories of Pharmacology, Green Cross Corporation.

Assay of Lysozyme Activity—The reaction mixture (3.0 ml) containing 4-MU-(GlcNAc)₄ (0.003~0.076 mM) and lysozyme (1.4×10^{-8} mol) in 0.1 M citrate buffer (pH

2.6~8.2) was incubated at 35°C. After 30 min in the case of pH 4.6~6.4, 1 hr in the case of pH 3.7~4.3 and 6.7~7.0, or 2 hr in the case of pH 2.6~3.4 and 7.3~8.2, the fluorescence intensity of 4-methylumbelliferone liberated was measured at 445 nm with excitation at 320 nm in a Hitachi 650-10S fluorescence spectrometer equipped with a Hitachi 056 recorder. A reagent blank, substituting 5 mM phosphate buffer (pH 6.2) for lysozyme solution, was processed in a similar manner. The activity of 1 mole of lysozyme was calculated according to the following equation, where F , F_0 and F_s are the fluorescence intensity obtained from enzyme solution system, reagent blank system and 1 nM 4-methylumbelliferone, respectively, and T is reaction time (min).

Lysozyme activity (nmol/min/mole of lysozyme)

$$= \frac{F - F_0}{F_s} \times \frac{3}{1000} \times \frac{1}{T} \times \frac{1}{1.4 \times 10^{-8}}$$

Determination of Kinetic Parameters—

The values of K_m and V_{max} were measured in the substrate concentration ranging from 3.66×10^{-6} M to 1.25×10^{-5} M, and they were calculated from a plot of $1/v$ vs $1/[S]$ at 6 different substrate concentrations. Under condition was $S \ll K_m$, the Michaelis-Menten equation reduces to the following equation.

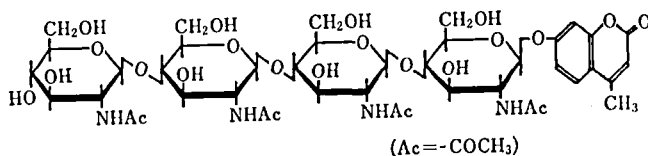


Fig. 1. Structure of 4-methylumbelliferyl tetra-N-acetyl- β -chitotetraoside

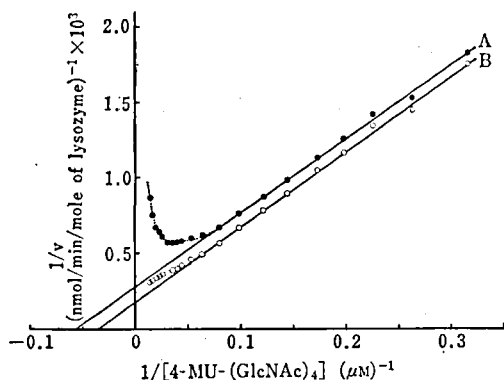


Fig. 2. Lineweaver-Burk plots of the hydrolysis of 4-MU-(GlcNAc)₄ by hen egg white lysozyme

The hydrolysis of 4-MU-(GlcNAc)₄ by lysozyme was assayed as described in "Experimental."

●: Uncorrected data; ○: corrected data.

$$v = \frac{k_{cat}}{K_m} \cdot E_0 \cdot S$$

Here k_{cat} is the overall catalytic rate constant, and E_0 and S are the enzyme and the substrate concentrations, respectively. The value of k_{cat} was calculated as V_{max}/E_0 , and pseudo-second order rate constant was calculated as k_{cat}/K_m .

Protein Concentration—The concentration of lysozyme was determined spectrophotometrically using an absorption coefficient of $A_{1\%}^{1\text{cm}} = 26.9$ at 280 nm.³⁹

Saccharide Concentration—The concentration of 4-MU-(GlcNAc)₄ was determined spectrophotometrically using mole absorption coefficient of 12.4 mM⁻¹·cm⁻¹ at 317 nm. The molar absorption coefficient was experimentally determined from the absorbance at 317 nm in water and the dry weight of 4-MU-(GlcNAc)₄.

Results and Discussion

Effect of Substrate Concentration on

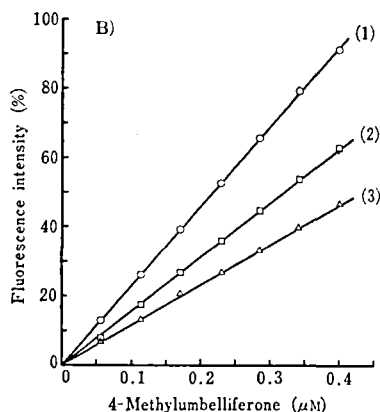
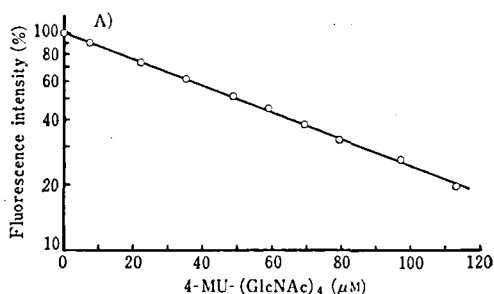


Fig. 3. Effect of 4-MU-(GlcNAc)₄ against the fluorescence intensity of 4-methylumbelliferone

A) The fluorescence intensity of 4-methylumbelliferone (62 μM) was determined at 445 nm with excitation at 320 nm in the presence of 4-MU-(GlcNAc)₄. B) The fluorescence intensity of various concentration of 4-methylumbelliferone was determined at 445 nm with excitation at 320 nm in the presence of 4-MU-(GlcNAc)₄. The concentration of 4-MU-(GlcNAc)₄ were: 1(○), 0 μM; 2(□), 28 μM; 3(Δ), 48 μM.

Lysozyme-Catalyzed Hydrolysis of 4-MU-(GlcNAc)₄

When the dependence of the observed rate of the lysozyme-catalyzed hydrolysis of 4-MU-(GlcNAc)₄ at pH 5.2 upon substrate concentration was expressed in a Lineweaver-Burk plot⁴⁰ (Fig. 2), a straight line was obtained up to

Table 1. Kinetic parameters of hen egg white lysozyme-catalyzed hydrolysis of oligosaccharides

Substrate	K_m (M)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($s^{-1}\cdot M^{-1}$)	pH	Temp.	Ref.
(GlcNAc) ₆	1.0×10^{-5}	1.5×10^{-1}	15000	5.2	40	5
(GlcNAc-MurNAc) ₃	3×10^{-5}	5×10^{-1}	17000	5.3	40	6
(GlcNAc) ₅	1×10^{-5}	3.3×10^{-2}	3300	—	—	7
4-MU-(GlcNAc) ₄	2.9×10^{-5}	1.0×10^{-4}	3.5	5.2	35	this paper
<i>p</i> -Nitrophenyl-(GlcNAc) ₃	8×10^{-4}	1.5×10^{-5}	0.019	5.1	40	8

the substrate concentration of about 1.5×10^{-5} M, indicating that the enzymatic process obeys simple Michaelis-Menten kinetics in this low concentration range. Upward curvature of the plot was observed in the substrate concentration range higher than about 3×10^{-5} M, indicating that high substrate concentration give rise to the apparent substrate inhibition (A in Fig. 2). However, this inhibition effect was not true inhibition of lysozyme activity, because the presence of high concentration of the substrate quenched significantly the fluorescence of 4-methylumbelliferone as shown in Fig. 3. Quenching effect of 4-MU-(GlcNAc)₄ was almost the same at any concentration of 4-methylumbelliferone (Fig. 3B). The 28×10^{-6} M and 48×10^{-6} M of 4-MU-(GlcNAc)₄ quenched about 30% and 50% of the fluorescence of 4-methylumbelliferone, respectively. When the found values of $1/v$ were corrected by the quenching rate of each substrate concentration, upward curvature of the uncorrected plot (A) disappeared as shown in (B) of Fig. 2. The kinetic parameters for hydrolysis of 4-MU-(GlcNAc)₄ were calculated by using the corrected data in the low substrate concentration range where the simple Michaelis-Menten equation seemed applicable. The K_m and k_{cat} value for the hydrolysis of 4-MU-(GlcNAc)₄ by hen egg white lysozyme were 2.9×10^{-5} M and $1.0 \times 10^{-4} s^{-1}$, respectively, and pseudo-second order rate constant, which is a parameter representing the "efficiency of utilization" of the substrate, was $3.5 s^{-1}\cdot M^{-1}$.

The kinetic parameters of hen egg white

lysozyme-catalyzed reaction of (1 \rightarrow 4)-linked oligosaccharide of N-acetyl-glucosamine (tri-, tetra-, penta-, and hexasaccharide) and its derivatives were summarized in Table 1. The K_m values for oligosaccharide other than trisaccharide were similar and were about 10^{-5} M. The affinity for trisaccharide was lower than that for other oligosaccharides. On the other hand, the k_{cat} values for oligosaccharides increased in the following order depending upon the sugar chain length: hexasaccharide > pentasaccharide > tetrasaccharide > trisaccharide. The value of pseudo-second order rate constant (k_{cat}/K_m) also increased in that order.

pH Dependence of the Kinetic Parameters

According to Dixon's theory,⁹⁾ pK_m -, $\log V_{max}$ - and $\log V_{max}/K_m$ -pH profiles should be composed of straight line sections which have integral slopes joined by short curved parts. In pK_m -pH profile, a bend with concaved side upwards represents the pK value of an ionizable group in a free enzyme and a bend with concaved side downwards represents the pK value of an enzyme-substrate complex. Similarly, the bends of $\log V_{max}$ - and $\log V_{max}/K_m$ -pH profiles represent pK values of an enzyme-substrate complex and a free enzyme, respectively. These results were applied to the pK_m -, $\log V_{max}$ - and $\log V_{max}/K_m$ -pH profiles of lysozyme in order to obtain the information about ionizable groups responsible for the interaction of 4-MU-(GlcNAc)₄ and active site of lysozyme.

The kinetic parameters of lysozyme for 4-MU-(GlcNAc)₄ were determined at various pH's

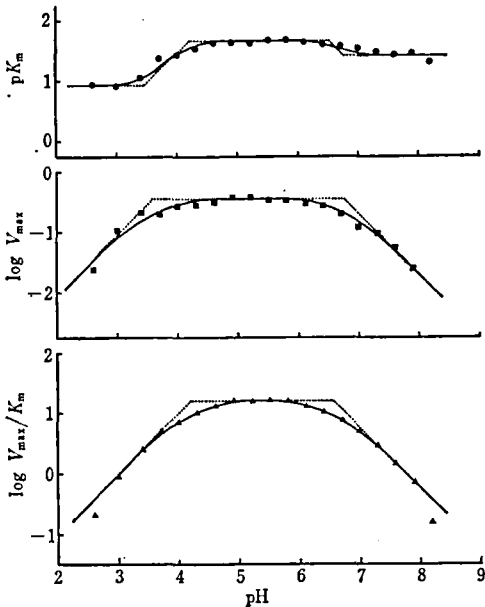


Fig. 4. Effect of pH on K_m , V_{max} and V_{max}/K_m measured with 4-MU-(GlcNAc)₄ as a substrate

The assay of the hydrolysis of 4-MU-(GlcNAc)₄ by lysozyme and determination of kinetic parameters were carried out as described in "Experimental."

from 2.6 to 8.2 at 35°C. The pH dependence of the kinetic parameters are shown in Fig. 4. When we draw straight guide line of integral slopes on pK_m -pH profile according to Dixon's theory, the bends with concaved side upwards at pH 6.5 and 4.2 and the bends with concaved side downwards at pH 6.7 and 3.4 were obtained. From $\log V_{max}$ -pH profile, the bends with concaved side upwards at pH 6.7 and 3.5 were obtained, and the bends with concaved side upwards at pH 6.5 and 4.2 were obtained from $\log V_{max}/K_m$ -pH profile. It was found from these results that the binding of 4-MU-(GlcNAc)₄ perturbed two ionizable groups in the enzyme. A group of $pK=6.5$ in the free enzyme was perturbed to 6.7 in the enzyme-substrate complex, and another group of $pK=4.2$ in the free enzyme was perturbed to 3.5. It has previously been found that a group with pK of 4.2 in a free enzyme is perturbed to 3.5 upon

binding to tri-N-acetyl-chitotriose, while another group with a $pK=5.8$ is perturbed to 6.2 upon binding to the substrate¹⁰. The group with $pK=4.2$ has been identified as Asp-101, while the group with $pK=5.8$ has been identified as Glu-35.¹⁰⁻¹² Brake *et al.*¹³ have been reported that four ionizable groups (the side chains of Glu-35, Asp-52, Asp-66 and Asp-101) are affected by saccharide binding. Imoto *et al.*⁷ have been shown that in the free enzyme Glu-35 has pK 6.0 to 6.5; Asp-52, pK 3.0 to 4.6; Asp-66, pK less than 2; and Asp-101, pK 4.2 to 4.7, and binding of saccharide raises the pK of Glu-35 by 0.3 to 0.6, lowers that of Asp-101 by 0.6 to 0.8, and has no significant effect on Asp-52. Consequently, the alkaline limb and the acidic limb of the kinetic parameters-pH profiles described in this paper should be interpretable as reflecting Glu-35 and Asp-101, respectively.

References

- 1) T. Inaba, T. Ohgushi, Y. Iga and E. Hasegawa: *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 1597 (1984)
- 2) T. Tanimoto, H. Fukuda and J. Kawamura: *Iyakuhin Kenkyu*, **15**, 942 (1984)
- 3) K. Imai, T. Takagi and T. Isemura: *J. Biochem.*, **53**, 1 (1963)
- 4) H. Lineweaver and D. Burk: *J. Am. Chem. Soc.*, **56**, 658 (1934)
- 5) S. K. Banerjee, I. Kregar, V. Truk and J. A. Rupley: *J. Biol. Chem.*, **248**, 4786 (1973)
- 6) D. M. Chipman, J. J. Pollock and N. Sharon: *J. Biol. Chem.*, **243**, 487 (1968)
- 7) T. Imoto, L. N. Johnson, A. C. T. North, D. C. Phillips and J. A. Rupley: *The Enzymes*, ed. by P. D. Boyer., **7**, 666 (1972)
- 8) T. Osawa and Y. Nakazawa: *Biochim. Biophys. Acta*, **130**, 56 (1966)
- 9) M. Dixon: *Biochem. J.*, **55**, 161 (1953)
- 10) F. W. Dahlquist, L. Jao and M. A. Raftery: *Proc. Nat. Acad. Soc. U. S.*, **56**, 26 (1966)
- 11) F. W. Dahlquist and M. A. Raftery: *Biochemistry*, **7**, 3277 (1968)
- 12) S. M. Parsons and M. A. Raftery: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **41**, 45 (1970)
- 13) C. C. F. Blake, L. N. Johnson, G. A. Mair, A. C. T. North, D. C. Phillips and V. R. Sharma: *Proc. Roy. Soc. London Biol. Sci.*, **169**, 378 (1967)

酵素製剤の品質に関する研究 (第6報)

β-ガラクトシダーゼ製剤

谷本 剛・福田秀男・川村次良

Studies on the Quality of Enzyme Preparation (VI)

β-Galactosidase Preparation

Tsuyoshi TANIMOTO, Hideo FUFUDA and Jiro KAWAMURA

β-Galactosidase preparations were investigated with a view to comparing their quality by the enzymological method. These studies were carried out on 6 kinds of commercially available β-galactosidase preparations. All of the preparations were found to contain 97~116% of the labeled amount, and were within the range of permissible content. The enzymes in all preparations had an identical pH optimum of 4.5. These enzymes were active specifically with β-D-galactoside as a substrate, and did not catalyze the hydrolysis of α-D-galactoside and β-D-glycoside other than β-D-galactoside. The K_m values of these enzymes for *o*-nitrophenyl β-D-galactopyranoside were similar and were about 1.2 mM. The K_m values of these enzymes for *p*-nitrophenyl β-D-galactopyranoside were also similar and were about 0.85 mM.

(Received May 31, 1984)

β-ガラクトシダーゼ製剤は *Aspergillus oryzae* の産生する β-ガラクトシダーゼ¹⁾ を主成分とする乳糖分解酵素製剤である。β-ガラクトシダーゼは乳糖のグルコースとガラクトースへの加水分解を触媒する酵素であり、この酵素を主成分とする本製剤は乳児の乳糖不耐により生ずる消化不良の改善及び経管栄養食、経口流動食などを摂取した時の乳糖不耐により生ずる下痢などの改善を目的に、前者に対しては通常、1回 1250~2500 単位を哺乳時に同時に経口投与し、後者の目的には通常、摂取乳糖量 10g に対して 5000 単位を同時に投与することとされている。

今回、我々は種々の市販 β-ガラクトシダーゼ製剤を入手する機会を得たので、これら製剤の品質を検討した。本製剤の酵素化学的な面からの品質に関する知見はほとんどないことから、本報では酵素化学的側面からみた品質の検討結果を中心に述べる。

実験方法

1. 試料・試薬・試液

i) 試料：今回入手した試料は 6 品目である。これら試料のうち 1 品目は顆粒剤であり、他はすべて散剤であった。

ii) 基質及び基質関連化合物：*o*-Nitrophenyl-β-D-galactopyranoside, *o*-ニトロフェノール, *p*-ニトロフェノールは和光純薬株式会社, *p*-nitrophenyl-β-D-

galactopyranoside と *p*-nitrophenyl-β-L-fucopyranoside は P-L Biochemicals, *p*-nitrophenyl-2-acetamide-2-deoxy-β-D-galactopyranoside と *p*-nitrophenyl-β-D-mannopyranoside は Koch-Light Laboratories, *o*-nitrophenyl-α-D-galactopyranoside と *o*-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside は Senn Chemicals からそれぞれ購入した。

iii) McIlvaine 緩衝液 (pH 4.5) : 0.1M クエン酸溶液に 0.1M リン酸一水素ナトリウム溶液を加えて pH 4.5 に調整する。

iv) 炭酸ナトリウム液：無水炭酸ナトリウム 105.99 g に水を加えて溶かし、全量を正確に 1000 ml とする。

v) 基質液：標準酵素活性測定法には *o*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside 172 mg を McIlvaine 緩衝液 (pH 4.5) に溶解し全量を 100 ml としたものを基質液とした。この基質液の濃度は 5.71 mM であり、基質特異性の検討には他の基質も 5.71 mM になるように McIlvaine 緩衝液 (pH 4.5) に溶解して調製した。 K_m 値の測定には 0.489 mM から 2.45 mM の範囲において任意の 8 種の濃度の基質溶液を McIlvaine 緩衝液 (pH 4.5) を用いて調製した。至適 pH の測定には *o*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside 172 mg を pH 2.5 から 7.0 の範囲の 10 種の McIlvaine 緩衝液にそれぞれ溶解し、全量を 100 ml としたものを使用した。

Table 1. Contents of enzyme activity in β -galactosidase preparations

Sample No.	Labeled amount (units/g)	Range of permissible content (%)	Enzyme activity (units/g)	(%)
1	5000	80~120	4870	97.4
2	5000	80~120	5340	106.8
3	5000	80~120	5810	116.2
4	5000	80~120	5430	108.6
5	5000	80~100	4930	98.6
6	5000	80~120	5290	105.8

vi) 酵素溶液: 製剤 50 mg を精密に量り取り, 乳鉢に入れ, 水約 20 ml を加えて完全に溶解し, メスフラスコに移し正確に 100 ml とする. この液の 2 ml を正確に量り取り, 水を加えて正確に 50 ml としたものを酵素溶液とする.

2. 標準酵素活性測定法

30° で 5 分間予温した基質液 3.5 ml に 30° で 5 分間予温した酵素溶液 0.5 ml を加え, 正確に 10 分間反応を行った後, 炭酸ナトリウム液 1 ml を加える. この液につき水を対照として 420 nm における吸光度 A を測定する. 別に, 基質液 3.5 ml に炭酸ナトリウム液 1 ml を加えた液に酵素溶液 0.5 ml を加え, この液につき水を対照として 420 nm における吸光度 A_0 を測定する. 上記条件下で 1 分間に $1 \mu\text{mol}$ の *o*-ニトロフェノールを遊離する酵素量を 1 単位とし, 試料 1 g 中の酵素量は次式から算出する.

試料 1 g 当たりの酵素量 (単位)

$$= \frac{A - A_0}{0.917} \times \frac{1}{0.5} \times \frac{1}{10} \times 2500 \times \frac{1000}{\text{試料の採取量 (mg)}} \quad (1)$$

ただし, 第 1 項分母の 0.917 は $1 \mu\text{mol}/5 \text{ ml}$ の *o*-ニトロフェノールの 420 nm における吸光度である. なお, *p*-nitrophenyl 誘導体を基質にしたときは, *p*-ニトロフェノールの極大吸収が 400 nm にあり, その $1 \mu\text{mol}/5 \text{ ml}$ の 400 nm における吸光度が 3.496 であるので, 400 nm における吸光度 A 及び A_0 を測定し, 式(1)の第 1 項の分母に 0.917 の代りに 3.496 を代入して単位を算出する.

3. K_m の測定

種々の濃度の基質液を用いて標準酵素活性測定法に準じて活性を測定し, Lineweaver-Burk の方法²⁾ にしたがって K_m を算出した. この算出は Cleland のプログラム³⁾ を用いてコンピューターで行った.

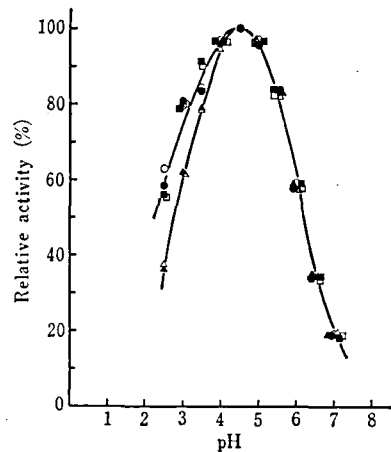


Fig. 1. Effect of pH on the activity of β -galactosidase from preparations

The symbols for sample No. 1, 2, 3, 4, 5 and 6 were ●, ○, ■, □, ▲ and △, respectively.

結果と考察

製剤の酵素活性含有量

製剤の表示量はいずれも 1 g 当たり 5000 単位であり, その含量規格幅は 80~120% である. 標準酵素活性測定法 (各製剤の規格試験法と同一である) で各製剤の酵素活性を測定したとき, Table 1 に示すように, いずれの製剤も規格値に適合する酵素量を含有していた.

製剤中の β -ガラクトシダーゼの至適 pH

o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranoside を基質にして各製剤中の β -ガラクトシダーゼ活性の pH 依存性を検討したところ, Fig. 1 に示すようにいずれの製剤の酵素とも pH 4.5 で最大の活性を示した. pH 4.5 よりアルカリ性側の pH 領域ではすべての製剤で同じ相対活性を示したが, 酸性側領域での相対活性は製剤間で若干の差がみられた. この差の理由は不明である

Table 2. Substrate specificity of β-galactosidase in the preparations

Substrate	Relative activity (%)					
	Sample number					
	1	2	3	4	5	6
<i>o</i> -Nitrophenyl-β-D-galactopyranoside	100	100	100	100	100	100
<i>p</i> -Nitrophenyl-β-D-galactopyranoside	105	105	101	102	102	101
<i>o</i> -Nitrophenyl-α-D-galactopyranoside	0.018	0.022	0.021	0.023	0.017	0.015
<i>o</i> -Nitrophenyl-β-D-glucofuranoside	0.29	0.25	0.24	0.25	0.24	0.22
<i>p</i> -Nitrophenyl-2-acetamide-2-deoxy-β-D-galactopyranoside	0.063	0.053	0.059	0.060	0.057	0.060
<i>p</i> -Nitrophenyl-β-D-mannopyranoside	0	0	0	0	0	0
<i>p</i> -Nitrophenyl-β-L-fucopyranoside	0	0	0	0	0	0

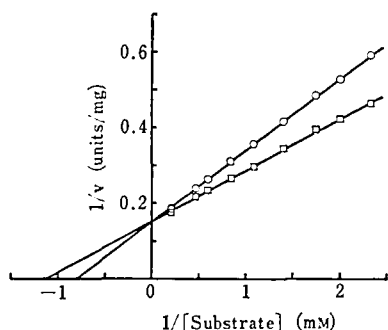


Fig. 2. Lineweaver-Burk plots of the hydrolysis of *o*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside and *p*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside by β-galactosidase from preparation O, *o*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside was used as substrate; □, *p*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside was used as a substrate.

が、各製剤の処方相違が酸性領域での活性発現に影響したのかもしれない。

製剤中の β-ガラクトシダーゼの基質特異性

Table 2 に示した 7 種の配糖体を用いて各製剤中の β-ガラクトシダーゼの基質特異性を検討した。いずれの製剤の酵素とも各基質に対する作用の程度は同じであり、*o*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside と *p*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside に対して最も強く作用した。両基質に対する作用はほぼ同程度のものであることから、アグリコンのニトロフェニル基の構造異性は活性にあまり影響しないものと考えられるが、糖部分がグルコース、ガラクトサミン、マンノース、フコースなどの配糖体はほとんど基質として作用せず、また α 結合した D-ガラクトシドに対しても酵素はほとんど作用しないことから、製剤中の酵素は β 結合した D-ガラクトシドに特異的に作用するものであるこ

Table 3. The K_m for *o*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside and *p*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside of β-galactosidase in preparations

Sample No.	K_m (mM)	
	ONPG*	PNPG**
1	1.26 ± 0.032	0.842 ± 0.045
2	1.22 ± 0.039	0.892 ± 0.025
3	1.28 ± 0.029	0.871 ± 0.048
4	1.24 ± 0.016	0.857 ± 0.019
5	1.24 ± 0.042	0.848 ± 0.021
6	1.24 ± 0.033	0.856 ± 0.041

* *o*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside
** *p*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside

とが示された。

製剤中の β-ガラクトシダーゼの基質に対する K_m 値

o-Nitrophenyl-β-D-galactopyranoside 及び *p*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside に対する各製剤中の β-ガラクトシダーゼの K_m を測定した。Fig. 2 に代表的な Lineweaver-Burk プロットを示したが、 V_{max} は両基質でほぼ同じであったが、 K_m 値は *p*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside の方が小さかった。いずれの製剤の酵素も *o*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside に対する K_m 値は 1.2~1.3 mM であり、*p*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside に対する K_m 値は 0.84~0.89 mM であり (Table 3)、各製剤間で酵素の基質に対する親和性に大きな相違はみられなかった。

製剤中の β-ガラクトシダーゼのクロマトフォーカシング

クロマトフォーカシングは蛋白質をその等電点にしたがって分離するカラムクロマトグラフ法であり、こ

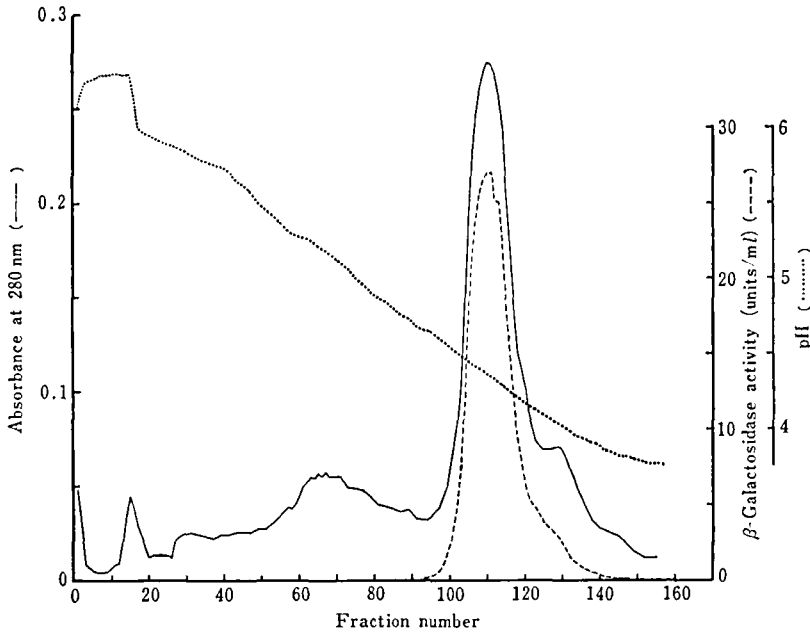


Fig. 3. Chromatofocusing of β -galactosidase from preparation

The preparation (175 mg) was dissolved in 5 ml of 0.025M imidazole-HCl buffer (pH 6.0), and 4 ml of the solution was subjected to chromatofocusing on a column (0.9×50 cm) of polybuffer exchanger 94 equilibrated with 0.025M imidazole-HCl buffer (pH 6.0). The elution was carried out with polybuffer 74 adjusted to pH 4 at a flow rate of 20 ml per hr, and 2 ml fractions were collected. —, Absorbance at 280 nm; ----, β -galactosidase activity; ·····, pH.

のための交換体と pH 勾配形成用展開溶媒が市販されている。これらを用いたクロマトフォーカシングでは蛋白質は真の等電点より若干低い pH で溶出されてくるために、蛋白質の等電点を正確に測定することはできないが、およその等電点を知ることができ、また未知蛋白質の比較同定にも利用することができる。ここでは2種の製剤(試料 No. 3, 6)を選び、pH 6—4 の範囲でクロマトフォーカシングを行い、両者の比較を行った。Fig. 3 に試料 No. 6 のクロマトグラフを示したが、 β -ガラクトシダーゼ活性は pH 4.4 付近を中心に1個の活性溶出ピークとして認められた。図には示さないが、試料 No. 3 もこれとまったく同一の活性溶出ピークを示した。また 280 nm の吸光度で追跡した蛋白質の溶出曲線も両試料でほぼ類似したものであった。このことから両製剤に用いられた酵素原体は物理化学的にも極めて類似したものであることが推察された。

ま と め

今回入手した6品目の β -ガラクトシダーゼ製剤の含量からみた品質はすべて良好なものであった。また、製剤の主成分である β -ガラクトシダーゼの至適 pH、基質特異性、基質に対する親和性などの酵素化学的性状についても製剤間に差はなく、いずれの製剤の酵素も β -D-ガラクトシドに特異的に作用しうるものであることが明らかになった。

文 献

- 1) Y. Tanaka, A. Kagamiishi, A. Kiuchi and T. Horiuchi: *J. Biochem.*, **77**, 241 (1975)
- 2) H. Lineweaver and D. Burk: *J. Am. Chem. Soc.*, **56**, 658 (1934)
- 3) W. W. Cleland: *Advances in Enzymol.*, **29**, 1 (1967)

高速液体クロマトグラフィーによるウシインシュリンと
ブタインシュリン製剤中のインシュリンの定量

太田美矢子・徳永裕司・木村俊夫・佐藤 浩・山羽 力

Determination of Insulins in Bovine and Porcine Insulin Preparations
by High-Performance Liquid Chromatography

Miyako OHTA, Hiroshi TOKUNAGA, Toshio KIMURA,
Hiroshi SATOH and Tsutomu YAMAHA

A reversed-phase high-performance liquid chromatographic (HPLC) method for the determination of insulin in commercially available preparations was investigated. Insulin in the preparations was successfully determined without interference from preservatives by the HPLC method on a LiChrosorb RP-18 column using a mixture of acetonitrile and 5 mM tartate buffer (pH 3.0) (27 : 73) containing 0.15 mM sodium sulfate as the mobile phase at 40°C for porcine insulin preparations and at 50°C for bovine insulin preparations. The values obtained by the HPLC method were 91.0~105.0% of the potency indicated in the label as the sum of both potencies of insulin and desamido-insulin, and the coefficients of variation were 0.39~2.20 (n=3). This method can be applied to all insulin preparations, and used to determine the amount of desamido-insulin as well as insulin.

(Received May 31, 1984)

最近、逆相充てん剤を用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によるインシュリンの分離の報告は多いが、市販インシュリン製剤を用いて定量した例はあまりない。前報¹⁾、著者らは、スクレオシル 5CN の充てん剤を用いて、モノコンポーネントクラスのウシ又はブタインシュリン市販製剤の定量を行った。しかし、分解物のデスアミドインシュリンが含まれる製剤もあり、この HPLC の条件では、インシュリンとデスアミドインシュリンの分離定量は困難であった。また、著者らは種々のインシュリンをリクロソルブ RP-18 を用いた HPLC 法²⁾ により同時分離を行ったが、インシュリンとデスアミドインシュリンは完全に分離できるものの、多量の防腐剤が同一位置に溶出し、インシュリンの定量は困難であった。

著者らは、ブタインシュリン又はウシインシュリン製剤中のインシュリンとそのデスアミドインシュリンの同時定量法を検討し、好結果を得たので報告する。

実験方法

1. 試料・試薬・溶液

ノボ社のモノコンポーネントのウシインシュリン (27.2 IU/mg) 及びブタインシュリン (26.8 IU/mg) を標準品として用いた。デスアミドインシュリンは、インシュリンを 0.01N 塩酸溶液中で 37°, 4 週間処理

した後、凍結乾燥することにより得た。インシュリン製剤は市販品を、リクロソルブ RP-18 (5 μ m) はメルク社製を用い、その他の試薬は試薬特級品を用いた。

内部標準溶液：*p*-メチルアミノ安息香酸 22 mg に 0.001N 塩酸溶液を加えて 1000 ml とする。

標準原液：モノコンポーネントウシインシュリン又はブタインシュリン 10 mg に、0.01N 塩酸溶液 2 ml を加えて溶かす。

2. 装置

装置は日立高速液体クロマトグラフ 635 型を用い、カラムはリクロソルブ RP-18 (250 mm \times 4.0 mm I.D.) でカラム温度は 40° 及び 50° を用いた。検出波長は 280 nm、感度は 0.04 AUFS を用いた。流量は 0.8 ml/min で溶出した。移動相はアセトニトリルと 5 mM 酒石酸緩衝液 (pH 3.0) (27 : 73) の混液に 0.15 M 硫酸ナトリウムを加える。移動相の調製は 20° で行った。カラムは使用後アセトニトリルと 0.1M リン酸 (27 : 73) の混液で洗浄した。

3. 定量方法

ウシインシュリン製剤 300 μ l (又はブタインシュリン製剤 400 μ l) に 1N 塩酸溶液 10 μ l、内部標準溶液 100 μ l を加え、これに全量が 610 μ l になるように 0.001N 塩酸溶液を適量加えよく混和し試料溶液とする。標準溶液は、ウシインシュリン標準原液 100 μ l

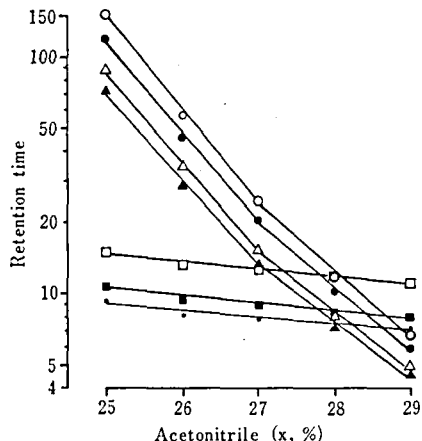


Fig. 1. Effect of the concentration of acetonitrile on the retention time of various insulins and preservatives at 45°C

Conditions: column, LiChrosorb RP-18 (250 mm × 4 mm I. D.); flow rate, 0.8 ml/min; Detection, 280 nm (0.04 O. D.); mobile phase, a mixture of acetonitrile and 5 mM tartrate buffer (pH 3.0) (x : 100-x) containing 0.15 M sodium sulfate.

Compounds: —○—, phenol; —■—, methyl-p-hydroxybenzoate; —□—, m-cresol, —▲—, bovine insulin; —△—, bovine desamido-insulin; —●—, porcine insulin; —○—, porcine desamido-insulin.

(又はブタインシュリン標準原液 120 μl) に内部標準溶液 100 μl を加え、全量が 610 μl になるように 0.001N 塩酸溶液を加えよく混和する。標準溶液及び試料溶液の 20 μl ずつを交互に HPLC に注入し、内部標準に対するピーク高さ比を測定し定量する。

結果と考察

1. HPLC の条件について

製剤中には、防腐剤のフェノール、パラオキシ安息香酸メチル及びクレゾールのいずれかが多量に含有し、また類縁物質のデスアミドインシュリン (A鎖末端のアルギニンのデスアミド化) を含有するものもすくなくないことから、防腐剤の妨害なしにインシュリンとデスアミドインシュリンを分離定量する HPLC の条件を検討した。

移動相中のアセトニトリル及び硫酸ナトリウムの濃度の影響について検討した結果を、Fig. 1, 2 に示す。インシュリンとその類縁物質の溶出時間は、アセトニトリル及び硫酸ナトリウムの少しの濃度変化で大きく変わるが、防腐剤の溶出時間はほとんど変わらなかった。定量にはアセトニトリル 27%、硫酸ナトリウム

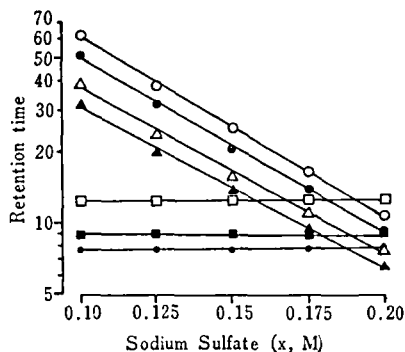


Fig. 2. Effect of the concentration of sodium sulfate on the retention time of various insulins and preservatives at 45°C

Other conditions (except mobile phase) and compounds were the same as in Fig. 1. mobile phase, a mixture of acetonitrile and 5 mM tartrate buffer (pH 3.0) (27 : 73) containing xM sodium sulfate.

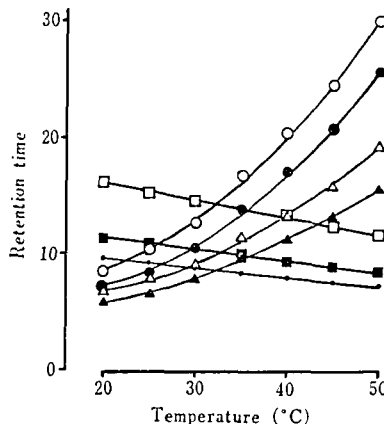


Fig. 3. Effect of the column temperature on the retention time of various insulins and preservatives

Other conditions (mobile phase) and compounds were the same as in Fig. 1. mobile phase, a mixture of acetonitrile and 5 mM tartrate buffer (pH 3.0) (27 : 73) containing 0.15 M sodium sulfate.

0.15 M, を用いた。

カラム温度によるインシュリンと防腐剤の溶出時間を Fig. 3 に示す。温度の上昇は、インシュリンとその類縁物質の溶出時間を大きく増加させ、防腐剤のそれをわずかに減少させた。インシュリン相互の分離は、30° 以上で十分分離した。しかし、溶出時間の一番大きい防腐剤のクレゾールと十分分離する条件を考慮し、ブタインシュリン製剤は 40°、ウシインシュリン製剤は 50° を用いた。

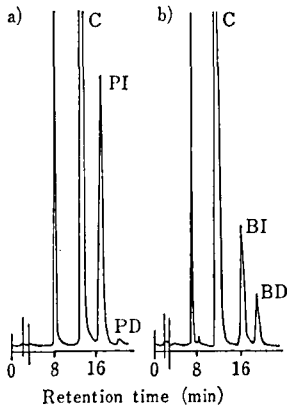


Fig. 4. Chromatograms of insulin preparations 1D and 2F

Other conditions were the same as in Fig. 1.

- a) 1D, column temperature, 40°C.
- b) 2F, column temperature, 50°C.

Compounds: C, cresol; PI, porcine insulin; PD, porcine desamido-insulin; BI, bovine insulin; BD, bovine desamido-insulin

2. 検量線

定量条件でのウシインシュリン、ブタインシュリンの検量線は、それぞれ0~20.5IU/mlと0~24IU/mlの間で直線性が成立し、いずれも原点を通る直線を与えた。また、ウシインシュリンとブタインシュリンは、それぞれ13.6IU/mlと16.1IU/mlを繰り返し6回溶出するとき、ピーク高さ比の変動係数は1.9%以下であった。

3. 定量

デスアミドインシュリンはインシュリンと同等の力価と紫外外部吸収をもつので、ウシのデスアミドインシュリンはモノコンポーネントウシインシュリンを、ブタのデスアミドインシュリンはモノコンポーネントブタインシュリンを標準として定量した。ブタインシュリン製剤 (Preparation 1D) とウシインシュリン製剤 (Preparation 2F) のクロマトグラムを Fig. 4 に示す。クレゾールとブタインシュリン又はウシインシュリンが良好に分離した。また、Table 1, 2 に定量結果を示す。インシュリンとデスアミドインシュリンの力価の和は、ブタインシュリン製剤で38.6~41.1IU/ml (表示単位40IU/ml)、ウシインシュリン製剤で37.9~42.0IU/ml (表示単位40IU/ml)、18.2~18.9IU/ml (表示単位20IU/ml) であった。各々の定量値は3回測定の前平均値で、それらの変動係数は0.39~

Table 1. Assay results of porcine insulin in preparations by HPLC method

Preparation	Labeled potency* (IU/ml)	Found (IU/ml) (n=3)		
		PI	PD	PI+PD
1A	40	38.7	—	38.7
1B	40	39.6	—	39.6
1C	40	41.1	—	41.1
1D	40	38.6	1.1	39.7
1E	40	39.0	1.0	40.0
1F	40	38.8	—	38.8
1G	40	38.9	1.8	40.7
1H	40	38.6	—	38.6

PI, porcine insulin; PD, porcine desamido-insulin.
*, The potency indicated in the label.

Table 2. Assay results of bovine insulin in preparations by HPLC method

Preparation	Labeled potency* (IU/ml)	Found (IU/ml) (n=3)		
		BI	BD	BI+BD
2A	40	37.9	—	37.9
2B	40	41.4	—	41.4
2C	40	40.3	1.7	42.0
2D	40	40.9	1.0	41.9
2E	40	38.1	1.2	39.3
2F	20	13.1	5.8	18.9
2G	20	18.2	—	18.2

BI, bovine insulin; BD, bovine desamido-insulin.
*, The potency indicated in the label.

2.20%の範囲であった。いずれも表示単位にはほぼ一致し、表示単位の91.0~105.0%を示した。

4. 結論

ここに述べた方法によれば、従来困難であった製剤中の防腐剤の妨害を受けることなく、インシュリンとそのデスアミド体を分離定量することができ、またそれらの値が表示力価とよく一致した。

文 献

- 1) 太田美矢子, 徳永裕司, 木村俊夫, 佐藤 浩, 川村次良: 薬誌, 102, 1092 (1982)
- 2) M. Ohta, H. Tokunaga, T. Kimura, H. Satoh, J. Kawamura, *Chem. Pharm. Bull.*, 31, 3566 (1983)

ヒト T リンパ球幼若化反応に及ぼす各種抗炎症剤の影響

押沢 正・早川亮夫・山村雅一*

Effect of Anti-inflammatory Drugs on Transformation of Human T-lymphocytes to Blast-like Cells Induced by PHA and on One-way Mixed Lymphocyte Reaction

Tadashi OSHIZAWA, Takao HAYAKAWA and Masaichi YAMAMURA*

The effect of anti-inflammatory drugs was tested on transformation of human T-lymphocytes to blast-like cells induced by phytohemagglutinin (PHA) and on one-way mixed lymphocyte reaction.

The following were investigated: antipyrine, isopropylantipyrine, 4-aminoantipyrine, aminopyrine, sulpyrine, aminopropyrone, phenylbutazone, oxyphenbutazone, ketophenylbutazone, sulfipyrazone, benzydamine, hydrocortisone and betamethasone. It was found that betamethasone inhibited PHA-induced blast formation by more than 90% at the concentration of 4 μ M and that the concentration of oxyphenbutazone, benzydamine and hydrocortisone required for 90% inhibition was 40 μ M.

(Received May 31, 1984)

はじめに

医薬品等により生体の防御機構の不全を招く現象は、医薬品の安全性の面からも重要な問題である。その一つに日和見感染があげられる。これは平素は無害な弱病原菌が生体防御機能の低下に乗じて異常増殖し、重篤な感染症をひき起すもので、近年臨床上の大きな問題になってきている。我々は日和見感染の原因の一つとして薬剤投与による多形核白血球機能の低下を疑い、数種の解熱・鎮痛・消炎剤について、*in vitro* の酸素代謝に対する影響を指標とした検討を行った。その結果、いくつかの非ステロイド系抗炎症剤が多形核白血球機能に対し抑制的に作用することを知った。しかし服用後しばしば重篤な感染症をひき起すことが知られているステロイドは無作用であった¹⁾。ステロイド剤の場合はリンパ球機能への影響がよく知られているので、非ステロイド系の抗炎症剤がリンパ球の機能に対してどのように作用するかは興味深い。本報告は、*phaseolus vulgaris* のレクチン (PHA) による T リンパ球の芽球様細胞への変換と混合リンパ球反応 (MLR) とに対して、各種抗炎症剤が及ぼす影響について調べたものである。

実験方法

培養液は RPMI 1640, 20 mM HEPES (pH 7.4)

にペニシリン 100 u/ml, ストレプトマイシン 100 μ g/ml を加えたものを用いた。

実験に用いた各種抗炎症剤のうちアンチピリン, イソプロピルアンチピリン, 4-アミノアンチピリン, アミノピリン, スルピリン, アミノプロピロン, フェニルブタゾン, オキシフェンブタゾン, ケトフェニルブタゾン, スルフィンピラゾン, ベンジダミンは当所薬品部の立沢氏より, またベタメサゾン-21-リン酸二ナトリウムは塩野義製薬より恵与された。ヒドロコルチゾン-21-リン酸二ナトリウムは Sigma から購入した。

PHA は Difco から, Ficoll は Pharmacia から, Conray は第一製薬から購入した。[6-³H]-チミジンは New England Nuclear のものを用いた。

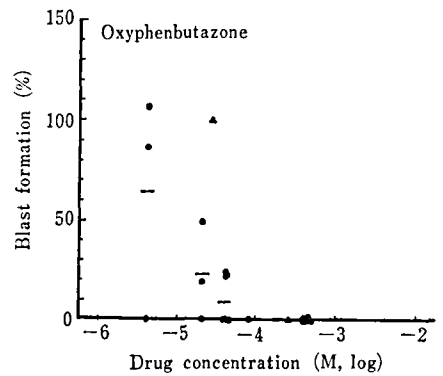
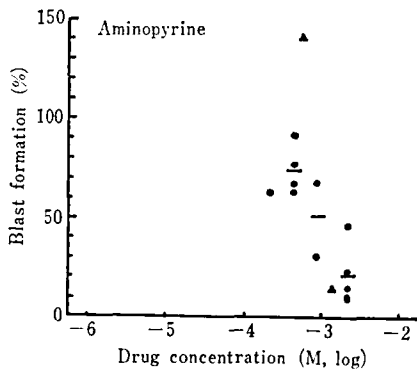
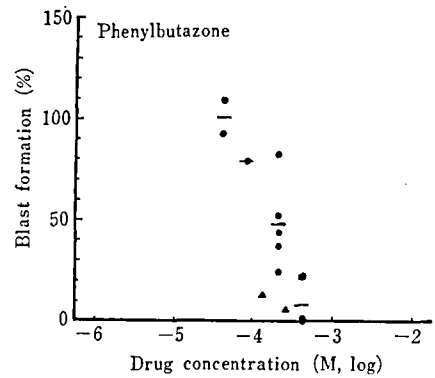
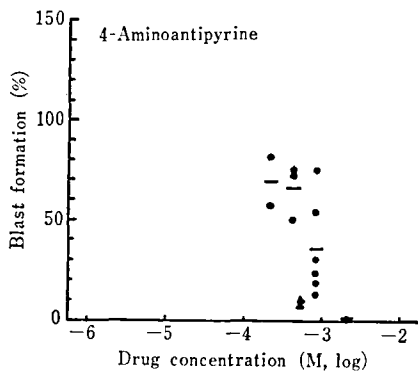
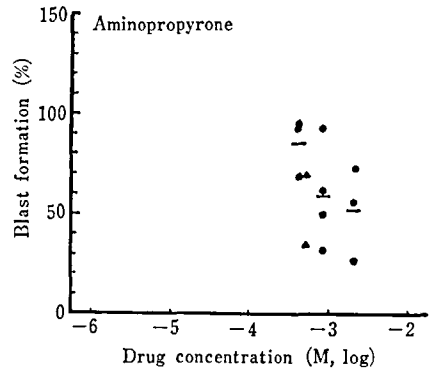
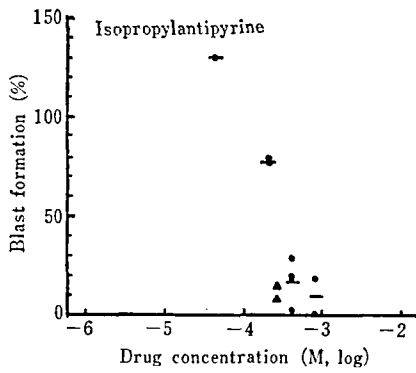
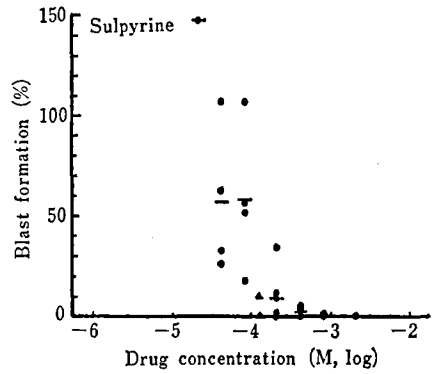
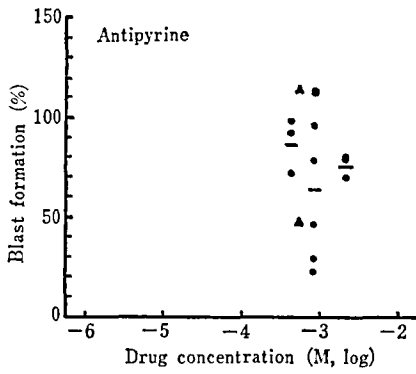
1. リンパ球

ヘパリン (40 u/ml) 採血した健常人末梢血を Ficoll-Conray (d=1.077) に層積し, 遠心分離して, リンパ球を得た。これを培養液で 2 回洗った後, 1 \times 10⁶/ml に調整した。

2. PHA によるリンパ球の幼若化

丸底のマイクロタイタープレートに, リンパ球 (5 \times 10⁴ cells), ヒト AB 型血清 (終濃度 8.3%), PHA (終濃度 8.3 μ g/ml), 各種薬物溶液 (終濃度 4 μ M~2 mM) を取り, シールをして混合した後, 37° で 2 日間培養した。³H-チミジン 1 μ Ci を加え 37° で 4 時間標識した。セルハーベスターでグラスフィルター上に細胞を捕集し, その放射能を液体シンチレーションカウンターで計測した。

* 東海大学・医学部



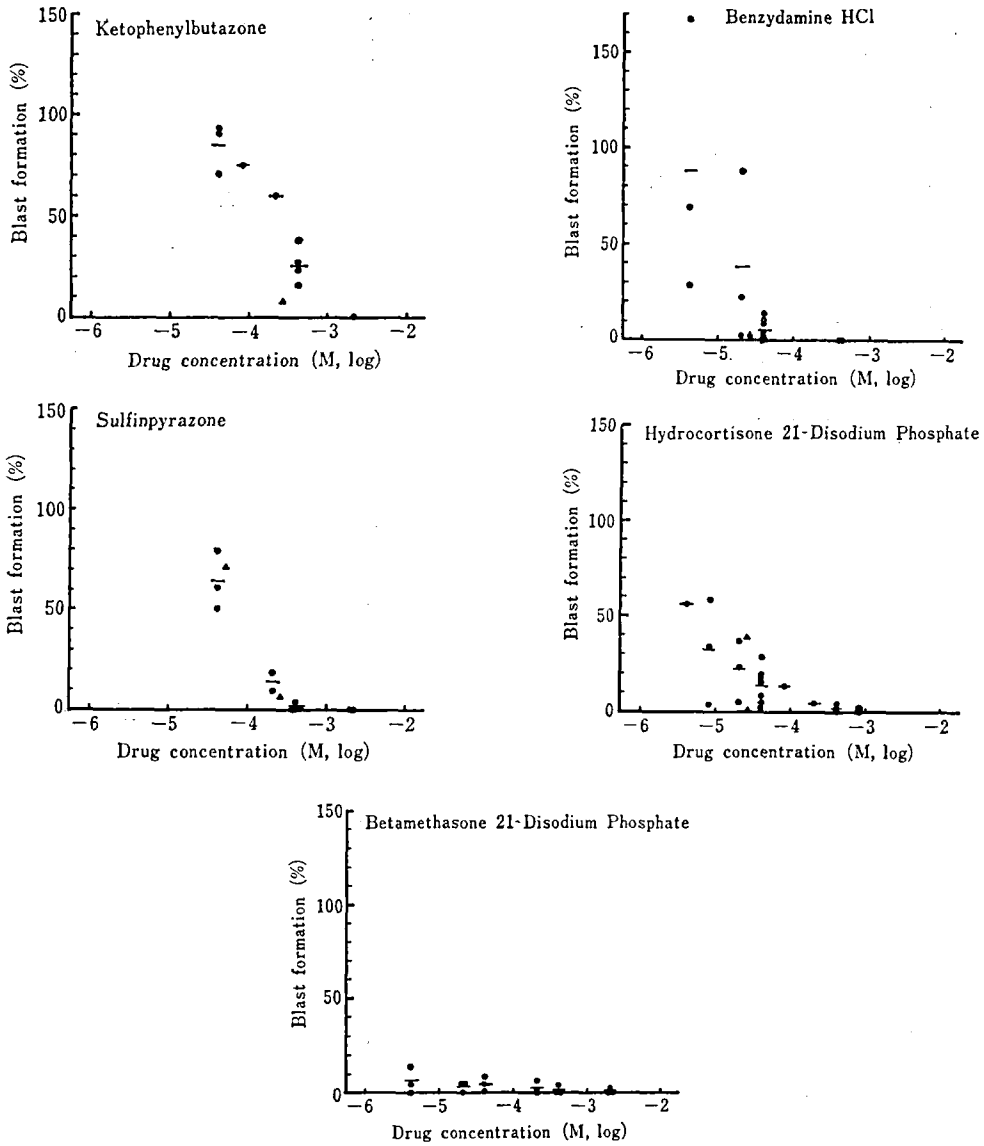


Fig. 1. Effect of anti-inflammatory drugs on blast formation of human lymphocytes by PHA (●) and mixed lymphocyte reaction (▲)
—: mean value of PHA test

3. 混合リンパ球反応³⁾

① マイトマイシンC処理

二人の健常人から得た末梢血のうち一方は上記の方法でリンパ球を分取した。他方は、等容の培養液を加えて希釈した後、マイトマイシンCを $50 \mu\text{g/ml}$ になるように添加し、 37° で30分間インキュベートした。以降は同様に Ficol-Conray 法でリンパ球を調製した。

② 混合リンパ球反応

丸底のマикроタイタープレートに、リンパ球 ($5 \times$

10^4 cells), マイトマイシンC 処理したリンパ球 (5×10^4 cells), ヒト AB 型血清 (終濃度 10.5%), 薬物溶液 (終濃度 $26 \mu\text{M} \sim 1.3 \text{mM}$) を加えて、 37° で7日間培養した。 ^3H -チミジン $1 \mu\text{Ci}$ を加えて 37° で更に16時間インキュベートした。セルハーベスターで細胞を補集し、液体シンチレーションカウンターで計測した。

結 果

各薬物ごとの結果について Fig. 1 に示した。Tリ

Table 1. Effect of anti-inflammatory drugs on blast formation of human T-lymphocytes by PHA

Drug	Inhibition	Drug conc. required for 90% inhibition (mM)
Antipyrine	-	-
Isopropylantipyrine	+	0.8
4-Aminoantipyrine	+	>1.0
Aminopyrine	±	>2.0
Sulpyrine	++	0.2
Aminopropyrone	-	-
Phenylbutazone	+	0.4
Oxyphenbutazone	+++	0.04
Ketophenylbutazone	+	1.0
Sulfipyrazone	++	0.2
Benzydamine	+++	0.04
Hydrocortisone	+++	0.04
Betamethasone	++++	<0.004

ンパ球の幼若化に対して阻害効果が強く出た薬物は、スルピリン、オキシフェンブタゾン、スルフィンピラゾン、ベンジダミン、ヒドロコルチゾン、ベタメサゾンであった。

allogenic な細胞刺激に対する T 細胞の幼若化である混合リンパ球反応においては、各薬物について一種又は二種の濃度で行ったが、PHA の場合とほぼ同一の結果を与えた。

PHA による幼若化反応について各薬物の阻害効果を Table 1 にまとめた。右のカラムには幼若化反応を90%阻害するのに要する薬物濃度を示した。これらのうちで特に強い阻害がみられたのは、ベタメサゾンで4 μ Mで90%以上の阻害を示した。オキシフェンブタゾン、ベンジダミン、ヒドロコルチゾンが90%阻害に要する濃度は40 μ Mであった。200 μ Mで90%阻害

したのは、スルピリン、スルフィンピラゾンであった。以下フェニルブタゾンでは0.4 mM、イソプロピルアンチピリンでは0.8 mM、4-アミノアンチピリンは1 mM以上、アミノピリンは2 mM以上を要した。アンチピリンとアミノプロピロンについては、はっきりした阻害効果はみられなかった。

考 察

すでによく知られているようにヒドロコルチゾンやベタメサゾンには強い阻害効果がみとめられた。

オキシフェンブタゾンやベンジダミンでもヒドロコルチゾンと同程度の阻害がみられたが、これらの薬物は多形核白血球に対しても抑制的に作用した^{4,5)}ので、この二つの防御系でみる限りヒドロコルチゾンよりも影響が大きいといえる。更にスルピリンにも比較的強い阻害効果がみられたが、同時に多形核白血球の食殺菌能をも抑制するので⁴⁾、この薬物も服用時の感染症誘発に注目する必要がある。

T細胞の幼若化試験は、T細胞が抗原刺激によって幼若化することのモデル実験であり、これだけで複雑なT細胞の機能への影響の全体を評価することはできないが、実験操作も簡単であるので、薬物による細胞性免疫に対する影響を評価する方法の一つとして有用であると考えられる。

文 献

- 1) 早川堯夫, 押沢 正: 衛生試報, 102, 40 (1984)
- 2) 神吉泰三郎, 市川洋一: 免疫実験操作法, VIII, 2633 (1979)
- 3) 大野竜三, 福井浩彦: 免疫実験操作法, VI, 1953 (1977)
- 4) T. Oshizawa, T. Hayakawa, H. Shioda, A. M. Yamamura: 4th International Congress of Immunology (Paris) Abstracts, 11. 13. 16. (1980)

モルモット多形核白血球の食作用に伴う酸素代謝に及ぼす各種抗炎症剤の影響

早川堯夫・押沢 正

Effects of Anti-inflammatory Drugs on Oxygen Metabolism associated with Phagocytosis by Guinea Pig Polymorphonuclear Leukocytes

Takao HAYAKAWA and Tadashi OSHIZAWA

Opportunistic infection has become a problem in the clinical field. Wide use of drugs may impair the immunological system and facilitate infection by non-pathogenic microorganisms. In this work we have studied, *in vitro*, the effects of some anti-inflammatory drugs on O_2 metabolism (O_2 consumption) by guinea pig polymorphonuclear leukocytes (PMNs) stimulated by heat-killed *E. coli* or myristic acid since stimulated O_2 consumption is one of the basic mechanism involved in the intracellular killing of microorganisms by PMNs. It was found that some drugs, such as phenylbutazone, oxyphenbutazone, ketophenylbutazone, benzydamine, ibuprophen and flufenamic acid inhibited O_2 consumption by PMNs stimulated by either of the two stimuli, heat-killed *E. coli* and myristic acid. Interestingly, metiazinic acid and alclofenac inhibited only *E. coli* stimulated O_2 consumption by guinea pig PMNs. Pyrazolone derivatives and hydrocortisone had no significant effect on O_2 consumption by PMNs stimulated by these stimuli.

(Received May 31, 1984)

多形核白血球は生体防禦の第一線で働く食細胞で、微生物が体内に侵入するや速やかに局所に集まり、微生物を貪食し、殺菌する。この殺菌作用の第一段階として起る最も重要な生化学的現象は酸素代謝の充進、すなわち白血球による急激な酸素の消費である。これは白血球膜に微生物等による刺激が伝達されると、膜に存在する NADPH 酸化酵素が活性化され、酸素 (O_2) からスーパーオキシド (O_2^-) が産生されることによる現象である。この O_2^- は更に H_2O_2 , $OH\cdot$, 一重項酸素, ClO^- などのいわゆる活性酸素に変化し、殺菌作用のもとになる¹⁾。ちなみに微生物を貪食することができても酸素代謝の充進を起こすことができない白血球を持つ患者 (慢性肉芽腫症) は、繰り返し重篤な感染症に罹り、死に至る例も少なくない。

したがって、白血球の異物接触に際しての正常な酸素代謝の充進は、感染等に対する生体防禦機構の最も基本的なものの一つである。

一方、近年、日和見感染 (opportunistic infection) という現象が臨床上の大きな問題となってきている。これは平素は無害な弱病原性の微生物によって引き起こされる感染症で、宿主側の防禦機構の低下がその原因であるとされている。この日和見感染は、広域抗生剤、抗癌剤や抗炎症剤等の使用頻度の増加に比例して

おり、最近20年間で約10倍近く増加しているという²⁾。繁用されている薬剤が生体の防禦機構に何らかの悪影響を与え、日和見感染の原因の一つとなっていることは十分疑われることである。

本研究ではモルモット腹腔内浸出多形核白血球を加熱大腸菌あるいはミリスチン酸で刺激した際に引き起こされる酸素代謝の充進に対して、いくつかの解熱、鎮痛、抗炎症剤がいかなる影響を及ぼすかについて検討した。

実験方法

1. モルモット腹腔内浸出多形核白血球の調製

一夜絶食した 400~600 g の Hartley 系モルモットの腹腔に滅菌した 2% カゼイン-生理食塩水液 (pH 7.3~7.4 に調整したもの) を注射する。15~17時間後にモルモットを殺し、直ちに開腹して腹腔内浸出液をとり、次いで腹腔内を 30 ml の冷した生理食塩水で3度洗う。浸出液と洗液を合し、150×g で4°、5分間遠沈する。集めた細胞に 0.2% NaCl 20 ml を加えて30秒間低張処理したのち、直ちに 1.6% NaCl 20 ml を加えて等張にもどす。液をガーゼで濾過後、150×g で4°、10分間遠沈する。集めた細胞を冷した Ca^{2+} を含まない Krebs Ringer Phosphate Buffer (KRP) 又

は Ca^{2+} を含まない Phosphate Buffered Saline (PBS (-)) 30 ml に浮遊させ、 $150 \times g$ で 4° , 5 分間遠沈することにより洗浄する。最後に沈殿した白血球を適量の KRP 又は PBS(-) に浮遊させて、目的とする濃度に調整する。浮遊液は使用直前まで氷水中で保存する。

2. 加熱処理大腸菌の調製

E. coli B Hershey 株種菌を試験管に入れ、20~30 ml の Tryptic Soy Broth (TSB) 中で 37° , 8~9 時間培養する。次に 200~300 ml の TSB 中に移し、 37° , 8~9 時間培養した後、更に 5~10 l の TSB に入れて一昼夜振盪しながら培養する。培養液を 8000 rpm で 10 分間遠心して集菌し、生理食塩水で 3 回洗浄する。沈殿した菌を 150 ml の生理食塩水に均等になるよう懸濁し、 120° で 15 分間オートクレーブにかけた後、生理食塩水に懸濁し、8000 rpm で 10 分間遠心する。この操作を上清が透明になるまで繰り返して加熱菌体を洗浄する。次に熱処理によって凝集した菌を分散させるために超音波処理を 45W で 5 秒間行い、更に上清が透明になるまで生理食塩水で洗浄する。最終的に 1×10^{11} 個/ml となるように生理食塩水に懸濁し、小試験管に分注した後、オートクレーブをかけて滅菌し、 -80° で保存する。東京都臨床医学総合研究所より試料の一部を分与された。

3. 抗大腸菌血清の調製

上記のように調製した加熱大腸菌懸濁液に 0.01% EDTA を加えたのち、Freund's complete adjuvant (Difco Co.) と 1:1 の割合に混合し、その 2 ml を 1 週間ごとにウサギに皮下注射し、6 週間後に耳静脈より採血する。プールした血液は、 37° で 1 時間放置した後、更に 4° で 1 晩放置し、3000 rpm, 10 分間遠心して血清を分離する。 56° で 30 分間加熱して補体を非動化した後、40% 飽和硫酸アンモニウムで IgG 分画を沈殿させ、この沈殿を再び水に溶かして生理食塩水に対して十分透析する。透析後、小試験管に分注して -80° で保存する。都臨床研より試料の一部を分与された。

4. 白血球の食作用に伴う酸素消費の測定

酸素電極を用いて、反応液中の溶存酸素量を一種の電解分析的に測定する方法によった。電極はクラーク型電極 (イエロースプリング社製) を用いた。記録計のゼロ点調整には反応容器に 5 mM グルコースを含む KRP 又は PBS を満たし、次に生イースト菌液 (250 mg/ml) を 20 μ l 加えて呼吸させ、溶存酸素を完全に消費したところをゼロ点とした。次に容器をよく洗い、KRP 又は PBS を満たし、 37° で平衡になった

ところで記録計上の 100% スケールのペン位置を定めた。容器中の全溶存酸素量は (37° における水の溶存酸素量 $0.217 \mu\text{mole/ml}$) \times (容器中の反応液の容量) より算出した。

白血球の酸素代謝の測定は通常次のように行った。反応容器中に 5 mM グルコースを含む KRP 又は PBS を 37° で予温しておき、これに $1 \sim 2 \times 10^7$ 個の細胞及び薬剤を含む検液もしくはその溶媒のみ ($\sim 10 \mu$ l) を加える。容器を開放状態のまま 3 分間保温して平衡に達したところで、ふたをして外界と遮断し、4 分間インキュベートして休止期の酸素消費速度を測定する (A)。次に加熱大腸菌 $10 \sim 30 \mu$ l ($1 \sim 3 \times 10^9$ 個) もしくは可溶性の代謝活性化物質の 1 つであるミスチン酸 (0.5%, 50% エタノール溶液) $5 \sim 10 \mu$ l をシリンジで注入し、酸素消費の最大速度を測定する (B)。これらの代謝活性化剤による酸素呼吸の上昇は、(B) - (A) で表わす。なお、ミスチン酸を用いる実験のいくつかは、加熱大腸菌で食作用を行わせたのちの多形核白血球にミスチン酸を加え、この際の酸素消費最大速度 (C) を測定し、(C) - (A) で表わした。

実験結果と考察

1. 白血球の食作用に伴う酸素代謝の亢進

Fig. 1 にモルモット多形核白血球の食菌又は膜刺激時の酸素代謝を酸素電極法で測定した際の典型的な例

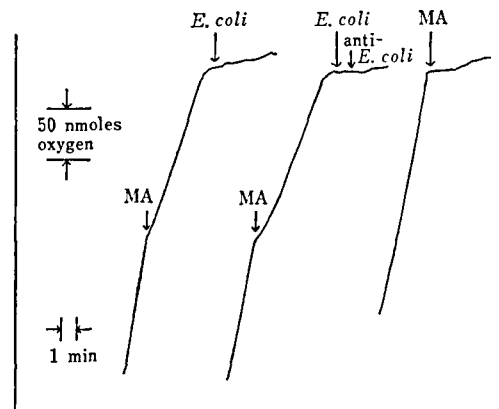


Fig. 1. O_2 consumption by guinea pig polymorphonuclear leukocytes (PMNs) stimulated by heat killed *E. coli* or myristic acid (MA)

The rate of O_2 consumption was measured in a Clark-type oxygen electrode.

PMNs: 10^7 cells/1.53 ml of Ca^{2+} -free Krebs Ringer phosphate, *E. coli*: 3×10^9 cells (30 μ l), anti-*E. coli*: 10 μ l (3.5 μ g), MA: 0.5%, 10 μ l

Table 1. Effects of heat killed *E. coli*, myristic acid, glucose and anti-*E. coli* antiserum on O₂ consumption by guinea pig polymorphonuclear leukocytes (PMNs)

Exp. No.	Heat killed <i>E. coli</i> (10 ⁸ cells/ μ l) added (μ l)	0.5% Myristic acid added (μ l)	5 mM Glucose	Anti- <i>E. coli</i> antiserum (0.35 μ g/ μ l) added (μ l)	O ₂ Consumption (nmoles/min/10 ⁷ PMNs)	
1	—	—	+	—	3.7	
	10	—	+	—	32.8	
	20	—	+	—	46.0	
	20	—	—	—	33.9	
	30	—	—	+	10	62.4
	30	—	—	+	—	54.6
	40	—	—	+	—	61.4
2	—	—	+	—	1.6	
	30	—	+	10	41.9	
	30	—	+	—	48.9	
3	—	—	+	—	4.4	
	—	5	+	—	88.2	
	—	10	+	—	108.4	
	—	15	+	—	64.2	
	—	20	+	—	0	

Exp. No. 1, 2: 1 × 10⁷ PMNs/cuvetteExp. No. 3 : 5 × 10⁶ PMNs/cuvette

を示す。白血球は加熱大腸菌もしくはミリスチン酸の添加により活性化され、著しく呼吸が上昇する。ミリスチン酸は白血球を加熱大腸菌で刺激したのも添加しても、直接添加しても、その代謝活性化作用は同じである。一種の粒子で食作用を伴う加熱大腸菌と可溶性の膜刺激剤であるミリスチン酸による活性化とは、初期の段階において機構が異なると考えられる。

Table 1 には反応条件の検討結果を示す。加熱大腸菌は白血球数 (10⁷個) の 100 倍量 (10⁹個) で明らかな酸素代謝亢進をひき起こしており、更に量を増やしてゆくと (~4 × 10⁹個) 活性化の程度もいく分増加してゆく傾向にあるが直線的ではない。オプソニンとしての抗大腸菌抗体の添加はヒトの末梢血由来の白血球の場合と異なり必ずしも必要としない。NADPH 再生系、ヘキソースモノリン酸回路への補給原料であるグルコースには若干添加効果がみられる。これらの結果から以後の実験には加熱大腸菌 1.5 ~ 3 × 10⁹ 個を用い、5 mM グルコースを添加することとし、抗体処理は省略した。ミリスチン酸は 5 ~ 10 μ l の添加で最もよく刺激したが、20 μ l になると細胞融解的に作用した。

2. 有機溶媒の影響

被検薬剤は水に溶けにくいものも多く、適当な有機溶媒に溶かして試験する必要がある。そこで水と混和

しうる代表的な溶媒、エタノールとジメチルスルホキシド (DMSO) について、本実験系への影響を検討した。加熱大腸菌を刺激剤として用いた場合、エタノールは終濃度 0.5% で約 30% の阻害を示し、終濃度 0.8% では約 80% の阻害を示した。一方、DMSO は終濃度 0.8% でもほとんど影響せず、終濃度 1.5% でも約 30% 程度の阻害であった。ミリスチン酸を刺激剤として用いた場合、溶媒の影響は大腸菌の場合ほど顕著でなく、エタノール終濃度 0.8% でも約 25% の阻害に止まった。DMSO は終濃度約 2% で同程度の阻害を示した。

以上の結果から、以後の実験では水に溶けにくい薬剤は DMSO に溶解し、DMSO 終濃度は最高 0.8% 程度まで、かつ被検液と同濃度の DMSO を加えた系を常にコントロールとして用いることとした。

3. 食作用に伴う酸素代謝に対する各種解熱・鎮痛・抗炎症剤の影響

Table 2 に粒子状の刺激剤としての加熱大腸菌あるいは可溶性の刺激剤としてのミリスチン酸を用いた際の多形核白血球の食作用に伴う酸素代謝に対する各種解熱・鎮痛・抗炎症剤の影響について検討した結果を示した。

ピラゾロン誘導体 (アンチピリン, 4-アミノアンチピリン, スルピリン) の場合、スルピリンを比較的高

Table 2. Effects of anti-inflammatory drugs on oxygen consumption by guinea pig polymorphonuclear leukocytes (PMNs) stimulated by heat killed *E. coli* and myristate

Drug	Drug conc. (mM)	Remaining activity of oxygen consumption by guinea pig PMNs stimulated by		
		<i>E. coli</i> (B)-(A)*	Myristate (B)-(A)*	Myristate (C)-(A)*
Antipyrine	1.0	100	ND	102
	2.0	99	ND	100
4-Aminoantipyrine	0.5	111	ND	ND
	1.0	128	ND	ND
	2.0	121	ND	99
	5.0	113	ND	96
Sulpyrine	1.0	100	ND	99
	2.0	99	ND	103
	4.0	76	ND	99
Phenylbutazone	0.1	85	ND	90
	0.2	51	ND	83
	0.3	37	ND	69
	0.4	31	ND	51
Oxyphenbutazone	0.1	77	ND	95
	0.2	69	ND	90
	0.5	49	ND	65
	1.0	33	ND	42
Ketophenylbutazone	0.5	79	ND	76
	1.0	42	ND	68
	2.0	37	ND	66
Benzylamine	0.01	105	ND	100
	0.02	113	ND	99
	0.05	89	ND	82
	0.1	80	ND	75
	0.15	72	ND	50
	0.2	45	ND	33
	0.25	17	ND	17
	0.3	1	ND	4
Ibuprophen	0.5	95	97	ND
	1.0	64	79	ND
	2.0	33	60	ND
Mefenamic acid	0.25	142	100	ND
	0.5	131	101	ND
	1.0	103	100	ND
Flufenamic acid	0.25	100	88	ND
	0.5	22	78	ND
	1.0	0	56	ND
Metiazinic acid	0.2	96	ND	ND
	0.5	50	ND	ND
	1.0	2	101	ND
Alclofenac	0.2	79	ND	ND
	0.5	40	104	ND
	1.0	26	100	104
Hydrocortisone	1.0	95	ND	91
	2.0	96	ND	99

* Details are described in "EXPERIMENTAL PROCEDURE".

ND: not done

濃度(4 mM)共存させて加熱大腸菌の食作用を測定した際いくぶん阻害効果がみられたほかは、薬剤濃度が mM のオーダーでもほとんど影響を示さなかった。4-アミノアンチピリンでは加熱大腸菌の系でむしろわずかな促進効果がみとめられた。

一方、ピラゾリジン誘導体(フェニルブタゾン、オキシフェンブタゾン、ケトフェニルブタゾン)は加熱大腸菌の系、ミリスチン酸の系ともいずれも濃度依存的に阻害作用を示した。加熱大腸菌の系で約50%阻害をもたらす濃度は、フェニルブタゾン 0.2 mM, オキシフェンブタゾン 0.5 mM, ケトフェニルブタゾン 1 mM であった。ミリスチン酸を刺激剤とした系では阻害の程度は相対的に低く、約50%阻害をひき起こす薬剤濃度は加熱大腸菌の場合の約2倍もしくはそれ以上であった。

酸性の非ステロイド抗炎症剤の効果は一様ではない。イブプロフェン、フルフェナム酸、メチアジン酸、アルクロフェナックは加熱大腸菌を刺激剤とした系で濃度依存的に阻害作用を示した。しかしミリスチン酸の系では、前二者が加熱大腸菌の系より相対的に低い程度ながら阻害作用を示したのに対し、後二者は全く阻害作用を示さなかった。メフェナム酸(0.25~0.5 mM)は加熱大腸菌の系でいくぶん促進傾向を示したがミリスチン酸の系では全く影響しなかった。これらの結果は酸性の非ステロイド抗炎症剤の間で白血球に対する作用点が異なっていることを示唆している。

白血球による微生物の食作用から酸素代謝の亢進に至る過程を段階的に分けると、白血球による異物認識→細胞膜受容体との結合→捕食→食胞形成→NADPH 酸化酵素活性化過程の賦活→酸化酵素の活性発現→酸素代謝の亢進となる。可溶性の刺激剤の場合は、細胞膜を直接刺激して酸化酵素活性化過程の賦活、そして酵素の活性発現をもたらすと考えられる。メチアジン酸、アルクロフェナックはミリスチン酸で刺激したとき何らの阻害作用を示さないのであるから、酸化酵素の活性化過程や酵素活性そのものに作用するのではない。加熱大腸菌などの粒子を刺激剤とした場合にのみその影響があらわれるのであるから、白血球による異物認識、接触、捕食、食胞形成あるいはこれらの過程と酸化酵素賦活過程とを結びつける刺激伝達経路に作用点を有するものと推定される。イブプロフェン、フルフェナム酸は、さきに述べたピラゾリジン誘導体と同様に、加熱大腸菌の系のみならず、ミリスチン酸を刺激剤として用いた系でも阻害的に作用し、かつ前者の系でより強い阻害がみられるところから、異物認識から食胞形成に至る過程にも作用

点を有すること、刺激剤に対する膜の構造を何らかの形で変えること、あるいは酸化酵素の活性化過程もしくは酸化酵素活性そのものにも阻害的に働くこと、などの可能性が考えられる。なおフルフェナム酸はそれ自体、休止期の呼吸を2倍程度上昇させる効果を示すので、細胞膜に対して直接的な作用を有するものと考えられる。この作用が膜を変化させ、これが他の刺激剤による活性化に対しては阻害的に働くとも考えられるが、この点は将来の検討に待たねばならない。

塩基性の抗炎症剤であるベンジタミンは、刺激剤を加熱大腸菌としてもミリスチン酸としても、いずれも 0.05 mM から阻害的作用を示し、0.3 mM でほとんど完全に代謝機能を停止させる。この場合、ベンジタミンを添加した白血球をトリパンブルーの排除試験により調べてみると、薬剤により濃度依存的に生細胞数が減少してゆく傾向にあった。したがってベンジタミンは、白血球の食作用の過程のいずれかに特異的な作用点を有するというより、細胞そのものにダメージを与えていると考えられる。

ステロイド療法はしばしば重篤な日和見感染をひき起こすことが報告されているが、ステロイド剤であるヒドロコルチゾンは多形核白血球の食作用機能に関しては 2 mM でもほとんど無作用であった。

以上、日和見感染との関連で臨床上使用されているいくつかの解熱・鎮痛・抗炎症剤について、モルモット腹腔内浸出多形核白血球の食作用に伴う酸素代謝に及ぼす影響を及ぼすかを調べた。こうした *in vitro* の実験がどの程度 *in vivo* での状態を反映しているかは今後更に検討が必要であるが、少なくともここで酸素代謝に何らかの形で阻害的に作用した薬剤は、安全性の面からみてマークしておいた方がよいと思われる。一方、本実験条件下で酸素代謝に影響を及ぼさなかった薬剤についても、多形核白血球による食殺菌作用にとって酸素代謝の亢進は必要であるが十分条件ではないことに留意して、別の角度からの検討が望まれる。事実、スルピリンや 4-アミノアンチピリンは、*C. albicans* のヒトやモルモット多形核白血球による細胞内殺菌に阻害的に作用するという結果が観察されている^{3,4)}。

日和見感染は生体内防禦機能の低下により誘発されるから多形核白血球以外の免疫担当細胞における数や機能低下も当然問題となる。著者らはヒドロコルチゾンが多形核白血球に対してほとんど影響を及ぼさなかったが、リンパ球の機能には悪影響を及ぼすことを観察している⁵⁾。これはステロイド療法による重篤な感染症の誘発はリンパ球への影響と関係があるとする多

くの知見と一致する。これに関連してスルピリン、フェニルブタゾン、オキシフェンブタゾン、ベンジタミンなども 10^{-4} M もしくはそれ以下の濃度で PHA によるリンパ球幼若化反応を90%以上抑制することにも注目する必要がある。フェニルブタゾン、オキシフェンブタゾンは *in vivo* で顆粒球減少作用も知られているので、多形核白血球に対しては、数の面及び機能の面から、またリンパ球には機能の面からなど、二重三重に生体防禦機能に悪影響を及ぼしているとも考えられる。

ところで、熱、痛み、炎症などは見方によれば感染等に対する生体側の警告信号である。これらの信号を消すことが治療上必要とされる場合が多く、これを目的とした解熱・鎮痛・抗炎症剤が医薬品として広く用いられる理由でもある。しかし信号の消去は、警告をマスクすることを意味しているので、ときに感染症が

進行してゆくのに気づかない、いわゆる不顕性感染のケースも出てくる。こうしたタイプの薬剤が一方で感染防禦機構を抑制するとすれば、マスクされた感染の進行は一段と促進されることになるので一層の注意が必要であると思われる。

文 献

- 1) B. M. Babior: *New Engl. J. Med.*, 298, 659, 721 (1978)
- 2) 奥平雅彦, 久米 光: 医学のあゆみ, 111, 1029 (1979)
- 3) T. Oshizawa, T. Hayakawa, H. Shioda, A. M. Yamamura: *4th International Congress of Immunology (Paris) Abstracts*, 11.13.16 (1980)
- 4) 川村次良ら: 原子力平和利用成果報告書(第23集) 66-1~66-3 (1983) 科学技術庁
- 5) 押沢 正ら: 衛生試験, 102, 36 (1984)

医用材料の適合性に関する化学的研究（第3報） 試作血液回路の DEHP 溶出防止効果について

辻 楠雄・新谷英晴・菊池 寛・大場琢磨・和田義晶*

Chemical Studies on Compatibility to Medical Application III Prevention of Migration of DEHP from Blood Tubings

Kusuo TSUJI, Hideharu SHINTANI, Hiroshi KIKUCHI,
Takuma OBA and Yoshiaki WADA*

It was previously reported that DEHP in blood tubings migrated into the blood during dialysis. To prevent this hazard, five types of improved tubings, the inner surfaces of which were improved to prevent DEHP migration, were tested. Human serum was circulated into them and the amount of DEHP migration from the tubing into the human serum during circulation determined by HPLC.

Eighteen to 22 mg of DEHP was found to migrate from blood tubing on market. On the other hand, the amount of DEHP migration from the improved blood tubing were as follows: the blood tubing made of PVC-polyolefin copolymer, 4 mg; tubings made of PVC, the inner surfaces of which were treated with plasma, 4.9 mg; PVC-polyolefin or PVC-EVA double layered tubings, 11.3~12.5 mg; PVC-polyurethane double layered tubings, 16.5 mg.

(Received May 31, 1984)

ま え が き

人工腎臓用血液回路（血液回路）は、軟質塩化ビニル（PVC）で作られ、メインチューブと血液ポンプ部から構成されている。それらにはいずれも可溶性とし

て35~45%のフタル酸ジ(2-エチルヘキシル)(DEHP)が含まれている。腎不全患者の人工透析の際には血液回路から DEHP の一部が溶出して血液中に移行することが知られている¹⁾。また、われわれは人工透析時に溶出する DEHP を定量するために、人血漿を用いて6時間灌流したとき約 18 mg の DEHP が溶出することを報告している²⁾。

* 日本医療用プラスチック協会

このように人工透析に際して、血液回路中の DEHP が血液中に溶出することを防止する目的で、血液回路の内面に 5 種類の異なる方法で可溶性溶出防止処理を施された試作の血液回路を用い、これに人血清を灌流させたときに人血清中に移行する DEHP を定量し、溶出量について市販の血液回路と比較し、DEHP の溶出防止効果の評価を行った。

実験の部

1. 試料

実験に用いた試作の血液回路は次の A~E である。

A : プラズマ処理血液回路 (L社製)

A' : A のポンプ部をシリコンチューブに置換した血液回路

B : ポリオレフィン系樹脂, PVC 2層構造血液回路 (M社製)

C : ポリウレタン, PVC 2層構造血液回路 (N社製)

D : エチレン酢ビ共重合 (EVA), PVC 2層構造血液回路 (M社製)

E : PVC・ポリオレフィンの共重合樹脂製血液回路 (O社製)

F, G : 市販の PVC 製血液回路 (対照試料) (L及びM社製)

A' を除く試作の血液回路の血液ポンプ部は従来通りの PVC 管で、メインチューブは、その内面に可溶性溶出防止処理を施してある。

通常血液回路はメインチューブ約 6m, ポンプ部約 40cm である。ポンプ部の可溶性含量は約 45% でメインチューブのそれに比して約 1.3 倍多い。

実験にはいずれの試料とも 2 組用いた。

2. 装置

血液ポンプ : 日機装製, BP-22 型

恒温恒湿装置 : タバイ製, PR-22 型

遠心機 : 国産遠心機製, H-108NA 型

高速液体クロマトグラフ (HPLC) : 島津製, LC-3A 型

HPLC 用検出器 : 島津製, SPD-2A 型

データ処理装置 : 島津製, クロマトバック C-R1A 型

3. 試薬

フタル酸ジ(2-エチルヘキシル) : 東京化成製, 特級品

フタル酸ジ n-オクチル : 東京化成製, 特級品

アセトニトリル : 関東化学製, 液体クロマト用

4. 実験方法

4-1. 人血清による血液回路からの DEHP の溶出

実験

血液回路の動脈側と静脈側のコネクターを結合したのち、血液回路のポンプ部を血液ポンプのローラ部にそう入する。次いで両端のシャント継手を 300 ml の人血清の入っている丸底フラスコに入れ、250 ml/min の流速に調整した血液ポンプを用い、大型恒温器中で 37° に保ちながら、血清を連続灌流させる。0, 1, 2, 4 及び 6 時間後に血清 1 ml ずつを正確に採取し、4-2 の方法で DEHP の実験を行った。

4-2. 人血清中の DEHP の抽出と HPLC による定量

人血清 1 ml を 10 ml の共栓遠沈管にとり、1N 水酸化ナトリウム 1 ml 及びアセトニトリル 2 ml を加え、40 分間激しく振り混ぜる。一夜 5° で静置したのち、再び 10 分間振り混ぜ、3500 rpm で 15 分間遠心分離し、たん白質を分離する。

その上澄液 1 ml をとり、これに内部標準物質としてフタル酸ジ n-オクチル (DnOP) を DEHP の濃度に応じて 10~30 µg 正確に加え振り混ぜる。これを HPLC 用の試料溶液とし、その 10 µl を注入し、内部標準法により定量する。

HPLC による分析条件は次の通りである。

カラム : Nucleosil 5C18, 4.6 mmφ × 150 mm.

移動相 : ホーアセトニトリル (10 : 90)

圧力 : 60 kg/cm²

流速 : 0.9 ml/min.

検出器 : UV 検出器 (測定波長 254 nm)

この条件での DEHP, DnOP の保持時間は、それぞれ 7.5 分, 8.7 分であった。

結 果

1. 検量線

DEHP 200 mg をヘキサン 100 ml に溶かして 2000 µg/ml とし、この溶液を用いて、血清 1 ml 中に 2.5, 5, 12.5, 25 及び 50 µg を加え、DEHP の濃度が、5, 10, 25, 50 及び 100 µg/ml になるように調製する。実験方法 4-2 の方法で、DEHP を抽出したのち、その 1 ml に内部標準物質 DnOP 10 µg を加え、その 10 µl を HPLC に注入して、DEHP の検量線を作製したところ、Fig. 1 の如く、良好な直線性を示した。また、島津クロマトバックを用い、面積比による内部標準二点検量線法により、DEHP の定量を行った。

2. 添加回収実験

人血清 2 ml に DEHP 200 µg を加え、4-2 の方法にしたがって添加回収実験を行ったところ、99.6~100.3% (n=3) と良好な回収率が得られた。

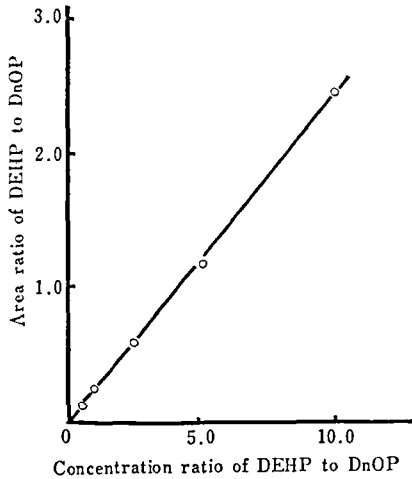


Fig. 1. Calibration curve for DEHP

DEHP: 5, 10, 25, 50, 100 μ g/ml

DnOP: 10 μ g/ml

HPLC condition

column; nucleosil 5C18. 4.6 mm ϕ \times 150 mm

carrier; H₂O : CH₃CN (10 : 90)

pressure; 60 kg/cm²

flow rate; 0.9 ml/min

detector; UV (254 nm)

3. 血液回路からの DEHP の溶出

試作の血液回路 A~E 5 種と、試料 A の血液ポンプ部をシリコンチューブに置換した血液回路 A'、並びに市販の血液回路 2 種を用い、これらに 4-1 の方法で人血清を灌流させ、溶出した DEHP の量と灌流時間の関係を Fig. 2 に示す。いずれの血液回路とも灌流時間の長い程、DEHP の溶出量は直線的に増加した。市販品はいずれも 6 時間の灌流で 18~22 mg の DEHP の溶出が見られたが、可そ剤溶出防止処理を施した試作品はいずれも溶出防止効果がみられた。すなわち、DEHP の溶出量はプラズマ処理チューブで 4.9 mg (市販品に比べて約 75% 減)、PVC・ポリオレフィン共重合樹脂チューブで 4 mg (約 80% 減)、ポリオレフィン系樹脂あるいは EVA の 2 層構造チューブで 11.3~12.5 mg (約 60% 減)、ポリウレタンの 2 層構造チューブで 16.5 mg (約 20% 減) であった。また、血液ポンプ部をシリコンチューブで置換した試作回路 A' の場合は 2.9 mg (約 85% 減) で、最も良好な防止効果が認められた。

考 察

DEHP は PVC の可そ剤として用いられているフタル酸エステルの中では最も毒性が小さく³⁾、有用な

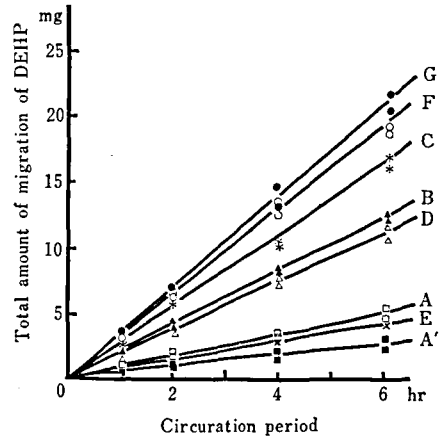


Fig. 2. Migration of DEHP from improved blood tubing

Human serum: 300 ml, 37°, 250 ml/min

A: Plasma treatment

A': Exchange with silicone at pumping for A

B: PVC-Polyolefin double layer structure

C: PVC-Polyurethane double layer structure

D: PVC-EVA double layer structure

E: PVC-Polyolefin co-polymer

F and G: Tubing on the market

可そ剤として PVC 製医療用具に広く用いられている。しかし、最近発表された Naional Toxicology Program (NTP) の第 3 回発がん物質年次報告⁴⁾において、発がん物質として 117 の物質のリストにあげられた。このことが現時点において即刻 DEHP の使用を禁止することと結びつくとは思われないが、つとめて血液回路から DEHP の溶出を減少させる必要がある。特に使用期間の長い人工透析にあたってはその配慮が必要である。そこで血液灌流中に DEHP が溶出しにくいように各種の溶出防止処理を施した血液回路を試作して、人工透析に近い条件で血清を灌流させ、溶出防止効果の評価を行った。

実験の結果、市販の血液回路からは 6 時間の人血清の灌流で 18~22 mg の DEHP の溶出がみられたが、可そ剤防止処理を施した試作の血液回路では DEHP の溶出は 4.5~16.5 mg でいずれも DEHP の溶出防止効果が認められた。なかでも溶出防止効果の優れていた血液回路は DEHP をほとんど含まない材質の物を用いている試料 E と、内面をプラズマ処理した試料 A であった。試料 E からの DEHP の溶出は 4 mg で、DEHP の含有量の多い材質のチューブを使った血液ポンプ部に起因するものと考えた。また試料 A のポンプ部をシリコンチューブに置換した試料 A' で同様の

実験をしたところ、DEHPの溶出量は2.9mgで試料Aに比べ約2mg減少した。これらのことからポンプ部からのDEHPの溶出は2~4mgで、ポンプ部からのDEHPの溶出を抑制する工夫を行えば防止効果がより一層期待できるものと考えられる。しかし、それでも試料A'からDEHPが少量ながら溶出してきているのは、血液回路の内面に施されているプラズマ処理の不均一さや長時間の血清の灌流による処理表面の劣化などによって生じるDEHPの浸出によるものと考えられる。

また、2層構造のものでは内層の樹脂としてEVA(試料D)、ポリオレフィン系(試料B)、ポリウレタン(試料C)の順に溶出防止効果が認められた。いずれの試作の血液回路も血液ポンプのシゴキ作用に耐える弾性を必要とするために、血液ポンプ部にはDEHPを約45%を含有するPVCを用いているため、灌流時間と共にDEHPの溶出の増加があったものと考えられる。その他のDEHPの溶出の原因としては、2層構造とするための押出し成型加工時の熱処理によるDEHPの内層への浸透や、灌流中での内層の亀裂などによるものと考えられる。

結 論

PVCの可成剤として用いられているDEHPの溶出を防止するために、各種の溶出防止処理を施した試作の血液回路について、人血清を6時間灌流させ、血清中に溶出されたDEHPをHPLCで定量し、溶出防止効果についての評価を行い、次のような結論を得

ることができた。

(1) 市販の血液回路でのDEHPの溶出は18~22mgであったが、内面にプラズマ処理を施した血液回路での溶出は4.9mg、内層がポリオレフィン系樹脂あるいは、EVAの2層構造のものでは11.3~12.5mg、内層がポリウレタンのものでは16.5mgで、DEHPの溶出防止効果がそれぞれ認められた。

(2) PVC製の血液ポンプ部からのDEHPの溶出をみるために、プラズマ処理を施した血液回路の血液ポンプ部をシリコンチューブに置換して、同様の実験を行ったところ、防止効果は向上しDEHPの溶出は2.9mgとなった。

(3) メインチューブにDEHPをほとんど含まないPVC・ポリオレフィン共重合樹脂を用い、血液ポンプ部には市販品を使った血液回路では4mgの溶出が認められた。この場合溶出したDEHPはほとんど血液ポンプ部に起因すると考えられた。

本研究は昭和57年度厚生科学研究費によった。終りに本研究のために人血清の提供を頂いた東京都駒込血液センターの越村栄之助博士に謝意を表します。

文 献

- 1) 小野慶治, 立川 涼, 脇本忠明: 日本医事新報 No. 2642: 24 (1974)
- 2) 大場琢磨, 辻 楠雄, 水町彰吾, 飯田和子: 人工臓器, 6, 48 (1977)
- 3) 大場琢磨ら: 衛生試報, 93, 1 (1975)
- 4) *Chemical Regulation Reporter*: Vol. 7, No. 43. 1572, Jan. 27 (1984)

新しく考案した4分画フラット寒天平板の Spiral System への応用

小沼博隆・尾上洋一*・倉田 浩

Devised Four Compartments Flat Agar Plate applicable to the Spiral
Plating System for counting Bacteria

Hirotaka KONUMA, Youichi ONOUE* and Hiroshi KURATA

A specially designed flat plastic plate with four compartments was constructed and its applicability as an agar plate was examined with the spiral plate technique for counting bacteria. Statistical analyses of the results showed no difference between this plate and ordinary ones at the 5% level of probability, except in bacterial suspensions used at population below $10^3/ml$. Analysis of operation times and material requirements showed that significant savings in cost, time, space and support labour could be achieved with this special plate as compared to ordinary plates. Therefore, this four compartments agar plate is recommended as rapid, simplified, and convenient technique for use in the spiral plate method.

(Received May 31, 1984)

まえがき

著者ら²⁾は、Gilchristら³⁾、Campbellら⁴⁾によって開発された Spiral Plating system の精度並びに簡易・迅速性について、種々の食品を検査材料に用いて標準寒天培養法（混釈法）と比較した結果、本装置は混釈法に匹敵し得る精度を持ち、簡易・迅速化が計れることを報告した。また、本装置の弱点であるサンプル吸引ノズルの口径が小さいために生じる目詰りを防止するために口過機能を備えたストマッカー袋を考案し、その口過袋の信頼性、迅速性についても報告した。

今回は、Spiral Plating system (SPL) の特徴を生かして微生物濃解析を簡易・迅速化することを目的に4分画シャーレを用い、4種類の選択培地を個別にしかもフラットに分注、凝固させることのできるドーナツ型硬質ガラスディスクを考案した。このドーナツ型ディスクを用いて4分画フラット寒天平板を作製し、SPL に応用したところ、被検サンプル中の菌数が $10^3 \sim 10^5/ml$ の範囲であるならば1枚の平板で4菌種を同時に定量解析できることがわかったので報告する。

実験材料及び方法

1. 使用菌株と試料の調製

Staphylococcus aureus ATCC 25923, *Escherichia coli* IFO 12734, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028,

Vibrio parahaemolyticus IFO 12711, の4菌種をハートインフュージョンプロス (Difco) で一夜培養 (35°) 後、滅菌生理食塩水で菌数を $10^2 \sim 10^5/ml$ に適宜10倍段階希釈し試料とした。なお、*V. parahaemolyticus* については培地及び希釈液は3%塩化ナトリウム添加のものを用いた。

2. 使用装置、器材及び培地

装置：Spiral Plater model B-250 (Spiral System 社)
器材：滅菌シャーレ (栄研器材), Xプレート1009・4分画シャーレ (ファルコン) 及び新しく考案した直径 85 mm, 口径 22 mm, 厚さ 3 mm のドーナツ型硬質ガラスディスク (Fig. 1)。

培地：TCBS (日水), MLCB (日水), DHL (栄研), 卵黄5%添加マニット食塩寒天 (MS) (栄研) 及び標準寒天培地 (栄研)。

3. 4分画フラット寒天平板の作製方法

Xプレート1009・4分画シャーレに考案した滅菌済みドーナツ型ガラスディスクをセットし、Fig. 2 に示すごとく中心部のホールから各種寒天培地を分注し、寒天培地がガラスディスク内側表面全体に密着した時に分注をやめ凝固させる。寒天培地が凝固した後、ガラスディスクを滅菌ピンセットで取り除くことによって各分画内の寒天平板の高さは分画仕切り壁の高さと等しくなり、4分画寒天平板の表面全体がフラットな平板を作製することができた。使用に際しては、フ卵器内 (35°) で2時間乾燥後、実験に供した。

無分画寒天平板の作製方法は、滅菌Sシャーレを用

* 神奈川県衛生研究所

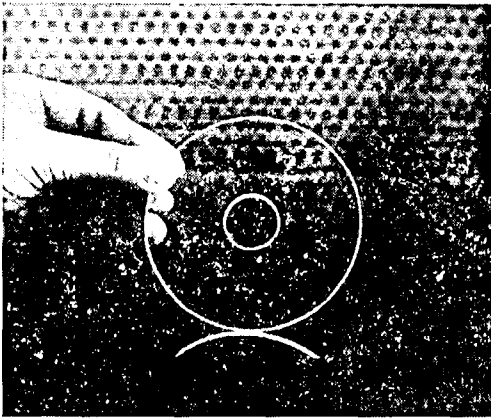


Fig. 1. New apparatus for flattening agar media of four compartments petri dish

Diameter: 85 mm, Bore: 22 mm, Thickness: 3 mm

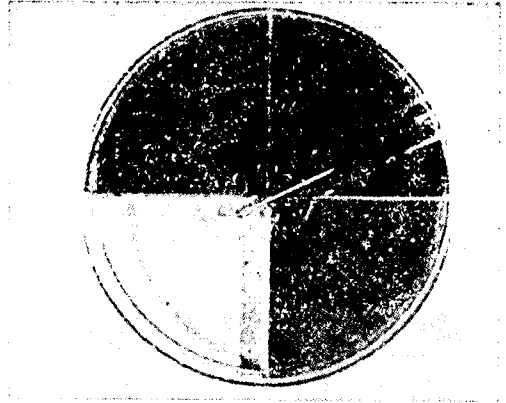


Fig. 2. Demonstration of the four compartments flat agar plate

い常法にしたがって各種培地を分注・凝固・乾燥させ実験に供した。

4. 細菌数測定方法

4菌種単独並びに4菌種混合の各段階希釈試料について SPL を用いて無分画及び4分画寒天平板に塗抹し、 $35^{\circ}\cdot 18\sim 24$ 時間培養後菌数計測を行った。計測方法は、無分画寒天平板は所定⁹⁾の方法で行った。4分画寒天平板は各分画ごとに2つの集落算定用格子内の集落数を計測した後、所定の方法にしたがった。また、集落数が10個以下の場合分画内の集落のすべてを計測し、その集落数を4倍し、全塗抹量(0.037 ml)で除し、ml 当たりの菌数とした。

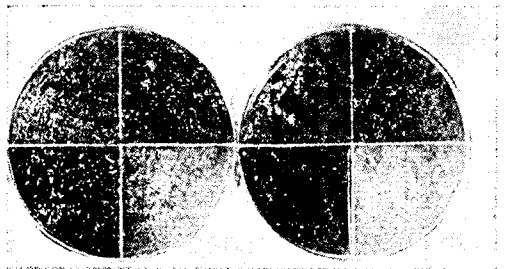
5. データの解析

無分画と4分画フラット寒天平板に出現した集落数は、統計処理し、両平板の分散が等しい場合は t 検定、等しくない場合は Welch の t 検定を行い、両平板値を比較検討した。

結 果

1. Spiral Plating System で塗抹培養した4分画寒天と4分画フラット寒天平板の比較

SPL は、レコード盤のように寒天平板を回転させると同時に Sample 塗抹ノズルでラセン状に試料を塗抹するため、Fig. 3 右側に示すごとく X プレート 1009・4分画シャーレに各種培地を通常の方法で分注・凝固させた4分画寒天平板を用いると、培地の分注量が多い場合は表面張力で表面が凸レンズ状に盛り上がり、塗抹ノズルで寒天が切れる。また、分注量が少ない場合は、各分画の仕切り壁にノズルがひっかかり上下動を



Flat agar plate non-flat agar plate

Fig. 3. Comparison of bacteria colonies on the four compartments flat agar plate (used new apparatus) and non-flat agar plate (Conventional method) from suspension of $10^4\sim 10^6$ bacteria/ml inoculated by spiral plating system

繰り返すため、正確な塗抹をすることができないことを認めた。そこで、考案したドーナツ型硬質ガラスディスクを用いて作製した4分画フラット寒天平板に塗抹したところ、Fig. 3 左側に示すごとく確実な塗抹ができた。また、菌数 10^3 , 10^4 , 10^5 /ml の試料を塗抹したところ、Fig. 4 に示したごとく均一に試料を塗抹することができ、菌量を変えても確実に塗抹できることを確認した。

2. 無分画と4分画フラット寒天平板の菌数測定値の比較

1) 非選択培地を用いた場合

4分画フラット寒天平板に SPL で試料を塗抹し、各分画に出現した菌数の精度を測定するために、*S. aureus* $10^2\sim 10^5$ /ml の段階希釈液試料を用い、各試料ごとに非選択培地(標準寒天培地)を分注、凝固させた無分画寒天平板 100 枚計 400 枚及び4分画フラット

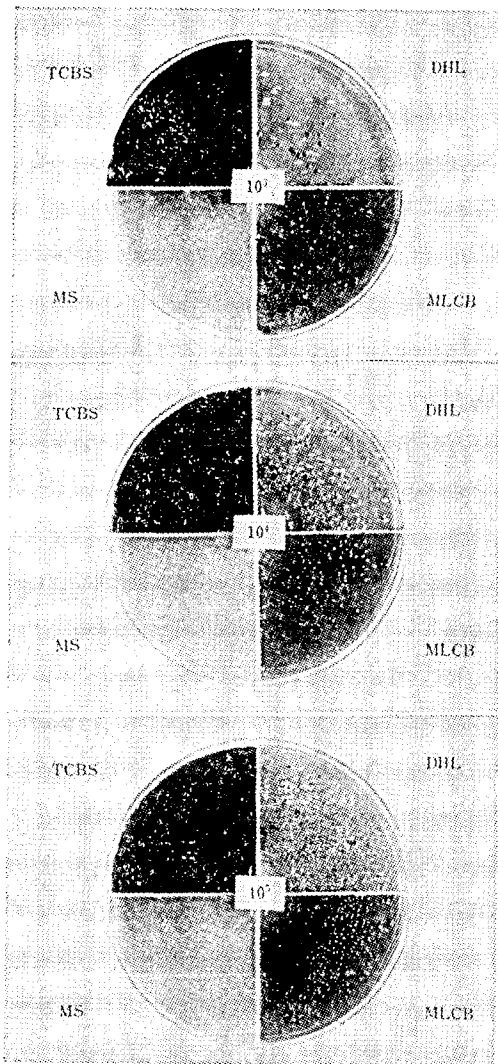


Fig. 4. Bacterial colonies on four compartments flat agar plate from suspension of 10^3 , 10^4 and 10^5 bacteria/ml inoculated by spiral plating system

寒天平板 100 枚、合計 500 枚に塗抹し、両寒天平板を比較した。

その結果、 10^2 /ml 試料では、無分画寒天平板は 100 枚中 99 枚 (99%) に集落が出現したのに対し、4 分画フラット寒天平板は各分画とも 60~70% にしか出現せず、有意差検定はできなかった。

10^3 /ml 試料では、すべての無分画・4 分画フラット寒天平板に集落が出現したので、両寒天平板から得られた菌数測定結果をもとに度数分布図を作成した (Fig. 5)。その結果、無分画と 4 分画フラット寒天平板の各分画 (分画 I~IV) の度数分布曲線は良く似た

パターンを示し、両平板の菌数は平均値 3.78 前後で分散は等しく、 t 検定は t 値 0.00281~0.68580 の範囲にあり、5% 有意水準で有意の差は認められなかった。なお、Fig. 5 中の分画 I~IV の配列はすべて SPL のノズルが各分画の寒天平板に塗抹する順に分画番号を付したものである。

10^4 /ml 試料では、 10^3 /ml 試料と同様、無分画と 4 分画フラット寒天平板度数分布曲線は良く似たパターンを示し、平均値 4.63 前後で各分画とも分散は等しく、 t 検定は t 値 0.11602~0.63100 の範囲にあり、5% 有意水準で有意の差は認められなかった。

10^5 /ml 試料では、両寒天平板の度数分布曲線は似たパターンを示し、平均値 5.12 前後、各分画とも分散は 1.15325~1.97118 の範囲で分散は等しく認められたが、 t 検定で分画 II は t 値 2.90714 で有意の差が認められた。

以上の結果から、*S. aureus* 1 菌種のみを標準寒天培地に塗抹した 4 分画フラット寒天平板は、ml 当り 10^3 ~ 10^5 菌数が存在するサンプルにおいては無分画寒天平板に匹敵し得る精度のあることがわかった。

2) 4 種類の選択培地を用いた場合

次に、4 分画フラット寒天平板は、微生物叢解析に応用できる精度を持つかどうかを検討するために次の実験を行った。*V. parahaemolyticus*, *S. typhimurium*, *E. coli* 及び *S. aureus* の各々の菌種を 10^3 ~ 10^5 /ml になるように混合した各 10 倍段階希釈液試料を調整し、各試料ごとに 4 種類の寒天培地 (TCBS, MLCB, DHL 及び MS 寒天培地) を分注・凝固させた無分画、4 分画フラット寒天平板 (4 種類の培地を 1 枚のシャーレに分注、凝固) 各 10 枚、合計 150 枚に塗抹し、各試料及び各培地ごとに無分画と 4 分画フラット寒天平板に発育した集落数を比較した。

その結果、各菌種の試料ともに 10^4 ~ 10^5 /ml では *V. parahaemolyticus* を除き、5% 有意水準で有意の差は認められなかったが、 10^3 /ml では *S. typhimurium* を除き有意の差が認められた。しかし、1% 有意水準では *V. parahaemolyticus*, *S. aureus* のみに有意の差が認められた (Table 1)。

3. 操作時間の比較

4 菌種を混合した試料 100 検体を SPL を用いて 4 分画と無分画寒天平板に塗抹した際の操作時間を比較した (Table 2)。その結果、操作時間は 4 分画フラット寒天平板法では 81.6 分、無分画寒天平板法では 4 種類の寒天平板を用いるため 400 枚に塗抹することになり 252.0 分費やした。したがって 1 時間当りの処理検体数は、4 分画フラット寒天平板法 74 検体に対し、無

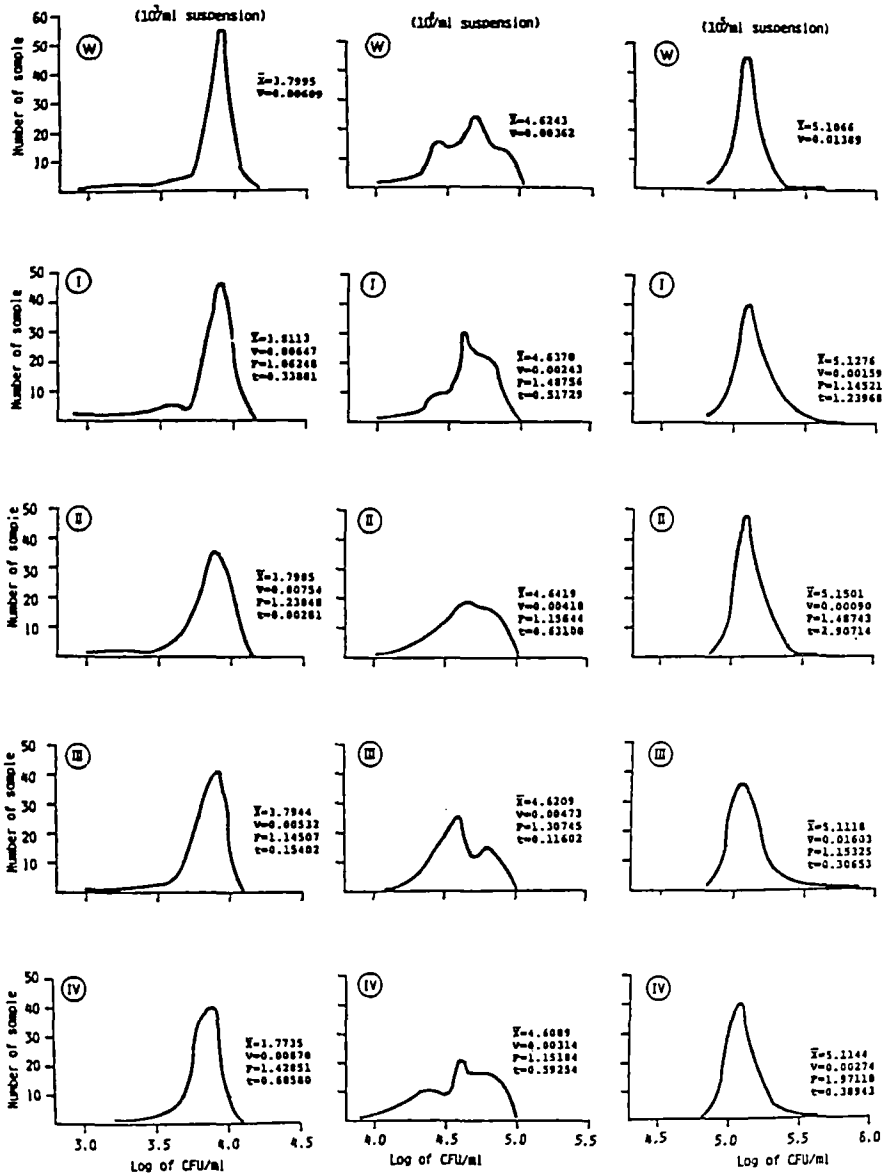


Fig. 5. Comparison of numerical analysis of replicate colony count on 100 samples of *Staphylococcus aureus* suspension ($10^3 \sim 10^6$ cells) by the whole agar plate and four compartments flat agar plate method

Ⓜ : Whole agar plate method

Ⓛ~Ⓧ: Four compartments flat agar plate method

分画寒天平板法は23.8検体と約1/3であった。

4. 培地及び器材の消費の比較

試料100検体をSPLを用いて培地に塗抹した際の、4分画法と無分画寒天平板法における使用培地並びにシャーレの消費量を比較した (Table 2)。

その結果、使用培地量は、4分画フラット寒天平板法では、TCBS, MLCB, DHL及びMS寒天培地に1050 ml消費したのに対し、無分画寒天平板法では、2000 ml消費した。シャーレ消費量は、前者では100枚消費したのに対し、後者では400枚と4倍消費した。

Table 1. Statistical analysis of comparative replicate colony counts on each 10 samples of *S. aureus*, *E. coli*, *V. parahaemolyticus* and *S. typhimurium* suspension ($10^3 \sim 10^5/ml$) by the whole agar plate and four compartments flat agar plate method

Method	<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Escherichia coli</i>		
	10^3	10^4	10^5	10^3	10^4	10^5
Whole plate method	$\bar{X}=3.054$ V=0.00122	$\bar{X}=4.019$ V=0.00085	$\bar{X}=5.026$ V=0.00284	$\bar{X}=3.335$ V=0.00554	$\bar{X}=4.364$ V=0.00413	$\bar{X}=5.206$ V=0.00069
Four compartments flat plate method	$\bar{X}=2.970$ V=0.00484	$\bar{X}=4.026$ V=0.00303	$\bar{X}=5.030$ V=0.00277	$\bar{X}=3.411$ V=0.00705	$\bar{X}=4.374$ V=0.00420	$\bar{X}=5.198$ V=0.00246
Whole plate method: Four compartments method	F=3.95498 t=3.41106**	F=3.56858 t=0.35526	F=1.02450 t=0.16899	F=1.27220 t=2.14151*	F=1.01744 t=0.346321	F=3.564246 t=0.450494

Method	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>			<i>Salmonella typhimurium</i>		
	10^3	10^4	10^5	10^3	10^4	10^5
Whole plate method	$\bar{X}=3.721$ V=0.00689	$\bar{X}=4.802$ V=0.00192	$\bar{X}=5.229$ V=0.01003	$\bar{X}=3.355$ V=0.00825	$\bar{X}=4.153$ V=0.00298	$\bar{X}=5.160$ V=0.00064
Four compartments flat plate method	$\bar{X}=3.582$ V=0.00520	$\bar{X}=4.660$ V=0.01093	$\bar{X}=5.251$ V=0.00335	$\bar{X}=3.411$ V=0.00706	$\bar{X}=4.088$ V=0.00968	$\bar{X}=5.127$ V=0.00813
Whole plate method: Four compartments method	F=1.32674 t=3.99668**	F=5.69426 t=3.96077***)	F=2.99873 t=0.60141	F=1.16877 t=1.43141	F=3.24893 t=1.82678	F=12.7900 t=1.11449 ^{w)}

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, W): welchs test

Table 2. Media and equipment requirements, and process time and sample-handling capacities of the examination of 100 samples of bacterial suspension by the method of whole agar plate and four compartments agar plate

Method	Plastic petri dishes	Media				Total time (100 samples)	Sample per hour
		TCBS	MLCB	DHL	MS		
Whole plate method	400	2000 ^{ml}	2000 ^{ml}	2000 ^{ml}	2000 ^{ml}	min. 252.0	23.8
Four compartments flat plate method	100	1050	1050	1050	1050	81.6	74.0

考 察

微生物叢解析を簡易、迅速及び省力化することを目的に1枚のシャーレ(4分画シャーレ使用)に4種類の培地を個別にしかもフラットに分注、凝固させることのできるドーナツ型硬質ガラスディスクを考案した。このドーナツ型ディスクを用いて作製した4分画フラット寒天平板をSPLに応用し、本寒天平板の精度、迅速性、省力化について従来から行われている1枚の寒天平板を用いる方法と比較検討した。

SPLの精度、簡易・迅速性に関する研究は、既に

本システムの開発者である Gilchrist³⁾, Campbell⁴⁾に加え Donnellyら⁶⁾, Jarvisら⁷⁾, Peelerら⁸⁾, Hedgesら⁹⁾, Kramerら¹⁰⁾及び著者ら^{1,2)}によって行われ、その実用性、経済性及び省力性に至るまで詳細に報告されている。しかし、いずれの場合も1枚のシャーレに1種類の培地を分注、凝固させた寒天平板を用いて菌数計測を行っているに過ぎない。

著者らは、SPLの特徴であるところの寒天平板がレコード盤の様に回転している時に寒天平板上にサンプル塗抹ノズルでラセン状に試料を塗抹すること、及び菌数計測は発育集落が出現した寒天平板を8等分し

た専用の集落算定用格子を用い、その対称2点の格子(1/4平板)を計測して ml 当りの菌数とすることに注目した。これらの2つの特徴を生かして、平板の各1/4に4種類の選択培地を分注、凝固させることによって1枚の寒天平板から少なくとも4菌種を同時に計測することができ、加えて使用培地、シャーレの節約及び操作時間の短縮が可能となるのではないかと考え、4分画シャーレに4種類の培地を分注、凝固させた寒天平板を作製し SPL で試料を塗抹してみた。しかし、分注培地量が多い場合は表面張力によって寒天平板全体が凸レンズ状に盛り上がり、寒天平板を回転させると、塗抹ノズルが盛上った寒天に引っかかり、スムーズに塗抹できなかった。また逆に、培地量が少ない場合はシャーレを分画している仕切の壁にノズルが引っかかり塗抹できなかった。つまり、SPL の塗抹ノズルは、寒天平板全面がフラットでないとスムーズな塗抹ができないことがわかった。そこで、4分画シャーレの各分画に培地をフラットに分注、凝固させることのできるドーナツ型硬質ガラスディスクを考案した。このディスクを用いて作製した4分画フラット寒天平板の精度を、従来の寒天平板と比較した結果、被検試料の菌数が $10^3/ml$ 以上存在する場合は、各分画に発育した集落の計測値は従来の寒天平板と同等の精度を持つことが明らかになった。このことは、Jarvis ら⁷⁾ が種々の食品を用いた実験から、SPL 塗抹培養後の平板は、どの分画に出現した集落数を計測しても、元のサンプルの菌数測定が可能であるとした報告と一致した。しかし、4菌種を混合した場合には $10^3/ml$ で有意の差が認められたが、その差は極く小さいもので微生物叢解析には支障のないものと考えられる。

4分画フラット寒天平板を用いることによる操作時間並びに器材の節約は、無分画寒天平板法に比較し、操作時間で約 1/3、シャーレ枚数 1/4、培地量約 1/2 とすることができ、迅速性、省力化に加え経済性も向上することがわかった。しかし、4分画フラット寒天

平板法の欠点は、培地を分注、凝固させる際の操作に時間を費すことである。また、作製した平板を保存する際は、完全密封の状態にしないと、培地の水分が蒸発し、表面がやせるため各分画の寒天表面がフラットにならなくなるなどであるが、この問題は寒天平板の表面に滅菌した合成フィルムを貼ることにより、あるいはビニール袋で平板全体を密封することにより解決し、約2週間保存することができた。

以上、SPL に新しく考案した4分画フラット寒天平板を用いることによって、複雑な微生物叢解析の簡易・迅速化及び省力化が計れることから、特に検体が一時に集中し、しかも被検材料の優勢菌種をマークして検索を進めるような食中毒検体、あるいは臨床材料の試験法としては有用であると考えられる。また、本平板を食品の微生物学的品質管理に応用することにより、微生物叢を主体にした簡便な品質管理の可能性も考えられる。

文 献

- 1) 小沼博隆ら: 日本食品衛生学会第41回学術講演会要旨集, p. 18 (1981)
- 2) H. Konuma *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**, 765 (1982)
- 3) J. E. Gilchrist *et al.*: *Appl. Microbiol.*, **25**, 244 (1973)
- 4) J. E. Campbell, J. E. Gilchrist: *Dev. Ind. Microbiol.*, **14**, 95 (1973)
- 5) User Manual of Spiral Plater Model-B, Spiral Systems, Inc.
- 6) C. B. Donnelly *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **32**, 21 (1976)
- 7) B. Jarvis *et al.*: *J. Appl. Bacteriol.*, **43**, 149 (1977)
- 8) J. T. Peeler *et al.*: *J. Food Protect.*, **40**, 462 (1977)
- 9) A. J. Hedges *et al.*: *J. Appl. Bacteriol.*, **45**, 57 (1978)
- 10) J. M. Kramer *et al.*: *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **6**, 286 (1979)

Zinc diethyldithiocarbamate 妊娠期投与における母ラット，
胎仔及び出産仔の発育に及ぼす影響

中浦 慎介・田中 悟・川島邦夫・高仲 正・大森義仁

Effects of Zinc diethyldithiocarbamate on the Prenatal and
Postnatal Developments of the Rats

Shinsuke NAKAURA, Satoru TANAKA, Kunio KAWASHIMA,
Akira TAKANAKA and Yoshihito OMORI

Zinc diethyldithiocarbamate (ZDEC) was suspended in olive oil and was given by oral intubation to pregnant Wistar rats at the daily doses of 31.25, 62.5, 125 and 250 mg/kg during days 7 through 15 of gestation, and the effects of ZDEC on the prenatal and postnatal developments were examined.

NO changes in maternal body weight gain, food consumption and general symptoms were found in the groups of 62.5 mg/kg of ZDEC and below. In the 125 mg/kg group, slight diarrhea was observed. In the highest dose group of 250 mg/kg, maternal body weight gain and food consumption were markedly suppressed, toxic symptoms such as piloerection, diarrhea and syntexis were seen, and 7 out of 22 dams died.

At the 20th day of gestation, there was no evidence of an increase in fetal death or of malformation attributable to the treatment with ZDEC in any of the dose levels examined. In the postnatal examination, the developments of the offspring were well maintained at dose levels of 125 mg/kg and below without any evidence of disorders attributable to the treatment on morphological examination.

It is concluded that ZDEC has no teratogenic effect in rats under the present experimental conditions, although the compound, at dose levels of 125 and 250 mg/kg, elicited maternal toxicity.

(Received May 31, 1984)

はじめに

われわれは家庭用品に用いられている化学物質の安全性に関する研究の一環として、妊娠期に投与した化学物質の胎仔及び出産仔の発育に及ぼす影響を催奇形性を中心に検索している。これまで繊維製品などの防炎加工剤として用いられていた Tris(2,3-dibromopropyl)phosphate¹⁾、Tris(1,3-dichloroisopropyl)phosphate²⁾ 及び Tris(2-chloroethyl)phosphate³⁾ の成績をそれぞれ報告した。今回はゴム類の加硫促進剤⁴⁾として用いられている Zinc diethyldithiocarbamate (ZDEC) を妊娠ラットに投与し、母体、胎仔及び出産仔に及ぼす影響を調べたので、その成績を報告する。

ZDEC は食品関係用品、医療用品及び衛生用品などのゴム製品に添加されている。ゴム製品への添加量は比較的少量であり、急性毒性も弱いことが知られている⁴⁻⁷⁾。しかし催奇形性に関する報告は認められない。

実験材料及び方法

1. 検体

ZDEC は住友化学工業 K.K. の製品 (Lot. No. 20601) で、水には不溶であることから使用時、超音波破砕器 (360W, 5分) を用いてオリーブ油 (日本薬局方) で20%懸濁液として実験に供した。

2. 動物

ウイスター系ラット (日本ラット, 雌12週齢, 雄14週齢) を用い、妊娠母獣を得るために未経産雌 (5匹) と同系の雄 (2匹) の割合で一夜同居させた。翌朝膈垢中に精子が認められた雌ラットを受精したものとして実験に供し、この日を妊娠0日として起算した。妊娠ラットはアルミ製妊娠ケージ (夏目製作所) に1匹ずつ收容し、温度 25±1°, 相対湿度 55±5%, 換気回数 15/hr., 明暗交代12時間の動物室内で、固型飼料 (オリエンタル酵母, MF) 及び水道水を自由に摂取させた。

3. 投与量及び投与方法

ZDEC の投与量は、予備実験の成績を参考にして

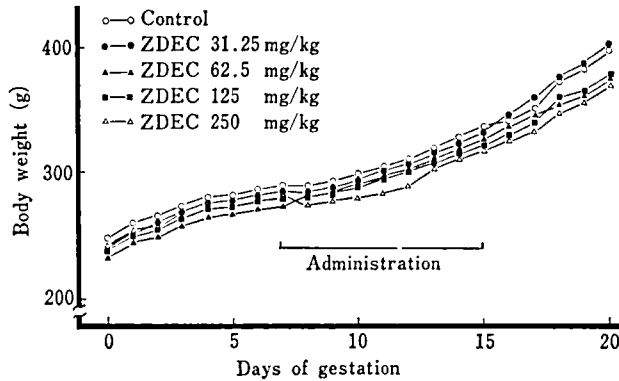


Fig. 1. Effect of oral administration of ZDEC on body weight of pregnant rats

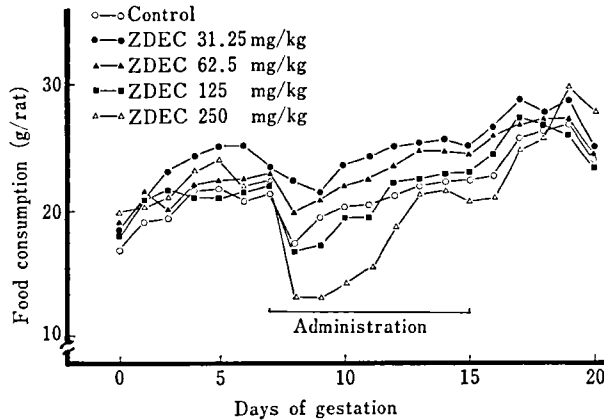


Fig. 2. Effect of oral administration of ZDEC on food consumption of pregnant rats

決定した。すなわち、12週胎の雌ラットに ZDEC の 125, 250 及び 500 mg/kg を 5 日間経口投与した結果、500 mg/kg で 5 匹中 5 匹が死亡、250 mg/kg で軽度の体重増加抑制及び下痢が観察された。125 mg/kg では著変は認められなかった。この成績から、本実験の最大投与量を 250 mg/kg とし、以下 125, 62.5 及び 31.25 mg/kg 用量を用いた。1 群 21~23 匹の妊娠ラットに胎仔の器官形成期を含む妊娠 7 日から 15 日まで毎日 1 回胃ゾンデを用いて経口投与し胎仔実験及び育成実験を行った。なお、対照群にはオリーブ油を 5 ml/kg 経口投与した。

妊娠ラットは毎日一般状態を観察し、体重及び摂餌量を測定した。

4. 胎仔実験

前述した妊娠ラットのうち、対照群の 14 匹、31.25, 62.5 及び 125 mg/kg 群の 15 匹、250 mg/kg の 14 匹を胎仔実験に用いた。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、

性比及び死亡胎仔数を調べた。生存胎仔については肉眼及び触手による外表異常の検査を行い、体重を測定した。各母体について無作為に約 1/3 の胎仔を抽出し、ブアン液で、残り約 2/3 の胎仔は 90% アルコールでそれぞれ約 2 週間固定した。ブアン液固定胎仔については粗大切片標本⁸⁾ を作製して内部器官の異常を、アルコール固定胎仔についてはアリザリン赤染色骨格標本⁹⁾ を作製して骨格系の異常をそれぞれ拡大鏡下で調べた。

5. 育成実験

妊娠末期に解剖しなかった妊娠ラット、対照群の 7 匹、31.25 mg/kg 群の 8 匹、62.5 mg/kg 群の 7 匹、125 mg/kg 群の 8 匹については自然分娩させ、育成実験を行った。分娩後すみやかに出産仔の数、生死、外表異常の有無などを観察し、体重を測定した。なお、4 日齢時において 10 匹以上の仔動物を哺育している母ラットについては仔動物数を 10 匹に制限した。その後は 1 週間に 1 回体重を測定するとともに発育の状態

Table 1. Effect of oral administration of ZDEC on pregnant rats

Doses (mg/kg/day)	Control	31.25	62.5	125	250
No. of dams examined	21	23	22	23	21
No. of dead dams	0	0	0	0	7(33.3%)
No. of dams for fetal examination	14	15	15	15	14
No. of dams with totally dead fetuses	0	0	0	0	0
No. of corpora lutea (mean±S.D.)	192 (13.7±1.9)	202 (13.4±1.4)	217 (14.4±1.7)	211 (14.0±2.0)	214 (15.2±3.0)
No. of total implants (mean±S.D.)	171 (12.2±2.4)	181 (12.0±2.3)	184 (12.2±1.1)	188 (12.5±1.6)	181 (12.9±2.4)
Implantation ratio(%)	89.8	89.2	85.6	89.6	85.4
No. of dams for postnatal examination	7	8	7	7	-
No. of dams with no pups delivered	0	0	0	0	-

Table 2. Effect of oral administration of ZDEC to pregnant rats on spleen weight

Doses (mg/kg/day)	Control	31.25	62.5	125	250
No. of pregnant rats	14	15	15	15	14
Body weight (g)	394±25	403±26	382±40	381±29	378±31
Spleen weight					
Absolute (g)	0.86±0.16	0.86±0.15	0.89±0.15	0.85±0.12	0.90±0.16
Relative (g/100g)	0.22±0.04	0.22±0.04	0.23±0.03	0.22±0.03	0.24±0.03

Data are mean±S.D.

(耳介伸展，歯芽崩出，被毛発生，眼瞼開裂，睪丸下垂及び陰開口の時期)を調べた。4週齢時に離乳，雌雄の仔動物を分離飼育した。仔動物の生後観察は10週齢時までに行った。観察終了後，剖検し，主要器官の重量を測定した。

なお，実験成績は母体を評価の単位として， χ^2 検定¹⁰⁾(母ラットの死亡率)，t 検定¹¹⁾(母ラットの体重，摂餌量，黄体数，着床数及び脾重量，胎仔の数及び体重，出生仔の数，体重及び器官重量)，及び順位和検定¹²⁾(胎仔の死亡率，形態異常発生頻度，化骨数，分娩率，哺育率，出生仔の生存率)を用いて対照群と比較検討した。

実験成績

1. 妊娠母体に及ぼす影響

妊娠期間中における各群母ラットの平均体重の推移を Fig. 1 に示した。ZDEC の 31.25 及び 62.5 mg/kg 群は対照群と同様な体重増加を示し，一般状態に著変は認められず，死亡例はなかった。125 mg/kg 群では平均体重の推移に変化は認められなかったが，投

与開始 6 日目(妊娠12日)から 8 日目(妊娠14日)まで軽度の下痢が22匹中 5 匹に観察された。250 mg/kg 群では投与開始 2 日目(妊娠 8 日)から軽度の体重増加抑制が認められるとともに全例に立毛，下痢，眼の周囲の出血及び衰弱が観察され，21匹中 7 匹が妊娠 9 日目から13日目の間に死亡した(Table 1)。死亡をまぬがれた妊娠ラットの体重は投与終了後も軽度の増加抑制が認められた。

妊娠期間中の摂餌量の推移は Fig. 2 に示した。対照群及び各 ZDEC 群とも投与開始 2 日目(妊娠 8 日)に摂餌量の低下が認められた。妊娠期間中の摂餌量では，125 mg/kg 以下の群は対照群に比べて特に大きな差を示さなかった。250 mg/kg 群では投与開始 2 日目(妊娠 8 日)から 6 日目(妊娠12日)まで対照群より低い摂餌量を示した。しかし投与 7 日目からは対照群とはほぼ同様の推移を示した。

胎仔実験に用いるために妊娠20日目にエーテル麻酔下で開腹して得られた母ラットの所見は Table 1 に示した。

黄体数，着床数及び着床率において対照群と ZDEC

Table 3. Effect of oral administration of ZDEC to pregnant rats on fetal development

Doses (mg/kg/day)	Control	31.25	62.5	125	250
No. of dams	14	15	15	15	14
No. of total implants	171	181	184	188	181
No. of live fetuses (mean±S.D.)	164 (11.7±2.5)	177 (11.8±2.4)	180 (12.0±1.1)	180 (12.0±2.2)	172 (12.2±2.7)
Sex ratio (Male/Female)	0.71	0.86	0.78	1.02	0.93
Body weight (g)					
Male (mean±S.D.)	3.8±0.2	3.8±0.2	3.6±0.4	3.7±0.3	3.4±0.4
Female (mean±S.D.)	3.5±0.2	3.5±0.2	3.3±0.3	3.5±0.3	3.2±0.4
No. of dead implants	7	4	4	8	9
Early death	7	4	4	8	9
Late death	0	0	0	0	0
Mortality (%)	4.1	2.7	2.1	4.9	5.6
No. of fetuses with malformation	0	0	0	0	1(0.6%)

Table 4. Effect of oral administration of ZDEC to pregnant rats on skeletal development of fetuses

Doses (mg/kg/day)	Control	31.25	62.5	125	250
No. of dams	14	15	15	15	14
No. of fetuses	112	118	120	123	117
No. of fetuses with malformations					
Cleft palate	0	0	0	0	1(0.8%)
No. of fetuses with variations					
Cervical ribs	8(7.3%)	11(8.2%)	5(3.7%)	2(1.5%)	10(8.9%)
Varied cervical arches	0	0	2(1.7%)	0	4(4.2%)
Varied thoracic centra	11(11.0%)	5(4.3%)	6(4.9%)	5(4.4%)	4(3.0%)
Split thoracic centra	3(2.7%)	2(1.6%)	1(0.7%)	0	3(2.2%)
Varied sternbrae	71(64.0%)	71(59.7%)	76(63.6%)	78(64.1%)	97(81.4%)
Lumbar ribs	39(33.7%)	48(43.3%)	45(37.4%)	71(58.5%)	37(31.1%)
Varied pubes	0	1(0.8%)	0	0	0
Ossification state(average number)					
Metacarpus	7.5	7.8	7.4	7.6	7.3
Metatarsus	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0
Sacro-caudal vertebrae	7.9	8.2	7.9	8.0	7.7

Occurrence rate(%) in parenthesis is the average of the incidence in each litter.

群との間に有意差は認められなかった。

Zinc ethylphenyldithiocarbamate (ZEPIC) を妊娠ラットに投与した場合、脾重量が有意に増加することを報告した¹³⁾。そこで本実験でも妊娠ラットの脾重量を測定比較した (Table 2)。しかし対照群と各 ZDEC

群との間に有意差は認められなかった。

2. 胎仔に及ぼす影響

Table 3 に示した通り、平均生存胎仔数、性比、胎仔体重及び胎仔死亡率ともに対照群と ZDEC 群との間に有意差は認められなかった。

Table 5. Effect of oral administration of ZDEC to pregnant rats on postnatal development of offspring

Doses (mg/kg/day)	Control	31.25	62.5	125
No. of dams	7	8	7	8
No. of implantation site (mean±S.D.)	87 (12.4±2.2)	112 (14.0±1.1)	81 (11.5±3.6)	94 (11.7±2.1)
No. of newborn at birth (mean±S.D.)	84 (12.0±2.4)	108 (13.6±1.5)	80 (11.4±3.6)	90 (11.3±2.3)
Delivery index (%)	96.7	96.3	98.9	95.4
No. of offspring at 4 days (mean±S.D.)	82 (11.7±2.1)	105 (13.0±1.2)	77 (11.0±3.5)	84 (10.5±2.0)
Viability index (%)	97.9	97.5	96.7	93.9
No. of offspring after selection at 4 days ^{a)} (mean±S.D.)	68 (9.7±0.7)	80 (10.0±0.0)	63 (9.0±1.9)	76 (9.2±1.4)
No. of offspring at 4 weeks (mean±S.D.)	57 (8.1±3.0)	70 (8.7±2.0)	58 (8.2±1.8)	63 ^{b)} (9.0±1.7)
Lactation index (%)	83.5	87.5	92.8	83.7
No. of offspring at 10 weeks (mean±S.D.)	56 (8.0±3.4)	70 (8.7±2.0)	58 (8.2±1.8)	62 (8.8±1.6)
Survival index (%)	92.8	100	100	98.5

a): Litters with a total number of offspring greater than 10 were reduced to this number on the 4th day after birth. b): All offspring from 1 dam in the 125mg/kg group was killed by cannibalism of the dams within 4 weeks after birth.

Delivery index=(No. of offspring at birth/No. of implantation sites)×100
Viability index=(No. of offspring at 4 days/No. of offspring at birth)×100
Lactation index=(No. of offspring at 4 weeks/No. of offspring selected at 4 days)×100
Survival index=(No. of offspring at 10 weeks/No. of offspring at 4 weeks)×100
These indexes are the average of the incidence in each litter.

外表異常の検査において、対照群及び ZDEC 125 mg/kg 以下の群では異常胎児は観察されなかった。250mg/kg 群に口蓋裂を有する胎児が 1 例認められた。しかし、発現頻度は 0.6% で対照群に比べて有意差は認められなかった。

内部器官の検査では生存胎児中に異常胎児は観察されなかった。

骨格検査の成績は Table 4 に示した。骨格奇形と考えられる異常は対照群及び ZDEC 125 mg/kg 以下の群には観察されなかった。250mg/kg 群に口蓋裂を有する胎児が 1 例 (0.8%) 観察された。しかし、この骨格奇形胎児の発現頻度は低く、対照群に比べて有意差も認められなかった。

骨格変異と考えられる異常は対照群を含む各群に観察された。すなわち、頸肋骨が各群に 1.5~8.9% 観察された。頸椎椎弓の短小あるいは分離を有した胎児が 62.5 mg/kg 群に 1.7%、及び 250 mg/kg 群に 4.2% 観察された。胸椎椎体の変形 (痕跡状、二連球状) が各群に 3.0~11.0% 観察された。胸椎椎体の分離が対照群に 2.7%、31.25 mg/kg 群に、1.6%、62.5 mg/

kg 群に 0.7% 及び 250 mg/kg 群に 2.2% それぞれ観察された。胸骨核の異常 (変形、分離、癒合、欠損) を有する胎児が対照群に 64.0%、31.25 mg/kg 群に 59.7%、62.5 mg/kg 群に 63.6%、125 mg/kg 群に 64.1% 及び 250 mg/kg 群に 81.4% 観察された。臑肋骨が対照群を含む各群に 31.1~58.5% 観察された。恥骨の短小が 31.25 mg/kg 群に 0.8% 観察された。しかしながら、これら骨格変異の発生率には対照群と ZDEC 投与群との間に有意差は認められなかった。

骨化状態については中手骨、中足骨及び仙尾椎の骨数を調べて判定した (Table 4)。いずれの骨数においても対照群と ZDEC 投与群との間に有意差は認められなかった。

3. 出産仔の発育に及ぼす影響

各群 7~8 匹の妊娠ラットを自然分娩させ、出産仔の生後発育について調べた。250 mg/kg 群では母ラットが 22 匹中 7 匹死亡したため、育成実験は 31.25、62.5 及び 125 mg/kg の 3 用量について行った。

Table 5 に示した通り、着床数及び分娩仔数並びに分娩率では ZDEC 投与群と対照群との間に有意差は

Table 6. Effect of oral administration of ZDEC to pregnant rats on absolute organ weights of offspring

Doses (mg/kg/day)	Control		31.25		62.5		125	
Sex of offspring	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male
No. of dams	7		8		7		7	
No. of offspring	34	22	34	36	24	34	27	35
Brain (g)	1.92±0.07	2.05±0.10	1.88±0.15	1.97±0.16	1.93±0.06	2.06±0.11	1.92±0.08	2.03±0.10
Pituitary (mg)	12.9±1.74	10.3±1.90	11.6±2.63	11.5±1.81	13.6±2.63	12.2±1.96	11.9±2.54	10.7±2.21
Thyroid (mg)	18.0±2.35	21.9±5.92	18.0±3.00	21.2±2.65	21.5±5.33	23.6±6.38	19.7±3.83	22.1±4.10
Thymus (g)	0.47±0.12	0.59±0.12	0.50±0.10	0.60±0.12	0.44±0.10	0.59±0.17	0.45±0.08	0.52±0.12
Heart (g)	1.05±0.14	1.53±0.31	1.01±0.10	1.44±0.30	1.07±0.15	1.55±0.26	1.08±0.11	1.46±0.17
Lung (g)	1.61±0.24	2.10±0.31	1.72±0.30	2.14±0.49	1.81±0.41	2.29±0.41	1.68±0.27	2.06±0.35
Liver (g)	11.9±1.12	17.9±2.94	11.5±1.26	16.4±3.39	13.6±1.77	18.1±3.35	12.2±1.70	16.5±2.92
Spleen (g)	0.57±0.08	0.80±0.07	0.61±0.09	0.78±0.14	0.64±0.08	0.91±0.22	0.62±0.07	0.82±0.14
Kidney (g) R	0.98±0.11	1.42±0.19	0.95±0.10	1.41±0.20	0.99±0.11	1.49±0.27	0.98±0.13	1.37±0.19
L	0.97±0.09	1.42±0.21	0.93±0.09	1.36±0.18	0.99±0.11	1.46±0.23	0.99±0.15	1.38±0.19
Adrenal (mg) R	35.5±4.74	30.7±5.60	32.1±4.80	29.4±5.84	33.6±5.83	31.1±7.96	31.1±3.89	26.1±4.80
L	34.9±5.48	30.4±5.67	35.3±5.51	27.9±6.95	35.6±6.89	33.4±8.63	32.4±7.05	29.1±5.97
Uterus (g)	0.41±0.08		0.42±0.09		0.49±0.10		0.38±0.04	
Ovary (mg) R	85.4±15.5		90.3±11.3		83.9±20.9		82.4±10.7	
L	90.9±14.3		86.4±17.8		89.8±23.1		84.2±16.1	
Testis (g) R	1.86±0.15		1.76±0.12		1.70±0.16		1.77±0.11	
L	1.84±0.14		1.76±0.15		1.70±0.15		1.76±0.10	

Data are mean±S.D.

認められなかった。4日齢時生存率にも有意差は認められなかった。125 mg/kg 群の1匹の母ラットは分娩後1週以内に出産仔全例を喰殺した。しかし、哺育率及び10週齢時生存率のいずれにおいても対照群とZDEC投与群との間に有意差は認められなかった。

出生仔の体重について、10週齢に至るまで測定したが、雌雄ともいずれの測定時においても対照群とZDEC投与群との間に有意差は認められなかった。

出生仔の耳介伸展、歯芽崩出、被毛発生、眼瞼開裂、睪丸下垂及び陰開口の各時期において対照群とZDEC投与群との間に有意な差は認められなかった。

10週齢時における解剖所見でもZDEC投与との関連性を示唆する異常は観察されなかった。

主要器官の実重量はTable 6に示すとおり、若干のバラツキが散見されたが有意な変化は認められなかった。体重に対する相対値も有意差はなかった。

考 察

ZDECを妊娠ラットに連続経口投与した場合、125 mg/kg 群の22匹中5匹(22.7%)に軽度ではあったが下痢が認められた。また250 mg/kg 群では立毛、下痢、眼の周囲の出血及び衰弱並びに著明な摂餌量の

減少と体重増加抑制が観察され、21匹中7匹(33.3%)のラットが妊娠期間中に死亡した。これらの成績から、妊娠ラットに対して、125 mg/kg 用量は毒性発現量であり、250 mg/kg は致死量であると考えられる。

われわれはZDECと類似の化学構造を有するZEPGは妊娠ラットの脾重量の増加及び胎仔致死作用を有することを認めている¹³⁾。しかし、ZDECを用いた本実験では妊娠ラットの脾重量の増加及び胎仔死亡率の増加は観察されなかった。

ZDECを投与した妊娠ラットから得られた胎仔について、外表奇形としては250 mg/kg 群に口蓋裂が1例観察された。しかし、本実験の対照群並びに自然発生奇形に関する報告¹⁴⁻¹⁶⁾との比較において、この発生頻度及び形状ともにZDECに起因したものとは考えられない。また、内部器官及び骨格の奇形は1例も認められなかった。

胎仔の骨格変異として、頸椎椎弓の変異が62.5及び250 mg/kg 群にそれぞれ2例及び4例観察された。しかしながら、本実験の対照群及び当研究室の背景データとの比較において、その発現頻度は低く、ZDECに起因したものとは考えられない。また、腰肋が各群に若干例観察された。安田ら¹⁷⁾は腰肋の頻度は催奇形性

の指標になると報告しているが、本実験ではその発生頻度が ZDEC 群において特に高くなるという成績は得られなかった。

骨化状態は中手骨、中足骨及び仙尾椎数を指標として観察したが、骨化遅延は認められなかった。

なお、著しい胎仔致死作用を示した ZEPG では、胎仔の骨格変異の増加及び骨化遅延が認められている¹²⁾。

ZDEC 125 mg/kg 以下の用量群の出生仔の観察において、発育の状態、死亡率、体重の推移、解剖所見及び器官重量のいずれにおいても ZDEC 投与によると考えられる異常は認められなかった。

以上、本実験条件下では ZDEC が胎仔致死作用及び催奇形作用を有する物質であるとは評価されなかった。なお、母体に対して 62.5 mg/kg、胎仔に対して 250 mg/kg、出生仔に対して 125 mg/kg は無影響であった。

ま と め

Zinc diethyldithiocarbamate (ZDEC) の 31.25, 62.5, 125及び 250 mg/kg をラットに妊娠 7 日から 15 日まで毎日 1 回強制経口投与し、妊娠母体、胎仔及び出産仔に及ぼす影響を催奇形性を中心に検索した。

1) 妊娠母体：一般状態、摂餌量及び解剖所見において 62.5 mg/kg 以下の群では変化は認められなかった。125 mg/kg 群では軽度な下痢が認められた。250 mg/kg 群では立毛、下痢、眼の周囲の出血、衰弱所見及び摂餌量の低下と体重増加抑制が認められ、22 匹中 7 匹が死亡した。

2) 胎仔：生存数、性比、体重及び死亡率において 250 mg/kg を含む ZDEC 投与群で変化は認められな

かった。外形、内部器官及び骨格検査において ZDEC 投与によると考えられる異常例は観察されなかった。

3) 出産仔：着床数、分娩仔数、分娩率、4 日齢時生存率、哺育率、10 週齢時生存率、体重及び器官重量に変化は認められなかった。耳介伸展、歯芽崩出、被毛発生、眼瞼開裂、睾丸下垂及び腔開口の各時期において変化は認められなかった。

文 献

- 1) 川島邦夫ら：衛生試報，98，50 (1980)
- 2) 田中 悟ら：衛生試報，99，50 (1981)
- 3) 川島邦夫ら：衛生試報，101，55 (1983)
- 4) 日本ゴム協会：ゴム工業便覧，p.234 (1973)
- 5) 日本ゴム工業会食品医療用品部会：ゴム製食品用器具及び容器包装等に関するポジティブリスト，p.17 (1983)，日本ゴム協会
- 6) H. G. Bourne *et al.*: *Arch. Environ. Health.* 16, 700 (1968)
- 7) C. L. Ivanova *et al.*: *Environmental Research* 4, 201 (1971)
- 8) J. G. Wilson, J. Workany: *Teratology—Principles and Techniques*, p.262 (1964) Chicago Univ. Press
- 9) A. B. Dawson: *Stain Technol.*, 1, 123 (1926)
- 10) 佐久間 昭：生物検定法，p.234 (1975) 東大出版
- 11) C. S. Weil: *Food Cosmet. Toxicol.*, 8, 177 (1970)
- 12) 佐久間 昭：簡便統計手法，p.5 (1965) 日本レダリー
- 13) S. Nakaura *et al.*: *J. Toxicol. Sci.* 8, 337 (1983)
- 14) 江崎考三郎，谷岡功邦：先天異常，10, 216 (1970)
- 15) A. K. Palmer: *Drugs and Fetal Development*, M. A. Klingberg *et al.* eds., *Adv. Exp. Biol. Med.*, 27, 45 (1972)
- 16) 亀山義郎ら：先天異常，20, 25 (1980)
- 17) 安田峯生，前田広由：先天異常，13, 25 (1973)

N-ブチル-N-ニトロソ尿素 (BNU) による白血病発生に対する免疫抑制剤 及び同系骨髄細胞移植の影響 (I) 初期の変化について

古田京子・荻生俊昭*・松岡千明・前川昭彦

Effects of Azathiopurine-feeding or Bone Marrow Transplantation on Leukemogenic Activity of N-Butyl-N-nitrosourea (BNU) in Donryu Rats (I) Sequential Observations of Immunological and Histological Changes in the Subacute Stage

Kyoko FURUTA, Toshiaki OGIU*, Chiaki MATSUOKA and Akihiko MAEKAWA

Eleven-week-old male Donryu rats were given a 400 ppm BNU solution as the drinking water for 5 weeks, thereafter treated with continuous feeding of 0.04 or 0.01% azathiopurine containing diet or single intravenous injection of 5×10^7 bone marrow cells. Rats were sacrificed every 5 weeks until the 25th experimental week and the immunological state was examined by PFC assay and histological changes. BNU administration for 5 weeks caused a marked immunodepressive state, hypoplasia of hematopoietic organs such as the bone marrow, spleen and thymus, and also atrophy of the testis. These changes were improved by bone marrow transplantation. In contrast, recovery from the hypoplastic state was delayed in rats given azathiopurine diet after BNU-treatment. Two leukemias were induced in both the group given BNU only and also the group given BNU+azathiopurine, respectively, although no leukemia was observed in the BNU-bone marrow transplantation group. It is suggested that not only the transforming but also the immunosuppressive activities of BNU play an important role in BNU-leukemogenesis in rats.

(Received May 31, 1984)

はじめに

今までに種々の発癌性物質が宿主免疫能を低下させる事が報告されている。この現象は発癌性物質が免疫監視機構の閾値を低下させ、発生して来た少数個の癌細胞の増殖を抑制できなくさせるために、肉眼的な大きな腫瘍にまで成長してしまうのだと考えられている¹⁾。

一方、小田嶋²⁾がN-ブチル-N-ニトロソ尿素(BNU)の連続経口投与によりラットに白血病が高率に発生する事を報告して以来我々のグループによりラットに種々の病型の白血病を誘発する手段が開発され、ラットにおける実験白血病の研究が促進されるようになって来た³⁻⁶⁾。

ラット白血病発生におよぼす宿主免疫能の影響を検討する目的で今回、BNUをラットに投与した後、免疫抑制剤であるアザチオプリン(イムラン)の投与、

あるいは同系ラット骨髄細胞の移植を行ない、経時的に屠殺して宿主におこる変化を観察した。

材料及び方法

1: 動物

8週齢の雄ドンリュウラットを日本ラット(埼玉)から購入し、基本食 CE-2(日本クレア・東京)で、室温 $25 \pm 1^\circ$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ の動物室で飼育した。

2: N-ブチル-N-ニトロソ尿素 (BNU)

BNUは泉化学(横浜)より購入したものを精製して用いた。BNUは、光、温度、湿度に分解されやすいため冷蔵庫内に保存した。毎日、400 ppmになるようBNUを蒸留水に溶解し、遮光した給水ビンに入れて投与し、自由摂取させた。

3: アザチオプリン

アザチオプリン(田辺製薬、大阪)は粉末飼料 CE-2に混ぜて投与した。

4: 骨髄細胞の調製

骨髄細胞は同系雄ドンリュウラットの大腿骨及び上腕骨より採取し、ハンクス液に浮遊させて、ガーゼで濾過した後、3回、遠心と浮遊をくり返して洗った後、

* 現、愛知県がんセンター研究所

* Present address: Laboratory of Ultrastructure Research, Aichi Cancer Center Research Institute

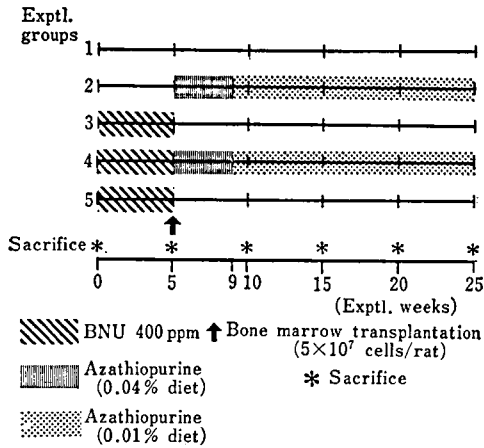


Fig. 1. Experimental design for examining the effects of immunological treatments on leukemogenesis by BNU in Donryu rats

位相差顕微鏡下で生細胞数を算定し、 1×10^8 個/ml となる様に調整した。

5: PFC (plaque-forming cell) の算定

定期屠殺の4日前に被検ラットにヒツジ赤血球を静注し、屠殺時に脾細胞を採取し、橋本らの方法⁷⁾により PFC の算定を行なった。

6: 実験群 (Fig. 1)

動物は11週齢時に5群に分け、第1群は無処置の対照群とし、第2群は実験第5週目から0.04%にアザチオプリンを混ぜた粉末飼料を投与したが、Fig. 2 に示すように体重の著しい減少がみられたため、第9週目からは、濃度を下げて0.01%のアザチオプリン添加飼料を投与し、以降、この濃度の飼料を実験終了時まで自由摂取させた。第3群には400 ppm BNU 溶液を飲料水として5週間投与した後、基本食で飼育した。第4群にはBNUを5週間投与した後、第5週目から第9週目までは0.04%アザチオプリン添加飼料を、第10週目以降は0.01%アザチオプリン添加飼料を実験期間中投与した。第5群にはBNUを5週間投与した後、直ぐに1匹当たり 5×10^7 個の骨髓細胞を尾静脈より注入し、以降、基本食で飼育した。各群の動物は5週毎に6匹ずつ屠殺し、各3匹をPFC算定に、各3匹を組織学的観察に供した。

7: 組織学的観察

動物はエーテル麻酔により屠殺し、主要臓器をとり、10%緩衝ホルマリン液で固定後、パラフィンに包埋し、薄切後、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

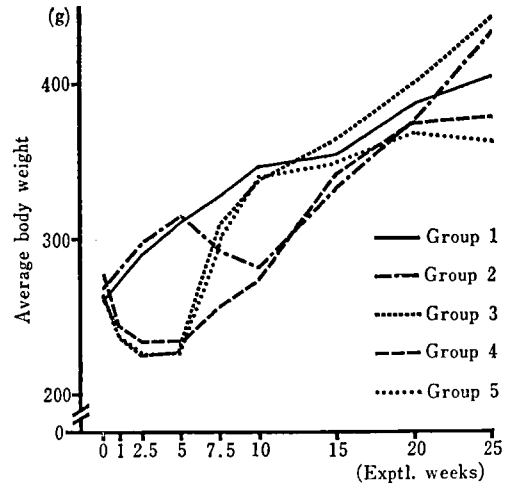


Fig. 2. Growth curves of rats treated with BNU in the drinking water for 5 weeks followed by immunological treatments

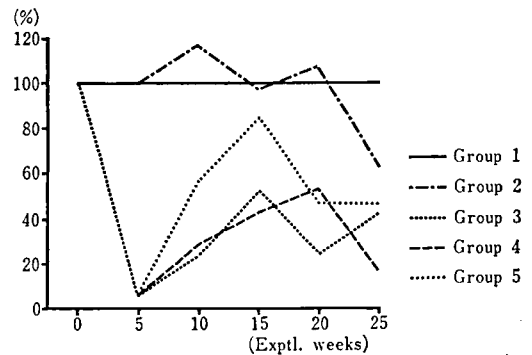


Fig. 3. Percentage of PFC count of experimental groups to the untreated control group

結 果

1: 体重の変化

Fig. 2 に実験開始後の体重の変動を示した。無処置対照群では順調な体重の増加がみられたのに対し、BNU 投与を行った3つの群では実験開始と共に急速な体重減少がみられ、特に最初の1週間は体重減少が著明であった。投与開始後2.5週目から投与終了時までにはほぼ同じ体重を維持し、投与終了と共に急速な体重増加が見られ、特に第3群と第5群では実験10週目には、無処置対照群とほぼ同じくらいまでにその回復が見られた。一方、第2群では0.04%アザチオプリン添加飼料投与開始後より体重の著明な減少がみられたが、アザチオプリンの濃度を0.01%に下げた第9週目以降、順調な体重の増加がみられた。これに対し、第4群で

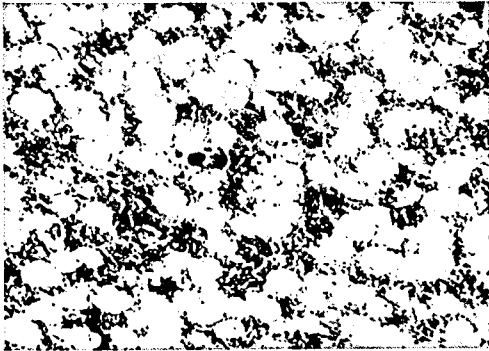


Fig. 4. Hypoplasia of the bone marrow observed in a rat given BNU solution for 5 weeks ($\times 100$, H-E).



Fig. 5. Hypoplasia of hematopoiesis in the splenic red pulp at the 5th experimental week ($\times 40$, H-E).

は第3群、第5群に比べ、体重の回復は遅れたものの、実験10週日には、第2群とほぼ同じまで回復し、以後、順調に体重が増加し、15週目にはほぼ他の群と同じ程度にまで増加した。

2: PFC 算定結果

Fig. 3 に無処置対照群に対する百分率で PFC 算定結果を示した。無処置対照群では 10^6 個の脾細胞当りの PFC は 4000~5500 で経時的に漸増する傾向がみられた。アザチオプリン単独投与群では PFC の減少傾向は弱く25週で著明に減少した。BNU 投与群では投与終了時には PFC は対照群の6%にすぎなかった。第3群と第4群では PFC の回復が遅延していたが、第5群では急速な回復がみられ、実験15週目には対照群の83%くらいまで回復した。その後実験20ないし25週目に PFC の値が再び低下する傾向がみられた。

3: 病理学的所見

肉眼的及び組織学的に変化の強く見られた臓器は骨髄、脾臓、胸腺及び精巣であった。骨髄は第2群では実験25週目に骨髄の一部に低形成像が認められた。一方、BNU 投与各群では5週目に高度の造血の低形成像が見られた (Fig. 4)。第3群と第4群では20週目に対照群程度まで回復した。一方、第5群では10週目にかなりの回復が見られ15週目には対照群程度まで回復した。脾臓はアザチオプリンのみを投与した第2群では20週目まで無処置対照群との間に違いはみられなかったが25週目には白脾髄の軽度の萎縮がみられた。BNU 投与各群では実験5週目に対照群の約2/3の大きさに萎縮し、組織学的にも赤脾髄の低形成像が認められた (Fig. 5)。その後アザチオプリンを投与した第4群では第3群、第5群に比べ回復が遅れ、20週目に至り第3群、第5群と同じ程度に回復した。

胸腺は、無処置対照群では実験15週目まで徐々に退



Fig. 6. Severe depression of thymocytes from the thymus at the 5th experimental week ($\times 100$, H-E).

縮し、以降この大きさを維持した。これに対し、BNU 投与各群では急速な臓器重量の減少がみられ、5週目には対照群の約1/4になった。組織学的には皮質の胸腺細胞がほとんど消失し、皮質-髓質境界も明瞭でなくなった (Fig. 6)。しかし BNU 投与中止後は、各群共に急速な臓器重量の回復がみられ、組織学的にも皮質に胸腺細胞の再出現が見られ (Fig. 7)、実験15週目には無処置対照群とほぼ同程度にまで回復した。これら BNU 投与群の中でアザチオプリン後投与群の回復が他の2群に比べ、やや遅れる傾向がみられた。

精巣の変化は BNU 投与群のみに見られ、投与開始後よりその重量が減少し、BNU 投与中止後もなお減少が続き、10週目には実験開始時の約1/3にまで激減した。組織学的には、5週目にはほとんどの精細管において精祖細胞、精母細胞、精娘細胞の消失がみられ一部の精細管に精子がわずかに残っているのが見られるのみであった。10週目ではこれらの中のごく一部の精細管に再生が見られ (Fig. 8)、精子形成の見られた

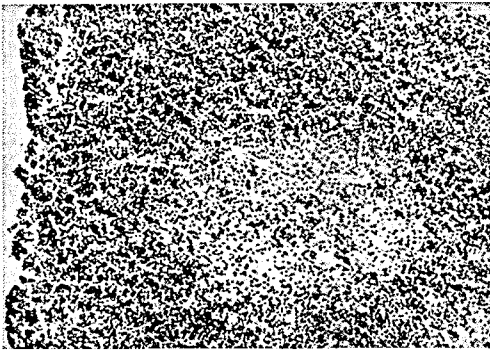


Fig. 7. Repopulation with lymphoblasts and thymocytes 5 weeks after completion of BNU treatment ($\times 100$, H-E).

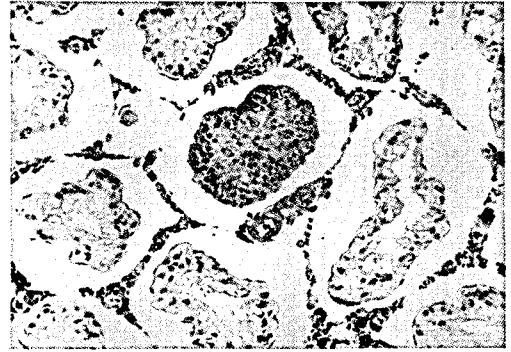


Fig. 8. Disappearance of spermatogonia and spermatocytes from the testis, partly recovering spermatogenesis 5 weeks after completion of BNU treatment ($\times 100$, H-E).

例もあった。実験15週目には一部に再生の認められない精細管を残しているものの、ほとんどの精細管に再生が認められた。これらの変化には、BNU 投与終了後の処置の違いによる差は認められなかった。

実験期間中に、骨髄細胞移植群における GVH 反応 (graft-versus host reaction) は見られなかった。一方、実験25週までの間に、BNU 投与群中、第3群では実験11週と13週に、また第4群では実験20週と25週に白血病の発生が認められたが、第5群では白血病は発生しなかった。

考 察

BNU を5週間投与する事により免疫能が著明に低下すると共に、造血臓器の障害が認められた。また精子形成の障害も高度に認められた。すなわち、BNU は強い免疫抑制作用を有する事が確認された。小田嶋ら⁸⁾は、Sprague-Dawley ラットに BNU を投与した場合、2週間の連続投与では PFC の回復は著明であるが、5週間以上の連続投与では、回復しない事を報告している。今回の実験でも一度回復した PFC 算定数が再び下がる傾向が見られた BNU による免疫能の抑制は、骨髄細胞を移植する事により改善された。これは恐らく、免疫に関連する細胞を移植した為の直接的な効果のみならず、全体に低下した造血機能に対し、血液幹細胞の補給を行なう意義も大きいと考えられる。しかし、骨髄細胞移植後、短期間の屠殺を行っていない為、CFU-S の出現の確認は行われていない。一方、アザチオプリンを無処置ラットに投与しても、PFC 算定数は急速には低下せず、実験25週目になってはじめて低下を見た。アザチオプリンの免疫抑制作用には恐らく T 細胞系、B 細胞系等々、種々の細胞系が関与する為、PFC 算定数を下げるには長期間の投与を必

要とするものと考えられる。BNU+アザチオプリン投与群では、精子形成障害からの回復に影響は見られないが、脾や骨髄の造血の障害、あるいは胸腺の障害からの回復が他の群よりやや遅れる傾向がみられ、また、PFC の算定数も実験25週目には低下している。一方、BNU 単独投与群及び BNU+アザチオプリン投与群にのみ早期に白血病の発生が認められている事から、免疫監視機構が、BNU あるいはアザチオプリンにより障害されて、発生して来た少数個の白血病細胞が増殖し、顕性白血病に至るのに大きく影響しているものと考えられる。

ま と め

BNU 単独5週間投与によりラットに免疫能の著明な低下、造血及び精子形成の障害がみられた。同系骨髄細胞の移植により、それらの回復が促進された。また BNU 単独投与群及び BNU+アザチオプリン投与群では白血病の発生が各々2例ずつ見られた。これらの事から BNU による白血病の発生には単に BNU による細胞の腫瘍化のみならず、免疫抑制作用も非常に重要な役割を演じている事がうかがわれる。

謝辞

この実験は文部省がん特1、山村班の援助の下に行われたものである。PFC の実施について、橋本嘉幸先生 (東北大薬学部) の御援助を得た。また BNU の精製は中館正弘先生にお願いした。

文 献

- 1) F. M. Burnet: *Progr. Exp. Tumor Res.*, 13, 1 (1970)

- 2) S. Odashima: *Gann*, **61**, 245 (1970)
 3) T. Ogiu, M. Nakadate, S. Odashima: *J. Natl. Cancer Inst.*, **54**, 887 (1975)
 4) T. Ogiu, M. Nakadate, S. Odashima: *Cancer Res.*, **36**, 3043 (1976)
 5) M. Takeuchi, T. Ogiu, M. Nakadate, S. Odashima: *Gann*, **71**, 231 (1980)
 6) T. Ogiu, S. Odashima: *Acta Pathol. Jpn.*, **32** (Suppl. 1), 223 (1982)
 7) 橋本嘉幸, 大島絃子: 免疫実験操作法, Vol. 2, p. 477 (1972) 日本免疫学会 (京都)
 8) S. Odashima, Y. Hashimoto, T. Ogiu, A. Maekawa: *Gann*, **66**, 615 (1975)

N-ブチル-N-ニトロソ尿素 (BNU) による白血病発生に対する免疫抑制剤及び同系骨髄細胞移植の影響(II) 長期発癌実験による白血病発生への影響

荻生俊昭*・古田京子・松岡千明・前川昭彦

Effects of Azathiopurine-feeding or Bone Marrow Transplantation on Leukemogenic Activity of N-Butyl-N-nitrosourea (BNU) in Donryu Rats (II) Effects on the Induction of Leukemia

Toshiaki OGIU*, Kyoko FURUTA, Chiaki MATSUOKA and Akihiko MAEKAWA

Eleven-week-old male Donryu rats were given a 400 ppm BNU solution as the drinking water for 5 or 15 weeks, thereafter treated with continuous feeding of a 0.01% azathiopurine diet or single intravenous injection of 5×10^7 bone marrow cells. The experiment was continued until the 90th experimental week. Final incidences of leukemias were 31~54% in the groups given BNU for 5 weeks and 77~82% in the groups given BNU for 15 weeks. Azathiopurine feeding after 5-week-treatment with BNU showed an increase in the incidence of leukemia, although a statistically significant difference in the incidences was not demonstrated between the group receiving BNU and azathiopurine and the group given BNU alone. In contrast, bone marrow transplantation could not save the rats from induction of leukemias by BNU. These results suggest that the destruction of immuno-surveillance play an important role in the progression of leukemia in rats.

(Received May 31, 1984)

はじめに

N-ブチル-N-ニトロソ尿素 (BNU) には強い白血病誘発作用がある事が、始め小田嶋¹⁾によって示され、その後、多くの人々²⁻⁴⁾によって追認された。他方、このBNUには強い免疫抑制作用があり、我々の先の実験によっても5週間のBNU連続経口投与により免疫能が著明に低下するが、骨髄細胞を移植すると免疫能の回復が促進される事、免疫抑制剤アザチオプリンの投与はその回復を遅延する事が示された⁵⁾。それゆえ、更に長期の実験により、BNUによる白血病発生に対するこれらの処置がどのような影響を与えるかを検

討する目的で、今回、BNUを5週間あるいは15週間投与した後、アザチオプリン添加飼料の連続投与、あるいは同系ラット骨髄細胞移植を行ない、90週迄経過観察して白血病発生に及ぼす影響を検討した。

材料及び方法

1: 動物

8週齢の雄ドブリユウラットを日本ラット(埼玉)から購入し、基本食CE-2(日本クレア、東京)で、室温 $25 \pm 1^\circ$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ の動物室で飼育した。

2: N-ブチル-N-ニトロソ尿素 (BNU)

BNUは泉化学(横浜)より購入したものを精製して用いた。BNUは、光、温度、湿度に対し感受性が高いため、冷蔵庫内に保存し、毎日、400 ppmになる様蒸留水に溶解し、遮光した給水ビンに入れて投与し、自由摂取させた。

* 現 愛知県がんセンター研究所

* Present address: Laboratory of Ultrastructure Research, Aichi Cancer Center Research Institute

3: アザチオプリン

アザチオプリン (田辺製薬, 大阪) は粉末飼料 CE-2 に混ぜて投与した。

4: 骨髄細胞の調製

骨髄細胞は同系雄ドブリウラットの大腿骨及び上腕骨より採取し、ハンクス液に浮遊させて、ガーゼで濾過した後、3回、遠心と浮遊を繰り返して洗った後、位相差顕微鏡下で生細胞数を算定し、 1×10^8 個/ml となる様に調整した。

5: 実験群

動物は7群に分けた (Fig. 1)。第1群は無処置対照群、第2群は実験5週目より0.01%アザチオプリン添加飼料を投与した対照群とした。第3群にはBNU溶液を5週間投与した後、基本食を与えた。第4群には

BNU 溶液を5週間投与した後、0.01%アザチオプリン添加飼料を与えた。第5群にはBNU溶液を5週間投与した後、直ちに 5×10^7 個の骨髄細胞を尾静脈より移植した。第6群は、BNU溶液を15週間投与した群、第7群は、BNUを15週間投与した後、 5×10^7 個の骨髄細胞を移植した群とした。

6: 病理学的観察

動物は経時的に体重を測定すると共に、血液を採取し、白血病の出現をチェックした。衰弱した動物はエーテル麻酔により屠殺し、主な臓器をとり、10%緩衝ホルマリン液で固定した後、パラフィンに包埋した。組織標本は薄切後、ヘマトキシリン-エオジン染色を行った。血液塗抹標本はライト-ギムザ染色を行った。

結 果

1: 体重の変化

Fig. 2 に実験開始後の体重の変動を示した。各群共、実験開始時の平均体重は290~300gの間にあったが、第1群と第2群は、ほぼ同様の増加曲線を描き、順調に体重増加が見られた。BNU投与各群は、処置の開始と共に急速に体重の減少がみられ、第3群、第4群、第5群は5週間のBNU投与中止と共に急速な体重の増加が認められ、3群共にほぼ同様の経過をたどって増加した。これらの3群は実験10週から40週まで第1群、第2群とほぼ平行に増加し、これら2群に追いつく事は無かった。一方、第6群と第7群ではBNU投与期間の内、実験10週目までは体重減少が続き、それ以後はやや回復がみられた。実験15週目にBNU投与を終了した後は、急速な回復がみられた。体重曲線に

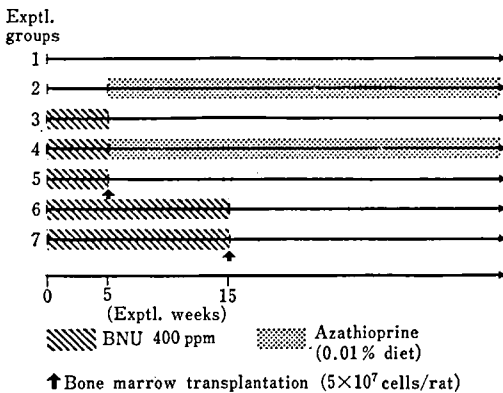


Fig. 1. Experimental design for examining the effects of immunological treatments on leukemogenesis by BNU in Donryu rats

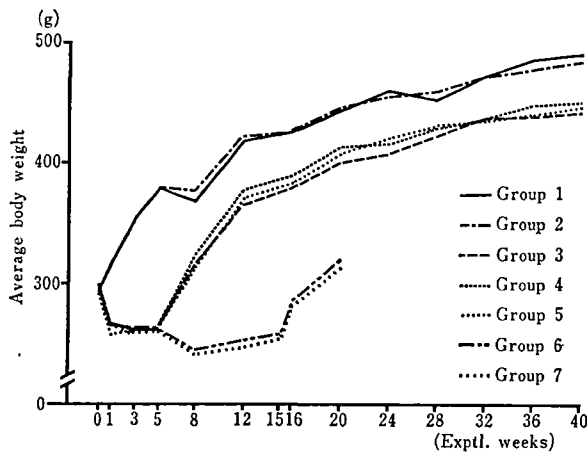


Fig. 2. Growth curves of rats given BNU in the drinking water for 5 or 15 weeks followed by immunological treatments

Table 1. Incidences of leukemias and tumors in various organs

Exptl. groups	No. of rats examined	Average survival period (Wk±SD)	No. of rats with tumors	No. of rats with leukemia	Number of rats with tumors in			
					Digestive tract	Pituitary gland	Mammary gland	Others
1	32	58.5±18.1	5(16%)	0	0	3(9%)	1(3%)	1(3%)
2	29	57.3±15.8	7(24%)	1(3%)	0	4(14%)	1(3%)	3(10%)
3	29	41.0±12.6	16(55%)	10(34%)	7(27%)	2(7%)	0	2(7%)
4	28	36.8±10.8	18(64%)	15(54%)	3(11%)	0	1(4%)	4(14%)
5	29	39.4±13.8	16(55%)	9(31%)	6(21%)	1(3%)	1(3%)	6(21%)
6	22	22.1±3.8	19(86%)	18(82%)	10(45%)	0	0	4(18%)
7	22	21.8±4.0	19(86%)	17(77%)	8(36%)	0	0	2(9%)

Table 2. Average survival periods of rats with leukemia and incidences of various types of leukemia

Exptl. groups	No. of rats with leukemia	Average survival period (Wk±SD)	Myeloblastic leukemia	Myelocytic leukemia	Eosinophilic leukemia	Erythroblastic leukemia	Lymphoblastic leukemia	Unclassified
1	0	—	0	0	0	0	0	0
2	1	46.1	0	1(100%)	0	0	0	0
3	10	42.4±13.0	1(10%)	3(30%)	0	0	1(10%)	5(50%)
4	15	36.2±9.5	0	6(40%)	0	1(7%)	3(20%)	5(33%)
5	9	39.0±11.3	1(11%)	2(22%)	0	1(11%)	5(56%)	0
6	18	22.2±4.0	0	4(22%)	1(6%)	7(39%)	3(17%)	3(17%)
7	17	22.0±4.1	0	5(29%)	0	10(59%)	1(6%)	1(6%)

おいてはこの2群間に有意差は見られなかった。なお、実験は90週まで続けられたが、BNU 5週間投与の3群の平均生存期間がほぼ40週である事から、実験40週までの体重増加曲線を示した。

2: 腫瘍の発生

Table 1 に白血病及び臓器別に腫瘍を有する動物数を示した。この Table に見られるように BNU を投与されなかった対照群は約20%の担癌率であったが、5週間 BNU を投与した群では平均約60%、15週間 BNU を投与した群では共に86%の担癌率であった。

白血病の発生は、アザチオプリン単独投与の第2群に1例見られた他、5週間 BNU を投与した3群では、アザチオプリンを後投与した群で発生率が高くなったが、他の2群(第3群、第5群)との間に χ^2 検定による有意差は認められなかった。BNU を15週間投与した2群では共に約80%の頻度で白血病の発生が認められた。

その他の腫瘍としては、消化管、下垂体や乳腺等に主として認められた。この中で消化管の腫瘍は BNU 投与群にのみ認められた。

3: 白血病の発生時期と病型

白血病の病型は、末梢血塗抹標本及び組織所見により、以前に記載した分類法⁷⁾に基づいて分け、Table 2 に示した。この Table に示したように、BNU を5週間投与した場合には平均約40週で、15週間投与した場合には平均約22週で白血病の発生がみられた。5週間 BNU 投与を行った3群の内、アザチオプリンを後投与した群では白血病の発生時期がやや早まる傾向が見られたが、BNU 単独投与の第3群との間に有意差は認められなかった。病型では骨髓球型、赤芽球型及びリンパ芽球型が多く見られたが、骨髓芽球型はわずかに2匹に認めただけであった。また、極めて診らしい好酸球型白血病が1例第6群に見られた。

4: その他の腫瘍

Table 3 に組織学的な分類と、発生動物数を示した。この Table に示したように、BNU 投与群に前胃の腫瘍が見られた。また BNU 投与終了後長期間生存した第3群~第5群のラットに大腸腺腫の発生が多かった。一方、対照群においては下垂体の腫瘍の発生が比較的多くみられた。その他の腫瘍は各群1~2例ずつで、極めて少数であった。

Table 3. Number of rats with various types of tumors

Organs	Histological diagnoses	Exptl. groups						
		1	2	3	4	5	6	7
Forestomach	Papilloma	0	0	2	1	3	6	6
	Squamous cell carcinoma	0	0	0	0	1	3	1
Duodenum	Adenoma	0	0	0	0	0	0	1
	Adenocarcinoma	0	0	0	0	1	3	1
Ileum	Adenoma	0	0	1	0	0	0	0
Colon	Adenoma	0	0	5	3	4	0	0
Pituitary gland	Adenoma	3	2	0	0	0	0	0
	Adenocarcinoma	0	2	2	0	1	0	0
Mammary gland	Fibroadenoma	1	1	0	1	1	0	0
Liver	Hemangioma	0	0	0	0	0	2	0
Spleen	Hemangioma	0	0	0	1	2	0	0
Ear duct	Papilloma	0	0	0	0	0	0	2
	Squamous cell carcinoma	0	0	0	0	0	1	0
Thyroid gland	Adenoma	0	1	0	0	0	0	0
	Adenocarcinoma	0	1	0	0	0	0	0
Adrenal gland	Adenoma	0	1	0	0	0	0	0
Kidney	Fibroma	0	0	0	1	1	0	0
Meninx	Meningioma	0	0	1	0	0	0	0
Trigeminal nerve	Neurinoma	0	0	0	1	0	0	0
Subcutis	Fibroma	0	0	1	0	1	0	0
Testis	Interstitial cell tumor	1	0	0	0	0	0	0
Omentum	Hemangioma	0	0	0	1	0	0	0
Retroperitoneum	Hemangiosarcoma	0	0	0	0	1	0	0
Lower Jaw	Osteoma	0	0	0	0	1	0	0

考 察

今回の実験において、BNU 投与後の同系骨髄細胞移植は、白血病発生を抑制しなかった。BNU 投与後アザチオプリン添加飼料を投与した場合は、白血病の発生率、発生時期は、BNU 投与後基本飼料で飼育した場合と比べ、統計学的有意差は認められなかったものの、促進される傾向が見られた。

アザチオプリンは免疫抑制剤として使用されているが、その作用の発現は、6-メルカプトプリンに変わり、更に分解して ribotide となり、イノシン酸との競合によりグアニル酸、アデニル酸の合成を阻害することによると考えられている⁸⁾。今回の実験では白血病発生率は、BNU 単独投与群よりも、BNU+アザチオプリン群でやや高く、また、平均生存期間も短縮する傾向がみられたが、統計学的有意差が見られなかった。この原因として、BNU の投与量が多すぎた事及びアザチオプリンの量が、必ずしも恒常的免疫抑制に有効な量ではなかった事などが考えられる。一方、BNU 投

与後の同系骨髄細胞移植が白血病発生抑制には有効ではなかった事に対しても同様な事が考えられる。言い換えれば 400 ppm BNU の 5 週間投与は、白血病発生に対する免疫監視機構の閾値を低下させるのに充分すぎる量であり、最早、免疫抑制剤や免疫賦活剤の影響を受けないのかも知れない⁹⁾。

今村ら¹⁰⁾は、マウスを用いて、BNU 単独では発生しなかった白血病が、アザチオプリンを後投与する事により発生した事を報告している。しかし、マウスの場合には白血病とされる多くのものが胸腺型白血病であり、その発生には常にウイルスの存在が重大な影を落している¹¹⁾。これに対しラットでは白血病発生にウイルスは関与していないと考えられる事から^{12,13)}、白血病の発生機序が異なり、マウスでの結果が必ずしもラットの結果には平行しないと考えられる。

BNU の長期連続投与では骨髄芽球性白血病が多発する事が小田嶋らにより報告されているが^{14,15)}、今回の実験では骨髄芽球性白血病は極めて少なかった。この事は、例えば、N-エチル-N-ニトロソ尿素やN-ブ

ロピル-N-ニトロソ尿素を高濃度で長期間投与した場合には、各々赤芽球性¹⁶⁾あるいは骨髓球性白血病¹⁷⁾を誘発するが、低濃度を長期間投与したり、高濃度を短期間投与した場合には、白血病の発生率が低下すると共に種々の病型の白血病が見られた事から、今回の実験でもBNUの投与期間が短かったために、種々の病型の白血病が発生したものと考えられる。一方、下垂体腫瘍は対照群に多く見られ、実験群には殆ど出ていないが、これは、対照群が長期間生存したために出た自然発生腫瘍であり、アザチオプリンはその他の腫瘍も含め、全体に腫瘍の発生率をわずかながら上げている。この事は、アザチオプリン投与が免疫監視の水準をやや低下させている事を示しているように思われる。恐らく、化学物質による白血病の発生に対しても、免疫監視機構は重要な役割を演じているが、この作用を破壊あるいは水準を下げるにはBNUの5週間程度の投与で充分なのであらうと考えられる。

ま と め

11週齢雄ドングラットにBNUを5週間投与した後、アザチオプリンを投与した場合、白血病の発生率、発生時期は、BNU単独投与群に比べ、統計学的有意差は認められなかったものの、促進される傾向が見られた。BNU5週間あるいは15週間投与後の同系骨髓細胞の移植は、白血病発生抑制には有効ではなかった。15週間BNUを投与した場合には高率に、また早期に白血病の発生が認められた。これらの事からBNUによる白血病発生に対しては、BNUによる免疫監視機構の破壊あるいは水準の低下が重要な役割を果していることが示唆された。

謝辞

この実験は文部省がん特1、山村班の援助の下に行われたものである。また、BNUの精製は中館先生にお願いした。

文 献

- 1) S. Odashima: *Gann*, **61**, 245 (1970)
- 2) K. Yokoro, N. Imamura, S. Takizawa, H. Nishihara, E. Nishihara: *Gann*, **61**, 287 (1970)
- 3) S. Odashima, F. C. Wang: *Gann*, **61**, 597 (1970)
- 4) M. Hosokawa, E. Gotohda, H. Kobayashi: *Gann*, **62**, 557 (1971)
- 5) S. Odashima, Y. Hashimoto, T. Ogiu, A. Maekawa: *Gann*, **66**, 615 (1975)
- 6) 古田京子, 荻生俊昭, 松岡千明, 前川昭彦: 衛試報告, **102**, p. 62 (1984)
- 7) T. Ogiu: *Gann*, **69**, 781 (1978)
- 8) 板倉克明: 医科免疫学(菊池浩吉, 編) p. 233 (1981), 南江堂
- 9) F. M. Burnet: *Progr. Exp. Tumor Res.*, **13**, 1 (1970)
- 10) N. Imamura, M. Nakano, A. Kawase, Y. Kawamura, K. Yokoro: *Gann*, **64**, 493 (1973)
- 11) 志佐 満, 杉山武敏, 西塚泰章: 新版日本血液学全書5, 白血病及び類縁疾患1, p. 43 (1982), 丸善
- 12) N. Imamura: *Gann*, **64**, 47 (1973)
- 13) Y. Sakura, T. Ogiu, N. Imamura, K. Furuta, C. Matsuoka, S. Odashima: *J. Natl. Cancer Inst.*, **73**, 757 (1984)
- 14) S. Odashima, T. Ogiu, A. Maekawa: *Comparative Leukemia Research 1973, Leukemogenesis*, p. 107 (1975), Univ. of Tokyo Press.
- 15) S. Odashima, T. Ogiu, A. Maekawa, M. Nakadate: *Gann Monogr.*, **17**, 405 (1975)
- 16) T. Ogiu, M. Nakadate, S. Odashima: *Cancer Res.*, **36**, 3043 (1976)
- 17) T. Ogiu, M. Nakadate, S. Odashima: *J. Natl. Cancer Inst.*, **54**, 887 (1975)

肝癌プロモーターの検索方法の確立に関する実験的研究——
フェノバルビタール，ブチルヒドロキシトルエン，
バルビタールのプロモーション作用について

古川文夫・豊田和弘・小久保 武・高橋道人・林 裕造

Establishment of Test Methods for examining Promoters of Hepatocarcinogenesis—
Promoting Effects of Phenobarbital, Butylated Hydroxytoluene and Barbital

Fumio FURUKAWA, Kazuhiro TOYODA, Takeshi KOKUBO,
Michihito TAKAHASHI and Yuzo HAYASHI

Carcinogenesis is considered to consist of at least two stages, initiation and promotion. The initiation stage is thought to involve only one step whereas the promotion stage may include several steps. An initiator is a substance which results in the induction of tumors when followed by the repeated application of promoting agents. This fact indicates that the detection of promoters as well as carcinogens is an urgent necessity.

In the present study, the promoting effects of phenobarbital, butylated hydroxytoluene (BHT), and barbital during hepatocarcinogenesis initiated by a single injection of diethylnitrosamine (DEN) were investigated. The test compound was added to the diet for administration. After 40 weeks, a significantly higher incidence of liver tumors could be seen in the phenobarbital and barbital groups as compared to the control group. Assessment of the promoting effects was also carried out by analysis of the degree of development of γ -glutamyl transpeptidase (GTT) positive foci which are considered as preneoplastic hepatocyte lesions. The number and area were calculated with the aid of a semiautomatic image analyser TAS-plus (Leitz, Co., West Germany).

The results indicated that phenobarbital and barbital are promoters of liver carcinogenesis, whereas there was no evidence of a promoting effect of BHT during hepatocarcinogenesis.

(Received May 31, 1984)

はじめに

ヒトの癌の原因として環境因子が重要な役割を果たしていることが指摘されているが、発癌因子の作用機序の詳細についてはいまだ不明な点が多い。一方、発癌過程にはイニシエーション(起始段階)とその細胞の増殖並びに悪性化への変化、即ちプロモーション(促進段階)の過程を経て発癌に至ることが指摘されている。即ち、発癌はイニシエーター(起始因子)のほかプロモーター(促進因子)が作用して、癌に至ることが多くの実験で明らかにされている^{1,2)}。従来、癌原性物質の評価や安全性の研究に際しては、単に1つの物質の発癌性にだけ注意が向けられていたが、プロモーターの役割についても十分に考慮を払い、物質の安全性を評価しなければならなくなっている。したがってプロモーター作用に関する研究は癌の予防上、極めて重要であると思われ、種々の物質のプロモーター作用の検出方法の開発もまた重要な課題となっている。

特にヒトの癌発生に環境因子が重要な役割を演じるとされたとすれば、長期、無差別に曝露されかねない環境化学物質の諸臓器におけるプロモーター作用の検出は急務であるといえよう。

今回我々は、肝癌プロモーターを検索するための実験モデルの開発を目的として diethylnitrosamine (DEN) をイニシエーターとし投与法、投与量、投与期間につき検討を加えた。また組織学的検索に際しては肝の前癌病変とされる酵素偏異増殖巣、特に γ -glutamyl transpeptidase (GGT) の陽性細胞巣をマーカーとし、出現個数、単位面積当たり占有する病巣面積を計測し評価した。また二段階発癌の実験モデルとしての有効性を確めるため、モデル化合物として肝癌プロモーターとして知られている phenobarbital (陽性対照)、butylated hydroxytoluene (BHT)、マウスの自然発生肝腫瘍の発生が促進され、そのプロモーター作用が示唆されている barbital の三つを選び検討を加えた³⁻⁶⁾。

実験1 イニシエーターとしての DEN の投与方法の検討とその経時的観察

本実験はイニシエーターとしての DEN の投与方法、投与量、投与期間の決定を目的として実施した。

実験材料と方法

7週齢雄 F344 ラット (日本チャールスリバー社) 99匹を用いこれらを3群に分け、各群33匹とした。Fig.1 に示した如く、1群は DEN (和光純薬) を 50 ppm の濃度に飲料水に添加し、55週間連続投与した。2群は1群と同様に 50 ppm DEN を4週間飲料水に添加投与しそれ以後からは水道水のみを投与した。3群は蒸留水で調整した 80 mg/kg 体重量の DEN を腹腔内に1回 (0.5 ml/100 g 体重量) 投与し、その後、水道水にて飼育観察した。いずれも実験期間中は固型飼料 (オリエンタル MF, オリエンタル酵母社製) を自由に摂取させた。各群とも20週目までは6週間おきに3匹ずつをエーテル麻酔下にて屠殺剖検し、肝を中

心に病理組織学的に検索を行った。肝臓は方形葉、内側左葉、外側左葉、右葉の各葉をそれぞれ厚さ約 5 mm の組織片を切り出し、冷アセトン液にて固定し、通常の方法でパラフィン包埋、マイクロームで厚さ 4 μm で薄切、ベンゼンにて脱パラフィンした後 GGT 染色を Rutenburg らの方法を用いて行った⁷⁾。GGT の陽性細胞数 (N: Number) と単位面積当りに占める陽性部位面積 (A: Area) の測定にはライツ社製画像解析装置 TAS plus を用いて行ったほか、同一ブロックで hematoxylin eosin (H. E) 染色を行ない通常の病理組織学的検索を行った。

結果

各群の GGT 陽性細胞数 (N)、陽性面積 (A) の経時変化については Fig.2 に示した。1群においては個数 (N)、面積 (A) とともに4週以後急激な増加がみられ、16週目までには全動物が死亡した。2及び3群においては20週目より個数 (N)、面積 (A) とともに緩やかな上昇を示し、その後の著しい増加は見られなかった。55週目における個数 (N) では2群 42個/cm²、3群 44個/cm²、面積 (A) では2群 16 mm²/cm²、3群 21 mm²/cm² であったが、個数 (N)、面積 (A) の増加パターンは Fig.2 に示したように、2、3群とも極めて類似していた。

小括

DEN の投与方法、投与量、投与期間の検討を GGT を指標とした肝細胞増殖巣をマーカーとし経時的な観察によって行った結果、2、3群の群間に大きな差は見られなかった。したがって 80 mg/kg 体重量 DEN を1回腹腔内投与する方法はイニシエーション期間が短

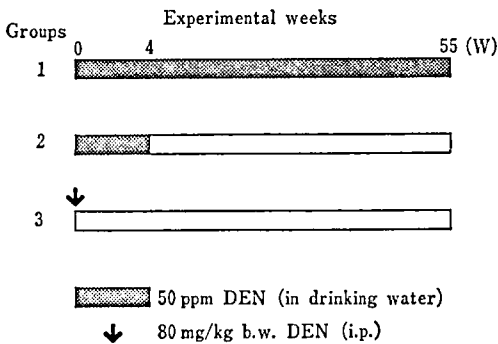


Fig. 1. Experimental design for examining appropriate method and dose for initiation using hepatocarcinogen, DEN.

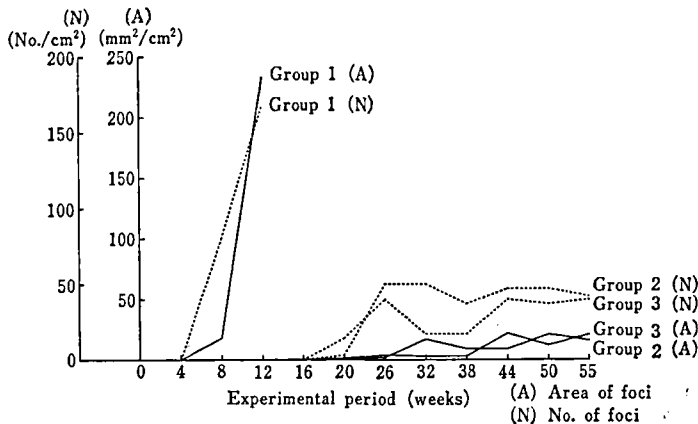


Fig. 2. Periodic changes of GGT positive foci

く設定できるという利点によりイニシエーションの方法として適切であると考えられた。

実験 2 肝癌二段階発癌モデルによるプロモーター作用の検索

イニシエーターとして DEN を腹腔内に 1 回投与する方法により肝癌プロモーター作用の検索を目的とし、また検索法の確立を目指し実施した。

実験材料及び方法

7 週齢雄 F344 ラット (日本チャールスリバー) 80 匹を用い、これらを 4 群に分け各群 20 匹とした。実験のモデルは Fig. 3 に示したようにすべての動物に蒸留水で調整した 80 mg/kg 体重量の DEN を腹腔内に 1 回 (0.5 ml/100 g 体重量) を投与しイニシエーション処理とした。その後 1 群は対照群として基本食で飼育し、2 群は 1 週間後より 0.05% phenobarbital 添加

固型飼料で飼育、3 群は 1 週間後より 1% butylated hydroxytoluene (BHT) 添加固型飼料で飼育、4 群は 1 週間後より 0.5% barbital 添加固型飼料で飼育した。実験期間中、動物の観察を実施し、定期的に体重測定を行った。実験開始後 40 週目にすべての生存動物を屠殺し、採血、解剖を実施し肉眼的観察を行った。肝臓は摘出後重量を測定し、実験 1 と同様に各葉を細切し、冷アセトンにて固定を行い、通常の方法でパラフィン包埋した。脱パラフィン後、薄切した切片は GGT と H. E. 染色を施し、単位面積あたりの GGT 陽性細胞数 (N) と面積 (A) をライツ社製 TAS plus にて測定を行った。

生化学的検索は、血清の glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), glutamic pyruvic transaminase (GPT), lactic dehydrogenase (LDH), alkaliphosphatase (ALP), γ -glutamyl transpeptidase (GGT) につき味の素分析センターに測定を依頼した。

結 果

体重は実験開始より各群共に順調な増加を示した。実験終了時では Table 1 に示した如く、barbital 群において対照群に比し体重の増加傾向がみられた。実験経過中に少数の動物が死亡したが、BHT 群では 2 例が肺炎で、barbital 群では 7 例が fighting による出血と衰弱で死亡した。

解剖時における肝重量は Table 1 に示したごとく対照群で 8.2 ± 1.2 g であったのに比べ phenobarbital 群では 13.3 ± 1.9 g, BHT 群では 14.8 ± 2.2 g, barbital 群では 17.9 ± 2.3 g といずれも著しい増加が認められた。統計学的には Welch's test による有意差検定で有意差が示されたほか、体重当りの肝重量においても同様に有意差がみられた。

肉眼的及び病理組織学的検索においては Table 2 に示した如く肝腫瘍の発生は対照群の 20 匹中 1 例に対

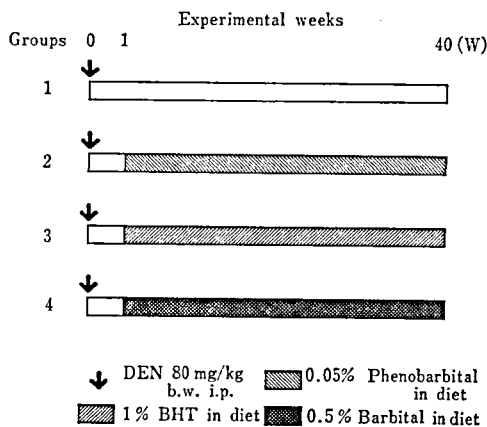


Fig. 3. Experimental design for examining promoting effects of Phenobarbital, BHT and barbital on hepatocarcinogenesis initiated by DEN in F344 rats.

Table 1. Body weight, liver weight, and liver weight/body weight of animals at 40 weeks.

Groups	No. of effective animals	Body Weight(g)	Liver Weight(g) (mean \pm S.D.)	Liver wt/body wt (%)
1. Control	20	365 \pm 49	8.2 \pm 1.2	2.62 \pm 0.12
2. Phenobarbital	20	368 \pm 26	13.3 \pm 1.9*	3.60 \pm 0.35*
3. BHT	18	353 \pm 36	14.8 \pm 2.2*	4.19 \pm 0.27*
4. Barbital	13	402 \pm 35	17.9 \pm 2.3*	4.46 \pm 0.36*

* p<0.01

Table 2. Tumor incidence of phenobarbital, BHT and barbital treated rats after initiation by DEN on hepatocarcinogenesis at 40 weeks.

Groups	No. of effective animals	Total No. of tumors	No. of rats with tumors	Average no. tumor/rat
1. Control	20	1	1	0.05
2. Phenobarbital	20	6*	5	0.30
3. BHT	18	1	1	0.06
4. Barbital	13	6*	6*	0.46

* $p < 0.05$

Table 3. Serum biochemical data on hepatocarcinogenesis initiated by DEN in male F344 rats (Mean \pm S. D.)

Groups	GGT (mu/ml)	GOT (KU)	GPT (KU)	LDH (WU)	ALP (KAU)
1. Control	2.3 \pm 0.9	114 \pm 45	60 \pm 71	686 \pm 362	10.8 \pm 3.0
2. Phenobarbital	3.9 \pm 5.5*	118 \pm 77	67 \pm 51	1481 \pm 871*	10.5 \pm 4.1
3. BHT	2.5 \pm 0.6	161 \pm 11*	26 \pm 7	830 \pm 659	17.0 \pm 1.0
4. Barbital	3.0 \pm 0.8	124 \pm 19	31 \pm 6	1819 \pm 598*	10.3 \pm 0.9

* $p < 0.01$

し phenobarbital 群では20匹中5例, BHT 群では18例中1例, barbital 群では13匹中6例に見られ, barbital 群には統計学的に有意差が示された. 組織化学的検索によると BHT 群では GGT 陽性部位が主に門脈周囲の肝細胞に特異的にみられ不規則な不定形を示した (Fig. 4). BHT 群における門脈周囲領域の酵素偏異は H. E 染色での観察では増殖性変化などの病変は認められなかった (Fig. 5). しかし GGT 染色を施すと Fig. 4 にみられる不規則な GGT 陽性細胞巣が出現しており, 画像解析装置による描画で陽性細胞巣は Fig. 6 のように示され, 個数(N)並びに面積(A)が自動的に計測される. 測定結果については Fig. 7 に示した. 対照群は GGT の個数 (N) 12.94個/cm², 面積 (A) 0.26 mm²/cm² であるのに比し phenobarbital 群では個数 (N) 69.5個/cm², 面積 (A) 3.92 mm²/cm² と増加していた. 一方 BHT 群では面積 (A) 0.85 mm²/cm² であったが個数 (N) においては陽性細胞巣が Fig. 6 に示したごとく融合しており個数の算出が不可能であった. また, barbital 群では面積 (A) 0.48 mm²/cm² 個数 (N) 4.20個/cm² と増加は認められなかった.

血清生化学検査データは Table 3 に示した如く,

GGT は対照群で 2.3 \pm 0.9 (mU/ml) であったのに比し, phenobarbital 群では 3.9 \pm 5.5 (mU/ml) と有意な増加を示した. GOT では対照群 114 \pm 45 (KU) に比し BHT 群では 161 \pm 11 (KU) と増加がみられた. LDH では対照群 686 \pm 362 (WU) に対し phenobarbital 群 1481 \pm 871 (WU) barbital 群 1819 \pm 598 (WU) といずれも増加がみられており, 有意差が認められた.

小 括

イニシエーターとして DEN を1回投与し, プロモーターの段階で phenobarbital, BHT, barbital を投与したが, phenobarbital 群では腫瘍の増加と GGT 陽性細胞巣の個数, 面積の増加, 血清 GGT の上昇が認められた. しかし BHT 群では腫瘍の増加がみられないのに GGT 陽性部位が増加しており不規則な不定形を示した. 一方 barbital 群では肝腫瘍の増加が認められたにもかかわらず, GGT 陽性細胞巣の増加は認められなかった.

考 察

肝発癌におけるプロモーターの存在意義については



Fig. 4. Periportal zonal reactions of GGT positive area are seen by histochemical method. The section corresponds to the same figure shown in Fig. 5. GGT-staining, $\times 50$

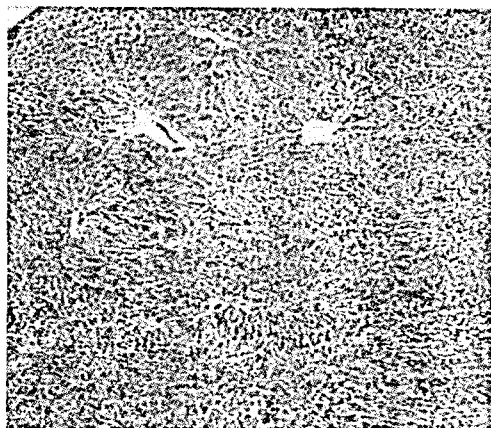


Fig. 5. No remarkable changes are seen in the liver of a rat treated with BHT for 40 weeks. Hematoxylin and eosin staining, $\times 50$

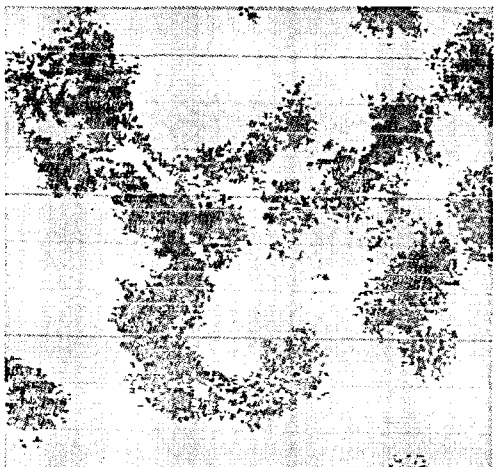


Fig. 6. Microcomputer image of GGT positive lesions appeared in TAS Image Analyser, corresponding to Fig. 4.

1971年 Peraino らが 2-acetylaminofluorene (AAF) を短期間投与後 phenobarbital を投与すると肝癌発生を促進することを明らかにしたのが最初とされる⁸⁾。phenobarbital のプロモーション効果は次いで DEN や 3-methyl-4-dimethylaminoazobenzene で起始された肝発癌過程でも、またマウスの自然発生の肝発癌過程でも確認された^{8,9)}。phenobarbital によるプロモーションの過程においては ATPase, G-6-Pase の活性の低下ないし欠落, GGT の活性の上昇など酵素偏異を示す増殖巣が出現することが知られている。これらの病巣は肝癌の前癌病変のマーカーとしてその意義が注目されている。特に GGT 陽性細胞巣は早期から出現してくることが数々の研究により実証されており最も有効なマーカーとされている^{10,11)}。Kitagawa らは発癌過程で経時的にこの酵素偏異増殖巣の数と大きさを測定することにより、プロモーション作用が定量的に把握されると述べている^{12,13)}。実験 1 では肝の酵素偏異増殖巣をマーカーとしてイニシエーターの投与方法、

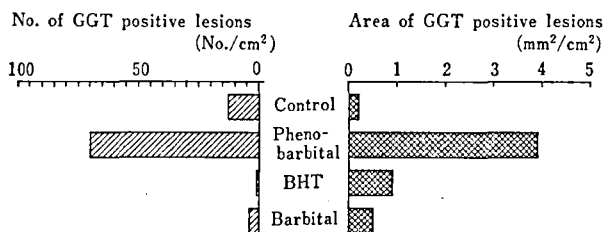


Fig. 7. The number and area of GGT positive lesions in the animals treated with phenobarbital, BHT and barbital after initiation by DEN in male rats.

投与量、投与期間の検討を行ったが、GGT については Fig. 2 に示した如く 50 ppm DEN を飲料水として4週間投与した場合と 80 mg/kg DEN を i.p. 1回投与した場合では面積 (A)、個数 (N)、出現時期はほぼ同様な傾向を示しており、80 mg/kg 体重量 DEN を1回腹腔内投与方法がイニシエーション処理の期間が短く理想的な方法であると考えられた。実験2ではこの結果に基づいて実験を開始し、phenobarbital 群の GGT 陽性細胞巣の増加と腫瘍発生数の増加との間に相関が認められた。しかし barbital 群では GGT 陽性細胞巣の発現は少かったにもかかわらず腫瘍発生率は phenobarbital 群と同様に増加を示した。

一方、BHT 群では GGT 陽性細胞巣が主に門脈周囲領域に発現しており、腫瘍発生は増加していない。これらの結果は GGT 陽性部位のみの解析から腫瘍発生を予知するのは不十分であることを示している。また GGT 陽性細胞巣の個数、面積が減少しているという事実のみからプロモーターでないと結論するのは不相当と考えられる。

BHT の肝癌発生におけるプロモーター作用については Peraino らが AAF をイニシエーターとして実験を行った際に弱いプロモーター作用を認めたとの報告がある⁵⁾。しかしその後 Imaida らは DEN をイニシエーションとして作用させた時、肝ではプロモーター作用が明らかでなかったと報告している¹⁴⁾。一方 BHT に関しては肺腫瘍におけるプロモーター作用についての報告は数多くある¹⁵⁾。また BHT の癌原性試験ではラット及びマウスに癌原性がなかったとされている^{16,17)}。我々の実験においては BHT のプロモーター作用は明らかにされなかったが GGT 陽性細胞巣が門脈周囲に特異的にみられ、これらの陽性部位の存在が前癌性酵素偏異病変の検出に際し障害となることが判明した。このような非定型的 GGT 陽性領域の出現は高濃度の phenobarbital, ethanol, norethandrolon, ethynylestradiol の投与の際にも認められることが報告されているが、その意義については明らかにされていない¹⁸⁻²¹⁾。

barbital の癌原性試験はすでに SD 系ラットや B₆C₃F₁ 系マウスを用いて実施され、前者では癌原性は証明されず、後者においては肝腫瘍の発生が認められている⁶⁾。今回の我々の実験においても barbital 群では腫瘍発生の増加がみられており barbital の肝癌に対するプロモーター作用のあることが示唆されており、マウスに見られた肝腫瘍の増加もそのプロモーター作用による可能性が強いと考えられる。

GGT 活性は、成熟ラット肝ではほとんど証明されず、わずかに細胆管腔の刷子縁に存在しているに過ぎない²²⁾。また腫瘍組織の検索ではマウスの自然発生肝腫瘍は GGT 活性に乏しく、発癌剤により誘発された肝腫瘍は高い活性が認められるとされる¹⁰⁾。我々の実験では、ほとんどの肝腫瘍において GGT の活性が認められており、これらの報告と同様の結果が得られている。最近、佐藤らは glutathione S-transferase の Placental form (GST-P) の抗体をラットの胎盤の cytosol から分離し、組織化学的に応用できることを報告すると共に GGT との相関性について検討を加えている²³⁾。前癌病変のマーカーとして GGT のほかにこのような GST-P など他のマーカーを併用することにより、前癌病変の認識を一層確実にすることができ、検出の信頼度を増すことが出来ると思われる。

本研究は昭和57、58年度国立機関公害防止等試験研究費によって行われたものである。

文 献

- 1) I. Berenblum, *et al.*: *Br. J. Cancer.*, **1**, 379 (1947)
- 2) I. Berenblum, *et al.*: *Adv. Cancer.*, **2**, 129 (1954)
- 3) C. Peraino, *et al.*: *Cancer Res.*, **31**, 1506 (1971)
- 4) N. Sawada, *et al.*: *Gann* **74**, 806 (1983)
- 5) C. Peraino, *et al.*: *Fd. Cosmet. Toxicol.* **15**, 93 (1977)
- 6) M. Matsuyama, *et al.*: *Jap. J. Hygiene* **37**, 892 (1983)
- 7) A. M. Rutenburg, *et al.*: *J. Histochem. Cytochem.*, **17**, 517 (1969)
- 8) T. Kitagawa, *et al.*: *Gann* **68**, 255 (1977)
- 9) S. Fiala, *et al.*: *J. Natl. Cancer Inst.*, **48**, 1393 (1972)
- 10) T. Kitagawa, *et al.*: *Gann* **71**, 536 (1980)
- 11) T. Kitagawa, *et al.*: *Gann* **62**, 207 (1977)
- 12) T. Kitagawa, *et al.*: *Gann* **69**, 679 (1978)
- 13) H. C. Pitot, *et al.*: *Nature* **271**, 456 (1978)
- 14) K. Imaida, *et al.*: *Carcinogenesis* **14**, 895 (1983)
- 15) 加勢田静ら: *医学のあゆみ*, **123**, 147 (1982)
- 16) M. Hirose, *et al.*: *Fd. Cosmet. Toxicol.* **19**, 147 (1981)
- 17) T. Shirai, *et al.*: *Fd. Cosmet. Toxicol.* **20**, 861 (1982)
- 18) Y. Mochizuki, *et al.*: *Acta Histochem. Cytochem.* **16**, 155 (1983)
- 19) G. Ideo, *et al.*: *J. Clin. Chem. Biochem.* **18**, 237 (1980)
- 20) G. Ronchi, *et al.*: *Beitr. Pathol.*, **150**, 316 (1973)
- 21) L. Kamden, *et al.*: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **67**, 795 (1983)
- 22) T. Kitagawa, *et al.*: *Gann* **71**, 362 (1980)
- 23) K. Sato, *et al.*: *Gann*, **75**, 199 (1984)

ガス状及び揮発性化学物質の哺乳動物細胞に対する細胞遺伝学的影響
I. 培養細胞を用いる染色体異常試験

祖父尼俊雄・林 真・松岡厚子・沢田 稔・畑中みどり・石館 基

Cytogenetic Effects of Gaseous and Volatile Chemicals on Mammalian
Cells *In Vitro* and *In Vivo*.

I. Chromosome Aberration Tests in Cultured Mammalian Cells

Toshio SŌFUNI, Makoto HAYASHI, Atsuko MATSUOKA,
Minoru SAWADA, Midori HATANAKA and Motoi ISHIDATE, Jr.

The present studies are aimed to detect gaseous and volatile chemicals which induce chromosome aberrations in cultured mammalian cells. Chinese hamster cells were exposed to test chemicals in the gaseous phase, using the Gas-exposing System which has been newly developed at our laboratory.

The exposure chamber was equipped with a rotary holder to rotate the cylindrical culture bottles, in which cells growing in a monolayer were exposed directly to gaseous chemicals. The cells were exposed to each test chemical for one hour, and chromosome preparations were made after incubation for an additional 23 hours.

Ethylene oxide and methyl acrylate induced chromosome aberrations in 39% and 100% of metaphases at the doses of 250 ppm and 190 ppm (the concentration in a gas-generator), respectively, while benzene did not significantly increase the frequencies of chromosome aberrations. Actual concentration of methyl acrylate in the culture bottle was monitored by a gas chromatograph, and found to be about one-third of that in the gas-generator.

(Received May 31, 1984)

変異原性試験は多くの物質の安全性について短期間にスクリーニングすることができるため、これまで種々の環境汚染物質について検索が行われてきた。しかし、ガス状物質あるいは揮発性物質についてはその曝露方法が困難なことからあまり研究されていない。現在までにムラサキツユクサ¹⁾、枯草菌²⁾及びショウジョウバエ³⁾を用いる変異原性試験による報告があり、さらにサルモネラ菌を用いる試験法の開発が試みられている^{4,5)}。しかし、哺乳動物細胞を用いた変異原性試験はほとんど試みられておらず、わずかにエチレンオキシドによるラットの優性致死試験⁶⁾、煙草の煙についてのヒトリンパ球の姉妹染色分体交換試験⁷⁾やベンゼンによる小核試験⁸⁾が行なわれているにすぎない。今回、我々はガス状及び揮発性化学物質の変異原性試験を行うためのガス曝露システムを開発し、哺乳動物培養細胞による染色体異常誘発試験を行い、エチレンオキシド、メチルアクリレート及びベンゼンについてガス状曝露における染色体異常誘発性を検討したので報告する。

実験方法

1. ガス曝露システム

培養細胞へのガス曝露には培養液の層を介さずに行えるだけ直接細胞に曝露できるように回転培養法を採用した。曝露チェンバー内には回転培養ホルダーを備え、これに円筒型ガラス培養びんを設置し、培養びんを回転させることにより培養液に浸されていない部分の細胞が直接検体ガスに順次曝露されることになる。曝露形式はフローシステムとし、一定時間一定濃度のガス体を曝露するようにした。

ガス状化学物質を用いる場合には検体ガスと空気をそれぞれのガスボンベより標準ガス発生機に導く (Fig. 1 Left)。発生機はS-TEC標準ガス発生機SGGU-72LCで、希釈率は100:1~10000:1まで可変でき、精度は±2%、発生方式は毛細管式流量比混合法で、発生流量は約3 l/min、発生圧力は約10 mmHgである。所定濃度の検体ガスは恒温槽中の加温用蛇管を通過して、ポアサイズ0.3 μmのフィルターで除菌後曝露チェンバー内に入る。チェンバーは内寸法280

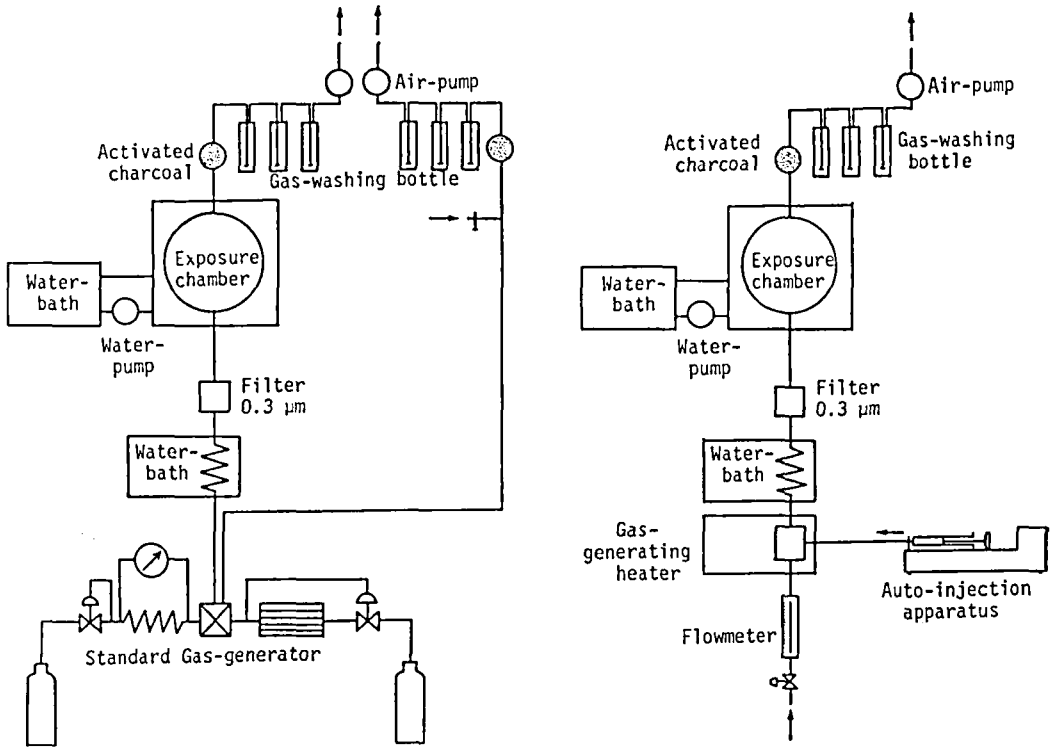


Fig. 1. Diagrams of the one-chamber type of the Gas-Exposing System.

Left: Flowchart for gaseous chemicals. Right: Flowchart for volatile chemicals.

mmφ×120 mm, 容積 7.38 l, グラスウールにより保温効率を高めたウォータージャケット型である。チェンバー内には9本の培養びんを固定できる回転ホルダーを備え、回転速度は0~1 rpmまで任意に設定できる。検体ガスはチェンバー内の9個のピンホールから流れ込む。それぞれのピンホールは9本の培養びんの口の位置に合わせてあり、排気は1箇所から行い。検体ガスはチェンバー内で培養細胞に一定時間曝露した後、活性炭槽、洗気びんを通った後エアポンプで引かれてドラフト中へ排気される。

揮発性化学物質については検体を任意の大きさの注射筒に取り、自動注入装置 (KN-204 NSII 型) を用いて一定の流量で熱板ガス発生器へ送り込む (Fig. 1 Right)。自動注入装置は注射筒に入れた検体をピエオンラックを用いて徐々に押し出すもので、注射筒の容量 (10, 20, 50 及び 100 ml) と注入速度 (5~270分) の組み合わせにより 14 μl/min から 20 ml/min まで流出量を変えられる。熱板ガス発生器は揮発性物質を気化させる装置で、恒温槽とそこに置かれたチェンバーより成り、恒温槽は室温から 95° まで任意に設定できる。沸点以上に加熱された熱板ガス発生器に送り

込まれた検体は気化し、システム内を流れる空気と混合して一定濃度のガスを発生する。システム内には流量計及びエアポンプにより常に 3 l/min の空気が流れるようにする。熱板ガス発生器において発生した検体ガスはガス状化学物質の場合と同じく、加温蛇管で温められ、フィルターを通り、チェンバー内で曝露された後、活性炭槽、洗気びんを通して排気される。

2. 被検物質

エチレンオキシドは、液化炭酸ガス中の10%エチレンオキシドを大同酸素(株)より入手し、発生時濃度 125, 250, 500 ppm で1時間細胞を曝露した。メチルアクリレート及びベンゼンは和光純薬工業(株)より入手し、前者は 60, 128, 189, 378 ppm, 後者は、15000, 26000, 31000, 38000 ppm で細胞を曝露した。

3. 培養細胞による染色体異常試験

本試験にはチャイニーズ・ハムスターの線維芽細胞株 (CHL)⁹⁾ を用いた。培養容器は円筒型ガラス培養びん (45 mmφ×50 mm) で、 5×10^5 個の細胞を播種し、回転培養器で2日間培養し、新しい培養液と交換後、直ちに検体ガスに曝露した。回転培養器及び曝露チェンバー内の回転ホルダーの回転速度は 0.25 rpm

Table 1. Chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with ethylene oxide in gaseous phase (Direct method)

Time* (h)	Dose (ppm)	Polyploid (%)	Frequency (%) of aberrant cells **					Total	Judge
			ctg	ctb	cte	frg	cse		
1-23	0	0.0	1.0	1.0	1.0	0.0	0.0	3.0	
	125	1.0	2.0	0.0	1.0	0.0	0.0	3.0	-
		3.0	0.0	1.0	1.0	0.0	0.0	2.0	-
250	2.0	2.0	7.0	21.0	20.0	0.0	0.0	35.0	+
		2.0	16.0	25.0	25.0	1.0	0.0	43.0	+
500	0.0	0.0	12.0	5.0	17.0	0.0	0.0	30.0	+
		2.0	9.0	4.0	22.0	0.0	0.0	30.0	+

* Treatment time - recovery time.

** ctg: chromatid gaps, ctb: chromatid breaks, cte: chromatid exchanges, frg: fragmentation, cse: chromosome-type exchanges including dicentric and ring chromosomes.

Table 2. Chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with methyl acrylate* in gaseous phase (Direct method)

Time** (h)	Dose		Polyploid (%)	Frequency (%) of aberrant cells ***					Total	Judge
	ml/h	ppm		ctg	ctb	cte	frg	cse		
1-23	0	0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
			4.0	2.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	3.0
	0.8	60	4.0	0.0	1.0	1.0	0.0	0.0	2.0	-
	1.7	128	2.0	56.0	39.0	16.0	8.0	0.0	70.0	+
	2.5	189	0.0	74.0	76.0	8.0	23.0	0.0	100.0	+
	5.0	378	Tox****							Tox

* Diluted 20 times with distilled water.

** , *** See the foot-notes in Table 1.

**** Almost no survival and/or mitotic cells.

とした。検体ガスの曝露時間は通常1時間とし、回転培養器に移して23時間後に染色体標本を作製した。

染色体標本作製2時間前にコルセミド処理(0.2µg/ml)を行い、細胞はトリプシンで剥し、75mM KCl溶液で15分間低張処理をした。新しく調製した固定液(氷酢酸1容、メタノール3容)で3~4回固定脱水後、空気乾燥法により標本を作製し、ギムザ液で染色した。

染色体の観察はよく広がった分裂中期像100個について行い、染色分体ギャップ(ctg)、染色分体切断(ctb)、染色分体交換(cte)、断片化(fr g)、染色体型交換(cse)などの構造異常をもつ細胞数をそれぞれ記録した。さらに、いずれかの構造異常を1個以上もつ異常細胞の出現頻度を求めると共に、倍数体細胞の出

現頻度も記録した。判定は異常細胞の出現頻度が5%未満を陰性(-)、5%以上10%未満を疑陽性(±)、10%以上を陽性(+)とした。

結 果

1. エチレンオキサイド

チャイニーズ・ハムスター培養細胞による染色体異常試験の結果をTable 1に示す。Table 1には同一濃度の欄に2つのデータを併記してあるが、これは同一濃度において2個の培養びんを用いて調べた結果を示してある。125 ppmまでは染色体異常は誘発されなかったが、250 ppmにおいては著しい異常頻度の上昇がみられた。2個の培養びんの平均値をとると、250 ppmでは39%の細胞に染色体型の異常がみられ、

Table 3. Chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with benzene in gaseous phase (Direct method)

Time* (h)	Dose		Polyploid (%)	Frequency (%) of aberrant cells **					Total	Judge
	ml/h	ppm		ctg	ctb	cte	frg	cse		
1-23	0	0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	
	10	15000	4.0	1.0	0.0	1.0	0.0	0.0	2.0	-
	16.7	26000	2.0	6.0	0.0	3.0	0.0	0.0	8.0	±
	20	31000	5.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	-
	25	38000	Tox***						Tox	
1-47	0	0	2.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	
	10	15000	9.0	0.0	1.0	2.0	0.0	0.0	2.0	-
	16.7	26000	8.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	-
	20	31000	7.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-
	25	38000	Tox						Tox	
3-21	0	0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
			0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
1/2-23 1/2	20	31000	1.0	0.0	0.0	2.0	0.0	0.0	2.0	-
			1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	-
1-23	20	31000	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	-
			0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-
2-22	20	31000	1.0	1.0	0.0	3.0	0.0	0.0	4.0	-
			1.0	0.0	2.0	1.0	0.0	0.0	2.0	-
3-21	20	31000	1.0	6.0	3.0	6.0	0.0	0.0	16.0	+
			0.0	1.0	1.0	1.0	0.0	0.0	3.0	-

*, **, *** See the foot-notes in Tables 1 and 2.

それにはギャップ、切断及び交換型の異常が含まれていた。500 ppm では異常頻度は幾分低下し (30%)、特に切断が低下した。

Table 1 に示されている濃度は培養びんの中の実際の曝露濃度ではなく、標準ガス発生機における濃度で示してある。メチルアクリレイトやベンゼンにおけるガスクロマトグラフを用いた濃度測定では、発生時の濃度の約 1/3 が培養びん内の曝露濃度であった。エチレンオキサイドにおいても、実際の曝露濃度が発生時の濃度の 1/3 と想定すると、50~165 ppm の範囲において染色体異常が誘発されたことになる。なお、ガスクロマトグラフの測定条件は本報告の II の実験の項を参照されたい。

2. メチルアクリレイト

メチルアクリレイトは培養細胞に対する毒性が強く、わずか 0.8 ml/hr の注入量でも著しい細胞致死効果が現われ、染色体観察ができない。さらに少量の注入を行う場合には検体が微量のため、連続的に一定濃度のガスを発生させることは困難である。そこで、メチルアクリレイトを蒸留水で20倍に希釈して、0.8, 1.7, 2.5 及び 5.0 ml/hr の注入量で実験を行った。Table 2 に示してある濃度 (ppm) は注入量、希釈率、分子

量、比重及び混合空気量 (180 l/hr) から換算したものである。

60 ppm では全く染色体異常の増加はみられないが、128 ppm においては70%の細胞に染色分体型の異常が認められた。さらに、189 ppm においては100%の細胞に異常がみられ、378 ppm では著しい細胞致死効果がみられた。異常の種類は交換型もみられたが、ギャップと切断が大部分を占め、さらに 189 ppm では染色体の断片化が増加するという特徴がみられた。

ガスクロマトグラフで測定した培養びん内の濃度を基にすると、約 30 ppm より異常頻度が上昇し、60 ppm で最高の出現頻度 (約 100%) を示し、60 ppm 以上では細胞致死効果が著しく染色体観察ができなかった。発生時の濃度と比較するといずれも約 1/3 の濃度に相当しており、メチルアクリレイトはかなり低い濃度において、しかもわずか1時間曝露によって染色体異常を誘発することが判明した。

3. ベンゼン

ベンゼンの培養細胞による染色体異常試験では 10, 16.7, 20 及び 25 ml/hr の注入量で、曝露時間は1時間とし、曝露後24及び48時間目に標本作製を行った。Table 3 に示してある濃度 (ppm) は注入量、希釈率、

Table 4. Chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with ethylene glycol in liquid phase (Direct method)

Time* (h)	Dose (mg/ml)	Polyploid (%)	Frequency (%) of aberrant cells **					Total	Judge
			ctg	ctb	cte	frg	cse		
24-0	0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
		2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	1.0	
	10	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	-
		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	1.0	-
		0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	1.0	-
		0.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	-
80	Tox***						Tox		
48-0	0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
		1.0	2.0	1.0	1.0	0.0	0.0	2.0	
	10	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	1.0	-
		2.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	1.0	-
		0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	1.0	-
		0.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	-
60	Tox						Tox		

*, **, *** See the foot-notes in Tables 1 and 2.

Table 5. Chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with methyl acrylate in liquid phase (Direct method)

Time* (h)	Dose (mg/ml)	Polyploid (%)	Frequency (%) of aberrant cells **					Total	Judge
			ctg	ctb	cte	frg	cse		
24-0	0	2.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	
	0.0375	1.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	2.0	-
	0.075	2.0	6.0	13.0	2.0	0.0	0.0	18.0	+
	0.15	0.0	5.0	75.0	8.0	40.0	0.0	98.0	+
48-0	0.0375	1.0	0.0	2.0	1.0	0.0	0.0	3.0	-
	0.075	1.0	3.0	4.0	2.0	0.0	0.0	7.0	±
	0.15	Tox***						Tox	

*, **, *** See the foot-notes in Tables 1 and 2.

分子量、比重及び混合空気量 (180 l/hr) より換算したものである。24時間の 16.7 ml/hr の注入量において疑陽性を示した以外は全て陰性であった。ただし、検体処理より48時間目の細胞に多少倍数体の増加する傾向がみられた。さらに、20 ml/hr の注入量で曝露時間を30分、1時間、2時間、3時間とし、24時間目の標本を観察したところ、3時間曝露の1つの培養びんでは陽性の結果が得られたが、もう1つのびんでは陰性であり、他の曝露時間も全て陰性であった。これらの実験結果を総合的に判断すると、ベンゼンのガス状曝露における染色体異常誘発性はかなり弱いか、あるいはほとんどないとみなしてよいと思われる。

考 察

本実験においてエチレンオキシドのガス状曝露によって培養細胞に染色体異常が誘発されることが判明した。エチレンオキシドは水と反応してエチレングリコールを形成することから、エチレンオキシドの直接の影響ではなく、培養液中に形成されたエチレングリコールによって染色体異常が誘発されたことも考えられる。エチレングリコールを直接培養液に加えて調べたところ、細胞致死効果の現れる濃度 (80 mg/ml) まで加えても染色体異常の誘発はみられなかった (Table 4)。この結果から培養液中にエチレングリコールが形成されたとしても、エチレングリコールによって染色体異常が誘発されたのではないと考えられる。

Table 6. Chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with benzene in liquid phase (Direct method)

Time* (h)	Dose (mg/ml)	Polyploid (%)	Frequency (%) of aberrant cells **						Judge
			ctg	ctb	cte	frg	cse	Total	
24-0	0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
	0.125	5.0	2.0	2.0	0.0	0.0	0.0	4.0	-
	0.25	4.0	2.0	1.0	0.0	0.0	0.0	3.0	-
	0.5	1.0	2.0	2.0	0.0	0.0	0.0	3.0	-
	1.0	1.0	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0	2.0	-
	2.0	1.0	2.0	2.0	1.0	0.0	0.0	4.0	-
	4.0	Tox***						Tox	
48-0	0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	1.0	
	0.125	0.0	0.0	1.0	2.0	0.0	0.0	3.0	-
	0.25	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-
	0.5	1.0	1.0	2.0	0.0	0.0	0.0	3.0	-
	1.0	2.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	1.0	-
	2.0	Tox						Tox	

*, **, *** See the foot-notes in Tables 1 and 2.

Table 7. Chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with benzene in liquid phase (Metabolic activation method)

S9 mix	Time* (h)	Dose (mg/ml)	Polyploid (%)	Frequency (%) of aberrant cells **						Judge
				ctg	ctb	cte	frg	cse	Total	
-	6-18	0	2.0	1.0	0.0	0.0	0.0	1.0	2.0	
			2.0	2.0	2.0	0.0	0.0	4.0		
		0.55	2.0	1.0	0.0	1.0	0.0	2.0	-	
			0.0	2.0	0.0	0.0	0.0	2.0	-	
		1.1	5.0	3.0	1.0	0.0	0.0	4.0	-	
			3.0	2.0	1.0	0.0	0.0	3.0	-	
	2.2	2.0	0.0	3.0	0.0	0.0	3.0	-		
		4.0	2.0	0.0	0.0	0.0	2.0	-		
	4.4	5.0	1.0	0.0	0.0	0.0	2.0	-		
		4.0	0.0	1.0	1.0	0.0	2.0	-		
	+	6-18	0	3.0	2.0	0.0	0.0	1.0	3.0	
				0.0	1.0	2.0	0.0	0.0	3.0	
0.55			0.0	2.0	3.0	5.0	0.0	7.0	±	
			1.0	2.0	2.0	6.0	0.0	10.0	+	
1.1			1.0	6.0	6.0	8.0	0.0	18.0	+	
			1.0	5.0	7.0	11.0	0.0	17.0	+	
2.2		0.0	6.0	13.0	9.0	0.0	21.0	+		
		0.0	3.0	4.0	9.0	0.0	14.0	+		
4.4		1.0	3.0	4.0	13.0	0.0	17.0	+		
		2.0	6.0	13.0	22.0	0.0	28.0	+		

*, ** See the foot-notes in Table 1.

エチレンオキシドは培養液中の塩素イオンと反応してエチレンクロヒドリンを形成することも考えられるが、エチレンクロヒドリンは Ames 試験において代謝活性化を併用した時のみ変異原性を示し¹⁰⁾、チャイニーズ・ハムスター培養細胞による体細胞突然変異試験においては陰性の結果が報告されている¹¹⁾。このようなことから、本試験で得られた結果はエチレ

ンオキシドそのものによって染色体異常が誘発されたことを示唆している。

メチルアクリレートは本実験においてガス状にて培養細胞に染色体異常を誘発したが、液状にて処理しても染色体異常が誘発される (Table 5)。液状処理で誘発された染色体異常のタイプも、ガス状曝露と全く同様に、交換型が少なく染色体の断片化が現われるとい

う特徴を示した。液状では24時間処理，ガス状では1時間曝露であり，処理時間に差異があるため染色体異常誘発効果を直接比較できない。しかし，液状にて24時間処理の0.15 mg/mlではほぼガス状1時間曝露の189 (実際には60) ppmに相当する異常頻度が得られている。一方，液状処理の処理時間を3時間に短縮すると，0.1 mg/mlでわずか14%の細胞にしか染色体異常が誘発されなかった。ガス状曝露ではわずか1時間の処理で100%という高頻度の染色体異常が出現しており，ガス状にて曝露した時の細胞への取り込みに何らかの特異性のあることが想定される。

本実験のベンゼンのガス状曝露では培養細胞に対し明らかな染色体異常誘発性を示さなかったが，液状にて処理した場合にも同様に陰性の結果が得られた。すなわち，ベンゼンを直接培養液に加え，超音波をかけて培養液中に懸濁させ，24及び48時間処理したところ，細胞致死効果のあらわれる濃度まで加えても染色体異常の誘発はみられなかった (Table 6)。一方，ラット肝 S9 mix による代謝活性化を併用すると，Table 7 に示されているように明らかに染色体異常の誘発が認められた。これらの結果はベンゼンそのものよりもベンゼンからの代謝産物の中に染色体異常を誘発するものが含まれていることを示している。ヒト培養リンパ球をベンゼンで処理すると染色体型の異常がみられるという報告¹²⁾があるが，他方，染色体異常が認められないという報告¹³⁾もあり，ベンゼンの代謝産物の中に染色体異常を誘発するものが含まれていることを推定している。本実験の結果は後者の考えを支持するものである。姉妹染色分体交換 (SCE) 試験によるとベンゼンは SCE の増加をもたらさないが，ベンゼンの代謝産物であるカテコール及びハイドロキノンが SCE の頻度を著しく上昇させており¹⁴⁾，染色体異常もこれらの代謝産物によって誘発される可能性が考えられる。

今回報告した3検体の他に，ガス状物質としてはアンモニア，亜硫酸ガス，硫化水素及びフロン-12 (ジクロロジフルオロメタン) について，揮発性物質としてはクロロホルム，トリクロロエチレン及び1,1-ジクロロエチレンについて培養細胞における染色体異常誘発性を検討した。1,1-ジクロロエチレンは代謝活性化を併用するとガス状曝露によっても染色体異常を誘発したが，その他の検体については陰性の結果を得ている。

文 献

- 1) C. H. Nauman, A. H. Sparrow, L. A. Schairer: *Mutat. Res.*, **38**, 53 (1976)
- 2) H. Tanooka: *Mutat. Res.*, **64**, 433 (1979)
- 3) P. G. Kale, J. W. Baum: *Mutat. Res.*, **68**, 59 (1979)
- 4) 松下秀鶴, 浜野義夫, 後藤純雄: 日本環境変異原学会第9回研究発表会講演要旨集, p. 42 (1980)
- 5) 佐々木裕子, 遠藤立一, 古井戸良雄: 日本環境変異原学会第9回研究発表会講演要旨集, p. 84 (1980)
- 6) J. W. Embree, J. P. Lyon, C. H. Hine: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **40**, 261 (1977)
- 7) C. Izard, D. Valadaud-Barrieu, J. Fayeulle, A. Testa: *Mutat. Res.*, **77**, 341 (1980)
- 8) K. Toft, T. Olofsson, A. Tunek, M. Berlin: *Arch. Toxicol.*, **51**, 295 (1982)
- 9) M. Ishidate, Jr., S. Odashima: *Mutat. Res.*, **48**, 337 (1977)
- 10) J. McCann, V. Simmon, D. Streitwieser, B. N. Ames: *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.*, **72**, 3190 (1975)
- 11) E. Huberman, H. Bartsh, L. Sachs: *Int. J. Cancer*, **16**, 639 (1975)
- 12) K. Morimoto: *Jap. J. Ind. Health.*, **18**, 23 (1976)
- 13) P. Gerner-Smidt, U. Friedrich: *Mutat. Res.*, **58**, 313 (1978)
- 14) K. Morimoto, S. Wolff: *Cancer Res.*, **40**, 1189 (1980)

ガス状及び揮発性化学物質の哺乳動物細胞に対する細胞遺伝学的影響

II. マウスを用いる小核試験

祖父尼俊雄・林 真・松岡厚子・沢田 稔・畑中みどり・石館 基

Cytogenetic Effects of Gaseous and Volatile Chemicals on Mammalian Cells *In Vitro* and *In Vivo*.

II. Micronucleus Tests in Mice

Toshio SOFUNI, Makoto HAYASHI, Atsuko MATSUOKA,
Minoru SAWADA, Midori HATANAKA and Motoi ISHIDATE, Jr.

To detect cytogenetic effects of gaseous and volatile chemicals on mammalian cells *in vivo*, the micronucleus test was carried out using 8-week-old ddY mice exposed to a test chemical in the gaseous phase for 3 hours. Femoral marrow cells were collected at 24 hours after the initiation of the exposure, and micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) were examined in 1000 polychromatic erythrocytes in each animal.

Ethylene oxide which was positive in the *in vitro* test, was also positive in the present *in vivo* test: the frequencies of MNPCE at 240 ppm, 380 ppm and 450 ppm were 0.25%, 0.70% and 1.15%, respectively, indicating a significant concentration-depending increase.

Methyl acrylate which was also positive in the *in vitro* test, however, was negative in the *in vivo* test: there was no significant increase in the frequencies of MNPCE, suggesting that methyl acrylate is not clastogenic to bone marrow cells of mice under the present condition.

On the other hand, benzene which was negative in the *in vitro* test, was positive in the *in vivo* test: the frequencies of MNPCE began to increase at the concentration of 1200 ppm (0.58%), peaked at 2600 ppm (1.35%), and then decreased slightly at 4000 ppm (0.88%), with a significant difference from that in the control (0.20%).

(Received May 31, 1984)

ガス状及び揮発性化学物質について、ガス状で曝露させた時の生体における染色体異常誘発性をマウスによる小核試験を用いて検討したので報告する。

実験方法

1. ガス曝露システム

マウスへのガス曝露システムは培養細胞に用いたシステムと基本的には同じであり、曝露形式としてフローシステムを用い、一定時間一定濃度のガス体を曝露するようにした。ただし、曝露チェンバーは培養細胞用のものは使えないので、動物個体用の曝露チェンバーを新たに製作した。また、揮発性化学物質に用いてきた熱板ガス発生器はガスクロマトグラフによる濃度測定の結果、発生濃度の経時的な変動が大きいが判明したために、より一定した濃度が得られる蛇管式ガス発生機を用いた。なお、揮発性物質の発生に用いる自動注入装置並びに排気系システムは培養細胞の実験に用いたものと同じである。

マウスへの曝露形式は全身曝露とし、2段階濃度のガス体が同時に曝露できるように2室型とした。装置は800×600×1500 mmの架台に組み込まれており、硬質ガラス製の円錐形曝露チェンバー2個が下部に取り付けられ、上部は流量及び圧力のコントロール・ユニットとなっている。曝露チェンバーは内径185 mm、高さ160 mm、内容積5.85 lで、上部中央には温度計が組み込まれており、必要に応じて温度計の代りに給水びんを備え付けることができる。曝露チェンバーの下部には気液分離器が備えられ、糞尿による排気の汚染を減少させることができると共に、分離器に取り付けられた糞及び尿捕集びんによって糞尿の分離、採取も可能である。検体ガスは曝露チェンバーの上部の流入口よりうず巻き状になりながら流入し、下部の気液分離器の排出口より排出される。

本装置の上部のコントロール・ユニットには圧力計、オリフィス流量計、流量調節バルブ及び圧力調節バルブがそれぞれ2個備えられており、圧力は±15 mmAq、

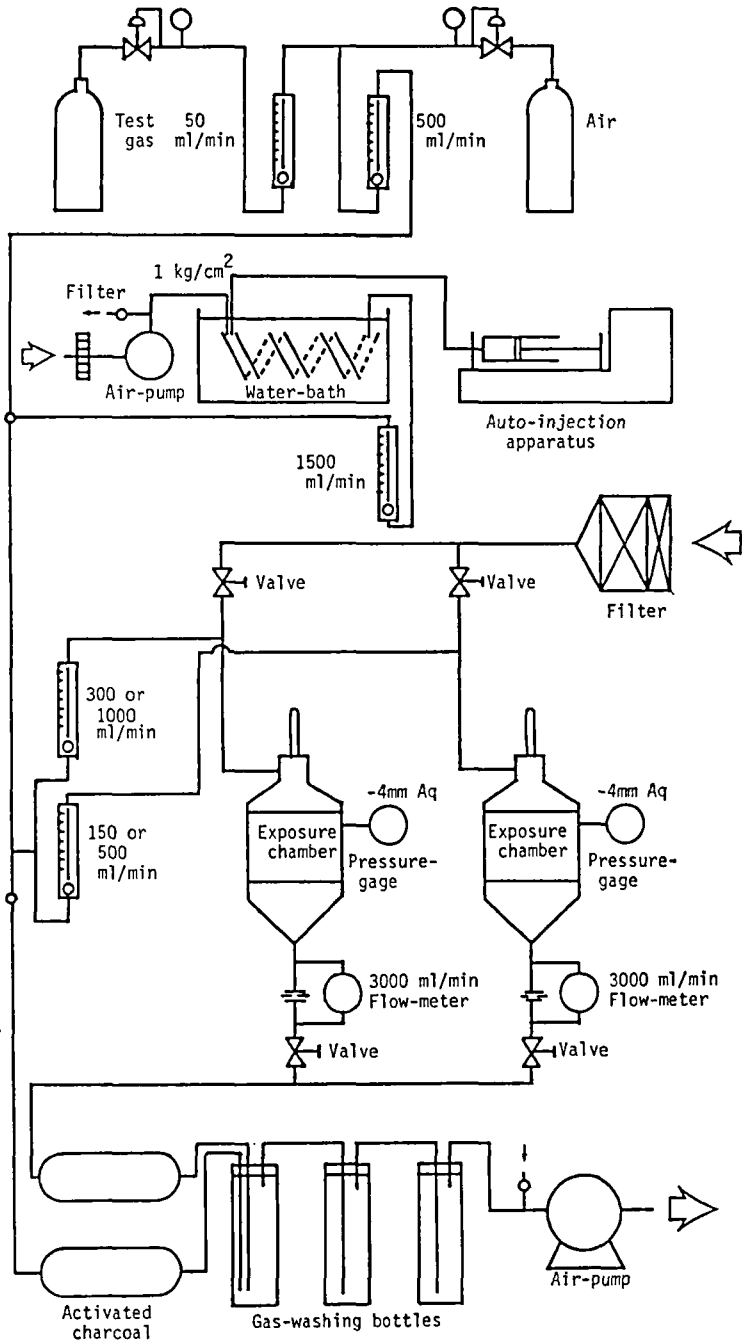


Fig. 1. Flow chart of the gas-exposing system for micronucleus tests in mice

流量は 0~6l/min に調節できる。本装置の上部側面にはプレフィルター及びヘパフィルターが組み込まれており、ここより取り込まれた清浄空気は検体ガスを希釈しながら曝露チャンパー内に流入する。曝露チャンパー内にはステンレス鋼製の円筒状の飼育ケージ

(直径 180 mm, 高さ 120 mm) があり、この中にマウスを 4~6 匹飼育することができる。目下のところ曝露時間は 1~3 時間としてあるため、給飼器は備えていない。

ガス状並びに揮発性化学物質の動物曝露システムの

フローシートを Fig. 1 に示す。ガス状化学物質を用いる場合には検体ガスをガスボンベより圧力調節器を用いて調節しながら、浮子式流量計にて一定流量で送り出した後、Y字管にて希釈用の空気と混合する。希釈率は混合後の流量の調節で任意に設定できる。例えば、検体ガスの流量を 50 ml/min とし、空気との混合後の流量を 500 ml/min とすることによって、検体ガスは約10倍に希釈されたことになる。

揮発性化学物質の場合には自動注入装置及び蛇管式ガス発生器を用いて検体ガスを得る。前者は培養細胞に用いたものである。後者は蛇管を組み込んだ恒温槽で、室温から 95° まで任意の温度に設定できる。蛇管の先端にはエアポンプからの空気の注入チューブが連結されており、フィルターを通った清浄空気が 1 kg/cm² の圧力で蛇管に送り込まれる。なお、一定圧力を維持するために一定量の空気をオーバーフローさせている。蛇管にはさらに自動注入装置から細管がさし込まれており、ここから検体が一定流量で注入される。沸点以上に加温された蛇管に送り込まれた検体は気化し、蛇管に流れる空気と混合して一定濃度のガスを発生する。

次に、任意の濃度の検体ガスは 2 個の流量計を用いて二分される。ガス状化学物質の場合には 500 ml/min の検体ガスが 2 個の流量計により 300 ml/min と 150 ml/min の流量に二分されて、2 個の曝露チャンパーへ送り込まれる。余分の 50 ml/min はオーバーフローさせて、直接排気系へ送る。揮発性化学物質の場合には 1500 ml/min の検体ガスが 1000 ml/min と 500 ml/min に二分されて、2 個の曝露チャンパーへ送り込まれる。曝露チャンパーには別にフィルターを通った清浄空気が送り込まれ、最終的にはチャンパー内に 3000 ml/min の流量が流れるように流量計にて調節する。これによってガス状化学物質は10及び20倍に、揮発性化学物質の場合には 3 及び 6 倍にそれぞれ希釈される。なお、チャンパー内の圧力は圧力計によってモニターし、わずかに陰圧 (-4 mmAq) になるよう調節バルブにてコントロールする。3000 ml/min の流量でチャンパー内に流した時の換気回数は 30/hr である。チャンパー内で動物に曝露した検体ガスは排気系へ送られる。

2. 被検物質

エチレンオキシドは液化炭酸ガス中の10%エチレンオキシドを大同酸素(株)より入手し、清浄空気曝露を対照群として、最終曝露濃度 240, 380 及び 450 ppm で各群 4 匹のマウスを曝露した。メチルアクリレートは和光純薬工業(株)より入手し、1100 ppm 及び 1700

ppm 3時間曝露の予備実験後、1300 及び 2100 ppm 3時間曝露の実験を行った。ベンゼンは和光純薬工業(株)より入手し、清浄空気曝露を対照群として、1200, 2600 及び 4000 ppm で各群 4 匹のマウスを3時間曝露した。

3. マウスによる小核試験

動物は ddY 雄マウス (静岡実験動物協同組合) を 7 週齢で購入し、1 週間の飼育馴化後試験に供した。検体ガス曝露24時間後に動物を頸椎脱臼によって屠殺し、右の大腿骨より骨髓細胞を牛胎仔血清を用いて採取した。骨髓細胞を遠沈濃縮後塗抹標本を作製し、直ちに風乾した。メタノールで5分間固定後、一部の標本は 3%ギムザ液にて25~30分間染色した。一部の標本は 0.24 mM のアクリジン・オレンジ溶液で3分間染色後、ゼーレンセンバッファ (pH 6.8) で数回洗浄し、蛍光顕微鏡で観察した¹⁾。

顕微鏡による観察は 1000 倍にて行い、細胞質の染色性の違いによって多染色性赤血球 (Polychromatic erythrocyte, PCE) と正染色性赤血球 (Normochromatic erythrocyte, NCE) を識別しながら小核をもつ PCE (Micronucleated PCE, MNPCE) の出現頻度及び PCE の全赤血球に対する割合を求めた。算定は 1 個体につき 1000 個の PCE 及び 1000 個の赤血球の観察に基づいて行った。

4. ガスクロマトグラフによる濃度測定

培養細胞による染色体異常試験においては検体ガス発生時における濃度を曝露濃度として用いたが、マウスによる小核試験においてはガスクロマトグラフを用いて曝露チャンパー内の濃度測定を行った。

測定条件

	エチレン オキシド	メチルアク リレート	ベンゼン
カラム	PEG 20M on クロモソル ブ 101	PEG 20M on クロモソル ブ 101	クロモソル ブ 101
カラム温度	140°	160°	190°
気化室温度	190°	210°	220°
キャリアガス	N ₂ 50 ml/min	N ₂ 50 ml/min	N ₂ 50 ml/min
検出器	FID	FID	FID
装置	島津 GC-9A	島津 GC-9A	島津 GC-9A

結 果

1. エチレンオキシド

MNPCE の頻度は対照群 0.18% に対し、240 ppm で

Table 1. Micronucleus tests in mice exposed to ethylene oxide in gaseous phase

Concentration (ppm)	Exposure period (h)	MNPCE* (%)	MNNCE** (%)	Ratio (%) of PCE***
0	3	0.18±0.17	0.20±0.14	58.1± 4.7
240	3	0.25±0.10	0.15±0.17	52.9±12.4
380	3	0.70±0.14	0.10±0.08	43.8±11.8
450	3	1.15±0.38	0.08±0.05	31.5±16.9

* MNPCE: Micronucleated polychromatic erythrocytes.

** MNNCE: Micronucleated normochromatic erythrocytes.

*** PCE: Polychromatic erythrocytes.

は0.25%, 380 ppm では0.70%, 450 ppm では1.15%と、曝露濃度の増加につれて MNPCE の頻度は上昇しており、エチレンオキシドの小核誘発性が明らかに認められた (Table 1)。小核をもつ NCE (Micronucleated NCE, MNNCE) の頻度は対照群と比較して差異はなかった。これは標本作製が曝露24時間後であるため、MNPCE の NCE への移行がまだ十分に行われていないためと推察される。PCE の割合は対照群の 58.1% に対し、240 ppm で 52.9%, 380 ppm で 43.8%, 450 ppm で 31.5% と、曝露濃度に比例して低下しており、エチレンオキシドの骨髄に対する影響が明らかに認められた。本実験の結果はエチレンオキシドがマウス骨髄において小核を形成すること、即ち染色体異常を誘発することを明らかにしている。

Fig. 2 に曝露チェンバーにおけるエチレンオキシドの濃度測定の結果を示す。低、中、高濃度で比較すると、明らかに高濃度の方が立ちあがり早く、低濃度では立ちあがり遅い。高濃度では約10分、中濃度では50分、低濃度では60分ではぼプラトーに達している。Table 1 に示してある濃度はプラトーに達した後の各測定値から得た平均曝露量で示してある。

2. メチルアクリレイト

メチルアクリレイトについては、小核試験の予備実験として2匹のマウスを用いて、1100 ppm 及び 1700 ppm の2段階濃度で3時間曝露を行った。曝露24時間後の標本においては MNPCE の頻度に何ら上昇の徴候がみられなかった。ただし、1700 ppm において PCE の割合が幾分低下する傾向がみられており、骨髄細胞に増殖抑制がもたらされていることが考えられる。このことから MNPCE の出現時期が影響を受けていることが推測されたため、次に 1300 ppm と 2100 ppm の2段階濃度を用いて、曝露後 18, 24, 30, 48 及び 72 時間に標本作製し、経時的観察を行った。

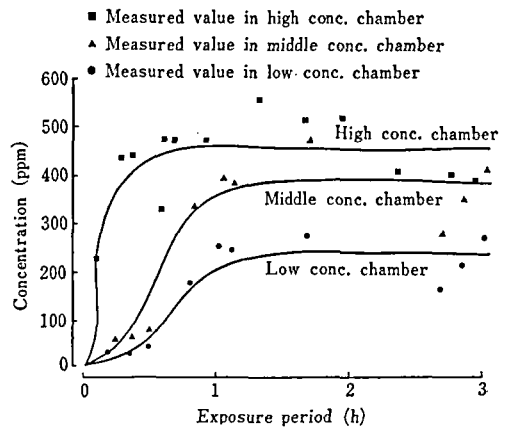


Fig. 2. Concentration of ethylene oxide in exposure chambers for the micronucleus test measured by a gas chromatograph.

Table 2 に示されているように、1300 ppm の30時間後の標本において MNPCE の頻度がやや高い傾向にあるが、2100 ppm においては当研究室の対照群の値 (0.22) と差異はなく、全体として MNPCE の頻度が明らかに上昇した時間は認められなかった。なお、2100 ppm 曝露群に用いた予備のマウスの中には24及び48時間においてそれぞれ1匹ずつ死亡しており、これ以上濃度を上げて実験することはできない。今回の実験からメチルアクリレイトはマウスの骨髄において小核誘発性を示さないという結果が得られた。

メチルアクリレイトについてガスクロマトグラフによる曝露濃度のモニターを行ったが、Fig. 3 に示されているように、高濃度及び低濃度共に約30分で急速に立ち上がり、90分までゆるやかに上昇し、以後はほぼプラトーに達した。Table 2 に示した濃度はほぼプラトーに達した後の平均的な値である。なお、メチルア

Table 2. Micronucleus tests in mice exposed to methyl acrylate in gaseous phase

Concentration (ppm)	Exposure period (h)	Sampling time (h)	MNPCE* (%)	Ratio (%) of PCE**
1300	3	18	0.15±0.07	47.8± 5.3
2100	3	18	0.25±0.07	54.0±12.0
1300	3	24	0.35±0.21	48.8± 3.9
2100	3	24	0.30±0.28	55.5± 2.1
1300	3	30	0.45±0.07	60.8± 1.8
2100	3	30	0.25±0.35	63.8± 1.1
1300	3	48	0.10±0.14	49.5±14.1
2100	3	48	0.35±0.21	43.3± 3.2
1300	3	72	0.30±0.00	39.0± 7.8
2100	3	72	0.35±0.21	47.8±11.7

*,** See the foot-notes in Table 1.

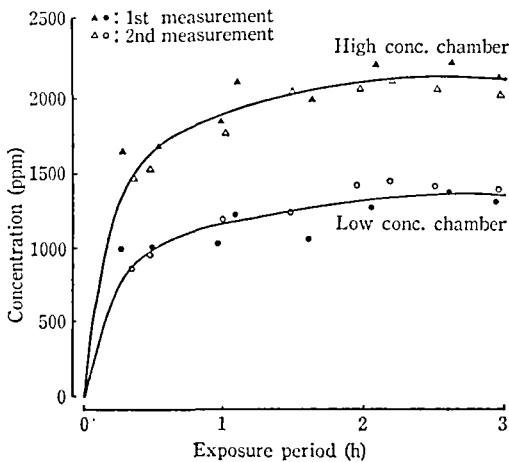


Fig. 3. Concentration of methyl acrylate in exposure chambers for the micronucleus test measured by a gas chromatograph.

リレートについては同一曝露条件で再度測定を行ったところ、前回と同様の測定結果が得られ (Fig. 3), 再現性が確認された。

3. ベンゼン

Table 3 に示されているように MNPCE の頻度は対照群0.20%に対し、1200ppm では0.58%, 2600ppm では1.35%と明らかな上昇がみられた。しかし、4000ppm の最高濃度では逆に0.88%と幾分低下した。MNPCE の頻度は4000ppm においてやや高い値を

示したが、明らかな差異とはいえない。これはエチレンオキシドの場合と同様に、曝露24時間後ではMNPCE の頻度の上昇は期待できないからである。PCE の割合にも著しい変動がみられず、骨髄の細胞増殖に対する阻害効果はないものと思われる。しかし、4000ppm において MNPCE の頻度が幾分低下したことは、高濃度曝露によって細胞周期への遅延効果が生じたためという推定もできる。4000ppm では24時間以降に MNPCE の頻度がピークに達する可能性が残されているわけである。本実験の結果から、ベンゼンがマウスの骨髄において小核を誘発すること、即ち染色体異常誘発性を示すことが明らかとなった。

Fig. 4 には曝露チャンバー内のベンゼン濃度のガスクロマトグラフによる測定結果を示す。エチレンオキシドの時と同様に濃度が高い程立ち上がり良く、高濃度では約20分、中濃度では40分、低濃度では60分以降よりほぼプラトーに達している。Table 3 に示されている曝露濃度はプラトーに達した時からの平均的な値として示しており、3時間における総曝露量としてはこれより幾分低い値を用いて求めなければならない。

考 察

エチレンオキシドについては古くからショウジョウバエ、枯草菌、大麦などにおいて変異原性のあることが知られており、植物においては染色体異常を誘発

Table 3. Micronucleus tests in mice exposed to benzene in gaseous phase

Concentration (ppm)	Exposure period (h)	MNPCE* (%)	MNCE** (%)	Ratio (%) of PCE***
0	3	0.20±0.08	0.10±0.12	51.7± 9.0
1200	3	0.58±0.15	0.10±0.08	41.8±21.2
2600	3	1.35±0.44	0.05±0.06	47.8± 5.2
4000	3	0.88±0.29	0.18±0.13	49.4± 3.8

*, **, *** See the foot-notes in Table 1.

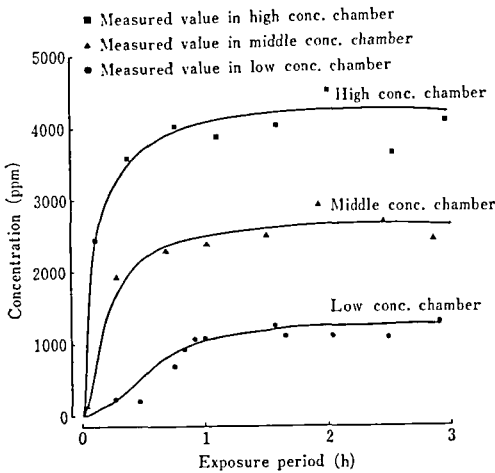


Fig. 4. Concentration of benzene in exposure chambers for the micronucleus test measured by a gas chromatograph.

することも知られている。最近のラットへの曝露実験の報告²⁾によると、250 ppm のエチレンオキシドを1日あたり7時間、3日間連続曝露し、最終曝露より24時間後の骨髄標本では染色体異常の出現頻度が対照群よりも高かったと述べている。また、同じ報告の中に10~1000 ppm のエチレンオキシドに4時間曝露した後、翌日50 ppm でさらに4時間曝露し、その24時間後に標本を作製し、小核の出現頻度を調べると、50 ppm より MNPCE の頻度が上昇し、250~1000 ppm においてかなり高い値を示したという記載もある。本実験における小核試験では240~450 ppm のエチレンオキシドの3時間曝露によって小核出現頻度の有意な増加が認められた。曝露形式が異なるため直接的に比較することは困難であるが、曝露時間と曝露濃度の積を総曝露量として比較推定すると、上述の報告例に比べて本実験では比較的低い濃度で陽性の結果が得られている可能性がある。Embree ら³⁾の報告に

よると、1000 ppm のエチレンオキシドで4時間曝露したラットの優性致死試験において陽性の結果が得られている。優性致死は生殖細胞に生じた染色体異常に起因しているといわれており、エチレンオキシドは骨髄細胞のような体細胞のみならず生殖細胞においても染色体異常を誘発しているものと考えられる。

メチルアクリレートは培養細胞においてはエチレンオキシドよりも低い濃度でしかも高頻度の染色体異常を誘発したが、本実験のマウスによる小核試験においては急性曝露の最大耐量と思われるかなり高濃度の曝露でも陽性の結果は得られなかった。メチルアクリレートの生体における作用機序が培養細胞系とは異なっていることが想定されるが、その差異は現在のところ明らかでない。

生体においてベンゼンが染色体異常誘発性を示すことはすでにいくつか報告がなされている。ベンゼン曝露を受けた工場従業員の末梢リンパ球に染色体異常が認められており^{4,5)}、ラット及びウサギの骨髄においてもベンゼンによって染色体異常が誘発されている^{6,7)}。本実験のマウスによる小核試験の結果は上述の報告と一致するものである。ベンゼンを液状で投与した小核試験の報告⁸⁾によれば、0.0625~2.0 mg/kg のベンゼンを24時間毎に2回マウスに経口投与すると、投与後6時間では0.5~2.0 mg/kg において、投与後24時間では0.125~0.5 mg/kg において小核の出現頻度が明らかに上昇している。本実験とは投与形式も投与回数も異なるため直接的な比較は困難である。2回投与より6時間では2回目の投与の効果はほとんど期待できないので、1回投与後30時間とすると、0.5~2.0 mg/kg の経口投与が本実験の1200~4000 ppm の3時間曝露の状況に近似するのかもしれない。最近、ベンゼンをガス状で曝露した報告⁹⁾があり、これによると95 ppm で48時間連続曝露したマウスにおいて明らかな小核誘発性が認められている。これを単に曝露時間と濃度の積から概算すると、1520 ppm の3時間曝露

に相当し、本実験の結果とほぼ一致する。

以上、エチレンオキシド、メチルアクリレート及びベンゼンの急性曝露(3時間)による生体レベルでの細胞遺伝学的影響について検討を加えたが、今後、亜急性曝露による影響を含めて、その他のガス状及び揮発性物質について検討を続けていく予定である。

終りに、エチレンオキシドのガスクロマトグラフによる測定に関して御協力をいただきました製品部辻捕雄技官に深謝致します。

文 献

- 1) 林 真, 祖父尼俊雄, 石館 基: トキシコロジーフォーラム, **6**, 419 (1983)
- 2) 大場琢磨: エチレンオキシドに関する最近の諸

情報, 日本衛生技術研究会 (1978)

- 3) J. W. Embree, J. P. Lyon, C. H. Hine: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **40**, 261 (1977)
- 4) I. M. Tough, W. M. Court Brown: *Lancet*, **i**, 684 (1965)
- 5) A. Forni, E. Pacifico, A. Limonta: *Arch. Environ. Health.*, **22**, 373 (1971)
- 6) P. Philip, M. K. Jensen: *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. A*, **78**, 489 (1970)
- 7) M. Kissling, B. Speck: *Helv. Med. Acta*, **36**, 59 (1971)
- 8) M. Hite, M. Pecharo, I. Smith, S. Thornton: *Arch. Toxicol.*, **51**, 295 (1982)
- 9) K. Toft, T. Olofsson, A. Tunek, M. Berlin: *Mutat. Res.*, **77**, 149 (1980)

細菌内毒素による家兎の末梢血管透過性因子について

長谷川隆一・川崎浩之進・加納晴三郎

Studies on Vascular Permeability Factor induced by Bacterial Endotoxin in Rabbits

Ryuichi HASEGAWA, Hironoshin KAWASAKI and Seizaburo KANOI

The relation of the time course of vascular permeability factor and various enzyme activities in rabbit serum was examined after the injection of lipopolysaccharide (LPS) (10 µg/kg, iv). The vascular permeability factor increased at 1.5 hr, then returned to normal level at 4.5 hr after the LPS injection. The activities of lysosomal enzymes, that is, N-acetyl-β-glucosaminidase and β-glucuronidase, increased 2-4 times from 1.5 to 6.5 hr after the LPS injection. However, acid and alkaline phosphatase activities did not change significantly at 1.5 hr after the LPS injection. GOT increased gradually up to 6.5 hr but GPT did not change through 6.5 hr after the LPS injection. The vascular permeability factors from both LPS-injected and normal rabbit sera were stable for 10 min in boiling water but the three lysosomal enzymes from both sera were labile under the same condition. By gel-filtration, the vascular permeability factor which increased after the LPS injection was mainly observed in a wide range of molecular weight of more than 10000 daltons.

(Received May 31, 1984)

グラム陰性菌細胞壁の成分であるリポ多糖 (LPS) は幅広い生体作用を有しているが、なかでも全身性の血管透過性亢進作用は LPS が組織へ浸透して毒性を發揮する際の重要な機構の一つであると推定される。西尾らはすでに LPS により血中の末梢血管透過性因子 (PF) が増加することを明らかにしており、その由来は好中球ライソゾームであろうと推定している^{1,2)}。本実験では、PF とライソゾームの関連性に注目し、LPS 静注後の血中の PF とライソゾーム酵素活性の時間的推移について検討し、更に PF の性質について

検討を加えた。

実験材料及び方法

1. 実験材料

LPS は *E. coli* UKT 株より温フェノール水法により抽出し、エタノール沈殿、超遠心によって精製したものを用いた。動物は健康雄性家兎体重 2.5~3 kg (ケアリー) を使用した。試薬はすべて市販の特級試薬を用いた。

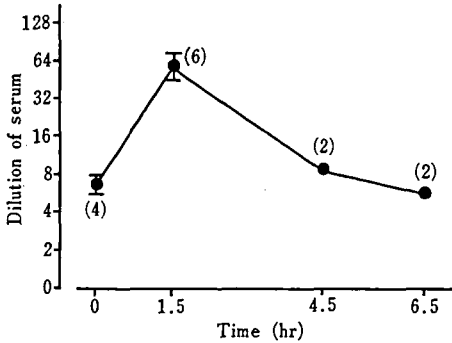


Fig. 1. The time course of vascular permeability factor in rabbit serum after LPS injection (10 µg/kg, iv)

The concentration of vascular permeability factor in serum is expressed as the marginal dilution to induce the dye leakage. The vertical bars indicate S.D. of the means. The number in parenthese indicates the number of animals.

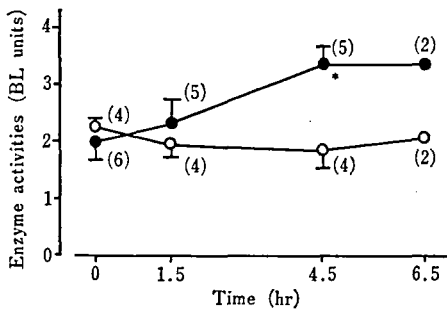


Fig. 3. The changes of serum phosphatase activities after injection of LPS

(—●—): alkaline phosphatase, (—○—): acid phosphatase, asterisk: $p < 0.01$ from the 0 time value. The others are the same as Fig. 1.

実験方法

1. 動物処置

LPS 10 µg/kg を家兎に静注し、0, 1.5, 4.5, 6.5 時間後に心臓採血により得た血液を室温に30分間放置し、3000 rpm で15分間の遠心により血清を得た。なお、血清の一部はライソゾーム酵素の安定化のため、最終0.2%になるように酢酸を添加した。

2. 末梢血管透過性の測定

未処置家兎背部を除毛し、血清（通常生理食塩水で2倍段階希釈）あるいは被検液 0.1 ml を皮内注射すると同時に、1%エバンスブルーを1 ml/kg 静注した。2時間後に皮内注射した部位の色素の漏出の直径を測定し、面積 (mm²) として表わした。

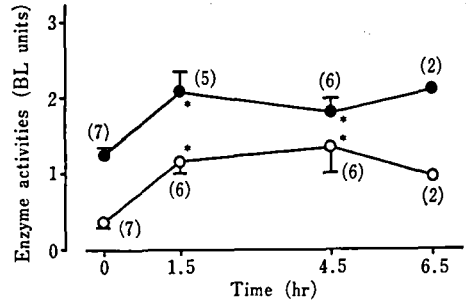


Fig. 2. The changes of lysosomal enzyme activities in serum after injection of LPS

N-acetyl-β-glucosaminidase (—●—) and β-glucuronidase (—○—) activities in rabbit serum were determined at the indicated time after injection of LPS (10 µg/kg, iv). Asterisk: $p < 0.02$ from the 0 time value. The others are the same as Fig. 1.

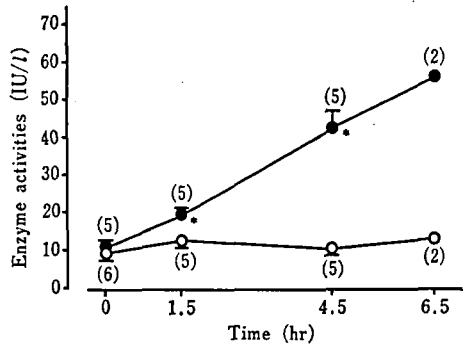


Fig. 4. The changes of serum transaminase activities after injection of LPS

(—●—): glutamic-oxaloacetic transaminase, (—○—): glutamic-pyruvic transaminase, asterisk: $p < 0.01$ from the 0 time value. The others are the same as Fig. 1.

3. 血清の各種酵素活性の測定

β-グルクロニダーゼは p-ニトロフェニル-β-D-グルクロニドを、N-アセチル-β-グルコサミナーゼは p-ニトロフェニル-N-アセチル-β-D-グルコサミドをそれぞれ基質とし、p-ニトロフェノールの遊離を 420 nm で測定する方法で行った^{3,4)}。酸性及びアルカリホスファターゼ、GOT、GPT は和光純薬の臨床検査キットを用いて測定した。

4. PF の熱安定性の測定

LPS 静注 1.5 時間後の血清 (LPS 血清) 及び正常血清を無菌生理食塩水で 2 倍に希釈し、密栓して沸騰水浴中で 10 分間加熱後、遠心分離した上清について、末梢血管透過性を測定するとともに、ライソゾーム酵素活性を測定した。

Table 1. Heat stability of vascular permeability factor from LPS-injected and normal rabbit sera

	Final Dilution	Dye Leakage(mm ²)	
		Untreated	Treated
LPS-injected serum			
Exp. 1	32	trace	u. d. ^a
	16	38.5	15.9
	8	38.5	38.5
Exp. 2	32	trace	trace
	16	38.5	28.3
Normal serum			
	16	u. d.	u. d.
	8	3.1	7.1
	4	38.5	28.3

LPS-injected rabbit serum was obtained 1.5 hr after injection of LPS (10 µg/kg, iv). LPS-injected and normal rabbit serum were diluted twofold with sterile saline, heated for 10 min in boiling water and centrifuged for 15 min at 3,500 rpm. The assay for vascular permeability of the supernatants was described in "Materials and Methods". a: undetectable.

5. PF のゲルろ過

a) セファデックス G-150 を 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) (緩衝液A) に懸濁し、じゅうぶん洗浄後、オートクレイブ (120°, 1.2気圧) で10分間滅菌し、45 cm × 1.5 cm のカラムに充填した。ゲルを約3倍量の滅菌緩衝液Aで洗浄後、LPS血清 1 ml を添加し、流速 0.5 ml/min で溶出し、1 ml ずつ分画した。各画分の 280 nm の吸光度を測定後、4画分ずつ合わせ、凍結乾燥した後、無菌生理食塩水 1 ml に溶解して、その 0.1 ml を用いて末梢血管透過性を測定した。

b) 正常血清は 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.0) (緩衝液B) 中で一夜、4° で透析した。別に DEAE-セファデックス A-50 を緩衝液Bでじゅうぶん洗浄後、pH 8.0 に調整し、オートクレイブで滅菌した。透析血清と調製した DEAE-セファデックス A-50 をじゅうぶん混合し、遠心分離して、その上清を凍結乾燥により濃縮し、無菌生理食塩水 1 ml に溶解後、さらに上記の方法でゲルろ過した。

実験結果

1. LPS 静注後の血清中の PF と各種酵素活性の経時変化

LPS 静注後の血清の PF の経時変化はすでに詳細に報告された結果¹⁾と一致して、4.5時間後に正常値ま

Table 2. The activities of lysosomal enzymes in LPS-injected and normal rabbit sera before and after heat treatment

	Enzyme Activities	
	Untreated	Treated
N-Acetyl-β-glucosaminidase		
	BL units	
LPS-injected serum	1.773	0.169
Normal serum	0.880	0.107
β-Glucuronidase		
LPS-injected serum	1.329	0.041
Normal serum	0.435	0.041
Acid phosphatase		
LPS-injected serum	1.08	0
Normal serum	1.23	0

All experimental conditions of heat treatment are the same as Table 1. The enzyme activities in the supernatants were determined as described in "Materials and Methods".

で回復した (Fig. 1)。一方、N-アセチル-β-グルコサミニダーゼ及び β-グルクロニダーゼ活性は、1.5時間後に 2~4 倍に増加し、その後 6.5時間までその値を維持した (Fig. 2)。また、酸性及びアルカリホスファターゼ活性は、1.5時間後ではいずれも有意な変化は示さず、酸性ホスファターゼ活性は 4.5時間までむしろ減少したが、アルカリホスファターゼは 4.5時間後に約2倍に増加した (Fig. 3)。しかし、測定した酵素はいずれも PF の経時変化とは一致せず、PF は少なくともこれらの酵素自身ではないと考えられる。

次に LPS による肝機能障害の指標として、血清 GOT, GPT を測定した (Fig. 4)。その結果、GPT は実験期間中、なんら変化を示さなかったが、GOT は経時的に 6.5時間まで増加し、LPS 10 µg/kg により肝になんらかの障害の起こっていることが示唆された。

2. PF とライソゾーム酵素の熱安定性

PF が血液中に遊離したライソゾーム酵素自身であるか否かを更に検討するため、LPS 血清及び正常血清を沸騰水浴中で10分間加熱したところ、Table 1 に示すように、両血清の末梢血管透過性はともに認識できる程度の活性の変化は認められず、少なくとも血清中における PF は非常に熱に対して安定な型で存在しているものと考えられる。

次に、同様に加熱処置した血清について、3種のライソゾーム酵素活性を測定したところ (Table 2)、PF とは著しく異なって、酵素活性の90%以上が消失した。したがって、少なくともこれら3種のライソゾーム酵

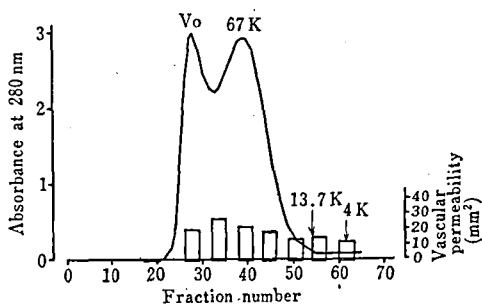


Fig. 5. The gel-filtration of LPS-injected rabbit serum on a Sephadex G-150 column

The serum obtained 1.5 hr after injection of LPS (10 μ g/kg, iv) was applied directly on the column. All column conditions and analysis are described in "Materials and Methods".

(—): absorbance at 280 nm, open column: vascular permeability, Vo: void volume, 67K, 13.7K, 4K: molecular weight of bovine serum albumin, ribonuclease B, protamine, respectively.

素は末梢血管透過性に何ら関与していないものと推定される。

3. PF のゲルろ過

PF の分子量を検索する目的で、血清のゲルろ過を試みた。LPS 血清を直接セファデックス G-150 でゲルろ過したところ、末梢血管透過性活性は void volume 以後の測定したすべての画分に検出されたが、ピークとしては認められなかった (Fig. 5)。なお、タン蛋白の溶出パターンは正常血清の場合と同一であった。

正常血清の場合は LPS 血清に比べ著しく PF の量が少ないので、前処置を行ったが、それによる PF の減少はなかった。ゲルろ過後の末梢血管透過性活性は LPS 血清の場合と異なって、分子量一万以下の画分のみ検出された (Fig. 6)。また、タン蛋白の溶出パターンでは 67K 部分のアルブミンのピークが完全に消失していた。

以上の結果、LPS により誘導される血清中の PF は分子量数万付近に幅広く分布していると考えられる。

考 察

LPS により誘導される PF の由来はいまだ不明であるが、LPS により血中のライソゾーム酵素活性の増加すること⁶⁾、好中球のライソゾーム画分には PF の存在すること^{7,8)} などから、LPS により増加する血中の PF の由来は好中球であろうと推定されている⁹⁾。

また、Dahinden と Fehr⁹⁾ は *in vitro* で LPS が好中球に作用してライソゾーム顆粒を放出させることを

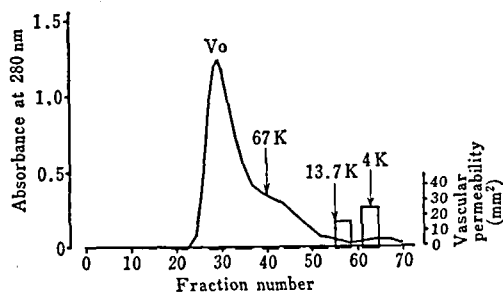


Fig. 6. The gel-filtration of normal rabbit serum on a Sephadex G-150 column

The normal rabbit serum was pretreated as described in "Materials and Methods". The others are the same as Fig. 5.

報告し、Heflin と Brigham¹⁰⁾ は LPS によって起こる肺での血管透過性亢進に顆粒球が重要な役割を担っていることを証明した。

本実験では、LPS による PF の増加とともに血中ライソゾーム酵素、特に β -グルコニダーゼ及び N-アセチル- β -グルコサミニダーゼ活性の増加することを明らかにした。しかし、Dahinden と Fehr⁹⁾ は LPS による好中球の脱顆粒は β -グルコニダーゼを含む一次顆粒では起こらず、ライソザイム及びビタミン B₁₂ 結合たん白を含む二次顆粒でのみ起こることを報告している。血中の β -グルコニダーゼの由来は好中球ではないかもしれない。実際、Wright と Gallin¹¹⁾ は実験的浮腫内にライソザイム及びビタミン B₁₂ 結合たん白は遊離してくるが、 β -グルコニダーゼは増加しないことを示した。

LPS は肝に作用して、スーパーオキシドを発生させ、過酸化脂質が増加した結果¹²⁾、膜が不安定となり、薬物代謝酵素活性の低下¹³⁾や、ライソゾームの崩壊¹⁴⁾の起こることが報告されている。さらに、肝のライソゾームにも PF の存在することが認められており¹⁵⁾、LPS による血中の PF は肝あるいは他の網内系組織由来の可能性もあると考えられる。また、LPS は補体系を活性化し、血管透過性亢進作用を有する C3_a 及び C5_a を産生することも知られており¹⁶⁾、補体系と PF の関連性もじゅうぶん検討する必要があると考えられる。

PF の本態については、分離精製に成功していない現在、ほとんど不明であるが、血中に存在している状態では非常に耐熱性であり、沸騰水浴中で不安定なライソゾーム酵素ではないと推定された。また、LPS により誘導される PF の分子量はかなり幅広く分布していると考えられることから、LPS 自体がマクロファ-

ジなどに取り込まれ、種々の分子サイズに分解されて、PFとして血中に遊離している可能性もあると考えられる。

文 献

- 1) 西尾 晃: 学位論文“細菌性発熱物質による家兎の末梢血管透過性亢進反応と発熱反応に関する研究”(1975)
- 2) 吉田 稔, 西尾 晃, 加納晴三郎: 日薬理誌, **73**, 63 (1977)
- 3) W. H. Fishman: *Methods of Enzymatic Analysis* (H. U. Bergmeyer, ed), 2nd Ed., Vol. 4, p. 929 (1974), Academic Press, New York
- 4) J. W. Woollen, R. Heyworth, P. G. Walker: *Biochem. J.*, **78**, 111 (1961)
- 5) S. W. Cousins, J. T. Rosenbaum, R. B. Guss, P. R. Egbert: *Infect. Immun.*, **36**, 730 (1982)
- 6) A. Janoff, G. Weissmann, B. W. Zweifach, L. Thomas: *J. Exp. Med.*, **116**, 451 (1962)
- 7) E. S. Golub, J. K. Spitznagel: *J. Immunol.*, **957**, 1061 (1966)
- 8) N. S. Ranadive, C. G. Cochrane: *J. Exp. Med.*, **128**, 605 (1968)
- 9) C. Dahinden, J. Fehr: *J. Immunol.*, **130**, 863 (1983)
- 10) A. C. Heflin, Jr., K. L. Brigham: *J. Clin. Invest.*, **68**, 1253 (1981)
- 11) D. G. Wright, J. I. Gallin: *J. Immunol.*, **123**, 285 (1979)
- 12) R. Ogawa, T. Morita, F. Kunimoto, T. Fujita: *Circ. Shock*, **9**, 369 (1982)
- 13) B. R. Aonawane, S. S. Yaffe: *Xenobiotica*, **12**, 303 (1982)
- 14) G. Weissmann, L. Thomas: *J. Exp. Med.*, **116**, 433 (1962)
- 15) A. J. Anderson: *Biochem. Pharmacol.*, **17**, 2253 (1968)
- 16) D. C. Morrison, R. J. Ulevitch: *Amer. J. Pathol.*, **93**, 527 (1978)

アミド系局所麻酔薬の水溶液中における安定性

岡田敏史・中原 裕・加納晴三郎

Studies on the Stability of Local Anesthetics of Amide Series in Aqueous Solutions

Satoshi OKADA, Hiroshi NAKAHARA and Seizaburo KANOHI

The heat stability (120° for 30 min) in aqueous solutions of some local anesthetics containing amide or ester linkage in the molecule was investigated by HPLC and solvent extraction-spectrophotometry. The compounds with an amide bond were quite stable under the condition compared to procaine with an ester bond. Among the test samples propitocaine was slightly hydrolyzed and the degradation ratio was 0.022 mole%, but the degraded compounds of procainamide, lidocaine, mepivacaine, and bupivacaine could not be detected.

(Received May 31, 1984)

現在、繁用されている局所麻酔薬は構造的にみると procaine, tetracaine などエステル系のものと procainamide, lidocaine など酸アミド系のものに大きく分けられる。一般に、アミドはエステルに比べて化学的に安定であることから、構造的には酸アミド系局所麻酔薬の通常条件における分解はあまり問題にならないものと予想される。しかしながら、procainamideの酸触媒加水分解の活性化エネルギーは 13.0 kcal/mole であり、procaineのそれにより小さいとの報告もあり^{1,2)}、アミド結合を有する化合物の構造により、それらの安定性は変化するものと考えられ、なお検討の余

地がある。

本実験では酸アミド系局所麻酔薬の注射薬 (1.0 w/v%) を自製し、加熱滅菌 (120°, 30分) 前後における pH 変化、UV 吸収スペクトル変化から、それらの分解の可能性を探るとともに、高速液体クロマトグラフ (HPLC) を用いて分解物の確認と定量分析を試みた。

実験方法

1. 試料及び試薬

procainamide-HCl (PA) はミドリ十字(株), lidocaine-HCl 及び propitocaine-HCl は藤沢薬品(株), mepi-

vacaine-HCl 及び bupivacaine-HCl は吉富製薬(株), procaine-HCl (PC) は第一製薬(株), bromvalerylurea は東洋化学(株)より供与された。また, *p*-aminobenzoic acid (PABA), *o*-toluidine, 2,6-xylylidine 及びその他の試薬は試薬特級品を用いた。

2. 装置

pH の測定は Metrohm 社の精密 pH メーター EA 510 を用い, 紫外部 (UV) 吸収スペクトルは日立分光光度計 100-60 型を用いた。HPLC の定量には島津製作所製の波長可変検出器 SPD-2A 付高速液体クロマトグラフ装置 LC-5A を用いた。

3. HPLC の条件

I. カラム: LiChrosorb RP-18 (10 μ m, 25 cm \times 4 mm i. d.), 移動相: 0.2M リン酸緩衝液 (pH 6.0) — アセトニトリル (50:50), 流量: 1.0 ml/min, 検出: UV (260 nm)。

II. 移動相: 0.1M リン酸緩衝液 (pH 6.0) — アセトニトリル (40:60), 流量: 1.2 ml/min, 検出: UV (225 nm), カラム及びその他の条件は, 操作条件 I に同じ。

4. 定量法

1) 試料溶液の調整 各試料 300 mg を精密にはかり, 脱炭酸水を用いて 30 ml (1 w/v% 水溶液) とし, この液 5 ml ずつをアンプルに分注し, 窒素置換したのち密封する。これらを 120 $^{\circ}$, 30分間加熱滅菌を行い試料溶液とする。別に PABA, *o*-toluidine 又は 2,6-xylylidine 各 50 mg を精密にはかり, 蒸留水 100 ml を加え標準原液とし, これを希釈して標準溶液 (0.5~50 μ g/ml) を作製した。ただし, PABA は PC 及び PA の, *o*-toluidine は propitocaine-HCl の, 2,6-xylylidine は lidocaine-HCl, mepivacaine-HCl 及び bupivacaine-HCl の分解物の標準として用いた。

2) HPLC法 試料溶液又はその10倍希釈溶液及び標準溶液の 10 μ l を HPLC に注入し, 定量分析を行った。

3) 溶媒抽出—吸光度法 試料溶液 0.5 又は 1.0 ml をとり, ホウ酸緩衝液 (pH 9.0, $I=0.05$) で希釈し, 全量を 4.5 ml とした。試料液中の大過剰の PC 又は PA を除くため, ジクロルメタン 10 又は 5 ml を加えて 4~6 回抽出を繰り返したのち, 水相中に残存する PABA を吸光度法により 264 nm で分析した³⁾。

結果と考察

HPLC の条件と検量線 各種の局麻剤について, 大過剰の主薬中に混在する微量の分解物の HPLC に

Table 1. pH change of local anesthetic solutions^{a)} before and after heat sterilization^{b)}

Local anesthetic	pH (1% solns.)		Δ pH
	Before	After	
Procainamide-HCl	5.92	6.29	0.37
Dibucaine-HCl	5.39	5.97	0.58
Lidocaine-HCl	4.86	5.33	0.47
Propitocaine-HCl	4.92	5.31	0.39
Mepivacaine-HCl	4.79	5.22	0.43
Bupivacaine-HCl	5.37	5.70	0.33
Procaine-HCl	5.59	4.54	-1.05
Bromvalerylurea ^{c)}	3.74	1.67	-2.07

a) All the drug concentrations were prepared to 1.0 w/v%.

b) Conditions of heat sterilization were at 120 $^{\circ}$ for 30 min.

c) Owing to a low solubility in water, it was solubilized in 50% EtOH solution.

よる分離分析を行うための諸条件を検討した。主薬の極性の差が大きく, それらの保持時間が大きく違うため, すべての局麻剤に同一の分析条件を適用することはできなかった。また, アミド系局麻剤の加熱滅菌による分解は主として加水分解が予想されるため, それらの加水分解物である PABA, *o*-toluidine 及び 2,6-xylylidine を主薬から分離定量するための HPLC の条件について検討した。

その結果, PABA を生ずる PC, PA には条件 [I] を, *o*-toluidine を生ずる propitocaine-HCl と 2,6-xylylidine を生ずる lidocaine-HCl, mepivacaine-HCl 及び bupivacaine-HCl には条件 [II] を適用した。これら 3 種の分解物について絶対検量線法で求めた検量線は, いずれも良好な直線関係を示し, 2 ng 以上で十分分析可能であった。

加熱滅菌による pH 変化 局麻剤 1 w/v% 水溶液の加熱滅菌前後における pH 変化 (Δ pH) を Table 1 に示す。アミド系局麻剤ではいずれも滅菌により pH はわずかに上昇するのに対し (Δ pH = 0.4~0.5), 対照として用いた PC 及び bromvalerylurea では pH は低下しており, その低下率も大きかった。

加熱滅菌により微量の酸アミドの加水分解があるものとする。脂肪酸又は芳香族カルボン酸ができる一方, alkyldiamine 又は芳香族アミンが生成する。alkyldiamine の塩基性は比較的強く⁴⁾, pH 5~6 付近では主としてジプトロン化体が形成されるとすると PA, dibucaine での pH の増加傾向は妥当なものと考えられる。lidocaine など他の 4 種のアミド系局麻剤では加

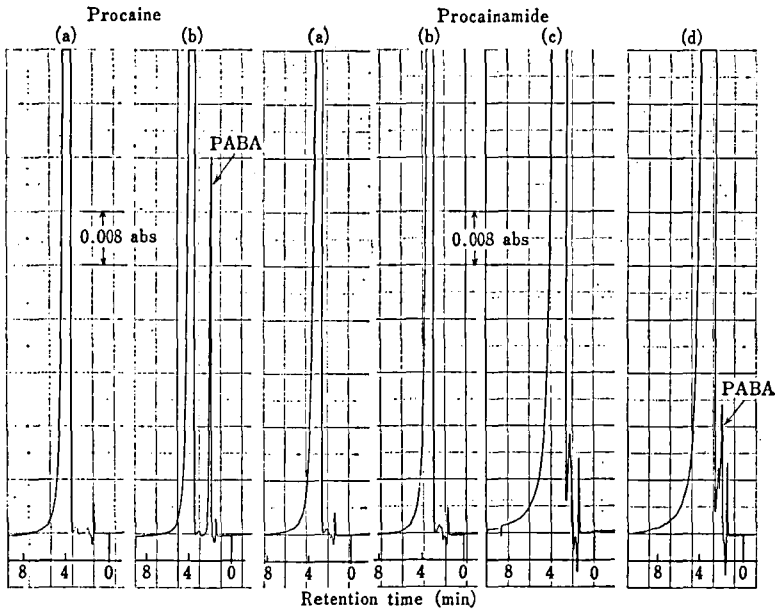


Fig. 1. Changes of liquid chromatograms for procaine and procainamide before and after heat sterilization (120°, 30 min)

Procaine: (a) before sterilization; (b) after sterilization.

Procainamide: (a) before sterilization; (b) and (c) after sterilization; (d) 5 $\mu\text{g/ml}$ of p-aminobenzoic acid (PABA) is added to sample (a), which corresponds to 0.1 mole % degradation of procainamide. In the cases of (c) and (d), LC analysis was done directly for the sample without dilution, while in the cases of (a) and (b) done for the 10 time-diluted sample.

Chromatographic conditions: LiChrosorb RP-18 (10 μm , 25 cm \times 4 mm i. d.), a mixture of 0.2M phosphate buffer (pH 6.0) and acetonitrile (50 : 50), 1.0 ml/min, UV (260 nm).

水分解により弱塩基性芳香族アミンが生成するが、pH 5-6 では一部がプロトン化されるだけであり、pH 変化は脂肪酸又は脂溶性性アミノカルボン酸の H^+ バランスに依存するものと考えられる。

一方、PC の加水分解では aminoalcohol と PABA が生成し、bromvalerylurea では urea と bromo-isovalerylic acid が生成する。したがって、これらの試料では芳香族又は脂肪酸カルボン酸の生成により pH が低下する。

加熱滅菌による UV 吸収スペクトル変化 各局麻剤の 1w/v% 水溶液の加熱滅菌前後における UV スペクトルの変化を測定したが、有意な変化を認めることはできなかった。例えば、PA 及び PC は加水分解により PABA を生成するものと考えられ、それぞれの極大吸収波長 λ_{max} (PA: 278 nm, PC: 290 nm; PABA: 264 nm) と λ_{max} でのモル吸光係数 (PA:

16100, PC: 18600, PABA: 14200) の関係から考えると、ある程度の加水分解があれば両者とも 270 nm 前後に等吸収点が現われる筈であるが、そのようなスペクトル変化は認められなかった。したがって、本条件下での局麻剤の加水分解は極くわずかなものと予想される。

以下ではスペクトル的には明確でないが pH 変化として認められる変化が、実際に分解物の生成とその量により裏付けられるかを HPLC 及び溶媒抽出-吸光度法により検討した。

PC 及び PA の HPLC 加熱滅菌前後における PC 及び PA 水溶液のクロマトグラムを Fig.1 に示す。PC の場合、加熱滅菌により PABA の生成が明白に認められた。一方、PA の場合 (a), (b) は滅菌前後の試料につき PC の場合と同一条件で得たクロマトグラムであり、滅菌による差は認められない。(c) は滅菌後の試料について試料液を希釈せずそのまま (10 倍の感度に相当) 測定したものである。主ピークの直

注) 電位差滴定法により o-toluidine の $\text{pK}_a=4.34$, 2,6-xylylidine の $\text{pK}_a=3.81$ と定められた。

Table 2. Degradation of procaine to *p*-aminobenzoic acid (PABA) by heat sterilization (120°, 30 min)

Exp. No.	Initial conc. of procaine ($\times 10^{-2}M$)	HPLC method		Spectrophotometry	
		PABA ($\times 10^{-4}M$)	Degrad. (mol %)	PABA ($\times 10^{-4}M$)	Degrad. (mol %)
1	3.67	7.19	1.95	7.19	1.96
2	3.67	6.79	1.84	6.95	1.90
3	3.67	7.21	1.96	7.35	2.01
4	3.67	7.43	2.02	7.31	2.00
5	3.67	6.71	1.82	6.78	1.85
6	3.67	7.33	1.99	7.58	2.07
Mean \pm S. D.		7.11 \pm 0.29	1.93 \pm 0.08	7.19 \pm 0.29	1.96 \pm 0.08

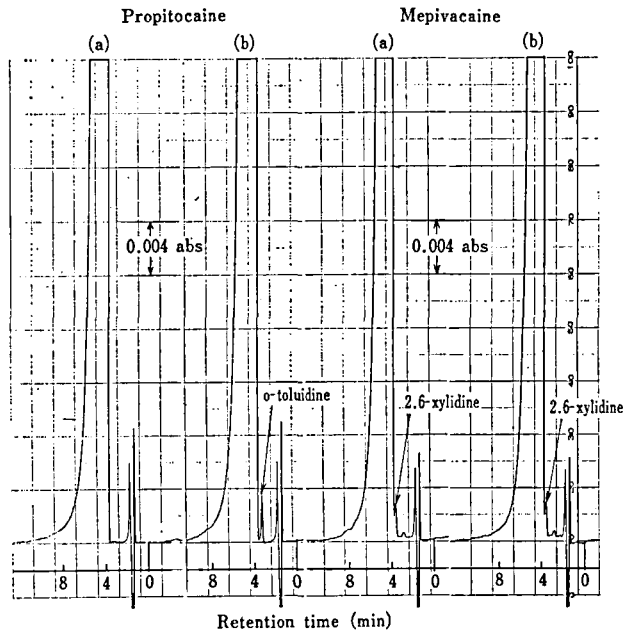


Fig. 2. Changes of liquid chromatograms for propitocaine and mepivacaine before and after heat sterilization (120°, 30 min)

Symbols (a) and (b) denote chromatograms for sample before and after heat sterilization, respectively.

Chromatographic conditions: LiChrosorb RP-18 (10 μ m, 25 cm \times 4 mm i. d.), a mixture of 0.1M phosphate buffer (pH 6.0) and acetonitrile (40 : 60), 1.2 ml/min, UV (225 nm).

前のピークは溶媒ピークに重なり、PABA によるものと断定できなかった。そこでPA に対し 0.1 mole% の PABA を添加した試料のクロマトグラムを (d) に示した。この場合 PABA は溶媒並びに不純物ピークよりかなり明確に分離しており、PA に対し 0.1 mole% の PABA が存在すれば HPLC で容易に分析可能で

あった。

PABA の添加回収率 Fig. 1 の結果より PA は加熱滅菌に対し安定であり、分解物の量は極めて少ないものと予想された。モル分解率として 0.1~1.0% の範囲で PC 及び PA に対し PABA を添加した時の回収実験の結果、PABA の添加量によらず HPLC、溶媒

Table 3. Degradation of procainamide, propitocaine, lidocaine, mepivacaine, and bupivacaine by heat sterilization (120°, 30 min)

Local anesthetics	Hydrolysis product ^{a)}	Degradation(mol %)
Procainamide	<i>p</i> -aminobenzoic acid	<0.002
Propitocaine	<i>o</i> -toluidine	0.022±0.003
Lidocaine	2,6-xylylidine	<0.002
Mepivacaine	2,6-xylylidine	<0.002 ^{b)}
Bupivacaine	2,6-xylylidine	<0.002

a) Possible degradation product by hydrolysis.

b) Although parent mepivacaine was found to contain about 0.02 mol % of 2,6-xylylidine, it was observed that the amount does not increase by heat sterilization.

抽出—吸光度法とともに95~105%の範囲で添加したPABAが回収された。したがって、0.1 mole%以上のPABAがあれば、いずれの方法を用いても十分に分析可能であった。

なお、PABA他2種の分解物に対するHPLCの検出限界は1 w/v% 溶液でのモル分解率としては0.002 mole%，これを絶対量としてみると、約1 ngに相当する。

加熱滅菌による局所麻酔薬の加水分解

(1) PCの加水分解 PCは代表的なエステル系の局所麻酔薬であり、酸又はアルカリ加水分解を受けやすい⁵⁾。事実、加熱滅菌することにより、加水分解物PABAがクロマトグラム上に明瞭に検出され(Fig. 1)、このPABAの生成量について6回の繰返し測定した結果をTable 2に示す。PABAは溶媒抽出—吸光度法でも十分測定でき、HPLC法と溶媒抽出—吸光度法による結果はよく一致した。生成したPABAの濃度としては平均 $7.1\sim 7.2\times 10^{-4}$ Mとなり、これは最初のPCのうち1.93~1.96 mole%が加水分解したことに対応している。

(2) アミド系局所麻酔薬の加水分解 Fig. 1に明らかのように加熱滅菌によるPAの加水分解は検出限界以下で、PCとくらべかなり安定であった。このようなPAの安定性はアミド系局麻剤に共通する性質であるのか確認するため、他のアミド系局麻剤についても同様な実験を試みた。Fig. 2にpropitocaineとmepivacaineの加熱滅菌前後のクロマトグラムを示し

た。

propitocaine (b)のクロマトグラムに加水分解物*o*-toluidineのピークが観察された。またmepivacaineでは加熱前後の試料ともに加水分解物2,6-xylylidineが主ピークの直前に観測され、原薬中に約0.02 mole%の割合で2,6-xylylidineが含まれることが推定された。lidocaine, bupivacaineについても同様な実験を行ったが、加熱滅菌による変化はなく、2,6-xylylidineの生成は認められなかった。これらの結果をTable 3にまとめて示した。

以上の結果、アミド系局麻剤はエステル系のものに比べ加熱滅菌(120°, 30分)に対して非常に安定であることが確認された。ただし、propitocaineの場合0.022 mole%の加水分解が認められ、他のアミド系局麻剤の挙動と少し違っていた。また、mepivacaineでは原薬中に約0.02 mole%の割合で原料不純物として2,6-xylylidineの混在が推定された。

文 献

- 1) A. Marcus, A. J. Taraszka, *J. Amer. Pharm. Assoc.*, 46, 28 (1957)
- 2) A. D. Marcus, S. Baron, *J. Amer. Pharm. Assoc.*, 48, 85 (1959)
- 3) 持田研秀, 岡田敏史, 昭和56年度厚生科学研究報告.
- 4) A. Albert, E. P. Serjeand Ed. (松浦貞郎訳), “イオン定数”, 丸善, 1962.
- 5) T. Higuchi, A. Havinga, L. W. Busse, *J. Amer. Pharm. Assoc.*, 39, 405 (1950)

分光学的方法によるトリパンプルーと牛血清蛋白との結合の測定

伊丹孝文・江馬 真・加納晴三郎

Spectrophotometric Measurement of the Binding of Trypan Blue with Bovine Serum Proteins

Takafumi ITAMI, Makoto EMA and Seizaburo KANOH

Binding of trypan blue (TB) with bovine serum proteins was examined spectrophotometrically. The following results were obtained.

- 1) A large change in the spectrum of TB was observed in the presence of bovine serum albumin (BSA), γ -globulin (γ -Glob) and bovine serum.
- 2) In all cases, a large decrement of absorbancy was observed at 565 nm.
- 3) The binding constants were calculated by using the degree of the absorbancy-decrease and the following values were obtained. The maximum numbers of molecule of TB that combine with one molecule of BSA and γ -Glob were 3.1 and 0.9, respectively. The equilibrium constants between TB and protein were 1.26×10^6 (M^{-1}) for BSA and 0.34×10^6 (M^{-1}) for γ -Glob.
- 4) The difference spectra for TB with bovine serum and the BSA solution of the same concentration to the serum were very similar.

These results suggested that the most part of TB might be bound to albumin molecule in serum.

(Received May 31, 1984)

まえがき

著者らは先にトリパンプルー (TB) のラット胎仔への毒性について検討し、母体に投与した TB が少量ながら胚へ移行すること、更に胚外体腔へ TB を直接投与すると母体に投与した時と同様な奇形胎仔が観察されることを明らかにした¹⁾。このことから、TB の胚への移行が TB の胎仔毒性発現に密接な関係があるものと考えられる。

一方、薬物の胚あるいは胎仔への移行は、一般に母体血中での蛋白結合率に著しく影響されるものと考えられる。

しかしながら、TB はセロファン膜、デキストランゲル、ポリビニールゲル等に対する吸着性が非常に高く、平衡透析法、メンブラン透過法あるいはゲル透過等の通常の蛋白結合の解析手段は用いることができず、蛋白結合性についての物理化学的解析はほとんどなされていない。

一方、色素が蛋白と結合した場合、吸収スペクトルに変化が生じることが知られており、この光学的性質の変化で色素-蛋白間の結合を解析しうることが Klotz により明らかにされた²⁾。

本論文では、TB の胎仔移行についての基礎的知見を得る目的で、吸収スペクトル法により TB の血清蛋白への結合について検討した。

実験材料及び方法

1. 試薬

トリパンプルー (TB) は小川らの方法³⁾ で市販 TB (Chroma-Gesellschaft) より精製した。牛血清アルブミン (BSA) は Sigma 社の Fraction V (Essentially fatty acid free)、 γ -グロブリン (γ -Glob) は Fraction II (Sigma 社) を用いた。ウシ血清 (BS) は Irvine Scientific Sales より入手した。

2. アルブミンの定量

ウシ血清中のアルブミンの定量は前述の BSA を標

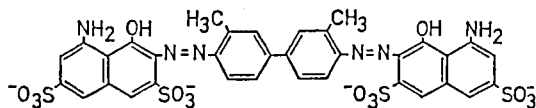


Fig. 1. Structure of trypan blue

品として、Doumas らの方法⁴⁾ (アルブミン B-テスト・ワーク, 和光純薬) で行った。

3. スペクトルの測定

TB 及び血清蛋白 (BSA, γ -Glob 又は BS) を PBS (0.02 M phosphate, 0.15 M NaCl, pH 7.4) に種々の濃度に溶解し, それぞれ 20° の水浴中で定温にした後, 等量を混合し, 再び水浴中で 1 時間放置した。この溶液の吸収スペクトルを日立 556 型二波長分光光度計で測定した。差スペクトルの測定には, 対照液として上記の蛋白溶液のかわりに PBS を用いて同様に操作したものを用いた。

4. 結合型 TB 量の測定

Klotz の方法²⁾ に準じて結合型 TB を測定した。すなわち, Klotz によれば遊離型色素の分子吸光係数を ϵ_1 , 蛋白結合時の分子吸光係数を ϵ_2 , 蛋白共存下での見かけの分子吸光係数を ϵ_{app} , 遊離型色素の存在率を α_1 とすると

$$\alpha_1 = \frac{\epsilon_{app} - \epsilon_2}{\epsilon_1 - \epsilon_2}$$

が成り立つと報告している。

このことから色素の結合率を α_2 とすると,

$$\alpha_2 = \frac{\epsilon_{app} - \epsilon_1}{\epsilon_2 - \epsilon_1} = \frac{\Delta\epsilon'}{\Delta\epsilon}$$

と書き直すことができる。ここで $\Delta\epsilon$ は遊離型色素と結合型色素の分子吸光係数の差 ($\epsilon_2 - \epsilon_1$) であり, $\Delta\epsilon'$ は蛋白共存下における分子吸光係数の変化である。

ϵ_2 は直接求めることができないので, 蛋白質濃度を増加させることにより外挿法²⁾ で求めた。

色素の結合率は, 差スペクトルにより $\Delta\epsilon'$ を求め, $\Delta\epsilon$ に対する比率より求めた。

5. 結合定数の算出

得られたデータを Langmuir 型の結合式

$$r = \frac{nKC}{1+KC}$$

に適用した。ただし, n は色素の蛋白に対する飽和結合量, K は平衡定数, r は結合型色素量 (mol TB/mol 蛋白), C は遊離型色素濃度 (M) である。

n 及び K はマイクロコンピュータ PC-8801 (日本電気) を用いて, 非線形最小二乗法により求めた⁵⁾。

BSA 及び γ -Glob の分子量はそれぞれ 7×10^4 及び 17×10^4 とした。

実験結果

1. TB の吸収スペクトルと血清蛋白の影響

PBS 中における TB (15 μ M) の吸収スペクトルと血清蛋白の影響について検討し, その結果を Fig. 2 に

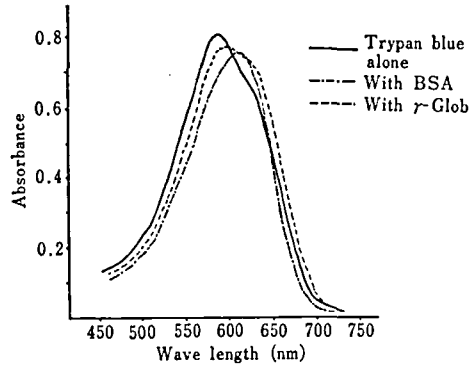


Fig. 2. Absorption spectra of trypan blue with or without bovine serum proteins

Trypan blue: 15 μ M

BSA: Bovine serum albumin (20 μ M)

γ -Glob: γ -Globulin (20 μ M)

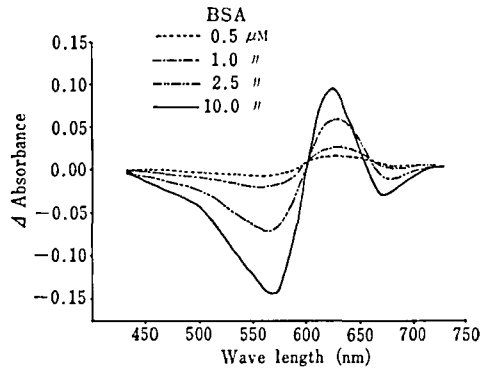


Fig. 3. Difference spectra of trypan blue with bovine serum albumin (BSA)

Trypan blue: 15 μ M

示した。すなわち, TB の吸収極大波長 (λ_{max}) は 585 nm, 分子吸光係数 (ϵ_1) は 5.4×10^4 であった。しかし, 牛血清アルブミン (BSA) 0.14% (20 μ M) 存在下では λ_{max} は 610 nm, 見かけの分子吸光係数 (ϵ_{app}) は 5.1×10^4 となりスペクトルの変化が認められた。 γ -グロブリン (γ -Glob) 0.34% (20 μ M) の共存下では λ_{max} 595 nm, $\epsilon_{app} = 5.1 \times 10^4$ であり, BSA の場合と異なるスペクトルを与えることが明らかとなった。

以上の結果から, BSA のみならず γ -Glob にも TB が結合しうることが明らかであり, その結合はスペクトルの変化から解析できるものと考えられた。

そこで, TB 濃度を一定に保ち, BSA 濃度を変化させて, その時のスペクトルの変化を差スペクトルで測定した。その結果を Fig. 3 に示した。すなわち, BSA の共存下で起こるスペクトルの変化は 3 つの波長域で

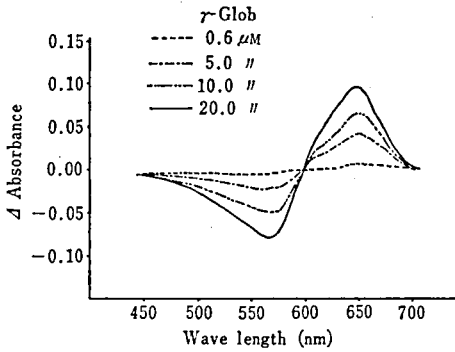


Fig. 4. Difference spectra of trypan blue with bovine γ -globulin (γ -Glob)
Trypan blue: 15 μ M

認められた。565 及び 670 nm を中心とする 2 つの波長域では吸光度の減少が、620 nm を中心とする領域では増加が認められた。

一方、 γ -Glob 共存下では BSA の場合と異なり、スペクトルの変化は 565 及び 650 nm を中心とする二つの波長域に認められた。前者の吸収の変化は BSA と同じく吸光度の減少であった。しかし、長波長側の変化は吸光度の増加を示した (Fig. 4)。

以上のように、蛋白の種類によって異なる差スペクトルが得られたが、各々に認められた吸収の変化はいずれも蛋白濃度に対応していることが認められた。

2. TB と血清蛋白との結合定数

TB と BSA の相互作用では 565 nm の分子吸光係数の変化は著しく (Fig. 3), また BSA に対する TB の結合数にかかわらず一定の傾向を示すことが報告⁶⁾されている。そこで、TB 濃度を 15 μ M と一定にし、BSA 濃度を 0.04% (6 μ M) から 0.3% (43 μ M) に変化させて $\Delta \epsilon'$ を測定し、 $\Delta \epsilon$ を外挿したところ、 $\Delta \epsilon = -9700$ であった。この値を用いて、TB 及び BSA のさまざまな濃度の組合せについて結合率を求めた。その結果を Scatchard plot して Fig. 5 に示した。

これらのデータについて解析を行い、Table 1 に示した。

また、TB と γ -Glob の結合についても、上記と同様に 565 nm の吸光度の減少を用いて結合率を求めた。

この時の $\Delta \epsilon$ は -8000 と推定され、これを用いて TB- γ -Glob の結合を測定し、その Scatchard plot を Fig. 5 に、得られた結合定数を Table 1 に示した。

すなわち、TB は BSA のみならず γ -Glob にも結合することが明らかになったが、前者に対する親和性は非常に高く、後者に比し約 4 倍の平衡定数 (K) を示すことが明らかになった。また、飽和結合量 (n) に

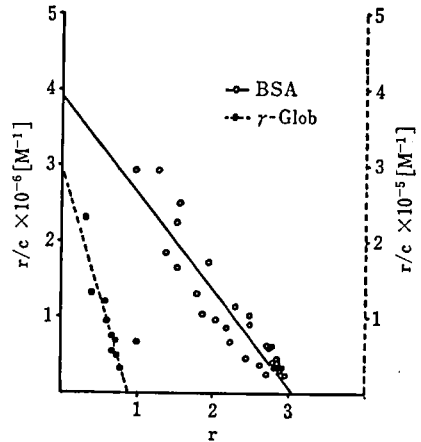


Fig. 5. Binding of trypan blue to bovine serum albumin (BSA) and γ -globulin (γ -Glob)

Table 1. Binding constants for the interaction of trypan blue with bovine serum proteins

Protein	n	$K \times 10^6$ (M^{-1})
Albumin	3.1	1.26
γ -Globulin	0.9	0.34

ついても BSA は γ -Glob の 3 倍以上の高い値を示した。

3. 血清による TB のスペクトルの変化

以上の結果から、TB は血清中のアルブミンのみならずグロブリン画分にも親和性を示すことが明らかとなった。また、蛋白の種類により異なるスペクトルを示すことも明らかとなった。

そこで、血清中における TB の存在状態を明らかにするために、血清による TB のスペクトル変化を測定した。対照として血清中の BSA 濃度と等しい濃度の BSA 溶液を用いた。その結果を Fig. 6 及び 7 に示した。

血清による吸収スペクトルの変化は BSA による変化と近似していたが、変化の大きさは同じ濃度の BSA で得られるものより小さい傾向が認められた。

考 察

今回の吸収スペクトル法により求めた TB と BSA の結合定数は $n=3.1$, $K=1.26 \times 10^6$ であった。一方、Allen and Orahovats⁷⁾ はセロファンディスクへの TB の吸着性を用いて BSA への結合定数を測定し、 $n=2$, $K=1.2 \times 10^5$ と報告している。著者らの得た K の値は彼らの K の値に比し、約 10 倍の高い値である。この原

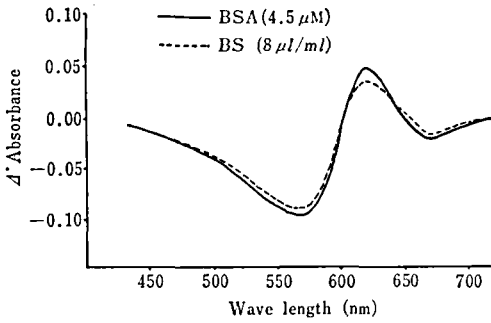


Fig. 6. Difference spectra of trypan blue with bovine serum (BS) and bovine serum albumin (BSA)

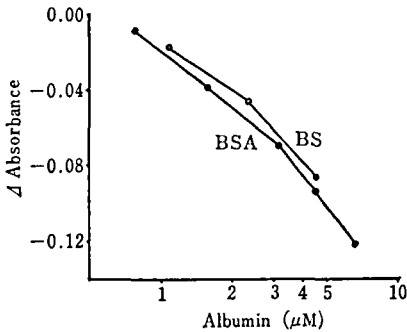


Fig. 7. Effect of bovine serum albumin (BSA) and bovine serum (BS) on absorbance of trypan blue at 565 nm

因については明確ではないが、Zaroslinskiら⁸⁾は温度条件により K の値が大きく変動することを報告しており、サリチル酸のBSAに対する K_1 は 37° から 15° への変化で3.4倍に増加すると報告している。今回の実験は 20° で行っており、Allen and Orahovats⁷⁾の実験は 37° であることから、彼らの報告した K の値との差は温度条件に一因があるものと考えられる。また、著者らのTBがクロマトグラフィ的に単一である³⁾のに対し、彼らのTBがアルコールによる分別沈澱法により精製したもので、なお0.5%程度の赤色不純物を含むと報告している。著者らはこの不純物がBSAに結合しうることを吸収スペクトルの変化により確認している(未発表)。また、この物質の構造の大部分がTBと共通であることが推定されている⁹⁾ことから、BSA溶液中では、TBのBSAへの結合に競合的作用を示すことが考えられる。したがって、TB純度の差も前述の K の値の差の一因と考えられる。

TBのBSAに対する飽和結合数(n)について、Lang and Lasser⁶⁾は吸着クロマトグラフィで精製

したTBで $n=3$ と報告しており、著者らの値と良く一致する。Allen and Orahovatsら⁷⁾は $n=2$ と低い値を測定しているが、これもTBの純度差に一因があるものと推定される。

TBとBSAとの結合方式についての詳細は明らかではないが、TBがスルホン酸基4個を有するアニオン色素であることから、メチルオレンジなどと同様に蛋白のアミノカチオンとのイオン結合が考えられる^{2,10)}。このことはBSAに結合したTBが1-anilino-naphthalene-8-sulfonic acid (ANS)により容易に一部置換されること¹¹⁾からも推定される。一方、Klotz²⁾はメチルオレンジが γ -Globに親和性を有しないことを報告しているが、TBについては γ -Globに強い親和性を有することが明らかとなった。このことは、TBの蛋白結合では、一般のスルホン酸色素とは異なる要因が関与する可能性を示唆するものと考えられる。

この様に、BSAのみならず γ -Globにも結合性を有するTBが血中ではいかなる存在様式をとっているかは興味ある点であるが、血清アルブミンは血清中で主要な蛋白であり、TBとの結合において γ -グロブリンなどより高い結合定数を示すこと(Table 1)、BSによるTBの吸収スペクトルの変化がBSAによるものと近似していること(Fig. 6)、更にこの変化の大きさは等量のBSAで充分説明しうる(Fig. 7)などの事実は血中でのTBが高い比率でBSAと結合していることを示唆している。しかしながら、胎仔毒性などの発現は母体血中TB濃度が $100\mu\text{g/ml}$ 以上で認められ¹²⁾、このような高濃度TBの結合状態は吸収スペクトル法では困難であり、超遠心分離法¹³⁾などの直接的な方法での解析が必要と思われる。

TBが血清蛋白と高い親和性を有するという実験結果は、TBの血中半減期が著しく長いこと、しかしながら、胎仔への移行率が極めて小さいことと密接な関係があると考えられる。一方、Fig. 7に示されるようにBSによるTBの吸光度の変化が対応する精製BSAによる変化よりも小さいことは内因性結合阻害物質の存在する可能性も考えられる。

しかし、TBの吸収スペクトルの変化は各蛋白により異なることから、血清のような混合蛋白溶液での結合を解析するには限界があり、上に示された可能性を明らかにするためにはなお他の方法(超遠心分離法等)¹³⁾を併用する必要があるものと考えられる。

謝辞

結合定数算出のコンピュータープログラムを御恵与

いただいた徳島文理大学薬学部平良全栄博士及び精製TBを御恵与いただいた当部小川義之博士に感謝します。

文 献

- 1) 江馬 真, 加納晴三郎: 日薬理誌, **83**, 433 (1984)
- 2) I. M. Klotz: *J. Am. Chem. Soc.*, **68**, 2299 (1946)
- 3) 小川義之, 江馬 真, 伊藤普志男, 外海泰秀, 中村恵三, 伊丹孝文, 川崎浩之進, 加納晴三郎: 分析化学, **33**, 397 (1984)
- 4) B. T. Dumas, W. A. Watson, H. G. Biggs: *Clin. Chim. Acta*, **31**, 87 (1971)
- 5) T. Itami, S. Kanoh: *Japan. J. Pharmacol.*, **33**, 1199 (1983)
- 6) J. H. Lang, E. C. Lasser: *Biochemistry*, **6**, 2403 (1967)
- 7) T. H. Allen, P. D. Orahovats: *Am. J. Physiol.*, **161**, 473 (1950)
- 8) J. F. Zaroslinski, S. Keresztes-Nagy, R. F. Mais, Y. T. Oester: *Biochem. Pharmacol.*, **23**, 1767 (1974)
- 9) F. E. Field, G. Roberts, R. C. Hallowes, A. K. Palmer, K. E. Williams, J. B. Lloyd: *Chem.-Biol. Interact.*, **16**, 69 (1977)
- 10) 寺田 弘, 中垣正幸: 薬誌, **86**, 1196 (1966)
- 11) M. T. Flanagan, S. Ainsworth: *Biochem. Biophys. Acta*, **168**, 16 (1968)
- 12) 江馬 真, 加納晴三郎: 日薬理誌, **79**, 369 (1982)
- 13) H. Kurz, H. Trunk, B. Weitz: *Arzneim-Forsch.*, **27**, 1373 (1977)

3-Nitro-1-nitroso-1-(4-pyridylmethyl)guanidine 及び関連化合物の合成

神谷庄造

Synthesis of 3-Nitro-1-nitroso-1-(4-pyridylmethyl)guanidine and Related Compounds

Shozo KAMIYA

The reaction of 4-pyridylmethylamine with nitroguanidine in water at 80~90°, gave 3-nitro-1-(4-pyridylmethyl)guanidine in 50% yield, and the reaction at 100° gave 4-pyridylmethylurea in 36% yield. 3-Nitro-1-(4-pyridylmethyl)guanidine and 4-pyridylmethylurea were also obtained by the reaction of 4-pyridylamine with 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine and 1-methyl-1-nitrosourea, in 74 and 53% yields, respectively.

Nitrosation of 3-nitro-1-(4-pyridylmethyl)guanidine, 3-nitro-1-(2-pyridylethyl)guanidine and 3-nitro-1-(3-pyridylmethyl)guanidine N-oxide with sodium nitrite and nitric acid, followed by neutralization, gave the corresponding 3-nitro-1-nitrosoguanidines.

(Received May 31, 1984)

合成化学研究部においては、抗腫瘍剤を得る目的で各種の抗腫瘍性化学官能基を有する複素環化合物を合成し、rat ascites hepatoma AH-13 及び mouse lymphoid leukemia L-1210 からなるファーストスクリーニングにかけて来た¹⁻³⁾。

当部において抗腫瘍剤の合成研究の一環として 3-nitro-1-nitroso-1-(4-pyridylmethyl)guanidine 及び関連化合物の合成を行い、これらの化合物のスクリーニングについては一部³⁾すでに報告済みであるが、合成に関しては報告してなかったのでここに報告する。

4-pyridylmethylamine (I) の水溶液に nitroguanidine (NG) を加え、80~90° に20分間加熱するとアンモニアを発生しながら反応し、3-nitro-1-(4-pyridylmethyl)guanidine (II) を生成した (収率50%)。II は I に 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine (MNNG) を反応させても得られる (収率74%)。II を硝酸・亜硝酸ナトリウムの系でニトロソ化し、更に中和すると 3-nitro-1-nitroso-1-(4-pyridylmethyl)guanidine (III) となる。

同様に、2-pyridylmethylamine (IV_a) 及び 2-pyridylethylamine (IV_b) にそれぞれ MNNG を反応させることによって相当する nitroguanidine V_a 及び V_b を得た。V_b はまた、IV_b の水溶液中、NG を 90° で反応させることによっても得られる。

V_a を各種のニトロソ化剤でニトロソ化を試みたが、ニトロソ体は得られなかった。一方、メチレン 2 箇の

V_b は硝酸・亜硝酸ナトリウムの系でニトロソ化され 3-nitro-1-nitroso-1-(2-pyridylethyl)guanidine (VI_b) となった。

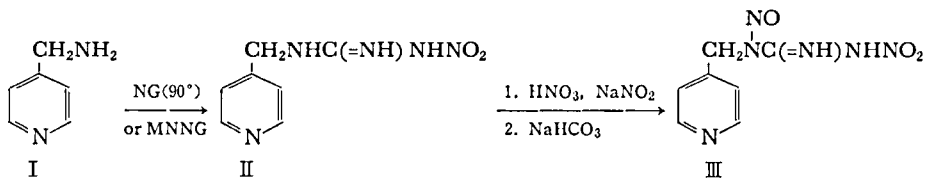
3-nitro-1-(4-pyridylmethyl)guanidine N-oxide (VII) 及び 3-nitro-1-(2-pyridylmethyl)guanidine N-oxide (VIII) のニトロソ化を試みたが、いずれも原料回収に終わった。しかしながら、3-nitro-1-(3-pyridylmethyl)guanidine N-oxide (X) は硝酸・亜硝酸ナトリウムの系でニトロソ化され 3-nitro-1-nitroso-1-(3-pyridylmethyl)guanidine N-oxide (XI) となった。

上で示したように I と NG を水溶液中、80~90° に加熱すると相当する nitroguanidine II を与えるが、I と NG を水溶液中、加熱還流すると 36% の収率で相当する尿素体 XII となる。XII はまた、I に 1-methyl-1-nitrosourea (MNU) を反応させても得られる。IV_b と NG を同様に加熱還流すると尿素体 XIII となる。一方、2-furylmethylamine (XIV) と NG を水溶液中で加熱還流すると 1-(2-furylmethyl)-3-nitroguanidine (XV, 27%) 及び 2-furylmethylurea (XVI, 44%) を生成した。

このように NG は応用の広い合成原料である。

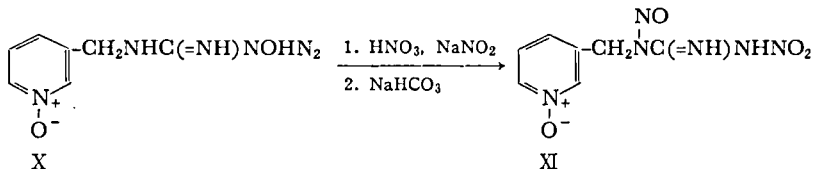
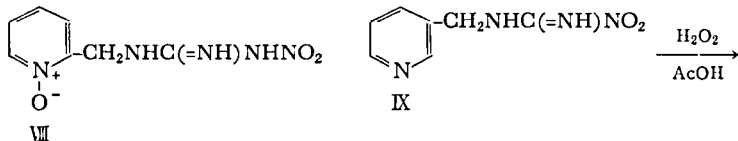
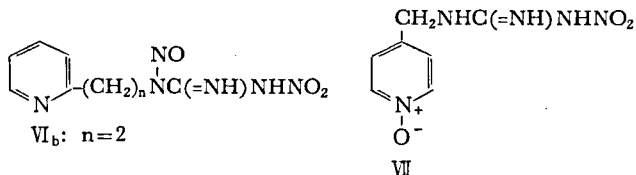
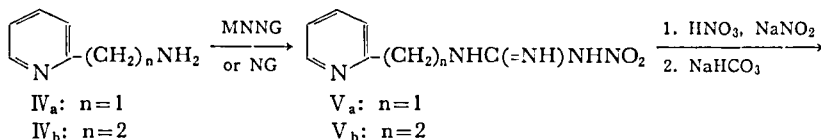
実 験

3-Nitro-1-(4-pyridylmethyl)guanidine (II) — 1. NG 法 4-aminomethylpyridine (I) 1.08 g (0.01モル), nitroguanidine (NG) 1.25 g (0.012モル) 及び



NG: $\text{NH}_2\text{C}(=\text{NH})\text{NHNO}_2$

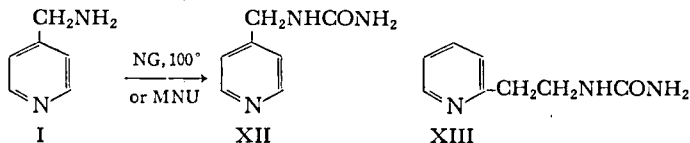
MNNG: $\text{CH}_3\text{N}(\text{NO})\text{C}(=\text{NH})\text{NHNO}_2$



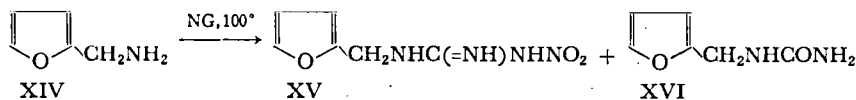
水 10 ml の混合物を水浴中で $80\sim 90^\circ$ に20分間加熱する。冷後、析出した結晶を濾取し、エタノールで洗い、乾燥する。橙色柱状晶 (エタノール), mp $202\sim 203^\circ$ dec. $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ nm (log ϵ): 268 (4.25). 収量, 0.98 g (50%). Anal. Calcd. for $\text{C}_7\text{H}_9\text{O}_2\text{N}_5$: C, 43.07; H, 4.65; N, 35.89. Found: C, 42.70; H, 4.81; N, 35.97. 2. MNNG 法 粉末とした 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine (MNNG) 4.41 g (0.03 モル) と水 10 ml の混合物に、氷冷下、攪拌しながら 4-amino-

nomethylpyridine 4.32 g (0.04 モル) を水 5 ml に溶かした液を滴加する。加え終ってより30分間攪拌を続ける。析出した結晶を吸引濾過し、冷水で洗い、乾燥する。橙色柱状晶 (エタノール), mp $202\sim 203^\circ$ dec. 収量, 4.31 g (74%).

3-Nitro-1-nitroso-1-(4-pyridylmethyl)guanidine (III) — 3-nitro-1-(4-pyridylmethyl)guanidine (II) 1.56 g (0.008 モル) を濃硝酸 5 ml に溶解し、氷冷下、攪拌しながら、亜硝酸ナトリウム 1.38 g (0.02 モル)



MNU: $\text{CH}_3\text{N}(\text{NO})\text{CONH}_2$



を水 2 ml に溶かした液を滴加する。更に氷水中で 20 分間攪拌し、氷を加えて炭酸水素ナトリウムで中和する。析出した結晶を吸引濾過し、氷水で洗い、減圧デシケータ中で乾燥後、エタノールで再結晶する。灰黄色針状晶, dp ca. 145°. 収量, 0.80 g (40%). $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ nm: ($\log \epsilon$): 269 (4.16). Anal. Calcd. for $C_7H_9O_3N_6$: C, 37.50; H, 3.60; N, 37.49. Found: C, 37.66; H, 4.04; N, 37.06. NMR (ppm, DMSO- d_6): 5.08 (s, CH_2NNO).

3-Nitro-1-(2-pyridylmethyl)guanidine (V_a)—MNNG 法 粉末とした MNNG 3.68 g (0.025 モル) を水 30 ml に懸濁し、氷冷下、攪拌しながら 2-aminomethylpyridine 2.70 g (0.025 モル) を水 5 ml に溶かした液を滴加する。更に 2 時間攪拌を続け、析出した結晶を吸引濾過し、水洗し、乾燥する。無色葉状晶 (エタノール), mp 178~179°. 収量, 3.30 g (68%). NMR (ppm, DMSO- d_6): 4.46 (d, 4 cps, CH_2NH). Anal. Calcd. for $C_7H_9O_2N_5$: C, 43.07; H, 4.65; N, 35.89. Found: C, 43.15; H, 4.65; N, 36.16.

3-Nitro-1-(2-pyridylethyl)guanidine (V_b)—1. NG 法 NG 1.25 g (0.012 モル) 及び水 10 ml の混合物に 2-aminomethylpyridine 1.22 g (0.01 モル) を加え、水浴中、90° で 5 分間加熱する。一夜放置後、析出した結晶を吸引濾過し、エタノールで洗い、乾燥後、エタノールで再結晶する。無色針状晶, mp 115~117°. NMR (ppm, DMSO- d_6): 7.02 (t, $PyCH_2$), 6.50 (q, $PyCH_2CH_2NH$), 1.55 (br, NH). 収量, 1.63 g (78%). Anal. Calcd. for $C_8H_{11}O_2N_5$: C, 45.93; H, 5.30; N, 33.48. Found: C, 46.22; H, 5.77; N, 33.50. 2. MMNG 法 粉末とした MNNG 4.41 g (0.03 モル) を水 20 ml に懸濁し、氷冷下、攪拌しながら 2-aminoethylpyridine 3.66 g (0.03 モル) を水 3 ml に溶かした液を滴加する。更に 1 時間攪拌後、析出した結晶を吸引濾過し、氷水で洗い、乾燥する。無色針状晶 (エタノール), mp 115~116°. 収量, 5.99 g (94%).

3-Nitro-1-nitroso-1-(2-pyridylethyl)guanidine (VI_b)—3-nitro-1-(2-pyridylethyl)guanidine (V_b) 1.05 g (0.005 モル) を冷 70% 硝酸 15 ml に溶かし、-5° で攪拌しながら亜硝酸ナトリウム 1.04 g (0.015 モル) を水 3 ml に溶かした氷冷液を滴加する。更に 15 分間攪拌を続けて後、氷を加えて攪拌しながら炭酸水素ナトリウムを少量ずつ加えることにより中和する。析出した結晶を吸引濾過し、氷水で洗い、乾燥する。黄色針状晶 (エタノール), mp 138~139° dec. 収量,

0.51 g (43%). NMR (ppm, DMSO- d_6): 7.24 (t, $CH_2CH_2N(NO)$), 5.93 (t, CH_2CH_2N), 0.22 (br, NH). Anal. Calcd. for $C_8H_{10}O_3N_6$: C, 40.33; H, 4.23; N, 35.28. Found: C, 40.46; H, 4.53; N, 35.55.

3-Nitro-1-(4-pyridylmethyl)guanidine N-Oxide (VII)—3-nitro-1-(4-pyridylmethyl)guanidine (II) 1.56 g (0.008 モル) を酢酸 40 ml に加熱溶解し、冷後、30% 過酸化水素水 2.0 g を加え、60~70° に 3 時間加熱する。水 100 ml を加え、減圧で濃縮し、更に水 100 ml を加え、減圧で濃縮する。析出した結晶を吸引濾過し、水洗し、乾燥する。褐色プリズム晶 (含水エタノール), mp 217° dec. 収量, 1.02 g (54%). Anal. Calcd. for $C_7H_9O_3N_5$: C, 39.81; H, 4.30; N, 33.17. Found: C, 39.62; H, 4.15; N, 32.88.

同様にして 3-nitro-1-(2-pyridylmethyl)guanidine N-oxide (VIII) を得る。無色針状晶 (含水エタノール), mp 222~223° dec. 収量, 1.62 g (77%). Anal. Calcd. for $C_7H_9O_3N_5$: C, 39.81; H, 4.30; N, 33.17. Found: C, 39.89; H, 4.23; N, 33.02.

3-Nitro-1-nitroso-1-(3-pyridylmethyl)guanidine N-Oxide (XI)—1. 3-Nitro-1-(3-pyridylmethyl)guanidine N-Oxide (X): 3-nitro-1-(3-pyridylmethyl)guanidine^{1b)}(IX) 5.85 g (0.03 モル) を酢酸 50 ml に溶かし、30% 過酸化水素水 6.8 g を加え、65~70° に 3 時間加熱する。水 50 ml を加え、減圧で濃縮し、更に水 50 ml を加え、減圧で濃縮する。析出した結晶を吸引濾過し、水洗し、乾燥する。無色葉状晶 (含水エタノール), mp 238~239° dec. 収量, 5.80 g (92%). Anal. Calcd. for $C_7H_9O_3N_5$: C, 39.81; H, 4.30; N, 33.17. Found: C, 40.01; H, 4.34; N, 33.14. 2. ニトロソ化 3-nitro-1-(3-pyridylmethyl)guanidine N-oxide (XI) 4.06 g (0.005 モル) を濃硝酸 5 ml に溶かし、氷冷下、攪拌しながら亜硝酸ナトリウム 0.69 g (0.01 モル) を水 2 ml に溶かした液を滴加する。更に 30 分間攪拌した後、氷を加え、炭酸水素ナトリウムで中和する。析出した結晶を吸引濾過し、冷水で洗った後、含水エタノールで再結晶する。約 185° で爆発する黄色針状晶。収量, 0.21 g (16%). NMR (τ , DMSO- d_6): 5.08 (s, $CH_2N(NO)$).

4-Pyridylmethylurea (XII)—1. NG 法 NG 1.04 g (0.01 モル) 及び水 25 ml の混合物に 4-aminomethylpyridine 1.50 g (0.014 モル) を加え、直火で 2 時間加熱、還流する。反応液を減圧で濃縮し、析出した結晶を吸引濾過し、エタノールで洗い、乾燥する。無色板状晶 (エタノール), mp 194~195°. 収量,

0.98 g (36%). Anal. Calcd. for $C_7H_9ON_3$: C, 55.61; H, 6.00; N, 27.80. Found: C, 55.38; H, 5.84; N, 27.35. 2. MNU 法 methylnitrosourea (MNU) 1.03 g (0.01モル) を水 10 ml に懸濁し、氷冷下、攪拌しながら 4-aminomethylpyridine 1.08 g (0.01モル) を水 2 ml に溶かした液を滴加する。更に室温で1時間攪拌すると全溶する。反応液を減圧で乾固し、脱色炭を加え、エタノールで再結晶する。無色葉状品, mp 194°. 収量, 0.80 g (53%).

2-Pyridylethylurea (XIII)—NG 12.5 g (0.12モル), 2-pyridylethylamine 12.2 g (0.1モル) 及び水 100 ml の混合物を2時間直火で加熱、還流する。反応液を減圧で濃縮し、析出した結晶を吸引濾過し、エタノールで再結晶する。無色柱状品, mp 142~144°. 収量, 4.8 g (23%). Anal. Calcd. for $C_8H_{11}ON_3$: C, 58.16; H, 6.71; N, 25.44. Found: C, 57.89; H, 6.71; N, 25.14.

3-Nitro-1-(2-furylmethyl)guanidine (XV) 及び 2-furylmethylurea (XVI)—2-furylmethylamine (XIV) 2.2 g (0.02モル), NG 2.1 g (0.022モル) 及び水 100 ml の混合物を2時間加熱、還流する。冷後、析出した結晶を吸引濾過し、エタノールで再結晶する。無色柱状品, mp 131~132°. 3-nitro-1-(2-furylmethyl)guanidine (XV), 収量, 0.93 g (27%). Anal. Calcd. for $C_8H_9O_3N_4$: C, 39.13; H, 4.38;

N, 30.43. Found: C, 39.44; H, 4.40; N, 30.07. 濾液を減圧で濃縮し、析出した結晶を吸引濾過し、エタノールで洗い、エタノールで再結晶する。無色柱状品, mp 109~110°. 2-furylmethylurea (XVI), 収量, 1.14 g (44%). Anal. Calcd. for $C_8H_9O_2N_2$: C, 51.42; H, 5.75; N, 19.99. Found: C, 51.39; H, 5.79; N, 20.03.

文 献

- 1) a. S. Kamiya: *Chem. Pharm. Bull.*, **20**, 2497 (1972). b. S. Kamiya: *Chem. Pharm. Bull.*, **23**, 2744 (1975). c. S. Kamiya: *Chem. Pharm. Bull.*, **25**, 1121 (1977)
- 2) 神谷庄造: 衛生試験, **101**, 119 (1983)
- 3) S. Kamiya and S. Sueyoshi: *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 1738 (1983)
- 4) S. Kamiya, Mi, Miyahara, S. Sueyoshi, I. Suzuki and S. Odashima: *Chem. Pharm. Bull.*, **26**, 3884 (1978)
- 5) Mi, Miyahara, S. Kamiya, A. Maekawa and S. Odashima: *Gann*, **70**, 731 (1979)
- 6) Mi, Miyahara, M. Miyahara, S. Kamiya and A. Maekawa: *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 2366 (1981)
- 7) Mi, Miyahara, M. Nakadate, S. Sueyoshi, M. Tanno, M. Miyahara and S. Kamiya: *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 4402 (1982)
- 8) 宮原美知子, 神谷庄造, 中館正弘, 末吉祥子, 丹野雅幸, 宮原 誠, 鈴木郁生, 小田嶋成和: 衛生試験, **96**, 91 (1978)

トリ置換 N-ニトロソ尿素の分解反応によって生ずるニトロ化合物 及びトリアゼン類の ^{13}C 核磁気共鳴

末吉祥子・丹野雅幸

^{13}C -Nuclear Magnetic Resonance of Nitro Compounds and Triazines
Produced by Decomposition of Trisubstituted Nitrosoureas

Shoko SUEYOSHI and Masayuki TANNO

3,3-Dialkyl-1-nitroso-1-(4-tolyl)ureas (Ib, d) decompose to produce 3,3-dialkyl-1-(4-tolyl)triazenes (IIb, d) an 3,3-dialkyl-1-(2-nitro-4-tolyl)ureas (IIIb, d) in chloroform or carbon tetrachloride at room temperature. The structures of the nitro compounds (IIIb, d) were confirmed by comparing their ^{13}C -NMR spectra with those of 4-methyl-2-nitroacetanilide (V) and its 3-nitro isomer (VI).

The barrier to rotation for 3-methyl-3-(3-pyridylmethyl)-1-(2-tolyl)triazene (IIc) was found to be about 12.0 kcal. mole⁻¹, approximately equal to that of 3,3-dimethyl-1-(4-tolyl)triazene.

(Received May 31, 1984)

・ある種の N-ニトロソ尿素類は抗腫瘍作用を有することが知られている¹⁾。当部では種々のニトロソ尿素

類のなかで主としてジ置換体を合成し、その抗腫瘍効果を調べるとともに化学反応性についても検討してき

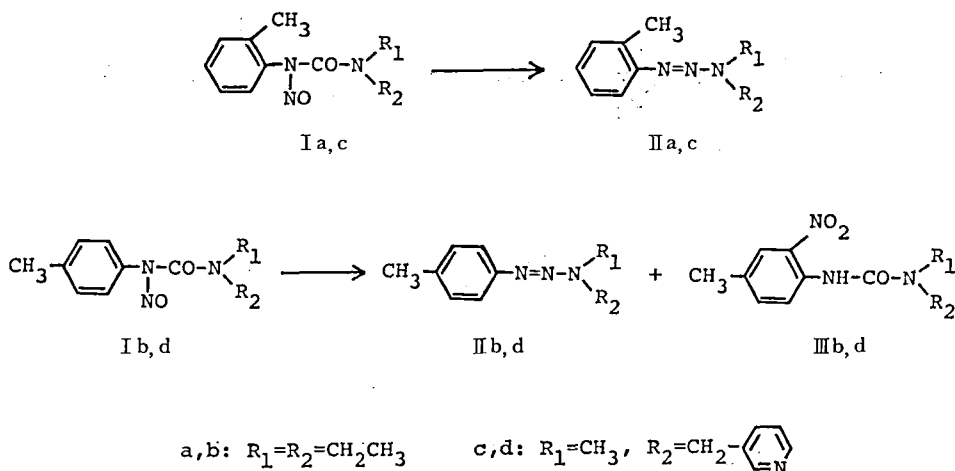


Chart 1

た²⁾。一方、トリ置換体に関しては生理活性又は反応性を調べた文献³⁾は少なく、特に 1-アリル-1-ニトロソ尿素誘導体についてはほとんど研究されていない。我々は新しい型のトリ置換ニトロソ尿素である 1-aryl-3,3-dialkyl-1-nitrosourea (I a-d) を合成しその反応性を検討した。I a-d は常温で不安定であり、溶媒に溶かすと炭酸ガスを放出して分解し主としてトリ置換トリアゼン類(II a-d)を生じる⁴⁾。しかし 4-トリル置換体 (I b, d) は溶媒の種類によって生成物が異なり、クロロホルムや四塩化炭素中ではトリアゼンよりむしろニトロ化合物 (III b, d) を主として与える⁵⁾ (Chart 1)。今回 ¹³C 核磁気共鳴 (¹³C-NMR) を利用して新物質であるニトロ化合物の構造を決定し、更に主な分解生成物であるトリアゼン類の回転障害 (rotational barrier) に対する自由エネルギーを検討した。

1. ニトロ化合物 (III b, d) の構造決定

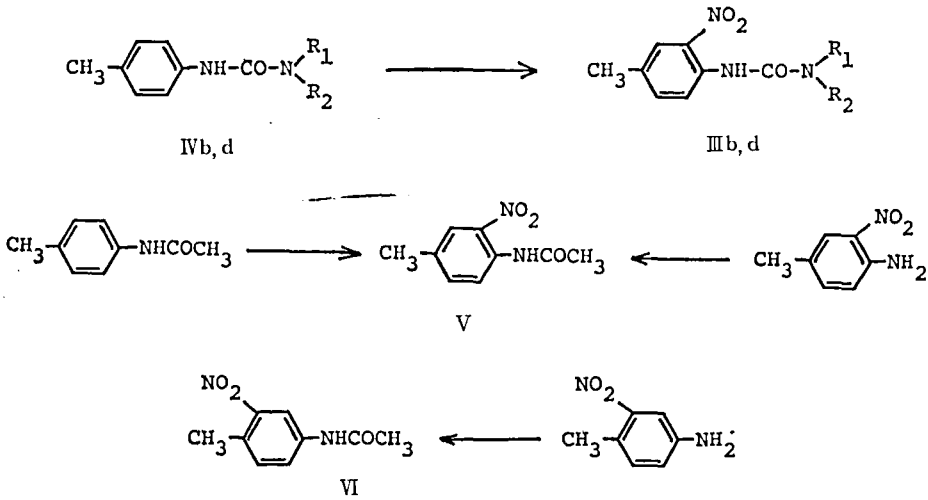
N-ニトロソ尿素体 (I b, d) をクロロホルム又は四塩化炭素に溶かし室温に置くと I b からは $C_{12}H_{17}N_3O_3$ の組成を持つ黄色プリズム晶が得られ、I d からは $C_{15}H_{16}N_4O_3$ の組成を持つ黄色針状晶が得られる⁶⁾。これらは赤外線吸収 (IR) 及び ¹H-NMR スペクトル (Table 2) よりフェニル環にニトロ基が導入されていることがわかり、更に尿素体 (IV b, d) を酢酸中硝酸でニトロ化して生ずるニトロ化合物と一致した⁶⁾。ところで尿素体における親電子置換反応の配向性は不明であるのでニトロ基の位置を上述の実験だけで決めることはできない。4-methylacetanilide のニトロ化反応⁷⁾ から予測してウレイド基に対してオルト位であろうと考えられるが、立体的影響をもたらすアセチル基

Table 1. UV Spectral Data of Nitro Compounds (III b, d, V and VI) in $CHCl_3$

Compd.	UV λ_{max} nm (log ϵ)			
III b	244(4.27)	285(3.77)	395(3.65)	
III d	246(4.28)	268(3.79)	289(sh)	389(3.39)
V	242(3.80)	370(3.17)		
VI	244(4.32)	330(3.30)		

よりも更にかさ高いと思われるウレイド基が導入されている尿素体でのニトロ化が 4-methylacetanilide の場合と一致するとは限らない。ウレイド基のメタ位、すなわちメチル基のオルト位へ起こる可能性があるため以下の実験を行った。

4-Methyl-2-nitroacetanilide (V)⁷⁾ は 4-methylacetanilide をニトロ化するか、2-nitro-*p*-toluidine をアセチル化して得られる。同様に 4-methyl-3-nitroacetanilide (VI)⁷⁾ は 3-nitro-*p*-toluidine をアセチル化して得られる (Chart 2)。III b, d の紫外線吸収 (UV) スペクトルを V 及び VI と比較すると V にやや類似する (Table 1)。次に III b, d, V 及び VI の ¹³C-NMR を測定して比較した。V 及び VI の各位置のケミカルシフトはベンゼン (128.5 ppm) を基準にして計算した値⁸⁾ と実測値より決定した。III b, d の実測値は Table 3 に示したが、各位置のケミカルシフトは V によく近似している。結局、各種データから III b, d は 2 位がニトロ化された化合物 3,3-dialkyl-1-(2-nitro-4-tolyl)-urea であると決定した。なお N-ニトロソ体 (I b, d) から C-ニトロ体 (III b, d) の生成機構については現

Table 2. ¹H-NMR Spectra Data of Nitro Compounds (IIIb, d, V and VI)^{a)}

Compd.	C ² -H	C ³ -H	C ⁵ -H	C ⁶ -H	C ⁴ -Me	COMe	NH ^{b)}
IIIb	—	7.98 (<i>J</i> =2)	7.38 (<i>J</i> =2, 8.5)	8.58 (<i>J</i> =8.5)	2.35	—	10.1
III d	—	7.95 (<i>J</i> =2)	7.40 (<i>J</i> =2, 9)	8.58 (<i>J</i> =9)	2.34	—	10.1
V	—	8.00 (<i>J</i> =2)	7.44 (<i>J</i> =2, 8.5)	8.63 (<i>J</i> =8.5)	2.39	2.28	10.2
VI	8.33 (<i>J</i> =2)	—	7.36 (<i>J</i> =8.3)	7.70 (<i>J</i> =2, 8.3)	2.45	2.08	10.3

a) IIIb, d and V were measured in CDCl₃, and VI was in DMSO-d₆ with (CH₃)₄Si as an internal standard. Chemical shifts are represented ppm and *J* values are Hz.

b) broad signal

在検討中である。

2. 3-Methyl-3-(3-pyridylmethyl)-1-(2-tolyl)-triazene (IIc) の回転障害

N-ニトロソ化合物 (I a-d) の分解で生じるトリアゼン類 (II a-d) の構造決定はジアゾニウム塩とジアルキルアミンより合成した標品と機器データを比較することによって行った⁶⁾が、その際 N³に置換したメチル基及びメチレン基の ¹³C シグナルは Fig. 1 に示したように室温でブロードである。これは π-共役系を有するトリアゼン基において図に示したような 1, 3-双極子共鳴構造 II' 又は II'' の寄与のために N²-

N³ 結合の二重結合性による回転障害が生じるからである⁹⁾。

IIc を重水素化クロロホルム (CDCl₃) 中で ¹³C-NMR を測定すると N-メチル基及び N-メチレン基のシグナルは低温で2本ずつに分離しケミカルシフトは -90° で 34.2 と 41.5 ppm 及び 48.5 と 56.5 ppm (TMS 基準) であった。一方、高温では1本ずつになり重水素化ジメチルスルホキシド (DMSO-d₆) 中 150° で N-メチル基が 35.6 ppm, N-メチレン基が 53.1 ppm (DMSO-d₆ の中心を基準) に観測された。

トリアゼン類の回転障害に対する活性化自由エネルギー

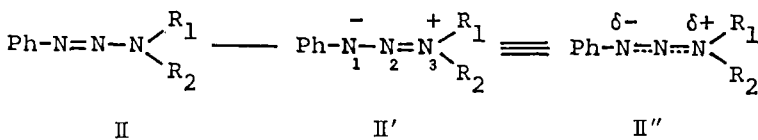


Table 3. ¹³C-NMR Spectral Data (ppm) of Nitro Compounds (IIIb, d, V and VI)^{a)}

Compd.	C ¹	C ²	C ³	C ⁴	C ⁵	C ⁶	CO
V 計算値 ^{b)}	131.2	138.2	124.0	133.0	135.3	119.4	
V 実測値	132.5	136.4	125.3	133.4	136.6	122.2	168.7
VI 計算値 ^{b)}	137.3	113.3	148.9	126.9	130.1	124.6	
VI 実測値	138.4	114.3	148.7	126.8	132.8	123.6	168.8
IIIb 実測値	131.0	135.3	125.1	135.5	136.9	121.4	153.7
III d 実測値	131.7	135.7	125.2	134.7	136.8	121.3	154.7

a) IIIb, d and V were measured in CDCl₃, and VI was in DMSO-d₆ with (CH₃)₄Si as an internal standard.

b) They were calculated with benzene (128.5 ppm) as standard.

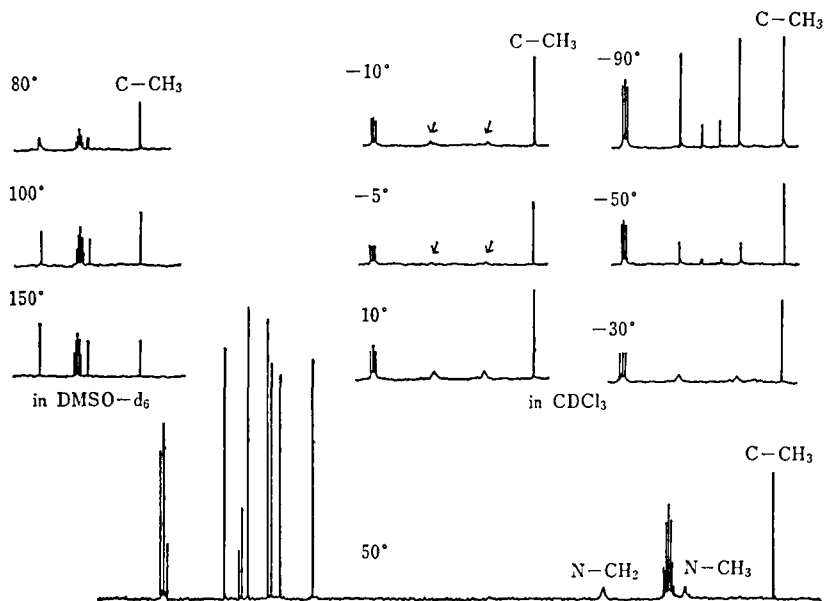


Fig. 1. ¹³C-NMR Spectra of 3-Methyl-3-(3-pyridylmethyl)-1-(2-tolyl)-triazene (IIc) at Various Temperatures

ギー (ΔG^*) は N³ 位に電子供与基を持つ化合物で測定されている⁹⁾が、IIc のように N³ にピリジルメチル基 (電子求引基と考えられる) を持ち更にフェニル環のオルト位に置換基のついた化合物の ΔG^* はほとんど知られていない。このようなトリアゼン類は電子供与基を持ち、比較的立体障害の小さいものに比べ N²-N³ 結合の二重結合性が減少しているので ΔG^* は小さくなると考えられる。IIc の種々の温度における ¹³C-NMR スペクトルから CDCl₃ における IIc の融合温度 (Tc) は -5° であることがわかり、近似的な活性化自由エネルギー ΔG^* (Tc) を求める¹⁰⁾ と 12.0 kcal·mole⁻¹ であった。Marullo ら⁹⁾ は 3,3-dimethyl-1-(4-tolyl) triazene 及び 3,3-dimethyl-1-phenyltriazene の ¹H-NMR より求めた ΔG^* (Tc)

がそれぞれ 12.1 と 12.7 kcal·mole⁻¹ であると述べている。IIc とこれらの化合物との差は 0.1~0.7 kcal·mole⁻¹ であり、やや IIc が低い程度であるが測定誤差を考えればほとんど差がない。したがって 3-methyl-3-(3-pyridylmethyl)-1-(2-tolyl) triazene (IIc) における N²-N³ の結合状態は 3,3-dimethyl-1-aryltriazene 類と類似であると考えられる。

実験の部

1. 合成法

3,3-Dialkyl-1-(2-nitro-4-tolyl) urea (III b, d)⁶⁾
IVb (1.5 g) を氷酢酸に溶かし発煙硝酸 (d: 1.52, 2 ml) を 0~5° で加え室温で30分反応させる。反応液は氷水中にそそぎエーテルで抽出し、エーテル層は飽

和炭酸水素ナトリウム液で洗う。芒硝で乾燥後溶媒を留去すると IIIb を得る。黄色プリズム晶 (*n*-ヘキサン再結晶), mp 45~46°, 収率, 52%。III d も同様に IVd をニトロ化して得る。ただし抽出はジクロロメタンで行い, 抽出後カラムクロマト (シリカゲル, クロロホルム) で精製する。黄色針状晶 (*n*-ヘキサン・エーテル再結晶), mp 76~77°。収率, 42%。

4-Methyl-2-nitroacetanilide (V)

i) *p*-Toluidine (5.4 g) を無水酢酸 10 ml に加えると 4-methylacetanilide (6.8 g) が析出する。白色リンベン晶 (エーテル再結晶), mp 153~154° (lit.,⁷⁾ mp 153°)。この結晶 (1.5 g) を IVb の場合と同様にニトロ化する。黄色針状晶 (エーテル再結晶), mp 94.5° (lit.,⁷⁾ mp 96°)。収率, 31%。

ii) 2-Nitro-*p*-toluidine (1.0 g) を無水酢酸 (10 ml) と振り混ぜピリジン (3 ml) を加えて2日間置いた後氷水にそそぐ。析出した結晶をろ取する。収率, 16%。

4-Methyl-3-nitroacetanilide (VI)

3-Nitro-*p*-toluidine (1.0 g) を氷酢酸 (10 ml) に溶かし無水酢酸 (5 ml) を加える。氷水中にそそぎ析出した結晶をろ取し, エーテル・アセトン混液より再結晶する。黄色針状晶, mp 148° (lit.,⁷⁾ 144.5°)。収率, 24%。

3-Methyl-3-(3-pyridylmethyl)-1-(2-tolyl) triazine⁶⁾ (IIc)

o-Toluidine (2.1 g) を36%塩酸 (3.4 ml) 及び水 (20 ml) に溶かし, これに亜硝酸ナトリウム (1.4 g) の水溶液 (7 ml) を0~5°で滴加した後30分攪拌する。反応液を 3-pyridylmethylamine (4.9 g) に加え室温で3時間攪拌する。次にクロロホルムで抽出し, 溶媒を留去後蒸留する。bp 168° (1 mmHg), 収率, 83%。

2. 使用機器及び操作条件

機種 ¹³C-NMR: 日本電子 FX-200 型

操作条件 frequency, 50.10 MHz; spectral width, 10000 Hz; pulse width, 6 μs (θ=36°); acquisition

time, 0.81892s, data point, 16384; accurate ±0.05 ppm; concentration, 0.2~0.9 g/ml; internal standard, Me₄Si (高温度で測定の場合は DMSO-d₆)

3. 活性化自由エネルギーの計算¹⁰⁾

$$\frac{\Delta G^*}{RT_c} = \log_e(\sqrt{2R/\pi Nh}) + \log_e(T_c/\delta\nu) \\ = 22.96 + \log_e(T_c/\delta\nu)$$

$$\delta\nu = \nu_A - \nu_B$$

T_c = 融合温度

文 献

- 1) J. M. Montgomery: *Cancer Treat. Rep.*, **60**, 651 (1976)
- 2) S. Sueyoshi, S. Kamiya: *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 1267 (1981); M. Miyahara *et al.*: *ibid.*, **30**, 4402 (1982); その他
- 3) K. Tsujihara *et al.*: *J. Med. Chem.*, **1982**, 441; M. Takeuchi *et al.*: *J. Natl. Cancer Inst.*, **56**, 1177 (1976); S. S. Singer: *J. Org. Chem.*, **47**, 3839 (1982)
- 4) 日本薬学会第102年会 (大阪) 1981: 講演要旨集 p. 428
- 5) 日本化学会第49春季年会 (東京) 1984: 講演要旨集, p. 928
- 6) *Chem. Pharm. Bull.*, 投稿中
- 7) R. A. Morton, A. McGookin: *J. Chem. Soc.*, 1934, 909; L. Gattermann: *Ber.*, **18**, 1483 (1885); J. K. Sanford *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **67**, 1941 (1945)
- 8) E. Pretsch *et al.*: *Tabellen zur Strukturaufklärung Organischer Verbindungen mit Spektroskopischen Methoden*, p. C120 (1981), Springer-Verlag, Berlin
- 9) N. P. Marullo *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 510 (1968); M. H. Akhtar *et al.*: *Tetrahedron*, **24**, 3899 (1968); T. Axenrod *et al.*: *Helv. Chim. Acta*, **59**, 1655 (1976); L. Lunazzi *et al.*: *J. Chem. Soc.*, **1978**, 686
- 10) 竹内敬人訳: ¹H 及び ¹³C NMR 概説, p. 203 (1979), 化学同人

低濃度投与レベルでの連続投与時におけるクロルデン類のラット体内分布

武田明治・関田 寛・佐々木久美子・河村葉子・内山 充
高橋 惇・大野泰雄・川西 徹・高仲 正

Distribution of Chlordane Components in Rat Tissues after Daily Oral
Administration of Technical Chlordane at Low Levels

Mitsuharu TAKEDA, Hiroshi SEKITA, Kumiko SASAKI, Youko KAWAMURA, Mitsuru UCHYAMA,
Atsushi TAKAHASHI, Yasuo OHNO Tohru KAWANISHI and Akira TAKANAKA

The distribution of some chlordane congeners (main components of technical chlordane and their biological metabolites) in rat tissues after daily oral administration of technical chlordane at the extreme low level of 10 µg/kg body weight/day for one week and two weeks was investigated. The chlordane congeners were extracted from samples (2 g or 5 ml) of the liver, kidney, brain, muscles, adipose tissue and blood of the administered rats and a control rat with the Biotron homogenizer in the mixture of acetone-hexane (1 : 2) or the Extrelut column in the case of the blood samples, followed by clean-up by acetonitrile-hexane partition and/or by Florisil column chromatography.

Finally, six chlordane congeners (*trans*- and *cis*-chlordane, *trans*- and *cis*-nonachlor, oxychlordane and heptachlor epoxide) were analyzed qualitatively and quantitatively by gas chromatography with ECD and with the columns packed with 2% OV-17, 3% OV-210 and 5% XE-60, separately. As the results none of the tested chlordane congeners accumulated at all or scarcely in all of the tested tissues other than the adipose tissue but some heptachlor epoxide accumulated in the kidney after administration for one week and in the adipose tissue after administration for one week and two weeks, while *trans*- and *cis*-chlordane and *cis*-nonachlor did not accumulate at all or scarcely in all of the tested tissues. Significant accumulations of *trans*-nonachlor and oxychlordane were found only in the adipose tissue.

(Received May 31, 1984)

クロルデンは、かつて我が国では農薬取締法に規定される農薬として登録されていたが、現在では無登録農薬となっている有機塩素系殺虫剤の一種であるが¹⁾、ディルドリンの代替品として木材及び木造建築物のシロアリ防除用に広範囲に使用されている。そしてクロルデンもまた他の有機塩素系殺虫剤と同様に環境汚染が懸念され、環境庁による水、底質及び魚介類についての調査²⁾からも、クロルデンの魚介類汚染は明らかにされている。クロルデンの木造建築物への使用はとりも直さず日常生活環境の汚染を、また魚介類の汚染は日常摂取している食品のクロルデンによる汚染を意味しており、ひいてはクロルデンによる人体暴露を唆している^{3,4)}。

このような現状に鑑み、クロルデンの環境及び人体への影響を正しく評価するための調査研究の一環として、低投与レベルでの連続投与時の実験動物の体内組織におけるクロルデンの主要成分の分布について検討した。

実験方法

1. 試薬・標準品及び標準溶液

ヘキサン、エーテル等の有機溶媒及び無水硫酸ナトリウムは残留農薬試験用のものを使用した。他の試薬は特に指定しない限り、市販の特級品を使用した。

フロリジル：フロリジン社製フロリジル PR を 130° で 16 時間以上加熱したものを、デンケーター中で放冷したのち使用した。

クロルデン標準品：*trans*-及び*cis*-クロルデン、*trans*-及び*cis*-ノナクロル、オキソクロルデン及びヘプタクロル・エポキンドはヴェルンコール・パンフィック社より供与されたものを使用した。

保存用クロルデン標準溶液：上記各クロルデン標準品の 100 µg/ml ヘキサン溶液。

分析用クロルデン標準溶液：保存用クロルデン標準溶液を適宜希釈し、単独あるいは混合して各成分の 0.1, 0.02, 0.01 及び 0.005 µg/ml ヘキサン溶液を調製した。

クロルデン工業原体(テクニカル・クロルデン): ヴェルシコール・パシフィック社より供与を受けたもの。ロット番号 B-9129-A (組成 *trans*-クロルデン 23.2%, *cis*-クロルデン 12.4%, *trans*-及び *cis*-ノナクロル合わせて 9.2%, ヘプタクロル 8.8% その他)。

エマノン混液: 花王石鹼(株)より入手したエマノンとエタノール及び生理食塩水 1:1:8 (v/v/v) の混液。

2. 実験動物及びクロルデンの投与方法

松本実験動物(株)より入手したウィスター系雄性ラット(体重 285~366 g)を投与群と対照群とに分け、投与群にはクロルデン原体をエマノン混液に 10 µg/ml になるように溶解し、1 ml/kg 体重の投与量で、1日1回胃ゾンデを用いて経口投与した。対照群にはエマノン混液のみを投与群と同様に投与した。なお、水と餌は自由摂取させた。

3. 分析試料

前述の投与群及び対照群のラットを所定の期間(1週間及び2週間)飼育した後、血液 5 ml を採取した後、直ちに断頭屠殺し、肝、腎、脳、筋肉及び脂肪組織をそれぞれ約 2 g 摘出した。

採取した血液は直ちに、他の臓器組織は湿重量を測定したのち、以下の分析操作を行った。

4. 分析操作

4.1 抽出

1) 血液

試料 5 ml に蒸留水 15 ml を加え、よく振り混ぜたのち、Extrelut (メルク社製、1検体分1包約 10 g) を充填したクロマト管(内径 2 cm, 長さ約 30 cm)に注入した。20分間放置後、ヘキサン 40 ml でクロルデン類を溶出した。溶出液はクデルナ・ダニッシュ型濃縮器を用いて 40° 以下の水浴上で、減圧下約 5 ml に濃縮した。

2) 脂肪組織

試料 2 g にアセトン・ヘキサン (1:2) 混液 100 ml を加えてバイオトロンを用いて高速かくはんしてクロルデン類を抽出し、抽出液を吸引ろ過した。ろ紙上の残渣を抽出溶媒 20 ml で洗浄し、ろ液に合した。ろ液の抽出液をクデルナ・ダニッシュ濃縮器を用いて 40° 以下の水浴上で減圧下 5 ml に濃縮した。この濃縮液を 100 ml の分液ロートに移し、ヘキサンを加えて全量 15 ml としたのち、ヘキサン飽和アセトニトリル 30 ml ずつで3回振とう抽出した。各々のアセトニトリル層を予め 5% 塩化ナトリウム溶液 300 ml の入っている分液ロートに移し、よく混和したのち、ヘキサン 100 ml で1分間激しく振とう抽出した。水層を除去したのち、ヘキサン層を水 50 ml で洗浄し、無水硫

酸ナトリウムで脱水後、クデルナ・ダニッシュ濃縮器を用いて 40° 以下の水浴上で減圧下 5 ml に濃縮した。

3) 脂肪組織以外の臓器組織

試料 2 g にアセトン・ヘキサン (1:2) 混液 100 ml を加えてバイオトロンを用いて高速かくはんして抽出したのち、吸引ろ過した。ろ紙上の残渣を抽出溶媒 20 ml で洗浄し、ろ液に合した。ろ液の抽出液をクデルナ・ダニッシュ型濃縮器を用いて 40° 以下の水浴上で減圧下約 5 ml に濃縮した。

4.2 フロリジルカラムクロマトグラフィー

内径 2 cm, 長さ約 30 cm のクロマト管にフロリジル 20 g をヘキサンにて湿式で充填して調製したカラム(両端に少量の無水硫酸ナトリウムを積層)に、前項の操作で得られた濃縮液を注入し、最初ヘキサン 200 ml で溶出した。初めの 100 ml は捨てて、次の 100 ml 溶出画分 (*trans*-ノナクロル画分) を分取した。次いで、エーテル・ヘキサン (6:94) 混液 150 ml で残りのクロルデン類を溶出した。各々の溶出画分はクデルナ・ダニッシュ型濃縮器を用いて 40° 以下の水浴上で減圧下 5 ml に濃縮した。

4.3 ガスクロマトグラフィー

前項の操作で得られた濃縮液をクロルデン類のガスクロマトグラフィー用試験溶液として、以下の測定条件で定性・定量を行った。

機種: 島津製作所製ガスクロマトグラフ GC-9A 型 (同社製クロマトグラフ用データ処理装置 クロマトパック C-R2AX 型を接続)

検出器: ECD (⁶³Ni)

カラム及び充填剤: a) 2% シリコン OV-17 (Chromosorb W-HP, 100~120メッシュ), 内径 2.6 mm, 長さ 2 m, b) 3% シリコン OV-210 (Chromosorb W-HP, 100~120メッシュ), 内径 2.6 mm, 長さ 2 m, c) 5% シリコン GE XE-60 (Gas chrom Q, 80~100メッシュ), 内径 3mm, 長さ 1.5 m. いずれもガラス製カラム。

カラム槽温度: a) 210°, b) 165~170°, c) 163~165°

注入口・検出器温度: a), b), c) いずれも 250°

キャリアガス及び流量: 高純度窒素, a) 20~30 ml/min, b) 50~70 ml/min, c) 40~70 ml/min

結果及び考察

ラットにクロルデン工業原体 (10 µg/kg/day) を 1週間及び2週間連続投与したのち、血液、脂肪組織、筋肉、肝、腎及び脳の各臓器組織におけるクロルデン類(クロルデン工業原体の主要成分の *trans*-及び *cis*-

Table 1. Distribution of chlordane congeners in rat tissues after daily oral administration of technical chlordane (10 µg/kg/day)

Administration term	Tissue	<i>trans</i> -Chlordane	<i>cis</i> -Chlordane	Oxychlordane	<i>trans</i> -Nonachlor	<i>cis</i> -Nonachlor	Heptachlor epoxide
1 Week	Adipose	ND	ND	12.60	6.29	1.15	10.36
	Muscle	ND	ND	1.27	1.29	ND	ND
	Liver	ND	ND	1.13	1.23	ND	ND
	Kidney	ND	ND	1.24	1.71	ND	8.16
	Brain	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Blood	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2 Weeks	Adipose	2.24	2.74	33.36	14.64	3.00	21.39
	Muscle	ND	ND	1.87	1.25	ND	1.68
	Liver	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Kidney	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Brain	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Blood	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND: not detected (<1.0 ng/g wet tissue or ml of blood)

Each positive value is shown as the average (ng/g tissue or ml of blood) of 2 animals in the administration for a week, and of 3 animals in that for 2 weeks.

A trace of amounts of oxychlordane (1.94 ng/g tissue) was detected only in adipose tissue of the control rat in the administration for a week, and a trace of amounts of oxychlordane, *trans*-nonachlor and heptachlor epoxide (2.0, 1.4 and 1.6 ng/g tissue, respectively) were detected in that for 2 weeks.

クロルデン及び *trans*- 及び *cis*-ノナクロル並びにクロルデンの主要な生体内代謝物であるオキシクロルデン及びクロルデン工業原体成分のヘプタクロルの主要な生体内代謝物であるヘプタクロル・エポキシド計6物質)について分布を検討し、各組織湿重量 1g (血液については 1ml) 当りのクロルデン類各成分の蓄積量の分析結果を Table 1 に示した。

クロルデン工業原体 10 µg/kg を 1 週間連日投与した場合のラット体内分布は、脂肪組織にオキシクロルデン、*trans*-ノナクロル及びヘプタクロル・エポキシドが、腎にヘプタクロル・エポキシドが有意に蓄積していた以外には、オキシクロルデン及び *trans*-ノナクロルが筋肉、肝及び腎に、*cis*-ノナクロルが脂肪組織に検出限界 (1.0 ppb) よりやや多い程度認められただけで、*trans*- 及び *cis*-クロルデンは検討したいずれの臓器組織から見出されなかった。

また、投与期間を 2 週間に延長した場合にもほぼ同様の蓄積傾向を示し、脂肪組織にオキシクロルデン、*trans*-ノナクロル及びヘプタクロル・エポキシドが有意に蓄積していたほかは、*trans*- 及び *cis*-クロルデン及び *cis*-ノナクロルが脂肪組織に、オキシクロルデン、*trans*-ノナクロル及びヘプタクロル・エポキシドが筋肉に検出限界よりやや多い程度認められたに過ぎず、他の臓器組織の肝、腎、脳及び血液からは、いずれの

クロルデン類も見出されなかった。

結局、今回の投与レベル (10 µg/kg/day) での実験では、クロルデン原体の主成分である *trans*- 及び *cis*-クロルデンは、2 週間投与後の脂肪組織に痕跡程度認められたに過ぎず、他の臓器組織並びに 1 週間投与では検討したいずれの臓器組織から見出されなかった。

なお、対照群 (各 1 匹) からは、1 週間投与では脂肪組織からのみオキシクロルデンだけが痕跡程度 (1.9 ppb)、また 2 週間投与では脂肪組織からのみオキシクロルデン以外に *trans*- ノナクロル及びヘプタクロル・エポキシドが、いずれも痕跡程度 (それぞれ 2.0, 1.4 及び 1.6 ppb) 認められた。

Tashiro ら⁵⁾ の *trans*- 及び *cis*-クロルデンの動物体内代謝に関する研究によれば、*trans*- 体は主にオキシクロルデンを経由して 1-hydroxy-2-chlordene へ、また、*cis*- 体は 1-*exo*-hydroxydihydrochlordene へ代謝されると報告している。

また、彼ら⁶⁾ は *trans*-ノナクロルは一旦脱塩素して *trans*-クロルデンに代謝されたのち、前述の *trans*-クロルデンの代謝経路にしたがって代謝されると報告しているが、*cis*- 体の代謝に関する報告は見当たらない。

今回の実験で投与物質に用いたクロルデン工業原体中の *trans*- 及び *cis*-クロルデンの組成 (それぞれ 23.2%, 12.4%) の比率は約 2:1 であり、また工業

原体中に共存する *trans*-ノナクロルからも *trans*-クロルデンが代謝生成されるのにもかかわらず、2週間投与後のラットの脂肪組織中に蓄積していたクロルデン異性体の濃度はほとんど同レベルであったことは興味ある知見である。この知見は *trans*-クロルデンが *cis*-体よりも動物体内ではより速やかに代謝されることを示唆している。

クロルデン工業原体中で *trans*-及び *cis*-クロルデンに次いで含有比率をもっているノナクロルは、今回の投与実験で用いた投与物質中の組成は *trans*-体及び *cis*-体合わせて約9%のものである。Sovocoolら⁷⁾が工業用原体の組成を測定したものでは、ノナクロルの *cis*-体は *trans*-体の10%以下であったと報告している。このことから今回使用したクロルデン工業原体には *trans*-ノナクロルが少なくとも8%以上含有していると考えられ、両異性体の組成比は約8:1とみなすことができる。今回の投与実験で脂肪組織中に蓄積していたノナクロルの *trans*-体と *cis*-体の比率は約5~6:1であったことから類推すると、ノナクロルもやはり動物体内では *trans*-体が *cis*-体よりも代謝され易いことを示唆している。

オキシクロルデンはクロルデン及びノナクロル、とりわけ両者の *trans*-体の主要代謝物の一つである^{5,6)}。したがって、この化合物が今回の投与実験で最も高濃度の蓄積を示したのも当然のことと言える。

ヘプタクロルはかつて我が国でも殺虫剤として登録されていたことのある有機塩素系農薬の一つであるが¹⁾、クロルデン工業原体中にも副生成物として存在している⁷⁾。ヘプタクロルは生体内でその一部が酸化代謝されて、ヘプタクロル・エポキシドとなって組織中に蓄積することが知られている⁶⁾。今回の投与実験から、クロルデン工業原体を投与したラットの脂肪組織中でオキシクロルデンに次いでヘプタクロル・エポキシドが高濃度に蓄積していた。工業原体中のヘプタクロルの組成比はクロルデン及びノナクロルを合わせた組成比に対して約1:5であるが、今回の投与実験で、ラットの脂肪組織中に蓄積していたヘプタクロル・エポキシドとクロルデン及びノナクロルの合わせた蓄積濃度比は約1~1.2:1であった。

クロルデン工業原体中の主要な構成成分の動物体内代謝物であることからオキシクロルデン及びヘプタ

クロル・エポキシドは今回の投与実験における低濃度投与レベルにおいてさえも、1週間投与で脂肪組織に有意な量の蓄積が認められた。両者の蓄積量の増加傾向は投与2週間まではほとんど同程度であるように見受けられたが、短期間の投与実験であったために、それ以後の蓄積傾向の変動を推察することはできなかった。

最後に、今回の投与実験は極めて低い投与レベルでのしかも極めて短い期間の連続投与実験であったために、Table 1からも明らかなように、クロルデン工業原体を投与したラット体内組織におけるクロルデン類の蓄積が未だ飽和状態に達していないと推量される。したがって、クロルデン類の低濃度投与レベルでの蓄積性に関する研究成果を確実に得るには、更に長期間にわたる連続投与実験もしくは同時に今回の投与レベルよりも高濃度の投与レベルを設定して実験を行う必要があると思量されるが、クロルデン工業原体中の主要成分の実験動物体内における動態の傾向を把握する上で、有益な知見を与えているものと思量される。

終わりに、本研究に当たり、実験に御協力いただいた香川県衛生研究所 毛利孝明氏に感謝致します。

なお、本研究は昭和58年度環境庁環境保全総合調査研究促進調整費による「化学物質(クロルデン)の安全性の評価に関する研究」の一環として行われたものである。

文 献

- 1) 富沢長次郎, 上路雅子・編: 最新 農業データブック, p. 44 (1982) ソフトサイエンス社
- 2) 環境庁環境保健部保健調査室レポートシリーズ No. 9, 昭和58年版ケミカルアセスメントアニュアルレポート“化学物質と環境”
- 3) T. Miyazaki, K. Akiyama, S. Kaneko, S. Horii: *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, **25**, 518 (1980)
- 4) 酒井 洋, 高井 透, 郷 周一, 石月要一: 第19回全国衛生化学技術協議会年会講演集, p. 38 (1977年9月, 京都市)
- 5) S. Tashiro, F. Matsumura: *J. Agr. Food Chem.*, **25**, 872 (1977)
- 6) S. Tashiro, F. Matsumura: *Arch. Environm. Contam. Toxicol.*, **7**, 113 (1978)
- 7) G. W. Sovocool, R. G. Lewis, R. L. Harless, W. K. Wilson, R. D. Zehr: *Anal. Chem.*, **49**, 734 (1977)

ケシの優良系統の選抜

一貫種のアヘン採取時におけるモルヒネ、コデイン含有量の関係について

佐竹元吉・栗原孝吾・畠山好雄・堀越 司・高橋一徳・島峯望彦・大野昌子

Selection of Opium Poppy

On the Relation of Incision Time of Poppy (*Ikkanshu*) Capsule to Morphine and Codeine Yields.

Motoyoshi SATAKE, Kogo KURIHARA, Yoshio HATAKEYAMA Tsukasa HORIKOSHI,
Kazunori TAKAHASHI, Mochihiko SHIMAMINE and Masako ŌNO

In order to study the optimum environmental conditions for the production of opium alkaloids, opium poppy was cultivated under different environmental conditions and the its alkaloid contents were determined.

The morphine contents in the opium of the *Ikkanshu* variety of *Papaver somniferum* L. decreased with increasing lancing, but the ratio of codeine to morphine increased. Similar results were obtained regardless of the differences in sowing seasons, locations and years.

(Received May 31, 1984)

ケシの品種は和歌山薬用植物栽培試験場で73系統の品種を保存しているが、モルヒネ及びコデインの含有量の高い品種の育成はまだ十分にはなされていない。

今回、優良系統の選抜のため、一貫種の切傷時におけるモルヒネ及びコデインの含有量の変動を明らかにし、品種改良のための試料の採取法の条件を決めたので、ここに報告する。

実験材料及び方法

1. 材料

ケシ (*Papaver somniferum* L.) の一貫種：

北海道薬用植物栽培試験場で1964年に春日部薬用植物栽培試験場より導入し継代した種子及び筑波薬用植物栽培試験場では1981年8月に和歌山薬用植物栽培試験場より導入した種子を用いた。

2. 栽培方法

播種：北海道では10アールに1981年5月8日及び1982年5月10日の2年間また筑波では1アールに1981年10月20日及び1982年3月1日の秋と春の2回、慣行に従い条播きを行った。(種子量 500 g/10 a)

肥料：北海道では元肥として複合成 (12-17-11) を10アール当たり 20 kg を施肥し、6週間後に、同じ肥料を10アール当たり 40 kg を追肥とした。筑波では元肥として、複合成 (15-15-15) を10アール当たり 31 kg 施肥し、追肥は行っていない。

3. アヘン採取法と時期

開花日より約15日目に川谷ら¹⁾の接続切(順切)で3筋切傷刃を用いて、3山ずつ、3回又は4回切傷し、各回のアヘンを分析用試料とした。

北海道では切傷したものの切り取り及び追い掻きを合せたものを試料とし、筑波では切り取り及び追い掻きを別けて、試料とした。

北海道では1981年第1回7月27日と28日、第2回7月29日と30日、第3回7月31日と8月1日、1982年第1回7月25日と26日、第2回7月27日と28日、第3回7月29日と30日で第4回目は採汁不可能であった。

筑波では秋播きは第1回の切り取りを1981年5月24日16時、追い掻きは5月25日の9時、第2回は5月26日と27日、第3回は5月28日と29日、第4回は5月30日と31日で、春播きの第1回は6月15日の16時で追い掻きは6月16日の9時、第2回は6月17日と18日、第3回は6月19日で、追い掻きは採汁が不可能であった。

4. モルヒネ及びコデインの定量法

ガスクロマトグラフィー

測定条件

Apparatus: Yokokawa Hewlett Packard YHP
5710A

Detector: FID

Column: OV-101 2% (Chromosorb W HP, 100~
120 mesh), glass, ID 2 mm, L. 1.2 m

Table 1. Effect of Scratching on the Codeine and Morphine content of Opium (Cultivated in Hokkaido)

Sowing Date	Cutting	Date	Weight (g)	Morphine (%)	Codeine (%)	C/M 比
May 8 1981	First	July 27, 28	74.2	13.59	4.2	0.31
	Second	July 29, 30	50.9	6.38	5.4	0.79
	Third	July 31, Aug. 1	13.1	1.25	5.4	4.32
May 10 1982	First	July 25, 26	42.21	16.73	4.7	0.28
	Second	July 27, 28	46.13	9.64	5.7	0.59
	Third	July 29, 30	20.31	7.27	6.5	0.89

Table 2. Effect of Scratching on the Codeine and Morphine content of Opium (Cultivated in Tsukuba)

Sowing Date	Cutting	Scratching off	Date	Time	Weight (g)	Morphine (%)	Codeine (%)	C/M 比
Autumn Oct. 26 1981	First	immediate	May 24	PM. 4	25.368	21.78	3.3	0.16
	First	interval	May 25	AM. 9	14.815	17.83	5.1	0.29
	Second	immediate	May 26	PM. 4	17.727	15.10	6.1	0.40
	Second	interval	May 27	AM. 9	11.701	10.57	6.8	0.64
	Third	immediate	May 28	PM. 4	7.011	11.54	6.2	0.53
	Third	interval	May 29	AM. 9	15.081	5.04	6.6	1.31
	Fourth	immediate	May 30	PM. 4	9.913	8.30	6.9	0.83
	Fourth	interval	May 31	AM. 9	12.511	3.72	4.3	1.16
Spring Mar. 10 1982	First	immediate	Jun 15	PM. 4	14.774	18.30	3.9	0.21
	First	interval	Jun 16	AM. 9	9.077	12.60	4.8	0.38
	Second	immediate	Jun 17	PM. 4	8.166	11.15	5.5	0.49
	Second	interval	Jun 18	AM. 9	10.417	7.77	5.1	0.65
	Third	immediate	Jun 19	PM. 4	3.539	3.44	5.8	1.68

Temp.: Injection port 250°

Column 220°

Detector 300°

Carrier gas: N₂ 30 ml/minH₂: 30 ml/min

Sens.: 10×16

Digital integrator: Takeda Riken TR-2221

Slope sense 40 μV/min

Peak width 6 sec

Valley time 3 sec

Height factor 10

標準溶液の調製 (1) モルヒネ標準溶液: モルヒネ約 50 mg を精密に量り, 無水エタノールに溶かし, 100 ml とする。(2) コデイン標準溶液: コデイン約 20 mg を精密に量り, 無水エタノールに溶かし, 100 ml とする。用時(1), (2)の等量混液を調製し標準混液とする。

内部標準溶液の調製 フタル酸ジノニル約 50 mg を精密に量り, アセトンに溶かし 100 ml とする。

試料溶液の調製 アヘン約 50 mg を精密に量り, 乳ばちにとり, 1%塩酸 5 ml を加えて10分間すり混ぜた。次に1%塩酸 5 ml を追加し, かき混ぜ, ろ過する。乳ばち, 乳棒及びろ紙上の残留物は水 5 ml ずつで3回洗い, ろ液と洗液を合せてクロロホルム 30 ml ずつで3回抽出し, クロロホルム液を除く。水層にアンモニア試液を加えてアルカリ性にし, クロロホルム・エタノール混液 (3:1) 40 ml 及び 30 ml ずつで2回抽出し, 脱脂綿を用いてろ過する。ろ液を減圧で蒸発乾固し, 残留物に無水エタノール 10 ml を正確に加えて溶かし, 試料溶液とする。

GC 試料の調製 試料溶液 1~2 ml を正確に量り, 減圧で蒸発乾固し, 得られた残留物に BSA 0.30 ml を加え 90° の水浴中で10分間加熱し, 冷後内部標準溶液 2 ml を正確に加えて, GC の試料溶液とする。

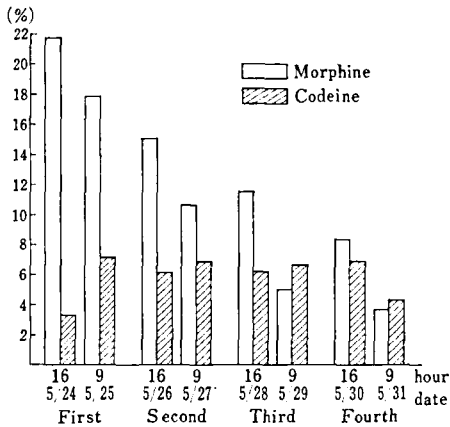


Fig. 1. Morphine and Codeine Content of Opium, cultivated in Tsukuba (Sowing in Autumn)

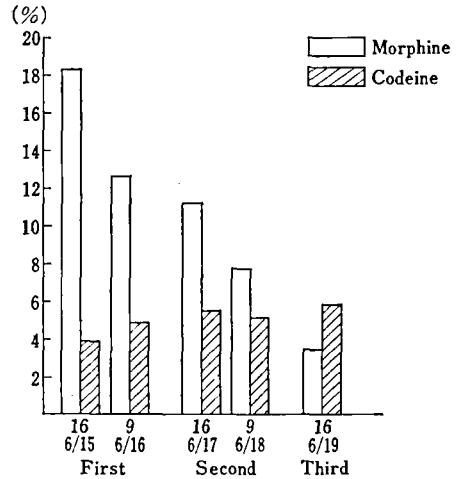


Fig. 2. Morphine and Codeine Content of Opium, cultivated in Tsukuba (Sowing in Spring)

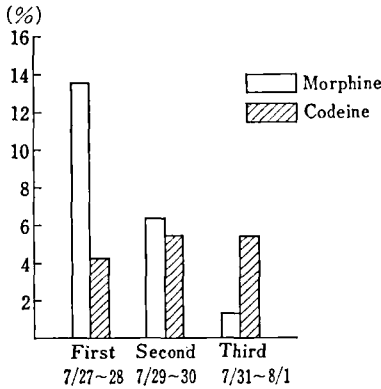


Fig. 3. Morphine and Codeine Content of Opium, cultivated in Hokkaido (Sowing in Spring, 1981)

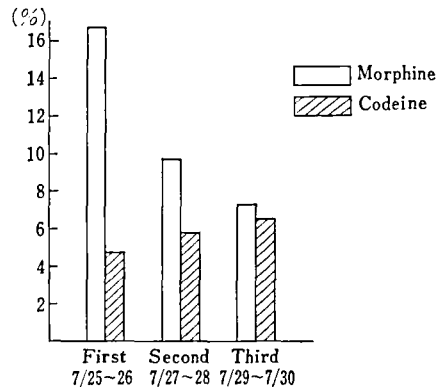


Fig. 4. Morphine and Codeine Content of Opium, cultivated in Hokkaido (Sowing in Spring, 1982)

検量線の作成 標準混液 2, 4 及び 6 ml を正確に量り、それぞれ減圧で蒸発乾固したのち、ビス(トリメチルシリル)アセトアミド (BSA) 0.30 ml を加え、90° の水浴中で10分間加熱する。冷後内部標準溶液 2 ml ずつを正確に加え、その 1 μ l をとり GC を行う。縦軸にはデジタルインテグレーターを用いて得たピーク面積比を、横軸にはモルヒネ及びコデイン量を取り検量線を作成する。

実験結果及び考察

北海道における1981年及び1982年のアヘン収量、モルヒネ及びコデインの含有率は (Table 1) のようである。筑波における1981年の秋播き及び1982年の春播きのケンのアヘン収量、モルヒネ及びコデインの含有率

は (Table 2) に示すようである。

北海道においては過去8年間のアヘン中のモルヒネ含有率が 6.02~15.80% であった²⁾ が、Table 1, Fig. 3, 4 の結果から採汁時期によって、1981年では 13.57~1.25%、1982年では 16.73~7.27% と第1回の切傷に比べて第3回の切傷は激減している。筑波においては (Table 2, Fig. 1, 2) 秋播きの第1回の切り取りではモルヒネ含有率が 21.78% と高く、春播きでは第1回切り取りが 18.3% であるが、第2回以後の切傷では (Fig. 1) のようにモルヒネの含有率が減少している。切傷したあとの乳液中のモルヒネの含有率は、切り取りしたものが追い掻きしたものより、4~5% 高い値を示した。

コデイン含有率は北海道及び筑波の結果とも同様で

切傷回数によってモルヒネほど影響を受けなく、3.3%~6.9%である。増加の率は小さいが、切傷の回を追うごとに含有率が高くなる傾向が見られる。

コデインとモルヒネの比をとると Table 1, Table 2 のようになり、第1回目の切傷ではモルヒネに比べて、コデインは少なく北海道、筑波及び秋播き、春播きにおいても0.4以下であるが、第2回目になると0.4~0.8となり、第3回目になるとコデインがモルヒネより多くなる。各回とも共通して、切り取りより、追い掻きの方が大きい値を示し、コデインからモルヒネが生合成されること³⁾から、切傷された蒴果はモルヒネ生産能力が弱まり、コデインで止まっているためか、コデイン含有率が、4回目の切り取りで6.9%、と最大値を示している。

また MIRAM ら⁴⁾によると蒴果のコデインとモルヒネの比は0.032、Tookey ら⁵⁾によると蒴果は0.42、であるが、切傷すると0.532から0.718に大きくなる

との報告もあり、切傷の効果がコデイン生産に影響を与えている今回の結果と一致する。蒴果中のコデイン、モルヒネの総量は第1回切傷の量から推測されるので、コデイン高含有株、モルヒネ高含有株の選抜は春播き、秋播きの両方とも、第1回切傷時のコデイン、又はモルヒネの含有量の高い株を選抜すればよいと思われる。

文 献

- 1) 川谷豊彦, 藤田早苗之助: 衛試報告, 76, 119 (1958)
- 2) 本間尚治郎, 石崎昌吾, 堀越 司: 衛試報告, 96, 158 (1978)
- 3) E. Brochmann-Hanssen, T. Furuya: *J. Pharm. Sci.*, 53, 575 (1964)
- 4) R. Miram, S. Pfeifer: *Sci. Pharm.*, 27, 34 (1959)
- 5) H. L. Tookey, G. F. Spenger, M. D. Grove, W. F. Kwolek: *Planta medica.*, 30, 347 (1976)

薬用植物の栽培試験 (第13報)

ハナトリカブトの道南, 道北における生育, 収量, 品質について¹⁾

堀越 司・坂東英雄²⁾・本間尚治郎・石崎昌吾

Studies on the Cultivation of Medicinal Plants (XIII)

Growth, Yield and Quality of *Aconitum chinense* Sieb. et Zucc. in Southern and Northern Hokkaido

Tukusa HORIKOSHI, Hideo BANDO, Naoziro HOMMA and Shogo ISHIZAKI

This investigation was carried out at Toyoura-machi, a southern district of Hokkaido and at Nayoro City, a northern district of Hokkaido from Oct., 1977 to Oct., 1978.

1. The growth and yield of *Aconitum chinense* Sieb. et Zucc. grown in Nayoro City, were found to be somewhat superior to that grown in Toyoura-machi, southern Hokkaido. In particular, the dry weight of root tubers M (10~34 g) grown in Nayoro City was two times as much as that grown in Toyoura-machi.

2. On the contrary, the total alkaloid, aconitine and mesaconitine content of the root tubers grown in Southern Hokkaido were somewhat superior to that grown in Northern Hokkaido.

(Received May 31, 1984)

ま え が き

ハナトリカブト *Aconitum chinense* Sieb. et Zucc. の系統並びに収穫年次について、衛生試報第101号 (p. 115~118) に報告したが、今回は道南、道北の比較に

- 1) 日本生薬学会第26回年会 (東京) にて一部発表
- 2) 北海道薬科大学生薬学教室

ついて検討し若干の知見を得たので、その概要を報告する。

材料及び方法

道北名寄2 (北薬試)、畑地 (沖積性砂質壤土) にて1977. 10. 30定植、名寄1 (木田氏) 畑地 (粘質壇壤土) に1977. 10定植と、道南豊浦1 (政田氏)、豊浦2 (西

Table 1. Growth of *Aconitum chinense* Sieb. et Zucc. (1978. 10)

Plot	Plants height (cm)	Hill spread (cm)	Number of stem	Diam. of main stem (mm)	Fresh weight of aerial part (g)
To. 1	52.9	33.3×24.9	1	10.3	257.0
" 2	50.9	32.6×23.8	1	9.3	155.5
Na. 1	45.6	31.9×26.7	1	14.3	167.5
" 2	51.5	31.2×26.9	1	11.3	349.5

Note. To. 1, 2: Toyoura machi (Southern Hokkaido), No. 1, 2: Nayoro city (Northern Hokkaido)

Table 2. Root growth of *Aconitum chinense* Sieb. et Zucc.

Plot	Length (cm)	Spread (cm)	Fresh of weight (g)
To. 1	27.9	22.5×14.5	157.5
" 2	29.0	24.2×16.6	142.9
Na. 1	19.1	19.8×15.4	271.2
" 2	27.8	24.1×17.2	257.4

Table 3. Parent root yield of *Aconitum chinense* Sieb. et Zucc.

Plot	Length (cm)	Diam. (mm)	Number	Fresh weight (g)	Dry weight (g)	Yielding percent (%)
To. 1	7.5	33.8	1	32.5	6.9	21.2
" 2	7.5	27.2	1	20.6	5.7	27.7
Na. 1	11.3	38.7	1	57.6	17.9	31.1
" 2	9.6	36.7	1	49.8	13.7	27.5

Table 4. Daughter root yield of *Aconitum chinense* Sieb. et Zucc.

Plot	Length (cm)	Diam. (mm)	Number	Fresh weight (g)	Dry weight (g)	Yielding percent (%)
To. 1	6.6	25.3	1.9	41.7	14.1	33.8
" 2	5.5	23.1	1.9	40.8	15.8	38.7
Na. 1	4.3	27.2	3.7	55.6	25.2	45.3
" 2	6.7	25.6	3.5	37.8	22.7	60.1

Table 5. Daughter root yield of *Aconitum chinense* Sieb. et Zucc.

Plot	Total dry weight (g)	L Dry weight(g) (Number)	M Dry weight(g) (Number)	S Dry weight(g) (Number)
To. 1	42.3	21.8 (1.4)	16.7 (2.5)	3.8 (1.9)
" 2	47.3	26.7 (1.6)	19.9 (2.6)	0.7 (1.5)
Na. 1	75.5	20.2 (1.2)	52.5 (7.6)	2.8 (2.4)
" 2	68.1	32.4 (2.1)	32.4 (5.5)	3.4 (2.8)

Note. L: fresh weight 35~46 g, M: fresh weight 10~34 g, S: fresh weight less than 9 g

Table 6. T-R ratio of *Aconitum chinense* Sieb. et Zucc.

Plot	Fresh weight of aerial part (T) (g)	Fresh weight of root (R) (g)	T-R ratio (%)	Root weight (g)	Root yielding percent (%)
To. 1	257.0	157.5	61.3	125.0	79.4
" 2	155.5	142.9	91.9	122.3	85.6
Na. 1	167.5	271.2	161.9	213.6	78.8
" 2	349.5	257.4	73.6	207.6	80.7

Table 7. Preparation ratio of Aconite root (*Aconitum chinense* Sieb. et Zucc.)

Plot	Fresh weight (g)	Dry weight (g)	Preparation weight (g)	Preparation ratio (%)
To. 1	41.7	14.1	12.2	86.5
" 2	40.8	15.8	10.4	65.8
Na. 1	55.6	25.2	20.9	82.9
" 2	38.8	22.7	18.9	83.3

Table 8. Alkaloid of Aconite root (*Aconitum chinense* Sieb. et Zucc.)

Plot	Total Alkaloid (%)		Aconitine (%)	Mesaconitine (%)
	L (35~46 g)	M (10~34 g)	M (10~34 g)	M (10~34 g)
To. 1	1.09	1.09	0.03	0.19
" 2	0.85	0.85	0.01	0.03
Na. 1	0.52	0.52	0.01	0.05
" 2	0.77	0.83	0.03	0.01

川) 畑地 (火山灰土壌) にてそれぞれ 1977. 10 定植した。翌年 1978. 10. 16~18 に掘り上げ水洗し調査を行った。

(i) 供試苗は道南は自家産で、道北は北薬試産のものである。

(e) 苗の基準 (北薬試) 根径 21.5~25.7 mm, 根長 5.1~6.7 cm, 根重 15.5~19.0 g

(f) 栽植距離 (北薬試) 畦幅 60 cm, 株間 30 cm の 1 条植。

(g) 肥料 (北薬試), 基肥 kg/2a, 堆肥 1000, IB 化成 20, 追肥変化 15.2, いも化成 15.0 施用

(h) 管理, 中耕 1 回, 除草 5 回, 薬剤散布 2 回実施。

結果及び考察

i) 生育 Table 1 のとおり地上部では特に差異は認められないが, 地上重においては道北 Na. 2 が優り, 地下部は Table 2 のとおり地上部と同様の傾向を示し, 地下重も道北が優っていた。

ii) 収量 Table 3~5 のとおり, 母根, 子根ともに乾重において道北が優る傾向を示し, 特に子根の大

きさ (L, M, S) のうち M (10~34 g) が最も優り, 道北は道南の約 2 倍であった。T-R 率は Table 6 のとおり道北名寄 1 が最高であって, 道南豊浦 1 が最低であった。

なお子根の生産率は 78.8~85.6% であった。

iii) 品質 Table 7 のとおり子根の調製重や調製率については, 道北が道南に若干優る傾向を示した。定量は北海道薬科大学生薬学教室で実施した。Table 8 によれば子根の総アルカロイド, アコニチン, メサコニチン含量は, 生育, 収量の傾向と異なり, 道南が若干優る傾向を示した。なおアコニチンの変動は小さいが, メサコニチンの変動は大きく 0.01~0.19% であって, 道南豊浦 1 が最も高く, 道北名寄 2 が最も低かった。以上のことからハナトリカブトの栽培特に附子生産の面から考えると, 子根を附子とすると, 子根の生産量は, 道北が道南に比し若干有利なようである。更に検討し追究して行きたい。

摘 要

本試験は北海道道南地方の豊浦町と道北地方名寄市

において、1977. 10. 30~1978. 10. 16~18に実施したものである。

1. 生育、収量道北名寄は道南豊浦に比し、生育収量は若干優る傾向を示し、特に子根 M (10~34 g)において約2倍の乾重が得られた。

2. 品質 生育収量とは反対に総アルカロイド、ア

コニチン、メサコニチン含量については、道南が道北に比し若干優る傾向を示した。

本試験遂行にあたり、終始御協力賜りました元西胆振花卉センターの伊藤正一氏に対し、感謝の意を表します。

薬用植物の栽培試験（第14報）

ハナトリカブトの栽植法と生育、収量、品質について¹⁾

堀越 司・坂東英雄²⁾・本間尚治郎、石崎昌吾

Studies on the Cultivation of Medicinal Plants (XIV) Growth, Yield and Quality on the Transplanting Pattern of *Aconitum chinense* Sieb. et Zucc.

Tukasa HORIKOSHI, Hideo BANDO, Naojiro HOMMA and Shogo ISHIZAKI

This investigation was carried out in three locations of Toyoura-cho and in a location of Otaki-mura, South Hokkaido, from Oct. 1977 to Oct. 1978.

1. The fresh weight of top of *Aconitum chinense* Sieb. et Zucco. by one-row planting-A plot was 2.5 times as heavy as that by five-row planting plot, but the fresh weight of roots was heavier in the case of five-row planting-B plot than any other planting plots. The best yield of root tubers was 36.1 g in the range M (10~39 g).

2. The highest total alkaloid contents (1.14~1.21%) were obtained by five-row planting-A plot. Mesaconitine contents were 0.19% and 0.03% in one-row planting-A plot and one-row planting-B plot, respectively.

(Received May 31, 1984)

まえがき

ハナトリカブト *Aconitum chinense* Sieb. et Zucc. の道南、道北における生育、収量、品質について、衛生試報第102号（第13報）に報告したが、今回は栽植法の比較について検討し若干の知見を得たので、その概要を報告する。

材料及び方法

苗は道南産を供試し、1977年10月に道南地方の豊浦町の桜地区と大滝村丸山地区に、それぞれ1条、2条（千鳥）、5条に定植した。畑地は火山灰土壌であって、翌年肥培管理して1978年10月16~18日に掘り上げ水洗調査を行った。

区分は、1条植-A 豊浦町桜地区 政田氏

- 1) 日本生薬学会第26回年会（東京）にて一部発表
- 2) 北海道薬科大学生薬学教室

”	-B	”	西川	
2	”	(千鳥)	”	久保
5	”	-A	大滝村丸山地区	三和氏
”	-B	”	”	”

結果及び考察

i) 生育 Table 1 のとおり、地上部の差異は、2条植（千鳥）が特に草丈が高い他は大差なく、地上部重に差異が認められ、1条植-Aが5条植-Aの2.5倍であった。Table 2 では、地下重は5条植-Bが最高でありながら5条植-Aは最低であった。

ii) 収量 Table 3, 4, 5によれば、母根、子根ともに5条植-Bが他に優り、子根の全乾重では、前記同様5条植-Bが最高の61.8gであったのに反し、5条植-Aは最低の30.6gであった。子根の大きさ別では、M (10~39g)が最高で特に5条植-B 36.1g (4.8ヶ)> 2条植(千鳥) 25.7g (3.7ヶ)> 1条植-B

Table 1. Growth of *Aconitum chinense* Sieb. et Zucc. (1978. 10)

Plot		Plants height (cm)	Hill spread (cm)	Number of stem	Diam. of main stem (mm)	Fresh weight of top (g)
One-row planting plot	A	52.9	33.3×24.9	1	10.3	257.0
"	B	50.9	32.6×23.8	1	9.3	155.5
Two-row planting plot	—	74.7	36.8×29.2	1	11.8	182.5
Five-row planting plot	A	49.2	20.4×18.3	1	12.9	102.0
"	B	54.5	32.8×26.4	1	11.0	177.0

Table 2. Root growth of *Aconitum chinense* Sieb. et Zucc.

Plot		Length (cm)	Spread (cm)	Fresh of weight (g)
One-row planting plot	A	27.9	22.5×14.5	157.5
"	B	29.0	24.2×16.6	142.9
Two-row planting plot	—	23.9	21.1×14.9	176.3
Five-row planting plot	A	27.2	17.0×12.9	128.2
"	B	25.9	22.2×14.1	210.0

Table 3. Parent root yield of *Aconitum chinense* Sieb. et Zucc.

Plot		Length (cm)	Diam. (mm)	Number	Fresh weight (g)	Dry weight (g)	Yield (%)
One-row planting plot	A	7.5	33.8	1	32.5	6.9	21.2
"	B	7.5	27.2	1	20.6	5.7	27.7
Two-row planting plot	—	9.3	35.9	1	43.2	11.2	25.9
Five-row planting plot	A	8.8	35.4	1	43.5	12.8	29.4
"	B	9.5	33.8	1	48.5	15.7	32.4

Table 4. Daughter root yield of *Aconitum chinense* Sieb. et Zucc.

Plot		Length (cm)	Diam. (mm)	Number	Fresh weight (g)	Dry weight (g)	Yield (%)
One-row planting plot	A	6.6	25.3	1.9	41.7	14.1	33.8
"	B	5.5	23.1	1.9	40.8	15.8	38.7
Two-row planting plot	—	5.1	23.9	2.4	44.8	17.1	38.5
Five-row planting plot	A	6.2	22.9	1.6	31.7	10.2	32.2
"	B	5.8	25.2	2.7	51.7	20.7	40.0

Table 5. Daughter root yield of *Aconitum chinense* Sieb. et Zucc.

Plot		Total dry weight (g)	L Dry weight (g) (Number)	M Dry weight (g) (Number)	S Dry weight (g) (Number)
One-row planting plot	A	42.3	21.8 (1.4)	16.7 (2.5)	3.8 (1.9)
"	B	47.3	26.7 (1.9)	19.9 (2.6)	0.7 (1.5)
Two-row planting plot	—	51.4	22.8 (1.5)	25.7 (3.7)	2.9 (2.0)
Five-row planting plot	A	30.6	12.8 (1.0)	15.1 (2.4)	2.7 (1.3)
"	B	61.8	23.5 (1.3)	36.1 (4.8)	2.2 (2.0)

Note. L: fresh weight 35~46g, M: fresh weight 10~34g, S: fresh weight less than 9g

Table 6. T-R ratio of *Aconitum chinense* Sieb. et Zucc.

Plot		Fresh weight of top (T)(g)	Fresh weight of root (R)(g)	T-R ratio (%)	Root weight (g)	Root yield (%)
One-row planting plot	A	257.0	157.5	61.3	125.0	79.4
"	B	155.5	142.9	91.9	122.3	85.6
Two-row planting plot	—	182.5	176.3	96.6	133.1	75.7
Five-row planting plot	A	102.0	128.2	125.7	85.0	66.3
"	B	177.0	210.0	118.6	161.5	76.9

Table 7. Preparation ratio of Aconite root (*Aconitum chinense* Sieb. et Zucc.)

Plot		Fresh weight (g)	Dry weight (g)	Preparation weight (g)	Preparation ratio (%)
One-row planting plot	A	41.7	14.1	12.2	86.5
"	B	40.8	15.8	10.4	65.8
Two-row planting plot	—	44.4	17.1	12.9	75.4
Five-row planting plot	A	28.3	10.2	9.1	89.2
"	B	53.8	24.0	17.1	71.3

Table 8. Alkaloid of Aconite root (*Aconitum chinense* Sieb. et Zucc.)

Plot		Total Alkaloid (%)		Aconitine (%)	Mesaconitine (%)
		L (40~46 g)	M (10~39 g)	M (10~39 g)	M (10~39 g)
One-row planting plot	A	1.09	1.09	0.03	0.19
"	B	0.85	0.85	0.01	0.03
Two-row planting plot	—	0.74	0.72	0.02	0.09
Five-row planting plot	A	1.14	1.21	0.05	0.18
"	B	1.09	0.97	0.04	0.07

は 19.9g (2.6ヶ) であって、他は大差ない。Table 6 の T-R 率についてみると、最高は 5 条植-A の 125.7 % であって、最低は 1 条植-A の 61.3% であった。なお子根の生産率は 1 条植-B が最高の 85.6% で、最低は 5 条植-A の 66.3% であった。

iii) 品質 Table 7 のとおり子根の調製量は 5 条植-B が最高の 17.1g で、最低は 5 条植-A の 9.1g であった。調製率は 5 条植-A の 89.2% が最高で、最低は 1 条植-A の 65.8% であった。

定量は北海道薬科大学生薬学教室で実施した Table 8 によれば、総アルカロイド、アコニチン、メサコニチン含量は概して、5 条植-A が高く、2 条植 (千鳥) の総アルカロイド含量は最低で、アコニチン、メサコニチン含量は 1 条植-B が最低であった。前報同様にメサコニチン含量の変動は大きく、最高 0.19% (1 条植-A) で、最低 0.03% (1 条植-B) であった。

以上のことから植付法による差異は特に認め難いが、

個々の差異については畑地の立地条件や肥培管理等によるものと考えられるので、更に検討を加え追究して行きたい。

摘 要

本試験は北海道道南地方の豊浦町 3ヶ所と大滝村の 1箇所において 1977年 10月 から 1978年 10月に実施したものである。

1. 生育収量 生育は地上部重では 1 条植-A は 5 条植-A の 2.5 倍であったが、地下重では 5 条植-B が他に優っていた。収量は 5 条植-B が優り、特に子根の大きさ別 M (10~39g) では、36.1g (4.8ヶ) と最も優っていた。

2. 品質 生育収量とは反対に総アルカロイド含量は 5 条植-A が最も高く (1.14~1.21%)、メサコニチン含量は前報同様に変動は大きく、1 条植-A は 0.19% で、1 条植-B が 0.03% であった。

本試験遂行にあたり、終始御協力賜りました元西 ます。
胆振花卉センターの伊藤正一氏に対し感謝の意を表し

国立衛生試験所リゾチーム標準品 (Control 831)

谷本 剛・福田秀男・木村俊夫・山羽 力

Lysozyme Reference Standard (Control 831) of National Institute
of Hygienic Sciences

Tsuyoshi TANIMOTO, Hideo FUKUDA, Toshio KIMURA and Tsutomu YAMAHA

The tenth "Lysozyme Reference Standard" (Control 831) of the National Institute of Hygienic Sciences was prepared. The lysozyme potency of the standard material was assayed against the 9th "Lysozyme Reference Standard" (Control 811) by turbidimetry using the dry-cell of *Micrococcus luteus* as the substrate and by fluorometry using 4-methylumbelliferyl tetra-N-acetyl- β -chitotetraoside as the substrate. The potency of the lysozyme reference standard thus obtained was defined as 1 mg [potency] per mg.

(Received May 31, 1984)

国立衛生試験所リゾチーム標準品 (Control 831) (第10回) 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 811) を対照として、*Micrococcus luteus* に対する溶菌作用に基く濁度法と 4-methylumbelliferyl tetra-N-acetyl- β -chitotetraoside (4-MU-(GlcNAc)₄) を基質にした蛍光法とによって測定した。

I-1 試液

(1) リン酸塩緩衝液: 既報¹⁾ の方法にしたがって調製した。

(2) クエン酸緩衝液: 0.1M クエン酸溶液 50 ml に 0.2N 水酸化ナトリウム試液を加えて pH 5.2 に調整したのち、水を加えて正確に 100 ml とする。

(3) 基質液 A: *Micrococcus luteus* 乾燥菌体 (生化学工業社製) を用いて、既報¹⁾ の方法にしたがって調製した。

(4) 基質液 B: 4-MU-(GlcNAc)₄ (ミドリ十字社製) 18.5 mg に水を加えて溶かし、正確に 50 ml とする。

I-2 力価測定法

(1) 方法-1 (濁度法, 2-2 用量測定法)

標準品原料及び標準品の約 50 mg (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 とし、それぞれを試料原液及び

標準品原液とする。以下、基質液 A を用いて既報²⁾ の定量法-1 の方法にしたがって測定した。

(2) 方法-2 (濁度法, 1-1 用量測定法)

方法-1 にしたがって試料原液及び標準品原液を調製する。以下、基質液 A を用いて日本薬局方外医薬品成分規格³⁾ に記載された定量法にしたがって測定した。

(3) 方法-3 (蛍光法)

標準品原料及び標準品の約 50 mg (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 0.01M リン酸塩緩衝液 (pH 6.2) を加えて正確に 50 ml としたものを試料溶液及び標準品溶液とする。試験管に基質液 B 0.2 ml とクエン酸緩衝液 2.6 ml を加え、35° で 5 分間予温した後、0.2 ml の試料溶液、標準品溶液及び 0.01M リン酸塩緩衝液 (pH 6.2) を先のそれぞれ別の試験管に加えて 35° で反応を開始し、30 分後に励起波長 320 nm、蛍光波長 445 nm における蛍光強度を測定し、それぞれの蛍光強度を F_T 、 F_S 及び F_0 とする。

試料 1 mg 中のリゾチーム量は次式で算出する。

$$\text{試料 1 mg 中のリゾチーム量 (mg[力価]/mg)} \\ = \frac{F_T - F_0}{F_S - F_0} \times \frac{\text{採取した標準品の乾燥物重量(mg)}}{\text{採取した試料の乾燥物重量(mg)}}$$

I-3 測定結果

3 種の力価測定法で測定したリゾチーム標準品原料 1 mg 当たりのリゾチーム量 (mg[力価]) を Table 1 に示した。方法-1 及び 2 は 10 回の、方法-3 は 8 回の

Table 1. Potency of the material for lysozyme standard

Exp. No.	Potency [mg(potency)/mg]		
	Turbidimetry		Fluorometry
	Method-1	Method-2	Method-3
1	1.051	1.035	1.013
2	1.035	1.042	1.038
3	1.011	1.022	1.002
4	0.949	1.000	1.033
5	1.029	1.028	1.013
6	1.017	1.054	1.012
7	1.022	1.019	1.010
8	0.990	0.963	0.998
9	1.003	1.024	
10	1.044	0.999	
Mean ±S. D.	1.015 ±0.0297	1.019 ±0.0259	1.015 ±0.0139

Table 2. Amino acid composition of the material for lysozyme standard

Amino acid	Amino acid residues per mole of lysozyme		
	Material	Lysozyme standard	Reference ⁵⁾
Lys	6.02	6.04	6
His	1.03	1.04	1
Arg	11.32	11.27	11
Asp	20.63	20.73	21
Thr*	6.81	6.81	7
Ser*	9.00	9.03	10
Glu	5.06	5.08	5
Pro	2.14	2.15	2
Gly	12.09	12.10	12
Ala	12.30	12.22	12
Cys	1.57	1.55	8
Val	5.74	5.76	6
Met	2.00	2.00	2
Ile	5.63	5.64	6
Leu	8.00	8.00	8
Tyr	3.05	3.15	3
Phe	3.03	3.05	3

* Uncorrected

繰り返し実験の結果から、いずれの測定方法においても、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。

Table 3. Loss on drying of the material for lysozyme standard

Exp. No.	Loss on drying (%)	
	Material	Lysozyme standard
1	1.88	3.45
2	2.02	3.65
3	2.05	3.07
4	2.05	3.77
Mean ± S. D.	2.00 ± 0.081	3.48 ± 0.307

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、リゾチーム標準品のそれと比較した。アミノ酸分析は Spackman らの方法⁴⁾にしたがって行った。すなわち、リゾチーム標準品原料約2mgを硬質試験管にとり、6N塩酸1.5mlを加えて減圧下で封管し、これを110°で24時間加熱して加水分解した。加水分解後、内容を水浴上で乾固し、残留物について835型日立高速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のそれともよく一致した (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、一般に蛋白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の乾燥減量はそれぞれ2.00%及び3.48%であった (Table 3)。

ま と め

国立衛生試験所標準品第10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のリゾチーム標準品を対照として測定したところ、濁度法で測定した力価は標準品原料1mg当たり1.015±0.0297mg [力価] (方法-1)及び1.019±0.0259mg [力価] (方法-2)であり、蛍光法での力価は標準品原料1mg当たり1.05±0.0139mg [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2.00%であり、前回のリゾチーム標準品のそれと比べて若干低かった。標準品原料のアミノ酸組成はリゾチーム標準品のそれと差はなく、またシスチンを除いて文献

値ともよく一致した。これらの結果から、本標準品原料を国立衛生試験所標準品第10回“リゾチーム標準品”(Control 831)とし、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：衛生試報，98，87 (1980)

- 2) 谷本 剛ら：衛生試報，96，98 (1978)
- 3) 厚生省薬務局審査課監修：日本薬局方外医薬品成分規格，p.73 (1982)
- 4) D. H. Spackman, W. H. Stein and S. Moore: *Anal. Chem.*, 30, 1190 (1958)
- 5) R. E. Canfield: *J. Biol. Chem.*, 238, 2691 (1963)

塩ビ食品衛生協議会が提案したポリ塩化ビニル製食品容器包装中のジブチルスズ化合物のガスクロマトグラフィーによる試験法の検討

山崎 壮・石綿 肇・谷村顕雄

Study on the Gas Chromatographic Determination of Dibutyltin Compounds in Food Containers and Packing Materials made of Polyvinyl Chloride, Which was proposed by Japan Hygienic PVC Association

Takeshi YAMAZAKI, Hajimu ISHIWATA and Akio TANIMURA

A gas chromatographic method was proposed by Japan Hygienic PVC Association for the determination of dibutyltin compounds in food containers and packing materials made of polyvinyl chloride (PVC), as an alternative to the present method by paper chromatography. The outline of the method is as follows: 1) extraction from samples with carbontetrachloride-methanol (2:1) mixture under reflux, 2) conversion of alkyltin compounds into their chloride derivatives by shaking extracts with 1N hydrochloric acid, 3) clean-up using Florisil columns, 4) gas chromatography using a OV-17 column.

We analyzed dibutyltin compounds in some PVC products according to the method. The method was used with a minor modification. The main modified steps were as follows: 1) Insoluble matters in hexane were removed before Florisil column chromatography. 2) The concentration of hydrochloric acid in the hydrochloric acid-acetone mixture, which is injected together with sample solutions into a gas chromatograph, was heightened.

(Received May 31, 1984)

ポリ塩化ビニル (PVC) には、品質劣化を防止するために di-*n*-octyltin maleate polymer, di-*n*-octyltin bis (isooctylthioglycolate), di-*n*-octyltin dilaurate などが、樹脂 100 部に対して 1.5~3 部配合されている。しかし、有機スズ化合物には毒性の比較的高いものもあり、わが国では食品用 PVC へのジブチルスズ化合物の使用は自主規制¹⁾されている。また、食品衛生法においても材質規格及び試験法が定められている²⁾。PVC 中のジブチルスズ化合物の試験法としては、試料を四塩化炭素-メタノール (2:1) 混液で還流し、ろ紙クロマトグラフィーで定性試験を行う方法を採用しており、この時の確認限度はジブチルスズ化合物として約 100 ppm である。しかしながら、現行法では疑似スポットの認められる製品が少なくないため、更に

薄層クロマトグラフィー又はポーラログラフィーなどでジブチルスズ化合物の確認を行う必要がある。

以上の事から、新たな材質試験法が必要とされ、竹内らの方法³⁾に基づいたガスクロマトグラフィー (GC) による試案⁴⁾が塩ビ食品衛生協議会 (塩食協) から提案された。試案の概要は、試料 10g を前記混液で還流し、Florisil カラムでクリーンアップした後、GC でジブチルスズ化合物を定性、定量するものである。

我々はこの試案を基に、食品衛生法適合品、不適合品、及び現行法による疑似スポット検出品についての応用性、並びに各分析ステップ毎の追試と検討を行った。その結果、試案に若干の修正を加えれば適用可能であると考えられた。

実験方法

1. 試料

塩食協から厚生省に提出された PVC 試料5検体(試料 No. 1~5)と市販製品(試料 No. 6, 7). その内訳は以下の通りである.

試料 No. 1: 現行試験法で疑似スポット検出品. ジブチルスズ化合物は不配合.

試料 No. 2: 告示20号合格品(硬質 PVC)

試料 No. 3: 告示20号合格品(軟質 PVC)

試料 No. 4: ジブチルスズ検出品(告示20号不合格)

試料 No. 5: ジブチルスズ配合品(非食品用)

試料 No. 6: 市販の硬質 PVC 容器(食品包装容器, 卵ケースなど複数種を細切後に混合して1検体とした.)

試料 No. 7: 市販の軟質 PVC ラップ

2. ガスクロマトグラフィー

ガスクロマトグラフ: Yanaco G-80, FID 付(柳本製作所)

カラム: 2% OV-17 on Gas-chrom Q, 2 m × 3 mm. カラムは1日の分析終了後常にシラン処理した⁵⁾.

カラム温度: ①恒温分析 145° 又は 150°, ②昇温分析 120° $\xrightarrow{6^\circ/\text{min}}$ 280° $\xrightarrow{15 \text{ min}}$ 280°

注入口及び検出器の温度: 250°

窒素流量: 25 ml/min.

3. 試験方法

塩食協から提案された試案⁴⁾(塩食協案)を改良し, 以下の方法を用いた.

試料 5g を細切し, 300 ml ナスフラスコに入れた. 四塩化炭素-メタノール(2:1)混液 150 ml を加え, 水浴中で4時間還流した. 冷後, 抽出液をろ過した. 四塩化炭素-メタノール(2:1)混液 50 ml で抽出残渣をすすぎ, ろ液と合わせ, ロータリーエバポレーターで蒸発乾固した(水浴の温度は 30° 以下. 以後も同様). 得られた残留物をジエチルエーテル(エーテル) 100 ml を用いて 300 ml の分液漏斗に移し, 1N 塩酸 100 ml を加えて5分間激しく振り混ぜて, アルキルスズ化合物を塩化物にした. 静置後, エーテル層を取り, 無水硫酸ナトリウムを加えて脱水を行った. それをロータリーエバポレーターで蒸発乾固した. 残留物をヘキサン 10 ml を用いて遠沈管に移し, 2500 rpm で5分間遠心して上澄液を取った. 沈殿にヘキサン 5 ml を加えてかくはん後, 再び遠心して上澄液を取った. 上澄液は Florisil カラム*1)にのせ, ヘキサン-エーテル(75:25)混液 100 ml を流した. 次に, ヘキサン-エー

テル-酢酸(75:25:1)混液 100 ml を流し, この画分を分取してロータリーエバポレーターで蒸発乾固した. 残留物にヘキサンを加えて 5 ml とし, 試験溶液とした. 試験溶液 2 μ l, 次いで, 塩酸-アセトン(5:95)混液*2) 1 μ l をマイクロシリンジにとり, ガスクロマトグラフに注入した. 分析は恒温分析でも昇温分析でもよい. ただし, 恒温分析の場合は, 数回の試験溶液注入毎にカラムを 280° で空焼きし, その後 dibutyltin dichloride (DBTCl₂) 溶液の注入を数回繰り返してカラムの平衡状態を得る必要があった.

結果及び考察

1. PVC 抽出物の塩酸処理について

PVC 中のアルキルスズ化合物は, エステル, アンル基, 水酸基, 酸素など種々の配位子が結合した形で存在している. それで, PVC 抽出物をヘキサンに溶かした後, 1N 塩酸で処理してそれらを全て塩化物に変えて分析する方法が塩食協案では採用されている. その際の抽出物を溶かす溶媒としてはヘキサンよりもエーテルのほうがよかった. PVC 抽出物中にはヘキサン不溶物が多く, その大半はエーテル可溶であったからである.

2. Florisil カラムクロマトグラフィーによるクリーンアップについて

PVC 製品中の butylhydroxytoluene (BHT), iso-octylthioglycolate (IOTG) がガスクロマトグラム(カラム: OV-17)上で dibutyltin dichloride (DBTCl₂) と明確に分離しないこと⁴⁾, 多量の可塑剤が DBTCl₂ よりかなり遅れて溶出してくること³⁾などの理由から, クリーンアップが必要とされている. そこで, クリーンアップが塩食協案でうまくいくかどうかを確かめた. なお, 2% OV-17, 2 m のカラムを用いてガスクロマトグラム上の挙動を調べたところ, IOTG, BHT, DBTCl₂ の順で溶出し, IOTG は DBTCl₂ とベースライン分離した. それで, IOTG については今回検討しなかった.

(1) 試料の前処理

塩食協案では, 塩酸処理後の有機層について溶媒を留去してヘキサンに再溶解し, 無水硫酸ナトリウムを重層した Florisil カラムにのせることになっている. しかし, その方法では, 試料をヘキサンに再溶解した際に多量の白色不溶物を生じ, カラムを詰まらせた.

*1: Florisil (和光純薬) を 130° で3時間加熱活性化した後, 3g をヘキサンに懸濁させてガラスカラム(内径 1 cm, 長さ 20 cm)に充てんした.

*2: 塩酸-アセトン混液は用時調製した.

Table 1. Effect of addition of hydrochloric acid on detection of DBTCl_2 by gas chromatography

column temperature	concentration of hydrochloric acid ¹⁾	relative peak height of DBTCl_2 ²⁾	relative peak area of DBTCl_2 ²⁾
145°	1%	100 (basis)	100 (basis)
145°	5%	112	98
145°	10%	119	105
145°-280° ³⁾	1%	no peak	no peak
145°-280°	5%	87	84
145°-280°	10%	107	106

- 1) One microliter of 100 $\mu\text{g/ml}$ DBTCl_2 in hexane and 1 μl of hydrochloric acid-acetone mixture were injected together into a gas chromatograph. The concentrations of hydrochloric acid in the hydrochloric acid-acetone mixtures are shown in the Table.
- 2) The figures are expressed in values relative to the result of the isothermal analysis at 145° using 1% hydrochloric acid solution.
- 3) The column temperature was retained at 145° until DBTCl_2 was eluted, and then the temperature increased to 280°.

また、重層した無水硫酸ナトリウムが固化し、これも溶媒の流れを悪くした。更に、白色不溶物はヘキサノール-酢酸画分に溶出し、この画分をヘキサノールに再溶解した時に再度多量の不溶物を生じた。したがって、試料をカラムにのせる前に脱水し、かつ、ヘキサノール不溶物を遠心分離して除くほうがよいと考える。

なお、試料の採取量を 5g にすることによって沈殿の量が少なくなり、以後の操作が更にやりやすくなった。

(2) 溶出における挙動

試料を多量に用意できる市販製品 (試料 No. 6, No. 7) を用いて、 DBTCl_2 及び妨害物質の Florisil カラムからの溶出挙動を調べた。PVC 製品の抽出時にジブチルスズ化合物として dibutyltin maleate monomer 又は DBTCl_2 を PVC 10g に対して 100 ppm, 500 ppm の 2 通りに添加した。更に、トリブチルスズ化合物がジブチルスズ化合物の不純物として混入することも考えられるので、tributyltin chloride (TBTCI) を 100 ppm, 500 ppm 添加した。また、BHT も 100 ppm, 500 ppm 添加した。上記物質を添加しない場合と比較しながら上記物質の溶出挙動を調べた。

Florisil カラムにはヘキサノール 30 ml (試料をカラムにのせるために用いた 15 ml も含む)、ヘキサノール-エーテル混液 100 ml、ヘキサノール-エーテル-酢酸 (75:25:1) 混液 100 ml の順で流した。その際、ヘキサノール-エーテル混液の混合比を (85:15), (80:20), (75:25), (67:33) のいずれかにし、比較した。

ヘキサノール画分には BHT と、軟質 PVC に多量に含まれている可塑剤の大半が溶出した。ヘキサノール-エーテル画分には TBTCI の一部が溶出した。ヘキサノール-

Table 2. Recovery test of DBTCl_2

sample No.	DBTCl_2 ¹⁾ added	DBTCl_2 found	recovery
1	0.5 mg	0.53 mg	106%
2	0.5 mg	0.58 mg	116%
3	0.5 mg	0.54 mg	108%

- 1) DBTCl_2 (0.5 mg) was added to the extraction solvent for 5g of a PVC sample before reflux.

エーテル-酢酸画分には DBTCl_2 と残りの TBTCI が溶出した。ヘキサノール-エーテルの混合比に関係なく、 DBTCl_2 はヘキサノール-エーテル-酢酸画分のみに回収された。しかもこの画分にはガスクロマトグラム上で DBTCl_2 のピークに対する妨害物質は認められなかった。なお、この後更にエーテル-酢酸 (100:1) 混液を流したが、 DBTCl_2 、TBTCI の溶出は認められなかった。

DBTCl_2 は酢酸で強引に溶出させるが、それだけ強く Florisil に吸着されていると考えられる。そのため、妨害物質を洗い出す溶出溶媒 (ここではヘキサノール-エーテル混液) の多少の極性変動では DBTCl_2 の溶出挙動に影響が出ないと考えられる。したがって、Florisil はロットによって吸着活性に差があるとよくいわれているものの、 DBTCl_2 の溶出は Florisil の活性の差の影響を受けにくいと考えられる。

クリーンアップという点からは、 DBTCl_2 を溶出させる前に流す溶媒は DBTCl_2 が溶出しな範囲でできるだけ極性の高いものを用いたほうがよいと考えられる。溶出条件は今後更に検討する必要がある。

3. 塩酸-アセトン混液の塩酸濃度

ガスクロマトグラフィーの際、 DBTCl_2 はカラム担

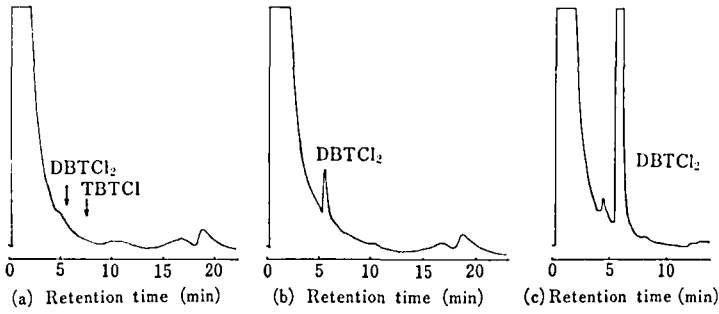


Fig. 1. Gas chromatograms of PVC samples

(a) sample No. 2, (b) the sample that 0.5 mg of DBTCl_2 was added to the extraction solvent for 5 g of sample No. 2 before reflux, (c) sample No. 4

column temperature: 150° (isothermal)

The arrows indicate the retention times of DBTCl_2 and TBTCI .

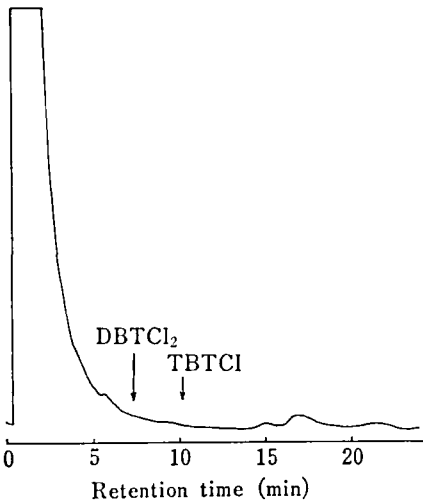


Fig. 2. Gas chromatogram of PVC sample No. 1

column temperature: 145° (isothermal)

The arrows indicate the retention times of DBTCl_2 and TBTCI .

体に吸着されやすいため、 DBTCl_2 溶液と同時に塩酸を注入すると吸着が抑えられることが報告されている^{3,4)}。そこで、 DBTCl_2 溶液と同時に注入する塩酸-アセトン混液の塩酸濃度と DBTCl_2 のピークの大きさや高さとの関係を検討した。結果を Table 1 に示す。

恒温分析では、塩酸濃度を上げるほうがピークがシャープになった。

PVC 抽出物を Florisil カラムでクリーンアップ後も、ガスクロマトグラム上で DBTCl_2 よりかなり遅れて溶出する多量の未知成分が依然含まれていた。

Table 3. Determination of dibutyltin compounds in PVC samples

sample No.	the present method	GC method
1	±	-
2	-	-
3	-	-
4	+	+
5	+	+

+: DBTCl_2 was detected.

-: DBTCl_2 was not detected.

±: A false spot was detected by paper chromatography.

dioctyltin dichloride もそこに含まれる。そのため、ガスクロマトグラフィーを恒温分析で連続して行う場合、それらが後の試料の分析を妨害する場合があった。したがって、昇温分析を採用するか、または恒温分析を行う場合はカラムを時々空焼きする必要があった。そこで、昇温分析を想定して、試料の注入、溶出毎にカラム温度を 280° に昇温させた場合も検討した。その結果、塩酸濃度が低いと DBTCl_2 のカラムへの吸着が多かった。カラムを高温にすると、それまでの DBTCl_2 の吸着性の平衡状態がくずれ、 DBTCl_2 が吸着されやすくなったものと考えられる。

塩酸はガスクロマトグラフの腐食を招くので、使用量は抑えることが望ましい。したがって、塩酸-アセトン混液は (5:95) の混合比のものを用いることにした。

4. 添加回収実験

試料 No. 1~3 の 3 検体に対して 100ppm の DBTCl_2 を抽出時に添加し、「試験方法」に記した方法で分析

した。その結果を Table 2 に示す。なお、試料 No. 1~3 は Table 3 に示す通り、ジブチルスズ化合物は配合されていない。DBTCl₂ の添加回収率は充分に満足し得るものであった。

5. 塩食協から提出された試料の分析

塩食協から厚生省に提出された PVC 試料 5 検体 (試料 No. 1~5) を「試験方法」に記した方法で分析した。告示20号合格品 (試料 No. 2) と不合格品 (試料 No. 4) のガスクロマトグラムを Fig. 1 に示す。PVC 製品の DBTCl₂ の規格は 100 ppm 以下となっているが、試料 No. 2 に 100 ppm の DBTCl₂ を添加した試料のガスクロマトグラム (Fig. 1(b)) と比較すれば明らかなように、ジブチルスズ化合物配合の有無の判定は容易である。現行試験法で疑似スポットを生ずる試料 No. 1 についてもガスクロマトグラム上で DBTCl₂ に一致するピークは認められなかった (Fig. 2)。この点は現行試験法よりもすぐれている。5 検体の判定結果を Table 3 に示す。

結 論

塩ビ食品衛生協議会から提案のあった試案について追試、検討した結果、一部改良することによって PVC 中のジブチルスズ化合物の材質試験法として利用できると考えられた。改良法は「試験方法」に示した。この方法は、現行試験法で疑似スポットを生ずる試料にも適用でき、また、現行試験法で合格する試料についても新たな問題点の派生は認められなかった。

文 献

- 1) 塩ビ食品衛生協議会：塩化ビニル樹脂製食品容器包装等に関する自主規制基準 (PL 規格改訂第7版), 1982. 3.
- 2) 厚生省告示第20号, 1982. 2. 16.
- 3) 竹内正博, 伊藤弘一, 森謙一郎, 原田裕文: 東京衛研年報, 28-1, 69 (1977)
- 4) 塩ビ食品衛生協議会会報, 64, 1 (1983)
- 5) G. K. H. Tam, G. Lacroix, J. F. Lawrence: J. Chromatogr., 259, 350 (1983)

マーマレード、ジュース中のオルトフェニルフェノールの定量

川崎洋子・酒井綾子・山田 隆・谷村顕雄

Determination of *o*-Phenylphenol (OPP) in Marmalade and Juice

Yoko KAWASAKI, Ayako SAKAI, Takashi YAMADA and Akio TANIMUMA

Determination of *o*-phenylphenol (OPP) in marmalade, orange and grapefruit juice samples were carried out by gas chromatography with a FID detector. It was observed that 8 samples of marmalade contained OPP (0.1~0.34 ppm). Amounts of OPP in the juice samples were below the detection limit (0.05 ppm).

(Received May 31, 1984)

オルトフェニルフェノール (OPP) は、昭和52年4月に食品添加物として指定許可された。レモン、オレンジ、グレープフルーツ等の防ばい剤として 10 ppm の限度で使用されている。OPP は果肉中よりは果皮に多く残留するものと考えられる。通常は果皮は食用に供しないが、一部の食品、例えばマーマレード等には果皮も使用される。そこで市販のマーマレード、ジュース等について OPP を測定した。

実 験 方 法

「食品中の食品添加物分析法」¹⁾ に従い、精油定量装置を用いて抽出後、ガスクロマトグラフィーで定量し

た。

ガスクロマトグラフ：ヒューレット・パッカード製 5710A型 (FID 検出器付き)、カラム：OV 101 3 mm i. d. × 1.8 m, カラム温度：180°

結 果 及 び 考 察

この定量法による添加回収率はジュースに 1 ppm 添加したとき 94%、マーマレードに 0.2 ppm を添加したとき 68% であった。市販のマーマレード25種類 (輸入品13種類, 国産12種類) の分析結果を Table 1 に示した。検出限界 (0.05 ppm) 以下のもの17検体、最高 0.34 ppm であった。

Table 1. Contents of OPP in Marmalade and Juice

Sample	Country	OPP (ppm)	Sample	Country	OPP (ppm)
A	Switzerland	nd	N	Japan	0.31
B	England	nd	O	Japan	0.21
C	England	nd	P	Japan	0.17
D	England	nd	Q	Japan	0.11
E	England	nd	R	Japan	0.10
F	England	nd	S	Japan	nd
G	England	nd	T	Japan	nd
H	England	nd	U	Japan	nd
I	England	nd	V	Japan	nd
J	U. S. A.	0.27	W	Japan	nd
K	U. S. A.	Tr	X	Japan	nd
L	France	0.34	Y	Japan	nd
M	France	nd			

nd < 0.05 ppm, 0.05 ppm ≤ Tr < 0.1 ppm

オレンジ、グレープフルーツのジュース5検体を分析した結果はすべて検出限界以下であった。

手塚らは1981年にマーマレード97検体を分析して7検体から0.1~0.3 ppmのOPPを検出したが、WHOの1日許容摂取量1.0 mg/kgを大幅に下まわっていると報告しているが²⁾、今回の我々の結果もほぼ同様

の結果であった。

文 献

- 1) 厚生省環境衛生局食品化学課編: 食品中の食品添加物分析法, p. 193~199 (1982), 講談社
- 2) 手塚洋子ら: 食品衛生研究, 31, 141 (1981)

たらこの亜硝酸塩処理とニトロソアミン量について

川崎洋子・山崎 壮・山本 都・山田 隆・谷村顕雄

Determination of Nitrosamines in Salted Pollack Roe treated with Nitrite

Yoko KAWASAKI, Takeshi YAMAZAKI, Miyako YAMAMOTO,
Takashi YAMADA and Akio TANIMURA

Determination of nitrosodimethylamine (NDMA) in salted pollack roe treated with nitrite was carried out with a gas chromatograph with a TEA detector. It was observed that the amounts of NDMA in the roe did not increase by treatment with nitrite. Analyses of 30 commercial salted pollack roe samples, found NDMA below the determination limit was found in 3 samples, 0.5~2.0 ppb in 11 samples, 2.0~3.0 ppb in 13 samples, and above 3.0 ppb in 3 samples. The maximum content of NDMA was 4.1 ppb.

(Received May 31, 1984)

亜硝酸塩は発色剤として食品に添加することが許可されており、その対象食品は食肉製品及び魚卵の一部である。今回、我々は、たらこ(スケトウダラの卵巣を塩蔵したもの)に亜硝酸塩を使用した場合ニトロソ

ジメチルアミン(NDMA)の量にどのような影響を及ぼすかについて実験を行い、若干の知見をえたので報告する。なお、たらこに関しては昭和58年8月27日より添加が認められている。

Table 1. Nitrite, dimethylamine, and nitrosodimethylamine contents in salted pollack roe

Contents in Brine		Contents in Pollack Roe Refrigerated for						
NO ₂ ⁻ *1	Asc.*2	0 day				10 days		
		NO ₂ ⁻ (ppm)	Amine (ppm)	NDMA*3 (Raw) (ppb)	NDMA*3 (Broil)*5 (ppb)	NO ₂ ⁻ (ppm)	Amine (ppm)	NDMA*3 (Raw) (ppb)
0	0	0.14	29.8	ND**4	ND	0.05	87.0	0.5
6.9	0	2.25	25.8	ND	1.0	0.16	31.6	ND
6.9	1	3.10	26.5	ND	ND	0.16	30.0	ND
6.9	2	2.43	48.5	ND	1.8	0.30	25.5	0.5
11.9	0	5.61	33.0	ND	1.3	0.23	34.2	0.6
11.9	1	5.28	18.7	ND	1.0	0.18	79.5	ND
11.9	2	5.46	20.8	ND	ND	0.22	21.6	ND

*1 ppm in brine for pollack roe

*2 ascorbic acid molecular ratio to nitrite

*3 nitrosodimethylamine

*4 not detected (below 0.5 ppb)

*5 broiled to an edible state on a gas range

実験方法

1. 試料：試料に用いたたらこは特に記さない場合は漁獲後冷凍し、北海道立中央水産試験場で食塩、亜硝酸塩等で処理したものをを用いた。

2. 器具及び装置

ガスクロマトグラフ：Shimadzu GC-6AM (島津製作所)

検出器：熱エネルギー検出器 TEA-502 (Thermo Electron Co.)

高速液体クロマトグラフ：Shimadzu-LC-3 (島津製作所)，検出器：Shimadzu Fluorescence Spectro Monitor RF-530

3. 方法

ガスクロマトグラフィー条件：カラム：10% PEG 20M on Gas-chrom P, 1.5 m×3 mm i. d.

カラム温度：110°

ニトロソアミンの抽出及び定量は、アルカリ性で水蒸気蒸留した後ジクロロメタンで抽出した。それを濃縮し、熱エネルギー検出器付ガスクロマトグラフで定性、定量を行った²⁾。

亜硝酸イオンの定量は、温湯抽出後硫酸亜鉛を用いて除タンパクし、ジアゾ発色により比色定量した²⁾。

第二アミンの定量は、7-クロロ-4-ニトロベンゾ-2-オキサ-1,3-ジアゾール (NBD-Cl) と反応後蛍光検出器付高速液体クロマトグラフを用いる方法³⁾、又は銅-ジチオカルバメート法による比色定量⁴⁾によりジメチルアミンとして算出した。

Table 2. Nitrosodimethylamine content in salted pollack roe

NO ₂ ⁻ *1	Asc.*2	Contents in Pollack Roe	
		N*3	NDMA**4(ppb) ± SD
0	0	7	0.4 ± 0.7
0	40	9	0.7 ± 0.9
6.9	40	8	0.4 ± 0.7
6.9	60	8	0.8 ± 0.7
11.9	40	8	0.8 ± 0.7
11.9	60	9	0.7 ± 0.6

*1 ppm in brine for pollack roe

*2 ascorbic acid molecular ratio to nitrite

*3 number of experiments repeated

*4 nitrosodimethylamine

結果

1. 亜硝酸塩及びアスコルビン酸の濃度の影響

漬け込み液中の亜硝酸塩の濃度が NO₂⁻ として 6.9, 11.9 ppm, アスコルビン酸のモル濃度が亜硝酸塩に対して、0, 1, 2倍のときのたらこ中の亜硝酸塩、第二アミン及びニトロソジメチルアミン (NDMA) の量を Table 1 に示した。また、処理したたらこを通常食べるときのようにガスコンロで焼いたときの NDMA 量も合せて示した。

NDMA は亜硝酸塩の添加によって生成しなかったが、可食状態に焼くことにより、やや増加した。たらこ中の亜硝酸根は、亜硝酸塩処理により明らかに増加

Table 3. Effect of period of refrigeration on dimethylamine, and nitrosodimethylamine contents in salted pollack roe

Treatment		Determined in salted cod raw Refrigerated for							
		0 day		10 days		20 days		30 days	
NO ₂ ⁻ (ppm)	Asc.* ¹	Amine (ppm)	NDMA* ³ (ppb)	Amine (ppm)	NDMA* ³ (ppb)	Amine (ppm)	NDMA* ³ (ppb)	Amine (ppm)	NDMA* ³ (ppb)
6.9	40	—* ²	—	81.6	ND* ⁴	198.8	2.3	340.0	3.8
			—		ND		1.9		5.3
6.9	60	—	—	179.5	0.6	92.3	ND	166.8	2.7
			—		ND		1.6		3.6
100	0	30.5	1.8	32.4	ND	45.5	1.6	49.4	2.3
			ND		ND		1.3		1.5

*¹ ascorbic acid molecular ratio to nitrite*² not determined*³ nitrosodimethylamine*⁴ not detected (below 0.5 ppb)

Table 4. Nitrite, dimethylamine, and nitrosodimethylamine contents in nitrite treated commercial salted pollack roe

NO ₂ ⁻ in Brine (ppm)		in Pollack Roe Refrigerated for							
		0 day			10 days			20 days	
NO ₂ ⁻ (ppm)	Asc.* ¹	Amine (ppm)	NDMA* ¹ (ppb)	NO ₂ ⁻ (ppm)	Amine (ppm)	NDMA* ¹ (ppb)	NO ₂ ⁻ (ppm)	Amine (ppm)	NDMA* ¹ (ppb)
0	0.46	174	0.8	0.15	220	1.4	0.17	166	1.7
6.9	6.78	—* ²	—	0.35	147	2.8	0.21	113	4.8

*¹ nitrosodimethylamine*² not determined

したが、10日間の冷蔵によって減少した。

アスコルビン酸を亜硝酸塩のモル濃度の40, 60倍加えたときのたらこ中のNDMAを測定した結果をTable 2に示した。亜硝酸塩やアスコルビン酸の量によって、NDMAの量に差はみられなかった。

2. 冷蔵庫に保存したたらこ中のNDMA, 亜硝酸塩及びDMA

Table 1で示した実験では、たらこを10日間冷蔵庫中に保存した後亜硝酸塩、ジメチルアミン、NDMAの量を測定した。また、流通の過程や家庭での購入後の保存期間を考慮して、20日間及び30日間冷蔵後の測定を行った結果をTable 3に示した。

冷蔵によって第二アミンの量は著しく増加したが、NDMAの量は20日間の冷蔵後もほとんど変わらなかつ

た。30日間の冷蔵により、試料の一部にかびの生えたものがみられたが、NDMA量はやや増加した。亜硝酸塩を通常の約10倍量加えた実験でも、NDMAの量は増加しなかった。

以上の実験に使用したたらこは、第二アミンの量がこれまで報告されている結果に比べてかなり少かった^{1,5)}。そこで、購入時から高い第二アミン量を示した市販の塩たらこを亜硝酸ナトリウムで処理したものを測定した結果をTable 4に示した。

3. 長時間(5~24時間)亜硝酸塩処理したたらこのNDMA

Table 4までに示した実験は、たらこを亜硝酸塩で3~5時間処理したものについて行ったが、たらこの品質により、未熟卵については5~24時間処理を行う

Table 5. Nitrosodimethylamine contents in salted pollack roe treated with nitrite for a long period

NO ₂ ⁻ Ascorbic acid in Brine*1	Treated Period (hr)	Contents in Pollack Roe	
		Amine*2 (ppm)	NDMA*3 (ppb)
0	0	121.3	ND
6.7	40	32.7	ND
6.7	40	69.6	1.3
			0.6

*1 molecular ratio of ascorbic acid to nitrite

*2 measured as dimethylamine

*3 nitrosodimethylamine

こともある。このような長時間処理を行った試料についての分析結果を Table 5 に示した。

24時間処理によっても、NDMA の量に変化は無かった。

4. 無処理市販たらこ中の NDMA

市販のたらこ30検体中の NDMA を定量した結果、検出限界以下のもの3検体、2.0 ppb 未満のもの11検体、3.0 ppb 未満のもの13検体、3.0 ppb 以上のもの3検体で、最高は 4.1 ppb であった。

ま と め

亜硫酸塩処理によって、たらこ中の NDMA 量に、著しい増加はみられなかった。

文 献

- 1) Miyako Yamamoto et al.: *Food Cosmet. Toxicol.*: **18**, 297 (1980)
- 2) 原田基夫: 食品衛生研究, **26**, 92 (1976)
- 3) 川崎洋子ら: 食衛誌, **24**, 308 (1983)
- 4) 河端俊治ら: 同上, **14**, 31 (1973)
- 5) 河村太郎ら: 同上, **12**, 192 (1971)

BHA 添加ラット飼料における変異原性物質生成の可能性の検討

酒井綾子・宮田ルミ子・谷村顕雄

Study on the Possibility of Mutagen Formation in Rat Feed containing Butyl Hydroxy Anisol

Ayako SAKAI, Rumiko MIYATA and Akio TANIMURA

Rat feed containing butyl hydroxy anisol (BHA, 2%) was examined for mutagenicity to inquire into the possibility of mutagen formation by the interaction of BHA with the contents of the rat feed. Rat feed was extracted with chloroform-methanol (2:1) and the extracts tested for mutagenicity by Ames assay with *Salmonella typhimurium* TA100 and TA98. The extracts did not show mutagenicity, even in extracts of feed heated at 100° for 24 hr.

(Received May 31, 1984)

ブチルヒドロキシアニソール (BHA) は、日本では昭和29年以来使用されてきた酸化防止剤であり、国際的にも広く使用されている。ところが、昭和57年4月に名古屋市立大学医学部伊東教授によって、BHA 2%を含む飼料で飼育した F344 ラットの前胃にがんが発生したことが報告された¹⁻³⁾。BHA については、発がん性物質の短期検索を目的として種々の変異原性試験が実施されているが、大部分の試験法で変異原性を示さないことから⁴⁾、BHA はプロモーターである可能性が示唆されている。一方、動物実験用飼料調製時に BHA を添加した飼料を加熱成型するため、飼料の加熱によってあるいは飼料の保存中にイニシエーターが生成した可能性も否定できない³⁾。また、石崎らは、

BHA の紫外線照射による分解物の1つである 2-tert-ブチルヒドロキノンに枯草菌による“Rec-assay”により DNA に損傷を与えることを報告している⁵⁾。そこで、BHA 添加飼料中に飼料成分と BHA との反応や BHA の酸化によって変異原性物質が生成する可能性について検討した。

実験方法

1. 飼料

BHA を 2% 含有する発がん性試験用ラット固型飼料及びその対照実験用飼料を用いた。

2. 飼料抽出液の調製

ラット飼料 5g を粉碎し、クロロホルム-メタノー

Table 1. Lack of mutagenicity of extracts from rat feed containing BHA (2%)

	DMSO solution of extracts ^{a)}	Feed ^{b)}	His ⁺ revertant/plate			
			TA 100		TA 98	
			-S9	+S9	-S9	+S9
Control feed	0.2	0.5	152	163	18	36
	0.5	1.25	159	147	16	31
	2	5	185	162	28	36
	5	12.5	188	140	28	46
	20	50	175	180	25	40
BHA feed	0.2	0.5	140	198	20	55
	0.5	1.25	154	192	20	50
	2	5	K ^{c)}	203	K	51
	5	12.5	K	164	K	23
	20	50	K	K	K	K
BHA feed, after removing BHA fraction ^{d)}	0.2	0.5	129	130	20	45
	0.5	1.25	142	124	35	38
	2	5	130	185	21	51
	5	12.5	107	178	34	37
	20	50	K	131	30	55
Heated BHA feed	0.2	0.5	149	167	22	41
	0.5	1.25	107	194	33	53
	2	5	K	191	K	44
	5	12.5	K	115	K	38
	20	50	K	K	K	K
Solvent control			153	152	31	40
Benzo[a]pyrene (50 µg/plate)				2160		718

a) Concentrates of extracts from 5g of rat feed with chloroform-methanol (2:1) were dissolved in 2 ml of dimethyl sulfoxide (DMSO) for Ames assay

b) Original amounts of feed equivalent to the extracts tested

c) Killing effect to the tester strain was observed

d) BHA fraction was removed from the extract of rat feed containing BHA by preparative thin-layer chromatography

ル (2:1) 20 ml で2回振とう抽出した。遠心分離及びろ過によって抽出液から固型物を除去したのち濃縮し、残渣にジメチルスルフォキシド (DMSO) 2 ml を加えて Ames 試験用抽出液とした。

飼料の加熱による影響を調べるために、BHA 2% 含有飼料 5 g を 100° で8時間ずつ合計24時間加熱したのち、粉碎し、同様に操作して Ames 試験用抽出液を調製した。

BHA 2% 含有ラット飼料 5 g の抽出液を濃縮し、分取薄層クロマトグラフィーを実施した。BHA 画分を除去し、残りのすべての画分をクロロホルム-メタノール (2:1) で抽出、濃縮、DMSO 2 ml を添加して BHA を除いた Ames 試験用抽出液を調製した。

3. 分取薄層クロマトグラフィー

プレート：Merck PLC プレート、シリカゲル 60F₂₅₄, 20×20 cm, (2 mm 厚)。

展開溶媒：iso-オクタン-酢酸 (9:1)。

検出：紫外線下 (254 nm)。

4. Ames 試験

Salmonella typhimurium TA100 及び TA98 を用いて矢作らによるブレインキューベーション法によって行った⁷⁾。S-9 mix は、PCB 誘導した Fischer ラット肝ホモジネートより調製した。陽性対照にはベンゾ[a]ピレンを用いた。

結果及び考察

Table 1 に示したように、BHA を2%含む飼料のクロロホルム-メタノール抽出物には変異原性は認められなかった。抽出液 0.2, 0.5, 2, 5, 20 µl は、それぞれ理論値で BHA 10, 25, 100, 250, 1000 µg を含むが、抽出された BHA によると考えられる Killing のため、高用量では変異原性物質の有無を試験することができなかった。BHA は、BHT と異なり細菌に対する毒性が比較的高いため、Ames 法による変異原性試験は 300 µg/plate 程度までしか実施できない⁴⁾。そこで、分取薄層クロマトグラフィー (PLC) を実施し、BHA 画分を除去した残りの全画分の抽出物について Ames 試験を行った、この際 PLC プレート上には BHA の酸化または BHA と飼料成分との反応によって生じたと考えられる対照飼料には認められない 2, 3 のスポットが認められたが、抽出物に変異原性は認められなかった。

実験に用いたラット飼料はすでに加熱成型されてい

るものであるが、更に 100° で24時間加熱し、加熱による影響を調べたところ、やはり変異原性物質の存在は認められなかった。

BHA は飼料への添加により揮散や酸化、分解などによって減少すると考えられるが⁷⁾、本実験に用いた飼料では加熱前の分析で飼料に添加した BHA の83% が、100°, 24時間加熱後で68%が残存していることが確認された。

BHA と油脂との相互作用による変異原性物質生成の可能性を検討するために、未使用サラダ油や調理に使用済みのサラダ油に 1, 2.5, 10, 25, 100 mg/ml の濃度で BHA を添加し、170° で7時間加熱後、それぞれのサラダ油 10 µl について Ames 試験を実施したが、やはり変異原性は認められなかった。

今回の実験は、飼料抽出物に変異原性の増加があるかどうかという大まかな実験であり、BHA の試験菌株に対する毒性が強いこともあって、比較的変異原性の弱い物質の少量の生成があっても検出できないと考えられる。しかしながら、BHA の酸化や飼料成分との反応による強力な変異原性物質の相当量の生成はないと考えられ、BHA によるラットにおける発がんが BHA のプロモーター作用によるという示唆の1つとなるものと考えられる。

終りに、BHA の定量に御協力を戴いた森本登志子氏に謝意を表します。

文 献

- 1) 林 裕造：厚生省がん研究報告集，昭和57年度，459 (1982)
- 2) 村上貴久：食品衛生研究，32, 635 (1982)
- 3) 藤井正美：衛生化学，29, 111 (1983)
- 4) T. Kawachi, T. Komatsu, T. Kada, M. Ishidate, M. Sasaki, T. Sugimura and Y. Tazima: Results of recent studies on the relevance of various short-term screening tests in Japan in "The Predictive Value of Short-term Screening Tests in Carcinogenicity Evaluation", ed. G.M. Williams *et al.*, pp. 253 (1980). North-Holland Biomedical Press, Elsevier
- 5) 石崎睦雄，小山田則孝，上野清一，勝村 馨，細貝祐太郎：食衛誌，20, 143 (1979)
- 6) T. Yahagi, M. Nagao, Y. Seino, T. Matsushima, T. Sugimura and M. Okada: *Mutation Res.*, 48, 121 (1977)
- 7) 石谷孝佑，平田 孝，高井順子，木村 進：日本食品工業学会誌，23, 244 (1976)

中国製クリスタルカットガラスからの鉛及びヒ素の溶出試験

石綿 肇・井上たき子・山田 隆・谷村顕雄

Migration Tests of Lead and Arsenic from Crystal Cut Glasses made in China

Hajimu ISHIWATA, Takiko INOUE, Takashi YAMADA and Akio TANIMURA

Migration of lead and arsenic from crystal cut glasses imported from China was tested. Migration of lead was observed in all samples tested (total 4 lots; 5 glasses for each lot). The level (2.5 ± 0.9 ppm) of detected lead in one of 4 lots exceeded the limit (2 ppm) in the Japanese regulation. Migration of arsenic was not observed in any of the samples.

(Received May 31, 1984)

クリスタルカットガラスは、一般に酸化鉛を最高30%程度添加し加工するため、鉛の溶出が時折問題になる。今回、中国製クリスタルカットガラスについて鉛の溶出試験を行ったところ、一部の製品について規格値を超える鉛の溶出をみたので報告する。また、参考までにヒ素についても同様の試験を行ったので合わせて報告する。

実験方法

1. 試料

昭和57年に輸入した中国製クリスタルカットガラス

4種類各5個ずつ

2. 内表面積の計算

試料はいずれも円筒形のため、内径と深さを測定し、計算により内表面積を算出した。

3. 溶出液の作製

試料の上端から5mm下まで、あらかじめ60°に加温した4%酢酸を満たし、60°の恒温水槽中に30分間放置した。その後、内溶液をビーカーに移し、この液を溶出液とした。

4. 鉛の定量法

Perkin-Elmer 403を用い、炭素管フレームレス原

Table 1. Migration of Lead and Arsenic from imported Crystal Cut Glasses

Volume (ml)	Food contact surface (cm ²)		Migration (ppm)					Mean \pm S.D.	
			1	2	3	4	5		
A	70	78	Pb (2 ml/cm ²)* ¹	1.1	1.9	1.4	1.4	0.8	1.3 \pm 0.4
			Pb (Direct)* ²	2.4	4.2	3.2	3.1	1.8	2.9 \pm 0.9
			As (Direct)	nd* ³	nd	nd	nd	nd	nd
B	180	141	Pb (2 ml/cm ²)	0.6	1.5	1.2	1.2	1.2	1.1 \pm 0.3
			Pb (Direct)	1.0	2.3	1.8	1.9	1.8	1.8 \pm 0.5
			As (Direct)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
C	120	107	Pb (2 ml/cm ²)	1.2	2.1	2.6	3.3	3.2	2.5 \pm 0.9
			Pb (Direct)	2.2	3.8	4.6	5.9	5.8	4.5 \pm 1.6
			As (Direct)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
D	130	118	Pb (2 ml/cm ²)	1.1	1.4	1.5	1.7	1.9	1.5 \pm 0.3
			Pb (Direct)	1.9	2.5	2.8	3.1	3.4	2.7 \pm 0.6
			As (Direct)	nd	nd	nd	nd	nd	nd

*¹ corrected values by Japan's Food Sanitation Law (Concentration in the solution assuming 2 ml of the migration solution was used for 1 cm² of food contact surface)

*² concentration in the migration solution

*³ less than 0.04 ppm as As₂O₃

子吸光法により溶出液中の鉛の定量を行った¹⁾。測定条件は、ランプ：鉛中空陰極ランプ、波長：283.3 nm、ドライビング：110° 18秒、チャーリング：550° 30秒、アトマイジング：2000° 5秒。

5. ヒ素の定量法

ジエチルジチオカルバミン酸銀法により溶出液中のヒ素の定量を行った²⁾。ただし、ピリジンの代わりにプルシン・クロロホルム溶液を用いた。

結果及び考察

4種類のカットグラスについて各々5個ずつ、鉛とヒ素について溶液試験を行った。結果を Table 1 に示した。

現行食品衛生法(1983年現在)³⁾では、ガラス製品からの溶出試験には、内表面積 1 cm² 当り 2 ml の浸出液を用いる事になっているが、本試験に供したグラスの容量は 2 ml/cm² 以下であったため、浸出液を満す方法をとった。この方法による結果を基に、溶出液 2 ml/cm² 当りに換算した場合、鉛については試料

Cにおいて5検体中4検体に規格値(2 ppm)を超えるものが認められた。また、平均値は 2.5±0.9 ppm であり、ロットとしても規格値を超えていた。参考として溶出液中の濃度も併記した。この値は換算前の値であり、溶出液中の鉛の濃度を直接示すものである。

ヒ素に関しては全例とも検出限界(As₂O₃ として 0.04 ppm) 以下で、規格値(0.1 ppm) 内であった。

クリスタルカットグラスは鉛化合物が添加してあるため、鉛の溶出についてはじゅうぶんに留意する必要がある。一方、現行の溶出試験法は浸出液 2 ml/内表面積 cm² を採用しているが、コップ等では容量が小さく、この条件を満たさないものが多く、陶磁器、ホウロウ引きの規格に準じた方法、すなわち、浸出液を満す方法を採用する事がのぞましい。

文 献

- 1) 日本薬学会編：衛生試験法・注解，p.7 (1980)，金原出版
- 2) 日本薬学会編：同上，p.47 (1980)，金原出版
- 3) 厚生省告示第20号 (1982年2月16日)

ガラス製器具からの鉛、カドミウム、ヒ素及びアルカリの溶出—— 現行規格試験法と国際規格試験法による比較

井上たき子・石綿 肇・山田 隆・谷村顕雄

Migration of Lead, Cadmium, Arsenic and Alkali from Glasswares—— Comparison of Existing Japanese Methods and International Standard Method

Takiko INOUE, Hajimu ISHIWATA, Takashi YAMADA and Akio TANIMURA

Migration amounts of lead, cadmium, arsenic and alkali from glassware were assayed by existing Japanese methods and by the method of International Organization for Standardization (ISO) and the results compared. Migration tests of metals and arsenic were carried out with 4% acetic acid solution at 60° for 30 min. in the domestic method and at 22° for 24 hr. in the ISO method. No migration of lead, cadmium and arsenic was observed in any of the samples except for the migration of lead from lead glassware. Migration amount of lead from 25% lead glassware assayed by the ISO method was significantly higher than that by the domestic method. The migration amount of alkali from soda-lime glassware assayed by the domestic method was higher than that by the ISO method using water as a migration solvent.

The results obtained by both methods were lower than the limits specified in both domestic and ISO regulations.

(Received May 31, 1984)

各種の規格や基準などは各国でそれぞれ独自の法律等をもって決められている。我国においても食品用のガラス製器具・容器包装に関する規格、試験法等は食

品衛生法により定められている¹⁾。一方、現在では各国独自の規格等が輸出入時のトラブルや非関税障壁などの問題を起し、規格等の国際統一化が望まれている。

Table 1. Migration of Lead, Cadmium and Arsenic from Glass Wares by Domestic and ISO Methods

Cup	Method	Pb	Cd	As ₂ O ₃
		concentration, ppm*		
Soda-lime glass (machine made) 160 ml, 156 cm ²	domestic	nd	nd	nd
	ISO	nd	nd	nd
Soda-lime glass (hand made) 170 ml, 150 cm ²	domestic	nd	nd	nd
	ISO	nd	nd	nd
25% Lead glass 140 ml, 125 cm ²	domestic	1.03±0.06 (0.58±0.03)	nd	nd
	ISO	1.62±0.06 (0.90±0.03)	nd	nd
30% Lead glass 200 ml, 171 cm ²	domestic	0.28±0.02 (0.17±0.01)	nd	nd
	ISO	0.31±0.01 (0.18±0.01)	nd	nd

* Concentration in the migration solution, mean±S. D.

Values in parentheses are corrected according to the domestic law. Detection limits of Pb, Cd and As₂O₃ are 20, 2 and 40 ppb, respectively, in the migration solution.

その一環として、ガラス製器具について国内現行法及び国際標準化機構 (International Organization for Standardization, ISO) による方法で、鉛、カドミウム、ヒ素及びアルカリの溶出試験を行い、溶出量の比較を行った。

実験方法

1. 試料

- ソーダ石灰ガラス製コップ(タンク溶融機械製),
- 同コップ(るつぼ溶融手吹き製), 3) 鉛ガラス製コップ(酸化鉛25%含有), 4) 同コップ(酸化鉛30%含有).

2. 溶出試験

食品衛生法のうち、食品、添加物等の規格基準、第3器具及び容器包装、ガラス製器具又は容器包装の方法¹⁾及びISOの方法²⁾を用いた。各試験はすべて同一ロットの製品3個ずつを用いて行った。

- 国内法による鉛、カドミウム^{*1}及びヒ素の溶

*1 国内法では基準なし

*2 国内法では“液を満し”とあるが、ISO法に準じて5mm下までとした。

*3 ISOでは基準なし。

*4 ISOでは内面に施釉又は彩色加工していないソーダ石灰ガラスには溶出試験は適用されない。

*5 ISOでは22±2°

*6 ISOでは基準なし。

出：器具の上端から5mm下の所まで^{*2}、あらかじめ60°に加温した4%(v/v)酢酸を満し、恒温水槽中で60°で30分間保温した。

- 国内法によるアルカリの溶出：器具の上端から5mm下の所まで^{*2}、あらかじめ60°に加温した水を満し、恒温水槽中で60°で30分間保温した。

- ISO法による鉛、カドミウム及びヒ素^{*3}の溶出^{*4}：器具の上端から5mm下の所まで4%(v/v)酢酸を満し、22±3°^{*5}で24時間放置した。

- ISO法によるアルカリの溶出^{*6}：器具の上端から5mm下の所まで水を満し、22±3°で24時間放置した。

3. 鉛及びカドミウムの定量

Perkin-Elmer 403型原子吸光度計を用い、鉛は国内法¹⁾にしたがって、また、カドミウムは鉛の方法に準じて定量を行なった。ただし、原子吸光度法は炭素管フレームレス方式によった³⁾。

鉛及びカドミウムの測定条件はそれぞれ、ランプ：鉛中空陰極ランプ；カドミウム中空陰極ランプ、波長283.3nm；228.3nm、ドライビング：110°18秒；110°18秒、チャーリング：550°30秒；400°30秒、アトマイジング：2000°5秒；1500°5秒で行った。

4. ヒ素の定量

現行食品衛生法のうち、「食品、添加物等の規格基準、第1食品D各条、清涼飲料水の成分規格、2.ヒ素の試

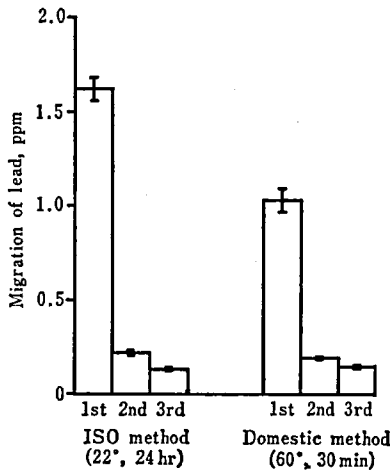


Fig. 1. Effect of repetition on the migration of lead from glass made of 25% lead glass. Migration tests were repeated using the same samples. Results are shown as mean \pm S. D. (n=3).

験法, ジエチルジチオカルバミン酸銀法¹⁾により行なった。ただし、ピリジンの代りにブルシン・クロロホルム溶液を用いた⁴⁾。

5. アルカリの定量

国内法¹⁾によった。すなわち、溶出液 100 ml にメチルレッド試液 2 滴を加え、0.01 N 硫酸で滴定した。

結果及び考察

1. 鉛、カドミウム及びヒ素の溶出

国内法及び ISO 法によるガラス製器具からの鉛、カドミウム及びヒ素の溶出結果を Table 1 に示した。鉛の溶出は、25%及び30%鉛ガラス製コップで認められ、両者共に国内法よりも ISO 法で高い値（それぞれ $p < 0.001$, $p < 0.02$ で有意）を示した。また、今回の実験例では、25%鉛ガラスの方が30%鉛ガラスよりも国内法、ISO 法共に高い値を示した。この結果は、溶出量は単に鉛含量のみではなく、表面の微細構

造や品質等に大きく影響される事を示している。鉛ガラス製コップからはカドミウムとヒ素は検出されず、またソーダ石灰ガラス製品においても検出されなかった。

別に、機械製ソーダガラス製コップと25%鉛ガラス製コップとについて繰り返し溶出を試みた。鉛ガラスからの鉛の溶出は溶出試験を繰り返す事により大きく減少した (Fig. 1)。一方、一回目の溶出試験で検出されなかった試料または金属類については二回目以後で溶出が認められる事はなかった。

国内法における溶出限度は、内表面積 1 cm^2 当たり 2 ml の 4%酢酸を加え、または溶出液を相当量に希釈した時、溶出液中の鉛の濃度は 2 ppm、ヒ素は 0.1 ppm である¹⁾。カドミウムの溶出に関しては規格はない。一方、ISO では深型器（食品と接触する面の深さが 2.5 cm 以上、今回用いた試料はすべてこれに属す）では、所定の条件で溶出し、溶出液中の鉛の濃度は 5 ppm、カドミウムは 0.5 ppm であり²⁾、ヒ素の溶出に関しては規格はない。したがって、本実験に供した試料は食品衛生法、国際規格共に限度内であった。

2. アルカリの溶出

国内法及び ISO 法共にアルカリの溶出は食品衛生法による限度 (4 ppm) 以内であった。溶出濃度はソーダ石灰ガラスでは、機械製、手吹き製共に国内法で高く ($p < 0.02$)、また25%鉛ガラスでは ISO 法で高い値 ($p < 0.01$) を示した。最も高い値を示したものは25%鉛ガラス製コップを ISO 法で溶出した場合で、 Na_2O として溶出液中の濃度で 1.12 ppm であった。ISO ではアルカリの溶出に関する規格はないが、この値を国内法の溶出濃度に換算すると 0.6 ppm に相当する。25%鉛ガラス製コップは、国内法で試験した場合にもソーダ石灰ガラス製コップより高い値を示した (Table 2)。

ま と め

ガラス製コップについて、国内法及び ISO 法によ

Table 2. Migration of Alkali

Cup	Domestic method		ISO method	
	concentration, ppm as Na_2O^*			
Soda-lime glass (machine made)	0.58 \pm 0.03	(0.30 \pm 0.02)	0.46 \pm 0.05	(0.24 \pm 0.03)
Soda-lime glass (hand made)	0.26 \pm 0.03	(0.15 \pm 0.02)	0.14 \pm 0.08	(0.08 \pm 0.04)
25% Lead glass	0.86 \pm 0.09	(0.48 \pm 0.05)	1.12 \pm 0.05	(0.63 \pm 0.03)

* Concentration in the migration solution, mean \pm S. D. (n=3)

Values in parentheses are corrected according to the domestic law.

り鉛、カドミウム、ヒ素及びアルカリの溶出試験を行った。鉛ガラスからの鉛の溶出は国内法に比較し、ISO法で有意に高い値が認められた。また、アルカリの溶出は、ソーダ石灰ガラスでは国内法が、25%鉛ガラスではISO法が高い値を示した。しかし、カドミウム及びヒ素の溶出は認められなかった。

本研究の費用の一部は昭和58年度厚生科学研究費補助金で行った。

文 献

- 1) 厚生省告示第20号(昭和57年2月16日)
- 2) International Organization for Standardization: ISO 7086/1-1982 (1982)
- 3) 日本薬学会編: 衛生試験法・注解, p.2 (1981)
- 4) 日本薬学会編: 同上, p.47 (1981)
- 5) International Organization for Standardization: ISO 7086/2-1982 (1982)

規格基準設定のためのソース、あん(餡)類の真菌試験

宇田川俊一・坂部フミ・鈴木明子・成田紀子・倉田 浩

Mycological Survey of Worcester and Fruits Sauces and "An" (Bean jam) for Standardization Purpose

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

A total of 15 commercial samples of Worcester and fruits sauces and 21 samples of bean jams (the Japanese name: An), which were composed of 2 raw, 12 fresh and 7 dehydrated types, were examined for total numbers of fungi. The survey of bean jams showed that all samples of raw and dehydrated types and 42% of fresh type had total counts of $<1.0 \times 10^3$ cfu/g to 4.8×10^4 cfu/g. High levels of contamination (more than 1.0×10^3 cfu/g) were found in two raw and three fresh bean jams. Yeasts and two zygomycetous fungi, *Absidia* and *Mucor*, were the predominant groups found in the mycoflora. The results of the examination of Worcester and fruits sauces indicated a better overall mycological quality.

Because relatively rapid growths of these yeasts and molds were observed on the substratum, this could result in the spoilage of retailed bean jam products such as in Japanese confectionery, even after a few days of storage. Fungal contamination of bean jams may be controlled by the reduction of the initial fungal load in the ingredients (beans), chill storage of raw bean jam, sanitation in the processing plants, effective pasteurization of fresh bean jam, and in the improvement in handling and packing.

(Received May 31, 1984)

調味料の真菌試験として著者ら¹⁾は1983年に味噌、醤油、焼肉のたれ類について調査結果を報告した。その後、引続いて各種のソースについても同様の調査を行った。

あん(餡)類は製菓原料として東洋独特の食品であり、その形態は日持ちの悪いものから長期にわたって常温流通するものまでさまざまである。著者ら²⁾は1981年に即席食品の一部として粉末する粉の真菌試験を行い報告したが、あん類そのものについての微生物試験はこれまで細菌を対象としたものがほとんどで、真菌については製あん原料である豆類の報告³⁾が発表されているにすぎない。

今回は以上の2品目について規格基準設定のための

基礎資料を得るべく市販品の実態調査を行い、その結果をまとめて報告することにした。

試 験 方 法

1. 試料: 市販のウースターソース5銘柄5検体(pH 2.58~4.12), 中濃果実ソース5銘柄5検体(pH 3.01~4.18), 濃厚果実ソース5銘柄5検体(pH 3.13~4.27), 合計15検体を購入し供試した。供試検体はいずれも野菜・果実の煮出汁または搾汁に糖類、食酢、食塩、香辛料、カラメル、糊料などを加えて調製されているが、各試料間で内容上特記すべき相違点はみられなかった。また、製造年月日からみた製造後の経過日数は長期のもので1年6箇月、大部分が7箇月以内

Table 1. Fungal counts and their identification in "An" (bean jam)

Food and commercial brand	Fungal counts per g	Kind of fungi detected
Raw bean jam		
Nama-an MO	2.0×10^3	<i>Cladosporium</i> , <i>Mucor</i> , <i>Phoma</i> , yeasts
Sakura-an TN	3.3×10^3	<i>Absidia</i> , <i>Mucor</i> , <i>Rhizopus</i>
Fresh bean jam*		
Ogura-an TM	$< 1.0 \times 10^3$	<i>Cladosporium</i>
Koshi-an TM	1.5×10^3	Yeasts, imperfect fungi
Ogura-an MI	4.8×10^4	<i>Hormonema</i> , yeasts
Koshi-an MI	1.2×10^3	<i>Hormonema</i> , <i>Phoma</i> , yeasts, imperfect fungi
Koshi-an MO	2.6×10^3	Yeasts
Dehydrated bean jam		
Shiro-an N	$< 1.0 \times 10^3$	Imperfect fungi
Shiro-an N	3.3×10^3	<i>Absidia</i> , <i>Mucor</i> , <i>Penicillium</i>
Shiro-an N	$< 1.0 \times 10^3$	<i>Penicillium</i>
Sarashi-an N	4.6×10^3	Yeast, imperfect fungi
Sarashi-an N	$< 1.0 \times 10^3$	Yeast
Sarashi-an N	$< 1.0 \times 10^3$	<i>Mucor</i>
Koshi-an MA	1.5×10^2	<i>Aspergillus</i> , <i>Cladosporium</i> , yeasts, imperfect fungi

* The omitted 7 samples were negative for fungal counts.

の製品であった。

同様に、市販の原料あん2銘柄2検体、生あん7銘柄12検体（小倉あん6点、こしあん5点、粒あん1点）、乾燥あん2銘柄7検体（白あん、さらしあん各3点、こしあん1点）、合計21検体を購入し供試した。いずれも合成保存料を含まず、1点のみに合成着色料使用の表示がみられた。製造後の経過日数は生あんの6点が7箇月以内、乾燥あんの2点が7箇月、3箇月であったほかは、製造年月日の表示がなく不明であった。

2. 真菌生菌数測定法：真菌の生菌数測定は1973年発行の食品衛生検査指針〔I〕検査法別⁴⁾に準拠した。主要な処理条件は以下のようである。

試料の各5ml又は5gをはかり取り、滅菌生理食塩水液中に均一分散させた後、希釈試料液を調製した。使用培地は3種類であり、ソースについては塩化ナトリウム(50g/l)及びクロラムフェニコール(100mg/l)添加ポテト・デキストロース寒天、原料あんについてはクロラムフェニコール(100mg/l)添加ポテト・デキストロース寒天を、そのほかのあん試料にはMY-20寒天⁵⁾をそれぞれ用いた。作成した各寒天平板上に試料希釈液の一定量を塗抹し、表面を無菌的に乾燥後、23°、7日間培養し、発生した真菌コロニー数を計測した。

結果及び考察

1. ソース

供試したソース全試料が真菌非検出であり、微生物制御上とくに問題となる点は認められなかった。

2. あん（餡）類

結果をTable 1にまとめて示した。表にみられるように原料あん、乾燥あんの全試料から真菌が検出された。一方、生あんでは供試試料の半数から真菌が検出された。真菌非検出の生あん検体はほとんどが加熱殺菌してパック包装されたものと思われる。

真菌が検出された原料あん及び生あん試料では、真菌数 $10^3/g$ 以上の試料が5点も含まれており、煮炊きの製造工程がある食品としては微生物学的な衛生管理がきわめて不十分である。原料あんは無糖の状態にある中間製品であるが、低温保管が行われていなかったものもあり、変敗への進行が憂慮される状態であった。非パックの生あん検体は主として和生菓子原料として用いられるもので、試料採取時以後もかなり常温流通期間があることを考慮すると、たとえ加糖状態であっても原料あんと同様に衛生管理を改善する必要がある。

最近、高良⁶⁾は東京都に寄せられた苦情食品中カビ発生が原因とされたものを調べた結果、菓子類が62%と圧倒的に多いという実態を述べている。このような

カビ汚染の原因として、和生菓子の場合には原料あん、生あんの真菌が指摘され、またその発生要因として製造工場内での汚染（とくに放冷工程中での汚染）と販売管理体制の不十分が推定される。

あん類から検出された真菌は接合菌類の *Absidia*, *Mucor*, 酵母類が多いのが特徴で、これに原料豆から由来の不完全菌類が加わり、フロラが構成されていた。いずれも好湿性の真菌であり、しかも接合菌類や酵母類の生育速度はきわめて速やかなため、変敗現象も製造後1～2日間という早期に起こる可能性がある。

ま と め

市販製品の真菌試験から、ソースについての真菌を対象とした微生物学的規格基準設定の必要性は少ないが、もし基準を設けるとすれば醤油などと同様に現状からみて真菌生菌数は ml 当り10個以下ということになろう。

一方、65°、10～20分間の加熱処理で完全に殺菌されるはずの酵母類があん類の真菌フロラの主体となっていたことは、一次煮炊き後の原料あん、生あんの二次汚染が原因であると考えられる。これを防止するためには、原材料の菌数の低減、放冷など作業場の環境の

クリーン化、二次殺菌の強化、包装加熱殺菌の導入による殺菌効果の確保などが検討されねばならない。

あん製品の微生物学的規格基準としては真菌数 g 当たり 100 個以下の設定が考慮されるべきであり、また原料あんについては製品と同様の真菌数とともに低温保管を義務づける必要があるものと思われる。更に、あん製品の常温流通に際しては、製造年月日の表示義務及び安全を保証する賞味期間の表示が望ましい。

本調査研究は昭和58年度厚生省環境衛生局食品衛生調査費によって実施した。

文 献

- 1) 宇田川俊一ら: 衛生試報, 101, 150 (1983)
- 2) 宇田川俊一ら: 衛生試報, 99, 153 (1981)
- 3) H. Hitokoto et al.: *Mycopathologia*, 73, 33 (1981)
- 4) 厚生省環境衛生局監修: 食品衛生検査指針 [I] 検査法別, p. 615 (1973), 日本食品衛生協会, 東京
- 5) K. B. Raper and D. I. Fennell: *The Genus Aspergillus*, p. 686 (1965), Williams & Wilkins, Baltimore
- 6) 高良実之: 第2回食品衛生微生物研究会講演要旨集, p. 31 (1981)

乾燥加工食品の品質に関する真菌試験

宇田川俊一・坂部フミ・鈴木明子・成田紀子・倉田 浩

Mycological Quality of Dehydrated Food

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

A total of 52 dehydrated convenience food, which were composed of 11 coffee, 10 miso soups, 21 soups, and 10 freeze-dried vegetables and others used in preparing Chinese noodles and miso soups were examined for total number of fungi. All tested samples were commercially produced and procured at the retail level.

The result of the examination of the coffee indicated a better overall mycological quality; of the two positive samples, one contained more than 1.0×10^4 cfu/g. The survey of various soups showed that all tested miso soup and more than half of the other soup samples (in Western, Chinese and Japanese styles) had total counts of $< 1.0 \times 10^3$ to 2.5×10^3 cfu/g and of $< 1.0 \times 10^1$ to 1.8×10^2 cfu/g, respectively. *Eurotium* spp. and yeasts were the most common groups found, followed by *Aspergillus* and *Penicillium*. Presumably *Aspergillus flavus* and yeasts were came from the ingredient (miso) and were not inhibited appreciably by the dehydration process. *Eurotium* spp., a xerophytic fungi was frequently found to be representative components of the flora found in the other soups. Total fungal counts found in the freeze-dried vegetables and others varied from 1.3×10^1 to 6.6×10^2 cfu/g. More than half of them had higher fungal contamination exceeding 1.0×10^2 cfu/g. Most of the developed colonies were found to be *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* and yeasts as survived contaminants.

Attempts to control fungal contamination in the freeze-drying and packaging process of dehydrated foods such as soups, and vegetables, etc., were not always adequate. Thus, the possibility for fungal contamination is present in the processing of dehydrated foods during the process.

(Received May 31, 1984)

食品の保存性を高めると同時に、利用の便利さを目的として種々の乾燥加工食品がますます普及している。著者ら¹⁾は1981年に規格基準設定のための即席食品及び乳製品類似食品の真菌試験と題して、スープ類(インスタントスープ、みそ汁など)、コーヒー用粉末ミルクについての真菌学的な調査を報告した。今回は新形態食品の衛生調査として、主として市販凍結乾燥食品を対象とした細菌並びに真菌の汚染実態を再調査した。

試験方法

1. 試料：市販のインスタントコーヒー7銘柄11検体(凍結乾燥8検体、そのほか3検体)、みそ汁4銘柄10検体(すべて粉末)、スープ類9銘柄21検体(洋風9検体、中華風8検体、和風4検体)、かやく類8銘柄10検体(めん類関係3検体、みそ汁関係7検体)を購入し検査に供試した。インスタントコーヒーの製造年月日が明記されていた検体は1点のみで、製造後試験実施までの経過日数は3箇月、みそ汁の製造年月

日が明記されていた検体は6点、製造後の経過日数は1～9箇月(平均4箇月)、スープ類の製造年月日が明記されていた検体は12点、製造後の経過日数は1～7箇月(平均4箇月)、かやく類の製造年月日が明記されていた検体は10点、製造後の経過日数は1～15箇月(平均3箇月)であった。なお、インスタントコーヒーの場合は、大部分の製造が賞味期間を設定していて、短いものでも1年9箇月、長いものでは2年11箇月が表示されていた。

2. 真菌生菌数測定法：真菌の生菌数測定は1973年発行の食品衛生検査指針〔I〕検査法別²⁾に準拠した。主要な処理条件については以下のようである。

試料の各5gをはかり取り、滅菌生理食塩水液中に均一に分散させた後、希釈試料液を調製した。使用培地はクロラムフェニコール(100 mg/l)添加ポテト・デキストロース寒天及びこれに塩化ナトリウム(50 g/l)を加えたもので、後者はみそ汁及びスープ類の試料の場合に用いた。作成した寒天平板上に試料希釈液の一定量を塗抹し、表面を無菌的に乾燥後、23°

Table 1. Results on mycological examination of dehydrated foods

Dehydrated food	No. of tested samples	No. of negative samples	No. of positive samples			
			<10	Fungal counts per g 10 ¹ -10 ²	10 ² -10 ³	>10 ³
Coffee	11	9	1	1	0	0
Miso soup	10	0	2	6	1	1
Soup	21	9	3	7	2	0
Vegetables, etc.	10	0	0	4	6	0
Total	52	18(35%)	6(11%)	18(35%)	9(17%)	1(2%)

Table 2. Fungal counts in various soups and their identification

Food	Commercial brand	Fungal counts per g	Kind of fungi detected
Miso soup	Akadashi A	3.3 × 10 ¹	<i>Aspergillus</i> , <i>Eurotium</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Wallemia</i>
	Sansai A	<1.0 × 10 ¹	Yeasts
	Awase A	2.5 × 10 ³	Yeasts
	Miso N	7.3 × 10 ¹	<i>Aspergillus</i> , <i>Eurotium</i> , yeasts
	Miso N	<1.0 × 10 ¹	<i>Eurotium</i>
	Miso N	1.0 × 10 ²	<i>Absidia</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Eurotium</i> , <i>Syncephalastrum</i>
	Natto N	3.3 × 10 ¹	<i>Aspergillus</i> , <i>Eurotium</i> , yeasts
	Miso I	9.3 × 10 ¹	<i>Aspergillus</i> , <i>Wallemia</i> , yeasts
	Miso M	2.0 × 10 ¹	<i>Cladosporium</i> , <i>Penicillium</i> , yeasts
	Sansai I	4.6 × 10 ¹	<i>Eurotium</i> , <i>Penicillium</i> , yeasts
Soup	Corn P	2.0 × 10 ¹	<i>Cladosporium</i> , yeasts
	Cream P	1.4 × 10 ²	<i>Absidia</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Eurotium</i> , <i>Syncephalastrum</i> , imperfect fungi
	Potage A	1.3 × 10 ¹	<i>Aspergillus</i> , <i>Eurotium</i>
	Corn cream A	<1.0 × 10 ¹	<i>Penicillium</i>
	Beef cream A	4.0 × 10 ¹	<i>Aspergillus</i> , <i>Eurotium</i>
	Corn A (Chinese)	<1.0 × 10 ¹	Yeast
	Consomme Y (Chinese)	8.6 × 10 ¹	<i>Eurotium</i> , <i>Trichoconiella</i> , yeasts
	Consomme Y (Chinese)	<1.0 × 10 ¹	Yeast
	Chicken N (Chinese)	1.8 × 10 ²	<i>Eurotium</i> , <i>Penicillium</i> , imperfect fungi
	Consomme N (Japanese)	3.3 × 10 ¹	<i>Eurotium</i> , yeasts
	Consomme N (Japanese)	1.3 × 10 ¹	<i>Geotrichum</i> , imperfect fungi
	Consomme R (Japanese)	1.3 × 10 ¹	<i>Phoma</i> , yeast

7日間培養し、発生した真菌のコロニー数を計測した。

結果及び考察

1. インスタントコーヒー

Table 1に示したようにコーヒー11試料中真菌が検出された試料は2検体で、82%の検体が真菌非検出であった。検出した2検体の1つは <1.0 × 10¹ cfu/g で発生した真菌は *Paecilomyces*、他の1つは 2.0 × 10¹ cfu/g で発生した真菌は *Aspergillus niger* であった。

後者は西ドイツから製品の形で輸入されたものであり市場の大半を占める国産製品ではなかったことも考慮すれば、インスタントコーヒーに関しては菌学的な面から食品衛生上問題となるおそれはないものと判断された。

2. 粉末みそ汁及びスープ類

みそ汁の試料については、Table 1のように全検体から真菌が検出され、しかも 10² cfu/g 以上の真菌が発生した検体が2点含まれていた。みそ汁は1977年の

Table 3. Fungal counts in freeze-drying vegetables etc. and their identification

Food	Commercial brand	Fungal counts per g	Kind of fungi detected
Vegetables, egg, fish meats	Chinese noodle N	4.6×10^2	Yeasts
Vegetables, meats, egg, fish meats	Chinese noodle M	3.6×10^2	<i>Aspergillus</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Exophiala</i> , yeasts
Vegetables, fish meats, seaweed	Chinese noodle K	4.0×10^2	<i>Wallemia</i>
Vegetables, seaweed	Miso soup S	1.5×10^2	<i>Fusarium</i> , <i>Penicillium</i> , yeasts
Vegetables, seaweed	Miso soup S	2.0×10^2	<i>Fusarium</i> , yeasts
Vegetables, seaweed	Miso soup S	1.4×10^2	<i>Fusarium</i> , <i>Penicillium</i> , imperfect fungi, yeasts
Vegetables, seaweed	Miso soup A	1.3×10^2	Yeasts
Vegetables, seaweed	Miso soup N	2.6×10^2	<i>Penicillium</i> , yeasts
Vegetables, mushroom	Miso soup H	6.6×10^2	<i>Chrysosporium</i> , <i>Hormonema</i> , <i>Ophiostoma</i> , <i>Phoma</i> , imperfect fungi
Vegetables, mushroom	Miso soup C	1.7×10^2	<i>Aspergillus</i> , yeasts

調査¹⁾でも真菌検出検体数が56%とかなり高かったが、今回の調査は前回の検出率をはるかに上回り、しかも前回の検出試料では真菌生菌数がすべて <10~10 cfu/g であったことを考えると、製造加工面での微生物学的品質管理がその後改善されたとはいいいがたい。真菌検出試料の詳細を Table 2 に示すが、全体的には *Aspergillus*, *Eurotium*, 酵母類の検出頻度が高かった。発生した *Aspergillus* のうちで、*A. flavus*, *A. oryzae* など製造上麹菌として使用されたものが3検体に認められ、また酵母類(7検体に検出)、*Absidia*, *Syncephalastrum* などの生みそからしばしば分離される真菌が発生するところをみると、生みそからの加工時に加熱処理のない製品が多いようである。このような真菌のほとんどは耐熱性が弱いので、わずかな加熱処理で殺菌できるはずであり、drying 加工前の製造工程での殺菌対策を講ずる必要がある。

スープ類も Table 1 のように57%の試料に真菌が検出され、前回の70%以上の検体が真菌非検出であり、残りの30%もいずれも生菌数 <10 cfu/g の数値を示したという結果と比較した場合、明らかに微生物学的品質は悪くなっている。真菌検出試料の詳細を Table 2 に示したが、真菌が 10^2 cfu/g 以上発生した2検体は、いずれも好乾性カビの *Eurotium* が多発し、製造後の二次汚染が原因ではないかと推測された。しかも、*Eurotium* はみそ汁を含めスープ類全体に発生頻度が高かった。その生育に対する最低水分活性値は a_w 0.70~0.75 である³⁾。したがって乾燥食品の水分活性値を a_w 0.60 以下に維持するよう管理し、*Eurotium*

の増殖を制御するよう乾燥と防湿のため包材にも一層の注意を払う必要がある。

3. かやく(加薬)類

中華めん類とインスタント生みそ用のかやく類を調査したが、両者とも共通の材料のものもあり内容は乾燥野菜(とくにねぎ)、コーン、もやし、めんま、豆腐、麩、なめこ、わかめ、なると、卵、豚肉などであった。全試料から真菌が検出され、とくにみそ汁用のかやく類に 10^2 cfu/g 以上の真菌発生検体が多く品質が悪かった。分離された真菌の内容も好乾性真菌だけでなく、他の乾燥食品には認められない植物寄生菌の *Fusarium* が同一ブランドの製品 (Table 3) にいずれも検出されるなど、野菜原材料由来の一次汚染菌が目立つ点の特徴であった。とくに、かやく類の材料中でも加熱工程の伴わない原材料ほど一次汚染のリスクが高いので、無加熱加工のかやく類の製造では清浄な原材料を用いるよう微生物学的品質管理を一層はかるべきであろう。

ま と め

調査した市販乾燥食品のうちでインスタントコーヒーを除き、みそ汁、スープ類、かやく類など41検体中10検体(24%)が真菌数 10^2 cfu/g を示したことは近代的食品加工技術の1つである freeze drying が必ずしも微生物学的品質において管理が十分に行き届いていないことを示している。みそ汁やスープ類では簡単な加熱処理で一次汚染のカビや酵母(真菌)は制御できる筈であり、またこれらの商品が長期間常温で流通

することを考慮すれば、好乾性カビの対策も十分乾燥防湿をはかることによって技術的に解決しなければ事故要因になりかねない。結論として少なくとも対象となった乾燥食品での真菌生菌数をg当り 100 cfu 以下に制御できなければ衛生的であるとはいいがたいであろう。製造面での微生物学的品質管理に一層の改善が望まれる。

本調査研究は昭和58年度厚生省環境衛生局食品衛生

調査費によって実施した。

文 献

- 1) 宇田川俊一ら: 衛生試報, 99, 153 (1981)
- 2) 厚生省環境衛生局監修: 食品衛生検査指針〔I〕検査法別, p. 615 (1973), 日本食品衛生協会, 東京
- 3) L. R. Beuchat (ed.): *Food and Beverage Mycology*, p. 527 (1978), Avi Publ., Westport, Connecticut

和歌山薬用植物栽培試験場植物目録

堀越 司・木下孝三¹⁾

List of Plants: Wakayama Experiment Station of Medicinal Plants

Tsukasa HORIKOSHI and Kozo KINOSHITA

- | | |
|--|---|
| Acanthaceae キツネノマゴ科 | Narcissus tazetta L. |
| Adhatoda vasica Nees アダトーダ | var. chinensis Roemer スイセン |
| Beloperone guttata T. S. Brande. コエビソウ | Zephyranthes carinata Herb. サフランモドキ |
| Strobilanthes flaccidifolius Nees リュウキュウアイ | Anacardiaceae ウルシ科 |
| Agavaceae リユウゼツラン科 | Mangifera indica L. マンゴー |
| Cordyline terminalis Kunth センネンボク | Rhus javanica L. ヌルデ |
| Phormium tenax Forst. マオラン | Spondias cythrea Sonn. タマゴノキ |
| Aizoaceae ツルナ科 | Anonaceae パンレイシ科 |
| Tetragonia tetragonoides O. Kuntz. ツルナ | Anona cherimola Mill. チェリモヤ |
| Alismataceae オモダカ科 | Apocynaceae キョウチクトウ科 |
| Alisma plantago-aquatica L. | Allamanda neriifolia Hort. キダチアリアケカズラ |
| var. orientale Samuels. サジオモダカ | var. hendersonii Raff. オオアリアケカズラ |
| Amaranthaceae ヒユ科 | Amsonia elliptica Roem. et Schult. チョウジソウ |
| Achyrothes japonica Nakai イノコズチ | Carissa arduina Lam. カリッサ |
| Amaryllidaceae ヒガンバナ科 | Melodinus suaveolens Champ. et Benth. |
| Agave americana L. アオノリウゼツラン | Rauwolfia serpentina Benth. インドジャボク |
| var. variegata Nichols. リウゼツラン | Strophanthus divaricatus Wall. |
| Clivia nobilis Lindl. クンシラン | Vinca major L. ツルニチニチソウ |
| Crinum asiaticum L. | Araceae サトイモ科 |
| var. japonicum Baker ハマオモト | Acorus calamus L. |
| Curculigo latifolia Dry. キンバイザサ | var. angustatus Bess ショウブ |
| Hymenocallis speciosa Salisb. ササガニユリ | A. gramineus Soland セキショウ |
| Leucojum aestivum L. オオマツユキソウ | Alocasia macrorrhiza Schott クワズイモ |
| Lycoris sanguinea Maxim. キツネノカミソリ | Arisaema serratum Schott |
| L. squamigera Maxim. ナツズイセン | var. thunbergii Makino マムシグサ |
| | A. urashima Hara ウラシマソウ |
| | Monstera deliciosa Liebm. ホウライショウ |

1) 元和歌山薬用栽培植物栽培試験場長

- Pinellia ternata* Breit. カラスビシャク
P. tripartita Schott オオハンゲ
 Araliaceae ウコギ科
 Aralia elata Seem. タラノキ
 Dendropanax trifidus Makino カクレミノ
 Fatsia japonica Decne. et Planch. ヤツデ
 Panax ginseng C. A. Mey. オタネニンジン
 P. japonicum C. A. Mey. トチバニンジン
 Tetrapanax papyriferus K. Koch カミヤツデ
 Aristolochiaceae ウマノスズクサ科
 Aristolochia debilis Sieb. et Zucc. ウマノスズクサ
 Aspleniaceae チャセンシダ科
 Asplenium antiquum Makino オオタニワタリ
 Asplenium incisum Thunb. トラノオシダ
 Berberidaceae メギ科
 Berberis thunbergii DC. メギ
 Epimedium diphyllum Lodd. バイカイカリソウ
 E. grandiflorum Morr.
 var. *thunbergianum* Nakai イカリソウ
 E. sempervirens Nakai トクワイカリソウ
 var. *multifoliolatum* T. Shimizu ソハヤキイカリソウ
 Mahonia japonica DC. ヒイラギナンテン
 Nandina domestica Thunb. ナンテン
 Bignoniaceae ノウゼンカズラ科
 Campsis grandiflora K. Schum. ノウゼンカズラ
 Catalpa ovata G. Don キササゲ
 Tecomaria capensis Spach ヒメノウゼンカズラ
 Bixaceae ベニノキ科
 Bixa orellana L. ベニノキ
 Boraginaceae ムラサキ科
 Borago officinalis L. ルリジサ
 Heliotropium corymbosum Ruiz. et Pav. ニオイムラサキ
 Symphytum asperum Lepech. オオハリソウ
 S. officinale L. ヒレハリソウ
 Botrychiaceae ハナワラビ科
 Sceptridium ternatum Lyon フユノハナワラビ
 Bromeliaceae パイナップル科
 Ananas comosus Merr. パイナップル
 Cactaceae サボテン科
 Astrophytum myriostigma Lem. ランボーギョク
 Cephalocereus senilis Pfeiff. オキナマル
 Epiphyllum oxypetalum Haw. ゲツカビジン
 Gymnocalycium platense Br. et R. コウリュウマル
 G. saglionis Br. et R. シンテンチ
 Hylocereus guatemalensis Br. et R. サンカクチュウ
 ウ
 Lophophora williamsii Coult. ウバタマ
 Malacocarpus vorwerkiana D. M. Port. ハクケンギョク
 Mammillaria bicolor Lehm. ハクギョクト
 M. spinossima Lem.
 var. *discolor* S. D. ショウジョウマル
 Notocactus apricus Berg. コウチマル
 N. offonis Berg. セイオウマル
 Opuntia diademata Lem. ナガケムサン
 O. microdasys Lehm. キンエボシ
 Peireskia aculeata Mill. モクキリン
 Phyllocactus ackermanii Walp. クジャクサボテン
 Campanulaceae キキョウ科
 Lobelia inflata L. ロベリアソウ
 Platycodon grandiflorum A. DC. キキョウ
 Capparidaceae フウチョウソウ科
 Crataeva religiosa Forst. ギョボク
 Caprifoliaceae スイカズラ科
 Sambucum nigra L. セイヨウニワトコ
 S. sieboldiana Blume ニワトコ
 Viburnum opulus L. テマリカンボク
 Weigela coraensis Thunb. ハコネウツギ
 Caricaceae パパイヤ科
 Carica papaya L. パパイヤ
 Caryophyllaceae ナデシコ科
 Saponaria officinalis L. サボンソウ
 Stellaria media Ory. ハコベ
 Celastraceae ニシキギ科
 Euonymus alatus Sieb. ニシキギ
 E. japonica Thunb. マサキ
 Chenopodiaceae アカザ科
 Chenopodium ambrosioides L.
 var. *antheminticum* A. Cray アメリカアリタソウ
 Cistaceae ハンニチバナ科
 Helianthemum apenninum Lam. ハンニチバナ
 Commelinaceae ツユクサ科
 Rhoco discolor Hance ムラサキオモト
 Tradescantia reflexa Rafin. ムラサキツユクサ
 Compositae キク科
 Achillea millefolium L. セイヨウノコギリソウ
 A. moschata Jacq. ジャコウノコギリソウ
 Anthemis nobilis L. ローマカミツレ

- Artemisia absinthium L. ニガヨモギ
 A. capillaris Thunb. カワラヨモギ
 A. kurramensis Quazilbash クラムヨモギ
 Aster tataricus L. f. シオン
 Atractylodes japonica Koidz. オケラ
 A. lancea DC. ホソバオケラ
 Carthamus tinctorius L. ベニバナ
 Chrysanthemum cinerariaefolium Vis. シロバナ
 ムシヨケギク
 C. coccineum Willd. アカバナムシヨケギク
 Cichorium intybus L. キクニガナ
 Cynara scolymus L. チョウセンアザミ
 Echinops ritro L. ルリタマアザミ
 Farfugium japonicum Kitam. ツワブキ
 Helianthus annuus L. ヒマワリ
 Inula helenium L. オオグルマ
 Matricaria chamomilla L. カミツレ
 Petasites japonicus Maxim. フキ
 Rudbeckia laciniata L. オオハンゴンソウ
 Silybum marianum Gaertn. マリヤアザミ
 Stevia rebaudiana Bert. ステビア
 Convolvulaceae ヒルガオ科
 Ipomoea batatas Poir. サツマイモ
 Pharbitis nil Choisy アサガオ
 Cornaceae ミズキ科
 Aucuba japonica Thunb. アオキ
 Cornus officinalis Sieb. et Zucc. サンシュユ
 Crassulaceae ベンケイソウ科
 Kalanchoe hybrida Hort. カランコエ
 Sedum spectabilis Boreau オオベンケイソウ
 Cruciferae アブラナ科
 Brassica campestris L.
 subsp. napus J. D. Hook, et Ander.
 var. nippon-oleifera Makino アブラナ
 Wasabia japonica Matsum. ワサビ
 Cucurbitaceae ウリ科
 Gynostemma pentaphyllum Makino アマチャヅル
 Cyperaceae カヤツリグサ科
 Cyperus alternifolius L. シュロガヤツリ
 Davalliaceae シノブ科
 Nephrolepis auriculata Trimen タマンダ
 N. bostonensis Hort. ボストンタマンダ
 Dioscoreaceae ヤマノイモ科
 Dioscorea japonica Thunb. ヤマノイモ
 Dipsacaceae マツムシソウ科
 Dipsacus fullonum L. オニナベナ
 Ephedraceae マオウ科
 Ephedra distachya L. フタマタマオウ
 E. sinica Stapf マオウ
 Equisetaceae トクサ科
 Equisetum hyemale L. トクサ
 E. scirpoides Michx. ヒメドクサ
 Ericaceae ツツジ科
 Pieris japonica D. Don. アセビ
 Rhododendron indicum Sweet サツキ
 R. pulchrum Sweet
 var. spesiosum Hara オオムラキツツジ
 Erythroxylaceae コカノキ科
 Erythroxylon coca Lam. コカノキ
 Eucommiaceae トチユウ科
 Eucommia ulmoides Oliv. トチユウ
 Euphorbiaceae トウダイグサ科
 Alchornea tramoides Muell. Arg. オオベニカシワ
 Alerites fordii Hemsl. シナアブラギリ
 Euphorbia lathyris L. ホルトソウ
 E. milii Desmoul
 var. tananarivae Lean. ハナキリン
 E. pulcherrima Willd. ボインセチア
 E. sieboldiana Morr. et Decne. ナツトウダイ
 E. tirucallii L. ミドリサンゴ
 Mercurialis leiocarpa Sieb. et Zucc. ヤマアイ
 Ricinus communis L. トウゴマ
 Sapium sebiferum Roxb. ナンキンハゼ
 Gentianaceae リンドウ科
 Swertia japonica Makino センブリ
 Geraniaceae フウロウソウ科
 Geranium thunbergii Sieb. et Zucc. ゲンノシヨ
 ウコ
 Pelargonium graveolens L'Hert. ニオイテンジク
 マオイ
 Gesneriaceae イワタバコ科
 Conandron ramondioides Sieb. et Zucc. イワタバ
 コ
 Ginkgoaceae イチョウ科
 Ginkgo biloba L. イチョウ
 Gramineae イネ科
 Andropogon citratus DC. シトロネラグラス
 Anthoxanthum odoratum L. ハルガヤ
 Avena sativa L. エンバク
 Coix lacryma-jobi L.
 var. ma-yuen Stapf ハトムギ
 Cymbopogon citratus Stapf レモングラス

- C. winterianus* Jowitt シトロネラグラス
Oryza sativa L. イネ
Phyllostachys nigra Munro クロチク
Triticum sativum Lam. コムギ
Vetiveria zizanioides Nash ベチバー
Guttiferae オトギリソウ科
Hypericum erectum Thunb. オトギリソウ
Hamamelidaceae マンサク科
Distylium racemosum Sieb. et Zucc. イスノキ
Hipocastanaceae トチノキ
Aesculus turbinata Blume トチノキ
Iridaceae アヤメ科
Belamcanda chinensis DC. ヒオウギ
Crocus sativus L. サフラン
Iris floretina L. ニオイイリス
I. japonica Thunb. シャガ
I. laevigata Fisch. カキツバタ
I. sanguinea Hornem. アヤメ
I. tectorum Maxim. イチハツ
Lapeyrousia cruenta Bak. ヒメヒオウギ
Watsonia angusta Ker-Gawl. ヒオウギズイセン
Labiatae シソ科
Hyssopus officinalis L. ヒソップ
Iboza riparia N. E. Br. フブキバナ
Isodon japonicus Hara ヒキオコソ
Leonurus sibiricus L. メハジキ
Melissa officinalis L. メリッサ
Mentha arvensis L.
var. *piperescens* Holmes ハッカ
M. piperita L. セイヨウハッカ
M. viridia L.
var. *crispa* Benth. チリメンハッカ
Monarda fistulosa L. ヤグルマカッコウ
Origanum vulgare L. オリガスム
Pogostemon cablin Benth. パチョリ
Prunella vulgaris L.
var. *lilacina* Nakai ウツボグサ
Rosmarinus officinalis L. マンネンロウ
Salvia officinalis L. サルビア
Scutellaria baicalensis Georgi コガネバナ
Stachys betonica Benth. カッコウチュロギ
Thymus quinquecostatus Celak. イブキジャコウソウ
var. *albiflorus* Hara シロバナイブキジャコウソウ
T. vulgaris L. タチジャコウソウ
Lardizabalaceae アケビ科
Akebia quinata Decne. アケビ
Stauntonia hexaphylla Sieb. et Zucc. ムベ
Lauraceae クスノキ科
Cinnamomum camphora Sieb.
var. *linalocclifera* Fujita ホウショウ
C. japonicum Sieb. ヤブニッケイ
C. loureirii Nees ニッケイ
C. zeylanicum Nees セイロンニッケイ
Laurus nobilis L. ゲッケイジュ
Lindera strychnifolia F. Vill. テンダイウヤク
Macilus thunbergii Sieb. et Zucc. タブノキ
Leguminosae マメ科
Acacia contusa Merr. ソウシジュ
Bauhinia purpurea L. ムラサキソシンカ
Caesalpinia japonica Sieb. et Zucc. ジャケツイバラ
Cassia fistula L. ナンバンサイカチ
C. multijuga Rich. ハナセンナ
C. obtusifolia L. エビスグサ
C. torosa Cav. ハブソウ
Derris elliptica Benth. ハイトバ
D. malaccensis Pain タチトバ
Erythrina crista-galli L. カイコウズ
Gleditschia japonica Miq. サイカチ
Glycine max Merrill ダイズ
Glycyrrhiza ehinata L.
G. glabra L. スペインカンゾウ
G. uralensis Fisch. et DC. ウラルカンゾウ
Haematoxylon campechianum L. ロックウッド
Indigofera decora Lendl. ニワフジ
Leucaena glauca Benth. ギンゴウカン
Melilotus officinalis Lam. セイヨウエビラハギ
Mimosa sepiaria Benth. キダチミモサ
Ononis spinosa L. オノニス
Pterocarpus angolensis DC.
P. lucens Lepr. et Guilletperr
Sophora angustifolia Sieb. et Zucc. クララ
S. japonica L. エンジュ
Liliaceae ユリ科
Allium tuberosum Rottl. ニラ
Aloe africana Mill. アロエ
A. arborescens Mill. キダチアロエ
A. chinensis Bak. トウロカイ
A. ferox Mill. アオワニロカイ
Alstroemeria pulchella L. f. ユリズイセン

- Anemarrhena asphodeloides* Bunge ハナスゲ
Asparagus cochinchinensis Merr. クサスギカズラ
A. officinalis L. マツバウド
A. plumosus Baker
 var. *nanus* Nichols シノブボウキ
A. pygmaeus Makino タチテンモンドウ
Aspidistra elatior Blume ハラン
Chlorophytum comosum Bak. オリヅルラン
Colchicum autumnale L. イヌサフラン
Disporum smilacinum A. Gray チゴユリ
Fritillaria thunbergii Miq. アミガサユリ
Haemanthus albiflos Jacq. マユハケオモト
Haworthia cymbiformis Duv. タカラグサ
Hemerocallis dumortierii Morr.
 var. *dumortierii* Morr. ヒメカンゾウ
Liriope platyphylla Wang et Tang ヤブラン
Nolina recurvata Hemsl. トックリラン
Ophiopogon japonicus Ker-Gawl.
 var. *genuinum* Maxim. ジャノヒゲ
Ornithogalum caudatum Ait. コモチカイソウ
Polygonatum odoratum Druce
 var. *japonicum* Hara アマドコロ
Rhodea japonica Roth オモト
Sansevieria trifasciata Prain アツバチトセラン
Tricyrtis hirta Hook. ホトトギス
T. macranthopsis Masam. キイジョウロウホトトギス
T. nana Yatabe チャボホトトギス
Urginea maritima Bak. カイソウ
Veratrum japonicum Loesen, f. シュロソウ
Yucca gloriosa L. アツバキミガヨラン
- Lythraceae** ミソハギ科
Cuphea hyssopifolia Humb.
- Magnoliaceae** モクレン科
Illicium religiosum Sieb. et Zucc. シキミ
Magnolia kobus DC. コブシ
M. liliflora Desrouss. モクレン
M. stellata Maxim. シデコブシ
Schisandra chinensis Baill. チョウセンゴミン
- Malvaceae** アオイ科
Gossypium nanking Meyen ワタ
Hibiscus coccineus Walt. モミジアオイ
H. hamabo Sieb. et Zucc. ハマボウ
H. rosa-sinensis L. ブッソウゲ
Malva rotundifolia L. マルバアオイ
M. sylvestris L. ウスベニアオイ
- Marantaceae** クズウコン科
Stromanthe sabguinea Sond. ウラベニショウ
- Menispermaceae** ツヅラフジ科
Arcangelisia flava Merr.
Coculus laurifolius DC. コウシュウウヤク
Sinomenium acutum Rehd. et Wils. オオツヅラフジ
Stephania cepharantha Hayata タマサキツヅラフジ
Tinospora crispa Miers. イボツヅラフジ
- Moraceae** クワ科
Artocarpus integra Merr. ナガミパンノキ
Cannabis sativa L. アサ
Ficus carica L. イチジク
F. elastica Roxb. インドゴムノキ
F. lacor Ham.
F. religiosa L. インドボダイジュ
F. retusa L. ガジュマル
Humulus lupulus L. ホップ
- Musaceae** バショウ科
Musa basjoo Sieb. バショウ
M. cavendishii Lamb. サンジャクバナナ
Strelitzia angusta Thunb. オオギバショウモドキ
S. reginae Banks ゴクラクチョウカ
- Myrsinaceae** ヤブコウジ科
Ardisia crenata Sims マンリョウ
A. japonica Blume ヤブコウジ
- Myrtaceae** フトモモ科
Eucalyptus globulus Labill.
Eugenia cumini Druce ムラサキフトモモ
Pimenta acris Kostel. ペーラム
Psidium cattleianum Sabine テリハバングロウ
P. guajava L. バングロウ
- Nyctaginaceae** オシロイバナ科
Bougainvillea spectabilis Willd.
 var. *lateritia* Lam. ブーゲンビレア
- Nymphaeaceae** スイレン科
Nuphar japonicum DC. コウホネ
Nymphaea tetragona Georgi ヒツジグサ
- Oleaceae** モクセイ科
Forsythia suspensa Vahl. レンギョウ
Jasminum nudiflorum Lindl. オウバイ
J. odoratissimum L. キソケイ
J. sambac Ait. マツリカ
Ligustrum japonicum Thunb. ネズミモチ
L. lucidum Ait. トウネズモチ

- L. ovalifolium* Hasskarl.
 f. aureum Rehd. フイリオオバイボタ
Olea europaea L. オリーブノキ
Osmanthus fragrans Lour.
 var. aurantiacus Makino キンモクセイ
Onagraceae アカバナ科
 Trapa japonica Flerov ヒシ
Orchidaceae ラン科
 Bletilla striate Reichb. *f.* シラン
 Calanthe discolor Lindl. エビネ
 Cymbidium goeringii Reichb. *f.* シュンラン
Orobanchaceae ハマウツボ科
 Aeginetia indica L.
 var. gracilis Nakai ナンバンギセル
Osmundaceae センマイ科
 Osmunda japonica Thunb. センマイ
Paeoniaceae ボタン科
 Paeonia albiflora Pall.
 var. trichocarpa Bunge ジャクヤク
 P. japonica Miyabe et Takeda ヤマジャクヤク
 P. suffruticosa Andr. ボタン
Palmae ヤシ科
 Phoenix canariensis Chaub. カナリーヤシ
 Trachycarpus excelsa Wenal. ワジュロ
Pandanaaceae タコノギ科
 Pandanus boninensis Warb. タコノギ
Papaveraceae ケン科
 Chelidonium majus L.
 var. asiaticum Ohwi クサノオウ
 Eschscholtzia californica Cham. ハナビシソウ
 Glaucium flavum Grantz ツノゲンシ
 Papaver bracteatum Lindl. ハカマオニゲンシ
 P. orientale L. オニゲンシ
 P. rhoeas L. ヒナゲンシ
 P. setigerum DC.
 P. somniferum L. ケン
Passifloraceae トケイソウ科
 Passiflora edulis Sims. クダモノトケイソウ
Phytolaccaceae ヤマゴボウ科
 Phytolacca americana L. アメリカヤマゴボウ
 P. esculenta Van Houtte ヤマゴボウ
 Rivina humilis L. ジュズサンゴ
Piperaceae コショウ科
 Peperonia crassifolia Bek.
 Piper nigrum L. コショウ
Plantaginaceae オオバコ科
 Plantago asiatica L. オオバコ
 P. psyllium L.
Plumbaginaceae イソマツ科
 Plumbago capensis Thunb. ルリマツリ
Podocarpaceae マキ科
 Podocarpus chinensis Wall. ラカンマキ
 P. macrophylla D. Don イスマキ
 P. nagi Zoll. et Moritzzi ナギ
Polygonaceae タデ科
 Amblygonon pilosum Nakai オオケタデ
 Fagopyrum crymosum Meisn. シヤクチリソバ
 Polygonum filiforme Thunb. ミズヒキ
 P. tinctorium Lour. アイ
Polypodiaceae ウラボシ科
 Lepisorum thunbergianus Ching ノキシノブ
 Platyserium bifurcatum C. Chr. ビカクシダ
 Polystichum tsus-simense J. Sm. ヒメカナワラビ
 Pyrrosia lingua Farwell ヒトツバ
Portulacaceae スベリヒユ科
 Portulacaceae L. スベリヒユ
 Talinum crassifolium Willd. ハゼラン
Pteridaceae イノモトソウ科
 Adiantum capillus-veneris L. ホウライシダ
 Pteris multifida Poir. イノモトソウ
 P. vittata L. モエジマンダ
 Sphenomeris chusana Copel. ホラシノブ
Punicaceae ザクロ科
 Punica granatum L. ザクロ
Ranunculaceae キンポウゲ科
 Aquilegia flabellata Sieb. et Zucc. オダマキ
 A. vulgaris L. セイヨウオダマキ
 Caltha palustris L.
 var. membranacea Turcz.
 f. decumdens Makino エンコウソウ
 Clematis terniflora DC. センニンソウ
 Coptis japonica Makino オウレン
 var. major Satake コセリバオウレン
 C. quinquefolia Miq. バイカオウレン
Rhamnaceae クロウメモドキ科
 Zizyphus vulgaris Lam.
 var. inermis Bunge ナツメ
Rosaceae バラ科
 Agrimonia pilosa Ledeb.
 var. japonica Nakai キンミズヒキ
 Chaenomeles sinensis Koehne カリン
 C. speciosa Nakai ボケ

- Eriobotrya japonica* Lindl. ビワ
Filipendula hexapetale Gilib. ロクベンシモツケ
F. ulmaria Maxim. セイヨウナツユキソウ
Geum urbanum L. セイヨウダイコンソウ
Potentilla chinensis Serg. カワラサイコ
Prunus laurocerasus L. セイヨウバクチノキ
P. mune Sieb. et Zucc. ウメ
Pyrus communis L.
 var. *sativa* DC. セイヨウナツ
Sanguisorba officinalis L. ワレモコウ
Spiraea japonica L. f. シモツケ
S. thunbergii Sieb. ユキヤナギ
Rubiaceae アカネ科
Coffea arabica L. アラビアコーヒーノキ
Gardenia jasminoides Ellis クチナンシ
Psychotria rubra Muell.
Rubia tinctorum L. セイヨウアカネ
Serissa foetida Lam. ハクチョウゲ
Uncaria rhynchophylla Miq. カギカズラ
Rutaceae ミカン科
Citrus limonimeditica Lush. ブッシユカン
C. tachibana Tanaka ニッポンタチバナ
C. unshu Marcov. ウンシユウミカン
Evodia rutaecarpa Hook. f. et Thom. ゴシュユ
Phellodendron amurense Rupr. キハダ
 var. *japonicum* Ohwi オオバキハダ
 var. *lavallei* Sprague ミヤマキハダ
 var. *sachalinense* Fr. Schm. ヒロハノキハダ
P. chinense Schneid. シナキハダ
P. wilsonii Hayata et Kanehira タイワンキハダ
Ruta chalepensis L.
 var. *bracteosa* Paol. コヘンルーダ
R. graveolens L. ヘンルーダ
Zanthoxylum piperitum DC. サンショウ
Sapindaceae ムクロジ科
Euphoria longana Lam. リュウガン
Litchi chinensis Sonn. レイチ
Sapindus mukurossi Gaertn. ムクロジ
Sapotaceae アカテツ科
Achras zapota L. サボジラ
Saururaceae ドクダミ科
Houttuynia cordata Thunb. トクダミ
Saururus chinensis Baill. ハンゲショウ
Saxifragaceae ユキノシタ科
Deutzia crenata Sieb. et Zucc. ウツギ
Hydrangea macrophylla Seringe
 var. *otaksa* Makino アジサイ
H. serrata Seringe
 var. *thunbergii* Sugimoto アマチヤ
Pilrostegia viburnoides J. D. Hook. et Thom.
 var. *parviflora* Oliv. シマユキカズラ
Saxifraga stolonifera Meerburg ユキノシタ
Scrophulariaceae ゴマノハグサ科
Botryopleuron tagawae Ohwi キノクニスズカケ
Digitalis lutea L. キバナジギタリス
D. purpurea L. ジギタリス
Paulownia tomentosa Steudl. キリ
Verbascum blattaria L. モウズイカ
Veronicastrum sibiricum Penn. クガイソウ
Selaginellaceae イワヒバ科
Selaginella tamariscina Spring イワヒバ
S. uncinata Spring コンテリクラマゴケ
Solanaceae ナス科
Cestrum elegans Schlecht. ベニチヨウジ
C. nocturnum L. ヤコウボク
Datura arborea L. コダチチヨウセンアサガオ
D. inermis Jacq. トゲナシチヨウセンアサガオ
D. stramonium L. シロバナヨウシュチヨウセン
 アサガオ
D. tatula L. ヨウシュチヨウセンアサガオ
Lycium chinense Mill. クコ
Physalis alkekengi L.
 var. *francheti* Hort. ホオズキ
Scopolia japonica Maxim. ハシリドコロ
Solanum dulcamara L. ズルカマラ
S. nigrum L. イスホオズキ
Withania somnifera Dun.
Stemonaceae ビヤクブ科
Stemona japonica Miq. ビヤクブ
S. sessilifolia Miq. タチビヤクブ
Tamaricaceae ギヨリユウ科
Tamarix chinensis Lour. ギヨリユウ
Taxaceae イチイ科
Taxus cuspidata Sieb. et Zucc. イチイ
Torreya nucifera Sieb. et Zucc. カヤ
Taxodiaceae スギ科
Cryptomeria japonica D. Don スギ
Metasequia glyptostroides Hu et Cheng メタセコ
 イア
Theaceae ツバキ科
Camellia japonica L.
 var. *hortensis* Makino ツバキ

- var. *rusticana* Tuyama ヌキツバキ
C. sasanqua Thunb. サザンカ
 Thymelaeaceae ジンチョウゲ科
Daphne odora Thunb. ジンチョウゲ
Edgeworthia papyrifera Sieb. et Zucc. ミツマタ
 Typhaceae ガマ科
Typha latifolia L. ガマ
 Umbelliferae セリ科
Ammi visnaga Lam. アンミ
Angelica acutiloba Kitag. トウキ
A. keiskei Koidz. アンタバ
Bupleurum falcatum L. ミツマサイコ
Daucus carota L. ニンジン
Ferula assa-foetida L. アギ
Foeniculum vulgare Mill. ウイキョウ
Glehnia littoralis Fr. Schm. ハマボウフウ
Oenanthe javanica DC. セリ
Peucedanum japonicum Thunb. ボタンボウフウ
 Valerianaceae オミナエシ科
Patrinia scabiosaefolia Fischer オミナエシ
 Verbenaceae クマツヅラ科
Callicarpa japonica Thunb. ムラサキシキブ
Lantana camara L. シチヘンゲ
 Violaceae スミレ科
Viola dissecta Ledeb.
 var. *sieboldiana* Maxim. ヒゴスミレ
V. odorata L. ニオイスマイレ
 Zingiberaceae ショウガ科
Alpinia intermedia Gagnep. アオノクマタケラン
A. japonica Miq. ハナミヨウガ
 f. *xanthocarpa* Yamasiro et Maeda キミノハ
 ナミヨウガ
A. kumatake Makino クマタケラン
A. sanderæ Sand. フイリゲットウ
A. speciosa K. Schum. ゲットウ
Amomum amarum Lour. ヤクチ
Curcuma domestica Valetton ウコン
 謝辞 本植物目録作成に御協力を賜った、和歌山県立日高高等学校酒井美和嬢に深謝します。

業 務 報 告

Annual Reports of Divisions

昭和58年度業務概況

所長 鈴木郁生

社会経済の発展に伴って科学技術の果たす役割が一段と重要となるとともに、国民の日常生活における保健衛生の維持についてもなお一層の努力が払われねばならないなかで、政府は第二次臨時行政調査会の最終答申を受け、前年に引続いて行政の改革を推進している。その結果歳出抑制（マイナスシーリング）、定員削減計画の実施及び技能労務職員等の採用抑制等が行われ、加えて本年1月には昭和60年3月31日の定年退職者の後補充については不補充の方針が決定されるなど、業務遂行上極めて厳しい状況が続いている。

後述するように新薬の製造承認をめぐる不祥事が発生し、当所は厳しく綱紀の肅正をはかるとともに、時の流れに遅れないように、国の要請に対応できる体制を作るための根本的な業務の見直しを考慮しているとき、当所は臨時行政調査会による行政改革の具体的方策の1つとして、厚生省関係の見直しの対象機関に昭和58年12月指定され、自主点検調査を実施することになった。実施に当り、副所長を委員長とする自主点検委員会を設け、この下に総括、薬品、食品、生活関連、生物、情報、起草の各小委員会を編成した。現在自主点検調査票を配布し、その集計をまって点検を開始し、おそくとも年内に成案を得たい考えである。この自主点検に関連してはすでに昭和54年に策定された「国立衛生試験所将来計画」が存在するので、これに基づいて衛生試験所の業務全般及び業務に関連する事項（たとえば施設、環境など）の調査点検を行い、現状を厳しく見直し、将来を見通し、当所への期待に応えるための種々の施策を明らかにしたい所存である。

最近ライフサイエンスの発展の成果として遺伝子組換え等のバイオテクノロジーの進歩は目覚ましいものがある。これらの先端技術を応用した開発研究が医薬品をはじめとして各分野にわたって盛んに行われており、

当所においても先端技術の利用開発に対応して試験研究体制の整備をはかるため、昭和58年10月1日から生物化学部に先端技術を利用して製造される医薬品等の試験研究を所掌する室の新設が認められたことから、国立衛生試験所組織細則の一部改正を行い、生物化学部第三室を増設、室長1名を増員した。なおこの分野の急速な発展に対応し試験研究体制の一層の整備強化が必要であると考えている。

わが国の官民あげて取り組むべき重要な課題となっている癌の制圧について、昭和58年6月中曽根総理の提言による「対がん10カ年総合戦略」が閣議決定され、昭和59年度から癌対策の研究を一層総合的に推進することとなった。この戦略のうち当所は癌研究支援プロジェクト計画のリサーチ・リソースバンク（細胞・遺伝子銀行）事業のうち、癌研究に必要な培養細胞を研究者に供給する細胞バンク（仮称）事業を財団法人がん研究振興財団の委託事業として昭和59年10月から実施することになり、必要な組織、設備、施設の整備が重要な課題となっている。施設は3号館の一部改修をもってし、必要な備品類の予算として昭和59年度歳出予算に1億6千5百万円が計上された。癌制圧に関する研究は当所でも以前から行われているところであったが、今後も細胞バンクの事業を含めて恒久的な課題として取り組む考えである。

国際機関会議、国際学会への参加、国際技術協力及び国際協力事業への協力等の国際的業務は年々増加し、一部は当所の通常業務となりつつあり、昭和58年においても国際環境計画（UNEP）、WHOの国際化学物質安全性評価計画（IPCS）への積極的な協力が行われた。

技術協力としては国際協力事業団（JICA）の要請によるインドネシアの国立医薬品食品品質管理試験所

(NQCL) 強化プロジェクトが58年4月1日より正式に開始された。この技術協力はジャカルタのNQCL内に無償による4000 m²の実験棟の建設と相俟ってかつてない規模の協力事業となりつつあり、今後数年間にわたり専門家の派遣、研修生の受入れ(58年度は3名)、試験研究機材(58年度は約3千5百万円)の供与が行われることになっている。一方チェニシアの医薬品品質管理のプロジェクトはフォローアップの段階に入り、59年前半ではほぼ終了する予定である。このほかマレイシアにおける食品分析マニュアルの作成についての要請に応え、当所より専門家を2名派遣した。さらにラオス人民共和国の製薬センター建設の事前調査についても専門家を2回にわたり派遣している。

海外からの技術協力の要望はこのほかにも多く、たとえばフィリピンからも緊急な要請もあり、今後当所本来の業務のかたわらどれだけのことが可能か、慎重な対応が求められる。

施設の整備に関しては昨年の10号館及び11号館に引続き4号館(動物舎)給排水等の改修工事が行われた。その他大阪支所、薬用植物栽培試験場などでも一部改修工事が施工されている。

全国衛生化学技術協議会の年会は58年度で20回を迎え、9月29日、30日栃木県衛生研究所の主催により宇都宮市で開催された。特別講演としては「GLPについて」(厚生省保存)、及び「毒性試験のガイドラインについて」(戸部毒性部長)が行われた。またこの年会より「衛生化学検査における精度管理」を実施することになり、サンプルの配布が行われた。従来の講演会、シンポジウムなどの内容から一步進んで技術的な面でも連携を深めたことで、この意識は評価されるものと考えている。

新薬の開発をめぐる一連の汚職事件に当所薬品部長が関係し、9月22日当局により逮捕された。国民の信頼に応えるべき機関においてかかる不祥事を引き起したことは、まことに遺憾のきわみであり、深く反省しさらに一層綱紀の肅正をはかり、本来の当所の業務に励み、国民の信頼を早速に回復するよう全力を挙げて努めているところである。

追記：昭和58年8月30日はA. J. C. ヘルツ先生(国立衛生試験所の前身司薬場開設を提案、明治初期薬品の品質管理に貢献したオランダ人、当所構内に顕彰碑がある)の没後百年の忌日に当たった。当所有志は神奈川県薬剤師会、横浜衛生研究所の方々とともに横浜のヘルツ先生の墓前にもうた。

総務部

部長 渡辺 登

1. 組織

昭和58年10月1日から、生物化学部に室の新設が認められたことに伴い国立衛生試験所組織細則の一部改正(ホルモン室を生物化学第一室に、酵素室を生物化学第二室に変更及び生物化学第三室の新設)が行われた。

なお、等級別定数の改訂により研究職2等級から研究職1等級へ1名、切上が認められた。

2. 定員

昭和57年度末の定員は303名であったが第6次定員削減計画に基づき行政職(二)2名、研究職2名、計4名の定員削減と生物化学第三室の新設に伴う研究職1名(6ヵ月)の増員により、昭和58年度末の定員は、指定職2名、行政職(一)50名、行政職(二)36名、研究職212名、計300名となった。

なお、昭和59年度は、増員が認められなかった。

2. 予算

昭和58年度予算総額は、2,596,115千円で前年度の2,666,704千円に比較して70,589千円の減額となった。

減額の内容としては、昭和58年度予算における各事項の経費のうち、旅費、庁費等、10%、試験研究費5%が減額された。

新規の内容としては、遺伝子組換え等から生産される医薬品の品質及び安全性確保の試験法の開発研究のための増員分(1名)として、2,325千円、血清等製造及び検定費の事業費で、ブドウ糖、リンゲル100 ml以上の注射剤試験法の改正(不溶性微粒子試験、無菌試験にメンブランフィルター法試験の追加)により、19,883千円の増額が認められた。

国立機関原子力試験研究費においては、新規テーマ1課題(単クローン抗体を用いるラジオイムノアッセイの臨床分析への応用に関する研究)3,668千円が認められた。

国立機関公害防止等試験研究費においては、新規テーマ1課題(環境汚染物質と細菌毒素との生体系における相互作用に関する研究)10,378千円が認められた。

なお、昭和58年度事項別予算額は別表のとおり。

4. 施設整備費

(1) 厚生本省試験研究所施設整備費

昭和58年度は、動物舎(4号館)給排水等補修工事(46,379千円)を行った。また同工事の関連工事として発熱性物質試験室の整備も併せ行った。

資料 昭和 58 年度 予算額

区 分	昭和57年度 (A)	昭和58年度 (B)	対前年度差 額増△減額 (B)－(A)	備 考
	(千円)	(千円)	(千円)	
〈組織〉厚生本省試験研究機関	2,457,076	2,408,355	△48,721	
(項)厚生本省試験研究所	2,277,189	2,210,795	△66,394	
人 当 経 費	1,614,803	1,586,191	△28,612	生物化学部 1 名増員
一般事務経費	45,117	38,640	△ 6,477	
研 究 費	234,549	223,090	△11,459	
特別研究費	17,102	16,247	△ 855	1. 医薬品, 食品添加物等安 全性評価のための新技術利 用と評価基準の確立に関す る研究 (7,110千円) 2. 遺伝子組換え等の新技術 により生産される高分子医 薬品の品質試験法の開発研 究 (9,137千円)
標準品製造費	7,126	6,770	△ 356	
安全性生物試験研究センター運営費	225,094	215,292	△ 9,802	
薬用植物栽培試験場運営費	110,966	104,151	△ 6,815	
情報活動運営費	15,061	13,831	△ 1,230	
施設管理事務経費	7,371	6,583	△ 788	
(項)血清等製造及び検定費	132,016	151,181	19,165	
一般事務経費	13,133	12,415	△ 718	
事 業 費	118,883	138,766	19,883	
(項)厚生本省試験研究所施設費	47,871	46,379	△ 1,492	動物舎(4号館)給排水等改 修工事
〈組織〉厚生本省試験研究機関	209,628	187,760	△21,868	
(項)国立機関原子力試験研究費	61,357	58,199	△ 3,158	
(項)放射能調査研究費	6,996	6,493	△ 503	
(項)国立機関公害防止等試験研究費	141,275	123,068	△18,207	
計	2,666,704	2,596,115	△70,589	

(2) 国立機関原子力施設整備費

昭和58年度は、RI 施設内壁及び外壁補修工事(3,667千円)を行った。

(3) 各所修繕費(特別修繕費)

昭和58年度は、大阪支所図書室模様替工事2年計画(昭和58年度～同59年度)の初年度分(2,325千円)として、基礎、鉄骨及び土間コンクリート工事を行った。

5. その他

(1) 昭和58年度における部長職以上の人事異動は次のとおりである。

(58.4.1付)

生 薬 部 長 原田 正敏(千葉大学薬学部教授)

(58.5.15付)

大阪支所薬品 加納晴三郎(大阪支所長)

部長事務取扱

辞 職 持田 研秀(大阪支所薬品部長)
(58.10.13付)

薬品部長事務 鈴木 郁生(副所長)
取扱

休 職 江島 昭(薬品部長)
(58.11.1付)

生物化学部長 山羽 力(医化学部長)
併任

辞 職 川村 次良(生物化学部長)
(58.12.31付)

筑波薬用植物 原田 正敏(生薬部長)
栽培試験場長
併任

辞 職 大野 忠郎(筑波薬用植物栽培試験
場長)

合成化学研究部

部長 神谷 庄造

概要

昭和58年度の研究課題は57年度と同じであるが、特に毒性部との共同研究である「化学物質の吸入による気道及び肺の毒性学的研究」における分担研究、「ホルムアルデヒドの毒性発現に関する有機化学的研究」が急速に進展し、毒性部の研究共々、大きな成果を上げることが出来た。

わが国の医薬品の品質の向上と行政の簡素化を目的として昭和55年度より始まった「日本薬局方外医薬品成分規格」の作成研究が進んでいるが、第一部397品目、第二部36品目よりなる1983年版を発行することが出来た。今後、当所の関与する基準作成のためのモデルが出来たと思う。昭和59年度よりは「医薬品添加剤」についても日本薬局方並の統一規格を作成することになった。

宮田直樹第一研究室長は、「アザ多核芳香族炭化水素類の代謝に関する研究」のため、昭和59年2月1日より1箇年、米国 NIH (Dr. D. M. Jerina 研究室) へ出張した。

研究業績

1. 生理活性物質の合成と化学反応に関する研究

当部においてここ10年間実施して来たニトロソ・ニトロゲンジウム類及びニトロソ尿素類に関する研究において、これらの化合物の発癌性、抗腫瘍性、突然変異誘発性などの生理活性と、またその間発見された基礎的な化学反応についてはほとんど報文になっているが、合成については未発表のものが多いため58年度より59年度にわたって報文としている。(→誌上発表1) [衛生試験報, 101, 71 (1983)]

N^1 , N^3 ジ置換尿素誘導体のニトロソ化における配向性を確立することが出来た。すなわち、尿素誘導体 $RNHCONHR'$ においてニトロソ基の入る窒素は、置換基 R 及び R' の電子密度と立体障害の程度に支配され、 N^1 ニトロソ体か N^3 ニトロソ体のいずれかのみが生成する場合と両者の混合物が生成する場合がある(→誌上発表1)

57年度より58年度にかけてニトロソ尿素類の基本的な新反応を二種発見したが、これらの新反応はニトロソ尿素類の生理活性を説明する上に大いに役立った。

トリ置換ニトロソ尿素類が収率良くトリアツェン誘導体に変換する新反応を見出したが、本反応の反応機

構を ^{13}C -NMR によって検討した。また、本反応において少量ではあるが C-ニトロ化合物が生成するが、その生成機構についても検討した。(→学会発表7)

2-ハイドロキシエチル尿素誘導体は、 $NaNO_2$ -HCl や $NOCl$ - $CHCl_3$ などのニトロソ化剤により閉環し 3-ニトロソ-2-オキサゾリジノン誘導体となる。本閉環反応の N-ニトロソ化、ついで脱アミノ化を経る反応機構を報告した。(→学会発表2) 現在、本反応の合成化学的応用を検討中である。

ある種のアルキルtriaツェン類が抗腫瘍性を示すことより始った「トリアツェン類の合成研究」において、ジヒドロピリジン型のシアノトリアツェンの立体構造異性体を明らかにするために、 ^{13}C -NMR 及び ^{15}N -NMR を用いて検討を行った。

モルヒネの新微量活性代謝物質「7,8-エポキシaid」に関する研究においては、モルヒネ-7,8-エポキシaid 関連化合物として N-ノルメチル体及び N-アリル体の合成法を確立し、日々その薬理活性と構造との相関について検討中である。

汚染大気中に含まれるニトロ化多核芳香族炭化水素類に関する化学的研究においては、58年度はアクリジンの NO_2 ガスによるニトロ化によって得られるポリニトロ体及びその酸化成績体の構造を明らかにした。

2. 生理活性物質の作用発現に関する化学的研究

ホルムアルデヒドの毒性発現に関する分担研究課題「タンパク質並びに核酸関連化合物とホルムアルデヒドの反応」については、58年度はメチレン橋化合物のモデル化合物としてアミノ酸及び核酸塩基類のマニッヒ塩基を合成し、これらのメチレン橋化合物が容易に還元されてアミン部分がメチル化された N-メチル体となることが分った。これらの化学的な知見に基づいて、ホルムアルデヒドのラットの鼻腔癌発生機構を考察した。(→学会発表1) (環境衛生局企画課、家庭用品安全対策室へ報告) また、カルノシンのような低分子ペプチドとホルムアルデヒドの反応によって得られる成績体の構造を検討中である。

すでに 1-(2-クロロエチル)-1-ニトロソ-3-(3-ピリジルメチル)尿素 N-オキサイドや 1,3-ジフェニル-1-ニトロソ尿素類の抗腫瘍性について報告しているが、今回、これらの化合物の AH-13 及び L-1210 に対する殺細胞性及び DNA 障害性を *in vivo* と *in vitro* の実験系で検討した。(→学会発表6)

1,3-ジアリル-1-ニトロソ尿素類の抗 AH-13 作用の作用機作を検討した。生体分子のモデル化合物としてアデニン、グアニン、リジン、N-アセチルペニシラミン、ベンジルアミンなどと 1,3-ジフェニル-1-ニト

ロソ尿素との反応を試みたところ、主な化学活性種はアリルアゾニウムイオンとアリルイソシアナートであった。N-アセチルペニシラミンとの反応ではN-アセチル-S-ニトロソペニシラミンが単離出来たので、反応系中にニトロソニウムイオンが生成していることは確実である。以上の化学反応をふまえて、これらの化合物群の抗 AH-13 作用の作用機作を説明した。(→誌上発表2)

3. 薬物代謝の化学的解析と機構に関する有機化学的研究

本研究は東大薬学部広部研究室との共同研究である。チトクロム P-450 モデル反応系として酸素分子の還元的活性化を伴う酸化反応系を設計し、飽和炭化水素及び不飽和炭化水素の酸化反応系を確立した。また、チトクロム P-450 による還元反応をモデル錯体を用いて検討した。(→誌上発表3, 4, 5, 学会発表3, 4, 5)

4. 医薬品添加剤(日本薬局方外医薬品成分規格、第二部)の統一規格の作成については、医薬品添加剤メーカーの技術水準に格差があるので、作業過程でむづかしい問題が多々出てくると思われるが、なるべく短期間に関係者に改正の理念と方針を徹底させるつもりである。

薬 品 部

部 長 内 山 充

概要

医薬品の GMP は既に軌道に乗り、GLP も本年施行され、製造及び試験の技術はとみに充実されつつある。一方、製剤技術も著しく進歩しそれに伴って合目的な製剤が次々と開発、実用化されているが、この面での安定性、安全性、生物学的利用性などについては、必ずしも評価法が整備されているとはいえない。他方、局方各条や一般試験法には、最新の知見を導入して改善、向上させるべき余地が見られる。当部も検査、研究の両業務を通じてこれらの実勢に対処する必要がある。

58年9月に江島昭部長が退任し、鈴木副所長(当時)が部長を兼務した。59年3月に立澤政義第三室長が退職、同4月に内山充が部長に、武田 寧が第三室長に発令された。

インドネシア医薬品食品研究所の強化計画に協力した。チュニジアからの研修生 Miss Samira Ouanes が58年12月に帰国した。

業務成績

1. 国家検定

ブドウ糖注射液 491 件(うち不溶性異物による不適1件)は昨年比 170 件の減少であるが、リンゲル液、塩酸エタンブトールはほぼ昨年同様、避妊薬がフィルム剤 29 件を含め 49 件と 2 倍以上になり総件数は 692 件であった。

2. 特別審査試験

総件数 270 件と激増した。これは解熱鎮痛剤が 2.5 倍の 214 件を数えたためである。

3. 特別行政試験

けしのアルカロイド定量試験(モルヒネ、コデイン、テバイン) 227 件を新たに行った。国産、輸入あへんはほぼ例年通りである。

4. 一斉取締試験

ビタミン B₁ B₆ 糖衣錠、マレイン酸クロルフェニラミン錠、メシル酸ジメトチアジン錠・カプセルにつき行った。全例適であった。

5. その他

局方改正、局外規作成、WHO 依頼による国際薬局方原案の検討などに協力した。

研究業績

1. 医薬品の規格及び分析法

i) 日本薬局方に関連した規格及び試験法

局方各条中の有害試薬を用いる試験法の改訂(薬務局安全課)、エタノール中の不純物の定量法の確立と従来法との比較(→学会発表19)、市販グリセリン中の夾雑物の検出(厚生科学研究、薬務局安全課)、インドメタシンカプセルの溶出試験規格の検討、フェノチアジン系薬物製剤の純度、定量及び含量均一性試験法の作成(厚生科学研究、薬務局審査課)、局方収載麻薬及びその製剤の HPLC、GC による定量法の検討などを行った。

ii) 医薬品に関する分析化学的研究とその応用

インドメタシンとその製剤の分析(→誌上発表12, 126)、ナファゾリン・クロルフェニラミン液の定量(→誌上発表13)、クロフィブラートカプセルの分析(→誌上発表14)、ヒドロコルチゾン・ジフェンヒドラミン軟膏の分析(→誌上発表15)に HPLC を応用した。また、オートサンプラー HPLC による製剤中の解熱鎮痛剤などの自動分析システムを検討した。(→学会発表20, 21)バルビツール酸類の HPLC につき充填剤に対する親和性と化学構造の相関を検討した。(→学会発表22)人血漿中のプロプラノロール及びその代謝物ナフトキン酸の定量法を確立し、血中濃度の経時推移の測定に応用した。(→誌上発表7)解熱鎮

痛剤・抗ヒスタミン剤及び鎮咳薬配合のシロップ剤中のアスピリン、マレイン酸クロルフェニラミン、塩酸メチルエフェドリンなどの迅速分析法を確立した。(厚生科学研究, 薬務局監視指導課)あへんに含まれるメコン酸の試験法を検討した。

iii) 輸入熱帯病薬の規格試験法

ブリマキン、ファンシダール、スラミンなど14種類の薬物につき、含量、純度、安定性試験及び定量法の検討を行った。(厚生科学研究, 薬務局監視指導課)

2. 医薬品の物理・化学的安定性

i) 製剤中の医薬品の安定性

錠剤中の塩酸メクロフェノキサートの加水分解と温湿度との関係(→誌上発表11)、臭化プロバンテリンの加水分解物の同定と定量法、フェニルブタゾンの分解速度に及ぼす温湿度の影響などを検討した。ドライシロップ剤中のセファレキシンの分解を検討した。パルビツール酸関連物質の分解物の分離条件、市販製剤中のアスピリンの安定性などにつき基礎的に検討した。メシル酸ジメトチアジンの安定性とその試験法を明らかにした。(厚生科学研究, 薬務局安全課)

ii) 発がん実験に供する医薬品の安定性

ブセチン、アミノピリンの純度及び安定性を試験した。(厚生省がん研究)

3. 医薬品, 添加剤, 容器などの相互作用

i) ゼオライトの吸着性

ゼオライトのアンモニア吸着性とその特異性につき検討した。(→学会発表17)

ii) リポソーム

6-カルボキシフルオレセインを指標として、血漿中での薬物のリポソーム膜透過性について検討した。(→学会発表18)

4. 医薬品の有効性に関する薬剤学的研究

i) 生物学的同等性の解析と評価法

生物学的同等性試験結果の評価基準(→学会発表9)、分散分析法と検出力の算出法(→誌上発表6, 9)及び検出力(1-β)の意義づけ(→誌上発表125)につき検討した。フロセミド製剤について、利尿作用を指標としての生物学的利用性の評価の可否をしらべた。(→誌上発表8)

ii) 経口固形剤の生物学的同等性と溶出試験の相関

いくつかの市販製剤を用いて条件を選びつつ溶出試験を行い、臨床の場での製剤選択に際しての有用性を確かめ(→誌上発表124)、更に市販強心配糖体、抗てんかん薬製剤を用いて一般的に生物学的利用性の予知手段としての溶出試験の有用性とその限界を検討した。(→学会発表10)(厚生科学研究, 薬務局監視指導課)

iii) 生物学的同等性試験に用いる実験動物

ヒトによる生物学的同等性試験を実験動物を用いてモデル化できるかどうかにつき、グリセオフルビン製剤その他を用いて検討した。(→学会発表8, 11) ビーグル犬あるいはゲッチンゲン種ミニブタ(→誌上発表10) いずれもヒトに勝る結果を与えなかった。

iv) Intrinsic condition と生物学的利用性

内服固形剤の吸収速度を左右する内因性条件である胃内排出速度(→誌上発表123)と剤形との関連、及び胃液酸度の簡易測定用剤についての基礎的検討(→学会発表12, 15)を行った。健康人と患者とでフロセミドの体内動態の差を調べ、臨床効果との相関を解析した。(→学会発表13)

v) Extrinsic condition と生物学的利用性

シクランデレートカプセルを用いて食餌条件と吸収速度との関連をヒトについて検討した。

5. 新開発剤形の薬剤学的評価法

単クローン抗体を用いた drug delivery system のモデルとして抗 DNP 抗体-アルブミン小球体結合物を試験し体内動態を検討し、同時にマウス肺がん細胞に対する単クローン抗体の調製を試みた。(科学技術庁)

6. 麻薬及び習慣性薬物に関する研究

i) 向精神薬の分析とその応用

サルの体液及び体毛中のメタンフェタミン及びその代謝物を追跡し、中毒者判定への応用を検討した。〔衛生試験, 102, 21 (1984)〕メスカリンの微量定量法を確立しウバタマサボテン数種からメスカリンの検出を行った。向精神薬のマイクロクリスタルテストを改良させた。(→誌上発表16) フェネチルアミン系及びアンフェタミン系向精神剤のフルオレッサミンプレラベル法によるHPLC分析法を確立した。(→誌上発表17)

ii) 向精神剤標準品の合成

メスカリン 20g, サイロシン 4g を合成し精製法などにつき検討した。(薬務局麻薬課)

生物化学部

部長 山羽 力

概要

昭和58年11月1日付の川村次良生物化学部長の退職に伴い、同日、山羽力医化学部長が生物化学部長の併任となり、昭和59年4月1日付でその併任が解かれ、新たに生物化学部長に配置換えされた。部の組織として、昭和58年10月1日から、遺伝子組換えなどの先端

技術を利用して製造される医薬品に対処するための室の新設が認められ(生物化学第三室), 早川堯夫主任研究官が同室長に発令された。これに伴いホルモン室が生物化学第一室に, 酵素室が生物化学第二室に改名された。

川村前生物化学部長は標準品の規格標準の設定の技術指導のため, 昭和58年9月12~24日の期間, 台湾省薬物食品試験研究機関へ出張した。早川堯夫主任研究官は米国タフツ大学での1年間の留学を終えて, 9月末に帰国した。

業務成績

1. 国家検定

インシュリン製剤102件及び脳下垂体後葉関係製剤69件について検定を行ったが, 全件合格であった。

2. 特別審査試験

酵素製剤など14件について審査を行った。

3. 一斉取締試験

β -ガラクトクソンダーゼ製剤6件及び酒石酸ジヒドロエルゴタミン製剤11件について試験を行いその結果はいずれも合格品であった。

4. 標準品製造

昭和58年度の標準品製造品目及びその出納状況については, 巻末の表を参照されたい。

5. その他

日本薬局方第11改正に伴う業務(薬務局安全課), 組換えDNA技術を応用して製造される医薬品の承認に必要な添付資料及び組換えDNA技術応用医薬品の製造のための指針の作成(薬務局審査課, 生物製剤課), 医薬品原料規格整備に関する検討(厚生科学研究(神谷班), 薬務局審査課), 臨床診断薬懇談会での基準作成(東西医薬品工業協会)などに協力した。

研究業績

1. 医薬品の規格及び試験法に関する研究

i) ステロイドホルモンの定量法に関する研究

ピロールを用いるけい光定量法で生成する呈色物質の構造について検索した。

ii) ステロイドホルモン製剤の製造管理及び品質管理の向上に関する研究

酢酸コルチゾン, 酢酸デキサメタゾン, フルオメトロン及び吉草酸ベタメタゾン製剤について検討した。(→誌上発表18, 129)

iii) 不安定医薬品の純度の向上に関する研究

高速液体クロマトグラフ法を用いて酒石酸ジヒドロエルゴタミンの定量法を検討し, 安定性試験に応用した。(厚生科学研究(永井班), 薬務局安全課)(→誌上発表19, 学会発表26)

iv) 医薬品製剤の迅速分析法作成に関する研究

カリジノゲナーゼ, プロメライン製剤(原料)の試験法を検討し, 迅速分析法原案を作成した。(委託研究, 薬務局監視指導課)(→誌上発表127, 128)

v) 遺伝子組換え等の新技術により生産される高分子医薬品の品質試験法の開発研究(特別研究)

① 遺伝子組換えにより生産されたヒトインシュリン及び種々のインシュリンについて, 高速液体クロマトグラフ法を用いたフィンガープリントアナリシスを行った。(→誌上発表20, 学会発表25)

② 高速液体クロマトグラフ法による生合成及び天然ヒト成長ホルモンの分離について検討した。(→学会発表27)

vi) 麦角アルカロイドの定量法に関する研究

高速液体クロマトグラフ法を用いてマレイン酸エルゴメトリンの光分解について検討した。(委託研究, 公定書協会)(→誌上発表21)

2. 医薬品の有効性及び安全性に関する生物化学的研究

i) ペプチド及びタンパク質製剤の純度に関する研究

高速液体クロマトグラフ法を用いて, インシュリン製剤の定量法及び溶液中でのブタインシュリンの安定性及びに分解物の挙動を検討した。(→学会発表24)[衛生試報102, 33(1984)]

ii) 標識化合物の利用による医薬品等の生体免疫機能に及ぼす影響に関する研究(原子力研究)

① 動物及びヒト多形核白血球の食作用に対する各種医薬品の *in vitro* での効果を調べた。(原子力平和利用成果報告書第23集)

② ヒトリンパ球の幼若化反応等に及ぼす各種抗炎症剤等の影響について検討した。[衛生試報102, 36(1984)]

iii) 多形核白血球機能の分子機構並びに各種薬剤の有害作用発現に関する生化学的研究

多形核白血球の活性酸素並びに利用系に対する数種の医薬品の影響について調べた。[衛生試報102, 40(1984)]

iv) バイオテクノロジーにより生産される医薬品の品質確保に関する研究

組換えDNA技術を応用して製造される医薬品の承認申請基準案作成のための基礎的研究を行った。また, 細胞培養により製造される医薬品についての問題点を検討した。(厚生科学研究(野島班), 薬務局審査課)(→誌上発表22)

v) DNAの抽出・解析・合成技術の開発に関する

研究

遺伝子組換えを利用して生産された成長ホルモンの生物学的有効性に関する検討を行った。(科学技術振興調整費(池原班), 科学技術庁研究調整局)

vi) 酵素製剤の品質に関する研究

β -ガラクトンダーゼ製剤及びリゾチーム製剤の品質について検討した。〔衛生試報102, 25, 29 (1984)〕

3. 生体内活性物質の作用機序に関する研究

i) 糖尿病合併症の発症に関する酵素化学的研究

精製家兎水晶体アルドース還元酵素IIの性状を詳細に検討し, 糖尿病性白内障発症への関与について考察した。(→誌上発表23, 24, 25)

ii) 水晶体アルドース還元酵素阻害剤の合成と構造活性相関に関する研究

各種オキサゾール誘導体を合成し, その水晶体アルドース還元酵素に対する阻害効果と構造活性相関について検討した。(→誌上発表26, 学会発表29)

4. 標準品に関する研究

i) 化学分析用標準品の品質規格に関する研究

コハク酸ヒドロコルチゾンほか6品目の品質規格を設定した。(厚生科学研究(木村班), 薬務局安全課)

ii) 生物活性等試験用標準品の設定に関する研究

① ヘパリン国際標準品の検定を行い WHO へ報告した。また各種基原のインシュリンの国際標準品につき, 生物活性及び物理化学的試験を行い WHO へ報告した。

② 前年度に制定したカリジノゲナーゼ標準品について, 更に詳細な報告を行なった。また, リゾチーム標準品の新ロットの更新を行った。(→学会発表28)〔衛生試報102, 127 (1984)〕

放射線化学部

部長 寺尾 允 男

概要

昭和58年度は主として放射性医薬品の品質試験法の開発, 及び安全性に関する試験研究業務, 重金属の生体内動態, 薬物の体内動態, 免疫の生化学に関する研究を行った。

なお, 永松国助, 鈴木和博の二名が, それぞれ一年間の予定で米国に留学中である。

業務成績

1. 放射性医薬品の特別審査試験

体内適用及び体外適用放射性医薬品について試験あ

るいは書類審査を行った。

その結果, 2品目について表現等に問題が認められ, 再度検討することが要求された。

審査対象となった製品別品目数は次の通りである。

体内診断用放射性医薬品 1品目

体外診断用放射性医薬品 2品目

研究業務

1. 放射性医薬品の標的臓器の生化学的機能に及ぼす影響

骨診断に用いられる ^{99m}Tc -メチレンジホスホン酸テクネチウムの骨髄細胞の機能に与える影響を, Balb/c マウスを用い免疫機能の面から検討した。その結果, 常用の50倍投与量においても, 正常 Balb/c マウスの免疫機能に比較して, 何ら有意の変化は認められなかった。(原子力試験研究成果報告書24集)

2. 単クローン性抗体を用いるラジオイムノアッセイの臨床分析への応用に関する研究

ヒト成長ホルモンに対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ株を約60株確立した。(原子力試験研究成果報告書24集)

また, 東北大学薬学部南原利夫教授と協同で, 11-デオキシコルチゾールに特異的なモノクローナル抗体を調製し, その性質を調べた。(→誌上発表27, 学会発表30)

3. 放射性医薬品の品質試験法に関する研究

ジメルカプトコハク酸テクネチウム (^{99m}Tc) 注射液, テクネチウム大凝集人血清アルブミン (^{99m}Tc) 注射液及びエタンヒドロキシニホスホン酸テクネチウム (^{99m}Tc) 注射液の品質を, ガラス線維薄層クロマトグラフィーを行うことにより迅速に試験できることが明らかとなった。

また, 上記のキット中に含まれる Sn^{2+} の簡易迅速定量法を検討するとともに, HPLC による品質試験法についても基礎的検討を加えた。(原子力試験研究成果報告書24集)

4. 鉛化合物の生体内運命に関する研究

ラットに鉛化合物を投与すると, 肝において鉛結合タンパクの誘導合成が起こることを見出した。このタンパクは *de novo* に合成されるものであり, ポリアクリルアミド電気泳動で, Zn-チオネインとは異なった移動度を示す。Zn-チオネインに対する抗体とは交叉反応すること, また, アミノ酸組成及び分子量から, チオネインの一種と考えられる。(→学会発表31)

5. 衣類等に含まれる化学物質の生物学的研究

2,4,6-トリ-tert ブチルフェノール (TTBP) の吸収, 分布, 排泄について検討した。

TTBP を経口一回投与したラットでは、TTBP 及びその代謝物は尿中にはほとんど排泄されず、大部分が糞中に排泄された。

体内分布は、脂肪組織への蓄積性が高く、甲状腺、膵臓及び副腎等にも比較的高濃度の残存を認めた。

6. T細胞機能に及ぼす薬物の影響

エチレンチオ尿素は *in vivo* においてヘルパー及びサブプレッサーT細胞の両方を抑制することが明らかとなった。

7. 抗体産生系に及ぼす薬物の影響

ヒツジ赤血球 (SRBC) に対する一次免疫応答後期における Interleukin (IL-2) 及び LPS の効果を検討した。SRBC 免疫後3日目のマウス脾細胞 (day 3細胞) を抗 Thy 1.2 (または抗 BAT) +C 処理し、*in vitro* で培養し PFC へ成熟させるためには、抗原の他に LPS と ConA 刺激脾細胞培養上清 (ConA-SN) の両方が必要であり、ConA-SN 中のリンホカインは IL-2 であることが判明した。(→誌上発表130, 学会発表32)

8. 標識化合物の利用による医薬品等の生体免疫機能に及ぼす影響に関する研究

好塩基球細胞株 (2H3 細胞) を用いて、細胞骨格系に作用する薬物の、セロトニン放出に対する影響を調べたところ、反応 1) を促進するもの (サイトカラシン B, D), 2) 低濃度で促進し、高濃度で抑制するもの (ケトグロボシン A, D, J), 3) 抑制するもの (アスポカラシン B, D), の3つのグループに分類できることが明らかとなった。

9. 生体膜結合酵素の活性に対する有害物質の効果に関する研究

さきに我々が見い出したヒト赤血球膜タンパクのリン酸化反応が Hg^{2+} と Cd^{2+} により著しく促進される現象について、タンパクリン酸化反応に影響を与える、プロテインキナーゼ、ホスファターゼなど種々の酵素活性との関連において検討した結果、これらの重金属の効果は膜タンパクの perturbation によるものと結論した。

10. 赤血球表面抗原に対する研究

さきに単離したヒト赤血球に対するモノクローナル抗体は Ig M抗体であること、抗原は脂質であることを明らかにした。

11. 生体膜機能を利用した生理活性物質の分離精製技術の開発

ラット Interleukin 2 (IL-2) の部分精製を行い、IL-2 に対する単クローン抗体の調製を検討している。一方、IL-2 依存性Tリンパ球ラインの細胞膜抗原に対する単クローン性抗体を産生するハイブリドーマを

複数確立した。これらの抗体のうち IL-2 レセプターに特異的なものを検索中である。

12. 界面活性剤の開発と使用条件の確立に関する研究

数種のアルキルグルカミン類を合成し、その性質を検討した。

13. 細胞の情報認識と応答に関する研究

好塩基球細胞株 (2H3 細胞) を用い、IgE レセプターのリン酸化反応について調べた。IgE レセプターのリン酸化は β サブユニットに起こり、 Ca^{2+} 依存性であった。(→学会発表33)

14. 遺伝子組換え等の新技術により生産される高分子医薬品の品質試験法の開発研究

遺伝子組換え技術により生産される高分子医薬品の抗原性を調べるために、モノクローナル抗体を利用する方法を検討中である。

15. DNA の抽出解析合成技術の開発に関する研究

大腸菌に生産させたヒト成長ホルモンの分離精製法を開発した。

16. バイオテクノロジーにより生産される医薬品の品質確保

バイオテクノロジーにより生産される医薬品の品質を確保するための問題点について、文献調査等を行った。

生 薬 部

部長 原 田 正 敏

概要

昨年度に引き続き、生薬及び漢方エキス剤の規格試験法の基礎的研究と生薬・食品の薬理活性と成分に関する研究を遂行した。

業務成績

1. 特別審査 従来と同様、生薬又は漢方エキス剤を含む製剤 (かぜ薬 201 件) について審査を行った。この審査により、配合生薬成分の確認試験が大部設定されるようになり、審査の効果があったものと思われる。その反面、漢方エキス剤は混合生薬のエキスであるため無数の成分を含み、特定成分の分離確認が困難な場合がしばしばある。したがって、判定に苦しみような確認試験の無理な設定がみうけられた。

研究業績

1. 生薬及び生薬製剤の規格試験法の基礎研究

i) 生薬の規格試験法の研究

前年度に引き続き、猪苓、車前子、竜胆、桔梗、石膏、

大黃、牡丹皮などの品質評価法について検討を行った。(→誌上発表131, 132, 133, 134, 135)また、局方生薬の灰分について全般的に検討した。

ii) 漢方製剤の薬剤学的研究

漢方湯液中の成分間の反応を調べるため、ベルベリンとグリチルリチンの反応物の化学構造を¹³C-NMR法を用いて解析した。(→学会発表34)標準品を目標として、グリチルリチン標準品の調製法並びにその純度決定法を検討した。(厚生科学研究費、薬務局へ報告)漢方エキス剤の品質評価のための研究として、麻黄湯エキスの生物学的試験の検討を行い(同上)、桂皮について官能試験、理化学試験などを総合した品質評価法を検討し(→学会発表35)、指標成分の原料中含量と製剤中含量の比(利用率)を用いる漢方エキス剤の品質試験法をまとめた。(→誌上発表136, 137, 138)

2. 植物資源の医薬的利用に関する研究

i) 薬用植物の化学的品質評価

¹³C-NMR 直接測定法を用い、当帰、柴胡、ハトムギを測定した。

ii) 東洋薬物の成分検索とその生物活性の研究

前年度に引き続き駆瘀血生薬の化学・薬理研究を行った。甘草、牡丹皮、柴胡の70%メタノールエキスを共同研究部に供給するとともに、川芎に認められた筋弛緩作用の成分的追求を行い、これらの成分による作用部位の解析を行った。(→学会発表36)(科学技術振興調整費、研究調整局へ報告)

iii) 熱帯・亜熱帯の微生物・植物の総合開発に関する共同研究

インドネシアでの繁用生薬のクスリウコン(*Curcuma xanthorrhiza* の根茎)に含有される精油成分につき、利胆活性、その活性成分、その薬理作用機序を検討した。カンフルにその主活性成分の意義をみとめ、インドネシアバンドン工科大学との共同研究を終了することになった。(→学会発表37)(インドネシアバンドン工科大学、理化学研究所との共同研究、科学技術振興調整費、研究調整局へ報告)

3. 天然有害物質の化学的研究

i) マイコトキソンの研究

Chaetoglobosin A 誘導体を作成し、これらを含めた cytochalasin 類と生体たん白アクチンの相互作用を検討した。Chaetomium spp. の細胞毒成分 isocochliodinol, neocochliodinol の構造を決定した。(→誌上発表28)

ii) オゴノリの研究

オゴノリ成分の抽出方法、各抽出分画の薬理試験、それらの化学的性質について検索を行った。(厚生科学

研究費、環境衛生局へ報告)

iii) 新開発食品の安全性評価に関する研究

ゴシポールの定量とハトムギ、茶類の文献的検索を行った。(環境衛生局へ報告)

療 品 部

部長 大場 琢 磨

概要

歯科鑄造冠用金属には、健康保険では金銀パラジウム合金が主として使われてきたが、金価の高騰などの理由から、代ってニッケルクロム合金が使われだし、昭和58年2月に健康保険に採用されてから使用量が次第にふえてきた。これをきっかけとして歯科用金属の安全性が問題となり、昭和58年度に厚生科学研究班(班長 東京医歯大 佐藤温重教授)が組織され、ニッケルのアレルギー性をはじめとするニッケルクロム合金の毒性に関する検討が始められた。当部はニッケルの溶出と同合金の腐蝕を分担した。

人工腎臓装置基準は過去10年にわたって同調査会において審議されてきたが、ようやく昭和58年6月20日付の薬務局長通知によって承認基準の形で公布された。

近年の電子技術の応用から医療用具の範囲は急拡大しているが、これに対応するため、59年度予算で、当部に電子機器研究室(ME室)を設置し、増員を要求したが、最終の大蔵省の査定段階で没となった。しかし将来の展望を考えると、国としての医療用具の対応は甚だ心細い限りで、シーリングのきびしい折とはいえ、誠に残念なことであった。

業務成績

1. 眼内レンズの基準作成

眼内レンズは白内障患者の水晶体を摘出して、代りに眼内に挿入移植されるもので、光学部の材料は主にポリメチルメタクリレート(PMMA)が使われ、その直径は約5mmで薄く重さは約10mgという非常に小さいものである。

FDAでは1982年に認可しており、海外では既に約1万個が治療に使われ好成绩をあげているといわれている。これに関する基準のうち、強度、溶出物試験などを当部で分担したが、今年5月にほぼ完成し、近く公布されると共に申請中の5社の製品も認可される見込みである。

2. 家庭用品の試験検査

前年に基準作成を行ったテトラクロエチレン及びトリクロエチレンの規制基準は、昭和58年5月27日

付で告示された。その結果上記の2溶剤は家庭用エアゾール製品及び家庭用洗剤への使用が禁止されることになった。

年次計画による試験検査は加硫促進剤1品目、溶剤2品目及び洗剤助剤1品目について行った。

3. 理化学試験室のスペクトル測定

FX-200型核磁気共鳴装置はディスクドライブ装置にやや弱点があるもののほぼ順調に作動し、生薬部など各所で頻繁に利用している。当室で依頼されて測定した試料数は大阪支所分を含めて約80件であった。依頼は分子構造を目的とした特殊測定法及び質量分析を併用する希望が増加し、構造が決定された事例もあった。

質量分析依頼も昨年に比べて増加したが、サンプルタイプがイオン源に不向きなため有用なスペクトルがえられないことが多かった。

その他の共通機器に関しては一昨年一度も利用されなかった低温灰化装置が数回利用され、使用頻度の高いものは蛍光光度計、自記濃度計であった。

なお昭和58年度予算でGC-MSの購入について機種選定委員会を作って検討した結果、日本電子DX-300に決定し、共通機器として食品部の機器室に設置されることになった。

研究業績

1. 歯科製造用ニッケルクロム合金から溶出される金属イオンの定量と変色に関する研究

配合比の異なるニッケルクロム合金14種を試料とし、これらを1%乳酸溶液、日局生食液、1%乳酸・0.1%硫化ナトリウム溶液及びヒト唾液の各液中37°で3週間浸漬し、その間適時に液を採取し、原子吸光法によりニッケル、クロム、銅の定量を行い、試料の金属組成、浸漬液、溶出金属量及び変色との関係を比較検討した。この結果に基づいて、アレルギー性、発がん性に関係のあるニッケルなどの溶出試験法を作成した。(厚生科学研究、東京医歯大などと共同、薬務局へ報告)

2. イオン交換樹脂混床を用いた尿毒症患者血液の電解質バランスの調整

さきに血液のpHバランスに好適な混床を確定したが、今回は混床通過によるNa, K, Ca, Mg, Hのバランスを検討した結果、アンバーライト50(R), (Mg), (Ca)及び(H)の6:7:25:10の混床が優れていることが判り、樹脂量とイオン選択係数との間に比例関係があることが認められた。(科学技術庁特別研究)(一誌上発表29, 30, 学会発表40, 41, 42)

3. 血液回路の放射線滅菌による材質の変化と品質

改良に関する研究

血液回路を構成している塩ビ以外の材料、ポリエチレン、ポリプロピレン、ナイロンの部分品に1~5 Mrのγ線を照射し、それらの材質変化を検討したが、2.5 Mrad以下では特に支障をきたす変化は認められなかった。また前年度照射をした改良型チューブの経年変化をも調査した。(原子力研究)

4. 家庭用品に含まれる化学物質の分析化学的研究

ゴム製品に使われている加硫促進剤は約70種に及んでいるが、これらの中で特にメルカプトベンゾチアゾール系及びジチオカルバメート系の加硫促進剤あるいはそれらの変化体はアレルギー性を示すことが知られている。

ゴム製品中の加硫促進剤の系統的分析法を検討し、事故をおこしたゴム手袋の分析を行った。分析の結果、検出された促進剤とゴムアレルギー患者のパッチテストで陽性を示した促進剤とはよく一致した。この成果は、ゴムカプレン事故の予防、治療に今後大いに貢献することになると思われる。

また厚生省のモニター病院において綿ネルの寝間着で色素沈着をとまなり接触皮膚炎を起こした事故があり、送付された寝間着のメタノール抽出物について分析を行ったところ、捺染に使われたナフトールASが原因物質であると判定することができた。(環境衛生局家庭用品対策室へ報告; 東邦大医学部、名古屋大医学部と共同)(→学会発表43, 44)

5. 機器分析及びコンピュータによるデータ処理に関する研究

当所のFX-200で測定したNMRデータをそのまま磁気テープに追加保存できるシステムをルーチン化した。今後これをマイコンで検索できるシステムを考えてゆく。

またNMRの特徴である非破壊分析法の利点を生かし、二重サンプル管による測定に関する考察を行った。(→学会発表45)

環境衛生化学部

部長 義平 邦利

概要

本年度の主な業務内容は継続の他に、環境汚染などを反映して、新たに、天然放射性核種の分析に関する研究、低沸点有機塩素化合物の主成要因物質の制御に関する研究、飲料水中の発がん物質に関する研究に着手した。

一方、化粧品を経時安定性に関する研究、陸水域の有機ハロゲン化合物の分析手法に関する研究、建築物維持管理、資材の衛生安全確保手法の策定に関する研究は本年度で終了した。

タイ国環境庁技官 Miss Cherdchan Siriwong は昭和58年10月17日より59年1月21日まで環境第三室で技術研修を行った。

佐谷戸安好室長は昭和58年12月6日より同20日まで、タイ国水道技術訓練センターの事前調査団団長としてタイ国へ出張した。

業務成績

1. 空気関係

前年に引続き東京都内3箇所の子設自動車排気ガス測定所で、各種の自動計測器を用いて大気汚染物質の常時測定を実施した。現在、各種自動計測器から得られたデータはコンピュータを用い統計処理を行い効率化がはかられている。3箇所での調査は、次の12項目である。一酸化炭素、一酸化窒素、二酸化窒素、窒素酸化物、二酸化硫黄、オゾン、アルデヒド、浮遊粒子状物質、メタン、非メタン、全炭化水素、交通量。(環境庁大気保全局へ報告)

2. 化粧品関係

i) 一斉取締試験：検体数が飛躍的に増大した。1208件の口紅中のタール色素について、試験を継続中。

ii) 化粧品原料基準の追加品目について、試験を行った。(薬務局審査課へ報告)

iii) 化粧品の経時安定性等に関する調査及び試験。(薬務局審査課へ報告)

3. 水関係

i) 東京都下水道局南部第2管理事務所の湧水調査に関連し、当所8号及び11号館の地下湧水(5検体)について水質試験(水温、pH、蒸気残留物、塩素イオン、過マンガン酸カリウム消費量及び鉄イオン)を行った。(国立衛生試験所総務部長へ報告)

研究業績

1. 建築物内における空気質の衛生管理基準の設定に関する研究

i) 大規模建築物及び一般住居内におけるホルムアルデヒド汚染の実態を室内発生源との関連で検討した。(→誌上発表31)

ii) ホルムアルデヒドの個人暴露量を測定するための簡易分析法の検討を行った。(→学会発表46)

iii) 各種居住環境下における主婦について、ホルムアルデヒドによる個人暴露量の実態を明らかにすると共に、個人暴露量に及ぼす室内環境条件の影響を詳細

に検討した。(厚生科学研究、環境衛生局企画課家庭用品安全対策室へ報告)

2. 環境試料中の天然放射性物質の分析に関する研究

大気浮遊塵中の²¹⁰Pb分析法を確立した。

3. 化粧品等に含有する許可物質の分析化学的研究
HPLCを用いて、クリーム、乳液、化粧水、及びシャンプー等化粧品を対象として微量に含有するオキシベンゾン、トリクロロカルバネド等の試験法を確立した。(→学会発表48)

4. 化粧品用タール色素中の未反応中間体等の分析と安全性に関する研究

安全性に問題があると考えられる Sudan I とトルイジン類について検討を行い、これらに関連のある赤色 219, 204, 205, 225 号中から Sudan I, また赤色 503, 401, 紫色 401 号中からトルイジン類の存在の有無の簡易分析法を確立した。(→学会発表47, 49)

5. 化粧品の安全性を予測する *in vitro* 試験法の研究

安全性評価の一つとして、モルモットの皮膚を用いて、ラウリル硫酸ナトリウム共存下における¹⁴C安息香酸の皮膚透過性を検討した。(原子力研究)

6. 染毛剤の分析法に関する研究

57年度までに確立した試験法を利用して、臨床問題があると考えられる製品について、パッチテストとの相関から、成分について研究をした。

7. 水道水質基準及び試験方法の設定に関する研究

i) 水道水中の標準分析法の開発に関する研究：水道水質基準の追加・改定などの基礎資料を得るために、水道水中のスズ、ニッケルの分析方法の研究を開始した。(環境衛生局水道整備課中間報告)

ii) 陸水域の有機ハロゲン化合物の分析手法に関する研究：昭和56, 57年度の研究成果をもとに共同研究機関8箇所と協力して、全国水道原水302試料を分析し、分布状況と他の水質成分との相関関係を解析した。また有機ハロゲン化合物の代替分析法についても確立した。(水道環境部、環境庁総合プロジェクト研究、大沢班報告)(→誌上発表32, 33, 34, 学会発表50, 52)

iii) 温泉水の衛生化学的研究：温泉飲用泉汚染調査方法の検討及び汚染の実態について泉質の種別毎に研究を行った。(環境庁自然保護局へ報告)

iv) 低沸点有機塩素化合物の生成要因物質の制御に関する研究：都市河川におけるトリハロメタン生成原因物質の検索と発生源との関連を研究するため、鶴見川を対象として検討を行っている。(水道環境部、環境

庁総合プロジェクト研究, 合田班報告) (→学会発表53)

8. 水道用薬品または水道用品に関する研究

i) 水道用品等規格設定に関する研究: 水道用薬品または水道用品等の規格設定のためエポキシ亜鉛びき鋼管並びに硬質塩化ビニル管の成分及び溶出試験を行った。(水道環境部水道整備課へ報告)

ii) 建築物維持管理, 資材の衛生安全性確保手法の策定に関する研究: 建築物維持管理及び資材の衛生安全性確保のため, 昭和56, 57年度, 洗浄剤, 充てん剤, 塗料, 防錆テープの溶出試験, 成分試験とトリクロロエチレンテトラミンなどの毒性試験データをもとに維持管理基準案を策定した。(環境衛生局企画課へ報告)

9. 水利用に関する衛生化学的研究

i) 飲料水中の発がん物質に関する研究: 水道水中の主要発がん物質の摂取量とその危険度を評価するため, 低沸点有機ハロゲン化合物の Ames test 並びに染色体異常誘起能試験を開始した。(厚生省がん研究助成金, 内山班報告)

食 品 部

部 長 斎 藤 行 生

概要

昭和59年4月1日付で, 内山充前食品部長は, 薬品部長として移動し, 後任に食品部第三室長が就任した。また同日付で石坂孝技官が新しく採用された。更に5月1日付で米谷民雄技官が着任した(国立公害研究所より)。

鈴木隆主任研究官は脂質の過酸化に関する研究のために米国コネティカット大学に出張中である。武田明治第一室長は昭和58年11月13日より昭和59年1月10日迄食品分析プロジェクトにおける短期顧問としてマレーシアに出張し, 任を果して無事帰国した。

昭和58年7月16日付で三原翠主任研究官が, また昭和59年3月31日付で辰濃隆主任研究官が退職した。

業務面では, 食品の赤かび毒による汚染, 輸入ワカサギ中のダイオキシン問題等の難問にも直面したが部員一同の努力により大過なく新年度を迎えることができた。

業務成績

1. 輸入食品検査: 58年度は, 西独白ワイン6検体の異物検査, オレンジ中のチアベンダゾール1検体, カシューナッツ3検体中のアフラトキシン類の試験検査を行った。

異物検査6検体は要注意。他の試験検査結果は可であった。

2. 特別行政試験: 国産及び輸入の食品総数108検体につき, 重金属, 農薬, マイコトキシン, 添加物, 異物等の化学試験を行った。

その内訳はバイナップル2検体, 生あん5検体, 粉末スープ6検体, 穀類83検体, 砂糖12検体である。

研究業績

1. 食品中の人工汚染物

i) 人工汚染物の分析及び試験法

食品中の有機リン農薬— 新に5農薬を加えた— 一斉分析法及び有機塩素剤の分析につき検討を加え(厚生科学研究)合せて輸入穀物中のクロルデンの実態調査を行った。(環境衛生局へ報告)

輸入ワカサギ中のダイオキシンの分析法の検討を行った。(環境衛生局へ報告)更に食品中のEDB残留量の調理による減衰につき検討した。(環境衛生局へ報告)

ii) 人工汚染物の代謝及び動態

in vitro でのリン酸トリエステル類の代謝につき比較検討した。

iii) 人工汚染物の作用

ラット赤血球膜に対する有機リン剤の影響を調べ種々の生化学的反応との関連性について検討を加えた。

未だ毒性解明の充分でない2,4,5-T並びに2,4-Dをとりあげ脂質代謝への影響をperoxisomeの増殖促進という面から検討し, この除草剤による発癌との関連性にまで論をすすめた。(→誌上発表37)

2. 食品中の天然汚染物

i) 天然汚染物の分析及び試験法

多波長分光計を用いるHPLCによりアフラトキシンのコンファメーションを同時に行う微量分析法について検討した。(→誌上発表43)また穀類汚染が懸念されるニバレノール及びデオキシニバレノールのTLC分析法の検討を行った。生物異物としての昆虫の混入時判定に虫体酵素測定を検討しLAP及びコリンエステラーゼが目的に適合することを知った。酵素法による生あん中のシアン配糖体-シアンの分析を試みた。

ii) 天然汚染物の代謝及び動態

乳分泌最高時におけるステリグマトシステンの体内分布について検討を加え, ステリグマトシステンによる発癌部位との因果関係について考察を加えた。またステリグマトシステンとヒトの胃液, 胆汁及び人工胃液並びに人工の腸液との相互反応を検討した。コナダニの防除法開発のため基礎実験を白色光を用いて行ったが, 走光性に対する有意の結果が得られなかった。

iii) 天然汚染物の作用
 オクラトキシンAと蛋白質との結合様式、結合力に
 関して基礎的な検討を行った。(→学会発表56, 57)

3. 食品成分の変質と安全性

i) 成分及び変性物の分析

抗酸化剤の存在が、TBA 反応によって代表される
 生体内過酸化状態にどのような影響をあたえるか検討
 した。(→誌上発表38)

また CCl_4 や HCB 投与肝と非投与肝の TBA 反応
 の差から、触媒として作用する鉄の形態を推論した。
 (→誌上発表39)

放射性医薬品の標的臓器の生化学的機能に及ぼす影
 響を検討した。(原子力試験研究費, 科学技庁へ報告)

ii) 成分及び変性物の動態

クロロフィル関連化合物の実態, 分析, 化学反応及
 び生成原因等につき詳しい検討を行った。(→誌上発表
 40, 学会発表58, 59)

iii) 新開発食品の安全性

“健康食品”の不健全な部分に光をあて、問題点を
 抽出し、従来、模糊としていた“健康食品”に対する
 食品衛生の立場を明確にした。(→誌上発表44)

4. 食品汚染物の検知, 実態, 人体暴露

i) 未検知汚染物の検知システム

アサリから抽出した中性画分及び酸性画分は、汚染
 海域から採取した貝と食用貝とでは明かに相異なるこ
 とを見出した。(国立機関公害防止総合研究)

ii) 食品汚染物の実態に関する研究

モニタリングデータベースは総計75万件に達し各種
 の解析及びデータの提供を行った。

乳用児食を含む日常食中の汚染物摂取量調査 total
 diet study を行い、全国11機関のデータとも合せて解
 析した。(厚生科学研究)

iii) 化学物質の経口摂取量と危険度予測

過去8年に亘る厚生科学研究, トータルダイエツ
 ト・スタディー及び食品汚染物モニタリングの結果を
 鳥瞰し、食品汚染物の人体摂取実態を明らかにした。
 更にその結果を踏まえて発癌危険度を試算した。(月刊
 薬事, 25, No. 6, 47 (1983)) また安全性の考え方及
 び試算の方法を実例をひいて説明した。(→誌上発表
 42)

5. 食中毒の化学的解明

多波長分光計を検出器とする HPLC 法によるオゴ
 ノリ間の成分差の検討を行った。(厚生科学研究)

6. その他

鶏の脂肪酸複合合成酵素の C 及び N 末端を決定する
 とともに、合成酵素中の thioesterase を分離し、アミ

ノ酸 sequence に関する分析研究を行った。(→誌上発
 表41)

食品添加物部

部長 谷村 顕雄

概要

昭和58年8月, 11品目の食品添加物の追加指定に関
 連して, その規格, 食品中の分析法等の作製を行った。
 また昭和59年度に公布が予定されている第5版食品添
 加物公定書の前案について検討を行っている。膀胱癌
 がんの疑いが持たれているオルトフェニルフェノール
 (OPP) の柑橘類製品中の残留が懸念されたため, 緊
 急の実態調査を行った。

石綿肇主任研究官はニトロソアミン研究のため科学
 技術庁中期派遣研究員として昭和58年7月より1箇月
 間欧州の諸研究機関に出張, また昭和58年9月カナダ
 で開催された第8回ニトロソ化合物に関する国際学会
 に山田隆室長ら3名が出席, 発表, 聴講した。

業務成績

1. 製品検査

食用色素: 検査件数 342, 合格 341, 不合格 1

2. 食品添加物について

i) マーメレード, ジュースに含まれる OPP 含量
 の実態調査を行った。(食品化学課) [衛生試報,
 102, 133 (1984)]

ii) 食品中に含まれる二酸化チタンの灰化, 発色法
 による分析法を作製した。(厚生科学研究)

iii) 天然添加物標準分析法を作成した。(食品化学
 課)

3. 容器包装について

輸入ガラス製コップ4ロット(各5個)について鉛
 の溶出試験を行ったところ1ロットについては規格値
 を超える鉛が溶出した。[衛生試報, 102, 140 (1984)]
 また, しり器からのトルエンジアミンの溶出試験を行
 った。(食品衛生課)その他, プラスチックの材質・溶
 出試験法案について追試験を行った。(食品化学課) [衛
 生試報, 123, 129 (1984)]

研究業績

1. ニトロソ化合物に関する研究

i) 医薬品のニトロソ化について

ミノサイクリンからのニトロソジメチルアミン
 (NDMA) の生成速度は, ジメチルアミンからの生成
 速度を起えており, ミノサイクリンからの NDMA の
 生成にはジメチルアミンを経ない経路があることが示

唆された。トラザミドからは、その構造から予測されるニトロソヘキサメチレンイミンのほかにニトロソピペリジンが高率で生成した。(→誌上発表45)

ii) 生体試料中のニトロソウレアの分析法

ニトロソメチルウレアは不安定なためアルカリ性でジアゾメタンとし、ニトロチオフェノールと反応させてメチルチオエーテルとして分析する方法を検討した。また胃内容物、血液などの生体試料中からの分析は、けいそう土を充てんしたカラムを通して精製することにより好結果が得られた。

iii) 食品中のメチルグアニジン、アグマチンの分析法

メチルグアニジン、アグマチンをベンゾインと反応させ蛍光検出器付高速液体クロマトグラフィーによる定量法を検討した。

iv) ゴム製乳首に含まれるニトロソ化合物前駆体の同定、定量

乳首ゴム中の残存加硫促進剤の分析法として、ジアルキルジチオカルバメートをエチルエステルとし、ガスクロマトグラフィーにより定量する方法を作製した。

2. 食品添加物等に関する研究

i) プチルヒドロキシアニソール (BHA) からの変異原性物質の生成の可能性について

発がん性の認められた BHA 2% 添加ラット飼料について、BHA と飼料中の成分との反応による変異原性物質生成の可能性について Ames 法を用いて試験を行ったが、二次生成物として変異原性物質が生成している可能性は認められなかった。〔衛生試報, 102, 137 (1984)〕

ii) 食品添加物の 1 日総摂取量調査

食品添加物の 1 日摂取量調査方式により、10機関で調製した試料を対象として酢酸の摂取量を調査した。酢酸の 1 日総摂取量は平均値で 254.1 mg (天然由来を含む)であった(食品化学課)。グリチルリチン酸の摂取量については、市販食品中のグリチルリチン酸量を測定し、摂取量への寄与度との関係を明らかにした。(→学会発表61)

iii) 調製粉乳中の亜鉛塩の定量法

湿式灰化後、原子吸光法で分析することにより、妨害なく定量できた。

iv) 畜水産食品中の残留物質の検査法に関する研究

合成抗菌剤につき、HPLC 法による系統的検査法の検討を行った。(厚生科学研究)また、トリメトプリム、オルメトプリム、ピロミド酸の試験法を設定した。(乳肉衛生課)

衛生微生物部

部長 倉田 浩

概要

当部における検定・試験業務は、昨年度とほとんど変わらない。JICA のチュニジア国医薬品管理プロジェクトの援助の目的で、昭和58年8月より3箇月間、細菌第1室長の石関忠一技官が同国に滞在し、無菌室の新設、機器の整備に関し援助を行った。また、昭和58年3月から研修の目的で当部に配属された同国医薬品管理所の職員 Miss Mahjoubi Leila は、11月末日に無事研修を終えて帰国した。かねてから同じく JICA 関係で、インドネシア国立医薬食品管理センターの援助を開始しているが、昭和58年2月21日から2週間、また昭和59年2月5日から1週間、専門家会議並びに起工式に参列のため倉田がジャカルタに出張した。このほか本年も国内外から研究生が当部において研修を受けた。また WHO の援助の一環として、河西勉技官が、マレーシア国のクアラルンプール地域に出張し、食品衛生微生物試験規格を充実させる目的で、昭和58年10月から1月まで、約3箇月当地に滞在した。

業務成績

1. 国家検定

検査 (輸出検査を含む)

ブドウ糖、リンゲル、インシュリン、ホルモン、避妊薬など総計1383件 (うち細菌試験716件、真菌試験667件)を行ったが、不適はなかった。

2. 一斉取締試験

眼科用剤の水性並びに軟膏剤について総計340件 (うち細菌試験170件、真菌試験170件)を実施したが不適品はなかった。

3. 食品に関する試験

輸入食品検査では、細菌検査が総計144件で、その中に不適品が25件あった。また真菌検査では輸入茶2件を行ったが不適品が1件あった。

4. 規格・基準試験, 行政試験など

本年度は、あん類、ソース類、凍結乾燥食品などについて微生物試験を行い、規格・基準の設定のための基礎資料を提供した。

研究業績

1. 放射線照射による医薬品、化粧品微生物汚染防止に関する研究

昨年度に継続し、生薬類の甘草、桂皮、柴胡、当帰及びソウジツなどの微生物並びに含有成分の分析 (生

薬部分担)を、50~1000 krad の5段階の照射物について試験を行った。滅菌並びに有効成分の分解という見地からみると、適当な照射線量は、200~500 krad 以内にあるとの結果が得られた。

2. 各種医薬品、化粧品製剤に用いられる防腐剤に関する研究

脂肪酸と有機酸との間の抗菌性をみたが、緑膿菌に特異的と思われる活性を見いだした。

3. 血液回路の放射線滅菌による材質変化と、それに対する品質改良並びに滅菌効果に関する研究

Bacillus pumilus の芽胞に対する ^{60}Co の γ 線の照射が有効か、またその際に過酸化水素の併用効果についても併せて試験した。

4. 畜水産食品中の抗生物質の検査法に関する研究
抗生物質の個別検査法の検討を行いつつあるが、輸入天然ビタミン蜜蜂花粉の中よりオキシテトラサイクリンを検出、定量を行った。

5. 温泉等の微生物汚染に関する基礎研究

温泉の原泉及び飲用泉について細菌の試験法の検討を行っている。

6. 細菌の変異に関する研究

テトラサイクリン抵抗性プラスミド導入株を試験菌株として使用可能かどうかの検討を進めている。

7. 細菌性食中毒の生態に関する研究

液卵並びに卵製品の細菌調査を行う一方、輸入食肉などからわが国に搬入されるサルモネラの菌型と耐性菌について調査をつづけている。

8. 各種食品の微生物規格基準設定のための基礎資料の集積

昨年度は、つくだ煮、味噌、しょう油、焼肉のたれなど、また本年度は、あん類、ソース類、凍結乾燥食品(コーヒーを含む)などについての微生物叢の調査を実施し、規格設定のための基礎資料を提供した。〔衛生試験報, 101, 147, 150 (1983)〕

9. 微生物試験の迅速・自動化に関する研究

スパイラルシステムの中に、新しく4分画フラット平板を考案した。(→学会発表62, 66)

10. 食中毒を起因するブドウ球菌並びにセレウス菌に関する研究

食中毒由来のセレウス菌の毒素原性並びにフェージ感受性、コリン感受性の相違について、血清学的な検討を行っている。(→学会発表63, 65, 67, 69, 70)

11. 食品中の嫌気性菌の検出に関する研究

ピフィズ菌の検出率を高めるべく培地の比較検討を試みている。

12. ウサギ腸管内から分離される好気性ニトロソジ

メチルアミン (NDMA) 生成菌の検索

13. 植物性生薬の真菌汚染に関する研究
生薬由来の *Aspergillus* の同定を行っている。

14. 食品中の有害真菌に関する研究

主として北海道で多発した赤カビ麦から、*Fusarium* 菌を検出し、その毒素産生性を化学的に調査する一方では、発生要因の追跡を目的として、今までの異常発生地域気象について調査した。倉庫に貯蔵中の落花生のアフラトキシン汚染の推移を経時的に測定している。また、*Chaetomium* のカビ毒を研究した。(→誌上発表55, 56, 57, 学会発表71, 72, 76, 77, 78, 79)

15. 生活環境における一次汚染真菌類の実態調査と真菌の同定

生活環境に分布する真菌、カーペットなどを汚染するカビ類、人畜共通病原性真菌などの検出と同定を行い、衛生基準作成の基礎資料を提供している。(→誌上発表49, 50, 51, 学会発表72, 73, 74, 75)

16. 酵母の食品衛生並びに保存に関する研究

たん白、脂肪分解性の酵母を集め、魚肉の腐敗、分解性の検討を行うと同時に有害代謝物の産生性があるかどうかの検索を行っている。(→誌上発表53, 54, 学会発表80)

17. 食品の衛生微生物制御技術の確立に関する調査・研究

食中毒の発生統計、頻発する食中毒菌の種類、食品の製造工程中に認められる汚染のチャンスなどの多次元解析法により食品の微生物的危害度の分析と、その位置付けに基づく規格基準の設定への考え方を提案した。(→誌上発表142, 143, 学会発表68)

医化学部

部長 田中 彰

概要

昭和59年4月1日付で山羽力部長は生物化学部長に転出され、後任に田中彰医化学部第一室長が昇任した。医化学部第一室長には福岡正道主任研究官が就任し、昭和58年9月16日以来当部に在席した武田寧主任研究官は、薬品部薬品第三室長に転出した。また同日付で、西巻知子技官が第一室に配属された。

米国ケンタッキー大学に一年間留学した佐藤道夫技官は昭和58年11月27日に帰国し、森本和滋技官は昭和59年3月26日より一年間の予定で、米国ペンシルバニア州立大学ミルトン S. ハーシーメディカルセンターに留学中である。

研究業績

1. 食品添加物の代謝に関する研究（環境衛生局行政研究）

i) チアベンダゾール (TBZ) の代謝

TBZ の催奇形性は使用した溶剤により著明な差異がある事実に着目し、アラビアゴムとオリーブ油を溶剤として用いた際の代謝の異同を、妊娠マウスを使用して調べた。

この結果、オリーブ油を用いた群の方が血中濃度が高く、 $T_{1/2}$ (first phase) も約 2 倍長かった。

尿中主代謝物は 5-位の水酸化体とその抱合体であり、TBZ と共にこれらの胚芽に及ぼす影響を器官及び細胞培養法により検討した。(→学会発表81, 82)

ii) デヒドロ酢酸 (DHA) の代謝

^{14}C -デヒドロ酢酸 (DHA) を雄マウスに投与し、その吸収、分布、代謝、排泄を調べた。DHA は尿中に速かに排泄され、特に残留性の著しい臓器は認められなかった。主代謝物は尿中に 3 種存在し、分布パターンはラットよりウサギのそれに近いことが分った。(→学会発表83)

iii) オルトフェニルフェノール (OPP) 及びオルトフェノールナトリウム (OPP-Na) の代謝

OPP 及び OPP-Na を 2% 含有する餌で 1 年間飼育した Fischer 系雄ラットの尿中代謝物の遊離型と抱合体の消長を比較検討した。

iv) ソルビン酸 (SA) 及びソルビン酸カリウム (SA-K) の代謝

15% SA 添加飼料で飼育したマウス尿の非極性部分に、S-9 の共存下 TA 98 で弱い変異原性が認められた。腸内容物中の変異原の一部が尿中にも排泄されているものと考えられる。

SA-K を長期間与えたマウス肝での過酸化脂質の含量は、添加飼料の濃度と負の相関を示し、15% SA 群は同濃度の SA-K 群より高い過酸化脂質を含むことが示唆された。(→誌上発表58)

また、肝の還元型 GSH の含量は添加飼料中の SA 濃度に応じて低く、マウス肝癌の誘発と密接に関係していることを示唆した。(→誌上発表59)

v) 赤色 3 号の甲状腺機能に及ぼす影響

赤色 3 号 (エリスロシン) を 4% 含有する飼料を 2 年以上にわたって摂取した S.D. 系雄性ラットに、甲状腺腫の発生が報告されているので、種々の濃度の赤色 3 号を含む餌で飼育したラットの T_3 、 T_4 及び TSH に対する影響について、現在検討中である。

vi) 毒性評価のための Assay 法の開発研究

液体培地による Rec-Assay 法において、保存が容

易な胞子を用い、BTB の色変で簡便に最小発育阻止濃度の値を判別する方法を、AF-2 等をモデル化合物として、microtiter plate を使用して検討した。(→誌上発表60)

2. 家庭用品に含まれる化学物質の代謝に関する研究（環境衛生局行政研究）

i) ゴム加硫促進剤の代謝

① 2-(morpholiniothio)-benzothiazole (MTBT) の代謝

^{35}S -MTBT を合成し、ラット体内での代謝をしらべ、尿中代謝物として 2-メルカプトベンゾチアゾールとそのメルカプツレート抱合体を証明し、各分子中の硫黄原子の由来を明らかにした。(→学会発表84)

② N-cyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (CBS) の代謝

^{14}C -CBS (morpholine- ^{14}C) を新たに合成し、このモルホリン部分の雄性ラット体内での動態を調べると共に、*in vivo* でのニトロソモルホリンの生成条件を検討した。(→学会発表85)

ii) 可塑剤の代謝に関する研究

2-エチルヘキシルジフェニルホスフェート (EHDP) のラットによる代謝試験を行うため、 ^{14}C -フェノールを原料として ^{14}C -EHDP (phenyl- ^{14}C) の合成を行った。

iii) 助染剤 1, 2, 4-トリクロルベンゼン (TCB) の代謝

TCB を還元的に脱クロルする菌をラット腸内容物より分離した。これらは *S. epidermidis* (6 株)、*S. saprophyticus*、*Streptococcus* sp. (2 株)、*Bacillus* sp.、*Lactobacillus* sp. 及び未同定のグラム陰性桿菌であり、菌体中の酵素により嫌気的条件下で、クロルが脱離されることが判明した。(→誌上発表61)

3. 既存化学物質の代謝に関する研究（薬務局行政研究）

i) 2-ニトロバラクレゾール (NPC) の代謝

^{14}C -NPC を雌性 S.D. 系ラットに経口投与し、その尿、糞、呼気、胆汁への排泄と臓器分布をしらべ、尿中代謝物として NPC 以外にアセチルアミノ体を証明した。(→学会発表86)

ii) 標識化合物による化学物質の安全性を予測する *in vitro* 試験法の開発

肝癌を誘発するジエチルニトロソアミンを陽性対照として、NPC によるラット肝オルニチン脱炭酸酵素 (ODC) の誘導及びプロモーター作用のあるデオキシコロール酸の介在した際の影響を経時的に追跡し、ODC の指標としての有用性を検討した。

4. 医薬品、食品添加物等安全性評価のための新技術利用と評価基準の確立に関する研究(特別研究)

尿中代謝物の ^{13}C -NMR から代謝異常が発見される可能性があるか否かを追求するため、種々の薬物を投与したラットの尿と、その対照として未処理のラット尿の ^{13}C -NMR スペクトルを測定し、比較検討した。

5. 異物代謝における酵素化学的研究

i) エステル型化合物の酵素分解に関する研究

トリス(2,3-ジプロモプロピル)ホスフェート及びその関連物質のラット臓器酵素による分解を追跡し、その反応機構を考察した。

ii) 脂環族一級アミンの酸化的脱アミノ機構の研究
脂環族の一級アミンのD置換体を合成し、その脱アミノ反応での同位体効果の有無を調べた。

6. 発癌性、制癌性物質の生化学的研究

高比放射をもつ ^3H -PNU(プロビルニトロソ尿素)を合成し、*in vitro*における子牛胸腺のDNAへのアルキル化量を、グアニンのN7位とO6位との比で算出し、他の同族体のそれと比較し検討した。PNUはENU(エチルニトロソ尿素)とBNU(ブチルニトロソ尿素)に非常によく似た反応性を示すことが分かった。(→誌上発表62, 学会発表88)

またモノ及びジニトロソ尿素類のラット肝クロマチンとの相互作用についても、詳細な検討を行った。(→学会発表87)

7. 腎診断薬に関する研究

放射性腎診断薬として $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DMP(2,3-ジメルカプトプロピオン酸)を新たに合成し、マウス、ラット、ウサギの腎イメージ(image)を明瞭に描出することができた後、ヒト(有志者)での応用を試みて成功した。また腎イメージング剤(imaging agent)の化学構造についての総括討論を行った。(→誌上発表63, 学会発表89, 90)

化学物質情報部

部長 竹中 祐典

概要

当部は発足以来3年を経過し、担当する国際協力事業も組織の拡充に伴い促進化されて来た。また、情報検索業務を単なるサービスから研究へ発展させる端緒を開き、情報ファイルの有効な検索及び評価への指針を得た。

中館情報第一室長は、IPCS 第1回環境保健基準シ

ョートドキュメントタスクグループ(ブラッセル, 58/9/19~22),及びIPCS環境保健基準「トリコテセン」ワーキンググループ(ジュネーブ, 58/12/19~21)に出席し、途次IPCSセントラルユニットを訪ね情報交換を行った。竹中はIPCS毒性学と化学物質の安全性領域での人材開発とトレーニングに関するワークショップ(ルクセンブルグ, 58/11/28~12/2)に出席した。

IPCS米国地域間研究ユニットのDr. L. Moustafaは、昭和58年5月20日と23日に当所を訪ね、当部及び所内の関係者と情報交換を行った。また、IRPTCのディレクターDr. J. Huismanは、国際農業交流会議に出席のため来日し、昭和58年6月6日当所を訪ね、当部の職員とIRPTCの最近の活動について意見を交換した。

業務成績

1. 国際有害化学物質登録(IRPTC)制度

IRPTCリーガルデータベースファイルに収録されているわが国の法規制関連データについて、食品衛生法、毒物劇物取締法等を調査し正しいデータを提供するとともに、約10件の問合せ事項について調査し回答した。

予防毒性学用語集(案)に対しコメントを求められたのに対し、当所専門家及び当部の見解をまとめIRPTC本部に送付した。

前年度IRPTC国内協力委員会の勧めによりIRPTCの広報活動を積極的に行った。

昭和58年度IRPTC国内協力委員会を委員19名の出席のもと昭和59年2月29日に開き、IRPTC及びナショナルコレスポンデントの年間活動報告を行うとともに、データベースファイルの利用について協議した。

2. 国際化学物質安全性計画(IPCS)

環境保健基準「LASと関連化合物」の第1次ドラフトの英文の不備な点を再修正した。環境保健基準「トリコテセン」のプレリナリドラフトに対する米国内専門家ならびにワーキンググループのコメントを検討し、ドラフトを一部修正した。

環境保健基準「合成ピレスロイド」は最終的にアレスリン以下8品目についてプレリナリドラフトを作成し、そのショートドキュメントとしての内容形成の適合性を検討した。

環境保健基準「フェニトロチオンと関連化合物」のプレリナリドラフトの作成に関連して、フェニトロチオン、トリクロルフォン及びジクロルヴォスの物理化学的性質、分析法、分解性、代謝、哺乳類毒性、ヒト並びに生態系への影響などの文献検索を行い、文献リストを作成し、必要な原著論文を収集し、ドラフト

執筆者に提供した。ドラフト執筆責任者は江藤守総教授(九大農)で他に8名のドラフト作成委員が協力している。

その他に外国のリード機関が作成した環境保健基準第1次ドラフト「トルエン」等5品目について国内コメントを提出するための調査を行った。

当所のIPCS関連事業に対して専門家の助言を求めるIPCSヘルスクライテリアドキュメント原案検討委員会を昭和59年3月12日に開き、環境保健基準の作成、試験法の開発、人材開発、食品添加物と食品中の残留農薬の評価、評価優先物質リストなどについて協議した。

IPCS事業に関連した国際会議への当所研究者の出席は今年度は一挙に増大した。IPCSの組織構造の強化に関する協議委員会(ジュネーブ, 58/7/11/~15)には大森センター長が、食品添加物合同専門家委員会(JECFA)の第27回(ジュネーブ, 58/4/11~20)と第28回委員会(ローマ, 59/3/19~28)には林部長が、残留農薬合同会議(JMPR)(ジュネーブ, 58/12/5~14)には戸部部長が、また、環境保健基準「トリコテセン」の作成に関連して、コードトリコテセン研究会議(米国プリマス, 58/6/13~17)には倉田部長が、IPCSトリコテセンワーキンググループ(ジュネーブ, 58/12/19~21)には倉田部長が中館室長とともに出席した。遺伝毒性と癌原性の短期試験法に関する共同研究(CSSTT)の運営委員会(ジュネーブ, 58/5/16~18)及びブラッセル, 59/1/9~13)並びにシンポジウム(米国セントサイモンズアイランド, 58/10/24~28)には石館部長が、IPCSの第1回環境保健基準ショートドキュメントタスクグループ(ブラッセル, 58/9/19~22)には、高仲部長が中館室長とともに、また、IPCSの食品中の化学物質の試験と評価法の原則を刷新するための作戦会議(英国オクスフォード, 58/9/19~23)には林部長が出席した。

3. オンライン情報検索と情報誌作成

オンライン検索は、JOISの利用が112件、DIALOGが240件、NIH/EPA/CISが27件で、前年度より約30%増加している。

衛試情報はNo.5及びNo.6を、情報室=ニュースはNo.22からNo.28までを作成し関係者に配布した。

4. 図書係業務と衛生試験所報告の発行

i) 図書係業務

昭和58年度の図書購入状況は次のとおり。

()内は前年度分を示す。

外国図書	1,783千円	(1,391千円)
外国雑誌	15,026	(12,420)

国内図書	200	(一)
国内雑誌	937	(809)
合計	17,946	(14,620)

図書購入費は前年度より3,326千円増額されたが、殆んどが外国雑誌の値上り分に充当され、残額で新刊医学辞典を購入した。

図書係への外来閲覧者数は190名、外部からの文献複写依頼は55カ所からの270件であった。

3回にわたって開かれた図書委員会の事務局を担当した。薬図協関東地区会(東大, 昭和58年6月23日)には部員1名が参加した。

ii) 衛生試験所報告の発行

衛生試験所報告編集委員会に協力し、衛生試験所報告第101号を発行し、所員並びに所外、外国の関連機関に配布した。

研究業績

1. バイオリジカルデータベース作成・検索システムの研究

a) 5種のサブシステムのプログラム基本設計を行った。b) 約1700の化合物につきおもに変異原性試験データのテストデータ約2500件を作成し、物質データにWLN記号を付与した。c) サンプルデータによるデータベースの評価を行い、フォーマットの統一、試験結果の表による要約及び試験結果の判定等についての基準を作成した。d) 化学構造因子の分析にWLNを用い、変異原性、発癌性、催奇形性の各々の活性と化学構造因子との相関を検討するためのシステムの基本設計を行った。(科学技術庁振興調整費、変異原性部、薬理部、病理部と共同、科学技術庁振興局へ報告)

2. 化学物質の安全性アセスメントに関する研究

i) 化学物質の構造・活性相関に関する研究

化学構造と変異原性との関係を研究するために試験データを追加するとともに水・オクタノール分配係数も要因に加え判別分析を行った。(委託事業研究、労働省労働基準局安全衛生部化学物質調査課へ報告)

ii) 化学物質の評点法に関する調査研究

環境化学物質の安全性点検の優先リスト作成に評点法を導入する目的で、そのパラメータとなる分配係数、生産量、毒性データを収集、整理し、分配係数の計算法を検討した。(委託事業研究、環境庁環境保健部保健調査室へ報告)

3. 化学物質の情報検索に関する研究

i) データベースの有効利用に関する調査研究

a) NIH/EPA/CISの環境及び毒性データベースについて、データ項目の内容と収録物質の種類、数について調べ有効利用法を検討した。(→学会発表91)

b) RTECS のオンライン検索法について、部分構造、名称、毒性コードを用い、関連物質群、その毒性の種別、毒性値を検索する方法を検討した。(→学会発表93)

ii) オンラインによる毒性関連文献の調査研究

小核誘起性の試験について、8種のデータベースの各々の有用性、検索用語、特徴及び各データベース間の重複、並びにデータ内容、収録誌の種別等を検討し、小核試験文献リストを作成した。(→学会発表92)(変異原性部と共同)

安全性生物試験研究センター

センター長 大森 義 仁

当センターがその業務を開始し5年を経過したところで、各部の業務は増加の一途をたどり、定員削減の実施が大きな負担になっている。業績を認められて愛知がんセンターや企業への転出を行った室長及び主任研究官が2名みられたことは欣ぶべき現象とも考えられるが、人材の補充にはさらにある程度の時間を要することは、今後も慎重に対応すべき問題を新たに提起したものと考える。

厚生省各局からの業務の遂行には従来とそれほどの変化がみられなかったが、行革の一環としてセンターの部が関連している検定業務のあり方に近い将来に変化がみられる状態となって来ている。他省庁からの委託試験・研究は年々増加傾向をたどり、予算も大型化する趨勢にあるが、その実績も一段と向上した。

昭和56年度から開始された日米毒性研究協力事業の一環として行われている研究者の交換は順調に進行し、本年度は米国毒性計画(NTP)の研究業績のまとめを行う Peer Review Committee に active observer としての参加を行ったことも注目すべき成果と考えられ、また相互の研究者の受け入れと研究業績の交換及び討論にさらに大きな進展をみとめた。

WHO, FAO, IPCS 関係の専門委員会、ワークショップへの部長、室長の参加要請も増加し、国際レベルでの研究交流が年々盛んとなって来ている。今年度は中国並びにインドネシアに対する薬品・食品品質管理試験研究所への協力の結果、講師・研究員の派遣と研修員の受け入れが急増し、この状態は当然継続するものと考えられる。

厚生省業務局における GLP の実施及び医薬品承認申請に係る新テストガイドラインの公布、更に各省庁でのこれらの計画への参加などに、当センターの研究

者の関係も増えつつあり、従来からの業務の変遷、行革の動向なども考慮し、今後、センターの業務の適正配分、研究員の充実などに更に慎重な配慮を行うべき時期に達したと考えるものである。

毒 性 部

部長 戸部 満 寿 夫

概要

昨年(昭和58年)4月、FAO/WHO の JECFA で食品添加物の1つブチルヒドロキシアニソール(BHA)のラット及びハムスターの前胃における発癌性が討議され、前胃のない動物での追跡実験の必要性が指摘された。

わが国では毒性部及び病理部の共同研究として、イヌによる6箇月間の実験が急拠計画され、本年(昭和59年)4月の JECFA の討議の間に合わせるべく、イヌ25頭による6箇月間の飼育実験を行った。厳しい時間的制約の中で部員各位の強力な協力により、イヌによる最初の大型実験が成功した。

前年度(57年度)の人工透析器による眼障害の原因究明のための実験で、その原因が略解明されたが、引続いて若干の補強実験を行い、この問題は完了した。成績については本号の総説を参照されたい。

研究業績

1. 医薬品

i) 注射剤の安全性に関する研究(薬務局委託研究)
当部で作成した新しい試験方法(案)による実験を4研究機関で実施し、その成績の一致性について検討した。(薬務局へ報告)

ii) 放射性医薬品の毒性試験

骨疾患診断薬である ^{99m}Tc -メチレンジホスホン酸テクネシウムのラットによる毒性試験を行った。(原子力研究、科学技術庁へ報告)

2. 食品添加物

i) ブチルヒドロキシアニソール(BHA)の毒性に関する研究(環境衛生局委託研究)

ビーグル犬による6箇月間の毒性試験を行った。

ii) 青色202号及び赤色202号の皮膚毒性に関する研究

予備試験として急性毒性試験を行った。

3. 家庭用品

i) ゴム加硫促進剤のメルカプトベンゾチアゾール、ジフェニルグアニジン、メルカプトインダゾリン、2-(モルホリノチオ)ベンゾチアゾール及び N-シクロ

ヘキシル-2-ベンゾチアゾールスルフェンアミドのマウスによる慢性毒性試験を継続して実施した。新たに、N,N'-ジエチルチオ尿素の局所刺激性、アレルギー性についての試験を開始した。

ii) 防炎加工剤のトリス (2,3-ジクロロプロピル) ホスフェイト及びトリス (2-クロロエチル) ホスフェイトのマウスによる経口並びに経皮慢性毒性試験、ビス (2,3-ジプロモプロピール) ホスフェイト・マグネシウム及び 2,4,6-(トリプロモフェニル) 2-メチル 2,3-ジプロモプロピルエーテルのラットによる試験を継続した。新たに、ヘキサプロモシクロデカンの急性毒性試験をマウスで開始した。

iii) 防菌・防霉剤の α -プロモシンナムアルデヒド及び *p*-クロロ-*m*-キシレノールのマウスによる経皮慢性毒性試験、ホルムアルデヒドの吸入毒性試験を継続して行った。

iv) 「化学物質の吸入による気道及び肺の毒性研究」の一環として、ジクロロメタン及びホルムアルデヒドの短時間暴露により生ずる気道及び肺の変化、特に肺胞表面活性物質等について検討した。(家庭用品安全対策室へ報告)

v) ジクロロメタンの吸入毒性試験実験に先立ち、慢性吸入装置の試作検討と基礎実験を行った。

vi) 2-エチルヘキシルジフェニルホスフェイトの局所刺激性及びアレルギー性について試験を開始した。

vii) 溶剤の毒性に関する研究

1,1,1-トリクロロエタンの局所刺激性及びアレルギー性について試験を開始した。

4. 既存化学物質

ポリ臭化ビフェニルのマウスによる慢性毒性試験、ビス (2,3,3,3-テトラクロロプロピル) エーテル、ペンタクロロエタン、パラ-*sec*-ブチルフェノール及び 2,4,6-トリ-*tert*-ブチルフェノールのラットによる慢性毒性試験を継続して行った。また新たに水素化トリフェニルの急性及び亜急性試験をラットにより行った。

5. その他

i) 低沸点有機塩素化合物の生体機能に及ぼす影響に関する研究 (環境庁・公害防止)

プロモホルム、ジプロモクロロメタン及びプロモシクロロメタンのラットによる慢性毒性試験のうち病理組織学的検査を継続した。

ii) オゴノリ類海藻による食中毒の解明に関する研究 (厚生科学研究, 食品衛生課へ報告)

iii) 銅酸化物の生体に及ぼす影響に関する研究
ラットによる12箇月の慢性試験を終了し3箇年に及んだ研究が58年度をもって終了した。(厚生科学研究,

食品衛生課へ報告)

iv) 人工腎臓透析器の品質確保に関する研究 (厚生科学研究)

v) 駆瘀血剤の毒性に関する研究

牡丹皮、桂皮及び甘草について急性毒性試験を行った。

vi) ジャコウ代替品に関する研究

牛黄の亜急性毒性及び蟾酥の急性毒性試験を行った。

vii) 小型霊長類等の実験動物化と特性

マーモセットの特性に関する研究 (→学会発表94)

(科学技術振興調整費)

viii) 医薬品、食品添加物等の安全性評価のための新技術利用と評価基準の確立に関する研究 (特別研究)

ix) 歯科材料の安全性評価法の確立に関する研究 (佐藤班) (厚生科学研究)

X) 農薬中毒の解毒剤に関する研究 (堀岡班) (厚生科学研究)

薬 理 部

部 長 高 仲 正

概要

昭和58年7月末で10号館2階の一室の内装改修が終り、クリーンルームを設置して、培養細胞を用いる実験に着手した。

大野泰雄技官はカロリンスカ研究所における1年間の研究を終了し8月2日帰国した。その成果は当部における細胞レベルの研究の発展に寄与している。今年度の短期海外出張は4件で、田中室長(6月30日~7月9日)インドネシア: 国立薬品食品品質管理試験所建物建設計画のドラフトレポート説明、田中室長(9月15日~28日)中華人民共和国、杭州、浙江医科大学: WHO 主催 Workshop 講師、高仲(9月17日~24日)ベルギー: IPCS の Short document の専門家会議、高仲、田中室長(59年2月5日~11日)インドネシア: 技術協力58年度連絡会議である。

研修員の受入れは、中国衛生部薬品生物製品検定所、王秀文さん(4月1日~5月30日)、中国沈阻医薬品管理所、張素玉さん(8月22日~9月14日)で催奇形試験を中心に研修を行った。

本年度は新たに4課題について研究に着手すると共に、単年度研究として2課題を行った。また、4課題が研究を終了した。したがって継続分を含めると、厚生省関係9、科技厅関係5、環境庁関係2、文部省3及び特別研究2課題について研究を行った。

業務成績

国家検定

昭和58年度はブドウ糖注射液 511 件, リンゲル液 8 件について発熱性物質試験を行い, そのうちブドウ糖注射液 1 件が不適と判定された。

研究業績

1. 医薬品等の薬理作用に関する研究

i) 駆瘀血剤の薬理学的研究(科学技術振興調整費, 科技厅へ報告)(一誌上発表67)

ii) ジャコウ代替品の開発に関する研究(厚生科学研究費, 薬務局へ報告)

iii) 環境汚染物質の生体機能障害性に関する研究(国立機関公害防止等試験研究費, 環境庁へ報告)(一誌上発表68)

iv) 放射性医薬品の生体解毒機能に及ぼす影響に関する研究(原子力試験研究費, 科技厅へ報告)

v) 医薬品の中樞作用に関する基礎的研究

vi) 注射剤の溶血性に関する研究(厚生科学研究費, 薬務局へ報告)

vii) ジチオカルバメート系化合物による赤血球障害に関する研究

viii) 腎における薬物代謝活性を変動させる要因に関する研究

ix) 芳香族アミン類の代謝及び毒性発現の動物種属差に関する研究

x) 肝ミクロソーム中の芳香族アルデヒド還元酵素の研究

xi) 肝単離細胞を用いた化学物質の毒性発現機構解明に関する研究

本年度より4年計画で研究を開始した。(一学会発表97)

xii) 化学物質(クロルデン)の安全性評価に関する研究(環境保全研究促進調整費, 薬務局へ報告)

xiii) 医薬品の *in vivo* におけるニトロソ化に関する研究(がん研究助成金, 厚生省へ報告)(一誌上発表70)

xiv) ニトロソアミン類の臓器障害及び毒性発現機序に関する研究(一誌上発表71, 学会発表100)

xv) 既存化学物質の毒性に関する研究(家庭用品等試験検査費, 薬務局へ報告)

xvi) 海藻(オゴノリ類)による原因不明の食中毒の解明に関する研究(厚生科学研究費, 厚生省へ報告)

2. 医薬品, 食品添加物等の後世代に及ぼす影響に関する研究

i) 化学物質の機能的発達過程に及ぼす影響に関する行動薬理学的研究

本年度より2年計画で研究を開始した。(文部省科学研究費, 文部省へ報告)

ii) 中枢アミン神経機能の発達に及ぼす胎生期に投与したメタンフェタミンの影響

本年度をもって終了した。

iii) 各種化合物の神経系の発生・分化と発達に及ぼす影響に関する研究

iv) ラット胎仔中枢神経系の発達に及ぼすエチルアルコール母体投与の影響

単年度で研究を行った。(文部省科学研究費, 文部省へ報告)

v) 胎仔期を含む発育期の肝薬物代謝酵素の特性とその役割に関する研究(一誌上発表69, 72, 学会発表98, 99)

vi) ステロイドホルモン剤の男性化作用に関する研究

vii) 合成黄体ホルモンによる性分化異常の発現機構に関する研究

本年度より2年計画で研究を開始した。(文部省科学研究費, 文部省へ報告)

viii) 食品添加物の次世代に及ぼす影響に関する研究(食品等試験検査費, 環境衛生局へ報告)

ix) 家庭用品に用いられる化学物質の次世代に及ぼす影響に関する研究(家庭用品等試験検査費, 環境衛生局へ報告)(一学会発表95, 96)

3. 安全性評価のための科学技術開発に関する研究

i) 遺伝子組換えの新技術により生産される高分子医薬品の品質試験法の開発研究(特別研究)

ii) 医薬品, 食品添加物等の安全性評価のための新技術利用と評価基準の確立に関する研究(特別研究)

iii) スクスの特性と有用性に関する研究(科学技術振興調整費, 科技厅へ報告)

iv) 標識化合物による医薬品, 食品添加物等の安全性を予測する *in vitro* 試験法の開発研究(原子力試験研究費, 科技厅へ報告)

病 理 部

部長 林 裕 造

概要

病理組織学研究室 荻生俊昭技官は昭和58年6月をもって退官し, 請われて愛知県立がんセンターに赴任した。また本年4月一般病理研究室に豊田和弘君が着任した。

本年もまた海外出張の多い年であった。先づ林がジ

ムネーブにおいて開催された食品添加物に関する FAO/WHO 合同専門家会議（4月9日～4月22日）、ボストンにおける日米協力癌研究会議（5月7日～5月13日）、英国オックスフォード大学で開かれた WHO 主催の毒性評価法検討委員会（9月17日～9月25日）、国際癌研究機関（リオン）における化学物質の発癌評価委員会（1月15日～1月22日）、ハワイで開催された化学物質の変異原性及び発癌性を対象として日米医学研究委員会（2月5日～2月10日）、本国 FDA（ワシントン）の主催による食品添加物の安全性評委員会（2月21日～2月26日）、ローマで開催された食品添加物に関する FAO/WHO 合同専門家会議（3月16日～3月30日）に出席した、一般病理研究室長高橋が WHO より派遣されて中国杭州市浙江医科大学において最近の発癌試験の方法の現状と問題点について講演を行うと同時に発癌性、変異原性、催奇型性等早期検索法についての指導を行った（9月15日～9月25日）。次いで腫瘍病理研究室室長黒川は日米科学技術協力事業による毒性学及び発癌性試験に関する米国の実状を視察するため米國を訪問し NIEHS 及び NCI に於て発癌試験の実施法とその問題点、毒性試験の発癌性試験に於ける役割、変異原性試験の発癌性評価に対する重要性等について討論し、更に NTP による発癌性評価会議にも出席した。その他研究業務においては特別の変化はなく、順調に進行、発展しつつある。

研究業績

- 1) 環境化学物質の動物発癌試験に関する研究
 - i) ビペロニールブトキサイドの慢性毒性及び癌原性の研究
 - ii) 酢酸レチノールの慢性毒性及び癌原性の検索
 - iii) フェニトインの癌原性の研究
 - iv) 魚粉加熱分解物の癌原性の研究
 - v) トリエタノールアミンの慢性毒性及び癌原性の研究
 - vi) マスクキシロールの慢性毒性及び癌原性の研究
 - vii) ヒトがん第一次予防に関する基礎的・臨床的研究の一環としてイニシエーター、プロモーターによる発癌実験
 - viii) アルコールと食塩の発癌プロモーター作用の研究、腭発癌に及ぼす影響の検討
(以上厚生省がん研究助成金)
- 2) 環境汚染物質の発癌促進作用の評価に関する研究
 - i) 皮膚2段階発癌システムの環境汚染物質の影響の検索
 - ii) 肝2段階発癌システムの環境汚染物質の影響の

検索

- iii) 胃2段階発癌システムの環境汚染物質の影響の検索
- iv) 膵2段階発癌システムの環境汚染物質の影響の検索
- v) 腎2段階発癌システムの環境汚染物質の影響
(以上環境庁国立機関公害防止等試験研究費)
- 3) がん研究の基礎資料としてのラット自然発生腫瘍の評価に関する研究
- 4) 異種の動物及び遺伝的背景を異にする動物における複数癌原因因子の相互比較検討に関する研究
- 5) 食品の毒性評価に関する基礎的研究
- 6) 発癌プロモーターに対する抑制要因の検索
- 7) 胃癌プロモーターの解明とその機構に関する研究
- 8) N-ニトロソ化合物の標的臓器に関する実験病理学的研究
(以上文部省がん特別研究費)
- 9) 塩化第二鉄の慢性毒性試験並びに癌原性試験
- 10) 食用黄色4号の慢性毒性試験並びに癌原性試験
- 11) 臭素酸カリウムの慢性毒性試験並びに癌原性試験
(以上食品添加物安全性再評価費)
- 12) 医薬品・食品添加物等安全性評価のための新技術利用と評価基準の確立に関する研究の一環として経胎盤発癌性試験法の検討（原省科学研究費特別研究費）
- 13) 抗悪性腫瘍剤（アドリアマイシン）の安全性に関する研究
- 14) 動物発癌実験の評価に関する研究
- 15) 毒性試験法ガイドライン作製に関する研究
(以上厚生省科学研究費)
- 16) 毒性試験法ガイドライン作製に関する研究（医薬品等調査研究委託費）
- 17) 皮膚2段階発癌システムによるアミノ酸加熱分解物のイニシエーター作用の検討
- 18) フェニールブタゾンの癌原性及びプロモーション作用に関する研究
- 19) パルビタールの癌原性に関する研究
(以上文部省癌特別研究費)
- 20) 無機及び有機酸化剤の毒性及び発癌性に関する研究（癌振興会）
- 21) 体内適用放射性医薬品の安全性に関する研究
骨診断薬としてメチレンジホスホン酸テクネシウムの組織に与える影響に関する研究（科学技術庁原子力試験研究費）

変異原性部

部長 石 館 基

概要

食品添加物(天然添加物を含む)の安全性に関する再評価の一環として、前年度に引続き、微生物を用いる遺伝子突然変異試験(Amesテスト)、哺乳類培養細胞(チャイニーズ・ハムスター線維芽細胞株)を用いる染色体異常試験、並びに、上記試験で陽性と判定されたものについて、マウスを用いる小核試験を実施した。一方、水道水中に検出される有機ハロゲン化合物についても同様な検索を行った。更に、過酸化水素あるいはフェナセチン関連化合物の変異原の機構について多角的に検討を加えた。

科学技術庁による委託試験として放射性医薬品の変異原性に関する研究、並びに、環境庁公害防止委託試験として、前年度に引続きガス状物質の変異原性検出法の開発に関する研究を行ってきた。国際的協力事業としては、日米医学協力並びに、WHO/IPCS 計画事業に基づき、特に環境中の発がん性物質の短期スクリーニング法の開発に関する研究を担当してきた。

昭和59年3月をもって微生物変異研究室の吉川邦衛室長が退職した。昭和59年4月より、対がん10箇年戦略に基づく研究支援の一部として、当所に新たに細胞バンクが開設されることとなり、現在、当部及び放射線化学部の協力によってその準備が進められている。

研究業績

1. 食品添加物の変異原性に関する研究

i) 食品添加物22種について、サルモネラ菌(6菌株)による突然変異原性試験を実施した。

ii) 上記食品添加物及び28種類の天然添加物について培養細胞を用いる染色体異常誘発試験を行った。

iii) 57年度 i) 及び ii) 試験において陽性の結果が得られたものの中6種についてマウス骨髄を用いる小核試験を行った。

i) ii) iii) いずれも厚生省環境衛生局食品化学課へ報告)

2. 放射性医薬品の突然変異原性に関する研究

エタンヒドロキシ二ホスホン酸テクネチウム(骨診断薬)について、微生物による突然変異原性試験、並びに、哺乳動物細胞による染色体異常試験を行った。(科学技術庁へ報告)

3. 環境汚染化学物質の変異原性試験

i) ディーゼル排ガスの変異原性に関する研究(結

核研究所と共同)

ディーゼル排ガスの有機溶媒抽出物について、微生物を用いる突然変異試験並びに培養細胞による姉妹染色分体交換試験を代謝活性化法を併用して行った。更に、ディーゼル排ガスの短期暴露をうけたマウスの肺胞マクロファージの染色体異常誘発性について検討した。(環境庁大気保全局へ報告)

ii) 水道水中における微量有機物質の変異原性に関する研究

クロロベンゼンその他水道水中の微量有機化合物及び関連物質10種についてサルモネラ菌による突然変異試験並びに染色体異常誘発試験を行った。(→学会発表118)

iii) 大気汚染物質の哺乳動物細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響に関する研究

数種の大気汚染物質(特にガス状、揮発性物質)の生体における染色体異常誘発性を検索するためにマウスを用いる小核試験を行った。(環境庁企画調整局へ報告)

4. サルモネラ菌を用いた突然変異原性に関する研究

PCB あるいはPB+BF 前処理マウス(C57BL/6)の肝S9について、間接変異原物質の代謝的活性化能並びに薬物代謝酵素活性を比較検討し、Ames試験に用いられる適切な肝S9について検討した。また、活性酸素のサルモネラ菌に対する突然変異原性を検討した。(→学会発表116)

5. 突然変異原物質のDNA損傷型に関する研究

前年度にひきつづき、過酸化水素から生ずる一重項酸素の枯草菌形質転換DNAに対する不活化作用について検討した。

6. 変異原物質の代謝活性化機構に関する研究

Phenacetinとその関連化合物の変異原性を検索し、S9 mix 中でのこれらの化合物の代謝的活性化について検討した。(→学会発表117, 120)

7. 培養細胞の染色体異常による発がん物質短期検索法の改善と評価

種々の生活関連物質について哺乳動物培養細胞を用いる染色体異常誘発試験と体細胞突然変異試験及び生体における小核試験について定量的比較を行った。(→誌上発表158, 学会発表114)

8. マウスを用いる小核試験法の開発に関する研究
小核誘発機構に関する細胞遺伝学的な基礎的研究、データ評価のための統計処理方法について検討を行った。また、アクリジンオレンジ蛍光染色法を用いてラット胎仔肝細胞における小核試験を行った。(→誌上発

表157, 94, 学会発表119)

9. 活性酸素の染色体異常誘発機構に関する研究

キサンチンオキシダーゼとハイポキサンチンのスーパーオキシドラジカル発生系について培養細胞における染色体異常誘発性を検討した。(→学会発表115)

10. 変異原物質の情報収集

バイオリジカルデータベースの詳細設計について検討し、染色体異常誘発試験及び小核試験のデータ集積のためのデータベースの改良を行った。(→学会発表92)

11. WHO/IPCS 計画による変異原性試験法の開発

既知発がん性物質のうち細菌に変異原性を示さない化合物について哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験を行った。

大 阪 支 所

支所長 加納晴三郎

大阪支所においては、国家検定、製品検査、一斉取締試験、輸入食品検査などを行っているが輸入食品検査を除いてはほぼ例年なみの件数を処理している。

これらの業務のほかに、国立機関公害等防止試験研究、特別研究、厚生科学研究及びその他の研究について、薬品部、食品部及び薬理微生物部に述べるような内容のものが採りあげられ、それぞれに成果を挙げている。

以下各別に詳述する

薬 品 部

部 長 伊 阪 博

概要

昭和58年5月15日付を以て持田部長が退官し、支所長が部長取扱となったが、本年4月1日付で、薬品部第一室長伊阪博が薬品部長に就任した。また1月1日付を以て辻、四方田両技官が食品部へ、井上技官が薬理微生物部へ配置換えとなった。また、新たに小室技官が薬理微生物部から薬品部へ配置換えとなった。これらの異動に伴って部屋の模様替えも行われ、気分一新を計った。12月には柴田技官が大阪大学より薬学博士の学位を授与された。1月には中原技官が大阪大学へ薬学博士の学位申請をし、目下審査中である。

業務成績

1. 国家検定

検定数はブドウ糖注射液が944件、リンゲル注射液が7件で計951件であったが、ブドウ糖注射液については1件が不合格であった。原因は不溶性微粒子によるものであった。プロチオナミド錠については検定件数は13件であったがすべて合格した。

2. 一斉取締試験

塩酸チアラミドを含有する内服固形剤15件につき定量試験及び重量偏差試験を実施したが全品とも合格した。

3. 特別行政試験

国内産収納あへん11件(香川県4件、和歌山県2件、岡山県5件)についてモルヒネ含有量試験を実施した。

4. その他

i) 医薬品の原料規格集の作成に関する研究(第四次, 審査課)

ii) 不安定医薬品の純度向上に関する研究(本年度終了, 安全課)

などが行われた。

研究業績

1. 医薬品の分析化学的研究

i) 光学異性体を HPLC による分離法を引きつづいて検討中である。被検体はアルカノール・アミン誘導体を中心とし、移動相及び固定相の両面より検討しているが分離試薬 G1TC を前年度に検討したピンドロールについてプロプラノールに適用したところ良好な分離が可能となった。(→学会発表121)更に、GC による可能性も検討中である。

ii) 不安定医薬品の純度向上に関する研究の一環として、引き続き溶媒抽出による分解産物の分配系を検討すると共に、とくに酸アミド系局所麻酔薬数種をえらび、加熱滅菌操作を加えたときの分解性を検討した。これらの薬剤はエステル系のそれに比べて安定性は高いが、構造により、また、pH 依存性などにより差違がみとめられ、薬剤の化学構造と分解性についての二三の知見がえられた。(厚生省へ報告)

2. 環境汚染物質と細菌毒素との生体系における相互作用に関する研究

i) 各種環境汚染物(重金属, 農薬, プラスチック, 溶剤, など)約30種とマウスに毒素と共に負荷して血中 GOT, GPT, ChE などの消長を検討したが、毒性との相関性は一様でなく、検討すべき多くの知見をえた。(環境庁へ報告)

ii) 毒素の生体反応を生化学的に明らかにする目的で毒素注射後約1.5時間で血中に血管透過性促進因子出現を発見し、この実体を一部明らかにした。すなわ

ち、好中球顆粒中に存在する水解酵素活性を示す因子に比べて、LPSにより誘発される透過性因子は分子数数万位であった。したがって、両者の差違は更に詳しく検討すべきことを示した。(→学会発表123)

食 品 部

部長 原 田 基 夫

概要

支所三部協同による国立機関公害防止等試験研究では当部では先の経験(一誌上発表98, 99)を生かし、ヒメダカを用いた実験である種の重金属、農業に毒性増強作用を認めた。(環境庁へ報告)

59年1月辻澄子、四方田千佳子両技官が当部に所属換となった。

厚生科学研究が3件あり、うち1件は継続事業となった。

業務成績

1. 製品検査

食用タール色素475検体について検査した。不合格はなかった。

2. 輸入食品検査

重金属(鉛)18件、酸化防止剤2件、保存料1件、亜硫酸2件、着色料2件、合成樹脂材質試験1件、水分活性3件の化学検査を行った。

3. 残留農薬実態調査

外国産農産物のうちソバ6件についてカルバメート系農薬(デナボン、ランネット、トップジンM、ベンレートとその分解物)の検査を行った。今年度新たにジャガイモ18件についてクロロプロファム、テミックの2種の農薬の検査を行った。結果はいずれも不検出又は痕跡以下であった。(食品化学課へ報告)

4. 研修について

国際協力事業団にかかる昭和58年度輸出入食品検査コース(研修生10名)の研修を11月に、農業利用コース(研修生8名)の研修を59年4月に行った。また農林規格検査所から2名の研修を行った。

研究業績

1. 食品・添加物等の安全性に関する研究

i) 食品添加物の1日摂取量調査に関する3箇年計画は昨年(一誌上発表100, 101, 102)で完了した。結果は58年度食品化学講習会で発表した(一誌上発表160)。今年度は新たに5箇年計画の初年度として、未調査の添加物を対象とした。当部でまとめた結果は有機酸系酸味料 1303 mg, D-ソルビット 986 mg, β -カ

ロチン 530 mg, オルトリン酸塩 433 mg, カルシウム 366 mg, アミノ酸系及び核酸系調味料 85.5 mg などの1日摂取量であった。(食品化学課へ報告) また当部の分担であった繊維素グリコール酸(CMC)の新しい分析法を確立した。(→学会発表127)

ii) 天然添加物の分析法作製では各種天然色素、被膜剤、ルチン、天然糊料、カゼインなどの分担がきまり、当部では被膜剤(カルナウバワックス、ライスワックス、キャンデリラワックス、ミツロウ、木ロウ、石油ワックス等)の系統的分析法を完成させた。(→学会発表126)

iii) 食品添加物の分析法の標準化に関する研究(厚生科学研究: 谷村班)では、先に公刊された「食品中の添加物分析法」に対して全国各種検査機関から見直しや意見が集められ、これらに対して当部において問題点を抽出し、それらの解決案を示した。(食品化学課へ報告)

iv) 食品添加物の規格試験法の改良の目的で、高速液体クロマトグラフィーによる食用タール色素中の有機性不純物(原料物質、反応中間体及び附随色素)の系統的な検出・定量法を開発した。(一誌上発表103) 更に有機性不純物と主色素を同時に定量するための簡易試験法を提案し、本法を用いて許可タール色素の実態を調査した。(一誌上発表104) また食品中の保存料及び殺菌料の定量法について総説した。(一誌上発表105)

v) 輸入食品に違反の多いホウ酸塩の微量定量法として、2-エチル 1,3-ヘキサジオールを用いる改良法を提出し、多数検体の短時間処理を可能とした。(一誌上発表106) また輸入食品の現場的な衛生検査の手段として、高価な機器を用いない簡易比色試験法を設定した。今年度対象とした品目はエチレンジブロマイド、亜硫酸、デヒドロ酢酸、ソルビン酸、安息香酸、オルトフェニルフェノール、ホウ酸、亜硝酸の8品目である(厚生科学研究: 田辺班)

vi) ゴム製品の規格化に関する研究(厚生科学研究: 岡田班)では、ゴムの加硫剤として用いられる有機過酸化化合物及びそれらの分解物が、最終製品中に残存しないことをGCによって確かめた。(→学会発表128)

vii) 外国産農産物の残留農薬実態調査に関連して、カルバメート系農薬の高速液体クロマトグラフィーによる系統的分析法を確立した。(→学会発表129)

viii) その他、ヨーグルト中の安息香酸とソルビン酸の同時定量法(一誌上発表107)を確立し、Thu-joneの香粧品、化粧石けん中からの分析法を設定した。(一誌上発表161) また、チーズ、ハム、ソーセージ中のリ

ン酸塩、ポリリン酸塩の分別定量法を定め(→誌上発表162)、乳及び粉乳中の乳酸の酵素的測定法を開発した。(→誌上発表108)

タイ国における食品添加物、容器包装についての技術指導の結果がまとめられた。(→誌上発表109, 110, 111, 112)

2. 食品中の生体有害作用物質に関する研究

i) 魚介類の腐敗の指標となる不揮発性アミン(ヒスタミン、プトレスチン、カダベリン)とNBD-F(7-Fluoro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole)を反応させてNBD-アミンとし、これを蛍光検出高速液体クロマトグラフィーによって分別定量する方法を確立(→誌上発表113)し、また腐敗の指標となっている揮発性アミン(トリメチルアミン、ジメチルアミン、モノメチルアミン)とアンモニアをヘッドスペース・GC法によって同時分別定量する方法を開発した。(→誌上発表114, 学会発表124)

ii) 油脂の劣化による有害性については、赤血球に対する溶血作用 C_{50} (50%溶血量)の生物学的測定で評価できる。このため市販フライ食品から抽出した油脂について C_{50} を測定し、化学的測定法である酸価、過酸化値、カルボニル値と比較した。(→学会発表125) ついで劣化油脂の溶血作用を追跡し、溶血作用より50%溶血に必要な油の量 C_{50} を求め、この値はフライ油の劣化の指標となることが示された。(→誌上発表115) 更に劣化油の溶血作用に基づく赤血球の形態学的変化を、位相差顕微鏡又は走査電子顕微鏡により観察した。(→誌上発表116)

薬理微生物部

部長 加納晴三郎

概要

昭和59年1月1日付をもって小室徹雄技官が薬品部へ、代わって井上和美技官が薬品部より配置換えとなった。1月に小川義之技官が京都大学より、12月に伊丹孝文技官が大阪大学よりそれぞれ薬学博士の学位を授与された。59年1月江馬貞技官が大阪府立大学へ農学博士の学位を申請し、目下審査中である。従来からの業務、研究に加えて「環境汚染物質と細菌毒素との生体系における相互作用に関する研究」(国立機関公害防止等試験研究、58年度～60年度)における初年度研究の一部を分担し、全員一致協力して、後述のような成果をあげた。

業務成績

国家検定として、ブドウ糖及びリンゲル注射液 951 件の発熱性物質及び無菌試験を行い、いずれも適と判定された。

輸入食品の細菌試験は行われなかった。

研究業績

発熱物質に関する研究と胎生薬理学に関する研究とが前年に引き続いて行われた。その上、微生物あるいは動物細胞を用いる変異原試験がますます重要視されていることから、当部においても変異原性に関する研究が発足し、遂行された。この他前述した公害防止等試験研究が、一同協力して行われた。

発熱物質に関する研究では、前年度に製剤化に成功した仮標準内毒素を用いて、日本薬局方の発熱性物質試験に用いるウサギの体重条件の検討と、市販のリムラス試薬の活性の比較検討が行われた。(厚生科学研究)更に標準内毒素の物性並びにその活性をより明確にするために、TCA 抽出内毒素との比較検討を行い薬理学会総会で報告した。(→学会発表130)

変異原に関する研究グループでは、胎生薬理学研究グループと協力して、まず催奇性と発癌性を有するトリパンプルーについて検討し、市販トリパンプルーはケイ酸カラムクロマトグラフィーにより吸収極大波長 605 nm をもつ本体である青色色素画分(Blue Fr.)と 555 nm に極大波長をもつ合成副産物である赤色色素画分(Red Fr.)とに分画され、両分画の混在比は各社標品間に著明な差異のあることを示した。(→誌上発表117)更に両分画及び関連化合物による変異原性と催奇形性について検討し、市販トリパンプルーによる奇形胎仔の発現は、その Blue Fr. の作用によるものであり、Red Fr. 及び試験した関連化合物はいずれも催奇形性を示さないことを明らかにした。(→誌上発表118, 学会発表131)また変異原性は Ames test により検討した結果、S-9 存在下で各社標品より得た Red Fr. が変異原性を示し、Blue Fr. 及び関連化合物は変異原性を示さないことを示し、トリパンプルーの催奇形性は、本体である Blue Fr. に、変異原性は合成副産物である Red Fr. にそれぞれ分担されていることを明らかにした。(→学会発表131)哺乳動物細胞による染色体異常誘発試験については、本所変異原性部との共同研究により検討されつつある。

胎生薬理学研究グループでは、アスピリンの胎仔毒性に対する内毒素の増強作用の機序について検討し、内毒素によるサリチル酸の胎仔内濃度の上昇は、母体血清アルブミン濃度の低下と、たん白結合阻害物質である遊離脂肪酸濃度の増加によるたん白質との結合性の低下によることを明らかにした。(→誌上発表119,

学会発表132) またトリバンブルーによる胎仔障害が、トリバンブルーの直接作用によるのか又は母体の障害による二次的結果なのかを明らかにするため、子宮角腔内又は胚外体腔内に投与して、検討した結果、トリバンブルーは、胚に直接作用して奇形を発現させることを示唆した。(→誌上発表120, 学会発表133)

次に、薬品部、食品部との共同による「環境汚染物質と細菌毒素との生体系における相互作用に関する研究」における当部分担として、39種の環境汚染物質と内毒素をマウスにそれぞれ同時投与することにより、致死率、体重の変化を指標として、いかなる物質が内毒素によりその毒性が増強されるかについてスクリーニングし、7種の環境汚染物質の毒性が内毒素により増強されることを報告した。(環境庁企画調整局)

以上の研究実績の他に、本年度は家庭用品安全対策の一環として、ヘキサブROMシクロデカンのラットに対する催奇形試験を行い、実験の範囲内では、催奇形性を認めないことを報告した。(厚生省報告)

北海道薬用植物栽培試験場

場長 島山好雄

概要

58年4月1日付をもって熊谷健夫技官が採用された。研究業務は、前年度より継続のものが多く、科学技術振興調整費による「実証及び生薬資源の確保に関する特定総合研究」の一部、優良品種の選抜に関する研究の分担として、ヤマト・ホッカイトウキの品種育成に取り組んでいる。麻薬課の委託試験としてケンの系統保存及び技術保存に関する研究も続行している。

国内外を問わず野生品の採取は次第に困難になってきており、生薬原料の供給に不安が持たれているものもあるので、寒地系野生薬用植物の栽培化に取り組むことにし、材料の蒐集にかかり始めた。

業務成績

1. 種子交換

採種	183種	(筑波試験場へ送付)
受入	95件	655種
分譲	48件	83種

2. 薬用植物の栽培・自生調査

野生薬用植物の栽培に当り、その供試材料蒐集のため、各地で採取を行った。

石狩当別	キバナイカリソウ
陸別	エゾウコギ(無刺株)
オホーツク海岸	エゾノレンソウ

興部・旭川 オクエゾサイシン

研究業務

1. トウキ(科学技術振興調整費)

種特有の形態形質を備えた個体群、低温伸長性個体群、易抽苔性個体群を各隔離圃場に定植し、第2回目の選抜を行い、個体別に採取した。

難抽苔個体より採取した種子はすべて不稔粒で発芽が得られず、上記個体群より改めて選抜する予定である。

2. ケン

寒冷地におけるケンの朔果収量及び収量構成要素の成立過程を調べた。

5月2日播種、6月9日には主軸花の花芽分化が認められ、6月14日には3・4節にも認められる。花芽分化は上位(主軸花)から11節位まで観察され、環境の影響を受け難い形質であることが確認された。花数、結果率、平均1果重等の収量構成要素は開花前から盛期にかけて成立をほぼ完了するようである。(薬務局麻薬課へ報告)

3. ジャクヤク

1969年雑種集団中より各々形質の異なる135個体を選び、各個体を株分けにより増殖してきた。1981年62系統を収穫し、その個体収量、ペオニフロリン等成分含量及び形態的特性について比較を行った結果、高収量、高成分含量系統の選抜の可能性が確認された。(→学会発表134)

4. カラスビシャク

野生薬用植物の栽培化に関する研究の一環として本植物を取り上げ、増殖法、収穫期、栽植密度、植付深度について検討した。(→学会発表135)

5. その他

主要作物については優良遺伝子導入のため継続して国内外より材料を蒐集し、一部は成分含量の分析に着手している。

Gentiana 属, Paconia 属, Rheum 属, Aconitum 属, Corydalis 属, Scopolia 属

筑波薬用植物栽培試験場

場長 原田正敏

概要

本年度の主な業務は、次の業務成績及び研究業績の項で述べるように、前年度からの継続のものが中心となっている。

佐竹育種生理研究室長は、日本生薬研究者第4次訪

中国の一員として、昭和58年7月27日から同年8月13日にかけて中国を訪問し、山西省、陝西省において生薬の基源植物・生産・流通の調査及び学术交流を行った。

また、昭和60年3月17日から開催される科学万博つくば'85（テーマ：人間・居住・環境と科学技術）の政府出展に協力するため、展示物件等の検討を行い、科学技術庁計画局国際科学技術博覧会推進室あて計画案を提出した。

昭和58年12月31日付をもって、多大の功績を遺された大野忠郎場長と林菊一庶務課長が退官され、後任に原田正敏生薬部長が併任となって場長に、豊田芳男大阪支所庶務課長補佐が庶務課長にそれぞれ着任した。また、昭和59年2月1日付をもって、下村講一郎九州大学薬学部助手が育種生理研究室へ配置換着任した。

業務成績

1. 薬用植物の自生地調査

平尾台高知におけるミシマサイコの自生地調査及び当該周辺の分布状況を調査した。

2. 植物採集調査

種子交換を主な目的とし、国内産業用植物及び日本固有植物の分布調査を行うとともに、採種を行った。

本年度は茨城県内の小見川周辺、加波山、筑波山、足尾山、大竹海岸及び当該周辺並びに山梨県の富士山を調査対象区域として、324種を調査し、種子108種、苗24種を採集した。

3. 薬用植物の栽培地の調査

大黃（中国）、芍薬（新潟）及びオウギ（茨城）について実施した。

4. 種子交換の実績

種子の保管	1,513種	(57年・58年分)
受 入 れ	152件	延べ 2,990種
配 布	181件	延べ 3,701種

なお、本年度も薬用植物関係の種苗法にかかる業務として、ダイオウ及びシャクヤクが取り上げられ、新品種登録審査規程の作成について厚生省側より当場の大野場長（58年12月31日退職）・佐竹育種生理研究室長及び伊豆薬用植物栽培試験場の両場長が参画し、同規準案の策定に当たった。

研究業績

1. ミシマサイコ（科学技術振興調整費）

i) 優良系統の選抜、育成に関する研究

個体選抜によって育成した系統の特性を調査し、草丈、分枝長、節数、主根風乾重において優れた34系統を選抜し、これらの種子を隔離して採取した。

前年選抜した早熟系統の12個体の系統間の差異を検

討したところ主根風乾重については分散分析で、5%の危険率で系統間に有意の差が認められた。この系統間の差が遺伝的なものか否かを検討する必要がある。

ii) 受精様式に関する研究

交配実験の基礎研究として、開花、結実の様式を検討したところ、雄ずいの成熟期間は開花開始から3～4日で、同一花序内では10日間であった。雌ずいは開花後4日目頃から受精可能となり、1週間後には適期となる。即ち、雄ずい先熟のため、同一小花内での受精は物理的にほとんど困難である。

人工受粉によると自家、他家受粉の結果、ほぼ同程度の稔実を示したので、自家受粉も可能と推察されるが、近交弱勢の検討が必要である。

iii) 栽培条件と生育との関係についての研究

土壌恒温槽を用いた実験によると、25°の温度条件で根及び地上部の成育がよい結果を得た。

2. ケン

一貫種及び外国導入の91系統のモルヒネ、コデイン含有量の多い系統の選抜を行い、特にコデイン含量の高かったものはf-102の9.4%、f-61の7.97%であった。またシーダーテープ利用のケン栽培の省力化の検討もを行い、テープ使用は播種時間に関して、慣行法より約40%の時間で済み、省力化効果があると考えられる。

3. ハトムギ

個体選抜及び系統選抜による優良品種の育成について

前年に引き続き交配種のF₄の選抜と採種を行った。ファイトロンによる栽培では系統間の差が明らかになった。生育適温は25°～30°で、20°、35°区は生育阻害が現われた。

ハトムギ類の品質についてはヨードデンプン反応で、局方に適さないものがあり、脂肪の酸化価にも系統間の差異が認められた。

4. 薬用植物の品種保存に関する研究

ヒロハセネガ、ボタン、シャクヤク、アカヤジオウ、チョウセンニンジン、オウレン、ムラサキ、イノゴチ等について、品種、栽培法、種子貯蔵法等を検討した。

5. 組織培養に関する研究

ケイヒ、マオウ、ハシリドコロ、カラスビシャク等について増殖法と優良系統選抜のための基礎的検討を行い、個体及びカルスの誘導を行っている。

伊豆薬用植物栽培試験場

場長 西 孝三郎

概要

昭和57年度の静岡県の中小河川改修工事として、当場に隣接する青野川の河川改修工事が行われた。その際、当場の敷地、3432 m² が建設省へ移管され、代替地として旧河川敷の埋立て地を占用使用してきたが、昭和59年2月9日、正式に所管換となった。また、以前からの懸案事項であった敷地を二分されていた道路敷(赤線) 39 m² についても、昭和59年3月24日所管換財産受渡しが行われた。

このため、当場の敷地面積は、8197 m² となった。

上述の改修工事に伴い当場の敷地形態が変わったため、本年度は、新しいは場への導入路を作り、また、国道136号線沿いにキョウチクトウ50本、隣接地の境界にネズミモチ40本を植栽した。

業務成績

1. 種子交換

採種	72種	(筑波試験場へ送付)
	内訳	野生 20種
		標本植物 26種
		温室植物 26種

受入れ 26件 120種

分譲 17件 82種

2. 薬用植物の自生地調査

長者ヶ原、大室山、石廊崎、天子山、稲取の各地に自生する植物、ミシマサイコ、オウレン、アマチャヅル等について植生調査を行った。

研究業績

1. ミシマサイコ(科学技術振興調整費)

伊豆半島に野生している5系統。国内で栽培されている系統及び北九州、平尾台の野生種、計7系統の染色体数の確認をした。

その結果、栽培種、伊豆半島野生種はいずれも $2n=26$ であるが、平尾台の野生種は $2n=20, 21, 22$ で、20が最も多かった。

2. シナニッケイ(Cinnamomum cassia)

Cassiaの増殖は通常、実生あるいは取木で行われているが、さし木による増殖の可否について試験を行った。発根剤 α -ナフトレン酢酸 100 ppm を使用し 20°以上の高温と60%以上の湿度を保持することによって、発根率 100%の成績が得られた。

3. ケン

伊豆地方における栽培法の確立を目的に11月9日 0.5アールのは場に播種した。本年度は冬季、異常低温に遭遇したが、開花盛期は5月14日で、5月18日からあへん採取を行った。

4. ジオウ

ジオウから分離した病原細菌の地上部への病斑形成を調べると同時に他の罹病植物から分離した菌を用い、ジオウ以外の植物にも接種して病原性の有無を確認した。また市販されている殺菌剤10種を供試し、抗菌力についても検討した。〔日本生薬学会第30回年回(徳島)(83.10.25)にて発表〕

和歌山薬用植物栽培試験場

場長 堀 越 司

概要

ケンは57年11月中旬に播種し、発芽は良好であって、12月～1月の最高気温、最低気温は平均気温よりやや高く生育も良好であった。2月～3月は反対に平均気温よりも低く、特に3月上中旬の最低気温は 0° 以下の日が多く、しかも降霜があり、早生系統や一貫種系統に被害(生育停止株の出現(芯づまり))は甚大であった。4月～5月は平均気温より高くなったが、アヘン採取適期には雨天の日が多く、採取条件も悪くアヘン採汁量も平年より減少した。トウキ、ミシマサイコの特調費試験、ミシマサイコの開花順位などの播種、サジオモダカ、アマチャヅルの植付け調査に追われるとともに、特にアマチャヅルブームの影響をまともに受け7月から今日まで、問い合わせや見学、指導等に追われ前年に比し一層の多忙さを極めた。なお庁舎内のペンキ塗装や補修も行った。

業務成績

1. 薬用植物栽培文書応答 57件

2. 植物(種苗含) 入手 31件64種
配布 32件69種

3. 植物調査 キイジョウロウホトトギス、アマチャヅル、ヤマアイ、バイカオウレン、センブリ、テンダイウヤク、ニッケイ、カギカズラ、イワタバコ、ヤマゴボウ、コセリバオウレン

4. 種子交換 115種を採種調製して筑波薬試に送付した。

5. 熊野川町へ山菜、薬草の資源調査(1983.7.4～6)、川辺町老人会連台会(1983.7.19)、美浜町農協婦人大会(1983.9.22)、清水町高齢者グループリーダー講習会(1983.11.8)、御坊市農協大学講座(1984.2.

29), 中津村林業研究会研修会 (1984. 3. 9) にて講演, 58年度特殊農産物新規導入事業 (御坊市野口地区), 印南町薬草栽培研究会, 中津村山びこグループなどに対し指導協力した。来場者は前年よりも多く 1,299 名であった。

研究業績

1. ケシ 品種及び系統保存並びに技術保存を目的に育成管理し, 開花調査, アヘン採取, 種子の保存を行った。

i) 開花調査

インド系極早生が 4 月 10 日開花始, 順次開花し, 早中晩生の開花最盛は 4 月 21 日~5 月となり, 開花終了は 5 月 17 日であった。

ii) アヘン採取

早生系は 5 月 14 日より開始し, 5 月 20 日までに 4 回, 中晩生系は 5 月 23 日より開始し, 5 月 27 日までに 3 回実施した。

iii) 種子保存

1 系統 5 果 9 区 72 系統を採取し乾燥調製保存した。

2. オウレン

i) 1980 年 11 月美山村串本地区より入手したセリバオウレン (丹波系) は杉林, 柿畑, みかん畑水田あと (土付, 水洗, エビスグサ下) 目下試験中である。

ii) 優良品種の育成に関する試験 (優良系統の選抜) 1984 年 2 月筑波薬試に報告した。

(イ) 発芽は種子の大きさ 1.5 mm 以下が良く, 産地別では紀州川辺の栽培種が優り, 野生種では九州平尾台が良好であった。

(ロ) 生育, 3 年次株では種子の大きさ 1.0 mm 以下 > 1.0 mm > 1.5 mm の順であったが, 1 年次採では一定の傾向は認め難い。産地別では, 九州平尾台の葉長は短く, 葉巾は広く, 四国高知は葉長長く, 葉巾は最狭であった。なお栽培種は野生種に比し生育良好であった。

iii) 畑地における種子の大きさと摘花について, 1 年次の抽苔率は種子の大きさ 1.5 mm 以上 > 1.5 mm 混合 > 1.25 mm 以下の順であって, 種子の大きさと抽苔率は関係し大きい種子ほど抽苔率は高い傾向を示した。生産, 収量には差異はない。

4. トウキ (大和)

優良品種の育成に関する試験 (優良系統の選抜) 1984 年 2 月筑波薬試に報告した。

(イ) 発芽は種子の採取部位や種子の大きさと異なり, 主茎頂果の 1.0 mm が最も不良であった。

(ロ) 生育は主茎頂果区が最も劣り, 種子の大きさ 1.5 mm が良好であった。なお葉柄色は全株赤系で緑

混入であった。

5. キハダ

i) タイワンキハダの接木について

(イ) タイワンキハダの接木は可能であり, さし木よりも生長の良いことが確認された。

(ロ) 接木の時期は 3 月中旬から 4 月中旬が良く, 活着率は 80~100% であって, 4 月下旬は気温の上昇により 10% と激減した。〔日本生薬学会第 30 回年会 (徳島) (1984. 10. 25) にて発表〕

ii) 系統の収集

Phellodendron chinense の種子 (1984. 3. 13), *Phellodendron Wilsonii* の苗 (1984. 3. 15) を入手し播種又は植付けた。

6. その他, サジオモダカの畑地栽培の可否, アマチャヅルの系統収集やさし木, ハウス栽培の効果, センブリの開花結果により生薬標本を作成し, 種子も採取した。ハブソウ, エビスグサ, ハトムギ, ヒマワリなどの展示栽培も行った。

種子島薬用植物栽培試験場

場 長 葵 一 八

概要

平均気温 (18.9°) 及び年間降雨量 (2,680 mm) は, 過去 5 箇年間の平均値とほぼ等しく, 日照時間 (2,800 hr.) のみは, 10 月~12 月の降雨量が, 平均値の 25~50% 範囲であったため, 平均値を 300 hr. 上回る多照であった。また, 台風は 9 月下旬に 1 回のみの接近通過であったため, 植物の生育・収量及び建造物への被害もすくなく, 気象条件としては, 比較的良好年であった。

栽培試験は, ミシマサイコ, ニッケイ属植物, ウコン属植物について行った。系統保存植物としては, インドジャボク属植物, ウコン属植物, ニッケイ類, コカノキ, キナ, ステビア, ハトムギ及びクミスクテンなどである。

業務成績

1. 薬用植物の生態分布調査

種子島に自生・又は栽植している, ショウガ科植物及び薬用樹木について, 生態分布調査を行い, 採取したものについては保存栽培することにした。

2. 交換用種子の採種

島内に自生・栽培されている種子植物を調査し, 生態分布図と採取植物の胎葉標本を作成保存した。また, 採種した完熟種子 122 種を筑植に送付した。

3. コノキの優良品種の選抜

当场で保存栽培している、コノキ 281 本中、採葉乾燥の試料として採取できた52個体につき、コカイン成分分析を筑植へ依頼し、高含量コカイン個体を選抜することにした。

4. その他

年間の見学者は 833 名で、温室及び標本園を中心に見学させ、薬用植物に対する知識啓蒙を図った。なお、場内のニッケイ植林地内に遊歩道を設け、薬用樹種の造成法を展示した。また、近年、薬草ブームの影響もあって、これが同定、並びに栽培・利用の指導にもあたった。

研究業務

1. ミシマサイコの種子消毒による発芽菌の腐敗防除効果試験

霧島山系(えびの市加久藤産)のミシマサイコを、島内で隔離栽培して得た種子を供試して、ベンレート水和剤濃度×処理時間(濃度100・500・1000倍×処理2・8・16・24時間)の12処理に、種子無消毒と種子・土壌無消毒の2処理を加えた計14処理により、ミシマサイコ幼苗の腐敗枯死に対する、防除法を検討した。その結果500倍・1000倍の2時間処理を除けば、処理時間が長い程、発芽時期での防除効果はあるが、長時間の効果は期待できない。

2. ミシマサイコの摘芯試験

当场、在来種のミシマサイコを供試して、抽苔茎を地上 15 cm 部位で切断する区、抽苔茎を地上 30 cm で切断する区、及び放任区の3処理区を設けて試験した。その結果、

- 1) 地上部生重は、放任区、30 cm 切断区に比し、15 cm 切断区は劣っていた。
 - 2) 生根収量は 30 cm 切断区で増収の可能性が認められた。
 - 3) 切断により台風等による、折損がすくないという利点を認めた。
- #### 3. ウコン (*Curcuma longa* Linn.) の産地別収量

性の比較

4産地(インドネシア産・台湾産・ジャワ系 No. 2 及び種子島産)のウコンについて、生育・収量調査を行い、産地間における根茎の肥大性について検討した。その結果、1株全重が大で主根茎重の小なる産地(台湾産・種子島産)と、1株全重が小で主根茎重が大なる産地(インドネシア産・ジャワ系 No. 2)とに群別できることを認めた。

4. ニッケイ属植物の生育調査

ニッケイ(種子島在来種)は、昭和47年3月22日～24日に、場内の前植生(雑木林)を伐採して植栽したものの20株について、樹高と樹幹径(長径×短径)とを調査した。その結果、樹高は 4.82～7.00 m、長径 10.6～17.6 cm、短径 10.3～16.2 cm のそれぞれの範囲内の生育であった。

次年度は、地上部の生育と根系分布、並びに根皮中の成分含量について調査する。

5. ハトムギの産地別隔離栽培による採種

6産地(タイ産・北朝鮮A, B・中国産A, B・当场在来種)のハトムギを、雑交しないように6地点で隔離栽培を行った。採種量は中国産B(3343.4 gr)、中国産A(2656.9 gr)、北朝鮮A(2566.1 gr)、北朝鮮B(1450.4 gr)、タイ産(30.0 gr)であった。

中国産A・B、北朝鮮A・Bの採種種子の殆んどは、筑植で育種母材に供試するために送付した。

6. ミシマサイコの産地別隔離栽培による採種

5産地(霧島系・平尾台系・山口系・高知系・当场産)のミシマサイコを、5地点で隔離栽培を行うとともに、場内の網室でも隔離採種を行った。採種量は霧島系(露地 710.2 gr)、当场産(露地 619.95 gr)、平尾台系(露地 182.63 gr、網室 22.2 gr)、高知系(露地 22.04 gr、網室 22.24 gr)であったが、山口系は秤量し得るだけの採種量は得られなかった。また、霧島系・平尾台系及び高知系は、筑植で育種母材に供試するために送付した。

1 Nitrosation of 1-Substituted 3-(2-Pyridylmethyl)ureas and Related Compounds

Shozo KAMIYA and Shoko SUEYOSHI: *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 1738 (1983)

1-置換 3-(2-ピリジルメチル)尿素 [$\text{PyCH}_2\text{N}^2\text{HCO-NHR}$] を $\text{NaNO}_2 \cdot \text{HCl}$ の系によってニトロソ化する時、 $\text{R}=\text{CH}_3$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$, C_6H_5 の場合は 1-ニトロソ体のみを生成するが、 $\text{R}=\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ の場合は 1-ニトロソ体と 3-ニトロソ体の混合物が得られる。

1-置換 3-(2-ピリジルエチル)尿素 [$\text{PyCH}_2\text{CH}_2\text{-NHCONHR}$] のニトロソ化でも同じような配行性を示した。

1-フェニル-及び 1-(4-トリル)-3-ベンジル尿素 [$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{NHCONHC}_6\text{H}_4\text{R}$] のニトロソ化では、1-ニトロソ体は得られず 3-ニトロソ体のみが得られる事実より、ピリジン核の電子効果が大きく影響していることが分る。

2 Action Mechanism of Anti-AH 13 Activity of 1,3-Diaryl-1-nitrosoureas and Related Compounds

Michiko MIYAHARA, Makoto MIYAHARA and Shozo KAMIYA: *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 564~570 (1984)

1,3-diaryl-1-nitrosoureas (I) の投与は腹水肝癌 AH 13 細胞を移植したラットに延命効果をもたらした。(I)の活性体は aryl diazonium ion, aryl isocyanate と nitrosonium ion など 3 種のもが生じた。これらは adenine, guanine, lysine, cysteine と反応した。(I)が担癌動物の腹腔内に投与されると以下の様に反応し延命効果を示すと考えた。(I)は腹水中の腫瘍細胞の核内にまでただちに透過し、分解して、aryl diazonium ion を生成する。これは DNA に adduct を作り、結果として DNA の分断をひき起こす。分断したものの一部は修復のひきがねになるが、aryl isocyanate や nitrosonium ion により修復酵素のカルバモイル化やニトロソ化が進行し修復酵素を修飾し活性を低下させて修復阻害をおこさせるので、DNA 障害が固定され、動物個体は延命した。

3 チトクロム P-450 をモデルとした反応

宮田直樹, 広部雅昭*: *有合成*, **40**, 861 (1983)
鉄ポルフィリン錯体を用いるチトクロム P-450 モ

デル反応に関する最近の研究をまとめた。本論文は反応様式にしたがって三つに分けられ、第一は α , β , γ , δ -テトラフェニル鉄(III)クロライド ($\text{Fe}^{\text{III}} \text{TPPCl}$) と 2-ヨードソ-m-キシレンより発生したポルフィリナト鉄-オキセン錯体が第三アミンを脱アルキル化する反応である。第二の反応は分子状酸素の還元的活性化を伴う酸化であり、プロトン性溶媒中に生成した活性化酸素中間体が第三級アミン、スルフィド及び炭化水素を酸化する。第三は還元型鉄ポルフィリンによって第三級アミノキンドやアレンオキンド類を還元的に脱酸素化する反応である。

* 東京大学薬学部

4 Deoxygenation of Tertiary Amine N-Oxides and Arene Oxides by Iron (II) Porphyrin as a Model of Cytochrome P-450 Dependent Reaction

Naoki MIYATA, Tomofumi SANTA* and Masaaki HIROBE*: *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 377 (1984)

還元型チトクロム P-450 モデル錯体であるテトラフェニルポルフィリン鉄(II)は、第三級アミン N-オキンド類及びアレンオキンド類を室温で還元する。本研究でオキンド体から還元型鉄ポルフィリンへ直接オキセンが transfer する過程(直接的酸素転移機構)が示された。

* 東京大学薬学部

5 Oxidation of Tertiary Amines and Sulfides by an Iron (III) Porphyrin- O_2 - $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ System as a Model of Cytochrome P-450

Tomofumi SANTA*, Naoki MIYATA and Masaaki HIROBE*: *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 1252 (1984)

$\text{Fe}(\text{III})$ -ポルフィリン, O_2 及び $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ を用いる新しいチトクロム P-450 モデル系で種々の第三級アミン及びスルフィドはそれぞれ第二級アミン及びスルホキンド類に酸化された。

* 東京大学薬学部

6 生物学的同等性の試験方法についての解説 一統計解析 その3—

江島 昭, 緒方宏泰, 鹿庭なほ子, 青柳伸男,
柴崎利雄, 渡辺 康*, 本橋 清*, 山口定男*,

諏訪 要*³, 別所貞雄*³, 有賀政義*³, 天田 敏*³, 北浦敏行*⁴, 高岸 靖*⁴, 鮫島政義*⁴, 島 本次雄*⁴, 今里 雄*⁴: *医薬品研究*, 15, 123 (1984)

生物学的同等性試験における統計解析法に関し, 1) データを対数変換した場合, 2) データを平方根変換した場合, 3) 追加実験を行う場合, 4) 群間で被験者数が異なる場合のそれぞれについて, 分散分析法及び検出力の算出法について標準的方法の解説を行った。

*1 明治薬科大学

*2 国立国府台病院

*3 東京医薬品工業協会製剤技術懇談会

*4 大阪医薬品協会製剤研究会

Determination of Propranolol and Its Metabolite, Naphthoxylactic Acid, in Human Plasma by High Performance Liquid Chromatography

Hiroshi TAKEI, Hiroyasu OGATA and Akira EJIMA: *Chem. Pharm. Bull.*, 31, 1392 (1983)

蛍光検出器を用いた HPLC 法によって, プロプラノロール及びその代謝物である, naphthoxylactic acid (NLA) の定量法を確立した。NLA は強いテーリングを起したので, ジアゾメタンによるメチル化を前処理として行う方法をとった。1 ml 血漿を試料として, pH 10.2 の条件でプロプラノロールをエーテル抽出し, 次に, 液性を強酸性に変え, NLA をエーテル抽出する方法をとった。両物質共に92%以上の回収率を得た。検出限度は, プロプラノロールは 0.5 ng/ml 血漿, NLA は 2 ng/ml 血漿であった。この方法により, 20 mg プロプラノロール経口投与後のプロプラノロール及び NLA の血中濃度の時間的推移を測定することが出来た。

Bioavailability of Two Preparations of Furosemide and their Pharmacological Activity in Normal Volunteers

Hiroyasu OGATA, Sadock ZUGARNI, Akira EJIMA and Yasuhito KAWATSU*: *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 24, 791 (1983)

10人の健康被験者を用いて, フロセミド 40 mg を含む市販 2 製剤のバイオアベイラビリティ及び利尿効果を検討した。フロセミド尿中排泄速度とナトリウムイオン尿中排泄速度・尿排泄速度との間には直線的な関係が成立していることが判った。検討した 2 製剤については, バイオアベイラビリティ・利尿効果につい

て有意な差は認められなかった。また, フロセミド含量の変動性は, 経口投与後の尿中24時間回収率の変動に反映していたが, 利尿効果にまでは影響を与えていなかった。分散分析の解析の結果, 利尿効果を指標としても, 充分, バイオアベイラビリティを評価できることがわかった。

* 国立療養所東京病院

生物学的同等性試験における検出力, 主としてヒト試験とビーグル犬試験の比較

鹿庭なほ子, 緒方宏泰, 青柳伸男, 江島 昭, 佐久間 昭*: *薬誌*, 104, 175 (1984)

生物学的同等性試験の検出力について, ジアゼパム錠, フルフェナム酸・カプセル, ナリジクス酸錠, グリセオフルビン錠, シクランデレート・カプセルを例にとり, 主としてヒト試験とビーグル犬試験とを比較した。従来より生物学的同等性試験の検出力では最大血中濃度, 血中濃度-時間曲線下面積のようなパラメータの方が, 各時間の血中濃度あるいは最大血中濃度に達する時間のようなパラメータよりも検出力が高いと言われていたが, 今回もこのことは実証された。パラメータの値を体重当りの投与量で補正しても検出力は変わらないが, 血中濃度-時間曲線下面積を k_B で補正するとかえって検出力は低下した。同一のスケールで試験を行った場合には, フルフェナム酸を除いて, ビーグル犬試験よりもヒト試験の方が検出力が高かった。

* 東京医科歯科大学難治疾患研究所

Bioavailability of griseofulvin from plain tablets in Göttingen minipigs and the correlation with bioavailability in humans

Nobuo AOYAGI, Hiroyasu OGATA, Nahoko KANIWA, Akira EJIMA, Yukio YASUDA* and Yoshikuni TANIOKA*: *J. Pharm. Dyn.*, 7, 7 (1984)

ゲッティング種ミニブタを対象に, グリセオフルビン製剤 4 種の Bioavailability 試験を行い, 既に行ったヒトとの結果と比較した。薬物投与後の C_{max} , AUC ともヒト-ミニブタ間に高い相関性がみられたが, 製剤間の Bioavailability の差はヒトに比べミニブタの方が小さく, また *in vivo* パラメータの統計的検出力もミニブタの方がよかった。したがって, ミニブタはグリセオフルビン製剤の Bioavailability の予測評価に用いることが出来ても, 生物学的同等性試験にはその有用性が低いように思われる。また, 最高血中濃度到達時間の比較から, ミニブタはヒトより胃内容排出速

度が遅いことが示唆された。

* 実験動物中央研究所

11 **Stability of Solid Dosage Forms. II. Hydrolysis of Meclofenoxate Hydrochloride in Commercial Tablets**

Sumie YOSHIOKA, Toshio SHIBAZAKI and Akira EJIMA: *Chem. Pharm. Bull.*, 31, 2513 (1983)

市販製剤における塩酸メクロフェノキサート(MF)の加水分解を原末と比較して速度論的に検討した。分解速度はMFの臨界湿度以上においてはべき関数であらわすことができ分解の予測が可能であった。また炭酸マグネシウムをはじめとする数種の賦形剤の分解促進作用が明らかになった。

12 **クロマトグラフ法による製剤の試験法(第2報) インドメタシン製剤の分析**

江島 昭, 立沢政義, 松田りえ子: 医薬品研究, 15, 93 (1984)

製剤中のインドメタシン及びその分解物の TLC 及び HPLC による定量法を確立した。

TLC 法はシリカゲルを吸着剤とし、(I)エーテル・氷酢酸(100:3)又は(II)n-ヘキサン・イソプロパノール・氷酢酸(84:14:2)を展開溶媒としてp-クロル安息香酸を確認し純度試験を行う。

HPLC 法による純度試験はカプセル剤、坐剤及びゲル軟膏は ODS を充填剤とし、レクタールカプセルはニトリル基を結合したシリカゲルを充填剤としてp-クロル安息香酸の定量を行う。インドメタシンの定量は ODS を充填剤とし、テトラヒドロフラン・薄めたリン酸(1→1000)(1:1)又はメタノール・薄めたリン酸(1→1000)(3:1)を移動相として行う。

13 **クロマトグラフ法による製剤の試験法(第3報) ナファゾリン・クロルフェニラミン液の定量**

江島 昭, 立沢政義, 松田りえ子: 医薬品研究, 15, 109 (1984)

ナファゾリン・クロルフェニラミン液中の硝酸ナファゾリン及びマレイン酸クロルフェニラミンの HPLC による定量法を作成した。試料を水で希釈して試料溶液とする。ODS を充填剤とし、ラウリル硫酸ナトリウムを含む移動相を用いたイオンペア法により定量を行った。従来の比色定量法に比べて操作も簡単で、ナファゾリン及びクロルフェニラミンの同時定量が可能となった。

14 **クロマトグラフ法による製剤の試験法(第4報) クロフィブラートカプセルの定量**

江島 昭, 立沢政義, 松田りえ子: 医薬品研究, 15, 113 (1984)

HPLC によるクロフィブラートカプセル中の主薬及び分解物の定量法を作成した。クロフィブラートは ODS を充填剤としアセトニトリル・薄めたリン酸(1→1000)混液(6:4)を移動相として定量する。分解物のp-クロルフェノールは、ニトリル基を化学結合したシリカゲルを充填剤とし、ヘキサン・イソプロパノール・氷酢酸(98.45:1.5:0.05)を移動相とし定量した。HPLC 法により、分解物の妨害なくクロフィブラートの定量が可能である。また順相系を用いることによりクロフィブラート中の微量のp-クロルフェノールをパラベン類の妨害なく迅速に定量することが可能になった。

15 **クロマトグラフ法による製剤の試験法(第5報) ヒドロコルチゾン・ジフェンヒドรามミン軟膏の定量**

江島 昭, 立沢政義, 松田りえ子: 医薬品研究, 15, 118 (1984)

HPLC によるヒドロコルチゾン・ジフェンヒドรามミン軟膏の定量法を作成した。ODS を充填剤としたイオンペアクロマトグラフ法及びスチレン-ジビニルベンゼン系ポラスポリマーを用いる方法を検討したが、後者の方法はパラベン類の妨害を受けないため、定量法として採用した。HPLC により、分解物の共存下でも精度の良い定量が可能となった。

16 **向精神剤のマイクロクリスタルテスト II**

高橋一徳, 島峯望彦, 角田健司*, 渡辺富雄*, 大野昌子: 日法医誌, 37, 699 (1983)

TLC を併用し、二種の異なる組成の I-KI 試液を用いたマイクロクリスタルテストにより、幻覚剤メスカリンを確認し、更にフルオレッサミンによる HPLC 法で含量を測定する簡易鑑別法について述べた。

また本法を適用し、国立衛生試験所筑波薬用植物栽培試験場で栽培した4種のメスカリン起原植物 *Lophophora williamsii* (ウバタマ, peyote) の成分の分離、確認、定量を行い、幻覚植物としての国産 peyote に評価を加えた。

* 昭和大学医学部

17 フルオレッサミンによるフェネチルアミン及びアンフェタミン系化合物の新高速液体クロマトグラフ法

島峯望彦: 日法医誌, 38, 206 (1984)

一級アミンであるフェネチルアミン系及びアンフェタミン系の向精神剤の微量分析法を開発するためフルオレッサミンを用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) について研究を行った。

メスカリン, アンフェタミン, STP, DOET など30種の化合物について検討を加えた。その結果 pH 8.5 で 0.05% フルオレッサミン-アセトン溶液により最大の蛍光強度を示した。この反応は室温において3秒以内で完結し、蛍光生成物は安定で5時間では変化が認められず、24時間後でも約2%蛍光強度の減少が認められる程度であった。HPLC はカラム温度 40°で行い、いずれの化合物も 2~10 ng の微量が確認できた。この方法の有利性はフルオレッサミンの過剰が測定を妨害しないことである。その理由はフルオレッサミンにより生成された蛍光物質が HPLC により分離され、各々が別に測定され得るからである。二級アミンの添加実験を行ったがその影響は認められなかった。また、薄層クロマトグラフィーと HPLC を併用した方法も検討した。本法を適用し Peyote (Lophophora 属) 中のメスカリン、及びメタンフェタミンを投与したサル尿中のアンフェタミンの定量を行い好結果を得た。

18 液体クロマトグラフ法による糖質コルチコイドの定量II. ヒドロコルチゾン, 酢酸ヒドロコルチゾン, フルオシノロンアセトニド及び酢酸プレドニゾロン含有軟膏及び眼軟膏への応用

徳永裕司, 木村俊夫, 川村次良: 医薬品研究, 15, 87 (1984)

軟膏及び眼軟膏中に含まれるヒドロコルチゾン, 酢酸ヒドロコルチゾン, フルオシノロンアセトニド及び酢酸プレドニゾロンを高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法で定量することを検討した。軟膏中の基剤及び賦形剤等の除去のためシリカゲルカラムを使ったプレスクリーニング処理後、得られた試料溶液を HPLC 法で定量する方法を確立した。

19 高速液体クロマトグラフ法による錠剤中のジドロエルゴタミンの定量及び水溶液中の安定性

徳永裕司, 木村俊夫, 川村次良: 分析化学, 33, 26 (1984)

ジドロエルゴタミン (DE) の定量法として、移動相に 3mM トリエチルアミン, カラムにリクロソ

ルブ RP-18 (5 μ m) を充てんした 150 mm \times 4 mm i. d. ステンレス管を用いた高速液体クロマトグラフ法を確立した。この方法を DE の光及び熱に対する安定性の検討に応用した。30000 ルクスの白熱光下で3時間まではほぼ安定に存在し、1%酒石酸溶液中 80~100°の加熱で、残存率40~60%まで見掛け上擬一次反応で分解し、その活性化エネルギーは、19.8 kcal/mol degree であった。この方法を市販のメタンスルホン酸ジドロエルゴタミン錠の定量及び含量均一性試験に適用した。

20 Analysis of Insulins by High-Performance Liquid Chromatography. II. Separation of Various Species of Insulins

Miyako OHTA, Hiroshi TOKUNAGA, Toshio KIMURA, Hiroshi SATOH and Jiro KAWAMURA: Chem. Pharm. Bull., 31, 3566 (1983)

高速液体クロマトグラフ法により、ウシ, ブタ, ヒツジ及びウマの4種のインシュリンの分離を検討した。これら4種のインシュリンは、リクロソルブ RP-18 のカラムを用い、カラム温度を 40°とし、アセトニトリルと 5mM 酒石酸緩衝液 (pH 3.0) (27:73) の混液に 0.15 M 硫酸ナトリウムを含有させた移動相を用いて溶出するとき、完全に分離した。

21 Determination of Ergometrine Maleate and Methylergometrine Maleate in Pharmaceutical Preparations by High-Performance Liquid Chromatography

Hiroshi TOKUNAGA, Toshio KIMURA and Jiro KAWAMURA: Chem. Pharm. Bull., 31, 3993 (1983)

製剤中のマレイン酸エルゴメトリン (EM) 及びマレイン酸メチルエルゴメトリン (MM) の定量法として高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法を検討した。EM 及び MM の錠剤又は注射液を塩化ナトリウム及びアンモニア試液に加え、ジクロルメタンで抽出した。EM 及び MM は 1.5mM トリエチルアミンを含むアセトニトリル・50mM 酢酸緩衝液の混液を用い、リクロソルブ RP-18 カラムで定量した。得られた定量値を比色定量法と比較したところ、MM 錠の場合を除いて一致した。JPX の EM 錠の含量均一性試験法で調製した試料溶液を HPLC 法と比色定量法と比較したところ、HPLC 法では 80.8%, 比色定量法では 96.0% であった。EM 錠からの抽出の際に EM の分解が起っていることが示唆された。

22 組換え DNA 技術を利用して生産される医薬品の品質確保に関する基礎研究

野島庄七*1, 川村次良, 小池克郎*2, 清水直容*3, 寺尾允男, 名取俊二*1, 山崎修道*4, 早川堯夫: 医薬品研究, 15, 492 (1984)

組換え DNA 技術を利用して生産される医薬品の品質確保を図る上で、製造過程から基礎、前臨床、臨床試験においてどのような検討が必要であるかについて、2年間にわたり調査研究(厚生省特別研究)した結果を報告した。また、背景となる考え方についても述べた。

*1 東京大学薬学部

*2 癌研究会附属研究所

*3 帝京大学医学部

*4 予研

23 Purification and Some Properties of Aldose Reductase from Rabbit Lens

Tsuyoshi TANIMOTO, Hideo FUKUDA and Jiro KAWAMURA: *Chem. Pharm. Bull.*, 31, 2395 (1983)

4種のアルドース還元酵素(Ia, Ib, IIa, IIb)を家兎水晶体から均一に単離した。4種の酵素の分子量はゲルろ過法で33K, 電気泳動法で37Kであった。酵素反応の最適pHは4種ともpH 5.6であった。4種の酵素は広い基質特異性を示し、種々のアルデヒド、アルドースに対して作用したが、D-hexoseに対してはIIa, IIbの作用は弱かった。Ia, IbはNADPHとNADHを補酵素に利用したが、IIa, IIbはNADPHを特異的に利用した。逆反応(基質の酸化反応)は高濃度の基質を必要とし、反応の平衡は基質の還元反応の方向に傾いていることが推察された。酵素化学的諸性質からIa, Ibはalditol: NADPH oxidoreductase [EC 1.1.1.21]に分類される酵素であると考えられた。

24 家兎水晶体のDL-グリセルアルデヒド還元酵素活性の多様性

谷本 剛, 福田秀男, 川村次良: 薬学雑誌, 104, 62 (1984)

家兎水晶体のDL-グリセルアルデヒド還元酵素活性の多様性を検討した。DL-グリセルアルデヒド還元酵素活性をもつ酵素はアフィニティークロマトで2個の画分(F-1とF-2)に分画され、F-2はChromatofocusingで更に4個の活性画分(F-2a, -2b, -2c, -2d)に分離された。F-1の酵素の性質はF-2の4種の酵素のそれとは著しく相違していた。F-1の酵素の

分子量は約60Kであったが、F-2の4種の酵素のそれはすべて約33Kであった。F-1はD-erythroseに高い特異性を示したが、F-2の酵素はすべてDL-glyceraldehydeに最も強く作用した。F-1はquercitrin, quercetinなどのアルドース還元酵素阻害剤でほとんど阻害されず、 SO_4^{2-} による活性化もみられなかった。F-2の4種の酵素はその性状からF-2aとF-2c(A群)及びF-2bとF-2d(B群)の2群に分類でき、各群内の2種の酵素の性質はきわめて類似していた。両群の酵素ともaldoseに関して広い基質特異性を示したが、B群のpentose, hexoseに対する作用は著しく弱かった。A群は SO_4^{2-} で顕著に活性化されたが、B群は活性化されなかった。アルドース還元酵素阻害剤は両群の酵素を強く阻害したが、A群の方がB群よりこれら阻害剤に対して強い感受性を示した。

25 Characterization of Aldose Reductases Ia and Ib from Rabbit Lens

Tsuyoshi TANIMOTO, Hideo FUKUDA and Jiro KAWAMURA: *Chem. Pharm. Bull.*, 32, 1025 (1984)

家兎水晶体から単離したアルドース還元酵素Ia及びIbの性状を詳しく検討した。両酵素はアルドースを含めた種々のアルデヒド化合物に対して作用したが、特に芳香族アルデヒドに強い作用を示した。アルドースに関してはDL-glyceraldehydeに対して高い親和性を示し($K_m=31\mu\text{M}$)、D-glucoseに対する親和性は低かった($K_m=90\sim 120\text{mM}$)。両酵素はNADPHとNADHを補酵素としたが、NADPHの方が補酵素としてよく利用された。NADPHに対する K_m は、 $1.3\mu\text{M}$ 、NADHのそれは $270\sim 420\mu\text{M}$ であった。両酵素は SO_4^{2-} で強く活性化された。この活性化は K_m と V_{max} の両者を増加させた。両酵素はアルドース還元酵素阻害剤として知られているquercitrin, quercetinなどで著しく阻害された。種々のアデニンスクレンオチドを用いた阻害実験から本酵素への補酵素の結合には補酵素分子中の2'-位及び5'-位リン酸基が必須であることが推察された。

26 Inhibition of Aldose Reductases from Rabbit Lens by Oxazole Derivatives

Tsuyoshi TANIMOTO, Hideo FUKUDA, Jiro KAWAMURA, Masumi NAKAO*, Utako SHIMADA*, Akira YAMADA* and Chiaki TANAKA*: *Chem. Pharm. Bull.*, 32, 1032 (1984)

C-2位とC-5位に種々の置換基をもつ20種のオキサ

ゾール誘導体を合成し、家兎水晶体アルドース還元酵素に対する阻害効果を調べたところ、8種の誘導体に強い阻害効果が認められた。そのうち benzyl 5-phenyl-2-oxazolecarbamate (I) と N-phenyl-N'-(5-phenyl-2-oxazolyl) urea (II) が特に強い阻害効果を示した。I の 50% 阻害濃度 (IC_{50}) は約 $15 \mu M$ であり、II の IC_{50} も同程度であった。これら阻害剤は乳酸脱水素酵素にも若干の効果を示したが、アルドース還元酵素にはほぼ特異的に作用することが示唆された。これら誘導体の阻害効果の構造活性相関についての若干の考察を行った。

*大阪薬科大学

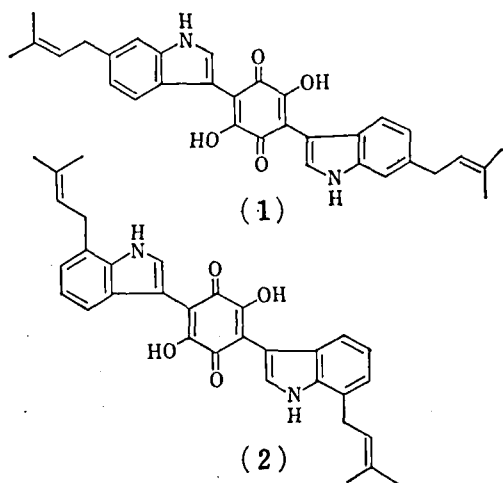
27 Production of a Monoclonal Anti-11-deoxycortisol Antibody

Hiroshi HOSODA*, Norihiro KOBAYASHI*, Toshio NAMBARA*, Jun-ichi SAWADA and Tadao TERAO: *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 381 (1984)

11-deoxycortisol に対するモノクローナル抗体の調製を行った。11-deoxycortisol-BSA 複合体により免疫された Balb/c マウスの脾臓細胞を NS1 骨髄腫細胞と融合し、11-deoxycortisol に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドマクローンを得た。このモノクローナル抗体は、非常に高い親和性 ($K_a = 2 \times 10^{10} M^{-1}$) を示し、11-deoxycortisol に対する高い特異性を有する。

*東北大学薬学部

28 Isocochliodinol and Neocochliodinol, Bis(3-indolyl)-benzoquinones from *Chaetomium* spp.



Setsuko SEKITA: *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 2998 (1983)

Chaetomium murorum, *C. amygdalisporum* からそれぞれ新マイコトキシン isocochliodinol (1), neocochliodinol (2) を単離した。これらの構造は物理測定 (IR, UV, MS, 1H -NMR) 及び化学反応により下図のように決定し、構造既知である cochliodinol のプレニル基の位置異性体であることを明らかにした。

29 イオン交換樹脂混床を用いた尿毒症成分の除去と電解質バランスの保持

新谷英晴, 辻 楠雄, 大場琢磨: *人工臓器*, **13** 694 (1984)

我々は尿毒症成分特に尿素吸着除去にイオン交換樹脂の使用を試みてきた。イオン交換樹脂処理において問題となる pH バランス、カチオンバランスの補正が解決されなければならない。強酸性カチオン交換樹脂 Amberlite 200C (H), (Na) と弱酸性カチオン交換樹脂 Amberlite 50 (Ca), (Mg), (K) の種々の割合の混床に血清 50 ml を添加し樹脂処理前後の血清 pH, Na, K, Ca, Mg の変化を検討した。その結果, pH, K, Ca, Mg は 200C(H) 0.3 ml, 50(K) 0.18 ml, 50(Ca) 0.75 ml, 50(Mg) 0.21 ml の混床でバランスが保たれた。Na については 200C(Na) が 5 ml 混床された時約 16% が補正されなかった。

30 血清中の尿毒症成分の高速液体クロマトグラフィーによる分別定量

新谷英晴, 辻 楠雄, 大場琢磨: *衛生化学*, **30**, 1 (1984)

①カラムに Zorbax ODS, 移動相にカウンターイオンとして 2.5 mM ヘキサンスルホン酸ナトリウムを添加したリン酸緩衝液 (5 mM リン酸-ナトリウムを含む, pH 2) を用いてベアードイオン逆相クロマトグラフィーを行うことにより尿素 (U), 尿酸 (UA) の同時定量を, ②①の移動相に更に 80 mM 過塩素酸ナトリウムを添加することにより UA, クレアチニン (Cr), メチルグアニジン (MG) の同時定量を, ③カラムに日本分光 ODS SS-10A, 移動相に 20% (v/v) アセトニトリルを添加した過塩素酸緩衝液 (15 mM 過塩素酸ナトリウムを含む, pH 5) を用いることにより, Cr, MG, ビタミン B₁₂ の同時定量を可能とした。

31 室内空気汚染に関する研究 (第3報) 室内空气中のホルムアルデヒド濃度について

松村年郎, 村松 学*, 尾谷勝昭: *日本公衆衛*

生雑誌, 30, 303 (1983)

ホルムアルデヒド自動計測器の性能評価試験を行うとともに大規模建築物及び一般住居等におけるホルムアルデヒド汚染の実態調査を行った。その結果、自動計測器によって得られた測定値は、ホルムアルデヒドの標準的な測定法である NIOSH のクロモトローブ酸法ともよく一致し、また、同一試料ガスによる再現性試験においても変動係数で 2.2% を示し、本計測器によって得られた測定値は十分評価に耐え得ることが明らかとなった。また、室内ホルムアルデヒド濃度は 1 時間値で 1~290 ppb, 日平均値で 2~50 ppb の濃度範囲を示し、特に、新築の住居及び家具を購入した住居等においては、1 時間値が 100 ppb 以上の高濃度を示す時がしばしば認められた。また、今回、得られた実測値を基に、個人曝露量の推定を行った。その結果、家庭の主婦、オフィス勤務者、戸外労働者等の曝露量は 0.24 mg/day~2.70 mg/day の範囲であることが明らかとなった。

* 東京都衛生局

32) 不揮発性有機塩素化合物の生成に関する研究 (I) フミン酸の塩素化反応生成物

佐谷戸安好, 中室克彦, 松井啓子: 水道協会雑誌, 52(12), 29 (1983)

2 種の起源の異なるフミン酸の塩素処理によって生成する有機塩素化合物のうち、特に、不揮発性有機塩素化合物の生成状態及び塩素化反応生成物の検索について検討を行った。その結果、フミン酸の各種塩素化反応条件において生成する TOCl (Total Organic Chloride) のうち、約 70~80% は POCl (Purgeable Organic Chloride) で、そのうち、クロロホルムは 10~20% を占めるにすぎなかった。また、フミン酸の塩素化反応によって生成した低分子物質は高分子物質に比較して塩素含有率が高いことを示した。更に、フミン酸の不揮発性塩素化反応生成物の GC-MS による検索結果についても併せて報告した。

33) 水中全有機ハロゲン化合物の分析手法に関する研究

佐谷戸安好, 安藤正典, 岸喜昭, 松井啓子, 真柄泰基*, 相沢貴子*: 水道協会雑誌, 53(1), 20 (1984)

水中有機ハロゲン化合物の標準分析方法策定に関する研究の一環として TOX 計による全有機ハロゲン化合物測定に関する基礎的検討を行った。

1) Dohman 型 TOX 計による水中有機ハロゲン

化合物の測定において、測定の都度活性炭等のブランク値を補正する必要があると考える。また、同一試料について連続測定を行った場合、日間の測定誤差は、TOX 100 $\mu\text{g/l}$ 程度で小、50 $\mu\text{g/l}$ 以下で大となることが認められた。

2) 吸着操作において、低級脂肪族炭化水素、酢酸類、アルコール類は吸着効率が悪いことを認めた。

3) 有機ハロゲン化合物の熱分解における回収率は低級脂肪族炭化水素において低い傾向がみられ、またこれら回収率と沸点の間には相関関係が認められた。

4) 本法は、水中に酢酸類、アルコール類あるいは低沸点化合物類が多く存在した場合は理論値よりも低い値を示すことが考えられる。

* 国立公衆衛生院

34) Microdetermination of Bromide in Water by Gas chromatography

Masanori ANDO and Yasuyoshi SAYATO: *Water Research*, 17, 1823 (1983)

水の塩素処理によって生成するトリハロメタンのうち、 CHCl_2Br , CHClBr_2 あるいは CHBr_3 などのブロム化合物は水中ブロマイオンが Cl_2 によって活性化されて生成するものと考えられている。このことから、水中ブロム化合物の生成機構、並びにブロム化合物の生成量を推定するためには、水中ブロマイオンの微量定量方法を確立することが重要な問題であると考えられる。すなわち、水中ブロムを Amberlite CG-400 でブロマイオンのみを分離し、これに 0.01% クエン酸 0.1 ml, 5% KMnO_4 2 ml, 40% H_2SO_4 1 ml を加え 10 分間放置する。ついで、25% 硫酸第一鉄 5 ml, 4% NaOH 5 ml を加えて、ゴム栓、アルミキャップをして、20°, 1 時間放置する。この気相の一定量をガスクロマトグラフに注入し、生成した CHBr_3 量を測定し、水中のブロマイオン量を算出するものである。この方法によって水中ブロマイオンは、1 μg まで、試料 100 ml を使用した場合は、10 ppb まで測定が可能であることを認めた。

35) Studies on Vinyl Chloride Migrating into Drinking Water from Polyvinyl Chloride Pipe and Reaction Between Vinyl Chloride and Chlorine

Masanori ANDO and Yasuyoshi SAYATO: *Water Research*, 18, 315 (1984)

トリハロメタンをはじめとする有機ハロゲン化合物

は水の塩素処理によって生成し、これが有機物の存在量あるいは塩素量に比例して増加することが明らかになっている。一方、トリクロロエチレン、テトラクロロエチレン、1,1,1 トリクロロメタン及び塩化ビニル(VCM)などが、地下水汚染物質として、あるいは硬質塩化ビニルパイプ、ライニングパイプ中からの溶出物質として測定されることがある。本報では、硬質塩化ビニルからの VCM 溶出状況と、溶出した VCM の塩素との反応について検討した。その結果、硬質塩化ビニルパイプからも VCM が溶出することが確認された。更に、溶出された VCM は塩素と反応して、短時間のうちに消失した。また消失した VCM は塩素によって、クロロ酢酸あるいはクロロアセトアルデヒドに変換されていることを、GC-MS によって確認した。

36 **A Study on Water Quality Evaluation of the Chao Phraya River**

Katsuhiko NAKAMURO, Damrong KISANANUWAT*, Monthip TABUCANON* and Wattana SUKASEN*: *J. Sci. Soc. Thailand*, 8, 175 (1982)

タイ国チャオプラヤ川(メナム川)の水質評価に関する検討を行った。その結果、本河川において、乾季(4月~11月)に海水が河口から60km上流まで遡上することが認められたが、雨季(5月~10月)では河口から約10km上流まで遡上するにすぎないことが認められた。BODやDOの流域あるいは季節の変動の結果から、バンコク首都圏を流下するチャオプラヤ川の水質変動は、潮、河川流量、家庭下水と工場排水等の影響を強く受けることが明らかとなった。また、BODとDOの間に高い相関性が認められた。

* タイ国環境庁, 環境基準部

37 **Effect of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid on peroxisomal enzymes in rat liver**

Yoichi KAWASHIMA*, Haruyo KATOH*, Setsuko NAKAJIMA*, Hiroshi KOZUKA* and Mitsuru UCHIYAMA: *Biochem. Pharmacol.* 33, 241 (1984)

2,4,5-Tあるいは2,4-Dなどの除草剤の毒性検討が必ずしも充分でないことが予見されたので、これら除草剤の有する生理活性のうちこれまで検討されていない脂質代謝への影響を peroxisome の増殖促進という面から検討した。2,4,5-T等の投与によりCN不感性的なパルミトイルCoA酸化が、カタラーゼや、クレアチンアセチルトランスフェラーゼとともに著明に

上昇した。またミトコンドリア画分においてM.W. 80000のポリペプチドの増加が観察された。これらは2,4,5-Tの発がん性と矛盾せず、抗脂薬クロフィブラート等と作用の似たものであることを示す。

* 富山医科薬科大学

38 **生体内抗酸化性成分存在下におけるチオバルビツール酸(TBA)反応**

三原 翠, 内山 充, 山根靖弘*: 薬学雑誌, 103, 889 (1983)

TBA法が過酸化脂質の絶対量を表しているのではなく、共存する抗酸化性成分も含めた組織の過酸化の状態を総合的に表していると推論してきたが、この推論を更に確かめるために、肝ホモジネートとリノール酸メチルヒドロパーオキシド(MLHPO)のTBA反応系に、生体含有の抗酸化性成分; グルタチオン, アスコルビン酸, α -トコフェロールを加えて検討した。MLHPOのTBA値はグルタチオンの添加で抑制されるが、アスコルビン酸や α -トコフェロールでは抑制されない。MLHPOのTBA反応は、これらの抗酸化性成分を一緒に加える事で効果的に抑制された。正常肝ホモジネートのTBA反応はアスコルビン酸で強く抑制されるが、 α -トコフェロールでは抑制されない。CCl₄中毒肝ホモジネートのTBA反応は α -トコフェロールで強く阻害された。

* 千葉大学薬学部

39 **Effects of Antioxidants on the TBA Reaction of Various Rat Liver Homogenates**

Midori MIHARA and Mitsuru UCHIYAMA: *Biochemical Medicine* 30, 131 (1983)

TBA反応は薬物を投与していない自然の状態のもの(若齢及び老化ラット肝)ではEDTAの添加により50%以上の強い抑制が認められる。一方CCl₄投与やHCB投与肝のような薬物投与肝では、その抑制が低く明らかに相違が認められる。したがって自然な状態にある肝では非ヘム鉄関与のTBA反応が起こっている比率が高く、薬物投与肝ではヘム鉄関与の比率が大きいと思われる。

40 **Determination of pheophorbide a, pyropheophorbide a and phytol**

Yuiko TAKEDA*, Yukio SAITO and Mitsuru UCHIYAMA: *J. Chromatogr.*, 280, 188 (1983)

クロロフィルは光、微生物、pH 等の変化を受けやすい物質であり、この分解物を多量に含む食品でしばしば光過敏症が起こることがある。クロレラ中毒、アワビの中腸腺による発症例があり、前者はフェオホルバイド後者はピロフェオホルバイドがその原因物質であると報告されている。日常食としてはクロロフィル含有野菜の漬物中にこれらの分解物の検出例特にピロフェオホルバイドが報告されている。このことからクロロフィル分解物の分布や動態を明らかにするため分解物の正確な簡易分析法の検討を行った結果、HPLC-RP-8 F254 を用いた TLC 法によりフェオホルバイド、ピロフェオホルバイドの定性定量、フィトールの GC 分析法を確立し、各種食品中の分解物の挙動を把握した。

ントを行った。

43 アフラトキシンの化学分析

齋藤 行生: マイコトキシン, 17, 14 (1983)

発癌性マイコトキシン、アフラトキシンの分析上の問題として、①分析上の微量化と、②アフラトキシンの確認法の二点があげられる。本論文では、特に後者に焦点をあて、アフラトキシンの紫外外部吸収光を利用し、多波長分光計装着の HPLC により、微量のアフラトキシンの確認、定量の同時分析法について検討した。その結果、数 ng で確認試験が、また 0.4 ng でも定量分析が可能であることが判明した。

44 健康食品ブームと食品衛生

内山 充: 化学と工業, 36, 560 (1983)

健康食品を様々な側面から眺め、健康食品問題を通して食生活のあり方にも触れ、食品科学の将来を展望した。

45 Formation of Volatile Nitrosamines by Drug-Nitrite Interactions under Physiological Conditions

Ayako SAKAI, Takiko INOUE and Akio TANIMURA: *Gann*, 75, 245 (1984)

3級アミンを中心とする28の医薬品について、生理的条件下での亜硝酸との反応による揮発性ニトロソアミンの生成について検討した。医薬品と亜硝酸とは、医薬品 10 mM, 亜硝酸ナトリウム 40 mM, pH 3.0, 37° で、1又は4時間反応させ、生成したニトロソアミンは GC-TEA によって定量した。

28医薬品のうち、24から測定可能な揮発性ニトロソアミンの生成が認められた。そのうちアミノピリンとミノサイクリンからのニトロソジメチルアミン (NDMA, それぞれ、55~65%, 11%) とドラザミドからのニトロソピベリジン (NPPI, 2~7%) の生成率が高かった。また、アミノピリンとミノサイクリンからの NDMA の生成率は、同条件下におけるジメチルアミンからの NDMA の生成率を超えており、ジメチルアミンを経ない NDMA の生成経路の存在が示唆された。アスコルビン酸による医薬品からのニトロソアミン生成の抑制についても検討したところ、本条件下では、アスコルビン酸はよい抑制剤であった。

41 The Architecture of the Animal Fatty Acid Synthetase II Separation of the core and thioesterase functions and determination of the N-C orientation of subunit

John S. MATTICK*1, Jane NICKLESS*1, Michinao MIZUGAKI*2, Chao-Yuh YANG*1, Sadao UCHIYAMA and Salih J. WAKIL*1: *J. Biol. Chem.* 258, 15300 (1983)

鶏の脂肪酸合成酵素は α -chymotrypsin によって分子量 230000 と 33000 のフラグメントに分離され、これらのフラグメントは硫安分画とゲル透過法によって精製された。230000 の大型フラグメントは脂肪酸合成酵素の中心となる活性のほとんどを含んでおり (acetyl and malonyl transacylase, condensing enzyme, β -keto acyl and enoyl reductase, dehydratase, acyl carrier protein), 小型 33000 フラグメントは完成された acyl 鎖を遊離させる thioesterase を含んでいた。精製された thioesterase に対する抗体は他の蛋白分解酵素によって分離された analogous peptide (Mr 33000) と交差反応した。アミノ酸 sequence 分析は thioesterase が脂肪酸合成酵素の C-末端に位置することを示した。

*1 Baylor College of Medicine

*2 東北大学医学部

42 食品中の有害物質の危険度評価

内山 充: 食品衛生学雑誌, 24, 249 (1983)

食品中に存在する各種有害物質の評価に関する考え方に定量的な視野を導入することを提案し、更に現在の食品中の汚染物の実在量を基に、それらの有する発がんリスクを低濃度外挿法によって計算してアセスメ

46 蛍光検出高速液体クロマトグラフィーによる食品中の第2アミンの分析

川崎洋子, 山田 隆, 石綿 肇, 谷村頭雄: 食

衛誌, 24, 308 (1983)

食品中から第二アミンを塩酸抽出し, NBD-クロライドとアルカリ性下で反応させて第二アミンの誘導体(NBD-アミン)とし, 蛍光検出高速液体クロマトグラフを用いて分別定量する方法を検討した. この方法は比較的簡便で分析時間が短く, かつ感度よく食品中の第二アミンの分別定量が可能であった. カラムは Zorbax SIL, 移動相にシクロヘキサン-酢酸エチル(3:2)を用いた. 定量限界は 0.2 ppm であり, 生たらこ, 魚肉ソーセージ, 焼いたにしんに, それぞれ, 100, 10, 10 ppm のジメチルアミンを添加した時の回収率はそれぞれ, 100, 81, 85% であった. 生のもより焼いたものの方がより多くの第二アミンが検出された. 白及び黒こしょうにピペリジンが 510, 250 ppm 検出された.

47 **Determination of Volatile Nitrosamine Levels in Foods and Estimation of Their Daily Intake in Japan**

Miyako YAMAMOTO, Ryoichi IWATA, Hajimu ISHIWATA, Takashi YAMADA and Akio TANIMURA: *Fd. Chem. Toxic.*, 22, 61 (1984)

魚介類, 魚介製品, 食肉製品, ビール, チーズなどの食品中の揮発性ニトロソアミンの定量を行い, それらの中のニトロソアミンの含量と日本人の食品群別摂取量から計算した結果, 揮発性ニトロソアミンの摂取量は 0.5 µg/人/日 となった. この値の88%は海産物によるものであった.

48 **The Reaction of Ethylenethiourea with Nitrite and Transnitrosation by N-Nitrosoethylenethiourea**

Miyako YAMAMOTO, Takashi YAMADA and Akio TANIMURA: *Chem. Pharm. Bull.*, 31, 3678 (1983)

エチレンビスジチオカーバメート系農薬の分解物及び代謝産物であるエチレンチオウレアを亜硝酸と反応させると N-ニトロソエチレンチオウレア (NETU) が生成した. この反応は, 比較的ニトロソ化速度の大きいモルホリンやメチルウレアの場合よりも更に速く, また pH が低くなるほど速かった. NETU はアルカリ性, 特に pH 10 付近で最も不安定であり, また酸性条件下での主な分解反応は脱ニトロソ化であった. NETU から 2級アミンへのニトロソ基の転移反応は pH 3 及び pH 5 で高い収率を示した.

49 **Microscopic observation of human hairs infected with *Microsporum ferrugineum***
Kosuke TAKATORI*1, Shun-ichi UDAGAWA, Hiroshi KURATA and Atsuhiko HASEGAWA*2:
Mycopathologia, 81, 129 (1983)

皮膚糸状菌 *Microsporum ferrugineum* によって侵襲されたヒト毛髪について, 光学顕微鏡及び走査型電子顕微鏡による観察を行った結果, 寄生形態に関する知見を得た. 病原菌は毛髪フィラメント部位にまず侵入し, 毛髪の表皮と皮質の間に菌糸をのばすことが観察された. また, 病原菌の分節型分生子の球状体が毛管に侵入している状態をしばしば認めた. 表層にみられた分節型分生子の形態についても記載した.

*1 食品薬品安全センター-秦野研究所

*2 東京大学農学部付属家畜病院内科

50 ***Thermoascus aegyptiacus*, a new thermophilic ascomycete**

Seiichi UEDA* and Shun-ichi UDAGAWA:
Trans. mycol. Soc. Japan, 24, 135 (1983)

好高温性子の菌の新種として *Thermoascus aegyptiacus* (分生子時代 *Paecilomyces aegyptiacus*) を記載した. 本種はスエズ運河(エジプトのポートサイドの北 30 km 地点)の底泥から分離され, その生育温度範囲は 25~55°, 最適生育温度は 40°, また 20° 以下では生育しないことから, 典型的な好高温菌である. 子の胞子の形態は既報の *T. thermophilus* に類似するが, *Polypaecilum* のような分生子は認められず, むしろ本種の分生子は *T. crustaceus* の *Paecilomyces* に類似するため, 両者の中間的な性質を備えているものといえる.

* 長崎県衛生公密研究所

51 **Two new species of *Eupenicillium* from Nepalese soil**

Masaki TAKADA* and Shun-ichi UDAGAWA:
Trans. mycol. Soc. Japan, 24, 143 (1983)

1980年に行った文部省海外学術調査の際に採集したネパールの土壌試料より分離された子の菌類 *Eupenicillium* 属について 2新種を記載した.

Eupenicillium angustiporcatum sp. nov. はネパール西部のノーダンダの森林土壌より分離されたもので, *E. tularensis* に似るが, 子のうが連鎖せず, 子のう胞子の表面構造も相違がみられた. *E. nepalense* sp. nov. はネパール中央部のカトマンズ市内の水田土壌から分離され, *E. fractum* に似るが, 子のう胞子の形, 表面

構造などが異なった。

* 東洋醸造(株)リサーチセンター

52

広島産及び東北産カキの微生物叢に関する生態学的・衛生細菌学的研究

小沼博隆: 日医大誌, 50, 788 (1983)

広島産カキ (29検体), 東北産カキ (18検体) の微生物叢を生態学的に検討し, 次のような結果を得た。

1) 広島カキの生菌数は, $10^2 \sim 10^6/g$ の範囲内にあり, 同定された主要菌叢構成菌は, 非好塩性 *Pseudomonas* III/IV-NH, *Pseudomonas* III/IV-H, *Pseudomonas* II, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio* spp., *Aeromonas* spp., (*A. hydrophila*, *A. anaerogenes* を含む), *Flavobacterium* spp., *Moraxella* spp., *Enterobacter cloacae*, *Streptococcus faecium*, *Lactobacillus* spp., *Bacillus* spp., 及び *Clostridium perfringens* などであった。

2) 東北産カキの生菌数は, $10^2 \sim 10^5/g$ の範囲内にあり, 同定された主要菌叢構成菌は好塩性 *Pseudomonas* III/IV-H, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio* spp., *Moraxella* spp., 及び *Acinetobacter* spp. などであった。

3) 最優勢菌は, 広島産では非好塩性 *Pseudomonas* であったのに対し, 東北産では好塩性 *Pseudomonas* であった。

4) 広島産カキからのみ特異的に *Aeromonas hydrophila* subspecies *hydrophila* biotype 1 が優勢菌の1つとして検出された。

5) 広島産カキから分離された *Aeromonas hydrophila* は, ウサギ, マウス腸管結紮ループ法及び乳のみマウス胃内接種法を用いて, その起病性を検討したところ, いずれも生菌あるいは培養ろ液接種により腸管内容液貯留が認められた。

53

市販冷蔵そう菜類・鮮魚介類から分離した低温酵母のタンパクおよび脂肪分解能

小島満子, 倉田 浩: 食衛誌, 24, 532 (1983)

市販冷蔵そう菜類・鮮魚介類から分離した8属33菌種の低温酵母の生育温度範囲を調べ, 5° , 15° , 25° 培養におけるタンパク (カゼイン) 及び脂肪 (バター, 牛脂) 分解能試験を行った。 5° , 15° , 25° , 7日培養におけるタンパク分解能陽性率は, それぞれ 21.2%, 18.2%, 15.2%, 脂肪 (バター) 分解能陽性率は, それぞれ 30.3%, 60.6%, 54.5% であった。 15° 培養の4日以内にタンパク, 脂肪分解能を示した酵母は *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Leucosporidium*, *Rhodotorula*, *Trichosporon* の6属14菌種であった。 5° 培養の4日以内にタンパク, 脂肪分解能を示した

酵母は *Candida parapsilosis*, *Candida santamariae*, *Candida valida*, *Candida zeylanoides*, *Cryptococcus laurentii*, *Candida lipolytica*, *Leucosporidium gelidum*, *Trichosporon pullulans* の4属8菌種であった。特に後の3菌種は, 強いタンパク脂肪両分解能を示す菌種であった。

54

市販冷蔵そう菜類・鮮魚介類から分離した酵母の同定

小島満子, 倉田 浩: 食衛誌, 24, 525 (1983)

市販冷蔵そう菜類及び鮮魚介類から分離した酵母89株を, 次のような8属36菌種に同定した。 *Candida beechii*, *Candida guilliermondii*, *Candida humicola*, *Candida intermedia*, *Candida lambica*, *Candida lipolytica*, *Candida membranaefaciens*, *Candida parapsilosis*, *Candida pelliculosa*, *Candida sake*, *Candida santamariae*, *Candida solani*, *Candida valida*, *Candida zeylanoides*, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus infirmo-miniatus*, *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus luteolus*, *Cryptococcus macerans*, *Debaryomyces hansenii*, *Kloeckera apiculata*, *Leucosporidium gelidum*, *Rhodotorula aurantiaca*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula graminis*, *Rhodotorula minuta*, *Rhodotorula pallida*, *Rhodotorula rubra*, *Torulopsis candida*, *Torulopsis halonitratophila*, *Torulopsis holmii*, *Torulopsis magnoliae*, *Trichosporon cutaneum*, *Trichosporon penicillatum*, *Trichosporon pullulans*, *Trichosporon variabile*。

55

Chemotaxonomy of *Gibberella zeae* with Special Reference to Production of Trichothecene and Zearalenone

Masakatsu ICHINOE, Hiroshi KURATA, Yoshitsugu SUGIURA* and Yoshio UENO*: *Appl. Environ. Microbiol.*, 46, 1364 (1983)

麦類赤カビ病菌の *Fusarium graminearum* の teleomorph であり, 圃場における越冬形でもある *G. zeae* を麦作圃場中の残置稲わらより分離して, トリコテセン系マイコトキシン及びゼアラレノンの生産性を検索した。日本の各地から採取した113菌株のうち93%にトリコテセン生産能があり, それらはニバレノール生産菌, デオキシニバレノール生産菌の二つの系統に分れた。両者を同時に生産する菌株は認められなかった。採取地域により両系統の分布に差異がみられた。

ゼアラレノンは供試菌株の68%に生産性が認められたが, トリコテセン生産性の両系統との間には一定の

関係がみられなかった。

* 東京理科大学薬学部

56 陰イオン交換セフェデックスによる穀類中のトリコテセン系マイコトキシンの精製法及び大麦における自然汚染例について

土肥祥子*, 四月朔日富司子*, 北井博*, 小坂菊枝*, 一戸正勝, 大場邦弘*: 食衛誌, 25, 1 (1984)

従来, 多用されているトリコテセン分析における XAD カラムによるクリアアップ法を DEAE-Sephadex A-25 カラムクロマトグラフィーを用いる方法に改良し, 再現性, 回収率ともに良好な分析法を開発した。本法による北陸地方産大麦のトリコテセン汚染調査を1977年から1982年まで実施した結果, ニバレノール, デオキシニバレノールの恒常的汚染を認め, 特に前者による汚染が顕著であったが, 年次別に汚染レベルが異なることを明らかにした。

汚染原因菌の *Fusarium* 陽性率との関係については年次により異なり2~60%の範囲であった。

* 石川県衛生公害研究所

57 輸入食品におけるマイコトキシン生産菌の検出
宇田川俊一: マイコトキシン, 14, 6 (1982)

輸入食品検査の現況と輸入農産物のカビ汚染の特徴を述べるとともに, 輸入香辛料の調査から得られたカビ汚染の実態を報告した。調査対象となった香辛料は1976~1980年にかけて輸入された外国産香辛料各種284点で, これらを菌学試験に供した結果, (1)カビが容易に生育し, かつマイコトキシンが生産され得るもの, (2)カビは生育するが, マイコトキシンの生産が阻害されるもの, (3)カビが生育し難く, したがってマイコトキシンも生産されないものの3グループに分類されることを明らかにした。そして(1)に属する品目の中で, 特に black pepper, white pepper, chilli pepper の3種が輸入並びに消費量が多く, かつ *Aspergillus flavus* の発育に起因するアフラトキシン汚染の危険性が高いことを指摘した。

58 Depletion of the Reduced Glutathione Level in the Liver and Production of the Mutagens in the Intestine in the Mice Inducing Hepatoma by Feeding on a High Level Dose of Sorbic Acid

Toshie TSUCHIYA and Tsutomu YAMAHARA:
Mutation Res., 130, 267 (1984)

15% Sorbic acid (SA) 添加飼料で長期間飼育したマウスにおいて, 肝癌を高率で誘発した原因を究明することを目的とした。

その結果, 肝発癌群である15% SA群にのみ腸内容物の酸性分画に mutagen の生成を認めた。

更に, 肝の還元型 glutathione (GSH) 濃度について測定した結果, 15% SA群は, 飼育3箇月で対照群の40%に相当し, 以後9箇月間にわたり対照群の60%相当量が減少し続けた。また飼料に添加したSA濃度と肝GSH濃度との間に linear-dose-response の相関性を認めた。

以上の結果より, SAを高濃度長期間マウスに摂食させた時, 腸内に mutagen が生成し, 吸収後肝において活性化され, GSHが減少して比較的解毒されにくい環境の中で, 発癌への過程が進行するものと考えられる。

59 Urinary Excretion of Mutagens and the Effects of Sorbic Acid on the Lipid Peroxide Levels in the Mice Fed on a 15% Sorbic Acid Diet

Toshie TSUCHIYA and Tsutomu YAMAHARA:
J. Toxicol. Sci., 8, 213 (1983)

15% Sorbic acid (SA) 添加飼料で飼育したマウスの尿をそのままあるいは, β -glucuronidase で酵素分解し, Amberlite XAD-2 カラムでヒスチジンを除いた試料を調製した。この尿試料を TLC で分画し, Ames Test を行ったところ, non-polar fraction に TA 98 で S9 共存下弱いながら変異原性を認め, TA 100 では認められなかった。すでに報告した変異原性のある腸内容物試料と, これらの尿試料とを TLC で比較したところ, 腸内容物中に生成された変異原の一部が尿中にも排泄されていることが, 示唆された。Lipid peroxide レベル (TBA 値) についても検討した結果, potassium sorbate (SA-K) を長期間投与した時のマウス肝の TBA 値は飼料への添加濃度に応じて減少したが, 15% SA 群の TBA 値は同モル濃度の SA-K 群より高く, 変異原生成の差違が影響したものと思われる。

60 Cultural Conditions for a Quantitative Liquid Methods Using the Spore Rec-Assay System

Toshie TSUCHIYA and Tsutomu YAMAHARA:
Agric. Biol. Chem., 48, 1655 (1984)

液体培地による Rec assay において, BTB の色変

て簡便に MIC 値を判別できる方法を, microtiter plate を使用し検討した. 保存が容易で前培の必要がない Spore (*B. subtilis* H17 Rec⁺, M45 Rec⁻) を賀田らの方法にしたがって調製しテスト菌株として用いた. 陽性対照として3種の Mutagen (MNNG, AF-2, Mit C) を用い, 培養後加えた BTB の黄変が Growth Cell を含む well で明瞭で, MIC 値が数回の実験で再現性良く, かつその比 (MIC Rec⁺/MIC Rec⁻) ができるだけ大きい最適の培地濃度及び菌量について検討した. 本実験条件下では, 0.4% glucose-0.4% nutrient 培地に Spore を 10⁴/ml 加え 18 hr 培養後, 0.04% BTB を 1 滴加えた時が最適であった. この時陰性対照 (Kanamycin etc.) は常に MIC 比が 1 を示したので, 簡便な Rec assay 法として応用できる.

61 Reductive Dechlorination of 1, 2, 4-Trichlorobenzene by *Staphylococcus epidermidis* Isolated from Intestinal Contents of Rats

Toshie TSUCHIYA and Tsutomu YAMAHA:
Agric. Biol. Chem., 48, 1545 (1984)

1, 2, 4-Trichlorobenzene (TCB) を還元的に脱クロルする菌を, ラット腸内容物より分離し, それらは *S. epidermidis* (6 株), *S. saprophyticus*, *Streptococcus* sp. (2 株), *Bacillus* sp., *Lactobacillus* sp. 及び未同定のグラム陰性桿菌であった. *S. epidermidis* (A 株) において, TCB は主に *o*-Dichlorobenzene (*o*-DCB) に変換され, *o*-DCB は更に Monochlorobenzene (MCB) に脱クロルされた. これらの脱クロル化は水素ガス気相下でのみ進行した. また A 株において, 生菌の超音波処理及び乾燥菌体でも脱クロル化能を有し, NADPH 添加により促進された.

したがって, 分離菌体中の酵素により TCB の還元的脱クロル化が行われるものと考えられる.

62 Reaction of 1-*n*-Propyl-1-nitrosourea with DNA *in vitro*

Kazushige MORIMOTO, Akira TANAKA and Tsutomu YAMAHA: *Carcinogenesis*, 4, 1455 (1983)

[*n*-propyl-2, 3-³H]1-*n*-Propyl-1-nitrosourea (PNU) (比放射能: 665 mCi/m mol) が合成され, 子牛胸腺 DNA との反応が pH 7.0, 37° で *in vitro* で調べられた.

アルキル化の程度は加えた PNU に比例し, 1 mM の PNU を用いた場合 DNA 1 mg 当たり 68 p mol がアルキル化に使われた. 緩やかな酸水解の後, プリン

塩基が Sephadex G-10 カラムクロマトグラフィーにより分離された. O⁶-*n*-propylguanine と O⁶-isopropylguanine は分離されたが, 7-*n*-propylguanine と 7-isopropylguanine はこの方法では成功せず, μ Bondapak-C₁₈ の逆相カラムを用いた液体クロマトグラフィーにより分離した. 主反応物質は 7-*n*-propylguanine と O⁶-*n*-propylguanine で, 7-iso-propylguanine と O⁶-isopropylguanine は微量反応生成物として確認された. O⁶-alkyl G/7-alkyl G の比は 0.73 で, 1-エチル-1-ニトロソ尿素と 1-*n*-ブチル-1-ニトロソ尿素の比率に類似していた.

63 A New Radiopharmaceutical: ^{99m}Tc DMP for Renal Scanning

Akira TANAKA, Toyoei MACHIDA*, Makoto MIKI* and Tsukuru SHIMADA*: *Eur. J. Nucl. Med.*, 8, 317 (1983)

腎診断薬 ^{99m}Tc-DMP (dimercaptpropionic acid) を新たに合成し, この化合物の至適合成条件と安定性が明らかにされた. ^{99m}Tc-DMP を用いたラットの腎スキャンは, 放射能が特異的に腎に集積し, 明瞭な腎イメージを抽出することを示した. またウサギでも同様に良好な腎イメージを与え, 臨床応用に有望な結果を示唆した.

化学構造と腎親和性との相関が考察され, 隣接した SH 基とその α -位にカルボキシル基のような配位子が少なくとも一個あれば, 腎スキャン剤として使用できることを初めて明らかにした.

* 東京慈恵会医科大学泌尿器科

64 Biochemical Studies on Phthalic Esters IV Metabolism of Diheptyl Phthalate (DHP) in Rats

Michio SATO, Tohru ADACHI, Akira TANAKA and Tsutomu YAMAHA: *Drug Metab. Dispos.*, 12, 517 (1984)

雄ラットを用いて, di (5-methylhexyl) phthalate (DMHP) の吸収排泄, 臓器分布, 代謝実験を行った. 経口投与した ¹⁴C-DMHP は迅速に吸収されて尿, 糞中に各々 60%, 30% 排泄された. 胆汁排泄は 15% であった. 特異的な臓器親和性は認められなかった. 尿中代謝物として 4 種の化合物を単離した. 各構造は機器分析によって 5-hydroxy-5-methylhexyl phthalate, 6-hydroxy-5-methylhexyl phthalate, 5-carboxyhexyl phthalate, 及び 3-carboxypropyl phthalate と決定した. 糞中には, 未変化の DMHP と mono-5-methyl-

hexyl phthalate (MMHP) 及び少量のフタル酸が存在した。胆汁中代謝物としては、MMHP とそのグルクロン酸抱合体を同定した。

65 自動血球分類装置 MICROX の実験動物への応用 II. ウサギ、ラット及びマウス白血球の分別
松本清司, 落合敏秋, 関田清司, 川崎 靖, 安原加寿雄, 降矢 強: 実験動物, 32, 115 (1983)
ウサギ, ラット及びマウスの血液について MICROX による白血球分類を行い, 第1報と同様の検討を行った。1) ウサギの白血球 4272 細胞について検討したところ, 一致率は98.0%であり, ラット(5484細胞)では98.2%, マウス(5329細胞)では97.8%であった。2) 光学顕微鏡による目視法との相関では, いずれの動物とも, 分葉核好中球及びリンパ球で, 高い相関性が見られた。3) 異型リンパ球及び赤芽球はほとんど Unknown と判定され, その細胞数は, 平均, 13.2個(ウサギ), 10.5個(ラット), 13.6個(マウス)であった。

以上のことから, MICROX は, サル, イヌと同様, ウサギ, ラット及びマウスに白血球分類に使用し得ると考えられた。

66 Effect of Mitomycin C on Bone Marrow Cells in Mice

Kiyoshi MATSUMOTO, Tsuyoshi FURUYA and Masuo TOBE: *J. Toxicol. Sci.*, 9, 51 (1984)

Mitomycin C (2 mg/kg) をマウスに1回 ip 投与し, 骨髄細胞数及び骨髄細胞分別を11日まで経時的に行った。

- 1) 骨髄細胞数は投与後2日目に最少値を示し, 7日目に回復した。
- 2) 骨髄細胞の分別では, 前赤芽球及び塩基性赤芽球は1日目に, 多染性赤芽球は2日目に, 成熟好中球は4日目に, それぞれ最少値を示した。細胞分別における回復は, 4~7日目に認められた。骨髄リンパ球は, 骨髄細胞数が低値を示した時, 高値を示した。
- 3) 末梢血中の網状赤血球は, 投与後4日目に最少値を示し, 11日目に回復した。

67 生薬エキスの生体影響に関する毒性学的研究
一芍薬, 桃仁, 当帰及び川芎一

田中 悟, 高橋 惇, 小野田欽一, 川島邦夫, 中浦慎介, 長尾重之, 遠藤彦彦, 大野泰雄, 川西 徹, 高仲 正, 粕谷 豊*, 義平邦利, 福岡正道, 関田節子, 鈴木英世, 原田正敏, 名取

信策*2, 中路幸男, 小林和雄, 鈴木幸子, 内藤克司, 内田雄幸, 安原加寿雄, 斉藤 実, 石井美民, 戸部満寿夫, 庄司順三*3: 薬学雑誌, 103, (9), 937 (1983)

生薬エキスの生体への影響を調べることを目的として, 芍薬, 桃仁, 当帰, 川芎のメタノールエキスをラット及びマウスに単回経口又は腹腔内投与, あるいはラットに21日間連日経口投与して毒性学的検討を行った。大量のエキスを1回投与した場合, 4種生薬とも毒性徴候及び致死効果を示した。比較的大量のエキスを連日投与した場合, 生薬によっては動物に中毒症状を現わし, 血液学的, 生化学的あるいは病理学的検査において異常所見を示した。得られた成績から, 生薬の生体影響に関する毒性学的アプローチの重要性が示唆された。

*1 東京大学薬学部

*2 明治薬科大学田無校

*3 昭和大学薬学部

68 Comparative Toxicology of Mirex, Photomirex and Chlordecone after Oral Administration to the Mouse

Kanosuke FUJIMORI, I. K. HO, H. M. MEHE-NDALE and D. C. VILLENEUVE: *Environ. Toxicol. Chem.*, 2, 49 (1983)

塩素系農薬(クロルデコン, マイレックス, フォトマイレックス)をマウスに経口投与し, 毒性の発現を摂餌量, 体重, 死亡率等の一般毒性並びに血糖等の生化学的变化を測定, 毒性を比較検討した。組織中の残留量はクロルデコンが一番多いが, 毒性としてはマイレックスが一番高かった。

69 The Heterogeneity of Arylhydrocarbon Hydroxylase in Fetal Liver Microsomes of Rats

Keinosuke MIZOKAMI, Momoko SUNOUCHI, Kazuhide INOUE, Kanosuke FUJIMORI, Akira TAKANAKA, Yoshihito OMORI and Toshitsugu YUBISUI: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 113, 59 (1983)

ラット胎仔の肝ミクロソームの電子伝達系成分とベンズピレン水酸化活性(AHH)に及ぼすNADH-synergismの相関性について検討した。

AHHに及ぼすNADH-synergismはラット胎仔の肝で認められたが, 母体の肝では認められなかった。胎仔の肝で認められたNADH-synergismはラットの

成長と共に減少し、チトクロム b_5 /チトクロム P-450 含量比の変化と密接に相関していた。更に、胎仔の肝ミクロソームの NADH-synergism は、SKF 525-A, 7,8-ベンズフラボンで阻害され、 CN^- は影響がなかった。

胎仔の肝の AHH に関与するチトクロム P-450 はチトクロム b_5 の要求性の点で、母体のチトクロム P-450 とは異なると予想される。

70 New Method for Quantitative Measurement of N-Nitrosodimethylamine Formation in the Whole Mouse

Toru KAWANISHI, Atsushi TAKAHASHI, Yasuo OHNO, Akira TAKANAKA, Yutaka KASUYA and Yoshihito OMORI: *Arch. Toxicol.*, **54**, 323(1983)

ニトロソジメチルアミン (NDMA) の代謝阻害剤であるピラゾール 300 mg/kg を前投与したマウスを用いて、生体内の NDMA 生成量をほぼ正確に測定する事に成功した。マウスは液体窒素で凍結した後粉碎し、NDMA を抽出、ガスクロで定量した。このマウスを用いて、アミノピリンと亜硝酸ナトリウムを同時経口投与した場合の NDMA の生成量を測定した。

71 Effect of Phenobarbital and 3-Methylcholanthrene on the Hepatic Microsomal Metabolism of N-Nitrosodimethylamine, N-Nitrosomethylbutylamine and N-Nitrosomethylbenzylamine

Toru KAWANISHI, Yasuo OHNO, Atsushi TAKAHASHI, Masahiro NAKADATE, Akira TAKANAKA, Yutaka KASUYA and Yoshihito OMORI: *Cancer Lett.*, **20**, 157 (1983)

肝ミクロソームによる、ニトロソジメチルアミン (NDMA), ニトロソメチルブチルアミン (NMBuA), ニトロソメチルベンジルアミン (NMBeA) の脱アルキル化活性に及ぼす、フェノバルビタール (PB) と 3-メチルコランソレン (MC) の前投与の効果を測定した。

PB は NMBuA の脱メチル化と脱ブチル化、及び NMBeA の脱ベンジル化を増加させた。MC は NMBuA の脱ブチル化と NMBeA の脱ベンジル化を増加させたが、NMBeA の脱メチル化を減少させた。その他の脱アルキル化はほとんど変化なかった。これらの結果は、各脱アルキル化反応が複数の酵素によって触媒されている事を示唆している。

72 Comparison of Hepatic Drug-metabolizing Enzymes induced by 3-Methylcholanthrene and Phenobarbital between Pre- and Postnatal Rats

Momoko SUNOUCHI, Akira TAKANAKA, Keinosuke MIZOKAMI, Kazuhide INOUE, Kannosuke FUJIMORI, Yutaka KASUYA and Yoshihito OMORI: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **73**, 457(1984)

ラット胎仔肝の薬物代謝酵素系に及ぼす 3-メチルコランソレン (3MC) とフェノバルビタール (PB) の影響について調べ、新生仔及び母体肝のそれと比較検討した。3MC (25 mg/kg/日) を妊娠18, 19日に腹腔内投与したところ、妊娠21日齢ラット胎仔肝のベンズピレン代謝活性及びチトクロム P450 含量は、母体以上に増加した。また胎仔肝のヘキソバルビタールとアミノピリンの代謝活性は有意に増加したのに対して、母体では変化がみられなかった。更に、新生仔に対する 3MC の影響を調べたところ、母体と同様なパターンの誘導効果が得られた。一方、PB (60 mg/kg/日) を妊娠18, 19, 20日に腹腔内投与した妊娠21日齢の胎仔及び母体肝では、ともに同様なパターンの誘導効果が認められた。このように、胎仔肝におけるヘキソバルビタールとアミノピリンの代謝酵素活性は、3MC 及び PB の母体投与により誘導されること、また胎仔肝薬物代謝酵素系に対する 3MC の誘導効果は、新生仔及び母体肝のそれとは異なることを明らかにした。

73 Independent Induction of Intestinal Metaplasia and Gastric Cancer in Rats Treated with N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine

Masae TATEMATSU*1, Chie FURIHATA*2, Tsutomu KATSUYAMA*3, Ryohei HASEGAWA*1, Jun-ichi NAKANOWATARI*1, Daizo SAITO*2, Michihito TAKAHASHI: Taijiro MATSUSHIMA*2 and Nobuyuki ITO*1: *Cancer Research*, **43**, 1335 (1983)

腸上皮化生と分化型腺癌の相関性が指摘されている。MNNG によって発生するラットの実験胃癌を8週間隔によって80週まで経時的に観察し、胃粘膜の病理形態学的変化を、Paradoxical Con-A 染色にて胃型と腸型に分類し、画像解析装置により定量的に測定した。また組織の一部についてペプシノーゲンアイソザイム (Pg 1~4) の変化を検索した。

正常粘膜、腺腫様増殖及び分化型腺癌において、それぞれ胃型より腸型の形質転換が低頻度でおきること

が推察されたが、腸上皮化生の腺癌に至る前癌病変としての所見は得られなかった。

*1 名古屋市立大学医学部第一病理

*2 東京大学医学研究所癌生物

*3 信州大学医学部病理

74 **Early Lesions during Pancreatic Carcinogenesis induced in the Syrian Hamster by DHPN or DOPN. I. Histologic, Histochemical and Radioautographic Findings**
Malcom A. MOORE*¹, Michihito TAKAHASHI, Nobuyuki Iro*² and Peter BANNASCH*¹:
Carcinogenesis, 4(4), 431 (1983)

ハムスターに N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine あるいは N-nitrosobis(oxopropyl)amine を投与し、生ずる膵の前癌病変につき、組織学的、組織化学的、ラジオオートグラフィーの手法を用いて、その特性を検討した。

膵癌発生過程の初期には、異型病変と嚢胞状病変がみられ、前癌病変としての意義が指摘されている。しかし、ラジオオートグラフィーによると前者ではサイミジンの取り込みが多いのに対し、後者では極めて少ない。また前癌病変に特異的に現われる PAS 陽性反応においても、前者で陽性、後者で陰性であった。また前者では glucose-6-phosphate dehydrogenase が証明され、膵癌の前癌病変のマーカーとなりうる事が確認された。

*1 ドイツ癌研究センター癌実験病理部

*2 名古屋市立大学医学部第一病理

75 **Early Lesions during Pancreatic Carcinogenesis induced in the Syrian Hamster by DHPN or DOPN II. Ultrastructural Findings**

Malcom A. MOORE*¹, Michihito TAKAHASHI, Nobuyuki Iro*² and Peter BANNASCH*¹:
Carcinogenesis: 4(4), 439 (1983)

ハムスターに N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine あるいは N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine を投与し、生ずる膵の前癌病変につき、電子顕微鏡的に観察し、その特性を検討した。

膵癌発生過程には、初期病変として、異型病変と嚢胞状病変があり、それらの前癌病変としての意義が指摘されている。

電顕の観察によれば、前者は細胞の異型性が顕著で、膵癌にみられる細胞と同様な変化が共通してみられた

のに対し、後者では、正常の細膵管上皮と類似し、しばしば、腺房細胞の変性像がみられた。

以上の所見から、膵癌の前癌病変としては異型病変が極めて重要であることが判明した。

*1 ドイツ癌研究センター実験病理部

*2 名古屋市立大学医学部第一病理

76 **Spontaneous Tumors in F344/DuCrj Rats**
Akihiko MAEKAWA, Yuji KUROKAWA, Michihito TAKAHASHI, Takeshi KOKUBO, Toshiaki OGIU, Hiroyuki TANIGAWA, Yuko OHNO, Fumio FURUKAWA and Yuzo HAYASHI: *Gann*, 74, 365 (1983)

当部で行った6つの癌原性試験の対照群として用いた雄296、雌297匹のF344/DuCrjラットの自然発生腫瘍を検討した。雄においては、率丸間細胞腫を筆頭に、乳腺線維腫及び線維腺腫、単核球性白血病、褐色細胞腫、甲状腺C-細胞腺腫、包皮腺腺腫、肝腫瘍性結節、肺腺腫等が多くみられた。これに対し、雌では下垂体腺腫、子宮内膜ポリープ、乳腺線維腺腫、白血病、C-細胞腺腫等が主体を占めた。また頻度は低いが、これ以外にも多くの臓器に種々の腫瘍が認められた。幾つかの腫瘍について群毎の発生率の変動がみられた。

77 **Carcinogenicity Study of Ammonia-Process Caramel in F344 Rats**
Akihiko MAEKAWA, Toshiaki OGIU, Chiaki MATSUOKA, Hiroshi ONODERA, Kyoko FURUTA, Hiroyuki TANIGAWA and Yuzo HAYASHI: *Fd Chem. Toxicol*, 21, 237 (1983)

アンモニア-カラメルの癌原性をF344ラットを用いて検討した。カラメルは蒸留水に0(対照群)、1及び4%の濃度に溶解し、飲料水として2年間投与した。対照群を含む雌雄各群において、多くの臓器組織に種々の腫瘍が認められたが、何れも自然発生腫瘍と同じであり、またその発生率も雄の下垂体腫瘍を除き対照群との間に用量相関をもった有意な増加はみられなかった。唯だ雄4%群の下垂体腫瘍だけは、その発生率が対照群に比べ有意に高かったが、その殆んどは顕微鏡的腫瘍であり、過形成等の所見は対照群と差がなく、また下垂体腫瘍の自然発生率は群により可成り変動する事が知られており、これらの事より4%群雄の下垂体腫瘍の増加はカラメル投与とは関係なく、自然発生の変動の範囲にはいるものと考えられた。これらの結果より、アンモニア-カラメルはF344ラットへの2年間の経口投与で癌原性はないと結論された。

78 **Induction of Angiogenic Tumors in the Duodenum of Female Donryu Rats by N-iso-butyl-N-nitrosourea**

Toshiaki OGIU, Chiaki MATSUOKA, Kyoko FURUTA, Akihiko MAEKAWA, Masahiro NAKADATE and Shigeyoshi ODASHIMA: *Gann*, 74, 342 (1983)

N-イソブチル-N-ニトロソ尿素 (i-BNU) の雌性ドリュウラットでの癌原性を検討した。i-BNU は 400, 200 又は 100 ppm の水溶液を飲料水として毎日投与した。腫瘍は十二指腸を中心とする消化管に用量相関をもってみられ、組織学的には多くは血管由来の腫瘍であった。i-BNU のドリュウラットにおける臓器特異性を n-BNU のそれと比較した。

79 **Induction of Tumors in the Small Intestine and Mammary Gland of Female Donryu Rats by Continuous Oral Administration of N-Carboxymethyl-N-nitrosourea**

Akihiko MAEKAWA, Toshiaki OGIU, Chiaki MATSUOKA, Hiroshi ONODERA, Kyoko FURUTA, Hiroyuki TANIGAWA and Shigeyoshi ODASHIMA: *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 106, 12 (1983)

N-カルボキソメチル-N-ニトロソ尿素 (CMNU) の雌性ドリュウラットでの癌原性を検討した。CMNU は 400, 200, 100 ppm 水溶液を飲料水として毎日与えた。腫瘍は主として小腸及び乳腺にみられ、小腸腫瘍の発生率は 400 ppm 群で最も高く、明瞭な用量相関がみとめられた。これに対し、乳腺腫瘍は 200, 100 ppm 群に多くみられ、400 ppm 群での発生率はこれら二群よりも低かった。CMNU の臓器特異性を化学構造の類似する他のアルキルニトロソ尿素のそれと比較した。

80 **Modification of Pancreatic Carcinogenesis in the Hamster Model. IX. Effect of Pancreatitis**

Parviz M. POUR*, Michihito TAKAHASHI, Thorakla DONNELLY* and Katherine STEPAN*: *JNCI*, 71(3), 607 (1983)

膵臓癌の発生に際し、膵炎の影響が疫学的に指摘されているが、実験膵癌モデルを用い急性あるいは反復性膵炎の影響を調べた。

膵癌の発生には N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine (BOP) を用い、ハムスター皮下に投与した。膵炎の作成は、胆膵共通管の十二指腸開口部を結紮し、胆汁

の膵内逆流による膵炎を用いた。その結果、膵炎の 3 日目及び 8 週目に、BOP を投与した場合、膵癌の発生は著しく抑制された。一方、BOP 投与後 4 週日より、4 週毎に 4 回、膵炎を起させた群 (反復性膵炎) では、発生率が高く、しかも腫瘍の大きさも大きいのが特徴で、明らかな促進効果がみられた。

* ネブラスカ州立大学エプリー癌研究所

81 **Neoplastic and Non-Neoplastic Lesions in Aging Slc:Wistar Rats**

Akihiko MAEKAWA, Hiroshi ONODERA, Hiroyuki TANIGAWA, Kyoko FURUTA, Yukio KODAMA, Shigetomo HORIUCHI and Yuzo HAYASHI: *J. Toxicol. Sci.*, 8, 279 (1983)

雄 98, 雌 100 匹の Slc:Wistar ラットの自然発生腫瘍及び非腫瘍性病変を検討した。雄では睪丸腫瘍を筆頭に、造血臓器、副腎、甲状腺、包皮腺、下垂体、肝及び乳腺の腫瘍が、雌では下垂体、乳腺、造血臓器、子宮及び甲状腺の腫瘍が主なものであった。これら自然発生腫瘍の好発臓器及び組織学的所見は F344/DuCrj ラットのそれと全く同じであったが、幾つかの腫瘍の発生頻度は両系の間で多少の差異がみられた。一方、非腫瘍性病変は主として心、腎及び肝にみとめられたが、それ以外の臓器組織にも種々の病変が観察された。

82 **Long-Term In Vivo Carcinogenicity Test of Fish Meal Pyrolysate in Syrian Golden Hamsters**

Michihito TAKAHASHI, Fumio FURUKAWA, Kasuke NAGANO*, Yoshifumi MIYAKAWA, Takeshi KOKUBO and Yuzo HAYASHI: *Gann*, 74, 633 (1983)

食品成分、特に魚や肉などの加熱分解物の中に高い変異原性を示す物質が見出され、経口的に摂取した場合、発癌物質として作用する可能性が示唆されている。実験動物飼料に含まれる魚粉成分を加熱し、変異原性物質が生成されていることを確認し、その癌原性の有無をハムスターを用いて検索した。

ハムスターに 20%, 10% の割合に魚粉加熱分解物を混じた飼料を与え 114 週まで投与したが、肝の脂肪変性及びアミロイド沈着、腎の慢性腎症がみられたほかは、誘発されたと思われる腫瘍の発生は認めなかった。その他 40% 群、5% 群についても少数の動物で実験がなされたが、腫瘍発生はなかった。即ち、魚粉加熱分解物はハムスターにおいて明らかな癌原性を示さないこ

とが判明した。

* 日本バイオアッセイセンター

83 **Enhancement by Potassium Bromate of Renal Tumorigenesis initiated by N-Ethyl-N-Hydroxyethylnitrosamine in F-344 Rats**

Yuji KUROKAWA, Michihito TAKAHASHI, Takeshi KOKUBO, Yuko OHNO and Yuzo HAYASHI: *Gann*, 74, 607 (1983)

食品添加物である臭素酸カリウム (以下臭力) のラット腎腫瘍に対するプロモーター作用を検討した。

雄 F-344 ラットに、N-エチル-N-ヒドロキシエチルニトロサミン (EHEN) を濃度 1000 及び 500 ppm で経口投与 (2 週間) 後、臭力 500 ppm 又は蒸留水を 24 週間経口投与した。

その結果、腎細胞腫瘍、異型細胞巢の発生率は臭力投与によって有意の上昇を示し、臭力の腎腫瘍発生に対するプロモーター作用が明らかになった。

84 **Effect of Dibutyltin dichloride on Incidence of Pancreatic Adenocarcinoma induced in Hamster by a Single Dose of N-Nitrosobis-(2-oxopropyl)amine**

Michihito TAKAHASHI, Fumio FURUKAWA, Takeshi KOKUBO and Yuzo HAYASHI: *Cancer Letter*, 20, 271 (1983)

N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine (BOP) をハムスターの皮下に投与すると人間の膵癌に類似した膵管由来の腺癌が高率に発生する。一方 dibutyltin dichloride (DT) を投与すると胆道に潰瘍が生ずることが知られている。

膵癌発生に際し、胆道の傷害がどのように影響するかを検討するため、実験を行った。BOP の投与は皮下へ 1 回投与とし、その前後各 1 週間に、DT を 1 回投与した。その結果、BOP を 20 mg/kg 体重量 1 回投与すると、約半数に膵腺癌が発生してくることが明らかになったほか、DT を後投与すると膵癌の発生が著しく抑制された。またこの群では膵以外に副腎、卵巣、肝の腫瘍の発生が見られ、標的臓器が変動することも明らかとなった。

85 **Carcinogenicity of Potassium Bromate Administration Orally to F-344 Rats**

Yuji KUROKAWA, Yuzo HAYASHI, Akihiko MAEKAWA, Michihito TAKAHASHI, Takeshi

KOKUBO and Shigeyoshi ODASHIMA: *JNCJ*, 71(5), 965 (1983)

食品添加物である臭素酸カリウム (臭カ) の癌原性試験をラットを用いて行った。

雌雄 F-344 ラット各群 50 頭を用いて、臭カを飲料水中濃度 500 及び 250 ppm で、110 週間投与し、病理組織学的に検索した。

その結果、腎細胞腫瘍発生が臭カ投与群に高率に見られた。即ち、500 ppm 群、雄 88%、雌 80%、250 ppm 群、雄 60%、雌 56%、対照群、雄 6%、雌 0% であった。その他、雄の腹膜中皮腫の発生も、臭カ投与群で有意に高かった。

以上、臭カはラットに癌原性を有することが判明した。

86 **Development of Adenocarcinomas after Transplantation of Rat Glandular Stomachs treated *in vitro* with N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)**

Yuji KUROKAWA, Michihito TAKAHASHI, Yuzo HAYASHI, Yuko OHNO, Naoko TAKAMURA: *Experientia*, 39, 1404 (1983)

胎児及び新生児ウイスターラット腺胃を、試験管内で、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (MNNG) で処理後、同系ラットの背部皮下に移植して 12 箇月後に動物を屠殺して、腫瘍発生を検討した。

その結果、MNNG 処理腺胃からは 11/118 (9.3%) に腺癌が発生したが、無処置腺胃からの腺癌の発生はなかった。腺癌の発生は、新生児腺胃よりも胎児腺胃に高率に見られた。

更に、種々の間葉系腫瘍の発生も見られた。

87 **Inhibition of Spontaneous Leukemia in F-344 Rats by Tetramethylthiuram disulfide (Thiram)**

Michihito TAKAHASHI, Takeshi KOKUBO, Fumio FURUKAWA, Kasuke NAGANO, Akihiko MAEKAWA, Yuji KUROKAWA and Yuzo HAYASHI: *Gann*, 74, 810 (1983)

農薬やゴムの加硫促進剤として用いられているチラム (tetramethylthiuram disulfide) のラットに対する癌原性試験を終了し、病理学的検討を実施したところ、チラムに癌原性を認めなかったが、自然発生腫瘍である白血病の発生が抑制され、用量逆相関が認められた。動物は F-344 ラット 300 匹を用い、雌雄各 50 匹を 1 群とし、8 週齢よりチラムを 0.1% 及び 0.05% の割合

混じた基本飼料を与えた。104週間投与後、8週間基本飼料で飼育した後、全生存動物を屠殺剖検し、病理学的検索を実施した。

その結果、白血病が雄の0.1%群2例、0.05%群4例に対し、対照群で10例であり、雌の0.1%群2例、0.05%群6例に対し、対照群では14例といずれも実験群では低い発生率であった。

88 Nucleolar Alterations of Myocardial Cells and Glomerular Epithelial Cells in Rats after a Single Administration of Adriamycin

Yuzo HAYASHI, Takayoshi IMAZAWA, Takeshi KOKUBO and Michihito TAKAHASHI: *Toxicology Letters*, 20, 105 (1984)

アントラサイクリン系の抗癌剤であるアドレアマイシンの心毒性及び腎毒性の発現機序を検討する目的で、15 mg/kg をラットに静脈内投与した後、両器官の微細構造変化を経時的に観察した。その結果、投与後2時間目より心筋細胞及び腎糸球体上皮細胞に核小体分離 Nucleolar segregation の誘発される事実が知られた。

89 Pathogenesis of Paraquat-induced Pulmonary Hemorrhage in Hamster with Special Reference to Arterial Constriction

Takeshi KOKUBO, Michihito TAKAHASHI, Fumio FURUKAWA, Kasuke NAGANO* and Yuzo HAYASHI: *Acta Pathol. Jpn.*, 34(1), 41 (1984)

パラコートは商品名グラモキシソンとして市販されている除草剤であるが、しばしば誤飲あるいは自殺目的の使用による事故が報告されている。そしてその際見られる肺の変化、特に肺出血の様相が特徴的な事である。ハムスターにこのパラコートを投与し、肺出血の解剖学的特徴を解析した結果、その出血の様相は肺胞毛細血管破壊による出血に違いないが、ある一定の大きさの動脈の支配領域に巣状に限局していた。これ等の結果はパラコートの毛細管内皮に対する直接的障害作用による出血ではなく、異常な動脈反応の結果であるという事が示唆された。

* 泰野研究所

90 Carcinogenicity of Low Doses of N-Ethyl-N-nitrosourea in F-344 Rats - A Dose-Response Study

Akihiko MAEKAWA, Toshiaki OGIU, Chiaki MATSUOKA, Hiroshi ONODERA, Kyoko FURUTA, Yuji KUROKAWA, Michihito TAKAHASHI, Takeshi KOKUBO, Hiroyuki TANIGAWA, Yuzo HAYASHI, Masahiro NAKADATE and Akio TANIMURA: *Gann*, 75, 117 (1984)

エチルニトロソ尿素 (ENU) の癌原性閾値又は最小発癌量、及び ENU の臓器特異性に対する用量の影響を検索する目的で、低用量の ENU (0.3, 1, 3 及び 10 ppm) を2年間 F344 ラットに投与した。10 ppm の ENU は雌雄共に神経系及び消化管腫瘍を誘発した。その他より低い濃度群においても幾つかの腫瘍の自然発生が促進された。高濃度 (400 ppm) の ENU は F344 ラットの十二指腸に選択的に腫瘍を誘発する事が判っており、この実験結果は ENU の臓器特異性は用量によって影響され、また ENU は multi-potent な癌原性物質である事を示している。この試験結果からは、神経系及び消化管腫瘍の最小発癌量は凡そ 10 ppm である様にみえるが、10 ppm 以下の濃度でも幾つかの腫瘍の自然発生が促進される事より、ENU はより低濃度でも癌原性を有すると考えられる。これら神経系及び消化管腫瘍について、 10^{-6} の発癌危険率での VSD を検討した。

91 A Comparative Histometrical Analysis of Renal Inner Medulla of Man, Swine, Dog and Hamster

Takeshi KOKUBO, Michihito TAKAHASHI, Fumio FURUKAWA, Kasuke NAGANO*1, Yuzo HAYASHI and Tohru TAKAHASHI*2: *Tohoku J. exp. Med.*, 142, 77 (1984)

腎髓質においては腎先端部に向け浸透圧勾配が形成され尿濃縮を達成している。この尿濃縮機構の理論として対向流増幅理論が確立している。しかしこの理論は一本のネフロンを基本として作られているため、腎髓質における多数のネフロンが複雑にからみあった構造に適応できるか問題である。本論文においてヒト、ブタ、イス、ハムスターの腎髓質を形態計測的に解析した。その結果ヒト、ブタにおいては対向流増幅系理論の適応は無理で対向流交換系に属し、一方イス、ハムスターでは対向流増幅系とみても矛盾はない事が判った。

*1 泰野研究所

*2 東北大学

92 **Correlative Morphological and Biochemical Studies on Monocrotaline-induced Pulmonary Alteration**

Yuzo HAYASHI, Takeshi KOKUBO, Michihito TAKAHASHI, Fumio FURUKAWA, Hiroko ORSUKA* and Koroku HASHIMOTO*: *Toxicology Letter*, 21(1), 65 (1984)

モノクロータリン 60 mg/kg をラットに皮下注射後、1, 2, 3 及び 4 週目に肺を摘出して病理組織学的検査、肺胞面積の計測、アンジオテンシン転換酵素活性 (ACE) の測定を行った。投与後、肺の組織変化が徐々に進行し、それに伴い肺胞面積の減少と ACE の低下が認められた。

* 食品薬品安全センター

93 **Induction of Digestive-tract Tumors in F344 Rats by Continuous Oral Administration of N-Butyl-N-nitrosourea**

Masaki TAKEUCHI, Toshiaki OGIU, Chiaki MATSUOKA, Kyoko FURUTA, Akihiko MAEKAWA, Masahiro NAKADATE and Shigeyoshi ODASHIMA: *J. Cancer. Res. Clin. Oncol.*, 107, 32 (1984)

N-ブチル-N-ニトロソ尿素 (BNU) の F344 ラットでの癌原性を検討した。BNU は 400 ppm の濃度の水溶液を雌雄の F344 ラットに飲料水として毎日投与した。雌雄共に上部消化管に腫瘍の高率な発生がみられ、組織学的には殆んどが上皮性の腫瘍 (乳頭腫、扁平上皮癌及び腺表皮癌) であった。それに加えて雌ラットには腔腫瘍、また雌雄ラットには造血器及び外耳の腫瘍の発生がみられた。BNU の F344 ラットでの臓器特異性をドブリュラットでの臓器特異性及び他の N-アルキルニトロソ尿素の場合と比較した。

94 **An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test**

Makoto HAYASHI, Toshio SOFUNI and Motoi ISHIDATE: *Mutation Res.*, 120, 241 (1983)

アクリジンオレンジ蛍光染色法をマウス及びラットを用いる小核試験に適用した。この染色法では、小核は明るい緑色の蛍光を発生し、従来のギムザ染色法に比べて小核顆粒など小核と紛らわしいものとの区別が容易で、その結果、観察者間のデータのばらつきが非常に小さくなっていることも実証された。このアクリジンオレンジ染色法を用いることによって、小核試験のデータの信頼性をより高めることができると考えられ

る。

95 **Dexamethasone のエンザイムイムノアッセイに関する研究**

柴田 正, 長谷川隆一, 持田研秀: *薬学雑誌*, 103, 1054 (1983)

Dexamethasone の C-3 位, C-6 位及び C-21 位に carboxyl 基を導入し、ウシ血清アルブミン (BSA) と結合させ、家兎に免疫して抗血清を得た。このうち Dexamethasone-6-carboxymethyl thioether-BSA より得られた抗体は特異性が高く、更にアフィニティクロマトグラフィーを用いて得た精製抗体は Dexamethasone の C-16 位メチル基のエピマーである Betamethasone との交叉反応率が最も低く、高感度なエンザイムイムノアッセイが可能となった。

96 **Kinetic Studies on Pancreatic Lipase Activity in Micellar Systems. II. Effect of Fatty Acid Chain Length of Substrates**

Hiroshi NAKAHARA, Satoshi OKADA, Kenshu MOCHIDA, Hidenobu OHMORI* and Masaichiro MASUI*: *Chem. Pharm. Bull.*, 31, 4213 (1983)

デオキシコール酸ミセルに可溶化した一連の脂肪酸ビニルエステルに対するリパーゼ活性を、基質フリーのミセルを阻害剤とする fully competitive inhibition mechanism に基づいて速度論的に解析した。各基質について得られた阻害定数 (K_i) の値は互いによく一致し、上記機構の妥当性が支持された。一方最大速度 (V) 及び Michaelis 定数 (K_m) は脂肪酸鎖長の減少に伴って増大した。 V/K_m 値の比較から基質特異性について考察した。また K_m/K_i 値から基質を可溶化したミセルとリパーゼとの complex は基質フリーのミセルとリパーゼとの complex に比べて不安定であることが示唆された。更に脂肪酸鎖長の変化に伴う V 及び K_m の変化は基質分子とミセル間の相互作用の差異によるものであることが示唆された。

* 大阪大学薬学部

97 **小容量注射剤の不溶性微粒子試験について**

持田研秀, 伊阪 博, 辻 澄子: *医薬品研究*, 15(2), 305 (1984)

小容量注射剤中の不溶性微粒子を顕微鏡法及び光しゃへい法によって測定した。ダイヤモンドペン亀裂法を利用することにより、アンプル開封時のガラス片の混入を防いだ。

市販の小容量注射剤に混存する不溶性微粒子の粒度

分布は両対数プロットにおいて良好な直線関係を示すが、粒度分布による特性値よりも、粒子数 ($2\mu\text{m}$ 以上, $5\mu\text{m}$ 以上) による比較がロット間の差を検出することができ、光しゃへい法は製造工程管理上有用であることを明らかにした。

98 アニリン系化合物による魚の仮死現象 (I)
魚類による半数致死試験実施上の問題点

外海泰秀, 小川俊次郎, 伊藤啓志男, 慶田雅洋*
衛生化学, 29, 280 (1983)

アニリン, O-トリジン, 2,6-キシリジン, N-メチルアニリン, N-N-ジメチルアニリンの5種類のアニリン誘導体のうち後3者の水溶液ではメダカ, 金魚及びコイが横転し仮死する現象が見られ, この状態が長時間持続した。またこれらの化合物で48時間後に供試魚の50%が横転, 仮死する濃度 SC_{50} 値を求め, 致死濃度 LC_{50} 値と比較したところ, 2,6-キシリジン及びN-N-ジメチルアニリンで大きな差が見られた。横転状態にある供試魚を真水にもどしたとき, 魚は約30分後に再び遊泳を始めたのに対して, 供試したアニリン系化合物の大部分が魚体中から排泄されるのに約4時間を要した。

* (現)ネッスル(株)

99 アニリン系化合物による魚の仮死現象 (II)
魚の仮死現象と魚体蓄積量の相関性について

小川俊次郎, 外海泰秀, 伊藤啓志男, 慶田雅洋*
衛生化学, 29, 286 (1983)

アニリン系化合物の魚毒性と仮死作用を解明するため, アニリン, O-トリジン, 2,6-キシリジン, N-メチルアニリン及びN-N-ジメチルアニリンのヒメダカ, ワキン, コイにおける魚体蓄積量を調べた。48時間仮死状態の持続する2,6-キシリジン, N-メチルアニリン及びN-N-ジメチルアニリンでは, 各魚種とも試験溶液濃度を上げて, 魚体内蓄積量は, ある濃度以上上らず, 魚には各化合物に対する閾値の存在することが明らかとなった。また, 仮死魚の試験溶液を高濃度にし, 更に長時間放置するとはい死した魚体内の化学物質量は閾値を超え, 漸次, 試験溶液中の化学物質が浸透して増加する事実が認められた。したがって, この仮死現象は, 化学物質の魚体への侵入を防止する生体防御反応と考えられる。

* (現)ネッスル(株)

100 日本人の安息香酸, デヒドロ酢酸, プロピオン酸及びそれらの塩類並びにパラオキシ安息香酸エステル類などの各種保存料の1日摂取量について

豊田正武, 伊藤啓志男, 一色賢司*¹, 大西和夫*², 加藤丈夫*³, 神蔵美枝子, 白石由美子*⁴, 原田行雄*⁵, 深澤喜延*⁶, 横山 剛*⁷, 米田孟弘*⁸, 慶田雅洋*⁹: 日本栄養・食糧学会誌, 36, 467 (1983)

全国9ブロックで4種保存料の1日総摂取量を含量実態調査方式により求めた。安息香酸 10.9 mg, デヒドロ酢酸 0.595 mg, プロピオン酸 17.5 mg, パラオキシ安息香酸エステル 1.011 mg であった。

*¹ 北九州市環境衛生研究所

*² 東京都立衛生研究所多摩支所

*³ 仙台市衛生試験所

*⁴ 札幌市衛生試験所

*⁵ 長野県衛生公害研究所

*⁶ 山梨県衛生公害研究所

*⁷ 和歌山県衛生研究所

*⁸ 島根県衛生公害研究所

*⁹ ネッスル(株)

101 日本人の亜硫酸及びその塩類(漂白剤)の1日摂取量について

豊田正武, 伊藤啓志男, 一色賢司*¹, 大西和夫*², 加藤丈夫*³, 神蔵美枝子, 白石由美子*⁴, 原田行雄*⁵, 深澤喜延*⁶, 横山 剛*⁷, 米田孟弘*⁸, 慶田雅洋*⁹: 日本栄養・食糧学会誌, 36, 481 (1983)

1976~1981年の6年間, 全国9ブロックで, 11453検体の食品について亜硫酸を分析した。総検出率は51.8%であった。含量実態調査方式による亜硫酸の1日総摂取量は 21.0 mg であった。またモデル献立からの推定値と比べた。

*¹ 北九州市環境衛生研究所

*² 東京都立衛生研究所多摩支所

*³ 仙台市衛生試験所

*⁴ 札幌市衛生試験所

*⁵ 長野県衛生公害研究所

*⁶ 山梨県衛生公害研究所

*⁷ 和歌山県衛生研究所

*⁸ 島根県衛生公害研究所

*⁹ ネッスル(株)

102 マーケットバスケット方式による日本人の各種食品添加物の1日摂取量の推定

豊田正武, 伊藤啓志男, 一色賢司*¹, 大西和夫*², 加藤丈夫*³, 神蔵美枝子, 白石由美子*⁴, 原田

行雄*5, 深澤喜延*6, 横山 剛*7, 米田孟弘*8,
平山佳伸*9, 山本芳子*9, 藤井正美*9, 慶田雅
洋*10: 日本栄養・食糧学会誌, 36, 489 (1983)

全国10機関で, 1人1日喫食量に相当する試料を採取し, 8食品群ごとに添加物含有量を分析し, 1日摂取量を求めた. 平均1日摂取量はプロピレングリコール 43 mg, ソルビン酸 36.3 mg, グリチルリチン酸 1.39 mg などであった.

*1 北九州市環境衛生研究所

*2 東京都立衛生研究所多摩支所

*3 仙台市衛生試験所

*4 札幌市衛生試験所

*5 長野県衛生公害研究所

*6 山梨県衛生公害研究所

*7 和歌山県衛生研究所

*8 島根県衛生公害研究所

*9 厚生省食品化学課

*10 ネッスル(株)

103 **Detection and Determination of Organic Impurities in Food Coal-Tar Dyes by High Performance Liquid Chromatography**
Yasuhide TONOGAI, Yoshio ITO and Masahiro IWAIDA*: *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 24, 275 (1983)

高速液体クロマトグラフィーを用いて, 7種類の食用タール色素中の有機性不純物(原料物質, 反応中間体及び副色素)の系統的な検出・定量法を開発した. 更に食用タール色素の製品検査の純度試験に高速液体クロマトグラフィーを適用する試みとして, 原料物質及び反応中間体はスルファニル酸量に, また副色素は主色素量にそれぞれ換算して総量の表示をする方法を提案した. 本法を用いて1978年から1980年の間に生産された105検体の色素中の有機性不純物について調査を行った結果, 検体中の総有機性不純物量が3%を超えるものが9検体認められた.

* (現) ネッスル(株)

104 **高速液体クロマトグラフィーによる各種食用タール色素及び有機性不純物の統一定量法**
外海泰秀, 伊藤啓志男, 原田基夫: *食衛誌*, 25, 10 (1984)

食用タール色素の製品検査における色素試験法を改良する試みとして, 色素中の有機性不純物及び主色素を高速液体クロマトグラフィーで同時定量するための簡易試験法を提案した. カラムには Zorbax C₈ を用い, 基本液に1%酢酸アンモニウム溶液 (pH 8.0),

添加液に20%アセトニトリル-メタノール混液を使用する濃度勾配法により, 11種類の許可食用タール色素について同一条件で測定できた. 有機性不純物含量の算出は, 無色有機性不純物(未反応原料, 反応中間体等)及び副色素の総量で表示した. 本法を用いて46検体の色素を調べた結果, 総有機性不純物含量が3%を超えるものが11検体認められた.

105 **食品中の保存料及び殺菌料の定量法について**
伊藤啓志男: *防菌防黴誌*, 11, 365 (1983)

食品中の保存料及び殺菌料について, 当部で開発又は改良した定量法について総説する. (1)ソルビン酸, デヒドロ酢酸及び安息香酸の定量法は試料, 水及び有機溶剤の各量比を考慮することにより, 乳化を防止し, 磨砕と抽出を同時に行い全ての食品に適応できる方法を作製した. (2)パラオキシ安息香酸エステル類はエーテル抽出後, 0.4N-KOHの50%メタノール溶液を用いることにより脂肪の除去が可能となった. (3)オルトフェニルフェノール, ジフェニル及びチアベンダゾールは酢酸エチル抽出後, キシレンで置換し, アルミナカラムにより精製する方法を開発した. (4)過酸化水素はメタノール抽出後, フェノール, 4-アミノアンチピリン及びベルオキシンダーゼと反応させ安定な呈色物とした後, 濃縮することにより高感度の定量法を開発した.

106 **2-Ethyl-1, 3-Hexanediolキレート抽出法及びプロトン化クルクミンを用いる食品中のホウ酸の定量法**

福井昭三*1, 平山晃久*1, 野原基司*1, 小林香代子*2, 河村太郎*2, 慶田雅洋, 伊藤啓志男, 小川俊次郎, 恒内靖男*3, 山崎裕康*3, 小野尚子*3: *衛生化学*, 29, 323 (1983)

食品試料を灰化後, 液体試料とし, 2-Ethyl-1, 3-Hexanediolのクロロホルム溶液でホウ酸をキレート抽出し, 室温でプロトン化クルクミンと反応させる比色定量法について検討し, 簡易で定量性もよく, また, 試験管内で発色させるため, 1回に多数の検体が処理できる利点を有する試験法を確立した. カラ付きニビ及び塩蔵クラゲにホウ酸20ppmを添加したとき, 本法での各々の回収率は100.7%及び99.0%と良好であった.

*1 京都薬科大学

*2 横浜市衛生研究所

*3 神戸学院大学薬学部

- 107 高速液体クロマトグラフィーによるヨーグルト中の安息香酸及びソルビン酸の同時迅速定量
伊藤蒼志男, 外海泰秀, 小川俊次郎, 横山 剛^{1*}, 本田恒男^{2*}, 慶田雅洋^{3*}: *Japanese Journal of Dairy and Food Science*, 32, A-89 (1983)

逆相分配系カラムを使用する高速液体クロマトグラフィーによるヨーグルト中の安息香酸とソルビン酸の同時迅速定量法について検討した。試料を希アルカリ溶液にて、pH 8 に調整後、超音波照射により均一な試験溶液を調製し、除たんぱく、メタノール抽出、遠心分離によって得た上澄液を濾過したものについて高速液体クロマトグラフィーにより定量する。安息香酸 15 ppm, ソルビン酸 45 ppm を添加したときの回収率は、いずれも93%以上の良好な結果を得た。

*1 和歌山県衛生研究所

*2 協同乳業研究所

*3 ネッスル(株)

- 108 液状乳及び粉乳中の乳酸の酵素的測定法
本田恒男^{1*}, 中野良一^{2*}, 青野博^{3*}, 金田吉男^{4*}, 慶田雅洋^{5*}: *食衛誌*, 24, 314 (1983)

液状乳及び粉乳中の乳酸含量の酵素的測定法において従来のヒドラジン法の代りにグルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼを用いたところ、反応時間を短縮し、室温測定が可能となった。本法の回収率は液状乳、脱脂粉乳及び全脂粉乳において87~113%であった。脱脂粉乳及び全脂粉乳に適用した場合、実験者及び実験室が異なっても、測定値の変動は日常分析に支障のない範囲内にあった。

*1 協同乳業研究所

*2 森永乳業品質管理部

*3 ベーリンガー・マンハイム山之内

*4 兵庫県衛生研究所

*5 (現)ネッスル(株)

- 109 Gas Chromatographic Determination of Propionic Acid and Sodium and Calcium Propionate in Bread and Cake

Yasuhide TONOGAI, Amara KINGKATE*, Wanthanee THANISSORN* and Udomkiat PUNTHANAPRATED*: *J. Food Protection*, 46, 284 (1983)

パン、ケーキなどに広く使用されているプロピオン酸及びそのナトリウム、カリウム塩をリン酸酸性下に酢酸エチルで抽出し、ガスクロマトグラフィーで測定する同時定量法を確立した。

本品をパンに200及び2000 ppm 添加したときの回収率は、いずれも94.0%以上であり、本法による検出

限界は25 ppm であった。

本法の特徴は、従来の水蒸気蒸留法に比し操作中の損失が少なく、操作も短時間であり、プロピオン酸の塩類も同時に定量できることにある。

* Department of Medical Sciences, Thailand

- 110 Enzymatic Determination of L-Glutamic Acid (L-Glutamate) in Fish Sauces and Instant Noodles

Yasuhide TONOGAI, Amara KINGKATE*, Wanthanee THANISSORN* and Udomkiat PUNTHANAPRATED*: *J. Food Protection*, 46, 522 (1983)

魚醬及び即席ラーメン中のL-グルタミン酸の酵素による定量法を確立した。魚醬は適度に水で希釈し、即席ラーメンは水と煮沸した濾液をそれぞれ検液とし、グルタミン酸脱水素酵素を作用させ、最終的に生じたフォルマザンの可視部吸収(492 nm)を測定した。

また本法により試料中のL-グルタミン酸量を測るとともに、セミマイクロセルダール法で総窒素を測定し、両者の存在比から天然由来のグルタミン酸と添加されたものの判別を試みた。

本酵素反応はグルタミン酸に特異的であり、測定時間も短いため、多数の検体を処理するのに極めて有用と考えられた。

* Department of Medical Sciences, Thailand

- 111 Quantitative Determination of Colorants in Dried Shrimp and Shrimp Paste Using Ion-Exchange Extraction and High Performance Liquid Chromatography

Yasuhide TONOGAI, Amara KINGKATE* and Chawewon HALLILAMIAN*: *J. Food Protection*, 46, 592 (1983)

蛋白性食品である干エビ及びエビペースト中の着色料を液状陰イオン交換樹脂 Amberlite LA-2 で抽出して精製し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で定性定量する方法を確立した。

着色料は食品中で蛋白成分と結合することが多くその精製法が極めて困難であったが、本法により効率よく着色料を食品成分から分離できた。また HPLC により16種類の色素の同時定量条件を設定した。

本法によりタイ国製干エビ21検体、エビペースト23検体について色素分析を行った結果、Orange II, Rhodamine B など不許可色素の使用されているものがあつた。

* Department of Medical Sciences, Thailand

112 Hygienic Investigation on Plastic Food Containers in Thailand

Yasuhide TONOGAI, Amorn WONGRUKPANCH* and Chaweevon HALILAMIAN*: *Eisei Kagaku*, 29, 242 (1983)

タイ国製プラスチック食器90検体について、溶出試験及び材質試験等の衛生化学的検査を行った。メラミン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリカーボネート製食器では、4%酢酸で溶出した蒸発残渣が特に血類に多く検出され、多いものでは2000 ppmを起えるものが見られた。塩化ビニル樹脂製の植物油容器には塩化ビニルモノマーが0.75~13.43 ppm検出された。またポリスチレン容器から揮発性物質の多く検出されるものが見られたが、ポリカーボネート製の哺乳瓶の品質は良好であった。

* Department of Medical Sciences, Thailand

113 蛍光検出高速液体クロマトグラフィーによる鮮魚及びその加工品中の不揮発性腐敗アミンの分別定量法

外海泰秀, 伊藤啓志男, 原田基夫: *食衛誌*, 25, 41 (1984)

鮮魚及びその加工品からヒスタミン、プトレスチン、カダベリンを *n*-ブタノールで抽出し、7-fluoro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD-F) と pH 8 で反応させて NBD-アミンとし、蛍光検出高速液体クロマトグラフィーにより分別定量する方法を検討した。カラムは "Zorbax C₈"、移動相には50%リン酸緩衝液 (pH 6) のメタノール混液を用い、励起波長 470 nm、蛍光波長 530 nm で測定した。3種のアミンを鮮魚に5又は25 ppm 添加したときの回収率はいずれも92.0%以上であり、本法での定量限界は 0.2 µg/g であった。本法での定量値を TLC 蛍光デンストメーター法の値と比較した結果、両者はほぼ一致した値を示した。

114 ガスクロマトグラフィーによる鮮魚介類並びにその加工品の揮発性アミン及びアンモニアの定量

外海泰秀, 伊藤啓志男, 原田基夫: *食衛誌*, 25, 149 (1984)

モノメチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミンは50%水酸化カリウム溶液中で、またアンモニアは酢酸緩衝液 (pH 3.5) 中でクロラミンTと反応後それぞれ加温することにより、ヘッドスペース・ガスクロマトグラフィーで分別定量する方法を開発した。鮮魚介類中のトリメチルアミン及びアンモニアの25°に

おける経時的な生成量は、24時間目から急激に増加し、アンモニア量は全体の86.4~98.8%を占めた。本法で定量した試料中4者の総量をコンウエー法の値と比較すると、鮮魚介類では両測定値はほぼ一致したが、揮発性アミンを比較的多く検出した魚加工品では、コンウエー法の方が低く出る傾向にあった。

115 フライ油の家兎赤血球の溶血性に対する影響

豊田正武, 井崎やゑ子*, 原田基夫: *食衛誌*, 24, 545 (1983)

劣化フライ油の赤血球溶血作用を追跡した。アセトンに溶解したフライ油を塩化ナトリウム・リン酸緩衝液 (pH 7.4) 5 ml に加えた後、一定量の家兎赤血球を加え、37° 15分間反応後、遠沈上清の540 nmにおける吸光度を測定し、溶血曲線より50%溶血に必要な油の量 (C₅₀) を求めた。さつまあげを自動フライヤーにてフライした油の C₅₀ は劣化と共に減少し、新鮮油の4.35 mg に対し66日後は1.30 mg となった。C₅₀ は油脂の化学的及び物理的劣化指標と特有な相関を示した。

* 京都市衛生研究所

116 フライ油の家兎赤血球の変形に対する影響

豊田正武, 原田基夫: *食衛誌*, 25, 19 (1984)

自動フライヤーにてさつま揚げをフライした菜種油による家兎赤血球の形態変化を調べた。アセトンに溶解した油 0.5 mg を0.85%塩化ナトリウム・リン酸緩衝液 5 ml に加えた後、一定量の家兎赤血球を加え、37° 15分反応後、グルタルアルデヒドで固定し、位相差顕微鏡又は走査電子顕微鏡により形態を観察した。新鮮油で赤血球は正常な円盤型を示すが、フライ油の経時的な劣化と共に内方陥没型の変形を示し、カップ状を経て、膜の内方陥没が見られるようになり、更に球形に近くなった。赤血球の変形を形態指数で表わし、フライ油の劣化の化学及び物理指標との相関性を比較したところ、遊離脂肪酸、酸価、粘度と有意な相関を示した。

117 ケイ酸カラムクロマトグラフィーによる市販トリパンブルーの精製

小川義之, 江馬 真, 伊藤啓志男, 外海泰秀, 中村恵三, 伊丹孝文, 川崎浩之進, 加納晴三郎: *分析化学*, 33, 397 (1984)

ケイ酸カラムクロマトグラフィーにより市販トリパンブルーの精製並びに標品中に混在する赤色色素の分離を行った。展開溶媒 *n*-ブタノール: メチルエチル

ケトン：水：濃アンモニア水（5：3：1：1，v/v）でトリパンブルーの本体である青色色素画分（Blue Fr.）と合成副産物である赤色色素画分（Red Fr.）に分画された。580 nm の吸光度より計算した総色素回収率は約86%であった。両画分を水で透析後凍結乾燥したところ、市販トリパンブルー中の両画分の混在比（Blue Fr./Red Fr., w/w）は 1.64 ± 0.18 (M \pm S.D., n=6) であった。上記溶媒を用いたシリカゲル薄層クロマトグラフィーによる Rf 値は Blue Fr. 0.05, Red Fr. は 0.20 であった。高速液体クロマトグラフィーにより両画分ともそれぞれの main peak 以外に一個の Minor peak のみを認めた。吸収極大波長は Blue Fr. が 605 nm, Red Fr. は 555 nm であった。両画分の混在比は各社の標品間に著明な差異が認められた。

118 **Studies on the Pharmacological Bases of Fetal Toxicity of Drugs (IV). Effect of Endotoxin and Starvation on Serum Protein Binding of Salicylic Acid in Pregnant Rats**

Takafumi ITAMI and Seizaburo KANOHI: *J. Pharmacol.*, 33, 1199 (1983)

先に著者らは Aspirin のラット胎仔への毒性が内毒素 (LPS) により増強されることを認めた。同時に代謝産物 Salicylic acid (SA) の胎仔内濃度の上昇が観察され、これが毒性増強の一因と考えられた。この機作を明らかにするために母ラット血中での SA-蛋白結合について検討した。〔結果〕① 妊娠の後期で内因性遊離脂肪酸 (FFA) の血清中濃度の上昇及び SA 結合能の低下が認められた。② LPS の投与により Albumin 濃度が低下した。③ LPS 投与又は絶食により FFA 濃度が上昇し、一方 SA 結合能は低下した。④ LPS 投与後の血清を活性炭処理し FFA を除去すると SA 結合能は正常値に復した。以上の結果から、LPS 投与による血清 Albumin の低下及び蛋白結合阻害物質である FFA の増加が胎仔内 SA 濃度の上昇の一因であろうと考えられる。

119 **薬物の胎仔毒性に関する薬理学的研究 (VI) ラットにおける Trypan blue 及び関連化合物の催奇形作用について**

江馬 真, 川崎浩之進, 小川義之, 伊丹孝文, 加納晴三郎: 日薬理誌, 83, 459 (1984)

Trypan blue (TB) と関連化合物の催奇形作用を Wistar ラットを用いて検討した。1) o-Tolidine, 1-

Amino-8-naphthol-3,6-disulfonic acid 又は 1-Nitro-naphthalene-3,6-disulfonic acid を妊娠ラットに皮下投与したが、胎仔への影響は認められなかった。2) 市販 TB (C-TB), C-TB より分離した Blue fraction (BF) 又は Red fraction (RF) を妊娠ラットに皮下投与したところ、BF 投与群で奇形胎仔が発現し、C-TB 投与群よりも高い奇形発現率がみられた。奇形の型は C-TB 投与群と同様であった。しかし、RF 投与群では胎仔への影響は認められなかった。3) 妊娠11日に BF を胚外体腔内に投与したとき、催奇形作用が認められた。以上の結果より、C-TB による奇形胎仔発現は BF の作用であると考えられた。

120 **薬物の胎仔毒性に関する薬理学的研究 (v) ラットにおける Trypan blue の投与方法による催奇形作用の差について**

江馬 真, 加納晴三郎: 日薬理誌, 83, 433 (1984)

Wistar ラットを用いて各種投与方法による Trypan blue (TB) の催奇形作用を検討した。1) TB の催奇形作用は皮下又は静脈内投与で発現したが、経口投与では発現しなかった。2) 皮下投与による奇形胎仔発現の臨界期は妊娠10日までであった。3) 尾奇形、脊椎裂、椎骨奇形、心臓奇形、水頭、眼奇形などが観察されたが、奇形の型には投与日による特異性は明確ではなかった。4) 妊娠4又は6日の子宮角腔内投与では奇形胎仔の発現はみられなかった。5) 妊娠10又は11日に TB を胚外体腔内に投与したとき、皮下投与の場合と同様の型の奇形が発現した。6) 皮下又は胚外体腔内投与後の胚細胞内に青色の顆粒が観察された。以上の結果より、TB は胚に直接作用して奇形を発現させることが示唆された。

121 **殺虫剤及び食品添加物などのラットにおける胎仔毒性に関する研究 (第6報) Diethylene glycol の胎仔毒性**

川崎浩之進, 村井敏美, 加納晴三郎: 応用薬理, 27, 801 (1984)

Diethylene glycol (DEG) のラットに対する催奇形性について検討し以下の成績を得た。1) DEG の雌ラットに対する LD₅₀ は 13.5 g/kg (po) であった。2) DEG を 5, 1 及び 0.2% の割合で添加した飼料を妊娠の0日から20日まで与えたとき、母体体重の増加、摂餌量、着床所見、胎仔体重などに対照群との間に有意差は認められなかった。3) 妊娠末期胎仔について、外表異常胎仔はいずれの群にも認められなかった。内臓

検査では0.2%投与群に小眼症が1例認められたが、DEG投与による奇形は考えられなかった。また骨格検査では対照群を含む各群に変異例及び化骨遅延例が見られたが、奇形例は1例も認められなかった。

4)自然分娩仔の生後発育を視察した結果、5%投与群で週齢以降の体重増加がやや抑制されたが、仔生存率はいずれの投与群とも高い値を示し、対照群との間に差は認められなかった。以上から、本実験の範囲内ではDEGのラットに対する催奇形性はないと考えられた。

122 Studies on the State of Dispersion of LPS in Aqueous Media by Sucrose Density Gradient Ultracentrifugation Analysis

Tetsuo KOMURO and Seizaburo KANOH: *Japan. J. Med. Sci. Biol.*, 36(2), 122 (1983)

E. coli UKT-B株より、温フェノール・水抽出法により得たLPSの水溶液中における分散状態を検討した。ショ糖密度勾配遠心(SDGU)分析法により、intact LPSは水に溶解した場合、密度1.03~1.17の範囲に広く分布するが、超音波処理によりその分布状態は大きく変化し、一つのピークを形成した。このピークは、超音波処理時間と共に漸次低密度領域へと移行したが、最終的にはある一定の密度領域に収斂する傾向を示した。電顕等によりLPSが超音波処理によりある一定のサイズに均一に分散していくことが推定できた。LPSの発熱活性は、LPSを数分間超音波処理することにより上昇するが、SDGUで分画した場合、低い密度領域に分布するLPSにその発熱活性が高く現われた。

123 製剤の胃内容排出速度

緒方宏泰: 製薬工場, 3, 477 (1983)

内服固形製剤のバイオアベイラビリティ、特に、吸収速度を決定する因子の一つに、ヒトの胃内容排泄速度がある。バイオアベイラビリティの変動要因の一つであり、個人内、個人間においても変動することから、把握がむづかしく、あまり解明が進んでいない。そこで、その測定法、速度論的解析法について、従来の方法を概説するとともに、胃内容排出速度に影響を与える因子の考察を行った。更に、製剤上の因子と胃内容排出速度との相互作用について文献のデータをまとめ、胃内容排出速度に影響を受けにくい製剤について考察を加えるとともに、逆に、胃内容排出速度を積極的に利用した製剤の可能性についても言及した。

124 生物学的同等性と溶出試験

緒方宏泰: 日病薬誌, 19, 533 (1983)

市販の内服固形製剤の生物学的同等性が問題となり、その後の検討の成果をもとに、生物学的同等性試験は内容的に整備・強化された。その結果、同等性の証明は、ヒト試験の結果をもとに行うこととなった。

しかしながら、市販製剤の試験をすべてヒト試験で行うことは不可能であり、簡易な *in vitro* 溶出試験によって、生物学的に非同等である製剤をチェック出来る事が望ましい。そこで、従来の研究成果をもとに、同等な製剤(非同等なもの含まない)のみを選び出す溶出試験法の試験方法について考察を行った。臨床の場において、多銘柄の中から、良質な製剤を選ぶ方法としては、有用性の高いものと考えられた。

125 生物学的同等性試験の検出力(1-β)

緒方宏泰: 日薬会誌, 35, 1297 (1983)

昭和55年5月30日、薬審第718号により出された生物学的同等性試験の厚生省方針において、同等性の統計的証明方法として、用いられたヒト試験の統計的検出力が規定された。従来の帰無仮説にもとづく検定において、αの危険率のみを決めて検定を行った場合、有意差ナシの判定から導き出される「同等」の中に、本当は非同等なのに、データがバラついたために見掛け上、同等となる事の危険率の歯止めがなく、どの程度の信頼性のあるデータにもとづく「同等」なのか不明である。そこで、試験の検出力(1-β)を0.8以上とすることにより、先に述べた危険率を20%以下に押えることになった。これらの諸点についての考え方、具体例について、解説を行った。

126 医薬品迅速分析法 — 5 —

インドメタシン及びその製剤(上)

立沢政義: 月刊薬事, 26, 147 (1984)

医薬品迅速分析法 — 6 —

インドメタシン及びその製剤(下)

立沢政義: 月刊薬事, 26, 171 (1984)

インドメタシンは非ステロイド系消炎剤としてカプセル剤、坐剤、レクタルカプセル剤、ゲル軟膏剤などの剤形で繁用されている。カプセル剤及び坐剤は局方にも収載されているが、試験法に若干不備点がある。

これらの点を考慮して、インドメタシン及びその製剤の分析法を検討し、原薬についてはTLCによる類縁物質の試験法、製剤についてはHPLCによる定量法を作成した。

127 医薬品迅速分析法(3) プロメライン及びプロメライン錠

谷本 剛: 月刊薬事, 25, 1183 (1983)

消炎酵素剤として用いられるプロメライン製剤(単味錠剤)及びその原体の定量法には種々の問題点が指摘されており, 必ずしも満足すべき方法が確立されていた訳ではなかった。そこで, 試薬・試液の調製法, 試料溶液の調製法, 定量操作法の各面から検討を行い, バラツキが少なく再現性のよい統一的試験法を作成した。

128 医薬品迅速分析法(4) プロメライン・トリプシン含有複合剤

谷本 剛: 月刊薬事, 25, 2223 (1983)

トリプシンを含有したプロメライン製剤中のプロメラインの定量法が確立されていなかったために各製造メーカーは任意の定量法を設定していた。そのためにそれらの定量法に統一性はなく, しかも不備な点を多くもつものであった。そこで, 製剤中のトリプシンをアプロチニンで特異的に阻害し, プロメラインのみを選択的に定量できる分別定量法を確立した。この方法を用いることによって複合剤中のプロメラインを選択的に正確に定量することが可能となった。

129 ステロイドホルモン製剤の液体クロマトグラフ法による定量法について

木村俊夫: 月刊薬事, 26, 155 (1984)

現在用いられている副腎皮質ステロイドは約36成分, 製剤の種類は約100, メーカー別では更に多くの種類の製剤がある。これらの製剤の品質は, 保存中に主成分が分解しているものがあるなど, 有効性及び安全性の面で問題があった。56年及び57年度には厚生科学研究を行ってこれらの製剤の品質を確保できるような統一試験法を確立した。この試験法では錠剤, 注射剤, 軟膏剤, クリーム剤などの製剤別に前処理法を定め, 定量は逆相液体クロマトグラフ法を採用した。多種の製剤に効率よく適用できるようにするため, 試験方法の細部にわたり注釈及び解説を行った。

130 リンホカイン

沢田純一: ファルマシズ, 19(10), 1184 (1983)

種々の免疫反応は, リンパ球, マクロファージをはじめとする種々の細胞群の間の複雑な相互作用の結果であり, そこには様々な調節機構も知られている。近年, これらの細胞間相互作用の担い手, 又は免疫調節因子としてのリンホカインの役割が注目を集めている。

本稿では, 最近の知見を含めて, リンホカインの免疫反応における役割に関して概説した。

131 猪苓・車前子・竜胆の品質

西本和光: 現代東洋医学, 4(2), 56 (1983)

猪苓の輸入品について調査した結果を述べた。需要増の品不足のため, 輸入31ロット中品質のよいと思われるものは数ロットに過ぎなかった。

車前子については品質的な問題は特にないが, 市場品には数種がある。

竜胆については堅竜胆というものが輸入されていることを述べた。この堅竜胆は日局リュウタンの性状特に鏡検記載に適合しないが, 苦味はある。

132 桔梗・石膏の品質

西本和光: 現代東洋医学, 4(3), 62 (1983)

桔梗については市場品の品質に特に問題ないことを述べた。

石膏については, 水に難溶性のものが煎薬としてどのくらい服用されるかを調べた。石膏単味の実験であるが, 300 ml の煎液中には 0.55 g が溶けるに過ぎなかった。したがって, 石膏の硫酸カルシウムかあるいは他成分が薬能に関与しているかということになり, 関連石薬及び名称の寒水石, 凝水石, 方解石, 長石, 理石についても考察を行った。

133 大黃の品質

西本和光: 現代東洋医学, 4(4), 62 (1983)

良質大黃の形質的特徴である放射線を精査した結果を述べた。また, 従来雅黄が市場品の大部分を占めていたが, 近年錦紋大黃が雅黄に代って輸入されるようになった。錦紋大黃は大黃のなかで最良のものとされているが, 現在輸入されている錦紋大黃を調べたところ, 下等級のものが多いようである。

134 牡丹皮の品質

西本和光: 現代東洋医学, 5(1), 58 (1984)

現市場の牡丹皮はほとんど輸入品であり, 木心が抜き去られていないものがあり, 品質は低下していることを述べた。また, 牡丹皮のにおい成分であるペオノールの分析についてUV法及び液体クロマトグラフ法を検討し, 牡丹皮配剤の漢方湯液中のペオノール含量を測定したところ, 桂枝茯苓丸料及び大黃牡丹皮湯の湯液1日量中には十数ミリグラムという微量のペオノールが溶存していることが判った。

135 良い生薬の確保

西本和光: フォルマシアレビュー, No. 12, 71 (1983)

漢方方剤の調剤用生薬(漢薬)に特に留意して、その品質検査及び品質保持に対する考え方を論述した。まず、天産物である生薬は生産された時点ですでに品質が決ってしまうこと、流通段階では品質保持が精一杯で、経時的劣化はまぬがれない。したがって、品質のよい生薬を確保するためには、栽培を含めた適正な生産とGMPの実施が必要であることを説明した。品質試験及び規格については、日局等の公定規格の各試験項目の意味を記述した。更に各生薬の品質上の留意点、表として主要生薬の輸入(生産)量等一覧を付け加えた。

136 漢方エキス製剤の化学的品質評価をめぐって (I)

野口 衛: 月刊薬事, 25, 2283 (1983)

原料生薬中に含まれる成分の漢方製剤中へ移行する割合は、当該成分の物理化学的特性(熱水への溶解性、水蒸気蒸留能、安定性、化学反応性 etc)と製剤工程で生ずる機械的損失の2つの要因により支配されることを明らかにし(この値を利用率と定義した)、原料中の指標成分含量と利用率を用いる漢方製剤の品質評価法を考案した。

137 漢方エキス製剤の化学的品質評価法をめぐって (II)

野口 衛: 月刊薬事, 25, 3379 (1983)

漢方煎剤のモデルとして麻黄湯を取り上げ、調製条件と指標成分の利用率の関係について検討した結果、水溶性成分では、生薬残渣をろ過した後の水溶液の容積が利用率に最も大きな影響を与えることが明らかとなった。

ついで、麻黄湯エキス製剤を試製した場合の製造工程における指標成分の利用率の推移を追跡したところ、抽出液の濃縮乾燥工程での損失が最も大きいことが明らかとなった。

以上の結果から、利用率測定は、製剤の品質管理や製剤技術の改良の有力な手段になると結論される。

138 漢方エキス製剤の化学的品質評価をめぐって (III)

野口 衛: 月刊薬事, 26, 163 (1984)

市販漢方エキス製剤は、使用した原料生薬の規格や使用量が不明であるが、市販の原料生薬中の指標成分

含量及び利用率推定値より指標成分の規格値を定めることにより、原理的に可能である。

そこで、このような方法を一般化する上で必要な分析法、サンプリング法、データの取り扱い方など基本的な事項について検討した。

139 健康食品

内山 充: 食品衛生研究, 33, 1095 (1983)

食品衛生調査研究の成果に基づき、現在の“健康食品”の有する各種の問題点を食品衛生学の見地から総合的に論じた。

140 環境汚染物摂取量推計と食品衛生

内山 充: 食品衛生研究, 33, 519 (1983)

過去8箇年間の厚生科学研究「食品中の各種汚染物の実態に関する調査研究」の中の「日常食中の汚染物摂取量調査」の研究成果をまとめたものである。

わが国の食品汚染物の人体内摂取量の実態が、マーケットバスケット法により明らかにされている。

141 有害物質の危険度評価

内山 充: 月刊薬事, 25, 1147 (1983)

生活環境中に不可避的に存在する有害物質の安全性や危険性に関する定量的解析法を例示しつつ安全性の確保にいかに対処すべきかを説いた。

142 食品衛生における微生物制御の基本的考え方 (I)

倉田 浩, 小沼博隆, 小久保弥太郎*1, 品川邦汎*2, 徳丸雅一*3, 尾上洋一*4, 齊藤文一*5, 吉田拓郎*6: 食品衛生研究, 34, 225 (1984)

食品衛生における微生物コントロールの新しい考え方を創案し、適正な食品の衛生微生物学的規格、基準の設定に役立つ基礎データの集積を行い、食品の微生物コントロールに必要な足がかりを作成する目的で、現行の規格等の現状分析と国際的な動向を調査した。その結果、わが国の微生物規格が適用されている食品は乳・乳製品、33品目、乳等以外の食品16品目のみに定められているにすぎなかった。また、規格の定められている食品の食中毒発生件数は非常に少なく、規格の有用性が示唆された。しかし、規格設定に至ったプロセスが明確でない部分が多くあった。

一方、ICMSF(国際食品微生物規格委員会)から提案された微生物規格は、サンプリング法、試験法、対象微生物、対象食品、評価判定方法に至るすべてのプロセスにおいて科学的データを基に決定しようとする

方向性が打ち出されていた。

- *1 東京都立衛生研究所
- *2 岩手大学
- *3 埼玉県衛生研究所
- *4 神奈川県衛生研究所
- *5 日本食品分析センター大阪支所
- *6 全国食品衛生監視員協議会

143 食品衛生における微生物制御の基本的考え方 (II)

倉田 浩, 小沼博隆, 小久保弥太郎*1, 品川邦汎*2, 徳丸雅一*3, 尾上洋一*4, 斉藤文一*5, 吉田拓郎*6: 食品衛生研究, 34, 331 (1984)

前報にて、わが国及び国際食品微生物規格委員会(ICMSF)における食品微生物の規格、基準の現状分析とその動向について紹介する一方、近代の食品微生物学及び食品製造工業の現状に立脚し、しかも今日の生活様式並びに水準に即応した合理的な規格設定へ向けての問題点の指摘を行った。その指摘の中には、極めて限られたテクノロジーの細部にわたるものもあったが、日本の現状をふまえ、改めて、科学的根拠に立拠した食品の微生物規格設定のための基本構想を案出し、3つのステップからなるフローチャートを作成した。このフローチャートにしたがって、食品を実際に当てはめる演習を試みたところ、必要とするデータさえ準備することができるならば、食品の安全性、健全性、経済性、監視・指導性を考慮した満足のいく微生物規格を設定することができることを明らかにした。

- *1 東京都立衛生研究所
- *2 岩手大学
- *3 埼玉県衛生研究所
- *4 神奈川県衛生研究所
- *5 日本食品分析センター大阪支所
- *6 全国食品衛生監視員協議会

144 生殖毒性試験法指針

田中 悟: トキシコロジーフォーラム, 6(5), 456 (1983)

医薬品を対象とした三節生殖毒性試験及び食品添加物や農薬などを対象とした催奇形性試験と多世代生殖毒性試験について、日本及び諸外国の試験法指針の相違点を中心に解説した。医薬品を対象とした生殖毒性試験法の日本の指針はFDAやECの指針と基本的に異なる部分が認められ、諸外国の指針との整合性の必要性が考えられた。

145 動物から人へ —外挿の科学—

林 裕造: 食品衛生研究, 33(4), 79 (1983)

毒性データバンクと動物実験モデルを利用する「動物から人への外挿」の方法を提案した。データバンクには各種毒性試験成績、人における疫学的調査資料、臨床追跡調査資料、副作用報告等が含まれる。これらの資料を整理して、化学物質による生体の障害を1)人と動物が質的に同じであるもの、2)質的に異なるもの、3)特殊な条件の生体にあらわれるものに大別する。2)3)に属する生体障害に関しては、データバンクの他に適切な動物実験モデルの利用が必要である。

146 実験腫瘍とアミラーゼ値

高橋道人: Oncologia, 5, 154 (1983)

ハムスターの実験腫瘍のモデルを用い、腫瘍発生過程におけるアミラーゼ値の上昇が、腫瘍の発生と関連する現象であるかどうかを調べた。アミラーゼ活性の測定は、血液及び尿を2週毎に採取し、経時的に、Blue starch法により、アミラーゼアインザイムはTitan IIIセルローズアセテート膜を支持体とした電気泳動法によって分画した。

その結果、N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine (BOP)を投与している間の6週目までは尿中の腫型アミラーゼ活性がすべて低値であったが、8週目より高値を示す例が見られた。高値を示した症例を選び、腫臓を精査したところ、すべての症例において、腺癌あるいは異型腺管が認められた。腫型アミラーゼ値の上昇は異型腺構造からの腺液の漏出に起因するものと考えられる。

147 動物発癌試験の評価

林 裕造, 高橋道人: 病理と臨床, 1(6), 895 (1983)

発癌性試験は子防医学的立場から医薬品、食品添加物などの生活関連物質並びに各種環境化学物質の人における発癌性の評価を目的として実施される。

動物発癌試験の評価にあたっては種々の項目にわたって再検討する必要がある。

動物実験においては、被験物質、実験動物、投与量、実験期間、飼料、解剖と病理組織標本の作製の影響について注意が払われるべきである。

病理学的検査における問題点としては、動物の自然発生腫瘍についての理解が大切である。

発癌性試験の陽性判定基準として、WHOの判定基準につき、紹介したほか、発癌性の質的評価や量的評価につき解説を試みた。

148 最近の動物長期テストの成果と問題点

林 裕造, 黒川雄二: 代謝, 20, 19 (1983)

化学物質の癌原性の有無を最終的に判断する方法は、現時点では動物を用いた長期投与試験によらざるを得ない。日本をはじめとして、欧米諸国において最近10年間に数多くの長期試験が行われている。

その結果を大きく、医薬品、食品関連物質、農薬、産業化学物質、環境化学物質に分けて報告した。

更に、試験結果の質的及び量的評価の問題、ヒトへの外挿についてもふれている。

149 中国のがん死亡統計図譜 —Atlas of Cancer Mortality in the People's Republic of China—

黒木登志夫*1, 黒川雄二, 加美山茂利*2, 松下秀鶴*3: トキシコロジーフォーラム, 6(5), 544 (1983)

中国のいわば、国家の大事業として中国厚生省、科学学術院などの援助の下に、1973~75年の3年間に渡って調査が行われた。

1979年には、上記の標題の下にそのデータの全てが公表され、全世界の癌研究者、特に疫学関係者に多くの反響を呼んだ。

この小解説文において、本書におけるガン死亡率、地域分布、死亡原因などについて、紹介を行った。

*1 東京大学

*2 秋田大学

*3 国立公衆衛生院

150 発癌性試験における実験動物

高橋道人: トキシコロジーフォーラム, 7(1), 11 (1984)

発癌性試験における実験動物の選択に際し、どのような点に注意を払うべきか、を総論的に解説した。特にラット、マウス、ハムスターなど小動物が用いられる理由並びに、どのような系を用いるべきかについて述べた。

発癌性試験における実験動物の使用で最も重要なことは、その動物を長期に飼育した際に現れる自然発生腫瘍を理解することであり、これらの背景データが確立されていなければならないことを力説した。

また発癌性の評価にあたっては被験物質の体内動態など、代謝面での知識を加味し、評価がなされるべきである。

種々の短期癌原性試験には、その目的に応じた動物種又は系が用いられることを紹介した。

151 動物発がん試験の立場からみた短期変異原性試験の意味するもの

林 裕造: 環境変異原研究, 5(1), 23 (1983)

化学物質の発がん性評価における短期テストの役割と問題点について述べた。1)短期テストによる *in vitro* での作用が *in vivo* においてあらわれるか否かを確かめるための方法の開発とその実施がテスト結果の予知性を高めるために必要である。2)プロモーター作用を検出するための短期テストの開発は短期テストによる評価の幅を拡大する意味で重要である。3)発がん性の有無が確認されている物質を中心に、その関連化合物について短期テストを系統的に実施し、成績を比較評価する。この仕事は被験対象の有効な拡大につながる。

152 バイオマテリアルの生体組織反応

前川昭彦: 病態生理, 3, 372 (1984)

種々のバイオマテリアルと生体組織との反応を、主としてそれらを動物の体内に埋没した場合の際におこる生体組織反応、殊に長期間埋没による腫瘍発生を中心に、バイオマテリアルと生体組織との反応、体内埋没による初期の組織反応、長期間埋没による生体組織の反応腫瘍化、埋没により腫瘍を発生させるバイオマテリアルの種類、異物発癌を修飾する各種因子、異物による発癌の機序及び異物により発生する腫瘍の病理、の各項目について言及した。

153 GLP に添った病理検査法

古田京子, 前川昭彦, 林 裕造: トキシコロジーフォーラム, 7, 278 (1984)

米国に引続き、昭和58年4月より我が国においてもGLPが施行され、医薬品の製造(輸入)承認申請の為に行われている安全性に関する凡ゆる前臨床試験がその規制の対象となっている。これら各種毒性試験の中でも、長期にわたる試験、殊に慢性毒性試験やがん原性試験では、試験の中で病理検査の占める比重が大きい。本章はGLP規制のもとで行われる各種毒性試験での病理検査における注意すべき点及び長期毒性試験における病理検査の信頼性保証について簡単にまとめたものである。

154 変異原性試験のがん研究分野における役割

石館 基: *Oncologia*, 6, 76 (1983)

微生物、昆虫あるいは哺乳動物を用いる変異原性試験は、本来、遺伝毒性試験の一環として開発されてきた。本邦においては、食品添加物AF-2に発がん性が実証されてから、種々の化学物質の変異原性と発がん

性との相関について社会的関心が高まってきた。それは、AF-2 に発がん性が認められる以前に、すでに変異原性が認められ、特に遺伝学者の間でその危険性が予測されていた事実によるものである。変異原性試験の重要性について、発がん性物質検索への適応、化合物の代謝産物検索への適用、発がん阻止物質検索への利用、職場環境のモニタリングへの応用、及びがん治療への適用という観点から述べている。

155 変異原性と発癌性試験

石館 基: 実験医学, 1, 208 (1983)

我々は無数の化学物質にかこまれて生活しているが、その安全性を調べるのに短期間に行える変異原性試験が重要な役割を果たしている。細胞 DNA の構造と機能は、ウイルスからヒトの細胞に至るまで共通している。もしも、DNA に及ぼす影響が体細胞に及ぶならば、ヒトの発癌性に無関係ではあり得ない。また、もしも生殖細胞に及ぶならば、我々の子孫に悪い遺伝的影響を及ぼす可能性がある。変異原性試験と発癌性の相関は、対象となる発癌性物質の種類によって異なるが、例外はあるとしても、発癌性の高い物質は、変異原性も高く、また変異原性の高い物質の中に発癌性物質が含まれていることは事実である。いくつかの変異原性試験を組み合わせることは、発癌性の短期スクリーニングとして重要であると考えられる。

156 食品添加物の変異原性試験成績 (その 4)

—昭和57年度厚生省試験研究費による—

石館 基, 吉川邦衛, 祖父尼俊雄: トキシコロジーフォーラム, 6, 671 (1983)

昭和57年度には、33種類の合成食品添加物について Ames テスト並びに染色体異常試験を行い、20種類の天然添加物について染色体異常試験のみを行った。更に、6種の合成添加物についてマウスの小核試験を行った。

Ames 試験では、33種のうち L-システイン塩酸塩及び二酸化塩素 (液剤) の 2 検体のみが陽性であった。染色体異常試験では、33種のうちマルトール、L-システイン塩酸塩及び二酸化塩素 (粉剤) の 3 種が陽性となった。天然添加物については、明らかに陽性となるものは認められなかった。小核試験を行った 6 検体はすべて陰性であった。

157 小核試験におけるアクリジンオレンジ蛍光染色法

林 真, 祖父尼俊雄, 石館 基: トキシコロジー

フォーラム, 6, 419 (1983)

近年、化学物質の染色体異常誘発性を調べる *in vivo* 試験法として重要視されている小核試験には、その手法、例えば試験に用いる動物種、系統、被検物質の投与経路及び回数、染色法などについてまだ問題点が残されている。著者らは染色法について新しくアクリジンオレンジ蛍光染色法を適用し、その有用性の高いことを確認した。この染色法の長所として①小核を有する多染色赤血球の計測をより確実に行うことができ信頼性の高いデータを得られる②染色は簡単な操作で短時間に行える③蛍光が強いので通常の実験室で観察可能である④肥満細胞の顆粒と小核の識別は確実に行えるので、ラットもマウス同様に実験動物として問題なく用いられる、などがあげられる。

158 染色体異常誘発試験における代謝活性化法について

祖父尼俊雄, 松岡厚子: 環境変異原研究, 5, 4 (1983)

哺乳動物培養細胞を用いる試験系に1975年頃より代謝活性化系が導入されてきた。それにはラットなどの肝ミクロゾーム分画を用いる方法や、フィーダー細胞を用いる方法、また宿主経路法などがある。肝ミクロゾーム分画 (S9) を用いる方法は、大別すると、剝離した浮遊細胞を検体及び S9 と共に振盪する方法と単層で生育している細胞を検体と S9 で処理する方法とに分けられる。この二つの方法について、陽性対照のジメチルニトロサミンやベンツ (a) ピレンなどを用いて実験条件の比較を行い、後者の方が細胞の損失も少なく、実験操作も簡便で、良好な結果が得られることを報告している。

159 解熱鎮痛剤フェナセチンの代謝活性化と種差

能美健彦, 吉川邦衛: 化学と生物, 21, 352 (1983)

フェナセチンは、ハムスターの S9 を用いて代謝活性化を行うとサルモネラ菌 TA 100 に変異原性を示すが、通常のエームス試験に用いられるラットの S9 を使用した場合には変異原性を発現しない。ラットとハムスターの代謝活性化能の差が、フェナセチンの活性化経路のどの段階に起因しているかを HPLC 分析とエームス試験を併用して検討した。その結果、ラットとハムスターの「種差」の原因は、両者の脱アセチル化能の差にあることが明らかになった。フェナセチンの示す薬効毒性と代謝との関連を、歴史的に考察した。

160 日本人の各種食品添加物一日摂取量について

伊藤蒼志男: 食品衛生研究, 33, 1055 (1983)

日本人の各種食品添加物の一日摂取量を測定した。調査方式としては(1)含量実態調査方式(国民栄養調査に基づく方式)、(2)陰膳方式、(3)食品添加物用マーケットバスケット方式(厚生省食品化学課と大阪支所とで作製)を用いた。調査地域は北海道から九州までの10箇所、国衛試食品添加物部と各地域の地方衛研の協同で本実験を行った。調査食品添加物は、ソルビン酸、サッカリン、プロピオン酸、BHT、BHA、デヒドロ酢酸、パラオキシ安息香酸エステル類及び亜硫酸の9種類とした。3種の調査方式では(1)での摂取量が最も高く、ついで(3)、(2)の順となった。また摂取量の最も多いのはソルビン酸の63.8~25.5 mg、ついで亜硫酸の21.052~0.167 mgの順となった。次に最も調査の簡便な(3)の方式で48品目の食品添加物について測定した結果、日本人の1日平均総摂取量は119.9 mgとなった。

161 Thujoneの香粧品、化粧石けん、室内芳香剤及び酒類からの分析法

小川俊次郎*1, 伊藤蒼志男, 原田基夫, 平井邦夫*1, 慶田雅洋*2: (粧技誌), 17, 107 (1983)

香料品/化粧石けん、室内芳香剤及び酒類中の α -及び β -Thujoneの分別定量法として、Dean-stark装置を用いた蒸留法により試料から分離し、シクロヘキサンに捕集した後、水洗浄及びアルミナカラムクロマトグ

ラフィーにより精製しガスクロマトグラフィーで定量する方法を確立した。酒類、ヘアトニック、ヘアリキッドに α -及び β -Thujoneの各々100 ppmを添加した時の回収率は90.7%以上、化粧石けんでは82.5%以上、オーデコロン及び室内芳香剤では82.6%以上であった。市販品38検体について分析したところ、オーデコロン1検体より α -及び β -Thujoneが各々45.9及び96.1 ppm検出された。

*1 京都薬科大学

*2 ネッスル(株)

162 チーズ、ハム、ソーセージ中のリン酸塩及びポリリン酸塩の分別定量

豊田正武, 慶田雅洋*: 日食工誌, 30, 462 (1983)

プロセスチーズ、ハム、ソーセージから、氷冷した20% TCAにて各種リン酸を抽出し、分画にDowex AG 1×4のカラムを用い、0.15 M, 0.26 M, 0.38 M塩化カリウム溶出液(pH 5.0, 0.5 mM EDTA含有)、2N塩酸にて、オルト、ピロ、トリリン酸、他のポリリン酸を溶出させ、加熱分解後比色定量した。プロセスチーズのポリリン酸は0.21~1.30%で、オルトリン酸/ポリリン酸の比率は0.48~4.52であった。ハム、ソーセージではポリリン酸0.16~0.44%、比率が0.25~1.54であった。

* (現)ネッスル(株)

1. 神谷庄造, 末吉祥子, 宮原美知子, 丹野雅幸, 中路幸男, 鈴木幸子, 鎌田栄一, 金子豊蔵, 戸部満寿夫: **Histidine 及びその関連化合物と Form-aldehyde の反応**
日本薬学会第 104 年会 (1984. 3. 28)
 2. 宮原 誠, 宮田直樹, 神谷庄造: **置換尿素類の N-ニトロソ化を利用した閉環反応 2. 1, 2, 4-オキサジアゾール-5 オン誘導体の合成**
日本薬学会第 104 年会 (1984. 3. 28)
 3. 三田智文*, 宮田直樹, 広部雅昭*: **チトクロム P-450 モデル錯体による炭化水素の酸素化**
日本薬学会第 104 年会 (1984. 3. 28)
-
- * 東京大学薬学部
4. 宮田直樹, 三田智文*, 広部雅昭*: **Novel Functions of Porphrin-Iron Complex as a Model of Cytochrome P-450: Deoxygenation and Reductive Dioxygen Activation**
The 9th International Congress of Heterocyclic chemistry (1983. 8. 22)
-
- * 東京大学薬学部
5. 三田智文*, 宮田直樹, 広部雅昭*: **チトクロム P-450 モデル錯体による酸素分子活性化と基質酸化反応**
第 10 回反応と合成の進歩シンポジウム (1983. 11. 7)
-
- * 東京大学薬学部
6. 宮原美知子, 末吉祥子, 神谷庄造: **ニトロソウレア誘導体の抗腫瘍活性発現における差異——殺細胞性と DNA 障害性——**
日本薬学会第 104 年会 (1984. 3. 30)
 7. 丹野雅幸, 末吉祥子: **トリ置換 N-ニトロソ尿素類の分解反応**
日本化学会第 49 春季年会 (1984. 4. 1)
 8. 江島 昭: **Bioequivalence Among Experimental Animals: Evaluation of Experimental Animals in Assessing of Drug Bioequivalence**
The Second American-Japanese Conference on Pharmacokinetics and Biopharmaceutics (August 8, 1983)
 9. 緒方宏泰: **バイオアベイラビリティの評価・基準: 試験研究の立場から**
第 8 回製剤セミナー (1983. 7. 27)
 10. 緒方宏泰, 青柳伸男, 鹿庭なほ子, 江島 昭: **医薬品の bioavailability と溶出速度の関連性**
第 5 回製剤の開発と評価シンポジウム (1983. 10. 6)
 11. 青柳伸男, 緒方宏泰, 鹿庭なほ子, 江島 昭: **グリセオフルビン製剤に関するヒト, 動物間の生物学的同等性の比較, 検討**
第 15 回薬物代謝と薬効・毒性シンポジウム (1983, 11. 11)
 12. 緒方宏泰, 青柳伸男, 鹿庭なほ子, 江島 昭, 鈴木紘一*1, 高岸 靖*2, 土居義男*2, 小倉敏弘*2: **新胃液酸度簡易検査用カプセル「GA-Test」の有用性の検討**
第 4 回日本臨床薬理学会 (1983. 12. 1)
-
- *1 国立大蔵病院・消化器科
*2 塩野義製薬・製造部
13. 川津泰仁*1, 丸山安司*1, 町田和子*2, 芳賀敏彦*2, 緒方宏泰, 遠藤真砂子, 江島 昭: **患者と健康人におけるフロセミドの動態と臨床効果**
第 4 回日本臨床薬理学会 (1983. 12. 1)
-
- *1 国立療養所東京病院・薬剤科
*2 同・内科
14. 鹿庭なほ子, 青柳伸男, 緒方宏泰, 江島 昭: **シクランデレート・カプセルのバイオアベイラビリティに及ぼす食餌の影響**
第 4 回日本臨床薬理学会 (1983. 12. 2)
 15. 緒方宏泰, 青柳伸男, 鹿庭なほ子, 江島 昭, 鈴木紘一*1, 高岸 靖*2, 土居義男*2, 小倉敏弘*2: **新胃液酸度簡易検査用カプセル「GA-Test」の有用性の検討**
日本薬学会第 104 年会 (1984. 3. 28)
-
- *1 国立大蔵病院・消化器科
*2 塩野義製薬・製造部

16. 鹿庭なほ子, 緒方宏泰, 青柳伸男, 江島 昭, 今里 雄*, 高橋照孝*, 上茵裕子*, 川人康弘*: 市販シクランデレート・カプセルの **Bioavailability** 試験
日本薬学会第104年会(1984.3.28)
-
- * 大日本製薬
17. 石橋無味雄, 吉岡澄江, 柴崎利雄, 高井信治*: 窒素代謝物に対する経口投与と吸着剤としてのゼオライトの基礎的検討
日本薬学会第104年会(1984.3.30)
-
- * 東大生研
18. 吉岡澄江, 石橋無味雄, 柴崎利雄, 江島 昭: リポゾームの血漿中における内包薬物の放出に関する検討
日本薬学会第104年会(1984.3.28)
19. 柴崎利雄, 河野ひとみ, 中里直美, 江島 昭: ヘッドスペース・GC法によるエタノールの純度試験
日本薬学会第104年会(1984.3.29)
20. 松田りえ子, 立沢政義, 江島 昭, 高井信治*: 高速液体クロマトグラフィー・オートアナライザーシステムによる混合製剤の定量
第4回液体クロマトグラフィー討論会(1983.11.10)
-
- * 東京大学生産技術研究所
21. 松田りえ子, 立沢政義, 江島 昭, 高井信治*: 高速液体クロマトグラフィー・オートアナライザーシステムによる坐剤中の解熱鎮痛剤の定量
第4回液体クロマトグラフィー討論会(1983.11.10)
-
- * 東京大学生産技術研究所
22. 松田りえ子, 立沢政義, 江島 昭: パルピツール酸誘導体の逆相系における保持比と構造の関係について
第4回液体クロマトグラフィー討論会(1983.11.9)
23. 高橋一徳, 島峯望彦, 大野昌子: 向精神剤のマイクログリスタルテスト III
第68次日本法医学会総会(1984.5.16)
24. 太田美矢子, 徳永裕司, 木村俊夫, 川村次良: 高速液体クロマトグラフィーによるインシュリンの分析(IV) 酸性溶液中のインシュリンの安定性
日本分析化学会第32年会(1983.10.4)
25. 太田美矢子, 木村俊夫, 川村次良: 高速液体クロマトグラフィーによるインシュリンの分析(II) 種々のインシュリンのフィンガープリントアナリシス
日本薬学会第104年会(1984.3.29)
26. 徳永裕司, 木村俊夫, 川村次良: 高速液体クロマトグラフ法によるジヒドロエルゴタミンの定量
第20回全国衛生化学技術協議会(1983.9.30)
27. 徳永裕司, 木村俊夫, 川村次良: 高速液体クロマトグラフ法による生合成及び天然ヒト成長ホルモンの分離
日本薬学会第104年会(1984.3.29)
28. 谷本 剛, 福田秀男, 木村俊夫, 川村次良: 国立衛生試験所カリジノゲナーゼ標準品の制定について
第20回全国衛生化学技術協議会年会(1983.9.30)
29. 中尾ますみ*, 山田 晃*, 田中千秋*, 谷本 剛, 福田秀男: オキサゾール誘導体による家兎水晶体アルドース還元酵素の阻害作用
日本薬学会第104年会(1984.3.29)
-
- * 大阪薬科大学
30. 小林典裕*, 細田 宏*, 南原利夫*, 沢田純一, 寺尾允男: モノクローナル抗ステロイド抗体 I. 抗11-デオキシコルチゾール抗体の調製
日本薬学会第104年会(1984.3.30)
-
- * 東北大学薬学部
31. 池淵秀治, 寺尾允男, 山根靖弘*: 鉛投与により誘導される鉛結合たん白の性質について
日本薬学会第104年会(1984.3.30)
-
- * 千葉大学薬学部
32. 沢田純一, 寺尾允男: 一次免疫応答後期における **Interleukin 2 (IL2)** の役割
第13回日本免疫学会総会(1983.12.9)

33. 手島玲子, 池淵秀治, 寺尾允男: ラット好塩基球細胞膜の Ca^{2+} 依存性タンパクリン酸化反応について
日本薬学会第104年会 (1984. 3. 29)
34. 野口 衛: ^{13}C NMR を用いるベルベリン-グリチルリチネートの構造解析
日本生薬学会第30年会 (1983. 10. 25)
35. 野口 衛: 生薬及び漢方製剤の理化学的品質評価をめぐる 2, 3 の課題について
第12回生薬分析討論会 (1983. 7. 26)
36. 関田節子, 尾崎幸紘, 鈴木英世, 原田正敏: 駆瘀血生薬の薬理効果 (第2報) 川芎の中樞性筋弛緩作用について
日本薬学会第104年会 (1984. 3. 28)
37. 尾崎幸紘, 原田正敏: インドネシア薬用植物 (*Curcuma* 属) 含有精油成分の胆汁分泌作用
第57回日本薬理学会総会 (1984. 3. 23)
38. 大場琢磨, 辻 楠雄, 中村晃忠, 新谷英晴, 水町彰吾, 菊池 寛, 鹿庭正昭, 小嶋茂雄, 叶多謙蔵, 川崎 靖, 降矢 強, 松本清司, 戸部満寿夫: N 社透析器による眼障害事故の原因究明について
第21回日本人工臓器学会大会 (1983. 9. 15)
39. 辻 楠雄, 菊池 寛, 新谷英晴, 大場琢磨, 安居茂夫*: 医療用具の残留エチレンオキサイドに関する研究 (第10報) ヘッドスペース法を用いた自動分析装置によるエチレンオキサイドの定量
第58回日本医科器械学会大会 (1983. 5. 20)
- * (徳島津製作所・東京研究所)
40. 新谷英晴, 辻 楠雄, 大場琢磨: 血清中の尿毒症成分の分別定量
第32回日本分析化学会 (1983. 10. 3)
41. 新谷英晴, 辻 楠雄, 大場琢磨: 血清中のカチオン成分の定量と前処理法
日本薬学会第104年会 (1984. 3. 28)
42. 新谷英晴, 辻 楠雄, 大場琢磨: イオン交換樹脂混床を用いた尿毒症成分の除去と電解質バランスの保持
第21回日本人工臓器学会 (1983. 9. 14)
43. 関東裕美*, 細野久美子*, 伊藤正俊*, 石原 勝*, 鹿庭正昭, 小嶋茂雄, 中村晃忠: ゴム製品中の抗原物質について
第47回日本皮膚科学会東日本学術大会 (1983. 10. 22)
- * 東邦大学
44. 早川律子*, 松永佳世子*, 請井智香子*, 大岩久美子*, 小嶋茂雄, 鹿庭正昭, 中村晃忠: ネルネマキによる Pigmented Contact Dermatitis
第74回日本皮膚科学会山口地方会 (1984. 1. 29)
- * 名古屋大学
45. 叶多謙蔵, 川瀬延也*: 2重サンプル管による高分解能 NMR
日本分析化学会第32年会 (1983. 10. 5)
- * 日本精密蝸
46. 松村年郎, 亀谷勝昭: ホルムアルデヒドによる室内空気汚染について (第4報)
第24回大気汚染学会 (1983. 11. 18)
47. 木嶋敬二, 斎藤恵美子, 義平邦利: HPLC による化粧品用タール色素の分析 (III) アゾ系などに含有する未反応中間体などの分離定量
日本薬学会第104年会 (1984. 3. 29)
48. 原田裕文*, 木嶋敬二, 岩倉良平*, 澤村邦夫*, 西島 靖*, 能崎章輔*, 平松 功*, 広田 博*, 藤山喜雄*, 視 照雄*: 化粧品試験法
日本薬学会第104年会 (1984. 3. 28)
- * 日本薬学会 衛生試験法部会 化粧品試験法ワーキンググループ
49. 木嶋敬二, 斎藤恵美子, 義平邦利: HPLC による化粧品用タール色素の分析 (II) タール色素の規格と未反応中間体トルイジン類の定量
第20回全国衛生化学技術協議会年会 (1983. 9. 30)
50. 佐谷戸安好, 中室克彦: 含窒素化合物の塩素化合物によるクロロピクリンの生成
第10回環境汚染物質とそのトキシコロジーシンポジウム (1983. 10. 21)

51. 近藤 稔*, 土岡松男*, 大竹正一*, 小田切芳典*, 佐谷戸安好, 中室克彦: 前橋市付近の地下水水質の地域特性
第38回関東水道衛生協議会(1983. 11. 18)
* 前橋市水道局
52. 安藤正典, 松井啓子, 佐谷戸安好: 水中全有機ハロゲン化合物(TOX)の分析法に関する研究
日本薬学会第104年会(1984. 3. 29)
53. 佐谷戸安好, 中室克彦, 入口政信*, 石塚美恵子*, 佐野 仁*, 原田忠彦*: 鶴見川におけるトリハロメタンと全有機ハロゲン化合物及びこれら生成原因物質の動態
日本薬学会第104年会(1984. 3. 29)
* 川崎市衛生研究所
54. 中室克彦, 小山恵理子, 佐谷戸安好: フミン酸のオゾン処理による反応生成物の生成特性
第35回全国水道研究発表会(1984. 5. 9)
55. 沢村良二*, 佐谷戸安好, 中室克彦, 土屋悦輝*, 梶野勝司*, 永井勉夫*: 残留塩素・DPDによる定量法
日本薬学会第104年会(1984. 3. 28)
* 日本薬学会 衛生試験法部会 水質試験法ワーキンググループ
56. 内山貞夫, 斎藤行生, 内山 充: マイコトキシンの蛋白質バインディング. オクラトキシンAの結合性と抽出効率について
日本食品衛生学会第46回学術講演会(1983. 10. 13)
57. 内山貞夫, 斎藤行生, 内山 充: オクラトキシンAとヒト血清アルブミンとの結合性について
日本薬学会第104年会(1984. 3. 29)
58. 武田由比子, 内山貞夫, 斎藤行生, 内山 充, 小沼博隆, 倉田 浩: クロロフィル含有食品(各種漬物)中の光過敏症原因物質, ピロフェオホルバイド, フェオホルバイドの実態とその成因について
日本食品衛生学会第46回学術講演会(1983. 10. 13)
59. 斎藤行生, 武田由比子, 内山貞夫, 内山 充: 酸性条件下におけるクロロフィルの分解について
日本薬学会第104年会学術講演会(1984. 3. 29)
60. 川崎洋子, 山崎 壮, 山本 都, 山田 隆, 谷村 顕雄: たらこの亜硝酸処理とニトロソアミン量について
第47回日本食品衛生学会(1984. 5. 17)
61. 神蔵美枝子, 中里圭子, 谷村顕雄: グリチルリチン酸の摂取量に関する研究
日本食品衛生学会第46回学術講演会(1983. 10. 14)
62. 小沼博隆, 倉田 浩, 尾上洋一*: 新しく考案したFour Compartments Flat Agar Plateのスパイラルシステムへの応用
日本食品衛生学会第46回学術講演会(1983. 10. 13)
* 神奈川衛生研究所
63. 今野純夫*1, 旅田一衛*2, 武政二郎*3, 吉田幸紀*4, 藤野訓男*5, 重久 保*6, 尾上洋一*7, 徳丸雅一*8, 小久保弥太郎*9, 品川邦汎*10, 小沼博隆, 倉田 浩: 食肉及び食肉製品中の黄色ブドウ球菌の汚染実態と分離菌株のエンテロトキシン産生について
日本食品衛生学会第46回学術講演会(1983. 10. 13)
*1 仙台市衛生試験所
*2 大阪府公衆衛生研究所
*3 財団法人 日本油料検定協会総合分析センター
*4 和歌山市衛生研究所
*5 岩手県衛生研究所
*6 日本ハム中央研究所
*7 神奈川衛生研究所
*8 埼玉県衛生研究所
*9 東京都立衛生研究所
*10 岩手大学
64. Hiroshi KURATA: Significance of the Food Survey for Food-borne Fungi and Mycotoxins implicating Mycotoxicosis in Human.
1st International Symposium on Chemobiodynamics, Chiba, Sept. 5-6, 1983
日本食品衛生学会第46回学術講演会(1983. 10. 13)
65. 尾上洋一*1, 旅田一衛*2, 武政二郎*3, 吉田幸紀*4, 今野純夫*5, 重久 保*6, 徳丸雅一*7, 小久保弥太郎*8, 藤野訓男*9, 品川邦汎*10, 小沼博隆, 倉田 浩: 食肉及び食肉製品から分離したセレウス菌の性状, 型別及び下痢原性毒について

日本食品衛生学会第46回学術講演会(1983. 10. 13)

- *1 神奈川県衛生研究所
- *2 大阪府公衆衛生研究所
- *3 財団法人 日本油料検定協会総合分析センター
- *4 和歌山市衛生研究所
- *5 仙台市衛生試験所
- *6 日本ハム中央研究所
- *7 埼玉県衛生研究所
- *8 東京都立衛生研究所
- *9 岩手県衛生研究所
- *10 岩手大学

66. 小沼博隆, 倉田 浩, 尾上洋一*: 新しく考案した4分画フラット寒天平板のスパイラルシステムへの応用
食品衛生微生物研究会第4回学術講演会(1983. 11. 17)

* 神奈川県衛生研究所

67. 品川邦汎*1, 旅田一衛*2, 武政二郎*3, 吉田幸紀*4, 今野純夫*5, 藤野訓男*6, 重久 保*7, 尾上洋一*8, 徳丸雅一*9, 小久保弥太郎*10, 小沼博隆, 倉田 浩: 食肉・食肉製品中の黄色ブドウ球菌・セレウス菌の汚染実態と分離菌株の毒素原性について
食品衛生微生物研究会第4回学術講演会(1983. 11. 17)

- *1 岩手大学
- *2 大阪府公衆衛生研究所
- *3 財団法人 日本油料検定協会総合分析センター
- *4 和歌山市衛生研究所
- *5 仙台市衛生試験所
- *6 岩手県衛生研究所
- *7 日本ハム中央研究所
- *8 神奈川県衛生研究所
- *9 埼玉県衛生研究所
- *10 東京都立衛生研究所

68. 小沼博隆, 徳丸雅一*: 基本構想をふまえた微生物規格設定のためのフローチャートとその演習
食品衛生微生物研究会第4回学術講演会(1983. 11. 17)

* 埼玉県衛生研究所

69. 棚林 清*, 品川邦汎*, 松坂尚典*, 小沼博隆, 倉田 浩: ブドウ球菌エンテロトキシンFの精製と各種材料由来ブドウ球菌エンテロトキシン産生
日本獣医学会第96回学術講演会(1983. 6. 25)

* 岩手大学

70. 安形則雄*1, 品川邦汎*2, 尾上洋一*3, 小沼博隆: 各種由来セレウス菌の生化学性状・血清型及び毒素原性について
日本獣医学会第97回学術講演会(1984. 4. 9)

- *1 名古屋市衛生研究所
- *2 岩手大学
- *3 神奈川県衛生研究所

71. Shun-ichi UDAGAWA: **Taxonomy of Mycotoxin-producing Chaetomium.**
3rd International Mycological Congress, Tokyo, Aug. 30-Sept. 3, 1983

72. Shun-ichi UDAGAWA: **Taxonomy of Thermophilic and Thermotolerant Fungi in a Recent Development.**
1st International Symposium on Chemobiodynamics, Chiba, Sept. 5-6, 1983

73. Seiichi UEDA* and Shun-ichi UDAGAWA: **Mycoflora Study of Brackish and Marine Sediments in Nagasaki, Japan**
3rd International Mycological Congress, Tokyo, Aug. 30-Sept. 3, 1983

* Nagasaki Prefectural Institute of Public Health & Environmental Sciences

74. 川島愛雄*1, 河村洋一*1, 高島一郎*1, 北村清隆*2, 福代良一*3, 小林博人*3, 宇田川俊一: **Dactylaria gallopava** による皮下膿瘍
第27回日本医真菌学会総会(1983. 10. 16)

- *1 石川県立中央病院皮膚科, 血液内科
- *2 国立金沢病院皮膚科
- *3 金沢医科大学皮膚科

75. 河村洋一*1, 高島一郎*1, 川島愛雄*1, 北村清隆*2, 福代良一*3, 宇田川俊一: 真菌 **Dactylaria gallopava** 感染を合併した急性骨髄性白血病の1例
第25回日本臨床血液学会総会(1983. 10. 29)

- *1 石川県立中央病院血液内科, 皮膚科
- *2 国立金沢病院皮膚科
- *3 金沢医科大学皮膚科

76. Masakatsu ICHINOE, Shigeru UCHIYAMA*1, Ryuji AMANO*2 and Hiroshi KURATA: **Trichothecenes-producing Fusarium in Barley and Wheat in Japan**

International Mycotoxin Symposium, Sydney, Australia, Aug. 12-15, 1983

*¹ Research Lab., Zenyaku Kogyo Co.

*² National Consumer Information Center

77. Masakatsu ICHINOE, Hideki HAGIWARA and Hiroshi KURATA: **Distribution of Trichothecene-producing Fungi in Barley and Wheat Fields in Japan**

3rd International Mycological Congress, Tokyo, Aug. 30-Sept. 3

78. 一戸正勝: 赤カビ中毒とトリコテセン系マイコトキシン

昭和58年度日本菌学会関東談話会 (1984. 3. 17)

79. 斉藤隆夫*, 高橋俊江*, 小山清隆*, 名取信策*, 宇田川俊一, 関田節子: **Chaetomium 属より産生される Epipolythiodioxopiperazine 系化合物に関する研究 I**

日本薬学会第104年会 (1984. 3. 29)

* 明治薬科大学

80. 小島満子: ポルトガルにおける酵母の分類と同定に関する国際研修会

昭和58年度日本菌学会関東談話会 (1984. 3. 17)

81. 土屋利江, 田中 彰, 山羽 力: **チアベンダゾール (TBZ) の妊娠マウスによる体内動態について**

日本食品衛生学会第46回学術講演会 (1983. 10. 13)

82. 土屋利江, 田中 彰, 福岡正道, 山羽 力: **Thiabendazol のマウスにおける代謝及び生体に及ぼす影響について**

日本薬学会第104年会 (1984. 3. 29)

83. 嶺岸謙一郎, 福岡正道, 山羽 力: **デヒドロ酢酸のマウスにおける代謝**

日本食品衛生学会第47回学術講演会 (1983. 5. 17)

84. 福岡正道, 田中 彰, 佐藤道夫, 山羽 力: **ベンゾチアジルスルフェンアミド系加硫促進剤の代謝 II. チアゾール環の2位硫黄原子の由来について**

日本薬学会第104年会 (1984. 3. 29)

85. 田中 彰, 福岡正道, 山羽 力: **¹⁴C- 及び ³⁵S- 標識加硫促進剤の合成研究 メルカプトベンゾチ**

アゾール系化合物の合成

日本薬学会第104年会 (1984. 3. 29)

86. 紅林秀雄, 田中 彰, 南原精一, 福岡正道, 山羽力, 伊藤隆太*: **2-Nitro-p-cresol のラットによる吸収, 排泄, 分布, 及び代謝**

日本薬学会第104年会 (1984. 3. 29)

* 東邦大学医学部薬理学教室

87. Kazushige MORIMOTO and Tsutomu YAMAHARA: **Interaction of Bis- and Mono-N-nitroso-ureas with Rat Liver Chromatin in vitro**

Eighth International Meeting on N-nitroso compounds: Occurrence and Biological Effects, Banff, Canada (1983. 9. 8)

88. 森本和滋, 田中 彰, 山羽 力: **in vitro における 1-n-Propyl-1-nitroso-urea (PNU) と DNA との反応**

第42回日本癌学会総会 (1983. 10. 26)

89. 田中 彰, 町田豊平*, 三木 誠*, 柳沢宗利*, 倉内洋文*, 島田 作*: **腎診断薬の開発に関する研究 (第8報) 新しい診断薬, Tc99m-DMP の前臨床的研究**

第23回日本核医学会総会 (1983. 9. 23)

* 東京慈恵会医科大学泌尿器科

90. 倉内洋文*, 町田豊平*, 三木 誠*, 田中 彰, 大石幸彦*, 木戸 晃*, 上田正山*, 柳沢宗利*, 島田 作*: **新しい腎診断薬 Dimercaptopropionic acid (DMP) の臨床応用**

第23回日本核医学会総会 (1983. 9. 23)

* 東京慈恵会医科大学泌尿器科

91. 関沢 純, 加納直子: **環境汚染物質の毒性データのオンライン検索について**

第20回全国衛生化学技術協議会年会 (1983. 9. 30)

92. 矢崎扶美子*, 林 真, 中館正弘: **オンラインによる小核試験の文献検索について**

日本薬学会第104年会 (1984. 3. 30)

* 日本公定書協会

93. 加納直子, 関沢 純: **RTECS のオンラインによる毒性データの検索**

日本薬学会第104年会 (1984. 3. 30)

94. 松本清司, 落合敏秋, 関田清司, 川崎 靖, 降矢 強: マーモセットの血球について
第18回日本実験動物学会 (1983. 8. 25)

95. 中浦慎介, 田中 悟, 川島邦夫, 高仲 正, 大森 義仁: エチルフェニルジチオカルバミン酸亜鉛のラット胎仔毒性について
第10回日本毒科学会学術年会 (1983. 7. 25)

96. 川島邦夫, 田中 悟, 中浦慎介, 長尾重之, 遠藤 任彦, 小野田欽一, 高仲 正, 大森義仁: リン酸トリエステル系防炎加工剤の妊娠期投与によるラット胎仔及び出産仔の発育に及ぼす影響
第10回日本毒科学会学術年会 (1983. 7. 25)

97. 大野泰雄, Kari Ormstad*, Sten Orrenins*: 肝単離細胞による Cyclophosphamide 毒性発現機構の研究
第57回日本薬理学会総会 (1984. 3. 24)

* カロリンスカ研究所法医学

98. 井上和秀, 藤森観之助, 溝上敬之助, 篠内桃子, 高仲 正, 大森義仁: ラット胎仔肝ミクロゾームによるアミノピリン代謝パターンの特異性
第57回日本薬理学会総会 (1984. 3. 26)

99. 篠内桃子, 溝上敬之助, 藤森観之助, 井上和秀, 高仲 正, 大森義仁: 胎仔肝におけるヘム合成と分解の特性について—3-Methylcholanthrene と Cobalt chloride の影響—
日本薬学会第104年会 (1984. 3. 30)

100. 川西 徹, 大野泰雄, 高橋 惇, 高仲 正, 大森 義仁, 今野りん子*: ラット肝ミクロゾームによるニトロソアミン類の脱アルキル化反応に及ぼす各種阻害剤の影響
日本薬学会第104年会 (1984. 3. 30)

* 共立薬大

101. 前川昭彦, 荻生俊昭, 小野寺博志, 谷川広行*, 黒川雄二, 高橋道人, 林 裕造, 中館正弘: 低用量のエチルニトロソ尿素 (ENU) のラットにおける発癌性に関する研究
第42回日本癌学会総会 (1983. 10. 25)

* 森下製薬株式会社

102. 立松正衛*¹, 降旗千恵*², 勝山 努*³, 白井智之*¹, 小木曾 正*¹, 高橋道人, 松島泰次郎*², 伊東 信行*¹: ラット MNNG 胃癌発生過程における腸上皮化生の発癌病変としての意義
第42回日本癌学会総会 (1983. 10. 25)

*¹ 名市大第一病理

*² 東大・医科研・癌生物

*³ 信大・医・2病

103. 高橋道人, 古川文夫, 林 裕造, 高橋正一*, 長瀬すみ*: N-Nitrosobis (2-oxopropyl) amine (BOP) によるハムスターの膵臓癌モデルにおける腭型アミラーゼの変動と膵臓病変について
第42回日本癌学会総会 (1983. 10. 25)

* 佐々木研・生化

104. 高橋道人, 黒川雄二, 小久保 武, 古川文夫, 宮川義史, 林 裕造: 皮膚2段階発癌モデルを用いたアミノ酸加熱分解物のイニシエーション作用
第42回日本癌学会総会 (1983. 10. 25)

105. 高橋道人, 小久保 武, 古川文夫, 黒川雄二, 林 裕造: 実験胃癌モデルによる胃癌プロモーターの検索—食塩, サッカリン, その他のプロモーター作用について
第42回日本癌学会総会 (1983. 10. 25)

106. 高橋道人, 小久保 武, 古川文夫, 岸本嘉夫*, 前川昭彦, 林 裕造: チラムの癌原性試験における自然発生白血病の抑制効果について
第42回日本癌学会総会 (1983. 10. 25)

* 塩野義製薬株式会社油日ラボラトリーズ

107. 小久保 武, 高橋道人, 古川文夫, 宮川義史, 岸本嘉夫*, 林 裕造: 単一回静注によるアドリアマイシンのラットにおける毒性
第42回日本癌学会総会 (1983. 10. 25)

* 塩野義製薬株式会社油日ラボラトリーズ

108. 小久保 武, 高橋道人, 林 裕造: モノクロタリン投与による実験的肺高血圧症モデルを用いた肺血管病変の解析
第72回日本病理学会総会 (1983. 4. 6)

109. 黒川雄二, 高橋道人, 林 裕造: MNNG 経口投与によるマウス小腸腫瘍の発生とそれに対する高食塩食の促進効果について
第72回日本病理学会総会 (1983. 4. 6)
110. 今井田克己*, 白井智之*, 福島昭治*, 伊東信行*, 高橋道人: 全身性転移のみられた脳室上衣腫の1剖検例
第72回日本病理学会総会 (1983. 4. 6)
- * 名市大第一病理
111. 高橋道人: 発癌の促進と抑制
第1回産業医科大学学会総会学術講演会 (1983. 4. 23)
112. 前川昭彦, 小野寺博志, 谷川広行*, 林 裕造: 長期飼育 Sic: Wistar Rat における自然発生腫瘍について
第42回日本癌学会総会 (1983. 10. 5)
- * 森下製薬株式会社
113. 小野寺博志, 谷川広行*, 前川昭彦, 黒川雄二, 林裕造: 臭素酸カリウムの短期投与によるラット近位尿管の変化について
第42回日本癌学会総会 (1983. 10. 5)
- * 森下製薬株式会社
114. 津吉 俊*1, 片桐 稔*2, 坂野安生*1, 林 真, 祖父尼俊雄, 石館 基: *In vitro* 小核試験に関する研究 化学物質スクリーニング法への適用性について
第12回日本環境変異原学会 (1983. 10. 28)
- *1 四天王寺国際仏教大学
*2 兵庫医大
115. 祖父尼俊雄, 畑中みどり, 石館 基: スーパーオキシド発生系における染色体異常誘発
第12回日本環境変異原学会 (1983. 10. 28)
116. 吉川邦衛, 宮田ルミ子, 石館 基: Myeloperoxidase-Halide-Hydrogen Peroxide 系による活性酸素のサルモネラ菌に対する突然変異原性
第12回日本環境変異原学会 (1983. 10. 29)
117. 能美健彦, 吉川邦衛, 石館 基, 平塚 明*, 渡部烈*: フェナセチン・ブセチンの代謝活性化と変異原性
第12回日本環境変異原学会 (1983. 10. 29)
- * 東京薬大
118. 沢田 稔, 祖父尼俊雄, 石館 基: 哺乳動物細胞における 1,1-Dichloroethylene の変異原性
第12回日本環境変異原学会 (1983. 10. 29)
119. 林 真, 祖父尼俊雄, 石館 基: マウス骨髄における小核の生成機構
第12回日本環境変異原学会 (1983. 10. 29)
120. 能美健彦, 石館 基, 渡部 烈*: フェナセチン, ブセチンの代謝的活性化機構
日本薬学会第104年会 (1984. 3. 28)
- * 東京薬大
121. 伊阪 博, 榎谷真美, 柴田 正, 加納晴三郎: 高速液体クロマトグラフィーによるプロプラノロールの光学分割
第33回日本薬学会近畿支部大会 (1983. 11. 13)
122. 中原 裕, 岡田敏史, 加納晴三郎: ミセル系におけるリパーゼ活性 III.
第33回日本薬学会近畿支部大会 (1983. 11. 13)
123. 長谷川隆一, 川崎浩之進, 加納晴三郎: 細菌内毒素による家兔の末梢血管透過性因子について
日本薬学会第104年会 (1984. 3. 28)
124. 外海泰秀, 伊藤蒼志男, 原田基夫: ヘッドスペース・GC 法による各種揮発性アミンの分別定量法
日本食品衛生学会第46回学術講演会 (1983. 10. 13)
125. 豊田正武, 伊藤蒼志男, 原田基夫: 50%溶血量による市販フライ食品の評価と他の化学指標との関係について
日本食品衛生学会第46回学術講演会 (1983. 10. 13)
126. 外海泰秀, 辻 澄子, 伊藤蒼志男, 原田基夫: 食品中の各種天然ワックスの系統的分析法
日本食品衛生学会第47回学術講演会 (1984. 5. 18)
127. 四方田千佳子, 豊田正武, 伊藤蒼志男, 原田基夫: 食品中の線維素グリコール酸 (CMC) の分析法の改良
日本食品衛生学会第47回学術講演会 (1984. 5. 18)

128. 原田基夫, 井上たき子: シリコーンゴム中の有機過酸化物及びその分解物の残存について
第20回全国衛生化学技術協議会年会 (1983. 9. 30)
129. 中村恵三, 原田基夫: 高速液体クロマトグラフィーによるカルバリル (NAC), チョファネートメチル (TPM), ベノミル (BM), MBC の系統的残留分析法の検討
第20回全国衛生化学技術協議会年会 (1983. 9. 30)
130. 小室徹雄, 村井敏美, 小川義之, 川崎浩之進, 加納晴三郎: 発熱物質 (LPS) の新調製法とその物性並びに薬理学的特性, 4. Phenol あるいは TCA により抽出した LPS の活性の比較
第57回日本薬理学会総会 (1984. 3. 26)
131. 小川義之, 江馬 真, 川崎浩之進, 加納晴三郎: 薬物の胎仔毒性に関する薬理学的研究 (VII) Trypan blue の催奇形性と変異原性について
第57回日本薬理学会総会 (1984. 3. 26)
132. 伊丹孝文, 加納晴三郎: 薬物の胎仔毒性の発現機序 (IX) 胎仔血清蛋白質のアスピリン及びサリチル酸結合性について
第64回日本薬理学会近畿部会 (1983. 12. 6)
133. 江馬 真, 村井敏美, 伊丹孝文, 加納晴三郎: 薬物の胎仔毒性の発現機序 (VIII) ラットにおける Trypan blue の投与方法による催奇形性の差について
第23回日本先天異常学会総会 (1983. 7. 12)
134. 熊谷健夫, 沢井清道, 畠山好雄, 本間尚治郎, 山岸 喬*, 西沢 信*: シャクヤク選抜系統の特性比較
日本生薬学会第30回年会 (1983. 10. 25)
- * 北海道立衛生研究所
135. 畠山好雄, 熊谷健夫, 三浦忠一: カラスビシャクの栽培研究 1 増殖法
生薬の栽培と品質に関する研究会 (1984. 3. 10)
136. 佐竹元吉, 飯田 修: ジュズダマ属生薬の研究 (第2報) (第3報)
日本薬学会第104年会 (1984. 3. 29~30)
137. 堀超 司, 玉置克巳: キハダの栽培に関する研究 (6) タイワンキハダの接木について
日本生薬学会第30回年会(徳島) (1983. 10. 26)

所員の研究、試験及び検査に関する発表を主とする「衛試例会」は、昭和26年から原則として毎月第2火曜日、本所講堂において開催されているが、昭和58年度に行った演題は次のとおりである。

第250回(昭和58年4月12日)

1. 肝癌プロモーター作用検索における計測的解析の意義について

病 理 部 °古 川 文 夫
宮 川 義 史
岸 本 嘉 夫
小久保 武
高 橋 道 人
林 裕 造

2. エチレンビスニトロソ尿素の免疫担当細胞に及ぼす影響について

放射線化学部 °手 島 玲 子

3. 市販冷蔵食品から分離した低温酵母のタンパク・脂肪分解能、及び酵母に関するユネスコプログラム(ボルトガル)に参加して

衛生微生物部 °小 島 満 子

4. トリブチルホスフェート投与ラットの尿中代謝物の検索

食 品 部 °鈴 木 隆
佐々木 久美子
武 田 明 治
内 山 充

第251回(昭和58年5月10日)

1. HPLCによる化粧品用アントラキノン系タール色素中の未反応中間体の分析

環境衛生化学部 °木 嶋 敬 二
齊 藤 恵美子
義 平 邦 利

2. モノクロタリン投与による実験的肺高血圧症モデルを用いた肺血管病変の解析

病 理 部 °宮 川 義 史
古 川 文 夫
岸 本 嘉 夫
小久保 武
高 橋 道 人
林 裕 造

3. MNNG 経口投与によるマウス小腸腫瘍の発生とそれに対する高食塩食の促進効果について

病 理 部 °大 野 裕 子
高 村 直 子

今 沢 孝 喜

黒 川 雄 二

4. 薬物代謝酵素チトクロム P450 モデル反応

合成化学研究部 °宮 田 直 樹

5. インドメタシンカプセル製剤の Bioavailability

薬 品 部 °青 柳 伸 男
緒 方 宏 泰
鹿 庭 なほ子

第252回(昭和58年6月14日)

1. メトロニダゾール糖衣錠の Bioavailability とヒト胃液酸性度

薬 品 部 °緒 方 宏 泰
青 柳 伸 男
鹿 庭 なほ子

2. チラムの癌原性試験における自然発生白血病の抑制結果について

病 理 部 °岸 本 嘉 夫
古 川 文 夫
宮 川 義 史
小久保 武
高 橋 道 人
林 裕 造

3. 強制経口及び混餌投与による薬物の毒性発現の差異について

毒 性 部 °会 田 喜 崇

4. 室内空気中のホルムアルデヒド濃度について

環境衛生化学部 °松 村 年 郎
亀 谷 勝 昭

5. 食品中の安定ヨウ素分析法

環境衛生化学部 °亀 谷 勝 昭
松 村 年 郎

第253回(昭和58年7月12日)

1. トリ置換 N-ニトロソ尿素化合物の分解反応—トリアツェン類及びニトロ化合物の生成—

合成化学研究部 °末 吉 祥 子
丹 野 雅 幸

2. エトキシキンの光化学変化及び酸化成績体に関する高速液体クロマトグラフィー

食品添加物部 °加 藤 三 郎

3. 医療用具の残留エチレンオキサイドに関する研究(第10報)

ヘッドスペース法を用いた自動分析装置によるエチレンオキサイドの定量

療 品 部 °辻 楠 雄

菊池 寛
新谷 英晴
大場 琢磨

4. 高濃度ソルビン酸を長期投与したマウスにおける腸管内変異原の生成と肝グルタチオンの減少について

医化学部 °土屋利江
山羽 力

5. 一次免疫応答の後期段階の解析及びリンホカインの役割

放射線化学部 °沢田純一

第254回(昭和58年9月13日)

1. 高速液体クロマトグラフィーによるインシュリンの分析(Ⅲ)

インシュリン製剤の定量

生物化学部 °太田美矢子

2. 1,3-ジアリル-1-ニトロソ尿素の抗 AH13 作用機構について

合成化学研究部 °宮原美知子

3. カルボキシメチル尿素による雌性ドンリュウラット小腸及び乳腺腫瘍の発生

病理部 °谷川広行
小野寺博志
松岡千明
古田京子
荻生俊昭
前川昭彦

4. エチルフェニルジチオカルバミン酸亜鉛の妊娠期投与における母ラット、胎仔及び出産仔の発育に及ぼす影響

薬理部 °中浦棋介

5. 新しい腎診断薬 ^{99m}Tc-DMP の基礎及び前臨床的研究

—放射性腎診断薬の開発とその歴史的考察—

医化学部 °田中彰

第255回(昭和58年10月11日)

1. 生薬成分の定量用標準品 Paeniflorin について

生薬部 °鈴木英世
関田節子
原田正敏

2. 製剤の胃痛過速度に及ぼす粒子径, 比重, 食餌の影響

薬品部 °鹿庭 幸子
青柳 伸男
緒方 泰
江島 昭

3. Slc: Wistar ラットの自然発生腫瘍について

病理部 °小野寺博志
古田京子
前川昭彦
毒性部 児玉幸夫
堀内茂友

4. リン酸トリエステル系消炎加工剤の妊娠期投与によるラット胎仔及び出産仔の発育に及ぼす影響

薬理部 °川島邦夫

5. ベンゾチアジルスルフェンアミド系加硫促進剤の代謝研究

医化学部 °福岡正道
田中彰

第256回(昭和58年11月8日)

1. マーモセットの血球の性状について

毒性部 °松本清司

2. 薬物の胎仔毒性の発現機序(Ⅷ)

ラットにおける Trypan blue の投与方法による催奇形性の差について

大阪支所薬理微生物部 °江馬真

3. *in vitro* における 1-n-propyl-1-nitrosourea (PNU) と DNA との反応

医化学部 °森本和滋
田中彰
山羽力

4. 肝、腎単離細胞を用いたアリルアルコール (AA) の毒性発現機構の研究

薬理部 °大野泰雄

第257回(昭和58年12月13日)

1. フェナセチン・ブセチンの代謝活性化と変異原性

変異原性部 °能美健彦
吉川邦衛
石館基
東京薬科大 平塚明
渡部烈

2. 我国における各種食品添加物の1日摂取量調査に関する研究

大阪支所食品部 °豊田正武

3. パルピツール酸誘導体の逆相系における保持比と構造との関係

薬品部 °松田りえ子

4. 構造異型からみたラット腺胃腫瘍性病変の解析

病理部 °古川文夫
宮川義史
岸本喜夫
小久保武

- 高橋道人
5. チアベンダゾール (TBZ) の妊娠マウスによる体内動態について

医化学部 °土屋利江
田中彰

第258回(昭和59年1月17日)

1. クロロフィル含有食品(各種漬物)中の光過敏症原因物質, ピロフェオホルバイド, フェオホルバイドの実態とその成因について

食品部 °武田由比子
内山貞夫
斎藤行生
内山充
衛生微生物部 小沼博隆
倉田浩

2. 高速液体クロマトグラフィーによるピンドロールの光学分割

大阪支所薬品部 °榊谷直美

3. 薬物担体としてのリボゾムの膜透過性に及ぼす血漿成分の影響

薬品部 °吉岡澄江

4. エキス中の消化管吸収画分の標的臓器に対する薬理作用の検定麻黄エキスの血管作動性効果

生薬部 °尾崎幸紘
原田正敏

5. 活性酸素発生系における染色体異常

変異原性部 °祖父尼俊雄

第259回(昭和59年2月14日)

1. マイコトキシンの蛋白質バインディングオクシラトキシンAの結合性と抽出効率について

食品部 °内山貞夫
斎藤行生
内山充

2. トリパンプルー及びその関連化合物の催奇形性と変異原性

—トリパンプルー標品に混在する赤色附随色素の分離とその変異原性—

大阪支所薬理微生物部 °小川義之
川崎浩之進

3. 細菌内毒素による Aspirin の胎仔毒性増強機構

大阪支所薬理微生物部 °伊丹孝文
加納晴三郎

4. 亜硝酸と薬物の相互作用 (VII)

マウス体内でのニトロソジメチルアミン生成量の定量的測定の試み

薬理部 °川西徹

5. N-Ethyl-N-hydroxynitrosamine (EHEN) によるラット腎腫瘍発生に対する臭素酸カリウムの増強効果

病理部 °黒川雄二
大野裕子
今沢孝喜
高村直子

6. N-nitrobis(2-oxopropyl)amine (BOP) によるハムスターの膀胱癌モデルにおける腺型アミラーゼの変動と膀胱病変について

病理部 °岸本嘉夫
高橋道人
古川文夫
宮川義史
林裕造

第260回(昭和59年3月13日)

1. 1,1-ジクロロエチレンの染色体異常誘発性

変異原性部 °沢田稔
祖父尼俊雄
石館基

2. 単一回静注によるアドリアマイシンのラットにおける毒性

病理部 °宮川義史
古川文夫
岸本嘉夫
小久保武
高橋道人
林裕造

3. アドリアマイシンによる核の微細構造変化

病理部 °今沢孝喜
古川文夫
宮川義史
岸本嘉夫
小久保武
高橋道人
黒川雄二
林裕造

4. グリチルリチン酸の摂取量に関する研究

食品添加物部 神藏美枝子

5. N社透析器による眼障害事故の原因究明について(その1)

療品部 °辻楠雄
中村晃忠
小嶋茂雄
新谷英晴
水町彰吾

菊池寛
鹿庭正明
叫多謙蔵
大場琢磨

(その2)

毒 性 部

川崎靖
松本清
降矢強
戸部満寿夫

支 所 例 会

第69回 (昭和58年6月29日)

1. 小容量注射剤の不溶性微粒子試験について
薬 品 部 辻 澄 子
2. 改良マーケットバスケット方式, 含量実態調査方式及び, 陰膳方式による食品添加物の1日摂取量調査
食 品 部 豊 田 正 武

第70回 (昭和58年9月27日)

1. 薬物の胎仔毒性の発現機序 (Ⅷ) ラットにおける Trypan blue の投与方法による催奇形性の差について
薬理微生物部 江 馬 真
2. ミセル系におけるリパーゼ活性に関する速度論的研究
Ⅱ 基質の脂肪酸鎖長の影響
薬 品 部 中 原 裕
3. 高速液体クロマトによるカルバリル (NAC), チオファネートメチル (TPM), ベノミル (BM) 及び MBC (メチルベンズイミダゾールカルバメート) の系統的分析法の検討
食 品 部 中 村 恵 三

第71回 (昭和58年11月29日)

1. 薬物の胎仔毒性の発現機序 (Ⅸ) 胎仔血清蛋白質

のアスピリン及びサリチル酸結合性について

薬理微生物部 伊 丹 孝 文

2. ヘッドスペース GC法による魚貝類中揮発性アミン及びアンモニアの分別定量法
食 品 部 外 海 泰 秀

第72回 (昭和59年2月21日)

1. 細菌内毒素による家兎の末梢血管透過性因子について
薬 品 部 長 谷 川 隆 一
2. クロマトフォーカシングによる溶血性レンサ球菌発熱性外毒素Aの精製について
薬理微生物部 村 井 敏 美
3. 劣化フライ油の家兎赤血球の溶血及び変形に対する影響
食 品 部 豊 田 正 武

第73回 (昭和59年3月19日)

1. Phenol あるいは TCA により抽出した大腸菌由来の発熱物質 (LPS) の活性の比較
薬 品 部 小 室 徹 雄
2. 薬物の胎仔毒性に関する薬理学的研究 (Ⅶ) Trypan Blue の催奇形性の変異原性について
薬理微生物部 小 川 義 之

 特別講演会

- | | |
|---|---|
| <p>1. 昭和58年8月22日
 (1) Pathology Quality in the National Toxicology Program (NTP) Bioassay Study
 Dr. Gray Boorman
 Head, Tumor Pathology, NTP,
 U. S. A.
 (2) Studies of Chemical Disposition under National Toxicology Program
 Dr. H. B. Matthews
 Head, Chemical Disposition, NTP,
 U. S. A.</p> | <p>3. 昭和59年1月19日
 遺伝子傷害性物質の化学特性と発癌性
 ——有機化学的側面から——
 名古屋市立大学薬学部
 教授 川添 豊</p> |
| <p>2. 昭和58年11月29日
 腸内菌叢と健康
 東京大学農学部教授 光岡 知足</p> | <p>4. 昭和59年2月8日
 ビタミンDと生体
 東京工業大学理学部
 教授 池川 信夫</p> |
| | <p>5. 昭和59年3月14日
 がん発生の機構
 国立がんセンター研究所
 生物物理部長 永田 親義</p> |

 支所所内講演会

- | | |
|--|---|
| <p>1. 昭和58年2月24日
 パーソナルコンピューターについて
 大阪大学薬学部
 高木 達也</p> | <p>国立衛生試験所化学物質情報部
 加納 直子</p> |
| <p>2. 昭和58年7月5日
 文献検索について</p> | <p>3. 昭和59年2月24日
 微生物の増殖を熱測定でみる
 大阪府立大学農学部
 助教授 高橋 克忠</p> |

特別研究(厚生省)

1. 医薬品, 食品添加物等安全性評価のための新技術利用と評価基準の確立に関する研究(医化学, 毒性, 薬理, 病理, 変異原)
2. 遺伝子組換え等の新技術により生産される高分子医薬品の品質試験法の開発研究(生物, 放射線, 薬理)

国立機関原子力試験研究費(科学技術庁)

1. 放射性医薬品の品質試験法に関する研究(放射線)
2. 体内適用放射性医薬品の安全性に関する研究
 - (1) 放射性医薬品の標的臓器の生化学的機能に及ぼす影響(放射線, 食品)
 - (2) 放射性医薬品の毒性試験(毒性)
 - (3) 放射性医薬品の各種臓器に及ぼす組織学的変化に関する研究(病理)
 - (4) 放射性医薬品の突然変異原性に関する研究(変異原)
 - (5) 放射性医薬品の生体解毒機能に及ぼす影響に関する研究(薬理)
3. 標識化合物による医薬品食品添加物等の安全性を予測する *in vitro* 試験法の開発研究(医化学, 薬理, 環境)
4. 医療用資材の放射線滅菌に関する研究
 - (1) 血液回路の放射線滅菌による材質の変化とそれに対する品質改良並びに滅菌効果に関する研究(療品, 衛徴)
 - (2) 放射線照射による医薬品, 化粧品等の微生物汚染防止に関する研究(衛徴)
5. 標識化合物の利用による医薬品等の生体免疫機能に及ぼす影響に関する研究(生物, 放射線)
6. 単クローン性抗体を用いるラジオイムノアッセイの臨床分析への応用に関する研究(放射線)

放射能調査研究費(科学技術庁)

環境試料中の天然放射性核種の調査に関する研究(環境)

科学技術振興調整費(科学技術庁)

1. ネットワーク共用による化合物情報等の利用高度化に関する研究

化合物総合データベースシステムの形成に関する研究

バイオロジカルデータベース作成・検索システム(情報, 薬理, 病理, 変異原)
2. 実験動物の開発等に関する研究

実験生物の開発に関する研究

実験動物の開発と品質管理に関する研究
小型霊長類等の実験動物化と特性に関する研究

マーマセットの特性に関する研究(毒性)

3. 証・経穴の科学的実証及び生薬資源の確保に関する総合研究

(1) 漢方療法に関する研究

証に関する研究

駆瘀血剤の有用性に関する研究(生薬, 毒性, 薬理)

(2) 生薬資源の確保に関する研究

薬用植物の品質評価に関する研究(筑波)

4. 生体膜機能の解析・利用技術の開発に関する研究

(1) 特異的機能を持つ生体膜の解析・構成技術の開発

生体膜の精製技術の開発

界面活性剤の開発と使用条件の確立(放射線, 合成)

(2) 生体膜の利用技術の開発

① 反応物質等の吸収・輸送・蓄積技術の開発

生体膜の機能を利用して薬物を選択的に投与する技術の開発(薬品)

② 反応物質等の効率的な分離・濃縮技術の開発

生体膜機能を利用した生理活性物質の分離・精製技術等の開発(療品, 放射線)

5. DNA の抽出・解析・合成技術の開発に関する研究

DNA の合成技術に関する研究

有用物質等の生産に関与する DNA の合成技術の開発に関する研究

DNA の合成技術及び有用物質等の分析方法に関する研究(生物, 放射線)

6. 熱帯・亜熱帯の微生物・植物の総合的な開発利用技術に関する研究

熱帯・亜熱帯の植物資源の医薬・農薬・食糧等としての開発研究

植物の生物活性物質の医薬としての利用に関する研究(生薬)

国立機関公害防止等試験研究費(環境庁)

1. 陸水域の有機塩素化合物の分析手法に関する研

究(環境)

2. 汚染レベルを前提とする環境化学物質の安全性試験に関する研究(食添)
3. 生物質を指示剤とする環境汚染物質の監視システムに関する研究(食品)
4. 環境汚染物質の発癌促進作用の評価に関する研究(病理)
5. 大気汚染物質の哺乳動物細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響に関する研究(変異)
6. 環境汚染物質の生体機能障害に関する研究(薬理)
7. 環境汚染物質と細菌毒素との生体系における相互作用に関する研究(支所薬品, 支所食品, 支所薬徴)

環境保全総合調査研究促進調整費(環境庁)

化学物質(クロルデン)の安全性の評価に関する研究(食品, 毒性, 薬理)

厚生科学研究費補助金(厚生省)

1. GMPにおける製造工程のバリデーションの基準作成に関する研究(衛徴)
2. 動物発癌実験等の評価の方法に関する研究(病理)
3. 薬剤師教育制度に関する調査研究(食品)
4. 銅酸化物の生体に及ぼす影響に関する研究(毒性)
5. 食品中の各種汚染物質の実態に関する研究(食品)
6. 器具の試験法に関する研究(食添)
7. 食品の微生物制御のための適正技術の確立に関する調査研究(衛徴)
8. 建築物維持管理資材の衛生・安全性確保手法の策定に関する研究(環境)
9. 漢方エキス製剤の規格規準の作成に関する研究(生薬)
10. 日米科学技術協力に係る研究(センター長)
11. 食品添加物の分析における妨害物質に関する研究(食添, 支所食品)
12. 注射剤の局所刺激性に関する研究(センター長, 毒性)
13. 水産食品中の医薬品等の検査法に関する研究(食添)
14. 化学物質の吸入による気道及び肺の毒性学的研究(毒性, 合成)
15. 歯科材料の安全性評価法の確立に関する研究(療品)
16. オゴノリ類による原因不明の食中毒の解明に関

する研究(生薬, 毒性, 薬理, 食品)

17. 農薬中毒の解毒剤に関する研究(毒性)
18. 医薬品原料規格整備のための研究(合成, 薬品, 生物, 支所薬品)
19. 輸入熱帯病の治療薬に関する研究(副所長)
20. 生活環境中における家庭用品から発生する化学物質の吸入暴露に関する研究(環境)
21. バイオテクノロジーにより生産される医薬品の品質確保に関する研究(センター長, 生物, 放射線)
22. ジャコウ代替品の開発に関する研究(薬理, 毒性)
23. 高分子膜分離の方法による注射用原料水の製造に関する研究(副所長, 生物)
24. 溶出試験による内服固形製剤の品質向上に関する研究(生物, 薬品)
25. 各都道府県における食品等に係る衛生化学検査の精度管理について(食品)
26. 化粧品品の許可基準作成に関する研究(環境)
27. 抗悪性腫瘍剤の安全性に関する研究(病理)
28. 化粧品用タール色素の安全性に関する研究(環境)
29. 細胞遺伝子銀行業務における細胞株遺伝子等の品質管理検定業務に関する研究(変異原)
30. 標準品の製法及びその品質規格の設定に関する研究(薬品, 生物)
31. 不安定性医薬品の試験規格に関する研究(薬品, 生物, 支所薬品)
32. 現場における食品等の簡易試験法に関する研究(支所長, 支所食品)
33. 食品添加物生産量, 流通量, 消費量の総合的把握に関する調査研究(支所食品)

科学研究費補助金(文部省)

1. 化学物質の機能的発達過程に及ぼす影響に関する行動薬理学的研究(薬理)
2. 合成黄体ホルモンによる性分化異常の発現機構に関する研究(合成)
3. 生体膜タンパクリン酸化機構に及ぼす薬毒性に関する研究(放射線)
4. ラット胎仔中枢神経系の発達に及ぼすエチルアルコール母体投与の影響(薬理)
5. 発癌における常在微生物の役割究明と Gnotobiotte の利用(衛徴)
6. 発癌プロモーターとその抑制因子に関する研究(病理)
7. 複数癌原因因子の相互作用(病理)

8. N-ニトロソ化合物の構造, 代謝と標的臓器相関 (病理)
 9. 胃癌の発生に関する研究 (病理)
 10. マイコトキソンの化学的定量分析とその応用 (食品)
 11. 微量元素のバイオキネティクス (食品)
 12. がん研究のための実験動物の維持と開発 (病理)
 13. 薬物及び環境要因の継代的影響に関する研究 (センター長)
 14. 白血病リンパ腫発生における骨髄と胸腺の相互作用 (病理)
 15. 原子爆弾の放射線の染色体異常による線量推定 (変異原)
 16. 小型ウサギ日動物の実験動物化とバイオメデカル研究分野における有用性の研究 (毒性)
 17. 食中毒の診断方法に関する研究—特に毒素検出法について— (衛徴)
- がん研究助成金 (厚生省)
1. 国産穀類のマイコトキソンの汚染実態と汚染原因菌の生体学的検討 (衛徴)
 2. 環境化学物質の動物発癌試験に関する研究の総括並びに癌原性評価に関する研究 (病理, 薬品, 食添)
3. ヒトがんの第一次予防に関するインシエーター／プロモーターによる発がん実験 (病理)
 4. アルコールと食塩の発癌プロモーター作用の肝癌発生に及ぼす影響 (病理)
 5. ヒトの多重癌の実態と要因に関する研究 (病理)
 6. ヒトの内因性ニトロソ発がん物質及び食品中のニトロソ化される物質の研究 (センター長, 医化)
 7. 飲料水中及び大気中の発癌物質汚染に関する研究 (食品, 環境)
- その他
1. 生乳及び脱脂粉乳中の毒素原性細菌 (黄色ブドウ球菌・セレウス菌) の汚染実態について (衛徴) 三島海雲記念財団
 2. 医薬品の規格及び試験法に関する研究 (薬品, 生物) 日本公定書協会
 3. 食肉製品に含まれる不揮発性ニトロソ化合物に関する研究 (食添) 伊藤記念財団
 4. 食肉及び食肉製品中の黄色ブドウ球菌及びセレウス菌のエントロトキシン産生に及ぼす影響について (衛徴) 伊藤記念財団

国家検定及び検査等の処理状況

Survey of The Results of National Tests

昭和58年度における検定及び検査等の処理状況は次のとおりである。

国家検定については、総件数で前年度に比べて6.0%(117件)の減少となった。

検定品目別では、ブドウ糖注射液が11.2%(181件)の減少となったが他の品目は若干増加した。

次に、輸入食品検査及び特別行政試験は前年度に比

して、8.1%、29.4%の減少となったが、一方、特別審査試験及び一斉取締試験については24.0%、239.1%の増加となり特に一斉取締試験は2年連続の大幅増となった。

検定検査総処理検体数は5,398件で前年度に比べて688件、14.6%の増加であった。

区 分	昭 和 5 8 年 度 処 理 検 体 数		
	東 京	大 阪	合 計
国 家 検 定	863件	964件	1,827件
製 品 検 査	343	475	818
特 別 審 査 試 験	(488) 274	—	(488) 274
輸 入 食 品 検 査	(359) 176	(29) 27	(388) 203
一 斉 取 締 試 験	(1,647) 1,477	(15) 15	(1,662) 1,492
特 別 行 政 試 験	755	29	784
計	(4,455) 3,888	(1,512) 1,510	(5,967) 5,398

() 内数字は試験件数

国家検定及び検査等の処理実績(次頁以下に掲載)

は次のとおりである。

○昭和58年度国家検定品目別月別判定別件数

実績表…………… 242頁

○昭和58年度製品検査月別判定別件数実績表… 244頁

○昭和58年度特別審査試験月別判定別件数実

績表…………… 244頁

○昭和58年度輸入食品検査品目別月別判定別

件数実績表…………… 246頁

○昭和58年度特別行政試験実績表…………… 250頁

○昭和58年度一斉取締試験判定別件数実績表… 251頁

昭和58年度国家検定品目別

区 分	4 月			5 月			6 月			7 月			8 月			9 月			
	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	
プロチオナミド	東京	1	—	1	—	—	—	1	—	1	—	—	1	—	1	—	—	—	
プロチオナミド錠	大阪	—	—	—	2	—	2	2	—	2	—	—	—	—	—	4	—	4	
塩酸エタンブトール	東京	4	—	4	2	—	2	4	—	4	4	—	4	4	—	4	—	—	
塩酸エタンブトール錠	東京	8	—	8	7	—	7	13	—	13	10	—	10	6	—	6	14	—	14
避妊用ポリオキソエチレンノニルフェニルエーテルゼリー	東京	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	1	—	—	—	
避妊用ポリオキソエチレンノニルフェニルエーテルフィルム	東京	2	—	2	4	—	4	3	—	3	2	—	2	2	—	2	4	—	4
避妊用メンフェゴール錠	東京	—	—	—	1	—	1	2	—	2	—	—	4	—	4	—	—	—	
インシュリン注射液	東京	—	—	—	1	—	1	—	—	—	2	—	2	1	—	1	3	—	3
プロタミンインシュリン亜鉛水性懸濁注射液	東京	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
イソフエンインシュリン水性懸濁注射液	東京	—	—	—	1	—	1	2	—	2	1	—	1	3	—	3	—	—	
インシュリン亜鉛水性懸濁注射液	東京	2	—	2	3	—	3	7	—	7	4	—	4	5	—	5	5	—	5
ブタ精製インシュリン亜鉛水性懸濁注射液	東京	—	—	—	—	—	—	1	—	1	—	—	1	—	1	—	—	—	
結晶性インシュリン亜鉛水性懸濁注射液	東京	1	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	1	—	—	—	
無晶性インシュリン亜鉛水性懸濁注射液	東京	—	—	—	1	—	1	—	—	—	—	—	1	—	1	—	—	—	
ブタ精製中性インシュリン注射液	東京	—	—	—	1	—	1	—	—	1	—	1	—	—	—	—	—	—	
二相性インシュリン水性懸濁注射液	東京	1	—	1	—	—	—	—	—	1	—	1	—	—	—	1	—	1	
オキシトシン注射液	東京	2	—	2	9	—	9	3	—	3	3	—	3	5	—	5	5	—	5
バソプレシン注射液	東京	2	—	2	—	—	—	1	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	
フェリプレシン注射液 (塩酸プロピトカイン3%を含むもの)	東京	—	—	—	2	—	2	—	—	2	—	2	2	—	2	—	—	—	
ブドウ糖注射液	東京 大阪	38 78	—	38 78	46 69	1 1	47 70	31 74	—	31 74	29 87	—	29 87	37 82	—	37 82	22 62	—	22 62

月別判定別件数実績表 (No.1)

10 月			11 月			12 月			1 月			2 月			3 月			合 計		
合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計
1	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	1	5	—	5
—	—	—	2	—	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3	—	3	13	—	13
7	—	7	2	—	2	6	—	6	2	—	2	1	—	1	6	—	6	42	—	42
3	—	3	5	—	5	12	—	12	5	—	5	10	—	10	7	—	7	100	—	100
2	—	2	—	—	—	2	—	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	5	—	5
1	—	1	4	—	4	—	—	—	1	—	1	—	—	—	6	—	6	29	—	29
—	—	—	4	—	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4	—	4	15	—	15
—	—	—	1	—	1	—	—	—	3	—	3	2	—	2	—	—	—	13	—	13
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	1	—	—	—	1	—	1
3	—	3	3	—	3	1	—	1	—	—	—	5	—	5	—	—	—	19	—	19
1	—	1	5	—	5	2	—	2	3	—	3	11	—	11	—	—	—	48	—	48
1	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	1	—	—	—	4	—	4
—	—	—	1	—	1	—	—	—	—	—	—	1	—	1	—	—	—	4	—	4
—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	—	2	—	—	—	—	—	—	4	—	4
1	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3	—	3
—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	1	—	—	—	—	—	—	4	—	4
1	—	1	4	—	4	6	—	6	1	—	1	8	—	8	2	—	2	49	—	49
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	1	—	—	—	4	—	4
2	—	2	—	—	—	2	—	2	2	—	2	—	—	—	2	—	2	14	—	14
44	—	44	51	—	51	63	—	63	29	1	30	43	—	43	56	—	56	489	2	491
84	—	84	95	—	95	76	—	76	69	—	69	85	—	85	82	—	82	943	1	944

昭和58年度国家検定品目別

区分			4月			5月			6月			7月			8月			9月		
			合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計
内訳	容量100ml未満	東京 大阪	15 38	—	15 38	25 40	1 —	26 40	9 41	—	9 41	9 48	—	9 48	15 41	—	15 41	7 31	—	7 31
	容量100ml以上	東京 大阪	23 40	—	23 40	21 29	— 1	21 30	22 33	—	22 33	20 39	—	20 39	22 41	—	22 41	15 31	—	15 31
リンゲル液		東京 大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
内訳	容量100ml未満	東京 大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	容量100ml以上	東京 大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
タンニン酸パソプ レシン油性懸濁注 射液		東京	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
中性インシュリン 注射液		東京	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
計		東京 大阪	61 78	—	61 78	78 71	1 1	79 72	68 77	—	68 77	60 87	—	60 87	75 84	—	75 84	54 66	—	54 66
合計			139	—	139	149	2	151	145	—	145	147	—	147	159	—	159	120	—	120

昭和58年度製品検査月別

区分		4月			5月			6月			7月			8月			9月		
		合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計
東	京	42	—	42	7	—	7	46	—	46	3	—	3	52	—	52	8	—	8
大	阪	27	—	27	49	—	49	43	—	43	37	—	37	25	—	25	62	—	62
計		69	—	69	56	—	56	89	—	89	40	—	40	77	—	77	70	—	70

昭和58年度特別審査試験月別

区分		4月			5月			6月			7月			8月			9月		
		合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計
東	京	73	—	73	38	—	38	17	2	19	18	—	18	20	—	20	19	—	19
試験件数		145			53			37			35			37			30		

月別判定別件数実績表 (No.2)

10 月			11 月			12 月			1 月			2 月			3 月			合 計		
合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計
21	—	21	33	—	33	34	—	34	16	—	16	14	—	14	37	—	37	235	1	236
47	—	47	48	—	48	45	—	45	34	—	34	43	—	43	52	—	52	508	—	508
23	—	23	18	—	18	29	—	29	13	1	14	29	—	29	19	—	19	254	1	255
37	—	37	47	—	47	31	—	31	35	—	35	42	—	42	30	—	30	435	1	436
1	—	1	—	—	—	1	—	1	1	—	1	—	—	—	—	—	—	5	—	5
1	—	1	—	—	—	—	—	—	1	—	1	2	—	2	—	—	—	7	—	7
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	1
1	—	1	—	—	—	1	—	1	1	—	1	—	—	—	—	—	—	4	—	4
1	—	1	—	—	—	—	—	—	1	—	1	2	—	2	—	—	—	7	—	7
1	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	1	2	—	2
—	—	—	—	—	—	1	—	1	—	—	—	1	—	1	—	—	—	2	—	2
69	—	69	80	—	80	96	—	96	50	1	51	85	—	85	85	—	85	861	2	863
85	—	85	97	—	97	76	—	76	70	—	70	87	—	87	85	—	85	963	1	964
154	—	154	177	—	177	172	—	172	120	1	121	172	—	172	170	—	170	1,824	3	1,827

判定別件数実績表

10 月			11 月			12 月			1 月			2 月			3 月			合 計		
合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計
40	1	41	45	—	45	15	—	15	9	—	9	35	—	35	40	—	40	342	1	343
41	—	41	31	—	31	40	—	40	41	—	41	58	—	58	21	—	21	475	—	475
81	1	82	76	—	76	55	—	55	50	—	50	93	—	93	61	—	61	817	1	818

判定別件数実績表

10 月			11 月			12 月			1 月			2 月			3 月			合 計		
合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計
9	—	9	16	—	16	22	—	22	6	—	6	10	—	10	24	—	24	272	2	274
		18			27			43			8			15			40			488

昭和58年度輸入食品試

区分	4月				5月				6月				7月				8月				9月			
	合格	不合格	要注意	計	合格	不合格	要注意	計	合格	不合格	要注意	計	合格	不合格	要注意	計	合格	不合格	要注意	計	合格	不合格	要注意	計
農産物	東京															4				4				
	大阪																				2			2
水産物	東京							5	1			6	2			2								
	大阪																							
畜産物	東京				60			60	37			37				6				6				
	大阪				18			18																
かん詰類	東京																							
	大阪																							(2) 2
添加物	東京																							
	大阪																							
酒精飲料	東京																						2	2
	大阪																							
飲酒用原料	東京																							
	大阪																							
清涼飲料	東京																							
	大阪																							
その他の料	東京																							
	大阪																							
器具包装おもちゃ	東京										(20)	20												
	大阪																				1			1

驗月別判定一覧表(No.1)

10 月				11 月				12 月				1 月				2 月				3 月				合 計							
合 格	不 合 格	要 注 意	計	合 格	不 合 格	要 注 意	計	合 格	不 合 格	要 注 意	計	合 格	不 合 格	要 注 意	計	合 格	不 合 格	要 注 意	計	合 格	不 合 格	要 注 意	計	合 格	不 合 格	要 注 意	計				
								1	1		2													3			3	5	4		9
																												2			2
																3				3								10	1		11
																												97	6		103
				(3)																								18			(3) 21
																															(2) 2
																															(20) 20
																												1			1

昭和58年度輸入食品試

区 分	4 月				5 月				6 月				7 月				8 月				9 月				
	合 格	不 合 格	要 注 意	計	合 格	不 合 格	要 注 意	計	合 格	不 合 格	要 注 意	計	合 格	不 合 格	要 注 意	計	合 格	不 合 格	要 注 意	計	合 格	不 合 格	要 注 意	計	
上記いづれ にも属さな いもの	東京	—	—	—	—	6	—	6	—	—	—	—	—	6	—	6	—	6	—	6	—	—	—	—	—
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
計	東京	0	0	0	0	60	6	0	66	42	1	0	(20) 63	2	6	0	8	4	12	0	16	0	0	2	2
	大阪	0	0	0	0	18	0	0	18	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	(2) 5
	計	0	0	0	0	78	6	0	84	42	2	0	(20) 64	2	6	0	8	4	12	0	16	3	0	2	(2) 7

験月別判定一覧表 (No.2)

10 月				11 月				12 月				1 月				2 月				3 月				合 計					
合 格	不 合 格	要 注 意	計	合 格	不 合 格	要 注 意	計	合 格	不 合 格	要 注 意	計	合 格	不 合 格	要 注 意	計	合 格	不 合 格	要 注 意	計	合 格	不 合 格	要 注 意	計	合 格	不 合 格	要 注 意	計		
-	-	-	(1) 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	3	-	8	5	21	-	(1) 27	試験 件数	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1		
0	0	0	(1) 1	0	0	0	0	1	1	4	6	0	0	0	0	3	0	0	3	5	6	0	11	117	32	6	(21) 176		359
0	0	0	(3) 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	21	1	0		(5) 27
0	0	0	(4) 4	0	0	0	0	1	1	4	6	0	0	0	0	3	0	0	3	5	6	0	11	138	33	6	(26) 203	388	

() 内数字は無判定

昭和58年度特別行政試験実績表

1. 一般試験検査

局	課(室)	品(項)目	件数	担 当 部
薬務局	麻薬課	1. 国内産収納あへのモルヒネ含有率試験	19	{薬品部(8) 大阪支所薬品部(11)}
		2. 輸入あへん(インド産)のモルヒネ含有率試験	55	薬品部
環境衛生局	食品衛生課	1. 輸入テーブルオリーブ缶詰の検査	3	食品添加物部
		2. 輸入ワカサギのダイオキシン検査	11	食品部
		3. フィリピン産パイナップルの被膜剤様物質の検査	2	食品部
		4. 食中毒病因物質究明のための検査	4	食品部
		5. 小麦及び小麦粉調整品の EDB 検査	10	食品部
	食品化学課	1. 輸入冷凍ジャガイモの検査	1	食品部
		2. 沖縄産インゲンに残留する EDB の検査	7	食品部
計			112	{東京 101 大阪 11}

2. 特殊試験検査

局	課(室)	品(項)目	件数	担 当 部
薬務局	審査課	1. 化粧品原料規格作成のための試験	29	環境衛生化学部
		2. 医療用具の品質確保に関する試験	1	療品部
		3. 溶解補助剤使用基準作成のための試験 5品目, 急性毒性等の試験	10	{合成化学研究部 毒性部 薬理部 変異原性部}
	安全課	1. 既存化学物質の毒性試験 6品目 急性毒性, 亜急性毒性, 慢性毒性, 催腫瘍性, 生体内運命に関する試験	17	{毒性部(4) 病理部(4) 薬理部(9)}
		麻薬課	1. 向精神剤標準品の製造	2
	2. けし栽培等試験		119	{筑波薬用植物栽培試験場(1) 北海道 " (1) 伊豆 " (1) 和歌山 " (1) 薬品部(115)}
環境衛生局	家庭用品 安全対策室	1. 家庭用品に使用される化学物質の試験 検査 新規……溶剤, 防災剤, ゴム添加剤, 可塑剤, 各1品目 継続……加流促進剤1品目, 溶剤2 品目, ビルダ-1品目 計8品目 急性毒性, 慢性毒性, 経皮発がん性, 皮膚刺激, アレルギー, 代謝, 催奇 形性, 分析設定法, 吸入毒性試験	31	{毒性部(24) 医化学部(1) 薬理部(1) 療品部(4) 大阪支所薬理微生物部(1)}
		1. 食品汚染物質調査に伴う検査	300	食品部
	食品衛生課	2. 食品の規格基準の設定等に係る試験 検査 (1) 規格基準, 理化学試験(砂糖, しっ き具)	7	{食品部(3) 食品添加物部(1) 衛生微生物部(3)}

局	課(室)	品(項)目	件数	担 当 部	
環境衛生局	食品衛生課	(2) 衛生規範, 理化学試験(あん) 微生物試験(あん, ソース)			
		(3) 新形態食品 理化学試験(凍結乾燥食品) 微生物試験(")			
		3. 穀類及び穀類調整品の EDB 残留検査	50	食品部	
	食品化学課	1. 食品添加物規格基準設定に係る試験	3	{食品添加物部(1) [大阪支所食品部(2)}	
		2. 食品添加物の慢性毒性及び癌原性試験	5	病理部	
		3. 食品添加物の変異原性試験 第一次合成品 Ames 法, 20品目, chromosome 法, 20品目 第二次合成品 マラス骨髓小核試験 3品目 第一次天然品 chromosome 法, 15 品目	58	変異原性部	
		4. 食品添加物のプロモーター試験	1	毒性部	
		5. 食品中のニトロソアミンの分析及び分 析法の開発	1	食品添加物部	
		6. 容器包装規格基準作成試験	1	食品添加物部	
		7. 外国農産物残留農薬試験 (ソバ5検体, ジャガイモ10検体)	16	{食品部(1) [大阪支所食品部(15)}	
	水道環境部	水道整備課	1. 水質管理調査試験 毒性試験(2品目), 標準試験(2品 目)	4	環境衛生化学部(5) 毒性部(3) 変異原性部(10)
			2. 特定化学物質試験	10	
			3. 水道用薬品等規格策定に係る試験 毒性試験(1品目), 成分試験(2品 目), 溶出試験(1品目)	4	
環 境 庁	大気保全局	1. 東京都内3箇所における大気汚染測定 調査	3	環境衛生化学部	
		計	672	{東京 654 [大阪 18}	

総件数 784 件 (東京 755 件, 大阪 29 件)

昭和58年度一斉取締試験判定別件数実績表

区 分	合 格	不 合 格	未 判 定	計	試験件数
東 京	666	15	796	1,477	1,647
大 阪	15	0	0	15	15
計	681	15	796	1,492	1,662

国立衛生試験所において製造し、交付している標準品は別表のとおりである。

別表

日本薬局方標準品

(昭和59年4月1日現在)

	標準品名	包装単位	価格	使用目的
1	アスコルビン酸	1g入 1本	13,100 ^円	アスコルビン酸散, 同注射液, 注射用コルチコトロピン, 持続性コルチコトロピン注射液の定量法
2	安息香酸エストラジオール	20mg入 1本	10,400	安息香酸エストラジオールの純度試験, 同注射液, 同水性懸濁注射液の確認試験及び定量法
3	インシュリン	20mg入 1本	11,800	インシュリン, インシュリン注射液, インシュリン亜鉛水性懸濁注射液, 結晶性インシュリン亜鉛水性懸濁注射液, 無晶性インシュリン亜鉛水性懸濁注射液, プロタミンインシュリン亜鉛水性懸濁注射液, イソフェンインシュリン水性懸濁注射液の定量法, イソフェンインシュリン水性懸濁注射液の純度試験
4	塩酸チアミン	1g入 1本	13,000	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
5	塩酸ピリドキシン	200mg入 1本	15,400	塩酸ピリドキシン注射液の定量法
6	含糖ペプシン	20g入 1本	13,600	含糖ペプシンのたん白消化力試験
7	ジゴキシン	20mg入 1本	10,800	ジゴキシン, 同錠, 同注射液の純度試験
8	血清性性腺刺激ホルモン	1,000単位入 1本	25,400	血清性性腺刺激ホルモン, 注射用血清性性腺刺激ホルモンの定量法
9	酢酸コルチゾン	100mg入 1本	10,300	酢酸コルチゾンの確認試験及び純度試験, 同水性懸濁注射液の確認試験, 酢酸プレドニゾロンの純度試験
10	酢酸ヒドロコルチゾン	100mg入 1本	10,400	酢酸ヒドロコルチゾンの確認試験及び純度試験, 同水性懸濁注射液の確認試験, 酢酸プレドニゾロンの純度試験
11	酢酸プレドニゾン	100mg入 1本	11,100	酢酸プレドニゾンの確認試験
12	シアノコバラミン	200mg入 1本	10,400	シアノコバラミン, 同注射液の定量法, 酢酸ヒドロキシコバラミンの純度試験及び定量法
13	ジギタリス	1g入 3本	10,200	ジギタリス, 同末の定量法
14	ジゴキシン	50mg入 1本	10,700	ジゴキシンの確認試験及び定量法, 同錠の純度試験, 溶出試験, 含量均一性試験及び定量法
15	ジゴキシン	50mg入 1本	10,400	ジゴキシンの確認試験及び定量法, 同錠の溶出試験, 含量均一性試験及び定量法, 同注射液の定量法
16	酒石酸水素エピネフリン	20mg入 1本	8,400	エピネフリン, ノルエピネフリン, 同注射液の純度試験
17	酒石酸水素ノルエピネフリン	20mg入 1本	9,400	エピネフリン, ノルエピネフリンの純度試験, 同注射液の純度試験及び定量法
18	G-ストロファンチン	100mg入 1本	11,300	G-ストロファンチンの定量法, 同注射液の確認試験及び定量法

日本薬局方標準品

	標準品名	包装単位	価格	使用目的
19	胎盤性性腺刺激ホルモン	1,000単位入 1本	24,000	胎盤性性腺刺激ホルモン、注射用胎盤性性腺刺激ホルモンの定量法
20	チロジン	500mg入 1本	6,600	パンクレアチンのたん白消化力試験
21	デスラノシド	100mg入 1本	11,700	デスラノシドの純度試験及び定量法、同注射液の確認試験及び定量法
22	トロンピン	500単位入 2本	20,500	トロンピンの定量法
23	ニコチン酸	500mg入 1本	10,400	ニコチン酸注射液の定量法
24	ニコチン酸アミド	500mg入 1本	11,100	ニコチン酸アミド注射液の定量法
25	脳下垂体後葉	10mg入 2本	6,900	オキシトシン注射液、パンプレシン注射液の純度試験及び定量法
26	薄層クロマトグラフ用酢酸レチノール	10,000単位入 10カプセル	4,400	酢酸レチノール及びバルミチン酸レチノールの確認試験、ビタミンA油、同カプセルの定量法
27	薄層クロマトグラフ用バルミチン酸レチノール	10,000単位入 10カプセル	4,300	酢酸レチノール及びバルミチン酸レチノールの確認試験、ビタミンA油、同カプセルの定量法
28	パラアミノベンゾイルグルタミン酸	500mg入 1本	18,400	葉酸の純度試験
29	ヒドロコルチゾン	100mg入 1本	10,300	ヒドロコルチゾンの確認試験及び純度試験
30	フルオンロンアセトニド	50mg入 1本	7,400	フルオンロンアセトニドの定量法
31	ブレドニゾロン	100mg入 1本	10,700	ブレドニゾロンの確認試験、同錠の確認試験、溶出試験及び含量均一性試験
32	プロゲステロン	50mg入 1本	10,500	プロゲステロンの確認試験
33	ヘパリンナトリウム	1,200単位入 1本	18,200	ヘパリンナトリウム、同注射液の定量法、硫酸プロタミン、同注射液の抗ヘパリン試験
34	マレイン酸エルゴメトリン	20mg入 1本	10,500	マレイン酸エルゴメトリンの純度試験及び定量法、同錠の含量均一性試験及び定量法、同注射液の定量法、マレイン酸メチルエルゴメトリンの定量法、同錠の含量均一性試験及び定量法
35	メトトレキサート	200mg入 1本	17,800	メトトレキサートの確認試験及び定量法
36	葉酸	500mg入 1本	11,900	葉酸、同錠、同注射液の定量法
37	ラナトシドC	100mg入 1本	11,000	ラナトシドCの純度試験及び定量法、同錠の確認試験、含量均一性試験及び定量法
38	リボフラビン	200mg入 1本	13,400	リボフラビン、同散、リン酸リボフラビンナトリウム、同注射液の定量法
39	硫酸プロタミン	100mg入 1本	17,300	イソフェンインシュリン水性懸濁注射液の純度試験
40	リン酸ヒスタミン	20mg入 1本	5,500	注射用コルチコトロピン、持続性コルチコトロピン注射液の純度試験
41	レセルピン	50mg入 1本	18,500	レセルピン、同散、同錠、同注射液の定量法、同錠の含量均一性試験

国立衛生試験所標準品

(昭和59年4月1日現在)

	標準品名	包装単位	価格	使用目的
			円	
1	エストロロン	20mg入 1本	10,400	エストロン製品の確認試験及び定量法
2	エストラジオール	20mg入 1本	10,400	エストラジオール製品の純度試験
3	塩酸チアミン液	1mg入 10本	3,800	チアミン製品の定量法
4	ウロキナーゼ	1,000単位入1本	11,700	ウロキナーゼ原液及びその製剤の定量法
5	カリジノゲナーゼ	100単位入 1本	10,200	カリジノゲナーゼ及びその製剤の生物活性試験並びに定量法
6	パレイショデンプン	100g入 1本	16,800	パンクレアチン、ジアスターゼ製品のデンプン消化力試験の参考
7	ヒアルロニダーゼ	500mg入 1本	12,100	注射用ヒアルロニダーゼの定量法
8	ビタミンA油(ビタミンA検定用)	1g (10,000単位)入 10本	15,000	ビタミンA製品の定量法
9	プロピオン酸テストステロン	20mg入 1本	10,200	プロピオン酸テストステロン製品の定量法
10	融点測定用 {アセトアニリド, アセトフェネチジン, カフェイン, スルファニルアミド, スルファピリジン, ワニリン}	各1g入 6本	30,300	融点測定用温度計, 同装置の補正
11	リゾチーム	500mg入 1本	16,900	リゾチーム製品の定量法
12	ルチン	500mg入 1本	9,600	ルチン製品の定量法
13	アシッドバイオレット6B	1g入 1本	3,400	食品, 医薬品, 化粧品及び製剤中のアシッドバイオレット6Bの確認試験
14	アシッドレッド	1g入 1本	2,100	食品, 医薬品, 化粧品及び製剤中のアシッドレッドの確認試験
15	アゾルピンエキストラ	1g入 1本	2,600	粘膜以外医薬品, 化粧品及び製剤中のアゾルピンエキストラの確認試験
16	アマランス	1g入 1本	1,900	食品, 医薬品, 化粧品及び製剤中のアマランスの確認試験
17	インジゴ	1g入 1本	2,600	外用医薬品, 化粧品及び製剤中のインジゴの確認試験
18	インジゴカルミン	1g入 1本	1,700	食品, 医薬品, 化粧品及び製剤中のインジゴカルミンの確認試験
19	エオン	1g入 1本	1,800	食品, 医薬品, 化粧品及び製剤中のエオンの確認試験
20	エリスロシン	1g入 1本	1,800	食品, 医薬品, 化粧品及び製剤中のエリスロシンの確認試験
21	オイルエロー AB	1g入 1本	1,700	粘膜以外医薬品, 化粧品及び製剤中のオイルエローABの確認試験
22	オイルエロー OB	1g入 1本	1,700	粘膜以外医薬品, 化粧品及び製剤中のオイルエローOBの確認試験
23	オイルオレンジ SS	1g入 1本	1,700	粘膜以外医薬品, 化粧品及び製剤中のオイルオレンジSSの確認試験
24	オイルレッド XO	1g入 1本	1,700	粘膜以外医薬品, 化粧品及び製剤中のオイルレッドXOの確認試験
25	オレンジ I	1g入 1本	1,800	粘膜以外医薬品, 化粧品及び製剤中のオレンジIの確認試験
26	オレンジ II	1g入 1本	2,400	外用医薬品, 化粧品及び製剤中のオレンジIIの確認試験

国立衛生試験所標準品

	標準品名	包装単位	価 格	使 用 目 的
27	ギネアグリーン B	1g入 1本	3,000	粘膜炎外医薬品、化粧品及び製剤中のギネアグリーンBの確認試験
28	サンセットエロー FCF	1g入 1本	1,700	食品、医薬品、化粧品及び製剤中のサンセットエローFCFの確認試験
29	タートラジン	1g入 1本	1,900	食品、医薬品、化粧品及び製剤中のタートラジンの確認試験
30	テトラクロルテトラブromフルオレセイン	1g入 1本	2,200	外用医薬品、化粧品及び製剤中のテトラクロルテトラブromフルオレセインの確認試験
31	テトラブromフルオレセイン	1g入 1本	2,100	外用医薬品、化粧品及び製剤中のテトラブromフルオレセインの確認試験
32	トルイジンレッド	1g入 1本	2,000	外用医薬品、化粧品及び製剤中のトルイジンレッドの確認試験
33	ナフトールエロー S	1g入 1本	1,700	粘膜炎外医薬品、化粧品及び製剤中のナフトールエローの確認試験
34	ニューコクシン	1g入 1本	1,900	食品、医薬品、化粧品及び製剤中のニューコクシンの確認試験
35	パーマネントオレンジ	1g入 1本	2,000	外用医薬品、化粧品及び製剤中のパーマネントオレンジの確認試験
36	ハンサエロー	1g入 1本	2,000	外用医薬品、化粧品及び製剤中のハンサエローの確認試験
37	ファストグリーン FCF	1g入 1本	3,800	食品、医薬品、化粧品及び製剤中のファストグリーンFCFの確認試験
38	ファストレッド S	1g入 1本	2,700	粘膜炎外医薬品、化粧品及び製剤中のファストレッドSの確認試験
39	ブリリアントブルー FCF	1g入 1本	3,200	食品、医薬品、化粧品及び製剤中のブリリアントブルーFCFの確認試験
40	フルオレセイン	1g入 1本	2,100	外用医薬品、化粧品及び製剤中のフルオレセインの確認試験
41	フロキシシン	1g入 1本	1,900	食品、医薬品、化粧品及び製剤中のフロキシシンの確認試験
42	ボンソー R	1g入 1本	1,800	粘膜炎外医薬品、化粧品及び製剤中のボンソーRの確認試験
43	ボンソー SX	1g入 1本	1,800	粘膜炎外医薬品、化粧品及び製剤中のボンソーSXの確認試験
44	ボンソー 3R	1g入 1本	1,800	粘膜炎外医薬品、化粧品及び製剤中のボンソー3Rの確認試験
45	リソールルピン BCA	1g入 1本	1,900	外用医薬品、化粧品及び製剤中のリソールルピンBCAの確認試験
46	レーキレッド C	1g入 1本	1,800	外用医薬品、化粧品及び製剤中のレーキレッドCの確認試験
47	レーキレッド CBA	1g入 1本	2,100	外用医薬品、化粧品及び製剤中のレーキレッドCBAの確認試験
48	レーキレッド DBA	1g入 1本	2,100	外用医薬品、化粧品及び製剤中のレーキレッドDBAの確認試験
49	ローズベンガル	1g入 1本	1,800	食品、医薬品、化粧品及び製剤中のローズベンガルの確認試験

昭和58年度国立衛生試験所標準品出納状況

(医薬品等試験用標準品)

標準品名	前年度末 在庫数量	製造数量	売払数量	自家消費等 数量	年度末 在庫数量	備考
	個	個	個	個	個	
アスコルビン酸	140	113	196	1	56	
安息香酸エストラジオール	9	0	3	0	6	
インシュリン	38	100	61	7	70	
ウロキナーゼ	7	250	121	2	127	58.4.1追加
エストラジオール	30	0	0	0	0	
エストロン	43	0	2	0	41	
塩酸チアミン	191	201	219	1	172	
塩酸チアミン液	29	0	13	0	16	
塩酸ピリドキシン	103	200	169	0	134	
カリジノゲナーゼ	—	253	210	13	30	58.4.1追加
含糖ペプシン	3	33	23	0	13	
ギトキシン	8	50	3	0	55	
血清性性腺刺激ホルモン	28	73	57	0	44	
酢酸コルチゾン	38	0	8	0	30	
酢酸ヒドロコルチゾン	38	0	30	0	8	
酢酸プレドニゾン	59	0	2	0	57	
シアノコバラミン	16	300	222	0	94	
ジギタリス	18	0	0	0	18	
ジギトキシン	65	0	18	1	46	
ジゴキシン	104	0	19	1	84	
酒石酸水素エピネフリン	44	0	8	0	36	
酒石酸水素ノルエピネフリン	33	0	3	0	30	
G-ストロファンチン	31	0	0	0	0	
胎盤性性腺刺激ホルモン	32	100	76	0	56	
チロシン	55	145	165	0	35	
デスラノド	55	0	21	0	34	
トロンビン	19	50	49	2	18	
ニコチン酸	37	0	15	0	22	
ニコチン酸ニコチン	30	100	105	0	25	
脳下垂体後葉	33	60	48	4	41	
薄層クロマトグラフ用酢酸レチノール	38	0	23	1	14	
薄層クロマトグラフ用バルミチン酸チノール	12	50	24	0	38	
パラアミノベンゾイルグルタミン酸	38	0	13	0	25	
パレインゲンブ	0	0	0	0	0	
ヒアルロンダーゼ	35	0	4	0	31	
ビタミンA油 (ビタミンA検定用)	0	0	0	0	0	
ヒドロコルチゾン	50	0	33	0	17	
フルオシノロンアセトニド	26	70	21	0	75	
プレドニゾン	13	50	13	0	50	
プロゲステロン	11	48	10	0	49	
プロピオン酸テストステロン	31	0	1	0	30	
ヘパリンナトリウム	63	100	75	2	86	

標準品名	前年度末 在庫数量	製造数量	売払数量	自家消費等 数量	年度末 在庫数量	備考
マレイン酸エルゴメトリン	73	100	71	0	102	
メトトレキサート	74	0	6	1	37	
融点測定用 (アセトアニリド, アセトフ エネチジン, カフェイン, スルファニルアミド, スル ファピリジン, ワニリン)	9	30	22	0	17	
葉酸	35	100	64	0	71	
ラナトシドC	31	0	6	0	25	
リゾチーム	102	210	265	2	45	
リボフラビン	80	402	314	2	166	
硫酸プロタミン	13	0	0	0	13	
リン酸ヒスタミン	83	0	72	0	11	
ルチン	16	0	10	0	6	
レセルピン	68	0	35	0	33	
酢酸デスオキシコルトン	0	0	0	0	—	58.4.1削除
ジエテルスチルベストロール	11	0	0	11	—	"
計	2,211	3,188	2,948	51	2,400	

(色素試験用標準品)

標準品名	前年度末 在庫数量 個	製造数量 個	売払数量 個	自家消費等 数量 個	年度末 在庫数量 個	備考
アシッドバイオレット6B	86	0	4	0	82	
アシッドレッド	9	0	6	0	3	
アゾルビンエキストラ	94	0	3	0	91	
アマランス	0	0	0	0	0	
インジゴ	145	0	3	0	142	
インジゴカルミン	7	0	6	1	0	
エオシン	130	0	4	0	126	
エリスロシン	6	0	4	1	1	
オイルエローAB	229	0	4	0	225	
オイルエローOB	239	0	4	0	235	
オイルオレンジSS	236	0	4	0	232	
オイルレッドFXO	221	0	6	0	215	
オレンジI	285	0	3	0	282	
オレンジII	165	0	3	2	160	
ギネアグリーンB	80	0	6	0	74	
サンセットエローFCF	0	0	0	0	0	
タートラジン	0	0	0	0	0	
テトラクロルテトラブROMフ ルオレセイン	163	0	3	0	160	
テトラブROMフルオレセイン	124	0	3	0	121	
トルイジンレッド	90	0	3	2	85	
ナフトールエローS	161	0	4	0	157	
ニューコクシン	0	0	0	0	0	
パーマネントオレンジ	42	0	4	0	38	
ハンサエロー	87	0	3	0	84	
ファストグリーンFCF	52	0	6	2	44	
ファストレッドS	210	0	3	0	207	
ブリリアントブルーFCF	0	0	0	0	0	
フルオレセイン	202	0	3	1	198	
フロキシソ	380	0	7	0	373	
ボンソーR	276	0	8	0	268	
ボンソーSX	162	0	4	0	158	
ボンソー3R	225	0	16	1	208	
リゾールルビンBCA	374	0	4	0	370	
レーキレッドC	397	0	3	0	394	
レーキレッドCBA	131	0	4	1	126	
レーキレッドDBA	170	0	3	0	167	
ローズベンガル	6	0	4	0	2	
計	5,184	0	145	11	5,028	

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専門誌に発表したもの。
 - 学会発表：学会で講演したもの。
 - 業務報告：所長、各部長（支所も含む）及び各薬用植物栽培試験場の長が過去1年間（前年度）の業務成績、研究業績をまとめた報告。
 - 総説：所員の調査又は研究を中心とした総説で、図書委員会が執筆を依頼したもの。
3. 用紙及び枚数の制限：衛生試験所所定の原稿用紙を用い、原則として下記の規定に従う。
 - 報文：図表を含めて20枚以内。
 - ノート及び資料：図表を含めて15枚以内。
 - 誌上発表：1題目について1枚程度。
 - 業務報告：各部及び各薬用植物栽培試験場について8枚以内。
 - 総説：原稿を依頼するとき別に定める。
4. 原稿の提出：原稿は表紙（第1ページとする）、英文要旨、本文、文献、英文要旨の和文（参考）、最後に図表を入れた封筒の順に左上をひもでとじ、表紙右上に報文、ノート、資料のうち希望する分類を朱書きし、所長宛の報告書を表紙の上に添えて、定められた原稿〆切期日までに図書館宛に提出する。
5. 原稿の審査：図書委員会は提出された原稿の採否及び分類を決定する。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。原稿の語句の統一を計るため、原則的に「日本薬局方記載の手引」に従う。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。
 - また、原稿は楷書ペン書きにする。
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	(°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
ミリリットル	ml	サイクル	cycle	保持時間	t _g
(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
(㏄を用いない)		カンデラ	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	mp (d.p.c)	紫外吸収	UV
アンペア	A	沸点	bp	赤外吸収	IR
ボルト	V	凝固点	fp	核磁気共鳴	NMR
オーム	Ω	比重	d	電子スピン共鳴	ESR
ガウス	G	屈折率	n	旋光分散	ORD
エルステッド	Oe	重量パーセント	%	円偏光二色性	CD
ジュール	J	容量/重量パーセント	v/w%	マススペクトル	MS
カロリー	cal	parts per million	ppm		

4. 句読点：,、.を用い、.としない。

5. 数字：アラビア数字を用いる。千の単位にコンマをつけない。ただし、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	<u>試薬</u>
イタリック体———	例：学名など	<i>Papaver somniferum</i> L.
スモールキャピタル———	例：著者名など	Masato <u>ASAHINA</u>

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：衛生試報, 88, 112 (1970)

2) 菅野三郎ら：衛生化学, 17, 19 (1971)

3) M. D. Hollenberg, D. B. Hope: *Biochem. J.*, 106, 557 (1968)

4) A. White *et al.*: *Principles of Biochemistry*, 4th Ed., p. 937 (1968), McGraw-Hill Inc., New York

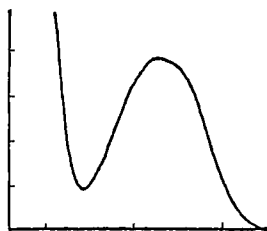
5) 佐々木慎一：マスペクトル解説, p. 61 (1967) 広川書店

6) USP XVIII, p. 321 7) JIS K 1234 (1970)

7・6 図表：図又は複雑な構造式など、凸版にする必要のあるものは厚手白色紙か青色方眼紙（黒、茶色の方眼紙は使用しない）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入れない（原図）。別に原図のコピーをとり、図中の数字、記号又は説明などの文字はタイプで打ち、原図と共に提出する。ただし、説明が多い場合は別紙にタイプしても良い。

また、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き、図はすべて本文中に書かない。

(例)



(原図)

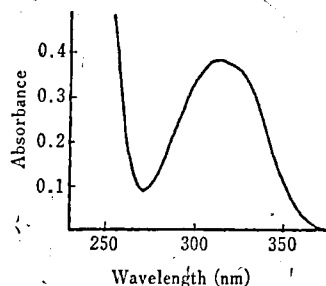


Fig. 2. Ultraviolet spectrum of material for "Ergometrine Maleate Reference Standard" (20 µg/mL) (コピーにタイプ)

図の番号は Fig. 1., Fig. 2., ……とし、表題、説明はともに図の下に、表の番号は Table 1., Table 2., ……とし、表題は表の上に、説明は表の下に記す。なお、表題、説明は原則として英語で書き（資料の場合はこの限りでない）、表題は大文字で始め、最後に . をつけない。

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。外国語の論文の要旨は、日本語で原稿用紙 1 枚程度にまとめる。ただし、題名、著者名、雑誌名は外国語。

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。

国立衛生試験所図書委員会

昭和 59 年度 図書 編集 委員

谷 村 顕 雄	田 中 彰	竹 中 祐 典
丹 野 雅 幸	吉 岡 澄 江	太 田 美 矢 子
手 島 玲 子	関 田 節 子	鹿 庭 正 昭
中 室 克 彦	内 山 貞 夫	神 蔵 美 枝 子
坂 部 フ ミ	鈴 木 康 雄	川 島 邦 夫
小 久 保 武	松 岡 厚 子	豊 田 正 武
飯 田 修	金 子 英 夫	笹 子 久 美 子

衛 生 試 験 所 報 告 第 102 号

昭和 59 年 11 月 15 日 印 刷
昭和 59 年 11 月 20 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 コ ー 印 刷 株 式 有 限 公 司
東京都文京区後楽 2-21-8