

衛生試験所報告

第 108 号

平成 2 年

BULLETIN
OF
NATIONAL INSTITUTE OF
HYGIENIC SCIENCES

No.108 1990

国立衛生試験所

衛生試験所
Eisei Shikenjo Hokoku

衛試報告 108 号正誤表

ページ	位置, 行	誤	正
II, III		木村 敏夫	木村 俊夫
IV	上, 3	Leview	Review
V	上, 17	Technical Date	Technical Data
"	" , 23	DAN	DNA
VI	上, 13	Methylidigoxin	Metilidigoxin
46	Fig. 1. 図中	CICH	CHCl
"	" タイトル	1Chemical	Chemical
51	右下, 2	layinghens	laying hens
96	Fig. 2. タイトル	alginlae	alginate
116	Fig. 2. 図中	③	⑤
"	" "	④	③
"	" "	⑤	④
118	最上段	Technical Date	Technical Data
158	右上, 5	結果	結論
162	英文タイトル	Methylidigoxin	Metlidigoxin
	サマリー	"	"
163~165	Fig. 1~5, 7. タイトル	"	"
174	右上, 14	岡田 敏夫	岡田 敏史
183	左上, 1	ダミノトッド	ダミノジッド
194	左下, 10	中蒲 楨介	中浦 楨介
214	右下, 14	危疫原	免疫原
221	右上, 24	2.4 mg/kg	2.4 g/kg
227	左下, 14	腹腔内投与	腹腔内投与
"	" , 3	Sasaki, K. and	Sasaki, K. Suzuki, T. and
232	左下, 5	Sato, H.	Sato, M.
"	" , 4	and Terao, T.	Ichinoe, M. and Terao, T.
243	右上, 1, 3, 4, 8, 11, 13	P-450-AFB	P-450 _{AFB}
252	右上, 15	lipopolysaccharides- fractionated	lipopolysaccharides fractionated
49	Fig. 4. 5		<p>Fig. 4.</p>
			<p>Fig. 5.</p>

衛生試験所報告

第 108 号

平成 2 年

**BULLETIN
OF
NATIONAL INSTITUTE OF
HYGIENIC SCIENCES**

No. 108 1990

Published by
National Institute of Hygienic Sciences
Tokyo, Japan

国立衛生試験所

目 次

総 説	
化学物質の発がん性リスクアセスメント	林 祐造…… 1
報 文	
リゾチーム標準品中のマイナー成分について	横田椅江・福田秀男・田中 彰……17
酵素製剤の品質に関する研究 (第11報) —カリジノゲナーゼ製剤—	
……………	谷本 剛・太田美矢子・川崎ナナ・田中 彰……20
ガスクロマトグラフィーによる輸入農産物中のアジンホスメチルの定量	
……………	根本 了・鈴木 隆・斎藤行生……25
Production and Characterization of Monoclonal and Polyclonal Antibodies against Digoxin	沢田純一・Noppavan Janejai・寺尾允男……29
アザチオプリン投与ラットを用いた免疫毒性試験法の検討: 免疫毒性国際共同研究 (アザチオプリン) 分担研究報告	松本清司・関田清司・落合敏秋・高木篤也・高田幸一・降矢 強・黒川雄二・斎藤嘉朗・手島玲子・鈴木和博・沢田純一・寺尾允男・戸部満寿夫……34
わが国の化学物質規制情報検索システムの整備と国際化学物質有害性情報登録 (IRPTC) の法規制データベースの効果的利用について	関沢 純……40
テトラクロロビンホスのラットによる28日間反復経口投与毒性試験について	
……………	小川幸男・鈴木幸子・高田幸一・佐井君江・鎌田栄一・梅村隆志・金子豊蔵・黒川雄二……45
2,2'-Methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol) のラットにおける催奇形成に関する研究	
……………	田中 悟・川島邦夫・宇佐見誠・中浦慎介・児玉幸夫・高仲 正……52
ハムスター膀胱発癌過程にみられる膀胱萎縮に対する粗製大豆トリプシンインヒビターの影響	
……………	古川文夫・今沢孝喜・篠田和俊・佐藤元信・吉村博之・今井田克己・高橋道人・林 裕造……57
喫煙曝露によるハムスターの気管・気管支および肺の初期変化と過酸化脂質量	
……………	吉村博之・篠田和俊・岡宮英明・古川文夫・今井田克己・高橋道人・松村年郎・長谷川亨……62
Quinacrine 投与によるラットの肝および腎におけるミエリン小体と酸性フォスファターゼ の電顕的局財	
……………	今沢孝喜・古川文夫・吉田順一・篠田和俊・今井田克己・高橋道人・林 裕造……66
F344 ラットにおける dicyclopentadiene の28日間反復投与毒性試験	
……………	佐藤元信・岡宮英明・古川文夫・篠田和俊・今沢孝喜・豊田和弘・高橋道人……71
ラット新生仔腎の各種レクチンに対する染色性に関する研究—成熟ラットとの比較—	
……………	佐藤秀隆・豊田和弘・古川文夫・小笠原裕之・今沢孝喜・今井田克己・高橋道人・林 裕造……78
タンニン酸の F344 ラットにおける亜慢性毒性試験	
……………	小笠原裕之・外館あさひ・小野寺博志・松島裕子・渋谷 淳・吉田順一・前川昭彦・林 裕造……84
Musk xylol の B6C3F1 マウスにおける毒性および癌原性試験	
……………	松島裕子・前川昭彦・小野寺博志・渋谷 淳・吉田順一・黒川雄二・林 裕造……89
キトサンの製剤素材としての利用—アルギン酸ナトリウムの添加効果—	
……………	宮崎玉樹・小室徹雄・四方田千佳子・岡田敏史……95
ノ ー ト	
ニクズクの薄層クロマトグラフ法による確認試験法の確立と日本薬局方外生薬規格への導入	
……………	鈴木英世・原田正敏……98
プラズマスプレイ方式 LC/MS 用プローブデバイスの作製	叶多謙蔵…… 100

マイコトキシンの化学分析に関する研究 (第21報)

イムノアフィニティーカラムクロマトグラフィーと高速液体クロマトグラフィー

の組合わせによる Aflatoxin 類の迅速分析……………五十畑悦子・豊田正武・斎藤行生… 104

蛍光検出液体クロマトグラフィーによる油脂食品中のブチルヒドロキシアニソール (BHA)

の迅速定量法……………山田 隆… 109

マウス肺組織中のプロスタグランジン E₂ の定量

……………畝山智香子・佐藤秀隆・矢沢るり・古田京子・今井田克己・林 裕造… 111

食用タール色素中の硫酸塩定量における活性炭の問題点

……………柿内 雅・辻 澄子・柴田 正・伊藤普志男… 114

資 料

向精神剤の同定に関する研究 (第7報)

幻覚剤 3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDA), 3,4-Methylenedioxymethamphetamine

(MDMA) および 5-Methoxy-3,4-methylenedioxyamphetamine (MMDA) の標準品製造

と各種分析データ……………島峰彦彦・高橋一徳・中原雄二… 118

アクリル酸エチルのラット前胃上皮細胞 DNA 損傷試験

……………森本和滋・辻 和彦・大沢良一・高橋 惇… 125

エイズ医薬品候補スクリーニング研究 I. 1988年度報告

……………三木 隆・大貫奈穂美・新開敬行・藪内 清・小野哲郎・大友信也・

松田良夫・松山雅子・秋吉京子・大竹 徹・森 治代・森本素子・

上羽 昇・国田信治・藤田宣哉・石崎 徹・神村紀子・永田久紀・

森下高行・小林慎一・三宅恭司・石原佑弐・磯村思无・斉藤隆行・

小田和正・松崎 稔・桜田教夫・佐藤七七朗・野呂新一・三瀬勝利・

牛島広治・清水博之・大野田秀樹・北村 敬・徳永 徹… 128

必須元素のラット臓器内濃度に関する研究 (第1報)

……………鈴木幸子・小川幸男・鎌田栄一・金子豊蔵・黒川雄二… 132

国立衛生試験所塩酸チアミン標準品 (Control 891)

……………岡田敏史・広重律子・田中正一・村井真美・木村敏夫… 136

国立衛生試験所メストラノール標準品 (Control 881)

……………岡田敏史・広重律子・田中正一・村井真美・木村敏夫… 138

国立衛生試験所リン酸ベタメタゾンナトリウム標準品 (Control 881)

……………岡田敏史・広重律子・田中正一・村井真美・木村敏夫… 141

国立衛生試験所リン酸デキサメタゾンナトリウム標準品 (Control 891)

……………岡田敏史・広重律子・田中正一・村井真美・木村敏夫… 144

国立衛生試験所酢酸ヒドロコルチゾン標準品 (Control 891)

……………岡田敏史・広重律子・田中正一・村井真美・木村敏夫… 147

国立衛生試験所リン酸ヒドロコルチゾンナトリウム標準品 (Control 891)

……………岡田敏史・広重律子・田中正一・村井真美・木村敏夫… 150

国立衛生試験所リン酸プレゾニゾロンナトリウム標準品 (Control 891)

……………岡田敏史・広重律子・田中正一・村井真美・木村敏夫… 153

国立衛生試験所コハク酸トコフェロール標準品 (Control 881)

……………田中正一・村井真美・徳永裕司・木村敏夫・岡田敏史… 156

国立衛生試験所酢酸クロルマジノン標準品 (Control 881)

……………田中正一・村井真美・徳永裕司・木村敏夫・岡田敏史… 159

国立衛生試験所メチルジゴキシン標準品 (Control 881)

……………田中正一・村井真美・徳永裕司・木村敏夫・岡田敏史… 162

国立衛生試験所シアノコバラミン標準品 (Control 891)

.....田中正一・村井真美・木村敏夫・岡田敏史...	166
国立衛生試験所標準品（日本薬局方標準品）“エンドトキシン標準品”（Control 891）	
.....小川義之・村井敏美・天野博夫・江馬 真・伊丹孝文・川崎浩之進...	169
業務報告.....	171
特別研究報告.....	210
誌上发表.....	216
単行本.....	258
行政報告.....	262
学会発表.....	269
衛試例会.....	287
平成元年度に行った主な研究課題.....	293
国家検定および検査等の処理状況.....	301
国立衛生試験所標準品.....	309

CONTENTS

Leview

Yuzo Hayashi: Carcinogenic Risk Assessment of Chemicals.....	1
--	---

Originals

Isue Yokota, Hideo Fukuda and Akira Tanaka: On a Minor Component found in the Lysozyme Reference Standard.....	17
Tsuyosi Tanimoto, Miyako Ohta, Nana Kawasaki and Akira Tanaka: Studies on the Quality of Enzyme preparations (XI) —Kallidinogenase Preparations.....	20
Satoru Nemoto, Takasi Suzuki and Yukio Saito: Gas Chromatographic Determination of Azinphos-methyl in Imported Crops.....	25
Jun-ichi Sawada, Noppavan Janejai and Tadao Terao: Production and Characterization of Monoclonal and Polyclonal Antibodies against Digoxin.....	29
Kiyosi Matsumoto, Kiyosi Sekita, Toshiaki Ochiai, Atsuya Takagi, Koichi Takada, Tsuyoshi Furuya, Yuji Kurokawa, Yoshiro Saito, Reiko Teshima, Kazuhiro Suzuki, Jun-ichi Sawada, Tadao Terao and Masuo Tobe: Evaluation of Immunotoxicity Testings Using Azathioprine-Treated Rats: The International Collaborative Immunotoxicity Study (Azathioprine).....	34
Jun Sekizawa: Future Development of the Japanese Chemicals Regulation Date Search System and the Effective Use of the IRPTC Legal File.....	40
Yukio Ogawa, Sachiko Suzuki, Kouichi Takada, Kimie Sai, Eiichi Kamata, Takashi Umemura, Toyozo Kaneko and Yuji Kurokawa: Twenty-eight-day Repeated Dose Toxicity Test for Tetrachlorvinphos in Wister Rat.....	45
Satoru Tanaka, Kunio Kawashima, Makoto Usami, Shinsuke Nakaura, Yukio Kodama and Akira Takanaka: Studies on Teratogenic Potential of 2, 2'-Methylenebis (4-methyl-6- <i>tert</i> -butylphenol) in Rats.....	52
Fumio Furukawa, Takayoshi Imazawa, Kazutoshi Sinoda, Motonobu Sato, Hiroyuki Yoshimura, Katsumi Imaida, Michihito Takahashi and Yuzo Hayashi: Effects of Crude Soybean Trypsin Inhibitor on Pancreatic Atrophy Induced by BOP Treatment in Hamsters.....	57
Hiroyuki Yoshimura, Kazutoshi Shinoda, Hideaki Okamiya, Fumio Furukawa, Katsumi Imaida, Michihito Takahashi, Toshiro Matumura and Tohru Hasegawa: Early Histopathological Changes in Trachea, Bronchus and Lung, and Changes in Lipid Peroxidation in Hamsters, Due to Inhaled Cigarette Smoke.....	62
Takayoshi Imazawa, Fumio Furukawa, Jun-ichi Yoshida, Kazutoshi Shinoda, Katumi Imaida, Michihito Takahashi and Yuzo Hayashi: Ultrastructural Localization of Myelin Bodies and Acid Phosphatase Activities in the Liver and Kidney Induced by Quinacrine in Rats.....	66
Motonobu Satoh, Hideaki Okamiya, Fumio Furukawa, Kazutoshi Shinoda, Takayoshi Imazawa, Kazuhiro Toyoda and Michihito Takahashi: Twenty-eight day Repeated Dose Toxicity Test of Dicyclopentadiene in F334 Rat.....	71
Hidetaka Sato, Kazuhiro Toyoda, Fumio Furukawa, Hiroyuki Ogasawara, Takayoshi Imazawa, Katsumi Imaida, Michihito Takahashi and Yuzo Hayashi: Lectin Reactivity in the Kidney of Newborn Rat Compared to Adult Rat.....	78
Hiroyuki Ogasawara, Asahi Todaye, Hiroshi Onodera, Yuko Matsushima, Makoto Shibutani, Jun-ichi Yoshida, Akihiko Maekawa and Yuzo Hayashi: Subchronic Oral Toxicity Study of Tannic Acid in F344 Rats.....	84
Yuko Matsushima, Akihiko Maekawa, Hiroshi Onodera, Makoto Shibutani, Jun-ichi Yoshida, Yuji Kurokawa and Yuzo Hayashi: Toxicity and Carcinogenicity Studies of Musk xylol in B6C3F1 mouse.....	89
Tamaki Miyazaki, Tetsuo Komuro, Chikako Yomota and Satoshi Okada: Usage of Chitosan as a Pharmaceutical Material: Effectiveness as an additional additives of	

sodium alginate	95
Note	
Hideyo Suzuki and Masatoshi Harada: Identification of Nutmeg by Thin-Layer Chromatography and Its Introduction to Japanese Standards for Non-Pharmacopoeial Crude Drugs.....	98
Kenzo Kanohta, : Studies on a Modified Plasmaspray LC/MS Device	100
Etsuko Isohata, Masatake Toyoda and Yukio Saito: Studies on Chemical Analysis of Mycotoxin (XXI): A Rapid Analytical Method for Aflatoxins by Immunoaffinity Column Chromatography and High Performance Liquid Chromatography.....	104
Takashi Yamada: Determination of Butylated Hydroxy-Anisole in oily Foods by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection	109
Chikako Uneyama, Hidetaka Sato, Ruri Yazawa, Kyoko Furuta, Katsumi Imaida and Yuzo Hayashi: Measurement of Prostaglandin E ₂ Content in Lung Tissue of Mouse.....	111
Masa Kakiuchi, Sumiko Tsuji, Tadashi Shibata and Yoshio Ito: Studies on Activated Charcoal concerning the Determination of Sulfate in Food Coal-Tar Dyes.....	114
Technidacal Date	
Mochihiko Shimamine, Kazunori Takahashi and Yuji Nakahara: Studies on the Identification of Psychotropic Substances (VII) Preparation and Various Analytical Date of Standard References of Some Hallucinogens, 3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDA), 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and 5-Methoxy-3,4-methylenedioxyamphetamine (MMDA)	118
Kazushige Morimoto, Kazuhiko Tsuji, Ryoichi Osawa and Atsushi Takahashi: DAN Damage Test in Forestomach Squamous Epithelium of F344 Rat Following Oral Administration of Ethyl Acrylate.....	125
Takashi Miki, Nahomi Ohnuki, Takayuki Shinkai, Kiyoshi Yabuuchi, Tetsuro Ono, Nobuya Ohtomo, Yoshio Matsuda, Masako Matsuyama, Kyoko Akiyoshi, Tohru Ohtake, Haruyo Mori, Motoko Morimoto, Noboru Ueba, Nobuharu Kunita, Nobuya Fujita, Tohru Ishizaki, Noriko Kamimura, Hisanori Nagata, Takayuki Morishita, Shinichi Kobayashi, Takashi Miyake, Yuichi Ishiwara, Shin Isomura, Takayuki Saito, Kazumasa Oda, Minoru Matsuzaki, Norio Sakurada, Nanao Sato, Shinichi Noro, Katsutoshi Mise, Hiroshi Ushijima, Hiroyuki Shimizu, Hideki Ohonoda, Takashi Kitamura and Tohru Tokunaga: Preliminary Screening for Antiviral AIDS Drugs : I. Report on fiscal year 1988.....	128
Sachiko Suzuki, Yukio Ogawa, Eiichi Kamata, Toyozo Kaneko and Yuji Korkawa: Study on Essential Metal Concentration in the Organs of Rats (Report 1)	132
Satoshi Okada, Ritsuko Hiroshige, Masakazu Tanaka, Mami Murai and Toshio Kimura: Thiamine Hydrochloride Reference Standard (Control 891) of National Institute of Hygienic Sciences	136
Satoshi Okada, Ritsuko Hiroshige, Masakazu Tanaka, Mami Murai and Toshio Kimura: Mestranol Reference Standard (Control 881) of National Institute of Hygienic Sciences	138
Satoshi Okada, Ritsuko Hiroshige, Masakazu Tanaka, Mami Murai and Toshio Kimura: Betamethasone Sodium Phosphate Reference Standard (Control 881) of National Institute of Hygienic Sciences.....	141
Satoshi Okada, Ritsuko Hiroshige, Masakazu Tanaka, Mami Murai and Toshio Kimura: Dexamethasone Sodium Phosphate Reference Standard (Control 891) of National Institute of Hygienic Sciences.....	144
Satoshi Okada, Ritsuko Hiroshige, Masakazu Tanaka, Mami Murai and Toshio Kimura: Hydrocortisone Acetate Reference Standard (Control 891) of National Institute of Hygienic Sciences	147
Satoshi Okada, Ritsuko Hiroshige, Masakazu Tanaka, Mami Murai and Toshio Kimura:	

Hydrocortisone Sodium Phosphate Reference Standard (Control 891) of National Institute of Hygienic Sciences.....	150
Satoshi Okada, Ritsuko Hiroshige, Masakazu Tanaka, Mami Murai and Toshio Kimura: Prednisolone Sodium Phosphate Reference Standard (Control 891) of National Institute of Hygienic Sciences.....	153
Masakazu Tanaka, Mami Murai, Hiroshi Tokunaga, Toshio Kimura and Satoshi Okada: Tocopherol Succinate Reference Standard (Control 881) of National Institute of Hygienic Sciences	156
Masakazu Tanaka, Mami Murai, Hiroshi Tokunaga, Toshio Kimura and Satoshi Okada: Chlormadinone Acetate Reference Standard (Control 881) of National Institute of Hygienic Sciences	159
Masakazu Tanaka, Mami Murai, Hiroshi Tokunaga, Toshio Kimura and Satoshi Okada: Methylidigoxin Reference Standard (Control 881) of National Institute of Hygienic Sciences	162
Masakazu Tanaka, Mami Murai, Toshio Kimura and Satoshi Okada: Cyanocobalamin Reference Standard (Control 891) of National Institute of Hygienic Sciences.....	166
Yoshiyuki Ogawa, Toshimi Murai, Hiro Amano, Makoto Ema, Takafumi Itami and Hironoshin Kawasaki: National Institute of Hygienic Sciences Standard (the Japanese Pharmacopoeia Standard) "Endotoxin Reference Standard" (Control 891).....	169
Annual Reports of Divisions	171
Report of Collaborative Study.....	210
Summaries of Papers Published in Other Journals.....	216
Titles of Scientific Books	258
Scientific Reports to Governmental Agencies.....	262
Titles of Speeches at Scientific Meetings Seminars	269
Seminars	287
Main Research Projects Carried Out in Fiscal Year 1989.....	293
Survey of the Results of National Tests.....	301
Reference Standards Prepared by National Institute of Hygienic Sciences.....	309

化学物質の発がん性リスクアセスメント

林 裕 造

Carcinogenic Risk Assessment of Chemicals

Yuzo Hayashi

Assessment of human cancer risk associated with any particular specified chemical exposure required a complicated scientific procedure, starting with careful review of all pertinent information on the chemical, derived from experimental, epidemiological and clinical studies. It is generally agreed within the scientific community that there are four steps or components which are typically involved in carcinogenic risk assessment. The first step, which is referred to as hazard identification, entails a qualitative evaluation of data concerning the potential of the chemical to produce a carcinogenic effect in man. The second step, exposure assessment, is the process of measuring or estimating real or hypothetical human exposure to the chemical of interest. The third step, dose-response assessment, is the evaluation of both hazard and exposure information to estimate the mathematical probability that the carcinogenic potential associated with the agent in the human population under defined conditions of exposure. In the final step, referred to as risk characterization, all relevant information from the first three steps is integrated to characterize the carcinogenic risk associated with expected human exposure to the chemical of interest. The process of carcinogenic risk assessment, therefore, relies strongly upon the availability and quality of information on the chemical of interest.

In conclusion, risk assessment is defined as a scientific procedure or logical frame-work to assess or infer the risk level or risk profile of the agent of interest in man on the basis of existing information. The execution of any given risk assessment, however, may be hampered by involvement of various uncertainties resulting from deficiencies or critical gaps in the necessary information on the chemical. On such occasions, it is necessary to make assumptions on the basis of the prevailing scientific thought concerning carcinogenic process, to take account of these uncertainties, so that risk assessment can still be completed. Therefore, risk assessment is regarded as a complex mixture of currently available data on the chemical of interest (Specific Information) and assumptions or inference rules based on the prevailing scientific thought on chemical carcinogenesis (General Information). From these points of view, the common ground for risk assessment can be divided into two categories. The first one is the issue of the specific information necessary for assessment, which includes the methodology of data production and the system of data distribution. The second one is the problem of reinforcing the general information for the assumptions or inference rules which indicate the need for basic research concerning extrapolation from animal to man, from high dose to low dose, from environmental concentration to exposure levels and from intake levels to active levels at the target site.

(Received May 31, 1990)

1. はじめに

リスク (危険, 危険性, 危険度) という用語はヒトによって, あるいは専門領域によって異なった意味に受けとめられている傾向にある。リスクアセスメントの分野では, リスク (risk) を「ある要因または要因群が定められた条件下でヒト, ヒト集団, 生態系等に対して特定の障害 (hazard) をひきおこす確率 (proba-

bility)」と定義している¹⁾。なお, リスクアセスメントは, 近年, 医学/生物学のみならず, 工学, 経済学, 社会学, 心理学等の領域においても試みられているが, 具体的な考え方, 手法については, 問題とする要因 (化学物質, 物理的因子, ストレス等), 障害 (発がん, 神経障害, 建築物の崩壊, 経済的破綻等) あるいは障害を受ける対象 (個人, 一般ヒト集団, 特定ヒト集団, 建築物等) の種類によって多少の相違がみられる。本

稿では、主題を「化学物質または化学物質群の生涯曝露によるヒト集団、特に一般ヒト集団における発がんリスクの評価」すなわち、化学物質の発がんリスクアセスメントに限定し、実例をまじえて、その目的、方法ならびに将来課題について述べる。

2. リスクアセスメントの目的

—リスクアセスメントとリスクマネジメント—

ヒトの健康を障害する要因には、生物的要因（細菌、ウイルス等）、物理的要因（放射線、熱、振動等）、化学的要因（各種化学物質）および社会心理学的要因がある。化学的要因は、従来、ややもすれば軽視される傾向にあったが、化学工業の発展に伴い、各種環境化学物質の生体に及ぼす様々な影響、特に慢性影響が注目されるにつれて、生体障害因子としての重要性が見直されるようになった。健康障害の最も極端な事例であるがんの発生についても疫学的調査結果からヒトがんの70%が環境化学物質への曝露に関係していると推定されている^{2,3)}。一方、ヒトの生活は衣食住を通じてすべてが広義の化学物質に依存している事実も忘れてはならない。化学物質とヒトとの関わり合いについてのこのような二面性を考慮に入れ、ヒトとの接触が確認もしくは推定されている様々な物質について、それらによるヒト集団における発がんリスクを適切に評価することはがん予防、厳密にはがん一次予防の対策の確立に必要な科学的知見を提供することになる。これが化学物質を対象とする発がんリスクアセスメントの目的である。

誤解を避けるために追加すると、リスクアセスメント自体はがん予防対策そのものではない。がん予防のためにはリスクアセスメントの結果を基礎にして対象とする物質または物質群の使用、摂取等について現実的な対策を立て、その実践あるいは実践の促進にふみきることが必要となる。これがリスクマネジメント (risk management) である。広義に解釈するとリスクマネジメントには2種類ある。第一は個人または個人集団がリスクアセスメントの結果等の情報に基づいて実施するリスクマネジメントである。例えば脂肪の過剰摂取が乳がん、大腸がんのリスクを増加させる可能性があると言う知見に基づいて食生活様式を変更したとすれば、これは個人レベルでのリスクマネジメントである。禁煙あるいは節煙も同様である。国立がんセンターから提案されているがん予防十二カ条 (Table 1) はライフスタイルに関連した発がん要因を対象とする個人レベルで実施可能なリスクマネジメントの方針を示したものである⁴⁾。第二はヒトに対する発がん

Table 1. がんを防ぐための12カ条

1. バランスのとれた栄養をとる
2. 毎日、変化のある食生活を
3. 食べすぎをさげ、脂肪はひかえめに
4. お酒はほどほどに
5. たばこを少なくする
6. 適量のビタミンと繊維質のものを多くとる
7. 塩辛いものは少なめに、熱いものはさましてから
8. 焦げた部分はさける
9. かびの生えたものに注意
10. 日光に当たりすぎない
11. 適度にスポーツをする
12. 体を清潔に

国立がんセンター監修、財団法人研究振興財団発行

ん性が確認もしくは推定された物質を対象とする行政上の規制である。医薬品、食品添加物等を含む各種化学物質についての製造/使用の禁止、使用制限—アフラトキシン B₁、ベンツピレン等の食品中濃度についての規制等はこれにあたる。これらの規制は国単位もしくは地域単位で実施されるがん予防を目的としたリスクマネジメントとも言える。

前述のごとくリスクマネジメントには多くの内容が含まれているが、発がんを対象とするリスクマネジメントと言え一般的には行政機関による規制を意味する。「近年、現実の行政判断に直接関連する課題もしくは行政の場に特有な事象を対象とした科学研究の分野」について、「行政科学 regulatory science」という名称が用いられている^{5,6)}。その意味からするとリスクアセスメントは regulatory science における重要な研究課題に数えられる。

3. リスクアセスメントの手順と問題点

3.1 リスクアセスメントの手順

発がんリスクアセスメントの目的は対象とする物質がヒトにがんを発生させるリスクがどの程度なのか、より端的に言えば「どの程度安全か危険か」を推定することである。このような推定を行うために必要な情報は次の3群に大別される⁷⁾。

- a) その物質はヒトに対する発がん性を潜在的に持っているか？
- b) ヒトはその物質にどの程度曝露されているか？
- c) その発がん性はどの程度の強さか？

これら3種の情報は一般に異なった研究技術によって得られるので、知見を評価する際にもそれぞれ異な

った専門的知識を必要とする。そのためリスクアセスメントでは集められた情報を次に述べる3つの段階に分けて評価し、次いで各3段階での評価結果を統合して最終的判断を加えるという手順がとられる¹⁾。

3.1.1 障害性確認 hazard identification

その物質がヒトに対する発がん性を潜在的に持っているか否かを判断する段階である。ヒトについての適切な疫学情報が利用出来れば最も有効である。しかし大部分の例では動物実験等の結果に基づいて判断される。この場合、実験系での知見がどの程度ヒトにあてはまるかの判断が必要となる。

3.1.2 曝露評価 exposure assessment

化学物質への曝露とは、化学物質と生体の内部・外部表面との接触と定義されている。端的に言うと、曝露評価とは食物や飲料水を通じての摂取、薬物の経口摂取、呼吸に伴う気道からの吸収、皮膚との接触等のすべてを対象とし、それぞれについて曝露の大きさ(量、濃度)、期間、頻度および経路を判断もしくは推定する段階である。曝露量の推定は技術的に困難な場合が多く、医薬品の場合には直接的に算定または推定することの可能な例もあるが、一般には関連のある他の指標を用いて間接的に推定する場合が多い。具体的な方法は、環境濃度の測定値に基づく推定、環境濃度の予測値に基づく推定、生体試料の測定値に基づく推定の3つに大別される²⁾。なお、曝露評価の結果は、次に述べる用量反応評価の結果と組み合わせて利用されるので、可能な限り両者が対応する内容であることが望ましい。また、特定の集団が特異的曝露を受けるときは、地域的、職業的、あるいは年齢別などの分布を求めることも必要となる。曝露評価はリスクアセスメントにおける極めて重要な要素であるが、著者の専門からはずれるので、技術面の詳細は別書に譲る。

3.1.3 用量反応評価 dose-response assessment

曝露量(投与量、摂取量、接触量)と発がん率との関係から、対象とする物質の発がん性強度を推定する段階である。一般に、用量反応評価の結果は特定の曝露量に対応するリスクの程度、もしくは特定のリスクに対応する曝露量のレベルの形で示される。例えば、A物質 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日の生涯曝露による肝がんのリスクは 10^{-6} 、あるいは肝がんのリスクを 10^{-5} にとどめるために必要なB物質の生涯曝露による用量は $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日等である。用量反応評価においても適切なヒトの疫学データがあれば好都合であるが、一般には長期動物試験等の知見が用いられる。なお、長期動物試験データおよび疫学データのいずれの場合においても、入手し得る情報の多くは比較的高濃度の曝露

によるものなので、実際のリスクアセスメントに際して必要な低濃度でのリスクを推定するためには数理モデルによる低濃度への外挿が必要となる。

3.1.4 リスク判定 risk characterization

最終的に、上記3段階での検討結果を統合して、対象とする物質が通常の曝露条件、日常の摂取量あるいは予想される曝露条件下で、ヒトに対してどの程度の発がんリスクを示すかを推定する。この段階をリスク判定と言う。リスクマネジメントあるいは対象とする物質についての行政的な規制決定はこのリスク判定の結果に基づいて行われる。したがって、リスクアセスメントは、研究によって得られた様々の知見をリスクマネジメントに反映させるための手順と考えることが出来る。

3.2 リスクアセスメントと不確定要因

簡単に言って、リスクアセスメントは、対象とする化学物質の生体影響、本稿では発がん性に関連する既存の情報を慎重に評価して、その結果に基づいてその物質のヒトに対するリスクの程度を推定する作業である。したがって、リスクアセスメントによる最終的判断の信頼性は各段階での評価に必要な情報量に依存している。十分な情報が得られる限り、リスクアセスメントは容易であるが、このような例は稀で、実際には情報不足により、言い換えると不確定要因(uncertainty factor)の介入により、作業の進行が妨げられる場合が多い。不確定要因の中には情報の不足の他に、情報間での結論の食い違いによるものも含まれる。一般にリスクアセスメントの作業の過程で不確定要因の介入が気付かれた場合には、関連分野での基礎的な研究知見(例えば、発がん機序に関する研究知見、代謝活性化に関する生化学的知見)に基づいて適切な仮説を設定して作業を進める方法がとられる³⁾。したがって、リスクアセスメントは2種類の情報、すなわち1)対象とする物質もしくは関連類似物質についての特異的な情報と、2)化学物質による発がんに関連する基礎的な研究情報(一般情報)に基づいて実施されると言える。現在、発がん研究は日進月歩の状態にあるために、リスクアセスメントに際し一般情報に基づいて設定される仮説は時代とともに、厳密に言えば、リスクアセスメントの担当者が持っている科学的知識の水準もしくは発がんに関する考え方に依存して変化してくる。したがって、極端な例では、同じ特異的情報を用いているにも拘らず、設定する仮説の違いによってリスクアセスメントの結果が著しく相違することもあり得る。実際にリスクアセスメントの結果について交わされる論議の多くはアセスメントの作業に際して設

定される仮説、特にその物質の危険性あるいは安全性のどちらか一方を極端に重視した仮説に起因するものである。次に仮説設定の実例を示そう。

実例1: AF-2, 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide は1965年にボツリヌス菌, サルモネラ菌に対する効果から食品添加物としての製造使用が許可された。1973年になり, この物質が変異原性を有する事実が明らかになり⁹⁾, さらにマウスを用いた長期実験で前胃に扁平上皮がんを発生させるという知見が得られた¹⁰⁾。これらの事実に基づいて1974年に AF-2 の製造/使用許可は取り消された。現在の基準から考えると, その時点において提出された AF-2 の発がん性に関連する特異的情報には多少不十分な面が残されているが, この行政決定(リスクマネジメント)の背景となったリスクアセスメントにおいて, これらの不備を補うために次の仮説が設定されている⁷⁾。

- ① 変異原性試験の結果から考えて AF-2 は遺伝子障害性を有する発がん物質とみなされる。
- ② この種類の発がん物質には閾値がないと言う前提を取る方が適切である。
- ③ ヒトは AF-2 の発がん性に対し実験動物と同程度以上の感受性を有するであろう。

遺伝子障害性発がん物質, genotoxic carcinogen (後述) を対象とするリスクアセスメントに際しては, 特別の情報がない限り, 現在でも上記仮説を採用する場合が多い。

実例2: 臭素酸カリウムは1973年に, 製パンに用いる小麦粉の改良剤としての使用が許可されている。1979年に, この物質は細菌を用いた変異原性試験および培養細胞を用いた染色体異常試験において陽性の結果を示し¹¹⁾, 引き続き1982年に, ラットを用いた長期経口投与実験において腎がんを誘発する事実がみられた¹²⁾。さらに, 15 ppm から 500 ppm までの段階の濃度を用いた長期経口投与による用量反応関係を求める実験が行われ (Fig. 1)。その結果から 10^{-6} リスクにおける臭素酸カリウムの実質安全濃度 (100 万分の1 の確率でがんを発生させるための濃度) が 0.95 ppm であると算定された^{13,14)}。一方臭素酸カリウムは加熱によって分解しやすく, 小麦粉に 50 ppm の濃度で添加した場合には, パンの中に残留は認められず, 150 ppm を添加した場合にも 5 ppm の残留がみられるにすぎない。実際に Fisher らは臭素酸カリウムを 75 ppm の濃度で添加した小麦粉を用いて製造したパンをラットの基礎飼料として2年間の長期実験を実施し, 有意な腫瘍発生がみられなかったと報告している¹⁵⁾。以上の知見を基礎にして, 現在日本では最終製品 (パ

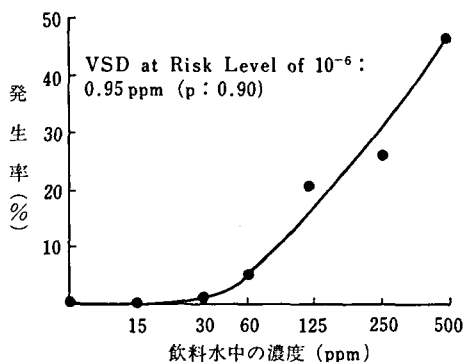


Fig. 1. 臭素酸カリウムの110週間経口投与による腎腫瘍発生用量反応関係

ン)中に残留が認められないという条件で, 30 ppm までの濃度の臭素酸カリウムを小麦粉に添加することが許可されている。なお, 化学分析による臭素酸カリウムの検出限界濃度は, 先に述べた, 実質安全濃度 0.95 ppm よりはるかに低いとの事である。この例においても, 動物実験において認められた発がん性はそのままヒトに適用されるという仮定の基にリスクアセスメントが進められているが, 実例1との相違はリスクマネジメントの段階で曝露評価のデータを採用している点である。

4. 有害性確認の実際

有害性確認は曝露評価とならんでリスクアセスメントに必要な基本的知見を提供する過程であり, 用量反応評価においてリスクを推定(算定)する際の条件設定にも関与する。なお, 用量反応評価(定量的リスクアセスメント)と対比して, 有害性確認を定性的リスクアセスメントを呼ぶ場合がある。

4.1 有害性確認に必要な情報

1) 基本的事項: 対象とする物質の①ヒトにおける曝露の経路(経口, 経気道, 経皮等), と様式(持続的曝露, 間欠的曝露, 曝露期間等), ②物理化学的性質(安定性, 水溶性, 脂溶性等), ③化学構造, ④純度および不純物等の知見。

2) 動物試験成績等の実験データ: ①動物による長期発がん性試験のデータ, ②変異原性試験等の短期試験ならびに発がん性機序の解析を目的とした研究データ, ③免疫機能の抑制, 内分泌環境への影響, 生体内代謝, 器官毒性等に関する毒性実験データ(後述)。

3) ヒトでの調査データ: ①対象とする物質の曝露による結果と予想されるがんの症例報告, ②相関研究-Correlation study によるデータ, ③ケースコントロ

ール研究、コホート研究等による分析疫学的データ。

疫学的調査は、発がん性が疑われる物質への曝露によるヒトの反応を知るための重要な情報であるが、調査結果が様々の要因、例えば、①曝露群と対照群の選択基準、②調査期間、③バイアス、攪乱因子への対応、④採用した統計学的手法等の影響を受けるので、評価に際して細心の注意をはらう必要がある。一般に、①複数の独立した調査で同じような相関が示される、②相関性の程度が強い、③用量反応相関が認められる、④曝露の減少に伴ってがんの発生率が低くなる等の知見が得られる因果関係についての推論の信頼度が増す。なお、国際がん研究機構 (IARC) ではヒトでの調査による発がん性に関する知見を次の5段階に分類している¹⁶⁾ (詳細は4.2.5を参照)。

① ヒトに対する発がん性について十分な証拠がある。すなわち、対象とする物質とヒトにおける発がんとの間に因果関係が認められる。

② ヒトに対する発がん性についてある程度 (limited) の証拠がある。すなわち、因果関係があると思われるが、偶然性、バイアス、攪乱因子による可能性も否定出来ない。

③ 証拠が不十分である。すなわち、相関が認められるが、偶然性、バイアス、攪乱因子による可能性も否定出来ない。

④ 証拠がない、適切に企画、実施された分析的疫学調査において、曝露と発がんとの間に相関がみられない。

⑤ データが入手し得ない。

4.2 長期動物試験成績の評価

対象とする物質のヒトに対する発がん性の可能性を評価する際に、疫学調査の結果および長期動物試験の成績が用いられるが、適切な疫学調査が実施されている例は稀なため、評価の根拠を長期動物試験成績に求める場合が多い。特に新しい医薬品、食品添加物等のヒトに対するリスクについての判断は長期動物試験等の実験データに依存せざるを得ない。

一般に化学物質のヒトに対する有害影響の検討を目的とする動物試験の評価には3つの段階がある¹⁷⁾。第1は、その試験が評価可能な試験であるか否かについての評価、すなわち技術面の評価である。第2は、試験結果を動物実験レベルの問題として考える評価、そして第3は、得られた試験結果のみならず、関連情報を含めて、被験物質のヒトに対する影響を判断するための評価、いわばヒトへの外挿を指向した評価である。詳細は別書¹⁷⁾に譲り、本節および次節に概要を述べる。

4.2.1 技術面の評価

実施された試験がガイドラインあるいは GLP 基準に沿っているかと言う事だけでなく、被験物質の化学的性状、生物学的性質および予想されるヒトへの投与条件から考えて、目的に合った試験が適切に立案され、正しく実施されたかについての評価が重要である。特に、発がん性試験は多数の動物を用い、長期間にわたる大規模な仕事であるため、実験条件の些細な変動により試験全体が大きな影響を受けることも有り得る。したがって、試験結果の評価にあたり、実施された実験の細部を再検討する必要がある。

a) 試験動物の選択と飼育条件が適切であるか？

b) 被験物質の純度、不純物、内容、担体もしくは飼料中での安定性等が適切に検討されているか？

c) 投与経路の選択が適切であったか？ 被験物質の投与はヒトでの曝露経路に準じた経路によるというのが原則である。臨床適用が経口、皮下注射、経皮ならば、そのまま動物実験にも当てはまるが、中には技術的に困難な場合もある。このような例では、投与後の体内動態を考慮に入れて、適切な投与経路を選ぶ必要がある。静脈内注射を腹腔内注射に、筋肉内注射を皮下注射に変更するのはその例である。いずれの場合においても、採用した投与方法によって目的に沿った結果が期待し得るといふ科学的根拠を明確にし、その旨を報告書に記載しておく必要がある。

d) 最高用量の設定が適切であるか？ 日本のみならず、いずれの国のガイドラインをみても、発がん性試験における最高用量を「腫瘍以外の原因で動物の寿命に影響を与えることなく、最小限の毒性変化を現わす量 (最大耐量, MTD)」と規定している¹⁸⁾。この規定は発がん物質の投与量と実験動物における発がん率との間に次のような関係がみられることが根拠になっている。

① 被験物質の全投与量の増加に伴って発がん率が高くなる。

② 被験物質の1日当たりの投与量を増加させると発がんまでの期間が短縮し、1日当たりの投与量を低くすると発がんに必要な全投与量が少なくてすむ。

以上の関係は強力な発がん物質についての実験結果から得られたものなので、そのままの形で作用が微弱な発がん物質に適用され得るとは限らないとしても、考え方の上では受け入れられる。この観点に立つと、発がん試験では被験物質の動物に対する毒性を考慮した上で、1日当たりの投与量を出来るだけ高くする方が、試験結果を短縮しうる点で有利であり、試験結果が false negative (本来陽性であるべきものが陰性の結果となる) になる危険も少なくなる¹⁷⁾。フェナセチ

ンを例にとると、この物質は従来より人において腎あるいは膀胱の発がん性が疑われていたが、井坂らによる報告の以前には、動物に対して発がん性を示さないものと判断されていた¹⁹⁾。井坂らの実験と他の研究者による実験との根本的な相違は用量設定の点にある。すなわち井坂らは最高用量を亜急性毒性試験の結果に基づいて決定しているのに対し、他の研究者は人における臨床用量より定めている。そのために両者の間に10倍の開きが出ている。

e) 中用量および低用量の設定が適切であったか？ガイドラインによると、適切な公比 α を選び、中用量を $\alpha \times \text{MTD}$ に設定するように定め、かつ α^2 が0.1より大にするように規定している。なぜ $\alpha^2 \geq 0.1$ でなければならないかについて考えてみよう。

MTDは3ヶ月間程度の亜急性毒性試験の結果から決められるので、2年間の投与実験におけるMTDより大である可能性がある。このような場合には、発がん性試験での投与期間中に多くの動物が死亡するという結果を招く。そこで、最高用量(MTD)群の大半が死亡し、中用量および低用量群は生存したが統計学的に有意な腫瘍発生がなかったという例を仮定する。この場合、もし α^2 が0.1より大きいと、等しいとすると、MTDと中用量の間がそれ程離れていないため、中用量が定義された最高用量に近くこれを代行し得るので、発がん性がないという判断を下し得る。一方、 α が小さすぎると(例えば0.1)、中用量は最高用量を代行出来ないので、たとえ有意な腫瘍発生がなくても発がん性がないという判断を下し難い。これが第一の理由である。もう一つの理由がある。最高用量における発がん率が低く、これだけで判定が困難な場合でも、 α が大きいと中用量でもある程度の腫瘍発生が期待されるので、用量反応関係から発がん性の判定が容易になる。このような例で、もし α が小さいと中用量での腫瘍発生は0になり評価が著しく困難になる。このような用量設定の方式は、被験物質の発がん性が陰性もしくは極めて微弱である事を前提として定められたものである。したがって、あらかじめある程度の発がん性があると予想されるが、有用性から考えて開発に結び付けたいというような物質の場合には、始めから別の用量設定方式を考える必要がある。

f) 投与期間が適切であるか？

g) 各種検査が適切に行われているか？ 例えば、病理学的検査が不備なために、発生した腫瘍、特に微小がんを見逃し、その結果、評価に著しい影響を及ぼすことがある。したがって、病理解剖時の丹念な観察と詳細な記載および、肉眼的に認められた病変を確実に

に組織標本上に現わす努力が必要である。

4.2.2 試験結果の評価

発がん性試験結果の評価とは、各検査データに基づいて、被験物質が使用した動物に対して発がん性を示すか否かの判断を下すことである。化学物質の生物作用に関する試験結果を判断する手順として、一般的には、被験物質に対する生体の反応を数量的なデータで表わし、次にそれらの数値について統計学的解析を行って対照群と実験群の差あるいは用量反応関係等が検討される。発がん性試験においても、原則的に1例1例の病理検査成績に基づいて各群について何らかの数量的データ、例えば発がん率あるいはがん発生までの平均期間などが算出され、それについて統計学的解析が実施される。なお、統計学的手法には色々あるが、著者はPeto方法²⁰⁾を推奨したい。

WHO Tech. Rep. Ser. 426 (1969)では、得られた試験結果に統計学的解析を行い、次のような形式の反応がみられた場合に発がん性が陽性と判定されると述べている。

① 対照群にみられないタイプのがんの発生があった場合。

② 対照群にもみられるがんが実験群により高率に発生した場合。

③ 対照群に比べて、より多種類の器官・組織に腫瘍の発生がみられた場合。

④ 実験群と対照群の間で発がん率の差はみられないが、実験群におけるがんの発現が対照群に比しより早期な場合。

化学物質に対する一般の生物反応に比べて発がんの過程は極めて複雑なので、単純な統計学的解析だけでは誤りを招く危険もある。例えば、明らかにがんとなしうる病変の発生率が低く、対照群と実験群との間に統計学的有意差が認められなくても、同じ器官にいわゆる前がん性変化あるいはがんの発生母地と思われる病変が高率にみられる例では、被験物質のその器官に対する発がん性の疑いは濃厚である。

4.2.3 発がん機序についての考察

WHOの判定基準によると、発がん性の有無は実験群と対照群における発がん率もしくは発がんの時期を比較することによって決められる。言い換えると、動物に有意な腫瘍発生をおこす物質は、作用機序のいかに拘らず発がん物質と定義される。しかし、このような基準で発がん性有りとして認められた物質の中には作用機序が全く異なっているもの、活性の程度に著しい差のあるものが含まれており、それらを同じように発がん物質とみなしてヒトに対する影響を一率に評価す

る考えは科学的にみて必ずしも妥当ではない。特に医薬品の場合には有用性の観点から、たとえ発がん性試験の結果が陽性であっても開発を進めたいという例も有り得る。このような場合での対応として、被験物質によって動物にがんが発生したという事実の持つ生物学的意義あるいはヒトに対するリスクの意義を作用機序の立場から考えてみる必要がある¹⁷⁾。

1) 発がん物質の分類

現在、発がんの機序には不明な点が多いが、動物に長期間投与することにより、その発がん率を高めたり、発がん時期を早めたりする物質を大雑把に二つに分けることが出来る²¹⁾。

a) 遺伝子障害性発がん物質 genotoxic carcinogen, 一次性発がん物質 primary carcinogen

被験物質もしくはその代謝物が標的細胞の遺伝子に作用(発がん遺伝子の活性化, 発がん抑制遺伝子の不活性)してがん化を起す物質を遺伝子障害性発がん物質, あるいは一次性発がん物質と呼ぶ(以後, genotoxic carcinogen)。ニトロソ化合物, 多環芳香族炭化水素, アルキル化剤などの古典的な発がん物質はすべてこの範疇に含まれる。

Genotoxic carcinogen は一般に生体内で代謝活性化され, 電子親和性の中間体となって DNA の求核部位と反応して付加体を生成したり, アルキル化のような修飾をする事が知られている。したがって, 通常の発がん性試験で陽性の結果が得られた場合, その物質について標的細胞の DNA に対する反応性を検討する事は genotoxic carcinogen であるか否かの判断の手掛かりになる。DNA 付加体あるいは修飾の検出には生化学的分析法が用いられるが, 付加体については最近 Randerath により開発された ³²P-ポストラベル法が有用である²²⁾。この方法は芳香環等の付加したヌクレオチドと通常のヌクレオチドがクロマトグラフの上で異なった挙動を示す事実に着目したもので, 感度が高く, 10⁸ 個のヌクレオチドに 1 個の割合で生成した付加体の検出が可能であると言われている。なお, 微生物や培養細胞を用いた変異原性試験の成績も遺伝子障害性について有用な情報となる。

b) 非遺伝子障害性発がん物質 non-genotoxic carcinogen, epigenetic carcinogen, 発がん促進物質 carcinogenic promoter, 二次発がん物質 secondary carcinogen

生体のどこかに細胞のがん化が起こりやすいような条件をつくり, 結果的に対照群よりも高率のがん発生を起す物質について表題に示す様々な名称が与えられている。ここでは non-genotoxic carcinogen と総称

することにする。各種ホルモン, 生体内の内分泌環境を乱す物質, 特定の組織に壊死と再生を反復させる物質等はこの種の発がん物質として作用する可能性がある。免疫抑制物質も non-genotoxic carcinogen に入れられるが, 免疫抑制物質の多くは DNA にも作用するのでその場合には genotoxic carcinogen としての性格も有している事が多い。

Non-genotoxic carcinogen といわれる発がんプロモーターとの相違が時折大きな問題になるので, 両者の関係について説明しておきたい。発がん二段階説によると, 疾患としてのがんの発現にはイニシエーションおよびプロモーションと呼ばれる二つの過程が関与する。イニシエーションは正常の細胞が遺伝子の変化を受けて潜在的ながん細胞に移行する過程, プロモーションはそのような変化を受けた細胞が増殖して疾患としてのがんにまで進展する過程を言う。この様にプロモーションの過程を引き起こす物質を発がんプロモーターあるいはプロモーターと呼んでいる。理論的にはプロモーターを作用させただけではがんの発生は起こらないはずであるが, もし動物の体の中にあらかじめがん細胞が存在したり, 飼料中にたまたま混在した発がん物質によってどこかの器官の細胞がイニシエートされるような場合には, プロモーターだけの投与によっても腫瘍の発生が起こってくる。例えば遺伝的に肝がんがしやすいことが知られている C3H 系のマウスでは, 意図的に肝発がん物質を与えなくても肝細胞の中になんか変化を受けた肝細胞が存在するので, フェノバルビタールなどのプロモーターを作用させただけでも対照群に比べて早い時期に肝がんが発生してくる。同じことは他の自然発生腫瘍についても言える。

したがって, 定義から考えると, non-genotoxic carcinogen とプロモーターは異なった概念であるが, 実際問題として, 両者はかなり似通った面を持っている。

第一に, non-genotoxic carcinogen の長期投与による腫瘍発生は, マウスの肝, 肺, ラットの副腎髄質, 甲状腺, 乳腺等のような腫瘍が自然発生しやすい部位にみられる事が多い。したがって, non-genotoxic carcinogen の作用は腫瘍の自然発生の促進に過ぎないとの意見もある。

第二に, プロモーターの単独投与によって腫瘍の自然発生が促進される事実もある。

第三に, 二段階発がん実験において, non-genotoxic carcinogen の多くは標的組織に対してプロモーター作用を示す。

以上の知見をまとめてみると, non-genotoxic car-

cinogen とプロモーターの間に本質的な相違はないように思われる。極端に言うと、両者の相違はその物質の作用が non-genotoxic carcinogen として発見されたか、プロモーターとして発見されたかの違いによるのかもしれない。実際に、発がん性リスクアセスメントの分野ではプロモーターを non-genotoxic carcinogen の概念に含めて取り扱う傾向がある。

4.2.4 発がん機序を考慮に入れた評価

a) genotoxic carcinogen についての評価

IARC においてヒトでの発がん性が確かであると判断された物質を通覧すると、そのほとんどが動物に対しても発がん性を示す²⁴⁾。これらの物質の中で、genotoxic carcinogen とみなされるものについてみると、その相関はより明確である。したがって、動物に対する genotoxic carcinogen は、逆に、ヒトに対しても発がん性を示し得ると考えるのが妥当である。

このような観点からみると、genotoxic carcinogen とみなされる物質のリスクを評価する際には、次節で述べる用量反応評価が重要であるが、その他に被験物質の代謝に関する研究が有用な情報となる場合がある。例えば、活性代謝物の体内における生成が、曝露量をはるかに上回る高用量でのみ起こるといふ知見が得られた場合、あるいは代謝過程に著しい種差があって、活性代謝物の生成がヒトでは起こりにくいと判断される場合には、ヒトにおける危険度がかかなり低くなると予想される。

b) non-genotoxic carcinogen についての評価

Non-genotoxic carcinogen は標的細胞の遺伝子を直接的に障害せずに、発がんを引き起こす物質を言う。作用機序として内分泌環境や代謝環境の持続的な変化あるいは組織の壊死と再生の反復等が挙げられるが、厳密に言うと、標的細胞の増殖の促進、分化の促進もしくは抑制あるいはそれらに関連する酵素/機構の活性化を起す物質は non-genotoxic carcinogen として働く可能性がある。したがって、non-genotoxic carcinogen についての評価のポイントは、先ず実験動物のレベルで対象とする物質によってがんが発生する機序を明らかにし、次いでその機序がヒトにおいてどの程度おこるか推定することである。同時に、最も重要な事項として、評価の対象となる物質が genotoxic carcinogen ではない事実を明らかにすることが必要である。実際に、標的細胞の遺伝子に対する障害性の確認が不十分なために、本来 genotoxic carcinogen であるべきものを non-genotoxic carcinogen に分類する場合が有り得る。したがって、遺伝子障害の検出に関する技術の進歩に伴って、従来 non-genotoxic

carcinogen とみなされていた物質の一部は genotoxic carcinogen に再分類される可能性がある。

解熱鎮痛剤として用いられている phenacetin はその一例である。phenacetin の大量長期投与による腎がんの発生は臨床疫学的に古くから知られており、動物における発がん性についても井坂ら¹⁹⁾、中西らによる報告がある²⁰⁾。一方、発がん機序については、従来、この物質の変異原性が判然としていなかったために、中間代謝物質である phenetidine による尿細管の障害の持続がその要因に挙げられていた。すなわち、phenacetin は non-genotoxic carcinogen とみなされていた事になる。しかし、最近、Nohmi らはハムスターの肝を用いた実験で、phenacetin の代謝物の中に変異原性の強い3物質、N-hydroxyphenacetin, N-hydroxyphenetidine, N-nitrosophenetole を見出し、これらのいずれかが発がんに関与していると推定している²⁴⁾。

4.2.5 IARC における発がん性の評価

フランスのリヨン市にある国際がん研究機構 (International Agency for Research on Cancer: IARC) では、1971年以来ヒトに対して発がん性が疑われる化学物質を選び、各国の専門研究者を集めて、公表された動物実験結果、変異原性試験データならびに疫学調査成績に基づいて、ヒトに対する発がん危険度の評価を行ってきた。評価結果は、“IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans” の表題で1990年までに48巻が刊行されている。

IARC の評価では化学物質あるいは職業的曝露をヒトに対する発がん性の立場から次の4種類(細分類を入れて5種)に分類している。

1群: ヒトに対する発がん性が明らかな物質。

2群: 疫学的事実は不十分もしくは不適切であるが、動物発がん実験の結果からヒトに対する発がん性が疑われる物質。動物実験、変異原性試験および関連研究のデータ等を基礎にして2群をさらに2A群、2B群に分けている。

2A群: ヒトに対する発がん性が多分あると思われる (higher degree of probability) 物質。

2B群: ヒトに対する発がん性の可能性がある (lower degree of probability) 物質。

3群: ヒトに対する発がん性分類がされない物質 (多くは情報不足による)。

4群: ヒトに対する発がん性がないと判断される物質。

リスクアセスメントの立場から考えると IARC に

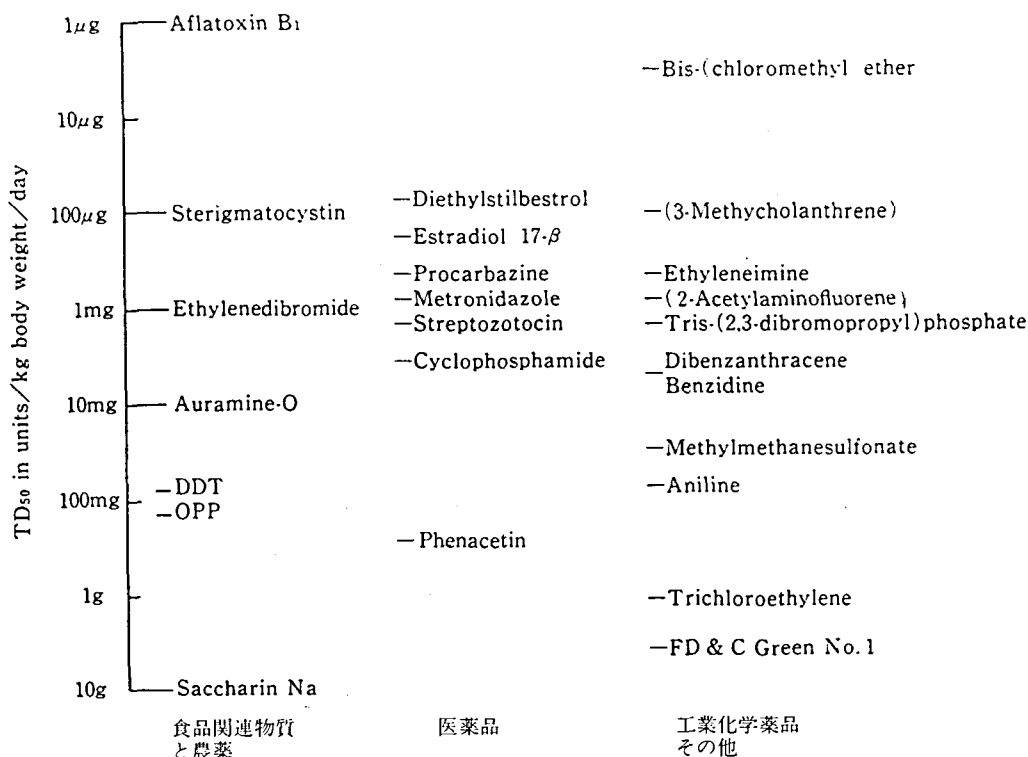


Fig. 2. 各種環境化学物質の生涯曝露による50%発がん量

おける発がん性評価は障害性確認に相当する。しかし、IARCの評価では、ヒトにおける疫学的事実が重視されているため、1群に属する物質は疫学的調査が実施されやすいものに限られる傾向があり、実際にすべての物質が職業性曝露もしくは医薬品である。その意味で、IARCの評価は予知評価ではなく、化学物質への曝露とヒト発がん性との関係についての、即知データに基づく現状確認の資料であるといえる。もちろん、これらの資料は予知評価を進める上での基礎に成り得るし、IARC内部においても、がん研究に関する最新の成果を踏まえて評価基準を改良し、より現状に即した評価を実施しようとする働きがみられる。

5. 用量反応評価 dose-response assessment の実際問題点

対象とする物質の曝露量 (D) とそれによってがんが発生しうる確率 (P) との関係 $P=f(D)$ を求めて、その物質のリスクを量的に推定する過程を言う。次に現状において試みられている代表的な方法とそれらの問題点について述べる^{1,4)}。

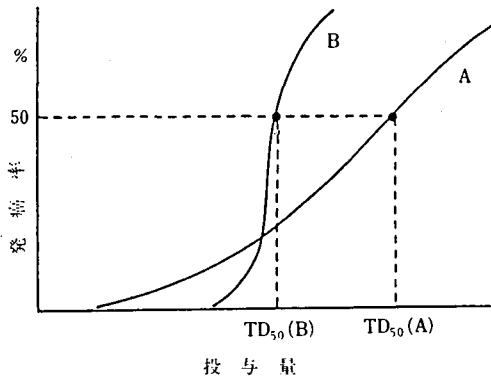
5.1 50%発がん量 (TD₅₀)

長期動物試験において求められた投与量 (特に1日当たりの投与量) と発がん率との関係にプロビットモ

デル等の数理モデルを適用して、50%の動物にがんを誘発させるための投与量 (TD₅₀) を算定することが出来る。TD₅₀ は多数の発がん物質についてそれらの強さを比較しようとする目的には有用であるが (Fig. 2), この値はヒトにおける曝露量に比べてはるかに高いので、それ自体では低濃度におけるリスクを判断する際の適切な情報にはなり難い。また、Fig. 3に示すように、TD₅₀ で比較した発がん性の強さ (A < B) が低用量になると逆転 (A > B) してしまうことも有り得る。したがって、ヒトでの危険性もしくは安全性を評価するには、低用量における発がん性の程度、言い換えると用量-反応曲線においても裾野の部分を調べる必要がある。

5.2 NOEL (No-observed-effect level), NOAEL (No-observed adverse effect level)

化学物質の安全性を評価する指標として、動物実験において投与した物質の影響が認められなかった用量 NOEL あるいは有害影響がみられなかった用量 NOAEL が古くから用いられている。厳密に言うところの方法には、以下の2点で問題がある：①得られた NOEL は、推計学的に裏付けされたものではないので、その意味が使用された動物数に依存する。すなわち、10匹中の0匹と1000匹中の0匹とは、統計学的に異



TD₅₀ は必ずしも低用量における発がん性の強さをしめす指標にはならない

Fig. 3. 発がんの用量-反応関係と TD₅₀

なった意味を持つ。②何の反応も現われないう「閾値」の存在を仮定しているが、各個体により閾値は異なるし、集団における閾値を推定することは困難である。しかし、化学物質の投与によって起こされた変化が可逆的の性質のものならば、動物実験でみられた NOEL を無作用量または閾値とみなしても安全性評価に際し、それ程大きな支障にはならない。一方、発がん性のように非可逆的影響の場合には、特定の試験においてたまたま認められた NOEL をその物質の閾値とみなすことは適切と言えない。

5.3 数量モデルによる低濃度外挿

生活環境における同じような低い用量レベルでの反応率(発がん率)は、動物実験によっても疫学調査によっても直接には観測出来ないの、これを補う方法として、長期動物試験で得られた用量-反応データに数理モデルを適用する手法が用いられる。この方法は、まず低濃度を含む何段階かの用量群についての長期動物試験を行い、次いで観察データに適合するように、モデル関数のパラメータを推定し、統計解析の手法によって、動物実験では反応が観察出来ないような低濃度領域における用量-反応関係を把握しようとするものである (Fig. 4)。発がん物質のリスク評価の指標として国際的に注目されつつある実質安全量, VSD (10⁻⁶, 10⁻⁸ 等の極めて低い率でがんを発生させるに必要な用量)はこの方法によって算定される。統計解析に用いられる数量モデルとして probit モデル, logit モデル, one-hit モデル, gamma multi-hit モデル, multi-stage モデル, Weibull モデル等が提案されているが、詳細は文献に譲り、ここでは数理モデルの一般概念に触れることにする。

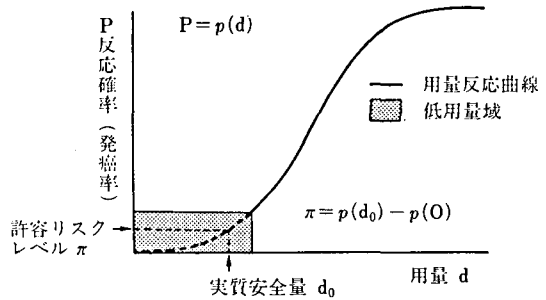


Fig. 4. 実質安全量の定義と算定法

数理モデルは、反応率 P を、用量 D の関数で表現するものである²⁵⁾。

$$P = f(D; \theta) = f(D) \quad \dots\dots ①$$

ここで、 θ は関数 f に含まれる数個のパラメーターである。モデルが実験データに十分適合した場合には、原データが持つ情報の大部分が、このパラメータにより表現されることになるので、以後の用量-反応関係の解析は、パラメーターの解釈へと転換出来る。そこで、用量が 0 (D=0) のときの自然反応率 (バックグラウンド反応率) を ρ ($0 < \rho < 1$) とする ($\rho = f(0)$)。このとき、用量 D において観察される反応率 P* の解釈として、以下の 3 通りの考え方がある。

(1) 独立の場合

$$P^* = \rho + (1 - \rho)f(D) \quad \dots\dots ②$$

すなわち、自然反応しないもの (1-P) のうちの $f(D) = P$ が、用量 D により反応すると考える。

(2) 加法性が成立する場合

$$P^* = f(D+d), \quad d > 0 \quad \dots\dots ③$$

d は ρ を導出する有効用量で、用量 D との和が実際に負荷された用量であると考える。

(3) 両者の混合

$$P^* = \rho + (1 - \rho)f(D+d) \quad \dots\dots ④$$

以上の②~④とも、 $\rho = 0$ の時は①に一致する。

以上の関係から実質安全量 (VSD) の算定を考えてみる。説明を簡単にするため、以下では②の場合のみを扱うことにする。

閾値あり (D₀) のモデルを考えると、

$$f(D) = 0, \quad 0 \leq D \leq D_0 \quad \dots\dots ⑤$$

であるから、

$$P^* = \rho + (1 - \rho)f(D) = \rho \quad \dots\dots ⑥$$

となる。閾値なしのモデルでは、

$$f(D) > 0, \quad D > 0 \quad \dots\dots ⑦$$

ゆえに、

$$P^* = \rho + (1 - \rho)f(D) > \rho \quad \dots\dots ⑧$$

となり、いかに低用量であっても、0 でない限りは、

観察される反応率は自然反応率を上回ることになる。

「安全性」を、「自然反応率が増加しない」として定義するならば、閾値なしのモデルを用いると、用量が0でない限り、「安全」とは言えなくなる。これは、発がん物質に関するデラニー条項の考え方でもある。そこで用量 D_1 により発生する生涯リスク $P_1=(D_1)$ が非常に小さな値 (10^{-6} , 10^{-8}) になると仮定すると、

$$P^* = \rho + (1-\rho)P_1 = \rho + (1-\rho)f(D_1) \dots\dots \textcircled{9}$$

となる。したがって、VSD は、関数 f の逆関数を f^{-1} とすると、 $\textcircled{9}$ より

$$\text{VSD} = D_1 = f^{-1}[\rho + (1-\rho)P_1] \dots\dots \textcircled{10}$$

として求めることが出来る。

前述のごとく、高用量でのデータを低用量領域まで外挿するために、多くの数学モデルが開発されている。しかし、多くの場合モデルは、観測データとはよく適合するが、低用量でのリスクの予測には不確実性が避けられない。現時点ではどのような場合にも適用できる単一の数学モデルは未だ確立されていない。異なるモデルを用いると、観測可能な領域では良く一致した予測値が得られても、低濃度領域での予測値には大きな差異がみられることが多い。この理由として、 $\textcircled{1}$ 従来の VSD の算定は通常の発がん性試験結果に基づい

ていることが多い事、 $\textcircled{2}$ 動物データに対するモデル関数の適合度の検定が不十分である事等が挙げられる。

したがって、統計学的にみて信頼度が高く、生物学的にも意味のある VSD を求めるには、先ずその目的に沿った実験計画法の研究が必要であると結論付けられる。別の観点から、用量・反応関係を考える際の用量として、標的部位における有効濃度を知ることが最も望ましいとの意見もある。実際に投与量が高くなると体内での代謝（活性化および解毒の両者）の飽和が起こり、投与量（曝露量）と有効量との関係が直線性を示さない例がある。したがって、体内動態を考慮に入れて低濃度領域における有効濃度を推定することが出来れば、それを「用量」として用いることによって数学モデルの確実性と有用性を著しく高くすることが可能である。キネティックモデルはこのような考え方を基盤としているが、実際にはこのモデルを適用するために必要な情報を得られない例が多い。

以上、低濃度外挿法には多くの問題点が残され、その解決には極めて長期の時間を要すると予想される。したがって、現実的には入手可能な通常の長期動物試験結果を用い、参考資料として使える程度の値の算定に止めざるを得ない。

5.4 non-genotoxic carcinogen の低濃度リスク評価

VSD の値が数理モデルによって著しく相違するという事実を仔細に調べると、その多くは non-genotoxic carcinogen についてであって、典型的な genotoxic carcinogen の場合には採用した数理モデルによる算定値の相違はそれ程顕著ではない。

Non-genotoxic carcinogen の作用機序は物質ごとに著しく異なり、さらに、genotoxic carcinogen の場合と違って、作用そのものが本質的に（曝露が短期間である限り）可逆的とみなされる。したがって、non-genotoxic carcinogen についての低濃度リスク評価においては、用量と発がん率の関係を調べるよりも、発がんに関与すると予想される作用、例えば内分泌環境の異常（プロラクチンや TSH の過剰分泌）、肝組織の壊死と再生の反復あるいは発がんにつながると思われる増殖性病巣の発生等についての用量作用関係や時間作用関係を調べる方が適切と考えられる^{14,21)}。なお、最近 non-genotoxic carcinogen の低濃度リスクを概算するための数理モデルが提案されている。

6. リスク判定

6.1 リスク判定において考慮すべき事項

前述のごとく、リスク判定とは有害性確認、曝露評

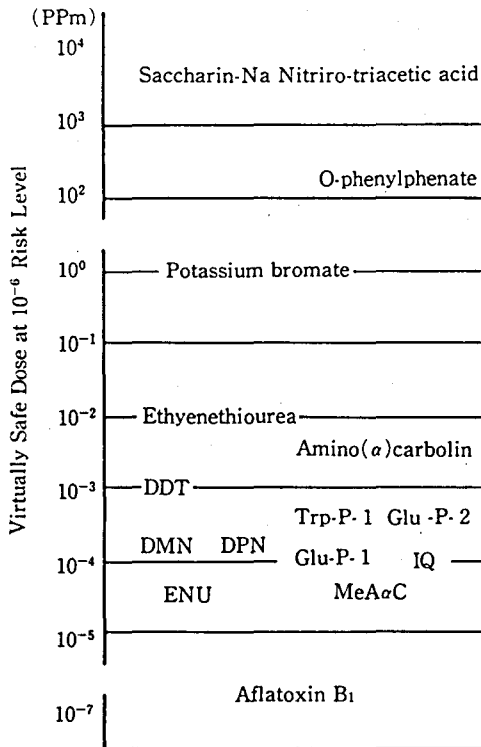


Fig. 5. 各種環境化学物質の実質安全量

価および用量反応評価において検討された知見を統合して、ヒトにおける(予想される)曝露量/条件において対象とする物質がヒトに対してどの程度の発がんリスクを示すかを判定する段階である。判定の結果は、対象とする物質についてのリスクマネジメント(規制決定)の基礎と成るので、それぞれのリスクマネジメントに反映しやすいような形式で結論を出すことが望ましい。例えば、規制が環境中の濃度である場合には、測定もしくは推定された濃度と発がんリスクとの関係を中心とした判定をする必要がある。米国のEPAでは長期動物試験結果に multi-stage モデル適用をして低用量への外挿を行い、曝露評価で判断された環境中濃度における発がんリスクの上限界を算出している²⁶⁾。一方、食品添加物や食品汚染物質の場合には、1日許容摂取量(ADI)あるいは許容残留濃度(acceptable residue level)等の判断を考慮に入れた評価が必要である。

リスク判定に際しても対象とする物質が genotoxic carcinogen か non-genotoxic carcinogen かによって考え方を考える必要がある。Genotoxic carcinogen の場合には、代謝等の研究でその物質に対する反応性にはっきりとした種差のある事実が証明されない限り、ヒトはその物質に対して最も高い感受性を示す種であるという前提でリスクを判定するのが原則である。一方、non-genotoxic carcinogen については反応性は種によって著しく相違し、ヒトが実験動物に比べて反応性が極めて低い例もしばしばみられる。したがって、non-genotoxic carcinogen についてのリスク判定には、有害性確認(発がん性の定性的評価)において検討された作用機序、種差等の知見が有用である¹⁷⁾。

実例3: 酢酸レチニールをラットに2年間経口投与すると副腎髄質の褐色細胞腫の発生率が対照群に比し有意に高まる²⁷⁾。では、酢酸レチニールはヒトに対してどの程度の発がんリスクがあるか? 酢酸レチニールの副腎髄質に対する影響のメカニズムの観点からこの問題を考えよう⁷⁾。

- ① 大量の酢酸レチニールをラットに与えると骨組織から Ca^{2+} が遊出して、血中の Ca^{2+} 濃度が上昇する。
- ② 血中の Ca^{2+} 濃度が上昇すると副腎髄質細胞におけるカテコールアミン合成が高まる。すなわち、機能亢進が起こる。
- ③ 褐色細胞腫はラットに自然発生しやすい腫瘍である。
- ④ ラットに自然発生しやすい他の内分泌組織の腫瘍と同様に、副腎髄質においても機能亢進の長期間持続に伴い過形成および腫瘍化が促進されると考えられ

る。

したがって、褐色細胞腫の発生に関する種特異性および酢酸レチニールによる骨組織からの Ca^{2+} の遊出が通常の投与量では起こらない事実を考慮に入れると、この物質を通常の用量で摂取した際のヒトの副腎髄質に対する発がんリスクは無視し得ると判断される。ソルビトール、ラクチトール、キシリトール等のポリオールや乳糖をラットに大量長期間投与した際にみられた副腎髄腫瘍についても同様な判断が可能である。

実例4: トリプシンインヒビターをラットに経口投与すると膵臓に腺房細胞由来の腫瘍が発生する²¹⁾。十二指腸下部および上部空腸に存在するI細胞は膵液に含まれるトリプシンの欠乏状態のとき、コレシストキニン(CCK)を遊離する。CCKは腺房細胞に作用し膵液分泌を促進させる。しかし大量のトリプシンインヒビターを経口投与すると、膵液から分泌されたトリプシンが補足されてトリプシンの作用がI細胞に到達しなくなる。そのためCCKが遊離して腺房細胞に刺激を与える。このような状態が持続するとラットでは腺房細胞の過形成がみられ、トリプシンインヒビターを経口投与すると、このような腫瘍の発生が顕著となる。しかしハムスターの膵臓がんは多くが膵管由来であり、腺房細胞由来のものは少ない。このような事実を考えるとラットは腺房細胞が刺激を受け易い動物種であるといえる。このようなケースもまたラットのトリプシンインヒビターの大量投与の結果生ずるもので、ヒトでは余り考慮する必要のない現象と考えられる。

6.2 採点方式によるリスク判定

通常のリスクアセスメントの方式とは別に、有害性確認に関連する試験結果を用いて、採点方式でリスクを判断する方法が、Gricemer-Cueto および Squire によって提案されている。批判も強く、現在のところ広く採用されている訳でもないが、考え方としては参考になるので、ここでは Squire の方法²⁸⁾を紹介することにする。

まず、対象とする物質についての試験結果を Table 2 に示す6つの因子(A, B, C, D, E, F)について採点し、点数の総和を発がん性の強さとする。

Aでは、腫瘍発生率の増加がみられた動物種の数を問題にしているが、これは既知発がん物質の多くが2種類以上の動物において発がん性を示している事実に基づいている。

Bは、腫瘍の発生した臓器数に関してであるが、これも多くの発がん物質が1種類以上の動物で1個以上の臓器を標的臓器とすることによる。一般に複数の動物種で多くの臓器に発がん性を示す場合、代謝、薬理、

Table 2. 採点方式による発癌性の量的評価法 (Squire, 1981)

因 子	点数
A. 有意な腫瘍発生の認められた動物種の数	
2 以上	15
1	5
B. 1 またはそれ以上の動物種における組織学的に異なるタイプの悪性腫瘍の数	
3 以上	15
2	10
1	5
C. 投与群において誘発された悪性腫瘍の適切な対照群における自然発生率	
1%未満	15
1~10%	10
10~20%	5
20%を越えるもの	1
D. 用量相関関係 (2年間の1日当り体重1 kg 当たりの累積経口投与相等量)	
1 μg 未満	15
1 μm~1 mg	10
1 mg~1 g	5
1 g を超えるもの	1
E. 誘発腫瘍における悪性腫瘍の割合	
50%を越える	15
25~50%	10
25%未満	5
悪性腫瘍なし	1
F. 適当な組みあわせの試験で測定された遺伝毒性	
陽 性	25
疑陽性	10
陰 性	0

各因子の点数を総計して発癌物質の強さをつぎのようなクラスに分ける。クラス1 (86~100点)。クラス2 (71~85点)。クラス3 (56~70点)。クラス4 (41~55点)。クラス5 (41点未満)。

解毒機構などを考えれば、その物質が哺乳類の一種であるヒトにも発がん性を示すだろうということが疑われる。

Cでは、検体投与群で腫瘍発生の標的となった臓器が、自然発生腫瘍のみられやすい部位であるか否かを問題にする。当然、自然発生率の低い臓器に発がん性を示す物質はより強度なものと判断する。

Dでは、用量相関関係が取り上げられている。従来、

腫瘍発現までの時間と用量の大小は最もよく発がん性の強度を示す指標と考えられてきた。しかし、腫瘍発現時期の算定は通常のガイドラインに従った発がん性試験では不可能なので、ここでは用量のみが取り上げられている。

Eでは、誘発された腫瘍の悪性度が、問題にされる。Criesmer の方法では悪性腫瘍の発生率のみが扱われているが、ここでは良性腫瘍の発生率も含めて考慮されている。すなわち、悪性腫瘍の比率が高いほど強度の発がん性を示すものと考え、同時に良性腫瘍から悪性腫瘍への移行の問題も取り入れられている。

Fでは、変異原性試験結果が考慮されているが、この場合、特定の試験法が列記されておらず、ある数種類の試験法の結果をまとめて、陽性、擬陽性または陰性として取り扱うようにしてある。

以上、6つの因子をそれぞれに点数を付けていけば、Table 3 に示すように総点数は最低13点、最高100点となる。この点数付けの際に注意すべきことは、もしも発がん性が1種以上の動物または性、各種の投与方法、投与量などで陽性であったときには、その最も感受性の高かった成績を因子 B, C, D, E に当てはめることである。原著者はこのようにして得られた総点数に基づいて、発がん性の強さを5つの順位に分類している。実例として、これまでに適切な発がん性試験が行われた化学物質の中から10種についての採点結果を示している。この表をみると、今まで印象的にしか理解していなかった発がん性の強弱がかなりはっきりした形で示されているように思われる。

Table 3. Squire の採点方式による発癌性評価の実例

発 癌 物 質	点数	クラス
アフラトキシン	100	1
ジメチルニトロソアミン	95	1
塩化ビニル	90	1
トリス (2,3-ジプロモプロピル)ホスフェート (Tris)	90	1
2-ナフチルアミン	81	2
クロロホルム	65	3
NTA	51	4
クロルデン	40	5
サッカリン	36	5
DDT	31	5

NTA: ニトリロ三酢酸

DDT: ジクロルジフェニルトリクロルエタン

7. リスクアセスメントの将来課題

—リスクアセスメントにおける情報の量と質—

リスクアセスメントは既存の情報に基づいて対象とする要因のヒトに対するリスク（ここでは発がん性リスク）を適切に判断することである。ここでは適切な判断とは、不確実性を可能な限り少なくした判断を意味する。言い換えると、リスクアセスメントの適否は情報の量と質およびその活用にかかっている。そこで稿を終えるにあたり、将来課題として、リスクアセスメントに有用な情報とその効果的な活用法について考えてみたい。

7.1 情報の量

クロード・シャノン情報は情報について「不確実性を減少させるもの」という定義を与え、情報量 (I) と不確実性 (u) との間に次の関係式を示している²⁹⁾。

$$I = \log_2(1/u)$$

この式は情報量を1単位ふやすと不確実性が半分になることを意味する。このような考え方は原則的にリスクアセスメントについても適用されるが、ここで問題になることは量の意味である。物事を頭の中であるいはコンピュータを応用して判断する際の過程を考えてみると、思考を進めるためには各段階においてそれぞれ必要とされる情報を入力することが前提となる。リスクアセスメントにおいて不確実性を減少させるための情報の量も単に物理的な意味での量ではなく、必要とする有意義な情報である。実際に、化学物質の毒性/安全性に関して集められた各種情報の中には、リスクアセスメントにおける有用性が感じられないものも少なくない。逆に言うと、情報をつくる段階、すなわち試験/研究を実施する段階において、安全性評価の立場から、それぞれの実験計画も慎重に検討する必要がある。この中には試験ガイドライン自身の再点検も含まれる。

7.2 情報の活用

提供された情報がリスクアセスメントの目的に対して十分に反映されているか否かについても考える必要がある。長期動物試験を例に挙げると、これらの試験結果の中で必ず活用される情報は投与濃度と発がん率の関係あるいは投与濃度と発がん時期との関係等のいわば形式化された情報である。研究者が前がん病変の頻度と分布、発がん母地と思われる病変の存在、がん病変と周囲組織との関係、あるいは内分泌環境への影響等の発がん過程あるいはがんの進展に関連する詳細な情報を提供したとしても、最終的にこれらの情報は全く無視される例も有り得る。極端ではあるが、対象

とする物質が明らかに non-genotoxic carcinogen でありかつ作用の発現に著しい種差があるという情報が有りながら、genotoxic carcinogen としてのリスク評価を受けるといふ事例も耳にしている。

情報が十分に活用されない原因として、情報そのものが不完全な場合もあるが、リスクアセスメントにおける論理のわく組（厳密に言えばリスクアセスメント担当者が持っているリスクアセスメントのわく組についての理解）が形式化され過ぎて、数理化あるいは記号化された情報面 (syntax) のみを受け入れ、情報の持つ意義 (semantics) の受け入れを排除する傾向のある事実も見逃し得ない。リスクアセスメント担当者は柔軟な態度で情報の解析/評価に対応すべきであろう。次節において具体的な対応の方法について触れる。

7.3 特異情報と一般情報

リスクアセスメントと不確実要因の節(3.2)で述べたごとく、リスクアセスメントは2種類の情報に基づいて進められる。第1は対象とする物質についての特異的な情報、第2は発がんの機序、代謝等に関する一般的な情報である。現行のリスクアセスメントは、先ず特異的情報を基礎として実施され、次いでその結果を補正し、不確実性を多少軽減させるために一般的情報が参照される。特異的情報を主体とするリスクアセスメントの方法は、正攻法であり、最も確からしい結果を与えるように見えるが、そこにはいくつかの問題があり、将来課題として、一般的情報をより広く利用する方法を考える必要がある。

1) 評価を必要とする物質の数は極めて多く、そのすべてについて十分な特異的情報を期待することは極めて困難である（生命科学の目的は安全性評価だけではない）。

2) 特異的情報に基づいて進められた評価に随伴する不確実性の多くは情報の形式面（投与量と発がん率との関係等）に由来するものではなく、情報の意味に関係のある事項に起因するものである。この様な不確実性の中には、一般的情報を適切に取り入れることにより解決される場合が多い。例えば、ラットを用いた長期試験で被験物質の投与群に甲状腺の濾胞腫瘍あるいは腺がんがみられた場合を考えよう。この場合、変異原性試験結果が陰性、薬理学的試験で血中の T3, T4 レベルの減少、TSH レベルの増加等の特異的情報があれば、この物質による甲状腺腫瘍の発生は直接的な遺伝子障害によるものではなく、内分泌環境の障害に起因するものと結論付けられる。このような判断は各種抗甲状腺物質の甲状腺に対する作用について収集された一般的情報に基礎を置いている。事例3, 4に

において述べた副腎髄質の褐色細胞腫および膵臓房腺腫の発生に関する判断も同様である。

同じ特異的情報を用いてリスクアセスメントを実施しているにも拘らず、2つのグループ間で違った評価結果が示されることがある。このような場合、その原因の多くは特異的情報の中に断片的に含まれる重要な知見、すなわち、がんが発生したことの医学・生物学的意義に関する知見をどの程度利用したかに関わっている。具体的な理由として、2つのグループ間で発がんに関する科学的知識のレベルが異なっているとも考えられるが、本質的には、リスクアセスメントのわく組の中で一般的情報の取り扱いが不明確なままに置かれている事実も指摘されるべきであろう。発がん性リスクアセスメントの実施を普及させるためには、発がんの機序、代謝の種差、内分泌環境の変動と発がん、発がん過程に及ぼすオータコイドの関与、暴露評価に関連する分析化学データの取り扱い等についての基礎研究を強化し、リスクアセスメントの基盤となる知見（一般的情報）を整理する必要がある。一般的情報が充実すれば、当然より少ない特異的情報で不確実性の少ないリスク判定が可能になると考えられる。さらには、将来展望として一般的情報を主体とし、それに限られた量の特異的情報を適用して対象とする物質あるいは物質群のヒトに対するリスクを評価する方法が確立されるものと期待される。

8. おわりに

リスクアセスメントは、本来、極めて微量の発がん物質もしくは活性の低い発がん物質への曝露に伴うリスクを評価するための方法、ないし思考論理のわく組として、米国 EPA において検討されたものであるが、現在、評価の対象をさらに拡大し、企業、行政を含む様々な機関で幅広く応用されつつある。本稿では、発がん物質を対象とするリスクアセスメントについて基礎となる論理と一般的な方法を解説したつもりである。勿論、現行のリスクアセスメントには批判もあり、技術的に改善すべき点も少なくない。しかし、リスクアセスメントの最も大きな功績は、一つ一つの化学物質を対象としてそれらの毒性/安全性の検討にそそがれた研究者/技術者の努力の成果が多くの人々の目に触れる機会を持ったことにあると、著者は密かに思っている。

謝辞：本総説は厚生科学研究「発がん性をもつ医薬品のリスクアセスメントに関する研究」、厚生省がん研究助成金による指定研究「発がん物質の規制決定に関する基礎研究」および対がん10ヶ年総合戦略プロジ

ェクト研究分野3「発がん促進とその抑制に関する研究」の班会議における討議をもとにまとめたものである。研究を分担していただいた班員の諸先生ならびに原稿作成に御協力いただいた吉村博之博士に感謝します。

文 献

- 1) Federal Register Part II. Office of Science and Technology Policy: Chemical Carcinogenesis; A Review of the Science and its Associated Principles (1985) 邦訳一厚生省生活衛生局食品化学課(監修), 林 裕造ほか(監訳): 化学物質の発癌性評価, 薬事日報社(1987)
- 2) Higginson, J.: Present trends in cancer epidemiology, *Proc. Cancer. Con.* 8, 40~75 (1969)
- 3) Boyland, E.: The correlation of experimental carcinogenesis and cancer in man. *Prog. Exp. Tumor Res.* 11, 222~234 (1967)
- 4) 林 裕造, 高橋道人: 代謝, 22巻 臨時増刊号「癌'85」, 3-7 (1985)
- 5) 内山 充: 厚生科学の最前線 4-レギュレトリーサイエンス, 厚生 1989. 1, 32~33 (1989)
- 6) 林 裕造: 厚生省がん研究助成金による研究報告集, 462 (1987)
- 7) Hayashi, Y.: Carcinogenesis, In Risk Assessment-The Common Ground, Proceedings of the Life Science Research Symposium held in Tokyo 1987, pp. 156~166 (1989)
- 8) 内山 充: 化学物質のリスクアセスメント手法に関する調査研究(環境庁) 財団法人公衆衛生協会, 1~13 (1987)
- 9) Kondou, S. and Ichikawa-Ryo, H.: Testing and clacification of mutagenicity of furylfuramide in *Escherichia coli*. *Japan J. Genet.* 48, 295~300 (1973)
- 10) Ikeda, Y.: Chronic Toxicity of Furyl furamide to Mice. Report to Food Sanitary Coommitte of the Ministry of Health and Welfare, Japan. [in Japanese] (1974)
- 11) Kawachi, T., Komatu, T., Kada, T., Ishidate, M., Sasaki, M., Sugiyama, T. and Tazumi, T.: Results of recent studies on the relevance of various shot-term screening tests in Japan. In the Predictive Value of Shot-term Screening Tests in Carcinogenicity Evaluation (G. M. Williams, R. Kroes, H. W. Waijers and K. W. Van de Poll, Eds.), pp. 253~257. Elsevier/North-Holland, Amsterdam/New York. (1980)
- 12) Kurokawa, Y., Hayashi, Y., Maekawa, Y., Takahashi, M. and Kokubo, T.: Induction of renal cell tumors in F-344 rats by oral administration of potassium bromate, a food additive. *Gann*, 73, 335~338 (1982)
- 13) Kurokawa, Y., Aoki, S., Matushima, Y., Takamura, N., Imazawa, T. and Hayashi, Y.: Dose-response studies on the carcinogenicity of po-

- tassium bromate in F344 after long-term oral administration, *J. Natl. Cancer Inst.* **77**, 977~982 (1986)
- 14) Hayashi, Y., Kurokawa, Y., Maekawa, A. and Takahashi, M.: Strategy of long-term animal testing for quantitative evaluation of chemical carcinogenicity, *New Concepts and Developments in Toxicology* (ed. Chambers, P. L., Gehring, P. and Sakai, F.), pp. 383~391, Elsevier Science Pub., Amsterdam, New York (1986)
 - 15) Fisher, N., Hutchinson, J. B. and Berry, R.: Long-term toxicity and carcinogenicity studies of the bread improver potassium bromate. I. Studies in rats. *Food Cosmet. Toxicol.*, **17**, 33~39 (1979)
 - 16) WHO: IARC Monographs of the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Supplement 4, Lyon, France (1982)
 - 17) 林 裕造, 長谷川良平: 発癌性試験の評価, *医薬品研究*, **18**, 495~504 (1987)
 - 18) 厚生省薬務局審査第一課: 医薬品毒性試験法ガイドライン1990解説, *薬事日報社*, 49~59 (1990)
 - 19) Isaka, H., Yoshii, H., Otsuji, A., Koike, M., Nagai, Y., Koura, M., Sugiyama, K. and Kanabayashi, T.: Tumors of Sprague-Dawley rats induced by long-term feeding of phenacetin. *Gann*, **70**, 29~36 (1977)
 - 20) WHO: Statistical Methods in Cancer Research. Volum III—The design and analysis of long-term animal experiments, IARC Scientific Publications No. 79 (1986)
 - 21) 林 裕造: 環境化学物質による発癌の病理. 第一次予防の病理学的基礎. *日病会誌*, **77**, 3~24 (1988)
 - 22) Randerath, K., Randerath, E., Agrawal, H. P., Gupta, R., Schurdak, M. K. and Reddy, M. V.: ³²P-Postlabeling methods for carcinogen-DNA adduct analysis. *Environ. Health Perspect.* **62**, 57~65 (1985)
 - 23) WHO: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenicity: An Updating of IARC Monographs Volume 1 to 42. IARC Monographs of the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Suppl. 7 (1987)
 - 24) Nohmi, T., Mizukami, K., Kawano, S., Fukuhara, M. and Ishidate, M.: Metabolic activation of phenacetin and phenetidine by several forms of cytochrome P450 purified from liver microsomes of rats and hamsters. *Jap. J. Cancer Res. (Gann)*, **78**, 153~161 (1987)
 - 25) 林 裕造, 高橋道人, 青木繁伸: 化学物質の発がん性評価. *食品衛生研究*, **34**, 1077~1099 (1986)
 - 26) Anderson, E. L.: Perspective on Risk Assessment of Carcinogens, Banbury Report 31, *Carcinogen Risk Assessment: New Directions in the Qualitative and Quantitative Aspects.* ed. Hart, R. W. and Hoerger, F. D., Cold Spring Harbor Lab., 281~294 (1988)
 - 27) Kurokawa, Y., Hayashi, Y., Maekawa, A., Takahashi, M. and Kokubo, T.: High incidences of pheochromocytomas after longterm administration of retinyl acetate to F344/Ducrj rats, *J. Natl. Cancer Inst.*, **74**, 715~723 (1985)
 - 28) Squire, R. A.: Ranking Animal Carcinogen. — a proposed Regulatory Approach. *Science*, **214**, 877~880 (1981)
 - 29) 金子郁容: <不確実性と情報>入門, 岩波セミナーブックス33, 岩波書店 pp. 109~159 (1990)

リゾチーム標準品中のマイナー成分について

横田 椅江・福田 秀男・田中 彰

On a Minor Component found in the Lysozyme Reference Standard

Isue Yokota, Hideo Fukuda and Akira Tanaka

A minor component separated by HPLC from egg-white lysozyme was found to have a different substrate specificity from the main component, lysozyme. However, it did not show any difference in molecular weight and immuno-cross reactivity from lysozyme.

There was no evidence based on our study that this minor component is an artificially-produced substance.

(Received May 31, 1990)

リゾチーム標準品(国立衛生試験所, Control 835)および市販リゾチーム製剤中のリゾチームに、イオン交換系カラムを用いた HPLC により分離しえるマイナー成分が存在し、標準品から分離したこの成分がリゾチーム様の酵素活性ならびにアミノ酸組成(酸加水分解法)を有することを押沢らが既に報告した¹⁾が、この成分についてさらに若干の知見を得たので報告する。

実験方法

1. 試 薬

4-methylumbelliferyl tetra-N-acetyl- β -chitotetra-*oside* はミドリ十字株式会社より入手した。 β -N-acetylhexosaminidase (ナタ豆) は生化学工業(株)より購入した。

2. 逆相系カラムを用いた HPLC 法

操作条件は次の通りである。

検出器: 紫外吸光度計(測定波長: 279 nm), カラム: LiChrosorb RP-18 (4 \times 250 mm), カラム温度: 室温, 移動相: (A) 0.1% TFA 含アセトニトリル, (B) 0.1% TFA, (A) 32% \rightarrow 50% (25分) グラジエント, 流量: 0.9 ml/min, 試料溶液: 1 mg/ml 水溶液, 注入量: 25 μ l.

3. メインおよびマイナー成分の分離調製法

リゾチーム標準品(国立衛生試験所, Control 832)を水に溶解して約 10 mg/ml の濃度とし、逆相系カラムを用いた HPLC を繰り返してメイン成分とマイナー成分の画分を分取し、各々をロータリーエバポレーターにより乾固したのち、少量の水に溶かして凍結乾

燥した。得られた両成分の同一条件によるクロマトグラムを Fig. 1 に示した。

4. 卵白からのリゾチームの分離調製法

スーパーマーケットより購入の鶏卵10個から卵白を集め、1/10量の水を加えて静かにかき混ぜた後、ガーゼを用いてろ過し、これに5%相当量の塩化ナトリウムを加えて溶解させた後、1N 水酸化ナトリウムを用いて pH を 10.3 とし、冷蔵庫内に7~10日間保存した。生じた結晶を遠心分離して集め、これを0.25%酢酸に溶かし、ろ過して不溶物を除去したのち、5%相当量の塩化ナトリウムを加え、以下同様の操作をさらに4回繰り返して針状結晶のリゾチームを得た(収量: 約 35 mg)。

結果と考察

1. リゾチーム標準品各種ロット中のマイナー成分含量

これまでに製造され、-7 $^{\circ}$ C で保管されていた国立衛生試験所リゾチーム標準品の中、原料ロットの異なるもの6種について、逆相系カラムを用いた HPLC による挙動を調べたところ、Fig. 2 に示したように、イオン交換系カラムの場合¹⁾と同様にマイナー成分がメイン成分の直前にピークとして分離されることが明らかとなった。これらロット間のメイン成分に対するマイナー成分の含有比を面積積分法により算出したところ、Table 1 に示した様に両成分の含有比が原料ロット間で一定ではないことがわかった。さらに、

Table 1 中に示した Control No. の初めの2桁はその原料ロットを標準品として小分けし保存した時点の

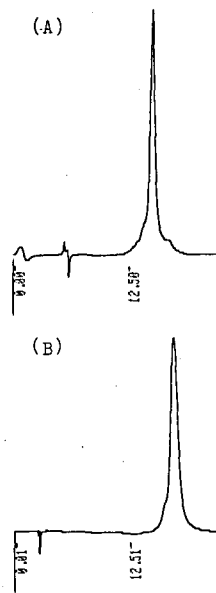


Fig. 1. HPLC chromatograms of minor (A) and main (B) component fractions obtained from egg-white lysozyme (NIHS reference standard, Control 832)

HPLC conditions: column, LiChrosorb RP-18 (4 × 250 mm); mobile phase, (A) 0.1% TFA-acetonitril, (B) 0.1% TFA, (A) 32%—50% (25 min), gradient; column temp., room temp.; detector, 279 nm; flow rate, 0.9 ml/min

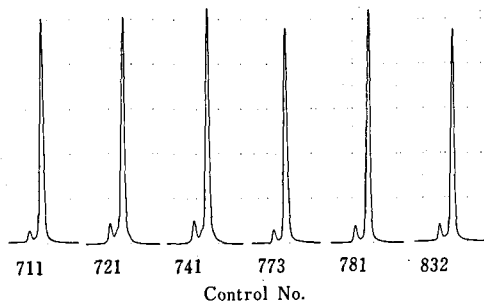


Fig. 2. HPLC chromatograms of the lysozyme NIHS reference standards prepared from different materials

HPLC conditions are the same as in Fig. 1.

西歴を示すことから、例えば Control 711 と 832 では保管期間に10年以上の差のあることを示すので、この表および Fig. 2 から、このマイナー成分は経時的に増加するものではないことがわかる。

2. 再結晶化とマイナー成分の含有量

リゾチーム標準品は企業より入手した原料を小分け

Table 1. Content-ratio of minor component against main component in several different lots of the lysozyme NIHS reference standard

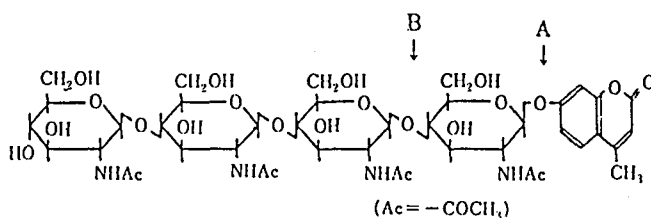
Control No. of the reference standard	Content-ratio
	minor/main (%)
711	5.05
721	9.40
741	9.52
773	6.46
781	7.69
832	8.42

して製造されたものである。したがって、マイナー成分が企業ベースの分離精製過程における人為的産物ではとの疑問を解くため、次のような実験を行った。

リゾチーム標準品 (Control 832) 約 30 mg を水 5 ml に溶解し、5%相当量の塩化ナトリウムを加えて溶かした後、0.05N 水酸化ナトリウムを用いて pH を 10.3 に調整し、冷蔵庫中に放置して結晶化したリゾチームについて、逆相系カラムを用いた HPLC によりそのマイナー成分含量を結晶化前の標品のそれと比較した。その結果、両者のクロマトグラムのパターンは全く一致し、両成分の含有比に差を生じなかった。また、これとは別に、メイン成分について上述と同様の操作で再結晶化を試みたところ、結晶化には成功しなかったが、得られた沈殿物について同様にクロマトグラムを調べたところ、処理前後に何ら差が認められなかった。これらのことは、マイナー成分が再結晶化で除去しえるものではなく、また、再結晶化の操作により生じるものでもないことを示している。また、実験室規模により卵白から分離精製して得たリゾチームにもメイン成分に対して 6.2%相当量のマイナー成分が検出されたことから、マイナー成分が企業規模による分離精製過程で生じたものである可能性も否定できない。

3. 分子量および免疫学的交叉性の検討

マイナーおよびメイン成分について、全自動高速電気泳動装置 (PhastSystem, ファルマシア社) を用いて SDS 電気泳動を試みたところ、両者の移動速度は全く一致し、分子量の差異は見出されなかった。また、メイン成分を抗原として調製したウサギ抗血清に対し、オクタロニー法でマイナー成分は沈降線を示し、メイン成分と交叉したことから、免疫学的にも両成分間に差異は見出されなかった。マイナー成分のアミノ酸組成もリゾチームとの間に相違が認められていない¹⁾が、

Fig. 3. A lysozyme substrate, 4-methylumbelliferyl tetra-N-acetyl- β -chitotetraoside

イオン交換系および逆相系カラムを用いた HPLC で分離する以上は、リゾチームと何らかの構造上の差異が存在するはずであり、この点に関しては現在検討中である。

4. 基質特異性

稲葉ら²⁾によって合成されたリゾチーム基質 4-methylumbelliferyl tetra-N-acetyl- β -chitotetraoside (Fig. 3) に対し、リゾチームが Fig. 3 に示した結合位置 A と B を約 1 : 4 の速度で切断することは福田ら³⁾によって報告されている。そこで、マイナー成分のこれら位置の切断速度比を調べるため、福田らの方法³⁾を準用した β -N-acetylhexosaminidase (NAHase) を添加した系と、谷本らの方法⁴⁾を準用した添加しない系により、メイン成分とともにマイナー成分の比活性 [mg (力価)/mg] を測定したところ、Table 2 に示す結果を得た。NAHase を添加しない系では基質の結合位置 B で切断される分が測定されないため、NAHase を添加した系としない系で得られた力価の差が B 位置の切断により生じた分であり、それと NAHase を添加しない系の値との比が A と B の切断速度比となる。Table 2 の結果から、マイナー成分の見掛けの A、B 切断速度比は約 1 : 2 となるが、Table 2 の値はリゾチーム標準品の力価を両系ともに 1.00 とした時の値であり、リゾチーム自身の A、B 切断速度比が約 1 : 4 であるので、マイナー成分の真の A、B 切断速度比は約 1 : 8 となり、リゾチームと異なる基質特異性を有することが判明した。なお、ここでは一種類の基質に対してのみの基質特異性の違いを検出したが、このことは、その他の基質に関する特異性についても、リゾチームと異なる可能性を示唆するものであろう。

メイン成分はリゾチームそのものであり、両系において同様の力価を示したことは当然といえるが、標準品すなわち HPLC による分画処理前のものより低い比活性を示していることから、0.1% TFA 含有アセ

Table 2. Relative activities of minor and main components found in egg-white lysozyme (NIHS reference standard)

Each relative activity was estimated by two methods using a substrate, 4-methylumbelliferyl tetra-N-acetyl- β -chitotetraoside with³⁾ and without⁴⁾ β -N-acetylhexosaminidase (NAHase) as a sensibility increasing agent.

Component	mg (potency)/mg	
	-NAHase	+NAHase
minor	0.280	0.859
main	0.836	0.838

トニトリルを用いる分離操作はリゾチームの比活性を低下させると考えられる。

ま と め

リゾチーム標準品に見出されたマイナー成分は、合成基質 4-methylumbelliferyl tetra-N-acetyl- β -chitotetraoside に対してリゾチームと異なる基質特異性を有することが判明した。しかし、分子量、免疫学的交叉性など構造上の点に関してはリゾチームとの違いを見出せなかった。この成分はリゾチームの再結晶化により増減しないことから、卵白からの分離精製過程で生じた人為的産物ではなく、元来、卵白中に存在した物質と判断された。

文 献

- 1) 押沢 正, 横田 裕江, 福田 秀男, 谷本 剛, 田中 彰: 医薬品研究, **19**, 943 (1988)
- 2) Inaba, T., Ohgushi, T., Iga, Y. and Hasegawa, E.: *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 1597 (1984)
- 3) Fukuda, H., Tanimoto, T. and Yamaha, T.: *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 3375 (1985)
- 4) 谷本 剛, 福田 秀男, 川村 次良: 医薬品研究, **15**, 942 (1984)

酵素製剤の品質に関する研究 (第11報)

—カリジノゲナーゼ製剤—

谷本 剛・太田美矢子・川崎ナナ・田中 彰

Studies on the Quality of Enzyme Preparations (XI)

—Kallidinogenase Preparations—

Tsuyoshi Tanimoto, Miyako Ohta, Nana Kawasaki and Akira Tanaka

Qualitative tests of 22 kinds of commercially available kallidinogenase preparations were carried out by the enzymological method. These preparations consisted of 16 kinds of tablets, 5 kinds of capsules and 1 kind of ampoule. One sample of tablet showed kallidinogenase activity less than 80% of the labeled amount by spectrophotometry, pH stat and kinin-liberating methods. All other preparations were found to have 90~120% of the labeled amount by spectrophotometry using S-2266 as the substrate. Other enzymes, i.e. kininase, trypsin and chymotrypsin were found as impurities, but the contents were very low.

(Received May 31, 1990)

循環障害改善薬として広く臨床に使用されているカリジノゲナーゼ (EC 3.4.21.8) はキニノーゲンに特異的に作用してキニン遊離するキニノゲナーゼの一種であり、ブタ膵臓由来のものが医薬品として使用されている。この製剤は約10年前に再評価の対象とされ、昭和63年に再評価結果が公示され、その有用性については認められた。しかし、従来からこの製剤には品質上の幾つかの問題点が指摘されていたこと^{1,2)}、カリジノゲナーゼの公的標準品が配布されるようになったことから、再評価結果の公示に際して原体規格の整備が勧告されていた。従来、カリジノゲナーゼ原体のタンパク質化学的純度に関しては規定がなく、比活性が1単位/mg から約500単位/mg 以上のものまで種々の純度のものが使用されていたが、この勧告によって比活性は100単位/mg 以上であることが規格化され、一定の純度を維持したものが医薬品に使用されるようになった。

今回、新しい規格に基づいた高純度原体を使用した製剤を入手する機会を得たので、この新製剤の酵素化学的品質に関して検討した。

実験方法

1. 試料・試薬・標準品

1) 試料: 錠剤16検体, カプセル剤5検体, 注射剤1検体, 合計22種の製剤を市販品から入手した。錠剤およびカプセル剤はいずれも腸溶剤であり、注射剤は凍結乾燥製剤であった。

2) 試薬: 大豆トリプシンインヒビターは Sigma 社から購入した。D-バリン-ロイシル-アルギニン p-ニトロアニリド・2塩酸塩 (S-2266) およびメトキシ-スクシニル-アルギニル-プロリル-チロシン p-ニトロアニリド (S-2586) は Kabi 社から、ブラジキニンは和光純薬工業㈱から、ベンゾイルアルギニンエチルエステル (BAEE) は Sigma 社から購入した。キニノーゲンは生化学工業㈱から供与されたものを使用した。このキニノーゲンはウシ血漿から調製した低分子量キニノーゲンであり、最大キニン遊離能は 155 ng ブラジキニン/mg であった。ブラジキニンのエンザイムイムノアッセイ用キット (マーケット A) は大日本製薬㈱から購入した。

3) 標準品: 国立衛生試験所カリジノゲナーゼ標準品を使用した。

2. 試液

1) リン酸緩衝液: pH 7.0 の 0.1M リン酸緩衝液 500 ml に水を加えて 1000 ml とする。

2) ホウ酸緩衝液: 15 mM ホウ酸溶液に 5 mM 四ホウ酸ナトリウム液を加えて、pH 8.0 に調整した後、水を加えて10倍に希釈する。

3) トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0): トリスヒドロキシメチルアミノメタン 2.42 g に水 100 ml を加えて溶かし、これに塩酸を加えて pH 8.0 に調整した後、水を加えて 200 ml とする。

4) トリス塩酸緩衝液 (pH 8.3): トリスヒドロキシメチルアミノメタン 12.1 g, 塩化ナトリウム 56.2 g

に水 800 ml を加えて溶かし、1N 塩酸で pH 8.3 に調整し、さらに 1M 塩化カルシウム溶液 10 ml を加えた後、水を加えて全量 1000 ml とする。

5) トリプシンインヒビター溶液：大豆トリプシンインヒビター 5 mg にリン酸緩衝液を加えて溶かし、10 ml とする。

3. 重量偏差試験

日局11, 重量偏差試験法, 錠剤およびカプセル剤の項に準じて試験した。

4. プラジキニンのエンザイムイムノアッセイ

既報の方法³⁾にしたがって行った。

5. カリジノゲナーゼ製剤の力価測定

1) 分光学的な方法

1) 試料溶液および標準溶液の調製：内服用剤の場合は、錠剤10個あるいはカプセル剤10個の内容物を乳鉢に取り、リン酸緩衝液の適量を加えてすりつぶし、粥状とした後、さらにリン酸緩衝液を加えて、その 1 ml 中に約 10 単位のカリジノゲナーゼを含む液を製する。次いで、これを 3000 rpm で20分間遠心分離し、その上澄液を試料原液とし、この 4 ml にトリプシンインヒビター溶液 1 ml を加え、さらにリン酸緩衝液を加えて正確に 10 ml としたものを試料溶液とする。注射剤は10アンプルの内容物をリン酸緩衝液に溶かし、1 ml 中に約 10 単位を含む液を製し、試料原液とし、この 4 ml にトリプシンインヒビター溶液 1 ml を加え、さらにリン酸緩衝液を加えて正確に 10 ml としたものを試料溶液とする。標準品 1 アンプルの内容物をリン酸緩衝液に溶かし、正確に 10 ml としたものを標準原液とし、この 4 ml にトリプシンインヒビター溶液 1 ml を加え、さらにリン酸緩衝液を加えて正確に 10 ml としたものを標準溶液とする。

2) 基質溶液：S-2266 10 mg をトリス塩酸緩衝液に溶かし、正確に 50 ml とする。

3) 操作法：あらかじめ $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$ で5分間加温した基質溶液 2.5 ml を層長 10 mm のセルに入れ、これに $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$ で5分間加温した試料溶液 0.5 ml を加えると同時に記録計を作動させ、 $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$ で水を対照にして2分および6分後の波長 405 nm における吸光度 A_{T2} および A_{T6} を測定する。別に、標準溶液 0.5 ml につき試料溶液と同様に操作し、2分および6分後の吸光度 A_{S2} および A_{S6} を測定する。また別に、トリプシンインヒビター溶液 1 ml にリン酸緩衝液を加えて 10 ml とした液 0.5 ml につき、試料溶液と同様に操作して、2分および6分後の吸光度 A_{O2} および A_{O6} を測定する。これらの得られた吸光度から、次式により試料1個または1アンプル当りの単位

を算出する。

試料1個または1アンプル当りの単位 (KU)

$$= \frac{(A_{T6} - A_{T2}) - (A_{O6} - A_{O2})}{(A_{S6} - A_{S2}) - (A_{O6} - A_{O2})} \times \frac{a}{10} \times b \times \frac{1}{10}$$

a: 標準品 1 アンプル当りの単位

b: 調製した試料原液の全量 (ml)

2) pH スタット法

1) 試料溶液および標準溶液の調製：内服用剤の場合は、表示量にしたがって 100 単位に相当する量を乳鉢に取り、ホウ酸緩衝液の適量を加えてすりつぶし、粥状とした後、さらにホウ酸緩衝液を加えて、正確に 25 ml とする。これを 3000 rpm で20分間遠心分離し、その上澄液を試料原液とし、この 4 ml にトリプシンインヒビター溶液 1 ml を加えて試料溶液とする。注射剤は5アンプルの内容物をホウ酸緩衝液に溶かし、正確に 50 ml とし、この 4 ml にトリプシンインヒビター溶液 1 ml を加えて試料溶液とする。標準品 1 アンプルの内容物をホウ酸緩衝液に溶かし、正確に 25 ml としたものを標準原液とし、この 4 ml にトリプシンインヒビター溶液 1 ml を加えて標準溶液とする。

2) 基質溶液：BAEE 1000 mg をホウ酸緩衝液に溶かし、正確に 20 ml とする。

3) 操作法：pH スタット装置の反応槽にホウ酸緩衝液 6 ml に試料溶液または標準溶液 2 ml を加え、 $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ で5分間保った後、初期 pH を 8.0 に維持する。これに基質溶液 0.5 ml を加え、酵素反応の進行に伴う酸の生成量を 0.01N 水酸化カリウムで経時的に滴定する。試料溶液または標準溶液で1分間当りに消費した水酸化カリウム溶液の量をそれぞれ V_T , V_S とする。別に、ホウ酸緩衝液 4 ml にトリプシンインヒビター溶液 1 ml を加えた液 2 ml につき、試料溶液と同様に操作して、1分間当りに消費した水酸化カリウム溶液の量 V_B を測定する。これらの得られた消費量から、次式により試料1個または1アンプル当りの単位を算出する。

試料1個または1アンプル当りの単位 (KU)

$$= \frac{V_T - V_B}{V_S - V_B} \times a \times 25 \times \frac{1}{b}$$

a: 標準品 1 アンプル当りの単位

b: 採取した試料の数

3) キニン遊離活性測定法

1) 試料溶液の調製法：内服用剤の場合、試料の適量を取り、20 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0) を加えてすりつぶし粥状とした後、さらに同緩衝液を加えて 1 ml 中に約 2.5 単位を含む液を製する。次いで、

3000 rpm で20分間遠心分離し、得た上澄液 1 ml にトリプシンインヒビター溶液 1 ml および 10 mM 1, 10-フェナントロリン液 1 ml を加え、さらに 20 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0) を加えて 10 ml としたものを試料溶液とする。注射剤の場合は試料の適量を取り、20 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0) を加えて溶かし、1 ml 中に約 2.5 単位を含む液を製し、以下、内服用剤の場合と同様にして試料溶液を製する。

2) キノノーゲン溶液：キノノーゲンの適量を取り、20 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0) を加えて溶かし、その 1 ml にキノノーゲン 6 mg を含む液を製する。

3) 操作法：あらかじめ $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$ で 5 分間加温した試料溶液 0.5 ml に $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$ で 5 分間加温したキノノーゲン溶液 0.5 ml を加えて $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$ で正確に 2 分間反応させた後、3 分間煮沸し、次いで 20% トリクロル酢酸液 0.2 ml を加えて氷冷し、3000 rpm で 10 分間遠心分離して上澄液を得る。この上澄液 0.5 ml に 0.9% 塩化ナトリウム-0.2%ゼラチン-0.1%アジ化ナトリウムを含む 0.55M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) 0.5 ml を加えて前処理検体とし、この 0.2 ml を用いて生成したカリジンの量をエンザイムイムノアッセイによってブラジキニン量 (B) として測定する。別に、20 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0) 0.5 ml を用いて試料溶液と同様に操作し、空試験値 (B_0) を測定する。

キニン遊離活性 (単位/KU)

$$= (B - B_0) \times 24 \times \frac{1}{a} \times \frac{1}{2}$$

a: 試料溶液 1 ml 中のカリジノゲナーゼ単位 (KU)

ただし、1 分間に 1 ng のブラジキニン相当量のキニンを遊離する酵素量を 1 単位とする。

6. キナーゼ活性の測定法

1) 試料溶液の調製：内服用剤の場合、試料の適量を取り、50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) を加えてすりつぶし粥状とした後、さらに 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) を加えて、1 ml 中に約 2 単位を含む液を製し、次いで 12000 rpm で 20 分間遠心分離し、得た上澄液を試料溶液とする。注射剤の場合は、試料の適量を取り、50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) を加えて溶かし、1 ml 中に約 2 単位を含む液を製して、試料溶液とする。

2) ブラジキニン溶液の調製：ブラジキニンの適量を取り、50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) を加えて溶かし、その 1 ml に 200 ng のブラジキニンを含む液を製する。

3) 操作法：あらかじめ $32 \pm 0.5^\circ\text{C}$ で 5 分間加温した試料溶液 0.5 ml に $32 \pm 0.5^\circ\text{C}$ で 5 分間加温したブラジキニン溶液 0.5 ml を加え、 $32 \pm 0.5^\circ\text{C}$ で正確に 2.5 分間反応させた後、20% トリクロル酢酸液 0.2 ml を加えて反応を停止し、3000 rpm で 10 分間遠心分離して上澄液を得る。この上澄液 0.5 ml に 0.9% 塩化ナトリウム-0.2%ゼラチン-0.1%アジ化ナトリウムを含む 0.55M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) 0.5 ml を加えて、前処理試料検体とし、この 0.2 ml を用いてエンザイムイムノアッセイ法で残存ブラジキニン量 (B) を測定する。別に、試料溶液の代わりに 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 ml を用いて試料溶液の場合と同様に操作して空試験値 (B_0) を測定する。

キナーゼ量 (単位/KU)

$$= (B_0 - B) \times 24 \times \frac{1}{a} \times \frac{1}{2.5}$$

a: 試料溶液 1 ml 中のカリジノゲナーゼ単位 (KU) ただし、1 分間に 1 ng のブラジキニンを分解する酵素量を 1 単位とする。

7. トリプシン様酵素活性の測定法

1) 試料溶液の調製：カリジノゲナーゼ製剤の力価測定法の項に準じて、試料原液を調製する。試料原液 4 ml にトリプシンインヒビター溶液 1 ml を加え、さらにリン酸緩衝液を加えて正確に 10 ml としたものを試料溶液 I とし、試料原液 4 ml にリン酸緩衝液を加えて正確に 10 ml としたものを試料溶液 II とする。

2) 基質溶液：S-2266 10 mg をトリス塩酸緩衝液に溶かし、正確に 50 ml とする。

3) 操作法：あらかじめ $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$ で 5 分間加温した基質溶液 2.5 ml を層長 10 mm のセルに入れ、これに $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$ で 5 分間加温した試料溶液 I 0.5 ml を加えると同時に記録計を動作させ、 $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$ で水を対照にして 2 分および 6 分後の波長 405 nm における吸光度 A_{12} および A_{16} を測定する。別に、試料溶液 II 0.5 ml につき試料溶液 I と同様に操作し、2 分および 6 分後の吸光度 A_{22} および A_{26} を測定する。

トリプシン様酵素活性 (単位/KU)

$$= \{(A_{26} - A_{22}) - (A_{16} - A_{12})\} \times \frac{1}{4} \times \frac{1000}{11600} \times \frac{3}{0.5} \times \frac{1}{a}$$

a: 試料溶液 1 ml 中のカリジノゲナーゼ量 (KU)

ただし、1 分間に 1 nmol の S-2266 を加水分解する酵素量を 1 単位とする。

8. キモトリプシン様酵素活性の測定法

1) 試料溶液の調製：カリジノゲナーゼ製剤の力価

測定法1)の項に準じて調製した試料原液を試料溶液とする。

2) 基質溶液：S-2586 25 mg を水 60 ml に溶かす。

3) 操作法：37±0.5℃ に保ったトリス緩衝液 (pH 8.3) 1.0 ml に試料溶液 0.2 ml を加え、次いであらかじめ 37±0.5℃ で5分間加熱した基質溶液 0.6 ml を加え、よく混和し、正確に5分間経過後、50%酢酸液 0.6 ml を加えて反応を停止する。この液につき 405 nm における吸光度 A_T を測定する。別に、37±0.5℃ に保ったトリソ緩衝液 (pH 8.3) 1.0 ml に試料溶液 0.2 ml を加え、次いで50%酢酸液 0.6 ml を加えて、5分間放置した後、基質溶液 0.6 ml を加え、よく混和し、このものにつき 405 nm における吸光度 A_B を測定する。

キモトリプシン様酵素活性 (単位/KU)

$$= (A_T - A_B) \times \frac{1}{5} \times \frac{1000}{11600} \times 12 \times \frac{1}{a}$$

a: 試料溶液 1 ml 中のカリジノゲナーゼ量。

ただし、1分間に 1 nmol の S-2586 を加水分解する酵素量を1単位とする。

結果と考察

1. 製剤の重量偏差試験

経口用カリジノゲナーゼ製剤は腸溶性製剤である。日局では腸溶皮膜などの剤皮を施した製剤についての重量偏差試験法の規定はないが、剤皮を施した製剤の

重量偏差の実態を把握する目的で日局の試験法に準じて試験を行った。

Table 1 に示すように、錠剤16検体、カプセル剤4検体のいずれにおいても偏差の基準を越えるものはまったく存在しなかった。変動係数 (C. V.) も比較的小さく、重量偏差はよく管理されているものと推察された。

2. カリジノゲナーゼ製剤の定量試験

カリジノゲナーゼはキノノーゲンからキニンを遊離させることによって、その薬理効果が期待される薬剤である。一方、その定量試験は通常、高精度迅速分析法である合成基質を用いた方法で行われる⁴⁾。しかし、この方法はカリジノゲナーゼに特異的な方法ではない。すなわち、定量法が薬理効果に必要なキニン産生能を直接反映しているわけではない。そこで、本製剤の品質を評価するために合成基質法による定量試験とともに、生体内基質としてのキノノーゲンからのキニン遊離活性を測定する定量試験を合わせ行った。

Table 2 には合成基質を用いた分光学的定量法および pH スタット法による定量値とともにキニン遊離活性測定法による定量値を示した。錠剤の1検体を除いて各製剤とも合成基質法では規格値の範囲内の定量値を示した。これらの製剤のキニン遊離活性も既ね満足できるものであり、これらの各製剤に含有されるカリジノゲナーゼは表示量の 85~130% のキニン遊離能をもつものであることが推察された。検体4は合成基質

Table 1. The weight variation test for kallidinogenase preparations

Sample No.	Form ^{a)}	Average weight (mg)	Range of weight (mg)	Number of tablet or capsule having the deviation of more than 7.5 or 10%	C.V. (%)
1	T	140.4	144.5~134.5	0 (>7.5%)	2.19
2	T	110.9	113.2~109.3	0 (>10%)	0.83
3	T	110.6	115.5~106.2	0 (>10%)	2.28
4	T	223.4	228.5~215.6	0 (>7.5%)	1.30
5	T	107.9	110.2~105.5	0 (>10%)	1.34
6	T	143.1	147.9~138.9	0 (>7.5%)	1.89
7	T	145.9	150.8~141.7	0 (>7.5%)	1.63
8	T	139.1	144.4~133.9	0 (>7.5%)	2.25
9	T	156.7	163.0~148.7	0 (>7.5%)	2.60
10	T	91.0	92.8~87.5	0 (>10%)	1.89
11	T	156.7	159.1~153.1	0 (>7.5%)	1.08
12	T	123.8	129.0~117.7	0 (>7.5%)	2.31
13	T	112.7	116.1~109.6	0 (>10%)	1.45
14	T	86.5	88.1~85.4	0 (>10%)	0.85
15	T	134.4	137.0~132.1	0 (>7.5%)	1.03
16	T	145.5	148.3~143.8	0 (>7.5%)	0.93
17	C	167.8	178.7~158.3	0 (>7.5%)	2.59
18	C	185.2	198.2~173.7	0 (>7.5%)	3.41
19	C	208.6	218.6~199.1	0 (>7.5%)	2.31
21	C	171.1	175.1~164.7	0 (>7.5%)	1.54

^{a)} T: tablet, C: capsule

Table 2. Contents of enzyme activity in kallidinogenase preparations

Sample No.	Form ^{a)}	Labeled amount ^{b)}	Range of permissible content (%)	Enzyme activity (%)		
				S-2266	BAEE	Kininogen
1	T	25	90~130	110.2	106.2	89.9
2	T	25	90~130	99.1	83.1	85.3
3	T	25	90~130	75.9	73.6	43.4
4	T	25	90~130	98.6	111.6	114.7
5	T	25	90~130	103.3	112.9	130.2
6	T	25	90~130	102.8	110.6	103.1
7	T	25	90~130	118.2	133.2	114.7
8	T	25	90~130	104.4	126.1	108.5
9	T	25	90~130	105.0	126.1	120.9
10	T	25	90~130	92.8	96.3	89.9
11	T	25	90~130	120.5	122.7	91.5
12	T	25	90~130	111.2	149.3	79.1
13	T	25	90~130	110.1	106.2	86.8
14	T	10	90~130	102.6	108.7	88.4
15	T	25	90~130	113.3	110.6	114.7
16	T	25	90~130	106.0	119.5	85.3
17	C	25	90~130	111.3	126.1	103.1
18	C	10	90~130	93.0	102.5	103.1
19	C	25	90~130	95.2	100.3	106.2
20	C	25	90~130	98.5	108.1	111.6
21	C	25	90~130	111.6	99.9	93.8
22	I	40	90~130	121.8	128.9	101.6

^{a)} T: tablet, C: capsule, I: injection.

^{b)} Units per one tablet, capsule or ampoule.

法によってもその含有量は規格下限以下であり、キニン遊離活性は表示量から期待される値の半分以下であった。

3. カリジノゲナーゼ製剤中の夾雑酵素としてのキニナーゼ、トリプシン様酵素、キモトリプシン様酵素の含有量

カリジノゲナーゼ製剤はキニンを産生する酵素剤であり、このキニンが薬効を現す本体である。そのために、キニンを分解する酵素が混在することは製剤の品質上大きな問題となる。そこで、これらの夾雑酵素として混在する可能性の高いキニナーゼ、トリプシン様酵素、キモトリプシン様酵素の含有量を各製剤について測定した (Table 3)。すべての製剤においてキニナーゼ活性は 0~15 ng ブラジキニン/分/KU の極めてわずかな量しか認められなかった。また、トリプシン活性やキモトリプシン活性も同様にわずかな量しか混在していなかった。キニナーゼとトリプシンに関しては規格の整備がなされる前の製剤についても測定されており⁴⁾、カリジノゲナーゼによって産生されたキニンの全てを分解するのに十分なキニナーゼ量を同時に含有している製剤も存在することが指摘されていたが、それと比べると再評価後の規格を整備した今回の製剤ではこの両酵素活性は著しく低値を示し、製剤に使用された原体の純度が大きく改善されていることがうかがわれた。

なお、製剤中の3種の夾雑酵素の含有比率は必ずし

Table 3. Contents of other enzyme activities as the impurity in kallidinogenase preparations

Sample No.	Enzyme activity (unit/KU)		
	Kininase	Trypsin	Chymotrypsin
1	0	0	0.12
2	0	0	1.01
3	6.3	0.31	0.99
4	0	0.13	0.01
5	15	0	0.81
6	1.1	0	1.33
7	0	0.16	1.24
8	0	0	1.19
9	0	0.07	0.13
10	4.4	0.10	1.17
11	9.2	0.81	1.07
12	0.58	0.39	1.17
13	0	0	0.10
14	0	2.3	0.44
15	0	0.16	0.16
16	10	0.16	1.40
17	0	0	1.13
18	1.3	0.07	0.99
19	6.3	0.19	1.15
20	4.4	0.19	0.18
21	10	0.48	1.36
22	7.3	0.65	0.92

も一定ではなく、製剤ごとに異なり、キニナーゼを多く含むものであってもトリプシン様酵素の量は少ない製剤もあり、またキニナーゼの量が少なくともトリプシン様酵素やキモトリプシン様酵素の量が多い製剤も

あった。このことは多分に原体の製造方法が異なることによるものと思われる。

文 献

1) 藤本幸夫：薬物療法，10，485 (1977)

- 2) 早川堯夫，川村次良：医薬品研究，9，799 (1978)
 3) 谷本 剛，福田秀男，山羽 力：医薬品研究，16，839 (1985)
 4) 谷本 剛，福田秀男：衛生試験，107，17 (1989)

ガスクロマトグラフィーによる輸入農産物中のアジンホスメチルの定量

根本 了・鈴木 隆・斎藤行生

Gas Chromatographic Determination of Azinphos-methyl in Imported Crops

Satoru Nemoto, Takashi Suzuki and Yukio Saito

A gas chromatographic method for the quantitative analysis of azinphos-methyl in agricultural products was studied. Azinphos-methyl was extracted with acetone. The extract was cleaned up by charcoal column chromatography for the treatment of wheat and soybean and by using coagulating reagent for the treatment of lemon and orange, then determined by a gas chromatograph equipped with a flame photometric detector (FPD).

The mean recovery of azinphos-methyl added to wheat, soybean and lemon at the level of 0.1 or 0.2 $\mu\text{g/g}$ was 96.6~101.0%. The detection limit of azinphos-methyl was 0.04 $\mu\text{g/g}$ in the case of wheat and soybean extracted from 10 g of each sample and 0.02 $\mu\text{g/g}$ in the case of lemon and orange extracted from 20 g of each sample. Azinphos-methyl was not detected in any of the imported, 6 wheat, 6 soybean, 5 lemon and 4 orange tested using the abovementioned method.

(Received May 31, 1990)

緒 言

アジンホスメチル {Azinphos-methyl; 0, 0-Dimethyl S-[(4-oxo-1, 2, 3-benzotriazin-3(4H)-yl)methyl] phosphorodithioate, Fig. 1} は有機リン系殺虫剤の一種であり，果樹，野菜，穀類などに対して害虫の駆除に用いられる¹⁾。本農薬は1985年に米国環境保護局 (EPA) により催腫瘍性の可能性がある農薬の一つに上げられ，その後1987年に発表された食品中の農薬規制に関する米国科学アカデミーの提言²⁾の中でその催腫瘍性が検討され，EPA による発癌物質の分類法でグループD (人間の発癌性物質とは分類されないもの) に分類された。米国では残留許容量が大麥，小麦，大豆などに対して 0.2 ppm，また，りんご，いちご，柑橘類，たまねぎなどに対して 2.0 ppm 等が定められている³⁾。

一方，わが国においてはアジンホスメチルは農薬として登録されていないために残留基準および登録保留基準も定められておらず，したがって，その農産物中の残留分析法についても定められていない。

しかし，本農薬の米国における適用作物が78種と多く，その中には小麦，大豆あるいは柑橘類などが国にとって海外依存度の高い農産物が多く含まれていることから，輸入農産物中の残留が懸念される。

そのため本農薬の食品中の残留分析法を確立する目的で，試料として海外依存度の高い小麦，大豆，レモン，オレンジを用いて検討を行った。本農薬の分析法としては，米国食品医薬品局 (FDA) により提示された比色法を用いた測定法があるが，試料をアルカリ加水分解後呈色させるなど操作が複雑であり，また，色素や他の農薬による妨害を受け易いなどの欠点がある。一方，厚生省の残留農薬分析法 (Draft)⁴⁾ では有機リン剤の分析に活性炭カラムクロマトグラフィーによるクリーンアップ法を用いているが，本法を用いてアジンホスメチルを測定した例は見あたらない。そこで，小麦および大豆について厚生省法を基本にして分析法の検討を行った。厚生省法では，食品からの有機リン剤の抽出に 30% (v/v) 含水アセトンを用いているが，これを小麦に適用した場合，その後の液液抽出操作で溶液が乳化して分離が困難であり，回収率の低下が見

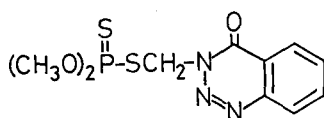


Fig. 1. Structure of azinphos-methyl

られた。そのため、抽出に用いるアセトンの含水率等について検討を行なったところ乳化の少ない良好な条件が得られた。また、果実および野菜については佐々木ら⁹⁾により活性炭カラムクロマトグラフィーの代わりに凝固化液を用いたより簡便なクリーンアップ法が報告されている。アジンホスメチルの分析にこの方法を用いた報告は見あたらないが、今回この方法をレモンおよびオレンジ中の本農薬の分析に適用したところ良好な結果が得られたので報告する。

実験方法

1. 試料

東京、横浜および神戸の各検疫所から昭和63年10月から平成元年2月にかけて当所に送付された大豆（米国产3検体、中国産1検体、ブラジル産1検体）、小麦（米国产2検体、オーストラリア産2検体、カナダ産1検体）、レモン（米国产4検体）、オレンジ（米国产4検体）および当所に保存してあった大豆（原産国不明1検体）、小麦（原産国不明1検体）ならびに世田谷区内で購入したレモン（米国产1検体）を用いた。

2. 試薬

アジンホスメチル標準品：日本特殊農薬製造（株）、純度98.0%のものを用いた。

貯蔵用標準原液：アジンホスメチル 10 mg を *n*-ヘキサンを用いて溶解し 100 μg/ml 溶液とした。

分析用標準溶液：貯蔵用標準原液を試験の目的に応じてアセトンあるいは *n*-ヘキサンの適宜希釈して調製した。

有機溶媒類：市販一級品を蒸留して用いた。

水：イオン交換水を2回蒸留したものを用いた。

塩化ナトリウム：市販の試薬特級品

無水硫酸ナトリウム：残留農薬試験用

ろ過助剤：セライト No. 545 (Johns-Manville 製)

活性炭：ダルコ G-60 (Darco 製)

微結晶セルロース：カラムクロマトグラフィー用アピセル（フナコシ薬品（株）製）

活性炭混合物：活性炭 0.5 g と微結晶セルロース 4.5 g の混合物

活性炭カラム：内径 1.5 cm、長さ 30 cm のクロマト管の底にガラスウールを敷き、少量のベンゼンを流

し入れ、無水硫酸ナトリウム約 5 g を加えた。これに活性炭混合物 5 g を適量量のベンゼンに懸濁したものを注入し、活性炭が落ち着いた後無水硫酸ナトリウム約 5 g を積層した。

塩化アンモニウム：市販の試薬特級品

リン酸：市販の試薬特級品

凝固化液：塩化アンモニウム 10 g およびリン酸 20 ml を水に溶かして 800 ml とした。

3. 装置

ガスクロマトグラフ：（株）島津製作所製 GC-15A 型（FPD 付、P モード）データ処理装置として同社製クロマトパック C-R4A 型を接続

粉碎器：（株）日本精機製作所製遠心粉碎機（大豆および小麦の粉碎にはメッシュスクリーンの穴径がそれぞれ 0.5 mm および 0.25 mm のものを用いた。）

ホモジナイザー：Biotrona 社製バイオトロン

振とう機：イワキ（株）製 KM シューカー

減圧濃縮機：ヤマト科学（株）製ロータリー・エバポレーター RE-46A 型

4. ガスクロマトグラフィー (GC) の測定条件

カラム：内径 3 mm のガラスカラムを使用

a) 1% QF-1, Gas-Chrom Q (80~100 メッシュ), 1.0m

b) 5% DC-200, Chromosorb W (HP, 80~100 メッシュ), 0.5m

c) 2% OV-1, Gas-Chrom Q (80~100 メッシュ), 0.5m

d) 2% OV-17, Chromosorb W (HP, 100~120 メッシュ), 1.0m

e) Ultra Bond 20 M (80~100 メッシュ), 0.5m

注入口温度：280°C

カラム温度：a) 220°C, b) 240°C, c) 220°C, d)

270°C, e) 240°C

検出器温度：280°C

キャリアーガス（窒素）：40 ml/min

水素：60 ml/min, 空気：60 ml/min

試料注入量：2 μl

5. 実験操作

5.1 小麦、大豆

厚生省の Draft 法を一部改良して行った。すなわち、粉碎した試料 10 g に水 10 ml を加えた後アセトン 90 ml を加え、5 分間振とう抽出した後、ろ過助剤を厚さ約 5 mm に敷いた吸引ろ過器を用いてろ過した。ろ過盤上の残渣をアセトン 50 ml を用いて洗い込み、ろ液を先のろ液と合わせた後、あらかじめ 5% 塩化ナトリウム溶液 400 ml を入れた分液ろうとに移し、20%

(v/v) ジクロロメタン含有ベンゼン 100 ml で抽出した。ジクロロメタン・ベンゼン層を水 100 ml で洗った後、無水硫酸ナトリウムで脱水し、40℃以下で溶媒を減圧留去した。残留物を *n*-ヘキサン 30 ml に溶解し、アセトニトリル 30 ml で3回抽出し、アセトニトリル層を合わせ、40℃以下で溶媒を減圧留去した。残留物をベンゼン 5 ml に溶解し、活性炭カラムに注入しベンゼン 150 ml で溶出した。溶出液は 40℃以下で大部分のベンゼンを減圧留去し、さらに窒素気流中で完全に揮散させ、残留物をアセトン 4 ml に溶解し GC 用検液とした。

5.2 レモン, オレンジ

佐々木らの方法に準じて行った。すなわち、レモンはその全部を用いて、また、オレンジは外果皮を除去したものをホモジナイザーで均一にした後、そのうち 20 g を取りアセトン 80 ml を加えて 5 分間振とう抽出した後、ろ過助剤を厚さ約 5 mm に敷いた吸引ろ過器を用いてろ過した。ろ過盤上の残渣をアセトン 20 ml を用いて洗い込みろ液を先のろ液と合わせ、凝固化液 100 ml およびセライト No. 545 5 g を加え時々攪拌しながら 30~40 分放置した。混合物を吸引ろ過し、ろ過盤上の残渣を 40% (v/v) 含水アセトン 20 ml で洗い、ろ液を合わせ、2% 塩化ナトリウム溶液 200 ml で希釈し、ベンゼン 100 ml で抽出した。ベンゼン層を 2% 塩化ナトリウム溶液 100 ml で 2 回洗い、無水硫酸ナトリウムで脱水し、40℃以下で大部分のベンゼンを減圧留去し、さらに窒素気流中で完全に揮散させた。残留物をアセトン 4 ml に溶解し GC 用検液とした。

6. GC による定量

貯蔵用標準原液をアジンホスメチルの濃度が 0.1~2.0 µg/ml になるようにアセトンで希釈し、その 2 µl をガスクロマトグラフに注入し、ピーク高さまたはピーク面積を測定し絶対検量線法により定量を行った。なお、定量にはカラム a) を使用したが、カラム b)~e) を用いても同様に測定可能であった。

結果および考察

1. 小麦, 大豆の分析

試料の抽出溶媒として、厚生省の Draft 法では 30% (v/v) 含水アセトンを使用しているが、これを小麦に適用した場合、得られた抽出液を 5% 塩化ナトリウム溶液で希釈し水層から 20% (v/v) ジクロロメタン含有ベンゼンで抽出する際、あるいはその後の水洗の過程で溶液が乳化してしまい分離が困難であった。そのため、抽出に用いるアセトンの含水率を検討したところ、含水率が 20% (v/v) 以上では、分離困難な乳

が生じることが判明した。また、ろ過盤上の残渣を洗う溶媒も含水させない方が乳化的が少なかった。このことから抽出操作は、試料 10 g に対して水 10 ml を加えた後、アセトン 90 ml で抽出し、残留物をアセトン 50 ml で洗うこととした。この条件で抽出操作を行った場合には、やや乳化的が生じることがあるものの、容易に分離可能なものであった。大豆については、抽出に 30% (v/v) 含水アセトンを用いても乳化的は生じなかったが、小麦と同じ条件で抽出することにした。また、抽出液を 5% 塩化ナトリウム溶液で希釈し、20% (v/v) ジクロロメタン含有ベンゼンで抽出する際、厚生省の Draft 法では抽出を 2 回行っているが、1 回の抽出ですでに 96.5±3.6% (Mean±C. V., n=3) 回収されたことから、ベンゼンの使用量をできるだけ減らし、かつ分析時間の短縮を図るために抽出は 1 回とすることとした。

次に *n*-ヘキサン・アセトニトリル分配による脱脂操作の検討を行った。すなわち、*n*-ヘキサン 30 ml にアジンホスメチル 10 µg を添加し、アセトニトリル 30 ml で抽出操作を行った。その結果アセトニトリルによる抽出操作が 2 回では測定値にばらつきが多く値が一定しなかったが、3 回の抽出操作により 96.0±2.5% (Mean±C. V., n=3) の回収率が得られた。このことから、アセトニトリルによる抽出操作は、3 回行うこととした。

活性炭カラムクロマトグラフィーによるクリーンアップの検討として、アジンホスメチル 200 µg をカラムに負荷し、ベンゼンで溶出した時の溶出パターンを Fig. 2 に示した。その結果アジンホスメチルは溶出液 120 ml までですべて溶出した (回収率 97.8%) ことから、ベンゼン 150 ml で溶出することとした。

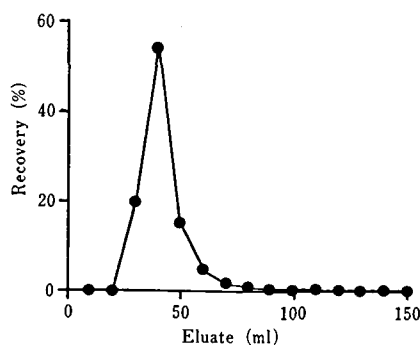


Fig. 2. Elution profile of azinphos-methyl from charcoal column* with benzene

*0.5 g charcoal and 4.5 g cellulose in 1.5 cm i. d. column

2. レモン, オレンジの分析

佐々木らによると, 抽出液を凝固液で処理した後のろ液を, 2%塩化ナトリウム溶液 200 ml で希釈し, これから抽出する際の溶媒としてベンゼンまたは *n*-ヘキサンを用いるとしている. そこで, このとき用いる抽出溶媒の選択に際して, レモンを用いた添加回収実験 (0.1 $\mu\text{g/g}$ 添加) で各溶媒に対する回収率を比較した. その結果ベンゼンで1回抽出した場合には, $96.6 \pm 0.9\%$ (Mean \pm S. D., $n=4$) の回収率が得られたのに対し, *n*-ヘキサンをを用いた場合には, 1回の抽出では $76.3 \pm 2.3\%$ (Mean \pm S. D., $n=4$) と回収率が低かった. しかし, *n*-ヘキサンをを用いて2回抽出を行った. 場合には, $101.4 \pm 4.1\%$ (Mean \pm S. D., $n=4$) と良好な回収率が得られた. 以上の結果から, 今回は操作の迅速化を図るためにベンゼンによる1回の抽出操作で行うこととしたが, 従事者の健康上からはベンゼンの使用は極力抑えることが望ましいので, その場合には, *n*-ヘキサンによる2回の抽出操作で行うことも可能であった.

3. GC 条件の検討

検討したカラムのうち10% QF-1, 5% XE-60, 2% OV-225 および 5% PEG-20 M などではアジンホスメチルは溶出しにくい, または感度が不足であった. 一方, 5% DC-200, 2% OV-1, 1% QF-1, 2% OV-17 および Ultra Bond 20 M を用いた場合にはピーク形状, 感度ともに良好であった. また, これらのカラムを用いた場合アジンホスメチルの最少検出量は, いずれも 0.2 ng (S/N=3) 前後であった. また, 検量線はピーク高さおよびピーク面積いずれを用いても 0.1~2.0 $\mu\text{g/ml}$ (0.2~4.0 ng) で良好な直線性 ($r=0.999$) を示した. Fig. 3 に1% QF-1 のカラムを用いて作成した検量線を示した. なお, アジンホスメチルは, GC の固定相の担体に吸着されやすいため感度の変動が大きいので, 実試料を繰り返し注入し感度が安定したのちに定量を行った. また, Fig. 4 に今回用いた試料を本法を用いて測定したときのクロマトグラムを示したが, 妨害ピークは認められなかった.

4. 添加回収実験

小麦, 大豆およびレモンを用いてアジンホスメチルを試料に対して 0.1 あるいは 0.2 $\mu\text{g/g}$ になるように添加し回収率を求めたところ Table 1 に示したように $96.6 \sim 101.0\%$ の回収率が得られた. また, 本法におけるアジンホスメチルの検出下限は, 小麦, 大豆の場合は試料 10 g を用いて最終液量を 4 ml とし, その 2 μl をガスクロマトグラフに注入した場合, 試料中 0.04 $\mu\text{g/g}$ であった. レモン, オレンジの場合は試

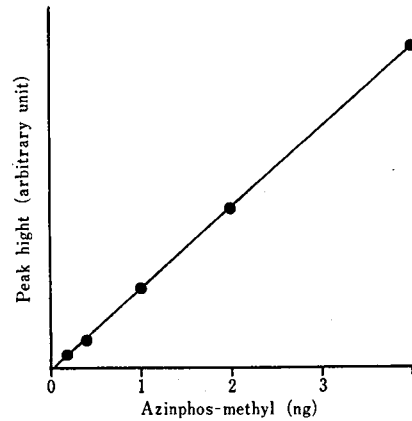


Fig. 3. Calibration curve of azinphos-methyl

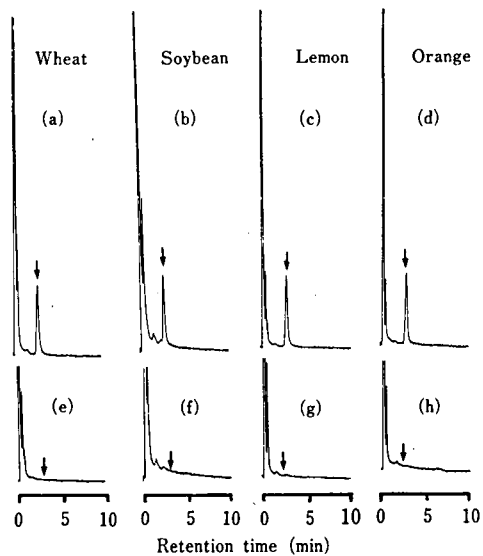


Fig. 4. Gas chromatograms of crops extracts

(a), (b): fortified with 0.2 $\mu\text{g/g}$ of azinphos-methyl, (c), (d): fortified with 0.1 $\mu\text{g/g}$ of azinphos-methyl, (e)~(h): unfortified crops, (wheat, soybean; 10 g crop, 2 $\mu\text{l}/4$ ml injection) lemon, orange; 20 g crop, 2 $\mu\text{l}/4$ ml injection)

GC conditions; column, 1% QF-1, 3 mm i. d. \times 1 m; column temp., 220 $^{\circ}\text{C}$; injection temp., 280 $^{\circ}\text{C}$; detector temp., 280 $^{\circ}\text{C}$; carrier gas (N_2), 40 ml/min; H_2 , 60 ml/min; air, 60 ml/min (\downarrow ; azinphos-methyl)

料 20 g を用いて最終液量を 4 ml とし, その 2 μl をガスクロマトグラフに注入した場合, 試料中 0.02 $\mu\text{g/g}$ であった. なお, 最終液量を 1 ml とすることにより, 検出下限を小麦, 大豆で 0.01 $\mu\text{g/g}$, レモン, オレン

Table 1. Recovery of azinphos-methyl from fortified crops

Crop	Fortification level ($\mu\text{g/g}$)	n	Recovery (%) Mean \pm S. D.
Wheat	0.2	3	97.9 \pm 5.7
Soybean	0.1	4	101.0 \pm 4.3
Lemon	0.1	4	96.6 \pm 0.9

ジで 0.005 $\mu\text{g/g}$ とすることも可能であった。

5. 輸入食品の検査結果

小麦 6 検体, 大豆 6 検体, レモン 5 検体およびオレンジ 4 検体について調査した結果, いずれの試料からもアジンホスメチルは検出されなかった。

ま と め

1. 小麦, 大豆, レモンおよびオレンジ中のアジンホスメチルの分析法について検討し, 小麦, 大豆については, 活性炭カラムクロマトグラフィーにより, また, レモン, オレンジについては凝固法によりクリーンアップを行い GC により定量できることを示した。

2. 小麦, 大豆およびレモンを用いて求めた添加回

収率は 96.6~101.0% であった。また, 本法に於ける検出下限は, 小麦および大豆では試料 10 g を用いたとき 0.04 $\mu\text{g/g}$, レモンおよびオレンジでは試料 20 g を用いたとき 0.02 $\mu\text{g/g}$ であった。

3. 今回調査した輸入農産物からはいずれもアジンホスメチルは検出されなかった。

文 献

- 1) 富澤長次郎, 上路雅子, 腰岡政二編: “最新農薬データブック” p. 23 (1989). ソフトサイエンス社
- 2) “Regulating Pesticides in Food (The Delaney Paradox)” pp. 45~99 (1987), National Academy Press, Washington D. C.
- 3) “Code of Federal Regulations” 40 parts 180. 154, (July 1, 1989), the office of the Federal Register National Archives and Records Administration.
- 4) 厚生省生活衛生局食品化学課編, “残留農薬分析法 (Draft)”, pp. 21~29 (1986), (社)日本食品衛生協会, 東京
- 5) Sasaki, K., Suzuki, T. and Saito, Y.: Simplified cleanup and gas chromatographic determination of organophosphorus pesticides in crops. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 70, 460 (1987)

Production and Characterization of Monoclonal and Polyclonal Antibodies against Digoxin

Jun-ichi Sawada, Noppavan Janejai¹⁾ and Tadao Terao

沢田純一・Noppavan Janejai・寺尾允男

Three hybridoma cell lines (DIG 64.2B.5, DIG 104.H10.1 and DIG 222.4D.5) producing monoclonal antibodies against digoxin were established, and the properties of these monoclonal antibodies were characterized and compared with three polyclonal rabbit anti-digoxin antisera. Both polyclonal and monoclonal antibodies gave association constants ranging from 10^9 to 10^{10} (M^{-1}). The monoclonal antibodies were of the IgG1(κ) or IgG2b(κ) subclass. Cross-reactivities of these monoclonal antibodies and polyclonal antisera with various related cardenolides and their aglycones were determined by competitive radioimmunoassay. The monoclonal antibodies were specific for digoxigenin-containing glycosides such as lanatoside C and deslanoside, but not for digitoxigenin-containing glycosides. On the other hand, the specificities of the polyclonal antisera were less strict than the monoclonal antibodies and relatively cross-reactive with digitoxin. It was shown that the RIA for digoxin using DIG 64.2B.5 is sensitive enough to detect 0.2~0.3 nM (30~60 pg/tube) of digoxigenin-containing cardenolides.

(Received on May 31, 1990)

Introduction

Selection of high-yielding *Digitalis lanata*

¹⁾ National Institute of Health, Thailand.

plants is important for the production of cardiac glycosides, digoxin and lanatoside C. Immunoassays including radioimmunoassay have been widely employed for the estima-

tion of cardenolide contents in plant tissues and cultured cells¹⁻³⁾ as well as for the determination of their blood levels⁴⁻⁶⁾. For the accurate determination of both digoxin and lanatoside C contents in plant tissues, the quantitation by HPLC is required. However, the clean-up procedures of the samples for HPLC are tedious and time-consuming, especially for the purpose of screening digoxin-producing plants grown *in vitro*.

In this paper, we report on the production and characterization of monoclonal and polyclonal antibodies against digoxin suitable for the selection of digoxin-producing plant cultures. Application of the antibodies for the estimation of digoxin contents in plant tissues will be published elsewhere^{17,18)}.

Materials and Methods

Chemicals

Digoxin, digoxigenin, digitoxin, digitoxigenin, gitoxin, gitoxigenin, strophanthidin, acetylstrophanthidin, ouabain, ouabagenin were purchased from Sigma Chemical Co., St. Louis; digitalin and digitonin from Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd., Tokyo; and digitoxose from Nakarai Chemicals Ltd., Tokyo. Deslanoside and lanatoside C were kindly provided by Dr. Tokunaga, National Institute of Hygienic Sciences. ³H-digoxin (42.7 Ci/mole; NET-222) was purchased from NEN Research Products, Boston.

Hapten-protein conjugates

Digoxin was conjugated to human serum albumin (Sigma) and ovalbumin (Sigma) by the method of Smith *et al.*⁹⁾. Digoxin-conjugated human serum albumin (Dig-HSA) and ovalbumin (Dig-OVA) were used as an immunogen and a coating antigen in ELISA, respectively.

Preparation of rabbit anti-digoxin antisera

Japanese albino rabbits were immunized s. c. four times with 1.25 mg/rabbit of Dig-HSA in Freund's complete adjuvant (FCA) at intervals of three weeks and bled 10 days after the final immunization.

Production of monoclonal antibodies against digoxin

Female BALB/c mice (Japan SLC, Hamamatsu) were immunized s. c. six times with 125 µg/mouse of Dig-HSA in Freund's com-

plete adjuvant at intervals of about 3 weeks. Three days before fusion, 50 µg of Dig-HSA in saline was injected i. p. into the mice. The spleen cells were fused with P3/NS1/1-Ag4-1(NS1) cells as described previously^{7,8)}. After fusion, the cells were cultured with HAT-containing medium on twelve 24-well culture plates. Hybridoma cells in ELISA positive wells (22 wells) were cloned. The supernatants of ELISA-positive cloned cells were checked for RIA titer. Four selected RIA-positive clones were subcloned, and finally three subcloned lines were established. The subcloned cells were propagated, and the culture supernatants were obtained just before the cultures became confluent. The cells were also propagated *in vivo* in pristane-treated BALB/c mice, and their ascitic fluids were obtained. Unless otherwise stated, the ascitic fluids were used as monoclonal antibody sources.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

ELISA was carried out as described previously⁷⁾. Dig-OVA (2 µg/ml) was used as a coating antigen; β-galactosidase-conjugated sheep anti-mouse Ig (Amersham, N8310) as a second antibody-enzyme conjugate; and 4-methylumbelliferyl-β-D-galactoside as a substrate. The activity of the enzyme bound to solid-phase was measured by the fluorescence intensity of liberated 4-methylumbelliferone with a Titertek Fluoroskan reader (Flow).

For isotyping, heavy and light chain-specific rabbit antisera (Miles) as second antibodies and β-galactosidase-conjugated donkey anti-rabbit Ig (Amersham, N8340) as a third antibody-enzyme conjugate were used as described previously⁷⁾. The dilutions of the second antibodies were predetermined by using anti-human growth hormone⁷⁾ and anti-17-α-hydroxyprogesterone⁸⁾ monoclonal antibodies as positive controls.

Radioimmunoassay (RIA)

Radioimmunoassay was carried out by the dextran-charcoal method⁹⁾ as described previously^{8,10)}. For titration of antibodies, 100 µl of serial dilutions of supernatants and 100 µl of ³H-digoxin (20000 dpm) in 0.1% gelatin (Difco)-10 mM phosphate-buffered saline (G-PBS) were incubated for 3 hr at 4°C, and

then 200 μ l of 1% charcoal-0.1% dextran in G-PBS was added. After 5 min at 4°C, the tubes were centrifuged at 3000 rpm for 15 min at 4°C. The supernatants were transferred to scintillation vials, and the radioactivity was measured with a liquid scintillation counter (Aloka, LSC 703). An antibody titer of 1 in the RIA was defined as the concentration giving half maximum binding. Association constants (K_a) were determined by Scatchard plot analysis¹¹⁾ by incubating a constant amount of antibody with varying concentrations of ³H-digoxin. For the determination of cross-reactivity, 50 μ l of antibody diluted to titer 4 and 100 μ l of ³H-digoxin (20000 dpm) were incubated with 50 μ l of various concentrations of inhibitors in G-PBS at 4°C, and the bound radioactivity was measured as described above. The ratio of the bound ³H-digoxin in the presence of inhibitor (B) to that in the absence of inhibitor (B_0) was plotted to the concentration of inhibitor, and the concentration giving 50% B/B_0 (IC_{50}) was determined.

Results and Discussion

Establishment of hybridoma clones

For the production of monoclonal antibodies, the spleen cells from two BALB/c mice immunized with Dig-HSA were fused with NS1 myeloma cells, and the hybridomas were selected in HAT-medium. The supernatants were screened by ELISA using Dig-OVA as a coating antigen or by RIA, and finally three RIA-positive subcloned hybridoma lines (DIG 64.2B.5, 104.10H.1 and 222.4D.5) were

established.

Properties of monoclonal and polyclonal anti-digoxin antibodies

The isotypes of the monoclonal antibodies were determined by isotyping ELISA. The DIG 64.2B.5 and 104.10H.1 antibodies were belonged to the IgG1(κ) subclass, and the DIG 222.4D.5 antibody was of the IgG2b(κ) subclass. The association constants determined by Scatchard plot analysis ranged from 2.5×10^9 to 1.8×10^{10} and were comparable to or greater than those of rabbit polyclonal antisera (Table 1).

The cross-reactivities of the monoclonal antibodies were examined by competitive RIA and compared with those of rabbit antisera. The concentrations of inhibitors required to give 50% inhibition (IC_{50}) relative to that of digoxin are shown in Table 2. As shown in Table 2, the relative IC_{50} values of the murine monoclonal antibodies and rabbit polyclonal antisera for deslanoside (β 1,4-D-glucosyldigoxin or deacetyllanoside C) and lanatoside C were between 1.1 and 2.6, indicating that they were highly cross-reactive with these digoxigenin-containing cardenolides. Rabbit antisera were more or less cross-reactive with digoxigenin, digitoxin, digitoxigenin. On the other hand, the cross-reactivities of the monoclonal antibodies, especially DIG 64.2B.5 and 222.4D.5, with digitoxin and digitoxigenin were very low. Moreover, the monoclonals were less reactive with digoxigenin than the polyclonal antisera. Thus, the monoclonal antibodies were shown to be more specific for digoxigenin-glycosides

Table 1. Properties of monoclonal and polyclonal antibodies to digoxin

Antibody	$K_a(M^{-1})$	RIA titer		Isotype
	$\times 10^9$			
Monoclonal antibody				
DIG 64.2B.5	18	100 ^{a)}	25,000 ^{b)}	$\gamma 1, \kappa$
BIG 104.10H.1	2.5	120 ^{a)}	130,000 ^{b)}	$\gamma 1, \kappa$
DIG 222.4D.5	5.8	170 ^{a)}	46,000 ^{b)}	$\gamma 2b, \kappa$
Polyclonal antiserum				
RAD #8701	7.9	160,000		—
RAD #8702	9.0	66,000		—
RAD #8703	6.7	110,000		—

^{a)} RIA titer of culture supernatant.

^{b)} RIA titer of ascites.

Table 2. Cross-reactivities of monoclonal and polyclonal anti-digoxin antibodies

Inhibitor	Relative IC ₅₀ value ^{a)}					
	Monoclonal antibody			Polyclonal antibody		
	DIG 64.2B.5	DIG 104.10H.1	DIG 222.4D.5	RAD#8701	RAD#8702	RAD#8703
Digoxin	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Digoxigenin	14	6.4	140	2.1	2.8	3.9
Deslanoside	1.3	1.6	1.1	1.9	1.7	1.6
Lanatoside C	1.4	1.8	1.8	2.6	1.5	1.1
Digitoxin	8900	150	1000	34	28	16
Digitoxigenin	100000	690	100000	110	98	63
Gitoxin	110	100	52	79	68	100
Gitoxigenin	>500000	>650000	>180000	4200	5100	3100
Digitalin	15000	930	15000	710	320	100
Digitonin	160000	>67000	>200000	190000	>210000	>310000
Strophanthidin	>360000	2300	>170000	1200	620	300
Acetylstrophanthidin	>360000	1700	>170000	2100	1600	170
Ouabain	>360000	1100	>170000	86000	40000	4600
Ouabagenin	>360000	3600	>170000	95000	40000	3700
Digitoxose	>1300000	>670000	>2000000	>2600000	>2100000	>3100000

^{a)} Concentration required to give 50% inhibition relative to digoxin. Concentration of digoxin was set at 1.0 for all antibodies.

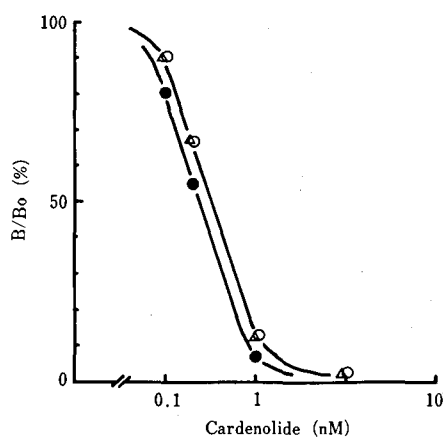


Fig. 1. Standard curves of radioimmunoassay for digoxin (●), deslanoside (○) and lanatoside C (△)

than the rabbit antisera.

So far, several groups have already produced monoclonal antibodies against digoxin¹²⁻¹⁴⁾. However, their specificities have not been determined in detail¹⁴⁾, or the specificities for digoxin are not rigid, namely, most monoclonal antibodies were highly cross-reactive with digitoxin^{12,13)}. Mudgett-Hunter *et al.*¹⁵⁾ repeatedly prepared monoclonal anti-digoxin antibodies. One of their monoclonal antibodies

(40-150) was less cross-reactive with digitoxin and digitoxigenin than the previous ones. The specificity of the 40-150 antibody is similar to our monoclonal antibody, DIG 64.2B.5.

Radioimmunoassay for digoxin, deslanoside and lanatoside C

Fig. 1 shows the standard curves of radioimmunoassay for digoxin, deslanoside and lanatoside C. As shown in Fig. 1, the IC₅₀ values of the digoxigenin-containing cardenolides were ca. 0.2~0.3 nM (corresponding to 30~60 pg/tube) in this RIA system using the DIG 64.2B.5 monoclonal antibody. The sensitivity obtained is enough to estimate the content of digoxigenin-glycosides in plant cultures grown *in vitro*.

Schöner and Reinhard¹⁶⁾ reported that the lanatoside C contents of plants propagated *in vitro* are lower than those propagated in the field. However, its content is still several fold higher than other major cardenolides. It was reported to be up to 40~50% of the total content of digoxigenin-glycosides in the plants cultured *in vitro*. Other cardenolides of relatively high contents were deslanoside, digoxin, α -acetyldigoxin and lanatoside A (a digitoxin derivative). The cross-reactivities of the antibodies with α -acetyldigoxin is un-

known, but its content is relatively low¹⁶⁾. Therefore, our monoclonal antibody, DIG 64.2B.5, is assumed to bind mainly to digoxin, deslanoside and lanatoside C among the cardenolides present in *D. lanata* plant cultures. Thus, our RIA system using the monoclonal antibody can be used to roughly estimate the sum of digoxin, deslanoside and lanatoside C contents. Applications of the antibodies to screening of plant cultures are now in progress and will be described elsewhere^{17,18)}

Acknowledgements

This work was supported in part by funds from the Science and Technology Agency of Japan.

References

- 1) Weiler, E. M. and Zenk, M. H.: Radioimmunoassay for the determination of digoxin and related compounds in *Digitalis lanata*. *Phytochemistry*, **15**, 1537~1545 (1976)
- 2) Garve, R., Luckner, M., Vogel, E., Tewes, A. and Nover, L.: Growth, morphogenesis and cardenolide formation in long-term cultures of *Digitalis lanata*. *Planta Medica*, **40**, 92~103 (1980)
- 3) Vogel, E. and Luckner, M.: Distribution of cardenolides in *Digitalis lanata*. *Planta Medica*, **41**, 161~165 (1981)
- 4) Smith, T. W., Butler, V. P. and Haber, E.: Characterization of antibodies of high affinity and specificity for the *Digitalis* glycoside digoxin. *Biochemistry*, **9**, 331~337 (1970)
- 5) Oliver, G. C., Parker, B. M., Brasfield, D. L. and Parker, C. W.: The measurement of digitoxin in human serum by radioimmunoassay. *J. Clin. Invest.*, **47**, 1035~1042 (1968)
- 6) Besch, H. B. and Watanabe, A. M.: Radioimmunoassay of digoxin and digitoxin. *Clin. Chem.*, **21**, 1815~1829 (1975)
- 7) Sawada, J., Wada, N., Irie, M., Tokunaga-Doi, T., Ohtsuka, E., Ikehara, M. and Terao, T.: Comparison of the antigenicities of native human growth hormone (hGH) and three forms of recombinant hGHs using monoclonal antibodies. *Mol. Immunol.*, **23**, 625~630 (1986)
- 8) Sawada, J., Terao, T., Itoh, S., Maeda, M., Tsuji, A., Hosoda, H. and Nambara, T.: Production and characterization of monoclonal antibodies to 17 α -hydroxyprogesterone. *J. Steroid Biochem.*, **28**, 405~410 (1987)
- 9) Herbert, V., Lau, K.-M., Gottlieb, C. W. and Bleicher, S. J.: Coated charcoal immunoassay of insulin. *J. Clin. Endocr. Metab.*, **27**, 1375~1384 (1965)
- 10) Sawada, J., Janejai, N., Nagamatsu, K. and Terao, T.: Production and characterization of high-affinity monoclonal antibodies against morphine. *Mol. Immunol.*, **25**, 937~943 (1988)
- 11) Scatchard, G.: The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **51**, 660~672 (1949)
- 12) Bang, B. E., Hurme, M., Juntunen, K. and Mäkelä, O.: Studies of monoclonal and polyclonal anti-digoxin antibodies for serum digoxin radioimmunoassay. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **41**, 75~78 (1981)
- 13) Mudgett-Hunter, M., Margloies, M. N. and Haber, E.: High-affinity monoclonal antibodies to the cardiac glycoside, digoxin. *J. Immunol.*, **129**, 1165~1172 (1982)
- 14) Zalcborg, J. R., Healey, K., Hurrell, J. G. R. and McKenzie, I. F. C.: Monoclonal antibodies to drugs-digoxin. *Int. J. Immunopharmacol.*, **5**, 397~402 (1973)
- 15) Mudgett-Hunter, M., Anderson, W., Haber, E. and Margolies, M. N.: Binding and structural diversity among high-affinity monoclonal anti-digoxin antibodies. *Mol. Immunol.*, **22**, 477~488 (1985)
- 16) Schöner, S. and Reinhard, E.: Long-term cultivation of *Digitalis lanata* clones propagated *in vitro*: Cardenolide content of the regenerated plants. *Planta Medica*, **478**~481 (1986)
- 17) Saito, K., Yamazaki, M., Shimomura, K., Yoshimatsu, K. and Murakoshi, I.: Genetic transformation of foxglove (*Digitalis purpurea*) by chimeric foreign genes and production of cardioactive glycosides. *Plant Cell Rep.*, in press (1990)
- 18) Yoshimatsu, K., Satake, M., Shimomura, K., Sawada, J. and Terao, T.: Determination of cardenolides in hairy root cultures of *Digitalis lanata* by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Natural. Products*, in Press (1990)

アザチオプリン投与ラットを用いた免疫毒性試験法の検討：
免疫毒性国際共同研究（アザチオプリン）分担研究報告

松本清司¹⁾・関田清司・落合敏秋・高木篤也・高田幸一・降矢 強・
黒川雄二・斎藤嘉朗・手島玲子・鈴木和博・沢田純一・寺尾允男・戸部満寿夫

Evaluation of Immunotoxicity Testings Using Azathioprine-Treated Rats:
The International Collaborative Immunotoxicity Study (Azathioprine)

Kiyoshi Matsumoto¹⁾, Kiyoshi Sekita, Toshiaki Ochiai, Atsuya Takagi,
Koichi Takada, Tsuyoshi Furuya, Yuji Kurokawa, Yoshiro Saito,
Reiko Teshima, Kazuhiro Suzuki, Jun-ichi Sawada, Tadao Terao and Masuo Tobe

The immunotoxicological effects of azathioprine (AZP) were examined by enhanced histopathological and function tests in the rat which is routinely used in toxicological tests. Male F344 rats were orally administered AZP in doses of 0, 2.5, 12.5 and 25.0 mg/kg/day for 28 days.

Reductions in the organ weights of the thymus, spleen, liver, kidney, and testis in a dose-dependent manner were confirmed. Hematological examination revealed a marked decrease in the number of WBCs, which was associated with a decrease in the number of lymphocytes. In the femoral bone marrow, a significant reduction in the total cell number attributed to the decrease in the number of lymphocytes and granulocytes was observed. Histopathologically, atrophy and obfuscation of the corticomedullary junction in the thymus, the decrease of lymphocytes in the thymus and spleen, and the disappearance of germinal centers in the lymph nodes were observed.

As for the functional testings, azathioprine treatment did not affect remarkably the PFC number and the NK cell activity per unit spleen cell number. However, the total spleen cell number per spleen was decreased in a dose-dependent manner. Therefore, the total functional activities (PFC and NK) per spleen were decreased.

Thus, in the AZP-treated F344 rats, it was shown that the enhanced histopathological tests were useful to evaluate potential risks to the immune system.

(Received May 31, 1990)

はじめに

化学物質の中には、免疫システムに作用し、その機能を抑制または亢進するものがあることが知られている。このような作用が生体にとって好ましくない場合には、その化学物質が免疫毒性を有するといわれる。生体防御機構としての免疫システムの役割の重要性を考えると、毒性試験における一指標としての免疫毒性の重要性は明白であり、古くより指摘されてきたところである。

免疫毒性評価法設定の動向としては、主として、現在のラットを主体とする毒性試験を免疫組織病理学的に拡大しようとする(EC)方向と、機能試験を主体とすべきであるとする(アメリカ)2通りの考え方が従

来よりあった。免疫機能検査を行うことが、免疫毒性評価のうえでベストであることはいうまでもないことであろう。しかしながら、生体の免疫システムそのものが複雑な構成成分よりなり、多種多様な生物学的活性を発現することから、免疫機能試験系はかなりの数にのぼっており、どのような試験法を免疫毒性試験として用いれば適切であるかの決定を難しいものになっている。また生体の免疫反応は、用いられる動物種、系統等の遺伝的要因、栄養、ホルモン、神経系、外部環境等の要因にも左右され、二次的な免疫機能の異常を本来の免疫毒性と区別することも必要とされる。さらに、従来の毒性試験がラットを主体に行われてきた経緯がある一方で、免疫機能試験の大部分がマウスで確立されたもので、ラットにおける免疫機能の標準的な試験法の確立にはまだ時間が必要とされるという事情もある。

¹⁾ 信州大学医学部

このように、免疫毒性試験法の設定には、種々の問題点が指摘されているが、国際化学物質安全性計画 (International Programme on Chemical Safety, IPCS) では、1986年より、各国における免疫毒性試験法の確立および調和 (harmonization) に向けて、免疫毒性の評価法に関する専門家会議を設け種々の議論を続けている。その活動の一つとして、免疫毒性国際共同研究 (International Collaborative Immunotoxicity Study (ICIS)) (注：初期には International Collaborative Immunotoxicity Programme (ICIP) と呼ばれていた。) が、1988年より実施されている^{1,2)}。

今回の国際協同研究には、アメリカを含む9カ国、22の研究所が参加を表明し、対象物質としてはアザチオプリンが選ばれた。各研究所とも同一のプロトコールに従い、ラットにアザチオプリン (Azathioprine) を28日間経口投与の後、詳細な血液学的、組織学的検討ならびに免疫機能検査を行い、これらの結果から各検査項目の免疫学的意義を再検討するとともに研究所間のデータの比較を行おうというもので、当所毒性部と機能生化学部が参加する機会を得たので、当所における成績について報告する。

実験材料および実験方法

1. 動物

4週齢の F344 雄ラット (SPF) 80匹を日本 SLC により購入し、1群20匹よりなる4群とし、各群ともに10匹は一般毒性検査用、残る10匹は免疫機能検査用として実験に供した。動物室は室温 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、照明12時間に維持した。

2. 薬物

ICIS を介して英国 ICI 社より送付されたアザチオプリン (以下 AZP) を 0 (C 群)、0.025 (L 群)、0.125 (M 群) または 0.25 (H 群) % (各々 0, 2.5, 12.5 または 25 mg/kg/day に相当) の割合に 1% メチルセルロースで懸濁し胃管により各々 (1 ml/100 g 体重) を28日間強制経口投与した。なお、予備試験において 25 mg/kg/day が最大耐量と考えられたのでこれを最高用量とした。

3. 検査項目

1) 一般毒性試験：一般状態および体重は毎日測定した。血液形態学的検査として、実験終了時に眼窩静脈叢より採取した血液について赤血球数 (RBC)、ヘモグロビン量 (Hb)、ヘマトリット値 (PCV)、平均赤血球容積 (MCV)、血小板数 (Plt) および白血球数 (WBC) をシスメックス M-2000 で計数し、白血球分別はマイクロックスにより測定した。麻酔下でラット

を放血致死させ大腿骨を摘出し、骨髄検査として大腿骨1本当りの骨髄細胞数および細胞分別を行った。臓器については脳、肺、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、胸腺、腸間膜リンパ節、膝窩リンパ節および精巣を摘出し重量を測定した。これら臓器と腸管、大腿骨、肺門リンパ節を5%中性緩衝ホルマリンで固定の後、常法に従い H-E 染色を施し詳細な組織学的検査を行った。

統計処理：いずれの測定値も平均値と標準偏差値で表し、群間の有意差は Dunnett の多重比較検定法によった。

2) 免疫機能検査：PFC アッセイは4日前にヒツジ赤血球 (5%, 2 ml) により免疫 (i. p.) されたラットより脾臓を摘出し、Mishell-Dutton 法³⁾ により PFC を計数した。NK 細胞アッセイには、⁵¹Cr で標識された YAC-1 細胞を標的細胞として用いた。標的細胞と脾臓細胞とを混合し、4時間後の標的細胞からの ⁵¹Cr 放出を測定した。なお、20% 放出を示すエフェクター細胞活性を、1 lytic unit とした。

いずれの測定値とも平均値および標準偏差で表し、統計処理は Student の t 検定法によった。

結 果

1. 一般毒性試験

一般状態および体重：H群で被毛汚染および立毛が見られたが、その他の群では特記すべき症状は見られなかった。体重については投与用量に依存した増加抑制が認められた (Fig. 1)。

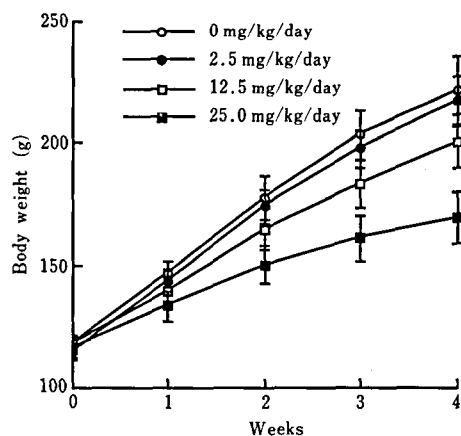


Fig. 1. Body weight of F344 rats administered AZP for 4 weeks

Table 1. Organ weight of male F344 rats administered AZP for 28 days

Group	C	L	M	H
Dose (mg/kg/day)	0	2.5	12.5	25
No. of animals	10	10	10	10
Body weight (g)	221±15	217±10	200±12**	170±11**
Absolute organ weight				
Brain (g)	1.79±0.03	1.77±0.02	1.78±0.02	1.76±0.06
Lung (g)	0.82±0.06	0.81±0.04	0.80±0.09	0.77±0.06
Liver (g)	9.08±0.83	8.83±0.79	7.58±0.63**	6.57±0.76**
Kidney (g)	1.44±0.07	1.42±0.09	1.35±0.10	1.20±0.11**
Spleen (g)	0.51±0.03	0.50±0.03	0.42±0.03**	0.37±0.03**
Testis (g)	2.46±0.13	2.41±0.11	2.37±0.19	2.17±0.24**
Adrenal (mg)	28.0±3.5	26.5±2.9	27.2±4.4	25.5±1.8
Thymus (g)	0.42±0.04	0.36±0.03**	0.13±0.03**	0.07±0.03**
Mesenteric L.N. (mg)	64.8±13.9	67.6±11.0	54.3±5.2	51.7±8.3*
Popliteal L.N. (mg)	6.0±1.4	8.1±2.1	4.9±1.8	5.1±2.3
Relative organ weight				
Brain (g%)	0.81±0.05	0.82±0.03	0.89±0.04**	1.04±0.05**
Lung (g%)	0.37±0.02	0.37±0.02	0.40±0.03*	0.46±0.03**
Liver (g%)	4.10±0.17	4.06±0.20	3.78±0.14**	3.87±0.29*
Kidney (g%)	0.65±0.01	0.65±0.03	0.67±0.02	0.71±0.03**
Spleen (g%)	0.23±0.01	0.23±0.01	0.21±0.02**	0.22±0.01
Testis (g%)	1.11±0.05	1.11±0.03	1.19±0.08	1.28±0.11**
Adrenal (mg%)	12.7±1.4	12.2±1.0	13.6±2.0	15.1±1.2**
Thymus (g%)	0.19±0.02	0.17±0.02*	0.06±0.01**	0.04±0.02**
Mesenteric L.N. (mg%)	29.5±6.7	31.3±5.7	27.1±2.3	30.6±5.5
Popliteal L.N. (mg%)	2.7±0.6	3.8±1.1	2.4±0.9	3.0±1.4

*,***) Significantly different from control (Group C) at $p < 0.05$ or 0.01 , respectively.

Table 2. Hematological findings of F344 male rats administered AZP for 28 days

Group	C	L	M	H
Dose (mg/kg/day)	0	2.5	12.5	25
No. of animals	10	10	10	10
RBC $\times 10^6/\mu\text{l}$	8.96±0.28	8.72±0.28	7.94±0.31**	6.66±0.39**
Hb g/dl	15.9±0.5	15.5±0.5	15.4±0.8	16.9±1.3
PCV %	50.0±1.2	50.6±1.7	49.0±1.8	44.7±2.4**
MCV fl	55.8±1.1	58.0±0.9**	61.7±1.0**	67.0±1.7**
Plt $\times 10^3/\mu\text{l}$	879±27	946±29	964±51**	1090±69**
WBC $\times 10^3/\mu\text{l}$	9.4±1.0	8.1±0.5	4.4±0.6**	3.2±0.2**
Differential count				
Neutro-band %	0.3±0.2	0.2±0.3	0.2±0.2	0.2±0.2
Neutro-seg %	16.4±3.9	15.7±4.8	21.2±4.7	20.4±6.6
Eosino %	0.8±0.3	1.0±0.9	0.8±0.6	0.5±0.5
Lympho %	81.9±4.3	82.7±5.0	77.3±4.6	78.3±6.3
Mono %	0.7±0.5	0.7±0.3	0.6±0.2	0.7±0.4

***) Significantly different from control (Group C) at $p < 0.01$

臓器重量：胸腺、脾臓、肝臓、腎臓および精巣重量の減少が見られた。特に胸腺重量の減少が著明でH群

でC群の約17%となった (Table 1)。

血液形態学的検査：RBC、PCV および WBC の減

Table 3. Femoral bone marrow and differential cell counts of male F344 rats orally administered azathioprine for 28 days

Group Dose (mg/kg/day) No. of animals	C 0 10	L 2.5 10	M 12.5 10	H 25 10
Nucleated Cell Counts				
($\times 10^6$ /femur)	88.2 \pm 6.5	89.3 \pm 5.4	52.1 \pm 3.8**	39.6 \pm 5.7**
Differential Counts (%)				
Proerythroblasts	0.9 \pm 0.7	0.9 \pm 0.2	1.2 \pm 0.5	1.4 \pm 0.5
Basophilic erythroblasts	4.3 \pm 1.2	4.5 \pm 2.0	7.1 \pm 2.2	7.6 \pm 1.5**
Polychromatic erythroblasts	33.2 \pm 3.7	35.7 \pm 6.5	47.9 \pm 3.8**	51.5 \pm 5.1**
TOTAL ERYTHROBLASTS	38.4 \pm 4.4	41.0 \pm 6.5	56.2 \pm 5.5**	60.5 \pm 6.0**
Myeloblasts	0.6 \pm 0.2	0.7 \pm 0.4	0.4 \pm 0.2	0.2 \pm 0.3
Promyelocytes, neutrophilic	1.6 \pm 0.7	1.9 \pm 1.4	1.5 \pm 0.6	0.9 \pm 0.5
Myelocytes, neutrophilic	4.4 \pm 1.7	4.0 \pm 0.7	4.0 \pm 1.2	3.1 \pm 1.0
Metamyelocytes, neutrophilic	6.7 \pm 1.7	9.4 \pm 1.7	6.9 \pm 2.5	4.4 \pm 2.7
Mature neutrophils	17.2 \pm 3.3	17.6 \pm 2.7	14.6 \pm 3.3	12.4 \pm 5.1
Eosinophils	2.7 \pm 1.3	2.3 \pm 1.0	3.3 \pm 0.5	2.6 \pm 1.0
Basophils	0.3 \pm 0.3	0.2 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1
TOTAL GRANULOCYTES	33.6 \pm 7.1	36.1 \pm 4.0	30.8 \pm 5.4	23.6 \pm 7.2
G/E ratio (Ave.)	0.88	0.90	0.56	0.40
Monocytes	2.0 \pm 1.1	2.1 \pm 1.0	1.7 \pm 0.8	1.1 \pm 0.5
Marrow lymphocytes	21.5 \pm 6.5	17.6 \pm 6.0	5.8 \pm 2.9**	6.3 \pm 2.0**
Plasma cells	0.3 \pm 0.3	0.2 \pm 0.2	0.2 \pm 0.2	0.1 \pm 0.1
Mast cells	1.4 \pm 0.4	1.1 \pm 0.8	2.2 \pm 0.9	3.7 \pm 1.8*
Reticulum cells	0.3 \pm 0.5	0.2 \pm 0.3	0.3 \pm 0.3	0.4 \pm 0.4
Macrophages	1.3 \pm 0.7	0.8 \pm 0.4	1.5 \pm 0.9	3.3 \pm 1.7
Megakaryocytes	0.5 \pm 0.4	0.3 \pm 0.3	0.5 \pm 0.4	0.3 \pm 0.2
Mitotic cells	0.8 \pm 0.5	0.4 \pm 0.4	0.8 \pm 0.3	0.6 \pm 0.4

Values are mean \pm SD of 10 animals.

***) Significantly different from control (Group C) at $p < 0.05$ or 0.01 .

少ならびに MCV と Plt の増加が見られた。この内 WBC はH群でC群の約34%と著明に減少したが、白血球分別の結果から主にリンパ球の変化によるものであった。また、赤血球系については大球性貧血の像を呈した (Table 2)。

骨髄検査：大腿骨1本当りの骨髄細胞数はM群以上で著明に減少した。これは骨髄細胞分別の結果から、特に骨髄リンパ球と顆粒球の減少によるものであった (Table 3)。

組織学的検査：組織学的に胸腺では萎縮、皮質・髄質境界部の不明瞭化およびリンパ球の減少、脾臓では PALS および濾胞でリンパ球の減少、バイエル板、肺門、膝窩および腸間膜リンパ節ではリンパ球の減少、バイエル板および腸間膜リンパ節で胚中心の消失、骨髄では脂肪化および細胞数の減少がM群以上で著明に見られた。また、肝臓でグリコーゲンの消失がM

群以上で見られた (Table 4)。

2. 免疫機能検査

10^6 脾臓細胞当りの PFC 数は、高用量の処理によっても著しい低下が認められず、L群では、逆に若干の上昇が認められた。全脾臓細胞数が、用量依存的に減少しているため、結果的には脾臓当りの全 PFC 数もまた用量依存的に減少した (Table 5)。

10^6 脾臓細胞当りの NK 細胞活性 (lytic units) にも大きな低下は認められず、PFC アッセイの場合と同様に、脾臓当りの全 NK 細胞活性は用量依存的に減少した (Table 6)。

考 察

日本では医薬品、食品添加物、農薬あるいは化学物質の毒性を調べるためのいくつかの試験法ガイドラインが既に提示されているが、これらの試験系の内容は

Table 4. Histological findings of rats administered AZP for 28 days

Organs Findings	Group Dose (mg/kg/day) No. of animals	C	L	M	H
		0 10	2.5 10	12.5 10	25 10
Thymus					
atrophy	+	0	0	10	0
	++	0	0	0	10
obfuscation of corticomedullary junction	±	0	0	1	0
	+	0	0	8	0
	++	0	0	1	10
reduction of lymphocyte	±	0	0	1	0
	+	0	0	7	0
	++	0	0	2	10
Spleen (PALS)					
reduction of lymphocyte	±	0	0	6	4
	+	0	0	1	5
(follicle)					
reduction of lymphocyte	±	0	1	1	3
	+	0	0	6	6
Peyer's patches					
disappearance of germinal center	±	0	0	1	4
	+	0	0	1	2
reduction of lymphocyte	±	0	0	0	5
	+	0	0	0	1
Hilar lymph node					
reduction of lymphocyte	±	0	0	3	4
Popliteal lymph node					
reduction of lymphocyte	±	0	0	3	5
	+	0	0	0	1
Mesenteric lymph node					
disappearance of germinal center	±	0	3	4	3
	+	0	0	3	7
reduction of lymphocyte	±	0	2	5	5
	+	0	0	3	4
Bone marrow					
fatty marrow	±	1	0	2	1
	+	0	0	8	9
reduction of cellularity	±	0	0	1	1
	+	0	0	9	9
Liver (liver cell)					
depletion of glycogen	±	0	0	3	2
	+	0	0	5	2
	++	0	0	1	6

±: slight +: moderate ++: severe

Table 5. Effect of azathioprine on the primary anti-SRBC response

Group Dose (mg/kg/day) No. of animals	C	L	M	H
	0 5	2.5 5	12.5 5	25 5
Body weight (g)	217.2±10.5	212.4±12.9	200.1±11.7*	178.6±20.9**
Spleen weight (g)	0.625±0.053	0.591±0.055	0.548±0.042*	0.564±0.034
Spleen cells/spleen (×10 ⁶)	5.18±0.32	5.07±0.54	3.99±0.71**	2.99±0.26**
PFC/10 ⁶ cells	432±122	548±132	375±77	416±128
PFC/spleen (×10 ⁻⁵)	2.26±0.74	2.81±0.88	1.52±0.53	1.25±0.45*

Significant levels: * p<0.05; ** p<0.01.

Table 6. Effect of azathioprine treatment on the NK cell activity

Group Dose (mg/kg/day) No. of animals	C 0 5	L 2.5 5	M 12.5 5	H 25 5
Body weight (g)	213.7±15.6	208.5±15.4	189.7±8.1*	168.5±12.5**
Spleen weight (g)	0.578±0.060	0.572±0.026	0.480±0.036*	0.461±0.014*
Spleen cells/spleen (×10 ⁸)	5.68±0.87	4.99±0.79	3.54±0.19**	2.89±0.32**
Lytic units/10 ⁶ cells	0.97±0.28	1.21±0.65	1.19±0.32	0.88±0.23
Lytic units/spleen	570±228	564±244	413±117	249±52*

Significant levels: * p<0.05; ** p<0.01.

アメリカや EC のものとはほぼ同様であり、いずれのガイドラインでも一般毒性試験としては、血液形態学的、血液生化学的ならびに病理組織学的検査が要求されていることは周知のところである。

今回、免疫毒性検索のアプローチをどのように行えばよいかを検討する ICIS の目的のもと、ラットにアザチオプリンを28日間強制経口投与する亜急性毒性試験を実施した。この試験では特に免疫系への影響を調べるために、現行のガイドラインでは要求されていない試験項目 (enhanced histopathological tests), 例えば骨髄細胞数、腸間膜、膝窩リンパ節重量測定およびこれらと肺門リンパ節を含めたリンパ系臓器の詳細な組織学的検査、ならびに免疫機能検査としての PFC および NK 細胞のアッセイを選び、各々プロトコールに従い、検査を行った。さらに、我々は血液系への影響を検討する目的で骨髄細胞分別についても検討を加えた。

結果に示したとおり、アザチオプリン投与により血液学的にはリンパ球を主体とした白血球数の減少および大球性貧血、骨髄検査ではリンパ球および顆粒球減少による骨髄細胞数の著大な低下、臓器重量では胸腺および脾重量の減少、組織学的検査ではこれらの臓器の萎縮およびリンパ節のリンパ球減少が認められた。このように骨髄、リンパ系臓器のより詳細な組織学的検討ならびに骨髄検査を実施することにより、従来の毒性試験でとらえることのできるリンパ球数減少や主要臓器の変化に加え、骨髄や各リンパ節におけるリンパ球の減少ならびに生体防御上重要な役割を演じる骨髄顆粒球の減少を明確に示すことができた。

一方、機能試験としては、PFC および NK 細胞のアッセイを用いたが、単位脾臓細胞数当りの PFC 数および NK 活性には著しい減少は認められず、今回用いた F344 ラットの系統においては、抗ヒツジ赤血球

一次免疫応答またはナチュラルキラー細胞活性に関与する細胞群のみが特に AZP に高い感受性を示すものではないことが予想された。しかし、全脾臓細胞数が用量依存的に減少していることから、脾臓当りの全 PFC 数および NK 細胞活性ともに減少する結果となった。

アザチオプリンはメルカプトプリン誘導体でプリン合成阻害、RNA および DNA 合成阻害作用を有し白血球減少症を惹起することから、免疫抑制剤としても用いられている薬物である⁴⁾が、このような細胞分裂阻害や免疫系に対する抑制作用については、今回実施された毒性試験項目よりある程度察知し得るものと考えられた。

以上の結果より、今回用いられた F344 ラットの系において AZP の免疫毒性評価を検討した場合には、病理組織学的および血液学的所見と機能検査の結果には平行した関係が得られ、一次スクリーニングとしての病理組織学的検査の有用性が示された。

研究所間のデータの解析は今後の ICIS 会議からの報告書を待って別途報告したい。

文 献

- 1) 寺尾允男：免疫毒性に関する国際共同研究。International Collaborative Immunotoxicity Programme を中心として。衛生試報, 106, 1 (1988)
- 2) 澤田純一, 寺尾允男：ICIP: 免疫毒性試験法の有効性評価に関する国際共同研究計画の発足。トキシコロジーフォーラム, 5, 555 (1988)
- 3) Mishell, R. I. and Dutton, R. W.: Immunization of dissociated spleen cell cultures from normal mice. *J. Exp. Med.*, 126, 423 (1967)
- 4) Elion, G. B.: Biochemistry and pharmacology of purine analogues. *Fed. Proc.*, 26, 898 (1967)

わが国の化学物質規制情報検索システムの整備と国際化学物質有害性情報登録 (IRPTC) の法規制データベースの効果的利用について

関沢 純

Future Development of the Japanese Chemicals Regulation Data Search System and the Effective Use of the IRPTC Legal File

Jun Sekizawa

After ten years of international cooperation in developing the IRPTC Legal File, its usefulness in searching for chemicals regulation data from abroad and in Japan was studied. The superiority of the database in offering summaries of the legal texts from 50 countries and 7 international organizations was obvious, but the need for improvements in the coverage and the accuracy of the data was found. The development of a Japanese database of legal information on chemicals based on international information exchange is desirable.

(Received May 31, 1990)

1. 化学物質規制情報整備の重要性

わが国の化学物質規制はこの数十年間の化学工業の質、量における大きな変化に対応して、より多くの科学的な根拠に裏打ちされ、相応しい考え方にもとづいてなされるべく努力が積み重ねられてきている。しかし一方では各国の化学物質規制の違いとそれについての情報交換の不足が、先進国間では関税外障壁のひとつとして問題とされ、途上国からは先進国による公害輸出が指摘される原因のひとつとなっている¹⁾。

化学物質の法規制は製造、使用、運搬、廃棄、環境、衛生 (食品、生活、労働) など種々の方面が関係する。ある調査²⁾によると化学工業に関連してわが国には11の省庁にまたがって181種類の国内法規があるが、この多岐にわたる化学物質規制情報について検索する手段は現在ではたいへん限られている。

われわれは1972年のストックホルム国連人間環境会議の決議にもとづいてつくられた国連環境計画 (United Nations Environment Programme: UNEP) の活動のひとつとしての化学物質の有害性に関する情報交換の国際協力、すなわち国際化学物質有害性情報登録 (International Register of Potentially Toxic Chemicals: IRPTC) の日本の窓口 (National Correspondent) として10年間にわたり IRPTC の法規制データベースの作成に協力してきた (Fig. 1)。

IRPTC 法規制データベースは国際協力により開発された化学物質法規制に関するファクトデータベース

としてたいへんユニークである。本データベースは磁気テープの形で IRPTC よりわが国に提供され、厚生省統計情報部の大型コンピュータ上で INQ データベースシステムにのせ当所から専用回線で検索できる。

本データベースの内容を分析するとともに、わが国の化学物質法規制情報検索システムの整備に関連して本データベースの有用性について検討した。

2. IRPTC 法規制ファイルの内容と検索

IRPTC は化学物質の安全性に関する種々の情報を国際協力のネットワークを通じて収集、データベース化し、要求に応じて提供する目的で1976年に UNEP の一機関として組織がつけられた。

IRPTC のデータベースは化学物質の安全性を評価

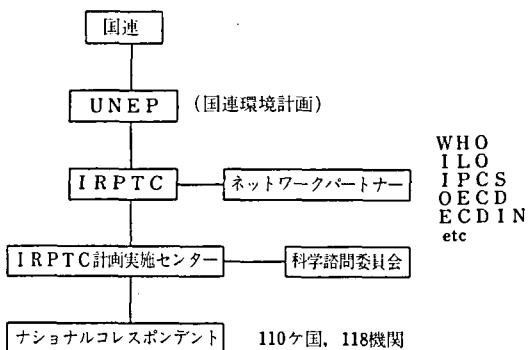


Fig. 1. IRPTC の組織

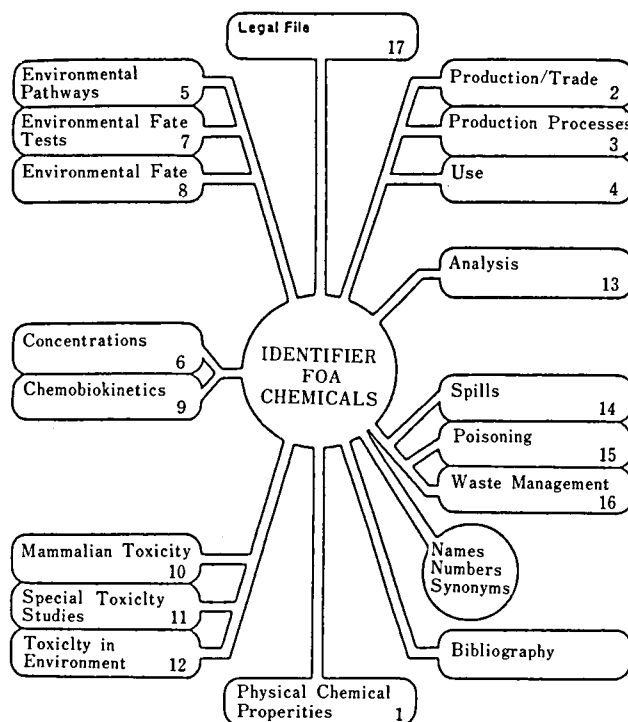


Fig. 2. File Components of the IRPTC Database

Table 1. Development of the IRPTC legal file

Year	Number of records	Number of chemicals	Note (Publications)
1979	—	400*	Start Data Collection from 12 Countries and 6 International Organizations
1980	—	172	(Legal Data Profiles for Selected Chemicals)**
1983	—	407	(IRPTC Legal File 1983)**
1986	—	561	(IRPTC Legal File 1986)**
1987	—	6,000*	—
1989	42,326	8,000*	Data collected from 50 Countries and 7 International Organizations

* Approximate numbers

** Only data for priority chemicals were published to save printing costs.

することに関連したファクトデータを検索できる総合データベースとして Fig. 2 に示す 17 の分野のファイルが物質同定情報 (物質名, CAS 登録番号, RTECS 番号) により結合されたものとしてつくられ, 1979 年からデータ収集が開始された。

IRPTC 法規制ファイルは 17 番目のファイルにあたるが, 全ファイル中でこの 10 年間にデータが最も充実されてきたファイルであり, また利用度も最も高いファイルである (Table 1)。

IRPTC 法規制ファイルのデータ項目とサンプルデ

ータを Table 2, Table 3 に示す。例えば, 物質名: Chloroform, RTECS 番号: FS9100000, 国名 (Area): 西独 (DEU), 主題 (Subject): 労働衛生 (Occ) の組み合わせを使って Table 3 の下段に見られる西独における作業環境中のクロロフォルム濃度の規制データを検索することができる。このように IRPTC 法規制ファイルでは基準値を含む規制情報を根拠法令とともに直接検索できることに特徴がある。

Table 4 には法規制データの内容を主題 (Subject) 別に検索した結果を示す。空気中の濃度規制データが

Table 2. Data fields in the IRPTC legal file

AREA:	Geographical area or organization (e. g., Japan, EEC or FAO/WHO)
TYPE:	Type of mechanism (e. g., regulation, recommendation)
SUBJECT:	Subject of mechanism (e. g., air, soil, food, etc.)
DESCR.:	Description of mechanism (e. g., threshold limit value, maximum residue limit, prohibition, etc.)
LEVELS, REMARKS;	Levels with specified analytical method and remarks (e. g., MAC, 30 mg/m ³ air (10 ppm), skin absorption)
EFFECTIVE DATE:	Effective date (date when control mechanism took, or will take effect)
ENTRY DATE:	Entry date in the IRPTC Register
REFERENCES:	Reference

Table 3. Example data from the IRPTC legal file

Recommendations-Legal Mechanisms							
FS 9100000 Chloroform							
Area	Type	Subject	Descr.	Levels, Remarks	Effective Date	Entry Date	References
BRA	REG	AIR OCC	AL	94 mg/m ³ (20 ppm) (for 48 h/wk) (hazardous degree: Maximum)		Aug 1982	SMTBR* 3, 141, 1980
CSK	REG	AIR OCC	MAC	TWA: 50.0 mg/m ³ CLV: 250.0 mg/m ³	Oct 1978	May 1982	HPMZC* 39, —, 1978
DEU	REG	AIR EMI	MXL	The air emissions of organic compounds must not exceed (as the sum of all compounds in one class) the following massconcentrations. Class I: 20 mg/m ³ at a massflow of >0.1 kg-h Class II: 150 mg/m ³ at a massflow of >3 kg-h Class III: 300 mg/m ³ at a massflow of >6 kg-h if compounds from different classes are present the massconcentration must not exceed 30 mg/m ³ the substance belongs to class II		Jun 1982	KOIMM* 1, 1B 1/12, 1979
DEU	REC	AIR OCC	MAK	50 mg/m ³ (10 ppm) (VP=21.0 kPa at 20C) suspected as being a carcinogenic working material. The MAK value is therefore tentatively retained.		Mch 1983	DFSK** XVIII, 14, 1982

最も多かったが、細分類 (Specification) を見るとその86%は労働衛生の分野の規制データであることがわかる。その他、表示、使用、包装、輸送、販売に関する規制データ、食品、水質に関する規制データも多くを占めている。

IRPTC 法規制ファイルは現在50カ国、7国際機関からの化学物質規制情報を収録しているが、国あるいは国際機関別に収録データ数を調べると Table 5 に示す結果が得られた。米国、ヨーロッパ共同体 (EC) はそれぞれ独自の化学物質法規制情報データベースを既に持っていることから提供データ数が圧倒的に多く

なっている。また国連の各専門機関による基準値や危険性分類の勧告データは優先的にデータベースに採録されることから各国連機関に関係した主題分野の情報が多く見いだされる。

Table 6 にはわが国から送付したデータを検索した結果をまとめた。法令の数としてはまだ少ないが有害物質に関する重要な規制データは最低限カバーしている。送付データの全てが入力されている訳ではないことは、例えばわが国で食品添加物として指定されている化合物のリストを以前に送付したが検索結果では見いだせなかったことからわかる。米国のデータについ

Table 4. Numbers of records related to major subjects in the IRPTC legal file

Subject	Specification ^{a)}	Record count ^{b)}
AIR	—	13,606 (11,727)
LABEL	Occupational	8,481
FOOD	—	7,352 (2,563)
	Permitted MAC, MRL ^{c)} etc.	(2,167)
USE	—	7,163 (4,027)
	Prohibited/Restricted Permitted	(2,362)
PACK	—	6,471
AQ ^{d)}	—	4,433 (1,673)
	Emission	
TRNSP ^{e)}	—	2,870
SALE	—	2,452
WASTE	—	2,414
GOODS ^{f)}	—	2,347

a) Dash (—) means "not specified".

b) Numbers in the parentheses are included in the numbers of "not specified".

c) Maximum Allowable Concentration, Maximum Residue Limit

d) Aqua (Water)

e) Transport

f) Household goods

てチェックしたところ、いわゆる間接食品添加物（食品包装材料）についての規制データは見られたが直接食品添加物（わが国でいう食品添加物）についてのデ

Table 5. Numbers of records from the countries and the international organizations which contributed much to the IRPTC legal file

Countries	Record counts	International organizations	Record counts
USA	9,061	EC	4,685
USSR	4,224	FAO/WHO	810
FRG ^{a)}	3,799	United nations	357
United Kingdom	3,218	IMO ^{b)}	219
Canada	2,838	WHO	163
Sweden	1,913		
Czechoslovakia	1,560		
Japan	1,212		
Switzerland	805		
Belgium	742		

a) Federal Republic of Germany

b) International Maritime Organization

ータは見つからなかったことから IRPTC は現時点でデータ入力についてデータの選別または優先順位づけを行っていていると考えられた。

Table 7 には1988年にわが国から送付したデータの内訳を示す。法令の改正による物質の追加、削除や規制内容の変更によるデータ更新もあったが、わが国のデータを検索した結果データの誤りに気づいて変更、追加、削除を依頼した例も多数あった。その中には単純な入力ミスと思われる例もあったが、労働安全衛生法中の製造禁止物質について輸出が禁止されていると

Table 6. Numbers of records of Japanese chemicals regulations in the IRPTC legal file

Subject (主題)	Specification (細分類)	Record count ^{a)} (レコード件数)	Note (日本の関係法令等)
AIR (空气中濃度)	OCC (作業環境)	235	日本産業衛生学会勧告
	AMBI or EMI (環境/排出)	30	環境基準/大気汚染防止法
AQ (水質)	DRINK (飲料水)	7	水道法
	AMBI or EMI (環境/排出)	62	環境基準/水質汚濁防止法
FOOD (食品)	—	31	食品衛生法
USE (使用)	PRO or RSTR (禁止/制限)	50	毒物劇物取締法/化審法/家庭用品規制法
	PRMT (許可)	399	農薬取締法
	— (その他)	3	家庭用品規制法
GOODS (家庭用品)	—	76	家庭用品規制法
CLASS (分類)	—	343	化審法/毒物劇物取締法
LABEL (表示)	—	332	毒物劇物取締法
SALE (販売)	—	332	毒物劇物取締法
MANUF (製造)	—	10	化審法

a) 複数の主題に関係する規制データがあるためレコード件数は重複して数えられている

Table 7. Japanese chemicals regulation data supplied to IRPTC (Example from 1988)

法令または勧告	デ ー タ			
	追加 ^{a)}	変更 ^{a)}	削除 ^{a)}	合計 ^{a)}
農薬取締法	141 (2)	15 (3)	14 (2)	170 (7)
日本産業衛生学会の勧告	79 (10)	46 (14)	40 (3)	165 (27)
毒物劇物取締法	53 (13)	19 (13)	13 (3)	85 (29)
労働安全衛生法	— (—)	7 (3)	7 (1)	14 (4)
食品衛生法	— (—)	1 (1)	1 (1)	2 (2)
その他	— (—)	7 (5)	— (—)	7 (5)
合計	273 (25)	95 (39)	75 (10)	443 (74)

a) 物質数(件数)

する記述が見られ IRPTC の誤解による入力と考えられるケースがあった。

3. わが国における法規制情報の整備

わが国の化学物質規制の概要と規制情報の検索の詳細については他に記した³⁾が、複雑多岐にわたる化学物質規制の最新の情報を常に的確に把握することは容易ではない。実際に種々の法令ではまちまちの化学物質の命名が混在しておりそれらについての索引づけがされていないために、ある物質についてどのような規制がおこなわれているかを知ることがたいへん困難である。

いくつかの法令中に収載されている化学物質について、法令別に収載の有無を案内する日本語による検索システムが JOIS (JICST On-line Information System) により今年から提供されるようになったが、本システムでは規制内容についてはあらためて法令を読んで調べる必要がある。環境庁でも環境化学物質についてパソコンで利用できる日本語による法令収載の有無についての案内データベースを試作しているが現在は提供範囲は限られている。

国際的な情報の交換について考えてみると英訳された日本の法令の数は多くなく、法令名ひとつをとっても編者によってまちまちに英訳されている場合もあり

誤解を生む原因になっているとさえ思われた。

IRPTC 法規制ファイルは規制データの内容を直接検索できる点、また海外の情報をも検索できかつ直接国際的情報交換に役立っている点でユニークなデータベースである。

国際経済の中で大きな比重を占めるわが国がわが国に対する国際的な理解を促進するためにも、また重要な公的情報について国内での情報公開を進める上でも、米国などで整備されているような規制情報を含む化学物質安全性情報検索システムを整備することが今後重要と考えられる。われわれはこの考えに沿って IRPTC 法規制ファイルの国内での活用について現在検討を進めている。

文 献

- 1) United Nations Environment Programme: "London guidelines for the exchange of information on chemicals in international trade, amended 1989", (1989), pp. 22
- 2) 藤原良造: 化学工業における環境、保安、衛生関連の法規, 化学と工業, 34, 561~583 (1981)
- 3) 関沢 純: 6 規制情報の検索; "毒性情報の検索と管理", 竹中祐典, 宇高奎二, 榎本 真編, 地人書館, 東京 (1989), pp. 153~179

テトラクロロビンホスのラットによる28日間
反復経口投与毒性試験について

小川幸男・鈴木幸子・高田幸一・佐井君江
鎌田栄一・梅村隆志・金子豊蔵・黒川雄二

Twenty-eight-day Repeated Dose Toxicity
Test for Tetrachlorvinphos in Wistar Rat

Yukio Ogawa, Sachiko Suzuki, Kouichi Takada, Kimie Sai,
Eiichi Kamata, Takashi Umemura, Toyozo Kaneko and Yuji Kurokawa

A 28-day oral toxicity test of tetrachlorvinphos (TCV) was conducted in male and female Slc: Wistar rats by gavage at dose levels of 0, 10, 100 or 1000 mg/kg/day. The male and female rats showed dose-related inhibition of serum cholinesterase activity and erythrocyte acetylcholinesterase activity. At a dose of 1000 mg/kg, body weight gain was decreased in males, and there were 6 deaths in females. Adrenal gland, liver, kidney and thyroid gland weights were increased. The adrenal lesions were characterized by vacuolization and swelling of the cortex cells. The hepatic lesions consisted of vacuolization and necrosis of the hepatocytes. The renal lesions consisted of regeneration and necrosis of the tubular epithelial cells. These lesions were mostly observed at a dose of 1000 mg/kg. After a 14-day recovery period in the 1000 mg/kg group, the changes of cholinesterase, total cholesterol, γ -glutamyltransferase, alkaline phosphatase, aspartate aminotransferase and blood urea nitrogen in serum were restored or showed a tendency toward recovery. However, the lesions in the kidney and adrenal remained. More than 14 days are therefore considered to be needed for recovery. At doses of more than 10 mg/kg, significant inhibition of the serum cholinesterase activity in both sexes, erythrocyte acetylcholinesterase activity in males, and lesions of the adrenal gland in females were observed. Target organs for TCV-treated rats were the adrenal, liver and kidney. It was concluded that the NOEL under this experimental condition is less than 10 mg/kg/day.

(Received May 31, 1990)

はじめに

白蟻駆除剤として広く使用されていたクロロデン類の代替物質である有機リン剤テトラクロロビンホスの安全性を調べる目的で、28日間の反復経口投与試験を行った。

実験材料および方法

被験物質：実験に用いたテトラクロロビンホス (2-chloro-1-(2,4,5-trichlorophenyl) ethenyl dimethyl ester, (Z)-) (TCV) (CAS NO. 22248-79-9) はシェル化学㈱製の商品名ガードナ (純度98.82%) である。TCVの構造式を Fig. 1 に示した。

動物および飼育条件：日本エスエルシーより Slc: Wistar ラット (SPF) 雌雄各130匹を4週齢で購入し、1週間の馴化の後に、山崎ら¹⁾の方法により雄

(117~130 g)、雌 (101~112 g) の各々60匹を選抜し、対照 (C) 群と最高用量 (H) 群および中間の用量 (L, M) 群の4群のほか回復群としてC群とH群の2群、計6群に雌雄各10匹を割り付けた。室温 23±1°C、湿度 55±5%、6時~18時の12時間照明下の SPF 動物室内で、床敷を入れたポリカーボネート製ケージに5匹を収容し、ラット飼育用固形飼料 (船橋農場製 F2) と水道水を自由に摂取させた。

投与量および投与方法：雄の LD₅₀ 値 (約 4 g/kg)²⁾ の 1/2 の 2000 mg/kg を投与量設定のための予備実験として5日間投与した結果、体重減少および衰弱 (歩行不能) が認められたため、その半量 1000 mg/kg を最高用量 (H群) とした。またラットの亜急性毒性試験でコリンエステラーゼ活性阻害を認めない最大無作用量の 200 ppm (0.02%)³⁾ と、摂餌量 15 g/day/100 g 体重から算出した体重当たりの経口投与量 30 mg/

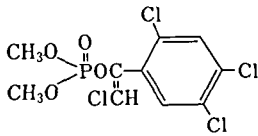


Fig. 1. Chemical structure of tetrachlorvinphos

kg の1/3の10 mg/kgを低用量(L群)とした。このLとHの間を公比10として、中間用量(M群)100 mg/kgを設け計3用量とした。

検体は5%のアラビアゴム溶液に懸濁し、動物の体重100g当たり0.5mlになるように調製した。毎朝体重を測定しその体重から投与量を計算し、胃ゾンデにより1日1回28日間強制経口投与した。なお、回復群については最終投与後14日間の回復期間を設けた。

初日に雄の各群5匹(対照およびH群は回復群を含め10匹)の血液学、血清生化学および病理学的検査を行う動物、次の日に雄の各群5匹(対照およびH群は回復群を含め10匹)の血液凝固能検査、赤血球および臓器生化学的検査を行う動物に投与を始めた。さらに

次の日から雌の動物について同様に投与を始めた。

観察ならびに検査項目：投与期間中は一般状態の観察、死亡の有無および体重、摂餌量の測定を行った。尿検査は、雄は最終投与直後に、雌は投与26日目に行った。雌雄とも最終投与24時間後と回復期間終了後には、血液学、生化学、病理学的検査および血液凝固能検査を行った。

1. 一般状態、体重および摂餌量

毎朝9時より12時まで、一般状態の観察を行った。体重の測定は毎朝行い、摂餌量の測定は週に1回行った。死亡の有無の確認は、毎日9時および18時の2回行った。

2. 血液学的検査および血清生化学的検査

各群雌雄5例について、16時間絶食後、エーテル麻酔下で眼窩静脈叢より採血し、血液学的検査の項目、および遠心分離した血清について生化学的検査の項目について測定した(Table 1)。

3. 病理学的検査

放血と殺後、剖検し、脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、

Table 1. Hematological and biochemical examinations

Items of measurement	Abbreviation	Kit(maker)
Hematology		
Coulter Counter Model SP		
Red blood cell count	RBC	
Hemoglobin concentration	Hb	
Packed cell volume	PCV	
White blood cell count	WBC	
Sysmex Platelet Counter PL-100		
Platelet count	Plt	
Microx Heg 30A		
Differential count of white blood cell		
Reticurocyte count	Ret	
Biochemistry (serum)		
Gemsaec Automatic Fast Analyzer Type IV		
Total protein ^{a)}	TP	Wako
Albumin	Alb	Wako
Albumin-globulin ratio	A/G	Calculation
Blood urea nitrogen	BUN	Shinotest
Creatinine	CRN	BMY
Glucose	Glc	BMY
Triglycerides	TG	BMY
Total cholesterol	TCho	BMY
Alkaline phosphatase	AIP	Wako
Cholinesterase ^{a)}	ChE	BMY ^{c)}
Aspartate aminotransferase ^{b)}	AsT	Eiken
Alanine aminotransferase ^{b)}	ALT	Eiken
γ -Glutamyltransferase ^{b)}	γ GT	BMY
Lactate dehydrogenase ^{b)}	LDH	Shinotest
Calcium	Ca	Wako
Inorganic phosphorus	P	Wako
Sodium	Na	Daiichi
Potassium	K	Daiichi
Blood coagulability		
Amelung coagurometer KC-10		
Fibrinogen	Fib	Midorijuji
Hepaplastin	Hep	Eisai

BMY : Boehringer Mannheim Yamanouchi, Shinotest : Shinotest Laboratory, Wako : Wako Pure Chemical Industries, Daiichi : Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd., Midorijuji : Midorijuji Co., Ltd., Eisai : Eisai Co., Ltd.

a) : Brain and liver were measured with the same kits of the serum.

b) : Liver was measured with the same kits of the serum.

c) : Butyrylthiocholine was used as a substrate.

脾臓、精巣、卵巣、甲状腺、副腎を摘出し重量を測定した。これらに加えて下垂体、眼球、膀胱、大腿骨(骨髄)および肉眼的に変化の認められた器官、組織を摘出し、10%中性等張ホルマリンで固定した。

病理組織学的検査は心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、甲状腺および肉眼的に変化の認められたものについて行った。

4. その他の検査

2, 3 で用いた動物とは別の雌雄の各群5例について、以下の検査を行った。

血液凝固能検査は、エーテル麻酔下で頸静脈より、3.8%クエン酸3ナトリウム0.2 ml を入れた注射筒で採血し、分離した血漿について、Table 1 に示した項目を測定した。

血液凝固能検査で遠心分離した赤血球を、生理的食塩水で洗浄し、赤血球のアセチルコリンを Δ pH法により測定した。

さらに放血と殺後、脳および肝臓を摘出し、脳は正中線で2分しその一方を、肝臓は約1gを秤量し、それぞれ3倍量の1.15% KCl 溶液を加えホモジナイズした後、10000G で20分間遠心分離した上清についてTable 1 に示す生化学的検査を行った。

尿検査は、ラプスティック3(マイルス三共)を用い、雄は最終投与直後に、雌は投与26日目に各群5例より強制排泄により得た尿について、蛋白質、ケトン体、ブドウ糖、潜血、pH の5項目を検査した。

5. 統計処理

体重についてはt検定を行った。血液学的検査、生化学的検査、臓器重量の結果は、F検定を行った後、等分散のものはt検定、等分散でないものはAspin-Welch法でt検定を行った。

実験結果

主に変化の見られた検査項目について記述し、それぞれ図表に示した。

1. 一般状態、体重および摂餌量 (Fig. 2, 3)

一般状態では、雌のH群において1週間目に下腹部尿道孔周囲の汚れが認められた。また雌のH群のみに、4日目より死亡が認められ、投与期間中に6例が死亡した。雄では一般状態の変化および死亡は認められなかった。体重は、雄のH群で1週間目より増加抑制が認められた。雌のH群は1週間目に減少が認められたが、2週間目以後では対照群と大きな差は認められなかった。摂餌量において、雌雄の各群とも対照群との差はなかった。

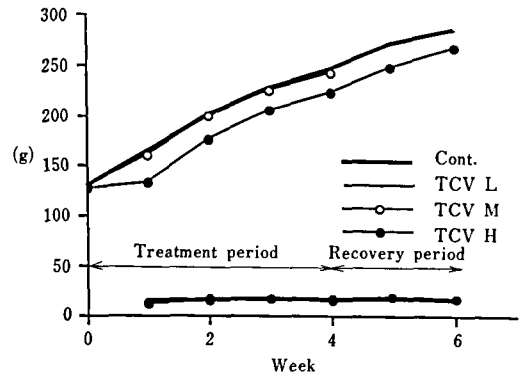


Fig. 2. Effects of TCV on body weight and food consumption of male rats

Each point represents the mean of 5 or 10 rats.

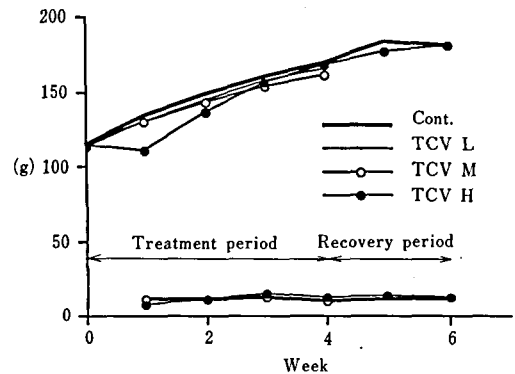


Fig. 3. Effects of TCV on body weight and food consumption of female rats

Each point represents the mean of 4 to 10 rats.

2. 血液学的検査

雄のH群でRBC, Hb, PCVの減少, Plt, Retの増加, 雌のH群でHb, Eosiの減少, Lymph, MonoおよびRetの増加が認められた。H群の回復期間終了時に、雄でRBC, Hb, PCVの減少, Pltの増加, 雌ではHbの減少, Bandの増加が認められた。しかし、いずれも軽度の変化であり、バックグラウンドデータ⁴⁾の範囲内であった。

3. 血清生化学的検査 (Table 2)

用量相関的な変化を認めたものは、雄のL群以上でChEの減少, M群以上でGlc, TGの減少, TChoの増加, 雌のL群以上でA/G, ChEの減少, M群以上でTP, TChoの増加であった。その他、雄のL群以上でBUNの増加, H群でTP, Alb, γ GTの増加, A/G, AIP, AsTの減少, 雌のLおよびM群でAlbの減少, M群でGlcの増加, H群で γ GTの増加, AIP, AsTの減少が認められた。H群の回復期間終了

Table 2. Serum biochemical findings in rats after 28 days treatment of TCV and 14 days untreated recovery period

Group(Dose)	Cont.	L (10 mg/kg)	M (100 mg/kg)	H (1000mg/kg)	Recovery		
					Cont.	H (1000mg/kg)	
Male							
TP g/dl	6.68±0.21	6.68±0.19	6.80±0.06	7.46±0.28 **	6.70±0.05	6.50±0.13 *	
Alb g/dl	4.17±0.06	4.25±0.10	4.21±0.06	4.35±0.14 *	4.12±0.04	4.02±0.11	
A/G	1.66±0.06	1.75±0.06	1.62±0.04	1.40±0.06 **	1.59±0.03	1.62±0.10	
BUN mg/dl	17.32±0.86	19.87±1.85 *	19.68±1.26 **	21.04±5.53	22.65±1.26	25.99±7.19	
Glc mg/dl	155.4±8.70	140.8±14.13	140.2±5.70 *	115.0±12.5 **	142.7±4.8	129.0±8.9 *	
TG mg/dl	160.7±47.54	112.9±31.70	63.1±9.05 **	37.3±5.14 **	183.6±33.8	128.3±35.4 *	
TCho mg/dl	59.28±8.43	64.19±1.44	78.00±8.14 **	102.04±16.21 **	82.01±7.89	75.39±15.34	
AIP mU/ml	571.2±47.2	598.8±31.2	550.2±59.7	397.8±50.4 **	425.0±30.8	413.9±43.3	
ChE mU/ml	640.4±141.3	400.2±88.3 *	174.1±51.6 **	94.3±10.1 **	617.9±89.0	449.1±102.4 *	
AsT mU/ml	61.88±6.03	63.60±3.17	55.08±1.25	49.37±4.24 **	54.29±6.82	48.56±3.33	
AIT mU/ml	28.65±3.68	27.62±5.04	29.65±6.60	32.08±6.90	28.09±2.43	22.14±1.72 **	
γGT mU/ml	0.01±0.00	0.01±0.00	0.40±0.45	7.46±1.28 **	0.01±0.00	0.64±0.63	
LDH mU/ml	806.0±271.2	849.5±146.3	586.1±82.6	520.7±207.6	491.7±262.0	348.5±224.3	
Female							
TP g/dl	6.64±0.08	6.51±0.17	6.86±0.10 **	7.32±0.20 **	6.77±0.28	6.86±0.08	
Alb g/dl	4.30±0.08	4.09±0.09 **	4.14±0.04 **	4.29±0.08	4.27±0.13	4.32±0.07	
A/G	1.84±0.06	1.68±0.07 **	1.52±0.04 **	1.42±0.05 **	1.71±0.10	1.70±0.05	
BUN mg/dl	18.48±1.60	19.73±1.07	21.07±1.94	19.28±3.26	24.53±1.96	22.52±1.56	
Glc mg/dl	116.5±8.1	122.0±13.4	131.0±4.1 *	129.3±10.7	138.6±10.9	139.7±6.7	
TG mg/dl	83.44±30.86	68.29±9.58	81.52±17.63	45.72±8.39	119.4±32.0	112.9±20.5	
TCho mg/dl	126.6±7.0	131.4±9.3	142.0±8.2 *	193.3±14.5 **	120.8±12.9	148.5±5.5 **	
AIP mU/ml	396.4±47.1	382.6±42.2	335.8±23.1	284.2±38.7 **	308.8±22.6	301.0±28.7	
ChE mU/ml	1401.3±123.8	586.5±131.0 **	389.3±66.1 **	133.3±22.9 **	1481.0±172.2	1093.3±78.7 **	
AsT mU/ml	56.89±8.88	59.38±12.86	49.14±2.81	40.14±4.13 **	52.10±6.81	46.31±5.04	
AIT mU/ml	28.20±6.08	24.62±2.44	24.71±4.67	20.97±4.16	26.62±5.43	23.05±4.57	
γGT mU/ml	0.95±0.32	0.95±0.17	1.28±0.42	10.88±2.07 **	0.15±0.32	1.02±0.37 **	
LDH mU/ml	465.4±203.0	487.8±273.4	389.7±233.2	287.7±150.0	502.9±259.1	432.4±197.4	

Values represent mean ± S. D. (n=4 or 5)

Level of significance : * by p<0.05, ** by p<0.01

Table 3. Biochemical findings in rats after 28 days treatment of TCV and 14 days untreated recovery period

Group(Dose)	Cont.	L (10 mg/kg)	M (100 mg/kg)	H (1000mg/kg)	Recovery		
					Cont.	H (1000mg/kg)	
Male							
E AChE	0.13±0.02	0.09±0.02 *	0.05±0.02 **	0.02±0.01 **	0.06±0.01	0.04±0.01 *	
B ChE	7.79±0.69	7.81±1.27	9.00±0.73 *	7.54±0.82	9.95±0.81	8.85±0.61 *	
L ChE	7.19±0.97	7.99±1.33	5.82±1.71	6.41±0.53	7.62±1.04	8.07±0.48	
L AsT	571.4±51.8	485.2±86.4	302.6±73.7 **	225.7±33.2 **	506.3±70.4	453.5±46.6	
L AIT	325.4±46.5	265.3±32.9 *	258.6±29.1 *	275.0±16.9	271.0±29.1	297.0±11.4	
L γGT	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	2.67±1.70 **	0.00±0.00	0.00±0.00	
L LDH	3982±400	3178±554 *	2841±281 **	2741±211 **	3559±371	3575±161	
Female							
E AChE	0.07±0.01	0.07±0.01	0.02±0.02 **	0.02±0.01 **			
B ChE	6.21±2.73	6.41±2.47	7.79±0.86	6.66±0.68			
L ChE	6.76±1.52	6.86±0.97	9.64±0.55 *	7.58±2.91			
L AsT	301.8±53.3	267.7±83.1	429.7±290.9	241.1±57.8			
L AIT	206.9±25.7	177.7±54.2	226.1±31.2	234.9±34.1			
L γGT	0.00±0.00	0.00±0.00	0.09±0.14	3.40±1.14 **			
L LDH	2227±191	1993±417	2344±246	2078±270			

E : Erythrocyte, B : Brain, L : Liver, Values represent mean ± S. D. (n=4 or 5)

Level of significance : * by p<0.05, ** by p<0.01

Female rats at the recovery test were lost by the death.

時に、雄で Glc, TG, ChE, AIT の減少、雌で ChE の減少、TCho, γGT の増加が認められたがその程度は軽減し、回復傾向を示した。

4. 脳および肝臓の生化学的検査と赤血球中の AChE 活性検査 (Table 3)

雄の L 群以上で赤血球の AChE, 肝臓の AIT, LDH に減少, M 群以上で肝臓の AsT に減少, M 群の脳

の ChE に増加, H 群の肝臓の γGT に増加, 雌の M 群以上で赤血球の AChE に減少, M 群で肝臓の ChE に増加, H 群で肝臓の γGT に増加が認められた。統計学的に有意な変化として認められたこれらの検査項目のすべては, H 群の回復期間終了時には, 雄では回復傾向を示した。雌では 6 例が死亡したため, 回復期間終了時の検査は行えなかった。雄の回復群を含めた,

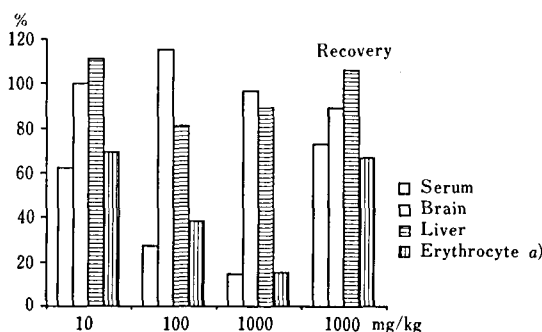


Fig. 4. ChE activity of male rats treated with TCV
Level of significance: **p<0.01, *p<0.05(n=5)
a): AChE activity

血清, 脳, 肝臓の ChE および赤血球中の AChE 活性を, それぞれ対照群に対する比率 (%) として Fig. 4 (雄) と Fig. 5 (雌) に示した。雌雄の血清の ChE と雄の赤血球中の AChE 活性では L 群から, 雌の赤血球中の AChE 活性では M 群から減少が認められたが, 脳および肝臓では減少が認められなかった。

5. 臓器重量 (Table 4)

雄の L 群の肝臓で実・比重量に減少, M 群以上で肝臓の実・比重量に増加, 腎臓, 甲状腺, 副腎の実・比重量に増加, 雌の L 群以上で副腎の実・比重量に増加, M 群以上で肝臓, 腎臓の実・比重量の増加, M 群

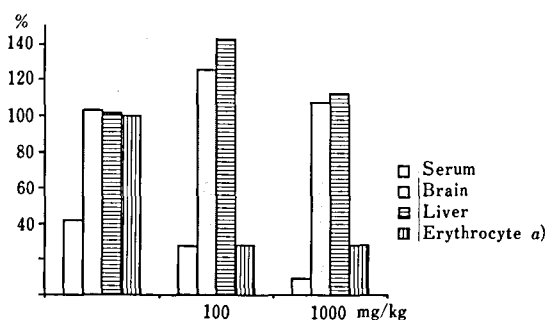


Fig. 5. ChE activity of female rats treated with TCV

Level of significance: *p<0.01(n=4 or 5)
a): AChE activity

の甲状腺で比重量の増加, H 群の卵巣, 甲状腺の実・比重量の増加が認められた。

H 群の回復期間終了時に雄で腎臓は実・比重量, 肝臓の比重量に増加, 雌では, 肝臓, 腎臓, 副腎の実・比重量の増加が認められたがその程度は軽減し, 回復傾向を示した。

6. 病理組織学的検査 (Table 5)

雄では, 肝細胞の腫大が M 群に 1 例, H 群に 2 例, 腎臓の尿細管の壊死が H 群で 5 例, 上皮の剝離が H 群で 4 例, 石灰化が H 群で 4 例, 硝子円柱が H 群に 1 例,

Table 4. Organ weight of rats after 28 days treatment of TCV and 14 days untreated recovery period

Group(Dose)	Cont.	L(10 mg/kg)	M(100 mg/kg)	H(1000mg/kg)	Recovery	
					Cont.	H(1000mg/kg)
Male						
Body weight g	236.2±4.9	232.2±6.7	233.7±10.9	210.8±9.0 **	271.9±15.5	256.0±20.7
Absolute organ weight						
Liver g	7.50±0.44	6.93±0.22 *	8.22±0.50 *	12.26±0.53 **	7.74±0.72	8.19±0.43
Kidney g	1.52±0.09	1.51±0.02	1.57±0.06	2.23±0.13 **	1.67±0.06	1.92±0.16 *
Thyroid mg	16.0±3.1	15.2±4.0	16.6±3.9	22.2±2.0 **	14.0±3.5	20.2±6.5
Adrenal mg	42.2±6.0	43.8±1.1	44.8±4.0	59.8±5.9 **	38.8±3.0	39.2±6.3
Relative organ weight						
Liver g%	3.17±0.16	2.98±0.07 *	3.52±0.09 **	5.82±0.26 **	2.84±0.16	3.21±0.21 *
Kidney g%	0.64±0.03	0.65±0.02	0.67±0.02	1.06±0.04 **	0.61±0.01	0.75±0.02 **
Thyroid mg%	6.8±1.4	6.6±1.8	7.1±1.6	10.5±0.7 **	5.2±1.4	7.9±2.6
Adrenal mg%	17.9±2.5	18.9±0.9	19.2±2.1	28.4±2.6 **	14.3±1.2	15.5±3.7
Female						
Body weight g	160.1±7.8	158.9±3.8	155.3±4.4	153.6±8.3	180.9±4.3	180.0±3.0
Absolute organ weight						
Liver g	4.52±0.19	4.46±0.14	4.98±0.31 *	9.04±0.59 **	4.91±0.06	5.97±0.19 **
Kidney g	1.04±0.04	1.09±0.03	1.10±0.02 *	1.32±0.09 **	1.09±0.05	1.31±0.05 **
Ovary mg	66.0±4.7	75.8±9.5	79.0±12.2	80.0±5.3 **	76.2±16.6	73.2±11.0
Thyroid mg	13.0±1.6	11.2±3.1	15.3±1.3	16.6±0.9 **	15.6±5.2	16.6±6.8
Adrenal mg	45.8±5.6	56.2±2.2 *	78.3±9.3 **	87.0±6.7 **	45.0±2.3	53.2±2.8 **
Relative organ weight						
Liver g%	2.82±0.12	2.81±0.10	3.21±0.13 **	5.89±0.37 **	2.72±0.04	3.31±0.12 **
Kidney g%	0.65±0.01	0.68±0.03	0.71±0.02 **	0.86±0.09 **	0.60±0.03	0.73±0.04 **
Ovary mg%	41.2±2.4	47.8±6.6	50.8±7.0	52.3±5.5 **	42.1±8.9	40.7±6.5
Thyroid mg%	8.1±0.8	7.1±2.1	9.8±0.8 *	10.8±0.1 **	8.6±2.8	9.3±3.9
Adrenal mg%	28.6±2.4	35.4±2.0 **	50.5±6.6 **	57.0±7.2 **	24.9±1.6	29.6±2.0 **

Values represent mean ± S.D. (n=4 or 5). Level of significance: * by p<0.05, ** by p<0.01

Table 5. Histopathological findings in rats after 28 days treatment of TCV and 14 days untreated recovery period

Organ Finding	Group n	Male					Female						
		Cont.	L	M	H	Recovery		Cont.	L	M	H	Recovery	
						Cont.	H					Cont.	H
		5	5	5	5	5	5	5	5	4	5	5	5
Liver													
swelling		±		1	2						2		
vacuolization of centrilobular area		±										1	
		+										3	
necrosis of centrilobular area		±								1	2		
		+									2		
focal cell infiltration		±	2	1	2	1	2	1	2	2	2	2	2
Kidney (tubules)													
eosinophilic body		±	3	4	1								
		+	2	1	4	5	5	4					
regeneration		±	2	2	1		2				2		1
		+			4			3			2		2
		++						2			1		
necrosis		±						1					
		+				5							
desquamation of epithelial cell		++				4							
dilatation		+									1		
calcification		±				4	4	4	2	3	5	4	3
hyaline cast		±				1	1				1		1
Adrenal (cortex)													
vacuolization		±						2					2
		+			1			2					2
		++				5				4	5		
swelling		+				5			2	4	5		

±:slight, +:mild, ++:marked

副腎皮質細胞の空胞化がM群に1例、H群に5例、腫大がH群に5例認められた。雌では、肝細胞の腫大がH群に2例、空胞化がH群に4例、壊死がM群に1例、H群に4例、巣状細胞浸潤がL群以上に各2例、腎臓の尿細管の再生がH群で5例、拡張が1例、硝子円柱がH群に1例、副腎皮質細胞の空胞化がM群に4例、H群に5例、腫大がL群に2例、M群に4例、H群に5例認められた。

H群の回復期間終了時に雄で肝臓の細胞浸潤が2例、腎臓の尿細管の再生が5例、壊死が1例、石灰化が4例、硝子円柱が1例、副腎皮質細胞の空胞化が4例、雌では腎臓の尿細管の再生が3例、硝子円柱が1例、副腎皮質細胞の空胞化が4例に認められたが、これらの障害の程度は軽減していた。

7. その他の検査

血液凝固能検査・尿検査において、検体によると思われる変化は認められなかった。

総括および考察

血清生化学的検査で認めた雌雄H群のTCho, γ GTの増加, AIP, ChE, AsTの減少等は、肝臓障害を示す変化としては弱いものであった。一方、肝臓の生化学的検査では雌雄のH群の γ GTの増加、雌雄のM、H群で肝臓重量の増加、肝臓の組織学的検査では雄のH群に肝細胞の腫大、雌のH群に腫大、空胞化および壊死が認められ、H群では肝臓への影響が明らかであった。雄のL群以上でBUNの増加が認められ、また雌のMおよび雌雄のH群の腎臓重量の増加、さらに病理組織学的検査ではH群の尿細管に雌は再生、雄は壊死・上皮細胞の脱落・石灰化等が認められ、H群では腎臓への影響も明らかである。TCVは代謝されて腎臓から尿中へ排泄⁵⁻⁹⁾されることから、これらの変化は検体によるものと考えられる。雌雄のM以上の群のTP, TChoの増加からは甲状腺機能の低下が考えられ¹⁰⁾、雌のMおよび雌雄のH群の甲状腺重量の増加から甲状腺への影響が示唆されたが、病理組織学的検査では変化が認められなかった。雄のH群および雌のL群以上で副腎重量の増加、同時に病理組織学的検査では皮質細胞の空胞化・腫大が認められ、副腎への影響も明らかである。

ラットおよびイヌ等を用いた混餌投与による亜急性毒性試験では、肝臓の重量増加あるいは比重量増加が認められ^{3,6)}、マウスを用いた長期毒性試験では肝細胞癌の発生が示されている^{11,12)}。腎臓については、亜

急性毒性試験では、肝臓の重量増加あるいは比重量増加が認められ^{3,6)}、マウスを用いた長期毒性試験では肝細胞癌の発生が示されている^{11,12)}。腎臓については、亜

急性毒性試験で重量の増加が認められている³⁾。長期毒性試験の組織学的検査では、雄マウスの腎尿管由来の癌⁶⁾、またラットの雌の甲状腺にC-cellの腺腫、副腎の腺腫、雌雄の甲状腺にC-cellの増殖¹¹⁾が報告されている。今回の実験条件ではH群の肝臓・腎臓の重量増加がこれらの文献と同様に認められた。

血清のChE活性阻害が雌雄のL群(10 mg/kg)以上、赤血球のAChE活性阻害が雄のL群(10 mg/kg)以上に、用量に伴った変化として認められたが、脳および肝臓では明らかなChE活性阻害が認められなかった。ラットおよびイヌ等を用いた混餌投与による亜急性毒性試験では800 ppm(120 mg/kg/day)以上で血漿ChE活性阻害を示し^{2,3,13)}、またWalkerら³⁾は混餌投与による200 ppm(30 mg/kg/day)がChE活性阻害を認めない無作用量であり、3160 ppm(500 mg/kg/day)では赤血球および脳のChE活性阻害が認められた、と結論しているが、我々の強制経口投与の結果とは一致しなかった。

TCVは臓器組織中への蓄積性が無く⁸⁾、ウン・ニワトリを用いた代謝実験で、ほぼ7日間で体内から消失するといわれている¹⁴⁾。しかし、28日間投与後認められたChE活性阻害等多くの変化は14日間の回復期間後に、いずれも回復ないし回復傾向は認められたが、腎臓・副腎の組織学的検査において影響は残っており、回復には14日間以上必要と思われる。

28日間の反復投与毒性試験により、10 mg/kg群以上で雌雄に血清のChE活性阻害、雄に赤血球のAChE活性阻害、雌の副腎への影響が認められ、無作用量は10 mg/kg未満と考えられた。また、1000 mg/kg群では雄に体重増加抑制、雌で死亡が認められ、さらに副腎、肝臓および腎臓に影響を与えるものと考えられた。

文 献

- 1) Yamazaki, M., Noguchi, U., Tanda, M. and Shintani, S.: Statistical methods appropriate for general toxicological studies in rats. *J. Takeda Res. Lab.*, 40 (3/4), 163~187 (1981)
- 2) Nishimura, M., Sakama, H., Aoki, H. and Nishiwaki, K.: Inhalation toxicity of agricultural pesticides. *Jap. J. Ind. Health*, 16, 523~530 (1974)
- 3) Walker, A. I. T., Brown, V. K. H., Stevenson, D. E. and Thorpe, E.: Toxicological studies with the insecticide. *Pestic. Sci.*, 3, 517~525 (1972)
- 4) 石井 暢, 吐山豊秋, 坂口 孝監訳: “実験動物とヒトの血液・臨床生化学検査値集”, BRIJ M. MITRUKA, HOWARD M. RAWNSLEY, 監修, 清至書院, 東京, (1981), p. 67
- 5) IARC MONOGRAPHS VOLUME 30: p. 202, (1983)
- 6) Review of Mammalian and Human Toxicology, Tetrachlorovinphos, Proprietary Information for Use by Regulatory Authorities: p. 29, Shell International Petroleum Maatschappij B. V., The Hague Health, Safety and Environment Division (HSE)
- 7) Akintonwa, D. A. A. and Hutson, D. H.: Metabolism of 2-chloro-1(2, 4, 5-tri-chlorophenyl) vinyl dimethyl phosphate in the dog and rat. *J. Agric. Food Chem.*, 15(4), 632~637 (1967)
- 8) Akhtar, M. H. and Foster, T. S.: Metabolism and excretion of tetrachlorovinphos in dairy cows. *J. Agric. Food Chem.*, 28, 698~704 (1980)
- 9) Gutenmann, W. H., John, L. E. S. and Lisk, D. J.: Metabolic studies with Gardona insecticide in the dairy cow. *J. Agric. Food Chem.*, 19 (6), 1259~1260 (1971)
- 10) 河合 忠, 玄番昭夫, 屋形 稔編集: “異常値の出るメカニズム”, 医学書院, 東京, (1989), p. 106
- 11) NCI (National Cancer Institute) Bioassay of Tetrachlorovinphos for possible carcinogenicity. Technical Report Series No. 33: p. 22, DHEW Publication No. (NIH) 78~833 (1978)
- 12) Ward, J. M., Bernal, E., Buratto B., Goodman, G., Strandberg, J. D. and Schueler, R.: Histopathology of neoplastic and nonneoplastic hepatic lesions in mice fed containing tetrachlorovinphos. *J. National Cancer Institute*, 63 (1), 111~118 (1979)
- 13) Whetstone, R. R., Phillips, D. D., Sun, Y. P. and Ward, L. F.: 2-Chlor-1-(2, 4, 5 trichlorophenyl) vinyl dimethylphosphate, a new insecticide with low toxicity to mammals. *J. Agric. Food Chem.*, 14 (4), 352~356 (1966)
- 14) Akhtar, M. H. and Foster, T. S.: Tetrachlorovinphos metabolism in laying hens. *J. Agric. Food Chem.*, 29 (4), 766~771 (1981)

2,2'-Methylenebis (4-methyl-6-*tert*-butylphenol)

のラットにおける催奇形性に関する研究

田中 悟・川島邦夫・宇佐見誠

中浦楨介・児玉幸夫・高仲 正

Studies on the Teratogenic Potential of 2,2'-Methylenebis
(4-methyl-6-*tert*-butylphenol) in RatsSatoru Tanaka, Kunio Kawashima, Makoto Usami, Shinsuke Nakaura,
Yukio Kodama and Akira Takanaka

2,2'-Methylenebis (4-methyl-6-*tert*-butylphenol), an antioxidant, was given orally to pregnant Wistar rats by stomach intubation at the dose levels of 93.5, 187 or 375 mg/kg body weight during days 7 to 17 of pregnancy, and the effects of the compound on dams and fetal developments were examined.

In the dams at the two higher doses of 187 and 375 mg/kg, toxic signs such as hair fluffing and diarrhoea were observed, and their body weight gain and food consumption were suppressed. Two dams, which showed marked diarrhoea in the highest dose group, died. However, there was no evidence of fetal malformation attributable to treatment with the compound in any of the dose groups treated, although a slight increase in fetal death was found in the highest dose group.

It is concluded that 2,2'-methylenebis (4-methyl-6-*tert*-butylphenol) has a weak lethal effect on fetal development but not a teratogenic effect in the rat.

(Received May 31, 1990)

家庭用品に使用されている化学物質の安全性を評価する場合、一般毒性、がん原性、催奇形性などに関する情報は重要であるが、なかでも催奇形性は次世代の発生・発達に悪影響を及ぼすため特に重要である。

われわれは、家庭用品に使用されている化学物質の安全性に関する研究の一環として、催奇形性について検討しており、これまでに繊維製品の防炎加工剤¹⁻³⁾およびゴム類の加硫促進剤⁴⁻⁷⁾の成績をそれぞれ報告した。

今回は老化防止剤としてゴムやプラスチック類に使用されている 2,2'-methylenebis (4-methyl-6-*tert*-butylphenol) (MBMBP) の催奇形性をラットを用いて検索したので、その成績を報告する。

MBMBP の毒性に関する報告は乏しいが、化成品工業協会の「有機ゴム薬品セーフティデータシートおよび取扱安全指針」⁸⁾によるとラットの経口投与の LD₅₀ 値は 4880~6500 mg/kg の範囲内にあり、MBMBP の 200~5000 ppm 添加飼料を13週間摂取させたラットの亜急性毒性試験では、5000 ppm 濃度での雌ラットの軽度な成長阻害以外、特に毒性は認められなかったと記載されている。また、Takahashi

らは MBMBP の 1.135 mmol/100 g 添加飼料を雄ラットに1週間与えた試験で肝臓中のトリグリセライドの減少⁹⁾およびプロトンピン時間と部分プロトンポラスチン時間の短縮¹⁰⁾を報告している。

一方、Telford ら¹¹⁾は各種の抗酸化剤をラットに妊娠期間中、強制経口投与または飼料添加投与して胎児死亡について調べた試験で、本試験の被験物質である MBMBP と類似の化学構造を有する老化防止剤 2,2'-methylenebis(4-ethyl-6-*tert*-butylphenol) (MBEBP) は飼料添加投与 (積算投与量 250 mg/rat) により、胎児死亡率の増加を示したと報告している。また、われわれは MBEBP の 187, 375 および 750 mg/kg 用量をラットに妊娠7日から17日まで経口投与した催奇形試験で、催奇形性は認められなかったが、750 mg/kg では胎児死亡率の増加傾向を認めた¹²⁾、しかし、MBMBP の胎児致死作用や催奇形作用など、胎児発生に及ぼす影響について検討した報告は認められない。

本研究は、MBMBP の胎児致死性および催奇形性について検索し、妊娠母体および胎児発生に対する無影響量を推定することを目的として行った。

実験方法

MBMBP は大内新興化学工業の製品 (Lot No. 608008) を用いた。MBMBP は水にほとんど溶解しないため、オリーブ油 (日本薬局方) を用い、超音波ホモジナイザーにより懸濁液を調製して投与した。投与量は、非妊娠雌ラットを用いた予備試験の成績および類似の化学構造を有する老化防止剤 MBEBP の催奇形試験の成績¹²⁾を参考にして、93.5 mg/kg, 187 mg/kg および 375 mg/kg の3段階とした。

動物はウィスター系ラット (日本ラット, 雄14週齢, 雌12~13週齢) を用いた。動物室は温度 25±2°C, 相対湿度 55±5%, 換気回数15回/hr., 明暗交代12時間 (明期 6:00~18:00) とした。

妊娠ラットを得るために、未経産雌を雄と一夜同居させた。翌朝、陰栓または陰栓中に精子が認められた雌ラットを妊娠したものとして実験に供し、この日を妊娠0日とした。

妊娠ラットはアルミ製妊娠ケージ (夏目製作所) に一匹ずつ収容し、固形飼料 (オリエンタル酵母, MF) および水道水を自由に摂取させた。

各群20~24匹の妊娠ラットに、胎児の器官形成期を含む妊娠7日から17日まで、MBMBP の 375 mg/5 ml/kg, 187 mg/2.5 ml/kg および 93.5 mg/1.25 ml/kg 用量を毎日1回胃ゾンデを用いて経口投与した。なお、対照群の妊娠ラットにはオリーブ油 5 ml/kg を同様に経口投与した。

妊娠ラットについては一般状態を毎日観察し、体重および摂餌量を測定した。

すべての妊娠ラットは妊娠20日目にエーテル麻酔下で帝王切開して子宮を摘出し、黄体数、着床数、死亡胎児数、生存胎児数を調べた。生存胎児については外表異常の検査を行い、性比を調べ、体重を測定した。各母体当たり約1/3の生存胎児についてはブアン液で約2週間固定したのち、Wilsonの方法¹³⁾に準じて粗大切片標本を作製して内部器官の異常の検査を行った。残り約2/3の生存胎児については90%エタノール液で固定したのち、Dawsonの方法¹⁴⁾にしたがってアリザリン赤染色骨格標本を作製して骨格系の異常の検査を行った。

実験成績は母体を評価の単位として、 χ^2 -検定、t-検定または順位和検定を行い、危険率5%および1%の水準で対照群と比較した。

実験成績および考察

1. 妊娠母体に及ぼす影響

妊娠ラットの一般状態について、対照群および93.5 mg/kg 群では特に異常は観察されなかった。187 mg/kg 群では投与3日 (妊娠9日) ごろから被毛の禿立ちや軟便のラットが観察された。375 mg/kg 群のラットでは投与2日 (妊娠8日) 頃から被毛の禿立ち、下腹部の汚れ、下痢が観察され、また鼻孔あるいは口角周囲への凝血塊様物の付着が認められた。そして特に著しい下痢症状を示した2匹のラットが衰弱して妊娠18日 (投与終了翌日) にともに死亡した (Table 1)。口角周囲などへの凝血塊様物の付着の原因については明らかでないが、MBMBP は血液凝固時間を遅延させることが報告されていることから¹⁰⁾、鼻孔や口角周囲への出血傾向が現れた可能性が考えられる。

妊娠期間中のラットの体重の推移を Fig. 1 に示した。93.5 mg/kg 群は対照群と同様順調な体重増加を示し、MBMBP 投与の影響は認められなかった。187 および 375 mg/kg 群では、投与3日 (妊娠9日) 頃から、体重増加の抑制が認められ、妊娠20日まで有意に低い体重であった。体重増加抑制の程度は高用量群が大きかった。

摂餌量については、図示しなかったが、93.5 mg/kg 群は妊娠期間中を通して対照群と同様な摂餌量の推移を示した。187 および 375 mg/kg 群は投与2日 (妊娠8日) から対照群より有意に低い摂餌量を示した。しかし、187 mg/kg 群は投与6日 (妊娠12日) 以後は対照群と同程度に回復した。また 375 mg/kg 群は投与期間中有意に低い摂餌量であったが、投与期間終了後は速やかな回復を示し、妊娠20日の摂餌量は対照群とほぼ同程度であった。

以上の成績から、妊娠ラットに対して 187 mg/kg

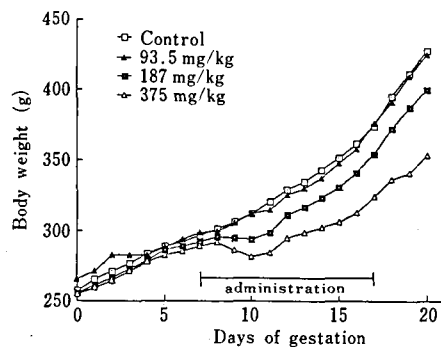


Fig. 1. Effect of oral administration of MBMBP on body weight of pregnant rats

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

Dose (mg/kg)	0	93.5	187	375
No. of dams	24	20	20	22
No. of dead dams	0	0	0	2
Mortality (%)	0	0	0	9.1
No. of corpora lutea (mean±S. D.)	371 (15.5±2.4)	313 (15.6±2.0)	305 (15.2±2.7)	296 (14.8±2.0)
No. of implants (mean±S. D.)	299 (12.5±2.3)	300 (15.0±1.8)**	271 (13.5±1.7)	249 (12.5±2.0)
Implantation ratio (%)	82.9	96.1*	89.8	85.4

Implantation ratio is given as the average from each dam.

* (P<0.05), ** (P<0.01): Significant difference from the control value.

Table 2. Effect of oral administration of MBMBP to pregnant rats on fetal developments

Dose (mg/kg)	0	93.5	187	373
No. of dams	24	20	20	20
No. of implants	299	300	271	249
No. of live fetuses (mean±S. D.)	273 (11.4±3.4)	288 (14.4±2.0)*	264 (13.2±1.7)	180 (9.0±5.7)
Sex ratio (%) (male/female)	102.2 (138/135)	88.2 (135/153)	88.6 (124/140)	95.7 (88/92)
Body weight (g)				
Male(mean±S. D.)	3.8±0.3	3.6±0.3*	3.7±0.3	3.7±0.4
Female(mean±S. D.)	3.6±0.3	3.4±0.3	3.4±0.3	3.5±0.4
No. of dead implants	26	12	7	69
Early death	20	12	7	68
Late death	6	0	0	1
Mortality (%)	8.6	4.1	2.4	28.4
No. of dams with dead implants only (%)	1(4.2)	0	0	5(25.0)
No. of fetuses with external malformation	0	0	0	0

Fetal mortality (%) is given as the average of incidence in each litter.

* (P<0.05): Significant difference from the control value.

は毒性影響量, 375 mg/kg は致死量であることが明らかにされた。この結果は、先に報告した類似の化学構造を持つ老化防止剤 MBEBP の結果 (毒性影響量 375 mg/kg, 致死量 750 mg/kg)¹²⁾ と比較した場合、MBMBP は妊娠ラットに対して MBEBP よりやや毒性が強いものと考えられる。

妊娠ラットの帝王切開の成績を Table 1 に示した。

黄体数については対照群と MBMBP 各群との間に有意差は認められなかった。

着床数および着床率については最低用量である 93.5

mg/kg 群のみ対照群に比べて有意に高い値を示した。しかし、さらに高用量である 187 および 375 mg/kg 群では有意差は認められず、また MBMBP の投与は受精卵の着床後の時期から開始されており、93.5 mg/kg 群で認められた着床数および着床率の有意な高値は、MBMBP 投与に起因したものではないと考えられる。

2. 胎児発生に及ぼす影響

Table 2 に示した通り、生存胎児数では 93.5 mg/kg 群のみ対照群に比較して有意に高い値を示したが、こ

Table 3. Effect of oral administration of MBMBP to pregnant rat on internal organ development of the fetuses

Dose (mg/kg)	0	93.5	187	375
No. of dams	23	20	20	15
No. of fetuses examined	102	115	94	66
Dilatation of renal pelvis	0	1(1.3)	0	2(3.1)

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

れは前述した通り、本用量群の着床数および着床率の有意な高値を反映した結果と考えられる。

性比では対照群と MBMBP 各群との間に有意差は認められなかった。

生存胎児の体重について、93.5 mg/kg 群の雄のみ対照群に比べて有意に低い体重を示した。しかし、さらに高用量である 187 および 375 mg/kg 群では有意な低体重は認められなかった。また同腹胎児数が多い場合各胎児の体重は一般に小さいことが知られている。したがって、93.5 mg/kg 群で認められた雄胎児の低体重は同腹胎児数の有意な高値を反映した結果であり、MBMBP 投与に起因したものではないと考えられる。ちなみに、93.5 mg/kg 群は雌胎児も対照群を含む各群に比べて有意ではなかったが低体重であった。

胎児死亡率について、対照群と MBMBP 各群との間に有意差は認められなかったが、最高投与量の 375 mg/kg 群は 28.4% とかなり高い死亡率を示した。また、375 mg/kg 群ではすべての胚・胎児が死亡していた母ラットが 5 匹 (25%) 認められた。375 mg/kg 用量は妊娠ラットに対して致死量であったことから、母体に対する著しい毒性影響を反映した二次的影響によって胎児死亡が増加した可能性は否定できない。しかし、MBMBP と類似の化学構造を持つ老化防止剤 MBEPP が弱いけれども胎児致死作用を示したという報告^{11,12)}と併せ考えた場合、MBMBP も軽度ではあるが胎児致死作用を有することが示唆される。

生存胎児の外表面検査において、対照群および MBMBP 各群のいずれにも異常例は観察されなかった。

胎児の内部器官の検査成績を Table 3 に示した。対照群および 187 mg/kg 群に異常例は観察されなかったが、腎盂の拡張が 93.5 mg/kg 群に 1 例および 375 mg/kg 群に 2 例観察された。しかし、その出現率に有意差は認められず、また腎盂の拡張は自然発生的にもしばしば観察される異常¹⁵⁾であることから、MBMBP 投与に起因したものとは考えがたい。

胎児の骨格検査の成績を Table 4 に示した。骨格

奇形は全群を通して 1 例も認められなかった。種々の骨格変異が対照群を含む各群に認められた。すなわち、頸椎肋骨の胎児が対照群に 1 例、187 mg/kg 群に 3 例、375 mg/kg 群に 2 例観察された。頸椎椎体の変形 (痕跡状) の胎児が対照群に 1 例観察された。胸椎椎体の変形 (痕跡状、二連球状) の胎児が対照群を含む各群にそれぞれ 1 例観察された。第 13 肋骨の短小の胎児が対照群に 1 例観察された。胸骨核の異常 (変形、分離、癒合、欠損) の胎児が対照群を含む各群に 62~92 例観察された。腰椎肋骨を有する胎児が対照群を含む各群に 84~91 例観察された。腸骨前 27 椎骨の胎児が 187 mg/kg 群に 1 例観察された。しかしながら、いずれの骨格変異の発生率においても対照群と MBMBP 各群との間に有意差は認められなかった。また、サリチル酸などの催奇形性物質を妊娠ラットに投与した場合、14 肋骨 (extra ribs) の発生頻度が増加することから^{16,17)}、14 肋骨は催奇形性検出の指標の一つになると考えられているが、本実験の MBMBP 投与群において 14 肋骨の発生頻度が特に高くなるという成績は得られなかった。

骨化状態については、仙・尾椎骨、中手骨、中足骨数を調べて判定した。いずれの骨数においても対照群と MBMBP 各群との間に有意差はなく MBMBP 投与の影響は認められなかった。

ま と め

2,2'-Methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol) の 93.5, 187 および 375 mg/kg 用量を妊娠ラットに妊娠 7 日から 17 日まで毎日 1 回強制経口投与し、妊娠母体および胎児発生に及ぼす影響について調べた。

1) 妊娠母体について、187 mg/kg 以上では被毛の糞立ち、軟便、摂餌量の低下および体重増加の抑制が認められた。さらに 375 mg/kg では鼻孔あるいは口角周囲への凝血塊様物の付着、下腹部の汚れ、下痢が観察され、2 例が死亡した。黄体数や着床率に影響は認められなかった。

Table 4. Effect of oral administration of MBMBP to pregnant rat on skeletal development of the fetuses

Dose (mg/kg)	0	93.5	187	375
No. of dams	23	20	20	15
No. of fetuses examined	171	173	170	114
No. of fetuses with skeletal malformation	0	0	0	0
No. of fetuses with variations				
Cervical ribs	1 (0.7)	0	3 (1.6)	2 (1.7)
Varied cervical centra	1 (0.7)	0	0	0
Varied thoracic centra	1 (0.7)	1 (0.5)	1 (0.5)	1 (0.8)
Shortened 13th ribs	1 (0.7)	0	0	0
Varied sternebrae	62 (35.9)	92 (53.5)	91 (52.9)	75 (66.7)
Lumbar ribs	84 (48.4)	90 (53.6)	91 (53.4)	89 (77.4)
rudimentary	82 (47.5)	81 (48.2)	82 (48.2)	86 (74.7)
extra (14th rib)	2 (0.9)	9 (5.4)	9 (5.2)	3 (2.7)
27-pre-sacral vertebrae	0	0	1 (0.6)	0
Ossification state (average number)				
Metacarp	7.9	7.8	7.9	7.7
Metatarsi	8.0	8.0	8.0	8.0
Sacro-caudal vertebrae	7.8	7.8	7.8	7.7

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

** (P<0.01): Significant difference from the control value.

2) 胎児発生について、いずれの投与量でも生存胎児数、性比および胎児体重に特に影響は認められなかったが、375 mg/kg では胎児死亡率の増加傾向が認められた。外表、内部器官および骨格の検査において本化学物質投与によると考えられる異常例は観察されなかった。

以上、2,2'-methylenebis (4-methyl-6-tert-butylphenol) はラット胎児の発生に対して、大量投与した場合弱い致死作用を有することが示唆されたが、催奇形性は認められなかった。なお、無影響量は妊娠母体に対して 93.5 mg/kg、胎児発生に対して 187 mg/kg とそれぞれ推定された。

本研究は反生省生活衛生局・家庭用品試験検査費によって行った。

文 献

- 川島邦夫, 田中 悟, 中浦慎介, 長尾重之, 小野田欽一, 粕谷 豊, 大森義仁: Tris (2,3-dibromopropyl) phosphate 妊娠期投与のラット胎児および出産仔に及ぼす影響. 衛生試報, 98, 50~56 (1980)
- 田中 悟, 中浦慎介, 川島邦夫, 長尾重之, 遠藤任彦, 小野田欽一, 粕谷 豊, 大森義仁: Tris (1,3-dibromoisopropyl) phosphate 妊娠期投与のラット胎児および出産仔の発育に及ぼす影響. 衛生試報, 99, 50~55 (1981)
- 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: Tris (2-chloroethyl) phosphate 妊娠期投与のラット胎児および出産仔の発育におよぼす影響. 衛生試報, 101, 55~61 (1983)
- 中浦慎介, 田中 悟, 川島邦夫, 高仲 正, 大森義仁: Zinc diethyldithiocarbamate 妊娠期投与のラット胎児および出産仔の発育におよぼす影響. 衛生試報, 102, 55~61 (1984)
- Kawashima, K., Tanaka, S., Nakaura, S., Nagao, S., Endo, T., Onoda, K., Takanaka, A. and Omori, Y.: Effect of phosphoric acid tri-esters flame retardants on the prenatal and postnatal developments of the rat. *J. Toxicol. Sci.*, 8, 339 (1983)
- 中浦慎介, 川西 徹, 川島邦夫, 田中 悟, 高仲正, 大森義仁: 日本薬学会講演要旨集, 5G11-2 (1985)
- Nakaura, S., Kawanishi, T., Ohno, Y., Kawashima, K., Tanaka, S., Takahashi, A., Takanaka, A. and Omori, Y.: Fetal toxicity of zinc ethylphenyldithiocarbamate (3). Mechanism of methemoglobin formation. *J. Toxicol. Sci.*, 10, 252 (1985)
- 化成工業協会: 有機ゴム薬品セーフティデータシートおよび取扱い安全指針 (第II集). p. 44

- (1987)
- 9) Takahashi, O. and Hiraga, K.: Effects of four bisphenolic antioxidants on lipid contents of rat liver. *Toxicol. Letters*, 8, 77~86 (1981)
 - 10) Takahashi, O. and Hiraga, K.: Effects of four bisphenolic antioxidants on prothrombin levels of rat plasma. *Toxicol. Letters*, 7, 405~408 (1981)
 - 11) Telford, I. R., Woodruff, C. S. and Linford, R. H.: *Am. J. Anat.*, 110, 29~36 (1962)
 - 12) 田中 悟, 川島邦夫, 中浦慎介, Djajalaksana, S., 黄 芒莉, 高仲 正: 2,2'-Methylenebis(4-ethyl-6-tert-butylphenol) のラットにおける催奇形性に関する研究. *衛生試報*, 107, 51~55 (1989)
 - 13) Wilson, J. G.: "Teratology-Principles and Techniques", edited by Wilson, J. G. and Warkany, J., p.262 (1965) The University of Chicago Press, Chicago and London
 - 14) Dawson, A. B.: Note on the staining of the skeleton of cleared specimens with alizarin red S.: *Stain Technol.*, 1, 123~124 (1926)
 - 15) Morita, H., Ariyuki, F., Inomata, N., Nishimura, K., Hasegawa, Y., Miyamoto, M. and Watanabe, T.: *Cong. Anom.*, 27, 147~206 (1987)
 - 16) 安田峰生, 前田広由: 催奇形試験の指標としての臍肋の意義. *先天異常*, 13, 25~29 (1973)
 - 17) Tanaka, S., Kawashima, K., Nakaura, S., Nagao, S., Kuwamura, T., Takanaka, A. and Omori, Y.: *Cong. Anom.*, 13, 73~84 (1973)

ハムスター膵発癌過程にみられる膵萎縮に対する
粗製大豆トリプシンインヒビターの影響

古川文夫・今沢孝喜・篠田和俊・佐藤元信
吉村博之・今井田克己・高橋道人・林 裕造

Effects of Crude Soybean Trypsin Inhibitor on Pancreatic
Atrophy Induced by BOP Treatment in Hamsters

Fumio Furukawa, Takayoshi Imazawa, Kazutoshi Shinoda,
Motonobu Sato, Hiroyuki Yoshimura, Katsumi Imaida,
Michihito Takahashi and Yuzo Hayashi

Experiment I: Female Syrian golden hamsters were given 5 weekly sc injections of N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine (BOP) while simultaneously being treated with SBTI diet for 5 weeks (BOP + SBTI). Other two groups were treated with BOP or SBTI alone. Sacrificed at week 30, the numbers of both adenocarcinomas and dysplastic lesions were decreased in the BOP+SBTI group relative to the BOP alone group. Experiment II: Female hamsters were given 3 weekly sc injections of BOP and then fed a SBTI diet for 40 weeks. The numbers of dysplastic lesions was decreased in the BOP and SBTI group relative to the BOP alone group. An inhibitory effect was observed for the pancreas in hamsters fed SBTI after BOP treatment.

In experiments I and II, atrophic changes of pancreatic exocrine tissues and fatty tissue infiltration were observed in hamsters treated with BOP. The ratios of exocrine atrophy in pancreas sections were measured with the aid of an image processor. Areas (2.4 mm²) of splenic and gastric lobes were selected randomly, and the included exocrine tissue measured to allow calculation of percentage area of exocrine tissue atrophy.

In hamsters simultaneously treated with BOP and SBTI, the percent areas of intact exocrine tissues in both splenic and gastric lobes were significantly higher (87% and 83%) as compared to the BOP group values (61% and 61%), at the level of $p < 0.01$, respectively.

In experiment II, the percent areas of intact splenic and gastric exocrine tissues were similarly significantly higher in the BOP/SBTI group (92% and 93%), as compared to the BOP group values (67% and 60%), at the level of $p < 0.01$, respectively.

Thus, in both experiments, atrophic changes in pancreatic exocrine tissue were more severe in the BOP group than in the SBTI treated groups.

(Received May 31, 1990)

はじめに

ラットに粗製大豆トリプシンインヒビター (SBTI) を与えると膵腺房細胞のチモゲン顆粒, DNA 量, RNA 量, 蛋白質量が増加し, 肉眼的に膵は腫大する¹⁾. また 4-hydroxyaminoquinolin 1-oxide (HAQO) をイニシエーターとしたラット膵腺房細胞の二段階発癌モデルにおいて SBTI のプロモーション作用が示されている. ハムスターにおいても SBTI を与えると軽度な膵の腫大が認められるが²⁾, 腺房細胞腫瘍の発生は認められない.

ハムスターに N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine (BOP) を投与すると膵管の腫瘍が発生することが知られているが, 同時に非腫瘍性病変として脂肪浸潤を伴った外分泌組織の萎縮が認められる^{3,4)}. この病変の発生機序として二つのことが考えられる. 一つは BOP 投与により腺房細胞が何らかの障害を受け, 変性, 壊死に陥り, その部分に捕捉的に脂肪浸潤が及ぶか, 他方は膵管障害あるいは腫瘍発生に伴い膵管が狭窄または閉塞し膵液が逆流することにより外分泌腺が変性し, その結果, 脂肪浸潤を伴う外分泌腺の萎縮を来すことが考えられる.

ハムスターに SBTI を BOP と同時に, あるいは BOP の投与後に与えた場合, 外分泌腺の萎縮に SBTI がどの様に影響するのか, またその萎縮が腫瘍発生とどの様な関連性を示すかについて検討した.

実験材料および方法

実験 I

5週齢の雌シリアンゴールデンハムスター90匹(3協ラボサービス)を用い, それを3群に分けて(1群30匹)実験を行った. SBTI は不二製油より入手した. この trypsin inhibitor 活性は 388/U/g (BAPA 法)であり, Sigma 社製の SBTI の約5分1に相当する²⁾. 第一群には BOP (Ash Stevens Inc., Detroit, MI) を生理食塩水にて溶解して 10 mg/kg 体重の用量で背部皮下に週1回, 5回投与した. SBTI は5%の割合で MF 粉末飼料(オリエンタル酵母社製)に混じて BOP 投与の2日前から投与終了2日後までの32日間自由に摂取させた(BOP+SBTI群). 第二群は BOP の週1回, 5回投与のみとした(BOP群). 第三群は5% SBTI 添加飼料を32日間自由に摂取させた(SBTI群). 飲料水は水道水を自由に与え, 実験期間は BOP 投与開始から約30週間とした.

実験 II

5週齢の雌シリアンゴールデンハムスター90匹(三

協ラボサービス)を用い, それを3群に分けて(1群30匹)実験を行った. 第一群は BOP を実験1と同様の用量で背部皮下に週1回, 3回投与した. 翌週から MF 粉に混じた5% SBTI を38週間自由に摂取させた(BOP/SBTI群). 第二群は BOP の週1回, 3回投与のみとした(BOP群). 第三群は5% SBTI 添加飼料を38週間自由に摂取させた(SBTI群). 飲料水は水道水を自由に与え, 実験期間は BOP 投与開始から約40週間とした.

実験 I, IIとも実験終了後, エーテル麻酔下にて屠殺・解剖した. 膵は十二指腸とともに摘出し, 10%中性緩衝ホルマリン液にて固定し, 常法により脱水, パラフィン包埋し, 薄切, ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を施し, 膵を中心に病理組織学的に検索した.

膵外分泌腺の萎縮の比率は脂肪浸潤を指標として, 画像解析装置 TAS plus (ライツ社製)を用いて HE 染色標本を用いて計測した. 計測は膵を脾葉と胃葉とに分けて, 各葉1視野 0.48 mm² を無作為に5視野を選び, 脂肪の面積(合計2.4 mm²)を計測して割合を算出した. 統計学的な検定は student の t 検定で行った.

結 果

実験 I

体重は実験開始から SBTI 群に比べ BOP+SBTI 群と BOP 群は軽度の増加抑制がみられた. 肉眼的に BOP+SBTI 群と SBTI 群には膵の著しい肥大は認められなかった. 膵癌は BOP+SBTI 群では28匹中18個, BOP 群では29匹中41個, 異形成は BOP+SBTI 群では27個, BOP 群では62個認められ, 膵癌と異形成の発生数は BOP 群に比べ BOP+SBTI 群は有意に減少した ($p < 0.05$). SBTI 群の30匹には膵管および腺房細胞の腫瘍性病変は認められなかった.

発生した膵癌は病理組織学的に分化型腺癌で豊富な結合織からなり, 不規則な小膵管の構造を示した. 癌細胞は立方状から高円柱状で異型性に富み, 分裂像も散見された. また杯細胞の出現もみられた (Fig. 1). 異形成は比較的小さく, 大きな腺の周囲に小腺管の増生が認められるが, 周囲組織への浸潤像は認められなかった. 異形成にも杯細胞の出現が認められた (Fig. 2). 発生した癌および異形成の組織像は群間に差は認められなかった. 外分泌組織の萎縮は BOP+SBTI 群では軽度で腺房細胞が小葉単位で脱落し脂肪組織に置換される像も認められた (Fig. 3). BOP 群では多くの腺房細胞が小葉単位で脱落し, 脂肪組織に置換さ

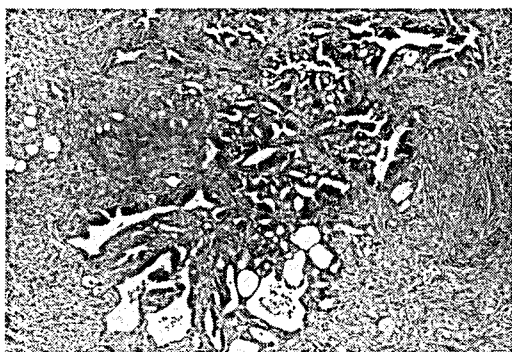


Fig. 1. Pancreatic adenocarcinoma. Atypical glands exhibiting cuboidal, columnar or goblet cells and hyalinized stroma (Experiment I, BOP+SBTI group)

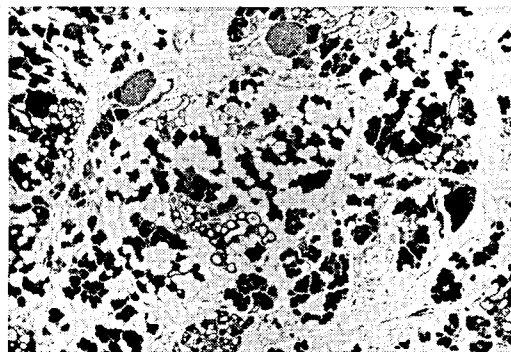


Fig. 4. Severe atrophic changes of Pancreatic exocrine tissue (Experiment I, BOP group)

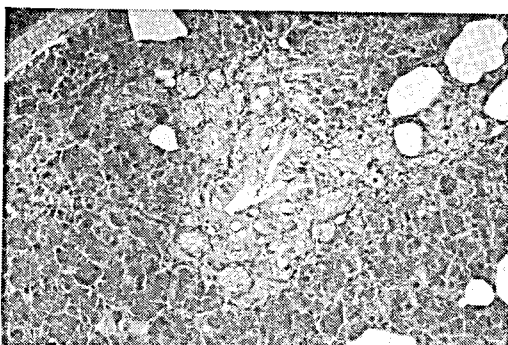


Fig. 2. Pancreatic dysplastic lesion (Experiment I, BOP+SBTI group)

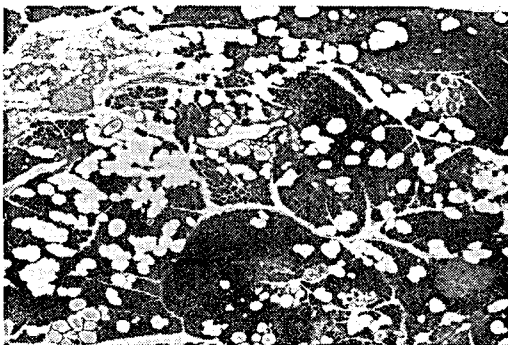


Fig. 3. Slightly atrophic changes of Pancreatic exocrine tissue (Experiment I, BOP+SBTI group)

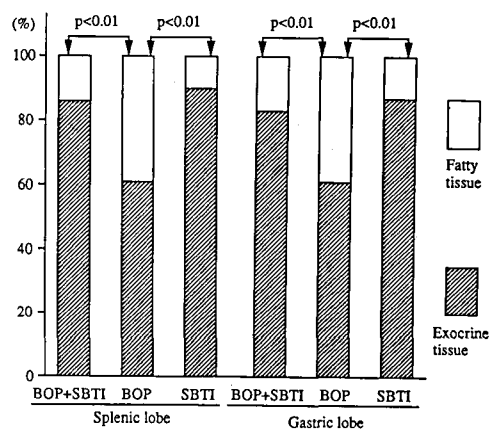


Fig. 5. Percent areas of pancreatic exocrine and fatty tissues in hamster simultaneously treated with BOP and SBTI (experiment I)

の占有面積比率は87%, BOP 群では61%, SBTI 群では91%であった。胃葉では BOP+SBTI 群の外分泌腺は83%, BOP 群では61%, SBTI 群では87%であった。胃葉と脾葉ともに外分泌腺の占有面積比率は BOP 群に比べ BOP+SBTI 群と SBTI 群は有意に高い値を示した ($p < 0.01$)。

実験 II

体重は実験開始から BOP 群と SBTI 群は順調に増加したが、24週から BOP/SBTI 群と BOP 群は SBTI 群に比べ増加抑制がみられ、終了時にはその傾向が強く認められた。肉眼的に BOP/SBTI 群と SBTI 群には BOP 群と比べて膵の著しい肥大は認められなかった。

膵癌は BOP/SBTI 群では29匹中3個、BOP 群では29匹中7個、異形成は BOP/SBTI 群では5個、BOP 群では16個認められ、膵癌の発生数には有意差

れた像を示し、また小膵管の出現も認められた (Fig. 4)。

外分泌腺と脂肪浸潤の面積比を計測した結果、Fig. 5 に示すように脾葉では BOP+SBTI 群の外分泌腺

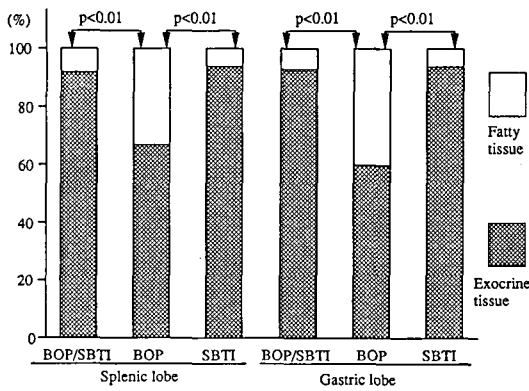


Fig. 6. Percent areas of pancreatic exocrine and fatty tissues in hamsters treated with BOP followed by SBTI (experiment II)

は認められなかったが、異形成の発生数は BOP 群に比べ BOP/SBTI 群では有意に減少した ($p < 0.05$)。SBTI 群の30匹には膵管および腺房細胞の腫瘍性の変化は認められなかった。

病理組織学的には癌および異形成は実験 I と同様の像を示したが、BOP/SBTI 群および SBTI 群の腺房細胞はチモージェン顆粒数の増加により細胞全体が腫大した。

外分泌腺と脂肪浸潤の面積比を計測した結果、Fig. 6 に示すように脾葉では BOP/SBTI 群の外分泌腺の占有面積比率は92%、BOP 群では67%、SBTI 群では94%であった。胃葉では BOP/SBTI 群の外分泌腺は93%、BOP 群では60%、SBTI 群では94%であった。胃葉と脾葉ともに外分泌腺の占有面積比率は BOP 群に比べ BOP/SBTI 群と SBTI 群は有意に高い値を示した ($p < 0.01$)。

考 察

BOP と SBTI を同時にハムスターに与えると外分泌腺の萎縮および腫瘍の発生が抑制された。一方、蛋白分解酵素阻害剤である camostat を BOP と同様に与えると腫瘍の発生が抑制されるが、外分泌腺の萎縮は抑制されていない⁹⁾。したがって、腫瘍の発生は trypsin inhibitor の作用により抑制されるとしても、外分泌腺の萎縮は trypsin inhibitor に共通の作用とは考えられない。さらに、このことは trypsin inhibitor 活性は SBTI では約 400~500 TI/mg であり、camostat はその 10~20 倍高いことから理解できる。SBTI には trypsin inhibitor 以外に大豆蛋白質とリノール酸に富む脂肪、非酵素系生理活性物質であるサポニン、ステロール、トリテルペンアルコール、

ゴイトローゲン、ビタミンなどが含有されていることから、これら trypsin inhibitor 以外の成分が外分泌腺の萎縮に参与した可能性が考えられる。SBTI と BOP を同時に投与することにより BOP の腺房細胞に対する障害が减弱されるか、あるいは一度は障害を受けるが SBTI により再生能が賦活された可能性などが考えられる。しかし、今回の実験では外分泌腺の萎縮の程度は BOP/SBTI 群と SBTI 群とでは差が非常に小さいこと、一度障害を受けた腺房細胞は再生が困難であること⁹⁾、また SBTI の投与期間が比較的短期間であることなどから BOP の腺房細胞に対する障害作用が减弱した可能性が高い。

BOP 投与後に SBTI を投与しても前癌病変としての異形成発生の抑制および外分泌腺の萎縮がいずれも抑制された。このことは BOP が直接、腺房細胞に作用したものの、SBTI の投与を BOP の最終投与から1週間後に開始したため、腺房細胞の障害程度が比較的軽度で、SBTI により再生能が惹起され、腺房細胞がほぼ完全に修復された可能性も考えられる。このような萎縮は無処置ハムスターにおいても加齢により増加することが報告されている⁷⁾。

ヒトでは膵の脂肪浸潤は lipomatosis があり肥満症、脂肪代謝障害、糖尿病、老人性膵萎縮等に認められるが、原因は明らかにされていない⁸⁾。実験的には Bell らの報告によればハムスターに streptozotocin を投与してラ氏島の β 細胞に障害を与えてから BOP を投与した結果、腫瘍は完全に抑制され、外分泌腺の萎縮もほぼ完全に抑制された⁹⁾、この様に見、腫瘍の発生が抑制されると外分泌腺の萎縮も抑制されるようだが、camostat の実験が示すように両者は直接的には関係が認められない。

ラットに SBTI を投与すると膵の腺房細胞を刺激して hyperplasia と hypertrophy の効果を発現する。今回ハムスターに SBTI を最長38週間与えても肉眼的にはラットのような膵の腫大は認められなかった。ラットとハムスターの SBTI に対する反応性の違いは camostat の連続投与によるとハムスターでは血中の cholecystokinin (CCK) 値が約 2.9 倍、ラットでは約 3.5 倍に上昇することからも理解できる¹⁰⁾。

結 語

BOP 投与ハムスターに SBTI を与えると外分泌腺の萎縮は抑制され腫瘍の発生も抑制された。

それは SBTI と BOP を同時に投与することにより腺房細胞に対する BOP の障害が减弱した可能性が考えられた。

BOP 投与後に SBTI を投与しても異形成の発生の抑制と外分泌腺の萎縮が抑制された。BOP による腺房細胞の障害が軽度のために SBTI によりほぼ完全に修復された可能性が考えられた。

文 献

- 1) McGuinness, E. E., Morgan, R. G. H. and Wormsley, K. G.: Effects of soybean flour on the pancreas of rats. *Environmental Health Perspectives*, **56**, 205~212 (1984)
- 2) 古川文夫, 豊田和弘, 阿部 弘, 長谷川良平, 佐藤秀隆, 高橋道人, 林 裕造: 粗製トリプシンインヒビターの膵臓に与える影響および種差. 衛生試験, **105**, 46~50 (1987)
- 3) 高橋道人, 古川文夫: 化学物質による発癌—膵—, トキシコロジーフォーラム, **10**, 497~503 (1987)
- 4) Takahashi, M., Pour, P., Althoff, J. and Donnelly, T.: Sequential alteration of the pancreas during carcinogenesis in Syrian hamsters by *N*-nitrosobis(2-oxopropyl)amine. *Cancer Res.*, **37**, 4602~4607 (1977)
- 5) 古川文夫, 高橋道人, 佐藤元信, 篠田和俊, 今井田克己, 林 裕造: ハムスター BOP 誘発膵癌における蛋白分解酵素阻害剤 (camostat) の同時投与による抑制効果. 第49回日本癌学会総会記事, pp. 70 (1990)
- 6) 古川文夫, 今沢孝喜, 篠田和俊, 佐藤元信, 佐藤秀隆, 高橋道人, 林 裕造: WBN/kob ラットにおける自然発症膵炎モデルの病理組織学的検討. 第6回日本毒性病理学会講演要旨集, pp. 55 (1990)
- 7) 高橋道人: “膵癌の基礎と臨床”, 並木正義, 新興医学出版社, 東京 (1979), pp. 1~9
- 8) 小島国次: “現代病理学大系 第13巻 消化腺”, 中山書店, 東京 (1985), pp. 183~195
- 9) Bell, R. H. JR. and Strayer, D. S.: Streptozotocin prevents development of nitrosamine-induced pancreatic cancer in the Syrian hamster. *J. Surg Oncol.*, **24**, 258~262 (1983)
- 10) Kanno, T., Kawaguchi, K., Okegawa, T., Muryobayashi, K., Sawada, M., Yonezawa, H. and Kanazawa, H.: Species differences among rat, guinea pig, and hamster in the effectiveness of camostat to release endogenous CCK, induce pancreatic hypertrophy, and in pancreatic secretory responses to secretagogues. *Biomedical Res.*, **10**, Supplement 1, 119~131, (1989)

喫煙曝露によるハムスターの気管・気管支および
肺の初期変化と過酸化脂質量

吉村博之・篠田和俊・岡宮英明・古川文夫
今井田克己・高橋道人・松村年郎・長谷川 亨*

Early Histopathological Changes in Trachea, Bronchus and Lung, and
Changes in Lipid Peroxidation in Hamsters, Due to Inhaled Cigarette Smoke

Hiroyuki Yoshimura, Kazutoshi Shinoda, Hideaki Okamiya,
Fumio Furukawa, Katsumi Imaida, Michihito Takahashi,
Toshiro Matsumura and Tohru Hasegawa*

The main objective of this work was to determine the influence of cigarette smoke exposure on the mechanisms which promote respiratory tumors. And another aim was the accumulation of basic data regarding the effect of cigarette smoke exposure in hamsters in the Hamburg II smoking machine.

Male Syrian golden hamsters were caused to inhale cigarette smoke in the Hamburg II smoking machine. The hamsters inhaled cigarette smoke twice a day, for 9 minutes, 5 times a week. The administration period were 1, 2, 4, 8 and 12 weeks. For each inhalation, the rotating disk was fitted with 30 cigarettes. Each puff, 35 ml in volume, was diluted seven times with room air. At the completion of administration, subjects were examined histopathologically, and lung and serum lipid peroxidation levels were also measured.

Histopathological examination of the respiratory tract and alveolar epithelium disclosed no cigarette smoke-related hyperplastic lesion in any animal. And in the hamsters which inhaled cigarette smoke, "smoke cells" accumulation were observed in the alveolar space after 8 and 12 weeks exposure. Significant increase in the number of BrdU positive cells were not observed following cigarette smoke exposure, but a tendency for lung malondialdehyde (MDA) levels to increase was evident.

On the other hand, serum lipid peroxide (LPO) levels showed a marked decrease in the animals exposed to cigarette smoke for 2, 4 and 8 weeks in comparison with the identically handled control animals. But serum LPO levels showed a tendency to increase with cigarette smoking during all experimental periods. The above results suggested that cigarette smoking may cause a change in lipid peroxidation levels such as lung MDA and serum LPO levels.

(Received May 31, 1990)

はじめに

喫煙は肺がん発生の重要なハイリスクファクターの一つである。我々は、diethyl-nitrosamine(DEN)をイニシエーターとするハムスターの実験気道発がんモデルにおいて、プロモーション時期に喫煙曝露を行うと、DEN単独投与群に比べ、喫煙曝露を負荷した群では、喉頭・気管上皮の乳頭腫および過形成の発生が有意に増加し、喫煙がハムスターの気道腫瘍発生に対してプロモーター作用を示すことを報告した¹⁾。

近年、実験的喫煙研究では、国際的にHamburg II

型喫煙吸入装置が用いられている。

今回、この装置を用いての喫煙曝露による初期影響の基礎的検索とプロモーター作用のメカニズムを解析する一環として、経時的な気管、気管支および肺の組織学的検索に加え、肺および血清の過酸化脂質量の測定を行った。

実験方法および材料

1. 実験動物

4週齢の雄、Syrian golden hamster, 50匹(三協ラボサービス社より購入)を用い、各々25匹から成る喫煙群および対照群の2群を設置し、喫煙曝露1, 2, 4, 8, 12週後に各群5匹ずつをペントバルビタール

* 佐賀医大、地域保健 (Dep. Com. Health Sci., Saga Med. Sch.)

麻酔下で屠殺し、以下の項目について検索を行った。なお、体重は実験終了まで週1回測定した。

2. 喫煙曝露方法およびタバコ煙濃度測定

喫煙は Hamburg II 型ハムスター用装置 (Borgwaldt 社, ハンブルグ) を使用し、両切ピース (日本たばこ) の主流煙を室内空気にて7倍に希釈し、午前と午後の1日2回、1回9分間 (30本)、週5日間の曝露を行った。対照群の動物は、喫煙時間と同時間、吸入用ホルダーにより拘束した。また、吸煙流量は17.5 ml/sec., 吸煙時間は約2秒、吸煙量は35 ml と設定した。主なタバコ煙成分物質である一酸化炭素および二酸化窒素の濃度は検知管法により、ホルムアルデヒド濃度は AHMT 法²⁾ に準じて測定した。なお、試料吸取液には 0.1 M KOH 水溶液を用いた。その結果、本実験条件では一酸化炭素 0.1%, 二酸化窒素 2ppm, ホルムアルデヒド 1.18 ppm であった。

3. 組織学的検索

肺は解剖時、左葉に10%中性緩衝ホルマリンを注入固定後、主気管支の走行に沿って縦に4部位に分割した。気道は咽頭部より摘出した後、同様に固定し、喉頭部より気管軟骨と並行に6断面に分割して切り出しを行った。その後、肺・気管は通常の方法で脱水、パラフィン包埋、薄切し、ヘマトキシリン-エオジン染色を実施した。さらに、すべての動物に対して屠殺2時間前に 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU, Sigma) を 40 mg/kg の用量で腹腔内に投与し、抗 BrdU 抗体 (DAKOPATTS) を用い、免疫組織化学的に染色を施した³⁾。顕微鏡下で上皮内の BrdU 陽性細胞を数え、細胞増殖活性について検討した。

4. 肺および血清中過酸化脂質の定量

喫煙曝露 2, 4, 8, 12週間の肺および血清につい

て以下の方法により測定した。肺は右葉4葉を対象とし、摘出後、0.25 M ショ糖溶液にて洗浄、急速凍結後、-20°C で保存、TBA (thiobarbiturate) 法で行った。TBA 反応物質を逆相カラムに負荷、溶出クロマトグラムよりその面積計測から算出した malondialdehyde (MDA) 量を過酸化脂質量の指標とした⁴⁾。また、血清過酸化脂質は八木別法に準じた過酸化脂質量定量試薬 (デタミナー LPO キット; 協和メデックス社) を用いて lipid peroxide (LPO) を測定した⁵⁾。

結 果

喫煙曝露により体重増加には差はみられなかった。肺胸膜面の剖検時肉眼観察では、タバコ煙吸入による炭粉沈着は最長喫煙曝露の12週間の例でも認められなかった。一方、病理組織学的には、肺胞腔内に炭粉粒子を一部に貧食した大型の細胞の小集簇、いわゆる smoke cells が、喫煙群の8週曝露で1/5例、12週では4/5例に認められた (Fig. 1)。しかし、その部位に肺胞上皮の増殖は見られなかった。また、喫煙群の肺には対照群と比べて強く気管支炎、気管支周囲炎などが見られる傾向があった。気道上皮には、喉頭部上皮を含め増殖性の変化は観察されなかった。なお、4週間曝露では軽度の肺胞上皮細胞の増殖が1例に見られたが、喫煙との関連性を示唆するような所見は認められなかった。

免疫組織化学的に細胞増殖を検索したが、喉頭、気管、気管支および肺胞の上皮細胞においては、喫煙群と対照群の間で BrdU 陽性細胞数に明かな差は認められなかった。しかし、前述した4週間喫煙群に見られた肺胞上皮の増殖部位では、BrdU 陽性細胞数の増加が見られた。

Table 1. Malondialdehyde (MDA) levels in lung tissue and lipid peroxide (LPO) levels in serum of hamsters inhaled with cigarette smoke

Treatment	Specimen	2 weeks	4 weeks	8 weeks	12 weeks
Sham-Smoking	Lung MDA (nmol/g)	47.0±10.1	32.6±3.0	47.4±4.9	59.0±12.2
	Serum LPO (nmol/ml)	49.2±12.0	23.7±5.0	18.5±5.5	8.1±1.7
Smoking	Lung MDA (nmol/g)	58.2±6.5	31.2±1.6	49.4±5.6	81.8±7.2
	Serum LPO (nmol/ml)	34.0±7.6	17.1±7.8	15.3±1.6	8.9±1.5

Animals were exposed to cigarette smoke for up to 12 weeks and sacrificed at sequential points. Quantitative determination of MDA levels was performed by the modified TBA reaction method as described in "Materials and Methods". LPO levels were measured with a Determiner LPO kit. Values are means±SD from 3~5 animals.

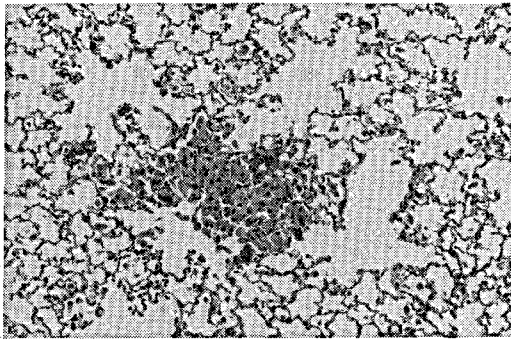


Fig. 1. Accumulation of "smoke cells" in the area of alveolar space. 8 weeks smoking.

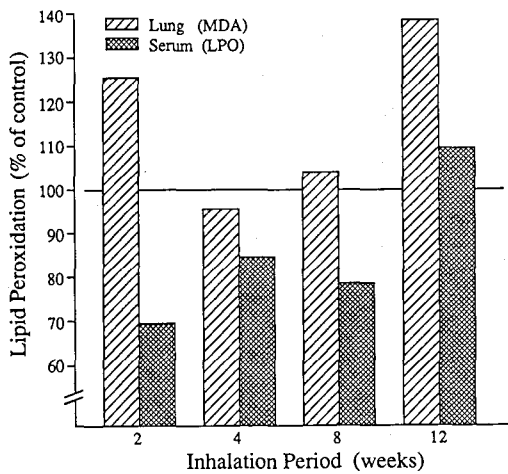


Fig. 2. Lipid peroxidation levels in lung tissue and serum of hamsters inhaled with cigarette smoke.

過酸化脂質量の測定結果を Table 1, Fig. 2 に示す。肺の MDA 量は、喫煙曝露 2 週と比べ 4 週では低下を示したが、その後は 8, 12 週と増加した (Table 1)。同様の傾向は、各週における対照群との比較 (Fig. 2) でも認められ、喫煙開始直後の 2 週間目では 124% と増加を示したが、4 週間の曝露では 95.6% と減少した。しかし、その後 8 週では 104.2%, 12 週では 138.6% と再び増加が見られた。一方、血清中 LPO 値は、喫煙群および対照群ともに実験期間の延長に伴い減少する傾向が見られた。また、対照群との比較では、12 週間喫煙例を除き他の喫煙期間の例では対照群よりいずれも低く、2 週間喫煙では 69.0%, 4 週 84.5%, 8 週 78.8%, 12 週 109.8% であった (Fig. 2)。このように、12 週間喫煙例以外の例では対照群より低値であったが、変動率を経時的にみると、その値が増加する傾向が見

られた。

考 察

喫煙はヒトにおいて発がんに関与することが明らかであるにもかかわらず、動物の吸入曝露実験においては、その確認が困難であった。動物、特にげっ歯類を対象とした喫煙曝露装置 (人工喫煙装置) には大別して 2 種類あり、一つは、チャンバーに動物を入れ、そこにタバコ煙を充満させるいわば全身曝露方式であり、他の一つは今回用いた経鼻曝露方式である。前者は、喫煙実験の初期には正常空気の供給あるいはタバコ煙の希釈がなされておらず、その後改良が加えられ、正常空気を間欠的に供給する人工喫煙装置が用いられた。これらの方法ではいずれも、吸煙時間、タバコ煙濃度、吸煙本数などに問題があり、喫煙条件が実験者によりまちまちとなり結果の評価が容易でなかった。一方、後者では、吸煙時間、吸煙量、タバコ燃焼温度、タバコ煙濃度 (希釈率) などが統一されて、人工喫煙装置の Hamburg II 型喫煙装置が国際的に用いられるようになった。さらにこの装置では、喫煙本数も従来より増減出来るという利点もある。その結果、喫煙実験条件が統一化され、評価が容易となった。

Dontenwill ら⁶⁾, Kobayashi ら⁷⁾ は、Hamburg II 型喫煙装置を用いたハムスターの実験で、特に咽頭および喉頭上皮の感受性が高いことを指摘している。本実験では、Hamburg II 型喫煙装置を用いて、喉頭、気管・気管支および肺に対する喫煙の影響を経時的に検討し、その初期病変の成り立ちを調べ、肺腫瘍発生促進のメカニズムを解明することを目的とした。発がん促進の指標として細胞増殖が一つの重要な所見であるといわれる。ヒトにおけるこのような気道上皮の病変はハムスターにおいても言われている。そこで、今回我々は、これら上部気道上皮の変化を含め肺内気管支・肺胞上皮の変化を HE 染色により病理組織学的に、また、BrdU 陽性細胞数の計測から細胞増殖能について検索した。しかし、今回の 30 本/1 回 × 2 日、週 5 日、12 週間の喫煙曝露実験では、喫煙群と対照群の間で著しい差は認められず、これは、喫煙期間が短かったことも一因と考えられた。また、前に行った DEN 併用実験における気道の乳頭腫・過形成の発生を部位別にみると、気管におけるそれら腫瘍性病変の発生率には喫煙負荷による促進が見られたが、喉頭上皮ではその差は少なかった。このような結果は、Dontenwill ら⁶⁾ の成績においても同様であった。つまり、DEN によりイニシエーションされるのは、主に声帯部以下の気管上皮であり、この部位に喫煙の影響が発

現したものと考えられた。さらに、喫煙実験のような吸入曝露実験では、特にげっ歯類においては鼻腔上皮を考慮するべきであると考えられる。ヒトにおける喫煙は口からの経路での吸入であるのに対して、げっ歯類では経鼻吸入であり、さらにその鼻腔の構造はヒトのそれより複雑であると言われている。犬の気管瘻孔からの直接喫煙を行った Hammond ら⁸⁾ は、喫煙単独で肺腫瘍を証明した。Johnson ら⁹⁾ は、O₃ の吸入曝露実験で前鼻腔上皮を詳細に検索し、nonciliated cuboidal/transitional 部上皮の高い感受性を病理組織学的検索および BrdU 細胞陽性数より指摘している。したがって、喫煙の吸入実験においても初期病変を検討する場合には、鼻腔上皮の詳細な検索が必要であろう。

過酸化脂質は細胞膜の障害因子であり、肺における直接的な作用としては間質性肺炎の発症との関連¹⁰⁾が指摘されている。また、がんや動脈硬化あるいは老化など種々の病態との関連¹⁰⁾や、発がんプロモーションに関係するとの報告¹¹⁾などもある。本実験では、肺の過酸化脂質量 (MDA) は、2 週間喫煙曝露により一次的に増加した。その後、4 週では対照群よりわずかに低下したが、8 週さらに12週間の喫煙で再び増加が示された。4 週間喫煙での低値は、肺の機能的 SH 基などの直接作用による生物学的活性の低下によるものか、あるいは、抗酸化性防御系酵素の作用が関与している可能性が推測された。生体内には過酸化脂質を代謝したり生成を抑制する酵素 (Glutathione peroxidase, Glutathione reductase など) や内因性の抗酸化物質である非蛋白・SH (NPSH), Vitamine E などが存在する。また、肺はほかの臓器に比べて飽和脂肪酸の組成割合が高く、呼吸を通じ常に外界から様々な刺激物質に曝露されるために、前述の防御系のほかにも防御機構の関与が考えられる。しかし、今回の実験では抗酸化性防御系酵素について測定を実施しておらず、喫煙との関連における解釈は不明である。

血清中過酸化脂質量 (LPO) の変動は喫煙曝露の延長とともに増加する傾向がみられ、肺の過酸化脂質量の変動と8週間喫煙以降はその関連性が示唆されているが、血清中の過酸化脂質は肺におけるその生成の結果のみを反映するものではない。肺との関連で血清中の過酸化脂質の変動を考える際には、ほかの液性因子の測定が必要であろうと思われる。石原ら¹²⁾は、ヒトにおける喫煙の急性効果を、血中 6-keto PGF_{1α}, トロンボキサン B₂, 過酸化脂質などの液性因子の測定により検討し、喫煙によるこれら液性因子の変動を観察している。

今回、著者らは喫煙の肺がんに対する影響のメカニズムの解析を目的とし、Hamburg II 型喫煙装置を用いての基礎的実験データの集積のため、同装置を用いての喫煙曝露での呼吸器に対する早期病変を病理組織学的、免疫組織化学的検索、あわせて過酸化脂質の定量を行った。しかし、今回の実験では、初期変化において肺腫瘍との明確な関連性は確認出来なかった。今後さらに、鼻腔上皮の変化の検討を加える必要がある。また、ハムスター喫煙におけるプロモーター作用については、タバコ煙の成分、特にホルムアルデヒドなどの刺激性物質の役割についても考慮される必要がある。

文 献

- 1) 岡宮英明, 高橋道人, 篠田和俊, 古川文夫, 佐藤元信, 今井田克己, 林 裕造: ハムスターの呼吸器腫瘍発生における喫煙のプロモーター作用, 第49回日本癌学会総会記事, p. 91 (1990)
- 2) 日本薬学会編: 衛生試験法・注解, 金原出版株式会社, 東京・大阪・京都 (1980), p. 1132~1133.
- 3) 古川文夫, 豊田和弘, 阿部 弘, 長谷川良平, 佐藤秀隆, 高橋道人, 林 裕造: 粗製トリプシンインヒビターの膀胱に与える影響および種差一病理組織学的および免疫組織化学的検索一. 衛生試験, 105, 46~50 (1987)
- 4) 高橋道人, 古川文夫, 岡宮英明, 篠田和俊, 畝山智香子, 長谷川 亨: 胃粘膜病変の指標としての尿中過酸化脂質量の意義. 癌の臨床, 36, 293~298 (1990)
- 5) Ohishi, N., Ohkawa, H., Miike, A., Tatano, T. and Yagi, K.: A new assay method for lipid peroxides using a methyleneblue derivative. *Biochem. Int.*, 10, 205~211 (1985)
- 6) Dontenwill, W., Chevalier, H. J., Harke, H. P., Lafrenz, U., Reckzeh, G. and Schneider, B.: Investigations on the effects of chronic cigarette-smoke inhalation in Syrian golden hamsters. *J. Natl. Cancer Inst.*, 51, 1781~1832 (1973)
- 7) Kobayashi, N., Hoffmann, D. and Wynder, E. L.: A study of tobacco carcinogenesis. Epithelial changes induced in the upper respiratory tracts of Syrian golden hamsters by cigarette smoke. *J. Natl. Cancer Inst.*, 53, 1085~1089 (1974)
- 8) Hammond, E. C., Auerbach, O., Kirman, O. and Garfinkel, L.: Effect of cigarette smoking on dogs. II. Pulmonary neoplasms. *Arch. Environ. Health*, 21, 740~768 (1970)
- 9) Johnson, N. F., Hotchkiss, J. A., Harkema, J. R. and Henderson, R. F.: Proliferative responses of rat nasal epithelia to ozone. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 103, 143~155 (1990)
- 10) 内山照雄: 肺と過酸化脂質. 日本胸部臨床, 43,

- 903~909 (1984)
- 11) Nigam, S. K., McBrien, D. C. M. and Slater, T. F.: Eicosanoides, Lipid Peroxidation and Cancer, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York London Paris Tokyo (1988)
- 12) 石原陽子, 北村 論, 千治松洋一, 本間日臣: 喫煙と肺の代謝—健常者の血中 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$, thromboxane B_2 , 過酸化脂質に及ぼす喫煙の影響. 日胸疾会誌, 22, 1122~1126 (1984)

Quinacrine 投与によるラットの肝および腎における ミエリン小体と酸性フォスファターゼの電顕的局在

今沢孝喜・古川文夫・吉田順一・篠田和俊
今井田克己・高橋道人・林 裕造

Ultrastructural Localization of Myelin Bodies and Acid Phosphatase Activities in the Liver and Kidney Induced by Quinacrine in Rats

Takayoshi Imazawa, Fumio Furukawa, Jun-ichi Yoshida, Kazutoshi Shinoda,
Katumi Imaida, Michihito Takahashi and Yuzo Hayashi

Electron microscopic studies were conducted to reveal the ultrastructural aspects of the myelin body and acid phosphatase activity in rats induced by quinacrine, an antimalarial drug. Each of 22 rats in three groups were examined. The first group of control rats was initially given a single i. p. dose (200 mg/kg) of diethylnitrosamine (DEN) only and then fed a CRF-1 basal diet for 8 weeks. The second and third group were treated with DEN or saline, and starting 2 weeks later, were fed a CRF-1 basal diet supplemented with 500 ppm quinacrine for 6 weeks. All animals were subjected to a partial hepatectomy at week 3, and then sacrificed at week 8. Liver and kidney tissues specimens from 2 rats per group were collected for routine electron microscopic study. Furthermore, the activity of acid phosphatase, a key enzyme for lysosomal activity, was also investigated. In this study, tissues were fixed with a solution of 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer. After fixation, tissues were frozen and their 8 μm sections were treated with Gomori's lead nitrate buffer solution, and post-fixed with a 1% osmium solution. After being embedded in Epon 812, ultrathin sections were made.

Intracellular myelin bodies were observed in the hepatocytes, interlobular bile duct cells, renal glomerular podocytes and renal tubular cells in the quinacrine treated groups, but not were observed in rats treated with DEN alone. Acid phosphatase activities were increased in hepatocytes and renal proximal tubular cells in the quinacrine treated groups compared to the DEN treated control group, but no obvious changes were seen in either interlobular bile duct cells or renal distal tubular cells.

In this study, it was shown further that a swelling of the interlobular bile duct cells with the numerous enlarged lysosomes in rats treated with quinacrine. Myelin bodies were also seen in glomerular podocytes and distal tubular cells of the quinacrine treated groups.

(Received May 31, 1990)

はじめに

Quinacrine (キナクリン) は合成抗マラリア治療剤, 消化管内寄生虫駆除剤として用いられたアクリジン系の化合物である。

この薬物は脾, 肺, 副腎, 腎, 膵等に強い親和性をもち, ラットに投与すると腸管から速やかに吸収された後, これら諸器官に長期間蓄積する。電顕的にこれ

ら器官の細胞内にライソゾームの腫大増生と多数のミエリン様小体が出現することから, リン脂質症を誘発させるモデルとされている^{1,2)}。我々は肝二段階発癌モデル³⁾を利用した発癌物質の中期検索法により, キナクリンにラットの肝発癌過程を促進する作用があることを明らかにした⁴⁾。今回, 細胞内リン脂質蓄積に関する電顕的な検索を行う目的で, リン脂質症に関与するライソゾームおよびその指標となる酵素である酸

性フォスファターゼ (ACP) について、キナクリンを投与したラットの肝および腎の超微形態学的な検索を行った。

実験材料および方法

実験には5週齢の F344 雄ラット(日本チャールス・リバー)を用いた。動物を1週間馴化させた後、各群22匹として3群を設け、第1群と第2群には diethyl-nitrosamine (DEN: 和光純薬工業) 200 mg/kg を単回腹腔内投与し、第3群には DEN の媒体である生理的食塩水を同様に投与した。DEN 投与の2週間後から動物を屠殺する前日までの6週間、第2群および第3群の動物には 500 ppm 濃度のキナクリン(東京化成工業: Fig. 1) を CRF-1 粉末飼料(日本チャールス・リバー)に混じて、また第1群の動物には対照群として同粉末飼料のみをそれぞれ自由に摂取させた。キナクリンの投与開始後1週間目に、全例エーテル麻酔下にて肝の2/3部分切除を行った(Fig. 2)。動物は温度 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、換気回数 18/hr (オールフレッシュ)、12時間の蛍光灯照明、12時間の消灯のバリヤシステム内で飼育し、ソフトチップを床敷としたプラスチックケージに群別に収容し、飲料水は試験期間を通じて自由に摂取させた。

実験開始8週間後に一夜絶食処置を施し、エーテル

麻酔下で動物を放血屠殺した。各群から2匹の肝および腎を摘出し、4%パラホルムアルデヒド・2%グルタルアルデヒド液(0.1M リン酸緩衝液: pH 7.4)で固定した後、1%オスミウム酸液で後固定を行い、常法に従いエポキシ樹脂包埋した。また、ACP 検索用に2%グルタルアルデヒド液(0.1M カコジル酸緩衝液: pH 7.2)で固定した後、クリオスタットで $8\mu\text{m}$ の凍結切片を作製し、ACP 染色後、1%オスミウム酸液で後固定を行いエポキシ樹脂包埋した。包埋した標本はオープンで硬化させ、ウルトラカット(REICHERT-JUNG)で厚切り切片および超薄切片を作製し、ACP 染色を行った標本は鉛染色のみを、それ以外の標本は鉛および酢酸ウランの二重電子染色を施し、透過型電子顕微鏡(日本電子: JEM-100CX5)で観察した。

結 果

キナクリンを投与した第2群(DEN 前投与)および第3群の肝細胞、クッパー細胞および小葉間胆管細胞は対照の第1群と比較して超微形態的にライソゾームの増生、大型化ならびにミエリン小体の出現が観察された。

ACP 活性についてみると、肝細胞内ではライソゾームの増生に伴って明らかな増加が見られたが、小葉間胆管細胞ではライソゾームが著しく増生していたにもかかわらずほとんど検出されなかった。その他肝細胞内に脂肪滴が、また小葉間胆管細胞に小さな空胞変性が認められた。一方、第2群と第3群を比較した場合、DEN を処置した第2群の方がその変化がより強く現われた。他の小器官においては、各群とも変化は認められなかった。Fig. 3~6 に肝臓の電顕像を示す。

対照の第1群では、超微形態的に肝細胞内にはミトコンドリア、粗面小胞体等の小器官とともに少数の一次ライソゾームが観察された。同様に小葉間胆管細胞では管腔側に微絨毛が観察された(Fig. 3)。

対照群の肝細胞の ACP 染色の電顕像では酵素活性がライソゾームに限局し、核膜、粗面小胞体、ミトコンドリア等は陰性であった(Fig. 4)。

DEN とキナクリンを投与した第2群の肝細胞内にはミエリン小体を形成し、多様な形状の二次ライソゾームが無数に観察された(Fig. 5)。同群の小葉間胆管細胞においても肝細胞と同様に、二次ライソゾームが増生しており、細胞質はライソゾームで埋め尽くされ、核は胞体の外側に偏在していた。また、小さな空胞形成も観察された。その他、クッパー細胞にも二次ライソゾームが認められた。

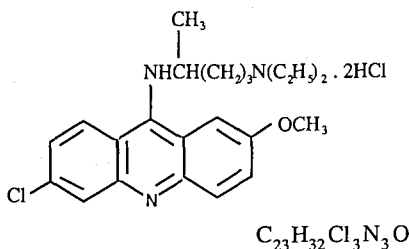


Fig. 1. Chemical structure of quinacrine

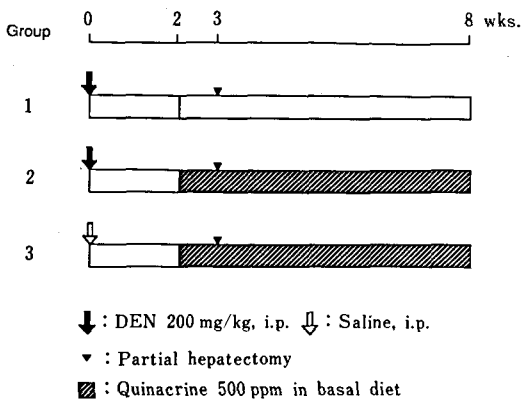


Fig. 2. Experimental design

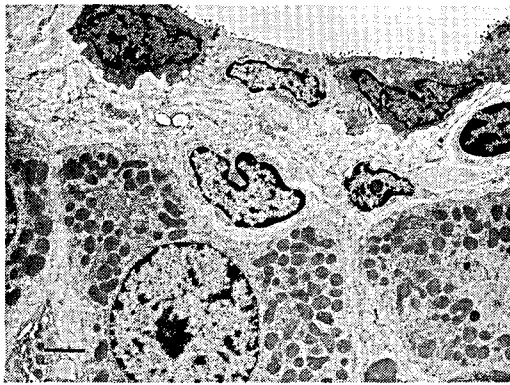


Fig. 3. Electron micrograph of normal hepatocytes and interlobular bile duct. Compared to hepatocytes, cytoplasmic organelles are smaller and fewer in the interlobular bile duct cells

Bar=2 μ m (first group)

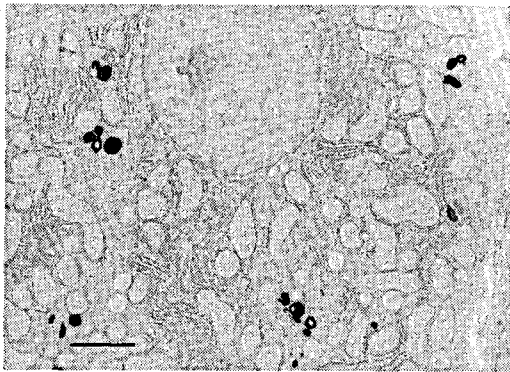


Fig. 4. Electron micrograph of localization of acid phosphatase activity in the normal hepatocyte. Intracellular lysosomes showing as electron-dense bodies

Bar=2 μ m (first group)

キナクリンを単独投与した第3群においても、肝細胞、小葉胆管細胞およびクーパー細胞に第2群と同様の変化が認められ、ACP活性が明らかに増加していた (Fig. 6).

腎組織は皮質部より採取し、主に腎小体、近位尿細管および遠位尿細管上皮細胞について検索した。キナクリンを投与した第2群と第3群では糸球体の足細胞および遠位尿細管上皮細胞に多数のミエリン小体とライソゾームの増生が観察されたが、両群間での差はなかった。第1群ではこのような変化は認められなかった。キナクリン投与群のACPは糸球体足細胞および尿細管上皮細胞のいずれにも増加していたが、近位尿細管上皮細胞において特に顕著であった。第1群のACPは主として近位尿細管上皮細胞でみられたのみ

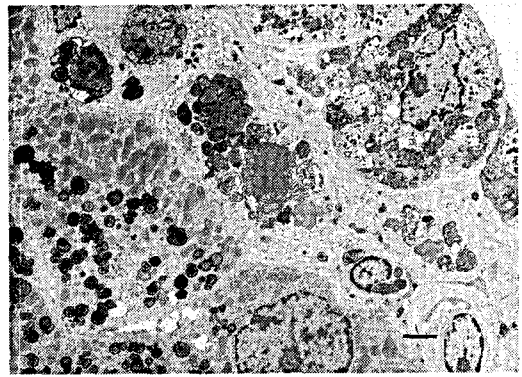


Fig. 5. Numerous myelin-like lamella bodies in the hepatocytes and interlobular bile duct cells of rat treated with DEN and quinacrine. These inclusions are characteristic of phospholipidosis

Bar=2 μ m (second group)

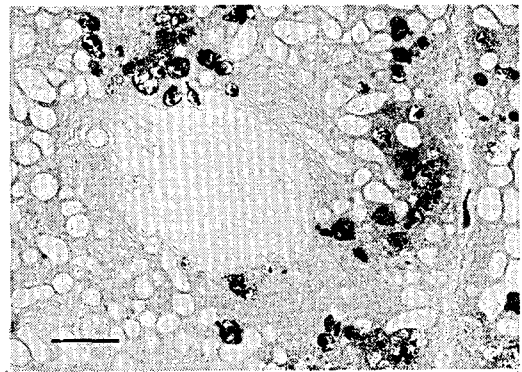


Fig. 6. Hepatocyte showing increase of acid phosphatase activity in the quinacrine only treated rat

Bar=2 μ m (third group)

であった。Fig. 7~10に腎の電顕像を示す。

対照の第1群の腎小体の電顕像では Fig. 7に示すごとく、糸球体係縮、その支持組織であるメサンギウム (血管間膜) およびこれらを被うポウマン囊のいずれにもライソゾームの変化は認められなかった。

キナクリンを単独投与した第3群の電顕像では足細胞に肝細胞でみられたと同様のミエリン小体の二次ライソゾームと電子密度の高い小さな顆粒状の一次ライソゾームが多数観察された (Fig. 8)。しかし、メサンギウム細胞にはこれらの変化はほとんど見られなかった。

第3群の遠位尿細管上皮細胞には顕著に増生したミエリン小体が観察された (Fig. 9)。

第3群の近位尿細管上皮細胞におけるACP染色の



Fig. 7. Electron micrograph of normal mesangial cell located in the glomerulus of the rat. Capillary lumens contain red blood cells

Bar=2 μm (first group)

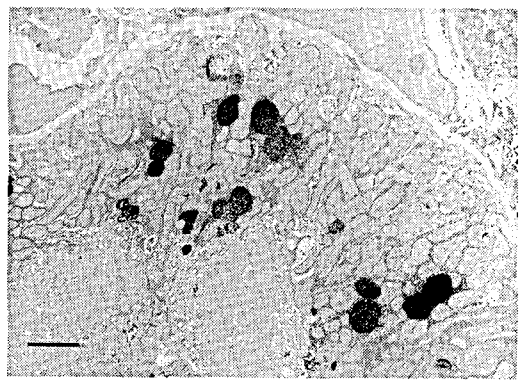


Fig. 9. Proximal tubular epithelium showing increase of acid phosphatase activity in the quinacrine only treated rat

Bar=2 μm (third group)

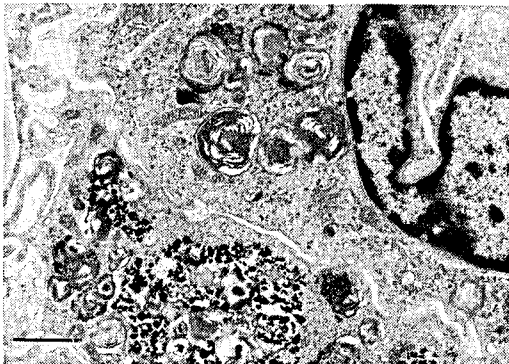


Fig. 8. Quinacrine treated rat showing accumulation of the myelin-like lamellar bodies in the cytoplasm of the effected mesangial cell. Electron-dense granule bodies seems to be primary lysosomes

Bar=1 μm (third group)

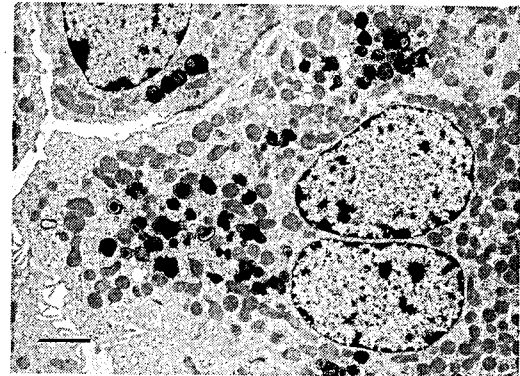


Fig. 10. Marked increase myelin bodies in the distal tubular epithelium in the quinacrine only treated rat

Bar=2 μm (third group)

電顕像では電子密度の高い ACP がミトコンドリアと同じくらい大きく、かつ多数観察された (Fig. 10).

考 察

キナクリン投与による肝細胞の超微形態学的変化は、ミエリン様構造を示す二次ライソゾームの増生と ACP の増加であった。特に、肝の小葉間胆管細胞においてはミエリン小体が著しく増生し、強い変性が確認されたが、肝細胞と異なり ACP 活性の増加は検出されなかった。これは、強い細胞変性によるものと思われる。腎糸球体の足細胞には一次および二次ライソゾームが多数観察されたが、ACP はわずかに検出されたに過ぎなかった。しかし、対照群では全く検出されなかったことから、キナクリン投与群にみられた変化は薬物投与によるものと考えられる。尿管管では近

位尿管管の二次ライソゾームは対照群と比べ増加していたが、遠位尿管管に比し、より軽度であった。この展開として、近位尿管管は本来、ライソゾームの発達している部位であることの他に遠位尿管管上皮細胞のキナクリンに対する親和性が、近位尿管管上皮細胞より大であることが考えられる。

ライソゾームは大きく2種類に分類できる。一つは一次ライソゾームといわれ、ゴルジ体のトランス側の囊から出芽によって形成され、消化対象物質と出会っていないものである。もう一つは二次ライソゾームといわれ、多様な形態をなし袋状の膜内に基質や加水分解酵素を含み、一次ライソゾームが Phagocyte と出会い、様々な基質と何度も融合を繰り返し生じたものである⁵⁻⁷⁾。また、ライソゾーム中には40種類以上の酵素が含まれているといわれ、これらの酵素はすべて酸性加水分解酵素で、プロテアーゼ、ヌクレアーゼ、

リパーゼ、ホスホリパーゼ、ホスファターゼなどがある⁹⁾。肝で観察されたライソゾームはほとんどが貧食能を有する二次ライソゾームであったことから、ミエリン様小体の成因は取り込まれたキナクリンがリン脂質と結合し、細胞内に蓄積された結果、形成されたものと考えられた。キナクリンは生化学的にホスホリパーゼ A₂ の阻害作用を有しており^{9,10)}、本酵素で消化されるリン脂質が過剰に供給され、キナクリンとともにライソゾームに取り込まれ、リン脂質症発現に大きく関与したと思われる。ライソゾーム内で異物の異常蓄積が起これば、正常な細胞機能である消化能に少なからず影響を及ぼし、異常に蓄積した基質でふくれあがったライソゾームは、それ自身の機能に加え正常な細胞の機能をも阻害し、特別な症状を引き起こす原因ともなりうる¹¹⁾。肝におけるキナクリン誘発ミエリン様小体の増生は林ら¹⁾が報告しているが、組織化学的にライソゾーム内にリン脂質顆粒を証明したことから、典型的なリン脂質症であるとしている。本実験条件下においてもこのようなリン脂質症が惹起されているものと考えられた。

DEN のみを処置した群では検索した肝および腎の各細胞にライソゾームおよび ACP 量の変化はほとんどなかった。一方、キナクリン投与群においては、DEN 投与の有無にかかわらず肝、腎とも、一部を除き、ライソゾームの増生および ACP の増加を認めたが、肝では、DEN 前処置群でキナクリン単独群より強い増加がみられた。DEN の標的臓器は肝であり、DEN 処置によりキナクリン誘発のライソゾーム増生が増強されたことは、DEN によるラット肝発癌がライソゾームの増生とともに、促進された事実を考える上で興味のある知見である。キナクリンによる肝発癌の促進作用に対しリン脂質症そのものが一次的に関与しているのか、リン脂質症に伴う細胞障害が二次的に影響しているのかが問題になるが、リン脂質症の変化に比し肝発癌促進作用が極めて軽度である事を考慮に入れると、二次的な影響による可能性の方が妥当と考

えられる。

文 献

- 1) 林 裕造, 今井 清, 長谷川紀昭: Quinacrine によるラットのリン脂質症. 日本病理学会誌, 65, 84~85 (1976)
- 2) 林 裕造, 森本和滋, 前川昭彦: 薬物誘発性脂質症. トキシコロジーフォーラム, 8, 468~479 (1985)
- 3) Ito, N., Tsuda, H., Tatematsu, M., Inoue, T., Tagawa, Y., Aoki, S., Uwagawa, S., Kagawa, M., Ogiso, T., Masui, T., Imaida, K., Fukushima, S. and Asamoto, M.: Enhancing effect of various hepatocarcinogens on induction of preneoplastic glutathione S-transferase placental form positive foci in rats—an approach for a new medium-term bioassay system. *Carcinogenesis*, 9, 387~394 (1988)
- 4) 吉田順一, 高村直子, 畝山智香子, 古田京子, 豊田和弘, 今井田克己, 林 裕造: ラット肝の前癌病変発生過程におけるキナクリンの影響. 第6回日本毒性病理学会発表, 6, 12 (1990)
- 5) Holtzman, E.: Lysosomes; A survey. Springer-Verlag, New York (1976)
- 6) Hasilik, A.: Biosynthesis of lysosomal enzymes. *Trends Biochem. Sci.*, 5, 237~240 (1980)
- 7) Erickson, A. H., Conner, G. E. and Blobel, G.: Biosynthesis of a lysosomal enzyme. *J. Biol. Chem.*, 256, 11224~11231 (1981)
- 8) Bainton, D.: The discovery of lysosomes. *J. Cell Biol.*, 91, 66s~76s (1981)
- 9) Vargaftig, B. B. and Hai, N. D.: Selective inhibition by mepacrine of the release of rabbit aorta contracting substance evoked by the administration of bradykinin. *J. Pharm. Pharmacol.*, 24, 159~161 (1972)
- 10) Blackwell, G. J., Flower, R. J., Nijkamp, F. P. and Vane, J. R.: Phospholipase A₂ activity of guinea pig isolated perfused lungs; stimulation and inhibition by anti-inflammatory steroids. *Br. J. Pharmacol.*, 62, 79~80 (1978)
- 11) Neufeld, E. F., Lim, T. W. and Shapiro L. J.: Inherited disorders of lysosomal metabolism. *Annu. Rev. Biochem.*, 44, 357~376 (1975)

F344 ラットにおける dicyclopentadiene の 28日間反復投与毒性試験

佐藤元信・岡宮英明・古川文夫・篠田和俊
今沢孝喜・豊田和弘・高橋道人

Twenty-eight day Repeated Dose Toxicity Test of Dicyclopentadiene in F344 Rat

Motonobu Satoh, Hideaki Okamiya, Fumio Furukawa, Kazutoshi Shinoda,
Takayoshi Imazawa, Kazuhiro Toyoda and Michihito Takahashi

A twenty-eight day repeated dose toxicity test of dicyclopentadiene (DCPD) was carried out in male and female F344 rats at the dose levels of 200, 40, 8 or 0 mg/kg/day.

Thirty six animals of both sexes were divided into 6 groups of equal number. All groups were treated i.g. administration for 28 days daily, and two groups of them, at the dose levels of 200 and 0 mg/kg, were used for investigation of recovery.

Inhibition of body weight gain was observed in the 200 mg/kg groups in both sexes and the 40 mg/kg group in male, but in female this inhibition was recovered at day 17 of the treatment.

Increases in liver and adrenal gland weights, and decrease in thymus weight were noted in the 200 mg/kg groups in both sexes, and increase in kidney weight was also observed in the 200 and 40 mg/kg groups in male.

On histopathological examination, hypertrophy of the adrenal cortex, and foamy cytoplasm in hepatocytes were observed in the 200 mg/kg groups of both sexes.

Repair of histopathological lesions occurred within 14 days resting period.

Based on these findings, it was concluded that the No Observed Effect Level of DCPD would be 8 mg/kg/day.

(Received May 31, 1990)

はじめに

Dicyclopentadiene ($C_{10}H_{12}$: DCPD) は cyclopentadiene の二量体であり、分子量 132.19, 比重 0.975, 融点 17°C, 沸点 170°C, 引火点 32.2°C の透明液状の芳香族系有機化合物である¹⁾。本物質はエポキシ樹脂やポリエステル樹脂などの合成樹脂、可塑剤、農薬(塩素化物)、医薬品、塗料、乾燥剤、香料などの原料として用いられているほか、合成ゴムの第三成分でもある。

本物質には刺激性および依存性があり、ACGIH (American Conference of Governmental Industrial Hygienists) による1986年の許容濃度は平均8時間の作業で 5 ppm とされている²⁾。

ラットを用いた急性毒性試験では、経口投与による LD_{50} が 353 mg/kg³⁾、腹腔内投与による LD_{50} が 200 mg/kg と報告されている。長期毒性試験では、ラットの吸入実験³⁾があるが、経口毒性試験については

報告がない。今回、我々は DCPD の毒性を把握する目的で、化審法ガイドライン⁴⁾に準じて雌雄の F344 ラット72匹を用いた28日間の強制経口による反復投与試験を実施した。

実験材料および方法

1. 動物ならびに飼育条件

5週齢の F344 ラット雌雄各36匹を日本チャールス・リバー社より購入し、1週間の馴化期間後、雌雄とも各群6匹として6群に分けた。

動物の飼育はバリエーションシステムの飼育室にて行い、室内の環境条件は温度 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、換気回数 18/hr (オールフレッシュ)、12時間の蛍光灯照明、12時間の消灯とした。プラスチックケージ内に動物を6匹ずつ収容し、床敷は三協ラボサービス株式会社のソフトチップを用い、週2回交換を行った。動物には固型飼料 (CRF-1, 日本チャールス・リバー社) および飲料水 (水道水) を自由に摂取させた。

2. 被験物質ならびに投与量

検体は日立化成工業株式会社製の純度96.48%のDCPDを用い、オリーブ油に溶解して、5ml/kgとなるよう濃度を調整した。群構成は200, 40, 8および0mg/kgの投与群ならびに200および0mg/kgの14日間回復群とした。動物にはラット用金属製胃ソングを用い、1日1回として検体を28日間連続経口投与した。なお、対照群には溶媒のオリーブ油を同様に投与した。

3. 観察ならびに検査項目

投与後、全動物の一般状態を毎日観察し、定期的に体重と摂餌量を測定した。26日目に雌雄の対照群および最高用量群から新鮮尿を採取し、マルティスティックス(マイルス・三共衛)を用いて蛋白質、ブドウ糖、ケトン体、潜血、pHの5項目を検査した。最終投与日または休薬14日目の夕刻から動物を一晩絶食させ、翌日にエーテル深麻酔下で、腹部大動脈より採血し屠殺剖検した。

血液学的検査は赤血球数、白血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、MCVの各項目について、また血清生化学的検査は総蛋白、総コレステロール、尿素窒素、クレアチニン、カルシウム、無機リン、ナトリウム、カリウム、クロール、GGT、コリンエステラーゼ、GOT、GPT、LDH、ALP、アルブミン、A/G比の各項目について実施した。

剖検時、肉眼的に観察した後に諸臓器を摘出・精査し、脳、下垂体、唾液腺、胸腺、心臓、肺、腎臓、副腎、脾臓、肝臓、精巣、卵巣については重量測定を行った。上記臓器に加え脊髄、胸骨、大腿骨、胃、腸、膵臓、膀胱、皮膚、乳腺、リンパ節、副鼻腔、気管食道、甲状腺、舌、精囊腺、前立腺、子宮、陰を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。組織は通常の方法によりパラフィン包埋して薄切片を作製し、Hematoxylin-Eosin (HE) 染色を施し、病理組織学的に検索を行った。なお、肝臓についてはPAS染色も行い、病理組織学的に検索した。

4. 統計学的処理⁵⁾

血液学的検査値、血清生化学的検査値および臓器の絶対重量と相対重量については、等分散の検定をBartlett法で行い、等分散の場合、一元配置分散分析で群間に有意差を認めた時はDunnett法あるいはSheffe法を用いて対照群と投与群の比較を行った。等分散が認められない場合、Kruskal-Wallis法を行い、群間に有意差を認めた時は、Dunnett法あるいはSheffe法を用いて対照群と投与群の比較を行った。また、2群間の比較にはt検定を用いた。

結 果

1. 一般状態、体重、摂餌量

中途死亡例が、雄の最高用量群で26日目に、雌の最高用量群で17日目に各1匹ずつ認められた。剖検所見において肺の暗赤色化が認められ、組織学的検索で肺のほぼ全域において肺胞内への出血がみられた。

雌雄とも最高用量群において3週目ごろから投与後の流涎が観察され、投与3時間後まで続いた。それ以外には、いずれの群においても一般状態の変化は認められなかった。

雌雄の平均体重推移をFig. 1, 2に示した。雄の最高用量群において実験開始3日目から体重増加抑制が認められ、14日間の休薬により回復した。また、40mg/kg投与群でも17日目で降体重増加抑制が認められた。雌の最高用量群において実験開始3日目より17日目まで体重増加抑制が認められた。摂餌量は雌雄の最高用量群において実験開始より7日目まで低値(対照群の50~60%)を示したがその後は対照群とほぼ同量であった。また、雄の40mg/kg投与群では7日目より21日目まで若干低値(対照群の約90%)を示した。

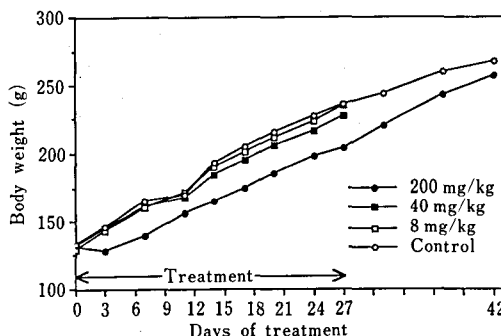


Fig. 1. Growth curves of male rats treated orally with DCPD

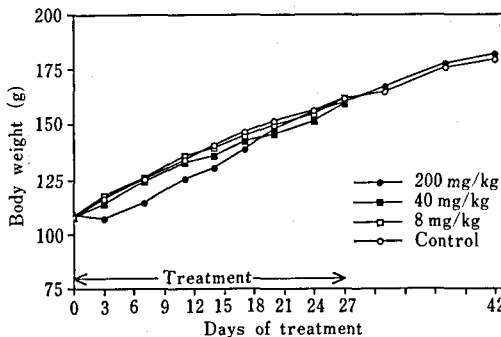


Fig. 2. Growth curves of female rats treated orally with DCPD

Table 1. Serum chemistry and hematology data for male rats treated with DCPD

Item	28 day dosing test (mg/kg)				14 day recovery test (mg/kg)	
	200	40	8	0	200	0
Serum chemistry						
Effective No.	6	6	6	6	4	6
T-pro (g/dl)	6.05±0.22	6.50±0.09**	6.10±0.14	6.17±0.19	6.43±0.21	6.52±0.18
Cholesterol (mg/dl)	72.5±7.45	76.8±5.04*	70.2±3.55	68.2±7.08	57.5±3.32	54.2±3.13
BUN (mg/dl)	15.0±0.91	17.4±1.36	15.8±1.62	15.3±1.97	15.4±1.31	15.5±1.54
Creatinine (mg/dl)	0.35±0.05	0.35±0.05	0.40±0.06	0.38±0.08	0.43±0.05	0.38±0.08
Ca (mg/dl)	9.52±0.30	9.95±0.14*	9.82±0.29	9.52±0.35	9.90±0.29	10.1±0.14
P (mg/dl)	7.50±0.64	7.22±0.66	7.59±0.90	7.30±0.58	7.95±1.10*	6.75±0.53
Na (mEq/dl)	142±0.81**	145±1.06	143±2.71	145±1.33	143±2.6	143±1.0
K (mEq/dl)	3.85±0.36	3.78±0.12	3.73±0.31	3.68±0.12	4.63±0.94	4.23±0.33
Cl (mEq/dl)	103±1.72**	104±0.89*	105±1.97	106±1.67	103±0.51	103±0.53
G-GT (IU/l)	0.83±0.98	-	0.33±0.51	-	0.75±1.50	0.17±0.41
Cho-E (IU/l)	6.67±3.14	6.67±1.03*	6.00±2.61	5.33±0.52	5.25±1.71	3.67±1.75
GOT (IU/l)	94.3±5.68	95.7±6.41	91.3±7.92	97.5±6.56	105±9.5**	88.3±5.6
GPT (IU/l)	51.3±5.68**	43.2±58.5**	40.8±4.88	36.5±4.04	38.0±6.38	39.5±3.33
LDH (IU/l)	1055±120*	1200±122	1000±314*	1358±204	1872±428**	1175±22.4
ALP (IU/l)	513±21.0*	474±58.5	437±35.7	425±58.6	488±9.56**	378±22.4
Alb (g/dl)	4.30±0.14*	4.67±0.05	4.47±0.05	4.53±0.18	4.45±0.13	4.58±0.18
A/G	2.45±0.10**	2.57±0.05*	2.77±0.24	2.78±0.18	2.25±0.10	2.40±0.13
Hematology						
Effective No.	6	6	6	6	3	6
Erythrocyte (x10 ⁴ /mm ²)	261±60.7	229±22.4	348±136	241±26.4	239±27.1	242±14.0
Ht. (%)	14.3±3.56	12.5±1.20	19.1±7.51	13.3±1.92	13.4±1.94	12.8±8.00
MCV (fl)	54.6±0.92	54.6±0.49	55.1±0.49	54.8±1.63	55.7±1.53*	53.0±1.41
Leukocyte (x10 ² /mm ²)	52.3±9.73	51.2±8.62	56.7±4.75	50.9±8.02	48.0±4.82	56.8±22.8
Hb. (g/dl)	17.1±0.24*	16.5±0.33	16.8±0.65	16.7±0.34	16.2±0.36	17.0±0.54

Data represent mean values ± S.D. - : Not detectable

* : Significantly different from respective control value at p<0.05.

** : Significantly different from respective control value at p<0.01.

2. 尿検査

尿中蛋白質、ブドウ糖、ケトン体、潜血、および pH について対照群と最高用量群間で顕著な差は認められなかった。

3. 血液および血清生化学的検査

雌雄における項目ごとの値を Table 1, 2 に示した。血清生化学的検査では雄の 40 mg/kg 以上の投与群においてコリンエステラーゼ GPT ALP の増加または増加傾向、クロール A/G 比の減少がみられたが、休薬後には ALP の高値が示されたのみであった。雌においては最高用量群でコリンエステラーゼの増加が、全投与群でカリウムの減少が示され、休薬により回復した。

血液学的検査では雄の最高用量群におけるヘモグロビン量の上昇、雌の最高用量群におけるヘマトクリット値の上昇が認められたが、休薬により回復した。また、雌の 40 mg/kg 投与群でヘモグロビン量の増加、8 mg/kg 投与群および最高用量群で MCV の上昇が示されたが、用量反応相関は認められなかった。

4. 臓器重量

雌雄の臓器ごとの絶対重量および相対重量を Table

3, 4 に示した。

雌雄とも最高用量群において肝臓・副腎の重量増加、胸腺の重量減少が示され、休薬により回復傾向を示した。その他、雄の 40 mg/kg 以上の投与群において腎臓相対重量の増加、最高用量群で脳・肺・精巣の相対重量の増加および脾臓絶対重量の減少が認められ、休薬により回復した。また、雌の最高用量群において卵巣重量の減少がみられ、休薬により回復した。

5. 病理組織学的所見

主な病理組織学的所見を Table 5 に示した。

肝臓：雌雄の最高用量群の全例において肝のほぼ全域で肝細胞内に泡沫状物質の出現が認められた (Fig. 3)。この変化は軽微であり、雄と比較し雌においてより軽度であった。PAS 染色においてこの泡沫状物質は陰性を示した。14日間の休薬により肝病変は回復した。雌雄の 40 mg/kg 以下の投与群においては対照群と比較し明らかな病変は認められなかった。

副腎：雌雄の最高用量群のほぼ全例で皮質束状層の肥大 (hypertrophy) が認められ、休薬により回復した。雌雄の 40 mg/kg 以下の投与群においては対照群と比較し明らかな病変は認められなかった。

Table 2. Serum chemistry and hematology data for female rats treated with DCPD

Item	28 day dosing test (mg/kg)				14 day recovery test (mg/kg)	
	200	40	8	0	200	0
Effective No.	6	6	6	6	5	6
Serum chemistry						
T-pro (g/dl)	6.52±0.24	6.38±0.21	6.30±0.25	6.45±0.08	6.38±0.18*	6.75±0.26
Cholesterol (mg/dl)	58.2±2.93*	58.5±2.59*	56.3±2.73	54.5±2.43	75.8±8.23	82.3±7.73
BUN (mg/dl)	14.8±3.25	16.5±2.11	16.8±2.66	15.3±1.08	15.8±2.58	17.1±1.50
Creatinine (mg/dl)	0.47±0.08	0.47±0.05	0.45±0.08	0.50±0.11	0.40±0.00	0.45±0.10
Ca (mg/dl)	9.93±0.27	10.2±0.28	9.90±0.34	10.1±0.23	10.1±0.23*	10.5±0.23
P (mg/dl)	7.82±0.84	7.45±0.38	7.50±0.46	7.02±0.92	7.00±0.35**	5.92±0.44
Na (mEq/dl)	143±1.26	143±1.09	143±2.04	144±0.82	142±0.84**	144±1.21
K (mEq/dl)	3.85±0.22**	3.93±0.25*	4.00±0.11*	4.18±0.10	3.90±0.27	3.70±0.35
Cl (mEq/dl)	102±2.42	104±0.99	102±0.40	104±1.65	104±0.89	106±1.60
G-GT (IU/l)	0.33±0.52	-	0.17±0.41	-	0.60±1.34	0.17±0.41
Cho-E (IU/l)	8.00±2.37**	5.00±2.76	5.17±2.64	4.17±1.72	5.60±2.51	6.33±1.75
GOT (IU/l)	122±13.1*	96.7±7.71	91.0±2.83*	103±10.4	88.6±9.61	80.5±5.24
GPT (IU/l)	51.0±8.25	40.7±4.41	40.8±4.88	44.8±7.99	36.0±6.04	39.5±4.28
LDH (IU/l)	2304±726	1657±314	1499±185	1980±567	1043±215**	346±165
ALP (IU/l)	569±38.3	591±43.9	602±41.8	586±22.9	355±35.1*	297±32.3
Alb (g/dl)	4.67±0.21	4.57±0.14	4.47±0.22	4.57±0.10	4.42±0.11**	4.85±0.16
A/G	2.52±0.15	2.53±0.12	2.43±0.15	2.43±0.14	2.26±0.11**	2.57±0.10
Hematology						
Erythrocyte (x10 ⁴ /mm ²)	253±43.5	259±60.9	363±164	207±15.5	213±8.46**	226±4.72
Ht (%)	14.0±2.43*	14.0±3.65	20.0±9.32	11.1±0.80	11.5±0.44	12.0±0.30
MCV (fl)	55.0±0.84*	53.8±1.17	54.8±0.99*	53.7±0.61	53.8±0.45	53.0±0.67
Leukocyte (x10 ² /mm ²)	47.9±7.95	43.5±3.78	50.2±3.87	47.1±7.93	48.4±5.27	42.0±5.33
Hb. (g/dl)	17.1±0.45	17.7±0.76*	17.0±0.37	16.6±0.66	16.1±0.36**	16.9±0.38

Data represent mean values ± S.D. - : Not detectable

* : Significantly different from representative control value at p<0.05.

** : Significantly different from representative control value at p<0.01.

その他の臓器において特記すべき所見はみられなかった。

考 察

最高用量群において中途死亡した雌雄2例は、肺動脈内への出血による死亡と考えられた。DCPDの経口投与による実験⁶⁾において、肺のうっ血や出血が報告されていることから、中途死亡の2例は本物質の毒性により死亡した可能性があるが、生存動物には肺出血の原因となるような変化は認められなかった。

雌雄の最高用量群および雄の中用量群において認められた体重増加抑制は、同時期における摂餌量の低下と関連があると考えられた。

血液学的検査において、雄の投与群にヘモグロビン量の増加が、雌の投与群にヘマトクリット値 MCV およびヘモグロビン量の増加が示されたが、用量相関は認められなかった。これは、投与群における赤血球数の若干の上昇傾向に起因するものと考えられたが、赤血球数上昇には用量相関がなく、またそれを裏づけるような病理組織学的変化も観察されなかったため、検体投与に起因するものではないと考えられた。

本研究で腎相対重量の増加が雄にのみ 40 mg/kg 以上の投与群において示されたが病理組織学的には明らかかな病変を認めなかった。一方、ラットを用いた DCPD の吸入実験³⁾において、雄にのみ腎重量の増加が報告されており、病理組織学的にも腎近位尿管の変性や尿管柱が観察されている。これらのことより、DCPD の腎毒性には性差があることが推測された。血清生化学的検査においては雄の 40 mg/kg 以上の投与群で用量相関を伴ったクロールの減少が認められたが、ナトリウムやカリウムにおいては顕著な変動がみられておらず、毒性学的な意義は少ないものと考えられた。一方、雌の投与群においてはカリウムの減少が用量相関をもって認められたが、腎尿管には病理組織学的にこれを裏づける所見はみられず、毒性学的意義は不明であった。

雌雄の最高用量群で肝重量の増加が認められたが、病理組織学的には雄においてより強い変化がみられた。肝細胞内にみられた泡沫状物質は PAS 陰性であり、グリーゼン顆粒ではなく、肝細胞の水様変性あるいは脂肪変性が考えられた。血清生化学的検査においても雄では肝障害を思わせる変化が雌と比較してより強

Table 3. Absolute and relative organ weights of male rats treated with DCPD

Item	28 day dosing test (mg/kg)			14 day recovery test (mg/kg)		
	200	40	8	0	200	0
Effective No.	6	6	6	6	5	6
Brain	1.93±0.05 (1.03 **)	1.79±0.2 (0.84)	1.90±0.1 (0.86)	1.89±0.07 (0.85)	1.98±0.09 (0.81)	1.92±0.05 (0.75)
Pituitary	0.007±0.0004 (0.004)	0.008±0.0005 (0.004)	0.007±0.0001 (0.003)	0.008±0.0005 (0.003)	0.008±0.0001 (0.003)	0.008±0.0009 (0.003)
Salivary gl.	0.39±0.01 (0.20)	0.42±0.04 (0.20)	0.41±0.04 (0.19)	0.42±0.04 (0.19)	0.47±0.04 (0.19)	0.48±0.03 (0.19)
Thymus	0.24±0.04* (0.13)	0.30±0.02 (0.14)	0.31±0.02 (0.14)	0.33±0.02 (0.15)	0.28±0.01 (0.11 *)	0.26±0.03 (0.10)
Lung (R)	0.58±0.03 (0.31)	0.58±0.04 (0.27)	0.59±0.04 (0.27)	0.59±0.06 (0.26)	0.65±0.07 (0.27)	0.63±0.07 (0.25)
(L)	0.30±0.09 (0.16 *)	0.30±0.03 (0.14)	0.32±0.03 (0.14)	0.30±0.04 (0.14)	0.35±0.05 (0.14)	0.33±0.03 (0.13)
Heart	0.72±0.09 (0.38)	0.72±0.05 (0.34)	0.74±0.06 (0.34)	0.78±0.06 (0.35)	0.78±0.01 (0.32)	0.78±0.06 (0.30)
Spleen	0.38±0.04* (0.20)	0.48±0.06 (0.23)	0.49±0.06 (0.22)	0.49±0.02 (0.22)	0.59±0.04 (0.24 **)	0.54±0.03 (0.21)
Liver	6.42±0.2 (3.41 **)	6.68±0.4 (3.14)	6.73±0.6 (3.04)	6.53±0.3 (2.92)	7.07±0.74 (2.89)	6.96±0.21 (2.72)
Adrenal (R)	0.029±0.005* (0.016 **)	0.023±0.002 (0.011)	0.020±0.004 (0.009)	0.020±0.004 (0.009)	0.021±0.002 (0.009)	0.021±0.002 (0.008)
(L)	0.030±0.006* (0.016 **)	0.024±0.003 (0.011)	0.024±0.007 (0.011)	0.022±0.005 (0.010)	0.022±0.008 (0.009)	0.022±0.003 (0.008)
Kidney (R)	0.74±0.03 (0.39 **)	0.79±0.04 (0.37 *)	0.81±0.08 (0.37)	0.74±0.05 (0.33)	0.85±0.06 (0.35)	0.84±0.06 (0.33)
(L)	0.74±0.04 (0.39 **)	0.80±0.05 (0.38 *)	0.79±0.06 (0.36)	0.77±0.02 (0.34)	0.82±0.05 (0.34)	0.82±0.05 (0.32)
Testis (R)	1.26±0.04 (0.67)	1.29±0.05 (0.61)	1.33±0.07 (0.60)	1.29±0.05 (0.58)	1.30±0.07* (0.53 *)	1.44±0.02 (0.56)
(L)	1.27±0.04 (0.67 **)	1.32±0.04 (0.62)	1.32±0.05 (0.60)	1.32±0.05 (0.59)	1.37±0.07 (0.56)	1.44±0.05 (0.56)

Data represent mean values ± S.D.

Relative organ weights are shown in parentheses (%)

* : Significantly different from respective control value at p<0.05.

** : Significantly different from respective control value at p<0.01.

Table 4. Absolute and relative organ weights of female rats treated with DCPD

Item	28 day dosing test (mg/kg)			14 day recovery test (mg/kg)		
	200	40	0	200	5	0
Effective No.	6	6	6	6	6	6
Brain	1.80±0.04 (1.2)	1.77±0.03 (1.2)	1.82±0.06 (1.2)	1.83±0.12 (1.2)	1.91±0.09 (1.1)	1.84±0.05 (1.1)
Pituitary	0.008±0.0004 (0.006)	0.008±0.001 (0.006)	0.008±0.001 (0.005)	0.010±0.002 (0.006)	0.011±0.001 (0.006)	0.010±0.001 (0.006)
Salivary gl.	0.31±0.04 (0.21)	0.32±0.02 (0.22)	0.30±0.04 (0.20)	0.33±0.04 (0.22)	0.39±0.02 (0.22)	0.35±0.04 (0.21)
Thymus	0.24±0.04 ** (0.16 *)	0.27±0.03 (0.18)	0.29±0.03 (0.19)	0.28±0.01 (0.19)	0.27±0.01 ** (0.16 *)	0.23±0.02 (0.14)
Lung (R)	0.48±0.04 (0.33)	0.44±0.03 (0.29)	0.47±0.08 (0.31)	0.48±0.06 (0.31)	0.53±0.07 (0.30)	0.51±0.05 (0.30)
(L)	0.23±0.01 (0.16)	0.23±0.01 (0.16)	0.25±0.03 (0.16)	0.26±0.04 (0.17)	0.28±0.03 (0.16)	0.25±0.02 (0.15)
Heart	0.56±0.05 (0.38)	0.55±0.02 (0.37)	0.53±0.05 (0.35)	0.56±0.05 (0.37)	0.61±0.05 (0.35)	0.57±0.02(0.34)
Spleen	0.32±0.05 (0.22)	0.35±0.03 (0.23)	0.38±0.04 (0.25)	0.38±0.06 (0.25)	0.47±0.03 ** (0.27 *)	0.40±0.02 (0.24)
Liver	4.47±0.20 * (3.0 **)	4.13±0.24 (2.8)	4.00±0.16 (2.6)	4.13±0.24 (2.7)	4.57±0.18 ** (2.6 *)	4.19±0.13 (2.5)
Adrenal (R)	0.029±0.004 ** (0.019 *)	0.022±0.002 (0.014)	0.024±0.002 (0.016)	0.023±0.003 (0.015)	0.028±0.004 (0.016)	0.027±0.004 (0.016)
(L)	0.031±0.001 * (0.021 *)	0.024±0.002 (0.016)	0.025±0.003 (0.016)	0.024±0.006 (0.016)	0.029±0.003 (0.016)	0.026±0.004 (0.016)
Kidney (R)	0.54±0.03 (0.37)	0.52±0.03 (0.35)	0.53±0.05 (0.35)	0.53±0.05 (0.35)	0.58±0.04 (0.33)	0.54±0.03 (0.32)
(L)	0.53±0.02 (0.36)	0.53±0.05 (0.36)	0.55±0.04 (0.36)	0.53±0.04 (0.35)	0.59±0.06 (0.34)	0.54±0.03 (0.32)
Ovary (R)	0.021±0.004 ** (0.014 *)	0.024±0.001 (0.016)	0.027±0.003 (0.018)	0.028±0.004 (0.019)	0.036±0.009 (0.021)	0.036±0.004 (0.021)
(L)	0.024±0.004 (0.016)	0.028±0.005 (0.019)	0.028±0.004 (0.018)	0.031±0.006 (0.020)	0.037±0.01 (0.021)	0.036±0.008 (0.021)

Data represent mean values ± S.D.

Relative organ weights are shown in parentheses (%)

* : Significantly different from respective control value at p<0.05.

** : Significantly different from respective control value at p<0.01.

Table 5. Summary of histopathological findings in male and female rats treated with DCPD

Findings	28 day dosing test (mg/kg)				Recovery test (mg/kg)	
	200	40	8	0	200	0
Male						
Liver						
foamy cytoplasm	+	-	-	-	-	-
Adrenal gland						
hypertrophy of the zona fasciculata	+	-	-	-	-	-
Female						
Liver						
foamy cytoplasm	±	-	-	-	-	-
Adrenal gland						
hypertrophy of the zona fasciculata	+	-	-	-	-	-

+ : mild ± : slight

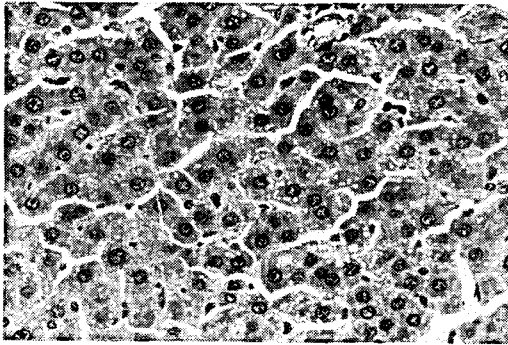


Fig. 3. Foamy cytoplasm in hepatocytes observed in 200 mg/kg group in male

く認められた。これらの所見を考慮すると本物質の肝に対する影響には性差があることが示唆された。

雌雄の最高用量群のほぼ全例に副腎皮質束状層の肥大が認められたことより、本物質により糖代謝に影響を与えた可能性が示唆された。

本研究で肝・副腎に見られた病理組織学的変化は14日間の休薬により回復したことより、本物質により惹起された変化は可逆性のものと考えられた。

以上の結果から、本実験条件下における DCPD の無影響量は 8 mg/kg/day と考えられた。

文 献

- 1) 化学工業日報社：“10889の化学商品”，化学工業日報社，東京（1989），pp. 541
- 2) American Conferences of Governmental Industrial Hygienists: “Documentation of the Threshold Limit Values and Biological Exposure Indices”, 5th ed. American Conferences of Governmental Industrial Hygienists Inc., Cincinnati, Ohio (1986), pp. 194
- 3) Kinkead, E. R., Pozzani, U. C., Geary, D. L. and Carpenter, C. P.: The mammalian toxicity of dicyclopentadiene. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 20, 552~561 (1971)
- 4) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室，大森義仁：“化審法 毒性試験法の解説”，化学工業日報社，東京（1987），pp. 23~42
- 5) 吉村 功：“毒性・薬効データの統計解析”，サイエンティスト社，東京（1987），pp. 26~93
- 6) Patty, F. A.: “Industrial Hygiene and Toxicology”, 2nd ed. Wiley (Interscience), New York (1963), pp. 1216

ラット新生仔腎の各種レクチンに対する染色性に関する研究
—成熟ラットとの比較—

佐藤秀隆・豊田和弘・古川文夫・小笠原裕之
今沢孝喜・今井田克己・高橋道人・林 裕造

Lectin Reactivity in the Kidney of Newborn
Rat Compared to Adult Rat

Hidetaka Sato, Kazuhiro Toyoda, Fumio Furukawa,
Hiroyuki Ogasawara, Takayoshi Imazawa, Katsumi Imaida
Michihito Takahashi, and Yuzo Hayashi

The distribution of binding sites for 13 lectins with different specificities was studied in adult and new-born rat kidney tissue by staining paraffin sections with the ABC method. Various segments of the uriniferous tubule in both rats showed differential affinity for lectins.

None of these lectins showed any reactivity with the immature developmental components of kidney like S-shaped bodies and mesonephric blastema. In the new-born rat kidney, the reactivity of 4 lectins (DBA, PNA, SBA and WGA) on the proximal tubules was very weak compared with the adult rat. Seven lectins (RCA-I, BSL-I, WGA, UEA-I, PHA-E, PSA, LCA), which stained the glomerulus of adult rats, failed to react with glomerular tuft in new-born rat kidneys. On the contrary, 4 lectins (RCA-I, WGA, UEA-I and PHA-E) out of these 7 lectins stained the surface of podocyte in the new-born kidney. Colloidal iron stained glomerular tuft in adult rats also showed less reactivity in immature glomerulus. These results suggested that changes in lectin binding reactivity are associated with the development and the differentiation of the rat kidney.

(Received May 31, 1990)

はじめに

細胞や組織に存在している複合糖質は、発生過程での細胞間認識に重要な役割を果たしており、また分化や加齢あるいは腫瘍化に際して変化することが知られている。従来、細胞表面の糖鎖を組織学的に検出するには、カルボキシル基等の酸性基に基づく方法、例えばアルシアン青やコロイド鉄等が用いられてきたが、これらの方法は非特異的であり、特定の糖鎖を検出するには酵素による消化によらねばならなかった。近年、特定の糖構造と特異的に結合するレクチンが、特定の細胞や腫瘍化した細胞を識別しようとする際に極めて有効であると報告されている。例えば、精子形成においてピーナッツレクチン (PNA) と大豆レクチン (SBA) に対する精原細胞、第一次精母細胞、第二次精母細胞の反応性は、それぞれ [PNA(-), SBA(-)], [PNA(+), SBA(-)], [PNA(+), SBA(+)] の変化をとげることが知られている¹⁾、大腸癌発生過程において粘膜上皮では小麦胚レクチン (WGA)、ヒマ

豆レクチン (RCA II)、カプトガレクチン (LPA) に対する結合性が低下し PNA に対する反応が認められるようになると報告されている²⁻⁵⁾。また、胸腺や脾臓のリンパ球を PNA や LPA 等のレクチンを用いて特定の細胞集団 (ヘルパー-T, サプレッサー-T) に分離できることが知られている⁶⁾。

腎臓はネフロンを単位とするが、一本の尿細管は形態的、機能的に異なった多数の分節に分けることができる。この様な腎臓の機能的に異なる部位を組織学的に検索する手段として、レクチン染色が有用であると報告されている⁷⁻¹⁰⁾。今回、ラット新生仔腎臓各部位の発生・成熟過程における種々のレクチンに対する染色性を成熟ラットのそれと比較検討し、またコロイド鉄および PAS 染色についても検討を加えた。

実験方法

F344 ラットを日本チャールス・リバー社より購入してバリヤーシステムの動物室にて飼育・交配した。飼料は日本チャールス・リバー社製の固型飼料 CRF-1

Table 1. Lectin (agglutinin) used in histochemical studies

Acronym	Agglutinin Latin name	Carbohydrate binding specificity
DBA	Dolichos Biflorus Agglutinin (ドリコスマメ凝集素)	α -D-GalNAc
PNA	Peanut Agglutinin (ピーナッツ凝集素)	Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc, β -D-Gal
RCA-I	Ricinus Communis Agglutinin (ヒマ凝集素)	β -D-Gal, Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc
SBA	Soybean Agglutinin (大豆凝集素)	α or β -GalNAc, α -D-Gal
BSL-I	Bandeiraea Simplicifolia Lectin-I (バンディラマメ凝集素-I)	α -GalNAc, α -D-Gal, Laminin
SJA	Sophola Japonica Agglutinin (エンジュ凝集素)	D-GalNAc, D-Gal
WGA	Wheat Germ Agglutinin (コムギ胚凝集素)	β -D-GlcNAc, Sialic acid
S-WGA	Succinylated Wheat Germ Agglutinin (サクニル化コムギ胚凝集素)	GlcNAc
UEA-I	Ulex Europaeus Agglutinin (ハリエニシダ凝集素)	α -D-Fuc
PHA-E	Phaseolus Vulgaris Agglutinin (インゲンマメ凝集素)	Erythroagglutinin
PHA-L	Phaseolus Vulgaris Agglutinin (インゲンマメ凝集素)	Leucoagglutinin Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 2Man
PSA	Pisum Sativum Agglutinin (エンドウマメ凝集素)	D-Man
LCA	Lens Culinaris Agglutinin (レンズマメ凝集素)	GlcNAc β 1-2Man α -

を用い、飲料水は水道水を与え、実験期間中自由に摂取させた。生後1, 2, 4, 10日目に2~3匹を屠殺、腎臓を摘出し10%緩衝ホルマリンにて固定、常法どおりパラフィン包埋し、薄切片にHE, PAS, レクチンならびにコロイド鉄染色を行い光学顕微鏡下にて観察した。

レクチン染色は、常法にて脱パラフィンをを行った後、0.3%過酸化水素加メタノール30分処理にて内因性ペルオキシダーゼ活性を阻止した後、アビジン液・ビオチン液にて内在するアビジン・ビオチンをマスクした。その後ビオチン化レクチン(10 μ g/ml 0.1 M リン酸緩衝液 pH 7.4 0.1 mM の Ca, Mg, Mn イオンを含有)にて一時間反応させ、アビジン・ビオチン複合体で30分反応、ジアミノベンチジンにて発色した。使用した13種のレクチンおよびその糖結合特異性については Table 1 に示した。

結 果

生後1~4日の腎最外層には胎仔腎臓(Fig. 1)と同様に未熟な細胞群とともにS字体(S-shaped body)が認められ(Fig. 2)、ネフロンの新生が続いていることが示された。この未熟な細胞群はPASおよびコロイド鉄に陰性であり、周囲もPASにより連続的には染色されなかった。原始糸球体ではコロイド鉄陰性であるが、深部の形態的に比較的成熟していると考えられる糸球体はPASおよびコロイド鉄に対して陽性で

あった(Fig. 3)。一方、皮髄境界部は細胞密度が極めて疎で、尿細管の発達も未熟であった。6日目以降では皮質外層に未熟な細胞群およびS字体などのネフロン新生層は認められなかった。この時期、皮質最深層の糸球体は形態的に成熟しており、糸球体係蹄はコロイド鉄陽性であるが、表層の糸球体ほど係蹄の形成も不明瞭で、コロイド鉄陰性と未熟であった。一方、近位尿細管刷子縁はPAS陽性であるが、この時期では近位尿細管直部を形態的に識別できなかった。

Table 2に成熟ラット腎各部位の各種レクチンに対する染色性を示した。成熟ラットの尿細管は、PNA, RCA-I, SBA, WGA, LCAにより程度の差はあるものの全域が陽性に染色された(Fig. 4)。DBAは近位尿細管S1, 2と遠位尿細管ならびに集合管で、BSL-Iは近位尿細管S1, 2と遠位尿細管で陽性であった。PHA-L, PSAは近位尿細管のみ(Fig. 5)を、PHA-Eは近位尿細管と集合管、S-WGAは近位および遠位尿細管と集合管にて陽性であったが、SJAはいずれの部位でも陰性であった。腎小体についてみると、糸球体係蹄はRCA-I, BSL-I, WGA, UEA-I, PHA-E, PSA, LCAに陽性であり、ボウマン嚢はUEA-I, LCAに染まるが、上皮細胞はどのレクチンによっても染色されなかった。

Table 3には新生仔腎各部位の各種レクチンに対する染色性を、Table 4には成熟ラットと新生仔での各種レクチンに対する染色態度の差を成熟ラットの染色

Table 2. Distribution of lectin binding sites in adult rat kidney

		DBA	PNA	RCA-I	SBA	BSL-I	SJA	WGA	SWGA	UEA-I	PHA-E	PHA-L	PSA	LCA
Glomerular	turf	-	-	+	-	++	-	++	-	+	+	-	+	++
Podocyte	Cell Surface	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Cytoplasm	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bowman's	capsule	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Proximal	tubules S1,2	++	+++	++	++	+	-	++	+	-	+	+++	+	+
	Cytoplasm	++	-	-	+	++	-	++	-	-	+	++	-	+
S3	Cell Surface	-	+	++	+	++	-	+++	+	-	+	+++	+	+
	Cytoplasm	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Thin limb	Cell Surface	-	++	++	+	-	-	++	-	-	-	-	-	+
	Cytoplasm	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Thick limb	Cell Surface	-	++	++	+++	-	-	++	-	-	-	-	-	+
	Cytoplasm	-	-	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Distal	Cell Surface	++	+++	++	++	+	-	++	+	+	-	-	-	+
	Cytoplasm	++	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Collecting	Cell Surface	+++	++	++	+++	-	-	+++	+	+	+	-	-	+
	Cytoplasm	+	+	+	++	-	-	++	-	+	-	-	-	+

- : negative + : weakly positive ++ : positive +++ : strongly positive

Table 3. Distribution of lectin binding sites in new-born rat kidney

		DBA	PNA	RCA-I	SBA	BSL-I	SJA	WGA	SWGA	UEA-I	PHA-E	PHA-L	PSA	LCA
Glomerular	turf	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Podocyte	Cell Surface	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	++	-	-
	Cytoplasm	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bowman's	capsul	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
Proximal	tubules S1,2	+	-	++	-	+	-	+	-	-	+	++	+	+
	Cytoplasm	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
S3	Cell Surface	-	-	++	-	+	-	+	-	-	+	++	+	+
	Cytoplasm	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Thin limb	Cell Surface	-	++	++	+	++	-	++	-	-	-	-	-	+
	Cytoplasm	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Thick limb	Cell Surface	-	++	++	++	++	-	++	-	-	-	-	-	+
	Cytoplasm	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Distal	Cell Surface	++	+++	++	++	+	-	++	+	+	-	-	+	+
	Cytoplasm	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Collecting	Cell Surface	+++	++	++	+++	-	-	+++	+	+	+	-	-	-
	Cytoplasm	-	-	-	++	-	-	-	-	+	-	-	-	-

- : negative + : weakly positive ++ : positive +++ : strongly positive

性を基準として示した。

皮質最表層に見られた未熟な細胞群やS字体は、いずれのレクチンでも染色されなかった。新生仔腎の近位尿細管では、RCA-I、PHA-E、PSA などに対する反応性に変化はなかったが、DBA、PNA、SBA、WGA など成熟ラットで強い反応を示すレクチンに対する染色性が低下しており (Table 3)、全体として近位尿細管の各種レクチンに対する染色性は、成熟ラットに比べて低下していた (Table 4)。遠位尿細管および集合管は、4日以降成熟ラットと染色性に差を認めないものが多く、ネフロンが発生が見られる1、2日目では、被膜直下のY字分岐部までの集合管が各種レクチンに対して成熟ラットとほぼ同様の染色態度を示した。

腎小体についてみると、糸球体係蹄は PHA-L を

除いた他のいずれのレクチンに対しても陰性であった。podocyte は、成熟ラットではいずれのレクチンとも反応しなかったが、新生仔腎の未熟な糸球体の podocyte 表層は、RCA-I、WGA、UEA-I、PHA-E、PHA-L に陽性 (Fig. 6) であり、ボウマン嚢は RCA-I、BSL-I、WGA、UEA-I 等に陽性であった。

考 察

今回行った成熟ラット腎の各種レクチンに対する染色性は、村田らの報告⁷⁾とよく一致した。一方、Schulte ら⁸⁾も同様の実験を行っているが、今回の我々の結果とは染色性の強さや染色部位に多少一致しない点が見られた。この違いは、固定液によるものと考えられる。事実、ヒトの大腸においては UEA-I に対



Fig. 1. Metanephritic tissues cap ampulla of collecting duct and form S-shaped vesicle. The inner layer was shared by widely spaced stromagenic cells. (day eighteen of fetus H. E. $\times 50$)

MB: Metanephric blastema
 SV: S-shaped vesicle
 PT: Primitive tubule

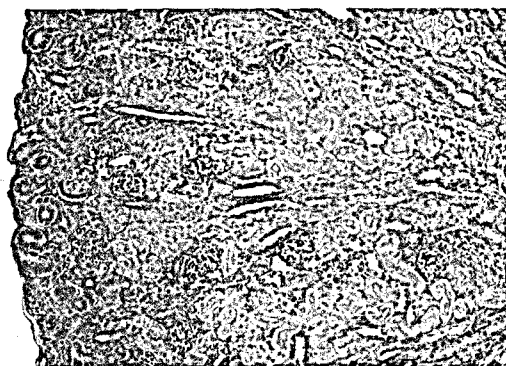


Fig. 2. S-shaped vesicles and primitive tubules are observed in outer layer of cortex. (2-day-old rat PAS $\times 25$)

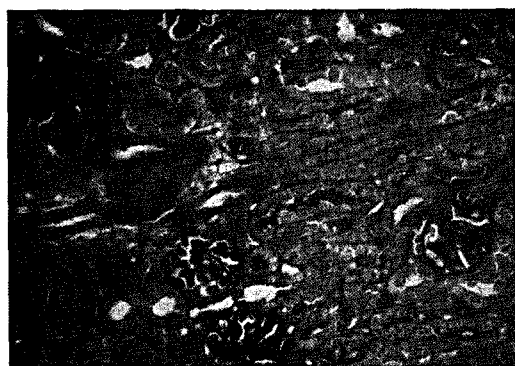


Fig. 3. Prominent reaction of colloidal iron to matured glomerulus but not to immature glomerulus and S-shaped body. Glomerular tuft, brush border and basement membrane of tubules are PAS positive. (2-day-old rat, colloidal iron+PAS $\times 25$)

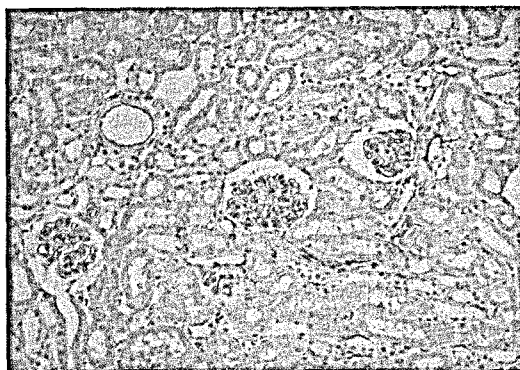


Fig. 4. Marked reaction in the binding of WGA to glomerular tuft and proximal tubules (Adult rat WGA $\times 33$)

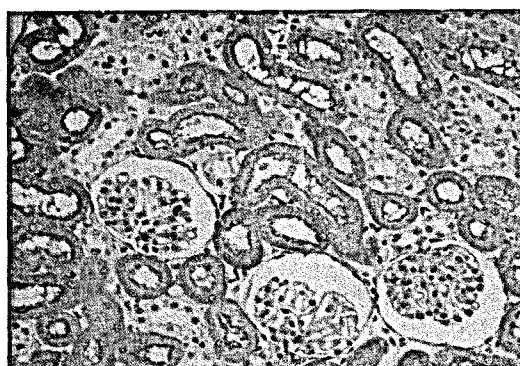


Fig. 5. Prominent binding of PHA-L to proximal tubules (Adult rat PHA-L $\times 50$)

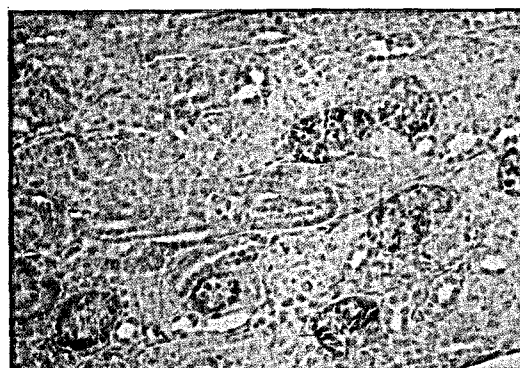


Fig. 6. Surface of the podocyte and proximal tubules react to PHA-L. (2-day-old PHA-L $\times 50$)

する染色性が凍結標本とホルマリン固定標本では異なることが知られており¹¹⁾、レクチン染色の際にはどのような固定が最適なのかという点も含めて今後の検討が必要である。

今回の検索で新生仔の集合管、遠位尿細管、深部ネ

Table 4. Changes of lectin binding pattern in the kidney of new-born rat compared to adult rat

	DBA	PNA	RCA-I	SBA	BSL-I	WGA	SWGA	UEA-I	PHA-E	PHA-L	PSA	LCA
Glomerular turf			↓		↓	↓		↓	↓	↑	↓	↓
Podocyte			↑			↑		↑	↑	↑		
Bowman's capsule					↑	↑						
Proximal tubules	↓	↓		↓	↓	↓	↓			↓		↓
Thin limb		↓		↓	↑							
Thick limb					↑		↑					
Distal tubules											↓	
Collecting duct												↓

↑ increase ↓ decrease

フロンなどは、ほぼ成熟ラットと同様の染色性を示したが、表層のネフロンにおいては、その分化・成熟が生後10日目においても完全に終了していないことがレクチン染色やコロイド鉄染色により示唆された。ところで腎臓の発生は、尿管芽 (ureteric bud) が造後腎組織 (metanephric blastema) に侵入して分岐し、分岐部先端に後腎小胞 (metanephric cap) が誘導・形成され、その後ネフロンへと分化・成熟していく。尿管芽からは尿管、腎盂、腎杯、集合管が、造後腎組織からは尿細管と糸球体が分化する。このような形態学的なネフロンの発生・成熟過程と腎各部位の各種レクチンに対する反応性の変化は同様の傾向を示すことが明らかとなった。特に、成熟ラットの糸球体係蹄に反応性を示す WGA, BSL-I, LCA, RCA-I, UEA-I, PHA-E, PSA などのレクチンは、発生途中または未熟な糸球体係蹄には認められず、未熟な糸球体の podocyte 表層にみられた。Kunz らは、N-アセチルガラクトサミンを認識する Helix pomatia レクチンに対する結合性が podocyte の成熟につれて変化することを見だしており¹²⁾、このような事実は、シアル酸、ガラクトース、ガラクトサミン等の糖鎖が、podocyte の成熟による形態の変化にもなって細胞表層の分布が変化し、基底膜側に偏在するようになることを示していると思われる。

使用した13種のレクチンは認識する糖鎖の性状により、ガラクトースまたはガラクトサミン (DBA, PNA, RCA-I, SBA, BSL-I, SJA), グルコサミン (WGA, Succinylated WGA), フコース (UEA-I), マンノー

ス (PHA-L, PSA, LCA), その他の糖鎖 (PHA-E) を認識する5グループに分類される。それら同一群内のレクチンに対する染色性を比較してみると、同じ糖鎖を認識するとされているレクチンでも同じ部位を染色するとは言えない。例えば、ガラクトースを認識する6種のレクチンでも PNA や RCA-I は尿細管全域で陽性であるが、SJA はいずれの部位とも反応しなかった。レクチンは、糖鎖の立体構造やその構成糖によって結合性が影響されるとされており、今回の結果もそれを反映しているものと考えられた。

レクチンのこのような糖結合特異性を利用して、種々の病態における特定の部位を認識しようとする試みはいくつか行われており、例えば、Holthöfer らは腎嚢胞症についてレクチンを用いた発生部位の検討を行っており¹³⁾、その有用性を認めている。また、慢性腎不全における腎糸球体硬化の過程において特定のレクチンに対する結合性が失われることが報告されている^{14,15)}。ところで、レクチン組織化学に種属差があることは、Holthöfer の14種の動物の腎を FITC 標識レクチンで検索した報告¹⁶⁾から明らかである。ネフロンのレクチン結合部位は、一定の類似性は認められるが、種属による厳然たる違いが存在し、ある動物種での結果は、そのまま他の動物種には必ずしも当てはまらない。今回の報告には示していないが、我々もマウス、モルモット、ハムスターを用いて検討を加え、種々の点で反応性が異なることを証明している。また、腎芽腫においてもレクチンに対する反応性に種差のあることが報告されている^{17,18)}。したがって、種々の病

態にレクチン組織化学を応用しようとする際には、各々の動物種または系統での正常な組織における染色性に関する検討が不可欠である。このような点をふまえば、レクチン組織化学は種々の病変の動態や腫瘍の組織起源とその発生過程などを組織学的に検索するための強力な方法と期待される。

文 献

- 1) Watanabe, M., Muramatsu, T., Shirane, H. and Ugai, L.: Discrete distribution of binding sites for *Dolichos biflorus* agglutinin (DBA) and for peanut agglutinin (PNA) in mouse organ tissues. *J. Histochem. Cytochem.*, **29**, 779~790 (1981)
- 2) Boland, C. R., Montgomery, C. K. and Kim, Y. S.: Alterations in human colonic mucin occurring with cellular differentiation and malignant transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **79**, 2051~2055 (1982)
- 3) Cooper, H. S.: Peanut lectin-binding sites in large bowel carcinoma. *Lab. Invest.* **47**, 383~390 (1982)
- 4) Cooper, H. S. and Reuter, V. E.: Peanut lectin-binding sites in polyps of the colon and rectum. Adenomas, hyperplastic polyps, and adenomas with *in situ* carcinoma. *Lab. Invest.* **49**, 655~661 (1983)
- 5) Boland, C. R., Montgomery, C. K. and Kim, Y. S.: A cancer-associated mucin alterations in benign colonic polyps. *Gastroenterology* **82**, 664~672 (1982)
- 6) Nakano, T., Imai, Y., Naiki, M. and Osawa, T.: Characterization of mouse helper and suppressor T cell subsets separated by lectins. *J. Immunol.*, **125**, 1928~1932 (1980)
- 7) Murata, F., Tuyama, S., Hamada, H., Ozawa, M. and Muramatsu, T.: Distribution of glycoconjugates in the kidney studied by use of labeled lectins. *J. Histochem. Cytochem.* **31**, 139~144 (1983)
- 8) Schulte, B. A. and Spicer, S. S.: Histochemical evaluation of mouse and rat kidneys with lectin-horseradish peroxidase conjugates. *Amer. J. Anatomy* **163**, 345~362 (1983)
- 9) Holthöfer, H., Virtanen, I., Pettersson, E., Törnroth, T., Alftan, O., Linder, E. and Mitettinen, A.: Lectins as fluorescence microscopic markers for saccharides in the human kidney. *Lab. Invest.*, **45**, 391~399 (1981)
- 10) Kunz, A., Brown, D., Vassalli, J.-D., Kontturi, M., Kupulainen, T. and Orci, L.: Ultrastructural localization of glycoalyx domains in human kidney podocytes using the lectin-gold technique. *Lab. Invest.*, **53**, 413~420 (1985)
- 11) Yonezawa, S., Nakamura, T., Tanaka, S. and Sato, E.: *Ureix europaeus* agglutinin-I binding sites in normal mucosa, adenoma, and carcinoma of the human large bowel. *JNCI* **69**, 777~785 (1982)
- 12) Kunz, A., Brown, D. and Orci, L.: Appearance of *Helix pomatia* lectin-binding sites on podocyte plasma membrane during glomerular differentiation. *Lab. Invest.*, **51**, 317~324 (1984)
- 13) Holthofer, H., Kumpulainen, T. and Rapola, J.: Polycystic disease of the kidney. Evaluation and classification based on nephron segment and cell-type specific markers. *Lab. Invest.*, **62**, 363~369 (1990)
- 14) Yonezawa, S., Iriya, S., Nakamura, T., Uemura, S., Otsuji, Y., Ohi, Y. and Sato, E.: Deposition of alpha 1-antitrypsin and loss of glycoconjugate carrying *Ureix europaeus* agglutinin-I binding sites in glomerular sclerotic process. *Nephron*, **33**, 38~43 (1983)
- 15) Yonezawa, S., Shibata, M., Shimizu, T., Nakamura, T. and Sato, E.: Griffonia simplicifolia I-A₄ staining of mice glomerular tufts and its alteration in diabetic mice. *Acta Pathol. Jpn.* **36**, 1653~1658 (1986)
- 16) Holthöfer, H.: Lectin binding sites in the kidney. A comparative study of 14 animal species. *J. Histochem. Cytochem.* **31**, 531~537 (1983)
- 17) Wick, M. R., Manivel, C., O'Leary, T. P. and Cherwitz, D. L.: Nephroblastoma; A comparative immunohistochemical and lectin-histochemical study. *Arch Pathol, Lab. Med.*, **110**, 630~635 (1986)
- 18) Henningar, R. A., Sens, D. A., Spicer, S. S., Schulte, B. A., Newman, V., Sens, M. A. and Garvin, A. J.: Lectin histochemistry of nephroblastoma. *Histochem. J.* **17**, 1091~1110 (1985)

タンニン酸の F344 ラットにおける亜慢性毒性試験

小笠原裕之・外館あさひ・小野寺博志・松島裕子
 渋谷 淳・吉田順一・前川昭彦・林 裕造

Subchronic Oral Toxicity Study of Tannic Acid in F344 Rats

Hiroyuki Ogasawara, Asahi Todate, Hiroshi Onodera, Yuko Matsushima,
 Makoto Shibutani, Jun-ichi Yoshida, Akihiko Maekawa and Yuzo Hayashi

A 13-week subchronic oral toxicity study of tannic acid (TA) was carried out in F344 rats at dose levels of 0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2 and 0.4% in the drinking water, to determine appropriate dose levels for a subsequent 2-year carcinogenicity study. The rats were randomly allocated to 6 groups, each consisting of 12 males and 12 females. No animals died during the administration period. There were no significant difference in body weight gain, food consumption and organ weights between the treated and control groups, although a slight decrease in water intake was seen in the 0.4% TA treated group. No specific changes were observed in any parameters in the hematological and biochemical investigations. Histopathological examination, revealed toxic changes in the TA treated male groups, in the form of necrosis in the liver, but toxicologically it was of minor importance.

From these results, it was concluded that the provable maximum tolerable dose of TA in the drinking water would be more than 0.4%. In consideration of the avoidance of drinking water, the maximum tolerable dose of tannic acid was determined to be 0.5%, when given in the drinking water.

(Received May 31, 1990)

はじめに

タンニンは植物界に広く分布する天然化合物であり、タンニン酸は通例、五倍子または没食子から得られたタンニンのことである。タンニン酸は主に工業用材料として用いられているが、そのほか我が国では、食品関連分野で清酒の清澄剤、医薬分野で止血薬、収れん薬および下痢の治療薬として用いられている、海外では、食品のフレーバー剤および助剤などとしても用いられ、さらに歯科材料、化粧品および外用貼付製剤などにも使用されるなど、その用途は多岐にわたっている。

タンニン酸の毒性については現在までにいくつかの報告があり、ラットにおける LD₅₀ 値は経口投与で 2.26 g/kg¹⁾、皮下投与では、1.50 g/kg²⁾ とされている。ラットの経口投与による急性毒性試験におけるタンニン酸の主な毒性標的臓器は肝臓であり^{1,3)}、肝細胞の小葉中心性壊死が最も多く観察されている⁴⁾。ラットにおける長期投与試験では、経口投与の場合、毒性は明らかではないが⁵⁾、皮下投与や筋肉内投与の場合では肝腫瘍や投与局所の腫瘍の発生が認められてい

る^{6,7)}。また、肝腫瘍発生の促進効果⁸⁾や、逆に皮膚腫瘍発生の抑制効果⁹⁾に関する報告もある。ただし、これらの報告は古いものが多く、がん原性試験法ガイドラインに従った経口投与による長期試験の報告はない。

今回我々は、ラットにおけるタンニン酸の長期経口投与による慢性毒性・がん原性試験を行う目的で、その予備試験としての13週間経口投与亜慢性毒性試験を行ったのでその結果について報告する。

実験材料および方法

1. 被験物質および動物

被験物質は、大日本製薬(株)より購入した局方タンニン酸 (C₇₆H₄₂O₄₆, 純度100%) である。本物質は、五倍子から抽出・精製したもので、淡黄色～淡褐色の無定型粉末、光沢のある針状または海綿状の塊で、無臭かわずかに特異なにおいがあり、味は極めて渋い。

動物は、日本チャールス・リバー(株)より購入した4週齢雌雄各72匹の F344/DuCrj ラット (SPF) を使用した。2週間の馴化飼育期間の後、各群12匹よりなる6群に分け6週齢時より実験に供した。

動物は、バリエーションシステム室にて温度 24±1°C, 湿

度 $55 \pm 5\%$ 、換気回数18回/時（オールフレッシュ）、12時間蛍光灯照明、12時間消灯の条件下で飼育した。動物はポリカーボネート製ケージに5匹ずつ収容し、床敷は三協ラボサービス株式会社のソフトチップを用い、週2回交換を行った。飼料として固型飼料(CRF-1: オリエンタル酵母)を試験期間中自由に摂取させた。

2. 実験方法

タンニン酸を蒸留水に0.025%、0.05%、0.1%、0.2%および0.4%の濃度に溶解し、飲料水として13週間自由に摂取させた。なお、今回の試験における最高用量は、少数の動物を用いた予備試験の結果から求められた、飲水忌避による体重減少のない最大量である。試験期間中、検体は1週間に3回、新しく調製するとともに、飲水量の測定を行った。また、対照群には蒸留水のみを同様の方法で同期間自由に摂取させた。

試験期間中、死亡の有無および一般状態を毎日観察し、体重測定は週1回、摂餌量は試験開始後4週間は週1回、それ以後は2週に1回測定した。動物は試験最終日の前日から一晩絶食後、翌日エーテル麻酔下で、腹部大動脈より採血を行い、屠殺・剖検した。

各臓器は肉眼的に観察し、脳、唾液腺、胸腺、肺、心臓、脾臓、肝臓、腎臓、副腎および雄の精巣については重量測定の後、鼻腔、下垂体、眼球を含む頭蓋、舌、気管、甲状腺、食道、胃、小腸、大腸、膀胱、膀胱、皮膚、筋肉、乳腺、リンパ節、胸骨、大腿骨、脊椎、雄の精囊腺、前立腺、雌の卵巣、子宮、腔については摘出後直ちに10%中性緩衝ホルマリン液にて固定した。組織は通常の方法によりパラフィン包埋後、薄切片を作製し、Hematoxylin Eosin (HE) 染色を施し、最高用量群と対照群について病理組織学的に検索し、対照群と比較して最高用量群で変化のあった臓器・組織については全群の検索を行った。

採取した血液については、自動血球計測装置（東亜医用電子社、CC-150型）にて赤血球数(RBC)、白血球数(WBC)ヘモグロビン量(Hb)、ヘマトクリット値(Ht)および平均血球容積(MCV)の測定を行い、分離した血清については凍結後、アルブミン(Alb)、総タンパク(TP)、アルブミン・グロブリン比(A/B)、総コレステロール(TC)、尿素窒素(UN)、クレアチニン(CR)、カルシウム(Ca)、無機リン(P)、glutamic oxaloacetic transaminase (GOT)、glutamic pyruvic transaminase (GPT)、乳酸脱水素酵素(LDH)、アルカリフォスファターゼ(ALP)、 γ -glutamyltranspeptidase(γ -GT)、コリンエステラーゼ(ChE)、ナトリウム(Na)、クロール(Cl)、カリウム(K)の各項目

について測定した。

3. 統計学的処理

血液学的、血清生化学的検査値および臓器の絶対重量と相対重量については、等分散の検定をBartlett法で行い、等分散の場合、一元配置の分散分析で群間に有意差を認められた時はDunnett法を用いて対照群と投与群の比較を行った。等分散が認められない場合、Kruskal-Wallis法を行い、群間に有意差を認められた時は、Dunnett法を用いて対照群と投与群の比較を行った¹⁰⁾。

結 果

1. 死亡の有無および一般状態

試験期間中、雌雄各群とも死亡動物は認められず、一般状態にも異常は認められなかった。

2. 体重および摂餌量

試験期間中の体重推移をFig.1に示す。対照群と比較して、雌雄各投与群とも体重増加に差異は認められなかった。

試験期間中の摂餌量をFig.2に示す。雌雄各投与

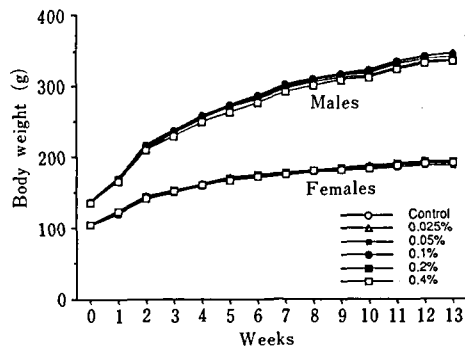


Fig.1. Growth curves of F344 rats treated with tannic acid for 13 weeks

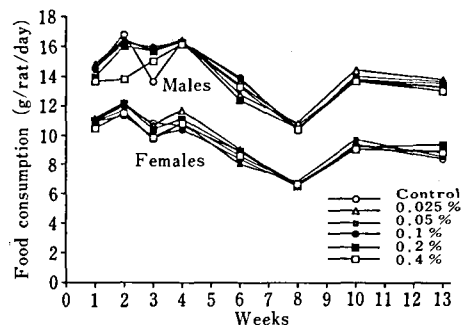


Fig.2. Daily food consumption in F344 rats treated with tannic acid for 13 weeks

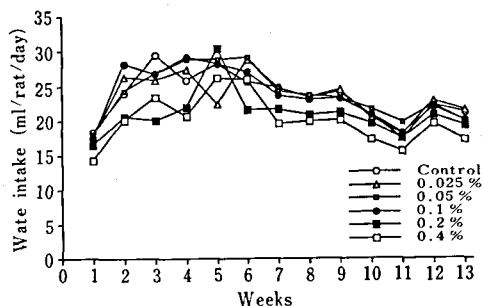


Fig. 3. Daily water intake in F344 male rats treated with tannic acid for 13 weeks

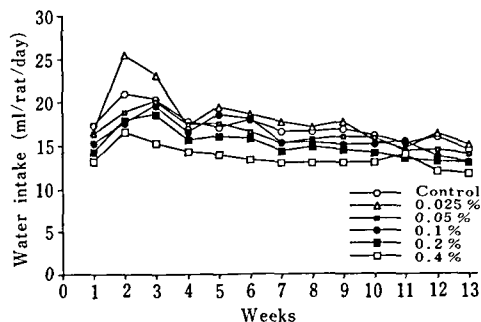


Fig. 4. Daily water intake in F344 female rats treated with tannic acid for 13 weeks

群とも対照群とほぼ同様の推移を示した。

3. 飲水量

試験期間中の飲水量を Fig. 3, 4 に示す。雌雄とも 0.4% 投与群で飲水量の軽度の減少が認められ、特に雌では試験全期間を通じてその傾向が持続した。

4. 血液学的および血清生化学的検査

血液学的および血清生化学的検査の結果を Table 1 および Table 2 に示す。対照群に対する有意差検定の結果、雄では WBC, TP, A/G, Cl において測定値

の上昇, GOT, LDH, K において測定値の低下, 雌では Ca において測定値の上昇, GOT, LDH, ALP において測定値の低下がタンニン酸投与群で有意に認められた。

5. 臓器の絶対重量および相対重量

各群の諸臓器の絶対重量を Table 3, 4 に示す。絶対重量および相対重量は、対照群と比較して雌雄とも有意差は認められなかった。

Table 1. Hematological and serum biochemical data of F344 male rats treated with tannic acid for 13 weeks

Dose (Effective No.)	Control (12)	0.025 % (12)	0.05 % (12)	0.1 % (12)	0.2 % (12)	0.4 % (12)
Alb (g/dl)	4.57±0.13	4.55±0.12	4.59±0.14	4.61±0.10	4.50±0.14	4.55±0.19
TP (g/dl)	6.46±0.24	6.43±0.13	6.40±0.22	6.47±0.19	6.26±0.16 *	6.23±0.17 *
A/G	2.43±0.26	2.46±0.18	2.49±0.29	2.52±0.31	2.59±0.29	2.74±0.30 *
TC (mg/dl)	58.0±5.4	54.9±4.4	55.8±5.0	58.4±4.4	56.2±4.9	57.8±3.8
UN (mg/dl)	19.1±2.0	19.1±1.7	18.7±0.7	19.1±1.0	17.5±1.5	18.8±0.9
CR (mg/dl)	0.58±0.06	0.53±0.07	0.55±0.05	0.54±0.05	0.54±0.05	0.56±0.05
Ca (mg/dl)	10.3±0.2	10.2±0.1	10.3±0.2	10.4±0.2	10.3±0.2	10.5±0.4
P (mg/dl)	5.76±0.37	5.74±0.17	6.27±0.40 *	6.29±0.26 *	6.09±0.28	6.23±0.66
GOT (IU/l)	108 ±13.9	103 ±6.9	94.2±10.3	92.7±15.6	82.5±6.0 *	78.5±8.2 *
GPT (IU/l)	54.4±6.4	53.2±5.7	51.2±5.5	52.3±5.3	47.8±5.5 *	50.8±5.5
LDH (IU/l)	2218±427	1873±375	1741±628	1614±541	1391±212 *	840 ±321 *
ALP (IU/l)	251 ±15.6	257 ±14.6	257 ±11.4	255 ±13.4	258 ±15.8	252 ±16.0
γ-GTP (IU/l)	0.67±0.65	0.08±0.29	0.08±0.29	0.33±0.65	0.33±0.65	0.42±0.79
ChE (IU/l)	0.42±1.00	0.08±0.29	—	0.42±0.79	0.83±1.59	0.58±1.24
Na (mEq/l)	143 ±0.8	144 ±1.4	143 ±0.6	145 ±1.4 *	145 ±1.6	142 ±1.6
Cl (mEq/l)	103 ±1.0	104 ±1.0	103 ±1.0	104 ±1.0	104 ±1.1	105 ±1.4 **
K (mEq/l)	4.50±0.22	4.40±0.29	4.37±0.31	4.23±0.28	4.28±0.17	4.19±0.52 *
WBC (x10 ² /ul)	43.1±4.9	43.2±5.2	47.7±6.7	49.1±5.4 **	46.4±7.8	48.7±5.6 **
RBC (x10 ⁴ /ul)	1025±38.5	1007±22.2	1005±18.6	1034±33.9	1040±34.3	1047±55.0
Hb (g/dl)	19.3±11.9	15.9±0.3	15.9±0.2	16.4±0.4	16.3±0.45	16.5±0.64
Ht (%)	52.4±1.2	52.1±1.1	51.9±0.7	53.4±1.6	53.6±1.7	54.1±2.6
MCV (fl)	51.6±0.5	51.7±0.4	51.7±0.5	51.6±0.5	51.5±0.5	51.7±0.4

Data represent mean values ± S.D.

— : Not detectable

*, **: Significant difference from the control group at p<0.05 and 0.01, respectively

Table 2. Hematological and serum biochemical data of F344 female rats treated with tannic acid for 13 weeks

Dose (Effective No.)	Control (12)	0.025 % (12)	0.05 % (12)	0.1 % (12)	0.2 % (12)	0.4 % (12)
Alb (g/dl)	4.52±0.22	4.45±0.17	4.54±0.18	4.57±0.20	4.47±0.18	4.43±0.11
TP (g/dl)	6.14±0.25	6.06±0.19	6.26±0.29	6.26±0.22	6.15±0.24	6.13±0.16
A/G	2.82±0.38	2.79±0.24	2.67±0.18	2.73±0.27	2.68±0.25	2.62±0.24
TC (mg/dl)	88.8±6.6	91.9±6.4	82.7±24.0	91.1±5.4	88.5±5.4	88.1±6.0
UN (mg/dl)	16.6±1.4	15.8±1.2	15.1±1.9	16.5±1.5	16.7±1.6	16.8±1.5
CR (mg/dl)	0.50±0.04	0.51±0.05	0.51±0.05	0.51±0.05	0.52±0.06	0.50±0.06
Ca (mg/dl)	10.5±0.2	10.7±0.2	10.6±0.3	10.7±0.3	10.6±0.1	10.7±0.17 *
P (mg/dl)	5.81±0.33	5.13±0.47 **	5.22±0.57 **	5.73±0.40	5.74±0.26	6.07±0.31
GOT (IU/l)	71.3±8.8	62.2±8.1	64.6±14.9	69.2±16.7	61.4±6.3 *	57.1±4.9 *
GPT (IU/l)	41.4±7.9	38.4±3.4	37.8±4.6	38.3±3.6	37.8±4.9	37.8±5.7
LDH (IU/l)	775 ±156	415 ±204 *	510 ±571 *	839 ±155	424 ±199 *	239 ±126 *
ALP (IU/l)	336 ±43.8	312 ±39.2	310 ±35.0	292 ±42.6	316 ±64.8	278 ±22.4 *
γ-GTP (IU/l)	0.83±1.03	0.58±0.67	0.42±0.51	0.67±0.78	0.50±0.67	0.58±0.51
ChE (IU/l)	0.75±0.97	1.17±1.75	0.58±1.16	1.17±1.94	1.42±1.44	1.50±1.31
Na (mEq/l)	142 ±0.8 *	144 ±1.0 *	143 ±2.4	143 ±1.4	142 ±1.09	141 ±1.9
Cl (mEq/l)	105 ±1.11 *	107 ±0.9 *	107 ±1.6 *	107 ±0.8	106 ±0.50	106 ±1.4
K (mEq/l)	3.95±0.21	3.93±0.28	3.92±0.31	4.13±0.19	3.96±0.14	3.95±0.37
WBC (x10 ² /ul)	36.3±7.9	29.8±7.4	29.7±5.2	30.0±7.4	27.9±5.7 **	32.5±3.5
RBC (x10 ⁴ /ul)	898 ±37.0	871 ±21.9	880 ±24.8	865 ±24.6 *	867 ±21.9	870 ±41.8
Hb (g/dl)	14.9±0.5	14.6±0.3	14.8±0.3	14.5±0.4	14.5±0.33	14.7±0.61
Ht (%)	48.6±2.0	47.2±1.1	47.8±1.4	46.9±1.4	47.1±1.3	47.2±2.2
MCV (fl)	54.1±0.34	54.2±0.3	54.4±0.5	54.2±0.4	54.3±0.5	54.3±0.5

Data represent mean values ± S.D.

- : Not detectable

*, **: Significant difference from the control group at p<0.05 and 0.01, respectively

Table 3. Absolute organ weights of F344 male rats treated with tannic acid for 13 weeks

Dose (Effective No.)	Control (12)	0.025 % (12)	0.05 % (12)	0.1 % (12)	0.2 % (12)	0.4 % (12)
Brain	2.02±0.05	2.00±0.05	2.01±0.05	2.03±0.04	2.03±0.06	2.01±0.07
Salv. glands	0.49±0.06	0.48±0.02	0.48±0.04	0.50±0.02	0.48±0.04	0.47±0.03
Thymus	0.22±0.04	0.21±0.04	0.21±0.05	0.23±0.05	0.22±0.04	0.24±0.04
Lung (R)	0.70±0.08	0.67±0.04	0.67±0.05	0.67±0.05	0.67±0.04	0.69±0.03
(L)	0.36±0.05	0.35±0.01	0.35±0.03	0.35±0.03	0.35±0.01	0.34±0.01
Heart	0.97±0.05	0.96±0.04	0.94±0.06	0.94±0.06	0.95±0.04	0.95±0.05
Spleen	0.61±0.04	0.59±0.02	0.60±0.04	0.60±0.04	0.58±0.03 *	0.59±0.03
Liver	8.05±0.52	8.01±0.31	8.02±0.51	8.02±0.51	7.82±0.32	7.81±0.31
Adrenal (R)	0.021±0.003	0.021±0.003	0.021±0.004	0.021±0.004	0.021±0.002	0.021±0.002
(L)	0.021±0.002	0.023±0.003	0.023±0.003	0.020±0.004	0.021±0.002	0.020±0.002
Kidney (R)	0.96±0.04	0.96±0.06	0.96±0.06	0.97±0.05	0.97±0.07	0.96±0.04
(L)	0.96±0.05	0.95±0.07	0.96±0.07	0.98±0.04	0.96±0.05	0.97±0.05
Testis (R)	1.47±0.06	1.46±0.09	1.47±0.06	1.50±0.04	1.44±0.06	1.46±0.05
(L)	1.52±0.06	1.50±0.06	1.48±0.07	1.54±0.08	1.50±0.08	1.48±0.07

Data represent mean values ± S.D.

*: Significant difference from the control group at p<0.05

Table 4. Absolute organ weights of F344 female rats treated with tannic acid for 13 weeks

Dose (Effective No.)	Control (12)	0.025 % (12)	0.05 % (12)	0.1 % (12)	0.2 % (12)	0.4 % (12)
Brain	1.88±0.04	1.85±0.05	1.86±0.04	1.87±0.06	1.88±0.04	1.85±0.05
Salv. glands.	0.39±0.10	0.35±0.03	0.36±0.04	0.36±0.03	0.35±0.03	0.34±0.02
Thymus	0.19±0.02	0.19±0.02	0.19±0.03	0.19±0.03	0.20±0.01	0.20±0.03
Lung (R)	0.52±0.04	0.50±0.04	0.51±0.04	0.53±0.06	0.54±0.09	0.51±0.04
(L)	0.26±0.02	0.26±0.02	0.26±0.01	0.26±0.01	0.26±0.02	0.26±0.01
Heart	0.62±0.05	0.64±0.03	0.61±0.04	0.64±0.05	0.61±0.07	0.64±0.05
Spleen	0.42±0.04	0.40±0.02	0.41±0.03	0.42±0.03	0.43±0.02	0.43±0.04
Liver	5.10±0.25	5.05±0.35	5.02±0.40	4.97±0.35	5.08±0.26	4.89±0.40
Adrenal (R)	0.020±0.003	0.020±0.002	0.021±0.003	0.021±0.003	0.022±0.003	0.021±0.004
(L)	0.021±0.002	0.021±0.003	0.022±0.002	0.022±0.003	0.022±0.003	0.021±0.003
Kidney (R)	0.58±0.04	0.58±0.03	0.58±0.03	0.59±0.05	0.62±0.04	0.61±0.04
(L)	0.59±0.05	0.58±0.03	0.60±0.03	0.59±0.04	0.62±0.04	0.62±0.04

Data represent mean values ± S.D.

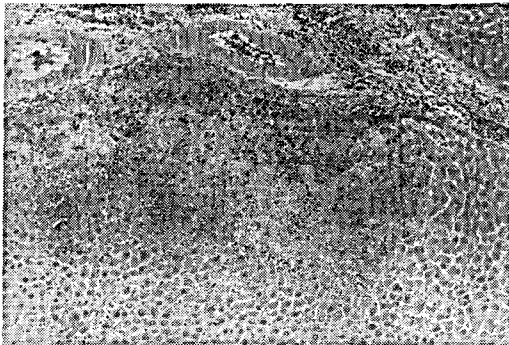


Fig. 5. Focal subcapsular coagulation necrosis of the liver in the F344 rat treated with 0.4 % tannic acid for 13 weeks

6. 病理組織学的検査結果

病理組織学的検査の結果、雄では、肝臓辺縁部の小壊死巣および好酸性小体を持つ変性細胞の出現が、0.025, 0.05, 0.1, 0.2および0.4%投与群にそれぞれ1, 2, 1, 1および3例認められ (Fig. 5), その程度は0.4%投与群で最も強度であった。また、雄の0.4%投与群のみに、腎臓の限局的な尿細管の拡張が3例に認められた。対照群ではこれらの変化は認められなかった。これに対して雌では、いずれの臓器にも検体投与に起因すると思われる病理組織学的変化は認められなかった。

考 察

今回使用したタンニン酸は、五倍子から得た加水分解型タンニン (ガロタンニン) であり、加水分解によ

って D-glucose と gallic acid に分解される。タンニンはラットにおいて肝毒性を有し、急性経口および連続皮下投与で小葉中心性壊死⁴¹⁾、皮下投与で肝線維症および胆管増生など⁶⁾の変化が認められ、同時に血清生化学的所見からも肝機能障害を示す所見が認められている⁴⁾。

本試験において、肝病変がタンニン酸投与群のみに認められているが、これらの病変は肝臓辺縁部の限局性小壊死巣であり、これまでの報告でみられた小葉中心性壊死とは異なっていた。また、投与各群の肝臓の絶対重量および相対重量は対照群と比較して差が認められず、血清生化学的検査における GOT, LDH および ALP など肝機能を反映する項目において測定値の上昇もみられず、むしろ低下傾向を示している。今回の試験でみられた肝病変の程度は最高投与群で最も強いことを考慮すれば、この病変とタンニン酸投与との関連性を否定することはできない。しかしこの肝病変は雄のみにみられ、雌では1例もみられなかったことに加え、肝重量や血清生化学的検査の結果からは、その毒性学的所見は軽度なものであると思われる。0.4%投与群にみられた腎病変もごく軽度であり、尿細管の変性や再生像には対照群との間に差はなく、腎への毒性作用も明瞭ではなかった。今回の試験において急性毒性試験で報告されたような明瞭な肝病変がみられなかったのは、おそらく投与量の違いによるものと思われる。

今回の試験結果から、雌雄とも最高用量である0.4%投与群においても、体重増加抑制が認められず、肝

毒性が疑われるものの、その毒性学的所見は軽度であると考えられたことより、タンニン酸の飲水投与による最大耐量は0.4%を越える量とし、飲水忌避も考慮してがん原性試験における最大耐量を0.5%と決定した。

文 献

- 1) Boyd, E. M.: The acute toxicity of tannic acid administered intragastrically. *Can. med. Ass. J.*, **92**, 1292~1297 (1965)
- 2) Cameron, G. R., Milton, R. F. and Allen, J. W.: Toxicity of tannic acid. An experimental investigation. *Lancet*, **ii**, 179~186 (1943)
- 3) Korpassy, B., Koltay, N. and Horvai, R.: Toxizität peroral verabreichter Gerbstäure. *Wien. Klin. Wochenschrift*, **62**, 270 (1950)
- 4) Texl, A. and Konecny, M.: Hepatotoxic effect of tannic acid and rectobaryum in rats. *Scr. Med. (Brno.)*, **41**, 301~312 (1968)
- 5) Blumenberg, F. W. and Kessler, F. J.: Untersuchungen über die Resorbierbarkeit oral zugeführten Tannins. *Arzneimittel-Forsch.*, **10**, 742~743 (1960)
- 6) Korpassy, B.: Tannins as hepatic carcinogens. *Prog. Exp. Tumor. Res.*, **2**, 245~290 (1961)
- 7) Kirby, K. S.: Induction of tumours by tannin extracts. *Br. J. Cancer*, **14**, 147~150 (1960)
- 8) Mosonyi, M. and Korpassy, B.: Rapid production of malignant hepatomas by simultaneous administration of tannic acid and 2-acetylaminofluorene. *Nature (Lond.)*, **171**, 791 (1953)
- 9) Khan, W. A., Wang, Z. Y., Athar, M., Bickers, D. R. and Mukhtar, H.: Inhibition of the skin tumorigenicity of (\pm)-7 β , 8 α -dihydroxy-9 α , 10 α -epoxy-7, 8, 9, 10-tetrahydrobenzo[a]pyrene by tannic acid, green tea polyphenols and quercetin in senear mice. *Cancer Letters*, **42**, 7~12 (1988)
- 10) 吉村 功：“毒性・薬効データの統計解析”，サイエンティスト社，東京（1987），pp. 28~93
- 11) Horvath, E., Solyom, A. and Korpassy, B.: Histochemical and biochemical studies in acute poisoning with tannic acid. *Brit. J. exp. Path.*, **41**, 298~304 (1960)

Musk xylol の B6C3F1 マウスにおける毒性および癌原性試験

松島裕子・前川昭彦・小野寺博志・渋谷 淳
吉田順一・黒川雄二・林 裕造

Toxicity and Carcinogenicity Studies of Musk xylol in B6C3F1 mouse

Yuko Matsushima, Akihiko Maekawa, Hiroshi Onodera, Makoto Shibutani,
Jun-ichi Yoshida, Yuji Kurokawa and Yuzo Hayashi

Toxicity and carcinogenicity studies of musk xylol were examined in B6C3F1 mice. The LD₅₀ of the chemical was considered to be more than 4000 mg/kg. In the acute toxicity and 14-day repeated-dose oral toxicity studies, tremor was observed in some animals given high doses of the chemical. In the 17-week repeated-dose oral toxicity study, musk xylol was given at dietary dose levels of 0.0375, 0.6%. During the experimental period, almost all mice given 0.3% or more died. There was no difference in the body-weight gain between the treated groups given 0.15% or less and the control group. Histologically, enlargement and irregularity of hepatocyte were found in both sexes given 0.15% or more. Based on the results, the chemical was given at dietary levels of 0 (control), 0.075 or 0.15% for 80 weeks in the carcinogenicity study. Overall tumor incidences in all treated groups of both sexes were significantly higher than those in the respective controls. Combined malignant and benign liver cell tumors increased clearly in both sexes and a significant positive trend for the occurrence of hepatocellular carcinomas was noted in males. Incidences of lung and Harderian gland tumors and lymphomas in treated groups were also slightly higher than those in controls. In addition, incidences and total numbers of malignant tumors increased significantly in treated groups of both sexes, although no dose-relation was evident. The results demonstrated that musk xylol is carcinogenic in B6C3F1 mice of both sexes when given at dose-levels of 0.075 or 0.15% in the diet for 80 weeks.

(Received May 31, 1990)

はじめに

Musk xylol は Fig. 1 に示すような化学構造を有する合成ニトロムスクの一種で、人造ジャコウ香料として石鹸や化粧品などに広く用いられてきた。しかし環境の追跡調査により河川、海の魚類中から musk xylol が検出され、このものが環境汚染物質であるとの報告 (Yamagishi^{1,2}) 以来、自主規制により現在国内では使用されていない。Musk xylol の毒性に関する報告はほとんどないが、同じ合成ニトロムスクの1つである musk ambrette (Fig. 1) はラットに神経毒性を示したとの報告がある (Spencer³)。最近の報告では、TA100 を用いた Ames 試験において、musk ambrette は S9 存在下で陽性を示したが、musk xylol に変異原性は認められていない (Nair⁴)。

本研究は、既存化学物質安全性再評価の一貫として、musk xylol の毒性および癌原性を検討したものである。

実験材料および方法

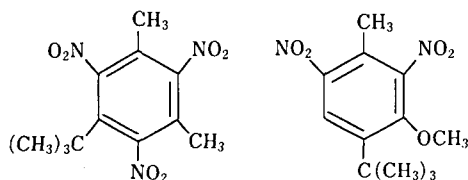
検体: Musk xylol (musk xylene, 2, 4, 6-trinitro-1, 3-dimethyl-5-*tert*-butylbenzene, CAS No. 81-15-2) は中国製品で、高砂香料 (神奈川) より供与されたジャコウ様香気を有する白色、結晶状の粉末であり、純度は96%以上であった。

動物: 雌雄 Crj: B6C3F1 マウス (日本チャールス・リバー・神奈川) を5週齢で入荷し、1週間の馴化飼育後、実験を開始した。

飼育条件および飼料: 動物は、室温 24±1°C、湿度 55±5%、バリアシステム下動物室で飼育し、飼料は CRF-1 粉末飼料 (オリエンタル酵母・東京) を用いた。なお、飲料水はイオン交換水を自由に与えた。

急性毒性試験

Musk xylol は0.25%アラビアゴム溶液に125, 250,



Musk xylol
(2, 4, 6-Trinitro-1, 3-dimethyl-5-*tert*-butylbenzene)

Musk ambrette
(2, 6-Dinitro-3-methoxy-4-*tert*-butyltoluene)

Fig. 1. Chemical structures of musk xylol and musk ambrette

500, 2000 および 4000 mg/kg の用量で溶解し、各群雌雄各5匹に一回強制経口投与した。動物は14日間観察した後に屠殺・剖検し、病理学的検索を行なった。

14日間反復投与毒性試験

動物は各群雌雄各8匹よりなる6群に分け、musk xylol は0 (対照群)、0.3, 0.6, 1.25, 2.5 および5%の割合で CRF-1 粉末飼料に混入し、14日間自由摂取させた。毎日臨床症状と死亡の有無を観察、記録し、投与終了時に全生存動物を屠殺・剖検した。

17週間反復投与毒性 (亜慢性毒性) 試験

動物は各群雌雄各10匹ずつ6群に分け、musk xylol は CRF-1 粉末飼料に0 (対照群)、0.0375, 0.075, 0.15, 0.3 および0.6%の濃度で混入し、17週間自由に与えた。毎日臨床症状および死亡の有無を観察し、投与終了時に全生存動物を屠殺・剖検した。主要臓器および組織は10%中性ホルマリン溶液で固定し、病理組織学的に検索した。

癌原性試験

動物は各群雌雄各50匹よりなる3群に分け、musk xylol は17週間の亜慢性毒性試験の結果に基づき0 (対照群)、0.075 および0.15%の割合で CRF-1 粉末飼料に混入し、80週間自由に摂取させた。動物は毎日観察し、衰弱した動物や死亡例はすみやかに解剖した。体重と摂餌量の測定は実験開始の1カ月間は1回/週、その後は1回/月測定した。検体は80週目まで投与し、その後10週間は全群を基本食で飼育し、90週目に全生存動物を屠殺・剖検し、実験を終了した。解剖時に、赤血球・白血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値を測定し、主要臓器 (肺、心、肝、脾、腎臓、精巣) はその重量を測定し、上記臓器および病変部を含む全臓器・組織は10%中性緩衝ホルマリン溶液で固定し、病理組織学的に検索した。データは Fisher 検定、カイ二乗検定に加え、Peto 等 (1980) により提唱された検定法を用い統計的に解析した。

結 果

急性毒性試験

投与3~18時間後、雌雄 4000 mg/kg 投与群に振せんが見られたが、ほかの群にはなんらの症状もみられなかった。死亡は雌 4000 mg/kg 群に1例みられただけであった。病理組織学的に、いずれの投与群においても明白な毒性病変は見られなかった。この実験結果より musk xylol の LD₅₀ は >4000 mg/kg であると判断した。

14日間反復投与毒性試験

0.6%以上の投与群において、0.6%群の雌1匹を除

くすべての動物が投与後2～4日目に死亡した。これに対し、雌雄対照群と0.3%群では全例が実験期間終了時まで生存した。高濃度群の幾匹かの動物においては死亡前に振せんが認められ、死亡時の剖検所見では胃と小腸に出血が認められた。病理組織学的に、死亡した数匹の動物には腺胃の出血性糜爛がみられた。この病変を除き、脳を含めたほかのすべての臓器に musk xylol が原因と考えられる毒性的病変はみられなかった。

17週間反復投与毒性(亜慢性毒性)試験

雌雄0.6%群の全例と0.3%群の雄8匹および雌の全例が実験期間中に死亡したが、ほかの群に死亡例はみられなかった。0.15%以下の投与群と対照群の間には、全実験期間を通して体重増加および飼料摂取量に有意差はみられなかった。臓器重量について、肝の比重量が雄の0.075%群を除く全投与群で用量相関性はないもののわずかに増加していた。組織学的検索では、雌雄0.15%群に肝細胞の腫大と肝細胞索の乱れがみられたが、肝以外の臓器には投与に起因した毒性病変はみられなかった。少数例の死亡動物の検索では上記肝病変に加え、腺胃粘膜の糜爛が認められた。

この試験結果から、musk xylol の混餌投与における癌原性試験の最大耐量は、雌雄とも0.15%であると判断した。

癌原性試験

体重：雄0.15%群において実験開始4週目より80週目まで対照群に比べ有無に体重増加抑制が認められた。雌においては全群とも実験期間を通してほぼ同じ体重増加を示した (Fig. 2)。

飼料および検体摂取量：検体投与期間中の平均飼料

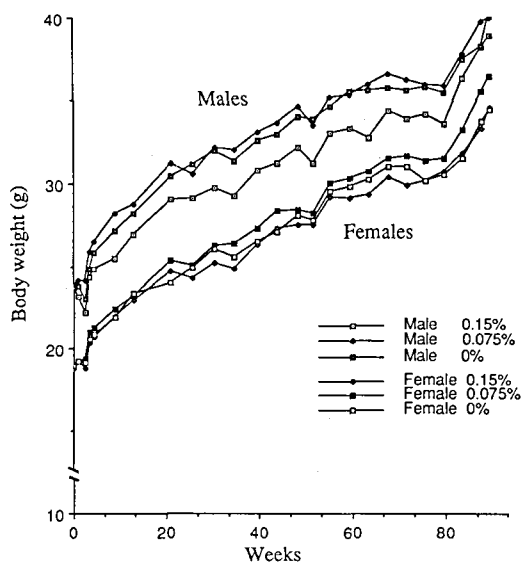


Fig. 2. Growth curves of B6C3F1 mice give musk xylol for 80 wk

摂取量 (g/day/mouse) は雄対照群 3.91, 0.075%群 3.84, 0.15%群 3.37, 雌では対照群 3.60, 0.075%群 3.57および0.15%群 3.30で、雌雄とも0.15%群の摂取量は対照群に比し有意に低かった。摂取量より算出した雌雄一匹あたりの検体総摂取量 (g) は Table 1 に示した。

生存曲線および平均生存期間：雌雄ともに投与群と対照群の間で平均生存期間に有意差は認められず、累積死亡率にも差異は認められなかった (Table 1)。

血液学的検査：雄0.075%群の赤血球数とヘマトクリット値が有意 (p<0.05) の上昇、雌0.15%群のヘモ

Table 1. Total tumor incidence, musk xylol-intake and mean survival time of B6C3F1 mice given musk xylol in the diet for 80 wk

Dose (%)	No. of mice			Mean total musk xylol intake (g/mice/80wk)	Mean survival time and range (wk)
	initial	effective	with tumours		
Males					
0.15	50	47	40**	2.82	89.2 (75-90)
0.075	50	50	37*	1.61	89.0 (66-90)
0	50	49	22	0	89.8 (86-90)
Females					
0.15	50	49	30**	2.76	88.2 (64-90)
0.075	50	50	30**	1.49	86.6 (57-90)
0	50	46	9	0	88.8 (74-90)

* p<0.01 ** P<0.001 (chi-square test) as compared to control value.

Table 2. Sites and types of tumors in B6C3F1 mice given musk xylol in the diet for 80 wk

Site and type of tumours	No. of mice with tumours					
	Males			Females		
	0%	0.075%	0.15%	0%	0.075%	0.15%
Effective no. of mice	49	50	47	46	50	49
Liver						
adenoma	9	19*	20**	1	14***	13***
carcinoma	2	8*	13**	0	1	2
(adenoma/carcinoma)	11	27**	33***	1	15***	15***
hemangioma	0	0	0	2	0	0
hemangioendothelioma	2	0	0	0	0	0
Lung						
adenoma	3	5	6	0	2	2
carcinoma	0	0	0	0	1	0
(adenoma/carcinoma)	3	5	6	0	3	2
Harderian gland						
adenoma	2	9*	10*	3	3	5
carcinoma	1	1	0	0	0	0
(adenoma/carcinoma)	3	10*	10*	3	3	5
Hematopoietic organs						
lymphoma (lymphocytic)	4	4	2	3	5	6
lymphoma (histiocytic)	0	2	0	1	0	2
Testis						
histiocytic sarcoma	0	1	0	-	-	-
Epididymis						
histiocytic sarcoma	0	1	0	-	-	-
Small intestine						
adenoma	1	1	0	0	0	0
Caecum						
signet-ring cell carcinoma	0	0	1	0	0	0
Subcutis						
hemangioma	0	1	0	0	0	0
hemangioendothelioma	0	2	1	0	1	0
fibrosarcoma	0	0	0	0	1	1
Ureter						
transitional cell carcinoma	0	0	1	0	0	0
Preputial/clitoral gland						
squamous cell carcinoma	0	1	0	0	0	0
Adrenal gland						
pheochromocytoma	0	0	0	0	1	0
Forestomach						
papilloma	0	0	0	0	0	1
fibrosarcoma	0	0	0	0	1	0
Uterus						
endometrial stromal polyp	-	-	-	1	1	2
leiomyoma	-	-	-	0	1	0
endometrial stromal sarcoma	-	-	-	0	4	0
Ovary						
hemangioma	-	-	-	1	0	0
Thyroid gland						
follicular adenoma	0	0	1	0	1	0
Spleen						
hemangioma	0	0	0	1	0	0
hemangioendothelioma	0	0	0	1	2	0
Pleural cavity						
osteosarcoma	0	0	0	0	0	1

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ (chi-square test) as compared to control value

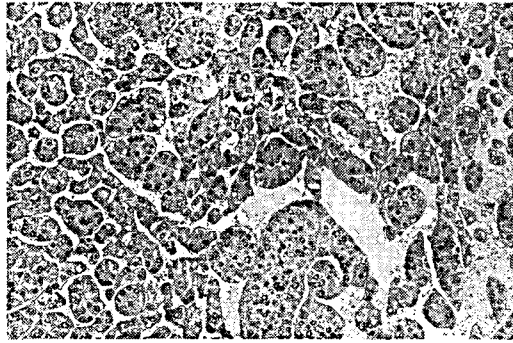


Fig. 3. Well-differentiated hepatocellular carcinoma from a male mouse given 0.15% musk xylol. Tumor cells show typical trabecular pattern, separated by dilated sinusoids. H & E ×40

グロビン量が有意 ($p < 0.01$) の低下を示した。

臓器重量：対照群に比し有意 ($p < 0.05$) の増加を示した臓器は雌雄0.15%群の肝臓，有意 ($p < 0.01$) の減少を示した臓器は雄0.15および0.075%群の腎臓であった。肝重量の増加には雌雄ともに用量相関性が認められた。

病理組織学的検査

腫瘍性病変：雌雄各群における良性，悪性を含めたすべての腫瘍の発生率は雌雄各投与群で対照群に比べ有意 ($p < 0.001$) に増加していた (Table 1)。Table 2 は各群にみられた腫瘍の発生部位，組織型および発生頻度をまとめたものである。腫瘍は対照群を含む雌雄各群で主として肝，ハーダー氏腺，造血臓器および肺にその発生がみられたが，投与群においてはこれらの他にもより多くの種類の腫瘍の発生がみられた。肝細胞腫瘍 (Fig. 3) は雌雄各投与群において，対照群に比べ有意 ($p < 0.001$) に多く発生し，特に雄の肝細胞

癌の発生には明瞭な positive trend がみられた。そのほか，雌雄投与群において肺腫瘍，ハーダー氏腺腫瘍やリンパ腫の発生率の上昇がみられたが，雄ハーダー氏腺腫瘍の場合を除きいずれも有意差はみられなかった。雌0.075%群の子宮内膜肉腫の発生率も対照群に比べ有意に高かったが，0.15%群では一例もその発生がみられなかった。

Table 3 は，雌雄各群にみられた腫瘍のうち，悪性腫瘍のみについてその総数および発生率をまとめたものである。悪性腫瘍の発生率やその総数も雌雄投与群で対照群に比べ有意に高かったが，いずれも用量相関性ははっきりしなかった。

非腫瘍性病変：対照群を含む雌雄全群に幾つかの非腫瘍性病変がみられたが，それらの発生にはっきりとした群間の差はみられなかった。

考 察

Musk xylol の毒性に関してはこれまでほとんど報告がないが，同じニトロムスクの musk ambrette は神経毒性作用を示し，混餌投与または皮膚塗布によりラットの中脳および末梢神経に脱髄および軸索変性を引き起こすことを報告している (Spencer²¹)。今回の急性毒性や14日間経口投与反復毒性試験においても高濃度投与群で振せん等の神経症状がみられている。しかしながら，これら試験はもちろん，17週間反復毒性試験および癌原性試験においても投与群の神経系 (大脳，脊髄) になんら毒性所見はみられなかった。これらの事より musk xylol の神経毒性作用を完全に否定することはできないが，もしあったとしてもその作用は musk ambrette よりはるかに弱いものと考えられる。急性毒性，14日間および17週間反復投与毒性試験の結果から，musk xylol を大量に投与すると消化管に出血をきたし，また肝細胞の大小不同や腫大をきた

Table 3. Total malignant tumor incidence in B6C3F1 mice given musk xylol in the diet for 80 wk

Dose(%)	Males			Females		
	0	0.075	0.15	0	0.075	0.15
Effective no. of mice	49	50	47	46	50	49
No. of animals with malignant tumours	9	17	17*	5	14*	12
Total no. of malignant tumours	9 (4)**	20* (7)	18* (6)	5 (4)	16* (6)	12 (9)
Types of malignant tumours	4	7	5	3	6	5

* $p < 0.05$ (chi-square test) as compared to control value.

** No. in parentheses are tumours with metastasis in remote organs

す事が明かとなった。Musk xylol はモルモット⁵⁾やヒトでの closed-patch test⁶⁾ で弱いながらも皮膚刺激性のあることが報告されており、消化管出血や糜爛はこのものの直接刺激作用によるものと考えられる。癌原性試験でみられた非腫瘍性病変はこの系統の老齢マウスに自然発生する病変と同じであり (Ward⁷⁾), musk xylol 投与に起因すると考えられる特異的病変は認められなかった。雄投与群の腎重量減少を裏づける明瞭な組織学的所見はみられなかった。肝においては、17週間反復投与毒性試験でみられたような肝細胞の腫大や大小不同ははっきりせず、投与群における肝重量の増加は肝腫瘍に起因するものと考えられた。血液学的検査でもいくつかのパラメータに変動がみられたが、いずれも用量相関はなく、毒性的に意義のある変化ではなかった。

今回の試験で用いた B6C3F1 マウスは肝、造血臓器、肺やハーダー氏腺等に自然発生腫瘍が好発する系統であることは良く知られている (Ward⁷⁾, Tamano⁸⁾)。雌雄検体投与群ではこれら自然発生好発腫瘍の発生率の上昇がみられ、肝細胞性腫瘍において最も顕著であった。また、発生率は低いが、投与群においてより多くの臓器・組織に種々の腫瘍発生がみられた。加えて雌雄投与群で、用量相関性はみられなかったものの悪性腫瘍の発生率および総数が、対照群に比べ有意に高かった。これらの実験結果より、musk xylol は0.075 または0.15%の濃度で飼料に混じり80週間与えたとき、雌雄 B6C3F1 マウスに癌原性を示すことが結論された。

近年、musk xylol を含むニトロムスクが河川、海の水類および水試料中より検出され、これらが生物蓄積性の環境汚染物質である事が明らかとなっている (Yamagishi²⁾, Yurawecz & Puma⁹⁾)。河川の魚や水試料中から検出される musk xylol の濃度はおよそ0.2 ppm であり、この濃度は同一試料から検出されたほかの環境汚染物質であるデイルドリン (0.011 ppm) や p, p'-DDE (0.015 ppm) に比べればはるかに高い濃度であった (Yamagishi¹⁾)。また Nair⁴⁾ は musk xylol が、噛みタバコ (Indian chewing tobacco & betel quid.) 中に比較的高濃度 (0.45~0.79 mg/g wet wt) 含まれていると報告している。今回の癌原性試験における摂餌量から算出した musk xylol の1日摂取量は、雄0.075 および0.15%投与群でそれぞれ91 mg/kg/日 (70~125) および170 mg/kg/日 (141~228)、雌0.075 および0.15%投与群で101 mg/kg/日 (80~143) および192.8 mg/kg/日 (166~259) であ

った。これらの量は環境中に存在する musk xylol の量より予想されるヒトへの曝露量と比べはるかに高い量ではあるが、この事はヒトにおける musk xylol の発癌危険度を完全に除外することにはならない。また musk xylol は他のニトロムスクとともに相乗的に作用する可能性も考えられ、今後特に水質環境中における musk xylol を含めたニトロムスクの追跡調査が必要であろう。

文 献

- 1) Yamagishi, T., Miyazaki, T., Horii, S. and Kaneko, S.: Identification of musk xylene and musk ketone in fresh-water fish collected from the Tama river, Tokyo. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **26**, 656~662 (1981)
- 2) Yamagishi, T., Miyazaki, T., Horii, S. and Akiyama, K.: Synthetic musk residues in biota and water from Tama river and Tokyo bay (Japan). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **12**, 83~89 (1983)
- 3) Spencer, P. S., Bischoff-Fenton, M. C., Moreno, O. M., Opdyke, D. L. and Ford, R. A.: Neurotoxic properties of musk ambrette. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **75**, 571~575 (1984)
- 4) Nair, J., Ohshima, H., Malaveille, C., Friesen, M., O'Neill, I. K., Hautefeuille, A. and Bartsch, H.: Identification, occurrence and mutagenicity in *Salmonella typhimurium* of two synthetic nitroarenes, musk ambrette and musk xylol, in Indian chewing tobacco and betel quid. *Fd Chem. Toxicol.*, **24**, 27~31 (1986)
- 5) Parker, R. D., Buehler, E. V. and Newmann E. A.: Phototoxicity, photoallergy, and contact sensitization of nitro musk perfume raw materials, *Contact Dermatitis*, **14**, 103~109 (1986)
- 6) Opdyke, D. L. J.: Fragrance raw materials monographs (musk xylol.). *Fd Cosmet. Toxicol.*, **13**, 881 (1975)
- 7) Ward, J. M., Goodman, D. G., Squire, R. A., Chu, K. C. and Linhart, M. S.: Neoplastic and nonneoplastic lesions in aging (C57BL/6N × C3H/HeN) F1 (B6C3F1) mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, **63**, 849~854 (1979)
- 8) Tamano, S., Hagiwara, A., Shibata, M., Kurata, Y., Fukushima, S. and Ito, N.: Spontaneous tumors in aging (C57BL/6N × C3H/HeN) F1 (B6C3F1) mice. *Toxicol. Pathol.*, **16**, 321~326 (1988)
- 9) Yurawecz, M. P. and Puma, B. J.: Nitro musk fragrances as potential contaminants in pesticide residue analysis. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **66**, 241~247 (1983)

キトサンの製剤素材としての利用 アルギン酸ナトリウムの添加効果

宮崎玉樹・小室徹雄・四方田千佳子・岡田敏史

Usage of Chitosan as a Pharmaceutical Material Effectiveness as an additional additives of sodium alginate

Tamaki Miyazaki, Tetsuo Komuro, Chikako Yomota and Satoshi Okada

Application of chitosan, a deacetylated compound of chitin obtained from shells of shrimps, was investigated with reference to the pharmaceutical excipient for directly compressed tablets.

Several drugs were chosen as model compounds and their *in vitro* dissolution tests were carried out according to the JP XI dissolution test. When chitosan was used alone as an excipient, immediate-release tablets were obtained, as already reported. But when more than 5% of sodium alginate, 1000 cps, was added as excipient, tablets showed an extended-release property under the present experimental conditions.

(Received May 31, 1990)

甲殻類や昆虫類の外殻などから得られるキチンとその脱アセチル化物キトサンは多量に存在する天然高分子資源であることから、その有効利用を模索しての研究が多く分野でなされている¹⁾。製剤分野においても、キチン・キトサンの持つ特性を活かすような製剤素材への有効利用に関する応用研究がなされてはいるが²⁻¹³⁾未解決の部分が多い。

著者らはこれまでに、キトサンのみを賦形剤として製錠した場合は錠剤が速やかに崩壊するため、速放性製剤賦形剤として有効であるという *in vitro* 溶出試験結果を得ている。今回はさらに、この素材が徐放性製剤用賦形剤として利用できるかどうかを検討した。キトサンの構造はセルロースに類似した多糖体であるが、水溶液中で正に解離するアミノ基を分子内に持つため、負電荷を持つ物質を共存させれば反応しあい、錠剤の崩壊を抑えることが出来るのではないかと考えた。また、キトサンが酸性溶液中でゲル化する性質を有していることも徐放化には有利に働くものと予測された。そこで食品分野で増粘剤として繁用されているカルボキシル基を有するアルギン酸ナトリウムを用いてその有効性を検討した。

実験材料および実験方法

1. 試料・試薬

キトサン 90 L (脱アセチル化度90%, 粘度 71 cps) は(株)加ト吉からの供与品を用いた。アルギン酸ナトリウムはシグマ社 (3500, 14000 cps: 25℃における2%

溶液の粘度) および半井化学 (300, 1000 cps: 20℃における1%溶液の粘度) のを用いた。その他の試薬および薬物は市販の試薬特級品または局方品を用いた。

2. 直打錠の製法

直接粉末打錠(直打錠)は、赤外測定用臭化カリウム錠剤成形器(島津製作所製)とハンドプレス(島津製作所製 SSP-10A)を用いて打錠圧 560 kg/cm² で製錠した。得られた錠剤のサイズは直径 13 mm, 厚さ約 1.6 mm であった。1錠当たりの主薬含量は 20mg で、キトサンとアルギン酸ナトリウムを各々加えて全量を 300mg とした。

3. 溶出試験

in vitro 溶出試験は自動溶出試験システム(富山産業株式会社)を用い、第十一改正日本薬局方・溶出試験第2法(パドル法)に準拠して行った。パドル回転数は 100 rpm に固定、試験液には 0.025 M リン酸塩緩衝液 (pH 6.8) 900 ml を用いた。溶出試験は少なくとも 3 回以上繰り返し実施し、結果はそれらの平均値で示した。バラツキはいずれの実験結果においても数%以内であったので、特にグラフ中には示さなかった。

実験結果

1. 薬物の溶出速度に及ぼすアルギン酸ナトリウムの添加効果

粘度の異なる 4 種のアルギン酸ナトリウムを用い、それら粘度の差異が薬物の *in vitro* 溶出挙動に及ぼ

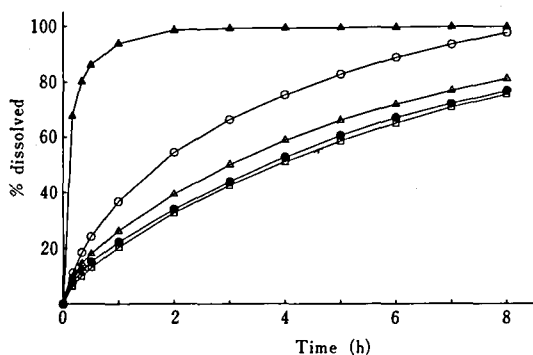


Fig. 1. Effect of alginate viscosity on the dissolution rate of thiobarbituric acid

○: without alginate, △: 300 cps, □: 1000 cps
●: 3500 cps, ▲: 14000 cps

Dissolution tests were carried out in 900 ml of 0.025 M phosphate buffer (pH 6.8) at 100 rpm by the PD method. As additives each tablet contained chitosan 90 L with or without sodium alginate.

す影響を検討した。モデル薬物には 2-チオバルビツール酸を用い、これにアルギン酸ナトリウム 15 mg (5%相当分) とキトサン 90 L 265 mg とを加えて製した直打錠からの溶出試験結果を Fig. 1 に示した。

Fig. 1 から明らかなように 14000 cps のアルギン酸ナトリウムを用いた場合は試験開始後速やかに錠剤崩壊が起こったが、300 cps では徐放化効果が認められ、1000 あるいは 3500 cps の場合にはさらに強い徐放化効果が認められた。

2. 薬物の溶出速度に及ぼすアルギン酸ナトリウムの添加量の影響

上記実験で強い徐放化効果が認められたアルギン酸ナトリウムのうち、規格品として入手しやすい 1000 cps のものを用いて、その添加量が徐放化効果に及ぼ

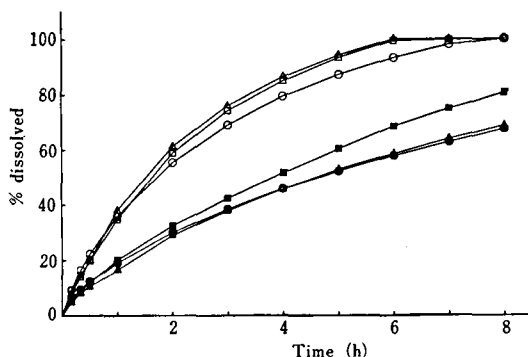


Fig. 2. Effect of alginates contents on the dissolution rate of thiobarbituric acid

○: without alginate, △: 1%, □: 2.5%, ●: 5%
▲: 10%, ■: 20%

Dissolution tests were carried out in 900 ml of 0.025 M phosphate buffer (pH 6.8) at 100 rpm by the PD method. As additives each tablet contained chitosan 90 L with or without sodium alginate.

す影響について検討した。モデル薬物には上記実験系と同様 2-チオバルビツール酸を用いたが、キトサン 90 L の含量は加えたアルギン酸ナトリウムの添加量に応じて加減し、全量 300 mg の錠剤を製した。得られた結果を Fig. 2 に示した。

アルギン酸ナトリウム添加量を 1~20% と変化させて検討した結果、5% 以上添加することにより良好な徐放化効果が得られた。ただし本実験における 20% 添加の場合には徐放効果が若干低下していることから、逆に崩壊促進剤としての効果が発現する可能性もあることが示された。

3. 薬物の特性とアルギン酸ナトリウムの添加効果

アルギン酸ナトリウムの徐放化効果がどの種の薬物で期待できるかを、水に対する溶解度あるいは pK_a

Table 1. Effect of alginate on the dissolution rate of drugs

Drug	1		2		3		4		5		6		7	
	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
T30(min)	<10	70	<10	105	55	>360	70	105	30	75	56	120	25	105
T50(min)	<10	135	10	240	115	>360	135	240	60	158	105	270	50	210
T70(min)	<10	210	23	>360	198	>360	*	>360	105	300	180	>360	90	360
Solubility(ml/g)	170		18		**		460		133		88		120	
pK_a	5.0		4.9		4.5		2.8		4.8		6.3		8.6	

Dissolution tests were carried out in 900 ml of 0.025 M phosphate buffer (pH 6.8) at 100 rpm by the PD method. As additives each tablet contained chitosan 90 L with or without sodium alginate.

Drug 1: p-aminobenzoic acid, 2: aminopyrine, 3: indomethacin, 4: salicylic acid, 5: sulfanilamide
6: 2-thiobarbituric acid, 7: theophylline

* not tested, ** Practically insoluble

値の異なる薬物7種を用いて検討した。得られた結果を Table 1 に示した。

T_{50} (薬物が50% 溶出するのに要する時間) で溶出速度を比較すると今回用いたモデル薬物の場合、本実験条件下では、それら薬物の溶出速度と溶解度あるいは pK_a 値との間に相関性は認められなかった。しかしいずれの薬物でも T_{30} , T_{50} , T_{70} 値において明らかに遅延していると言う結果を得た。

考 察

これまでキトサンを製剤に利用する研究は種々なされているが、特定の薬物を用いての実験系が多い^{2,4,11,12)}。そこで、薬物の特性をも考慮するため数種のモデル薬物を用いてキトサン直打錠を製造し、*in vitro* 溶出試験を行った。賦形剤としてキトサンを単独で用いた場合はこれまでも指摘されているように^{8,13)}、崩壊促進剤として作用するが、アルギン酸ナトリウムを共存させると錠剤の崩壊を抑える可能性が示された。キトサンの有する2位のアミノ基とアルギン酸ナトリウムのカルボキシル基が水溶液中で解離し、相互作用することで複合体を形成したためと考えられる。このことは、クエン酸あるいはアジピン酸を賦形剤に共存させると錠剤の崩壊が抑制され、徐放化効果が認められたというこれまでの報告結果^{11,13)}からも理解できるように、クエン酸やアジピン酸も同様に分子内にカルボキシル基を持っていることから、水溶液中で負に解離する官能基を有する添加剤の共存が大きく効いているものと言える。

同じアルギン酸ナトリウムでも粘度によって作用に差が認められた。高分子物質は、鎖長や分子形態などの違いによって粘度が変化する。キトサンとの反応においては、それらの点も考慮すべき因子と考えられる。詳細に関しては今後の検討が必要である。

今回使用した7種の薬物に関しては、いずれの場合にも良好な徐放化効果が認められた。しかし今回行った実験範囲内では、薬物の分子構造、 pK_a 値あるいは溶解度のいずれもキトサン錠からの主薬の溶出速度とは、特に認められるような相関性はなかった。この点に関してはひきつづき検討したい。また製錠に際しては賦形剤の量が可能な限り少ないほうが望ましいこと、打錠圧は実生産レベルを考慮した場合できるだけ低いほうが望ましいことなど、今回の実験条件にはいくつかの問題点が認められた。他の添加剤との混合処方を含め、今後さらに製法に改良を加えていく予定である。

文 献

- 1) “別冊フードケミカル-1 キチン/キトサンの科学”, 食品化学新聞社, 東京 (1987)
- 2) Sawayanagi, Y., Nambu, N. and Nagai, T.: Directly Compressed Tablets containing Chitin or Chitosan in Addition to Lactose or Potato Starch. *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 2935~2940 (1982)
- 3) Sawayanagi, Y., Nambu, N. and Nagai, T.: Directly Compressed Tablets containing Chitin or Chitosan in Addition to Mannitol. *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 4216~4218 (1982)
- 4) Sawayanagi, Y., Nambu, N. and Nagai, T.: Dissolution Properties and Bioavailability of Phenytoin from Ground Mixtures with Chitin and Chitosan. *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 2064~2068 (1983)
- 5) Kawashima, Y., Handa, T., Kasai, A., Takenaka, H. and S. Y. Lin: The Effects of Thickness and Hardness of the Coating Film on the Drug Release Rate of Theophylline Granules Coated with Chitosan-Sodium Tripolyphosphate Complex. *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 2469~2474 (1985)
- 6) Sawayanagi, Y., Nambu, N. and Nagai, T.: Enhancement of Dissolution Properties of Griseofulvin from Ground Mixtures with Chitin or Chitosan. *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 4464~4467 (1982)
- 7) Shiraiishi, S., Arahira, M., Imai, T. and Otagiri, M.: Enhancement of dissolution rates of several drugs by low-molecular chitosan and alginate. *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 185~187 (1990)
- 8) F., Acarturk: Preparation of a prolonged-release tablet formulation of diclofenac sodium. *Pharmazie*, **44**, 547~549 (1989)
- 9) F., Acarturk: Preparation of a prolonged-release tablet formulation of diclofenac sodium. *Pharmazie*, **44**, 621~622 (1989)
- 10) A. G., Nigalaye, P., Adusumilli and S., Bolton; Investigation of prolonged drug release from matrix formulations of chitosan. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **16**, 449~467 (1990)
- 11) Kawashima, Y., S. Y. Lin, Kasai, A., Handa, T. and Takenaka, H.: Preparation of a Prolonged Release Tablet of Aspirin with Chitosan. *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 2107~2113 (1985)
- 12) W. M. Hou, Miyazaki, S., Takada, M. and Komai, T.: Sustained Release of Indomethacin from Chitosan Granules. *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 3986~3992 (1985)
- 13) 宮崎玉樹, 小室徹雄, 四方田千佳子, 岡田敏史: キトサンの製剤への利用, 第4回キチン・キトサン・シンポジウム, 京都 (1990.5)

ニクズクの薄層クロマトグラフ法による確認試験法の
確立と日本薬局方外生薬規格への導入

鈴木英世・原田正敏

Identification of Nutmeg by Thin-Layer Chromatography and Its Introduction
to Japanese Standards for Non-pharmacopoeial Crude Drugs

Hideyo Suzuki and Masatoshi Harada

When nutmeg was extracted with hot methanol and cooled, much precipitate was produced. The colorless crystals, obtained on recrystallization, were identified as trimyristin by spectroscopic means and by direct comparison with the standard. Then, the identification of nutmeg was established by using the same extraction as above and subjecting the precipitate to thin-layer chromatography. This method was newly introduced to the Standards for Non-pharmacopoeial Crude Drugs.

(Received May 31, 1990)

はじめに

生薬ニクズクは、日本薬局方外生薬規格¹⁾に記載されており、胃腸薬に配合される。その基原として、インドネシア、シンガポール、スリランカ、中国南部などに産する *Miristica fragrans* Houttuyn (*Myristicaceae*) の種子が当てられている。これはナツメグとしてよく知られており、薬用には種皮を除いて使われる。また、ニクズクの仮種皮であるメースについては、Ozaki らによって成分の myristicin に抗炎症作用が確かめられた²⁾。著者らは、同規格の改定作業に関わり、これまで設定されていなかったニクズクの確認試験法を検討した。ニクズクの成分として、精油には *d*-caphene, *d*- α -pinene, dipentene, *d*-borneol, geraniol, safrole, myristicin が含まれ、脂肪油には oleic acid その他 glyceride が含まれ、多くは trimyristin (Fig. 1) からなっていることが知られている³⁾。ここでは、できるだけ特徴のあるニクズクの成分を目標に確認方法を設定し、日本薬局方外生薬規格への取載を企画した。

実験材料および方法

1. 生薬および試薬

ニクズク：東京市場から入手したセイロン産のもの
およびインドネシア市場で入手したもの。

trimyristin: Sigma Chemical Co. 製。

2. 薄層クロマトグラフ法

薄層板：Merck 社製，TLC plates silicagel 60 10
×20 cm，厚さ 0.25 mm。展開溶媒：クロロホルム・
ヘキサン混液 (7:3)。検出：ヨード蒸気。

3. 核磁気共鳴装置

本体：日本電子製 JEOL FX-200 型 (¹³C, 50.1 M
Hz)。

4. ガスクロマトグラフ法

日立製作所製 063 型ガスクロマトグラフを用いた。
検出：水素炎イオン化検出器。カラム：ガラス製 (内
径 3 mm×長さ 2m) のカラム管に，Chromosorb G
(AW-DMGS, 80~100 ムッシュ) に OV-101 を 2%
コーティングした担体を充填した。キャリアーガス：
窒素を用い，流速 30 ml/min で流した。カラム温度：
200°C。注入口および検出器の温度：250°C。

5. マスクロマトグラフ法

日本電子製 JMS. DX300 型質量分析計を用いた。
イオン化電圧：70 eV。測定：EI-直接注入法。

6. 成分分析

ニクズク (スリランカ産) の種皮を除き，乳鉢を用
いて粉碎した。粉末 2.5 g にメタノール 25 ml を加
えて還流抽出を 1 時間行った。温時ろ過してろ液と残

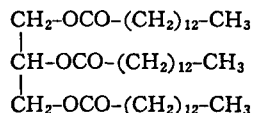


Fig. 1. Structure of trimyristin

渣に分けた。残渣はさらにメタノール 25 ml を用いて 2 回同様に抽出を行った。ろ液部分にクロロホルムを加えて析出物を溶かして、それらを合併し、減圧下溶媒留去した(残留物 1.07 g, 収量 42%)。残留物をクロロホルム 100 ml に溶かし、その溶液を 10% 炭酸水素ナトリウム溶液 30 ml で 2 回、分配処理をして酸性成分を除いた。このクロロホルム層を水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧下留去した(残留物 0.74 g, 収量 29%)。さらにこの残留物にメタノール 10 ml を加え、加温して溶かし、2 時間放置後、析出した結晶(仮称 MA)を減圧吸引してガラスフィルター上に集めた(結晶 0.16 g, 収率 6%)。

MA の性状

無色粒状結晶。融点 56°C。

IR $\nu_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$ cm⁻¹: 1735, 1160 (ester)

MS m/z (%) : 722 (M⁺, 0.03, C₁₇H₃₂O₂), 495 (59), 211 (100, CO(CH₂)₁₂CH₃)。

¹H-NMR(CDCl₃, δ) : 0.88 (9H, s-like), 1.26 (br. s, highest signal), 2.31 (6H, t, δ=7), 4.14 (2H, d, δ=6, 12), 4.28 (2H, d, d, δ=4, 12), 5.29 (1H, m)。

¹³C-NMR(CDCl₃, δ) : 13.72 (q), 13.83 (q), 14.03 (q), 22.56~34.15 (many peaks), 62.04 (t), 68.90 (d)。

7. MA の加水分解

MA 10 mg に水酸化カリウムの 10% エタノール溶液 2 ml を加え、還流抽出器を付け 1 時間加熱した。反応液に希硫酸を加えて酸性とし、エーテルで抽出し、エーテル層を濃縮し、常法により製したジアゾメタン溶液を添加、1 時間放置して GC 試験溶液を調製した。

結果および考察

1. MA の構造

¹H-NMR より、δ 1.26 にメチレン連鎖に由来するシグナルを認め、δ 0.88 に 9H 分のシグレット様のシグナルが見られ、3 個のメチル基の存在が予想された。また、¹³C-NMR においても δ 13.72, 13.83, 14.03 のシグナルより、3 組のメチル基が認められた。¹H-NMR における δ 4.14 (2H, d, d, δ=6, 12), 4.28 (2H, d, d, δ=4, 12) から 2 組の酸素官能基に付いたメチレンが見られ、δ 5.29 (1H, m) にそれらメチレンの中間に位置すると推定されるメチンプロトンが見られた。¹³C-NMR においても δ 62.04 (t) と δ 68.90 (d) のシグナルが見られることより、-O-CH₂-CH(-O)-CH₂-O- の存在が一層強く示唆された。さらに MA の加水分解で得た酸性部のメチル化合物はガスクロマトグラフ法でピークとして出現するのは t_R 9.2 min のみのものであり、myristic acid から

誘導したメチル体の t_R と一致した。

また、IR でエステル結合が見られることも考慮にいと、MA は myristic acid を構成要素として持つ triglyceride と考えられた。これは、MS の結果からも支持された。

最後に、MA の薄層クロマトグラフ法を実施したところ R_f 値 0.6 付近に黄色のスポットを認め、これは同時に展開した標品の trimyristin のスポットと R_f 値が一致し、同定は完全になった。

2. trimyristin の薄層クロマトグラフ法

trimyristin の薄層板上のスポットの確認に、1) 希硫酸の噴霧、加熱の処理; 2) 2% dichlorofluorescein 噴霧、紫外線照射; 3) ヨウ素蒸気処理、を行ったところ、汎用される一般的な 1) 法ではほとんどスポットが確認できなかった。リピド類の検出に使われる 2) 法⁴⁾では感度が低かった。そのうち、3) 法が最も感度が高く、これを検出に採用した。本法の検出限度はスポット量として、約 0.5 μg であった。

Fig. 2 に、標品の trimyristin, MA およびニクズクに適用した例を示した。trimyristin はかなり特徴的なスポットとして確認された。この確認試験はスリランカ産のニクズクの他インドネシア産のものでも実施し、同様な結果を得た。さらにニクズクの確認試験は、日本生薬連合会に加盟している東京および大阪の複数の会社でも実施された。

3. 日本薬局方外生薬規格に導入された確認試験法¹⁾

(1) 本品の粉末 1 g にメタノール 10 ml を加え、水浴上で 3 分間加温した後、温時、ろ過する。ろ過を氷水中で 10 分間放置するとき、白色の沈殿を生じる。

(2) (1) で生じた沈殿にクロロホルム 5 ml を加え溶かし、試料溶液とする。この液につき、薄層クロマト

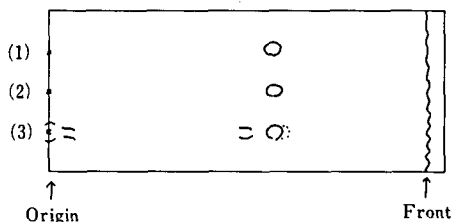


Fig. 2. Thin-layer chromatography of trimyristin in nutmegs

TLC plate: silica gel 60 (Merck), Solvent: chloroform: *n*-hexane (7 : 3), Detection: Iodine vapor, (1): Standard trimyristin, (2): Trimyristin isolated, (3): Precipitate from the methanol ext. of nutmeg (Sri Lanka)

グラフ法により試験を行う。試料溶液 2 μ l を薄層クロマトグラフ用シリカゲルを用いて調製した薄層板にスポットする。次にクロロホルム・ヘキサン混液 (7:3) を展開溶媒として約 10 cm 展開した後、薄層板を風乾する。これをヨウ素蒸気にさらすとき、*R_f* 値 0.6 付近に黄色のスポットを認める。

ま と め

ニクズクの確認試験方法を局方外生薬規格に導入するために検討した。本確認試験法では、先ず温時メタノール抽出、放冷により、難溶性の trimyristin 類の析出を調べる。ついで析出物につき、薄層クロマトグラフ法を適用して、trimyristin の存在を確認する。本物質はヨウ素蒸気にさらして検出されるが、感度はかなり良好である。

謝辞：本研究にあたり確認試験法の追試および意見

の交換をしていただきました日本生薬連合会の関係者の方々に深謝致します。本研究の一部は厚生科学研究 (昭和 61~63 年度、局方外生薬の品質確保に関する研究) の補助金により行われた、ここに記して感謝の意を表します。

文 献

- 1) 厚生省薬務局審査第二課監修：日本薬局方外生薬規格，p. 69 (1989)，薬事日報社
- 2) Ozaki, Y., Soedigdo, S., Wattimena, Y. R. and Suganda, A. G.: *Japan J. Pharmacol.*, **49**, 155 (1989)
- 3) 難波恒雄著：“原色和漢薬図鑑”，(上)，p. 245 (1980)，保育社
- 4) Stahl, E.: *Thin-Layer Chromatography*”, 2nd edition, Translated by M. R. F. Ashworth, p. 866 (1969) Springer-Verlag, Berlin

プラズマプレイ方式 LC/MS 用プローブデバイスの作製

叶多謙蔵

Studies on a Modified Plasmaspray LC/MS Device

Kenzo Kanohta

A probe device for LC/MS interface for a sector type mass spectrometer by VG Analytical Ltd. is described.

The probe capillary for introduction of LC eluent to the ion source has a coaxial structure, ie. outer and inner capillary.

The outer capillary is made of stainless steel to heat the probe, while the inner fused silica capillary has the role of insulating the eluent from the high voltage of the ion source. This prevents the eluent from excess electric charge which causes discharge of ions and disturbs MS experiments.

The device also contributes to easy management and quick diagnosis as the structure of the probe is simple compared to the original and the duplicate structure of the capillaries make it possible to examine the probe facilities without taking off the interface from the ion source.

The cleaning of the probe is also easily accomplished by the use of another fused silica capillary.

(Received May 31, 1990)

ま え が き

2つの分析機器を連結運用して両者の利点を強調する一方両者の欠点は相補作用で消えるいわゆる HYPHENATED METHOD OF CHEMICAL ANALYSIS はガスクロマトグラフ/質量分析法をもって嚆矢とするといつてよいであろう。

このダブルヘッダー式機器分析法は分析手順、分析感度の両面にわたって画期的な技術革新をはたした。

液体クロマトグラフィー (LCあるいはHPLC) では適用可能な化合物種はガスクロマトグラフィーに比べ広い範囲にわたり、最近では蛋白質のような高分子量物質までもが質量分析計 (MS) で分析可能となり、LC と組み合わせることで多方面の研究分野でブレークスルーがはたされると期待できる。

現在報告されている種々の HPLC/MS 用インターフェースのうち通常の LC 条件がそのまま MS でも適用できるサーモプレイ方式 (TSP) が最も有望な

ものの1つとされているといっただけでよいであろうが¹⁾、その改良品として VG Analytical 社 (VG) はプローブ・ノズル部に 650 ボルト以下の電圧を印加するプラズマスプレイ・インターフェース (PSP) を発表した。Shackleton らはこのデバイスが溶離液の選択にあたって極性溶媒に限定される TSP と異なり溶媒の選択が広範囲にわたり有用であるとしており²⁾、著者がこれを入手して実験したところ、分析感度などの点では明らかに TSP 方式と比べてすぐれているのが認められたが、装置の不安定、使いにくさなど改良すべき点のあることも見いだした。

またこの方式でのイオン化法についても種々の考察を行ない、いくつかのプロトタイプにつき実験して、安定な性能を示すデバイスを作製できたのでここに報告する。

実験装置ならびに LC/MS 用インターフェース・プローブの作製

MS は VG 社製 ZAB-2SEQ 型を用い、LC/MS 用インターフェースのプローブ部、高電圧電源部およびプローブ加熱部、TSP・PSP の3部からなる PSP 装置のうち、後2者は VG 製品をそのまま使用した³⁾。

LC 用ポンプには日本分光佛製 880-PU 型を、また時に応じて同社製 UV/可視光検出器 875-UV 型を用いた。使用した LC 用カラムは Supelco 社製 LC-18DB (4.6 mm id. × 15 cm, 粒子径 5 μm) その他を、またヒューズド・シリカ素管は水系溶媒に弱いので必要なときには同社製 GC 用ヒューズド・シリカ・キャピラリーカラム OV-1 (0.2 mm id., 0.35 mm od.) を使用した。

LC/MS 用プローブとしては VG 社製の最新版あるいは MK 4 型リムーバブルキャピラリー型の代わりに、著者の考案になる例えば 0.71 mm od., 0.41 mm id. 長さ 40 cm のステンレスキャピラリーが装着できるように改造した。またキャピラリーは 0.5 mm od. のドリルを用いて先端 5 mm 長部の径を大きくした。

このキャピラリーの両端間の電気抵抗はほぼ 1.3 Ω で、VG 社製プローブ加熱用付属装置がそのまま使用できるように調節した。

実験結果

このプローブを用いる LC/MS 実験法としては、0.2 mm id., 0.35 mm od., 長さ約 80 cm のヒューズド・シリカ・キャピラリー素管の1端はグラファイト・ベスベル・フェラルを用いて液洩れのないよう移動相溶出部端子に装着し、他方の先端はほぼプローブ

のステンレス・キャピラリーの先端に位置するように挿入する。この両者の内・外径の関係ではプローブ加熱による LC 溶離液の気化によってプローブへのバック・プレッシャーにかかわるヒューズド・シリカの飛び出し現象は起こらない。もしシリカキャピラリーが飛び出すようであればステンレスの先端に目づまりが生じているからであり、先端を太くしている理由はそのような事態を起こりにくくすることにあり、また液が手前にしみ出すようであれば、それはヒューズド・シリカの挿入が不十分であるか、あるいはヒューズド・シリカに傷が生じて液の戻りがおきているかのどちらかである。

操作手順は、まずヒューズド・シリカ・キャピラリーを MS より切り放した状態で溶離液を流し、正常に LC が運転されているのを確かめた上ポンプを停止、ヒューズド・シリカ・キャピラリーを正しくプローブに挿入して LC/MS を運転し、機器が正常に動作しているのを確認したのち電気系の調整に移る。

プローブ印加電圧を加えプローブ部温度 200°C (メカニカル読み、以下同じ) 以下から LC/MS 実験を開始するとき温度は急激に二百数十度 C に上昇する。

イオンの生成については CRT 上では始めのうちは強度、ピーク型とも非常に不安定であるが、温度その他適当な操作条件が満たされる数分以内が経過するとメイン・スリット、コレクター・スリットを調整して観測分解能が5000以上の安定したイオン出現するようになるが、感度をあげる意味から通常は2000以下程度で実験する。

1. 操作温度、印加電圧について

この LC/MS インターフェースではイオン源部 (IB)、イオン源プローブ装着部 (IP)、プローブ先端部 (PT) の3箇所加熱と温度制御を行うようになっている。

初期条件が IB: 220°C, IP: 1.3 A では IP 初期温度は 180°C で、250°C ないし 300°C の時ピーク強度は最大となりそれより高くなると反って減少してしまう。IP: 1.5 A とすると IP 初期温度が高くなるだけでイオン強度が最大となる温度範囲は変わらない。この条件下での PSP 印加電圧と強度の間では、Fig. 1 のような関係のあることが示された。印加電圧値が大きいほどピーク強度も大となるわけで、この関係はイオン源ブロックをあらたに洗浄した直後においても同様であった。

ただ、Fig. 1 でもわかるように印加電圧が 500 V 以上となる時はノイズも増加することが認められた。

電圧を印加しない TSP 方式ではステンレス・キャ

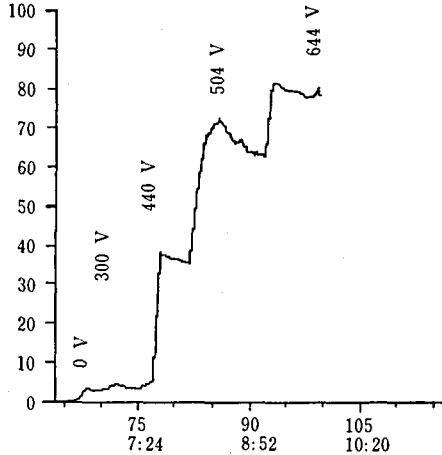


Fig. 1. Relationship between ion intensities and applied voltage to the probe tip. The voltage in the figure corresponds to the knob position 0, 2, 4, 6, 8 respectively

ピラリ-プローブでの報告とは異なり³⁾イオン強度はほとんど失われてしまう。ただ、IPに電流を流さずに実験するときにはこの強度関係は逆となり、検出器ゲインをあげる必要があるが電圧を印加した

い時のみピークが認められるようになる。

2. プローブのヒューズド・シリカ・キャピラリー先端位置とイオン強度の関係

前節での実験で得られた最適操作条件の1である、IB温度220°C、IP電流値1.3Aでプローブ先端温度を280°Cとして、プローブ先端部位におけるヒューズド・シリカ先端部位の位置と観測されるイオン強度の関係を調べたところ、その間に重要な関係のあることがわかった。

すなわちヒューズド・シリカ先端をプローブ先端よりわずかに突出させていくときイオン強度は急速に弱くなる一方、ヒューズド・シリカ素管を手前にひいて後退させると、プローブ先端部でのステンレス管とヒューズド・シリカ先端のギャップが数ミリメートル以内のとき左右対象のイオン・ピーク形と最強のイオン強度が得られ、より手前に後退させてゆくときには再びピーク強度は弱くなりかつその形も不整となることがわかった。

3. 実験例

Fig. 2は逆相LCとしてカラムはLC-18DB、溶液0.1M酢酸アンモニウム、流速1ml/minで、IB: 220°C、PT: 280°C、イオン加速電圧: 7kVにおけるアデノシン1.0μgのトータル・イオン・クロマトグ

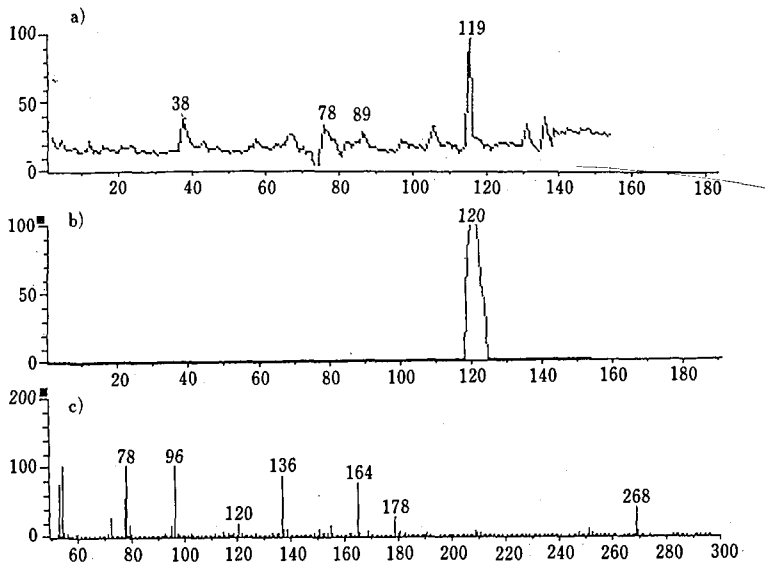


Fig. 2. LC combined MS of adenosine

a) TIC, b) Mass chromatogram on m/z : 268, c) Mass spectra at the 120 th scan. LC/MS experimental condition. LC: column LC-18DB (4.6 mm id. \times 15 cm), solvent: 0.1M ammonium acetate, 1 ml/min, MS: TSP-PSP ion source, ion source temperature 230, DCI current 1.3 A, PSP probe initial temperature ca. 200, accelerating voltage 7 kV

ラム, m/z : 268 (プロトン付加アデニン) のマス・クロマトグラムならびに観測されたマスペクトルである。

測定ゲインはクーロン/時・絶対値ではなく任意量ではあるが装置としてはかなり低ゲイン量でのデータである。本装置はデータの出力が計算機プリンターによるほかにクリティカルな検出限度の計算はしがたいがレファレンスのマスペクトルとよく合っているといえよう。

考 察

LC/MS 用プローブとして VG 社では1986年 TSP・PSP インターフェースを発売して以来、今日までに公表したものに限っても既に4種のモデルに改変されている。

しかしいずれのモデルもイオンの生成は必ずしも安定とはいえず、一定の感度を保持しているとはいえない。これは一定時間実験を継続しなければならないクロマトグラフィーにおいては適当ではない。

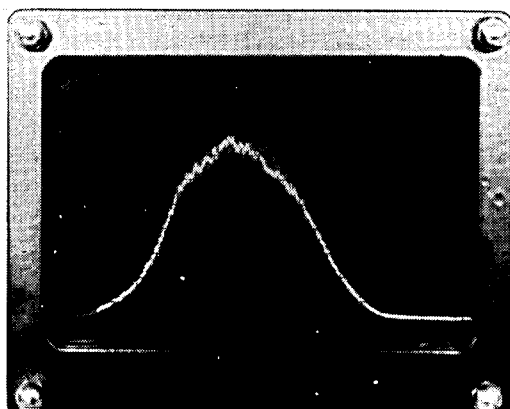
最も新しい MK 4 型あるいはリムーバブル型プローブを用いておこなう実験においても時々見受けられる現象として、CRT 上では非常に分解能の高い一連のイオン群が Fig. 3 で示されるように実は或るエネルギー幅で出現している種類のイオンが或るエネルギー範囲でイオン源内で突然放電消失しその位置での強度が小さくなったり、あるときには0になると、あたかも2個以上の分解能が高く分離されるピークが出現していると誤認してしまうことに起因するときもあるのがわかった。

ある部分のイオンが完全に放電で失われるとその位置はベース・ラインと等しくなってしまうからである。

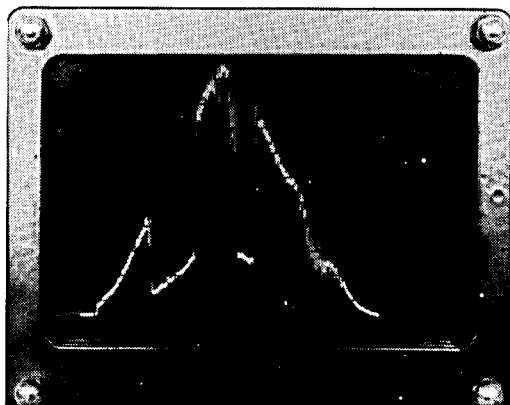
このような現象が生ずる原因としては、プローブ先端で溶離液溶媒を含む分子が大過剰イオン化したり、あるいはイオン引出しコーン部位の一部の汚れがいちじるしいとき、放電によってイオン源を通過して分析管に到達するイオンが消失してしまう。その結果その部位ではイオンは観測されず、次の瞬間では生ずるイオン量は過剰ではなくなるので放電せずにコーンを通過して観測される現象を繰り返すのであろう。

MK 4 型リムーバブルプローブのように LC 移動相が高圧に印加され大電流の流れているステンレス・キャピラリー面と直接に接触しながら通過して、イオン源に投入されるときには、グロー放電によるイオンの生成の機会が増加して大過剰となりこの好ましからぬイオン源内部での放電がおこるものと思われる。

一方、著者のデバイスでは溶離液溶媒はヒューズ



(a)



(b)

Fig. 3. Single ion image in about 2000 resolution under optimal and un-optimum co-axial capillary structure.

Gap between stainless steel and fused silica capillary tip: a) 2 mm, b) 10 mm

ド・シリカ部では絶縁されており、ヒューズド・シリカ先端をプローブより突出させるとグロー放電によるイオンは生成されにくくなる一方、より手前に引き出して実験すれば大過剰のプラズマ・イオンが生成して、ピークの一部で放電現象が認められるようになるのであろう。

ヒューズド・シリカとステンレス・キャピラリーの先端部位の至適ギャップ距離は種々実験した結果では必ずしも一定ではなく、これはイオン源内部の汚染状況の差によって、正確には定められないのであろう。この現象を逆に利用して、イオン源のよれ具合など微妙な実験環境の差異での MS 操作につき、両者のギャップを調整することで最適実験条件の設定に役立たせるパラメータとするメリットが生まれたといえる。

また、このプローブの重要な利点としてあげられるのは、構造がシンプルとなっていることに由来する。機器の診断の簡素化があげられる。クロマトグラフィーでは系の液洩れ、目詰まりは致命的な失敗で、迅速、容易にこれらの事態に対応が出来る装置がすぐれていることは明らかで、高真空を要求される MS ではなるべく真空条件を損なわずに操作が続けられるにこしたことはなく、このデバイスではプローブが不調のときにも多くの場合ヒューズド・シリカキャピラリーを引き出してチェックするだけで済む。

ステンレス・キャピラリー・プローブ先端で目詰まりを起こすときなどもオーバーホールすることなくプローブ先端の開口部にステンレス・バーを差し込むだけで貫通・復調できることが多い。

溶離液を他の系に替えるときの手続きや、実験を終えるにあたって酸性溶媒などをイオン源から洗い出しメタノールなどの有機溶媒による洗浄をおこなう一連の操作も LC のポンプは用いず、小試験管にそれぞれの溶媒をいれておきイオン源と装置外部の圧力差を利用して溶媒を注入して確実かつ簡単に実行できるのも

おおきな利点であろう。

ヒューズド・シリカ素管の欠点としては、水系溶媒に弱いことがあげられるが、そのような実験にあたっては OV-1 などの化学結合型ガスクロマトグラフィー用キャピラリーを使うとよい。このプローブを使う実験にあたっては時々キャピラリーをひきだしてみても先端部が脆くなっていないか否かを確認し、もし先端部が脆いようであればその部分を折って使うようにするとよい。

電気絶縁性を保持するうえ水系溶媒にも長時間耐えうるようなプローブとしては、ヒューズド・シリカ・キャピラリーの代わりに金属製キャピラリーを絶縁剤でコーティングして用いることも考えられる。

文 献

- 1) Blakley, C. R. and Vestal M. L.: *Anal. Chem.*, 55, 750 (1983)
- 2) Shackleton, C. H. L., Merdininck, J. and Lawson, M.: *Mass Spectrometry of Biological Materials*: p. 297 (1990) Marcell Dekker Inc.
- 3) VG Analytical Ltd.: *TSP/PSP Manual*, 1987

マイコトキシンの化学分析に関する研究 (第21報) イムノアフィニティーカラムクロマトグラフィーと高速液体クロマト グラフィーの組合せによる Aflatoxin の迅速分析

五十畑悦子・豊田正武・斎藤行生

Studies on Chemical Analysis of Mycotoxin (XXI) A Rapid Analytical Method for Aflatoxins by Immunoaffinity Column Chromatography and High Performance Liquid Chromatography

Etsuko Isohata, Masatake Toyoda and Yukio Saito

An analytical method for aflatoxins using solvent extraction, affinity column (containing monoclonal antibodies against aflatoxins bound onto agarose) clean-up and high performance liquid chromatographic determination was applied to the analysis of aflatoxins in peanuts, pistachio nuts, white and black peppers and corn. Recoveries of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ spiked to peanuts, pistachio nuts and corn at the level of 20 ppb were 77.4~81.4, 70.1~77.9 and 72.3~94.8%, respectively. In the case of white and black peppers, because the spiked aflatoxin recovery rate was low, further purification steps should be studied. The stability of the affinity column was good. This procedure is recommended as a rapid and reliable method for the analysis of aflatoxins in the three kinds of foods, peanuts, pistachio nuts and corn.

(Received May 31, 1990)

近年抗体の特異的反応を利用したイムノアッセイによる定量手段が微量生理活性物質などに簡便でかつ迅速な分析手段として、繁用されている¹⁻⁹⁾。われわれもこれまで発癌性かび毒である Aflatoxin (Af.) について下記に示すイムノアッセイを検討してきた。

1) Af. のモノクローナル抗体を利用して、Micro-titration Plate 中でイムノアッセイを完了させる方法 (3 種類)^{10,11)}。

2) Af. のモノクローナル抗体をアガロースゲルに結合したイムノアフィニティーカラムを用いて選択的に分離した Af. をフロリジルチップに吸着させ、そのチップに吸着した Af. の蛍光を標準の Af. の蛍光と比較して肉眼により判定する方法¹²⁾。

3) Af. のポリクローナル抗体を利用し、カード上でイムノアッセイを行う方法で、操作終了後標準の色調と比較して Af. 量を肉眼で判定する方法¹⁰⁾。

以上の方法は、いずれも高感度、簡易性に優れた方法であることについては充分認められるが、食品の種類によっては分析値の再現性に問題を残していた。そこで今回は、さらに先に検討した方法 2) で用いた Af. のモノクローナル抗体をアガロースゲルに結合したイムノアフィニティーカラムを用いて Af. を選択的に分離する方法に高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を組合せて Af. を定量する分析手段を試みた。試料として Peanuts, Pistachio nuts, Peppers および Corn に Af. B₁, B₂, G₁, G₂ を 20 ppb と 50 ppb を添加したものを調製し検討した結果、添加回収率、分析値の再現性およびカラムの安定性に優れた値を示した。

実験方法

1. 実験材料

東京都世田谷区内において市販されていた Peanuts, Pistachio nuts, White Pepper, Black Pepper と Corn を購入した。

2. 試薬と試液

Af. B₁, B₂, G₁, G₂ 標準液: Mackor chemicals.

クロロホルム, メタノール: 和光純薬(株)製試薬特級品。

アセトニトリル: 片山化学(株)製 HPLC 用, PBS 試薬: OXOID Dulbecco A ER14a 5 錠を蒸留水に溶解し全量を 500 ml とした。

イムノアフィニティーカラム: OXOID TD-110.

その他の試薬は市販の試薬特級品を用いた。

3. 装置

HPLC 検出器: 日立 655 形。

HPLC ポンプ: 日立 635 形。

HPLC データー処理装置: 日立 L-2500.

4. 実験操作

4.1 HPLC 用検液の調製

試料の全量を粉碎し、円錐四分法により縮分して、20 g ずつの試料を調製した。これらの試料に Af. 標準液 20 ppb および 50 ppb を添加し、減圧下エバポレーターで Af. 標準液の溶媒分を除去した後、Corn は Fig. 1 による方法, Peanuts, Pistachio nuts, Peppers は Fig. 2 による方法で, Af. を分離した。

4.2 イムノアフィニティーカラムクロマトグラフィー

Sample (corn) 20 g

Shake with 100 ml of CH₃CN-water (3:2) for 30 min

Filtrate

Take 5 ml

PBS 100 ml

Immunoaffinity column

Wash with 20 ml of PBS

Wash with 10 ml of water

Elute with 5 ml of MeOH

Eluate (MeOH)

Evaporate to dryness

Residue

Dissolve in 500 μl of MeOH

HPLC

Fig. 1. Analytical procedure for aflatoxins in corn

Sample (peanuts, pistachio nuts, peppers) 20 g

Shake with 40 ml of MeOH-water (3:2) for 30 min

Filtrate

Take 4 ml

PBS 46 ml

Immunoaffinity column

Wash with 20 ml of PBS

Wash with 10 ml of water

Elute with 5 ml of MeOH

Eluate (MeOH)

Evaporate to dryness

Residue

Dissolve in 500 μl of MeOH

HPLC

Fig. 2. Analytical procedure for aflatoxins in peanuts, pistachio nuts and peppers

イムノアフィニティーカラムはあらかじめ PBS 溶液 10 ml を流した後、蒸留水 10 ml でカラム内を洗浄しこれらの洗液は捨てた。

Fig. 1 あるいは Fig. 2 により調製した試料は PBS 溶液で希釈した (アセトニトリル-水抽出液は 20 倍, メタノール-水抽出液は 11~12 倍, pH 7.4)。PBS 溶液で希釈した試料をカラムに保持させて、カラムを蒸留水 10 ml で洗浄した後、メタノールで Af. を溶出した。溶出液の溶媒分は減圧下で留去し、残渣を一定量のメタノールに溶解し、HPLC 用の検液とした。

4.3 HPLC 条件

4.3.1 順相クロマトグラフィー

① カラム: Silica gel 4 mm id × 250 mm.

移動相: トルエン-酢酸エチル-ギ酸-メタノール (350:30:4:15)。

検出: 蛍光 Ex 365 nm, Em 425 nm.

② カラム: μ -Polasil 4 mm id × 250 mm.

移動相: クロホルム-シクロヘキサン-アセトニトリル-イソプロパノール (75:22.5:3:15)。

検出: UV 360 nm, 蛍光 Ex 365 nm, Em 425 nm.

4.3.2 逆相クロマトグラフィー

① カラム: Yanapak ODS-T, 4 mm id × 250 mm.

移動相: 水-メタノール-アセトニトリル (75:35:20)。

検出: 蛍光 Ex 366 nm, Em 431 nm.

② カラム: μ -Bondapak C18 4 mm id × 250 mm.

移動相: 水-メタノール-アセトニトリル (75:35:20)。

検出: 蛍光 Ex 366 nm, Em 431 nm.

結果と考察

1. Af. の抽出

Peanuts, Pistachio nuts, Peppers における Af. の抽出方法は、すでに各種の食品による添加回収実験で満足できる結果が得られているメタノール系の溶媒による抽出方法 (Fig. 2) により行い、Corn は前報¹²⁾における Corn の抽出溶媒の検討結果から、アセトニトリル系溶媒による抽出 (Fig. 1) を採用した。

2. HPLC

Peanuts, Pistachio nuts, Peppers に Af. 20 ppb を添加した試料より得られた HPLC のクロマトグラムは Fig. 3~4 に示すとおりである。各 Af. の分離は良好であり、また Peppers 以外は Af. の定量を妨害するピークは見られなかった。

3. 添加回収試験

Peanuts, Pistachio nuts, Peppers および Corn に

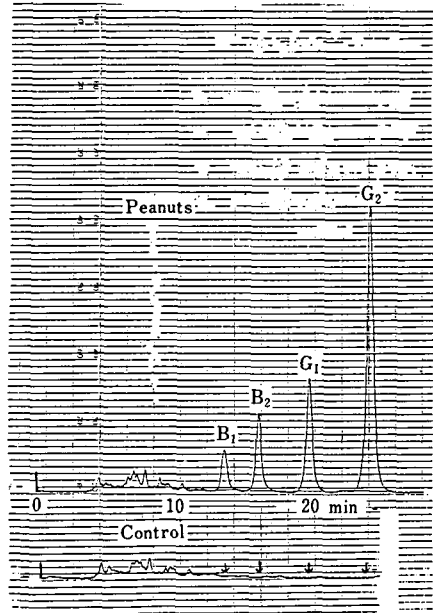


Fig. 3. Chromatograms of Aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in peanuts

HPLC conditions: Column; silica gel 4 mm id × 250 mm. Eluent; toluene-ethyl acetate-formic acid-methanol (350:30:4:15). Flow rate; 0.7 ml/min.

Af. B₁, B₂, G₁, G₂ を 20 ppb と 50 ppb を添加した試料からの Af. の添加回収実験結果は Table 1 に示すとおりであった。Peanuts, Pistachio nuts, Corn は従来の化学分析に近い値を示したが Peppers は white, black とともに Af. が 20 ppb, 50 ppb 添加のいずれの試料も定量は困難であった。本法による Peppers の分析はイムノアフィニティーカラムクロマトグラフィー用試料の前処理について適切な抽出方法などの検討が必要であると考えられる。

4. イムノアフィニティーカラムの安定性および再現性

入手したイムノアフィニティーカラムを冷凍庫中で 3 カ月間保存し Peanuts, Pistachio nuts, White pepper に Af. B₁, B₂, G₁, G₂ を 20 ppb 添加し回収率を求めたところ Table 2 に示す結果であった。イムノアフィニティーカラム入手後、直ちに Af. を分析した Table 1 の結果に較べ、カラムの劣化はほとんど認められなかった。また、複数試料による分析値のバラツキもほぼ満足できる範囲内であった。

5. 迅速性

本分析操作は模式図 (Fig. 5) に示すとおり、Af. の

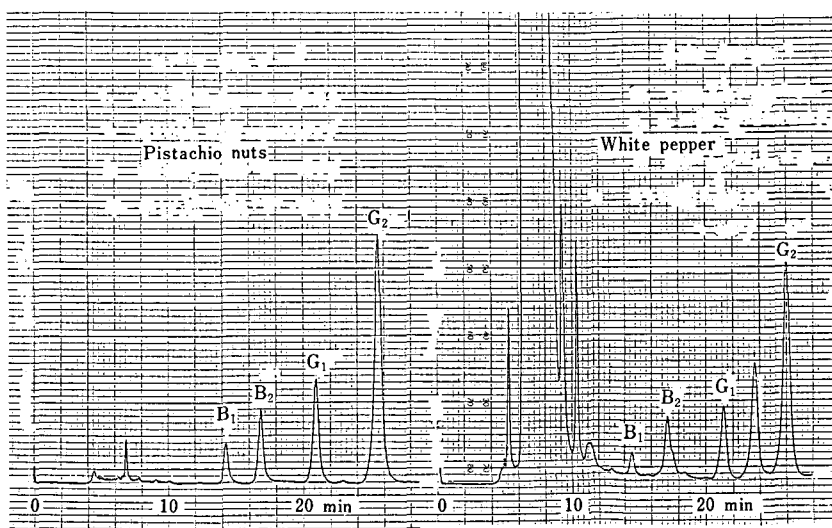


Fig. 4. Chromatograms of Aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in white pepper and pistachio nuts

HPLC conditions: The same to Fig. 3.

Table 1. Recoveries of aflatoxins spiked to peanuts, pistachio nuts, white pepper and corn

Sample	Spiked (ppb)	Recovery (%)			
		Af. B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
Peanuts	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	20	74.4	78.8	77.7	81.4
	50	73.8	79.6	75.6	88.8
Pistachio nuts.	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	20	72.9	77.0	70.1	77.2
	50	70.0	76.9	82.0	79.3
White pepper	0	n.d.	4.9	n.d.	n.d.
	20	68.3	95.7	54.0	67.5
	50	50.1	105.0	68.1	64.3
Corn	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	20	72.3	83.3	87.5	94.8

分析は2時間以内にすべてが完了し、分析操作の迅速性は充分満足できる結果であった。

ま と め

今回、われわれは Af. のモノクローナル抗体を結合したイムノアフィニティーカラムを利用する前処理法

と HPLC とを組み合わせた Af. の分析を試みたところ次の知見が得られた。

- 1) 冷凍庫に保存したカラムは3カ月までの保存実験では安定であった。
- 2) カラムごとの再現性は良好であった。
- 3) イムノアフィニティーカラムクロマトグラフィ

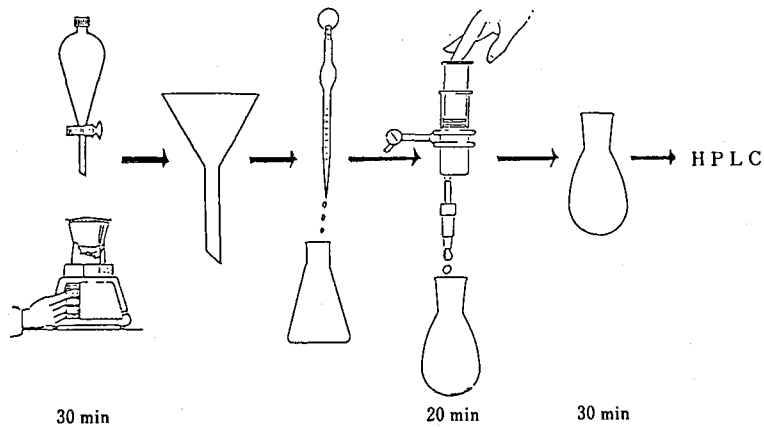


Fig. 5. Diagram of analytical procedure for aflatoxins

Table 2. Recoveries of aflatoxins spiked to peanuts, pistachio nuts and white pepper

Sample	No.	Recovery (%) ^{a)}				
		Af.	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
Peanuts	1	68.3	77.6	66.4	73.5	
	2	67.4	76.6	65.2	73.6	
Pistachio nuts	1	75.5	74.0	64.7	69.4	
	2	75.9	73.6	66.0	71.8	
White pepper	1	60.2	68.2	45.9	46.4	
	2	67.6	77.4	39.6	34.3	

a) Spiked 20 ppb, respectively.

一により得られた試料は HPLC による Af. の微量分析が可能であった。

4) 分析の簡易性に優れていた。

以上、今回の実験により、Af. のイムノアッセイはこれまで特異性、高感度、簡易性については優れた方法であることが認められていたが、イムノアッセイと HPLC を組合せることにより、懸念されていた Af. 分析における定量性についても、充分満足できる結果が得られた。さらにカラムの安定性、カラムごとの再現性についても満足できる結果が得られ、本法は食品中のかび毒分析の特殊性に充分対応できる優れた分析手段になり得ることがわかった。

文 献

1) Shotwell, O. L. and Hesseltine, C. W.: Use of

bright greenish yellow fluorescence as a presumptive test for aflatoxin in corn. *Cereal Chem.*, 58, 124~127 (1981)

2) Holaday, C. E.: Minicolumn chromatography—State of the art. *J. American Oil Chemists Soc.*, 56, 931A~934A (1981)

3) Pestka, J. J., Li, Y., Harder, O. W. and Chu, F. S.: Comparison of radioimmunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay for determining aflatoxin M₁ in milk. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 64, 294~301 (1981)

4) 奥田智子, 桑島りつ, 橋 武彦: マイクロプレート光度法による溶血反応の簡易測定法. 臨床検査, 28, 584~586 (1984)

5) 横山一章: マイクロプレートを利用した酵素抗体法による免疫複合体の測定. アレルギー, 33, 117~126 (1984)

6) 池田修一, 木下研一郎, 市丸道人, 中島茂宏, 北村 勉, 日野茂男: 酵素抗体法による ATLA 抗体の検索. 臨床と研究, 62, 283~286 (1985)

7) AOAC: Aflatoxin B₁ in cottonseed products and mixed feed enzyme-linked immunosorbent screening method. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 72, 189~191 (1989)

8) 五十畑悦子, 豊田正武, 斎藤行生: とうもろこし加工品中の Aflatoxin の分析. 第26回全国衛生化学技術協議会講演要旨. pp. 18~19 (1989)

9) 五十畑悦子: 酵素免疫測定法によるマイコトキシン類の分析. 第13回かび毒研究会講演要旨, (1986)

10) 五十畑悦子, 豊田正武, 斎藤行生: マイコトキシンの化学分析に関する研究 (第18報)—Aflatoxin B₁ の Enzyme Immunoassay による分析. 衛生試験報, 105, 93~99 (1987)

11) 五十畑悦子, 豊田正武, 斎藤行生: マイコトキシンの化学分析に関する研究 (第19報)—T-2 toxin の Enzyme Immunoassay による分析. 衛生試験報, 106, 117~120 (1988)

12) 五十畑悦子, 豊田正武, 斎藤行生: マイコトキシ

ンの化学分析に関する研究 (第20報) —とうもろ
こしおよびとうもろこし加工品中の Aflatoxin 分

析. 衛生試報, 107, 128~132 (1989)

蛍光検出液体クロマトグラフィーによる油脂食品中の ブチルヒドロキシアニソール (BHA) の迅速定量法

山田 隆

Determination of Butylated Hydroxy-Anisole in Oily Foods by High-performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection

Takashi Yamada

Simple and rapid determination method for butylated hydroxyanisole [2(3)-*tert*-butyl-4-hydroxyanisole] (BHA) (CAS no. 25013-16-5) is developed.

BHA was extracted from oily foods with hexane and from hexane layer to acetonitrile. The acetonitrile layer was either directly or after concentration injected to high-performance liquid chromatograph (HPLC) equipped with a fluorescence detector. As the internal standard for determination, *tert*-butyl-*p*-cresol was used. The conditions for HPLC were as follows. Column; Shim-pack CLC-ODS (6 mm i. d. × 15 cm); Mobile phase; 75% methanol; Excitation wave length for the fluorescence detector 298 nm; Emission wave length 332 nm.

The recoveries of BHA from salad oil, margarine, and butter added 10 µg/g or 200 ng/g of BHA were satisfactory.

(Received May 31, 1990)

はじめに

ブチルヒドロキシアニソール (BHA) は世界各国で食品添加物として酸化防止のため広く用いられている。わが国では現在のところ、魚介冷凍品および鯨冷凍品の浸せき液に 1.0 g/kg 以下、油脂、バター、魚介干製品等に 0.2 g/kg 以下使用することが認められている。

食品中からの BHA の分析法としては、ヘキサン抽出後、アセトニトリル分配でクリーンアップし、ガスクロマトグラフィーで定量する方法¹⁾、連続抽出装置を使って水蒸気蒸留する方法²⁾、それを微量化し、かつ定量に液体クロマトグラフィーを用いた橋爪らの方法³⁾ などがある。

今回、Verhagen らが⁴⁾ 血清中の BHA を蛍光検出液体クロマトグラフィーにより測定した方法を応用し、簡便な前処理のみで油脂食品中の BHA を迅速に感度よく定量する方法を検討した結果を報告する。

実験材料および方法

1. 装置

液体クロマトグラフは(株)島津製作所製 LC-6A に同社製蛍光検出器 RF-530 を接続したものをを使用した。

2. 試薬

ヘキサン、BHA およびアセトニトリルは(株)和光純薬製試薬特級を、その他の試薬もすべて試薬特級を使用した。

3. 試料

試料はいずれも市販品を使用した。植物性油脂食品として、サラダ油およびマーガリン、動物性油脂食品としてバターを使用した。

4. 方法

a) 10 µg/g 以上の検出を目的とする場合

試料 1.0 g をとり、ヘキサン約 2.5 ml に溶かし、分液漏斗に入れる。さらにヘキサン約 2.5 ml で容器を洗い、さきの分液漏斗に加える。分液漏斗にヘキサン飽和アセトニトリル 30 ml を加えて振りまぜ、アセトニトリル層を 100 ml のメスフラスコに分取する。さらに、ヘキサン飽和アセトニトリル 30 ml ずつを用い同様の操作を 2 回繰り返す。メスフラスコに内部標準溶液として *tert*-butyl-*p*-cresol (TBPC) のヘキサン溶液を最終濃度 30 µg/ml となるように加え、アセトニトリルで 100 ml にメスアップして試験溶液とする。

b) 微量 (0.2 µg/g 以上) の検出を目的とする場

合 上記のアセトニトリル抽出液をロータリーエバポレーターを用いて 5 ml 以下に濃縮し、内部標準溶液として TBPC ヘキサン溶液を最終濃度 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように加え、アセトニトリルで 5 ml にメスアップして試験溶液とする。

5. 液体クロマトグラフィーの条件

カラム: Shim-pack CLC-ODS 6.0 mm i. d. \times 15 cm, 移動相: 75%メタノール, 流速: 1.0 ml/分, 注入量: 20 μl , 蛍光検出器励起波長: 298 nm, 蛍光波長: 332 nm

結 果

1. 検出波長の検討

BHA は75%メタノール中での励起波長の極大 298 nm, 蛍光波長の極大が 332 nm であった。内部標準物質としては、BHA と似た構造をもち強い蛍光を有する TBPC を用いることとした。この物質は、励起波長の極大 280 nm, 蛍光波長の極大が 320 nm であったが、液体クロマトグラフィーの検出波長として BHA に最適である励起波長 298 nm, 蛍光波長 332 nm においても十分測定可能であった。

2. 食品中の妨害物質

試料としたサラダ油、マーガリン、バターのいずれから、10 $\mu\text{g}/\text{g}$ 以上の検出を目的とする方法ではクロマトグラム上にピークは検出されなかった。微量の検出を目的とする方法では、Fig. 1 に示すように上記の試料のいずれからでも BHA の保持時間 (6.1分) の少し前 (5.5分) にピークが認められたが、BHA 測定の妨害とはならなかった。

バターに 0.2 $\mu\text{g}/\text{g}$ の BHA を添加したときのクロマトグラムを Fig. 1 に示した。

3. 食品への添加回収

試料に BHA を 10 $\mu\text{g}/\text{g}$ または 0.2 $\mu\text{g}/\text{g}$ 加えた場合の添加回収率 Table 1 を示した。

回収率は 87~109% でほぼ満足出来る結果が得られた。

考 察

わが国の BHA 使用基準は BHA とジブチルヒドロキシトルエン (BHT) の合計量で規定されている。ここで用いた液体クロマトグラフィーの溶出条件では、BHT は保持時間が非常に長くなる。また、BHT は、励起波長の極大 286 nm, 蛍光波長の極大 320 nm であるが、その強度は BHA や TBPC に比べて弱く、BHA 百分の一程度であったので、BHA, BHT の同時定量は行えなかった。しかし、特殊な目的では

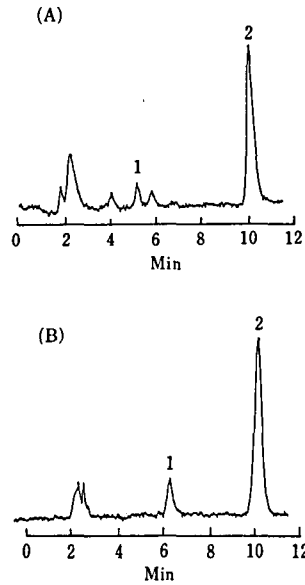


Fig. 1. Liquid chromatogram of BHA

(A) Extract from butter added with 0.2 $\mu\text{g}/\text{g}$ of BHA. Concentration of *tert*-butyl-*p*-cresol (internal standard) was 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. (B) Authentic BHA solution (0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Concentration of internal standard was 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. 1: BHA 2: *tert*-butyl-*p*-cresol

Table 1. Recovery of BHA added to foods

Foods	BHA added	Recovery (%)
Salad oil (1 g)	10 μg	93, 95
	0.2 μg	95, 99
Margarine (1 g)	10 μg	102, 106
	0.2 μg	92, 94
Butter (1 g)	10 μg	109, 95
	0.2 μg	87, 99

BHA の量のための測定が必要な場合もあり、そのようなときには簡便で定量下限が 0.2 $\mu\text{g}/\text{g}$ と低いことからきわめて有用な方法と思われる。

文 献

- “食品中の食品添加物分析法”, 厚生省環境衛生局食品化学課編, 講談社, 東京 (1982), pp. 254~256
- 成田弘子, 鈴木由利子, 浅岡公江, 大村正美, 橋本久美子, 北田善三, 橋爪清松, 永納秀男: BHT, BHA の分析法の検討. 食衛誌, 29, 47~51 (1988)
- Hashizume, K., Toda, C., Yasui, T. and Nagano,

H.: Determination of Butylated Hydroxyanisole and Butylated Hydroxytoluene in Oily Foods and Dried Fish by High-Performance Liquid Chromatography. *Jpn. J. Toxicol. Environm. Health*, 34, 550~554 (1988)

4) Verhagen, H., Thijssen, H. H. W. and Kleijans, J. C. S.: Sensitive high-performance liquid chromatographic method for the routine determination of butylated hydroxyanisole in plasma: *J. Chromatogr.* 413, 282~286 (1987)

マウス肺組織中のプロスタグランジン E₂ の定量

畝山智香子・佐藤秀隆・矢沢るり・古田京子・今井田克己・林 裕造

Measurement of Prostaglandin E₂ Content in Lung Tissue of Mouse

Chikako Uneyama, Hidetaka Sato, Ruri Yazawa, Kyoko Furuta,
Katsumi Imaida and Yuzo Hayashi

A radioimmunoassay (RIA) was applied for the determination of PGE₂ levels in the lung from 4 groups of male ICR mice 1) fed a standard diet, 2) fed a 20% corn oil-supplemented diet (HFD) for 2 weeks, 3) given a single s.c. injection of 15 mg/kg of 4NQO, a potent lung carcinogen and 4) given a s.c. injection of 4NQO and subsequently fed HFD for 2 weeks. Animals were sacrificed at week 3, and the lung was carefully excised and frozen in liquid nitrogen to prevent the postmortem synthesis of PGE₂. PGE₂, extracted from the lung tissue, was purified and then measured with or without adding a known amount of PGE₂. The lung levels of PGE₂ were shown to be significantly higher in the groups treated with HFD and/or 4NQO than the group fed a standard diet. These results show that the modified RIA method can be used for the measurement of PGE₂ contents in the tissue of animals.

(Received May 31, 1990)

疫学的調査結果によれば、食事要因もしくは栄養因子とヒト発癌リスクとの因果関係が指摘されている。また、その疫学的知見を支持する基礎的実験データも動物実験により報告されており、たとえば、乳腺¹⁾や大腸²⁾の実験的腫瘍の発生が高脂肪食摂取により促進されたという報告があり、食餌中脂肪含有量と発癌との関連性が注目されている。我々はマウスの肺腫瘍発生モデルを用い、高脂肪食摂取によりマウスの肺腫瘍の発生が促進されることを報告した³⁾。そのメカニズムのひとつとして肺組織中のプロスタグランジン (PG) の関与が示唆されているが、はっきりとした証明は未だなされていない。内因性の PG が腫瘍の発生に関与することを証明するためにはその臓器の組織中に含まれる PG の定量が不可欠である。しかし、一般に生体組織中の PG の定量は困難であることが多い。とくに、脂肪食摂取による肺腫瘍促進作用のように、その影響はあったとしてもわずかなものであると考えられる場合は、PG 量の変化もわずかでありその差の測定は困難であることが多い。そこで、我々は通常行なわれる方法に多少手を加えることで、高速液体クロ

マトグラフィー (HPLC) による精製を行う事なくマウス肺組織中の PGE₂ を定量する事に成功したので報告する。

実験方法

1. 動物

実験のプロトコールを Fig. 1 に示した。5 週齢の ICR 雄マウスを日本チャールス・リバーから購入し、一週間の馴化期間の後、肺発癌物質である 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO) 15 mg/kg を s.c. 投与した。さらに、4NQO 投与一週間後から高脂肪食として 20% corn oil を含む CRF-1 粉末飼料で二週間飼育した。そのほか、4NQO 投与の群、高脂肪食群、溶媒対象群を設けた。各群とも実験開始 3 週目にエーテル麻酔下に放血により屠殺し、ただちに肺を摘出した。この際、胸腔を開くと同時にコールドスプレーで胸腔内を冷却し、凍った肺を摘出した後、直ちに液体窒素で凍結して測定時まで -70°C で保存した。

2. PG の抽出および精製⁴⁾

以下の操作はすべて氷冷下に、アルゴンガスででき

るだけ置換しながら行った。ガラス器具はすべてシリコンコートをしたものを用いた。

凍結肺組織約 100 mg を正確に秤量し、インドメタシン 1 µg/ml を含む抽出溶媒 (酢酸エチルエステル/イソプロパノール/0.1N 塩酸 (3:3:1)) 8 ml でホモジナイズした。この組織懸濁液 3 ml に酢酸エチル 2 ml, 水 3 ml, 回収率測定用の ^3H -PGE₂ 100 µl (約 2000 cpm) を加えて攪拌した。1000×g, 10 分間 4°C で遠心し、有機溶媒層を全量別の試験管に移し取り、無水硫酸ナトリウムを適量加えて -30°C で一晩放置した。翌朝融解して攪拌後、1000×g で遠心上層の溶媒を減圧下に留去した。

8 mm×15 mm のケイ酸カラムをベンゼン/酢酸エチル (6:4, v/v) で予備洗浄し、ベンゼン/酢酸エチル/メタノール (6:4:0.2) 1.5 ml に溶解した上記抽出物を負荷した。ベンゼン/酢酸エチル (6:4) 6 ml で洗浄し、ベンゼン/酢酸エチル/メタノール (6:4:0.2) 12 ml で溶出した。この画分を減圧下に留去し、Isogel Tris Buffer (ITB, 0.01 M-Tris, 0.14 M-NaCl, 0.01 M-EDTA, 0.0012M-aspirin, 0.1% NaN₃, pH 7.4) 350 µl に溶解して radio immunoassay (RIA) に用いた。

3. PGE₂ の RIA⁵⁻⁶⁾

RIA を行うに当たり、理想的なコントロールは PGE₂ を全く含まない肺組織の上記方法による抽出、精製物であるが、現実にそのようなものは存在しない。また各試料の抽出、精製の回収率の違いを補正するため、以下のような方法で測定した。

抗 PGE₂ 抗体 (Advanced Magnetics 社) と標品の PGE₂ (フナコシ薬品(株)) および約 20000 cpm に ITB で希釈した ^3H -PGE₂(NEN) を 37°C, 1 時間反

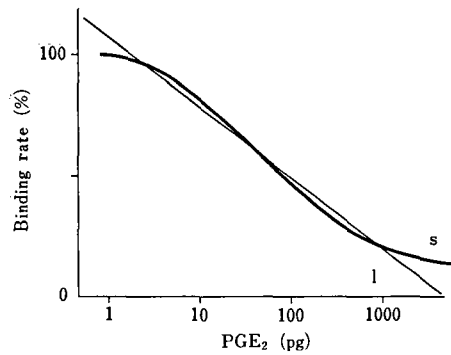


Fig. 2. Standard curve for PGE₂ radioimmunoassay

s: Standard Curve, l: Linear Regression

応させ、正常ウサギ IgG, ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (いずれも ICN Immunobiologicals 社) と混合後、一晩 4°C で静置した。1500×g, 40 分間遠心し、上清を捨て、沈澱物に 0.1 N NaOH 200 µl を加えて溶解しシンチレーションカクテルを加えて放射活性を測定した。このようにして作製した検量線を Fig. 2 に示す (曲線 s)。この検量線の約 10 pg-1 ng の範囲で近似できる直線 (l) をグラフ上にかき、その方程式

$$y = -29.1 \log x - 253.2 \quad (1)$$

y; 結合率 (%)

x; PGE₂ 量

を得た。PGE₂ x₁ を含む試料と、それに既知量の PGE₂ b×100 pg を加えた試料 (PGE₂ 量 x₂) を測定する。

$$x_1 + b \times 10^{-10} = x_2 \quad (2)$$

x=x₁ の時 y=y₁, x=x₂ の時 y=y₂ とすると (1),

(2) より

$$10^{-m} + b \times 10^{-10} = 10^{-n} \quad (3)$$

$$m = (y_1 + 253.2) / 29.1$$

$$n = (y_2 + 253.2) / 29.1$$

結合率は沈澱物のカウント×100/Binding control であり、y₁, y₂ いずれの場合も含まれる不純物の量は同じであるから、実測値 (沈澱物のカウント) をそれぞれ c₁, c₂, Binding Control を a とすると (3) は

$$10^{-t} + b \times 10^{-10} = 10^{-u} \quad (4)$$

$$t = (c_1/a \times 100 + 253.2) / 29.1$$

$$u = (c_2/a \times 100 + 253.2) / 29.1$$

となる。(4) の式に c₁, c₂, b の実測値を代入し、a の値を求める。この a を用いて試料中の PGE₂ 量を決定した。さらに抽出、精製の回収率で補正を行ない、肺湿重量当りの PGE₂ 量を算出した。

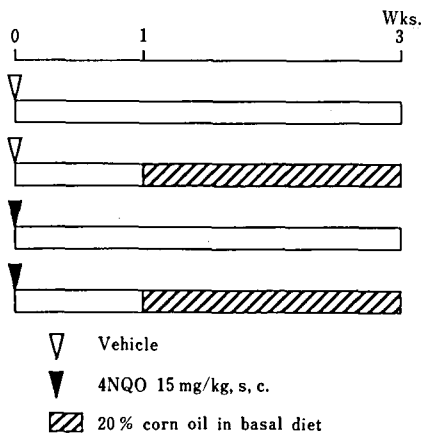


Fig. 1. Experimental protocol

Table 1. Body weight and PGE₂ levels in lungs of mice treated with 4NQO and/or a high fat diet

Group	Treatment	No. of mice	Body weight(g)	PGE ₂ (ng/mg tissue)
1	Control	5	34.4±2.4	0.370±0.167
2	High fat	5	33.8±1.7	0.993±0.441*
3	4NQO	5	34.6±1.2	0.839±0.240*
4	4NQO → High fat	5	35.0±1.8	0.916±0.330*

Mean±SE

* Significantly different from control at p<0.05

結果と考察

得られた結果を Table 1 に示す。高脂肪食の投与期間は2週間であり、各群の体重に差はみられなかった。肺組織中に含有する PGE₂ 量を見ると、高脂肪食摂取および 4NQO の投与によって肺組織中の PGE₂ 量がコントロールより高くなっていた。これは 4NQO 投与によっても、また、高脂肪食摂取によってもマウスの肺組織中の PGE₂ が高まっていることを示している。4NQO 投与後3週後でも、また、わずか2週間の高脂肪食の摂取によっても、肺組織中の PGE₂ が高まっていた事実はマウス肺腫瘍の発生過程の少なくとも比較的初期の段階において、肺組織中で PGE₂ 量の増加があったことを示しており、肺腫瘍の発生と、高脂肪摂取によるその促進作用の機序を考えるうえで興味深い。したがって、高脂肪食摂取による発癌促進に肺組織中の PG の変化が影響するという考えを支持するものといえる。また、この結果は動物の組織そのものを試料としたものとしては比較的ばらつきの少ない結果であると思われる。検量線としては log-logit 目盛グラフなどの直線を用いた方が理論的には正しい数式が得られるが、簡便法としては本試験で用いた方法も、充分使用可能であると判断した。

文 献

- 1) Thommpson, H. J., Meeker, L. D. and Tagliaferro, A. R.: Effect of energy intake on the promotion of mammary carcinogenesis by dietary fat. *Nutr. Cancer* 7, 37~41, (1985)
- 2) Sakaguchi, M., Minoura, T., Hiramatsu, Y., Takada, H., Yamamura, M., Hioki, K. and Yamamoto, M.: Effects of dietary saturated and unsaturated fatty acids on fecal bile acids and colon carcinogenesis induced by azoxymethane in rats. *Cancer Res.*, 46, 61~65, (1986)
- 3) Imaida, K., Sato, H., Okamiya, H., Takahashi, M. and Hayashi, Y.: Enhancing effect of high fat diet on 4-nitroquinoline 1-oxide-induced pulmonary tumorigenesis in ICR male mice. *Jpn. J. Cancer Res.* 80, 499~502, (1989)
- 4) Ohuchi, K., Yoshino, S., Kanaoka, K., Tsurufuji, S. and Levine, L.: A possible role of arachidonate metabolism in allergic air pouch inflammation in rats. Anti-inflammatory effect of indomethacin and dexamethasone and the level of prostaglandin E₂ in the exudate. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 68, 326~331, (1982)
- 5) Levine, L. and Vunakis, H. V.: Antigenic activity of prostaglandins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 41, 1171~1177 (1970)
- 6) 稲川寿夫：“プロスタグランジン研究法”，山本尚三，鹿取信編，東京化学同人，東京 (1986)，pp. 97~103

食用タール色素中の硫酸塩定量における活性炭の問題点

柿内 雅・辻 澄子・柴田 正・伊藤誉志男

Studies on Activated Charcoal concerning the Determination of Sulfate in Food Coal-Tar Dyes

Masa Kakiuchi, Sumiko Tsuji, Tadashi Shibata and Yoshio Ito

It is very difficult to determine the content of sulfate in food coal-tar dye by the method designated in the "Japanese Standards of Food Additives(V)", because the endpoint on titration is difficult to gauge.

We determined the concentration of sulfate in food dye nephelometrically after decolorization with charcoal but obtain different values depending on the kind of charcoal used.

Because the adsorbed or eluted sulfate in the various charcoals were dispersed widely, so we tested the sulfate contents in five kinds of charcoals.

It was found that all kinds of charcoals eluted or adsorbed sulfate in varying degrees. Therefore no charcoal was found to be satisfactory for use in the sulfate test.

(Received May 31, 1990)

はじめに

第五版食品添加物公定書の硫酸塩定量法には、色素水溶液に活性炭を加え脱色した後テトラヒドロキシキノロン2ナトリウムを指示薬として、塩化バリウムで滴定する方法が記載されているが、終末点が非常に分かりにくいという弱点がある。それゆえ著者らは、公定法に従い活性炭処理した試験液に分散剤を加えた後、塩化バリウムを加え濁度を測定する簡便法^{1,2)}を採用している。公定法と簡便法の硫酸塩定量値はよく一致した。著者らの硫酸塩検査結果と各社の製品検査の検体に添付される自社試験結果は、比較的一致するが、他の試験項目と比べると差が大きい。試験法の違いによる差はみとめられないことから、この原因として活性炭処理があげられる。活性炭は品質により、活性炭から硫酸塩が溶出される場合、逆に吸着される場合が考えられることから、数種の活性炭を用いて検討した。その結果、活性炭が硫酸塩定量に有意に影響を与えているという知見を得た。

実験方法

1. 装置および試薬

1) 装置：日立分光光度計 139 を使用し、波長 440 nm で測定した。

2) 試薬：活性炭：①Merck 製 charcoal activated 2186. ②関東化学製活性炭素粉末。③武田薬品製白鷺

A. ④片山化学製活性炭素粉末。⑤太平化学製活性炭素。を使用した。

硫酸イオン標準溶液：無水硫酸ナトリウム 1.0 g を水に溶かして 100 ml とする。(Na₂SO₄ 10 mg/ml)

分散剤^{1,3)}：塩化ナトリウム 120 g を水 400 ml に溶解し、グリセリン 500 ml および水を加えて 1 l とする。

色素は国立衛生試験所標準品を使用し、その他の試薬はすべて特級品を用いた。

2. 硫酸塩の定量法

色素 0.5 g に水 50 ml を加えて溶かし (0.5 g/50 ml)、活性炭 10 g を加えながら 3 分間穏やかに煮沸し、冷却する。次にうすめた硝酸 (1→2) 1 ml を加え良く振り混ぜた後ろ過する。このろ液 10 ml に水 5 ml、分散剤 5 ml ついで 0.1N 塩化バリウム 5 ml を加えて良く振り混ぜ、吸収波長 440 nm における濁度を測定する。標準液は硫酸ナトリウム溶液 (0, 2.5, 5.0, 10.0 mg/50 ml) の 4 種類の濃度のものを用い、試料ろ液と同様に操作する。

<実験 1> 色素を用いず水 50 ml のみで、5 種類の活性炭それぞれについて処理し、硫酸塩を定量した。ブランクとしては活性炭処理を行わず同様に操作した。

<実験 2> 色素を用いず無水硫酸ナトリウム溶液 (0, 2.5, 5.0, 10.0 mg/50 ml) を 5 種類の活性炭でそれぞれ処理し、硫酸塩を定量した。ブランクとしては、活性炭処理を行わず同様に操作した。

<実験 3> 国立衛生試験所標準品色素、黄色 4 号

Table 1. Elution of sulfate from charcoal with water

Charcoal	Absorbance at 440nm mean ± S.D.	sulfate (mg/10g.charcoal)
Blank	0.007 ± 0.001	0.64 ± 0.09
①	0.014 ± 0.002	1.28 ± 0.18
②	0.066 ± 0.004	6.06 ± 0.37
③	0.237 ± 0.023	21.74 ± 2.11
④	0.103 ± 0.004	9.45 ± 0.37
⑤	0.070 ± 0.012	6.42 ± 1.10

- ① Merck
- ② Kantokagaku
- ③ Takeda: Sirasagi-A
- ④ Katayamakagaku
- ⑤ Taiheikagaku

0.5gに水 50 ml を加え、5種類の活性炭それぞれについて処理し、硫酸塩を定量した。

<実験4> 国立衛生試験所標準品色素、黄色4号 0.5gに水 50 ml を加え、これに標準硫酸ナトリウム溶液 (10 mg/ml) 1 ml を添加し、5種類の活性炭それぞれにおける添加回収率を求めた。

が活性炭に吸着されていることがわかった。硫酸ナトリウム 10 mg を添加した場合の測定値は②関東化学製と⑤太平化学製の活性炭でブランク値の70%、③武田薬品製白鷺Aと④片山化学製の活性炭では50%程度となり、30%から50%の硫酸塩が活性炭に吸着された。このような低い回収率では、たとえ直線性が得られて

結果と考察

1. 活性炭の影響について

1) 水による活性炭からの硫酸塩の溶出。

<実験1>の操作手順で行い、結果を Table 1 に示した。活性炭からの硫酸塩の溶出は、少ない方が望ましいが、種類によってかなりの硫酸塩が溶出した。①の Merck 製が1番溶出が少なく、③の武田薬品製白鷺Aが1番多く溶出した。水によって硫酸塩を溶出しない活性炭はなかった。

2) 標準硫酸ナトリウムを添加した時の活性炭からの硫酸塩の溶出と吸着。

<実験2>の操作手順で行い、結果を Fig.1 と Fig.2 に示した。

Fig.1 より①の Merck 製が比較的溶出が少なく、活性炭処理なしの物と相関性が得られた。Fig.2 は Fig.1 から硫酸ナトリウム無添加の時の値を差し引いた検量線だが①の Merck 製のみが、活性炭処理なしの場合とはほぼ一致する検量線が得られた。他の活性炭については、Fig.1 でわかるように硫酸ナトリウム無添加時にかなりの硫酸塩が溶出しているにもかかわらず、この値を差し引くとすべて、活性炭処理なしの物より低くなり、今度は溶出とは逆に、かなりの硫酸塩

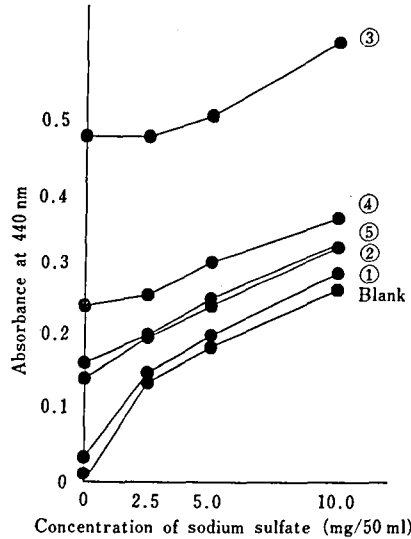


Fig.1. Elution and adsorption of sulfate from charcoal in adding of standard sodium sulfate

- ① Merck
- ② Kantokagaku
- ③ Takeda: Sirasagi-A
- ④ Katayamakagaku
- ⑤ Taiheikagaku

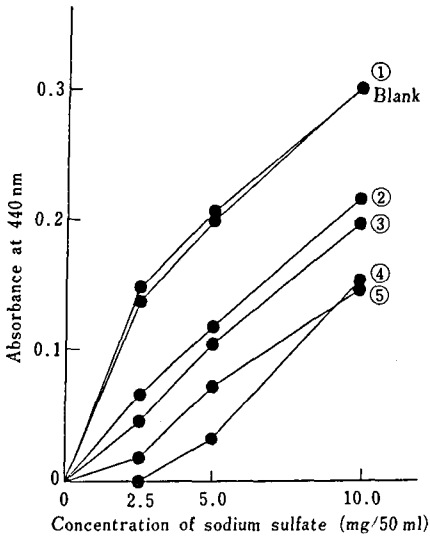


Fig. 2. Calibration curves using various charcoals

- ① Merck
- ② Kantokagaku
- ③ Takeda: Sirasagi-A
- ④ Katayamakagaku
- ⑤ Taiheikagaku

も正確な値は求められない。その中で① Merck 製がブランク値とほぼ等しい値を示した。

3) 色素を吸着させた時の活性炭からの硫酸塩溶出。
 <実験3>の操作手順で行い、結果を Table 2 に示した。Table 1 と Table 2 を比較すると、③武田薬品製白鷺A以外はほとんど同じ結果が得られた。③武田薬品製白鷺Aは、色素を吸着させることによって、吸着させていない時より (0.4 mg/g 活性炭) 硫酸塩

が多く溶出した。③武田薬品製白鷺Aは、色素を吸着するかわりに本来活性炭に吸着されている不溶性硫酸塩をも溶出させたものと思われる。活性炭の種類によって差はあるものの、すべての活性炭が色素存在下において硫酸塩を溶出した。

4) 硫酸塩添加回収率における活性炭の影響

<実験4>の操作手順で行い、結果を Table 3 に示した。

②③④⑤の活性炭では、Table 1, 2 でわかるように水および標準色素水に対して硫酸塩を溶出するにもかかわらず、Table 3 の添加回収率は100%より低い値が得られた。このことより、活性炭は、硫酸塩は溶出しているが、一方では逆に添加した硫酸塩を吸着しており、吸着の方が溶出より多いことがわかった。吸着のほうが多ければ本来の値より測定値が低くなり、規格上問題となる。① Merck 製のみが、これまでの実験で活性炭処理なしのもの、相関性が得られたが、添加回収率は118%と測定値が高めであった。規格上限値より低い場合は問題ないとしても真の値を測定することは出来ない。以上の結果より、それぞれの活性炭によって差はあるが、活性炭からの硫酸塩の溶出、吸着または溶出と吸着、が同時に行われており、溶出と吸着とのバランスのとれたもの、つまり良質のものは5種類の中になかった。あえて言えば① Merck 製の活性炭は常に硫酸塩を一定量溶出しており、吸着は認められず、値は少々高くなるものの一定した値が得られた。以上種々の活性炭が、硫酸塩定量値に大いに影響を与えていることがわかった。

Table 2. Elution of sulfate from charcoal in adding of dye

Charcoal	Absorbance at 440nm mean \pm S. D.	sulfate (mg/10g. charcoal)
①	0.016 \pm 0.009	1.74 \pm 0.83
②	0.065 \pm 0.004	5.87 \pm 0.28
③	0.288 \pm 0.016	25.96 \pm 1.47
④	0.106 \pm 0.009	10.00 \pm 0.83
⑤	0.073 \pm 0.010	6.70 \pm 0.83

- ① Merck
- ② Kantokagaku
- ③ Takeda: Sirasagi-A
- ④ Katayamakagaku
- ⑤ Taiheikagaku

Table 3. Effect of charcoal on the recovery test of sulfate

charcoal	Sulfate (mg) mean \pm S.D.	Recovery (%)
Blank	10.0 \pm 1.0	100 \pm 10
①	11.7 \pm 1.6	117 \pm 14
②	8.3 \pm 0.8	83 \pm 8
③	8.7 \pm 4.8	87 \pm 48
④	8.2 \pm 1.4	82 \pm 14
⑤	9.9 \pm 1.9	99 \pm 19

Standard solution sodium sulfate solution (10mg/ml) 1ml

- ① Merck
- ② Kantokagaku
- ③ Takeda: Sirasagi-A
- ④ Katayamakagaku
- ⑤ Taiheikagaku

文 献

1) 外海泰秀, 上吉千恵子, 野村幸雄: タール色素の製品検査について (第10報), 食用タール色素中の塩化物および硫酸塩の定量に関する問題点, 食衛誌, 14, 90~93 (1972)

2) 外海泰秀, 野村幸雄, 吉田由美子, 栗山加代: 昭和44年度におけるタール色素の製品検査について (第2報), タール色素の製品検査法の簡易化の試み, 衛生試報, 88, 134~139 (1970)

3) 高木誠司: "定量分析の実験と計算", 共立出版, 東京 (1951), pp. 217~220

向精神剤の同定に関する研究 (第7報)
 幻覚剤 3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDA),
 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) および
 5-Methoxy-3,4-methylenedioxyamphetamine (MMDA)
 の標準品製造と各種分析データ

島峯望彦・高橋一徳・中原雄二

Studies on the Identification of Psychotropic Substances (VII)
 Preparation and Various Analytical Data of Standard References of
 Some Hallucinogens, 3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDA),
 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and
 5-Methoxy-3,4-methylenedioxyamphetamine (MMDA)

Mochihiko Shimamine, Kazunori Takahashi and Yuji Nakahara

The Reference Standards of 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA), 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and 5-methoxy-3,4-methylenedioxyamphetamine (MMDA) were prepared. Their purities determined by HPLC were 99.8% for DMA hydrochloride, 99.8% for MDMA hydrochloride and 99.5% for MMDA hydrochloride. For the identification and determination, various analytical data of the three drugs were measured and studied by TLC, UV, IR, HPLC, GC/MS and NMR.

(Received May 31, 1990)

はじめに

国連が提案している「向精神薬に関する条約」批准に向けて、現在我国の厚生省では麻薬等に関する国内法の整備を進めているところである。昨年(平成元年12月)新たに23品目の向精神薬が麻薬に指定された。

著者らは、行政の要請を受けて、麻薬に指定された向精神薬の標準品の製造、分析法の整備、尿中代謝物の検出法の研究等を行っている。昨年は2,5-Dimethoxy-4-methylamphetamine (STP), 2,5-Dimethoxy-4-bromoamphetamine (DOB) および 2,5-Dimethoxy-4-ethylamphetamine (DOET) について報告¹⁾したが、今回は、近年乱用が拡大しているメチレンジオキシアンプエタミン系の幻覚剤である 3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDA), 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) および 5-Methoxy-3,4-methylenedioxyamphetamine (MMDA) の3種について標準品の製造を行い、各種分析データを測定したので報告する。

薬物の来歴

1. MDA

MDA は1910年に合成され、1939年に動物実験に用いられ、鎮咳剤、精神安定剤および食欲減退剤として特許がとられた。R(-)体はS(+)体より3倍の活性を持ち、食欲抑制や抗うつ剤として期待されたが、市販はされなかった。すべての不正MDAはラセミ体で、200~230 mgを含むカプセルで密売される。MDAは1960年代後半から1970年代前半にかけて米国内でlove drugとして広く乱用されたが、1973年死亡例が散発して以来、次第に減少していった。死因は呼吸不全である。

2. MDMA

MDMAは最近“エクスタシー”、“XCT”、“アダム”という名で密売市場に再び現われた。1914年に特許広報に報告されたのが始めてであり、1970年代後半に地下組織の薬物として知られていたが、医療用には期待されなかった。北米とヨーロッパにおいてMDMA

の密造が報告されており、50~100 mg を含有する錠剤、カプセルまたは粉末の形で1回分20ドル程度で密売される。作用は穏やかな幻覚作用が現われ、気分はコカインの効果に似ている。通常、作用は4~6時間続き、感受性の高い人は2日間もハイな状態が続くといわれる。MDMA は当初、LSD の再来としてサイケデリックを好む音楽家や芸術家の間で用いられ、“acid house” と呼ばれるデスコダンスホールなどから広がりを見せた。現在、米国とヨーロッパ（特にスペイン、ドイツ、オランダ、ベルギー、英国）を中心に acid house party が各地で催され、MDMA の愛好者が激増している。我が国でも1985年に京都でMDMA が押収されている。死亡例も報告されており、18歳の女性で150 mg の MDMA を服用し、1時間半の飲酒中に死亡した。死因は薬物による不整脈と診断された。

3. MMDA

MMDA はメスカリンとアンフェタミンの薬理活性の研究中に1962年一連の化合物の一つとして合成された。この構造はナツメグやニクスクの主要成分である myristicin の構造に類似している。生理活性はメスカリンの3倍の活性を持ち、150 mg を経口摂取すると、作用が現われる。MMDA は弱い幻覚剤と考えられている。

実験の部

1. 標準品の製造

3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDA), piperonal (Aldrich) と nitroethane から Ramirez らの方法²⁾で、3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) は上記の MDA を Fitzgerald らのメチル化法³⁾で、5-Methoxy-3,4-methylenedioxyamphetamine (MMDA) は 5-methoxy-3,4-methylenedioxybenzaldehyde (Lancaster Synthesis 製) から MDA の場合と同様の方法²⁾でそれぞれ合成した。

上記の方法で得た MDA および MMDA はいずれも無水エタノールに溶かし、飽和塩化水素・エタノール溶液を少量加え、氷室に放置する。析出する結晶をとり、無水エタノールより再結晶を数回繰り返して、採取後減圧で乾燥し、MDA・HCl および MMDA・HCl を得た。HPLC により純度を計算すると MDA・HCl および MMDA・HCl それぞれ99.8%および99.5%であった。MDMA も塩酸塩として得られ、イソプロパノールで再結晶を数回繰り返して、採取後減圧で乾燥して MDMA・HCl を得た。HPLC で純度を計算すると99.8%であった。

以下、これらのものを標準品として用いる。

試薬、溶媒は市販の試薬特級品を用いた。

2. 装置

測定装置は以下のものを用いた。

UV: 島津 UV-260 分光光度計

HPLC: 横河 HP 1040 M

ダイオードアレイ検出システム

GC/MS: 横河 HP 5890 A (MSD 5970 付)

IR: 島津 IR-460 赤外分光光度計

NMR: Varian GEMINI-300 FTNMR(300MHz)

核磁気共鳴装置

3. 試験方法

3.1 薄層クロマトグラフ法

試料溶液は各試料のメタノール溶液(1→500)を用い、薄層板 (Silica gel 60 F254, メルク社製) に約10 μl スポットした。展開溶媒と発色試薬を下に示す。

展開溶媒

i) methanol : conc. NH₄OH = 100 : 1.5

ii) CHCl₃ : methanol : conc. NH₄OH = 27 : 3 : 0.1

iii) CHCl₃ : acetone : methanol : conc. NH₄OH =
15 : 12 : 3 : 0.1

発色試薬: 塩化白金ヨウ化カリウム溶液

3.2 紫外吸収スペクトル

各試料のメタノール溶液を適宜希釈して用いた。

3.3 高速液体クロマトグラフィー

試料溶液は各試料の水溶液(1→1000)を用い、マイクロシリンジでその5 μl をクロマトグラフに注入した。カラムは Inertsil ODS (5 μ, 150×4.6 mm), 移動相は i) 1/10 M NaH₂PO₄ : methanol : CH₃CN = 85 : 7.5 : 7.5 と ii) 1/8 M NaH₂PO₄ : CH₃CN = 4 : 1 の2種類を用い、流速は1 ml/min, カラム温度は40°C, 検出波長は236 nm で測定した。

3.4 ガスクロマトグラフ-質量分析 (GC/MS)

GC/MS は、各試料の遊離塩基およびトリフルオロアセチル (TFA) 誘導体として測定した。

各試料のメタノール溶液を適宜希釈して用い、オートサンプラーでその1 μl をクロマトグラフに注入した。

(1) TFA 誘導体化

上記のメタノール溶液を一部とり、減圧乾固して得た残渣に無水トリフルオロ酢酸:酢酸エチル(1:1)溶液の0.2 ml を加え、55°C で20分間加熱する。冷後室温で窒素気流下溶剤を留去した後、酢酸エチル0.1 ml に溶解し、試料溶液とする。

(2) 測定条件

測定条件を下に示す。

カラム: 10 m × 0.25 mm i. d. 100% dimethylsiloxane capillary column (OV-1 bonded, ガスクロ工業製)

注入: Splitless, 150°C

測定温度: 60°C (0.5 min) - 20°C/min - 250°C

キャリアガス: ヘリウム (25 Kpa)

3.5 赤外吸収スペクトル

各試料約 1 mg を用いて, 常法により KBr 錠を作製し, 測定した。

3.6 核磁気共鳴スペクトル

各試料約 10 mg を遊離塩基として, CDCl_3 (1% TMS を含む) 1 ml に溶解し, 試料溶液とする。

4. 試験成績

4.1 性状および融点

MDA · HCl は白色結晶状粉末で, 融点は 183~184°C (lit.⁴⁾ 183~185°C, lit.⁵⁾ 185~186°C), MDMA · HCl は白色結晶状粉末で, 融点は 148~150°C (lit.⁶⁾ 148~150°C lit.⁷⁾ 147~148°C), MMDA · HCl は白色結晶状粉末で, 融点は 177~178°C (lit.⁷⁾ 190~191°C, lit.⁸⁾ 191°C) である。

4.2 薄層クロマトグラフ法 (TLC)

4種の展開溶媒による各試料の TLC の結果は Table 1 に示す通りであった。

MDA と MMDA の R_f 値はほぼ同じ値を示し, TLC では両者の識別は困難であったが, MDMA とは明らかな差が認められた。

4.3 紫外吸収スペクトル (UV)

それぞれの吸収極大, 極小および E 値の測定結果を Table 2 に示す。MDA と MDMA の吸収曲線は酷似していて, 236 nm と 287 nm にほぼ同じ吸光強度で吸収極大を示すが, MMDA のそれは他に比べ 242 nm と 277 nm に吸収極大を示し, 特に 277 nm のピークはかなり弱く, 識別可能であった。

4.4 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

用いた2種類の移動相の内, system(i) が (ii) に

Table 1. Thin layer chromatographic data of the drugs tested*

Compound	$R_f \times 100$		
	Solvent		
	i	ii	iii
MDA	39	27	50
MDMA	31	25	21
MMDA	40	29	47

* Conditions are described in the text

Table 2. UV data of the drugs

Compound	$\lambda_{\text{min}}^{\text{MeOH}}$		$\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$	
	nm	$E_{1\%}^{1\text{cm}}$	nm	$E_{1\%}^{1\text{cm}}$
MDA · HCl	221	123.9	236	193.5
	256	20.0	287	188.7
MDMA · HCl	221	130.0	236	184.4
	256	19.2	287	171.6
MMDA · HCl	262	22.8	242*	180.0
			277	45.0

* Shoulder

Table 3. Retention times (min) of the drugs by HPLC

Compound	Mobile phase	
	i	ii
MDA	7.44	3.60
MDMA	8.36	4.11
MMDA	10.17	4.28

比で良好な分離を示し, MDA, MDMA, MMDA の順に溶出した (Table 3 および Fig. 1)。

4.5 ガスクロマトグラフ—質量分析 (GC/MS)

3種の化合物の遊離塩基と TFA 誘導体の保持時間 (RT) および主ピークを Table 4 に示す。

(1) 遊離塩基

MDA および MMDA のいずれの場合にもベースピークイオンは m/z 44 で, β 解裂により生成した $[\text{CH}_3\text{CH}=\text{NH}_2]^+$ である。その他主なピークは, 親イオン (M^+) から ethylimine 部分が脱離した $M^+ - 43$ [m/z 136 (MDA), 166 (MMDA)] がそれぞれ認められた。MDMA の場合はベースピークイオンは m/z 58 で, β 解裂により生成した $[\text{CH}_3\text{CH}=\text{NHC H}_3]^+$ である。その他のピークは非常に弱いが, $M^+ - 57$ [m/z 136] および $M^+ - 58$ [m/z 135] が認められる。

(2) TFA 誘導体

TFA 誘導体のマススペクトル (EI) を Fig. 2 に示す。遊離塩基の場合に比べ, M^+ が明確に現われている。推定される主な解裂様式 Fig. 3 に示す。解裂経路は主に二経路である。まず M^+ から CF_3CONHR の脱離によりスチレン様イオン (MDA, MDMA: m/z 162, MMDA: m/z 192) となる経路。他の経路は β 解裂によりアミン部分 (MDA, MMDA: m/z 140, MDMA: m/z 154) とベンジル部分 (MDA, MDMA:

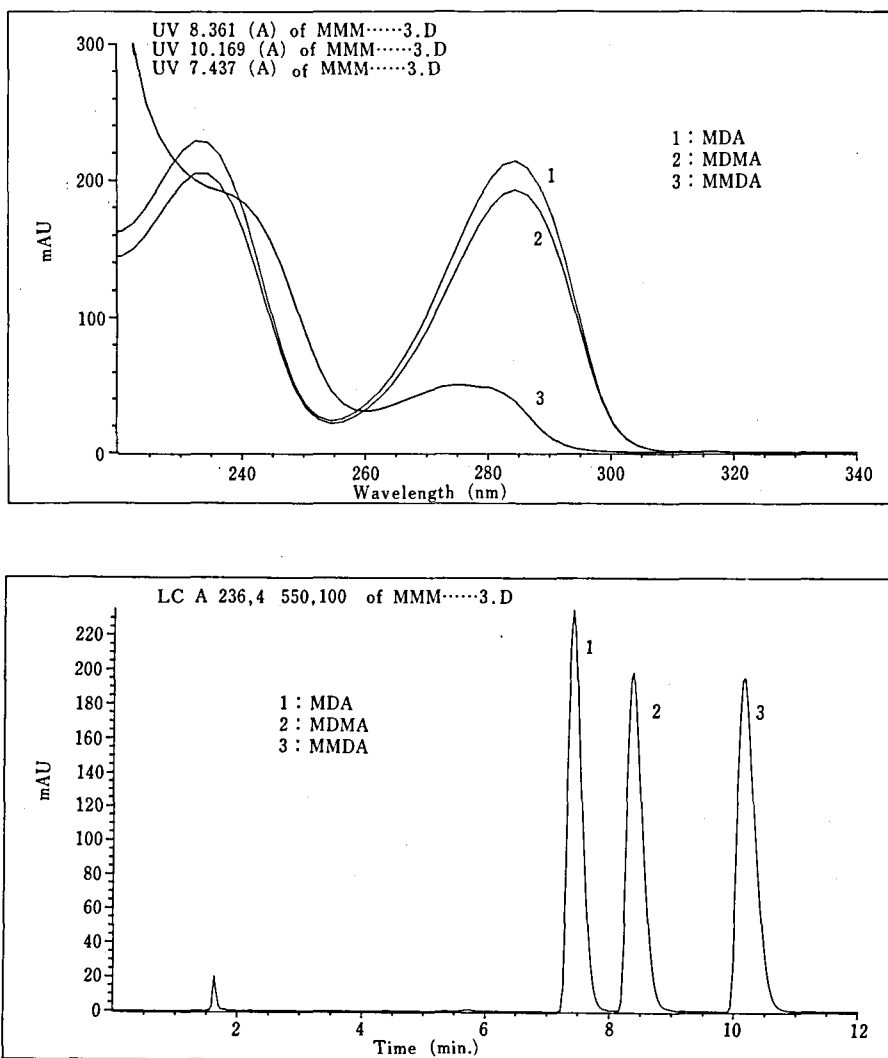


Fig. 1. HPLC chromatograms and UV spectra of MDA, MDMA and MMDA

Table 4. Retention times and principal peaks of MDA, MDMA and MMDA by GC/MS

	RT (min)	Base peak (m/z)	Principal peaks (relative abundance, %)
MDA	base 6.44	44	179(M ⁺ , 1.0), 136(21.2), 135(9.2), 77(5.6), 51(7.8), 45(4.4)
	TFA- 8.80	135	275(M ⁺ , 23.7), 162(47.1), 140(7.4), 77(25.7), 69(17.8), 51(19.7)
MDMA	base 7.33	58	193(M ⁺ , 0.2), 136(2.2), 135(4.2), 77(7.3), 56(5.8), 51(8.2)
	TFA- 10.01	154	289(M ⁺ , 23.2), 162(85.7), 135(61.3), 110(48.9), 77(33.8), 51(25.8)
MMDA	base 9.33	44	209(M ⁺ , 0.2), 166(22.6), 165(7.3), 92(2.3), 77(4.0), 42(5.1)
	TFA- 10.86	165	305(M ⁺ , 29.8), 192(45.7), 140(4.7), 120(5.8), 92(6.1), 77(11.8)

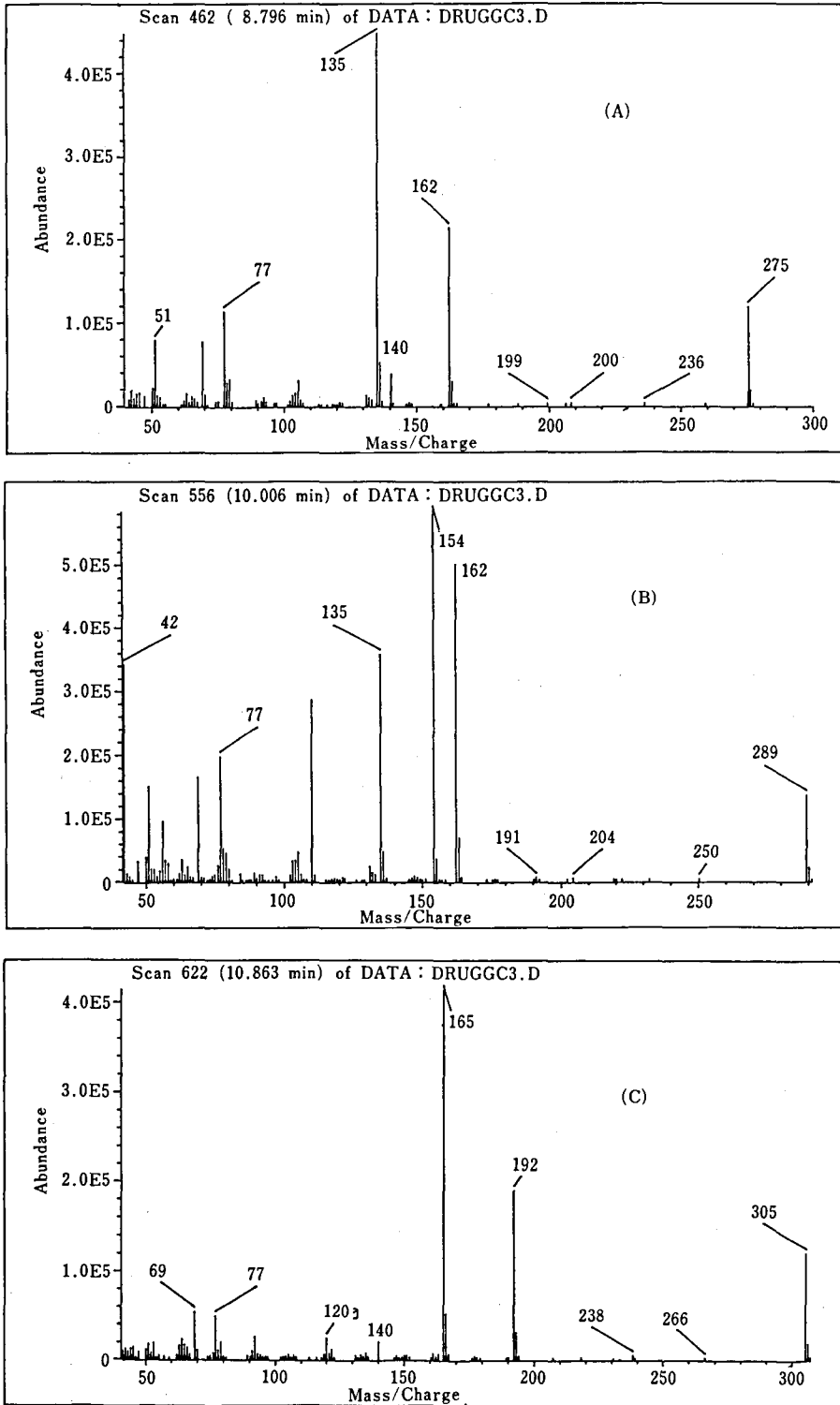


Fig. 2. EI mass spectra of TFA-MDA (A), TFA-MDMA (B) and TFA-MMDA (C)

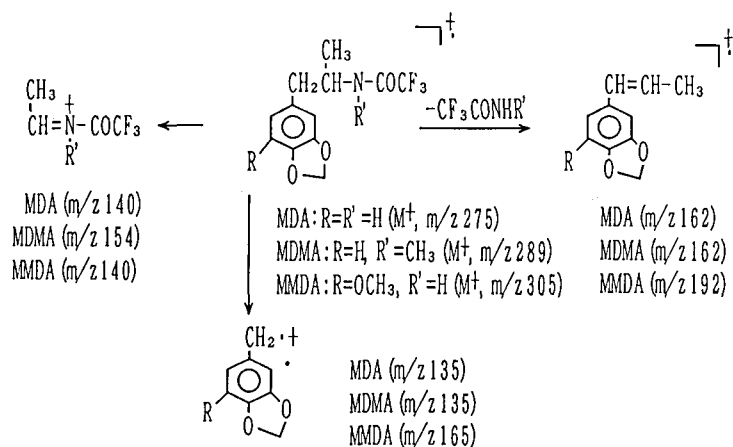


Fig. 3. Possible mass fragmentation patterns of TFA-MDA, TFA-MDMA and TFA-MMDA

m/z 135, MMDA : m/z 165) とに解裂するルートである。その他に、CF₃CO 基に関係した開裂が見られ、それぞれ M⁺-39[M⁺-HF₂; m/z 236 (MDA), 250 (MDMA), 266(MMDA)] および M⁺-67[M⁺-HF₂-CO; m/z 208(MDA), 222(MDMA), 238(MMDA)] に対応するピークが観測された。これらの解裂様式を基に類縁物質の確認、同定を行うことが可能であると思われる。

4.6 赤外吸収スペクトル (IR)

3種の化合物の KBr 錠による赤外吸収スペクトルを Fig. 4 に示す。3者ともよく類似したスペクトルを示している。

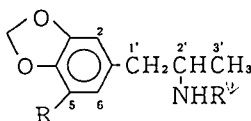
4.7 核磁気共鳴スペクトル (NMR)

3種の化合物のプロトンケミカルシフト (δ ppm) の帰属を Table 5 に示す。5.95 ppm 付近に methylenedioxy 基のメチレンシグナルが観測されている。興味深いことには、5位に OCH₃ 基が入ると、ベンゼン環の2, 6位の水素が他のものに比べ0.3 ppm 程度高磁場にシフトした。

結 論

本資料は向精神薬条約の別表 I に含まれる MDA, MDMA, MMDA の標準品の製造に基づき、3種の化合物の各種分析データを整理するとともに、相互の識別のためにデータの解析を行い、鑑定の際の参考資料として役立つものと思われる。

Table 5. Proton chemical shifts (ppm) of MDA, MDMA and MMDA in CDCl₃



	*NMR'	1'	2'	3'	O-CH ₂ -O	2	5	6	R'
MDA	1.32 bs	2.43 dd 2.63 dd	3.11m	1.11 d	5.93 s	6.69 d	R=H 6.75 d	6.64 dd	R'=H —
MDMA	1.41 bs	2.54 dd 2.60 dd	2.72m	1.05 d	5.93 s	6.75 d	R=H 6.69 d	6.64 dd	R'=CH ₃ 2.39 s
MMDA	1.34 bs	2.41 dd 2.64 dd	3.12m	1.12 d	5.94 s	6.39 d	R=OCH ₃ 3.90 s	6.36 d	R'=H —

bs: broad singlet, dd: double double doublet, m: multiplet, s: singlet, d: doublet

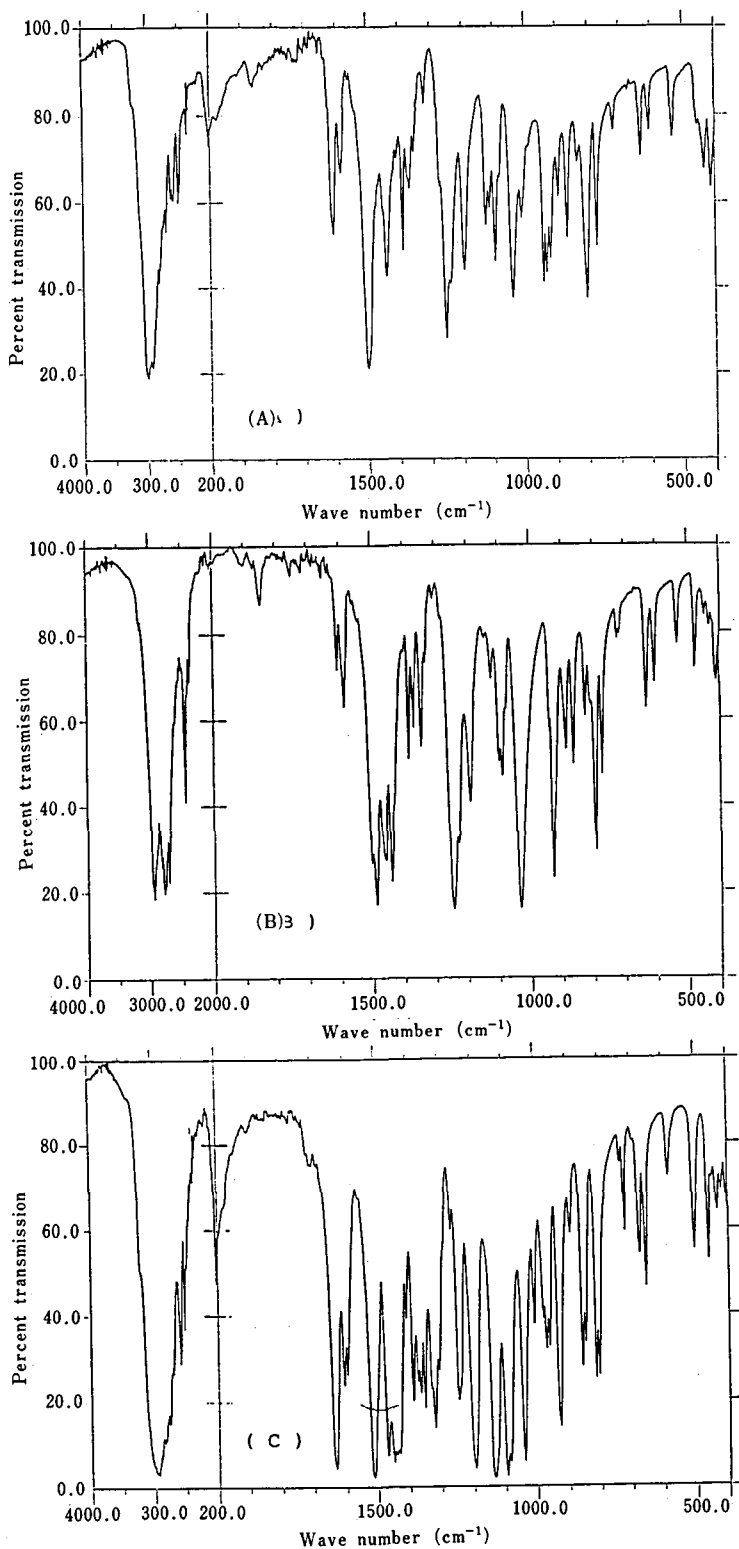


Fig. 4. IR spectra of MDA. HCl (A), MDMA. HCl (B) and MMDA. HCl (C)

文 献

- 1) 島峯望彦, 高橋一徳, 中原雄二: 向精神剤の同定に関する研究 (第6報) 幻覚剤 2, 5-Dimethoxy-4-methylamphetamine (STP), 2, 5-Dimethoxy-4-bromoamphetamine (DOB) および 2, 5-Dimethoxy-4-ethylamphetamine (DOET) の標準品製造と各種分析データ. 衛生試験, 107, 113~119 (1989)
- 2) Ramirez, F. A. and Weston, A. W.: The reduction of phenolic β -nitrostyrenes by lithium aluminium hydride. *J. Am. Chem. Soc.*, 72, 2781~2782 (1950)
- 3) Fitzgerald, R. L., Blanke, R. V., Glennon, R. A., Yousif, M. Y., Rosecrans, J. A. and Poklis, A.: Determination of 3, 4-Methylenedioxyamphetamine and 3, 4-Methylenedioxymethamphetamine enantiomers in whole blood. *J. Chromatogr.*, 490, 59~69 (1989)
- 4) Gunn, J. W. Jr, Sobol, S. P. and Moore, R. A.: Analytical manual, BNDD publishing, pp. 71~74 (1971)
- 5) DalCason, T. A.: The characterization of some 3, 4-methylenedioxyphenylisopropanolamine (MDA) analogs. *J. Forensic Sci.*, 34, 928~961 (1989)
- 6) Gunn, J. W. Jr, Sobol, S. P. and Moore, R. A.: Analytical manual, BNDD publishing, p. 209 (1987)
- 7) Division of Narcotic Drugs: "Recommended Methods for Testing Illicit Ring-substituted Amphetamine Derivatives", United Nations, pp. 42 (1987)
- 8) Shulgin, A. T.: Psychotomimetic amphetamines. II. Methoxy 3, 4-dialkoxyamphetamine. *Experientia*, 20, 366~367 (1964); *C. A.*, 61, 8209 (1964)

アクリル酸エチルのラット前胃上皮細胞 DNA 損傷試験

森本和滋・辻 和彦・大沢良一・高橋 惇

DNA Damage Test in Forestomach Squamous Epithelium of F344 Rat Following Oral Administration of Ethyl Acrylate

Kazushige Morimoto, Kazuhiko Tsuji, Ryoichi Osawa and Atsushi Takahashi

The alkaline elution assay were applied for testing DNA damage of forestomach squamous epithelium in male F344 rat after oral administration of ethyl acrylate (EA), a forestomach carcinogen. The animals were starved for 18 hr and then given a single oral dose of EA. No DNA damage were observed by EA at the concentration of 0.1~4.0%.

The weights of the forestomach increased with EA dose, reflecting edema and inflammation, but that of glandular stomach did not change with its dose.

(Received May 31, 1990)

はじめに

アクリル酸エチル (Ethyl acrylate, EA) はアクリル繊維, 塗料, 接着剤, アクリルゴムなどの製造や, 繊維, 皮革, 紙などの加工に利用されている¹⁾.

EA は雄性 F344 ラットに経口投与するとその頻度は低い²⁾が, 用量依存的に前胃扁平上皮癌を誘発することが Ghanayem ら³⁾によって報告されている. しかし EA は Ames テストは陰性であった³⁾. しかし我々は発癌性を有する化合物で, 遺伝子毒性試験の陰性の化合物でも, 発癌標的臓器に直接投与すると標的細

胞 DNA の損傷作用を有していることを Sodium o-phenylphenate (OPP-Na) の膀胱上皮細胞で見出し報告した^{4,5)}. そこで EA が標的臓器の前胃上皮細胞 DNA の損傷作用を有しているか否かを調べる目的で, 先に開発したアルカリ溶出法による前胃上皮細胞 DNA 損傷作用の検出法⁶⁾を用いて調べた.

実験方法

1. 投与方法および前胃上皮組織の採取

実験動物は雄性 F344/DuCrj ラット (チャールズリバー) (体重 140~160 g) を用い, 一夜絶食後, 被

Table 1. Alkaline elution rates of DNA in forestomach epithelium of F344 rats by EA

Concentration ^{a)} (%)	Number of experiments	Elution rate ^{b)} $K(\text{ml}^{-1}) \times 10^2$
0.0	12	4.92 ± 2.85
0.1	3	2.01 ± 1.52
0.8	2	2.97
4.0	2	1.78

a) Rats were starved for 18 hr and then given 4 ml of corn oil solution via gastric tube. The animals were killed 3 hr later and their forestomach were removed.

b) Data show mean values ± SD or mean values.

Table 2. Forestomach and glandular stomach weight in male F344 rats

Body weight (g)	Number of animals	Tissue weight ^{a)}	
		Forestomach (mg)	Glandular stomach (mg)
100-120	3	156.0 ± 9.5	518.3 ± 122.7
121-140	4	196.3 ± 15.0	441.5 ± 22.0
141-160	8	190.4 ± 18.8	540.4 ± 100.6

a) Data show mean values ± SD.

験化合物のコーンオイル液 4.0 ml を強制経口投与した。サンプルはEA およびアクリル酸は東京化成工業製を、マレイン酸ジエチル (Diethylmaleate, DEM) はSigma社製を用い、それぞれコーンオイル (Sigma社製) に溶解し調製した。

投与3時間後にエーテル麻酔下で放血屠殺し、胃を摘出し、充分 0.024 M EDTA-0.075 M NaCl (pH 7.5) 溶液で洗滌後、先に報告した方法⁶⁾にて前胃上皮細胞を集めアルカリ溶出法を行った。

2. 前胃および腺胃重量の測定

胃を摘出し、充分 EDTA-NaCl 溶液で洗滌後、注意深く前胃と腺胃を分け、濾紙にて水分を充分除去後秤量した。

結果と考察

1. EA 処理ラットにおける前胃上皮細胞 DNA 損傷試験

EA を0.1~4.0%、3時間処理後のDNA損傷作用の有無を調べたが、いずれの濃度でもむしろ対照群よりもアルカリ溶出速度定数は低かった (Table 1)。

1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine (MNNG) で

は0.023% (5 mg/kg) でアルカリ溶出速度定数は 0.0797 ± 0.0287 を示したが⁶⁾、EA はこの濃度の170倍の4.0%でもDNA損傷作用を有していないことは、本化合物は標的細胞DNAに対しても遺伝子毒性作用を有していないことがわかった。Waegemaekers と Bensink³⁾ は27種のアクリル酸エステルについて *Salmonella*-ミクロソーム試験 (TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA1538) を行っているがいずれも陰性であり、EAの前胃の発癌はNongenotoxicな過程を経て進行するものと考えられる。

2. EA によるラット前胃重量の増加

先のDNA損傷試験で4.0%EAで処理すると前胃が肥大していることが観察された。そこでラットの体重と前胃および腺胃の重量を測定した。Table 2に示したごとく、無処置ラットにおいて体重に依存して前胃、腺胃の重量も増加する傾向が認められた。したがって体重当りの組織重量比を対照群と処置群と比較した。

Fig. 1に示すごとくEAの濃度に依存して前胃重量が増加した。一方腺胃では増加率は低かった。4%EA処置3時間後の前胃重量の増加は対照群の187%

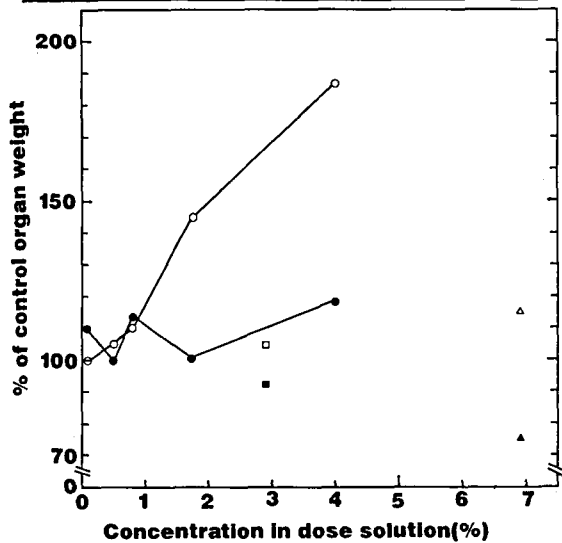


Fig. 1. The dose-response for the increase in forestomach weight by EA

Organ weight in the glandular stomach and forestomach of male F344 rats 3 hr following an oral dose were expressed for the percentage of control organ weight. Mean values were expressed from two rats. The concentration of acrylic acid (□, ■) and diethylmaleate (△, ▲) were equivalent molar concentrations (1.6 mmol) of 4% EA (○, ●). Forestomach, □, △, ○; Glandular stomach, ■, ▲, ●.

に達したが、同濃度で処置1時間後でも増加率は145%に達し、極めて短時間に重量の増加が観察された。一方 Fig. 1 に示すごとく4% EA と等モル濃度の2.9%アクリル酸や6.9%の DEM ではこのような作用は認められなかった。deBethizy ら⁷⁾ は雄性の Sprague-Dawley ラットに EA を投与すると前胃の重量が増加することを報告しているが、4% EA で153%の増加率であった。また同様に腺胃における増加率は低く、我々の行った F344 ラットとほぼ同じ傾向であった。外部からの観察で浮腫 (Edema) が認められたことも同じであった。

EA は雄性 F344 ラットに 100 mg/kg, および 200 mg/kg で週5回、2週間経口投与すると頻度は低いが用量依存的に前胃扁平上皮癌を誘発することが報告されている²⁾。また S. D. ラットに EA を投与して前胃の非タンパク質性の SH 基を測定すると、EA の濃度に依存して SH 基が減少し、2% EA 処理1時間後には85%の SH 基が消失していることが報告されている⁷⁾。一方 EA のエステル水解物アクリル酸は前胃 SH 基を減少する作用は極めて低かった⁷⁾。Miller ら⁸⁾ は EA とアクリル酸のグルタチオンとの反応性を *in vitro* でラット肝臓ホモジネート (10000×g 上

清) の存在下で比較しているが、4 mM EA は 2 mM GSH を15分間のインキュベーションで100%消失させたが、4 mM アクリル酸は全く GSH を消失させなかった。したがってアクリル酸は EA に比して SH とのマイケル付加反応 (Michael addition) がきわめて起こりにくいことが明らかとなった。

したがって EA はアクリル酸にエステル水解される前に曝露される臓器、すなわち前胃で Non-genotoxic な機構で、タンパク質の SH 基を修飾したり浮腫や炎症を伴いながら発癌へと導かれ、従来の DNA 修飾型の発癌物質とは異なったタイプの化合物であることがわかった。

ま と め

前胃に癌原性を有する EA を雄性 F344 ラットに強制経口投与し、3時間後に前胃扁平上皮細胞を集め、DNA 損傷作用の有無を調べたが、0.1~4.0%の範囲で DNA 損傷作用は認められなかった。

EA 処置ラットにおいては用量に依存して、前胃重量が増加し、浮腫が認められた。一方腺胃にはこのような増加はほとんど認められなかった。

文 献

- 1) 後藤 稠, 池田正之, 原 一郎: "産業中毒便覧", pp. 926~927, 医歯薬出版, 東京 (1984)
- 2) Ghanayem, B. I., Maronpot, R. R. and Matthews, H. B.: Association of chemically induced forestomach cell proliferation and carcinogenesis. *Cancer Lett.*, **32**, 271~278 (1986)
- 3) Waegemaekers, T. H. J. M. and Bensink, M. P. M.: Non-mutagenicity of 27 aliphatic acrylate esters in the Salmonella-microsome test. *Mutat. Res.*, **137**, 95~102 (1984)
- 4) Morimoto, K., Fukuoka, M., Hasegawa, R., Tanaka, A., Takahashi, A. and Hayashi, Y.: *Jpn. J. Cancer Res.*, **78**, 1027~1030 (1987)
- 5) Morimoto, K., Sato, M., Fukuoka, M., Hasegawa, R., Takahashi, T., Tsuchiya, T., Tanaka, A., Takahashi, A. and Hayashi, Y.: Correlation between the DNA damage in urinary bladder epithelium and the urinary 2-phenyl-1,4-benzoquinone levels from F344 rats fed sodium o-phenylphenate in the diet. *Carcinogenesis*, **10**, 1823~1827 (1989)
- 6) 森本和滋, 橋高浩史, 辻 和彦, 高橋 惇, 古川 文夫, 高橋道人, 林 裕造: アルカリ溶出法によるラット前胃扁平上皮細胞 DNA 損傷の検出. 衛生試験, **107**, 25~28 (1989)
- 7) deBethizy, J. D., Udinsky, J. R., Scribner, H. E. and Frederick, C. B.: The disposition and metabolism of acrylic acid and ethyl acrylate

in male Sprague-Dawley rats. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 8, 549~561 (1987)
8) Miller, R. R., Ayres, J. A., Rampy, L. W. and

McKenna, M. J.: Metabolism of acrylate esters in rat tissue homogenate. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 1, 410~414 (1981)

エイズ医薬品候補スクリーニング研究.

I. 1988年度報告

三木 隆*¹・大貫奈穂美*¹・新開敬行*¹・藪内 清*¹・小野哲郎*²
大友信也*²・松田良夫*³・松山雅子*³・秋吉京子*³・大竹 徹*⁴
森 治代*⁴・森本素子*⁴・上羽 昇*⁴・国田信治*⁴・藤田宣哉*⁵
石崎 徹*⁵・神村紀子*⁵・永田久紀*⁵・森下高行*⁶・小林慎一*⁶
三宅恭司*⁶・石原佑弼*⁶・磯村思无*⁶・斎藤隆行*⁷・小田和正*⁷
松崎 稔*⁷・桜田教夫*⁸・佐藤七七朗*⁸・野呂新一*⁸・三瀬勝利
牛島広治*⁹・清水博之*⁹・大野田秀樹*⁹・北村 敬*⁹・徳永 徹*⁹

Preliminary Screening for Antiviral AIDS Drugs.

I. Report on fiscal year 1988

Takashi Miki*¹, Nahomi Ohnuki*¹, Takayuki Shinkai*¹, Kiyoshi Yabuuchi*¹,
Tetsuro Ono*², Nobuya Ohtomo*², Yoshio Matsuda*³, Masako Matsuyama*³,
Kyoko Akiyoshi*³, Tohru Ohtake*⁴, Haruyo Mori*⁴, Motoko Morimoto*⁴,
Noboru Ueba*⁴, Nobuharu Kunita*⁴, Nobuya Fujita*⁵, Toru Ishizaki*⁵,
Noriko Kamimura*⁵, Hisanori Nagata*⁵, Takayuki Morishita*⁶, Shinichi Kobayashi*⁶,
Takashi Miyake*⁶, Yuichi Ishiwara*⁶, Shin Isomura*⁶, Takayuki Saito*⁷,
Kazumasa Oda*⁷, Minoru Matsuzaki*⁷, Norio Sakurada*⁸, Nanao Sato*⁸,
Shinichi Noro*⁸, Katsutoshi Mise, Hiroshi Ushijima*⁹, Hiroyuki Shimizu*⁹,
Hideki Ohnoda*⁹, Takashi Kitamura*⁹ and Tohru Tokunaga*⁹

Preliminary screening for antiviral AIDS drugs has been carried out, using three different *in vitro* assay systems. Among 105 samples tested, 13 were found to inhibit the growth of HIV *in vitro*. Eleven of 13 were well-known anti-HIV chemicals, while the remaining two of plant origin were new chemicals whose anti-HIV activities have not been reported elsewhere.

(Received May 31, 1990)

はじめに

エイズは20世紀の黒死病とよばれ、米国やアフリカを中心に、百万人を越す感染者がいるのではないかと
いわれている。数年の潜伏期を経て発症に至り、90%

以上の発症者は5年以内に死に至るといわれている^{1,2)}。エイズを対象とする医薬品は AZT (3-azido-3-deoxythymidine)³⁾ などが知られているが、効力や副作用の点で問題が多く、決定的な治療薬は見い出されていない。日本における患者数は多くはないが、世界的なエイズの流行は、人類の前途に暗影を投げかけている。

エイズ治療薬の開発を目的として、昭和63年度から、厚生省とヒューマンサイエンス振興財団が中心となり、エイズ医薬品候補物質のスクリーニング研究班が発足

*¹東京都立衛生研究所・*²大分県公害衛生センター・*³神戸市環境保健研究所・*⁴大阪府立公衆衛生研究所・*⁵京都府衛生公害研究所・*⁶愛知県衛生研究所・*⁷神奈川県衛生研究所・*⁸北海道立衛生研究所・*⁹国立予防衛生研究所

した。日本の医薬メーカーの新薬開発能力は秀れたものがあり、抗生物質を中心に、多くの秀れた新薬が世に送りだされている。研究班では参加医薬品メーカーから提供された合成化学物質や生薬抽出物について、国立予防衛生研究所、国立衛生試験所、大阪府立公衆衛生研究所など8地方衛生研究所から成る研究班で、候補物質のスクリーニング研究を行った。昭和63年度は105サンプルが提出され、そのうち2サンプルが今まで知られていなかったエイズウイルスの増殖を抑制する有望な物質であることが判明した。

実験方法

スクリーニングはMT-4細胞のHIV-1感染による細胞障害性の抑制を指標としたマイクロプレート法を用いた。この方法で活性の認められたものは、生細胞数測定法もしくは巨細胞形成抑制法で抗HIV活性の確認を行った。

1. マイクロプレート法

MT-4細胞（高知医科大学三好勇夫教授により分離されたヒトT細胞性白血病患者由来のリンパ球、CD4⁺, HTLV-1⁺）はHIV-1(HTLV-IIIB株)に対して高い感受性を持ち、HIV感染後3～5日でCPE (cytopathogenic effect, 細胞変性効果) が出現し、ほとんどの細胞が死滅する。顕微鏡下の観察により、CPEの判定は容易である。添加した薬剤がこのCPEの発現を抑制するか否かで、薬剤の抗HIV活性を判定する。方法は以下のとおりである。

丸底96ウェルマイクロプレート (Nunc社) に試験薬剤の2倍段階希釈系列 (100 μ l/ウェル12段階) を作る。対数増殖期にあるMT-4細胞をプレート1枚当たり約600万個になるように遠心分離により集め、少量の培地に懸濁する。この浮遊液に100 TC ID₅₀/mlになるようにHIVを加えて37°C 1時間吸着させる。吸着後プレート1枚当たり10 mlの培地を加え、100 μ l/ウェルを薬剤希釈系列に添加する。このときの細胞濃度は30万個/mlとなる。非感染細胞と薬剤非添加細胞を対照にとる。5%炭酸ガス存在下、37°Cで培養。3日培養後、顕微鏡観察により主として試料による細胞毒性を調べる。同時に感染時と同じ薬剤の2倍段階希釈系列のプレートを作り、3日間培養したプレートから1/5～1/3の細胞を移しかえる。感染後6日目に判定を行う。顕微鏡観察によりHIV感染によるCPE発現の有無を判定する。薬剤が細胞毒性を示さない濃度でHIV感染によるCPE発現の抑制がみられた場合、有効と判定される。

2. 生細胞数測定法

方法はマイクロプレート法と同様であるが、スケールアップされているところと、トリパンブルー染色により生細胞数を測定するところに違いがある。方法は以下のとおりである。

平底24ウェルプレートに所定の濃度に希釈した薬剤溶液を500 μ l加える。一方、対数増殖期にあるMT-4細胞を遠心分離により集め、少量の培地に浮遊させる。この浮遊液に対し、MOI (multiplicity of infection) = 0.001になるようにHIVを加えて37°C 1時間吸着させる。吸着後直ちにウェル当たり500 μ lとり薬剤希釈溶液を混合し、炭酸ガス存在下37°Cで培養する。非感染細胞と薬剤無添加感染細胞を対照にとる。感染後3日目にサンプルを攪拌して少量をとり出し、トリパンブルー染色を行う。検鏡により非染色細胞を計測し生細胞とする。同時に感染時と同様の薬剤希釈系列を用意し、培養液の1/5～1/3を新しい希釈系列に移しかえる。感染6日目にも生細胞数を同様の方法により測定する。薬剤の存在により、どの濃度域でウイルス増殖が抑制されているかを調べ、有効性の指標とする。

3. 巨細胞形成抑制法

HIVが持続感染しているMOLT-4細胞 (J. MinowadaらによりヒトT細胞性白血病患者より分離された白血球細胞、HTLV⁻, CD4⁺) と非感染MOLT-4細胞を混合培養すると、MOLT-4(HIV)細胞上に発現したHIV蛋白と非感染MOLT-4細胞のCD-4レセプターが結合し多核巨細胞が形成される。薬剤の添加によりこの巨細胞形成が抑制されるか否かで、抗HIV活性を計測する。方法は以下のとおりである。

平底24ウェルプレート (Nunc) に所定の濃度に希釈した試料溶液500 μ lを加える。一方培地に懸濁した持続感染MOLT-4(HIV)細胞浮遊液100万個/mlをウェルあたり250 μ l加え、さらに同じ濃度の非感染MOLT-4細胞浮遊液250 μ lを加えて炭酸ガス存在下37°Cで混合培養する。培養後数時間で巨細胞形成が認められ、20時間後に明確になる。少量をとり、トリパンブルー染色し、生細胞数を測定し、Fusion Indexを算出する。

結 果

マイクロプレート法で試験された合計105サンプル中抗HIV活性を示した13サンプルの有効濃度、最小毒性濃度および化合物名 (既知物質のみ) をTable 1に示す。残りの92サンプルは抗HIV活性は認められなかった。これら105サンプルは参加企業20社から提供されたものであり、国立予防衛生研究所と各地方衛

Table 1. Effective doses and minimum cytotoxicity doses of chemicals which showed anti-HIV activities *in vitro* (microplate assay with MT-4 cells infected with HIV-1)

Sample No.	Effective doses ($\mu\text{g/ml}$ or U/ml)	Minimum cytotoxicity doses ($\mu\text{g/ml}$)	Chemicals	Company
880031	1,000~125 $\mu\text{g/ml}$	1,000	castanospermine	A
880032	1,000~500 $\mu\text{g/ml}$	1,000	deoxynojirimycin	A
880042	250 $\mu\text{g/ml}$	500	new chemical	B
880047	125~3.9 $\mu\text{g/ml}$	250	new chemical	C
880052	250~15.6 $\mu\text{g/ml}$	500	ddA	D
880090	1,000~31.3 $\mu\text{g/ml}$	1,000	dextran sulfate 1000	E
880091	1,000~2.0 $\mu\text{g/ml}$	1,000	dextran sulfate 5000	E
880092	1,000~3.9 $\mu\text{g/ml}$	1,000	dextran sulfate 10000	E
880093	1,000~3.9 $\mu\text{g/ml}$	1,000	dextran sulfate 40000	E
880094	1,000~7.8 $\mu\text{g/ml}$	1,000	Hoe/Bay/946	E
880095	10,000~78 U/ml		IFN	F
880096	10,000~5 U/ml		IFN	F
880101	100~25 $\mu\text{g/ml}$	100	well-known chemical?	G

Table 2. Anti-HIV activities of sample no. 880047 with microplate assay method

Tube no	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	UC	IC
Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	500	250	125	62.5	31.3	15.6	7.8	3.9	2.0	1.0	0.5		
3 days incubation													
Cytotoxicity	×	○	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
CPE	-	-	-	-	-	±	±	±	±	+	+	-	+
6 days incubation													
Cytotoxicity	×	×	○	◎	◎	◎	◎	◎				◎	○
CPE			-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+

UC, uninfected control; IC, infected control.

Cytotoxicity: ◎, cells grew well as in UC; ○, growth of cells was partially inhibited by the chemical added; ×, growth of cells was completely inhibited by the chemical added.

CPE: +, CPE was observed as in IC; +, CPE was partially observed; ±, CPE was observed very weakly; -, CPE was not observed.

生研究所の2カ所で試験を受けた。得られた実験結果はほぼ一致しており、再現性が認められた。Table 1の13サンプル中、有効濃度域が広く、最も有望と考えられる検体番号880047のマイクロプレート法、生細胞数測定法および巨細胞形成抑制試験の結果をTable 2, 3, 4に示す。いずれの試験でも明らかに有効性が認められ、HIV ウイルスの増殖が抑制されていた。

考 察

Table 1にまとめられているごとく、提供された105サンプル中13のものに、*in vitro* 試験で抗 HIV 活性が認められた。しかし、このうちの10サンプル

(880031, 32, 52, 90~96)は、抗 HIV 活性があることが広く知られている物質であり、原料や精製法が原報と異なるだけのものである。880101も既知物質と思われる。これらのものは抗 HIV 活性を示したことは当然であり、もちろん新発見とはいえない。

これに対して880042と880047は有望であり、今後の研究が待望される。なお、両者とも植物由来のものであるが、特許等の問題があり、詳細は明らかにすることはできない。ほぼ完全に精製され、構造式を判明しているものと思われる。ともあれ、第一次スクリーニングとはいえ、二つの新しい抗 HIV 医薬品候補物質が発見されたことは、一つの成果をいえよう。

Table 3. Anti-HIV activities of sample no. 880047 with trypan blue dye exclusion method

Tube no	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	UC	IC
Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	500	250	125	62.5	31.3	15.6	7.8	3.9	2.0	1.0		
3 days incubation												
Cytotoxicity	○	○	○	◎	◎	*	◎	◎	◎	◎	◎	◎
CPE	-	-	-	-	-	*	-	-	-	+	-	+
6 days incubation												
Cytotoxicity	×	×	○	◎	◎	*	◎	◎			◎	
CPE	-	-	-	-	-	*	-	-	+	+	-	+

UC, uninfected control; IC, infected control

Cytotoxicity: ◎, cells grew well; ○, growth of cells was partially inhibited by the chemical added; ×, growth of cells was completely inhibited by the chemical added, *, cytotoxicity could not be determined by contamination of fungi.

CPE: +, CPE was observed as in IC; -, CPE was partially observed; -, CPE was not observed at all; *, CPE could not be observed by contamination of fungi.

Table 4. Anti-HIV activities of sample no. 880047 with multinucleated giant cell formation inhibition assay

Tube no.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	UC	FC
Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	500	250	125	62.5	31.3	15.6	7.8	3.9	2.0	1.0		
Cytotoxicity	○	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
Giant cell	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+

UC, unfused control; FC, fused control.

Cytotoxicity: ◎, growth of cells was observed as in UC; ○, growth of cells was partially inhibited.

Giant cell: +, multinucleated giant cells were formed as in FC; -, formation of giant cells was partially inhibited by the chemical added; -, giant cells were not observed at all.

文 献

- Gottlieb, M. S., Jeffries, D. J., Mildvan, D., Pinching, A. J., Quinn, T. C. and Weiss, R. A.: "Current topics in AIDS. Vol. 1". John Wiley & Sons, Chichester, (1987)
- Bridge, T. P., Mirsky, A. F. and Goodwin, F. K.: "Psychological, neuropsychiatric, and substance abuse aspects of AIDS". Raven Press, New York (1988)
- Mitsuya, H., Weinhold, K. J., Furman, P. A., Clair, M. H. St., Lehrman, S. N., Gallo, R. C., Bolognesi, D., Barry, D. W. and Broder, S.: 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BWA5090): An antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-cell lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 7096~7100 (1985)

必須元素のラット臓器内濃度に関する研究 (第一報)

鈴木幸子・小川幸男・鎌田栄一・金子豊蔵・黒川雄二

Study on Essential Metal Concentration in the Organs of Rats (Report 1)

Sachiko Suzuki, Yukio Ogawa, Eiichi Kamata, Toyozo Kaneko and Yuji Kurokawa

Concentration of 5 elements (Ca, Cu, Fe, Mg, Zn) in 10 organs (brain, heart, lung, liver, kidney, spleen, testis, thymus, salivary gland and bone) and serum of rats were determined by inductively-coupled argon plasma atomic emission spectrometry (ICP). Samples were digested with nitric acid and perchloric acid in a sealed double Teflon vessel with polypropylene jacket by heating with a microwave oven.

The concentration of 5 elements in the organs can be grouped into 5 categories as follows. ① heart, liver and spleen (Mg>Fe>Ca>Zn>Cu) ② lung and kidney (Mg>Ca>Fe>Zn>Cu) ③ brain, thymus and testis (Mg>Ca>Fe=Zn>Cu) ④ serum and bone (Ca>Mg>Fe=Zn>Cu) ⑤ salivary gland (Ca=Mg>Fe>Zn>Cu).

(Received May 31, 1990)

はじめに

近年、微量元素の生体内バランスに関する問題に大きな関心もたれ始めている。従来までは、この微量元素を必須元素と有害元素と区別してその生体機能を研究してきたが、最近では、全ての微量元素の生体内バランスを考えながら、それぞれの元素の生物学的役割や毒性発現機構などを考える時代になっている。特に血液、尿、頭髪など入手が容易な生体試験中の微量元素濃度は生物学的指標として環境汚染問題との関連を含めて数多く測定されている。その結果、生体内の微量元素のバランスが崩れると、老化¹⁾、悪性腫瘍²⁾、循環器疾患³⁾、老人性脳疾患⁴⁾、免疫疾患⁵⁾などの原因になることも少しずつ解明されてきている。

本報では最近急速に普及しつつある誘導結合アルゴンプラズマを励起源とする発光分光分析法 (inductively coupled argon plasma atomic emission spectrometry: ICP) によるラット臓器 (脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、精巣、胸腺、顎下腺)、骨 (大腿骨) および血清中の多元素同時分析 (Ca, Cu, Fe, Mg, P, S, Zn) を行ない測定条件および若干の正常値を得たので、その成績を報告する。

実 験

1. 試薬および標準溶液

試料分解のための硝酸、過塩素酸は有害金属測定用試薬を使用した。検量線用標準溶液として各種金属に

ついては和光純薬製原子吸光用標準液 (1000 ppm)、リンは同社製光電用リン標準液 (1 mg/ml)、イオウは容量分析用 N/10 硫酸を用いて調製した。

標準溶液は多元素分析用として多元素混合溶液とした。多元素混合溶液は元素間の共存塩類、分光干渉および化学的安定性を考慮した Table 1 に示すような4グループに分けたものを調製した。

検量線の作成は空試験溶液と既知濃度標準溶液を使う1点標準法によった。既知濃度標準溶液には Table 1 に示した各標準溶液を用いた。

2. 装置および測定条件

誘導結合プラズマ (ICP) 発光分光分析装置は真空多元素同時分析型 Thermo-Jarrell Ash 社製 ICAP-61 を使用した。装置の構成および測定条件をまとめて Table 2 に示す。試料分解には電子レンジ用試料分解容器 (三愛科学製) を使用した。電子レンジ (日立 MR-M26) を出力 200 W で使用した。

3. 試料の採取と分解方法

Slc: Wistar 系雄ラット6週齢を5匹使用した。エーテル麻酔下で眼窩静脈叢より採血し、頸動脈切断による放血後肝臓、腎臓、脾臓、精巣、心臓、肺、脳、胸腺、顎下腺、骨を摘出した。各臓器は湿重量で約 300 mg、骨は約 350 mg を精秤し、血清は 1 ml を内容積 7 ml のテフロン製小容器に取り、濃硝酸 3 ml と過塩素酸 1 ml を加えて1昼夜放置後、ポリプロピレン製外筒にテフロン製試料容器をセットした電子レンジ用試料分解容器に試料を入れた小容器を入れ、蓋

Table 1. Compositions of mixed standard solutions

Standard 1	Standard 2 $\mu\text{g ml}^{-1}$	Standard 3 $\mu\text{g ml}^{-1}$	Standard 4 $\mu\text{g ml}^{-1}$
Blank	Ca 10	Fe 10	P 10
	Cu 10	Na 10	S 10
	K 100		
	Mg 10		
	Sr 10		
	Zn 10		

Table 2. Instrumentation and operating conditions

ICP spectrometer	Thermo-Jarrell Ash ICAP-61
RF frequency	27.1 MHz
RF power	1.1 kw
Reflected power	<5 w
Coolant gas	argon, 18 l/min
Auxiliary gas	argon, 0/min
Carrier gas	argon, 0.5 l/min
Observation height	18 mm above work coil
Sample intake rate	1.5 ml/min
Exposure	10 sec

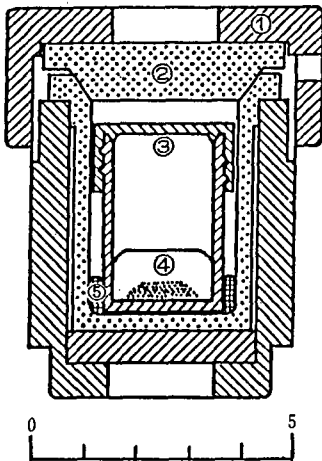


Fig. 1. Microwave acid digestion bomb made of Teflon and polypropylene

- ① PP-25, polypropylene jaket
- ② Teflon outer vessel (50 ml capacity)
- ③ Teflon PFA inner vessel (7 ml capacity)
- ④ sample+mixed decomposing acids
- ⑤ deionized water

を固く締め付けた。この電子レンジ用試料分解容器 (Fig. 1) 4個を家庭用電子レンジに入れ、5分間の予備加熱を行った後、さらに7.5分間加熱して湿式分解⁹⁾

を行った。放冷後開栓し、分解液をテフロンビーカーに移し、ホットプレート上でほとんど蒸発乾固するまで加熱を続けた (約1時間)。放冷後、蒸留水で一定重量とし測定用検体とした。

結果および考察

1. 試料の前処理について

ICP 発光法は試料を溶液にするのが一般的であるので、灰化法により試料を溶液に調製した。血清については試料と希釈液 (10 mmol/l 前後の塩酸または硝酸) を合わせた単純希釈法が一般に用いられる。今回、使用した噴霧式の分析装置 (ICP) の場合には試料の粘度が測定感度に影響するため10倍以上に希釈することが必要であり測定元素によっては検出限度以下になる場合がある。そのため本実験では血清も分解操作を行った。

従来からの湿式灰化法はケルダールフラスコなどの開放式容器で硫酸、過塩素酸、硝酸などの混酸を酸化試薬として試料に加えて加熱する。しかしながら、この湿式灰化法の場合灰化に多くの時間を費やし、開放式であるため酸の消費量も多く、外部からの汚染も考えられる。そこで密封方式である電子レンジを用いた湿式灰化法⁶⁻⁷⁾を用いることにした。

血清および各臓器における希釈倍数および分解希釈溶液中のおおよその分析元素濃度を Table 3 に示す。その結果骨の Ca 濃度が約 690 ppm、血清の Na 濃度が 540 ppm、全臓器を通して K 濃度が 90~230 ppm、P 濃度が 70~240 ppm、S 濃度が 50~350 ppm と高い値を示したが、米谷ら⁹⁾の報告からこれらの高い濃度の元素が今回測定した他の元素に与える分光干渉は問題にならないと考えられた。また高濃度を示した Ca が 1000 ppm まで直線性を有することが認められたので、Table 4 に示した希釈倍数で測定を行なった。

2. 正常ラットの臓器中の元素分布について

すべての生体組織は主として11種の主要元素 (H, C, N, O, Na, Mg, P, S, Cl, K, Ca) で構成され、その他成長・発育機能の維持のために Fe, Cu, Zn, Co, Mo などの元素が微量に必要であることが知られている¹⁰⁾。これらの元素と生体とのかかわり合いを研究するにあたって、その生体組織内での存在量・分布・化学形・代謝などを調べる必要がある。そこで上記16元素のうち現在の ICP 発光分光分析装置で測定可能な9元素すなわち Ca, Cu, Fe, Mg, Zn, K, Na, P, S の分布・存在量を Wistar 系雄ラット6週齢 (5例) の10臓器 (脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、胸腺、頸下腺、精巣、骨) および血清について測定した。そのう

Table 3. Concentrations of 9 elements in the digested sample solution ($\mu\text{g}/\text{ml}$)

Wave length ^{a)}	Brain	Lung	Heart	Liver	Kidney	Spleen	Testis	Thymus	Salivary	G. Bone	Serum
	dilution rate										
	18	25	23	30	35	26	30	25	35	100	5
Ca 3179	3.0	3.0	2.0	1.2	2.0	1.5	1.5	1.1	10	690	20
Cu 3247	0.11	0.17	0.22	0.2	0.25	0.2	0.06	0.05	0.07	0.02	0.2
Fe 2599	0.85	2.5	2.5	3.0	1.3	55	0.55	0.55	0.6	0.3	0.48
Mg 2790	9.20	6.0	6.0	7.2	6.0	8.5	7.0	9	10	10	6.5
Zn 2138	0.8	1.1	0.8	1.1	0.85	1.0	0.8	0.8	0.55	0.55	0.32
K 7964	230	120	150	110	90	170	145	200	115	18	48
Na 5889	55	42	40	20	40	20	35	18	18	17	540
P 1782	180	114	110	110	85	140	70	200	95	240	31
S 1820	75	60	110	60	55	70	350	52	36	10	175

^{a)} nm

Table 4. Concentrations of five elements in organs of rats

	Ca $\mu\text{g}/\text{g}$	Cu $\mu\text{g}/\text{g}$	Fe $\mu\text{g}/\text{g}$	Mg $\mu\text{g}/\text{g}$	Zn $\mu\text{g}/\text{g}$
Brain	50.5 \pm 1.8	1.87 \pm 0.08	14.3 \pm 0.60	150 \pm 4.01	13.2 \pm 0.42
Heart	47.1 \pm 1.62	5.24 \pm 0.15	58.0 \pm 3.28	219 \pm 5.37	17.5 \pm 0.47
Lung	80.8 \pm 3.55	4.26 \pm 0.07	70.3 \pm 41.1	149 \pm 10.9	27.3 \pm 2.24
Liver	39.5 \pm 5.67	7.64 \pm 0.69	94.4 \pm 2.22	239 \pm 9.25	32.9 \pm 1.96
Kidney	69.0 \pm 4.70	8.71 \pm 0.50	43.6 \pm 3.29	196 \pm 10.5	27.3 \pm 1.47
Spleen	42.7 \pm 3.47	5.95 \pm 1.97	154 \pm 10.7	227 \pm 8.44	27.7 \pm 0.95
Thymus	30.2 \pm 3.35	1.45 \pm 0.09	13.8 \pm 2.00	232 \pm 9.27	20.9 \pm 1.00
Salivary	345 \pm 37	2.46 \pm 0.14	26.3 \pm 12.3	331 \pm 24	19.5 \pm 1.58
Testis	46.3 \pm 2.23	1.36 \pm 0.10	13.3 \pm 1.12	170 \pm 10.9	20.6 \pm 1.24
Bone	76.8 \pm 8.05 ^{a)}	4.73 \pm 0.12	40.4 \pm 3.42	1.7 \pm 0.15 ^{a)}	58.1 \pm 3.79
Serum	109 \pm 0.74	1.04 \pm 0.04	2.01 \pm 0.25	24.3 \pm 1.09	1.41 \pm 0.09

Figures indicate average \pm S. D. ^{a)}: mg/g

ち Ca, Cu, Fe, Mg, Zn の結果を Table 4 に示す。以下 5 元素の濃度について若干補足説明をする。Ca 濃度の高い組織は骨で、以下、顎下腺、血清、肺、腎臓の順であった。

Cu 濃度は腎臓で 8.7 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、肝臓で 7.6 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、脾臓で 6.0 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、血清では 1.04 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。その他精巣、胸腺、顎下腺、骨についての測定値も算出されているが、測定に用いた分解溶液中の分析値が検出限界近くであったため、分析値の精度および正確さに問題があるように思われる。

Fe 濃度は脾臓が 154 $\mu\text{g}/\text{g}$ と最も高く、以下肝臓、肺の順であった。

Mg 濃度はほとんどの臓器で高い値を示し、Ca 濃度の 2 倍から 8 倍の値であったが、骨と血清では逆に Ca 濃度の 1/38, 1/4.5 と低い値を示した。しかし顎

下腺だけは Ca 濃度と Mg 濃度がほとんど同じ値であった。

Zn 濃度は骨が高く、次に肝臓で、肺・腎臓・脾臓の 3 臓器が 27 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、胸腺・顎下腺・精巣の 3 臓器は 20 $\mu\text{g}/\text{g}$ であった。

これらの結果から各生体組織は 5 元素の濃度分布から以下の五つに分類された (Fig. 2)。

- ①. 心臓, 肝臓, 脾臓 (Mg>Fe>Ca>Zn>Cu)
- ②. 肺, 腎臓 (Mg>Ca>Fe>Zn>Cu)
- ③. 脳, 胸腺, 精巣 (Mg>Ca>Fe=Zn>Cu)
- ④. 血清, 骨 (Ca>Mg>Fe=Zn>Cu)
- ⑤. 顎下腺 (Ca=Mg>Fe>Zn>Cu)

このことは正常状態でも生体に吸収された元素が組織間あるいは血清との間に濃度分布の差があることを示している。したがって血清中の元素濃度のみで特定

臓器等作用部位でのその元素の欠乏ないし過剰状態を把握できないことを意味している。

例えばCrは血液中濃度は組織中濃度の1/10~1/100と少なく、また血液中濃度の変動は、組織中濃度の変動より大きくなることが多いと報告されている¹¹⁾。また正常状態での金属の分布でCdの場合は腎臓に、Pbの場合は骨に集中し、血中濃度は低い値を示しているため血中濃度から蓄積濃度を推測出来ない場合があることも知られている。また、無機水銀、有機水銀の作用のように、同じ金属でもその化学形態によっても分布・作用が異なることにも注意することも必要である^{12,13)}。さらに最近では微量元素間の相互作用、特にセレン、亜鉛、あるいは銅と他元素との相互作用に関する報告が多く取り上げられている¹⁴⁾。今回の報告は5例という少数例の結果であること、放血方法として頸静脈切断を行なっているため臓器によっては血液の影響が残っている可能性も考えられるため、還流を行なった後の臓器内元素濃度についても比較検討する必要がある。以上のことから、この正常値は暫定値として今後追加測定する必要がある。さらに性差、週齢の違いについても検討する必要があると考えられる。

文 献

- 1) 山口賢次：加齢と微量元素，最新医学，45，753~757 (1990)
- 2) 竹内重雄，木許一良：胃潰瘍における金属の動態とその病態生理学的意義，“微量元素と消化器疾患”荒川泰行，竹内重雄編，新興医学出版，東京(1990) pp. 55~59
- 3) 家森幸男：循環器疾患と微量元素，最新医学，45，684~691 (1990)
- 4) Chazot, G. and Broussolle, E.: Brain Aging and Trace Elements in Human “Trace Elements in Clinical Medicine” ed. Hiroshi Tomita, Springer-Verlag, Tokyo (1989) pp. 39~46
- 5) 大沢基保：免疫と微量元素，最新医学，45，747~752 (1990)
- 6) Kojima, I., Uchida, T. and Iida, C.: Pressurized microwave digestion of biological samples for metal determination. *Analytical Sciences*, 4, 211~214 (1988)
- 7) Uchida, T., Kojima, I. and Iida, C.: Determination of metals in samples by atomic absorption and emission spectrometry with discrete nebulization, *Analytica Chimica Acta*, 116, 205~210 (1980)
- 8) Okamoto, K. and Fuwa, K.: Low-contamination digestion bomb method using a teflon double vessel for biological materials, *Analytical chemistry*, 56, 1758~1760 (1984)
- 9) 米谷民雄，内山貞夫，齊藤行生：ICP発光分光法の分光干渉に関する検討と市販ミネラルウォーターの分析への応用，衛生試験，107，132~134 (1983)
- 10) 吉川 博：微量元素と生体，臨床検査，24，775~782 (1980)
- 11) 和田 攻，郭 新彪，真鍋重夫：生体内微量元素とその臨床検査における意義，“臨床検査MOOK 22”生体内金属，山中 學，村地 孝，林 康之編，金原出版，東京 (1985) pp. 126~135
- 12) 内山 充：化学の領域増刊126号，“環境汚染物質と毒性”無機物質篇（山根靖弘・高島英伍・内山充編）pp. 25~34 (1980)
- 13) 米谷民雄：食品中の亜鉛およびカドミウムの化学形と消化管吸収，食衛誌，27，145~155 (1986)
- 14) 井村伸正：微量元素の相互作用，“微量元素と生体”，木村修一，左右田健次編，秀潤社，東京，(1987) pp. 57~70

国立衛生試験所塩酸チアミン標準品 (Control: 891)

岡田敏史・広重律子・田中正一・村井真美・木村俊夫

Thiamine Hydrochloride Reference Standard (Control 891)
of National Institute of Hygienic Sciences

Satoshi Okada, Ritsuko Hiroshige, Masakazu Tanaka,
Mami Murai and Toshio Kimura

The raw material of thiamine hydrochloride was examined for preparation of the "Thiamine Hydrochloride Reference Standard". Analytical results were as follows: melting point 242.7°; pH 3.2 (1g, water, 100 ml); IR spectrum the same as that of JP Reference Standard (Control: 841); one and two impurities detected by TLC and by HPLC analyses, respectively; assay by thiochrome method 100.3% and by HPLC 100.1% against the JP Reference Standard.

Based on the results, the present raw material was authorized to be the Reference Standard of the National Institute of Hygienic Sciences.

(Received May 31, 1990)

塩酸チアミンとその製剤（散剤，注射液）および硝酸チアミン，乾燥酵母の定量試験に用いられる国立衛生試験所塩酸チアミン標準品（日本薬局方標準品）を製造したので報告する。

1. 原料

武田薬品（株）より購入した。同社による試験成績は以下のとおりである：pH 3.19；水分0.20%；窒素16.4%（理論値：16.6%）；塩素 理論値(21.03%)の99.6%；定量100.0%（チオクローム法）および100.4%（HPLC法）。

2. 参照物質および試薬

参照物質として前回標準品（Control: 841）¹⁾を用い，試薬類は特級品または特級相当品を用いた。また，薄層クロマトグラフ法では蛍光剤入りのプレコート薄層板シリカゲル 60F₂₅₄（20×20 cm，層厚 0.25 mm，メルク社）を用いた。

3. 装置

自記分光光度計 Ubest-50（日本分光），赤外分光光度計 IR-700（日本分光），デジタル微量水分測定装置 AQ-1（平沼産業）を用いた。また，液体クロマトグラフ装置は島津製作所製のポンプ LC-5A，検出器 SPD-2A，データ処理装置 C-R3Aを用いた。

4. 試験方法

特に記すものの他は第十一改正日本薬局方（1986）²⁾の一般試験法および「塩酸チアミン」の試験法を準用した。

5. 試験成績

1) 性状：白色の結晶または結晶性の粉末で，わずかに特異なおいがある。

2) pH: 3.2 (1g, 水, 100 ml)

3) 紫外吸収スペクトル：本品の0.001N塩酸水溶液中(1→100000)における紫外吸収スペクトルを Fig. 1 に示した。波長 246 nm に吸収の極大が観察され，スペクトルの形状は前回標準品のものと一致した。

4) 赤外吸収スペクトル：臭化カリウム錠剤法を用

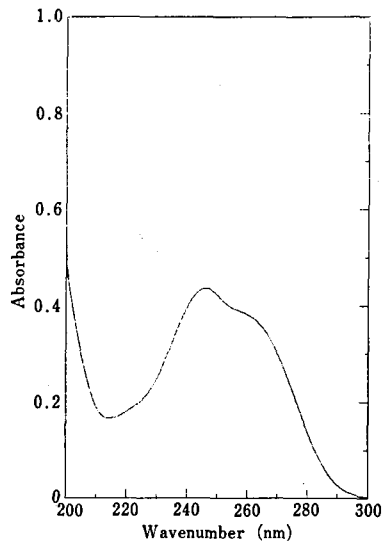


Fig. 1. Ultraviolet spectrum for thiamine hydrochloride reference standard

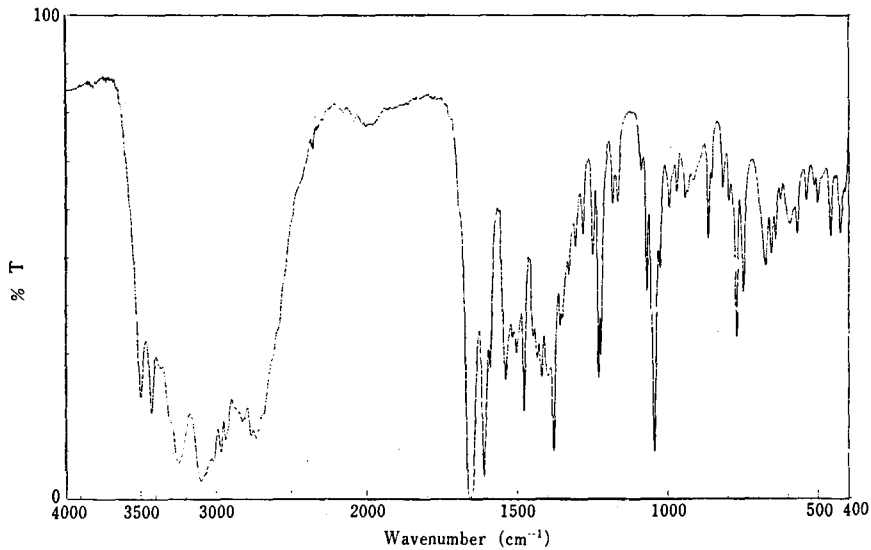


Fig. 2. Infrared spectrum for thiamine hydrochloride reference standard (KBr tablet)

いて赤外吸収スペクトルを測定した結果、前回標準品の赤外吸収スペクトルに一致した (Fig. 2).

5) 純度試験

i) 薄層クロマトグラフ法：本品のメタノール溶液 (0.02~20 mg/ml) を調製し、0.02~200 µg 量をシリカゲル薄層板にスポットする。10%酢酸ナトリウム・ベンゼン・アセトン・メタノール混液 (5:3:1:1) の下層を展開溶媒として約 10 cm 展開し、風乾後、紫外線照射法 (主波長 254 nm) によりスポットを観察する。スポット量 100 µg 以上で微量不純物 1 個が検出された。この不純物は前回標準品についても同様に観察された。検出限界は 0.1 µg であった。薄層クロマトグラムを Fig. 3 に示した。

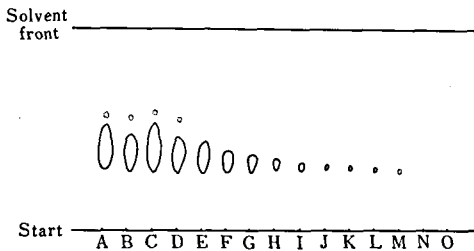


Fig. 3. Thin-layer chromatogram of thiamine hydrochloride

Solvent system: 10% sodium acetate-benzene-acetone-methanol (5:3:1:1). A, B, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O: material 200, 100, 50, 20, 10, 5, 1, 0.5, 0.2, 0.1, 0.05, and 0.02 µg, respectively. C, D: Japanese Pharmacopoeia Reference Standard 200 µg, 100 µg

ii) 液体クロマトグラフ法：本品 0.05 g を正確に量り、メタノールに溶かして正確に 25 ml とし、試料溶液とした。また、試料溶液の 1/100 および 1/2000 溶液を調製し、クロマトグラフィーの条件設定に用いた。これらの液 10 µl につき、次の条件で液体クロマトグラフ法による純度試験を行った。

操作条件

検出法：紫外吸光度計 (測定波長 254 nm)

カラム：Inertsil ODS-2 (5 µm, 4.6 mmφ × 150 mm)

移動相：薄めた氷酢酸 (1→100)・メタノール・アセトニトリル混液 (15:6:4)、ただし、氷酢酸水溶液中には 1-オクタンスルホン酸ナトリウムが含まれる (1.1 g/1,000 ml)。

流量：0.9 ml/min

カラム温度：30°C

検出感度：試料注入量の 1/100 に相当する量を注入し、得られるチアミンのピーク高さが、フルスケールの約 10% になるように記録計の感度を調整する。さらに、この条件で試料注入量の 1/2000 に相当する量を注入するとき、得られる主ピークの面積が必ず検出されるように分析パラメータを設定する³⁾。液体クロマトグラムの一例を Fig. 4 に示した。

面積百分率 0.05% 以上の不純物 1 個が検出され、不純物量は 0.13% と推定された。この結果は、薄層クロマトグラフ法による純度試験の結果と一致する。この結果、面積百分率法による本品の純度は 99.8% と推定された。

6) 水分：1.05% (n=5, SD 0.05%)

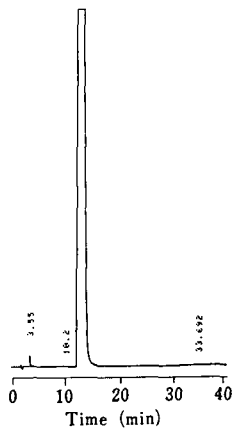


Fig. 4. High-performance liquid chromatogram for thiamine hydrochloride reference standard
 Conditions: column, Inertsil ODS-2 (5 μ m, 4.6 mm ϕ \times 150 mm); column temp. 30°C; mobile phase, a mixture of acetic acid-methanol-acetonitrile (15 : 6 : 4) containing 10 mM sodium octane sulfonate; flow rate, 0.9 ml/min; detection wavelength, 254 nm.

水分量は保存中に徐々に変化するため、製造ロットごとに水分量を定める必要がある。

7) 定量: 前回標準品を対照に吸光度測定法 (チオクローム法, 368 nm) により試験を行った結果, 100.3% (n=3, SD 0.3%) の値が得られた。別に,

純度試験に用いた操作条件を準用し, HPLC 法により定量試験を行った。参照物質として前回標準品 (Control: 841) を用い, 内標準物質としては *l*-オキシン安息香酸メチルを用いた。この結果, 本品の含量は 100.1% (n=3, SD 0.3%) と推定された。

塩素イオン量をチオシアン酸アンモニウムによる過剰の銀イオンの逆滴定 (Volhard 法) により求めた結果によれば 20.95% であり, 理論量 (21.03%) の 99.6% (n=3, SD 0.2%) であった。

標準品原料として入手した塩酸チアミンの品質試験を行った結果, 薄層クロマトグラフ法および液体クロマトグラフ法による純度試験でそれぞれ 1 個の微量不純物が認められたが, 本品の純度は HPLC 法により 99.8% と推定された。この結果, 本品は国立衛生試験所標準品として十分な品質を有することが認められたので Control 891 として製造配布した。

終わりに, 本標準品の製造にあたりご協力いただきました武田薬品株式会社に深謝いたします。

文 献

- 1) 太田美矢子, 木村俊夫, 山羽 力: 国立衛生試験所塩酸チアミン標準品 (Control 841). 衛生試験, 103, 118~120 (1985)
- 2) 厚生省編: “第十一改正日本薬局方” (1986)
- 3) 木村俊夫, 綱川延孝, 中守律夫: 副腎皮質ステロイドの標準品について, 医薬品研究, 17, 143~173 (1986)

国立衛生試験所メストラノール標準品 (Control: 881)

岡田敏史・広重律子・田中正一・村井真美・木村俊夫

Mestranol Reference Standard (Control 881) of National Institute of Hygienic Sciences

Satoshi Okada, Ritsuko Hiroshige, Masakazu Tanaka,
 Mami Murai and Toshio Kimura

The raw material of mestranol was examined for preparation of the “Mestranol Reference Standard”. Analytical results for the sample were as follows: UV spectrum indicated absorption maxima at 279 and 287 nm and absorptivity at 279 nm $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ 66; IR spectrum indicated specific absorption at 1612, 1578, 1505, 1253, and 1060 cm^{-1} ; optical rotation +3.9°; melting point 153.1°; loss on drying 0.03%; TLC and HPLC analyses indicated one impurity, respectively; the purity was assumed to be 99.3% by HPLC analysis.

Based on the results, the present raw material was authorized to be the Reference Standard of the National Institute of Hygienic Sciences.

(Received May 31, 1990)

メストラノールとその製剤の定量試験に用いられる国立衛生試験所メストラノール標準品を製造したので報告する。

1. 原料

塩野義製薬(株)より購入した。同社による試験成績は以下のとおりである： λ_{\max} 279 および 288 nm；波数 1612, 1579, 1507, 1254, 1062 cm^{-1} に特性吸収を認める；旋光度 $+4^\circ$ ；融点 152.4° ；他のステロイド 0.3% 以下；乾燥減量 0.08%；定量（固定E値=65.6を用いる吸光度測定法）100.3%；残留溶媒エタノール 0.02%。

2. 参照物質および試薬

試薬類は特級品または特級相当品を用いた。また、薄層クロマトグラフ法では蛍光剤入りのプレコート薄層板シリカゲル 60F₂₅₄ (20×20 cm, 層厚 0.25 mm, メルク社) を用いた。

3. 装置

真空恒温乾燥器 DP 22 (ヤマト科学), 融点測定器 Model PA-10S (宮本理研工業), 自動旋光計 PM-201 (ユニオン技研), 自記分光光度計 Ubest-50 (日本分光), 赤外分光光度計 IR-700 (日本分光) を用いた。また、液体クロマトグラフ装置は島津製作所製のポンプ LC-5A, 検出器 SPD-2A, データ処理装置 C-R3A を用いた。

4. 試験方法

特に記すもの以外は日本薬局方外医薬品成分規格 (1989)¹⁾ の「メストラノール」の試験法を準用した。

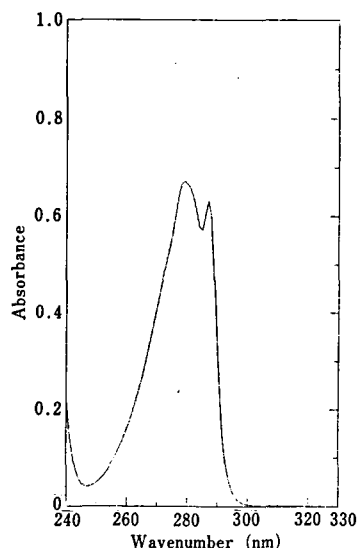


Fig. 1. Ultraviolet spectrum for mestranol reference standard

5. 試験成績

- 1) 性状：白色の結晶性の粉末で、においはない。
- 2) 紫外吸収スペクトル：無水エタノール溶液中 (1→10000) において波長 279 および 287 nm に極大吸収を示す (Fig. 1)。

279 nm における比吸光度E値 (1%, 1 cm) は66であった。

- 3) 赤外吸収スペクトル：臭化カリウム錠剤法を用

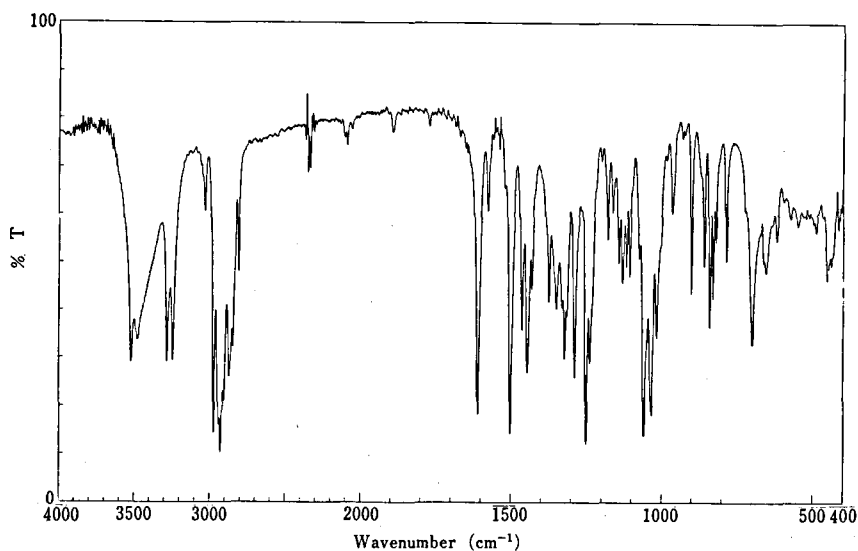


Fig. 2. Infrared spectrum for mestranol reference standard (KBr tablet)

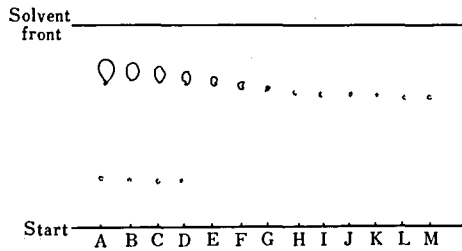


Fig. 3. Thin-layer chromatogram of Mestranol
Solvent system: chloroform-ethanol (29 : 1). A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M: material 200, 100, 50, 20, 10, 5, 2, 1, 0.5, 0.2, 0.1, and 0.02 μg , respectively

いて赤外吸収スペクトルを測定した結果、波数 1612, 1578, 1505, 1253, 1060 cm^{-1} に特性吸収を認めた (Fig. 2).

4) 旋光度: $+3.9^\circ$ (乾燥後, 0.2 g, ジオキサン, 10 ml, 100 mm)

5) 純度試験

i) 薄層クロマトグラフ法: 本品のクロロホルム溶液 (0.02~20 mg/ml) を調製し, 0.02~200 μg 量をシリカゲル薄層板にスポットする。クロロホルム・無水エタノール混液 (29 : 1) を展開溶媒として約 10 cm 展開し, 風乾後, 薄めた硫酸 (1 \rightarrow 2) を噴霧し, 105 $^\circ$ で15分間加熱後, スポットを観察する。スポット量 10 μg まで異種スポットは認められなかった。20 μg で1個の不純物スポットが観察された。検出限界は 0.02 μg であった。薄層クロマトグラムを Fig. 3 に示した。

ii) 液体クロマトグラフ法: 本品約 0.03 g を精密に量り, アセトニトリルに溶かし, 正確に 25 ml として試料溶液とした。別に, 試料溶液の 1/100 および 1/2000 溶液を調製した。これらの液 10 μl につき, 次の条件で液体クロマトグラフ法による純度試験を行った。

操作条件

検出法: 紫外吸光度計 (測定波長 280 nm)

カラム: SHIMPAK ODS-M (5 μm , 4.6 mm ϕ \times 150 mm)

移動相: アセトニトリル・水混液 (65 : 35)

流量: 0.4 ml/min

カラム温度: 室温 (約 20 $^\circ\text{C}$)

検出感度: 試料注入量の 1/100 に相当する量を注入し, 得られる主ピークの高さが, 記録紙のフルスケールの約 10% になるように記録計の感度を調整する。さらに, この条件で試料注入量の 1/2000 に相当する量を

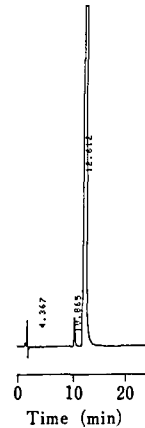


Fig. 4. High-performance liquid chromatogram for mestranol reference standard

Conditions: column, Shimpak ODS-M (5 μm , 4.6 mm ϕ \times 150 mm); mobile phase, a mixture of acetonitrile-water (65 : 35); flow rate, 0.4 ml/min; detection wavelength, 280 nm.

注入するとき, 得られる主ピークの面積が必ず検出されるように分析パラメータを設定する²⁾。液体クロマトグラムの一例を Fig. 4 に示した。

面積百分率 0.05% 以上の不純物 1 個が検出された。また, 面積百分率 0.03% 以上の不純物の総和は 0.63% と推定された。この結果は薄層クロマトグラフ法による純度試験の結果と一致する。この結果, 面積百分率法による本品の純度は 99.3% と推定された。

6) 乾燥減量: 0.03% (0.5 g, 105 $^\circ\text{C}$, 3 時間)

7) 定量: 吸光度測定法により試験を行い, 波長 279 nm 付近の吸収極大の波長における吸光度を測定し, 固定 E 値 (65.6) を用いて定量試験を行った。その結果, 100.6 \pm 0.3% (n=3) の値が得られた。なお, 本試験は USP 標準品が入手できなかったため局外規¹⁾の方法にしたがって行ったものである。

標準品原料として入手したメストラノールの品質試験を行った結果, 薄層クロマトグラフ法および液体クロマトグラフ法による純度試験で 1 個の微量不純物が認められ, その相対含量は 0.63% と推定された。したがって, 本品の面積百分率法による純度は 99.3% と推定された。この結果, 本品は国立衛生試験所標準品として十分な品質を有することが認められた。

終わりに, 本標準品の製造にあたりご協力いただきました塩野義製薬㈱に深謝いたします。

文 献

1) 厚生省薬務審査第二課編：日本薬局方外医薬品成分規格 (1989)

2) 木村俊夫, 綱川延孝, 中守律夫：副腎皮質ステロイドの標準品について, 医薬品研究, 17, 143~173 (1989)

国立衛生試験所リン酸ベタメタゾンナトリウム標準品 (Control: 881)

岡田敏史・広重律子・田中正一・村井真美・木村俊夫

Betamethasone Sodium Phosphate Reference Standard (Control 881)
of National Institute of Hygienic Sciences

Satoshi Okada, Ritsuko Hiroshige, Masakazu Tanaka,
Mami Murai and Toshio Kimura

The raw material of betamethasone sodium phosphate was examined for preparation of the "Betamethasone Sodium Phosphate Reference Standard". Analytical results for the sample were as follows: pH 7.90; optical rotation +100.5°; IR spectrum the same as USP Reference Standard of Betamethasone Sodium Phosphate; TLC indicated no impurities, but 5 kinds of impurities were detected in small amounts by HPLC; water content 14.7%; assay 100.2% by HPLC.

Based on the above results, this raw material was authorized to be the Reference Standard of the National Institute of Hygienic Sciences.

(Received May 31, 1990)

リン酸ベタメタゾンナトリウムとその製剤の定量試験に用いられる国立衛生試験所リン酸ベタメタゾンナトリウム標準品を製造したので報告する。

1. 原 料

塩野義製薬(株)より購入した。同社による試験成績は以下のとおりである：薄層クロマトグラフ法ではスポット量 200 µg まで不純物検出されず；液体クロマトグラフ法では0.05%以上の不純物1個を検出，面積百分率法による純度は99.9%と推定；水分3.51%；定量(吸光度測定法) 100.2%。

2. 参照物質および試薬

参照物質として USP のリン酸ベタメタゾンナトリウム (BMNaP) 標準品および日本薬局方標準品ベタメタゾンを用いた。試薬類は特級品または特級相当品を用いた。また，薄層クロマトグラフ法では蛍光剤入りのプレコート薄層板シリカゲル 60F₂₅₄ (20×20 cm, 層厚 0.25 mm, メルク社) を用いた。

3. 装 置

精密 pH メーター E510 (メトローム), 自動旋光計 PM-201 (ユニオン技研), 自記分光光度計 Ubest-50 (日本分光), 赤外分光光度計 IR-700 (日本分光),

デジタル微量水分測定装置 AQ-1 (平沼産業) を用いた。また液体クロマトグラフ装置は島津製作所製のポンプ LC-5A, 検出器 SPD-2A, データ処理装置 C-R3A を用いた。

4. 試験方法

特に記すものの他は日本薬局方外医薬品成分規格 (1989)¹⁾ の「リン酸ベタメタゾンナトリウム」の試験法を準用した。

5. 試験成績

1) 性状：白色の粉末で，においはない。

2) pH: 7.90 (0.1 g, 水, 20 ml)

3) 旋光度：+101° (脱水物換算 0.1 g, 水, 10 ml, 100 mm)

4) 紫外吸収スペクトル：BMNaP の約 0.012 g を精密に量り，水を加えて正確に 500 ml とし，水を対照に紫外吸収スペクトルを測定した結果，極大吸収波長は 242 nm, E 値 (1%, 1 cm, 242 nm) は 281 であった。吸収スペクトルを Fig. 1 に示す。

5) 赤外吸収スペクトル：臭化カリウム錠剤法を用いて赤外吸収スペクトルを測定した。その結果，USP 標準品と同一のスペクトルが得られた (Fig. 2)。

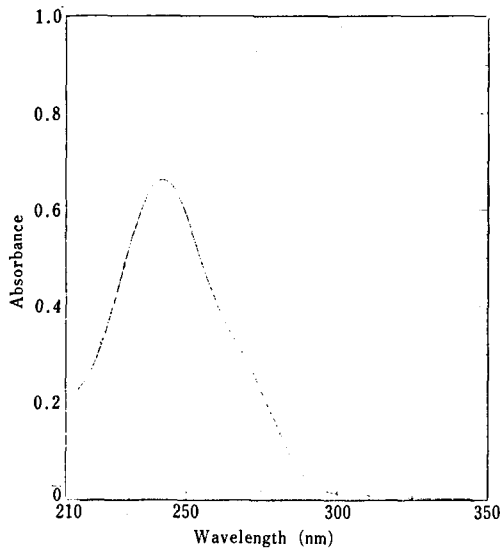


Fig. 1. Ultraviolet spectrum for betamethasone sodium phosphate reference Standard

6) 純度試験

i) 無機リン酸：試料溶液の吸光度は比較溶液の吸光度より大きくない。

ii) ベタメタゾン：局外規¹⁾の方法を準用し、薄層クロマトグラフを行う。展開溶媒は *n*-ブタノール・水・酢酸 (3:1:1) とし、検出は紫外線 (主波長 254 nm) 照射法によった。この結果、遊離のベタメタゾンは 200 μ g までのスポット量では検出されず、そのほかの不純物も検出されなかった。BMNaP の検出限

界は 0.2 μ g. 薄層クロマトグラムを Fig. 3 に示した。

iii) 液体クロマトグラフ法による純度試験：BM-NaP 標準品原料および USP 標準品約 0.03 g ずつを量り、それぞれをメタノールに溶かし、正確に 20 ml とし、試料溶液とした。この液 10 μ l につき、次の条件で液体クロマトグラフ法による純度試験を行った。

操作条件

検出法：紫外吸光光度計 (測定波長 240 nm)

カラム：島津 ODS-H (5 μ m, 4.6 mm ϕ ×150 mm)

移動相：メタノール・水 (50 mM NaCl) 混液 (50 : 50)

流量：0.4 ml/min

カラム温度：40°C

検出感度：試料注入量の 1/100 に相当する量を注入し、得られる BMNaP のピーク高さが、フルスケールの約 1/10 になるように記録計の感度を調整する。さらに、この条件で試料注入量の 1/2000 に相当する量を注入するとき、得られる主ピークの面積が必ず検出されるように分析パラメーターを設定した²⁾。

液体クロマトグラムの一例を Fig. 4(A) に示した。

面積百分率 0.05% 以上の不純物 5 個が検出されており、薄層クロマトグラフ法に較べ高い感度で不純物が検出できることがわかった。別に、主ピークのショルダーの位置に微量不純物が重なっているようであるが、これを主ピークより分離することはできなかった。この結果、面積百分率法による本品の純度は 99.3% と推定された。

一方、USP 標準品について同様の条件で純度試験

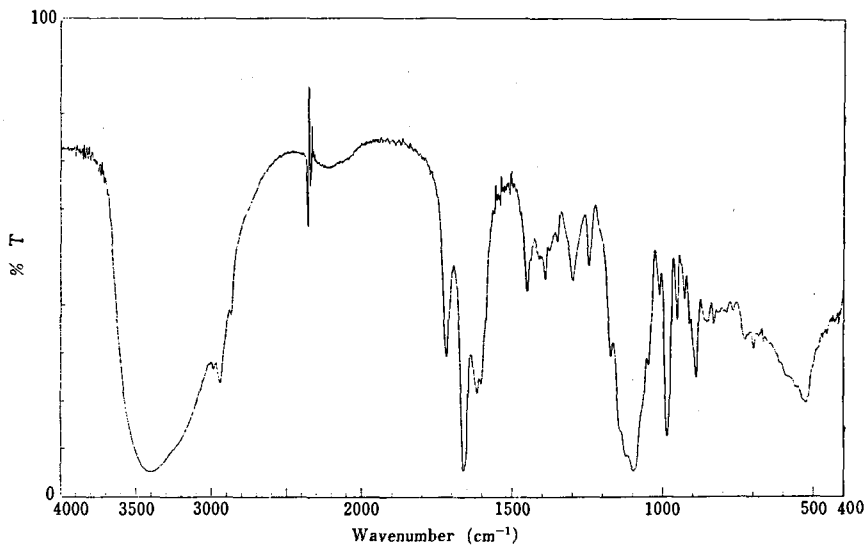


Fig. 2. Infrared spectrum for betamethasone sodium phosphate reference standard (KBr tablet)

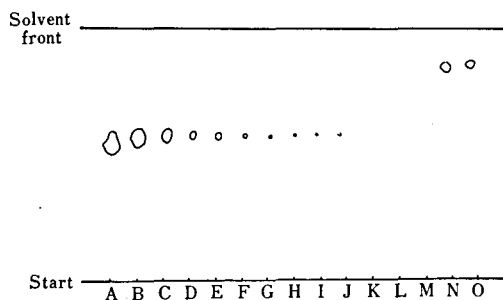


Fig. 3. Thin-layer chromatogram of betamethasone sodium phosphate

Solvent system: n-butanol-water-acetic acid(3:1:1). A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M: material 200, 100, 50, 20, 10, 5, 2, 1, 0.5, 0.2, 0.1, 0.05, and 0.02 μg , respectively. N, O: Betamethasone 10 μg , 2 μg

を行った結果を Fig. 4(B) に示した。本品と同種の4個の不純物が検出されており、面積百分率法による USP 標準品の純度は99.7%と推定された。

7) 水分：本品の約 20 mg を用いて電量滴定法によりその水分含量を求めた。その結果、本品の水分含量は14.7% (n=4, SD 0.4%) であった。局外規の

規格によれば本品の水分10.0%以下となっているが、本品は吸湿性が大きいことを考慮し、水分の急激な変動を避ける目的で特別に恒湿化を図ったものであり、そのため水分が大きくなっている。

本品の標準品としての包装においても、水分含量の変化を避けるため、アンプル中に充填することとし、充填試料の中よりサンプリングしてそのロットにおける水分含量を定めることとした。

8) 定量：純度試験を行ったと同様の条件で、USP 標準品を対照に絶対検量線法による定量試験を行った結果、100.2 \pm 1.4% (n=3, SD 1.4%) の値が得られた。なお、USP 標準品の水分含量は9.9%であった。

標準品原料として入手したリン酸ベタメタゾンナトリウムを USP 標準品と比較検討した結果、液体クロマトグラフ法による純度試験で5個の微量不純物が含まれることがわかったが、いずれも極微量であり、面積百分率法による純度は99.3%と推定された。USP 標準品に較べ若干その純度は劣るものの、国立衛生試験所標準品として十分な品質を有することが認められた。

終わりに、本標準品の製造にあたりご協力いただきました塩野義製薬(株)に深謝いたします。

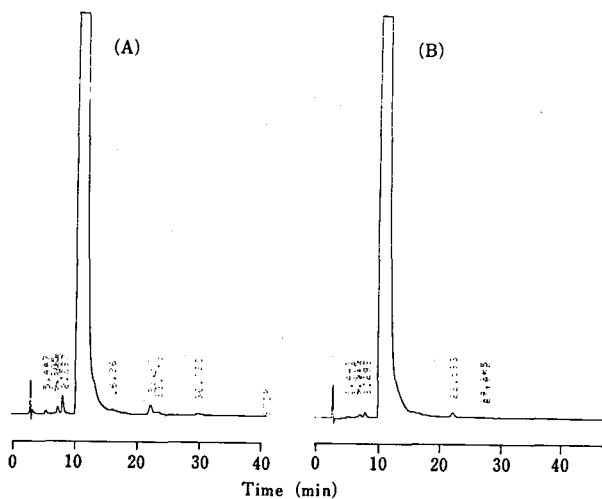


Fig. 4. High-Performance Liquid Chromatograms of Reference Standards for Betamethasone Sodium Phosphate

(A): Raw material; (B): USP RS

Conditions: column, shimpak ODS-H (5 μm , 4.6 mm ϕ \times 150 mm); mobile phase, a mixture of methanol-water (50:50) containing 50 mM sodium chloride; column temp., 40 $^{\circ}\text{C}$; flow rate, 0.4 ml/min; detection wavelength, 240 nm.

文 献

- 1) 厚生省薬務局審査第二課編：日本薬局方外医薬品成分規格 (1989)

- 2) 木村俊夫, 網川延孝, 中守律夫：副腎皮質ステロイドの標準品について, 医薬品研究, 17, 143~173 (1986)

国立衛生試験所リン酸デキサメタゾンナトリウム標準品 (Control: 891)

岡田敏史・広重律子・田中正一・村井真美・木村俊夫

Dexamethasone Sodium Phosphate Reference Standard (Control 891)
of National Institute of Hygienic Sciences

Satoshi Okada, Ritsuko Hiroshige, Masakazu Tanaka,
Mami Murai and Toshio Kimura

The raw material of dexamethasone sodium phosphate was examined for preparation of the "Dexamethasone Sodium Phosphate Reference Standard". Analytical results were as follows: UV spectrum indicates absorption maxima at 242 nm and absorptivity at 242 nm is $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ 304; optical rotation +79.0°; pH 7.7; ethanol 5.2%; water 6.0%; HPLC analysis indicates small amounts of three impurities and the purity was assumed to be 99.8%; assay by HPLC indicated 100.9% against the USP Reference Standard of "Dexamethasone Phosphate".

Based on the results, the present raw material was authorized to be the Reference Standard of the National Institute of Hygienic Sciences.

(Received May 31, 1990)

リン酸デキサメタゾンナトリウムとその製剤の定量試験に用いられる国立衛生試験所リン酸デキサメタゾンナトリウム標準品を製造したので報告する。

1. 原 料

萬有製薬㈱より購入した。

2. 参照物質および試薬

USP 標準品リン酸デキサメタゾン (Dexamethasone Phosphate Reference Standard) および日本薬局方標準品デキサメタゾンを対照物質として用いた。試薬類は特級品または特級相当品を用いた。また、薄層クロマトグラフ法では蛍光剤入りのプレコート薄層板 HPTLC 60F₂₅₄ (5×10 cm, 層厚 0.25 mm, メルク社) を用いた。

3. 装 置

精密 pH メーター E510 (メトローム), 自動旋光計 PM-201 (ユニオン技研), 自記分光光度計 Ubest-50 (日本分光), 赤外分光光度計 IR-700 (日本分光), デジタル微量水分測定装置 AQ-1 (平沼産業), ガスクロマトグラフ装置 GC-8A (島津) を用いた。また, 液体クロマトグラフ装置は島津製作所製のポンプ LC-5A, 検出器 SPD-2A, データ処理装置 C-R3A を用

いた。

4. 試験方法

特に記すものの他は日本薬局方外医薬品成分規格 (1989)¹⁾ の「リン酸デキサメタゾンナトリウム」の試験法を準用した。

5. 試験成績

- 1) 性状：白色の粉末で, においはない。
- 2) 旋光度：+79.0° (脱エタノールおよび脱水物換算, 0.1 g, 10 ml, 100 mm)
- 3) pH: 7.7 (1.0 g, 水, 100 ml)
- 4) 紫外吸収スペクトル：本品 0.02 g を水 1000 ml に溶かし, 水を対照に紫外吸収スペクトルを測定した結果, 242 nm に極大吸収が認められた (Fig. 1)。242 nm における比吸光度 E 値 (1%, 1 cm) は 304 であった。
- 5) 赤外吸収スペクトル：臭化カリウム錠剤法を用いて赤外吸収スペクトルを測定した結果, 波数 1713, 1665, 1623, 991, 891 cm^{-1} に特性吸収を認めた (Fig. 2)。
- 6) 純度試験
 - i) 薄層クロマトグラフ法：本品のメタノール溶液 (0.02~20 mg/ml) を調製し, 0.02~100 μg 量をシリ

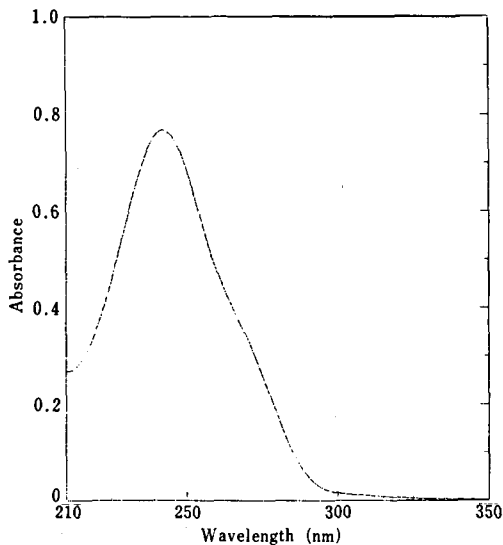


Fig. 1. Ultraviolet spectrum for dexamethasone sodium phosphate reference standard

カゲル薄層板にスポットする。n-ブタノール・水・酢酸混液 (3:1:1) を展開溶媒として約 10 cm 展開し、風乾後、紫外線 (主波長 254 nm) 照射法によりスポットを観察する。スポット量 100 μg まで不純物は観察されず、検出限界は 0.1 μg であった。薄層クロマトグラムを Fig. 3 に示した。

ii) 液体クロマトグラフ法：本品 0.02 g を正確に量り、メタノールに溶かし、正確に 20 ml とし、試料溶液とした。別に、試料溶液の 1/100 および 1/2000

溶液を調製した。また、比較のため試料溶液と同濃度の USP 標準品 (リン酸デキサメタゾン) 溶液を調製した。これらの液 10 μl につき、次の条件で液体クロマトグラフ法による純度試験を行った。

操作条件

検出法：紫外吸光光度計 (測定波長 240 nm)

カラム：ZORBAX ODS (7 μm , 4.6 mm ϕ × 250 mm)

移動相：メタノール・リン酸緩衝液 (100 mM, pH 2.6) (50:50)

流量：0.5 ml/min

カラム温度：40°C

検出感度：試料注入量の 1/100 に相当する量を注入し、得られるリン酸デキサメタゾンのピーク高さが、フルスケールの約 10% になるように記録計の感度を調整する。さらに、この条件で試料注入量の 1/2000 に相当する量を注入するとき、得られる主ピークの面積が必ず検出されるように分析パラメーターを設定する²⁾。

1/100 および 1/2000 溶液の液体クロマトグラムを Fig. 4 に、純度試験のそれを Fig. 5 に示した。

面積百分率 0.05% 以上の不純物 1 個 ($t_{\text{R}}=11.3$ 分) と 0.03~0.04% の微量不純物 2 個 ($t_{\text{R}}=16.1, 20.3$ 分) が検出され、これらの不純物総量は 0.13% と推定された。この結果、面積百分率法による本品の純度は 99.8% と推定とされた。別に、USP 標準品について同様の条件で純度試験を行った結果、面積百分率法による純度は 99.9% と推定された。

7) エタノール：局外規 (1989)¹⁾ に規定の方法に

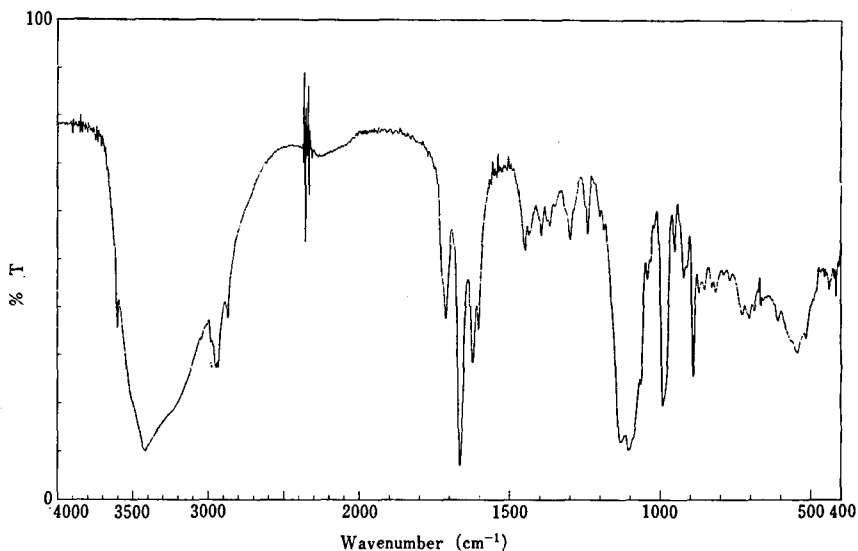


Fig. 2. Infrared spectrum for dexamethasone sodium phosphate reference standard (KBr tablet)

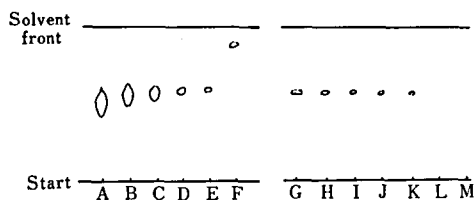


Fig. 3. Thin-layer chromatogram of Dexamethasone Sodium Phosphate

Solvent system: n-butanol-water-acetic acid (3 : 1 : 1). A, B, C, D, E, G, H, I, J, K, L, M: material 100, 50, 20, 10, 5, 2, 1, 0.5, 0.2, 0.1, 0.05, and 0.02 μ g, respectively. F: Dexamethasone 5 μ g

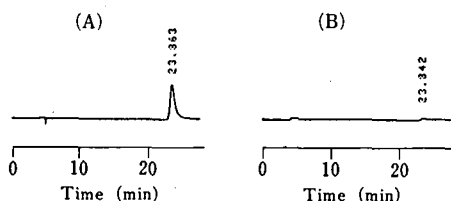


Fig. 4. Establishment for chromatographic conditions of purity test by HPLC for dexamethasone sodium phosphate (DxMSP) reference standard

(A): 1% solution of sample solution

(B): 0.05% solution of sample solution

Analytical conditions: column, Zorbax ODS (7 μ m, 4.6 mm ϕ \times 250 mm); mobile phase, methanol-0.1 M phosphate buffer (pH 2.6) (50 : 50); column temp., 40°C; flow rate, 0.5 ml/min; detection wavelength, 240 nm; injection volume 10 μ l; sample solution, 1.071 mg DxMSP/ml mobile phase.

より、残留溶媒としてのエタノール含量を測定した結果、5.2% (n=3, SD 0.2%) の値が得られた。

8) 水分: デジタル微量水分測定装置を用い、電量滴定法により本品の水分含量を測定した結果、6.0% (n=4, SD 0.3%) の値が得られた。エタノール量との和は11.2%であり、16%以下であるとの規定¹⁾を満足する。

9) 定量: USP 標準品を対照に液体クロマトグラフ法により定量試験を行った。操作条件は純度試験の項に記したと基本的には同様の条件とし、内部標準としてバラオキシン安息香酸メチルを用いた。その結果、100.9 \pm 0.9% (n=3) の値が得られた。純度的にみれば USP 標準品と同等の品質と思われるのに対し、本品の定量値は100.9%とやや高い。この原因についての詳細は不明であるが、本品の強い吸湿性(秤量時の

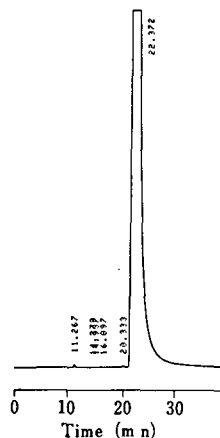


Fig. 5. Purity Test for Dexamethasone Sodium Phosphate (DxMSP) Reference Standard by High-Performance Liquid Chromatography

Analytical conditions are same as described in Fig. 4. Sample solution was adjusted to be 1.071 mg DxMSP/ml mobile phase.

吸湿も避けられない) がその一因と考えられる。すなわち、定量試験と水分測定実施の時間的な差(二日)にもとづく保存中(シリカゲルデシケーター、室温)における水分含量の変化が無視できなかった可能性がある。

標準品原料として入手したリン酸デキサメタゾンナトリウムの品質試験を行った結果、液体クロマトグラフ法による純度試験で3個の微量不純物が認められた。しかし、本品の面積百分率法による純度は99.8%と推定され、USP 標準品(リン酸デキサメタゾン)に匹敵する品質をもつことが明らかとなった。この結果、本品は国立衛生試験所標準品として十分な品質を有することが認められた。なお、本品が強い吸湿性をもつことを考慮し、標準品製造に際してはアンプル中に充填し、充填アンプルの中よりサンプリングしてその水分含量を決定することとした。

終わりに、本標準品の製造にあたりご協力いただきました萬有製薬(株)に深謝いたします。

文 献

- 1) 厚生省薬務局審査第二課編: 日本薬局方外医薬品成分規格 (1989)
- 2) 木村俊夫, 綱川延孝, 中守律夫: 副腎皮質ステロイドの標準品について, 医薬品研究, 17, 143~173 (1986)

国立衛生試験所酢酸ヒドロコルチゾン標準品 (Control: 891)

岡田敏史・広重律子・田中正一・村井真美・木村俊夫

Hydrocortisone Acetate Reference Standard (Control 891)
of National Institute of Hygienic SciencesSatoshi Okada, Ritsuko Hiroshige, Masakazu Tanaka,
Mami Murai and Toshio Kimura

The raw material of hydrocortisone acetate was examined for preparation of the "Hydrocortisone Acetate Reference Standard". Analytical results were as follows: $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ (242 nm) 403; IR spectrum indicates specific absorption at 3424, 1745, 1721, 1630, and 1374 cm^{-1} ; optical rotation $+164.4^\circ$ (in dioxane); melting point 219.5° (decomposition); loss on drying 0.16%; TLC and HPLC analyses indicated one and three impurities, respectively; assay by HPLC was 99.7% against the previous Reference Standard.

Based on the results, the present raw material was authorized to be the Reference Standard of the National Institute of Hygienic Sciences.

(Received May 31, 1990)

酢酸ヒドロコルチゾンとその製剤の定量試験に用いられる国立衛生試験所酢酸ヒドロコルチゾン標準品を製造したので報告する。

1. 原料

日本シェーリング㈱より購入した。同社による試験成績は以下のとおりである：旋光度 163.5° ；UV スペクトル λ_{max} 242 nm および $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ (242 nm) 399，液体クロマトグラフ法による純度試験では面積百分率法により 0.05% 以上の不純物 3 個を検出；乾燥減量 0.02%，残留溶媒テトラヒドロフラン 0.05% およびメタノール 0.01%；定量（固定 E 値 = 395 を用いる吸光度測定法）101.1%。

2. 参照物質および試薬

参照物質として前回標準品 (Control: 833) およびヒドロコルチゾン標準品を用い，試薬類は特級品または特級相当品を用いた。また，薄層クロマトグラフ法では蛍光剤入りのプレコート薄層板シリカゲル 60F₂₅₄ (20×20 cm，層厚 0.25 mm，メルク社) を用いた。

3. 装置

真空恒温乾燥器 DP 22 (ヤマト科学)，融点測定器 Model PA-10S (宮本理研工業)，自動旋光計 PM-201 (ユニオン技研)，自記分光光度計 Ubest-50 (日本分光)，赤外分光光度計 IR-700 (日本分光) を用いた。また，液体クロマトグラフ装置は島津製作所製のポンプ LC-5A，検出器 SPD-2A，データ処理装置 C-

R3A を用いた。

4. 試験方法

特に記すもの以外は第十一改正日本薬局方 (1986)¹⁾ の一般試験法および「酢酸ヒドロコルチゾン」の試験法を準用した。

5. 試験成績

1) 性状：白色の結晶または結晶性の粉末で，おいはない。

融点： 219.5° (分解)

2) 紫外吸収スペクトル：メタノール溶液中 (1→100000) で波長 242 nm に吸収の極大を示す (Fig. 1)。242 nm における比吸光度 E 値 (1%，1 cm) は 403 (n=3, SD 1.8) であった。

3) 赤外吸収スペクトル：臭化カリウム錠剤法を用いて赤外吸収スペクトルを測定した結果，波数 3424, 1745, 1721, 1630, 1374 cm^{-1} に特性吸収を認めた (Fig. 2)。また，このスペクトルは前回標準品の赤外吸収スペクトルに一致した。

4) 旋光度： $+164.4^\circ$ (乾燥後，0.05 g，ジオキサソ，10 ml，100 mm)

5) 純度試験

i) 薄層クロマトグラフ法：本品のジオキサソ溶液 (0.02~20 mg/ml) を調製し，0.02~200 μg 量をシリカゲル薄層板にスポットする。クロロホルム・エタノール混液 (12:1) を展開溶媒として約 15 cm 展開し，風乾後，紫外線照射法 (主波長 254 nm) およびアル

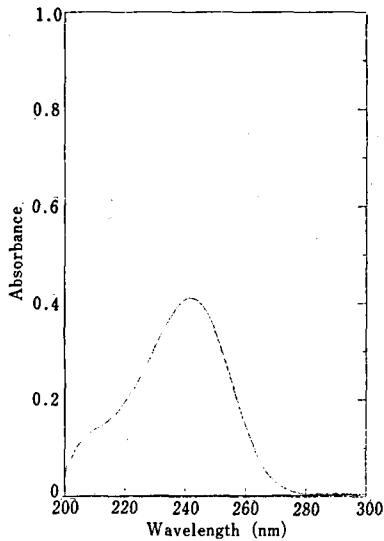


Fig. 1. Ultraviolet spectrum for hydrocortisone acetate standard

カリ性ブルーテトラゾリウム (BT) 試液を噴霧してスポットを観察する。UV 照射法および BT 試液による検出限界はともに $0.05 \mu\text{g}$ であり、スポット量 $50 \mu\text{g}$ 以上で1個の不純物が観察された。遊離のヒドロコルチゾンには $200 \mu\text{g}$ のスポットによっても観察されなかった。薄層クロマトグラムを Fig. 3 に示した。この展開溶媒系においてはスポット量により R_f 値がかなり大きく変化している。

ii) 液体クロマトグラフ法: 本品 0.02 g を正確に

量り、メタノールに溶かして正確に 20 ml とし、試料溶液とした。また、試料溶液の $1/100$ および $1/2000$ 溶液を調製し、クロマトグラフィーの条件設定に用いた。これらの液 $10 \mu\text{l}$ につき、次の条件で液体クロマトグラフ法による純度試験を行った。

操作条件

検出法: 紫外吸光光度計 (測定波長 254 nm)

カラム: Inertsil ODS-2 ($5 \mu\text{m}$, $4.6 \text{ mm}\phi \times 150 \text{ mm}$)

移動相: メタノール・水混液 ($60:40$)

流量: 0.7 ml/min

カラム温度: 室温 (約 20°C)

検出感度: 試料注入量の $1/100$ に相当する量を注入し、得られる酢酸ヒドロコルチゾンのピーク高さが、フルスケールの約 10% になるように記録計の感度を調整する。さらに、この条件で試料注入量の $1/2000$ に相当する量を注入するとき、得られる主ピークの面積が必ず検出されるように分析パラメータを設定する²⁾。液体クロマトグラムの一例を Fig. 4 に示した。

面積百分率 0.05% 以上の不純物 1 個が検出され、不純物量は 0.07% と推定された。この結果は薄層クロマトグラフ法による純度試験の結果と一致する。この結果、面積百分率法による本品の純度は 99.9% と推定された。

6) 乾燥減量: 0.16% (0.5 g , 105°C , 3 時間)

7) 定量: 純度試験に用いた操作条件を準用し、HPLC 法により定量試験を行った。参照物質として前回標準品 (Control: 833) を用い、内標準物質とし

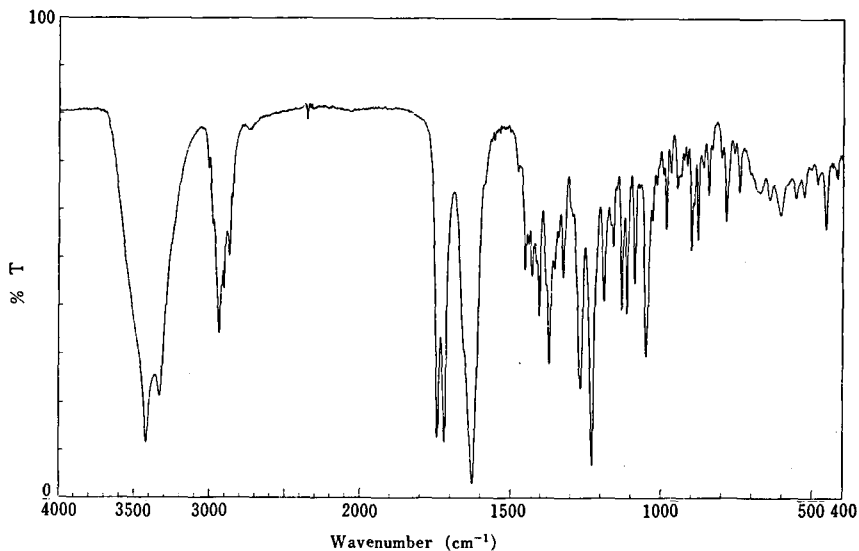


Fig. 2. Infrared spectrum for hydrocortisone acetate reference standard (KBr tablet)

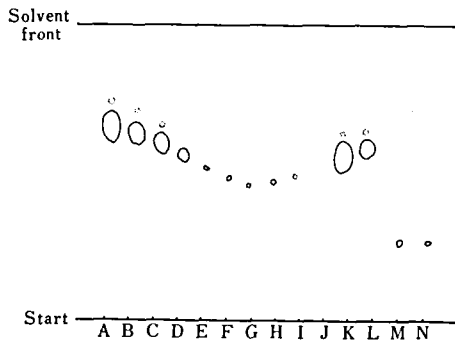


Fig. 3. Thin-layer chromatogram of hydrocortisone acetate

Solvent system: chloroform-ethanol (12 : 1). A, B, C, D, E, F, G, H, I, J: material 200, 100, 50, 10, 1, 0.5, 0.1, 0.05, and 0.025 μg , respectively. K, L: Japanese Pharmacopoeia Reference Standard 200 μg , 50 μg . M, N: Hydrocortisone 1 μg , 0.1 μg

では *p*-オキシ安息香酸ブチルを用いた。この結果、本品の含量として 99.7% ($n=3$, SD 0.6%) の値が得られた。別に、前回標準品を対照に吸光度測定法 (242 nm) により試験を行った結果、100.4% ($n=3$, SD 0.5%) の値が得られた。

結 論

標準品原料として入手した酢酸ヒドロコルチゾンの品質試験を行った結果、薄層クロマトグラフ法および液体クロマトグラフ法による純度試験で1個の微量不純物が認められた。また、本品の純度は HPLC 法により 99.7% と推定された。この結果、本品は国立衛生試験所標準品として十分な品質を有することが認めら

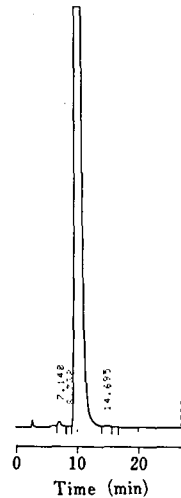


Fig. 4. High-performance liquid chromatogram for hydrocortisone acetate reference standard

Conditions: column, Inertsil ODS-2 (5 μm , 4.6 mm ϕ \times 150 mm); mobile phase, a mixture of methanol-water (60 : 40); flow rate, 0.7 ml/min; detection wavelength, 254 nm.

れた。

終わりに、本標準品の製造にあたりご協力いただきました日本シェーリング㈱に深謝いたします。

文 献

- 1) 厚生省編：“第十一改正日本薬局方” (1986)
- 2) 木村俊夫，綱川延孝，中守律夫：副腎皮質ステロイドの標準品について。医薬品研究，17，143～173 (1986)

国立衛生試験所リン酸ヒドロコルチゾンナトリウム標準品 (Control: 891)

岡田敏史・広重律子・田中正一・村井真美・木村俊夫

Hydrocortisone Sodium Phosphate Reference Standard (Control 891)
of National Institute of Hygienic SciencesSatoshi Okada, Ritsuko Hiroshige, Masakazu Tanaka,
Mami Murai and Toshio Kimura

The raw material of hydrocortisone sodium phosphate was examined for the preparation of the "Hydrocortisone Sodium Phosphate Reference Standard". Analytical data obtained were as follows: pH, 8.2; optical rotation $[\alpha]_D^{20}$, +124.1°; Infrared spectrum, same as that of BP Reference Standard of Hydrocortisone Sodium Phosphate; thin-layer chromatography, no impurities were detected; high-performance liquid chromatography (HPLC), 2 kinds of small amount of impurities were detected; assay, 99.2% by the enzyme method and 99.9% by the HPLC method in terms of the BP Reference Standard.

Based on the above results, this raw material was authorized to be the Reference Standard of the National Institute of Hygienic Sciences.

(Received May 31, 1990)

リン酸ヒドロコルチゾンナトリウムとその製剤の定量試験に用いられる国立衛生試験所リン酸ヒドロコルチゾンナトリウム標準品 (Control 891) を製造したので報告する。

1. 原料

アセトン、エタノール混液により再結晶を繰り返して、精製された標準品原料を萬有製薬(株)より購入した。

2. 参照物質および試薬

参照物質として BP のリン酸ヒドロコルチゾンナトリウム標準品を用いた。試薬類は特級品または特級相当品を用いた。

3. 装置

精密 pH メーター E510 (メトローム), 自動旋光計 PM-201 (ユニオン技研), 自記分光光度計 Ubest-50 (日本分光), 赤外分光光度計 IR-700 (日本分光), デジタル微量水分測定装置 AQ-1 (平沼産業) を用いた。

また、液体クロマトグラフ装置は島津製作所製のポンプ LC-5A, 検出器 SPD-2A, データ処理装置 C-R3A を用い、ガスクロマトグラフ装置は島津製作所製の GC-8A を用いた。

4. 試験方法

特に記すもの他は日本薬局方外医薬品成分規格 (1989) の「リン酸ヒドロコルチゾンナトリウム」の

試験法を準用した。

薄層クロマトグラフ法による純度試験: 原料および標準品約 0.010 g をメタノール 2 ml に溶かし, 次の条件で薄層クロマトグラフ法による純度試験を行った。

薄層板: 蛍光剤入りのプレコーテッド薄層板シリカゲル 60F₂₅₄ (20×20 cm, 層厚 0.25 mm, メルク社)

展開溶媒: *n*-ブタノール・水・氷酢酸 (10:2:1)

方法および検出法: 試料溶液の 1~40 μ l を薄層板にスポットし, 約 15 cm 展開した後, 薄層板を取り出し風乾した。これを紫外線 (主波長 254 nm) 照射下で観察した。

液体クロマトグラフ法による純度試験: 原料および標準品約 0.03 g を精密に量り, 移動相に溶かして正確に 20 ml とし, 試料溶液とした。この液 10 μ l につき, 次の条件で液体クロマトグラフ法による純度試験を行った。

カラム: Zorbax ODS (7 μ m, 4.6 mm ϕ ×250 mm)

移動相: 0.1M リン酸緩衝液 (pH 2.6)・メタノール混液 (3:2)

流量: 0.5 ml/min

検出器: 紫外吸光光度計 (測定波長 254 nm)

カラム温度: 35° 付近の一定温度

検出感度: 試料注入量の 1/100 に相当する量を注入し, 得られる主ピーク高さが, フルスケールの約 1/10 になるように記録計の感度を調整した。さらに, この

条件で試料注入量の1/2000に相当する量を注入するとき、得られる主ピークの面積が必ず検出されるように分析パラメーターを設定した。

ガスクロマトグラフ法による残留溶媒試験：メチルエチルケトンの内標準物質とし、次の条件で内標準法により定量分析を行った。

i) アセトン

試料溶液：原料約0.1gを精密に量り内標準液0.125mlを正確に加えて溶かし、さらに水を加えて正確に5mlとした。

内標準溶液：メチルエチルケトン0.1ml/100ml水
アセトン標準原液：アセトン(99.5%, 比重0.790)
0.2ml/50ml水

検出器：水素炎イオン化検出器

カラム：内径4mm, 長さ2mのガラス管にポリスチレン・ジビニルベンゼン共重合体からなるポーラスポリマービーズを充填したカラムPORAPAK Q(80~100 mesh, Waters Co.)

カラム温度：130~180°, 昇温5°/min.

キャリアーガス：窒素, 流量：内標準物質の保持時間が約13分になるような一定流量, 注入量：5 μ l

ii) エタノール

試料溶液：原料約0.1gを精密に量り, 内標準溶液0.125mlを正確に加えて溶かし, さらに水を加えて正確に5mlとした。

内標準溶液：メチルエチルケトン0.1ml/100ml水
エタノール標準原液：エタノール(99.5%, 比重0.793) 0.1ml/50ml水

そのほかはアセトンと同じ

液体クロマトグラフ法による定量試験：純度試験を行ったと同様の条件で, BP標準品を対照に絶対検量線法により定量試験を行った。

5. 試験成績

- 1) 性状：白色～淡黄色の粉末で, においはない。
- 2) pH: 8.2 (1g, 水, 100ml)
- 3) 旋光度：+124.1° (乾燥物換算 1g, リン酸緩衝液 pH 7.0, 100ml, 100mm)
- 4) 紫外吸収スペクトル：原料約0.010gを精密に量り, 水を加えて正確に500mlとし, 水を対照に紫外吸収スペクトルを測定した結果, 極大吸収波長は248nm, 乾燥物に換算した。E_{1%^{1cm}}(248nm)は337であった。吸収スペクトルをFig.1に示す。

5) 赤外吸収スペクトル：ペースト法を用いて赤外吸収スペクトルを測定した。その結果, BP標準品と同一のスペクトルが得られた (Fig.2)。

6) 純度試験

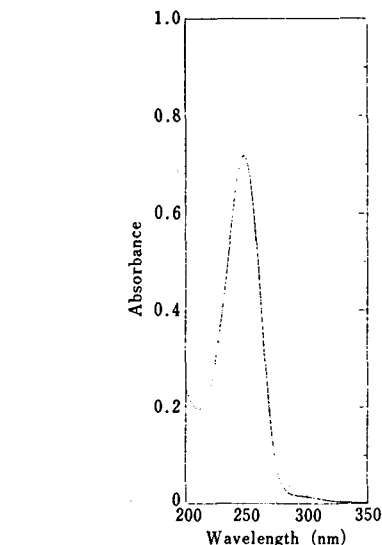


Fig.1. Ultraviolet spectrum of the material for hydrocortisone sodium phosphate reference standard (Control 891)

i) 遊離リン酸：0.3%

ii) 遊離ヒドロコルチゾン：0.0%

iii) 薄層クロマトグラフ法による純度試験：原料およびBP標準品ともに200 μ gをスポットしても不純物は検出されなかった (Fig.3)。リン酸ヒドロコルチゾンナトリウムの検出限界は0.1 μ gであった。

iv) 液体クロマトグラフ法による純度試験：液体クロマトグラムの一例をFig.4に示した。面積百分率0.05%以上の不純物2個が検出されており, 薄層クロマトグラフ法に較べて高い感度で不純物が検出できることがわかった。面積百分率法による本品の純度は99.8%と推定された。

またBP標準品では3個の不純物が検出され, 純度は99.5%と推定された。

7) 水分：本品約0.02gを用いて電量滴定法によりその水分含量を求めた。本品は吸湿性であり, 保存中の水分含量変化が避けられないため, アンプル中に充填することとし, 充填試料の中よりサンプリングしてそのロットにおける水分含量を定めた。その結果, Control 891の水分は5.1%であった。

8) 残留溶媒：未乾燥の原料中にはアセトンおよびエタノールの残留が認められたが, それぞれ0.06, 0.05%と非常にわずかであった。

9) 乾燥減量：3.7% (1g, 減圧, 80°, 5時間)

10) 定量：

i) 酵素法 99.2%

ii) 液体クロマトグラフ法

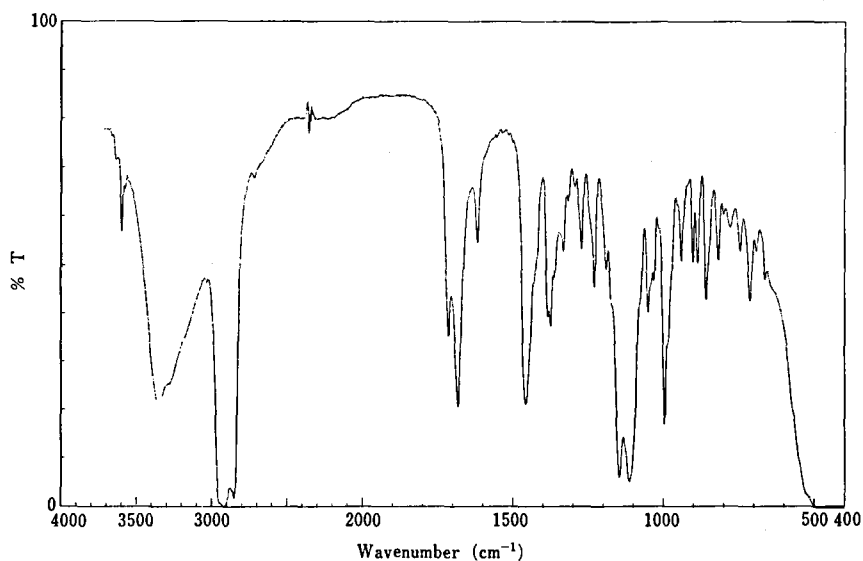


Fig. 2. Infrared spectrum of the material for hydrocortisone sodium phosphate reference standard (Control 891)

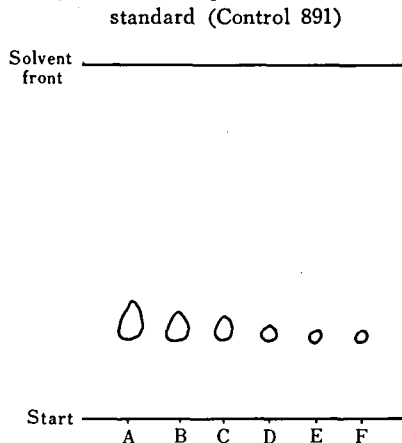


Fig. 3. Thin-layer chromatogram of raw material for hydrocortisone sodium phosphate reference standard (Control 891)

solvent system: *n*-butanol·water·acetic acid (10 : 2 : 1) A, B, C, D, E, F: 200, 100, 50, 20, 10 and 5 μ g, respectively

BP 標準品に対して定量試験を行った結果, 99.9% の値が得られた。

結 論

標準品原料として入手したリン酸ヒドロコルチゾンナトリウムを BP 標準品と比較検討した。液体クロマトグラフ法による純度試験で 2 個の微量不純物が検出

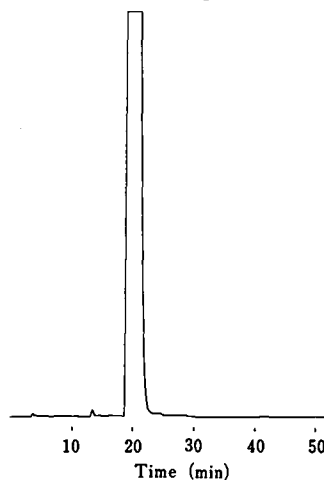


Fig. 4. High-performance liquid chromatogram of raw material for hydrocortisone sodium phosphate reference standard (Control 891)

Conditions: column, Zorbax ODS (4.6 mm ϕ ×250 mm); column temp., 35°; mobile phase, mixture of 0.1 M phosphate buffer (pH 2.6) and methanol (3 : 2); flow rate, 0.5 ml/min; detection wavelength, 254 nm

されたが, その純度は99.8%と推定され, BP 標準品と同等の値を示した。以上の成績から今回入手した標準品原料は, 国立衛生試験所標準品に適した品質を有することを認めた。終わりに, 標準品を製造するに当たりご協力いただきました萬有製薬㈱に感謝致します。

国立衛生試験所リン酸プレドニゾロンナトリウム標準品 (Control: 891)

岡田敏史・広重律子・田中正一・村井真美・木村俊夫

Prednisolone Sodium Phosphate Reference Standard (Control 891)
of National Institute of Hygienic SciencesSatoshi Okada, Ritsuko Hiroshige, Masakazu Tanaka,
Mami Murai and Toshio Kimura

The raw material of prednisolone sodium phosphate was examined for preparation of the "Prednisolone Sodium Phosphate Reference Standard". Analytical data obtained were as follows: pH 7.6; optical rotation $[\alpha]_D^{25}$, +99.0°; Infrared spectrum, same as that of BP Reference Standard; Thin-layer chromatography, 4 impurities were detected; high-performance liquid chromatography (HPLC), 7 kinds of impurities were detected; residual solvent, 0.76% (ethanol) and 0.23% (hexane); assay, 100.2% by the enzyme method and 99.7% by the HPLC method in terms of the BP Reference Standard.

Based on the above results, this raw material was authorized to be the Reference Standard of the National Institute of Hygienic Sciences.

(Received May 31, 1990)

リン酸プレドニゾロンナトリウムとその製剤の定量試験に用いられる国立衛生試験所リン酸プレドニゾロンナトリウム標準品 (Control 891) を製造したので報告する。

1. 原料

エタノール、ヘキサン混液により再結晶を繰り返し、精製された標準品原料を萬有製薬株式会社より購入した。

2. 参照物質および試薬

参照物質としてBPのリン酸プレドニゾロンナトリウム標準品を用いた。試薬類は特級品または特級相当品を用いた。

3. 装置

精密pHメーター E510 (メトローム)、自動旋光計 PM-201 (ユニオン技研)、自記分光光度計 Ubest-50 (日本分光)、赤外分光光度計 IR-700 (日本分光)、デジタル微量水分測定装置 AQ-1 (平沼産業) を用いた。

また、液体クロマトグラフ装置は島津製作所製のポンプ LC-5A、検出器 SPD-2A、データ処理装置 C-R3A を用い、ガスクロマトグラフ装置は島津製作所製の GC-8A を用いた。

4. 試験方法

特に記すもの以外は日本薬局方外医薬品成分規格 (1989) の「リン酸ヒドロコルチゾンナトリウム」の試験法を準用した。

薄層クロマトグラフ法による純度試験：原料および標準品約 0.010 g をメタノール 1 ml に溶かし、次の条件で薄層クロマトグラフ法による純度試験を行った。

薄層板：蛍光剤入りのプレコートッド薄層板シリカゲル 60F₂₅₄ (20×20 cm, 層厚 0.25 mm, メルク社)

展開溶媒：*n*-ブタノール・水・氷酢酸 (10:2:1)

方法および検出法：試料溶液の 1~20 μ l を薄層板にプロットし、約 15 cm 展開した後、薄層板を取り出し風乾した。これを紫外線 (主波長 254 nm) 照射下で観察した。

液体クロマトグラフ法による純度試験：原料および標準品約 0.03 g を精密に量り、移動相に溶かして正確に 20 ml とし、試料溶液とした。この液 5 μ l につき、次の条件で液体クロマトグラフ法による純度試験を行った。

カラム：Zorbax ODS (7 μ m, 4.6 mm ϕ ×250 mm)
移動相：0.1M リン酸緩衝液 (pH 2.6)・メタノール混液 (1:1)

流量：0.5 ml/min

検出器：紫外吸光光度計 (測定波長 254 nm)

カラム温度：35° 付近の一定温度

検出感度：試料注入量の 1/100 に相当する量を注入し、得られる主ピーク高さが、フルスケールの約 1/10 になるように記録計の感度を調整した。さらに、この条件で試料注入量の 1/2000 に相当する量を注入すると

き、得られる主ピークの面積が必ず検出されるように分析パラメーターを設定した。

ガスクロマトグラフ法による残留溶媒試験：メチルエチルケトン内標準物質とし、次の条件で内標準法により定量分析を行った。

i) エタノール

試料溶液：原料約 0.075 g を精密に量り内標準液 0.25 ml を正確に加えて溶かし、さらに水を加えて正確に 5 ml とした。

内標準溶液：メチルエチルケトン 0.5 ml/100 ml 水
エタノール標準原液：エタノール (99.5%, 比重 0.793) 0.5 ml/50 ml 水

検出器：水素炎イオン化検出器

カラム：内径 4 mm, 長さ 2m のガラス管にポリスチレン・ジビニルベンゼン共重合体からなるポーラスポリマービーズを充填したカラム PORAPAK Q (80~100 mesh, Waters Co.).

カラム温度：130~180°, 昇温 5°/min.

キャリアーガス：窒素, 流量：内標準物質の保持時間が約 8 分になるような一定流量

注入量：5 μ l

ii) ヘキサン

試料溶液：原料約 0.1 g を精密に量り内標準溶液 0.15 ml を加えて溶かし、さらにメタノールを加えて正確に 5 ml とした。

内標準溶液：メチルエチルケトン 0.2 ml/100 ml 水
ヘキサン標準原液：ヘキサン (96%, 比重 0.760) 0.1 ml/20 ml メタノール

そのほかはエタノールと同じ。

液体クロマトグラフ法による定量試験：純度試験を行ったと同様の条件で、BP 標準品を対照に絶対検量線法により定量試験を行った。

5. 試験成績

- 1) 性状：白色の粉末で、においはない。
- 2) pH: 7.6 (1g, 水, 100 ml)
- 3) 旋光度：+99.0° (乾燥物換算 1g, リン酸緩衝液 pH 7.0, 100 ml, 100 mm)
- 4) 紫外吸収スペクトル：原料約 0.010 g を精密に量り、水を加えて正確に 500 ml とし、水を対照に紫外吸収スペクトルを測定した結果、極大吸収波長は 248 nm, 乾燥物に換算した $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ (248 nm) は 310 であった。吸収スペクトルを Fig. 1 に示す。

5) 赤外吸収スペクトル：臭化カリウム錠剤法を用いて赤外吸収スペクトルを測定した。その結果、BP 標準品と同一のスペクトルが得られた (Fig. 2)。

6) 純度試験

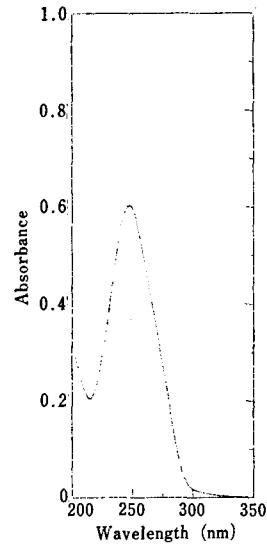


Fig. 1. Ultraviolet spectrum of the material for prednisolone sodium phosphate reference standard (Control 891)

i) 遊離リン酸：0.2%

ii) 遊離プレドニゾロン：0.1% (241 nm)

iii) 薄層クロマトグラフ法による純度試験：クロマトグラムを Fig. 3 に示した。200 μ g をスポットしたとき原料中に微量不純物 4 個を検出した。また BP 標準品中には 3 つの微量不純物を認めた。リン酸プレドニゾロンナトリウムの検出限界は 0.1 μ g であった。

iv) 液体クロマトグラフ法による純度試験：液体クロマトグラムの一例を Fig. 4 に示した。面積百分率 0.05% 以上の不純物 7 個が検出された。面積百分率法による本品の純度は 98.1% と推定された。

また BP 標準品では 5 個の不純物が検出され、純度は 98.5% と推定された。

7) 水分：本品約 0.02 g を用いて電量滴定法によりその水分含量を求めた。本品は吸湿性であり、保存中の水分含量変化が避けられないため、アンブル中に充填することとし、充填試料の中よりサンプリングしてそのロットにおける水分含量を定めた。その結果、Control 891 の水分は 4.5% であった。

8) 残留溶媒：未乾燥の原料中にはエタノール 0.76%, ヘキサン 0.23% の残留が認められた。また、乾燥した場合にもエタノール 0.08%, ヘキサン 0.17% の残留が認められた。

9) 定量：

i) 酵素法 100.2% (測定波長：241 nm)

ii) 液体クロマトグラフ法

BP 標準品に対して定量試験を行った結果、99.7%

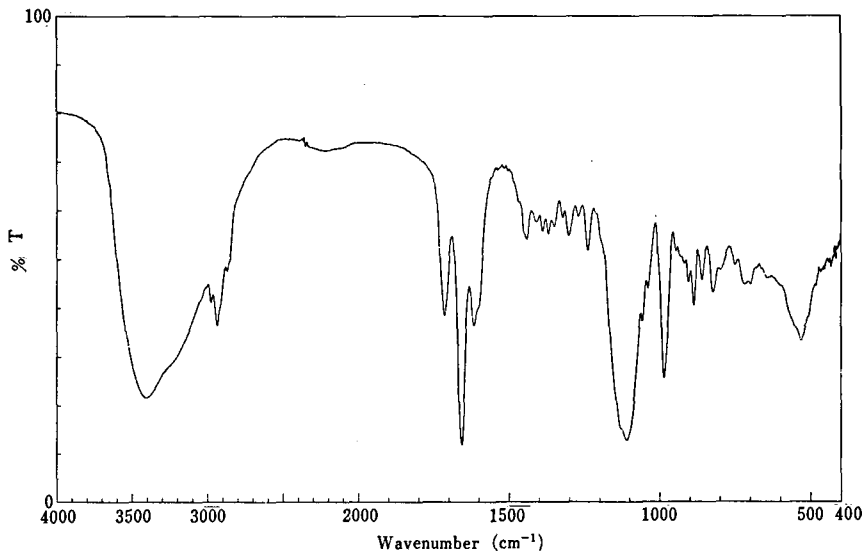


Fig. 2. Infrared spectrum of the material for prednisolone sodium phosphate reference standard (Control 891)

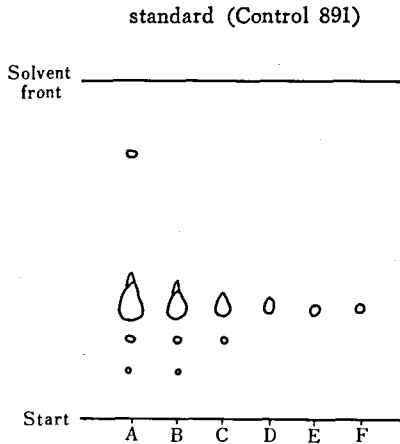


Fig. 3. Thin-layer chromatogram of raw material for prednisolone sodium phosphate reference standard (Control 891)

solvent system: *n*-butanol·water·acetic acid (10 : 2 : 1) A, B, C, D, E, F: 200, 100, 50, 20, 10 and 5 μ g, respectively

の値が得られた。

結 論

標準品原料として入手したリン酸プレドニゾンナトリウムを BP 標準品と比較検討した。原料中には約 1% の溶媒が残留しており、また液体クロマトグラフ法による純度試験で 7 個の微量不純物が検出され、その純度は 98.1% と推定された。しかし、BP 標準品と

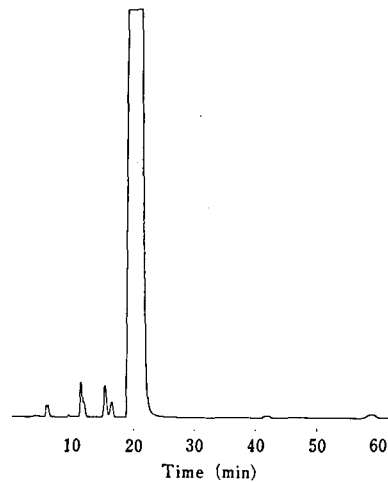


Fig. 4. High-performance liquid chromatogram of raw material for prednisolone sodium phosphate reference standard (Control 891)

Conditions: column, Zorbax ODS (4.6 mm ϕ \times 250 mm); column temp., 35 $^{\circ}$; mobile phase, mixture of 0.1 M phosphate buffer (pH 2.6) and methanol (1 : 1); flow rate, 0.5 ml/min; detection wavelength, 254 nm

同等の値であり、BP 標準品を対照とした定量値は 99.7% であった。以上の成績から今回入手した標準品原料は、国立衛生試験所標準品に適した品質を有することを認めた。終わりに、標準品を製造するにあたりご協力いただきました萬有製薬株式会社に深謝致します。

国立衛生試験所コハク酸トコフェロール標準品 (Control: 881)

田中正一・村井真美・徳永裕司・木村俊夫・岡田敏史

Tocopherol Succinate Reference Standard (Control 881)

of National Institute of Hygienic Sciences

Masakazu Tanaka, Mami Murai, Hiroshi Tokunaga,

Toshio Kimura and Satoshi Okada

Tocopherol succinate was tested for the preparation of "Tocopherol Succinate Reference Standard (Control 881)". Analytical data obtained were as follows: infrared spectrum, same as Tocopherol Succinate Reference Standard (Control 851); absorbance, $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ (286 nm) = 40.5; thin-layer chromatography, contaminants were not detected until 50 μg ; high-performance liquid chromatography, three contaminants were detected; loss on drying, 0.09%; assay, 100.0%.

On the basis of the above results, this material was authorized as the Japanese Pharmacopoeia Standard (Control 881).

(Received May 31, 1990)

第十一改正日本薬局方 (JP XI) コハク酸トコフェロールカルシウムの純度試験および定量法に用いる国立衛生試験所標準品 (日本薬局方標準品) "コハク酸トコフェロール標準品 (Control 881)" 製造のための分析を行ったので報告する。その品質の評価に当っては、エーザイ(株)の協力を仰いだ。

1. 原料

エーザイ(株)より購入した。同社による試験成績は次の通りである。

薄層クロマトグラフ (TLC) 法による純度試験: 37.5 μg まで異種スポットなし, 液体クロマトグラフ (HPLC) 法による純度試験: 不純物量 2.0%。吸光度: $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ (286 nm); 36.5 (0.01 g, クロロホルム, 100 ml)。定量: 99.7% (対日本薬局方標準品)。

2. 参照物質および試薬

日本薬局方標準品 (Control 851) を対照に試験を行った。試薬は特級品を用いた。

3. 装置

日本分光 IR-700 型赤外分光光度計, メトラー AE-240 型上皿電子天秤, 日本分光 U-best-50 型自記分光光度計, 島津 LC-6A 型液体クロマトグラフ装置, 島津 SPD-6A 型波長可変 UV モニター, 島津 C-R6A 型クロマトパックを用いた。

4. 試験方法

特に記するものの他は, JP XI の一般試験法および医薬品各条 "コハク酸トコフェロールカルシウム" の

試験法を準用した。

TLC 法による純度試験: 薄層板; メルク社製プレコート板シリカゲル 60F₂₅₄ (厚さ 0.25 mm, 20 × 10 cm), 展開溶媒; トルエン, 酢酸混液 (95:5)。試料溶液; 試料 10 mg を取り, クロロホルム 2.0 ml を加えて溶かし試料溶液とした。方法および検出法; 試料の 12.5~50.0 mg 相当の溶液をシリカゲル薄層板にスポットし, 約 15 cm 展開した後, 薄層板を取り出し風乾した。これに濃硫酸を均等に噴霧した後, 110°C で15分間加熱し, 直ちに白色光下で観察した¹⁾。

HPLC 法による純度試験: 原料および日本薬局方標準品 10 mg ずつを量り, それぞれを無水エタノール・薄めた氷酢酸 (1→5) 混液 (9:1) に溶かし 10 ml とし, 試料溶液とした。この液 20 μl につき, 次の条件で HPLC 法を行った。

操作条件:

検出法; 紫外吸光光度計 (測定波長: 284 nm)

カラム; ULTRON N-C18. L, (4.6 mm ϕ × 150 mm)

移動相; メタノール・水・氷酢酸混液 (97:2:1)

流量; 0.8 ml/min

カラム温度; 室温

検出感度; 試料注入量の 1/100 に相当する量を注入し, 得られた主ピークの高さが記録紙のフルスケールの約10%の高さになるように検出器の出力あるいは記録計の感度を調整した。さらに, この条件で, 試料注

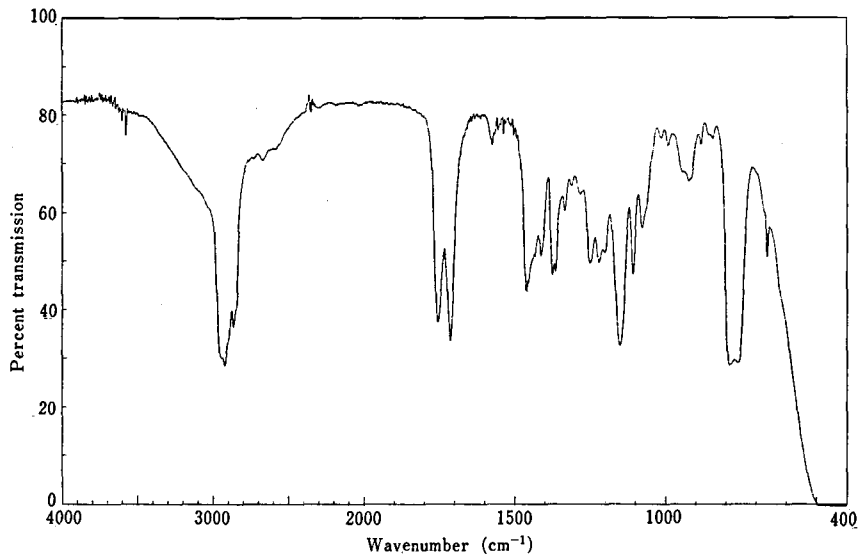


Fig. 1. Infrared spectrum of the material for tocopherol succinate reference standard (Control 881)

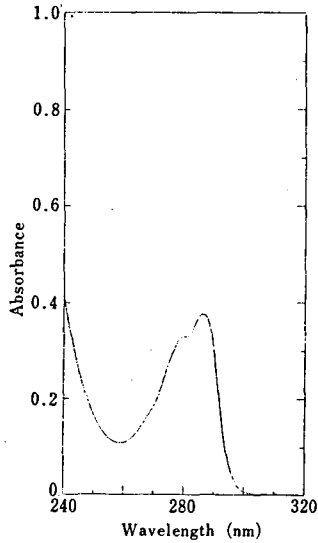


Fig. 2. Ultraviolet spectrum of the material for tocopherol succinate reference standard (Control 881)

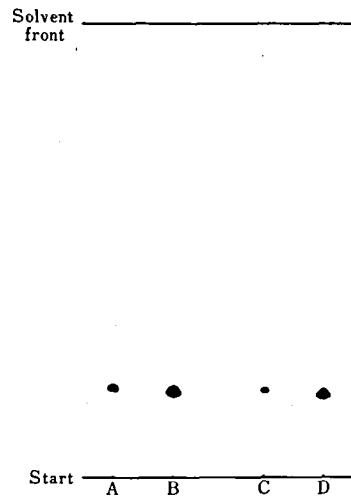


Fig. 3. Thin-layer chromatogram of tocopherol succinate

A, B: material 12.5 μ g, 50.0 μ g
 C, D: Japanese pharmacopoeia standard 12.5 μ g, 50.0 μ g

入量の1/2000に相当する量を注入したとき、得られたピークの面積が必ず検出されるように分析パラメーターを設定した。

5. 試験結果

- 1) 性状：白色の粉末で、においはない。
- 2) 赤外吸収スペクトル：試料を乾燥し、その0.08 gを四塩化炭素 0.2 ml に溶かし、液膜法 (NaCl 板) により測定した赤外吸収スペクトルを Fig. 1 に示す。波数 1756, 1462, 1376, 1366, 1253, 1151 cm^{-1} に吸収を

認めた。

3) 紫外吸収スペクトルおよび吸光度：吸光度 $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ (286 nm): 40.5 ± 0.5 ($n=8$) (0.01 g, クロロホルム, 100 ml)。紫外吸収スペクトルを Fig. 2 に示す。

4) TLC 法による純度試験：クロマトグラムを Fig. 3 に示す。この方法による検出限界は、0.06 μ g であった。原料、標準品ともに 50 μ g の塗布まで不純物を認めなかった。

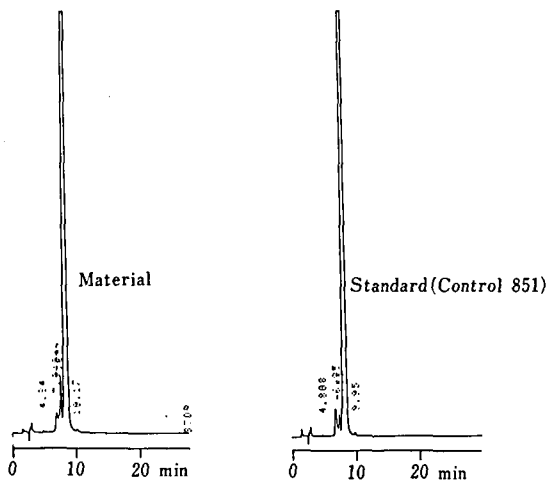


Fig. 4. High-performance liquid chromatograms of reference standards for Tocopherol Succinate

Conditions: column, ULTRON N-C18, L (4.6 mm ϕ \times 150 mm); mobile phase, mixture of methanol, water and acetic acid (97:2:1); flow rate, 0.8 ml/min; detection wavelength, 284 nm.

5) HPLC 法による純度試験: クロマトグラムを Fig. 4 に示す。標準品、標準品原料ともに3個の不純物ピークが認められた。全ピーク面積総和を100%としたとき、標準品および原料のコハク酸トコフェロール含量はそれぞれ 98.68% \pm 0.01% (n=4), 98.22% \pm 0.02% (n=4) であった。

6) 乾燥減量: 0.09% \pm 0.06% (n=5) (1g, 減圧,

五酸化リン, 24時間)

7) 定量: 標準品原料は, JP XI 法により標準品 (Control 851) と比較するとき, 100.0 \pm 0.4% (n=3) であった。

結 果

標準品原料として入手したコハク酸トコフェロールカルシウムの品質を日本薬局方標準品 (Control 851) と比較した。その結果 JP XI で採用している各種試験の結果は良好であった。吸光度として $E_{1cm}^{1\%}$ が40.5 と JP XI 規格値の範囲限界に近かったが、標準品 (Control 851) の値が40.2であり、またエーザイ㈱の試験成績は36.5であること考慮すると問題はないと考えられる。前回標準品に対する定量値は100.0%とよく一致した。純度試験についても、TLC 法および HPLC 法による試験を行ったがどちらも良好であった。特に HPLC 法による純度試験では、3個の不純物ピークが検出され、面積百分率法による原料の純度は98.22%と推定された。

これらの試験成績により今回入手した標準品原料は、国立衛生試験所標準品 (日本薬局方標準品) に適した品質を有することを認めた。終わりに、標準品を分析するに当たりご協力いただいたエーザイ㈱に感謝致します。

文 献

- 1) 勝井五一郎, 大前雅彦, 江沢敏一, 江沢 総: トコフェロール, 酢酸トコフェロールおよびコハク酸トコフェロール標準品に関する研究. 医薬品研究, 16, 506 (1985)

国立衛生試験所酢酸クロルマジノン標準品 (Control: 881)

田中正一・村井真美・徳永裕司・木村俊夫・岡田敏史

Chlormadinone Acetate Reference Standard (Control 881)
of National Institute of Hygienic SciencesMasakazu Tanaka, Mami Murai, Hiroshi Tokunaga,
Toshio Kimura and Satoshi Okada

Chlormadinone acetate was tested for the preparation of the "Chlormadinone Acetate Reference Standard (Control 881)". Analytical data obtained were as follows: loss on drying, 0.00%; infrared spectrum, 1740, 1715, 1658, 1604, 1587, 1256, 1244 cm^{-1} ; ultraviolet spectrum, $\lambda_{\text{max}}=284 \text{ nm}$; absorbance, $E_{1\%}^{1\text{cm}}(284 \text{ nm})=539\sim 549$; optical rotation, $[\alpha]_D^{20}$: -12.1° ; melting point, 214.6°C ; thin-layer chromatography, contaminants were not detected until $300 \mu\text{g}$; high-performance liquid chromatography, one contaminant was detected.

On the basis of the above results, this material was authorized as the National Institute of Hygienic Sciences Reference Standard (Control 881).

(Received May 31, 1990)

国立衛生試験所酢酸クロルマジノン標準品(Control 881)を製造したので報告する。

1. 原料

帝国臓器製薬㈱より購入した。

2. 試薬

試薬は特級品を用いた。

3. 装置

日本分光 IR-700 型赤外分光光度計, メトラ-AE-240 型上皿電子天秤, 日本分光 U-best-50 型自記分光光度計, 島津 210A 型自記分光光度計, 島津 QV 50 型分光光度計, 日立 100-60 型ダブルビーム分光光度計, ユニオン PM-201 型旋光計, 宮本理研製 Model PA-10S 型融点測定器, 島津 LC-6A 型液体クロマトグラフ装置, 日本分光 UVIDEC 100-2 型波長可変 UV モニター, 島津 C-R6A 型クロマトパックを用いた。

5. 試験方法

特に記するものの他は, JP XI の一般試験法の試験を準用した。

薄層クロマトグラフ (TLC) 法による純度試験: 薄層板; メルク社製プレコート板シリカゲル 60F₂₅₄ (厚さ 0.25 mm), 展開溶媒; ジクロルメタン・エーテル混液 (9:1), 試料溶液; 試料 50 mg をクロロホルム 5 ml に溶解した。方法および検出法; 試料溶液の酢酸クロルマジノン 100~300 μg 相当をシリカゲル薄層板にスポットし, 約 15 cm 展開した後, 薄層板を

取り出し風乾した。これを紫外線 (主波長, 254 nm) 照射法により観察した。

液体クロマトグラフ (HPLC) 法による純度試験: 試料 20 mg にアセトニトリルを加えて溶かし 10 ml とした。その 20 μl を HPLC 法により分析した。

操作条件

検出法; 紫外吸光度計 (測定波長, 236 nm および 285 nm)

カラム; STR ODS-M (4.6 mm ϕ × 150 mm)

移動相; アセトニトリル・水 (13:7)

流量; 0.6 ml/min

カラム温度; 室温

検出感度; 試料注入量の 1/100 に相当する量を注入し, 得られた主ピークの高さが記録紙のフルスケールの約 10% の高さになるように検出器の出力あるいは記録計の感度を調整した。さらに, この条件で, 試料注入量の 1/2000 に相当する量を注入したとき, 得られたピークの面積が必ず検出されるように分析パラメータを設定した。

5. 試験結果

1) 性状: 淡黄色の粉末でにおいはない。

2) 赤外吸収スペクトル: 臭化カリウム錠剤法で測定した原料の赤外吸収スペクトルを Fig. 1 に示す。1740, 1715, 1658, 1604, 1587, 1256 および 1244 cm^{-1} に吸収を認めた。

3) 紫外吸収スペクトルおよび吸光度: 原料を乾燥

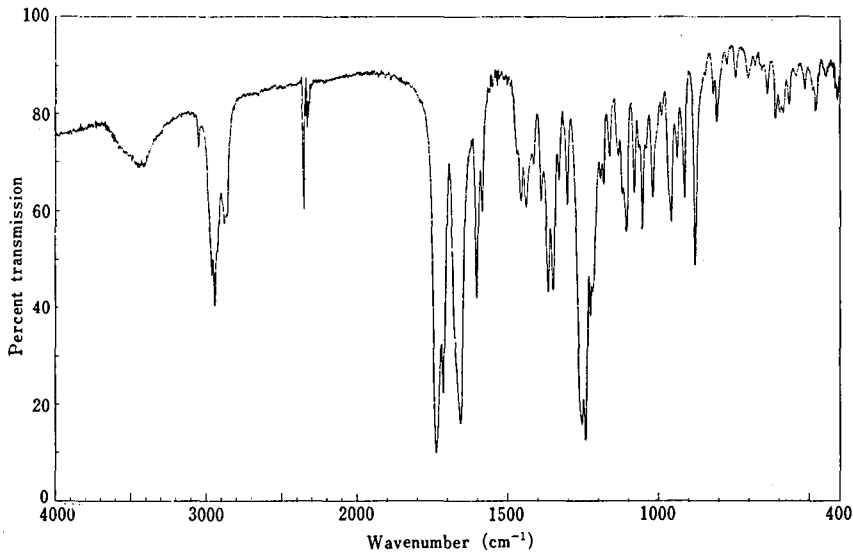


Fig. 1. Infrared spectrum of the material for chlormadinone acetate reference standard (Control 881)

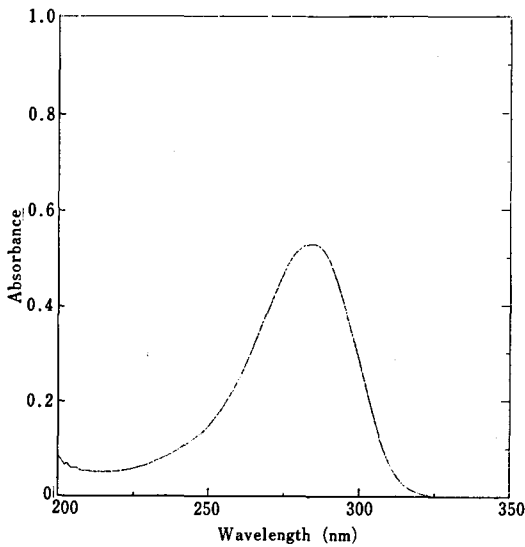


Fig. 2. Ultraviolet spectrum of the material for chlormadinone acetate reference standard (Control 881)

し、その 10 mg エタノール 1000 ml に溶かしたときの紫外吸収スペクトルを Fig. 2 に示す。スペクトル

は波長 284 nm に吸収の極大を示した。吸光度 $E_{1cm}^{1\%}$ (284 nm) : (10 mg, エタノール, 1000 ml) を測定した結果を Table 1 に示す。

4) 乾燥減量: $0.00\% \pm 0.09\%$ (n=6) (0.5 g, 減圧, 五酸化リン, 4 時間)

5) 旋光度: $[\alpha]_D^{20}$: $-12.1^\circ \pm 0.2^\circ$ (n=2) (乾燥後, 0.2 g, アセトニトリル, 10 ml)

6) 融点 (分解): $214.6^\circ \pm 0.2^\circ$ (n=6)

7) TLC 法による純度試験: 紫外線法により観察した結果を, Fig. 3 に示す。検出限界は, 0.20 μg であった。試料は 300 μg の塗布でも不純物を認めなかった。

8) HPLC 法による純度試験: 検出波長 236 および 285 nm で観察したクロマトグラムを Fig. 4 に示す。検出波長 236 nm では, 1 個の不純物が見られ, 全ピーク面積の総和を 100% としたときの酢酸クロルマジノン含量は $99.91\% \pm 0.01\%$ (n=4) であった。波長 285 nm では不純物は見られなかった。

結 論

新規標準品として酢酸クロルマジノン標準品を確立

Table 1. $E_{1cm}^{1\%}$ (284 nm) of the material for Chlormadinone Acetate Reference Standard (Control 881)

Instrument	U-best-50	Hitachi 100-60	Shimadzu-210A	Shimadzu-QV50
$E_{1cm}^{1\%}$ (284 nm)	543 \pm 2	549 \pm 1	547 \pm 1	539 \pm 1

* n=5

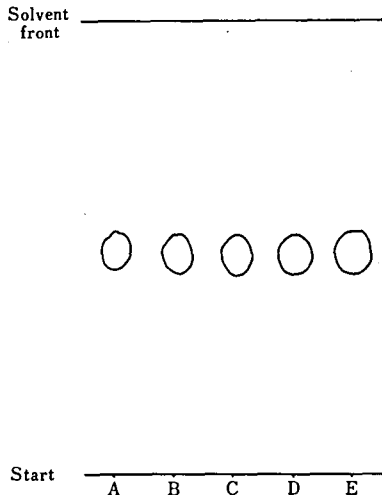


Fig. 3. Thin-layer chromatogram of reference standard for chlormadinone acetate

detection method: UV, solvent system: mixture of dichlormethane and ether (9 : 1), A, B, C, D, E: 100, 150, 200, 250, 300 μ g.

するため、標準品候補として帝国臓器製薬(株)より入手した酢酸クロルマジノンの品質試験を行った。その結果、各種試験の結果は良好であった。特に、吸光度の測定に当たっては4種の吸光度計を用いて行った。その結果、本品の $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ (284 nm) は539~549の範囲の値を示した。TLC法による純度試験では300 μ gの塗布まで不純物は検出されなかった。HPLC法による純度試験では、わずかに1個の不純物が検出されたが、その含量は0.09%程度と推定され、本候補品を標準品

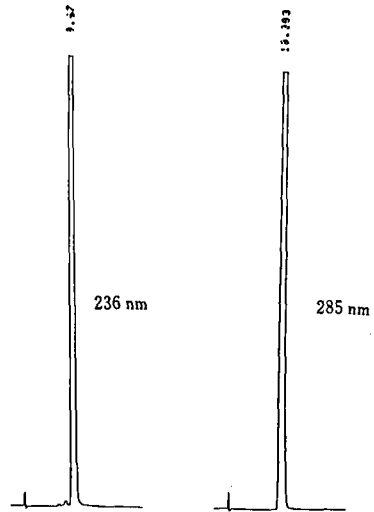


Fig. 4. Chromatograms of reference standard for chlormadinone acetate

Conditions: column, STR ODS-M (4.6 mm ϕ \times 150 mm); column temp., room temperature; flow rate, 0.6 ml/min; mobile phase, mixture of acetonitrile and water (13 : 7); detection wavelength, 236 nm or 285 nm.

として使用することに問題はないと考えられた。これらの試験成績により今回入手した標準品原料は、国立衛生試験所標準品に適した品質を有すると認め、褐色バイアルビンに100 mgずつ小分けを行い Control 881として平成2年2月より配布を開始した。最後に、標準品を製造するに当たりご協力いただきました帝国臓器製薬(株)に感謝致します。

国立衛生試験所メチルジゴキシン標準品 (Control: 881)

田中正一・村井真美・徳永裕司・木村俊夫・岡田敏史

Methyldigoxin Reference Standard (Control 881)
of National Institute of Hygienic Sciences

Masakazu Tanaka, Mami Murai, Hiroshi Tokunaga,
Toshio Kimura and Satoshi Okada

Methyldigoxin was tested for preparation of the "Methyldigoxin Reference Standard (Control 881)". Analytical data obtained were as follows: infrared spectrum 3456, 1738, 1086 cm^{-1} ; ultraviolet spectrum $\lambda_{\text{max}}=219\text{ nm}$; absorbance $E_{1\text{cm}}^{1\%}(219\text{ nm})=193.1$; water 0.99%; optical rotation $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +22.5^\circ$; thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography indicates two impurities, respectively; quantitative analysis of acetone 3.87%; assay by spectrophotometry 100.3% against Digoxin Reference Standard (Control 802).

On the basis of the above results, this material was authorized as the National Institute of the Hygienic Sciences Reference Standard (Control 881).

(Received May 31, 1990)

新規の強心配糖体標準品として国立衛生試験所メチルジゴキシン標準品を設定および製造するために、標準品候補となったメチルジゴキシンのジゴキシン標準品¹⁾に対する定量を含めた分析を行ったので報告する。

1. 原料

標準品候補とした試料は、山之内製薬㈱より購入した。同社による試験成績は次のとおりである。性状：白色の結晶性の粉末で、においに異常はない。旋光度： $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +24.1^\circ$ 。強熱残分：0.0%。水分：0.9%。アセトン：3.9%。定量：99.3%。

2. 参照物質および試薬

日本薬局方ジゴキシン標準品 (Control 802)。試薬は試薬特級品を用いた。

3. 装置

日本分光 IR-700 型赤外分光計，メトラー AE-240 型上皿電子天秤，日本分光 U-best-50 型自記分光光度計，日本分光 DIP-370 型旋光計，島津 LC-6A 型液体クロマトグラフ装置，日本分光 UVIDEC 100-2 型波長可変 UV モニター，島津 GC-8A 型ガスクロマトグラフ装置，島津 C-R3A 型クロマトバック，平沼 AQ-1 型デジタル微量水分測定装置を用いた。

4. 試験方法

特に記するもののほかは，JP XI の一般試験法の方法を準用した。

4.1 薄層クロマトグラフ (TLC) 法による純度試験

薄層板：メルク社製プレコーデッド板シリカゲル 60F₂₅₄ (厚さ，0.25 mm，20×20 cm)，展開溶媒：メチルエチルケトン・クロロホルム混液 (3:1)，試料溶液：試料 50 mg をクロロホルム 5 ml に溶かした。方法および検出法：試料溶液のメチルジゴキシン含量 25~400 μg 相当をシリカゲル薄層板にスポットし，約 15 cm 展開した後，薄層板を取出し，風乾した。これを [A] 紫外線 (主波長 254 nm) 照射法および [B] 希硫酸噴霧後，110°C で10分間加熱する方法により観察した。

4.2 液体クロマトグラフ (HPLC) 法による純度試験

試料 10 mg を量り，移動相 20 ml に溶かし試料溶液とした。この液 20 μl につき，次の条件で液体クロマトグラフィーを行った。

操作条件

検出法：紫外吸光光度計 (測定波長 219 nm)

カラム：Lichrosorb RP18-55，(4.0 mm ϕ ×250 mm)

移動相：メタノール・水 (65:35)

流量：0.5 ml/min

カラム温度：室温

検出感度：試料注入量の 1/100 に相当する量を注入し，得られた主ピークの高さが記録紙のフルスケールの約10%の高さになるように検出器の出力あるいは記

録計の感度を調整した。さらにこの条件で、試料注入量の1/2000に相当する量を注入するとき、主ピークの面積が必ず検出されるように分析パラメーターを設定した。

4.3 ガスクロマトグラフ (GC) 法によるアセトンの定量

本試料は、メチルジゴキシン1分子当たり1/2分子のアセトンを包接している。そこで試料中に含まれるアセトン量を GC 法により定量した。

方法：試料100 mgを精密に量り、内標準溶液2 mlを正確に加え、さらにジメチルホルムアミドを加えて正確に10 mlとする。この液1 μ lにつきガスクロマトグラフ法により試験を行い、内標準溶液のピーク面積に対するアセトンのピーク面積比を求め、検量線よりアセトン量を求めた。

内標準溶液：第3ブタノール1 gにジメチルホルムアミドを加えて2 lとする。

検量線：アセトン約400 mgを精密に量り、ジメチルホルムアミドを加えて正確に50 mlとする。この液1, 2, 4, 6 mlをそれぞれ正確に量り、内標準溶液10 mlを正確に加え、さらにジメチルホルムアミドを加えて正確に50 mlとする。この液1 μ lにつきガスクロマトグラフ法により試験を行い、内標準溶液のピーク面積に対するアセトンのピーク面積比を求め検量線を作成する。

操作条件

カラム：Porapak G (80~100 mesh, 4 mm ϕ ×2 m)

カラム温度：180°C

窒素：32 ml/min

水素：0.5 kg/cm²

空気：0.5 kg/cm²

4.4 ジゴキシンを標準品に用いた定量

試料10 mgを精密に量り、メタノールを加えて溶かし、正確に20 mlとする。この液5 mlを正確に量り、メタノールを加えて正確に100 mlとし、試料溶液とする。別に日本薬局方ジゴキシン標準品(Control 802)を105°Cで1時間減圧乾燥し、その約20 mgを精密に量り、メタノールを加えて溶かし、正確に200 mlとして標準溶液とする。試料溶液および標準溶液5 mlずつを正確に量り、それぞれに氷冷下、ピクリン酸試液15 mlおよび水酸化ナトリウム試液2 mlを正確に加え、よく振り混ぜた後、メタノールを加えて正確に25 mlとし、ピクリン酸試液15 mlおよび水酸化ナトリウム試液2 mlを正確に量り、メタノールを加えて正確に25 mlとした液を対照とし、波長495 nmにおける吸光度 A_T および A_S を経時的に測定し、それぞれの最大値を求める。

メチルジゴキシン量 (mg)

=ジゴキシン標準品の量 (mg)

$\times A_T/A_S \times 2 \times 1.055$

5. 試験結果

- 1) 性状：白色の粉末で、においはない。
- 2) 赤外吸収スペクトル：臭化カリウム錠剤法により測定した試料の赤外吸収スペクトルを Fig. 1 に示す。3456, 1738および1086 cm^{-1} に吸収を認めた。

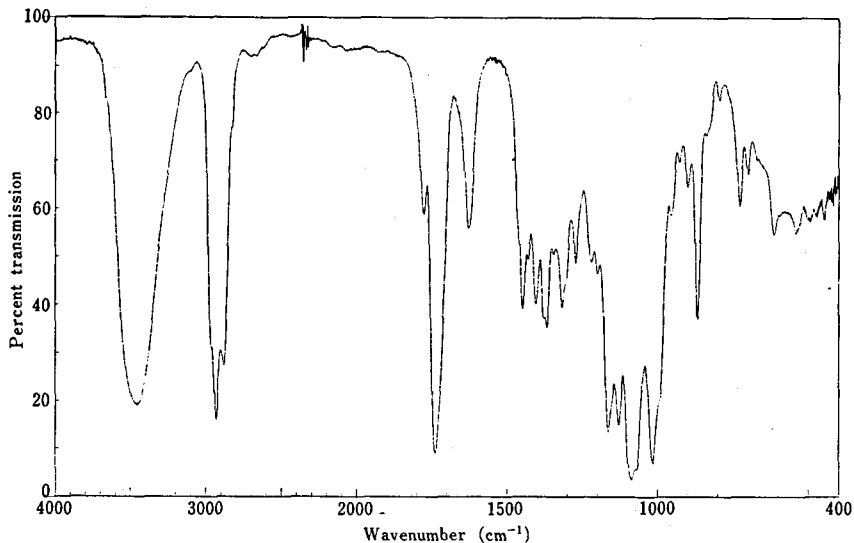


Fig. 1. Infrared spectrum of the material for methyl digoxin reference standard (Control 881)

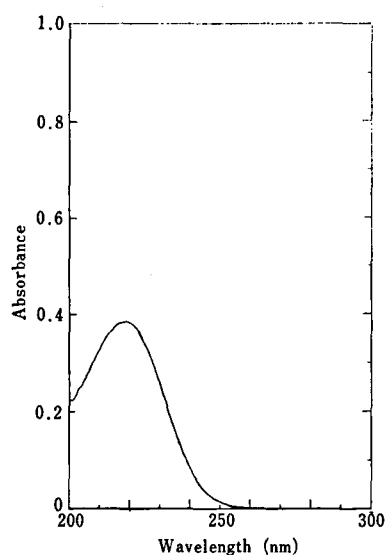


Fig. 2. Ultraviolet spectrum of the material for methyldigoxin reference standard (Control 881)

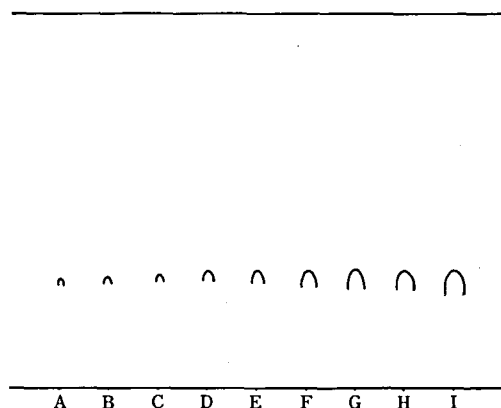


Fig. 3. Thin-layer chromatogram of reference standard for methyldigoxin

Detection method: UV. A, B, C, D, E, F, G, H, I: 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 400 μg .

3) 紫外吸収スペクトルおよび吸光度: 試料 20 mg をメタノール 1000 ml に溶かしたときの紫外吸収スペクトルを Fig. 2 に示す。波長 219 nm に吸収の極大を示した。吸光度 $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ (219 nm): 193.1 ± 1.0 ($n=5$) (20 mg, メタノール, 1000 ml)。

4) 水分量: 試料約 100 mg を精密に量り, デジタル微量水分測定装置により水分量を測定した。0.99 \pm 0.06% ($n=6$)。

5) 旋光度: $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: $+22.5 \pm 0.0^\circ$ ($n=3$) (脱水物に換算して 1 g, ピリジン, 10 ml)。

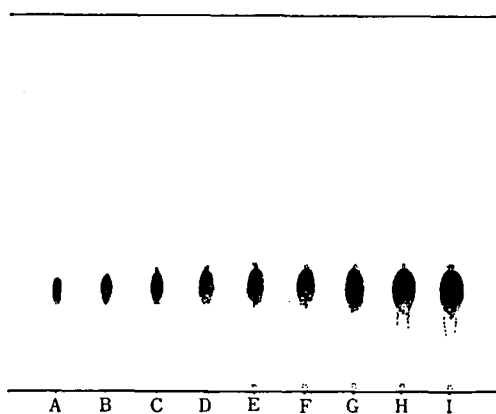


Fig. 4. Thin-layer chromatogram of reference standard for Methyldigoxin

Detection method: H_2SO_4 . A, B, C, D, E, F, G, H, I: 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 400 μg .

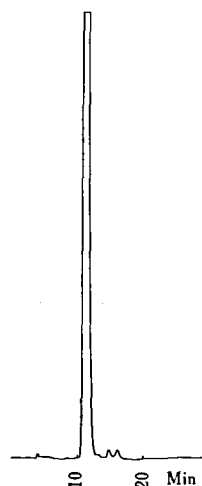


Fig. 5. Chromatogram of reference standard for methyldigoxin

Conditions: column, Lichrosorb RP18-55 (4.0 mm ϕ \times 250 mm); column temp., room temperature; flow rate, 0.5 ml/min; detection wavelength, 219 nm; mobile phase, mixture of methanol and water (65 : 35)。

6) TLC 法による純度試験: [A] 法および [B] 法で検出した結果をそれぞれ Fig. 3 および Fig. 4 に示す。[A] の紫外線法による検出限界は, 7.5 μg であり, スポット量 400 μg においても不純物は認められなかった。[B] の希硫酸による検出方法は高感度であり, その検出限界は 0.04 μg であった。スポット量 50 μg まで不純物を認めず, スポット量 400 μg で 2 種類の不純物が確認された。

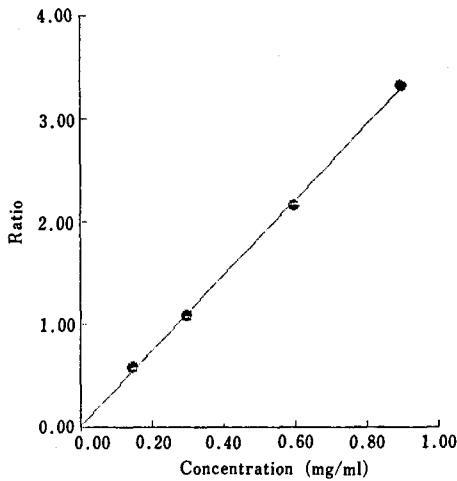


Fig. 6. Calibration curve of acetone by GC

7) HPLC 法による純度試験：クロマトグラムを Fig. 5 に示す。全ピーク面積の総和を 100% としたとき、試料のメチルジゴキシン含量は $99.60 \pm 0.03\%$ ($n=4$) であり、不純物として 0.17% と 0.23% の未知物質 2 種類を検出した。

8) GC 法によるアセトンの定量：内標準物質として第 3 ブタノールを用いたときのアセトンの検量線を Fig. 6 に、ガスクロマトグラムを Fig. 7 に示す。試料中のアセトン定量値は理論値 3.52% に対して $3.87 \pm 0.04\%$ ($n=3$) であった。

9) 定量：試料は日本薬局方ジゴキシン標準品 (Control 802) と比較するとき、その含量は $100.3 \pm 0.3\%$ ($n=3$) であった。

結 論

標準品候補として入手したメチルジゴキシンの品質をジゴキシン標準品に対する定量を含めて調べた。その結果、各種試験の成績は良好であった。しかし、TLC 法による純度試験では、スポット量 $400 \mu\text{g}$ で 2 種類の不純物が検出された。また、HPLC 法によ

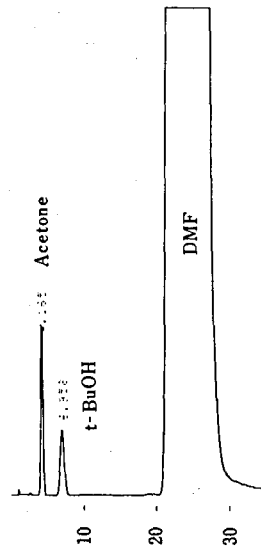


Fig. 7. Gas chromatogram of acetone in Methylidigoxin

Condition: column, Porapak G (80~100 mesh, 4 mm \times 2 m); column temp., 180°C; carrier gas, N_2 , 32 ml/min.

る純度試験においても同様に 2 種類の不純物ピークが検出されたが、面積百分率法を用いた場合、純度的には 99.60% 以上の高純度であることが確認された。これらの試験成績により今回入手した標準品候補品は、国立衛生試験所標準品に適した品質を有することを認め、バイアルビンに 50 mg ずつ小分けし、Control 881 として平成 2 年 2 月より配布を開始した。

終わりに、本標準品を製造するに当たりご協力いただきました山之内製薬㈱および日本分光㈱に感謝いたします。

文 献

- 1) 徳永裕司, 木村俊夫, 川村次良: 国立衛生試験所ジゴキシン標準品 (Control 801). 衛生試験報, 101, 121~123 (1983)

国立衛生試験所シアノコバラミン標準品 (Control: 891)

田中正一・村井真美・木村俊夫・岡田敏史

Cyanocobalamin Reference Standard (Control 891) of National Institute of Hygienic Sciences

Masakazu Tanaka, Mami Murai, Toshio Kimura and Satoshi Okada

Cyanocobalamin was tested for preparation on the "Cyanocobalamin Reference Standard (Control 891)". Analytical data obtained were as follows: loss on drying, 9.77%; infrared spectrum, same as that of the Cyanocobalamin Reference Standard (Control 871); thin-layer chromatography, five contaminants were detected; high-performance liquid chromatography, nine contaminants were detected; assay, 100.00% by JP XI method and 99.79% by HPLC method in terms of the JP Reference Standard (Control 871), respectively.

On the basis of the above results, this material was authorized as the Japanese Pharmacopoeia Standard (Control 891).

(Received May 31, 1990)

第十一改正日本薬局方 (JP XI) シアノコバラミン、同注射液の定量に用いる国立衛生試験所標準品 (日本薬局方標準品) "シアノコバラミン標準品 (Control 871 シリーズ)" の在庫が僅少になったのでロットの更新を行った。

前回の場合¹⁾と同様に、古いロットと標準品原料の比較試験を定性および定量的試験項目について行った。

1. 原料

萬有製薬(株)より購入した。

2. 参照物質および試薬

日本薬局方標準品 (Control 871) を対照として用いた。試薬は特級品を用いた。

3. 装置

日本分光 IR-700 型赤外分光光度計, メトラ-AE-240 型上皿電子天秤, 日本分光 U-best-50 型自記分光光度計, 島津 LC-6A 型液体クロマトグラフ装置, 島津 SPD-6A 型波長可変 UV モニター, 島津 SCL-6A システムコントローラー, 島津 C-R4A 型データ処理装置を用いた。

4. 試験方法

特に記するもの以外は, JP XI の一般試験法および医薬品各条 "シアノコバラミン" の試験法を準用した。

薄層クロマトグラフ (TLC) 法による純度試験: 薄層板; メルク社製プレコート板シリカゲル 60F₂₅₄ (厚さ, 0.25 mm), 展開溶媒; (A) プロパノール・水・10%アンモニア水混液 (7:2:1), (B) n-ブタノール・水・クロロホルム・酢酸・メタノール (25:

11:10:9:5), 試料溶液; 乾燥物に換算したとき 5 mg 相当する量の未乾燥原料および日本薬局方標準品 (Control 871) を 1 ml のメタノールに溶かした。方法および検出法; 試料溶液の 10~40 μ l をシリカゲル薄層板にスポットし, 約 15 cm 展開した後, 薄層板を取り出し風乾した。これに裏面より光を照射して観察した。

液体クロマトグラフ (HPLC) 法による純度試験: 原料および標準品それぞれ 20 mg 相当に水 5 ml を加えて溶かし, その 20 μ l を HPLC 法により分析した。

操作条件

検出法; 紫外吸光光度計 (測定波長: 361 nm)

カラム; μ Bondapak C₁₈ (3.9 mm ϕ ×150 mm)

移動相; アセトニトリルと 0.1M リン酸緩衝液 (pH 3.0) の混合液。ただし, 0分から8分まではアセトニトリル濃度11%, 8分から35分まではアセトニトリル濃度を11%から60%まで直線的に増加させ, その後60%に維持した。

流量; 1.0 ml/min

カラム温度; 30°C

検出感度; 試料注入量の 1/100 に相当する量を注入し, 得られた主ピークの高さが記録紙のフルスケールの約10%の高さになるように検出器の出力あるいは記録計の感度を調整した。さらに, この条件で試料注入量の1/2000に相当する量を注入したとき得られたピークの面積が必ず検出されるように分析パラメーターを

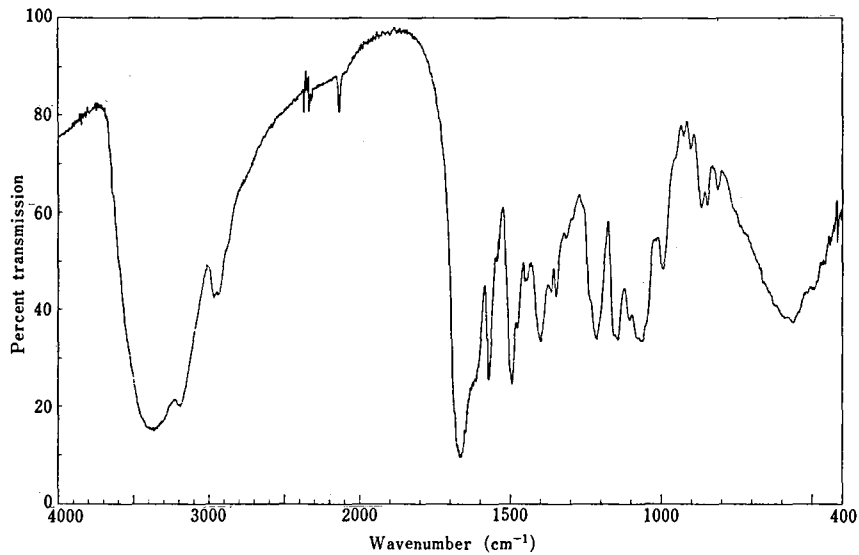


Fig. 1. Infrared spectrum of the material for cyanocobalamin reference standard (Control 891)

設定した。

HPLC 法による定量：標準品原料約 13 mg を精密に量り，これを内標準溶液に溶かして 50 ml とし，この 20 μ l を HPLC 法により分析した。そして，あらかじめ日本薬局方標準品を用いて作成した検量線よりシアノコバラミン量を求めた。内標準溶液はパラヒドロキシン安息香酸 90 mg を水に溶かし 2000 ml とした。

操作条件

検出法；紫外吸光度計（測定波長，278 nm）

移動相；アセトニトリル，0.1M リン酸緩衝液 (pH 3.0) 混液 (12 : 88)

その他の条件は純度試験と同様にした。

5. 試験成績

1) 性状：暗赤色結晶性の粉末で，においはない。
2) 赤外吸収スペクトル：臭化カリウム錠剤法で測定した原料の赤外吸収スペクトルを Fig. 1 に示す。これは，日本薬局方標準品の赤外吸収スペクトルとよく一致した。

3) 紫外および可視吸収スペクトル：試料約 20 mg を水 1000 ml に溶かしたときの紫外および可視吸収スペクトルを Fig. 2 に示す。スペクトルは，波長 278.5, 361, 549 nm にそれぞれ吸収極大を示し，それぞれの波長における吸光度を A_1, A_2, A_3 とするとき， A_1/A_2 は 0.539 ± 0.003 ($n=4$)， A_3/A_2 は 0.308 ± 0.001 ($n=4$) であった。

4) 乾燥減量：9.77% \pm 0.30% ($n=4$) (0.05 g，減圧 5 mmHg 以下，五酸化リン，100°C，4 時間)

5) TLC 法による純度試験：展開溶媒 (A) およ

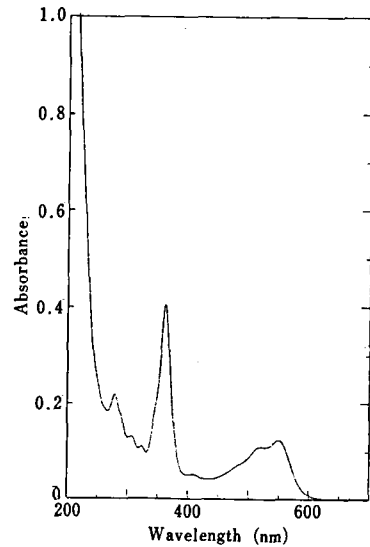


Fig. 2. Ultraviolet and visible spectrum of the material for the cyanocobalamin reference standard (Control 891)

び (B) で展開した結果をそれぞれ Fig. 3 および Fig. 4 に示す。原料 200 μ g の塗布で展開溶媒 (A) で 5 個，溶媒 (B) で 2 個の不純物スポットが認められた。不純物の数は，日本薬局方標準品 (Control 871) と比較すると，展開溶媒 (A) の場合 1 個過剰に検出された。

6) HPLC 法による純度試験：クロマトグラムを Fig. 5 に示す。不純物ピークは標準品で 6 個，原料で 9 個認められた。全ピーク面積の総和を 100% とした

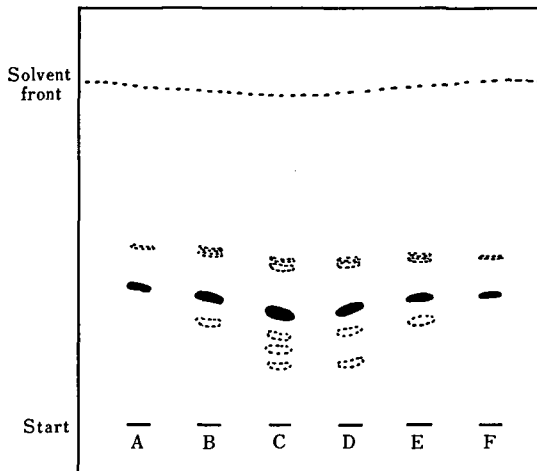


Fig. 3. Thin-layer chromatogram of reference standard for cyanocobalamin

solvent system: *n*-propanol-water-10% ammonia (7 : 2 : 1).

A, B, C: material 50 μ g, 100 μ g, 200 μ g

D, E, F: Japanese Pharmacopoeia Standard 200 μ g, 100 μ g, 50 μ g

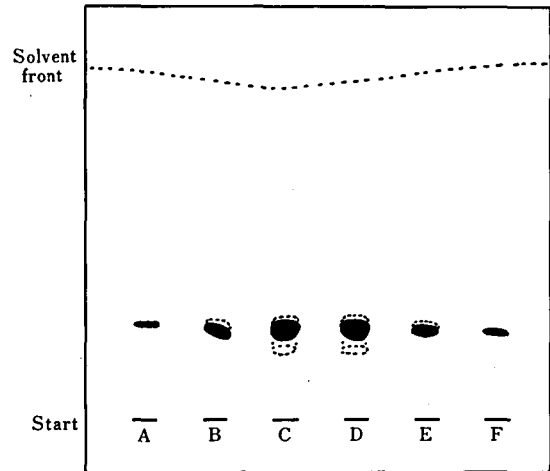


Fig. 4. Thin-layer chromatogram of reference standard for cyanocobalamin

solvent system: *n*-butanol, water, chloroform, acetic acid, and methanol (25 : 11 : 10 : 9 : 5).

A, B, C: material 50 μ g, 100 μ g, 200 μ g

D, E, F: Japanese Pharmacopoeia Standard 200 μ g, 100 μ g, 50 μ g

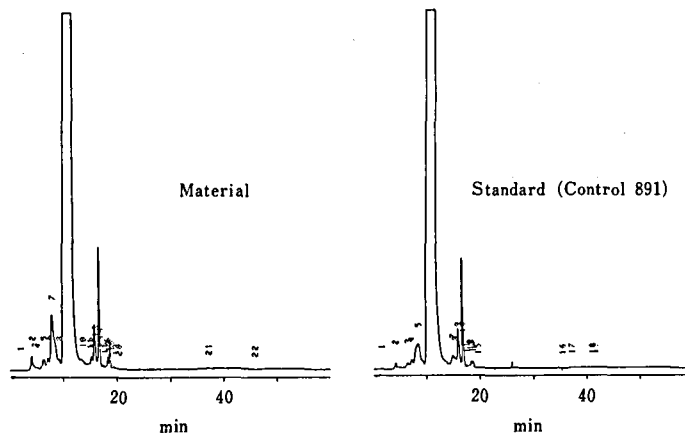


Fig. 5. Chromatograms of reference standards for cyanocobalamin

Conditions: column, μ Bondapak C₁₈ (3.9 \times 150mm); column temp., 40°C; flow rate, 1.0 ml/min; detection, 361 nm; mobile phase, a mixture of acetonitrile and 0.1 M phosphate buffer (pH 3.0) was used. An acetonitrile concentration in the mobile phase was 11% for the first eight minutes, and then linearly changed from 11% to 60% for twenty-seven minutes, and 60% acetonitrile level was maintained

とき、標準品および標準品原料のシアノコバラミン含量はそれぞれ 98.67% \pm 0.01% (n=3) および 98.20% \pm 0.03% (n=3) であった。

7) 定量: JP XI 法により原料を標準品 (Control 871) に対して定量すると, 100.00% \pm 0.67% (n=4) であった。HPLC 法による定量の検量線およびクロマトグラムを Fig. 6 および Fig. 7 に示す。HPLC 法による定量結果は, 99.79% \pm 1.07% (n=5) であった。

結 論

標準品原料として入手したシアノコバラミンを日本薬局方標準品 (Control 871) と比較検討した。その結果 JP XI で採用している各種試験の結果は良好であった。TLC 法による純度試験では、展開溶媒 (A) では前回標準品に比べて 1 個過剰の不純物が検出された。HPLC 法による純度試験では、原料の純度は

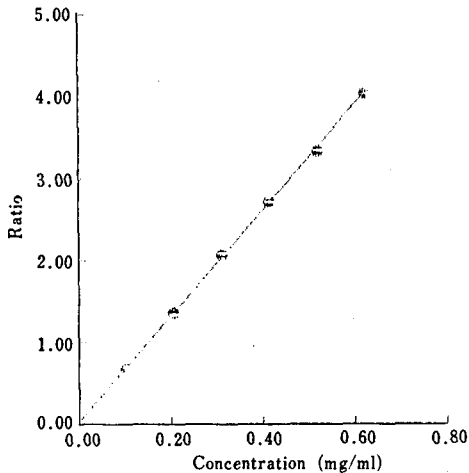


Fig. 6. Calibration curve of cyanocobalamin by HPLC

98.20%, 前回標準品の純度は98.67%となり、今回の原料は純度が劣っていると判明した。しかし、JP XI 法および HPLC 法による定量試験では、今回の原料は前回の標準品を基準にすると、それぞれ100.00%および99.79%となり、本品を標準品として用いることに問題はないと考えられた。

これらの試験成績により今回入手した標準品原料は、

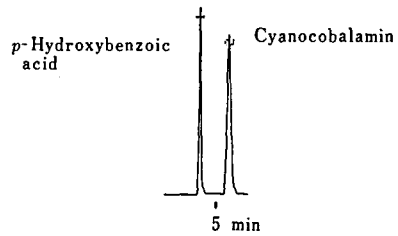


Fig. 7. Chromatographic assay of cyanocobalamin
Conditions: column, μ Bondapak C18(3.9 \times 150 mm); column temp., 40°C; flow rate, 1.0 ml/min; detection, 278 nm; mobile phase, a mixture of acetonitrile and 0.1 M phosphate buffer (pH 3.0) (12 : 88)

国立衛生試験所標準品（日本薬局方標準品）に適した品質を有することを認め Control 891 として平成2年1月より配布を開始した。

標準品を製造するに当たり、ご協力いただきました萬有製薬㈱に対しまして、感謝の意を表します。

文 献

- 1) 田中正一ら：国立衛生試験所シアノコバラミン標準品 (Control 871). 衛生試験, 107, 159 (1989)

国立衛生試験所標準品（日本薬局方標準品） “エンドトキシン標準品”（Control: 891）

小川義之・村井敏美・天野博夫
江馬 真・伊丹孝文・川崎浩之進

National Institute of Hygienic Sciences Standard (the Japanese Pharmacopoeia Standard) “Endotoxin Reference Standard” (Control 891)

Yoshiyuki Ogawa, Toshimi Murai, Hiro Amano, Makoto Ema,
Takafumi Itami and Hironoshin Kawasaki

The second “Endotoxin Reference Standard” (Control 891) of the National Hygienic Sciences (Japanese Pharmacopoeia Standard) was prepared. As a result of the test of its potency against the preceding lot of the Reference Standard (Control 881), the second “Endotoxin Reference Standard” (Control 891) containing 16000 endotoxin units per vial was authorized.

(Received May 31, 1990)

前回製造した国立衛生試験所（日本薬局方標準品）“エンドトキシン標準品”（Control 881）の在庫が僅

少となったために新ロットによる第2回標準品（Control 891）を製造したので結果を報告する。

Table 1. Estimated potencies of the endotoxin preparation (Control 891)

Exp. No.	Method-1		Method-2		Method-3
	HS II	HS II	Pregel M	Pyrogen	Endospeccy
1	0.96	0.71	0.71	0.84	0.96
2	1.13	1.19	1.41	1.19	1.06
3	2.15	1.11	1.30	1.19	1.09
4	0.82	0.79	0.71	1.19	1.02
Mean±S. D.	1.27±0.60	0.95±0.24	1.03±0.38	1.10±0.18	1.03±0.06

1. 標準品原料

原料は、Control 881と同様に *E. coli* UKT-Bより抽出精製したリポ多糖 LPS (Control 881と同じロットの LPS でディープフリーザー保存したもの) を今回新たにバイアル当たり 2 µg を窒素置換して充填(和光純薬株式会社に充填依頼)したものである。

2. 試薬および試験方法

試験方法: Control 881 (16000 EU/vial)¹⁾ に対して今回の Control 891 の力価 (エンドトキシン単位, EU) を標準化した。力価試験法は Control 881 を製造したときと同様に、①比濁時間分析法 (Method-1)、②ゲル化転倒法 (Method-2)、③比色法 (Method-3) の3種の方法により行った。

使用 LAL 試薬:

(1) 比濁時間分析法: LAL HS II (和光純薬 Lot No. CTJ 9212, 表示感度 0.03 EU/ml) の LAL 試薬を用いて行った。測定装置はトキシノメーター ET-201 (和光純薬) を用いた。

(2) ゲル化転倒法: ① LAL HS II (和光純薬 Lot No. CTJ 9212, 表示感度 0.03 EU/ml)、②プレゲル M (生化学工業 Lot No. AB 01, 表示感度 0.125 EU/ml)、③ Pyrogen (第一化学 Lot No. 8L1552, 表示感度 0.06 EU/ml) の3種の LAL 試薬を用いて行った。

(3) 比色法 (合成基質法): エンドスペシー (生化学工業 Lot No. 611209) の LAL 試薬を用いて行

た。

力価検定法:

比濁時間分析法は回帰直線の平行線定量法²⁾、ゲル化転倒法はエンドポイント³⁾の比較、合成基質法は回帰直線の傾斜比較によりそれぞれ力価を検定した。

3. 試験結果

Method-1, -2 および -3 によって求められた試料 1 バイアル中の力価を Table 1 に示す。

結 論

今回、新たに製造した試料の第1回標準品(Control 881)に対する力価を3種の方法で比較した結果、ばらつきを考慮するとき、第1回標準品と等しいものとみなした。

したがって、本試料をエンドトキシン標準品 (Control 891) とし、その1バイアル中に 16000 EU を含むものと認定した。

文 献

- 1) 川崎浩之進, 小川義之, 本間玲子, 石田説而, 田中重則, 土谷正和, 市東利明: リムルステストの標準化に用いられるエンドトキシンについて. 医薬品研究 (投稿中)
- 2) 黒川正身, 高橋宏一, 石田説而: “バイオアッセー, その医学生物学領域での適用”, 近代出版, 東京 (1978), pp. 105~173
- 3) 第十一改正日本薬局方追補 (1988), pp. 10~12

業 務 報 告

Annual Reports of Divisions

平成元年度業務概況

所 長 谷 村 顕 雄

1. 組織の整備

近年、人体への影響が解明されていない生活関連諸物質の安全性に関する情報が求められている。

さらに OECD が開始した既存化学物質に関する毒性試験の国際協力の問題、動物実験結果の人体へのより精密な外挿法、安全性評価のための基準の確立等、毒性情報を取り巻く環境は急激に動いている。

しかしながら、現有の組織体制では有害性の確認を中心とした毒性試験にとどまり、急速に変化しつつある社会情勢に対応し、さらに諸外国における安全性評価体制に歩調を合わせて行くのは困難な状況である。

このような状況を踏まえ、化学物質についての毒性情報をより精密に解析し、信頼性の高い安全性評価を支援するため、総合評価システムの構築が是非とも必要である。

また、安全性評価業務については、各専門分野との密接な連携のもとに総合的な評価体制が必須であることから、総合評価研究部の新設について努力しているところである。

なお、平成元年度組織定員要求において、安全性生物試験研究センター毒性部に評価研究室の新設が認められた。

有用な天然薬用資源の確保と開発に関連し、研究体制の強化の一環として、特に薬用植物栽培試験場は、筑波を中心とした薬用植物資源研究センターの創設を目標とし、また、各分場については、各方面との調整を行いつつ、可及的速やかにその在り方を決めたいと考えている。

2. 国立試験研究機関等将来構想

国立試験研究機関等将来構想検討会（座長 山村雄

一）は、昭和63年9月厚生科学会議の提言（厚生科学研究の基盤確立とプレイクスルーのために）を踏まえて、昭和63年10月に発足し、国立試験研究機関の今後の在り方について幅広く検討を行い本年4月「国立試験研究機関の改革方策」と題する報告書を公表した。

同報告書は其中で、国立試験研究機関に期待する機能と役割について、①国民の健康、安全性の確保等厚生行政を支援する研究の推進、②大学、民間等他の研究機関では総合的に対応できない分野の研究の推進、③大規模研究プロジェクトおよびニーズの高い研究の中核としての役割、④試験研究の基盤となる資料、規格等の作成および普及を挙げている。

次に、国立試験研究機関の活性化を図るための方策として、○試験研究施設等の充実、研究企画部門の強化、○研究費の確保、○研究者の養成・確保、○人事交流の促進、○大学等他の研究機関との研究交流の促進、○国際研究交流の促進、○養成訓練の充実、○検査検定の合理化、○研究評価体制の確立、○情報ネットワークの整備、○試験研究材料の供給体制の整備、○研究支援財団の整備、について積極的に取り組むべきであるとしている。

当所に関する見直しの具体的方向として、化学物質等の科学的総合的な安全性に関する研究の推進、医療機器の安全性に関する試験研究業務の組織的対応、薬用植物研究内容の充実・強化が望まれている。

また、常に最先端の科学技術に参画することにより、組織の活性を維持すること、あるいは近年、創薬科学技術に対する組織的取り組みが求められていることから、当所としても積極的に貢献すべきであると指摘されている。

今後ますます加速される国際化の流れの中で、当所も迅速に業務行政に対応しなければならない。また、薬局方をはじめとする公定規格書の内容の充実、整備は無論のこと国際的な調和と整合性を計ることも重要である。

一方ヒトの健康に及ぼす麻薬、向神経薬の乱用問題、さらにエイズ問題も世界的協力体制の下に取り組むべき重要な緊急課題と考えられ、これら諸問題の解決のため、当所の責務はますます重いものとなるであろう。

なお、当所の試験研究業務の改革方策については、昭和60年度まとめた「自主点検報告書」の中で示してあるとおり、これら指摘事項について既に問題点として取り上げ改善等に努めているものもあるが、これを機にさらに積極的に取り組んで行きたいと考えている。

3. 移転関係

政府は東京都区部の過密解消、都市・産業機能の地方分散を図るべく、国の研究機関等の一部を地方に移転することを目的として、昭和63年6月に制定された「多極分散型国土形成促進法」に基づき、同年7月、79行政機関等の移転が閣議決定された。

当所においても移転対象機関とされたことから、当所の業務内容、職員の勤務環境等を勘案のうえ、移転先地の選定について鋭意検討を重ねた結果、府中市(米軍基地跡地)を最良の移転先地として所内確認し、同市をはじめ関係省庁等に対し要望してきたところである。

その結果、平成元年8月24日「国の機関等移転推進連絡会議」(国の機関等の移転に関する省庁の事務次官をもって構成)において、79行政機関等の移転先地が公表され、当所の府中市への移転が決定した。

このため当所は、同年9月、移転に関する具体的諸問題の適切な対応と近代的研究環境の整備を目的として、長期的展望に立った当所の業務の発展に適した施設整備を検討するため、所内に所長を本部長とする「移転計画本部」(統括部会、広報部会、施設・設備計画部会、エネルギー・廃棄物処理計画部会および特々会計整備計画部会)を設置し、種々検討を行っているところである。

4. 国際協力関係

国際協力関係では、①安全性評価文書の作成を行っている WHO の国際化学物質安全性計画 (IPCS)、②化学物質の安全性に係る情報の収集、提供を行っている国連環境計画/世界保健機関 (UNEP/WHO)、③既存化学物質安全性点検を開始した経済開発協力機構 (OECD) 等へ日本代表機関として参画し事業を行っており、これらに関連する専門家会議への職員の参

加等、積極的に国際協力に努めているところである。

また、技術援助関係では、国際協力事業団等から、医薬品食品品質管理プロジェクト等に係る技術指導要請に応え、フィリピン、インドネシア等5ヶ国に対し、3人を当所から派遣した。

なお、多数の国からの技術指導要請により、本年度は研修生35人の受け入れを行った。

5. 全国衛生化学技術協議会

全国衛生化学技術協議会第26回年会は、9月13、14日神戸市環境保健研究所の主催により、神戸市で開催され、当所からは特別報告『精度管理について』(義平邦利食品添加物部長)などが発表された。

総務部

部長 水越浩二

1. 組織

平成元年度新設された安全性試験研究センター毒性部に主任研究官1名が認められた。

なお、等級別定数の改定により研究職2級から3級へ5名の切上げが認められた。

2. 定員

昭和63年度末の定員は282名であったが、第7次定員削減計画に基づき行政職(一)1名、行政職(二)1名、研究職2名、計4名の定員削減により、平成元年度末の定員は、指定職2名、行政職(一)46名、行政職(二)27名、研究職205名、計280名となった。

3. 予算

平成元年度予算の概要は次のとおりである。

(1) 一般予算

予算額は、2,853,554千円で前年度に比較して3.98%の増額が図られた。

増額、減額の主な項目としては、

- ①標準品製造費(6品目追加による増) 4,716千円
- ②情報活動運営費(コンピュータ導入に伴う平年度化増) 21,791千円
- ③施設管理事務経費(ボイラー技師、動物飼育員のメンテナンスへの振替に伴う増) 17,347千円
- ④受託研究費(新規研究課題に伴う増) 33,779千円
- ⑤施設整備費の減 Δ 38,924千円

等が挙げられる。

また、新規予算については、昭和62年度の補正予算において、薬用植物栽培制御実験室の新設が認められたが、これを維持するための経費として薬用植物栽培環境制御実験室運営費9,811千円が認められた。

別紙

平成元年度予算額

事 項	昭和63年度 (A)	平成元年度 (B)	対前年度差 引増△減額 (B)-(A)	備 考
	(千円)	(千円)	(千円)	
(組織)厚生本省試験研究機関	2,744,318	2,853,554	109,236	
(項)厚生本省試験研究所	2,557,266	2,702,601	145,335	
人 件 費	1,781,389	1,824,020	42,631	
人 当 経 費	7,431	7,609	178	
一般事務経費	40,055	41,529	1,474	
研 究 費	218,209	222,856	4,647	
特別研究費	15,767	16,195	428	1. 生活関連諸物質に含まれる微量有害成分の体内動態ならびに毒性発現機構に関する研究 (6,808千円) 2. 生体関連反応指標の有意性判定に関する研究 (9,387千円)
標準品製造費	14,592	19,308	4,716	
安全性生物試験研究センター運営費	201,402	207,299	5,897	
薬用植物栽培試験場運営費	93,632	103,916	10,284	
情報活動運営費	20,024	41,815	21,791	
施設管理事務経費	27,097	44,444	17,347	
対がん10か年総合戦略経費	62,999	64,704	1,705	
受託研究費	56,555	90,334	33,779	1. ニューロ・トロフィック・ファクター等の分離技術および機能の解析技術の開発 (9,234千円) 2. 疾病の発生に影響を及ぼす遺伝子の探査技術および機能の解析技術の開発 (4,118千円) 3. 医薬品の高感度・高性能安全性等評価試験方法の開発 (15,414千円) 4. 新開発食品の有用性・安全性評価技術の開発 (10,267千円) 5. バイオテクノロジーにより生産される医薬品の標準化と試験法開発 (8,197千円) 6. 形質転換薬用植物資源の開発, 育成及び利用 (6,143千円) 7. 高分子材料と薬理活性をもつ物質との総合技術の開発 (15,408千円) 8. 高分子医薬品の化学修飾による有用性増幅 (8,238千円) 9. 医用(高分子)材料の安全性評価法に関する研究 (8,202千円) 10. 免疫・食細胞系による生体防御機構の解明 (2,060千円) 11. 代謝・解毒・内分泌機能と生体防御機構の解明 (3,053千円)
乱用薬物基礎研究費	18,114	18,572	458	薬物乱用, 特に多剤乱用時の依存形成能とその薬物動態並びに生体に及ぼす影響に関する研究 (18,572千円)

事 項	昭和63年度 (A)	平成元年度 (B)	対前年度差 引増△減額 (A)-(B)	備 考
	(千円)	(千円)	(千円)	
(項)血清等製造および検定費	95,808	98,633	2,825	
一般事務経費	12,415	12,758	343	
事業費	83,393	85,875	2,482	
(項)厚生本省試験研究施設費	91,244	52,320	△38,924	8号館給湯配管等改修その他 工事(52,320千円)
[移替予算]				
(組織)厚生本省試験研究機関	170,306	200,310	30,004	
(項)国立原子力試験研究費	77,387	91,985	14,598	
(項)放射能調査研究費	2,000	2,608	608	
(項)国立機関公害防止研究費	90,919	105,717	14,798	
計	2,914,624	3,053,864	139,240	

* 予算額については両年度とも当初予算額

(2) 移替予算

予算額は、200,310千円で前年度と比較して17.62%の増額となった。

新規課題としては、国立機関原子力試験研究費において4課題(①食品照射により誘起される物質の安全性に関する研究22,464千円、②タンパク質ハイブリッド形成法によるタンパク性医薬品の安全性および有効性の確保に関する研究3,026千円、③化粧品品の安全性を予測する評価技術に関する研究5,530千円、④リンパ球の分裂中期細胞集積法に関する研究19,570千円)が認められた。

また、国立機関公害防止等試験研究費において3課題(①遺伝子組換え関連微生物の安全性評価に関する研究14,633千円、②先端技術産業で用いられる希土類等の生体影響の評価法に関する研究18,511千円、③公共用水域における開放系使用化学物質の動態および安全性等に関する研究3,327千円)が認められた。

なお、平成元年度事項別予算額は別紙のとおりである。

4. 施設整備状況

平成元年度の施設整備の概要は以下のとおりであった。

(1) 8号館給湯配管等改修工事(施設整備費52,320千円)を行った。

(2) 11号館ボイラー煙突修理工事(各所修繕費(特別修繕)3,032千円)を行った。

5. 国家検定医薬品等の改正

(1) 国家検定品目の追加

当所が検定することとされている国家検定品目は、新たに「半合成ヒトイソフェンインスリン水性懸濁注射液」が追加された。(平成元年9月29日、厚生省告

示第172号)

この結果、当所の試験に係る国家検定品目は、6品目から7品目となった。

(2) 標準品交付規定の一部改正

当所が製造し、申請者に交付している医薬品標準品は、平成2年1月22日より6品目追加されたことにより、医薬品標準品は79品目となった。(平成2年1月22日、厚生省告示第6号)

6. その他

平成元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。

(元. 4. 1付) 総務部長 水越浩二

(元. 5. 1付) 化学物質情報部長 神沼二真

(元. 11. 1付) 大阪支所薬品試験部長 岡田敏央

(元. 4. 1付) 辞職 志多良介(総務部長)

(元. 11. 1付) 辞職 木村俊夫(大阪支所薬品試験部長)

薬 品 部

部 長 武 田 寧

概 要

前年度に引続き、医薬品の品質確保および新開発製剤の評価に関することを中心に本年度の試験研究を実施した。放出調節製剤を中心とする新剤形医薬品の評価については、生物薬剤学および物理薬剤学の立場から製剤機能の評価方法の整備確立に向けて検討を進めている。また、医薬品の品質確保の基本である医薬品分析法、および医薬品乱用防止に必要な乱用薬物鑑定分析法について検討を加えている。

平成元年度には、ヒューマンサイエンス振興財団より流動研究員として泉川智氏が派遣され、官民共同プロジェクト研究事業の受託研究に従事した。

平成2年4月1日付けで、松田りえ子主任研究官が食品部へ、麻薬室石上暁子技官が機能生化学部へ、それぞれ配置換えとなり、代って同日付けで豊岡利正技官が食品部から第3室に配置換えになり、木倉瑠理技官が麻薬室に新規採用された。

業務成績

1. 特別審査試験

新薬89件、殺虫剤11件、およびかぜ薬・解熱鎮痛薬49件、合計149件について試験した。

2. 一斉取締試験

ジピリダモール錠(58品目)、スルピリン坐剤(5品目)、インドメタシン軟膏(13品目)、精製水(20品目)、注射用水(12品目)、およびビタミンC注射液(24品目)について試験した。

3. 特別行政試験

医薬品および医薬部外品の品質試験2件、日本薬局方医薬品の規格試験5件、あへんのモルヒネ含量試験79件(輸入あへん52件、国産あへん27件)、けしのアルカロイド定量試験135件(モルヒネ59件、コデイン76件)、ウパタマ中のメスカリン試験18件を実施した。

4. 標準品の製造

向精神薬分析用標準品としてフェネチルアミン系向精神薬5種(MDMA 20g, MMDA 20g, PMA 20g, TMA 20g, カチノン10g)を合成し、薬務局麻薬課に供給した。

5. 国際協力

国際協力事業団の技術協力事業であるフィリピン国食品薬品検定センタープロジェクトの実施に協力した。国際厚生事業団の発展途上国保健福祉開発企画推進検討委員会医薬品部会に参画し、アジア諸国薬事行政官研修およびアジア諸国麻薬行政官研修の実施に協力した。国連麻薬部の専門家会議に参加し、標準試験法の作成に協力した。

また、韓国国立保健院の禹仁愛氏(平成元年5月16日~6月9日)、および韓国国立科学捜査研究所の文栄鎬氏(平成元年12月27日~平成2年1月26日)に麻薬分析技術に関する研修を行なった。

6. その他

日本薬局方改正(薬務局安全課)、日本薬局方外医薬品成分規格作成および英訳(薬務局審査第二課)、安定性試験ガイドライン原案作成(薬務局審査第一課)、殺虫剤指針改訂(薬務局審査第二課)、地方衛研技術者講習会(薬務局監視指導課)、向精神薬に関する

資料収集(薬務局麻薬課)、乱用薬物に関する情報収集(薬務局麻薬課)等に協力した。

研究実績

1. 医薬品の分析法に関する研究

医薬品分析の自動化に関し、ラザロトリーロボットを用いた混合剤の溶出試験自動化システムを作成した。分析条件の最適化に関し、高速液体クロマトグラフィーによる製剤分析の操作条件の最適化を検討した。熱帯病治療薬の品質規格に関し、塩酸キニーネ注射液の類縁物質を検討するとともに、輸入製剤の品質試験を行った(厚生科学研究費補助金、薬務局経済課)。ビタミン主薬製剤の高速液体クロマトグラフ法による迅速分析法を作成した(薬務局監視指導課)。

2. 日本薬局方の規格および試験方法に関する研究

日本薬局方収載製剤への溶出試験の設定について検討し、溶出試験規格案を作成するとともに、溶出試験結果の施設間変動についても検討した(厚生科学研究費補助金、薬務局安全課)。一般試験法のアルコール数測定法、メタノール試験法等の改正について検討した。ヒ素試験法の検液調製法の改良について検討した(公定書協会)。有機塩基塩酸塩の非水滴定法の改良操作法を確立した。

3. 医薬品の有効性・安全性に関する薬剤学的研究

坐剤の生物学的利用性と放出試験に関し、回転セルを用いる方法の操作条件について検討し、回転セル内の溶媒量が坐剤からの薬物放出に大きな影響を及ぼすことを明らかにした。Population pharmacokineticsに関し、生物学的同等性評価に用いる解析法として分散分析と同様に有用であることを明らかにした。高分子材料利用製剤の生物薬剤学的評価技術に関し、0次放出徐放顆粒を用い、イヌにおける吸収部位通過時間が約2時間であることを明らかにした(HS 財団受託研究)。

4. 医薬品の物理・化学的安定性に関する研究

医薬品の安定性予測試験法に関し、現行安定性試験基準の見直しのための基礎的検討を行なった。不均一系医薬品の分解性に関し、ゼラチンゲル等の含水半固形製剤中の薬物の加水分解速度と水分含量との関係を明らかにし(厚生科学研究費補助金、薬務局経済課)、またポリ乳酸マトリックスに内包した薬物の加水分解をポリ乳酸の分解生成物が促進することを明らかにした。蛋白質およびペプチドのDDSの安定性に関し、示差熱分析(DSC)が製剤工程中の蛋白質の安定性評価や製剤の安定性評価に有用であることを明らかにした。生分解性高分子材料を利用した放出制御機能の設計および安定性に関し、ポリ乳酸マイクロスフェアの

薬物放出変動要因の解析から、マイクロスフェアの調製条件を調節することにより、薬物放出機能を支配するマトリックスの結晶化度を調節し、放出を制御する可能性を見出した (HS 財団受託研究費)。

5. 麻薬および依存性薬物に関する研究

毛髪中の乱用薬物の検出法に関し、GC/MS法による毛髪中の覚醒剤の検出法を確立するとともに、毛髪中の薬物の移動について検討した (乱用薬物鑑定法整備研究, 薬務局麻薬課)。生体中の乱用薬物の免疫アッセイに関し、ELISA法による唾液中のモルヒネの分析法を確立した。このELISA法をモルヒネ投薬中のがん患者のドラッグモニタリングに利用し、唾液分析のドラッグモニタリングにおける有用性を明らかにした (厚生科学研究費補助金, 薬務局麻薬課)。電気化学検出液体クロマトグラフ法によるカルボン酸の微量定量について検討した。向精神薬の分析法に関し、フェネチルアミン系向精神薬の分析マニュアルを作成した (厚生科学研究費補助金, 薬務局麻薬課)。フェネチルアミン類の代謝産物に関し、6種の化合物につき尿中代謝物を検討した (厚生科学研究費補助金, 薬務局麻薬課)。喫煙による薬物乱用に関し、覚せい剤を喫煙することにより生成する薬理活性物質のラット尿中代謝物について検討した。

生物薬品部

部長 田中 彰

構 要

昨年度の部名変更にともない、従来の1, 2, 3室に加えて標準品製造室は診断用医薬品室となり、名実ともに業務の内容は一新した。

平成元年度の業務は、以下に記すように前年度とほぼ同様であった。人事の面ではHS財団流動研究員、関沢文氏は平成2年3月31日付で退職し、4月1日付で藤村久子氏が採用された。

短期海外出張は、田中がWHO本部でのIPCSのTris-BPに関するHSGドラフト作成会議(スイス)、ひき続きヨーロッパ薬局方25周年記念公開会議に出席のため出張した(フランス, 平成元年6月21日~7月2日)。また福岡室長は、第5回国際毒科学会(英国, 平成元年7月16日~21日)に、早川室長は1989環太平洋国際化学会議(米国, 平成元年12月19日~23日)にそれぞれ出席した。

業務成績

1. 一斉取締試験

カリジノゲナーゼ製剤22件について試験を行い、21件が含量規格に適合し、1件が含量不足のため不適になった。

2. 特別審査試験

酵素製剤など33件について試験を行った。

3. その他

第12改正日本薬局方に伴う業務(薬務局安全課)、医薬品原料および添加物の規格整備に関する検討(厚生科学研究費補助金, 薬務局審査第二課)、局方医薬品の活用に関する業務(厚生科学研究費補助金, 保険局医療課)、検査薬に関する業務(厚生科学研究費補助金, 薬務局審査第二課)、バイオ医薬品の品質確保に関する啓蒙活動への協力(HS財団, 化学工学会)、組換えヒト成長ホルモンの試験法に関する国際共同研究への参加(WHO)、日本抗生物質医薬品基準(日抗基)の改正に伴う業務(薬務局生物製剤課)、1990年日抗基に関する解説および啓蒙(日本抗生物質学術協議会)。

研究業績

1. 医薬品の規格および試験法に関する研究

i) 塩化リゾチーム製剤中の複数のリゾチーム基質に対して異なる特異性を示す物質について検討した。

ii) ホルモン等の *in vitro* assay 法の基礎的研究として、ニワトリ胚芽細胞の増殖とプロテオグリカン産生におよぼす各種ホルモンおよび抗生物質等の作用、ならびにヘパリンのプロテオグリカン産生増強作用の機作について検討した。

iii) カリジノゲナーゼ製剤の合成基質を用いる分光学的迅速分析法ならびにpHスタット法を確立した。

iv) 高分子量型ウロキナーゼ標準品を試作し、ヒト尿由来ウロキナーゼ製剤の合成ペプチド基質を用いる簡易測定法を確立した。

v) バイオテクノロジーにより生産される医薬品の標準化と試験法開発として、組換えDNA技術により生産された各種エリスロポエチンの力価検定法の標準化に関する基礎的検討を行った(HS財団受託研究費)。

2. 医薬品の有効性と安全性に関する生物化学的研究

i) タンパク質ハイブリッド形成法によるタンパク質性医薬品の有用化

イ) リゾチームをポリエチレングリコール(PEG)でハイブリッド化し、その酵素化学的、物理化学的性質について検討した(原子力研究費)。

ロ) γ -グルタミルトランスペプチターゼ、組織プラスミノゲンアクチベータをPEGでハイブリッド化

し、その酵素化学的、物理化学的性質について検討した (HS 財団受託研究費)。

ii) Tris-BP によるラットの腎障害メカニズムは Bis-BP が原因物質であることを示した。また DBP による精巢障害は NMR 測定の結果、リン脂質の分子運動が減少することが分かった。

iii) 多形核白血球 (PMNs) 機能の分子機構ならびに各種薬剤の有害作用発現に関する生化学的研究として、PMNs の精製シトクロム b_{558} の物理化学的性質の検討ならびに dicyclohexylcarbodiimide による PMNs の活性化機構について検討した。

iv) バイオテクノロジー医薬品に対する生体応答の解析に関する基礎的研究として、ホルモンなど医薬品の種類別およびヒト型など化学構造別に分類した前臨床試験のあり方を提示した (厚生科学研究費補助金、薬務局審査第一課)。

v) バイオテクノロジーにより生産される医薬品の試験的製造とその性状に関する研究として、遺伝子工学的に新たに作製した数種のヒト成長ホルモン (GH) 誘導体を用いて、その構造と活性相関について検討した。

vi) 免疫・食細胞系による生体防御機構の解明の一環として、PMNs の活性酸素産生系の電子伝達機構におけるシトクロム b_{558} の役割および膜での存在状態について検討した (HS 財団受託研究費)。

vii) 医薬品生産に用いられる動物細胞に関する基礎的研究として、医薬品の安全性確保の観点から生産細胞に備わるべき条件について検討を進めた (厚生科学研究費補助金、薬務局審査第一課)。

viii) 組換え DNA 医薬品の開発手法に関する研究として、主に糖鎖部分の機能や構造・組成解析について検討した (厚生科学研究費補助金、薬務局審査第一課)。

3. 生体内活性物質の作用機序に関する研究

i) アルドース還元酵素阻害剤に関する研究

Monochasma savatierii から5種のイリドイド配糖体を単離し、その阻害活性を検討したところ、アセトシドが不拮抗型阻害様式による強い阻害活性を示した。

ii) 各種臓器におけるアルドース還元酵素の役割に関する研究

イ) イヌ腎臓におけるアルドース還元酵素の分布を調べ、髄質内層から本酵素を単離し、その性質を他組織由来酵素と比較検討した。

ロ) ガラクトース血症ラットを用いて加齢、妊娠、アルドース還元酵素阻害剤投与などによる水晶体内ア

ルドース還元酵素の量的変動を検討した。

ハ) ヒトにおけるアルドース還元酵素の役割、作用機序を検討するために、ヒト網膜アルドース還元酵素の遺伝子をもとにして遺伝子組換え法でヒト型酵素の発現を試み、昆虫由来細胞を宿主細胞とする培養系で大量発現することに成功した (厚生科学研究費補助金、保健医療局疾病対策課)。

iii) 鉄代謝に関する研究

鉄代謝に関与するセルロプラスミン、トランスフェリン、フェリチンなどの作用機序の解明に必須の Fe^{2+} 、 Fe^{3+} の特異的高感度分離分析法を確立した。

iv) ホルモン等による細胞増殖および分化誘導の調節機構に関する研究として、GH による脂肪細胞分化能において差異のある細胞の GH 受容体の化学的性質について比較検討した。

v) ホルモン等の作用発現に関与する諸因子に関する研究として、ラット初代培養肝細胞における GH 結合の各種ホルモン類による調節について検討した。

4. 放射性医薬品・診断薬に関する研究

大凝集アルブミンを ^{99m}Tc 化する場合、生成物質の安定性は、塩濃度、pH、温度により影響されることを明らかにした。

生 薬 部

部 長 原 田 正 敏

概 要

昨年度に引き続き、主として生薬の規格・試験法の基礎研究および生薬・生薬成分、天然有害物質の化学的研究、薬理的研究および薬物動態学的研究を行った。また、組織培養生成物の医薬品開発を志向しての基礎研究も行った。検定検査として、特別審査と一斉取締試験を行った。

平成2年3月31日付けで、西本和光第一室長が退官された。

中国政府からの研修留学生馬建平講師 (上海中医学院) は10月に1年間の研修を終了し、さらに研修期間が1年間延長された。

日本学術新興会の拠点大学方式による発展途上国との学術交流の実施に基づき、Dr. Iwang Soediro (インドネシア共和国バンドン工科大学) が薬用植物成分の化学的研究のため来部し、11月1日から11月30日まで滞在した。

科学技術振興調整費重点基礎研究外国人招へいにより、陳鳳庭副主任 (廣州市医薬工業研究所) が代謝生

化学部經由で来部し、2月26日から3月31日まで研究を行った。

業務成績

1. 特別審査

従来と同様、生薬または漢方エキス剤を含む製剤(かぜ薬38件)について審査を行った。

2. 医薬品一斉取締試験

漢方エキス製剤小青竜湯(12件)について、マオウアルカロイドおよび甘草中のグリチルリチン酸の定量を行ったところ、全件が含量規格に合格した。

研究業績

1. 生薬および生薬製剤の規格・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、局方生薬(ビャクシ、ショウマ、キツウコン)および局方外生薬(ゼンゴ、モクカ、チクジョ、チクヨウ、テンナンショウ)の品質評価法について生薬材料学的検討を行った。

ii) 漢方製剤の薬剤学的研究

ベルベリン 300, 600 mg/kg をラットに経口投与し、血漿中のベルベリン濃度を HPLC で測定した。血漿中のベルベリン濃度は用量依存的に増加し、2時間後に最高値を示した。その後、徐々に減少し12時間後においては 0.05 $\mu\text{g/ml}$ 程度の値が検知された。

iii) 生薬の薬物動態学的研究

マオウ含有アルカロイドの一つである *l*-ノルエフェドリンの静脈内投与後の体内動態について検討した。組織移行は速やかで、消失は比較的緩やかであるのがわかった。また、*d*-ノルエフェドリン、*dl*-ノルエフェドリンなどの体内動態の比較も行った。

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

同じ基原植物のビンロウジとダイフクヒの成分比較のため、まずビンロウジのアルカロイドの分離、精製を行った。

キササゲの主成分 catalpol と *p*-hydroxybenzoic acid の定量法を確立した。

ii) 有用な薬理活性をもつ新たな植物の探索とその利用

抗炎症作用を示した *Zingiber cassumunar* のヘキササン可溶画分より (E)-1-(3,4-di-methoxyphenyl) but-1-ene, (E)-1-(3,4-di-methoxyphenyl) butadiene, zerumbone および β -sitosterol などの数種の化合物を単離、同定した。

インドネシア産薬用植物 *Swietenia macrophylla* の抗マラリア活性画分より swietenine, swietenolide, tiglate を分離同定し、新化合物の構造を dehydroxy-

swietenine と決定した。

抗エイズ活性物質の探索として *Chaetomium globosum* より分離した chaetoglobosin A など3種の化合物を試験に供した。

iii) 繁用生薬の成分検索とその生物活性の研究

中国産の川芎に含有される tetramethylpyrazine はオキシトシン、アセチルコリンおよびセロトニン誘発ラット子宮収縮に対しては顕著な作用を示さなかった。一方, ferulic acid はアセチルコリンおよびセロトニン誘発収縮には影響を示さず、オキシトシン誘発収縮を抑制したので、ferulic acid による抑制作用の発現にはオキシトシン receptor の関与が考えられた。また、tetramethylpyrazine による抑制作用はプロプラノールで抑制されたので、この作用の発現には β -adrenoceptor の関与が考えられた。

iv) バイオテクノロジーによる薬用植物生成物の医薬利用に関する研究

生薬の黄連およびその培養カルスからの成分の溶出特性を調べるに当たり、まず塩化ベルベリンおよび生薬の黄連について、局方に準じた方法で溶出試験を行った。

同等量のベルベリンを含有する黄連および組織培養生成物の水抽出エキスを 1.5 g/kg および 3.1 g/kg 当てそれぞれラットに経口投与し、投与後の血漿中のベルベリン濃度を経時的に測定した。それぞれのベルベリンの血漿中濃度は漸次増加し、両者とも3時間で最高値を示す傾向にあり、以後徐々に減少した。(HS財団受託研究費)。

v) 薬用資源植物の確保、開発および利用

今期共同研究のテーマとして茯苓を選択し文献検索の後、含有成分指標物質の検討を行なった。(HS財団受託研究費、国際共同研究事業)。

3. 天然有害物質の化学的研究

i) マイコトキシンの検索・分離・同定・構造決定および生物活性の検討

小型菌核形成性 *Aspergillus flavus* の成分である痙攣性マイコトキシン afrotrem およびその関連インドロジテルベン化合物7種の定量分析を行ない、インドネシア産伝承薬から分離した菌株の主成分は dihydroxyflavinine であることを明らかにした。

マウス骨髄性白血病由来 M_1 細胞の再分化能を指標としたスクリーニングを行ない *Penicillium* sp. より griseofulvin, dechlorogriseofulvin を、*Fusarium* sp. より 24-ethylcholesta-5,7,22-triene-3-ol を分離同定した(特別研究)。

iii) 大量照射によって生成する有害物質の有機化学

的解明に関する研究

単糖類に高線量照射を行なった際の化学変動を測定した(国立機関原子力試験研究費, 科学技術庁)。

療 品 部

部長 中 村 晃 忠

概 要

EC 統合を前に, 医療用具の生物試験方法の標準化が国際標準化機構 (ISO) に新設された TC194 で進められている。同時に, 同様の日本の試験ガイドライン作成も進行している。

これに伴って, 中村は以下の会議に出席した。第1回全体会議(西ドイツ, 平成元年7月12日~13日), WG1 会議(英国, 平成2年1月31日~2月1日), 第2回全体会議(フランス, 平成2年4月25日~27日)。またスイスに留学中であった土屋利江室長は WG6 会議(西ドイツ, 平成元年10月23日~24日)に出席した。中村は医用材料と生体との相互作用に関する国際学会“BIOMAT89”(フランス, 平成元年12月)で講演するとともに医療用具の承認制度に関するラウンド・テーブルに参加した。

中村は3種のリン酸エステル化合物の IPCS/EHC 作成タスク・グループ会議(英国, 平成元年10月9日~13日)に原案作成者として出席した。また, ISO 第2回全体会議の後に, WHO において(平成2年5月1日), EHC 作成の最後の詰めの作業を行った。

小島茂雄室長は, WHO 東南アジア事務局主催のエイズ防止のためのコンドームの普及に関する会議(韓国, 平成元年12月7日~12日)にアドバイザーとして出席した。

土屋利江室長は, スイス・ベルン大学における *in vitro* 代替試験法の研究を終了し, 平成2年2月に帰国した。

その他, 叶多, 鹿庭, 新谷, 五十嵐が海外の国際学会で講演・参加した。

人事では, 平成2年3月31日付で水町彰吾主任研究官が定年退職された。長年の御苦勞に感謝する。

業務成績

1. 家庭用品関係

年度計画にしたがって, 5-クロロ-2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オン, *p*-tert.-ブチルフェノールホルムアルデヒド樹脂(レゾール型およびノボラック型), アクリル酸の分析試験法を作成した(家庭用品等試験検査費, 厚生省生活衛生局)。

研究業績

1. ポリウレタンフィルムの埋入組織反応に関する研究

4,4'-diphenylmethanediisocyanate (MDI), poly(tetramethyleneglycol) (PTMG), 1,4-butanediol (BD) を原料としたセグメント化ポリウレタンの2年間の埋入実験結果がまとまった。ポリウレタンはシリコーンに比べて有意に発癌率が高かった。埋入後のフィルム表面の変化は1年間埋入の変化がさらに進行したものであり, PTMG-rich なオリゴマーが溶出したものと解釈された。

埋入発癌に対する溶出物とフィルムの表面性状の影響を明らかにする目的で, 溶出物量と表面の状態を変化させた6種類のフィルムを作成し, 動物実験を開始した(HS 財団受託研究費, 毒性部, 変異遺伝部と共同)。

2. ポリウレタン材料の構造に関する研究

セグメント化ポリウレタンのハードおよびソフト部分のモデル化合物として, それぞれ diphenylmethane-4,4'-diurethane および PTMG を選び, これらの種々のモル比の混合物の IR スペクトルを各種のポリウレタンの IR スペクトルと比較した結果, セグメント化ポリウレタンの構造に関して興味ある事実を見出した(HS 財団受託研究費)。

3. 新材料の放射線滅菌による材質変化と生体適合性に関する研究

PTMG/MDI 系(A)および PTMG/MDI/BD 系(B)の2系統のポリウレタンの放射線照射の影響は対照的で, Aでは架橋, Bでは切断が起こること, そして, その主たる架橋または切断の部位は PTMG 部分であることを明らかにした。また, ポッティング材の γ 線照射によって direct mutagen が生成することを発見した(国立機関原子力試験研究費, 科学技術庁, 変異遺伝部と共同)。

4. 医療用具の毒性評価法に関する研究

ゴム材料の組織および細胞毒性はジチオカーバメート系加硫促進剤に起因すること, および, 短期の組織反応と細胞毒性との相関を明らかにした。両試験に共通の異なる毒性を持つ対照材料を作成することを試みた。また, これらとフランス薬局方陰性および陽性対照材料を用いて, 経日的に組織反応を追跡することを研究中である(厚生科学研究費補助金, 病理部, 民生科学協会, フランス INSERM/U37 と共同)。

5. 家庭用品による接触皮膚炎の原因究明に関する研究(原因製品/原因化学物質)

1) 手術用ゴム手袋/加硫促進剤(ジメチルおよび

ジエチルジチオカーバメート)

2) ポリエステル製ユニホーム/分散染料(ディスパーズイエロー64)

3) 工業用ゴム製品/老化防止剤(N-イソプロピル-N'-フェニル-p-フェニレンジアミン)(家庭用品等試験検査費, 厚生省生活衛生局)

6. 接触皮膚炎の原因究明の方法論に関する研究

感作モルモットを用いる方法によって, ゴム靴中の感作物質を調べた結果, 当初予想した mercaptobenzothiazole (MBT) およびその酸化体 MBTS 以外に MBT 骨格を持つ感作物質があること, および, 酸化防止剤の styrenated phenol も感作性を示すことが明らかとなった。この方法の有効性が示された。

7. 催奇形試験の *in vitro* 化に関する研究(国立機関公害防止等試験研究費, 環境庁)。

1) 催奇形物質を種々の量投与した動物の血清試料を用いて, その催奇形活性を測定した結果, 投与量に応じて催奇形活性が増した。

2) 胎仔胚の器官培養法を検討し, 内臓に奇形を誘発するウレタンの影響を調べた。

8. 情報理論のクロマトグラフィーへの応用に関する研究

昨年開発した関数 FUMI を液体クロマトグラフィー条件の最適化に応用した。移動相組成, カラム長, 流速, 測定波長, 内標準物質量の最適化について論じた。

9. スペクトル画像自動読みとり法に関する研究
イメージスキャナーによる NMR スペクトルの読み取り, 記述した化学シフト数値の自動読み取り法のアルゴリズムを作成し, NMR スペクトルの計算機可読化をはかった。

10. 液体クロマト/マススペクトロメトリーに関する研究

LC と MS を結合するに, サーモスプレイトとブラズマスプレイト法が有利とされているが, 現有の高性能 MS 装置でのインターフェースの安定性は悪かった。原因を調べた結果, これはイオン源内部でのイオンの放電によることを明らかにし, その恐れのない改良プローブを作成した。

11. 各種ガイドライン関係研究

1) 医療用具および医用材料の毒性試験体系の確立に関する研究(厚生科学研究費補助金, 薬務局審査第二課, 毒性部, 病理部, 変異遺伝部, 支所・生物試験部, 日本バイオマテリアル学会, 民生科学協会, 神奈川衛研と共同)。

2) 歯科材料の化学的・生物学的評価法のガイドラ

イン作成に関する研究(厚生科学研究費補助金, 東京医科歯科大学などと共同)。

3) リスクアセスメント手法の確立等に関する研究(厚生科学研究費補助金, 生活衛生局生活化学安全対策室, 毒性部等と共同)。

環境衛生化学部

部長 武田 明治

概要

本年度の主要業務の中, 環境関連分野として前年度から引続いて各種ガス状汚染物質の分析法の確立, 個人曝露量に関する基礎研究および天然放射性核種の環境調査ならびに水質評価に関する試料収集と水中微量化学物質のプライオリティリストの作成, 水道原水中の化学物質の動態に関する基礎研究および公共用水域の保全に関する基礎研究を実施した。

化粧品関連分野では化粧品原料基準(第二版)の見直し, アクションプログラムの一環として化粧品の種別許可制度の導入に伴う原料基準と使用基準作成(ファンデーション)および医薬部外品承認基準作成等への協力ならびに色素類の規格整備, 医薬部外品製剤の迅速試験法の確立に関する研究を行うとともに市販化粧品の品質監視を実施した。

国際協力の一環として WHO 水道水質ガイドライン策定のための共同作業を厚生省生活衛生局水道環境部, 国立公衆衛生院, 毒性部, 薬理部, 代謝生化学部と共同で実施した。また, Mrs. Pascuar (Bureau of Food and Drug, Philippines) がフィリピン国食品薬品検定センター技術援助プロジェクト(JICA プロジェクト)による研修生として滞在し, 化粧品分析に関する研修を受けた(平成元年5月~11月)。さらに水道事業体職員の長期研修(平成元年4月~平成2年3月)を行なった。

武田部長は国際協力事業団による技術協力事業の一環として実施中のフィリピン国食品薬品検定センタープロジェクトに対する技術移転の進捗状況の視察および1990年度協力計画の打ち合せのためマニラに出張した(平成2年2月16日~24日)。

業務成績

1. 空気関係

前年度に引き続き都内3ヶ所の国設自動車排ガス測定所で各種自動測定機を用いて大気汚染物質(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, ホルムアルデヒド, メタン, 非メタンお

よび全炭素、浮遊粒子状物質)ならびに交通量の常時測定を実施した(環境庁大気保全局自動車公害課)。

2. 化粧品関係

1) 一斉取締り試験

ホルモン(エストラジオール, エチニールエストラジオール)あるいはdl- α -トコフェロール(酢酸エステルを含む)を含有する育毛剤の試験を実施した(薬務局監視指導課)。

2) 原料規格の作成

化粧品原料の品質確保のため規格の見直しおよび新規基準作成を薬務局審査第二課と協力して行った(50品目(薬務局審査第二課))

3) 種別許可基準

種別許可基準の導入による許可基準作成のため規格(第5次, 一般化粧水, 日焼け止めローション, ヒゲそり用ローション, バック, 洗顔料)作成および第1次~第3次種別許可基準の改訂, 追加に協力した(薬務局審査第二課)。

2. 水質関係

1) 特定化学物質調査

水道原水中の特定化学物質の調査を地方自治体試験研究機関および水道事業者との協力の下に実施した(生活衛生局水道環境部水道整備課)。

2) 分析法開発

水道水源への汚染が問題となっている低沸点有機ハロゲン化合物についての分析法の開発を東京都衛生研究所と共同で行った(生活衛生局水道環境部水道整備課)。

研究業務

1. 建築物内空気質の衛生管理基準の設定に関する研究

1) 有機塩素系化合物の個人曝露量を測定するためのパッシブサンプラーおよびアクティブサンプラーの検討を行った。この研究の一環として μ -ジクロロベンゼンによる室内汚染の実態を調査した。

2) 前年度に引き続き二酸化窒素, 二酸化硫黄, ホルムアルデヒドの個人曝露量を同時に測定するためのパッシブサンプラーの検討を行った。

3) 建築物内の粒子状ホルムアルデヒド及び各種汚染物質(浮遊粒子状物質, その他)の同時測定を行い, 粒子状ホルムアルデヒドと汚染物質ならびに室内環境条件との関連性を明らかにした。

2. 環境試料中の天然放射性物質の調査に関する研究

河川水中の放射性ウラン(^{234}U および ^{238}U)の分析を行うとともに, プルトニウム, ウランの同時分析

法を検討した(放射能調査研究費, 科学技術庁)。

3. 化粧品の原料規格整備に関する研究

1) 化粧品等に使用される色素の規格整備

前年度に引き続き本年度は省令ⅡおよびⅢグループの色素の規格案の設定, さらにレーキ試験法の検討および天然色素の実態調査を実施した(厚生科学研究費補助金, 薬務局審査第二課, 東京都衛生研究所と共同)。

2) 医薬部外品成分の迅速分析法に関する研究

①除毛クリームおよびエアゾール中のチオグリコール酸塩, ②シャンプー, リンスおよび固形石鹼中のヘキサクロロフェン, ③化粧水および乳液中のイソプロピルメチルフェノール, ④ヘアトニックおよびヘアクリーム中の酢酸dl- α -トコフェロールの迅速分析法を確立した(厚生科学研究費補助金, 薬務局監視指導課, 東京都衛生研究所, 東京薬科大学と共同研究)。

4. 化粧品の生体影響評価に関する研究

1) 化粧品類の生体影響評価に関する基礎研究

防腐剤として諸外国で使用されているホルムアルデヒドを取り上げ, ①製品および水溶液等の化学的安定性, ②皮膚に適用される物質の生体影響等の安全性評価および③ホルムアルデヒドドナー型防腐剤の分析法について研究した(HS 財団受託研究費)。

2) 化粧品類の安全性予測法に関する研究

(1) 経皮吸収に及ぼす基剤の影響

化粧品成分の安全性予測手法開発の一環として汎用化粧品成分の経皮吸収に対する基剤の影響に関する基礎研究を透過膜としてラットの剥離皮膚, 正常ヒト角化細胞等を, また基剤として今年度は界面活性剤を用いて実施した(国立機関原子力試験研究費, 科学技術庁)。

(2) 細胞毒性に関する研究

SD系雄性ラット由来の肥満細胞に於けるヒスタミン放出を指標として化粧品原料等の細胞への影響を知るための基礎的研究を実施した。

5. 水道用薬品および用品に関する研究

水道用塗膜防水剤の安全性の検討のため本年度は溶出試験法について検討した(生活衛生局水道環境部水道整備課)。

6. 水利用に関する衛生化学的研究

1) 陸水域に於ける環境変異原物質の動態に関する研究

水域環境に確認されている変異原物質の濃縮法について研究した(国立機関公害防止等試験研究費, 環境庁)。

2) 発癌物質による環境汚染と生体影響の定量的解

析

水中発癌物質の定量的解析の基礎研究の一環として、水道水中に混入する可能性のある多環芳香族炭化水素の水中に於ける挙動を塩素処理との関連に於て検討するとともにそれらの微量分析法をも合わせ検討した(厚生省がん研究助成金, 国立癌センター運営部)。

3) 水道水中の多環芳香族炭化水素分析法の開発

多環芳香族炭化水素とその塩素処理生成物分析法の開発(日本水道協会)。

7. 環境汚染物質の衛生化学的研究

1) 先端技術産業で用いられる希土類等の生体影響の評価法に関する研究

ランタンの連続経口投与時に於けるカルシウムの生体利用に対する影響についてラットを用いて検討した(国立機関公害防止等試験研究費, 環境庁)。

2) 公共用水域に於ける解放系使用化学物質の動態ならびにその分解生成物の安全性等に関する研究

3) 水道水中の低沸点有機ハロゲン化合物の分析法の開発を東京都立衛生研究所と共同で行なった(水道環境部水道整備課)。

食 品 部

部 長 齋 藤 行 生

概 要

新しい食品を求める人々の欲求と、食品の生産・製造技術および処理・加工技術の進展とにより近年多くの食品が食卓をにぎわすようになった。さらに最近では食卓を離れた場で利用される食品も多くなり、食品衛生の守備範囲も拡大の傾向にある。

昨年度末、米国で外国企業製造のミネラルウォーターが微量のベンゼンで汚染されていることが判明した。同社の汚染ミネラルウォーターが我が国に輸入される可能性もあり、例により、当所では厚生省と協力のうえ緊急に分析法の設定作業を行った。

問題のミネラルウォーターには多量の炭酸ガスが含まれており通常のヘッドスペース法を利用する分析法では微量の含有ベンゼンの正確な定量は不可能であった。当部では苛性ソーダで炭酸ガスを捕捉する方法を考案し、微量のベンゼンを迅速に分析する方法を確立した。

この汚染問題は早期に解決した。

人事の面ではほぼ40年の長きにわたり、本所のために尽力された五十畑悦子主任研究官が3月31日付で定年退職され、4月1日付で新たに薬品部より松田りえ子主任研究官が就任した。

豊岡正利技官は一年間の米国、カンサス大学での研究を無事終えて帰国し、4月1日付で薬品部に配置換えとなった。また同日付で最所和宏技官が採用された。

鈴木 隆第一室長は国際化学物質安全性評価計画(IPCS)における農薬部門の会議(平成元年12月13日~20日)に出席するためにフローレンス(イタリア)へ出張した。

豊田正武第三室長は酪農製品中の有害化学物質の分析法設定に関する会議(平成2年3月10日~3月21日, 国際酪農連盟主催)に出席するためゲント市(ベルギー)へ出張した。

斎藤は汚染物摂取量モニタリングに関する会議(平成元年6月12日~14日, 国際生命科学協会主催, WHO後援), バイオテクノロジー応用食品の安全性に関する会議(平成元年11月5日~12日, 国際バイオテクノロジー協会および国際生命科学協会共催), およびIPCSにおける汚染物部門の会議(平成元年11月20日~24日)に出席するためにそれぞれ、ヘルシンキ市(フィンランド), ワシントン市(USA)およびモスクワ(ソ連)へ出張した。

業務成績

1. 輸入食品検査

主としてヨーロッパより輸入される食品の放射能検査(2件), 輸入畜水産物中の合成抗菌剤・農薬(239件)(生活衛生局乳肉衛生課), 輸入ワイン中のジエチレングリコール検査(2件), 輸入清涼飲料水中のベンゼンの検査(26件), 果実および果実ジュース中のダミノジッド(20件)(生活衛生局食品保健課)。

2. 特別行政試験

① 食品汚染有害物質調査に伴う検査として、ミネラルウォーター中の1,1,1-トリクロロエタン, トリクロロエチレンおよびテトラクロロエチレン等の分析を実施(生活衛生局食品保健課)。

② 食品等の規格基準の設定等に係る試験検査として豆類中のシアニンに関する調査を行った(生活衛生局食品保健課)。

3. 食品中の有害物質

① 食品中の残留農薬の分析

(i) 食品残留基準値の設定に必要な公的分析法の検討を、メトラクロール, ターブトリン, アジンホスメチル, トリクロロホン, ジスルホトン, エディフェンホスおよびエタルフルラリン等の農薬について実施した。さらにジスルホトンについては硫黄化合物含量の比較的多いネギ類からの分析が問題であり別個に検討を行った。

(ii) 昨年度、米国において、発癌性がうたがわれ

ているダミノトッドによるリンゴの汚染が問題となった。米国における残留基準は 30 ppm である。本農薬は発癌性がうたがわれていることから微量分析法の確立は必須である。

検討の結果数 ppb レベルのダミノジッドを定量する方法を確立した（生活衛生局食品化学課）。

(iii) ラノリン中の有機塩素系農薬の有無は、本農薬の使用の有無を反映すると考えられる。ラノリンより有機塩素系化合物を抽出し、精製するうえで通常の食品成分とは異なる困難な点があったがこの点を解決し、キャピラリーカラムを用いる ECD-GC により簡易な分析法を確立した。

(iv) 食品中の農薬のキャピラリー GC による分析には 2, 3 の問題点があるが、分離能、微量化等においてすぐれている点も多い、そこでカプタホールを用いてキャピラリー GC による分析法を検討した。さらに凝固法によるクリーンアップとキャピラリー GC との連用により分析の困難な油脂性食品中の有機リン農薬の一斉分析法を検討した。

② 清涼飲料水汚染

炭酸ガスを多量に含むミネラルウォーター中の微量のベンゼンをヘッドスペース法を用いて分析することは困難であるが、検討の結果この炭酸ガスをアルカリでトラップすると簡便・迅速にヘッドスペース法を用いて微量のベンゼンを測定することができることが判明した。本法は炭酸ガスを多量に含む飲料水中の低分子化合物をヘッドスペース法を用いて分析する場合に利用することができる。

③ ブドウ中のシアンの定量

ブドウおよびブドウジュース中に混入されたシアンを迅速に定量する方法を確立し、かつ既存のいくつかの簡易法についても比較検討し、それぞれの簡易法の検出感度等について評価した。

また、ブドウ果実中に注入されたシアンの減衰について検討し、衛生行政上の貴重な情報を提供した（生活衛生局食品保健課）。

④ 先端技術産業における環境汚染物質の拡散予測とモニタリング手法の開発に関する研究（国立機関公害防止等試験研究費、環境庁）。

⑤ 生活環境における発癌関連物質への暴露実態の総合的把握と評価に関する研究（対がん十カ年総合戦略研究）。

⑥ 指定化学物質等の環境経路での人体摂取量評価手法の開発に関する研究（化学物質総合安全対策調査研究、大森班）。

2. 生体反応・毒性・分析

① 有機スズ化合物、トリブチルスズは海産生物内で一部ジブチルスズ化合物として検出されている。したがって有機スズ化合物に関する汚染の実態と毒性上の評価を行うためには変化体についての情報も重要であり、この点に着目し、先ずジブチル体の代謝について検討し興味ある結果を得た。

② 生体試料中のチオール、ジスルフィドの微量分析法の確立

3. 食品照射

食品に γ -線照射が行われたかどうか、あるいは過線量照射が行われたかどうかを知る方法を開発することは食品衛生行政上重要な課題である。照射食品の検知法の開発には多くの時間が費やされているが未だよい方法がないのが現状である。今年度は、外国において照射の行われている 2, 3 の食品を選んで検討し、よい検知法を確立した（国立機関原子力試験研究費、科学技術庁、生活衛生局食品保健課）。

① γ -線照射柑橘類の判定法-ハーフェンブリオオスターの確立

② 照射食品の ESR による検知法

③ チオール化合物の濃度変化を指標とする検知法

4. 天然有害物

① ジャガイモ中の有毒アルカロイドについて (i) 分析法を確立し、(ii) 細胞内カルシウムイオンの濃度変化を利用する毒性評価を行い、さらに (iii) 調理加工による濃度変化を調べ、ジャガイモに関する新しい食情報を提供した。

② ライマ豆等輸入雑豆の毒性に関する調査を行い、輸入食品の安全性に関する対策の一助とした。

③ 食品中のかび毒の分析上の問題点、特に酵素免疫法に関する問題点に検討を加えた。

5. 調査研究

① 全国からの集計モニタリングのデータは 117 万件に達し、衛生行政のためにアウトプットし作表したデータを全国地研に提供した。

また、日常食中の汚染物摂取量調査を行い全国 10 機関のデータ解析を行った（生活衛生局食品保健課）。

② 輸入食品の放射能測定に関する精度管理、および輸入食肉・養殖魚類の検査精度管理を実施（生活衛生局食品保健課および肉肉衛生課）。

食品添加物部

部長 義平 邦利

概要

従来の当部の主な業務である化学的合成添加物と食

品用器具・容器包装に関する試験, 研究業務に加えて, 天然添加物のリスト作成作業が終り, 平成3年の表示にむけて本格的な作業が進行中である。

人事面では, 山崎壮技官が科学技術庁長期在外研究員として, 米国ペンシルバニア州立大学へ一年間出張中であつたが, 9月7日に帰国した。また, 合田幸広技官は科学技術庁長期在外研究員として, 米国テネシー州バンダービルト大学へ一年間の予定で出張中である。

義平は, 第36回 FAO/WHO 合同食品添加物会議に出席するためイタリアに出張した(平成2年2月3日~17日)。

外国からの研修生として, Miss Rosario E. Martin (フィリピン, 平成元年) が容器包装について研修を行った。また, 米国 FDA の Frank L. Joe, Jr. 博士が平成元年7月から1年間日米の食品添加物分析法の相違点等について当部で研究を行っている。

業務成績

1. 製品検査

食用色素: 検査件数	422件
合格	422件
不合格	0件

2. 規格, 基準の作成

(1) 天然添加物の規格基準設定のため, 天然着色料中の有害金属含量について検討した。また, 主色素成分以外の成分として含まれる必須金属の存在状態について HPLC-ICP を用いて分析した(食品添加物規格基準設定費, 厚生省生活衛生局食品化学課)。

(2) 食用赤色 104 号の規格基準設定のために光による脱ブロムが起こることを確認し, その反応条件等について検討した(食品添加物規格基準設定費, 厚生省生活衛生局食品化学課)。

(3) 食品添加物タール色素の分析法を改良するために重金属試験法を検討し, 従来の溶媒抽出法に改良を加え, 金属に適した溶媒を用いる方法を設定した(食品添加物規格基準設定費, 厚生省生活衛生局食品化学課)。

3. 特別行政試験

(1) 塩化マグネシウムの規格試験を行った結果, 食品添加物規格に適合であった(平成元年7月, 成田検疫所に報告)。

(2) 輸入リキュール(イタリア製)中の法定外色素について試験を行った結果, 法定外色素は確認されなかった(平成元年9月, 東京検疫所に報告)。

(3) 菓子(ビスケット31検体)中の亜硝酸ナトリウム試験を行った(平成元年10月, 厚生省生活衛生局食

品保健課)。

(4) 輸入チョコレート中の合成着色料の検査を行い, 不許可食用色素であるキノリンイエローを検出した(平成元年12月, 厚生省生活衛生局食品保健課)。

(5) 輸入リキュール(フランス製)中の法定外色素について試験を行った結果, 法定外色素は確認されなかった(平成2年1月, 横浜検疫所に報告)。

(6) 輸入漆塗装品(29検体)中のシアン化合物および金属(カドミウム, クロム, 鉛, ヒ素)について試験を行った結果, シアンイオンは30 μ g/検体以下であった。ヒ素はすべての検体中20 μ g以下であった。その他の金属はカドミウム(5mg/検体)を含む1検体を除いてすべて1mg/検体以下であった(平成2年3月, 厚生省生活衛生局食品保健課, 横浜検疫所, 名古屋検疫所, 神戸検疫所に報告)。

研究業績

1. 添加物の規格設定に関する研究

(1) 天然添加物中強い抗酸化力をもつハーブ系スパイス類の構成成分の調査を行ったところ, ローズマリーにはカルノジック酸, ウルソール酸が含まれ, ユーカリ葉中には β -ジケトン類の抗酸化物質が検出された(厚生科学研究費補助金, 厚生省生活衛生局食品化学課)。

(2) 天然添加物およびタール色素を HPLC-ICP により分析するため, HPLC 用溶媒が ICP プラズマに与える影響について検討した。

2. 食品添加物安全性再評価に関する研究

(1) ブチルヒドロキシアニソール(BHA)の催奇形成試験と関連し, 前年度開発した血清, 肝, 胎仔中からの BHA の微量定量法を用いて, 各用量の BHA を投与したラットの各組織への遊離 BHA および BHA 抱合体の移行量を測定した(食品添加物安全性評価試験費, 厚生省生活衛生局食品化学課)。

(2) 多形核白血球に強い活性作用を示したカロブジャームについて含有金属を明らかにするとともに構成糖を確認するための加水分解反応を検討した(食品添加物安全性評価試験費, 厚生省生活衛生局食品化学課)。

3. 食品添加物の有用性等に関する研究

(1) グリチルリチンおよび甘草抽出物はさまざまな薬理作用を有し, 古くから薬として用いられている。また甘味料として食品等にも広く用いられている。しかし一方, 長期間大量投与により重症の副作用が発現することが報告されているため, これらの使用については十分な知識と注意が必要である。そこでこれらの薬理作用, 食品に与える効果, 副作用, 使用量などに

ついて調査した（食品添加物有用性調査費，厚生省生活衛生局食品化学課）。

4. バイオテクノロジーを利用した食品添加物の生産と安全性に関する研究

(1) 標識化合物を利用する食品汚染物の分析法の開発研究

セイヨウアサネおよびヨウシュヤマゴボウ培養細胞の培地に添加した植物ホルモン（2, 4-Dおよびインドール酢酸）の取り込みについて調べた（国立機関原子力試験研究費，科学技術庁）。

(2) バイオテクノロジーを用いた食品および添加物の安全性に関する研究

セイヨウアサネ形質転換細胞について培地に添加したヒ素の取り込みについて調べた（HS 財団受託研究費）。

(3) セイヨウワサビ形質転換細胞の成分分析をガスクロマトグラフィーにより行った。セイヨウワサビの主成分のうちアリールイソチオシアネートを検出しなかったが、 β -フェニルエチルイソチオシアネートが検出された。その他にメチルチオプロピルイソチオシアネートが検出された（HS 財団受託研究費）。

(4) 紅麴菌 (*Monascus anka* の変異菌株) のエタノール抽出液より、2種の黄色素を単離し、NMR, MS等を用いてその構造を推定した。2種の黄色素は従来の紅麴色素とは炭素骨格が異なり、それらの分子式は $C_{21}H_{24}O_7$ (mw 388), $C_{23}H_{28}O_7$ (mw 416) であった（HS 財団受託研究費）。

(5) トランスジェニック植物を用いた新生理活性物質の研究を行った。

ステビア (*Stevia rebaudiana*) 毛状根を浸透圧ストレスおよび各種植物ホルモンの存在下で培養したが、甘味配糖体 stevioside は生産されなかった。shootを液体培地中で照明下培養すると stevioside が生産された。甘味配糖体の生産部位は葉であることが示唆された。

5. ニトロソ化合物に関する研究

(1) 各種食品に亜硝酸を作用させ N-ニトロソ化合物の生成をみたとき、その生成量に影響を与える物質について検討を行った。チオン酸イオンやクエン酸により促進効果がみられ、アスコルビン酸、エリソルビン酸等により阻害された（厚生省がん研究助成金）。

6. 器具、容器包装に関する研究

(1) 器具・容器包装から溶出したフェノールの測定におけるアミノアンチピリン法の応用について検討した。一部の添加剤では発色がみられたが、フェノール

樹脂からはこれらの添加剤の溶出はなかった（食品添加物安全性再評価等試験検査費）。

(2) 陶磁器中の鉛許容量調査と溶出高感度分析法を検討し、0.1 ppmの鉛の溶出まで対応できる方法を確立した（厚生科学研究費補助金，生活衛生局食品保健課）。

(3) フェノール樹脂製食器から溶出したフェノールの3次元高速液体クロマトグラムによる確認方法の検討を行った。誤認しやすいフェノールとビスフェノールAとの分離、確認が可能となった（食品添加物安全性再評価等試験検査費，厚生省生活衛生局食品化学課）。

有機化学部

部長 神谷 庄造

概要

平成元年度の研究業務ならびに医薬品および医薬品添加物の各種公定規格書にかかわる行政研究業務は、昨年に引続き順調に進展し、多くの知見と業績が得られた。

宮田室長は平成元年度科学技術振興調整費重点基礎研究（研究課題：各種難病治療のための化学療法剤候補化合物の設計と合成に関する研究）により、米国ハワイ州ホノルル市で開催された「1989年環太平洋国際化学会議」に出席し、キノン構造を有する化合物によるDNA開裂反応とその医薬品開発への応用について研究発表を行った。

当部は研究委員会平成元年度研究用機器購入予算により、高速液体クロマトグラフ光学活性検出装置の「キラルモニター Model 750-25 acs」を購入した。光学活性にかかわる研究を実施しておられる部の方々は、本装置を利用されたい。

当部の平成元年度の研究業務について以下のように報告する。なお、従来通り、部長および室長は長年にわたる知識と経験を生かして、各種の調査会、委員会、審議会、薬剤師国家試験関係委員会などに参画し、厚生行政に貢献した。

平成元年5月29日付をもって、当部は有機化学部に改称された。部員一同、心を新たにして研究に邁進することとなった。

研究業績

有用あるいは有害化学物質は生体内に取り込まれた後、酸化反応や還元反応を受け、活性中間体の生成、有用（有害）生理活性の発現、さらに抱合などの解毒

反応, ついで排泄と進む。当部では, この活性中間体と想定される物質を解明し, その各種化学指標(パラメーター)を求め, この「活性発現機構」, 「化学指標」ならびに生理活性の程度を示す「生理活性指標」の三者の相関より, 「ある化学物質の有用性あるいは有害性を量的に評価する」ことを目的として各種の研究を行っている。

1. 有害化学物質の化学反応性ならびに活性発現機構に関する研究

i) ニトロアレーン類およびニトロアザアレーン類の化学ならびに毒性発現機構に関する研究

汚染大気中に存在するニトロアレーン類(ニトロ化多環芳香族化合物)を合成し, その化学反応性と還元特性との相関を, その変異原性, 細胞毒性およびがん原性との関連において研究を行っている。また, 環中に窒素原子を有するアザアレーン類も発がん性を有する環境汚染物質として注目されているが, 本年度は6-アザベンツ(a)ピレンを新規に合成し, そのニトロ化反応およびニトロ化体の構造を検討した。

ii) 抗酸化剤のBHA(ブチルヒドロキシアニソール)は, ラットに対する発がん実験により前胃にがんが発生することが報告されている。当部では, BHAおよび関連化合物の代謝産物であるキノン類と, SH酵素モデルとしてのSH化合物との反応を検討し, 多くの知見を得ている。さらに, これらのキノン代謝物の活性酸素発生能と密接に相関する一電子還元特性と化学構造との相関を明らかにした。

2. 医薬品候補化合物の合成研究

i) 抗ウイルス作用を有する化合物の合成研究

抗エイズ薬候補化合物として, アデニン誘導体, 橋頭位にヒドラジン結合(N-N)を有する化合物, チオ尿素誘導体など5種を合成し, HS抗エイズウイルス性スクリーニング研究班にテストを依頼した。昨年度とも計8品目中, 活性を示したものは出なかった。

ii) 重機能性化学官能基を有する化合物の合成研究
重機能性化学官能基, すなわち, 一つの化学官能基のなかに二つの反応点を有する置換基は, 特になんかの化学療法剤の候補化合物として有望な化合物群である。本年度は, ラット腹水肝がんAH-13細胞に活性を示した三種のフェニルトリアツェン誘導体の生体高分子モデル化合物との反応様式より, その活性発現機構を明らかにした。

また, 一分子中に二つ以上の活性な化学官能基を有する化合物は重機能性化合物であるが, 重機能性化合物としてのベンゾキノン誘導体の合成を検討した。

iii) 生理活性物質の合成を目的とする不斉合成の開

発研究

分子中にエナンチオトピックな関係にある二つの化学官能基を有するプロキラル化合物を用いた不斉合成はいくつかの利点を有し, 光学活性体を得るための有用な合成戦略である。本年度は, プロキラル対称ジケトンの不斉アセタール化において, 種々の光学活性アルコキシランおよび反応溶媒を検討した結果, 選択性の向上に成功した。

iv) 抗腫瘍性ニトロソ尿素誘導体の合成と反応性に関する研究

抗腫瘍性ニトロソ尿素誘導体の合成の過程で発見された新反応の反応機構について, これらの反応が生体内で起きる可能性も含め検討を行っている。

1-アリル-1-ニトロソ-3-(2-ピリジルメチル)尿素類が, アセトンやエーテル中の加熱により好収率で2,4-ジヒドロ-1,2,4-トリアゾール-3-オン誘導体に閉環する反応をさらにくわしく検討し, その反応機構を明らかにするとともに, これらの新環状化合物の医薬品としての有用性について検討している。

ジ置換アリルニトロソ尿素類の非酸性条件下での二級アミンへのトランスニトロソ化反応について速度論的にくわしく検討し, また, ニトロソ尿素類のN-NO結合のラジカル開裂についても速度論的に検討し, ニトロソ尿素類の分解反応における一般的な反応機構を明らかにした。

3. 医薬品の純度に関する総合的研究

部長および室長は, 日本薬局方(局方), 日本薬局方外医薬品成分規格(局外規), 化粧品原料基準(粧原基)などの公定規格書の規格, 名称, 構造式, 化学名などの関係委員会に参画し, 貢献した。

局外規については, 本年度は医薬品原料22品目, 医薬品添加物7品目, 計29品目を収載した「日本薬局方外医薬品成分規格1989追補」を編集した。これにより局外規収載品目は, 医薬原料662品目, 医薬品添加物91品目, 計753品目となった。

局外規の原案作成, 構造式表示, 英文作成よりなる「日本薬局方外医薬品成分規格要綱集」をまとめた。本要綱集は, 医薬品関連公定規格書のための原案作成に役立つものである。

昭和56年より始まった厚生科学研究・局外規研究班(主任研究者 神谷庄造)は平成元年度をもって終了し, 今後は厚生省予算によって局外規を編集することとなった。

機能生化学部

部長 寺 尾 允 男

概 要

平成元年度の研究業務として、前年度に引き続き、主として、1)免疫担当細胞の機能に関する研究、2)生体膜の機能に関する研究、3)イムノアッセイ等を用いる超微量検出法の開発、4)依存性薬物の生物学的研究、5)抗体遺伝子の構造に関する研究、を行った。また、HS 財団の委託研究として、ニューロトロフィックファクター等の分離技術および機能解析技術の開発に関する研究を行った。

鈴木和博主任研究官は平成元年10月、代謝生化学部第一室長に配置換えとなった。また、永松国助主任研究官は平成2年3月31日付で退職し、4月1日から日本大学薬学部助教授として転任した。平成2年4月1日付で、石上暁子技官が薬品部から当部へ配置換えとなった。

研究業務

1. 免疫担当細胞の機能に関する研究

即時型アレルギー発症機構を解明する目的で、脱顆粒反応時におけるタンパクリン酸化反応および Ca^{2+} の動態に関し、前者は主としてチロシンキナーゼとの関係を、後者は個々の細胞について画像解析を用いる研究を行った。さらに毒性部と協力して、免疫毒性試験法に関する国際協力研究 (International Collaborative Immunotoxicity Study, ICIS) に関する研究を行った (科学研究費補助金, 文部省, 厚生科学研究費補助金)。

2. 生体膜の構造と機能に関する研究

i) ヒトリンパ球培養細胞株 IM9 の細胞膜に存在するヒト成長ホルモン受容体の機能を解析する目的で、受容体に対するモノクローナル抗体の調製を試みた (科学技術振興調整費, 科学技術庁)。

ii) IM9 細胞の成長ホルモン受容体の性質を解析する研究の一環として、リガンドおよびホルモルエテルによる受容体のダウンレギュレーションについて検討し、両者の機能に著しい差のあることを示唆する結果を得た (特別研究, 厚生省)。

3. イムノアッセイ等を用いる超微量検出法の開発
かびアレルギーの抗原検出法の開発を目的として、かび抗原の分離精製およびそれに対する抗体の調整を行った (国立機関原子力試験研究費, 科学技術庁)。

4. 依存性薬物の生物学的研究

モルヒネ受容体の情報伝達機構を解明する目的で、前年度に引き続きマウス脳のモルヒネ受容体のアゴニスト依存的リン酸化反応について検討するとともに、受容体に対するモノクローナル抗体調整のための基礎的検討を行った (科学研究費補助金, 文部省)。

5. 抗体遺伝子の構造に関する研究

抗ステロイドおよび抗モルヒネ抗体産生ハイブリドーマを用いて、各々の抗体の変領域のアミノ酸配列を、遺伝子の塩基配列および抗体のN末端附近のアミノ酸配列から決定した (国立機関原子力試験研究費, 科学技術庁)。

6. ニューロトロフィックファクター等の分離技術および機能解析技術の開発

神経系等に作用する物質の受容体の同定法として、リガンドと受容体の複合体に紫外線照射することにより架橋する簡易アフィニティラベルを開発した (HS 財団受託研究費)。

代謝生化学部

部長 高 橋 惇

概 要

前年度に引き続き、食品添加物、既存化学物質、家庭用品に含まれる化学物質等の代謝に関する試験ならびにそれに伴う基礎研究を行った。対がん戦略研究事業の一環として実施していた研究は第2期の3年目を終了した。また、今年度より、ヒューマンサイエンス振興財団の官民共同プロジェクト研究に参加し、代謝試験への生理学的速度論の導入に関する研究を開始した。

人事面では、平成元年10月1日付けで森本和滋代謝生化学部第一室長が化学物質情報部第一室長として転出し、代謝生化学部第一室長には鈴木和博機能生化学部主任研究官が就任した。最上知子技官は科学技術庁長期在外研究員として、カナダのアルバータ大学医学部脂質および脂質蛋白研究グループの Vance 教授のもとで脂質代謝に関する研究を行い、8月13日に帰国した。同技官は9月1日から、同研究グループで脂質代謝の分子生物学的手法を習得するため、1年間の予定で、再び出張した。また、短期海外出張では奥平和穂技官が英国で開催された第5回国際毒科学会議に出席した (平成元年7月16~21日)。

平成元年3月から、STA フェローとして来日していた英国雇用省健康安全部の Dr. Lynn Drummond は予定の研究を終了し、平成2年3月に帰国した。ま

た、平成2年1月、ヒューマンサイエンス振興財団流動研究員として東京薬科大学から岩田修永博士を迎えた。

研究業績

1. 食品添加物の安全性に関する代謝生化学的研究(食品等試験検査費, 厚生省生活衛生局食品化学課)

1) 安息香酸に関する研究

安息香酸ナトリウム塩およびカリウム塩の, それぞれ3用量を投与したラットの血中および尿中代謝物をTLCで分析し, 高用量投与群において, 馬尿酸への代謝過程が飽和されることを認めた。ナトリウム塩とカリウム塩の体内動態には差異はみられなかった。

2) ブチルヒドロキノンアニソール(BHA)に関する研究

¹⁴C-BHAを雄性F344ラットに経口投与し, 標的臓器である前胃を中心に組織分布を調べ, 前胃に高濃度分布することが判明した。

2. 家庭用品の安全性に関する代謝生化学的研究(家庭用品等試験検査費, 厚生省生活衛生局生活化学安全対策室)

1) ベンジルブチルフタル酸エステルに関する研究

ベンジルブチルフタル酸エステル(BBP)のラットにおける*in vitro*での代謝を調べる目的で, BBPおよび関連化合物について定量法を検討した。

2) アクリル酸に関する研究

アクリル酸の代謝に関する文献調査を行った。

3. 既存化学物質の安全性に関する代謝生化学的研究(既存化学物質委託費, 厚生省生活衛生局生活化学安全対策室)

1) ビス(トリブチルスズ)フタレートに関する研究

ビス(トリブチルスズ)フタレートの分析法は未だ確立されていない。そこで, HPLC, GC/MSを用い, 代謝試験に必要な分析法の検討を行っている。

4. 異物代謝に関する酵素等の研究

1) 脂環族一級アミンの酸化的脱アミノ機構に関する研究

in vivo および *in vitro* において, 脂環族一級ヒドロキシルアミンはケトンやアルコールにも代謝されることが判明した。

2) リン酸トリエステル類の代謝に関する研究

ウサギ肝ミクロソームにおける tricresyl phosphate の代謝はラットより速いことが判明した。

5. 遺伝子の損傷とその修復機構に関する生化学的研究

1) *in vivo* におけるDNA付加物形成に関する研

究

A/Jマウスに¹⁴C-ウレタンを投与し, 肝臓と肺臓DNAに取り込まれた放射能の解析をDNAの酸水解後, HPLCを用いて行くと, 30%位がDNA付加物であることが判明した。

2) 遺伝子損傷およびその修復に関する分子機構の研究

BHAやOPP-Naのキノン誘導体のラット前胃上皮細胞DNA損傷作用を比較すると, 2,5-di-tert-butyl BQやphenyl-BQが強い作用を有していることが判明した。

6. 生活関連諸物質に含まれる微量有害成分の体内動態ならびに毒性発現機構に関する研究

胚細胞の分化を指標にした*in vitro*での催奇形性検索法を用いて, ニトロアレーン類の作用を検討した。

7. 食品中の発がん関連物質の実態究明と安全性評価手法の確立に関する研究(厚生科学研究費補助金, 対がん十カ年戦略研究事業, 国立がんセンター運営部企画室)

1) 食品中の発がん関連物質のトキシコキネティック的研究

0.01~2%の¹⁴C-BHAを雄性F344ラットに経口投与し, 活性代謝物の前胃における生成量, 前胃タンパク質との共有結合量に関して用量評価を行ったところ, 1%以上の投与群で急に増加することが判明した。F344ラット肝ミクロソームにおいて, BHAはブチルヒドロキノンおよびブチルキノンに代謝されることが確認された。また, そのキノンのフラビン酵素や肝細胞上清による還元反応で, ラジカルや活性酸素種を発生させる可能性が示唆された。

また, A/Jマウスにウレタンを投与し, その血中濃度推移, 呼気中排泄量データから速度論モデルを構築した。生体高分子へのウレタンの取り込みを補正すると体内動態に飽和があることが認められた。

8. 動物実験結果から化学物質の低濃度暴露時のヒトに対する影響を推定するための毒物動態学的研究(国立機関公害防止等試験研究費, 環境庁)

1-ニトロピレン(1-NP)および1,6-ジニトロピレン(1,6-DNP)投与ラット尿中の変異原性物質にはO-アセチル転移酵素高産生株である*S. typhimurium* YG1024が最も感受性が高かった。1-NPの場合には, 24時間以内に変異原性物質が尿中へ排泄されるのに対し, 1,6-DNPを投与したラット尿中への変異原性物質の排泄は72時間後でも認められた。尿中変異原性活性の測定を化学物質のリスクの評価に用いる場合, 尿中変異原性活性曲線と時間との関係からパラメータを

算出し、そのパラメータ値について用量-反応評価を行うなどの工夫が必要であることを示唆した。

^{14}C -ウレタンを投与したマウスの血液を採取し、分取用 HPLC でヘモグロビンとアルブミンを分離した。両タンパクに共有結合している ^{14}C を測定した結果、ほぼ投与量に比例した ^{14}C の取り込みが認められた。

9. リスクアセスメント手法等の改善と確立等に関する研究（厚生科学研究費補助金、生活衛生局生活化学安全対策室）

発がん物質について、活性代謝物の生成、タンパクおよび核酸との付加物生成に関するデータを収集し、用量-反応評価に応用できるデータであるかどうかを検討し、用量-反応評価に応用可能なデータについて、タンパクおよび核酸との付加物生成量に関する速度論的解析と用量-反応評価を試み、リスクアセスメントへ応用できる代謝試験データの取り方について考察した。

モデル化合物として、ベンゼンを選び、その体内動態、および核酸、タンパク付加物生成に関する文献資料をもとに付加物生成の速度論的解析と用量評価を行い、付加物生成に見られる飽和過程は代謝の飽和に起因することを示した。

10. 代謝試験への生理学的速度論の導入に関する研究（HS 財団受託研究費）

A/J マウスにおける ^{14}C -ウレタンの体内動態について検討し、呼気中への排泄における律速過程は代謝過程であることを示した。また、ヒトおよびマウスのウレタンに対する発がん感受性の指標として、マウスとヒトの肝細胞におけるウレタンの DNA 付加物生成量を比較する目的で、今年度はそれに関する基礎研究を実施した。

衛生微生物部

部長 三 瀬 勝 利

概 要

前年度に引き続き、食品や薬品の安全性にかかわる微生物検査、試験、研究が行われた。本年度は特に、中国産のキノコの缶詰の細菌試験とエンテロトキシン試験で、多数の検体が試験され、関係者は多忙をきわめた。前年度から開始された予研や 8 地研と共同で行われているエイズ医薬品候補スクリーニング研究では、興味深い結果が得られているが、特許等の問題があり、詳細は明らかにすることは出来ない。

宮原美知子主任研究官は平成 2 年 3 月よりヒューマ

ンサイエンス振興財団の援助で、米国の Cold Spring Harbor 研究所で制限酵素の研究を行っている。平成 2 年 3 月 31 日付をもって、40 年近くの長期にわたって、衛生微生物部の細菌部門の試験・研究一特に無菌試験や Pyrogen に関する試験・研究一の発展に尽力されてきた石岡忠一第一室長が定年で退職された。なお同室長は当部において一年間の予定で、客員研究員として、透析用溶液の供給システムのバリデーションに関する研究を行なわれる予定である。第一室長の後任は棚元憲一主任研究官が配置換えとなった。また、平成 2 年 4 月 1 日付をもって、Forshungsinstitut Borstel（西独）より肥島由二博士を第一室に迎えた。

業務成績

1. 一斉取締試験

i) ビタミン C 注射液 48 件について無菌試験を行ったが、いずれも陰性であった。

ii) 精製水 80 件について、生菌数、大腸菌群、緑膿菌、および黄色ブドウ球菌の各試験を行った。特定菌はいずれも陰性であったが、多数の生菌が存在するものも認められた。

2. 特別行政試験

点眼剤 2 件について無菌試験（細菌および真菌試験）を行ったが、いずれも陰性であった。

3. 輸入食品検査

中国産キノコ缶詰の細菌試験（無菌試験、生菌数、好気性菌、嫌気性菌、大腸菌群、黄色ブドウ球菌）127 件と、中国産キノコ缶詰のブドウ球菌エンテロトキシン産生試験 127 件が行われた。

4. 規格・基準試験など

バイオ食品の安全性に関する試験、食品の品質保存期間設定のための基礎研究、食中毒防止のための基礎サーヴェイランスデータバンクシステム（上記のいずれも生活衛生局食品保健課）、食島の微生物制御に関する調査・研究（生活衛生局乳肉衛生課）および医療用透析液供給システム改善に関する研究（薬務局監視指導課）などが行われた。

研究業績

1. 細菌に関する研究

i) エンドトキシンに関する研究

種々の合成リピド A によるマクロファージのプロスタグランジン (PG) 誘導活性の研究から、非毒性でかつ PG 誘導活性を持ったリピド A アナログを化学的に合成出来る可能性が示唆された。ウサギの肺のマクロファージは LPS やリピド A に対して極めて感受性が高く、多量の PGE_2 や $\text{PGF}_{2\alpha}$ を産生した。この LPS によるウサギ肺のマクロファージからの $\text{PGF}_{2\alpha}$

の誘導活性は生理的濃度の PGE₂ を培養液に加えることにより、大幅に増強されることが見いだされた。遊離された PG が再び LPS で活性化されたマクロファージに作用して、アラキドン酸代謝のシクロオキシゲナーゼ代謝系を調節し得ることが示唆された。

また、エンドトキシンを化学的に定量する方法として、エンドトキシンの共通因子であるヒドロキシミリスチン酸を蛍光ラベルして極微量のエンドトキシンを化学的に定量する方法が確立された。本法により、数ナノピrogramのエンドトキシンの定量が可能となった。

ii) 制限酵素に関する研究

食中毒細菌の制限酵素の研究が行われ、サルモネラによく見いだされる制限酵素は、同一の起源から進化している可能性が示唆された。また、*Plesiomonas shigelloides* から、今まで未発見の GACNNNGTC という塩基配列を認識する制限酵素が発見され、企業化された。

iii) セレウス菌に関する研究

食肉・食肉製品および食中毒事件例から分離されたセレウス菌の大部分は、サルファ剤とベータ-ラクタム系抗生剤に耐性を示すことが見いだされた。

iv) その他

培養細胞を使用した2段階トランスホメーション法の改良により、発癌物質の検出率を高めることが示された。サルモネラの迅速検出キットの評価実験やビブリオの普遍形質導入フェージに関する研究も行われた。特に後者の研究では、ビブリオの染色体地図の作成がなされたことは特筆に値する。

2. 真菌に関する研究

i) 真菌の分類に関する研究

ペルーの馬糞から不整子のう菌類の新属新種が分離され、*Bulbithecium hyalosporum* と命名された。また、高知県の土壌から、子のう菌類の新種が見いだされ、*Coniochaeta arxii* と命名された。

ii) 病原真菌に関する研究

急性白血病患者に発症した原発性皮膚ムコール症の病原菌として、*Rhizopus microsporus var rhizopodiformis* を同定した。本菌による症例報告は、わが国ではこれが最初である。

iii) マイコトキシンの研究

Aspergillus flavus の中で、パスパリンとエミンドール SB を産出するものが見いだされた。新規の座れん性インドロジテルペン化合物として、エミンドール DA が *Emericella quadrilineata* から分離された。不完全菌類 *Paecilomyces lilacinum* の毒素産生培地にはアルカリ性培地が産生に適していることが判明し

た。南米の土壌から種々の *Emericella* 属を分離し、ステリグマトシスチン産生性を調べた所、その約1割に産生性が認められた。ベネズエラから採取された土壌の中に、*Emericella* に属する新種が発見され、*Emericella falconensis* と命名された。

iv) 有用真菌の探索に関する研究

Neocosmospora に属する菌から環状ペプチド生合成研究上有用な菌が発見された。小笠原諸島で採取された土壌から、*Neocosmospora* に属する二種の新種が発見された。

v) フザリウムに関する研究

ムギ類赤かび病菌のわが国における種類と分布が広範囲に調査された。フザリウム毒素類の汚染状況や食中毒とのかかわりあいも、同時に調査された。

化学物質情報部

部長 神 沼 二 真

概 要

当部はこれまで図書室の管理、化学物質の安全性に関する国際協力、化学物質の安全性に関する一般的な情報提供を業務の3本柱としてきたが、昨年度、部長の交代に伴い、コンピュータを活用した研究支援のための全所的な情報機能の整備が新しいミッションとして課せられた。また評価室の新設に伴い、化学物質の安全性の評価に関する当部の役割にも変化が生じた。

そこで本年度より、これまでの当部の業務と研究資源を総合的に見直し、新たな目標設定と、体制づくりを開始した。具体的には、図書と情報提供業務との一体化を計り、図書・情報サービス業務とし、化学物質の安全性に関する国際事業、IRPTC および IPCS への協力は調査業務に位置づけて、情報サービス業務とは明確に区分することとした。

また新たな業務の柱として、コンピュータを用いた研究支援システムの開発を立て、さらに線虫とコンピュータを用いた毒性試験法の可能性の検討を開始した。

人事面では、平成元年10月1日付で中館正弘室長が毒性部に転出、代わって森本和滋室長が代謝生化学部より、同日付で当部に配属となった。また平成2年3月31日付で橋場茂子主任研究官が定年退職した。なお、森本室長が日米医学協力研究米国派遣研修生として平成2年2月4～21日、米国出張し、国立環境保健科学研究所(NIEHS)とペンシルバニア州立大学医学部癌研等を訪問した。

支援業務(業務成績)

1. 図書・情報サービス

(1) 図書室の運営

昨年度まで雑誌 333 タイトル、単行本 7463 冊を保有していたが、外国雑誌の見直しを行った結果、情報室から図書室へ 11 タイトルの雑誌を移管し、22 タイトルを中止、新規に 24 タイトル購入した。この結果、本年度は雑誌 335 タイトル、単行本 7645 冊となった。また過去数年間ストックされていた雑誌の製本をすべて完了した。また所内向けに 675 タイトルのコンテンツサービスを行った。相互貸借による文献複写は、外部から 44 機関 323 件の依頼があり、当所から外部へは 93 機関 1324 件の申込みを行った。さらに、情報機器の導入等機能の改善を考慮した図書室のレイアウト変更を行い、また情報機能改善のためファクシミリを導入した。

(2) 情報検索サービス

図書室における情報検索機能を強化するため、新たに設けた情報コーナーで、パソコンを用いた CD による MEDLINE (変異遺伝部提供) の検索およびフロッピー・ディスクによる Current Contents (Life Sciences) の検索の利用サービスを開始した。また昨年度に引き続き、外部データベースを利用した所内に対する検索サービスを行った。システム別の利用件数は Dialog 253 件、JOIS 40 件、STN 21 件、CIS 9 件、総件数 323 件で、昨年度とほぼ同数であった。

(3) その他の情報提供

情報室ニュース No. 54 を作成し、所内向けに配布した。

(4) 衛生試験所報告編集業務

衛生試験所報告編集委員会に協力し、同報告第 107 号を発行し、所員ならびに所外、外国の関連機関または個人に配布した。

2. 化学物質の安全性に関する国際的な情報交換事業への協力

(1) 国際有害化学物質登録制度 (IRPTC) への協力
例年通り、IRPTC 法規制ファイルのうちわが国に関する情報を更新する協力を行った。またこれまでの成果をまとめて平成 2 年 3 月、ミュンヘンで開かれた IRPTC のワークショップで関沢純室長が報告した。

(2) 国際化学物質安全性計画 (IPCS) への協力

平成元年 10 月末より 11 月初めにかけて開催された評議委員会 (PAC) に神沼、関沢が出席し、今後の協力方針について情報を交換した。

1) ドキュメントの作成

「トリコテセン」等のカビ毒に関する環境保健基準 (EHC) 作成のためポスト・タスクグループ会議を中

館らがホストとなって 7 月に当所で開催した。また「リン酸エステル系難燃剤」の EHC に関して当所が作成した原案にもとづく最終のタスクグループが平成元年 10 月に英国のカーシャルトンで開催され、中村薬品部長と当部の加納直子氏が出席した。「エチレンジプロマイド (EDB)」の EHC は、一部の執筆者に引き続き原案作成を依頼している。「トリスジプロモプロピルホスフェート (Tris-BP)」に関する安全衛生ガイド (HSG) ドラフト作成が新たに着手され、所内外の専門家 6 名の協力を得て、第一次ドラフトを IPCS 本部に送った。

進捗が遅れていた、「陰イオン界面活性剤」(昭和 55 年開始)、「アセトニトリル」(昭和 61 年開始) はこれまでの作成分を見直し、完成へ向けて文献の再調査、追加執筆などを検討した。

この他に「フェンバレレート」、「ベルメトリン」、「*d*-フェノスリン」、「テトラメスリン」、「デルタスリン」については EHC および HSG の最終編集に協力した。また「アレスリン」、「レスメスリン」の EHC と「ベルメトリン」、「フェンバレレート」、「*d*-フェノスリン」、「テトラメスリン」、「デルタメスリン」、「ジクロロボス」、「アレスリン」、「レスメスリン」の HSG が出版された。

2) IPCS の国際化学物質安全性カードの作成

打ち合わせのため関沢が 9 月 (ポローニャ) と 12 月 (ルクセンブルグ) の会議に出席した。また 7 名の所外委員の協力を得て、合成ピレスロイド系農薬 14 品目および無水フタル酸、プロピレングリコールについてのカード原案を作成した。

3) データベースの作成

農薬安全性評価情報データベースを NEC の LAN FILE3 より IBM の dBASE III Plus に移植し FAO/WHO 合同残留農薬専門家会議事務局に提供した。

3. 研究を支援するコンピュータ環境の整備

本年は、この計画の第 1 年として、情報委員会の助けを借り、所内でのコンピュータ利用を促進するための啓蒙的な講演会を開催した。この活動と併行して、安全センターの Micro VAX II に、分子計算のための分子グラフィックスや分子モデリングのプログラムをいくつか移植した。なおこれらの活動には外部の HS 財団、CBI 研究会、医薬品副作用被害救済・研究振興基金等の協力を得ている。

研究業績

1. 毒性予測のためのコンピュータシステム研究

これまで当部で行ってきた、各種のデータベースの開発と、昨年まで神沼らが外部で開発してきた各種の

システムを叩き台として、コンピュータに化学物質とその毒性に関するデータと知識を蓄え、計算や専門家との対話的な処理によって、毒性の予測や、毒性の研究が必要とする情報を検索したり生成することができるシステムを構想し、第一次の概念設計を行った。毒性の予測としては発癌性の予測を当面の第1目標とし、とくに発癌物質のDNA修飾と活性代謝物は、具体的なモデルの検討に入った(一部、科学技術振興調整費 科学技術庁、科学研究費補助金、文部省)。

2. 線虫を用いた安全性試験のためのコンピュータシステムの開発

線虫の胚発生過程実時間での追尾、および線虫の匹数の計測と行動の追尾のためのコンピュータシステムの開発を行うべく、本年度は実験機器の整備を行った(一部科学研究費補助金、文部省)。

3. その他の研究

厚生科学研究費による「実験動物の吸入(経気道)による急性試験法に関する研究」、および危険物評価委員会の「危険物海上運送に関する調査研究」を分担した。

安全性生物試験研究センター

センター長 戸部 満寿夫

63年度で認められた毒性部評価室の新設に引き続いて、さらに主任研究官の増員とコンピュータ設置の調査費が認められた。厚生行政の支えの一つとして重要な、化学物質の安全性に係わる国立衛生試験所の役割に、一層の期待が寄せられたものと解し、真の前進を図らなければならぬ。

前年度に引き続き、各種の海外交流が盛んな年度であった。元年度は殊に、OECD 関連の動きが急激に増し、高生産量化学物質(HPVC)の安全性点検の実施が決まり、当センターもこれに参加することとなった。これに関連して、各種の会合が相次いで開催され、多くの方が参加された。HPVCの問題は、以前より実施されてきた国内の既存化学物質の点検と連動し、今後大きな仕事になる可能性があるが、それへの適切な対応のためにも、評価室の今後の役割と進展が重要となってこよう。

米国環境保健衛生研究所(NIEHS)との各種の交流を通して、漸くわが方から研究者の長期派遣が実現した。関係各方面の協力で改めて感謝し、このパイプがさらに太く永続的なものになるよう望むものである。

毒性部

部長 黒川 雄二

概要

入所以来長きに渡り薬理部、毒性部において貢献された堀内茂友動物管理室長は平成元年6月を以て辞職され、吉本濱子機器試験室長は平成2年3月を以て退職された。田中悟薬理部後世代影響研究室長が、後任の動物管理室長として平成元年7月より勤務している。平成元年5月に新設された毒性部評価研究室長に、中館正弘化学物質情報部第一室長が着任した。長谷川隆一主任研究官は、厚生省大臣官房厚生科学課に平成元年8月から7カ月間併任となった。鎌田栄一主任研究官は、昭和63年10月から引続き化学物質審査官として生活衛生局生活化学安全対策室に勤務している。また、生活化学安全対策室山本史技官が平成2年1月から評価研究室に併任となった。松本清司主任研究官は、平成2年3月から信州大学医学部付属動物実験施設助教授として出向となった。

金子豊蔵第3室長は、東邦大学より医学博士の学位を取得した。門馬純子主任研究官は、HS 財団助成金により平成元年1月から6カ月の予定で米国環境衛生研究所(NIEHS)に出張し主として皮膚毒性に関して研究中である。医薬品GLPの査察には、審査第1課担当6カ所および生活化学安全対策室担当分化学物質GLP2カ所に当部から8名の室長および主任研究官が参加した。

海外からの研修生としては、タイ国医科学局毒性部のスワンナ・チャルナット女史が第4室で平成元年6月～7月まで化学物質の感作性および吸入毒性について研修した。中国予防医学科学院環境衛生観測所副長の秦慧女史が第4室で平成2年2月～5月まで毒性学全般にわたり研修し、また所内外の施設で毒性と厚生行政との関わりについて調査した。

黒川雄二部長は、平成2年1月13日～21日までロンドンで開かれたOECDのad hoc Expert Group Meeting および Hazard Assessment Advisory Body(HAAB)に出席し、主として反復投与毒性および生殖発生毒性併合試験(ReproTox)について討論を行った。また平成2年3月26日～4月9日にかけて米国に出張し、ワシントンでのOECD主催の神経毒性試験ガイドラインに関するad hoc Expert Meetingに参加後、ノースカロライナ州のNIEHSで開かれた化学物質のリスクアセスメント確立のための第2回目

米学会会議に参加した。田中悟動物管理室長は、平成2年1月13日～24日まで、フランスで開催されたOECDのGLP査察官の講習会に出席し、GLPの国際的な考え方や査察の実際等について情報を得た。また、平成2年3月4日～15日まで、非エネルギー分野における日米科学技術協力計画にしたがってアメリカの政府機関、大学および研究所を訪問し、研究施設を視察するとともに、生殖発生毒性試験法ガイドラインの国際的整合性および代替試験法の開発の現状等について意見交換を行なった。中館正弘評価研究室長は、平成元年6月18日～24日までストックホルム、および平成元年9月2日～10日までパリで開催されたOECDの高生産量化学物質の安全点検の物質の選択と優先順位設定の専門家会議に出席した。

研究業務

1. 科学技術庁国立機関原子力試験研究費柑橘類等のγ線照射の有無判別法および健全性に関する研究

1) γ線照射した柑橘類の毒性に関する研究
γ線照射グレープフルーツについてマウスおよびラットを用いた慢性毒性試験および多世代試験を終了した。

2. 厚生省厚生科学研究費補助金

1) 乱用薬物鑑定法整備研究

毛髪中乱用薬物鑑定法を確立する為、サルを用いてコカインおよび大麻に関する実験を行った。

2) リスクアセスメント手法等の改善と確立に関する研究（生活衛生局生活化学安全対策室）

短期毒性試験法の長期毒性予測性に関する研究を毒性部の既存データを用いて行った。

3) 組織および血清に接触する医療用具に用いる材料の前臨床試験のガイドライン作成（薬務局審査第1課）

上記に係るガイドラインの作成を行った。

4) バイオテクノロジー医薬品に対する生体応答の解析に関する研究（薬務局審査第1課）

5) 実験動物の吸入（経気道）による急性毒性試験法に関する研究（薬務局安全課）

マウスおよびラットを用いてアンモニアの急性吸入毒性実験を行った。

6) 紫外線吸収剤の配合基準設定に関する研究（薬務局審査第2課）

紫外線吸収剤に関する欧米の状況調査および個々の成分に関する毒性等の文献収集を昨年引続き行った。

7) 医薬品等に用いられるフロンの代替品に関する研究（薬務局審査第2課）

フロン等規制対策の国際的動向の把握とエアゾール

式ゼンソク薬の噴射剤代替試験計画の策定について検討した。

8) 化粧品原料および化粧品の安全性試験項目設定のための基礎研究（薬務局審査第2課）

新規化粧品製造原料に対する安全性試験として、急性毒性試験、皮膚一次刺激性試験、連続皮膚刺激性試験、感作性試験、光毒性試験、眼刺激性試験、変異原性試験およびヒトパッチ試験のガイドラインを作成した。

9) 歯科材料の化学的、生物学的評価法ガイドライン作成に関する研究（薬務局審査第2課）

歯科材料の吸入毒性試験ガイドライン案の作成について検討した。

4. 厚生省生活衛生局食品化学課食品添加物安全性再評価費

1) ミョウバンとコチニールの相乗毒性

ラットによる慢性毒性試験を継続中である。

5. 厚生省生活衛生局食品保健課健康食品対策室

1) 健康食品の安全性に関する研究

鉱物性健康食品の一つである硫酸第一鉄とフライアッシュ（火力発電所での石炭燃焼後副産物）の混合物（商品名ビタニック）のラットによる慢性毒性試験を継続中である。

6. 厚生省生活衛生局生活化学安全対策室家庭用品等試験検査費

a) 5-クロロ-2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンの急性毒性試験を行った。

b) ジブチル錫二酢酸の亜急性毒性試験を行った。

c) *p*-tert-ブチルフェノールホルムアルデヒドレジン（レゾール型）の急性毒性試験を行なった。

d) *p*-tert-ブチルゲノールホルムアルデヒドレジン（ノボラック型）の急性毒性試験を行った。

e) *p*-メチルベンゼンスルホメチルジアイオダドの急性毒性試験を行った。

f) 接触皮膚炎の原因物質探索の手段として、感作モルモットを用いる試験法を開発検討した。

7. 厚生省生活衛生局水質試験検査費

1,3-ジクロロプロピオン酸の28日間反復投与試験を行った。

8. 厚生省乱用薬物試験研究費（薬務局麻薬課）

薬物乱用、特に多剤乱用時の依存形成能とその薬物動態ならびに生態におよぼす影響に関する研究

市販の鎮咳去痰剤の配合成分の強化効果についての検討を開始した。

9. 厚生省癌センター企画調整室がん研究助成金

非変異原性発がん物質の発がん機構における活性化

素の関与に関する研究

非変異原物質であるが発がん性を示す物質(特にペルオキシゾーム増殖剤と鉄ニトロ三酢酸)についてその発がんメカニズムに関する研究を行った。

10. 環境庁国立機関公害防止等試験研究費

希土類金属(イットリウム, ランタン)の吸入排泄試験および28日間反復投与試験を行った。

11. ヒューマンサイエンス振興財団共同プロジェクト研究

組成を変えたポリウレタンのラットへの長期埋入実験を開始した。

12. がん研究振興財団助成金活性化酸素を介する発がん機構に関する研究

臭素酸カリウムおよびペルオキシゾーム増殖剤について実験を行った。

13. IPCS 免疫毒性評価法の確立に関する研究

免疫抑制剤アザチオプリンをラットに28日間投与し、免疫毒性を調べた。

薬理部

部長 高 仲 正

概 要

厚生省組織規定の改正(平成元年省令第23号)により、薬理部の業務は「業務関連物質の薬理学的試験及び後世代に及ぼす影響に関する試験並びにこれらに必要な研究に関することをつかさどる」と規定され、組織細則(5月29日改正)で、中樞薬理研究室、末梢薬理研究室、生化学薬理研究室はそれぞれ第一室、第二室、第三室となり、第三室は「業務関連物質の細胞機能に及ぼす影響に関する薬理学的試験及び研究をつかさどる」となった。なお、後世代影響研究室はそのまま名称を継続した。

生化学薬理研究室籾内桃子技官は4月1日付で主任研究官に昇格した。また、後世代影響研究室田中悟室長は7月1日付で毒性部動物管理室長に配置換えとなり、後世代影響研究室長併任となった。中蒲慎介主任研究官は昭和40年10月に入所以来、催奇形性試験法の開発、局方注射薬の発熱性物質試験、実験動物における血液生化学試験・研究、全身オートラジオグラフィの導入、血液凝固系および溶血に関する研究、注射剤の局所障害に関する研究、胎芽培養法の確立等多くの業績をあげてきたが、平成元年12月31日付で退官した(在職期間24年2月)宇佐見誠技官が平成2年1月1日付で採用になり、後世代影響研究室において生殖毒性試験および胎芽を用いた *in vitro* での催奇形性の研

究を開始した。ヒューマンサイエンス振興財団(HS)流動研究員広田晃一博士は昭和62年4月1日より医薬品等の高感度・高性能安全性評価法の開発に関する研究に従事し、十分な業績をあげ、平成2年2月28日付で退所した。米国FDA医薬品生物製剤センター細菌製剤部細胞生理研究室長 J. G. Kenimer 博士は HS 流動研究員として2月23日に来日し、第二室においてニューロサーキット同時多点解析法等を用いる神経性栄養因子とモデュレータの機能評価法の開発に関する研究に従事している。第三室川西 徹技官は米国ノースカロライナ大学チャペルヒル校医学部細胞生物学・解剖学教室 J. J. Lemasters 教授のもとで、画像記録および解析装置付顕微鏡システムを用いた化学物質の細胞毒性試験法の開発研究に従事し、生細胞を用いて細胞レベルで化学物質の毒性発現過程を解析しうるシステムを確立して11月30日帰国した。今後このシステムを導入することにより、毒性発現機序の解析が容易になるのみならず、当所の業務に十分貢献しうると考える。

今年度は5課題について研究を終了し、新たに8課題について研究を開始した。なお、経常研究以外では、厚生省5、環境庁1、科学技術庁1、文部省1、ヒューマンサイエンス振興財団4および特別研究1課題について研究を行った。

短期海外出張は、高仲:FAO/WHO 合同残留農薬専門家会議(ジュネーブ、平成元年9月17日~29日)、川西技官:米国毒性学会(マイアミ、平成2年2月12日~16日)、高仲、田中室長、川島主任研究官:日米非エネルギー科学技術研究計画による生殖・発達毒性研究の打合せ(米国、平成2年3月4日~15日)の延5件であった。また、国内GLP査察には延6名が参加した。

外国からの研修生としては、ODAに関する技術協力により来日した Dra. Srikandi Djajalaksana さん(インドネシア共和国国立薬品食品品質管理試験所)が62年8月31日より2年間にわたり、後世代影響研究室において催奇形性試験の技術習得と結果の評価に関する研修を終了し、7月25日帰国した。李由美さん(韓国国立保健安全研究院毒性部生殖毒性科)は *in vitro* 催奇形性試験法および行動薬理試験法の修得のため、4月1日より6月24日まで後世代影響研究室および第1室で研修を行った。

研究業績

1. 医薬品等の薬理作用に関する研究

i) 肝遊離細胞を用いた化学物質の毒性発現機構の解明に関する研究

ii) 細胞の生理機能と細胞内カルシウムイオンの関係に関する研究

iii) 各種化合物の培養神経機能におよぼす影響に関する研究

本年度で研究を終了した。

iv) 神経細胞内情報伝達に関する研究

本年度より3年計画で研究に着手した。

v) 神経・神経間情報伝達に関する研究

本年度より3年計画で研究に着手した。

vi) 神経・末梢組織細胞間情報伝達に関する研究

本年度より3年計画で研究に着手した。

vii) 医薬品の平滑筋細胞機能におよぼす影響に関する研究(単離平滑筋細胞における交感神経伝達物質の作用)(科学研究費補助金, 文部省)

本年度で研究を終了した。

viii) 心筋および心筋細胞を用いた化学物質の障害発現機構に関する研究

本年度で研究を終了した。

ix) チトクロームP-450分子種の組合せによるヒト薬物代謝のシミュレーションに関する研究(HS 財団受託研究費)

本年度より3年計画で研究に着手した。

x) 肝以外の臓器における薬物代謝酵素の特性に関する研究

xi) 薬用植物・生薬の品質確保および利用に関する日中両国共同研究(HS 財団受託研究費)

本年度より3年計画で研究に着手した。

xii) 覚醒剤等の中枢作用に関する行動薬理学的研究

本年度で研究を終了した。

xiii) 発達期における薬物感受性の変化に関する行動薬理学的研究(小児医療研究, 厚生省)

本年度で研究を終了した。

xiv) 毒性発現における栄養因子の役割に関する研究

本年度より3年計画で研究に着手した。

2. 医薬品等の後世代におよぼす影響に関する研究

i) ステロイドホルモン剤の男性化作用に関する研究

ii) 食品添加物の次世代影響に関する研究(食品等試験検査費, 厚生省生活衛生局食品化学課)

iii) 家庭用品に用いられている化学物質の催奇形性に関する研究(家庭用品等試験検査費, 厚生省生活衛生局生活化学安全対策室)

iv) 既存化学物質の催奇形性に関する研究(家庭用品等試験検査費, 厚生省生活衛生局生活化学安全対策室)

3. 有効性・安全性評価のための科学技術開発に関

する研究

i) 強毒性が予想される環境汚染物質等の培養系を用いた低用量安全性検索法の確立に関する研究(国立機関公害防止等試験研究費, 環境庁)

ii) 培養肝細胞を用いた安全性検索法の確立に関する研究(HS 財団受託研究費)

本年度より3年計画で研究に着手した。

iii) ニューロサーキット同時多点解析法等を用いる神経性栄養因子とモジュレータの機能評価法の開発(HS 財団受託研究費)

本年度より3年計画で研究に着手した。

iv) トランスジェニック植物を用いた新生理活性物質の研究(科学技術振興調整費, 科学技術庁)

v) 生体関連反応指標の有意性判定に関する研究(新生仔における行動発達試験法の検討)(特別研究, 厚生省)

vi) リスクアセスメント手法の改善と確立に関する研究(厚生科学研究費補助金, 生活衛生局生活化学安全対策室)

病 理 部

部 長 林 裕 造

概 要

今年度、林裕造部長は次のように海外出張した。アメリカのNIEHS主催による「肝結節性病変に関するシンポジウム」に出席し、発表を行った(平成元年5月19日～25日)。ローマで開催されたJECFA(FAO/WHO合同食品添加物専門家会議)に出席した(平成元年5月27日～6月7日)。ブライトンでの「国際毒科学会」およびリヨンでの「化学物質による呼吸器障害の評価法」会議に出席した(平成元年7月10日～8月3日)。ホンコンで行なわれた「カフェインの安全性に関するシンポジウム(国際生命化学協会主催)」に出席した(平成元年8月6日～10日)。イギリスでのIPCS「トリエチル錫オキサイドのEHS作成のワーキンググループ」に出席した(平成元年9月10日～17日)。ソウルにおいて「韓国毒科学会・特別講演」を行った(平成元年12月1日～3日)。パハマにて開催された「国際生命科学協会年次総会」に出席した(平成2年1月16日～27日)。ハワイの「日米がん研究協力事業セミナー」に出席し、発表を行った(平成2年2月3日～9日)。さらに、ハワイの「日米医学研究セミナー」に出席し、発表を行った(平成2年3月17日～22日)。

また、高橋道人室長は次のように海外出張した。ハ

ワイにおいて開催された日米がん学会共同研究集会「増殖コントロールの分子的側面」に出席し、発表を行った(平成元年5月27日～6月2日)。また、アメリカ・テキサスでの「化学物質による細胞増殖: リスク評価における意義」に出席した。(平成元年11月28日～12月6日)。さらに、パリで行なわれた「OECDのパネル会議(Updating panel)」に出席し、討議を行った(平成2年3月4日～11日)。

研究業績

1. 厚生省がん研究助成金(国立がんセンター運営部企画課)

A. 食品に含まれる天然物質による消化器発がんの修飾

1) 大腸発がんの修飾

B. がん情報ネットワークの構築と一次・二次予防等がん対策の評価に関する臨床疫学的研究

1) 発がん物質の総量評価

C. リスクアセスメント手法等の改善と確立等に関する研究

1) 環境化学物質の発がん性リスクアセスメントに関する研究

D. 発がん性を有する医薬品のリスクアセスメントに関する研究

1) 疫学調査知見と動物データとの相関性

2) 発がんプロモーター作用を有する医薬品のリスク評価

3) 内因性生理活性物質に影響を及ぼす医薬品のリスク評価

E. バイオテクノロジー医薬品に対する生体応答の解析に関する研究

F. 発がん物質の規制決定に関する基礎的研究

1) 発がん物質の規制決定のリスク判定に関する研究

2) 臓器障害により発がん性を示す物質の規制決定の為のリスク評価

3) 低用量外挿による発がんリスク評価法の規制決定への応用に関する研究

G. 複数発がん要因によるリスク評価の基礎的研究

1) 複数の物質の組合せによる発がん性の変化に関する研究

2. 厚生省科学研究費・対がん十カ年戦略研究事業関係(国立がんセンター運営部企画課)

A. ヒト発がん促進要因の検出とそのリスク評価

1) 内因性発がん促進/抑制要因の検討

2) 胃がん発生の促進要因の研究

3. 文部省 科学研究費補助金関係

科学研究費補助金(文部省)

A. コホート研究による発がん要因に関する研究

B. 膀胱がん発生における宿主側要因の検討と解析

1) 膀胱がん発生の機構解析とその制御に関する研究

C. 化学物質による加齢性病変の発現に関する研究

1) 化学物質による加齢性病変の誘発

2) 加齢性病変の特質に関する形態学的解析

3) 加齢性病変の発現における DNA 修飾脂質過酸化の関与

4) 自然発生病変との比較

4. 食品添加物安全性再評価費関係(厚生省生活衛生局食品化学課)

A. ピロリン酸カリウムの慢性毒性ならびにがん原性試験

B. タンニン酸の慢性毒性ならびにがん原性試験

5. ヒューマンサイエンス振興財団共同プロジェクト研究

A. ニューロ・トロフィック・ファクターによる神経細胞老化抑制に関する研究

変異遺伝部

部長 石 館 基

概要

昨年5月29日付で変異原性部は変異遺伝部と改名された。その主な理由は、生活関連物質の変異原性は、遺伝毒性の一分野に過ぎず、その目指すところは、発がん性のみならず、生殖細胞を介する遺伝的傷害性の有無を検索することにあるためである。今後、当部にあっては、さらに業務を拡張し、遺伝毒性を検出するための試験法を開発することが急務と思われる。

当部では、前年度に引続き、食品添加物、水道中の有機汚染物質、照射食品成分、ならびに、既存化学物質等につき、微生物および哺乳類細胞を用いる変異原性試験を行った。

7月に米国で開催された国際環境変異原学会には、部長をはじめ、祖父尼室長、渡辺技官およびフィンランドより招へい中の Dr. Einisto が参加し、当部における研究業績の合計5演題につき発表した。10月、部長はドイツのエッセンで開催された染色体異常に関する国際シンポジウムに出席し、本邦における変異原性試験の動向について発表した。同月、林技官はフィンランドにおける一年間の共同研究を終え帰国した。12月、部長は、ソ連のレニングラードで開催された国連主催の国際環境変異原-がん原物質防衛委員会

(ICPEMC) に出席し、*in vitro* 試験法の問題点に関する報告書の作製を行った。本年、3月、林技官は米国ノースカロライナ州で開催された国際分析細胞学会シンポジウムに出席し、毒性試験法の自動化に関する講演を行った。4月、部長、祖父尼室長、能美室長は、米国 NIEHS で開催された化学物質のリスクアセスメント確立のための第2回日米学術会議に出席した。

対がん10ヶ年総合戦略に基づく細胞バンク事業は、当部の主要な活動の一部である。国内のがん研究者に年間約2500本の細胞保存アンプルが供給されている。保存、供給にあたり、細胞株の品質を十分管理し得る研究体制を確立することが重要と思われる。

本年3月、第一室の沢田技官が退職し、4月に名古屋市立大より鈴木技官が採用された。また、昨年の4月能美技官が第二室長に昇任されたのに対して、本年4月、大阪大学より、山田技官が採用された。フィンランドより招へいた Dr. Einisto が、本年2月帰国し、新たに、3月、ナイジェリアより Dr. Asita を招へいた。

研究業績

1. 食品添加物の変異原性に関する研究

8種類の天然添加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(生活衛生局食品化学課)。

2. γ 線照射した柑橘類の変異原性に関する研究

γ 線照射したグルコースの変異原性について微生物を用いる復帰変異試験ならびに哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験を行った(国立機関原子力試験研究費、科学技術庁)。

3. 環境汚染化学物質の変異原性に関する研究

1) 水道中における微量有機化合物および関連物質3種について、マウスを用いる小核試験を行った(生活衛生局水道環境部水道整備課)。

2) 動物実験結果から化学物質の低濃度暴露のヒトに対する影響を推定するための毒物動態学的研究

ニトロアレーンを投与した動物の尿の変異原性を検討した(国立機関公害防止等試験研究費、環境庁)。

3) 既存化学物質3種についてサルモネラ菌による変異原性試験および培養細胞を用いる染色体異常試験を行った(生活衛生局生活化学安全対策室)。

4) 2種のチャイニーズハムスター細胞株、CHLとCHOを用いて染色体試験における感受性を比較した(労働省化学物質情報課)。

4. 生体埋入高分子材料の安全性評価法に関する研究

照射、非照射ポリウレタンフィルムについてサルモネラ菌による変異原性試験を行った。

5. 薬用植物の組織培養生成物の変異原性に関する研究

チョウセンニンジンの培養生成物6種についてサルモネラ菌による変異原性試験および培養細胞を用いる染色体異常試験を行った(業務局審査第二課)。

6. マウスを用いる小核試験法に関する研究

網赤血球を用いる小核試験について検討を行った。

7. 活性酸素の染色体異常誘発機構に関する研究

スーパーオキシドラジカルを発生するといわれているメナジオンに対する耐性細胞を樹立し、染色体異常誘発性についてさらに検討した。

8. 微生物を用いる変異原性試験の開発および改良に関する研究

Salmonella typhimurium TA1538の染色体DNAから、ニトロ還元酵素、アセチル転移酵素の遺伝子産物を同定した。

9. 天然添加物の突然変異誘発作用に関する研究

天然甘味料ステビオサイドのアグリコンであるステビオールの変異誘発作用について検討するため、サルモネラの *gpt* 遺伝子をクローニングした。

10. 医療用具および医用材料の毒性試験体系の確立における変異原性試験の適用について検討した。

11. 化学物質統計など支援のための知識ベースシステム開発のために、バイオロジカルデータベースを利用して、実際の化合物について検討した。

12. リスクアセスメント手法等の改善と確立等に関する研究。変異原性試験のデータの定量的評価と国際的比較(生活衛生局生活化学安全対策室)。

13. 突然変異誘発機構の基礎的研究

環境変異原物質の動物遺伝子におよぼす影響を、シャトルベクターを用いて塩基配列のレベルで解析している。この前段階として、大腸菌中でシャトルベクターをニトロソアミンで処理した後生じる突然変異について塩基配列の変化を解析した。

14. 細胞バンクの運営と関連する基礎的研究

1) 細胞株の収集、品質管理、供給方法を含めた細胞バンク運営

平成元年度末までの収集細胞株は700株、平成元年度中の作製アンプル数は約4000本、供給アンプル数は2900本であった。供給件数は増加の傾向にあり平成二年度は3200本が見込まれる。

2) 汚染検査

作製したすべての細胞株のマイコプラズマ汚染検査を実施した。汚染率は約20%であった。

3) 細胞株が由来する動物種の確認

アイソザイムの分析により各細胞株の由来する動物

種について検討を加えたが、誤りは存在していないことを確認した。しかし、動物種が確認された場合においても、同一動物種間での相互混入の疑いについては上記方法では確認できない。そのため、VNTRプローブDNAを用いて遺伝子を直接確認する方法の開発研究を行っている。

4) 細胞株データベースの開発

すでに昨年 JCRB 細胞バンク内部で運用する細胞株データベースを確立した。しかし、他省庁においても細胞バンクが次々設立されつつある現在、横の連携をスムーズにするための細胞株情報データベースを開発する必要が生じている。そのため、我々が運用しているデータベースを基に、共同利用データベースシステムの開発に着手し、基本的なデータベースの構造を決定し、さらにデータ入力および修正プログラムの開発を行った。

大阪支所

支所長 伊 阪 博

大阪支所においては、昨年度に引き続き、国家検定・検査、製品検査、一斉取締試験、輸入食品検査および特別行政試験を行ってきたところであるが、平成2年4月から、従来食品添加物部で実施していた製品検査業務が当所食品試験部に移管されることになった。また、色素試験用標準品の製造業務についても平成元年9月から当所食品試験部に移管されている。

これらの業務のほかには特別研究、国立機関公害防止等試験研究、厚生科学研究および家庭用品等・食品等試験検査研究などを行った。また第Ⅱ期初年度のヒューマンサイエンス振興財団共同プロジェクト研究の受託研究を行った。なお、大学・試験研究機関等からの研修員の受け入れを行ったほか、例年通り、各部共通して大阪薬科大学学生(6名, 3ヶ月間)および摂南大学薬学部学生(10名, 1週間)を受け入れて研修指導を行った。

大阪支所各別には、以下詳述す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。

薬品試験部

部長 岡田敏史

概要

HS 財団の第2期の官民共同プロジェクト研究事業

が平成元年度にスタートし、第Ⅱ分野テーマ2、高分子材料と薬理活性をもつ物質との総合化技術の研究に二つの課題で参加することとなり、研究を開始している。ヒトインスリン製剤の国家検定およびブタインスリン製剤の国家検査数はほぼ横ばいとなっている。標準品製造個数はわずかの増加にとどまったが、新規標準品6品目の設定を行った。

平成元年7月1日付で徳永裕司主任研究官が薬務局審査第二課(有機化学部併任)へ配置換えとなった。平成元年11月1日付けで木村俊夫部長が退職し、後任に岡田敏史室長が就任した。平成2年1月31日付けで広重律子研究補助員が退職した。平成2年4月1日付けで石光進技官が採用され、第2室室長に就任した。また、同日付けで寛華子研究補助員が採用となった。平成元年3月13日より8月11日までフィリッピン国食品医薬品検定センタープロジェクトの研修生としてNazarita Lanuza氏が標準品製造および医薬品の機器分析についての研修を行った。

業務成績

1. 国家検定

ヒトインスリン製剤が91件で、全品合格であった。

2. 国家検査

ブドウ糖注射液が71件、リンゲル液が1件、インスリン製剤が7件で全品合格であった。

3. 一斉取締試験

コバミドを含有する内服固形製剤20件およびナリジクス酸錠およびそのカプセル剤23件につき定量試験を行い、その結果は全品合格であった。

4. 特別行政試験

国内産収納あへん12件(岡山県5件, 香川県7件)について、モルヒネ含量の定量試験を実施した。

5. 標準品製造

36品目について合計4,798個の標準品の製造を行った。新規標準品の設定は6品目であった。エストリオール、酢酸クロルマジノン、メストラノール、メチルジゴキシン、リン酸デキサメタゾンナトリウム、リン酸ベタメタゾンナトリウム。

6. その他

局方製剤の品質規格の設定に関する研究(厚生科学研究, 青柳班, 薬務局安全課), 医薬品の規格および試験法に関する研究(日本公定書協会)を行った。また、第12改正日本薬局方のための原案の作成を行った。

研究業績

1. 医薬品の分析化学的研究

i) 医薬品の規格および試験法作成に関する研究

i-1) 日本薬局方収載のプロピオン酸テストステロ

ンの吸光度測定法による新しい定量法を確立し、改正案を作成、提案した。一般試験法中の粘度測定法についての改正案を作成、提案した。また、試薬・試液の記載方法についての提案を行った(薬務局安全課)。

i-2) 旋光計校正用標準物質についての研究

日局精製白糖および JIS 特級サッカロース 4 種について NBS の標準 Sucrose を対照に試験を行った結果、いずれの糖も校正用標準物質として十分な純度をもっていることが明らかとなった(公定書協会)。

ii) 医薬品製剤の溶出試験法に関する研究

日局11収載の塩酸イミプラミン錠ほか4品目の錠剤について溶出試験法または崩壊試験法適用のための基礎的な検討および実態調査を行い、個々の品目に対する適切な試験条件の設定を行い、提案した(厚生科学研究、薬務局安全課)。

iii) 糖質コルチコイド中の残留溶媒

リン酸ヒドロコルチゾンナトリウムなどステロイドのリン酸エステル類の原薬中にメタノール、エーテル等の再結晶溶媒が残留し、公定書記載の乾燥条件では十分に除去できないことを明らかにした。

iv) 標準品の品質規格の設定に関する研究

平成2年度告示予定のジクロルフェナミド、テオプロミン、エピチオスタノール、マレイン酸メチルエルゴメトリンの各標準品原料についてその品質規格の検討を行った。

2. 医薬品と高分子物質の相互作用に関する研究

i) キトサンとその誘導体の高分子特性評価法とその製剤への利用技術に関する研究

キトサンを主賦形剤として数種のモデル薬物を含むキトサン直打錠を作製し、種々の条件の下での薬物の溶出挙動を観察した。溶出速度は薬物の種類により異なること、溶出挙動は拡散律速型であること等を明らかにした。また、アルギン酸ナトリウムまたはカルボキシメチルキチンを添加することにより徐放性製剤用の素材としての利用が期待される。

キトサンをゲル濾過法により分別し、分別試料の粘度と光散乱法より求めた分子量の関係より粘度式を求めた。GPC 法によりキトサンの分子量測定を行うためには分子量標準として用いるプルランとキトサンの溶液中における分子の広がり差を考慮して普通校正曲線($[\eta] M_w - V_e$)を用いる必要があった(HS 財団受託研究費)。

ii) 低分子化ヘパリンの抗凝固活性の評価方法およびその標準化に関する研究

低分子化ヘパリン(LMWH)は従来型のヘパリン(UFH)を化学的または酵素的に分解することにより

製造され、UFH に較べて副作用としての出血傾向の小さいことが特徴となっている。LMWHのこの特徴は血液凝固系における抗ファクター Xa および抗トロンビン活性の両面から評価されるが、本年度はその抗 Xa 活性を合成基質を用いて評価するための測定の諸条件についての検討を行った。

合成基質法によるヘパリンの抗 Xa 活性測定法は物理化学的な複合体生成反応とファクター Xa の酵素反応を組み合わせたものであり、活性測定の条件は主としてファクター Xa の基質に対する反応性という観点から検討すべきものと考えられた。

ファクター Xa および合成基質の安定性、反応温度および時間、至適 pH、血漿添加の可否、AT III の量など Xa と基質の反応性に関わる種々の要因が相互に関連していることを明らかにし、抗 Xa 活性測定条件の最適化を図った(HS 財団受託研究費)。

iii) 電気泳動法の生物化学的応用に関する研究

インスリン製剤の純度試験法を改良するための検討を引続き行っている。

iv) 血漿たん白と薬物の立体特異的結合に関する研究

ピンドロールほか3種の β -ブロッカーの各異性体はラット α_1 -酸性糖たん白(AGP)に対して固有の結合性を示すことを *in vitro* の実験より明らかにした。一方、ラット腹腔内にテルベン油を投与し、AGP を誘導させた後、各薬物を静脈内投与した時の血漿中の薬物動態を経時的に観察した。その結果、AGP への結合性の強い異性体ほど血漿中の薬物濃度は高くなることをラセミ体の光学分割定量により明らかにした。

食 品 試 験 部

部 長 伊 藤 誉 志 男

概 要

外海泰秀室長は、米国ケンタッキー州立大学でのプロスタグランジンに関する研究を終了し、平成元年8月24日帰国した。

「食品・医療品・化粧品関連タール色素標準品37品目の製造業務」が平成元年9月21日付けで、食品添加物部から当部に移管された。

「食用タール色素の製品検査」の、これまで食品添加物部で行っていた東日本地域の検体が、平成2年4月1日付けで、当部に移管され、当部では、これまで行って来た西日本地域の検体と合わせて、日本全地域の検査(800~1000検体/年)を行うことになった。

平成2年4月1日付けで、川本礼子研究補助員が新規採用された。

業務成績

1. 製品検査

食用タール色素489検体について検査した。不合格はなかったが、塩化物および硫酸塩含有量総和、食用青色1号の含量、食用赤色3号および食用黄色5号の副色素で規格限度に近いものが数検体認められた。

2. 輸入食品検査

生クリ中のフェニトロチオン、かんきつ中の防かび剤など58検体の農産物について76試験項目を検査した。

缶詰およびびん詰4検体のEDTA4試験項目、食品添加物2検体のグルコノデルタラクトン含量2試験項目、酒精飲料(ワイン)1検体の二酸化イオウ、およびソルビン酸2試験項目を実施した。

本年度の総検体数は65検体、総試験項目は84であった。

3. 標準品製造

平成元年9月21日付けで、食品添加物部から、当部に本業務が移管された時点で、担当の37品目のタール色素中、8品目(食用黄色4号および5号、食用赤色3号、102号、105号、および106号、食用青色1号および2号)が在庫0であった。そこで平成元年は食用赤色3号、食用黄色4号および5号、食用青色1号の4品目のラベル、ビンおよび箱を作製した。また平成2年にむけて、購入要望の多い食用黄色4号および食用青色1号の製造に着手した。担当の標準品製造については、予算、製造協力機関との協体制等について今後解決しなければならない多くの問題が残されている。

4. 行政試験

i) 関西地域の果実中のダミノジッド残留量の実態調査をおこなった。もも9検体(ND~0.42 ppm)、ぶどう10検体(ND~0.36 ppm)、さくらんぼ11検体(0.07~1.39 ppm)、りんご10検体(ND~0.88 ppm)となり、合計40検体中33検体からダミノジッドが検出され、これらはいずれもGC/MSで確認した(生活衛生局食品化学課、平成元年8月28日)。

ii) 玉ねぎ中のトリクロルホン(DEP)の試験法の作製(生活衛生局食品化学課、平成2年2月4日)。

iii) 各種農作物中のジスルホトンの試験法の作製(生活衛生局食品化学課、平成2年4月10日)。

5. 研修について

神戸農林規格検査所および同大阪支所技官各1名づつの研修を3ヶ月(平成元年9月25日~12月24日)、摂南大学薬学部研究員1名の研修3ヶ月(平成元年4

月1日~7月31日)、および日本油料検定協会技術者1名の研修6ヶ月(平成元年4月1日~10月21日)、京都薬科大学特別研究員1名の研修1ヶ月(平成2年1月5日~1月31日)をおこなった。

また神戸検疫所、大阪検疫所、大阪空港検疫所の初級者3名の研修2週間(平成元年9月18日~30日)、中級者3名の研修2週間(平成元年11月13日~24日)をおこなった。国際協力事業団農業利用コース7名(平成元年4月24日~28日)および輸出入食品検査技術研修生6名(平成元年11月1日~9日)の講義および実験指導を行った。大学特別研究生も含めて総数29名の食品衛生に関する研修指導を行った。

研究業績

1. 添加物などの安全性に関する研究

i) 食品中の添加物の分析法に関する研究

醤油、ソース、チョコレート等各種食品中のパバイン(天然添加物、熟成および蛋白分解剤)の定量法を作製した。N-Benzoyl-L-Arginine-p-Nitroanilide(基質)にパバインが作用することによって生成するp-Nitroanilineを電気化学検出器(ECD)付HPLCで高感度で定量する方法を作製した(厚生科学研究費補助金、生活衛生局食品化学課)。

ii) 食品添加物の一日摂取量に関する研究

昭和63年度に引き続き、地方衛研11機関と協力し、マーケットバスケット方式による調査研究を行った。

加工食品中のB群添加物(アミノ酸、ビタミン、有機酸のような天然にも存在するもの)140品目の総摂取量(天然由来のものも含む)は10003.7 mg(昭和58年~59年秋冬期)および998.6 mg(昭和63年春夏期)であった。そこで、平成元年度はB群添加物摂取量の中で天然由来のもの占める比率を予試験的に調査することにした。加工食品中の原料を詳細に調査して生鮮食品を主とした原料一覧を作製し、それらを購入し、これまでと同様にマーケットバスケット方式にしたがって群分けし、定量を行った。その結果B群添加物の天然由来の摂取量の把握ができる可能性が示唆された。そこでさらに修正を行い平成2年度に本実験を行うことにした。当部はグリセリン脂肪酸エステル、硝酸および亜硝酸を分担し、各々の加工および原料での1日摂取量 mg/日は、4.3および3.8、43.9および51.1、1.4および0.9となり、硝酸のみは、加工食品より原料の方が若干高い値となり、これは加工工程で減少するものと考えられる(食品等試験検査費、厚生省生活衛生局食品化学課)。

iii) 食品添加物の製品検査などの規格に関する試験法の作製

昭和63年度に引き続き、各種食用タール色素中の硫酸塩を測定する際用いる活性炭の吸着性、溶出性について詳細に検討した。今回調査した5社の中ではMerck社のものが最も良好な結果を示したが、それでも苦干の硫酸塩の溶出があり、これらが食用タール色素の製品検査での硫酸塩含有量の各社の自主検査結果と当部の測定値の相違の主たる原因と考えられる。現在、活性炭を用いないイオンクロマトグラフィーによる試験法について検討中である（食品等試験検査費、厚生省生活衛生局食品化学課）。

iv) 食品由来成分の含有量実態調査研究

平成3年7月1日より、食品添加物使用食品での全面表示が義務づけられることから、B群食品添加物（有機酸、ビタミン、ミネラルのような天然にも存在するもの）の各種食品中のバックグラウンド（天然由来含有量）値を明確にする必要性が高まっている。平成元年度は亜硫酸について調査した。試験法は、著者らの作製した改良ランキン装置を用いる比色定量法に従った。生鮮食品100品目中50ppm以上のものにはわけぎ、小玉ねぎがあり、10~50ppmのものとしてはにんにく、生えび、かいわれ大根等があった。加工食品113品目中、5~10ppmのものには切り干し大根、1~5ppmのものは桜えび、干ししいたけ、味付けのり、ビール等であった（食品等試験検査費、厚生省生活衛生局食品化学課）。

2. 残留農薬等の分析に関する研究

i) 農作物中の残留農薬の多成分分析法に関する研究

29種有機リン系農薬（DDVP、ダイアジノン、クロルピリホスメチル等）の各種農作物からのキャピラリーカラム FPD-GC による系統的分析法を作製した。米、小麦、大豆およびとうもろこしでは粉碎後、2倍量の水を加え、2時間放置後、アセトン抽出、アセトン留去後、10% NaCl を加え、20%ジクロロメタン含有ヘキサソールにて抽出後、濃縮し、アセトニトリル分配、シリカゲルカラム精製を行う。きゅうり、トマト、キャベツ、りんご、メロン等では最初の水の添加およびアセトニトリル分配、シリカゲルカラム精製は不要であり、20%ジクロロメタン含有ヘキサソール抽出濃縮液をそのまま試験液とすることができる。ニラ、ネギ等の含硫化物を含む野菜ではシリカゲルカラム精製が必要であった（食品等試験検査費、厚生省生活衛生局食品化学課）。

ii) ポストハーベスト農薬の農作物における保存、加工および調理での残留量の消長に関する研究

輸入ばれいしょのポストハーベスト（DDVP、クロ

ロプロファミン、クロルピリホス、ピレトリン）の保存中の各種温度、時間における消長、および、各種調理および加工による減少率を測定中である（食品等試験検査費、厚生省生活衛生局食品化学課）。

3. 輸入食品検査に関する研究

i) 輸入食品検査における高度検査機器利用に関する研究

横浜および神戸検疫所に検査課が新設されたのに伴って、上記の検疫所で GC/MS の使用方法および残留農薬分析方法の研修・指導を行なった。研修中分析した10検体の輸入小麦中、7検体からクロルピリホスメチル（0.02~0.69 ppm）、および3検体からマラチオン（0.04~0.13 ppm）が検出された。輸入大豆5検体中2検体からクロルピリホスメチル（0.05~1.03 ppm）、および1検体からフェニトロチオン（0.02 ppm）が検出された。輸入とうもろこし2検体から、いずれもクロルピリホスメチル（0.15~0.43 ppm）およびマラチオン（0.36~1.38 ppm）が検出された。また輸入かぼちゃ5検体中いずれも、輸入メロン2検体中1検体および輸入ぶどう1検体中から各々クロルピリホスメチル（0.01~0.15 ppm）、（0.01 ppm）および（0.02 ppm）が検出された。これらはいずれも GC/MS でその存在を再確認した（厚生科学研究費補助金、生活衛生局食品保健課）。

4. 食品添加物の有効性に関する研究

各種野菜を次亜塩素酸ナトリウム（NaClO）および亜塩素酸ナトリウム（NaClO₂）で洗浄することによって生成する有機塩素化合物について検討した結果、NaClO 洗浄では、R-CHClCH₂Cl₂、CH₂ClCH₂CHClCl₂、R-ClCl₂ および R-ClCl₂Cl₂Cl₂ の4種の化合物の生成することを GC/MS で確認した。またキャベツ、きゅうり、しそ、しゅんぎく、かいわれ、レタス、プチトマト、もやしでは上記4種化合物の生成量に大きな相違があることがわかった。NaClO₂ 洗浄ではこのような有機塩素化合物は全く生成しないことが明かとなった。

ゴーダ型チーズに20%ソルビン酸を浸漬して貯蔵室に放置した場合、13週間後もカビの発生は認められず、ソルビン酸4%および0.4%を皮膜剤に入れ、皮膜塗布した場合は、各々8週間および4週間有効であった。一方対照では2週間後に多くのカビが発生し、食用に供せられなくなった（食品等試験検査費、厚生省生活衛生局食品化学課）。

4. 食品中の有害作用物質に関する研究

各種発酵食品中のカルバミン酸エチル（ウレタン）の分析法の開発および実態調査を行った。これまでに

アルコール飲料等に関する分析法および実態調査報告は多くあるが、固体食品に関する分析法、およびアルコール飲料以外の食品に関する実態調査報告は少ない。そこで著者らは、試料をアセトン抽出、ガラス繊維濾紙による吸引濾過し、水を加えて希釈し、アセトンを減圧濃縮により留去後、ジクロロメタン抽出し、酸性セライトカラムで精製後減圧濃縮し、GC/MS (SIM) で定量する方法を作製した。本法を用いて各種発酵食品19品目中のウレタンを定量したところ、日本酒が最も高く 8.9~116.2 ppb、ついでしょうゆ 2.8~32.4 ppb、ワイン 9.3~20.6 ppb の順であった(対がん十カ年総合戦略)。

5. 環境汚染に関する研究

i) 陸水域における環境変異原物質の動態に関する研究

昨年までは水道水中の非極性低沸点化合物について検討してきたが、今年からは水道水中の極性物質について調査することにした。ポリエチレン多孔質中空糸膜 (EHF 膜) カートリッジを水道蛇口に接続し、毎分 2~3 l の流速で 15 m³ 通水後、アスピレーターで水分を除去し、メタノール抽出、濃縮し、Sep-pak シリカゲルカートリッジに負荷し、CH₂Cl₂、AcOEt、CHCl₃-MeOH (9:1)、CHCl₃-MeOH (1:1)、MeOH の 5 つの画分とし、各画分について目下 GC/MS (EI, CI, pos, neg) により化合物の検索・同定を行っている。また東京 2 カ所、静岡および大阪の水道水から調整した分画前のメタノール抽出物の Ames 試験による変異原性は大阪のものが最も強く、最も弱い静岡のものに比し、約 1000 倍の変異原性を示している (国立機関公害防止等試験研究費、環境庁)。

ii) 希土類元素の生体影響評価法に関する研究

先端技術の進歩に伴い、各分野での希土類元素の使用頻度は高まっているが、希土類元素の分析法および生体内での挙動に関する報告はきわめて少ない。そこで著者らはジスプロシウム (Dy)、ユーロビウム (Eu)、イッテルビウム (Yb)、イットリウム (Y) の 4 種の希土類について検討することにした。本年度は、生体内からの分析法を作製することにした。まず定量法として原子吸光分析法、蛍光分析法および ICP 発光分析法について比較した結果、感度、再現性のいずれの点でも ICP 発光分析法が優れていることがわかった。

次に、ラットの各種臓器からの抽出法について、キレート抽出法、乾式灰化法および湿式灰化法について比較した結果、いずれの臓器、いずれの希土類についても湿式灰化法が優れていることが明らかとなった。そこで、湿式灰化法により試験液を調整し、ICP 発光

分析法により定量することにし、平成 2 年度にはこれらの方法を用いて吸収、分布、排泄機構について検討することとし、目下実験中である (国立機関公害防止等試験研究費、環境庁)。

生物試験部

部長 川崎 浩之進

概要

平成元年度も前年度に引き続きインスリン製剤の国家検定・検査およびブドウ糖の国家検査ならびにエンドトキシン標準品を含む標準品製造を行った。研究業務としては主として、1) 発熱物質に関する研究、2) 農薬・食品添加物等の毒性に関する研究、を行い、さらに HS 財団からの受託研究として、3) 高分子等材料の有効性・安全性評価の指標となる試験法の開発、また、環境庁の公害防止等試験研究費による、4) 先端技術産業に係る環境汚染物質の脳、神経機能に対する影響の評価法に関する研究、等を行い、順調な進展をみた。

人事面に関しては、何ら変化はなかった。

業務成績

国家検定としてインスリン製剤 91 件、国家検査としてブドウ糖注射液 71 件、リンゲル液 1 件、インスリン製剤 7 件、特別行政試験として、輸液製剤アミパレンの発熱性物質試験 2 件を行い、全品合格であった。

他に、標準品 3 品目、計 1025 個の製造を行った。

研究業績

1. 発熱物質に関する研究

i) Limulus test に関する研究

各種の注射液について、リムルス試験の三種の方法、すなわち①ゲル化転倒法、②合成基質法、および③比濁時間分析法、を用いて比較検討を行い、反応障害が認められる注射液については、ゲル化法以外に希釈倍数が大きくとれる②あるいは③の方法のいずれかが利用可能であることを見出し、製品によってはこれら三種の方法を選択して用いることが必要であることを示唆した。

ii) 細菌性発熱物質 (ET) の構造と作用機序に関する研究

溶連菌発熱性外毒素による ET の毒性増強作用機序を明らかにすることを目的とし検討を行った。その結果、Mφ の ET に対する反応性に増強をもたらす外毒素刺激リンパ球培養上清、すなわちリンフォカインでウサギを前処理することにより、ET によって惹起される発熱反応、致死、血糖値の低下等の障害的生体

反応がそれぞれ増強され、外毒素での前処理の場合と全く同じ効果が得られた。このことから、外毒素で前処置されたウサギでの ET による著明な致死毒性の増強効果は、外毒素により誘導されるリンフォカインが、Mφ の ET に対する反応性を増強することによって引き起こされるとの推論を強く支持する結果を得た。

2. 農薬・食品添加物等の毒性に関する研究

i) 胎仔毒性の発現機構に関する生化学的研究

胎仔毒性に関連する生化学的指標を検索するために、薬物の胎仔毒性と糖蛋白合成との関連をドリコールレベルで検討した。その結果、HPLC による定量でラット胎盤および胎仔のドリコールは、いずれもイソブレンユニット19個のドリコールが多いことを明らかにした。

ii) 生体高分子と薬物との結合性と胎仔毒性との相関性に関する研究

アルコールの持続投与による胎仔毒性を検討した。妊娠ラットの胎仔の器官形成期にエタノールを投与したとき、奇形を誘発せず、死亡胚の増加などの作用も認めなかった。

3. 薬用植物およびその製剤の生物評価に関する研究

薬物の毒性に対する各種生薬およびその製剤の防御効果を明らかにするために、前年度で細菌性内毒素 (ET) の発熱に対して解熱効果が認められた大承気湯について検討した。ET 投与の前に2回 (18時間および2時間前) 投与しても、その解熱効果は1回の同時投与とほぼ同じであった。したがって漢方薬の解熱効果のスクリーニングには同時投与が良いことを明らかにした。

4. 高分子等材料の有効性・安全性評価の指標となる試験法の開発

(血液と接触する膜およびその材料の安全性評価とそれら技術の応用に関する研究)

HS 財団受託研究の第Ⅱ期第1年度の本年は、血液透析膜およびその材料等に対する適確な高性能な安全性評価法を確立することを目的に、現行の透析型人工腎の試料溶液の調製法について検討を加えた。すなわち、50℃ や 70℃ で長時間加熱したり、121℃ の高温抽出は ET や菌体のリムルスおよび発熱活性を不活化したことから、試料溶液の調製法としてそれら温度での抽出は、ET 汚染の検出を目的とする場合には適切でないこと、ET や菌体による汚染を検出するには、室温 (18℃) 1時間程度の温かな抽出が必要であること、50℃ 以上の温度で抽出すると LAL 試薬に反応する ET でない物質が遊離すること等を示した。これ

らの成績から人工腎を含む各種医療用具の安全性を評価する場合、ET 汚染を対象とする試料溶液と、材料等から溶出する化学物質の毒性を試験するための試料溶液を別々に調製することが必要であることを示唆した (HS 財団受託研究費)。

5. 先端技術産業に係る環境汚染物質による脳・神経機能に対する影響の評価法に関する研究

各種錫化合物 (テトラブチル錫, トリブチル錫, ジブチル錫, モノブチル錫, 四塩化錫) の胎仔毒性とその分布との関連性について検討した。上記化合物を雄ラットに経口投与したところ、有機錫では血中錫よりも脳内錫濃度が高かった。また無機錫では血中や脳内錫濃度は 0.1 μg/g 以下であった。このことから有機錫は中枢に蓄積される可能性があることを明らかにした。

また、塩化トリブチル錫についての脳・神経機能障害に関する行動薬理的検索として、1回投与したのちのラットの自発運動量を5日間測定したところ、投与量に対応した著しい夜間の運動量の低下が認められ、これは毒性の鋭敏な指標となり得ることを明らかにした。

さらに、各種中枢毒性物質の脳内アミン代謝に対する作用を明らかにする目的でマイクロダイアリス法を用いて検討したところ、芳香族アミノ酸脱炭酸酵素阻害剤 3-ヒドロキシベンジルヒドラジンがラット線条体のドーパミンならびにセロトニン代謝を強力に抑制することを明らかにした (国立機関公害防止等試験研究費, 環境庁)。

6. 医療用具および医用材料の毒性試験体系の確立に関する研究

発熱性物質試験法に関するガイドライン作成に関連して、ゴム手袋を材料として検討を行い、医療用具や材料における ET 汚染の検出のための試験法と、材料等由来の化学性の発熱物質が存在するか否かの確認のための試験法を分ける必要があることを明らかにした (厚生科学研究費, センター, 療品部などと共同)。

7. 生体関連反応指標の有意性判定に関する研究

化学物質の皮膚組織に対する安全性評価の動物実験の代替法の検索を目的とし、Mφ の活性酸素産生能を指標とし、典型的な活性酸素産生刺激剤 3種を用いて測定のための基礎的検討を行い、さらに Tween 80 とラウリル硫酸ナトリウム (SDS) を選び検討した。その結果、SDS では 0.0005% という極めて低濃度で影響が認められることを明らかにし、この方法が各種界面活性剤の皮膚に対する刺激性を簡便かつ鋭敏に検知し得る方法として有用であることを示した (特別研究, 厚生省)。

8. 家庭用品に用いられる化学物質の試験検査(家庭用品等試験検査費, 厚生省生活衛生局生活化学安全対策室)。

i) プチルベンジルフタレート of the ラットに対する催奇形性に関する研究

著明な影響は認められず, 試験は終了した。

ii) *p*-tert-プチルフェノールホルムアルデヒドレジン(ノボラック型) of the ラットに対する催奇形性に関する研究

著明な影響は認められず, 試験はほぼ終了に近づいている。

iii) *p*-メチルベンゼンスルホメチルジジオキシド of the ラットに対する催奇形性に関する研究

ラットに投与し, 試験を継続中である。

iv) グルタルアルデヒド of the ラットに対する催奇形性に関する研究

ラットに投与し, 試験を継続中である。

北海道薬用植物栽培試験場

場長 島山好雄

概要

平成元年7月1日付で, 香月茂樹室長が種子島薬用植物栽培試験場々長代理として転出し, 後任に柴田敏郎技官(元(株)津村順天堂栽培研究部)が新規採用となり, 着任した。

施設については, 庁舎および作業舎の屋根トタン葺換えおよび全面的再塗装により外観が一新した。

研究上は, 日中国際共同研究(HS財団受託研究費・長寿関連基礎科学研究)において山梔子・金銀花・釣藤・当帰・羌活・延胡索・木香・貝母・牡丹皮・茯苓などが研究テーマに決定したので, その中, 延胡索・木香を分担研究することになった。

業務成績

1. 種子交換

採種 179種(筑波試験場へ送付)

受入 56件 124種

分譲 25件 77種

2. 指導業務

ケシの講習会が7月26日に名寄市で開催され, 耕作者に対し講習を行った。

栽培指導については, 佐呂間町・芽室町・湧別町・網走市・多度志町・北竜町・名寄市・滝川市・栃木県那須町等の栽培組合あるいは各担当者に対して行った。

研究業務

1. センキュウ

生育初期のビニールマルチおよび8月期追肥の生育・収量に対する影響を調べたところ, マルチの効果は萌芽時より7月上旬までの茎葉乾物重, 草丈, 子イモ+ソロバン根乾物重において有意に認められたが, 7月中旬以降非マルチ区との生育差はほぼ消失し, 秋の収穫時にはその効果は認められなかった。また, 8月追肥の乾物収量増加に対する効果も見られなかった。

2. ケシ

収量および収量構成要素に対する栽植密度と施肥量の影響を調べた。モルヒネ収量はアヘン収量とモルヒネ含量の相乗効果により, 約19000株/10aの密植区が多収を示したが, 複合化成14-4-14を200kg/10a施用の多肥の効果は見られなかった。

アヘン収量は果数の効果が現れて栽植密度が高くなるにつれて増収を示し, 多肥の効果は認められなかった。

3. 野生薬用植物

生薬「細辛」が薬用植物栽培・品質評価の研究テーマにはいっているのので, まず道内に自生するオクエゾサイシンの種子の発芽特性について研究を始めた。種子は, 採種後乾燥状態で保存すると順次発芽力が低下し, 特に60日目以降になると著しく低下する。一方, これを湿潤状態に保てば9月上旬には発根に至る。しかし, 発根後低温を経験しないと胚軸に休眠が残って発芽に至らず, 8℃以下の温度に90日以上おかれるとほぼ完全に休眠が打破される。

発根温度は15℃が適し, 20℃では発根の進行が悪く, 8℃では全く発根に至らない。

カラスビシャクについては, 調製に適した収穫期決定のため球根形成の経時的変化を調べ, 特に理想型球根(仔球の着生がない完熟し残皮の剝離が容易, 扁球形ないし球形)の比率の高い時期の把握に努めたが, 調査したいずれの時期も理想型球根の比率は低く, 収穫適期を決定できなかった。

筑波薬用植物栽培試験場

場長 佐竹元吉

概要

平成2年3月31日付けで, 橋場主任研究官が退職した。

第二年次を迎えた省際研究での外国研究者はカナダのグエルフ大学のアンドリュウ・パウエル研究員(平成元年5月16日~9月12日), アメリカのコーネル大

学のクリスチン・フランケメント研究員（平成元年2月1日～平成2年4月30日）、西ドイツのザールランド大学のマルチナ・ザウエルバイン研究員（平成元年11月13日に来日）の3名である。ヒューマンサイエンス財団の国外流動研究員としてナイジェリアのイバダン大学のアジボラ・アキエミ・オラニイ研究員（平成2年3月26日来日）が植物化学の研究を行っている。

長寿関連基礎研究の国際共同研究の「日中薬用植物・生薬の品質確保および利用に関する研究」が第2期として本年度から開始された。

平成2年3月1日、2日の両日、筑波で所長、副所長、生薬部長および業務課長の出席のもとに場長会議が開催され、意義ある論議が交わされ、内山副所長より「厚生行政から見た機能的食品」についての特別講演が行われた。

海外出張は佐竹場長が「プライマリー・ヘルスケアにおける伝統薬の役割」のWHOのコンサルタントとして西サモア（平成元年5月28日～6月14日）、佐竹場長および飯田室長が日中国際共同研究の研究交流のために中国（平成2年2月19日～24日）に出張した。

業務成績

種子保管数

種子貯蔵庫（250種類 700缶）
 交換用種子数（1033種類/1990年）
 入手種子数 180件 800種類
 分譲種子数 165件 4526種類
 種子目録配付数 66ヶ国 386機関

研究業績

1. 薬用植物の栽培に関する研究

1) ミシマサイコの優良品種の育成

F4世代1年生の25系統の品質調査および選抜を行なったところ、No. 74 および No. 57 がサイコサポニン (a, c, d) 含有量が高く、生育も良く、選抜品種として、2年生の種子の採取を次年度の課題とした。サイコサポニン含量の高い系統は炭疽病に弱い傾向が見られたので、炭疽病に強い No. 6 や奈良系統との交配育種も課題である。

2) 薬用植物の生産性と品質

ミシマサイコとムラサキを多肥料区と貧栄養区で栽培したところ、ミシマサイコでは多肥料区が貧栄養区の2倍以上の生育を示したが黒土、赤土、砂土の間には差は認められなかった。ムラサキでは両区にはほとんど差が認められなかった。

3) ケシ

ケシの水耕栽培方法を確立するために、a) 定植時

期と光照度の影響を高度環境制御室で実験したところ、定植時期は1～2週目が良く、それ以後は開花異常があらわれた。高照度の区が果実が大きく、アヘン量が多い。

b) 養液の酸性度は生育、アヘン採取量とも pH 6.0 が良好であった。

2. 組織培養に関する研究

1) Ri プラスミドによる形質転換細胞の研究

a) ゲンノショウコの毛状根のタンニン成分を分析したところ、1/2 MS および B5 培地で培養したものの主成分が異なった。1/2 MS 培地では1,2,3,5,6-pentagalloylglucose, B5 培地では geraniin が主成分であった。

b) ELISA 法を用いてケジギタリスの成分含量を検討したところ、ジゴキシン値は HPLC 法のジゴキシン、デスラノイド、ラナトンドCの含量の総和と高い相関があった。モノクローナル抗体では0.2～2nMの範囲での分析が可能であり、ポリクローナル抗体でも同様な結果を得た。ケジギタリスの毛状根の5クローンの選抜を試みた。

c) センブリの毛状根から4種のキサントン類、3種のフェノール配糖体を単離し、4種は新規化合物であった。母植物から単離されていない配糖体が見いだされたことは毛状根に配糖化能があることを示唆している。

d) トロパンアルカロイドの生合成を研究するために、ズボイシフおよびヒヨスの毛状根をもちいて成分検索を行なったところ、6B-hydroxyhyoscyamine, hyoscyamine, norhyoscyamine, scopolamine, tropine が同定され、新規化合物として7B-hydroxyhyoscyamine が構造決定された。この化合物はトロパンアルカロイドの生合成上極めて興味ある化合物である。

2) 不定器官培養による物質生産

a) ダイオウの組織培養によるRG-タンニンの生産を検討したところ、*Rheum palmatum* の葉柄から誘導された不定根にRG-タンニンの構成要素の(+)catechin が同定され、RG-タンニン生産の可能性が示された。

b) ワレモコウの不定根培養物から11種類のタンニン成分を単離し、これらの経時的な含有量の変化を測定したところ、sanguin H-6 が不定根の生育量とともに培養4週目まで急激に増加した。

3. 薬用資源植物の開発研究

ペルー・アマゾンのイキトス市場の民間薬“Huaira Caspi”にAMVの逆転写酵素阻害活性が認められたので、成分の検討をおこない、3種のフェノール性化

化合物を単離した。これらの化合物は抗 HIV 試験、細胞毒性試験は陰性であったが、抗菌活性試験は compound II が陽性であった。

伊豆薬用植物栽培試験場

場長 西 孝三郎

概要

平成元年5月15日～16日、天城湯ヶ島町で開催された静岡大学、天城湯ヶ島町主催の国際シンポジウム「アジアの花食文化」に西がパネラーの一人として参加、「薬用植物としての食用花卉」と題して講演した。また西は平成元年9月24日～30日、薬用植物資源の調査および栽培地視察のため韓国へ出張した。

業務成績

1. 種子交換

採種 155種（筑波試験場へ送付）

内訳 野生植物 76種

標本植物 64種

温室植物 15種

受入 21件, 72種

分譲 20件, 97種

2. 薬用植物の自生地調査

前年度と同様伊豆半島各地の野生薬用植物の植生調査を行った。

研究業績

1. エビスグサ

本年度は系統間の比較試験を行い、収量と収量構成要素について検討した。供試した系統は古くから伊豆試験場、筑波試験場および下田市吉佐美地区で栽培されている3系統である。伊豆系統は他の2系統に比べ、主茎長、節数、主茎の太さおよび第1次分枝数のいずれも小さく、また種子も小粒で、熟期も早く早生系統であることが判明した。さらに収量構成要素としては1株莢数、1莢胚子数、稔実歩合および100粒重の4要素が考えられたので、今回供試した3系統について試算した。その結果、計算値と実験値はほぼ一致することが認められ、1株収量(=1株粒重)=1株莢数×1莢胚子数×稔実歩合×100粒重/100で表わされることが明らかとなった。

2. ケシ

伊豆における栽培法の確立を目的に昭和59年度から栽培試験を実施した。その結果は下記に示すとおりである。

①伊豆における播種の適期は11月15日前後である。

②伊豆における開花期(総花数の50%が開花した日)は5月3日～5日、あへん採取の適期は5月15日～20日である。③草たけは130～150cm、さく果の大きさは長さ8.3～10.0cm、最大直径6～7cm、④あへんの収量は年度によってかなり異なり、アール当たり150～280gであった。⑤モルヒネ含有率は10.0～13.6%であった。

3. ナガバクコ

前年度に引き続き寧夏枸杞の倍数性植物の作出を行った。種子を清水に12時間浸漬後、70%エタノール(1分間)と3%次亜塩素酸ナトリウム溶液(15分間)で滅菌した。

1988年12月10日～12日、1/2 MS 培地に播種し、1週間後、0.01～0.5%のホルヒチン添加の1/2 MS 培地に植えかえ、24、48および72時間ホルヒチン処理を行った。処理後、再度1/2 MS 培地に戻し十分発根するまでの3週間生育させた後、鹿沼土を入れた4号素焼鉢に移植した。鉢上げ後2週間はミストハウス、その後は温室内に置き、1989年2月25日、用土(堆肥+山土)入りの鉢に植えかえた。

なお、気孔の観察はスンプ法により行い、染色体の観察は根の先端部を採取し押しつぶし法により行った。結果の概要は下記のとおりである。

①ホルヒチンの濃度が高く、処理時間の長い区では鉢上げ後枯死する株が多く、48時間処理の0.5%区、72時間処理の0.1、0.3、0.5%区は全部枯死した。

②気孔の大きさは無処理区に比べいずれも処理区において大きく、1mm²当りの気孔の数は無処理区に比べ処理区で少なかった。

③低濃度の0.01%区は処理時間に関係なく全て染色体数は2n=24を示し、24時間の0.1、0.3%区、48時間の0.05、0.1、0.3%区、72時間の0.05%区では2n=24と48が確認され、同一株に2倍体と4倍体が共存するいわゆるキメラの状態が観察された。

④染色体数2n=48は72時間処理、0.03%区の10株中1株だけであった。

⑤葉の厚さは2倍体株に比べ、キメラ株、4倍体株で厚く、また2倍体株では葉肉部より主脈部が厚いのに対し、4倍体株では主脈部より葉肉部で厚く、キメラ株では両部分ともほぼ同程度の厚さであった。

和歌山薬用植物栽培試験場

場長 野口 衛

概要

当場は、平成元年に創立50周年を迎え、11月21日、

川辺町サイクリングターミナルにおいて、創立50周年記念祝賀会を開催した。

御出席は、第2代場長木下孝三氏、第4代場長堀越司氏、旧職員小峰常行氏、近畿麻薬取締官事務所長、大阪支所長、筑波試験場長の他、県業務課長、業事指導所長、御坊保健所長等関係者、川辺町長、御坊市長はじめ近隣市町村長、薬草研究会その他地元関係者等35名で、和やかな雰囲気の内には進行し、小峰常行氏、木下哲央氏に感謝状を贈呈した。また、会終了後、大部分の方々とともに席を試験場に移し、親しく交流を深めることができた。さらに、記念文集を作成、歴代場長、旧職員、現職員の方々に文章をお願いし、場の創立以来の歴史を記録に留めることができた。

このような機会を与えられ、また、会への御挨拶文を頂いた谷村顕雄所長ならびに所長代理として出席し挨拶文を代読された松原義泰業務課長に心より感謝するとともに、この間、色々の助言やはげましの言葉を頂いた平山重勝初代場長、大野忠郎第3代場長はじめ旧職員ならびに同道族の方々、会場の設営その他実務作業の御協力を頂いた川辺町職員の皆様に心より感謝致します。

施設設備面では、既設 TLC-デンストグラフのフロッピーディスクを追加購入し、また、大阪支所よりガスクロマトグラフを譲り受け、栽培法と調製加工法の成分含量に及ぼす影響の解析という当場の研究課題のさらなる推進が可能になった。また、顕微鏡切片作成用マイクロームを導入し、薬用植物の栽培条件の組織形態学的解析に着手した。

人事面では、平成元年3月31日付で園場作業員本下哲央氏が退官された。

業務成績

1. 種子交換

採種	136件
受入	5件
分譲	10件 5種

2. 指導業務

和歌山県は、生薬生産県として生まれ変わるため、業務課に生薬資源開発推進検討委員会を発足させ、県下9保健所で薬草栽培希望農家を募り、組織作りをはじめた。野口 衛は同会座長として栽培技術指導その他の相談に応じている。

団体見学、外部講習は20回、参加者は延べ500名、薬草問い合わせ件数は83件で、その内訳は、種苗依頼16、転作品目照会ならびに栽培法24、薬効問合せ14、植物鑑定12、調製加工法17件となっている。

研究業績

1. キキョウの摘花、摘蕾の根の収量増大に及ぼす効果の検討

試験用圃場(砂質畑土)に堆肥、IB化成肥料、200 kg, 6 kg/a を施し、白花キキョウの種子を播種、株間20 cm 間に間引き、夏期に花蕾を摘み、冬に堀上げ、草丈、地上部重、根頭径、根太、根長、水洗生根重を測定した。

キキョウ根の調製には、生根の表皮を高圧水を吹き付けた後金属製タワシで擦り取り、細根と側根の大部分を除き、水洗、温風乾燥し、重量を測定した。

その結果、草丈、根頭径、根太、根重は、いずれも、摘花>摘蕾>対照となったが、地上部重は、枯れた後に測定し、しかも一部摘花あるいは摘蕾しているため、一定の傾向は見られなかった。同様に、摘花の根長への影響は認められなかった。砂質畑土では、粘土質畑土に比べて根長は長い根重はやや小さくなり、根頭径、根太、根長は根重と密接な関係をもつが、必ずしも相関しなかった。

2. 土壌通気のミシマサイコの成長に及ぼす影響について

5種の土壌、川砂、山砂、砂質畑土、粘土質畑土、山土に土壌通気を行い、ミシマサイコを栽培し、根重ならびにサポニン含量を検討した。この間、雨が降らず、地面が乾燥している時は毎日正午に一枠ごとに水5Lを散水した。また、各区ごとの開花本数を計測、秋の収穫時に草丈、根長、地上部重、根重を測定、HPLCにてそれぞれのサポニン含量を測定、別に土壌硬度、土壌三相を測定し、植物成長の条件を考察した。

その結果、川砂、山砂区では、主根とともに側根がよく発達し、他の区に比べて重量も大きかったが、粘土質畑土、山土では、根の重量はやや小さく、また、側根は少なく、細根、ひげ根がよく成長した。各土壌区とも、通気、散水通気により開花株数が急激に増加し、また、草丈と地上部重、根長と根重、地上部重と根重はよく相関した。砂質土壌では散水により地上部重、根重とも増大するが、通気の効果はあまり認められない。これに対し粘土質畑土、山土では散水の効果はあまり認められず、通気と散水を施した場合に地上部重、根重は最大となった。サポニン含量は、砂質畑土を除いて通気区で増大したが、通気散水区では、川砂、山土、粘土質畑土で低下した。また、サイコサポニンA含量とサイコサポニンD含量の間には密接な関係が認められるが、根重とサポニン含量の間には、明確な関係は認められなかった。

3. キジツの調製法と成分含量の関係について

キジツの有効成分の一つと考えられている synephr-

rine (S) の HPLC による分析法を確立し、各種自製キジツを分析したところ、八朔は従来キジツとして用いられてきた甘夏、夏橙等と大きな差は認められなかった。古来、キジツとキコクは同一原料を大きさで分類してきたといわれているが、Sは先のフラボノイドの場合と同様に直径が増大すると含量が減少することが明らかとなった。

4. 半夏厚朴湯エキス製剤の品質評価法について

市販の煎剤調製装置2種ならびに土瓶を用いて調製した自家煎剤、市販エキス製剤12種について、味覚試験、各種生薬の指標成分の HPLC による分析、重量偏差試験、ならびに粒度の試験を行った。

その結果、自家煎剤の HPLC パターンは調製法により異なり、味は、還流装置を付けたものでやや匂いと辛味が強く、また土瓶抽出液は味は緩やかで、6-gingerol(Gi) の含量も低い値を示した。自家煎剤、エキス製剤の匂い、苦味、辛味の得点順位はよく対応した。エキス製剤の Gi, guanosine (Gu), rosmarinic acid (R) 含量は、ともに自家煎剤に比べると全体に低めで、移行率も自家煎剤に比べて低い値を示した。エキス製剤の味覚試験、重量偏差試験の成績とその R 含量の間に密接な相関がみられ、また、Gu, Gi に比べ、R 含量はメーカーによって著しく違いが見られた。ただし、Gu は半夏以外の生薬にも含まれているため、指標物質として用いられないことが明らかとなった。

5. ウコンのクルクミンの分析

種子島栽培試験場で栽培された種子島 (T) ならびにインドネシア産ウコン (I) の栽培法の成分含量に及ぼす影響を検討するため、TLC を用いる curcuminoids の分別定量法を確立し、あわせて、共存成分をまとめた非分離分析法と比較検討した。栽培法、調製加工法の詳細は種子島試験場の記録に譲る。

まず、生薬ウコン細切を EtOH 5 ml で抽出、薄層板にスポットし、CHCl₃:EtOH:AcOH=94.5:5:0.5 で展開後、TLC-DM を用い定量した。また curcuminoids の総量測定には、(CH₃)₂CO:n-hexane=1:1 で上記同様に分離、定量し、別に試料溶液を EtOH で希釈し、吸光度を測定、あわせて、curcuminoids の光分解の検討を行った。

実験結果

a) Curcumin 含量について

(T), (I) の curcumin 含量はそれぞれ0.04~0.4%, 0.4~2.1%で、両者には大きな含量差があった。また、(T)は概ね主根より分枝根の方が含量が高く、(I)は主根の方が分枝根より含量は高かった。

灌水処理により根重は増加するが、含量は変化せず、

マルチ処理は成長には効果がなく、(T)ではむしろ含量は低下した。さらに、50%遮光すると根重は減少、含量は低下し、75%遮光ではその傾向はより強いものとなった。

堆きゅう肥を増加すると、いずれも含量は低下し、根重は (I) で減少した。また、(T), (I) ともに根重の高い方が curcumin 含量も高いということが分かった。

植え付け深度については、(I)では種芋大小ともに浅い方が含量は高いが、逆に (T)では種芋大で深い方が含量がやや高い傾向が認められた。

栽植密度と根重との関係は (T), (I) ともに株間距離をとった方が根重は大きく、また、含量との関係は (T)で 20≒30>40 cm, (I)では 20>30≒40 cm となり、密植した方が含量は高くなるように思われる。

b) Curcuminoids のパターンについて

EtOH 抽出物の TLC パターンは原点より p, p'-dihydroxy-dicinnamoyl methane (a), p-hydroxy-cinnamoyl feruloyl methane (b), curcumin (c) の順となり、それぞれ主根と分枝根の含量に違いがあるが、(T)は全体として curcuminoids 含量は分枝根の方が高い値を示し、また (I)では curcuminoids 含量は主根で高い値となった。

なお、植物を遮光すると、(T)では (c) は減少するが、(a) は変化なく (b) が増加する。また、(I)ではいずれの成分も減少するが、特に (a), (b) でその割合は (c) より大きい。また、遮光による含量の低下は分枝根の方が小さいため、含量は主根より高めの値となった。

c) 簡易定量法の検討

非分離定量と分別定量時の curcuminoids の和の相関は r=0.997, 分光光度計で直接測定したものととの相関は r=0.997 で、分光光度計ではカロチノイド等に起因すると思われる夾雑物により約20%高めの値になるもの、かなり高い直線性を示した。このことから、ウコン中の curcumin 定量は curcuminoids 個々の値や比の変動に着目しない場合には係数を用いることにより、分光光度計にて簡易測定が可能であると結論される。

6. 薬草情報活動

一般からの薬草問い合わせを記録して2年目に入ったが、件数、内容とも昨年とほぼ同様で、国民の薬草情報に対する関心と期待は非常に大きく、商業主義的な情報の氾濫から国民を守るためには、正しい情報の提供がとくに重要であること、薬草や民間療法を国民の健康増進に役立てるためには、これらの効能を客観的

に評価する研究とそれを支えるシステムの確立が重要であることを痛感した。

種子島薬用植物栽培試験場

場長代理 香 月 茂 樹

概 要

平成元年3月31日付で葵一八場長が退職され、場長事務取扱に谷村顕雄所長が就任された。7月1日付で香月茂樹技官（前北海道薬用植物栽培試験場栽培管理室長）が場長代理として着任した。

全国的なふるさと創生・まち興しの計画、転換作物の模索・探求、より付加価値を高められる作物の探求と言った状況下であり、それらに対する見学・相談などが著しかった。特に種子島においてはサトウキビ・サツマイモの2種が農業の基幹作物となっており、これらの作物より他の作物へ、またこれらと複合した作物への転換ということ、各方面からの問い合わせなども多かった。

気象面においては、6月24日に台風6号、7月27日～28日未明に台風11号（瞬間最大風速 31 m/s）、7月31日に台風12号（同風速 31 m/s）、9月19日に台風22号（同風速 27 m/s）の接近・通過といった例年にない度重なる来襲を受けた。建物への直接の被害はなかったが、日照量試験の寒冷紗簡易ハウス2棟は、台風11号により倒壊した。なお、樹木への被害は事前に整枝を行っていたため倒伏はほとんどなかったものの、枝の折損量は多く、処理した量だけでも50トン余にも上った。それでもこの程度に被害が済んだのも、本場開設以来の防風対策が功を奏したためと考えられる。降雨量は思いの外少なく（台風11号時に 195 mm。他は少量。）、被害は出ていない。

遺伝子資源としての有用植物を積極的に導入し、極力手を掛けず保存することに重点を置くべく、本場防風林の樹種の更新・林内への植栽の可能性、また圃場間の防風垣の樹種の変更の可能性等について検討を始め、一部については育苗に着手した。傾斜面などの土壌保全を図る目的で、地被植物の植栽にも着手した。

業務成績

1. 種子交換

採種 236 種（筑波試験場へ送付）

内訳 野生種 159種

栽培種 77種

受入 40件 248種

分譲 20件 51種

2. 指導業務

鹿児島県農蚕園芸課主催の特用作物研修会が10月に鹿児島市で開催され、県内市町村の農政課担当者および農協関係者に対し講習を行った。

3. 薬用植物の自生調査

場内および種子島に自生する植物の調査を行い、薬用植物などについてのチェックをしている。

研究業績

1. ウコンの栽培に関する研究

1) 堆きゅう肥施用量試験

化学肥料を基本とし、それに堆きゅう肥の施用量を変えた場合、種子島産は 600 kg 施用において主根茎（大根茎）が、インドネシア産は 400 kg 施用においては総根茎・主根茎（大根茎）がそれぞれ多収であった。

2) 灌水量試験

例年になく、夏季における降水量があったため、各試験場区間での差異ははっきりしなかった。しかし、種子島産の1日9mm区においては主根茎（大根茎）・分岐根茎（小根茎）ともに多収であった。

一株中での主根茎（大根茎）の占有比率は種子島産よりインドネシア産の方が大きかった。しかし、各灌水量区間の差異は認められなかった。

3) 日照量制限下での施肥量の差異の影響

台風11号（7月27日～28日）により、寒冷紗簡易ハウスは倒壊し撤去した。その結果は次の通りである。

50%遮光では裸地との差異はないが、70%遮光では根茎収量は著しく減少した。主根茎（大根茎）・分岐根茎（小根茎）とも標肥+400・600 kg では裸地区・50%遮光区との間には有意差は認められないが、70%遮光区では根茎重は著減した。

以上の結果より、50%程度の遮光ならば、適正な施肥管理により裸地区との遜色のない生産が可能であると考えられる。

2. クミスクチンの栽培に関する研究

1) 施肥量試験

1回目調査（8月22日）では、草丈・総分枝数・1株当たりの収量とも3要素+有機質肥料添加区が最良であった。

2回目調査（11月15日）では総分枝数・1株当たりの収量（生）は、3要素+有機質肥料添加区で減少している。

1株当たりの収量（乾燥）では、3要素+有機質肥料添加区が多収であった。

特別研究報告

Report of Collaborative Study

乱用薬物基礎研究報告
乱用薬物に関する実験的研究

(昭和62年～平成元年)

世話人 毒性部 黒川 雄二

最近薬物乱用は、世界的な広がりをみせ特に青少年における乱用が重大な社会的、健康上の問題となってきた。その乱用の範囲も医療上ほとんど利用されることのない大麻、コカイン、ヘロインなどから、医療上重要な医薬品であるモルヒネ、バルビタール類、ベンゾジアセピン誘導体などにいたる広い範囲に及んでいる。このような状況を踏まえ、我が国でも昭和61年に官民一体となった薬物乱用に関する防止活動の実施が閣議決定された。当所でもその活動の一環として薬理学的見地から動物実験を主体とした基礎的研究を企画し、毒性部、薬品部、有機化学部および機能生化学部の各部の協力の下に昭和62年度から試験研究を行っており、この度第1次3年計画が終了したので報告する。

毒性部では薬物の精神依存性を検索する上で有用な試験法とされているサルを用いた静脈内薬物自己投与試験法について、我が国唯一の本試験実施機関である(財)実験動物中央研究所附属前臨床医学研究所(柳田知司所長)のご指導のもとに先ず本実験に対する基礎的検討を行なった。その後、近年乱用事例の報告が相次いでなされている市販の鎮咳去痰剤の配合成分であるメチルエフェドリンとカフェインの相互作用による強化効果について検討した。

薬品部では、大麻が煙草と混ぜて喫煙乱用されている点と大麻の主成分であるテトラヒドロカンナビノール(THC)が生体中のセロトニンを変動させる点に着目し、ニコチンおよびTHCの単独または併用単回および連続投与による血中および尿中のセロトニン関連化合物に及ぼす影響について、ラットおよびウサギを用いて検討した。

有機化学部では、依存性発現機序の解明や、より依

存性の少ない薬物を開発するうえで重要な薬物とオピオイドレセプターの関係に着目し、オピオイドレセプターと特異的な親和性を有する化合物の合成を目的に、モルヒネ誘導体の合成を行った。

機能生化学部では、モルヒネについて、遊離肝細胞を用いての代謝および毒性の検討、モノクローナル抗体の調製とその性質およびマウス脳モルヒネ受容体のリン酸化反応についての研究を行った。

以上、各担当部が行った試験研究の概要について述べたが、その具体的内容については以下に記す各々の報告書を参照されたい。

なお本研究計画は平成2年度から第2次3年計画の下に継続する予定となっている。

サルを用いた薬物静脈内自己投与試験による鎮咳去痰剤の強化効果の検討

毒性部

関田清司, 松本清司, 落合敏秋
高木篤也, 降矢 強, 黒川雄二
戸部満寿夫

〔目的〕

薬物の被乱用性の予測に最も重要な薬物側の要因は精神依存性の強さといわれている。言語を持たない動物を用いて薬物の精神依存性を検索するには、薬物を自発的に摂取できる条件下に動物をおき、薬物が動物の薬物探索および摂取行動を強化するか否かを検索する方法が一般的にとられている。特にサルによる静脈内薬物自己投与試験は有用とされている。しかし、サルを用いた静脈内薬物自己投与試験を実施できる国立機関はなく、その試験実施が従来より強く望まれていた。そこで、我が国唯一のサルでの薬物自己投与試験実施機関である(財)実験動物中央研究所附属前臨床医学研究所(柳田知司所長)のご指導のもとに当所でも

本試験ができるような基礎を整えることにした。さらに、本試験法を使用し、近年乱用事例の報告が相次いでなされている市販の鎮咳痰剤の配合成分であるメチルエフェドリンとカフェインの相互作用による強化効果について検討した。

〔実験方法および結果〕

1. 薬物自己投与装置

実験動物中央研究所の装置と基本的に同じ設計の装置を作製した。装置は給餌、給水の設備のほか、薬物摂取可能状態を合図する標示ランプおよび薬物を摂取するために押すレバースイッチを備えた専用ケージ、サルに静脈内カテーテルを留置した状態で係留しておくための金属性ハーネスおよび自在アーム、ケージの裏に設置してある自動注入装置、レバースイッチ、標示ランプおよび自動注入装置を実験条件によって制御するための制御装置および摂取回数を記録する記録装置からなる。

2. 静脈内カテーテル埋め込み手術

柳田の方法に従い、全身麻酔下で右頸部を切開し、右内頸静脈を露出させカテーテルを挿入し、カテーテルの先端が静脈洞もしくは右心房周辺に達する位置で周囲組織に固定した。次いで背部より皮下に有孔ゾンデを挿入し、頸静脈部まで押し進め、先端の孔にカテーテルの遊離端を留め、これを引き戻し、頸部の皮膚を縫合して手術を終了した。手術後はハーネスを装着し、カテーテルを自動注入装置のチューブに連結するとともにアームでケージに係留した。カテーテルが血栓による詰まりや、切断事故により使用できなくなった場合は他の静脈（内頸静脈または大腿静脈）へ再手術を行い実験を続けた。

3. 薬物弁別学習形成サルの作成

静脈内にカテーテルを留置した4頭のアカゲザルをレバーを押せば一定用量のコカインが注入されるような条件におき、レバー押しと薬物注入の関連性を学習させた。次に一日の薬物摂取可能時間を3時間に限定し、この時間を標示ランプで知らせ、コカインと生理食塩液を3日間づつ交互に摂取させる薬物弁別訓練を繰り返し行った。サルは次第にコカインと生理食塩液の違いを作用の有無から区別するようになり、コカイン投与日には頻りにレバーを押し薬物を摂取し、生理食塩液の日にはコカインの摂取回数の15%前後となった（薬物弁別学習の形成）。

4. メチルエフェドリンとカフェインの相互作用による強化効果

既述のようにして薬物弁別学習が形成された4頭の雄アカゲザルを用いた。実験は強化標準薬としてコカ

イン（60 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{inj.}$ ）を3日間、次に生理食塩液を3日間、次に被験薬として *dl*-メチルエフェドリン（ME）と無水カフェイン（AC）の混合液を3日間毎日3時間ずつ摂取する行程からなり、この行程を被験薬の各用量について行った。強化効果はコカインおよび生理食塩液の摂取回数と被験薬の摂取回数の比較により検討した。被験薬はMEの単位用量を480、120および30（ $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{inj.}$ ）としてこれにACを市販の薬剤と同じ割合（1:1.05）で混合した3液について検討した。ACの単位用量は504、126、31.5（ $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{inj.}$ ）に相当した。被験薬では生理食塩液の摂取頻度より高く、しかも単位用量に反比例する摂取頻度の増加も認められ、強化効果が認められた。被験薬が強い強化効果を示す単位用量はME 480とAC 504およびME 120とAC 126（ $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{inj.}$ ）の用量であった。被験薬のME 480とAC 504（ $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{inj.}$ ）の過剰摂取では嘔吐がみられ、その後の摂取日には摂取頻度が減少する傾向が認められた。このことは被験薬の過剰摂取は嫌悪効果として作用する可能性のあることを示唆する。しかし1頭では、嘔吐を認めた翌日も高い摂取行動を示し過剰摂取により死亡するほどの強化効果を示した。被験薬に認められた強い強化効果がMEとACの相互作用によるものか否かについては、今後MEおよびACの各々について強化効果の検討を待たなければならないが、市販の感冒薬や鎮咳去痰剤の配合成分として含有されている薬物で強い強化効果が認められたことはこの種の薬物乱用を考える上で重要なことと考えるべきである。

〔結語〕

実験動物中央研究所のご協力により国立機関として初めてサルを用いた静脈内自己投与試験による薬物の精神依存性の検討が出来るようになった。また、本試験法を利用した鎮咳去痰剤の配合成分の一つであるメチルエフェドリンとカフェインの混合液について強化効果を検討したところ強い強化効果が認められた。

たばこ喫煙および大麻喫煙による精神依存の化学的研究—Nicotine および THC の慢性投与による血中および尿中 5HT 関連化合物の変動に及ぼす影響—
薬品部

中原雄二、武田 寧

〔目的〕

たばこおよび大麻はいずれも喫煙により摂取され、連用すると耐性や精神的依存を生じることが知られている。また、大麻中毒者に好まれる大麻樹脂（ハッシュ）は、煙草と混ぜて喫煙乱用されるので、たばこ

の成分と大麻成分が同時に体内に吸収され、急性的にも慢性的にも単独使用とは異なる影響を及ぼすことも考えられる。本研究の目的は、たばこおよび大麻による依存や中毒の程度を知るために、それらの単独または併用の慢性使用による生体成分の変動を調べることにある。

精神的依存状態は、連用によって生じた生体(特に脳内)中の神経伝達物質の濃度レベルの変化と密接な関係があることが数多く報告されている。それゆえ、指標となる適当な化学物質を測定することによって、依存状態を推定出来ることが示唆される。

大麻の主成分のテトラヒドロカンナビノール(THC)の投与による生体中のセロトニン(5HT)に及ぼす影響については、興味深い結果が報告されている。マウスやラットに THC を投与すると、脳内の 5HT レベルは変動し、おおむね増加するが、減少することもある。5HT の代謝前駆物質の 5-ヒドロキシトリプトファン(5HTP) 誘因作用である wet dog shaking は、THC をイスに投与するとその作用が増強される。さらに、5HT 拮抗剤の cyprohepatidine をラットに投与すると、THC 作用の一つ(血中 prolactin 遊離に対する抑制作用)を消失させる。

以上の事実に着目し、動物に nicotine および THC の単独または併用による投与を行い、血中および尿中の 5HT 関連化合物の変動を調べ、連続投与による影響を見た。

〔研究方法〕

1. 動物、薬物および投与方法

血液試料の分析には、Japanese white 系雄性ウサギ(体重 2~2.2 kg)を、尿試料の分析には、Wistar 系雄性ラット(体重 200~230 g)を用いた。Nicotine, THC および両者混合は Emulphor-EL620 (GAF Corp., NY)-エタノール-生理食塩水(5:5:90)に溶解し、ウサギには静脈注射、ラットには腹腔内注射により投与した。

2. ウサギ plasma 中の 5HT 関連化合物に及ぼす急性効果の実験

ウサギにそれぞれ、1) コントロールとして Emulphor-EL620-エタノール-生理食塩水(5:5:90)、2) nicotine 溶液(0.2 mg/ml)、3) THC 溶液(4 mg/ml)、4) THC-nicotine 溶液(2~0.1 mg/ml)、5) THC-nicotine (4~0.2 mg/ml) 各 1 ml を耳から静脈内注射をし、投与直前(Oh)、0.5 h、1 h、2 h、4 h、6 h、8 h 後に耳から約 5 ml 採血した。採血後は直ちにペノゼクト試験官(真空、ヘパリン入り)に注入し、3000 rpm で10分間遠心した。上清の plasma を採取し、抽

出操作まで -25°C で冷凍保存した(以下同じ)。

3. ウサギ plasma 中の 5HT 関連化合物に及ぼす慢性効果の実験

1) 1日2回の投与による、投与1時間後の 5HT レベル

ウサギに1~5日目まで THC-nicotine (4~0.2 mg/ml) を、6~10日目まで THC-nicotine (8~0.4 mg) 各 1 ml を毎日午前9時と午後3時に静脈内注射し、午後の投与1時間後の血液を採取して、上記と同様の処置により plasma を得た。

2) 1日1回の投与による投与24時間後の 5HT レベル

ウサギに1~7日目(5, 6を除く)まで THC-nicotine(4~0.2 mg) を8~12日目まで8~0.4 mg を毎日午前9時に静脈注射し、24時間後(投与直前)に血液を採取して、上記と同様の処置により plasma を得た。

4. ラット尿中の 5HIAA 排泄に及ぼす慢性効果の実験

ラットに、それぞれ、1) コントロールとして Emulphor-EL620-エタノール-生理食塩水(5:5:90)、2) nicotine 溶液(0.2 mg/ml)、3) THC 溶液(4 mg/ml)、4) THC-nicotine 溶液(4~0.2 mg/ml) 各 0.2 ml を毎日午前10時と午後6時に腹腔内注射し、午後6時から翌日の午前10時までの尿を毎日採取した。

5. 血中および尿中の 5HT 関連化合物の抽出と定量

凍結 plasma 試料または尿試料を室温で解凍し、plasma 試料は 0.5 ml、尿試料は 1 ml を取り、plasma 試料の場合、内部標準として 100 nmol/ml の HVA 水溶液 0.1 ml および 0.5 M リン酸緩衝液(pH 5) を 2.5 ml 加え、尿試料の場合、内部標準として 100 nmol/ml の N-acetyl 5HT 水溶液 0.1 ml および 0.5 M リン酸緩衝液(pH 5) を 2 ml 加え、ODS-シリカ(70~230 メッシュ、600 mg) をバックした Excolumn(協和精密製、25×7.5 mm I.D.) により、自動抽出を行なった。抽出液は減圧留去後、0.2N 酢酸 0.5 ml を加えて再溶解し、その 10 μl を高速液体クロマトグラフ装置に注入した。5HT 関連化合物の同時定量は電気化学検出・高速液体クロマトグラフィーで行なった。

〔結果〕

1. Nicotine(0.2 mg) 投与した場合、投与後 0.5~8 時間、ウサギ plasma 中の 5HT は減少し、最低初期値の 1/12 になった。

2. THC(4 mg) 投与した場合、投与後 0.5~8 時

間、ウサギ plasma 中の 5HT は増加し、最大初期値の 7 倍に達した。

3. THC-nicotine (2~0.1 mg) 投与では、投与後 0.5~8 時間、ウサギ plasma 中の 5HT レベルは低下したが、THC-nicotine (4~0.2 mg) 投与では、逆に 5HT レベルは増加した。

4. THC-nicotine (4~0.2 mg) を 1 日に 2 回連続投与すると、投与 1 時間後の 5HT レベルは上昇するが、この現象は、7 日前後で耐性が発現した。

5. THC-nicotine (4~0.2 mg) を 1 日に 1 回連続投与すると、投与 24 時間後の 5HT レベルは、control 値に比べ減少し、TRP レベルは増加した。投与開始 8 日目から投与量を 2 倍に増加すると、TRP レベルも初期値以下に低下した。投与中止後も、その後 1 週間にわたり同じ状態が続いた。

6. nicotine (0.04 mg), THC (0.8 mg) および THC-nicotine (0.8~0.04 mg) をラットに 1 日 2 回連続投与すると、投与後 16 時間の尿の 5HIAA レベルは、数日後から control 値に比べ顕著に低下し、12 日後には、初期値の 1/28 に減少した。投与中止後も、その後 8 日間も 5HIAA は低レベルを維持した。

〔考察〕

Nicotine および THC のウサギ plasma 中の 5HT レベルに及ぼす急性効果は、前者はそれを減少させ、後者はそれを増加させた。この相反する作用を持つ両者を併用したところ、dose-dependent な二様性を示した。すなわち、THC-nicotine (2~0.1 mg/animal) では、5HT レベルを最小 1/10 まで減少させたが、THC-nicotine (4~0.2 mg/animal) では、反対に 5HT を初期値の最大 40 倍まで増加させた。また、ウサギ plasma 中のトリプトファン代謝物に及ぼす影響は、nicotine は TRP を減少させ、5HTP および 5HIAA を増加させた。一方、THC 単独ではトリプトファン代謝に有意の変化を与えないが、THC と nicotine の併用により、5HTP および 5HIAA をやや減少させ、TRP レベルが増加し、投与後 48 時間も高レベルを維持した。

THC-nicotine 併用のウサギ plasma 中の 5HT および TRP レベルに及ぼす慢性効果は、投与 1 時間後の 5HT レベルは、1 日目初期値に比べ大幅に増加するが、次第に増加幅は減少していった。投与 24 時間後の 5HT レベルは初期値より日に日に低くなり、投与中止後も 2 日間はさらに低下した後、次第に初期値レベルに回復していった。逆に、TRP は初期値よりも増加したが、THC-nicotine の投与濃度を 2 倍にすると、両者とも著しいレベルの低下が見られた。投与中

止後も、TRP のレベルは 7 日間も非常に低レベルを続けた。5HT/TRP 比の対数をとると投与開始の前半はマイナスの値を取るが、連用が進行した後半になるとプラスの値に転換する現象を見出した。これは、大麻の連用の度合いをチェックするための指標として有望であると考えられる。

Nicotine および THC の連続投与によるラット尿中の 5HIAA 排泄に及ぼす影響は、いずれの場合も最初の 2~3 日は初期値より増加するが、4~5 日目からは減少していき、最小 1/10 以下になる。投与を中止した 13 日以後も、低レベルを維持し、7~8 日間続いた。THC と nicotine 併用では、投与した期間は、同じく 5HIAA の減少を示したが、投与を中止すると、数日間はレベルの急激な上昇を示した。ウサギとラットの実験結果を同一に論じることは危険性があるが、THC および nicotine を投与すると、血中 5HT レベルは急性的（数時間）には一時増加するが、慢性投与により、血中 5HT および TRP はいずれも次第に減少し、その結果、尿中 5HIAA (TRP->5HTP->5HT->5HIAA と進行する代謝最終産物) のレベルも低下すると考えられる。

このように、THC および nicotine は、動物の血中や尿中の 5HT や 5HIAA の正常値を変化させること、特に、慢性的に使用した場合、耐性が現われたり、投与を中止しても、すぐには元の正常値に戻らないこと等が明らかになった。

モルヒネ誘導体の合成研究

有機化学部

宮田直樹, 末吉祥子

〔目的〕

精神依存性を有する薬物について、薬物とレセプターとの相互作用を分子レベルで解析することは、依存性発現機序の解明や、より依存性の少ない新薬を開発するための重要な研究課題の一つである。本研究では、麻薬性を有しながら現在も鎮痛薬として臨床に多用されているモルヒネ類を研究対象化合物として選んだ。既に筆者らは、モルヒネの新規 7, 8 位エポキシ誘導体を立体特異的に合成し、モルモット回腸標本を用いた *in vitro* 実験およびマウス、ラットを用いた *in vivo* 薬理試験によって、いずれの場合も鎮痛効果は母化合物に比して約 2~3 倍に増強すること、鎮痛効果の耐性はエポキシ誘導体の方がはるかに形成しにくいこと、依存性もエポキシ誘導体は極めて弱くなること、モルヒネのミューレセプターに対する選択的なアフィニティラベル化剤としてオピエートレセプター研

究に有用な化合物であることなどを報告している。

今回、オピオイドレセプターと特異的な親和性を有する化合物の合成を目的とし、モルヒネのC環に化学的反応性の高い官能基を導入した誘導体の合成を検討した。

〔実験・結果〕

官能基の導入部位は、モルヒネの活性に影響を与えることが知られているC環の6位とし、活性官能基としてN-ニトロ基を選び、コデインを原料として6位N-ニトロカーバメート誘導体の合成を行った。

コデインの塩化メチレン溶液にエチルイソシアネートあるいはベンジルイソシアネートを室温で反応させ、前者より融点104~106度の白色結晶(収率65%)、また後者より融点154~156度の白色粉末(収率62~69%)を得た。これらがコデインの6位カーバメート誘導体であることは、赤外吸収スペクトル、核磁気共鳴スペクトルおよび質量分析スペクトル等により決定した。

次に、これらのカーバメートをギ酸中亜硝酸ナトリウムでN-ニトロ化し、N-ニトロソエチルカーバメート誘導体およびN-ニトロソベンジルカーバメート誘導体を収率約75%で得た。N-ニトロソベンジルカーバメート誘導体は、分解点95度の結晶であり、構造は赤外吸収スペクトル、核磁気共鳴スペクトル等により決定した。

〔考察〕

一般に、アルキル置換N-ニトロソ尿素類は脂溶性が高く、すなわち極性が低く、血液-脳関門を通過しやすいことが知られている。今回新規に合成したカーバメート誘導体は、シリカゲルカラム(Nucleosil 50-5, 内径 6.0 mm×長さ 10.0 cm)を用いた高速液体クロマトグラフィ(移動相溶媒=ヘキサン:塩化メチレン:メタノール:トリエチルアミン=500:500:25:1, 流量 2 ml/分)により、それぞれ保持時間5.53分と4.59分を示し、原料のコデイン(保持時間:9.24分)よりも極性が低下していることが示された。また、コデインのN-ニトロソベンジルカーバメート誘導体では、保持時間が3.74分であり、さらに極性が低いことから、これらのコデイン誘導体は、血液-脳関門を通過しやすいことが予測される。一方、これらの化合物は、置換基として導入したN-ニトロソ基の分解により活性中間体が生成し、これがオピオイドレセプター部位を不可逆的に化学修飾することが予測される。今後さらに一連のN-ニトロソ誘導体を合成するとともに、これらの薬理試験、あるいは、レセプターとの反応性を検討する必要がある。

モルヒネの代謝および毒性、モルヒネに対するモノクローナル抗体の調製およびその性質およびモルヒネ受容体のリン酸化反応について

機能生化学部

永松国助, 鈴木和博, 手島玲子

池淵秀治, 沢田純一, 寺尾允男

薬理部

川西 徹, 大野泰雄

1. 遊離肝細胞を用いたモルヒネの代謝ならびに毒性について

ラットから調製した遊離肝細胞を用いてモルヒネの代謝ならびに毒性について検討した。

モルヒネの代謝物としてモルヒネのグルクロナイド抱合体、モルヒノン-グルタチオン抱合体、ノルモルヒネ、およびモルヒノンを検出した。

遊離肝細胞をモルヒネとインキュベートすると、肝細胞内のグルタチオン濃度が減少し、その結果肝細胞の死が認められた。また細胞内のグルタチオンの減少量と生成したモルヒノン-グルタチオン抱合体の量は、ほぼ等量であった。

ノルモルヒネの生成は、チトクローム P-450 の関与する薬物代謝酵素の関与が多いが、モルヒネの肝毒性発現の原因代謝物と考えられるモルヒノンの生成は、チトクローム P-450 の関与する薬物代謝酵素の関与は少なく、主にモルヒネ 6-脱水素酵素を介して起こることが明かとなった。

また、鎮咳剤として使用されるコデインについてもモルヒネの場合と同様の機構で代謝物のコデインノンが生成し、肝毒性を発現することが明かとなった。

2. モルヒネに対するモノクローナル抗体の調製およびその性質

モルヒネヘミサクシネート-ウシ血清アルブミン複合体を危疫原として用いて、モルヒネ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クローンを12株樹立した。これらのハイブリドーマの産生するモノクローナル抗体の性質を検討した結果、いくつかのオピエートアゴニストに交差反応性を示したが、ナロキソンやナルトレキソン等のアンタゴニストとは反応性が低いことが示された。得られたモノクローナル抗体の一つである MOR 131.5.13 を用いたラジオイムノアッセイでは、 IC_{50} が 0.1 nM (5.7 pg/tube) と非常に低く、高感度の免疫定量法の開発が可能であることが示された。またこの抗体は、鎮咳剤として使用されるコデインに対する反応性も有しており、コデインの定量も可能である。

3. マウス脳モルヒネ受容体のリン酸化反応について

て

マウス脳 P2 膜画分を用いて、モルヒネ、エンケファリン等のアゴニストの存在下 γ - 32 P-ATP を用いてリン酸化反応を行った。その結果アゴニストの存在下では非存在下に比べ 58 KDa のモルヒネ受容体タンパ

クのリン酸化が促進されることが認められた。またアンタゴニストのナロキソンはリン酸化を特異的に抑制することを見出した。単離したモルヒネ受容体のリン酸化を受けたアミノ酸を調べたところ、大部分がセリンであった。

鹿庭なほ子, 香取典子, 青柳伸男, 武田 寧, 内山 充: 局方製剤の溶出速度—糖衣錠の溶出速度の pH 依存性—

薬剤学, 49, 297 (1989)

塩酸クロルプロマジン, 塩酸イミプラミンおよび乳酸プレニラミンの市販製剤について溶出特性を検討した。いずれの薬物の市販製剤の中にも, 溶出速度に pH 依存性を示すものがあった。それらの製剤では pH 1.2 に比較し pH 6.8 において溶出速度が遅く, 胃液酸性度の低い患者でバイオアベイラビリティが低下する可能性が考えられた。半裁錠を用いた実験から, これらの糖衣錠の溶出速度が pH 依存性を示す原因は, コーティング膜の溶出性の pH 依存性にあること, しかし乳酸プレニラミンでは薬物の溶解度が低いためにコア部分の分散性の低さにもあることが判明した。局方では糖衣錠の崩壊試験の試験液は pH 1.2 と規定されているために, このような製剤が見逃されてしまう。糖衣錠の崩壊試験または溶出試験では, 中性付近の試験液を用いたほうがバイオアベイラビリティが患者の胃液酸性度に依存する製剤を識別しやすいと言える。

Kaniwa, N., Ogata, H.*, Aoyagi, N., Takeda, Y. and Uchiyama, M.: **Power Analyses of Moment Analysis Parameter in Bioequivalence Tests**
J. Pharm. Sci., 78, 1020 (1989)

現在のところ, 生物学的同等性試験において, 製剤間の吸収速度の差を高い検出力で評価できるパラメータがない。そこで, 薬物分子が体内に滞留する平均時間を意味する mean residence time (MRT) に注目し, その薬剤学および統計学的特性を, 実験データおよびシミュレーション・データを用いて検討した。MRT は吸収速度の変動に対してよく変化した。また, その検出力は AUC や C_{max} のような吸収量を評価するパラメータの検出力と同程度であった。これらのことから, MRT が, 生物学的同等性試験において吸収速度を評価するパラメータとして有用であることがわかった。

* 明治薬科大学

Yoshioka, S., Aso, Y., and Takeda, Y.: **Isothermal and Nonisothermal Kinetics in the Stability Prediction of Vitamin A Preparations**
Pharm. Res., 7, 388~391 (1990)

前報でコンピュータシミュレーションによって検討した非等温予測法の有用性と限界とを, 実際の製剤を

用いて検証するために, 市販のビタミンA製剤の有効期間の推定を非等温予測法によって行い, 等温予測法との比較を行った。ビタミンAはシロップ剤および注射剤ともにゼロ次にしたがって分解したが, その速度定数はアレニウスプロットにおいて直線性を示さず, シロップ剤では上に凸, 注射剤では下に凸のプロットが得られた。したがって加速試験に基づいて有効期間の推定を行うと, 実際の値よりも, シロップ剤では短く, 注射剤では長く推定され誤差を生じるが, 非等温予測法では, 等温予測法に比較してその誤差が著しく小さいことが明らかにされた。分解速度がアレニウス式に従わない薬物の有効期間の推定においては, 非等温法が等温法よりも精度良い値を与えるという, コンピュータシミュレーションの結果を裏付ける結果が得られた。

Kishida, A., Yoshioka, S., Takeda, Y. and Uchiyama, M.: **Formulation-assisted biodegradable polymer matrices**

Chem. Pharm. Bull., 37, 1954~1956 (1989)

DDS および医用材料に用いる生体内分解性ポリエステルマトリックスの分解速度の制御法を開発した。生体内において非常に遅い分解速度を示す高分子量のポリ乳酸あるいはほとんど分解を示さないポリ β -ヒドロキシ酪酸および β -ヒドロキシ酪酸—吉草酸共重合体のマトリックスについて, シンナリジンやクロニジンなどの塩基性物質を分解促進剤として添加することによって分解速度を制御することができた。添加剤の塩基性および添加量と分解速度との関係を明らかにし, これらの要素の組合せによりマトリックスに適当な分解性を付与することができることを示した。

吉岡澄江: 新薬承認申請に係わる製剤の安定性を保証するための資料に関する考察

薬剤学, 50, 65~67 (1990)

新薬承認申請のために行われる安定性試験の目的を考察した。製剤の有効期間を保証する根拠となるデータを得るためには, 長期保存試験は従来の保存条件である成行き室温で行うのではなく, 一定温度条件で行うべきであることを考察した。また, 加速試験および苛酷試験の考え方を提案した。

Aso, Y., Yoshioka, S. and Takeda, Y.: **Epimerization and Racemization of Some Chiral Drugs in the Presence of Cyclodextrin and Liposomes**

Chem. Pharm. Bull., **37**, 2786~2789 (1989)

エトポシド、エチアジドおよびカルベニシリンのエピマー化、ラセミ化および加水分解反応に及ぼす α -、 β -および γ -シクロデキストリン (α -、 β -、 γ -CyD)、ジメチル- β -シクロデキストリン (DM- β -CyD) およびリポソームの影響を速度論的に検討した。 α -および β -CyD はカルベニシリンのエピマー化および加水分解反応を促進したが、エトポシドのエピマー化反応、エチアジドのラセミ化および加水分解反応には影響しなかった。DM- β -CyD はエトポシドのエピマー化反応と、エトポシドのエピマーであるピクロエトポシドの加水分解反応、エチアジドのラセミ化および加水分解反応を抑制した。しかし、DM- β -CyD カルベニシリンのエピマー化および加水分解反応に影響しなかった。 γ -CyD はエトポシドのエピマー化反応、ピクロエトポシドの加水分解反応、エチアジドのラセミ化および加水分解反応を抑制した。一方、カルベニシリンのエピマー化および加水分解反応は γ -CyD により促進された。CyD と、エトポシド、ピクロエトポシドおよびエチアジドとの包接化合物が生成することにより、水酸イオンや緩衝液成分などの塩基の攻撃が阻害され、エピマー化、ラセミ化および加水分解反応が抑制されることが示唆される。また、 α -、 β -、 γ -CyD の水酸基がカルベニシリンのエピマー化および加水分解反応の促進に関与していると考えられる。リポソームはエトポシドのエピマー化反応、ピクロエトポシドの加水分解反応およびエチアジドのラセミ化反応を抑制したが、カルベニシリンの反応性には影響しなかった。反応性におよぼすリポソームの影響の違いはこれらの薬物のリポソームへの溶解性の差によって説明できると思われる。

Aso, Y., Yoshioka, S. and Takeda, Y.: **Epimerization and Racemization of Some Chiral Drugs in the Presence of Human Serum Albumin**

Chem. Pharm. Bull., **38**, 180~184 (1990)

カルベニシリン、エチアジド、エトポシド、および酢酸オキサゼパムのエピマー化、ラセミ化反応に及ぼすヒト血清アルブミン (HSA) の影響を速度論的に検討した。薬物のそれぞれのエピマーあるいはエナンチオマーの濃度の時間変化を立体特異的な高速液体クロマトグラフィーにより測定し、エピマー化、ラセミ化および加水分解のみかけの反応速度を推定した。HSA はエチアジドのラセミ化反応とエトポシドのエピマー化反応を抑制した。薬物の HSA への結合が水酸イオンあるいは水分子の攻撃を阻害し、反応が抑制される

と考えられる。一方、HSA はカルベニシリンのエピマー化反応を促進した。カルベニシリンは検討した pH において荷電しており、カルベニシリンと HSA のあいだのイオン-イオンあるいはイオン-ダイポール相互作用により水酸イオンあるいは水分子の攻撃を受けやすくなるようにカルベニシリンが活性化されるためと考えられる。HSA はエチアジド、カルベニシリンおよび酢酸オキサゼパムの加水分解反応を促進した。HSA に結合した酢酸オキサゼパムの d-体は l-体の 2 倍速やかに加水分解された。HSA のエステラーゼ様作用は立体選択的であることが示唆され、この選択性は薬物エナンチオマーの HSA に対する結合アフィニティーの差によるものと考えられる。

石橋無味雄：平成元年度統一試験法について

月刊卸薬業, **13**, 19 (1989)

日局11追捕における崩壊試験法について解説し、また崩壊試験法を実施する際における留意事項を説明した。また塩酸チアミン注射液法について試験方法を解説し、日局一般試験法にしたがって pH 試験および確認試験などを実施する際の留意事項を説明した。

Sekine, H.* and Nakahara, Y.: **Abuse of Smoking Methamphetamine mixed with Tobacco: II The Formation Mechanism of Pyrolysis Products**

J. Forensic Sci., **35**, 580~590 (1990)

たばこに覚醒剤を混ぜて喫煙乱用された時に生成する熱分解物の生成機構を GC および GC/MS を用いて調べた。主流煙には主に methamphetamine (14.5%), phenylacetone (3.1%), cyanomethyl 体 (1.5%), formyl 体 (1.5%), β -methylstyrene (1.7%) が含まれており、副流煙には主に methamphetamine (10.5%) と formyl 体 (1.4%) が含まれていた。これらの熱分解物の生成機構を pyrolyzer-GC/MS を用いて調べたところ、methamphetamine の自己分解により dimethylamphetamine および β -methylstyrene が生成し、他の分解物はたばこの成分との反応によって生成することが判った。特に cyanomethyl 体は空気の存在下で 670°C 以上の高い熱分解温度の時のみ生成することが判った。

* 埼玉県科学捜査研究所

Nakahara, Y., Takahashi, K., Takeda, Y., Konuma, K.*1, Fukui, S.*2 and Tokui, T.*3: **Hair Analysis For Drug Abuse, Part II. Hair Ana-**

lysis For Monitoring of Methamphetamine Abuse by Isotope Dilution Gas Chromatography/Mass Spectrometry

Forensic Sci. Inter., 45, 67~78 (1990)

覚せい剤乱用者の毛髪試料を用いて、安定同位体希釈法 GC/MS により長期の薬物乱用歴のモニタリングを行った。薬物使用歴既知の12人の覚せい剤乱用者から得た毛髪試料を根元側から 2cm ごとに分画し、各分画中の薬物濃度と薬物使用歴と比較したところ、12例中10例において両者の間により相関関係が認められた。2例においても、1~2カ月の誤差範囲以内であった。頭髪の5つの部位における薬物濃度の差およびパラッキを調べたところ、部位間に10~20%の差が認められたが、最も試料の均一性が高い部位は後部頭頂部であることが判った。この研究の結果、毛髪の方画分析により、過去数ヶ月から十数ヶ月の薬物使用歴の推定が可能であることが判った。

*1 国立下総療養所

*2 国立精神保健研究所

*3 桜が丘保養院

Nakahara, Y., Ishigami, A., Takada, Y., Usagawa, T.* and Uda, T.*: **Enzyme Linked Immunosorbent Assay Using Monoclonal Antibody to Detect Methamphetamine in Urine and Hair** *Eisei Kagaku*, 35, 333~338 (1989)

生体試料中の微量の覚せい剤を検出するためのモノクローナル抗体を用いる酵素標識免疫測定法(ELISA)を開発した。N-(4-aminobutyl)methamphetamine-BSA を用いた抗体産生実験により、覚せい剤メタンフェタミンに対して非常に特異性の高いモノクローナル抗体を得、これを用いてアッセイシステムを確立した。尿中メタンフェタミンの定量範囲は 0.3 から 30 $\mu\text{g/ml}$ であり、検出限界は 0.2 $\mu\text{g/ml}$ であった。1 $\mu\text{g/ml}$ での相対標準偏差は with in run で 5.68%, between run で 8.26% であり、48尿検体での ELISA 分析値と GC/MS 分析値の相関係数は 0.9934 であった。本法は試料量が 5 μl で測定可能であり、96検体を約1時間で分析できた。さらに、本法を毛髪試料中のメタンフェタミンの定量にも適用した。

* 宇部興産宇部研究所

石上暁子, 高橋一徳, 島峯望彦, 中原雄二, 武田寧: **デプレニールとメタンフェタミンの尿中代謝物の比較に関する研究(第1報)サル尿中代謝物につ**

衛生化学, 36, 74~78 (1990)

Deprenyl と methamphetamine のサル尿中代謝物を比較した。最初に尿中 deprenyl, desmethyldeprenyl, methamphetamine, p-hydroxymethamphetamine, amphetamine, p-hydroxyamphetamine の定量法を固相抽出, TFA化, シリル化等の処理後, GC/MS を用いて確立した。サルに Deprenyl を 0.2 mg/kg 投与後, 6, 12, 24, 48時間尿を分析した結果, 12時間以内の尿中のみに deprenyl および desmethyldeprenyl が検出された。それ以後は methamphetamine および amphetamine が検出され, methamphetamine 投与との区別が不可能であった。この結果, Deprenyl と methamphetamine 使用の識別は 12時間以内の尿試料においてのみ可能であることが判った。

中原雄二: **世界における覚せい剤の乱用の現状と問題点**

衛生化学, 36, 100~109 (1990)

覚せい剤アンフェタミン, メタンフェタミン乱用の世界の傾向と問題点について解説した。近年, あへん, ヘロイン, コカイン, 大麻, 向精神剤のような規制薬物の世界の押収量が急増している中で, 特に覚せい剤の世界的乱用の広がりについて焦点を当てた。1987年の世界の覚せい剤を含む興奮剤の押収量は5年前に比べ5~6倍に上昇し, 著しく増加している。世界の国々の覚せい剤乱用問題の現状を紹介するとともに, 過去および現在において, 特に大きな社会問題を経験した米国, スウェーデンおよび日本の覚せい剤乱用実態をクローズアップした。

覚せい剤の新しい乱用形態の流行についても紹介した。静注による薬物乱用に伴うエイズ感染の危険のため, 覚せい剤の乱用形態が注射から吸煙へと変化しており, 「アイス」と呼ばれる新種の「吸煙用覚せい剤」が登場している。この物質の化学的, 薬理的性質を示すとともに, 毒性についても述べた。

Kohda, H.*1, Tanaka, S.*1, Yamaoka, Y.*1, Yahara, S.*2, Nohara, T.*2, Tanimoto, T. and Tanaka, A.: **Studies on lens aldose reductase inhibitor in medicinal plants. II. Active constituents of *Monochasma savatierii* FRANCH. et MAXIM** *Chem. Pharm. Bull.*, 37, 3153~3154 (1989)

Monochasma savatierii FRANCH. et MAXIM の70%アセトン抽出物はウサギ水晶体アルドース還元酵素を非常に強く阻害した。この活性画分から, 2種のフェノール性グリコシド, アセトシド, デヒドロア

セトンドを含む5種のイリドイドグルコシドを単離した。これらのうち、アセトンドが最も強い活性 ($IC_{50} = 3.9 \times 10^{-7} M$) を示し、天然アルドース還元酵素阻害剤であるバイカレインの約2.5倍の強さを示した。イリドイドグルコシドであるデメチルムサエノシドや7-O-アセチル-8-エピ-ロガニン酸の阻害活性は弱かった。

*1 広島大学医学部

*2 熊本大学薬学部

谷本 剛: pH スタット

ファルマシア, 25, 1222~1225 (1989)

pH スタットとは溶液の pH を一定に維持する装置を意味し、化学反応に伴う酸または塩基の生成によって引き起こされる pH 変化を電氣的に検出し、自動的にアルカリまたは酸を加えることによって再び元の設定された pH にもどす目的で設計された装置である。pH スタットの構成、pH スタット法の原理およびその適用について概説した。

Tanimoto, T., Sato, S.* and Kador, P. F.*: Purification and properties of aldose reductase and aldehyde reductase from EHS tumor cells

Biochem. Pharmacol., 39, 445~453 (1990)

Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) 腫瘍細胞は基底膜成分の産生の研究のモデルとして利用されている。この細胞は免疫学的に異なる2種の NADPH-依存性還元酵素 (アルドース還元酵素, アルデヒド還元酵素) を含んでいる。この2種の酵素を硫酸分画, ゲルろ過, アフィニティークロマト, クロマトフォーカシングで均一に精製した。アルドース還元酵素の分子量は 38 kD, アルデヒド還元酵素の分子量は 40 kD であった。両酵素とも種々のアルデヒドを還元したが, L-グルコン酸の酸化はアルデヒド還元酵素のみが行った。グルコースやガラクトースに対しては両酵素とも同程度に作用し, EHS 腫瘍細胞におけるソルビトールの生成には両酵素が寄与していることが推察された。両酵素活性は硫酸イオンで上昇したが, 塩素イオンによってアルドース還元酵素活性は低下した。両酵素とも種々のアルドース還元酵素阻害剤で阻害された。

* National Institutes of Health, USA

辻 俊明*, 松本康宏*, 森 和彦*, 池部 均*, 照林宏文*, 赤木好男*, 谷本 剛: 新しいアルドース還元酵素阻害剤 (FR74366) のラットガラクトース白内障に対する効果

日眼会誌, 94, 120~127 (1990)

新しいアルドース還元酵素阻害剤である FR-74366 のラットガラクトース白内障に対する濃度別 (0.025% および 0.05%) 抑制効果および白内障に対する治療効果を組織学的, 生化学的に解析し, 以下の結論を得た。

1. 新規アルドース還元酵素阻害剤 FR-74366 は白内障発症抑制効果および治療効果を有していた。
2. 両効果は薬濃度に依存し, 低濃度 (0.025%) では作用が弱く効果にバラツキが見られたが, 高濃度 (0.075%) では強力な効果を示した。

* 京都府立医科大学

辻 俊明*, 高橋幸男*, 松本康宏*, 照林宏文*, 池部 均*, 赤木好男*, 伴由利子*, 川崎ナナ, 谷本 剛: 新しいアルドース還元酵素阻害剤 FR74366 の効果, 1. ラットガラクトース白内障予防効果

眼紀, 40, 2742~2748 (1989)

新しいアルドース還元酵素阻害剤である FR-74366 のラットガラクトース白内障に対する濃度別 (0.025% および 0.05%) 予防効果を光顕的および免疫組織化学的に検討し, 次の結論を得た。

1. 抑制効果には濃度依存性があった。
2. FR-74366 は 0.025% の低濃度では抑制効果に若干のバラツキがあった。
3. FR-74366 は 0.075% の高濃度では強力な抑制効果を示した。
4. 以上の結果から, 新規化合物である FR-74366 は有効なアルドース還元酵素阻害剤であると考えられた。

* 京都府立医科大学

川崎ナナ, 谷本 剛, 田中 彰: 酵素製剤の品質に関する研究 (第 VIII 報) トロンビン製剤

医薬品研究, 20, 784~789 (1989)

ヒトおよびウシ由来トロンビン製剤中のトロンビンの分子多様性をクロマトフォーカシングで検討した。ウシ由来製剤には2~4種の等電点の異なる α -トロンビン含有しており, ヒト由来製剤は3種の α -トロンビンと1種の β -トロンビン含有していた。ウシおよびヒト由来の α -トロンビンの合成基質 S-2238 に対する k_{cat} はすべての分子種で類似していたが, β -トロンビンの k_{cat} は α -トロンビンのそれより高かった。

Kawasaki, N., Ishigami, A., Tanimoto, T. and

Tanaka, A.: **Determination of iron (III) ion using ion chromatography with electrochemical detection and its application to the assay of the ferroxidase activity of ceruloplasmin**

J. Chromatogr., 503, 237~243 (1990)

セルロプラスミンは、2価鉄イオンを3価鉄イオンに酸化するフェロキシダーゼ活性を有しており、鉄代謝への関与や、抗酸化剤としての役割が明かにされている。本論文では、セルロプラスミンの活性を測定するために、Fe(II)存在下のFe(III)を電気化学検出器を用いたイオンクロマトグラフィーによって定量する方法を確立した。Fe(III)の分析は、アニオン交換樹脂充填カラム、移動相: 250 mM 乳酸、設定電位: -200 mVで行い、試料 10 μ l で 5 pmol まで定量が可能であった。また、本法を用いてセルロプラスミン(0.5~100 μ g)のフェロキシダーゼ活性の測定が可能であった。

Kawasaki, N., Tanimoto, T. and Tanaka, A.: **Characterization of aldose reductase and aldehyde reductase from rat testis**

Biochim. Biophys. Acta, 996, 30~36 (1989)

アルドース還元酵素(AR)とアルデヒド還元酵素(ALR)をラット睾丸から均一に精製した。ARの分子量は38 kD, 等電点は5.3であり、ALRの分子量は41 kD, 等電点は6.1であった。ARはキシロース、グルコース、ガラクトースなどのアルド糖に作用したが、ALRはほとんど作用しなかった。ARのアルド糖に対するKm値は比較的高かったが、真の基質であるアルデヒド型分子に対するKm値は非常に低かった。ARはNADPHとNADHの両者を補酵素としたが、ALRはNADPHのみを補酵素とした。ARは硫酸イオンで著しく活性化されたが、ALRはほとんど影響を受けなかった。AR, ALRともに既知AR阻害剤で強く阻害されたが、ALRのほうがARより阻害剤に対する感受性が低かった。また、両酵素ともピリドキサル5-リン酸で処理すると、阻害剤に対する感受性を失ったことから、阻害剤との相互作用にリジン残基が関与していることが推察された。

福田秀男, 田中 彰: **公定書試験法への生物学的反応性の概念の適用**

Pharm. Tech. Japan, 6, 315~325 (1990)

医薬品, 医療用具等の原材料の安全性試験法の *in-vitro* 化という観点からその可能性を述べ解説した米薬政局方 *in-vitro* 毒性小委員会の記述 [Pharmacop

peial Forum, Jan.-Feb., 4804 (1989)] を訳し, 紹介した。

友田輝夫*, 山口照英, 白尾悦子*, 川崎一夫*: **積分球を用いた老人性白内障水晶体の着色物質の吸収スペクトルについて**

新しい眼科, 6, 1577~1583 (1989)

老人性白内障の着色物質を明らかにするために積分球を用いてその吸収スペクトルを測定し, その主体がキサントマチンではないかと推論した。

* 金沢大学医学部

岡田 定*¹, 三好保由*¹, 滝沢芳夫*¹, 萩原昭二*¹, 森 啓*¹, 新倉春男*¹, 寺田秀夫*¹, 網脇祥子*², 水谷修紀*², 倉辻忠俊*², 山口照英, 高橋正知*³: **bcr および免疫グロブリン重鎖遺伝子に再構成を認めず, 好中球機能異常を呈した慢性好中球性白血病の一例**

臨床血液, 30, 1881~1885 (1989)

慢性好中球性白血病(CNL)は非常に希な骨髄性白血病であるが, CNL患者の好中球機能について主として生化学的な検討を行った。

*¹ 昭和大学藤が岡病院

*² 国立小児病院

*³ 東京女子医大

Nishikawa, S.*¹, Nishida, Y.*¹, Uemura, H.*¹, Yamada, Y.*¹, Tanaka, T.*¹, Uesugi, S.*¹, Morikawa, M.*², Uchida, E., Hayakawa, T. and Ikehara, M.*³: **Structure and activity of artificial mutant variants of human growth hormone**

Protein Engineering, 3, 49~53 (1989)

ヒト成長ホルモン変換体を site-directed mutagenesis 法により作製し, 構造活性相関を検討した。Trp86をTyrに置換してもCDスペクトル, 脂肪細胞分化活性とも変化しないが, Trp86を除去すると活性がやや低下した。32~46番目のアミノ酸欠失体(20K hGH)は構造, 活性ともほとんど変化しないが, 32~71番目のアミノ酸欠失体(17.5K hGH)は構造が大幅に変化し, 活性が失われたことから, 活性発現に立体構造が重要であることが示唆された。

*¹ 大阪大学薬学部

*² 佛東京免疫薬理研究所

*³ 佛蛋白質工学研究所

Uchida, E., Hayakawa, T., Niimi, S., Tanaka, A.

and Morikawa, M.*: **Structural characteristics of growth hormone receptors on mouse 3T3 cells having different biological responses to growth hormone**

J. Mol. Endocrinol., **3**, 239~245 (1989)

成長ホルモン依存的に脂肪細胞に分化する 3T3-F442A 細胞の分化前後、および分化能のない 3T3-C2 細胞について、成長ホルモンレセプターの構造を比較検討した。3T3-F442A の分化前の細胞のアフィニティラベルにより成長ホルモン・レセプター複合体として 130 kD の主要なバンドの他に 300 kD, 230 kD, 60 kD のバンドが得られること、シアリダーゼ、ツニカマイシン処理により成長ホルモンレセプターはシアル酸含有 N 結合型糖鎖を有することが判明した。これらのレセプターの構造的特徴は分化後の細胞、および 3T3-C2 細胞でも特に差異が認められなかった。

* 佛東京免疫薬理研究所

早川堯夫, 山口照英, 新見伸吾, 内田恵理子, 押沢正: **バイオテクノロジー医薬品: 特性, 品質評価のための解析法 (その 2) 糖鎖部分の構造解析法について**

医薬品研究, **20**, 735~759 (1989)

エリスロポエチン, 組織プラスミノゲンアクチベーター, ヒト顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子, 性腺刺激ホルモン類, 甲状腺刺激ホルモン, インターフェロン類, モノクローナル抗体, β -グルコセレブロンダーゼなどにおける糖鎖の機能に関する最近の知見を紹介し, バイオ産物における糖鎖の構造・組成解析の必要性を論考した。次に糖タンパク質の糖鎖の基本構造について解説し, 糖組成の分析, 糖タンパク質からの糖鎖の遊離, 糖鎖の分離と同定, 主要糖鎖構造の決定, 個々の結合部位における糖鎖の構造決定, 糖鎖マッピングなどに必要な技術, 方法について詳述した。

早川堯夫: **医療用ペプチドおよびたん白質の開発研究をめぐる最近の動向**

医薬品研究, **20**, 580~583 (1989)

バイオテクノロジーを中心とする医療用ペプチドおよびたん白質の開発研究における最近の知見の蓄積や技術的進歩について解説するとともに, 今後, 解決を迫られている具体的課題, 例えばサイトカインなどの多採な生物学的作用の解明, 製剤化, 送達, 標的指向性などの面での技術開発研究の重要性についてふれた。また, この分野の国際的動向について紹介した。

Hayakawa, T.: **Current regulatory situation in Japan with respect to the quality control of therapeutic peptides and proteins**

Cold Spring Harbor Laboratory Current Communication in Molecular Biology (Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Delivery, and Targeting), 195~200 (1989)

最近のわが国における医療用ペプチドやタンパク質類の品質確保がどのようなルールおよび科学的根拠に基づいて実施されているかを述べるとともに, バイオ医薬品に関して今後わが国で早急に取り組むべき主な課題について言及した。

Ikemoto, I.*, Machida, T.*, Tanaka, A., Kotera, S.*, Mikuriya, H.* and Shirai, T.*: **Appearance of LDH-X Activity in Rat Serum after Acute and Subacute Testicular Damages**

Jpn. J. Fertil. Steril., **35**, 247~252 (1990)

乳酸脱水素酵素 (LDH) のアイソザイムである LDH-X は精子および成熟精巣のみに特異的に存在するが, 最近ラットの急性実験的精巣障害で, 血中に LDH-X が出現することが報告された。

そこで血中 LDH-X の測定が精巣障害の指標として有用か否かを実験的に検討した。フタル酸ジブチルを 1 週間 2.4 mg/kg の割合で雄ラットに経口投与すると, 経時的に LDH-X の上昇傾向が認められた。また実験的精巣作製した場合も同様の結果がえられたが, 塩化カドミウム 1 回投与 (4 g/kg, i. p.) と実験的精巣捻転の場合は, 処置後 2 日目ピークに LDH-X が血中に出現した。血中 LDH-X の測定は, 臨床的にも急性的精巣障害のマーカーとして応用が可能であることを示唆した。

* 東京慈恵会医科大学

Fukuoka, M., Tanimoto, T., Zhou, Y., Kawasaki, N., Tanaka, A., Ikemoto, I.* and Machida, T.*: **Mechanism of Testicular Atrophy induced by Di-n-butyl Phthalate in Rats. Part I.**

J. Appl. Toxicol., **9**, 277~283 (1989)

ジブチルフタレートを 2.4 g/kg 体重の割合で, 連続 7 日間投与し, 右の精巣は ^{13}C -NMR の測定に用い, 一方左の精巣は, 固定後, 病理組織的に観察した。 ^{13}C -NMR 測定結果は, リン脂質の分子運動の減少のつぎに, リン脂質量の減少が観察された。この現象は病的には, 精子細胞の消失と一致する。

* 東京慈恵会医科大学

池部 均*, 赤木好男*, 照林宏文*, 高橋幸男*, 辻俊明*, 松本康宏*, 伴由利子*, 川崎ナナ, 谷本剛: ガラクトース血症による先天性白内障

眼紀, 40, 2737~2741 (1989)

SD 系妊娠ラットを全妊娠期間中, 食餌の種類により, 50%ガラクトース含有量食餌飼育群, アルドース還元酵素阻害剤混入50%ガラクトース含有食餌飼育群, 通常食餌群の3群に分け飼育し, それらのラットから生まれた仔ラットの水晶体における組織学的変化を経時的に観察した. その結果, 次の2点が明らかになった. 1) ガラクトース血症妊娠ラットから生まれた仔ラット水晶体に出現する先天性白内障は前後縫合部を中心とする核部分の筒状繊維膨化および液化として初発し, 前方に移動するように治癒する特異的な像を呈した. 2) アルドース還元酵素阻害剤投与は本白内障の出現を完全に抑制した.

* 京都府立医科大学

Ozaki, Y., Sekita, S., Soedigdo, S.*, Harada, M.:
Antiinflammatory effect of *Graptophyllum pictum* (L.) GRIF.

Chem. Pharm. Bull., 37, 2799~2802 (1989)

本薬用植物の薬部は, インドネシアで民間薬として切傷, はれもの, 胃潰瘍, 痔の治療に用いられている. この使用目的から抗炎症作用が期待されるので抗炎症作用およびその活性成分を検討した. 抗炎症作用はラットでのカラゲニン誘発浮腫の抑制, マウスでの酢酸誘発色素透過性亢進の抑制を指標とした. 本植物のエタノールエキスの経口抗与により抗炎症作用が認められ, この活性はエーテルと水の分配により得られた水可溶画分, さらにブタノールおよびメタノール可溶画分へ移行した. メタノール可溶画分はダイアイオンカラムクロマトグラフを用い分離し, 抗炎症作用を示す数種のフラボノイドを含む画分を分離した.

* Department of Pharmacy, Institute Technology of Bandung, Bandung, Indonesia

尾崎幸紘, 関田節子, 原田正敏: 川芎より得られたフタライド化合物リグスチライド類の中樞性筋弛緩作用

薬誌, 109, 402~406 (1989)

川芎のメタノールエキスを順次分配して得られたヘキサソルとしてクロロホルム可溶画分, さらにクロロホルム可溶画分をシリカゲルカラムクロマトグラフにより分離して得られた ligustilide, cnidilide および senkyunolide の筋弛緩作用を検討した. 筋弛緩作用

は, 麻酔下でのラット後肢の交叉性伸展反射の抑制作用を指標とした. これらフタライドは, 腹腔投与によりほぼ同程度の抑制作用を示し, この時, 神経筋接合部においてはクラール作用が認められなかったので, この作用は中樞性の筋弛緩作用と考えられた. また, これらフタライドを含むクロロホルム可溶画分はそれぞれのフタライドの効力と同程度か若干強かったため, これらフタライドは相乗的に作用していることが考えられた.

尾崎幸紘, 野口 衛, 鎌倉浩之, 原田正敏: 甘草エキスおよびグリチルリチンの経口投与後の血漿中グリチルリチン濃度および吸収量の比較検討

薬誌, 110, 77~81 (1990)

多成分を含む生薬エキスは, それらの成分が消化管から吸収される時, それぞれの成分が相互に影響することが考えられる. このことから, その使用頻度が高く, 多量の摂取により偽アルドステロン症を発現するため規制指導がなされている甘草を選び, 甘草エキスおよびこれに含有される相当量のグリチルリチンをそれぞれ経口投与して, 投与後の血漿中のグリチルリチン濃度を HPLC を用いて経時的に測定し, その相違を比較検討した. 甘草エキス中のグリチルリチンはエキス中の他の成分により若干影響された (T_{max} の有意の延長, C_{max} の低い傾向, および AUC_{24h} の若干の減少).

尾崎幸紘, 菅 忠三*, 吉岡利紘*, 森本悌次郎*, 原田正敏: 生薬と組織培養生成物の有効成分に基づいた薬理活性の比較による評価. 紫根の肉芽形成促進作用および黄連の肉芽形成抑制作用

薬誌, 110, 268~272 (1990)

組織培養で得られた紫根および黄連とこれらの天然産生薬との同等性を評価する方法の一環として, これら生薬に期待される薬理作用を選び, その薬理作用の同等性を検討した. 紫根とその培養生成物のエーテルエキスは, 含有される総シコニン系色素量が等しい場合はほぼ同程度の肉芽形成の促進作用が, また黄連とその組織培養生成物の水エキスは含有される総ベルベリン系アルカロイドの量が等しい場合はほぼ同程度の肉芽形成の抑制作用がそれぞれに認められた. このことから, 天然産生薬と培養生成物との薬理作用の同等性を評価する場合, それぞれの含有成分が定性的にも, また定量的にもあまり異ならず, それらの生薬の代表的な薬理作用の効力がほぼ等しいことが必要であると

考えられる。

* 榎三井石油化学工業生物工学研究所

尾崎幸紘：本邦産植物カギカズラおよびチョウジソウに含有されるインドールアルカロイドの薬理学的研究

日薬理誌, 94, 17~26 (1989)

本邦産植物のカギカズラおよびチョウジソウから得られた6種類のインドールアルカロイドの一般薬理作用を検討した。これらアルカロイドは、緩和な中枢抑制作用、弱い鎮痙作用および血圧降下作用を示した。特に、チョウジソウから得られた β -yohimbine は、顕著な血圧降下作用を示し、この作用の発現には α -adrenoceptor の抑制による血管拡張作用が関与することが考えられた。一方、カギカズラから得られた hirsutine は、アジマリンとはほぼ同程度の抗不整脈作用を示し、この作用発現には β -adrenoceptor の関与は少ないことが考えられた。

尾崎幸紘：本邦産植物カギカズラおよびチョウジソウ含有インドールアルカロイドの血管拡張作用

日薬理誌, 95, 47~54 (1990)

本邦産植物のカギカズラおよびチョウジソウから得られた hirsutine, hirsuteine および β -yohimbine は犬において後肢血管の拡張作用を示した。 β -yohimbine の作用効力はこれらアルカロイドの中で最も強く、また、yonimbine とほぼ同程度であり、この作用の発現には β -adrenoceptor の抑制が関与することが明らかとなった。一方、hirsutine の効力は hirsuteine よりも強く、また、脳血管および冠血管においても血管拡張作用を示した。この hirsutine による血管拡張作用の効力は血管の部位により若干の相違が認められた。

田中敏嗣*1, 長谷川明彦*1, 青木伸實*1, 山本 進*1, 宇田川俊一, 関田節子, 原田正敏, 野沢幸平*2, 河合賢一*2: 小型菌核形成 *Aspergillus flavus* 一系統のアフラトレムおよびその関連インドロジテルペン化合物の生産性

マイコトキシン, 30, 19~23 (1989)

インドネシア産伝承薬より分離した小型菌核形成 *A. flavus* 4 菌株およびアメリカ合衆国農業省北部研究センターから分与をうけた3株について、痙攣性マイコトキシン aflatrem とその関連インドロジテルペン化合物の定量分析をおこなった。その結果主成分は、収穫前の完熟トウモロコシの害虫であるクリヤケシキ

スイ (*Carpophilus hemipterus*) に摂食阻害活性をしめす dihydroxyaflavinine であることを明らかにした。

*1 神戸市環境保健研究所

*2 星薬科大学

Yano, S.*1, Harada, M., Watanabe, K.*1, Nakamaru, K.*1, Hatakeyama, Y.*1, Shibata, S.*2, Takahashi, K.*2, Mori, T.*3, Hirabayashi, K.*3, Takeda, M.*3 and Nagata, N.*3: Antilucer Activities of Glycyrrhetic Acid Derivatives in Experimental Gastric Lesion Models

Chem. Pharm. Bull., 37, 2500~2504 (1989)

甘草の主要有効成分グリチルリチン酸の疑アルドステロン症発現の性質を可及的に除去することを目的として、そのアグリコンのグリチルレチン酸の化学修飾を行い、18種の誘導体を合成し、それらの抗潰瘍作用を実験潰瘍モデルを用いて検討した。その結果、18 α -および 18 β -olean-12-ene-3 β , 30-diol, 18 β -olean-9(11)-12-diene-3 β , 30-diol および olean-11, 13(18)-diene-3 β , 30-diol のそれぞれの dihemipthalate 誘導体は強い抗潰瘍作用を与え、その機序は胃粘膜防御を強めるといことが示唆された。

*1 Chiba University

*2 Meiji College of Pharmacy

*3 Research Laboratory, Minophagen Pharmaceutical Co.

西本和光：白芷・前胡の品質

現代東洋医学, 10 (3), 95 (1989)

これらの生薬を解説し、現行局方のビクソンの性状規定は朝鮮半島産白芷に適合し、中国産の抗白芷は内部に放射状空隙がほとんどないことでやや異なることを述べた。

西本和光：木瓜・竹茹・竹葉・天南星の品質

現代東洋医学, 10 (4), 98 (1989)

これらの生薬を解説し、木瓜の原植物は現在カリンをあてているが、*Chaenomeles spesiosa* (= *C. lagenaria*) に基づくものが正品であること、また、竹茹、竹葉、天南星の原植物は複数であることを述べた。

西本和光：升麻・威靈仙・紫菀・吉草根の品質

現代東洋医学, 11 (1), 102 (1990)

これらの生薬を解説し、威靈仙の原植は複数で産地によって異なること、紫菀には山紫菀と称する偽品があること、また、現在の吉草根は真正品(縹草根)で

はないことを述べた。

原田正敏：気管支拡張薬——漢方処方における薬効群 (1)

現代東洋医学, 10 (2), 104~109 (1989)

一般用漢方製剤210処方の効能・効果に準拠して、気管支拡張薬とみなしうる処方を選択した。小青竜湯(しょうせいりゅうとう)以下6処方であり、麻黄以下15種の生薬が使われている。それらの治療効果を、現代的医薬品との対比の下に解説した。

原田正敏：抗ぜんそく薬——漢方処方における薬効群 (2)

現代東洋医学, 10 (2), 104~109 (1989)

前記事に引き続き、抗ぜんそく薬とみなしうる処方を選択し、解説した。小青竜湯(しょうせいりゅうとう)以下9処方であり、麻黄以下22種の生薬が使われている。

原田正敏：鎮咳去痰薬——漢方処方における薬効群 (3)

現代東洋医学, 10 (3), 108~115 (1989)

前記事に引き続き、鎮咳去痰薬とみなしうる処方を選択し、解説した。紫朴湯(さいぼくとう)以下22処方であり、蘇葉以下47種の生薬が使われている。

原田正敏：かぜ薬——漢方処方における薬効群 (4)

現代東洋医学, 10 (4), 113~120 (1989)

前記事に引き続き、かぜ薬とみなしうる処方を選択し、解説した。葛根湯(かっこんとう)以下12処方であり、葛根以下28種の生薬が使われている。

原田正敏：鼻炎用薬——漢方処方における薬効群 (5)

現代東洋医学, 11 (1), 114~119 (1990)

前記事に引き続き、鼻炎用薬とみなしうる処方を選択し、解説した。小青竜湯(しょうせいりゅうとう)以下7処方であり、麻黄以下34種の生薬が使われている。

原田正敏：解熱薬——漢方処方における薬効群 (6)

現代東洋医学, 11 (1), 114~119 (1990)

前記事に引き続き、解熱薬とみなしうる処方を選択し、解説した。白虎人参湯(びゃっこかにんじんとう)以下4処方であり、知母以下9種の生薬が使われている。

原田正敏：生薬と医薬品について

医薬品研究, 21, 165~175 (1990)

医薬品としての生薬を解説した。その内容は、天然物、医薬品、食品の概説、医薬品と食品との区別、生薬の基原、生薬の呼び方、生薬の定義、生薬(狭義)の範囲、生薬の使い方、効能・効果の認識のレベル、生薬の効能・効果の取扱い、生薬の医薬品審査方式下の分類、生薬(および漢方処方)の薬効分類、公的な効能・効果を持たない生薬の薬効群分布、生薬の規格設定と品質評価、医薬品としての生薬の固有な性質などである。

原田正敏, 荻原幸夫*1, 鹿野美弘*2, 赤堀 昭*3, 市尾義昌*4, 三浦 浩*5, 山本恵一*5, 鈴木英世: **漢方エキス製剤の分析について (II)**

医薬品研究, 20, 1300~1309 (1989)

昨年度の本報告(I)に引き続いて、厚生科学研究(漢方エキス製剤の品質確保の指針となる湯剤に関する研究, 昭和60~62年度)の昭和61, 62年度の成果を解説した。この研究により、規格設定が難しい処方について、指標成分の選定と試験法の開発を遂行し、ほぼ、全処方につきその達成を見た。併せて、前報でレビューした漢方処方の分析法に続いて、昭和60年から平成元年中頃までの学会などで発表された分析法をまとめた。

*1 名古屋市立大学薬学部

*2 北海道薬科大学

*3 小太郎漢方製薬(株)研究所

*4 (株)ツムラ品質研究所

*5 鐘紡(株)漢方研究所

原田正敏：漢方薬の品質に関する最近の動き

臨床薬理, 21, 305~310 (1990)

生薬と漢方製剤の品質評価とその品質確保の方法についてそれぞれ解説した。取り上げた内容は、生薬については、生薬の“相対的”品質評価、局方における生薬の規格の設定法、標準となる生薬、標準となる生薬の一層の限局化などであり、また、漢方製剤については、漢方エキス製剤の説明、その製造法、その品質(力価)、標準湯剤、エキス製剤と標準湯剤との同等性の検討、エキス製剤のGMPなどである。

中村晃忠：医用材料の安全性

薬学図書館, 34, 213~221 (1989)

医用材料に必要な性質、材料の安全性問題の実例、安全性確保のための制度、および医用材料の毒性試験法について概説した。

鹿庭正昭：家庭用品中の化学物質による健康被害：
ゴム製品によるアレルギー性接触皮膚炎の原因物質
の究明を中心に

製品と安全, 33, 2 (1989); 34, 2 (1989)

家庭用品によって引き起こされる接触皮膚炎などの
皮膚障害が、家庭用品中に含まれるどのような化学物
質によるものであるかについて、原因物質の検索方法
などを含めて、解説した。

すなわち、ゴム手袋、ゴムはきものなどの、市販ゴ
ム製品によるアレルギー性接触皮膚炎の事例について
検討した結果、ゴム添加剤、特に加硫促進剤、老化防
止剤が主要な原因物質となっていることを述べた。

中村晃忠：前臨床毒性試験—アレルギー性接触皮膚
炎への対策—

セラピューティック・リサーチ, 11, 668~671
(1990)

アレルギー性接触皮膚炎を減少させるための方策、
および、それに関連して原因物質を究明するための方
法論（特に、動物モデルを用いる方法）について述べ
た。

Nakamura, A., Ikarashi, Y., Tsuchiya, T. and
Kaniwa, M.: Radiation vulcanized natural ru-
bber latex is not cytotoxic

*Proceedings of the International Symposium
on Radiation Vulcanization of Natural Rubber
Latex, JAERI-M 89-228, 79~87 (1990)*

V-79 細胞を用いたコロニー法による細胞毒性試験
によって各種の天然ゴム製品（手袋、尿道カテーテル
等）を調べた結果、通常の硫黄加硫ゴムに比べて放射
線加硫ゴムの細胞毒性は著しく低く、ほとんど活性が
なかった。このことから、放射線加硫ゴムの医用材料
への応用の可能性が示唆された。

Hayashi, Y. and Matsuda, R.: Short column
advantage justified by information theory of
optimization in chromatography

Anal. Sci., 6, 131~133 (1990)

短いカラムの方が精度も効率も高い場合があるこ
とを理論的に示した。

Hayashi, Y.: Information theory of optimiza-
tion in chromatography

Anal. Sci., 6, 15~19 (1990)

クロマトグラフィの最適化理論を情報理論およびカ

ルマンフィルターの理論よりさらに展開した。

Hayashi, Y. and Matsuda, R.: Optimization of
detection wavelength in liquid chromatography
on the basis of information theory and Kal-
man filter

Anal. Sci., 5, 459~464 (1989)

混合剤の液体クロマトグラフィによる分析の検出
波長を最適化した。

Hayashi, Y. and Matsuda, R.: Modification of
the function of mutual information based on
information theory and the Kalman filter for
chromatographic optimization

Anal. Chim. Acta, 222, 313~322 (1989)

Anal. Chim. Acta, 222, 301 の理論を Gaussian 型
のピークに発展させた。混合剤分析の移動相組成
の最適化に応用した。

Matsuda, R., Hayashi, Y., Ishibashi, M. and
Takeda, Y.: Use of a function of mutual in-
formation for optimization of mobile-phase
composition in reversed-phase liquid chroma-
tography

Anal. Chim. Acta, 222, 301~312 (1989)

混合剤の分析について、移動相組成を、*Anal.*
Sci., 5, 329 の理論を使って最適化した。

Hayashi, Y., Yoshioka, S. and Takeda, Y.: Shan-
non information retrieved from overlapped
chromatographic peaks with Kalman Filter

Anal. Sci., 5, 329~334 (1989)

カルマンフィルターを用いると重なったクロマトグ
ラフィピークからどれだけの Shannon の情報量が得
られるかを、理論的に考察した。

Shintani, H. and Dasgupta P. K.*: Ion chroma-
tography using pH-detection

Frezenius J. Anal. Chem., 336, 38 (1990)

従来、イオンクロマトグラフィの検出の主流は電
気伝動度検出であった。イオンクロマトグラフィの
原理に従えばアニオン成分はサプレッサー通過後強酸
に変化し、カチオン成分はサプレッサー通過後強塩基
に変化する。それゆえ、それらの成分の pH 変化を検
出に適用できると考えた我々は、電気伝動度検出に加
えて pH による検出を試みた。その結果、電気伝動度

と同程度の感度で検出出来ることを確認した。さらに従来の膜型サプレッサーに加えて、バックグラウンドをさらに下げる目的で膜型の炭酸除去装置を付加したところ、より高感度が得られた。

* Texas tech university, USA

Shintani, H.: Difference of characteristics of paraperiodate and metaperiodate

Frezenius J. Anal. Chem., **336**, 38~39 (1990)

バラ過ようそ酸ならびにメタ過ようそ酸の間でピナリジオール化合物の開裂反応ならびに生成するアルデヒド化合物の比色定量における安定性などの違いが指摘されていた。我々はエチレングリコールにこれら過ようそ酸を作用させ生成するホルムアルデヒドを3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラゾン(MBTH)と縮合させて発色させる比色定量において、それぞれの過ようそ酸を別個に作用させた場合のこれらの過ようそ酸の差について検討した。

結論から言えばこれらの過ようそ酸の間に差は見られず、従来差が見られたと考えられていたのは、過ようそ酸そのものの性状によるのではなく、その液性(pH)に由来することがわかった。エチレングリコール量に対して過剰量にならない程度で液性のpHを5付近に保持された過ようそ酸を用いれば、いずれの過ようそ酸の場合も同様に満足のいく結果であった。

大津 晃*, 小嶋茂雄: ナフトール AS による接触皮膚炎

臨床皮膚科, **44**, 109~112 (1990)

ネル寝間着による色素沈着型接触皮膚炎を新たに経験したので、その原因物質について検討した結果、これまでの症例と同様に、ネルの染色の際に下漬け剤として使われたナフトール AS が原因となったものであることが確かめられた。患者の着用していたネル寝間着中のナフトール AS の含有量は、3450 ppm であった。ナフトール AS の化学構造とその抗原性との関連についても考察を行った。

* 茨城県西総合病院

小嶋茂雄, 鹿庭正昭, 五十嵐良明, 佐藤道夫, 中村晃忠, 門馬純子, 中路幸男, 黒川雄二: DC ブランド黄色綿セーターによる接触皮膚炎の原因物質の究明—ホスゲン(クロロフェニル)ヒドラゾン類—皮膚, **31** (増7), 24~33 (1990)

1987年6月に発生したDCブランド黄色綿セーターによる接触皮膚炎事故の原因究明をとおり、患者に

負担をかけずに接触皮膚炎の原因物質を探り出していくことのできる方法論の開発を試みた。すなわち、①事故品の抽出物を用いて感作モルモットを作成する、②このモルモットに、抽出物を種々の方法で分画したものをパッチして、陽性反応を示す画分を選び出す、③陽性画分についてGC-MS分析を行い、アレルゲンの化学構造を推定する”方法により原因物質の検討を行った、GC-MS分析の結果、陽性反応を示した画分に一致して4種のホスゲン(クロロフェニル)ヒドラジン類(PCPHs)が分布していることが分った。これらのPCPHsは、セーターに染着した黄色の色素(C. I. Pigment Yellow 16)が色落しの工程において次亜塩素酸ソーダと反応して生成したものである。そこで、PCPHsを別途合成し、感作モルモットおよび事故品の布のパッチで感作されたボランティアにパッチしたところ、いずれも強い陽性反応を示し、PCPHsが事故の原因物質であることが確認された。

Shintani, H. and Nakamura, A.: Analysis of a carcinogen, 4,4'-methylenedianiline, from thermosetting polyurethane during sterilization

J. Anal. Toxicol., **13**, 354~357 (1989)

高圧蒸気滅菌ならびに放射線滅菌された熱硬化症ポリウレタンである人工透析器のポッチング材部位を切り出し、メタノールで溶出させ、溶出されてくるMDAを高速液体クロマトグラフィーを用いて定量した。高速液体クロマトグラフィーの検出には芳香族アミンに特異的な電気化学検出器を用いた。

その結果、高圧蒸気滅菌ではMDAは生成されないが、放射線滅菌によりMDAが最大数ppmのオーダーで生成し、MDA生成量と放射線量との間には2次の回帰式が成立することが判かった。またメタノール溶出物をゲルろ過クロマトグラフィーで分子量を調べたところ、溶出物は数十万から数万のウレタンオリゴマーであることが判かった。

松村年郎, 亀谷勝昭, 野口忠彦*, 武田明治: 固体捕集剤を用いた空気中の二酸化硫黄の個人モニタリング法

日本公衆衛生雑誌, **36**, 823~827 (1989)

二酸化硫黄(SO₂)の個人曝露量と人体影響との関連性を明らかにする目的で、まず、個人曝露量を測定するための簡易測定法の開発を行った。

本法は空気中のSO₂をトリエタノールアミンを含浸させた捕集剤に捕集したのち、水で抽出後、生成した亜硫酸イオンを過酸化水素で硫酸イオンに酸化後、

クロラニル酸バリウム法で定量する方法である。本法の最小検出濃度は採気量が 288 l (0.2 l/min×24 hr) のとき 0.005 ppm, 標準液添加法による測定精度はくり返し測定で 1.9%, かつ, SO₂ の標準的な測定法であるパラローザニン法と同時測定を行っても測定値は ±5% 以内で一致する。本法を各種人々の個人曝露量の測定に適用した。その結果, 0.005~0.022 ppm の範囲で測定され, 本法が個人曝露量の測定法として実用性のあることが明らかとなった。

Ando, M., Matsui, S., Jinno, H. and Takeda, M.:
Urinary Excretion of Cyclic AMP in Cadmium-Intoxicated Rats

J. Toxicol. Environ. Health, 27, 307~315 (1989)

カドミウム連続投与によって発生するカルシウム負の状態の原因を究明するための一連の検討として, カルシウム代謝関係するビタミン D₃(VD₃), 副甲状腺ホルモン (PTH), 副甲状腺摘出 (PTX) 等の負荷に伴う尿中 cyclic AMP の排泄の変化について調べた。その結果, 1ヶ月のカドミウム投与群に VD₃, PTH, PTX 等の種々の処理を行ったところ, Control 群の変化と同様な挙動を示した。一方, 3ヶ月投与群における種々の処理した場合の Cyclic AMP の変化は Control ラットのよりも尿中 Cyclic AMP が増加することを認めた。このことから, カドミウムの連続投与によるカルシウムの負の状態は副甲状腺ホルモンの過剰分泌の可能性が示唆された。

Ishizaka, T., Suzuki, T. and Saito, Y.:
Metabolism of dibutyltin dichloride in male rats

J. Agric. Food Chem., 37, 1096~1101 (1989)

塩化ジブチルスズの雄ラットの腹腔内投与により, butyl (3-hydroxybutyl) tin dichloride, butyl (4-hydroxybutyl) tin dichloride および butyltin trichloride が酸に安定な代謝物として得られた。主たる酸-安定代謝物である butyl (3-hydroxybutyl) tin dichloride は腎に蓄積する傾向がみられた。butyl (4-hydroxybutyl) tin dichloride は尿中のみ検出された。なお, 脳には dibutyltin dichloride, butyl (3-hydroxybutyl) tin dichloride および butyltin trichloride がこれらの相対的極性の違いにもかかわらず存在していた。

Ishizaka, T., Nemoto, S., Sasaki, K. and Saito, Y.:
Simultaneous determination of tri-*n*-butyltin, di-*n*-butyltin, and triphenyltin compounds in

marine products

J. Agric. Food Chem., 37, 1523~1527 (1989)

トリブチル, ジブチルおよびトリフェニル錫化合物の同時分析法について検討した。試料をメタノールでホモジナイズしたのち, 塩化ナトリウム, 塩酸を加え, エチルエーテル-*n*-ヘキサン混液 (60:40) で抽出した。脂質をフロリジルカラムにより除いたのちエチルマグネシウムプロミドでアルキル化した。抽出したテトラアルキル錫は Sep-Pak フロリジルカートリッジにより精製したのち FPD 付ガスクロマトグラフィーにより定量した (定量下限: 各々 0.2 ng)。東京都内の小売店から購入した海産物試料の分析の結果, これらの試料が錫化合物, 中でも特にトリフェニル錫化合物により著しく汚染されていることが判明した。またトリブチル錫化合物は魚肝臓中で代謝されてジブチル錫およびそのアルキル側鎖の水酸基体で代謝分解されることが判明した。

Toyo'oka, T., Suzuki, T., Saito, Y., Furukawa, F., Takahashi, M., Hayashi, Y. and Imai, K.*:
Usage of ABD-F and SBD-F as prechromatographic labeling reagents for the simultaneous determination of thiols and disulfides in biological specimens

J. Pharmacobio-Dyn., 12, s-2, (1989)

生体中に存在するチオール・ジスルフィドの高感度同時分析法を開発した。初めにチオール化合物を蛍光試薬 ABD-F を用いて標識する。ついで未反応の ABD-F を除去した後, ジスルフィドを還元剤で対応する 2 分子のチオール化合物へと変換し, 2 番目の試薬 SBD-F で蛍光標識する。得られた ABD-thiol および SBD-thiol を蛍光検出-HPLC で分離定量した。本法によるチオール・ジスルフィド化合物の検出限界は 0.09~0.9 pmol であった。

* 東京大学医学部付属病院分院

Toyo'oka, T., Uchiyama, S. and Saito, Y.:
Effect of γ -irradiation on thiol compounds in grapefruit

J. Agric. Food Chem., 37, 769~775 (1989)

グレープフルーツ中のチオール化合物に対する ⁶⁰Co γ 線照射の影響を蛍光検出-HPLC によって調べた。未照射のグレープフルーツジュース中には還元型グルタチオン (GSH), システイン, システイニルグリシンのほか, 数種の未知化合物が確認され, それらの中で GSH が最も多く存在し平均値は 143.3 μ M であ

った。GSH 含量は照射線量にしたがって一次関数的に減少し、100 krad 照射時における残存率は80%であった。100 krad において得られた結果から GSH の G 値は0.29と計算された。標品の GSH を蒸留水またはクエン酸緩衝液 (pH 3) に溶解後 γ 線照射すると、GSH は酸化型のグルタチオン (GSSG) に定量的に変化した。しかし、実際試料のグレープフルーツでは GSSG の増加は認められなかった。

Toyo'oka, T., Suzuki, T., Saito, Y., Uzu, S.* and Imai, K.*: Fluorogenic reagent for thiols: 4-(N, N-dimethylaminosulphonyl)-7-fluoro-2, 1, 3-benzoxadiazole

Analyst, 114, 413~419 (1989)

ABD-F よりもチオール化合物に対して反応性が高く、特異的に反応する発蛍光試薬として DBD-F を新規合成した。DBD-F 自身は無蛍光性でありチオール基と反応すると励起波長 380 nm, 蛍光波長 510 nm 付近の強い蛍光を発した。DBD-F とチオールとの反応は50°C, 10分間で完了したが、SH 基を持たないアラニン, プロリン, シスチンやシステイン酸では同一条件下では反応せず、特異性も優れていた。チオール化合物を DBD-F で標識後蛍光検出-HPLC で分離検出したところ検出限界は0.92 (システイン), 0.16 (グルタチオン), 0.13 (ホモシステイン), 0.16 (N-アセチルシステイン), 0.32 pmol (α -メルカプトプロピオニルグリシン) であった。本法をラット臓器中のチオール化合物の測定に応用した。

* 東京大学医学部付属病院分院

Toyo'oka, T., Suzuki, T., Saito, Y. and Takahashi, A.: Electrochemical detection of mercapturic acid derivatives after separation by high-performance liquid chromatography

J. Chromatogr., 475, 391~399 (1989)

電気化学検出器 (ECD) 付逆相 HPLC 法によりメルカプトニル酸誘導体を分離定量した。ECD の応答は電圧の上昇 (+0.60~+0.85V) とともに増加したが一定値は得られなかった。モデファイアとしてはメタノールよりもアセトニトリルのほうが優れていた。本法によって得られた検量線は良い直線性を示し ($r=0.998$), CV 値は3.5%以下であった。ECD 応答はメルカプトニル酸のイオウ原子の酸化に基づいており、その近傍の微細構造に依存していた。+0.80Vでの検出限界は S-(3-hydroxybutyl) mercapturic acid の 0.21 pmol から S-(2-O-acetylbutyl) mercapturic

acid methyl ester の 8.3 pmol の範囲であった。

Toyo'oka, T., Furukawa, F., Suzuki, T., Saito, Y., Takahashi, M., Hayashi, Y., Uzu, S.* and Imai, K.*: Determination of thiols and disulfides in normal rat tissues and hamster pancreas treated with N-nitrosobis (2-oxopropyl) amine using 4-(aminosulfonyl)-7-fluoro-2, 1, 3-benzoxadiazole and ammonium 7-fluoro-2, 1, 3-benzoxadiazole-4-sulfonate

Biomed. Chromatogr., 3, 166~172 (1989)

蛍光検出-HPLC 法によりハムスターおよびラット臓器中のチオール・ジスルフィドの同時分析を行った。ウィスター系ラットの肝臓, 脾臓, 心臓, 肺, 胃, 膀胱, 子宮, 卵巣, 膵臓, 腎臓, 副腎中にはシステイン (CySH), シスチン (CySSCy), 還元型 (GSH) および酸化型のグルタチオン (GSSG) が様々な濃度で存在していた。老化ラット (111週令, F344) における CySH および CySSCy の濃度は若いラット (8週令, F344) よりもわずかに高かった。一方、ハムスターの膵臓に比較的選択的にガンを誘発させる N-nitrosobis (2-oxopropyl) amine (BOP) をシリアンゴールドンハムスターに投与後チオール・ジスルフィド量を測定したところ、未投与群と比較し、BOP 処理群の方が GSH で19倍、GSSG では14倍ほど高かった。

* 東京大学医学部付属病院分院

Toyo'oka, T., Suzuki, T., Saito, Y., Uzu, S.* and Imai, K.*: Evaluation of benzofurazan derivatives as fluorogenic reagents for thiols and amines using high-performance liquid chromatography

Analyst, 114, 1233~1240 (1989)

チオールおよびアミンに対する反応性を3種の発蛍光試薬 DBD-F, ABD-F, PBD-SO₂F で比較した。上記の3種はチオール化合物と反応し励起波長 390 nm, 蛍光波長 515 nm に蛍光を発した。すべての試薬およびそれらの加水分解物は蛍光を示さなかった。一方、アミンに対する反応では DBD-F が最も速く、チオール標識体と異なりアミン標識体での励起、蛍光波長は DBD-proline で 466 nm, 596 nm, ABD-proline で 466 nm, 602 nm, PBD-SO₂-proline で 453 nm, 566 nm であった。また蛍光強度はアルカリ性溶液よりも中性から酸性溶液において大きかった。9種のアミノ酸を DBD-F で標識後逆相 HPLC で分離検出す

ると、検出限界は数百フェムトモル程度であった。

* 東京大学医学部付属病院分院

Toyo'oka, T., Okudaira, K., Kurihara, M., Miyata, N., Takahashi, A., Suzuki, T. and Saito, Y.: **Determination of N-acetyl-S-carbethoxycysteine in rat and mouse urine by liquid chromatography with fluorescence detection**

Anal. Chim. Acta, 226, 109~119 (1989)

ラットおよびマウス尿中 N-acetyl-S-carbethoxycystein (CMA) の高感度、選択的な分離検出法を開発した。尿を酸性とした後酢酸エチルで CMA 抽出し、HPLC で CMA 分画を分取する。次いで内部標準物質 (GSH) 存在下アルカリで N-acetylcysteine に分解後 SBD-F で蛍光標識し、HPLC で分離定量する。ウレタンを 0.05 g/kg から 1.0 g/kg の範囲でラットおよびマウスの腹腔内に注射後 CMA 排泄量を測定すると投与量と供に CMA 量は上昇し、0.2 g/kg のときに最大に達した後減少した。しかし、CMA はウレタン未投与群によっても排泄されており、全尿におけるその量の平均値はラットで 12.5 nmol、マウスで 10.7 nmol であった。

Imai, K.*¹, Tsukamoto, Y.*¹, Uzu, S.*¹, Kanda, S.*¹, Toyo'oka, T., Tachiiri, Y.*² and Fujiwake, S.*²: **Dynamic analytical chemistry: A trial study of the interaction of fluorogenic reagents with living chinese hamster ovary cells**

Anal. Chim. Acta, 223, 299~308 (1989)

物質の極在部位の確認や移動量を調べる動的分析化学の概念を生きた細胞を使って紹介した。ここでは chinese hamster ovary cell と SIT カメラを備えた fluorescence microscope を用いてアミンやチオールに対する蛍光標識試薬の動きを観察した。NBD-F は初めに細胞の表面に吸着しそれから徐々に細胞の内部に浸透した後、ミトコンドリアと反応し、黄色の蛍光を発した。NBD-F と反応したものの主生成物の 1 つは phosphatidyl-ethanolamine であることがわかった。一方、OPA や ABD-F では細胞内のある種の顆粒と反応し、青色の蛍光を発した。

*¹ 東京大学医学部付属病院分院

*² 浜松ホトニクス(株)

Kawamura, Y., Uchiyama, S. and Saito, Y.: **Improvement of the half-embryo test for detection of gamma-irradiated grapefruit and its**

application to irradiated oranges and lemons

J. Food Sci., 54, 1501~1504 (1989)

照射グレープフルーツの判別法である half-embryo test について判別までの期間短縮を試みたところ、培養温度を 35°C にすると発芽率は 3 日目で最高に達し約半分の期間で判別可能となった。またジベレリン添加によりさらに短縮された。一方、照射オレンジおよびレモンについて half-embryo test の適用を試みたところ照射グレープフルーツと同様の結果が得られた。すなわち、非照射では half-embryo の根および芽は順調に生長し、発芽率は 3~4 日目で最高に達したが、0.15 kGy 以上の照射では根の伸長は大きく抑制され、また大部分は全く発芽しなかった。以上のことから、発芽率を指標とした half-embryo test は、グレープフルーツ、オレンジおよびレモンに適用でき、また再現性よく迅速に照射の有無を判別できる有用な試験法であった。

Kobayashi, T., Turumizu, A.*¹, Toyoda, M. and Saito, Y.: **Contents of chlorophylls, β -carotene and pesticide residues in butter head lettuce produced by various cultivation methods**

Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 36, 676~681 (1989)

水耕栽培や組織培養法の利用によって栽培された野菜と従来の土耕栽培による野菜の成分上の異同を検討するため、サラダ菜を用いてそのクロロフィル a, b および β -カロチンを測定した。まずサラダ菜のカルス化と再分化を導く条件を検討し、その組織培養系を確立し、次いで各段階でのクロロフィル a, b および β -カロチンを測定したところ、土耕品では両色素含量に 25:1 に近い相関があったが、水耕品では β -カロチンはほぼ一定であったのに対し、クロロフィル含量がばらついており、相関は認められなかった。また、トリクロロエチレンおよび 5 種農薬の残留量を測定した結果、水耕品からはいずれも検出されず、汚染を受けにくいことがわかった。

* 北里大学付属北里保健衛生専門学院

高木加代子, 豊田正武, 藤山由起*, 斎藤行生: **ジャガイモ中の α -チャコニンおよび α -ソラニンの加熱調理による影響**

食衛誌, 31, 67~73 (1990)

ジャガイモ中の α -チャコニン (CHA), α -ソラニン (SOL) の煮沸, 電子レンジ加熱, フライによる減少を調べた。両アルカロイドは 5% 酢酸溶液で抽出

し、Sep-Pak C18 で精製した後、高速液体クロマトグラフィーで定量を行った。CHA および SOL 含量は、煮沸しても減少が見られず、電子レンジ加熱で若干の減少が認められた。フライの場合には油の温度による影響が大きく、150°C では両アルカロイドの減少が見られず、170°C は減少の見られる場合があったが、変動が非常に大きく有意とは認められなかった。210°C では CHA で35.1%、SOL で40.3%の減少が認められた。一般家庭における調理の加熱条件では CHA および SOL は大部分残存し、除去効果は期待できないことが確認された。

* 北里大学付属北里保健衛生専門学校

Takagi, K., Toyoda, M., Saito, Y., Niwa, M. and Morimoto, H.*: **Composition of fermented grape juice continuously produced by immobilized *Lactobacillus casei***

J. Food Sci., 55, 455~457, 469 (1990)

Lactobacillus casei を固定したセラミックビーズを充てんしたバイオリアクターを用い、ぶどう果汁の連続発酵を行った。本システムで生産された発酵果汁の成分を、遊離菌を用いた従来法の発酵果汁と比較したところ、固定化 *L. casei* による発酵開始直後の発酵液ではケイ素含量が増加したが、これはセラミックビーズからの溶出によると思われる。ダイアセチルとメチオニンの含量が低くなっており、アスパラギン酸とシステインが高くなっていったが、その他大きな相違は見られなかった。5試行のうち2試行で *B. acillus megaterium* によるリアクターの汚染が発生した。

* キリンビール(株)

武田由比子, 小沼博隆, 内山貞夫, 斎藤行生: **高菜漬中のピロフェオホルバイド a, フェオホルバイド a の生成に対する細菌学的要因の検討**

食衛誌, 30 (3), 228~232 (1989)

高菜の古漬物でのフェオホルバイド a (Pheo-a) やピロフェオホルバイド a (Pyro-a) の生成要因を調べる目的で、新鮮高菜を各種処理条件下で塩漬けし、微生物の変化と分解物の生成量の測定を行った。塩漬け7日目までは細菌数と *Lactobacillus* 数の増加と平行して Pheo-a と Pyro-a 生成量が増加した。また、煮沸殺菌あるいはソルビン酸添加した高菜では両分解物とも生成量は対照より少なかった。さらに7日目の塩漬試料のホモジネートの遠心分離 (3000 rpm) 上澄液のミリポアフィルター (0.45 μm) によるろ液 (無菌)、残さ (有菌) 画分について、クロロフィル a (CHL-a)

あるいは Pheo-a との共存による分解物の生成を比較したところ、残さ画分での生成量 (CHL-a から Pheo-a と Pyro-a, Pheo-a から Pyro-a が生成される) がろ液画分より明らかに多かった。塩漬中の高菜からの Pyro-a の生成は漬物中に存在する細菌の分解酵素の作用の寄与が大きいと推察された。

Ishiwata, H., Sugita, T. and Yoshihira, Y.: **Comparison of the Bromine and 4-Amino-antipyrine Methods for the Detection of Phenol Released from Utensils and Container-Packages in Contact with Food**

J. Food Hyg. Soc. Japan, 30, 300 (1989)

食品用ゴム製品や樹脂塗装缶から溶出するフェノールの食品衛生法による公定試験法 (4-アミノアンチピリン法, 比色法) とホルムアルデヒドを原料とする合成樹脂製品から溶出するフェノールの公定試験法 (ブロム法, 沈澱法) について比較検討した。ブロム法では、検量線がシグモイド状を呈し、観察者による判定のバラツキが大きく、また、メラミンも沈澱が生じることが明かとなった。合成樹脂製品から得た溶出液について、比色法を応用したが、特に問題はなかった。

武田由比子, 豊田正武, 義平邦利: **クロロフィル関連化合物の溶血に及ぼす影響**

食衛誌, 30 (3), 223~227 (1989)

クロロフィルは加工や保存に伴う分解が速く、これらの分解物が食品の酸化を促進したり、動物に対して悪影響を及ぼす。それらのうち、比較的、食品中に存在率の高い Chlorophyll (CHL)-a, b, Pheophytin (PHY)-a, b, Pyropheophytin (PYROPHY)-a, Pheophorbide (PHEO)-a, Pyropheophorbide (PYRO)-a の生体膜への影響をウサギ赤血球の溶血作用で比較したところ、本実験条件下での50%溶血濃度は PYRO-a が 0.0005 μmole/ml 以下、PHEO-a = 0.0012, PHY-a = 0.0156, PHY-b = 0.0092 μmole/ml であった。CHL の溶血作用は非常に弱く 0.02 μmole/ml の高濃度でも20%以下であった。また、これらの作用は赤血球存在下での化合物の分解によるところも多く、特に、PHY-a より溶血作用の強い PHY-b は5時間後の残存率が11%であり、検液から PHEO-b が検出され、一方 PHY-a および PYROPHY-a からそれぞれ PHEO-a, PYRO-a がわずかに検出された。

武田由比子, 義平邦利: **生体膜の酸化に対するクロ**

ロフィル関連化合物の影響について

食衛誌, 31 (1), 30~35 (1990)

劣化した油中の hydroperoxide から炭化水素を生成させ、酸化の指標とする方法の開発により、食用油脂に対するクロフィルおよびその分解物の影響について報告したが、それを応用して、C3H マウス皮膚繊維芽細胞を用いて各種クロフィル関連化合物の光酸化促進作用を比較した。ペンタンを指標として検索すると、その生成量はピロフェオホルバイド-a が最も高く、次にフェオホルバイド-a であった。この両物質に比べ、フェオフィチン (a, b) は低いが、クロフィル (a, b) よりは極くわずかに高く、細胞損傷への影響も同様の傾向であり、ペンタン生成量と細胞損傷率に相関性 ($r=0.9587$) があった。

石綿 塵：生活環境におけるメラミンおよびその関連化合物

食衛誌, 30, 209 (1989)

食器に用いられるメラミン樹脂の原料モノマーであり、また、環境中に微量ながら広く分布しているメラミンについて、衛生的観点から総論的に論じた。

Maitani, T., Inouye, S., Uchiyama, S. and Saito, Y.: Comparison of metal-metal interaction after coadministration of arsenic and selenium or arsenic and tellurium into mice

J. Pharmacobio-Dyn., 13, s-14 (1990)

生体内での相互作用を比較する目的で、セレンおよびテルルをヒ素とともに投与し、臓器中投与元素濃度および必須元素濃度を ICP 発光分光法で測定した。セレンをヒ素とともに投与すると、肝臓中セレン濃度の減少と腎臓中セレン濃度の上昇が認められたが、テルルをヒ素とともに投与した場合には、肝臓と腎臓の両テルル濃度の減少が認められた。肝臓中のセレンおよびテルル濃度の減少により、肝亜鉛-チオネインの誘導量も減少した。また投与元素の存在状態を高速液クロ- ICP 直結法で分析した。

Sugita, T., Isiwata, H. and Yoshihira, K.: Release of Formaldehyde and Melamine from Tableware Made of Melamine-Form-aldehyde Resin

Food Addit. Contam., 7, 21 (1990)

メラミン樹脂製食器から溶出するメラミンとホルムアルデヒドとの関係について検討した。溶出量はともに温度に影響されるが、両者の濃度比には変化がなかった。4%酢酸を用い、60°Cで30分処理したときのホル

ムアルデヒドとメラミンの濃度は各々 0.0 ± 0.1 ppm, 0.04 ± 0.07 であった。95°C で繰り返し溶出試験を行うことにより、メラミンのモル濃度に対するホルムアルデヒドのモル濃度の比率 (y) は、 $\ln y = -1.4344 \ln x + 3.7814$ ($r = -0.9984$) の式にしたがって減少した (ただし、 x は溶出試験回数、 r は相関係数)。溶出試験繰り返し12回以後はその比は1.7から1.9の間で一定であった。

合田幸広, 齊藤礼子, 佐藤恭子, 神蔵美枝子, 義平邦利: イオンクロマトグラフィーによる食用赤色3号および同105号中のヨウ化物の定量

食衛誌, 30 (5), 309~395 (1989)

食用赤色3号および同赤色105号 (R3 および R105) 中の不純物であるヨウ化物について、イオンクロマトグラフィーを用いる定量法を検討した。国立衛生試験所標準品にヨウ化ナトリウム (NaI) を添加した回収実験では、電気伝導度検出法 (CD 法)、紫外部検出法の2法とも、ほぼ100%の良好な回収率を得た。そこでイオンの一般的検出法であるCD法を用い、実態の明らかにされていない市販食用色素中のヨウ化物量を測定した。その結果、R3 では31検体中28検体から NaI として色素総量の0.02~0.26%の、R105では9検体すべてから0.06~0.26%のヨウ化物を検出した。両色素とも、各製造業者ごとの定量平均値の偏りが見られたが、市販品全ての定量平均値は、0.075% (R3), 0.12% (R105) で、R105の方がやや高い結果を得た。

Tanno, M., Sueyoshi, S. and Kamiya, S.: 1,3-Nitroso rearrangement and trans-nitrosation of 1-aryl-3-benzyl-1-nitrosooureas which decompose to liberate nitrosyl radical under mild conditions

Chem. Pharm. Bull., 38, 49~54 (1990)

ジ置換、1-aryl-1-nitrosoourea 類を非極性溶媒中、33°C で分解させると、3-nitrosoourea 類へ異性化する。この熱分解反応を嫌氣的条件であるアルゴン下で行うと、異性化が速くなる事を見出した。このとき、競争的に起こるジアゾエステル転位は、逆に好氣的条件で進行した。また、1-aryl-1-nitrosoourea にジ置換尿素類を共存させ、トランスニトロソ化を行うと、本反応もアルゴン下の方が速かった。これらの結果から、N-NO 結合はラジカル解裂を起こし、酸素分子は妨害反応をすることを考えた。酸素濃度が低いときは、O-nitrosoisourea 中間体を生成した後、分子内転位反応

により 3-nitroso 体へ異性化し、また、尿素分子が存在するとき、中間体はニトロ化剤として作用すると推定した。一方、シ置換 monoaryl 尿素類を発煙硝酸でニトロ化すると、3-alkyl-1-(2-nitro-4-tolyl)-3-nitrosourea 類を生ずることが明らかになった。ニトロ化的条件下でニトロ化が起こる異常反応は発煙硝酸中の N_2O_4 によるものと推定した。

Kikuchi, Y.*¹, Irie, M.*¹, Ikebuchi, H., Sawada, J., Terao, T., Nakayama, S.*², Iguchi, S.*² and Okada, Y.*²: **Antigenic determinants of rat metallothioneins. Fine epitope mapping for a murine monoclonal autoantibody and rabbit polyclonal antisera**

J. Biochem., 107: 650 (1990)

メタロチオネインに対するモノクローナル抗体 (MT189-14-7) およびウサギ抗血清の認識するエピトープを、ラジオイムノアッセイにおける合成ペプチドの阻害活性を利用して、明らかにした。

*¹ 星薬科大学

*² 神戸学院大学薬学部

Ikebuchi, H., Teshima, R., Hirai, K.*¹, Sato, M., Ichinoe, M. and Terao, T.: **Production and characterization of monoclonal antibodies to nivalenol tetra-acetate and their application to enzymelinked immunoassay of nivalenol**

Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 371, 31 (1990)

トリコテセン系マイコトキシン、ニバレノールの 4 アセチル体 (nivalenol tetraacetate) に対するモノクローナル抗体を作製し、酵素免疫測定法 (ELISA) の系を開発した。3種のモノクローナル抗体が得られたが、そのうち、D18,102,59 抗体の特異性が最も高かった。測定感度は、0.1 ng/assay であった。大麦中のニバレノールの測定を行ったところ、ガスクロマトグラフィーで得られた結果と我々が開発した ELISA 法で得られた結果により相関が得られ、ELISA 法が、汚染穀類中のニバレノールを測定するのによい系であることが示された。

* 日本医科大学

Teshima, R., Hirai, K.*¹, Sato, H., Ikebuchi, H. and Terao, T.: **Radioimmunoassay of nivalenol in barley**

Appl. Environ. Microbiol. 56, 764 (1990)

トリコテセン系マイコトキシン、ニバレノールの 4

アセチル体 (Tetra-Ac-NIV) に対するポリクローナル抗体を作製し、ラジオイムノアッセイ (RIA) の系を開発した。この方法による検出限界は、0.5 ng/ml であった。この抗体は、acetyl-T-2-toxin, scirpenol triacetate とは交差反応性を示したが、他のマイコトキシンとは反応しなかった。次いで、大麦中のニバレノールの測定を行った。3段階の clean-up 操作の後、RIA 法でニバレノールの測定を行ったところ、ガスクロマトグラフィーで得られた結果とよい相関で得られた。このことから、我々の開発した RIA 法が、穀類中のニバレノールを定量するにあたり、簡便で精度のよい方法であることが示された。

* 日本医科大学

Teshima, R., Suzuki, K.*¹, Ikebuchi, H. and Terao, T.: **Enhancement of the phosphorylation of membrane bound myosin light chain by antigen stimulation in rat basophilic leukemia cells**

Molec. Immun. 26, 641 (1989)

ラット好塩基球細胞からの抗原刺激に伴う脱顆粒反応が起きる際に、18 KDa 蛋白質のリン酸化の促進が起きることが観察された。このリン酸化をうけた 18 KDa 蛋白質は、ミオシン抗体を用いた免疫沈降法による結果などから、ミオシン軽鎖であると同定した。このリン酸化された 18 KDa 蛋白質は、主に膜画分に存在していた。この 18 KDa 蛋白質のリン酸化は、外液 Ca^{2+} 依存性で、また、カルモジュリン阻害剤である trifluoperazine で抑えられるので、 Ca^{2+} -カルモジュリン依存性の反応によって起きていると思われる。

Morimoto, K., Sato, M., Fukuoka, M., Hasegawa, R., Takahashi, T., Tsuchiya, T., Tanaka, A., Takahashi, A. and Hayashi, Y.: **Correlation between the DNA damage in urinary bladder epithelium and the urinary 2-phenyl-1, 4-benzoquinone levels from F344 rats fed sodium O-phenylphenate in the diet**

Carcinogenesis, 10, 1823~1827 (1989)

OPP-Na の尿中フリー代謝物である OPP, phenylhydroquinone (PHQ), 2-phenyl-1, 4-benzoquinone (PBQ) を F344 ラット膀胱に注入し、上皮細胞 DNA の損傷について調べた。雌雄いずれのラットにおいても 0.05~0.1% PBQ で濃度に依存した DNA 損傷作用を認めた。OPP-Na を含む飼料で飼育すると 3~5 ヶ月で 1% および 2% 投与群で弱いながら DNA の

損傷が認められ、用量-反応関係も存在した。5ヶ月目の雄性ラットの尿中フリー代謝物を測定すると、0.5~2% OPP-Na の飼料レベルに比例して、PHQ や PBQ は増加した。2%雌性ラットの尿中 PHQ および PBQ 濃度は、2%雌性ラットのこれら濃度より有意に高かった。

発癌頻度の高い雄性ラットにおいて PHQ や PBQ の濃度が高く、また PBQ を *in situ* で膀胱に注入すると DNA 損傷や単純過形成も認められることから、キノン代謝物、PBQ が活性代謝物であることがわかった。

森本和滋：タバコに特異的なニトロサミンは強力な発癌性を有し、DNA を修飾する

ファルマシア, 25, 63~64 (1989)

タバコの煙や噛みタバコに高濃度存在しているタバコ発癌に重要な役割を演じているものと考えられている、ニコチンの N-ニトロサミン、NNK や NNN の肺 DNA のアルキル化とその修復についての最近の研究動向について紹介した。

Kurebayashi, H., Sato, M. and Tanaka, A.: Gas chromatographic/mass spectrometric determination of alicyclic primary hydroxylamines in metabolic studies *in vitro*

Biomedical & Environmental Mass Spectrometry, 18, 724~726 (1989)

脂環族ケトオキシムを還元して脂環族ヒドロキシルアミンを合成した。これを無水酢酸でアセチル化することで、容易に GC/MS で定性、定量することが可能となった。このアセチル体のマススペクトルは、脱アシル化フラグメントイオン (M-42, M-42-42, etc.) が優先し、Perdeuteroacetyl 化体でも脱アシル化 (M-44, M-44-44, etc.) が確認された。これらは、脂環族一級アミンのアセチル体のマススペクトルとは明確に区別することができた。生体内で生ずるヒドロキシルアミンは一般に不安定で、有害物質であることも多い。脂環族一級アミンはウサギ肝ミクロソームで比較的不安定なヒドロキシルアミンに代謝され、その際、分子状酸素18が取り込まれることが証明された。

紅林秀雄, 田中 彰：脂環族一級アミンのウサギ肝ミクロソームによる脱アミノ反応機構
RADIOISOTOPES, 39, 1A (1990)

重要な生体反応の一つに脂環族一級アミンのミクロソームにおける脱アミノ反応がある。かつて人工甘味

剤として使用されていたチクロ (sodium cyclamate) の尿中代謝物の一つ、cyclohexylamine やその類縁化合物の脂環族一級アミンは、NADPH および酸素存在下のウサギ肝ミクロソームによりケトンやアルコールに脱アミノ化される。その反応機構として、チクロ P-450 による α -位炭素の水酸化されたカルビノールアミンがケトンとアンモニアに分解する経路、および N 原子の水酸化で生成するヒドロキシルアミンやオキシムが分解される経路について解説した。

K, Wierzba.*1, Sugiyama, Y.*2, Okudaira, K., Iga, T.*2 and Hanano, M.*2: Uptake of Colchicine, a Microtubular System Destructuring Agent, by Isolated Rat Hepatocytes

Pharmac. Res., 6, 235 (1989)

微小管系の阻害剤であるコルヒチンのラット遊離肝細胞への取り込みについて検討した。取り込み過程には飽和があり、その初速度は代謝阻害剤、SH 基修飾存在下で低下した。また細胞内濃度は細胞外の20倍以上に濃縮されたが、これは細胞内外の結合では説明できないことを示した。以上からコルヒチンの肝取り込み過程は能動輸送系によることが示唆された。

*1 大鵬薬品工業(株)

*2 東京大学薬学部

三瀬勝利, 宮原美知子：腸管感染症起因細菌の制限酵素産生性の疫学への応用

モダンメディア, 36, 122~134 (1990)

腸管感染症をひき起こすグラム陰性桿菌から、数%の割合で制限酵素産生菌が見い出された。特に、*Salmonella infantis*, *Salmonella thompson*, *Salmonella blockley* および *Yersinia enterocolitica* 08 から特定の制限酵素が高率に見い出され、制限酵素産生性が、これらの菌の疫学に応用出来ることが示された。

Miyahara, M., Nakajima, K.*1, Kawanishi, T.*2 and Mise, K.: SshAI restriction endonuclease from *Salmonella shikmonah*

FEMS Microbiol. Lett., 66, 245~248 (1990)

Salmonella shikmonah から新型制限酵素 SshAI を分離精製し、その認識切断部位を 5'-CCTNAGG-3' と決定した。同時に、すでに発見されている他の *Salmonella* の制限酵素の認識塩基配列を比較し、相互に類似性のあることを見出した。*Salmonella* の制限酵素は同一の起源から進化しているのではないかと考

えられる。

*1 東京大学医学研究所

*2 日本食品衛生協会

Miyahara, M., Nakajima, K.*1, Shimada, T.*2 and Mise, K.: **Restriction endonuclease PshAI from *Plesiomonas shigelloides* with the novel recognition site 5'-GACNN/NNGTC** *Gene.*, **87**, 119~122 (1990)

新型制限酵素 PshAI を食中毒細菌 *Plesiomonas shigelloides* より分離精製した。収率は高く、1g の細胞あたり 400 u 以上の酵素が得られた。PshAI は 5'-GACNN/NNGTC-3' という新奇な塩基配列を認識、切断した。5'-GACNN/NNGTC-3' を認識する制限酵素は今まで発見されていないので、本酵素は組換え DNA 実験に有用な手段を提供することになろう。

*1 東京大学医学研究所

*2 国立予防衛生研究所

Ichige, A.*1, Matsutani, S., Oishi, K.*2 and Mizushima, S.*1: **Establishment of gene transfer systems for and construction of the genetic map of a marine *Vibrio* strain** *J. Bacteriol.*, **171**, 1825~1834 (1989)

海洋細菌 *Vibrio* sp. 60 株における 2 種の遺伝子伝達系を開発した。一つは、新たに分離されたバクテリオファージ As3 による普遍形質導入系で、染色体マーカーを 10^{-4} ~ 10^{-6} の頻度で導入した。もう一つは接合による遺伝子伝達系である。接合は、Tfr 供与体、つまり、トランスポゾンにより組換えが促進される (transposon-facilitated recombination) ように新たに構築された系を用いて行われた。Tfr 供与体は、宿主域にプラスミド RP4 と染色体の両方にトランスポゾン Tn10 を導入することにより構築し、染色体上の Tn10 の挿入部位からの染色体遺伝子の片寄った遺伝子伝達を起こした。これらの遺伝子伝達系により、ビブリオの染色体地図を作製した。

*1 東京大学応用微生物研究所

*2 日本大学農獣医学部

Tanamoto, K., Schade, U.*1, Rietschel, E. T.*1, Kusumoto, S.*2 and Shiba, T.*2: **Endotoxic induction of prostaglandin release from macrophages by nontoxic lipid A analogs synthesized chemically** *Infect. Immun.*, **58**, 217~221 (1990)

合成リピド A による、マクロファージのプロスタグランジン誘導活性を天然の LPS と比較した。用いた合成化合物はモノメリック、もしくはダイメリックのグルコサミンにリン酸、ミリスチン酸、3-OH ミリスチン酸、3-OH ミリストイロキシンミリスチン酸が異なった組合せで結合した化合物群であり、いずれも天然のリピド A とは構造的に脂肪酸の結合位置が異なることから多くの生物学的テストにおいてエンドトキシン活性がないことを証明した化合物群である。しかしながら、これらの化合物の多くはウサギの肺、およびマウスの腹腔由来のマクロファージを活性化してプロスタグランジン (E_2 , $F_2\alpha$) を産生し、あるものは天然のリピド A に匹敵する強い活性を示した。エンドトキシン耐性の C3H/HeJ マウス由来の腹腔マクロファージを用いた実験により、ジグルコサミン構造化合物、および天然のリピド A によるプロスタグランジンの誘導はエンドトキシンに特異的な機構、またモノサッカライド構造化合物の場合は非特異的な機構によることが証明した。以上の結果はまた、ある種のエンドトキシン活性が分離した構造体の存在が証明であり、エンドトキシンの生体に有利な活性のみを持ち、毒性のない化合物の分離の可能性が示唆された。

*1 Borstel Institute, West Germany

*2 大阪大学理学部

Tanamoto, K., Schade, U.* and Rietschel, E. T.*: **Sensitization of alveolar macrophages to lipopolysaccharide induced prostaglandin synthesis by exogenous prostaglandins** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **165**, 526~532 (1989)

ウサギの肺のマクロファージは、LPS やリピド A に対して極めて感受性が高く、多量のプロスタグランジン (E_2 , $F_2\alpha$) を産生した。この LPS によるウサギの肺のマクロファージからのプロスタグランジン $F_2\alpha$ の誘導活性は、生理的濃度のプロスタグランジン E_2 を培養液中に加えることにより大幅に増強されることを見出した (3~5 倍)。プロスタグランジン E_2 単独ではプロスタグランジン $F_2\alpha$ の誘導活性は全く認められず、非刺激濃度の LPS や、刺激濃度のゼイモザンとの共存でもこの作用は見られなかった。また、この増強効果はプロスタグランジン E_2 を LPS と同時に細胞に投与したときに最も強く現れた。この現象はプロスタグランジン E_2 の代わりにプロスタグランジン I_2 を使ったときの方がより強く現れた。一方、プロスタグランジン $F_2\alpha$ にはそのような効果は認められ

なかった。以上の結果は、遊離されたプロスタグランジンが再び、LPS で活性化されたマクロファージに作用して、そのアラキドン酸代謝物のシクロオキシゲナーゼ代謝系を調節し得る事を示唆している。

* Borstel Institute, West Germany

Fukuda, I.*¹, Tanamoto, K., Kanegasaki, S.*¹, Yajima, Y.*² and Goto, Y.*²: **Degradation of bacterial lipopolysaccharides in rat hepatocytes in vitro**

Br. J. Exp. Path., 70, 267~274 (1989)

ラットの肝実質細胞に於けるエンドトキシンの細胞内への取り込み、および解毒分解作用を、種々の部位をアイソトープラベルした LPS を用いて検討した。肝実質細胞はO抗原部分を持たないR型の LPS を経時的、かつ用量依存的に取り込んだ。脂肪酸部分を特異的にラベルした LPS との培養後、上清中に LPS の組成脂肪酸の一つである標識 3-ヒドロキシミリスチン酸と、トリグリセリドが 7:1 の比率で遊離することがわかった。以上の結果は肝実質細胞において脱アシル化によるエンドトキシンの解毒が行われていることを示している。

*¹ 東京大学医科学研究所

*² 東北大学医学部

Sakai, A. and Sato, M.: **Improvement of carcinogen identification in BALB/3T3 cell transformation by application of a 2-stage method**

Mutation Res., 214, 285~296 (1989)

培養細胞トランスフォーメーション試験による発癌物質の検出では、発癌物質のうち多環芳香族炭化水素は陽性を示す確率が高いが、その他の化合物については必ずしも良好な結果は得られていない。そこで、試験法の改良を試み、2段階トランスフォーメーション法を適用することにより、試験結果を向上できることを示した。MNNG, AF-2, Trp-P-1, Trp-P-2, BHA等は、標準法では陽性を示さないが、2段階法によると陽性を示した。

佐藤昭子*¹, 品川邦汎*², 小沼博隆: **食肉、食肉製品および食中毒事例から分離したセレウス菌の薬剤感受性**

防菌防黴誌, 17, 11~14 (1989)

食肉、食肉製品および食中毒事例から分離したセレウス菌(184株)の薬剤感受性を調べたところ、大部分の菌株はサルファ剤およびβ-ラクタム系抗生剤に

対し耐性を示した。食肉、食肉製品由来株は、サルファ剤耐性145/184株(78.8%)、アンピシリン耐性138/184株(75.0%)およびセフェゾリン耐性141/184株(76.6%)であり、80%以上の菌株がこれら3剤に対し耐性を示した。また、食中毒事例由来株の耐性パターンも同様の傾向を示した。食肉、食肉製品および食中毒事例由来株のアンピシリン耐性株の大部分は、β-ラクタマーゼ産生株でアンピシリンおよびペニシリンGを分解することからペニシリナーゼと考えられた。

*¹ 県立新潟女子短期大学

*² 岩手大学農学部

尾崎寿司*¹, 朝倉征雄*¹, 村瀬 稔*², 中西寿男*², 小沼博隆, 中村博臣*³: **食品中のサルモネラ迅速検出キット, Q-TOROL (Dynatech) の評価**

食品と微生物, 6, 113~116 (1989)

Q-TOROL はサルモネラに対するモノクロナール抗体を使用し、抗原検出を免疫的に行うサルモネラ迅速検出キットである。Q-TOROL によるサルモネラ検出性能を評価するために、3機関が同一材料、方法(本法と従来法)を用いて比較実験を行った。その結果、従来法に比べわずかの false positive が認められたものの、false negative は認められず、食品からのサルモネラ検出における Q-TOROL の迅速性と信頼性が評価された。

*¹ 大洋漁業(株)

*² 神戸市環境保健研究所

*³ 長瀬産業(株)

小沼博隆: **食品細菌の迅速、簡便検査法について**

食品衛生研究, 39, 39~53 (1989)

諸外国ならびに日本で開発され、食品の微生物検査領域で活用が期待される簡易・迅速法および自動化機器類を紹介し、その特徴、適応および問題点について解説した。

勝部泰次*¹, 品川邦汎*², 小沼博隆, 小久保彌太郎*³, 渡邊宣昭*⁴: **食鳥処理場における微生物制御に関する基礎的研究**

伊藤記念財団 昭和63年度 食肉に関する助成研究調査成果報告書, 7, 221~229 (1989)

食鳥処理場において衛生的な食鳥肉を生産するための有効な処理方法を確立することを目的に以下の実験を行った。

(1) 有機酸の除菌効果を調べたところ、湯漬水中の除菌効果は認められたが、屠体では認められなかった。

(2) 次亜塩素酸塩の除菌効果をサルモネラ、カンピロバクターを用いて調べたところ、pH 4.0 より pH 3.0 に調整することによって、除菌効果が増大した。

*1 日本大学農獣医学部

*2 岩手大学農学部

*3 東京都衛生研究所

*4 国際学院埼玉短期大学

一戸正勝：食品とカビ毒について

食品衛生研究, 39, 79~87 (1989)

カビ毒(マイコトキシン)として研究者の間で認識されている化合物の数はおよそ300種類を超えているが、食品、食品原料や家畜、家禽飼料などを汚染していることが確認されている自然汚染カビ毒はアフラトキシンをはじめニバレノール、デオキシニバレノール、ゼアラレノンなどのフザリウム毒素類の他オクラトキシン、チトリニンなどに限られている。これらのカビ毒の汚染状況、食中毒との係り合い、行政対応などにつき最近の調査研究の動向、貿易上問題となる世界各国のカビ毒規制の状況につき解説した。

Nozawa, K.*1, Horie, Y.*2, Udagawa, S., Kawai, K.*1 and Yamazaki, M.*3: Isolation of a new tremorgenic indoloditeropene, 1-O-acetyl-paxilline, from *Emericella striata* and distribution of paxilline in *Emericella* spp

Chem. Pharm. Bull., 37, 1387~1389 (1989)

Emericella 属に所属する19種について産生性マイコトキシンの1種パキシリンの生産性を検索した。パキシリンは、*E. desertorum*, *E. foveolata*, *E. striata* の3種に生産性が認められた。新規の産生性インドロジテルベン化合物としてエミンドール DA を *E. quadrilineata* から、また 1'-O-アセチルパキシリンを *E. striata* の菌糸体からそれぞれ分離した。さらに、これらの物質の立体構造を明確にした。

*1 星薬科大学

*2 千葉県立中央博物館

*3 千葉大学薬学部

田中敏嗣*1, 長谷川明彦*1, 清水伸實*1, 山本 進*1, 宇田川俊一, 関田節子, 原田正敏, 野沢幸平*2, 河合賢一*2: 小型菌核形成 *Aspergillus flavus* 一系統のアフラトレムおよびその関連インドロジテルベン化合物の生産性

マイコトキシン, 30, 19~23 (1989)

インドネシア産伝承薬から分離された小型菌核形成 *Aspergillus flavus* 菌株および米国農業省北部地方研

究センターから入手した同種類の菌株、合計7菌株についてアフラトレム、その関連インドロジテルベン化合物の生産性を UV 検出器付 HPLC で定量、検索した。全株ともアフラトレム、ジヒドロキシアフラビニンを生産した。乾燥菌核の g 当り、前者が 149~3009 μg 、後者が 1092~35629 μg であった。そのほか、アフラビニン、モノヒドロキシアフラビニン、モノヒドロキシイソアフラビニン、パスパリン、パスパリニン、エミンドール SB が定量された。*A. flavus* によるパスパリン、エミンドール SB の産生は最初の報告である。

*1 神戸市環境保健研究所

*2 星薬科大学

堀江義一*1, 宮治 誠*2, 西村和子*2, 田口英昭*2, 山口英世*3, 宇田川俊一: *Emericella* 属の南米土壌中における分布と発がん性マイコトキシン sterigmatocystin およびその関連化合物の生産性について

マイコトキシン, 29, 21~26 (1989)

ブラジル、コロンビア、パラグアイ、ベネズエラの土壌369試料について *Emericella* 属の分離を試みた結果、*E. acristata*, *E. dentata*, *E. echinulata*, *E. nidulans* (var. *lata* と var. *nidulans*), *E. quadrilineata*, *E. rugulosa* に分類される61株が分離された。これらの菌株を白米を基質として培養し、酢酸エチルで抽出後、ステリグマトシステン (STG) の産生を薄層クロマトグラフィーにより検索した。*E. acristata*, *E. dentata*, *E. echinulata*, *E. nidulans*, *E. quadrilineata*, *E. rugulosa* に STG の産生が認められた。また、STG 関連化合物としてノルゾロリン酸、ベルシコロリンの産生が *E. acristata*, *E. dentata*, *E. nidulans*, *E. quadrilineata*, *E. rugulosa* に認められた。

*1 千葉県立中央博物館

*2 千葉大学真核微生物研究センター

*3 東京大学応用微生物研究所

Mikami, Y.*1, Yazawa, K.*1, Fukushima, K.*1, Arai, T.*1, Udagawa, S. and Samson, R. A.*2: Paecilotoxin production in clinical or terrestrial isolates of *Paecilomyces lilacinus* strains *Mycopathologia*, 108, 195~199 (1989)

不完全菌類の *Paecilomyces lilacinus* は土壌、昆虫、線虫などから分離される反面、角膜真菌症など人体の病原菌としても知られている。本研究では臨床材料由来および土壌分離株20菌株について、N-末端基が不

飽和脂肪酸, C-末端基がアミンである中性ペプチドの毒素ベシトキシンの生産性を検索した結果を報告した。毒素生産培地は3種類を用いたが, アルカリ性培地が生産に適していることがわかった。供試した20株中19株に毒素産生が認められ, いずれの菌もきわめて類似した結果となっていたが, 主毒素はA, Bの2種類であった。

*1 千葉大学真核微生物研究センター

*2 Centraalbureau voor Schimmelcultures, Netherlands

Nakajima, H.*¹, Hamasaki, T.*¹, Tanaka, K.*¹, Kimura, Y.*¹, Udagawa, S. and Horie, Y.*²: **Production of cyclosporin by fungi belonging to the genus *Neocosmospora***

Agric. Biol. Chem., 53, 2291~2292 (1989)

免疫抑制剤として知られているシクロスポリンの生産菌として子の菌類核菌綱 *Neocosmospora* 属に分類される4菌株の生産性を検索したところ, 3株にシクロスポリンAの生産を, 1株にシクロスポリンCの生産をそれぞれ認めた。また, 1株からはシクロスポリンAとともにN-アセチル-C₉アミノ酸が分離され, 環状ペプチドの生合成研究上有用な菌であることがわかった。

*1 鳥取大学農学部

*2 千葉県立中央博物館

Hosoe, T.*, Nozawa, K.*, Udagawa, S., Nakajima, S.* and Kawai, K.*: **An anthraquinone derivative from *Dichotomophthora lutea***

Phytochemistry, 29, 997~999 (1990)

名古屋市衛生研究所の環境微生物調査においてオフィス街の戸外空中菌として分離された不完全菌類 *Dichotomophthora lutea* の二次代謝産物を研究した結果, 既知のマクロスポリン, アルタソラノールA, B, エルゴステロールとともに, 新規の代謝産物としてデメチルマクロスポリン (1, 3, 7-trihydroxy-6-methylanthraquinone) を単離し, その構造を決定した。菌類代謝産物として, ワーハイドロキシアントラキノンの分離はきわめてまれな例である。

* 星薬科大学

依藤時子*¹, 庄司昭伸*², 中川浩一*¹, 濱田稔夫*¹, 異陽一*³, 橋本孝二*³, 戸矢崎紀紘*⁴, 宇田川俊一: 急性骨髄性白血病に合併した cutaneous mucromycosis

真菌誌, 30, 288~296 (1989)

急性骨髄性白血病患者に発症した原発性皮膚ムコール症について報告した。症例は56歳の女性で, 急性骨髄性白血病の治療中, 左前腕の留置静脈針の固定絆創膏下に中心部黒色を呈する小丘疹が出現し, 急速に拡大して, 5日後に暗紫色で皮膚面より隆起した中心壊死性の病変となった。病理組織学的所見では真皮全層から表皮の一部に隔壁のない幅広い菌糸を認め, 菌糸は血管壁を貫通し, 血管を塞栓している像もみられた。Amphotericin B の点滴静注で皮疹はやや軽快したが, 皮疹出現により17日で死亡した。病原菌は *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* と同定された。本菌による症例は世界で12例, わが国では初例である。

*1 大阪市立大学医学部

*2 大阪回生病院

*3 大阪市立十三市民病院

*4 神戸市環境保健研究所

Udagawa, S. and Muroi, T.*: ***Bulbithecium*, a new genus of cleistocarpic coprophilous Ascomycetes**

Bull. Natn. Sci. Mus., Tokyo, Ser. B, 16, 13~19 (1990)

国立科学博物館の海外学術調査として南米ペルーの陰花植物フロラに関する研究を1984年に行った。調査に参加した滋賀大学の横山和正隊員によって接集された馬糞から, 不整子の菌類の新属新種が分離され, *Bulbithecium hyalosporum* と命名し, 記載した。本属の特徴は菌核状に発達する子のう果と, その殻壁が示すデキストロイド性, 無色, 楕円形の子のう胞子などで, アナモルフは *Acremonium* である。

* 塩野義製薬(株)製造部

Udagawa, S. and Takada, M.*: **A new species of *Coniochaeta***

Studies in Mycology(CBS), 31, 187~192 (1989)

高知県土佐清水市の農耕地土壌から分離された子の菌類の一菌株について形態的性質を観察した結果, *Coniochaeta* 属に分類される新種であることが結論され, *C. arxii* と命名, 記載報告した。本種の特徴は球形, 透過性の殻壁からなる子のう殻, こん棒形の子のう, 不等辺の楕円形で縦に発芽スリットのある子のう胞子を形成する点にあり, 既知種と容易に区別される。

* 東洋醸造(株)リサーチセンター

Udagawa, S., Horie, Y.*¹ and Cannon, P. F.*²:

Two new species of *Neocosmospora* from Japan, with a key to the currently accepted species

Sydowia, 41, 349~359 (1989)

Neocosmospora 属は子の菌類核菌綱に属する糸状菌であるが、最近免疫抑制剤シクロスポリンを生産する菌として注目されている。本研究では、1977および1983年に東京都小笠原諸島で採取した土壌から分離された *Neocosmospora* の2菌株について形態的特徴を調べ、これまでの既知種とは明らかに異なることを確認し、それぞれ *N. arxii*, *N. boninensis* と命名、新種として記載した。また、これまでの5種1変種と新しい2種を加えて種の検索表を作成した。

*1 千葉県立中央博物館

*2 CAB International Mycological Institute, UK

Horie, Y.*1, Miyaji, M.*2, Nishimura, K.*2 and Udagawa, S.: ***Emericella falconensis*, a new species from Venezuelan soil**

Trans. Mycol. Soc. Japan, 30, 257~263 (1989)

南米土壌中の病原真菌を検索中に、ベネズエラのコロ市郊外の半砂漠荒地から採取した土壌から *Emericella* 属(子の菌類, マヌハキタケ科)に属する新種が分離され、*E. falconensis* と命名、菌学的性質を記載した。

類似種として *E. fruticulosa*, *E. navahoensis*, *E. nidulans* var. *lata* などがあり、それぞれの代表株と比較のため子の菌胞子の走査電子顕微鏡による観察を行い、形態上の相違を検討した。

*1 千葉県立中央博物館

*2 千葉大学真核微生物研究センター

宇田川俊一：食品菌類

微生物, 6, 125~128 (1990)

植物着生菌類と食品、貯蔵菌類と食品、日和見感染菌と食品の3項目にわけて、食品を汚染するカビの危害性を論じた。植物着生菌類についてはプレハーヴェスト、ポストハーヴェストの両面についてマイコトキシン産生との関係が重要と考えられる。貯蔵菌類としては、最近の食品の製造加工技術および保蔵流通の発展による好乾性カビ、耐熱性カビの加害について考察した。最後に食品中の日和見感染菌が真菌症の発症にどのような係わりをもっているかについて最近のFD A および著者らの研究を基盤として推論した。

宇田川俊一：新たなアフラトキシン生産カビの発見

New Food Industry, 32 (1), 58~61 (1990)

強力な発がん性マイコトキシンであるアフラトキシン(AF)の生産菌はこれまでコウジカビに属する *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* の2種であるということが定説となっていた。しかし、最近米国農業省北部地域研究センターから米国産小麦などから分離された新種 *A. nomius* がAF生産性のあることを報告した。これとは別に著者らは最近タイ、インドネシアなど東南アジア諸国でコーン畑土壌、香辛料、伝承薬などの農産物から分離された *A. flavus* の非典型株が強力な生産力を示すことを明らかにした。この非典型株は約300 μ mの小型の菌核(*A. flavus*では菌核の直径は2~3mmに及ぶ)を形成し、形態的にも区別されること、これらの菌株の多くがAFG₁, G₂をきわめて多量に生産する点で通常の *A. flavus* の生産プロフィールと異なることから *A. flavus* の1変種としてもよいとの結論に達した。

宇田川俊一：住まいのカビとその対策

生活と環境, 34 (9), 46~48 (1989)

最近わが国の一般住宅の建築様式が洋風化し、しかも省エネルギー化として新建材を用いた密閉構造が一般的になってきたが、このような変化がもたらした室内環境への影響の1つとして住宅内のカビの発生による被害が激増している。一般家庭の室内環境は室内空間の湿度によって、ドライエリアとウェットエリアに二分されるが、住居のカビはそれぞれのエリアに応じて異なる種類が住みわけている。住居のカビ対策としては結露を防ぐための冬季の換気と除塵が基本であるが、最近普及している家庭用カビ取り剤、防カビ剤などの使用上の安全性についても注意事項を言及した。

宇田川俊一、岩津都希雄*：カビと人体

公衆衛生情報, 19 (4), 9~13 (1989)

生活環境中の病原真菌として白癬菌による最近の家族内あるいは施設内感染、黒色真菌による室内環境、食品などの汚染、室内環境とカビアレルギーとして、アレルギーとなる室内塵中のカビの増殖など公衆衛生上の今日の話題を解説した。

* 岩津皮膚科医院

宇田川俊一：微生物分類学の新しい流れ 8. かび

化学と生物, 27, 395~400 (1989)

化学分類学、分子生物学的手法によって得られた遺伝子情報に基づく微生物分類学が新しい流れとなっている。かびの場合も形態的特徴を主点とする伝統分類

学に加えて、化学分類学的検索によって得た情報をプラスする方向が最近の傾向としてみられる。

菌体成分のバイログラム、菌体蛋白質の電気泳動パターン、イソ酵素のポリアクリルアミドゲル電気泳動パターン、細胞壁構成多糖類の分析、ミトコンドリアのユビキノン系解析、二次代謝産物（マイコトキシンを含む）生産プロフィール、DNA-DNA ホモロジーほか DNA 分析などがそれで、新しい手法のかび分類への応用を展望した。

Aida, Y., Ando, M., Takada, K., Momma, J., Yoshimoto, H., Nakaji, Y., Kurokawa, Y. and Tobe, M.: **Practical Application of Microcapsulation for Toxicity Studies Using Bromodichloromethane as a Model Compound**

J. Am. College. Toxicol., 8, 1177~1187 (1989)

比較的低沸点の化合物であるプロモジクロロメタンをゼラチンと粉飴を材料としたマイクロカプセルに封入し、このカプセルを粉末飼料に混合し、長期毒性試験が可能か否かを検討した。その結果、カプセル中の被験物質は少なくとも3カ月間は安定であり、粉末飼料に混合しても6カ月間ほとんど変化しなかった。さらにオリーブ油に溶解して強制経口投与した場合とマイクロカプセルに封入し、混餌投与した場合の毒性発現を比較したが、両投与方法で大きな差はみられなかった。

高田幸一、安原加寿雄、中路幸男、吉本浜子、門馬純子、黒川雄二、会田喜崇、戸部満寿夫：**Tris (2-chloroethyl) phosphate のマウスにおける発癌性について**

J. Toxicol. Pathol., 2, 213~222 (1989)

ddY 系マウス各群雌雄50匹を用い TCEP を0, 0.012, 0.06, 0.3 および 1.5% 添添加した飼料を18カ月間投与して、その発癌性を検討した。雌雄ともに1.5%群で体重増加抑制、生存率の低下を認めた。病理組織学的検索の結果、雄で腎臓の腺腫および腎細胞癌が1.5%群で有意に増加し、また肝臓の腺腫が0.3および1.5%群で有意に増加した。雌では前胃の乳頭腫/扁平上皮癌が1.5%群で有意に増加し、また白血病が0.3および1.5%群で有意に増加した。以上の結果、TCEPはマウスに長期間投与することにより雄の腎臓および肝臓、また雌の前胃および造血臓器に発癌性を有することが判明した。

Kanbara, T.*, Ohmomo, N.*, Umemura, T., Kaji-

gaya, H.*, Umeda, M.*, Sugiyama, M.* and Isoda, M.*: **Local antibody production and immune complex formation in rats experimentally infected with *Angiostrongylus Cantonensis***

Am. J. Trop. Med. Hyg., 39, 353~360 (1988)

広東住血線虫を実験的に感染させたラットにおける虫体周囲の局所細胞反応および液性免疫応答について、好酸球を中心とした細胞反応、虫体抗原、IgM, IgG および C3 を免疫組織学的に検索した。広東住血線虫による中枢神経系局所免疫応答は血清中の抗体価上昇に先駆けて起こることが判明した。また、虫卵に対しても局所および全身性の免疫応答が認められたことなどから抗原抗体結合物は肉芽形成に関与している可能性が示唆された。

* 日本獣医畜産大学

松本清司：**自己免疫疾患自然発症系 MRL/lpr マウスの好中球増多症**

順天堂医学, 35, 106~116 (1989)

自己免疫疾患を自然発症する MRL/lpr マウスの血液および骨髄を調べたところ、今までに報告されたリンパ球増加に加え、2カ月令と早期から骨髄好中球の増加が認められ、しかも形質細胞増加を伴うことが分かった。これらの変化に現在知られているサイトカインすなわち G-CSF, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, BCGF 等がどのように関与しているかを考察した。

Umemura, T., Sai, K., Takagi, A., Hasegawa, R. and Kurokawa, Y.: **Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OH-dG) in rat kidney DNA after intraperitoneal administration of ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA)**

Carcinogenesis, 11, 345~347 (1990)

非変異原性腎発癌物質の鉄ニトリロ三酢酸 (Fe-NTA) の発癌メカニズムに酸素ラジカルの関与が強く疑われていることから、Fe-NTA 投与により DNA が活性酸素により傷害を受けているかどうかを検討する目的で Fe-NTA, Al-NTA, Na₂NTA, FeCl₃ をそれぞれラットの腹腔内投与し、活性酸素による DNA 傷害の指標である 8-OH-dG レベルを検索した。その結果、8-OH-dG レベルの上昇が Fe-NTA 投与群のみに見られたことは、Fe-NTA の発癌メカニズムに酸素ラジカルの関与が強く示唆され、さらに鉄と NTA の協調作用の必要性も示された。

Abe, M.*, Matsumoto, K., Hirose, S.* and Shirai,

T.*: The novel murine B cell differentiation antigen Lp-3

Intl. Immunol., 1, 576~581 (1989)

MRL/lpr マウスの異常増殖リンパ球と特異的に反応する Lp-3 というモノクローナル抗体の特性を調べた。この抗体は顆粒球、T- および B-リンパ球と広く反応することが知られているが、マウス骨髄中の Pre-B および virgin B 細胞には反応しないことがわかった。しかもこの抗体は自己免疫疾患自然発症系マウスの B 細胞で非常に高い活性を示すことも分かった。

* 順天堂大学医学部

松本清司, 戸部満寿夫: 環境汚染物質の毒性評価 1989 一般毒性試験

水質汚濁研究, 12, 609~614 (1989)

環境中の化学物質の毒性は、種々の毒性試験のデータに基づいて評価判定されるが、対象とする毒性の概念を知ることや個々の試験法の意味や位置づけをとらえることは重要な課題である。ここでは毒性の意味や一般毒性試験に係わる諸問題について水質に関連する物質を中心に最近の話題を折り込みながら解説した。

Takagi, A., Sai, K., Umemura, T., Hasegawa, R., and Kurokawa, Y.: Significant increase of 8-hydroxydeoxyguanosine in liver DNA of rats following short-term exposure to the peroxisome proliferators di (2-ethyl-hexyl) phthalate and di (2-ethylhexyl) adipate

Jpn. J. Cancer Res., 81, 213~215 (1990)

ベルオキシゾーム増殖剤はラット、マウスに肝発癌性を有する。我々はプラスマチック可塑性でベルオキシゾーム増殖作用のある di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) のラットへの投与で、発癌標的臓器の肝で活性酸素による DNA 傷害の指標の 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OH-dG) の増加を認めた。ベルオキシゾーム増殖および肝発癌性と 8-OH-dG との関連をさらに明確にするため、DEHP および構造類似体で、ベルオキシゾーム増殖作用と肝発癌性を有する di (2-ethylhexyl) adipate, 発癌性の無い無水フタル酸をそれぞれ 1.2, 2.5, 1.5% の濃度で粉末飼料に添加し (それぞれの化合物の発癌性試験で用いられた最高濃度)、F-344 ラットに2週間投与し、1および2週目に肝、腎 DNA 中の 8-OH-dG を測定した。その結果 DEHP, DEHA 群の肝のみ臓器重量と DNA 中の 8-OH-dG の有意増加を認められ、ベルオキシゾーム増殖および肝発癌と 8-OH-dG 増加との間に密接な関

係が示唆された。

Hasegawa, R., Murai-Kushiya, M., Komuro, T. and Kimura, T.: Stereoselective determination of plasma pindolol in endotoxin-pretreated rats by high-performance liquid chromatography

J. Chromatogr., 494, 381~388 (1989)

ラセミ体ピンドロールの体内動態に対するエンドトキシンの影響を光学活性分割定量法を用いて検討し、その効果が血液中蛋白結合率の増加によってもたらされること、またその結合率は顕著な立体特異性を示すことを明らかとした。さらにエンドトキシンにより β -ブロッカーの特異的結合蛋白である α_1 -酸性糖蛋白の増加することを示した。

児玉幸夫, 酒井建夫*, 内藤克司, 堀内茂友: ナキウサギにおける実験的胃潰瘍の形成

実験動物, 39, 35~41 (1990)

ナキウサギを用いて実験的胃潰瘍の形成についてラットと比較した。ナキウサギに水浸拘束ストレスを1日当たり2時間負荷すると4から5日に胃潰瘍が形成された。3時間の負荷では1~4日、4時間の負荷では1~3日および5時間の負荷では1~2日に形成した。特に5時間の負荷では広範な潰瘍が形成した。病理組織学的には多くは粘膜に限局していたが、5時間負荷では粘膜筋板に達しており、炎症性変化も認められた。ラットは1日あたりのストレス負荷が短時間で胃潰瘍が形成したが、組織学的にはナキウサギに比べて軽度であった。したがってナキウサギで胃潰瘍を形成するには、4時間4~5回程度が適しており、ラットより重篤な胃潰瘍が形成される可能性がある。

* 日本大学

大森義仁, 黒川雄二: 化学物質のリスクアセスメント確立のための日・米学術会議報告

J. Toxicol. Sci., 14, ix~x (1989)

昭和63年度から厚生省生活衛生局生活化学安全対策室で開始した、「化学物質総合安全対策調査研究」の第三分野「リスクアセスメント手法などの改善と確立に関する研究」の一環として第一回の日米合同会議が平成元年1月30日から2月1日までハワイにおいて開かれた。米国側は、米国環境保健衛生研究所(NIEHS)から7名、日本側は国立衛生試験所安全性生物試験研究センターを中心に7名が出席した。会議では、日米双方の毒性試験に関する組織機構、毒性試験結果、試験対象物質選択などに関して活発な討論が行われた。

Kurokawa, Y., Takahashi, M., Maekawa, A. and Hayashi, Y.: **Promoting effect of metal compounds on liver, stomach, kidney, pancreas, and skin carcinogenesis**

J. American College of Toxicology, **3**, 1235~1239 (1989)

環境中に存在する物質のプロモーター作用を検索するために、金属化合物を対象としてラットを用いた二段階発がん実験を行った。金属化合物としては、ZnCl₂, CrCl₂, ADCl₂, NiCl₂, HgCl₂ をもちい、肝臓、胃、腎臓、脾臓、皮膚に対するプロモーター作用をそれぞれの臓器に既に確立されたイニシエーターを用いた二段階発がん実験の結果、NiCl₂ が腎臓に対してプロモーター作用を有することが明らかとなった。

Tobe, M., Naito, K. and Kurokawa, Y.: **Chronic toxicity study on formaldehyde administered orally to rats**

Toxicology, **56**, 79~86 (1989)

雌雄ウイスターラットに0.5, 0.1, 0.02%ホルムアルデヒド溶液を24カ月投与する、慢性毒性試験を行った。0.5%溶液投与群において体重増加抑制、飼料、水の摂取量低下が見られ全動物が24カ月までに死亡した。この群ではさらに、前胃、腺胃のびらん、潰瘍、上皮過形成などがみられた。発癌性は認められなかった。以上の結果から、無影響量は0.02% (10 mg/kg 体重/day) と結論された。

Inoue, K., Nakazawa, K., Fujimori, K. and Takanaka, A.: **Extracellular adenosine 5'-triphosphate-evoked norepinephrine secretion not relating to voltage-gated Ca channels in pheochromocytoma PC12 cells**

Neurosci. Lett., **106**, 294~299 (1989)

外液性 ATP によるノルエピネフリン (NE) 放出の特性をパッチ法およびホールセル膜電位固定法にて検討した。外液 ATP は、10 μM から 1 mM の濃度範囲内で用量依存的に、PC12 細胞からの NE 放出を惹起した。ATP の最大薬理作用はニコチンのその約5倍であった。ATP による NE 放出は外液 Ca 依存性であるが、カルシウムチャネル・ブロッカーのカドミウム (300 μM) あるいはニカルジピン (10 μM) によってまったく影響を受けなかった。ATP はまた内向き電流を惹起し膜電位を脱分極させた。内向き電流の大きさは、ニコチンで惹起されるものの約5倍であった。以上の事実より、外液 ATP はレセプター制

御カルシウムチャネルを活性化し、そこからのカルシウム流入により NE を放出するものと考えられる。

Nakazawa, K., Fujimori, K., Takanaka, A. and Inoue, K.: **Existence of muscarinic suppression of a K current in PC-12 Pheochromocytoma cells**

Am. J. Physiol., **257**, C1030~C1033 (1989)

培養神経細胞クローンである PC12 細胞におけるムスカリン様作用を電気生理学的に検討した。ムスカリン受容体作動薬のメタコリンは、電位依存性カリウム電流を減弱したが、電位依存性カルシウム電流には影響しなかった。このカリウム電流減弱作用はムスカリン受容体拮抗薬のアトロピンにより抑制された。ニコチン受容体作動薬のニコチンは、このカリウム電流に影響しなかった。このことから、PC12 細胞にムスカリン受容体で調節されるカリウム電流が存在することが示された。

Nakazawa, K., Kasuya, Y.*¹ and Shigenobu, K.*²: **Developmental increase in inotropic and cyclic AMP response to isoproterenol in embryonic and newly hatched chicks**

Can. J. Physiol. Pharmacol., **67**, 1109~1111 (1989)

ニワトリ心筋における孵化直後の β-アドレナリン作動薬感受性低下の機序を検討するため、cyclic AMP の濃度を測定した。β-アドレナリン作動薬のイソプロテレンール刺激により、cyclic AMP レベルの上昇は孵化前・孵化後のいずれにおいても観察されたが、孵化前の心筋の方が低濃度から反応した。このことから、β-アドレナリン作動薬感受性低下に cyclic AMP 生成機構の変化が関与することが示唆された。

*¹ 星薬科大学

*² 東邦大学薬学部

中沢憲一、藤森観之助、井上和秀、関田節子、高仲正：モルモット摘出心房標本におけるセンキュウエキスの収縮力・心拍数・膜電位に及ぼす作用
薬誌, **109**, 662~671 (1989)

センキュウのメタノール抽出エキスの薬理作用を摘出心房標本を用いて検討した。センキュウエキスは心拍数をやや増大させ、収縮力を著明に抑制した。エキス中の成分であるフタライド系化合物のリグスチライドおよびセンキュノライドは、心拍数、収縮力ともに抑制した。センキュウエキス、リグスチライドおよびセンキュノライドは、カルシウム電流の指標である

slow action potential の立ち上がり速度を抑制した。このことから、センキュウエキスの心筋収縮抑制作用がフタライド系化合物によること、その作用機序としてカルシウム・チャンネル抑制が関与することが示唆された。

Kawanishi, T., Blank, L. M.*, Harootunian, A. T.*, Smith, M. T.* and Tsien, R.*: **Ca²⁺ oscillations induced by hormonal stimulation of individual Fura-2-loaded hepatocytes**

J. Biol. Chem., 264, 12859~12866 (1989)

蛍光試薬 Fura-2 を取り込ませた単一肝細胞内のカルシウムイオン濃度をデジタル化ビデオ蛍光顕微鏡法により測定した。0.1 nM のバゾプレシン, 0.5 μM のフェニレフリン, 0.5 μM の ATP によって、多くの細胞でオッシレーション状のカルシウムイオン濃度の上昇が観察された。細胞外カルシウムイオン濃度を下げると、カルシウムオッシレーションの振幅は変化することなく、その頻度が減少した。一方、細胞外カルシウムが無い状態でも一部の細胞でカルシウムオッシレーションが見られた。これらのことから、このオッシレーションを担うカルシウムイオンは、細胞内貯蔵部位から放出されていることが示唆された。また、細胞膜を脱分極させても、細胞内カルシウムイオン濃度は変化することなく、カルシウムオッシレーションの頻度が減少したことから、単離肝細胞では膜電位作動性カルシウムイオンチャンネルは重要な役割を果たしていないことが示唆された。

* University of California, Berkeley, U. S. A.

Smith, M. T.*, Blank, L.*, Kawanishi, T. and Tsien, R. Y.*: **Mitochondrial poisons block hormonal response and raise cytosolic calcium in single hepatocytes**

Toxicologist, 9, 70 (1989)

ホルモン刺激によって起こる単一肝細胞のカルシウムイオンオッシレーションは、FCCP, オリゴマイシン, ナイジェリン, バリノマイシン等のミトコンドリア阻害剤により抑制された。このとき、細胞内カルシウムイオン濃度は次第に上昇し、やがて細胞死が起こり、Fura-2 はリークした。これらのミトコンドリア阻害剤をホルモン刺激前に与えた場合でも、細胞内カルシウムイオン濃度は上昇し、カルシウムオッシレーションは阻害された。これらの結果から、ミトコンドリアが障害を受けると肝細胞のホルモン反応性が抑制され、細胞内カルシウムイオン濃度が上昇することが

示唆された。

* University of California, Berkeley, U. S. A.

Kawanishi, T., Nieminen, A-L.*, Herman, B.* and Lemasters, J. J.*: **Suppression of hormone agonist-induced Ca²⁺ oscillations in cultured hepatocytes by chemical hypoxia**

Toxicologist, 10, 24 (1990)

初代培養肝細胞では、2.5 mM KCN と 0.5 mM ヨード酢酸による化学的低酸素処置をすると、無酸素状態による還元的ストレスが生じる。蛍光試薬 FURA-2 とデジタル化ビデオ蛍光顕微鏡法を用いて、化学的低酸素処置をされた細胞におけるホルモン刺激によるカルシウムオッシレーションを調べた結果、オッシレーションは極めて強く抑制されることがわかった。カルシウムオッシレーションを生じさせるホルモン刺激により細胞内イノシトールリン酸生成は増加するが、この増加も化学的低酸素処置によって阻害された。一方、化学的低酸素処置によって細胞内 pH が低下することが知られており、同様に細胞内アンダーシスを引き起こす酢酸ナトリウム処置によってもカルシウムオッシレーションは阻害された。しかし、モネンシン処置により細胞内 pH を一定に保った培養肝細胞でも、化学的低酸素処置によってカルシウムオッシレーションは阻害された。以上の結果から、化学的低酸素状態によるカルシウムオッシレーションの阻害は、ATP 濃度減少に伴うイノシトールリン酸生成の抑制、および細胞内アンダーシスに伴う IP₃ によるカルシウム放出の阻害によることが示された。

* University of North Carolina at Chapel Hill, U. S. A.

Nieminen, A-L.*, Dawson, T. L.*, Gores, G. J.*, Kawanishi, T., Herman, B.* and Lemasters, J. J.*: **Protection by acidotic pH and fructose against lethal injury to rat hepatocytes from mitochondrial inhibitors, ionophores and oxidant chemicals**

Biochem. Biophys. Res. Commun., 167, 600~602 (1990)

種々の化学物質による毒性発現におけるミトコンドリアの ATP 生成と細胞外アンダーシスの重要性を、単離肝細胞を用いて検討した。細胞外 pH を下げるとプロナーゼ以外の毒物による毒性発現は軽減された。解糖系を介した ATP 生成の基質であるフルクトースは、シアン, オリゴマイシン, メナジオン, システイ

ン等の毒性を軽減した。CCCP, グラミジン, Br-A 23187 による毒性の軽減には, さらにオリゴマイシンが必要であった。これらのことから, これら ionophore は酸化的リン酸化を阻害することにより細胞毒性を発現することが示唆された。フルクトースは塩化水銀やプロナーゼの作用をほとんど軽減しなかった。以上の結果から, これら化学物質による細胞障害には, すべて, ミトコンドリアでの ATP 生成の阻害が関係していることが明らかとなった。さらに, 細胞外 pH を下げるとこれらの細胞障害は軽減された。

* University of North Carolina at Chapel Hill, U. S. A.

Harasawa, Y.*, Kimura, M.*, Ohno, Y. and Hayaishi, S.*: **Coronary endothelium is responsive to bradykinin and arachidonate but not to acetylcholine**

Arch. intern. Pharmacodyn. Therapie., 302, 196~208 (1989)

ブタの冠状動脈はカルシウムイオノフォア A23187 やブラジキニンにより弛緩するが, 血管内皮細胞を剝離した平滑筋のみの標本では弛緩しない。これらの処置による弛緩はアスピリンやインドメタシンでも, また, フェントールアミンとプロプラノロールの共存によっても抑制されないことから, 内皮依存性の弛緩因子 (EDRF) の遊離を介して作用するものと思われた。一方, ニトロプルシドによる弛緩やアセチルコリンによる収縮は, 内皮細胞剝離により影響されず, 平滑筋に直接作用することにより発現するものと考えられた。なお, アラキドン酸では内皮細胞依存性の一過性の収縮と, それに続くゆっくりとした弛緩が現れ, PGI₂ は弱い弛緩作用を有することから, 他の血管収縮性のプロスタグランジン類がアラキドン酸の収縮作用に関与していると思われた。

* アップジョンファーマシューチカルズリミテッド 総合研究所

Fukuhara, M.*, Nohmi, T., Mizokami, K., Sunouchi, M., Ishidate, M. and Takanaka, A.: **Characterization of three forms of cytochrome P-450 inducible by 3-methylcholanthrene in Golden Hamster livers with special referenc to Aflatoxin B₁ activation**

J. Biochem., 106, 253~258 (1989)

3-メチルコラントレン処置したハムスターの肝ミクロゾームから分離・精製したチトクロム P-450 分子

種の, P-450-AFB (P-450-I), P-450-II および P-450-III (みかけの分子量は各々 56000, 58000, 59500) のうち, P-450-AFB は主要な分子種である。この P-450-AFB はアフラトキシン B₁ に対して強い代謝活性化能を有すること, さらに, アフラトキシン B₁ の類縁化合物のステリグマトシスチンと o-ステリグマトシスチンに対しても強い代謝活性化能を有することを明らかにした。また, P-450-AFB に対する抗体を用いて, 3-メチルコラントレン処置したハムスターの肝ミクロゾームにおけるアフラトキシン B₁ の代謝活性化は, 主として P-450-AFB に起因すること, 一方, 同様に処置したモルモット, ラット, マウスおよびシマリスの肝ミクロゾームには P-450-AFB は存在しないことを示した。

* 国立公衆衛生院

Hirota, K., Kawanishi, T., Sunouchi, M., Ohno, Y., Takanaka, A., Yamazoe, Y.*¹, Kato, R.*¹ and Murakoshi, Y.*²: **Induction of cytochrome P-450c and P-450d by metyrapone in the primary culture of rat hepatocytes**

Japan. J. Pharmacol., 51, 136~139 (1989)

初代培養肝細胞の薬物代謝活性は培養することにより低下するが, この活性低下を抑制することが知られているメチラボンの作用を検討した。その結果, メチラボンは, ベンズピレン水酸化活性やエトキシマリン脱メチル化活性を誘導するが, アミノピリンやメトキシマリンの脱メチル化活性は変化させず, 初代培養肝細胞の薬物代謝における基質特異性を *in vivo* の状態から大きく変化させることを明らかにした。さらに, この原因は, チトクロム P-450 分子種のうち, P-450c と P-450d をメチラボンが特異的に増加させることによることを示した。

*¹ 慶応義塾大学医学部

*² 国立公衆衛生院

篠内桃子, 福原守雄*: **食品汚染カビ毒マイコトキシンの生体内代謝と毒性発現**

栄養学雑誌, 47, 171~178 (1989)

主としてチトクロム P-450 分子種との関連性に焦点を当て, アフラトキシン B₁ の生体内代謝, 特に代謝活性化と不活性化について解説し, 毒性発現における動物種差について考察した。

* 国立公衆衛生院

今井田克己: 画像処理装置について

The Journal of Toxicological Sciences, 14, Supplement III, 61~66 (1989)

「毒性試験技術の最近の進歩」の一つとして、画像処理装置を取り上げ、その機能を 1. 画像入力機能、2. カラー画像処理機能、3. 濃淡画像処理機能、4. 2値化画像処理機能、5. 計測機能、6. 3次元再構築機能、7. 統計処理機能に分類し、2次元処理と、3次元処理に分けて解説した。特に、3次元処理機能に関しては、2次元換算式による3次元データの推測と連続切片からの3次元再構築による直接的な解析に分けて、ラット肝に発生する前癌病変である過形成結節を例にとり解説した。

豊田和弘, 佐藤秀隆, 今井田克己, 古川文夫, 岡宮英明, 高橋道人, 林 裕造: F344 ラットにおける 5-Fluorouracil の亜慢性毒性試験

医薬品研究, 20, 1001~1009 (1989)

5-fluorouracil (5FU) の癌原性試験の実施にあたり、その予備試験として F344 ラットによる13週間の亜慢性毒性試験を実施した。動物は雌雄各6群(各群10匹)に分け、それぞれ 500, 250, 125, 62, 31, 0 ppm の割合に 5FU を溶解した精製水を飲料水として13週間自由摂取させた。実験経過中、雌雄の 500, 250, 125 ppm 投与群において、体重の増加抑制および飲水量の低下が 5FU の投与用量に相関して認められたが、中途死亡例は無く、全動物が試験終了時まで生存した。病理組織学的検索の結果、骨髄の有核細胞数の減少が雄の 500 ppm 投与群全例にみられ、また、脳および脊髄における小出血巣が雌雄の 500 および 250 ppm 投与群において40例中5例に認められた。

以上の試験結果より、5FU の飲水投与による癌原性試験の最大許容量を 125 ppm と決定した。

Maekawa, A., Onodera, H., Matsushima, Y., Nagaoka, T., Todate, A., Shibutani, M., Kodama, Y. and Hayashi, Y.: Dose-response carcinogenicity in rats on low-dose levels of N-ethyl-N-nitrosourethane

Jpn. J. Cancer Res. 80, 632~636 (1989)

発癌物質の低用量での影響を検討する目的で、N-ethyl-N-nitrosourethane (ENUR) をモデル化合物として用い、用量一反応実験を行った。各群40匹からなる6週齢 F344 ラットに、蒸留水に溶かした ENUR 水溶液(0, 0.15, 0.6, 2.5 および 10 ppm)を飲料水として2年間自由に与えた。2.5 および 10 ppm 群では、対照群にくらべ総腫瘍の発生率の増加および平均生存

期間の短縮が有意差をもってみられた。0.6 ppm 以上の群で、口腔から前胃にかけての上部消化管に乳頭腫または扁平上皮癌の発生が用量相関をもって認められた。Weibull, Logit および Probit 各モデルを用いて求めた扁平上皮癌発生に対する実質安全量 (VSD) はそれぞれ、 0.37×10^{-2} , 0.11×10^{-1} , および 0.78×10^{-1} ppm であった。この値を他の発癌物質の VSD と比較し、考察を加えた。

Hayashi, Y.: Pathological implications of rat liver foci and relevance to regulatory decision-making: Current status and future perspective

Toxicologic Pathology, 17, 716~720 (1989)

日本における発癌性物質の規制決定の概略を解説した。特に、毒性試験の際にラット肝に発生することの多い小病巣の場合を中心に、日本の規制決定の原則ならびに現状を述べ、さらに、今後リスクアセスメントのために必要となる研究課題を取り上げた。

林 裕造, 今井田克己, 畝山智香子: 高脂肪食と発癌

代謝, 「癌 '89」, 26, 37~42 (1989)

疫学的知見ならびに実験データをもとに、高脂肪摂取と発がんとの関連性について述べた。まず、脂肪の科学について述べ、ステアリン酸、ミリスチン酸等の飽和脂肪酸およびオレイン酸、リノール酸等の不飽和脂肪酸に分類され、さらに二重結合の位置によって ω -3, ω -6 の脂肪酸があり、これらの分類は高脂肪食と発がんの影響を考える上で、重要である。また、高脂肪食による影響が疑われる器官・組織癌として、乳癌、大腸・直腸癌、肝癌、前立腺癌、卵巣腫瘍、肺癌をとりあげ、それぞれ疫学ならびに実験データをもとに検討した。また、その作用機序について 1) 摂取カロリーの影響、2) 内分泌環境の影響、3) 胆汁酸代謝の関与、4) プロスタグランジンの関与、5) DNA 障害の可能性に分類して解説を加えた。

Imaida, K., Sato, H., Okamiya, H., Takahashi, M. and Hayashi, Y.: Enhancing effect of high fat diet on 4-nitroquinoline 1-oxide-induced pulmonary tumorigenesis in ICR male mice

Jpn. J. Cancer Res. 80, 499~502 (1989)

マウスの肺腫瘍発生モデルを用いて、高脂肪食摂取による肺腫瘍発生への影響を検討した。雄 ICR マウスに、肺発がん物質である 4-nitro quinoline 1-oxide

(4-NQO) を体重 kg 当り 15 mg 投与後1週間目より、20%の corn oil 添加飼料を投与する群と、基礎食のみを投与する群を設けた。また、高脂肪食投与のみの群も設けた。実験開始15, 18, 25週で屠殺剖検し、肺を実体顕微鏡下で観察し、発生した腫瘍の数を数えるとともに、腫瘍を病理組織学的に検討した。その結果、4-NQO 投与後高脂肪食を投与した群では、肺腫瘍の発生頻度とマウス一匹当りの発生個数がそれぞれ対照群より有意に高く、実験的に高脂肪食による肺腫瘍発生の促進作用が認められた。

Maekawa, A., Onodera, H., Furuta, K., Tanigawa, H.*1, Nagaoka, T., Todate, A., Matsushima, Y. and Ogiu, T.*2: **Teratoma of the pituitary gland in a young male rat**

J. Comp. Pathol., 100, 349~352 (1989)

4週齢で購入後、飼料として CE-2 を、飲料水として水道水を自由に摂取させて飼育中、5週齢(37日齢)で死亡した無処置 NRC: Donryu 雄ラットに下垂体腫瘍の発生をみた。病理組織学的に、腫瘍は三胚葉由来の種々の組織(神経組織、軟骨、骨、扁平上皮、腺上皮、横紋筋、脂肪組織および結合組織)よりなる典型的な奇型腫であった。

*1 森下製薬

*2 放射線医学研究所

Hasegawa, R.*1, Furukawa, F., Toyoda, K., Sato, H., Shimoji, N., Takahashi, M. and Hayashi, Y.: **In situ freezing of the urinary bladder: a trigger of rapid development of sodium o-phenylphenate-induced urinary bladder tumors in the rat**

Carcinogenesis, 10, 571~575 (1989)

OPP-Na を投与したラットに発生する膀胱腫瘍の発生過程における膀胱の凍結処置の影響について検討した。凍結処置は冷却した棒をラットの膀胱の漿膜面にあてることにより行い、実験開始時に行った。その後0.5, 1または2%の OPP-Na を飼料中に混じて投与した。その結果、凍結処置のみでも膀胱腫瘍の発生がみられ、さらに OPP-Na の投与によりその発生頻度は増大した。また、凍結処置により発生した膀胱の過形成を alkaline phosphatase, glucose-6-phosphatase, glucose-6-phosphatase dehydrogenase, succinate hydrogenase の酵素組織化学により検索したが、正常膀胱粘膜上皮と比較して著変はみられなかった。以上の結果より、ラット膀胱への凍結処置は OPP-Na

で誘発した膀胱腫瘍の急速な増殖の trigger となることを示唆した結果であると思われる。

*1 名古屋市立大学医学部

高橋道人: ***in vivo* 中期肝発癌物質検出法(ラットを用いて肝発癌物質を短期間で検出する新しい方法)**

医学のあゆみ, 148, 337 (1989)

癌原性試験はげっ歯類を用い、2年間の長期に亘るが、最近、比較的短期間で発癌物質やプロモーターを検出する系が、開発され確立されつつある。Ito らは肝の glutathione S-transferase (GST-P) 陽性細胞を前癌病変の指標とする8週間の *in vivo* 中期検索法を開発し、112種の化学物質について検討している。その結果、肝発癌物質のうち変異原性陽性の10/11(90.9%)に、変異原性陰性の11/13(84.6%)に陽性例がみられ、肝発癌物質全体では87.5%という高い陽性率を示した。肝以外の臓器に発癌性を示す発癌物質では、わずかに2/17(11.8%)が陽性であった。一方、非発癌物質25種のなかで陽性を示したものはまったくみられなかった。このことは、この検索法では肝発癌物質の一致率はきわめて高く、偽陽性発現の確率が少ないことが示されており、発癌性の有無を予測する検索法として有効であることがわかる。

Rehm, S.*1, Takahashi, M., Ward, J. M.*1, Singh, G.*2, Katyal, S. L.*3 and Hennemans, R.*4: **Immunohistochemical Demonstration of Clara Cell Antigen in Lung Tumors of Bronchiolar Origin Induced by N-nitrosodiethylamine in Syrian Golden Hamsters**

Amer. J. Pathol. 134, 79~87 (1989)

マウスの肺腺腫はII型肺胞上皮由来とされ、ハムスターの肺腺腫はクララ細胞由来と考えられている。発癌物質によって誘発されるハムスターの肺および細気管支の腫瘍につき、ハムスター特異性クララ細胞抗原(CCA)およびケラチンの局在性を免疫組織化学的に検索した。ハムスターに N-nitrosodiethylamine (NDEA) を皮下に投与して得られた気管支、肺の増殖性病変を対象とした。その結果、腫瘍の50%に CCA 陽性が認められ、特に立方上皮および腫瘍組織内のやや大型の空泡細胞が陽性を示した。言い換えると、NDEA によって誘発されるシリアンゴールデンハムスターの肺腺腫は細気管支上皮および終末細気管支のクララ細胞過形成から発生する。さらに、進展して扁平上皮の形態をとるようになると、CCA は検出できず、

ケラチンは陽性を示した。

*1 National Cancer Institute, U. S. A.

*2 University of Pittsburgh U. S. A.

*3 School of Medicine, University of Pittsburgh, U. S. A.

*4 Program Resources, Inc., U. S. A.

伊東信行*1, 北川和行*2, 林 裕造, 小林 博*3:
癌を語る (動物発癌実験の目指すもの)

オンコロジー, 22, 39~47 (1989)

4名の病理学者による座談会を行い, その要旨を報告した。「*in vivo* 研究の必要性」「動物実験のむずかしさ」「動物実験の重要性」「molecular と clinical のはざまで」「他領域研究者に望むこと」「癌死の予防をめざして」の話題について各研究者の意見を述べた。

*1 名古屋市立大学医学部

*2 財団法人癌研究会癌研究所

*3 北海道大学医学部

Hasegawa, R.*1, Furukawa, F., Toyoda, K., Sato, H., Imaida, K. and Takahashi, M.: **Sequential analysis of quinoline-induced hepatic heman-gioendothelioma development in rats**
Carcinogenesis, 10, 711~716 (1989)

ラット肝の血管内皮細胞腫に関して Quinoline の投与期間の影響について検討した。雄 Wistar ラットに 0.25% の Quinoline を飼料中に混じて 4, 8, 12, 16, 20週間投与し経時的に屠殺した。肝の血管内皮細胞腫の発生は Quinoline を12週間以上投与した群に認められた。また, 小病巣や異形成病変の発生がみられ, これらは12, 16, 20週間投与群間での差はみられなかった。一方, 肝実質細胞の過形成結節は1例にみられたのみであった。この結果より, 血管内皮細胞の異形成病巣は Quinoline の投与を持続した場合, 血管内皮細胞腫へと進展するものであることを示唆した結果であると考えられた。

*1 名古屋市立大学医学部

前川昭彦: 毒性試験における病理検査のあり方と病変の実例 (げっ歯類の腫瘍性病変)

食品衛生研究, 39, 35~45 (1989)

げっ歯類を用いた毒性試験のあり方として, 病変の種類, 肉眼的所見の表現とまとめ, 組織学的所見の表現とまとめ, 報告書のまとめ, 病理検査における問題点および病理検査における信頼性保証と GLP 査察について述べるとともに, 併せ病変の実例としてげっ歯類の腫瘍性病変について簡単にまとめた。

Takahashi, M., Sato, H., Toyoda, K., Furukawa, F., Imaida, K., Hasegawa, R.*1 and Hayashi, Y.: **Sodium o-phenylphenate (OPP-Na) promotes skin carcinogenesis in CD-1 female mice initiated with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene**
Carcinogenesis, 10, 1163~1167 (1989)

sodium o-phenylphenate (OPP-Na) をマウス皮膚に投与して, 皮膚二段階発癌モデルのイニシエーター作用, プロモーター作用を検討した。実験は CD-1 マウス背部皮膚に, 10 μg の 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) を週2回5週間投与し, その後 5 mg の OPP-Na を週2回47週間投与した。その結果, 20匹中15匹 (75%) の動物に計25個の皮膚腫瘍 (21例の乳頭腫と4例の扁平上皮癌) が発生した。一方, DMBA 投与後, アセトン溶液を投与した群では20匹中5匹 (25%) の動物に計6個の皮膚腫瘍 (5例の乳頭腫と1例の扁平上皮癌) のみであり, 統計学的に有意であった。さらにイニシエーションの時期に OPP-Na を投与し, その後プロモーターである TPA を投与した群では1例の乳頭腫が発生したのみで, イニシエーター作用は認められなかった。この実験では OPP-Na が皮膚腫瘍発生に対し, プロモーターとして働くことが示されたが, 皮膚の BrdU 標識率も OPP-Na 投与で2~3倍に上昇していた。

*1 名古屋市立大学医学部

Takahashi, M., Furukawa, F., Nagase, S.*1, Imaida, K. and Hayashi, Y.: **Elevated activity of pancreatic type amylase in the urine as an early indicator of pancreatic tumors in hamsters**

Internat. J. Pancreatol., 5, 47~53 (1989)

N-nitrosobis (2-oxopropyl) amine (BOP) によって誘発されるハムスターの実験発癌モデルを用い, その発生過程における尿および血清のアミラーゼアイソザイムの変動を調べた。6週齢雌シリアンゴールドンハムスターに 10 mg/kg の BOP を週1回6週間投与し, 経時的に2週ごとに尿および血清を採取しアミラーゼ活性を調べた。その結果, 総アミラーゼ値では経時的推移に一定の傾向はみられなかったが, P型 (腭型) アミラーゼ値では明確な異常が認められた。BOP 投与中の6週目までは, 尿中のP型アミラーゼ値は極めて低値であったが, 8週目からいずれの動物も高値を示した。特に高値を示した動物10週目, 14週目, 18週目に屠殺剖検し, 膵を組織学的に検索した。これらの動物はいずれも小膵癌あるいは前癌病変が認められ,

尿中のP型アミラーゼ値の上昇は初期膀胱癌の指標となると考えられた。P型アミラーゼ値の上昇の原因は腫瘍部からの膀胱液の漏出による限局性膀胱炎であると考えられた。

*1 佐々木研究所

Takahashi, M., Okamiya, H., Furukawa, F., Toyoda, K., Sato, H., Imaida, K. and Hayashi, Y.: **Effects of glyoxal and methylglyoxal administration on gastric carcinogenesis in Wistar rats after initiation with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine**

Carcinogenesis, 10, 1925~1927 (1989)

胃二段階発癌モデルを用い、グリオキサール、メチルグリオキサールのプロモーター作用を検索した。7週齢の雄ウィスター系ラットに最初、100 mg/l のMNNG 溶液を飲料水として与え、同時に10%食塩含有飼料を投与した。この処置を8週間続けた後、通常食に戻し、飲料水中に0.5%グリオキサールまたは0.25%メチルグリオキサールを混じり、32週間投与した。その結果、胃癌発生率は対照群で5匹(17%)に対し、グリオキサール群は12匹(43%)と増加していたほか、幽門腺領域の過形成および癌の発生率が上昇していた。一方、メチルグリオキサールでは、腺癌の発生率の増加は認められなかったが、過形成が上昇していた。この実験により、グリオキサールは、ラット胃二段階発癌においてプロモーター作用を示すことが明らかとなった。さらに、メチルグリオキサールもまた、プロモーター作用を示す可能性が示唆された。

Hasegawa, R.*1, Yamashita, K.*2, Morimoto, K., Furukawa, F., Toyoda, K., Shimoji, N., Takahashi, M. and Hayashi, Y.: **In situ freezing of the rat urinary bladder: DNA adduct formation in the bladder epithelium demonstrated by P-postlabeling assay**

Jpn. J. Cancer Res., 80, 826~832 (1989)

ラット膀胱の凍結処理による膀胱腫瘍2段階発癌におけるイニシエーション作用について検討した。ラット膀胱の漿膜面に-15から-30℃の凍結棒を2秒間あてることによるDNA修飾作用の有無について検討した。³²P-postlabeling法により、凍結処理後3日の膀胱上皮からDNA付加体が認められた。また、DNAのsingle-strand breakも凍結処理後10分の膀胱上皮に観察された。その結果、膀胱の凍結処理により膀胱粘膜にDNAの障害とDNA付加体の形成が

引き起こされる事が明らかとなった。

*1 名古屋市立大学医学部

*2 国立がんセンター生化学部

林 裕造: 動物代替法におけるヒトへの外挿
フレグナンスジャーナル, 11, 52~56 (1989)

動物を用いた *in vivo* の実験結果と動物代替法による *in vitro* の実験結果とを比較し、特にヒトへの外挿を行う場合の両試験法の比較を行った。結論として、*in vivo* 試験法と *in vitro* の動物実験代替法を適切に選択、組み合わせることによって化学物質の毒性に関するより信頼性の高い評価が可能となるものと考えられた。

Ogiu, T.*1, Fukami, H.*2, Matsuyama, M.*3 and Maekawa, A.: **Thymic lymphomas induced by N-propyl-N-nitrosourea (PNU) in the BUF/Mna rat, an inbred strain with a high incidence of spontaneous thymoma**

Acta Pathol. Japon., 39, 706~711 (1989)

自然発生胸腺腫好発系として知られる BUF/Mna ラットに N-propyl-N-nitrosourea (PNU) 水溶液(400 ppm)を飲料水として5週齢時より投与したところ、平均14週の潜伏期をもって全例に胸腺リンパ腫が発生し、BUF/Mna ラットは PNU に対しきわめて高感受性である事が示された。発生した胸腺リンパ腫についてその核型分析を行った所、多くの例で11番および12番目の染色体に異常がみられた。加えて、半数例近くに c-myc 遺伝子のある7番目の染色体にトリソミーが認められた。

*1 放射線医学研究所

*2 愛知県がんセンター

*3 名古屋大学医学部

高橋道人, 林 裕造: 環境汚染物質の毒性評価1989, 発癌性

水質汚濁研究, 10, 621~626 (1989)

発癌性試験結果の評価法につき概説した。

1. はじめに
2. 長期発癌性試験の概念と解釈
3. 評価における毒性学の問題点
 - 3.1 最大耐量 (MTD) の必要性和矛盾
 - 3.2 発癌物質の分類と質的評価
 - 3.2.1 一次発癌物質 (primary carcinogen)
 - 3.2.2 二次発癌物質 (secondary carcinogen)
 - 3.2.3 プロモーター (promoter)

- 3.3 生物学的有意性
- 3.4 げっ歯類の腫瘍とヒトの癌との関連性
4. 評価における病理学的問題点
- 4.1 腫瘍発生率の評価における問題点
- 4.2 腫瘍発生までの期間
- 4.3 腫瘍の診断における問題点
5. 統計学的有意性の評価
- 5.1 統計学的検定とその方法
- 5.2 偽陰性および偽陽性の回避
- 5.2.1 偽陰性
- 5.2.2 偽陽性
- 5.3 蓄積対照群 (Historical control)
- 5.4 実質安全量 VSD
6. おわりに

正岡 昭*¹, 柴田和夫*¹, 山川洋右*¹, 小林 学*¹, 小林 徹*¹, 今井田克己, 長谷川良平*¹, 柴田偉雄*¹: 慢性膿胸壁発生血管内皮細胞腫の1例
日本胸部臨床, 48, 336~342 (1989)

慢性膿胸壁発生血管内皮細胞腫の1症例の臨床経過と病理解剖学的検索結果を報告した。症例は62才の男性。30年以上継続した慢性膿胸患者で、頻回の咯血、血たんを呈するようになり、慢性膿胸壁への肺穿孔の治療を目的として胸膜肺全摘出術を実施した。やがて胸腔内の血腫の形成が認められ、再度開胸血腫除去術を行った。その後、呼吸困難の増強、咯血の回数の増加がみられ、死亡した。病理解剖すると左胸腔内には2000 ml以上の血液、凝血塊が認められ、膿胸壁をなす胸膜に悪性血管内皮細胞腫の発生が病理組織学的に、また、凝血第8因子の免疫組織学的検索により確認された。また、対側肺への転移も認められた。本症例は慢性膿胸の胸壁に発生したと考えられる悪性血管内皮細胞腫で、術後健側肺への転移を伴い、死亡した症例である。

*¹ 名古屋市立大学医学部

Fukushima, S.*¹, Asamoto, M.*¹, Imaida, K., El-Bolkainy, M.*², Tawfik, H. N.*² and Ito, N.*¹:
Comparative study of urinary bladder carcinomas in Japanese and Egyptians
Acta Pathol. Jpn. 39, 176~179 (1989)

膀胱腫瘍の組織像、発生要因、発生年齢、男女の発生比率をエジプト人と日本人とで比較検討した。膀胱腫瘍で全摘出術を受けた106症例の日本人膀胱腫瘍症例と169症例のエジプト人膀胱腫瘍症例に関して比較検討した。発生年齢を見るとエジプト人の症例の方が

日本人の症例より若い症例が多く見られた。また、男女比でみるとエジプト人の方が男性の発生が多く見られた。エジプト人の膀胱腫瘍は扁平上皮癌の発生が多くみられたのに対し、日本人の症例では移行上皮癌が多かった。また、腫瘍の深達度をみるとエジプト人の症例の方がより悪性度が高く、ある症例では Grade 1の扁平上皮癌でも筋層まで浸潤している症例も認められた。また、さらに興味深いことにエジプト人の多くの症例では *Schistosoma haematobium* の感染を伴っている症例が多くみられた。以上のように、膀胱腫瘍はエジプト人と日本人の症例でその組織像、発生年齢、発生要因に差が認められた。

*¹ 名古屋市立大学医学部

*² National Cancer Institute, Cairo, Egypt

Imaida, K., Tatematsu, M.*¹, Kato, T.*¹, Tsuda, H.*¹ and Ito, N.*¹: **Advantage and limitations of stereological estimation of placental form of glutathione S-transferase positive rat livercell foci by computerized 3-dimensional reconstruction**

Jpn. J. Cancer Res., 80, 326~330 (1989)

ラット肝に発生する GST-P 陽性細胞巣を連続切片を用いて3次元に再構築することによりその立体的構造と2次元のデータから3次元のデータを概算する換算式の妥当性について検討した。GST-P 陽性細胞巣はラットに DEN の投与後 DHEN, DBN, PB, Aldrin, BHA, PCB, BBN を投与して得られたものを用いた。陽性細胞巣の3次元構造は再構築の結果、比較的小さい陽性細胞巣では規則的な球形を呈していたが、大きな陽性細胞巣では不規則な形状を呈し、分岐した部分もあった。したがって、3次元データへの概算式の前提は小さい陽性細胞巣では問題無いが、大きな陽性細胞巣では必ずしも満足しない陽性細胞巣も存在することが明らかとなった。また、検索した物質に関しては2次元のデータを用いても、3次元のデータを用いても検索結果に差は見られなかった。

*¹ 名古屋市立大学医学部

Hasegawa, R.*¹, Mutai, M.*¹, Imaida, K., Tsuda, H.*¹, Yamaguchi, S.*¹ and Ito, N.*¹: **Synergistic effect of low-dose hepatocarcinogens in induction of glutathione S-transferase P-positive foci in the rat liver**

Jpn. J. Cancer Res., 80, 945~951 (1989)

低用量の肝発癌物質を組み合わせて投与した場合の

影響を肝前癌病変 (GST-P 陽性細胞巢) の発生を指標とした medium-term bioassay system を用いて検討した。ラットに DEN を腹腔内投与し、その後肝発癌物質である 2-AAF, 3'-Me-DAB, PB, TAA, EHEN, B[a]P, α -HCH を通常用いられる濃度の 1/6 の用量で単独投与, または最高 6 種までを組み合わせ投与した。実験開始 3 週目に肝部分切除を行った。8 週目に屠殺剖検し、肝の GST-P 陽性細胞巢の単位面積当りの発生個数ならびに面積を比較検討した。その結果、それぞれを単独で投与した群の陽性細胞巢の数または面積の総和より、6 種の肝発癌物質を組み合わせ投与した群に発生した陽性細胞巢の値の方が有意に高い値を示した。以上の結果より単独では発癌性を示さない低濃度であっても、他の物質と組み合わせ投与した場合、発癌性を示す可能性が示唆された。

*1 名古屋市立大学医学部

Watanabe, M., Ishidate, M. Jr. and Nohmi, T.: A sensitive method for the detection of mutagenic nitroarenes: construction of nitroreductase-overproducing derivatives of *Salmonella typhimurium* strains TA98 and TA100
Mutat. Res., 216, 211~220 (1989)

環境汚染物質として知られるニトロアレーンの菌体内代謝活性に関与する *S. typhimurium* ニトロ還元酵素の遺伝子を、TA1538 株よりクローン化し、マルチコピープラスミド pBR322 に組込み TA98, TA100 株へ導入した。得られた株 (YG1021, YG1026) は、対照株 TA1538 (pBR322) の約 50 倍のニトロフラゾン還元酵素活性を持ち、Ames 試験において、2-ニトロフルオレン、1-ニトロピレン、2-ニトロナフタレンといったニトロアレーン類に対して高い感受性を示した。以上より、YG1021, YG1026 株は、ニトロアレーンに対する高感受性株として極めて有用である。

Yamada, M., Makino, K.*, Amemura, M.*, Shinagawa, H* and Nakata, A.*: Regulation of the phosphate regulon of *Escherichia coli*: Analysis of mutant *phoB* and *phoR* genes causing different phenotypes
J. of Bacteriol., 171, 5601~5606 (1989)

大腸菌のリン酸レギュロンは、培地中のリン酸が欠乏すると発現が起こる。その調節遺伝子である *phoB* と *phoR* の突然変異株にはそれぞれ二種類の表現型を示すものが分離されている。突然変異株間の機能の相違は、遺伝子産物の機能ドメインを反映するものと考え

えて、突然変異遺伝子の塩基配列を決定した。その結果から *phoB* 蛋白質の機能上特に重要な領域を決定した。

* 大阪大学微生物病研究所

Yamada, M., Makino, K.*, Shinagawa, H* and Nakata, A.*: Regulation of the phosphate regulon of *Escherichia coli*: Properties of *phoR* mutants and subcellular localization of PhoR protein

Mol. Gen. Genet., 220, 366~372 (1990)

大腸菌の PhoR タンパク質はリン酸レギュロンにおいて正と負の調節機能を持つことが知られており、N 末端の疎水性領域で内膜と結合していると推測される。PhoR タンパク質の局在と機能を解析するため、N 末端からの欠失変異体を作成した。その結果 PhoR タンパク質は N 末端のアミノ酸が 83 個または 158 個欠失したものは、正の機能を保持していることがわかった。前者の欠失変異体を用いて、抗血清を作成しウエスタンブロッティング法により PhoR タンパク質が内膜と結合していることを証明した。

* 大阪大学微生物病研究所

渡辺雅彦, 能美健彦, 石館 基: ニトロアレーン, 芳香族アミンに高感受性を示す *Salmonella typhimurium* TA98, TA100 の新しい誘導株の樹立
環境変異原研究, 11, 67~74 (1989)

S. typhimurium TA1538 株からニトロ還元酵素, O-アセチル転移酵素遺伝子をクローン化し、それぞれの遺伝子を持つプラスミドを TA98, TA100 株へ導入し、芳香族アミン、ニトロアレーンに対し高い感受性を示す指標菌株を作成した。

Takagi, M.*, Ohkuma, M.*, Kobayashi, N.*, Watanabe, M. and Yano, K.*: Purification of cytochrome P-450alk from *n*-alkane-grown cells of *Candida maltosa*, and cloning and nucleotide sequencing of the encoding gene
Agric. Biol. Chem., 53, 2217~2226 (1989)

石油資化酵母 *Candida maltosa* IAM12247 において、*n*-alkane により誘導される cytochrome P-450 alk の精製を行った。酸化型 P-450alk は low spin 型の吸収スペクトルを示し、Soret peak は 418 nm, α peak は 568 nm, β peak は 534 nm であった。還元型 CO-complex の Soret peak は 450 nm であった。つぎに、オリゴヌクレオチドをプローブとして

cDNA より P-450alk 遺伝子のクローニングおよび塩基配列決定を行った。塩基配列より推定されたアミノ酸残基数は 523, 分子量は 59838 であり, 部分決定された P-450alk タンパクのアミノ酸配列に一致した。他種の P-450 との相同性について考察を加えた。

* 東京大学農学部

Watanabe, M., Ishidate, M. Jr. and Nohmi, T.:
Nucleotide sequence of *Salmonella typhimurium* nitroreductase gene

Nucl. Acids Res., 18, 1059 (1990)

S. typhimurium ニトロ還元酵素遺伝子の塩基配列を決定した。塩基配列より推定されたタンパク質の分子量は 23955, アミノ酸残基数は 217 であり, マキシセル法により推定されたニトロ還元酵素の分子量 28 kDa と近似の値であった。また, 転写および翻訳に関する各種コンセンサスシーケンスも見いだされた。

Matsuoka, A., Hirose, A.*¹, Natori, S.*¹, Iwasaki, S.*², Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr.: **Mutagenicity of ptaquiloside, the carcinogen in bracken, and its related illudane-type sesquiterpenes II. Chromosomal aberration tests with cultured mammalian cells**

Mutat. Res., 215, 179 (1989)

ワラビ中の発がん物質である ptaquiloside およびその構造類似化合物 hypoloside B, hypoloside C, illudin M, illudin S についてチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験を行った。ptaquiloside は 4.5 µg/ml という低濃度で染色体異常を誘発した。染色体異常誘発性は pH 依存性があり, pH 5.3 では pH 7.4 あるいは pH 8.0 と比べて90倍高い濃度で, 同程度の活性を観察することができた。hypoloside B および hypoloside C は ptaquiloside と同程度の, illudin M および illudin S は ptaquiloside よりかなり強い染色体異常誘発性を示した。

*¹ 明治薬科大学

*² 東京大学応用微生物学研究所

Hayashi, M., Yoshimura, I.*¹, Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr.: **A procedure for data analysis of the rodent micronucleus test involving a historical control**

Environ. Mol. Mutagen., 13, 347~356 (1989)

マウス骨髄を用いる小核試験は, 化学物質の安全性評価のための *in vivo* 短期試験系として広く用いられ

ている。しかし, 被験物質による小核誘発性を統計学的に評価する方法は確立していない。本論文では, 統計学の専門家を共著者に加え, 小核試験結果を判定するための統計学的手法を提案した。提案した手法は, 先ず陰性, 陽性対照群の背景データと, 当該試験の両対照群のデータを管理図法的に比較し, 試験自体の技術的正当性を評価する。技術的に成立しておれば次のステップに進み, 問題があれば再実験を行う。第2ステップでは陰性背景対照と比較して有意な増加を示す処理群があるかどうかを調べ, 第3ステップで用量反応関係があるかどうかを Cochran-Armitage trend test で評価する。第2, 第3ステップで有意となった場合に初めて陽性結果と判定し, それ以外の場合には陰性結果と判定する。

* 名古屋大学工学部

Hayashi, M., Sutou, S.*¹, Shimada, H.*², Sato, S.*³, Sasaki, Y.F.*⁴ and Wakata, A.*⁵: **Difference between intraperitoneal and oral gavage application in the micronucleus test: The 3rd collaborative study by CSGMT/JEMS-MMS**

Mutat. Res. 223, 329~344 (1989)

日本環境変異原学会の哺乳動物試験分科会・小核試験共同研究グループによる第3回共同研究の総まとめの論文である。34機関の研究者が参加し, 小核誘発の作用機構が異なると思われる17種の化学物質について, 投与経路の差によって試験結果にどのような差が生ずるかを検討した。1検体を2研究機関が受持ち, 2系統のマウスを用い腹腔内投与と強制経口投与による差を比較した。マウスの体重当たりの絶対重量で比較した場合には, 腹腔内投与の方がより低い用量で小核を誘発する傾向にあった。しかし, 用量を同時に行った簡便法による LD₅₀ に対する割合でみた場合には前述の傾向は不明瞭になり, 被験物質によれば強制経口投与の方がより低い用量で小核を誘発することが判明した。

*¹ 伊東ハム中央研究所

*² 第一製薬(株)研究所

*³ 日本たばこ産業(株)安全性研究所

*⁴ 残留農薬研究所

*⁵ 山之内製薬(株)中央研究所

Hayashi, M., Sofuni, T., Kodama, Y., Ishidate, M. Jr. and Tamura, H.*: **Micronucleus test with 1-β-D-arabinofuranosyl-cytosine administered by intraperitoneal injection and oral gavage**

Mutat. Res., 223, 345~348 (1989)

1- β -D-Arabinofuranosylcytosine (Ara-C) を腹腔内に投与した場合と、強制経口投与した場合のマウス骨髄における小核誘発性を比較検討した。用いたマウスの系統は CD-1 と変異原高感受性とされている MS/Ae の 2 系統である。先ず、Lorke の方法によってそれぞれの系統について ip と po により LD₅₀ を求めた。その値を参考に小核試験でのそれぞれの投与経路における最適な試験用量と標本作製時期を決定した後、同一条件下で投与経路の差を確認するための本実験を行った。Ara-C 両投与経路によってともに小核を誘発した。出現頻度に関しては po の方が高い傾向にあった。また、この化学物質は LD₅₀ 値と比較して非常に低い用量で (0.3%以下) でも小核を誘発することが判明した。

* 日本新薬協中央研究所

Suzuki, T., Kohda, K*, and Kawazoe, Y.*: **Enhanced cytotoxicity in simultaneous and sequential drug-heat treatments to cultured Chinese Hamster V79 cells**

Chem. Pharm. Bull., 37, 3058~3060 (1989)

一般に、温度上昇にともない薬物の細胞毒性効果は増強されるが、薬物処理と熱処理を分割して作用させたときの作用を検討する目的で、Bleomycin, Paraquat, MNU, ACNU といった遺伝子傷害性物質およびエタノール, DMSO, EDTA, 尿素といった一般的な細胞毒性物質の V79 細胞に対する致死効果を調べた。

その結果、4 種の遺伝子傷害物質については共通に、分割処理においては、その処理順序にかかわらず同時処理の約半分程度の作用増強がみられた。また、他の一般的な細胞毒性物質では、高温において survival curve の肩が減少する傾向を示し、毒性増強が認められたが、分割処理においては、薬物間および処理順序によって異なった作用増強のパターンを示した。

さらに、熱による細胞死を防ぐ作用を持つグリセロールにおいて、分割処理では逆に毒性が増強されるといった興味ある結果が得られた。

* 名古屋市立大学薬学部

Kohda, K.*¹, Kasai, H.*², Ogawa, T.*¹, Suzuki, T. and Kawazoe, Y.*¹: **Deoxyribonucleic Acid (DNA) damage induced by Bleomycin-Fe (II) in vitro: Formation of 8-hydroxyguanine residues in DNA**

Chem. Pharm. Bull., 37, 1028~1030 (1989)

Calf thymus DNA に対し、プレオマイシン-Fe(II) を処理したところ、DNA の酸化的傷害の 1 つである 8-hydroxyguanine 残基の生成が認められた。また同時に、DNA の分解産物である base propenal の生成も確認され、前者の生成量は後者に対し約 1%であった。

しかし、Ehrlich 腹水癌細胞に対してプレオマイシンを処理したところ、生存細胞が認められない濃度においても細胞 DNA 中の 8-hydroxyguanine 量の有意な上昇は認められなかった。

*¹ 名古屋市立大学薬学部

*² 国立がんセンター生物部

水沢 博: **細胞バンク運営の現場で使う細胞株データベースの作成と運用**

組織培養, 16, 117 (1990)

培養細胞株の情報管理の方法については厚生省細胞バンク設立以来重要な位置をしめてきた。しかし、システムエンジニアなどの専任の職員がいるわけではなく、さらに、準備期間が極端に短かったため現在運用中のデータベース管理システム (JDACS: JCRBD Data Management System) は極めて不備の多いものであった。そこで、5 年間の細胞バンク運営の経験を生かして、さらに他省庁に設立された多くの細胞バンクとの連携を考慮した培養細胞株の情報管理システム (IBDMS: Inter Bank Data Management System) を構築したので、この基本概念および利用方法について詳細に解説した。

品川保弘*, 水沢 博: **JCRB 細胞バンク追跡調査書に現れた供給培養細胞株の問題点**

細胞工学, 9, 77 (1990)

厚生省細胞バンクは1984年以来事業を開始し年間3000 アンプルにもおよぶ細胞株を国内で供給するまでに成長してきた。先端的な研究を支援することを目的とした細胞バンクであることから、供給する細胞株の品質を高度に維持するための品質管理はバンク運営において重要な位置をしめているとの認識で重点的に取り組んできた課題である。それにもかかわらず利用者から細胞の品質に関する疑問がいくつか提起されるケースがあったので、これらの疑問を整理し必要な場合は該当するサンプルについて 2 重に確認し疑問の全ては利用者が入手した後の問題であることを示し、細胞を利用するさいの注意点を明記した。

* 富山県衛生研究所

佐々木澄志*, 田中憲穂*, 水沢 博, 石館 基: 癌遺伝子 v-Ha-Ras を導入した BALB 3T3 細胞株 (Bhas42) を用いる発癌プロモーター検索系の開発環境変異原研究, 11, 75~80 (1989)

すでに樹立した Bhas42 細胞株の性状を確認を行った結果, この細胞は発ガンプロモーターと呼ばれる多くの化学物質に反応し形態変化が誘導される(形質転換)ことが明らかになった。本細胞株の親株である BALB/3T3 細胞株に形質転換を誘導するにはこの発ガンプロモーターの添加に先立ち突然変異誘発剤であらかじめ処理する必要があることからこの Bhas42 細胞株は2段階発ガンのステップのうち最初の段階がすでに終了してしまった細胞株であると考えられた。この細胞株の性質を利用し環境中の多くの発ガンプロモーターを検索することは有用であるという結果を得た。

* 食品薬品安全センター-秦野研究所

岡田敏史, 村井真美, 中原 裕*1, 木村俊夫*2: 局方収載ジフェンヒドรามミン含有製剤の液体クロマトグラフ法による定量

医薬品研究, 20, 667~673 (1989)

日局第二部には「ジフェンヒドรามミン・カルシウム散」, 「ジフェンヒドรามミン・ワレリル尿素散」, 「ジフェンヒドรามミン・フェノール・亜鉛華リニメント」, 「ヒドロコルチゾン・ジフェンヒドรามミン軟膏」の4種のジフェンヒドรามミン (DPH) 含有製剤が収載されている。いずれの製剤についても主薬の確認試験はあるが定量法の記載はなく, 簡便かつ統一的な定量法の確立が望まれる。

本報告においては各製剤からの DPH の定量的な抽出法および ODS カラムを用いた液体クロマトグラフ条件について検討し, 各製剤に対する定量的な分析条件を確立することができた。

*1 メレルダウ・フナイ(株)

*2 サンド薬品(株)

四方田千佳子, 小室徹雄, 広重律子, 田中正一, 徳永裕司, 木村俊夫: 吸光度測定法によるアセトアミノフェン, プリミドンおよびエテンザミドの定量

医薬品研究, 21, 68~79 (1990)

アセトアミノフェン, プリミドンおよびエテンザミドの吸光度測定法による定量法を検討し, 必要となる標準品の品質評価と確立を試みた。現在, 日局11では, これらの医薬品の定量法として窒素定量法が採用されているが, 吸光度測定法は操作が簡便で, 再現性も良好であることから, 吸光度測定法への変更が望ま

しい。

Komuro, T., Yomota, C., Kimura, T. and Galanos, C.: Comparison of R- and S-form lipopolysaccharide in pyrogen and Limulus tests

FEMUS Microbiol. Lett., 60, 79~84 (1989)

デオキシコール酸ナトリウム存在下でポリアクリルアミドゲル電気泳動法を用いて 4°C で細菌内毒素 (LPS) を R 型および S 型に分画し, それぞれのウサギにおける発熱活性および LAL 凝固活性を調べた。単位重量当りで比較するとき, R 型はいずれの活性においても S 型よりも有意に強いことを明らかにした。

Komuro, T., Yomota, C. and Kimura, T.: Studies on pyrogenicity in rabbits and Limulus amoebocyte lysate gelation activity of R- and S-form lipopolysaccharides fractionated from S-form lipopolysaccharide

Japan. J. Med. Sci. Biol., 42, 220~221 (1989)

グラム陰性菌の外膜成分であるリポ多糖 (LPS) は主として O 抗原多糖側鎖の数の違いにより化学的に不均一である。新たに開発したデオキシコール酸ナトリウム存在下におけるポリアクリルアミドゲル電気泳動法を用いて O 抗原多糖を含む画分 (S-LPS) と含まない画分 (R-LPS) とを得た。両者のアサギ発熱活性とリムルス活性には有意に差異のあることを明らかにした。

Inada, K.*1, Suzuki, M.*2, Takahashi, K.*3, Tanaka, S.*4, Tamura, H.*5, Komuro, T. and Yoshida, M.*6: A new perchloric acid (PCA) treatment of human plasma for detection of endotoxin by endotoxin-specific chromogenic test

Japan. J. Med. Sci. Biol., 41, 209 (1988)

血中エンドトキシンの測定法にはエンドトキシンに特異的なエンドスペー法と非特異的なトキシカラール法があるが, いずれの方法でも血漿の前処理法として過塩素酸処理法が用いられている。しかしこの前処理法では血漿を沈澱除去する段階でエンドトキシンも一部共沈して失われることを見いだした。血漿蛋白の沈澱除去操作を含まない新たな血漿前処理法を考案した。両者の方法を臨床検体に応用しエンドトキシンと病態との関係について考察を加えた。

* 岩手医科大学医学部

Galanos, C.*1, Jiao, B.*2, Komuro, T., Freudenberg,

M.* and Lüderitz, O.*: **Large-scale fractionation of S-form lipopolysaccharide from *Salmonella abortus equi***

J. Chromatogr., **440**, 397~404 (1988)

Salmonella abortus equi のS型 LPS を新たに考察した有機溶媒を用いる抽出法で分画して、長鎖画分、短鎖画分およびR画分とを得た。O抗原多糖は、長鎖画分に最も多量に含まれておりグルコサミンに対するモル比は25:1であったが、短鎖画分では2.5:1であった。いずれの画分も血清学的性質は化学分析により得られた組成値から推定される性質とよく一致することを明らかにした。

* Max-Planck-Institut für Immunbiologie

Taura, Y.*, Tanaka, M., Funakoshi, K.* and Sakai, K*.: **Asymmetric cyclization reaction by Rh (I) with chiral ligands**

Tetrahedron Letters, **30**, 6349~6352 (1989)

キラリなホスフィンリガンドをその配位子として有するロジウム錯体を触媒として用いた、1-butyl-4-penten-1-al 化合物の閉環によるシクロペンタノンの不斉合成の研究を行った。その結果、73% ee の光学純度で 4-butyl cyclopentanone が得られることが明らかとなった。また、同じ反応を利用した立体選択的シクロペンタノンの合成を行った。これらの結果は、本方法が光学活性なシクロペンタノイド合成の有力な手段となることを示した。

* 九州大学薬学部

Miyao, Y.*, Tanaka, M., Suemune, H.* and Sakai, K*.: **New ring conversion of monocyclic ketones to bicycloenone skeletons**

J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1535~1536 (1989)

側鎖の4位あるいは5位にカルボニル基を有す α 置換シクロペンタノンおよびシクロヘキサノンの酸触媒を用いた反応について研究を行った。その結果、本方法は1ポットでの連続する反応により環化成績物を与えることが判明した。このことは、本方法がインダン骨格を有す医薬品等の有益な合成反応となることを意味している。

* 九州大学薬学部

Hamano, T.*¹, Mitsunashi, Y.*¹, Aoki, N.*¹, Yamamoto, S.*¹, Tsuji, S., Ito, Y. and Oji, Y.*²: **High-performance Liquid Chromatographic Assay of Chondroitin Sulphate in Food Prod-**

ucts

Analyst, **114**, 891~893 (1989)

コンドロイチナーゼ ABC によってコンドロイチン硫酸 (ChS) から遊離した二つの不飽和二単糖の検出を基にした食品中の ChS の HPLC 法を開発した。コンドロイチナーゼ ABC により ChS を加水分解して得られた二つの不飽和二単糖 (6-硫酸および4-硫酸二単糖) の Zorbax NH₂ カラムの保持時間は6.2および7.3分であった。これらの二単糖のピークから試料中の ChS の量を測定した。市販マヨネーズ、ドレッシングおよび魚肉ソーセージにこの方法を適用し、良好な結果を得た。

*¹ 神戸市環境保健研究所

*² 神戸大学農学部

Tonogai, Y., Hasegawa, Y., Nakamura, Y., Fujino, S* and Ito, Y.: **Simultaneous Determination of Ten Kinds of Organochlorine Insecticides in Beef by Gas Chromatography**

J. Food Protect., **52**, 92 (1989)

牛肉中の10種の有機塩素系農薬 (β -BHC, P, P'-DDT, P, P'-DDE, P, P'-DDD, γ -ヘキサクロル, γ -ヘプタクロルエポキシド, アルドリン, ディルドリン, エンドリン) を ECD-GC で同時定量する方法を確立した。

1987年8月~12月に大阪または神戸港に入荷したオーストラリア産牛肉126検体を本法で検査した結果、12検体に有機塩素系の残留農薬を検出した。これらの中で厚生省の暫定基準を越えるものは2検体あり、DDT (DDE, DDD を含む) が1.82 ppm, またディルドリン (アルドリンを含む) が0.42 ppm であった。

* 神戸農林規格検査所大阪支所

小島満子, 外海泰秀, 高木加代子, 伊藤晋志男: **酵母および細菌を単独または混合接種した魚介類における揮発性塩基窒素の経日変化**
食衛誌, **30**, 19~26 (1989)

酵母 *Candida lipolytica*, 細菌 *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas fluorescens* を減菌魚介類ホモジネートに単独または混合接種し、5°C, 15°C, 25°C で1週間保存した場合の生菌数, pH 値, 揮発性塩基窒素 (VBN) の生成量を経日的に測定した。*C. lipolytica* の生菌数は細菌2菌種のそれらより2~3オーダーも低かったが、*C. lipolytica* によって生成された VBN 値は *S. epidermidis* によって生成されたそれよりは極めて高く、*P. fluorescens* によって生成

されたそれと近似していた。

また *C. lipolytica* は細菌との混合接種試料中においても優勢に増殖し、3週間保存後には細菌よりも高い生残性を示した。

長谷川ゆかり, 中村優美子, 外海泰秀, 小島満子, 伊藤誉志男: 細菌および酵母に対する亜塩素酸ナトリウムの抗菌作用

食衛誌, 30, 240~249 (1989)

液体培地ならびにサバホモジネート中における細菌 (*P. fluorescens*, *B. subtilis*) および酵母 (*C. lipolytica*, *Tr. cutaneum*) に対する亜塩素酸ナトリウム (NaClO_2) の抗菌作用特性を, 次亜塩素酸ナトリウム (NaClO) を対照として比較検討した。 NaClO_2 は液体培地中で細菌に対して, 最高値で NaClO の8倍の抗菌活性を示した。 またサバホモジネート中においても, NaClO_2 は細菌・酵母に対し NaClO より強い抗菌活性を示した。 しかし液体培地中での酵母に対する NaClO_2 の作用は, NaClO より弱かった。 イオンクロマトグラフィーと滴定法により両物質の残存量を測定したところ, NaClO_2 は NaClO に比して極めて安定であることが判明した。

辻 澄子, 中村優美子, 外海泰秀, 柴田 正, 内堀伸健*1, 川田 誠*1, 小林建夫*1, 鈴木 宏*1, 室井順子*2, 鈴木由記子*2, 兼田 登*2, 鈴木英喜*2, 宮本文夫*3, 伊藤誉志男: 農産物, 畜産物, 水産物およびそれらの加工品中の過酸化水素の含有量

日本食品工業学会誌, 37, 111~123 (1990)

農産物, 畜産物, 水産物およびそれらの加工品260種類(1621試料)中の過酸化水素 (H_2O_2) 含有量を酸素電極法により測定した。 その結果, (1)生鮮食品中の H_2O_2 はほとんど認められなかった。(2)加工食品中の H_2O_2 含有量は全般的に生鮮食品より高かった。(3)5 mg/kg 以上 H_2O_2 の含有量を示したのは, らっきょう甘酢, 干しいたけ, いかなご佃煮, 焼きのり, ひとえぐさ佃煮, 乾燥ひじき, 緑茶類, 紅茶, 麦茶, コーヒーいり豆, インスタントコーヒー粉末, ココア粉末, 濃口しょうゆであった。(4)茶類およびコーヒー類の飲用時での H_2O_2 含有量は5 mg/l 以下であった。 加熱調理では野菜類, 魚類および肉類の H_2O_2 含有量が増加した。

*1 日本生活協同組合連合会商品検査センター

*2 灘神戸生活協同組合商品検査センター

*3 千葉県衛生研究所

Hamano, T.*1, Mitsuhashi, Y.*1, Aoki, N.*1, Yamamoto, S.*1, Tsuji, S., Ito, Y. and Oji, Y.*2:

Colorimetric Micro-determination of Titanium Dioxide in Foods

Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 37, 162~166 (1990)

食品中の二酸化チタンの微量定量法について検討した。 試料 (0.5~2 g) を硫酸の存在下で濃硫酸と過塩素酸で湿式分解し, 冷後水で 50 ml にする。 これの 5 ml を比色管にとり, 1 ml の10%アスコルビン酸と 4 ml のジアンチピリルメタン溶液 (25 mg/ml 2.5 N 塩酸) を加え, 30分室温で放置後 390 nm で吸光度を測定する。 二酸化チタンの標準溶液を試料と同様に操作して得られた検量線より試料中の二酸化チタン量を求める。 数種の食品に添加した二酸化チタンの回収率は, 10 $\mu\text{g/g}$ で 92.1~98.8%, 100 $\mu\text{g/g}$ で 97.4~99.8%であった。 なお, 本法の定量限界は, 試料 2 g を用いた場合 5 $\mu\text{g/g}$ であった。

*1 神戸市環境保健研究所

*2 神戸大学農学部

中村優美子, 長谷川ゆかり, 外海泰秀, 伊藤誉志男: 農産物中の8種殺ダニ剤一斉分析法

衛生化学, 35, 466~475 (1989)

8種の殺ダニ剤アミトラズ, ベンゾメート, ジョホール, クロルフェンソ, クロルベンジレート, クロルプロピレート, フェニソプロモレート, テトラジホンの一斉分析法について検討した。 試料 20 g をアセトンで抽出した後, 食塩 15 g を加え, 20%酢酸エチル含有 *n*-ヘキサンで農薬を抽出した。 抽出物をキシレンに置換した後, フロリジルカラムに負荷し, *n*-ヘキサン洗浄後, 30%酢酸エチル含有 *n*-ヘキサンで農薬を溶出した。 アミトラズは OV-17 カラムを用いた FTD-GC で, その他の殺ダニ剤は CBP1 キャピラリーカラムを用いた ECD-GC で定量した。 本法により, りんご, なし, いちご, いよかん, きゅうり, 緑茶, 玄米中の8種殺ダニ剤を分析した結果, 検出量は 0.01 ppm 以下であった。 また, 殺ダニ剤を 0.25~5 ppm 添加して添加回収実験を行ったところ, 60.0~99.9%の回収率を得た。

柴田 正, 辻 澄子, 伊藤誉志男, 三浦和生*1, 小原一雄*2, 足立忠夫*2, 儀賀豊達*3, 浜野 孝*4, 三ツ橋孝正*4, 青木伸実*4, 山本 進*4, 水野俊秋*5, 慶田雅洋*5, 手塚義博*6: 改良ランキン装置を用いた食品中の微量亜硫酸の比色法の修正

食衛誌, 31, 57~66 (1990)

改良ランキン装置を用いた食品中の微量亜硫酸の比色法の改良を行った。食品試料中に含まれる亜硫酸以外の呈色妨害物質の影響を除去するために、試料液の一方に水を、他方に0.1%過酸化水素試液を加え、パラオザリニン・ホルムアルデヒド試薬を用いて発色させ、試料ブランクを差引き、亜硫酸量を求めた。さらに本法を用いて各種食51種を測定したところ、ほとんど全ての食品に適用可能であった。

*1 (財)日本銜詰検査協会

*2 (財)日本食品分析センター大阪支所

*3 サントリー(株)分析センター

*4 神戸市環境保健研究所

*5 ネッスル(株)品質管理部

*6 日本冷凍食品検査協会

小川義之:パイロジェンの不活化

防衛防衛誌, 17, 381~389 (1989)

医薬品におけるパイロジェンの汚染は、それ自体の毒素としての有毒作用(発熱その他)の面から防ぐことが必要であるとともに、パイロジェンは医薬品の製造過程における品質管理上の最も重要な指標ともなりうる。製薬業界のみならず、医療用具や食品分野においても、製品へのパイロジェンの混入を防ぐ方法あるいは除去・不活化方法には重大な関心が払われている。そこで、パイロジェンの不活化および除去法に関する出来るだけ最新の報告(著者等のデータを含めて)を紹介するとともに、不活化・除去の原理をパイロジェンの物理化学的構造から解説した。

Itami, T., Ema, M., Kawasaki, H. and Kanoh, S.:
Evaluation of teratogenic potential of sodium sulfite in rats

Drug Chem. Toxicol., 12, 123~135 (1989)

食品添加物にも用いられている亜硫酸ナトリウムの次世代への影響をウイスターラットを用いて検討した。妊娠8日から20日まで、亜硫酸ナトリウム(7水塩)を5.0, 2.5, 1.25, 0.63または0.32%を加えた粉末飼料を与えた。5%群の母体で体重低下と飼料摂取量の低下が認められたが、病的徴候は観察されなかった。20日に開腹して得られた胎仔は2.5%群を除いて全ての群で体重の低下が観察されたが、死亡・吸収率、性比に変化はなかった。外表、内臓、骨格での奇形例は1例も認められなかった。骨格および内臓の変異例や化骨遅延例がいくつかの胎仔で認められたが、それらの発生頻度は対照群に比べて有意差には至らなかった。また、新生仔について生後4週令まで観察したが、生

仔出生率、生存率および体重の増加のいずれも有意な変化は認められなかった。

以上の結果から、この条件において若干の胎仔毒性が認められたが、催奇形性はないものと考えられた。

Ema, M., Murai, T., Itami, T. and Kawasaki, H.:
Evaluation of the teratogenic potential of the rubber accelerator N-cyclohexyl-2-benzothiazylsulfenamide in rats

J. Appl. Toxicol., 9, 187~190 (1989)

N-cyclohexyl-2-benzothiazylsulfenamide (CBS)

のラット次世代に対する影響を検討した。CBS 0.001, 0.01, 0.1 または0.5%を含む飼料を妊娠0日から20日まで与えた。それぞれの群におけるCBS平均摂取量は0.7, 7.1, 69.6および288.8 mg/kg/dayであった。0.1および0.5%群における妊娠中の母体重増加は有意に低かった。0.5%群における妊娠中の飼料摂取量は対照群に比べて有意に低かったが、他のCBS投与群では対照群と同様であった。胎仔および胎盤重量の低下が0.5%群にみられた。着床前および後の胚-胎仔死亡率、生存胎仔数および性比にはCBS投与によると思われる影響は認められなかった。各群の生存胎仔の外表、骨格および内部器官の検査の結果、CBSの催奇形性を示す知見は得られなかった。以上の結果から、CBSはラット次世代の出生前発育に悪影響を及ぼさないことが示唆された。

Ema, M., Sakamoto, J., Murai, T. and Kawasaki, H.:
Evaluation of the teratogenic potential of the rubber accelerator dibenzthiazyl disulphide in rats

J. Appl. Toxicol., 9, 413~417 (1989)

Dibenzthiazyl disulphide (MBTS)のラット次世代への影響を検討した。MBTS 0.04, 0.2 または1%を含む飼料を妊娠0日から20日まで与えた。これらの各群における平均MBTS摂取量はそれぞれ26, 127 および596 mg/kg/dayであった。1%群の妊娠0日から14日までの母体重増加は対照群に比べて有意に低かった。しかし、飼料摂取量や毒性徴候などの母体の指標にはMBTSによると考えられる変化はみられなかった。着床前および後の胚-胎仔死亡率および生存胎仔の数、性比、体重にはMBTS投与による影響は認められなかった。胎仔の外表、骨格および内部器官の検査の結果、MBTSの催奇形性を示す知見は得られなかった。MBTS投与ラットから得た仔の生後発育は、いずれの群とも良好であった。これらの結

果から、MBTS はラット次世代の出生前および後の発育に悪影響を及ぼさないことが示唆された。

Misu, Y.*, Kuwahara, M.*, Amano, H. and Kubo, T.*: Evidence for tonic activation of prejunctional β -adrenoceptors in guinea-pig pulmonary arteries by adrenaline derived from the adrenal medulla

Br. J. Pharmacol., 98, 45~50 (1989)

モルモット肺動脈標本を用い、交感神経終末の促進性 β 受容体を介する β 遮断薬カルテオロールの作用を観察した。カルテオロールは濃度依存性に ^3H -ノルアドレナリン遊離を抑制したが、副腎摘除動物の肺動脈においてはこの作用が消失し、副摘後の副腎皮質ホルモン補充によっても回復しなかった。以上の結果より、この標本において交感神経終末の β 受容体に対して緊張性に作用しているのは副腎由来のアドレナリンであると結論された。

* 横浜市立大学

天野博夫：治療薬としてのニコチンの利用

日本医事新報, 3411, 147 (1989)

ニコチンの治療薬としての利用の可能性と限界、現状と将来性などについて、喫煙によるニコチンの摂取と血中動態、それによってもたらされる薬理作用と毒性との関係を中心に解説した。

Murai, T., Ogawa, Y., Kawasaki, H.: Macrophage hyperreactivity to endotoxin induced by streptococcal pyrogenic exotoxin in rabbits
FEMS Microbiol. Letters, 68, 61~64 (1990)

A群溶血性レンサ球菌由来の発熱性外毒素 (Streptococcal pyrogenic exotoxin; SPE) でウサギを前処置しておくと、大腸菌細菌内毒素 (Endotoxin) 投与による発熱が増強されることを見いだした。Endotoxin による発熱は、マクロファージ (M ϕ) が endotoxin に反応して産生する内因性発熱物質によって惹起されることから、SPE は M ϕ の endotoxin に対する反応性を増強するのではないかと推定した。この推定を、SPE で前処置したウサギから M ϕ を採取し、それらの endotoxin に対する反応性を、endotoxin による M ϕ の活性化反応を指標として *in vitro* で検討することによって立証した。

久田陽一*¹, 川村智子*¹, 奥田和代*¹, 野呂征男*¹, 田中俊弘*², 酒井英二*², 畠山好雄：ロートコンの

研究(1)栽培ハシドリコロのアルカロイド含量の変異

生薬誌, 43, 159~162 (1989)

ハシドリコロの栽培品は根や根茎の形状が野生品と著しく異なり、根茎は塊状を呈する。

個体の収量が野生に比べてかなり高く、個体内のアルカロイド含量の変異は小さい。総アルカロイド含量は全個体の平均値では局方規定値に達しないが、規定値以上の個体が根茎で全体の3分の1以上、根で4分の1存在した。

*¹ 名城大学

*² 岐阜薬科大学

畠山好雄, 熊谷健夫, 米田該典*: 野生薬用植物の栽培と育種に関する研究(1) *Saussurea lappa* の試作栽培

生薬誌, 43, 246~249 (1989)

導入種子は植物と名前が必ずしも一致しない場合があるので、中国の文献を参照し、形態的に記載とよく一致し、正条品と同定した。

わが国において最初の試作なので生理生態が全く分からず、越冬性、土壤水分の多寡、遮光の可否などを検討し、晩霜には弱いが充分越冬すること、遮光、多水分は生育阻害をもたらすことなどから開放条件の畑地で栽培可能なことが確認された。

* 大阪大学

Ishimaru, K. and Shimomura, K.: 7 β -hydroxy-hyoscyamine from *Duboisia myoporoides*-*D. leichhardtii* hybrid and *Hyoscyamus albus*
Phytochem., 28, 3507~3509 (1989)

ズボイシア交配種 (*D. myoporoides*-*D. leichhardtii*) の植物体ならびにヒヨスの毛状根より新規トロパンアルカロイドである 7 β -ヒドロキシヒヨスチアミンを単離構造決定した。また、5種の既知アルカロイド (6 β -ヒドロキシヒヨスチアミン, ヒヨスチアミン, ノルヒヨスチアミン, スコポラミン, トロピン) についても単離同定した。

佐竹元吉：薬用植物の保存

凍結および乾燥研究会誌, 35, 125~128 (1989)

薬用植物の保存の重要性を保存すべき種類、保存方法、ケン種子の貯蔵と発芽率、室温貯蔵と発芽率、種子の導入および自然保護について、記載した。

細田勝子, 野口 衛：キキョウの栽培と調製に関する

る研究(第2報) 土壤強制通気の成長に及ぼす効果
生薬, 44, 88~94 (1990)

川砂, 山砂, 砂質畑土, 粘土質畑土, 山粘土に土壤
通気あるいは土壤改良剤 PX を施しキキョウを栽培し
たところ, 土壤処理により土壤三相のうち液相の増大
する実験区においてキキョウの根重も増加した。また,
昼間の散水はキキョウ根収量にプラスの効果があるが,
夕方散水は, 水を与えない場合よりマイナスとなっ
た。

本法は, 植物の根の成長の科学的解析に有用である
のみでなく, 根類生薬の増産をはかる上でも有力な手
段となると考えられる。

Hosoda, K. and Noguchi, M.: **Studies on the Cu-
ltivation of Bupleurum falcatum L. I. Effect of
Cultivation Conditions on the Growth and
Saponin Contents**

Chem. Pharm. Bull., 38, 436~438 (1990)

ミシマサイコは, 栽培期間が長くなると一本ずつの
根の重量は増大するが, 枯死株が現れ, 単位面積あた
りの収量は必ずしも増大しない。

サポニン含量は, 2年生に比べ1年生で高く, また,
地上部を刈りこむと, 一本あたりの根重は増大するが
面積あたりの収量は減少し, サポニン含量はやや高め
となった。さらに, 透明あるいは黒色マルチングによ
り根の収量は増大した。

以上の結果から, 和歌山においては, 秋まき秋収穫
するのが, 収量, 成分含量とも最も良いと結論された。

細田勝子, 野口 衛: 枳実の調製と評価に関する研
究(第3報) 枳実の直径とシネフリン含量

薬誌, 110, 82~84 (1990)

枳実の有効成分の一つと考えられるシネフリンを
CM-セルロファイブ前処理により分離, HPLC にて
定量する方法を確立し, 各種カンキツ類果実より自製
した枳実を比較したところ, 温州ミカンの0.69%に対
し, 八朔, 甘夏, 田ノ浦0.22%前後, 夏橙は0.18%と
近似の値を示した。また, 本成分は, 先報のフラボノ
イドの場合と同様に, 直径の増加に伴い含量が低下し,
古来, 漢方で, 直径の違いにより枳実, 枳殻を使い分
けてきたとの合理性が成分含量面から証明された。

野口 衛: 薬のきた道進む道 IV

薬学図書館, 34, 164~169 (1989)

ギリシア時代のヒポクラテス医学の内科・婦人科の
薬物療法の特徴とそれに用いる生薬について考察し,
これが, 現代のドイツ, フランスの民間療法, さらに
はヨーロッパ各国の薬局方の生薬収載品目にまで影響
を及ぼしていることを明らかにした。

野口 衛: 薬のきた道進む道 V

薬学図書館, 34, 222~225 (1989)

古来の世界の薬草療法の歴史をたどる中から, それ
ぞれの民族の歴史に学ぶことの重要性を明らかにし,
伝統医学研究を通じて新しい薬はもとより, 生理学や
薬理学の新しい概念を見出す可能性があること, これ
らの成果をもとに民間薬や健康食品等今日的課題に対
応すべきことを示した。

単 行 本	Title of Scientific Books
<p>内山 充, 福田英臣, 佐藤哲男監訳: “トキシコロジ—”, Curtis D. Klaassen, Mary O. Amdur, John Doull 監修, 同文書院, 東京 (1988)</p>	<p>鈴木英世: 生薬の品質と規格. “医薬品の開発”, 第2巻, 生理活性物質 I, 柴田承二監修, 原田正敏編, 廣川書店, 東京 (1989) pp. 110~142</p>
<p>中原雄二: “医薬品の開発”, 17巻, 薬物の分析法, 中嶋暉躬編, 廣川書店, 東京 (1990) pp. 26~52</p>	<p>中村晃忠: 認可手順. “バイオマテリアルの最先端”, 筏 義人監修, シーエムシー, 東京 (1989) pp. 316~322</p>
<p>福田秀男: 第3章 医薬品各条. “日本抗生物質医薬品基準解説”, 日本抗生物質学術協議会編, 薬業時報社, 東京 (1990) pp. 814~820</p>	<p>鈴木郁生, 斎藤行生, 豊田正武: “薄層クロマトグラフィ—の実際”, 廣川書店, 東京 (1990)</p>
<p>早川堯夫: バイオテクノロジー—応用医薬品の製造上の安全性および品質確保. “医薬品の開発”, 6巻, 遺伝子工学と医薬品開発, 池原森男編, 廣川書店, 東京 (1989) pp. 223~262</p>	<p>Miyata, N., Miyahara, M. and Kamiya, S.: Chemical Studies Related to the Mechanism of Action of 3-BHA. “Medical, Biochemical and Chemical Aspects of Free Radicals”, ed. Hayaishi, O., Niki, E., Kondo, M. and Yoshikawa, T. Elsevier Science Publishers, Amsterdam (1989) pp. 497~500.</p>
<p>原田正敏: 医薬としての生薬の特徴. “生薬学” 改定第3版, 三橋 博編, 南江堂, 東京 (1989) pp. 61~75</p>	<p>宮田直樹, 菰田泰夫, 末松和実, 山口健太郎: “有機精密分析シリーズ (1) 高性能液体クロマトグラフィ—”, 廣川書店, 東京 (1989)</p>
<p>原田正敏: 天然物と医薬品. “医薬品の開発”, 第2巻, 薬理活性物質 I, 柴田承二監修, 原田正敏編, 廣川書店, 東京 (1989) pp. 3~14</p>	<p>Kurebayashi, H., Fukuoka, M. and Takahashi, A.: Possible intermediates on the metabolic pathways for oxidative deamination of cyclohexylamine by rabbit liver microsomes. Studies on deuterium isotope effects. “Medical, biochemical and chemical aspects of free radicals”, ed. Hayaishi, O., Niki, E., Kondo, M. and Yoshikawa, T., Elsevier, Amsterdam (1989) pp. 201~204</p>
<p>原田正敏: 生薬の規格. “医薬品の開発”, 第2巻, 薬理活性物質 I, 柴田承二監修, 原田正敏編, 廣川書店, 東京 (1989) pp. 110~117</p>	<p>Tanamoto, K.: Endotoxin “Development of a new quantitative method for detection of endotoxin by fluorescence labeling of 3-hydroxy fatty acid”, ed. Friedman, H., Klein, T. W., Nakano, M. and Nowotony, A., Plenum Publishing Corp, New York (1990) pp. 203~213.</p>
<p>原田正敏: 生薬の公認の効能・効果に基づいた薬理的薬効分類. “医薬品の開発”, 第2巻, 薬理活性物質 I, 柴田承二監修, 原田正敏編, 廣川書店, 東京 (1989) pp. 143~156</p>	<p>寺脇良郎, 三瀬勝利: 細菌の遺伝と分子生物学. “医科細菌学”, 吉川昌之介編集, 南江堂, 東京 (1989) pp. 51~83</p>
<p>原田正敏: 試験試料が天然物であることによる薬理的特徴とそれに伴う試料調製時の留意点. “医薬品の開発”, 第2巻, 薬理活性物質 II, 柴田承二監修, 原田正敏編, 廣川書店, 東京 (1989) pp. 289~301</p>	<p>岡村 登, 後藤延一, 相楽裕子, 千田俊雄, 富山朔二, 中村明子, 中谷林太郎, 堀内三吉, 三瀬勝利, 美善志康: “微生物のこぼ”, 講談社, 東京 (1989)</p>
<p>原田正敏: 一般薬理試験法. “医薬品の開発”, 第2巻, 薬理活性物質 II, 柴田承二監修, 原田正敏編, 廣川書店, 東京 (1989) pp. 338~352</p>	
<p>原田正敏: 漢方製剤. “医薬品の開発”, 第9巻, 医薬品の探索 III, 斎藤 洋, 野村靖幸編, 廣川書店, 東京 (1990) pp. 367~381</p>	

春田三佐夫, 細貝祐太郎, 宇田川俊一編: “目で見る食品衛生検査法”, 中央法規出版, 東京 (1989) pp. 1~318

Sekizawa, J. *et al.*: Environmental Health Criteria 87, “Allethrins-Allethrin, d-Allethrin, Bioallethrin, S-Bioallethrin”, World Health Organization, Geneva (1989)

Sekizawa, J. *et al.*: Environmental Health Criteria 92, “Resmethrins-Resmethrin, Bioresmethrin, Cis-methrin”, World Health Organization, Geneva (1989)

神沼二真編著: “生化学におけるコンピュータ利用(新基礎生化学実験法別巻)”丸善, (1989)

神沼二真: コンピュータとしてみた生命, 岩波講座, “転換期にある人間一別巻 1 「生命とは」”, 岩波書店, (1989) pp. 117~136

神沼二真: 生物は情報の宝庫, “バイオコンピュータの発想”, 甘利俊一編, 共立出版, (1989) pp. 117~136

神沼二真: 毒性情報検索分野の今後の展望, “毒性情報の検索と管理”, 竹中祐典, 宇高圭二, 榎本真編, 地人書館, 東京 (1989) pp. 187~201

降矢 強, 松本清司, 落合敏秋: “実験動物の基礎と技術II各論”, 日本実験動物協会編, 丸善株式会社, 東京 (1989)

戸部満寿夫, 中村晃忠, 落合敏秋: “バイオマテリアルの最先端”, 筏 義人監修, 株式会社シーエムシー, 東京 (1989)

Sudo, K.*1, Suzuki, K.*2, Matsumoto, K., Furuya, T. and Kurokawa, Y.: Characteristics of the KSN Inbred Mice: A Strain of Self-Prepetuating Nude Mice. “Immune-Deficient Animals in Experimental Medicine. 6th Int. Workshop on Immune Deficient Animals, Beijing, 1988”, ed. Wu Bq, Zheng J., Karger, Basel (1989) pp. 45~49

*1 東大医科学研究所

*2 東京医科大学

中館正弘: “毒性試験講座, 2巻, 毒性情報の検索と管理”, 毒性試験情報の検索, 竹中祐典, 宇高圭二, 榎本真編集, 地人書館, 東京 (1989) pp. 64~87

金子豊蔵: “医・歯科用バイオマテリアルの安全性評価法”, 吸入毒性試験, 佐藤温重, 桜井靖久編, サイエンスホーラム, 東京 (1987) pp. 47~52

金子豊蔵: “獣医実験動物学”, 動物実験技術一試料投与, 光岡知足他編, 川島書店, 東京 (1990) pp. 267~274

大野泰雄: 毒性学. “薬学・薬理学”, 中山貢一編, 丸善, 東京 (1989) pp. 403~423

大野泰雄: ミクロソーム. “毒性試験講座第6巻, 毒性生化学(上)”, 佐藤哲男・上野芳夫・遠藤 仁監修, 地人書館, 東京 (1989) pp. 128~133

Hasegawa, R., Sato, H. and Miyakasa, Y.: **Monograph on Pathology of Laboratory Animals “Integument and Mammary Glands. Squamous Cell Papilloma, Skin, Mouse”**, ed. Jones, T. C., Mohr, U. and Hunt, R. D., Springer-Verlag, Berlin(1989) pp. 19~24

Hasegawa, R., Miyakasa, Y. and Sato, H.: **Monograph on Pathology of Laboratory Animals. “Integument and Mammary Glands. Squamous Cell Carcinoma, Skin, Mouse”**, ed. Jones, T. C., Mohr, U. and Hunt, R. D., Springer-Verlag, Berlin (1989) pp. 31~38

Hasegawa, R., Miyakasa, Y. and Sato, H.: **Monograph on Pathology of Laboratory Animals. “Integument and Mammary Glands. Basal Cell Tumor, Skin, Mouse”**, ed. Jones, T. C., Mohr, U. and Hunt, R. D., Springer-Verlag, Berlin (1989) pp. 52~55

Maekawa, A.: **Monograph on Pathology of Laboratory Animals. “Integument and Mammary Glands. Trichoepithelioma, Skin, Rat”**, ed. Jones, T. C., Mohr, U. and Hunt, R. D., Springer-Verlag, Berlin (1989) pp. 56~63

Kanno, J.: **Monograph on Pathology of Laboratory**

- Animals. "Integument and Mammary Glands. Melanocytic Tumors, Skin, Mouse", ed. Jones, T. C., Mohr, U. and Hunt, R. D., Springer-Verlag, Berlin (1989) pp. 63~70
- Kanno, J.: Monograph on Pathology of Laboratory Animals. "Integument and Mammary Glands. Melanocytic Tumors, Skin, Hamster", ed. Jones, T. C., Mohr, U. and Hunt, R. D., Springer-Verlag, Berlin (1989) pp. 70~75
- Takahashi, M. and Miyakasa, Y.: Monograph on Pathology of Laboratory Animals. "Integument and Mammary Glands. Mast Cell Tumor, Skin, Mouse", ed. Jones, T. C., Mohr, U. and Hunt, R. D., Springer-Verlag, Berlin (1989) pp. 112~117
- Hayashi, Y., Maekawa, A. and Yoshimura, S.: Monograph on Pathology of Laboratory Animals. "Nervous system. Neurotoxicity of Perhexiline Maleate in Rats", ed. Jones, T. C., Mohr, U. and Hunt, R. D., Springer-Verlag, Berlin (1989) pp. 74~77
- Hayashi, Y., Takahashi, M. and Hasegawa, R.: Monograph on Pathology of Laboratory Animals. "Nervous System. Systemic Degenerative Disorders of Primary Sensory Neurons in Rats Induced by 4-Hydroxyaminoquinoline 1-Oxide", ed. Jones, T. C., Mohr, U. and Hunt, R. D., Springer-Verlag, Berlin (1989) pp. 92~98
- Ito, N., Imaida, K., Hasegawa, R. and Tsuda, H.: Critical Reviews in Toxicology, "Rapid bioassay methods for carcinogens and modifiers of hepatocarcinogenesis" ed. McClellan, R. O. vol. 19, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, (1989) pp. 385~415
- Ito, N., Tsuda, H., Hasegawa, R. and Tatematsu, M., Imaida, K. and Asamoto, M.: Biologically-based methods for cancer risk assessment. "Medium-term bioassay models for environmental carcinogenesis. Two-step liver and multi-organ carcinogenesis protocols", ed. Travis, C. C., Plenum Publishing Co., New York (1989) pp. 209~230
- Hayashi, Y.: Proceedings: Management of Risk from Genotoxic Substances in the Environment. "Regulation of genotoxic substances in Japan", ed. Freij, L. Print Graf AB, Stockholm (1989) pp. 230~241
- 前川昭彦, 荻生俊昭: 血液・造血器 I. "実験白血病・化学物質" 現代病理学大系18A, 中山書店, 東京 (1989) pp. 292~297
- 林 裕造, 山村雄一, 幕内雅敏, 西條長宏, 寺田正昭, 吉倉 廣: 癌研究の最前線, 座談会 "癌をめぐる最前線の話題" 二十年のあゆみ, 財団法人高松宮妃癌研究基金, 東京 (1989) pp. 121~150
- Battista, J.R.*, Nohmi, T., Donnelly, C.E.* and Walker, G.C.*: General analyses of cellular functions required for UV mutagenesis in *Escherichia coli*. "Antimutagenesis and anticarcinogenesis mechanisms II", ed. Kuroda, Y., Shankel, D.M. and Waters, M.D., Plenum Press, New York and London (1990) pp. 269~276
- * Massachusetts Institute of Technology, U. S. A.
- Nohmi, T., Battista, J.R.*, Ohta, T.*, Igras, V.*, Sun, W.* and Walker, G.C.*: Antimutagenesis effects of *umuD* mutant plasmids: Isolation and characterization of *umuD* mutants reduced in their ability to promote UV mutagenesis in *Escherichia coli*. "Antimutagenesis and anticarcinogenesis mechanisms II", ed. Kuroda, Y., Shankel, D.M. and Waters, M.D., Plenum Press. New York and London (1990) pp. 417~422
- * Massachusetts Institute of Technology U. S. A.
- Sorsa, M.*, Hayashi, M., Norppa, H.* and Vainio, H.*: Human biomonitoring in exposure to environmental genotoxicants. "Antimutagenesis and anticarcinogenesis mechanisms II", ed. Kuroda, Y., Shankel, D.M. and Waters, M.D., Plenum Press (1989) pp. 79~86
- * Inst. Occup. Health (Finland)
- 稲田捷也, 鈴木美幸, 高橋和彦, 吉田昌男, 遠藤重厚, 吉田俊巳, 須田秀俊, 一戸貞人, 小室徹雄, 田中重則,

田村弘志：エンドトキシン定量のための新しい血漿前処理法。“エンドトキシン臨床研究の現状と展望”，織田敏次監修，羊土社，東京（1989）pp. 27～34

下村講一郎，吉松嘉代：第4章 III 形質転換とその応用。“医薬品の開発”，第2巻，柴田承二監修，広川書店，東京（1989）pp. 87～109

下村講一郎：“植物バイオテクノロジー事典”，駒嶺穆他編集，朝倉書店，東京（1990）

下村講一郎：第2章 3 トランスジェニック植物による物質生産，“最新・植物細胞培養とファインケミカルズ”，駒嶺穆監修，シーエムシー，東京（1990）pp. 40～63

日本薬局方製剤の品質規格の設定に関する研究：青柳伸男，鹿庭なほ子，武田 寧

厚生科学研究(平成元年4月～2年3月)，平成2年3月厚生省薬務局安全課に報告。

高齢者薬物療法の総合的研究：阿曾幸男，吉岡澄江，武田 寧

厚生科学研究(平成元年4月～2年3月)，平成2年3月厚生省薬務局経済課に報告。

乱用薬物鑑定法整備研究—毛髪分析：中原雄二，島峯望彦，高橋一徳，武田 寧

乱用薬物鑑定法整備研究(平成元年4月～2年3月)，平成2年3月厚生省薬務局麻薬課に報告。

フェネチルアミン類の尿中代謝産物に関する研究：中原雄二，石上暁子

厚生科学研究(昭和63年9月～平成2年3月)，平成2年4月厚生省薬務局麻薬課に報告。

がん末期医療の在宅ケアのための疼痛管理に用いる麻薬製剤に関する研究：中原雄二

厚生科学研究(平成元年4月～2年3月)，平成2年4月厚生省薬務局麻薬課に報告。

向精神薬の分析法に関する研究：中原雄二，島峯望彦，高橋一徳，石上暁子

委託研究(平成元年9月～2年3月)，平成2年4月厚生省薬務局麻薬課に報告。

覚せい剤検体の起源解明に関する研究：中原雄二，石上暁子

厚生科学研究(平成2年2月～2年3月)，平成2年4月厚生省薬務局麻薬課に報告。

薬効評価データの記載フォーマットの標準化に関する研究：武田 寧

厚生科学研究(平成元年12月～2年3月)，平成2年3月厚生省薬務局審査第一課に報告。

保険医療における薬局方医薬品の活用方策に関する研究：大森義仁*1，梅澤 修*2，川村次良*3，葛谷 健*4，佐谷圭一*5，田中 彰，網川延孝*6，日野正信*7，村瀬雄二*8

厚生行政科学研究(平成元年9月～2年3月)，平成2年3月厚生省保険局医療課に報告。

*1 東京慈恵会医科大学

*2 昭和大学医学部

*3 日本公定書協会

*4 日本薬剤師会

*5 自治医科大学

*6 第一製薬株式会社

*7 塩野義製薬株式会社

*8 済生会神奈川県病院

バイオテクノロジー医薬品に対する生体応答の解析に関する基礎的研究：大沢利昭*1，笠原 忠*2，豊島聡*1，戸部満寿夫，高橋道人，田中悟，松本清司，早川堯夫

厚生科学研究(平成元年4月～2年3月)，平成2年3月厚生省薬務局審査第一課に報告。

*1 東京大学薬学部

*2 自治医科大学

医薬品生産に用いられる動物細胞に関する基礎的研究：豊島 聡*1，大沢利昭*1，小池克郎*2，早川堯夫，松橋 直*3，山内一也*4

厚生科学研究(平成元年4月～2年3月)，平成2年3月厚生省薬務局審査第一課に報告。

*1 東京大学薬学部

*2 癌研究会癌研究所

*3 虎の門病院沖中記念成人病研究所

*4 東京大学医科学研究所

組換えDNA医薬品の開発手法に関する研究：野島庄七*1，赤松 稯*2，小池克郎*3，杉浦 昭*2，寺尾允男，早川堯夫，松橋 直*4

厚生科学研究(平成元年4月～2年3月)，平成2年3月厚生省薬務局審査第一課に報告。

*1 帝京大学薬学部

*2 国立予防衛生研究所

*3 癌研究会癌研究所

*4 虎の門病院沖中記念成人病研究所

細胞毒性試験：医療用具および医用材料の毒性試験体系の確立に関する研究：土屋利江，五十嵐良明

厚生科学研究(昭和63年4月～平成3年3月)，平成2年3月厚生省薬務局審査第二課に報告。

国設自動車排出ガス測定所における大気汚染測定調

査：松村年郎，浅田 誠，亀谷勝昭，武田明治
調査報告(平成元年4月～2年3月)，平成2年7月環境庁大気保全局自動車公害課に報告。

化粧品等に使用する色素の規格整備に関する研究：武田明治，木嶋敬二
厚生科学研究(平成元年4月～2年3月)，平成2年4月厚生省薬務局審査第二課に報告。

保健衛生の観点から重要な医薬部外品成分の迅速分析法の開発に関する研究：木嶋敬二，斎藤恵美子，渡辺四男也*1，永山富雄*2
厚生科学研究(平成元年4月～2年3月)，平成2年4月厚生省薬務局監視指導課に報告。

*1 東京都立衛生研究所

*2 東京薬科大学

低沸点有機ハロゲン化合物および低沸点有機化合物の分析方法：安藤正典，関田 寛，神野透人，武田明治
食品等試験検査費(平成元年4月～2年3月)，平成2年3月生活衛生局水道環境部水道整備課に報告。

ゴルフ場農薬の分析方法：安藤正典，関田 寛，神野透人，武田明治
食品等試験検査費(昭和63年4月～平成2年3月)，平成2年3月生活衛生局水道環境部水道整備課に報告。

水道用資機材の安全評価システムに関する研究：安藤正典
食品等試験検査費(平成元年4月～2年3月)，平成2年3月生活衛生局水道環境部水道整備課に報告。

給水，配管における衛生学的安全性の評価に関する研究：安藤正典
厚生科学研究(平成元年4月～2年3月)，平成2年3月生活衛生局企画課に報告。

水道用塗料の衛生に関する研究：安藤正典
厚生省委託費(平成元年4月～2年3月)，平成2年3月生活衛生局水道環境部水道整備課に報告。

果実および果実ジュース中のダミノジッドの残留に係わる実態調査：鈴木 隆，斎藤行生
食品等試験検査費(平成元年5月～7月)，平成元年7月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

たまねぎ中のジスルホトンの分析：宮原 誠，鈴木隆，斎藤行生

食品等試験検査費(平成元年6月～9月)，平成元年9月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

清涼飲料水中のベンゼンの残留に係わる実態調査：根本了，鈴木 隆，斎藤行生

食品等試験検査費(平成2年3月～5月)，平成2年3月，4月，5月厚生省生活衛生局食品保健課に報告。

トリクロロホン，ジスルホトン，エディフェホスの分析について：宮原 誠，鈴木 隆，斎藤行生

食品等試験検査費(平成元年6月～12月)，平成2年3月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

ポスト・ハーベスト農薬分析調査：宮原 誠，鈴木隆，斎藤行生

ポスト・ハーベスト農薬衛生対策推進費(平成元年12月～2年3月)，平成2年3月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

ブドウ中のシアン化合物測定方法確立等に関する試験：河村葉子，内山貞夫，斎藤行生

食品等試験検査費(平成元年4月～8月)，平成元年8月厚生省生活衛生局食品保健課に報告。

輸入ワイン中のジエチレングリコールに関する調査報告：河村葉子，村山三徳，内山貞夫，斎藤行生

食品等試験検査費(平成元年9月～10月)，平成元年10月厚生省生活衛生局食品保健課に報告。

輸入食品の放射能測定に関する精度調査結果：内山貞夫，村山三徳，河村葉子，斎藤行生

食品安全対策費(平成元年4月～11月)，平成元年11月厚生省生活衛生局食品保健課に報告。

ライマ豆等輸入雑豆の毒性に関する調査報告：河村葉子，内山貞夫，斎藤行生

食品中の有害物質等に関する研究(平成元年4月～2年3月)，平成2年4月厚生省生活衛生局食品保健課に報告。

輸入食肉・養殖魚介類検査精度管理結果報告書：内山貞夫，村山三徳，鈴木 隆，宮原 誠，斎藤行生，田辺弘也*

輸入食肉・養殖魚介類安全確保対策費(平成元年12月)

～2年3月),平成2年2月厚生省生活衛生局乳肉衛生課に報告。

* 相模女子大学

平成元年度輸入食肉・養殖魚介類残留有害物質モニタリング報告書:斎藤行生,村山三徳,内山貞夫,宮原 誠,鈴木 隆
輸入食肉・養殖魚介類安全確保対策費(平成元年12月～2年3月),平成2年4月厚生省生活衛生局乳肉衛生課に報告。

輸入チョコレート中の合成着色料:山田 隆,山本都,山崎 壮,義平邦利
食品試験検査費(平成2年1月),平成2年1月厚生省生活衛生局食品衛生課に報告。

塩化マグネシウムの規格試験:武田由比子,義平邦利
食品試験検査費(平成元年8月),平成元年8月成田検疫所に報告。

輸入ビスケット中の亜硝酸根について:義平邦利,山田 隆,石綿 肇,武田由比子,川崎洋子,米谷民雄,山本 都,杉田たき子,山崎 壮,佐藤恭子,鈴木淳子,岩上 敏,渡辺啓恵
食品試験検査費(平成元年10月),平成元年10月厚生省生活衛生局食品衛生課,横浜検疫所に報告。

輸入リキュール(イタリア製)中の法定外色素について:川崎洋子,米谷民雄,義平邦利
食品等試験検査費(平成元年8月～元年9月),平成元年9月東京検疫所に報告。

輸入リキュール(フランス製)中の法定外色素について:武田由比子,川崎洋子,米谷民雄,義平邦利
食品等試験検査費(平成2年1月),平成2年1月横浜検疫所に報告。

天然添加物の分析手法等に関する研究:川崎洋子,合田幸広,義平邦利
厚生科学研究(平成元年4月～2年3月),平成2年4月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

食品添加物の有用性等に関する調査—グリチルリチンおよび甘草抽出物の有効性等について:山本 都,義平邦利
厚生科学研究(平成元年4月～2年3月),平成2年3

月生活衛生局食品化学課に報告。

BHAのラット胎仔への移行試験:山田 隆,山本都,義平邦利
食品添加物安全性再評価費(平成元年4月～2年3月),平成2年3月生活衛生局食品化学課に報告。

陶磁器中の鉛許容量調査と溶出高感度分析:石綿 肇,杉田たき子,山本 都,馬場二夫*
厚生科学研究(平成元年4月～2年3月),平成2年3月厚生省生活衛生局食品保健課へ報告(班長斎藤行生)。

* 大阪市立環境科学研究所

器具・容器包装から溶出したフェノールの測定における4-アミノアンチピリン法の応用:石綿 肇,杉田たき子,義平邦利
食品添加物安全性再評価等試験検査費(平成元年4月～元年12月),平成2年12月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

フェノール樹脂製食器から溶出したフェノールの3次元高速液体クロマトグラムによる確認方法の検討:石綿 肇,杉田たき子,義平邦利
食品添加物安全性再評価等試験検査費(平成元年4月～元年12月),平成2年3月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

塗装漆中のシアン:義平邦利,山田 隆,鈴木淳子,渡辺啓恵,岩上 敏,佐藤恭子,山本 都,山崎 壮,石綿 肇,杉田たき子,米谷民雄,武田由比子,川崎洋子
輸入食品等検査(平成2年2月～2年3月),平成2年3月横浜検疫所,名古屋検疫所,神戸検疫所に報告。

漆塗装品中のシアン化合物および金属の測定について:義平邦利,山田 隆,鈴木淳子,渡辺啓恵,岩上敏,佐藤恭子,山本 都,山崎 壮,石綿 肇,杉田たき子,米谷民雄,武田由比子,川崎洋子
輸入食品等検査(平成2年2月～2年3月),平成2年3月厚生省生活衛生局食品保健課,横浜検疫所,名古屋検疫所,神戸検疫所に報告。

天然着色料中の金属含量の測定および金属の存在状態のHPLC-ICPによる研究:米谷民雄,義平邦利
食品添加物規格基準設定費(平成元年4月～2年3月),平成2年3月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

International Collaborative Immunotoxicity Study (Azathioprine): Yuji Kurokawa, Kiyoshi Matsumoto, Tsuyoshi Furuya, Kiyoshi Sekita, Toshiaki Ochiai, Atsuya Takagi, Kouichi Takada, Tadao Terao, Jun-ichi Sawada, Kazuhiro Suzuki, Reiko Teshima and Yoshiro Saito

免疫毒性国際共同研究 (ICIS) (昭和63年度～), 平成2年1月20日 IPCS に報告.

水素化トリフェニールの代謝試験に関する研究報告: 嶺岸謙一郎, 高橋 惇

既存化学物質委託費(昭和60年9月～63年12月), 平成元年5月生活衛生局生活化学安全対策室へ報告.

アクリル酸の体内動態について(文献調査): 森本和滋, 紅林秀雄, 高橋 惇

家庭用品等試験検査費(昭和63年9月～平成元年7月), 平成元年7月生活衛生局家庭用品安全対策室へ報告.

アクリル酸エチルのラットにおける代謝生化学試験: 森本和滋, 高橋 惇

家庭用品等試験検査費(昭和62年9月～平成元年9月), 平成2年5月生活衛生局家庭用品安全対策室へ報告.

リスクアセスメント手法等の改善と確立等に関する研究(代謝試験結果の速度論的解析法に関する研究): 奥平和穂, 鈴木和博, 高橋 惇

厚生科学研究(平成元年4月～2年3月), 平成2年4月厚生省生活衛生局生活化学安全対策室へ報告.

細菌性食中毒防止のための基礎的サーベランスに関する研究: 小沼博隆, 尾上洋一*1, 品川邦汎*2, 塩沢寛治*3, 安形則雄*4, 和田正道*5, 丹野憲二*6

厚生科学研究(昭和62年4月～平成2年3月), 平成2年4月厚生省食品保健課に報告.

*1 神奈川県衛生研究所

*2 岩手大学農学部

*3 静岡県衛生環境センター

*4 名古屋市衛生研究所

*5 長野県衛生公害研究所

*6 日本食品分析センター

食鳥の微生物制御に関する調査研究: 勝部泰次*1, 小沼博隆, 後藤公吉*2, 伊藤隆夫*3, 品川邦汎*4, 徳九雅一*5, 仁科徳啓*6, 渡邊昭宣*7

厚生科学研究(昭和63年4月～平成2年3月), 平成2年4月厚生省乳肉衛生課に報告.

*1 日本大学農獣医学部

*2 新潟県衛生公害研究所

*3 岩手県衛生研究所

*4 岩手大学農学部

*5 埼玉県衛生研究所

*6 静岡県衛生環境センター

*7 国際学院短期大学

「食品中の有害物質等に関する研究」アフラトキシン汚染の実態把握, 検査の検討: 一戸正勝, 上村 尚*1, 矢崎広久*2, 高橋治男*2

厚生科学研究(平成元年度), 平成2年4月厚生省食品保健課に報告.

*1 東京都立衛生研究所

*2 千葉県衛生研究所

昭和63年度微生物農薬の安全性評価法の確立調査: 三瀬勝利, 北村 敬*1, 岡 基*2, 湊 一*2, 須藤隆一*3, 都留信也*4

三菱化成安全科学研究所(昭和63年4月～平成元年3月), 平成元年3月環境庁土壌農薬課へ報告.

*1 国立予防衛生研究所

*2 家畜衛生試験場

*3 国立公害研究所

*4 農業環境技術研究所

エイズ医薬品候補スクリーニング研究(昭和63年度): 三瀬勝利

ヒューマンサイエンス振興財団(昭和63年4月～平成元年3月), 平成元年4月厚生省薬務局へ報告.

農林水産分野等における相換え体利用のための指針作成: 飯野徹雄*1, 岩城英夫*2, 内田久雄*3, 小泉 明*4, 斎藤日向*5, 都留信也*6, 中島英男*7, 吐山豊秋*8, 原田 宏*2, 別府輝彦*9, 真鍋 勝*10, 三瀬勝利, 本吉総男*11, 山内一也*12, 山下淳*13

農林水産技術会議(昭和63年12月～平成元年3月), 昭和63年12月農林水産省に報告.

*1 早稲田大学人間科学部

*2 筑波大学生物科学系

*3 帝京大学理工学部

*4 国立公害研究所

*5 帝京大学医学部

*6 農業環境技術研究所

*7 家畜衛生試験場

*8 東京農工大学農学部

*9 東京大学農学部

*10 食品総合研究所

*11 農業生物資源研究所

*12 東京大学医科学研究所

*13 農業研究センター

組換え体の開放系利用に伴う環境保全の基本的な考え方(バイオテクノロジーと環境保全に関する検討会中間報告): 栗原 康*1, 近藤雅臣*2, 菅原 淳*3, 須藤隆一*3, 都留信也*4, 外村健三*5, 原田 宏*6, 古川謙介*7, 三瀬勝利, 矢野圭司*8, 和田秀穂*8
バイオテクノロジーと環境保全に関する検討会議(昭和63年4月~平成元年2月), 平成元年2月環境庁企画調整局に報告。

*1 東北大学理学部

*2 大阪大学薬学部

*3 国立公害研究所

*4 農業環境技術研究所

*5 大阪府立大学農学部

*6 筑波大学生物科学系

*7 微生物工業技術研究所

*8 東京大学農学部

実験動物の吸入(経気道)による急性毒性試験法に関する研究: 西村正雄*1, 関沢 純, 戸部満寿夫, 鎌田栄一, 香川 順*2, 八十川欣勇*3, 高久 悟*1
厚生科学研究(平成元年4月~2年3月), 平成2年3月厚生省薬務局安全課に報告。

*1 東京歯科大学

*2 東京女子医科大学

*3 日本海事検定協会

皮膚等に対する危険性評価基準に関する試験研究: 西村正雄*1, 関沢 純, 戸部満寿夫, 上田 徳*2, 内野篤*3, 須山祐之*1, 山中すみへ*1
その他(平成元年4月~2年3月), 平成2年3月日本海事検定協会に報告。

*1 東京歯科大学

*2 日本海事検定協会

*3 日本化学工業協会

実験動物を用いる急性毒性試験等の簡易法に関する研究: 西村正雄*, 関沢 純, 戸部満寿夫, 黒川雄二, 内藤克司, 安原加寿雄, 山中すみへ*
厚生科学研究(平成元年4月~2年3月), 平成2年3月日本海事検定協会に報告。

* 東京歯科大学

dl- α -Tocopherol および Sodium erythorbate の24カ月間併用毒性試験: 落合敏秋, 堀野 光, 松本清司, 関田清司, 高田幸一, 安原加寿雄, 斎藤 実, 吉本浜

子, 降矢 強, 黒川雄二, 戸部満寿夫
食品等試験検査費(昭和59年4月~平成元年3月), 平成元年8月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

γ 線照射した柑橘類等の毒性に関する研究—マウスによる慢性毒性試験—: 落合敏秋, 堀野 光, 高木篤也, 松本清司, 関田清司, 高田幸一, 川崎 靖, 降矢 強, 黒川雄二, 戸部満寿夫
国立機関原子力試験研究費(昭和63年4月~平成元年3月), 平成元年9月科学技術庁原子力局技術振興課に報告。

γ 線照射した柑橘類等の毒性に関する研究—マウスによる世代試験—: 関田清司, 川崎 靖, 松本清司, 落合敏秋, 高木篤也, 堀野 光, 降矢 強, 黒川雄二, 戸部満寿夫
国立機関原子力試験研究費(昭和63年4月~平成元年3月), 平成元年9月科学技術庁原子力局技術振興課に報告。

リスクアセスメントに必要な情報の収集方法の確立と情報の収集・管理: 中館正弘, 会田喜崇, 加納直子
厚生科学研究(平成元年度), 平成2年3月厚生省生活衛生局生活化学安全対策室に報告。

実験動物の吸入(経気道)による急性毒性試験に関する研究: 鎌田栄一, 小川幸男, 鈴木幸子, 金子豊蔵, 黒川雄二, 戸部満寿夫
厚生科学研究(昭和63年4月~平成2年3月), 平成2年4月厚生省薬務局安全課に報告。

リスクアセスメント手法等の改善と確立に関する研究: 小川幸男, 鎌田栄一, 鈴木幸子, 金子豊蔵, 黒川雄二
厚生科学研究(昭和63年4月~平成2年3月), 平成2年4月厚生省生活衛生局生活化学安全対策室に報告。

ジペンテンダイマーの亜急性毒性に関する研究: 小川幸男, 鎌田栄一, 鈴木幸子, 金子豊蔵, 黒川雄二
既存化学物質毒性試験調査費(昭和63年4月~平成2年3月), 平成2年4月厚生省生活衛生局生活化学安全対策室に報告。

歯科材料の化学的・生物学的評価法のガイドライン作成に関する研究—歯科材料の吸入毒性試験ガイドライン案作成: 金子豊蔵

厚生科学研究費(平成元年4月～2年3月),平成2年4月厚生省薬務局審査第二課に報告.

乱用薬物鑑定法整備に関する研究: 関田清司, 落合敏秋, 松本清司, 降矢 強, 黒川雄二

厚生科学研究(平成元年6月～2年1月),平成2年3月厚生省薬務局麻薬課に報告.

2,3-ジクロロプロピオン酸の28日間毒性試験: 黒川雄二, 長谷川隆一, 中路幸男

水質管理調査費(平成元年4月～元年7月),平成元年8月厚生省生活衛生局水道環境部水道整備課に報告.

ジブチル錫2酢酸の発がん性試験に関する文献調査: 長谷川隆一, 中路幸男, 黒川雄二

家庭用品等調査研究費(平成元年4月～2年3月),平成2年3月厚生省生活衛生局生活化学安全対策室に報告.

タール色素の毒性に関する研究, 赤色226号および黄色1号のマウスの経皮急性毒性試験について: 戸部満寿夫, 堀内茂友, 児玉幸夫

タール色素の毒性に関する調査研究委託費(平成元年9月～12月),平成元年12月厚生省薬務局 審査第二課に報告.

タール色素の毒性に関する研究, 赤色226号および黄色1号のウサギに対する経皮一時刺激試験について: 戸部満寿夫, 堀内茂友, 児玉幸夫

タール色素の毒性に関する調査研究委託費(平成元年9月～12月),平成元年12月厚生省薬務局 審査第二課に報告.

3(2)-*t*-Butyl-4-hydroxyanisoleのラットにおける催奇形性試験: 川島邦夫, 田中 悟, 中浦 慎介, 高仲 正

食品等試験検査費(昭和63年11月～平成2年1月),平成2年5月厚生省生活衛生局食品化学課に報告.

医療用具および医用材料の毒性試験体系の確立に関する研究: 高橋道人, 古川文夫

厚生科学研究(平成元年4月～2年3月),平成2年3月厚生省薬務局審査第二課に報告.

バイオテクノロジー医薬品に対する生体応答の解析に関する研究: 高橋道人, 豊田和弘

厚生科学研究(平成元年4月～2年3月),平成2年3月厚生省薬務局審査第一課に報告.

食品添加物の変異原性に関する試験—哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験: 沢田 稔, 松岡厚子, 林 真, 祖父尼俊雄, 石館 基

天然添加物安全性調査費(昭和63年10月～平成2年3月),平成2年6月厚生省生活衛生局食品化学課に報告.

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—マウスを用いる小核試験: 林 真, 祖父尼俊雄, 石館 基

水質管理強化対策費(昭和63年10月～平成2年3月),平成2年6月厚生省生活衛生局水道環境部に報告.

既存化学物質の変異原性に関する研究—(1)微生物を用いる突然変異試験: 渡辺雅彦, 松井道子, 松井恵子, 能美健彦, 石館 基, (2)哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験: 沢田 稔, 松岡厚子, 祖父尼俊雄, 石館 基

既存化学物質毒性試験調査費(昭和63年5月～平成2年3月),平成2年5月厚生省生活衛生局生活化学安全対策室に報告.

生体外染色体異常試験のスクリーニングの精度の向上に関する研究: 哺乳類培養細胞を用いる小核試験: 林 真, 祖父尼俊雄, 石館 基

労働省依託研究費(昭和63年6月～平成2年3月),平成2年5月労働省化学物質調査課に報告.

薬用植物の組織培養生成物に関する研究—(1)微生物を用いる突然変異試験: 渡辺雅彦, 松井道子, 松井恵子, 能美健彦, 石館 基, (2)哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験: 沢田 稔, 松岡厚子, 祖父尼俊雄, 石館 基

薬用植物の組織培養生成物の評価研究費(昭和63年6月～平成2年3月),平成2年5月厚生省薬務局 審査第二課に報告.

リスクアセスメント手法等の改善と確立に関する研究: 祖父尼俊雄, 松岡厚子, 沢田 稔, 石館 基

厚生科学研究(昭和63年4月～平成2年3月),平成2年4月厚生省生活衛生局生活化学安全対策室に報告.

医療用具および医用材料の毒性試験体系の確立に関する

る研究：祖父尼俊雄

厚生科学研究(昭和63年～平成2年), 平成2年3月厚生省薬務局審査第二課に報告.

局方製剤の品質規格の設定に関する研究：小室徹雄, 宮崎玉樹, 木村俊夫, 岡田敏史

厚生科学研究(平成元年4月～2年3月), 平成2年3月厚生省薬務局安全課に報告.

ブチルベンゾチルフタレートの子ラットに対する催奇形試験：江馬 真, 村井敏美, 伊丹孝文, 川崎浩之進

家庭用品等試験検査費(昭和63年5月～平成元年7月), 平成元年9月厚生省生活衛生局に報告.

医療用具および医用材料の毒性試験体系の確立に関する研究(発熱性物質試験について)：小川義之, 川崎浩之進

厚生科学研究(平成元年8月～2年4月), 本所療品部へ報告.

組織培養生成物の漢方処方における溶出成分等に関する研究：佐竹元吉, 原田正敏, 戸部満寿夫, 石館 基, 田端 守*1, 古谷 力*2

厚生科学研究費(平成元年4月～平成2年3月), 平成2年3月厚生省薬務局審査第二課に報告.

*1 京都大学

*2 北里大学

青柳伸男, 鹿庭なほ子, 香取典子, 武田 寧: 坐剤の放出試験法について—インドメタシン油脂性坐剤
第26回全国衛生化学技術協議会 (1989. 9)

N. Aoyagi: Significance of medium pH in the dissolution characterization of sugar- and film-coated tablets

Conference on International Harmonization of Pharmaceutical Quality, Japan (1989. 9)

Kishida, A., Dressman, J.*, Yoshioka, S. and Takeda, Y.: Some determinants of morphology and release rate from poly(l)lactic acid microspheres
49th International Congress of Pharmaceutical Sciences of F. I. P., Germany (1989. 9)

* University of Michigan, USA

石橋無味雄, 松田りえ子, 武田 寧: 非水滴定による有機塩基の定量法の検討 (その2)
第26回全国衛生化学協議会年会 (1989. 9)

石橋無味雄: BP, EP, FP, JP および USP の注射用水 (バルク) の規格および試験法について
Conference on International Harmonization of Pharmaceutical Quality, Japan (1989. 9)

田中 彰, 福岡正道, 御厨祐治*, 池本 庸*, 町田豊平*: 精巢障害に関する研究 Butylbenzyl phthalate (BBP) によるラット精巢障害について
第34回日本不妊学会学術講演会 (1989. 9)

* 東京慈恵会医科大学

池本 庸*, 町田豊平*, 御厨祐治*, 白井 尚*, 周玉, 福岡正道, 田中 彰: dibutyl phthalate 単回投与による実験的精巢障害
日本アンドロロジー学会第7回学術大会 (1989. 7)

* 東京慈恵会医科大学

山口照英, 早川堯夫, 関沢 文, 田中 彰, 山本行男*: 精製ヒト好中球 cytochrome b₅₅₈ の諸性質について

第62回日本生化学会大会 (1989. 11)

* 東京都臨床医学総合研究所

山口照英, 早川堯夫, 山本行男*, 佐藤功栄*: Dicyclohexylcarbodiimide による好中球の活性化について

第19回日本免疫学会総会 (1989. 11)

* 東京都臨床医学総合研究所

新見伸吾, 早川堯夫, 田中 彰: ラット初代培養肝細胞におけるヒト成長ホルモン結合のデキサメタゾンによる調節

第5回初代培養肝細胞研究会 (1989. 6)

新見伸吾, 早川堯夫, 田中 彰: ラット初代培養肝細胞におけるヒト成長ホルモン結合のホルモンによる調節

第62回日本生化学会大会 (1989. 11)

Hayakawa, T., Nakadate, M. and Yoshihira, K.: Nomenclature of biotechnologically derived medical agents—A View from Japan

The 1989 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, USA (1989. 12)

早川堯夫: バイオ医薬品原体の品質基準および製造条件とその設定の考え方

化学工学会バイオ分離プロジェクト研究会 (1989. 12)

高須 尚*¹, 西川 諭*¹, 西田好孝*¹, 上杉晴一*¹, 内田恵理子, 早川堯夫, 池原森男*²: ヒト成長ホルモンの人工変異体 (Pro89→Leu および Arg64→Ala) の作製とその性質

第39回日本薬学会近畿支部大会 (1989. 10)

*¹ 大阪大学薬学部

*² 蛋白質工学研究所

西田好孝*¹, 下川誠太郎*¹, 山縣ゆり子*¹, 富田研一*¹, 西川 諭*¹, 高須 尚*¹, 上杉晴一*¹, 内田恵理子, 早川堯夫, 池原森男*²: ヒト成長ホルモンのPro89変換体の構造と活性

第12回日本分子生物学会年会 (1989. 12)

*¹ 大阪大学薬学部

*² 蛋白質工学研究所

谷本 剛, 川崎ナナ, 田中 彰: トロンピン製剤の品質に関する酵素化学的検討

第26回全国衛生化学技術協議会 (1989. 9)

Ikebe, H.*, Tsuji, T.*, Matsumoto, Y.*, Mori, K.*, Terubayashi, H.*, Akagi, Y.* and Tanimoto, T.: **Effects of aldose reductase inhibitor FK366 on rat galactose cataracts**

4th Congress of the US-Japan Cooperative Cataract Research Group, Kanazawa, Japan (1989. 11)

* 京都府立医科大学

Matsumoto, Y.*, Ikebe, H.*, Tsuji, T.*, Takahashi, Y.*, Terubayashi, H.*, Akagi, Y.*, Itoi, M.*, Tanimoto, T. and Ohta, M.: **Congenital cataracts in offspring of galactosemic rats**

4th Congress of the US-Japan Cooperative Cataract Research Group, Kanazawa, Japan (1989. 11)

* 京都府立医科大学

Akagi, Y.*, Terubayashi, H.*, Tsuji, T.*, Matsumoto, Y.*, Mori, K.*, Ikebe, H.*, Tanimoto, T. and Ohta, M.: **Effect of hypertonic NaCl solution on the rat galactosemic cataract**

4th Congress of the US-Japan Cooperative Cataract Research Group, Kanazawa, Japan (1989. 11)

* 京都府立医科大学

Nakayama, T.*, Tanimoto, T. and Kador, P. F.*: **Polyol production by human red blood cell aldehyde reductase**

Japan-US Aldose Reductase Workshop, Nagoya, Japan (1989. 11)

* National Institutes of Health, USA

Tanimoto, T., Ohta, M., Akagi, Y.* and Terubayashi, H*.: **Biochemical and morphological changes on development of sugar cataract in rat lenses**

Japan-US Aldose Reductase Workshop, Nagoya, Japan (1989. 11)

* 京都府立医科大学

Kobayashi, K., Fukuoka, M., Naito, K., Takada, K., Tanaka, A. and Tobe, M.: **Bis- and Tris-(2,3-dibromopropyl) phosphate (BP) induced nephrotoxicity in rats, and carcinogenicity of Bis-BP. The 5th international congress of toxicology,**

UK (1989. 7)

Fukuoka, M., Zhou, Y., Ikemoto, I.*, Tanaka, A. and Machida, T.*: **Biochemical changes along with testicular atrophy induced by di-n-butyl phthalate in rats.**

The 5th international congress of toxicology, UK (1989. 7)

* 東京慈恵会医科大学

木下 薫*1, 名取信策*1, 関田節子, 藤田昌彦*2, 森川 馨*2: **多形核白血球の活性酸素による細胞障害反応に対する cytochalasin の阻害作用**

日本薬学会第109年会 (1989. 4)

*1 明治薬科大学

*2 国立公衆衛生院

鈴木英世, 原田正敏, 佐竹元吉: **厚生科学「日本薬局方外生薬の品質確保に関する研究」報告 化学項目について**

第26回全国衛生化学技術協議会年会 (1989. 9)

関田節子, 原田正敏, 鈴木明子, 成田紀子, 宇田川俊一, 木村雅友*: **Pulmonary aspergillosis 患者から分離した *Aspergillus terreus* の二次代謝産物および数種の *A. terreus* 非臨床株との比較**

第29回マイコトキシン研究会 (1989. 9)

* 近畿大学医学部

田中敏嗣*1, 長谷川明彦*1, 青木伸實*1, 山本 進*1, 宇田川俊一, 関田節子, 原田正敏, 野沢幸平*2, 河合賢一*2: **小型菌核形成 *Aspergillus flavus* 一系統のアフラトレムおよびその関連インドロジテルペン化合物の生産性**

第29回マイコトキシン研究会 (1989. 9)

*1 神戸市環境保健研究所

*2 星薬科大学

鈴木英世, 原田正敏, 菅 忠三*, 森本悌次郎*: **植物培養細胞中のオーキシンの定量**

日本生薬学会第36回年会 (1989. 10)

* 三井石油化学工業(株)生物工学研究所

坂元史歩*, 黒柳正典*, 上野 明*, 関田節子: **山豆根 (*Sophora subprostrata Radix*) の成分研究**

日本生薬学会第36回年会 (1989. 10)

* 静岡県立大学薬学部

原田正敏：漢方薬の品質に関する最近の動き
第19回日本臨床薬理学会 (1989. 11)

尾崎幸紘, 馬 建平*, 李 儀奎* : **Tetra-methylpyrazine および ferulic acid のラット生体位子宮の自発運動におよぼす薬理作用**
第63回日本薬理学会総会 (1990. 3)

* 上海中医学院薬理学教室, 上海, 中国

江藤一洋*¹, 秋田正治*¹, 横山 篤*¹, 土屋利江, 岩瀬隆之*² : **毒性試験代替法の最近の進歩 2. 哺乳類全胚培養法について**
第16回日本毒科学会学術年会ワークショップ(1989. 6)

*¹ 東京医歯大歯学部

*² 三菱化成

関東裕美*, 野池尚美*, 伊藤正俊*, 露木重明*, 鹿庭正昭 : **ゴム手袋による接触皮膚炎**
第19回抗原研究会 (1989. 7)

* 東邦大学医学部

鹿庭正昭, 五十嵐良明, 小嶋茂雄, 中村晃忠, 門馬純子, 中路幸男, 黒川雄二, 関東裕美*, 伊藤正俊* : **ゴム長靴による接触皮膚炎：その原因物質の検討**
第14回日本接触皮膚炎学会 (1989. 12)

* 東邦大学医学部

Nakamura, A., Ikarashi, Y., Tsuchiya, T. and Kaniwa, M.: **Radiation vulcanized natural rubber latex is not cytotoxic**
International Symposium on Radiation Vulcanization of Natural Rubber Latex, Tokyo and Takasaki, Japan (1989. 7)

大沢尚美*, 藤卷正人*, 五十嵐良明, 鹿庭正昭, 小嶋茂雄, 中村晃忠 : **ゴム製品の毒性評価法に関する研究 (第一報) : L929 寒天重層法による細胞毒性**
第11回日本バイオマテリアル学会大会 (1989. 10)

* 民生科学協会研究所

五十嵐良明, 土屋利江, 鹿庭正昭, 小嶋茂雄, 中村晃忠, 大沢尚美*, 藤卷正人* : **ゴム製品の毒性評価法に**

関する研究 (第二報) : V79 コロニー法による細胞毒性

第11回日本バイオマテリアル学会大会 (1989. 10)

* 民生科学協会研究所

中村晃忠, 高橋道人, 土屋利江, 小嶋茂雄, 五十嵐良明, 鹿庭正昭, 豊田和弘, 大沢尚美*, 内間高夫*, 藤卷正人* : **ゴム製品の毒性評価法に関する研究 (第四報) : まとめと提案**
第11回日本バイオマテリアル学会大会 (1989. 10)

* 民生科学協会研究所

Nakamura, A., Ikarashi, Y., Tsuchiya, T., Kaniwa, M., Sato, M., Takahashi, M., Toyoda, K., Ohsawa, N.* and Uchima, T.* : **Correlations between chemical constituents, cytotoxicities and tissue responses: in the case of natural rubber latex materials**
BIOMAT 89, calcified tissues and biomaterials, France (1989. 12)

* 民生科学協会研究所

林 譲, 松田りえ子 : **クロマトグラフィの定量精度と分析効率の研究 II. 精度-効率の関係**
第33回液体クロマトグラフ研究会 (1990. 2)

松田りえ子, 林 譲, 石橋無味雄, 武田 寧 : **クロマトグラフィの定量精度と分析効率の研究 I. 精度の最適化と効率の最適化**
第33回液体クロマトグラフ研究会 (1990. 2)

Hayashi, Y. and Matsuda, R.: **Total chromatographic optimization (TOCO) based on information theory**
Conference on Liquid Chromatography 89 (1989. 10)

林 譲, 松田りえ子 : **液体クロマトグラフィの内部標準物質の量と検出波長の最適化**
日本分析化学会第38年会 (1989. 10)

林 譲, 松田りえ子 : **情報測度 FUMI を用いた液体クロマトグラフィの測定波長の最適化**
日本薬学会第109年会 (1989. 4)

小嶋茂雄, 伊佐間和郎, 新谷英晴, 中村晃忠, 内間高

夫*, 藤巻正人*: 生体内埋入によるポリウレタンフィルムの変質について—FT-IR/ATR法による検討—

第11回日本バイオマテリアル学会大会(1989.10)

* 民生科学協会研究所

中村晃忠: アレルギー性接触皮膚炎への対策

第5回経皮吸収型製剤シンポジウム(1989.10)

中村晃忠: 医用材料の前臨床試験について

第3回人工股関節集中討議(1990.5)

Shintani, H. and Nakamura, A.: Change of characteristics of polyurethane by gamma-ray and autoclave sterilization

Pitts Conf. USA (1990.3)

Shintani, H. and Nakamura, A.: Formation of 4, 4'-methylenedianiline in polyurethane potting compound by gamma-ray sterilization

VII World Congress of the International Society for Artificial Organs, Japan (1989.10)

松村年郎, 亀谷勝昭, 浅田 誠, 武田明治: イオンクロマトグラフによる空気中の粒子状ホルムアルデヒドの定量

第30回大気汚染学会(1989.11)

松村年郎, 亀谷勝昭, 武田明治: 室内空気中の粒子状ホルムアルデヒド濃度について

第30回大気汚染学会(1989.11)

亀谷勝昭, 松村年郎: 植物葉中の²³⁴U および²³⁸U

第31回環境放射能調査研究発表会(1989.11)

Jiao, S.*¹, Iwashima, K.*² and Kametani, K.: Simultaneous determination of plutonium and uranium in plant materials

International Symposium of Radiological Protection, China (1989.11)

*¹ Liaoning Institute of Labour Hygiene

*² 国立公衆衛生院

木嶋敬二: 化粧品の迅速簡易分析法(2)—防腐殺菌剤, 卵胞ホルモン, アイシャドー中のタール色素—

日本化粧品科学会第14回学術大会(1989.6)

齊藤恵美子, 永山富雄*¹, 木嶋敬二, 渡辺四男也*², 武田明治: 高速液体クロマトグラフィーによるシャンプー, リンス中のKathon® CGの分析

第27回日本化粧品技術者会研究討論会(1989.11)

*¹ 東京薬科大学

*² 東京都立衛生研究所

神野透人, 関田 寛, 安藤正典, 武田明治: 水道水中ベンツ(a)ピレンの塩素処理生成物の変異原性

日本薬学会第109年会(1989.4)

関田 寛, 神野透人, 安藤正典, 武田明治: 水道水中微量物質の濃縮方法の定量的解析

日本薬学会第108年会(1989.4)

安藤正典, 武田明治: 水道とアスベスト

第26回全国衛生化学技術協議会年会(1989.9)

神野透人, 松田英貴*, 関田 寛, 安藤正典, 武田明治: ジフェニルエーテル系除草剤の塩素処理生成物と変異原性

日本環境変異原学会第18大会(1989.11)

* 札幌市水道局

安藤正典, 関田 寛, 神野透人, 武田明治: 水中生物活性物質の安全性評価の問題点

第24回水質汚濁研究学会(1990.3)

五十嵐敦子, 斎藤行生: 汚染物摂取量の地域別比較について

第26回全国衛生化学技術協議会年会(1989.9)

豊岡利正, 鈴木 隆, 斎藤行生, 古川文夫, 高橋道人, 林 裕造, 今井一洋*: チオール・ジスルフィドの高感度同時分析法の開発と生体試料への応用

第8回生体成分の分析化学シンポジウム(1988.9)

* 東京大学医学部付属病院分院

宇津園子*, 矢部なおみ*, 豊岡利正, 今井一洋*: ベンゾフラザン骨格を有する蛍光試薬の反応性

日本薬学会第109年会(1989.4)

* 東京大学医学部付属病院分院

Imai, K.*, Uzu, S.* and Toyo'oka, T.: Derivatization in HPLC

3rd International Symposium on Drug Analysis,
Belgium (1989. 5)

* 東京大学医学部付属病院分院

鈴木 隆, 斎藤行生, 須田浩子*: ECD-GC によるメ
トクロロールの分析

第26回全国衛生化学技術協議会年会 (1989. 9)

* 日本食品衛生協会

宮原 誠, 鈴木 隆, 斎藤行生: ラノリン中の農薬の
分析

第26回全国衛生化学技術協議会年会 (1989. 9)

宮原 誠, 鈴木 隆, 斎藤行生: キャピラリー GC に
よる食品中のカプタホールの分析

日本食品衛生学会58回学術講演会 (1989. 10)

Miyahara, M., Suzuki, T. and Saito, Y.: A sim-
plified multiresidue method for capillary GC of
organophosphorus pesticides in crops—a coagu-
lation method

International Chemical Congress of Pacific Basin
Societies, USA (1989. 12)

河村葉子, 内山貞夫, 斎藤行生: チリ産ブドウへのシ
アン混入事件に関連して

第26回全国衛生化学技術協議会年会 (1989. 9)

内山貞夫, 佐藤民史, 河村葉子, 斎藤行生: 照射食品
の ESR による検知法の検討

日本食品衛生学会58回学術講演会 (1989. 10)

浦野 隆*1, 園部廣美*1, 宇田泰三*2, 伊藤幸勝*2,
五十畑悦子, 豊田正武, 斎藤行生: 酵素免疫測定法に
よる果汁中のカビ毒分析における問題点について

日本食品衛生学会57回学術講演会 (1988. 5)

*1 キリンビール(株)

*2 宇部興産(株)

五十畑悦子, 豊田正武, 斎藤行生, 鶴見昭夫: とうも
ろこしととうもろこし加工品中の Aflatoxin の分析

第26回全国衛生化学技術協議会年会 (1989. 9)

高木加代子, 豊田正武, 斎藤行生: 天然有害物質の生
体および食品中における挙動—加熱調理後のジャガイ

モ中のアルカロイドについて

日本食品衛生学会58回学術講演会 (1989. 10)

豊田正武, W. D. Rausch*, 高木加代子, 斎藤行生,
井上和秀, 大野泰男: 天然有害物質の生体および食品
中における挙動—培養動物細胞内カルシウムイオンの
濃度変化を指標としたジャガイモアルカロイドの評価
日本食品衛生学会58回学術講演会 (1989. 10)

* Institut für Med. Chemie Veterinarmed Uni-
versität, Austria

Isohata, E., Nakamura, F., Toyoda, M. and Saito,
Y.: High-performance liquid chromatographic
determination of mycotoxins in foodstuffs

Chromatography, International Symposium, Tokyo
Japan (1989. 10)

馬場二夫*, 福田正則*, 佐々木清司*, 石綿 肇, 杉
田たき子: 紙製器具の衛生学的研究—無機陰イオンに
ついて—

第26回全国衛生化学技術協議会年会 (1989. 9)

* 大阪市立環境科学研究所

Ishiwata, H.: Gas chromatographic method for
tetramethylsuccinonitrile in food

103 rd AOAC Annual International Meeting,
USA (1989. 9)

Ishiwata, H., Rosario, E. M.*, Sugita, T. and Yoshi-
hira, K.: Studies on materials and migration
of food-contact ware V. Detection and determina-
tion of phenol released from plastic wares by
4-aminoantipyrine method

58th Meeting of Food Hygienic Society of Japan,
Yamaguchi, Japan (1989. 10)

* Bureau of Food and Drugs, Phillipines

岩上 敏, 佐藤恭子, 合田幸広, 義平邦利, 奥山恵美,
市 隆人, 小竹欣之輔: 紅麴より得られた黄色素につ
いて

第58回日本食品衛生学会 (1989. 10)

佐藤恭子, 岩上 敏, 合田幸広, 山崎 壮, 義平邦利,
小関良宏, 作田正明: 培養細胞への植物ホルモンの取
り込みに関する食品衛生学的研究

第58回日本食品衛生学会(1989.10)

武田由比子, 合田幸広, 川崎洋子, 神蔵美枝子, 義平邦利: 亜塩素酸ナトリウムおよび次亜塩素酸ナトリウムの分別定量法の検討

第58回日本食品衛生学会(1989.10)

Yamazaki, T. and Flores, H.E.: **Production of steviol glucosides by hairy root cultures of stevia**

American and Canadian Societies of Plant Physiologists, Canada (1989.6)

* Pennsylvania State University, USA

米谷民雄, 井上清嗣, 内山貞夫, 齋藤行生: ヒ素とセレンおよびヒ素とテルルを同時投与した時の生体内相互作用の比較

第4回金属の関与する生体関連反応シンポジウム(1989.6)

Maitani, T., Saito, Y., Yoshihira, K. and Suzuki, K. T.*: **Hepatic calcium level and induction of Zn-thionein**

US-Japan Scientific Seminar on Metallothionein in Biology and Medicine, USA (1989.12)

* National Institute for Environmental Studies

菊池 裕*¹, 入江昌親*¹, 澤田純一, 池淵秀治, 寺尾允男, 中山 茂*², 井口 伸*², 岡田芳男*²: メタロチオネインのエピトープの解析

第19回日本免疫学会(1989.11)

*¹ 星薬科大学

*² 神戸学院大学薬学部

海老沢計慶*¹, 前田昌子*², 辻 章夫*², 沢田純一, 寺尾允男, 西村善文*¹, 荒田洋治*¹: NMR による免疫グロブリンの高次構造の研究. V. 抗ステロイド抗体の抗原結合による変化

第62回日本生化学会(1989.11)

*¹ 東京大学薬学部

*² 昭和大学薬学部

Okada, Y.*¹, Nakayama, S.*¹, Iguchi, S.*¹, Kikuchi, Y.*², Irie, M.*², Sawada, J., Ikebuchi, H. and Terao, T.: **Synthesis of N-terminal epitope peptides of**

mammalian metallothioneins (MTs)

The 11th American Peptide Symposium (1989.7)

*¹ 神戸学院大学薬学部

*² 星薬科大学

鈴木和博, 鈴木澄子*, 齊藤嘉朗, 池淵秀治, 寺尾允男: ホルモンエストロゲンによるヒト成長ホルモン受容体の Down-regulation

第62回日本生化学会大会(1989.11)

* 国立公衆衛生院

Suzuki, K., Suzuki, S.*, Saito, Y., Ikebuchi, H. and Terao, T.: **Phorbol diester-induced down-regulation of human growth hormone-receptor**

7th International Conference on Cyclic Nucleotides, Calcium, and Protein Phosphorylation (1989.10)

* 国立公衆衛生院

池淵秀治, 手島玲子, 田中東一, 佐藤道夫, 沢田純一, 一戸正勝, 寺尾允男: ツェラレノンに対するモノクローナル抗体を用いる免疫測定法について

第30回マイコトキシン研究会(1990.1)

手島玲子, 池淵秀治, 寺尾允男, 宮川武彦*¹, 中西守*², 荒田洋治*¹: 好塩基球細胞株のカルシウム動態に及ぼす protein kinase 阻害剤の影響

第11回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム(1989.10)

*¹ 東京大学薬学部

*² 名古屋市立大学薬学部

手島玲子, 池淵秀治, 寺尾允男, 宮川武彦*¹, 中西守*², 荒田洋治*¹: 好塩基球細胞株の細胞内カルシウム動態に及ぼす staurosporine の影響

第62回日本生化学会大会(1989.11)

*¹ 東京大学薬学部

*² 名古屋市立大学薬学部

森本和滋, 高橋 惇, 宮田直樹, 神谷庄造: BHA のキノン誘導体のラット前胃上皮細胞 DNA 損傷作用

第48回日本癌学会総会(1989.10)

Morimoto, K.: **Biochemical mechanism of OPP-Na and 3-BHA carcinogenesis in rats**

U.S.-JAPAN Joint Panel on Environmental Muta-

genesis and Carcinogenesis, 17th Joint Conference on "Non-genotoxic Carcinogens", USA (1990. 2)

紅林秀雄, 田中 彰, 高橋 惇: 脂環族一級アミンのウサギ肝ミクロソームによる脱アミノ反応機構
第26回理工学における同位元素研究発表会 (1989. 7)

紅林秀雄, 田中 彰, 高橋 惇: 脂環族一級アミンの肝ミクロソームによる脱アミノ反応機構—安定同位体を利用して
第20回薬物代謝と薬効・毒性シンポジウム (1989. 10)

Okudaira, K., Morimoto, K. and Takahashi, A.: **The Pharmacokinetics and DNA Binding of Urethane in Mice.**
5th. International Congress of Toxicology, England (1989. 7)

福原 潔, 宮田直樹, 松井道子, 石館 基, 神谷庄造: ニトロアレーンの還元特性と変異原性について
第18回日本環境変異原学会 (1989. 11)

宮田直樹, 神谷庄造, 森本和滋, 高橋 惇: キノン類へのチオール化合物の付加, その活性酸素発生能に及ぼす影響について
第48回日本癌学会総会 (1989. 10)

Miyata, N. and Kamiya, S.: **Chemical studies on BHA carcinogenesis**
The 1989 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Hawaii, USA (1989. 12)

宮原美知子, 三瀬勝利, 島田俊雄*: 病原細菌からの遺伝子操作酵素の探索. I. 食中毒細菌 *Plesiomonas shigelloides* の新型制限酵素 PshAI の性状
第63回日本細菌学会総会 (1990. 3)

* 国立予防衛生研究所

酒井綾子, 藤木博太*: 発癌プロモーター, *okadaic acid* および類似化合物の BALB/3T3 細胞二段階トランスフォーメーションに対する作用
第48回日本癌学会総会 (1989. 10)

* 国立がんセンター研究所

Kobatake, M., N. J. W. Kreger-van Rij*¹, N. van

Uden*², Tonogai, Y., Hasegawa, Y. and Ito, Y.: **Spoilage yeasts isolated from seafoods in Japan and in Portugal**

5th International Symposium on Microbial Ecology (1989. 8)

*¹ Univ. of Groningen, The Netherlands

*² Gulbenkian Inst. of Science, Portugal

小沼博隆: 食肉および食肉製品の微生物管理のための基礎的研究
微生物技術協議会第10回研究会 (1989. 7)

小沼博隆: 食品の微生物制御のためのサーベランスシステム
食品衛生微生物研究会第10回学術講演会 (1989. 9)

上田成子*¹, 桑原祥浩*¹, 小沼博隆, 安形則雄*², 徳丸雅一*³, 品川邦汎*⁴: 土壌および野菜類における *Bacillus cereus* ならびに *Bacillus thuringiensis* の分布について
食品衛生微生物研究会第10回学術講演会 (1989. 9)

*¹ 女子栄養大学

*² 名古屋市衛生研究所

*³ 埼玉県衛生研究所

*⁴ 岩手大学農学部

梅迫誠一*¹, 小沼博隆, 今野純夫*², 和田正道*³, 徳丸雅一*⁴, 品川邦汎*⁵: 市販サルモネラ検出キット活用による自動化への試み
食品衛生微生物研究会第10回学術講演会 (1989. 9)

*¹ 奈良県衛生研究所

*² 仙台市衛生研究所

*³ 長野県衛生公害研究所

*⁴ 埼玉県衛生研究所

*⁵ 岩手大学農学部

徳丸雅一*¹, 小沼博隆, 梅迫誠一*², 今野純夫*³, 品川邦汎*⁴: 食品中のサルモネラ検出法における市販キットの実用性と自動化への応用の試み
日本獣医学会第108回学術講演会 (1989. 9)

*¹ 埼玉県衛生研究所

*² 奈良県衛生研究所

*³ 仙台市衛生研究所

*⁴ 岩手大学農学部

小泉信三*, 加藤 肇*, 吉野嶺一*, 林 長生*, 一戸正勝: ムギ類赤かび病の発生生態に関する研究 (8)

ムギ類赤かび病菌のわが国における種類と分布

日本植物病理学会平成元年度夏季関東部会(1989.6)

* 農林水産省農業研究センター

宇田川俊一：食品および生活環境中の真菌汚染
衛生微生物技術協議会第10回研究会(1989.7)田中敏嗣*1, 長谷川明彦*1, 青木伸實*1, 山本 進*1,
宇田川俊一, 関田節子, 原田正敏, 野沢幸平*2, 河合
賢一*2: 小型菌核形成 *Aspergillus flavus* 一系統の
アフラトレムおよびその関連化合物の生産性
第29回マイコトキシン研究会(1989.9)

*1 神戸市環境保健研究所

*2 星薬科大学

岩津都希雄*, 宇田川俊一: *Exophiala jeanselmei*
var. heteromorpha および *var. castellanii* の分
類上の問題について

日本医真菌学会第33回総会(1989.9)

* 岩津皮膚科医院

鍛冶友昭*1, 池田啓子*1, 寺林 征*1, 斎藤明彦*1, 杉
山義昭*1, 宇田川俊一, 岩津都希雄*2, 福代良一*3:
皮膚ムーコル症

日本医真菌学会第33回総会(1989.9)

*1 富山県立中央病院

*2 岩津皮膚科医院

*3 埼玉医科大学

野田徳朗*, 奥村 哲*, 鹿野由紀子*, 前田 学*, 森
俊二*, 宇田川俊一: 毛のう炎様皮疹を生じた *Pseudo-*
dallescheria boydii の皮膚感染例

日本医真菌学会第33回総会(1989.9)

* 岐阜大学医学部

庄司昭伸*1, 木村雅友*2, 三橋武弘*3, 宇田川俊一:
深在性真菌症における凍結組織からの真菌培養結果
日本医真菌学会第33回総会(1989.9)

*1 大阪回生病院

*2 近畿大学医学部

*3 大阪市立大学医学部

細江智夫*, 野沢幸平*, 河合賢一*, 仲嶋正一*, 宇田
川俊一: 市販食品から分離された *Penicillium cru-*
stosum が生産するペニトレム類およびその関連化合

物

第30回マイコトキシン研究会(1990.1)

* 星薬科大学

堀江義一*1, 宮治 誠*2, 西村和子*2, 田口英昭*2,
宇田川俊一: 病原性糸状菌の生態学的研究:(第2報)
南米土壤中の *Aspergillus fumigatus* とその近縁
菌について

日本医真菌学会第33回総会(1989.9)

*1 千葉県立中央博物館

*2 千葉大学真核微生物研究センター

高鳥浩介*1, 伊藤信子*1, 太田利子*1, 宇田川俊一,
信太郎*2: ハウスダストにみる真菌アレルゲン, 特
に好稠性真菌

日本医真菌学会第33回総会(1989.9)

*1 (財)食品薬品安全センター秦野研究所

*2 国立相模原病院

関沢 純: 農業安全性評価情報データベースの構築と
利用

第12回情報化学討論会(1989.11)

Sekizawa, J.: Experience from providing legal
data and using the IRPTC Legal File in Japan
International Workshop on the Future Develop-
ment of the IRPTC Legal File, FRG (1990.3)会田喜崇: 食品に含まれる化学物質の安全性に対す
る国際機関の対応第109回日本獣医学会総会(公衆衛生学分科会シンポ
ジウム)(1990.3)梅村隆志, 佐井君江, 高木篤也, 長谷川隆一, 黒川雄
二: 鉄ニトリロ三酢酸腹腔内投与によるラット腎の
8-ハイドロキシデオキシグアノシン(8-OH-dG)の生
成

第18回日本環境変異原学会(1989.11)

松本清司, 関田清司, 落合敏秋, 降矢 強, 黒川雄
二: マウスおよびラットの骨髄検査値
第36回日本実験動物学会(1989.5)太田 洋, 松本清司, 降矢 強, 黒川雄二: MRL/lpr
マウスの血液および骨髄所見

第36回日本実験動物学会 (1989.5)

高木篤也, 佐井君江, 梅村隆志, 長谷川隆一, 金子豊蔵, 黒川雄二: ペルオキシゾーム増殖剤12カ月間投与ラット肝 DNA 中の 8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-OH-dG) の生成

第48回日本癌学会 (1989.10)

小川幸男, 鎌田栄一, 鈴木幸子, 小林和雄*, 金子豊蔵, 黒川雄二, 戸部満寿夫: 2-Mercaptobenzothiazole (MBT) のマウスにおける毒性について

第16回日本毒科学会 (1989.6)

* 食品農薬品安全性評価センター

関田清司, 落合敏秋, 大野昌子, 黒岩康子*, 角田健司*: 有機リン系農薬 (スミチオン) 中毒に対する Atropine および PAM の効果に関する研究

第73次日本法医学会総会 (1989.5)

* 昭和大学医学部

松本清司: 毒性試験技術の最近の進歩「一般毒性試験機器について」

第16回日本毒科学会 (1989.6)

落合敏秋, 松本清司, 関田清司, 降矢 強, 黒川雄二: 骨髄の赤血球数と粒度分布測定の意味

第16回日本毒科学会 (1989.6)

鎌田栄一, 内藤克司, 中路幸男, 小川幸男, 鈴木幸子, 高田幸一, 金子豊蔵, 黒川雄二, 戸部満寿夫: マウスによる Tris (1,3-dichloro-2-propyl) phosphate の急性および亜急性毒性試験について

第16回日本毒科学会 (1989.6)

児玉幸夫, 酒井建夫*, 長尾壮七*, 堀内茂友, 内藤克司: ナキウサギ *Pika* (*Ochotonarufescens rufescens*) の皮膚ヒスタミン量

第108回日本獣医学会 (1989.10)

* 日本大学

佐井君江, 内山貞夫, 大野泰雄, 金子豊蔵, 黒川雄二: ESR 測定による臭素酸カリウム ($KBrO_3$) の活性酸素生成の検討

第48回日本癌学会総会 (1989.10)

Nakadate, M., Hayashi, M., Sofuni, T., Aida, Y. and Osada, T.*: Studies on structure-activity relationships for predicting the mutagenicity of chemicals

The 1989 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, USA (1989.12)

* 日本総合技術研究所

児玉幸夫, 酒井建夫*, 高橋 薫*, 長尾壮七*: 実験動物学領域におけるナキウサギの生物学特性

平成元年度東京獣医畜産学会 (1989.8)

* 日本大学

長谷川隆一, 村井真美, 小室徹雄, 木村俊夫: ラセミ体ピンドロールの体内挙動に対するエンドトキシンの影響

第33回日本薬学会関東支部大会 (1989.11)

長谷川隆一, 高木篤也, 梅村隆志, 佐井君江, 金子豊蔵, 黒川雄二: フッソ系ペルオキシゾーム増殖剤投与によるラット肝 8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-OH-dG) の生成について

第48回日本癌学会総会 (1989.10)

Smith, M. T.*, Blank, L.*, Kawanishi, T. and Tsien, R. Y.*: Mitochondrial poisons block hormonal response and raise cytosolic calcium in single hepatocytes

The 1989 Annual Meeting of Society of Toxicology, USA (1989.3)

* University of California, Berkeley, USA

原沢裕子*, 木村雅昭*, 前田かおり*, 大野泰雄, 林茂寛*: ブタ摘出冠動脈における内皮依存性弛緩に対する外液 K^+ 濃度減少の効果

第62回日本薬理学会総会 (1989.3)

* アップジョンファーマシューティカルズリミテッド総合研究所

広田晃一, 川西徹, 篠内桃子, 大野泰雄, 高仲 正: *In vitro* 初代培養肝細胞における MC 型薬物代謝誘導剤の影響

第80回日本薬理学会関東支部 (1989.6)

Kawanishi, T., Nieminen, A-L.*, Dawson, T. L.*,

Herman, B.* and Lemasters, J. J.*: **Suppression by chemical hypoxia of Ca²⁺ oscillations induced by phenylephrine in rat hepatocytes**

The International Conferens on Video Microscopy, USA (1989. 6)

* University of North Carolina at Chapel Hill, USA

Lemasters, J. J.*, Nieminen, A. L.*, Gores, G. J.*, Dawson, T. L.*, Wray, B. E.*, Kawanishi, T., Tanaka, Y.*, Florine-Casteel, K.*, Bond, J. M.* and Herman, B.*: **Multiparameter digitized video microscopy (MDVM) of hepatic cell injury**

The International Conferens on Video Microscopy, USA (1989. 6)

* University of North Carolina at Chapel Hill, USA

川島邦夫, 田中 悟, 中浦 慎介, 高仲 正, Djajalaksana, S.*¹, 黄 芒莉*²: **Norethynodrel の男性化作用に対する Mestranol の協力作用**
第16回日本毒科学会学術年会 (1989. 6)

*¹ National Quality Control Laboratory of Drug and Food, Indonesia

*² 中華人民共和国湖北省薬物試験所

中浦 慎介, 田中 悟, 川島邦夫, 高仲 正, Djajalaksana, S.*¹, 黄 芒莉*², 李 由美*³: **ラット胎芽培養法の *in vitro* 催奇形性試験法としての有用性 (1) サリチル酸ナトリウムの *in vitro* および *in vivo* 胎芽の発育への影響**

第16回日本毒科学会学術年会 (1989. 6)

*¹ National Quality Control Laboratory of Drug and Food, Indonesia

*² 中華人民共和国湖北省薬物試験所

*³ 大韓民国国立保健安全研究院

中浦 慎介, 田中 悟, 川島邦夫, 高仲 正, Djajalaksana, S.*¹, 黄 芒莉*²: **ラット胎芽培養法の *in vitro* 催奇形性試験法としての有用性 (2) エチレンチオウレアの *in vitro* および *in vivo* 胎芽の発育への影響**
第29回日本先天異常学会 (1989. 6)

*¹ National Quality Control Laboratory of Drug and Food, Indonesia

*² 中華人民共和国湖北省薬物試験所

川島邦夫, 田中 悟, 中浦 慎介, 高仲 正, Djajalaksana, S.*¹, 黄 芒莉*²: **Norethindrone の男性化作用に対する Mestranol の協力作用**

第29回日本先天異常学会 (1989. 6)

*¹ National Quality Control Laboratory of Drug and Food, Indonesia

*² 中華人民共和国湖北省薬物試験所

Nakazawa, K., Inoue, K., Obama, T., Fujimori, K. and Takanaka, A.: **Characterization of an ATP-activated inward current in PC12 pheochromocytoma cells**

7th International Conference on Cyclic Nucleotides, Calcium, and Protein Phosphorylation, Kobe, Japan (1989. 10)

Inoue, K., Nakazawa, K., Fujimori, K., Obama, T., Shibusaki, M. and Takanaka, A.: **ATP-stimulated Ca influx resulting in ³H-norepinephrine secretion from PC12 cells**

7th International Conference on Cyclic Nucleotides, Calcium, and Protein Phosphorylation, Kobe, Japan (1989. 10)

大野 泰雄, 広田 晃一, 川西 徹, 篠内 桃子, 高仲 正: **初代培養肝細胞を用いた化学物質の薬物代謝酵素誘導能と *in vivo* 試験との比較**

第3回日本動物実験代替法研究会 (1989. 10)

Kawanishi, T., Nieminen, A-L.*, Herman, B.* and Lemasters, J. J.*: **Suppression of hormone agonist-induced Ca²⁺ oscillations in cultured hepatocytes by chemical hypoxia**

The 1990 Annual Meeting of Society of Toxicology, USA (1990. 2)

* University of North Carolina, USA

Nieminen, A-L.*, Kawanishi, T., Herman, B.* and Lemasters, J. J.*: **Mitochondria depolarization does not lead to intracellular release in cultured rat hepatocytes exposed to HgCl₂ or uncoupler**
The 1990 Annual Meeting of Biophysical Society, USA (1990. 3)

* University of North Carolina, USA

井上和秀, 中沢 憲一, 藤森 観之助, 小濱 とも子, 齊藤

勲*, 高仲 正: PC12 細胞での外液 ATP によるノルエピネフリン放出; receptor-operated Ca チャネルの関与

第63回日本薬理学会総会 (1990.3)

* 昭和大学薬学部

中沢憲一, 井上和秀, 小濱とも子, 藤森観之助, 高仲正: PC12 cells における ATP により活性化する内向き電流およびその外液カルシウム依存性

第63回日本薬理学会総会 (1990.3)

井上和秀, 中沢憲一, 藤森観之助, 高仲 正: PC12 細胞の Ca influx 統御機構

第63回日本薬理学会総会 (1990.3)

木村雅昭*, 原沢裕子*, 前田かおり*, 田原 誠*, 大野泰雄, 林 茂寛*: 培養内皮細胞を移植した冠状動脈の反応

第63回日本薬理学会総会 (1990.3)

* アップジョンファーマシューティカルズリミテッド総合研究所

外館あさひ, 前川昭彦, 小野寺博志, 林 裕造: 合成 ACTH: [Alb1, Lys17, Lys18, Lys19,]-ACTH-(1-19)-NH₂ 長期投与のラット副腎皮質に及ぼす影響

第78回日本病理学会総会 (1989.4)

長谷川良平*, 立松正衛*, 白井智之*, 萩原昭裕*, 高橋道人, 伊東信行*: グルタチオン S-トランスフェラーゼ各分子種のヒトおよびラット大腸癌における免疫組織化学的検討

第78回日本病理学会総会 (1989.4)

* 名古屋市立大学医学部

今井田克己, 豊田和弘, 古川文夫, 下地尚史, 高橋道人, 林 裕造: Sodium o-phenylphenate (OPP-Na) の F 344 ラットへの投与時間と膀胱腫瘍発生率との相関

第78回日本病理学会総会 (1989.4)

菅野 純*, 今井田克己, 前川昭彦, 春日 孟*, 林裕造: 赤色 105 号のラット甲状腺に対する作用機序

第78回日本病理学会総会 (1989.4)

* 東京医科歯科大学医学部

高橋 智*, 津田洋幸*, 小木曾正*, 今井田克己, 広瀬雅雄*: 輸血後に graft versus host disease (GVHD) を発生した 1 症例

第78回日本病理学会総会 (1989.4)

* 名古屋市立大学医学部

今井田克己: ワークショップ, 毒性試験技術の最近の進歩: 画像処理装置について

第16回日本毒科学会学術年会 (1989.5)

Zukowski, K., Yamada, H., Lee M.-S. *, Imaida, K. and Wang, C. Y. *: Carcinogenicity of benzidine metabolites in heterotopic bladder of the rat
American Association for Cancer Research, USA (1989.5)

* Michigan Cancer Foundation, USA

Shimoji, N., Okamiya, H., Hasegawa, R. *, Imaida, K., Takahashi, M., Ito, N. * and Hayashi, Y. *: Freezing initiation of bladder carcinogenesis promoted by sodium o-phenylphenate (OPP-Na) of rat urinary bladder

Society of Toxicology, USA (1989.5)

* 名古屋市立大学医学部

Takahashi, M. and Hayashi, Y. *: Importance of endocrine interactions for pancreatic carcinogenesis in rats and hamsters.

Molecular Aspects of Growth Control, The Joint Meeting of The American Association for Cancer Research and The Japanese Cancer Association, USA (1989.5)

高橋道人, 長谷川亨*, 篠田和俊, 永岡隆晴: 胃粘膜病変の指標としての尿中過酸化脂質量の意義

第12回日本がん疫学研究会 (1989.6)

* 佐賀医科大学医学部

Hayashi, Y., Maekawa, A., Takahashi, M. and Imaida, K. *: Carcinogen risk assessment: 産業化による環境保健問題—リスクアセスメントとその管理—
第9回産業医科大学国際シンポジウム (1989.7)

Hayashi, Y., Takahashi, M. and Furukawa, F. *: Modifying effects of soybean trypsin inhibitor

on carcinogen-induced pancreatic alterations in rats.

5th. International Congress of Toxicology, Basic Science in Toxicology, England (1989.7)

林 裕造: 発がん物質のリスクアセスメント

第48回日本癌学会総会 (1989.10)

菅野 純*¹, 佐々木澄志*², 水澤 博, 石館 基, 林裕造, 春日 孟*¹: v-Ha-ras 導入非形質転換 BALB 3T3 細胞株 (Bhas 42細胞) の細胞間連絡能

第48回日本癌学会総会 (1989.10)

*¹ 東京医科歯科大学医学部

*² 食品薬品安全センター・秦野研究所

長谷川良平*, 古川文夫, 豊田和弘, 高橋道人, 林裕造, 伊藤信行*ラット肺発がんに対する酸化防止剤の抑制効果

第48回日本癌学会総会 (1989.10)

* 名古屋市立大学医学部

前川昭彦, 小野寺博志, 谷川広行, 渋谷 淳, 松島裕子, 永岡隆晴, 外館あさひ, 林 裕造: ラット神経系腫瘍発生に及ぼすバルビタールの影響

第48回日本癌学会総会 (1989.10)

小野寺博志, 松島裕子, 永岡隆晴, 外館あさひ, 渋谷淳, 前川昭彦, 林 裕造: N-Nitroso-bis-(2-oxopropyl) amine (BOP) 経胎盤投与で誘発されたラットの卵巣腫瘍

第48回日本癌学会総会 (1989.10)

松島裕子, 小野寺博志, 永岡隆晴, 外館あさひ, 渋谷淳, 前川昭彦, 林 裕造, 黒川雄二: Musk xylene のマウスにおける癌原性について

第48回日本癌学会総会 (1989.10)

佐藤秀隆, 高橋道人, 岡宮英明, 古川文夫, 豊田和弘, 林 裕造: Dicofol によるマウス肝腫瘍発生の用量作用関係

第48回日本癌学会総会 (1989.10)

豊田和弘, 高橋道人, 古川文夫, 佐藤秀隆, 今井田克己, 宮川義史: BOP で誘発された SENCAR マウスの肺腫瘍

第48回日本癌学会総会 (1989.10)

古川文夫, 高橋道人, 岡宮英明, 今井田克己, 今沢孝喜, 篠田和俊, 林 裕造: HAQO とトリプシンインヒビター処置によるラット膵腺細胞腫瘍発生過程の経時的検索

第48回日本癌学会総会 (1989.10)

吉田順一, 今井田克己, 下地尚史, 古田京子, 高橋道人, 林 裕造: ラット肝発癌過程における免疫抑制作用物質の影響

第48回日本癌学会総会 (1989.10)

今井田克己, 下地尚史, 長谷川良平*, 佐藤秀隆, 古田京子, 高橋道人, 林 裕造: マウス肺腫瘍発生過程における高脂肪摂取とインドメタシンの同時投与による促進作用

第48回日本癌学会総会 (1989.10)

* 名古屋市立大学医学部

篠田和俊, 古田京子, 岡宮英明, 高橋道人, 豊田和弘, 今井田克己, 林 裕造: ハムスター膵二段階発癌における魚油の影響

第48回日本癌学会総会 (1989.10)

高橋道人, 古川文夫, 岡宮英明, 今井田克己, 今沢孝喜, 佐藤秀隆, 林 裕造: BOP とトリプシンインヒビターの併用投与による膵発癌の抑制効果

第48回日本癌学会総会 (1989.10)

岡宮英明, 高橋道人, 長谷川享*, 古川文夫, 篠田和俊, 今井田克己, 林 裕造: ラット胃粘膜の脂質過酸化および細胞増殖に及ぼす食塩の影響

第48回日本癌学会総会 (1989.10)

* 佐賀医科大学医学部

今沢孝喜, 古川文夫, 篠田和俊, 外館あさひ, 今井田克己, 高橋道人, 林 裕造: HAQO (4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide) 単回投与による標的細胞の微細構造変化

第48回日本癌学会総会 (1989.10)

佐藤元信, 豊田和弘, 佐藤秀隆, 今沢孝喜, 下地尚史, 高橋道人: ラット上部消化管腫瘍発生におけるビタミンA欠乏の影響

第48回日本癌学会総会 (1989.10)

豊田和弘, 高橋道人, 五十嵐良明, 土屋利江, 鹿庭正昭, 小嶋茂雄, 中村晃忠, 内間高夫*, 藤巻正人*: ゴム製品の毒性評価法に関する研究
第11回日本バイオマテリアル学会 (1989.10)

* 民生科学協会研究所

古川文夫, 阿部弘, 古田京子, 篠田和俊, 岡宮英明: 消化管の固定法
第14回実験動物病理組織技術懇話会 (1989.11)

篠田和俊, 古川文夫, 岡宮英明, 佐藤元信, 古田京子, 阿部 弘: 精巢における BrdU 免疫組織化学
第14回実験動物病理組織技術懇話会 (1989.11)

Takahashi, M., Imaida, K., Furukawa, F. and Hayashi, Y.: Inhibitory effects of soy bean trypsin inhibitor during initiation and promotion phase on hamster N-nitrosobis (2-oxopropyl) amine pancreatic carcinogenesis
Chemically Induced Cell Proliferation: Implications for Risk Assessment, USA (1989.11)

古川文夫, 高橋道人, 長谷川良平, 福島昭治: 実験肺癌発生過程におけるラ氏島の内分泌細胞の動態
第40回名古屋市立大学医学会総会 (1989.12)

今井田克己, 高村直子, 畝山智香子, 吉田順一, 古田京子, 高橋道人, 林 裕造: 肺 Clara 細胞の分布と PCB 投与による反応の動物種差
第6回日本毒性病理学会 (1990.2)

吉田順一, 高村直子, 畝山智香子, 古田京子, 豊田和弘, 今井田克己, 林 裕造: ラット肝の前癌病変発生過程におけるキナクリンの影響
第6回日本毒性病理学会 (1990.2)

豊田和弘, 高橋道人, 佐藤秀隆, 岡宮英明, 今井田克己, 林 裕造: 長期動物試験における心肥大とその合併病変
第6回日本毒性病理学会 (1990.2)

佐藤元信, 古川文夫, 篠田和俊, 岡宮英明, 今沢孝喜, 今井田克己, 高橋道人: WBN/kob ラットにおける精巢の萎縮性病変について
第6回日本毒性病理学会 (1990.2)

今沢孝喜, 豊田和弘, 佐藤秀隆, 下地尚史, 今井田克己, 高橋道人: エトキシキン投与によるラット腎石灰化および腎結石の超微形態学的観察ならびに元素分析
第6回日本毒性病理学会 (1990.2)

加藤俊男*, 立松正衛*, 今井田克己, 山田真弓*, 伊東信行*: 肝発癌物質の中期発癌性試験におけるラット肝 GST-P 陽性細胞の3次元的解析
第6回日本毒性病理学会 (1990.2)

* 名古屋市立大学医学部

古川文夫, 今沢孝喜, 篠田和俊, 佐藤秀隆, 高橋道人, 林 裕造: WBN/kob ラットにおける自然発症肺炎モデルの病理組織学的検討
第6回日本毒性病理学会 (1990.2)

豊田和弘, 高橋道人, 佐藤秀隆, 岡宮英明, 今井田克己, 林 裕造: 長期動物試験における心肥大とその合併病変
第6回日本毒性病理学会 (1990.2)

篠田和俊, 古川文夫, 福原守雄*, 佐藤元信, 高橋道人: ハムスター p448 の局在ならびに BOP 誘発肺癌における発現
第6回日本毒性病理学会 (1990.2)

* 国立公衆衛生院

佐藤秀隆, 豊田和弘, 古川文夫, 岡宮英明, 今沢孝喜, 高橋道人, 林 裕造: ラット新生仔腎の各種レクチンおよびコロイド鉄に対する染色性の検討
第6回日本毒性病理学会 (1990.2)

永岡隆晴, 小野寺博志, 前川昭彦: ラット子宮内膜腺癌の発生に関する実験病理学的研究
第6回日本毒性病理学会 (1990.2)

小野寺博志, 永岡隆晴, 渋谷 淳, 小笠原裕之, 前川昭彦: ラット子宮内膜腺癌の発生に関する実験病理学的研究—卵巣腫瘍と子宮内膜病変との相関—
第6回日本毒性病理学会 (1990.2)

外館あさひ, 渋谷 淳, 小野寺博志, 永岡隆晴, 前川昭彦, 林 裕造: ニトロベンゼンの28日間反復投与試験でみられた中枢神経病変について
第6回日本毒性病理学会 (1990.2)

小笠原裕之, 小野寺博志, 永岡隆晴, 外館あさひ, 渋谷 淳, 前川昭彦: 骨髄原発と考えられるラット自然発生組織球性肉芽腫

第6回日本毒性病理学会 (1990. 2)

渋谷 淳, 小笠原裕之, 小野寺博志, 前川昭彦, 林裕造: ラット中枢神経系神経膠細胞腫についての免疫組織学的研究

第6回日本毒性病理学会 (1990. 2)

渋谷 淳, 桶田理喜*¹, 堀 映*²: Diffuse axonopathy を呈した methotrexate-related leukoencephalopathy の1例

第30回日本神経病理学会 (1989. 6)

*¹ 東京医歯大学医学部

*² ハノーバ医科大学医学部

Watanabe, M., Einistö, P.*¹, Ishidate, M. Jr. and Nahmi, T.: Establishment and an application of new substrains of *S. typhimurium* highly sensitive to nitroarenes and aromatic amines

International Conference on Genetic Toxicology of Complex Mixtures, USA (1989. 7)

*¹ Institute of Occupational Health, Finland

Watanabe, M., Ishidate, M. Jr. and Nohmi, T.: New modified strains of *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, very sensitive to nitroarenes and aromatic amines by cloning of acetyltransferase gene

5th International Conference on Environmental Mutagens, USA (1989. 7)

Watanabe, M., Ishidate, M. Jr. and Nohmi, T.: Nitroarene sensitive *Salmonella typhimurium* strains YG1021 and YG1026 with a high nitroreductase activity, derived from TA98 and TA100, respectively

5th International Conference on Environmental Mutagens, USA (1989. 7)

Matsushita, H.*¹, Endo, O.*¹, Matsushita, H. Jr.*¹, Mochizuki, M.*², Watanabe, M. and Ishidate, M. Jr.: Mutagenicity of nitroarenes by new tester strains, TA100/pYG216, TA100/pYG219, TA98/

pYG216 and TA98/pYG219

5th International Conference on Environmental Mutagens, USA (1989. 7)

*¹ 国立公衆衛生院

*² 共立薬科大学

Einistö, P.*¹, Schimberg, R.*², Koivisto, P.*³ and Watanabe, M.: Occupational exposure to dyes in textile and clothing industry

5th International Conference on Environmental Mutagens, USA (1989. 7)

*¹ Institute of Occupational Health, Finland

*² Regional Institute of Occupational Health, Finland

*³ Einlayson Ltd, Finland

Watanabe, M., Ishidate, M. Jr. and Nohmi, T.: Establishment of new strains of *S. typhimurium* highly sensitive to nitroarenes and aromatic amines: TA98 and TA100 substrains with rich nitroreductase or acetyltransferase activities

4th International Conference on N-Substituted Aryl Compounds: Occurrence, Metabolism and Biological Impact of nitroarenes, USA (1989. 7)

能美健彦, 渡辺雅彦, Einistö, P.*¹, 松岡厚子, 祖父尼俊男, 石館 基: 遺伝子工学的手法を用いた新しい試験細胞の開発とその応用

日本環境変異原学会第18回大会 (1989. 11)

*¹ Institute of Occupational Health, Finland

Einistö, P.*¹, 能美健彦, 渡辺雅彦, 石館 基: Mutagenicity of 32 chemicals and human urine specimens in *S. typhimurium* strains with various nitroreductase or acetyltransferase activities

日本環境変異原学会第18回大会 (1989. 11)

*¹ Institute of Occupational Health, Finland

渡辺雅彦, 能美健彦, 石館 基: *S. typhimurium* 高感受性株の分子的基礎: ニトロ還元酵素, アセチル転移酵素遺伝子の塩基配列

日本環境変異原学会第18回大会 (1989. 11)

能美健彦, Battista, J. R.*¹, Dodson, L. A.*² and Walker, G. C.*³: 大腸菌 UmuD 蛋白質の解裂=活性化と

紫外線誘発突然変異における RecA の第3の役割
日本環境変異原学会第18回大会 (1989.11)

* Massachusetts Institute of Technology, USA

渡辺雅彦, 能美健彦, 石館 基: *Salmonella typhimurium* O-アセチル転移酵素のクローニングと塩基配列

第12回日本分子生物学会年会 (1989.12)

能美健彦, Battista, J. R.*, Ohta, T.*, Igras, V.*, Sun, W.* and Walker, G. C.*: 大腸菌 *UmuD* ミュータントの単離とその解析

第12回日本分子生物学会年会 (1989.12)

* Massachusetts Institute of Technology, USA

能美健彦: 大腸菌 *UmuD* 蛋白質の活性化と紫外線誘発突然変異

第2回抗変異原研究会 (1989.5)

山田雅己, 牧野耕三*, 品川日出夫*, 中田篤男*: 大腸菌リン酸レギュロンの調節機構: 抑制的機能だけを持った PhoR 突然変異体の解析

第61回遺伝学会大会 (1989.10)

* 大阪大学微生物病研究所

松岡厚子, 能美健彦, 渡辺雅彦, 祖父尼俊雄, 石館基: *S. typhimurium* の O-アセチル転移酵素およびニトロ還元酵素遺伝子の CHL 細胞への導入

日本環境変異原学会第18回大会 (1989.11)

Harnois, M. C., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr.: **Correlation of results from three genetic toxicology tests with results from oncogenicity assays**
5th International Conference on Environmental Mutagens, USA (1989.7)

Hayashi, M., Norppa, H.*, Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr.: **Flow cytometric micronucleus test with mouse bone marrow and peripheral blood erythrocytes**

5th International Conference on Environmental Mutagens (1989.7)

* Inst. Occup. Health, Finland

Ishidate, M. Jr., Harnois, M. C. and Sofuni, T.: *In*

vitro clastogenicity of 951 chemical substances
5th International Conference on Environmental Mutagens, USA (1989.7)

Kirkland, D. J.*¹, Ishidate, M. Jr., Gatehouse, D.*² and Richardson, C.*³: **Investigations on the extent of testing required to exclude non-clastogens in routine chromosomal aberration tests**
5th International Conference on Environmental Mutagens, USA (1989.7)

*¹ Microtest Research Ltd, UK

*² Glaxo Group Research, UK

*³ ICI Central Toxicology Lab, UK

Sofuni, T., Matsuoka, A., Sawada, M., Ishidate, M. Jr. and Shelby, M. D.*: **A comparison of chromosome aberration induction in the CHO and CHL cell systems by 25 chemicals**

5th International Conference on Environmental Mutagens, USA (1989.7)

* National Institute of Environmental Health Sciences, USA

Sutou, S.*¹, Shimada, H.*², Wakata, A.*³, Awogi, T.*⁴, Ohuchida, A.*⁵, Hayashi, M. and Sofuni, T.: **Scrutiny of protocols for the micronucleus test with mice—Achievements by CSGMT/JEMS. MMS**
5th International Conference on Environmental Mutagens, USA (1989.7)

*¹ 伊東ハム中央研究所

*² 第一製薬(株)研究所

*³ 山之内製薬(株)中央研究所

*⁴ 大塚製薬(株)徳島研究所

*⁵ 大鵬薬品(株)研究部

Hayashi, M.: **Considerations for automating micronucleus testing**

Image recognition systems workshop on automation requirements, UK (1989.2)

Hayashi, M.: **Third collaborative study by CSGMT/JEMS-MMS. Difference between ip and po application in the mouse micronucleus test**

18th Meeting of the EC Contact Group on Genetic Effects of Environmental Chemicals, Spain (1989.3)

Norppa, H.*, Hayashi, M., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr.: **Automation of mouse blood micronucleus test by flow cytometry**
EEMS 18th Annual Meeting, Roumania (1988. 10)

* Inst. Occup. Health, Finland

Hayashi, M., Norppa, H.*, Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr.: **Automation of mouse micronucleus test by flow cytometry and image analysis**
14th International Meeting of the Society for Analytical Cytology, USA (1989. 3)

* Inst. Occup. Health, Finland

林 真: 変異原性試験における統計解析の実際
第40回医薬安全性研究会定例会 (1989. 10)

林 真, Norppa, H.*, Maki-Paakkanen, J.*, Sorsa, M.*, 祖父尼俊雄, 石館 基: 抗 BrdU 抗体法によるヒトリンパ球小核試験法
日本環境変異原学会第18回大会 (1989. 11)

* Inst. Occup. Health, Finland

島田弘康*, 佐武佐知子*, 伊東 悟*, 服部千春*, 林真, 石館 基: Benzo[a]pyrene の小核試験における投与回数の影響
日本環境変異原学会第18回大会 (1989. 11)

* 第一製薬

小核共同グループ (JEMS. MMS): 小核試験における投与回数の影響
日本環境変異原学会第18回大会 (1989. 11)

Sorsa, M.*, Hayashi, M., Norppa, H.* and Vainio, H.*: **Human Biomonitoring in Exposure to Environmental Genotoxicants**
2nd International Conference on Mechanisms of Antimutagenesis and Anticarcinogenesis, Japan (1988. 12)

* Inst. Occup. Health, Finland

沢田 稔, 祖父尼俊雄, 石館 基: 活性酸素発生系における染色体異常誘発性 VII. 変異原処理による menadione 抵抗性細胞の分離
日本環境変異原学会第18回大会 (1989. 11)

祖父尼俊雄, 川瀬雅子*¹, 水沢 博, 石館 基, 池上洋二*², 小野勝弘*², 安藤俊夫*²: 染色体異常を誘発するピリドンカルボン酸系誘導体について
日本環境変異原学会第18回大会 (1989. 11)

*¹ ㈱カイノス伊東研究所

*² 明治薬科大学

祖父尼俊雄: 哺乳動物試験に影響を及ぼす要因の解析とその協力研究の推進
日本環境変異原学会第18回大会 (1989. 11)

Hayashi, M., Norppa, H.*, Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr.: **Micronucleus test with mouse bone marrow and peripheral blood erythrocytes using flow cytometry**

10th Annual Symposium of the Finnish Society of Toxicology, (1989. 5)

* Inst. Occup. Health, Finland

鈴木孝昌, 幸田光復*, 川添 豊*: ポリアクリル酸によるプレオマイシンの効果増強の機構に関する研究
第48回日本癌学会総会 (1989. 10)

* 名古屋市立大学薬学部

鈴木孝昌, 幸田光復*, 川添 豊*: 多価アルコール類によるプレオマイシンの細胞毒性増強効果
日本薬学会第109年会 (1989. 4)

* 名古屋市立大学薬学部

佐々木澄志*, 水沢 博, 石館 基, 田中憲穂*: 急速凍結による動物細胞への遺伝子導入
第48回日本癌学会総会 (1989. 10)

* 食品薬品安全センター秦野研究所

品川保弘*¹, 片岡英子, 水沢 博, 野村信夫*², 佐々木梢*³, 難波正義*³: 46, XX male より培養樹立した JTC-17 細胞の HeLa マーカーについて
日本組織培養学会第62回大会 (1989. 6)

*¹ 富山県立衛生研究所

*² 日本獣医畜産大学

*³ 岡山大学

森川 馨*, 雲 聡*, 秋山英雄*, 森本和滋, 水沢博, 藤田昌彦*: サプレッサー tRNA 遺伝子を用いたアルキルニトロソウレアによる遺伝子変異の解析

第48回日本癌学会総会 (1989.10)

* 国立公衆衛生院

菅野 純*¹, 佐々木澄志*², 水沢 博, 石舘 基, 林裕造, 春日 孟*¹: v-Ha-ras 導入非遺伝子形質転換 BALB 3T3 細胞株 (Bhas42 細胞) の細胞間連絡

第48回日本癌学会総会 (1989.10)

*¹ 東京医科歯科大学

*² 食品薬品安全センター秦野研究所

水沢 博, 品川保弘*: JCRB細胞バンク・データ管理システム (JDACS) 構築と利用

日本組織培養学会第62回大会 (1989.6)

* 富山県立衛生研究所

徳永裕司, 広重律子, 岡田敏史, 木村俊夫*¹, 宮本由香理*²: 糖質コルチコイド中の残留溶媒の測定

第26回全国衛生化学技術協議会年会 (1989.9)

*¹ サンド薬品㈱

*² 大阪薬科大学

小室徹雄, 四方田千佳子, 木村俊夫: R型 LPS と S型 LPS の発熱活性およびリムス活性に関する考察

第36回毒素シンポジウム (1989.7)

中村優美子, 長谷川ゆかり, 外海泰秀, 伊藤蒼志男: 輸入食品中の食品添加物分析上の問題点 (2) 各種食品中タール系色素の分析法に関する検討

第26回全国衛生化学技術協議会年会 (1989.9)

長谷川ゆかり, 中村優美子, 外海泰秀, 伊藤蒼志男: 輸入食品中の食品添加物分析上の問題点 (1) GC/MS による食品中安息香酸・ソルビン酸の確認および定量

第26回全国衛生化学技術協議会年会 (1989.9)

外海泰秀, 長谷川ゆかり, 中村優美子, 伊藤蒼志男: 輸入食品中の食品添加物分析上の問題点 (3) 各種食品中二酸化イオウの分析法に関する検討

第26回全国衛生化学技術協議会年会 (1989.9)

三ツ橋幸正*, 浜野 孝*, 青木伸賢*, 山本 進*, 辻澄子, 伊藤蒼志男: 食品中の二酸化チタンの微量比色定量

第26回全国衛生化学技術協議会年会 (1989.9)

* 神戸市環境保健研究所

浜野 孝*, 三ツ橋幸正*, 青木伸賢*, 山本 進*, 辻澄子, 伊藤蒼志男: 酵素法によるアスパルテームの分析法

第26回全国衛生化学技術協議会年会 (1989.9)

* 神戸市環境保健研究所

柴田 正, 柿内 雅, 辻 澄子, 伊藤蒼志男: 食用タール色素製品検査の試験法の検討

第26回全国衛生化学技術協議会年会 (1989.9)

柴田 正, 辻 澄子, 伊藤蒼志男, 吉岡正則*, 平塚まゆみ: 固体食品中の天然添加物であるリゾチームの蛍光分析法の開発

日本食品衛生学会第58回学術講演会 (1989.10)

* 摂南大学薬学部

長谷川ゆかり, 中村優美子, 外海泰秀, 伊藤蒼志男, 寺澤慎二: 各種発酵食品中カルバミン酸エチル (ウレタン) の分析法の開発

日本食品衛生学会第58回学術講演会 (1989.10)

村井敏美, 小川義之, 川崎浩之進: A群溶血性レンサ球菌の産生する発熱性外毒素による大腸菌内毒素の致死毒性増強作用機序について

第106回日本薬理学会近畿部会 (1989.6)

石丸幹二, 佐竹元吉, 下村講一郎: 組織培養によるタンニン類の生産 (1) 一ダイオウの不定根および細胞培養

第11回植物組織培養学会大会, シンポジウム (1989.7)

石丸幹二, 池田嘉代, 北沢 尚, 下村講一郎: 7β-hydroxyhyoscyamine の単離および関連アルカロイド類の HPLC 分析

第11回植物組織培養学会大会, シンポジウム (1989.7)

広瀬 誠*, 名取信策*, 石丸幹二, 池田嘉代, 佐竹元吉, 下村講一郎: 泡囊草 (Physochlaina physaloides) の不定根および毛状根におけるアルカロイド

第11回植物組織培養学会大会, シンポジウム (1989.7)

* 明治薬科大学

富田哲司*, 大川博志*, 鎌田 博*, 原田 宏*, 下村講一郎: Datura 毛状根および再分化体のトロパンアルカロイド合成に対するジベレリンの効果

第11回植物組織培養学会大会, シンポジウム(1989.7)

* 筑波大学

小笠原健*, 鎌田 博*, 原田 宏*, 池田嘉代, 下村
講一郎: 薬用植物への外来遺伝子導入法の開発(2)
—トランスジェニックペラドナンの作出

第11回植物組織培養学会大会, シンポジウム(1989.7)

* 筑波大学

下村講一郎, 池田嘉代, 小笠原健*, 鎌田 博*: 薬用
植物への外来遺伝子導入法の開発(3) —トランスジ
ェニックペラドナにおけるアルカロイド生産
第11回植物組織培養学会大会, シンポジウム(1989.7)

* 筑波大学

池田嘉代, 下村講一郎: トコンの不定根培養によるア
ルカロイド生産と個体再分化
第11回植物組織培養学会大会, シンポジウム(1989.7)

広瀬 誠*, 小山清隆*, 高橋邦夫*, 下村講一郎, 佐
竹元吉, 石丸幹二: ワレモコウの不定根培養
日本生薬学会第36回年会(1989.10)

* 明治薬科大学

石丸幹二, 下村講一郎: ゲンノショウコの毛状根培養
とその成分
日本生薬学会第36回年会(1989.10)

吉松嘉代, 下村講一郎: トコンの組織培養に関する研
究(6) —Shootの液体培養による増殖とアルカロイド
生産

日本生薬学会第36回年会(1989.10)

飯田 修, 長南明夫, 橋場茂子: ミシマサイコの根の
皮層部と成分について

日本生薬学会第36回年会(1989.10)

江崎勝司, 佐竹元吉, F. Ayala, 楠見武徳*¹, 柿澤
寛*¹, 神田 博史*², 糸川秀治*³: ペルー産生薬の研究
(II)

日本薬学会109年会(1989.4)

*¹ 筑波大学化学系

*² 広島大学総合薬学科

*³ 東京薬科大学

江崎勝司, 佐竹元吉, 楠見武徳*, 柿澤 寛*: ペルー
産生薬の研究(II) *Huaira caspi* の成分(1)
第33回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会
(1989.9)

* 筑波大学化学系

西 孝三郎: コルヒチン処理による寧夏枸杞 (*Lyci-
um barbarum* L.) の倍数性育種
日本生薬学会(1989.10)

野口 衛: ヒポクラテス医学とその薬剤
第18回生薬分析討論会(1989.9)

細田勝子, 野口 衛, 葵 一八*: ウコン中のクルク
ミンの TLC-デンシトメトリーによる分析
第18回生薬分析討論会(1989.9)

* 前種子島薬用植物栽培試験場

細田勝子, 野口 衛: 薬草問合せ記録を作成してみ
て
社会薬学研究会第8回全国総会(1989.9)

井本芳則, 橋本清史, 白井恵一, 常風潤一*, 細田勝
子, 野口 衛: 半夏厚朴湯の品質試験
第11回日本病院薬剤師会近畿学術大会(1990.1)

* 国保日高総合病院

所員の研究、試験および検査に関する発表を主とする「衛試例会」は、昭和26年から原則として毎月第2火曜日、第一会議室において開催されているが、平成元年度に行った演題は次のとおりである。

第315回（平成元年4月11日）

1. X線回折装置を用いる粘土性および繊維状鉱物の分析法の基礎的検討

環境衛生化学部 ○木 嶋 敬 二
齊 藤 恵美子
武 田 明 治

2. C₂ 対称を有するキラルなジオールによる不斉アセタール化

有機化学部 栗 原 正 明

3. 西洋アカネ抽出エキス中の変異原性物質について

食品添加物部 ○川 崎 洋 子
合 田 幸 広
義 平 邦 利

4. ニトロアレーン、芳香族アミンの代謝活性化に関する *Salmonella typhimurium* ニトロ還元酵素、アセチル転移酵素遺伝子のクローニングと塩基配列

変異遺伝部 ○渡 辺 雅 彦
能 美 健 彦
石 館 基

5. DC ブランド黄色綿セーターによる接触皮膚炎の原因物質の追求—1

—モルモットを用いた感作性物質の検索法ならびに強度評価—

毒 性 部 ○門 馬 純 子
療 品 部 小 嶋 茂 雄

6. DC ブランド黄色綿セーターによる接触皮膚炎の原因物質の追求—2

—抽出物の分画法、原因物質の構造決定、ならびにその由来の検討—

療 品 部 ○小 嶋 茂 雄
毒 性 部 門 馬 純 子

7. p-Tert-butylphenol formaldehyde resin による接触皮膚炎事例の検討

療 品 部 鹿 庭 正 昭

第316回（平成元年5月9日）

1. 医薬品のエピマー化、ラセミ化反応の速度論的検討

—ヒト血清アルブミンの影響—

薬 品 部 ○阿 曾 幸 男
吉 岡 澄 江

2. 毛状根培養における植物ホルモン等の影響—セイヨウアカネ

食品添加物部 ○佐 藤 恭 子
山 崎 壮

3. ラット精管単離平滑筋細胞の調製法および電気生理学的性質

薬 理 部 中 沢 憲 一

4. ラット前胃上皮細胞におけるDNA損傷の検出

(2) BHA および代謝関連化合物について

代謝生化学部 ○森 本 和 滋
有機化学部 宮 田 直 樹

5. ヘアレスラットと有毛ラットの皮膚の基本構造の違いについて

毒 性 部 ○内 藤 克 司

第317回（平成元年6月13日）

1. 生分解性高分子の分解性評価法としての GPC-LALLS システムについて

薬 品 部 ○吉 岡 澄 江
岩 木 和 夫

2. ウレタンのトキシコキネティクスの研究(1) マウスにおけるウレタンのトキシコキネティクスの研究

—体内動態とDNA結合

代謝生化学部 ○奥 平 和 穂
森 本 和 滋

3. 環境汚染物質クロルデンの神経機能に対する作用機序

薬 理 部 ○井 上 和 秀
中 沢 憲 一

4. ジクロルベンゼン類 (DCB) の肝、腎遊離細胞毒性に対する影響

薬 理 部 大 野 泰 雄

第318回（平成元年7月11日）

1. 組織培養馬鈴薯におけるアルカロイド含量の変動について

食 品 部 ○高 木 加 代 子
A. D. Powell
豊 田 正 武

2. ローゼル草中のアントシアニンについて
食品添加物部 佐藤 恭子
3. 初代培養肝細胞におけるメチルコラントレン型誘導剤の効果
薬理部 広田 晃一
4. ラット胎芽培養法の *in vitro* 催奇形試験法としての有用性(1)
サルチル酸ナトリウムの *in vitro* 胎芽の発育への影響
薬理部 中浦 慎介
5. 自己免疫疾患自然発症系 MRL/lpr マウスの好中球増多症：リンパ増殖症との関連性について
毒性部 松本 清司

第319回 (平成元年9月12日)

1. 医薬品のエピマー化，ラセミ化反応の速度論的検討
—シクロデキストリンおよびホスファチジルコリンの影響—
薬品部 ○阿曾 幸男
吉岡 澄江
2. 中国産川芎および当帰に含有される成分のラット子宮自発運動におよぼす作用
生薬部 ○馬 建平
尾崎 幸紘
原田 正敏
3. 細胞バンクの利用状況と問題点
変異遺伝部 ○水沢 博
本間 正充
片岡 英子
4. 細胞株同定のための新しいプローブDNAの検索
変異遺伝部 ○本間 正充
片岡 英子
水沢 博
5. ラット胎芽培養法の *in vitro* 催奇形性試験法としての有用性(2)
エチレンチオウレアの *in vitro* および *in vivo* 胎芽の発育への影響
薬理部 中浦 慎介

第320回 (平成元年10月17日)

1. 非酸性下におけるN-アリアル-N-ニトロソ尿素類のトランスニトロソ化
有機化学部 ○丹野 雅幸
末 吉祥子
2. 組織培養生成物の有効性の評価

—紫根および黄連を例として—

- 生薬部 尾崎 幸紘
小シンポジウム：国立衛生試験所におけるコンピュータの利用の方向
座長 中村 晃忠
1. 毒性試験におけるコンピュータ・システムの利用
毒性部 中路 幸男
2. 米国 NTP におけるコンピュータ・システム
1) 毒性試験の病理組織診断のコンピュータ化
病理部 今井田 克己
2) 毒性試験研究機関のコンピュータ化
薬理部 井上 和秀
3. 研究支援コンピュータシステムのデザイン
化学物質情報部 神沼 二真

第321回 (平成元年11月14日)

1. 市販各種ダイアライザーのガンマ線照射によって生成する4,4'-メチレンジアニリン量について
療品部 ○新谷 英晴
中村 晃忠
2. 生体内埋入によるポリウレタンフィルムの表層の変化について：
FT-IR/ATP 法による検討
療品部 ○小嶋 茂雄
伊佐間 和郎
3. 抗酸化剤 BHA の代謝および発癌機序
—その有機化学的探索 (2)—
有機化学部 宮田 直樹
4. ATP による神経系クローム PC12 からのノルエピネフリン放出機序の研究
薬理部 ○井上 和秀
中沢 憲一
藤森 観之助
5. 植物培養細胞中のオーキシンの定量
生薬部 ○鈴木 英世
原田 正敏

第322回 (平成元年12月12日)

1. 中国産川芎 *Ligusticum Chuanxiong* より得られた ligustilide 二重体の構造
生薬部 ○関田 節子
天津中葯研究院 華 偉義
2. 蛍光画像処理法による好塩基球細胞株の細胞内カルシウム動態の解析
機能生化学部 手島 玲子
3. スコポラミンに対するモノクローナルおよびポリ

クローナル抗体の調製ならびにその性質

機能生化学部 ○菊池 裕
 沢田 純一
 有機化学部 丹野 雅幸
 末 吉祥子
 筑波薬用植物栽培試験場 吉松 嘉代
 石丸 幹二
 下村 講一郎

渡辺 雅彦

能美 健彦

第 323 回 (平成 2 年 1 月 16 日)

1. 血小板および白血球における 13-Hydroxyoctadecadienoic acid の生成反応

大阪支所 食品試験部 外海 泰秀

2. ゴム製品の毒性評価法に関する研究 (第一報)

L929 寒天重層法による細胞毒性

療 品 部 ○中村 晃 忠
 五十嵐 良 明
 鹿庭 正 昭
 小嶋 茂 雄
 民生科学協会研究所 大沢 尚 美
 藤 卷 正 人

3. " (第二報)

V79 コロニー法による細胞毒性

療 品 部 ○五十嵐 良 明
 土屋 利 江
 鹿庭 正 昭
 小嶋 茂 雄
 中村 晃 忠
 民生科学協会研究所 大沢 尚 美
 藤 卷 正 人

4. " (第三報)

組織炎症反応と細胞毒性との相関

病 理 部 ○豊田 和 弘
 高橋 道 人
 療 品 部 中村 晃 忠
 五十嵐 良 明
 土屋 利 江
 鹿庭 正 昭
 小嶋 茂 雄
 民生科学協会研究所 内間 高 夫
 藤 卷 正 人

5. Urine mutagenicity analysis: The role of nitroreductase and acetyltransferase activity of the indicator bacteria strain

変異遺伝部 ○Priikko Einisto
 石 館 基

6. *Salmonella typhimurium* ニトロ還元酵素, O-アセチル転移酵素遺伝子の塩基配列および高等生物遺伝子との比較

変異遺伝部 ○渡辺 雅彦
 能美 健彦
 石 館 基

7. BHA のキノン誘導体のラット前胃 DNA 損傷作用と BHA 投与ラットにおけるキノン体の生成

代謝生化学部 ○森本 和 滋
 有機化学部 宮田 直 樹
 昭和薬大 飯尾 利 弘

第 324 回 (平成 2 年 2 月 13 日)

1. 照射香辛料の ESR による検知法の検討

食 品 部 内山 貞 夫

2. ヒトリンパ球培養を用いる小核試験

変異遺伝部 林 真

3. 骨髄の赤血球数と粒度分布測定の毒性的意義

毒 性 部 落合 敏 秋

4. 転移性遺伝因子を用いた細菌のフィンガープリンティング

衛生微生物部 松谷 佐知子

5. *Salmonella typhimurium* O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase 遺伝子のクローニング

変異遺伝部 ○羽倉 昌 志
 能美 健彦
 石 館 基

化学物質情報部 森本 和 滋

6. ステビアの組織培養によるステビオール配糖体の生産の試み

食品添加物部 山崎 壮

第 325 回 (平成 2 年 3 月 13 日)

1. TOCO: クロマトグラフィの最適化

薬 品 部 ○松田 りえ子
 療 品 部 林 謙

2. デプレニール (パーキンソン病薬) 使用者と覚せい剤使用者の識別のための分析法

薬 品 部 ○石上 暁 子
 高橋 一 徳
 中原 雄 二

3. ニトロアレーンの化学

有機化学部 福原 潔

4. HPLC によるシャンプー, リンス中の Kathon®

CG の分析

環境衛生化学部 ○齊藤 恵美子

木嶋 敬二
武田 明治

支 所 例 会

第99回 (平成元年4月24日)

1. リムルステストの制度化について
生物試験部 川崎 浩之進
2. 環境汚染物質特に有機錫による体温調整機能の障害について
生物試験部 小川 義之

第100回 (平成元年6月28日)

1. 液体クロマトグラフ法によるニコチン酸注射液中のニコチン酸の定量
薬品試験部 徳永 裕司
2. 各種食品中の過酸化水素の実態調査研究
食品試験部 伊藤 誉志男
3. コーヒー中の過酸化水素生成機構について
食品試験部 辻 澄子

第101回 (平成元年9月27日)

1. 逆浸透膜の性能評価における指標物質の検索Ⅱ
薬品試験部 村井 真美
2. Dean-Stark 蒸留法による環境底質および水中微量汚染物質の濃縮ならびに GC/MS による分析
食品試験部 長谷川 ゆかり
3. 培養細胞を用いたインシュリンの *in vitro* パイオアッセイ法の考案
生物試験部 天野 博夫

第102回 (平成元年10月24日)

1. スパンスール型徐放性製剤の *in vitro* 溶出特性評価法に関する考察
薬品試験部 小室 徹雄
2. 食品中の天然添加物であるリゾチームの蛍光分析

法の開発

- 食品試験部 柴田 正
3. A群溶血性連鎖球菌の産生する発熱性外毒素 (SPE) による大腸菌内毒素 (Endotoxin) の致死毒性増強機序について
(Ⅱ)SPE 投与によるマクロファージの Endotoxin 反応性増強効果)
生物試験部 村井 敏美

第103回 (平成元年11月27日)

1. 食品中8種殺ダニ剤の一斉分析法の設定
食品試験部 中村 優美子
2. キトサンに対する対イオンの活量係数と薬物等との相互作用について
薬品試験部 四方田 千佳子
3. 血小板および白血球における13-Hydroxyoctadecadienoic acid の生成反応
食品試験部 外海 泰秀

第104回 (平成元年1月30日)

1. 低分子量ヘパリンの活性評価法およびその標準化について (1)
薬品試験部 田中正一
2. ゴム加硫促進剤N-Cyclohexyl-2-benzothiazylsulfenamide のラットにおける催奇形試験
生物試験部 江馬 眞
3. 塩化トリブチルスズの妊娠ラットおよびその胎仔に対する影響
生物試験部 伊丹 孝文

 特別講演会

- 平成元年5月29日
「DNAの再編成と遺伝子発現への影響」について
東京理科大学基礎工学部教授
飯田 滋
meshift mutagenesis」
Centre National De La Recherche
Scientifique, France Robert P. P. Fuchs
- 平成元年6月14日
「ヒト癌遺伝子」について
国立がんセンター研究所部長
関谷 剛男
平成2年1月18日
「生物システムと情報」について
東京大学薬学部教授 清水 博
- 平成元年10月13日
「日常生活と分析化学」について
星薬科大学教授 今枝 一男
平成2年1月23日
「最近のNMR」について
東京薬科大学助教授 神藤 平三郎
- 平成元年10月26日
「ポリアミンの生体内機能に及ぼす調節機構」について
東京慈恵会医科大学教授 林 伸一
平成2年1月30日
「動物細胞における遺伝的組換え」について
東京大学医学研究所教授 池田 日出男
- 平成元年10月30日
「EGF(上皮成長因子)遺伝の発現の調節機構と生体内に対する作用」について
National Institutes of Health, Md., USA
Takami Oka
平成2年2月27日
「モルヒネ受容体」について
日本大学理工学部教授 村越 善衛
- 平成元年11月7日
「温熱による抗癌剤増強と温熱耐性」について
国立予防衛生研究所部長 水野 左敏
平成2年3月6日
「ヒト全遺伝子解析と遺伝子バンク」について
国立予防衛生研究所室長 橋本 雄之
- 平成元年11月16日
「Molecular Biology and genetic aspects of fra-
北里大学薬学部教授 梅山 秀明

 支所所内講演会

- 平成元年11月24日
腫瘍壊死因子(TNF)について
東京工業大学資源研究所 山本章博

特別研究 (厚生省)

1. 生活関連諸物質に含まれる微量有害成分の体内動態ならびに毒性発現機構に関する研究 (生薬, 環境, 食品, 有機, 代謝, 衛微, 変異, 支所食品)
Disposition and toxicological mechanism of toxic trace compounds in the environment and foodstuffs
2. 生活関連反応指標の有意差判定に関する研究 (生物, 療品, 食添, 機能, 薬理, 病理, 支所生物)
Study on *ex vivo* and *in vitro* systems for the measurement of biological effects of drugs and chemicals

国立機関原子力試験研究費 (科学技術庁)

1. 標識化合物と細胞工学的手法の利用による医薬品, 生活関連物質等のアレルギー感受性およびその安全性評価法の確立に関する基礎的研究 (生物, 療品, 機能, 代謝)
Utilization of labeled compounds and cell technology for the development of *in vitro* sensitization tests for drugs and chemicals
2. 標識化合物を利用する食品汚染物質の分析法の開発に関する研究 (食品, 食添, 機能, 衛微, 筑波)
Development of analytical methods for food contaminants by using radiolabeled compounds
3. 遺伝子組換えを利用したラジオイムノアッセイの改良に関する基礎的研究 (機能)
Study on improvement of radioimmunoassay by genetic engineering
4. 新医用高分子材料の放射線滅菌による血液適合性の変化に関する研究 (療品)
Studies on the effect of r-ray sterilization on hemocompatibility of new biomedical polymers
5. 高速液体クロマトグラフィーを適用した放射性医薬品の品質試験法の開発に関する研究 (機能)
Study on the development of assay methods of radiopharmaceuticals by high-performance liquid chromatography
6. 食品照射により誘起される物質の安全性に関する研究

Safety evaluation of products in foods formed by γ -irradiation

- (1) 照射により誘起される食品の化学的および生物学的変動に関する研究 (食品)
Study on chemical and biological variance in foods induced by γ -irradiation
- (2) 大量照射した食品成分の変異原性に関する研究 (変異)
Mutagenicity study on heavily γ -irradiated food components
- (3) 大量照射によって生成する有害物質の有機化学的解明に関する研究 (生薬)
Chemical elucidation of toxic substances generated by high dose γ -irradiation

7. タンパク質ハイブリッド形成法によるタンパク性医薬品の安全性および有効性の確保に関する研究 (生物)
Study on ensuring safety and efficacy of protein drugs by protein-hybrid formation
8. 化粧品安全性を予測する評価技術に関する研究 (環境)
Evaluation method for safety of cosmetics and quasi-drugs
9. リンパ球の分裂中期細胞集積法に関する研究 (変異)
Study of a method to accumulate metaphase in cultured human lymphocytes

放射能調査研究費 (科学技術庁)

1. 環境試料中の天然放射性核種の調査に関する研究 (環境)
Study on the determination of natural radioactive nuclides in environmental samples

科学技術振興調整費 (科学技術庁)

1. 免疫学的受容体の修飾・機能変換技術の開発
免疫調節因子受容体の修飾・機能変換技術の開発
生化学的修飾によるリンパ球の成長ホルモン受容体の機能変換に関する研究 (機能)
Study on the functional modification of growth hormone receptors of human lymphocytes by biochemical methods
2. 化学物質設計等支援のための知識ベースシステムに関する研究
毒性予測知識ベースシステムの開発 (情報)

Development of a knowledge-based system for toxicity prediction using structure-activity relationship (SAR) of chemical substances

3. トランスジェニック植物による新生理活性物質の研究(筑波)

Research on production of new biologically active compounds by transgenic plants

国立機関公害防止等試験研究費(環境庁)

1. 強毒性が予想される環境汚染物質等の培養系を用いた低用量安全性検索法の確立に関する研究(薬理)

Study in the assessment of putative potential toxicity of environmental pollutants at low dose using culture

2. 先端技術産業に係わる環境汚染物質による脳、神経機能に対する影響の評価法に関する研究(支所生物, 毒性, 薬理)

Evaluation methods for the effects of environmental pollutants on brain and neuronal functions

3. 実験動物結果からの化学物質の低濃度暴露時のヒトに対する影響を推定するための毒物動態学的研究(有機, 機能, 代謝, 変異)

Estimation of risk to humans by extrapolation from low dose animal data: Toxicokinetic studies

4. 遺伝子組換え関連微生物の安全性評価に関する研究(衛徴)

Safety assesment of microorganisms used for recombinant DNA technology

5. 先端技術産業で用いられる希土類等の生体影響の評価法に関する研究(環境, 毒性, 支所食品)

Evaluation method for biological effects of rare earth metals

6. 公共用水域における開放系使用化学物質の動態および安全性等に関する研究(環境)

Studies on the behaviours and safety assesment of environmental polluting chemicals in ambient water

7. 陸水域における環境変異原物質の動態に関する研究(環境, 支所食品)

Movement of mutagenic substances in fresh water

8. 先端技術産業に係る環境汚染物質の拡散予測とモニタリング手法の開発に関する研究(食品)

Study on the diffusion process and monitoring method of pullutants related to high technology industries

厚生科学研究費補助金(厚生省)

1. 食品中の発癌関連物質の実態の究明と安全性評価手法の確立に関する研究(副所長, 代謝, 支所食品)

Development of toxicokinetic method for safety evaluation and exposure assessment of potential carcinogens in foods

2. ヒト発がん促進要因の検出とそのリスク評価(病理)

Detection and risk evaluation of promoting factors in human cancer

3. 透析液供給システムのバリデーションに関する研究(衛徴)

Studies on validation of dialysis system

4. 難病の疾患モデル調査(変異)

Investigation of malignant disease models

5. 農産物の加工・調理による残留農薬の消長に関する研究(食品)

Study on the effect of processing and cooking on the concentration of residual pesticide in foods

6. 医薬品関連国際協力の推進ならびに改善に関する研究(薬品)

Study on promotion and improvement of international cooperation in the pharmaceutical field

7. 保健衛生上の観点から重要な医薬部外品成分の迅速分析法の開発に関する研究(環境)

Development of simple and rapid determination method for essential components of quasi-drugs

8. 医薬品生産に用いられる動物細胞に関する研究(生物)

Study on quality control of mammalian cell substrates for drug production

9. 医薬品の第1相試験のあり方に関する研究(センター長)

Research on the procedures for GCP in Japan

10. 医療用具および医療材料の毒性試験体系の確立に関する研究(センター長, 療品, 支所生物)

Study on establishing guidelines for preclinical toxicity evaluation of medical devices

- and biomaterials
11. リスクアセスメント手法等の改善と確立等に関する研究（センター長、療品、食品、代謝、情報、毒性、薬理、病理、変異）
Study on improvement of risk assessment from chemical exposure
 12. 免疫反応利用体外診断用医薬品の品質確保および臨床評価に関する研究（機能）
Studies on quality control and clinical evaluation of drugs for diagnosis by *in vitro* immunological reactions
 13. 高齢者薬物療法の総合的研究（薬品）
Study on dosage forms suitable for elderly patients
 14. 日本薬局方製剤の品質規格の設定に関する研究（薬品、支所薬品）
Study on standards of drug formulations in Japanese Pharmacopoeia
 15. 人工腎臓装置の品質確保に関する研究（衛徴）
Study on quality assurance of hemodialysis apparatus as sterile medical devices
 16. 発癌性を有する医薬品のリスクアセスメントに関する研究（病理）
Risk assessment of carcinogenic pharmaceuticals
 17. 実験動物の吸入（経気道）急性毒性試験法に関する研究（センター長、情報）
Improvement of animal test for acute inhalation toxicity
 18. フェネチルアミン類の尿中代謝産物に関する研究（薬品）
Study on urinary metabolites of phenethylamines
 19. 紫外線吸収剤の配合基準設定に関する研究（毒性）
Study on the establishment of a combination standard of UV absorbent
 20. がん末期医療の在宅ケアのための疼痛管理に用いる麻薬製剤に関する研究（薬品）
Chemical study on narcotic maintenance for cancer pain
 21. 医薬品の原料等の品質確保に関する研究（センター長、薬品、生物、生薬、有機、変異、支所長）
Study on the establishment of the quality of bulk drug substances and pharmaceutical
 22. 化粧品等に使用する色素の規格整備に関する研究（環境）
Study on the standards for colors used in cosmetics
 23. 畜水産食品の有害物質の分析法および汚染実態に関する調査研究（食品）
Study on the establishment of analytical method for toxic substances in fish and livestock products and fact-finding survey on pollution
 24. 熱帯病治療の開発研究（薬品）
Study of therapeutic medicine for tropical diseases
 25. 細菌性食中毒等防止に関する調査研究（衛徴）
Study on the surveillance system for control of bacterial food poisoning
 26. 糖尿病の合併症に関する研究（生物）
Study on diabetic complications
 27. 歯科材料の化学的・生物学的評価法のガイドライン作成に関する研究（療品、毒性）
Study on preparing guidelines for chemical and biological evaluation methods of dental materials
 28. 薬効評価データの記載フォーマットの標準化に関する研究（薬品、薬理）
Standardization of format and content of evaluation data of new drug applications
 29. 組織培養生成物の漢方処方における溶出成分等に関する研究（センター長、生薬、変異、筑波）
Constituents eluted from the Kampo medicine containing by tissue culture products
 30. 組織 DNA 医薬品の開発手法に関する研究（生物、機能）
Study on quality control and standardization of recombinant DNA drugs
 31. 新しい日米科学技術に関する研究（センター長）
Toxicology program under the US—Japan non—energy research cooperation
 32. 食品中の有害物質等の実態に関する研究（食品、食添、衛徴）
National survey of pollutants in foods
 33. バイオテクノロジー医薬品に対する生体応答の解析に関する研究（センター長、生物、毒性、病理）

Study on biological effects of biotechnologically produced medicines

34. 食品添加物一日摂取量および化学的合成品以外の食品添加物の同定・分析法等に関する研究 (食添)
Studies of daily intake of food additives, and analysis for nonchemically synthesized food additives
35. 新開発食品素材健康影響評価研究 (副所長)
Regulatory issues on newly developed food-stuffs
36. 覚せい剤検体の起源解明に関する研究 (薬品)
Chemical study on elucidation of the origin of illicit methamphetic sample
37. 食品中の残留農薬規制に関する国際比較研究 (食品)
Comparision of international residual pesticide regulation
38. 画像処理法による好塩基細胞株のカルシウム動態の解析 (機能)
Analysis of calcium signals in rat basophilic leukemia cells using a digital imaging fluorescence microscope
39. 天然添加物の分析法などに関する研究 (食添, 支所食品)
Studies on analysis of natural food additives from various foods
40. 輸入食品検査における高度検査機器利用に関する研究 (支所食品)
Utalization of high level analytical apparatus on inspections of imported foods

科学研究費補助金 (文部省)

1. コホート研究により発がん要因に関する研究 (病理)
Cohort study of modifying factors of human cancer
2. ヒト細胞の不死化に関与する遺伝子の研究 (変異)
Study on the genes involved in immortalization of human cells
3. 生物活性金属錯体の薬学的研究 (食添)
Research on the metal complexes with biological activity
4. 組織培養汚染マイコプラズマ検出用合成オリゴヌクレオチドプローブの開発と応用 (変異原)
Development of the synthetic oligonucleo-
- tides to detect contaminated mycoplasma in cultured mammalian cells
5. 発がんにおける酸素ラジカルの関与 (病理)
Effects of oxygen radicals on carcinogenesis
6. 化学物質による加齢性病変の発現に関する研究 (病理)
Induction of age related legions in rodents by chemicals
7. モルヒネ受容体の機能発現機構の研究 (機能)
Studies on the function of opiate receptors
8. コレラ菌制限酵素の遺伝子操作への応用と制限酵素産生性の感染源決定への応用 (衛徴)
Screening of restriction endonucleases and application to the epidemiology of detection of specific restriction endonucleases in *Vibrio cholerae*
9. 脱顆粒反応におけるIgE受容体のチロシン酸化の意義について (機能)
The role of tyrosine phosphorylation of IgE receptor on degranulation from rat basophilic leukemia cells

がん研究助成金 (厚生省)

1. 亜硝酸処理により生成するN-ニトロ化合物等の変異原性・がん原性物質に関する研究 (所長, 衛徴)
Studies on mutagenic or carcinogenic substances such as N-nitroso compounds produced by treatment with nitrites
2. 非変異原性発がん物質の発がん機構における活性酸素の関与に関する研究 (毒性, 食品)
Involvement of active oxygen in the carcinogenic mechanism of non-mutagenic carcinogens
3. 食品中に含まれる天然物質による消化器発がんの修飾 (病理)
Modification of gastro-intestinal carcinogenesis in animals by natural substances in foods
4. 発がん物質の規制決定に関する基礎的研究 (病理, 食添, 有機)
Basic study for regulation of environmental carcinogens
5. 発がん物質による環境汚染と生体影響の定量的解析: 水中の発がん物質の定量的解析 (環境)
Studies on quantitative analysis of carcinogenic pollutants in drinking water

6. がん情報ネットワークの構築と一次・二次予防等がん対策の評価に関する臨床疫学的研究(病理)

Establishment of an information network for clinicoepidemiological studies on primary and secondary cancer prevention

7. 複数発がん要因によるリスク評価の基礎研究(病理・変異)

Basic study for risk evaluation by multiple carcinogenic factors

食品添加物等安全性再評価費(厚生省)

1. 器具・容器包装から溶出したフェノールの測定における4-アミノアンチピリン法の応用(食添)

Application of 4-aminoantipyrine method to phenol released from plastic wares

委託事業(厚生省)

1. 乱用薬物鑑定法整備研究(薬品, 毒性)
Study on identification method of abused drugs—Hair analysis for monitoring drug abuse history

2. 向精神薬の分析法に関する研究(薬品)
Study on analytical method for psychotropic drugs

3. 発達期における薬物感受性の変化に関する行動薬理学的研究(薬理)

Behavioral pharmacological study on variation of drug sensitivity in the development stage

乱用薬物基礎研究

1. 薬物乱用, 特に多剤乱用時の依存形成能とその薬物動態ならびに生体におよぼす影響に関する研究(センター長, 毒性, 薬品, 有機, 機能)

Study on dependence, behavior and biological effects of drug abuse especially of multi-drug abuse

家庭用品等試験検査費(厚生省生活衛生局)

1. *p*-メチルベンゼンスルホメチルジイオダイドのラットに対する催奇形性試験(支所生物)

Teratology study of *p*-methylbenzenesulfomethyl diiodide in rats

2. グルタルアルデヒドのラットに対する催奇形性試験(支所生物)

Teratology study of glutaraldehyde in rats

食品等試験検査費

1. 水道水中低沸点有機ハロゲン化合物の分析方法

の開発(環境)

Establishment of analytical methods for volatile organic halides

2. 食品添加物の有効性に関する研究(食添, 支所食品)

Study on efficacy of food additives

3. 食用タール色素の製品検査法の開発に関する研究(食添, 支所食品)

Establishment and improvement of quality control methods for food colors

4. 日本人の食品添加物の一日摂取量調査に関する研究(支所食品)

Estimation of daily intake of food additives according to market basket studies in Japan

5. 食品由来成分の含有量実態調査研究(支所食品)
Investigation on some compound's content originated in various natural foods

6. 残留農薬の多成分分析法の確立(支所食品)

Establishment of systematic analytical method for multipesticide residue

7. 農作物中のポストハーベスト農薬の保存, 加工および調理における消長に関する研究(支所食品)

Direase of post-harvest pesticides contained in agricultural products after storing, manufacturing and cooking

その他

1. 水道水中の多環芳香族炭化水素の分析方法と塩素処理生成物の挙動に関する研究(環境)日本水道協会

Studies on establishment of determination methods for polyaromatic hydrocarbons and behaviour of their chlorinated products

ヒューマンサイエンス振興財団共同プロジェクト研究(長寿関連基礎科学研究事業)

1. ニューロ・トロフィック・ファクターレセプター等の分離技術および機能の解析技術の開発(機能)

Development of methods for isolation and functional analysis of neurotrophic receptors

2. ニューロ・サーキット同時多点解析法等を用いる神経栄養因子とモデュレータの機能評価法の開発(薬理)

Development of evaluating method for the effects of neurotrophic factors and modulators on neuro-circuit using a real-time multi-

- point quantitative monitoring of intracellular free calcium ion
3. ニューロ・トロフィック・ファクターによる神経細胞老化抑制に関する研究 (病理)
Inhibitory effects of neuronal aging by neurotrophic factors
 4. DNA 診断に有用な制限酵素の開発 (衛徴)
Screening of restriction endonucleases useful for DNA diagnosis
 5. 形質転換を用いた薬用植物の高度環境制御システム下での特性解析 (筑波)
The differentiation of morphological and chemical characteristics of transgenic plants cultivated under artificial systems
 6. バイオテクノロジーによる薬用植物生成物の医薬利用に関する研究 (生薬)
Study on application of substances of medicinal plants produced by biotechnology to medicines
 7. 医薬品等の有効性および安全性検索法としての培養実験系の確立とその評価に関する研究 (薬理)
Studies on the development and their evaluation of screening methods for the efficacy and safety of drugs using culture systems
 8. 変異原性試験に有用な高感受性テスト細胞の開発に関する研究 (変異)
Development of sensitive tester cells useful for mutagenicity tests
 9. 代謝試験への生理学的速度論の導入に関する研究 (代謝)
Application of physiologically based pharmacokinetic modeling for pharmacokinetics and metabolic studies
 10. 皮膚適用化学物質の生体影響評価に関する基礎研究 (環境)
Fundamental studies on evaluation for the biological effects of chemical substances applied to the skin
 11. エリスロポエチン (EPO) 等の力価試験法の標準化に関する研究 (生物)
Standardization of bioassay methods for biotechnology drugs like erythropoietins
 12. バイオテクノロジーを用いて作られる食品中の成分の安全性評価方法の開発研究 (食品)
Development of methods to assess the safety of components in foods produced through biotechnology
 13. 食品添加物等のバイオテクノロジーの利用による作出生産物の化学的評価法の開発 (食添)
Development of methods for chemical assessment of food additives produced through biotechnology
 14. 生分解性高分子を利用した放出制御機能の設計とその安全性に関する研究 (薬品)
Design of biodegradable controlled-release systems and stability study of their physico-chemical properties
 15. 高分子材料利用製剤の生物薬剤学的評価技術に関する研究 (薬品)
Biopharmaceutical evaluation of the *in vitro* and *in vivo* performance of dosage forms formulated with various type of polymer substances
 16. キトサンとその誘導体の高分子特性評価法とその製剤への利用技術の開発に関する研究 (支所薬品)
Characterization of chitosan and its derivatives and their application to drug formulations
 17. 低分子ヘパリンの抗凝血活性の評価方法およびその標準化に関する研究 (支所薬品)
Studies on standardization of evaluating method of anticoagulant activity for low molecular weight heparin
 18. タンパク質ハイブリッド形成法による酵素剤の有用化 (生物)
Development of useful enzyme for drugs by protein-hybrid formation
 19. インプラント材料の異物発癌に関する研究 (療剤)
Studies on tumor-formation by implant materials
 20. 血液と接触する膜およびその材料の安全性評価とそれらの技術の応用に関する研究 (支所生物)
Studies on safety evaluation and application of hemodialysis membranes and related materials
 21. 多形核白血球の活性酸素産生機構の解明とこれに影響をおよぼす諸因子に関する研究 (生物)
Studies on the activation mechanism of superoxide-generating system of polymorpho-

nuclear leukocytes

22. チトクローム P-450 分子種の組み合わせによるヒト薬物代謝のシミュレーションに関する研究 (薬理)
Studies on the simulation of human drug metabolism by combination of several species of cytochrome P-450s

ヒューマンサイエンス振興財団国際共同研究事業

1. 新剤形医薬品の評価試験技術の開発 (副所長, 薬品)
Development of evaluation methodology of new dosage forms
2. 薬用資源植物の確保, 開発および利用 (筑波, 生薬, 薬理)
Exploitation and utilization of medicinal plant resources in Japan and China

ヒューマンサイエンス振興財団エイズ医薬品開発推進事業

1. エイズ医薬品候補物質スクリーニング研究 (衛徴)
Preliminary screening for antiviral AIDS drugs

対がん十力年総合戦略研究事業

1. 生活環境における発がん関連物質の暴露実態の総合的把握と評価に関する研究 (食品)
Assesment of exposure of man to carcinogens and related chemical in the environment
2. 食品中の発がん関連物質の実態究明と安全性評価法の確立に関する研究 (副所長, 代謝, 支所食品, 有機, 衛徴)
Development of toxicokinetic methods for safety evaluation and exposure assesment of potential carcinogens in foods

国家検定および検査等の処理状況

Survey of the Results of National Tests

平成元年度の検定検査等の処理状況は次のとおりである。

国家検定は9月29日、「半合成ヒトイソフェニンソリン水性懸濁注射液」が国家検定品目に追加された。総処理件数では前年度に比べて2件(2.15%)の減少となった。

国家検査は、総処理件数で前年度に比べて58件(42.34%)の減少となった。

製品検査は74件(8.84%)、特別審査試験は18件(12.24%)、特別行政試験は54件(65.85%)、輸入食品検査は51件(28.33%)、それぞれ前年度より増加となり、一斉取締試験は390件(59.54%)、前年度より減少となった。

検定検査等8項目の総処理件数は下表のとおり1,878件で、前年度に比べて255件(11.95%)の減少となった。

区 分	平成元年度の処理件数					
	東 京		大 阪		合 計	
国 家 検 定	(0)	0	(91)	91	(91)	91
国 家 検 査	(0)	0	(79)	79	(79)	79
製 品 検 査	(422)	422	(489)	489	(911)	911
特 別 審 査 試 験	(220)	165	(0)	0	(220)	165
特 別 行 政 試 験	(134)	134	(2)	2	(136)	136
一 斉 取 締 試 験	(222)	222	(43)	43	(265)	265
輸 入 食 品 検 査	(179)	166	(84)	65	(263)	231
一 般 依 頼 試 験	(0)	0	(0)	0	(0)	0
合 計	(1,177)	1,109	(788)	769	(1,965)	1,878

()内数字は試験件数

国家検定およ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。

- 平成元年度国家検定品目別月別判定別件数実績表…………… 302頁
- 平成元年度国家検査品目別月別判定別件数実績表…………… 302頁
- 平成元年度製品検査月別判定別件数実績表…………… 304頁

- 平成元年度特別審査試験月別判定別件数実績表…………… 304頁
- 平成元年度輸入食品検査月別判定別件数実績表…………… 304頁
- 平成元年度特別行政試験実績表…………… 308頁
- 平成元年度一斉取締試験判定別件数実績表…………… 308頁

平成元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
ヒトインシュリン注射液	大阪	1	—	1	—	—	—	5	—	5	1	—	1	1	—	1	—	—	—
ヒトインフュンインシュリン水性懸濁注射液	大阪	3	—	3	2	—	2	3	—	3	4	—	4	2	—	2	1	—	1
半合成ヒトインスリン亜鉛水性懸濁注射液	大阪	—	—	—	4	—	4	—	—	—	1	—	1	1	—	1	2	—	2
半合成ヒト中性インスリン注射液	大阪	1	—	1	1	—	1	1	—	1	—	—	—	2	—	2	2	—	2
半合成ヒト結晶性インスリン亜鉛水性懸濁注射液	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	1	—	—	—	—	—	—
半合成ヒト二相性インフュンインスリン水性懸濁注射液	大阪	—	—	—	2	—	2	1	—	1	1	—	1	—	—	—	—	—	—
半合成ヒトインフュンインスリン水性懸濁注射液	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
計		5	—	5	9	—	9	10	—	10	8	—	8	6	—	6	5	—	5

平成元年度国家検査品目別

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	
ブドウ糖注射液	大阪	9	—	9	12	—	12	13	—	13	6	—	6	6	—	6	4	—	4	
内訳	内容量 100 ml 未満	大阪	3	—	3	4	—	4	6	—	6	1	—	1	—	—	—	2	—	2
	内容量 100 ml 以上	大阪	6	—	6	8	—	8	7	—	7	5	—	5	6	—	6	2	—	2
結晶性インシュリン亜鉛水性懸濁注射液	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
インシュリン亜鉛水性懸濁注射液	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
インフュンインシュリン水性懸濁注射液	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
インシュリン注射液	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
リングル液	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	1
計		9	—	9	12	—	12	13	—	13	6	—	6	6	—	6	5	—	5	

月別判定別件数実績表

10 月			11 月			12 月			1 月			2 月			3 月			合 計		
合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計
2	—	2	2	—	2	1	—	1	1	—	1	1	—	1	2	—	2	17	—	17
1	—	1	1	—	1	5	—	5	2	—	2	1	—	1	2	—	2	27	—	27
2	—	2	1	—	1	—	—	—	—	—	—	1	—	1	2	—	2	14	—	14
—	—	—	1	—	1	—	—	—	1	—	1	1	—	1	2	—	2	12	—	12
1	—	1	1	—	1	—	—	—	—	—	—	1	—	1	—	—	—	4	—	4
—	—	—	3	—	3	1	—	1	1	—	1	1	—	1	1	—	1	11	—	11
—	—	—	—	—	—	2	—	2	3	—	3	1	—	1	—	—	—	6	—	6
6	—	6	9	—	9	9	—	9	8	—	8	7	—	7	9	—	9	91	—	91

月別判定別件数実績表

10 月			11 月			12 月			1 月			2 月			3 月			合 計		
合 格	不 合 格	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
8	—	8	4	—	4	5	—	5	—	—	—	1	—	1	3	—	3	71	—	71
3	—	3	—	—	—	4	—	4	—	—	—	—	—	—	2	—	2	25	—	25
5	—	5	4	—	4	1	—	1	—	—	—	1	—	1	1	—	1	46	—	46
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	1	1	—	1	2	—	2
—	—	—	1	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	1	2	—	2
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	—	2	2	—	2
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	1	1	—	1
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	1
8	—	8	5	—	5	5	—	5	—	—	—	2	—	2	8	—	8	79	—	79

平成元年度輸入食品検査

区 分	4 月				5 月				6 月				7 月				8 月				9 月				
	合格	不合格	無判定	計	合格	不合格	無判定	計	合格	不合格	無判定	計	合格	不合格	無判定	計	合格	不合格	無判定	計	合格	不合格	無判定	計	
添 加 物	東京	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	1	—	—	—	
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	—	—	—	2	—	—	
酒 精 飲 料	東京	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	
飲 酒 精 原 料	東京	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
清 涼 飲 料	東京	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
そ の 他 の 料 飲	東京	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
器 具 容 器 包 装 お も ち ゃ	東京	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
上 記 い ず れ に も 属 さ な い も の	東京	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
東 京	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	1	1	—	—	—	1	1	—	1
大 阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	6	6	—	—	2	2	—	—	10	10	
合 計	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	6	7	1	—	2	3	1	—	10	11	

平成元年度特別行政試験実績表

局(部) 課(室)	品(項) 目	件数	担 当 部
薬務局 監視指導課	1. 輸液製剤の試験について	2	支所生物試験部
	2. 医薬品の試験について	5	薬品部
	3. 医薬品等の試験について	10	衛生微生物部
麻薬課	1. 鳥羽玉の試験について	6	薬品部
	2. 輸入生あへんのモルヒネ含有率試験について	52	薬品部
生活衛生局 食品保健課	1. ぶどう中のシアン化合物測定方法の設定等に係る試験検査について	15	食品部
	2. 菓子中の亜硝酸ナトリウムの測定等に係る試験について	31	食品添加物部
	3. 中国産キノコ缶詰のエンテロトキシン試験について	3	衛生微生物部
食品化学課	農薬B T剤に関する検査について	12	衛生微生物部
合 計		136	東 京 134件 大 阪 2件

平成元年度一斉取締試験判定別件数実績表

区 分	合 格	不 合 格	無 判 定	計
東 京	205	10	7	222
大 阪	43	0	0	43
合 計	248	10	7	265

国立衛生試験所標準品

Reference Standards Prepared by National
Institute of Hygienic Sciences

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

(平成2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入り 1本	15,500	・アスコルビン酸散、同注射液の定量法
2	安息香酸エストラジオール	50mg入り 1本	12,000	・安息香酸エストラジオールの純度試験、同注射液、同水性懸濁注射液の確認試験および定量法
3	インスリン	20mg入り 1本	22,900	・インスリン、インスリン注射液、インスリン亜鉛水性懸濁注射液、結晶性インスリン亜鉛水性懸濁注射液、無晶性インスリン亜鉛水性懸濁注射液、プロタミンインスリン亜鉛水性懸濁注射液、イソフェンインスリン水性懸濁注射液および中性インスリン注射液の定量法、イソフェンインスリン水性懸濁注射液の純度試験
4	エルゴカルシフェロール	100mg入り 1本	14,100	・エルゴカルシフェロールの確認試験および定量法
5	塩酸チアミン	1g入り 1本	14,700	・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
6	塩酸ピリドキシソ	200mg入り 1本	18,400	・塩酸ピリドキシソ注射液の定量法
7	エンドトキシソ	2 μ g入り 1本	13,900	・注射用水のエンドトキシソ試験
8	含糖ベプシン	5g入り 1本	14,900	・含糖ベプシンのたん白消化力試験
9	吉草酸ベタメタゾン	100mg入り 1本	14,400	・吉草酸ベタメタゾンの確認試験および定量法
10	ジゴキシソ	20mg入り 1本	11,900	・ジゴキシソ、同錠、同注射液の純度試験
11	血清性性腺刺激ホルモン	1,000単位 1本入り	28,400	・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
12	コハク酸トコフェロール	150mg入り 1本	12,900	・コハク酸トコフェロールカルシウムの定量法
13	コハク酸ヒドロコルチゾン	100mg入り 1本	14,400	・コハク酸ヒドロコルチゾンの確認試験および定量法、同ナトリウムの定量法
14	コレカルシフェロール	100mg入り 1本	14,100	・コレカルシフェロールの確認試験および定量法
15	酢酸コルチゾン	100mg入り 1本	11,500	・酢酸コルチゾンの確認試験および定量法 同水性懸濁注射液の確認試験
16	酢酸トコフェロール	150mg入り 1本	12,900	・酢酸トコフェロールの確認試験および定量法
17	酢酸ヒドロコルチゾン	100mg入り 1本	12,500	・酢酸ヒドロコルチゾンの確認試験および定量法、同水性懸濁注射液の確認試験および定量法
18	酢酸プレドニゾン	100mg入り 1本	12,300	酢酸プレドニゾンの確認試験および定量法、プレドニゾンの純度試験
19	シアノコバラミン	200mg入り 1本	11,800	・シアノコバラミン、同注射液の定量法、酢酸ヒドロキシコバラミンの純度試験および定量法
20	ジギタリス	1g入り 1本	12,100	・ジギタリス、同末の定量法
21	ジギトキシソ	50mg入り 1本	11,800	・ジギトキシソの確認試験および定量法、同錠の溶出試験、含量均一性試験および定量法
22	ジゴキシソ	50mg入り 1本	11,600	・ジゴキシソの確認試験および定量法、同錠の溶出試験、含量均一性試験および定量法、同注射液の定量法
23	酒石酸水素エビネフリン	50mg入り 1本	10,200	・エビネフリン、ノルエビネフリン、同注射液の純度試験
24	酒石酸水素ノルエビネフリン	50mg入り 1本	11,400	・エビネフリン、ノルエビネフリンの純度試験、同注射液の純度試験および定量法

日本薬局方標準品

	標準品名	包装単位	価格	使用目的
25	G-ストロファンチン	100mg入り 1本	12,500 ^円	・G-ストロファンチンの定量法, 同注射液の確認試験および定量法
26	胎盤性性腺刺激ホルモン	1,000単位 1本入り	26,800	・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
27	チロジン	500mg入り 1本	10,100	・パンクレアチンのたん白消化力試験
28	デキサメタゾン	100mg入り 1本	12,300	・デキサメタゾンの確認試験および定量法
29	デスラノシド	100mg入り 1本	12,900	・デスラノシドの純度試験および定量法, 同注射液の確認試験および定量法
30	トコフェロール	150mg入り 1本	12,900	・トコフェロールの確認試験および定量法, コハク酸トコフェロールカルシウムおよび酢酸トコフェロールの純度試験
31	トリアムシノロン	100mg入り 1本	12,300	・トリアムシノロンの確認試験および定量法
32	トリアムシノロンアセトニド	100mg入り 1本	12,300	・トリアムシノロンアセトニドの確認試験および定量法
33	トロンビン	500単位入り 2本	29,500	・トロンビンの定量法
34	ニコチン酸	500mg入り 1本	12,200	・ニコチン酸注射液の定量法
35	ニコチン酸アミド	500mg入り 1本	13,000	・ニコチン酸アミド注射液の定量法
36	脳下垂体後葉	20mg入り 2本	11,300	・オキントシン注射液, パソプレシン注射液の純度試験および定量法
37	薄層クロマトグラフ用酢酸レチノール	10,000単位入り 10カプセル	3,400	・酢酸レチノールおよびバルミチン酸レチノールの確認試験, ビタミンA油, 同カプセルの定量法
38	薄層クロマトグラフ用バルミチン酸レチノール	10,000単位入り 10カプセル	3,300	・酢酸レチノールおよびバルミチン酸レチノールの確認試験, ビタミンA油, 同カプセルの定量法
39	パラアミノベンゾイルグルタミン酸	500mg入り 1本	20,400	・葉酸の純度試験
40	ヒドロクロロチアジド	100mg入り 1本	11,300	・ヒドロクロロチアジドの定量法
41	ヒドロコルチゾン	100mg入り 1本	12,300	・ヒドロコルチゾンの確認試験および定量法, プレドニゾロンの純度試験
42	フルオシノロンアセトニド	50mg入り 1本	11,900	・フルオシノロンアセトニドの定量法
43	プレドニゾン	100mg入り 1本	11,900	・プレドニゾロンの確認試験, 同錠の確認試験, 溶出試験および含量均一性試験
44	プロゲステロン	50mg入り 1本	11,700	・プロゲステロンの確認試験
45	ベタメタゾン	100mg入り 1本	12,300	・ベタメタゾンの確認試験および定量法
46	ヘパリンナトリウム	1,200単位 1本入り	20,300	・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
47	マレイン酸エルゴメトリン	50mg入り 1本	13,000	・マレイン酸エルゴメトリンの純度試験および定量法, 同錠の含量均一性試験および定量法, 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および定量法
48	メトトレキサート	200mg入り 1本	18,500	・メトトレキサートの確認試験および定量法
49	葉酸	500mg入り 1本	13,600	・葉酸, 同錠, 同注射液の定量法
50	ラナトシドC	100mg入り 1本	12,200	・ラナトシドCの純度試験および定量法, 同錠の確認試験, 溶出試験, 含量均一性試験および定量法
51	リボフラビン	200mg入り 1本	15,400	・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
52	硫酸プロタミン	100mg入り 1本	20,000	・イソフェインスリン水性懸濁注射液の純度試験
53	レセルピン	50mg入り 1本	21,800	・レセルピン, 同散, 同錠, 同注射液の定量法, 同錠の溶出試験および含量均一性試験

国立衛生試験所標準品（医薬品等試験用標準品）：局方外医薬品

（平成2年4月1日現在）

	標準品名	包装単位	価格	使用目的
			円	
1	ウロキナーゼ	1,000単位 1本入り	15,400	・ウロキナーゼ原液およびその製剤の定量法
2	エストラジオール	50mg入り 1本	12,000	・エストラジオールおよびその製剤の純度試験
3	エストリオール	100mg入り 1本	10,400	・エストリオールおよびその製剤の定量法
4	エストロン	50mg入り 1本	12,000	・エストロンおよびその製剤の確認試験および定量法
5	塩酸チアミン液	1mg入り 10本	8,500	・チアミンおよびその製剤の定量法
6	カリジノゲナーゼ	100単位 1本入り	13,500	・カリジノゲナーゼおよびその製剤の生物活性試験並びに定量法
7	吉草酸ジフルコルトロン	100mg入り 1本	10,700	・吉草酸ジフルコルトロンおよびその製剤の定量法
8	酢酸クロルマジノン	100mg入り 1本	11,400	・酢酸クロルマジノンおよびその製剤の確認試験および定量法
9	酢酸デキサメタゾン	100mg入り 1本	15,600	・酢酸デキサメタゾンおよびその製剤の定量法
10	ヒアルロニダーゼ	500mg入り 1本	14,300	・注射用ヒアルロニダーゼの定量法
11	フルオシノニド	100mg入り 1本	14,400	・フルオシノニドおよびその製剤の確認試験および定量法
12	フルオロメトロン	100mg入り 1本	15,600	・フルオロメトロンおよびその製剤の定量法
13	フルドロキシコルチド	100mg入り 1本	15,600	・フルドロキシコルチドおよびその製剤の定量法
14	プロビオン酸テストステロン	50mg入り 1本	11,500	・プロビオン酸テストステロンおよびその製剤の定量法
15	プロビオン酸ベクロメタゾン	100mg入り 1本	15,600	・プロビオン酸ベクロメタゾンおよびその製剤の定量法
16	メストラノール	100mg入り 1本	11,100	・メストラノールおよびその製剤の定量法
17	メチルジゴキシン	50mg入り 1本	10,100	・メチルジゴキシンおよびその製剤の確認試験及び定量法
18	融点測定用 アセトアリニド, 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入り 6本	35,700	・融点測定用温度計, 同装置の補正
19	酪酸ヒドロコルチゾン	100mg入り 1本	15,600	・酪酸ヒドロコルチゾンおよびその製剤の定量法
20	リゾチーム	500mg入り 1本	19,500	・リゾチーム製品の定量法
21	リン酸デキサメタゾンナトリウム	100mg入り 1本	11,100	・リン酸デキサメタゾンナトリウムおよびその製剤の定量法
22	リン酸ヒスタミン	50mg入り 1本	9,600	・ヒスタミン試験
23	リン酸ヒドロコルチゾンナトリウム	100mg入り 1本	10,300	・リン酸ヒドロコルチゾンナトリウムおよびその製剤の定量法
24	リン酸プレドニゾンナトリウム	100mg入り 1本	10,300	・リン酸プレドニゾンナトリウムおよびその製剤の定量法
25	リン酸ベタメタゾンナトリウム	100mg入り 1本	11,400	・リン酸ベタメタゾンナトリウムおよびその製剤の定量法
26	ルチン	500mg入り 1本	11,100	・ルチン製品の定量法

国立衛生試験所標準品（色素試験用標準品）

（平成2年4月1日現在）

	標準品名	包装単位	価格	使用目的
1	アシッドバイオレット6B	1g入り 1本	2,900	円 ・医薬品、化粧品および製剤中のアシッドバイオレット6Bの確認試験
2	アシッドレッド	1g入り 1本	3,100	・食品、医薬品、化粧品および製剤中のアシッドレッドの確認試験
3	アゾルビンエキストラ	1g入り 1本	2,700	・粘膜以外医薬品、化粧品および製剤中のアゾルビンエキストラの確認試験
4	アマランス	1g入り 1本	2,600	・食品、医薬品、化粧品および製剤中のアマランスの確認試験
5	インジゴ	1g入り 1本	2,800	・外用医薬品、化粧品および製剤中のインジゴの確認試験
6	インジゴカルミン	1g入り 1本	2,600	・食品、医薬品、化粧品および製剤中のインジゴカルミンの確認試験
7	エオン	1g入り 1本	2,700	・医薬品、化粧品および製剤中のエオンの確認試験
8	エリスロシン	1g入り 1本	2,800	・食品、医薬品、化粧品および製剤中のエリスロシンの確認試験
9	オイルエロー AB	1g入り 1本	2,500	・粘膜以外医薬品、化粧品および製剤中のオイルエロー ABの確認試験
10	オイルエロー OB	1g入り 1本	2,500	・粘膜以外医薬品、化粧品および製剤中のオイルエロー OBの確認試験
11	オイルオレンジ SS	1g入り 1本	2,500	・粘膜以外医薬品、化粧品および製剤中のオイルオレンジ SSの確認試験
12	オイルレッド XO	1g入り 1本	2,400	・粘膜以外医薬品、化粧品および製剤中のオイルレッド XOの確認試験
13	オレンジ I	1g入り 1本	2,600	・粘膜以外医薬品、化粧品および製剤中のオレンジ Iの確認試験
14	オレンジ II	1g入り 1本	2,600	・外用医薬品、化粧品および製剤中のオレンジ IIの確認試験
15	ギネアグリーン B	1g入り 1本	2,900	・粘膜以外医薬品、化粧品および製剤中のギネアグリーン Bの確認試験
16	サンセットエロー FCF	1g入り 1本	2,600	・食品、医薬品、化粧品および製剤中のサンセットエロー FCFの確認試験
17	タートラジン	1g入り 1本	2,600	・食品、医薬品、化粧品および製剤中のタートラジンの確認試験
18	テトラクロルテトラブromフルオレセイン	1g入り 1本	2,700	・外用医薬品、化粧品および製剤中のテトラクロルテトラブromフルオレセインの確認試験
19	テトラブromフルオレセイン	1g入り 1本	2,900	・外用医薬品、化粧品および製剤中のテトラブromフルオレセインの確認試験
20	トルイジンレッド	1g入り 1本	2,400	・外用医薬品、化粧品および製剤中のトルイジンレッドの確認試験
21	ナフトールエロー S	1g入り 1本	2,700	・粘膜以外医薬品、化粧品および製剤中のナフトールエローの確認試験
22	ニューコクシン	1g入り 1本	2,600	・食品、医薬品、化粧品および製剤中のニューコクシンの確認試験
23	パーマメントオレンジ	1g入り 1本	2,400	・外用医薬品、化粧品および製剤中のパーマメントオレンジの確認試験
24	ハンサエロー	1g入り 1本	2,400	・外用医薬品、化粧品および製剤中のハンサエローの確認試験
25	ファストグリーン FCF	1g入り 1本	3,700	・食品、医薬品、化粧品および製剤中のファストグリーン FCFの確認試験
26	ファストレッド S	1g入り 1本	3,100	・粘膜以外医薬品、化粧品および製剤中のファストレッド Sの確認試験

国立衛生試験所標準品（色素試験用標準品）

（平成2年4月1日現在）

	標準品名	包装単位	価格	使用目的
27	ブリリアントブルーFCF	1g入り 1本	2,800 ^円	・食品、医薬品、化粧品および製剤中のブリリアントブルーFCFの確認試験
28	フルオレセイン	1g入り 1本	2,700	・外用医薬品、化粧品および製剤中のフルオレセインの確認試験
29	フロキシシン	1g入り 1本	2,700	・食品、医薬品、化粧品および製剤中のフロキシシンの確認試験
30	ボンソーR	1g入り 1本	2,700	・粘膜以外医薬品、化粧品および製剤中のボンソーRの確認試験
31	ボンソーSX	1g入り 1本	2,700	・粘膜以外医薬品、化粧品および製剤中のボンソーSXの確認試験
32	ボンソー3R	1g入り 1本	2,800	・粘膜以外医薬品、化粧品および製剤中のボンソー3Rの確認試験
33	リソールルピンBCA	1g入り 1本	2,800	・外用医薬品、化粧品および製剤中のリソールルピンBCAの確認試験
34	レーキレッドC	1g入り 1本	2,800	・外用医薬品、化粧品および製剤中のレーキレッドCの確認試験
35	レーキレッドCBA	1g入り 1本	2,900	・外用医薬品、化粧品および製剤中のレーキレッドCBAの確認試験
36	レーキレッドDBA	1g入り 1本	2,900	・外用医薬品、化粧品および製剤中のレーキレッドDBAの確認試験
37	ローズベンガル	1g入り 1本	2,700	・食品、医薬品、化粧品および製剤中のローズベンガルの確認試験

平成元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	年度末 在庫数量	備考
	個	個	個	個	個	
アスコルビン酸	147	250	235	2	160	
安息香酸エストラジオール	15	0	0	0	15	
インスリン	120	100	35	9	176	
ウロキナーゼ	38	300	224	10	104	
エストラジオール	28	0	16	0	12	
エストリオール	0	0	0	0	0	
エストロン	39	0	1	0	38	
エルゴカルシフェロール	22	118	126	0	14	
塩酸チアミン	84	285	252	0	117	
塩酸チアミン液	54	40	18	50	26	
塩酸ピリドキシン	152	300	355	1	96	
エンドトキシン	59	687	683	0	63	
カリジノゲナーゼ	117	100	164	5	48	
含糖ペプシン	51	50	31	0	70	
吉草酸ジフルコルトロン	48	0	0	0	48	
吉草酸ベタメタゾン	50	50	34	0	66	
ギトキシン	10	45	13	0	42	
血清性性腺刺激ホルモン	62	0	55	0	7	
コハク酸トコフェロール	48	50	43	0	55	
コハク酸ヒドロコルチゾン	26	0	14	0	12	
コレカルシフェロール	8	197	122	0	83	
酢酸クロルマジノン	0	51	0	0	51	
酢酸コルチゾン	67	0	4	0	63	
酢酸デキサメタゾン	48	0	0	0	48	
酢酸トコフェロール	132	450	551	1	30	
酢酸ヒドロコルチゾン	36	70	63	0	43	
酢酸プレドニゾン	47	0	31	0	16	
シアノコバラミン	121	288	281	4	124	
ジギタリス	16	0	0	1	15	
ジギトキシン	49	0	17	0	32	
ジゴキシン	29	0	20	0	9	
酒石酸水素エピネフリン	64	0	29	0	35	
酒石酸水素ノルエピネフリン	15	0	5	0	10	
G-ストロファンチン	26	0	0	0	26	
胎盤性性腺刺激ホルモン	5	238	153	0	90	
チロジン	60	200	148	0	112	
デキサメタゾン	59	0	41	1	17	
デスラノシド	66	0	13	0	53	
トコフェロール	86	200	249	0	37	
トリアムシノロン	35	0	3	0	32	
トリアムシノロンアセトニド	17	50	16	0	51	
トロンビン	13	100	83	0	30	
ニコチン酸	26	50	12	0	64	
ニコチン酸アミド	52	250	176	0	126	

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	
脳下垂体後葉	29	0	17	0	12	
薄層クロマトグラフ用酢酸レチノール	105	0	25	0	80	
薄層クロマトグラフ用パルミチン酸レチノール	117	0	64	0	53	
パラアミノベンゾイルグルタミン酸	39	0	14	0	25	
ヒアルロニダーゼ	14	0	1	0	13	
ヒドロクロチアジド	32	0	7	0	25	
ヒドロコルチゾン	77	0	43	0	34	
フルオシノニド	28	0	3	0	25	
フルオシノロンアセトニド	9	60	49	0	20	
フルオロメトロン	48	0	0	0	48	
フルドロキシコルチド	50	0	0	0	50	
ブレドニゾロン	7	100	68	0	39	
プロゲステロン	30	0	1	0	29	
プロピオン酸テストステロン	21	0	1	0	20	
プロピオン酸ベクロメタゾン	48	0	3	0	45	
ベタメタゾン	62	0	13	0	49	
ヘパリンナトリウム	43	100	67	0	76	
マレイン酸エルゴメトリン	89	0	16	0	73	
メストラノール	0	50	0	0	50	
メチルジゴキシン	0	50	0	0	50	
メトトレキサート	32	0	2	0	30	
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)	26	40	35	0	31	
葉酸	11	150	101	0	60	
酪酸ヒドロコルチゾン	50	0	0	7	43	
ラナトシドC	61	0	15	0	46	
リゾチーム	154	200	265	1	88	
リボフラビン	161	324	400	1	84	
硫酸プロタミン	46	0	8	3	35	
リン酸デキサメタゾンナトリウム	0	50	0	0	50	
リン酸ヒスタミン	73	0	15	0	58	
リン酸ヒドロコルチゾンナトリウム	0	50	0	0	50	
リン酸ブレドニゾロンナトリウム	0	50	0	0	50	
リン酸ベタメタゾンナトリウム	0	50	0	0	50	
ルチン	25	0	9	0	16	
レセルピン	8	30	15	0	23	
計	3,742	5,823	5,573	96	3,896	

(色素試験用標準品)

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	
アシッドバイオレット6B	73	0	1	0	72	
アシッドレッド	0	0	0	0	0	
アゾルビンエキストラ	83	0	0	0	83	
アマランス	457	0	4	1	452	
インジゴ	130	0	1	0	129	
インジゴカルミン	0	0	0	0	0	
エオシン	115	0	0	0	115	
エリスロシン	0	0	0	0	0	
オイルエローAB	217	0	0	0	217	
オイルエローOB	227	0	0	0	227	
オイルオレンジSS	223	0	0	0	223	
オイルレッドXO	202	0	0	1	201	
オレンジI	273	0	0	0	273	
オレンジII	154	0	0	0	154	
ギネアグリーンB	67	0	0	0	67	
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	149	0	0	0	149	
テトラブROMフルオレセイン	110	0	0	0	110	
トルイジンレッド	76	0	0	0	76	
ナフトールエローS	141	0	0	0	141	
ニューコクシン	0	0	0	0	0	
パーマネントオレンジ	28	0	0	0	28	
ハンサエロー	73	0	1	0	72	
ファストグリーンFCF	16	0	4	1	11	
ファストレッドS	196	0	0	0	196	
ブリリアントブルーFCF	0	0	0	0	0	
フルオレセイン	187	0	0	0	187	
フロキシシン	342	0	4	5	333	
ボンソーR	246	0	0	0	246	
ボンソーSX	147	0	1	0	146	
ボンソー3R	155	0	0	0	155	
リゾールルビンBCA	360	0	1	0	359	
レーキレッドC	384	0	0	0	384	
レーキレッドCBA	120	0	1	0	119	
レーキレッドDBA	159	0	0	0	159	
ローズベンガル	0	0	0	0	0	
計	5,110	0	18	8	5,084	

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。そのほか誌上发表、単行本、行政報告、学会発表、業務報告、総説などを収載する。
 - 報文：独創性に富み、新知見を含むまとまった研究業績。
 - ノート：断片的な研究業績で、独創性や新知見が認められるもの。
 - 資料：試験、製造または調査などで、記録しておく必要のあるもの。
 - 誌上发表：衛生試験所報告以外の専門誌に発表したもの。
 - 単行本：単独または共同で執筆し、公刊されたもの。
 - 行政報告：行政の依頼により実施し、報告書を提出したもの。
 - 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）およ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：所員の調査また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. 用紙および枚数の制限：衛生試験所所定の原稿用紙、あるいはB5判ワープロ用紙（20字×20行）を用い、原則として下記の規定に従う。なお、全文を英語で書く場合には、A4判の用紙を用いる。
 - 報文：図表を含めて20枚以内。
 - ノートおよび資料：図表を含めて15枚以内。
 - 誌上发表：1題目について1枚程度。（2枚にわたる場合はページを入れる）
 - 業務報告：各部およ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などでとじ、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、定められた原稿の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および分類を決定する。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、新送りがなの、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。ただし用語例に関しては「衛生試験所報告記載の手引」による。止むを得ぬ学術用語以外は常用漢字を用いる。原稿は楷書ペン書きまたはワードプロセッサ書きにする。なお、全文を英語で書いてもよい。その場合には、タイプライターを用い、10ピッチダブルスペースで打つこと。
 2. 学術用語：学会の慣例に従う。文中では物質はその名称を記し、化学式は用いない。例えば塩酸と書き、HCl としない。また、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、物性などの単位および定数の記号または略号は、次に掲げるものを用いる。

メートル	m	度(セルシウス)	°C	parts per billion	ppb
マイクロメートル	μm	ケルビン度	K	モル濃度	M
ナノメートル	nm	ベクレル	Bq	規定濃度	N
(mμ を用いない)		カウント毎分	cpm	旋光度	α
オングストローム	Å	(cps は用いない)		吸光度	A
平方メートル	m ²	グレイ	Gy	水素イオン指数	pH
アール	a	シーベルト	Sv	pK 値	pK
リットル	l	クーロン/キログラム	C/kg	ミハエリス定数	K _m
(L を用いない)		サイクル	cycle	R _f 値	R _f
ミリリットル	ml	回毎分	rpm	保持時間	t _R
(cc を用いない)		ヘルツ	Hz	50%致死量	LD ₅₀
マイクロリットル	μl	キャンデラ	cd	50%有効量	ED ₅₀
(λ を用いない)		ルクス	lx	経口投与	p. o.
立方メートル	m ³	ダイン	dyn	静脈投与	i. v.
グラム	g	気 圧	atm	腹腔投与	i. p.
マイクログラム	μg	ト ル	Torr	皮下投与	s. c.
(γ を用いない)		水銀柱ミリメートル	mmHg	筋肉投与	i. m.
時	hr	毎センチメートル	cm ⁻¹	標準偏差	S. D.
分	min	(カイザー)		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(dec.)		
アンペア	A	沸 点	bp	紫外吸収	UV
ボルト	V	凝固点	fp	赤外吸収	IR
オーム	Ω	比 重	d	核磁気共鳴	NMR
ガウス	G	屈折率	n	電子スピン共鳴	ESR
エルステッド	Oe	重量パーセント	%	旋光分散	ORD
ジュール	J	容量/重量パーセント	v/w%	円偏光二色性	CD
カロリー	cal	parts per million	ppm	マススペクトル	MS

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：文字の下に赤で次のように記す。

ゴ ッ ク 体~~~~~	例：見出しなど	試薬
イ タ リ ッ ク 体———	例：学名など	<u>Papaver somniferum</u> L.
スモールキャピタル=====	例：著者名など	<u>L-ascorbic acid</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。なお、所外の共著者の所属は著者名の右肩に*（複数のときは*1,*2...）のように記して脚注とする。

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, Ichiro Seta and Kyoko Azuna

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、また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。

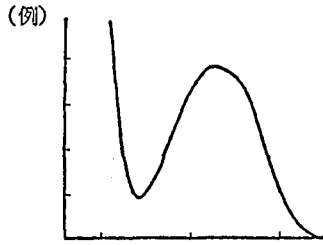
7・5 文 献：本文の引用箇所右肩に^{3), 2,5), 1-4)}のように記し、終わりに文献として引用順に書く。

雑誌名は Chemical Abstracts およ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せず、編者名や出版地も記載する。

例：衛生試験「投稿執筆規定の改定について」を参照して下さい。

7・6 図 表：図また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）に黒インクまたはすみで書き、図中の数字、記号または説明などの文字は入れない（原図）。写真は印画紙に鮮明にプリントしたものを使用すること。その他の点は図の規定に従う。別に原図のコピーをとり、図中の数字、記号または説明などの文字はタイプで打ち、原図とともに提出する。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。



(原図)

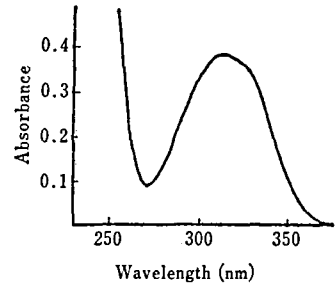


Fig. 2. Ultraviolet spectrum of material for "Ergometrine Maleate Reference Standard" (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (コピーにタイプ)

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。表中の項目に関する注は項目の右肩に^{a), b), ……}のように記して示す。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

図およ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。また、電子顕微鏡写真には希望する縮尺を記入する。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、ならびに図、表のそれぞれの枚数を記し、原稿の最後にとじる。

8. 誌上発売等の記載要領：誌上発表、単行本、行政報告、学会発表については、別に定める記載要領および例示に従う。

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

平成 2 年度 図書編集委員

内山 充	高 仲 正	神 沼 二 真
伊豆津 健 一	新 見 伸 吾	関 田 節 子
新 谷 英 晴	佐々木 久美子	村 山 三 徳
武 田 由比子	栗 原 正 明	手 島 玲 子
高 橋 昭 江	宇田川 俊 一	長谷川 隆 一
小野田 欽 一	今井田 克 己	能 美 健 彦
伊 丹 孝 文	下 村 講一郎	遠 山 中 夫
二野宮 総 子		

衛生試験所報告 第108号

平成 2 年 11 月 25 日 印 刷
平成 2 年 11 月 30 日 発 行

発行所 国立衛生試験所化学物質情報部
東京都世田谷区上用賀 1 丁目 18 番 1 号

印刷所 サンコー印刷株式会社
東京都文京区小石川 2-25-12-903