

ISSN 0077-4715
CODEN: ESKHA 5

衛生試験所報告

第 109 号

平成 3 年

BULLETIN
OF
NATIONAL INSTITUTE OF
HYGIENIC SCIENCES

No.109 1991

国立衛生試験所

衛生試験所
Eisei Shikenjo Hokoku

衛生試験所報告

第 109 号

平成 3 年

**BULLETIN
OF
NATIONAL INSTITUTE OF
HYGIENIC SCIENCES**

No. 109 1991

Published by
National Institute of Hygienic Sciences
Tokyo, Japan

国立衛生試験所

目 次

総 説	
食品照射の現状とその検知法に関する国際的動向	内山貞夫・斎藤行生…… 1
報 文	
毒性情報検索の方法論—食品添加物の例から—	関沢 純・橋場茂子……11
Tris(2-chloroethyl)phosphate (TCEP) の雌マウスにおける経皮慢性毒性/発癌性試験	高田幸一・吉本浜子・安原加寿雄・門馬純子・会田喜崇・ 斎藤 実・黒川雄二・戸部満寿夫……18
Bis(2,3-dibromopropyl)phosphate Magnesium のラットによる急性および亜急性毒性試験	高田幸一・内藤克司・会田喜崇・門馬純子・吉本浜子・ 中路幸男・黒川雄二・戸部満寿夫……25
ラット腎遊離細胞への有機陰イオンの取り込み機構	大野泰雄・西山憲子・川西 徹・高仲 正……32
2,2'-Isobutylidene-bis(4,6-dimethylphenol) のラットにおける催奇形性に関する研究	石井浩之・宇佐見誠・川島邦夫・高仲 正……37
F344 ラットにおける <i>p</i> -phenetidine の 28 日間反復投与毒性試験	佐藤元信・古川文夫・川西 徹・豊田和弘・今沢孝喜・鈴木順子・高橋道人……42
Stevioside の F344 ラットを用いた亜慢性毒性試験	阿瀬善也・豊田和弘・今井田克己・林 修次・今沢孝喜・林 裕造・高橋道人……48
ラット肝二段階発がんモデルにおけるフェノバルビタールの用量相関について	小野寺博志・松島裕子・畝山智香子・渋谷 淳・三森国敏・前川昭彦・林 裕造……55
Cyanoguanidine の F344 ラットにおける亜慢性毒性試験	松島裕子・小野寺博志・小笠原裕之・北浦敬介・三森国敏・前川昭彦・高橋道人……61
WBN/Kob ラット精巣の萎縮性病変における電顕ランタン・トレーサー法による血液—精巣関門 の検索	今沢孝喜・佐藤元信・古川文夫・篠田和俊・吉村博之・豊田和弘・高橋道人……67
F344 ラットにおける <i>m</i> -nitroaniline の 28 日間反復経口投与毒性試験	吉田順一・小野寺博志・松島裕子・渋谷 淳・前川昭彦・古田京子・高橋道人……72
ノ ー ト	
Stability of Vitamin B ₁ in a Commercial Multivitamin Syrup Preparation	Edwin J. Villeza, Yukio Aso, Sumie Yoshioka, Yasushi Takeda……81
陰イオン界面活性剤を対象とした環境保健クライテリアの作成—文献情報の更新と執筆体制 の再編成	森本和滋・加納直子・神沼二眞……83
EHC の第 1 次ドラフトへのコメント提供業務に関する若干の改善	森本和滋・逸見雅貴子・神沼二眞……88
グルタルアルデヒドのラットにおける急性毒性—若齢動物と老齢動物の比較—	大野圭子・安原加寿雄・川崎 靖・中路幸男・黒川雄二……92
資 料	
市販国内産きのこ中の放射性セシウムに関する調査	河村葉子・内山貞夫・斎藤行生……98
グレープフルーツ中のチアベンダゾール (TBZ) の分析	山田 隆・武田由比子・川崎洋子・山本 都・山崎 壮・ 義平邦利・鈴木 隆・斎藤行生……100
Migration and Material Tests of Some Food-Contact Plastic Wares Made in Thailand	Phawanat Smerasta・Pongtip Srivburuang・Nongyow Tongtan・ Hajimu Ishiwata・Kunitoshi Yoshihara……105
エイズ医薬品候補スクリーニング研究 II, 1989 年度報告	

.....野呂新一・佐藤七七朗・桜田教夫・藤田宣哉・石崎 徹・神村紀子・吉田幸雄・ 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・森下高行・小林慎一・ 三宅恭司・石原佑弐・磯村恩无・斉藤隆行・小田和正・松崎 稔・ 関根大正・大貫奈穂美・貞升健志・藪内 清・三木 隆・三瀬勝利・ 牛島広治・清水博之・大野田秀樹・北村 敬・徳永 徹.....107	
1990年度EHC第1次ドラフトの要約.....森本和滋・神沼二真.....110	
<i>In vitro</i> での過酸化水素による8-hydroxy-deoxyguanosine生成に対するL-ヒスチジンの増強作用高木篤也・佐井君江・長谷川隆一・黒川雄二.....113	
必須元素のラット臓器内濃度に関する研究(第2報)肺・肝臓・腎臓・脾臓について鈴木幸子・小川幸男・広瀬明彦・金子豊蔵・黒川雄二.....115	
OECD反復投与毒性および生殖発生毒性併合試験法(Repro Tox)の有用性に関する研究戸部満寿夫・田中 悟・川島邦夫・内藤克司・中路幸男・今井田克己・ 宇佐見 誠・内田雄幸・鎌田栄一・児玉幸夫・高田幸一・安原加寿雄・ 斎藤 実・梅村隆志・小野寺博志・古川文夫・古田京子・松島裕子・ 豊田和弘・今沢孝喜・高橋道人・高仲 正・黒川雄二・林 裕造.....119	
国立衛生試験所コレカルシフェロール標準品(Control 901)笥 華子・小松裕明・田中正一・村井真美・石光 進・岡田敏史.....136	
国立衛生試験所エルゴカルシフェロール標準品(Control 901)笥 華子・小松裕明・村井真美・石光 進・岡田敏史.....139	
国立衛生試験所酢酸ブレドニゾロン標準品(Control 901)笥 華子・小松裕明・村井真美・石光 進・岡田敏史.....142	
国立衛生試験所フルオシノロンアセトニド標準品(Control 901)笥 華子・村井真美・小松裕明・石光 進・岡田敏史.....145	
国立衛生試験所ジクロフェナミド標準品(Control 891)岡田敏史・泉 若江・村井真美・小松裕明・石光 進.....148	
国立衛生試験所エピチオスタノール標準品(Control 891)岡田敏史・泉 若江・村井真美・小松裕明・石光 進.....151	
国立衛生試験所メトキサレン標準品(Control 901)村井真美・笥 華子・小松裕明・石光 進・岡田敏史.....154	
国立衛生試験所インドシアニングリーン標準品(Control 901)村井真美・笥 華子・小松裕明・石光 進・岡田敏史.....157	
国立衛生試験所トルナフタート標準品(Control 901)村井真美・笥 華子・小松裕明・石光 進・岡田敏史.....159	
国立衛生試験所薄層クロマトグラフ用酢酸レチノール標準品(Control 901)および 薄層クロマトグラフ用バルミチン酸レチノール標準品(Control 901)村井真美・笥 華子・小松裕明・石光 進・岡田敏史.....162	
国立衛生試験所マレイン酸メチルエルゴメトリン標準品(Control 891)村井真美・笥 華子・小松裕明・石光 進・岡田敏史.....165	
国立衛生試験所シクランデラート標準品(Control 901)笥 華子・村井真美・小松裕明・石光 進・岡田敏史.....168	
国立衛生試験所ショ糖オクタ硫酸エステルカリウム標準品(Control 901)村井真美・笥 華子・小松裕明・石光 進・岡田敏史.....171	
国立衛生試験所リポフラビン標準品(Control 891)村井真美・笥 華子・小松裕明・石光 進・岡田敏史.....173	

国立衛生試験所 <i>d</i> -カンフル標準品 (Control 901) および <i>dl</i> -カンフル標準品 (Control 901)	
.....村井真美・寛 華子・小松裕明・石光 進・岡田敏史.....	176
平成 2 年度における食用タール色素製品検査より算出した生産量	
.....柴田 正・木村実加・川本礼子・柿内 雅・辻 澄子・伊藤誉志男.....	178
国立衛生試験所標準品 (色素標準品) エリスロシン標準品について	
.....辻 澄子・柿内 雅・川本礼子・木村実加・柴田 正・伊藤誉志男.....	181
国立衛生試験所標準品 (色素標準品) プリリアントブルー FCF 標準品について	
.....辻 澄子・柿内 雅・川本礼子・木村実加・柴田 正・伊藤誉志男.....	183
国立衛生試験所標準品 (色素標準品) タートラジン標準品について	
.....川本礼子・柿内 雅・木村実加・辻 澄子・柴田 正・伊藤誉志男.....	184
国立衛生試験所標準品 (色素標準品) アルラレッド AC 標準品について	
.....木村実加・柿内 雅・川本礼子・辻 澄子・柴田 正・伊藤誉志男.....	186
業務報告	189
特別研究報告	235
誌上発表	281
単行本	341
行政報告	346
学会発表	353
衛試験例会	378
平成 2 年度に行った主な研究課題	384
国家検定および検査等の処理状況	391
国立衛生試験所標準品	399
衛生試験所報告第 109 号キーワード索引	408

CONTENTS

Review	
Sadao Uchiyama, Yukio Saito: Recent World-Wide Advances in Irradiation of Food and Its Identification	1
Originals	
Jun Sekizawa, Shigeko Hasiba: A Study on Toxicological Information Search-An Example from a Study on Food Additives-	11
Koichi Takada, Hamako Yoshimoto, Kazuo Yasuhara, Junko Momma, Yoshitaka Aida, Minoru Saito, Yuji Kurokawa and Masuo Tobe: Combined Chronic Toxicity/Carcinogenicity Test of Tris(2-chloroethyl)phosphate (TCEP) Applied to Female Mouse Skin	18
Koichi Takada, Katsushi Naito, Yoshitaka Aida, Junko Momma, Hamako Yoshimoto, Yukio Nakaji, Yuji Kurokawa and Masuo Tobe: Acute and Subacute Toxicity Studies of Bis(2, 3-dibromopropyl)phosphate Magnesium in Rat	25
Yasuo Ohno, Noriko Nishiyama, Toru Kawanishi, Akira Takanaka: Studies on the Uptake of 8-Anilino-1-naphthalene Sulfonate by Rat Freshly Isolated Renal Cells	32
Hiroyuki Ishii, Makoto Usami, Kunio Kawashima, Akira Takanaka: Studies on the Teratogenic Potential of 2, 2'-Isobutylidene-bis(4,6-dimethylphenol) in Rats	37
Motonobu Sato, Fumio Furukawa, Toru Kawanishi, Kazuhiro Toyoda, Takayoshi Imazawa, Jyunko Suzuki, Michihito Takahashi: Twenty-eight-day repeated dose toxicity test of <i>p</i> -phenetidine in F344 rats	42
Yoshiya Aze, Kazuhiro Toyoda, Katsumi Imaida, Shuji Hayashi, Takayoshi Imazawa, Yuzo Hayashi, Michihito Takahashi: Subchronic Oral Toxicity Study of Stevioside in F344 Rats	48
Hiroshi Onodera, Yuko Matsushima, Chikako Uneyama, Makoto Shibutani, Kunitoshi Mitsumori, Akihiko Maekawa, Yuzo Hayashi: Dose-response relationship of promotion by phenobarbital in rat two-stage hepatocarcinogenesis	55
Yuko Matsushima, Hiroshi Onodera, Hiroyuki Ogasawara, Keisuke Kitaura, Kunitoshi Mitsumori, Akihiko Maekawa, Michihito Takahashi: Subchronic Oral Toxicity Study of Cyanoguanidine in F344 Rats	61
Takayoshi Imazawa, Motonobu Sato, Fumio Furukawa, Kazutoshi Shinoda, Hiroyuki Yoshimura, Kazuhiro Toyoda and Michihito Takahashi: Ultrastructural Study of the Blood-Testis Barrier in Rat by the Lanthanum Method	67
Junichi Yosida, Hiroshi Onodera, Yuko Matsushima, Makoto Shibutani, Akihiko Maekawa, Kyoko Furuta, Michihito Takahashi: Twenty-eight Day Repeated Dose Toxicity Test of <i>m</i> -Nitroaniline in F344 Rats	72
Notes	
Edwin J. Villeza, Yukio Aso, Sumie Yoshioka, Yasushi Takeda: Stability of Vitamin B ₁ in a Commercial Multivitamin Syrup Preparation	81
Kazushige Morimoto, Naoko Kanoh, Tsuguchika Kaminuma: Up-dating the References for Environmental Health Criteria for Anionic Surfactants and Preparation of Its First Draft	83
Kazushige Morimoto, Akiko Hemmi, Tsuguchika Kaminuma: Some Improvements of Giving of Comments on the First Drafts of the EHC Monographs	88
Keiko Ohno, Kazuo Yasuhara, Yasushi Kawasaki, Yukio Nakaji, Yuji Kurokawa: Comparative	

Studies on Acute Toxicity of Glutaraldehyde Using Young and Old Rats	92
Technical Data	
Yoko Kawamura, Sadao Uchiyama, Yukio Saito: Survey of Radiocesium in Domestic Mushrooms on the Market	98
Takashi Yamada, Yuiko Takeda, Yoko Kawasaki, Miyako Yamamoto, Takeshi Yamazaki, Kunitoshi Yoshihira, Takashi Suzuki, Yukio Saito: Determination of Thiabendazole(TBZ) in Grapefruit	100
Phawanat Smerasta, Pongtip Srivburuang, Nongyow Tongtan, Hajimu Ishiwata, Kunitoshi Yoshihira: Migration and Material Tests of Some Food-Contact Plastic Wares Made in Thailand	105
Shinichi Noro, Nanao Sato, Norio Sakurada, Nobuya Fujita, Tohru Ishizaki, Noriko Kamimura, Yukio Yoshida, Tetsuro Ono, Nobuya Ohtomo, Yoshio Matsuda, Masako Matsuyama, Kyoko Akiyoshi, Tohru Ohtake, Haruyo Mori, Motoko Morimoto, Noboru Ueba, Nobuharu Kunita, Takayuki Morishita, Shinichi Kobayashi, Takashi Miyake, Yuichi Ishiwara, Sin Isomura, Takayuki Saito, Kazumasa Oda, Minoru Matsuzaki, Hiriomasa Sekine, Nahomi Ohnuki, Kenji Sadamasu, Kiyoshi Yabuuchi, Takashi Miki, Katsutoshi Mise, Hiroshi Ushijima, Hiroyuki Shimizu, Hideki Ohnoda, Takashi Kitamura, Tohru Tokunaga: Preliminary Screening for Antiviral AIDS Drugs II. Report on fiscal year 1989.....	107
Kazushige Morimoto, Tsuguchika Kaminuma: Summaries on the First Draft of the EHC Monographs in 1990.....	110
Atsuya Takagi, Kimie Sai, Ryuichi Hasegawa, Yuji Kurokawa: Enhancing Effect of L-Histidine on the Formation of 8-Hydroxy-deoxyguanosine Induced by Hydrogen Peroxide <i>in vitro</i>	113
Sachiko Suzuki, Yukio Ogawa, Akihiko Hirose, Toyozo Kaneko and Yuji Kurokawa: Study on Essential Metal Concentration in the Organs of Rats (Report 2) -lung·liver·kindney·spleen-	115
Masuo Tobe, Satoru Tanaka, Kunio Kawashima, Katsushi Naito, Yukio Nakaji, Katsumi Imaida, Makoto Usami, Osayuki Uchida, Eiichi Kamata, Yukio Kodama, Koichi Takada, Kazuo Yasuhara, Minoru Saito, Takashi Umemura, Hiroshi Onodera, Fumio Furukawa, Kyoko Furuta, Yuko Matsushima, Kazuhiro Toyoda, Takayoshi Imazawa. Michihito Takahashi, Akira Takanaka, Yuji Kurokawa, Yuzo Hayashi: A Study on the Usefulness of the OECD Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test(Repro Tox)	119
Hanako Kakehi, Hiroaki Komatsu, Masakazu Tanaka, Mami Murai, Susumu Ishimitsu, Satoshi Okada: Cholecalciferol Reference Standard (Control 901) of the National Institute of Hygienic Sciences.....	136
Hanako Kakehi, Hiroaki Komatsu, Mami Murai, Susumu Ishimitsu, Satoshi Okada: Ergocalciferol Reference Standard (Control 901) of the National Institute of Hygienic Sciences.....	139
Hanako Kakehi, Hiroaki Komatsu, Mami Murai, Susumu Ishimitsu, Satoshi Okada: Prednisolone Acetate Reference Standard (Control 901) of the National Institute of Hygienic Sciences	142

Hanako Kakehi, Mami Murai, Hiroaki Komatsu, Susumu Ishimitsu and Satoshi Okada: Fluocinolone Acetonide Reference Standard (Control 901) of the National Institute of Hygienic Sciences	145
Satoshi Okada, Wakae Izumi, Mami Murai, Hiroaki Komatsu, Susumu Ishimitsu: Diclofenamide Reference Standard (Control 891) of National Institute of Hygienic Sciences.....	148
Satoshi Okada, Wakae Izumi, Mami Murai, Hiroaki Komatsu, Susumu Ishimitsu: Epiteostanol Reference Standard (Control 891) of National Institute of Hygienic Sciences.....	151
Mami Murai, Hanako Kakehi, Hiroaki Komatsu, Susumu Ishimitsu, Satoshi Okada: Methoxalene Reference Standard (Control 901) of National Institute of Hygienic Sciences.....	154
Mami Murai, Hanako Kakehi, Hiroaki Komatsu, Susumu Ishimitsu, Satoshi Okada: Indocyanine Green Reference Standard (Control 901) of National Institute of Hygienic Sciences.....	157
Mami Murai, Hanako Kakehi, Hiroaki Komatsu, Susumu Ishimitsu, Satoshi Okada: Tolnaftate Reference Standard (Control 901) of National Institute of Hygienic Sciences.....	159
Mami Murai, Hanako Kakehi, Hiroaki Komatsu, Susumu Ishimitsu, Satoshi Okada: Retinol Acetate Reference Standard for Thin-Layer Chromatography (Control 901) and Retinol Palmitate Reference Standard for Thin-Layer Chromatography (Control 901) of National Institute of Hygienic Sciences.....	162
Mami Murai, Hanako Kakehi, Hiroaki Komatsu, Susumu Ishimitsu, Satoshi Okada: Methylethylergometrine Maleate Reference Standard (Control 891) of National Institute of Hygienic Sciences	165
Hanako Kakehi, Mami Murai, Hiroaki Komatsu, Susumu Ishimitsu, Satoshi Okada: Cyclandelate Reference Standard (Control 901) of National Institute of Hygienic Sciences.....	168
Mami Murai, Hanako Kakehi, Hiroaki Komatsu, Susumu Ishimitsu, Satoshi Okada: Potassium Sucrose Octa Sulfate Reference Standard (Control 901) of National Institute of Hygienic Sciences	171
Mami Murai, Hanako Kakehi, Hiroaki Komatsu, Susumu Ishimitsu, Satoshi Okada: Riboflavin Reference Standard (Control 891) of National Institute of Hygienic Sciences	173
Mami Murai, Hanako Kakehi, Hiroaki Komatsu, Susumu Ishimitsu, Satoshi Okada: <i>d</i> -Camphor Reference Standard (Control 901) and <i>dl</i> -Camphor Reference Standard (Control 901) of National Institute of Hygienic Sciences.....	176
Tadashi Shibata, Mika Kimura, Reiko Kawamoto, Masa Kakiuchi, Sumiko Tsuji, Yoshio Ito: Estimated production by the Official Inspection of Coal-Tar Dyes (including Dye Aluminum Lakes) in 1990 Based on Official Inspection Figures	178
Sumiko Tsuji, Masa Kakiuchi, Reiko Kawamoto, Mika Kimura, Tadashi Shibata, Yoshio Ito: Studies on "Erythrosine Standard", Dye Standards of National Institute of Hygienic Sciences	181
Sumiko Tsuji, Masa Kakiuchi, Reiko Kawamoto, Mika Kimura, Tadashi Shibata,	

Yoshio Ito: Studies on "Brilliant Blue FCF Standard", Dye Standards of National Institute of Hygienic Sciences	183
Reiko Kawamoto, Masa Kakiuchi, Mika Kimura, Sumiko Tsuji, Tadashi Shibata, Yoshio Ito: Studies on "Tartrazine Standard", Dye Standards of National Institute of Hygienic Sciences	184
Mika Kimura, Masa Kakiuchi, Reiko Kawamoto, Sumiko Tsuji, Tadashi Shibata, Yoshio Ito: Studies on "Allura Red AC Standard", Dye Standards of National Institute of Hygienic Sciences	186
Annual Reports of Divisions	189
Report of Collaborative Study	235
Summaries of Papers Published in Other Journals	281
Title of Scientific Books	341
Scientific Reports to Governmental Agencies	346
Titles of Speeches at Scientific Meetings Seminars	353
Seminars	378
Main Research Projects Carried Out in Fiscal Year 1990	384
Survey of the Results of National Tests	391
Reference Standards Prepared by National Institute of Hygienic Sciences	399
Subject Index	408

食品照射の現状とその検知法に関する国際的動向

内山 貞夫・斎藤 行生

Recent World-Wide Advances in Irradiation of Food and Its Identification

Sadao Uchiyama, Yukio Saito

Irradiation (ionizing radiation) of various foods is growing in popularity internationally. For example, it is used as a substitute for the use of post-harvest pesticides. This trend has served to intensify research on the identification of irradiated foods. The first Research Co-ordinated Meeting on Analytical Detection Method for Irradiated Foods was held in Poland under the sponsorship of FAO/IAEA in 1990 in order to solve problems related to the international trade of irradiated foods and to ensure their correct labelling in the market. In this review, the world-wide advances in the irradiation of food and its identification are introduced and discussed.

Key words : 照射食品, 照射食品の検知法, ESR 法, 熱発光法, 化学発光法

(Received May 31, 1991)

I. はじめに

現在, 農薬を使用しないと収穫後の食品のほぼ 20%が病虫害により損失を蒙るといふ。

食品の保存のため, 古来, 様々な方法が利用されてきた。すなわち, 天日乾燥, 発酵, 加熱, 冷蔵, 化学物質の利用などである。しかしどの方法にも利点と欠点があり, 一つの方法ですべての食品の保存に有効ではあり得ない。そこで, 食品の保存のためには多種の手段が存在することが望ましい。

近年, 食品の品質をそこなわずに長い期間保存するために食品に放射線を照射する国がふえているといふ。我が国ではジャガイモの発芽防止のためのみ 0.15 kGy の照射を認めている。

食品照射に関しては, 特にその安全性について長い研究の歴史があるが, 国際的な現状はどうか WHO(世界保健機関)/FAO(国連食糧産業機関)/IAEA(国際原子力機関)の資料¹⁾による解説ならびに照射食品の検知法に関する国際的動向について述べる。

II. 食品照射の現状

食品に照射する放射線としては, γ 線, X線, 加速電子線などがあるが, これらを食品に照射する場合の最も大きな問題は, 照射することにより食品中に新たに誘導放射能を生ずるかどうかという点であ

る。しかしこの問題は, 発生源のエネルギーレベルを低くすることにより解決した。次に問題となるのは, 照射による食品成分の変化である。生化学的, 化学的变化が起こる。

牛乳や酪農製品に 0.1 kGy の照射をすることにより, 風味が失われる。牛肉に高線量照射するとやはり風味が失われるが, 豚肉の場合には影響が少ない。牛肉の場合でも -30° では 50 kGy の照射をうけても風味の悪化はなかったが, 牛肉を空気にさらしながら 1.5 kGy の照射を行うと褐色に変色する。

食品照射は, 殺菌, 殺虫, 果実などの熟度の調節などの目的のために行われるが, その他の影響として豆をやわらかくする作用もあり調理時間の短縮になる。また, 照射食品の安全性については WHO²⁾によると 10 kGy 以下の吸収線量の場合には問題なしとされている。そこで, 本稿では, 栄養成分および微生物に対する食品照射の影響について述べることとする。

1. 栄養成分の変化

1 kGy 以下では栄養成分の変化はほとんど問題ないとされている。1~10 kGy ではある種のビタミンが破壊される。10~50 kGy では, 低温でしかも空気を遮断して照射することによりビタミンの損失を防ぐことができる。

リボフラビン, ナイアシンおよびビタミン D は照射に対して比較的安定である。

ビタミン A, B, E および K は容易に照射により破壊される。果実や野菜中のビタミン C はあい矛盾する試験成績が得られている。

最近豚肉中のチアミンについての試験成績が発表された²⁾。

それによると照射線量とチアミン分解量とは反応相関があり、照射後調理を行うことによりさらにチアミンの減少が観察された (図1 参照)。

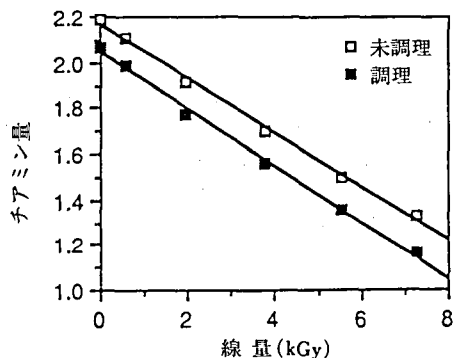


Fig. 1. 照射豚肉と照射後調理 (真空包装した豚肉を 100°C の熱湯中に 30 分間放置) した豚肉中のチアミン量 (R. K. Jenkins ら²⁾ より引用)

2. 微生物に対する影響

微生物, 特にサルモネラのようなグラム陰性菌に

対しては殺菌効果が高い。芽胞は高線量でないと殺菌されない。したがってボツリヌス中毒は照射では防ぎようがない。また、照射により一般公衆の健康をそこなうような制御不能の危険な細菌が突然変異により発生したりする危険性はないのかが問題となりくり返し確認のための研究がなされてきた。現在のところそのようなデータはなくむしろ照射をうけた菌は弱くなり調理により容易に死滅するようである。

1961年ブルッセルにおいて食品照射に関する会議が開かれて以来、FAO/IAEA および WHO 合同専門家会議がしばしば開催され、その結果、現在にいたるまで、食品照射について表1に示す勧告を行っている。

現在、35ヶ国が、全体として約30食品に照射を行っている。表2, 3にEC諸国および、日本近隣諸国における照射食品許可品目ならびに最大吸収線量を示した。表4に食品照射における有効必要線量と目的の関係を示した。

以上のように、食品に照射を行うことにより、食品中の成分に変化を生ずる。

これらの変化のうち好ましからざる変化は、放射線の利用に工夫をこらすことにより解決が試みられている。

新しい方法の導入にはいくらか慎重になってもなりすぎることはない。使用へ向けてさらに大きく一步を踏み出すにしても、まず必要なことは、照射食品

表 1. 国際機関による勧告

委員会	照射対象食品	目的	暫定 or 非暫定	線量 (kGy)	承認年月日
FAO/IAEA/WHO 専門家委員会 (1969)	ジャガイモ	発芽防止	暫定	0.15 max	1969. 4.12
	小麦, 小麦製品	昆虫駆除	"	0.75 max	1969. 4.12
FAO/IAEA/WHO 専門家委員会 (1976)	ジャガイモ	発芽防止		0.03~0.15	1976. 9. 7
	玉ネギ,	発芽防止	暫定	0.02~0.15	1976. 9. 7
	パパイヤ	昆虫駆除		0.5~1	1976. 9. 7
	イチゴ	保存期間延伸		1~3	1976. 9. 7
	小麦, 小麦製品			0.15~1	1976. 9. 7
	米	保存期間延伸, 殺菌	暫定	0.1~1	1976. 9. 7
FAO/IAEA/WHO 専門家委員会 (1980)	鳥肉 (チキン)	保存期間延伸, 殺菌	暫定	2~7	1976. 9. 7
	全食品	発芽防止, 保存期間延伸 殺菌, 昆虫駆除, 熟度調節		~10	1980.11. 3

表 2. E C 諸国の照射食品の許可状況

IAEA 1990-05-15

国名	許可品目数 ^{a)} Provisional/ Unconditional	許可品目中の最大吸収線量 (kGy) (最大吸収線量の品目)
フランス	13	11.0 (香辛料)
イタリア	3	0.15 (ジャガイモ, 玉ネギ, ニンニク)
オランダ	7 ^{b)}	25.0 ^{b)} (病人用冷凍食)
ベルギー	11	10.0 (香辛料)
デンマーク	1	15.0 (香辛料)
スペイン	2	0.15 (ジャガイモ)
ドイツ	0	
イギリス	7 ^{c)}	10.0 (香辛料)
ルクセンブルグ	0	
アイルランド	0	
ギリシャ	0	
ポルトガル	0	

a) : IAEA 資料の記載品目数による。ただし、実験用および市場テスト用は除く。

b) : Temporary, 1991 まで。

c) : 1991/1/1 および 1991/2/13 より。

表 3. 日本近隣諸国の照射食品の許可状況

(IAEA 1990-05-15 より)

国名	許可品目数 ^{a)} Provisional/ Unconditional	許可品目中の最大吸収線量 (kGy) (最大吸収線量の品目)
日本	1	0.15(ジャガイモ)
韓国	6	10.0 (香辛料)
中国	8	8.0 (ソーセージ)
台湾	6	30.0 (香辛料)
フィリッピン	3	0.15(ジャガイモ)
インドネシア	3	10.0 (香辛料)
ベトナム	3	0.15(ジャガイモ)
タイ	16	10.0 (玉ネギ)
ソ連	5	1.0 (乾燥果実)
アメリカ	8	30.0 (香辛料, 乾燥野菜)
オーストラリア	0	
ニュージーランド	0	

a) : IAEA 資料の記載品目数による。ただし、実験用および市場テスト用は除く。

の検知法を確立すること、食品に照射を行った場合の変化を的確に把握し、安全性に絶えず心がけること、および照射食品に関する国際的な情報の交換であろう。

IIIではそのような観点より最近の検知法開発の動向を概観することとする。

III. 検知法開発の背景、現状および今後

食品保存技術の一つとしてのイオン化放射線照射に関する問題点の一つは検知法に関するものである。食品照射に利用されるイオン化放射線としては、 γ 線、X線、加速電子線などがある。これらを食品に

表 4. 有効必要線量と目的

目 的	線量 (kGy)	食 品
低線量 (~1 kGy)		
(a) 発芽防止	0.05~0.15	ジャガイモ, 玉ネギ, ニンニク, ショウガ等
(b) 昆虫駆除, 寄生虫駆除	0.15~0.50	穀類, 豆類, 果実及び干果実, 乾燥魚肉豚肉等
(c) 熟度調節	0.50~1.0	果物, 野菜等
中線量 (1~10 kGy)		
(a) 保存期間延伸	1.0~3.0	魚, イチゴ等
(b) 腐敗防止, 病原菌殺菌	1.0~7.0	海産物 (生, 冷凍), 家禽・畜肉 (生, 冷凍) 等
(c) 食品加工過程の改良	2.0~7.0	グレープ (ジュース量増大), 乾燥野菜 (調理時間短縮) 等
高線量 (10~50 kGy)*		
(a) 工業滅菌 (加温)	30~50	家禽・畜肉, 海産物, 調理食品, 減病院食
(b) 食品添加物及び食品の除菌	10~50	香辛料, 酵素, 天然ガム等

* 特別の目的のために利用されるが FAO/WHO 食品企画委員会は, 未だ高線量照射を認めていない。

照射する場合の発生源は

- (1) γ 線は ^{60}Co あるいは ^{137}Cs (最大エネルギーは, 1.33 MeV 以下),
- (2) X線; 機械線源利用の場合 5 MeV 以下,
- (3) 電子線; 機械線源利用の場合 10 MeV 以下, と規定している¹⁾。この照射エネルギーレベルでは誘導放射能の発生はあり得ない, しかし食品中に化学的あるいは生化学的変化は起こる。この微小の変化を指標にして, 現在, 世界各国で照射食品の検知法に関する研究が盛んに行われている。以下に, 国立衛生試験所で開発された方法も加えて, 照射食品の検知法開発に関する国際的現状と今後について解説を加えたい。

1. 背 景²⁾

食品がイオン化放射線による照射 (以降照射と記す) をうけたかどうかを判定する検知法が必要とされ長い間研究がつけられてきたが, 大きな成果は得られなかった。それにもかかわらず, 検知法の開発に関する世界的な要望はますます強くなっている。その主な理由の一つとして, 食品照射の許可条件が国により異なるために生ずる貿易上の問題を解決する手段の一つとして検知法が必要である点が挙げられる。

検知法は永年開発が難しいものとされてきたが, 最近の技術進歩に伴い極めて有力な検知法が次々と報告されている。このような背景のもとに FAO/IAEA は, 1990年1月から5年間, 国際的な検知法の確立に向けて『照射食品の検知法に関する調整研究計画 (The Co-ordinated Research Program

on Analytical Detection Methods for Irradiation Treatment of Food: ADMIT)』を開始した (当所, 食品部も参加)。

本稿では, この計画の第1回会議『照射食品の検知法に関する研究調整会議, ポーランド, Jachranka, 1990-06-25~29』⁴⁾で討議された検知法についての紹介と, なかでも有力視されている ESR 法と熱・化学発光法を中心に述べることにする。なお, その他の検知法も幾つかあるが, 過去の総説を参照していただきたい^{5,6)}。

2. 第1回照射食品の検知法に関する研究調整会議

『照射食品の検知法に関する研究調整会議』で討議された検知法は, 今日報告されている有力な検知法のほとんどが網羅されており, 物理学的方法, 化学的方法および生物学的方法の3部門に大別された。さらに, 各部門は, 以下のように分類された。

1) 物理学的方法

- a) ESR 法; b) 化学発光法; c) 熱発光法;
- d) インピーダンス法; e) 粘度法; f) 分光近赤外法

2) 化学的方法

- a) *o*-チロシン法; b) 脂肪-揮発性炭化水素法; c) 脂肪-揮発性シクロブタン法; d) DNA 法; e) その他の方法

3) 生物学的方法

- a) 微生物学的方法; b) 胚培養法

この会議で話し合われた検知法の理想的原則とは, 技術的原則として, 識別性, 特異性, 応用性, 安定

性、強靱性、独立性、再現性、正確性、感度、線量依存性が優れていることであり、実用的原則として、簡易性、安価、少量の試料量、操作の迅速性、広範な対象食品、非破壊測定、容易な標準化と等級化、信頼性の点で優れていることである。さらに本計画では、定性的な検知法の開発を定量的検知法の開発より優先させ、定量的検知法が最終目標であることを確認した。また、照射の有無判定は、独立した複数の検知法によって行われることが望ましいとされた。

3. 物理学的方法

食品の照射は、細胞膜の変化やラジカル生成に由来するさまざまな物理的变化を伴うことが考えられる。これらの変化を物理的指標として検知法に利用した。これらの方法のうち、ESR 法および熱・化学発光法は後に詳しく述べることにして、先に他の物理学的方法を紹介する。

インピーダンス法^{7,9)}：照射によって生体膜の変化またはイオン透過性の変化が著しく促されるので、この変化を電気的に測定して検知法に利用した。この方法は照射ジャガイモの検知法に利用されている。操作は簡単で、ジャガイモに電極を挿入し、異なる周波数、例えば 50 および 5 kHz の電流を流して各々のインピーダンスを求め、両インピーダンスの比から照射の有無を測定する。照射後保存期間 6 ヶ月まで有効であり、吸収線量 0.06~0.15 kGy までの照射ジャガイモを検知できるとされている。

粘度法^{9,10)}：照射食品のホモジネートまたはその懸濁液の粘度変化を検知法に利用した。照射によって食品の細胞膜の透過性と細胞中の高分子が変化し、粘度変化を来す。この方法は香辛料について最もよく検討されており、3~5 kGy の線量で照射されたものが検知されるとしているが、食品の種類によって粘度変化が異なり、明確性に欠けるので、今後の研究成果に待たねばならない。

分光-近赤外法¹¹⁾：照射食品の近赤外反射分析であり、照射コショウおよびパプリカの検知法として研究されている。しかし、現段階では基礎的検討の段階であり、照射食品の実用検知法としてはさらに検討する必要がある。

3.1 ESR 法

ESR 法 (電子スピン共鳴法)^{12,13)} は、照射食品中のフリーラジカルを測定する方法であり、非破壊分析である。照射によって食品に生じるラジカルは、乾燥した固形成分や高分子成分の中で安定化し、一般的に言われるラジカルの寿命に比べて長期間安定

なラジカルとして ESR 測定によって検出される。測定法は ESR 操作以外は簡単であり、通常は乾燥状態の試料 (必要に応じて粉末状態) 50~500 mg を石英製の ESR 測定セルに挿入し、測定する。

ESR 測定によって得られるラジカルのシグナルのうち、加工過程や保存中に受ける加熱や光照射によって生ずるシグナルではなく、照射特有のシグナルを検知法に利用することが望まれる。適用食品は香辛料 (図 2, 当食品部で開発した方法)、乾燥野菜、種子、乾燥果実、骨付きの畜肉およびトリ肉、骨付き魚、殻付き貝である。照射特有のシグナルによる検知法が提案されているが、果実や穀物に対する低線量照射では適用不可能と思われる。骨付きトリ肉の検出下限は 50 Gy であるが、殻付き貝ではさらに低い。今後は生物学的変動 (Biological variability) のバラツキの検討をすべきであろう。

未知の吸収線量を定量的に求める唯一の方法として、照射骨付き肉の線量付加法 (Dose additional method) がある。照射によって骨組織のようなカルシウム含有量の高い部分にラジカルが生じ、乾燥状態で結晶状のマトリックス (Hydroxyapatite など) に安定ラジカルが捕捉される。このラジカルは照射以外の処理によっては生成せず、長期間安定であり、このことが定量分析への応用を可能としている。試料の調製は、まず骨から骨髓を取り除き、脱水乾燥した骨を粉末化し、その一定量 (100~200 mg 程度) の ESR 測定を行う。照射特有のシグナ

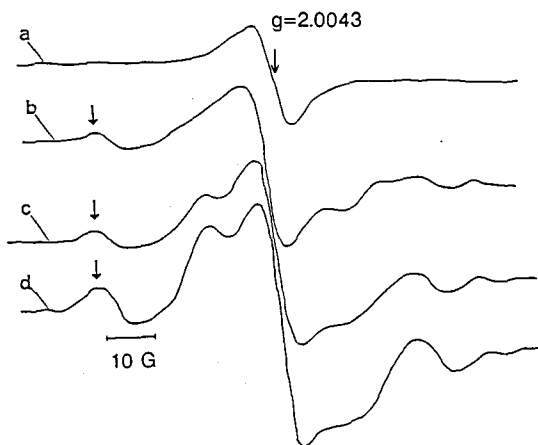


Fig. 2. 照射とうがらしの ESR スペクトル

a : 非照射 ; b : 10kGy 照射 ; c : 30kGy 照射 ; d : 50kGy 照射 ; 図中の矢印 : 照射特有な副シグナル (内山ら¹²⁾ より引用)

ル強度を求めたのち、この試料に一定の吸収線量 (1 kGy など) を照射する。再度 ESR 測定を行い、シグナル強度を求める。同様の操作を繰り返して、吸収線量とシグナル強度との関係をもとめ、外挿法による算出から未知の吸収線量 (kGy) を求める (図 3)。

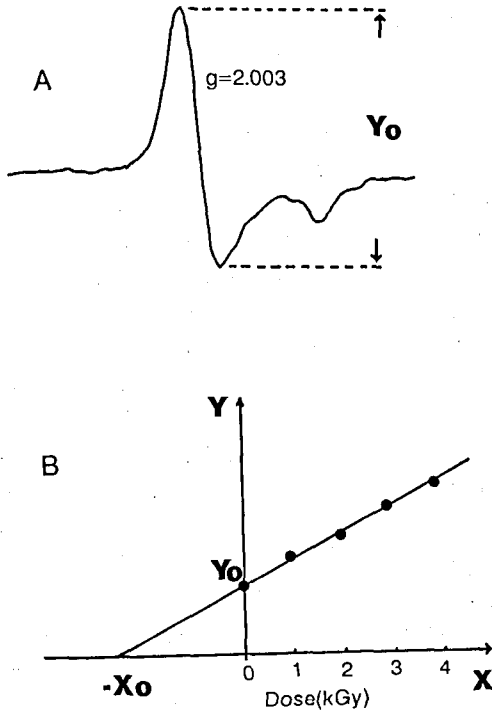


Fig. 3. ESR 線量付加法による照射骨付きトリ肉の吸収線量の求め方

A: 照射された骨の ESR スペクトル; B: 吸収線量 (X) とラジカル強度 (Y) の関係; X_0 : 求める吸収線量; Y_0 : 照射された骨のラジカル強度 (内山²⁵⁾より引用)

この線量付加法は、現在のところ骨付きトリ肉など骨付き肉に限られており、その他は今後の研究に待たねばならない。また電子加速器などの使用を要するので、一般実験室での測定には向かないという問題点が残っている。

3.2 熱発光法および化学発光法

熱発光法 (Thermoluminescence: TL)¹⁴⁾ は、照射によって食品中に捕捉されたフリーラジカルは加熱により光となって遊離するが、この発光量を照射食品の検知法として利用したものである。また、化学発光法 (Chemical luminescence: CL)¹⁵⁾ は、照射によって食品の表面に生じた過酸化水素などの過酸化物質がルミノール水溶液と反応し、発光 (424 nm) する現象を利用したものである。

両発光法の概要を図 4 に示す。照射した香辛料、乾燥野菜などの判定に利用され、ドイツの公定法とされている。この公定法によれば、TL 法は照射された香辛料や乾燥野菜 20 品目の判定に使用できるとしているが、水分の影響に留意しなければならない。図 5 は照射ショウガの熱発光スペクトルである。CL 法は 16 品目についての測定条件が記載されているものの、水分の影響や再現性に問題があり、実際には 7 品目に適用可能と言われている。TL 法の検出下限は 1.5 kGy、CL 法は 2.5 kGy であり、照射後 1 年以上は有効という。また TL 法は CL 法に比べて湿度、酸化、エチレンオキシドくん蒸などの影響が少なく、CL 法よりも有効と言われている。現在、照射の有無判定の精度を高めるために両者の合併法も検討中という。

4. 化学的方法

照射によって生じたフリーラジカルは食品成分と反応し、さまざまな物質を生成する。実用照射線量では、その生成量は微量であり、かつ他の食品加工

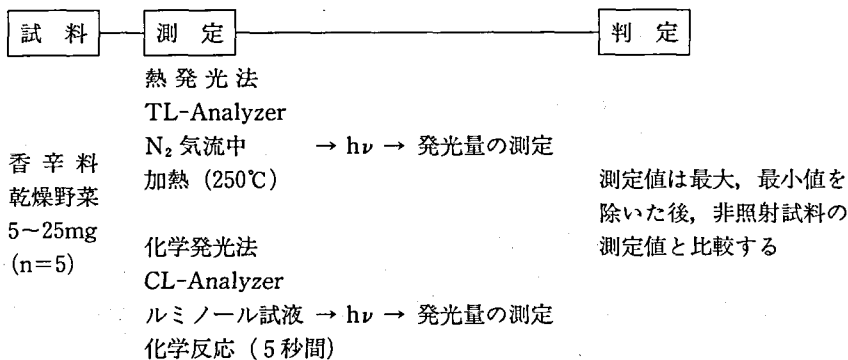


Fig. 4. 熱発光法および化学発光法

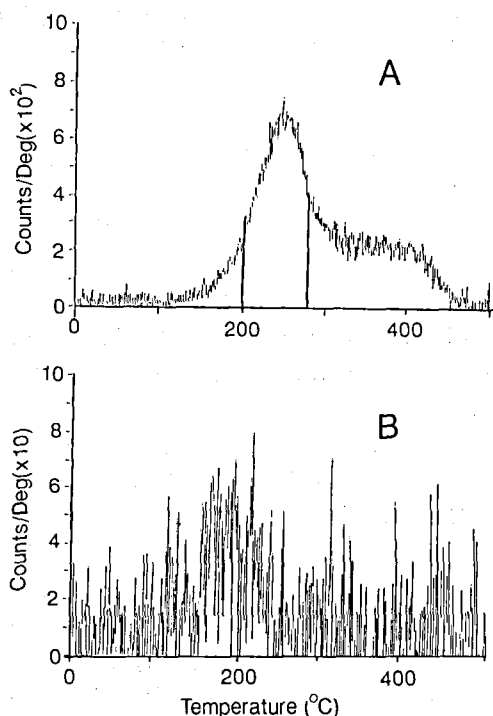


Fig. 5. 照射ショウガの熱発光スペクトル

A: 10kGy 照射 (発光量の目盛りは非照射 B の 10 倍); B: 非照射 (内山²⁵⁾ より引用)

過程で生じた生成物と区別することは難しい。この部門では、『照射食品の検知法に関する研究調整会議』で取り上げられた主要な化学的方法を紹介するにとどめたい。

o-チロシン法¹⁶⁾: o-チロシンが照射肉など照射タンパク質中に特有の生成物であると報告されたことが端緒となって開発された。しかし、非照射のものでも微量ながら検出されることから、判定基準の設定が必要となっている。蛍光または電気化学検出器付きの高速液体クロマトグラフ分析法で定量する。

脂肪-揮発性炭化水素法¹⁷⁾: 脂肪の照射によって生成する揮発性のアルカン類とアルケン類を、ガスクロマトグラフィー (GC) で分離定量する。特に Heptadecene, Tetradecene, および Hexadecadiene が指標として有効とされている。0.25~2.0 kGy で照射されたトリ肉、牛肉、豚肉を検知できるという。

脂肪-揮発性シクロブタンオン法¹⁸⁾: 脂肪に含まれる照射特有の生成のひとつである 2-Alkylcyclobutanone 類を、GC-MS の選択的イオンモニター

法によって分析同定する。脂肪 200 mg (トリ肉として 10 g 以下) でも検出可能であり、照射線量が 0.2 kGy 程度でも検出できるが、抽出操作の簡略化などの改善が求められている。

DNA 法: DNA (デオキシリボ核酸) は、微量ではあるが食品中に一般的に含まれる成分であり、照射によって分解することが知られている。現在幾つか報告がなされているが^{19,20)}、実用的な検知法はない。しかし、将来有望な検知法であり、当部でも現在検討中である。

5. 生物学的方法

食品中に付着する微生物は、照射によって殺菌されたり、微生物叢の構成が変わることが知られている。また、照射による生物学的影响として発芽、組織学および形態学的な変化が観察され、この変化を指標とする検知法が報告されている。

DEFT-APC 法^{21,22)}: 菌数を直接落射フィルター法 (Direct epifluorescent filter technique: DEFT) および一般生菌数 (好気性菌) を測定する方法 (Aerobic plate count: APC) で測定し、DEFT/APC 値を求める。照射香辛料は 10^4 以上を示す。これは、フィンランドの公的方法として用いられており、照射した香辛料やハーブの一次スクリーニングに有効という。

胚培養法^{23,24)}: 低線量 (1 kGy 以下) で照射された柑橘類 (グレープフルーツ, レモン, オレンジ) の種子を取り出し、その外皮を除き、内部の胚をシャーレ中で培養する。発芽率 50% 以上であれば、非照射と判定する。検出限界は 0.15 kGy である。当食品部で開発した方法であるが、操作は簡単であり、実用照射線量 (0.3~0.5 kGy) で十分に照射柑橘類を検知できる。図 6 は照射グレープフルーツの種子より摘出した胚の発芽および根の成長を示している。

IV. おわりに

食糧の秀れた保存法の開発は、世界万民共通の強い願いの一つである。本稿で述べた食品への放射線照射法には様々な問題点が提起されてきた。それらが一つ一つ解決され、あくまでも科学的な判断に基づく正しい食品保存法開発への努力となって実ることが期待される。照射食品検知法の確立はそのための一助となるであろう。

照射食品の検知法は、食品照射の国際的な普及とともにその必要性が叫ばれながら、永年良い方法が

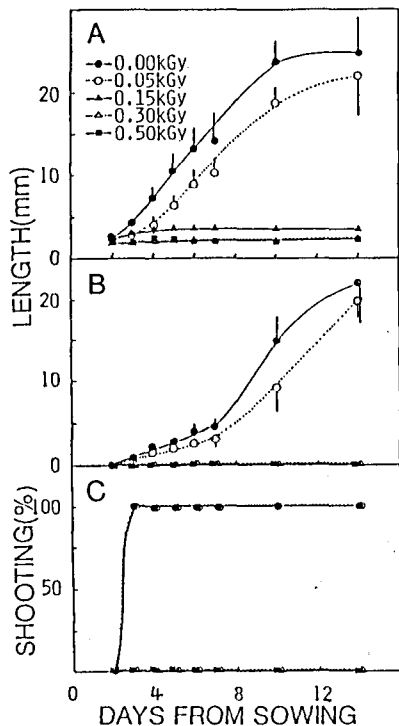


Fig. 6. 胚培養法における照射グレープフルーツの種より摘出した胚の発芽および根の成長

A: 根の成長; B: 芽の成長; C: 発芽率(%) (河村ら²⁴⁾より引用)

開発されなかった。そして、適正な照射処理や食品への表示が国家管理によって徹底されればそれで検知法がなくてもよいとの考えが支配的であった時期もあったが、今日再び検知法の確立が求められている。それは、有望な検知法の報告が最近多くなったことによるものであろう。

FAO/IAEAが『照射食品の検知法に関する調整研究計画』を開始し、新たに実用的な国際検知法の開発に向けて第一歩を踏み出したのは意義深い。一方、EC諸国では経済統合を目指す故に、実用的な検知法の設定は切実な問題である。既に1993年に向けてEC独自に検知法が検討されているが、特にESR法と熱・化学発光法は研究所間でのブラインド試験の段階にきている。まさにECでの動向が世界的な方向を決定する可能性が強い。

現段階で有力な実用検知法として考えられる方法を表5に示す。しかし、これらの方法も現在検討中であり、国際的に認知された検知法として確立しなければならず、また多種多様な食品に対応するためには、他の検知法の開発研究も並行して行わなければならない。各国とも照射食品の検知法に多大の関心を持ち、照射食品に関する諸問題を解決するための開発研究を行っている。

文 献

- 1) WHO: "Food Irradiation, a technique for preserving and improving the safety of food"

表 5. 照射食品の主な実用検知法 (1991)

検 知 法	適 用 品 目
ESR 法	骨付き肉, 骨付き魚, 殻付き貝 乾燥果実, ナッツ, 香辛料 (レッドペッパーなど)
ESR—線量付加法 (定量的方法)	骨付き肉
熱発光法/化学発光法	香辛料, ハーブ, 乾燥野菜
インピーダンス法	ジャガイモ
脂肪—揮発性 炭化水素/シクロブタノン法	肉, 魚, 脂肪を含む食品
胚培養法	柑橘類
DEFT—APC 法 (微生物学的スクリーニング法)	香辛料, ハーブ

(内山²⁵⁾より引用)

- WHO, Geneva (1988)
- 2) Jenkins, R. K., Thayer, D. W. and Hansen, T. S.: *J. Food Science*, 54, 1461 (1989)
 - 3) WHO: "Document on Food Irradiation Adopted on 16, Dec. 1988 by the FAO/IAEA/WHO/ITC-UNCTAD/GATT. Int. Conf. Acceptance, Control and Trade in Irradiated Food, 12-16 Dec. 1988, Geneva", WHO, Geneva (1988)
 - 4) Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture: "A Report of the First Research Co-ordination Meeting, Warsaw (Jachranka), Poland, 25-29 June, 1990, Regarding Co-ordinated Research Programme on Analytical Detection Methods for Foods (ADMIF)", pp1-45, Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, Vienna, Austria (1990)
 - 5) Bögl, K. W., Regula, D. F. and Suess, M. J. (eds.): a WHO Working Group on Health Impact and Control Methods of Irradiated Foods Neuherberg/Munich, 17-21 Nov. 1986, Institut für Strahlen Hygiene, Bundesgesundheitsamt, ISH-Heft 125, 58-346 (1988)
 - 6) Delincée, H. and Ehlermann, D. A. E.: *Radiat. Phys. Chem.*, 34, 877-890 (1989)
 - 7) Hayashi, T. and Kawashima, K.: *J. Japan Soc. Technol.*, 30, 51-54 (1983)
 - 8) Hayashi, T.: a WHO Working Group on Health Impact and Control Methods of Irradiated Foods Neuherberg/Munich, 17-21 Nov. 1986, Institut für Strahlen Hygiene, Bundesgesundheitsamt, ISH-Heft 125, 432-452 (1988)
 - 9) Farkas, J., Koncz, A. and Sharif, M. M.: *Radiat. Phys. Chem.*, 35, 324-328 (1990)
 - 10) Heide, L., Nurnberger, E. and Bögl, K. W.: *Radiat. Phys. Chem.*, 36, 621-627 (1990)
 - 11) Suzuki, T., Yasumoto, K., Hayashi, T., Chow, R. K. and Tajima, M.: *Food Irradiation, Japan*, 23, 77-80 (1988)
 - 12) Uchiyama, S., Kawamura, Y. and Saito, Y.: *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 31, 499-507 (1990)
 - 13) Dodd, N. J. F., Swallow, A. J. and Ley, F. S.: *Radiat. Phys. Chem.*, 26, 451-453 (1985)
 - 14) Heide, L., Guggenberger, R. and Bögl, K. W.: *Radiat. Phys. Chem.*, 34, 903-913 (1989)
 - 15) Heide, L. and Bögl, K. W.: *Int. J. Radiat. Biol.*, 57, 201-219 (1990)
 - 16) Meier, W., Burgin, R. and Frolich, D.: *Radiat. Phys. Chem.*, 35, 332-336 (1990)
 - 17) Nawar, W. W. and Balboni, J. J.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 53, 726-729 (1970)
 - 18) Stevenson, M. H., Crone, A. V. J. and Hamilton, J. T. G.: *Nature*, 344, 202-203 (1990)
 - 19) Jabir, A. W., Deeble, D. J., Wheatley, P. A., Smith, C. J., Parsons, B. J., Beaumont, P. C. and Swallow, A. J.: *Radiat. Phys. Chem.*, 34, 935-940 (1989)
 - 20) Östling, O. and Hofsten, B. V.: a WHO Working Group on Health Impact and Control Methods of Irradiated Foods Neuherberg/Munich, 17-21 Nov. 1986, Institut für Strahlen Hygiene, Bundesgesundheitsamt, ISH-Heft 125, 58-346 (1988)
 - 21) Pettipher, G. L. and Rodriguez, U. M.: *J. Appl. Bacteriology*, 53, 323-329 (1982)
 - 22) Betts, R. P., Farr, L., Banks, P. and Stringer, M. F.: *J. Appl. Bacteriology*, 64, 329-335 (1988)
 - 23) Kawamura, Y., Uchiyama, S. and Saito, Y.: *J. Food Sci.*, 54, 379-382 (1988)
 - 24) Kawamura, Y., Uchiyama, S. and Saito, Y.: *J. Food Sci.*, 54, 1501-1504 (1988)
 - 25) 内山貞夫：RADIOISOTOPES, 40(7), 302-311 (1991)

毒性情報検索の方法論
— 食品添加物の例から —

関沢 純・橋場茂子

A Study on Toxicological Information Search
— An Example from a Study on Food Additives —

Jun Sekizawa, Shigeko Hashiba

The information search method for toxicological evaluation of food additives was examined. Both a survey of the existence of critical reviews or specific databases for toxicological evaluation and the performance of preliminary online-search are important for a comprehensive and effective search. Examples of file selection and search scheme examination are reported. The results are considered to be generally applicable to toxicological information search for other groups of chemicals.

Key words : 毒性情報検索, 食品添加物, 安全性評価資料, オンラインデータベース

(Received May 31, 1991)

1. はじめに

わが国は食品添加物として使用できる物質を個々に指定するいわゆるポジティブリスト方式をとっている。ところが近年の食糧輸入の増大と貿易の不均衡拡大にともない、食品添加物として使用可能な品目の諸外国との違いが通商の関税外障壁として攻撃的のひとつとされてきた。そこでこれまで食品添加物として指定していなかった物質についても、わが国独自の立場から安全性についての情報を整備しておき外国からの疑義に対応していくことが必要となってきた。

われわれは厚生省の依頼により昭和60年度から昭和63年度にかけて、以下の物質について安全性評価のための文献調査と文献レビュー作成の調査研究を行った^{1,2)}。すなわち国連食糧農業機関 (Food and Agriculture Organization of United Nations: FAO) / 世界保健機関 (World Health Organization: WHO) 合同の食品添加物専門家会議 (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives: JECFA) において安全性について評価された結果、許容一日摂取量 (Acceptable Daily Intake: ADI) が設定された物質 (A1 リスト記載物質) であって、わが国においてはまだ食品添加物として指定されていない物質が対象となった。

この調査研究の過程で開発された情報検索の方法論は、他の調査、研究においても基本的に有効と認められたので、情報検索手法の開発についての一研究成果として以下に報告する。

ただし、データは数年前の調査結果であり、その後の検索システム側の改良により若干の修正が必要となっているのでそれらについてもコメントを加えた。

2. 調査対象物質と情報検索上の問題点

調査対象としてとりあげた51物質をTable 1に記す。これらの物質の安全性についての情報検索をすすめる上で次の事項が問題となった。

(1) 食品添加物は本来ヒトが食品経由で摂取しても安全と認められてきた物質である。ことにTable 1に記載された物質はJECFAによりその安全性が確認された物質ばかりである。このように広く安全性が認められた物質は通常毒性学的に関心をもたれないため、あらためて安全性についての研究が行われていない場合が多い。その結果、一般的に毒性関連情報がきわめて少ない。

(2) 安全性についての研究が行われている場合も、それらは食品添加物の指定に必要なため政府機関またはメーカーが行った研究であって、その成果は一般の学術誌には公表されないことが多い。

(3) Table 1記載物質は食品添加物の他にも多く

Table 1. List of food additives on which information was searched

Name	CAS Number	Use *1
Ammonium alginate	90054-34-9	Thickening agent, Stabilizer
Ammonium phosphatidate		Emulsifier
Ascorbyl palmitate	137-66-6	Antioxidant
beta-Apo-8'-carotenal	1107-26-2	Food colours
beta-Apo-8'-carotenoic acid	1962-15-8	Food colours
Calcium acetate	62-54-4	Antimould and antirope agent Stablizer, Bufferring agent
Calcium alginate	9005-35-0	Thickening agent, Stabilizer
Calcium ascorbate	5743-27-1	Antioxidant
Calcium 5'-guanylate	38966-30-2	Flavour enhancer
Calcium-5'-inosinate	38966-29-9	Flavour enhancer
Calcium dl-malate	5743-31-7	Seasoning agent, Bufferring agent
Calcium myristate	15284-51-2	Anticaking agent, Emulsifier
Calcium palmitate	542-42-7	Anticaking agent, Emulsifier
Calcium stearate	1592-23-0	Anticaking agent, Emulsifier
Canthaxanthin	514-78-3	Food colour
Formic acid	64-18-6	Food preservative, Flavour adjunct
Hydroxypropyl methylcellulose	9004-65-3	Anticaking agent, Emulsifier
Magnesium gluconate	3632-91-5	Bufferring agent, Firming agent, Yeast food
Magnesium hydroxide	1309-42-8	Alkali, Colour adjunct
Magnesium phosphate,dibasic	7757-86-0	Dietary supplement, Nutrient
Magnesium phosphate,tribasic	7757-87-1	Anticaking agent
Monoammonium glutamate	7558-63-6	Flavour enhancer, Salt substitute
Monocalcium di-L-glutamate	19238-49-4	Flavour enhancer, Salt substitute
Monopotassium L-glutamate	19473-49-5	Flavour enhancer, Salt substitute
Polysorbate 20	9005-64-5	Emulsifier, Dispersing agent
Polysorbate 40	9005-66-7	Emulsifier, Dispersing agent
Polysorbate 60	9005-67-8	Emulsifier, Dispersing agent
Polysorbate 65	9005-71-4	Emulsifier, Dispersing agent
Polysorbate 80	9005-65-6	Emulsifier, Dispersing agent
Potassium acetate	127-08-2	Bufferring agent, Antimicrobial Preservative
Potassium alginate	9005-36-1	Thickning agent, Stabilizer
Potassium benzoate	582-25-2	Antimicrobial preservative
Potassium citrate	866-84-2	Sequestrant, Bufferring agent Stabilizer
Potassium d,l-malate	585-09-1	Seasoning agent, Bufferring agent
Potassium ferrocyanide	13943-58-3	Anticaking agent
Potassium gluconate	299-27-4	Yeast food
Potassium hydrogen carbonate	298-14-6	Bufferring agent
Potassium lactate	996-31-6	Antioxidant synergist
Potassium palmitate	2624-31-9	Anticaking agent, Emulsifier
Potassium propionate	327-62-8	Antimould and antirope agent
Potassium stearate	593-29-3	Anticaking agent, Emulsifier
Stannous chloride	7772-99-8	Antioxidant
Sodium ferrocyanide	13601-19-9	Anticaking agent
Sodium gluconate	527-07-1	Sequestrant, Yeast food
Sodium myristate	822-12-8	Anticaking agent, Emulsifier
Sodium palmitate	408-35-5	Thickening agent, Emulsifier, Stabilizer
Sodium stearate	822-16-2	Anticaking agent, Emulsifier
Sodium stearyl lactylate	18200-72-1	Emulsifier, Stabilizer
Sodium sulfite	7757-83-7	Antimicrobial preservative
Stannous chloride	7772-99-8	Antioxidant
Stearyl citrate	1337-33-3	Emulsifier, Sequestrant

*1 Use information is based on FAO/WHO reports

の用途をもち、そのいくつかは試薬としても利用されることがあるため、オンラインの文献検索により毒性試験に関係して見いだされる多くの文献は、実は別の物質の毒性試験に関する情報である。

(4) 文献検索において代表的な毒性に関するキーワードを物質名と組み合わせる方法をとった場合に、特殊な毒性に関する情報を見過ごす場合がある。

ここにあげた問題点は他の化学物質の情報検索に

おいてもほぼ共通する事項であり、以下の検討の結果は国際化学物質安全性計画 (International Programme on Chemical Safety : IPCS) の環境保健クライテリア作成などにも適用し基本的に有効なことが証明された。

3. 情報検索の方法

情報検索の手順として一般的には Fig. 1 に示したようなプロセスが必要である。以下この図に示した順を追って結果を記す。

3.1 既存の安全性評価資料 (クリティカルレビュー) の有無の調査

情報検索の出発点では対象となる物質についてどのような安全性評価が既に行われているかを知ることが重要である。対象物質について Table 2 に記した安全性評価資料、文献レビュー、毒性データ集、食品添加物規格情報資料を参照し、安全性評価に有用な既存の情報の有無をチェックした。

これらの資料は評価対象物質についてこれまでの安全性評価の概要を知る上で大変有効である。また

網羅的な情報検索結果に基づいてつくられた信頼性の高いクリティカルレビューがあれば、それがつくられた年次までの情報はあらためて集める必要はなくなる。さらに重要なことは、国際機関や政府機関で作成された資料には学術誌に公表されない情報も収載されている。例えば SCOGS report (GRAS 物質再評価資料) は網羅的な文献のレビューと専門家グループによる評価を経て作成された資料であり、今回の調査対象物質のうち約 6 割の物質について評価の報告があった。

Table 2 に示した資料の内容については別に詳しく記した²⁾のでそちらを参照されたい。

3.2 オンライン文献検索手法の検討

(1) 安全性に関連した文献の予備的検討

天然色素のひとつであるカンタキサンチン (CANT) についていくつかのオンラインファイルを用いて予備的な検索を行った結果を Table 3 に紹介する。検索された文献を標題と抄録により分類した後、安全性に関わりがあると思われたテーマ (*3) の文献について内容を検討した。

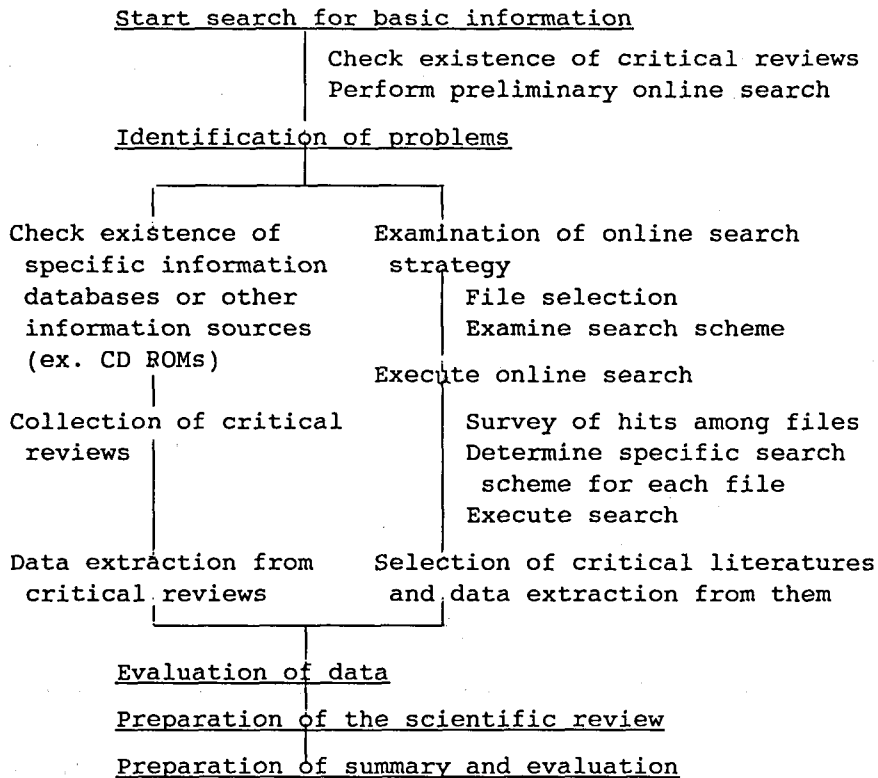


Fig. 1. Strategic scheme for information search

Table 2. Critical reviews or databooks related to safety evaluation of food additives

Name	Contents	Editor or Publisher	Publication year
JECFA Monographs on food additives	Toxicology Specification	WHO FAO	Every year after 1961
SCOGS Reports *1	Scientific Literature Review Evaluation of Health Aspects	FDA *4 (Sponser)	1972-1981
RTECS *2	Toxicology databook	NIOSH *5	1971- (Now available as CD ROM*7)
IARC Monographs *3	Carcinogenicity evaluation	IARC	1972-
Food Chemicals Codex (Third edition)	Specification	NRC *6	1981-1986

- *1 Selected Committee on GRAS (Generally Recognized as Safe) Substances
 *2 Registry of Toxic Effects of Chemical Substances
 *3 IARC (International Agency for Research on Cancer) Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans
 *4 Food and Drug Administration
 *5 National Institute for Occupational Safety and Health
 *6 National Research Council
 *7 Compact Disc Read Only Memory

Table 3. Summary of online literature search on a food colour, canthaxanthine

Grouping of Literatures based on the contents	File				Total *2
	TOXLINE (1982-85)	MEDLINE (1980-85)*1	CA SEARCH (1982-85)*1		
Application					
Medicine	27	23 (19)	13 (9)		34
Colouring (fish etc)	3	1 (0)	5 (2)		7
Colouring (foods) *3	1	1 (0)	1 (1)		2
Artificial suntan *3	6	6 (6)			6
Chemical synthesis			7 (0)		7
Analysis					
Natural substances	2	3 (0)	36 (2)		39
Foods *3			2 (0)		2
Blood *3	1	3 (1)	1 (1)		4
Biochemistry					
Biosynthesis	5	2 (0)	21 (5)		23
Metabolism *3	1	1 (0)	1 (1)		2
Toxicity					
Eye disease	6	6 (6)			6
Reproductive effects:bird	1		1 (1)		1
Allergenicity *3		1 (1)			1
Total	52	45 (29)	88 (22)		133

- *1 Numbers in the parentheses are the numbers of literatures concomitantly found in the TOXLINE file
 *2 Duplicates are omitted
 *3 Literatures which may be important for risk assessment of canthaxanthine for use as a food additive

CANTは日焼け剤(見かけ上日焼けした肌をつくる)の有効成分として用いられている。この日焼け剤を利用した人々の眼にCANTが沈着して網膜

症を引き起こした。また日焼け剤使用者から得た血液が肉眼的に黄色く着色していたことから輸血に用いられた時に問題があるのではないかと懸念された。

じん麻疹患者を対象とした誘発試験において CANT は陽性の試験結果を呈しアレルゲンとしての疑いもたれた。

(2) ファイルの選択

CANT の安全性を考える上で必要と思われたこれら文献の収録状況を毒性学, 化学, 医学文献についての基本的な三種のファイル (TOXLINE, CA SEARCH, MEDLINE) について比較検討した。

TOXLINE では*3 の分類に相当する文献として 16 件が検索されたがこれらはすべて MEDLINE または CA SEARCH のいずれかにおいて検索されていた。この他に MEDLINE と CA SEARCH の両者を用いることにより食品の着色, 食品や血液中の CANT の分析, CANT の代謝, アレルギー性について TOXLINE では検索できなかった 8 件の文献が見いだされた。

CA SEARCH と MEDLINE の併用が毒性関連文献の検索において TOXLINE よりモレが少なく有用であると考えられた。

(3) 検索式の検討

当部では従来毒性情報に関するオンライン文献検索を外部より依頼された時に, 検索効果をあげる目的で TOXLINE ファイルを用いてきた。その際多数の文献の中から必要な文献を選び出す時のキーワードとして Table 4 に記すような用語の組み合わせを試験的に用いていた。

CANT についてこの組み合わせで検索を実施したところ 19 件の文献が選出されたが, 3.2 の冒頭に記した内容 (眼病, アレルギー性, 血液の着色) の文献はこの組み合わせでは検索することがで

きなかった。また 19 件のうち Carcinogen? で検索された 11 件の文献は CANT が抗癌作用をもつのではないかという研究の報文であり CANT の発癌性に関する報文ではなかった。したがって TOXLINE を用いた物質名ないし CAS 登録番号と Table 4 のキーワードの組み合わせによる検索はノイズとモレが多く, 必ずしも有効でないことがわかった。

Table 5 にはこの点の改善をはかるために行った検索の結果を示す。すなわち化学関連文献については, まず CA SEARCH においてケミカルアブストラクトサービス (CAS) の CAS 登録番号を用いその物質についての文献を網羅的に検索する。次に "/NPT" (Non Patent の略号) をかけあわせて非特許文献に限定する。最後に CAS が比較的広い概念としての関連分野毎に付与するセクションコード (SC: Section code の略号) を用い, 例えば毒性学については /SC=CA104 OR CA004 (年次によりコード番号がふた通りある) をかけあわせて必要な文献をしばりこんだ。毒性学の他に例えば薬理学関連の文献が必要な時は /SC=CA101 を用いるなどすればよい。なおセクションコードは一文献に複数付与されている場合もある。この他に分析法に関する文献については "DTN." (Determination の略号) のようなファイル側で決められたキーワードを CAS 登録番号と組み合わせで使用するとよい。

次に医学文献については MEDLINE では文献の中で, ある物質の毒性や代謝が主題となっている場合には, ディスクリプタ (記述子: DE=Descriptor) として "TO" (Toxicity: 毒性の略号) や

Table 4. Searching toxicology literatures with TOXLINE*1

Theme	Key words or subfile codes
Toxicity	Toxic + Toxicity + Toxicology
Carcinogenicity	Carcinogen& *2 + Neoplasm? *2
Irritation	Irrita& *2
Mutagenicity	EMIC *3
Reproductive effects /Teratology	ETIC *4
Metabolism	Metabolism
Pharmacokinetics	Absorption + Excretion + Distribution

*1 Search was performed on October 1985

*2 Truncation

*3 Mutagenicity documents file developed by Environmental Mutagens Information Center, Oak Ridge National Laboratory

*4 Teratogenicity documents file developed by Environmental Teratogens Information Center, Oak Ridge National Laboratory

Table 5. Searching toxicology related literatures by CA SEARCH or MEDLINE

(1) CASEARCH

No	Search tag or scheme	Potassium gluconate Sodium gluconate Magnesium gluconate	Potassium stearate Sodium stearate Calcium stearate
1	CAS Registry Number *1	635	3,761
2	1/NPT *2	194	1,208
3	2/SC=CA104 or CA004 *3	1	7

*1 Literatures searched with CAS Registry Numbers for the compounds

*2 Literatures limited as non-patent documents

*3 Literatures limited with section codes for toxicology

(2) MEDLINE

No	Headings or Descriptors	Numbers of literatures
1	Gluconates(L)TO/DE *1,2	4
2	Gluconates(L)ME/DE *1,2	146
3	2 AND (Sodium or Potassium or Calcium) *3	18
4	Polysorbate(L)ME/DE *1,2	45
5	2 AND (Polysorbate or Tween/TI) *4	17

*1 "Gluconates" and "Polysorbates" are headings in the Index Medicus

*2 Headings are linked with subheadings, "Toxicity" or "Metabolism" as descriptors

*3 Salts of gluconates are searched by combining a heading "Gluconates" with headings "Sodium", "Potassium" and "Calcium"

*4 "Polysorbate" or "Tween" is used in the titles of the literatures

"ME"(Metabolism:代謝の略号)が付与されているので、これらを用いて目的とする文献を検索できる。

これらの方法を用いて数百から数千件もある文献の中から、予想のつきにくい特殊な毒性についてのいくつかのキーワードの組み合わせをあらかじめ用意しなくても文献のモレとノイズ(不要な文献)をきわめて少なくした検索が可能となる。

3.3 ファイル間の収録件数の比較検討

DIALOGではDIALINDEXという横断索引ファイルを用い、いくつかのファイルの集合をつくり同じキーワードについてのヒット件数をファイル毎に出力させることができる。目的により毒性学、化学、環境などのいくつかの関連ファイルの集合をつくり、予備的にファイル間の収録状況を比較検討することができる。

3.4 クリティカルレビューの検索

クリティカルレビューについて調べるには系統的

に国際機関や政府機関によるこれらの資料を収集、整理しておく必要がある。これらの資料は作成機関(IPCS, NTP=National Toxicology Program:米国国家毒性試験計画, など)、目的(発がん性レビューなど)、対象とする物質(農薬、食品添加物など)によりさまざまである²⁾。

当部でこれらの代表的な資料を収集していることから、著者らはこれら資料の利用を容易にするための索引、検索システムの構築の準備を進めている。

Table 2に記した資料のうちSCOGS reportはわれわれの安全性評価レビューの作成にたいへん役立ったが、この資料はTOXLINE, CA SEARCH, MEDLINEなどでは検索できない。しかし米国政府関連機関のレポートを収載するファイル(NTIS:National Technical Information Service)ではSCOGS reportを探すことができる。また米国連邦政府官報ファイル(FRA:Federal Register Abstracts)を用いて米国食品医薬品庁

(Food and Drug Administration: FDA) の食品添加物関連の通知, 法令の所在について調べることができた。

最近 IPCS と IRPTC (国際化学物質有害性情報登録: International Register of Potentially Toxic Chemicals) は協力してクリティカルレビューの登録と案内を開始した。CCTTE (Chemicals Currently being Tested for Toxic Effects: 化学物質毒性試験情報案内)³⁾ という計画の中で, これらのクリティカルレビューの登録データ件数はまだ少ないが参照してみる価値はある。

3.5 食品添加物安全性評価情報データベース

安全性評価情報をデータベースとして整備している例がある。食品添加物の安全性評価情報データベースとシステムについての調査した結果を記す。

(1) FAO/WHO

JECFA の食品添加物評価資料について, 著者は当部の NEC N5200 MK2 上でデータベースソフトとして LANFILE3 を用い検索システムを作成した。しかし N5200 MK2 が所内で普及せず LANFILE3 がデータベースソフトとして限界が多かったことと次の理由によりその後のデータ更新を中止した。

FAO/WHO は JECFA のレポートの内部検索システムとして 1985 年に Food Additives Data System を開発し, その内容を出版した⁴⁾。このデータベースでは食品添加物の名称による索引があり, 評価の年次経過がわかるようになっている。

(2) FDA

FDA では食品添加物として使用されている物質について FDA が作成した安全性評価資料および連邦政府による規制の現状を検索できるデータベース “Everything Added to Food in the U.S. (EAFUS)” を構築し利用している。

(3) EC

EC (European Community: 欧州共同体) では加盟国内における経済的一体化を促進するために商品内容の危険性, 有害性などによる分類の方法と, 注意事項として表示すべき項目と方法の共通化, 標準化を進めている。EC の化学物質規制については EC の化合物総合データベース, ECDIN (Environmental Chemicals Data and Information Network) を用いて検索できる。

4. まとめ

毒性情報の検索にあたって 2. にあげた問題点に

対して, 次の対策をみいだした。

(1) 既存の安全性評価資料の存否について調査, 収集し, 基本となる情報を把握する。これらの資料を用いることにより学術誌に公表されないデータおよび, 網羅的な文献レビューにもとづいた信頼性の高い安全性評価の結果を知りえる。

(2) オンライン検索の実施にあたっては予備的な検索を行い, ファイルの選択や検索式について検討することにより, 有効, 的確な検索が可能となる。毒性関連文献の検索では DIALOG の CA SEARCH あるいは STN の CAS ONLINE と MEDLINE を併用し, それぞれセクションコード, ファイル側で用意したキーワード, および主題となる物質の毒性や代謝について付与されたディスクリプタなどを組み合わせて検索することでモレやノイズの少ない検索結果を得られる。

(3) 目的とする化合物に関連した安全性評価情報のデータベースが開発され, オンライン, フロッピーディスク, CD ROM, データ集などの媒体により提供されている場合があり, これらを利用することにより的確な情報が得られる。

(4) 本研究では DIALOG の CA SEARCH を用いた検索結果を示したが, 最近では STN の CAS ONLINE が提供されており, ケミカルアブストラクトの抄録をオンラインで出力させることができるようになった。比較的多く (数十件) の文献を検索で得た時は, 初めにタイトルのみ出力 (無料) させ, その中から必要とする文献を選択しこれらについてのみ書誌事項, 抄録を出力させている。抄録を読めばその文献の必要性をチェックできるので, 無駄に多くの文献の入手をはからなくてもすむ。

以上記してきたように情報検索を的確に行うか否かが, 研究の実施と成果に大きな影響を与える。情報の調査または情報検索はその意味で単なるサービスというよりは, 今日における研究活動の重要な一構成要素として評価されるべきと考える。

現在, 当所では研究者自身がオンライン文献検索についてある程度習得することが, 必要な状況になってきている。本報文が情報検索に関心をもつ研究者の参考の一助になれば幸いである。

謝 辞

本研究は厚生省生活衛生局食品化学課の厚生科学研究費の支援により行われた。共同研究者⁵⁾ またオンライン検索について助言を下さった加納直子さん

に感謝する。また原稿について助言を下された神沼二眞部長に感謝する。

文 献

- 1) 竹中祐典, 関沢 純, 大沢利昭, 内山貞夫, 橋場茂子, 高橋昭江, 松本清司, 紅林秀雄, 山本都, 山崎 壯: 昭和60~63年度厚生科学研究

報告書 (1985~1988)

- 2) 関沢 純, 山本 都: 食品の安全性評価のための化学物質情報. 食衛誌, 31, 457~468 (1990)
- 3) IPCS/IRPTC: International Registry of Chemicals Currently Tested for Toxic Effects (1990)
- 4) FAO: FAO food and nutrition paper 30 /rev. 1 & 30/rev.1/add.1 (1985)

Tris(2-chloroethyl)phosphate (TCEP) の雌マウスにおける 経皮慢性毒性/発癌性試験

高田幸一・吉本浜子・安原加寿雄・門馬純子
会田喜崇・斎藤 実・黒川雄二・戸部満寿夫

Combined Chronic Toxicity/Carcinogenicity Test of Tris(2-chloroethyl)phosphate (TCEP) Applied to Female Mouse Skin

Koichi Takada, Hamako Yoshimoto, Kazuo Yasuhara, Junko Momma,
Yoshitaka Aida, Minoru Saito, Yuji Kurokawa and Masuo Tobe

Tris(2-chloroethyl)phosphate (TCEP), a widely used flame retardant, was tested for its skin chronic toxicity/carcinogenicity using female Slc: ddY mice. TCEP (5 and 50%) dissolved in ethanol was applied to the shaved skin twice a week for 79 weeks. The control group received ethanol under similar condition. In addition, 5 animals in each group were killed at 6 and 12 months and used for the chronic toxicity study.

In body weight, food consumption and survival rate, there was no significant difference between the control and treated groups. Spleen weight was decreased in the 50% group. No significant difference in the incidence of tumors and other non-neoplastic lesions of the skin and other organs was found between the control and treated groups.

The results indicate that under the conditions of the present study, TCEP has no carcinogenicity and toxicity for the skin.

key words : Tris(2-chloroethyl)phosphate, 防炎加工剤, マウス, 慢性毒性試験, 発ガン性試験

(Received May 31, 1991)

緒 言

我が国では火災による事故対策としてカーテン, カーペットの防炎加工が, 消防法や児童福祉法などにより義務づけられている¹⁾。ポリエステル, ナイロンなどの可燃性繊維や木綿, レーヨンなどの易燃性繊維は防炎加工剤を用いて難燃化しているが, この防炎加工剤には無機リン酸塩, ホウ酸塩などの一時性防炎加工剤と有機リン化合物, 有機ハロゲン化合物などの耐久性防炎加工剤がある²⁾。

1977年に米国でポリエステル製の子供寝衣の防

炎加工剤として広範囲に用いられていた Tris(2,3-dibromopropyl)phosphate (Tris-BP) が発癌性を認められたことにより使用禁止となった^{3,4)}。現在, これらの代替品として, Tris(2-chloroethyl)phosphate (TCEP), Tris(1,3-dichloropropyl)phosphate (TDCPP), Tris(chloropropyl)phosphate (TCPP) 等が用いられ, 特に TCEP は繊維の防炎加工剤および塩化ビニルなどの樹脂の難燃性可塑剤としての用途をもっている。

TCEP の LD₅₀ 値はラットの経口投与で 200~400 mg/kg, 腹腔内投与で 280 mg/kg⁵⁾, マウスの

経口投与で0.86~1.0 g/kgである⁶⁾。本物質のLD₅₀量をラットに腹腔内投与すると、激しい癲癇様痙攣が起るが、ラット脳内のコリンエステラーゼ阻害作用は弱い⁶⁾。一方、本物質をラットに80~125 mg/kg/day, 37日間、腹腔内に与えても麻痺症状は起らない⁵⁾。モルモットで皮膚刺激作用は認められていない⁵⁾。変異原性はTA100およびTA1535を用いた実験でPrivalら⁷⁾は認めなかったと報告しているが、中村ら⁸⁾は弱陽性としている。またTCEPのマウスによる長期塗布毒性試験の報告はなされていない。

今回、我々は防炎加工剤代替品の安全性評価の一環として、Tris(2-chloroethyl)phosphate(TCEP)の経皮慢性毒性/発癌性試験を雌マウスを用いて行ったので報告する。なお、雄マウスはfightingが激しく皮膚に損傷をきたすことから、雌マウスを用いて実験を行った。

実験材料および方法

1. 被験物質

TCEPは東京化成製の試薬特級(純度98%, Lot: AOR-1)を用いた。TCEPは化学式(Cl(CH₂)₂O)₃POで分子量285.5, 比重1.425, 沸点351℃, 引火点246℃, 無臭, 低揮発性, 無色の液体でアルコールなどの有機溶媒に可溶, 水およびヘキサンに不溶である⁹⁾。

2. 使用動物および飼育条件

Slc: ddY系マウス(静岡実験動物農業協同組合)の雌を1週間予備飼育後, 一般状態から健康と思われた動物を選び5週齢で実験に供した。

動物はソフトチップを敷いたプラスチックケージに3匹ずつ収容し, 室温23±1℃, 湿度55±5%, 12時間照明(午前6時~午後6時)のバリエアの飼育室で, 固形飼料および水道水を自由に摂取させて飼育した。

3. 実験方法

1) 用量設定および群構成

予備試験としてTCEPの5%および50%エタノール溶液を雌マウスの背部に30日間塗布した結果, いずれの群においても変化が認められなかったので, 長期試験での投与量は5%および50%エタノール溶液の2段階とした。

以上の結果に基づき, 発癌性試験の群構成は1群50匹で, 対照群, 5%および50%群とし, 対照群には溶媒として用いたエタノールのみを塗布した。さ

らに, 経時変化をみる目的で, 各群10匹からなるサテライト群を設け6および12カ月目に各群5匹を屠殺し各種検査を行う慢性毒性試験に供した。

2) 投与方法および投与期間

動物用電気バリカンで剪毛した動物の背部中央に1×1.5 cmの広さに, 幅1 cmのガラス製ノズルを付けた注射器で, 0.025 mlを週2回, 18カ月間塗布した。なお, 塗布部の皮膚の発毛状態には個体差があるので, バリカンによる剪毛は随時塗布前日に行った。

3) 体重および摂餌量

体重および摂餌量の測定は, ケージ毎にまとめて行い, 6カ月目までは週1回, それ以降は隔週に1回行った。

4) 動物の一般状態

投与期間中, 動物の一般状態および死亡の有無は毎日朝夕2回観察し, 投与期間中の死亡動物および瀕死動物は発見後速やかに剖検し, 可能な限り器官および組織の病理組織学的検査を行った。

5) 血液学的検査

実験終了時の18カ月目に, 各群10匹ずつ, 無作為に選んだ動物の眼窩静脈叢から採取した血液について赤血球数(RBC), ヘモグロビン量(Hb), ヘマトクリット値(Ht), 白血球数(WBC), 平均血球容積(MCV), 平均ヘモグロビン量(MCH), 平均ヘモグロビン濃度(MCHC)をCoulter Counter-SP(米国: Coulter社製)を用いて測定した。さらに, 血液塗抹標本はライトギムザ染色を施した後, Microx-A型(立石製)で白血球百分比を算出した。サテライト群でも, 6カ月目に各群から5匹を, 12カ月目ではすべての生存動物について同様に検査を行った。

6) 血清生化学的検査

検体投与6カ月目にサテライト群の各群から5匹を, 12カ月目ではすべての生存動物について検査を行った。

動物は前日から約16時間絶食した。血液学的検査用に眼窩静脈叢から採血後, 断頭により採血し, 遠心分離して得られた血清について, 総蛋白量(TP), アルブミン(Alb), A/G比, 尿素窒素(BUN), 血糖(Glc), 遊離脂肪酸(NEFA), リン脂質(PL), 中性脂肪(TG), 総コレステロール(TCho), アルカリ性ホスファターゼ(ALP), グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ(GOT), グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ

(GPT), 血清グリシルプロリン・ジペプチジルアミノペプチダーゼ(GPDAP) を Gemusaec IV型自動分析装置 (米国 Electro Nucleonics 社製) によって測定した。

7) 剖検および器官重量の測定

投与期間終了日まで生存した動物は、エーテル麻酔下で放血致死後、剖検所見を記録した。さらに器官および組織を採取し、脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓および精巣は実重量を測定し、体重比重量を算出した。

8) 病理組織学的検査

前記に示した器官の他、下垂体、甲状腺、顎下腺、胸腺、膵臓、食道、胃、小腸、大腸、骨髄、膀胱、精巣上体、精囊腺、脊髄、坐骨神経、子宮、卵巣、腸間膜リンパ節および大腿部筋肉は10%ホルマリン液で固定後、常法に従い薄切標本を作製しヘマトキシリン・エオジン (H-E) 染色を施して病理組織学検査を行った。

4. 統計処理¹⁰⁾

生存率および腫瘍発生率の検定は χ^2 検定で行った。血液学的検査、血清生化学的検査および器官重量については Bartlett の方法で等分散の検定を行った。等分散の場合は群間の有意性を一元配置の分散分析法を用い、等分散でない場合は Kruskal-Wallis の方法を用いた。群間に有意性が認められた場合の多重比較は例数が揃っている場合は Dunnett 型で、不揃いな場合は Scheffe 型で、それぞれ対照群と各処置群の有意差検定を行った。

結 果

1. 体重および摂餌量

各群の経時的変化を Fig. 1 に示した。体重および摂餌量とも、対照群とほぼ同様の推移を示し、各群間に有意の差は認められなかった。サテライト各群の体重および摂餌量もほぼ同様の推移を示した。

2. 一般状態および動物の死亡

実験期間中、TCEP 投与群で特に異常を示す所見は認められなかった。各群の生存曲線を Fig. 2 に示した。対照群で23週目より、5%群で39週目より、50%群で33週目より死亡が認められた。実験終了時の生存率は対照群で48%、5%群で40%および50%群で54%であり、対照群とTCEP投与群との間に有意差は認められなかった。サテライト群も特に異常を示す所見は認められず47週目に50%群の1例が死亡した。

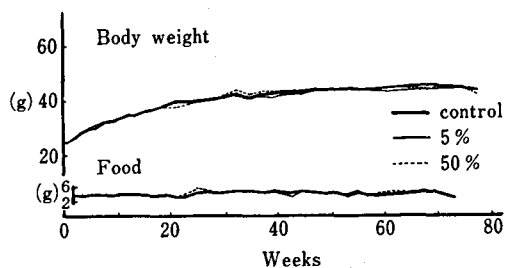


Fig. 1. Body weight and food consumption for female mice painted with TCEP

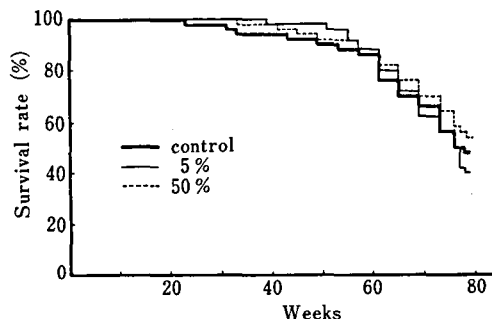


Fig. 2. Survival curves of female mice painted with TCEP

3. 剖検所見

途中死亡ならびに生存動物の剖検時における腫瘍の発生は、対照群で肺に11例および皮下に10例、5%群で肺に6例、肝臓に3例および皮下に9例、50%群で肺に8例、肝臓に2例および皮下に10例に認められた。サテライト群では47週目に死亡した50%群の皮下に1例認められた。

4. 血液学的検査 (Table 1)

5%および50%群でMCHCの有意な増加が、50%群でMCHの有意な増加が認められた。白血球百分比では5%および50%群でリンパ球の減少傾向を認めた。サテライト群の6および12カ月目では群間に差は認められなかった。

5. 血清生化学的所見

サテライト群による血清生化学的検査では6カ月目において各群ともに変化は認められなかった。12カ月目では5%および50%群でA/G比の有意な上昇が認められた。

6. 器官重量 (Table 2)

50%群で脾臓に実重量および比重量の有意な減少が、さらに肝臓に比重量の有意な減少が認められた。サテライト群の6および12カ月目では群間に差は

Table 1. Hematological findings of female mice painted with TCEP for 18 months

Dose (%)		0	5	50
No. of animals		10	10	10
RBC	$\times 10^6/\mu l$	9.31 \pm 0.65	8.75 \pm 1.05	8.50 \pm 1.18
Hb	g/dl	13.54 \pm 0.98	13.15 \pm 1.28	13.03 \pm 1.31
Ht	%	40.95 \pm 3.24	38.82 \pm 3.99	38.63 \pm 3.52
MCV	fl	43.92 \pm 1.10	44.42 \pm 1.23	45.85 \pm 4.07
MCH	Pg	14.55 \pm 0.42	15.10 \pm 0.56	15.50 \pm 1.36 *
MCHC	%	33.11 \pm 0.43	33.95 \pm 0.60 **	33.76 \pm 0.62 *
WBC	$\times 10^3/\mu l$	10.62 \pm 6.43	6.17 \pm 2.47	9.07 \pm 13.81
Differential Count				
BAND	%	1.30 \pm 1.23	0.70 \pm 0.64	1.80 \pm 0.89
	$\times 10^3/\mu l$	0.07 \pm 0.07	0.04 \pm 0.03	0.26 \pm 0.58
SEG	%	15.20 \pm 11.31	18.80 \pm 8.65	26.10 \pm 10.45
	$\times 10^3/\mu l$	1.28 \pm 0.79	1.04 \pm 0.40	2.81 \pm 5.31
EOSINO	%	2.20 \pm 2.03	3.00 \pm 1.53	3.60 \pm 2.01
	$\times 10^3/\mu l$	0.14 \pm 0.12	0.16 \pm 0.07	0.30 \pm 0.41
BASO	%	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
	$\times 10^3/\mu l$	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
LYMPHO	%	80.50 \pm 13.31	77.10 \pm 10.52	67.40 \pm 11.16 *
	$\times 10^3/\mu l$	9.04 \pm 6.40	4.90 \pm 2.58	5.57 \pm 7.27
MONO	%	0.80 \pm 0.58	0.40 \pm 0.40	1.10 \pm 0.52
	$\times 10^3/\mu l$	0.09 \pm 0.12	0.03 \pm 0.03	0.14 \pm 0.29

Values indicate mean \pm S.D.

* : Significant at 5% level as compared with control value

** : Significant at 1% level as compared with control value

Table 2. Organ weight of female mice painted with TCEP for 18 months

Dose (%)		0	5	50
No. of animals		24	20	27
Body weight	g	44.7 \pm 10.0	42.3 \pm 8.3	43.9 \pm 6.3
Absolute Organ Weight				
Brain	g	0.50 \pm 0.02	0.49 \pm 0.01	0.50 \pm 0.03
Heart	g	0.19 \pm 0.03	0.16 \pm 0.02 *	0.18 \pm 0.02
Lung	g	0.30 \pm 0.15	0.27 \pm 0.09	0.26 \pm 0.05
Liver	g	2.17 \pm 1.22	1.64 \pm 0.38	1.64 \pm 0.30
Kidney	g	0.63 \pm 0.14	0.60 \pm 0.14	0.59 \pm 0.11
Spleen	g	0.34 \pm 0.25	0.22 \pm 0.13	0.20 \pm 0.11 *
Relative Organ Weight				
Brain	g%	1.17 \pm 0.24	1.21 \pm 0.26	1.15 \pm 0.18
Heart	g%	0.43 \pm 0.10	0.40 \pm 0.07	0.41 \pm 0.06
Lung	g%	0.70 \pm 0.36	0.66 \pm 0.29	0.60 \pm 0.14
Liver	g%	4.90 \pm 2.57	3.94 \pm 0.87	3.75 \pm 0.61 *
Kidney	g%	1.44 \pm 0.38	1.46 \pm 0.41	1.35 \pm 0.23
Spleen	g%	0.78 \pm 0.58	0.56 \pm 0.40	0.47 \pm 0.23 *

Values indicate mean \pm S.D.

* : Significant at 5% level as compared with the control value

認められなかった。

7. 病理組織学的検査

実験開始後、7カ月目(206日目)で最初に腫瘍を持った動物が対照群に認められたので、これ以後の動物を有効動物とした。なお、自己融解が著明で組織学的検査ができなかった動物は有効数から除いた。

腫瘍の病理組織学的所見を Table 3 に示した。

18カ月目において、塗布部位の皮膚の腫瘍は各群ともに認められなかった。肺の腺腫は、対照群で12例(24.5%)、5%群で5例(10.2%)および50%群で15例(30%)で、各群間に有意差は認められなかった。白血病/悪性リンパ腫は対照群で7例(14.3%)、5%群で13例(26.5%)および50%群で

5例(10%)で、各群間に有意差は認められなかった。肉眼的に認められた皮下腫瘍は組織学的にはほとんどが乳腺の腺癌であり、対照群で9例(18.4%)、5%群で7例(14.3%)および50%群で10例(20%)で、各群間に有意差は認められなかった。その他の臓器にも種々の腫瘍が散見されたが、対照群と投与群との間に差は認められなかった。サテライト群では12カ月目に肺、リンパ節および乳腺の腫瘍が小

数例認められた。6カ月目では各群ともに腫瘍の発生は認められなかった。

6、12および18カ月目の非腫瘍性所見をTable 4に要約した。18カ月目では子宮内膜の増殖、腎臓の尿細管増殖および拡張、肺の細胞浸潤などが対照群を含む各群に認められた。50%群で皮膚の1例に認められた表皮の増殖は頸部に塗布部位ではなかった。その他、種々の所見を認めたが、いずれも散発

Table 3. Summary of tumor findings in female mice painted with TCEP

Doses (%)	12 Months			18 Months		
	0	5	50	0	5	50
No. of animals examined	5	5	5	49	49	50
Respiratory system						
Lung						
adenoma	1	1	0	12	5	15
adenocarcinoma	0	0	0	1	0	0
Digestive system						
Liver						
hemangioendothelioma	0	0	0	0	1	0
Forestomach						
papilloma	0	0	0	0	0	2
Hematopoietic / Lymphatic system						
Thymus						
malignant lymphoma	0	0	0	1	0	0
Spleen						
malignant lymphoma	0	0	0	1	0	0
lymph node						
lymphoma	1	0	0	1	0	0
malignant lymphoma	0	0	0	2	5	0
leukemia	0	0	0	3	8	5
Genital system						
Ovary						
granulosa cell tumor	0	0	0	0	1	0
papillary cystadenoma	0	0	0	0	0	1
Uterus						
endometrial polyp	0	0	0	0	1	0
adenocarcinoma	0	0	0	0	0	2
hemangioma	0	0	0	1	0	0
Mammary gland						
adenoma	0	0	1	1	1	1
adenocarcinoma	0	0	1	9	7	10
Endocrine system						
Pituitary gland (anterior lobe)						
adenoma	0	0	0	0	1	1
Adrenal gland (cortex)						
adenoma	0	0	0	0	0	1
adenocarcinoma	0	0	0	1	0	2
Pancreas						
islet cell adenoma	0	0	0	0	0	1

Table 4. Summary of non-neoplastic findings in female mice painted with TCEP

Organs	Doses (%)	6 Months			12 Months			18 Months		
		Findings			Findings			Findings		
		0	5	50	0	5	50	0	5	50
Respiratory system										
Lung										
		0	0	0	0	0	0	0	3	0
	adenomatous hyperplasia	0	0	0	0	0	0	0	3	0
	congestion	0	1	1	0	0	0	1	0	0
	foamy cell infiltration	0	0	0	1	0	1	2	1	1
	cell infiltration	0	1	1	2	3	0	9	2	3
Digestive system										
Stomach (forestomach)										
	hyperplasia	0	0	0	0	0	0	1	1	0
Liver										
	focal necrosis	0	1	0	1	1	0	0	1	2
	extramedullary hematopoiesis	0	0	0	0	0	1	2	0	1
Pancreas										
	cell infiltration	0	0	0	1	0	0	3	0	1
Urinary system										
Kidney (tubules)										
	hyperplasia	0	0	0	0	0	0	1	2	2
	dilatation	0	0	0	1	0	0	4	4	3
Hematopoietic system										
Spleen										
	extramedullary hematopoiesis	0	0	0	0	0	1	4	0	1
	hemosiderin deposition	0	0	0	0	0	0	3	0	1
Genital system										
Ovary (follicle)										
	cystic dilatation	0	0	0	0	0	0	2	1	0
Uterus (endometrium)										
	hyperplasia	0	0	0	0	0	0	21	17	15
	(lumen) dilatation	0	0	1	1	2	0	4	1	0
Endocrine system										
Pituitary gland (anterior lobe)										
	hyperplasia	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Thyroid gland (follicle)										
	hyperplasia	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Integument, musculo-skeletal system										
Skin (epidermis)										
	hyperplasia	0	0	0	0	0	0	0	0	1

的であった。6および12カ月目では各臓器で対照群を含む各群に種々の変化が認められたがいずれも散発的であった。

総括および考察

著者らは TCEP の経口発癌性試験において、雄で腎臓の腫瘍 (82%) および肝臓の腫瘍 (38%)、雌で白血球 (18%) および前胃の腫瘍 (14%) を認め、発癌性のあることを報告した¹¹⁾。今回、雌マウ

スを用いて5および50%の TCEP を皮膚に週2回、18カ月間塗布した経皮発癌性試験とともに6および12カ月目で屠殺する慢性毒性試験を併せて行った。

対照群を含む各群とも塗布部位に潰瘍など皮膚の変化が認められなかったことから TCEP は皮膚に対する刺激性はないものと考えられた。この結果はモルモットによる皮膚刺激試験の結果⁵⁾と一致した。

18カ月目における血液学的所見では MCH

(50%群) および MCHC (5 および 50%群) が有意な増加を示したが、これらの値はバックグランドデータを参考にすれば、軽微であることから異常所見とは考えられなかった。また、白血球百分比におけるリンパ球の減少 (50%群) は器官重量での脾臓の実重量および比重量の減少と関連性のある現象と考えられるが、組織学的にその意義を明らかにすることはできなかった。

発癌性試験において肺の腺腫、造血器官の白血病/悪性リンパ腫および乳腺の腺癌などが多く認められたが、腫瘍発生率は対照群との間に有意差は認められず、また ddY マウスにおける自然発生腫瘍データの¹²⁾ 範疇にあることから自然発生によるものと思われる。

全身諸臓器において低頻度ながら散見された非腫瘍性変化は、いずれも加齢に伴う変化であり、薬物による影響とは考えられなかった。

今回の雌マウスによる長期毒性試験の結果、TCEP 塗布による明らかな発癌性は認められなかった。しかし、経口投与による試験では雄マウスの腎臓に発癌性が認められており¹¹⁾、今後は雄マウスによる塗布試験の必要性があるものと考えられる。

文 献

- 1) 大場啄磨：環境汚染物質と毒性，化学の領域増刊 129号，101頁 (1980) 南江堂
- 2) 山口正夫：プラスチック難燃化の現状．日本ゴム協会誌，47，803～812 (1974)
- 3) Consumer product safety commission children's wearing apparel containing Tris: interpretation as banned hazardous substance. *Fed. Reg.* 42, 18850～18854 (1977)
- 4) Carcinogenesis Testing Program: Bioassay of tris(2, 3-dibromopropyl) phosphate for possible carcinogenicity. NCI Carcinogenesis Technical Report Series No. 76 (1978)
- 5) Fassett, D. W.: Industrial Hygiene and Toxicology II 1914～1924 (1963)
- 6) 門馬純子：厚生省 (生活化学安全対策室) 報告 (1985)
- 7) Prival, M. J., McCoy, E. C., Gutter, B. and Rosenkranz, H. S.: Tris(2, 3-dibromopropyl) phosphate; Mutagenicity of a widely used flame retardant. *Science*, 195, 76～78 (1977)
- 8) Nakamura, A., Tateno, N., Kojima, S., Kaniwa, M. and Kawamura, T.: The mutagenicity of halogenated alkanols and their phosphoric acid esters for salmonella typhimurium. *Mutation, Res.* 66, 373～380 (1978)
- 9) 後藤 稠編：産業中毒便覧. 977頁，医歯薬出版 (1983)
- 10) 山崎 実，野口雄次，丹田 勝，新谷 茂：ラット一般毒性試験における統計的手法の検討．武田研究所報，40，163～187 (1981)
- 11) 高田幸一，安原和寿雄，中路幸男，吉本浜子，門馬純子，会田喜崇，黒川雄二，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)
- 12) 鈴木繁生，松岡章夫，二木力夫，高垣善男：ddY系マウスにおける自然発生腫瘍の病理学的研究．*Exp. Anim.* 30, 407～420 (1981)

Bis(2,3-dibromopropyl)phosphate Magnesium のラットによる 急性および亜急性毒性試験

高田幸一・内藤克司・会田喜崇・門馬純子
吉本浜子・中路幸男・黒川雄二・戸部満寿夫

Acute and Subacute Toxicity Studies of Bis(2,3-dibromopropyl) phosphate Magnesium in Rat.

Koichi Takada, Katsushi Naito, Yoshitaka Aida, Junko Momma,
Hamako Yoshimoto, Yukio Nakaji, Yuji Kurokawa and Masuo Tobe

Acute and subacute oral toxicity tests of Bis(2,3-dibromopropyl)phosphate magnesium (Bis-BP·Mg) were carried out in Wistar rats.

In the acute toxicity test, Bis-BP·Mg suspended in arabic gum was administered orally to a group consisting of 10 male and 10 female rats, and they were observed for 14 days. LD₅₀ values of male and female rats were 283 (253~314) mg/kg and 261 (219~310) mg/kg, respectively. As toxic symptoms, eyelid closure, crouching, shivering and staggering gait were observed in the treated groups of both sexes. In gross findings, hypertrophy, discoloration and necrotic change of the liver, and hypertrophy and discoloration of the kidney were observed in the treated groups.

In histopathological examination, necrosis, desquamation, large nuclei formation of the tubular epithelium, and tubular dilatation of the kidney and necrosis of the liver cells were observed in the treated groups.

In the subacute toxicity test, groups of rats consisting of 5 males and 5 females were fed a commercial diet containing 0, 30, 100, 300 and 1000 ppm Bis-BP·Mg for 45 days. In body weight and food consumption, there were no significant difference between the control and treated groups. Significant increases were observed in the liver and kidney weights of male rats fed 1000 ppm Bis-BP·Mg. Histopathologically, desquamation, swelling, and large nuclei formation of the tubular epithelium, and tubular dilatation of the kidney were observed, but they were much less frequent than those in the acute toxicity test. It was concluded that Bis-BP·Mg has apparent renal toxicity.

Key words : Bis(2,3-dibromopropyl)phosphate magnesium, 急性および亜急性毒性試験, 腎毒性, ラット, 防炎加工剤

(Received May 31, 1991)

緒 言

石油化学の発展に伴い多くの繊維（ポリエステル、ナイロン、ビニロン等）が開発されてきた。これらの繊維は可燃性のものが多く、我が国では火災による事故対策としてカーテン、カーベットの防炎加工が義務づけられており、また、米国では乳幼児の寝具類に防炎加工剤の使用が義務づけられている。

このため種々の防炎加工剤が開発され、使用されているが、代表的な化合物としてトリス（1-アジリニル）ホスフィンオキシド（APO）、トリス（2,3-ジプロモプロピル）ホスフェート（Tris-BP）、ト

リス（2-クロロエチール）ホスフェート（TCEP）があげられる。しかしAPOは造血機能障害などが認められ¹⁾、Tris-BPはマウスの肝臓・腎臓、ラットの腎臓に発癌性²⁾、またTCEPはマウスの腎臓・肝臓に発癌性³⁾があることから使用が禁止されている。そのため、その代替品としてBis(2,3-dibromopropyl)phosphate magnesium (Bis-BP·Mg)をはじめとする種々の有機リン化合物が使用されてきた。Bis-BPはTA 100およびTA 1535を用いた実験で強い変異原性^{4,5)}、あるいは腎毒性が報告されている⁶⁻⁸⁾。

しかしながら Bis-BP·Mgの毒性に関する報告は

変異原性試験⁵⁾を除いてはみあたらない。このため、我々は慢性毒性・発癌性試験に先立ってラットでの経口急性毒性試験および45日間の亜急性毒性試験を行ったので報告する。

実験材料および方法

1. 検 体

使用した Bis-BP·Mg は、丸菱油化製の工業品で、Bis 体 62%、Mono 体 38% の混合物で純度 90% である。

性状は白色微粉末で水、エタノール、メタノールおよびその他の多くの有機溶媒に不溶である。

2. 動 物

静岡実験動物農業協同組合より急性毒性試験では4週齢で、また亜急性毒性試験では6週齢で購入した Slc:Wistar ラットの雌雄を、室温 23±1°C、湿度 55±5%、12時間照明(午前6時~午後6時)、換気回数 18/hr (オールフレッシュ)の飼育室で、ハンガー式架台を用いてアルミケージ(寸法: W 23×L 21×H 16 cm)にて1週間馴化飼育して実験に供した。動物は体重により層別化し、急性毒性試験では雌雄各々12群(1群10匹:体重雄85~104g, 雌75~90g)、また、亜急性毒性試験では雌雄各々5群(1群5匹:体重雄180~210g, 雌130~145g)に分けた。

3. 急性毒性試験

Bis-BP·Mg に5%アラビアゴム液を加え、5W/V%の懸濁液になるように調製した。投与は金属製胃管を用いて、1回強制経口投与を行った。なお、投与量は雄で196~609 mg/kg (公比1.12)、雌で123~643 mg/kg (公比1.18)の各々11段階とした。なお、対照群には検体投与群の最高投与量と同用量の5%アラビアゴム液を投与した。検体投与後の症状観察、死亡動物の有無および体重測定は14日間行った。さらに、14日間の観察を終了した時点で、すべての生存動物を、屠殺解剖して肉眼的に観察を行った後、一部の動物については病理組織学的検査を行った。

4. 亜急性毒性試験

急性毒性試験の結果に基づき、0(対照群)、30、100、300および1000 ppmの5用量を設けた。検体は船橋農場製のラット飼育用粉末飼料(F2)にそれぞれの割合で添加混合し、成型・乾燥して検体飼料を調製した。また、投与および観察期間は45日間とした。

一般状態および死亡の有無については毎日観察し、体重および摂餌量の測定は、週に2回行った。また、実験終了時には解剖に先立って16時間前に除餌を行い、その後すべての動物について、下記に示す各種検査を行った。

1) 血液学的検査: 眼窩静脈叢より採血した血液について、赤血球数(RBC)、ヘモグロビン量(Hb)、ヘマトクリット値(Ht)、平均血球容積(MCV)、平均ヘモグロビン量(MCH)、平均ヘモグロビン濃度(MCHC)および白血球数(WBC)を Coulter counter SP(Coulter Counter 社製)を用いて測定した。

2) 血清生化学的検査: 眼窩静脈叢より採取した血液を3000 rpmで15分間遠心分離して得られた血清について、総蛋白量(TP)、アルブミン(Alb)、A/G比、尿素窒素(BUN)、クレアチニン(CRN)、尿酸(UA)、血糖(Glc)、中性脂肪(TG)、総コレステロール(TCho)、アルカリ性フォスファターゼ(AIP)、コリンエステラーゼ(ChE)、グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ(GOT)、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ(GPT)、ロイシニアミノペプチダーゼ(LAP)、乳酸脱水素酵素(LDH)、磷(P)およびマグネシウム(Mg)を臨床生化学自動分析機 Gemsaec IV型(米国 Electro Nucleonic 社製)を用いて測定した。また、ナトリウム(Na)は電解質オートアナライザーで測定(日立702型)した。

3) 器官重量測定: 動物は生化学的検査のための血液採取を行った後、頸静脈切断により屠殺した。すべての動物について肉眼的に観察を行った後、脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、精巣、卵巣および副腎を摘出し、直ちに重量を測定し、さらにそれぞれの100g体重比を算出した。

4) 病理組織学的検査: 重量測定を行った器官のほか、胃、さらに肉眼的に変化を認めた器官および組織を摘出し、10%中性ホルマリン液で固定した後、常法に従ってパラフィン薄切標本を作製し、ヘマトキシリン-エオジン染色(H-E)を施し、腎臓についてはH-E染色の他にPAS、アザン染色を施して鏡検した。

5. 統計処理

急性毒性試験では、投与後14日間の死亡動物数より Litchfield-Wilcoxon 法に従って LD₅₀ 値を算出した。

亜急性毒性試験の血液学的検査、血液生化学的検査および器官重量の成績は、等分散を Bartlett の

方法で検定し、等分散の場合は一元配置の分散分析を行い、等分散でない場合は、Kruskal-Wallisの方法によって順位和検定を行った。群間に有意性が認められた場合の多重比較は、例数が揃っている場合はDunnett型で、不揃いな場合はScheffe型で、それぞれ対照群と各処置群の有意差検定を行った。

実験成績

1. 急性毒性試験

1) 一般状態

検体投与群の雌雄に共通する症状として、閉眼、うずくまり、流涙、身振いが認められた。高用量ではこれらの症状に加えて、歩行踉蹌あるいは歩行困難さらに立毛がみられ、腹臥又は横臥の姿勢をとり呼吸も荒く、正向反射消失後死亡した。

2) 死亡経過

動物の死亡はTable 1に示すように、検体投与後3時間目より認められた。雄では短期間で集中的に、また雌ではやや長い経過で死亡した。

3) 剖検所見

雌雄とも24時間以内に死亡した動物は殆んど変化は認められなかった。その後死亡した雌雄の動物

物では肝臓の肥大、退色および小葉の明瞭化が多く認められ、腎臓の退色も少数認められた。対照群を除く検体投与群の生存動物は雌雄とも肝臓の内・外側左葉辺縁部に淡黄色を呈する壊死様変化(雄で39例中37例、雌で54例中9例)および腎臓の肥大、退色、表面粗造(雄で39例中8例、雌で54例中14例)が認められた。

4) 病理組織学的検査

14日間生存した一部の動物について行った検査では、肝臓の内・外側左葉辺縁部に胞巣状の壊死が認められ、その周囲に結合組織の増生が強く認められた。腎臓では髓質外層近位尿細管上皮細胞の壊死、脱落および扁平化による管腔の拡張が、さらに、通常の4~5倍の大きさの尿細管上皮細胞の核が認められた。

5) LD₅₀ 値

検体投与後14日間の各群の死亡動物数より算出したLD₅₀ 値は、雄で283 mg/kg (信頼限界253~314 mg/kg)、雌で261 mg/kg (信頼限界219~310 mg/kg)であった。

2. 亜急性毒性試験

1) 一般状態および死亡

Table 1. Mortality of male and female rats fed Bis-BP·Mg

Sex	Dose (mg/kg)	No. of Animals	Hours			Days				
			3	6	24	2	3	4	5	6~14
Male	Cont.	10	0	0	0	0	0	0	0	0
	196	10	0	0	0	0	0	0	0	0
	220	10	0	0	2	2	2	2	2	2
	246	10	0	0	2	3	3	3	3	3
	276	10	0	0	1	3	3	3	3	3
	309	10	0	0	2	4	6	6	6	6
	346	10	0	0	4	6	9	9	9	9
	387	10	0	0	8	9	9	9	9	9
	434	10	0	0	9	9	9	9	9	9
	486	10	0	2	8	9	10	10	10	10
	544	10	0	2	10	10	10	10	10	10
	609	10	1	2	9	9	10	10	10	10
Female	Cont.	10	0	0	0	0	0	0	0	0
	123	10	0	0	0	0	0	0	0	0
	145	10	0	0	0	1	1	1	1	1
	171	10	0	0	0	2	2	2	2	2
	202	10	0	0	0	0	1	2	2	2
	238	10	0	0	0	2	2	2	2	2
	281	10	0	0	1	2	6	7	7	7
	332	10	0	0	0	3	5	6	7	7
	391	10	0	0	4	5	6	7	7	7
	462	10	0	0	4	5	9	9	9	9
	545	10	0	0	7	9	9	9	9	9
	643	10	1	4	8	9	10	10	10	10

検体投与期間中、雌雄とも特記すべき変化は認められなかった。

動物の死亡は雌雄とも対照群および各検体投与群で認められなかった。

2) 体重および摂餌量 (Fig. 1, 2)

体重は雌雄ともに各検体投与群で対照群とほぼ同

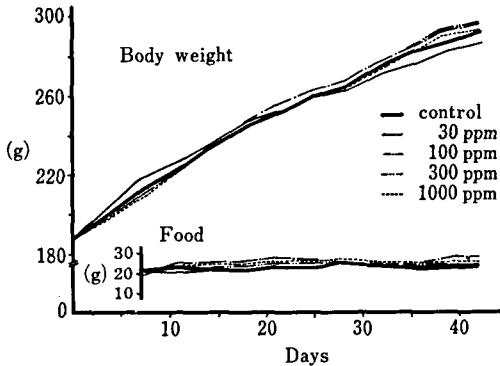


Fig. 1. Body weight and food consumption of male rats fed Bis-BP·Mg

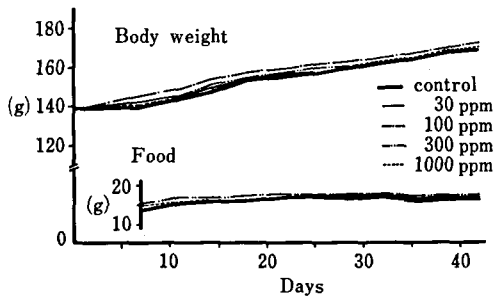


Fig. 2. Body weight and food consumption of female rats fed Bis-BP·Mg

様あるいは上回る増加を示した。

摂餌量は雌雄ともに群間に差を認めなかった。

3) 血液学的検査 (Table 2)

雌ではRBCがほぼ用量相関的に減少し、特に300および1000 ppm群で有意に認められた。雄ではRBCが100 ppm群でのみ有意に減少した。

4) 血清生化学的検査 (Table 3)

雄では1000 ppm群でCRNおよびNaの有意的な減少およびPの有意的な増加が認められた。雌ではBUN, ChEおよびTGが用量相関的に減少し、その他、1000 ppm群でGPTの有意的な減少、A/G比の有意的な上昇が認められた。

5) 器官重量 (Table 4)

雄では300 ppm群で腎臓の実重量の増加、1000 ppm群では肝臓および腎臓の実重量および比重量の増加が認められた。雌では有意差は認められなかった。

6) 肉眼所見

雄では1000 ppm群で腎臓の軽度な退色が認められた。雌では各群に著差は認められなかった。

7) 病理組織学的検査 (Table 5)

雄では検体投与群において、腎尿管上皮細胞の脱落、膨化、巨核化および好酸性小体の出現、尿管の拡張が高用量群に多く認められた。また前胃、心臓および肺の変化が少数例に認められた。

雌では検体投与群において、腎尿管の拡張および上皮性円柱が認められた。その他の器官に変化は認められなかった。

総括および考察

Bis-BP·Mgの経口投与によるLD₅₀値は雄で

Table 2. Hematological findings of male and female rats fed Bis-BP·Mg for 45 days

Dose (ppm)		Cont.	30	100	300	1000
No. of animals		5	5	5	5	5
Male	RBC	7.87 ± 0.27	7.40 ± 0.79	$6.85 \pm 0.66^{**}$	7.92 ± 0.71	7.57 ± 0.61
	Hb	46.2 ± 1.10	46.2 ± 0.84	47.6 ± 1.14	46.6 ± 0.84	48.2 ± 0.84
	Ht	15.3 ± 0.34	15.2 ± 0.44	15.6 ± 0.23	15.4 ± 0.42	15.3 ± 0.24
	MCV	47.3 ± 1.5	47.7 ± 1.1	45.8 ± 1.4	48.3 ± 0.7	48.2 ± 1.8
	MCH	17.6 ± 0.3	17.2 ± 0.4	17.4 ± 0.5	17.8 ± 0.4	18.0 ± 0.3
	MCHC	36.2 ± 1.6	34.9 ± 1.1	35.1 ± 1.1	36.4 ± 0.6	35.3 ± 0.8
	WBC	7.9 ± 1.0	8.9 ± 4.5	8.7 ± 3.0	7.5 ± 2.7	7.5 ± 1.2
Female	RBC	7.74 ± 0.36	7.37 ± 0.90	7.22 ± 0.40	$6.80 \pm 0.32^{**}$	$6.91 \pm 0.65^*$
	Hb	46.8 ± 1.52	46.1 ± 1.14	45.9 ± 1.24	46.1 ± 0.85	45.7 ± 1.20
	Ht	15.7 ± 0.37	15.7 ± 0.22	15.5 ± 0.28	15.8 ± 0.18	15.6 ± 0.46
	MCV	45.5 ± 1.3	44.9 ± 1.1	46.0 ± 1.3	45.1 ± 1.0	44.8 ± 0.9
	MCH	18.3 ± 0.5	18.3 ± 0.7	17.4 ± 0.5	17.6 ± 0.6	18.1 ± 0.3
	MCHC	35.7 ± 1.1	34.7 ± 1.3	36.6 ± 0.8	36.2 ± 0.8	37.3 ± 1.5
	WBC	7.0 ± 0.8	8.4 ± 1.6	6.5 ± 0.8	7.8 ± 1.3	9.9 ± 5.1

Values indicate mean \pm S.D.

* , ** : Significantly different from control at $P < 0.05$ and 0.01 , respectively.

Table 3. Biochemical findings of male and female rats fed Bis-BP·Mg for 45 days

Dose (ppm)		Cont.	30	100	300	1000	
No. of animals		5	5	5	5	5	
Male	TP	g/dl	7.0 ± 0.12	7.3 ± 0.34	7.0 ± 0.29	6.9 ± 0.09	7.1 ± 0.15
	Alb	g/dl	4.2 ± 0.10	4.4 ± 0.20	4.3 ± 0.08	4.3 ± 0.10	4.4 ± 0.04
	A/G		1.53 ± 0.11	1.47 ± 0.13	1.56 ± 0.12	1.66 ± 0.08	1.57 ± 0.07
	BUN	mg/dl	19 ± 3.6	20 ± 1.9	18 ± 2.9	17 ± 3.0	15 ± 1.5
	UA	mg/dl	1.8 ± 0.36	2.0 ± 0.41	2.4 ± 1.29	1.2 ± 0.24	1.3 ± 0.26
	CRN	mg/dl	0.62 ± 0.08	0.63 ± 0.06	0.62 ± 0.06	0.53 ± 0.04	0.50 ± 0.02 *
	Glc	mg/dl	161 ± 12.8	163 ± 10.2	155 ± 20.5	155 ± 8.8	142 ± 7.5
	TG	mg/dl	131 ± 33.3	140 ± 24.2	151 ± 35.7	138 ± 17.2	173 ± 28.0
	TCho	mg/dl	65 ± 9.3	69 ± 7.0	66 ± 5.1	56 ± 4.3	60 ± 2.5
	AIP	mu/ml	398 ± 48.4	434 ± 42.6	425 ± 16.0	408 ± 22.7	388 ± 25.5
	ChE	mu/ml	624 ± 93.7	632 ± 93.9	586 ± 125	635 ± 62.8	714 ± 85.8
	GOT	mu/ml	80 ± 25.6	92 ± 73.2	80 ± 24.4	59 ± 8.1	62 ± 10.0
	GPT	mu/ml	42 ± 13.2	47 ± 28.5	38 ± 6.1	29 ± 4.5	30 ± 5.3
	LDH	mu/ml	695 ± 760	422 ± 210	463 ± 318	217 ± 81	210 ± 78
	P	mg/dl	6.06 ± 0.64	6.95 ± 0.71	7.14 ± 0.79	6.80 ± 0.21	7.12 ± 0.17 *
	Na	MEQ/l	146 ± 1.6	146 ± 3.3	148 ± 5.5	144 ± 0.6	143 ± 1.2 *
Mg	mg/dl	2.30 ± 0.16	2.34 ± 0.39	2.80 ± 0.32	3.14 ± 0.05	3.22 ± 0.11	
Female	TP	g/dl	7.0 ± 0.20	6.7 ± 0.34	6.7 ± 0.16	6.8 ± 0.12	6.6 ± 0.29
	Alb	g/dl	4.4 ± 0.13	4.3 ± 0.19	4.4 ± 0.12	4.4 ± 0.03	4.3 ± 0.10
	A/G		1.74 ± 0.04	1.82 ± 0.05	1.90 ± 0.08	1.87 ± 0.10	1.93 ± 0.14 *
	BUN	mg/dl	20 ± 1.8	18 ± 1.3	18 ± 3.2	16 ± 0.6	13 ± 0.7 **
	UA	mg/dl	1.8 ± 0.37	1.8 ± 0.30	1.6 ± 0.44	1.2 ± 0.30	1.3 ± 0.30
	CRN	mg/dl	0.55 ± 0.10	0.55 ± 0.06	0.54 ± 0.05	0.53 ± 0.01	0.51 ± 0.03
	Glc	mg/dl	142 ± 21.6	136 ± 18.0	137 ± 6.4	129 ± 5.4	131 ± 10.1
	TG	mg/dl	101 ± 15.2	70 ± 9.7 *	90 ± 24.8	74 ± 12.0 *	70 ± 7.7 *
	TCho	mg/dl	87 ± 2.9	87 ± 3.7	82 ± 2.6	82 ± 6.9	83 ± 2.6
	AIP	mu/ml	326 ± 30.6	305 ± 22.0	306 ± 33.6	319 ± 23.5	280 ± 25.4
	ChE	mu/ml	1828 ± 284	1751 ± 145	1630 ± 261	1448 ± 163 *	872 ± 165 **
	GOT	mu/ml	86 ± 38.0	62 ± 8.5	63 ± 14.3	64 ± 7.6	54 ± 14.1
	GPT	mu/ml	42 ± 8.8	39 ± 5.7	39 ± 10.0	34 ± 5.5	28 ± 4.9 *
	LDH	mu/ml	502 ± 324	328 ± 125	397 ± 198	337 ± 174	288 ± 147
	P	mg/dl	5.30 ± 0.36	3.98 ± 0.40	4.17 ± 0.80	4.30 ± 0.49	4.05 ± 0.52
	Na	MEQ/l	144 ± 2.3	142 ± 0.5	142 ± 1.3	142 ± 1.8	143 ± 2.4
Mg	mg/dl	2.54 ± 0.09	2.42 ± 0.48	2.38 ± 0.13	2.38 ± 0.13	2.38 ± 0.15	

Values indicate mean ± S.D.

*, ** : Significantly different from control at P<0.05 and 0.01, respectively.

283 mg/kg, 雌で261 mg/kgであった。検体投与による一般状態の変化としてはうずくまり、身振り、歩行踰越および正向反射消失などが認められた。剖検所見としては肝臓の退色および壊死様変化、腎臓の退色、肥大および表面粗造が認められた。これら臓器の変化に対応する病理組織学的所見としては肝臓で肝細胞の壊死および線維症（結合組織の増生）、腎臓では髄質外層近位尿細管上皮細胞の壊死、脱落、扁平化および巨核化、管腔の拡張などが認められた。

Elliott ら⁹⁾はSDラットにBis-BPを120 mg/kg, 1回腹腔内投与し48時間後に屠殺し検査した結果、血清クレアチニンの上昇、腎尿細管のHenle's loopの上皮細胞の壊死が認められたと報告し、また、戸部ら⁹⁾は100 mg/kgを腹腔内、1回投与し1, 3, 7および14日後に屠殺した結果、腎臓で近位尿細管上皮の扁平化による管腔の拡張、上皮細胞の脱落および膨化が1日目から、上皮細胞の再生が3日目から認められたと報告している。これら以外にもBis-BPをラットに投与すると多尿となり、腎尿細管の壊死、拡張が認められたとする報告^{7,9)}がある。この様にBis-BPは強い腎障害を示すが、Mg塩で

あるBis-BP·Mgも急性毒性試験における肉眼ならびに病理組織学的所見からBis-BPと同様に腎障害を起こすことが示唆された。しかし、これらの報告では肝臓に対する影響は認められなかったとしている。なお、Tris-BPでは腎障害とともに肝臓の小葉中心性の壊死が認められたとする報告もある¹²⁾。Bis-BP·Mgがリン酸エステル系防炎加工剤であるTris-BP^{10,11)}およびTCEP⁹⁾と共通して腎に障害を及ぼすことは興味深いことである。

さらにまた、Bis-BPの代謝実験¹³⁾では腎臓および肝臓に高い分布を示し、剖検および病理組織学的検査における結果と考え合わせるとBis-BP·Mgの標的臓器は腎臓および肝臓であることを示唆しているものと思われる。

亜急性毒性試験は30, 100, 300および1000 ppmの4群を設け実験を行った。血清生化学的検査では雌の300および1000 ppm群でBUN, TGおよびChEの減少が認められ、TGおよびChEの減少は戸部らのBis-BPの報告⁹⁾と一致していた。器官重量では、雄の1000 ppm群で肝臓および腎臓の実重量および比重量の増加が認められ、急性毒性試験に

Table 4. Organ weight of male and female rats fed Bis-BP for 45 days

Dose (ppm)		Cont.	30	100	300	1000	
No. of animals		5	5	5	5	5	
Male	Body weight	g	282.4 ± 35.8	297.6 ± 21.6	302.4 ± 14.9	300.8 ± 16.3	301.2 ± 21.2
	Absolute Organ Weight						
	Brain	g	1.80 ± 0.04	1.80 ± 0.04	1.83 ± 0.06	1.81 ± 0.04	1.82 ± 0.08
	Heart	g	0.77 ± 0.10	0.83 ± 0.12	0.77 ± 0.03	0.81 ± 0.05	0.81 ± 0.05
	Lung	g	0.90 ± 0.06	1.02 ± 0.18	1.12 ± 0.26	1.03 ± 0.20	1.12 ± 0.23
	Liver	g	8.34 ± 1.29	9.42 ± 1.53	10.42 ± 2.43	9.18 ± 1.01	10.80 ± 1.82 *
	Kidney	g	1.58 ± 0.19	1.70 ± 0.15	1.83 ± 0.16	1.87 ± 0.15 *	1.88 ± 0.18 *
	Spleen	g	0.53 ± 0.04	0.59 ± 0.07	0.55 ± 0.02	0.54 ± 0.05	0.58 ± 0.09
	Testis	g	2.64 ± 0.17	2.78 ± 0.13	2.78 ± 0.19	2.79 ± 0.20	2.83 ± 0.14
	Adrenal	mg	31.0 ± 2.00	33.4 ± 3.05	29.8 ± 3.83	31.2 ± 2.28	33.4 ± 3.71
	Relative Organ Weight						
	Brain	%	0.64 ± 0.08	0.60 ± 0.03	0.61 ± 0.03	0.60 ± 0.02	0.61 ± 0.03
	Heart	%	0.28 ± 0.02	0.28 ± 0.03	0.25 ± 0.01	0.27 ± 0.01	0.27 ± 0.02
	Lung	%	0.32 ± 0.02	0.34 ± 0.05	0.37 ± 0.08	0.34 ± 0.06	0.37 ± 0.06
	Liver	%	2.95 ± 0.14	3.16 ± 0.41	3.44 ± 0.73	3.04 ± 0.23	3.61 ± 0.41 **
	Kidney	%	0.57 ± 0.03	0.57 ± 0.04	0.60 ± 0.04	0.62 ± 0.05	0.62 ± 0.03 *
	Spleen	%	0.19 ± 0.02	0.20 ± 0.01	0.18 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.19 ± 0.02
	Testis	%	0.94 ± 0.09	0.94 ± 0.05	0.92 ± 0.07	0.92 ± 0.04	0.94 ± 0.03
	Adrenal	mg%	11.1 ± 1.77	11.3 ± 1.18	9.9 ± 1.47	10.4 ± 0.50	11.1 ± 1.24
Female	Body weight	g	172.8 ± 5.9	172.0 ± 12.4	176.2 ± 8.8	174.8 ± 9.0	169.8 ± 11.0
	Absolute Organ Weight						
	Brain	g	1.75 ± 0.06	1.68 ± 0.03	1.72 ± 0.06	1.71 ± 0.02	1.67 ± 0.04
	Heart	g	0.53 ± 0.04	0.60 ± 0.06	0.55 ± 0.03	0.54 ± 0.05	0.52 ± 0.04
	Lung	g	0.83 ± 0.17	0.72 ± 0.10	0.74 ± 0.06	0.69 ± 0.04	0.74 ± 0.07
	Liver	g	5.95 ± 0.66	5.13 ± 0.46	5.31 ± 0.48	5.18 ± 0.31	5.17 ± 0.78
	Kidney	g	1.12 ± 0.12	1.12 ± 0.07	1.12 ± 0.12	1.09 ± 0.07	1.12 ± 0.05
	Spleen	g	0.37 ± 0.01	0.35 ± 0.04	0.35 ± 0.03	0.38 ± 0.04	0.38 ± 0.04
	Ovary	mg	61.6 ± 10.6	58.4 ± 3.7	64.8 ± 8.4	62.6 ± 8.1	60.0 ± 11.5
	Adrenal	mg	56.8 ± 23.9	40.6 ± 3.4	54.0 ± 31.7	44.2 ± 6.7	39.6 ± 5.7
	Relative Organ Weight						
	Brain	%	1.01 ± 0.05	0.98 ± 0.07	0.98 ± 0.06	0.98 ± 0.05	0.88 ± 0.05
	Heart	%	0.31 ± 0.02	0.32 ± 0.02	0.31 ± 0.03	0.31 ± 0.02	0.31 ± 0.02
	Lung	%	0.47 ± 0.10	0.42 ± 0.07	0.42 ± 0.04	0.40 ± 0.03	0.43 ± 0.02
	Liver	%	3.20 ± 0.32	2.99 ± 0.30	3.02 ± 0.25	2.96 ± 0.09	3.04 ± 0.37
	Kidney	%	0.65 ± 0.06	0.65 ± 0.06	0.64 ± 0.08	0.63 ± 0.05	0.66 ± 0.06
	Spleen	%	0.22 ± 0.01	0.20 ± 0.03	0.20 ± 0.02	0.21 ± 0.02	0.22 ± 0.03
	Ovary	mg%	35.7 ± 6.4	34.1 ± 3.7	36.8 ± 4.5	35.8 ± 4.8	35.3 ± 6.3
	Adrenal	mg%	33.7 ± 14.6	23.8 ± 3.2	30.6 ± 17.9	25.2 ± 2.7	23.3 ± 3.0

Values indicate mean ± S.D.

*,** : Significantly different from control at P<0.05 and 0.01, respectively.

おける肝臓および腎臓の肥大を裏づける結果が得られた。病理組織学的所見では、雌雄ともに腎尿細管の拡張、尿細管上皮細胞の脱落および巨核化など急性毒性試験と同様の所見が認められた。しかし、肝臓の重量増加を裏づける組織所見が得られなかったことに関しては、Elliott⁶⁾らのTris-BPの投与では重量増加は認めるが組織学的変化は認めなかったとしており、これらの報告と同様であった。

以上の結果、Bis-BP-Mgはラットの腎臓の尿細管に障害を示すことが判明した。しかし、急性毒性試験で認められた肝障害は亜急性毒性試験では認められなかった。なお、慢性毒性試験で食道を含む消化管および肝臓に腫瘍発生の増加が認められている¹⁴⁾。

文 献

1) 大場啄磨：環境汚染物質と毒性，化学の領域増

刊，129号，101頁（1980）南江堂

- 2) Carcinogenesis Testing Program: Bioassay of tris(2, 3-dibromopropyl) phosphate for possible carcinogenicity. NCI Carcinogenesis Technical Report Serises No. 76 (1978)
- 3) 高田幸一，安原和寿雄，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)
- 4) Prival, M. J., McCoy, E. C., Gutter, B. and Rosenkranz, H. S.: Tris(2,3-dibromopropyl) phosphate; Mutagenicity of a widely used flame retardant. Science, 195, 76~78 (1977)
- 5) Nakamura, A., Tateno, N., Kojima, S., Kaniwa, M. and Kawamura, T.: The mutagenicity of halogenated alkanols and their phosphoric acid esters for salmonella typhimurium. Mutation, Res. 66, 373~380 (1978)
- 6) Elliott, C. W., Lynn, R. K., Houghton, D. C.,

Table 5. Histopathological findings of male and female rats fed Bis-BP·Mg for 45 days

Sex	Male					Female				
	Dose (ppm)		100	300	1000	Dose (ppm)		100	300	1000
No. of animals	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Lung congestion	±	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Heart fibrosis	±	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Liver extramedullary hematopoiesis	±	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Kidney (Proximal tubules)										
eosinophilic body	±	0	2	3	1	3	0	0	0	0
desquamation of epithelium	±	0	1	2	4	0	0	0	0	0
swelling of epithelium	±	0	0	1	2	2	0	0	0	0
epithelial cast	±	0	0	0	0	2	0	0	0	0
dilatation	±	0	0	0	2	1	0	0	0	0
large nuclei	±	0	0	0	1	0	0	1	1	1
regeneration	±	0	0	2	1	1	0	1	1	2
regeneration	±	0	0	0	0	3	0	0	0	1
regeneration	±	0	0	1	0	3	0	0	0	0
regeneration	±	0	0	0	0	2	0	0	0	0
regeneration	±	1	0	1	0	1	0	0	0	0
Forestomach hyperkeratosis	±	0	0	1	0	0	0	0	0	0

± : slight + : mild

- Kennish, L. M. and Bennett, W. M.: Nephrotoxicity of the flame retardant Tris(2,3-dibromopropyl)phosphate, and its metabolites. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **62**, 179~182 (1982)
- 7) Robert, K. L., Clare, G. G., Kenneth, W. and John, M. K.: Metabolism, distribution, and excretion of the flame retardant, Tris-BP in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **63**, 105~119 (1982)
- 8) Fukuoka, M., Takahashi, T., Naito, K., and Takada, K.: Comparative studies on nephrotoxic effects of tris(2,3-dibromopropyl)phosphate and bis(2,3-dibromopropyl)phosphate on rat urinary metabolites. *J. Appl. Toxicol.* **8**, 43~52 (1988)
- 9) 戸部満寿夫, 中路幸男, 小林和雄, 中村晃忠, 内藤克司, 齊藤 実, 鈴木幸子, 内田雄幸, 高田幸一, 安原加寿雄, 大場 栄: 腎障害に関する基礎的研究 PM および Bis-BP 投与による尿中酵素活性と組織学的変化の相関性, 衛試報告, **103**, 51~59 (1985)
- 10) Osterberg, R. E., Bierbower, G. W., and Hehir, R. M.: Renal and testicular damage following dermal application of the flame retardant tris(2,3-dibromopropyl)phosphate. *J. Toxicol. Environ Health* **3**, 979~987 (1977)
- 11) Reznik, G., Ward, J. M., Hardistry, J. F. and Russfield, A.: Renal carcinogenic and nephrotoxic effects of the flame retardant tris(2,3-dibromopropyl)phosphate in F344 rats and (C57BL/6N×C3H/HeN) F1 mice. *JNCI* **63**, 2, 205~212 (1979)
- 12) Soderlund, E., Dybing, E., and Nelson, D. S.: Nephrotoxicity and hepatotoxicity of tris(2,3-dibromopropyl)phosphate in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **56**, 171~181 (1980)
- 13) Minegishi, K., Kurebayashi, H., Nambara, S., Morimoto, K., Takahashi, T. and Yamaha, T.: Comparative studies on absorption, distribution, and excretion of flame retardants halogenated alkyl phosphate in rats. *EISEI KAGAKU* **34**, 102~114 (1988)
- 14) 小林和雄, 高田幸一, 内藤克司, 内田雄幸, 安原加寿雄, 戸部満寿夫: Bis-BP·Mg 投与による消化器系及び泌尿器系の組織学的変化について. 第3回毒性病理研究会講演要旨集, 52頁 (1987)

ラット腎遊離細胞への有機陰イオンの取り込み機構

大野泰雄・西山憲子・川西 徹・高仲 正

Studies on the Uptake of 8-Anilino-1-naphthalene Sulfonate
by Rat Freshly Isolated Renal Cells

Yasuo Ohno, Noriko Nishiyama, Toru Kawanishi and Akira Takanaka

The addition of 8-anilino-1-naphthalene sulfonate (ANS) into rat renal cell suspension caused a rapid increase in fluorescence (Ex. 400 nm, Em. 470 nm). The increase in fluorescence seemed to be composed of two phases. When the cells were disrupted by ultrasonic wave, the fast phase (0-ca 20 sec) increased and the slow phase (after ca 40 sec) disappeared. The rate of increase in the slow phase was dependent on the concentration of ANS and on the ambient temperature. A double reciprocal plot of the rate and the concentration exhibited straight line. It was decreased by bromophenol blue and rose bengal but not by other organic anions like *p*-aminohippuric acid and several metabolic inhibitors.

It seemed that the uptake of ANS into the renal cell is mediated by a carrier which is different from that for *p*-aminohippuric acid.

Key words : 8-anilino-1-naphthalene sulfonate, kidney cells, uptake, freshly isolated renal cells

(Received May 31, 1991)

腎は化学物質や薬物によりしばしば障害を受けることが知られている。これらの腎毒性発現機序を検討するためには多種類の、様々な特徴を持つ実験法が存在することが望ましい。一方、我々は Jones¹⁾により報告された方法により調製した腎遊離細胞が主に腎皮質の近位尿細管に由来することを示し^{2,3)}、毒性研究への応用も可能であることを示した⁴⁾。しかし、調製直後の遊離細胞系では、それを調製する際のコラーゲナーゼ処理により細胞膜が変化してしまう可能性もあり、腎遊離細胞を腎毒性試験法の一つとして確立するためには、細胞膜機能についても検討しておく必要がある。そこで、本研究においては、腎の主要な機能のひとつである細胞膜を介した化学物質の輸送機構について、有機陰イオンである 8-anilino-1-naphthalene sulfonate (ANS) を用い検討した。

実験方法

肝および腎遊離細胞は雄ラット (ウィスター系, 10~15 週齢, 日本ラット) より、それぞれ Moldéus⁵⁾ および Jones¹⁾ のコラーゲナーゼ還流法に従って調製した。肝遊離細胞は 150 メッシュのナイロ

ンフィルターで濾過した後、600 rpm で 3 分間遠心し、沈澱を 12.5 mM の HEPES を含む Krebs-Henseleit 溶液 (Krebs 液) で分散し、実験に使用した。腎遊離細胞は 150, 300, および 450 メッシュのフィルターで順次濾過し、その後 600 rpm で 3 分間遠心し、沈澱を Krebs 液で一回洗浄した後、Krebs 液で再分散し実験に用いた。

細胞への取り込みの絶対量は Sugiyama⁶⁾ の濾過法を用いて測定した。3 ml の腎細胞懸濁液 (2×10^6 cells/ml) を分光蛍光光度計 (日立 650-40) にセットした蛍光セル中に入れ、37°C で攪拌しながら 5 分間プレインキュベートした。その後、2.5 mM の ANS 溶液を添加し、その蛍光強度の変化を記録した (励起波長 400 nm, 蛍光波長 480 nm)。5 分後に細胞懸濁液を吸引濾過し (Watman GF/F), 3 ml の氷冷 Krebs 液で 3 回洗浄した。濾紙を 2 ml のアルカリ性メタノール溶液 (メタノール: 1N-NaOH=8:1) 中で 1 時間振盪し、ANS を抽出した。これを遠心し、その上清の蛍光 (励起波長 390 nm, 蛍光波長 500 nm) を測定し、細胞に付着或いは細胞内に存在した ANS を測定した。

細胞への取り込み過程は ANS 添加後の蛍光の変

化を追跡することにより検討した。2 ml の細胞懸濁液（腎細胞は 2×10^6 cells/ml, 肝細胞は 5×10^6 cells/ml）を蛍光セルに入れ、以後上と同様に ANS 添加後の蛍光変化を記録した。なお、各種薬物（特記ない場合は $20 \mu\text{M}$ ）による ANS 取り込みに対する影響を検討する場合は ANS 添加の 5 分前に細胞懸濁液中に添加した。

実験成績

1. 細胞懸濁液への ANS 添加による蛍光変化と細胞への取り込み量との関係

腎遊離細胞懸濁液に ANS を加え 400 nm の光を照射すると、470~480 nm 付近に強い蛍光が現れた。この蛍光は ANS 添加直後に急速に上昇し、ついでゆるやかな上昇となる (Fig. 1)。ANS による蛍光強度の変化は ANS の細胞への結合、あるいは取り込みと対応していた (Fig. 2)。一方、超音波で細胞膜を破壊した標本では ANS の添加直後の約 20 秒間は蛍光が急速に増加したが、以後一定となった。

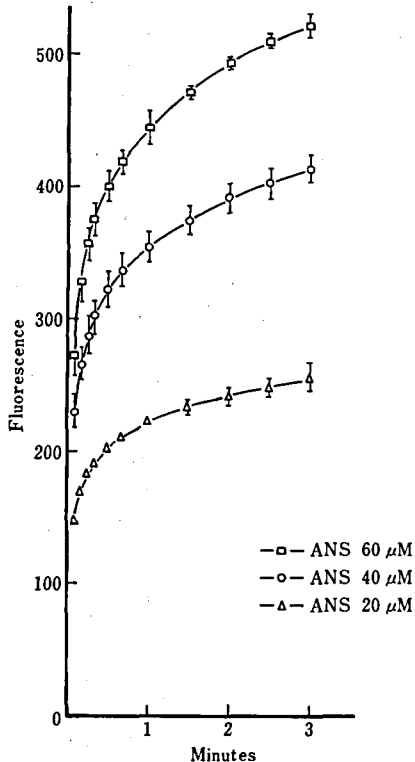


Fig. 1. Increase in fluorescence after addition of 8-anilino-1-naphthalene sulfonate (ANS) into the renal cell suspension.

These data represent the mean \pm S. E. of 3 determinations.

これらの結果から、添加直後の蛍光の増加は細胞膜表面への結合によるものであり、その後のゆっくりと増加する部分は細胞内への取り込みによると思われる。そこで、細胞内への ANS の取り込み過程を検討するために、添加後 20 秒から 40 秒までの相と 40~90 秒までの相とにわけて検討した。

2. ANS 取り込み速度と細胞膜への結合の薬力学的解析

ANS 添加による蛍光強度の変化は ANS 濃度に依存しており、Fig. 1 に示したように ANS 濃度の増加に応じて蛍光は強くなる。しかし、その変化の速度は ANS の濃度の変化に対して直線的では無く、明らかに頭打ちの傾向が認められ、Lineweaver-Burk plot を行って見ると Fig. 3 で示したように、ほぼ直線となった。Krebs 液を用いて細胞を懸濁した場合に、20~40 秒の間の蛍光の変化からみかけ上の K_m 値と V_{max} 値を計算するとそれぞれ $56.2 \pm 14.0 \mu\text{M}$ および $2.64 \pm 0.27 \text{ pmole/min}/2 \times 10^6 \text{ cells}$ であった。また、肝遊離細胞ではそれぞれ

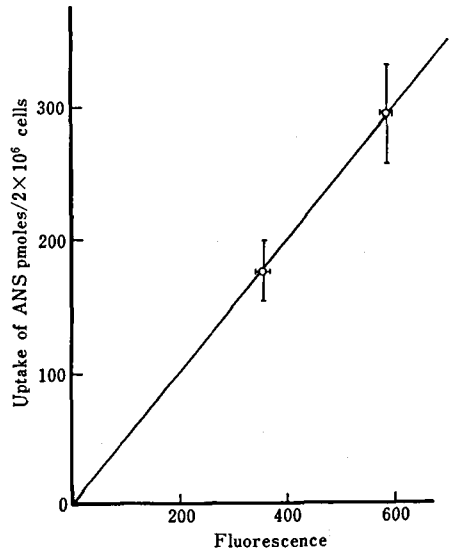


Fig. 2. Relation between the intensity of fluorescence and the amount of ANS extracted from the renal cells.

Fluorescence was measured at 5 min after the addition of ANS into the renal cell suspension and then filtered by glass filter. Cells on the filter were extracted with methanol: 1N-NaOH (8:1) and ANS was determined spectrofluorometrically. These data represent the mean \pm S. E. of 5 determinations.

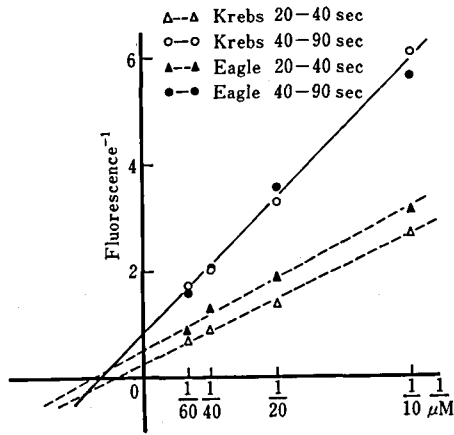


Fig. 3. Lineweaver-Burk plot of the change of fluorescence and the concentration of ANS.

Renal cells were suspended in Krebs-Henseleit solution or Eagle's MEM medium. All of the other experiments in this manuscript used Krebs-Henseleit solution to suspend the cells.

Changes in the fluorescence were measured between 20 and 40 sec or between 40 and 90 sec after the addition of ANS into the cell suspension.

14.8 μM および 2.99 pmole/min/ 5×10^5 cells であった。一方、40~90 秒の間の変化からみかけ上の Km 値と Vmax 値を計算するとそれぞれ $45.0 \pm 8.3 \mu\text{M}$ および 1.28 ± 0.12 pmole/min/ 2×10^6 cells となった。肝遊離細胞の場合にはそれぞれ 18.4 μM および 2.17 pmole/min/ 5×10^5 cells であった。一方、Eagle MEM 培地を用いて細胞を懸濁した場合には、蛍光の変化は少なかった。しかし、Fig. 3 で示したように 40~90 秒間での変化は Krebs 液を用いた場合と変わらなかった。これは Eagle MEM 培地の内に含まれるアミノ酸等が細胞膜への ANS の結合を抑制するが、細胞内への取り込みには影響しないことによると思われる。以後、細胞内への ANS の取り込みの指標として ANS 添加後 40~90 秒間の蛍光の変化を用いた。

3. ANS 取り込み速度の温度依存性

インキュベーション温度が 15°C, 27°C, および 37°C では温度が高い方が ANS の取り込みが多く (Fig. 4), ANS の取り込み過程が温度依存的であることがわかる。これをアレニウスプロットすると右下がりの曲線が得られ、その直線の傾きから活性化エネルギーを求めたところ、ANS 20 μM で 12.52 Kcal/mole, ANS 60 μM で 10.54 Kcal/

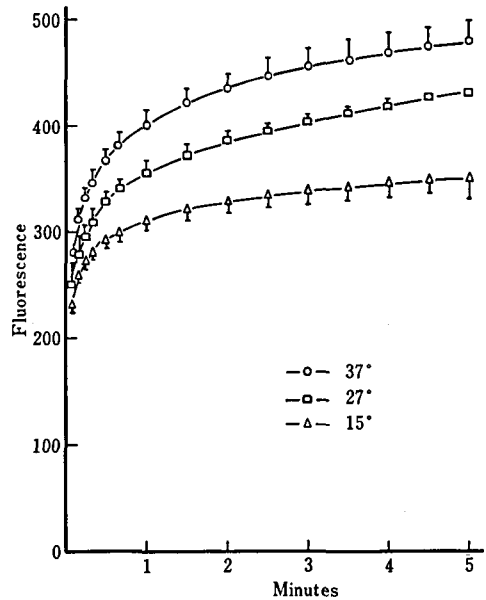


Fig. 4. Influence of ambient temperature on the uptake of ANS by renal cells.

Renal cells were preincubated at the indicated temperature and the ANS was added. Because the fluorescence of the ANS itself changes depending on the temperature, results of 27°C and 15°C were corrected based on the relation between temperature and fluorescence which was obtained by using ANS and sonicated renal cell suspension.

mole であった (Fig. 5).

4. 代謝拮抗剤および SH 基および NH₂ 基修飾剤の影響

代謝阻害剤である KCN, antimycin A, rotenone, carbonylcyanide-*m*-chlorophenylhydrazine, および ouabain では ANS の蛍光は影響されなかった。SH 基修飾剤である *n*-ethylmaleimide, *p*-hydroxymercuribenzoic acid でも抑制は認められなかった。一方、NH₂ 基修飾剤である 2,4-dinitrofluorobenzene では濃度依存的な抑制が認められた。この結果を逆数プロットしたものが Fig. 6 であり、競合的抑制に近い抑制であった。

5. 有機陰イオンによる影響

ANS の腎遊離細胞への取り込みは bromophenol blue と rose bengal により競合的に抑制された。しかし、sulfobromophthalene, *p*-aminohippuric acid, probenecide (いずれも 20 μM) では抑制されなかった (Fig. 7, 8).

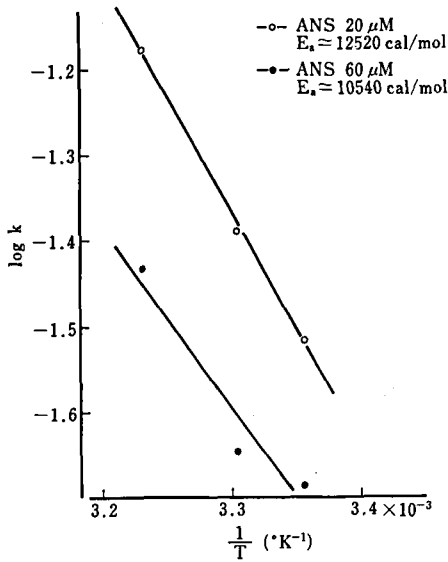


Fig. 5. Arrhenius plot for the uptake of ANS by renal cells.

k indicated the changes of the fluorescence (between 40 and 90 sec) divided by the concentration of ANS.

Activation energy (E_a) can be obtained from slope of the line.

Slope = $-E_a/2.3 R$ (R : gas constant)

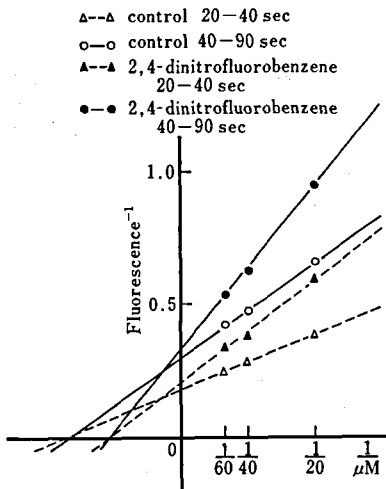


Fig. 6. Effects of 2,4-dinitrofluorobenzene ($20 \mu\text{M}$) on the uptake of ANS by renal cells.

考 察

ANSは細胞膜あるいは細胞内の構造と結合することにより大きな蛍光の変化を起こすことが知られており、この性質を利用して赤血球⁹⁾、Ehrlich腹

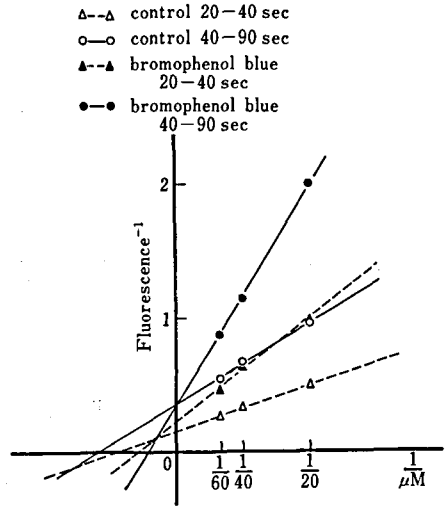


Fig. 7. Effects of bromophenol blue ($20 \mu\text{M}$) on the uptake of ANS by renal cells.

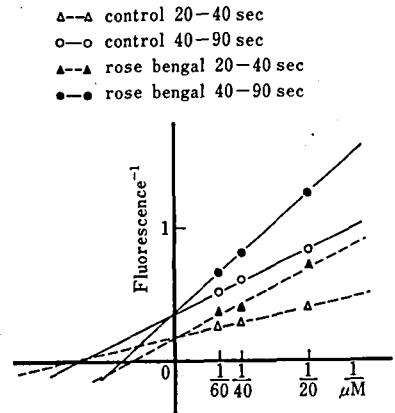


Fig. 8. Effects of rose bengal ($20 \mu\text{M}$) on the uptake of ANS by renal cells.

水癌細胞⁹⁾、肝細胞^{6,7)}などの細胞内への有機陰イオンの輸送に関する研究が行われてきた。これは添加後の蛍光の強さが細胞膜あるいは細胞内に取り込まれたANSの量と直線的な関係にあること、また、砒素処理等で生存率の低下した細胞標本ではANS添加直後に急速に蛍光が増加した後は、蛍光の強さが一定となるのに対して、生存率の高い標本ではANS添加後10分以上にわたり蛍光が増加していくこと、更には、ある種の培養癌細胞では細胞内にANSが入らない⁷⁾こと等からANS添加による蛍光の変化を追うことにより、ANSの細胞膜への結合や細胞内への移行を連続的に追跡できることによる。

腎遊離細胞を用いた今回の実験においても、ANS 添加による蛍光の変化が細胞膜面あるいは細胞内に存在する ANS の量と比例関係にあることが示された。また、超音波処理により細胞構造が破壊された標本では、ANS の細胞内への輸送と対応していると思われる ANS 添加 20 秒以降のゆるやかな蛍光の増加が認められなかった。これは細胞構造が破壊された場合は ANS が膜を横切ることなく、細胞内成分と直ちに結合することによると思われる。

ANS の細胞内への輸送の初速度 (ANS 添加後 40~90 秒間の蛍光変化を指標とした) は ANS 濃度に依存して増加し、Lineweaver-Burk プロットで直線的になったことから、ANS の輸送が濃度のみに依存する単純拡散によるものではなく、細胞膜に存在する担体を介していることが示唆された。同様の結論が肝細胞でも示されている^{6,7)}。また、ANS 取り込みの初速度は温度依存性であり、アレニウスプロットにより得た ANS の細胞内への取り込みに要するエネルギーは 20 μ M で 12.5 Kcal/mole であった。これは肝遊離細胞での sulfobromophthalein やコール酸の値がそれぞれ 11 Kcal/mol¹⁰⁾ および 13 Kcal/mole¹¹⁾ であることとほぼ対応している。

ANS の取り込み過程はミトコンドリアの電子伝達系阻害やアンカップラー、また、Na⁺-K⁺-ATPase 阻害剤のいずれによっても抑制されず、ANS の腎遊離細胞への取り込み過程はエネルギーに依存した能動輸送ではなく、担体を介する促進拡散であると思われる。同様の結果は肝遊離細胞で ANS については Sugiyama ら⁶⁾ および Chen and Lery⁷⁾ により、dihydroergotamine については Dumont ら¹²⁾ により示されている。一方、コール酸の取り込み過程はエネルギー依存性であると報告されている¹¹⁾。

ANS の取り込み過程は *p*-aminohippuric acid, sulfobromophthaleine, probenecide では抑制されず、rose bengal および bromophenol blue で競合的に抑制された。これは ANS と前三者の輸送に関係する担体は異なる物であること、および、後二者の担体とは類似したものであることを示唆している。また、SH 基修飾剤である ethylmaleimide や sodium *p*-hydroxymercuribenzoic acid では影響されず、NH₂ 基修飾剤である 2,4-dinitrofluorobenzene により抑制されたことは、担体の機能に SH 基はそれほど重要ではなく、NH₂ 基の重要性を示唆しているものと思われる。

コラーゲナーゼ処理することにより得た腎遊離細胞においても ANS 輸送に係る担体が存在し、これを介して ANS は細胞内へ拡散してゆくものと思われた。この担体の性質は肝遊離細胞において報告されたもの⁶⁾ とほぼ同様であった。

文 献

- 1) Jones, D. P., Sundby, G. B., Ormstad, K. and Orrenius, S.: Use of isolated kidney cells for study of drug metabolism, *Biochem. Pharmacol.*, **28**, 929~935 (1979)
- 2) 大野泰雄, 川西 徹, 高橋 惇, 高伸 正, 大森 義仁, 遠藤 仁: コラーゲナーゼ灌流法によって得られた腎単離細胞の由来とその特徴, 第17回薬物代謝と薬効毒性シンポジウム, 講演要旨集, 227~230 (1985)
- 3) 大野泰雄: 肝および腎遊離細胞を用いる毒性試験法, トキシコロジーフォーラム, **10**, 144~152 (1987)
- 4) Ohno, Y., Jones, T. W. and Ormstad, K.: Allyl alcohol toxicity in isolated renal epithelial cells: Protective effects of low molecular weight thiols, *Chem. Biol. Interactions* **52**, 289~299 (1985)
- 5) Moldéus, P., Högborg, J. and Orrenius, S.: Isolation and use of liver cells, *Meth. Enzymol.* **52**, 60~71 (1978)
- 6) Sugiyama, Y., Kimura, S., Lin, J. H., Izukura, M., Awazu, S. and Hanano, M.: Effects of organic anions on the uptake of 1-anilino-8-naphthalenesulfonate by isolated liver cells, *J. Pharm. Sci.* **72**, 871~876 (1983)
- 7) Cheng, S. and Levy, D.: The interaction of the anionic fluorescence probe, 1-anilino-naphthalene-8-sulfonate with hepatocytes and hepatoma tissue culture cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **511**, 419~429 (1978)
- 8) Fortes, P. A. G. and Hoffman, J. F.: Interaction of fluorescent probes with anion permeability pathways of human red cells, *J. Membr. Biol.*, **16**, 79~100 (1974)
- 9) Levinson, C. and Villereal M. L.: Interaction of the fluorescent probe, 1-anilino-8-naphthalenesulfonate, with the sulfate transport system of Ehrlich ascites tumor cells, *J. Cell Physiol.*, **86**, 143~154 (1975)
- 10) Schwenk, M., Burr, R., Schwarz, L. and Pfaff, E.: Uptake of bromosulfophthalein by isolated liver cells, *Eur. J. Biochem.* **64**, 189~197 (1976)
- 11) Anwer, M. S., Kroker, R. and Hegner, D.:

Cholic acid uptake into rat hepatocytes, *Hoppe-Seyler's Physiol. Chem.* **357**, 1477~1486 (1976)
12) Dumont, M., de Gouet, G., le Bigot, J. F. and

Erlinger, S.: Mechanism of uptake of dihydroergotamine by isolated rat hepatocytes: Effect of trofenadomycin, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **234**, 239~243 (1985)

2,2'-Isobutylidene-bis(4,6-dimethylphenol) のラットにおける 催奇形性に関する研究

石井浩之・宇佐見誠・川島邦夫・高仲 正

Studies on the Teratogenic Potential of 2,2'-Isobutylidene-bis (4,6-dimethylphenol) in Rats

Hiroyuki Ishii, Makoto Usami, Kunio Kawashima and Akira Takanaka

2,2'-Isobutylidene-bis(4,6-dimethylphenol), an antioxidant, was given orally to pregnant Wistar rats by stomach intubation at the dose levels of 5, 15 or 45 mg/kg body weight during days 7 to 17 of gestation, and the effects of the compound on dams and fetal developments were examined.

In the dams at the two higher dose levels of 15 and 45 mg/kg, toxic signs (tremor, startle reflex, salivation, involuntary urination, wheezing and nostril discharge) were observed. Moreover, at the highest dose level, additional toxic signs (lacrimation and vaginal bleeding), suppression in maternal body weight gain and food consumption were observed. However, there was no evidence of an increase in malformations attributable to the treatment with 2,2'-isobutylidene-bis(4,6-dimethylphenol) in any of the treated groups.

It was concluded that 2,2'-isobutylidene-bis(4,6-dimethylphenol) has no teratogenic effect in rats, though toxic signs were observed in treated dams of the 15 and 45 mg/kg groups.

Key words : 2,2'-isobutylidene-bis(4,6-dimethylphenol), 催奇形性, 老化防止剤

(Received May 31, 1991)

我々は、家庭用品に用いられている化学物質の安全性評価の一環として、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'-isobutylidene-bis(4,6-dimethylphenol) (IBBMP) 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。

IBBMPは既存化学物質であるが(分類番号4,コード番号928), 催奇形性に関する報告はない。

実験方法

IBBMPは日本バイエル社の製品を用いた。IBBMPは水にほとんど溶解しないため、オリーブ油(日本薬局方, 小堺製薬㈱, Lot. No. QK-6)を用いて9 mg/ml溶液を調製して投与した。投与量

は妊娠ラットを用いた予備試験の成績を参考として、5 mg/kg, 15 mg/kg および 45 mg/kg の3段階とした。

動物はウィスター系ラット(日本チャールスリバー, 雄13週齢, 雌12週齢)を用いた。動物の飼育環境は温度25±2℃, 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、未経産雌を雄と同居させ、翌朝膈垢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1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、IBBMPの45 mg/5 ml/kg, 15 mg/1.67 ml/kg および 5 mg/0.56 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毎日一般状態を観察し、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子宮を摘出し、黄体数、着床数、死亡胎児数および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、性別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、頭部および腹部についてはWilsonの粗大切片法⁹⁾で、胸部については西村の顕微解剖法⁹⁾で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¹⁰⁾にしたがってアリザリン赤染色骨格標本を作製し、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、母体体重、摂餌量および胎児体重についてはBartlettの等分散検定を行い、5%有意水準で分散が等しい場合は一元配置分散分析を行った。分散が等しくない場合と、黄体数、着床数、生存胎児数、性比、異常発生率および骨化数についてはKruskal-Wallisの順位和検定を行った。対照群との有意差検定は、危険率5%および1%でDunnett法またはTukey法を用いて行った。また死亡率および着床率については χ^2 -検定を行い、危険率5%および1%で対照群との有意差検定を行った。

実験成績

1. 妊娠母体に及ぼす影響

1) 一般症状

対照群および5 mg/kg群では全観察期間を通じて一般状態に変化は認められなかった。15 mg/kg群では振頭および驚愕反射が約半数の例に、また流涎、尿失禁、喘鳴および鼻孔あるいは口角周囲の凝血塊様物質の付着がそれぞれ1例観察された。45 mg/kg群では振頭および驚愕反射がほぼ全例に、また流涎、流涙、尿失禁、喘鳴、鼻孔あるいは口角周囲の凝血塊様物質の付着および膺からの出血がそれぞれ1~4例観察された。

2) 体重および摂餌量

妊娠期間中におけるラットの体重の推移を Fig. 1

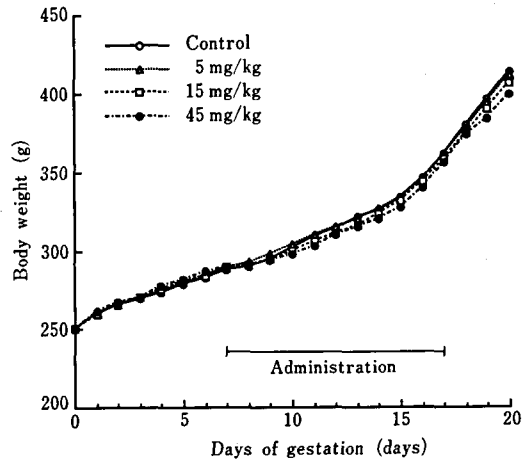


Fig. 1. Effect of oral administration of IBBMP on body weight of pregnant rats

に示した。妊娠期間を通じ、IBBMP各投与群とも対照群との間に有意な差は認められなかった。しかし、妊娠7日目の体重を基準とした体重増加量では、45 mg/kg群で妊娠9~15日目および19~20日目に有意な減少が認められた。

摂餌量については図示しなかったが、5 mg/kg群および15 mg/kg群では検体投与によると考えられる変化は認められなかった。45 mg/kg群では妊娠19日目に摂餌量の有意な減少が認められた。

3) 黄体数、着床数および着床率

妊娠ラットの帝王切開成績を Table 1 に示した。黄体数、着床数および着床率とも対照群と IBBMP 各投与群との間に有意な差は認められなかった。

2. 胎児に及ぼす影響

1) 生存胎児数、性比、体重および死亡率

Table 2 に示したように、平均胎児数、性比、胎児体重および胎児死亡率とも対照群と IBBMP 各投与群との間に有意な差は認められなかった。

2) 外表検査成績

対照群および5 mg/kg群では外表に異常を有する胎児は観察されなかった。15 mg/kg群では眼瞼開存、上顎裂、口蓋裂、脊髄裂および曲尾を伴った胎児、口蓋裂、脊髄裂および曲尾を伴った胎児、鎖肛および無尾を伴った胎児がそれぞれ1例ずつ観察された。45 mg/kg群では曲尾が1例観察された (Table 2)。

3) 内部器官検査成績

胎児の内部器官の検査成績を Table 3 に示した。胸腺の頸部残留が対照群および5 mg/kg群にそれ

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

Dose (mg/kg)	0	5	15	45
No. of dams	20	20	20	20
No. of dead dams Mortality (%)	0 0	0 0	0 0	0 0
No. of corpora lutea (mean±S.D.)	351 (17.6±2.7)	332 (16.6±1.8)	334 (16.7±3.0)	322 (16.1±1.3)
No. of implants (mean±S.D.)	330 (16.5±1.8)	307 (15.4±2.2)	304 (15.2±2.1)	285 (14.3±3.9)
Implantation ratio (%)	94.7	92.5	92.5	88.1

Implantation ratio (%) is given as the average from each dam.

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

Dose (mg/kg)	0	5	15	45
No. of dams	20	20	20	20
No. of implants	330	307	304	285
No. of live fetuses (mean±S.D.)	307 (15.4±2.0)	290 (14.5±2.6)	271 (13.6±3.0)	265 (13.3±3.8)
Sex ratio (male/female)	147/160	152/138	138/133	129/136
Body weight (g)				
Male (mean±S.D.)	3.82±0.37	3.76±0.23	3.79±0.37	3.85±0.32
Female(mean±S.D.)	3.58±0.32	3.54±0.23	3.54±0.43	3.62±0.23
No. of dead implants	23	17	33	20
Early death	21	17	33	19
Late death	2	0	0	1
Mortality (%)	7.0	5.9	11.4	6.7
No. of dams with dead implants only (%)	0	0	0	0
No. of fetuses with external malformation	0	0	3 a) .b) .c)	1 d)

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

a) Open eyelids, Cleft palate, Cleft lip, Myeloschisis and Kinky tail

b) Cleft palate, Myeloschisis and Kinky tail

c) Anal atresia and Anury

d) Kinky tail

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

Dose (mg/kg)	0	5	15	45
No. of dams	20	20	20	20
No. of fetuses examined	102	97	88	89
No. of fetuses with internal malformations	7 (6.9)	7 (7.3)	10 (12.2)	8 (8.4)
Thymic remnant in the neck	6 (5.9)	6 (6.1)	7 (8.5)	7 (7.2)
Dilatation of renal pelvis	1 (1.0)	0	2 (2.0)	1 (1.3)
Ptosis of kidneys	0	0	1 (1.0)	0
Displacement of kidneys	0	0	1 (1.0)	0
Displacement of ovaries and uterus	0	0	1 (1.0)	0
Persistent left umbilical artery	0	1 (1.3)	2 (4.2)	0

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

それぞれ6例, 15 mg/kg 群および45 mg/kg 群にそれぞれ7例観察された。また腎盂拡張が対照群および45 mg/kg 群にそれぞれ1例, 15 mg/kg 群に2例観察され, 腎臓下垂, 腎臓の位置異常, 子宮および卵巣の位置異常を伴う胎児が15 mg/kg 群に1例観察された。さらに臍動脈の左側走行が5 mg/kg 群に1例, 15 mg/kg 群に2例観察された。しかし, それらの発生率に有意差は認められなかった。

4) 骨格検査成績

骨格検査成績を Table 4 に示した。

a) 骨格奇形

骨格奇形として, 頭頂間骨の形成不全が5 mg/kg 群に1例, 頸椎弓の形成不全が対照群に2例観察された。また頸椎弓の欠損および癒合, 胸椎弓の癒合, 胸椎体の欠損および癒合, 腰椎弓の癒合および離開, 腰椎体の欠損, 肋骨の欠損および癒合を伴う複合奇形が15 mg/kg 群に1例観察された。さらに腰椎弓の欠損が15 mg/kg 群に1例, 肋骨の結節形成が対照群に1例, 5 mg/kg 群に4例および15 mg/kg 群に3例, 波状肋骨が5 mg/kg 群および15 mg/kg 群にそれぞれ1例, 胸骨分節の癒合が対照

群に1例観察された。しかし, いずれの骨格奇形の発生率においても対照群と IBBMP 各投与群との間に有意差は認められなかった。

b) 骨格変異

骨格変異として, 頸椎肋骨が対照群に2例, 5 mg/kg 群および15 mg/kg 群にそれぞれ1例観察された。また胸椎弓の異常(縮小)が15 mg/kg 群に1例, 胸椎体の異常(二連球状, 分離)が対照群を含む各群に11~17例, 胸骨分節の異常(変形, 分離, 欠損)が対照群を含む各群に76~109例観察された。さらに腰椎肋骨が対照群を含む各群に18~40例, 腰椎体の異常(変形, 縮小)が15 mg/kg 群に2例観察された。しかし, いずれの骨格変異の発生率においても対照群と IBBMP 各投与群との間に有意差は認められなかった。

c) 骨化状態

骨化状態については中手骨, 中足骨および仙・尾椎骨の骨数を調べて判定したが, いずれの骨数においても対照群と IBBMP 各投与群との間に有意差は認められなかった。

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

Dose (mg/kg)	0	5	15	45
No. of dams	20	20	20	20
No. of fetuses examined	205	193	182	176
No. of fetuses with skeletal malformation	4(1.9)	3(1.9)	5(3.5)	0
Hypoplasia of interparietal	0	1(0.7)	0	0
Hypoplasia of cervical arch	2(0.9)	0	0	0
Absence and fusion of cervical arch	0	0	1(0.8)	0
Fusion of thoracic arch	0	0	1(0.8)	0
Absence and fusion of thoracic centrum	0	0	1(0.8)	0
Absence of lumbar arch	0	0	1(0.8)	0
Fusion and diastasis of lumbar arch	0	0	1(0.8)	0
Absence of lumbar centrum	0	0	1(0.8)	0
Absence and fusion of ribs	0	0	1(0.8)	0
Nodulation of ribs	1(0.6)	4(2.2)	3(1.9)	0
Wavy ribs	0	1(0.7)	1(0.6)	0
Fusion of sternbrae	1(0.5)	0	0	0
No. of fetuses with variations	92(44.6)	129(67.5)	101(56.1)	121(64.7)
Cervical ribs	2(1.0)	1(0.5)	1(0.6)	0
Varied thoracic arch	0	0	1(0.8)	0
Varied thoracic centrum	11(5.5)	11(6.2)	16(9.1)	17(10.2)
Varied sternbrae	76(36.4)	109(57.3)	81(45.6)	92(48.2)
Lumbar ribs	18(9.6)	19(10.1)	22(11.3)	40(22.1)
rudimentary extra (14th rib)	18(9.6)	17(9.0)	20(9.9)	36(19.5)
Varied lumbar centrum	0	2(1.1)	2(1.3)	4(2.6)
	0	0	2(1.7)	0
Ossification state (average number)				
Metacarpi	8.0	7.9	7.9	7.9
Metatarsi	8.6	8.2	8.5	8.4
Sacro-caudal vertebrae	8.2	7.9	8.0	8.2

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

考 察

妊娠ラットに IBBMP を経口投与した場合、15 mg/kg 群で一般状態に振顫、驚愕反射、流涎、尿失禁、喘鳴および鼻孔あるいは口角周囲の凝血塊様物質の付着が認められ、45 mg/kg 群では上記症状に加え、流涎および腔からの出血が観察され、さらに摂餌量および妊娠 7 日目を基準とした体重増加量の減少が認められた。また、45 mg/kg 群で摂餌量の低下が認められた。これらの成績から、一般症状に変化が認められた 15 mg/kg 用量が妊娠ラットに対する中毒量であることが明らかにされた。

胎児に対する影響としては、外表検査において 15 mg/kg 群に眼瞼開存、上顎裂、口蓋裂、脊髄裂および曲尾を伴った胎児、口蓋裂、脊髄裂および曲尾を伴った胎児、鎖肛および無尾を伴った胎児がそれぞれ 1 例ずつ、また 45 mg/kg 群に曲尾が 1 例観察されたが、これらの異常は自然発生的にも観察される異常であり^{11,12)}、発現率も低いことから IBBMP 投与による影響とは考え難い。

内部器官の異常として、胸腺の頸部残留が対照群を含む IBBMP 各投与群に、腎盂拡張が対照群および 5 mg/kg 群に、臍帯動脈の左側走行が 5 mg/kg 群および 15 mg/kg 群に観察された。また腎臓下垂、腎臓の位置異常、子宮および卵巣の位置異常を伴う胎児が 15 mg/kg 群の 1 例に観察されたが、この胎児は外表検査において鎖肛および無尾の複合奇形と判定された胎児であった。しかしこれらの異常は、自然発生的にも観察される異常であり^{11,12)}、発現率も低く、対照群に対し有意差も認められなかったことから IBBMP 投与による影響とは考え難い。

骨格奇形として、頭頂間骨の形成不全が 5 mg/kg 群に、頸椎弓の形成不全が対照群に、腰椎弓の欠損が 15 mg/kg 群に、肋骨の結節形成が対照群、5 mg/kg 群および 15 mg/kg 群に、波状肋骨が 5 mg/kg 群および 15 mg/kg 群に、胸骨分節の癒合が対照群に観察された。また頸椎弓の欠損および癒合、胸椎弓の癒合、胸椎体の欠損および癒合、腰椎弓の癒合および離開、腰椎体の欠損、肋骨の欠損および癒合を伴う複合奇形が 15 mg/kg 群の 1 例に観察されたが、この胎児は外表検査において、口蓋裂、脊髄裂および曲尾の複合奇形と判定された胎児であった。骨格変異として、頸椎肋骨が対照群、5 mg/kg 群および 15 mg/kg 群に、胸椎弓の異常（縮小）

が 15 mg/kg 群に、胸椎体の異常（二連球状、分離）、胸骨分節の異常（変形、分離、欠損）あるいは腰椎肋骨が対照群を含む各群に、腰椎体の異常（変形、縮小）が 15 mg/kg 群に観察された。しかし、いずれの骨格異常の発生率においても対照群と IBBMP 各投与群との間に有意差は認められなかった。一方、サリチル酸などの催奇形物質を妊娠ラットに投与した場合、腰椎肋骨の発生頻度が増加することから^{13,14)}、腰椎肋骨は催奇形性検出の指標のひとつになると考えられているが、本実験では腰椎肋骨の発生頻度が IBBMP 投与によって特に高くなるという成績は得られなかった。

以上、本実験条件下においては IBBMP には催奇形性はないものと考えられた。なお、妊娠母体に対する無影響量は 5 mg/kg であった。

ま と め

IBBMP の 5、15 および 45 mg/kg を妊娠ラットに胎児の器官形成期を含む妊娠 7 日から 17 日目まで毎日 1 回強制経口投与し、妊娠の維持および胎児発生に及ぼす影響を検索した。

1) 妊娠母体について 5 mg/kg 群では全観察期間を通じて一般状態、摂餌量および体重増加に変化は認められなかった。15 mg/kg 以上の用量では振顫、驚愕反射、流涎、尿失禁、喘鳴および鼻孔あるいは口角周囲の凝血塊様物質の付着が観察された。45 mg/kg 群では上記症状に加え、流涎および腔からの出血が観察され、さらに摂餌量および妊娠 7 日目の体重を基準とした体重増加量の減少が認められた。

2) 胎児発生について、いずれの投与群においても生存胎児数、性比、胎児体重および胎児死亡率に有意な変化は認められなかった。また外表、内部器官および骨格の検査においても IBBMP 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'-isobutylidene-bis(4,6-dimethylphenol) はラット胎児の発生に対して催奇形性はないものと考えられた。なお、妊娠母体に対する無影響量は 5 mg/kg であった。

本研究は厚生省生活衛生局・家庭用品試験検査費によって行った。

文 献

- 1) 川島邦夫ら：衛生試験報, 98, 50 (1980)
- 2) 田中 悟ら：衛生試験報, 99, 50 (1981)

- 3) 川島邦夫ら：衛生試報, **101**, 55 (1983)
 4) 中浦楨介ら：衛生試報, **102**, 55 (1984)
 5) S. Nakaura *et al.*: J. Toxicol. Sci., **8**, 339 (1983)
 6) 中浦楨介ら：日本薬学会講演要旨集, 5G 11-2 (1985)
 7) S. Nakaura *et al.*: J. Toxicol. Sci., **10**, 252 (1985)
 8) J. G. Wilson: "Teratology-Principles and techniques," edited by J. G. Wilson and J. Warkany, p.262 (1965), The University of Chicago Press, Chicago and London
 9) 西村耕一：先天異常, **14**, 23 (1974)
 10) A. B. Dawson: Stain Technol., **1**, 123 (1926)
 11) 亀山義郎ら：先天異常, **20**, 25 (1980)
 12) H. Morita *et al.*: Cong. Anom., **27**, 147 (1987)
 13) S. Tanaka *et al.*: Cong. Anom., **13**, 73 (1973)
 14) 安田峰生, 前田広由：先天異常, **13**, 25 (1973)

F344 ラットにおける *p*-phenetidine の 28 日間反復投与毒性試験

佐藤元信・古川文夫・川西 徹・豊田和弘
 今沢孝喜・鈴木順子・高橋道人

Twenty-eight-day repeated dose toxicity test of *p*-phenetidine in F344 rats

Motonobu Sato, Fumio Furukawa, Toru Kawanishi, Kazuhiro Toyoda,
 Takayoshi Imazawa, Jyunko Suzuki and Michihito Takahashi

A twenty-eight-day repeated dose toxicity test of *p*-phenetidine was carried out in male and female F344 rats at dose levels of 160, 40, 10 or 0 mg/kg/day.

Thirty animals of both sexes were divided into 6 groups of equal number. All groups were treated daily by i.g. administration for 28 days, two extra groups of animals at dose levels of 160 and 0 mg/kg being used for investigation of recovery over 14 days.

Hematological and urinary examinations revealed decrease in erythrocytes and increased serum reticulocytes and urinary urobilinogen in the 160 and 40 mg/kg groups of both sexes, and methemoglobinemia occurred in the 160 mg/kg group. Increase in spleen weight was noted in the 160 and 40 mg/kg groups. On histopathological examination, hemosiderosis, increased extramedullary hemopoiesis, congestion of the spleen and myeloid hyperplasia of the bone marrow were observed in the 160 and 40 mg/kg groups of both sexes.

Repair of these lesions occurred within 14 days after the cessation of administration.

Based on these findings, a no-observed-effect level for *p*-phenetidine would be concluded 10 mg/kg/day.

key words : *p*-phenetidine, メトヘモグロビン, ラット

(Received May 31, 1991)

はじめに

p-phenetidine (*p*-ethoxyaniline ; C₈H₁₁NO, Fig. 1) は分子量 137.18, 凝固点約 3°C, 沸点 253~255°C, 引火点 115.6°C の透明液状の芳香族系有機化合物であり, トリフェニルエタン系酸性染料の中間体や医薬品 phenacetine 合成の原料として用いられている¹⁾.

経口投与による急性毒性試験では LD₅₀ がラットで 580 mg/kg²⁾, マウスで 530 mg/kg, マウス腹腔

内投与の LD₅₀ は 692 mg/kg と報告されている³⁾.

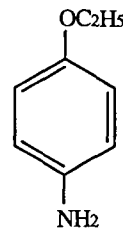


Fig. 1. Chemical structure of *p*-phenetidine

これまでにラットを用いた長期間の経口毒性試験については報告がない。

今回、我々は雌雄の F344 ラット 60 匹を用い、化審法ガイドライン⁴⁾に準じて *p*-phenetidine の 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 30 匹を日本チャールズリバー社より購入し、1 週間の馴化期間後、雌雄とも各群 5 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 $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 、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 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。動物には固型飼料 (CRF-1, 日本チャールズリバー社) 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

検体は川崎化学工業⁵⁾製の純度 99.36% の *p*-phenetidine を用い、オリーブ油に溶解して、5 ml/kg となるように濃度を調整した。群構成は 160, 40, 10 および 0 mg/kg の投与群並びに 160 および 0 mg/kg の 14 日間回復群とした。動物にはラット用金属製胃ゾンデを用い、1 日 1 回、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

動物の一般状態は検体投与後に連日観察し、定期的に体重と摂餌量を測定した。尿検査については、26 日目に新鮮尿を採取し、マルチスティックス (マイルス・三共⁶⁾) を用いて pH、蛋白質、ケトン体、ビリルビン、ブドウ糖、潜血、ウロビリノーゲン、比重の 8 項目を検査した。

採血は、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、腹部大動脈より行った。血液学的検査は赤血球数、白血球数、ヘモグロビン量 (Hb.)、ヘマトクリット値 (Ht.)、MCV、MCH、MCHC の各項目について実施し、さらにメトヘモグロビンの測定⁵⁾も行った。血清生化学的検査は総蛋白 (T-Pro.)、総コレステロール、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン、カルシウム (Ca)、無機リン (P)、ナトリウム

(Na)、カリウム (K)、クロール (Cl)、G-GT、コリンエステラーゼ (Cho-E)、GOT、GPT、LDH、ALP、アルブミン (Alb)、A/G 比の各項目について実施した。

採血した後に放血屠殺し剖検した。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、気管支、食道、甲状腺、舌、精嚢腺、前立腺、子宮、膣を 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、脾臓・肝臓・大腿骨骨髄についてはベルリンブルー染色も行い、病理組織学的に検索した。

4. 統計学的処理⁶⁾

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られた時は 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られた時は、Dunnett 型検定法あるいは Sheffe 型検定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

途中死亡例は試験期間を通じて認められなかった。また、いずれの群においてもチアノーゼ等の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. 2 に示した。雌雄ともに体重増加抑制は認められなかった。また、摂餌量に関しても群間で相違はみられなかった。

2. 尿検査

尿中ウロビリノーゲンが雌雄の 160 mg/kg 群で 2~4 Ehrlich 単位/dl、40 mg/kg 群で 1 Ehrlich 単位/dl 検出され、用量反応相関的な増加が認められた。他の項目については群間に相違は見られなかった。この増加は 14 日間の休薬期間により回復した。

3. 血液および血清生化学的検査

雌雄における各群の検査値を Table 1, 2 に示し

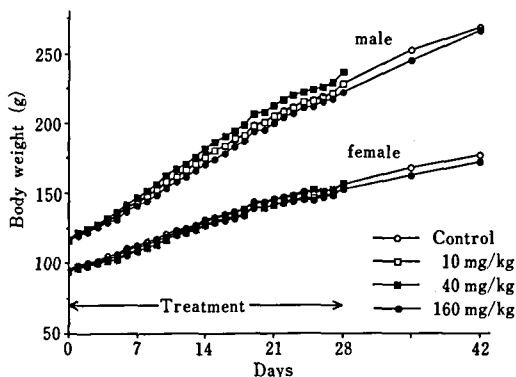


Fig. 2. Growth curves of rats treated orally with *p*-phenetidine

た。

血液学的検査では雌雄の 40 mg/kg 以上の投与群において赤血球系パラメーターの変化が認められた。特に顕著であったのは赤血球数の減少ならびに網状赤血球数の増加（最高用量群では対照群の 10 倍以上にまで増加）であり、用量反応相関性が示された。また、メトヘモグロビンが雌雄の 160 mg/kg 群で 2%以上の含有率として計測された。これらの変化は 14 日間の休薬期間により回復した。

血清生化学的検査では雌雄ともに顕著な変化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。

脾腫が雌雄の 40 mg/kg 以上の投与群において認められ、160 mg/kg 群ではその重量が対照群の 3 倍近くにまで達した。その他、160 mg/kg 群において軽度な心および腎重量の増加がみられた。なお、これらの変化は 14 日間の休薬期間により回復または回復傾向を示した。

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。

脾臓：雌雄の 40 mg/kg 以上の投与群において高度な髓外造血の亢進およびうっ血が認められ、ベルリンブルー染色において高度なヘモジリン沈着が観察された。14 日間の休薬によりこれらの変化は回復または回復傾向を示した。雌雄の 10 mg/kg 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。

骨髄：雌雄の 40 mg/kg 以上の投与群において高度な赤芽球系の過形成像 (hyperplasia) が観察さ

Table 1. Hematology and serum chemistry data for male rats treated with *p*-phenetidine

Item	28 days dosing test (mg/kg)				recovery test (mg/kg)	
	160	40	10	0	160	0
Hematology						
Erythrocyte ($\times 10^4/\mu\text{l}$)	627 \pm 18.5 **	791 \pm 29.3 **	870 \pm 20.2	895 \pm 30.5	861 \pm 16.9 **	928 \pm 31.2
Hb. (g/dl)	13.8 \pm 0.25 **	13.5 \pm 0.33 **	14.5 \pm 0.32	15.0 \pm 0.46	15.5 \pm 0.38 *	14.7 \pm 0.49
met-hemoglobin (%)	2.74 \pm 1.09 **	-	-	-	-	-
Ht. (%)	44.5 \pm 0.77 **	45.2 \pm 1.36 **	48.5 \pm 0.98	50.3 \pm 1.86	52.0 \pm 1.27 *	49.7 \pm 1.68
MCV (fl)	71.0 \pm 1.53 **	57.2 \pm 0.64 *	55.7 \pm 0.22	56.2 \pm 0.58	60.4 \pm 0.48 **	53.6 \pm 0.37
MCH (pg)	22.1 \pm 0.54 **	17.1 \pm 0.29	16.6 \pm 0.13	16.8 \pm 0.29	18.0 \pm 0.11 **	15.8 \pm 0.50
MCHC (g/dl)	31.1 \pm 0.21 **	29.8 \pm 0.31	29.8 \pm 0.15	29.9 \pm 0.32	29.7 \pm 0.15	29.5 \pm 0.96
Reticulocyte (%)	27.0 \pm 2.48 **	5.08 \pm 0.45 **	2.89 \pm 0.65	2.55 \pm 0.75	2.71 \pm 0.29	2.66 \pm 0.45
Leukocyte ($\times 10^2/\mu\text{l}$)	101 \pm 49.6	47.0 \pm 6.52	41.4 \pm 2.19	47.8 \pm 12.7	42.8 \pm 3.70	40.8 \pm 5.22
Serum chemistry						
T-pro (g/dl)	5.78 \pm 0.28	6.14 \pm 0.13	5.80 \pm 0.16	6.08 \pm 0.26	5.84 \pm 0.15	5.98 \pm 0.16
Cholesterol (mg/dl)	46.6 \pm 4.62 *	50.4 \pm 1.82	47.6 \pm 1.34	51.2 \pm 1.79	47.8 \pm 2.59	50.8 \pm 3.11
BUN (mg/dl)	11.4 \pm 1.87	13.6 \pm 1.23	12.0 \pm 0.89	12.0 \pm 0.93	15.3 \pm 1.46	16.7 \pm 1.68
Creatinine (mg/dl)	0.42 \pm 0.04	0.42 \pm 0.04	0.42 \pm 0.04	0.38 \pm 0.04	0.42 \pm 0.08	0.46 \pm 0.05
Ca (mg/dl)	10.6 \pm 0.46	10.5 \pm 1.07	10.5 \pm 0.31	10.9 \pm 0.36	10.9 \pm 0.24	10.9 \pm 0.16
P (mg/dl)	9.04 \pm 0.37	8.94 \pm 0.46	8.70 \pm 0.78	8.46 \pm 0.56	8.04 \pm 0.27	8.16 \pm 0.18
Na (mEQ/dl)	142 \pm 6.61	144 \pm 0.71	142 \pm 5.61	144 \pm 0.71	142 \pm 3.08	144 \pm 1.48
K (mEQ/dl)	4.60 \pm 0.45	5.32 \pm 0.55	4.74 \pm 0.34	5.04 \pm 0.27	4.50 \pm 0.12	4.58 \pm 0.13
Cl (mEQ/dl)	102 \pm 5.50	103 \pm 0.71	102 \pm 4.16	104 \pm 0.55	102 \pm 1.95	103 \pm 0.54
G-GT (IU/l)	1.6 \pm 1.52	0.4 \pm 0.55	1.4 \pm 0.89	0.2 \pm 0.45	-	0.2 \pm 0.45
Cho-E (IU/l)	0.8 \pm 1.10	1.2 \pm 1.64	3.0 \pm 1.22	2.0 \pm 1.22	3.6 \pm 1.82	3.8 \pm 1.64
GOT (IU/l)	87.8 \pm 10.5	85.6 \pm 3.65	88.4 \pm 6.62	92.6 \pm 5.46	61.6 \pm 5.94	74.2 \pm 13.0
GPT (IU/l)	42.6 \pm 2.30	40.6 \pm 2.41 **	42.4 \pm 1.82	45.8 \pm 3.11	34.2 \pm 2.95	40.8 \pm 10.0
ALP (IU/l)	987 \pm 51.4	985 \pm 42.7	1077 \pm 54.5	1056 \pm 84.7	621 \pm 56.6	602 \pm 57.7
Alb (g/dl)	4.32 \pm 0.24	4.50 \pm 0.16	4.24 \pm 0.17	4.34 \pm 0.23	4.42 \pm 0.08	4.56 \pm 0.15
A/G	2.96 \pm 0.18 **	2.74 \pm 0.18	2.72 \pm 0.16	2.48 \pm 0.13	3.14 \pm 0.24	3.26 \pm 0.42

Data represent mean values \pm S.D.

- : Not detectable

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

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

Table 2. Hematology and serum chemistry data for female rats treated with *p*-phenetidine

Item	28 days dosing test (mg/kg)				recovery test (mg/kg)	
	160	40	10	0	160	0
Hematology						
Erythrocyte ($\times 10^4/\mu\text{l}$)	682±51.3 **	752±26.7 **	878±39.0	876±24.1	879±19.4	910±24.4
Hb. (g/dl)	15.0±1.15	13.6±0.51 *	14.9±0.55	15.0±0.29	16.0±0.36 **	14.8±0.35
met-hemoglobin (%)	2.40±0.16 **	-	-	-	-	-
Ht. (%)	47.2±3.95	44.0±1.42 *	48.6±2.05	48.9±1.34	53.8±1.17 **	49.3±1.22
MCV (fl)	69.1±0.65 **	58.6±0.39 **	55.3±0.24 *	55.8±0.28	61.2±0.39 **	54.1±0.10
MCH (pg)	22.0±0.37 **	18.1±0.27 **	17.0±0.24	17.2±0.37	18.3±0.21 **	16.3±0.24
MCHC (g/dl)	31.7±0.54 **	30.8±0.50	30.7±0.31	30.8±0.63	29.8±0.38	30.1±0.38
Reticulocyte (%)	22.5±4.77 **	4.53±0.63 **	1.75±0.43	1.97±0.41	2.26±0.48	2.19±0.15
Leukocyte ($\times 10^2/\mu\text{l}$)	71.8±50.7	42.8±6.22	46.6±11.3	45.5±10.2	36.4±4.10	35.0±5.15
Serum chemistry						
T-pro (g/dl)	5.72±0.13	5.72±0.15	5.66±0.11	5.70±0.10	5.84±0.15	5.88±0.13
Cholesterol (mg/dl)	59.4±2.97	65.0±4.18	62.2±2.39	63.0±1.00	71.2±3.49	75.4±3.05
BUN (mg/dl)	11.8±0.83	10.6±1.59	11.9±1.16	11.5±0.49	15.1±0.92	14.9±1.55
Creatinine (mg/dl)	0.36±0.05	0.36±0.05	0.36±0.05	0.38±0.04	0.40±0.07	0.4±0.07
Ca (mg/dl)	10.6±0.62	10.4±0.22	10.2±0.40	9.96±0.84	10.7±0.09	10.7±0.22
P (mg/dl)	8.42±1.23	8.16±0.40	8.34±0.35	8.46±0.65	6.96±0.50	7.04±0.54
Na (mEq/dl)	144±2.68	143±0.44	143±0.14	144±1.09	145±2.08	143±2.92
K (mEq/dl)	4.86±0.34	4.72±0.22	4.64±0.47	4.54±0.46	4.34±0.34	4.38±0.22
Cl (mEq/dl)	106±1.48	106±0.44	107±0.90	106±0.54	107±1.65	105±2.19
G-GT (IU/l)	0.8±0.45	0.6±0.55	0.8±0.84	0.2±0.45	-	0.4±0.89
Cho-E (IU/l)	-	1.2±1.79	0.6±1.34	2.6±3.21	4.4±3.13	4.2±1.10
GOT (IU/l)	76.2±6.42	80.2±1.31	82.0±6.40	81.6±11.6	62.8±4.76	68.0±10.8
GPT (IU/l)	33.6±4.67	31.8±3.03	36.2±4.71	33.8±3.77	29.8±1.30	35.0±4.53
ALP (IU/l)	796±82.4	750±53.8	732±23.2	737±45.4	480±27.6	462±52.9
Alb (g/dl)	4.44±0.11	4.30±0.14	4.22±0.08	4.28±0.45	4.56±0.21	4.54±0.15
A/G	3.42±0.19	3.02±0.24	2.94±0.27	3.04±0.24	3.58±0.38	3.38±0.23

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 $p < 0.01$.

Table 3. Absolute and relative organ weights of male rats treated with *p*-phenetidine

Item	28 days dosing test (mg/kg)				14 days recovery test (mg/kg)	
	160	40	10	0	160	0
Effective No.	5	5	5	5	5	5
Brain	1.84±0.06 (0.83)	1.87±0.08 (0.79)	1.84±0.04 (0.81)	1.83±0.05 (0.81)	1.90±0.06 (0.72)	1.86±0.05 (0.70)
Pituitary	0.008±0.001 (0.004)	0.008±0.001 (0.003)	0.008±0.001 (0.004)	0.009±0.002 (0.004)	0.010±0.002 (0.004)	0.010±0.001 (0.004)
Salivary gl.	0.38±0.04 (0.17)	0.42±0.02 (0.18)	0.39±0.03 (0.17)	0.39±0.04 (0.17)	0.46±0.06 (0.17)	0.45±0.02 (0.17)
Thymus	0.33±0.06 (0.15)	0.32±0.02 (0.14)	0.32±0.03 (0.14)	0.30±0.11 (0.13)	0.32±0.03 (0.12)	0.31±0.04 (0.12)
Lung (R)	0.60±0.06 (0.27)	0.61±0.04 (0.26)	0.58±0.09 (0.26)	0.60±0.04 (0.27)	0.63±0.05 (0.24)	0.62±0.03 (0.23)
(L)	0.32±0.03 (0.14)	0.31±0.01 (0.13)	0.30±0.02 (0.13)	0.31±0.03 (0.14)	0.36±0.06 (0.13)	0.33±0.03 (0.12)
Heart	0.79±0.03 (0.36 **)	0.78±0.02 (0.33)	0.76±0.03 (0.33)	0.75±0.06 (0.33)	0.89±0.06 (0.34)	0.87±0.03 (0.32)
Spleen	1.38±0.10 * (0.62 **)	0.67±0.05 * (0.28 **)	0.51±0.01 (0.22)	0.49±0.04 (0.22)	0.75±0.07 ** (0.28 **)	0.57±0.05 (0.21)
Liver	8.37±0.54 (3.77)	9.09±0.60 (3.84)	8.37±0.44 (3.67)	8.44±0.72 (3.71)	9.13±0.80 (3.43)	9.20±0.54 (3.42)
Adrenal (R)	0.013±0.003 (0.006)	0.016±0.003 (0.007)	0.019±0.003 (0.008)	0.018±0.005 (0.008)	0.018±0.002 (0.007)	0.016±0.004 (0.006)
(L)	0.017±0.003 (0.008)	0.017±0.002 (0.007)	0.017±0.001 (0.007)	0.017±0.003 (0.008)	0.020±0.002 (0.008)	0.020±0.003 (0.007)
Kidney (R)	0.78±0.06 (0.35)	0.80±0.05 (0.34)	0.78±0.05 (0.34)	0.78±0.06 (0.34)	0.90±0.07 (0.34)	0.89±0.05 (0.33)
(L)	0.80±0.04 (0.36 *)	0.81±0.05 (0.34)	0.78±0.04 (0.34)	0.78±0.06 (0.34)	0.89±0.08 (0.33)	0.91±0.05 (0.34)
Testis (R)	1.21±0.07 (0.55)	1.31±0.07 (0.55)	1.29±0.08 (0.56)	1.20±0.17 (0.53)	1.37±0.05 (0.52)	1.37±0.04 (0.51)
(L)	1.19±0.09 (0.54)	1.32±0.08 (0.56)	1.30±0.07 (0.57)	1.20±0.15 (0.52)	1.39±0.07 (0.52)	1.41±0.08 (0.53)

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 *p*-phenetidine

Item	28 days dosing test (mg/kg)				14 days recovery test (mg/kg)	
	160	40	10	0	160	0
Effective No.	5	5	5	5	5	5
Brain	1.78±0.04 (1.12)	1.71±0.06 (1.09)	1.76±0.04 (1.15)	1.74±0.07 (1.14)	1.79±0.07 (1.04 ^{**})	1.72±0.05 (0.98)
Pituitary	0.008±0.002 (0.005)	0.007±0.002 (0.005)	0.008±0.001 (0.005)	0.009±0.001 (0.005)	0.010±0.002 (0.006)	0.010±0.005 (0.006)
Salivary gl.	0.29±0.02 (0.19)	0.32±0.03 (0.20)	0.32±0.02 (0.21)	0.33±0.02 (0.21)	0.34±0.04 (0.20)	0.34±0.03 (0.19)
Thymus	0.28±0.03 (0.18)	0.32±0.04 (0.20)	0.26±0.03 (0.17)	0.33±0.04 (0.22)	0.27±0.02 (0.16)	0.28±0.03 (0.16)
Lung (R)	0.49±0.05 (0.32)	0.45±0.05 (0.29)	0.46±0.04 (0.30)	0.46±0.03 (0.30)	0.51±0.04 (0.30)	0.48±0.03 (0.27)
(L)	0.26±0.02 (0.17)	0.24±0.01 (0.15)	0.24±0.02 (0.16)	0.25±0.01 (0.17)	0.26±0.01 (0.15)	0.25±0.01 (0.14)
Heart	0.62±0.07 (0.41)	0.58±0.03 (0.37)	0.57±0.03 (0.37)	0.59±0.05 (0.39)	0.63±0.02 (0.37)	0.61±0.04 (0.35)
Spleen	0.93±0.06 ^{**} (0.61 ^{**})	0.48±0.05 ^{**} (0.31 ^{**})	0.38±0.02 (0.25)	0.37±0.04 (0.25)	0.52±0.03 ^{**} (0.30 ^{**})	0.41±0.02 (0.23)
Liver	5.42±0.34 (3.55)	5.76±1.27 (3.67)	4.82±0.30 (3.14)	5.05±0.33 (3.30)	5.31±0.17 (3.09)	5.27±0.32 (2.99)
Adrenal (R)	0.02±0.003 (0.011)	0.02±0.003 (0.012)	0.02±0.002 (0.013)	0.02±0.001 (0.013)	0.02±0.003 (0.014)	0.02±0.005 (0.012)
(L)	0.02±0.004 (0.013)	0.02±0.002 (0.013)	0.02±0.002 (0.014)	0.02±0.003 (0.014)	0.03±0.003 [*] (0.015 [*])	0.02±0.003 (0.012)
Kidney (R)	0.57±0.02 [*] (0.37 ^{**})	0.55±0.02 (0.35)	0.52±0.02 (0.34)	0.53±0.02 (0.35)	0.60±0.03 (0.35)	0.58±0.03 (0.33)
(L)	0.57±0.01 (0.37)	0.55±0.02 (0.35)	0.56±0.03 (0.36)	0.53±0.04 (0.35)	0.60±0.01 (0.35)	0.59±0.03 (0.33)
Ovary (R)	0.035±0.005 (0.023)	0.033±0.003 (0.021)	0.037±0.006 (0.024)	0.035±0.005 (0.023)	0.038±0.006 (0.022)	0.040±0.012 (0.023)
(L)	0.030±0.007 (0.019)	0.033±0.007 (0.021)	0.034±0.011 (0.022)	0.043±0.017 (0.028)	0.038±0.007 (0.022)	0.035±0.007 (0.020)

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 rats treated with *p*-phenetidine

Findings	28-days dosing test (mg/kg)				Recovery test (mg/kg)	
	160	40	10	0	160	0
	- + ++ +++	- + ++ +++	- + ++ +++	- + ++ +++	- + ++ +++	- + ++ +++
Spleen						
hemosiderosis	0 0 0 10	0 0 5 5	10 0 0 0	10 0 0 0	0 0 1 9	10 0 0 0
increased extramedullary hemopoiesis	0 0 7 3	0 1 8 1	10 0 0 0	10 0 0 0	10 0 0 0	10 0 0 0
congestion	0 0 10 0	0 7 3 0	10 0 0 0	10 0 0 0	0 8 2 0	10 0 0 0
Bone marrow						
myeloid hyperplasia	0 0 0 10	0 0 10 0	10 0 0 0	10 0 0 0	0 0 10 0	10 0 0 0
Liver						
hemosiderin deposition	3 7 0 0	10 0 0 0	10 0 0 0	10 0 0 0	5 5 0 0	10 0 0 0
increased extramedullary hemopoiesis	7 3 0 0	10 0 0 0	10 0 0 0	10 0 0 0	10 0 0 0	10 0 0 0

--: not remarkable +: mild ++: moderate +++: severe

れ (Fig. 3), 休薬により回復傾向を示した。雌雄の 10 mg/kg 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。

肝臓：雌雄の 160 mg/kg 群において軽度な髓外造血の亢進および Kupffer 細胞や肝細胞にヘモジデリンの沈着が観察されたが、これらは休薬により回復または回復傾向を示した。

その他の臓器において特記すべき所見はみられず、

また、いずれの所見についても明らかな性差は認められなかった。

考 察

本試験の血液学的検査において、雌雄の最高用量群でメトヘモグロビン (Fe³⁺ヘモグロビン) が検出された。このことは *p*-phenetidine 投与によりメトヘモグロビン血症が発生したことを示している。

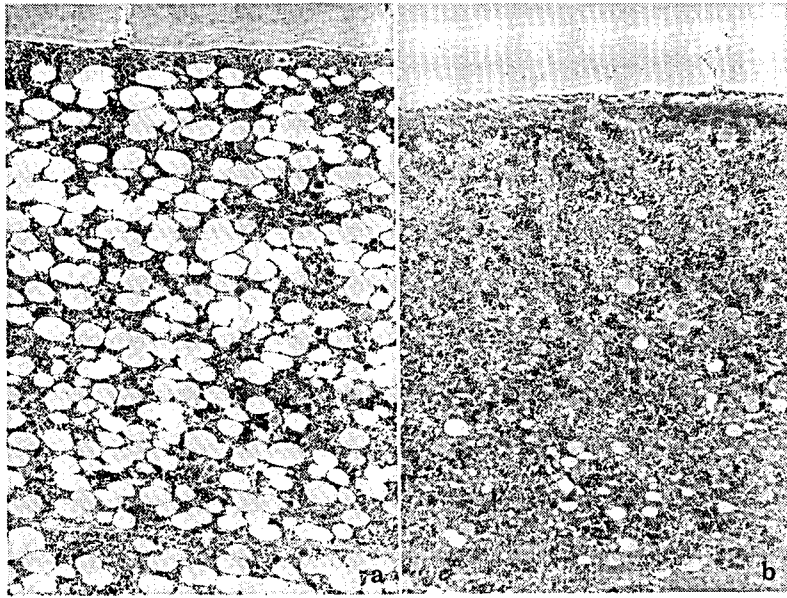


Fig. 3.

- a) Bone marrow in female control group.
H. E. stain
- b) Myeloid hyperplasia in bone marrow observed in female 160 mg/
kg group.
H. E. stain

p-phenetidine は医薬品 phenacetine の代謝物として知られている^{7,8,9}。phenacetine は解熱鎮痛剤として用いられていたが、血液障害等の副作用があることが知られており、また、発がん性の危険性も報告されたことから現在ではあまり用いられていない薬物である。phenacetine 投与による血液障害（メトヘモグロビン血症）はおもにその代謝物である *p*-phenetidine (N-hydroxy-*p*-phenetidine) によるものと報告されている^{7,8,9}。また、アニリン色素投与によるメトヘモグロビン血症も広く報告されている¹⁰。本研究において *p*-phenetidine 投与によりメトヘモグロビン血症が認められたことはこれらの報告と一致するものであった。

脾臓および肝臓におけるヘモジテリンの沈着は、これらの臓器におけるメトヘモグロビン赤血球の処理（崩壊）によるものと考えられた。一方、網状赤血球数の増加・骨髄の造血亢進・脾臓および肝臓における髄外造血の亢進は血球崩壊による赤血球数の減少（貧血）を補うための代償性反応として発現したものであり、*p*-phenetidine の造血系に対する直接的な障害作用によるものではないと考えられた。また、尿中ウロビリノーゲンの増加もヘモグロビン

分解量の上昇に起因した反応と考えられた。

本物質により惹起された変化はいずれも 14 日間の休薬により回復または回復傾向を示しており、これらの変化は可逆性と考えられた。

10 mg/kg 群では雌雄とも、いずれの項目においても対照群と比較し有意な変化は認められず、本実験条件下における *p*-phenetidine の無影響量は 10 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. 588
- 2) Vasilenko, N. M., Volodchenko, V. A., Nakonechny, A. A. and Sadokha, E. R.: Comparative toxicological assessment of para-phenetidine and cyanethyl-para-phenetidine. *Pharmacol. Toxicol.*, **3**, 367~369 (1972)
- 3) Sweet, D. V.: “Registry of toxic effects of chemical substances”, U.S. department of health and human services (1987), pp. 3228
- 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) 中村延雄，柴田 昭：“血液学研究検査法”，中

- 外医学社 (1980), pp. 210~211
- 6) 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
- 7) Nakayama, N. and Masuda, Y.: Suppression of Phenacetin-induced methemoglobinemia by Dietyldithiocarbamate and Carbon disulfide and its relation to Phenacetin metabolism in mice., *J. Pharmacobio-Dyn.*, 8, 868~876 (1985)
- 8) Egan, H., Fishbein, L., Castegnaro, M., O'Neill, I. K., Bartsch, H. and Davis, W.: “Environmental carcinogens-selected methods of analysis, 4”, International Agency for Reserch on Cancer. Lyon (1981), pp. 287~310
- 9) Clissold, S. P.: Paracetamol and phenacetine., *Drugs*, 32, 46~59 (1986)
- 10) Harrison, J. H. and Jollow, D. J.: Contribution of aniline metabolites to aniline-induced methemoglobinemia. *Mol. Pharmacol.*, 32, 423~431 (1987)

Stevioside の F344 ラットを用いた亜慢性毒性試験

阿瀬善也・豊田和弘・今井田克己・林 修次
今沢孝喜・林 裕造・高橋道人

Subchronic Oral Toxicity Study of Stevioside in F344 Rats

Yoshiya Aze, Kazuhiro Toyoda, Katsumi Imaida, Shuji Hayashi,
Takayoshi Imazawa, Yuzo Hayashi, Michihito Takahashi

A 13-week subchronic oral toxicity study of stevioside was carried out in F344 rats at dose levels of 0, 0.31, 0.62, 1.25, 2.5 and 5% in diet, to determine appropriate dose levels for a 2-year carcinogenicity study. The rats were randomly allocated to 6 groups, each consisting of 10 males and 10 females.

No animals died during the administration period. Between the control and treated groups, there were no differences in body weight gain during the administration period and in food consumption in the later period of the study. LDH on biochemical investigation and single cell necrosis in the liver revealed by histopathological examination were increased in all male treated groups. These were not considered specific changes, because of the lack of any clear dose response, the relatively low severity and the limitation to males. Other parameters that were found to demonstrate significant differences on hematological and biochemical investigations were of minor toxicological significance.

From these results, a concentration of 5% in diet was concluded to be a suitable maximum tolerable dose of stevioside for a 2-year carcinogenicity study in rats.

Key words : Stevioside, 亜慢性毒性試験, 甘味料, F344 ラット

(Received May 31, 1991)

はじめに

Stevia は、南米のパラグアイ原産のキク科の植物 *Stevia rebaudiana* Bertoni の葉に含まれる天然の甘味料である。現在、stevia は広い範囲の食品 (清涼飲料, 乳飲料, ヨーグルト, 冷菓, チューインガム等) に使用されている。Stevia の甘味成分は 8 種類が確認されており, 甘味が強く含有量の多い成分は stevioside と rebaudioside A で, stevioside はショ糖の約 120~150 倍程度の甘味を有す

る¹⁾。

現在まで、stevia に関する毒性試験は多数実施されており, 重篤な毒性は報告されていない。しかし, stevia の成分である stevioside の腸内細菌代謝物である steviol は, Ames test において一部の菌株で陽性結果が報告されている²⁾。一方, 現在報告されている発癌性試験は stevia を用いたものであり³⁾, stevioside 単独での発癌性試験の報告は見当たらない。

今回, 我々は stevioside の発癌性試験を実施す

るに先立ち、亜慢性毒性試験を実施したので報告する。

実験材料および方法

1. 被験物質および動物

被験物質は、ステビア工業会より提供された stevioside を用いた。本物質は *Stevia rebaudiana* Bertoni の葉から浸出・精製（純度 95.6%）したもので、分子量 804.90、融点 196~198° の白色粉末で Fig. 1 に示す構造を有する。

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 60 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、6 週齢時に雌雄各群 10 匹よりなる 6 群に分け実験に供した。

動物の飼育は、SPF バリヤーシステムの動物室にて温度 24±1°C、湿度 55±5%、換気回数 18 回/時（オールフレッシュ）、12 時間の蛍光灯照明、12 時間の消灯の条件下で行った。

動物はポリカーボネート製箱型ケージに 3~4 匹ずつ収容し、床敷は三協ラボサービスのソフトチップを用い、週 2 回交換した。

2. 実験方法

Stevioside を粉末飼料 (CRF-1) に 0.31%、0.62%、1.25%、2.5% および 5% の濃度に混じ、対照群には粉末飼料のみを 13 週間自由に摂取させた。飲水は精製水を自由に摂取させた。試験期間中は死亡の有無および一般状態を毎日観察し、体重測定および摂餌量は毎週 1 回測定した。動物は試験最終日の前日から一晩絶食させ、翌日エーテル麻酔下で腹

部大動脈より採血後、屠殺剖検した。

諸臓器は肉眼的に観察後、摘出し、脳、唾液腺、胸腺、肺、心臓、脾臓、肝臓、腎臓、副腎、精巣については重量測定のために、鼻腔、視神経および眼球を含む頭蓋、下垂体、舌、気管、甲状腺・上皮小体、大動脈、食道、胃、小腸、大腸、膵臓、膀胱、皮膚・乳腺、大腿筋、リンパ節、胸骨、大腿骨（骨髄）、脊髄、精囊、前立腺、精巣上体、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、Hematoxylin-Eosin (HE) 染色を施し、全群全例について病理組織学的に検索した。

採取した血液は、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)、ヘマトクリット値 (Ht)、血小板 (PLT) の各項目について、分離した血清は凍結後、総タンパク (TP)、総コレステロール (Cho)、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (CRN)、カルシウム (Ca)、無機リン (P)、ナトリウム (Na)、カリウム (K)、クロール (Cl)、 γ -glutamyltranspeptidase (G-GT)、コリンエステラーゼ (Cho-E)、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)、アルブミン (Alb)、アルブミン・グロブリン比 (A/G) 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³⁾。

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 (Fig. 2)

雌雄とも投与群の体重増加抑制はみられなかったが、屠殺時の体重では対照群に比して、雄で 5%、雌で 2.5% 以上の群で有意な低下がみられた

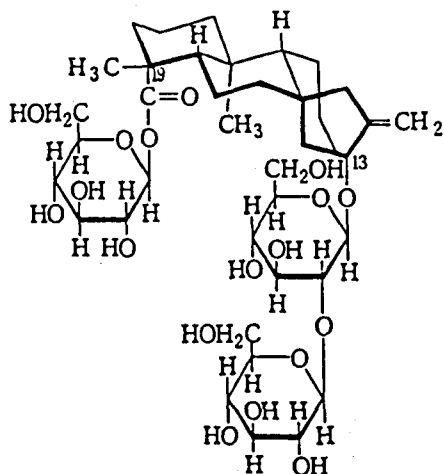


Fig. 1. A structural formula of stevioside

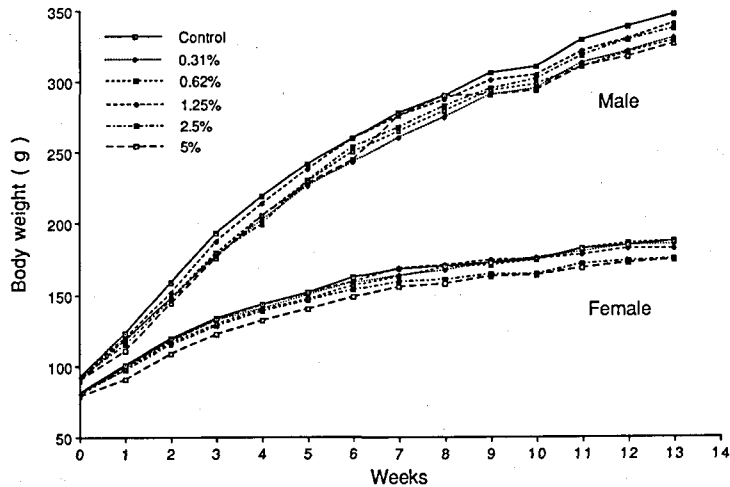


Fig. 2. Growth curves of F344 rats treated with stevioside for 13 weeks

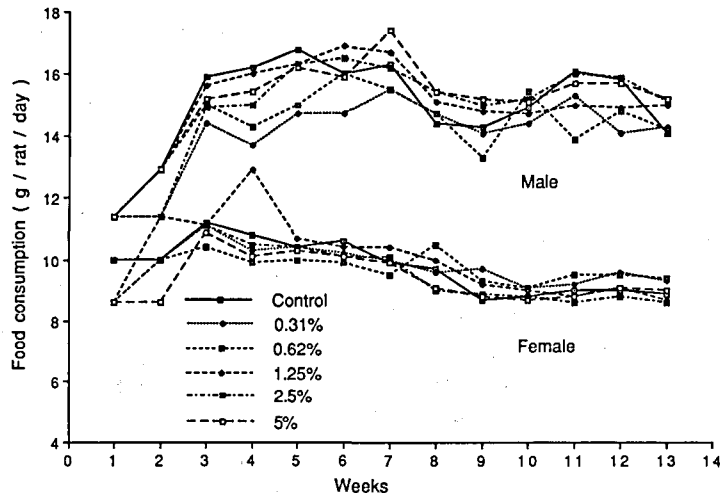


Fig. 3. Daily food consumption in F344 rats treated with stevioside for 13 weeks

(Table 3, 4).

3. 摂餌量 (Fig. 3)

雌雄とも投与初期に投与群で対照群に比して摂餌量の低下する群がみられたが、試験の後半には同様に推移した。

4. 血液学および血清生化学的検査

(Table 1, 2)

雄では対照群に比して投与群でTP, Cho, BUN, CRN, K, GOT, LDH, ALP, PLTで有意な上昇, P, Htで有意な減少がみられた。雌では対照群に比して投与群でTP, GOT, GPT, LDH, ALP, Alb, PLTで有意な上昇, Cho, Clで有意

な減少がみられた。雄でみられたLDHの上昇は明瞭な用量依存性はみられないものの、投与群でやや高値を示した。

5. 臓器の絶対重量および相対重量

(Table 3, 4)

雄では対照群に比して投与群で絶対重量および相対重量とも有意な差はみられなかった。

雌では対照群に比して投与群で絶対重量において肝臓、腎臓の有意な増加が、相対重量において脳、脾臓、肝臓の有意な増加が、心臓、腎臓の有意な低下がみられたが、いずれも軽度な変化であった。

Table 1. Serum biochemical and hematological data of male rats treated with stevioside

Item / Dose (%)	0	0.31	0.62	1.25	2.5	5
Effective No.	10	10	10	10	10	10
Serum biochemistry						
TP (mg/dl)	6.28±0.08	6.28±0.14	6.28±0.10	6.45±0.14*	6.42±0.15	6.37±0.12
Cho (g/dl)	52.1±2.0	52.9±3.8	54.3±4.3	57.0±4.5*	57.9±3.6*	58.3±4.7**
BUN (mg/dl)	14.1±1.4	15.6±0.8*	15.9±1.5**	16.1±1.1**	17.4±1.1**	17.2±0.9**
CRN (mg/dl)	0.57±0.07	0.57±0.05	0.62±0.04	0.64±0.05*	0.70±0.05**	0.72±0.06**
Ca (mg/dl)	10.3±0.3	10.3±0.3	10.3±0.3	10.5±0.3	10.5±0.3	10.4±0.4
P (mg/dl)	5.98±0.18	6.10±0.21	5.79±0.29	5.42±0.28**	5.5±0.27**	5.42±0.26**
Na (mEQ/dl)	145±1.2	145±0.8	145±0.9	145±1.2	145±0.5	144±0.9
K (mEQ/dl)	4.24±0.20	4.37±0.16	4.44±0.14	4.48±0.22**	4.33±0.11	4.51±0.23**
Cl (mEQ/dl)	105±0.9	104±1.1	105±0.3	104±1.4	104±1.1	103±0.5
G-GT (IU/l)	0.1±0.3	0.3±0.5	0.1±0.3	0.6±0.7	0.4±0.5	0.4±0.7
Cho-E (IU/l)	3.9±1.4	4.2±2.1	4.1±2.1	4.7±2.0	4.5±2.2	5.2±2.1
GOT (IU/l)	78.7±8.3	85.6±7.0	78.8±6.1	88.4±5.7*	80.6±7.2	87.8±21.4
GPT (IU/l)	46.1±5.1	46.0±2.4	43±3.1	45.1±3.0	41.6±2.8	47.9±16.2
LDH (IU/l)	538±249	900±309*	654±219	1075±251**	875±310*	1035±234**
ALP (IU/l)	271±22	289±19	292±18	311±19**	344±19**	345±22**
Alb (g/dl)	4.64±0.12	4.73±0.12	4.74±0.13	4.78±0.08	4.79±0.15	4.78±0.09
A/G	2.83±0.18	3.07±0.38	3.08±0.24	2.87±0.22	2.96±0.21	3.02±0.22
Hematology						
RBC (x10 ⁴ /mm ³)	976±17	977±18	914±132	950±30	961±31	966±28
Ht. (%)	50.1±0.67	50.3±0.92	46.7±6.75*	48.4±1.27*	49.3±1.57	49.6±1.49
WBC (x10 ² /mm ³)	45.4±6.0	44.8±4.4	39.2±8.1	40.4±3.5	45.7±4.0	44.6±5.1
PLT (x10 ⁴ /mm ³)	76.5±5.4	78.4±2.6	75.1±11.1	78.4±2.8	79.0±3.9	83.1±4.5*

Data represent mean values ± S.D.

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

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

Table 2. Serum biochemical and hematological data of female rats treated with stevioside

Item / Dose (%)	0	0.31	0.62	1.25	2.5	5
Effective No.	10	10	10	10	10	10
Serum biochemistry						
TP (mg/dl)	6.22±0.23	6.34±0.28	6.27±0.19	6.59±0.28**	6.63±0.26**	6.48±0.24
Cho (g/dl)	94.2±8.0	89.5±10.4	81.0±8.7**	88.3±9.7	88.3±8.7	84.0±9.3
BUN (mg/dl)	14.3±1.5	14.7±1.7	14.1±1.7	15.5±1.8	15.6±1.7	15.7±1.4
CRN (mg/dl)	0.57±0.09	0.62±0.10	0.58±0.08	0.64±0.07	0.57±0.07	0.59±0.06
Ca (mg/dl)	10.3±0.3	10.3±0.3	10.3±0.3	10.5±0.3	10.6±0.3	10.4±0.4
P (mg/dl)	5.71±0.92	5.72±0.85	5.44±1.00	5.17±0.64	5.95±0.39	5.89±0.77
Na (mEQ/dl)	146±1.8	147±1.7	145±0.9	146±1.1	145±1.6	146±1.8
K (mEQ/dl)	4.29±0.66	4.03±0.26	4.49±0.77	4.5±0.49	4.21±0.17	4.64±0.42
Cl (mEQ/dl)	108±1.4	106±1.7	107±1.1	105±2.3**	105±1.1**	105±1.3**
G-GT (IU/l)	0.5±0.7	0.5±0.7	0.4±0.7	0.4±0.5	0.3±0.5	1.2±1.4
Cho-E (IU/l)	8.3±1.8	7.0±1.2	6.9±2.1	7.4±2.9	7.2±1.8	7.2±1.5
GOT (IU/l)	70.7±4.5	74.8±5.1	83.8±10.9*	74.9±4.4	76.6±9.2	79.5±4.1*
GPT (IU/l)	32.4±5.1	32.9±2.0	36.3±3.5	37.2±2.5*	36.9±2.4*	35.4±4.1
LDH (IU/l)	503±195	684±211	901±349**	544±247	722±274	793±290
ALP (IU/l)	163±18	169±23	182±27	181±24	183±23.0	205±15**
Alb (g/dl)	4.73±0.13	4.82±0.23	4.75±0.16	5.02±0.24*	4.95±0.24	4.91±0.21
A/G	3.18±0.20	3.17±0.19	3.12±0.23	3.21±0.26	2.93±0.22	3.14±0.16
Hematology						
RBC (x10 ⁴ /mm ³)	912±25	901±19	914±31	890±41	909±24	901±45
Ht. (%)	49.4±6.2	39.7±8.7	29.9±5.7	36.0±6.3	49.2±0.8	49.2±2.4
WBC (x10 ² /mm ³)	34.1±2.6	31.8±5.6	36.0±6.3	29.9±5.7	39.7±8.7	36.7±6.2
PLT (x10 ⁴ /mm ³)	83.2±2.7	84.9±4.8	86.2±3.2	80.7±18.7	90.2±3.4*	92.6±5.8*

Data represent mean values ± S.D.

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

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

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

Item / Dose (%)	0	0.31	0.62	1.25	2.5	5
Effective No.	10	10	10	10	10	10
Body weight	329±14	317±11	316±15	325±15	322±9	309±22*
Brain	1.99±0.03 (0.61)	1.98±0.07 (0.63)	2.01±0.07 (0.64)	2.03±0.03 (0.63)	1.99±0.06 (0.62)	2.00±0.05 (0.65)
Salivary gl.	0.54±0.05 (0.17)	0.53±0.05 (0.17)	0.53±0.05 (0.17)	0.56±0.03 (0.17)	0.52±0.12 (0.16)	0.55±0.04 (0.18)
Thymus	0.24±0.04 (0.07)	0.21±0.04 (0.07)	0.20±0.03 (0.06)	0.22±0.03 (0.07)	0.26±0.11 (0.08)	0.22±0.03 (0.07)
Lung (R)	0.70±0.03 (0.21)	0.69±0.06 (0.22)	0.65±0.06 (0.21)	0.66±0.03 (0.20)	0.66±0.05 (0.20)	0.66±0.05 (0.21)
(L)	0.36±0.01 (0.11)	0.35±0.02 (0.11)	0.34±0.20 (0.11)	0.36±0.02 (0.11)	0.35±0.02 (0.11)	0.34±0.03 (0.11)
Heart	1.01±0.06 (0.31)	0.95±0.07 (0.30)	0.94±0.04 (0.30)	0.95±0.04 (0.29)	0.97±0.07 (0.30)	0.93±0.06 (0.30)
Spleen	0.64±0.04 (0.19)	0.63±0.03 (0.20)	0.62±0.03 (0.20)	0.65±0.03 (0.20)	0.66±0.03 (0.21)	0.65±0.06 (0.21)
Liver	7.68±0.45 (2.3)	7.22±0.34 (2.3)	7.44±0.52 (2.4)	7.94±0.50 (2.4)	8.01±0.46 (2.5)	8.06±0.45 (2.6)
Adrenal (R)	0.017±0.003 (0.005)	0.018±0.004 (0.006)	0.016±0.002 (0.005)	0.017±0.002 (0.005)	0.017±0.003 (0.005)	0.019±0.005 (0.006)
(L)	0.020±0.003 (0.006)	0.019±0.003 (0.006)	0.017±0.002 (0.005)	0.019±0.002 (0.006)	0.020±0.002 (0.006)	0.020±0.004 (0.006)
Kidney (R)	1.00±0.06 (0.30)	0.94±0.05 (0.30)	0.94±0.10 (0.30)	0.96±0.04 (0.30)	0.96±0.06 (0.30)	0.95±0.06 (0.31)
(L)	1.00±0.08 (0.30)	0.95±0.05 (0.30)	0.92±0.06 (0.29)	0.98±0.03 (0.30)	0.97±0.07 (0.30)	0.94±0.06 (0.31)
Testis (R)	1.52±0.05 (0.46)	1.51±0.06 (0.48)	1.46±0.07 (0.46)	1.51±0.07 (0.46)	1.47±0.03 (0.46)	1.47±0.04 (0.48)
(L)	1.54±0.03 (0.47)	1.51±0.03 (0.48)	1.49±0.04 (0.47)	1.52±0.05 (0.47)	1.52±0.08 (0.47)	1.52±0.04 (0.49)

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 stevioside

Item / Dose(%)	0	0.31	0.62	1.25	2.5	5
Effective No.	10	10	10	10	10	10
Body weight	177±11	176±8	177±10	173±11	165±10*	163±5**
Brain	1.85±0.08 (1.0)	1.83±0.04 (1.0)	1.83±0.05 (1.0)	1.84±0.05 (1.1)	1.84±0.05 (1.1)	1.84±0.06 (1.1*)
Salivary gl.	0.36±0.05 (0.20)	0.38±0.07 (0.22)	0.36±0.03 (0.20)	0.34±0.07 (0.20)	0.33±0.02 (0.21)	0.34±0.02 (0.21)
Thymus	0.18±0.02 (0.10)	0.19±0.02 (0.11)	0.19±0.01 (0.11)	0.18±0.02 (0.11)	0.18±0.02 (0.11)	0.18±0.02 (0.11)
Lung (R)	0.51±0.04 (0.29)	0.48±0.02 (0.27)	0.49±0.04 (0.28)	0.51±0.04 (0.29)	0.49±0.03 (0.30)	0.48±0.04 (0.30)
(L)	0.26±0.02 (0.15)	0.25±0.02 (0.14)	0.26±0.02 (0.15)	0.26±0.02 (0.15)	0.25±0.02 (0.15)	0.25±0.01 (0.16)
Heart	0.61±0.04 (0.35)	0.61±0.06 (0.35)	0.65±0.07 (0.37)	0.62±0.05 (0.36)	0.58±0.04 (0.36)	0.56±0.03 (0.35*)
Spleen	0.40±0.03 (0.23)	0.41±0.03 (0.23)	0.41±0.05 (0.23)	0.40±0.03 (0.23)	0.39±0.02 (0.24)	0.41±0.04 (0.25*)
Liver	3.91±0.29 (2.2)	3.96±0.27 (2.2)	4.00±0.24 (2.3)	4.13±0.35* (2.4*)	4.25±0.22* (2.6**)	4.38±0.25** (2.7**)
Adrenal (R)	0.021±0.003 (0.012)	0.020±0.003 (0.011)	0.022±0.004 (0.012)	0.021±0.003 (0.012)	0.022±0.003 (0.014)	0.020±0.003 (0.013)
(L)	0.023±0.004 (0.013)	0.23±0.003 (0.013)	0.023±0.004 (0.013)	0.024±0.002 (0.014)	0.024±0.003 (0.014)	0.023±0.002 (0.014)
Kidney (R)	0.57±0.04 (0.32)	0.56±0.02 (0.32)	0.57±0.04 (0.32)	0.55±0.03 (0.32)	0.52±0.01* (0.32)	0.52±0.03* (0.32)
(L)	0.58±0.06 (0.33)	0.57±0.03 (0.33)	0.58±0.05 (0.33)	0.56±0.03 (0.32)	0.53±0.02* (0.32)	0.53±0.03* (0.33)

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.

6. 病理組織学的検査結果 (Table 5, 6)

心臓では心筋症が雄で対照群を含む全群で、雌では2.5%投与群1例においてみられた。

肺では雌雄とも、肺動脈壁への石灰沈着が対照群

を含む全群でみられた。

肝臓では単細胞壊死 (Fig. 4) が雌雄とも対照群を含む全群でみられ、雄では対照群に比して投与群で程度および頻度ともやや強くみられた。細胞浸潤

Table 5. Histopathological findings of male rats treated with stevioside

Findings / Dose (%)	0				0.31				0.62				1.25				2.5				5			
	-	±	+	#	-	±	+	#	-	±	+	#	-	±	+	#	-	±	+	#	-	±	+	#
Heart																								
Myocardopathy	2	3	5	0	6	2	2	0	4	0	4	2	6	2	2	0	3	4	3	0	5	3	1	1
Lung																								
Calcification of pulmonary ar.	4	3	3	0	3	3	4	0	5	2	3	0	7	2	1	0	5	5	0	0	8	2	0	0
Liver																								
Single cell nec.	2	8	0	0	2	7	1	0	1	7	2	0	2	5	3	0	0	1	9	0	0	5	5	0
Cell infiltration	9	1	0	0	10	0	0	0	9	1	0	0	9	1	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0
Focal necrosis	10	0	0	0	9	0	1	0	10	0	0	0	10	0	0	0	9	0	1	0	10	0	0	0
Micro-granuloma	10	0	0	0	9	0	1	0	10	0	0	0	9	1	0	0	10	0	0	0	8	2	0	0
Spleen																								
Brown pigment	9	1	0	0	10	0	0	0	9	1	0	0	9	1	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0

- ; Normal ± ; Minimal + ; Slight # ; Moderate

Table 6. Histopathological findings of female rats treated with stevioside

Findings / Dose (%)	0				0.31				0.62				1.25				2.5				5			
	-	±	+	#	-	±	+	#	-	±	+	#	-	±	+	#	-	±	+	#	-	±	+	#
Heart																								
Myocardopathy	10	0	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	9	0	1	0	10	0	0	0
Lung																								
Calcification of pulmonary ar.	6	3	1	0	8	2	0	0	5	3	2	0	7	3	0	0	9	1	0	0	6	4	0	0
Liver																								
Single cell nec.	3	7	0	0	8	2	0	0	6	4	0	0	4	6	0	0	5	5	0	0	7	3	0	0
Cell infiltration	9	1	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0
Focal necrosis	9	0	1	0	10	0	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	9	0	1	0	10	0	0	0
Micro-granuloma	8	1	1	0	10	0	0	0	10	0	0	0	9	1	0	0	9	0	1	0	8	1	1	0
Spleen																								
Brown pigment	1	1	7	1	2	0	4	4	2	5	3	0	3	3	3	1	2	2	4	2	0	4	6	0
Kidney																								
Calcification	9	1	0	0	8	2	0	0	7	3	0	0	9	1	0	0	8	1	1	0	7	3	0	0
Harderian gland																								
Cell infiltration	10	0	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	9	0	0	1

- ; Normal ± ; Minimal + ; Slight # ; Moderate

は雌雄とも対照群を含め投与群で散発的にみられた。巣状壊死および小肉芽腫は雄では投与群で、雌では対照群を含め投与群で散発的にみられた。

脾臓では褐色色素沈着が雄では対照群を含め投与群で散発的に、雌では対照群を含む全群でみられた。

腎臓では雌において皮髄境界部への石灰沈着が対照群を含む全群でみられた。

ハーゲン腺では細胞浸潤が雌の5%投与群1例においてみられた。

考 察

Steviosideを0.31%, 0.62%, 1.25%, 2.5%および5%の濃度で、F344ラットに13週間混餌投与する亜慢性毒性試験を実施した。

その結果、死亡動物および一般症状の発現は試験期間を通じてみられなかった。体重増加および試験後半の摂餌量は対照群と投与群間において大きな差はみられなかった。臓器の相対重量では雌の投与群で脳、心臓、脾臓、肝臓および腎臓において対照群

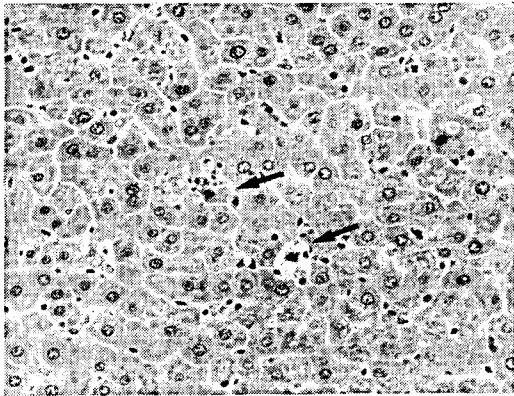


Fig. 4. Single cell necrosis (arrows) in the liver of male rats treated with 5% stevioside

に比して有意差がみられたが、軽度な変化であった。また、雄の投与群で血清生化学検査における LDH の上昇が、病理組織検査における肝臓の単細胞壊死が対照群に比してやや強くみとめられた。しかし、これらの変化は雌でみられないこと、明瞭な用量依存性がみられないこと、および軽度な変化であることから投与に起因する非特異反応と考えられた。その他、血液学的検査および他の血清生化学検査項目においても有意差がみられたが、毒性学的に意味のない軽度な変化と考えられた。また、病理組織検査においてみられた他の変化についても、散発的な発生か用量依存性のない自然発生性の変化と考えられた。

現在、stevioside の安全性に関する動物試験はかなり報告されている。急性毒性試験では、ICR 系マウスおよび Wistar 系ラットを用いた試験において LD₅₀ が、マウス経口および皮下投与で 8.2 g/kg 以上、腹腔内投与で雄 2.43 g/kg、雌 2.29 g/kg、

ラットでは経口および皮下投与で 8.2 g/kg 以上、腹腔内投与で雄 1.5 g/kg、雌 1.91 g/kg と報告されている⁴⁾。この結果は stevioside の毒性がかなり低いことを示唆するものである。さらに、亜急性毒性試験⁵⁾、慢性毒性試験⁶⁾、生殖毒性試験⁷⁾の結果においても毒性は報告されておらず、今回の試験でも明らかな毒性はみられなかった。

以上の結果、並びに本実験における最大投与量の 5% においても雌雄とも体重抑制が 10% 以内にとどまっており、明らかな毒性所見がみられないことから stevioside の癌原性本試験における最大耐量 (MTD) を 5% と決定し、本実験に入った。

文 献

- 1) 義平邦利, 松井道子, 石館 基: ステビオサイドの最近の話題, トキシコロジーフォーラム, **10**, 281~289 (1987)
- 2) Pezzuto, J. M., Compadre, C. M., Swanson, S. M., Nanayakkra, N. P. D., Kinghorn, A. D.: Metabolically activated steviol, the aglycone of stevioside, is mutagenic., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **82**, 2478~2482 (1985)
- 3) 吉村 功: 毒性・薬効データの統計解析, pp. 28~93 (1987), サイエンス社
- 4) 片山 修, 住田哲也, 林 紘司, 三橋博編: ステビア実用化と研究開発データ, pp. 225~281 (1976), ISU 株式会社
- 5) 明石春雄, 横山幸雄: ステビア乾葉抽出物の安全性について—各種毒性試験結果の報告, 食品工業, **10** 下, 34~43 (1975)
- 6) Yamada, A., Ohgaki, S., Noda, T., Shimazu, M.: Chronic toxicity study of Dietary stevia extracts in F344 rats, *J. Food Hyg. Sci. Japan*, **26**, 169~183 (1985)
- 7) Planas, G. M.: Contraceptive properties of *Stevia rebaubiana*. *Science*, **162**, 1007 (1968)

ラット肝二段階発がんモデルにおけるフェノバルビタールの用量相関について

小野寺博志・松島裕子・畝山智香子・渋谷 淳
三森国敏・前川昭彦・林 裕造Dose-response relationship of promotion by phenobarbital
in rat two-stage hepatocarcinogenesisHiroshi Onodera, Yuko Matsushima, Chikako Uneyama, Makoto Shibutani,
Kunitoshi Mitsumori, Akihiko Maekawa and Yuzo Hayashi

Investigation of the effect of various doses of phenobarbital (PB) in Experiment I (PB dose levels: 0, 38, 75, 150, 300 or 600 ppm) and Experiment II (PB dose levels: 0, 1, 4 or 16 ppm) given to male F344 rats (20 animals/group) in drinking water for 39 weeks after a single intraperitoneal injection of diethylnitrosamine (DEN) was performed using incidence of hepatic tumors and number or area of enzyme-altered foci as end-point lesions. There were no significant differences in the final body weight changes between DEN-initiated PB treatment (DEN+PB) and DEN-initiated (DEN) groups. Dose-dependent increases in the absolute and relative liver weights and in the incidence of hepatic carcinoma were found in the DEN+PB groups treated with 38 ppm PB or above 75 ppm PB or above, respectively. The numbers or areas of γ -GTP or GST-P positive foci of the liver were increased in the DEN+PB groups treated with 38 ppm PB or above. Additional investigation of 7-ethoxycoumarin *o*-deethylase (7-ECDE) induction in Experiment III, 7 groups consisting of 3 animals/group being fed water containing PB (0, 1, 4, 16, 75, 300 or 1200 ppm) for 1 week after the initiation of DEN and a further 7 groups (5 rats/group) receiving the same drinking water without DEN treatment, revealed dose-dependent increases of 7-ECDE in the DEN+PB groups and PB groups treated with 16 ppm PB or above. The present studies indicate that the threshold for promotion by PB is 38 ppm.

Key words: フェノバルビタール, 二段階肝発癌, 用量-反応, プロモーション作用, 7-ethoxycoumarin *o*-deethylase (7-ECDE)

(Received May 31, 1991)

はじめに

フェノバルビタール (PB) は肝の酵素を誘導する薬物としてよく知られている。また発癌物質を処置した後、この薬物を投与することにより腫瘍発生が増強するいわゆるプロモーター作用を有する物質でもある。

近年、いくつかの癌原性物質について、用量-反応関係を求める動物実験が行われ、特に、低用量では高用量とは異なった反応を示す結果も得られている¹⁾。またプロモーター作用についても用量-反応関係が必ずしも明確ではなく、用量や投与方法によっては抑制する報告もある^{2,3)}。

今回、肝発癌物質である DEN をイニシエーターとしたラット二段階肝発癌モデルを用いて PB によって誘発される増殖性病変の形態学的変化とその頻度、および γ -GTP と GST-P 両染色を用いての酵素変異陽性果の数と面積について、特に低用量での PB の肝臓に対するプロモーション作用の用量-反応関係を検討したので報告する。また、PB によって誘導される P-450 依存性の肝酵素を測定し、酵素誘導が発現する PB の用量とプロモーション作用が発現する PB の用量との関連性も検討した。

実験材料および方法

動物は日本チャールス・リバー(株)より購入した 4

週齢のF 344/DuCrj 雄性ラット (SPF) を用い2週間馴化した後, 6週齢で実験を開始した。

飼育環境は室温 $24 \pm 1^\circ\text{C}$, 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 時間消灯のバリアーシステム下の動物室で飼育し, 飼料は固型飼料 (CRF-1: オリエンタル酵母株) を実験期間中自由に摂取させた。

実験はPBの濃度を変えて2回行った。実験の群構成を Fig. 1 に示す。実験 I では動物を各群 20 匹とし第 1 群から第 5 群までは生理食塩水に溶解した Diethylnitrosamine (DEN: CAS, No. 55-18-5, 和光純薬株) を 100 mg/kg 体重を 1 回, 腹腔内投与しイニシエーション処置とした。その 1 週間後より 600, 300, 150, 75 および 38 ppm の濃度で蒸留水に溶解した Phenobarbital sodium (PB: CAS No. 50-06-7, イシロ薬品株・局方) を飲料水としてこれらの群に自由に与えた。加えてイニシエーションのみの第 6 群と, イニシエーション処置をせず PB 600 ppm を与えた第 7 群を設定した。PB 投与開始後 39 週目に全動物を屠殺解剖し実験を終了した。

実験 II は実験 I と同様に行い, 第 1 群~3 群は DEN でイニシエーション処置後 16, 4 および 1 ppm の PB を投与した。イニシエーションのみの群として第 4 群を設定した。

解剖時に体重を測定した後, エーテル深麻酔下で放血死させ肝臓を摘出した。肝重量を測定後, 一部を冷アセトンにて直ちに固定し, パラフィン切片を作成した。γ-GTP, GST-P (ABC 法) の酵素染

色を行い⁴⁾, 画像解析装置 TAS-plus (ライツ社製) で計測した。残りの肝臓と甲状腺・肺・脾臓・副腎・腎臓は 10% 中性緩衝ホルマリンで固定し, 常法に従い H-E 染色標本を作製し病理組織学的に検索した。

実験 III として 7-Ethoxycoumarin *o*-deethylase (7-ECDE) 活性の測定を行った。各群 5 匹からなる第 1 群から第 6 群までは 1200, 300, 75, 16, 4 および 1 ppm の濃度の PB を 1 週間飲水投与した。第 7 群はイニシエーションと PB を投与しない無処置対照群とした。第 8 群から第 13 群には DEN でイニシエーション処置後, その 1 週間後より 1200, 300, 75, 16, 4 および 1 ppm の濃度の PB を第 1~6 群と同様に 1 週間, 飲水投与した。またイニシエーションのみの群として第 14 群を設けた。PB 投与 1 週後に全動物を屠殺解剖した。解剖時に体重・肝重量を測定後, 肝臓の一部を凍結保存し, Challiner ら⁵⁾ の方法により 7-ECDE 活性を測定した。

結 果

1. 実験 I および II

実験期間中いずれの群においても動物の死亡は認められなかった。解剖時における体重と肝の絶対重量および相対重量, 腫瘍発生率を Table 1 に示す。

実験 I では, 体重は DEN+600 ppm 群 (第 1 群) でやや低い傾向があったが, DEN のみの対照群 (第 6 群) と比べて有意差は認められなかった。しかし, 肝臓の絶対重量と相対重量においては PB の

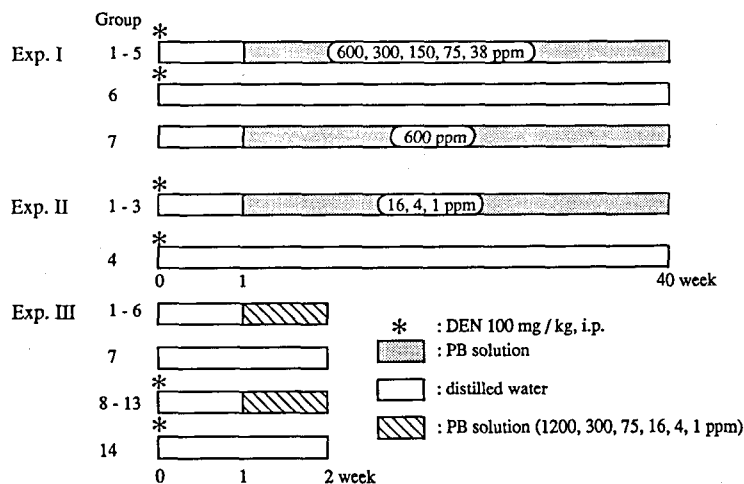


Fig. 1. Experimental design

Table 1. Body weight, liver weight and tumor incidence in F344 rats treated with PB for 39 weeks after initiation of DEN

	Group		No. of rats	Final body weight (g)	Liver weight		Incidence of tumor (%)		
	DEN	PB dose (ppm)			absolute	relative	HCC ^a	adenoma	total
Exp. I									
1.	+	600	20	422	18.7*	4.43*	25*	25*	50*
2.	+	300	20	438	17.6*	4.08*	30*	25*	55*
3.	+	150	20	432	15.3*	3.55*	10	20*	30*
4.	+	75	20	428	14.1*	3.30*	10	10	20*
5.	+	38	20	434	13.4*	3.10*	0	5	5
6.	+	0	20	434	12.5	2.88	0	0	0
7.	-	600	20	434	16.7*	3.84*	0	5	5
Exp. II									
1.	+	16	20	428	13.1	3.06	0	10	10
2.	+	4	20	428	13.7	3.20	0	5	5
3.	+	1	20	429	13.8	3.22	0	5	5
4.	+	0	20	426	13.5	3.17	0	15	15

a : Hepatocellular carcinoma

* : Significantly different from control (group 6) at p<0.05

用量に相関して増加が認められ、PBのみの第7群を含めてすべてのPB投与群で対照群との間に有意差が認められた。

肝細胞癌の発生は第1, 2, 3, 4群でそれぞれ25, 30, 10, 10%に認められ第5, 6, 7群では癌の発生は認められなかった。第1群と第2群の肝癌発生頻度は第6群の対照群に比べ有意に増加した。

肝細胞腺腫の発生頻度は、第1群と第2群で25%, 第3群で20%, 第4群と第5群でそれぞれ10%と5%であった。また、PB 600 ppmのみの第7群でも5%に認められた。その発生頻度は第1, 2および3群で第6群に比べ有意差が認められた。肝細胞癌と腺腫の腫瘍性病変を合計すると第1群で50%, 以下第5群までそれぞれ55, 30, 20, 5%で、対照群に比べて第1~4群の総発生頻度に有意差が認められた。

実験IIにおいては、第1~3群の体重や肝重量は第4群の対照群に比べ有意差は認められなかった。肝細胞癌の発生はいずれの群においても認められなかったが、肝細胞腺腫は第1群で10%, 第2群で5%, 第3群で5%, DENのみの第4群においても15%に認められた。しかし、第1~3群と第4群との間に発生頻度における有意差は認められなかった。

実験Iにおけるγ-GTP陽性細胞巢の単位面積当りの陽性数と占有面積をTable 2に示した。実験Iにおいては陽性細胞巢数は第5群で第6群の対照

群と比べ約3倍に増加しており、第1~4群の陽性巢数は有意に増加した。陽性巢占有面積は第1~3群において、対照群に比し有意に増加し、第4群と第5群においても有意差は認められないものの、増加傾向がみられた。

実験IIでは、第1~3群の陽性細胞数および占有面積は、対照群に比し有意差は認められなかった。

GST-Pの染色結果をTable 3に示す。実験Iにおいて陽性細胞巢の数は第4群でやや少ない傾向にあったが、ほぼ用量に相関して増加しており、第1群では第6群(対照群)の約3倍に増加した。第1~3群の増加は第6群の対照群に比し有意であった。一方、第7群では陽性細胞数、面積とも有意に減少していた。陽性細胞の占有面積においてはPBの用量に相関した増加が認められ、第1, 2群と第7群で第6群に比し有意差が認められた。実験IIにおいては、DENのみの対照群(第4群)と比べPB 1 ppm投与群(第3群)で陽性細胞数、占有面積とも少ない傾向があったが、他のPB投与群と対照群との間に有意な増加は認めなかった。

2. 実験 III

PB投与後1週後に屠殺解剖した実験IIIにおいては、第1群で最終体重において増加抑制が認められ、対照群の第7群との間に有意差が認められた(Table 4)。肝の絶対および相対重量では、PBのみ投与した第1群から第3群で有意な増加がみられ、

Table 2. Number and area of γ -GTP positive foci in F344 rats treated with PB for 39 weeks after initiation of DEN

	Group		No. of Foci (No. / cm ²) Mean \pm S.D	Area of Foci (mm ² /cm ²) Mean \pm S.D
	DEN	PB dose (ppm)		
Exp. I				
1.	+	600	23.2 \pm 5.0*	4.131 \pm 0.77*
2.	+	300	18.4 \pm 6.3*	2.164 \pm 0.80*
3.	+	150	6.2 \pm 1.4*	0.617 \pm 0.15*
4.	+	75	6.5 \pm 2.8*	0.556 \pm 0.31
5.	+	38	2.5 \pm 0.9	0.134 \pm 0.08
6.	+	0	0.8 \pm 0.5	0.015 \pm 0.03
7.	-	600	0.3 \pm 0.3	0.011 \pm 0.01
Exp. II				
1.	+	16	3.5 \pm 1.4	0.14 \pm 0.05
2.	+	4	2.5 \pm 1.2	0.10 \pm 0.05
3.	+	1	1.9 \pm 1.1	0.08 \pm 0.05
4.	+	0	2.1 \pm 0.8	0.09 \pm 0.04

* Significantly different from control (group 6) at $p < 0.01$

Table 3. Number and area of GST-P positive foci in F344 rats treated with PB for 39 weeks after initiation of DEN

	Group		No. of Foci (No. / cm ²) Mean \pm S.D	Area of Foci (mm ² /cm ²) Mean \pm S.D
	DEN	PB dose (ppm)		
Exp. I				
1.	+	600	59.2 \pm 4.3*	9.21 \pm 1.2*
2.	+	300	49.7 \pm 6.1*	7.53 \pm 0.7*
3.	+	150	45.8 \pm 5.9*	6.26 \pm 1.6
4.	+	75	34.9 \pm 4.3	4.22 \pm 2.1
5.	+	38	42.4 \pm 22.8	3.52 \pm 2.0
6.	+	0	18.3 \pm 6.6	1.18 \pm 0.2
7.	-	600	1.0 \pm 0.7*	0.06 \pm 0.1*
Exp. II				
1.	+	16	11.9 \pm 4.0	0.89 \pm 0.35
2.	+	4	11.4 \pm 3.9	0.71 \pm 0.23
3.	+	1	6.5 \pm 3.9	0.50 \pm 0.32
4.	+	0	10.7 \pm 4.3	0.72 \pm 0.25

* Significantly different from control (group 6) at $p < 0.01$

第4群から第6群での肝重量は無処置対照群の第7群と同様の傾向を示した。

DENを投与した第8~14群では、絶対重量で第9群が、相対重量で第8、9群と第12群がDENのみの第14群に比し有意な増加を示した。

7-ECDEの測定値は第1~4群で第7群に比し有意に増加した。DENのイニシエーション処置を施した第8群から14群では、第8群から第11群で対

照群の第14群に比し有意に高い値を示した。

考 察

DENをイニシエーターとしてPBのプロモーション作用についてのラット肝二段階発癌実験を行った。PBを600 ppmの濃度で39週間投与しても最終体重に変動は認められなかったが、実験IIIの1200 ppmのPBでは、投与1週間で有意な体重増

Table 4. Body weight, liver weight and 7-ECDE activity in F344 rats administered PB for 1 week with or without DEN initiation

Exp. III	Group		No. of rats	Body weight (g)	Liver weight		7 - ECDE* Mean \pm S.D
	DEN	PB dose (ppm)			absolute	relative	
1.	-	1200	5	189 ^a	9.69 ^a	5.14 ^a	446.6 \pm 144.9 ^a
2.	-	300	5	192	8.97 ^a	4.67 ^a	345.2 \pm 135.5 ^a
3.	-	75	5	209	8.89 ^a	4.24 ^a	184.7 \pm 47.4 ^a
4.	-	16	5	202	7.61	3.77	59.7 \pm 14.9 ^a
5.	-	4	5	202	7.54	3.72	40.7 \pm 4.3
6.	-	1	5	204	7.45	3.64	47.5 \pm 8.4
7.	-	0	5	208	7.76	3.73	33.1 \pm 7.3
8.	+	1200	3	178	8.55	4.78 ^b	296.9 \pm 26.5 ^b
9.	+	300	3	202	9.31 ^b	4.59 ^b	247.9 \pm 8.1 ^b
10.	+	75	3	199	7.88	3.95	189.8 \pm 26.8 ^b
11.	+	16	3	196	7.54	3.85	63.7 \pm 0.8 ^b
12.	+	4	3	190	6.74	3.55 ^b	40.9 \pm 7.1
13.	+	1	3	201	7.66	3.81	30.4 \pm 9.0
14.	+	0	3	194	7.30	3.76	33.4 \pm 4.0

* : 7-Ethoxycoumarin o-deethylase (nmol / mg protein / min)

a: Significantly different from control (group 7) at p<0.01

b: Significantly different from control (group 14) at p<0.01

加抑制が認められた。しかし、肝重量はPB投与1週では75 ppm以上のPB群で、また39週投与では38 ppm以上のPB群で絶対重量および相対重量がともに増加した。これは、PBの39週間連続投与により75 ppm PB群はもとより、38 ppm PB群の肝においても小胞体の増生が活発化したことを意味するものであろう。さらに、7-ECDE活性は本実験で、16 ppm以上のPB群で有意に増加した。また、PB単独投与群では、有意差はないものの、1 ppm PBから7-ECDEは上昇する傾向がみられ、プロモーター作用以外のPB本来の薬理作用の検出には、この酵素の測定が非常に有効であると考えられた。一方、腫瘍の発生頻度においては、75 ppm以上のPB群で肝細胞腫瘍の総発生頻度が対照群に比し有意に増加したことから、PBの腫瘍発生に対する明らかなプロモーション作用の最低濃度は75 ppmとみなされた。Perainoら⁶⁾は、アセトアミノフェンでイニシエートされたラットにPBを投与したところ、肝腫瘍の増加が100 ppm以上の群でみられ、20 ppm群では増加しなかったと報告している。今回の成績は、彼らのそれとほぼ一致しており、肝腫瘍誘発最少量は75 ppm前後であることが判明した。

γ -GTP・GST-P各染色での陽性細胞巢の出現数は38 ppm以上で用量に相関した増加を示した。しかし、16 ppmでは γ -GTPやGST-P陽性細胞巢の数と面積で明かな変動は認められなかった。酵素変異を指標としたPBの最少作用量は38 ppmとみなされる。Goldsworthyら⁷⁾は肝酵素変異巢に対するPBのプロモーション作用についての実験をラットを用いて行い、プロモーション作用の発現しない用量は10 ppm以下と報告している。この報告では、肝の部分切除を行った上でDENのイニシエーション処理を施しているため、肝の酵素変異陽性巢の発現率が非常に高い。Goldsworthyらの実験結果と今回のプロモーション最少作用量の相違は、この肝部分切除の有無に起因するものと推察された。

PBの極低用量の投与では酵素変異陽性巢の数と面積が減少するという報告がなされている²⁾。一方、高用量の短期間投与より、低用量で長期間投与された肝の方が変異陽性巢が多いという報告もなされている⁸⁾。今回の実験においても低用量群(1~4 ppm)で腫瘍発生ないし酵素変異陽性巢が減少する傾向がみられ、PBは最少作用量以下ではむしろ増殖性病変の発生に対し抑制的に作用する可能性も示唆された。PBはプロモーション作用を有する用量

より低い用量においても、7-ECDE 活性の成績で示されているように、肝の種々の代謝酵素を誘導しそれがむしろ、解毒作用として機能している可能性も考えられた。また、動物の系統や性差およびホルモンの関与によってPBのプロモーション作用に差異が生じることが知られており⁹⁻¹¹⁾、プロモーション作用の閾値の決定にはさらに種々の要因が関与しているものと思われる。

以上の結果から、本実験条件下ではフェノバルビタールの7-ECDEで代表される薬物代謝酵素の活性は16 ppm以上の用量で明らかに増加するが、プロモーション作用は、腫瘍発生に対しては75 ppm、酵素変異陽性巣に対しては38 ppm以上の用量で発現することが示された。

文 献

- 1) Maekawa, A., Ogiu, T., Matsuoka, C., Onodera, H., Furuta, K., Kurokawa, Y., Takahashi, M., Kokubo, T., Tanigawa, H., Hayashi, Y., Nakadate, M. and Tanimura, A.: Carcinogenicity of low doses of N-ethyl-N-nitrosourea in F344 rats; A dose-response study. *Gann*, **75**, 117~125 (1984)
- 2) Pitot, H. C., Goldsworthy, T. L., Moran, S., Kennan, W., Glauert, H. P., Maronpot, R. R. and Campbell, H. A.: A method to quantitate the relative initiating and promoting potencies of hepatocarcinogenic agents in their dose-response relationships to altered hepatic foci. *Carcinogenesis*, **8**, 1491~1499 (1987)
- 3) Walker, V. E. and Swenberg, J. A.: Phenobarbital lacks promoting activity for neurogenic tumors in F344 rats transplacental exposed to ethylnitrosourea. *J. Neuropathology and Experimental Neurology*, **48**, 263~269 (1989)
- 4) Goldsworthy, T. L. and Pitot, H. C.: The quantitative analysis and stability of histochemical markers of altered hepatic foci in rat liver following initiation by diethylnitrosamine administration and promotion with phenobarbital. *Carcinogenesis*, **6**, 1261~1269 (1985)
- 5) Challiner, M. R., Park, B. K., Odum, J., Orton, T. C. and Parker, G. L.: The effects of phenobarbitone on urinary 6-hydroxycortisol excretion and hepatic enzyme activity in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *Biochem. Pharmacol.*, **29**, 3319~3324 (1980)
- 6) Peraino, C., Staffeldt, E. F., Haugen, D. A., Lombard, L. S., Stevens, F. J. and Michael Fry, R. J.: Effects of varying the dietary concentration of phenobarbital on its enhancement of 2-acetylaminofluorene-induced hepatic tumorigenesis. *Cancer Research*, **40**, 3268~3273 (1980)
- 7) Goldsworthy, T., Campbell, H. A. and Pitot, H. C.: The natural history and dose-response characteristics of enzyme-altered foci in rat liver following phenobarbital and diethylnitrosamine administration. *Carcinogenesis*, **5**, 67~71 (1984)
- 8) Appel, K. E., Menden, M., Buchmann, A. and Schwarz, M.: Effect of varying the concentration of phenobarbital and its duration of treatment on the evolution of carcinogen induced enzyme-altered foci in rat liver. *Cancer Letters*, **57**, 75~82 (1991)
- 9) Weghorst, C. M., Pereira, M. A. and Klaunig, J. E.: Strain differences in hepatic tumor promotion by phenobarbital in diethylnitrosamine- and dimethylnitrosamine-initiated infant male mice. *Carcinogenesis*, **10**, 1409~1412 (1989)
- 10) Weghorst, C. M. and Klaunig, J. E.: Phenobarbital promotion in diethylnitrosamine-initiated infant B6C3F1 mice: influence of gender. *Carcinogenesis*, **10**, 609~612 (1989)
- 11) Hiasa, Y., Kitahori, Y., Konishi, N., Shimoyama, T. and Jung-Chung Lin.: Sex differential and dose dependence of phenobarbital-promoting activity in N-bis(2-hydroxypropyl) nitrosamine-initiated thyroid tumorigenesis in rats. *Cancer Research*, **45**, 4087~4090 (1985)

Cyanoguanidine の F344 ラットにおける亜慢性毒性試験

松島裕子・小野寺博志・小笠原裕之・北浦敬介
三森国敏・前川昭彦・高橋道人

Subchronic Oral Toxicity Study of Cyanoguanidine in F344 Rats

Yuko Matsushima, Hiroshi Onodera, Hiroyuki Ogasawara, Keisuke Kitaura,
Kunitoshi Mitsumori, Akihiko Maekawa and Michihito Takahashi

A 13-week subchronic oral toxicity study of cyanoguanidine was performed in male and female F344 rats by feeding of CRF1 powder diets containing 0, 1.25, 2.5, 5 and 10% cyanoguanidine to determine appropriate dose levels for a subsequent 2-year carcinogenicity study. The rats were randomly allocated to 5 groups, each consisting of 10 males and 10 females. No animals died during the administration period. Inhibition of body weight gain was more marked in both sexes of the 10% group and in females of the 5% group as compared with the control group. Mean food intake in males of the groups treated with 5% or 10% and in females of the 10% group was significantly higher than that in the control group. Serum biochemical investigation revealed a higher level of serum BUN in both sexes of the 10% group. On histopathological examination, toxic changes characterized by the occurrence of intranuclear eosinophilic inclusion bodies in the proximal tubular epithelium of the kidney were observed in both sexes of the 10% group. Similar inclusion bodies were also seen in 2 out of 10 males of the 5% group.

From these results, it was concluded that a level of 10% of cyanoguanidine in the diet is unequivocally toxic. A dose level, 5% cyanoguanidine, in the diet might be appropriate as a high dose for a carcinogenicity study.

Key words : Cyanoguanidine, F344 ラット, 腎毒性, 封入体, 亜慢性毒性

(Received May 31, 1991)

はじめに

Cyanoguanidine は日本で年間 5500 t 生産されており (1986 年), その用途として, メラミン, グアニジン塩やグアナミン類の製造原料, cyanoguanidine 樹脂 (染料固着剤, 繊維加工剤, 塗料, 接着剤, 医薬品, イオン交換樹脂) や爆薬原料等に他の化合物と合成して使用されたり, あるいはそのまま添加しエポキシ樹脂硬化剤, 糊澱粉添加剤, 粘度調整剤や化学肥料等に広く用いられている。変異原性は S14 plant fraction を添加した salmonella TA98 で陽性であるが, マウス肝 S9 mix では陰性である (Tarras¹⁾)。他に, この化学物質の環境および毒性データに関する報告はほとんどない。

今回我々は, cyanoguanidine の短期間大量投与による毒性を明らかにし, 引き続き実施する癌原性試験の用量設定を行うため, 亜慢性毒性試験を行っ

たのでその成績を報告する。

材料および方法

1. 検体

Cyanoguanidine (Dicyanodiamide $C_2H_4N_4$, 分子量 84.09, CAS No. 461-58-5) は水 (25°C で 4.13 g/100 ml) やアルコールに若干溶解する不揮発性の白色結晶性粉末である。水溶液はほぼ中性を示し, 中性では安定である。試験には, 三和ケミカル㈱の cyanoguanidine (純度 99.9%) を用いた。

2. 動物および飼育環境

ホワイトフレックを床敷としたプラスチックケージに動物を収容し, 室温 $24 \pm 1^\circ C$, 湿度 $55 \pm 5\%$, 換気回数 18 回/時 (オールフレッシュ), 照燈 12 時間, 消灯 12 時間に維持されたバリヤースystem 動物室で飼育した。

3. 亜慢性毒性試験の用量設定

急性毒性試験 1: 9週齢の雌性 F344/DuCrj ラット (SPF 日本チャールスリバー株) 5匹を用いて、検体投与前 4時間絶食した。検体は蒸留水に懸濁し、20あるいは 30 g/kg 体重の検体を一回強制経口投与した。全動物とも死亡はみられなかったが、30 g/kg 体重投与群において投与 1時間後に体温低下、動作の鈍化、チアノーゼ、2時間後には横臥、チアノーゼ等の症状が見られた。しかし、投与 18時間後にはこれらの症状は回復し、下痢がみられたのみとなった。投与一週間後に行なった剖検時には、特に異常な所見はみられなかった。

急性毒性試験 2: 6週齢の雌 F344/DuCrj ラット 9匹を 3群に分け、cyanoguanidine を CRF 1 粉末飼料に 0, 5 および 10% の割合で混入し、14日間自由摂取させた。試験終了時まで動物の死亡は認められなかった。投与群においては用量に相関して体重増加抑制が見られたが、飼料摂取量は、逆に高用量群ほど多かった。以上の成績より、亜慢性毒性試験での最高用量を 10% とし、以下 5, 2.5, 1.25 および 0% の用量を設定した。

4. 亜慢性毒性試験方法

動物は 5週齢の F344/DuCrj ラットを一週間の馴化後、雌雄各 50匹を 5群に分けた。Cyanoguanidine は CRF-1 粉末飼料に 0 (対照群), 1.25, 2.5, 5 および 10% の濃度で混入し、13週間自由摂取させた。飲料水は水道水を自由摂取させた。体重および飼料摂取量は毎週測定した。臨床症状および死亡動物の有無を毎日観察し、投与 13週後に全生存動物を屠殺剖検し、試験を終了した。動物は屠殺の前日より一晩絶食後、エーテル麻酔下で開腹し、腹部大動脈より採血を行った。血液学的検査には、自動血球計数装置 (C-150 型: 東亜医用電子社) を用いて赤血球数、白血球数、ヘマトクリット値、MCV, MCH, MCHC および血小板数を測定した。血清生化学的検査は GOT, GPT, アルカリフォスファターゼ, γ -GTP, コリンエステラーゼ, 総コレステロール, 総蛋白, アルブミン, A/G, 尿素窒素, クレアチニン, Ca, P, Na, K, Cl の各項目について実施した。動物は肉眼的に剖検後、脳, 胸腺, 心, 肺, 腎, 副腎, 脾, 肝および精巣の臓器重量の測定を行った。また上記臓器に加え、主要臓器を 10% 中性緩衝ホルマリン溶液に固定した。諸臓器は常法に従って薄切切片を作成し、Hematoxylin-Eosin (HE) 染色をほどこして病理組織学的検索

を行った。

5. 統計処理

体重, 血液学的検査値, 血清生化学的検査値および臓器重量の結果は各群の分散比を Bartlett の方法で検定し、等分散の場合は一元配置の分散分析を行い、不等分散の場合は Kruskal-Wallis の方法により検定を行った。群間に有意性が認められた場合の多重比較は例数が等しければ Dunnett 型で、また例数が異なれば Scheffe 型でそれぞれ対照群と各投与群間との有意差検定を行った。

結 果

1. 死亡動物および一般状態

試験全期間を通じて雌雄全群に死亡動物は認められず、一般症状においても検体に起因すると思われる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、雌雄の 10% 群および雌の 5% 群において有意な体重増加抑制が認められた (Fig. 1, Table 1)。また、飼料摂取量は雌雄共に検体濃度に相関して増加する傾向がみられ、更に雌雄の 10% 群および雌の 5% 群で対照群に比し有意に増加した (Table 1)。また、検体の総摂取量は、混餌の用量に相関した (Table 1)。

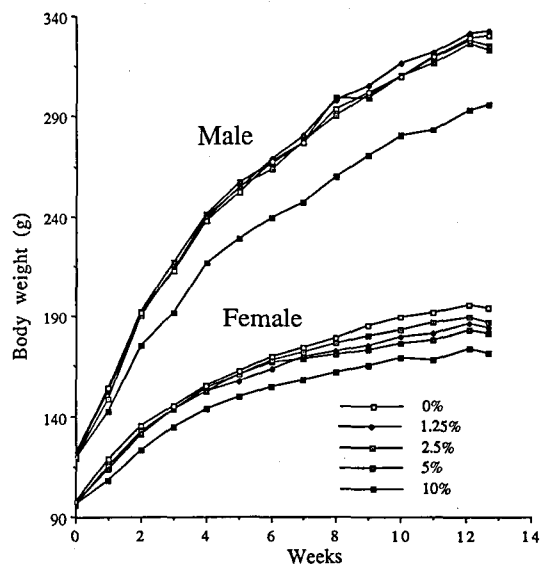


Fig. 1. Growth curves in male and female F344 rats treated with cyanoguanidine for 13 weeks

Table 1. Body weight, diet intake and total chemical intake in male and female F344 rats fed diet containing cyanoguanidine for 13 weeks

Sex	Dose (%)	Final body weight (g)	Diet intake (g/rat/day)	Total chemical intake (g/rat/13wk)
Male	0	329.8±14.9	15.40±1.30	0
	1.25	332.5±16.9	15.53±1.43	17.29
	2.5	325.3±13.7	15.85±1.50	36.40
	5	322.8±11.7	16.73±1.66*	76.44
	10	295.7±14.7**	17.11±1.47**	155.60
Female	0	193.8± 1.0	10.49±0.83	0
	1.25	183.9±13.8	10.55±1.07	11.83
	2.5	186.7±11.4	11.18±1.01	25.48
	5	181.3±8.1**	10.86±1.28	49.14
	10	171.5±6.1**	11.74±1.28**	106.47

Values are mean ± S.D.

* p<0.05, ** p<0.01

3. 臓器重量

雄の10%群において脳、心および腎の絶対重量が有意に減少し、これらの相対重量は逆に増加した。5%以下の投与群では投与用量に関連した変化は認められなかったが、以下の臓器に有意差が認められた。5%群の副腎重量減少、2.5%群の心重量増加、1.25%群の心および精巣重量増加 (Table 2) がみられた。雌の10%群で、脳、胸腺、肝および副腎の絶対重量が有意に減少し、脳、心、脾、腎の相対

重量が逆に増加する傾向がみられた。5%群では10%群と同様の変動として、胸腺と肝の絶対重量が減少し、脳と心の相対重量が増加した。2.5%以下の投与群では、肝の絶対重量で減少したことを除いては、用量に関連した変動はみられなかった (Table 3)。

4. 血液学および血清生化学的検査

血液学および血清生化学的検査の結果を Table 4 および 5 に示す。血清生化学的検査においては、投与濃度に関連した変化として、BUN が雄の5%以上の投与群および雌の全投与群において有意に増加し、ALP の有意な増加が雄の10%群と雌の5%以上の投与群にみられた。また、コリンエステラーゼの増加が雄の10%群に認められ、雌の1.25, 5 および10%の投与群では GOT が有意に増加した。一方、総蛋白は雌雄の5%以上の投与群で有意に減少し、総コレステロールも雄の5%以上の投与群と雌の10%群で減少した。更に、Cl は雌の2.5%群および雌雄の5%以上の投与群で有意に減少し、雄では Ca と GPT も5%以上の投与群で減少した。その他、有意な変動がいくつかの項目にみられたが、投与用量に関連するものではなかった。

血液学的検査では、WBC が雄の5%以上の投与群で有意に増加し、血小板数も雄の5%群と雌雄の10%群で増加した。

Table 2. Absolute organ weights and organ/body weight ratios in male rats treated with cyanoguanidine for 13 weeks

Item	Dose level (%)				
	0	1.25	2.5	5	10
Effective No.	10	10	10	10	10
Body weight	329.8±14.9	332.5±16.9	325.3±13.7	322.8±11.7	295.7±14.7**
Brain	1.99±0.07(0.60)	1.99±0.07(0.60)	1.99±0.05(0.61)	1.98±0.06(0.61)	1.92±0.03** (0.65**)
Thymus	0.22±0.04(0.07)	0.24±0.04(0.07)	0.23±0.04(0.07)	0.22±0.04(0.07)	0.22±0.04(0.07)
Lung.R	0.71±0.09(0.22)	0.68±0.08(0.21)	0.73±0.09 (0.23)	0.68±0.11(0.21)	0.65±0.15(0.22)
Lung.L	0.35±0.03(0.11)	0.36±0.05(0.11)	0.37±0.03(0.12)	0.37±0.10(0.12)	0.38±0.12(0.13)
Heart	0.94±0.06(0.29)	1.00±0.04*(0.30*)	0.99±0.05*(0.30*)	0.94±0.06(0.29)	0.91±0.06*(0.31*)
Spleen	0.61±0.06(0.18)	0.65±0.09(0.20)	0.65±0.09(0.20)	0.60±0.03(0.19)	0.60±0.11(0.20)
Liver	7.20±0.45(2.18)	7.20±0.54(2.16)	6.95±0.40(2.14)	7.10±0.35(2.20)	6.66±0.36(2.25)
Adrenal.R	0.019±0.002(0.006)	0.018±0.004(0.005)	0.019±0.003(0.006)	0.017±0.003(0.005)	0.018±0.004(0.006)
Adrenal.L	0.021±0.004(0.007)	0.020±0.002(0.006)	0.021±0.001(0.007)	0.018±0.002*(0.006*)	0.020±0.003(0.007)
Kidney.R	0.96±0.07(0.29)	0.94±0.06(0.28)	0.93±0.04(0.29)	0.96±0.05(0.30)	0.89±0.06*(0.30*)
Kidney.L	0.97±0.07(0.29)	0.94±0.09(0.28)	0.95±0.05(0.29)	0.96±0.06(0.30)	0.92±0.04** (0.31**)
Testis.R	1.43±0.05(0.44)	1.51±0.08*(0.45*)	1.44±0.06(0.44)	1.43±0.06(0.44)	1.35±0.08(0.46)
Testis.L	1.49±0.07(0.45)	1.53±0.06(0.46)	1.49±0.04(0.46)	1.48±0.08(0.46)	1.40±0.19(0.48)

Values represent mean ± S.D. in absolute organ weights.

Values in parentheses represent percentage of organ/body weight ratios.

* p<0.05, **p<0.01

Table 3. Absolute organ weights and organ/body weight ratios in female rats treated with cyanoguanidine for 13 weeks

Item	Dose level (%)				
	0	1.25	2.5	5	10
Effective No.	10	10	10	10	10
Body weight	193.8±1.0	183.9±13.8	186.7±11.4	181.3±8.1**	171.5±6.1**
Brain	1.85±0.05(0.96)	1.86±0.06(1.02)	1.81±0.09(0.97)	1.84±0.04(1.02**)	1.80±0.05*(1.05**)
Thymus	0.21±0.03(0.11)	0.21±0.04(0.11)	0.20±0.03(0.10)	0.18±0.03*(0.10)	0.18±0.03*(0.11)
Lung.R	0.52±0.06(0.27)	0.50±0.08(0.27)	0.53±0.09(0.29)	0.51±0.07(0.28)	0.48±0.03(0.28)
Lung.L	0.27±0.03(0.14)	0.27±0.03(0.15)	0.27±0.06(0.15)	0.27±0.03(0.15)	0.25±0.01(0.15)
Heart	0.62±0.04(0.32)	0.61±0.06(0.33)	0.62±0.03(0.33)	0.63±0.03(0.35**)	0.61±0.05(0.36**)
Spleen	0.42±0.03(0.21)	0.41±0.04(0.22)	0.42±0.05(0.22)	0.41±0.03(0.22)	0.40±0.02(0.23**)
Liver	4.14±0.22(2.14)	3.94±0.21*(2.15)	3.95±0.28(2.11)	3.82±0.21** (2.11)	3.80±0.25** (2.21)
Adrenal.R	0.022±0.003(0.011)	0.021±0.002(0.012)	0.022±0.003(0.012)	0.021±0.003(0.012)	0.018±0.002** (0.011)
Adrenal.L	0.024±0.003(0.012)	0.023±0.004(0.012)	0.024±0.004(0.013)	0.022±0.002(0.012)	0.020±0.003** (0.012)
Kidney.R	0.59±0.04(0.30)	0.57±0.04(0.31)	0.59±0.03(0.32)	0.57±0.05(0.31)	0.58±0.04(0.34**)
Kidney.L	0.59±0.05(0.30)	0.58±0.03(0.32)	0.59±0.02(0.32)	0.58±0.05(0.32)	0.58±0.04(0.34**)

Values represent mean ± S.D. in absolute organ weights.

Values in parentheses represent percentage of organ/body weight ratios.

* p<0.05, **p<0.01

Table 4. Serum chemistry and hematology in male rats treated with cyanoguanidine for 13 weeks

Item	Dose level (%)				
	0	1.25	2.5	5	10
Effective no.	10	10	10	10	10
Serum chemistry					
Albumin (g/dl)	4.39±0.10	4.40±0.18	4.33±0.16	4.26±0.08**	4.31±0.16
T.protein (g/dl)	6.36±0.13	6.35±0.18	6.23±0.28	6.12±0.11**	6.14±0.16**
A/G	2.24±0.16	2.28±0.23	2.31±0.21	2.30±0.09	2.36±0.21
T.cholesterol (mg/dl)	50.4±4.30	51.4±4.60	50.8±2.74	46.3±3.56*	43.4±4.06**
BUN (mg/dl)	16.0±1.77	17.10±1.50	16.50±0.97	18.93±1.87**	27.56±2.61**
Creatinine (mg/dl)	0.50±0.00	0.48±0.04	0.47±0.05	0.48±0.04	0.52±0.08
Na (mEq/l)	142.0±0.94	143.1±0.57**	142.7±1.16	142.3±1.06	142.0±0.82
Cl (mEq/l)	103.1±1.00	103.3±1.06	104.0±0.67*	101.8±1.14*	99.5±1.36**
K (mEq/l)	4.29±0.21	4.50±0.32	4.43±0.13	4.46±0.22	4.32±0.30
Ca (mg/dl)	10.35±0.23	10.29±0.22	10.18±0.24	10.06±0.12**	10.01±0.10**
P (mg/dl)	5.86±0.35	5.90±0.39	5.53±0.19*	5.42±0.33**	5.99±0.51
GOT (IU/l)	78.5±5.78	84.6±15.02	76.7±8.43	78.7±8.78	79.2±8.22
GPT (IU/l)	15.1±4.51	13.1±5.51	14.5±4.30	8.3±2.95**	6.8±2.20**
ALP (IU/l)	227.3±8.77	227.8±22.9	212.4±19.4	228.1±7.91	246.2±21.5*
γ-GTP (IU/l)	0.3±0.48	0.6±0.52	0.7±0.82	0.4±0.70	0.5±0.71
Cholinesterase (IU/l)	3.4±1.51	3.8±1.55	4.0±3.68	4.2±1.62	5.0±1.63*
Hematology					
WBC (x10 ⁶ /μl)	30.6±4.17	36.2±4.47**	35.6±7.28	39±3.83**	41.3±6.27**
RBC (x10 ⁶ /μl)	925.1±74.96	962.2±28.23	961.5±29.86	942.5±25.44	919.2±23.18
PLT (x10 ⁴ /μl)	73.12±5.76	80.62±3.94**	77.76±6.91	80.95±4.03**	86.45±3.39**

Values are mean±S.D.

* p<0.05, ** p<0.01

5. 病理組織学的所見

雌雄の10%群全例に腎近位尿管上皮の核内に好酸性の封入体が多発した (Fig. 2)。5%群の雄においては、この封入体は1切片に1~2個程度みられるのみとなり、10例中2例に観察された。その他に腎でみられた所見として、雄で腎皮質尿管上皮内に好酸性小体および再生上皮、雌ではカルシウ

ム沈着がみられたが、いずれも対照群と同じ頻度であった。対照群を含めた雌雄全群に、肝臓の小肉芽および心臓の限局性心筋炎がみられ、心筋炎は雄の方がその発生頻度は高かったが、何れも対照群と同頻度の発生であった。肺においては限局性あるいはびまん性間質性肺炎が雌雄各群に数例ずつみられた。

Table 5. Serum chemistry and hematology in female rats treated with cyanoguanidine for 13 weeks

Item	Dose level (%)				
	0	1.25	2.5	5	10
Effective no.	10	10	10	10	10
Serum chemistry					
Albumin(g/dl)	4.32±0.17	4.30±0.16	4.34±0.08	4.21±0.22	4.23±0.13
T. protein(g/dl)	6.28±0.16	6.20±0.23	6.16±0.10	6.05±0.25*	6.07±0.19*
A/G	2.22±0.26	2.27±0.16	2.40±0.16	2.29±0.16	2.31±0.10
T. cholesterol (mg/dl)	82.2±6.92	80.2±3.26	75.0±6.98*	81.3±4.22	71.0±5.81**
BUN(mg/dl)	12.96±0.98	14.97±0.70**	15.77±1.10**	18.75±0.90**	28.82±3.54**
Creatinine(mg/dl)	0.46±0.05	0.48±0.04	0.49±0.03	0.43±0.05	0.45±0.05
Na(mEq/l)	142.3±1.25	142.0±0.66	141.9±1.09	141.5±1.08	141.1±1.26
Cl(mEq/l)	104.7±0.68	104.9±0.57	103.4±1.18**	102.1±1.60**	103.3±0.82**
K(mEq/l)	4.51±1.37	4.22±0.26	4.13±0.21	4.19±0.38	4.16±0.21
Ca(mg/dl)	10.25±0.38	9.99±0.17	10.20±0.33	10.11±0.44	10.05±0.24
P(mg/dl)	5.64±1.14	5.18±0.42	5.31±0.39	5.49±0.41	6.12±0.24
GOT(IU/l)	66.0±7.85	75.4±6.04**	72.0±4.67	75.5±8.20*	80.7±5.81**
GPT(IU/l)	9.7±4.20	9.5±2.07	7.7±2.16	6.9±1.45	7.7±1.49
ALP(IU/l)	128.3±19.2	132.1±17.0	135.6±13.0	146.8±16.5*	154.7±18.0**
γ-GTP(IU/l)	0.6±0.70	0.6±0.70	1.0±0.82	0.9±0.88	1.0±0.82
Cholinesterase(IU/l)	5.4±1.35	6.1±2.28	5.3±1.49	6.5±2.42	7.0±2.58
Hematology					
WBC(x10 ² /μl)	29.7±5.27	32.7±5.23	30.6±4.33	29.0±5.73	31.6±4.40
RBC(x10 ⁴ /μl)	881.2±49.43	915.6±30.24	914.6±20.83	898.8±26.59	874.5±42.90
PLT(x10 ⁴ /μl)	74.31±5.24	82.04±6.55**	82.03±8.14*	82.03±11.27	89.59±3.41**

Values are mean±S.D.

* p<0.05, ** p<0.01

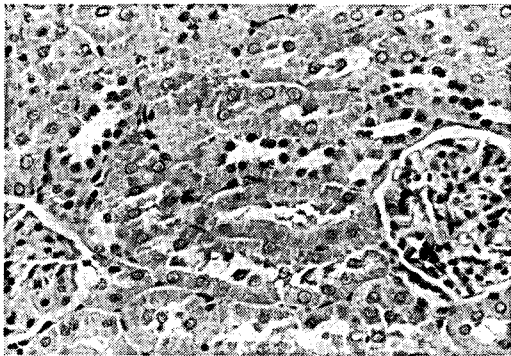


Fig. 2. Intranuclear eosinophilic inclusion bodies in the proximal tubular epithelium of the kidney from a male F344 rat fed diet containing 10% cyanoguanidine for 13 weeks. H & E stain ×100

考 察

Cyanoguanidine 水溶液は中性で安定であるが水に対する溶解度が低いため、今回の試験では、より高用量の検体投与の毒性変化を見るために、投与方法として混餌投与方法を選択した。雌雄の10%群および雌の5%群においては、有意な体重増加抑制がみられたが、飼料摂取量は用量が高いほど逆に増加していた。これは高用量ほど飼料中に占める検体の

容積率が高いため、実際のカロリー摂取量は対照群に比し、明らかに低いことに起因するものと考えられた。また、腎臓近位尿細管上皮に核内封入体が雌雄10%群では認められたことから、この群では何らかの毒性作用が発現しているものと思われ、これも体重増加抑制に関与しているものと推察した。

臓器重量では、雌雄の10%群において種々の臓器の絶対重量が減少し、それらの相対重量は増加した。また、雌の5%群においても一部の臓器に10%群と同様の変動がみられたが、これらの変動は体重増加抑制に伴う二次的な変化と考えられた。

血清生化学的検査では、BUNが雄の5%以上の投与群および雌の1.25%以上の投与群において有意に増加した。BUNの増加は腎障害を反映した変化とみなされている。しかし、BUNの対照群の値は動物のロットによりばらつきが大きく、雌雄の5%以下の投与群における検査値は今までに行った亜慢性毒性試験の対照群の背景データ(佐藤²⁾、下地³⁾、松島⁴⁾、小笠原⁵⁾)の範囲内に入るものであった。一方、雌雄10%群のBUN値は背景データよりも明らかに高い値であり、この変動は本検体投与に起因するものと判断した。また、雄の10%群と雌の5%以上の投与群にみられたALP、GOTないしコリンエステラーゼの増加も核内封入体発現に関連する腎障害に伴うものと推察された。その他、

5%以上の投与群にみられた総蛋白、総コレステロール等の項目の減少は体重増加抑制に伴う変化と解釈した。血液学的検査において高用量に認められたWBCと血小板数の増加は、投与用量に関連する変化であるが、その増加の原因については明確にすることができなかった。

ヒトでは、この物質を扱う労働者に皮膚湿疹が発生する報告がなされている (Senff⁶⁾) が、今回の試験では、ラットに皮膚の異常はみられなかった。Cyanoguanidine およびこの誘導体は医薬品として胃、十二指腸潰瘍の治療薬 (Buschauer⁷⁾, Yamada⁸⁾) あるいは抗高血圧血管拡張剤 (Nielsen⁹⁾) としてヒトへ投薬されている事などを考慮すると、長期における毒性および癌原性試験の実施が強く切望される。

以上の結果から、cyanoguanidine のラットに対する主な標的臓器は腎であると推察され、投与期間の遷延とともに腎病変は重篤化する可能性もあるが、本物質の癌原性試験における最大投与量としては5%が適切と考えられた。

文 献

- 1) Tarras, A., Braun, R., Stenz, E. and Schuster, G.: Mutagenicity assay with *Salmonella typhimurium* revealing biotransformation of antiphytoviral substances by cell-free plant extract. *Zentralbl Mikrobiol*, **144**, 197~202 (1989)
- 2) 佐藤秀隆, 豊田和弘, 古川文夫, 小久保 武, 高橋道人, 林 裕造: F344 ラットにおける塩化第二鉄の癌原性試験実施にあたっての子備試験 (亜慢性毒性) の成果について. 衛試報告, **103**, 21~28 (1985)
- 3) 下地尚史, 松島裕子, 今井田克己, 長谷川良平, 黒川雄二, 林 裕造: F344 ラットにおける potassium pyrophosphate の亜慢性毒性試験. 衛試報告, **106**, 66~72 (1988)
- 4) 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, 黒川雄二, 林 裕造: 乳酸カルシウムの F344 ラットにおける亜慢性毒性試験. 衛試報告, **107**, 78~82 (1989)
- 5) 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: タンニン酸の F344 ラットにおける亜慢性毒性試験. 衛試報告, **108**, 84~89 (1990)
- 6) Senff, H. and Kuhlwein, A.: Allergic contact eczema caused by dicyanodiamide. *Derm. Beruf. Umwelt.*, **36**, 99~101 (1988)
- 7) Buschauer, A., Postius, S., Szelenyi, I. and Schunack, W.: Isohistamine and homologs as components of H2-antagonists, 22. H2-antihistaminics. *Arzneimittelforschung*, **35**, 1025~1029 (1985)
- 8) Yamada, T., Shimamura, H., Tsukamoto, Y., Yamaguchi, A. and Ohki, M.: Pyridazinones. 3. Synthesis, antisecretory, and antiulcer activities of 2-cyanoguanidine derivatives. *J. Med. Chem.*, **26**, 1144~1149 (1983)
- 9) Nielsen, K. J. E., Nielsen, C. B., Mellekjaer, S. and Siggaard, C.: Lack of effect of pinacidil on theophylline pharmacokinetics and metabolism in man. *Pharmacol. toxicol.*, **67**, 156~158 (1990)

WBN/Kob ラット精巣の萎縮性病変における電顕ランタン・トレーサー法 による血液-精巣関門の検索

今沢孝喜・佐藤元信・古川文夫・篠田和俊
吉村博之・豊田和弘・高橋道人

Ultrastructural Study of the Blood-Testis Barrier in Rat by the Lanthanum Method

Takayoshi Imazawa, Motonobu Sato, Fumio Furukawa, Kazutoshi Shinoda,
Hiroyuki Yoshimura, Kazuhiro Toyoda and Michihito Takahashi

Ultrastructural changes of the testes in 35-week-old WBN/Kob rats were investigated using the lanthanum-tracer method. Tissues were cut and fixed with a solution containing 1% lanthanum and 2% glutaraldehyde in a 0.1 M sodium cacodylate buffer at pH 7.8 and with a solution of 2% osmium and 1% lanthanum in a 0.1 M sodium cacodylate buffer. Ultrathin sections of epoxy resin-embedded specimens were stained with uranyl acetate and lead citrate and observed into a JEM-100CX5 JEOL transmission electron microscope. The remnants of each testis were fixed in Bouin's fixative, and observed light-microscopically, where almost all seminiferous tubules in all of the six testes were found to be severely atrophied.

Electron microscopically, lanthanum pigments were limited in the Sertoli cell tight junctions of the seminiferous tubules even in the severely atrophied tubules. In conclusion, it is unlikely that the testicular atrophy in WBN/Kob rats is attributable to dysfunction of the blood-testis barrier.

Key words : WBN/Kob ラット, 精巣萎縮, ランタン・トレーサー法, 血液-精巣関門

(Received May 31, 1991)

はじめに

精巣組織には血液-精巣関門 (Blood-Testis Barrier) が存在し, 薬物・毒物等の精細管内物質透過を厳しく制限すると共に, 自己抗原となりうる精子と抗体産生細胞との接触を遮断し, 精子形成における安定した環境を維持しているとされている¹⁻³⁾. 血液-精巣関門部位は形態学的にペルオキシダーゼ, ランタン, フェリチンなどのトレーサーを用いた電顕的観察において, セルトリ細胞間の tight junction であるとされている^{4,5)}.

我々は 1,3-dinitrobenzene 投与によりセルトリ細胞が障害され, 血液-精巣関門が破綻することを電顕的ランタン・トレーサー法で明らかにし, 報告した⁶⁾. 一方, ラット精巣輸出管の結紮により萎縮した精巣においては, この関門が破綻し, ランタンがセルトリ細胞の tight junction を通過して精母細胞に到達していることも報告されている⁷⁾.

今回, 臍内外分泌障害を示す自然発症糖尿病モデルとして用いられている Wistar 系由来の近交系である WBN/Kob ラット^{8,9)} にみられた自然発生の萎縮精巣について, ランタン・トレーサー法を用いて血液-精巣関門の破綻の有無を観察するとともに, セルトリ細胞内の障害について超微形態学的に検討した。

実験材料と方法

動物は 5 週齢の WBN/Kob 系雄ラットを用いた (日本 SLC 社, 静岡). 動物の飼育は SPF バリヤーシステムの飼育室にて, 室温 24±2°C, 湿度 55±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行った. 動物は透明なポリカーボネート製箱形ケージに収容し, 床敷は三協ラボサービス社 (東京) のソフトチップを用い, 週 2 回交換を行った. 実験終了まで無処置のまま MF 固型飼料 (オリエンタル酵母工業

社、東京)と水道水を自由摂取させた。

35週齢時に5匹の動物をエーテル麻酔下にて放血屠殺後、精巣を摘出し、重量測定した後、以下の組織学的検索に供した。

1) 病理組織学的検索

光顕検索：ブアン液にて固定した精巣のパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色した後、病理組織学的に検索した。

2) ランタン・トレーサー法

正常精巣および萎縮精巣を各々4個ずつ用いて、Neaves⁷⁾の方法に準じて行った。取り出した精巣の一部を細切し、1.0%硝酸ランタン (TAAB社、イギリス)を含むカコジル酸緩衝液 (0.1M, pH 7.8) で調製した2.0%グルタルアルデヒド溶液にて氷水中で5時間固定後、同緩衝液中に一晩浸漬し、同濃度の硝酸ランタンを含む2.0%オスミウム酸溶液で8時間の後固定を行った。エチルアルコールで脱水後、エポキシ包埋し、超薄切片を作成した。この切片に酢酸ウラン-クエン酸鉛の二重染色を施し、透過型電子顕微鏡 (JEOL-100 CXS) にて鏡検した。

結 果

精巣のマクロ所見において、正常の精巣(2.289±0.169g)と比較して明らかに萎縮した精巣(1.042±0.141g)は5匹中4匹に片側あるいは両側性に認められ、その数は6個であった。これら萎縮した精巣は柔軟であり、褶曲した白膜により包まれていた。

光学顕微鏡による病理組織学的検索において、正常な精細管はFig.1にみられる様に、精上皮が数層の細胞から構成され、精子形成が観察された。一方、肉眼的に萎縮した精巣は精細管が高度に萎縮していた。これらの精細管は管径が減少し、内腔に精細胞はほとんど観察されず、セルトリ細胞が認められるのみであった (Fig.2)。

電顕ランタン・トレーサー法による検索では、微細構造の保持は良好であり、加ランタンによっても固定効果にはほとんど影響はみられなかった。正常な精細管 (Fig.3) では、セルトリ細胞内のミトコンドリア、小胞体等の小器官も正常で、脂質顆粒も多数観察され、ランタンは基底側から細胞間隙に沿って精細管中に侵入していたが、隣接するセルトリ細胞の細胞膜の融合により形成されている tight junction においてそれ以上の侵入は阻止され、傍腔

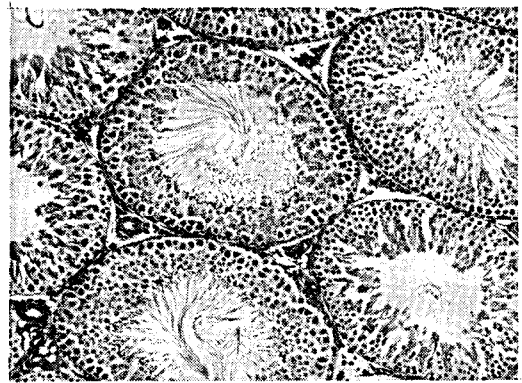


Fig. 1. Light micrograph of normal seminiferous tubules. H&E stain ×33



Fig. 2. Light micrograph of severely atrophic seminiferous tubules. Note degeneration of the germinal epithelium. H & E stain ×33

区画にランタン粒子は認められなかった (Fig.4)。高度に萎縮した精細管 (Fig.5) のセルトリ細胞では、核の高度な infolding 像、拡張した小胞体とゴルジ体、空胞変性、基底膜の肥厚と infolding 像等が観察された。しかし、ランタンの細胞間隙への侵入は正常の精細管と同様にセルトリ細胞の tight junction によって阻止されていた (Fig.6)。

考 察

一般にセルトリ細胞は種々の障害因子に対して極めて耐性であり¹⁾、そのため血液-精巣関門も物理的/化学的障害や、種々の病変に対して影響を受けにくいとされている²⁾。しかし、薬物投与^{6,10,11)}あるいは精巣輸出管の結紮⁷⁾等によるセルトリ細胞の障害も報告されている。今回、セルトリ細胞の機能の一つである血液-精巣関門の維持に着目し、

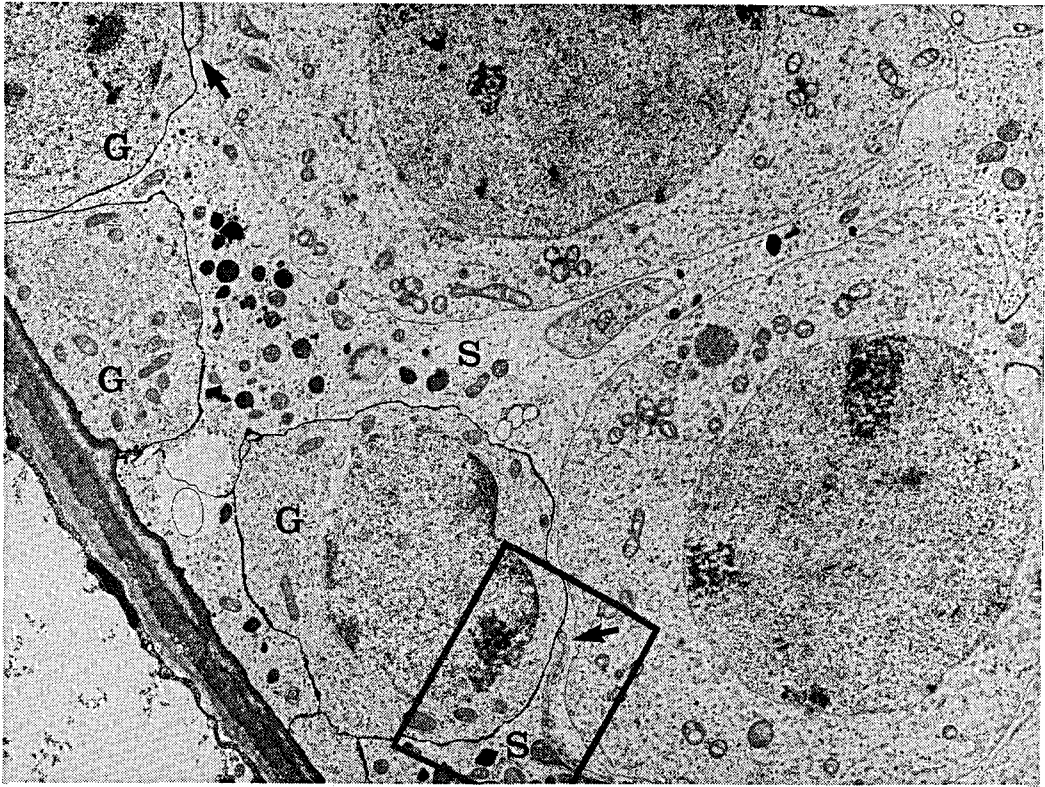


Fig. 3. Electron micrograph of normal seminiferous epithelium. Lanthanum particles have penetrated the intercellular cleft around a spermatogonium (G), but stop abruptly at the tight junctions (arrows) between Sertoli cells (S). $\times 5400$

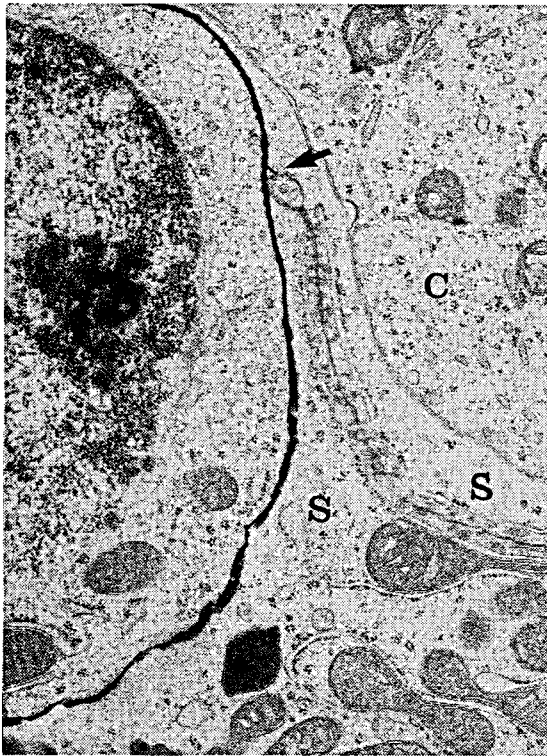


Fig. 4. Higher magnification of the area indicated on Fig. 3. A portion of the blood-testis barrier is formed by tight junctions joining adjacent Sertoli cells (S). Lanthanum particles stop abruptly a short distance into the junction (arrow), which blocks access to extracellular space around the spermatocytes (C). $\times 18000$

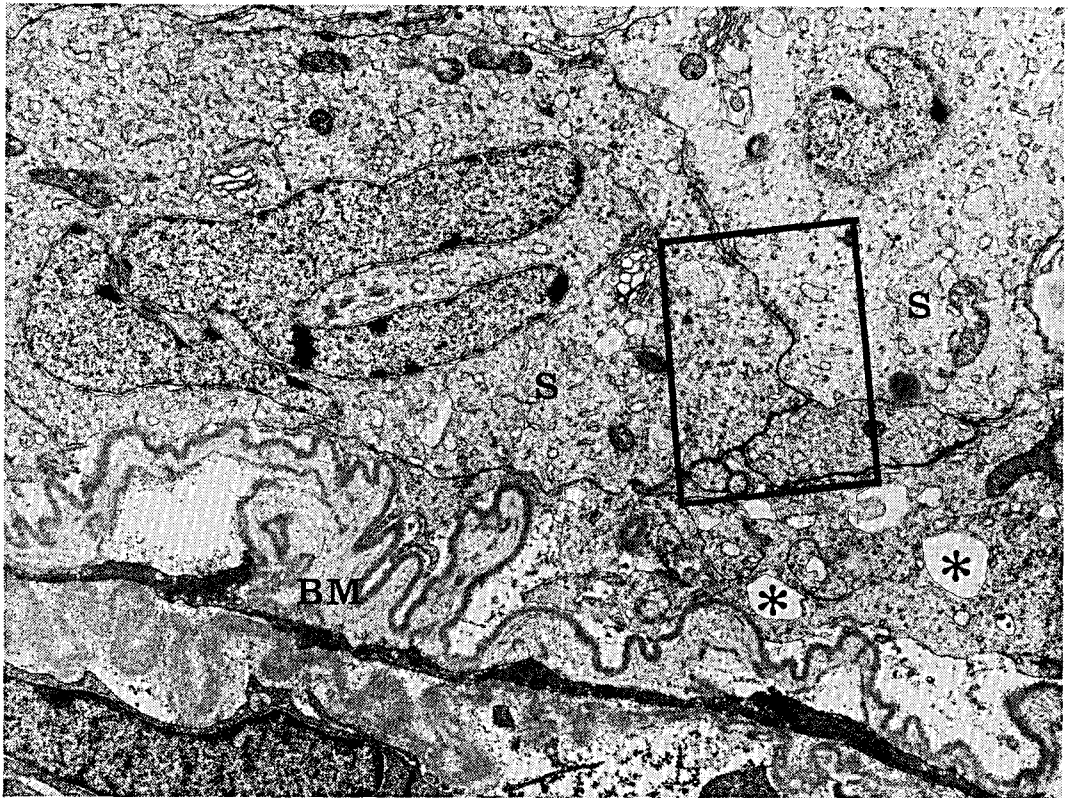


Fig. 5. Electron micrograph of severely atrophic seminiferous epithelium. Note the presence of an infolded Sertoli cells (S) nucleus, convoluted basement membrane (BM), and vacuolization (*) of seminiferous epithelium. Lanthanum particle distribution is limited to the basal compartment of the epithelium. $\times 8000$

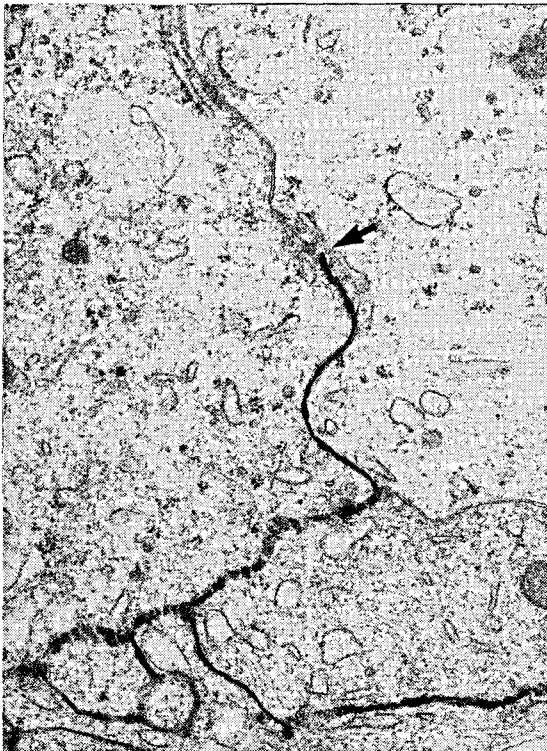


Fig. 6. Higher magnification of the area indicated on Fig. 5. The absence of lanthanum beyond the Sertoli tight junctions (arrow) demonstrates the intactness of these junctions. $\times 24000$

WBN/Kob ラットの萎縮精巣を超微形態学的に検索した。その結果、自然発生萎縮した WBN/Kob ラット精巣におけるランタン粒子の侵入はセルトリ細胞の tight junction により阻止されており、高度萎縮精巣精細管においても血液-精巣関門は破綻していないことが示唆された。WBN/Kob ラットの精巣萎縮の原因は明らかでなく、循環障害、ホルモン異常、精細胞あるいはセルトリ細胞の機能障害等が考えられている¹²⁾。

本研究において高度萎縮精細管のセルトリ細胞には機能障害を示唆する細胞内小器官の変化が認められたが、血液-精巣関門の障害は認められなかったことを考慮すると、これらセルトリ細胞の変化は精細胞消失による二次的な変化であって、精巣萎縮の原因の一つである可能性は否定できるものと考えられた。

結 語

自然発症糖尿病モデルである WBN/Kob ラットの 35 週齢で自然発生した精巣萎縮についてランタン・トレーサー法を用いて血液-精巣関門を超微形態学的に観察した。その結果、高度萎縮精細管が観察され、精細胞の消失、セルトリ細胞質内の変性等がみられた。しかし、セルトリ細胞の tight junction でランタン粒子の侵入が阻止されており、自然発生精巣萎縮では血液-精巣関門に影響しないことが示された。

文 献

- 1) Fawcett, D. W.: Hand book of physiology. Endocrinology V, pp.21, (1975) American Physiological Society, Washington D.C.
- 2) 熊本悦明：精巣の細胞構築。代謝, 16, 425~432 (1979)
- 3) 奥村勝彦：血液-精巣関門。トキシコロジーフォーラム, 7, 599~606 (1984)
- 4) Fawcett, D. W., Leak, L. V. and Heidger, P.

- M. Jr.: Electron microscopic observations on the structural components of the blood-testis barrier. *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 10, 105~122 (1970)
- 5) Dym, M. and Fawcett, D. W.: The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol. Reprod.*, 3, 300~326 (1970)
- 6) 篠田和俊, 岡宮英明, 今沢孝喜, 古川文夫, 豊田和弘, 佐藤秀隆, 高橋道人: BrdU 免疫組織化学およびランタン・トレーサー法による 1,3-dinitrobenzene の精巣毒性の病理学的解析。衛生試報, 107, 63~67 (1989)
- 7) Neaves, W. B.: Permeability of Sertoli cell tight junctions to lanthanum after ligation of ductus deferens and ductuli efferentes. *J. Cell Biol.*, 59, 559~572 (1973)
- 8) Nakama, K., Shichinohe, K., Kobayashi, K., Naito, K., Uchida, O., Yasuhara, K. and Tobe, M.: Spontaneous diabetes-like syndrome in WBN/Kob rats. *Acta Diabetol Lat.*, 22, 335~342 (1985)
- 9) Tsuchitani, M., Saegusa, T., Narama, I., Nishikawa, T. and Gonda, T.: A new diabetic strain of rat (WBN/Kob). *Lab. Anim.*, 19, 200~207 (1985)
- 10) Pogach, L. M., Lee, Y., Gould, S., Giglio, W., Meyenhofer, M. and Huang, H. F. S.: Characterization of cis-platinum-induced Sertoli cell dysfunction in rodents. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 98, 350~361 (1989)
- 11) Weber, J. E., Turner, T. T., Tung, K. S. and Russell, L. D.: Effect of cytochalasin D on the integrity of the Sertoli cell (blood-testis) barrier. *Am. J. Anat.*, 182, 139~147 (1988)
- 12) Sato, M., Furukawa, F., Shinoda, K., Mitsumori, K., Imazawa, T., Imaida, K. and Takahashi, M.: Sequential pathological study on spontaneous testicular degeneration in WBN/Kob rats. *J. Toxicol Pathol.*, submitted

F344 ラットにおける *m*-nitroaniline の 28 日間反復経口投与毒性試験吉田順一・小野寺博志・松島裕子・渋谷 淳
前川昭彦・古田京子・高橋道人Twenty-eight Day Repeated Dose Toxicity Test of *m*-Nitroaniline in F344 RatsJunichi Yoshida, Hiroshi Onodera, Yuko Matsushima, Makoto Shibutani,
Akihiko Maekawa, Kyoko Furuta and Michihito Takahashi

A twenty-eight day repeated oral dose toxicity test of *m*-nitroaniline (*m*-NA) was carried out in male and female F344 rats at dose levels of 0, 15, 50 or 170 mg/kg/day.

Animals of both sexes were divided into 6 groups, each consisting of 30 animals, 4 groups being used for the 28 days dosing study and the remainder for investigation of subsequent recovery.

Inhibition of body weight gain, and induction of cyanosis and methemoglobinemia were observed in the highest dose groups of both sexes, but there were no animal mortalities. Testicular atrophy was evident but there was no effect on the ovaries in the same group. In addition to these findings, hemolytic anemia and increases of liver, spleen and kidney weights were also observed in both sexes in a dose-related fashion. Histologically, the highest dose group showed reduction of spermatogenesis with multinucleated giant cell formation, lipofuscin deposition mainly in the proximal renal tubules, and increases in hemosiderin deposition and extramedullary hematopoiesis in the liver. Dose-related increases in the incidence of hemosiderin deposition in the spleen, erythroid hyperplasia in the bone marrow and swelling of hepatocytes were observed in treated groups. After a 14 day recovery period, these findings were attenuated or had disappeared.

Based on these results obtained under the present experimental conditions, it was concluded that *m*-NA induces hemolytic anemia and exerts testicular toxicity in rats and that the non-observed-effect level of *m*-NA is less than 15 mg/kg/day.

Key words: *m*-nitroaniline, 28 日間反復投与試験, メトヘモグロビン血症, 溶血性貧血, 精巣毒性

(Received May 31, 1991)

緒 言

m-Nitroaniline (*m*-NA) は芳香族ニトロ化合物に属し、アゾ染料等の原料等に広く使用されている。本化合物は 1,3-dinitrobenzene (*m*-DNB) の生体における代謝物であり¹⁾、ヒトにおいてはメトヘモグロビン血症を惹起させることが報告されている²⁾。しかし実験動物を用いた毒性試験報告は、わずかに急性毒性試験と変異原性試験のみであり、経口 LD₅₀ 値は雄ラットで 540 mg/kg, 雄マウスで 310 mg/kg³⁾、S-9 非添加条件で実施した Ames 試験では TA98 株で陽性、TA100 株で陰性⁴⁾、また TA98, TA1538, TA100 および TA1535 で陽性という結果⁵⁾が得られている。

今回、我々は既存化学物質の安全性評価の一環と

して、ラットを用いた *m*-NA の 28 日間反復投与毒性試験を実施したので報告する。

実験材料および方法

1. 検 体

m-NA (CAS No. 99-09-2: C₆H₅O₂N₂) は、Fig. 1 に示した化学構造を有する水に難溶、有機酸に易溶な黄色の針状結晶性粉末である。実験には大和ケミカル㈱の *m*-NA (純度 99.8%) を用いた。検体はオリーブ油に懸濁させ調製した。

2. 動物および飼育環境

予備試験、本試験とも日本チャールス・リバー社より購入した F344 系ラットを用い、1 週間馴化させた後、発育良好な動物を実験に供した。動物飼育は温度 24±1℃、湿度 55±5%、換気回数 18/hr (オ

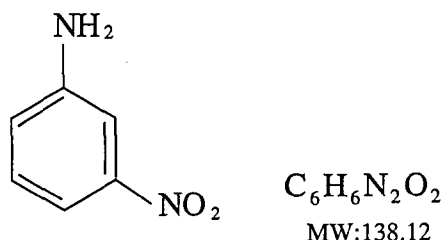


Fig. 1. Chemical structure of *m*-nitroaniline

ールフレッシュ), 12 時間照明 (7:00~19:00) に維持されたバリエーションシステムの動物室にて行い, 動物はソフトチップを床敷としたプラスチックケージ内に 5 匹ずつ収容し, 固型飼料 (CRF-1: 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。

3. 用量設定の根拠

6 週齢の雄動物 25 匹を 1 群 5 匹として 5 群に分け, *m*-NA 0, 100, 150, 200 および 250 mg/kg を 7 日間連続強制経口投与した。その結果, 動物の死亡はなかったものの 100 mg/kg 以上の投与群で脾および肝の重量増加, 150 mg/kg 以上の投与群で精巣萎縮, 200 mg/kg 以上の投与群で体重増加抑制がそれぞれ認められた。高度の貧血と体重増加抑制が 200 mg/kg の 7 日間投与で出現したことから, 本試験での最高用量を 170 mg/kg とし, 以下 50 および 15 mg/kg を選んだ。

4. 実験方法

6 週齢の雌雄各 30 匹計 60 匹を用いた。このうち 40 匹は投与終了屠殺動物として雌雄とも 5 匹からなる 4 群に, また残り 20 匹は投与終了後 14 日間休薬させる回復群 2 群に分けた。各群の動物には 0, 15, 50 および 170 mg/kg の *m*-NA を, ラット用金属製胃ゾンデを用い, 5 ml/kg の容量で 1 日 1 回 28 日間連続経口投与した。投与期間中は連日一般症状観察および体重測定を行い, 摂餌量を週 1 回測定した。また, 対照群および高用量群の回復群では休薬期間中も症状観察, 体重および摂餌量測定を実施した。

投与 4 週目および休薬 2 週目に新鮮尿を採取し, 尿検査用試験紙 (マルティスティック SG: マイルス・三共社) を用い pH, 蛋白質, ウロビリノーゲン, ビリルビン, 潜血, ケトン体, ブドウ糖および比重を検査した。

最終投与日および休薬 14 日目の夕刻から一夜絶

食させ, 翌日エーテルで麻酔したのち腹部大動脈から全採血し動物を屠殺した。採取血液の一部は塗抹標本および血液学的検査に供し, 残りは遠心分離後, 血清を生化学的検査に供した。

血液学的検査項目のうち赤血球数, 白血球数, ヘモグロビン量, ヘマトクリット値, MCV, MCH, MCHC および血小板数は多項目自動血球計数装置 (Sysmex M-2000: 東亜医用電子社) を用いて算出した。白血球分類および赤芽球計数は Wright's 染色を施した血液塗抹標本を作製し, 網状赤血球計数は Brecher's new methyleneblue 染色を施した血液塗抹標本を作製し, それぞれ血液細胞自動分析装置 (Microx HEG-120 A) を用いて実施した。またメトヘモグロビン量はシアンメトヘモグロビン法⁶⁾ に準じ測定した。

血液生化学的検査は GOT, GPT, アルカリフォスファターゼ, γ -GTP, コリンエステラーゼ, 総コレステロール, 総蛋白, アルブミン, A/G, 尿素窒素, クレアチニン, Ca, P, Na, K, Cl の各項目について実施した。

諸臓器・組織の剖検後, 脳, 下垂体, 唾液腺, 甲状腺, 胸腺, 心, 肺, 腎, 副腎, 脾, 肝, 卵巣, 精巣および精巣上体の重量測定を行った。また上記臓器に加え主要臓器を 10% 緩衝中性ホルマリン液に固定した。諸臓器は常法に従って薄切切片を作製し, Hematoxylin-Eosin (HE) 染色を施して病理組織学的検査を行った。なお一部の組織は Berulin blue 染色, Azan 染色および Schmorl 法による染色を施し検索した。

5. 統計処理

投与終了屠殺群の結果は分散比を Bartlett の方法で検定し, 等分散の場合は一元配置の分散分析を行い, 不等分散の場合は Kruskal-Wallis の方法により検定を行った。群間に有意性が認められた場合の多重比較は例数が等しければ Dunnett 型で, また例数が異なれば Scheffe 型でそれぞれ対照群と各投与群間との有意差検定を行った。なお, 回復群は雌雄とも *t*-検定を行った。

結 果

1. 一般症状

各群とも実験全期間を通して死亡例は認められなかった。170 mg/kg 群の雌雄に投与後自発運動の減少および鼻端, 四肢末端部等のチアノーゼが観察されたが, 休薬により消失した。

2. 体重および摂餌量

雄は投与後期に 50 mg/kg 以上の投与群で、雌は投与初期から 170 mg/kg 群で各々対照群と比べ有意な体重増加抑制がみられた (Fig. 2)。これらの傾向は、雌雄とも休薬することにより回復傾向を示し、実験終了時には各群間に差は認められなかった。

摂餌量は雌雄とも 170 mg/kg 群で 1 週目に顕著な低値を示し、雄は投薬終了時まで対照群に比べやや低値で推移したが、雌はその後対照群とほぼ同様

な推移を示した。一方、休薬 2 週目の摂餌量は雌雄とも 170 mg/kg 群で対照群を上回った。

3. 血液学的所見

雌雄とも赤血球数、ヘモグロビン量およびヘマトクリット値の有意な減少が 15 mg/kg 以上の投与群で、MCV, MCH, 赤芽球数 (50 mg/kg 群を除く) および網状赤血球数の有意な増加が 50 mg/kg 以上の投与群でそれぞれ用量相関的にみられた (Table 1, 2)。また MCHC と血小板数 (雄を除く) の有

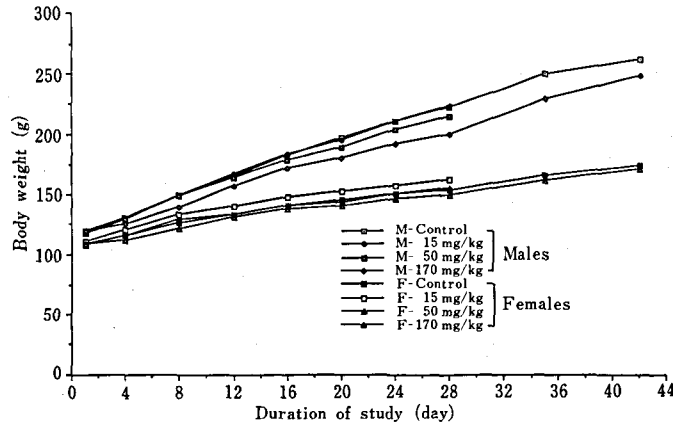


Fig. 2. Mean body weights in F344 rats treated orally with *m*-nitroaniline

Table 1. Hematological findings in male rats after the oral administration of *m*-nitroaniline for 28 days and a recovery period for 14 days

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)	
	0	15	50	170	0	170
No. of animals	5	5	5	5	5	5
RBC ($\times 10^4/\mu\text{l}$)	934 \pm 39.2	868 \pm 12.0**	781 \pm 16.8**	494 \pm 27.0**	996 \pm 71.0	863 \pm 16.4*
HGB (g/dl)	15.6 \pm 0.23	14.5 \pm 0.21**	14.4 \pm 0.31**	11.8 \pm 0.52**	15.9 \pm 1.08	16.4 \pm 0.31
HTC (%)	52.5 \pm 2.5	48.9 \pm 0.8**	48.2 \pm 1.1**	42.7 \pm 1.7**	53.5 \pm 3.7	54.8 \pm 1.1
MCV (fl)	56.1 \pm 0.6	56.4 \pm 0.3	61.7 \pm 0.5	86.7 \pm 1.5*	53.7 \pm 0.3	63.5 \pm 0.7**
MCH (pg)	16.7 \pm 0.5	16.7 \pm 0.1	18.5 \pm 0.4	24.0 \pm 0.5*	16.0 \pm 0.1	19.0 \pm 0.1**
MCHC (g/dl)	29.8 \pm 1.0	29.5 \pm 0.2	29.9 \pm 0.5	27.7 \pm 0.3*	29.7 \pm 0.2	29.9 \pm 0.2
PLT ($\times 10^4/\mu\text{l}$)	98.3 \pm 13.6	97.8 \pm 2.8	98.0 \pm 2.9	78.9 \pm 7.4	85.5 \pm 4.3	84.2 \pm 1.9
WBC ($\times 10^2/\mu\text{l}$)	44.8 \pm 4.4	43.6 \pm 4.8	49.0 \pm 5.1	354 \pm 72.7*	36.4 \pm 7.7	35.6 \pm 4.4
Band (%)	1.0	0.9	2.0	2.2	0.8	1.1
Segment (%)	19.1	17.1	12.0	18.4	23.9	23.4
Eosinophil (%)	1.1	0.4	0.9	0.1*	0.2	0.4
Basophil (%)	0.1	0.2	0.2	0	0.1	0
Lymphocyte (%)	77.3	80.9	83.9	77.8	73.9	74.2
Monocyte (%)	1.3	0.4	0.5	0.6	1.0	0.9
Myelocyte (%)	0	0	0.1	0.9	0	0
Erythroblast (/100WBC)	0.8 \pm 1.5	3.0 \pm 3.6	4.2 \pm 4.7	18.5 \pm 9.8*	2.8 \pm 3.1	1.2 \pm 1.7
Reticulocyte (/100RBC)	3.48 \pm 0.38	3.54 \pm 0.86	5.50 \pm 0.67**	39.7 \pm 1.29**	2.96 \pm 0.48	2.44 \pm 0.72
Methemoglobin (%)	0	0	0	3.26	0	0

Data represent mean values \pm SD.

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

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

Table 2. Hematological findings in female rats after the oral administration of *m*-nitroaniline for 28 days and a recovery period for 14 days

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)	
	0	15	50	170	0	170
No. of animals	5	5	5	5	5	5
RBC ($\times 10^4 / \mu\text{l}$)	930 \pm 47.2	858 \pm 31.3**	769 \pm 18.5**	480 \pm 15.2**	926 \pm 39.6	898 \pm 10.5
HGB (g/dl)	15.8 \pm 0.67	14.7 \pm 0.40**	14.4 \pm 0.31**	11.1 \pm 0.37**	15.5 \pm 0.40	17.3 \pm 0.22**
HCT (%)	51.3 \pm 2.6	48.0 \pm 1.4*	46.4 \pm 0.7**	40.5 \pm 1.0**	50.2 \pm 2.3	56.6 \pm 0.6**
MCV (fl)	55.2 \pm 0.5	56.0 \pm 0.9	60.4 \pm 0.7**	84.4 \pm 1.4**	54.2 \pm 0.4	63.1 \pm 0.7**
MCH (pg)	17.1 \pm 0.3	17.2 \pm 0.2	18.7 \pm 0.3**	23.0 \pm 0.1**	16.7 \pm 0.3	19.3 \pm 0.2**
MCHC (g/dl)	30.9 \pm 0.6	30.7 \pm 0.1	31.0 \pm 0.3	27.3 \pm 0.5**	30.9 \pm 0.7	30.6 \pm 0.2
PLT ($\times 10^4 / \mu\text{l}$)	94.9 \pm 6.7	101 \pm 5.3	97.4 \pm 4.2	81.6 \pm 4.9**	77.2 \pm 20.8	79.4 \pm 5.0
WBC ($\times 10^2 / \mu\text{l}$)	40.2 \pm 11.9	37.8 \pm 4.8	40.8 \pm 8.0	320 \pm 41.2*	35.6 \pm 7.6	48.2 \pm 6.3*
Band (%)	0.5	2.2	1.6	2.4	0.7	0.4
Segment (%)	15.3	16.6	12.0	16.4	18.6	17.5
Eosinophil (%)	0.4	0.4	0.2	0.4	1.3	0.9
Basophil (%)	0.2	0.3	0	0	0	0
Lymphocyte (%)	82.1	79.7	86.0	79.3	78.2	80.4
Monocyte (%)	1.5	0.7	0.2**	0.7	1.2	0.8
Myelocyte (%)	0	0.1	0	0.7	0	0
Erythroblast (/100WBC)	1.3 \pm 1.5	1.5 \pm 3.3	3.9 \pm 3.4	13.5 \pm 4.3**	1.2 \pm 1.3	0.6 \pm 0.8
Reticulocyte (/100RBC)	1.78 \pm 0.37	3.72 \pm 0.29	5.92 \pm 0.40*	41.3 \pm 3.86*	2.18 \pm 0.63	1.66 \pm 0.24
Methemoglobin (%)	0	0	0.04	3.16	0	0

Data represent mean values \pm SD.* : Significantly different from respective control value at $p < 0.05$.** : Significantly different from respective control value at $p < 0.01$.Table 3. Serum biochemical findings in male rats after the oral administration of *m*-nitroaniline for 28 days and a recovery period for 14 days

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)	
	0	15	50	170	0	170
No. of animals	5	5	5	5	5	5
GOT (IU/l)	80.6 \pm 1.7	61.0 \pm 3.5*	62.4 \pm 11.0*	74.6 \pm 8.2	81.6 \pm 2.6	63.4 \pm 5.0**
GPT (IU/l)	36.8 \pm 3.1	32.8 \pm 2.8	33.2 \pm 1.3	35.2 \pm 2.9	38.2 \pm 3.4	37.8 \pm 0.8
Alp (IU/l)	601 \pm 43.9	578 \pm 25.4	521 \pm 51.4	534 \pm 75.7	455 \pm 19.1	465 \pm 24.9
γ -GTP (IU/l)	0	0	0	0.80 \pm 1.30	0.60 \pm 0.55	0.40 \pm 0.55
T-cho (mg/dl)	51.6 \pm 6.3	60.2 \pm 2.7	75.0 \pm 9.0**	79.8 \pm 10.1**	52.2 \pm 3.0	53.0 \pm 1.2
Cho-E (IU/l)	4.40 \pm 0.55	4.60 \pm 0.55	5.00 \pm 1.58	4.80 \pm 0.45	6.00 \pm 2.82	4.00 \pm 1.00
T-pro (g/dl)	5.88 \pm 0.29	6.08 \pm 0.13	6.30 \pm 0.10**	6.52 \pm 0.23**	6.14 \pm 0.11	6.16 \pm 0.11
Alb (g/dl)	4.64 \pm 0.18	4.82 \pm 0.16	5.08 \pm 0.08**	5.38 \pm 0.26**	4.66 \pm 0.11	4.78 \pm 0.13
A/G	3.78 \pm 0.44	3.84 \pm 0.39	4.20 \pm 0.46	4.84 \pm 0.96*	3.16 \pm 0.15	3.48 \pm 0.26*
BUN (mg/dl)	15.1 \pm 1.86	12.6 \pm 1.18	14.5 \pm 1.44	13.0 \pm 2.36	17.7 \pm 1.79	17.2 \pm 1.89
Creatinine (mg/dl)	0.42 \pm 0.04	0.38 \pm 0.04	0.38 \pm 0.04	0.46 \pm 0.05	0.42 \pm 0.04	0.38 \pm 0.04
Ca (mg/dl)	10.4 \pm 0.48	11.0 \pm 0.18*	10.9 \pm 0.12	11.2 \pm 0.11*	10.5 \pm 0.33	10.7 \pm 0.10
P (mg/dl)	6.60 \pm 0.72	6.56 \pm 0.51	6.56 \pm 0.70	7.20 \pm 0.19	8.42 \pm 1.43	7.84 \pm 0.30
Na (mEq/l)	142 \pm 6.4	143 \pm 1.5	144 \pm 1.1	145 \pm 1.15	145 \pm 1.9	144 \pm 0.6
K (mEq/l)	4.74 \pm 0.40	4.74 \pm 0.15	4.60 \pm 0.21	5.00 \pm 0.44	4.48 \pm 0.74	4.30 \pm 0.34
Cl (mEq/l)	103 \pm 3.2	104 \pm 0.5	103 \pm 1.3	101 \pm 1.22	103 \pm 1.0	104 \pm 0.8

Data represent mean values \pm SD.* : Significantly different from respective control value at $p < 0.05$.** : Significantly different from respective control value at $p < 0.01$.

意な減少およびメトヘモグロビン含有率の有意な増加が雌雄 170 mg/kg 群でみられた。白血球数は 170 mg/kg 群の雌雄で対照群より有意に増加した。休業により、これら所見のうち雌雄の MCV,

MCH および雄の赤血球数は依然対照群との間に有意差が認められたが、雌のヘモグロビン量およびマトクリット値は対照群より高値を、赤芽球数および網状赤血球数は対照群より低値を示し、メトヘモ

グロブリンは全群とも消失した。

4. 血液生化学的所見

総タンパク質およびアルブミンの増加が15 mg/kg 群から雌雄とも用量相関的にみられ、雌は投与全群、雄は50 mg/kg 以上の投与群で対照群との間に有意差が認められた (Table 3, 4)。またA/G比も170 mg/kg の雌雄で有意に増加した。総コレステロールは雄では用量に相関して増加した。これらの所見は休薬により回復傾向が認められた。

5. 尿検査所見

雌雄とも50 mg/kg 以上の群で尿の色調が変化し、50 mg/kg 群は濃黄色、170 mg/kg 群は淡褐色を示した。ウロビリノーゲン値は投与群で用量相関的に上昇した。一方、休薬群では雌雄とも各項目に著変は認められなかった。

6. 肉眼的所見

精巣および精巣上体の萎縮が50 mg/kg 群の1例および170 mg/kg 群の全例に、また脾および肝の腫大が170 mg/kg 群の雌雄全例に認められた。一方、回復群においても170 mg/kg 群では雌雄ともこれらの所見が認められたが、その程度はやや軽減していた。

7. 臓器重量

脾(雌の15 mg/kg 群を除く)および肝では雌雄とも用量相関的な重量増加を示した (Table 5, 6)。

腎重量の有意な増加ならびに精巣重量の有意な減少が170 mg/kg 群の動物にみられた。一方、休薬後は脾、肝、腎、精巣、精巣上体等に依然有意差が示されたものの、その程度は軽減し回復傾向が認められた。

8. 病理組織学的所見

以下の臓器に投与に起因する所見がみられた (Table 7)。

脾においては、赤脾髄のヘモジデリン沈着、髓外造血亢進およびうっ血が15 mg/kg 以上の投与群に認められた (Photo. 1)。骨髄では赤血球系の造血亢進が15 mg/kg 以上で認められた。肝では肝細胞腫大が50 mg/kg 以上の投与群に Kupffer 細胞および肝細胞のヘモジデリン沈着ならびに髓外造血亢進が170 mg/kg 群に認められた。腎においては、170 mg/kg 群の雌雄で主に近位尿細管上皮内にリポフスチン沈着がみられた。また50 mg/kg 以上の投与群の雄に Eosin 好性、Azan 陽性の Eosinophilic body の増加が認められた。精巣では170 mg/kg 群の雄全例に精細管の萎縮、多核巨細胞の出現、精母細胞・精子細胞・精子の変性、Lydig 細胞の増生が認められた (Photo. 2)。精巣上体では、50 mg/kg 群の1例および170 mg/kg 群の全例の精巣上体管内に精子は認められず、変性した精上皮細胞や多核巨細胞の集簇のみが認められた。2週間の休薬により

Table 4. Serum biochemical findings in female rats after the oral administration of *m*-nitroaniline for 28 days and a recovery period for 14 days

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)	
	0	15	50	170	0	170
No. of animals	5	5	5	5	5	5
GOT (IU/l)	73.0 ± 13.2	75.0 ± 7.1	57.8 ± 5.8*	58.8 ± 7.5	68.0 ± 7.1	63.8 ± 11.4
GPT (IU/l)	41.2 ± 9.0	35.4 ± 5.4	31.4 ± 2.7*	33.4 ± 2.5	33.8 ± 2.2	34.2 ± 4.0
Alp (IU/l)	360 ± 35.9	340 ± 21.5	337 ± 41.2	373 ± 32.6	269 ± 27.6	346 ± 24.3**
γ-GTP (IU/l)	0	0.20 ± 0.45	0.20 ± 0.45	0.80 ± 1.10	0	0.60 ± 0.55
T-cho (mg/dl)	70.8 ± 8.3	89.4 ± 4.9**	84.0 ± 3.2**	76.2 ± 6.2	84.8 ± 4.6	81.6 ± 7.8
Cho-E (IU/l)	6.00 ± 3.39	4.60 ± 0.55	4.80 ± 2.49	4.80 ± 3.49	3.60 ± 3.51	4.20 ± 0.84
T-pro (g/dl)	5.70 ± 0.21	6.32 ± 0.18**	6.28 ± 0.11**	6.32 ± 0.23**	6.18 ± 0.28	6.10 ± 0.29
Alb (g/dl)	4.50 ± 0.21	5.04 ± 0.23**	5.10 ± 0.07**	5.28 ± 0.16**	4.62 ± 0.22	4.54 ± 0.09
A/G	3.76 ± 0.17	3.96 ± 0.42	4.36 ± 0.47	5.12 ± 0.55**	2.96 ± 0.23	2.96 ± 0.43
BUN (mg/dl)	10.2 ± 0.88	12.8 ± 1.35**	12.4 ± 0.88**	13.5 ± 0.74**	14.7 ± 2.10	17.4 ± 1.11*
Creatinine (mg/dl)	0.38 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.44 ± 0.05	0.40 ± 0.07	0.38 ± 0.04	0.38 ± 0.04
Ca (mg/dl)	9.5 ± 1.61	10.7 ± 0.12	10.8 ± 0.30	10.9 ± 0.27	10.4 ± 0.34	10.4 ± 0.26
P (mg/dl)	7.80 ± 0.19	7.98 ± 0.08	7.70 ± 0.29	7.82 ± 0.29	6.26 ± 0.56	6.72 ± 0.30
Na (mEq/l)	138 ± 10.9	144 ± 1.6	145 ± 0.8	145 ± 0.9	142 ± 3.1	143 ± 0.9
K (mEq/l)	4.52 ± 1.24	4.16 ± 0.29	4.00 ± 0.32	5.18 ± 0.61	3.84 ± 0.59	3.68 ± 0.30
Cl (mEq/l)	100 ± 9.0	104 ± 0.9	106 ± 0.8*	105 ± 1.1	105 ± 2.7	106 ± 1.3

Data represent mean values ± SD.

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

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

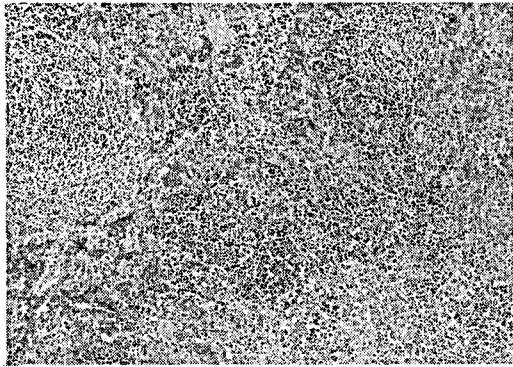


Photo 1. Increased extramedullary hematopoiesis, marked hemosiderin deposition and congestion in the spleen from a rat treated with 170 mg/kg of *m*-nitroaniline (HE stain, $\times 100$)



Photo 2. Depletion of spermatogenesis with multinuclear giant cell formation in seminiferous tubules and interstitial cell hypertrophy of the testis from a rat treated with 170 mg/kg of *m*-nitroaniline. (HE stain, $\times 100$)

これらの所見は回復軽減傾向を示した。

考 察

170 mg/kg 群の動物に投与後観察された鼻端等のチアノーゼは、メトヘモグロビン血症に起因するものであった。*m*-NA の類似化合物である *m*-DNB もラットに対しメトヘモグロビン血症を惹起するが⁷⁾、経口投与での LD_{50} 値は 83 mg/kg と *m*-NA に比べかなり低値であり⁸⁾、*m*-NA は *m*-DNB と同様ラットの赤血球に対し毒性を有するが、その作用はやや弱いことが判明した。メトヘモグ

ロビン血症を惹起する化合物では、多くの場合溶血性貧血が報告されている^{8,9)}。今回の実験においても用量相関的な赤血球数の減少、肝および脾のヘモジリン沈着の増加、ウロビリノーゲンの尿中排泄量増加、骨髓過形成、幼若赤血球数増加等の溶血に伴う変化が観察された。しかしこれらの変化は休業により回復傾向を示す可逆性変化とみなされた。

m-NA 投与による変化が認められた臓器は腎、脾、肝、精巣および精巣上体であった。腎では近位尿細管上皮内にリポフスチン沈着がみられ、これが重量増加の原因と考えられた。脾の重量増加は赤脾髓のうっ血、ヘモジリン沈着および髓外造血がその原因と考えられた。肝では溶血に起因するヘモジリン沈着および髓外造血以外に肝細胞の腫大も認められた。血液生化学検査でアルブミンの増加がみられ、類似化合物の *m*-DNB に酵素誘導作用⁹⁾があることを考慮すれば、肝の蛋白合成能亢進も重量増加の原因と考えられた。精巣では精母細胞より成熟段階の進んだ精上皮の殆どが変性または脱落し、また精巣上体では精子が認められなかったことから、精子形成障害が臓器重量減少の原因と考えられた。*m*-DNB の精巣毒性が報告され⁸⁾て以来、その機序を解析するための研究がなされている。Blackburnらは経口投与後の精巣変化を経時的に観察し¹⁰⁾、Fosterらは精祖細胞とSertoli細胞をco-cultureし¹¹⁾、また篠田らはBrdU免疫組織化学的手法およびランタン・トレーサー法を用いて検索し¹²⁾、最初に影響を受けるのはSertoli細胞であることが示されている。しかし今回用いた用量の*m*-NAではSertoli細胞に変化はなく、*m*-DNBと比べ精巣毒性の弱いことは判明したが、障害の発生機序については解明できなかった。

血液検査で白血球数の異常な高値が170 mg/kg群の雌雄で観察された。今回測定に用いた装置および溶血剤は本来ヒトの臨床検査用に開発されたものである。松本は同機種を用いて同溶血剤の効果を検討した結果、マウスでは多染性赤血球に対し溶血作用のないことを確認し、残存した血球が測定されることによって、白血球数が異常高値となることが明らかとなった¹³⁾。今回の試験では、溶血性貧血があり、特定の白血球が増加した所見もないことから、同様の機種で白血球数が増加したものと考えられた。

以上の結果から*m*-NAのラットに対する主な標的臓器は*m*-DNBと同様、赤血球と精巣であったが、その毒性は*m*-DNBより弱いことが判明した。

Table 5. Absolute and relative organ weights in male rats after the oral administration of recovery period for 14 days

Item	28 days dosing groups (mg/kg)			
	0	15	50	170
No. of animals	5	5	5	5
Body weight	210±5.0	212±2.6	202±10.1	190±8.8**
Brain	1.78±0.08 (0.85)	1.76±0.06 (0.83)	1.77±0.03 (0.88)	1.75±0.04 (0.93)*
Pituitary	0.008±4.47 (0.004)	0.009±1.30 (0.004)	0.007±8.37 (0.004)	0.006±3.85 (0.003)
Saliv. glands.	0.40±0.02 (0.19)	0.42±0.01 (0.20)	0.42±0.05 (0.21)	0.41±0.11 (0.22)
Thyroid	0.013±8.37 (0.006)	0.016±2.19* (0.008)*	0.013±1.22 (0.006)	0.016±2.17* (0.009)**
Thymus	0.30±0.03 (0.14)	0.33±0.05 (0.15)	0.28±0.03 (0.14)	0.27±0.04 (0.14)
Lung (R)	0.55±0.04 (0.26)	0.60±0.04 (0.28)	0.55±0.05 (0.27)	0.56±0.05 (0.29)
(L)	0.28±0.01 (0.13)	0.29±0.02 (0.14)	0.28±0.02 (0.14)	0.28±0.02 (0.15)
Heart	0.74±0.05 (0.35)	0.76±0.02 (0.36)	0.73±0.04 (0.36)	0.73±0.07 (0.38)*
Spleen	0.48±0.06 (0.23)	0.56±0.03 (0.26)**	0.67±0.03** (0.33)**	1.77±0.10** (0.94)**
Liver	6.17±0.16 (2.94)	6.74±0.25** (3.18)**	7.28±0.24** (3.60)**	8.14±0.27** (4.3)**
Adrenal (R)	0.017±4.15 (0.008)	0.021±0.003 (0.010)	0.020±3.91 (0.010)	0.017±1.64 (0.009)
(L)	0.019±2.28 (0.009)	0.019±3.78 (0.009)	0.020±1.34 (0.010)	0.020±1.14 (0.010)
Kidney (R)	0.71±0.04 (0.34)	0.80±0.09 (0.38)	0.73±0.08 (0.36)	0.75±0.04 (0.39)*
(L)	0.75±0.03 (0.36)	0.77±0.03 (0.36)	0.76±0.04 (0.37)	0.76±0.06 (0.40)**
Testis (R)	1.33±0.06 (0.64)	1.39±0.05 (0.66)	1.21±0.17 (0.60)	0.61±0.09** (0.32)**
(L)	1.33±0.05 (0.63)	1.40±0.02 (0.66)	1.28±0.21 (0.63)	0.60±0.09 (0.32)
Epididymis	0.53±0.03 (0.25)	0.53±0.09 (0.25)	0.54±0.17 (0.27)	0.38±0.05 (0.20)

Data represent mean values±SD. 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 6. Absolute and relative organ weights in female rats after the oral administration of recovery period for 14 days

Item	28 days dosing groups (mg/kg)			
	0	15	50	170
No. of animals	5	5	5	5
Body weight	148±4.8	154±2.6	146±4.4	146±6.3
Brain	1.69±0.05 (1.14)	1.71±0.03 (1.11)	1.70±0.04 (1.16)	1.67±0.05 (1.14)
Pituitary	0.010±1.14 (0.007)	0.011±1.22 (0.007)	0.011±0.002 (0.008)	0.010±1.304 (0.007)
Saliv. glands.	0.30±0.03 (0.20)	0.32±0.02 (0.21)	0.32±0.03 (0.22)	0.33±0.04 (0.22)
Thyroid	0.013±1.30 (0.009)	0.014±1.64 (0.009)	0.014±2.00 (0.010)	0.015±2.17 (0.010)
Thymus	0.27±0.04 (0.18)	0.29±0.05 (0.19)	0.27±0.05 (0.19)	0.24±0.02 (0.17)
Lung (R)	0.47±0.05 (0.32)	0.45±0.03 (0.29)	0.46±0.07 (0.31)	0.45±0.03 (0.31)
(L)	0.24±0.02 (0.16)	0.23±6.84 (0.15)	0.25±0.03 (0.17)	0.25±9.31 (0.17)
Heart	0.55±0.07 (0.37)	0.60±0.05 (0.39)	0.57±0.01 (0.39)	0.54±0.03 (0.37)
Spleen	0.36±0.02 (0.25)	0.42±0.02 (0.27)	0.54±0.03* (0.37)*	1.63±0.12* (1.12)*
Liver	3.94±0.33 (2.66)	4.61±0.14** (3.00)	5.27±0.18** (3.60)**	6.77±0.20** (4.63)**
Adrenal (R)	0.022±5.48 (0.015)	0.022±3.78 (0.015)	0.019±0.002 (0.013)	0.023±3.70 (0.016)
(L)	0.024±3.58 (0.016)	0.025±4.66 (0.016)	0.021±4.62 (0.015)	0.024±1.52 (0.017)
Kidney (R)	0.53±0.04 (0.35)	0.55±0.03 (0.36)	0.54±0.03 (0.37)	0.60±0.02** (0.41)**
(L)	0.53±0.04 (0.36)	0.57±0.04 (0.37)	0.54±0.01 (0.37)	0.60±0.04* (0.41)*
Ovary (R)	0.032±4.66 (0.021)	0.031±0.003 (0.020)	0.034±4.44 (0.023)	0.033±8.73 (0.023)
(L)	0.029±3.36 (0.019)	0.036±3.78* (0.023)	0.032±3.21 (0.022)	0.027±4.18 (0.018)

Data represent mean values±SD. 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.

m-nitroaniline for 28 days and a

14 days recovery groups (mg/kg)	
0	170
5	5
251±13.9	235±7.3**
1.81±0.05 (0.72)	1.76±0.11 (0.75)
0.010±1.52 (0.004)	0.009±8.37 (0.004)
0.45±0.06 (0.18)	0.42±0.02 (0.18)
0.018±0.001 (0.007)	0.017±1.67 (0.007)
0.31±0.05 (0.13)	0.32±0.05 (0.14)
0.65±0.04 (0.26)	0.59±0.05 (0.25)
0.32±0.03 (0.13)	0.30±0.02 (0.13)
0.83±0.07 (0.33)	0.85±0.05 (0.36)**
0.52±0.03 (0.21)	0.82±0.06** (0.35)**
6.96±0.64 (2.77)	6.72±0.25 (2.85)
0.021±0.005 (0.008)	0.022±4.71 (0.009)
0.023±3.59 (0.009)	0.024±1.64 (0.010)
0.83±0.05 (0.33)	0.82±0.03 (0.35)
0.82±0.05 (0.33)	0.85±0.04 (0.36)**
1.43±0.05 (0.57)	0.83±0.10** (0.35)**
1.45±0.05 (0.58)	0.80±0.11** (0.34)**
0.69±0.08 (0.28)	0.47±0.03** (0.20)**

m-nitroaniline for 28 days and a

14 days recovery groups (mg/kg)	
0	170
5	5
164±5.5	164±5.9
1.71±0.04 (1.04)	1.66±0.06 (1.02)
0.011±2.000 (0.007)	0.010±0.001 (0.006)
0.31±0.03 (0.19)	0.33±0.03 (0.20)
0.013±1.79 (0.008)	0.013±1.48 (0.008)
0.27±0.03 (0.16)	0.31±0.10 (0.19)
0.46±0.03 (0.28)	0.48±0.04 (0.29)
0.24±0.02 (0.15)	0.25±0.02 (0.15)
0.59±0.04 (0.36)	0.59±0.03 (0.36)
0.39±0.03 (0.24)	0.71±0.08** (0.44)**
4.05±0.29 (2.47)	4.77±0.17** (2.92)**
0.021±4.03 (0.013)	0.024±0.004 (0.015)
0.023±3.65 (0.014)	0.025±4.39 (0.016)
0.53±0.04 (0.32)	0.57±0.02 (0.35)*
0.55±0.04 (0.33)	0.59±0.03 (0.36)*
0.028±0.003 (0.017)	0.034±3.81* (0.021)**
0.032±3.36 (0.020)	0.030±3.77 (0.018)

また本実験条件下における *m*-NA の無影響量は 15 mg/kg 未満と考えられた。

文 献

- Mason R. P. and Josephy. P. D.: Free radical mechanism of nitroreductase. In: Rickert DE (ed) Toxicity of nitroaromatic compounds. Hemisphere, Washington, 121~140 (1984)
- Santodonato, J., Bosch, S., Meylan, W., Becker, J. and Neal, M.: Monograph on human exposure to chemicals in the workplace: Nitroanilines. Center for chemical hazard assessment, Syracuse Research Corporation, Syracuse, New York, Report No. SRC-TR-84-1046, p. 26, 33 (1985)
- Vernot, E. H., MacEwen, J. D., Haun, C. C. and Kinkead, E. R.: Acute toxicity and skin corrosion data for some organic and inorganic compounds and aqueous solutions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **42**, 417~423 (1977)
- Chiu, C. W., Lee, L. H., Wang, C. Y. and Bryan, G. T.: Mutagenicity of some commercially available nitro compounds for *Salmonella typhimurium*. *Mutation Res.*, **58**, 11~22 (1978)
- Shimizu, M., and Yano, E.: Mutagenicity of mono-nitrobenzene derivatives in the Ames test and rec assay. *Mutation Res.*, **170**, 11~22 (1986)
- 宮地隆興, 藤沢桂子: 赤血球メトヘモグロビン測定法, 血液学研究検査法, 青木延雄, 柴田昭編, 210~211, 1980, 中外医学社.
- Facchini, V. and Griffiths, L. A.: The involvement of the gastro-intestinal microflora in nitro-compound-induced methaemoglobinaemia in rats and its relationship to nitrogroup reduction. *Biochem. Pharmacol.*, **30**, 931~935 (1981)
- Cody, T. E., Witherup, S., Hastings, L., Stemmer, K. and Christian, R. T.: 1,3-dinitrobenzene: Toxic effects in vivo and in vitro. *J. Toxicol. Environ. Health*, **7**, 829~847 (1981)
- Abdo, K. M. and Jokinen, M. P.: Subchronic (13-week) toxicity studies of N, N-dimethylaniline administered to Fischer 344 rats and B6C3F₁ mice. *J. Toxicol. Environ. Health*, **29**, 77~88 (1990)
- Blackburn, D. M., Gray, A. J., Lloyd, S. C., Sheard, C. M. and Foster. P. M. D.: A comparison of the effects of the three isomers of dinitrobenzene on the testis in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **92**, 54~64 (1988)

Table 7. Summary of histopathological findings in rats treated orally with *m*-nitroaniline

Findings	28-days dosing test (mg/kg)				Recovery test (mg/kg)	
	0	15	50	170	0	170
Spleen						
hemosiderin deposition	-	±	± ~ +	++	- ~ ±	++
extramedullary						
hematopoiesis	-	±	± ~ +	++	-	- ~ ±
congestion	-	±	+	++	-	- ~ +
Bone marrow						
erythroid hyperplasia	-	- ~ ±	+	++	-	+ ~ ++
Liver						
hepatocyte swelling	-	-	± ~ +	+ ~ ++	-	-
hemosiderin deposition	-	-	-	± ~ +	-	± ~ +
extramedullary						
hematopoiesis	-	-	-	± ~ +	-	-
Kidney						
lipofuscin deposition	-	-	- ~ +	+ ~ ++	-	+
Testes						
depletion of						
spermatogenesis	-	-	- ~ ±	+ ~ ++	-	±
polynuclear giant						
cell formation	-	-	-	++	-	+
hyperplasia of						
interstitial cell	-	-	-	+	-	±
Epydidymis						
Absence of spermatozoa	-	-	- ~ +	++	-	+

±: Slight +: moderate ++: severe

- 11) Foster, P. M. D., Lloyd, S. C. and Prout, M. S.: Toxicity and metabolism of 1,3-dinitrobenzene in rat testicular cell cultures., *Toxic. in Vitro.* 1, 31~37 (1987)
- 12) 篠田和俊, 岡宮英明, 今沢孝喜, 古川文夫, 豊田和弘, 佐藤秀隆, 高橋道人: BrdU 免疫組織化

- 学およびランタン・トレーサー法による 1,3-dinitrobenzene の精巣毒性の病理学的解析, 衛生試験報, 107, 63~67 (1989)
- 13) 松本清司: 毒性試験技術の最近の進歩, w1-2. 一般毒性試験機器について, *J. Toxicol. Sci.*, 14 Supplement III, 67~73 (1989)

Stability of Vitamin B₁ in a Commercial Multivitamin Syrup Preparation

Edwin J. Villeza*, Yukio Aso, Sumie Yoshioka and Yasushi Takeda

Accelerated stability studies of a commercial vitamin B₁ syrup preparation were carried out at 50, 60, 70 and 80°C. The decomposition of vitamin B₁ in the preparation followed pseudo-first order reaction kinetics. Apparent decomposition rate constants conformed to the Arrhenius equation. Apparent activation energy and shelf-life at 25°C were estimated to be 24.2 kcal/mol and 3.3 years, respectively.

Key words : Stability; Vitamin B₁; Shelf-life; Syrup preparation

(Received May 31, 1991)

Introduction

It is well known that the chemical stability of drugs in preparations is affected by excipients present in the preparation. This is exemplified by the accelerated degradation of cephalexin in dry syrup preparations in the presence of citrate, which is added in order to adjust the pH¹⁾.

Various kind of multivitamin syrup preparations containing vitamin B₁ are on the market. It has been reported that vitamin B₁ is hydrolyzed via several pathways; (a) oxythiamine is formed at pH below 1; (b) a pyrimidine and a thiazole at acidic and neutral pH; (c) pyrimidine diamine at alkaline pH. The hydrolysis rate depends on the pH of the solution; Vitamin B₁ is maximally stable near pH 2 and unstable at alkaline pH. The hydrolysis rate is also affected by buffer components such as acetate, citrate and phosphate²⁾. Vitamin B₁ is also susceptible to oxidation and forms thiochrome in the presence of oxygen²⁾. It has been also reported that vitamin B₁ liquid preparations become less stable when mixed with riboflavin and/or nicotinamide³⁾.

Vitamin B₁ decomposition rate is affected by various factors as mentioned above. In this study, accelerated stability test of vitamin B₁ was carried out for a commercial

multivitamin syrup preparation, which contained riboflavin, nicotinamide and several active components. The effect of the components on the stability of vitamin B₁ was examined and the shelf-life of the preparation was estimated.

Experimental

Materials A vitamin B₁ syrup preparation was purchased. Active ingredients in the preparation are vitamin B₁ nitrate (5 mg), taurine (1000 mg), inositol (50 mg), nicotinamide (20 mg), riboflavin sodium phosphate (5 mg), vitamin B₆ (5 mg) and caffeine (50 mg) in 100 ml of syrup. The syrup was a yellow clear solution and the pH was 2.5. Content of vitamin B₁ nitrate was found to be 5.15 mg in 100 ml of the preparation. Other chemicals used were of reagent grade.

Accelerated test The syrup preparation in original bottles was stored at 50, 60, 70 or 80°C in a thermostatic water or oil bath. The syrup sample was taken out at appropriate intervals and vitamin B₁ was assayed by HPLC.

Assay of Vitamin B₁ in the syrup Five ml of the syrup sample was transferred to a 10 ml-volumetric flask. Two ml of internal standard solution (0.1 mg/ml ethyl vanillin) was added to the solution and diluted to 10 ml with 50 mM sodium hexane sulfonate (pH 3.3). Twenty μ l of the solution was injected to a chromatograph (Model L-6000, Hitachi) equipped with sample injector (AS-8000,

* Bureau of Food & Drugs, Department of Health, Philippines

Tosoh) and a column (Inertsil ODS-2,150×4.6 mm, Gasukuro Kogyo) maintained at 35°C in column oven (Model 655A-52, Hitachi). Mobile phase was a mixture of 50 mM sodium hexane sulfonate aqueous solution (pH 3.3 adjusted with phosphoric acid) and acetonitrile (85 : 15). A flow rate of 1 ml/min was utilized. Column eluate was monitored at 280 nm.

Results and Discussion

Although the syrup preparation contained many components, vitamin B₁ could be determined by HPLC. No interference due to other components or decomposition products was observed.

Figure 1 shows plots of the percent remaining of vitamin B₁ as a function of storage time at various temperatures. The decomposition rate increased with storage temperature. Decomposition time profiles could be analyzed by the pseudo-first order reaction model at all the temperatures studied. Apparent decomposition rate constants were estimated from the time courses using a nonlinear regression analysis program (MULTI⁴⁾). Figure 2 shows the Arrhenius plot for the apparent decomposition rate constants of vitamin B₁ in the syrup preparation. For some multi-component systems, it is difficult to estimate the shelf-life at room temperature by extrapolation from accelerated stability data, because

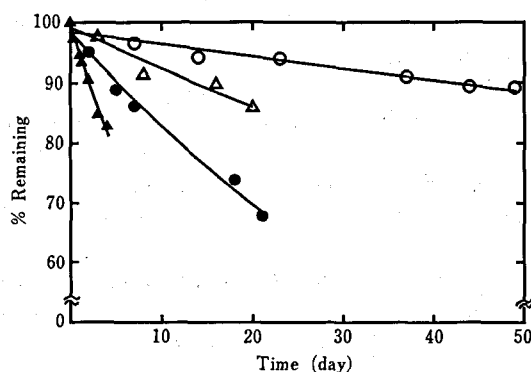


Fig. 1. Time courses for vitamin B₁ decomposition in a commercial syrup preparation
○, 50°C; △, 60°C; ●, 70°C; ▲, 80°C

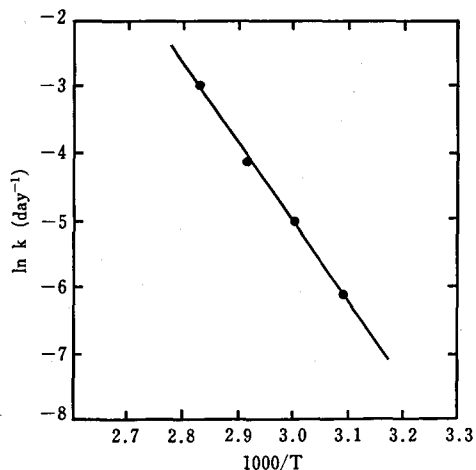


Fig. 2. Arrhenius plot for vitamin B₁ decomposition rate constants

degradation rates do not conform to the Arrhenius equation. The syrup preparation studied, however, provided linear plots that conformed to the Arrhenius equation. From the slope of the plots, activation energy was estimated to be 24.2 kcal/mol. This is reasonable for ordinary chemical reaction but is less than the values of 27.4 kcal/mol at pH 3.0 and 29 kcal/mol at pH 1.7 previously reported for vitamin B₁^{2,5)}. The smaller activation energy may be ascribed to the effect of the components in the preparation. The shelf-life, defined as the time to reach 90% of label claim, at 25°C was estimated to be 3.3 years, which is less than 4 years at room temperature indicated by label claim expiration date on the label.

References

- 1) N. Katori, S. Yoshioka and M. Uchiyama: *Bulletin of National Institute of Hygienic Sciences*, **104**, 30 (1986)
- 2) J. J. Windheuser and T. Higuchi: *J. Pharm. Sci.*, **51**, 354 (1962)
- 3) G. B. Stone: *J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed.*, **39**, 159 (1950)
- 4) K. Yamaoka, Y. Tanigawara, T. Nakagawa and T. Uno: *J. Pharmacobio-Dyn.*, **4**, 879 (1981)
- 5) R. Huttenrauch: *Pharmazie*, **24**, 111 (1969)

陰イオン界面活性剤を対象とした環境保健クライテリアの作成
 -文献情報の更新と執筆体制の再編成

森本和滋・加納直子・神沼二眞

Up-dating the References for Environmental Health Criteria for Anionic
 Surfactants and Preparation of Its First Draft

Kazushige Morimoto, Naoko Kanoh and Tsuguchika Kaminuma

The preparation of a EHC monograph for anionic surfactants was started in 1980. The chemicals consist of linear alkylbenzene sulfonate(LAS), alkyl sulfate(AS) and alkyl α -olefin sulfonate(AOS). Although a preliminary draft appeared in 1985, further works were stopped for 5 years. For the development of the preliminary draft, up-dating the references was performed by using on-line JICST data base from 1981 to 1990. The number of literature on LAS was 486. On the other hand the number on AS was about 1/5 that of LAS. In the case of AOS, only 20 literatures were retrieved. The literatures on LAS were many in the research field of environmental science and very few in the toxicology field.

Key words : EHC monograph, Linear alkylbenzene sulfonate(LAS), on-line JICST data base.

(Received May 31, 1991)

1. はじめに

1980年に国際化学物質安全性計画(IPCS)が発足すると同時に、我が国でも国立衛生試験所が参加機関(National Participating Institutions, PI's)としてこの計画に協力することとなった。IPCSではヒトの健康や環境への危険度を評価しその結果を出版物とする事業を最も優先させてきた。当初は環境保健クライテリア(Environmental Health Criteria, EHC)が唯一の出版物であったが、引き続いて安全衛生ガイド(Health and Safety Guide), さらに1990年には国際化学物質安全性カード(International Chemical Safety Cards)が発刊されるようになった。

化学物質情報部を中心とする当所のワーキンググループが最初に取り組んだのは陰イオン界面活性剤(Anionic Surfactants)に関するモノグラフ(EHC)の作成であった。具体的な品目としてはLAS(linear alkylbenzene sulfonate), AS(alkyl sulfate), AOS(alkyl α -olefin sulfonate)が選ばれた(Fig. 1)。この仕事は'80年9月より始められ、1985年には国内の多くの専門家の協力を得てプレリミナリド

ラフトが一応完成した。しかしそれ以後EHCの執筆規定が改訂され、環境部門の執筆範囲が拡大したり、有力な執筆者が物故されるなど諸々の障害が発生し、作業の継続が困難となり、以後5年ほど停止状態にあった。

1989年、報告者の一人(森本)がこのドラフト作成作業を引き継ぐこととなった。作業再開にあたりまず最初に行ったのは、プレリミナリドドラフトが作成された1980年以後の文献情報の再調査であった。本報告はこの再調査(担当, 加納)の結果とド

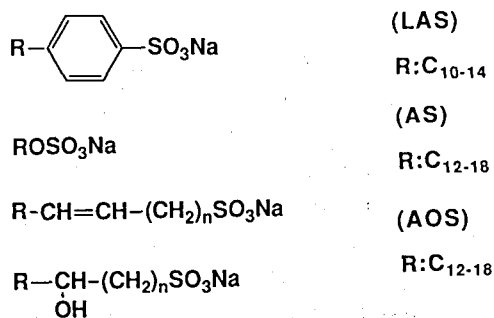


Fig. 1. Chemical structure of LAS and related compounds

ラフト完成に向けての方策について報告する。

2. 文献調査

文献の再調査としては、界面活性剤に関連する内容を収載した各種情報媒体を探索し、該当する文献の有無を調べた。

(1) 予備調査

a. 日本科学技術文献速報 (JICST) の環境公害編 (印刷体)。

本速報は主要な国内外の雑誌を収録し、年間索引によって個々の文献内容を概観できる。今回は、洗剤、LAS、アルキル硫酸ナトリウムの見出し語に注目し1982年～1989年の文献を調べた。

その結果哺乳動物での毒性に関する文献は少なく、

- 1) 魚類、水生生物への影響
- 2) 環境での濃度—河川水、海水、底質、土壌
- 3) 機器分析

などの分野の研究報告が多いことがわかった。

b. 毒性データ集 (RTECS, Registry of Toxic Effects of Chemical Substances)。

RTECS コンパクトディスク版 CCINFO-90-1 を用いて1980年代の毒性文献の追加データを調べた。

その結果

- | | |
|---------------------------------|-----|
| 1) LAS | 14件 |
| Sodium Dodecylbenzene Sulfonate | 7件 |
| 2) AS (化合物毎に出てきている) | |
| Sodium Decyl Sulfate | 4件 |
| Sodium Dodecyl Sulfate | 29件 |
| Sodium Hexadecyl sulfate | 2件 |
| Sodium Octadecyl Sulfate | 2件 |
| 3) AOS | 7件 |

とデータ件数も少なく、1980年代の追加もごくわずかであった。

c. 書誌情報資料

すでに印刷体となっている資料¹⁻⁴⁾およびライオン生物科学研究所提供文献リストにより、生物影響のうち、安全性、毒性に関する文献、発生過程に対する影響、標的臓器、器官系に対する影響、発癌性、変異原性に関する文献、ヒト、サルに対する影響、の項目を通覧し、1980年代前半の文献の追加状況を調べた。その結果厚生省の編纂した「洗剤の毒性とその評価」²⁾からは、LASおよびASについてはほとんど1980年以前の文献が中心であり、AOSについて代謝に関する文献⁵⁾1件だけが見出された。

合成洗剤研究会による「合成洗剤に関する文献・

資料総覧」⁴⁾は、和文1928編、欧文845編をリストした文献資料集であるが、注意を要すべき追加毒性文献はほとんど見いだされなかった。また、「界面活性剤の安全性および生分解性に関するデータシート集」³⁾からも毒性に関しては注意を要すべき文献はほとんど無かった。

(2) オンラインデータベースによる文献検索

JICST ファイルを用い、1981年1月～1990年2月迄の範囲で、LAS, AS, AOSの総文献数を調べた。LASについては更に毒性と環境について細かく調べた。また環境については、外国と日本に分けて比較した。

その結果、Table 1に示したように、1981年～1989年を対象期間とする文献検索では、LASが486件と最も多く、ヒトへの影響やヒフに関してはノイズを含めても17件と少なく、哺乳動物への影響もノイズを含めて28件であった。これらについてオフラインプリントを入手して解析すると、資料として価値のあるものはそれぞれ7件、10件以下と減少した。一方環境生物に対する影響、動態、濃度、分布等環境に関する文献は261件と圧倒的に多かった。このうち魚と水生生物を除く環境の文献を日本と外国に分けて比較すると、日本の文献137件に対して外国の92件という結果で、全体の約6割が日本の研究者による報告であった (Table 2)。また毒性試験についてはその対象が魚類・水生生物であり、ヒトへの影響やヒフに対する報告で原著論文は少なかった (Table 1)。代表的な原著論文は参考文献5.～22.として列記しておく。

またASについての文献は110件と多いが、環境関係の文献は10件以内と少なかった。これに対してAOSは関連の文献が20件とわずかであり内容から関連ありとみなされた文献もわずかであり、すでにLASで検討済みの文献であった。

3. 結果と考察

1981～1990年において、LASの毒性を報告した文献は少ない。したがってこの部分に関するプレリミナリドラフトの更新は比較的容易であることがわかった。すなわち急性・亜急性・慢性毒性の文献は1件¹¹⁾、催奇形性は3件¹²⁻¹⁴⁾、変異・遺伝毒性は3件¹⁵⁻¹⁷⁾、その他の毒性は2件^{7,18)}、生化学や代謝が6件^{6,8,9,10,19,20)}であった。

一方ドラフト内容のうち環境に関連する部分は3章 ヒトならびに環境の曝露源

Table 1. Number of literatures of LAS and related compounds retrieved from JICST file^{a)}

Keywords for retrieval	Chemical name		
	LAS	AS	AOS
LAS	486		
AS or AOS and detergent		110	20
Effects on humans	6	3	
Skin	15	6	
Effects on mammals	28	13	
Effects on fish and aquatic invertebrates	32	2	
Surface water and sea water	47	2	
Water pollution	100	7	
Soil, soil pollution	32	1	
Sediment	50	2	
Instrumental analysis	18		

a) Coverage of file(from January 1981 to February 1990).

Table 2. Comparison of number of literatures of LAS between Japan and foreign countries

Key word	Japan	Foreign countries
LAS	220	266
Surface water and sea water	38	9
Water pollution	56	44
Soil, soil pollution	12	20
Sediments	31	19

4章 環境中の移動, 分布, 変換

5章 環境とヒトへの曝露濃度

7章 環境生物への影響

と分かれているが, この10年間に新たに多数の文献が報告されている。そこでわれわれは少なくともLASについては検討された220件にのぼる文献を検討し, 必要なものは選択, 追加すべきであると判断した。また日本の文献が6割を占めているが, 北海道から九州迄各地の公害研究所や衛生研究所での研究報告が多く, 我が国における洗剤の安全性に関する関心の高さがうかがわれる。しかし, Huber^{21,22)}は, 1988年, 西独のアーヘンで開催されたLASの現状に関する国際会議で, LASは環境的にコントロールできる物質であり, とくに代替品を探索する必要は無いものと結論しており, 日本と外国

との間で安全性に対する考え方の違いがみられる。

一方ASは環境に関する報告が少なく, またAOSについては総報告数が非常に少ないことが分かった。

4. ドラフト完成に向けての方策

以上述べてきた文献調査の結果を踏まえ第1次ドラフトの完成を目指してまず環境部門の執筆者を決めることとした。

そこでプレリミナリドラフトの執筆以来長きにわたり協力を頂いているライオン生物科学研究所大場所長と武井主任研究員を訪問し我々の検索の結果得られた方策を聞いていただき改めて協力をお願いしたところ, 種々の助言が得られ2, 3章の執筆を担当していただく件も了承された。この時LASの環

境問題に関する文献をすでに蓄積しており、しかも EHC 執筆経験も有る専門家ということで米国と西ドイツの研究者が環境部門の執筆分担の候補者としてあげられた。しかし大場所長を通じて打診していただいたが、何れも種々の事情で執筆依頼は不成立に終わった。

更に 1990 年 6 月 22 日 IPCS 本部を訪問し担当者である Smith 博士や Gilbert 博士ともドラフト完成に向けての方策について話し合った。Gilbert 博士の Toxline による 1981~1987 年までの検索結果も毒性に関する文献は 26 件と我々の検索結果と数の上では同様な傾向を示し、毒性に関する章は日本で追加する方向で良いが、環境については執筆者の選択がキポイントとのことで一致した。

7 月に入ってから Smith 博士から英国の Institute of Terrestrial Ecology の Stuart Dobson 博士より協力の内諾が得られたとの連絡を受けた。博士は東京タスク会議にも出席された親日家でもあり、早速連絡したところ快い協力の手紙を受領した。同博士とさらに詳細な事務的な打ち合せを行ったところ、4, 5, 7 章の執筆について了承するとの手紙とともに、日本の環境データについては文献を収集し、環境レベル、生物影響など日本語で執筆された文献を同博士が作成したトリブチルスズの EHC²³⁾ の中にある Table を参考にして英文の表としてまとめてくれるようにとの依頼があった。そこで国内の専門家、東京都環境科学研究所 若林主任研究員と川崎市公害研究所吉川研究員の協力を得て 11 枚の表を作成し、文献リスト (28 件) と共に 11 月送付した。Dobson 博士からは非常に役に立つ表であるので採択したいとの返事があり、有効な国際協力が生まれた。

12 月には残る章を国立衛試の中で林病理部長、黒川毒性部長、祖父尼変異遺伝部長、高橋病理部長、田中毒性部長、長谷川毒性部長、関沢化学物質情報部長、および森本室長が担当することになった。こうして本年 1 月にはプレリミナドラフトが配布された。

1991 年 2 月 12 日には待望の原案検討委員会を開催するにいたり、9 月第 1 週迄にそれぞれの分担部分の原稿を提出することになり第 1 次ドラフト完成に向けてのタイムスケジュールが決められた²⁴⁾。

5. おわりに

完成に向けての作業再開に際し、過去の資料の散

逸が大きな困難となった。EHC の刊行までには早く 4 年を要するがその間に担当者が様々な理由により交替せざるを得なくなることも十分考えられる。したがって仕事自体の記録を残すことが非常に重要である。とくに文献検索の資料、収集文献の整理およびリストの作成、原稿の依頼日および受領日の記録、原稿が受領日までに入手出来ない場合のそれ以後の対応の記録、IPCS との交信記録、委員会資料のファイリング等の整備がきわめて重要なことを今回の仕事で痛感した。

謝辞：文献調査にあたり資料を提供頂き、貴重な御教示を賜りましたライオン生物科学研究所 武井玲子主任研究員に感謝の意を表します。また本原稿作成に当たってワープロ入力を願った斎藤牧江研究補助員に感謝いたします。

文 献

- 1) 厚生省環境衛生局食品化学課編：合成洗剤用界面活性剤の安全性に関する研究—厚生省委託試験成績集—厚生省食品化学課レポートシリーズ No. 7 (1981)
- 2) 吉田克己, 喜多村正次, 滝沢行雄, 池田正之, 小泉直子, 山本芳子, 藤井正美：洗剤の毒性とその評価, 厚生省環境衛生局食品化学課編 (1983)
- 3) 日本界面活性工業技術委員会：界面活性剤の安全性および生分解性に関するデータシート集, 第 1 集—経口毒性 (1987), 第 2 集—経皮毒性, 眼刺激性 (1987), 第 3 集—発がん性, 変異原性 (1988), 第 4 集—催奇性, 代謝吸収, その他毒性 (1988), 第 5 集—水生生物毒性, 植物毒性, 微生物に対する作用 (1989), 第 6 集—生分解性 (1990)
- 4) 安達六郎, 河辺広男：合成洗剤に関する文献・資料総覧, 合成洗剤研究会 (1987)
- 5) Inoue, S., O'Grodnick, J. S. and Tomizawa, S.: Metabolism of alpha olefin sulfonate (AOS) in rats. *Fundam. Appl. Toxicol.* 2, 130~138 (1982)
- 6) DeLeo, V. A., Harber, L. C., Kong, B. M. and De Salva, S. J.: Surfactant induced alteration of arachidonic acid metabolism of mammalian cells in culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 184, 477~482 (1987)
- 7) Dominguez, J. G., Parra, J. L., Balaguer, F. and Pelejero, C. M.: The inhibitory effect of some amphoteric surfactants on the irritation potential of alkylsulphates. *Int. J. Cosmet.*

- Sci.*, **3**, 57~68 (1981)
- 8) Javed, S., Misra, V. and Viswanathan, P. N.: In vitro studies on the effect of linear alkyl benzene sulphonate on serum albumin. *Int. J. Cosmet. Sci.*, **10**, 241~246 (1988)
 - 9) Tavss, E. A., Eigen, E., Temnikow, V. and Kligman, A. M.: Effect of protein cationicity on inhibition of *in vitro* epidermis curling by alkylbenzene sulfonate. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **63**, 574~579 (1986)
 - 10) Zaccone, G., LoCascio, P., Fasulo, S. and Licata, A.: The effect of an anionic detergent on complex carbohydrates and enzyme activities in the epidermis of the catfish *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Histochem. J.*, **17**, 453~466 (1985)
 - 11) Scailteur, V., Maurer, J. K., Walker, A. P. and Calvin, G.: Subchronic oral toxicity testing in rats with a liquid hand-dishwashing detergent containing anionic surfactants. *Fd. Chem. Toxic.*, **24**, 175~181 (1986)
 - 12) Nomura, T.: High sensitivity of fertilized eggs to radiation and chemicals in mic: comparison with that germ cells and embryos at organogenesis, *Cong. Anom.*, **24**, 329~337 (1984)
 - 13) Koizumi, N., Ninomiya, R., Inoue, Y., Tsukamoto, T., Fujii, M. and Yamamoto, Y.: Implantation disturbance studies with linear alkylbenzene sulphonate in mice, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **14**, 73~81 (1985)
 - 14) Nomura, T., Hata, S., Shibata, K. and Kusafuka, T.: Killing of preimplantation mouse embryos by main ingredients of cleanser AS and LAS, *Mut. Res.*, **190**, 25~29 (1987)
 - 15) Sunakawa, T., Inoue, K. and Okamoto, K.: Studies on the mutagenicity of surfactants. Mutagenicity of surfactants following activation with various liver homogenates (S-9) and mutagenicity in the presence of norharman. *Eisei Kagaku*, **27**, 204~211 (1981) (in Japanese)
 - 16) Kishi, M., Satoh, S., Horiguchi, Y. and Ito, K.: Effects of surfactants on bone marrow cells. *Bull. Kanagawa P. H. Lab.*, **14**, 57~58 (1984) (in Japanese)
 - 17) Yam, J., Booman, K. A., Broddle, W., Geiger, L., Heinze, J. E., Lin, Y. J., McCarthy, K., Reiss, S., Sawin, V., Sedlak, R. I., Slenski, R. S. and Wright, G. A.: Surfactants: a survey of short-term genotoxicity testing. *Fd. Chem. Toxic.*, **22**, 761~769 (1984)
 - 18) Sasaki, M. and Nakao, T.: Immunosuppressive effect of LAS-treated antigen on mice. *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.*, **31**, 109~114 (1980)
 - 19) Kotani, S. and Takano, K.: The effects of surfactants on transaminase activity in porcine liver. *Bull. Dep. Ed. Univ. Niigata*, **28**, 25~31 (1986)
 - 20) Gupta, B. N., Mathur, A. K., Agarwal, C. and Singh, A.: In vitro effect of linear alkylbenzene sulphonate (LAS) on some enzymes in liver and gills of the teleost channa punctatus. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **42**, 375~381 (1989)
 - 21) Huber, L.: Conclusions for an ecological evaluation of LAS. *Tenside Surfactants Deterg.*, **26**, 71~74 (1989)
 - 22) Huber, L.: Conclusions from an ecological evaluation of LAS. *Soap Cosmet. Chem. Spec.*, **65**, 44, 46, 96 (1989)
 - 23) IPCS: Environmental Health Criteria, 116, Tributyltin Compounds, WHO, Geneva (1990) pp. 56~57, pp. 66~67, pp. 116~119
 - 24) 森本和滋：陰イオン界面活性剤のEHCの原案検討委員会議事録, pp. 3. 化学物質情報部 (1991)

EHCの第1次ドラフトへのコメント提供業務に関する若干の改善

森本和滋・逸見雅貴子・神沼二眞

Some Improvements of Giving of Comments on the First Drafts
of the EHC Monographs

Kazushige Morimoto, Akiko Hemmi, Tsuguchika Kaminuma

The EHC is historically most important among the activities of IPCS which was inaugurated in 1980, and its first draft is being circulated to IPCS contact points throughout the world. Comments and suggestions in improvements to the first draft of the EHC monograph is essential to the sound development of this document. Our suggestions on such improvements are the basis of this report.

Key words : The first draft of EHC, History and improvements of commentary work.

(Received May 31, 1991)

1. はじめに

IPCSは国際化学物質安全性計画と呼ばれ、1980年に発足以来昨年10周年を迎えたり、IPCSの活動の中で最も歴史があり重視されているものが環境保健クライテリア (Environmental Health Criteria, EHC) である。EHCは化学物質の安全性評価の参考となるデータ (おもに学術文献) を網羅的に収集、評価し一冊の本にまとめたものである。1976年に発行を開始し、現在116冊まで出版されている。EHCが完成するまでには、Fig.1に示したようないくつかの段階がある。

『ドラフトへのコメント提供』とは、二重枠で示した過程であり、短くても4年の年月を要するドキュメント作成工程のほぼ中間に位置している。すなわち、EHCの第1次ドラフトがParticipating InstitutionよりIPCS事務局(Central Unit, CU)に送付されると、CUではドラフトの内容や形式が整っていることを確認した後、“International Technical Report”と題して赤い表紙をつけ、IPCSネットワークを通じて各国の関係機関にレビューの目的で供覧する。EHCのドラフト作成過程におけるコメントの果たす役割は、第1次ドラフトの内容を検討し、重要な欠落を補い、間違いを修正し、更に第1次ドラフトのupdatingをも行う極めて実質的な作業である。したがって、本化合物について専門的な深い知識を有しているが、ドラフト作

成にはタッチできなかった研究者からのコメントを得られれば理想的である。

本報告では、我が国における過去の協力を整理し、報告者の一人(森本)がこの業務の担当窓口となつてから行った若干の改善について報告する。

2. これまでの対応策

我が国におけるIPCSのフォーカルポイント (Focal Point, 各国レベルでこの事業推進のために連絡調整業務を行う窓口) は厚生省大臣官房国際課である。第1次ドラフトが国際課に到着すると、直ちに環境庁(2カ所) 通商産業省(2カ所)、農林水産省(1カ所)、労働省(1カ所)、厚生省(5カ所)の合計11カ所に送付され、草案についての意見が求められる。国立衛生試験所長への依頼もその中に含まれている。国立衛試におけるこの文書への対応を過去数年にわたって整理すると以下のようにまとめられる。

所内の委員会の一つに情報委員会があった。この委員会は化学物質情報部が担当している国際協力活動を支援する目的で設けられた。当時医化学部に属していた報告者の一人(森本)も昭和60年~昭和64年までこの委員の一人であった。第1次ドラフトが化学物質情報部に到着すると、草案がすべてコピーされ情報委員に配布される。この時大部分のドラフトは100ページを超えていた。草案の記述、解釈、引用の誤りや文献の追加等が1ヵ月位で検討さ

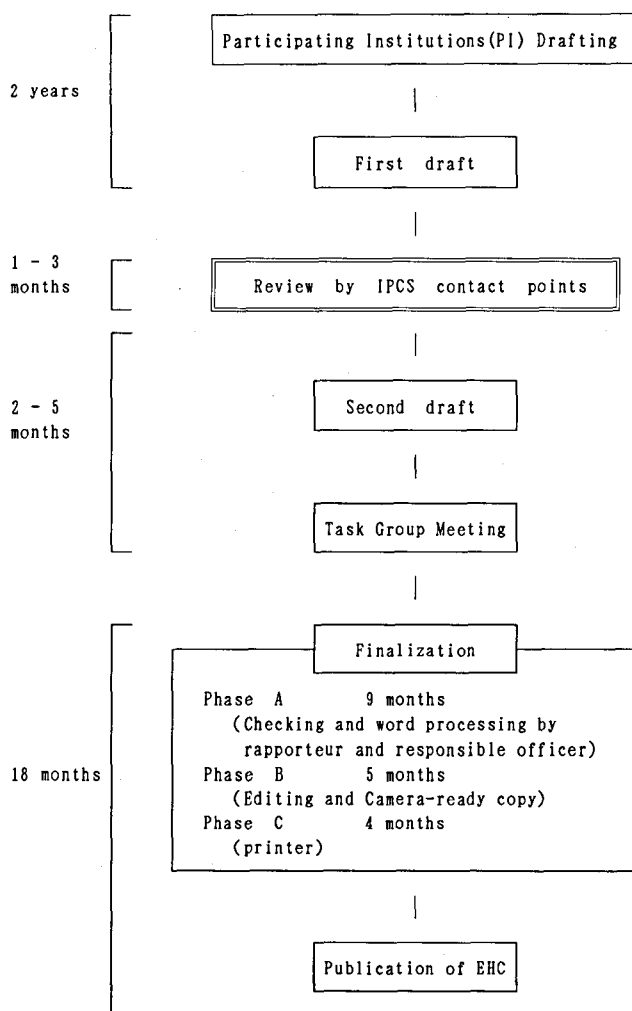


Fig. 1. Production process of EHC monograph

れた。また時には3つのドラフトがほぼ同じ時期に重なるというかなりの負担も生じた。これらドラフトの対象となる化学物質は総計20種にのぼった。しかもそれらは、Acrylonitrile, Hydrazine, Formaldehyde, 1- or 2-Propanol, 1,2-Di-chloroethane等の工業化学物質, Mycotoxin, Pyrrolizidinealkaloid等の天然物, Fenvalerate, delta-Methrin, Allethrin等の農薬, 水銀や鉛のような金属というように多岐にわたっていた。これらのドラフトが到着すると、各委員は自分の専門分野を中心にチェックして1ヶ月位で化学物質情報部へコメントを提出した。これらコメントは整理され、国際課を通じてIPCS事務局へ送付され、第2次ドラフトの作成の参考資料となった。

こうしたコメントは非常に重要視されることがあ

る。一例をあげるとHydrazineのドラフト依頼においては、ちょうど報告者の一人(森本)がDNA損傷の項目で一本鎖切断の仕事をやりはじめた時期であったので、自身の手元にあった文献に基づいて、3行の文章を追加したところ、1987年に発行されたEHC 68の45-46ページにほとんどそのまま採録されていた²⁾。

また当所で作成され、昭和63年7月4~8日に当所で開催された東京タスクグループ会議に上程されたFenvalerateの場合には、第1次ドラフトの供覧が前年の12月で、修正ドラフトの送付が翌年4月というように極めて短期間で作業が進められている。しかもこの間に数多くの加筆がなされたようで、総数で24ページ増えている。代謝の記述の例ではただ羅列されていたものが動物別に小タイトルがつ

けられ、3ページから6ページと分量が増え、内容も充実し、さらに最近の文献も追加されていた。

3. 新しい対応策

3.1 第1の試み

平成元年8月より従来の方法に修正が加えられた。IPCSの重要な業務は所長を通じて専門的な協力を依頼することとなった。またこの年度より各部から情報委員が選出されるように変更され情報委員会の性格も変わった。入手ドラフトのコピー配布が取りやめられ、部長および情報委員を通じて所内のすべての部にタイトルだけを紹介するようになった。このような変更が加えられた理由は、

① 多くのドラフトコピーが一時に届けられることがあり、負担ばかり感じられるが興味のわかないものが多くコピーの無駄であるという意見が何人かから寄せられた。

② EHC第1次ドラフトの存在が多くの人に知らされることの重要性が認識され、情報を伝えることが必要となった。

③ 情報部のコピーを取る労力の軽減等である。しかし、コメントを集約するという新たな方式ではEndrin, *n*-Hexaneを含む5件のドラフトについては、全くコメントが得られなかった。この反省から平成元年度IPCS国内協力委員会(平成2年3月

12日)において更なる改善について討議された。その中で出された意見は、

① 本年度のようにタイトルの紹介だけだと、なかなかドラフトに目を通す機会がなくコメントしにくい。

② それぞれのドラフトの内容に関係のある専門家にはその部分のみのコピーを配るようにし、できるだけコメントを求めるようにしたらどうか。

③ コメントを求める上での新たな工夫が必要である。等であった。

3.2 第2の試み

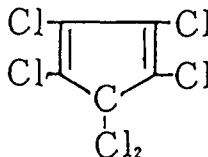
平成2年4月より<IPCS-EHCコメント依頼に関するお知らせ>をニュースのような体裁をとって発行することになった。Fig. 2には第1号のHexachlorocyclopentadieneの<お知らせ>を紹介した。ドラフトの総ページ、構造式、CAS registry numberおよび本文を通読して作成した要約(省略)を添付した。その結果、Table 1に示したように積極的な協力が寄せられるようになった。すなわち、Hexachlorocyclopentadieneに関する有機化学的な文章修正、白金に関する我が国の研究者の論文の追加やDi(2-ethylhexyl)phthalateの衛試で作成された論文の追加等貴重な協力が得られている。

1. Hexachlorocyclopentadiene (HEX)

(2 March, 1990送付, PCS/EHC/90.14)

本ドラフトは103ページより構成されている。

Molecular structure:



IUPAC name: 1,2,3,4,5,5'-hexachloro-1,3-cyclopentadiene

CAS registry number: 77-47-4

RTCS number: GY1225000

要約(省略)

Fig. 2. EHC commentary news (No. 1)

Table 1. Commentary contribution at NIHS

Chemical name (CAS registry number)	Commentary News(date)	Commentary contribution	No. of reader
1. Hexachlorocyclo- pentadiene (77-47-4)	1990. 4. 6	Comments on Chapter 2 Comments on commentary news	2
2. Trichlorfon (52-68-6)	1990. 4. 6	Comments on Chapter 2 Comments on commentary news	3
3. Fenitrothion (122-14-5)	1990. 5. 25	Comments on Chapter 2 Comments on commentary news	2
4. Methylparathion (298-00-0)	1990. 7. 6		2
5. Trichloroethane (71-55-6)	1990. 7. 6	Comments on commentary news	1
6. Platinum and selected platinum salts (7440-06-4)	1990. 7. 30	Additional reference of Japanese Scientist	1
7. Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) (117-81-7)	1990. 7. 30	Additional reference of NIHS work	1
8. Partially halogenated chlorofluoro-carbons (75-43-4, 75-45-6)	1990.10. 5	Comments on commentary news Additional material	1
9. Methyl ethyl ketone (78-93-3)	1990.12.11	Comments on commentary news	1
10. Propachlor (1918-16-7)	1991. 1. 25	Comments on commentary news	

4. おわりに

入手した情報を理解し要約する労を惜しまず配布すれば、依頼された側の労力は大幅に軽減され、信頼感のある協力関係が生まれる。すべてのドラフトをチェックするのは大変であるが、国立衛試には他の試験研究機関にはない独自の専門分野があり、その部分での責任あるコメントを小さなものでも出し続けていくことが供覧を通しての地に着いた協力であるように思われる。

時間的制約と組織的な制約のなかで、意義あるコメントを得るためには、研究所内での研究者の専門領域の把握とコメントを依頼する際にコメントの意義を理解してもらって、快く引き受けていただける

協力体制の確立 (In house net work) と所外の専門家とのネットワークを構築していくことが必要となる。IPCSの仕事は専門技能が要求される。それを習得しさらに仕事のパートナーとなる Central Unit や Collaborative Laboratory の専門家と意志の疎通ができ、場合によっては Central unit に出向して仕事をするような人材を育成するには数年が必要であろう。後継者を養成するためには貴重なコメントを提供された研究者にはタスク会議に専門家として出席願うとか (Fig.1), 新たな EHC ドラフトを作成するにあたり専門分野を中心に原稿の執筆や編集の経験を積んでもらう事が必要である。現状では In house network の協力体制の確立が急がれるが、将来は国際課との協力によって外部依頼のネッ

トワークの確立が期待される。

このような課題の解決はコンピュータを中心とした情報機器の導入とシステム化, ネットワーク化を含む情報環境の整備と表裏をなしている。情報環境の整備も緊急を要する課題である。

文 献

- 1) IPCS: Ten years of chemical safety 1980~1990, pp. 10, WHO, Geneva (1990)
- 2) IPCS: Environmental Health Criteria 68, Hydrazine, pp. 89, WHO, Geneva (1987)

グルタルアルデヒドのラットにおける急性毒性 —若齢動物と老齢動物の比較—

大野圭子・安原加寿雄・川崎 靖・中路幸男・黒川雄二

Comparative Studies on Acute Toxicity of Glutaraldehyde Using Young and Old Rats

Keiko Ohno, Kazuo Yasuhara, Yasushi Kawasaki,
Yukio Nakaji, Yuji Kurokawa

Acute oral toxicity test of glutaraldehyde (GA) was carried out in young (5-6W) and old (57-60W) Wistar/ST rats.

Experiment 1: Various doses of GA were administered by gavage. After 30 minutes, the rats showed abnormal gait, then took an abdominal or lateral position after 4 hours. Gross erosion, discoloration and thickening of the glandular stomach mucosa and hyperemia of the liver, intestine and lung were observed in the dead rats. The LD₅₀ values were 283 mg/kg for young rats and 141 mg/kg for old rats.

Experiment 2: One half of the LD₅₀ doses (140 mg/kg and 70 mg/kg of GA) were administered to young and old rats by gavage, respectively. Both groups showed a similar toxicity. Organ weights were not changed. In gross findings, erosion, discoloration and thickening of the glandular stomach mucosa were observed on day 1~7, but these damages were recovered by day 14. Histopathologically, atrophy, degeneration, necrosis, hemorrhage, edema and cell infiltration of the glandular stomach mucosa were found on day 1. Recovery from these changes was observed from day 3. Changes in several serum enzyme activities were observed on day 1~3.

Therefore, susceptibility to the acute toxic effect of GA was higher in old rats than in young rats. However, no apparent differences were observed in the toxic profiles by GA between young and old rats.

Key Words: グルタルアルデヒド, 急性毒性, ラット, 腺胃, 加齢効果

(Received May 31, 1991)

はじめに

Glutaraldehyde (GA) は強い抗菌作用をもつことから, 一般に内科, 外科および歯科用医療器具の滅菌, 消毒剤として, また, 電顕標本の組織固定液としても使用されている。今回我々は, 老齢時における化学物質の安全性評価に関する研究の一環として, 若齢および老齢ラットを用いてGAの経口急

性毒性について2つの試験を行ったので報告する。

実験材料および方法

使用検体は市販の50% GA水溶液(東京化成)を用い, 投与に際しては所定の濃度になるように蒸留水で希釈した。使用動物は若齢動物として4~5週齢, 老齢動物として56~59週齢のSPF雌雄Slc: Wistar/ST系ラット(日本エスエルシー)を

1週間予備飼育した後、それぞれ5~6週齢、57~60週齢で実験に供した。動物は、ソフトチップを敷いたポリカーボネート製ケージに2あるいは3匹ずつ収容し、室温 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 5\%$ 、照明5~17時の環境下のバリアーシステムで、固形飼料(船橋農場、F-2)と水道水を自由に摂取させて飼育した。なお実験Iにおいては、検体投与16時間前から4時間後までは除餌した。

実験I LD₅₀値の比較

投与量はLorkeによる方法¹⁾を参考にし、予備試験では10, 100および1000 mg/kg (各群3匹)のGAを、若齢および老齢の雌雄ラットに1回強制経口投与した。その結果より、本実験では若齢動物(平均体重:雄127g, 雌104g)には200, 400, 800, 1600 mg/kg (各群2匹)、老齢動物(平均体重:雄525g, 雌294g)には50, 100, 200, 400 mg/kg (各群3匹)のGAを投与量とし、1回強制経口投与した。

投与直後から14日間にわたって動物の一般状態および死亡の有無を観察した。死亡動物は直ちに、生存動物は投与14日目に解剖し、肉眼的観察を行った。LD₅₀値は14日間の死亡動物数からLorkeの方法¹⁾に従って算出した。

実験II 毒性発現の比較

GAの投与量は実験IのLD₅₀値を参考にそれぞれその半量、すなわち、若齢動物(平均体重:雄181g, 雌142g)では140 mg/kg、老齢動物(平均体重:雄554g, 雌290g)では70 mg/kgとし、1回強制経口投与した。

投与0 (control), 1, 3, 7, 14日目に、若齢および老齢動物の雌雄3匹ずつについて以下の検査を行った。

1. 生化学的検査

1) 血清: エーテル麻酔下で眼窩静脈叢より採血し、遠心分離により得られた血清を試料として、Table 1に示す項目について自動分析装置(日立、7150形)を用いて測定した。

2) 臓器ホモジネート: 肝臓および腎臓をそれぞれ1および0.5gずつ秤取し、これに氷冷等張塩化カリウム(1.19%KCl)をそれぞれ3および1.5mlずつ加え、テフロン軸ガラスホモジナイザー(Weaton, Potter型)を用いてホモジネートとした。これを10000×g, 20分間冷却遠心し、得られた上清を試料として、Table 1に示した項目のうち、酵素について測定した。

2. 臓器重量

採血後放血により屠殺し、肉眼的観察を行った後、肝臓、腎臓および脾臓を摘出し湿重量を測定した。

3. 病理組織学的検査

重量測定を行った臓器および胃、小腸を10%中性ホルマリン液で固定後、常法によりHematoxylin-Eosin染色標本を作製し、病理組織学的検査を行った。

4. 統計処理

生化学的検査、臓器重量における各測定値については、それぞれの対照群との多重比較を行った。

実験結果

実験I LD₅₀値の比較

1) 一般状態および死亡の有無

投与30分後より、若齢動物では400 mg/kg以上、老齢動物では200 mg/kg以上の投与群において雌雄全例に歩調異常が認められた。歩調異常は投与4時間目までには消失したが、動物はその後横臥あるいは腹臥の状態となった。また、眼、鼻からの出血、肛門周囲の汚れが、若齢動物では400 mg/kg以上、老齢動物では50 mg/kg以上の投与群のうち数匹において、投与直後より認められた。

動物の死亡は上記症状の発現後、投与5時間目から6日までの間に起こった。なお、生存動物は、投与4日目までにすべての症状は消失し回復した。

2) 剖検所見

死亡動物では、若齢および老齢動物の雌雄ともに腺胃が広範囲にびらんし、赤褐色および黒褐色の色調を呈しており、粘膜の肥厚も認められた。また、腸、肺および肝臓の充血も同時に認められた。その他、腹水の貯留や膀胱に血尿貯留を起しているものもあった。生存動物については、若齢動物では400 mg/kg以上、老齢動物では100 mg/kg以上の投与群において腺胃粘膜の肥厚が認められた。

3) LD₅₀値

14日間の動物の死亡数はTable 2に示した。LD₅₀値は、若齢動物では雌雄ともに283 mg/kg、老齢動物では雌雄ともに141 mg/kgであった。

実験II 毒性発現の比較

若齢および老齢動物の雌雄ともに、同様の生化学的、病理組織学的変化が認められた。

1. 生化学的所見

血清: 大きな変化は1~3日目に認められ、TP, Albは減少し、TGは増加した。酵素については特

Table 1. Test and reagent kit

Test	Abbreviation	Manufacturer
Total protein	TP	Wako
Albumin	Alb	Wako
Albumin-globulin ratio	A/G	
Blood urea nitrogen	BUN	Shinotest
Creatinine	CRN	BMJ
Glucose	Glc	BMJ
Phospholipids	PL	Wako
Triglycerides	TG	BMJ
Total cholesterol	T-Cho	BMJ
Free cholesterol	F-Cho	BMJ
Total bilirubin	TBil	Daiichi
Aldolase	Ald	BMJ
Alkaline phosphatase	AlP	BMJ
Alanine aminotransferase	AlT	BMJ
α -Amylase	Amy	BMJ
Iso-Amylase	P-Amy	BMJ
Aspartate aminotransferase	AsT	BMJ
Cholinesterase	ChE	BMJ
Glutamate dehydrogenase	GLDH	BMJ
γ -Glutamyl transferase	γ -GT	BMJ
Leucine aminopeptidase	LAP	BMJ
Lactate dehydrogenase	LDH	BMJ
Calcium	Ca	Wako
Magnesium	Mg	Wako
Inorganic phosphorus	P	Wako
Sodium	Na	Daiichi
Potassium	K	Daiichi
Chlorine	Cl	Daiichi

BMJ: Boehringer Mannheim Yamanouchi; Shinotest: Shinotest Laboratory; Wako: Wako Pure Chemical Industries; Daiichi: Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd.

Table 2. Dosage and mortality of rats administered a single dose of GA by gavage

	Dose (mg/kg)	Mortality	
		Male	Female
Young	200	0/2	0/2
(5-wk-old)	400	2/2	2/2
	800	1/2	2/2
	1600	2/2	2/2
Old	50	0/3	0/3
(57-wk-old)	100	1/3	0/3
	200	2/3	3/3
	400	3/3	3/3

に著しい変化は認められなかった。

肝臓および腎臓：酵素について特に著しい変化は認められなかった。

2. 臓器重量

体重の推移は、全群において投与1日目に減少の傾向があり、その後は回復した。体重当たりの各臓

器重量(%)には有意差が認められなかった。

3. 病理学的検査

1) 剖検所見

特に胃の変化が著明であった。投与1日目には胃は弛緩し、Limiting ridgeを境にして腺胃部はヒダが消失、粘膜は赤褐色を呈し肥厚していた。3日目も同様であった。7日目には灰白色の偽膜様物が腺胃部粘膜に雑斑状に付着していた。14日目には胃は緊張感を保ち、腺胃部はヒダを有していたが、散発的に粘膜の欠損部分が認められた。なお、前胃には明らかな変化は認められなかった。

2) 病理組織学的所見 (Table 3, Fig. 1)

主な変化は腺胃部に認められ、Controlに比べ投与1日目 (Fig. 1a) では充血および出血を伴った種々の深さにおよぶ粘膜の変性壊死、粘膜下織の浮腫、出血ならびに細胞浸潤等急性胃病変の組織像が認められた。3日目 (Fig. 1b) でもほぼ同様に粘膜の壊死、粘膜下織の浮腫ならびに細胞浸潤等が認められたが、粘膜の再生像、粘膜下織における毛細血管の新生および線維芽細胞の増生が一部に認められ、組織の修復が部分的に確認された。7日目 (Fig. 1c) では粘膜は再生上皮に置き換わっており、粘膜下織には著しい肉芽組織の増生が認められた。14日目 (Fig. 1d) になると粘膜下織の肉芽組織は癒痕化し、結合組織の増殖として認められた。

その他、肝臓において投与3日目より単細胞性壊死が軽度認められた。

考 察

実験IよりGAのLD₅₀値は、若齢動物283 mg/kg、老齢動物141 mg/kgと算出され、例数が少ないために統計的有意差は示せなかったが、年齢差が認められた。

GAの急性毒性については、5週令のSLC-SD系ラットでの強制経口投与の報告²⁾がある。一般状態として、自発運動の抑制、立毛、腹部の膨隆、歩調異常、眼瞼下垂、眼および鼻粘膜の出血がみられ、死亡例の多くは投与5~72 hr以内に起こった。さらに、剖検所見では、死亡例に肺の充血および腺胃のびらんあるいは壊死が認められた。これらの所見は今回の実験結果とほぼ一致していた。LD₅₀値は、雄134(115~157)mg/kg、雌165(125~218)mg/kgと今回の若齢ラットよりも低く、老齢ラットに近い値となっていたが、これは、使用動物の系統差によるものとも考えられる。

若齢および老齢動物にそれぞれのLD₅₀値の半量を投与した実験IIでは、投与1日目に体重に減少傾向がみられたが臓器重量には変化はなかった。また、病理学的に主な変化は腺胃部に認められ、投与1日目では急性胃病変の組織像を呈していた。組織の修復は3日目より部分的に開始し、14日目では完全な再生像が見られた。さらに、血清酵素は1~3日目に大きく変化した。これらの結果より、GAの効果は胃粘膜に対する直接作用であり、体重の減少と血清酵素の変動は胃障害による吸収阻害に起因すると考えられた。アルブミンの減少による血清タンパク質の減少は摂餌量低下に基づくものであり、TGの増加は代償的エネルギー源として内因性中性脂肪が分解されたためと考えられる。肝臓において投与3日目より単細胞性壊死が軽度認められたが、血清酵素に大きな変化を与えるほどではなかった。これは、胃の炎症性変化に伴う門脈系を介しての二次的作用のためと思われる。

一般に投与量は体重を基に計算されているが、体表面積を基に計算する方がより適切であるという考え方もある。そこで今回の実験結果について検討してみた。なお、体表面積は $0.1 \times (\text{体重})^{2/3}$ で計算される³⁾。実験IではLD₅₀値に年齢差が認められ、老齢動物の方が若齢動物よりも低い値となった。しかし、老齢動物は体重比では若齢動物の4.1倍(雄)および2.8倍(雌)、体表面積比では2.6倍(雄)および2.0倍(雌)であることから、体重当たりで同量を投与すると体表面積当たりでは若齢動物に比べ老齢動物に対してより高い量となることがわかる。この点が年齢差を生じた一因となっている可能性も考えられたので、実験IIで毒性所見が同じであった投与量、すなわち、若齢動物で140 mg/kg、老齢動物で70 mg/kgを体表面積当りに換算してみた。その結果、若齢動物では0.079 mg/cm²(雄)、0.073 mg/cm²(雌)、老齢動物では0.058 mg/cm²(雄)、0.046 mg/cm²(雌)となり、体重当たりと同様にやはり差が認められた。

以上の結果から、GAに対する感受性は加齢により上昇することが示唆された。使用できる動物数に制限があったため今回はpreliminaryな結果としてしか示すことができなかったが、毒性に対する加齢の影響は、今後さらに検討していかなければならない課題であると思われる。

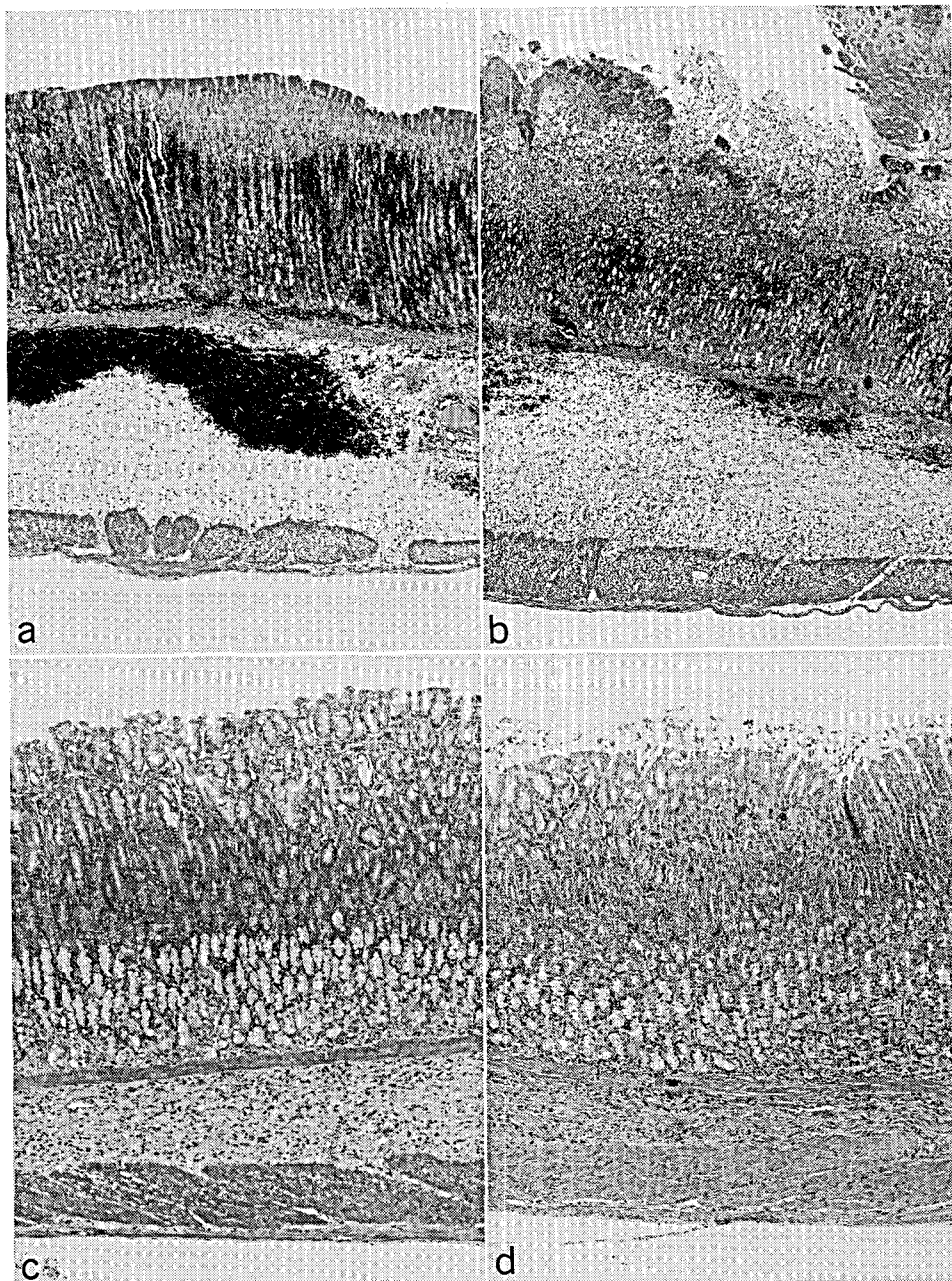


Fig. 1. Glandular stomach from young male rats administered a single dose of GA (140 mg/kg) by gavage (H-E stain).

(a) Mucosal degeneration and necrosis with marked congestion, hemorrhage and submucosal edema with a few associated inflammatory cells and hemorrhage (1 day after administration). (b) Mucosal necrosis and submucosal edema with associated inflammatory cells (3 days after administration). (c) Submucosal granulation tissue formation (7 days after administration). (d) Submucosal connective tissue proliferation with hemosiderin deposition (14 days after administration).

Table 1. Concentrations of cesium-137 and 134 in domestic mushrooms on the market

Table 3. Histological findings in rats administered a single dose of GA for 14 days

Organ site findings	Age		Young ^(a)					Old ^(b)														
	Sex		Male					Female														
	Period (day)	No. of animals	0	1	3	7	14	0	1	3	7	14	0	1	3	7	14					
			3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3					
Stomach																						
forestomach																						
submucosa																						
edema				3				3	2				3	2	1		2	3				
cell infiltration				1	2			2	2				2	1			2	3				
hemorrhage													1	2				1				
granulation tissue					2					1				2				1				
limiting ridge																						
forestomach																						
stratified epithelium																						
bura				1	1				3	2			3	1			2	2				
lamina propuria																						
edema				2	1								2				1	1				
glandular stomach																						
erosion and/or ulcer (U-I)						3	3			3	2			3	3			3	3			
mucosal layer																						
atrophy				3					3	1			3					3				
degeneration and/or necrosis				3	3				3	3			3	3	2			3	3	1		
mitosis and/or regeneration				3	3				3	3	2		3	3	3			2	3	3		
gastoric gland dilatation				3	1		3		3	2		2	2	3	1		3	1	3	3		
angioectasis and congestion				3	3				3	3			2	3	1		3	2	1	3		
hemorrhage				3	1				3	3			3	3			3	3				
cell-infiltration				3	3	3	3		3	3	2	1		3	3	2	3	3	3	2		
lamina muscularis mucosa																						
degeneration and/or necrosis					3				1	3				2					3			
hemorrhage				3	3				3	3				2	3			2	3			
cell infiltration				3	3	2	3		3	3	2	1		3	3	2	2	3	3	3	2	
submucosa																						
edema				3	3				3	3				3	3	2		3	3	3		
hemorrhage				3	3				2	3				3	3	2		3	3	3		
cell infiltration				3	3	3	3		3	3	3	2		3	3	3	3	3	3	2		
granulation tissue					3	3	3		3	2	1			3	3	2		3	3	2		
hemosiderin deposition						3	3			2	3			3	3	3		3	3	3		
connective tissue proliferation							3				3					3				3		
proper muscular coat																						
vacuolation in muscle				3	3				2	2				1	2					2		
edema				2					3					3				3				
hemorrhage					1				2					1					1			
cell infiltration				1	3	1	1		3	3	1	1		1	3	2	1		3	3	3	1
subserosal space																						
edema				3					3					3					3	2		
cell infiltration				3	3	2	1		3	3	2	1		3	3	2	1		3	3	3	2
Liver																						
single cell necrosis					3	1			3		1			3	3	1			3	1		

a : Young indicate 6-weeks-old rats administered a single dose of GA (140mg/kg).

b : Old indicate 60-weeks-old rats administered a single dose of GA (70mg/kg).

文 献

- 1) Dietrich Lorke: A new approach to practical acute toxicity testing. *Arch. Toxicol.*, 54, 275~287 (1983)
- 2) Nobuo Uemitsu, Hajime Kawasaki, Tadakazu Furuhashi, Koji Miyoshi, Tadahiko

Ohtaka, Akira Nomura, Takashi Hasegawa, Yasushi Shimizu, Masao Nakazawa: Acute and subacute toxicity studies and local irritation study of glutaraldehyde. *Oyo Yakuri*, 12, 11~32 (1976)

- 3) Eldon M. Boyd: Predictive Toxicometrics, Scientechica, Bristol (1972) pp. 257~258

市販国内産きのこ中の放射性セシウムに関する調査

河村葉子・内山貞夫・斎藤行生

Survey of Radiocesium in Domestic Mushrooms on the Market

Yoko Kawamura, Sadao Uchiyama and Yukio Saito

Domestic mushrooms on the market were tested for concentration of radiocesium; cesium-134 and 137 by γ -ray spectrometer. Cesium-137 was detected in most samples of dried and raw shiitake (*Lentinus edodes* (BERK.) SING.). The concentrations were from 6.7 to 73.9 Bq/kg in dried ones and from 1.3 to 6.4 Bq/kg in raw ones. It was not detected in enokitake (*Flammulina veltipes* (FR.) SING.) and shimeji (*Lyophyllum aggregatum* (SECR.) KÜHNER and *Pleurotus ostreatus* (FR.) QUÉL.). Cesium-134 was not found in all samples.

Key Words : mushroom, cesium-134, cesium-137, γ -ray spectrometer

(Received May 31, 1991)

1986年に発生したチェルノブイリ原子力発電所事故以来、我が国では輸入食品についてはセシウム-134およびセシウム-137に由来する放射能濃度の合計が370 Bq/kg以下という暫定基準を設け、当試験所においても輸入食品について検査を行ってきた。その結果きのこ類のうち数検体より基準値を超過するセシウムが検出され輸入禁止となったほか、セシウム含量がやや高いものが見いだされた¹⁾。また杉山らは国内産野生きのこにおいてセシウム含量の高いものがあることを報告している²⁾。そこで今回はきのこ類のうち我が国において最も生産量の高い乾燥および生しいたけ(*Lentinus edodes* (BERK.) SING.)、えのき(*Flammulina veltipes* (FR.) SING.)およびしめじ(*Lyophyllum aggregatum* (SECR.) KÜHNERまたは*Pleurotus ostreatus* (FR.) QUÉL.)の4種類について市販品中の放射性セシウム濃度の調査を行ったので報告する。

実 験 方 法

1. 試 料

平成3年3月より4月に青森、秋田、群馬、長野、大分、宮崎の6県で購入された乾燥しいたけ、生しいたけおよびえのきたけ各6検体、およびしめじ5検体の合計23検体を分析試料とした。

2. 測定装置

γ 線分析システム：高純度ゲルマニウム- γ 線

検出器 GC 4019-7915-30 型 (キャンベラ社製)、マルチチャンネルアナライザー 8505 型 (キャンベラ社製) および γ 線核種解析システム (東陽テクニカ社製)。

3. 測定方法

試料は破碎したのち測定容器に充填密封後、精秤して測定試料量を求めた。この容器を γ 線測定装置に装着し、乾燥試料は60000秒間、生試料は20000秒間 γ 線量を測定し、セシウム137および134の放射能濃度を求めた。定量下限はセシウム134および137ともに1.0 Bq/kg以下とした。

結果および考察

今回調査した市販国内産きのこ23検体の測定結果をTable 1に示した。セシウム137の含有量はきのこの種類により大きな差がみられた。検出頻度、含有量共に最も高かったのは乾燥しいたけで6検体すべてから検出され、含有量は6.7 Bq/kg~73.9 Bq/kgで平均24.6 \pm 23.0 Bq/kgであった。Fig. 1に最も濃度の高かったNo. 6の γ 線スペクトルを示した。また生しいたけは6検体中5検体より検出され、含有量は1.3 Bq/kg~6.4 Bq/kgで平均4.5 \pm 1.7 Bq/kgであった。一方えのきたけおよびしめじからはセシウム137は全く検出されなかった。セシウム134については、Fig. 1に示すように乾燥しいたけNo. 6では全く検出されず、またそれ以外

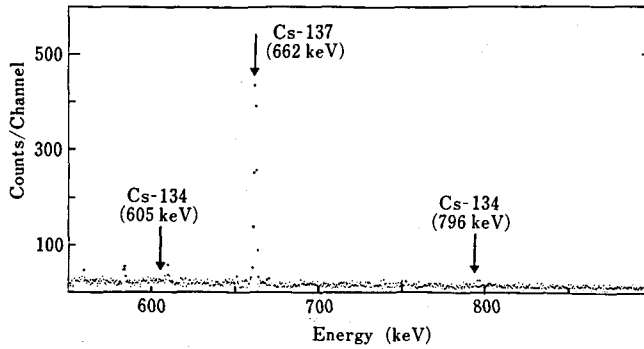


Fig. 1. Gamma spectrum of dried Shiitake

Table 1. Concentrations of cesium-137 and 134 in domestic mushrooms on the market

Sample	Cs-137(Bq/Kg)	Cs-134(Bq/kg)	
Dried shiitake	1	6.7 ± 1.1	ND
	2	11.5 ± 1.2	ND
	3	11.8 ± 1.2	ND
	4	16.1 ± 1.2	ND
	5	27.5 ± 1.2	ND
	6	73.9 ± 2.3	ND
Raw shiitake	1	ND	ND
	2	1.3 ± 0.2	ND
	3	4.3 ± 0.4	ND
	4	4.8 ± 0.3	ND
	5	5.7 ± 0.7	ND
	6	6.4 ± 0.5	ND
Enokitake	1	ND	ND
	2	ND	ND
	3	ND	ND
	4	ND	ND
	5	ND	ND
	6	ND	ND
Shimeji	1	ND	ND
	2	ND	ND
	3	ND	ND
	4	ND	ND
	5	ND	ND

Each value is the measured value ± standard deviation. ND: < 1.0 Bq/kg

のすべての検体からも検出されなかった。

きのこ類は一般に放射性金属を蓄積しやすいといわれているが、今回の調査で放射性セシウムが検出されたのはしいたけのみであった。しいたけは、なら・くぬぎ等の原木を用いて栽培するため原木中のセシウムがしいたけ中に移行したものと考えられる。一方えのきたけおよびしめじは放射能濃度が低いおがくず等で栽培されており、また栽培期間が短いため放射性物質の蓄積がみられなかったのであろう。乾燥しいたけは生しいたけと比較しやや高い放射能濃度を示すがこれは乾燥による濃縮の結果である。しかし今回検出された放射性セシウム量は輸入暫定基準の 370 Bq/kg と比較し十分に低い測定値であり食品衛生上問題はないと考えられる。一方セシウム 134 はいずれの検体からも検出されず、これらのしいたけに含有される放射能はチェルノブイリ事故ではなく過去の核実験に由来するものと考えられる。また生産地域と放射能濃度については一定の傾向はみられなかった。

終わりに試料採取に御協力いただいた各県の担当者の方々に深謝致します。

文 献

- 1) 厚生省生活衛生局食品保健課，乳肉衛生課：ソ連原子力発電所事故に係わる輸入食品の監視指導について，事務連絡昭和63年11月1日(1988)
- 2) 杉山英男，岩島 清，柴田 尚：キノコ類およびその生息基質中における放射性セシウムの分布，*RADIOISOTOPES*, 39, 499~502(1990)

グレープフルーツ中のチアベンダゾール (TBZ) の分析

山田 隆・武田由比子・川崎洋子・山本 都
山崎 壮・義平邦利・鈴木 隆・齊藤行生

Determination of Thiabendazole (TBZ) in Grapefruit

Takashi Yamada, Yuiko Takeda, Yoko Kawasaki, Miyako Yamamoto,
Takeshi Yamazaki, Kunitoshi Yoshihira, Takashi Suzuki, and Yukio Saito

The officially recognized gas chromatographic method (detector: nitrogen-phosphorus detector) for determination of thiabendazole (TBZ) in grapefruits, tends to give results that are higher than the actual values. This may be due to the fact that more of the TBZ in authentic TBZ solution is adsorbed on the column than TBZ in the sample solutions that contain a lot of impurities.

Because of this difficulty, two liquid chromatographic methods were compared. If a fluorescence detector is available, the method of Nakazato *et al.* (ethyl acetate extraction and ion pair HPLC) is the best for preparation of test solution. When an ultraviolet detector is used, clean-up of the ethyl acetate extract is necessary. By the method of Kitada *et al.*, the retention time of TBZ becomes shorter after injection of many samples. In view of these results, the method of Nakazato *et al.* is the methods-of-choice for TBZ in grapefruit.

Key words: チアベンダゾール, イオンペアクロマトグラフィー, 分析

(Received May 31, 1991)

緒 言

昨年, 輸入グレープフルーツから規制値以上のチアベンダゾール (TBZ) を検出したとの連絡を受けた。その検体についていくつかの方法で再試験を行ったところ, 結局, 規制値以下であることが判明したが, 試験法の比較検討の結果, およびその過程で見いだされた興味ある留意点について報告する。

2. 試料・試薬・方法

2.1 試料 (グレープフルーツ):

- (i) 世田谷区内で購入
- (ii) 輸入グレープフルーツ (2ロット, それぞれ3つの袋に分けて入っていた)

Lot 1-A, Lot 1-B, Lot 1-C, Lot 2-A, Lot 2-Bおよび Lot 2-C.

2.2 試 薬

チアベンダゾール (メルク製), アセトニトリル (和光純薬製) 液体クロマトグラフィー用, ラウリル硫酸ナトリウム (SDS) (半井化学製) イオンペアクロマトグラフィー用

その他の試薬は, すべて特級を使用した。

2.3 試験溶液の調製法

2.3.(i) 方法A

中里らの方法¹⁾に準じて行った。すなわち, 試料 10gに, 酢酸ナトリウム, 無水硫酸ナトリウムを加えて混和した後, 酢酸エチルを加えてブレンダーでかく拌した。これをろ紙 (No. 5C) でろ過し, ロータリーエバポレーターで約 2 ml に濃縮し, メタノールを加えて 10 ml とした後, 再度ろ紙でろ過して試験溶液とした。

2.3.(ii) 方法B

「食品衛生検査指針: 20. チアベンダゾール」²⁾に準じて行った。すなわち, 試料 50g をブレンダーカップに取り, 酢酸ナトリウム, セルロースパウダー, 無水硫酸ナトリウムを加えてホモジナイズした後, 酢酸エチルを加えてかき混ぜ, 吸引ろ過した。酢酸エチル抽出液を分液漏斗に移し, 水酸化ナトリウム溶液で洗った後, 希塩酸で抽出, 塩酸層をアルカリ性として酢酸エチルで抽出, 脱水後酢酸エチルで 50 ml とし試験溶液とした。

2.4 測 定

2.4.(i) 液体クロマトグラフィー (LC)	カラム温度：40℃
(a) LC-(1) 法	流速：0.7~1.0 ml/min
中里らの測定方法 ¹⁾ (イオンペア LC) を TBZ の みの分析に適するように一部変更して分析した。	検出：蛍光分光光度計 (励起波長 305 nm, 螢 光波長 350 nm), および分光光度計 (298 nm)
カラム：Inertsil ODS-2, 4.6 mm×25 cm	2.4.(ii) ガスクロマトグラフィー (GC)
移動相：アセトニトリル：メタノール：水 (30 : 30 : 40) に 0.01 M となるように SDS を添加し、 リン酸で pH 2.4 に調整した。	カラム：Methylsilicone, 0.2 mm×12 m, 膜厚 0.33 μm.
カラム温度：30℃	カラム温度：100℃で 20 分, 次いで 30℃/min で 200℃まで昇温し, さらに 15℃/min で 250℃まで昇 温し, 3 分間保持する。
流速：1.0 ml/min	検出器：窒素・リン検出器 (NPD)
検出器：蛍光分光光度計 (励起波長 305 nm, 螢 光波長 350 nm), および分光光度計 (298 nm)	2.4.(iii) 薄層クロマトグラフィー
(b) LC-(2) 法	衛生検査指針 ²⁾ に準じた。
北田らの方法 ³⁾ を参考にした。	薄層：メルク HPTLC sil 254 F 10 cm×10 cm
カラム：Inertsil ODS-2, 4.6 mm×15 cm	展開溶媒：クロロホルム：メタノール (9 : 1)
移動相：メタノール：水 (1 : 1)	検出：254 nm における紫外外部吸収

Table 1. Apparent TBZ concentration of the sample solution prepared by Method A*

	TBZ concentration (ppm) in Grapefruit		
	LC-(1)	LC-(2)	GC
Bought in Setagaya-ku	2.5	2.4	4.9
Recovery** (%)	93	90	—
Samples from a Prefecture			
Lot 1-A	2.3	2.7	4.9
Lot 1-B	2.2	2.3	
Lot 1-C	3.1	3.1	
Lot 2-A	2.1	2.0	5.1 ***
Lot 2-B	1.6	2.0	
Lot 2-C	1.8	2.2	

* Grape fruit was homogenized with ethylacetate and filtered.

** Recovery when 10 μg/g of TBZ was added.

*** The retention time was a little different.

LC-(1) : The method of Nakazato et al.¹⁾ was used with a little modification. The conditions were as follows.

Column, Inertsil ODS-2 4.6 mm×25 cm:

Mobile phase, acetonitrile-methanol water (30 : 30 : 40), containing 0.01 M sodium raulylsulfate adjusted to pH 2.4 with phosphoric acid:

Column temperature, 30℃ :

Detection, fluorescent detection with the excitation wave length at 305 nm and the fluorescent wave length at 350 nm.

LC-(2) : The method of Kitada et al.³⁾ was used with a little modification. The mobile phase was 50% methanol and the column temperature was 40℃. Other chromatographic conditions were the same as those of the LC-(1).

GC : Column, methylsilicone 0.2 mm×12 m:

column temperature, 100℃ for 20 min, raised to 200℃ with the rate of 30℃/min and raised to 250℃ with the rate of 15℃/min and maintained for 3 min:

Detector used was Nitrogen-phosphorus detector.

結 果

3.1 方法A (酢酸エチルによる抽出のみ) により調製した試料溶液の測定結果を Table 1 に示した。

3.2 方法B (酢酸エチル抽出—アルカリ洗浄—酸抽出—酢酸エチル抽出) により調製した試料溶液の測定結果を Table 2 に示した。

3.3 薄層クロマトグラフィー

Lot 1-A および Lot 2-A からそれぞれA法およびB法により得た試験溶液, および Lot 1-A に TBZ を $5 \mu\text{g/g}$ 添加して B 法により得た試験溶液を 10 倍に濃縮し, 薄層クロマトグラフィーを行った。結果を Fig. 1 に示した。多数のスポットがあり, これらの分画には種々の物質が含まれていることがわかった。

考 察

4.1 LC による測定について

① Table 1, Table 2 に示したように, LC (1) 法による測定値と LC (2) 法による測定値はほぼ一致した。このことおよび 4.3 で述べることより, LC 法の測定値が GC 法の測定値より真の値に近いものであると考えられる。

② LC (1) 法, LC (2) 法共に, 蛍光検出器を用いることにより TBZ を測定できた (Fig. 2(A), (C), Fig. 3(A), (C))。

③ LC (1) 法では, 注入量が $5 \mu\text{l}$ 以上になると TBZ のピークが 2 つに分裂した。これは, TBZ の量が多すぎると, 移動相中でのイオンペア形成が十分に行われなためと思われる。従って, 注入量は $3\sim 5 \mu\text{l}$ が適当であった。

④ LC (2) 法では TBZ の保持時間がカラムを

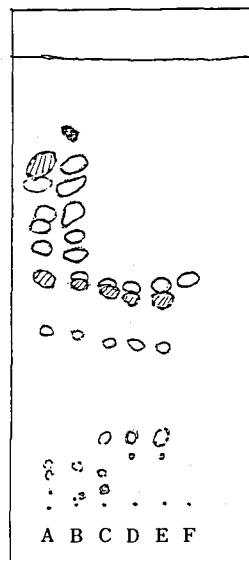


Fig. 1. Thin layer chromatogram of the sample solutions and authentic TBZ

A: Lot 1-A fruit was extracted by method A.
 B: Lot 2-A fruit was extracted by method A.
 C: Lot 1-A fruit was extracted by method B.
 D: Lot 2-A fruit was extracted by method B.
 E: Lot 2-A fruit fortified with 5 ppm of TBZ was extracted by Method B.
 F: authentic TBZ

Extraction method (A) was described in Table I. Extraction method (B) was described in Table II.

The conditions of TLC were as follows:
 Plate, Merck HPTLC sil 254F 10×10 cm;
 Developing solvent Chloroform-Methanol (9:1);
 Detection, Ultraviolet absorption (254 nm);
 ☉ showed fluorescence under a ultraviolet lamp (365 nm) ● showed brown color.

Table 2. Apparent TBZ concentration of the sample solution prepared by Method B*

	TBZ concentration (ppm) in Grapefruit		
	LC-(1)	LC-(2)	GC
Lot 1-A	2.2	2.6	7.1
Recovery** (%)	85	78	74
Lot 2-A	1.7	1.7	2.6

* Grapefruit was homogenized with ethylacetate and the ethylacetate layer was washed with NaOH solution, extracted with HCl, and reextracted with ethylacetate after alkalization.

** Recovery when $5 \mu\text{g/g}$ of TBZ was added to Lot 1-A

The conditions of LC-(1), LC-(2) and GC were the same as described in Table 1.

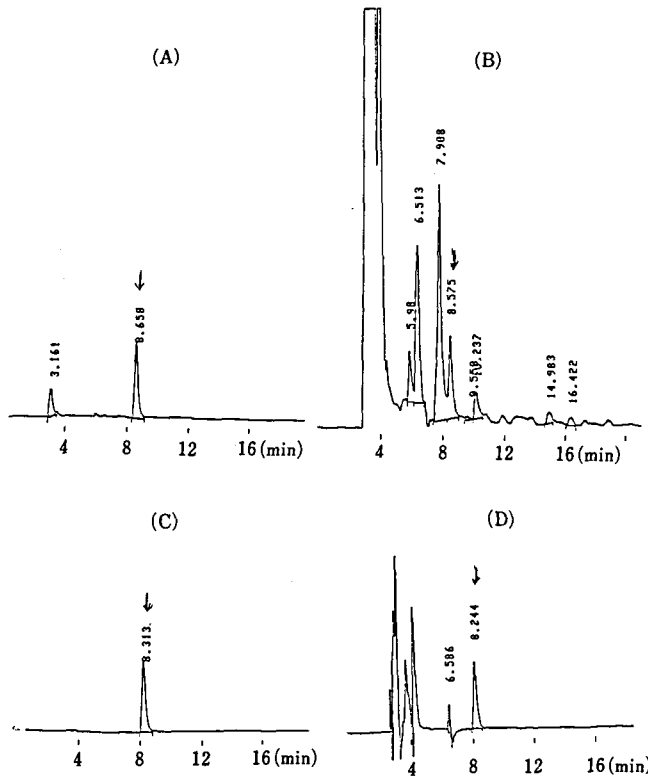


Fig. 2. Liquid chromatograms of the sample solutions prepared according to methods A and B, and chromatographed under the conditions of LC-(1).

(A): Extracted by method A and detected by a fluorescent detector.

(B): Extracted by method A and detected by a UV detector.

(C): Extracted by method B and detected by a fluorescent detector.

(D): Extracted by method B and detected by a UV detector.

Method A and the chromatographic conditions for LC-(1) were described in Table I.

Method B was described in Table II.

The arrows show the peaks of TBZ.

使用するにつれて短くなった。これは夾雑物によるカラムの汚れのためと思われる。TBZの保持時間が4分以内になるとTBZのピークとすぐ前のピークがまったく分離しなくなった。

⑤ 今回使用したカラムでは、LC (1) 法では保持時間が短縮する現象やカラムの劣化現象はみられなかった。一般的注意事項としては、移動相が約pH 2であるため、この条件でも使用可能なODSカラムを選択する必要があることが挙げられる。

4.2 試験溶液の調製方法AとBの比較

① 方法Aは方法Bに比べ非常に簡便であるが、

紫外外部吸収をもつ夾雑物が多い (試験溶液の色は淡黄色～黄色)。

② LC (1) 法において298 nmの吸収でモニターした時に夾雑物がTBZのピーク付近に存在し、TBZとは完全分離しなかった (Fig. 2(B))。また、LC (2) 法においても、夾雑物がTBZのピークに重なった (Fig. 3(B))。したがって、方法Aにより調製した試験溶液の場合、紫外外部吸収検出器による定量は不可能である。

③ 方法Bは、方法Aと比べて試料のクリーンアップには時間と手間がかかるが、試験溶液は無色ま

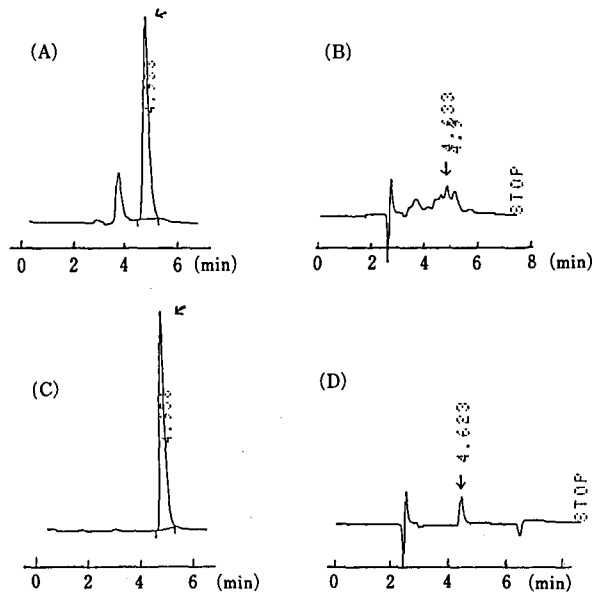


Fig. 3. Liquid chromatograms of the sample solutions prepared according to Method A and B, and chromatographed under the conditions of LC-(2).

(A), (B), (C) and (D) are the same as described in Fig. 2. Method A and the chromatographic conditions for LC-(2) were described in Table 1.

Method B was described in Table 2.

たは微着色の澄明溶液であった。夾雑物が少ないため、LC分析においては蛍光検出だけでなく、298 nmでの紫外外部吸収検出でも妨害ピークのないクロマトグラムが得られ、TBZの定量ができた (Fig. 2(D), Fig. 3(D))。

4.3 GCによる測定について

検量線は直線とならず、カラムへの吸着が著しかった。そのため、低濃度では感度が悪く高濃度では感度は著しく高くなるため、検量曲線を作成して濃度を求めた。

また、これらの吸着は試料から調製した試験溶液の注入により一時的に回復した。これは、試験溶液中の夾雑物がカラムに吸着し、TBZのカラムへの吸着を抑えたためと考えられる。このため、試験溶液と標準溶液を交互に注入した。しかしながらいずれにしても、検量線用の標準溶液に対するGCの応答は、試料から調製した試験溶液中のTBZよりも低くなることは避けられない。そのため場合によっては、試験溶液中のTBZの測定値が実際の値より高いものとなる可能性がある。「食品衛生検査指針」²⁾ではGCの検出器として蛍光光度型検出器を

採用しており、今回我々が使用したのは窒素・リン検出器であるが、上記の現象は、カラムへの吸着の問題であるので、検出器の種類にかかわらず同様なことが起きると考えられる。

GC分析法で規制値以上のTBZが検出されたのはこのような現象によるものと思われた。したがってGC法による定量を行うにあたっては上記の点に十分留意しながら測定を行う必要がある。

結 論

TBZは極性が高くGCによる検出は上に述べたように困難な場合があるので、LCによる測定の方が容易である。

試料を方法Bで調製した場合には夾雑物の少ない試験溶液が得られ、LCによる測定において蛍光による検出だけでなく、紫外外部吸収による検出も可能である。しかしこの方法はA法にくらべ時間がかかるので、LCの検出器として蛍光分光光度計が使用できる場合は簡便なA法により調製した試験溶液を用いて測定するのがよいと考えられる。

文 献

- 1) 中里光男, 斎藤和夫, 菊池洋子, 井部明広, 藤沼賢司, 二島太一郎: イオン対高速液体クロマトグラフィーによる柑橘類およびバナナ中のチアベンダゾール, ジフェニル, およびオルトフェニルフェノールの分析, 衛生化学, **34**, 401 ~407 (1988)
- 2) 厚生省生活衛生局化学課監修: “食品衛生検査指針 食品中の食品添加物分析法” pp. 97~102
- 3) 北田善三, 玉瀬喜久雄, 井上雅成, 佐々木美智子, 谷川 薫: かんきつ類およびバナナ中のジフェニル, オルトフェニルフェノールおよびチアベンダゾールの分析, 食衛誌, **23**, 21~24 (1982)

Migration and Material Tests of Some Food-Contact Plastic Wares Made in Thailand

Phawanat Smerasta*, Pongtip Srivburuang*, Nongyow Tongtan*,
Hajimu Ishiwata and Kunitoshi Yoshihira**

Migration and material tests of food-contact plastic wares were carried out in compliance with the Thai Food Act. Sample materials studied were melamine resin, polyethylene, polypropylene, polystyrene, and polyvinyl chloride. Migration levels of phenol, formaldehyde, colors and heavy metals were determined. A test for vinyl chloride monomer in polyvinyl chloride was carried out. Migrant and residual levels in all samples were in compliance with the Act.

Key words : food-contact plastic ware, determination of monomer, Thai Food Act, Japanese Food Sanitation Law

(Received May 31, 1991)

Introduction

A variety of food-contact plastic wares made in Thailand were examined by the official methods in the Thai Food Act¹⁾ to determine the levels of regulated migrants and a residual monomer.

Materials and Methods

1. Samples

Nine plastic tableware samples made in Thailand were studied to determine migrants and a residual monomer. The samples were made of melamine resin (two samples), polyethylene (one sample), polypropylene (three samples), polystyrene (one sample) and poly-

vinyl chloride (two samples).

2. Migration test

Samples were filled with hot water, 60°C, for the extraction of formaldehyde, phenol and colors, or with 4% acetic acid for the extraction of heavy metals, and maintained at 60°C for 30 min in a water bath. The extraction solution was used as a test solution.

3. Test for vinyl chloride monomer in polyvinyl chloride

One gram of polyvinyl chloride was dissolved in 20 ml of tetrahydrofuran which was previously cooled in methanol/dry ice. The solution was used as the test solution.

4. Determination of migrants or vinyl chloride monomer

Migrants and vinyl chloride monomer in the test solutions were determined by the following methods specified in the Thai Food Act: an acetylacetone method for formaldehyde (the steam distillation was omitted); a sodium sulfide method for heavy metals; a visual observation method for colors; and a gas

* Division of Agricultural Chemistry, Department of Agriculture, Ministry of Agriculture and Cooperative: Bangkok, Bangkok 10900, Thailand

** Toa University: 2-1, Ichinomiya-gakuen cho, Shimonoseki, Yamaguchi

Table 1. Results of Inspection of Plastic Food-contact Wares

Test item	Limit	Material								
		MM	MM	PE	PP	PP	PP	PS	PVC	PVC
Migration test										
Phenol	30ppm	1ppm>	1ppm>	-	-	-	-	-	-	-
Formaldehyde	4ppm	0.1ppm>	0.1ppm>	-	-	-	-	-	-	-
Colors	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Heavy metals	1ppm	1ppm>	1ppm>	1ppm>	1ppm>	1ppm>	1ppm>	1ppm>	1ppm>	1ppm>
Material test										
Vinyl chloride	1ppm	-	-	-	-	-	-	-	0.1ppm>	0.1ppm>

ND: not detectable by observation, -: no specifications in this material.

MM: melamine resin, PE: polyethylene, PP: polypropylene, PS: polystyrene, PVC: polyvinyl chloride

chromatographic method for vinyl chloride monomer. A 4-aminoantipyrine method²⁾ was used, instead of the bromine method²⁾, for phenol.

Results and discussion

Results of the test are shown in Table 1. All migrants and vinyl chloride monomer were below regulatory limits.

Examination of phenol in Thailand and Japan must include not only phenol resins but also resins made from formaldehyde such as melamine resin. Extractable phenol was less than 1/30 of the limit (30 ppm) in two cups made of melamine resin. A 4-aminoantipyrine method, a Japanese official method²⁾ given in the specification for food-contact rubber products, was used for the determination of phenol to determine the leachable concentration because the bromine method, an official method in both countries, is not suitable. Formaldehyde, which is limited to 4 ppm in the test solution, was below the detection limit of 0.1 ppm. The steam distillation, which causes dilution of the solution, was omitted to increase the detection limit. Release of colors from melamine resin, polyethylene, polypropylene, polystyrene and polyvinyl chloride was not observed. No heavy metals were detected in the test solu-

tions by the migration test of these plastics. Residual vinyl chloride monomer in two polyvinyl chloride products was not detected (less than 0.1 ppm).

Specifications and analytical methods for food-contact plastic wares by the Thai Food Act¹⁾ and the Japanese Food Sanitation Law²⁾ are almost the same. Specifications of leachable formaldehyde and phenol are mentioned as "not detectable" in the Japanese Food Sanitation Law²⁾. This term is considered to correspond to 4 ppm for the former²⁾ and 30 ppm for the latter³⁾.

These tests did not reveal migrant and residual vinyl chloride monomer levels that would make the products unsuitable for domestic use in Thailand or export to Japan.

Acknowledgements

This work was supported in part by funds from the UNDP/FAO Project, THA/87/003, the United Nations.

References

- 1) Thai Food Act (1985)
- 2) Japanese Food Sanitation Law, Notice No. 370 (1959)
- 3) Food Chemistry Division, Ministry of Health and Welfare, Ed., "Hygienics of Plastics Used for Food", p. 11 (1980), Kodansha, Tokyo.

エイズ医薬品候補スクリーニング研究

II. 1989年度報告

野呂新一*1・佐藤七七朗*1・桜田教夫*1・藤田宣哉*2・石崎 徹*2
 神村紀子*2・吉田幸雄*2・小野哲郎*3・大友信也*3・松田良夫*4
 松山雅子*4・秋吉京子*4・大竹 徹*5・森 治代*5・森本素子*5
 上羽 昇*5・国田信治*5・森下高行*6・小林慎一*6・三宅恭司*6
 石原佑弐*6・磯村思无*6・斉藤隆行*7・小田和正*7・松崎 稔*7
 関根大正*8・大貫奈穂美*8・貞升健志*8・藪内 清*8・三木 隆*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.

II. Report on fiscal year 1989

Shinichi Noro*1, Nanao Sato*1, Norio Sakurada*1, Nobuya Fujita*2,
 Tohru Ishizaki*2, Noriko Kamimura*2, Yukio Yoshida*2, Tetsuro Ono*3,
 Nobuya Ohtomo*3, Yoshio Matsuda*4, Masako Matsuyama*4, Kyoko Akiyoshi*4,
 Tohru Ohtake*5, Haruyo Mori*5, Motoko Morimoto*5, Noboru Ueba*5,
 Nobuharu Kunita*5, Takayuki Morishita*6, Shinichi Kobayashi*6, Takashi Miyake*6,
 Yuichi Ishiwara*6, Sin Isomura*6, Takayuki Saito*7, Kazumasa Oda*7,
 Minoru Matsuzaki*7, Hiromasa Sekine*8, Nahomi Ohnuki*8, Kenji Sadamasu*8,
 Kiyoshi Yabuuchi*8, Takashi Miki*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 was carried out using three different *in vitro* assay systems. Among 104 samples tested, six were found to inhibit the growth of HIV *in vitro*. Four of six were acidic polysaccharides of sea weed origin and one was a well-known anti HIV chemical whose anti-HIV activity has not been reported.

Key words : AIDS, HIV, Anti-AIDS drugs, Microplate methods, Giant cell

(Received May 31, 1991)

はじめに

エイズウイルス感染者の正確な数は不明であるが、すでに米国やアフリカを中心に、一千万人の感染者がいるのではないとも言われている。アフリカの象牙海岸のある都市では、死亡率ワーストテンランキングの第一位はエイズであるといわれている。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AZT³⁾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⁴⁾。日本における患者数は多くはないが、徐々に増加の傾向をたどっており、世界的なエイズの流行は人類の前途に暗影をなげかけている。

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した。研究班では医薬品メーカーから提供

*1北海道立衛生研究所・*2京都府衛生公害研究所
 所・*3大分県衛生公害センター・*4神戸環境保健研究所
 ・*5大阪府公衆衛生研究所・*6愛知県衛生研究所
 ・*7神奈川県衛生研究所・*8東京都立衛生研究所
 ・*9国立予防衛生研究所

された生薬抽出物や化学合成物などについて、国立衛生試験所、国立予防衛生研究所、北海道立衛生研究所など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。平成元年度は104サンプルが提出され、そのうち6サンプルが陽性を示した。陽性を示した6サンプル中の4サンプルとは海草由来の酸性多糖であり、残りの2サンプルは合成化学物質であった。

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使用した。本法で活性を認められたものは、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。実験の詳細は前報⁵⁾に記した通りである。

結 果

マイクロプレート法で試験された合計104サンプル中抗HIV活性を示した6サンプルの有効濃度、最小毒性濃度、および化合物をTable 1に示した。特許とのからみがあり、具体的な化合物名を記載することは、申しあわせにより禁じられている。これら104サンプルは参加企業13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生研究所で抗HIV活性が調べられた。Table 1の6サンプル中4サンプル(検体番号890296~890299)とは海草由来の酸性多糖を主成分として含む抽出過程における種々の分画である。検体番号890288はA社で合成された化合物であり、今回あらたに抗HIV活性が見い出されたものである。検体番号890300は化合物名は伏せられているが、既知物質である。

代表的な具体例として、Table 2と3に検体番号890288と890299のマイクロプレート法の結果を示

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
890288	1.25~10.0	≥ 25	new chemical	A
890296	31.3~500	>500	acidic polysaccharide	B
890297	31.3~500	>500	acidic polysaccharide	B
890298	62.5~500	>500	acidic polysaccharide	B
890299	31.3~500	>500	acidic polysaccharide	B
890300	0.39~12.5	≥ 25	well known chemical	C

Table 2. Anti-HIV activities of sample no. 890288 with microplate assay method

Tube no	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	UC	IC
Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	100	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.20	0.10		
3 days incubation													
Cytotoxicity	×	×	×	○	○	◎	○					◎	◎
CPE				-	-	-	-	++	++	++	++	-	++
6 days incubation													
Cytotoxicity	×	×	○	○	○	○						◎	○
CPE			-	-	-	-	++	++	++	++	++	-	++

UC, uninfected control; IC, infected control. CPE, cytopathogenic effect.

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 not observed.

Table 3. Anti-HIV activities of sample no. 890299 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. CPE, cytopathogenic effect.

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 not observed.

Table 4. Anti-HIV activities of sample no. 890299 with multinucleated giant cell formation inhibition assay

Tubo no.	1	2	3	4	5	6	7	8	UC	FC
Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	500	250	125	62.5	31.3	15.6	7.8	3.9		
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.

す。また Table 4 に検体番号 890299 の巨細胞形成抑制試験の結果をかかげる。いずれにおいても HIV ウイルス増殖抑制が明らかに認められる。

考 察

Table 1 にまとめられているように、提供された 104 サンプル中 6 のものに、*in vitro* の試験で抗 HIV 活性が認められた。このうち 1 サンプルは既知のものであったが、残りのものは今後の研究に期待をつなぐものである。特に検体番号 890288 はあらたに抗 HIV 活性が見出された構造式の判明している化合物であり、今回の予想外の発見が契機となり、類似化合物などの抗 HIV 活性に関する研究が発展することを期待したい。検体番号 890296～890299 の 4 サンプルは、有名な海草由来の酸性多糖を含む抽出過程における種々の分画である。精製

は完了していないため、既知物質か未知物質か不明であるが、興味ある知見といえよう。

このように第一次スクリーニングとはいえ、1989 年度と前年度と同様、新しい有望な抗 HIV 医薬品候補物質が発見されたことは、一つの大きな成果と言って良いであろう。

文 献

- 1) 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)
- 2) Bridge, T. P., Mirsky, A. F. and Goodwin, F. K.: "Psychological, neuropsychiatric, and substance abuse aspects of AIDS". Raven Press, New York (1988)
- 3) 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)
- 4) Dalgleish, A. G. and Weiss, R. A.: "AIDS and New Viruses" Academic Press, London (1990)
- 5) 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, 石原佑弼, 磯村思无, 齊藤隆行, 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: エイズ医薬品候補スクリーニング研究, I. 1988年度報告, 衛生試験, 108, 128~131 (1990)

1990年度EHC第1次ドラフトの要約

森本和滋・神沼二眞

Summaries on the First Draft of the EHC Monographs in 1990

Kazushige Morimoto, Tsuguchika Kaminuma

The first drafts of the EHC monographs in 1990 were summarized into Japanese. The chemicals consist of hexachlorocyclopentadiene, trichlorfon, fenitrothion, methylparathion, trichloroethane, platinum and selected platinum salts, di(2-ethylhexyl)phthalate, partially halogenated chlorofluorocarbons, methyl ethyl ketone, and propachlor.

Key words : IPCS, The first draft of EHC, EHC monographs in 1990.

(Received May 31, 1991)

1. はじめに

1990年4月から1991年2月迄のコメント提供については、本誌「EHCの第1次ドラフトへのコメント提供業務に関する若干の改善」で記述したように新たな方式を採用した¹⁾。そこで本年度の方式と反響、結果について要約の部分を中心に報告する。

2. IPCS-EHC コメント依頼に関するお知らせの作成について

第1次ドラフトが到着すると速やかにドラフトを通読しその要約を作成し、ドラフトの総ページ、構造式、CAS registry number等を記入し各部の部長と情報委員にお知らせとして配布した。

3. 修正を加えた要約

積極的な協力が寄せられ、文章の修正、論文の追加については「EHCの第1次ドラフトへのコメン

ト提供業務に関する若干の改善」の論文で報告したが²⁾、さらに要約の部分についての様々な修正意見も多数寄せられた。

それぞれの化合物について寄せられた意見に従って修正したものを資料として記録にとどめることはこれら資料が蓄積した時、化学物質の安全性評価の重要な資料となるものと考え以下記載した。

1) Hexachlorocyclopentadiene (HEX)

HEXは刺激臭のある液体で、水には難溶で、化学的には反応性とんでおり、Diels-Alder反応等の付加反応や置換反応を行う。農薬の合成原料や、難燃剤、樹脂、色素の製造にも使われている。脂溶性が高いため、環境中では底質や生物への濃縮が予想されているが、光によって比較的速やかに分解される。ラットにおける体内動態試験では、尿への排泄が主で、経口投与および吸入実験では肝臓や腎臓への蓄積が認められる。HEXは生体成分との反応性が極めて強いため、生体内で親化合物の量は少な

いことは分かっているが、代謝物についての報告はほとんどない。動物への毒性は吸入毒性が最も強く、経口投与においても毒性が中程度に現れ、刺激性毒物と考えられる。HEXは突然変異原性は認められない。ヒトへの健康影響としては、目、鼻、喉、肺への刺激が問題であると考えられる。発癌性については利用しうるデータが少なく判断ができない。したがって本物質の評価のために必要な今後の研究課題として、代謝研究、生態系における運命、催奇形性について行うことを提言している。

2) Trichlorfon (TC)

TCは無色の結晶性粉末で、水、ベンゼン、エタノール、クロロホルムに可溶である。殺虫剤として広く農場、森林で使用されている。環境中では、水や土中で光分解を受け、殺虫剤として有効成分である dichlorvos になる。動物における体内動態試験では、経口投与後の吸収は速やかで、尿中排泄も速く、マウスにおける生物学的半減期は80分と短い。代謝としてはTCが脱HCl化、転位反応により dichlorvos になり、本代謝物がアセチルコリンエステラーゼと反応する。従って、動物への急性毒性は、本酵素への阻害作用に伴う神経毒性である。TCはDNAへのアルキル化能を有しており、様々な試験で遺伝毒性を示す。発癌性については陽性であるとの明確な報告はない。胎児毒性や催奇形性はラットやマウスで認められている。今後の研究としては、ヒトでの遅延神経毒性の研究の必要性を提示している。

3) Fenitrothion (FN)

FNは黄褐色の液体で、水には難溶であるが、ほとんどの有機溶媒には可溶である。広範な害虫に有効な殺虫剤で、収穫前の果物、野菜、大豆、米、コーヒー等いろいろな作物に散布されるが、日光によって速やかに二酸化炭素に分解されるため、半減期は1~2日と短い。ラット、マウスにおける体内動態試験では、経口投与量の90%が尿中に排泄される。主代謝物はO-methyl基の脱メチル体や fenitrooxon (FNO) である。動物への主たる毒性は、神経組織のアセチルコリンエステラーゼがFNOによって阻害されることによるアセチルコリンの蓄積に伴う諸症状、例えば流せんや振せん等の神経毒性である。突然変異原性はほとんどの試験で陰性である。発癌性については、ラットやマウスで調べられているが陰性である。また胎児毒性や催奇形性も陰性である。

ヒトがFNに曝露されると、血漿中のコリンエステラーゼ活性の低下が認められる。1988年 JMPR (The Joint Meeting of FAO and WHO for Pesticide Residue) では一日許容摂取量 (ADI) を0~0.005 mg/kgと定めた。

4) Methylparathion (MP)

MPは白色の結晶性粉末で、水、エタノール、クロロホルムに可溶である。チオリン酸エステル系の殺虫剤で、世界での総生産量は年間8万トンと推定される。穀物の保護のために、噴霧ないし、粉末として散布される。環境中では、大気中で酸化的に光分解を受け methylparaaxon を経由して分解される。また水域環境では生分解も加わって半減期が2~4日と短い。一方、土中での半減期は1~2ヶ月と比較的長い。

ラットにおける体内動態試験では、¹⁴Cで芳香環を標識した化合物を用いた実験で経口投与量の94%が48時間以内に尿中に排泄され、主代謝物はp-nitrophenol である。動物への主たる毒性は、神経組織のアセチルコリンエステラーゼが阻害されることによるアセチルコリンの蓄積に伴う諸症状、例えば流せんや振せん等の神経毒性である。突然変異原性はAmes試験は陰性であるが酵母において陽性であり、哺乳動物細胞では姉妹染色分体交換試験が陽性を示したが、他の試験では陰性を示しており、今後の検討が必要である。発癌性についてはラットやマウスで調べられているが陰性である。また胎児毒性や催奇形性も陰性である。

ヒトがMPに曝露されると、血漿中のコリンエステラーゼ活性の低下が認められる。

5) Trichloroethane (TCE)

TCEは無色の、特徴的な臭いを有する不燃性の液体で、主として機械の金属部分の液体洗浄剤やグリース除去に噴霧用に用いられる。

環境中では生分解性が低いため使用地域の付近の空気、土壌、水の汚染、特に地下水汚染に伴う飲料水への汚染が問題となる。甲殻類や魚類等の水生生物への急性毒性は10~30 mg/lで観察されるが生物濃縮は低い。また、成層圏での存在はオゾン破壊の一端を担っていると考えられている。

ラットやマウスの体内動態試験では、投与ルートにかかわらず、主排泄経路は肺である。ラットにおいては吸入後72時間に94~98%が未変化体として呼気に排泄され、一部尿に2,2,2-trichloroethanol glucuronideとして排泄される。動物への毒性は他

の塩素系の溶媒と比較すると肝臓への毒性は低く、むしろ中枢神経系への影響が問題である。突然変異原性は陰性であり、発癌性はラットやマウスにおける1500 ppmの24ヶ月の反復投与においても認められなかった。胎児毒性はラットやマウスにおける875 ppmまでの吸入試験では異常は認められなかった。

ヒトの実験吸入曝露では500 ppm, 7h/d, 5日間で軽い眠気, 頭痛, 目や鼻の刺激が観察された。

6) Platinum and selected platinum salts

白金とその化合物として14種類が取り上げられ、その内訳は無機化合物としてPtCl₂, PtCl₄, PtO₂, PtO等が、配位化合物としてcis-dichloro-di-amineplatinum (II) (cis-platin)等8種類が収録されている。

白金は銀白色のあまり堅くない金属で、展延性があり、大量の水素を吸収する性質がある。大部分の化合物は水に不溶であり不揮発性であるため環境への拡散は少ない。環境汚染としては自動車のエミッションからの大気汚染が報告されている。

体内動態試験や毒性試験は制癌剤のcis-platinの記述が大部分を占めている。本化合物はマウスにおいて腹腔内投与の80%が1日以内に尿中に排泄される。腎臓への分布と残留性が高い。急性毒性としては、腸上皮の表皮剥落、骨髄抑制、ネフローゼ、脾臓や胸腺の退縮が観察される。変異原性も極めて強い。ヒトにおけるcisplatinの副作用としては腎毒性や、吐き気、骨髄毒性等が認められる。

7) Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)

DEHPは無色ないし黄色の油状液体で、水には難溶であるが、ほとんどの有機溶媒には可溶である。年間400万トンが世界中で使用され、可塑剤として使用されている。プラスチック中には40%(w/w)のレベルで存在する。これらプラスチック製品は焼却炉やごみ捨て場に廃棄されると、いずれも大気中に揮発され環境汚染の原因となる。大気中のDEHPは降雨によって水系に移行する。DEHPは脂溶性が高く、中程度の残留性があるため、水生生物への蓄積が報告されている。

ラットにおける体内動態試験では、経口投与量の50%が尿と胆汁に排泄される。腸内でリパーゼによって水解を受け、モノエステル, mono(2-ethylhexyl)phthalateになり、吸収後、 ω および $\omega-1$ 酸化を受けてアルコール体を生成し更に対応するケトン体やカルボン酸となる。動物実験では、ラット

とマウスで肝細胞癌の誘発が雌雄両性で認められた。ほとんどの遺伝子毒性試験は陰性であり、DEHPの肝細胞の増殖促進作用や代謝物のペルオキシソーム増殖促進作用が癌原性と関連があるものと考えられている。

8) Partially Halogenated Chlorofluorocarbons (PHC)

Dichlorofluoromethane(HCFC21)とChlorodifluoromethane(HCFC22)は無色の気体で、水に難溶である。1987年にはHCFC22は24万6千トンが世界で生産された。主として冷蔵庫の冷媒として使用されている。廃棄された冷蔵庫からの環境への放出はオゾン層の破壊につながるものが危惧されるが、すべてがハロゲン基で置換したTrichlorofluoromethane (CFC11)と比較するとオゾン層の枯渇能(ozone depletion potential, ODP)は1/20と低い。

ラットにおける体内動態試験では、吸入による吸収は速やかであり尿や糞中への排泄は極めて低い。二酸化炭素としての呼吸への排泄は投与量の0.1%と低く、体内では代謝されずほとんど未変化体のまま呼吸から排泄される。動物への吸入毒性は麻酔作用に基づく諸症状、例えば中枢神経の機能の抑制や流涙、立毛、散瞳等で、遺伝毒性試験はほとんど陰性であり、発癌性については十分な研究はされていない。またHCFC22はCDラットにおいて頻度は低いが小眼球や眼球欠如等の催奇形性が認められた。

ヒトへの影響については、HCFC22の曝露と心悸亢進の関係が認められるとの報告がある。

9) Methyl ethyl ketone (MEK)

MEKはアセトン臭を有する無色透明の液体で、水にも各種有機溶媒にも可溶であり、また可燃性が極めて高い。MEKはゴム、樹脂、合成高分子工業において溶媒として用いられ、米国では年間に25万8千トンが生産されている。環境中へは主として蒸発によって大気へ放出されるが、光化学反応にて速やかに分解されるため、むしろ水域環境への汚染が問題とされている。

ヒトにおける肺からの吸収は速やかで、約70%と吸収率も高いが、吸収後は速やかに血中より消失し、呼吸と尿より排泄され、尿中の主代謝物は3-hydroxy-2-butanoneである。動物への吸入毒性は、鼻、目、咽頭等の刺激作用や麻酔作用に伴う行動異常等の報告がある。MEKは四塩化炭素やクロロホルム等のハロゲン化アルキルの肝臓や腎臓に対する

毒性を増強する作用があり、その6例が表にまとめられている。またラットにおいて催奇形性を示し、Amesテストは陰性であり、哺乳動物細胞においても遺伝毒性は認められないが細胞毒性は観察され、細胞間情報伝達の経路であるギャップ結合に影響を与えることを通して催奇形性が発現するものと考えられる。

10) Propachlor (PC)

PCは淡黄褐色の固体で、ベンゼン、アセトン、ヘプタン等各種有機溶媒に易溶である。この化合物はMonsanto Chemical社が1958年に開発した除草剤で、イチゴ、タマネギ、トウモロコシ畑に散布される。土壤中での分解は速やかで主として土壤微生物によって行われ、半減期は2~14日である。

ラットにおける体内動態試験では経口投与の67%が胆汁中に排泄され、代謝物としては塩素と置換したグルタチオン抱合体が同定され、尿中からは数種の2-methylsulfonyl-acetanilideが検出されており体内貯留性が低い。動物への急性毒性は中程度(ラット経口投与, LD₅₀, 950~2,176 mg/kg)で、

興奮、痙攣等の中樞神経症状や肝臓及び腎臓機能の障害が認められ、慢性毒性としてはヘモグロビンや赤血球の減少や好中球の増加、肝臓や腎臓の機能障害が濃度依存的に認められる。また皮膚に対しては強い刺激作用も観察される。突然変異原性はほとんどの試験で陰性である。胎児毒性や催奇形性も認められていない。発癌性の実験はまだ行われていない。ヒトへの影響では、1.4%水溶液が皮膚刺激の認められる濃度として記述されている。

4. おわりに

要約の文章について種々の御指摘を頂きました内山副所長(当時)、戸部センター長、田中部長、また追加論文をお知らせ頂いた米谷室長、長谷川室長に感謝致します。

文 献

- 1) 森本和滋, 逸見雅貴子, 神沼二真: EHCの第1次ドラフトへのコメント提供業務に関する若干の改善, 衛生試報, 109, 188 (1991)

In vitroでの過酸化水素による8-hydroxy-deoxyguanosine 生成に対するL-ヒスチジンの増強作用

高木篤也・佐井君江・長谷川隆一・黒川雄二

Enhancing Effect of L-Histidine on the Formation of 8-Hydroxy-deoxyguanosine Induced by Hydrogen Peroxide *in vitro*

Atsuya Takagi, Kimie Sai, Ryuichi Hasegawa and Yuji Kurokawa

Treatment of deoxyguanosine with H₂O₂ (56 mM) at 37°C for 2 hrs resulted in the formation of 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OH-dG). The formation of 8-OH-dG by H₂O₂ was increased about 3-folds in the presence of 78 μM L-histidine (L-His). The result suggests that oxidative DNA damage induced by H₂O₂ *in vitro* might be enhanced by L-His.

Key words : 8-hydroxy-deoxyguanosine, oxidative DNA damage, L-histidine, hydrogen peroxide

(Received May 31, 1991)

はじめに

最近、ヒト胎児線維芽細胞にL-histidine (L-His) と過酸化水素 (H₂O₂) の同時添加により、また、L-His と H₂O₂ の反応生成物の添加によりDNA鎖切断が高頻度に生じることが報告された¹⁾。

H₂O₂にはDNA鎖切断作用があることから²⁾、この事実はH₂O₂による酸化的DNA傷害をL-Hisが増強したものと考えられた。一方、8-hydroxy-deoxyguanosine(8-OH-dG)は*in vitro*³⁾、*in vivo*⁴⁾の試験で酸化的DNA傷害の指標として有用であることが報告されている (Fig. 1)。そこで、L-Hisが

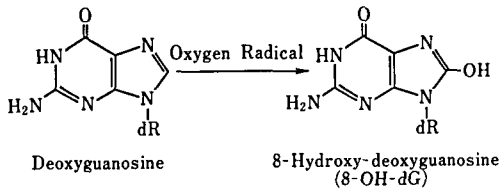


Fig. 1. Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position

H_2O_2 の酸化的 DNA 傷害を増強させる可能性を調べるため、 H_2O_2 および L-His 存在下での deoxyguanosine (dG) からの 8-OH-dG 生成量を測定した。

実験方法

2'-deoxyguanosine (dG) (Sigma) (0.5 mg/ml), EDTA (20 mM) を含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.6) に H_2O_2 (和光純薬工業) 単独 (56 mM) または H_2O_2 (56 mM) および L-histidine monohydrochloride, monohydrate (L-His) (和光純薬工業) (78 μM) を含む溶液 (全量 0.5 ml) を遮光下 37°C で振とうし、反応開始 2 および 4 時間後に生成した 8-OH-dG 量を高速液体クロマトグラフィーに接続した電気化学検出器で測定した。なお、8-OH-dG の測定は既報にしたがって行い⁵⁾、それぞれ 2 回測定した値の平均値を算出した。

結果と考察

反応液中に生成された 8-OH-dG 量は dG 単独では 2, 4 時間後で 50, 44 pmole と増加したのに比較し、 H_2O_2 添加により 2, 4 時間後で 196, 168 pmole と増加した。 H_2O_2 に加え L-His を同時添加すると 2, 4 時間後で 480, 508 pmole と H_2O_2 単独の場合と比較して生成量は約 3 倍で、明かな 8-OH-dG 生成増加が認められた (Fig. 2)。

H_2O_2 は染色体異常誘発能を有することが知られているが⁶⁾、この H_2O_2 による染色体異常が L-His により、また、L-His と H_2O_2 反応生成物により増強され、他のアミノ酸では増強されないことが報告されている^{7,8)}。今回の実験結果より L-His が H_2O_2 による酸化的 DNA 傷害を増強することが強く示唆され、 H_2O_2 と L-His による染色体異常増加に酸化的 DNA 傷害増加が関与することが示唆された。

文献

1) 大屋幸子, 越智崇文, 山本興太郎: His+ H_2O_2

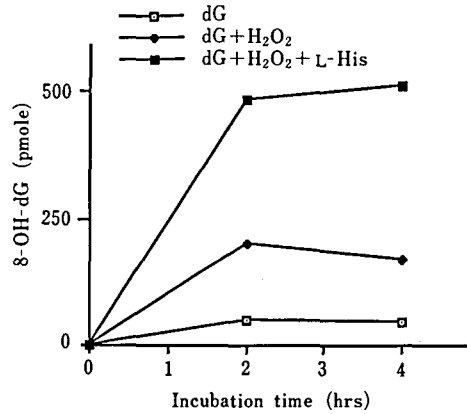


Fig. 2. Formation of 8-hydroxy-deoxyguanosine by H_2O_2 in the presence of L-histidine

Incubation mixture; dG: 0.5 mg/ml, H_2O_2 : 56 mM, L-histidine: 78 μM , 20 mM EDTA, 0.1 M phosphate buffer (pH 7.6), total 0.5 ml, 37°C, no light

二重処理および His- H_2O_2 adduct 処理による DNA 鎖切断の特性ならびに能動輸送との関連性, 日本癌学会第 48 回総会講演要旨集, pp. 59, (1989)

- 2) Olson, M. J.: DNA strand breaks induced by hydrogen peroxide in isolated rat hepatocytes. *J. Toxicol. Environ. Health.* **23**, 407~423 (1988)
- 3) Kasai, H. and Nishimura, S.: Hydroxylation of guanine in the nucleosides and DNA at the C-8 position by heated glucose and oxygen radical-forming agents. *Environ. Health Perspect.*, **67**, 111~116 (1986)
- 4) Kasai, H., Nishimura, S., Kurokawa, Y. and Hayashi, Y. Oral administration of the renal carcinogen, potassium bromate, specifically produces 8-hydroxydeoxyguanosine in rat target organ DNA. *Carcinogenesis*, **8**, 1951~1961 (1987)
- 5) 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-ethylhexyl) phthalate and di(2-ethylhexyl) adipate. *Jpn. J. Cancer Res.*, **81**, 213~215 (1990)
- 6) Oya, Y., Yamamoto, K. and Tonomura, A. The biological activity of hydrogen peroxide, 1. Induction of chromosome-type aberrations susceptible to inhibition by scavengers of hydroxyl radicals in human embryonic fibroblast. *Mut. Res.*, **177**, 245~253 (1986)

- 7) Shibuya, H., Iwata, K., Ohkawa, Y. and Inui, N. Histidine increases the frequency of chromosomal aberrations induced by the xanthine oxidase-hypoxanthine system in V79 cells. *Toxicol. Lett.*, 28, 117~123 (1985)
- 8) Oya, Y. and Yamamoto, K. The biological activity of hydrogen peroxide, IV. Enhancement of its clastogenic actions by coadministration of L-histidine. *Mut. Res.*, 198, 233~240 (1988)

必須元素のラット臓器内濃度に関する研究 (第2報)
肺・肝臓・腎臓・脾臓について

鈴木幸子・小川幸男・広瀬明彦・金子豊蔵・黒川雄二

Study on Essential Metal Concentration in the Organs of Rats (Report 2)

—lung · liver · kidney · spleen—

Sachiko Suzuki, Yukio Ogawa, Akihiko Hirose,
Toyozo Kaneko and Yuji Kurokawa

The objective of this study was to obtain the normal ranges of essential metals in male and female Slc : Wistar rats aged 9 or 11 weeks. Concentration of 10 elements (Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, S and Zn) in the lung, liver, kidney and spleen of rats was determined by inductively coupled argon plasma atomic emission spectrometry (ICP). Each sample was digested with nitric acid and perchloric acid in a sealed double Teflon vessel with polypropylene jacket by heating with a microwave oven.

The concentrations of Fe and Mn in the liver were different between males and females. The Fe level in the female was higher than that in the male, and Mn level in male was higher than that in female. The concentration of Fe in the spleen was different by sex and age. The Fe level in female was 2.3 times higher than that in male, and that in rats of 11 weeks was 1.8 times higher than that of 9 weeks.

Key words : essential metals; normal range; ICP; rat; organs

(Received May 31, 1991)

はじめに

前報¹⁾では、ICP (Inductively Coupled Plasma) 発光分析法を用いてラット臓器における多種類の必須元素の測定法を紹介した。実験動物の組織中の必須元素の正常値 (バックグラウンド値) を知ることは、欠乏ないし過剰状態の判定、および各種疾患または病態時の必須元素濃度を把握する上で有意義である。しかし動物組織中の必須元素濃度は個体差、性差、週齢などの因子により変動することが考えられるため多数の試料の分析結果の蓄積が不可欠である。今回は、現在までに測定が終了した9週齢と11週齢の無処置ラットの臓器内必須元素の分析結果をまとめて報告する。

実 験

1. 動物および飼育条件

Slc : Wistar系雌雄ラットの9週齢, 11週齢 (各々5匹) を用いた。動物は室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 湿度 $55 \pm 5\%$, 6時から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イト製ケージに5匹ずつを収容し, 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。

2. 測定対象臓器および元素

対象臓器は肺, 肝臓, 腎臓, 脾臓の4臓器, 対象元素はカルシウム (Ca), 銅 (Cu), 鉄 (Fe), カリウム (K), マグネシウム (Mg), マンガン (Mn), ナトリウム (Na), リン (P), イオウ (S), および亜鉛

(Zn) の10元素に限定した。

3. 試薬および標準溶液

Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn および Na の標準溶液：原子吸光分析用 1000 ppm 標準溶液 (和光純薬製) を適宜希釈混合して使用した。

P 標準溶液：光電用リン標準溶液 1 mg/kg (和光純薬製) を希釈して使用した。

S 標準溶液：容量分析用 N/10 硫酸 (和光純薬製) を用いて調整した。

4. 装置および測定条件

真空凍結乾燥器：FTS system 社製 DURA-DRY

誘導結合プラズマ (ICP) 発光分光分析装置：真

空多元素同時分析型 Thermo-Jarrell Ash 社製 ICAP-61

電子レンジ用試料分解容器：三愛科学製

電子レンジ：日立製 MR-M 26

5. 試験溶液の調整および分析法

動物はエーテル麻酔下で頸動脈切断による放血後、

肺、肝臓、腎臓、脾臓を摘出した。各臓器は凍結乾燥し、乾燥重量で約 100 mg を精秤し、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、電子レンジ用試料分解容器にセットして電子レンジで試料を分解した²⁾。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殆ど蒸発乾固するまで (約 1 時間) 加熱し、放冷後、蒸留水で一定重量として測定用検体とした。単位はすべて乾燥重量当たりの $\mu\text{g/g}$ で表した。精度管理のため NBS (米国標準局) の Bovine Liver を一連の分析ルーチンに加えた。分析法は前報¹⁾のとおりである。

結果および考察

1. 標準試料中の金属元素量

電子レンジによる試料の分解および ICP 発光分析法の信頼性を確かめるため NBS Bovine Liver の分析を行った。分析結果は 10 試料の平均値と標準

Table 1. Determination of metal in NBS standard reference material

Element	NBS 1577a (Bovine Liver)	
	Certified value	Observed value
Ca ($\mu\text{g/g}$)	120 ± 7	115 ± 5
Cu ($\mu\text{g/g}$)	158 ± 7	149 ± 6
Fe ($\mu\text{g/g}$)	194 ± 20	176 ± 9
K (Wt. %)	0.996 ± 0.007	0.966 ± 0.005
Mg ($\mu\text{g/g}$)	600 ± 15	567 ± 26
Mn ($\mu\text{g/g}$)	9.9 ± 0.8	9.4 ± 0.4
Na (Wt. %)	0.243 ± 0.013	0.226 ± 0.01
P (Wt. %)	1.11 ± 0.04	1.131 ± 0.07
S (Wt. %)	0.78 ± 0.01	0.65 ± 0.04
Zn ($\mu\text{g/g}$)	123 ± 8	114 ± 5

N=10 Data are mean ± SD

Table 2. Concentrations of 10 elements in organs of male rats (9 weeks)

Elements	Lung	Liver	Kidney	Spleen
Ca ($\mu\text{g/g}$)	374 ± 19	130 ± 11	272 ± 16	166 ± 14
Cu ($\mu\text{g/g}$)	6.0 ± 0.6	16.3 ± 2.0	24 ± 0.8	5.1 ± 0.2
Fe ($\mu\text{g/g}$)	361 ± 20	337 ± 43	253 ± 25	1216 ± 59
K (Wt. %)	1.24 ± 0.1	1.19 ± 0.02	1.07 ± 0.03	1.87 ± 0.11
Mg ($\mu\text{g/g}$)	594 ± 54	808 ± 22	752 ± 17	908 ± 56
Mn ($\mu\text{g/g}$)	—	9.2 ± 0.13	3.9 ± 0.14	—
Na (Wt. %)	0.49 ± 0.01	0.17 ± 0.02	0.45 ± 0.02	0.23 ± 0.02
P (Wt. %)	1.15 ± 0.11	1.27 ± 0.05	1.17 ± 0.04	1.43 ± 0.32
S (Wt. %)	0.55 ± 0.11	0.83 ± 0.02	0.85 ± 0.02	0.86 ± 0.04
Zn ($\mu\text{g/g}$)	79 ± 6	111 ± 9	90 ± 3	83 ± 6

N=5 Data (dry weight) are mean ± SD

—: Not detectable.

偏差を Table 1 に示した。分析値と保証値と比較するとおおむね良好な一致を示していると判断できた。

2. 臓器中の必須元素量

9 週齢, 11 週齢の雌雄ラットの臓器中必須元素量の測定結果を Table 2, 3, 4, 5 に示した。更に参考資料として飼育期間中に与えたラット飼育用固形飼料 (船橋 F2) 中の金属元素の測定結果を Table 6 に示した。

肝臓中の必須元素濃度：鉄濃度が9週齢, 11週齢の雄の値がともに 337 $\mu\text{g/g}$, 雌の値が 819 \pm 42 $\mu\text{g/g}$, 963 \pm 110 $\mu\text{g/g}$ を示し週齢差は認められなかったが, 雌雄で比較すると9週, 11週ともに雌の値が高く雄の2.5倍あった (Fig. 1)。さらにマンガン濃度が雄の場合9週齢で9.2 $\mu\text{g/g}$, 11週齢で8.5 $\mu\text{g/g}$, 雌の場合9週齢で7.1 $\mu\text{g/g}$, 11週齢で6.9 $\mu\text{g/g}$ を示し週齢の差は認められなかったが, 雌雄で比較すると雄の方が1.2倍高い値を示した (Fig. 3)。

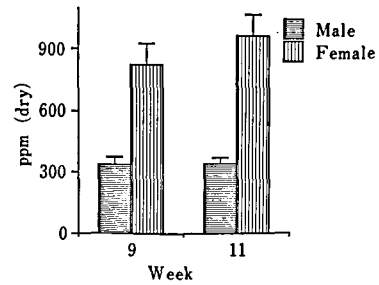


Fig. 1. Fe concentration in liver (T: SD)

脾臓中の必須元素濃度：鉄濃度が雄の場合9週齢で1216 $\mu\text{g/g}$, 11週齢では2245 $\mu\text{g/g}$ を示し, 雌の場合9週齢で2784 $\mu\text{g/g}$, 11週齢で5132 $\mu\text{g/g}$ を示した。雌雄共に9週齢に対して11週齢で1.8倍高い値を示した。9, 11週齢ともに雄に対して雌は2.28倍高い値を示した (Fig. 2)。

以上の結果から肝臓中の鉄, マンガン濃度には週齢差があり, 脾臓中の鉄濃度には性差, 週齢差が認められた以外は9週, 11週齢の臓器中必須元素濃

Table 3. Concentrations of 10 elements in organs of male rats (11 weeks)

Elements	Lung	Liver	Kidney	Spleen
Ca ($\mu\text{g/g}$)	402 \pm 28	122 \pm 8.5	272 \pm 18	154 \pm 4
Cu ($\mu\text{g/g}$)	6.3 \pm 0.2	15.0 \pm 1.0	24 \pm 0.9	4.7 \pm 0.3
Fe ($\mu\text{g/g}$)	429 \pm 67	337 \pm 34	261 \pm 26	2245 \pm 196
K (Wt.%)	1.23 \pm 0.04	1.11 \pm 0.02	1.08 \pm 0.01	1.67 \pm 0.05
Mg ($\mu\text{g/g}$)	601 \pm 11	764 \pm 19	751 \pm 14	831 \pm 25
Mn ($\mu\text{g/g}$)	—	8.5 \pm 0.3	3.8 \pm 0.06	—
Na (Wt.%)	0.53 \pm 0.01	0.15 \pm 0.005	0.44 \pm 0.03	0.21 \pm 0.02
P (Wt.%)	1.92 \pm 0.49	1.24 \pm 0.07	1.18 \pm 0.01	1.45 \pm 0.12
S (Wt.%)	0.51 \pm 0.05	0.80 \pm 0.06	0.89 \pm 0.01	0.81 \pm 0.04
Zn ($\mu\text{g/g}$)	80 \pm 2	110 \pm 4	89 \pm 0.7	79 \pm 2.7

N=5 Data(dry weight) are mean \pm SD —: Not detectable.

Table 4. Concentrations of 10 elements in organs of female rats (9 weeks)

Elements	Lung	Liver	Kidney	Spleen
Ca ($\mu\text{g/g}$)	359 \pm 22	122 \pm 7.4	383 \pm 167	167 \pm 17
Cu ($\mu\text{g/g}$)	6.5 \pm 0.3	17.9 \pm 0.2	26 \pm 2.6	5.4 \pm 0.26
Fe ($\mu\text{g/g}$)	422 \pm 23	819 \pm 42	278 \pm 20	2784 \pm 846
K (Wt.%)	1.26 \pm 0.1	1.19 \pm 0.03	1.05 \pm 0.03	1.72 \pm 0.09
Mg ($\mu\text{g/g}$)	621 \pm 30	837 \pm 32	771 \pm 18	909 \pm 67
Mn ($\mu\text{g/g}$)	—	7.1 \pm 0.51	3.4 \pm 0.12	—
Na (Wt.%)	0.51 \pm 0.03	0.17 \pm 0.01	0.42 \pm 0.01	0.21 \pm 0.004
P (Wt.%)	1.17 \pm 0.04	1.38 \pm 0.09	1.19 \pm 0.03	1.52 \pm 0.13
S (Wt.%)	0.60 \pm 0.14	0.84 \pm 0.020	0.86 \pm 0.005	0.86 \pm 0.05
Zn ($\mu\text{g/g}$)	82 \pm 4	129 \pm 7	99 \pm 5.5	86 \pm 6

N=5 Data(dry weight) are mean \pm SD —: Not detectable.

Table 5. Concentrations of 10 elements in organs of female rats(11 weeks)

Elements	Lung	Liver	Kidney	Spleen
Ca (μ g/g)	418 \pm 25	118 \pm 6.4	297 \pm 48	155 \pm 11
Cu (μ g/g)	6.5 \pm 0.6	18.1 \pm 1.2	30 \pm 6.2	4.7 \pm 0.2
Fe (μ g/g)	396 \pm 59	963 \pm 110	347 \pm 19	5132 \pm 633
K (Wt.%)	1.23 \pm 0.08	1.58 \pm 0.04	1.12 \pm 0.03	1.66 \pm 0.05
Mg (μ g/g)	604 \pm 44	778 \pm 23	783 \pm 21	828 \pm 32
Mn (μ g/g)	—	6.9 \pm 0.7	3.4 \pm 0.09	—
Na (Wt.%)	0.52 \pm 0.06	0.18 \pm 0.007	0.47 \pm 0.05	0.22 \pm 0.01
P (Wt.%)	1.1 \pm 0.1	1.08 \pm 0.54	1.26 \pm 0.05	1.43 \pm 0.12
S (Wt.%)	0.68 \pm 0.11	0.79 \pm 0.02	0.91 \pm 0.02	0.84 \pm 0.05
Zn (μ g/g)	77 \pm 6.1	117 \pm 5.7	103 \pm 1.6	79 \pm 4.2

N=5 Data(dry weight) are mean \pm SD —: Not detectable.

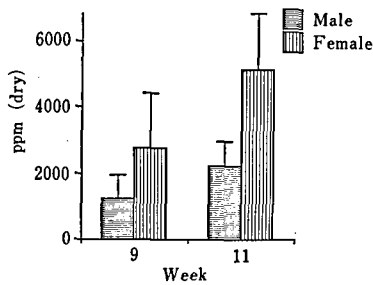


Fig. 2. Fe concentration in spleen (T: SD)

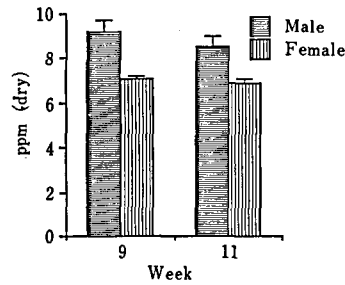


Fig. 3. Mn concentration in liver (T: SD)

Table 6. Concentrations of 10 elements in standard diets (F2)

Elements	Observed value	Elements	Observed value
Ca (μ g/g)	5522 \pm 439	Mn (μ g/g)	88 \pm 27
Cu (μ g/g)	8.9 \pm 0.8	Na (Wt.%)	0.15 \pm 0.01
Fe (μ g/g)	163 \pm 21	P (Wt.%)	0.63 \pm 0.03
K (Wt.%)	0.72 \pm 0.01	S (Wt.%)	0.22 \pm 0.01
Mg (μ g/g)	1910 \pm 48	Zn (μ g/g)	43 \pm 1.1

N=4 Data are mean \pm SD

度は比較的安定している時期のように思われた。

飼料成分中ミネラル量は製造会社によって異なり、しかも生体中の元素濃度は摂取した元素量に左右される³⁾ため参考資料として Table 6 に船橋農場製 F2 の分析結果を示した。

現在そのほかの臓器、週齢について測定中であるので、以後測定終了次第報告する予定である。

文 献

1) 鈴木幸子, 小川幸男, 鎌田栄一, 金子豊蔵, 黒川

雄二: 必須元素のラット臓器内濃度に関する研究 (第一報), 衛生試報, 108, 132~135(1990)

2) Kojima, I., Uchida T. and Iida, C.: Pressurized microwave digestion of biological samples for metal determination. *Analytical Sciences*, 4, 211~214 (1988)

3) J. Leeuwen: The influence of different Ca and P supplies on the vitamin A, Cu and Mn status of young cattle with additional effects of growth and season. *Neth. J. Sci.*, 19, 189~194 (1971)

OECD 反復投与毒性および生殖発生毒性併合試験法 (ReproTox) の有用性に関する研究

戸部満寿夫・田中 悟・川島邦夫・内藤克司・中路幸男
 今井田克己・宇佐見 誠・内田雄幸・鎌田栄一・児玉幸夫
 高田幸一・安原加寿雄・斎藤 実・梅村隆志・小野寺博志
 古川文夫・古田京子・松島裕子・豊田和弘・今沢孝喜
 高橋道人・高仲 正・黒川雄二・林 裕造

A Study on the Usefulness of the OECD Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test (ReproTox)

Masuo Tobe, Satoru Tanaka, Kunio Kawashima, Katsushi Naito,
 Yukio Nakaji, Katsumi Imaida, Makoto Usami, Osayuki Uchida,
 Eiichi Kamata, Yukio Kodama, Koichi Takada, Kazuo Yasuhara,
 Minoru Saito, Takashi Umemura, Hiroshi Onodera, Fumio Furukawa,
 Kyoko Furuta, Yuko Matsushima, Kazuhiro Toyoda, Takayoshi Imazawa,
 Michihito Takahashi, Akira Takanaka, Yuji Kurokawa and Yuzo Hayashi

We studied the usefulness of the OECD combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test (ReproTox) using cyclophosphamide (CP), which is well known for its toxicological properties. CP was given daily by gavage to groups of 12 male and 12 female 8-week-old Sprague-Dawley rats at doses of 0, 2, 3, 4.5 or 6.7 mg/kg.

Significant decreases in body weight and food consumption were observed in males given 6.7 mg/kg and in all treated females. One, 3 and 12 females died during pregnancy in the groups given 3, 4.5 and 6.7 mg/kg, respectively. In males 2 died in the 6.7 mg/kg group. Leukopenia and anemia were evident in treated males. The thymus and spleen weights were significantly decreased in treated rats. Histopathologically, atrophy of the thymus, spleen and bone marrow was observed.

With respect to the reproductive/developmental toxicity, dose-dependent increases in postimplantation loss and postnatal death of pups were found in treated dams. The body weight of pups from treated dams was significantly lowered.

Thus, most of the known toxicological properties of CP regarding systemic toxicity and reproductive/developmental toxicity were clearly demonstrated in this study. Therefore ReproTox can be considered a useful screening test for assessing repeat dose and reproductive/developmental toxicity of existing chemicals of high production volume, although teratogenic potential and adverse effects on spermatogenesis and fertility were not detected under the present experimental conditions.

Key words : ReproTox, Cyclophosphamide, Repeat dose toxicity, Reproductive/developmental toxicity, OECD

(Received May 31, 1991)

近年の著しい科学技術の進歩に伴い、ヒトの生活環境中で使用される化学物質は種類、量ともに急速に増加している。勿論、これらの化学物質はヒト社会の要求に基づいて必要性和目的を持って生産されているものである。しかしながら、これら多種類、多量の化学物質の毒性の評価は必ずしも十分とは言

い難い。特に、既存の一般化学物質については、その毒性は殆ど評価されていないのが現状である。

「化審法」¹⁾によれば、化学物質の毒性は、急性毒性試験、慢性毒性試験、催奇形性試験、がん原性試験、変異原性試験等の毒性試験を実施し、それらの結果に基づいて評価される。しかし、多種類の化学

物質のそれぞれについて、ガイドラインに従った毒性試験を実施することは、多くの人員や日数が必要であり、容易なことではない。

このような現状から、OECDは、1990年に、毒性に関する情報が殆ど認められない高生産量の既存の一般化学物質について、ガイドラインに従った毒性試験を実施するための優先順位を決めることを目的とした反復投与毒性および生殖発生毒性併合試験法 (ReproTox)^{2,3)}を提案した。この試験法は反復投与毒性と生殖発生毒性を同時にスクリーニングするもので、世界的にも新しい試験法である。

そこで我々は、毒性既知の代表的なアルキル化剤であるシクロホスファミドを用い、その毒性がこのReproToxによってどのように検出できるかを調べ、ReproToxの有用性について検討した。なお、提案されたReproToxの原文をAppendixとして文末に掲載したが、さらに改正される可能性がある。

実験材料および方法

1) 動物および飼育条件

使用した動物はSD系SPFラットの雌雄 (Slc:SD, 日本エスエルシー)で、7週齢で購入し、1週間順化飼育した後、一般状態に異常が認められず体重増加が良好なものを8週齢で実験に供した。1群の匹数は雌雄それぞれ12匹とした。雄はベルト式飼育機用ステンレス製金網ケージに1匹ずつ収容した。雌はホワイトチップを入れた柵型架台用ポリカーボネートケージに1匹ずつ収容した。固形飼料 (CRF-1:オリエンタル酵母) および水道水は自由に摂取させた。動物飼育室は温度 $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度30~70%、換気回数16回/時間、照明時間午前6時~午後6時とした。

2) シクロホスファミド (CP)

CPは塩野義製薬の製品 (Lot No. 099007; 純度99.93%)を用いた。投与にあたっては、注射用蒸留水 (日本薬局方、大塚製薬; Lot No. KOF73)を用い、0.355%溶液を用時調整した。投与液中のCPは、室温に24時間放置した場合の残存率は97.9%で、用時調整すれば毎日の投与終了時まで安定であることを確認した。

3) 投与量および投与方法

投与量はCPの毒性に関する文献^{4,5)}を参考に設定した。すなわち、体重増加抑制、白血球数の減少、胚の着床後喪失、胎児の発育障害等が発現すると考えられる6.7 mg/kgを最高用量とし、以下

公比1.5で除し、4.5、3および2 mg/kgの4段階とした。別に注射用蒸留水のみを投与する対照群を設けた。CPは毎日1回午前中に強制経口投与した。

4) 投与期間

雄の投与期間は交配前14日から交配期間を通して42日あるいは43日間 (半数ずつ)とした。雌の投与期間は交配前14日間、交配期間、妊娠期間を通して哺育3日までとした。

5) 交配方法

交配は投与14日から同群内で無作為に組合わせた雌雄を1対1で一夜同居させて行い、翌朝膣垢を採取して交尾の有無を調べた。膣垢中に精子が観察された日を妊娠0日とした。交尾が成立しなかった雌雄は交尾が成立するまで最長14日間毎日同じ組合せで交配を繰り返した。

6) 観察方法

a) 一般状態, 体重, 摂餌量

一般状態は、被毛や呼吸の状態、動き、流涙、流涎、下痢、痙攣、死亡などについて毎日観察した。体重は、雄では交配前、交配期間を通して試験終了まで毎週1回測定した。雌については交配前および交配期間中は週1回測定し、妊娠期間中は妊娠0, 7, 14, 21日、哺育期間中は哺育0日、4日にそれぞれ測定した。摂餌量は、交配期間中を除き、雌雄とも体重測定日に測定した。

b) 分娩および哺育

分娩は分娩予定日から分娩が確認されるまで最長4日間、毎日頻回に観察した。分娩が確認された雌については、哺育0日および4日に出産児の総数、生児数、死亡児数、性別、外表異常について調べ、体重を測定した。

c) 剖検および器官重量

雄は最終投与翌日 (43日あるいは44日)に体重を測定し、採血したのち剖検した。器官重量は胸腺、肝臓、腎臓、脾臓、精巣、精巣上体について測定した。雌は哺育4日に体重を測定したのち剖検し、妊娠黄体数、着床数を調べるとともに、胸腺、肝臓、腎臓、脾臓および卵巣の重量を測定した。新生児は哺育4日に体重を測定したのち剖検し、内部器官の異常の有無を調べた。

d) 血液学および血清生化学的検査

血液および血清生化学的検査は雄についてのみ行った。ラットは採血前一夜絶食させ、血液は腹大動脈より10 ml容注射筒を用いて採取した。

血液学的検査: 血液0.02 mlを取り、希釈液 (セ

ルバック 30 L, 東亜医用電子) で 500 倍に希釈し, 赤血球数 (RBC), ヘモグロビン量 (Hb), ヘマトクリット値 (PCV), 平均赤血球容積 (MCV), 平均赤血球血色素量 (MCH) および白血球数 (WBC) を Sysmex M-2000 (東亜医用電子) を用いて測定した。白血球百分比および赤芽球数 (Ebl) は, 血液 150 μ l を 5% EDTA 50 μ l を入れたマイクロ遠心チューブに取り, 混和したのち, 全量をスライドガラス上に滴下し OMURON MICROX SPINNER (立石電気) で 2 秒間スピンスさせ乾燥後, ライト染色を施してマイクロロック A 型 (立石電気) を用いて測定した。

血清生化学的検査: 血液約 8 ml を凝固促進剤および血清分離剤入り遠心チューブ (インセパック 9 ml 容; 積水化学) に取り, 約 10 分間室温に放置し, 氷冷後, 遠心分離 (3000 r.p.m., 10 分間) して得た血清について, 総蛋白 (TP), アルブミン, 尿素窒素 (BUN), クレアチニン, 血糖, 遊離脂肪酸, 磷脂質, 中性脂肪, 総コレステロール, 遊離コレステロール, 総ビリルビン, アルカリ性フォスファターゼ (AIP), グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ, グルタミン酸ピルピリン酸トランスアミナーゼ, コリンエステラーゼ, γ -グルタミルトランスペプチダーゼ, カルシウム, 無機リン, カリウムおよび塩素を自動分析装置 (7150 型; 日立製作所) を用いて測定した。

e) 病理組織学的検査

雌雄について, 脳, 心臓, 肝臓, 腎臓, 副腎, 脾臓および骨髄 (胸骨) は 10% 中性緩衝ホルマリン液で, 精巣, 精巣上体および卵巣はブアン液でそれぞれ固定し, パラフィン包埋後, 薄切, ヘマトキシリン・エオジン染色を施して病理組織学的検査を行った。

7) 統計学的解析⁶⁾

親の体重と摂餌量, 血液学的検査成績, 血清生化学的検査成績, 器官重量および新生児体重について

は, Bartlett の等分散の検定を行い, 等分散の場合は一元配置分散分析を行った。一元配置分散分析に差があり, 各群の例数が等しい場合は Dunnett の方法を用い, 例数が異なる場合は Scheffe の方法を用いてそれぞれ有意性の検定を行った。不等分散の場合は, Kruskal-Wallis の検定を行った。Kruskal-Wallis の検定に差があり, 各群の例数が等しい場合は Dunnett の方法を用い, 例数が異なる場合は Scheffe の方法を用いてそれぞれ有意性の検定を行った。黄体数, 着床数, 着床率, 新生児数, 出生率および新生児生存率については Kruskal-Wallis の検定を行い, 差がある場合は Scheffe の方法を用いて有意性の検定を行った。死亡率, 交尾率, 妊娠率および出産率については χ^2 検定を用いて有意性の検定を行った。なお, 新生児の体重については母体を標本単位とした。

成 績

1. 反復投与毒性

1) 一般状態および死亡

一般状態について, 雌雄とも対照群および CP の 4.5 mg/kg 以下では特に変化は認められなかった。6.7 mg/kg 群では投与 4 週目頃より動作が緩慢になり, 粗毛が目立ち, 消瘦が認められた。

死亡については Table 1 に示した。雄では, 6.7 mg/kg 群においてのみ投与 33 日と 42 日にそれぞれ 1 例が死亡した。一方, 雌では 3 mg/kg 群で投与 41 日 (妊娠 18 日) に 1 例, 4.5 mg/kg 群で投与 33, 36 および 42 日 (妊娠 18, 19 および 26 日) にそれぞれ 1 例が死亡した。6.7 mg/kg 群では投与 30 日より 45 日 (妊娠 15 日より 24 日) の間に全例 (12 例) が死亡した。そのうち, 6 例は妊娠期間中に死亡し, 残りの 6 例は分娩予定日後 3 日以内に分娩することなく死亡した。6.7 mg/kg 群の死亡し

Table 1. Mortality of rats treated with cyclophosphamide

Dose (mg/kg/day)	Male					female				
	0	2	3	4.5	6.7	0	2	3	4.5	6.7
No. of rats examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
No. of dead rats	0	0	0	0	2	0	0	1	3	12
Mortality (%)	0	0	0	0	16.7	0	0	8.1	25.0	100

た12例のうち11例は妊娠していたが、1例は不妊であった。

死亡ラットの剖検所見では、雄の6.7 mg/kg群で胸線の萎縮が認められた。雌では3 mg/kg以上で肝臓の肥大が認められ、さらに6.7 mg/kg群では胸腺と脾臓の萎縮および副腎の肥大が認められた。

2) 体重および摂餌量

体重について、雄では6.7 mg/kg群のみ有意な増加抑制が認められた。雌では全CP群において用量依存的で有意な増加抑制が認められた。摂餌量については、雄では6.7 mg/kg群のみ、雌では4.5 mg/kg以上で有意な低値が認められた。なお、雌の妊娠期間中に観察された体重増加の抑制は、分娩後の体重には有意差が認められなかったことから、CPの投与によって胚・胎児が死亡したために、胎児の順調な発育にともなう体重増加が認められなかったものと考えられた。

3) 血液学的検査(雄)

血液検査の成績はTable 2に示した。対照群に比べて、RBCの有意な減少とMCVおよびMCHの有意な増加が6.7 mg/kg群で認められた。Eblの有意な増加が4.5 mg/kg以上で認められた。さらに、WBCの用量依存的で有意な減少が3 mg/kg

以上で認められた。また、白血球百分比では4.5 mg/kg以上で分葉核好中球の有意な増加およびリンパ球の有意な減少が用量依存的に認められた。なお、WBCの減少は、白血球百分比の検査成績から、主にリンパ球の減少に起因したものと考えられた。

4) 血清生化学的検査(雄)

AIPの有意な減少が3 mg/kg以上で用量依存的に認められた。また、TPの有意な減少およびBUNの有意な増加が6.7 mg/kg群で認められた。

5) 剖検所見

CPを投与した雄では、胸腺の萎縮、肝臓の鬱血およびリンパ節の肥大が認められた。雌では胸腺の萎縮、肺の鬱血および副腎の肥大が認められた。

6) 器官重量

雄では胸腺および脾臓の実重量の有意な減少が4.5 mg/kg以上で用量依存的に認められた。比重量でも胸腺は6.7 mg/kg群で、脾臓は4.5 mg/kg以上でともに有意な減少を示した(Table 3)。雌では、胸腺重量の有意な減少は認められなかったが、脾臓では実重量および比重量とも有意な減少が全CP群(6.7 mg/kg群は全例死亡)で認められた(Table 4)。

Table 2. Hematological findings for male rats treated with cyclophosphamide

Dose(mg/kg/day)	0	2	3	4.5	6.7
No. of rats examined	12	12	12	12	10
RBC ($10^{12}/l$)	9.88 ± 0.43 ^{a)}	9.52 ± 0.41	9.28 ± 0.96	9.27 ± 0.38	8.65 ± 0.91 ^{**}
Hb (g/dl)	16.3 ± 0.8	15.8 ± 0.6	15.7 ± 1.3	15.8 ± 0.7	15.2 ± 1.1
PCV (%)	51.5 ± 2.6	49.5 ± 1.6	49.3 ± 4.2	49.6 ± 1.9	47.5 ± 3.5
MCV (fl)	52.1 ± 1.4	52.1 ± 1.7	53.2 ± 1.5	53.5 ± 1.2	55.1 ± 2.4 ^{**}
MCH (pg)	16.5 ± 0.5	16.7 ± 0.7	16.9 ± 0.6	17.1 ± 0.4	17.6 ± 0.8 ^{**}
Ebl (count/200WBC)	0.4 ± 0.8	0.8 ± 1.0	0.9 ± 1.0	2.6 ± 1.7 [*]	13.5 ± 18.5 ^{**}
WBC ($10^9/l$)	8.21 ± 1.68	5.08 ± 0.85	4.40 ± 1.27 [*]	2.87 ± 0.44 ^{**}	2.46 ± 1.21 ^{**}
Differential cell count(%)					
Neuto-B	1.9 ± 0.8	1.3 ± 0.7	1.5 ± 1.4	2.6 ± 1.1	2.7 ± 2.0
Neuto-S	16.6 ± 6.6	20.9 ± 7.5	26.5 ± 8.4	48.6 ± 16.0 ^{**}	67.9 ± 16.7 ^{**}
Eosino	2.1 ± 1.3	3.2 ± 2.0	2.2 ± 1.3	4.4 ± 2.1	3.9 ± 2.3
Baso	0	0	0	0	0
Lympho	79.7 ± 7.4	73.9 ± 7.2	68.5 ± 9.9	43.4 ± 17.0 ^{**}	24.9 ± 15.7 ^{**}
Mono	0.4 ± 0.7	0.8 ± 0.7	1.3 ± 1.1	0.9 ± 1.0	0.6 ± 0.9

a): The results are given as mean ± S.D. data.

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

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

Table 3. Absolute and relative organ weights for male rats treated with cyclophosphamide

Dose (mg/kg/day)	0	2	3	4.5	6.7
No. of rats examined	12	12	12	12	10
Body weight (g)	421±28 ^{a)}	423±29	412±30	394±31	349±32 ^{**}
Absolute organ weight					
Thymus (g)	0.42±0.08	0.39±0.09	0.38±0.09	0.29±0.09*	0.17±0.07 ^{**}
Liver (g)	11.83±1.17	11.95±1.38	11.87±1.53	10.97±1.43	9.90±1.79
Kidney (g)	2.69±0.23	2.67±0.28	2.72±0.27	2.54±0.27	2.39±0.37
Spleen (g)	0.71±0.08	0.59±0.07	0.57±0.08	0.48±0.05 ^{**}	0.47±0.13 ^{**}
Adrenal (mg)	69.3±8.0	69.3±12.8	70.0±9.3	64.3±9.1	67.8±7.2
Testis (g)	3.47±0.43	3.32±0.22	3.30±0.16	3.27±0.23	3.18±0.23
Epididymis (g)	1.22±0.09	1.19±0.11	1.19±0.11	1.15±0.08	1.09±0.15
Relative organ weight					
Thymus (g/100g B.W.)	0.10±0.02	0.09±0.02	0.09±0.02	0.08±0.02	0.05±0.02 ^{**}
Liver (g/100g B.W.)	2.81±0.16	2.82±0.24	2.88±0.28	2.78±0.17	2.82±0.28
Kidney (g/100g B.W.)	0.64±0.03	0.63±0.06	0.66±0.05	0.64±0.04	0.68±0.06
Spleen (g/100g B.W.)	0.17±0.02	0.14±0.01	0.14±0.02	0.12±0.01 ^{**}	0.14±0.03*
Adrenal (mg/100g B.W.)	16.6±2.6	16.4±2.7	17.1±2.4	16.4±2.3	19.6±2.4
Testis (g/100g B.W.)	0.83±0.12	0.79±0.07	0.80±0.06	0.83±0.08	0.92±0.07
Epididymis (g/100g B.W.)	0.29±0.02	0.28±0.02	0.29±0.03	0.29±0.03	0.31±0.04

^{a)}: The results are given as mean±S.D. data.

*: Significantly different from control value at P<0.05.

** : Significantly different from control value at P<0.01.

Table 4. Absolute and relative organ weights for pregnant female rats treated with cyclophosphamide

Dose (mg/kg/day)	0	2	3	4.5	6.7
No. of rats examined	12	12	11	8 ^{b)}	0
Body weight (g)	280±14 ^{a)}	278±13	281±16	266±20	—
Absolute organ weight					
Thymus (g)	0.27±0.04	0.28±0.05	0.27±0.05	0.27±0.09	—
Liver (g)	10.82±0.83	10.52±1.27	10.80±0.94	10.06±1.64	—
Kidney (g)	1.68±0.12	1.69±0.16	1.70±0.06	1.75±0.15	—
Spleen (g)	0.64±0.06	0.44±0.04 ^{**}	0.45±0.07 ^{**}	0.43±0.08 ^{**}	—
Adrenal (mg)	71.7±9.2	75.2±9.1	74.8±12.2	77.1±15.3	—
Ovary (mg)	106.1±16.7	112.7±15.1	117.1±19.0	113.8±17.6	—
Relative organ weight					
Thymus (g/100g B.W.)	0.10±0.01	0.10±0.01	0.10±0.02	0.10±0.03	—
Liver (g/100g B.W.)	3.87±0.30	3.79±0.39	3.82±0.27	3.79±0.58	—
Kidney (g/100g B.W.)	0.60±0.04	0.61±0.06	0.60±0.02	0.66±0.05*	—
Spleen (g/100g B.W.)	0.23±0.02	0.16±0.01 ^{**}	0.16±0.03 ^{**}	0.16±0.03 ^{**}	—
Adrenal (mg/100g B.W.)	25.6±3.6	27.1±3.6	26.4±4.0	29.4±7.2	—
Ovary (mg/100g B.W.)	38.0±6.6	40.6±5.3	41.5±6.6	43.1±7.7	—

^{a)}: The results are given as mean±S.D. data.

^{b)}: The results for one non-pregnant female omitted from the data.

*: Significantly different from control value at P<0.05.

** : Significantly different from control value at P<0.01.

7) 病理組織学的検査

Table 5に示した通り、脾臓の変化としては白脾髄の萎縮と辺縁帯の細胞の減少が雌雄とも全CP群で認められ、特に、雄の4.5 mg/kg以上では萎縮が高頻度で認められ、その程度も強いものが多かった。骨髄の変化は、雌雄ともに3 mg/kg以上で造血細胞、特に顆粒球系造血細胞の減少が認められた。さらに、胸腺の萎縮、特に胸腺皮質の萎縮が雄の4.5 mg/kg以上で認められ、6.7 mg/kg群が著しかった。また、雌の4.5 mg/kg群で萎縮が1例認められた。その他、肝臓では肝細胞の巣状壊死が、腎臓、副腎および心臓では鬱血が認められた。なお、途中死亡ラットの検査でも、主な変化は屠殺ラットに認められた変化と同様で、骨髄、脾臓、胸腺の萎縮であり、それらの程度は強いものが多かった。

2. 生殖発生毒性

1) 交尾および受胎能

Table 6に示した通り、交尾は対照群およびCP各群とも、全例に成立した。受胎は対照群、CPの2および3 mg/kg群では交尾雌12例すべてに成立し、4.5および6.7 mg/kg群でも12例中11例に成立した。交尾能および受胎能に対するCPの影響は認められなかった。

2) 妊娠

黄体数および着床数ではいずれのCP群も有意差を示さなかったが、着床率については4.5 mg/kg群で有意な低下が認められた (Table 7)。

3) 分娩および哺育

分娩および哺育に関する成績はTable 8に示した。2 mg/kg群ではいずれの指標においても有意

Table 5. Summary of histopathological findings for rats treated with cyclophosphamide

Dose(mg/kg/day)	Male					Pregnant female				
	0	2	3	4.5	6.7	0	2	3	4.5	6.7
No. of rats examined	12	12	12	12	10(2) ^{a)}	12	12	11(1)	8 ^{b)} (3)	0(11)
Spleen										
atrophy of white pulp	0	4	4	7	10(2)	0	2	1(1)	7(3)	0(11)
Bone marrow										
decrease in granulopoiesis	0	0	4	6	10(2)	0	0	5(1)	7(2)	0(11)
Thymus										
atrophy of cortex	0	0	0	5	8(2)	0	0	0(1)	1(3)	0(9)
Liver										
focal necrosis	0	0	0	0	2(2)	0	0	0(1)	1(2)	0(6)
Kidney										
congestion	0	0	0	0	1(1)	0	0	0(0)	1(1)	0(0)
Adrenal gland										
congestion	0	0	0	0	0(1)	0	0	0(0)	0(0)	0(0)

^{a)}: The numerals in parentheses denote numbers of dead animals.

^{b)}: The results for one non-pregnant rat omitted from the data.

Table 6. Fertility data for rats treated with cyclophosphamide

Dose(mg/kg/day)	0	2	3	4.5	6.7
No. of mated pairs	12	12	12	12	12
No. of copulated pairs	12	12	12	12	12
Copulation index(%) ^{a)}	100	100	100	100	100
No. of pregnant pairs	12	12	12	11	11
Fertility index(%) ^{b)}	100	100	100	91.7	91.7

^{a)}: Copulation index: (No. of copulated pairs/No. of pairs) × 100.

^{b)}: Fertility index: (No. of pregnant pairs/No. of copulated pairs) × 100.

Table 7. Pregnancy data for rats treated with cyclophosphamide

Dose(mg/kg/day)	0	2	3	4.5	6.7
No. of pregnant females examined	12	12	12	11	11
No. of pregnant females survived	12	12	11	8	0
Survival index(%) ^{a)}	100	100	91.7	72.7	0
No. of corpora lutea					
Mean±S.D.	15.3±2.5	15.4±2.5	17.9±2.5	18.4±3.6	—
No. of implantation sites					
Mean±S.D.	13.8±1.9	14.3±1.8	15.5±2.2	12.5±3.2	—
Implantation index(%) ^{b)}	90.6	93.9	87.2	69.0*	—

^{a)}: Survival index: (No. of pregnant females survived/No. of pregnant females examined)×100.

^{b)}: Implantation index: (No. of implantation sites/No. of corpora lutea)×100.

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

Table 8. Litter data for rats treated with cyclophosphamide

Dose(mg/kg/day)	0	2	3	4.5	6.7
No. of pregnant females survived	12	12	11	8	0
No. of dams with pups born	12	12	11	3	—
No. of dams with pups alive	12	12	10	2	—
Gestation index(%) ^{a)}	100	100	90.9	25.0*	—
No. of pups alive on day 0					
Mean±S.D.	12.4±2.4	9.4±3.1	7.5±2.9*	2.0±2.0**	—
Live birth index(%) ^{b)}	98.8	99.4	91.8	44.5**	—
No. of pups alive on day 4					
Mean±S.D.	12.2±2.4	8.8±3.4	6.0±3.5**	1.0±1.4*	—
Viability index on day 4(%) ^{c)}	98.1	86.9	76.3*	25.0*	—

^{a)}: Gestation index: (No. of dams with pups alive/No. of pregnant females survived)×100.

^{b)}: Live birth index: (No. of pups alive on day 0/No. of pups born)×100.

^{c)}: Viability index on day 4: (No. of pups alive on day 4/No. of pups alive on day 0)×100.

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

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

な変化は認められなかった。3 mg/kg 群では出生児数、4 日生存児数および 4 日生存率の有意な低下が認められた。4.5 mg/kg 群では妊娠率、出生児数、生児分娩率、4 日生存児数および 4 日生存率の有意な低下が認められた。なお、分娩予定日を過ぎても分娩しなかった 5 例の妊娠ラットについては、分娩予定日の 4 日後に解剖して子宮の状態を観察した結果、すべての胚が着床後の早期に死亡していることが確認された。また、妊娠期間中に死亡した妊娠ラットにおいても同様に着床後早期の胚死亡の所見が観察され、CP による胎生期死亡が認められた。

3. 新生児の体重および形態

CP 各群において 0 日齢新生児の体重の有意な低

下が認められた。4 日齢新生児の体重には有意差は認められなかった。対照群および CP 各群ともに外表異常あるいは内部器官の異常を有した新生児は 1 例も認められなかった (Table 9)。

考 察

CP の反復投与毒性としては、白血球および赤血球数の減少^{7,8)}、AIP および TP の減少⁷⁾、BUN の増加^{7,8)} および精巣、脾臓、胸腺重量の減少⁷⁾ が報告されている。また、病理組織学的検査で、脾臓、胸腺および骨髄の萎縮⁷⁾ および精子形成の障害^{9,10)} が報告されている。本実験においては、これらの毒性のうち精巣重量の減少と精子形成の障害は検出さ

Table 9. Body weights and morphology data for pups from rats treated with cyclophosphamide

Dose(mg/kg/day)	0	2	3	4.5	6.7
No. of dams with pups alive	12	12	10	2	—
Body weight of pups alive (g)					
On day 0 (Mean±S.D.)	5.8±0.3	4.9±0.7**	4.6±0.6**	2.9±0.5**	—
On day 4 (Mean±S.D.) Male	9.4±0.8	8.8±1.1	8.2±1.6	5.2±0.0	—
Female	9.0±0.9	8.5±1.4	8.0±1.0	—	—
No. of pups with external malformation	0	0	0	0	—
No. of pups with visceral malformation	0	0	0	0	—

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

れなかったが、その他の毒性は全て検出された。

また、CPの生殖発生毒性としては、受胎能の障害¹¹⁾、着床の障害^{4,5,10)}、胚・胎児の死亡^{4,5,10)}、胎児の発育抑制¹²⁾、奇形発現^{4,13-19)}が報告されている。本実験では、これらの毒性のうち催奇形性は検出されなかったが、その他の毒性はすべて検出された。

すなわち、CPについて既に報告されている反復投与毒性および生殖発生毒性の殆どのもが本実験において検出されたことは、ReproToxのスクリーニング試験法としての有用性を示唆したものと考えられる。

一方、本実験ではCPによる受胎能への悪影響および奇形の発現は検出されなかった。また、精巣および精巣上体の病理組織学的検査においても精子形成に対する影響は検出されなかった。CPは、50~100 mg/kgをマウスに単回腹腔内投与した場合、精巣重量が低下し、乏精子症を誘発することが報告されている^{9,20)}。また、飼料に添加して3 mg/kgをラットに交配前56日間投与した場合、受胎率が低下することが報告されている¹¹⁾。これらの実験に比べて、ReproToxに従った本実験の最高用量は6.7 mg/kgと少なく、また交配前の投与期間は14日間と短い。すなわち、本実験においてCPの受胎能や精子形成に対する悪影響が検出されなかったのは、CPの1回用量および交配前投与期間がこれらの障害発現量および障害発現期間に達していなかったものと考えられる。

CPの催奇形性については、ラットに10~30 mg/kgを妊娠5~16日のいずれかの日に単回腹腔内投与した実験^{13,14)}、マウスに50および100 mg/kgを妊娠11日から14日まで毎日腹腔内投与した

実験¹⁹⁾、ウサギに30 mg/kgを妊娠6~14日のいずれかの日に単回静脈内投与した実験¹⁵⁾において、奇形の発現が認められている。しかし、これらの実験はいずれも、ReproToxが求めている経口投与と比較して、吸収が良いと考えられる腹腔内あるいは静脈内投与により、しかも、かなりの量が奇形発現の臨界期(器官形成期)に集中して投与されている。これらのことから、本実験において奇形発現が検出されなかった原因の一つとして、ReproToxはラットの交配前から交配期間および妊娠期間を通して哺育3日までの長い期間の投与を求めているため、奇形発現の臨界期における1回用量が奇形発現量に達していなかったことが考えられる。また、もう一つの原因として、今回の実験の高用量では高頻度の胎生期死亡が認められたことから、妊娠の初期に胚が死亡したために、その後の臨界期における投与によって発現すべき奇形が発現し得なかったことが考えられる。

以上、CPについて既に報告されている反復投与毒性および生殖発生毒性の殆どのもが本実験で検出され、ReproToxは高生産量の既存の化学物質の反復投与毒性および生殖発生毒性のスクリーニング試験法として有用であると結論された。

謝辞：CPの提供をいただいた塩野義製薬(株)ならびにCPの純度および安定性を確認していただいた当所薬品部に感謝する。なお、本研究は平成2年度環境保全総合調査研究促進調査費によって実施された。

文 献

- 1) 厚生省生活化学安全対策室：“化審法毒性試

- 験法の解説”，化学工業日報社，p.160～173 (1987)
- 2) OECD guideline for testing of chemicals: Extended Steering Group Document. No.3 (1990)
 - 3) 黒川雄二：OECD の既存化学物質総点検事業・反復投与毒性及び生殖発生毒性試験法，医学のあゆみ，**156**，732 (1991)
 - 4) Trasler, J. M., Hales, B. F. and Robaire, B.: A time course study of chronic paternal cyclophosphamide treatment in rat; Effects of pregnancy outcome and the male reproductive and hematologic systems. *Biol. Reprod.*, **37**, 317～326 (1987)
 - 5) Trasler, J. M., Hales, B. F. and Robaire, B.: Paternal cyclophosphamide treatment of rats causes fetal loss and malformations without affecting male fertility. *Nature*, **316**, 144～146 (1985)
 - 6) 白須泰彦，吐山豊秋：“新毒性試験法—方法と評価”，リアライズ社，p.131 (1985)
 - 7) 村岡義博，矢原 功，伊東文男，奈良 博，渡辺弘，石川路夫，原田善雄：Ifosfamide (Z4942) のラットにおける亜慢性ならびに慢性毒性試験。基礎と臨床，**16**，432～461 (1982)
 - 8) Wheeler, A. G., Dansby, D., Hawkins, H. C., Payne, H. G. and Weikel, J. H. Jr.: A toxicologic and hematologic evaluation of cyclophosphamide (Cytosan) in experimental animals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **4**, 324～343 (1962)
 - 9) Lu, C. C. and Meistrich, M. L.: Cytotoxic effects of chemotherapeutic drugs on mouse testis cell. *Cancer Res.*, **39**, 3575～3582 (1979)
 - 10) Trasler, J. M., Hales, B. F. and Robaire, B.: Chronic low dose cyclophosphamide treatment of adult male rats; Effect on fertility, pregnancy outcome and progeny. *Biol. Reprod.*, **34**, 275～283 (1986)
 - 11) Botta, J. A. Jr., Hawkins, H. C. and Weikel, J. H. Jr.: Effects of cyclophosphamide on fertility and general reproductive performance of rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **27**, 602～611 (1974)
 - 12) Vogel, R. and Spielmann, H.: Beneficial effects of ascorbic acid on preimplantation mouse embryos after exposure to cyclophosphamide in vivo. *Teratogenesis, Carcinog. Mutagen.*, **9**, 51～59 (1989)
 - 13) Chaube, S., Kury, G. and Murphy, M. L.: Teratogenic effects of cyclophosphamide (NSC-26271) in the rat. *Cancer Chemother. Rep.*, **51**, 363～376 (1967)
 - 14) Ashby, R., Davis, L., Dewhurst, B. B., Espinal, R. Penn, R. N. and Upshall, D. G.: Aspects of the teratology of cyclophosphamide (NSC-26271). *Cancer Treat. Rep.*, **60**, 477～482 (1976)
 - 15) Fritz, H. and Hess, R.: Effects of cyclophosphamide on embryonic development in the rabbit. *Agents Actions*, **2**, 83～86 (1971)
 - 16) Greenberg, L. H. and Tanaka, K. R.: Congenital anomalies probably induced by cyclophosphamide. *J. A. M. A.*, **188**, 423～426 (1964)
 - 17) Kirshon, B., Wasserstrum, N., Willis, R., Herman, G. E. and McCabe, E. R. B.: Teratogenic effects of first trimester cyclophosphamide therapy. *Obstet. Gynecol.*, **72**, 462～464 (1988)
 - 18) Mirkes, P. E.: Cyclophosphamide Teratogenesis. *Teratogenesis, Carcinog. Mutagen.*, **5**, 75～88 (1985)
 - 19) Shogi, R. and Ohzu, E.: Effect of endoxan on developing mouse embryos. *J. Fac. Sc. Hokkaido Univ. (Ser VI)*, **15**, 662～665 (1965)
 - 20) Pacchierotti, F., Bellicampi, D. and Civitareale, D.: Cytogenetic observations, in mouse secondary spermatocytes, on numerical and structural chromosome aberrations induced by cyclophosphamide in various stages of spermatogenesis. *Mutat. Res.*, **119**, 177～183 (1983)

Appendix: OECD Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test Guideline

Combined Repeat dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test

FOREWORD

1. This screening test guideline is intended to be used in assessing toxicological properties of existing chemicals of high production volume within OECD Member countries and for which little or no toxicological information is available.
2. A "screening test" is, by definition, limited in scope compared to a conventional test guideline. Data from a screening test indicating possible toxic potential of a test substance identify that substance as one of high priority for further evaluation. Negative (or no) data do not indicate safety with respect to a particular endpoint but only that the substance does not have high priority for further testing. An estimate of possible human risk can only be made following further studies which confirm and extend the observations made using this screening test.

INTRODUCTION

3. This screening test guideline is designed to generate limited information concerning toxic effects on animals of both sexes of repeated dosing with a test substance, and also effects of the substance on male and female reproductive performance such as gonadal function, mating behaviour, conception and parturition.
4. Although the dosing period is longer than in a conventional 28-day repeated dose study, this test uses fewer animals of each sex per group and there is no measurement of haematological or clinical chemistry parameters (and only limited histopathology) in the females.
5. This guideline assumes that no data from repeated dose toxicity studies are available. It also assumes oral administration of the test substance. Modifications may be required if other routes of exposure are used.

Users of this Test Guideline should consult the Preface, in particular paragraphs 3, 4, 7 and 8.

Combined Repeat dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening TestLimitations of the Method

6. This test does not provide complete information on all aspects of toxicity or of development. In particular, it offers no means of detecting delayed manifestations of prenatal exposure or effects that may be induced during postnatal exposure. Due (amongst other reasons) to the small numbers of animals in the dose groups, the selectivity of the end points, and the short duration of the study, the method will not provide evidence for claims of no effects.

PRINCIPLE OF THE METHOD

7. The test substance is administered in graduated doses to several groups of males and females. Males should be dosed during two weeks before mating which is considered sufficiently long to enable detection of the majority of effects on male fertility and spermiogenesis.
8. Females of the parental generation should be dosed for two weeks (with the objective of covering at least two complete oestrous cycles) in order to elicit any adverse effects on oestrus by the test substance. The animals are then mated. The test substance is administered to both sexes throughout the mating period and pregnancy and up to day 4 of lactation when all animals, including offspring, are killed.
9. Maximum duration of the study following acclimatisation is 52 days, (14 days pre-mating, (up to) 14 days mating, 20 days gestation, 4 days lactation).

DESCRIPTION OF THE TEST PROCEDUREPreparation

10. Healthy young adult animals are randomised and assigned to the treatment groups. The animals are kept in cages for at least five days to allow for acclimatisation. It is recommended that the test substance be administered orally. Other routes of administration are also acceptable. All animals should be dosed by the same method during the appropriate experimental period. If any vehicle or other additive is used to facilitate dosing, it should be known not to produce toxic effects. Dosing should be on a seven-day per week basis.

Combined Repeat dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test

Experimental Animals

Selection of Species

11. This Test Guideline is designed for use with the rat. If other species are used, appropriate modifications will be necessary. Strains with low fecundity should not be used. Healthy animals, not subjected to previous experimental procedures, should be used. Females should be nulliparous and non-pregnant. The test animals should be characterised as to species, strain, sex, weight and/or age.

Number and Sex

12. Each test and control group should contain a sufficient number of animals to yield about 8 pregnant females at near term in the absence of an adverse reproductive effect. The objective is to produce enough pregnancies and offspring to assure a meaningful evaluation of the potential of the substance to affect fertility, pregnancy and maternal behaviour and suckling, growth and development of the F₁ offspring from conception to day 4 of lactation.

Housing and Feeding Conditions

13. The temperature in the experimental animal room should be 22°C (\pm 3°) and the relative humidity 30 to 70 per cent. When the lighting is artificial the sequence should be 12 hours light, 12 hours dark. For feeding, conventional laboratory diets may be used with an unlimited supply of drinking water. Pregnant females should be caged individually and may be provided with nesting materials.

Test Conditions

Dose Levels

14. At least three treatment groups and a control group should be used. If a vehicle is used in administering the test substance, the control group should receive the vehicle in the highest volume used. The highest dose level should

Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test

induce toxicity but not mortality in the parental animals. The intermediate and low dose levels should be selected so that a meaningful evaluation of dose-response could be determined. Dose levels may be based on information from acute toxicity tests or on results of a short range-finding study.

When administered by gavage the dose given to each animal should be based on the individual animal's body weight and adjusted weekly for changes in body weight.

Limit Test

15. If a test at a dose level of at least 1000 mg/kg produces no observed toxic effects and produces no evidence of interference with reproductive performance, studies at other dose levels may not be considered necessary.

PERFORMANCE OF THE TESTExperimental Schedules

16. Dosing of both sexes should begin 2 weeks prior to mating, after they have been acclimatised for at least five days. Mating should begin as soon as the animals have attained full reproductive competence. This may vary slightly for different rats in different laboratories, e.g. Sprague Dawley rats 10 weeks of age, Wistar rats about 12 weeks of age. Dosing is continued in both sexes during the mating period. Males should continue to be dosed and should be retained for the possible conduction of a second mating and should be killed during the period when females are killed (dosing days 41-50).
17. Daily dosing of the parental females should continue throughout pregnancy and up to day 4 of lactation.
18. Consideration should be given to modifications in the dosing schedule based on available information on the test substance, such as induction of its metabolism or bioaccumulation.

Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test

Mating Procedure

19. 1:1 (one male to one female) matings should be used in this study.
20. The female should be placed with the same male until pregnancy occurs or two weeks have elapsed. Each morning the females should be examined for the presence of sperm. Day 0 of pregnancy is defined as the day sperm is found.

Litter Size

21. Animals dosed during the study are allowed to litter normally and rear their progeny to day 4 of lactation.

Observations

22. Throughout the test period, each animal should be observed at least once daily. Pertinent behavioural changes, signs of difficult or prolonged parturition and all signs of toxicity, including mortality, should be recorded. Signs of toxicity are to be recorded when observed and should include time of onset, degree and duration. Cageside observations should include changes in skin, fur, eyes and mucous membranes as well as respiratory, circulatory, autonomic and central nervous system functions.
23. During pre-mating and mating periods, food consumption should be measured at least weekly. Optionally, food consumption may be measured during pregnancy. After parturition, and during lactation, food consumption measurements should be made on the same day that litters are weighed. Males and females should be weighed on the first day of dosing and weekly thereafter. These observations should be reported individually for each adult animal.
24. The duration of gestation should be calculated from day 0 of pregnancy. Each litter should be examined as soon as possible after delivery to establish the number and sex of pups, stillbirths, live births and the presence of gross anomalies.

Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test

25. Live pups should be counted and sexed and litters weighed on the morning after birth and on day 4. Physical or behavioural abnormalities observed in the dams or offspring should be recorded.

CLINICAL EXAMINATION

26. Haematology, including haematocrit, haemoglobin concentration, erythrocyte count, and total leucocyte count should be investigated in males only at the end of the test period. A fixed blood smear should be prepared for possible evaluation.
27. Selection of clinical chemistry procedures should be based on observed toxicity, data from human exposure if available, and judgement as to plausible mode of action. Possible determinations include Ca, P, Cl, K, fasting glucose, SGPT (ALAT), SGOT (AspaT), ornithine decarboxylase, GGTP, urea nitrogen, albumin, blood creatinine, total bilirubin and total serum protein measurements. Other determinations which may be necessary are: lipids, hormones, acid/base balance, methaemoglobin, and cholinesterase activity. Additional clinical biochemistry may be employed where necessary to extend the investigation of observed effects.
28. Urinalysis is not required on a routine basis, but only when there is an indication based on expected or observed toxicity.
29. If historical baseline data are inadequate, consideration should be given to determination of parameters before dosing commences.

PATHOLOGYGross Necropsy

30. At the time of sacrifice or death during the study the animals should be examined macroscopically for any structural abnormalities or pathological changes, with special attention paid to the organs of the reproductive

Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test

system. Further examination of infertile males or nonpregnant females is encouraged. The number of implantation sites and corpora lutea should be recorded.

Dead pups and pups killed at day 4 should also be examined macroscopically.

31. The liver, kidney, thymus of all animals, and the testes and epididymides of all male parental animals should be weighed.

Histopathology

32. Liver, kidney, adrenals, brain, heart, spleen, target organs, ovaries and testes of all parental animals should be preserved for microscopic examination. Formalin fixation is not acceptable for examination of testes and epididymides. An acceptable method is the use of Bouin's fixative for these tissues embedded in paraffin.
33. Histological examination should be performed on the preserved organs of the highest dose group and the control group. Examinations should be extended to the animals of other dosage groups when changes are seen in the highest dose group. Histological examination of ovaries is optional but should be carried out on any females failing to carry their pregnancy to term.

DATA AND REPORTING

Treatment of Results

34. Data may be summarised in tabular form, showing for each test group the number of animals at the start of the test, the number of animals with lesions (including type of lesion and the percentage showing each type), the number of fertile males, the number of pregnant females and the types of changes.
35. When possible, numerical results should be evaluated by an appropriate statistical method. A generally accepted statistical method should be used; the statistical methods should be selected as a part of the design of the study.

Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening TestEvaluation of Results

36. The findings of this toxicity study should be evaluated in terms of the observed effects, necropsy and microscopic findings. The evaluation will include the relationship between the dose of the test substance and the presence or absence, incidence and severity of effect or abnormalities, including gross lesions, identified target organs, infertility, clinical abnormalities, body weight changes, effects on mortality and any other toxic effects.

Test Report

37. The test report should also include the following information:
- species/strain used
 - toxic response data by sex and dose, including fertility, gestation, and viability indices
 - time of observation of any abnormal sign and its subsequent course
 - time of death during the study or whether animals survived to termination
 - tables presenting number of implantations, litter size and litter weights at the time of recording
 - toxic or other effects on reproduction, offspring, postnatal growth, etc.
 - body weight and organ weight data for the parental animals
 - food consumption data
 - haematological tests employed and results including baseline data
 - clinical biochemistry tests employed and results including baseline data
 - necropsy findings
 - a detailed description of microscopic findings, when performed
 - statistical treatment of results, where appropriate

Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test

Interpretation of Results

38. The study will provide evaluations of toxicities associated with administration of repeated doses, and indications of any reproductive/developmental toxicity effects. It should provide an indication of the need to conduct further investigations and may provide guidance in the design of subsequent studies.

国立衛生試験所コレカルシフェロール標準品 (Control 901)

笥 華子・小松裕明・田中正一
村井真美・石光 進・岡田敏史

Cholecalciferol Reference Standard (Control 901)
of the National Institute of Hygienic Sciences

Hanako Kakehi, Hiroaki Komatsu, Masakazu Tanaka,
Mami Murai, Susumu Ishimitsu and Satoshi Okada

Cholecalciferol Reference Standard for the Japanese Pharmacopoeia (JP RS) was prepared. The following analytical data were obtained: melting point 85.8°C; UV and IR spectra were in agreement with both of the previous JP RS and USP RS of Cholecalciferol; absorptivity at 265 nm $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 476$; optical rotation $[\alpha]_D^{20} = +110.1^\circ$; no impurities were detected by TLC and HPLC analyses; assay 100.1% by HPLC against the USP RS.

Based on the above results, the raw material was authorized as the Reference Standard of the National Institute of Hygienic Sciences.

Key words : Cholecalciferol, Quality evaluation, Authorization, JP Reference Standard

(Received May 31, 1991)

日本薬局方「コレカルシフェロール」の確認試験および定量法に用いられる国立衛生試験所コレカルシフェロール標準品 Control 901 (日本薬局方標準品)を製造したので報告する。

本品の品質評価にあたっては、第一製薬㈱および日本ロシュ㈱の協力を得て行った。

1. 原 料

カリ・デュファール社を通じて、Duphar社(オランダ)より、窒素置換したアンプルに小分け・充填された原料を購入した。

2. 参照物質および試薬

USP標準品および日本薬局方コレカルシフェロール標準品(Control 871)を対照に試験を行った。試薬は特級品または特級相当品を用いた。

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, 日立U-3210型自記分光光度計, ユニオンPM-201型旋光計, 宮本理研PA-20S型融点測定器を用いた。液体クロマトグラフ装置としては島津製作所製のLC-6A型送液ポン

ブ、SPD-6A 型波長可変 UV モニターおよび C-R6A 型データ処理装置を用いた。

4. 試験方法

特に記すものの他は、第十一改正日本薬局方の一般試験法および医薬品各条「コレカルシフェロール」の試験法を準用した。

薄層クロマトグラフ (TLC) 法による純度試験は以下のような条件で行った。

薄層板：メルク社製プレコート板シリカゲル 60 (厚さ 0.25 mm)

展開溶媒：シクロヘキサン・ジエチルエーテル混液 (1:1)

試料溶液：原料 10 mg をとり、クロロホルム 2.0 ml を加えて溶かし試料溶液とした。

試験方法：試料溶液 0.1~10 μ l (コレカルシフェロール 0.05~50 μ g 相当量) をシリカゲル板に窒素ガスを吹きつけながらスポットし、暗所で約 15 cm 展開した後、薄層板を取り出す。風乾した後、濃硫酸を均等に噴霧し、100°C で 5 分間加熱して、直ちに肉眼で観察した¹⁾。

液体クロマトグラフ (HPLC) 法による純度試験は以下の条件にしたが行い、面積百分率が 0.05% 以上のピークを不純物とした。

試料溶液：0.5 mg/ml イソオクタン溶液

注入量：10 μ l

検出法：紫外吸光度計 (測定波長 254 nm)

カラム：Chemcosorb 5Si (ϕ 4.0 mm \times 150 mm)

移動相：ヘキサン・*n*-アミルアルコール混液

(997:3)

流量：1.3 ml/min

カラム温度：19°C

検出感度：試料注入量の 1% 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 1/10 の高さ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 0.05% 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検出感度を調整した²⁾。

5. 試験結果

1) 性状：白色の結晶で、においはない。

2) 紫外吸収スペクトル：本品のエタノール溶液の紫外吸収スペクトルを測定するとき、波長 265 nm に吸収の極大が認められた。この波長における比吸光度 $E_{1\%}^{1cm}$ は 476 であった。紫外吸収スペクトルを Fig. 1 に示す。

3) 赤外吸収スペクトル：本品、前回標準品 (Control 871) および USP 標準品の赤外吸収スペクトルを臭化カリウム錠剤法により測定し、三者のスペクトルを比較するとき、同一波長のところに同様の強度の吸収が認められた。本品の赤外吸収スペクトルを Fig. 2 に示す。

4) 純度試験

i) 薄層クロマトグラフ (TLC) 法

試験方法の項に記載した方法で本品の薄層クロマトグラフ法による純度試験を行った結果、50 μ g まで原点以外に異種スポットを認めなかった。主スポットの位置は USP 標準品および前回標準品の Rf

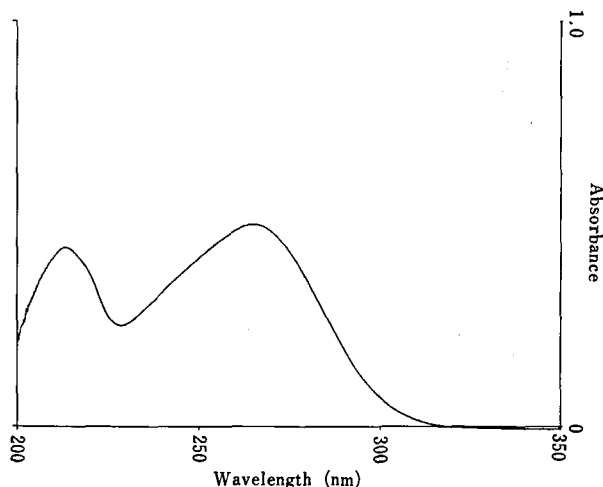


Fig. 1. Ultraviolet and visible spectrum of the raw material for cholecalciferol reference standard (Control 901)

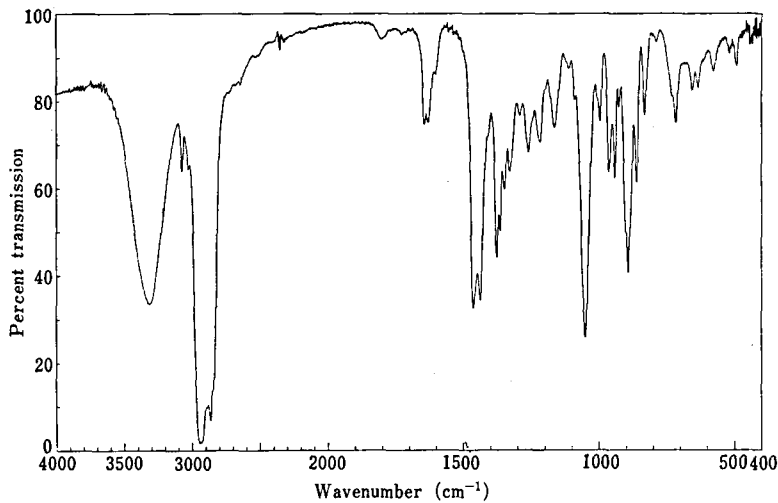


Fig. 2. Infrared spectrum of the raw material for cholecalciferol reference standard (Control 901)

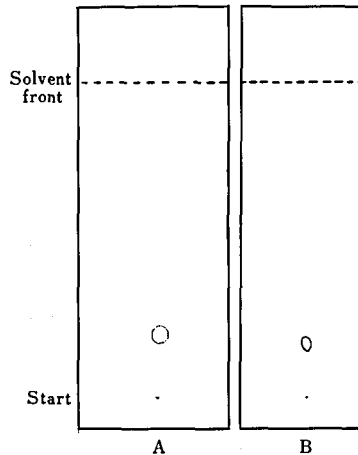


Fig. 3. Thin-layer chromatogram of the raw material for cholecalciferol reference standard (Control 901)

Solvent system: cyclohexane·ether (1 : 1)

Spots A~B: material 50 and 10 µg respectively

Detection: after spraying sulfuric acid upon the plate, heat the plate at 100°C for 5 min.

値に一致した。本法による主成分の検出限界は0.2 µgであった。薄層クロマトグラムを Fig. 3 に示す。

ii) 液体クロマトグラフ (HPLC) 法

試験方法の項に記載した方法で本品の液体クロマトグラフ法による純度試験を行った結果、前回標準品および USP 標準品と同様に面積百分率0.05%以上の不純物は検出されなかった。液体クロマトグラムを Fig. 4 に示す。

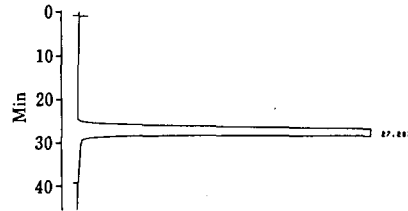


Fig. 4. High-performance liquid chromatogram of the raw material for cholecalciferol reference standard (Control 901)

Conditions: column, Chemcosolb 5 Si ($\phi 4.0 \times 150$ mm); column temp., 19°C; flow rate, 1.3 ml/min; detection wavelength, 254 nm; mobile phase, hexane·n-amylalcohol (997 : 3)

5) 融点、旋光度などその他の試験成績を Table 1 に示す。共同検定に参加していただいた第一製薬(株)および日本ロシユ(株)両社における試験成績もあわせて示した。

結 論

標準品原料として入手したコレカルシフェロールについて前回標準品および USP 標準品と比較検討した結果、いずれの試験の成績も満足すべきものであった。以上により、今回入手した標準品原料は、国立衛生試験所コレカルシフェロール標準品(日本薬局方標準品)に適した品質を有するものと認め、Control 901 として平成3年1月より配布を開始した。

Table 1. Analytical results of the raw material for cholecalciferol Reference standard (Control 901)

Testing items	N.I.H.S.	Lab.A	Lab.B
Optical rotation $[\alpha]_D^{20}$	+110.1°	—	—
Melting Point	85.8°C	84°C	84.9°C
Purity Tests			
1)TLC: single spot*	50 μ g	100 μ g	100 μ g
detection limit	0.2 μ g	—	0.1 μ g
2)HPLC: impurity	100%	100%	100%
$E_{1cm}^{1\%}(265nm)$	476	481	487
Assay**	100.1%	100.0%	99.9%

* The highest applied amount which shows single spot

** Assay by HPLC against the USP Reference Standard

終わりに、本標準品の製造にあたりご協力いただいた日本ロシュ(株)、第一製薬(株)および原料入手のお世話をいただいたカリ・デュファー社に深く感謝いたします。

親：医薬品研究, 16, 499 (1985)

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)

文 献

1) 勝井五一郎, 江沢敏一, 秋田吉三郎, 吉田継

国立衛生試験所エルゴカルシフェロール標準品 (Control 901)

覧 華子・小松裕明・村井真美・石光 進・岡田敏史

Ergocalciferol Reference Standard (Control 901)
of the National Institute of Hygienic Sciences

Hanako Kakehi, Hiroaki Komatsu, Mami Murai,
Susumu Ishimitsu and Satoshi Okada

Ergocalciferol Reference Standard for the Japanese Pharmacopoeia (JP RS) was prepared. The following analytical data were obtained: melting point 118.4°C; UV and IR spectra were in agreement with both of the previous JP RS and USP RS of ergocalciferol; absorptivity at 265nm $E_{1cm}^{1\%}=467$; optical rotation $[\alpha]_D^{20}=103^\circ$; no impurities were detected by TLC and HPLC analyses; assay 100.1% by HPLC against the USP RS.

Based on the above results, the raw material was authorized as the Reference Standard of the National Institute of Hygienic Sciences.

Key words : Ergocalciferol, Quality evaluation, Authorization, JP Reference Standard

(Received May 31, 1991)

カルシフェロール標準品 Control 901 (日本薬局方標準品) を製造したので報告する。

本品の品質評価にあたっては、第一製薬(株)および日本ロシュ(株)の協力を得て行った。

1. 原料

カリ・デュファール社を通じて、Duphar 社 (オランダ) より、窒素置換したアンプルに小分け・充填された原料を購入した。

2. 参照物質および試薬

USP 標準品および日本薬局方エルゴカルシフェロール標準品 (Control 871) を対照に試験を行った。試薬は特級品または特級相当品を用いた。

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 Ubest-50 型自記分光光度計, 日本分光 DIP-370 型旋光計および宮本理研 PA-20S 型融点測定器を用いた。液体クロマトグラフ装置としては島津製作所製の LC-6A 型送液ポンプ, SPD-6A 型波長可変 UV モニターおよび C-R6A 型データ処理装置を用いた。

4. 試験方法

特に記すものの他は、第十一改正日本薬局方の一般試験法および医薬品各条「エルゴカルシフェロール」の試験法を準用した。

薄層クロマトグラフ (TLC) 法による純度試験は以下のような条件で行った。

薄層板: メルク社製プレコート板シリカゲル 60 (厚さ 0.25 mm)

展開溶媒: シクロヘキサン・ジエチルエーテル混液 (1:1)

試料溶液: 試料 20 mg をとり, クロロホルム 2.0 ml を加えて溶かし試料溶液とした。

試験方法: 試料溶液およびその希釈液 0.1~10 μ l (エルゴカルシフェロール 0.01~100 μ g 相当量) をシリカゲル板に窒素ガスを吹きつけながらスポットし, 暗所で約 15 cm 展開した後, 薄層板を取り出す。風乾した後, 硫酸を均等に噴霧し, 100°C で 5 分間加熱して, 直ちに肉眼で観察したり。

液体クロマトグラフ (HPLC) 法による純度試験は以下の条件にしたがって行い, 面積百分率が 0.05% 以上のピークを不純物とした。

試料溶液: 0.5 mg/ml イソオクタン溶液

注入量: 40 μ l

検出法: 紫外吸光度計 (測定波長 254 nm)

カラム: Chemcosorb 5Si (ϕ 4.0 mm \times 150 mm)

移動相: ヘキサン・*n*-アミルアルコール混液 (997:3)

流量: 0.8 ml/min

カラム温度: 15°C

検出感度: 試料注入量の 1% 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 1/10 の高さ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 0.05% 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検出感度を調整した²⁾。

5. 試験結果

1) 性状: 白色の結晶で, においはない。

2) 紫外吸収スペクトル: 本品のエタノール溶液の紫外吸収スペクトルを測定するとき, 波長は 265 nm に吸収の極大が認められた。この波長における比吸光度 $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ は 467 であった。紫外吸収スペクトルを Fig. 1 に示す。

3) 赤外吸収スペクトル: 本品, 前回標準品 (Control 871) および USP 標準品の赤外吸収スペクトルを臭化カリウム錠剤法により測定し, 三者のスペクトルを比較するとき, 同一波長のところに同様の強度の吸収が認められた。本品の赤外吸収スペクトルを Fig. 2 に示す。

4) 純度試験

i) 薄層クロマトグラフ (TLC) 法

試験方法の項に記載した方法で本品の薄層クロマ

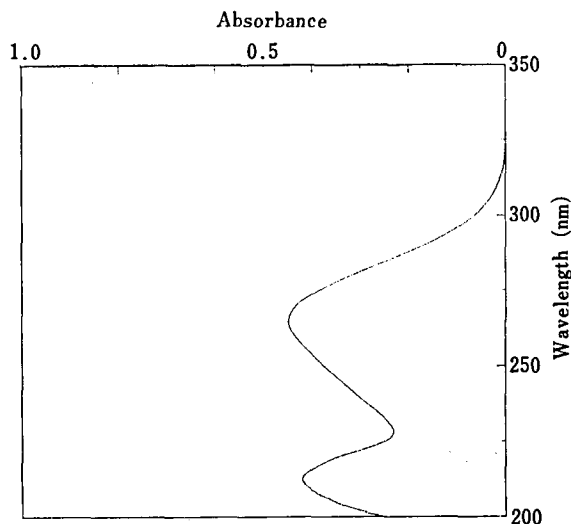


Fig. 1. Ultraviolet and visible spectrum of the raw material for ergocalciferol reference standard (Control 901)

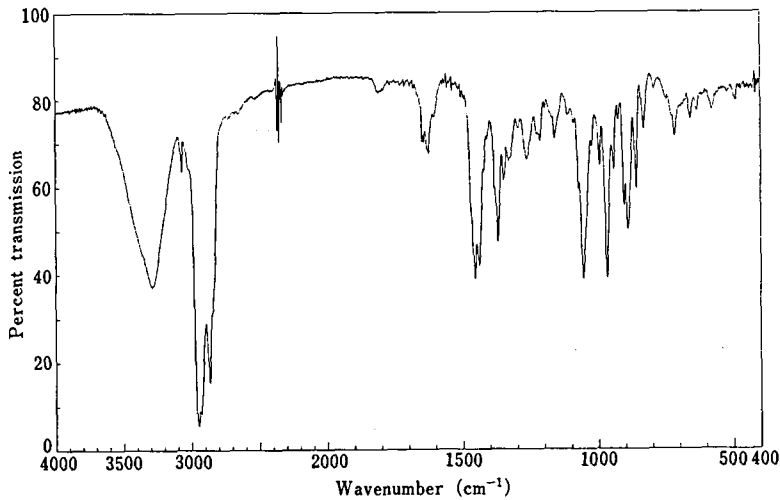


Fig. 2. Infrared spectrum of the raw material for ergocalciferol reference standard (Control 901)

トグラフ法による純度試験を行った結果、100 μg まで原点以外に異種スポットを認めなかった。主スポットの位置は USP 標準品および前回標準品の Rf 値に一致した。本法による主成分の検出限界は 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 (HPLC) 法

試験方法の項に記載した方法で本品の液体クロマトグラフ法による純度試験を行った結果、前回標準品および USP 標準品と同様に面積百分率 0.05% 以上の不純物は検出されなかった。液体クロマトグラムの一例を Fig. 4 に示した。

5) 融点、旋光度などその他の試験成績を Table 1 に示した。共同検定に参加していただいた第一製薬(株)および日本ロシュ(株)における試験成績も合わせて示した。

結 論

標準品原料として入手したエルゴカルシフェロールについて前回標準品および USP 標準品と比較検討した結果、いずれの試験成績も満足すべきものであった。以上により、今回入手した標準品原料は、国立衛生試験所エルゴカルシフェロール標準品 (日本薬局方標準品) に適した品質を有するものと認め、Control 901 として平成 3 年 3 月より配布を開始した。

終わりに、本標準品の製造にあたりご協力いただいた日本ロシュ(株)、第一製薬(株)および原料入手のお

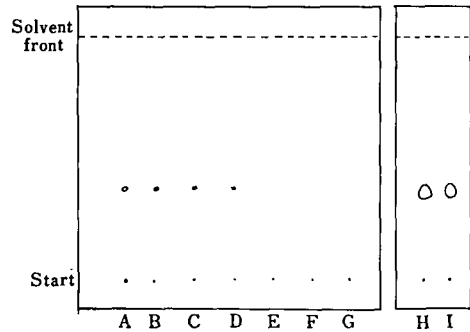


Fig. 3. Thin-layer chromatogram of the raw material for ergocalciferol reference standard (Control 901)

Solvent system: cyclohexane·ether (1 : 1)

Spots A~I: material 1, 0.5, 0.2, 0.1, 0.05, 0.02, 0.01, 100, and 50 μg respectively

Detection: after spraying sulfuric acid upon the plate, heat the plate at 100°C for 5 min.



Fig. 4. High-performance liquid chromatogram of the raw material for ergocalciferol reference standard (Control 901)

Conditions: column, chemcosorb 5 Si ($\phi 4.0 \times 150$ mm); column temp., 15°C; flow rate, 0.8 ml/min; detection wavelength, 254 nm; mobile phase, hexane·n-amylalcohol (997 : 3)

Table 1. Analytical results of the raw material for ergo-calciferol reference standard (Control 901)

Testing items	N.I.H.S.	Lab.A	Lab.B
Optical rotation $[\alpha]_D^{20}$	+103°	-	-
Melting Point	118.4°C	115°C	115.9°C
Purity Tests			
1)TLC: single spot*	100 μ g	100 μ g	100 μ g
detection limit	0.1 μ g	-	0.1 μ g
2)HPLC: impurity	100%	100%	100%
$E_{1\%}^{1\text{cm}}$ (265nm)	467	472	475
Assay**	100.1%	99.8%	99.9%

* The highest applied amount which shows single spot

** Assay by HPLC against the USP Reference Standard

世話をいただいたカリ・デュファア社に深く感謝いたします。

親：医薬品研究, 16, 499 (1985)

- 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)

文 献

- 1) 勝井五一郎, 江沢敏一, 秋田吉三郎, 吉田継

国立衛生試験所酢酸プレドニゾロン標準品 (Control 901)

笈 華子・小松裕明・村井真美・石光 進・岡田敏史

Prednisolone Acetate Reference Standard (Control 901) of the National Institute of Hygienic Sciences

Hanako Kakehi, Hiroaki Komatsu, Mami Murai,
Susumu Ishimitsu and Satoshi Okada

Prednisolone Acetate Reference Standard (Control 901) for the Japanese Pharmacopoeia (JP RS) was prepared. The following analytical data were obtained: melting point 236°C (decomposition); IR spectrum was same as that of JP RS of prednisolone acetate; absorptivity at 243 nm $E_{1\%}^{1\text{cm}}=379$; optical rotation $[\alpha]_D^{20}=+113.0^\circ$; no impurity was detected by TLC, but a small amount of two impurities was found by HPLC analysis; assay by HPLC against the JP RS 100.2%.

Based on the above results, this raw material was authorized as the Reference Standard of the National Institute of Hygienic Sciences.

Key words : Prednisolone acetate, Quality evaluation, Authorization, JP Reference Standard

(Received May 31, 1991)

「酢酸プレドニゾロン」の確認試験と定量法および「プレドニゾロン」の純度試験に用いられる国立衛生試験所酢酸プレドニゾロン標準品のロットの更

新を行い, Control 901として製造したので報告する。

本品の製造および品質評価にあたっては, 塩野義

製薬㈱の協力を仰いだ。

1. 原料

標準品原料は塩野義製薬㈱より供与された。同社による試験成績は以下のとおりである：旋光度 $[\alpha]_D^{20} +113.0^\circ$ ，乾燥減量 0.04%，定量 102.2% (固定 E 値を用いた吸光度法) および 100.7% (HPLC 法)。

2. 参照物質および試薬

前回標準品 (Control 703) を対照に試験を行った。別に、プレドニゾロン標準品，酢酸コルチゾン標準品および酢酸ヒドロコルチゾン標準品を用いた。試薬類は特級品および特級相当品を用いた。

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 Ubest-50 型自記分光光度計，日立 U-3210 型自記分光光度計，ユニオン PM-201 型旋光計，宮本理研 PA-20S 型融点測定器を用いた。液体クロマトグラフ装置は島津製作所製の LC-6A 型送液ポンプ，SPD-6A 型波長可変 UV モニターおよび C-R6A 型データ処理装置を用いた。

4. 試験方法

特に記すものの他は，第十一改正日本薬局方の一般試験法および医薬品各条「酢酸プレドニゾロン」の試験法を準用した。

紫外吸収スペクトル：本品約 10 mg を精密に量り，メタノールを加えて溶かし，正確に 100 ml とする。この液 5 ml を正確にとり，メタノールを加えて正確に 50 ml とする。この液について吸光度測定法により測定する。

薄層クロマトグラフ (TLC) 法による純度試験は以下のように行った。

薄層板：メルク社製プレコーテッド板シリカゲル 60F₂₅₄ (厚さ 0.25 mm)

展開溶媒：1,2-ジクロロエタン・メタノール・水混液 (470 : 50 : 1)

試料溶液：試料 20 mg をとり，クロロホルム・メタノール混液 (9 : 1) 1 ml を加えて溶かし，試料原液とした。これを希釈し，0.01~20 mg/ml の試料溶液を調製した。別にプレドニゾロン，酢酸コルチゾンおよび酢酸ヒドロコルチゾン標準品の 0.2 mg/ml 溶液を調製し，比較溶液とした。

試験方法：試料溶液および比較溶液 1~25 μ l (0.02~100 μ g 相当量) を薄層板にスポットし，約 15 cm 展開した後，薄層板を取り出す。風乾した後，

直ちに紫外線 (主波長 254 nm) 照射法により観察する。

液体クロマトグラフ (HPLC) 法による純度試験は以下の条件にしたがって行い，面積百分率 0.05% 以上のピークを不純物と判定した。

操作条件

試料溶液：1.2 mg/ml メタノール溶液

注入量：10 μ l

検出器：紫外吸光度計 (測定波長 254 nm)

カラム：Inertsil ODS-2 (ϕ 4.6 mm \times 150 mm)

移動相：水・アセトニトリル混液 (3 : 2)

流量：0.7 ml/min

カラム温度：室温 (約 25 $^\circ$ C)

検出感度：試料注入量の 1% 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 1/10 の高さ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 0.05% 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検出されるように検出感度を調整した¹⁾。

HPLC 法による定量は純度試験における操作条件を準用して行った。内標準物質としてパラオキシ安息香酸ブチルを用い，前回標準品を対照に定量試験を行った。

別に，前回標準品を対照に吸光度測定法 (243 nm) による定量試験も行った。

5. 試験結果

1) 性状：白色の結晶性粉末で，においはない。
融点 約 236 $^\circ$ C (分解)

2) 紫外吸収スペクトル：本品のメタノール溶液の紫外吸収スペクトルを測定するとき，波長 243 nm に吸収の極大が認められた。この波長における比吸光度 $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ は 379 であった。紫外吸収スペクトルを Fig. 1 に示す。

3) 赤外吸収スペクトル：本品および前回標準品 (Control 703) の赤外吸収スペクトルを臭化カリウム錠剤法により測定し，両者のスペクトルを比較す

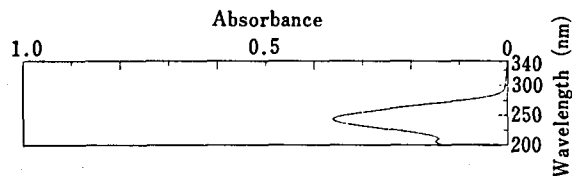


Fig. 1. Ultraviolet and visible spectrum of the raw material for prednisolone acetate reference standard (Control 901)

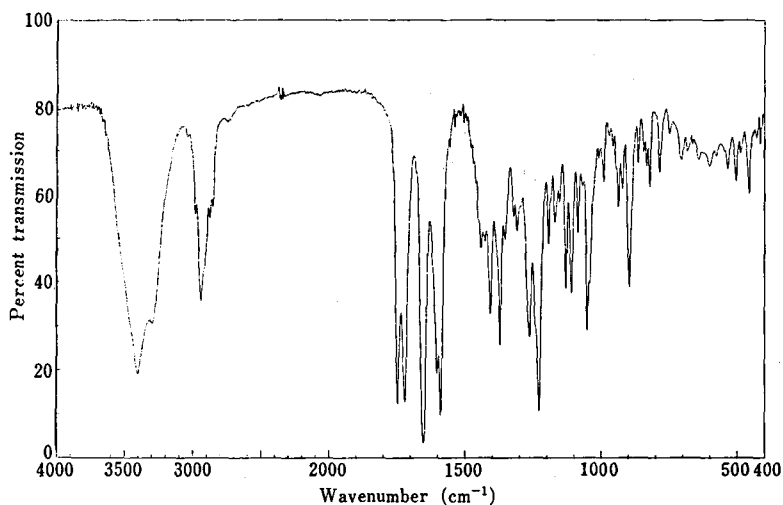


Fig. 2. Infrared spectrum of the raw material for prednisolone acetate reference standard (Control 901)

るとき、指紋領域において若干の差異が認められた。それぞれをアセトンに溶かした後、アセトンを留去し、残留物について同様の試験を行った結果、両者について波数 3402, 3298, 1748, 1721, 1653, 1590, 1408, 1372, 1230, 1051, 896, 785, 457 cm^{-1} 付近に同様の強度の吸収が認められた。本品の赤外吸収スペクトルを Fig. 2 に示す。

4) 旋光度 $[\alpha]_D^{25}$: +113.0° (乾燥後, 0.1 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 (TLC) 法

試験方法の項に記載の方法により薄層クロマトグラフ法による純度試験を行った。薄層クロマトグラムを Fig. 3 に示した。スポット量 100 μg までプレドニゾン、酢酸コルチゾンおよび酢酸ヒドロコルチゾンなどの異種スポットは認められなかった。また、主スポットの位置は前回標準品のそれに一致した。なお、本法による主成分の検出限界は 0.1 μg であった。

ii) 液体クロマトグラフ (HPLC) 法

試験方法の項に記載の方法により HPLC 法による純度試験を行った。この結果、保持時間 4.7 および 6.4 分の位置に 2 個の微量不純物が検出され、その量は面積百分率法によりそれぞれ 0.10% および 0.08% と推定された。液体クロマトグラムの一例を Fig. 4 に示した。

6) 乾燥減量: 0.04% (0.5 g, 105°C, 3 時間)

7) 定量法:

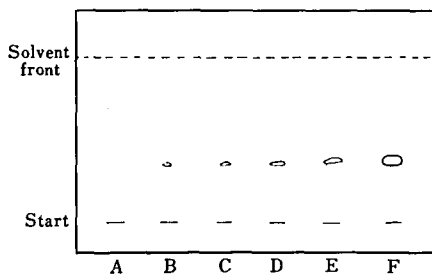


Fig. 3. Thin-layer chromatogram of the raw material for prednisolone acetate reference standard (Control 901)

Solvent system: 1, 2-dichloroethane·methanol·water (470 : 50 : 1)

Spots A~F: material 0.02, 0.1, 0.5, 1, 5, and 100 μg respectively.

Detection wavelength: 254 nm

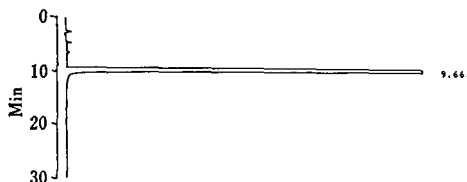


Fig. 4. High-performance liquid chromatogram of the raw material for prednisolone acetate reference standard (Control 901)

Conditions: column, Inertsil ODS-2 (ϕ 4.6 \times 150 mm); column temp., 25°C; flow rate, 0.7 ml/min; detection wavelength, 254 nm; mobile phase, water·acetonitrile (3 : 2)

- i) HPLC法 $100.2 \pm 0.6\%$ ($n=3$, 対前回標準品)
 ii) 吸光度測定法 $100.3 \pm 0.9\%$ ($n=4$, 対前回標準品)

結 論

標準品原料として入手した酢酸プレドニゾロンの品質について前回標準品と比較検討した。その結果、HPLC法による純度試験により2個の微量不純物が検出されたが、その総量は0.18%であり、純度は99.8%と推定された。その他の試験成績も満足すべきものであった。

以上により、今回入手した標準品原料は、国立衛生試験所酢酸プレドニゾロン標準品(日本薬局方標準品)に適した品質を有すると認め、Control 901として平成2年7月より配布を開始した。

終わりに、本標準品の製造にあたってご協力いただいた塩野義製薬㈱に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 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)

国立衛生試験所フルオシノロンアセトニド標準品 (Control 901)

覧 華子・村井真美・小松裕明・石光 進・岡田敏史

Fluocinolone Acetonide Reference Standard (Control 901) of the National Institute of Hygienic Sciences

Hanako Kakehi, Mami Murai, Hiroaki Komatsu,
Susumu Ishimitsu and Satoshi Okada

Fluocinolone Acetonide Reference Standard (Control 901) for the Japanese Pharmacopoeia (JP RS) was prepared. The following analytical data were obtained: melting point 268°C (decomposition); IR spectrum was same as the previous JP RS of Fluocinolone Acetonide; absorptivity at 237nm $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 363$; optical rotation $[\alpha]_D^{20} = +105.7^{\circ}$; no impurity was detected by TLC, but two impurities were detected by HPLC analysis; assay by HPLC against the previous JP RS 100.2%.

Based on the above results, this rawmaterial was authorized as the Reference Standard of the National Institute of Hygienic Sciences.

Key words : Fluocinolone acetonide, Quality evaluation, Authorization, JP Reference Standard

(Received May 31, 1991)

「フルオシノロンアセトニド」の確認試験および定量法に用いられる国立衛生試験所フルオシノロンアセトニド標準品(日本薬局方標準品)のロットの更新を行い、Control 901として製造したので報告する。

1. 原 料

本標準品原料は田辺製薬㈱より供与された。同社による試験成績は以下のとおりである：比吸光度 $E_{1\text{cm}}^{1\%}(237\text{nm}) = 363$, 旋光度 $[\alpha]_D^{20} = +103.9^{\circ}$, 液体クロマトグラフ法による純度99.7%, 乾燥減量0.47%。

2. 参照物質および試薬

前回標準品(Control 801)を対照に試験を行った。試薬類は特級品および特級相当品を用いた。

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Ubest-50型自記分光光度計, 日立U-3210型自記分光光度計, ユニオンPM-201型旋光計, 宮本理研PA-20S型融点測定器を用いた。液体クロマトグラフ装置は島津製作所製のLC-6A型送液ポンプ, SPD-6A型波長可変UVモニターおよびC-R6A型データ処理装置

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の一般試験法および医薬品各条「フルオシノロンアセトニド」の試験法を準用した。

紫外吸収スペクトル：原料約10 mgを精密に量り、無水エタノールに溶かし、正確に100 mlとする。この液10 mlを正確に量り、無水エタノールを加えて正確に100 mlとする。この液につき吸光度測定法により測定する。

薄層クロマトグラフ (TLC) 法による純度試験は以下のように行った。

薄層板：メルク社製プレコーテッド板シリカゲル60F₂₅₄ (厚さ0.25 mm)

展開溶媒：クロロホルム・酢酸ブチル・アセトン混液 (2:2:1)

試料溶液：試料20 mgをとり、アセトン2 mlを加えて溶かし、試料原液とした。アセトンを加えてこれを希釈し、数種の濃度 (0.01~10 mg/ml) の試料溶液を調製した。

試験方法：試料溶液2.5~20 μ l (フルオシノロンアセトニド0.025~200 μ g相当量)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す。風乾した後、直ちに紫外線 (主波長254 nm)を照射して観察し、異種スポットを認めない試料の量および検出限界を求めた。

液体クロマトグラフ (HPLC) 法による純度試験は日局11の方法を準用し、以下のような操作条件にしたがって試験を行い、面積百分率が0.05%以上のピークを不純物と判定した。

操作条件

試料溶液：2 mg/mlメタノール溶液

注入量：10 μ l

検出法：紫外吸光度計 (測定波長：254 nm)

カラム：Inertsil ODS (5 μ m, ϕ 4.6 mm \times 150 mm)

移動相：水・アセトニトリル混液 (13:7)

流量：0.9 ml/min

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

検出感度：試料注入量の1%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1/10の高さ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0.05%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検出されるように検出感度を調整した¹⁾。

5. 試験結果

1) 性状：白色の結晶性粉末で、おおいはない。
融点268 $^{\circ}$ C (分解)

2) 紫外吸収スペクトル：本品のエタノール溶液の紫外吸収スペクトルを測定するとき、波長237 nmに吸収の極大が認められた。この波長における比吸光度 $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ は363であった。紫外吸収スペクトルをFig. 1に示す。

3) 赤外吸収スペクトル：本品および前回標準品 (Control 801) の赤外吸収スペクトルを臭化カリウム錠剤法により測定し、両者のスペクトルを比較するとき、指紋領域において若干の差異が認められた。それぞれをアセトンに溶かした後、アセトンを留去し、残留物について同様の試験を行った結果、両者について波数3450, 1715, 1668, 1632, 1610, 1375, 1068 cm^{-1} 付近に同様の強度の吸収が認められた。本品の赤外吸収スペクトルをFig. 2に示す。

4) 旋光度 $[\alpha]_D^{25}$: +105.7 $^{\circ}$ (乾燥後, 0.1 g, メタノール, 10 ml, 100 mm)

5) 純度試験：

i) 薄層クロマトグラフ (TLC) 法

試験方法の項に記載の方法により薄層クロマトグラフ法による純度試験を行った。薄層クロマトグラムをFig. 3に示した。スポット量200 μ gまで異種スポットを認めなかった。また、主スポットの位置は前回標準品のそれに一致した。なお、本法による主成分の検出限界は0.1 μ gであった。

ii) 液体クロマトグラフ (HPLC) 法

試験方法の項に記載の方法によりHPLC法による純度試験を行った。この結果、保持時間11.9分および23.7分の位置 (主成分の保持時間は13.7分) に2個の微量不純物が検出された。その量は面

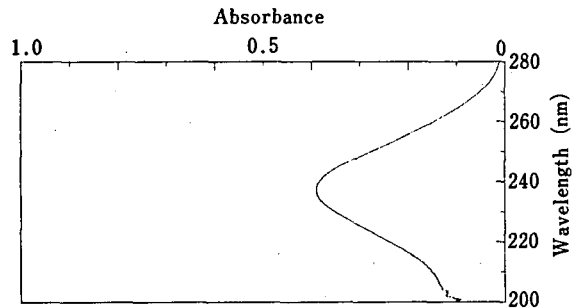


Fig. 1. Ultraviolet spectrum of the raw material for fluocinolone acetonide reference standard (Control 901)

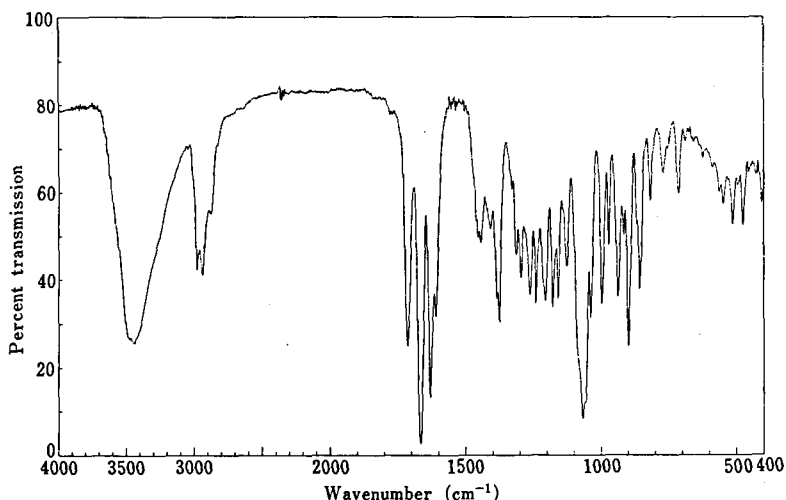


Fig. 2. Infrared spectrum of the raw material for fluocinolone acetonide reference standard (Control 901)

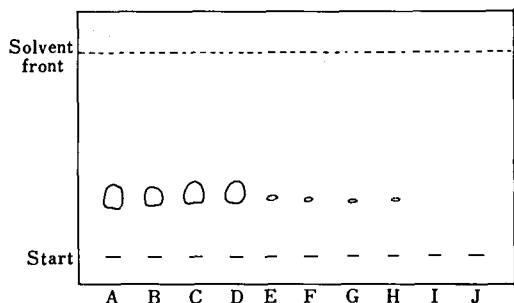


Fig. 3. Thin-layer chromatogram of the raw material for fluocinolone acetonide reference standard (Control 901)

Solvent system: *n*-butylacetate·chloroform·acetone (2 : 2 : 1)

Spots A~B: JPRS 200 and 100 μ g respectively.

Spots C~J: Material 200, 100, 1, 0.5, 0.25, 0.1, 0.05 and 0.025 μ g respectively.

Detection wavelength: 254 nm

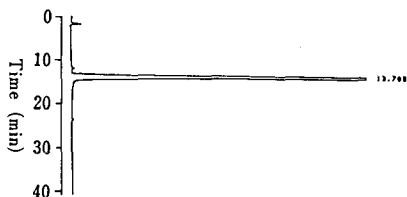


Fig. 4. High-performance liquid chromatogram of the raw material for fluocinolone acetonide reference standard (Control 901)

Conditions: column, Inertsil ODS (ϕ 4.6×150 mm); column temp., 40°C; flow rate, 0.9 ml/min; detection wavelength, 254 nm; mobile phase, water·acetonitrile (13 : 7)

積百分率法によりそれぞれ0.13%および0.15%と推定された。前回標準品の場合、別に2個の微量不純物が観察され、不純物の総量は面積百分率法で0.39%と推定された。液体クロマトグラムの一例をFig. 4に示した。

6) 乾燥減量：0.42% (0.2 g, 減圧, 105°C, 3時間)

7) 定量 (HPLC法) : 100.2±0.4% (n=4, 対前回標準品 Control 801)

結 論

標準品原料として入手したフルオシノロンアセトニドを前回標準品と比較検討した。この結果、液体クロマトグラフ法による純度試験においては2個の微量不純物が検出されたが、面積百分率法によるその総量は0.28%と推定され、前回標準品にくらべて同等以上の純度をもつものと判断された。その他の試験成績も満足すべきものであった。

以上により、今回入手した標準品原料は、国立衛生試験所フルオシノロンアセトニド標準品 (日本薬局方標準品) に適した品質を有すると認め、Control 901として平成2年12月より配布を開始した。

終わりに、標準品の製造にあたりご協力いただいた田辺製薬㈱に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 木村俊夫, 綱川延孝, 中守律夫: 副腎皮質ステロイド標準品について, 医薬品研究, 17, 143~173 (1986)

国立衛生試験所ジクロフェナミド標準品 (Control 891)

岡田敏史・泉 若江・村井真美・小松裕明・石光 進

Diclofenamide Reference Standard (Control 891)
of National Institute of Hygienic SciencesSatoshi Okada, Wakae Izumi, Mami Murai,
Hiroaki Komatsu and Susumu Ishimitsu

Quality of the raw material of diclofenamide was evaluated for preparation of "Diclofenamide Reference Standard". Analytical results for the sample were as follows: melting point 240°C (decomposition); UV spectrum indicates absorption maxima at 286 and 295 nm and the absorption ratio A_{286}/A_{295} 1.04; IR spectrum is same as that of the USP Reference Standard; no impurity was found by TLC, but a trace of one was found by HPLC analysis; the purity is assumed to be 99.95% by HPLC analysis; loss on drying 0.1%; assay by HPLC against USP Reference Standard 100.2%.

Based on the results, the present raw material was authorized to be the Reference Standard of the National Institute of Hygienic Sciences.

Key words : Diclofenamide, Quality evaluation, Authorization, JP Reference Standard

(Received May 31, 1991)

第十二改正日本薬局方の「ジクロフェナミド」および「ジクロフェナミド錠」の定量試験に用いられる国立衛生試験所ジクロフェナミド標準品を製造したので報告する。

なお、本品は日本薬局方外医薬品成分規格(1989)に「ジクロルフェナミド」(Dichlorphenamide)として記載されていたものであるが、日本薬局方に記載されるにあたり、国際一般名称(INN)のDiclofenamideが採用され、日本名も上記のように改められた。

1. 原料

本標準品の原料は萬有製薬(株)より購入した。

2. 参照物質および試薬

USP標準品(Dichlorphenamide Reference Standard)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DP22(ヤマト科学), 融点測定器Model PA-10S(宮本理研工業), 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-R6A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(局外規)の「ジクロルフェナミド」の試験法を準用したり。

5. 試験成績

1) 性状: 白色の結晶性の粉末で、わずかに特異なにおいがあり、味は苦い。

融点: 240°C (分解)

2) 紫外吸収スペクトル: 局外規の方法で調製した水溶液の紫外吸収スペクトルを測定するとき、波長286および295 nmに吸収の極大が認められた。それぞれの極大波長における吸光度比 A_{286}/A_{295} は1.04であった。紫外吸収スペクトルをFig. 1に示す。

3) 赤外吸収スペクトル: 本品およびUSP標準品の赤外吸収スペクトルを臭化カリウム錠剤法により測定し、両者のスペクトルを比較するとき、同一波数のところに同様の強度の吸収が認められた(Fig. 2)。

4) 純度試験(類縁物質)

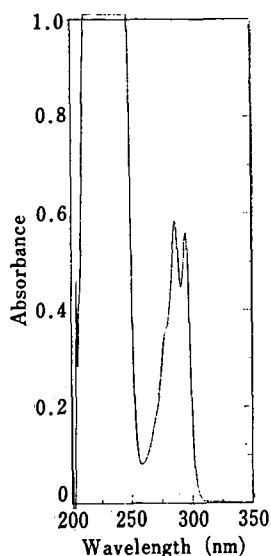


Fig. 1. UV spectrum for diclofenamide, the candidate for JP RS

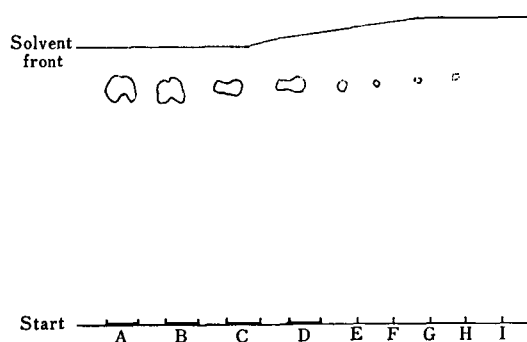


Fig. 3. Thin-layer chromatogram of diclofenamide, the candidate for JP RS

Solvent system: *n*-Butanol·Water·Acetic acid (2 : 2 : 1)

Spots A, C, E~I: material 200, 100, 10, 5, 2, 1, 0.5 μ g, respectively. Spots B, D: USP RS 200, 100 μ g respectively.

Detection: UV (254 nm).

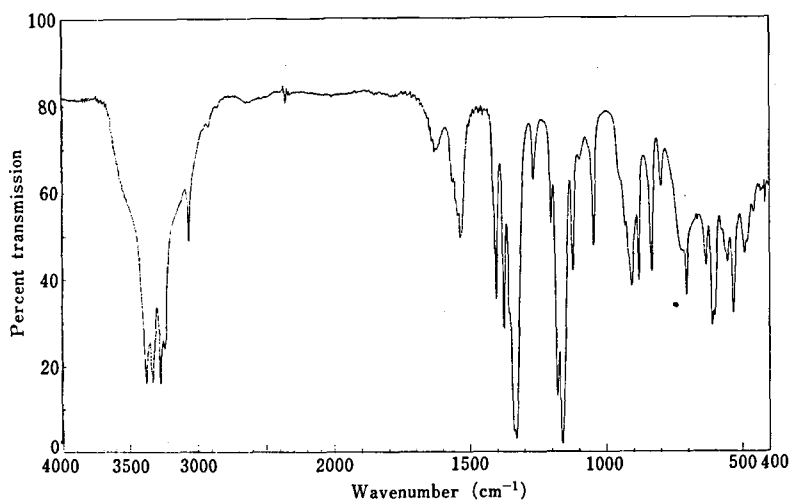


Fig. 2. IR spectrum for diclofenamide, the candidate for JP RS

i) 薄層クロマトグラフ法：本品のメタノール溶液 (0.1~20 mg/ml) を調製し、0.5~200 μ g 相当量をシリカゲル薄層板にスポットする。*n*-ブタノール・水・酢酸混液 (2 : 2 : 1) 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。本品および USP 標準品ともスポット量 200 μ g においても不純物は検出されなかった。なお、本法による検出限界は 0.5 μ g 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 を移動

相 2 ml に溶かし、試料溶液とした。試料溶液の 1/100 および 1/2000 溶液を調製し、これらの液を用いて純度試験の条件設定を行った。別に、試料溶液とほぼ同濃度の USP 標準品溶液を調製した。これらの液 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：紫外吸光度計 (測定波長 280 nm)

カラム：INERTSIL ODS-2 (5 μ m, 4.6 mm ϕ \times 150 mm L)

移動相：リン酸ナトリウム試液・アセトニトリル

混液 (7 : 3)

流量 : 0.5 ml/min

カラム温度 : 30℃

検出感度 : 試料注入量の 1/100 に相当する量を注入し、得られるジクロフェナミドのピーク高さが、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⁾。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、

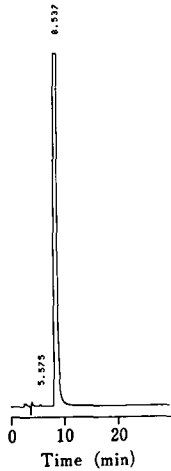


Fig. 4. High-performance liquid chromatogram for diclofenamide, the candidate for JP RS

Conditions: column, Inertsil ODS-2 (5 μ m, 4.6 mm ϕ \times 150 mmL); mobile phase, a mixture of sodium phosphate TS and acetonitrile (7 : 3); flow rate, 0.5 ml/min; column temp., 30℃; detection WL, 280 nm.

不純物量は 0.05% 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 99.95% と推定された。同一条件の下で USP 標準品の純度試験を行った結果、本品の不純物ピークと同様の保持時間にほぼ同量の不純物 1 個が検出され、その純度は 99.95% と推定された。

5) 乾燥減量 : 0.1% (0.5 g, 減圧, 100℃, 恒量)

6) 定量 : 純度試験を行ったとほぼ同様の条件でパラオキシ安息香酸エチルを内部標準物質として USP 標準品を対象に液体クロマトグラフ法により定量試験を行った結果、本品の含量は 100.2% (n=3, SD 0.3%) であった。

別に、USP 標準品を対象に吸光度測定法 (286 nm) による定量試験を行った結果、本品の含量は 100.6% (n=3, SD 0.4%) であった。

標準品原料として入手したジクロフェナミド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微量不純物 1 個を検出したが、本品の面積百分率法による純度は 99.95% と推定された。また、純度試験および定量法の結果によれば、本品は USP 標準品と同等の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。

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㈱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, p. 574
- 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)

国立衛生試験所エピチオスタンール標準品 (Control 891)

岡田敏史・泉 若江・村井真美・小松裕明・石光 進

Epitiostanol Reference Standard (Control 891)
of National Institute of Hygienic SciencesSatoshi Okada, Wakae Izumi, Mami Murai,
Hiroaki Komatsu and Susumu Ishimitsu

The raw material of epitiostanol was examined for preparation of "Epitiostanol Reference Standard". Analytical results for the sample were as follows: melting point 130.7°C (decomposition); UV spectrum indicates absorption maximum at 263 nm in ethanol; IR spectrum indicates specific absorption at 2920, 1383, 1056 and 590 cm^{-1} ; optical rotation $[\alpha]_D^{25} +24.4^\circ$; no impurity was found by TLC, but a small amount of one was found by HPLC analysis and the purity is assumed to be 99.5%; water content 1.52%.

Based on the results, the present raw material was authorized to be the Reference Standard of the National Institute of Hygienic Sciences.

Key words : Epitiostanol, Quality evaluation, Authorization, JP Reference Standard

(Received May 31, 1991)

第十二改正日本薬局方の「エピチオスタン」の定量試験に用いられる国立衛生試験所エピチオスタンール標準品を新たに製造したので報告する。

1. 原料

本標準品の原料は塩野義製薬(株)より購入した。メーカーによる試験成績は以下のとおりである：融点 129.4°C, 紫外吸収スペクトル λ_{max} 264 nm, 旋光度 $[\alpha]_D^{25} +23.0^\circ$, 純度試験 他のステロイド 0.5% 以下 (TLC), 水分 1.44%, 残留溶媒 (アセトン) 0.066%.

2. 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

融点測定器 Model PA-10S (宮本理研工業), 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), 旋光計 PM-201 (ユニオン), 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-R6A 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 (局外規) の「エピチオスタンール」の試験法を準用した¹⁾。

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り, 味はない。

融点：130.7°C (分解)

2) 紫外吸収スペクトル：本品のエタノール溶液 (1→1000) の紫外吸収スペクトルを測定するとき, 波長 263 nm に吸収の極大が認められた。この波長における比吸光度 $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ は 1.35。紫外吸収スペクトルを Fig. 1 に示す。

3) 赤外吸収スペクトル：本品の赤外吸収スペクトルを臭化カリウム錠剤法により測定するとき, 波数 2920, 1383, 1056 および 590 cm^{-1} に特異吸収が認められた (Fig. 2)。

4) 旋光度 $[\alpha]_D^{25} +24.4^\circ$ (脱水物換算, 0.1 g, クロロホルム, 10 ml, 100 mm)

5) 純度試験 (その他のステロイド)

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 相当量をシリカゲル薄層板にスポットする。クロロ

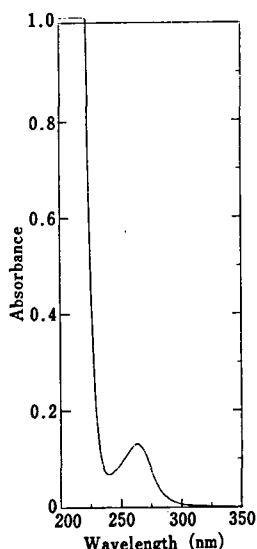


Fig. 1. UV spectrum for epitiostanol, the candidate for JP RS

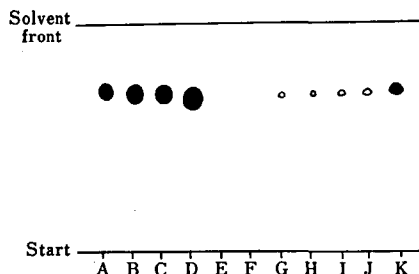


Fig. 3. Thin-layer chromatogram of epitiostanol, the candidate for JP RS

Solvent system: chloroform·methylethylketone (4 : 1)

Spots A~K: material 50, 100, 150, 200, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, and 2 μg , respectively.

Detection: after spraying sulfuric acid upon the plate, heat the plate at 130°C for 3 min.

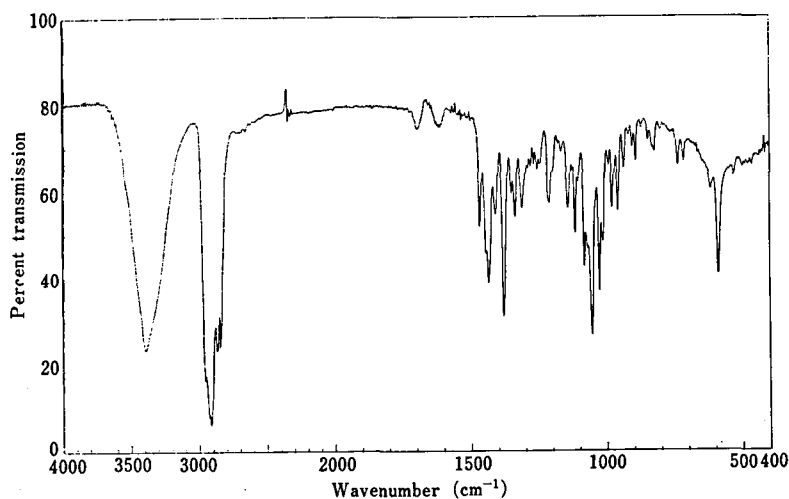


Fig. 2. IR spectrum for epitiostanol, the candidate for JP RS

ホルム・メチルエチルケトン混液 (4 : 1) を展開溶媒として約 10 cm 展開した後、薄層板を風乾する。硫酸を噴霧した後、約 130°C で 3 分間加熱してスポットを観察する。スポット量 200 μg においても不純物は検出されなかった。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。

ii) 液体クロマトグラフ法: 本品をメタノールに溶かして試料溶液 (0.02 g/ml) を調製した。別に、試料溶液の 1/100 および 1/2000 溶液を調製し、これらの液を用いて純度試験の条件設定を行った。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 218 nm)

カラム: INERTSIL ODS-2 (5 μm , 4.6 mm ϕ × 150 mm L)

移動相: メタノール・水混液 (85 : 15)

流量: 0.8 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、得られるエピチオスタノールのピーク高さが、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⁾。液体クロマトグラムの一例をFig. 4に示した。

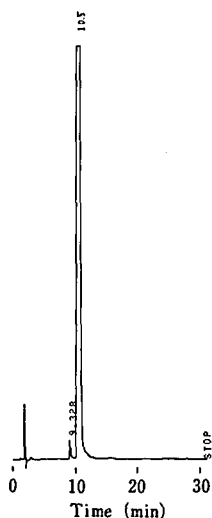


Fig. 4. High-performance liquid chromatogram for epitio stanol, the candidate for JP RS
Conditions: column, Inertsil ODS-2 (5 μ m, 4.6 mm ϕ \times 150 mmL); mobile phase, a mixture of methanol and water (85 : 15); flow rate, 0.8 ml/min; column temp., 40°C; detection WL, 280 nm.

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0.5%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99.5%と推定された。

6) 水分：微量水分測定装置を用いて電量法により水分を測定した結果、1.52%(n=4, SD 0.02%)の値が得られた。本品は1/4水和物であり、その理論水分量は1.45%であることから、測定された水分の大部分は水和水であり、吸着水は極微量と考えられる。

標準品原料として入手したエピチオスタンール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微量不純物1個を検出し、面積百分率法による本品の純度は99.5%と推定された。また、薄層クロマトグラフ法においてはスポット量200 μ gまで類縁物質は検出されなかった。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。

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) 厚生省薬務局審査第二課編：日本薬局方外医薬品成分規格1989：p. 117
- 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)

国立衛生試験所メトキサレン標準品 (Control 901)

村井真美・寛 華子・小松裕明・石光 進・岡田敏史

Methoxalene Reference Standard (Control 901)
of National Institute of Hygienic SciencesMami Murai, Hanako Kakehi, Hiroaki Komatsu,
Susumu Ishimitsu and Satoshi Okada

The raw material of methoxalene was examined for the preparation of the "Methoxalene Reference Standard". Analytical data obtained were as follows: ultraviolet spectrum, λ_{\max} = 300, 249 and 218 nm; absorbance, $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ (300 nm) = 559; infrared spectrum, same as that of USP Reference Standard of Methoxalene; melting point, 148°C; thin-layer chromatography, no impurities were detected until 50 μg ; high-performance liquid chromatography (HPLC), no impurities were detected, water, 0.04%; assay, 99.9% by absorbance method and 100.4% by the HPLC method in terms of the USP Reference Standard.

Based on the above results, this raw material was authorized to be the Reference Standard of the National Institute of Hygienic Sciences.

Key words : methoxalene, quality evaluation, authorization, JP Reference Standard

(Received May 31, 1991)

第十二改正日本薬局方の「メトキサレン」の定量試験に用いられる国立衛生試験所メトキサレン標準品を新たに製造したので報告する。

1. 原 料

大正製薬(株)より供与された。同社による試験成績は次のとおりである。

性状：白色の結晶でにおいはない，赤外吸収スペクトル：3142, 3117, 1709, 1620, 1586, 1545 および 874 cm^{-1} に特異吸収を示す， $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ (300 nm) : 559, 融点：148°C, 類縁物質 (TLC 法) : 主スポット以外のスポットを認めない, 水分：0.0%

2. 参照物質および試薬

参照物質として USP のメトキサレン標準品を用いた。試薬は試薬特級品または特級相当品を用いた。

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-6 (平沼産業), 融点測定器 PA-10S (宮本理研) 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-6A, 検出器 SPD-6A, データ処理装置 C-R6A 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) の「メトキサレン」の試験法を準用した。

i) 薄層クロマトグラフ法による純度試験：原料および USP 標準品約 0.02 mg をそれぞれクロロホルム 4 ml に溶かして試料溶液とし, これを 250 分の 1 に希釈して標準溶液とした。これらの液を用いて次の条件で薄層クロマトグラフ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薄層板シリカゲル 60F₂₅₄ (5×10 cm, 層厚 0.25 mm, メルク社) を用いた。

展開溶媒：クロロホルム, ヘキサン, 酢酸エチル (40 : 10 : 3)

方法および検出法：試料溶液および標準溶液の 5, 10 μl を薄層板にスポットし, 約 10 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。

ii) 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 0.002 g を精密に量り, それぞれ移動相に溶かして正確に 6 ml とし, 試料溶液とした。この液 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。

カラム；Inertsil ODS-2 (5 μ m, 4.6 \times 150 mm)

移動相；アセトニトリル水溶液 (35 v/v%)。

流量；0.8 ml/min

検出器；紫外吸光光度計 (測定波長 254 nm)

カラム温度；40 $^{\circ}$ C

検出感度；試料注入量の1/100に相当する量を注入したとき、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したとき、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。

iii) 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一の条件で、USP 標準品を対照に内標準法により定量試験を行った。内標準物質としては *p*-オキシ安息香酸メチルを用いた。

5. 試験成績

1) 性状：白色の針状晶で、においはない。

2) 紫外吸収スペクトル：原料約0.02 mgを精密に量り、エタノールを加えて正確に2500 mlとし、エタノール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300, 249, 218 nm, 脱水物に換算した $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ (300 nm) は559であった。吸収スペクトルを Fig. 1 に示した。

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。その結果、USP 標準品と同一のスペクトルが得られた (Fig. 2)。

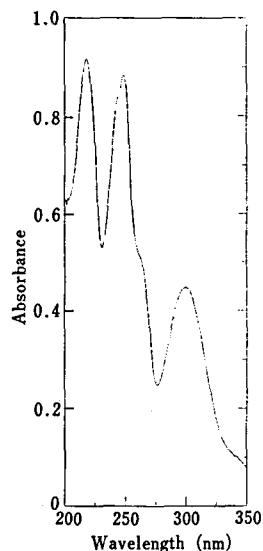


Fig. 1. Ultraviolet spectrum of the material for methoxalene reference standard (Control 901)

4) 融点：148 $^{\circ}$ C

5) 純度試験

i) 薄層クロマトグラフ法：クロマトグラムを Fig. 3 に示した。原料では50 μ g スポットしても不純物は認められなかった。一方 USP 標準品では25 μ g のスポットにより原点に不純物が認められたが、その不純物スポットは試料溶液を1/250に希釈した標準溶液5 μ l (0.1 μ g) より得られた主スポットよ

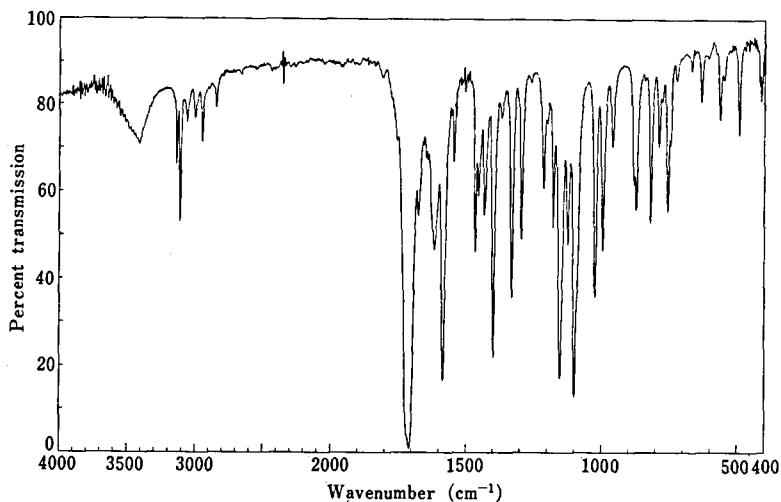


Fig. 2. Infrared spectrum of the material for methoxalene reference standard (Control 901)

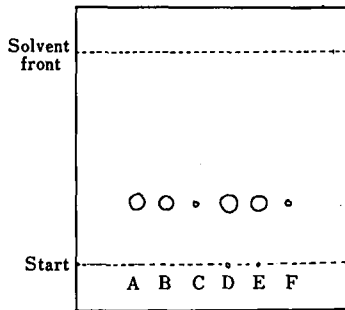


Fig. 3. Thin-layer chromatogram of methoxalene

Solvent system: chloroform-hexane-ethyl acetate (40 : 10 : 3)

A, B, C: material 50, 25, 0.1 μg . D, E, F: USP reference standard 50, 25, 0.1 μg .

りも濃くなかった。本法によるメトキサレンの検出限界は 0.01 μg であった。

ii) 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 に示す。原料では面積百分率 0.05% 以上の不純物は検出されず、したがって本品の純度は 100% と推定された。

一方 USP 標準品では 1 個の不純物が検出され、純度は 99.85% と推定された。

6) 水分：本品約 0.1 g を用いて電量滴定法によりその水分含量を求めた結果、 $0.04 \pm 0.01\%$ であった。

7) 定量：

i) 吸光度法 99.9% (対 USP 標準品, 測定波長 300 nm)

ii) 液体クロマトグラフ法 $100.4 \pm 0.2\%$ (対 USP 標準品)

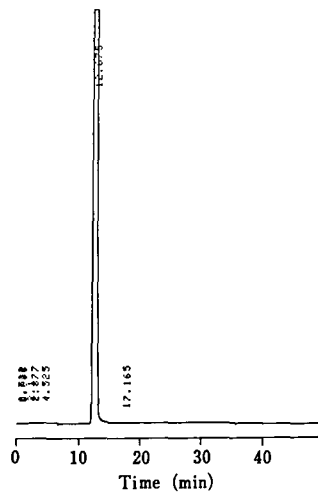


Fig. 4. High-performance liquid chromatogram of the material for methoxalene reference standard (Control 901)

Conditions: column, Inertsil ODS-2 (4.6 mm ϕ \times 150 mm); column temp., 40°C; mobile phase, 35 v/v% acetonitrile in water; flow rate, 0.8 ml/min; detection wavelength, 254 nm

結 論

標準品原料として入手したメトキサレンの品質を USP のメトキサレン標準品と比較した。その結果、各種試験の結果は良好であり、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本品に不純物は検出されなかった。USP 標準品ではそれぞれ 1 個の不純物が検出されたことから、本品は USP 標準品以上の品質を有すると考えられた。これらの結果から、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を認めた。

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大正製薬(株)に深謝致します。

国立衛生試験所インドシアニンググリーン標準品 (Control 901)

村井真美・寛 華子・小松裕明・石光 進・岡田敏史

Indocyanine Green Reference Standard (Control 901)
of National Institute of Hygienic SciencesMami Murai, Hanako Kakehi, Hiroaki Komatsu,
Susumu Ishimitsu and Satoshi Okada

The raw material of indocyanine green was examined for the preparation of the "Indocyanine green Reference Standard (Control 901)". Analytical data obtained were as follows: ultraviolet and visible spectrum, λ_{\max} = 785, 394, 216 nm; absorbance, $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ (785 nm) = 3239; infrared spectrum, same as Indocyanine Green USP Reference Standard; sodium iodide, 4.1%; thin-layer chromatography, no impurities were detected until 100 μg ; high-performance liquid chromatography, 4 impurities were detected; loss on drying, 1.8%; assay, 103.4% against USP Reference Standard.

Based on the above results, this raw material was authorized to be the Reference Standard of the National Institute of Hygienic Sciences.

Key words : indocyanine green, quality evaluation, authorization, JP Reference Standard
(Received May 31, 1991)

国立衛生試験所インドシアニンググリーン標準品 (Control 901) を新たに製造したので報告する。

1. 原料

第一化学薬品(株)より購入した。同社による試験成績は次のとおりである。 $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ (785 nm) : 3284, ヨウ化ナトリウム : 3.6%, 乾燥減量 : 1.8%

2. 参照物質および試薬

参照物質として USP のインドシアニンググリーン標準品を用いた。試薬は試薬特級品または特級相当品を用いた。

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), 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液体クロマトグラフ LC-6A, 検出器 SPD-6A, データ処理装置 C-R6A 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の一般試験法および日本薬局方外医薬品成分規格 (1989) の「インドシアニンググリーン」の試験法を準用した。

1) 薄層クロマトグラフ法による純度試験 : 原料および USP 標準品約 0.025 g をそれぞれメタノール 1 ml に溶かして試料溶液とし, 次の条件で薄層

クロマトグラフによる純度試験を行った。

薄層板 ; プレコーテッド薄層板シリカゲル 60 (20×20 cm, 層厚 0.25 mm, メルク社) を用いた。

展開溶媒 ; 水, *n*-ブタノール, 酢酸 (5 : 4 : 1)

方法および検出法 ; 試料溶液 2 および 4 μl を薄層板にプロットし, 約 10 cm 展開した後薄層板を取り出して風乾し, 肉眼で観察した。

2) 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 0.010 g を精密に量り, 移動相に溶かして正確に 5 ml とし, 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法による純度試験を行った。面積百分率で 0.05% 以上を示すピークを不純物とした。

カラム ; Inertsil ODS-2 (5 μm , 4.6×150 mm)
移動相 ; 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) とアセトニトリルの混液 (6 : 4)。

流量 ; 0.8 ml/min

検出器 ; 紫外吸光光度計 (測定波長 264 nm)

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したとき、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。

5. 試験成績

- 1) 性状：暗緑色の粉末で、おいはない。
- 2) 可視、紫外吸収スペクトル：原料約0.02 gを精密に量り、メタノールを加えて正確に10000 mlとし、メタノールを対照に吸収スペクトルを測定した結果、極大吸収波長は785, 394, 264および216 nmであった。乾燥物に換算した $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ (785

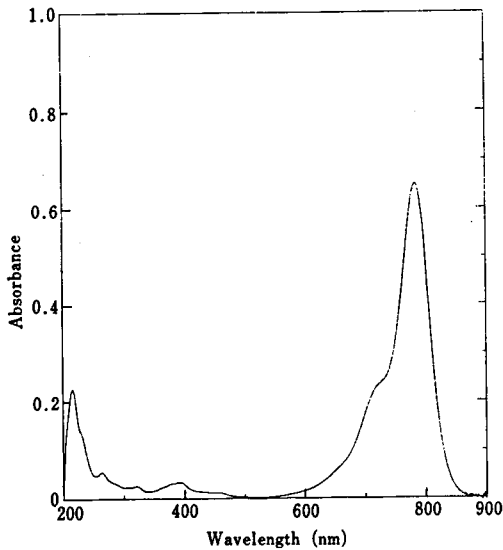


Fig. 1. Ultraviolet and visible spectrum of the material for indocyanine green reference standard (Control 901)

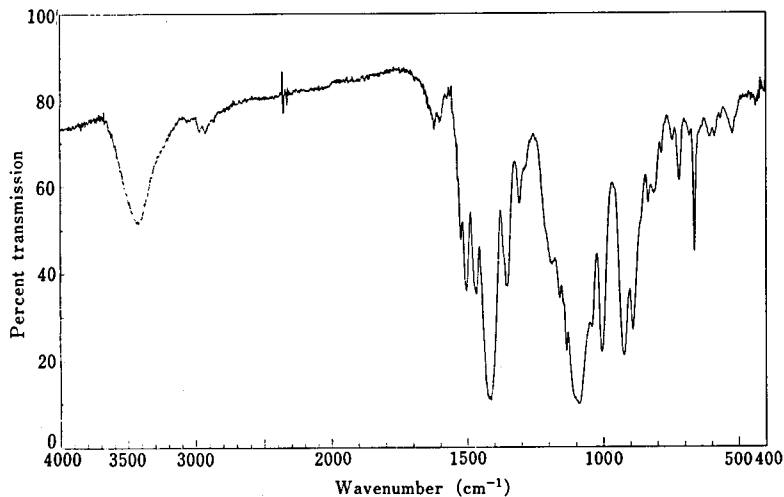


Fig. 2. Infrared spectrum of the material for indocyanine green reference standard (Control 901)

nm) は3239であった。吸収スペクトルをFig. 1に示す。

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。その結果、USP標準品と同一のスペクトルが得られた (Fig. 2)。

4) 純度試験

i) ヨウ化ナトリウム：4.1%

ii) 薄層クロマトグラフ法：クロマトグラムをFig. 3に示した。100 μg のスポットによっても不純物は認められなかった。一方、USP標準品では50 μg のスポットにより、5個の不純物が認められた。本法によるインドシアニングリーンの検出限界は0.05 μg であった。

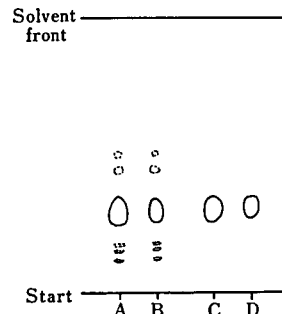


Fig. 3. Thin-layer chromatogram of indocyanine green

Solvent system: upper layer of the mixture of water-*n*-butanol-acetic acid (5 : 4 : 1). A, B: material 50, 100 μg . C, D: USP reference standard 50, 100 μg .

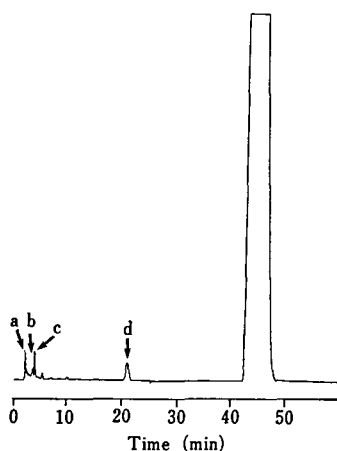


Fig. 4. High-performance liquid chromatogram of the material for indocyanine green reference standard (Control 901)

Conditions: column, Inertsil ODS-2 (4.6 mm ϕ \times 150 mm); column temp., 40°C; mobile phase, mixture of 0.05 M phosphate buffer (pH 6.0) and acetonitrile (6 : 4); flow rate, 0.8 ml/min; detection wavelength, 264 nm

a, b, c and d: peaks of impurities (each peak area was more than 0.05% of total peak area)

iii) 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 に示す。面積百分率 0.05% 以上の不純物ピーク 4 個が検出され、その総量は 0.56% と推定された。一方、USP 標準品では 11 個の不純物が検出され、その総量は 3.68% と推定された。

5) 乾燥減量：1.8% (0.2 g, 減圧, 70°C, 5 時間)

7) 定量 (吸光度法)：103.4% (対 USP 標準品, 測定波長 785 nm)。

結 論

標準品原料として入手したインドシアニングリーンの品質を USP 標準品と比較した。その結果、各種試験の結果は良好であった。液体クロマトグラフ法による純度試験で面積百分率 0.05% 以上の不純物 4 個が検出され、その総量は 0.56% と推定されたが、USP 標準品に比較してはるかに少ないことから、本品は USP 標準品以上の品質を有することが認められた。これらの試験成績により、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第一化学薬品(株)に深謝致します。

国立衛生試験所トルナフトート標準品 (Control 901)

村井真美・寛 華子・小松裕明・石光 進・岡田敏史

Tolnaftate Reference Standard (Control 901) of National Institute of Hygienic Sciences

Mami Murai, Hanako Kakehi, Hiroaki Komatsu,
Susumu Ishimitsu and Satoshi Okada

The raw material of tolinaftate was examined for the preparation of the "Tolnaftate Reference Standard". Analytical data obtained were as follows: ultraviolet spectrum, λ_{\max} = 257 nm; absorbance, $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ (257 nm) = 723; infrared spectrum, same as that of USP Reference Standard of Tolnaftate; melting point, 112.1°C; thin-layer chromatography, no impurities were detected until 500 μ g; high-performance liquid chromatography, no impurities were detected; loss on drying, 0%; water, 0.01%; assay, 100.4% by absorbance method and 100.1% by the HPLC method in terms of the USP Reference Standard.

Based on the above results, this raw material was authorized to be the Reference Standard of the National Institute of Hygienic Sciences.

Key words : tolinaftate, quality evaluation, authorization, JP Reference Standard

(Received May 31, 1991)

第十二改正日本薬局方の「トルナフタート」の確認、定量および同液の定量試験に用いられる国立衛生試験所トルナフタート標準品を新たに製造したので報告する。

1. 原料

日本曹達(株)より供与された。同社による試験成績は次の通りである。HPLCによる純度試験：純度100%，TLCによる純度試験：ワンスポット，残留溶媒（アセトン）：0.03%，水分：0.01%，融点：112.4℃

2. 参照物質および試薬

参照物質として USP のトルナフタート標準品を用いた。試薬類は試薬特級品または特級相当品を用いた。

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-6（平沼産業），融点測定器 PA-10S（宮本理研）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液体クロマトグラフ LC-6A，検出器 SPD-6A，データ処理装置 C-R6A 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）の「トルナフタート」の試験法および第十一改正日本薬局方の一般試験法を準用した。

i) 薄層クロマトグラフ法による純度試験：原料および USP 標準品約 0.050 g をクロロホルム 1 ml に溶かして試料溶液とし，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：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）を用いた。

展開溶媒：トルエン

方法および検出法：試料溶液 5，10 μl を薄層板にスポットし，約 10 cm 展開した後薄層板を取り出して風乾した。これを紫外線（主波長 254 nm）照射下で観察した。

ii) 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 0.010 g を精密に量り，それぞれ移動相に溶かして正確に 10 ml とし，試料溶液とした。この液 5 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。

カラム；LiChrosphere PR 18-5（5 μm，4.0×250 mm）

移動相；0.01 M リン酸二水素カリウム 11 に 1%

w/v リン酸 2 ml を加えたものとアセトニトリルの混液（3：7）。

流量；0.8 ml/min

検出器；紫外吸光光度計（測定波長 257 nm）

カラム温度；40℃

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したとき，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。

iii) 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一の条件で USP 標準品を対照に内標準法により定量試験を行った。内標準物質には *p*-ヒドロキシ安息香酸 *n*-ブチルを用いた。

5. 試験成績

1) 性状：白色の粉末で，わずかに特異なおいがある。

2) 紫外吸収スペクトル：原料約 0.015 mg を精密に量り，メタノールを加えて正確に 2500 ml とし，メタノールを対照に吸収スペクトルを測定した結果，極大吸収波長は 257 nm，乾燥物に換算した E_{1%^{1cm}}（257 nm）は 723 であった。吸収スペクトルを Fig. 1 に示す。

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。その結果，

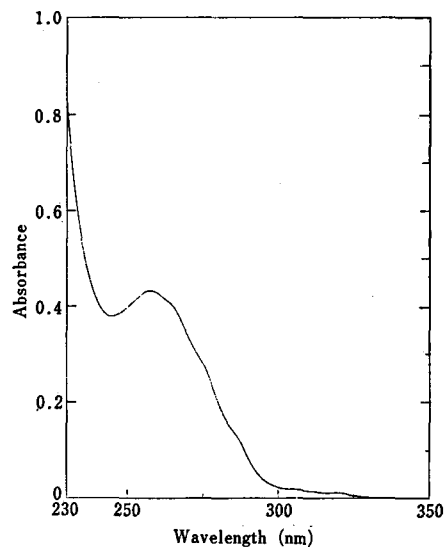


Fig. 1. Ultraviolet spectrum of the material for tolinaftate reference standard (Control 901)

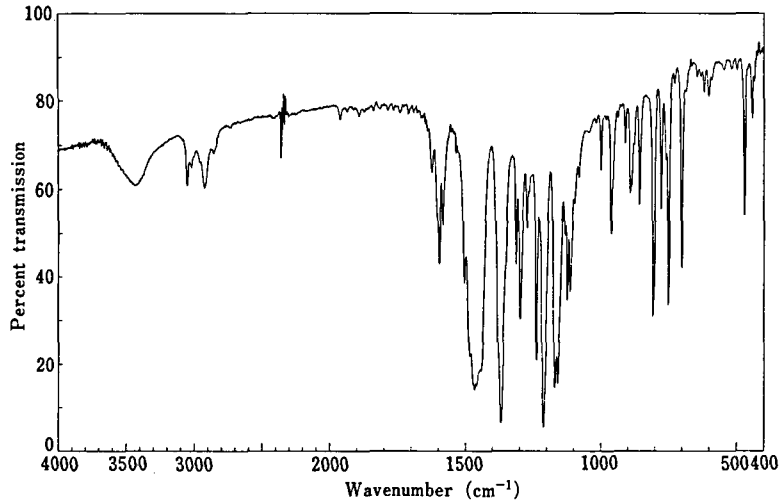


Fig. 2. Infrared spectrum of the material for tolinaftate reference standard (Control 901)

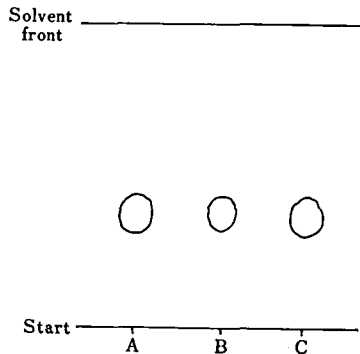


Fig. 3. Thin-layer chromatogram of tolinaftate. Solvent system: toluene. A, B: material 500 and 250 μg . C: USP reference standard 500 μg .

USP 標準品と同一のスペクトルが得られた (Fig. 2).

4) 融点: 112.1°C

5) 純度試験

i) 薄層クロマトグラフ法: クロマトグラムを Fig. 3 に示した, 500 μg スポットしても不純物は認められなかった. 一方 USP 標準品も不純物スポットは認められなかった. 本法によるトルナフタートの検出限界は 0.05 μg であった.

ii) 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 に示す. 面積百分率 0.05% 以下の不純物ピーク 2 個が検出されたが, 0.05% 以上のピークは検出されず, 本品の純度は

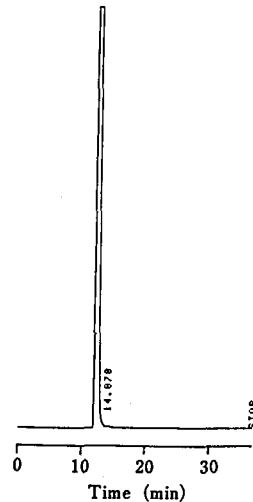


Fig. 4. High-performance liquid chromatogram of the material for tolinaftate reference standard (Control 901)

Conditions: column, LiChrosphere RP18-5 (4.0 mm ϕ \times 250 mm); column temp., 40°C; mobile phase, mixture of 0.01 M potassium dihydrogen-phosphate (containing 0.002% phosphoric acid) and acetonitrile (3 : 7); flow rate, 0.8 ml/min; detection wavelength, 257 nm)

100%と推定された. また USP 標準品でも 5 個の不純物ピークが検出されたが面積百分率で 0.05% に満たないため同様に純度は 100%と推定された.

6) 乾燥減量: 0% (0.5 g, 五酸化リン, 24 時間)

7) 水分: 0.01%

8) 定量

i) 吸光度法: 100.4% (対 USP 標準品, 測定波長 257 nm).

ii) 液体クロマトグラフ法: 100.1% (対 USP 標準品)

結 論

標準品原料として入手したトルナフタートの品質を USP 標準品と比較した。その結果、各種試験の結果は良好であった。薄層クロマトグラフ法による

純度試験では両標準品ともに不純物は検出されなかった。液体クロマトグラフ法による純度試験でも面積百分率 0.05% 以上の不純物は両標準品とも検出されず、純度は 100% と推定された。その他の試験成績より、本品は USP 標準品と同等以上の品質を有すると考えられた。これらの結果から、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を認めた。

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曹達㈱に深謝致します。

国立衛生試験所薄層クロマトグラフ用酢酸レチノール標準品 (Control 901) および薄層クロマトグラフ用パルミチン酸 レチノール標準品 (Control 901)

村井真美・笥 華子・小松裕明・石光 進・岡田敏史

Retinol Acetate Reference Standard for Thin-Layer Chromatography (Control 901) and Retinol Palmitate Reference Standard for Thin-Layer Chromatography (Control 901) of National Institute of Hygienic Sciences

Mami Murai, Hanako Kakehi, Hiroaki Komatsu,
Susumu Ishimitsu and Satoshi Okada

The raw materials of retinol acetate and retinol palmitate were examined for the preparation of the "Retinol Acetate Reference Standard for Thin-layer Chromatography" and "Retinol Palmitate Reference Standard for Thin-layer Chromatography", respectively. Analytical data obtained were as follows: thin-layer chromatography, no impurities were detected in retinol acetate and one impurities was detected in retinol palmitate; The *R_f* values of retinol acetate and retinol palmitate were consistent with those of Reference Standards (Control 713), respectively; ultraviolet spectrum, λ_{\max} = 326~327 nm; relative extinction, within the range reported in JPXI; weight variation of capsules, retinol acetate 224.0 ± 15.5 mg (RSD 6.9%), retinol palmitate 222.0 ± 13.8 mg (RSD 6.2%); assay, retinol acetate 57000 I.U./g, retinol palmitate 57000 I.U./g.

Based on the above results, these raw materials were authorized to be the Reference Standards of the National Institute of Hygienic Sciences.

Key words : retinol acetate, retinol palmitate, thin-layer chromatography, quality evaluation, authorization, JP Reference Standard

(Received May 31, 1991)

酢酸レチノールおよびパ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の確認試験に用いる衛生試験所標準品 (日本薬局方標準品) 「薄層クロマトグラフ用酢酸レチノール標準品」および「薄層クロマトグラフ用パルミチン酸レ

チノール標準品」のロットの更新を行ったので報告する。

前回標準品は 1971 年に調製されたものであり、調製時点におけるビタミン A 単位は 14 年を経過して酢酸レチノールで約 11%、パルミチン酸レチノ

ールで約 19% 低下しており、「ビタミン A 定量法」第 1 法の適用が困難な状態となっていた。

1. 原料

日本ロッシュ(株)より抗酸化剤 (BHA, BHT 各 5 mg/g) 入りの酢酸レチノール (100 万 IU/g) を、理研ビタミン(株)より抗酸化剤 (BHA, BHT 各 5 mg/g) 入りのパルミチン酸レチノール (170 万 IU/g) を標準品用の原料物質として供与された。この原料物質は理研ビタミン(株)において、とうもろこし油により窒素気流中で 5.7 万 IU/g となるよう希釈調製された。日局標準品の濃度となるよう調製されたこのビタミン A 希釈溶液は日清製粉(株)においてソフトカプセルに充填され (220 mg/Cap), 原料調製は完了した。

2. 試薬

試薬は試薬特級品または特級相当品を用いた。薄層板はメルク社製プレコーテッド板シリカゲル F60 (厚さ 0.25 mm, 20×20 cm) を用いた。

3. 装置

自記分光光度計 Ubest-50 (日本分光) を用いた。

4. 試験方法

第十一改正日本薬局方の一般試験法「ビタミン A 定量法」の試験法に従った¹⁾。

2. 試験成績

とうもろこし油による原料物質の希釈調製直後における希釈ビタミン A 溶液の当所と理研ビタミンにおけるビタミン A 定量値を Table 1 に示した。

1) 性状：微黄色透明の楕円形ソフトカプセル。

2) 薄層クロマトグラフ：「ビタミン A 定量法」中の確認試験法に記載される条件で薄層クロマトグラフィを行った。そのクロマトグラムを Fig. 1 に示した。15 単位のスポットにより、酢酸レチノールでは、 R_f 値 0.28 にスポットを認め、それ以外にはスポットを認めなかった。一方、パルミチン

酸レチノールは、 R_f 値 0.49 の主スポットのほかには 1 個の不純物スポット (R_f 値 0.54) を認めた。酢酸レチノールおよびパルミチン酸レチノールともに主スポットの R_f 値は前回標準品と一致した。検出限界は、それぞれ 0.5 単位、0.1 単位であった。

なお、本品中に抗酸化剤として処方されている BHA および BHT は本試験を妨害しないことを確認している。

3) 紫外吸収スペクトル：スペクトルを Fig. 2 に示した。酢酸レチノールおよびパルミチン酸レチノールともに波長 326~327 nm に吸収の極大を示した。また、各波長における吸光度比は次に示したように日局 11 で定める ± 0.030 の範囲内であることから、本品の定量には「ビタミン A 定量法」の第 1 法が適用できることを示している。

4) 定量

上記のように、本品は第 1 法の適用可能な純度をもっていることから、326 nm における吸光度より本品 1 g 中のビタミン A 単位を算出した。

酢酸レチノール : 57000 IU/g

パルミチン酸レチノール : 57000 IU/g

これらの値は高濃度の原料物質をとうもろこし油により規定の濃度に希釈調製した直後の値 (Table 1) に一致しており、カプセル化の過程での変質または劣化が無視し得る程度のものであったことを示

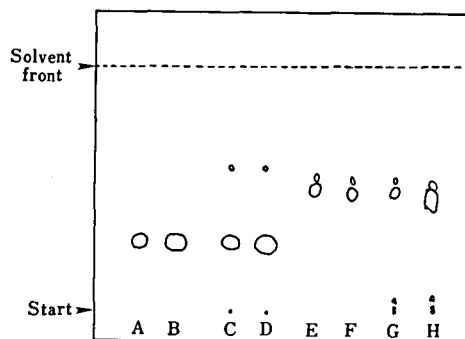


Fig. 1. Thin-layer chromatogram of retinol acetate and retinol palmitate

Solvent system: cyclohexane-ether (12 : 1). A, B: material for retinol acetate reference standard 15 I. U., 30 I. U.. C, D: retinol acetate reference standard (control 713) 15 I. U., 30 I. U.. E, F: material for retinol palmitate reference standard 15 I. U., 30 I. U.. G, H: retinal palmitate reference standard (control 713) 15 I. U., 30 I. U..

Table 1. Assay for the raw material of Retinol Acetate and Retinol Palmitate immediately after diluting concentrated raw material by corn oil

Sample	Assay (IU/g)	
	Riken Vit.	NIHS
Retinol Acetate	57,460	57,100
Retinol Palmitate	57,410	57,310

Table 2. The relative extinctions of retinol acetate and retinol palmitate

λ (nm)	retinol acetate		retinol palmitate	
	measured	reported in JPXI	measured	reported in JPXI
300	0.582	0.578	0.582	0.590
310	0.816	0.815	0.813	0.825
320	0.946	0.948	0.944	0.950
326	1.000	1.000	1.000	1.000
330	0.975	0.972	0.978	0.981
340	0.787	0.786	0.797	0.795
350	0.525	0.523	0.535	0.527

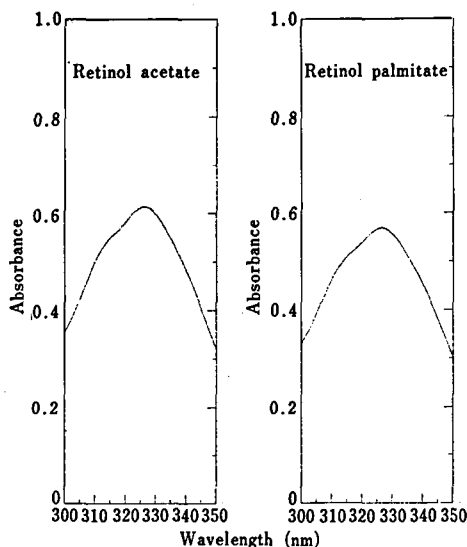


Fig. 2. Ultraviolet spectrums of the material for retinol acetate reference standard (Control 901) and the material for retinol palmitate reference standard (Control 901)

している。

5) ソフトカプセルへの充填

1カプセルあたりの充填量としては目標値を220 mgに設定して充填を行った。その結果、20個平均のバラツキは次に示すように7%以下と良好であった：

酢酸レチノール

224.0±15.5 mg (RSD 6.9%, n=20)

パルミチン酸レチノール

222.0±13.8 mg (RSD 6.2%, n=20)

結 論

標準品原料としてソフトカプセルに充填した形で入手した酢酸レチノールおよびパルミチン酸レチノールの品質試験を行った。その結果、本品は「ビタミンA定量法」第1法が適用可能な純度をもっていることが確認された。また、薄層クロマトグラフ法により酢酸レチノールでは不純物スポットは検出されなかった。一方、パルミチン酸レチノールは主スポットの他に1個の不純物スポットを認めたが、主スポットに比較して微量であり、確認試験用の標準品として問題はないものと考えられた。

以上のような試験成績より、今回調製した酢酸レチノールおよびパルミチン酸レチノール希釈溶液は薄層クロマトグラフ用標準品（日本薬局方標準品）として十分な品質を有することから、上記のような単位付を行ったうえで、Control 901として標準品製造を行った。

終りに、本標準品の製造にあたりご協力いただきました日本ロッシュ(株)、理研ビタミン(株)および日清製粉(株)の各社に深謝いたします。

文 献

- 1) 厚生省，第十一改正日本薬局方：p. 83(1986)

国立衛生試験所マレイン酸メチルエルゴメトリン標準品 (Control 891)

村井真美・笥 華子・小松裕明・石光 進・岡田敏史

Methylergometrine Maleate Reference Standard (Control 891)
of National Institute of Hygienic SciencesMami Murai, Hanako Kakehi, Hiroaki Komatsu,
Susumu Ishimitsu and Satoshi Okada

The raw material of methylergometrine maleate was examined for the preparation of the "Methylergometrine Maleate Reference Standard". Analytical data obtained were as follows: melting point, 181.7°C; ultraviolet spectrum, $\lambda_{\max}=313$ nm; absorbance, $E_{1\text{cm}}^{1\%}(313\text{ nm})=181.3$; infrared spectrum, 3406, 2962, 2928, 1645, 1574 cm^{-1} ; thin-layer chromatography, 6 impurities were detected; high-performance liquid chromatography, no impurities were detected; loss on drying, 0.02%; optical rotation, $[\alpha]_D^{20}=+44.04^\circ$; assay, 99.5% against Ergometrine Maleate Reference Standard (Control 755).

Based on the above results, this raw material was authorized to be the Reference Standard of the National Institute of Hygienic Sciences.

Key words : methylergometrine maleate, quality evaluation, authorization, JP Reference Standard
(Received May 31, 1991)

マレイン酸メチルエルゴメトリンとその製剤の定量試験に用いられる国立衛生試験所マレイン酸メチルエルゴメトリン標準品 (Control 891) を新たに製造したので報告する。

1. 原 料

サンド薬品㈱より供与された。

2. 参照物質および試薬

日本薬局方マレイン酸エルゴメトリン標準品 (Control 755)。試薬は試薬特級品または特級相当品を用いた。

3. 装 置

自記分光光度計 U-3210 (日立), 赤外分光光度計 IR-700 (日本分光), 旋光計 PM-201 (ユニオン), 融点測定器 PA-10S (宮本理研) 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-6A, 検出器 SPD-6A, データ処理装置 C-R6A を用いた。

4. 試験方法

1) 乾燥減量, 旋光度, 定量は, 第十一改正日本薬局「マレイン酸メチルエルゴメトリン」の試験法を準用し, 融点 (分解点), 紫外吸収スペクトル, 赤外吸収スペクトルは, 一般試験法を用いた。

2) 薄層クロマトグラフ法による純度試験: 原料 50 mg を精密に量り, 80 v/v% エタノール/強アンモニア水 (9:1) 5 ml を加えて試料溶液とし, 次の条件で薄層クロマトグラフによる純度試験を行った。

薄層板; プレコーテッド薄層板シリカゲル 60F₂₅₄ (20×20 cm, 厚さ 0.25 mm, メルク社)

展開溶媒; クロロホルム-メタノール-水 (75:25:3)

方法および検出法; 試料溶液を適宜希釈して 0.05~100 μg を薄層板にプロットし, 約 10 cm 展開した後薄層板を取り出して風乾した。これに *p*-アミノベンズアルデヒド 1 g を 96% エタノール 50 ml と塩酸 50 ml の混液に溶解した液を噴霧した。

3) 液体クロマトグラフ法による純度試験: 原料約 20 mg を精密に量り, 水に溶かして正確に 10 ml とし, 試料溶液とした。この液 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。

カラム; LiChrosorb RP-18 (7 μm , 4.0 × 250 mm)

移動相; 0.75 mM トリエチルアミンを含む 50

mM 酢酸緩衝液 (pH 3.4) とアセトニトリルの混液 (3:1).

流量: 0.7 ml/min

検出器: 紫外吸光光度計 (測定波長 254 nm)

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, 得られる主ピークの高さが, 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したとき, 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。面積百分率で 0.05% 以上を示すピークを不純物とした。

5. 試験成績

- 1) 性状: 白色の粉末で, においはない, 融点: 181.7°C (分解)
- 2) 紫外吸収スペクトル: 原料を乾燥後, その約 0.02 g を精密に量り水に溶かして正確に 100 ml とした。この液 6 ml を正確に量り, 水を加えて正確に 50 ml とした液を用いて測定した吸収スペクトルを Fig. 1 に示す。波長 313 nm に吸収の極大を示し, 比吸光度 $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ (313 nm) は, 181.3 ± 0.6 ($n=3$) 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測定した赤外吸収スペクトルを Fig. 2 に示す。3406, 2962, 2928, 1645, 1574 cm^{-1} に特異吸収を認めた。

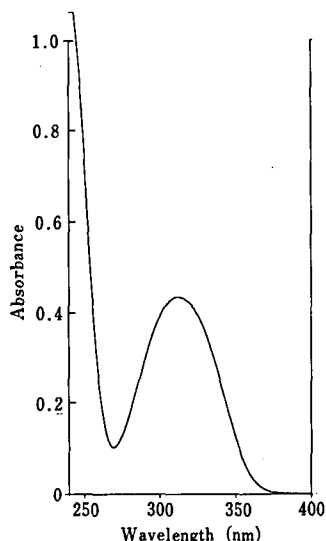


Fig. 1. Ultraviolet spectrum of the material for methylethergometrine maleate reference standard (Control 891)

- 4) 確認試験: 定量法で得た呈色液の吸収スペクトルを測定した結果, 波長 546 nm および 624 nm に吸収の極大を示した。

5) 純度試験

- i) 薄層クロマトグラフ法: クロマトグラムを Fig. 3 に示した。50 μg のスポットにより 6 個の不純物を認めたが, 0.25 μg をスポットしたときの主スポットよりも濃くなかったことから, いずれの不

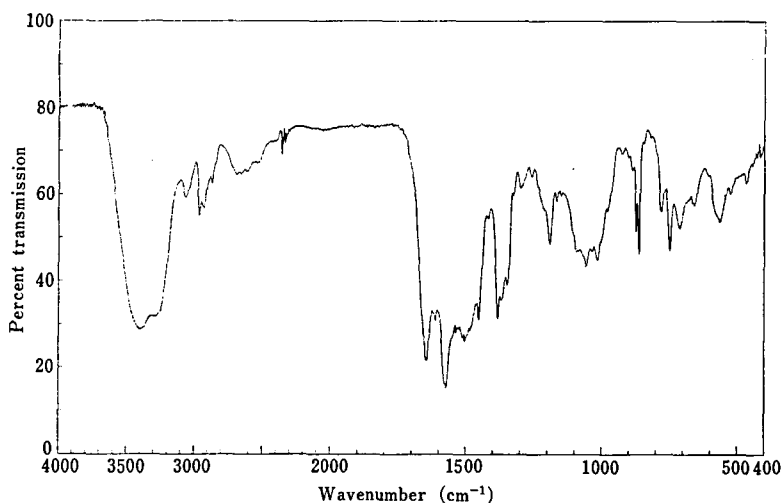


Fig. 2. Infrared spectrum of the material for methylethergometrine maleate reference standard (Control 891)

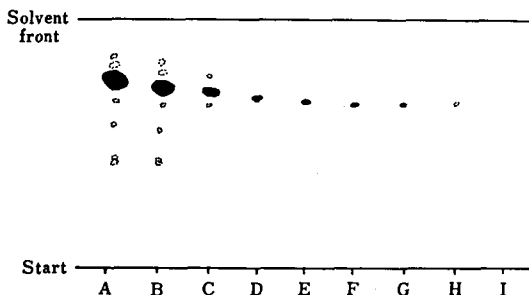


Fig. 3. Thin-layer chromatogram of the material for methylethylergometrine maleate reference standard (Control 891)

Solvent system: chloroform-methanol-water (75 : 25 : 3)

A, B, C, D, E, F, G, H, I: 100, 50, 5, 0.5, 0.38, 0.25, 0.15, 0.10, 0.05 μg , respectively.

純度も0.5%以下であると推定された。本法の検出限界は0.10 μg であった。

ii) 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に示す。マレイン酸エルゴメトリンほか3個の不純物ピークが認められたが、それらの面積百分率は0.05%以下であり、したがって純度は100%と推定された。

薄層クロマトグラフ法では検出限界から考えて、0.2%以上と推定される不純物6個が検出されたのに対し、液体クロマトグラフ法では面積百分率で0.05%以下の不純物4個が検出されたのみであった。この違いは検出方法の違いによるものと思われる。すなわち、液体クロマトグラフ法が紫外部254 nmの吸収で検出しているのに対し、薄層クロマトグラフ法では *p*-ジメチルアミノベンズアルデヒドによる呈色反応を用いていることから、混在する不純物が主成分よりも強い吸収を示す化合物に変換されたものと推定される。

6) 乾燥減量：0.02% (0.1g, 減圧, 五酸化リン, 4時間)

7) 旋光度： $[\alpha]_D^{20} = +44.04^\circ$ (乾燥後, 0.1g, 水, 20 ml, 100 mm)

8) 定量：マレイン酸エルゴメトリン標準品

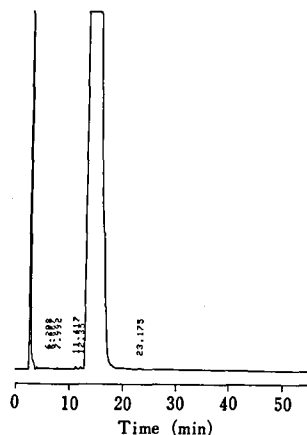


Fig. 4. High-performance liquid chromatogram of the material for methylethylergometrine maleate reference standard (Control 891)

a: maleic acid; b: ergometrine

Conditions: column, LiChrosorb RP-18 (4.0 mm ϕ \times 250 mm); column temp., room temp.; mobile phase, mixture of 0.05 M acetate buffer (pH 3.4, containing 0.75 mM triethylamine) and acetonitrile (3 : 1); flow rate, 0.7 ml/min; detection wavelength, 254 nm

(Control 755) を対照とするとき, 99.5 \pm 2.6% (n=3) であった。

結 論

標準品原料として入手したマレイン酸メチルエルゴメトリンの品質試験を行った。薄層クロマトグラフ法による純度試験で6個の不純物が検出された。一方液体クロマトグラフ法による純度試験でも、4個の不純物が検出されたが、いずれも微量であるため、液体クロマトグラフ法による純度は100%と推定された。また、定量値は99.5%であったこと、およびその他の試験成績より、今回入手した標準品原料は国立衛生試験所標準品として適した品質を有することを認めた。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サンド薬品(株)に感謝致します。

国立衛生試験所シクランデラート標準品 (Control 901)

笥 華子・村井真美・小松裕明・石光 進・岡田敏史

Cyclandelate Reference Standard (Control 901)
of National Institute of Hygienic SciencesHanako Kakehi, Mami Murai, Hiroaki Komatsu,
Susumu Ishimitsu and Satoshi Okada

The raw material of cyclandelate was examined for preparation of the "Cyclandelate Reference Standard". Analytical data obtained were as follows: melting point, 60°C; ultraviolet spectrum, λ_{\max} = 252, 258 and 264 nm $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ = 6.1 (252 nm), 7.5 (258 nm), 5.9 (264 nm); infrared spectrum, 3454, 2948, 1730, 1453, 1202, 737, 695 cm^{-1} ; thin-layer chromatography, no impurities were detected until 1000 μg ; high-performance liquid chromatography (HPLC), one impurity was detected, loss on drying, 0.00%.

Based on the above results, this raw material was authorized to be the Reference Standard of the National Institute of Hygienic Sciences.

Key words : cyclandelate, quality evaluation, authorization, JP Reference Standard

(Received May 31, 1991)

第十二改正日本薬局方において新たに収載された「シクランデラート」の定量法には液体クロマトグラフ法が採用されている。この定量法において用いられるシクランデラート標準品を製造したので報告する。

なお、本品は日本薬局方外医薬品成分規格(1989)において「シクランデラート」として収載されていたものである。

1. 原料

標準品原料は山川薬品工業(株)より供与された。同社による液体クロマトグラフ法による純度試験によればその純度は99.80%である。また、赤外吸収スペクトルの吸収波数は3460, 2950, 1732, 1453, 1201, 739, 696 cm^{-1} であった。

2. 試薬

試薬は試薬特級品または特級相当品を用いた。

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-6 (平沼産業), 融点測定器 PA-10S (宮本理研) 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-6A, 検出器 SPD-6A, データ処理装置 C-R6A を用いた。

4. 試験方法

特に記すもののほかは、第十一改正日本薬局方の一般試験法、および日本薬局方外医薬品成分規格(1989)の「シクランデラート」の試験法を準用した。

1) 薄層クロマトグラフ法による純度試験

本品0.100 g をエタノール1 ml に溶かして試料溶液とし、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: プレコーテッド薄層板シリカゲル 60F₂₅₄ (20×20 cm, 厚さ0.25 mm, メルク社) を用いた。

展開溶媒: ヘキサン-酢酸エチル-氷酢酸混液 (8:2:1)

試験方法: 試料溶液 2.8~10 μl (280~1000 μg) を薄層板にスポットし、約10 cm 展開した後、薄層板を取り出し、風乾した。これに紫外線 (主波長 254 nm) を照射し、ついでヨウ素蒸気にさらしてそれぞれ観察した。

2) 液体クロマトグラフ法による純度試験

本品約0.050 g を精密に量り、移動相に溶かして正確に50 ml とし、試料溶液とした。この液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。

カラム：Inertsil ODS (5 μm , 4.6 \times 150 mm)

移動相：アセトニトリル-水混液 (4:1)

流量：0.5 ml/min

検出器：紫外吸光光度計 (測定波長 228 nm)

カラム温度：40 $^{\circ}\text{C}$

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、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したとき、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。面積百分率で 0.05% 以上を示すピークを不純物とした。

5. 試験成績

1) 性状：白色の粉末で、特異なにおいがあり、味は苦い。

2) 融点：60 $^{\circ}\text{C}$

3) 紫外吸収スペクトル：本品約 0.050 g を精密に量り、エタノールを加えて正確に 100 ml とし、エタノールを対照に吸収スペクトルを測定した結果、252, 258, 264 nm に吸収の極大を示した。E₁^{1%}_{1cm} は 6.1 (252 nm), 7.5 (258 nm), 5.9 (264 nm) であった。スリット幅は、0.2 nm で測定した。吸収スペクトルを Fig. 1 に示す。

4) 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赤外吸収スペクトルを Fig. 2 に示す。3454, 2948, 1730, 1453, 1202, 737, 695 cm^{-1} 付

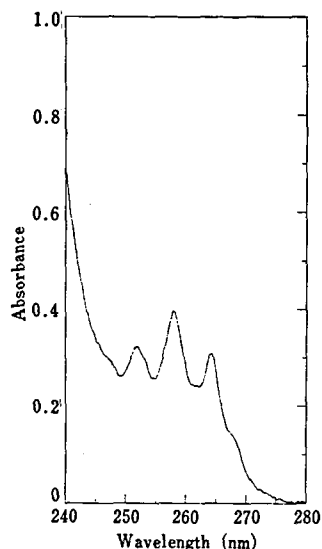


Fig. 1. Ultraviolet spectrum of the material for cyclandelate reference standard (Control 901)

近に吸収を認めた。

本品には 3 個の不斉炭素があるが、合成原料に *cis*-3,3,5-トリメチルサイクロヘキサノールを用いているため、実際には 4 種の光学異性体 (ジアステレオマー) の混合物となる。再結晶の際の溶媒組成、濃度、冷却法等によりその異性体比は微妙に変化し、その変化が赤外吸収スペクトル上に反映される。その意味では上記の吸収波数および吸収の強度は本品についての値であり、ロットが変われば波数 (5-

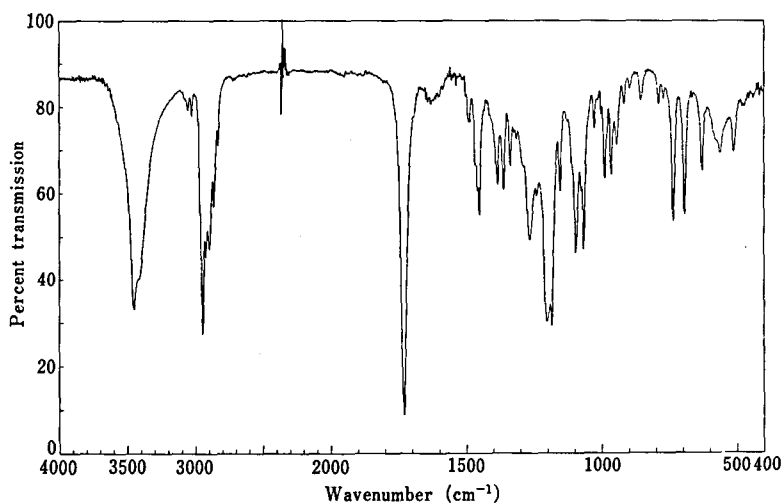


Fig. 2. Infrared spectrum of the material for cyclandelate reference standard (Control 901)

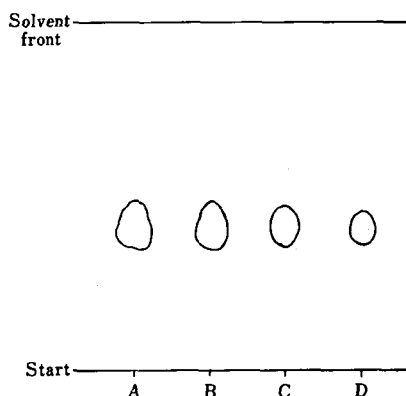


Fig. 3. Thin-layer chromatogram of the material for cyclandelate reference standard

Solvent system: hexane-ethyl acetate-acetic acid (8 : 2 : 1).

A, B, C, D: material 280, 500, 800, 1000 μg , respectively.

10 cm^{-1}), 強度とも変化する可能性があるため, 赤外吸収スペクトルの波数と強度を規格値として考えることはできない。

5) 純度試験:

i) 薄層クロマトグラフ法

薄層クロマトグラムを Fig. 3 に示した。スポット量 1000 μg においても紫外線照射法およびヨウ素蒸気法の両検出法において不純物は認められなかった。本法によるシクランデラートの検出限界は両法において 2.5 μg であった。

ii) 液体クロマトグラフ法

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, その量は 0.13% と推定された。

6) 乾燥減量: 0.00% (1g, シリカゲル, 24 時間)

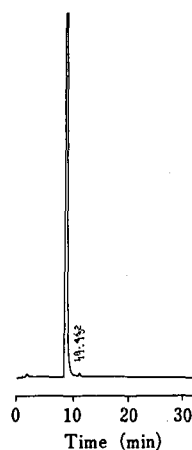


Fig. 4. High-performance liquid chromatogram of the material for cyclandelate reference standard (Control 901)

Conditions: column, Inertsil ODS (4.6 mm ϕ \times 150 mm); column temp., 40°C; mobile phase, mixture of acetonitrile and water (4 : 1); flow rate, 0.5 ml/min; detection wavelength, 228 nm)

結 論

標準品原料として入手したシクランデラートの品質試験を行った。薄層クロマトグラフ法では不純物は検出されなかったが, 液体クロマトグラフ法により微量不純物 1 個が検出され, その量は面積百分率法により 0.13% と推定された。本品は 4 種の光学異性体の混合物であり, 精製法によりその異性体比が微妙に変化し, その変化が赤外吸収スペクトルの吸収の波数と強度に反映されるためこれらの値を規格化することは現段階では困難であった。しかしながら, 本品が定量用の標準品として十分な品質を有することは明らかであることから, 国立衛生試験所標準品 Control 901 として製造を行った。

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山川薬品工業㈱に深謝致します。

国立衛生試験所ショ糖オクタ硫酸エステルカリウム標準品 (Control 901)

村井真美・笥 華子・小松裕明・石光 進・岡田敏史

Potassium Sucrose Octa Sulfate Reference Standard (Control 901)
of National Institute of Hygienic SciencesMami Murai, Hanako Kakehi, Hiroaki Komatsu,
Susumu Ishimitsu and Satoshi Okada

The raw material of potassium sucrose octa sulfate was examined for the preparation of the "Potassium sucrose octa sulfate Reference Standard (Control 901)". Analytical data obtained were as follows: infrared spectrum, 3494, 1642, 1247, 1002, 795, 584 cm^{-1} ; high-performance liquid chromatography, 3 impurities were detected; water, 6.2%; assay of sucrose octa sulfate, 99.1%.

Based on the above results, this raw material was authorized to be the Reference Standard of the National Institute of Hygienic Sciences.

Key words : potassium sucrose octa sulfate, quality evaluation, authorization, JP Reference Standard
(Received May 31, 1991)

第十二改正日本薬局方において「スクラルファート」の定量試験に用いられる国立衛生試験所ショ糖オクタ硫酸エステルカリウム標準品を新たに製造したので報告する。

1. 原 料

中外製薬(株)より購入した。同社による試験成績は次のとおりである。HPLCによる純度試験：純度100%，水分：6.2%，含量：99.1%。

2. 試 薬

試薬は試薬特級品または特級相当品を用いた。

3. 装 置

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-6 (平沼産業), また, 液体クロマトグラフ装置は東ソー(株)製のポンプ CCPD, 検出器 RI-8012, および島津製作所製のデータ処理装置 C-R6A 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の一般試験法に従った。

1) 液体クロマトグラフ法による純度試験：原料約 0.50 g を精密に量り, 移動相に溶かして正確に 10 ml とし, 試料溶液とした。この液 50 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。

カラム：Unisil Q NH_2 (5 μm , 4.6 \times 150 mm)

移動相：硫酸アンモニウム 48 g を水 1 l に溶かし, リン酸を用いて pH を 3.5 に調整した。

流量：0.8 ml/min

検出器：示差屈折計

カラム温度：30 $^{\circ}\text{C}$

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したとき, 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) ショ糖オクタ硫酸エステルの定量：原料約 0.2 g を精密に量り, 水 3 ml に溶かした。この液を強酸性イオン交換樹脂 (アンバーライト 120B) を用いて調製したカラム (内径約 10 mm, 樹脂層約 100 mm) に流し込んだ。流出速度は 1 分間 5 ml とし, 液が樹脂層に流入した後, 少量の水で洗い, 更に水で溶離し, 流出液 50 ml を, あらじめ 0.1 N 水酸化ナトリウム液 30 ml を正確に入れた容器に集めた。流出液につき, 過量の水酸化ナトリウムを 0.1 N 塩酸で滴定した (電位差滴定法)。同様の方法で空試験を行い補正した。

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) 赤外吸収スペクトル：臭化カリウム錠剤法を

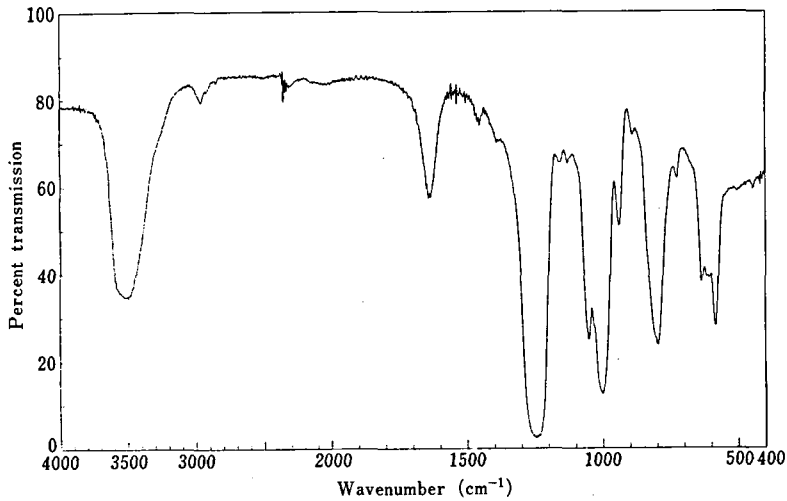


Fig. 1. Infrared spectrum of the material for potassium sucrose octa sulfate reference standard (Control 901)

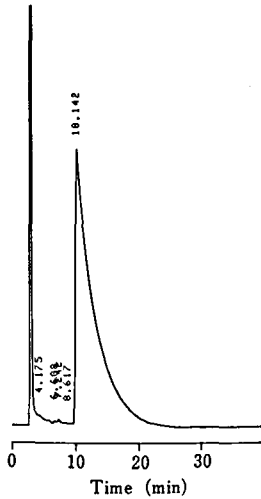


Fig. 2. High-performance liquid chromatogram of the material for potassium sucrose octa sulfate reference standard (Control 901)

Conditions: column, Unisil Q NH₂ (4.6 mm ϕ × 150 mm); column temp., 30°C; mobile phase, 0.363 M aq. ammonium sulfate (pH 3.5 by phosphoric acid); flow rate, 0.8 ml/min; detector, refractive index

用いて赤外吸収スペクトルを測定した。その結果、3494, 1642, 1247, 1002, 795, 584 cm⁻¹に特異吸収を認めた (Fig. 1)。

3) 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. 2 に示す。面積百分率 0.05% 以上の不純物ピーク 3 個が検出され、その総量は 0.38% と推定された。

4) 水分：6.2% (0.02 g, 電量滴定法)

5) ショ糖オクタ硫酸エステルの定量：99.1%

結 論

標準品原料として入手したショ糖オクタ硫酸エステルの品質試験を行った結果、各種試験の結果は良好であった。液体クロマトグラフ法による純度試験で面積百分率 0.05% 以上の不純物 3 個が検出されたが、その総量は 0.38% とわずかであり、本品の純度は 99.62% と推定された。定量値は 99.1% であった。以上の成績より、本品は国立衛生試験所標準品として適した品質を有することを認め、水分含量を表示して配布を開始した。

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中外製薬㈱に深謝致します。

国立衛生試験所リボフラビン標準品 (Control 891)

村井真美・笥 華子・小松裕明・石光 進・岡田敏史

Riboflavin Reference Standard (Control 891)
of National Institute of Hygienic SciencesMami Murai, Hanako Kakehi, Hiroaki Komatsu,
Susumu Ishimitsu and Satoshi Okada

The raw material of riboflavin was examined for the preparation of the "Riboflavin Reference Standard (Control 891)".

Analytical data obtained were as follows: melting point, 238.2°C (decomposition); absorbance, $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 859$ (267 nm), 277 (372 nm), 327 (445 nm); infrared spectrum, same as Riboflavin Reference Standard (Control 872); thin-layer chromatography, 5 impurities were detected; high-performance liquid chromatography, 11 impurities were detected; loss on drying, 0.25%; optical rotation, $[\alpha]_D^{20} = -133.6^\circ$; solubility, less than 16 min; assay, 100.1% against Riboflavin Reference Standard (Control 872).

Based on the above results, this raw material was authorized to be the Reference Standard of the National Institute of Hygienic Sciences.

Key words : riboflavin, quality evaluation, authorization, JP Reference Standard

(Received May 31, 1991)

リボフラビンおよび同酸の定量、リン酸リボフラビンナトリウムおよび同注射液の定量に用いる“リボフラビン標準品”の在庫が僅少になったのでロットの更新を行った。

1. 原 料

東京田辺製薬㈱より購入した。同社による試験成績は次のとおりである。融点：284°，旋光度：+135，乾燥減量：0.23%，総窒素：14.7%，吸光度 $A_{0.001\%}^{1\text{cm}} = 0.328$ (445 nm)

2. 参照物質および試薬

日本薬局方標準品 (Control 872)，試薬類は試薬特級品または特級相当品を用いた。

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)，旋光計 DIP-370 (日本分光)，融点測定器 PA-10S (宮本理研) 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-6A，検出器 SPD-6A，データ処理装置 C-R6A を用いた。

4. 試験方法

1) 乾燥減量，紫外吸収スペクトル，旋光度，定量は，第十一改正日本薬局「リボフラビン」の試験

法を準用し，融点 (分解点)，赤外吸収スペクトルは，一般試験法を用いた。

2) 薄層クロマトグラフ法による純度試験：標準品 (Control 872) および原料を乾燥し，その約 1 mg を精密に量り，それぞれに希水酸化ナトリウム試液 (0.1 N) 0.1 ml を加えて溶解後，メタノール 4.8 ml および 0.1 N 塩酸 0.1 ml を加えて標準溶液，試料溶液とし，次の条件で薄層クロマトグラフによる純度試験を行った。

薄層板；プレコーテッド薄層板シリカゲル 60 (20×20 cm，層厚 0.25 mm，メルク社)

展開溶媒；ジクロロメタン・メタノール・水酸化テトラメチルアンモニウム混液 (80：19：1)

方法および検出法；標準溶液 10 μl (2 μg) および 20 μl (4 μg)，試料溶液 1~30 μl (0.2~6 μg) を薄層板にプロットし，約 10 cm 展開した後薄層板を取り出して風乾した。これに長波長紫外線 (主波長 366 nm) を照射し，生じた蛍光スポットを観察した。

3) 液体クロマトグラフ法による純度試験：原料約 1 mg を精密に量り，移動相に溶かして正確に 10 ml とし，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法による純度試験を行った。

カラム；Inertsil ODS-2 (5 μm , 4.6 \times 150 mm)

移動相；0.005 M リン酸二水素カリウム水溶液 (pH 3.0) とアセトニトリルの混液 (87.5 : 12.5).

流量；0.8 ml/min

検出器；紫外吸光度計 (測定波長 267 nm)

カラム温度；40 $^{\circ}\text{C}$

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。

4) 溶解度；標準品および原料を乾燥し、その約10 mg を精密に測り、5%酢酸100 ml を加え、75 \pm 1 $^{\circ}\text{C}$ に加熱し、リボフラビンの溶解度を観察した。

5. 試験成績

1) 性状；だいたい黄色の粉末で、わずかににおいがある。

2) 融点；283.2 $^{\circ}\text{C}$ (分解)

3) 紫外および可視吸収スペクトル；原料約0.01 mg を精密に量り、リン酸緩衝液 (pH 7.0) を加えて正確に1000 ml し、リン酸緩衝液を対象に吸収スペクトルを測定した結果、267, 372, 445 nm に吸収の極大を示した。比吸光度 $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ は 859 (267 nm), 277 (372 nm), 327 (445 nm) であった。吸収スペクトルを Fig. 1 に示す。

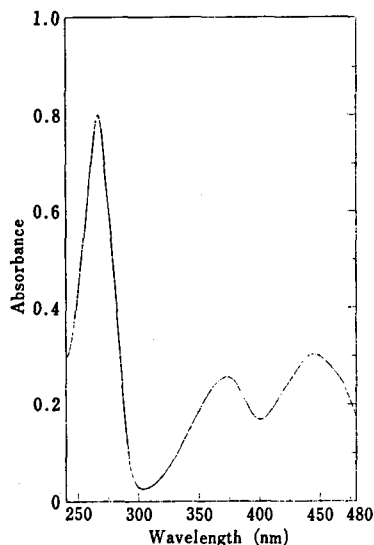


Fig. 1. Ultraviolet and visible spectrum of the material for riboflavin reference standard (Control 891)

4) 赤外吸収スペクトル；臭化カリウム錠剤法を用いて測定した赤外吸収スペクトルを Fig. 2 に示す。前回標準品と同一のスペクトルが得られた。

5) 純度試験

i) 薄層クロマトグラフ法；クロマトグラムを Fig. 3 に示した。原料および標準品では、各5個の発蛍光性の不純物のスポットが観察された。

ii) 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 に示す。原料では

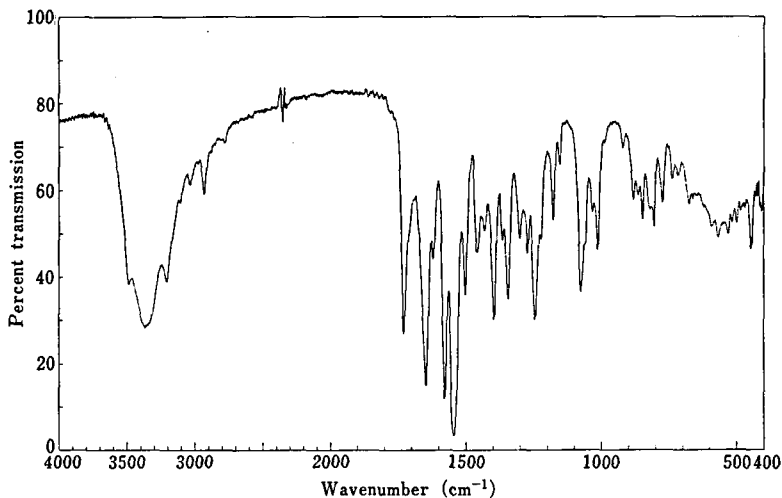


Fig. 2. Infrared spectrum of the material for riboflavin reference standard (Control 891)

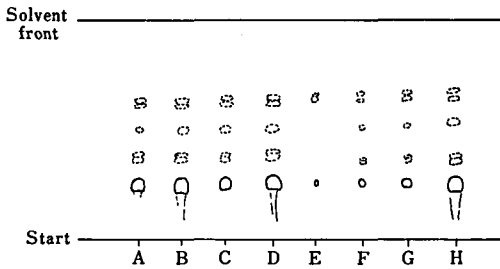


Fig. 3. Thin-layer chromatogram of riboflavin
Solvent system: dichloromethane-methanol-tetra-
methylammonium hydroxide (80 : 19 : 1)
A, B: Japanese Pharmacopoeia Reference Stan-
dard 2 μ g, 4 μ g. C, D, E, F, G, H: material 2, 4,
0.2, 0.4, 1 and 6 μ g, respectively.

面積百分率 0.05%以上の不純物ピーク 11 個が検出され、その総量は 1.61%と推定された。また標準品でも 11 個の不純物ピークが検出され、その総量は 1.38%と推定された。

- 6) 乾燥減量：0.25% (0.2 g, 105℃, 2 時間)
- 7) 旋光度： $[\alpha]_D^{20} = -133.6^\circ$ (0.1 g, 100 mm)
- 8) 溶解度：16 分以内に溶解した。
- 9) 定量 (吸光度法)： $100.1 \pm 0.5\%$ (n=3, 対前回標準品)

結 論

標準品原料として入手したりボフラビンの品質を日本薬局方標準品 (Control 872) と比較検討した。薄層クロマトグラフ法による純度試験で 5 個の蛍光不純物が検出され、液体クロマトグラフ法による純度試験でも、11 個の不純物が検出され、その純度

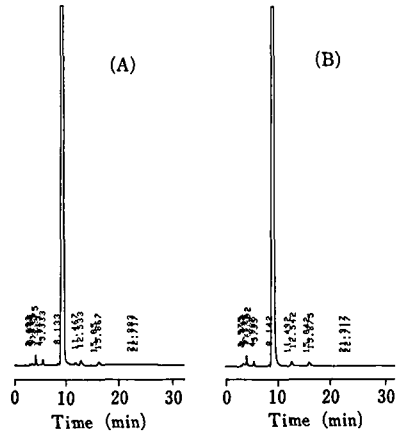


Fig. 4. High-performance liquid chromatograms of reference standards for riboflavin

(A): raw material; (B): reference standard (control 872)

Conditions: column, Inertsil ODS-2 (4.6 mm ϕ × 150 mm); column temp., 40℃; mobile phase, mixture of 0.005 M aq. potassium dihydrogenphosphate (pH 3.0) and acetonitrile (875 : 125); flow rate, 0.8 ml/min; detection wavelength, 267 nm

は 98.39%と推定された。高純度ではないが、日本薬局方標準品も同程度の純度であり、このものを対照とした定量値は 100.1%であることから、今回入手した原料は日本薬局方標準品と同程度の品質であると考えられる。その他の測定結果などより、国立衛生試験所標準品として適した品質を有することを認めた。

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東京田辺製薬㈱に深謝致します。

国立衛生試験所 *d*-カンフル標準品 (Control 901)
および *dl*-カンフル標準品 (Control 901)

村井真美・寛 華子・小松裕明・石光 進・岡田敏史

d-Camphor Reference Standard (Control 901) and *dl*-Camphor Reference
Standard (Control 901) of National Institute of Hygienic Sciences

Mami Murai, Hanako Kakehi, Hiroaki Komatsu,
Susumu Ishimitsu and Satoshi Okada

The raw materials of *d*-camphor and *dl*-camphor were examined for the preparation of the "*d*-Camphor Reference Standard" and "*dl*-Camphor Reference Standard". Analytical data obtained were as follows: ultraviolet spectrum, $\lambda_{\max}=257$ nm; absorbance, $E_{1\%}^{1\text{cm}}(257 \text{ nm})=723$; infrared spectrum, 2956, 1742, 1045 cm^{-1} ; optical rotation, $[\alpha]_D^{20}=+42.9^\circ$ (*d*-camphor), $[\alpha]_D^{20}=-0.00^\circ$ (*dl*-camphor); melting point, 180°C (*d*-camphor), 179°C (*dl*-camphor); gas-chromatography, one impurity was detected in *d*-camphor and four impurities were detected in *dl*-camphor.

Based on the above results, these raw materials were authorized to be the Reference Standards of the National Institute of Hygienic Sciences.

Key words: *d*-camphor, *dl*-camphor, quality evaluation, authorization, JP Reference Standard

(Received May 31, 1991)

第十二改正日本薬局方において「*d*-カンフル」および「*dl*-カンフル」の定量に用いられる標準品を製造したので報告する。

1. 原料

大正製薬㈱より供与された。

2. 試薬

試薬は試薬特級品または特級相当品を用いた。

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), 融点測定器 PA-10S (宮本理研), 旋光計 DIP-370 (日本分光) を用いた。また, ガスクロマトグラフ装置は島津製作所製の GC-8A, データ処理装置 C-R6A 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の一般試験法および「*d*-カンフル」「*dl*-カンフル」の試験法を準用した。

1) ガスクロマトグラフ法による純度試験: 原料約 0.040 g を精密に量り, エタノールに溶かして正確に 2 ml とし, 試料溶液とした。この液 2 μl につき, 次の条件でガスクロマトグラフ法による純度試験を行った。

カラム: 内径 3.2 mm, 長さ 3 m のガラス管にポリエチレングリコール 20 M を, 酸およびジメチルジクロルシランで処理した 180~250 μm のガスクロマトグラフ用ケイソウ土に 10% の割合で被覆したものを充填したもの (PEG 20M 10% Chromsorb W AW-DMCS 60/80 Mesh, ガスクロ工業)。

カラム温度: 130°C

キャリアーガス: 窒素

流量: *d*- および *dl*-カンフルの保持時間が約 13 分になるように調整した。

検出器: 水素炎イオン化検出器

検出感度: 試料注入量の 1/100 に相当する量を注入したとき, 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。

5. 試験成績

1) 性状: 無色の結晶性の粉末で, 特異な芳香があり, 味はわずかに苦く, 清涼味がある。

2) 紫外吸収スペクトル: *d*- および *dl*-カンフル約 0.120 g を精密に量り, それぞれエタノールを

加えて正確に 50 ml とし、エタノールを対象に紫外吸収スペクトルを測定した結果、極大吸収波長は 289 nm, $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ (289 nm) は *d*-体, *dl*-体共に 2.04 であった。吸収スペクトルを Fig. 1 に示す。

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。その結果, *d*-体, *dl*-体共に 2956, 1742, 1045 cm^{-1} 付近に極大吸収を示した (Fig. 2)。

4) 旋光度：*d*-体, $+42.9^\circ$ (0.4 g, 無水エタノール 20 ml, 100 mm)。 *dl*-体, -0.00° (0.4 g, 無水エタノール 20 ml, 100 mm)。

5) 融点：*d*-体, 180 $^\circ\text{C}$ 。 *dl*-体, 179 $^\circ\text{C}$ 。

6) ガスクロマトグラフ法による純度試験：クロマトグラムの一例をを Fig. 3 に示した。 *d*-カンフルでは面積百分率で 0.05% 以上の不純物 1 個が検出され、その量は 0.34% と推定された。したがって、*d*-カンフルの純度は 99.66% と推定された。一方、*dl*-カンフルでは面積百分率 0.05% 以上の不純物 4 個が検出され、その総量は 0.55% と推定された。したがって、*dl*-カンフルの純度は 99.45% と推定された。

結 論

標準品原料として入手した *d*-カンフルおよび *dl*-カンフルの品質試験を行った。その結果、各種

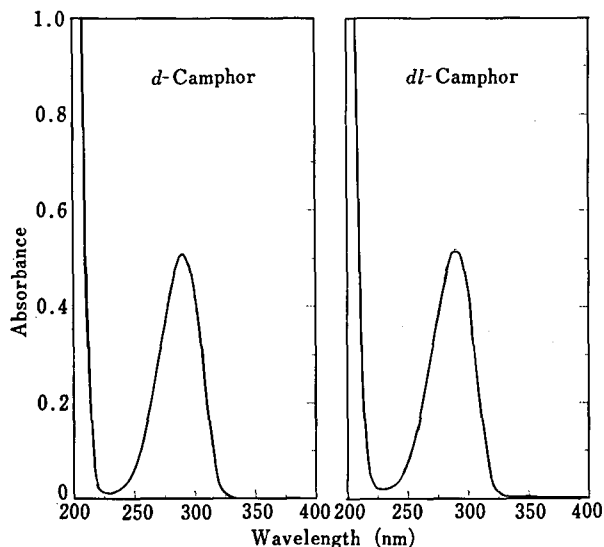


Fig. 1. Ultraviolet spectrums of the materials for *d*-camphor reference standard (Control 901) and *dl*-camphor reference standard (Control 901)

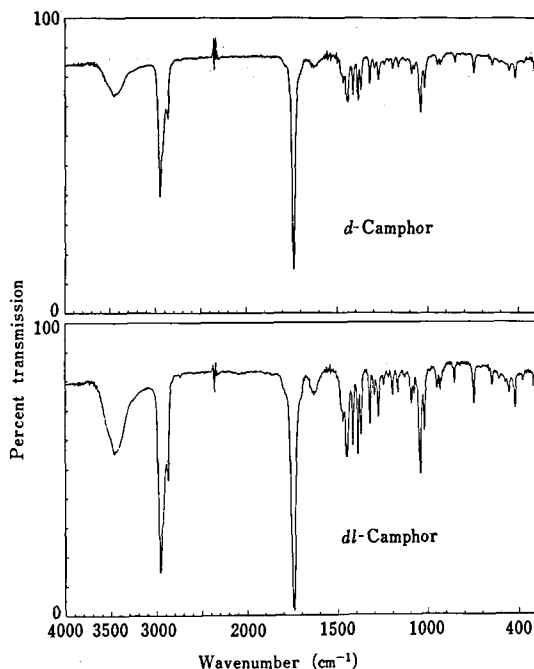


Fig. 2. Infrared spectrum of the materials for *d*-camphor reference standard (Control 901) and *dl*-camphor reference standard (Control 901)

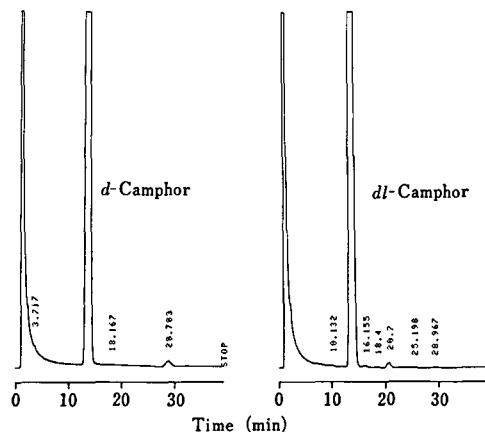


Fig. 3. Gas chromatograms of the materials for *d*-camphor reference standard (Control 901) and *dl*-camphor reference standard (Control 901)

Conditions: column, PEG 20 M 10% Chromsorb W AW-DMCS 60/80 mesh 3.2 mm ϕ \times 3 m; column temp., 130 $^\circ\text{C}$; carrier gas, nitrogen; detector, FID

試験の結果は良好であった。ガスクロマトグラフ法による純度試験でそれぞれ 1 個および 4 個の不純物が検出されたが、いずれも微量であり、その純度は

それぞれ99.66%および99.45%と推定された。その他の試験成績から、今回入手した原料は国立衛生試験所標準品として適した品質を有すると考えられ

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大正製薬(株)に深謝致します。

平成2年度における食用タール色素製品検査より算出した生産量

柴田 正・木村実加・川本礼子・柿内 雅・辻 澄子・伊藤誉志男

Estimated production by the Official Inspection of Coal-Tar Dyes (including Dye Aluminum Lakes) in 1990 Based on Official Inspection Figures

Tadashi Shibata, Mika Kimura, Reiko Kawamoto, Masa Kakiuchi,
Sumiko Tsuji and Yoshio Ito

The number of official inspections of coal-tar dyes and their lakes from april in 1990 till march in 1991 was 836 in total.

The quantity passed amounted to 238 ton in Japan.

The production of color for each month was summarised in Table 1, and by each producing company in Table 2.

The food coal-tar dye produced in the largest quantity was Food Yellow No. 4, occupying 46.2% in this period.

Key words : food color, coal-tar dye, official inspection, production

(Received May 31, 1991)

わが国ではこれまで11種の食用タール色素が食品衛生法施行規則別表第2の食品添加物として指定されてきた。さらに平成3年1月17日から食用赤色40号およびそのアルミニウムレーキが追加、施行された¹⁾。

これら食用タール色素はその販売等に当たって食品衛生法第14条第1項により製品検査が必要とされている。したがってわが国で食品添加物として使用される食用タール色素はすべて製品検査を経たものである。製品検査申請書には申請数量(300kgまで)が記載される。これら製品検査に申請された色素のうち一部は乳児用玩具の染色、医薬品の印字、試薬等に用いられるが、大部分は食品添加物として使用されている。

このことから申請数量の総計はわが国で食品添加物として使用される食用タール色素製造量を推定するひとつの統計値と考えられる。

食用タール色素の製品検査の東日本地域の検体については平成2年4月1日付けで、食品添加物部より支所食品試験部に移管され、これまで行ってきた

西日本地域の検体とあわせ、日本全地域の検査を行うこととなった。

平成2年4月1日から平成3年3月31日までに申請された836検体について各色素別、各月別および各生産社別の許可数量統計を作成した。

各色素の月別許可量を表1に、また各色素の生産社別許可量を表2に示した。

平成2年度の総許可量は約289トンであった。そのうち食用黄色4号が110トン(46%)で最も多く、ついで食用赤色102号45トン(19%)、食用黄色5号38トン(16%)の順であった。

また生産者別ではA社が99.9トン(41.8%)と最も多く、ついでE社77.7トン(32.6%)、B社21.0トン(8.9%)、C社20.1トン(8.4%)の順であった。

ちなみにアメリカ合衆国における主要な食用色素の許可数量(1989)²⁾を表3に示した。

総量は3798.9トンでわが国の約13倍であった。1人当たりではわが国の約5倍であった。

表 1. 平成2年度食用色素月別許可量

(単位:kg)

食用色素名	申請月 平成2年												合計	色別比率(%)	
	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月			
赤色-2号	---	300	600	300	900	300	---	---	---	600	---	600	19.75	3619.75	1.52
赤色-3号	300	900	1000	---	1360	600	1660	1320	900	300	900	600	600	9840	4.12
赤色-102号	2600	2700	5400	2700	5700	4334	3900	3600	5700	1500	1500	5200	5200	44834	18.78
赤色-104号	---	1200	1800	300	300	---	---	---	300	---	---	300	300	4200	1.76
赤色-105号	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0	0
赤色-106号	460	600	460	760	830	760	---	860	300	460	320	300	300	6110	2.56
黄色-4号	3900	9900	17400	8400	9900	12850	8700	7180	11400	4200	8700	7800	7800	110330	46.22
黄色-5号	1800	3670	3900	2550	2400	3300	3300	2700	4500	1800	4200	3900	3900	38020	15.93
青色-1号	600	340	900	900	700	1000	700	700	800	300	600	1700	1700	9240	3.87
青色-2号	---	---	---	---	250	551	---	---	---	---	300	---	---	1101	0.46
赤色-2号レキ	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0	0
赤色-3号レキ	---	---	580	---	---	---	---	400	---	---	300	---	---	1280	0.54
黄色-4号レキ	600	---	600	---	---	---	900	---	---	---	1500	---	---	3600	1.54
黄色-5号レキ	300	---	600	---	---	600	600	---	300	---	300	300	300	3000	1.26
青色-1号レキ	---	600	200	---	600	---	300	600	300	---	---	---	---	2600	1.09
青色-2号レキ	---	---	---	300	---	---	---	300	---	---	200	---	---	800	0.34
赤色-40号	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	100	---	20.7	120.7	0.05
赤色-40号レキ	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0	0
合計	10560	20210	33440	16210	22490	24295	20060	17660	25100	8560	19520	20140.45	20140.45	238695.45	
生産量月別比率(%)	4.42	8.47	14.01	6.79	9.61	10.18	8.40	7.40	10.52	3.59	8.18	8.44	8.44		

表 2. 平成 2 年度食用色素製造社別許可量

(単位:kg)

食用色素名	製造社名										合計	色別比率(%)	
	A社	B社	C社	D社	E社	F社	G社	H社	I社	J社			K社
赤色-2号	2100	300	300	---	600	300	---	---	19.75	---	---	3619.75	1.52
赤色-3号	5340	---	---	---	---	3600	900	---	---	---	---	9840	4.12
赤色-102号	14600	8400	3300	100	15600	900	1800	---	---	---	134	44834	18.78
赤色-104号	---	---	---	---	3300	---	600	300	---	---	---	4200	1.76
赤色-105号	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0	0
赤色-106号	1280	600	300	---	3000	630	300	---	---	---	---	6110	2.56
黄色-4号	46500	9600	9900	80	40800	600	2650	---	---	200	---	110330	46.22
黄色-5号	15450	1500	4800	120	9900	5700	550	---	---	---	---	38020	15.93
青色-1号	4700	300	1200	---	2700	40	300	---	---	---	---	9240	3.87
青色-2号	---	250	---	---	600	---	251	---	---	---	---	1101	0.46
赤色-2号 ₁ - ₁	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0	0
赤色-3号 ₁ - ₁	1280	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1280	0.54
黄色-4号 ₁ - ₁	3000	---	300	---	300	---	---	---	---	---	---	3600	1.54
黄色-5号 ₁ - ₁	2700	---	---	---	300	---	---	---	---	---	---	3000	1.26
青色-1号 ₁ - ₁	2300	---	---	---	300	---	---	---	---	---	---	2600	1.09
青色-2号 ₁ - ₁	500	---	---	---	300	---	---	---	---	---	---	800	0.34
赤色-40号	100	---	---	---	20.7	---	---	---	---	---	---	120.7	0.05
赤色-40号 ₁ - ₁	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0	0
合計	98850	20950	20100	300	77720.7	11770	7351	300	19.75	200	134	238695.45	
製造社別 比率(%)	42.83	8.78	8.42	0.13	32.56	4.93	3.08	0.13	0.01	0.08	0.06		100.01

表 3. アメリカ合衆国主要食用色素の許可数量
(単位:%)

FD&C Red No.3	赤色-3号	83.0
FD&C Red No.3 Lake	赤色-3号レキ	19.8
FC&C Red No.40	赤色-40号	1,179.9
FC&C Red No.40 Lake	赤色-40号レキ	185.2
FD&C Yellow No.5	黄色-4号	746.8
FD&C Yellow No.5 Lake	黄色-4号レキ	360.9
FD&C Yellow No.6	黄色-5号	730.5
FC&C Yellow No.6 Lake	黄色-5号レキ	274.1
FC&C Green No.3	緑色-3号	3.4
FC&C Blue No.1	青色-1号	106.1
FC&C Blue No.1 Lake	青色-1号レキ	31.8
FC&C Blue No.2	青色-2号	42.4
FC&C Blue No.2 Lake	青色-2号レキ	35.0

文 献

1) 厚生省令第1号, 平成3年1月17日 (官報号外)

2) 中村幹雄: 赤色40号の特性と利用, 月刊フードケミカル, 1991-3, 39~43 (1991)

国立衛生試験所標準品（色素標準品）エリスロシン標準品について

辻 澄子・柿内 雅・川本礼子・木村実加・柴田 正・伊藤誉志男

Studies on "Erythrosine Standard", Dye Standards of National Institute of Hygienic Sciences

Sumiko Tsuji, Masa Kakiuchi, Reiko Kawamoto, Mika Kimura, Tadashi Shibata and Yoshio Ito

"Erythrosine Standard (C.I. 45430)", Dye Standards of National Institute of Hygienic Sciences, was prepared.

The content of this Dye Standard was determined by the gravimetric method. This content averaged 99.1%.

Ultra violet-visible absorption and infrared spectra of the Dye Standard were also determined.

Key words : erythrosine, dye, standard, gravimetric method.

(Received May 31, 1991)

食用, 医薬品および化粧品色素として用いられるエリスロシンの確認試験または定量に用いられる標準品としてエリスロシン標準品を製造したので, それらの試験成績を報告する。

原 料

三栄化学工業㈱より購入した。

実験装置

自記分光光度計 U-3210 (日立), 赤外分光光度計 IR700 (日本分光), 精密 pH メーター E510 (メトローム), 自動電位差滴定装置 E665-E686 (メト

ローム), カールフィシャー水分計 MKA-210 (京都電子), 電気伝導度検出器 CDM-2 およびサプレッサー AMMS 付イオンクロマトグラフ 4500i (ダイオネックス)。

試験方法

特に記するものの他は, 食品添加物公定書食用赤色3号の試験項目¹⁾を準用した。

水分量: 試料を 15 mmHg の減圧下 24 時間乾燥した後, 200 mg を精秤し, カールフィシャー水分計で自動滴定した。

塩化物：外海らの自動電位差滴定法²⁾に従って行った。

硫酸塩：柿内らの濁度法³⁾に従ってメルク製活性炭 (2186) を用いて行った。

ヨウ化物：合田らのイオンクロマトグラフィー⁴⁾に準じて電気伝導度により行った。ただし、色素1%溶液を直接注入し、カラムはHPIC-NG1およびHPIC-NS1を用い、溶離液として25%アセトニトリル、7.5 mM 炭酸ナトリウムおよび2 mM テトラブチルアンモニウムヒドロキシド混液を用い、流速1.0 ml/min、室温、注入25 μ l、検出感度3 μ s/cmで測定した。

エリスロシン標準品 (C.I. 45430⁵⁾) 試験結果

性状 赤色粉末。

確認試験：食品添加物公定書中確認試験の項(1)~(4)までの試験に適合する。極大吸収波長526 nm (0.02 M 酢酸アンモニウム溶液)。

吸収スペクトル Fig. 1

赤外吸収スペクトル Fig. 2 (KBr 法)。

純度試験 (1) 水不溶物 0.00% (1%水溶液)。

(2) 液性 pH 7.0。

(3) 塩化物 0.01%。

(4) 硫酸塩 0.00%。

(5) 重金属 ①亜鉛 1.5 μ g/g (Znとして) および②その他の重金属 5.0 μ g/g (Pbとして)。

(6) ヒ素 0.1 μ g/g (As_2O_3 として)。

(7) 他の色素 0.01%水溶液0.05 mlについて食品添加物公定書に規定する方法でエリスロシン以外のスポットを認めない。

ヨウ化物：0.005% (I^- として)

水分量：0.77% (200 mg, 硫酸デシケーター 15 mmHg, 24時間)。

含量：99.1% (1g, 硫酸デシケーター 15 mmHg, 24時間乾燥後重量法)。

結 論

標準品原料として入手したエリスロシンの品質を検討した。その結果は良好であった。

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 (色素標準品) に適した品質を有することを認め、平成3年4月から配布を開始した。

終わりに、本標準品を製造するに当り多大のご協力をいただいた三栄化学工業(株)に感謝いたします。

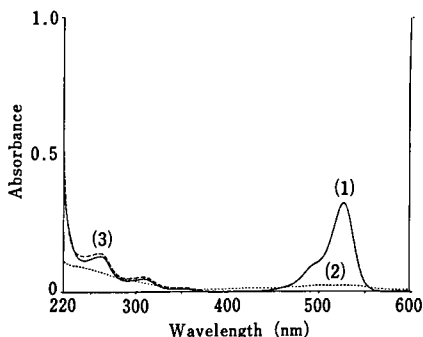


Fig. 1. Absorption spectra of erythrosine standard

Curve (1): 0.02 M AcONH₄,
(2): 0.1 N HCl,
(3): 0.1 N NaOH, conc.
3 mg/L, respectively.

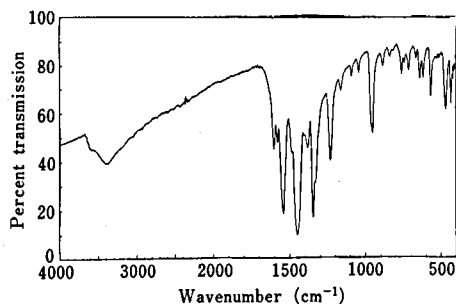


Fig. 2. Infrared spectrum of erythrosine standard

文 献

- 1) 石館守三, 谷村顕雄: "食品添加物公定書解説書", 第5版, 東京 (1987), D461~466
- 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方法の簡素化の試み, 衛生試報, 88, 134~139 (1970)
- 3) 柿内 雅, 辻 澄子, 柴田 正, 伊藤善志男: タール色素中の硫酸塩定量における活性炭の問題点, 衛生試報, 108, 114~117 (1970)
- 4) 合田幸広, 斉藤礼子, 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, 390~395 (1989)
- 5) Society of Dyers and Colourists: "Colour Index", 3rd Ed., Vol. 4 (1975), American Association of Textile Chemists and Colorists

国立衛生試験所標準品（色素標準品）ブリリアントブルー
FCF 標準品について

辻 澄子・柿内 雅・川本礼子・木村実加・柴田 正・伊藤誉志男

Studies on "Brilliant Blue FCF Standard", Dye Standards
of National Institute of Hygienic Sciences

Sumiko Tsuji, Masa Kakiuchi, Reiko Kawamoto, Mika Kimura,
Tadashi Shibata and Yoshio Ito

"Brilliant Blue FCF Standard (C.I. 42090)", Dye Standards of National Institute of Hygienic Sciences, was prepared.

The content of this Dye Standards was determined by titanium trichloride method.

This content averaged 96.3%.

Ultra violet-visible absorption and infrared spectra of the Dye Standard were also determined.

Key words : brilliant blue FCF, dye, standard, titanium trichloride method.

(Received May 31, 1991)

食用，医薬品および化粧品色素として用いられるブリリアントブルー FCF の確認試験または定量に用いられる標準品としてブリリアントブルー FCF 標準品を製造したので，それらの試験成績を報告する。

実験装置

自記分光光度計 U-3210 (日立)，赤外分光光度計 IR-700 (日本分光)，自動電位差滴定装置 E665-E686 (メトローム)，カール・フィシャー水分計 MKA-210 (京都電子)。

原 料

三栄化学工業(株)より購入した。

試験方法

特に記するものの他は，食品添加物公定書食用青色 1 号の試験項目¹⁾を準用した。

水分量：試料を 15 mmHg の減圧下 24 時間乾燥した後，200 mg を精秤し，カール・フィシャー水分計で自動滴定した。

塩化物：外海らの自動電位差滴定法²⁾に従って行った。

硫酸塩：柿内らの濁度法³⁾に従ってメルク製活性炭 (2186) を用いて行った。

ブリリアントブルー FCF 標準品 (C.I. 42090⁴⁾)

試験結果

性状 帯赤紫色粉末。

確認試験：食品添加物公定書中確認試験の項(1)～(5)までの試験に適合する。極大吸収波長 630 nm (0.02 M 酢酸アンモニウム溶液)。

吸収スペクトル Fig. 1

赤外吸収スペクトル Fig. 2 (KBr 法)。

純度試験 (1) 水不溶物 0.00% (1%水溶液)。

(2) 塩化物 0.01%。

(3) 硫酸塩 0.00%。

(4) 重金属 ①クロム 1.2 μg/g(Cr として)

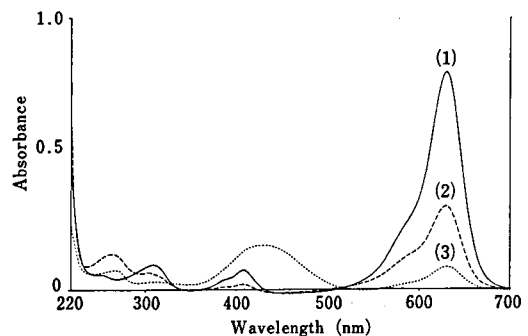


Fig. 1. Absorption spectra of brilliant blue FCF standard

Curve (1): 0.02 M AcONH₄,

(2): 0.1 N HCl,

(3): 0.1 N NaOH, conc.

5 mg/L, respectively.

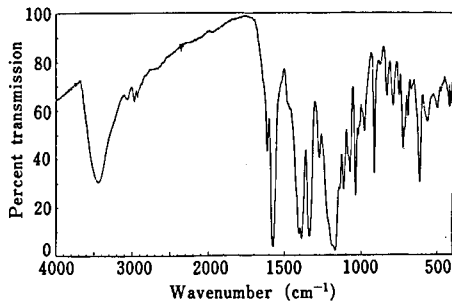


Fig. 2. Infrared spectrum of brilliant blue FCF standard

②マンガン 7.0 $\mu\text{g/g}$ (Mnとして) ③その他の重金属 3.0 $\mu\text{g/g}$ (Pbとして).

(5) ヒ素 0.1 $\mu\text{g/g}$ (As_2O_3 として).

(6) 他の色素 0.005%水溶液 0.05 ml について食品添加物公定書に規定する方法でブリリアントブルー FCF 以外のスポットを認めない.

水分量: 0.77% (200 mg, 硫酸デシケーター 15 mmHg, 24 時間).

含量: 96.3% (1 g, 硫酸デシケーター 15 mmHg, 24 時間乾燥後三塩化チタン法).

結 論

標準品原料として入手したブリリアントブルー FCF の品質を検討した。その結果は良好であった。

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 (色素標準品) に適した品質を有することを認め、平成 3 年 4 月から配布を開始した。

終わりに、本標準品を製造するに当り多大のご協力をいただいた三栄化学工業㈱に感謝いたします。

文 献

- 1) 石館守三, 谷村顕雄: “食品添加物公定書解説書”, 第 5 版, 東京 (1987), D505~509
- 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方法の簡素化の試み, 衛生試報, 88, 134~139 (1970)
- 3) 柿内 雅, 辻 澄子, 柴田 正, 伊藤誉志男: タール色素中の硫酸塩定量における活性炭の問題点, 衛生試報, 108, 114~117 (1970)
- 4) Society of Dyers and Colourists: “Colour Index”, 3rd Ed., Vol. 4 (1975), American Association of Textile Chemists and Colorists

国立衛生試験所標準品 (色素標準品) タートラジン標準品について

川本礼子・柿内 雅・木村実加・辻 澄子・柴田 正・伊藤誉志男

Studies on “Tartrazine Standard”, Dye Standards of National Institute of Hygienic Sciences

Reiko Kawamoto, Masa Kakiuchi, Mika Kimura, Sumiko Tsuji, Tadashi Shibata and Yoshio Ito

“Tartrazine Standard (C.I. 19140)”, Dye Standards of National Institute of Hygienic Sciences, was prepared.

The content of this Dye Standard was determined by the titanium trichloride method. This contents averaged 99.0%.

Ultra violet-visible absorption and infrared spectra of the Dye Standard were also determined.

Key words : tartrazine, dye, standard, titanium trichloride method.

(Received May 31, 1991)

食用、医薬品および化粧品色素として用いられるタートラジンの確認試験または定量に用いられる標準品としてタートラジン標準品を製造したので、そ

れらの試験成績を報告する。

実験装置

自記分光光度計 U-3210 (日立), 赤外分光光度

計 IR-700（日本分光），自動電位差滴定装置 E665-E686（メトローム），カール・フィシャー水分計 MKA-210（京都電子）。

原 料

ダイワ化成(株)より購入した。

試験方法

特に記するものの他は，食品添加物公定書食用黄色 4 号の試験項目¹⁾を準用した。

水分量：試料を 15 mmHg の減圧下 24 時間乾燥した後，200 mg を精秤し，カールフィシャー水分計で自動滴定した。

塩化物：外海らの自動電位差滴定法²⁾に従って行った。

硫酸塩：柿内らの濁度法³⁾に従ってメルク製活性炭 (2186) を用いて行った。

タートラジン標準品 (C.I. 19140⁴⁾) 試験結果

性状 とう黄色粉末。

確認試験：食品添加物公定書中確認試験の項(1)～(3)までの試験に適合する。極大吸収波長 428 nm (0.02 M 酢酸アンモニウム溶液)。

吸収スペクトル Fig. 1

赤外吸収スペクトル Fig. 2 (KBr 法)。

純度試験 (1) 水不溶物 0% (1%水溶液)。

(2) 塩化物 0%。

(3) 硫酸塩 0%。

(4) 重金属 5 $\mu\text{g/g}$ (Pb として)。

(5) ヒ素 0.05 $\mu\text{g/g}$ (As_2O_3 として)。

(6) 他の色素 0.01%水溶液 0.05 ml について食品添加物公定書に規定する方法でタートラジン以外のスポットを認めない。

水分量：0.91% (200 mg, 硫酸デシケーター 15 mmHg, 24 時間)。

含量：99.0% (1 g, 硫酸デシケーター 15 mmHg, 24 時間乾燥後三塩化チタン法)。

結 論

標準品原料として入手したタートラジンの品質を検討した。その結果は良好であった。

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（色素標準品）に適した品質を有することを認め，平成 3 年 5 月から配布を開始した。

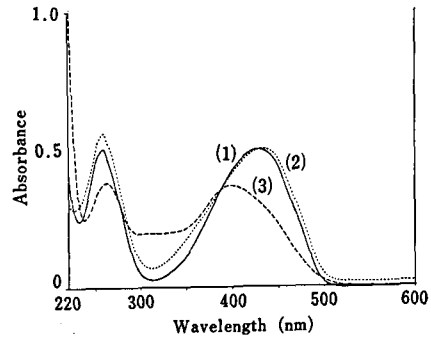


Fig. 1. Absorption spectra of tartrazine standard

Curve (1): 0.02 M AcONH₄,
(2): 0.1 N HCl,
(3): 0.1 N NaOH, conc.
10 mg/L, respectively.

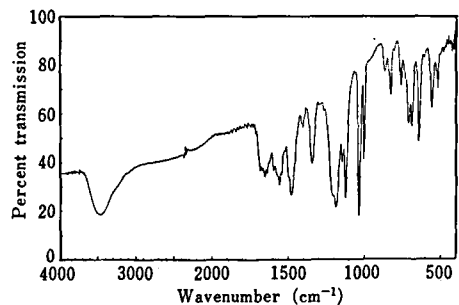


Fig. 2. Infrared spectrum of tartrazine standard

終わりに，本標準品を製造するに当り多大のご協力をいただいたダイワ化成(株)に感謝いたします。

文 献

- 1) 石館守三，谷村顕雄：“食品添加物公定書解説書”，第 5 版，東京 (1987)，D486～490
- 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方法の簡素化の試み，衛生試報，88，134～139 (1970)
- 3) 柿内 雅，辻 澄子，柴田 正，伊藤誉志男：タール色素中の硫酸塩定量における活性炭の問題点，衛生試報，108，114～117 (1970)
- 4) Society of Dyers and Colourists: “Colour Index”, 3rd Ed., Vol. 4 (1975), American Association of Textile Chemists and Colorists

国立衛生試験所標準品 (色素標準品) アルラレッド AC 標準品について

木村実加・柿内 雅・川本礼子・辻 澄子・柴田 正・伊藤誉志男

Studies on "Allura Red AC Standard", Dye Standards
of National Institute of Hygienic Sciences

Mika Kimura, Masa Kakiuchi, Reiko Kawamoto, Sumiko Tsuji,
Tadashi Shibata and Yoshio Ito

"Allura Red AC Standard (C.I. 16035)", Dye Standards of National Institute of Hygienic Sciences was prepared.

The content of this Dye Standards was determined by the titanium trichloride method. This content averaged 95.5%.

Ultra violet-visible absorption and infrared spectra of the Dye Standard were also determined.

Key words : allura red AC, dye, standard, titanium trichloride method.

(Received May 31, 1991)

食用色素¹⁾として用いられるアルラレッド AC の確認試験または定量に用いられる標準品としてアルラレッド AC 標準品を製造したので、それらの試験成績を報告する。

実験装置

自記分光光度計 U-3210 (日立), 赤外分光光度計 IR-700 (日本分光), 自動電位差滴定装置 E665-E686 (メトローム), カール・フィシャー水分計 MKA-210 (京都電子), クロマトグラフ装置 880 PU 型ポンプおよび 870 UV 型検出器 (日本分光)。

原 料

三栄化学工業²⁾より購入した。

試験方法

特に記するものの他は、厚生省令告示第 1 号³⁾を準用した。

水分量: 試料を 15 mmHg の減圧下 24 時間乾燥した後, 200 mg を精秤し, カールフィシャー水分計で自動滴定した。

塩化物: 外海らの自動電位差滴定法²⁾に従って行った。

硫酸塩: 柿内らの濁度法³⁾に従ってメルク製活性炭 (2186) を用いて行った。

低スルホン化副成色素および高スルホン化副成色素: HPLC 法により行った。

検液調製法

本品 10.0 mg を量り, 酢酸アンモニウム溶液を

加えて溶かして正確に 100 ml とし検液とし, 20 μ l を注入する。

HPLC 操作条件

検出器 可視部吸収検出器 (測定波長 515 nm)

カラム Inertcil ODS-2 (4.6 \times 250 mm)

カラム温度 40 $^{\circ}$ C

移動相 A 0.1 M 酢酸アンモニウム溶液, B メタノール

濃度勾配 A-B (0:100) から (100:0) までの直線濃度勾配を 50 分間行う。

流量 1 ml/分

アルラレッド AC 標準品 (C.I. 16035⁴⁾) の試験結果

性状 暗赤色粉末。

確認試験: 厚生省告示第 1 号¹⁾中確認試験の項(1)~(3)までの試験に適合する。極大吸収波長 499 nm (0.02 M 酢酸アンモニウム溶液)。

吸収スペクトル Fig. 1

赤外吸収スペクトル Fig. 2 (KBr 法)。

純度試験 (1) 水不溶物 0.00% (1%水溶液)。

(2) 塩化物 0.00%。

(3) 硫酸塩 0.00%。

(4) 重金属 5 μ g/g (Pb として)。

(5) 鉛 1.5 μ g/g (Pb として)。

(6) ヒ素 0.05 μ g/g (As₂O₃ として)。

(7) 低スルホン化副成色素 0.02%

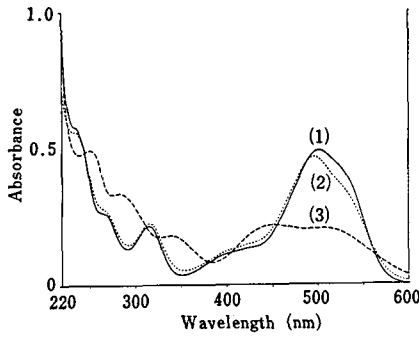


Fig. 1. Absorption spectra of allura red AC standard

Curve (1): 0.02 M AcONH₄,
 (2): 0.1 N HCl,
 (3): 0.1 N NaOH, conc.
 10 mg/L, respectively.

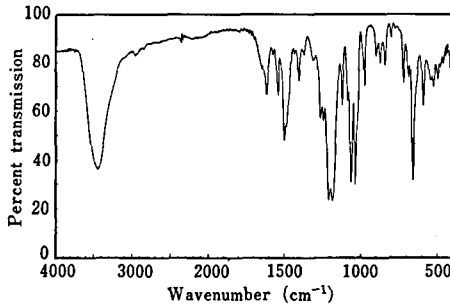


Fig. 2. Infrared spectrum of allura red AC standard

- (8) 高スルホン化副成色素 0.18%
- (9) 6-ヒドロキシ-5-(2-メトキシ-5-メチル-4-スルホフェニルアゾ)-8-(2-メトキシ-5-メチル-4-スルホフェノキシ)-2-ナフトレンスルホン酸二ナトリウム塩 0%
- (10) 6-ヒドロキシ-2-ナフトレンスルホナート一ナトリウム 0.13%
- (11) 4-アミノ-5-メトキシ-2-メチルベンゼンスルホン酸 0.02%
- (12) 6,6'-オキシビス(2-ナフトレンスルホナート)二ナトリウム 0%
- (13) 非スルホン化芳香族第一アミン 0%

低スルホン化副成色素および高スルホン化副成色素の HPLC クロマトグラムを Fig. 3 に示した。

図に示されたように、低スルホン化副成色素ではクレジジンスルホン酸アゾ G 塩色素 (p-CSA-G) のピークは認められず、クレジジンスルホン酸アゾ R 塩色素 (p-CSA-R) のピーク (0.02% に相当) が測定された。一方高スルホン化副成色素ではクレ

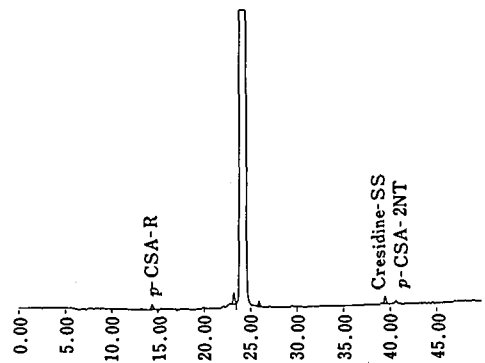


Fig. 3. HPLC chromatogram of subsidiary dyes in R-40 standard.

シジンスルホン酸アゾ β-ナフトール色素 (p-CSA-2NT) のピーク (0.01% に相当) およびクレジジンアゾシェファー塩色素 (Cresidine-SS) のピーク (0.17% に相当) が測定された。

水分量: 3.81% (200 mg, 硫酸デシケーター 15 mmHg, 24 時間)。

含量: 95.5% (1 g, 硫酸デシケーター 15 mmHg, 24 時間乾燥後三塩化チタン滴定法)。

結 論

標準品原料として入手したアルラレッド AC の品質を検討した。その結果は良好であった。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（色素標準品）に適した品質を有することを認めた。現在標準品として申請中である。

終わりに、本標準品を製造するに当たり多大のご協力を頂き、また低スルホン化および高スルホン化副成色素の標品を分与頂いた三栄化学工業㈱に深謝いたします。

文 献

- 1) 厚生省令第 1 号, 厚生省告示第 1 号 “食品, 添加物等の規格基準の一部を改正する件” 平成 3 年 1 月 17 日, 官報号外第 4 号
- 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方法の簡素化の試み, 衛生試験, 88, 134~139 (1970)
- 3) 柿内 雅, 辻 澄子, 柴田 正, 伊藤誉志男: タール色素中の硫酸塩定量における活性炭の問題点, 衛生試験, 108, 114~117 (1970)
- 4) Society of Dyers and Colourists: “Colour Index”, 3rd Ed., Vol. 6 (1975). American Association of Textile Chemists and Colorists

業 務 報 告

Annual Reports of Divisions

平成 2 年度 業務 概要

所 長 内 山 充

東欧における政治改革やベルシャ湾岸の危機など世界情勢に大きな変動の見られた平成2年度であったが、わが国では引き続き経済の発展と先端技術の発達に伴い、生活環境への化学物質や新開発品の導入が盛んである。生活の豊かさと便宜性追求にのみ目を奪われず、化学物質全般に対して国民の健康を確保する責任を担っている当所の業務も、技術水準の向上と対象物の変化に即応した形での推進が求められている。また数年前より国立試験研究機関に対して、各種の答申あるいは勧告の形で要望されている活性化、あるいは近代化の様々な提案に対しても、具体的に対応して結果を出すべき時期を迎えている。

所内的に見れば、昭和59年にまとめられた当所の自主点検報告書に盛り込まれていた組織と業務の見直しに関する課題は、関係機関の理解と協力も得てこれまでの5年間に着実に実行された。検定検査の合理化、バイオテクノロジーへの対応、化学物質安全性の評価、各種安全性情報を初めとする国際協力、およびそれらに伴う組織再編成と名称の変更などは、自主点検の線に沿った方向で既にスタートしている。平成2年度はいわばそれらの実績が業務上に具体的に示された年ということができよう。

業務実績等

当所の担っている基本的役割である行政支援研究に関しては、医薬品、食品、あるいはその他の生活関連物質につき、有効性、安全性、および品質評価に関する各種のガイドラインあるいは公定試験法の設定などを通じて、現代の学問水準を取り入れた効率的な貢献がなされた。これらはすべて、所内各部それぞれの専門分野における先導的基礎研究によっ

て支えられていることは言うまでもない。

業務行政上の判断や評価の科学的根拠をなす試験研究は、もとより当所の重要な業務であるが、一方食品、家庭用品および環境中のその他の化学物質の安全性についての公的な評価に関しては、省庁を超えて当所が全責任を負っているといっても過言ではない。安全性生物試験に関与している各部では、これまでの研究経過を基として、昨年度毒性部に新設された評価研究室を中心に、OECDの提唱で国際的に開始された既存化学物質の安全性点検作業に本年より積極的に参画している。平成3年度には、上記評価研究室に代わって安全性生物試験研究センター長直属の総合評価研究室が省令室として認められ、さらに充実強化が図られている。

平成2年度は日本薬局方の5年毎の大改定の区切りの年であり、第12改正日本薬局方は平成3年4月に公布された。本改正では170品目にも及ぶ各条規格の新収載、各条化学名の記載、生薬関連規格の整備、標準品の大幅な増加など、幾つもの懸案の実現に所員の多くが参画した。

移転関係

当所の将来に極めて大きな影響をもつ移転問題については、昨年度の報告のとおり現在の用賀を離れて東府中の米軍基地跡への移転が決定しており、所内の移転計画本部の各部会において検討が進められているが、予算的には平成3年度に一部準備費が認められている。一方本年度に、大阪支所についても国有地有効利用調査の結果、非効率であることが指摘され、別地移転を含め検討整備を図ることとなった。平成3年度内には大蔵省における処理方針が決

定されるという。このように、本所、支所ともに移転の対象となったが、今後は当所の将来構想を見据えながら関係機関と調整しつつ適切に対応しなければならない。

新しい動向等

国内外の情勢の変化は当所の組織計画や業務の運営方針にも影響を与えることとなるが、国民の健康と生活を防衛することが当所の基本的な最終目標であるところから、従来からの当所の研究業務の責任基盤を全うしつつ、かつ新しい動向への対応をも考える必要がある。平成2年度の初頭に報告された厚生省の「国立試験研究機関の改革方策」においても、当所のあるべき姿として、有効性、安全性、および品質の評価科学（レギュラトリーサイエンス）に重点をおきながら、その研究成果を常に最先端の科学技術の進歩に貢献するようフィードバックしつつ、組織の活性化を図って行くことが求められている。

その具体的現れとして、平成2年10月薬務局に医療機器開発課が設置されたことを受け、広範囲の対象物を含む医療用具・機器の安全性等に関する基盤的研究の国内の体制作りが必要となっている。また、同じ頃に日本学術会議より内閣総理大臣に対して、「創薬基礎科学推進」に関する勧告が出された。厚生省もこれを受けて薬務局を中心に積極的対応を検討中であるが、当所も「創薬」推進のために国が行うべき役割を見極め、今後の構想の中にこの勧告の精神を生かせるような方策を盛り込みたいと考えている。

このほか諸外国とも共通した問題として見逃せないのは、薬物乱用に関する研究体制の整備、動物愛護の趨勢を踏まえた安全性研究の方向づけ、薬用植物資源の保護と確保を目指した努力等であり、今後積極的に取り組みたい。

国際協力等

地球レベルの環境問題の提起や医薬品、食品等の国際的流通の活発化などに見られるように、物質には国境がない。研究においても行政においても、今や我が国だけの独善的な考え方は通用しない。本年は特に国際的な協力あるいは調和（ハーモニゼーション）の動きが活発になった。

WHOの国際化学物質安全性計画（IPCS）は開始後10年を経過し、その間の当所のリード機関としての貢献は高く評価されているが、従来の「環境保健クライテリア」の作成に加えて、「安全衛生ガイド」と「国際化学物質安全性カード」の2種の新しい資料の作成にも協力を開始した。既存化学物質の安全性点検に関するOECDを中心とした計画への協力については先に述べたが、国内の体制を整備し、平成3年度より3年間で33物質についての試験を我が国が分担することになった。これらのための会合へは専門家として多くの職員が派遣されている。

そのほか、新薬の承認基準の国際調和、薬局方の規格の国際調和、水道水中の汚染物の安全性評価、医療用具の材料中の残留物の評価、食品添加物あるいは農薬の安全性評価等行政上必要な国際会議に専門家として派遣された職員も多い。なお、科学技術庁の外国人研究員やヒューマンサイエンス振興財団の流動研究員として欧米諸国を始め世界各国から受け入れた外国人研究員は平成2年度は11名であった。

技術協力関係では国際協力事業団のフィリピン医薬品食品品質管理プロジェクトが最終の第5年目に入り、その他の国への個別の案件も含め5カ国に11名を当所より派遣した。なお、技術協力に関連する研修生の受け入れは32名であった。

技術協力関係では国際協力事業団のフィリピン医薬品食品品質管理プロジェクトが最終の第5年目に入り、その他の国への個別の案件も含め5カ国に11名を当所より派遣した。なお、技術協力に関連する研修生の受け入れは32名であった。

全国衛生化学技術協議会

業務の上で多くの関連のある地方衛生研究所あるいは薬事指導所等との交流の場として意義の深い全国衛生化学技術協議会の第27回年会は、平成2年10月11、12日に方波見年会長の下、埼玉県衛生研究所の主催により、大宮のソニックシティで開催された。当所からも多くの職員が参加し盛会であった。

総 務 部

部 長 桐 原 清 司

前部長 水 越 浩 二

1. 組 織

平成2年度に安全性生物試験研究センター毒性部の評価研究室が総合評価研究室として省令室に格上げが認められ、新設された。

2. 定 員

平成元年度末の定員は280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）2名、計3名の定員削減により、平成2年度末の定員は、指定職2名、行政職（一）45名、行政職（二）25名、研究職205名、計277名となった。

別紙

平成 2 年 度 予 算 額

事 項	平成元年度	平成 2 年度	対前年度差	備 考
	(A)	(B)	引増△減額 (B)-(A)	
	(千円)	(千円)	(千円)	
(組織)厚生本省試験研究機関	2,853,554	2,968,555	115,001	
(項)厚生本省試験研究所	2,702,601	2,809,722	107,121	
人 件 費	1,824,020	1,911,120	87,100	
人 当 経 費	7,609	7,704	95	
一般事務経費	41,529	41,716	187	
研 究 費	222,856	226,041	3,185	
特別研究費	16,195	16,195	0	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	19,308	21,401	2,093	
安全性生物試験研究センター運営費	207,299	204,782	△2,517	
薬用植物栽培試験場運営費	103,916	103,074	△ 842	
情報活動運営費	41,815	41,864	49	
施設管理事務経費	44,444	45,161	717	
対がん 10 年総合戦略経費	64,704	58,411	△ 6,293	
受託研究費	90,334	90,694	360	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 (9,254 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 (4,142 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 (15,454 千円) 4. 新開発食品の有用性・安全性評価技術の開発 (10,333 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 (8,212 千円) 6. 形質転換薬用植物資源の開発、育成および利用 (6,184 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 (15,470 千円) 8. 高分子医薬品の化学修飾による有用性増幅 (8,253 千円) 9. 医用(高分子)材料の安全性評価法に関する研究 (8,248 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 (3,084 千円)

事 項	平成元年度 (A)	平成2年度 (B)	対前年度差 引増△減額 (B)-(A)	備 考
	(千円)	(千円)	(千円)	
乱用薬物基礎研究費	18,572	18,572	0	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)
総合化学物質安全性研究費	0	22,987	22,987	
(項)血清等製造および検定費	98,633	98,304	△ 329	
一般事務経費	12,758	12,785	27	
事業費	85,875	85,519	△ 356	
(項)厚生本省試験研究施設費	52,320	60,529	8,209	8号館空調設備改修その他工 事 (60,529千円)
(移替予算)				
(組織)厚生本省試験研究機関	200,310	169,329	△ 30,981	
(項)国立機関原子力試験研究費	91,985	87,143	△ 4,842	
(項)放射能調査研究費	2,608	1,926	△ 682	
(項)国立機関公害防止等試験研究費	105,717	80,260	△ 25,457	
計	3,053,864	3,137,884	84,020	

* 予算額については両年度とも当初予算額

3. 予 算

平成元年度の予算の概要は次のとおりである。

(1) 一般予算

予算額は、2,968,555千円で前年度に比較して4.03%の増額が図られた。

増額、減額の主な項目としては、

①研究費 (試験研究費の単価アップに伴う増)

3,185千円

②標準品製造費 (4品目追加による増)2,093千円

③施設整備費の増 8,209千円

④対がん10か年総合戦略経費の減 △6,293千円

等が挙げられる。

また、新規予算については、OECDへの協力事業の一環である既存化学物質の安全性評価のためのシステム基本設計経費が総合化学物質安全性研究費として、22,987千円認められた。

(2) 移替予算

予算額は、169,329千円で前年度に比較して15.47%の減額となった。

新規課題としては、国立機関原子力試験研究費において3課題 (①タンパク性アレルゲンの標識化合物を用いる高感度・特異的診断法の開発に関する研究11,092千円、②薬物レセプターの新簡易アフィニティラベル法の開発研究7,861千円、③人工透析

器の放射線滅菌による生体適合性の変化に関する研究9,028千円)が認められた。

なお、平成2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2年度の施設整備の概要は以下のとおりであった。

(1) 8号館空調設備改修工事

(施設整備費37,089千円)

(2) 廃棄物処理施設改修工事

(施設整備費23,440千円)

(3) 2号館床改修工事

(各所修繕費(特別修繕)3,099千円)

5. 国家検定等品目の改正

(1) 国立衛生試験所標準品交付規定の一部改正

平成3年3月2日、医薬品標準品「ジクロフェナミド標準品」ほか3品目を追加し、また、同日付けで「ルチン標準品」1品目を削除した。(平成3年3月2日、厚生省告示第30号)これにより当所が交付している医薬品標準品は合計82品目となった。

薬 品 部

部 長 寺 尾 允 男
前部長 武 田 寧

概 要

前年度に引き続き、本年度も医薬品の品質確保、新開発剤の評価、および麻薬および依存性薬物に関する研究を中心に試験研究を実施した。医薬品の品質確保に関する研究では医薬品の分析法の確立および日本薬局方の規格、試験法に関する研究を中心に行った。新開発剤の評価に関する研究においては、放出調節剤を中心とする新剤形医薬品の評価法について生物薬剤学および物理薬剤学の立場から検討を加えた。麻薬および依存性薬物の研究では、主として薬物の分析法の確立ならびに生体試料からの薬物分析法の確立について検討した。

平成2年度において、フィリピン食品医薬品検定センター Mr. E. J. Villeza 氏が6月から11月まで在籍した。また、科学技術庁 STA フェローとして平成3年3月より Dr. C. G. Jordan が在籍している。

なお、平成3年4月1日付で武田寧部長が大阪支所長として転出し、代わって寺尾允男が部長として配置換えとなって転入した。

業務成績

1. 特別審査試験

新薬124件、かぜ薬43件、合計167件について試験した。

2. 一斉取締試験

ユビデカレノン錠(55件)、ビタミンK₁注射液(6件)、ビタミンK₂注射液(9件)、メタセパム内服固形製剤(25件)について試験した。

3. 特別行政試験

トリプトファン40件、あへんモルヒネ含量試験82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84件(モルヒネ42件、コデイン42件)について試験した。

4. 標準品の製造

フェネチリン(20g)、アンフェプラモン(20g)、フェンテルミン(20g)、カチン(20g)、エチルアンフェタミン(20g)を合成し、薬務局麻薬課に供給した。

5. 国際協力

国際厚生事業団：第1回必須医薬品製造管理研修

により、アジア諸国の薬事行政官に対する研修を行った。

国連麻薬部主催の麻薬に関する専門家グループ会議に出席し、“生体中アンフェタミンおよびコカインの標準試験法の recommended method”の作製に参加した。

台湾麻薬監視員に対し麻薬の分析の研修を行った。

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(薬務局審査課)、地方衛研技術者講習会(薬務局監視指導課)、麻薬、向精神薬、乱用薬物等に関する情報収集等(薬務局麻薬課)に協力した。

研究業績

1. 医薬品の分析法に関する研究

昭和63年2月1日発第90号薬務局長通知により承認基準が示されたビタミン主薬製剤製造承認基準のうち、ビタミンB₁₂およびC主薬製剤の迅速分析法を作成した。アルペンタゾールの原体の規格および試験法を開発した(厚生科学研究費補助金)。また、カルボン酸用発蛍光試薬7種を新規合成し、最適反応条件を設定した。

2. 日本薬局方の規格および試験方法に関する研究

ヒ素試験において回収率を高めるために「検液の調製法」の検討を行った。また、日本薬局方医薬品各条において、定量試験にテトラメチルアンモニウムヒドロキシド液を用いている品目について、それぞれの試験法の妥当性を検討した。これらの研究成果は第13改正日本薬局方に反映させる予定である。

3. 医薬品の有効性、安全性に関する薬剤学的研究

坐剤の放出速度とバイオアベイラビリティとの関連性を検討した結果、回転セル、透析チューブ、村西法のうち、回転セル法が最も優れた相関性を与えることが判明した。Population Pharmacokinetics モデルは非依存性の手法と同程度の結果が得られ、臨床の場での同等性解析の有力な手法の1つであることを明らかにした。アセトアミノフェン徐放錠のイヌでの吸収速度を調べ、インビトロ放出速度との関連性を検討した結果、インビトロ放出速度から予測されるより速い吸収速度が得られたことから消化管内での機械的力による錠剤の破壊が示唆された(HS財団委託研究費)。有機ニトロ化合物の経皮吸収製剤に関し血中実測濃度と、回転セル法によるイ

ンピトロ放出試験の結果から予測される血中濃度とを比較したところ、実測値の方が低かったので、インピトロ試験法において膜透過を遅くする工夫が必要であることが明らかとなった (HS 財団委託研究費)。

4. 医薬品の物理化学的安定性に関する研究

安定性ガイドラインをこれまで検討してきた科学的根拠に基づいて改訂した。医薬品の安定性の予測理論をたてるためタンパク製剤の安定化予測のための基礎的検討を行うため、カリクレイン、キモトリプシン、プロメラインの溶液状態における失活についての速度論的解析を行った。また、ゼラチンゲル中におけるフロモキセフの加水分解を水分含量との関連において速度論的に検討するとともに、分解速度と水分の運動量の関係を誘電緩和、NMR、ESRを用いて明らかにした。 β -ガラクトシダーゼ凍結乾燥品の保存安定性におよぼす各種添加剤の影響について検討し、非晶性の添加剤は安定化作用があるのに対して、結晶性の添加剤は安定化作用がないことから、添加剤の結晶性がタンパクの安定性を支配する要因であることを明らかにした。さらにポリ乳酸マイクロスフェアの薬物放出性を支配する要因の1つがマトリックスの結晶化度であること、保存条件に依存して結晶化度が変化し、これにともなって放出制御機能が変化することを見い出した。また、DSCがマイクロスフェアの物理化学的特性の評価の手法として有効であることを明らかとした (HS 財団委託研究費)。

5. 麻薬および依存性薬物に関する研究

大麻乱用者の毛髪中のカンナビノイドの主成分はCBNであることを確認した。サルに大麻主成分であるTHCを投与し毛髪中のカンナビノイドを分析するとやはり主成分はCBNであった。これは毛髪中でTHCは比較的速く酸化を受けCBNに変化するためである。これに関連して、毛髪中大麻成分の標準試験法を確立した (厚生科学研究費補助金)。我々がすでに開発したアミン用ECDラベル化法を用いて、唾液中のメタンフェタミンおよびアンフェタミンの定量法を確立した。この方法を用いて、覚醒剤乱用者の唾液中の覚醒剤を分析し、投与後の経過時間と濃度の変化を調べた。また、キラル試薬を用いるHPLCにより尿中*l*-メタンフェタミンと*d*-メタンフェタミンを分析する方法を確立した。トリプタミン系向精神薬4種、フェンシクリジン系向精神薬4種の呈色反応、TLC、GC、HPLC、GC/

MSを行い、これらの測定結果を用いて分析マニュアルを作成した (薬務局麻薬課委託費)。さらにフェネチルアミン類向精神薬8種の尿中代謝物の試験法を検討し、一斉分析法と個々の分析マニュアルを作成した (厚生科学研究費補助金)。覚せい剤検体起源解明を目的として、覚せい剤原料およびこれらから合成した覚せい剤の光学異性体分離分析を通じて、原料の光学組成が覚せい剤の光学組成に受け継がれることを明らかにするとともに、覚せい剤検体の起源を分類した (厚生科学研究費補助金)。また、覚せい剤の投与回数と毛髪中の覚せい剤およびその代謝物の量的関係を調べた (精神・神経疾患研究委託費)。

生物薬品部

部長 早川 堯 夫
前部長 田 中 彰

概要

当部の責務は生物薬品の品質確保およびその評価技術の開発ならびにこれに関連する生物化学的研究であるが、バイオテクノロジー応用医薬品の開発が着実に進捗した結果、関連する試験検査業務は拡大の一途を辿っている。その一方で、同時多発的に開発されてくる複数の同種の生物薬品を本質、有効性、安全性の観点からみてどのように評価すべきかの科学的コンセプトを提示する努力も続ける必要がある。また、生物薬品の特性を反映できる特異的で簡便な試験法の開発あるいは力価測定法の標準化の必要性もますます高まっている。研究面では国内外における生物薬品関連分野での急速な学問・技術の進展を着実にフォローし、また、EC、北米との三極構造の中でわが国が応分の科学的貢献を果たすために、限られた体制の中で研究および評価能力の拡充や有効活用をどのように達成していくかが依然課題であろう。

人事面では、平成3年4月1日付けで田中 彰部長が退官され、後任に早川堯夫が発令された。また、第三室長に山口照英主任研究官、主任研究官に新見伸吾研究員が昇任した。押沢 正厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室室長補佐が主任研究官として着任した。HS財団国外流動研究員としてAhmed Abdu Said博士が派遣された。

短期海外出張は以下のとおりであった。田中部

長：薬局方規格の国際的調和に関する会議出席および東、西ドイツ薬局方についての調査、情報収集（フランス、東独、西独、平成2年8月28日～9月6日）；(他)国際厚生事業団の発展途上国に対する海外協力事業に係る医薬品分野の協力に関する調査（フィリピン、ブルネイ、タイ、平成2年10月16～27日）；医薬品添加物の薬局方規格の国際的調和に関する合同公開会議および局方規格の調和に関する四極会議出席ならびに USP 協会、NIH、FDA での局方試験法についての意見交換（米国、平成3年1月28日～2月6日）、福田室長および谷本室長：非エネルギー分野における日米科学技術協力事業に関わる意見交換（米国、平成3年3月4日～14日）、早川：医療用成長ホルモンの試験法に関する国際ワークショップ出席（英国、平成2年7月15日～22日）；医療用モノクローナル抗体の製造と管理のために必要な事項案に関する WHO 会議出席（スイス、平成3年2月1日～11日）。

業務成績

1. 特別審査試験

新薬 53 件およびかぜ薬・解熱鎮痛薬 18 件、合計 71 件について試験した。

2. 一斉取締試験

昭和 63 年度より国家検定品目から削除されているオキシトシン製剤（3 品目）について、初めて試験を行った結果、すべて日本薬局方規格に適合していた。

3. その他

第 12 改正日本薬局方に伴う業務（薬務局安全課）、日本薬局方外医薬品成分規格検討委員会、原体・添加物小委員会（薬務局審査課）、医療用モノクローナル抗体の製造と管理のために必要な事項草案作製協力（WHO）、組換えヒト成長ホルモンの比活性決定および新規国際標準品設定のための国際共同検定（WHO）。

研究業績

1. 医薬品の規格および試験法に関する研究

i) 局外規塩化リゾチームの定量法について、精度および操作性の改良を行い、さらにそのリゾチーム製剤への適応性を検討した。

ii) 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標準的力価検定法の実用化に向けての検討を行った（HS 財団受託研究費）。

iii) 市販インスリン EIA キット間のバラツキについて標準品（インスリン）の違いから検討した。

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) PEG 化リゾチームの生物学的安定性について検討した（原子力研究費）。

ロ) ハイブリッド化組織プラスミノーゲン活性化因子（tPA）および γ -グルタミルトランスペプチターゼの酵素化学的性質、生物学的安定性について検討した（HS 財団受託研究費）。

ii) 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 チトクロム b 558 に対する単クローン抗体の作製を試みた。

iii) 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さらに検討した。

iv) 免疫・食細胞系による生体防御機構の解明の一環として、多形核白血球の活性酸素産生系のチトクロム b 558 の電子の授受機構について検討した（HS 財団受託研究費）。

v) 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見解をまとめ提示した（厚生科学研究費補助金、薬務局新医薬品課）。

vi) 精巣障害のメカニズムをエネルギー源およびこれに関与する酵素活性から検討した。

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
補酵素 PQQ のその他の機能の一つとして、アルドース還元酵素の活性調節への関与について検討した。

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) イヌ腎臓の内髄質にアルドース還元酵素に容易に変換しうる還元酵素が存在することを見だし、その性状を明らかにした。

ロ) ヒト精巣からアルドース還元酵素を単離し、他起源アルドース還元酵素の性状と比較検討した。

ハ) バキュロウイルス-昆虫細胞系で発現させたヒト組換えアルドース還元酵素の N 末、C 末を明ら

かにするとともにその性状を詳細に検討した(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

薬物投与などによる生体内鉄の挙動を検討するために, ラット肝臓中の非タンパク結合性鉄の電気化学的検出イオンクロマト法による高感度微量測定法を確立した。

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誘導に及ぼす各種阻害剤の影響について検討した。

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結合の各種栄養因子による調節について検討した。

4. 放射性医薬品に関する研究

i) ^{99m}Tc 大凝集アルブミンを製造し, 粒子の大きさによるラット体内分布を検討した。

ii) メルカプト系腎診断薬を合成し, そのラット体内分布を検討した。

生 薬 部

部 長 佐 竹 元 吉

前部長 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, 薬理学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, 特別審査を行った。

平成2年4月1日付けで尾崎幸紘主任研究官が第一室長に発令され, 川原信夫技官が採用された。平成3年2月1日付けで原田正敏部長が副所長に昇任され, 平成3年4月1日まで生薬部長を併任された。平成3年2月1日付けで小野景義技官が東京大学薬学部より当所に転任し, 生薬部に配属された。平成3年4月1日付けで佐竹元吉筑波薬用植物栽培試験場長が生薬部長に発令された。

海外出張は, 尾崎室長がヒューマンサイエンス振興財団の日中国際共同研究事業により, 国家医薬管理局の招きで7月8日より7月19日まで中国に出張し, 枳実, 枳殻の栽培地の見学および研究交流を

行った。

研究者および研修生の受け入れは, WHOフェローとしてマカオの薬務担当官F. Santos氏が4月9日より4月13日まで来部し, 伝統薬の研究方法及び規格作成について研修した。また, WHOフェローとして中国から, 蘭州市薬品検査所の程松林研究員が平成2年6月6日から3年3月2日まで滞在し, 生薬成分の血中濃度の測定について研究した。国際協力事業団の依頼で北京市腫瘍防治研究所の王殿升研究員が平成2年8月13日から3年3月31日まで当部および衛生微生物部に滞在し, カビ毒の化学的な研究を行った。また, 中国政府からの依頼で上海第二医科大学の講師胡國慶氏が平成2年7月2日に来日し, 当部で1年間の予定で種々生薬の薬理作用の検討を行っている。

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29件)について審査を行った。

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・試験法の基礎研究

利尿性生薬キササゲの成分, catalposide および *p*-hydroxybenzoic acid を確認する方法をTLCを用い検討した。この結果を第12改正日本薬局方の確認試験の参考とした。

ii) 漢方製剤の薬剤学的研究

甘草および黄連に含まれる主成分の glycyrrhizic acid および berberine をラットに同時に併用して経口投与し, 血漿中の berberine 濃度を単独投与の場合と比較検討した。血漿中の berberine 濃度は併用投与の方が若干高い傾向であった。

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種である *l*-ノルエフェドリンおよびその光学異性体の静脈投与後の体内動態について検討した。血漿中濃度推移ならびに尿中排泄量の解析の結果, 光学活性体単独投与時とラセミ体投与時の体内動態の違いは, *l*体に関しては排泄過程が, *d*体に関しては代謝過程が関与していると思われた。

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

ビンロウジ中の主アルカロイド arecoline および arecaidine の同時定量法を確立した。

キササゲの主成分 catalpol, catalposide および

p-hydroxybenzoic acid の定量法を用いて、同属植物の成分量的変化を調べた。その結果、各植物とも凍結乾燥や電子レンジで処理したものは catalposide 含量が高かった。

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* のヘキサソル可溶画分より分離、精製して得られた (*E*)-1-(3,4-dimethoxyphenyl)but-1-ene, (*E*)-1-3,4-dimethoxyphenyl)butadiene および zerumbone の抗炎症作用を検討した。これらの化合物の中で (*E*)-1-(3,4-dimethoxyphenyl)but-1-ene のみに抗炎症作用および鎮痛作用が認められた。

シロツメクサより分離された8種のサポニンについて構造を明らかにした。

iii) 繁用生薬の成分検索とその生物活性の研究

川芎および当帰の薬理研究として、中国産の川芎に含まれる tetramethylpyrazine および川芎と当帰に含まれる ferulic acid の抗炎症作用を検討した。

両化合物の経口投与によりカラゲニン誘発浮腫の抑制による抗炎症作用が認められた。また、抑制作用の効力は tetramethylpyrazine の方が強かった。

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

黄連およびその培養カルスからの溶出特性を調べるために、一つの薬効成分 berberine の溶出試験を局方の方法に準じて行った。両者は酸性溶媒や中性溶媒で同様な溶出挙動を示し、実験条件の範囲内で同等性が認められた。

同等量の berberine を含有する黄連および培養カルスの水抽出エキス 3.1 g/kg をラットに経口投与し、投与後の血漿中の berberine 濃度を経時的に比較検討した。両者の berberine の血漿中濃度の経時変化はほぼ同様の挙動を示した。しかし、両者の最高血中濃度は berberine の単独投与と比較すると低かった (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

中国産の硬紫根、軟紫根および日本で市販されている硬紫根のエーテル抽出エキスのエキス含量および総シコニン系色素の含有量を比較検討した。エキス含量および総シコニン系色素量は中国産硬紫根が最も多く、次に日本の市販の硬紫根、次に中国産軟紫根の順であった。

日本産茯苓の含有成分の検討を行った (HS 財団受託研究費、国際共同研究事業)。

vi) 菌類生薬の活性成分検索と化学的分類に関する研究

中国産マボツの成分研究に着手し文献検索を行った。また、*Emericella* 属について化学的分類の指標となる活性成分を検索した。*Emericella nidulans* より数種の化合物を単離した。

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

白血病由来 M1 細胞の分化誘導能を指標としたスクリーニングにより活性を示した黒色不完全菌 *Curvularia* sp. より brefeldin A, 7-epi-brefeldin A, 7-oxo-brefeldin A を単離同定した。

深在性真菌症の病因菌 *Penicillium marnefferi* の赤色色素3成分を分離し、そのうちの1種は phleiochrome 骨格を有する新規化合物であることを決定した。

中国の胃疾患患者の胃液から分離した *Aspergillus versicolor* 42 株の sterigmatocystin 生産性を検討した。更に SSP 液体培地での赤色色素として averfin, 5'-hydroxy-averantine を単離同定した (特別研究)。

ii) 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

糖類に高線量照射を行った際に生成する化合物を HPLC を用いて測定した。現在これらの化合物を分取するために条件を検討中である (国立機関原子力試験研究費、科学技術庁)。

iii) L-tryptophan 問題に関する調査および中毒原因究明に関する薬理学的検討

1989年に米国でL-tryptophanを含む健康補助食品の摂取が原因とみられる中毒が発生した。この原因究明のため、原料としてのL-tryptophanの特定の時期のロットに特徴的に含まれるピークEと言われている物質について、薬理学的手法を用いてセロトニン受容体に対する作用を検討した。本物質にはセロトニン受容体に対して刺激作用も拮抗作用も認められなかった (生活衛生局食品保健課)。

療 品 部

部 長 中 村 晃 忠

概 要

薬務局に医療機器開発課が誕生し、それに伴って、

審査体制、規格・基準・ガイドライン作りの見直しが進んでいる。また、平成2年度から新医療技術開発研究事業（事務局：医療機器センター；官民共同研究）が発足した。現在、当所の受託研究費の枠はいっぱいなので参加できないが、今後の問題として、regulationの立場と矛盾しない形で参加を考慮する必要がある。

家庭用品関係については、モニター病院との共同による接触アレルギー原因物質研究が軌道に乗って多くの成果をあげてきたが、当部だけで皮膚科医の臨床研究に化学面で応えることには無理があり、地方衛研を含めた研究体制づくりが必要と思われる。また、毒性実験計画も見直すべきであろう。

平成3年4月1日付けで、小嶋茂雄第一室長が環境衛生化学部長に昇進したのに伴い、佐藤道夫主任研究官が第一室長となり、矢上健技官が採用され第一室に配属された。平成3年5月9日より、HS財団外国人流動研究員として、中国薬品生物製品検定所・医用高分子室長・Xi Tingfei博士が派遣され、1年間官民共同研究に従事することになった。

業務成績

1. 医療用具関係

日局・埋植用対照プラスチックの新しいロット、これに関連して旧ロット、原料ポリエチレンおよびフランス薬局方陰性対照の溶出物試験および細胞毒性試験を実施した（特別行政試験、公定書協会）。

プラスチック製眼鏡レンズ基準・「色むら」試験（12品目）を実施した（特別行政試験、薬務局監視指導課）。

2. 家庭用品関係

年度計画にしたがって、diiodomethyl-4-tolyl-sulfone, glutaraldehyde, sodium dichloroisocyanurateの分析試験法を作成した（家庭用品等試験検査費、生活衛生局）。

3. 標準化とハーモナイゼーション

前年に引き続き、国際標準化機構（ISO）の技術委員会に参加した。医療用具の滅菌に関する技術委員会（ISO/TC198, 1990.10, Washington D.C.）、医療用および歯科用材料および用具の生物学的評価に関する技術委員会（ISO/TC 194, 1990.11, London; ISO/TC 194/WG 11, 1991.3, London）。

研究業績

1. ポリウレタンフィルムへの埋入組織反応に関する研究

前年からの長期の実験を継続中である。一方、動

物体内に埋入した時のポリウレタン表面のIRスペクトルの変化を経時的に追跡した結果、1~3ヶ月ですでに変化が起きていることが分かった（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

各種のポリウレタンおよびdiphenylmethane-4,4'-diurethane（モデル化合物）と分子量の異なるPTMGの混合物のIRスペクトル、熱分析、X線回折を調べた結果、芳香族カーバメートとPTMGとの間で1:1のコンプレックスを生成すること、この生成に最適のPTMGの分子量は1000であることを見いだした（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

ある種のポッティング材のガンマ線照射によって生成するdirect mutagenの本体を明らかにする目的で、その原材料および類似体を照射し、変異原性を調べた。今のところ、手がかりは得られていない（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. 赤眼症候群の原因物質の構造に関する研究

ヨーロッパで、新しく製造されたアセテート膜透析器によって日本で起きたのと類似した赤眼症候群が起きた。細胞毒性試験がこれらの原因物質を追求するのに優れたバイオアッセイ系であることが分かったので、原因物質の化学構造を詳しく調べる研究を再開した。

5. 材料からの各種化学物質の溶出に関する研究
極性の異なる物質の種々の溶媒への溶出挙動について歯科材料を用いて検討した。溶出速度は、物質の極性、溶媒の極性、材料の重合度（硬さ）、溶媒による材料の膨潤度などに影響されることが分かった（厚生科学研究費補助金）。

6. 医療用具の毒性評価法に関する研究

細胞毒性試験法と短期埋植試験法の標準試験方法を確立した。また、両試験法における陽性対照材料を確立した。これらの陽性対照材料とゴム材料、および陰性対照材料を用いて、レーザードップラーによる血流量変化で非侵襲的かつ経時的に炎症反応を追跡する方法（フランスINSERMが担当）と前記2法の結果を比較した結果、3方法間により相関があることが分かった（厚生科学研究費補助金、病理部、民生科学協会、INSERMと共同）。

7. 遅延型アレルギーの*in vitro*試験法の確立に関する研究

人のアレルゲンであるのに、従来の maximization 法では動物を感作するのが難しい Ni, Cr 化合物をアレルゲンとして、マウス末梢リンパ節検査を検討した。塗布時の溶媒などを改良することにより、これらの金属イオンの感作性を明確、簡便に評価できることを明らかにした（特別研究）。

8. 催奇形性試験の *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) エチレンチオ尿素をモデル化合物として、胚細胞の分化を指標とした宿主経由試験法を行った結果、*in vivo* とよく相関する催奇形作用を高感度、短期間に、定量的に検出できることが判明した。

2) 胎仔致死活性を示す合成除草剤 15 種について 3 種の *in vitro* 試験を行った。化合物のコロニー形成阻害強度が *in vivo* での胎仔致死活性の強度とよく相関することを明らかにした。

9. 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/原因物質）

1) ポリウレタンテープ/ベンゾトリアゾール系紫外線吸収剤（チヌビン P）

2) スニーカー/フェノール系老化防止剤（スチレン化フェノール）および MBT 系加硫促進剤

3) 自動車部品/PPD 系老化防止剤（家庭用品等試験検査費）

10. 接触アレルゲンのデータベース化に関する研究

日本接触皮膚炎学会の主宰により、パソコンレベルで活用できる接触アレルゲンデータベースの作成を目指して検討が開始された。当部もこれに参加し、製品の分析調査結果などの部分を分担している。

11. 抗菌防臭加工剤の安全性評価に関する研究

表記加工が流行しており、接触皮膚炎などの危害が増える可能性がある。そこで、まず本加工に関するメーカーや文献からの情報を収集・整理して今後の調査研究に備えた。

12. 情報理論のクロマトグラフィーへの応用に関する研究

一昨年開発した情報量を表す関数 FUMI に基づいて、HPLC の最適化の分析的意味について理論的に考察した。クロマト変数（測定波長など）をどの様に変化させたらより多くの情報量が得られるかという問題は、FUMI のクロマト変数に対する微分で答えられることが分かった。

13. 液体クロマト/マススペクトロメトリーに関する研究

当部で改良したインターフェースを用いて、トリプトファン中の不純物の測定に成功した

14. 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、薬務局医療機器開発課；毒性部、病理部、変異遺伝部、支所・生物試験部、食品薬品安全センター、民生科学協会、神奈川衛研、日本バイオマテリアル学会と共同）。

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、薬務局医療機器開発課；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；毒性部などと共同）。

環境衛生化学部

部長 小 嶋 茂 雄

前部長 武 田 明 治

概 要

環境関連分野では、各種の室内空気汚染物質の分析法の検討、これらの汚染物質への個人曝露量の測定法の検討や実態調査、ならびに水道水質基準の見直しへの協力、水道原水中に混入する恐れのある種々の化学物質の分析法の検討、これらの汚染物質の塩素処理などによる分解生成物の安全性の検討などを行った。

化粧品関連分野では、化粧品原料基準第二版追補 II、第 6 次化粧品種別許可基準および医薬部外品原料規格の作成、ならびにレーキ色素の規格整備に関して薬務局審査課と協力した。また、医薬部外品の迅速試験法の確立に関する研究を行うとともに、浴用剤の一斉取締り試験を実施した。

人事面では、30 年以上の長きにわたって本所の業務の発展に尽力されてきた亀谷勝昭第一室長ならびに斎藤恵美子主任研究官が平成 3 年 3 月 31 日付で定年退職された。

武田明治前部長は平成 3 年 4 月 1 日付で食品添加物部長として転出され、同日付で小嶋茂雄薬品部第一室長が後任の部長に就任した。また、同日付で第一室に埴岡伸光技官（九州大学）、第二室に山越葉子技官（お茶の水女子大）が新規採用となっ

た。

国際協力の面では、武田明治前部長は、WHO 飲料水水質ガイドライン改訂に関する会議に出席のため、イタリア（平成2年6月23日～7月3日）、デンマーク（同年11月4日～12日）およびオランダ（平成3年3月16日～24日）に出張した。また、トリクロルフォンおよびフェニトロチオンのIPCS/EHC作成のタスクグループ会議に出席のため、スイスに出張した（平成2年12月8日～16日）。

木嶋敬二室長および斎藤恵美子主任研究官は、化粧品分析技術の指導のため、フィリピン食品薬品センターへ出張した（それぞれ平成2年10月12日～12月11日および平成3年2月25日～3月19日）。また、木嶋敬二室長は、第16回国際化粧品学会での発表のため、米国に出張した（平成2年10月7日～13日）。

今年度も水道事業体職員の長期研修（平成2年4月～平成3年3月）を行った。

業務成績

1. 空気関係

前年度に引き続いて、東京都内3ヵ所の国設自動車排出ガス測定所において各種自動計測器による大気汚染物質（一酸化炭素、一酸化窒素、二酸化窒素、二酸化硫黄、オゾン、ホルムアルデヒド、メタン、全炭化水素および浮遊粒子状物質）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

硫酸ナトリウムを含有する浴用剤58品目の試験を実施した（薬務局監視指導課）。

2) 化粧品原料規格の作成

化粧品原料の品質確保のため、化粧品原料基準第二版追補IIおよび新規原料基準（50品目）の作成を薬務局審査課と協力して行った。

3) 種別許可基準の作成

第6次種別許可基準（化粧品、日焼け・日焼け止めオイル、浴用化粧品、染毛料、爪クリーム）の作成に協力した（薬務局審査課）。

4) 医薬部外品原料規格の作成

染毛剤の原料規格の作成に協力した（薬務局審査課）。

3. 水質関係

1) 特定化学物質の調査

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) 分析方法の開発

水道水源への汚染が問題となっているゴルフ場使用農薬について分析法の開発を行った（生活衛生局水道環境部水道整備課）。

研究業績

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暴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引き続いて行った。この研究の一環として、アクティブサンプラーを用いてパラジクロルベンゼンの個人暴露量の実態を各階層の人々を対象に調査した。また、集合住宅に居住する主婦を対象に個人暴露量に及ぼす生活行動時間および室内環境条件の影響を調査した。

2) ホルムアルデヒド、二酸化窒素および二酸化硫黄の個人暴露量の同時測定を目的としたパッシブサンプラーの開発を行い、ホルムアルデヒドについては基礎的検討を終了した。

3) 高断熱性・高气密性住宅におけるホルムアルデヒド汚染の実態を室内環境条件との関連性において検討した。

2. 環境試料中の天然放射性物質の調査に関する研究

前年度に引き続いて、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. 化粧品および医薬部外品の規格ならびに試験法に関する研究

1) 省令タール色素の規格整備に関する研究

今年度はレーキ色素の規格について検討した（厚生科学研究費補助金、薬務局審査課、東京都立衛生研究所と共同）。

2) 医薬部外品成分の迅速分析法に関する研究

医薬部外品中のグリチルリチン酸、グリチルレチン酸、レゾルシンおよびフッ素の試験法を確立した（厚生科学研究費補助金、薬務局監視指導課、東京都立衛生研究所、東京薬科大学と共同）。

4. 化粧品および化粧品原料中の微量物質の分析に関する研究

エチレンオキシドおよびエチレンクロロヒドリン

の分別分析法を確立した。

5. 化粧品安全性評価法に関する研究

1) 皮膚適用化学物質の生体影響評価に関する研究

化粧品中の防腐剤、界面活性剤などの生体影響を評価するのに必要な手法の確立を目指して基礎研究を行った。すなわち、ホルムアルデヒドの安定性、ホルムアルデヒドドナー型防腐剤の分析法、およびマクロファージの活性酸素産生を指標とした皮膚障害試験法について検討を行った（HS財団受託研究費、大阪支所と共同）。

2) 化粧品安全性予測法に関する研究

化粧品成分が皮膚に与える影響を培養表皮モデルおよびラットの剥離皮膚を用いて標識ATPの透過量から評価した（国立機関原子力試験研究費、科学技術庁）。

3) 生活関連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

ホルムアルデヒドおよびホルムアルデヒドドナー型化合物とコラーゲン誘導体やアミノ酸との反応性をポストカラムHPLC法により検討した（特別研究費）。

6. 水道用薬品または水道用品に関する研究

1) 水道用品等の規格設定に関する研究

水道用塗膜防水材料として使用される一液性エポキシ樹脂塗料の規格設定のための溶出試験方法を確立した（生活衛生局水道環境部水道整備課）。

2) 水道用資機材の安全評価システムに関する研究

水道用に広く使われている資機材の安全性を評価するためのシステムについて検討した（生活衛生局水道環境部水道整備課、水道管路技術センター）。

7. 水利用に関する衛生化学的研究

1) 陸水域における環境変異原物質の動態に関する研究

塩素の存在下ではイオン交換カラムによる濃縮の過程で変異原物質が化学変化を起こすことが分かったので、そうした化学変化が起きないように濃縮方法を見出すべく検討を行った（国立機関公害防止等試験研究費、環境庁）。

2) 飲料水および大気中の発がん物質汚染に関する研究

飲料水の多環芳香族炭化水素による汚染の実態の解明を試みた（厚生省がん研究助成金、国立がんセンター運営部）。

8. 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

ラットにランタンを連続経口投与すると、腸管からのカルシウムおよびリンの吸収が阻害されることが分かった（国立機関公害防止等試験研究費、環境庁）。

2) 公共用水域における開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
258種の農薬の変異原性について文献調査したところ、16種の農薬が4つ以上の方法で陽性を示し、発癌性や遺伝的影響が懸念されることが分かった（国立機関公害防止等試験研究費、環境庁）。

3) 水道水中のゴルフ場使用農薬および低沸点有機ハロゲン化合物の分析方法に関する研究

キャピラリー/GC-MS法による農薬の一斉分析法の開発を行った（生活衛生局水道環境部水道整備課、日本水道協会）。

食 品 部

部 長 齋 藤 行 生

概 要

食品の輸入件数がここ数年来急速に伸びており、それに応じて輸入食品の安全性に対する消費者の関心が一段と高まりを見せている。

平成2年度における食品関連のトピックスはポストハーベスト農薬の食品中の基準と残留実態についてである。当食品部では厚生省生活衛生局と協力して、長期的には十数年にわたる食品中の汚染物モニタリングおよびトータルダイエットスタディーにより、また短期的には、食品中の残留農薬の消長移行に関する研究や食品残留農薬ならびに動物用医薬品の一斉分析法の検討により、上記問題の解決のための周辺準備を進めている。

また昨年に引き続き官民共同プロジェクトならびに照射食品に関する研究も順調に展開している。

ここ数年来、外国よりの訪問客が増えているが、平成2年度には、韓国、中国、台湾、タイ、フィリピン、スリランカ、南米等の国々から食品専門官がWHOやJICA（国際協力事業団）等を介して当所当部を訪れている。

これらの訪問は彼らにとっては、わが国の食品検査体制とその実態を知る良い機会となり、我々にと

っては長い目で見れば、輸入食品の安全性につながる良い機会となる。

人事面では、ほぼ25年にわたり本所のために尽力された野村幸雄主任研究官が平成3年3月31日付けで定年退職された。

平成2年6月より平成2年11月まで、Mrs. Marilou U. Martinez (Bureau of Food and Drug, Philippines) がフィリピン国食品医薬品検定センタープロジェクトによる研修生として滞在、主としてマイコトキシン分析に関する研修をうけた。

根本了技官は平成2年10月1日付けで薬務局新医薬品課に出向し、新しい業務を体験することになった。後任として、平成3年4月1日付けで高附巧技官が採用された。

河村葉子主任研究官は併任官として、平成3年4月付けで大臣官房厚生科学課において国研と行政との間の架け橋の役割を果たすことになった。

鈴木隆第一室長は韓国食品衛生学会より招かれ、「日本における食品汚染物に関する最近の諸問題について」と題して1時間にわたり講演を行った(平成2年8月)。

内山貞夫第二室長は、FAO/IAEA 合同第一回照射食品の検知法に関する研究調整会議(ポーランド、ワルシャワ近郊ヤハランカ市、平成2年6月25日～6月29日)に参加した。

さらにヨーロッパにおける検知法開発の現状を知るために、検知法に関する代表的な研究機関である西ドイツ栄養研究所(カールスルーエ市、平成2年5月16日～6月23日)およびパターンソンがん研究所(英国、マンチェスター市、平成2年7月1日～8月13日)において共同研究を通じて情報の交換を行い3カ月にわたる出張を無事終了した。

豊田正武第三室長はIDF(国際酪農連盟)分析会議(イタリア、ミラノ市、平成3年3月9日～3月17日)に出席し、主として、マイコトキシン専門小委員会において、発がん性かび毒の簡易分析法の開発および国際的な共同研究について、参加各国(ドイツ、英国、オランダ、イタリア、スイス等)と協議をかさねた。

農業にしろ、照射食品にしろ、あるいはマイコトキシンにしても、食品衛生のための検査法は国際的に整合性のとれたものであることが望ましい。今後、簡便にして高感度の分析法の開発を目指して活発な研究交流が期待される。

斎藤は平成2年9月3日より9月7日まで、マレ

ーシア、クアラルンプール市において行われた第一回アジア食品衛生会議に出席し、アジアにおける食中毒撲滅のためのワークショップにおいて食中毒に関する日本の現状と対策について説明した。また平成3年3月5日より3月12日まで、フィリピン国食品医薬品検定センタープロジェクトに係る技術移転評価団の一員としてマニラに出張した。

業務成績

1. 輸入食品検査

食肉、養殖魚介類中の合成抗菌剤(104件)(生活衛生局乳肉衛生課)

食品の放射能検査(1件)、輸入雑豆中のリナマリン(14件)、輸入清涼飲料水中のベンゼン(6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ベンゼンの分析を実施(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、輸入雑豆中のシアン配糖体の分析法および衛生学上の考察を行った(生活衛生局食品保健課)

研究業績

1. 食品中の有害物質

① 食品中の残留農薬の分析

i) 柑橘類、バナナ、大豆および小麦中の7有機リン系農薬、メピンフォス、フォスファミドン、フェナミフォス、クルフォメート、カルボフェノチオン、フェンクロルフォスおよびクマフォスを凝集法を用いて分析する簡便な方法を確立した。

ii) 牛乳中の微量の有機リン系農薬、ダイアジノン、ジメトエート、マラチオン、およびホサロンの分析法を確立した。

iii) 高速液体クロマトグラフィーによる柑橘類中のイマザリルの分析法を確立した。

iv) 合成抗菌剤の一斉分析法につき新たに検討を加えた。

② 雑豆中のシアン化合物、リナマリンの分析法を確立した(生活衛生局食品保健課)。さらに本法を用いて、輸入雑豆を用いる製あん過程におけるシアン化合物の減衰について研究し食品衛生上の重要な知見を得た。

③ 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)

④ 生活環境における発がん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）

⑤ 指定化学物質等の環境経由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）

⑥ 諸外国で使用される新開発農薬の安全性評価方法に関する研究（生活衛生局食品保健課）

⑦ 有機スズ化合物の海域環境中における動態（国立機関公害防止等試験研究費，環境庁）

2. 生体反応・毒性・分析

有機スズ化合物の海域や海産物中での予想変化体をすべて合成し，それらの簡易分析法を確立した。これらの知見は有機スズ化合物の環境中における運命を明らかにする手段となる。

3. 食品照射

i) 発芽による玄米および玄麦の γ 線照射判別における多変量解析法の応用（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）

ii) ESRによる照射シナモンとオールスパイスの検知法の研究を行い，確実な検知法を確立した。（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）

4. 天然有害物

乳および乳製品中のマイコトキシンの分析は精製過程に問題を残している。今回アフィニティーカラムを用いる分析法を検討した結果，時間的にも費用の面でも経済的な方法を確立した。

5. 調査研究

① 全国からの集計モニタリングのデータは120万件に達し，衛生行政のためにアウトプットし，作成したデータを全国の地研に提供した。また，日常食中の汚染物摂取量調査を行い，全国11機関のデータの解析を行った。（生活衛生局食品保健課）

② 輸入食肉・養殖魚介類検査精度管理（生活衛生局乳肉衛生課）

③ 平成2年度輸入食肉残留合成抗菌剤等モニタリング（生活衛生局乳肉衛生課）

④ 国内産きのこの放射能に関する調査（生活衛生局食品保健課）

⑤ ポストハーベスト農薬に関する調査（生活衛生局食品化学課）

⑥ 既存化学物質毒性試験調査・第二種特定化学物質暴露量調査（生活衛生局生活化学安全対策室，戸部班）

⑦ 有機スズ化合物の食品経由暴露量解析（生活

衛生局乳肉衛生課）

⑧ 照射食品の検知法に対する国際的な情報収集ならびに研修・研究（科学技術庁原子力局調査国際協力課，生活衛生局食品保健課）

食品添加物部

部長 武田 明治

前部長 義平 邦利

概 要

当部の主要業務である合成食品添加物，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に引き続いて，食品衛生法改正に基づく平成3年度の表示に向けて本格的な作業を実施し，完了した。さらに，平成4年に向けての食品添加物規格改正のための作業が進行中である。

人事面では，合田幸広技官は科学技術庁長官在外研究員として，米国テネシー州バンダービルト大学へ一年間出張中であつたが，平成2年8月30日に帰国した。

義平邦利前部長は平成3年3月31日付けで定年退職された。平成3年4月1日付けで山崎壮技官は機能生化学部へ，山本都技官は化学物質情報部へ配置替えになった。武田明治部長は平成3年4月1日付けで環境衛生化学部より当部へ配置替え，就任した。さらに，坂元史歩技官および久保田浩樹技官は平成3年4月1日付けで採用され，当部に着任した。

義平前部長は平成2年10月（6日～13日）にうま味に関する第2回国際シンポジウムに出席のためイタリア国シリアへ出張した。石綿室長はFAOのコンサルタントとしてタイ国農務省農業局（平成2年8月13日～10月12日：Final Report on Analytical Chemistry for Food Additives and Contaminants, FAOへ報告）に，また，国際協力事業団専門家としてフィリピン国食品医薬品検定センター（平成2年12月6日～平成3年2月6日）に出張した。

外国からの研修生として，フィリピン国食品・医薬品検査センターのMiss Maria Victoria Pabruaは食品添加物の試験・検査研修のため平成2年6月から12月まで滞在した。また，中国唐山市衛生防疫所の邢大栄氏は平成2年6月から1年間の予定

で金属分析について研修を行っている。招聘研究員として米国 FDA の Dr. Frank Joe は前年度に引き続き平成2年7月まで日米の食品添加物の分析法の相違点につき研究し、帰国した。さらに、米国 FDA の Dr. Charles R. Warner は平成2年11月より1年の予定で同様に研究に従事している。

業務成績

1. 規格・基準の作成

(1) 食品添加物の規格・基準の将来に於ける国際化に備えた基礎資料収集のため、合成品を除く食品添加物に関してそれぞれの成分、分析法および毒性等の文献調査を実施した（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) 合成食品添加物の国際化および有効利用のための調査の一環として、臭素酸カリウムおよび過硫酸アンモニウムに関して諸外国の規格、使用状況および分析法等について調査した（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) 不許可合成色素の分析法開発研究の一環として、アゾルビン（赤色）、キノリンイエロー（黄色）およびパテントブルー（青色）について許可色素との分別分析法を TLC および HPLC により検討し、相互定性および定量分析が可能となった。

(4) 陶磁器からの溶出鉛およびカドミウムの規格改定の基礎資料とするため、現行公定法より高感度な試験法を検討し、現行試験法に対する問題点を調査した（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）。

(5) プラスチック製品および食品中のテトラメチルサクシノニトリルの規格設定のための試験検査を実施した（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. 特別行政試験

(1) グレープフルーツ中のチアベンダゾールに関する各種の分析法の比較検討を行い、問題点を明らかにするとともにチアベンダゾールの規格試験を実施した（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）。

研究業績

1. 食品添加物の規格設定に関する研究

1) 合成食品添加物

(1) 次亜塩素酸塩および亜塩素酸塩の混合物中のこれ等の塩の分別定量法を検討、開発した。その結果これ等の品質管理のための分析法精度の向上と所用時間の大幅な短縮が可能となった。

(2) 海産甲殻類中の残存亜硫酸塩類の分析法として改良ランキン法採用に伴う種々の問題点につき基礎的検討を実施し、分析技術上の問題点を明らかにした（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) 食用赤色40号の純度試験設定のために、色素中の不純物等の文献調査を行うとともに、存在すると考えられる低スルホン化および高スルホン化副生成物等の不純物を含めた試験法設定のための基礎研究を HPLC により実施した（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）。

(4) 食用赤色104号中の臭素化物のイオンクロマトグラフィー (ECD) による分析法を開発し、市販赤色104号の実態調査を実施し、すべてから0.01%以上の臭化物が検出された。

2) 天然添加物

(1) 輸入米国产フルーツカクテル缶詰中の桜桃に於けるカルミン使用の有無を判定するための基礎的調査・研究を行った（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) バイオテクノロジーで製造されたL-トリプトファンに対する規格作成のための試験・調査を実施した（食品添加物安全性再評価等試験調査費，厚生省生活衛生局食品化学課）。

(3) 西洋茜色素の原料植物 *Rubia tinctorum* から新規アントラキノン単離し、7-ヒドロキシテキノキノンと命名した。

(4) 西洋茜の根から1-ヒドロキシ-2-メチルアントラキノンと2-エトキシカルボニール-1-ヒドロキシアントラキノン単離、同定した。

2. 食品添加物の安全性再評価に関する研究

1) 合成添加物

(1) 合成タール色素の *in vitro* による安全性評価法開発の一環として、ウサギ腎髄質由来プロスタグランジン合成酵素、馬鈴薯由来およびモルモット腹腔多形核白血球 (PMN) 由来リボキシゲナーゼに対する31種タール色素等の阻害作用を検討し、基礎試料を得た（国立機関原子力研究費，科学技術庁）。

(2) 安全性再評価の一環として生体試料中 BHA に対する高感度分析法を HPLC-ECD を用いて検討した（食品添加物安全性再評価費，厚生省生活衛生局食品化学課）。

2) 天然添加物

(1) 天然添加物カラギーナン中の砒素の含有量お

よびその代謝研究のための HPLC-ICP の応用研究を実施した（食品添加物安全性再評価費，厚生省生活衛生局食品化学課）。

(2) 天然添加物カラギーナン中のアルミニウムを含む多元素同時分析法およびアルミニウムの植物体内挙動に及ぼす共存有機酸の影響について検討した（食品添加物安全性再評価費，厚生省生活衛生局食品化学課）。

(3) 食品添加物関連アルミニウム分析への ICP の応用研究の一環として超音波ネブライザーの有用性について検討した。

3. 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) トランスジェニック植物による生理活性物質の生産性検討のために *Lippia dulcis* の水耕栽培植物およびその培養毛状根を用いて比較検討した。ともに母植物の主成分であるテルペン類を生産した。特に，後者の場合培養条件を選べば *hernandulcin* は効率よく生成し，他のテルペン類は生成しないことを見出した。

(2) 西洋茜毛状根の成長およびアントラキノンの生産に対する植物ホルモン（IAA, NAA, 2,4-D およびカイネチン）およびしょ糖の影響を組織培養の条件下で検討した。毛状根は $5\mu\text{M}$ IAA 濃度で最も高い成長率とアントラキノン生産性を示したが，カイネチンは何等影響を示さなかった。また，しょ糖の毛状根の成長およびアントラキノンの生産性への影響は植物ホルモンの有無により左右されることを見出した。

(3) 組織培養適用被生産物の安全性評価法開発に関する基礎研究の一環として，西洋茜毛状根を用いて培地中有害不純物（砒素）の培養組織への移行を検討した。成長阻害は濃度依存性を示し，移行性は亜砒酸 (As^{+3}) が砒酸 (As^{+5}) より速く，組織内では投与形に関係なく As^{+3} で存在していた。

(4) 2D-INADEQUATE-NMR 法および ^{13}C 標識酢酸投与方法により紅麹菌の変異株より単離された新規黄色色素の構造および生成に関する知見を得た（HS 財団受託研究費）

(5) 超臨界流体抽出法により西洋ワサビ中の辛味成分の抽出条件を検討し，さらに，抽出成分につき既存の溶媒抽出法との比較を GC-MS を用いて比較した。

(6) ハイビスカス色素の主色素成分の分離を遠心液々分配クロマトグラフィーにより検討した。

(7) 好酸球増多筋肉痛症候群 (EMS) 発症原因レトリプトファン中の原因物質を解明するために HPLC により分析を行った。その結果を基にして特定ピークについては分取 HPLC により分取・単離し，機器分析により構造解析を行った。さらに，それ等の中不純物と考えられる化合物については化学合成し，各種分析機器による比較ならびに分子動力学計算を行った（厚生科学特別研究事業費）。

4. ニトロソ化合物に関する研究

(1) 市販コンドロイチン硫酸ナトリウム中のニトロサミン生成促進物質の精製をセファデックスカラムクロマトグラフィーにより行い，イオンペアクロマトグラフィー的に単一ピークを示すものを得た（厚生省がん研究助成金，国立がんセンター運営部）

5. 器具・容器包装に関する研究

(1) 陶磁器製食器から溶出される金属類の ICP による多元素同時分析法を開発し，これを用いて陶磁器製食器から溶出される金属類を調査した。鉛およびカドミウムは基準以下であったが，銅およびカルシウムで越えるものがあつた。（食品添加物規格基準設定費，厚生省生活衛生局食品保健課）。

(2) 陶磁器製食器からの鉛およびカドミウムの溶出に関する基礎的試験・研究を実施した（厚生科学研究補助金，厚生省生活衛生局食品保健課）。

(3) プラスチック製品中のテトラメチルサクシノニトリルの微量分析法（検出限界：1 ppb）および食品への移行に関する基礎検討を実施した。プラスチック製品中のテトラメチルサクシノニトリルは通常の条件では食品に移行しないことが判明した（食品添加物安全性再評価費，厚生省生活衛生局食品化学課）。

(4) 合成樹脂用容器包装規格試験法を幾つかの生分解性プラスチックについて適用したが，特に，実施上の問題点は見出せず，また，規格値を越えるものはなかった。

(5) メラニンがアンメリン，アンメリドを経てシアヌール酸へ加水分解される。これ等の HPLC による同時分析法を開発し，メラニン樹脂容器溶出液への応用を試みたところメラニンのみが検出され，他は全く検出されなかった。

(6) 微生物の増殖におよぼすメラニンの影響を検討した結果，メラニンは試験した 5 種微生物の中 *Saccharomyces cerevisiae* と *Staphylococcus aureus* の増殖を抑制することを見出した。

(7) ラット結紮小腸および静脈内に投与されたメ

ラニンの吸収および排泄を検討した。メラニン是小腸より一次指数関数的に吸収され、一次指数関数的に血液および尿へ出現した。一方、静脈投与されたメラニンは血液中から二次指数関数的に消失し、二次指数関数的に尿へ排泄された。これ等の結果はメラニンの尿中排泄は小腸からの吸収が律速段階であることを示唆している。

6. 生体常成分の相互反応

マロンジアルデヒドは変異原性(フレームシフト型)や発癌性に関連してDNA付加物が興味を持たれている。マロンジアルデヒドDNA付加物に対して特異性が高く、高感度微量分析法(ECD-HPLC)を開発した。

有機化学部

部長 宮田直樹

前部長 神谷庄造

概要

平成2年度の研究業務として、昨年度に引続き、

1) 有用生理活性物質の合成および化学反応性に関する研究、2) 有害物質の構造決定および毒性評価に関する有機化学的研究、3) 薬物と生体分子の相互作用の解析に関する研究、などを行った。特筆すべき研究成果として、丹野雅幸主任研究官らが、生理活性を有するN-アリアル-N-ニトロソウレアの熱分解過程の研究により、N-N結合のラジカルの解裂にともなうNOラジカルの発生を確認したことがあげられる。NOラジカルは、近年生体内での生成や生理作用が注目されており、本研究はこの分野での今後の研究に多大な示唆を与えた。

平成3年3月31日付けで、神谷庄造前部長が定年退職された。氏は、40年にわたって当所に在職され、昭和52年からは合成化学研究部長(平成元年より有機化学部と改称)として、試験研究業務に尽力された。後任には、4月1日付けで宮田が第1室長より昇任した。また、内野正氏が新規採用され第2室に配属された。新体制のもと創造的な有機化学研究をより一層進展させたいと考える。なお、徳永裕司主任研究官は、昨年度より引き続き厚生省薬務局審査課に出向(併任)中である。

宮田は、平成2年11月14日より24日まで米国へ出張し、カリフォルニア州バサデナで開催された第5回国際フリーラジカル会議において、研究成果

を発表した。また、神谷庄造前部長は、11月26日より12月2日まで、フィリピンに出張し、第13回アジア薬剤師会連合学術大会に出席した。

福原潔、栗原正明の両技官は、当所の共同利用機器400および300MHz核磁気共鳴装置の管理を担当した。

神谷庄造前部長、末吉祥子第2室長、宮田は、日本薬局方調査会委員として、第12改正日本薬局方の調査改正作業に従事した。

研究業績

1. 有用生理活性物質の合成および化学反応性に関する研究

1) 抗ウイルス作用を有する化合物の合成研究の一環として、抗HIV活性試験に供する目的で9-置換アデニン誘導体およびアジド化合物の合成法を検討した。(エイズ委託研究)

2) 依存性薬物に関する研究として、コデインの6位N-ニトロソカルバメート誘導体の合成を行った。これらは、モルヒネレセプターを特異的に化学修飾することが期待される(乱用薬物基礎研究)

3) 生理活性物質の合成を目的とした不斉合成法の開発に関する研究として、ジオキシランによるオレフィンの構造選択的エポキシ化反応の条件検討を行い、溶媒や液性について至適条件を明らかにした。

4) 生理活性を有するアミドおよび尿素誘導体の立体配座と化学反応性に関する研究として、各種ニトロソ尿素のX線構造解析を行い、NOラジカルの生成と立体構造との相関を明らかにした。

5) 核酸親和性化合物の合成および反応性に関する研究として、4-ニトロおよび4-アミノ-2-アリアルキノリン誘導体の合成法を検討した。

6) 酵素反応を用いた生理活性物質の光学選択的合成に関する研究として、加水分解酵素を用いプロキラルジエステルの速度論的不斉加水分解を行った。

7) 分子力場計算による反応メカニズムの解析に関する研究として、二環性スピロ化合物について各種コンフォーマーの分子力場計算を行い不斉アセタール化反応における置換基効果を明らかにした。

2. 有害物質の構造決定および毒性評価に関する有機化学的研究

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の一環として、種々のポリニトロアレーン類の還元特性を化学計算により解析し、変異原性の強さの指標となるニトロ基の還元特性がMNDO法を用いる半経験的

分子軌道計算により容易に算出できることを明らかにした。(厚生省特別研究)

2) 発がん性を示す抗酸化剤の毒性評価に関する有機化学的研究として、抗酸化剤由来の活性キノン代謝物の還元特性を分子軌道計算により求め、活性酸素発生能との相関を解析した。(厚生省がん研究助成)

3) 毒性評価を目的とした有機化学の新技術の導入に関する研究として、種々の発がん性ニトロアレーン類について活性酸素種 KO_2 による化学的酸化反応を検討した結果、1-ニトロピレンは芳香環の水酸化が進行すること、ジニトロピレン類ではニトロ基の酸化的置換反応が進行することを明らかにした。(環境庁公害防止等試験研究)

4) 含窒素多環芳香族炭化水素の合成と反応に関する研究として、6-アザベンツ[a]ピレンおよび6-アザベンツ[a]ピレン-N-オキシドの1位ニトロ体および3位ニトロ体を合成した。また、これらは、強力な変異原活性を有すること、ニトロ基の還元特性と変異原性により相関が見られることを明らかにした。

5) 生活環境中の発がん関連物質の究極活性物質の生体内生成の究明と安全性評価法の確立に関する研究の一環として、種々のハロゲン化ハイドロキノンおよびハロゲン化キノンからのセミキノンアニオンラジカルの生成のしやすさを化学計算により求めた。(対がん戦略総合研究)

3. 薬物と生体分子の相互作用の解析に関する研究

薬物代謝酵素(チトクロム P-450)の酸化反応モデル系の設計と反応に関する研究として、チトクロム P-450 モデルシステムを用い、N-ニトロソ化合物の酸化的代謝反応を検討した。

以上の研究の一部は、共立薬科大学有機薬化学教室望月正隆教授、昭和大学薬学部分析センター山口健太郎博士、福岡県衛生公害センター常盤寛博士、神奈川県衛生研究所薬事毒性部大森清美氏、および、所内関連各部の協力を得て行った。

機能生化学部

部長 澤田 純一

前部長 寺尾 允男

概要

平成2年度の研究業務として、免疫担当細胞の機能に関する研究、薬物受容体等の構造と機能に関する研究、イムノアッセイ等を用いる微量検出法の開発、モノクローナル抗体の機能変換等に関する研究等を行った。また、池淵第二室長を中心に RI 管理に関する業務を行ってきた。

平成2年4月1日付で、寺尾允男前機能生化学部長が薬品部長へ転任し、その後任に澤田純一第一室長が、澤田の後任に食品添加物部より山崎壯技官が任じられた。

業務成績

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(厚生科学研究、薬務局審査課)、日本薬局方の国際化方策および基盤整備に関する研究(厚生科学研究、薬務局安全課)等の調査研究を分担した。

研究業績

1. 免疫担当細胞の機能に関する研究

(i) 即時型アレルギー発症機構を解明する目的で、好塩基球細胞の脱顆粒反応時におけるチロシンキナーゼの関与およびカルシウムイオンの動態に関し、さらに検討を加えた(厚生科学研究費)。

2. 薬物受容体等の構造と機能に関する研究

(i) ヒトリンパ球培養細胞 IM-9 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、受容体ペプチドに対するモノクローナル抗体の調製を試み、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ株を樹立した(文部省科学研究費)。

(ii) 紫外線照射によるリガンドと受容体の架橋形成を利用した簡易アフィニティラベル法を、モルヒネ受容体の系を用いて検討した(国立機関原子力試験研究費)。

(iii) モルヒネ等の神経作用を分子レベルで解析する系を確立する目的で、オピオイド受容体の分離精製条件を検討し(HS財団受託研究費)、受容体に対するモノクローナル抗体の調製を試みた。

3. イムノアッセイ等を用いる微量検出法の開発

(i) 前年度に引き続いて、穀物中のニバレノール、

セラレノンのイムノアッセイ法による定量を継続して検討した。

(iii) 真菌アレルギーの抗原検出法の開発を目的として、真菌アレルギー原因抗原の精製および抗原性に関する解析を行った(国立機関原子力試験研究費)。

(iii) ニトロ多環芳香族化合物に対するモノクローナル抗体の作成を試みた(国立機関公害防止等試験研究費)。

(iv) メタロチオネインに対する高親和性モノクローナル抗体を新たに作成し、細胞内メタロチオネインの同定法に関して検討を加えた。また、RNaseに対するモノクローナル抗体も調製した。

4. モノクローナル抗体の機能変換等に関する研究

(i) 抗ステロイド抗体および抗ホルヒネ抗体の超可変領域アミノ酸側鎖に関する情報を得る目的で、pH反応性を調べ、HまたはL鎖の特異的なアフィニティラベルを検討した(国立機関原子力試験研究費)。

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。今年度より、第3期の対がん十カ年戦略研究事業の一環として、生活環境中の発がん関連物質の究極活性物質の生体内生成の究明と安全性評価法の確立に関する研究を開始した。また、国立機関公害防止等試験研究(環境庁)の一環として、米国スタンフォード研究所と単離肝細胞を用いた代謝研究に関して共同研究を開始した。

人事面では、最上知子技官が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教授のもとで肝リン脂質代謝制御機構の解明に関する研究に従事し、8月31日に帰国した。また、同技官は平成3年4月1日付で主任研究官に昇格した。岩田修永ヒューマンサイエンス振興財団流動研究員は10月1日付けで科学技術特別研究員に採用され、代謝生化学部に配属された。

短期海外出張では高橋(惇)がオランダで開催さ

れた第11回国際薬理学会議およびスウェーデンで開催された第8回国際ミクロソームと薬物酸化に関するシンポジウムに出席後、米国スタンフォード研究所を訪問し、共同研究の打合せを行った(6月24日~7月11日)。

研究業績

1. 化学物質の安全性に関する代謝生化学的研究

1) ジペンテンダイマーに関する研究(既存化学物質委託費, 生活衛生局生活化学安全対策室)

7種類の不飽和度の異なる成分を含有するジペンテンダイマー(DPD)の代謝を雄性ラットを用いて検討し、糞中より未変化体を、尿中より酸化体と思われる代謝物を検出した。GC-MSのSIM法による定量法を検討中である。

2) 塩化メチレンに関する研究(既存化学物質委託費, 生活衛生局生活化学安全対策室)

塩化メチレンの代謝試験およびその試験結果の生理学的速度論モデル解析に関する文献調査を行い、発がんリスクの定量的評価について考察した。

3) 酸化防止剤に関する研究(食品等試験検査費, 生活衛生局食品化学課)

ブチルヒドロキシアニソール(BHA)投与ラット前胃上皮細胞中の活性代謝物の検索を行い、BQ様物質の存在が示唆された。その生成量の速度論的解析の結果、BHAの毒性がBQ量に比例すると仮定すると、0.01%以下の投与量ではその毒性は投与量に比例すると考えられた。

4) ベンジルブチルブチル酸エステル代謝生化学的研究(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)

ベンジルブチルブチル酸エステル(BBP)および数種のBBP関連化合物のラット肝における*in vitro*での加水分解を調べた。BBPをはじめほとんどのジエステルにおいて、ベンジルエステルが加水分解されやすいことが判明した。

2. 異物代謝に関与する酵素等の研究

1) 脂環族1級アミンの酸化的脱アミノ機構の研究

脂環族1級ヒドロキシルアミンはオキシムに変換し、オキシム体は肝上清によりケトンになることが判明した。

2) リン酸トリエステル類の代謝に関する研究

Tricresyl phosphateは、マウス肝ミクロソームにおいてもジエステル体に代謝されることが判明した。

3. 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（特別研究）

食品添加物のソルビン酸が β -酸化される過程で、SH化合物と付加反応する活性代謝物に変換されることを明らかにした。

4. 生活環境中の発がん関連物質の究極活性物質の生体内生成の究明と安全性評価法の確立に関する研究（厚生省科学研究費，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) BHA由来のアチルキノンはキサンチンオキシダーゼおよびリポアミドデヒドロゲナーゼ，NADPH-cytochrome P450 reductase等の各種フラビン酵素類により1電子還元され，セミキノン体が生成することが判明した。

2) マウス肝のソルビン酸の代謝活性化に関わる酵素系が，ソルビン酸投与により選択的に誘導されることを明らかにした。

5. 動物実験結果から化学物質の低濃度曝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) ビレン-BSA 結合体で免疫したBALB/cマウスの脾細胞をマウスのミエロマ細胞と細胞融合させ，ビレンに対するモノクローナル抗体を調製した。

2) ^{14}C 標識したウレタンを投与したマウスの肝・肺DNA，RNAへ共有結合した放射能の用量-反応評価を行った。

3) 実験動物とヒトにおける化学物質の体内動態を比較検討する方法を確立させる目的で，単離肝細胞を用いたトリクロロエチレンの代謝に関する *in vitro* 実験を実施した。

6. 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) 代謝試験結果の速度論的解析法に関する研究（厚生科学研究費補助金，生活衛生局生活化学安全対策室，大森班）

生理学的薬物速度論の手法を用いて，化学物質の体内動態を解析している文献を収集し，その手法を用いた化学物質の安全性評価法について検討し，そのリスクアセスメント上の意義を考察した。また，毒性発現に関する薬物速度論について整理し，理論的考察を行った。

2) 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マウスにおけるウレタンの体内動態について検討し，速度論的解析を行い，高投与量で代謝過程が飽和することを明らかにした。また，昭和大医学部第一薬理との共同研究で，*in vivo*における化学物質の体内動態試験へのmicrodialysis法の導入を試み，化学物質とその代謝物の臓器・血中濃度の予測に応用可能であることを示した。

7. 薬物受容体の生化学的・薬物動態学的研究

1) 受容体の新簡易フォトアフィニティーラベル法の開発研究

成長ホルモンとその特異的受容体は紫外線照射によりフォトアフィニティーラベルされることを見出し，その基礎的条件を検討した。

衛生微生物部

部長 三 瀬 勝 利

概 要

入所以来40年近くの長きにわたって，国内における真菌学の第一人者として，研究・試験などの面で当所の発展に多大の貢献をされた宇田川俊一室長は平成3年3月31日付けをもって定年退官された。また当部第二室において20年以上にわたって食品の細菌検査に従事され，優れた業績をあげてこられた高山澄江技官も平成3年3月31日付けをもって定年退官された。お二人とも当所での業績が高い評価を受けていたこともあり，現在は新しい職場で関連分野の研究や検査に取り組んでおられる。平成3年4月1日付けをもって戸正勝第二室長が第三室長に，小沼博隆主任研究官が第二室長に配置換えとなった。また菊池裕博士を星薬科大学より第三室に迎えた。平成2年4月より石関忠一横浜国立大学客員教授を，平成2年5月より岡本秀彦国立予防衛生研究所前抗生物質部長を客員研究員として迎え，研究の指導を仰いでいる。HS財団の援助でCold Spring Harbor研究所に留学していた宮原美知子主任研究官は平成2年9月，研究を終了して無事帰国した。

業務成績

1. 一斉取締試験

1) ビタミンK₁，K₂，注射剤15件について無菌試験（細菌試験15件，真菌試験15件）を行ったが，いずれも陰性であった。

2) 日局オキシトシン注射剤3件について無菌試

験(細菌試験3件, 真菌試験3件)を行ったが, いずれも陰性であった。

3) 眼科用剤23件について無菌試験(細菌試験23件, 真菌試験23件)を行ったが, いずれも陰性であった。

2. 輸入食品検査

中国産塩蔵タケノコの細菌試験(生菌数, 好気性菌, 嫌気性菌, 大腸菌群, 黄色ブドウ球菌, 酵母, ウエルシュ菌, セレウス菌)と理化学試験(水分活性, 塩分濃度, pH)を9検体について行った。

3. 規格・基準試験など

バイオ食品の安全性に関する試験, 細菌性食中毒防止のための基礎的サーベイランスに関する研究(生活衛生局食品保健課), 食鳥の微生物制御に関する調査研究, 卵のサルモネラ汚染に関する調査研究(生活衛生局乳肉衛生課)および無菌性, 非発熱性の確認のための各種品質試験の利用等に関する研究(薬務局監視指導課)などが行われた。また, 予研や10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(厚生省-HS財団)も継続中である。

研究業績

1. エンドトキシンに関する研究

ビブリオ科細菌のリポ多糖をGC-MSやNMRを用いて解析した。KDOが検出されないビブリオ科細菌のリポ多糖はKDOの分岐構造を欠損し, 主鎖に存在するKDOの4位の水酸基はエステル化されていることが判明した。コレラ菌と共通抗原性を持つ non O1 *Vibrio cholerae* ハカタ株のリポ多糖の化学構造も決定された。

2. 制限酵素に関する研究

食中毒事件の原因菌として重要視されている *Salmonella infantis*, *Salmonella thompson* および *Salmonella blorkley* から, かなり高率に特定の制限酵素のアイソゾマーが検出された。制限酵素産生性は, これらの三血清型による食中毒の疫学に一つの指標を提供することが期待される(HS財団受託研究費)。

3. 可動遺伝子に関する研究

ソンネ型赤痢菌に存在するIS629の全塩基配列が決定され, IS3411と殆んど完全な相同性を持つことが示された。IS630の転座機構についても研究が行われた。(東京大学, 応用微生物研究所と協同研究)

4. 培養細胞系を用いた発癌物質や変異原物質の

スクリーニング研究

2段階トランスフォーメーション実験系を用いて, クエルセチンに *in vitro* でイニシエーション活性があることが判明した。また, okadaic acid 類発癌プロモーターについて, 動物実験と *in vitro* トランスフォーメーション実験との間に良い相関関係が認められた。さらに本実験系を用いて, 3-BHAとBQに統計学的に有意なイニシエーション活性が認められ, 後者の活性は前者のその約100倍であることが示された。BQがBHAの活性代謝物である可能性も示唆された。

5. 迅速法による食中毒細菌の分離同定法の研究

ポリスチレンボールを用いるサンドイッチELISA法によるブドウ球菌エンテロトキシン検出法を検討し, 食中毒原因食品および吐物からエンテロトキシン0.6~3.6 μ gを直接検出することができた。また150以上の食肉検体について, サルモネラ同定のための迅速検査法と従来法を用い, 迅速検査法の食品への応用の可能性と最適条件を検討した。

6. 真菌の分類同定に関する研究

コンタクトレンズを介して引き起こされた角膜真菌症の患者から, 起因菌として *Paecilomyces lilacinus* を分離・同定した。 *Fusarium* とそのトキシンに関する研究も継続中である。

7. その他

食品の微生物制御のためのサーベイランスシステムに関する研究, 水産食品由来腐敗酵母の微生物学的特性に関する研究(大阪支所食品試験部と協同研究)も行われた。

化学物質情報部

部長 神 沼 二 真

概 要

当部は1) 図書室の管理と情報サービス, 2) 化学物質の安全性に関する国際協力, 3) 研究支援のための全所的な情報機能とコンピュータリソースの整備を主たる業務としている。さらにこれらの業務を通じて開発, 蓄積されたりソースを用いて基礎研究を展開することを副次的な目標としている。こうした目標の設定とそれに対応した新しい体制づくりは昨年度より始まったが, 本年度はそれを一層推進し, 基本となる体制づくりをほぼ完了した。

人事面では, 平成3年1月1日付けで会田喜崇主

任研究官が毒性部に転出した。代わって中田琴子主任研究官が同日付で当部に配属となった。また、非常勤職員としてオンライン検索などを通じて全所的な支援サービス業務に携わっていた加納直子氏が、平成3年3月31日付で退職した。

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335タイトル、単行本7645冊を保有していたが、外国雑誌の見直しを行った結果、11タイトルを中止し、新規に10タイトルを購入した。この結果、本年度は雑誌334タイトル、単行本8090冊となった。また所内向けに56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38機関352件の依頼があり、当所から外部へは74機関、1318件の申し込みを行った。

(2) 情報検索サービス

図書室における情報検索機能は引き続きパソコンを用いたCDによるMEDLINE（今年度から図書室で購入）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行っている。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 149件、JOIS 32件、STN 60件、CIS 2件、総件数243件であり、利用件数だけでいえば昨年度より減少している。

(3) 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108号を印刷し、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

例年どおり、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、本ファイルはこれまで国立衛生試験所でしか検索できなかったが、統計情報部との協力でKIND（厚生省共用データベース）に本ファイルのをせ、厚生省や関係研究機関等でも利用できるようにし、併せてその利用マニュアルを作成した。

(2) 国際化学物質安全性計画 (IPCS) への協力

1) ドキュメントの作成

「エチレンジプロマイド (EDB)」のEHCは、変異遺伝部祖父尼部長より平成2年7月に遺伝毒性の章の原稿を受けとったが、一部の執筆者に引き続き原案作成を依頼している。

「陰イオン界面活性剤」(昭和55年開始)のプレリミナリドラフトは1980年迄の文献を引用しているため、1981年以降の文献検索を行った。その結果環境関係の文献はきわめて多いが、毒性関係の文献はわずかであることがわかった。環境関係はITEのDobson博士に執筆を依頼し、日本のデータは東京都環境科学研究所若林主任研究員、川崎市公害研究所吉川研究員の協力を得て、表を作成し11月Dobson博士に送付した。2、3章はライオン生物科学研大場所長、武井主任研究員に執筆を依頼した。毒性関係のup-datingは所内の林センター長、黒川部長、長谷川室長、祖父尼部長、高橋室長(現部長)、田中室長、関沢室長、森本室長が担当することになり、原案検討委員会を平成3年2月12日開催した。各章毎にプレリミナリドラフトの内容を検討し、修正原稿を9月第1週に集めることになった。

「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、原稿の集まらなかった環境生物への影響はITEのDobson博士に原稿を依頼し、ヒトへの影響は金沢大学医学部橋本教授に原稿を依頼し11月受領した。2章3章は2人の執筆者の原稿が重なっているため再編集をした。原案検討委員として所内より、高仲部長、中村部長、祖父尼部長に加わっていただき本文の内容についてのコメントを3月依頼した。

EHC第1次ドラフトのコメントの協力に関しては「IPCS-EHCコメント依頼に関するお知らせ」を10物質について、7号まで発行し、得られたコメントは国際課をとおしてIPCS本部へ送付した。

「フェニトロチオン」と「トリクロルホン」の第1次ドラフトが各国の供覧に付され、集められた100数十件のコメントをもとに第2次ドラフトを作成した。これらに関するタスクグループが平成2年12月にジュネーブで開催され、関沢室長と武田環境衛生化学部長、九州大学江藤教授、住友化学工業宮本研究所長が出席した。

2) IPCSの国際化学物質安全性カードの作成

12月(ルクセンブルグ)の検討会議に会田主任研究官が出席した。また7名の所外委員の協力を得て、18品目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の一部を IPCS に提供し、それが IPCS から出版された。

4) その他の活動

IPCS と IRPTC への 10 年間の協力の成果を所内の各方面の協力を得て「化学物質の安全性についての国際協力 10 年のまとめ」として編集、発行した。

5) また IPCS の活動の一環としてセントラル・ユニットのマネージャーである M. メルシェ博士を招待し、「化学物質の安全性評価についての国際協力」をテーマとする講演会を 11 月に KKR 東京竹橋会館で開催した。内容は、博士が「IPCS の活動と展望」について講演し、当所の林病理部長が「化学物質安全性評価と国際協力」について講演した。なお、この講演会には当所以外に IPCS の協力者、厚生省および他省庁の関係者、大学、民間企業の関係者などこの分野の産官学の関係者約 120 名が参加した。

3. 研究を支援するコンピュータ環境の整備

平成 2 年度より予算が認められた既存化学物質安全性点検体制（日本版 NTP 構想）のためのコンピュータシステムと、その全所的コンピュータリソースにおける位置づけに関する基本構想を、資料としてまとめ導入委員会に提出した。また、各部へのインタビュー調査を行い、全所的なコンピュータシステムの具体的な構築に関する基本的な考えをまとめ、平成 3 年 4 月の情報委員会に提出した。

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

毒性の予測や、毒性の研究者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、(株)アドイン研究所の協力を得てそのプロトタイプの開発を行った。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、発癌物質のカタロギングとデータベース化を続けている。また、さらに深いモデルとして、*in vivo* DNA 付加物量に関するデータベース化も行い、発癌に関係の深いグアニン O⁶ 位の修飾に関するデータ、240 件を蓄積した。（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、厚生省がん研究助成金）。

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とともに、ヒ素化合物の線虫への

毒性試験など予備的な実験を行った。

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)による急性毒性試験法に関する研究」を分担した。また、農薬安全性評価情報データベースの内容をデータ集として出版するために解説を加え整備した。

安全性生物試験研究センター

センター長 林 裕 造
前センター長 戸 部 満寿夫

平成 3 年 1 月 31 日付けで第 3 代センター長戸部満寿夫博士が退官された。昭和 39 年以来、毒性部室長、毒性部長の時期を含め 28 年間にわたる当研究所への御貢献に謝意を表します。その他、変異原部部长石館基博士の退官を始め、室長 6 名の交替等、センター全体に大幅な人事異動があった。

業務は全般的に順調に進められ、ICPS、JECFA、JMPR、OECD 等の国際協力事業、国際学術交流や GLP 査察業務についても各部の積極的な協力が得られた。平成元年より検討されてきた OECD による高生産量化学物質 (HPVC) の安全性点検の実施は、各国の同意の下に具体化され、当センターは国内で実施される試験の企画と評価に参加することとなった。本年度は、各部の協力により OECD から提案された方法に準ずるモデル試験を実施し、その結果を OECD、厚生省および国内の関連研究機関に報告した。なお、HPVC 安全性検討事業と相まって、NTP 体制の整備を促進するために既存化学物質安全性点検支援システムに係わるシステム化検討委員会に専門別のワーキンググループを設置した。

日米科学技術協力事業については、免疫毒性およびホルモンの生物検定に関する情報交換を目的として生物薬品部を中心に 3 名の研究者を NIEHS、FDA、EPA に派遣した。さらに、NIEHS と合同でリスクアセスメントの確立に関する第 3 回日米会議を開催した。

センター各部における試験/研究の内容は、特定の物質を対象とする試験から総合評価のための基盤研究および先端技術の導入による基礎研究の方向に移行しつつある。それらの研究の新しい動向に関連して、10 号館動物飼育室の一部がトランスジェニックマウス実験用に改修され、平成 3 年 3 月 12 日

付けて科学技術庁の認可を得た。

毒 性 部

部 長 黒 川 雄 二

概 要

平成2年4月1日付けで、長谷川主任研究官が機器試験室長に、小川、落合、斎藤技官が主任研究官に昇任した。さらに、広瀬技官(第3室)、大野技官(第4室)が採用された。同じく田中動物管理室長は薬理部後世代影響研究室長の併任が解除された。平成3年3月31日を以て、中路幸男第4室長と宇田川三郎動物飼育長が定年で退職された。第4室長の後任には国立がんセンター研究所生化学部津田充宥室長が着任した。平成3年3月1日付けで、化学物質情報部会田主任研究官が毒性部評価室に配置換えになった。平成3年4月12日に評価室が毒性部から独立し省令室「総合評価研究室」として認められ、中館室長、会田、鎌田主任研究官の3人でスタートした。今後、特に安全性生物試験研究センターの中核としての活動が期待される。平成3年4月から、斎藤主任研究官が機器室から第4室へ、高木技官が第2室から機器室へそれぞれ配置換えとなった。従って毒性部は6室構成となり、技術補助員4名を含め総勢28名である。

門馬主任研究官は1年間の米国NIEHSでの皮膚毒性、発癌性に関する研究を終えて平成3年1月に帰国した。梅村技官は平成2年9月から1年間の予定で米国American Health Foundationに毒性病理組織学研究のために滞在中である。

海外出張として、OECD関連では、Hazard Assessment Advisory Board (HAAB) (黒川部長、平成2年6月、ロンドンおよび平成3年3月、パリ)、高生産量化学物質の安全性点検における情報のレビューと試験計画に関する会議(中館室長、平成2年11月、パリ)、高生産量化学物質の情報と試験計画に関する拡大ステアリング会議および暴露に関するクライテリア設定会議(中館室長、平成3年3月、パリ)、IRPTCのデータベース利用に関する会議(鎌田主任研究官、平成2年8月、ジュネーブ)、遺伝毒性と発がんデータベースに関するシンポジウム(中館室長、平成3年1月、ジェノバ)、非変異原性発がん物質の発がん機構に関するワークショップ(黒川部長、平成2年6月、ブルッセル)。

そのほか、国際毒性ワークショップ(黒川部長、平成2年10月、北京)、国際フリーラジカル学会(長谷川室長、平成2年11月、バサデナ、米国)、米国NIEHSとの第3回化学物質リスクアセスメント確立のための会議(黒川部長、ハワイ、平成3年2月)、WHOの水道水質基準検討会議(長谷川室長、平成3年4月、コペンハーゲン)、韓国毒性学会(降矢室長、平成3年4月、ソウル)、IPCS国際化学物質安全性カード原案検討委員会(会田主任研究官、平成3年4月、ブルッセル)への出席があった。医薬品GLPの査察には14ヶ所へ延べ18人、化粧品GLPの査察には2ヶ所、2名が出張した。

研究業績

1. 厚生省厚生科学研究費補助金

1) 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い、さらに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、管理に関するデータベース作成と毒性予測の検討を行った。

2) 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ため、サルを用いてコカイン、THCに関する実験を行った。

3) 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)

曝露温度等曝露条件のLC₅₀値に及ぼす影響について検討した。

4) 医薬品等に用いられるフロンの代替品に関する研究(薬務局審査課)

エアゾール式ゼンソク薬の噴射剤代替品として期待されているHCFC-123とHFC-134aの安全性についてPAFTを中心に文献的な調査を行った。

5) 新規原料配合化粧品品の安全性評価のための試験法の研究(薬務局審査課)

新規化粧品製造原料に対する安全性試験の中で眼刺激性試験の代替の可能性について検討する目的でドレイズ法から得られる情報の解析を行った。

6) 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。

7) 生分解プラスチック分解生成物の安全性に関する研究(生活衛生局生活化学安全対策室)

各種の生分解性および光分解性プラスチックの子

測される分解物の安全性について調査研究を行った。

2. 厚生省生活衛生局生活化学安全対策室家庭用品試験検査費

1) 家庭用品

a) パラジクロロベンゼン

ラットにおける慢性吸入毒性試験を継続中である。

b) ジブチル錫二酢酸

免疫毒性について再検討した。

c) グルタルアルデヒドの急性毒性試験を行い、加齢による影響を検討した。さらに慢性毒性試験を開始した。

2) 既存化学物質

a) ジベンテンダイマー

慢性毒性試験を継続中である。

b) 5-フッ化プロパノール

急性・亜急性吸入毒性試験を行った。

c) 4,4-メチレンジアニリン

毒性文献調査を実施中である。

d) 1,1,2,2-テトラプロモエタン

急性・亜急性毒性試験を継続中である。

e) 2,2'-イソブチリデンビス(4,6-ジメチルフェノール)

亜急性毒性試験を行った。同慢性毒性試験を開始した。

3. 厚生省生活衛生局水質試験検査費

ジクロロ酢酸およびトリクロロ酢酸の毒性について文献調査し報告した。

4. 厚生省がん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酸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リロ三酢酸)についてその発がんメカニズムに関する研究を行った。

5. 厚生省対がん十カ年総合戦略研究事業

生活環境中の発がん関連物質の究極活性物質の体内生成の究明と安全性評価法の確立に関する研究
腎発がん物質である臭素酸カリウムをラットに投与した時のDNA酸化傷害について検討した。

6. 厚生省生活衛生局食品化学課健康食品対策室

1) 健康食品の安全性に関する研究

健康食品として利用されているスピルリナとこれに含まれている酸化ゲルマニウムの12カ月間慢性毒性試験を開始した。

7. 厚生省乱用薬物試験研究費(薬務局麻薬課)

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

サル薬物自己投与法によりメチルエフェドリン, カフェインおよびこれらの合剤の強化効果を検討した。

8. 厚生省医薬品審査等業務庁費(薬務局審査課)

タール色素毒性に関する試験

赤色230の(1)号および青色204号について経皮刺激性および急性経皮毒性を調べた。

9. 環境庁国立機関公害防止等試験研究費

希土類元素(ユーロピウム, ガドリニウム)の急性毒性および吸収排泄試験, 28日間反復投与毒性試験を行った。

10. 科学技術庁科学技術振興調整費(総合研究)

化学物質設計等支援のための知識データベースシステムに関する研究の一環として, 毒性(変異原性)予測知識データベースシステムの開発に関する研究を行い, そのプロトタイプシステムを構築した。

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

1) 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継続中である。

2) ポリウレタンの発がん性に及ぼす加齢効果を調べるため, 老齢ラットへの長期埋入実験を開始した。

薬 理 部

部 長 高 仲 正

概 要

後世代影響研究室長は平成元年7月1日より田中 悟動物管理室長(毒性部)が併任していたが, 4月1日付で川島邦夫主任研究官が後世代影響研究室長となった。

ヒューマンサイエンス振興財団(HS)流動研究員として, 今泉美佳博士は4月1日より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, 十分な業績をあげ, 平成3年3月31日付けで退所した。また, 郭 新彪博士は平成2年4月1日より第三室において医薬品等の高感度・高性能安全性評価法の開発に関する研究

に従事している。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ルレータの機能評価法の開発に関する研究に従事していた米国 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 博士は十分な業績をあげ、12月21日帰国した。パキスタン国 Gomal University 助教授 Mahammad Farid Khan 博士は科学技術庁流動研究員として平成3年2月26日に来日し、第三室において肝で作られる反応性代謝物に対する防御機構としての血中 GSH に関する研究に従事している。

第二室中澤憲一技官は科学技術庁長期在外研究員として、米国マサチューセッツ州ハーバート大学医学部細胞・分子生理学教室 Peter Hess 教授のもとで医薬品等生活関連化学物質の電気生理学的手法による薬効薬理学的研究ならびに安全性研究への応用についての研究を行うため、平成3年3月15日より1年間の予定で出張した。短期海外出張は、高仲：FAO/WHO 残留農薬合同会議（ローマ、9月16日～28日）、井上和秀主任研究官：第11回国際薬理学会（オランダ国アムステルダム、6月30日～7月12日）、第20回米国神経科学学会（米国セントルイス、10月26日～11月8日）の延3件であった。また、国内 GLP 査察には延4名が参加した。

外国からの研修生としては、柳鍾薫さん（韓国国立保健安全研究院薬理部薬効薬理科）が海馬組織を用いた内因性伝達物質の高速液体クロマトグラフィーによる分析の修得のため、平成3年1月29日より3月29日迄第二室で研修を行った。

今年度は9課題について研究を終了し、新たに7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7、環境庁1、科学技術庁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。

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

本年度で研究を終了した。

iii) 神経細胞内情報伝達に関する研究

iv) 神経・神経間情報伝達に関する研究

v) 神経・末梢組織細胞間情報伝達に関する研究
本年度で研究を終了した。

vi) 細胞間情報伝達におよぼす化学物質の作用に関する研究

本年度より3年計画で研究に着手した。

vii) 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（受託研究）

viii) 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

ix) 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（受託研究）

x) 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

xi) 毒性発現における栄養因子の役割に関する研究

本年度で研究を終了した。

2. 医薬品等の後世代に及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) ラット胎芽の発育に影響する血清中の因子に関する研究

本年度より3年計画で研究を開始した。

iii) 胚発生過程における遺伝子の発現に関する研究

本年度より5年計画で研究を開始した。

iv) 新しい生殖・毒性試験法のバリデーションに関する研究

単年度で研究を行った。

v) 天然添加物中の微量重金属の催奇形性に関する研究（食品等試験検査費，生活衛生局食品化学課）

本年度より3年計画で研究を開始した。

vi) 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，生活衛生局食品化学課）

vii) 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，生活衛生局生活化学安全対策室）

本年度で研究を終了した。

viii) 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，生活衛生局生活化学安全対策室）

本年度で研究を終了した。

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, 環境庁)

ii) 培養肝細胞を用いた安全性検査法の確立に関する研究 (受託研究)

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 (受託研究)

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)

本年度で研究を終了した。

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)

本年度で研究を終了した。

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, 生活衛生局, 生活化学安全対策室)

vii) デジタル化ビデオ顕微鏡を用いた有効性・安全性評価法の確立に関する研究

単年度で研究を終了した。

viii) 新規原料配合化粧品安全性評価のための試験法の研究 (厚生科学研究費, 薬務局審査課)

本年度より3年計画で研究に着手した。

病 理 部

部 長 高 橋 道 人

前部長 林 裕 造

概 要

林裕造部長は平成3年2月1日付けで安全性生物試験研究センター長に就任し、3月31日まで病理部長事務取扱を兼任した。引き続き平成3年4月1日付けで第一室長高橋道人技官が病理部長に就任した。病理部第三室長前川昭彦技官は昭和45年入所以来、化学物質の発癌性の研究において数多くの業績をあげ、厚生行政へ多大の貢献をされてきたが、平成2年9月30日付けで退官し、財団法人佐々木研究所病理部長に転任した。代わって平成3年1月1日付けで財団法人残留農薬研究所より三森国敏博士が第三室長に就任した。また平成3年4月1日付けで第一室長には川西徹薬理部主任研究官が就任した。第三室小野寺博志技官は平成2年4月1日付けで主任研究官に昇格した。

今年度、林裕造部長は次のように出張した。ベルギーでの「PCBとPCTに関する環境保健基準と

安全ガイド作成に関する専門家会議、およびスイスで開催された「FAO/WHO 合同食品添加物専門委員会」に出席した(平成2年5月26日~6月16日)。西ドイツで開催された「発がん性物質のリスクアセスメントに関するサテライトシンポジウム」に出席、発表した(平成2年8月22日~8月27日)。米国で開催された「医薬品承認申請資料の整合性に関する国際会議アドホック準備委員会」に出席した(平成3年1月13日)。米国での「日米がん研究協力事業セミナーおよび日米合同会議」に参加し、講演した(平成3年3月10日~3月17日)。

高橋道人室長(現部長)はGLP査察のため米国、ニュージャージー州に出張した(平成2年4月1日~4月7日)。またパリで行われた「OECD 試験法ガイドライン計画 第一回各国代表者会議」に出席し(平成2年10月2日~4日)、さらにハワイで行われた「化学物質のリスクアセスメント確立のための第3回日米会議」に出席し、討議した(平成3年2月4日~2月6日)。なお日米会議には、前川昭彦前室長と三森国敏室長も出席した。今井田克己室長はジュネーブで行われた「JECFA 食品添加物専門家会議」に出席し、討議した(平成3年1月21日~2月2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企画部)

A. 環境化学物質による発がん修飾の評価に関する研究

1) 脂質代謝およびエネルギー代謝への影響を介する発がん修飾の評価に関する研究

2) 内分泌環境への影響を介する発がん修飾の評価に関する研究

3) 塩類代謝への影響を介する発がん修飾の評価に関する研究

B. 食品に含まれる天然物質による消化器発がんの修飾

1) 胃発がんの修飾

C. がん予防およびがん対策を指向した、がん情報ネットワークに関する研究

1) 発がん物質データベース

D. 複数発がん要因によるリスク評価の基礎的研究

1) 複数の物質の組み合わせによる発がん性の変化に関する研究

E. 発がんと生活環境要因に関する分析疫学的研

究

2. 厚生省科学研究費・対がん十か年戦略研究事業関係（国立がんセンター運営部会計課）

A. 内的および外的因子による発がんの促進と抑制

1) 肺がんおよび消化器がんの抑制要因に関する研究

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. 実験的肺腫瘍発生過程におけるクララ細胞の動態と役割に関する研究

1) 実験的肺腫瘍の細胞起源に関する研究

2) 実験的肺腫瘍発生に及ぼす喫煙の影響

3) 各種実験動物の肺腫瘍発生における形態学的解析

4) 単離肺細胞の化学発がん物質に対する影響

B. 発がん研究における酸素ラジカルの関与

1) 酸素ラジカルを媒介とする化学発がんに関する研究

C. 膵癌発生の機構解析とその制御に関する研究

1) 膵癌発生における宿主側要因の検索と解析

D. コホート研究による発がん要因に関する研究

4. 厚生科学研究費

A. 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) 抗癌剤による発がんのリスク評価

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

B. 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

C. 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

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 祖父尼 俊雄

前部長 石 館 基

概要

本年度は人事面で異動があった。第1室の沢田稔技官の退職に伴い、平成2年4月1日付けにて鈴木孝昌が第1室に厚生技官として採用された。また、前年度の能美健彦技官の第2室長への昇格に伴い、同じく4月1日付けにて山田雅巳技官が採用された。石館基前部長が6月30日付けにて定年退官され、7月1日付けにて祖父尼俊雄室長が新部長に昇格し、同時に林真主任研究官が第1室長に昇格した。

平成2年7月に能美室長が、米国でのゴードン会議に出席し、変異原性の発現に関わる大腸菌とサルモネラ菌のumu遺伝子について発表を行った。平成3年1月に林室長が、イタリアで行われた「遺伝毒性と発がん性のデータベースと有害性評価のための有用性」に関する国際会議に出席し、当所の毒性試験のバイオリジカルデータベース（BL-DB）について発表を行った。

ヒューマンサイエンス振興財団（HS）助成金により、鈴木孝昌技官は3年2月より7月まで米国 Hazleton 研究所に出張し、トランスジェニックマウスを用いる遺伝子突然変異に関する研究に従事している。3年2月に松岡厚子主任研究官が染色体異常試験における代謝活性化法に関する研究によって、九州大学より薬学博士を授与された。

科学技術庁フェローシップである Dr. A. O. Asita は、ナイジェリアで食物の保存のために用いる植物煎煙の抽出物の変異原性に関する研究、植物抽出物の変異原性の抑制作用あるいは増強作用に関する研究、2種のアルキル化剤による小核誘発性の増強効果に関する研究など、およそ1年間にわたって多くの成果を挙げて、3月4日に帰国した。HS 振興財団リサーチレジデントである羽倉昌志博士は、およそ2年間にわたって O⁶-メチルグアニン転移酵素に関する研究に従事し、サルモネラ菌よりその遺伝子をクローニングし、その塩基配列を明らかにすることに成功し、平成3年3月31日付けで退所した。

海外研修生としては、韓国ソウル国立薬科大学 Seong Gon Kim 氏が平成2年8月より3ヶ月間、同じく韓国国立安全性研究所 Hyung Soo Kim 氏が

平成3年1月より3ヶ月間にわたり培養細胞を用いる試験を中心に熱心に研修を行った。

平成3年2月に祖父尼部長、水沢博第3室長が、米国の細胞バンク主要機関である ATCC および CIMR を訪問し、当細胞バンク運営に対する協力依頼および情報収集、細胞供給の折衝を行った。平成3年3月には祖父尼部長は日米科学技術協力協定に基づき変異原性試験法の国際的調和に関する共同研究のために NIEHS を訪問し、オランダで開催された第22回米国変異原学会年会に出席するとともに、共同研究成果発表会に出席し、染色体異常試験の試験法の問題点を明らかにした。

研究業績

1. 食品添加物の変異原性に関する研究

6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. 大量照射した食品成分の変異原性に関する研究

γ 線照射したグリシンおよびグルタミン酸について微生物を用いる復帰変異試験を行った(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) 水道水中の微量有機化合物の変異原性に関する研究

水道中に含まれ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
喫煙者および非喫煙者の尿中変異原性活性について、サルモネラ高感受性菌株を用いて検索を行った(国立機関公害防止等試験研究費, 環境庁)。

3) 既存化学物質の変異原性に関する研究

既存化学物質6種について、微生物を用いる復帰変異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) 生体外染色体異常試験の精度に関する研究

2種のモデル化合物について、培養細胞を用いる小核試験を行い、小核の誘発と、細胞増殖抑制率および染色体異常誘発性について比較検討した(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

γ 線照射したポッティング材の抽出物について、

微生物を用いる復帰変異試験を行った(HS財団受託研究費)。

5. 生活環境中の発がん関連物質の究極活性物質の生体内生成の究明と安全性評価法の確立に関する研究

チャイニーズ・ハムスター細胞株(CHL)より分離したメナジオン耐性細胞(MM1)を用いて、キノン類の染色体異常誘発性について検討した(対がん10カ年総合戦略受託研究費, がん研究振興財団)。

6. マウスを用いる小核試験法に関する研究

アクリジン・オレンジ超生体染色法を用いて、マウスおよびラットの末梢血網赤血球による小核試験法を開発した。

7. 培養細胞を用いる染色体異常誘発機構に関する研究

ピリドンカルボン酸誘導体によって誘発された染色体型異常について、トポイソメラーゼ抑制効果との関連性を検討した。

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

Salmonella typhimurium TA1538の染色体DNAから、O⁶-メチルグアニンDNAメチル転移酵素遺伝子(*ada*)をクローニングし、その塩基配列並びに転写活性化因子としての機能を大腸菌の*ada*遺伝子と比較した(HS財団受託研究費)。

9. 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

1) *S. typhimurium*より大腸菌*umuDC*変異株の紫外線突然変異誘発能を回復させる遺伝子(*samAB*)をクローニングし、その塩基配列を決定した。

2) *S. typhimurium*ニトロ還元酵素, アセチル転移酵素欠損株であるNR株, 1,8-DNP株における塩基配列レベルでの変異部位の同定, およびアセチル転移酵素の活性中心を検索した。

3) *S. typhimurium*よりグアニホスフォリボシル転移酵素の遺伝子(*gpt*)をクローニングし、その塩基配列を決定した。これを基に、8-アザグアニン耐性変異株の*gpt*遺伝子を、PCR法を利用して解析した。

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(厚生科学研究費補助金)。

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。

変異原性試験の1つである培養細胞による染色体異常試験について、2種のチャイニーズ・ハムスター細胞株、CHLおよびCHOを用いて、試験プロトコルの比較検討のための国際的な共同研究を行った（生活衛生局生活化学安全対策室）。

12. 実験動物における変異体細胞を指標とした発がん物質暴露量の推定

2種類以上の化学物質に同時に暴露された場合の相互効果について、マウス末梢血による小核試験法を用いて検討した（がん研究助成金による総合研究）。

13. 化学物質の変異原性に関する情報収集とデータベースの構築

当部で実施した微生物を用いる復帰変異試験のデータファイルを作製するとともに、およそ300種の化合物のデータ集を刊行した（科学研究費補助金研究成果公開促進費）。

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2年度末までの収集細胞株は730株、平成2年度中の作製アンプル数は約4000本、供給アンプル数は3030本であった。

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継続して実施している。汚染率は約15%で年ごとに低下している。

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をルーチン作業に組み入れて行っている。

4) 細胞株データベースの開発

すでに3年前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性が生じている。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確定し、さらにデータ入力および修正プログラムの再検討を継続して行っている。

大 阪 支 所

支 所 長 武 田 寧
前支所長 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。

また、医薬品試験用および色素試験用標準品の製造を行ってきた。

これらの業務のほか特別研究、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2年度のヒューマンサイエンス振興財団官民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、例年どおり、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（8名、1週間）を受け入れて研修指導を行った。

大阪支所各部別には、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。

なお、平成3年3月31日付けで伊阪博前支所長が定年退官し、後任に武田寧技官（本所薬品部長）が平成3年4月1日付けで就任した。

庶務課の人事異動は次のとおりである。

(2.6.15付) 庶務課長 武田 勲
(3.4.1付) 業務係長 中島一登
(3.4.1付) 本所配置換 猪原雄二
(2.6.15付) 辞職 豊田芳男（庶務課長）
(3.4.1付) 併任解除 高田正義（業務係長）

薬 品 試 験 部

部 長 岡 田 敏 史

概 要

HS財団の第2期官民共同プロジェクト研究事業も第2年度に入り、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し、その成果を固めつつある。ヒトインスリン製剤の国家検定数はかなり増加したが、昭和61年以来検定対象となってきたヒトインスリン注射液ほか4品目が本年度をもって検定品目から削除され、国家検査の対象となった。ブタインスリン

製剤およびブドウ糖注射液の国家検査数はやや増加した。標準品製造個数はほぼ横ばいであったが、新規標準品 11 品目の設定を行った。薬局方標準品の一部が平成 3 年度より日本公定書協会にて取扱われることになり、その原料の品質評価を開始している。

国際協力事業団のフィリピン国食品医薬品検定センタープロジェクトの標準品製造および医薬品の機器分析についての研修指導のため小室徹雄室長（平成 2 年 7 月 10 日～8 月 10 日）および岡田（平成 2 年 10 月 17 日～10 月 26 日）が同国に出張した。

平成 2 年 5 月 31 日付けで田中正一技官が退職し、平成 3 年 1 月 1 日付けで小松裕明技官が採用された。平成 3 年 2 月 28 日付けで寛 華子技術補助員が退職し、平成 3 年 4 月 1 日付けで泉 若江技術補助員が採用された。

業務成績

1. 国家検定

ヒトインスリン製剤が 147 件で、全品合格であった。

2. 国家検査

ブドウ糖注射液が 83 件、インスリン製剤が 23 件で全品合格であった。

3. 一斉取締試験

イブプロフェンを含有する内服固形製剤 48 件およびリン酸ヒドロコルチゾンナトリウム注射液 7 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 11 件（岡山県 5 件、香川県 6 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

40 品目について合計 4549 個の標準品の製造を行った。新規標準品の設定は平成 2 年度分として 4 品目であった：ジクロフェナミド、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。

6. その他

日本薬局方の改正（薬務局安全課）、日本薬局方外医薬品成分規格の作成（薬務局審査課）等に協力した。国際協力事業団のフィリピン国食品医薬品検定センタープロジェクトに協力し、技術指導を行った。

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) 日局収載アミノ酸類のアミノ酸クロマトグラフ法による純度試験

日局 11 に収載されるアミノ酸類の純度試験として「その他のアミノ酸」が規定され、リジンを除きペーパークロマトグラフ法が採用されている。これらの純度試験に対し、11 局追補において採用されたアミノ酸クロマトグラフ法の適用を試み、検出感度、再現性、定量性とも薄層クロマトグラフ法に比べても優れていることを明らかにした（公定書協会）。

i-2) 日本薬局方の国際化方策および基盤整備に関する研究

日本薬局方の国際化のための一つの大きな課題として機器分析法を大幅に採用して試験法の近代化を図るという問題がある。確認試験法への紫外および赤外吸収スペクトル (IR) 法の採用もその一つである。IR 法の採用にあたっては標準品を対照物質として用いる方向と標準 IR スペクトルを参照スペクトルとして用いる方向がある。標準品の急速な拡充には種々の困難が伴うため、参照スペクトル法を採用するために必要とされる測定装置の光分解能、測定条件などにつき検討し、その結果を報告した（厚生科学研究，薬務局安全課）。

i-3) WHO の IR 参照スペクトル集の作成事業に対する協力

WHO では国際薬局方 (IP) における各条医薬品の確認試験に IR 参照スペクトルを利用する方向でスペクトル集の作成作業を行っている。

WHO で測定された Acetazolamide 他 30 品目の IR スペクトルが実際に確認試験用の IR スペクトルとして問題がないか試験を行い、その結果を WHO に報告した。

ii) 標準品の品質規格の設定に関する研究

平成 2 年 3 月 2 日付で告示されたジクロフェナミド、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。

また、第 12 改正日本薬局方の公布に合わせ 7 品目の新規標準品（インドシアニングリーン、*d*-カンフル、*dl*-カンフル、シクランデラート、ショ糖オクタ硫酸エステルカリウム、トルナフタート、メトキサレン）を設定するためそれらの標準品原料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

徐放化製剤用素材としてのキトサンの利用可能性についてエビ殻キトサン（キトサン 90 L, 脱アセチル化度 90%, 鱗片状, 125~350 μm ）とカニ殻キトサン（キトサン微粒子, 脱アセチル化度 80%, ビーズ状, 平均粒径 10 μm ）の 2 種のキトサンを用いて比較検討した。アルギン酸ナトリウムなど酸性高分子多糖の添加による徐放化作用はキトサン 90 L では試験液の pH, 薬物の差異によらず観察されたが, キトサン微粒子の場合, それらの影響を受けやすく逆に, 溶出が促進される例もあった。この差異はキトサンの形状およびサイズに起因するものと推定された。

キトサンは水溶液中で種々の酸性多糖類とポリイオンコンプレックスを形成し, 等モル混合比付近でゲル状沈澱物を生じる。この白色ゲルを乾燥処理することにより一部の酸性多糖類（CM-キチン, ヒアルロン酸 Na, アラビン酸 Na）との間で透明な膜状ゲルの形成されることを認めた。これら膜状ゲルの生成条件, 安定性, 溶質透過性などについて検討し, 生分解性膜としての応用の可能性について検討している（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

合成基質法によるヘパリンの抗 Xa 活性測定法の測定条件について再検討を行い, 以下のようにその最適化を図った: 反応温度 30 $^{\circ}\text{C}$, 反応時間 5 分, pH 8.3, イオン強度 0.23, 凝固因子 Xa 355 pKat S-2222, 基質 100 nM, AT III 0.1 U, 測定濃度範囲 0.1~0.3 IU/ml。

本測定法を用いて異なる製法により製造されたいくつかの低分子化ヘパリン（LMWH）製品の抗 Xa 活性の評価を行った。また, この測定法で用いられる試薬類の一般化を図るために, 異なる試薬メーカーにより製造された Xa, AT III および基質の同一基準による評価方法について検討した。

ゲルクロマトグラフ法による LMWH の分子量測定条件について検討し, 分子量標準としては分画ヘパリン標準を用いる必要があり, 移動相には 0.5 M 硫酸ナトリウム液が最適であることを見いだした（HS 財団受託研究費）。

iii) 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これまでに明らかにしてきた。 β -ブロッカーの作用における種差特異性は AGP に対する結合性の差異に帰因するものと考え実験を継続中である。

食 品 試 験 部

部 長 伊 藤 啓 志 男

概 要

外海泰秀室長が国際協力事業団の農薬利用コース・フォローアップチームの一員として, ブラジルおよびボリビアで公開技術セミナーを行った（平成 3 年 1 月 22 日~2 月 11 日）。柿内雅技術補助員が平成 3 年 3 月 30 日付けで退職し, 4 月 1 日付けで木村実加技術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 836 検体（平成 2 年 4 月 1 日~3 年 3 月 30 日）について検査を行った。不合格はなかったが, 食用黄色 4 号塩化物および硫酸塩含有量総和, および食用黄色 5 号の副色素で規格限度に近いものが十数検体認められた。

2. 輸入食品検査

アワビ缶詰 3 検体の EDTA, 干し梅のサッカリン, シロップおよびバターの安息香酸とソルビン酸, ソース原料用ペースト 3 検体のソルビン酸, 総検体数 9 検体, 総試験項目 11 を検査した。

3. 標準品製造

食用青色 1 号, 食用赤色 3 号, 食用黄色 4 号および食用赤色 40 号の 4 種類, 計 1100 個について製造した。なお, 食用赤色 40 号は平成 3 年 1 月 17 日付で新規に指定された食品添加物であり, 目下, 標準品として申請中である。

4. 特別行政試験

平成 2 年 9 月~10 月, 西日本地域で購入した輸入レモンおよびレモンジュース中の収穫後使用農薬（イマザリル, 2,4-D, DP, OPP および TBZ）の実態調査を行った（生活衛生局食品化学課, 平成 2 年 10 月 25 日）。

5. 研修について

残留農薬および食品添加物の当部開発の分析法について, 講義および実験指導を行った。

i) 所内研修指導

缶詰検査協会技術者 1 名（平成 2 年 5 月 1 日~7

月31日), 摂南大学薬学部4年生6名(平成2年6月12日~21日), 神戸農林規格検査所技官1名, 泉生協検査室員1名および大阪薬科大学4年生2名(平成2年10月1日~12月21日), 食品衛生協会技術者3名(平成3年3月4日~7日), 神戸港, 大阪港および大阪空港の食品監視員5名(平成3年3月18日~30日), および国際協力事業団農薬利用コース研修生5名(平成3年4月23日~26日)について行った。

ii) 所外研修指導

国際協力事業団輸出入食品検査技術コース研修生7名, 神戸検疫所検査室で(平成2年11月5日~9日), 西日本地域港食品監視員11名, 神戸検疫所検査室で(平成3年2月18日~22日), 東日本地域港食品監視員11名, 横浜検疫所検査室で(平成3年2月25日~3月2日), および全国厚生省指定食品検査機関技術者46名, 食品衛生協会主催で調布の島津製作所検査センターで(平成3年3月26日~28日)行った。

所内および所外の総研修員数は98名である。

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

① 清涼飲料水中のアスパラテムまたは食品中のグリセリンを酵素で各々ホルムアルデヒドとし, 4-アミノ-3-ペンテン-2-オンとの反応色素生成物を比色法またはHPLCにより定量する方法を開発した。

② 食品中の α -アミラーゼの定量法として, 基質にアミロペクチン・アズールを用い, 生成するアミロズ・アズールをHPLCにより測定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

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(天然にも存在するもの)140品目中の天然由来量を知る目的で, 加工食品の原料(食品添加物は使用していないもの)中のB群添加物量を測定した。当部の分担はグリセリン脂肪酸エステル, 硝酸, 亜硝酸および総合まとめである。今回調査した加工食品中の原料中のグリセリン脂肪酸エステル, 硝酸, 亜硝酸および140品目の総量の一日摂取量mgは, それぞれ4.50(3.98), 30.0(43.9), 0.9(1.5)および6875(9987)であった。なお()内

は昭和63年度の加工食品中のB群添加物摂取量6mgである。したがって, B群添加物140品目の食品添加物として使用されたもの一日総摂取量は約3.18g(9.986g-6.805g)と推定される(食品等試験検査費, 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

① 食用タール色素・製剤試験法の改良

食用タール色素の水分含有量について乾燥減量試験法とカール・フィッシャー法との比較を行い, 後者の方が, 短時間に再現性良く水分含有量を測定できることを明らかにした(食品等試験検査費, 生活衛生局食品化学課)。

② 動植物由来の食品添加物の規格化に関する研究

化学合成品以外の食品添加物(天然添加物等)1051品目の表示が, 平成3年7月1日より義務付けられるが, いまだこれらの規格がない。そこで, これらの欧米諸外国, FAO/WHO, ECC等の規格を検討し, 比較表を作成した(厚生科学研究費補助金, 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

天然に存在する成分について, 今年は安息香酸の各種食品中でのバックグラウンド(天然由来含有量)値を測定した。生鮮食品68品目中, には, おおばが5ppm以上であった。加工食品170品目中, ヨーグルト, 各種チーズ, プルーン, 乾燥あんず, が10ppm以上であり, 5ppm以上のものとしては醤油, レモンゼリー, ジャム等であった(食品等試験検査費, 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

各種農作物中のFPD-GC・キャピラリーカラムを用いたジスルホトンおよびその代謝物(ジスルホトンスルホン, ジメトンチオールスルホン)の系統的試験法, ECD-GC・キャピラリーカラムを用いた7種ピレスロイド系農薬の一斉分析法を作製し, いずれも良好な回収率が得られた(食品等試験検査費, 生活衛生局食品化学課)。

ii) 収穫後使用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

① DDVP, クロロプロファム, クロルピリホスおよびピレトリンを添加したばれいしょの保存およびフレンチフライへの加工での消長を調べた。

DDVPは保存中および加工中に速やかに減少し、クロプロファミンは保存中微減、加工後の残存率は1.3%、クロルピリホスは保存中ほとんど減少せず、加工後の残存率7.7%。ピレトリンは、保存中ほとんど減少せず、加工後の残存率は5.9~10.1%であった。

② DDVP, クロプロファミン, クロルピリホス, クロルピリホスメチル, ピリミホスメチルおよびピレトリンを添加した、ばれいしょからでんぷんへの、加工過程での消長を調べた。大部分が水洗により除去され、最終製品にはピレトリンのみが約0.3%残存した。

③ キャプタン, イプロジオンおよびピレトリンを添加したサクランボの保存およびシロップ漬の加工過程での消長を調べた。キャプタンは保存中および加工中に速やかに減少、イプロジオンは保存中微減、加工後の残留率約40%、ピレトリンは保存中はほとんど減少せず、加工過程での残留率は51.1~71.7%であった(食品等試験検査費, 生活衛生局食品化学課)。

3. 輸入食品の安全性確保に関する研究

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

GC-MS (SIM) および HPLC (蛍光, UV) による輸入柑橘中の収穫後使用農薬6種 (DP, OPP, 2,4-D, イマザリル, TBZ およびベノミル) の一斉分析法を開発し、この方法を用いて横浜, 神戸両検疫所にて実態調査を行った(厚生科学研究費, 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

クエン酸イソプロピル (IPCit) および EDTA の有効性について検討した。IPCit の各種金属との安定度定数を決定し、亜鉛との錯体構造を解明した。EDTA は、食用タール色素のスズによる退色を防止する効果を認めた。そしていずれも抗酸化相乗剤として有効であることを証明した(食品等試験検査費, 生活衛生局食品化学課)。

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

ポリエチレン多孔質中空糸膜を用いて、東京、大阪および静岡の水道水中の変異原性物質を捕集し、最も強い変異活性を示した大阪の試料を Sep-pak シリカゲルカートリッジで分画し、GC/MS によりオキサジアゾンおよびブタクロールを分離同定した

(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

Dy, Eu, Yb および Y の4種の希土類元素をシロネズミに1回経口投与したところ、低用量 (0.1 g/kg) および高用量 (1.0 g/kg) では各々4日以内に92.0~98.4%および7日以内に93.9~98.4%がふん中に排せつされ、これらの元素は経口投与の場合、ほとんど体内に蓄積されないことが明らかになった(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

前年度に引き続きインスリン製剤の国家検定、インスリン製剤およびブドウ糖注射液の国家検定ならびにエンドトキシン (ET) 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 財団の委託研究として、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、等を行った。

平成2年9月17日より11月2日まで WHO フェローとしてフィリピン国食品医薬品局の Edgar Calbitaza 氏が医薬品の生物検定についての研修を行った。また平成3年4月21日から25日まで米国アトランタにおいて、Federation of American Societies for Experimental Biology 第75回年會が開かれ、江馬眞主任研究官が、「Embryoethality of butylbenzyl phthalate in rats」と題して研究発表を行った。

業務成績

国家検定としてインスリン製剤147件、国家検査としてブドウ糖注射液83件、インスリン製剤23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12件を行い、全品合格であった。他に標準品4品目、計1147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

金属イオンは微量でも ET の活性に影響する可能

性が考えられることから、ETのリムルス活性および発熱活性に対する微量の金属イオンの影響について検討した。アルミニウム、鉄、ガリウムイオンが0.1~10 μM で発熱活性を抑制し、リムルス活性もそれと併行して低下することが見い出された。このことからリムルス試験が発熱試験の代替として利用し得ることが示された。

ii) 細菌性発熱物質 (ET) の構造と作用機序に関する研究

A群溶連菌発熱性外毒素によるETの致死毒性増強の作用機序について検討し、致死毒性増強作用の発現要因は、発熱性外毒素が誘導する液性因子による、ETに対するマクロファージ ($M\phi$) の反応性の増強にあることを明らかにした。さらにその液性因子として、 $M\phi$ 活性化作用を有するインターフェロン γ などのリンフォカインが関与していることを見出し、この知見から、本来生体防御にたずさわるべき免疫調節因子が、ET致死性の増強という障害的応答を誘導し得ることを明らかにした。

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研究

胎仔期における発育、成長、分化には膜結合性糖蛋白が重要な役割を担っている。この生合成に関与するドリコール系の活性が、胎仔毒性の重要なパラメーターの可能性が高い。胎仔毒性の生化学的指標の検索のため、トリバンブルー、サリチル酸ナトリウム等の催奇形物質投与の妊娠ラットにおける胎盤一胎仔のドリコール濃度を正常動物のそれと比較したところ、正常のものより大きく低下していることを見出した。このことから胎仔における障害と胎盤、胎仔系のドリコール濃度とはよく相関することが明らかとなった。

ii) 催奇形性等発生毒性の発現機序に関する研究
薬物の妊娠母体に対する母体毒性、胚に対する致死作用、さらに催奇形性、これらの発生毒性がそれぞれどのように関連するのだろうか、その発現機序について検討するためにブチルベンジルフタレート (BBP) をモデル物質として妊娠ラットに投与したところ、BBPは妊娠の前半に投与した場合に胚致死作用を発現することを見出した。

3. 薬用植物およびその製剤の生物評価に関する研究

胎仔毒性発現の予防とその治療を目的に、ETによるラット胚致死作用に対する薬用人参の抑制効果につき検討した。10%人参エキス粉末添加飼料を与

えた妊娠ラットに10および20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ のETを投与すると、対照群と比べて有意に低い胚致死率を示すことを見出した。

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等の *in vitro* での簡便、迅速、経済的な毒性試験代替法を確立することを目的とし、細胞内ATPレベルを指標とした化学物質の毒性評価法に関する検討を行った。12~13種の無機金属塩がウサギ赤血球内ATPレベルに対する強い低下作用を示し、*in vivo* での毒性 (LD_{50}) とよく相関し、さらに手術用ゴム手袋抽出液もATPレベルを著明に低下させることを明らかにし、細胞内ATPレベルを指標とした *in vitro* 毒性試験法は代替毒性試験法として、血液透析器等の安全性評価に有用であることを示した (HS財団受託研究費)。

5. 医薬品等の高感度・高性能安全性等評価試験法の開発 (皮膚適用材料の生体影響評価に関する基礎研究)

$M\phi$ の活性酸素産生を指標とした皮膚障害試験法の開発について検討し、 $M\phi$ の O_2^- 産生に対する抑制作用を指標とすることにより、種々の界面活性剤の細胞毒性を短期間に、高感度かつ客観的に捉え得ることを明らかにした。さらに本法による毒性の評価成績は、眼刺激性試験の成績と高い相関を示すことを明らかにし、*in vivo* 試験の代替として有用であることを示した (HS財団受託研究費、環境衛生化学部と共同)。

6. 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

第一年度に、環境汚染物質として一連の有機錫化合物によるウサギの体温下降作用が脳・神経機能に対する急性障害のスクリーニング指標として有用であり、さらにそれらウサギの低温あるいは高温暴露により認められる正常体温維持機能の障害性の検索は、脳・神経機能の障害性の極めて良好な指標となり得ることを示した。しかし環境温を低温あるいは高温にセットし直す方策は、現段階ではそれぞれ各実験担当者の方式に依存している。本年はこれを普遍的な方式にするために、任意の温度に設定できるウサギ体温測定ボックスを設計し特製して、本法を客観的に評価するため、一連の有機錫化合物を用いて検討した。その結果、低温および高温暴露が一日の内で可能であり、体温調節機能障害を、より客観

的に確実に評価し得る方法を確立できた（国立機関公害防止等試験研究費，環境庁）。

7. 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を作成し報告した（厚生科学研究費，センター，療品部などと共同）。

8. 生体関連反応指標の有意性判定に関する研究
細胞レベルの反応指標として $M\phi$ の O_2^- 産生能および細胞内 ATP レベルに着目し，これらがともに皮膚適用化学物質の皮膚障害性を *in vitro* で評価する際の反応指標として，非常に有意性の高い指標となり得ることを明らかにした（特別研究，厚生省）。

9. 3T3-L1 前脂肪細胞を用いたインスリン感受性形質の発現に関する研究

この細胞の継代を重ねるのに平行してインスリン依存性グルコース消費が増大する現象を見出し，クローン培養によってインスリン感受性の高い細胞を得ることを目的に検討を加え，インスリン感受性を指標にしたクローン培養により形態分化の性質の異った2系統の細胞を分離し，インスリンの *in vitro* バイオアッセイ法を培養細胞系で確立し得る見透しが得られた（文部省科学研究費）。

10. 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) P-メチルベンゼンスルホメチルジイオグaid および，ii) グルタルアルデヒドの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 畠 山 好 雄

概 要

前年度に引き続き，薬用植物栽培・品質評価指針検討委員会において決定された対象植物について栽培研究を行うとともに，研究対象が多く，期間も長いので，長期計画のもとに材料収集や種苗の増殖に当たっている。

また，厚生省麻薬課の委託研究であるケシの栽培研究も実施し，アヘン 1104.52 g を納付，一般耕作者の実施指導にも力点をおいている。

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）の分担品目である延胡索・木香の研究にも着手したが，これは栽培研究ばかりでなく，従来の市場品と同等性をもつか否かまで調査しなければならない問題点を含んでいる。

海外出張については，柴田室長が日本生薬研究者第九次訪中団の一員として平成2年7月21日から8月3日まで中国の吉林省を訪れ，珍貴動物の人工飼育，人參・細辛の栽培地を見学し，長白山の自生植物を調査した。

業務成績

1. 種子交換

採種	157 種	（筑波試験場へ送付）
受入	32 件	116 種
分譲	27 件	179 種

2. 指導業務

ケシの講習会が7月24日に名寄市で開催され，一般耕作者に対し講習を行った。栽培指導については道内の名寄・下川・鹿追・北檜山・秩父別および秋田県等の各担当者，栽培組合に対して実施した。

研究業績

1. ケシ

昨年と同様，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。モルヒネおよびアヘン収量は，約17000株/10aの密植区で最多収を示したが，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。

寒冷地における10a当りアヘン収量の目標値を2kgに設定しているが，過去3年間の栽植密度試験では'90年のみが目標を達成し，'89年と'91年は目標を下回った。3ヶ年とも17000～19000株/10aの密植区において最高収量が得られているので，この条件下において他の3要素（有効歩合・1果当たりアヘン重量・アヘン中モルヒネ含量）を高く維持する栽培技術の開発が必要である。

2. シャクヤク

1年生から5年生までの乾物生産特性を把握し，3年栽培で生根収量3000kg/10aの目標収量を得られる栽培技術を開発するため試験を行った。

1年目の生育量は非常に小さいものであり，7月になってようやく支根の形成が始まる。2年目になると乾物重の増加が大きくなり，3年目は5年間の中で最大となり，品種の特性もよく表現するが，5年目になると増加は鈍化する。

10a当たりの養分吸収量は5年間で，チッソ50

・リン 15・カリ 50・カルシウム 70~80・マグネシウム 8 kg であり、5年間の中、1年目の吸収量は全量の2~5%、2年目10~15%、3~5年目各25~30%であった。

3. センキユウ

① ビニールマルチによる多収獲ないし早堀の可能性を検討した。透明ビニールによるマルチは効果がなかったが、緑色フィルムによるマルチは雑草を抑制し、非マルチに対し全生育期間を通じて乾物重が有意に高く、製品収量も高かった。しかし、マルチ施用によって栽植密度が低下してその分減収となり、マルチ効果による増収分が相殺されてしまうので、緑色マルチの実用化についてはさらに研究する必要がある。

② 施肥技術の一環として追肥時期の検討を行ったところ、春期の追肥が収量に大きな影響を及ぼすことが明かとなった。

4. オウレン

寒冷地における無遮光栽培の可能性を検討した。無遮光区の実生6年生株の根茎収量は遮光区との間に有意差がなかったものの、10a当たり収量は本州暖地の標準的収量(130~150 kg)に比べ70~80%と少なかった。しかし、遮光資材の労力と費用を考えれば、経済的に栽培が成立する可能性がある。また、5年生株のベルベリン型アルカロイドの含量も区間に差はなく、日局XIの規定(3.5%以上)を満たし、品質的にも問題はなかった。

筑波薬用植物栽培試験場

場長 西 孝三郎

前場長 佐 竹 元 吉

概要

平成2年6月30日付けで長南明夫技官が退職、平成2年10月1日付けで庶務課の阿部秀雄課長が退職、後任に薬務局経済課から守屋慶子郎流通調査官が就任、栽培研究室の江崎勝司技官が薬務局審査課漢方生薬係長に出向、栽培研究室に酒井英二技官が採用、平成3年4月1日付けで佐竹元吉筑波場長が生薬部長に異動になり、後任に西孝三郎伊豆場長が就任した。

長寿関連基礎研究の国際共同研究の「日中薬用植物・生薬の品質の確保および利用に関する研究(第2期)」は、第2年次を迎えその研究は順調に進展

している。

国際流動基礎研究(省際研究)による「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」は、所定の成果をあげ完了した。

本年度は、従来の継続業務に加えて、科学技術振興調整費平成2年度総合研究「新しい植物実験系開発のための基盤技術に関する研究(機能分化と形態分化の相関に関する実験系の開発)」が開始された。

省際研究での外国人研究者は、アメリカ、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、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~平成3年3月20日)、スイス、ジュネーブ大学のフィリップ・クリステン研究員(平成3年1月21日~平成3年3月28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、イバダン大学のアジボラ・アキイエミ・オラニイ研究員(平成2年3月26日~平成3年5月31日)が植物化学の研究を行った。

平成3年3月7日、8日の両日、筑波で所長、副所長および業務課長出席のもとに場長会議を開催し、意義ある議論を交わした。また、日本生薬学会名誉会長木島正夫先生を招き、「中国の薬用植物と生薬の品質」についての特別講演を催した。

海外出張は、佐竹前場長が「アマゾン農業研究協力計画」のためブラジル(平成2年4月9日~21日および12月5日~21日)へ、また、「第2回天然抗癌資源の開発利用に関する国際学術大会出席ならびに薬用植物栽培地の視察および資源植物の調査」(平成2年8月5日~12日)および「生薬の安定生産と薬用植物の研究方向に関するシンポジウム出席」(平成3年3月21日~24日)のため韓国へ、下村育種生理研究室長が、「アルカロイド生合成の制御機構に関する研究打ち合せ(国際学術研究)」(平成3年1月7日~16日)のためドイツに出張した。

業務成績

種子保管数

種子貯蔵庫	335種類	1340缶
交換用種子数	1033種類/1990年	
入手種子数	183件	541種類
分譲種子数	155件	3564種類
種子目録配布数	66カ国	386機関

研究業績

1. 薬用植物の栽培に関する研究

1) ベニバナの系統間差異に関する研究

保存2系統（筑波系統，東北大学系統）の生育，収量における特性の差異を検討したところ，形態的には下位葉の欠刻に差がみられ（筑波系統が深い），草状は東北大学系統が大きく，葉数，分枝数および管状花収量も東北大学系統が大きい傾向がみられた。また，種子収量は，密植の程度を変えても差異は認められなかった。

2) ハトムギ収量に及ぼす主茎除去処理の影響

前年度の栽培密植試験の結果，密植区にハガレ病の発生が多くみられた。そこで，同じ密度で主茎を除去して通風を良くしたところ，種子収量は10%増加した。

3) ミシマサイコの生育，収量における微量元素の施肥効果

根長，根茎，分枝根数および主根重は，堆肥区が最も大きく，化成区（隣および微量元素を配合した区）は，細根重は大きくなるが薬用部位の顕著な収量の増加は認められなかった。

4) ケシの水耕栽培における光条件の影響

高度環境制御棟においてケシを水耕栽培することが可能になったので，照度とアヘンの収量について検討した。照度5000~10000 luxでは，茎が細く，草丈が高く，開花が遅れる傾向があり，12000 lux以上の区は，アヘン収量が高い傾向がみられた。

2. 組織培養に関する研究

1) トコンの品質評価のためのHPLC法の開発

移動層の種類および組成，カラム温度，流速の条件等を検討し，高感度でのトコンアルカロイドであるエメチン，セファエリン，プロトエメチンの同時分析法を確立した。

2) Riプラスミドによる形質転換細胞の研究

a) トロパンアルカロイドの分布と毛状根での7 β -hydroxyhyoscyamineの生産

トロパンアルカロイドを含有するナス科植物では，7 β -hydroxyhyoscyamineの含有量にかなりの差が認められた。毛状根では，1種を除き7 β -hydroxyhyoscyamineの生産が認められた。これらのことから，7 β -hydroxyhyoscyamineの生産は，植物種により，また，培養形態の違いにより異なることが判明した。

b) チョウジソウ毛状根によるアルカロイドの生産

毛状根培養によるアルカロイド生産研究を行う目的で，圃場栽培株からの標品の単離を行った。その結果，本植物の根より新規のインドールアルカロイド17- α -O-methyl-yohimbineを単離同定した。室温における乾燥根では，本化合物は時間とともに減少し，yohimbineが主化合物となった。種々の培養系におけるアルカロイド生産を調べたところ，シュート培養の根および毛状根では，pleiocarpamineが主アルカロイドであったが，正常根培養では，17- α -O-methyl-yohimbineが主アルカロイドであった。また，正常根および毛状根培養におけるアルカロイドの経時変化も測定した。

c) *Lippia dulcis*の増殖とhernandulcinの生産
シュートの増殖は，2%しょ糖を含むMS固形培地が最も良好で，培養開始後20日目にhernandulcinの生産が最高値になった。培地に低濃度のchitosanを添加すると，シュートの生育が促進され，hernandulcinの生産量も増加した。

d) 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

ベラドンナおよびロベリア毛状根からの再分化個体の作出，毛状根のT-DNAの検出，薬用成分の定性定量分析，新規化合物の単離同定，外来遺伝子の導入，養液栽培法の確立を，産官学共同で検討した。

e) トランスジェニック植物による新生理活性物質の研究

2種類の薬用植物のトランスジェニック植物の作出，増殖方法の検討，生理活性物質の検索，外来遺伝子導入方法の検討とその特性の解析を，種々の研究機関と共同で行った。（省際研究）

f) 新しい植物実験系開発のための基盤技術に関する研究

(1) 形態分化と機能分化の相関に関する実験系の開発（科学技術振興調整費）

植物細胞の器官分化と二次代謝物生産能の相関に関する研究を進めるために，本年度は，薬用植物の種々の組織培養系の作出，植物組織からの簡便なDNA単離方法の確立，高感度な二次代謝物の分析方法の確立を行った。

3. 薬用植物資源の開発

ペルー・アマゾンの民間薬Huaira Caspi(*Cedrelina catenaeformis*)から2種類のdihydrophenanthrapyran型の化合物を単離し，構造を決定した。

伊豆薬用植物栽培試験場

場長事務取扱 原 田 正 敏
前 場 長 西 孝 三 郎

概 要

平成3年4月1日付で、西孝三郎場長が筑波薬用植物栽培試験場長として転出し、場長事務取扱として原田正敏副所長が就任された。平成2年度の研究業績として前年度に引き続き(1)伊豆におけるケシ栽培法の確立に関する研究(2)品質評価指針作成のための栽培試験(3)コルヒチン処理による倍数性育種に関する研究等を行った。

業務成績

1. 種子交換

採種 172種 (筑波試験へ送付)
内訳 野生植物 70種
標本植物 73種
温室植物 29種

受入 26件, 37種

分譲 30件, 52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い、新たにミシマサイコの自生地を見つけ茎頂培養により株の増殖を行った。

研究業績

1. 伊豆におけるケシ栽培法の確立に関する研究

昭和59年度から栽培試験を実施しているが、栽培法についてはほぼ確立できたので、最終年度として2・3の有機質肥料を施用することによって生育後期まで根の活力を維持しうる栽培法について検討した。本年度は天候不順な年で全体的に作柄は良くなかったが、いずれの施用区でもアール当たりのあへん収量は200~230gであり、モルヒネ含有率も12~17%であった。

特に牛糞を原料とした当场産自家製堆肥区においてはモルヒネ含有率が16.7%と高い値を示した。

2. 品質評価指針作成のための栽培試験

① エビスグサ

伊豆試験場保存種、筑波試験場保存種および下田市吉佐美地区在来種の3系統を供試し栽植密度試験を実施した。条間は60cmで各区共通とし、株間を15, 30および60cmにして試験を行った。1株収量は3系統とも疎植区で大となったが、アール当

りの収量は単位面積当りの株数が多い密植区で大きく、疎植区で小さかった。密植による増収の程度は筑波、吉佐美系統では標準区の1.72倍および1.83倍であり、伊豆系統では1.40倍であった。

② ケイガイ

生育特性を明らかにするため栽植密度(密植区:1050株/a, 標準区:525株/a, 疎植区:350株/a)試験を実施した。1株当たりの茎重、葉重および全花穂重とも密植区は標準区に比べ小さく、標準区の1/2程度であったが、標準区と密植区との差は小さかった。また、アール当たりの地上部重、有効花穂重ともに標準区で最大となり、標準区を100とすると地上部重は密植区で76, 疎植区で82, 有効花穂重は密植区で44, 疎植区で76であった。

3. コルヒチン処理による倍数性育種に関する研究

① ケシ

前年度より引き続き生育中の株から種子を採取し、平成2年10月~12月、ペーパーポットに播種し発芽後根端を採取して染色体の観察を行った。コルヒチン処理区由来の各種子とも $2n=22$ と44が共存するものと $2n=22$ のものが観察された。キメラ株の出現頻度は5~6%であった。なお、純粋な4倍体は観察されなかった。

② ナガバクコ

前年度までに作出または選抜した4倍体株の増殖およびキメラ株からの $2x$, $4x$ 株への分離を行い、さらに7系統を選抜した。

和歌山薬用植物栽培試験場

場 長 野 口 衛

概 要

野口は、平成2年7月17日~24日、西ドイツ、ボン市で開催された“生理活性天然物の生物学と化学に関する国際シンポジウム”に出席、キジツについて報告、また、10月28日~11月9日、HS財団の日中共同研究の一環として、中国、桂林・南寧地区へ山梔子、釣藤鈎の自生地、栽培地調査に出張した。

施設面では、実験台、流し、HPLC三次元検出器を購入、実験室を改装、事務室にエアコンを装備し、圃場作業の合理化のため耕運器を購入した。

業務成績

1. 種子交換

採種 102件
受入 5件
分譲 13件 8種

2. 指導業務

和歌山県業務課主催の生薬資源開発推進検討委員会の座長として生薬生産推進のための政策と農家の組織作りに協力し、団体見学並びに外部依頼計26回、参加者延べ711人に薬草に関する講義、指導を行った。会場への薬草問い合わせ件数は年間55件で、その内訳は種苗依頼13、栽培法9、薬効問い合わせ7、植物鑑定5、調製加工法6件、入手先、売り先、文献その他の情報16件となっている。

研究業績

1. コガネバナの栽培法

品質の安定した生薬オウゴンの生産技術確立を目的として、土壌条件、栽培条件、皮剥き乾燥条件を検討した。

その結果、1年生、2年生とも、砂質畑土では粘土質畑土に比べて生根重量は1.5倍以上、2年生生根重は1年生に比べ約2.5倍となった。なお、1、2年生とも生根重は掘り上げ時期により変動、秋より冬のほうが重量は減少し、1年生を移植すると、根は曲がりくねり、枝分かれした。また、粘土質畑土で栽培した1年生根は砂質畑土に比べ主根の伸びが悪く、側根が多く発達し、土壌改良剤PXには生根の増収効果は認められなかった。生根は乾燥しにくい、皮を剥くと短時間で乾燥でき、皮剥き乾燥後の歩留りは30%程度、皮剥き根を温風乾燥するとおおむね鮮やかな黄色になるのに対し、天日乾燥では表面が汚緑色となった。ただし、2年生2月掘り上げ分は、天日、温風乾燥とも汚緑色となった。

2. キキョウの摘花、摘実の根の収量増大ならびに成分含量に及ぼす効果の検討

砂質畑土よりなる圃場で白花キキョウを栽培（実験条件は昨年と同様）、サポニン、イヌリンを定量した。

サポニンの定量は、試料のMeOH抽出液を減圧下に濃縮乾固し水に溶かしたものをSEP-PAK C₁₈処理、TLC-デンシトメトリーを行った（サポニン標準品はn-BuOH可溶部より自製した）。また、イヌリンの定量は、試料の熱湯抽出液をSEP-PAK SILICAに吸着させ、有機溶媒で洗浄後水で溶出、30%塩酸・レゾルシン試薬（7:1）混液で発色させ、

480 nm付近の極大吸収波長で吸光度を測定した。

その結果、イヌリン含量は摘花、摘実により大きな変化は認められなかったが、水性エキス、希エタノールエキス、サポニン含量は摘実区で最も小さい値を示し、酸不溶性灰分は対照区で最も大きい値を示した。これを昨年度の結果とあわせると、摘花、摘実により根の収量は増大するが、サポニンその他の内容成分の生成は促進されていないものと結論された。

3. ミシマサイコの栽培法

ミシマサイコの収量を増大する栽培条件を明らかにするため、砂質畑土よりなるほ場に種子を2条蒔き、全面蒔きし、土壌改良剤PXの処理量を変え、また、一部ほ場に黒色マルチングを施して栽培を行い、秋に掘り上げ、各種計測を行った。

その結果、全面播きでは、条播きに比べて一本あたりの根重は小さいが、本数が多いため面積当たりの収量は大きく、また、条播きでは、処理区間の根重には差は認められるが、面積当たりの収量には差は認められず、全面、条播きとも、草丈の大小と根重の増減はよく対応した。一方、面積当たりの収量より計算した根重は、20本をサンプリングした場合より著しく小さくなったが、これは、間引き後に芽を出した生長の遅いものをも含むためである。なお、黒マルチは、根の重量増大、収量増大に効果があるが、PX処理では逆に減少した。

4. ミシマサイコの成長に及ぼす土壌微生物の影響

1米四方のコンクリートの枠内に深さ50 cmの暗渠配水管を接続、砂質畑土、粘土質畑土、山土とその1/5量のバークミンを入れ、ミシマサイコ種子を筋まきした。発芽後10 cm間隔に間引き（一区8×8=64本仕上げ）、7月より3月間、毎日6時間ずつ排水管末端よりコンプレッサーで土壌に通気（28 L/min）を施し、秋に掘り上げ、草丈、根長、地上部重、根重を測定した。

植物掘り上げ時に、枠試験区の植物から一番離れた場所、根のすぐ側の地下30 cmの土を取り、根と共にそれぞれを水で抽出し、各選択培地に加え、総細菌、放線菌、糸状菌、酵母、グラム陰性細菌、蛍光性シュウドモナス属細菌および通性嫌気性菌を平板混濁法で分離した。

その結果、植物収量は、測定したすべての指標とも砂質畑土通気区において最高で、山土非通気区において最低となった。また、砂質畑土区、山土区は

通気による生長促進がみられたが、粘土質畑土区では通気の効果は認められなかった。一方、土壤通気により非根圏、根圏および根面における微生物数が増加し、植物生長の最も高い砂質畑土通気区では、生長の最も低い山土非通気区に比べ放線菌および蛍光性シュウドモナス属細菌数が有意に多く、逆にカビは少なかった。そして、植物生長量を示す各指標と非根圏、根圏および根面における放線菌および蛍光性シュウドモナス属細菌数の間には正の相関が、又カビ数との間には負の相関が認められたが、その他の微生物については一定の関係は認められなかった。このことから、土壤微生物はミシマサイコの成長に何らかの関与をしているものと推測された。

5. ミシマサイコの根の内部形態、特に木部繊維の木化に及ぼす土壤の種類、土壤通気の影響

各種栽培条件で生育したミシマサイコについて、根頭より15 mm、中央部、根の先端より15 mmの3箇所より常法に従って切片を作成、メチルグリーン一酢酸溶液で染色、プレパラートを作成し、鏡検した。

圃場の設営、土壤の種類、播種栽培条件、植物各部位の計測並びにサポニン含量については先と同様である。

その結果、根頭部は、いずれの土壤の種類、土壤処理区とも道管は放射状に連続し、道管の周囲部分のみ木化するもの、同心円状あるいは放射状に木化するもの、木化がまだらに進行するものが認められた。しかし、中心部(髓)では道管は孤立して分散し、木化もほとんど認められなかった。

根の中央部については、川砂、山砂で道管の数が多い傾向がみられた。しかし、中心部(髓)では木化はほとんど認められず、道管は孤立して分散した。そして、木化は、土壤の通風、散水処理により進行し、通気散水で木化はもっとも強くなった。

次に、同じ位の植物丈のものについて、蕾形成期、開花期、結実期、種子成熟期にこれらを除き、地上部の枯れた秋に収穫、根の内部形態を比較すると、蕾形成の初期にこれを切除すると根の木化がほとんど認められないのに対し、それ以後の切除では木化細胞が生成した。

さらに、根先端より根頭部までの連続切片について内部構造の変化を検討したところ、根の先端部(細根部)では道管は孤立して円形に分散し、木化はほとんど認められないのに対し、根頭部に少し寄るにしたがって道管は外側へ連珠状に発達し、これ

に追い付くように木部繊維の木化がはじまり、木化の進行の程度により、木部繊維は同心円状あるいはまだら状を呈するが、最終的に木部が完全に木化した。

以上の結果から、土壤の種類、処理法によるミシマサイコの根の内部構造の違いは、外的条件の変化で生長段階がずれたために起こるものと推論された。

6. シソ中のロズマリン酸(R)含量とその局在部位ならびにソヨウの調製法の含量に及ぼす影響について

各地産シソ科植物チリメンシソ、チリメンアオシソ、カタメンシソ、アオシソ計10種の枝先10 cmの葉を半分縦切りし、一方を40℃で温風乾燥、他方を天日乾燥し、また、対生葉2枚を縦切りし4検体とし、温風乾燥機に入れ、40℃で8~10時間、50℃で2~3時間、70℃で1.5時間、それぞれ乾燥した。また、シソの枝先先端、5 cm、10~15 cm付近の葉を40℃で温風乾燥し、1種については茎および生葉の葉身+葉脈の横3分割、中央脈、葉柄ならびに花と花穂に分けた。次に、約5 mm角に切った生葉をそれぞれ40℃で1, 2, 4, 7, 18時間温風乾燥し、扇風機を用いて日陰乾燥したものおよび細切直後のもののR含量を比較した。また、RのMeOH溶液(0.08 mg/10 ml)を室内、暗所放置あるいはUV照射(366 nm)し、さらに、Rの6% MeOH溶液(0.053 mg/10 ml)を室内で放置し、これらのRをHPLCにより定量した。

その結果、温風乾燥と天日乾燥ではR含量の差に一定の傾向は無く、これは、天日乾燥がその時々気象条件に左右されることによるからではないかと思われた。また、50℃、70℃で乾燥するとソヨウのR含量(%)は40℃に比べ低い値を示し、また、シソの上部の葉ではR含量は高く、中でも葉の中央部(脈は除く)や花穂で高い値を示した。生葉のR含量は乾燥初期に減少したが、その後の変化は少なく、7時間以降は変化しなかった。このことから、Rは一度乾燥すれば、その後の熱には安定であると推測された。なお、RをMeOHに溶解すると室内光でも分解し、副産物を生成した。この現象は紫外線照射で促進され、分解はさらに進行した。しかし、6% MeOH溶液ではこの分解は約30時間後でも10%程度とかなり遅延した。

以上のことから、市販ソヨウのR含量の違いは、起源もさることながら、乾燥法の違いに由来する部分が大きいものと推定された。

7. ソヨウ配合漢方製剤中のロズマリン酸の分析法について

半夏厚朴湯, 参蘇欬, 神秘湯, 柴朴湯, 茯苓欬合半夏厚朴湯, 蘇子降気湯, 行気香蘇散自家煎剤ならびに市販エキス製剤計 35 検体について HPLC を用いて R を分析した。

その結果, 移動相溶媒の組成を少し変えたとすべの処方について R の分析が可能となり, この場合, R の移行率は他の生薬成分に比べて高い値を示し, 自家煎剤では, 生薬配合量の増加に伴い, また, 合方と加方においては単独処方と比べて移行率は低下した。また, エキス製剤では煎剤と比べて R 含量は全体的に低い値を示し, エキス製剤の生薬配合量と R 含量との間には煎剤で見られたような明確な関係は認められなかった。

種子島薬用植物栽培試験場

場長代理 香 月 茂 樹

概 要

海外出張は, 香月が日中国際共同研究の研究交流のため, 中国南部 (平成 2 年 10 月 28 日~11 月 9 日) を訪問した。

気象面においては, 台風の接近・通過が 5 個と多く, なかでも 9 月 18 日の台風 19 号 (瞬間最大風速 33.5 m/s), 10 月 6 日の台風 21 号 (同 23.5 m/s) などは比較的強いものであった。事前の備えもあり, 建物への直接の被害はなかったが, 風台風が多かったこともあり潮風による植物の傷みが著しかった。枝の折損や落葉が多く, 処理した量は 30 トン余に達した。雑木林の一部を開墾し, 屋外で栽培可能な植物をガラス室などから移植するとともに, 場内に散在していたハウショウをまとめた。

業務成績

1. 種子交換

採種 147 種 (筑波試験場へ送付)

内訳 野生種 100 種

栽培種 47 種

受入 51 件 199 種

分譲 27 件 75 種

2. 薬用植物の自生地調査

前年度と同様, 種子島・場内の野生薬用植物の調査を行った。

研究業績

1. ガジュツ

1) 従来どおりの施肥量で施肥位置に関する試験を実施した。平成 2 年 4 月 24・25 日定植。作条施肥で種イモの植付深度は一定にし, その上部・同位置・下部に施肥し。上部・下部にはそれぞれ 2 cm の間土をした。収量は, 主根茎では上部~下部施肥区の順に対種イモ比で 3.8・3.6・3.5 倍とわずかづつではあるが減少する傾向が見られた, 分岐根茎では同比で 2.7・2.7・2.8 倍であった。主根茎数では 2.5・2.4・2.5 個であった。

2) 生育の経時変化を調査した。4 月に収穫が終了し, 結果は平成 3 年度発表予定。

2. ウコン

生育の経時変化を調査した。4 月に収穫が終了し, 結果は平成 3 年度発表予定。

3. インドジャボク

ポリフィルムによるマルチング栽培法を実施し, その発芽特性について調査した。対照・黒マルチ・白マルチの各区を設け, 平成 2 年 6 月 12 日に播種した。どの区も播種後ほぼ 3 週間目ごろから発芽が始まり, その後急速に進み 10 日前後で極値に達した。発芽率は 60.8・63.2・6.4%と白マルチ区が極端に悪かった。発芽後の生存株率は最良時で 56.7・56.1・5.8%であり, 播種後 50 日目では 32.7・15.2・1.2%で, いずれも無処理区が最も高かった。

3. クミスクチン

ポリフィルムによるマルチング栽培法を実施し, その生育効果について検討した。対照・黒マルチ・白マルチの各区を設け, 平成 2 年 6 月 7 日に定植した。収穫調査は 9 月 10 日, 11 月 17 日に行った。白マルチ区は他の区と比較し, 高温期の生育が劣り, 温暖期~冷涼期の生育が優れていた。総収量は生体重・乾物重とも黒マルチ区が大で, 次いで白マルチ区, 無処理区の順であった。各区間の生乾重比の差は 9 月に小さく, 11 月に大きかった。生存株は 9 月ではすべての区で 100%であり, 11 月では 54.9・84.3・100%であり, 5 月 15 日では 10.6・29.4・47.1%で, 地上部を刈り込んだ株は全区においてすべて枯死した。

(WHOフェロー) 6名

Carlos A. F. Dos Santos	マカオ	衛生部	環境衛生部	2. 4. 9	2. 4. 20	男
Kan Xuegui	中国	衛生部	環境衛生部	2. 8. 14	2. 8. 15	女
Xu Fengdan	中国	衛生部	環境衛生部	2. 8. 14	2. 8. 15	女
Yuan Jun	中国	衛生部	環境衛生部	2. 8. 14	2. 8. 15	女
Zhang Shengzu	中国	衛生部	環境衛生部	2. 8. 14	2. 8. 15	男
Edgar Calbitaza	フィリピン	食品医薬品局	支生部	2. 9. 17	2. 11. 2	男

(その他) 9名

馬建平	中国	衛生部	環境衛生部	63.10.27	2.10.27	男
秦任慧	中国	衛生部	環境衛生部	2. 2. 16	2. 5. 15	女
Nawaporn Anantasinkul	タイ	衛生部	環境衛生部	2. 5. 7	2. 6. 1	女
胡国慶	中国	衛生部	環境衛生部	2. 7. 2		男
邓大成	中国	衛生部	環境衛生部	2. 7. 6		女
金坤	中国	衛生部	環境衛生部	2. 7. 8	2.10. 9	男
楊学錦	中国	衛生部	環境衛生部	2.10.22		男
鄭榮亨	中国	衛生部	環境衛生部	2. 12. 1	2.12.27	男
金珠	中国	衛生部	環境衛生部	3. 1. 5	3. 2. 25	男

(研究生) 52名

氏名	所属	受入部	入所	退所	性別	備考
佐藤秀	隆裕大	理学部	60. 4. 1	3. 3. 30	男	
藤池昭	北里大	理学部	61. 4. 21	3. 3. 31	男	
菊野水	北里大	理学部	61. 7. 25	2. 7. 1	男	
篠田谷	日大	理学部	63. 4. 1	2. 9. 30	男	
吉谷田	日大	理学部	元. 2. 13	3. 3. 29	女	
古吉	日大	理学部	元. 4. 1	3. 3. 31	男	
佐藤宏	日大	理学部	元. 4. 1	3. 3. 31	男	
新井波	陸奥大	理学部	元. 4. 13	3. 3. 29	男	
原井元	陸奥大	理学部	元. 6. 7	3. 3. 31	女	
笠原裕	陸奥大	理学部	元. 7. 1	3. 3. 31	男	
山村浩	東邦大	理学部	元. 10. 1	2. 9. 30	男	
村部康	東邦大	理学部	元. 10. 2	2. 4. 30	男	
野井和	東邦大	理学部	元. 11. 1	2. 4. 30	女	
原原浩	東邦大	理学部	元. 12. 1	3. 3. 31	女	
高岩正	東邦大	理学部	元. 1. 8	2. 6. 1	男	
田口倫	福岡大	理学部	2. 4. 1	3. 3. 31	男	
北安澤	福岡大	理学部	2. 4. 1	3. 3. 30	男	
相澤由	福岡大	理学部	2. 4. 27	3. 3. 31	男	
桑林正	東京大	理学部	2. 6. 1	3. 3. 31	女	
阿田倫	東京大	理学部	2. 6. 1	3. 3. 31	男	
林由	東京大	理学部	2. 6. 1	3. 3. 31	女	
小野英	東京大	理学部	2. 6. 4	2. 8. 31	女	
野森景	東京大	理学部	2. 9. 1	2. 11. 30	女	
小松智	東京大	理学部	2. 9. 1	2. 9. 7	男	
大西秀	東京大	理学部	2. 10. 1	2. 10. 1	男	
西野景	東京大	理学部	2. 10. 1	2. 10. 1	男	
野村秀	東京大	理学部	2. 10. 15	2. 10. 15	男	
田村景	東京大	理学部	2. 10. 24	2. 12. 31	男	
木野景	東京大	理学部	2. 11. 2	2. 11. 2	男	
野田景	東京大	理学部	2. 11. 15	2. 12. 11	男	
石野景	東京大	理学部	3. 1. 10	3. 3. 31	男	
栞野景	東京大	理学部	3. 1. 16	3. 2. 15	男	
西野景	東京大	理学部	3. 2. 12	3. 2. 12	男	
石野景	東京大	理学部	3. 3. 4	3. 3. 27	男	
栞野景	東京大	理学部	3. 3. 18	3. 3. 30	男	
西野景	東京大	理学部	3. 3. 18	3. 3. 30	女	
栞野景	東京大	理学部	3. 3. 18	3. 3. 30	男	
西野景	東京大	理学部	3. 3. 18	3. 3. 30	男	
栞野景	東京大	理学部	3. 3. 18	3. 3. 30	男	
西野景	東京大	理学部	3. 3. 18	3. 3. 30	男	
栞野景	東京大	理学部	3. 3. 18	3. 3. 30	男	
西野景	東京大	理学部	3. 3. 18	3. 3. 30	男	
栞野景	東京大	理学部	2. 9. 3	2. 9. 30	男	
西野景	東京大	理学部	2. 10. 1	2. 10. 31	男	
栞野景	東京大	理学部	3. 3. 18	3. 3. 30	男	
西野景	東京大	理学部	3. 3. 18	3. 3. 30	男	
栞野景	東京大	理学部	3. 3. 18	3. 3. 30	男	
西野景	東京大	理学部	3. 3. 18	3. 3. 30	男	
栞野景	東京大	理学部	3. 3. 18	3. 3. 30	男	
西野景	東京大	理学部	2. 10. 1	2. 10. 6	男	
栞野景	東京大	理学部	2. 10. 16	2. 11. 13	男	
西野景	東京大	理学部	2. 10. 16	2. 11. 13	男	

特別研究報告

Report of Collaborative Study

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 (第2次)

(昭和63年~平成2年)

世話人 代謝生化学部 高橋 惇

科学技術の進歩に伴い、国民生活に多くの利益をもたらした反面、医薬品、食品添加物、家庭用品、農薬、環境および食品汚染物質などの生活関連化学物質によって、国民の健康に重大な障害を与える可能性も懸念されるようになってきた。その原因物質としては、これら諸化学物質自体の他に、これらの化学物質中に含まれる微量の有害物質の影響も無視出来ない。生活関連諸物質に含まれる微量有害成分に曝される機会も多く、ヒトに予期しない健康障害が現われたり、ある場合は発がん、奇形発生のように重篤な毒性を発現させる可能性も考えられる。各種毒性試験によって生体に及ぼす有害性を検索する手段が進歩してきてはいるが、ヒトにおける発がん性や催奇形性などを予測することは必ずしも容易ではない。そこで、生活関連諸物質中の微量有害成分の汚染状況を把握すると共に、その有害成分の生成機序を明らかにする必要がある。また、生体に摂取された化学物質はそれ自身、あるいは生体内で活性化された代謝物が生体高分子の機能に影響を及ぼし、種々の毒性を発現させると考えられているものもある。そこで、化学物質の体内動態と毒性発現との関連性を明らかにするため、化学物質またはその代謝物の生体成分との相互作用を分子レベルで調べ、その化学反応が生体にどのような影響を与えるかを解析し、化学物質の化学構造および化学的反応性が毒性発現にどのように関連しているかを総合的に知ることが重要課題である。

以上の見地から、生活関連諸物質中の微量有害成分の含有量、およびその成分の体内動態と毒性発現との関連性を明らかにするため、微量有害成分の単離・同定、微量分析法の確立、微量有害成分の生成

機序の解明、活性代謝物の予測と化学的反応性の検討、生体試料中の変異原性・催奇形性物質の検索法の確立、体内動態の解明等を総合的に研究し、ヒトにおける安全性の予測に応用し得る試験基準を確立させるための研究を実施した。

第2次の本特別研究では第1次の研究に引き続き、高感度の諸試験法を開発研究し、その方法を用いて、ニトロアレーン類、マイコトキシン類、ethylene-thiourea (ETU)、ソルビン酸、過酸化水素、ホルムアルデヒドなどの微量有害成分に関するデータを集積させると共に、これらの実験データを基に、分子レベルでの化学反応性を細胞レベル・生体レベルでの反応性と対応させながら、多角的、総合的に検討した。

大気汚染が懸念されるニトロアレーン類に関しては、

1) ニトロアレーン類の還元的な活性化のされ易さが、置換基の位置および電子効果に大きく影響され、これが変異原性の強さを決める重要な因子の一つになっていることを明らかにした。特に、ジニトロアレーン類では、二つのニトロ基が共鳴構造を取り、その結果、二電子目の還元が起き易く、ニトロソへの還元が起き易いときに、ニトロレダクターゼの関与なしで還元が進行し、強力な変異原活性を発現することを示した。また、分子軌道計算により、ニトロアレーン類の還元特性、特に二電子目の還元され易さの指標が容易に算出できることが明らかになった。この結果は、他のニトロアレーン類の毒性評価にも応用可能と考えられる(有機化学部)。

2) 1-ニトロピレン(1-NP)は、S9 mix 非存在下では染色体異常を誘発しないが、S9 mix 存在下では染色体異常誘発性を示し、異常出現頻度はS9 添加濃度に比例して増加した。1-NPをS9 mixで

処理すると、1-APを含む数種の代謝物を生成するが、1-APには染色体異常誘発性は認められなかった。窒素ガス置換条件下より空気条件下の方が、1-NPの異常出現頻度が高かったことから、1-NPの酸化体の中により強いclastogenが存在することが示唆された。

1,3-, 1,6-, 1,8-ジニトロピレン (DNP) は、S9 mix 非存在下、低濃度で高頻度の染色体異常を誘発し、その強さは、1,8->1,6->1,3-DNPの順であった。

1-NP および 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。尿中への変異原性物質の排泄は1-NPの場合は24時間尿が一番多く、その後急速に減少したのに対し、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遅かった。

1-NP および 1,6-DNP 投与ラット尿中の変異原性物質の検出限界は、それぞれ0.05 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ (1-NP), 0.005 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ (1,6-DNP) であった。

また、喫煙者の尿中の変異原の検出にも、YG1024 が最も高い感受性を示し、喫煙者の尿中には芳香族アミン系変異原の存在が示唆され、YG1024 がヒトの尿中変異原の高感度モニタリングに有用であることが判明した (変異遺伝部)。

催奇形性活性の検索法に関しては、化学物質等の生殖毒性の予測やヒト曝露量を推定する試験法として、血清中の催奇形性活性測定法の開発と宿主經由催奇形性活性および胎仔致死活性の *in vitro* 試験法に関する研究を行った。細胞培養による宿主經由催奇形性試験法は、薬物の作用を鋭敏に検出できること、また、少ない動物数で、*in vivo* と良く相関する作用を短期間で定量的に検出できることを明らかにした。

ETUによる催奇形性の著しい種差には、ETUの神経分化阻害作用に対する感受性が、ラットMB細胞 (高感受性) と、マウスMB細胞 (低感受性) では著しく異なることが主原因であり、二次的な原因としてマウスにおけるETUの代謝はラットより速く、胎仔へ移行するETU量が少ないこと、が関係していることを示した。また、コロニー形成阻害試験は、胎仔致死作用を検出する *in vitro* 試験系として優れた方法であり、コロニー法が除草剤の胎仔致死作用と良く相関することを明らかにした (薬品部)。

食品、医薬品中のマイコトキシン類に関しては、

1) インドネシア産伝承薬の汚染カビ中に検出された小型菌核形成 *Aspergillus flavus* から2種類の新規インドロジテルペン化合物、monohydroxy-aflavinine と monohydroxyisoaflavinine を単離し、それらの化学構造を決定した。さらに、今回分析した7菌株はすべて痙攣性マイコトキシンの生産性を有し、その菌核中でaflatremおよびpasparinineとそれらの生合成前駆体が生産されることを明らかにした (生薬部)。

2) アフラトキシン M_1 を市販のアフィニティーカラムにより精製後、HPCLにて定量する簡易法を開発した。本法はアフィニティーカラムを繰り返し6回使用可能であり、また本法の検出限界は粉乳では0.05 ppb (50 ppt)、牛乳では0.005 ppb (5 ppt) であり、食餌中アフラトキシン B_1 の牛乳中への移行およびその動態研究に極めて有用であることを明らかにした。また、食品および飼料への汚染が懸念されている複数のマイコトキシン類の同時分析法の開発についても検討を加えた (食品部)。

3) ニバレノール、デオキシニバレノールの免疫学的検索法を開発し、それを実際の農作物に適用した。国産および輸入品のオオムギ、コムギの中、国産オオムギに0.05~23.2 ppmのニバレノール汚染物を見出した。汚染試料からの分離菌株についても、単孢子分離による純化を経て、培養物からのニバレノール、デオキシニバレノール生産能を検索中である (衛生微生物部)。

食品添加物、化粧品等に関する研究では、

1) ソルビン酸はその β -酸化による代謝分解の過程でSH基と反応性の高い活性代謝物に変換された。肝臓内にはその経路をバイパスする別の β -酸化経路も存在するが、15%ソルビン酸投与によって活性代謝物生成経路の酵素のみが選択的な誘導を受けた。これに伴う肝内SHプールの減少がペルオキシゾーム誘導に起因する酸化的ストレスを増幅し、発がんへ導いたものと推定された (代謝生化学部)。

2) マウスの臓器における過酸化水素の分解反応の系統差を検討した。カタラーゼ活性は肝臓が最も高く、腎臓、血液、十二指腸の順に活性が弱くなった。C57BLの方がC3Hよりカタラーゼ活性が弱く、特に、十二指腸では弱く、C57BLの方が過酸化水素の分解が遅かった (大阪支所食品試験部)。

3) ホルムアルデヒド (FA) と 2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol (BNPD) の同時分析および化粧

品に添加されるアミノ酸、ペプチド類との反応性をポストカラム誘導体化 HPLC 法を用いて検討した。本法は全分析過程を室温下で行えるため、本研究目的に適した方法である。この方法により、FA とアミノ酸、ペプチド類、特に、L-システイン、コラーゲンの加水分解物（分子量約 200）の共存で、FA 量が減少することを認めた。また、本法によりトルエンスルホンアミド樹脂などからの FA の遊離条件を検討する場合にも応用できる（環境衛生化学部）。

以上のように、それぞれの分野において、かなりの成果をあげることができた。今後、これらの成果を規制上の意志決定の科学的根拠にできるように、それぞれの研究が更に発展することを期待したい。

最後に、終始御協力を戴いた分担研究者各位と本研究の機会を与えて戴いた当局に対し深く感謝の意を表します。

ポリニトロアレン (PNA) の毒性発現機構に関する有機化学的研究

有機化学部

〔目的〕

ディーゼル排気ガス中などに含まれるニトロアレン類（多環芳香族炭化水素のニトロ誘導体）は、強力な変異原性および癌原性を示すことから、環境中の微量有害物質の一つとしてヒトへの影響が注目

されている化合物群である。当部では、新規なニトロベンツ[a]ピレンとして、1,6-ジニトロベンツ[a]ピレン、および、3,6-ジニトロベンツ[a]ピレンおよびそれらの誘導体を合成し、これらが非常に強力な変異原性物質であることを明らかにしている。ニトロアレン類は、生体内でニトロ基が還元代謝され変異原性を発現することから、ニトロ基の還元のされ易さは活性の強さを決める重要な因子の一つと考えられる。そこで本研究では、ニトロアレン類の還元特性、特にニトロ基がニトロソ基に二電子還元される際の還元特性を明らかにする目的で、半経験的分子軌道法 (MNDO 法) を用いて種々のニトロアレン類の一電子還元性および二電子還元性を計算し、還元特性の解析を試みた。

〔実験方法・結果〕

ニトロアレン類のニトロ基は、一電子還元されてニトロアニオンラジカルに、また、更に一電子還元されてニトロソ基になる。ニトロ基の一電子目の還元のされ易さの指標を得るために、MNDO 法により種々のニトロピレンおよびニトロベンツ[a]ピレンの最低空軌道 (LUMO) のエネルギーレベルを計算した。パラメーターは、MOPAC プログラム (Ver 5.0) の標準値を用いた。次に、ニトロ基の二電子目の還元され易さに関する指標を求めるために、ニトロアレン類の二電子還元状態を想定し、その最高被占軌道 (HOMO) のエネルギーレベル、

Table. 1 Results of MNDO-calculation for nitroarenes

Compound	LUMO	HOMO
	energy level (eV) in ground state	energy level (eV) in two-electron reduction state
Nitropyrenes		
1-Nitropyrene	-1.583	0.940
1-Nitro-3-cyanopyrene	-1.996	0.667
1-Nitro-6-cyanopyrene	-1.987	0.345
1-Nitro-8-cyanopyrene	-1.977	0.367
1,3-Dinitropyrene	-2.236	0.376
1,6-Dinitropyrene	-2.200	-0.117
1,8-Dinitropyrene	-2.187	-0.064
Nitrobenzo[a]pyrenes		
1-Nitrobenzo[a]pyrene	-1.686	0.377
3-Nitrobenzo[a]pyrene	-1.684	0.401
6-Nitrobenzo[a]pyrene	-1.740	0.761
1-Nitro-6-fluorobenzo[a]pyrene	-1.862	0.235
3-Nitro-6-fluorobenzo[a]pyrene	-1.861	0.246
1-Nitro-6-cyanobenzo[a]pyrene	-2.093	-0.127
3-Nitro-6-cyanobenzo[a]pyrene	-2.085	-0.081
1,6-Dinitrobenzo[a]pyrene	-2.273	-0.305
3,6-Dinitrobenzo[a]pyrene	-2.275	-0.444

すなわちイオン化ポテンシャルの化学計算を行った。結果を Table 1 に示す。

モノトロピレン, ニトロシアノピレンの三つの異性体, およびジトロピレンの三つの異性体の LUMO 値より, これらの化合物の一電子目の還元のされ易さの順は, ジトロピレン, ニトロシアノピレン, モノトロピレンとなった。また, それぞれの異性体間では還元のされ易さに差が無いことも示された。一方, HOMO 値の計算結果より示される二電子目の還元のされ易さも, 上記と同じ傾向を示した。しかし, ニトロシアノピレンの異性体では, 1-ニトロ-3-シアノ体が, 1-ニトロ-6-シアノ体および1-ニトロ-8-シアノ体に比べて二電子目の還元が起きにくいこと, また, ジトロピレンの異性体でも, 1,3-ジニトロ体が, 1,6-ジニトロ体および1,8-ジニトロ体に比べて二電子目の還元が起きにくいことが示された。ニトロベンツ[a]ピレン類については, 3,6-ジニトロベンツ[a]ピレンおよび1,6-ジニトロベンツ[a]ピレンおよびこれらの6位置換体(H, F, CN)のLUMO値およびHOMO値の計算結果より, 一電子目および二電子目の還元のされ易さは, 1-ニトロ体, 3-ニトロ体ともに, 6位の置換基がNO₂, CN, F, Hの順になった。

〔結論・考察〕

化学計算により求めたLUMO値およびHOMO値が, サイクリックボルタメトリーにより電気化学的に求めた一電子目および二電子目の酸化還元電位の実測値($E_{1(1/2)}$ および $E_{2(1/2)}$)と良い相関を示した(Fig.1参照)。この結果は, 半経験的分子軌道計算(MNDO法)により, ニトロ基のニトロソ基への還元の起き易さ, すなわち活性化され易さの適切な指標が求まることを示す。

すでに我々は, ニトロアレーン類の還元的な活性化のされ易さが, 置換基の位置および電子効果に大きく影響され, これが変異原性の強さを決める重要な因子の一つに成っていることを明らかにしている。特に, ジニトロアレーン類では, 1,6-ジニトロピレン, 1,8-ジニトロピレン, 1,6-ジニトロベンツ[a]ピレン, および, 3,6-ジニトロベンツ[a]ピレンのように, 二つのニトロ基が共鳴構造を取り, その結果, 二電子目の還元が起き易いとき, すなわちニトロソへの還元が起き易いとき, ニトロレクタターゼの関与なしで還元が進行し, 強力な変異原活性を示すことを報告している。今回, 分子軌道計算により, ニトロアレーン類の還元特性, 特に二電子目の還元

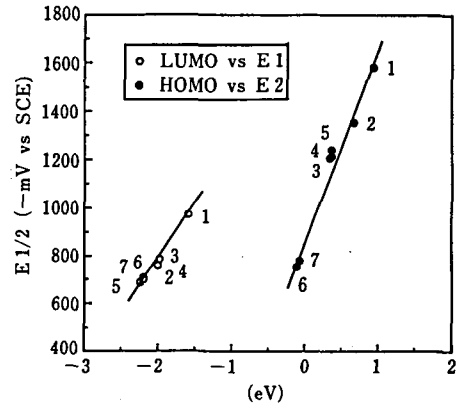


Fig. 1. Plot of LUMO vs $E_1(1/2)$ and HOMO vs $E_2(1/2)$ for nitro-pyrenes

- 1-NO₂, 2. 1-NO₂-3-CN, 3. 1-NO₂-6-CN, 4. 1-NO₂-8-CN, 5. 1,3-diNO₂, 6. 1,6-diNO₂, 7. 1,8-diNO₂

され易さの指標が容易に算出できることが明らかになった。この結果は, 他のニトロアレーン類の毒性評価にも応用可能と考える。

発表報文

- 1) Fukuhara, K., Miyata, N., and Kamiya, S.: Synthesis of 6-azabenz[a]pyrene. *Tetrahedron Lett.*, **31**, 3743~3744 (1990)
- 2) Fukuhara, K., Miyata, N., Matsui, M., Matsui, K., Ishidate Jr., M., and Kamiya, S.: Synthesis, chemical properties and mutagenicity of 1,6- and 3,6-dinitrobenzo[a]pyrenes. *Chem. Pharm. Bull.* **38**, 3156~3161 (1990)
- 3) Fukuhara, K., Miyata, N., Matsui, M., Matsui, K., Ishidate Jr., M., and Kamiya, S.: Relationship between electrochemical properties and mutagenicity of 6-substituted 1- and 3-nitrobenzo[a]pyrenes. *Mutation Res.*, **252**, 86 (1991)
- 4) Matsuoka, A., Sofuni, T., Miyata, N. and Ishidate Jr., M.: Clastogenicity of 1-nitropyrene, dinitropyrenes, fluorene and mononitrofluorenes in cultured Chinese hamster cells. *Mutation Res.*, **259**, 103~110 (1991)

ニトロアレーン類の変異原性に関する研究

変異遺伝部

1. 序

近年、ディーゼルエンジン排出ガス、石油ストーブ燃焼物中等、環境中に広く分布している汚染物質として、ニトロアレーン類が問題になっている¹⁻⁴⁾。ニトロアレーン類の中には、ジニトロピレンのように微生物に対して強い変異原性を有し⁵⁾、また、動物実験で発がん性が証明⁶⁾されているような物質が含まれており、我々の健康に重大な影響を及ぼす可能性が高い。

我々は、化学物質のヒトへの暴露状況を高感度でモニタリングするため、ニトロアレーン、芳香族アミンに高感受性を示す新しい *S. typhimurium* TA 98, TA100 の誘導株 YG1021, YG1024, YG1026, YG1029 を樹立した⁷⁻⁹⁾。これらの菌株は、クローニングした *S. typhimurium* TA1538 のニトロ還元酵素、アセチル転移酵素遺伝子をマルチコピー・プラスミド上に持つため、きわめて高い酵素活性を示す。この新しい試験菌株について、代表的な芳香族ニトロ化合物、芳香族アミノ化合物および構造的にこれらと関連のない変異原に対する感受性に関する検討を行った。ニトロ還元酵素活性の高い菌株 (YG1021, YG1026) は芳香族ニトロ化合物に対して、アセチル転移酵素活性の高い菌株 (YG1024, YG1029) は芳香族ニトロ、アミノ化合物から生じる芳香族ヒドロキシルアミンに対して、それぞれ特異的に高い感受性を示すことが判明した¹⁰⁾。

発がん物質に暴露された動物およびヒトの尿や糞便中に変異原性物質が存在することが報告¹¹⁾されており、尿、糞便中の変異原活性の検索は発がん物質への暴露の生物学的モニタリング法の一つとして関心が高まっている。しかし、この方法には、1) 尿中の変異原性活性物質の濃度が低い、2) 変異原性試験に使用する細菌に対して毒性を示す成分が尿中に存在する場合には正確な変異原性活性を調べることができない、3) 尿中には変異原性物質が不活性型の抱合体として存在している場合が多いなどの問題がある¹²⁾。

これらの問題点を解決する手段としては、尿の濃縮、 β -グルクロニダーゼやサルファターゼ処理を行うことなどが考えられるが、我々は新たに開発し

たニトロアレーン、芳香族アミンに高感受性を示す菌株を用いて、ニトロピレン類を投与したラット尿についてモニタリングを試みた。また、これらの高感受性株が、有害物質に暴露されたヒトのモニタリングに実際に有効であるか否かを検討するため、喫煙者および非喫煙者の尿中変異原について検討を行った。

2. 実験材料および方法

被験物質：

ラットの投与には1-ニトロピレン (1-NP, 純度99.9%以上, 東京化成工業¹³⁾) および1,6-ジニトロピレン (1,6-DNP, Aldrich chem. Co.) を用いた。

ラット尿中の変異原性活性の検索：

ラットへの被験物質の投与および尿の試料調製は当所代謝生化学部で行われた。10~11週齢のF344系SPF雄ラット (日本チャールズ・リバー) 1群4匹を試験に供した。各群ラットを1匹ずつ代謝ケージに入れ、24時間尿を採尿チューブを用いて冷却しながら採尿した。溶媒投与ラットにはDMSO: trioctanoil=1:2混液3 ml/kgまたは6 ml/kgを腹腔内投与した。1-NPおよび1,6-DNPの投与量は3 ml/kgおよび6 ml/kgとした。投与した時点を0時間とし、24時間尿 (0~24時間)、48時間尿 (24~48時間)、72時間尿 (48~72時間) を個別別に集めた。採取した尿は次の処理を行うまで-20℃のフリーザー中に保存した。

尿中にグルクロン酸抱合体として排泄される代謝物の変異原性活性を検出するために、尿試料を β -glucuronidaseで処理した。尿試料を2500 rpmで5分間遠心分離し、固形物を沈澱させた後、上清を50 ml遮光遠沈管に移した。0.4 M K_2HPO_4 あるいは0.4 M KH_2PO_4 を用いて尿試料のpHを6.8に調整した。1個体分の尿試料容量を精製水で10 mlとした後、 β -glucuronidaseを800 Sigma unit/mlになるように添加し、37℃で1時間インキュベートした¹³⁾。

Sep-pak法¹⁴⁾では、活性化したSep-pakに酵素処理した尿10 mlを流し、さらに5 mlの精製水を流して極性物質を洗い流した後、5 mlのメタノールで変異原性物質を溶出させた。一部の試験ではその後、5 mlのエタノールでさらに溶出した。溶出液をロータリーエバポレーターおよび窒素ガスを用いて乾固した。その残渣に200 μ lのDMSOを加え、Vortexを用いて溶解させ、試験試料とした。

ブルーレーヨン法¹⁵⁾では、尿試料 10 ml にブルーレーヨン (フナコシ) 30 mg を加え、室温で 30 分間振盪した。そのブルーレーヨンを取り出した後、新たなブルーレーヨン 20 mg を加え、同様に 30 分間振盪した。このブルーレーヨン 50 mg を 10 ml の水で 2 回洗浄し、洗浄後メタノール・アンモニア 100:1 混液 (10 ml/50 mg ブルーレーヨン) 中に入れ、室温で 30 分間振盪し、抽出した。この抽出操作を 2 回くり返し、抽出液を合わせて Sep-pak 法と同様にロータリーエバポレーターおよび窒素ガスを用いて乾固させ、DMSO 200 μ l に溶解させた。復帰突然変異試験:

変異原性試験菌株として *S. typhimurium* TA 98 (フレームシフト型変異原検出用)、および YG 1021 (ニトロ還元酵素 (NRase) 高生産株) と YG 1024 (O-アセチル転移酵素 (O-ATase) 高生産株)⁷⁻⁹⁾ の 3 菌株を用い、代謝活性化法を併用して 37°C、20 分間のプレインキュベーション法で行った。菌体を被検物質および S9 mix またはリン酸緩衝液と共にプレインキュベートした後、寒天平板上に重層し、37°C で 2 日間培養後、復帰突然変異コロニー数を計測した。

ヒト尿採取と抽出法:

喫煙者 (5 名) および非喫煙者 (5 名) の尿は、健康な成年男子から 1 人 500 ml ずつ 2 回提供を受けた。尿サンプル (500 ml) はブルーレーヨン (1 g \times 2) を用い処理した。ブルーレーヨンに吸着した物質は、メタノール・アンモニア溶液 (500 ml) で溶出し、濃縮してから 600 μ l の DMSO に溶解して、その一部 (50 μ l, 25 μ l, 12.5 μ l, 6.25 μ l) につき、TA98, YG1021, YG1024 を用い S9mix 存在下で変異原性試験を行った。

3. 実験結果および考察

ラット尿中の変異原性:

Sep-pak 法¹⁴⁾では、尿中に含まれているヒスチジン (His) を除去するため、メタノールの溶出前にカートリッジを水で洗い、His と変異原性物質を分離させた。His の吸着がほとんどないとされているブルーレーヨン法¹¹⁾を用いた抽出法と、Sep-pak C18 カートリッジを用いた抽出法を比較検討したところ、ブルーレーヨン法での抽出液と Sep-pak 法のメタノール溶出液との間には大きな差は認められなかった。Sep-pak C18 カートリッジを用いた抽出法は、ブルーレーヨン法に比較して操作が簡便であり、極めて迅速に変異原性物質の抽出が行

えるので、以後の実験では、Sep-pak C18 カートリッジによる抽出を行った。

溶媒を投与したラットの尿および無処理尿を Sep-pak 法によるメタノール溶出液について比較したところ、溶媒投与群と無処理群ラット尿の間には変異原性活性の有意な差は認められなかった。したがって、1-NP および 1,6-DNP 投与の場合に使用した溶媒は、変異原性活性測定に何ら影響を与えないと考えられ、以後の実験にはこれらの投与溶媒を使用することにした。

ニトロピレン類を投与した場合の尿中変異原性物質の検出に対する菌株の感受性について検討した。1-NP 投与ラット尿についての S9 mix 条件下での変異原性活性は、YG1024 \geq YG1021>TA98 の順であり、YG1024 と YG1021 に高い感受性が認められた。YG1024 菌株が高い感受性を示したことは、尿中には未変化体の 1-NP の他に、その代謝物もかなり含まれていることが示唆された。1,6-DNP 投与ラット尿の場合は S9 mix 存在の有無にかかわらず、変異原性活性は YG1024>YG1021 \geq TA98 の順であり、YG1024 が最も高かった。この結果から、1,6-DNP 未変化体が、尿中に排泄されていることが示唆された。以後の実験には、YG1024 を使用することにした。

1-NP (50 μ mol/kg)、1,6-DNP (5 μ mol/kg) および投与溶媒 3 ml または 6 ml/kg をそれぞれラット 4 匹に投与した後、24 時間、48 時間、72 時間尿を採取し、YG1024 を用いて試験を行った。1-NP を投与した場合、24 時間尿中の変異原性活性が一番高く、48 時間尿および 72 時間尿では経時的な減少の傾向を示した (Fig. 1)。しかし、1,6-DNP 投与ラットにおいては、5 μ mol/kg 投与の場合は 1-NP と同じ様に 24 時間尿中の変異原性活性が最も高かったが、その後の 48 時間尿、72 時間尿中の変異原性活性も高く、その活性はほとんど同程度であり、長時間にわたって変異原性物質が尿中へ排泄された (Fig. 2)。0.5 μ mol/kg 投与の場合は、24 時間尿と 48 時間尿はほぼ同程度の高い活性を示し、72 時間尿でも抽出物の DMSO 溶液 1 μ l/plate 以上で変異原性活性を検出することができた。1-NP または 1,6-DNP を 5 および 0.5 μ mol/kg 投与したラットの 24、48 および 72 時間尿中の 10 μ l/plate の変異原性活性値と時間との関係を Fig. 3 に示した。1-NP 5 μ mol/kg 投与ラットでは 72 時間尿中に、0.5 μ mol/kg 投与ラットでは 48 時間尿中

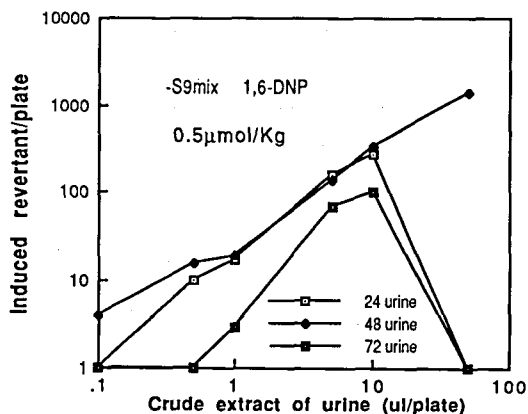
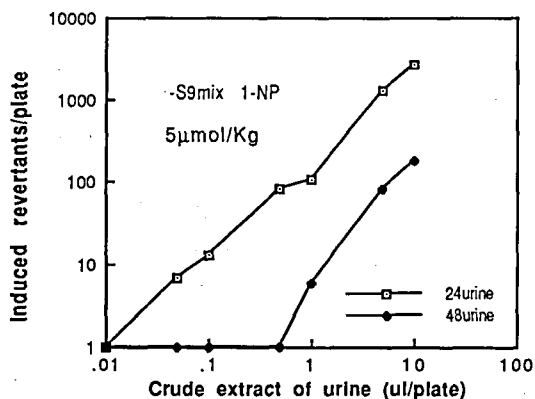
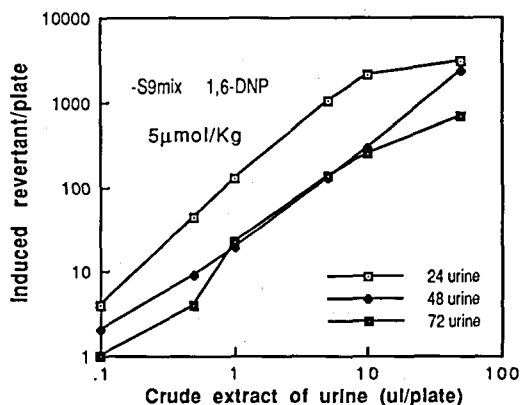
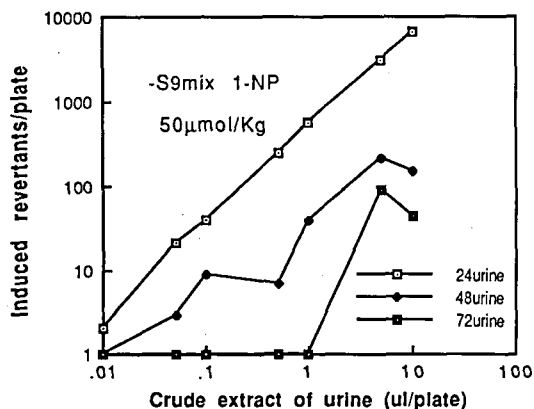


Fig. 1. Mutagenic activities observed in urine of rats treated with 1-NP

Fig. 2. Mutagenic activities observed in urine of rats treated with 1,6-DNP

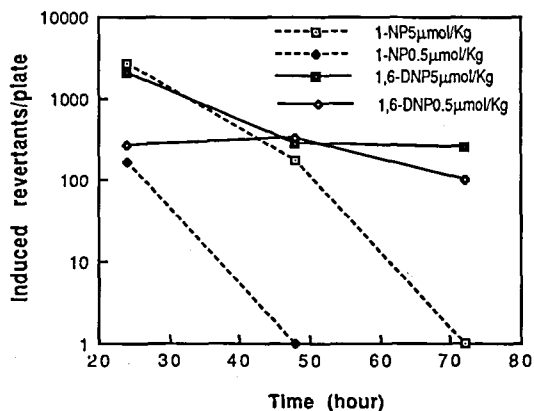


Fig. 3. Mutagenic activities observed in urine of rats treated with 1-NP or 1,6-DNP (5 μmol and 0.5 $\mu\text{mol}/\text{kg}$)

に変異原性活性が検出されなくなるのに対して、1,6-DNP 投与ラットの 72 時間尿中には高い変異原性活性が認められた。以上の結果から、1,6-

DNP およびその代謝物の体外への排泄は 1-NP に比較してかなり遅いことが示唆された。1,6-DNP はあらゆる溶媒に対する溶解性が低いために腹腔からの吸収が遅いためか、1,6-DNP の体内での代謝が 1-NP より遅いためと考えられる。

1-NP は 50, 5, 0.5, 0.05 $\mu\text{mol}/\text{kg}$, 1,6-DNP は 5, 0.5, 0.05, 0.005 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ の 4 用量を各々 4 匹に投与したラットの 24 および 48 時間尿について、YG1024 を用いて試験を行い、尿中の変異原性活性の検出限界について検討した (Fig. 4, 5)。1-NP においては、尿抽出液 10 $\mu\text{l}/\text{plate}$ では、0.05 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 迄変異原性活性が検出可能であり、1,6-DNP においては、0.005 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 迄検出可能であった。

1-NP は菌株により、1-NP \rightarrow 1-nitrosopyrene \rightarrow N-hydroxy-1-AP \rightarrow 1-AP と還元され、中間代謝物であるニトロソ体とヒドロキシアミノ体が活性代謝物と考えられている¹⁰⁾。1-NP および 1,6-DNP を投与したラットの尿中に高い変異原性活性

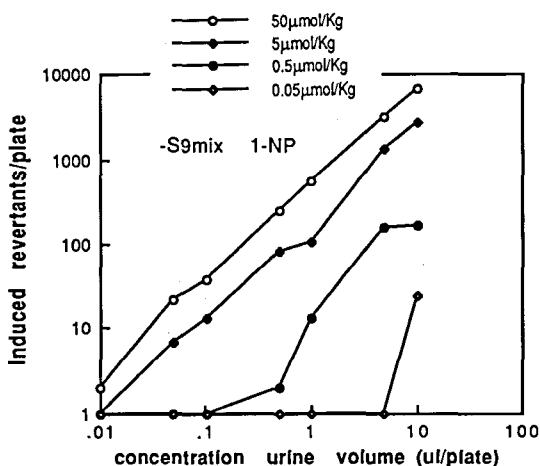


Fig. 4. Relation between doses of 1-NP and mutagenic activities of urine

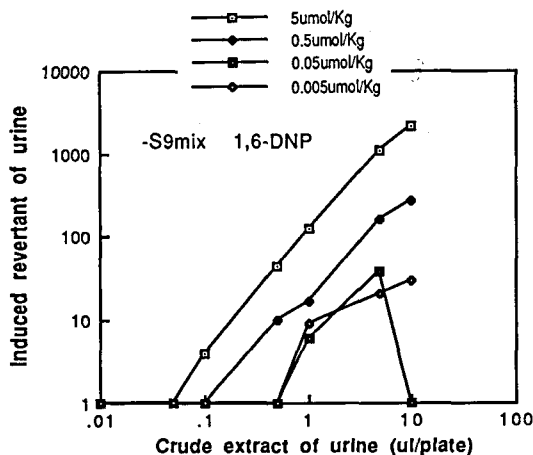


Fig. 5. Relation between doses of 1,6-DNP and mutagenic activities of urine

が認められ、1-NP も 1,6-DNP も共に、投与部位である腹腔から吸収され、変異原性物質が尿中に排泄されることがわかる。1-NP の代謝物である 1-AP の比変異原性活性は 33 rev/nmol であり、1-NP の 112 rev/nmol と比較すると、1-AP の比変異原性活性は低く、逆に 6/8-hydroxy-N-acetylaminopyrene は 600 rev/nmol と 1-NP よりも高い比変異原性活性を示すことが報告¹⁹⁾されている。しかし、我々は化学的同定を行っていないので、1-NP とその代謝物のどちらが多く尿中に排泄されているのかを明らかにすることはできなかった。

TA98 を用いた -S9 mix 条件下での比変異原性活性は 1-NP が 484 rev/nmol であるのに対し、1,6-DNP が 36,350 rev/nmol という報告⁵⁾がある。

それぞれの未変化体の変異原性活性には 75 倍もの大きな差が認められるが、我々の *in vivo* の実験では 5 $\mu\text{mol/kg}$ の 1-NP と 1,6-DNP を投与した場合、尿中に排泄される変異原性活性は 24 時間尿ではほぼ同程度であり、48 時間尿では 1,6-DNP の方が高いものの、1.6 倍程度であり、1-NP と 1,6-DNP 自体の変異原性活性の差より小さくなっている。1-NP が代謝されて、活性代謝物を多く生成するためか、1,6-DNP が代謝されて不活性代謝物を生成するためか、あるいは 1,6-DNP およびその活性代謝物の尿中への排泄が少ないためかどうかは不明である。

1-NP は、YG1021 において 24,700 rev/nmol、YG1024 では 3,040 rev/nmol と 1-NP の比変異原性活性は YG1021 の方が約 8 倍高いことが報告されている¹⁹⁾。これに対し、1-NP 投与ラット尿中の変異原性活性は YG1024 と YG1021 の両者において、ほぼ同程度か、むしろ YG1024 の菌株で高い活性を示した。このことは、尿中に 1-NP は未変化体のみならず、代謝物として排泄されていることが示唆される。また、YG1021 には NRase 高生産性のプラスミドが、YG1024 には O-ATase 高生産性のプラスミドが導入されていることを考え合わせると、代謝物はすでに N-ヒドロキシ体が多く、次の代謝経路が変異原性発現の律速段階となっており、YG1024 において YG1021 と同程度の変異原性活性を示した結果だと予測される。

喫煙者の尿中変異原性：

YG1021、YG1024 が有害物質に暴露されたヒトのモニタリングに有効であるか否かを検討するため、喫煙者、非喫煙者の尿および蒸留水（コントロール）をブルーレーヨンで処理して得たサンプルに対する TA98、YG1021、YG1024 の感受性を比較した (Fig. 6)。尿の濃縮物 50 μl は、元の尿 42.5 ml に相当する。図に示すように、喫煙者の尿は非喫煙者よりも高い変異原性を示した。非喫煙者の尿はコントロールよりやや高い変異原性を示したにすぎなかった。喫煙者の尿中変異原に対する感受性を 3 菌株で比較すると、アセチル転移酵素活性の増大した YG1024 がニトロ還元酵素活性の増大した YG1021 や従来からの株である TA98 よりも約 7 倍高い感受性を示した。これらの結果から、喫煙者の尿中にはアセチル転移酵素により活性化され、しかも S9 mix による代謝活性化を必要とする変異原、すなわち芳香族アミン系の変異原が存在していることが

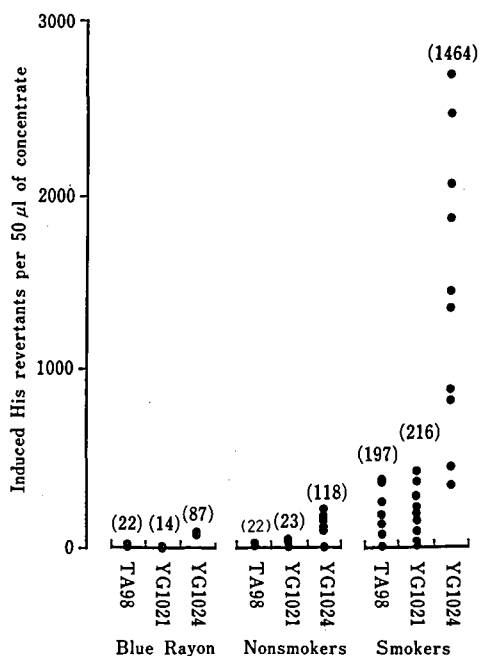


Fig. 6. Numbers of His⁺ revertants per 50 µl of concentrate of smokers' urine, non-smokers' urine and Blue Rayon extract

Numbers in parentheses represent the mean value of induced revertants per 50 µl of concentrate for each sample and strain. All samples were tested with S9 mix.

示唆された。また、YG1024がヒトの尿中変異原の高感度モニタリングに適していることが示された。

4. 要約

- Sep-pak法がブルーレーヨン法より迅速で簡単にラット尿中の変異原性物質を抽出することができた。
- 1-NPおよび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。
- 尿中への変異原性物質の排泄は1-NPの場合は24時間尿が一番多く、その後急速に減少したのに対し、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ゆるやかに減少し、1-NPよりも遅い傾向を示した。
- 1-NPおよび1,6-DNP投与ラット尿中の変異原性物質の検出限界は、それぞれ0.05 µmol/kg (1-NP), 0.005 µmol/kg (1,6-DNP)であった。
- 喫煙者の尿中の変異原の検出には、アセチル転

移酵素の増大したYG1024が最も高い感受性を示し、喫煙者の尿中には芳香族アミン系の変異原が存在することが示唆された。また、YG1024がヒトの尿中変異原の高感度モニタリングに有用であることが判明した。

文 献

- Rosenkranz, H. S., McCoy, E. C., Sanders, D. R., Butler, M., Kiriazides, D. K. and Mermelstein, R.: Nitropyrenes: Isolation, identification, and reduction of mutagenic impurities in carb on black and toners. *Science*, **209**, 1039~1043 (1980)
- McCoy, E. C. and Rosenkranz, H. S.: Cigarette smoking may yield nitroarenes. *Cancer Letters*, **15**, 9~13 (1982)
- 大西克成, 木内武美, 真鍋芳樹, 筒井英士: ニトロアレーンの重要性. 環境変異原研究, **6**, 29~37 (1984)
- 松下秀鶴, 河合昭宏, 後藤純雄, 久松由東: ニトロアレーン系変異原の環境分布は何故広いと推定されるのか. 環境変異原研究, **6**, 39~47 (1984)
- Mermelstein, R., Kiriazides, D. K., Butler, M., McCoy, E. C. and Rosenkranz, H. S.: The extraordinary mutagenicity of nitropyrenes in bacteria. *Mutat. Res.*, **89**, 187~196 (1981)
- Ohgaki, H., Negishi, C., Wakabayashi, K., Kusama, K., Sato, S. and Sugimura, T.: Induction of sarcomas in rats by subcutaneous injection of dinitropyrenes. *Carcinogenesis*, **5**, 583~585 (1984)
- Watanabe, M., Nohmi, T. and Ishidate, M. Jr.: New tester strains of *Salmonella typhimurium* highly sensitive to mutagenic nitroarenes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **147**, 974~979 (1987)
- 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)
- Watanabe, M., Ishidate, M. Jr. and Nohmi, T.: Sensitive method for the detection of mutagenic nitroarenes and aromatic amines: New derivatives of *Salmonella typhimurium* tester strains possessing elevated O-acetyl transferase levels. *Mutat. Res.*, **234**, 337~348 (1990)
- Einistö, P., Watanabe, M., Ishidate, M. Jr. and

Nohmi, T.: Mutagenicity of 30 chemicals in *Salmonella typhimurium* strains possessing different nitroreductase or O-acetyltransferase activities. *Mutat. Res.*, **259**, 95-102 (1991)

- 11) 根岸友恵, 早津彦哉: ヒト排泄物および体液中の変異原物質. 代謝, **20**, 臨時増刊号 721-729 (1983)
- 12) WHO: Principle of Toxicokinetic Studies. *Environmental Health Criteria*, **57**, 117-125 (1986)
- 13) Belisario, M. A., Carrano, L., Egiulio, A. D., Pecce, R. and Buonocore, V.: Effect of liver enzyme inducers on metabolite excretion in rats treated with 1-nitropyrene. *Toxicology Letters*, **36**, 233-241 (1987)
- 14) Kanoh, T., Fukuda, M., Mizoguchi, I., Kinouchi, T., Nishifuji, K. and Ohnishi, Y.: Detection of mutagenic compounds in the urine of mice administered pyrene during exposure to NO₂. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, **78**, 1057-1062 (1987)
- 15) Kobayashi, H. and Hayatsu, H.: A time-course study on the mutagenicity of smoker's urine. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, **75**, 489-493 (1984)
- 16) 大西克成, 木内武美: ディーゼル排ガスの変異原性, 特集/大気汚染物質の毒性. トキシコロジーフォーラム, **6**, 335-355 (1983)

血清中の催奇形性活性測定法の開発と宿主経由催奇形性活性および胎仔致死活性の *in vitro* 試験法に関する研究

療 品 部

〔目的〕

第一次の研究報告では, ethylenethiourea (ETU) をモデル化合物として, 全胚および胚細胞培養系で, その作用を比較し, 全胚培養で検出された形態形成阻害作用は, 胚細胞での分化阻害作用として検出できることを明らかにした¹⁾. さらに, thiabendazole (TBZ) を投与したマウスで発生した四肢奇形について, 肢芽細胞分化培養系を用いて, その原因物質²⁾と催奇形性発現機構³⁾について明らかにした.

第二次の本研究では, 化学物質等の生殖毒性の予測やヒト暴露量を推定する上で重要な試験法である血清中の催奇形性活性測定法の開発⁴⁾と宿主経由催奇形性活性および胎仔致死活性の *in vitro* 試験法⁵⁾

に関する研究を行ったので報告する.

〔実験方法, 結果, 考察〕

1) 宿主経由催奇形性活性の測定法の確立⁴⁾

妊娠 11 日目のラットに ETU を 50-200 mg/kg 経口投与した. コントロール群には, 蒸留水を同様に 11 ml/kg 与えた. 各群 2-3 匹ずつ使用し, 投与後 18 時間目に胎仔を取り出し, 中脳 (MB) 細胞および肢芽 (LB) 細胞を調製し, コントロール群および ETU 投与群共に, 同数の細胞をスポットし 5 日間培養した. 培養後, 培地を捨て, 各 well 内で分化発現した foci の数を数えた. ETU 投与群で生成した foci は, コントロール群で生成した foci を 100% とした時の相対的な割合で示した (図 1).

MB および LB 細胞共に, ETU 投与量の増加と共に, 細胞分化が阻害された. さらに, MB 細胞は, LB 細胞に比べ強く阻害された. ラットは, 頭部および指の奇形が発生し, 肢芽に比べ神経管の方が低用量で奇形を発生する *in vivo* での結果と良く相関している⁶⁾.

図 1 の MB の式より, 20% 阻害を示す ETU の投与量は, 14.5 mg/kg である. Khera ら⁷⁾ の *in*

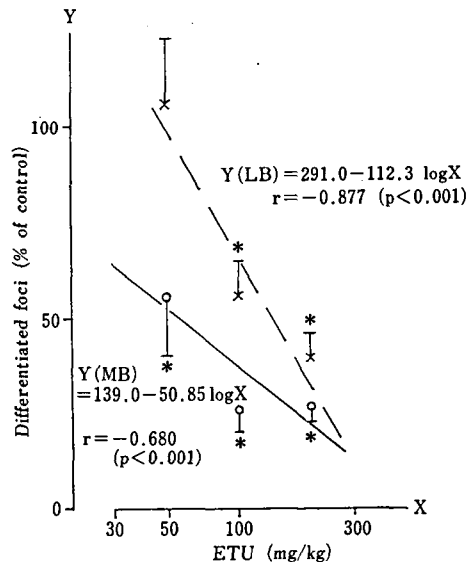


図 1 エチレンチオ尿素の宿主経由催奇形活性の検索

*, コントロール群と統計的に有意差有 ($p < 0.001$)
 コントロール群の中脳および肢芽細胞での分化 foci の数は各々 163 ± 13 および 185 ± 19 であった.
 ○, MB 細胞培養系; ×, LB 細胞培養系

vivo 実験では、30 mg/kg 投与した時、神経系への ETU の影響を認めたが、15 mg/kg では、影響がなかったと報告している。したがって、細胞培養で検出される 20%未満程度の阻害は、胎仔が出生するまでに回復すると考えられる。

以上の結果より、細胞培養系では、薬物の作用を鋭敏に検出できること、また、少ない動物数で、*in vivo* と良く相関する作用を短期間で定量的に検出できることを明らかにした。

2) 血清中の催奇形性活性測定法の開発⁴⁾

ETU は 50 mg/kg (単回投与) で、明らかに頭部の奇形をラットで誘発するが、マウスでは、800 mg/kg (連続投与) 与えても奇形仔の発生を認めず、両動物種での著しい種差が知られている。この原因を明らかにするために、血清中の催奇形性活性を測定する方法を開発し、種差の解明に応用した⁴⁾。

ラットおよびマウス MB 細胞培養系に ETU を直接加え、神経分化阻害活性を両動物種で比較した。マウス MB 細胞において ETU による 50%分化阻害濃度はラット MB 細胞での阻害濃度の 11 倍高い値を示した。この結果より、ETU の神経分化阻害作用は、マウスの細胞に比べ、ラットの細胞において、強い阻害作用を示すことが明らかになった。

次に、ラット MB 細胞培養系を用いて、ETU 投与したラット血清およびマウス血清の試料を試験した。ETU が最高血中濃度を示す投与後 2 時間目に、血液を採取し、速やかに血清試料を調製した⁴⁾。ラット試料では、投与量の増加に応じて細胞分化阻害活性が検出された。また、マウスに 200 mg/kg 投与した時の血清試料でも、強い分化阻害活性が認められた。

一方、マウス MB 細胞培養系を用いて、ETU 200 mg/kg 投与したラットおよびマウス血清の試料を試験した。血清試料は投与後 2 時間目に採取した血液から調製した。マウス MB 細胞培養系では、ラットおよびマウス血清共に、コントロール群との間で有意な差は認められなかったこと⁴⁾より、マウス MB 細胞では、ラットおよびマウス血清共に分化阻害活性を示さないことが明らかになった。

血清試料中の ETU 量を測定した結果⁴⁾、ラットでは、投与量に比例して、血清試料中の ETU 量が増加した。マウスでは、200 mg/kg 投与した時、ラットの値の 2 分の 1 程度であった。

以上の結果より、ETU による催奇形性の著しい種差は、第一に、ETU の神経分化阻害作用に対す

る感受性が、ラット MB 細胞 (高感受性) と、マウス MB 細胞 (低感受性) では著しく異なること、第二に、マウスでは、ラットに比べ、ETU の代謝が速く胎仔に移行する ETU 量が少ないことが原因である。

3) 胎仔致死活性 *in vitro* 試験法の確立⁵⁾

15 種の除草剤を妊娠ラットの器官形成期に投与し、*in vivo* での胎仔致死活性と MB 細胞および LB 細胞での分化および増殖阻害活性、さらに、樹立細胞株での細胞毒性の強度を比較した。

15 種の除草剤はいずれも催奇形性を認めなかったが、多くの化合物は、胎仔致死作用を示した。各化合物の胎仔致死作用の強度は非常に異なり、致死発生最小投与量は 0.2 mg/kg から 200 mg/kg の範囲であった。

MB および LB 細胞での IC₅₀ (50%阻害濃度) は、胎仔致死発生の最小投与量 (Lowest embryolethal dose) の値と相関性を認めなかった。

胎仔致死作用の強度と良く相関する *in vitro* 試験法を確立するために、我々は、V79 コロニー形成阻害試験法を用いることとした。第一の理由として、単離細胞がコロニーを形成する過程は初期胚の増殖過程に類似していると考えたこと、第二の理由として、細胞株を使用する方法は、動物代替法として優れているからである。

胎仔致死作用を感度高く検出するために、改変培地である 5%FCS-MMEM 培地を使用した。この培地は、10%FCS-MEM 培地と比較すると一般的に高感度培地であることが我々の研究⁶⁾より明らかになった。

種々の除草剤を V79 コロニー法で試験した結果、コロニー法で得られた IC₅₀ は、MB および LB 細胞での IC₅₀ に比べ、低濃度の値を示した。さらに、carboxylic acid ester タイプの除草剤は、生体内で容易に加水分解されていくことが予想されるので、肝 S9 画分をコロニー法の試験系に加えた。

コロニー法での *in vitro* 試験結果と *in vivo* での胎仔致死作用の強度との相関性を明らかにするために、両対数グラフにプロットした (図 2)。

carboxylic acid ester タイプの化合物は、S9 存在下で試験した結果もプロットし、相関係数を求めた結果、 $r=0.82$ という良好な結果が得られた。

したがって、コロニー形成阻害試験は、胎仔致死作用を検出する *in vitro* 試験系として優れた方法であるといえる。コロニー法が胎仔致死作用と良く相

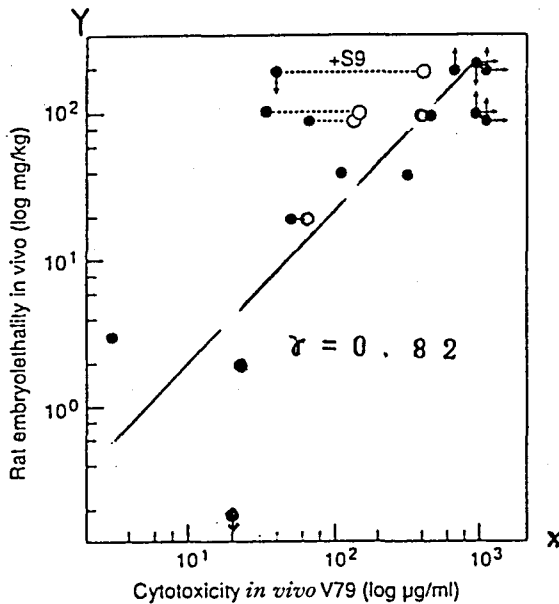


図2 除草剤の *in vivo* 胎仔致死作用を発現する最小投与量と V79 コロニー形成阻害強度との相関性

●; S9 非存在下, ○; S9 存在下.

関することを我々が初めて明らかにした⁵⁾。

種々の化学物質での催奇形性予測を高い確立で行うには、細胞と化学物質との単純な接触のみならず、化学物質の吸収、代謝、胎盤通過等の一連の動的な過程が考慮された胎仔への影響を、検出できる *in vitro* 試験法を確立する必要がある。

そのために、宿主経由催奇形性活性測定を検討を行った。化学物質が直接胎仔に影響を与えなくても、例えば、血流量を低下させる化学物質も催奇形性を誘発する可能性が示唆されている。宿主経由催奇形性活性検出法を応用すれば、化学物質の二次的な影響による催奇形性誘発物質も予測できるものと考えられる。

我々は、さらに、血清中の催奇形性活性を測定する方法を開発した⁴⁾。血清中の催奇形性活性測定については、Chatot ら⁹⁾は、ヒト血清をラットの全胚培養系に加え血清中の催奇形性活性の測定を試みている。彼らの方法には、いくつかの短所がある。まず第一には、コントロールのヒト血清で、ラットの全胚を培養した時、高頻度 (10~29%) で形態異常を認めた。第二に、血清中の補体成分が混在しているため、56°C、30 分間の加熱処理をし、補体成分の不活化を行った血清を培養系に加えている。熱

に不安定な化合物は、化学変化を受けるため、正確な催奇形性活性の測定は出来ないことが指摘できる。我々は、これらの問題を解決するために、加熱せずに、補体成分を除去し、その血清試料を細胞培養系に加える方法を開発した⁴⁾。

細胞培養による催奇形性試験法¹⁰⁾を用いて、我々は既に、ビタミン A 類縁体の lowest teratogenic dose と細胞分化阻害強度の指標である IC50 とが良く相関すること ($r=0.81$)¹¹⁾、また、種々の制癌剤等の lowest teratogenic dose とヒト胎児由来細胞の増殖阻害強度も良く相関すること ($r=0.82$)¹²⁾ も明らかにしている。

今後、家庭用品や医用材料に含まれる種々の化学物質等に適用し、定量的な毒性評価や、予測性が可能なシステム作りを目指していく予定である。

参考・発表報文

- 1) Tsuchiya, T., Takahashi, A., Asada, S., Takakubo, F., Ohsumi-Yamashita, N. and Eto, K.: *Teratology*, 43, 319 (1991)
- 2) Tsuchiya, T., Tanaka, A., Fukuoka, M., Sato, M. and Yamaha, T.: *Chem. Pharm. Bull.* 35, 2985 (1987)
- 3) Tsuchiya, T., Hisano, T., Tanaka, A. and Takahashi, A.: *Toxicol. Lett.* 38, 97 (1987)
- 4) Tsuchiya, T., Nakamura, A., Iio, T. and Takahashi, A.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* (1991) in press
- 5) Tsuchiya, T., Bürgin, H., Tsuchiya, M., Winternitz, P. and Kistler, A.: *Arch. Toxicol.* 65, 145 (1991)
- 6) Teramoto, S., Shingu, A., Kaneda, M. and Saito, R.: *Cong. Anom.* 18, 11 (1978)
- 7) Khera, K. S.: *Teratology*, 39, 277 (1989)
- 8) Tsuchiya, T., Ikarashi, Y., Toyoda, K., Uchima, T., Miyahara, T., Takahashi, M. and Nakamura, A.: *JAERI-memo*, 161 (1991)
- 9) Chatot, C. L., Klein, N. W., Piatek, J. and Pierro, L. J.: *Science*, 207, 1471 (1980)
- 10) 土屋利江: 生殖・発生毒性試験, 細胞培養, p. 273, 細胞トキシコロジー試験法 朝倉書店 (1991)
- 11) Kistler, A., Tsuchiya, T., Tsuchiya, M. and Klaus, M.: *Arch. Toxicol.* 64, 616 (1990)
- 12) 土屋利江: *In vitro* 催奇形性試験-embryo を用いる実験, *ファルマシア*, 26, 1126 (1990)

食品等に存在しているマイコトキシンに関する研究 小型菌核形成 *Aspergillus flavus* について

生薬部

aflatoxins 生産菌である *Aspergillus flavus* には小型菌核を多数形成する特異な菌株が存在し aflatoxin B, G の両グループを生産することが知られている。また、この菌核中には痙攣性インドール代謝産物として aflatrem (ATM), dihydroxyaflavinine (DAV), cyclopiazonic acid が含まれることが報告されている¹⁾。

われわれは、1986年にインドネシア産伝承薬 79 試料のカビ汚染調査を行い 48 試料から 103 株の *A. flavus* を検出した^{2,3)}。さらに、これらのうち 4 株が小型菌核形成株と同定されたので、そのうちの 1 菌株 (IAF-34) について痙攣性マイコトキシンの生産性を研究した。その結果、既知の *A. flavus* 代謝産物である ATM, DAV, aflavinine (AV), paspalinine (PSLN) に加えて、新規のインドロジテルペン化合物として monohydroxyaflavinine (MAV) と monohydroxyisoaflavinine (MisoAV) を単離したのでその化学構造を、MS, IR, UV, NMR, X-ray などの機器解析により決定した⁴⁾。次いで上記 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受けた同じ菌学的な性質を有する 3 株 (NRRL) の計 7 株について ATM およびその関連インドロジテルペン化合物の生産性を定量的に検討した⁵⁾。

(実験方法)

A. flavus (IAF-34) は Czapek-Yeast 寒天培地を用いて 34°C, 3 週間培養した後、菌核をかき集めジクロルメタン抽出した。ジクロルメタンエキスを

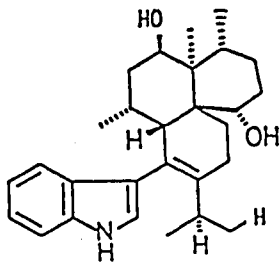
シリカゲルカラムクロマトグラフィーに付しアセトン流出部をメタノールで結晶化し dihydroxyaflavinine を得た。非極性画分について低圧液体クロマトグラフィーを行い aflavinine, aflatrem, paspalinine, ergosterol, monohydroxyaflavinine (1) (mp 161~162°C), monohydroxyisoaflavinine (2) (mp 146~148°C) を得た。

IAF 4 株および NRRL3 株の培養ならびに抽出は上記と同様の方法で行い試験エキスとした。定量は高速液体クロマトグラフィーで下記の条件で行った。カラム: Nucleosil 50-10, 4×600 mm カラム温度: 40°C。移動相: 水飽和クロロホルム-シクロヘキサン-クロロホルム-アセトニトリル-エタノール (200:200:50:1:1)。流量: 0.9 ml/min。検出: UV 275 nm。分析に使用した ATM, AV, PSLN, MAV, MisoAV および DAV の標準品は IAF-34 株の代謝産物として単離精製したものをを用いた。また, emindole SB (EMSB) および paspalinine (PSN) は *Emericella striata* 80-NE-22 株の代謝産物研究において単離精製したものをを用いた。

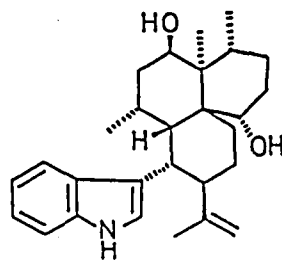
(実験結果と考察)

小型菌核形成 IAF-34 株の新規インドロジテルペン化合物の構造式を Fig. 1 の (1), (2) と決定した。各種スペクトルデータを Table 1 に示す。

ATM 以下 8 種類のインドロジテルペン化合物について分析を行った結果を Table 2 に示した。供試した 7 菌株は、いずれも ATM の生産性を有すること、また IAF-44 株をのぞいた 6 菌株に、ATM の生合成前駆体と考えられる EMSB, PSN, PSLN と DVA およびその関連化合物としての AV, MAV, MisoAV の 7 種類の化合物が生産されることが明らかになった。また、今回の結果から *A. flavus* の菌核中に ATM, PSLN の生合成前駆体と



Monohydroxyaflavinine (MAV) (1)



Monohydroxyisoaflavinine (MisoAV) (2)

Fig. 1. Chemical structures of monohydroxyaflavinine (1) and monohydroxyisoaflavinine (2)

Table 1 Spectradata of monohydroxyafllavinine (1) and monohydroxyisoafllavinine (2)

	monohydroxyafllavinine (1)	monohydroxyafllavinine (2)
mp	161~162°C	146~148°C
$[\alpha]_D^{25}$	+64°C (c=0.08, MeOH)	+56°C
IR $\gamma_{\text{Max}}^{\text{KBr}}$ Cm^{-1}	3470sh, 3420, 3310, 1705	
UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm	224(4.63), 277sh(3.93), 283(3.96),	226(4.33), 283(3.63), 291(3.60)
(log ϵ)	291(3.93)	
EI-MSm/z	421.2979(M ⁺ , 421.2979 for C ₂₈ H ₃₉ NO ₂) 403(M-H ₂ O), 130	421.2985(M ⁺ , 421.2979 for C ₂₈ H ₃₉ NO ₂) 403(M-H ₂ O), 130
Anal. Calcd for C ₂₈ H ₃₉ NO ₂	C, 77.62; H, 9.46; N, 2.92	
	Found: C, 77.63; H, 9.56; N, 2.98	
¹ H-NMR(CDCl ₃) δ	0.83, 0.96, 1.01, 1.16, 1.20~1.33, 1.29, 1.51, 1.71~2.00, 2.03~2.25, 2.48, 2.59, 4.40, 4.49, 6.91, 7.09, 7.20, 7.38, 7.41, 8.04	1.05, 1.22, 1.27, 1.32, 1.55, 1.64, 1.68~2.03, 2.06~2.28, 2.68, 3.17, 3.66, 3.97, 4.67, 4.80, 4.84, 7.05, 7.11, 7.18, 7.34, 7.52, 7.92
¹³ C-NMR (DMSO-d ₆) δ	13.16, 19.07, 19.21, 19.93, 20.50, 21.53, 27.22, 26.69, 29.77, 30.14, 30.29, 30.86, 35.37, 38.13, 42.86, 43.96, 67.93, 69.43, 111.39, 116.53, 118.26, 118.40, 120.60, 121.82, 125.41, 126.89, 135.83, 139.59	13.36, 18.17, 19.28, 22.32, 24.18, 27.08, 27.24, 29.92, 30.56, 30.88, 33.85, 37.62, 38.29, 42.58, 43.66, 45.31, 66.05, 69.48, 110.80, 111.36, 114.56, 117.29, 118.14, 120.51, 123.30, 126.93, 135.83, 149.87

Table 2. Production of indoloditerpenes by microsclerotium-producing strains of *Aspergillus flavus*

Strain	Indoloditerpenes* ¹ ($\mu\text{g/g}$)* ²							
	ATM	EMSB	PSN	PSLN	DAV	AV	MAV	MisoAV
IAF-32	3009	367	1852	418	34941	2265	1604	856
IAF-34	2286	356	2341	331	18529	3700	722	682
IAF-44	149	ND* ³	ND	21	1092	75	52	16
IAF-62	2313	2607	1510	159	35639	5325	1608	985
A-11612	155	477	515	23	6662	185	213	69
NRRL 3251	553	115	1306	9	7481	2170	93	127
NRRL 6444	533	951	746	1263	19777	4304	1099	1407

*¹ ATM: aflatrem, EMSB: emindole SB, PSN: paspaline, PSLN: paspalinine, DAV: dihydroxyafllavinine, AV: aflavinine, MAV: monohydroxyafllavinine, MisoAV: monohydroxyisoafllavinine.

*² Amounts ($\mu\text{g/g}$) of indoloditerpenes in dried weight of the sclerotia.

*³ ND: not detected (detection limit: 1 $\mu\text{g/g}$).

して2種類の代謝産物 EMSB, PSN の存在が初めて認められた。これらの定量値を見ると小型菌形成性 *A. flavus* の菌に含まれる二次代謝産物の主体は ATM よりむしろ DAV と思われる。今後は *A. flavus* による汚染については aflatoxins に加えてこれら痙攣性マイコトキシンについても研究を進める必要が有るものと考えられる。

痙攣性インドロジテルペン化合物の毒性発現機構に関連するものとして、モルモットの摘出回腸を用いた B. Loenders らの報告がある。それによると化学構造上 ATM と同一の骨格を有する Paxilline は、コリンエステラーゼ阻害活性を示さず、シナプス間隙での多量のアセチルコリン取り込みによるコリナージックな作用をしめすことが観察されている⁶⁾。

我々も現在ATM等について *in vitro* での研究を進行中である。

参考・発表報文

- 1) Wicklow, D. T., Cole, R. J.: *Can. J. Bot.*, **60**, 525 (1982)
- 2) 成田紀子, 鈴木明子, 宇田川俊一, 関田節子, 原田正敏, 青木伸實, 田中敏嗣, 長谷川明彦, 山本進, 戸矢崎紀紘, 松田良夫: マイコトキシン, **27**, 21 (1988)
- 3) 田中敏嗣, 長谷川明彦, 山本進, 青木伸實, 戸矢崎紀紘, 松田良夫, 宇田川俊一, 関田節子, 成田紀子, 鈴木明子, 原田正敏: マイコトキシン, **28**, 33 (1988)
- 4) Koohei Nozawa, Setsuko Sekita, Masatoshi Harada, Shun-ichi Udagawa and Ken-ichi Kawai: *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 626 (1989)
- 5) 田中敏嗣, 長谷川明彦, 青木伸實, 山本進, 宇田川俊一, 関田節子, 原田正敏, 野沢幸平, 河合賢一: マイコトキシン, **30**, 19 (1989)
- 6) Moss I. Selala, Gert M. Laekeman, Brigitte Loenders, Adrien Musuku, Arnold G. Herman and Paul Schepens: *J. Natural Products*, **54**, 207 (1991)

アフラトキシン M₁ のアフィニティーカラムを用いた微量定量法の開発

食 品 部

〔目的〕

アフラトキシン M₁ はアフラトキシン B₁ 混入餌を摂取した乳牛の乳中に carry-over として混入して来る B₁ の代謝物であり, 100 ppt 以下の量含まれる場合もある。我が国に於けるアフラトキシンの公定分析法¹⁾ および薬学会公定法^{2,3)} は, アフラトキシンを溶媒抽出しシリカゲルカラムまたはフロリジルカラムで精製後, TLC または HPLC を用い蛍光測定する方法である。しかしこれらの方法は繁雑かつ分析に長時間を要するため, より簡易な分析方法の開発が望まれ, Cup を用いた ELISA 法⁴⁾ 或はアフィニティーカラムを用いた HPLC 法⁵⁾ が登場した。前者は AOAC の公定法となっているが, 後者のアフィニティーカラムを用いた方法はまだ確立された方法とはいえない。

本研究では, 入手しやすい市販のアフィニティーカラムを用いより簡便かつアフィニティーカラムの繰り返し使用が可能な新しい分析法を考案した。

〔実験方法〕

アフィニティーカラムの調整:

OXOID Ltd. 製の Aflatoxin M₁ EASI-EXTRACT カラムを用い, 使用前に 10 ml の PBS で洗浄する。使用後は繰り返し使用に共する為 1 ml の DMSO-pH 7.0 25 mM 磷酸緩衝液 (1:1) を流し, 水 10 ml で 3 回, PBS 10 ml で 1 回洗浄する。

HPLC 条件:

HPLC: 島津製 LC9A, 検出器: 島津製蛍光検出器 RF-530

カラム: Hibar Lichrosorb RP-18 5 μm × 12.5 cm

移動相: 水・アセトニトリル・メタノール (60:30:10)

流速: 0.2 ml/min, 検出波長: Ex 360 nm, Em 435 nm

抽出精製法:

抽出は文献の方法⁵⁾ を改良し, 精製は新方式で行った。即ち粉乳試料の場合 10 g を採り温水 60 ml を加え, 50°C にて 30 分間攪拌溶解後室温に冷却する。水にて 100 ml とした後 3500 rpm で 20 分間遠心分離し, 上層の脂肪を除く。全脂粉乳の場合は再び 3500 rpm で 20 分間遠心分離し, 上層の脂肪を除く。いずれの場合も中間層の 20 ml を採りアフィニティーカラムに流し込み, カラムは水 5 ml で 4 回洗い, DMSO-磷酸緩衝液 2 ml で溶出する。最初の 0.5 ml を捨て, 次の 1.5 ml を集める。その 50~100 μl を HPLC に注入し定量する。

〔実験結果〕

1 ppb 濃度の M₁ 標準溶液をアフィニティーカラムに添加し, M₁ を溶出後カラムを洗浄調整し, 再添加を繰り返し行い回収率を調べたところ, 9 回目まではほぼ 100% の回収率が得られた。一方 M₁ 1 ppb 添加全脂粉乳または脱脂粉乳を用いて同様に繰り返し実験を行った場合, 6 回目まではほぼ 100% の回収率が得られ, 7 回目以降は回収率が低下した。

〔まとめ〕

アフラトキシン M₁ を市販のアフィニティーカラムにより精製後, HPLC にて定量する簡易法を開発した。本法の特徴はアフィニティーカラムを繰り返し 6 回使用可能な点にある。また本法の検出限界は粉乳当り 0.05 ppb (50 ppt) で, 牛乳当りでは 0.005 ppb (5 ppt) になる。本法は食餌中アフラトキシン B₁ の牛乳中への移行およびその動態研究に極めて有用である。

参考報文

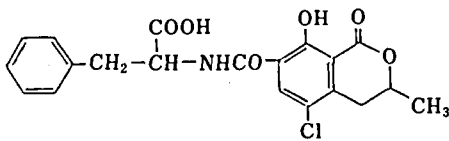
- 1) 厚生省食品衛生課長通知, 環食 128 号 (1987)
- 2) 日本薬学会編: 乳製品試験法・注解, 107 (1984) 金原出版
- 3) 日本薬学会編: 衛生試験法・注解, 404 (1990) 金原出版
- 4) AOAC Official Methods of Analysis, 15th Edition, 1st Supplement, 48 (1990)
- 5) D. N. Mortimer, J. Gilbert, M. J. Shepherd, J. Chromatogr., 407, 393 (1987)

複数の mycotoxin 分析

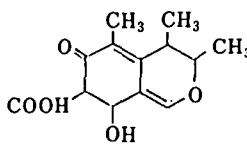
食品部

高温多湿の日本の気候風土はかびの生育に適している。したがって食品等がかびに汚染される機会が

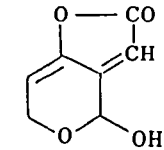
多い。現在までにかびから単離されたかび毒 (mycotoxin) の数は約 200 種といわれている。それらの中には強い急性毒性と発癌性の強いことで知られる aflatoxin B₁ がある。ヒトおよび家畜類は日常食品を介してかびに汚染された食品を摂取する可能性は充分考えられることである。アフリカにおいて aflatoxin B₁ の摂取量と肝癌発生に高い正の相関が認められており、かびの存在は国内産の食品および輸入食品を問わず食品衛生上危惧される問題である。現在食品衛生における行政面の対応は aflatoxin B₁ についてのみ食品中の暫定許容限度が示されているに過ぎない。食品がかびに汚染される場合、複数のかびにより汚染されたり、また 1 種類のかびが複数の mycotoxin を産生し複合汚染をひきおこすこともある。今回食品および飼料に於ける汚染が懸念されているものを対象に複数 mycotoxin の同時分析法の開発につき検討を加えた。



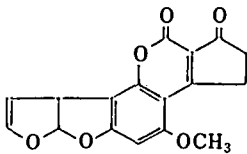
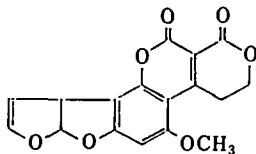
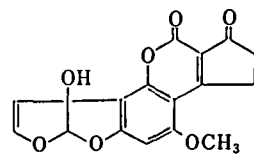
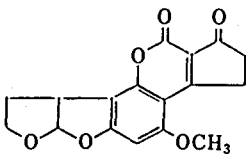
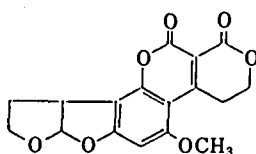
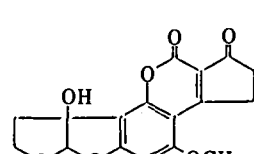
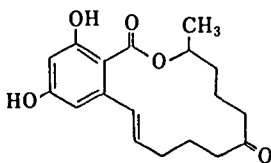
Ochratoxin A



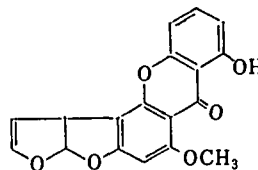
Citrinin



Patulin

Aflatoxin B₁Aflatoxin G₁Aflatoxin M₁Aflatoxin B₂Aflatoxin G₂Aflatoxin M₂

Zeranolone



Sterigmatocystin

Fig. 1. Chemical structures of mycotoxins

(実験方法)

1. 装置

ポンプ：日立 635 形，検出器：UV 日立 655 型，
記録計：D-6000, D-2000

2. 試料の調製

Fig. 1 に示す mycotoxin 類を含む食品全量を粉砕し，円錐四分法で縮分し 50 g ずつの試料をとり Fig. 2 に示す方法で分析し得られた methanol 溶液中の mycotoxin 類を HPLC により定量した。

3. HPLC

a) column: Yanapak ODS-T 4 mm, id, 250 mm eluent: acetonitrile-water-methanol (33-62-5)

b) column: Yanapak ODS-T 4 mm, id, 250 mm eluent: acetonitrile-water-acetic acid (55 : 45 : 2)

4. 確認

検出した各ピークはダイオードアレー検出器の装備された HPLC と薄層クロマトグラフィー (TLC) により確認した。HPLC による確認は当該ピークの吸収スペクトルを呼び出し標準液のスペクトルと比較することによった。TLC 法は当該 R_f 値部分のスポットを分取し，chloroform に溶解し，脱水後濃縮し benzene-acetonitrile (98-2) 溶液とし再 TLC を行い各々の mycotoxin 類を呈色反応により確認した。

HPLC condition

column: ODS-T 4 mmφ×250 mm
eluent: acetonitrile-water-methanol (33 : 62 : 5), acetonitrile-water-acetic acid (55 : 45 : 2).

TLC condition

silica gel 60 plates
group. 1: chloroform-methanol-water-formic acid (90 : 10 : 1 : 1)

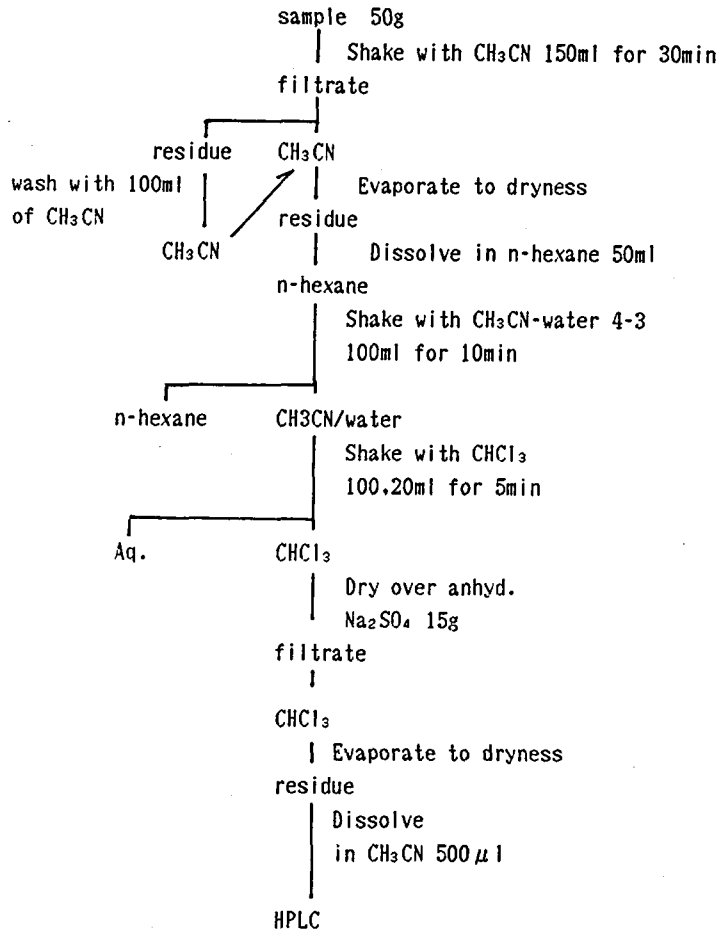


Fig. 2. Analytical procedure for Mycotoxins

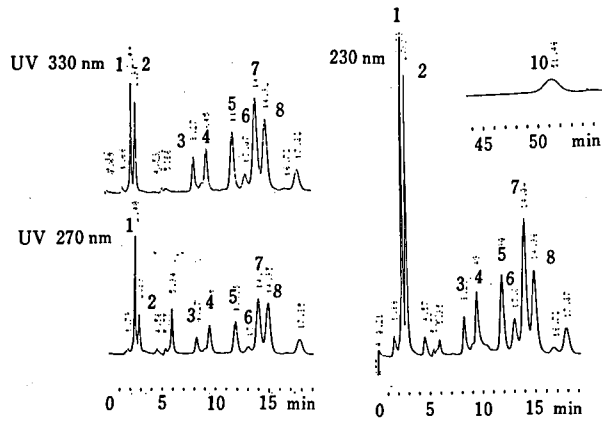


Fig. 3. High-performance liquid chromatogram of citrinin, ochratoxin A, aflatoxins, patulin and zearalenone.

Peak numbers were same as shown in Fig. 4.

[実験結果と考察]

Fig. 1 に示す mycotoxin 類による複合汚染を想定した試料について HPLC による分離検出を検討した。

1. HPLC 用試料の調製

Fig. 2 により 11 種類の mycotoxin 類を含む HPLC 用試料を調製した。

2. HPLC

11 種類の mycotoxin は何れも Yanapak ODS-T 4 mm, id×250 mm の column による reversed phase により分離検出が可能であった (Fig. 3~4)。acetonitrile-water-methanol (33:62:5) を移動相とした HPLC では UV 330 nm で citrinin, ochratoxin A, aflatoxin M₁, M₂, B₁, B₂, G₁, G₂ の 8 種類の mycotoxin を検出し, UV 270 nm で patulin, 230 nm では保持時間 51 分に zearalenone が検出できる。また acetonitrile-water-acetic acid (55:45:2) を移動相とした HPLC では UV 240 nm および 330 nm で sterigmatocystin が検出できた。なお各々の mycotoxin の検量線は Fig. 5 に示すとおりであった。

3. TLC

silica gel plates を使用し normal phase による TLC を行った。

chloroform-methanol-water-formic acid (90:10:1:1) で展開した aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂, ochratoxin A, patulin, citrinin, および fusarenon の R_f 値は Fig. 6 に示すとおりであった。Fig. 2 に示す mycotoxin 11 種類を corn に 50 ppb 添加

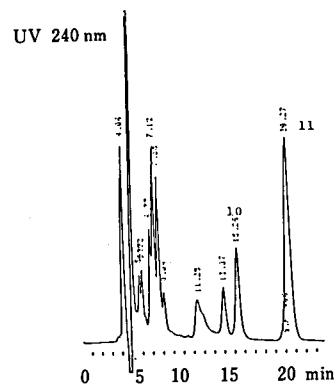


Fig. 4. High-performance liquid chromatogram of zearalenone and sterigmatocystin.

1. citrinin
 2. ochratoxin A
 3. aflatoxin M₂
 4. aflatoxin M₁
 5. aflatoxin G₂
 6. aflatoxin G₁
 7. aflatoxin B₂
 8. aflatoxin B₁
 9. patulin
 10. zearalenone
 11. sterigmatocystin
- HPLC condition
sample solvent: methanol
eluent:

Fig. 3 acetonitril-water-methanol (33-62-5)

Fig. 4 acetonitril-water-acetic acid (55-45-2)

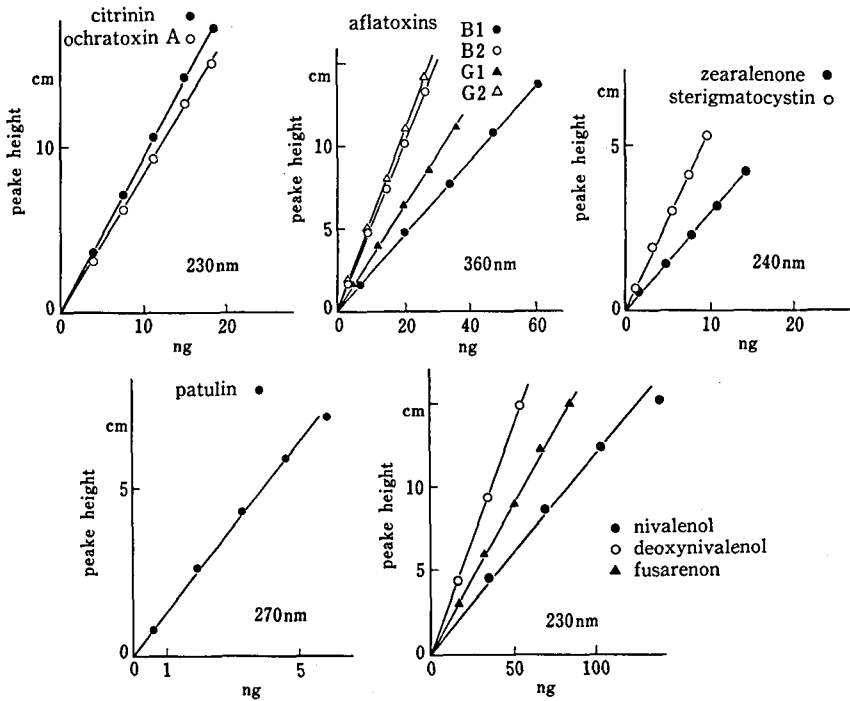
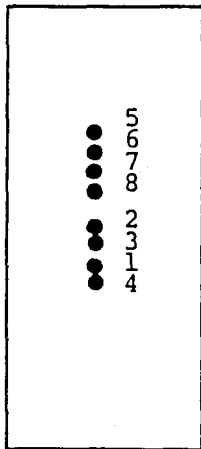


Fig. 5. Calibration curve of mycotoxins by HPLC



1. citrinin
2. ochratoxin A
3. patulin
4. fusarenon
5. aflatoxin B₁
6. aflatoxin B₂
7. aflatoxin G₁
8. aflatoxin G₂

Fig. 6. Mycotoxins on developed TLC plate.
Developing solvent:
chloroform-methanol-water-formic acid (90-10-1-1)

し回収実験を試みたところ何れも70%以上回収できた。

食品等に存在しているマイコトキシンに関する研究

衛生微生物部

輸入食品等におけるマイコトキシン汚染はアフラトキシンが中心であるのに対し、国産農作物では赤かび病菌 *Fusarium graminearum* に起因するトリコテセン系マイコトキシンのニバレノール (NIV)、デオキシニバレノール (DON) やゼアラレノン等による汚染が問題となる。当部においては1988年～1990年の間に国産オオムギを対象に汚染原因菌を含めた菌学試験と、地研との協同研究に基づき、ECD-GCによるトリコテセン分析試験を実施した。対象オオムギはほぼ同一地域で採取したもので、1988年産24点、1989年度産17点、1990年度産21点の合計62点である。

3ヶ年の調査においてNIVによる汚染が恒常的にみとめられ、1988、1989、1990年での陽性検体での平均検出濃度は、それぞれの0.50 ppm、2.58 ppm、3.58 ppmで、最高23.2 ppmのものも存在した。DONでは1988、1989、1990の各年度の試料で、それぞれ0.34 ppm、0.54 ppm、1.03 ppmであった。NIVの前駆体とみなされるフザレノン

Xは検出頻度が低く、62点中8点より検出され、陽性試料での平均検出濃度は0.24 ppmであった。

同一地域における採取試料の年次別のトキシシン汚染濃度の差は、気象条件の相違による圃場での汚染原因菌の発症との相関が示唆され、菌学試験による *Fusarium* 感染率では1988年、1989年、1990年でそれぞれ4.2%、7.9%、22.4%を示した。とくに1990年においてはオオムギ開花期における降雨量の増大がムギ類赤かび病の発症をもたらしたと推測される。NIV、DONなどのトリコセセン類の検出には従来TLC、ECD-GCなどによるクロマトグラフィが適用されているが、検出感度、操作性の繁雑さなどの点で改善が求められていた。より簡便なモノクローナル抗体による免疫化学的な検出法が当所機能生化学部との協同で開発され、NIVについては従来法に匹敵する検出値が得られることを明らかにしたが、試料をアセチル化する必要性があり、さらに検討を進めることにしている。

ゼアラレノンについてもモノクローナル抗体による試験法が開発され、HPLCでの測定値と対比しつつあるが、0.03~0.4 ppmの汚染物を得た他、分離 *Fusarium* 菌株の単孢子分離株の培養物に対して適用中である。

食品添加物等の微量有害成分に関する研究— ソルビン酸の代謝活性化機構の解明とペルオキシゾーム増殖作用について

代謝生化学部

(目的)

ソルビン酸 (2,4-hexadienoic acid) は短鎖の脂肪酸で、食品の保存剤として広く使用されている。低毒性で変異原性を示さないが、15%ソルビン酸食投与によりマウスに肝癌を誘発することが報告されている。ソルビン酸投与量に依存して肝内の還元型グルタチオンの減少が起こるとの報告 (Tsuchiya and Yamaha (1984) *Mutation Res*, 130, 267~272) から、肝細胞内の酸化ストレスの増大が発ガン機構に関連している可能性が考えられた。本研究では、酸化ストレス増大を裏付ける (1) ソルビン酸の代謝活性化とグルタチオンとの反応、(2) 代謝活性化に関与する酵素系のソルビン酸投与による選択的誘導、および (3) ペルオキシゾーム誘導を明らかにした。

(実験方法)

ソルビン酸の活性代謝物、3-keto-4-hexenoyl-CoA への変換は、精製酵素を用いた β -酸化の再構成系で検討した。ソルビン酸の CoA エステルを crotonase, 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase および補酵素とともにインキュベートし、差スペクトルを測定して3-keto-4-hexenoyl-CoA の Mg^{2+} -complex の生成を追跡した。3-keto-4-hexenoyl-CoA の SH 化合物との反応は、 Mg^{2+} -complex の吸収の消失とそれに伴う新たな波長の吸収帯の生成を追跡した。

Jcl/ICR マウス (4週齢) は、2~12週間、普通食 (CE-2) または15%ソルビン酸添加食を与えた。ソルビン酸添加食は栄養バランスを考慮し、ソルビン酸以外の脂肪含量を低く調製した。肝単離後ホモジネートを調製し、ソルビン酸代謝酵素活性、ペルオキシゾーム β -酸化活性を測定した。

(実験結果)

(1) ソルビン酸の SH トラップ剤への代謝活性化
ソルビン酸は、天然型の脂肪酸には存在しない2位と4位のトランス二重結合のためにその β -酸化の過程で SH 基との反応が可能な代謝物に変換されることが予想される (Fig. 1)。精製酵素を用いて β -酸化系を再構成し、ソルビン酸の CoA エステルの代謝を検討した。サンプル側のみ最初の段階の酵素を加えて差スペクトルを測定すると、ソルビン酸の CoA エステルに由来する 300 nm 付近の吸収が減少し、同時に 337 nm をピークとする 3-keto-4-hexenoyl-CoA の Mg^{2+} -complex の吸収が出現した。さらに、2 mM の還元型グルタチオンを加えると、337 nm の吸収は消失しそれに伴って 315 nm に吸収極大を持つ新たなピークが出現した。サンプルを限外濾過した後も同様の反応が起こることから、この現象は非酵素的であった。構造が類似し通常の脂肪酸の β -酸化中間体である crotonyl-CoA (4-butenoyl-CoA) から生成した Mg^{2+} -complex では還元型グルタチオンを加えても全くスペクトルに変化は認められなかった。したがって、この現象はグルタチオンによる Mg^{2+} -complex の破壊ではなく、3-keto 基に隣接する4位の二重結合の存在に依存した反応であることは明白であり、3-keto-4-hexenoyl-CoA の5位に SH 基が Michael 付加した新たな物質 (Mg^{2+} -complex) が生成したと推定した。さらに、遊離の CoA を用いても同様の反応が濃度と時間に依存して起きた。

(2) 代謝活性化に関与する酵素のソルビン酸投与

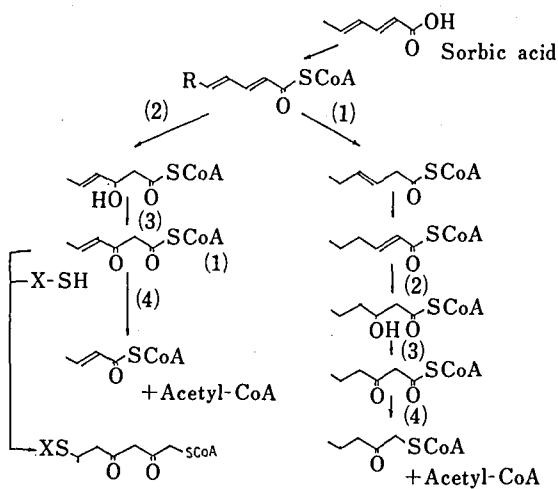


図 1. ソルビン酸のβ-酸化経路：代謝活性化経路とバイパス経路

(1) 2,4-dienoyl-CoA reductase, (2) 2,4-dienoyl-CoA hydratase, (3) 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, (4) 3-ketoacyl-CoA thiolase (1) 3-keto-4-hexenoyl-CoA

による選択的な誘導

肝臓内ではソルビン酸はこの古典的なβ-酸化経路で活性代謝物へと変換されるほかに、活性代謝物生成をバイパスする別の経路でもβ-酸化される (Fig. 1) ことから、両経路のバランスが活性代謝物生成量の鍵をにぎる。肝ホモジネート中の両経路の分岐点にあたる酵素の活性を測定したところ、活性代謝物生成経路の2,4-dienoyl-CoA hydratase 活性はバイパス経路の2,4-dienoyl-CoA reductase に比べて低く hydratase/reductase 比は0.22であった。しかし、15%ソルビン酸食投与により hydratase は3.6倍に誘導されたのに対し、reductase の誘導はわずか1.3倍であった。その結果、hydratase/reductase 比は0.6へと上昇し、大量に与えられたソルビン酸のかなりの量がSHトラップ剤へと代謝されたと推定される。マウスを12週まで飼育してもこの選択的な2,4-dienoyl-CoA hydratase の誘導は継続して見られた。

(3) ソルビン酸投与によるペルオキシゾーム酵素の誘導

遺伝毒性を示さないペルオキシゾーム増殖剤の発ガン機構として過酸化水素生成による酸化ストレスの増大が提唱され、8-ヒドロキシデオキシグアノシンの増加に示されるようなDNAの酸化障害が報告されている。15%ソルビン酸食2週間投与によ

りペルオキシゾームβ-酸化活性は2倍に増加した。この誘導は、12週まで継続して見られた。

〔結論〕

ソルビン酸はそのβ-酸化による代謝分解の過程でSH基と反応性の高い活性代謝物に変換された。肝臓内にはその経路をバイパスする別のβ-酸化経路も存在するが、15%ソルビン酸食投与によって活性代謝物生成経路の酵素のみが選択的な誘導を受けた。これに伴う肝内SHプールの減少がペルオキシゾーム誘導に起因する酸化ストレスを増幅し、発がんへ導いたものと推定される。

発表論文

Tomoko Nishimaki-Mogami, Akira Tanaka, Ken-ichiro Minegishi, and Atsushi Takahashi: Effect of sorbic acid feeding on peroxisomes and sorboyl-CoA metabolizing enzymes in mouse liver. Selective induction of 2,4-dienoyl-CoA hydratase (1991) *Biochem. Pharmacol.*, in press

in vitroでのマウス臓器中の過酸化水素の分解反応に及ぼす系統差の影響

大阪支所食品試験部

空気、水あるいは食品に含まれる過酸化水素 (H₂O₂) は非常に分解しやすい物質であり、人が少量摂取した場合、生体内で速やかに分解するといわれている。しかし、H₂O₂ はカタラーゼの少ないマウスに発癌性がある¹⁾ ことより、食品に使用した場合には残存しないことと規制されている²⁾。我々は第一次の研究結果で白ネズミにおける in vitro で H₂O₂ の分解挙動について報告したが、今回、マウス臓器を用い H₂O₂ の分解反応における系統差の影響を検討した。

〔実験方法〕

臓器：系統の異なる二種のマウス C₃H および C57BL の肝臓、腎臓、十二指腸および血液を用いた。

生体試料液の調製：各種臓器 1g に対して9倍量の生理食塩水を加えホモジナイザーを用いて冷却しながら摩砕したものを生体試料液とした。

1) H₂O₂ の測定：メタリン酸前処理酸素電極法³⁾により測定した。

2) カタラーゼ活性測定法：酸素電極法を用いて、梅本らの方法⁴⁾に準じて行った³⁾。

〔実験結果と考察〕

系統の異なる二種のマウスの各臓器にはいずれもカタラーゼ活性があり、各臓器の活性は肝臓が一番強く腎臓、血液、十二指腸の順に活性が弱くなった。C57BLの方がカタラーゼ活性が弱く、十二指腸では特に弱かった。

白ネズミと同様に1°Cでのマウスの各臓器にH₂O₂を500 µg/g添加した時の分解挙動を測定した結果、肝臓、腎臓では瞬時に分解した。十二指腸ではカタラーゼ活性の弱かったC57BLの方がH₂O₂の分解が遅かった。

参 考 報 文

- 1) A. Ito, M. Naito, Y. Naito, H. Watanabe: *Gann*, 73, 315 (1982)
- 2) 厚生省告示24号, 昭和55年2月20日(1980)
- 3) 辻 澄子, 津村明宏, 中村優美子, 外海泰秀, 伊藤誉志男: *食衛誌*, 28, 196 (1987)
- 4) 梅本 滋, 大橋 実, 宇津木義雄: *東海水研報*, 118, 59 (1985)

ポストカラム誘導体化 HPLC 法による化粧品中のホルムアルデヒドの分析化学的研究

環境衛生化学部

現在、我が国ではホルムアルデヒド (FA) の化粧品への配合は認められていない。しかしながら、欧米では EC Directive により 0.2% まで化粧品への配合が認められている。更に、数種類のホルムアルデヒドドナー化合物も使用されている。

しかし、化粧品にはタンパク質、ペプチド類およびアミノ酸など FA と何らかの interaction を起こすと考えられる成分が配合されている。事実、化粧品種別許可基準では、例えば、シャンプーおよびリンスに L-システインとして 1.5% まで配合が許可されている。従って、これらの成分と FA の反応性を検討することは、FA の安全性を評価する上にも重要なことである。また、ドナー型化合物の FA の遊離性は水溶液とするのみで加水分解を起こし、熱に対しても不安定なものが多い。従来から用いられているアセチルアセトンを用いる比色法では、試験操作中に FA を遊離することも考えられる。一方、ポストカラム誘導体化 HPLC を用いると、室温で FA とドナー化合物本体を同時に定量することができる。第 1 次研究では UV 検出器を利用した

HPLC 法について報告した。今回は、FA および 2-bromo-2-nitro-1,3-propandiol (BNPD) について上記化粧品配合成分との反応および化粧品中の FA の定量法についてポストカラム誘導体化 HPLC 法を用いて検討したので報告する。

1. 実験

1.1 試薬および試料

試薬：全て特級品を用いた。緩衝液は、Britton-Robinson Buffer を用いた。

試料：BNPD (Aldrich 製)、シャンプー、リンス、化粧水は、市販品類似のものを調製して用いた。加水分解コラーゲン液 (K-C)、加水分解コラーゲン樹脂酸縮合物 (R-C) およびヤシ油脂脂肪酸加水分解コラーゲンカリウム液 (Y-C) は種別許可基準規格品を用いた。

1.2 装置および HPLC 測定条件

文献^{1,2)}を参考とし、ポンプ(島津 LC-6A)、可視部検出器 (SPD-6AV)、化学反応槽 (CRB-6A) および記録計 (クロマトパック CR3A) を Fig. 1 に示すように接続して用いた。但し反応コイルは、0.5 mmφ×5 m を用いた。

カラム：CAPCELL PAK C₁₈ SG 120 Å (4.6 mmφ×250 mm)、移動相：0.086% リン酸水素二ナトリウムをリン酸で pH 2.1 とした。

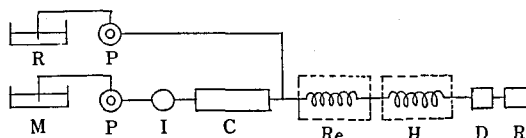
検出器：可視部 420 nm、流速 1.0 ml/min、ポストラベル用アセチルアセトン溶液³⁾ 0.8 ml/min、化学反応槽の温度 90°C。

2. 結果および考察

2.1 ポストカラム誘導体化 HPLC による FA と BNPD のクロマトグラムならびに BNPD の安定性

BNPD 0.02 g を pH 9 の緩衝液に溶解し、20.0 ml とした。これを室内で 24 時間放置し、10 µl を HPLC に注入して得られたクロマトグラムを Fig. 2 に示す。FA と BNPD は完全に分離し、FA と BNPD を同時に定量することができた。

同様に、pH 3, 7 および 9 の緩衝液中の BNPD



M; Mobile phase R; Reagent P; Pump
I; Injector C; Column Re; Reactor
H; Heat exchanger D; Detector
R; Recorder

Fig. 1. Scheme for HPLC equipment

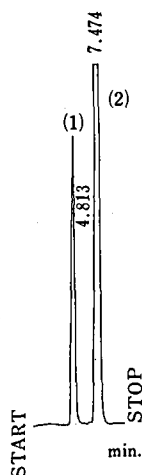


Fig. 2. HPLC Chromatogram of FA(1) and BNP(2)

Operating conditions are described in the text

から遊離するFAを室温および40℃で24時間まで測定した。その結果、pH 9では2時間放置で、40℃ 57.5 μg/ml、室温 52.5 μg/mlのFAを検出したが、pH 3では24時間放置でもFAはほとんど生成しなかった。

2.2 FAとアミノ酸の反応

化粧品の原料として各種のアミノ酸が利用されている。ε-アミノカプロン酸は日焼け、日焼け止め、ローションには0.1%以下、シャンプー、リンスには前述のようにL-システインの配合量が制限されている。

そこで、グリシン、DL-セリン、L-システインおよびε-アミノカプロン酸を2%の割合で前記緩衝液に溶解し、更に0.004%の割合でFAを添加し、試験溶液とした。これを室温および40℃で放置し、24時間までのFAの量を測定した。グリシン、DL-セリン、ε-アミノカプロン酸の場合は、各pH、放置温度および24時間までの放置でもほとんどFAの量は変化しなかったが、L-システインの場合は混合直後でもFAの量は30%以下となり、40℃で24時間後にはほとんど検出されなかった。そこで、シャンプーのように界面活性剤・増粘剤およびコンディショニング剤が含まれている多成分系において、システイン存在時にBNPDから遊離するFAの変化を測定した。0.14%BNPD含有シャンプーに2%の割合でL-システインを添加した場合および0.004%FA含有シャンプーに2%の割合でL-システインを添加した場合の試験溶液を室温および

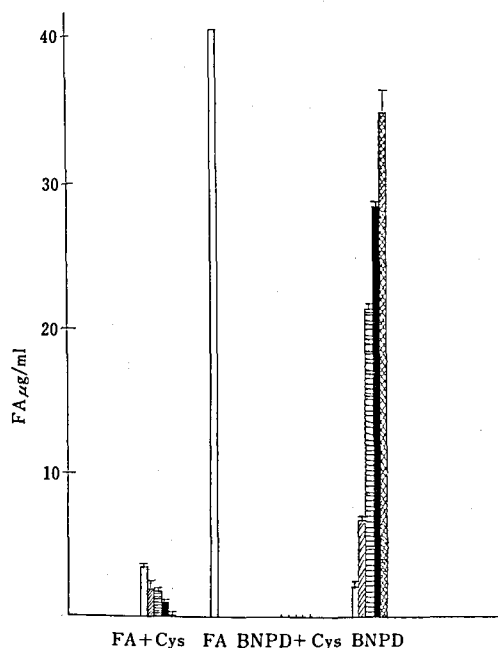


Fig. 3. Interaction of FA, BNPD and L-Cystine in Shampoo

Immediately after mixing
 after 2hr at 40°
 After 2hr at R. T
 After 24hr at 40°
 After 24hr at R. T

40℃で24時間放置し、試験溶液中のFAの量を測定した。その結果、L-システインによってFAが減少していることがわかった (Fig. 3)。このことは、タンパク質のスルフィド基とFAの反応 ($-\text{SH} \xrightarrow{\text{HCHO}} -\text{SH}-\text{CH}_2\text{OH}$) やR-SHがFAと反応して、ジチオアセタールを生成する反応と考えられる。

2.3 FAとペプチド類の反応

化粧品には加水分解コラーゲンやその誘導体が広く利用されている。ここでは3種類のKC (分子量約200, N:6.5%;分子量1000, N:4.7%;分子量2000, N:4.0%), R-C (分子量約600, N:1.8%) およびY-C (分子量約650, N:3.0%)を2%の割合で0.004%FA含有シャンプーに混合し、144時間40℃でインキュベートし試験溶液のFAを測定した。K-Cの分子量1000, R-CおよびY-Cにおいては20時間後においてもFAの変化はほとんど認められなかったが、K-Cの分子量200についてはFAが60%減少し、144時間後においては、更に減少した。K-Cの分子量200は窒素含量が高

く、通常のタンパク質のようにアミノメチロール誘導体ホルミル化体を生成すると考えられた。また、R-C, Y-Cはアミノ基が各々の樹脂酸やヤシ油脂肪酸と縮合しているためFAとの反応は弱いことが推察された。

3. 化粧品中のBNPDの定量

シャンプー、リンスおよび化粧水に0.1%の割合でBNPDを溶解し、試験溶液を調製した。試験溶液を水で希釈し、一定量とし、直ちにポストカラム誘導体化HPLCで測定した。各々の化粧品からはほぼ100%の回収率が得られた。本法は加熱等によって生成するFAも同時に定量することができるので有用な方法である。

4. まとめ

化粧品中のFAやFAドナー化合物と毒性発現の相関性を明らかにするために、化粧品中のFAの存在状態を知ることは重要なことである。化粧品中に添加したFAおよびBNPDと化粧品に利用されるアミノ酸およびペプチド類との反応性について検討した。ポストカラム誘導体化HPLC法を利用することにより全分析過程が室温で行えるので、アセチルアセトン比色法のように測定時にFAの分解の

心配もない。この方法によって化粧品に利用されるアミノ酸、ペプチド類、特にL-システイン、加水分解コラーゲン(分子量約200)液の共存でFAの減少が認められた。この場合、単に窒素含量のみでFAとの反応性を論ずるのは危険であるが、これらの成分が配合された場合は反応生成物についても考慮する必要がある。更に、本法を用いるとFAとBNPDが同時に定量できるので化粧品中のこれらの物質の定量および上記の反応性を論ずるには有用な方法である。また、現在詳細について検討中であるが、トルエンスルホンアミド樹脂のような成分でもFAを遊離する条件を正確に把握することができる。

文 献

- 1) H. Engelhard et al. *Chromatographia*, 20, 559 (1985)
- 2) *Official Journal of the European Communities* NoL 108/192, 28, 4. 90
- 3) 日本薬学会編, 衛生試験法・注解, p. 887(1990) 金原出版

特別研究報告

生体関連反応指標の有意性判定に関する研究

(昭和63年～平成2年)

世話人 機能生化学部 寺尾 允 男

薬物の有効性、安全性など生体に対する影響は、従来、動物モデル及びヒトを用いる系により判定する方法がとられてきた。これら従来の方法は、動物等の個体を用いるため、大がかりな実験系を用い、長期間にわたる研究が要求され、これに要する経費も莫大なものとなる。然るに、最近の分子生物学の目ざましい進歩、あるいは細胞生物学の発展に伴う細胞培養技術の向上などバイオ技術の著しい進歩により、これまで薬物の有効性、安全性など個体レベルで判定していたものが、新しい反応指標を導入することにより分子レベル、細胞レベルなどで、比較的容易にかつ短期間に判定または予測できる方法が開発できるものと考えられる。

本研究は、このような、新しい反応指標に基づく薬物の有効性、安全性の試験法の開発を最終目標としている。このためには、まず、種々の薬物が生体内で起こす諸反応を、分子レベル、細胞レベル、さらに組織レベルで詳細に解明し、それらの反応が個体レベルにおいて薬物が生体に及ぼす影響とどのように関連を持っているかを解明することが必要である。

本研究の第1期3年間では、薬物の生体に及ぼす諸反応を、(1)分子レベルでの反応、(2)細胞レベルでの反応、(3)組織レベルでの反応、(4)個体レベルでの反応の4つの反応に分けて検討し、薬物の有効性、安全性等の評価の指標となり得る反応を見い出すとともに、その指標の有意性を検討することを目的とした。

(1) 分子レベルでの反応指標

マロンジアルデヒド (MDA) は脂質過酸化反応やプロスタグランジン生成過程で生じる C3 化合物であり、食品などにも含まれている場合がある。MDA は DNA 中のグアニン塩基と付加物を形成し

尿中に排泄される。本研究では脂質の過酸化などにより生ずるマロンジアルデヒドの生体に対する障害の一指標として尿中の MDA とグアニン塩基の付加体を還元後、低電位で電気化学的に活性化したのち、電気化学検出高速液体クロマトグラフィーで定量する方法を開発した (食品添加物部)。

(2) 細胞レベルでの反応指標

今日では継代培養可能なヒトおよび哺乳動物細胞の開発が活発に行われており、当所細胞バンクから品質が保証されている多種類の細胞の入手が可能である。培養細胞を実験に用い、薬物の有効性、安全性のスクリーニング、予測あるいは評価を行える系を開発すれば、動物を用いる試験を減らすことが可能となり、動物愛護の観点からのみならず、試験にかける時間及び経費の削減にもなる。

例えば、ホルモン作用のスクリーニング、有効性あるいは力価の測定を行うため、そのホルモンに対する受容体を持つ培養細胞を用いることができる。そして、ホルモン作用に関連する情報伝達反応のいずれかを指標に選べば、動物を用いる場合と相関性のあるホルモン作用の *in vitro* 試験法を確立できる可能性がある。

本研究では、成長ホルモン受容体を持つ IM-9 細胞を用いるヒト成長ホルモンの活性を、細胞増殖ともなう $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込みで測定する研究が行われた。ヒト成長ホルモンの活性をこのような系で測定することができるようになったのは初めてである (機能生化学部)。

毒性を細胞レベルで測定する場合、マクロファージにおける O_2^- 産生能および ATP レベルが指標となり得ることが示された。特に ATP を指標としたときには、化学物質の毒性の初期過程を鋭敏に検出し得る可能性が示唆された。本研究では、動物から分離したマクロファージを用いているが、培養細胞株を用いる実験系を確立できる可能性も高い (大阪

支所生物試験部)。

生活環境中に存在して弱いアレルギー性を示す物質を感度よく検出できる試験法の開発が望まれてきた。本研究では遅延型アレルギーの *in vitro* 検査法として、リンパ球幼若化試験と末梢リンパ節リンパ球の増殖活性の測定による弱～中程度の感作強度のアレルゲン検出法の確立を旨とした。これら2つの *in vitro* 試験の結果はそれぞれ行った *in vivo* 試験の結果とよく一致している。今回検討した *in vitro* 試験法は短時間でかつ定量的に試験物質の感作性を予測できる方法であり、未知の遅延型アレルゲンの検索に利用できるものと期待される(療品部)。

腎臓や精巣に毒性を示す物質の *in vitro* 試験の指標として、これらの組織のエネルギー供給経路を取り上げることが可能かどうか検討した。腎毒性を示すものとして Tris-(2,3-dibromopropyl) phosphate および Bis-(2,3-dibromopropyl) phosphate を用い、精巣に毒性を示す物質として、Di-n-butyl phthalate を選択した。今回は個体を用いた研究であったが、得られた結果から、エネルギー供給経路に関与する因子を指標に選べば、ある化学物質が腎臓あるいは精巣に引き起こす障害について、細胞レベルでの変動から予測することが可能であることが示唆された(生物薬品部)。

(3) 組織レベルでの反応指標

発癌性の予測を短期間に判定し得る中期検索法の有効性を検討した。この方法はラットの肝を用いた *in vivo* 検索法であり、肝の前癌病変である胎盤型 glutathione S-transpeptidase 陽性細胞巣の発生を指標とするため、比較的短期間で被験物質の癌原性や発癌の修飾作用を予測することが可能である。また、被験物質の発癌抑制作用を検出することも可能である。本研究で被験物質として、免疫抑制剤による発癌修飾作用の有無について検討し、本法の有効性が確認された(病理部)。

(4) 個体レベルでの反応指標

化学物質の次世代における安全性試験の一環として、ラットあるいはマウス出生仔の行動発達試験が提唱されている。この試験では測定条件やチェックポイントが研究者間で一致していないことが成績を相対的に比較する場合の難点となっている。本研究では、運動機能試験法の一つである背地走性試験について、その試験基準を検討し、従来から指標として用いられてきた回転所要時間に加えて、斜面からの「転落」や「滑落」も加味した評価基準を検討し、

好結果を得た(薬理部)。

なお、本研究は平成3年度から第2次計画として3年間研究を継続することとなっている。

PAF 結合反応および過酸化脂質 DNA 付加物を指標とした試験法の開発

食品添加物部

本研究は2部に分けられる。まず前半は、生体関連反応として血小板活性化因子 (PAF) と PAF 受容体との結合反応を用いた系について述べ、後半は、生体関連反応として過酸化脂質の DNA 付加を指標とした系について報告する。

1. PAF 結合反応を指標とした試験法 〔緒言〕

我々は、これまでに生体関連反応指標として、数種のアラキドン酸カスケード関連酵素を用い、食品添加物、特に色素の安全性評価法の開発を行ってきた。その結果、プロスタグランジン (PG) 生合成酵素を用いた系が簡便なうえ、従来の安全性評価法で得られた結果との相関がよく、酵素レベルでの1次スクリーニングとしては適当なものと考えられた。本研究では、このような研究の一環として、受容体レベルでの1次スクリーニング法の開発を行うことにし、血小板活性化因子 (PAF) と PAF 受容体との結合反応が、1次スクリーニング法として応用可能か検討を行った。なお、食品添加物としては、国により検定が行われ、不純物が少なく、比較的安全性に関する情報量の多い食用タール色素を用いることにした。

〔実験方法〕

PAF の結合実験は次のように行った。ウサギ全血より血小板を分離し、検体と [³H]-PAF、または [³H]-PAF と非標識 PAF、に血小板を加えて室温で20分間インキュベートし、濾過により血小板と結合している PAF を free の PAF から分離後、放射活性として、specific binding (total binding から non-specific binding を減じたもの) を算出した。

〔実験結果・考察〕

食用タール色素のうちキサンテン色素はすべて PAF 結合実験に対して顕著な影響を示さなかった。一方、他の色素には、若干 PAF 結合実験に影響を与える物も見られた。特に、食用黄色5号は、10 μM の濃度で23%の障害がみられ、positive con-

trolであるリグナンの1/3程度の活性が見られた。

食用タール色素のうち、アゾ色素である食用黄色4号、同5号、食用赤色102号は、アレルギーとの関連性が問題になる色素であるが、このうち黄色5号が、ある程度PAF結合実験に影響を与えることが判明した。しかしながら、その活性は阻害活性であり、その作用は、炎症作用を抑える方向に働く可能性が強く、同色素のアレルギー感作作用に直接影響を与えるかどうかは、各種濃度での実験を行った後、考慮すべき問題であろう。

キサントン色素は、PG生合成酵素に対して顕著な阻害活性を示したが、PAF結合実験には、ほとんど影響を与えなかった。このことは、キサントン色素がPAFアンタゴニストとはならないだけでなく、キサントン色素の蛋白結合作用や一重酸素発生作用も、PAF結合実験にはほとんど作用を及ぼさないためと考えられる。

〔結論〕

一次スクリーニングには、生体機能を模倣した多方面からのアプローチが有効であり、その観点からいえば、PAF結合反応を指標とした系は、酵素レベルのスクリーニング系を補うものとして魅力的である。しかしながら本系は、酵素レベルの系より煩雑であり、結果として、同一時間内で得られる情報量は少ないという欠点がみられた。また実験を行った食用色素では、酵素レベルで行った場合と異なり強い活性は見られず、結果として、これまで知られている安全性等の知見との比較を充分に行うことは困難であった。今後、より強い生理活性を持つと考えられる、化粧品用合成色素等の検討も行うことも必要と考えられる。

2. 過酸化脂質DNA付加物を指標とした試験法〔緒言〕

マロンジアルデヒド (malonic dialdehyde: MDA) は、脂質過酸化反応やプロスタグランジン生合成過程で生じるC3化合物であり、食品添加物や食品中にも多量に含まれている。一方、バクテリアや動物細胞に対し変異原性が、マウスに対し発ガン性が確認されている。さらにMDAは、低分子非芳香属性化合物でありながら、他のacroleinやmethyl glyoxalといった類似化合物と異なり、フレームシフト型変異原物質であり、また生理的条件下でヌクレオシドと反応し共有結合性付加物を与えることが明らかにされている。近年、この非共有性付加物のうち生理的条件下での主付加物と考えられ、

その構造からフレームシフト変異原性との関連が推定されるM1G付加体 (pyrimide-[1,2a]purin-10(³H)-one, M1G-base) が、ラットの尿中より単離同定された。このことは、DNAが、脂質過酸化反応の結果生成されたMDAにより修飾された可能性が高いことを示している。しかしながら、この報告では、大量の尿から付加体を検出したものの定量性はなく、尿中の付加体のレベルを推定できず、結果として、脂質過酸化とDNA損傷の頻度や、脂質過酸化と生体のエイジングとの関連を推論できるものではなかった。もし定量性良く尿中の付加体を検出出来るならば、その方法はnoninvasiveな方法として、生体機能を簡便にモニター出来るという利点もある。よって、我々は尿中の付加体を定量性良く検出する方法について検討を行うことにした。

〔実験方法・結果・考察〕

まずM1G付加体の高感度分析方法について検討した。その結果、M1G付加体をあらかじめ還元し、低電位で電気化学的に活性にしたのち、電気化学検出高速液体クロマトグラフィー (LC-EC) で分析を行う方法が、優れていることが判明した。次に、試料精製方法について検討を行った。その結果最終的に、1回の液液分配、2回の固相抽出法 (solid phase extraction: SPE) を行い、さらにHPLCでM1G画分を分取した後、その画分を還元し、さらに2回SPEを行う方法で、M1G還元体と同じLCの保持時間をもつ電気化学感受性の妨害物を除去できることが判明した。なお、authenticなM1G付加体を用いて、本系の回収率を検討したところ、約20%となった。

次に人の尿について本系で分析を行ったところ、還元M1G付加体と同じ保持時間にピークが検出され、このピークは、hydrodynamic voltammogramで、authenticな試料と同様の挙動を示した。よって、人尿中にM1G付加体の存在する可能性が高いことが明らかとなった。また人尿中のM1G付加体の量は、回収率を考慮した結果、2~4 pmol/ml尿であることが判明し、この量は、尿中の8-hydroxyguanineとほぼ同じであった。よって、活性酸素等によるDNAの損傷には、直接DNAを酸化して8-hydroxyguanosineを形成させる過程と、脂質を過酸化したのちその最終分解物のひとつのMDAがDNAを修飾する過程の、複数の過程がある可能性が考えられた。

〔結論〕

SPEとLC-ECを用い、尿中より過酸化脂質のDNA付加物由来と考えられるM1G付加体を検出する方法を開発した。

リガンド結合とヒト成長ホルモン受容体の生化学

機能生化学部

蛋白性ホルモンの標的細胞では、通常細胞表面に受容体が存在し、受容体とホルモンの結合が作用発現の必須条件である。したがって、ホルモンの有効性を判定する最も基本的な判断基準は、受容体への親和性あるいは結合の有無を調べることである。しかし、このような指標を用いる場合には、受容体に対して親和性は持っているが、生理活性を示さないアンタゴニストとしての性質を有する物質と区別することができない。そこで、リガンドが受容体に結合した後、アゴニストのみが示す細胞内への情報伝達に伴う生化学的な反応を解析することにより、分子レベルあるいは細胞レベルでの有効性判定指標を設定できると考えられる。

我々はこれまでに受容体の情報伝達機構における受容体蛋白リン酸化反応について研究を進めてきた。本研究においては、ヒトの成長ホルモン受容体を持つことが知られているリンパ球培養細胞株であるIM-9細胞を用い、成長ホルモン(hGH)が受容体に結合したときに受容体分子あるいは細胞に起こる生化学反応のうち、ホルモンの有効性等の判定指標となるものを探索したので報告する。

IM-9細胞の増殖に及ぼす成長ホルモンの影響

IM-9細胞は10%牛胎児血清(FCS)を含むRPMI-1640培養液中で良好に増殖する。このような培養条件において、培養液中にhGHを種々の濃度で添加しても、添加しないコントロールに比べて、 ^3H チミジンのとり込みで測定する細胞増殖性には差は見られない。一方、FCSの濃度を3%に下げた培養液でIM-9細胞を24時間培養すると、細胞増殖能は著しく低下するが、このような処理を行った細胞はhGHに応答するようになり、10%FCSを含む培養液中とほぼ同程度の増殖性を示すようになることが明かとなった(図1)。

同じヒトリンパ球系細胞であり、成長ホルモン受容体を持っていないことが明かとなっているK-562, HL-60, CCRF-CEM細胞では、このような処理によってもhGHに対する応答性の出現は見ら

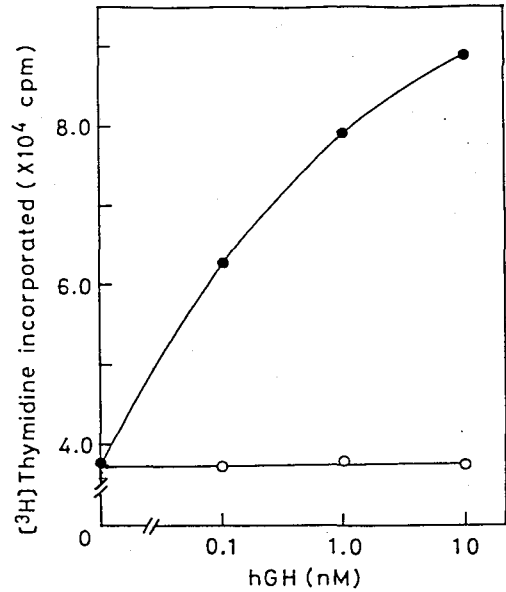


Fig. 1. Human growth hormone-stimulated growth of IM-9 lymphocytes and effect of phorbol diester

IM-9 cells cultured for 24 hr in RPMI 1640 containing 3% fetal bovine serum were harvested and treated with or without 100 nM phorbol 12 myristate 13 acetate (PMA) in Hanks' balanced salt solution. The cells were then washed with RPMI 1640 containing identical concentration of hGH and 3% fetal bovine serum and cultured in the presence or absence of 100 nM PMA for 24 hr. Continuing the culture, cell growth was measured for 17 hr by incorporation of ^3H thymidine.

●—● no PMA,
○—○ treated and cultured with PMA

れない。このことは、IM-9細胞におけるhGHの細胞増殖促進作用は、hGH受容体が関与した反応であることを意味している。したがって、hGHによる低血清培養液処理IM-9細胞の ^3H チミジンとり込み能でみた細胞増殖性は、hGHの有効性の判定指標として用いることができる可能性があるといえる。

成長ホルモン受容体のダウンレギュレーションと蛋白リン酸化

次に、リガンドの結合が受容体に及ぼす生化学的变化について検討した。上で述べたhGHのIM-9細胞増殖促進活性はフォルボールエステル類によって阻止される。この現象を詳細に検討した結果、フ

フォルボールエステルによって約50%のhGH受容体が細胞表面から細胞内にとり込まれ(ダウンレギュレーション), この細胞を再びフォルボールエステル非存在下で培養すると, 細胞表面の受容体数は, 多分受容体のリサイクリングにより, もとの数まで回復することが明かとなった. hGHの結合によっても, 同様に受容体の細胞内とり込みが見られるので, フォルボールエステルによる受容体の細胞内とり込みは, リガンドが受容体と結合することによって起こる細胞現象と同一のものをしていることを示唆している.

フォルボールエステル類の効果は, プロテインキナーゼCの活性化能のあるもののみが受容体のダウンレギュレーションをひき起こすことから, この現象にはプロテインキナーゼCによる蛋白リン酸化反応が関与していると考えられる. このことは, プロテインキナーゼCの阻害剤であるスタウロスポリンあるいはスフィンゴシンによってhGH受容体のとり込みが阻害されることから明かである.

そこでIM-9細胞にフォルボールエステルの一つであるPDBuを作用させたとき, どのような蛋白が特異的にリン酸化をうけるか検討した. 細胞をリン酸を含まない培養液中で $[^{32}\text{P}]$ 正リン酸と一定時間培養したのち, PDBuを加え, 3分間インキュベーションした. 細胞をハーベストしてNP-40で可溶化し, 可溶化画分につきSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い, PDBu添加により特異的にリン酸化される蛋白をオートラジオグラフィーによって調べた.

その結果, 分子量55Kの蛋白が特異的にリン酸化されていることが明かとなった. ヒト肝のhGH受容体の分子量は約110Kであると報告されており, 我々もアフィニティラベル法によりIM-9細胞のhGH受容体の分子量は約110Kであるという結果を得ているので, ここでリン酸化された55K蛋白は受容体そのものでない可能性が高い.

そこでこの蛋白と受容体との関係を知る目的で, PDBuで刺激し, 特異的にリン酸化反応を起こさせたIM-9細胞のNP-40による可溶化物にhGHを加え, 可溶化した受容体とhGHの複合体を形成させたのち, 抗hGH抗体によりこの複合体を免疫沈降させた. 沈澱を遠心で集め, SDSで可溶化してSDS-PAGEを行ったところ, ^{32}P -55K蛋白が特異的に免疫沈降されていることが明かとなった. 同様に, hGHをリガンドとしたアフィニティクロマト

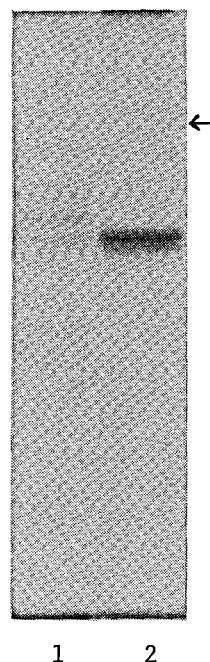


Fig. 2. Affinity-purified hGH receptors and their related proteins

Cell extracts from ^{32}P -labeled cells were applied to a column of hGH-fixed agarose gel, and hGH receptors and their related proteins were purified by elution with 6 M urea. The eluted proteins were analyzed on 10% gel by SDS-PAGE followed by autoradiography.

Position of hGH receptor is indicated by an arrow
Lane 1, no PDBu (control), lane 2, with PDBu

グラフにより, 受容体を特異的に分離した場合にも, ^{32}P -55K蛋白は受容体とともに分離されてきた(図2). これらの事実は55K蛋白は受容体そのものではないが, 受容体と結合してその機能を調節している蛋白である可能性が高い.

そこで55K蛋白のリン酸化反応がhGHの有効性の指標になり得るか検討した. PDBuを用いた場合と同様に細胞を3%FCS中で24時間培養後, $[^{32}\text{P}]$ 正リン酸で培養し, hGHを種々の濃度で加え55K蛋白のリン酸化を調べたが, hGHによっては55K蛋白の特異的リン酸化は起こらなかった. このことから, PDBuなどのフォルボールエステルとhGHでは受容体の細胞内とり込み現象に関与する機構が同一ではないことが示唆された. いずれにしても, 現段階では55K蛋白のリン酸化反応はhGHの有効性の判定指標として用いることはできないものと考

えられる。

〔まとめ〕

hGH受容体を細胞表面に発現しているIM-9細胞を用いて、hGHの有効性を評価できる指標について研究した。指標として細胞増殖にともなう ^3H チミジンのとり込みと、受容体に関連した蛋白のリン酸化反応について検討した。その結果、低血清培養液処理によりIM-9細胞がhGHに対し応答性を獲得し、細胞増殖が促進されることを見出し、この増殖性の促進を ^3H チミジンのとり込みできわめて簡便に測定できる系を確立した。一方、蛋白リン酸化反応を指標とする系においてはhGHに依存して起こる特異的リン酸化反応を見出すことはできなかった。

発表論文

- 1) K. Suzuki, S. Suzuki, Y. Saito, H. Ikebuchi and T. Terao: J. Biol. Chem., 265, 11320~11327 (1990)
- 2) K. Suzuki, S. Suzuki, Y. Saito, H. Ikebuchi and T. Terao: The Biology and Medicine of Signal Transduction. 7th International Conference on Cyclic Nucleotides, Calcium, and Protein Phosphorylation. p17 (1987)
- 3) K. Suzuki, S. Suzuki, Y. Saito, H. Ikebuchi and T. Terao: J. Pharmacobio-Dyn., 14, S-81 (1991)

細胞レベルでの反応指標に関する研究

大阪支所生物試験部

〔目的〕

*In vitro*の系における諸反応が、*in vivo*での生体反応の有意な指標となり得るか否かを検討することを目的として、本研究では、細胞レベルでの反応指標として、マクロファージ(M ϕ)の活性酸素(O_2^-)産生能および細胞内ATPレベルに着目し、これらが、皮膚適用化学物質の皮膚障害性評価の指標として有意であるかどうか検討、評価した。

〔方法〕

被験物質：化粧品原料に用いられる数種の界面活性剤を用いた。

M ϕ ：ミネラルオイルで刺激誘導したウサギ腹腔M ϕ あるいはラット腹腔常在M ϕ を用いた。採取

したM ϕ を96穴のマルチウエルプレートに、 10^5 個/well (O_2^- 測定用)あるいは 5×10^3 個/well (ATP測定用)となるようにウエルに付着させたのち、試験に供した。

O_2^- 産生能の測定：コンカナバリンAもしくはザイモザン粒子(O_2^- 産生刺激剤)と種々の濃度の被験物質を添加したチトクロームc溶液でM ϕ を1時間培養し、 O_2^- 産生量をチトクロームc還元反応によって定量した。

ATPの測定：種々の濃度の被験物質を添加した培養液でM ϕ を1時間培養後、各ウエルの細胞の総ATP量を、ATP測定キット(NRS/Lumit-PM Kit:日本ゼネラル)によって定量した。同時に、細胞をクリスタルバイオレットで染色し、550nmの吸光度から細胞の生存率を算出して、一定の細胞数当たりのATP量を求めた。

〔結果〕

非イオン性界面活性剤(polyoxyethylene lauryl ether: POE-LE)、陰イオン性界面活性剤(sodium lauryl sulphate: SDS, sodium N-lauroyl sarcosinate: SLSA)、陽イオン性界面活性剤(benzethonium chloride: BC, cetyl-trimethylammonium chloride: CMAC)、計5種の界面活性剤が、ラットM ϕ の O_2^- 産生能およびATPレベルに及ぼす

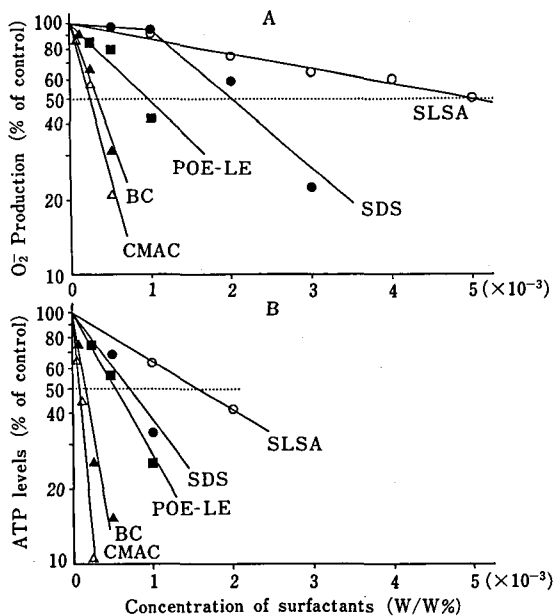


Fig. 1. Effects of five surfactants in O_2^- production (A) and ATP levels (B) of rat peritoneal macrophages *in vitro*.

影響を Fig. 1 に示した。これらの界面活性剤は、すべて濃度依存的に O₂⁻ 産生能および ATP レベルを低下させた。なお、O₂⁻ 産生能についてはウサギ Mφ でも検討したが、ラット Mφ とほぼ同じ成績が得られた。

O₂⁻ 産生能および ATP レベルを指標とする 2 つの試験成績は良く相関し、いずれにおいても、SLSA < SDS < POE-LE < BC < CMAC の順に強い毒性が検出された。また、両指標の毒性検出感度を比較すると、ATP レベルの方により鋭敏に毒性が検出された。

次に、これらの用量-反応直線から、O₂⁻ 産生能および ATP レベルを 50% 低下させる濃度 (IC₅₀) を求め、Watanabe ら (1989) がウサギ角膜初代培養細胞を用いて算出した LD₅₀ 値 (コロニー形成を 50% 阻害する濃度) およびウサギ眼刺激性試験によるドレイズスコア (DS20) と比較した (Table 1)。O₂⁻ 産生能および ATP レベルの低下を指標として得られた被験物質の毒性強度の順序は、Watanabe らの *in vitro* および *in vivo* の成績と良く一致した。O₂⁻ 産生能および ATP レベルを指標として求めた IC₅₀ 値は、共に Watanabe らの算出した LD₅₀ 値よ

りも小さく、これらの指標が高感度に細胞毒性を検出し得ることが示唆された。事実、ATP レベルの IC₅₀ 値付近での細胞生存率はいずれの界面活性剤についても 95% 以上であり、この指標が、化学物質の毒性に対する細胞の初期反応を非常に鋭敏に検出し得るものと考えられた。

Fig. 2 に、各界面活性剤の眼刺激性試験による毒性評価成績 (DS20 値) と、O₂⁻ 産生能および ATP レベルを指標としたときの毒性評価成績 (IC₅₀ 値) との相関性を示した。O₂⁻ 産生能については相関係数 0.964 (P < 0.02)、ATP レベルについては相関係数 0.993 (P < 0.01) と算出され、両指標ともに、*in vivo* における生体反応と高く相関する反応指標であることが示された。

[考察]

以上の結果より、Mφ の O₂⁻ 産生能および ATP レベルは、皮膚適用化学物質の皮膚障害性を *in vitro* で評価する際の細胞レベルでの反応指標として、有意性の高い指標であると結論される。ただし、化学物質による生体内での毒性発現機構は多様であることから、更に多種類の化学物質を用いてデータを蓄積する必要がある。本研究で検討した 2 つの

Table 1. Comparison of results from O₂⁻ production and ATP assays on rat peritoneal macrophages with cytotoxicity tests on rabbit cornea cells and Draize rabbit eye irritancy test

Surfactants	In vitro testing			In vivo testing	
	IC ₅₀ * (W/W% × 10 ⁻³)		LD ₅₀ §	DS20¶ (W/W%)	Draize rank †
	O ₂ ⁻ production	ATP levels (W/W% × 10 ⁻³)			
Nonionic					
POE-LE	0.95	0.53	1.8	4	Severe
Anionic					
SDS	2.0	0.70	4.5	4.5	Moderate
SLSA	5.0	1.55	5.5	7	Moderate
Cationic					
BC	0.33	0.16	2.0	1.5	Severe
CMAC	0.24	0.08	NDφ	NDφ	NDφ

* IC₅₀ : concentration of the surfactant extrapolated from the dose-response curve giving 50% inhibition of O₂⁻ production or ATP level

§ LD₅₀ : concentration of the surfactant extrapolated from the dose-survival curve giving 50% cell survival (from Watanabe et al. 1989)

¶ DS20 : concentration of the surfactant extrapolated from the dose-response curve giving a Draize score of 20 units (from Watanabe et al. 1989)

† Draize rank : ocular irritancy classification based on Draize test scores (from Watanabe et al. 1989)

φ ND : not determined

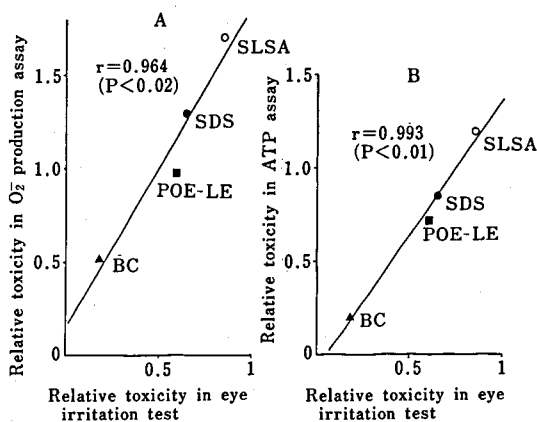


Fig. 2. Correlation of eye irritation in the Draize test and O_2^- production assay (A) or ATP assay (B) for four surfactants. Logarithmic values of the concentration (W/W%) of each surfactant predicted to cause a Draize score of 20 units (DS 20) were plotted as the relative toxicity *in vivo*, and logarithmic values of the concentration (W/W%) multiplied by 10^4 of each surfactant causing 50% inhibition of O_2^- production or ATP levels (IC_{50}) were used as the relative toxicity *in vitro*.

指標はいずれも高い有意性を示したが、毒性発現機構の多様性に対応するには、更に多数の、メカニズムの異なるエンドポイントによる指標の開発が必要であり、それらは毒性発現機構の解明にも資するものと考えられる。なお、 $M\phi$ は生体防御機構に重要な役割を担う細胞であることから、これらの反応指標には、単に皮膚障害性にとどまらず、例えば生体の免疫系に対する薬物の有効性、安全性の評価指標としての有意性が期待される。

参考文献

Watanabe, M. et al. Toxicol. *in vitro* 4 : 329~334 (1989)

遅延型アレルギーの *in vitro* 検査法

療 品 部

(目的)

化学物質の感作性の評価は毒性試験において重要な位置を占めている。臨床試験ではアレルゲンの検

索法としてパッチテストが行われているが、患者に負担を強いるだけでなく、新たな感作を引き起こす可能性もある。動物を用いて検討する方法としては、モルモットを用いた Maximization 法¹⁾ が広く行われている。この方法は、被験物質塗布後の浮腫、紅斑といった皮膚反応を肉眼的に観察することによって感作性の有無を判定するため、主観的になりやすく、また着色したものは判定を妨害するといった欠点があった。さらに、弱い感作性反応と刺激反応を区別することは容易ではない。マウスを用い、耳の腫脹で判定する方法 (mouse ear swelling test (ME-ST))²⁾ も開発されている。この方法は、モルモットの方法よりも客観的な判定をすることができ、より少ない動物で、短期間でできる利点がある。しかしながら弱~中程度の感作強度の物質を検出することは難しいとされている。また動物実験の場合、概して一定した判定結果が得にくいいため、化学物質の感作性の有無を *in vitro* で検討する試験法の開発が望まれている。

接触皮膚炎はIV型アレルギーに属し、Tリンパ球が重要な役割を担っている遅延型アレルギーである。これらの反応はツベルクリン反応と類似の典型的な細胞性免疫反応の一つと考えられる。接触アレルギーの一連の反応は、感作物質の侵入と修飾、Tリンパ球の活性化に伴っての感作の成立(導入期)、そして再び感作物質が侵入した時の反応(惹起期)の二つの段階に分けることができる。遅延型アレルギーの *in vitro* 試験法として、リンパ球幼若化試験が従来から行われてきた。感作個体から分離されたリンパ球に被験物質を加えると、それが感作リンパ球に対して特異的であれば刺激され、リンパ球が幼若化を起し増殖する。これは惹起期の反応で判定する方法であり、感作原因物質の究明に用いられている。今回はこれに加えて、未知化学物質の感作性を *in vitro* で予測するための方法として末梢リンパ節検査³⁾ についても検討した。この方法は、感作物質を塗布すると所属リンパ節内でリンパ球が活性化するという導入期の反応を観察するものである。

金属アレルギーは皮膚科の領域で問題になっている症例で、接触皮膚炎の原因物質としてニッケル、クロム、コバルトは常に上位にランクされている。しかし動物実験で金属アレルギーを再現することは困難であり、Maximization test でもニッケルの感作性は弱いとされている⁴⁾。

本研究では、こうした感作性の弱い金属アレルゲ

ンを *in vitro* で検出するために、リンパ球幼若化試験(惹起期)、末梢リンパ節検査(導入期)の二つの試験法を用いて検討した。試験法を改良した結果、*in vitro* 検査により金属アレルギーの感作性を確認することができた。得られた結果は *in vivo* 動物試験の結果と比較し、その有用性を確認した。

1. リンパ球幼若化試験による検討

(実験方法)

(1) *in vitro* リンパ球幼若化試験

ニッケル感作および非感作モルモットの心臓より採血し、比重遠心法によりリンパ球を分離洗浄した。リンパ球は牛胎児血清を10%含む RPMI 1640 培養液に浮遊させ 2×10^6 cells/ml の濃度に調整した。この細胞浮遊液を96穴マイクロプレートの各穴に0.2 ml ずつ分注し、種々の濃度の NiSO_4 、ニッケル-アルブミン複合体およびニッケル-表皮ホモジネート複合体を添加し、4日間培養した。培養最終日に ^3H thymidine を加え、さらに18時間培養後リンパ球を回収し、取り込まれた ^3H thymidine 量を液体シンチレーションカウンターにより測定した。被験物質を加えた系の cpm を加えない系の cpm で割った値、Stimulation Index (SI), を求めて幼若化反応を判定した。

(2) ニッケルの *in vivo* 感作性試験

感作: Maximization 法¹⁾に従って行った。雌性 Hartley 系モルモット(体重400~500 g)の肩甲骨上を毛刈りし、頭側から Freund's complete adjuvant (FCA) と蒸留水を等量混合した乳化液、5% 硫酸ニッケル (NiSO_4) 水溶液、FCA と2倍濃度の NiSO_4 水溶液を等量混合した乳化液をそれぞれ0.05 ml ずつ皮下注射した。6日後同部位を剃毛し、10%ラウリル硫酸ナトリウム (SLS) 含有白色ワセリンを塗布し、翌日10% NiSO_4 水溶液を含ませたる紙を48時間閉塞貼布して感作した。コントロール群は NiSO_4 の代わりに蒸留水を用いて同様の方法で行った。

惹起: さらに14日後背部を毛刈りし、種々の濃度の NiSO_4 水溶液を塗布し、48時間後の皮膚反応を下記基準により判定した。0=反応なし、1=軽度または散在性の紅斑、2=中程度、び慢性の紅斑、3=強い紅斑に浮腫。

(結果と考察)

NiSO_4 を $10 \mu\text{g/ml}$ 添加したときのリンパ球幼若化反応は、感作動物群の方が非感作群に比べ若干高い SI 値を示したが、明確な差を認めることはでき

なかった。非感作群でも弱いながらリンパ球の幼若化を認めた。これはニッケルイオンによる非特異的 mitogenic effect が影響しているものと思われる。またこの時の SI 値を *in vivo* における皮膚反応と比較すると、強い皮膚反応を示した動物ほど SI 値が高い傾向が認められた。

NiSO_4 -牛血清アルブミン複合体 ($200, 400 \mu\text{g/ml}$) を加えても幼若化は起こらなかった。また、未処理の表皮ホモジネート画分では感作および非感作動物のリンパ球とも幼若化を認めなかった。しかし NiSO_4 を塗布した表皮のホモジネート画分で刺激した場合、感作動物のリンパ球では明らかな幼若化反応の上昇を認めた。特に $10000 \times \text{g}$ 、 $15000 \times \text{g}$ での遠沈画分をタンパク量として $30 \mu\text{g/ml}$ の濃度で添加した時と、 $105000 \times \text{g}$ での遠沈蛋白画分を $8 \mu\text{g/ml}$ の濃度で添加した時、感作動物と非感作動物でのリンパ球幼若化反応に明らかな差を認めた (Fig. 1)。

このように表皮との複合体を用いることにより、感作の原因と考えられる物質が持つ mitogenic 効果と感作性を区別して検査することが可能になった。Robinson らは表皮細胞とニッケル複合体はニッケル感作リンパ球を著明に幼若化すると報告してお

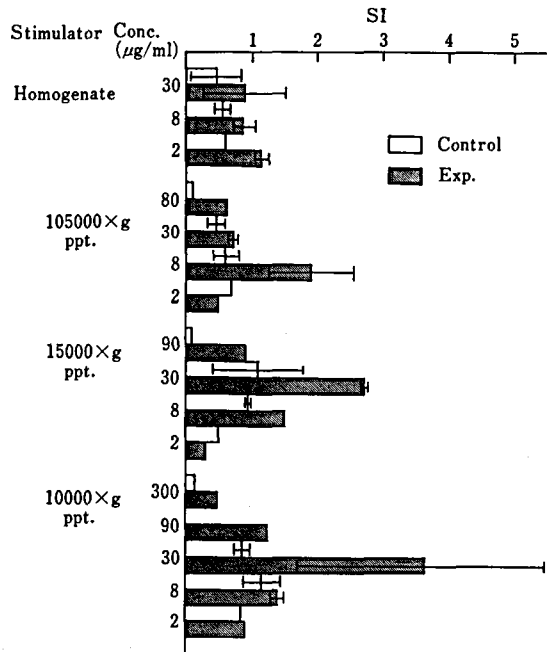


Fig. 1. Ability to induce lymphocyte transformation by homogenate and the fractions of NiSO_4 painted epidermal tissue

り⁴、我々の結果からもニッケルアレルギーにおいて表皮細胞が重要な役割をすることがわかった。金属イオンはハプテンであり、それらは表皮層の蛋白と結合し、Langerhans細胞による修飾、抗原提示等、一連の過程を経て感作が成立する。今回の研究方法をさらに発展させれば、ニッケルアレルギー感作のメカニズムを細胞および蛋白レベルで解明できるものと期待される。

2. 末梢リンパ節検査による評価

Kimberらは、NiSO₄と重クロム酸カリウム(K₂Cr₂O₇)について末梢リンパ節検査を試みた。その結果、感作性のある金属イオンを塗布しても所属リンパ節でリンパ球の増殖は起こらなかったと報告している³⁾。そこで我々は、概して検出が困難な金属アレルギーを *in vitro* 手法を用いて簡便に検出する方法を確立することを目的とした。また確立した方法を用いていくつかの金属について試験し、その感作強度の比較を行った。

〔実験方法〕

雌性 BALB/c 系マウス 6~8 週齢を 1 群 3 匹で試験した。マウスの両耳に被験物質を 25 μ l ずつ 3 日間塗布し、翌日頸部および腋窩リンパ節を取り出し、5 \times 10⁶ cells/ml のリンパ球浮遊液を調製した。この浮遊液を 96 穴マイクロプレートに 200 μ l ずつ分注し、[³H]thymidine を加えて 18 時間培養した。培養終了後、細胞を回収し、取り込まれた [³H]thymidine 量を液体シンチレーションカウンターで測定した。被験物質によるリンパ球の増殖度、すなわち感作性強度は、被験物質を塗布した群のカウントを溶媒のみを塗布した群のカウントで割った値、Stimulation Index (SI)、で表した。

〔結果と考察〕

(1) 塗布溶媒の影響

簡便かつ鋭敏に金属アレルギーを検出できる方法を確立するために、適切な塗布溶媒の検索を行った。Kimberらは金属塩の水溶液を塗布したが、リンパ球の増殖を誘導できなかった³⁾。Mollerは有機溶媒を塗布溶媒に用いることによってマウスを金属で感作できたと報告している⁵⁾。したがって、金属イオンの皮膚浸透量を高めることが、感作誘導に重要と考えられる。そこで溶媒には、皮膚透過性において優れ、かつ金属塩を比較的溶かし易いジメチルスルホキシド (DMSO) を用いた。3日間連続で塗布した後、翌日リンパ節を取り出して検査した。コバルト、クロム、ニッケル、および鉄の4種類の金属塩について5%濃度で試験した結果、SI値はコバルトで4.3、クロムで3.1、ニッケルでは2.3と感作性のある金属塩では明らかなリンパ球の増殖を認めたのに対し、感作性のない鉄ではSI値が1.15を示すにとどまった (Table 1)。

(2) *in vivo* 試験法との比較

強度の異なる4種類の感作物質、picryl chloride, 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB), cinnamic aldehyde, NiSO₄と皮膚刺激性物質であるラウリル硫酸ナトリウム (SLS) について検査した。picryl chlorideやDNCBを塗布した群では高いSI値を示した。一方cinnamic aldehydeおよびNiSO₄を塗布した場合、SI値は2.3と低い値しか示さなかった。感作性のないSLSを塗布した場合のリンパ球増殖度は、溶媒だけを塗布した群と同程度であった。これらの結果を *in vivo* 試験 (Human Patch Test, MEST, Guinea Pig Maximization Test, Buehler test) での感作性強度 (Potency Index)⁶⁾ と比較した。SIが高い物質はPotency Indexも大きな値を示し、末梢リンパ節検査が物質の感作性の有無および感作強度を予測できることがわかった。

Table 1. The results of local lymph node assays for four metal salts

Chemical	Vehicle	LNC proliferation ³ HTdR incorporation mean cpm \pm sd \times 10 ⁻³	SI
Exp. 1	DMSO	1.71 \pm 0.68	-
	5% K ₂ Cr ₂ O ₇	5.41 \pm 2.38	3.16
Exp. 2	DMSO	7.42 \pm 1.00	4.33
	DMSO	3.66 \pm 0.90	-
Exp. 3	5% NiSO ₄	8.35 \pm 2.30	2.28
	DMSO:H ₂ O (9:1)	2.88 \pm 0.83	-
Exp. 3	DMSO	3.31 \pm 0.19	1.15
	5% FeSO ₄		

(3) 傷つけの効果

物理的に角化層を取り除くことによって、耳からの金属イオンの透過量を増加させ、検出感度を上げる試みをした。被験物質を塗布する前に耳を注射針で表皮を引っかいた。5%塩化コバルト-エタノール溶液で検討した結果、傷つけを行なった時のSI値は4.4に対し、傷つけないときは2.1と低い値を示した。よって傷つけにより金属イオンの浸透量が増加し、その結果リンパ球の増殖も促進されることがわかった。一方、刺激性物質のSLSや非感作性の硫酸鉄を塗布しても、SI値はいずれも2未満の数値を示した。またこのリンパ球増殖度は塗布する金属塩の濃度に依存して増加した。

今回開発した方法を用いて、合計7種類の金属イオンについて検査した。その結果、コバルト、クロム、銅、およびニッケルイオンの塗布群で明らかなリンパ球増殖の上昇を検出できたが、感作能がないと報告されている鉄、マンガン、および亜鉛イオンの塗布群ではSI値が0.82~1.41を示し、溶媒だけを塗布した群と同程度であった。

以上の結果から本末梢リンパ節検査により、従来困難とされていた金属の感作性を簡便に *in vitro* で評価できることが明らかになった。我々が現在までに蓄積した実験結果では、感作性物質はすべてSI値が2以上を示し、かつSI値の大きさと *in vivo* での感作性強度とは比較的良く相関することが判明した⁷⁾。

本 *in vitro* 手法を導入した検査法は、短時間でかつ定量的に被験物質の感作性を予測できる方法であり、数多くの未知遅延型アレルゲンの検索に応用できるものと期待される。

(謝辞)

モルモットでの Maximization test は毒性部、門馬純子博士の暖かい指導のもとで行われた。ここに深謝致します。

文 献

- 1) B. Magnusson, A. M. Kligman: *J. Invest. Derm.*, **52**, 268 (1969)
- 2) S. C. Gad et al.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **84**, 93 (1986)
- 3) I. Kimber, C. Weisenberger: *Arch. Toxicol.*, **63**, 274 (1989)
- 4) M. K. Robinson et al.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **104**, 106 (1990)
- 5) S. C. Gad: *J. Appl. Toxicol.*, **8**, 361 (1988)

- 6) H. Moller: *Contact Dermatitis*, **10**, 65 (1984)
- 7) 五十嵐良明, 土屋利江, 中村晃忠: 日本薬学会第111年会講演要旨集, **3**, p. 56 (1991)

腎臓および精巣におけるエネルギー供給源とそれに関与する酵素臓器障害に伴う変動と生体反応指標としての有意性に関する研究

生物薬品部

〔研究目的〕

化学物質の安全性評価等に関しては、従来より、多種多様しかも多数の動物実験 (*in vivo*) のデータが利用されてきた。しかし、こうした動物試験の種類や試験動物の数を軽減することは、動物愛護の観点からみて重要である。従って、*in vivo* において起こり得る反応や現象を把握し、これを *in vitro* レベルに外挿できる系を確立していくことが望まれている。このためのアプローチの一つとして、まず、*in vivo* において生じる反応や現象において有意に変動する指標を見いだすことがあげられる。もし、このような指標が細胞レベルでも *in vivo* と同様の挙動をするならば、*in vitro* のレベルで *in vivo* において起こり得る反応や現象を把握することが可能になるからである。そこで本研究では、腎臓障害あるいは精巣障害を起こした動物を用い、主に2種の臓器へのエネルギー供給源とこれに関与する酵素系を対象に、障害により有意に変動する指標について検索し、それらの指標が細胞レベルの研究に応用できるかどうかに関する基礎的知見を得る目的で検討を行った。

〔実験方法〕

1. 腎臓における基質代謝に関する研究

ウィスター雄ラット(8週令)に Tris-BP および Bis-(2,3-dibromopropyl)phosphate(Bis-BP)を71.7, 143.4, 286.8 $\mu\text{mole/kg}$ の割合で経口投与し、尿中のブドウ糖および乳酸の濃度と乳酸脱水素酵素(LDH)の活性を測定し、また、腎臓中のリン脂質、シアル酸、イノシトールの濃度とLDHおよびLDHのアイソザイムの活性を測定した。

乳酸の濃度は Barker & Summerson の方法で、イノシトールは Sweeley らの方法を改良して測定し、リン脂質、シアル酸およびブドウ糖は市販のキット試薬を用い測定した。

2. 精巣における基質代謝に関する研究の場合

8週令のウィスター雄ラットに Di-n-butyl phthalate を 8.6 mmole/kg の割合で経口投与し、精巢中のブドウ糖、乳酸、果糖、ソルビトールおよびイノシトールの濃度とアルドース還元酵素、ソルビトール脱水素酵素、コハク酸脱水素酵素および LDH 等の活性を測定した。

ブドウ糖、果糖、ソルビトールおよびイノシトールは Sweeley らの方法を改良して測定した。乳酸は上記の 1 の方法に準じて測定した。アルドース還元酵素およびソルビトール脱水素酵素は Tanimoto らの方法で、また、コハク酸脱水素酵素は Pennington の方法で活性を測定した。その他の酵素活性は市販のキット試薬を使用し測定した。

〔研究結果と考察〕

1. 腎臓における基質代謝に関する研究

周知のごとく、腎臓における主なエネルギー消費過程はナトリウムイオンの尿細管再吸収である。このエネルギーは主に尿細管細胞における種々の基質の代謝(酸化反応)によって得られることが Pitts らにより報告されている。彼らの研究に従うと、主な基質は脂肪酸、グルタミン、乳酸、クエン酸、およびブドウ糖であり、これらは血中から抽出され、腎臓で酸化されて、腎臓の輸送機能のエネルギー源

となっている。しかし、その貢献度は乳酸、ブドウ糖において高いので、本研究ではこの 2 種のエネルギー源およびこれに関与する酵素を指標として、腎臓障害においてこれらがどのように変動するかを検討することとした。なお、Fukuoka らは Tris-(2,3-dibromopropyl)phosphate (Tris-BP) がラット腎近位尿細管に障害を起し、糖尿を惹起することを報告しているため、これを病態モデルとした。

Tris-BP により腎近位尿細管上皮細胞に障害が引き起こされた場合、ブドウ糖および乳酸の尿中排泄は有意に増加する(図 1, 2)。また、この 2 種のエネルギー源に関連する酵素としての LDH の尿中排泄も有意に増加する(図 3)。そこで、腎臓中での total LDH 活性を測定してみたが、これには必ずしも有意な変化、とりわけ尿中排泄の増加に対応する減少傾向は認められなかった。次に、腎臓中の LDH アイソザイム活性の変動を調べたところ、個々のアイソザイムによりその活性変動が異なり、いくつかのアイソザイム活性(LDH-2, LDH-3, LDH-4)においてはむしろ有意な増加が認められた(表 1)。これらの結果は、LDH アイソザイム活性の変動の有意性を調べることが腎臓障害を細胞レベルでモニターする際の指標になり得る可能性

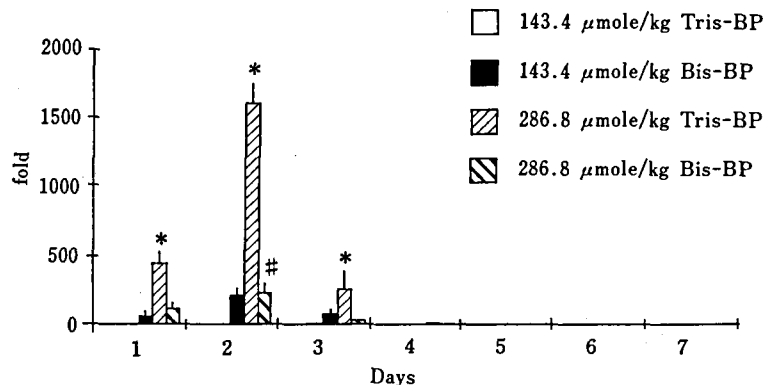


Fig. 1. Urinary levels of glucose at various time after single dosing with Tris-BP and Bis-BP at 71.7, 143.4 and 286.8 $\mu\text{mol/kg}$, respectively. ^aControl mean levels of urinary glucose were obtained from three control rats for 7 days: 1.9 ± 0.6 (\pm S. D.) mg/day. ^bSince the dose of 71.7 $\mu\text{mol/kg}$ did not cause abnormal urinary levels of glucose beyond the range of the controls, the results are eliminated. ^cA kit used for glucose assay is Boehringer Mannheim Autopack A glucose. ^dResults show a multifold increase in excretory glucose over the control mean values. ^e#: $P < 0.05$ and *: $P < 0.01$ compared with its respective control, Dunnett type mean rank test.

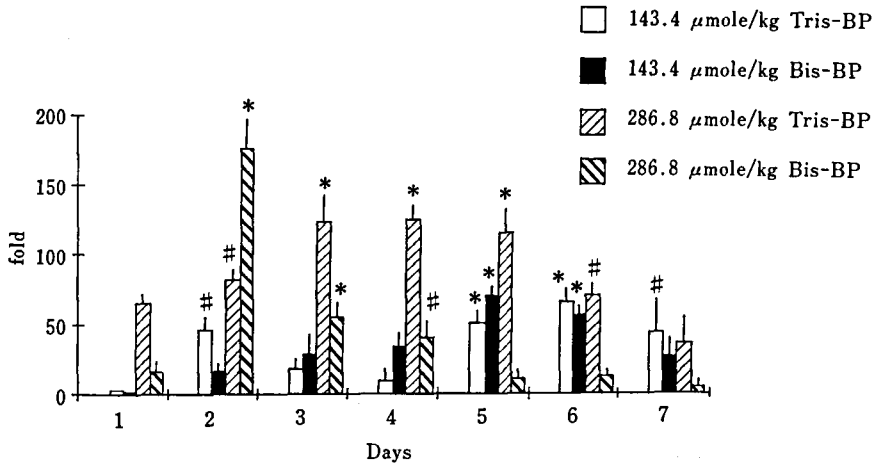


Fig. 2. Urinary levels of lactate at various times after single dosing with Tris-BP and Bis-BP at 71.7, 143.4 and 286.8 $\mu\text{mol/kg}$, respectively. ^aControl mean levels of urinary lactate were obtained from three control rats for 7 days: 1.5 ± 0.3 (S. D.) mg/day. ^bSince the dose of 71.7 $\mu\text{mol/kg}$ did not cause abnormal urinary levels of lactate beyond the range of the controls, the results are eliminated. ^cResults show a multifold increase in excretory lactate over the control mean values. [#]: $P < 0.05$ and ^{*}: $P < 0.01$ compared with its respective control, Dunnett type mean rank test.

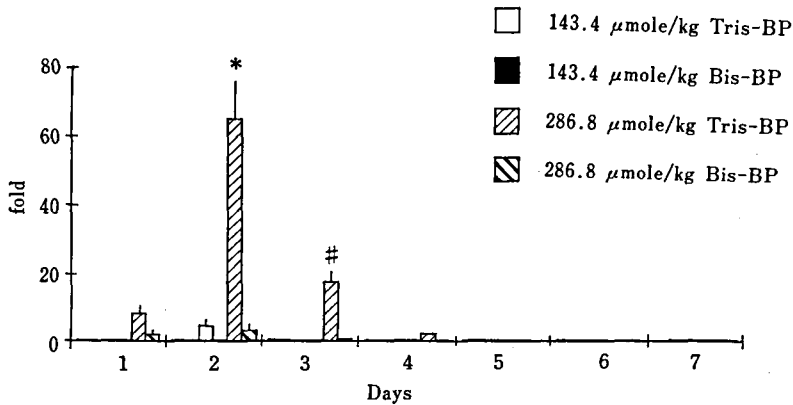


Fig. 3. Urinary activity of LDH at various time after single dosing with Tris-BP and Bis-BP at 71.7, 143.4 and 286.8 $\mu\text{mol/kg}$, respectively. ^aControl mean activities of urinary LDH were obtained from three control rats for 7 days: 1938.7 ± 754.8 (S. D.) mU/day. ^bSince the dose of 71.7 $\mu\text{mol/kg}$ did not cause abnormal urinary activities of LDH beyond the range of the controls, the results are eliminated. ^cA kit used for LDH assay is Wako LDH-UV-Test. ^cResults show a multifold increase in excretory LDH over the control mean values. [#]: $P < 0.05$ and ^{*}: $P < 0.01$ compared with its respective control, Dunnett type mean rank test.

Table 1. LDH isoenzyme activity of the right kidney from rats administered Tris- and Bis-(2,3-dibromopropyl) phosphate

Days	Chemicals	Body weight (g)	Kidney weight (g)	Kidney wt./Body wt. $\times 10^{-3}$	LDH-activity (mU) of the right kidney					
					Total LDH	LDH-1	LDH-2	LDH-3	LDH-4	LDH-5
1	Vehicle	215.3 \pm 12.9	1.76 \pm 0.19	(8.25 \pm 0.55)	150.8 \pm 48.4	42.8 \pm 12.7	19.0 \pm 14.1	8.2 \pm 4.9	31.3 \pm 9.7	49.5 \pm 5.3
	Tris-BP	212.7 \pm 7.3	1.85 \pm 0.15	(8.72 \pm 0.77)	125.0 \pm 8.0	32.5 \pm 2.2	24.3 \pm 1.9	8.8 \pm 1.5	25.6 \pm 4.1	33.8 \pm 3.0
	Bis-BP	221.3 \pm 16.0	1.77 \pm 0.07	(8.04 \pm 0.49)	189.8 \pm 29.8	49.6 \pm 5.8	38.5 \pm 5.8	14.2 \pm 4.2	33.6 \pm 6.1	53.8 \pm 8.8
2	Vehicle	234.0 \pm 11.4	1.85 \pm 0.14	(8.17 \pm 0.34)	200.7 \pm 37.3	56.7 \pm 13.5	32.5 \pm 7.2	14.4 \pm 7.2	39.3 \pm 10.9	57.7 \pm 18.8
	Tris-BP	218.7 \pm 17.9	2.01 \pm 0.07	(9.23 \pm 0.44)*	175.4 \pm 36.1	38.8 \pm 9.3	36.5 \pm 6.1	19.7 \pm 3.9	34.4 \pm 6.6	46.0 \pm 12.1
	Bis-BP	232.0 \pm 17.7	1.85 \pm 0.13	(7.97 \pm 0.41)	161.7 \pm 37.2	44.3 \pm 7.9	38.5 \pm 8.1	13.7 \pm 2.6	23.8 \pm 1.9	41.1 \pm 12.6
3	Vehicle	232.0 \pm 14.2	1.92 \pm 0.05	(8.08 \pm 1.69)	178.9 \pm 46.4	55.1 \pm 16.3	24.6 \pm 7.0	13.2 \pm 4.5	35.9 \pm 10.2	50.1 \pm 15.9
	Tris-BP	233.3 \pm 21.1	2.32 \pm 0.05*	(10.04 \pm 0.95)*	376.7 \pm 53.4	89.0 \pm 12.9	80.2 \pm 10.1*	49.0 \pm 10.1**	66.7 \pm 10.8*	91.8 \pm 14.3
	Bis-BP	244.0 \pm 28.6	1.94 \pm 0.09	(7.94 \pm 0.79)	356.1 \pm 98.9	92.6 \pm 30.3	74.5 \pm 27.3*	33.7 \pm 10.9	65.1 \pm 12.0	90.1 \pm 22.8

*: P<0.05 and ** P<0.01 compared with its respective control, Dunnett type mean rank test.

を示唆している。

2. 精巣における基質代謝に関する研究。

精巣における主な機能は精子形成である。精巣機能の維持と精子細胞の成長には、セルトリ細胞でブドウ糖から代謝されるイノシトールと果糖が関与し、また精子形成に必要なエネルギー源もセルトリ細胞において生成するとされている。ところで、Grootegoedらは、ブドウ糖が精子細胞のエネルギー代謝に重要な役割を果たすのではなく、セルトリ細胞のミトコンドリアで乳酸がLDHの関与でエネルギー源となっていると報告している。一方、フタル酸エステルは精巣障害を起こすことが知られている (Gangolli)。そこで本研究では、Di-n-butyl phthalate (DBP) により精巣障害を引き起し、その際、生体系のさまざまな因子、とりわけエネルギー供給との関連が予測される諸因子がどのように変動するかについて検討した。対象とした指標としては、従来から用いられている臓器障害の指標であるALP, GOT, γ -GTPおよびLAP等の離脱酵素を選び、更に新たに乳酸、ブドウ糖、果糖、イノシトール、ソルビトール、LDH、アルドース還元酵素、ソルビトール脱水素酵素およびコハク酸脱水素酵素等を加えた。表2および3には乳酸、ブドウ糖、イノシトールおよび果糖とこれらに関する酵素等のレベルが精巣障害によりどのように変動するかについて調べた結果を示した。乳酸およびイノシトールレベルに有意な増加が認められる一方で、果糖レベルは有意に減少している。対応する酵素系では、LDH活性が有意に増加し、ソルビトール脱水素酵素活性は有意に減少している。これらの現象は、DBPによる精巣障害により、精子に必要な2つの代謝系のうち、ブドウ糖 \rightarrow ソルビトール \rightarrow 果糖の系は抑制され、ブドウ糖 \rightarrow イノシトール系はむしろ亢進すると解

Table 2 Component levels in the right testis of rat after a single oral administration of di-*n*-butyl phthalate ^a

Component	Control	3h	6h	12h	1 day	2 days	3 days	4 days	5 days	7 days
Fructose (μg)	315.5±65.3	337.8±20.2	378.6±47.1	128.3±85.6*	57.5±20.6**	26.9±13.9**	77.8±7.7**	64.4±18.6**	129.3±65.4*	79.2±6.9**
Fructose g^{-1} testis $\times 10^{-6}$	336.9±64.3	402.7±7.6	449.7±66.9	150.6±102.1*	66.6±20.4**	29.8±15.4**	106.6±14.0**	92.6±30.7**	194.1±102.8*	122.5±10.3**
Glucose (μg)	10.0±4.0	12.6±1.8	10.9±4.5	7.8±3.2	15.5±2.7	19.7±2.3*	11.5±7.0	16.6±9.5	9.4±1.1	12.3±3.9
Glucose g^{-1} testis $\times 10^{-6}$	10.8±4.0	15.2±3.4	13.0±5.5	9.2±3.8	18.7±1.5	22.3±3.6*	15.8±9.6	23.4±13.8	13.8±2.3	18.8±5.1
Inositol (mg)	3.9±0.3	4.7±0.3	10.2±1.3**	4.2±1.4	7.4±2.2	2.3±1.2	10.6±1.9**	11.4±2.5**	25.0±16.9*	13.4±2.6**
Inositol g^{-1} testis $\times 10^{-3}$	4.2±0.3	5.6±0.2	12.0±1.2**	4.9±1.2	8.9±2.3	2.7±1.2	14.5±2.7**	16.1±3.8**	37.4±25.9	20.6±3.0**
Lactate (mg)	8.0±1.4	7.5±0.9	9.4±1.2	21.7±5.5*	12.4±2.8	11.3±2.1	11.6±3.9	22.5±7.4**	6.7±0.9	10.4±3.1
Lactate g^{-1} testis $\times 10^{-3}$	8.5±1.3	8.9±0.4	11.2±1.5	25.3±6.2*	14.6±2.6	12.7±2.5	16.0±5.4	32.4±12.0**	10.1±2.0	15.9±4.0
Sorbitol (μg)	112.0±7.1	21.0±3.6**	4.6±1.1**	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Sorbitol g^{-1} testis $\times 10^{-6}$	119.9±6.0	24.9±3.2**	5.4±1.3**	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Cholesterol (mg)	0.58±0.06	0.54±0.06	0.52±0.06	0.53±0.12	0.75±0.06**	0.45±0.05	0.64±0.08	0.83±0.09*	0.80±0.04*	0.70±0.08*
Cholesterol g^{-1} testis $\times 10^{-3}$	0.48±0.08	0.51±0.09	0.48±0.06	0.47±0.07	0.61±0.08*	0.45±0.04	0.66±0.09	1.10±0.10*	0.70±0.05*	1.29±0.09**
Protein (mg)	724.5±191.6	509.2±135.6	486.9±109.1*	763.8±207.0	597.4±89.0	584.6±123.0	636.7±102.6	644.1±8.9	563.7±66.5*	634.6±21.1
Protein g^{-1} testis	0.78±0.21	0.61±0.16	0.58±0.14	0.89±0.25	0.71±0.11	0.65±0.14	0.87±0.14	0.91±0.06	0.82±0.03	0.98±0.02

^a P<0.05 and ** P<0.01 compared with the respective control; Dunnett-type mean rank test. n.d. = not detectable. Controls are not different between data at 3, 6 and 12 h, and 1, 3 and 7 days, and the data from 1 day are used as the control values.

Table 3. Enzyme activity (mIU) in right testis of rat after a single oral administration of di-*n*-butyl phthalate^a

Enzyme	Control	3h	6h	12h	1 day	2 days	3 days	4 days	5 days	7 days
Acid phosphatase ($\times 10^3$)	9.2 \pm 0.5	8.5 \pm 1.9	9.5 \pm 0.8	10.1 \pm 0.4	10.6 \pm 0.5	8.7 \pm 0.6	8.4 \pm 0.7	9.1 \pm 0.1	7.7 \pm 0.4*	7.3 \pm 0.5*
Aldose reductase (Glucose)	9.8 \pm 0.5	10.0 \pm 1.5	11.3 \pm 1.3	11.7 \pm 0.4	12.5 \pm 0.4	9.8 \pm 0.8	11.6 \pm 0.9*	12.9 \pm 0.2**	11.1 \pm 0.6	11.3 \pm 0.7
Aldose reductase (Glucose)	310.6 \pm 26.5	271.4 \pm 26.9	161.5 \pm 11.0**	274.0 \pm 11.7	200.5 \pm 24.1	287.5 \pm 74.7	208.9 \pm 23.3	162.1 \pm 30.0*	160.8 \pm 9.5*	178.0 \pm 24.9*
Aldose reductase (Glucose)	334.0 \pm 28.5	323.1 \pm 32.1	190.0 \pm 12.9**	318.6 \pm 13.6	235.9 \pm 28.3	319.4 \pm 83.0	286.2 \pm 31.9	228.3 \pm 42.3*	233.1 \pm 13.7*	273.9 \pm 38.3
Aldose reductase (Glycerinaldehyde)	596.8 \pm 26.3	804.1 \pm 40.9	349.3 \pm 37.3**	574.7 \pm 17.7	668.7 \pm 50.1	615.3 \pm 21.4	631.3 \pm 26.2	673.8 \pm 12.9	659.9 \pm 53.6	688.1 \pm 56.7
Alkaline phosphatase ($\times 10^3$)	641.7 \pm 28.3	1004.9 \pm 48.7	410.9 \pm 43.9**	668.2 \pm 20.6	786.7 \pm 59.0	683.7 \pm 23.8	864.8 \pm 35.9**	949.0 \pm 18.2**	956.4 \pm 77.7**	1058.6 \pm 87.3**
Aspartate aminotransferase ($\times 10^3$)	27.4 \pm 3.0	28.6 \pm 4.6	40.5 \pm 1.2**	31.8 \pm 3.4	33.9 \pm 6.0	13.8 \pm 0.9*	40.6 \pm 3.6*	43.2 \pm 0.8*	42.5 \pm 2.6*	45.6 \pm 8.3*
γ -Glutamyl-transferase	29.5 \pm 3.2	34.1 \pm 5.5	47.6 \pm 1.4**	37.0 \pm 3.9	39.9 \pm 7.0	15.3 \pm 1.0*	55.6 \pm 4.9*	60.9 \pm 1.1**	61.6 \pm 3.7**	70.1 \pm 12.7**
Lactate dehydrogenase	6.5 \pm 0.2	6.0 \pm 0.3	6.3 \pm 0.7	6.6 \pm 0.1	5.9 \pm 0.5	5.4 \pm 0.4	6.9 \pm 0.1	7.1 \pm 0.4	6.5 \pm 0.1	7.0 \pm 0.5
Lactate dehydrogenase	7.0 \pm 0.2	7.1 \pm 0.4	7.4 \pm 0.8	7.7 \pm 0.1	6.9 \pm 0.6	6.0 \pm 0.4	9.5 \pm 0.2**	10.0 \pm 0.5**	9.4 \pm 0.2**	10.7 \pm 0.7**
Leucine aminopeptidase	17.8 \pm 2.7	33.7 \pm 3.4**	33.0 \pm 4.0**	33.0 \pm 0.6**	28.6 \pm 4.1*	26.1 \pm 4.7*	29.1 \pm 1.0**	29.7 \pm 3.1**	31.5 \pm 4.1**	32.3 \pm 1.8**
Sorbitol dehydrogenase	19.1 \pm 2.9	40.2 \pm 4.0**	38.8 \pm 4.7**	38.4 \pm 0.7**	33.7 \pm 4.8**	29.0 \pm 5.2	39.9 \pm 1.4**	41.9 \pm 4.4**	45.6 \pm 6.0**	49.7 \pm 2.8**
Succinate dehydrogenase	40.8 \pm 2.0	49.4 \pm 10.1	51.9 \pm 8.2	61.9 \pm 4.3*	49.9 \pm 1.1	57.5 \pm 2.1*	61.8 \pm 5.8*	56.8 \pm 4.0*	52.0 \pm 8.5	45.0 \pm 2.3
Succinate dehydrogenase	43.9 \pm 2.1	58.8 \pm 12.0	61.1 \pm 9.7**	72.0 \pm 5.0**	58.7 \pm 1.3	63.9 \pm 2.3*	84.6 \pm 7.9**	80.0 \pm 5.7**	75.3 \pm 12.3**	69.3 \pm 3.5*
Succinate dehydrogenase	638.3 \pm 22.0	710.6 \pm 64.8	770.0 \pm 54.6	876.6 \pm 93.2	812.3 \pm 131.6	614.3 \pm 9.7	427.7 \pm 98.4	538.5 \pm 28.4	731.4 \pm 189.6	640.6 \pm 17.9
Succinate dehydrogenase	686.3 \pm 23.7	846.0 \pm 77.1	905.9 \pm 68.9	1019.3 \pm 108.4**	955.7 \pm 154.8*	682.6 \pm 10.8	585.9 \pm 134.8	788.5 \pm 40.0	1060.0 \pm 274.8*	985.5 \pm 27.6
Succinate dehydrogenase	195.3 \pm 13.3	161.3 \pm 4.6	162.3 \pm 26.3	154.9 \pm 14.0	141.9 \pm 7.2	129.4 \pm 5.9**	95.6 \pm 5.7**	103.0 \pm 17.3*	124.4 \pm 18.1*	135.8 \pm 14.1*
Succinate dehydrogenase	210.0 \pm 14.3	192.0 \pm 5.5	191.0 \pm 30.9	180.1 \pm 16.3	166.9 \pm 8.5	143.8 \pm 6.6*	130.9 \pm 7.8**	145.0 \pm 24.3	180.3 \pm 26.3	208.9 \pm 21.7
Succinate dehydrogenase	311.5 \pm 5.1	349.4 \pm 32.9	304.8 \pm 11.5	264.4 \pm 40.5	270.5 \pm 22.4	181.9 \pm 25.7*	389.9 \pm 76.2	408.9 \pm 45.7	379.5 \pm 40.8	420.0 \pm 67.5
Succinate dehydrogenase	334.9 \pm 5.5	416.0 \pm 39.2	358.6 \pm 13.5	307.4 \pm 47.1	318.2 \pm 26.4	202.1 \pm 28.6*	534.1 \pm 104.4	575.9 \pm 64.4	550.0 \pm 59.2**	646.1 \pm 103.8*

^a First set of values for each enzyme is total activity. Controls are not different between data at 3, 6, 12, 24, 72 and 168 h, and the data from 24 h are used as the control values. The second set of values for each enzyme is total activity g^{-1} testis. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ compared with the respective control, Dunnett-type mean rank test.

Assay kits are Acid Phosphatase B-test Wako for ACP, Alkaline Phosphatase B-test Wako for ALP, GOT-UV test Wako for GOT, Boehringer Mannheim γ -GT for γ -GTP and LDH-UV test Wako for LDH.

積すれば説明がつく。また、乳酸レベルが増加し、LDH 活性レベルも増加していることは、精巣障害に際し、ブドウ糖→ソルビトール→果糖系の抑制現象とも関連して、乳酸からのエネルギー供給が顕著に増加していることを示している。いずれにしても、乳酸や LDH 活性レベルあるいはイノシトールレベルの増加は、ある種の精巣障害の有意性判定の新たな

指標になり得る可能性があると考えられる。

表 4 には上記の各酵素レベルの変動を精巣の各細胞で検討した結果を示している。DBP による精巣障害に際してのある特定酵素レベルでの変動は、各細胞に一樣に生ずるのではなく、細胞の種類により異なることがうかがえる。LDH に着目すると、germ cells, seminiferous lumen において有意な活

Table 4. Activities of enzymes in the testicular cell fraction after oral administration of DBP.^a

Enzyme and cell fraction	Control	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h
Aldose reductase^e						
Interstitial cells	72.1 (3.0)	67.5 (6.7)	64.3 (6.7)	64.3 (6.7)	56.3 (6.7)	55.8 (6.2)
Sertoli cells	29.6 (3.2)	34.3 (6.0)	19.5 (2.8)	24.1 (3.9)	25.8 (1.4)	25.2 (1.3)
Sertoli-germ connection	134.7 (49.1)	136.7 (15.1)	167.7 (28.2)	126.1 (38.3)	120.4 (35.2)	124.0 (32.5)
Germ cells	11.0 (1.9)	9.7 (0.1)	12.9 (2.3)	11.3 (2.3)	16.1 (2.3)	15.3 (2.2)
Seminiferous lumen	83.6 (11.9)	126.9 (16.9)	201.0 (49.5)*	144.7 (68.3)	201.0 (30.1)*	189.2 (30.9)
Alkaline phosphatase^d×10						
Interstitial cells	7.8 (0.1)	5.2 (0.7)	8.7 (0.7)	7.2 (1.1)	8.7 (0.7)	8.8 (0.5)
Sertoli cells	133.5 (28.2)	103.8 (25.9)	120.4 (41.1)	109.9 (12.3)	115.2 (29.7)	123.7 (23.7)
Sertoli-germ connection	130.4 (37.2)	133.4 (15.1)	123.7 (38.2)	139.9 (33.2)	140.9 (18.1)	140.0 (12.5)
Germ cells	2.6 (0.5)	3.7 (0.4)	5.9 (0.9)*	4.5 (0.7)	5.2 (0.5)	5.3 (0.2)
Seminiferous lumen	26.7 (7.9)	40.0 (8.5)	48.6 (8.1)*	41.9 (9.4)	40.1 (5.7)	40.2 (4.9)
γ-Glutamyl transferase^e						
Interstitial cells	55.7 (1.6)	62.5 (9.1)	70.1 (6.0)*	49.4 (8.1)	46.0 (8.2)	48.8 (7.6)
Sertoli cells	104.3 (51.5)	101.0 (50.2)	75.7 (18.5)	83.8 (22.8)	90.3 (15.2)	89.5 (19.2)
Sertoli-germ connection	5.1 (0.8)	5.3 (0.8)	4.9 (0.5)	4.5 (0.4)	4.5 (0.3)	4.0 (0.2)
Germ cells	55.7 (1.5)	62.5 (2.4)	58.8 (9.9)	47.3 (9.7)	40.1 (9.2)	45.3 (8.2)
Seminiferous lumen	1.9 (0.3)	2.2 (0.5)	2.4 (0.2)*	1.9 (0.2)	1.5 (0.2)*	1.2 (0.3)*
Lactate dehydrogenase^e×10²						
Interstitial cells	37.6 (2.8)	30.1 (4.2)	50.3 (6.8)	41.0 (5.1)	42.9 (4.1)	40.8 (4.6)
Sertoli cells	81.1 (3.2)	85.2 (2.9)	81.2 (8.7)	82.5 (6.7)	83.8 (9.8)	89.5 (9.2)
Sertoli-germ connection	136.5 (34.8)	107.4 (27.2)	94.7 (9.5)	104.7 (16.9)	113.9 (9.6)	114.0 (8.2)
Germ cells	3.5 (0.1)	6.5 (0.3)**	6.4 (0.6)*	6.4 (0.7)*	6.7 (0.8)	5.3 (0.6)
Seminiferous lumen	33.5 (0.5)	59.7 (9.7)*	74.4 (7.0)*	71.7 (2.0)	58.5 (0.3)*	51.2 (0.3)*
Leucine aminopeptidase^e×10²						
Interstitial cells	48.6 (7.8)	43.9 (16.3)	53.0 (8.9)	42.3 (5.4)	46.8 (5.6)	40.8 (6.6)
Sertoli cells	63.2 (2.0)	81.7 (15.9)	75.0 (19.4)	69.7 (10.5)	76.1 (14.6)	69.5 (9.2)
Sertoli-germ connection	98.0 (13.7)	105.0 (5.2)	99.0 (7.3)	85.6 (9.6)	78.9 (5.6)	94.0 (8.3)
Germ cells	4.6 (0.5)	6.7 (0.8)	6.9 (0.7)	5.8 (0.5)	5.4 (0.8)	5.3 (0.6)
Seminiferous lumen	22.4 (10.5)	35.4 (9.7)	45.7 (6.8)	46.1 (14.7)	24.8 (7.9)	21.2 (3.3)
Sorbitol dehydrogenase^e×10						
Interstitial cells	137.5 (16.9)	122.2 (9.1)	131.8 (12.7)	123.8 (22.4)	128.6 (18.6)	140.8 (13.6)
Sertoli cells	5.1 (0.7)	5.8 (0.8)	5.2 (1.5)	5.8 (0.6)	5.9 (0.8)	5.5 (0.2)
Sertoli-germ connection	10.9 (2.2)	11.6 (1.9)	9.5 (1.5)	8.8 (1.9)	9.6 (2.9)	9.4 (2.3)
Germ cells	1.9 (0.2)	1.0 (0.1)*	1.0 (0.1)*	1.3 (0.5)	1.3 (0.5)	1.3 (0.6)
Seminiferous lumen	7.8 (0.2)	8.9 (0.7)	8.9 (0.8)	9.2 (1.2)	9.2 (1.9)	9.2 (1.3)
Succinate dehydrogenase^e						
Interstitial cells	247.0 (19.7)	98.6 (9.1)*	156.9 (45.1)	153.4 (32.7)	265.3 (62.1)	140.8 (13.6)
Sertoli cells	281.9 (24.7)	145.7 (13.3)*	251.5 (10.5)	288.5 (40.9)	307.1 (41.7)	305.5 (40.2)
Sertoli-germ connection	127.6 (25.1)	158.1 (22.3)	161.3 (28.5)	168.5 (27.9)	178.9 (36.3)	159.4 (29.3)
Germ cells	34.4 (8.2)	29.9 (6.3)	44.7 (9.1)*	32.6 (9.5)	33.8 (7.7)	31.3 (5.6)
Seminiferous lumen	17.0 (1.7)	14.7 (0.6)	36.6 (5.3)*	21.9 (3.4)	20.7 (4.2)	19.2 (1.3)

^a The results are means (±SD); *P<0.05 and ** P<0.01 compared with the respective controls; Dunnett-type mean rank test.

^b Controls are not different between data at 3, 6, 12, 24 and 48 h, and the data from 12 h are used as the control values.

^c Value= activity in mIU g⁻¹ testis

^d Value= activity in BL unit g⁻¹ testis; BL unit= Bessey-Lowry unit.

^e Value= activity in GR unit g⁻¹ testis; GR unit= Goldbarg-Rutenburg unit.

^f Assay kits are Alkaline Phospha B-test Wako for ALP, Boehringer Mannheim γ-GT for γ-GTP, Wako LAP-AR II for LAP and LDH-test Wako for LDH.

性増加が観察された。このことは、ある化学物質による臓器障害等の可能性について、ある生体内因子の有意な変動を指標として細胞レベルで予測、評価しようとする際、臓器を構成する各細胞と各指標とを総合的に組み合わせて実施する必要があることを示唆している。また、こうしたアプローチを適切に行えば臓器障害等の機構についても有用な情報がもたらされるものと考えられる。

〔まとめ〕

本研究は人為的に実験動物に腎臓および精巣障害を引き起こし、その際有意に変動する生体内指標について検討し、細胞レベルでの安全性予測理論の構築に資する基礎的知見を得ることを目的としたものである。特に臓器のエネルギー供給経路に着目し、エネルギー供給源およびそれに関する諸酵素における変動に関して障害群と対照群との比較を行い、その変動の有意性を検討したものである。その結果、腎臓や精巣障害に際してはエネルギー供給源およびそれに関する諸酵素、例えば乳酸やLDHレベルが有意に変動することが判明し、細胞レベルにおける安全性予測試験の指標として活用できる可能性が示唆された。また、精巣障害における実験で示したように、精子細胞やセルトリ細胞等の細胞レベルで指標の変動を調べれば、変動係数(CV)値が小さく、より明確な有意差を判定できるデータが得られることが判明した。また、エネルギー供給経路に関する因子は、臓器を構成する細胞の種類に依存して *in vivo* レベルの有意な反応を反映する指標となることが判明した。このことは、臓器を構成する細胞や代謝系を考慮しながら指標項目を適切に選択すればより精密な細胞レベルでの安全性予測系を構築することが可能であることを示唆している。現在、腎臓および精巣の細胞を培養する条件が確立しているので、本研究結果をもとに、エネルギー供給経路に関する因子を指標にすれば、細胞レベルでの変動の有意性判定から、ある化学物質が腎臓あるいは精巣に引き起こす障害作用(生体関連反応)を予測することが可能か否かについての検討をさらに進める計画である。

参 考 文 献

- Barker & Summerson, J. Biol. Chem., 138, 535 (1941)
- Fukuoka et al., J. Appl. Toxicol., 7, 23 (1987)
- Gangolli, Environ. Health Perspect., 45, 77 (1982)
- Grootegoed et al., Biochem. Biophys. Acta., 767, 248 (1984)
- Tanimoto et al., Chem. Pharm. Bull., 31, 204 (1983)
- Pennington, Biochem. J., 80, 649 (1961)
- Pitts et al., J. Clin. Invest., 51, 557 (1972); Med. Clin. N. amer., 59, 507 (1975); Kidney Int., 7, 130 (1975)
- Sweeley et al., J. Am. Chem. Soc., 85, 2497 (1963)
- 主な成果報告(誌上発表)
- 1) M. Fukuoka et al., Comparative studies on nephrotoxic effects of Tris(2,3-dibromopropyl) phosphate and Bis(2,3-dibromopropyl) phosphate on rat urinary metabolites. J. Appl. Toxicol., 8, 43 (1988)
 - 2) M. Fukuoka et al., Tris(2,3-dibromopropyl) phosphate nephrotoxicity in the rat: Histological and biochemical changes in renal components by ¹³C-NMR spectra. J. Appl. Toxicol., 8, 411 (1988)
 - 3) M. Fukuoka et al., Mechanism of testicular atrophy induced by di-n-butyl phthalate in rats. Part 1. J. Appl. Toxicol., 9, 277 (1989)
 - 4) M. Fukuoka et al., Mechanism of testicular atrophy induced by di-n-butyl phthalate in rats Part 2. The effects on some testicular enzymes. J. Appl. Toxicol., 10, 285 (1990)
 - 5) Y. Zhou et al., Mechanism of testicular atrophy induced by di-n-butyl phthalate in rats Part 3. Changes in the activity of some enzymes in the Sertoli and germ cells, and in the levels of metal ions. J. Appl. Toxicol., 10, 285 (1990)
- その他公表された成果
- ・福岡正道他5名：精巣障害に関する研究、その2。Dibutyl phthalate (DBP) によるラットこう丸萎縮について。日本薬学会第109年会(1989.4)
 - ・田中 彰他4名：精巣障害に関する研究、その3。Butylbenzyl phthalate (BBP) による精巣障害について。日本薬学会第109年会(1989.4)
 - ・池本いさお他6名：Dibutyl phthalate 単回投与による実験的精巣障害。日本アンドロロジー学会第7回学術大会(1989.7)
 - ・Fukuoka et al., The 5th international congress of toxicology, Basic science in toxicology (1989.7)

ラット肝の前癌病変を指標とした免疫抑制剤
の発癌修飾作用の検討

病 理 部

発癌性の予想を短期間に判定し得る中期検索法の有効性と、本検索法による被験物質の発癌性およびその修飾作用の有無を短期間に検索が可能であるかどうかを検討した。この検索法は、ラットの肝を用いた *in vivo* の検索法であり、肝の前癌病変である胎盤型 glutathione S-transpeptidase (GST-P) 陽性細胞巢の発生を指標とするため、変異原性の有無に関わらず、比較的短期間で被験物質の癌原性や発癌の修飾作用を予想することが可能であり、しかも、

被験物質の発癌の抑制作用を検出することも可能であることが明かとなった。そこで、この中期発癌検索法を応用し、免疫抑制剤による発癌修飾作用の有無について検索した。

実験は6週齢のF344雄ラットを用い、各群23匹からなる8群に分けた。用いた免疫抑制剤として azathioprine (AZ), cyclophosphamide (CP), prednisone (PR) を選び、AZは150 ppm, PRは30 ppm で基礎飼料中に混じ、また、CPは2.5 mg/kg で飲料水中に混じて投与した。いずれの群も免疫抑制剤の投与開始1週後に体重 kg 当たり 200 mg の diethylnitrosamine (DEN) を腹腔内投与し、4週目に2/3部分肝切除を行った。さらに、実験開始3週目より500 ppm の phenobarbital (PB) を基礎飼

Table 1. Quantitative values of GST-P⁺ foci

Group	Test compound	No. of rats	Area(mm ²)/cm ²		No./cm ²	
			Mean	SD	Mean	SD
G-1	DEN+Pheno 500ppm +AZ 150ppm	22	0.65±0.18 ^a		21.2±3.99 ^a	
G-2	DEN+Pheno 500ppm +CP 2.5mg/kg	22	0.47±0.21		16.5±5.19 ^b	
G-3	DEN+Pheno 500ppm +PR 30ppm	19	0.24±0.11 ^a		8.4±2.56 ^a	
G-4	DEN+AZ 150ppm	20	0.30±0.12 ^a		12.4±3.65 ^a	
G-5	DEN+CP 2.5mg/kg	22	0.22±0.13		6.2±2.49	
G-6	DEN+PR 30ppm	19	0.04±0.02 ^a		1.7±0.93 ^a	
G-7	DEN+Pheno 500ppm	23	0.40±0.21		13.3±4.35	
G-8	DEN	22	0.18±0.14		5.3±2.13	

Pheno:Phenobarbital, AZ:Azathioprine, CP:Cyclophosphamide

PR:Prednisone

a: Significantly different from group 7, p<0.01.

b: Significantly different from group 7, p<0.05.

c: Significantly different from group 8, p<0.01.

料中に混じり投与した。実験群 (Table 1 参照) として、第1から3群は免疫抑制剤とPBを投与した群 (AZ+PB, CP+PB, PR+PB)、第4から6群は免疫抑制剤の投与群 (AZ, CP, PR)、第7群はPBの投与群 (PB)、そして第8群は対照群とした。実験は9週間で終了し、動物をエーテル麻酔下に採血し、白血球分画を調べた。屠殺後、肝・脾臓・胸腺を摘出し、それらの重量を測定後、ホルマリン固定した。固定後、肝臓の一定の葉から切片を切り出し、一匹当たり4切片づつからなる連続切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン (H&E) 染色と、GST-Pを用いた免疫組織化学染色とを行った。肝に認められたGST-P陽性細胞巣は画像処理装置を用いてその数および面積を計測し、また、肝の全体の面積をH&E染色切片を用いて計測し、肝の単位面積当たりのGST-P陽性細胞巣の数および面積を算出し、対照群と比較検討した。

その結果、白血球分画と脾臓および胸腺の重量から免疫抑制剤による効果が確認された。GST-P陽性細胞巣の単位面積当たりの数並びに面積は (Table 1) 対照群で各々0.18, 5.3であったが、AZ群で0.3, 12.4と有意に増加した。さらにPB群で0.4, 13.3であるのに対して、AZ+PB群では0.65, 21.2といずれも有意に増加していた。逆に、PR群では0.04, 1.7と抑制傾向を示し、さらに、PR+PB群では0.24, 8.4とPB群と比較して抑制傾向を示した。以上の結果より、AZには肝発癌の前癌病変の発生を促進的に作用することが明らかとなり、また、PRは抑制傾向を示すなど免疫抑制剤には肝の前癌病変の発生過程を修飾するものがあることが示された。

このように、肝の前癌病変であるGST-P陽性細胞巣の発生を指標とした中期発癌検索法は、免疫抑制剤など医薬品の発癌性やその過程の修飾作用の有無を予想する上で極めて有効な検索法であると言える。

新生仔における行動発達研究法の検討

Negative Geotaxis 試験法について

薬理部

近年、化学物質の次世代における安全性試験の一環として、ラットあるいはマウス出生仔の行動発達試験が提唱されている。それらの試験項目のうち、特に、姿勢制御や平衡感覚などの運動機能に関連あ

る数種の反射行動試験は出生直後から実施が可能である。なかでもNegative Geotaxis (NG, 背地走性) 試験は、反射の有無を判定するだけでなく、反射行動の所要時間を指標としていることから、各個体における影響の程度を数値として比較することが可能である。しかし、測定条件やチェックポイントが研究者間で一致していないことが成績を相対的に比較する場合の難点となっていると考えられたのでその試験基準について検討した。

当部では従来、文献的に繁用されている傾斜角25°の条件下で、頭部を斜面の谷側に向けて置かれたラットが180°山側に向き直るまでの所要時間 (回転所要時間) を指標として、出生仔のNG試験を4日齢から12日齢まで実施しており、文献的に通例実施されている6日齢以後については、対照群の測定値は文献値とほぼ一致する成績を得ている。一方、4~6日齢時には、回転の際にバランスを崩して転落する個体 (「転落」) や斜面上に置かれた姿勢のまま滑落する個体 (「滑落」) が散見された。

妊娠期投与化学物質の出生仔に及ぼす影響を調べる一環として、妊娠期にクロルデン (CL) を投与 (10, 20 mg/kg; p.o.) したラット出生仔についてNG試験を行った。回転所要時間の測定は60秒を限度とした。なお、極力、計時データを得るため次のような便法を試みた。すなわち、所要時間が60秒を越えた場合には、これを60秒として計算し、また「転落」または「滑落」例については、計時を一旦中止してラットをもとの位置に戻した後、計時を継続した。さらに、「滑落」を繰り返し回転の見られない場合には、これを60秒以上経過とみなした。その結果、CL群における平均回転所要時間は4~10日齢の間対照群よりも短縮し、見かけ上、運動機能の発達促進を示す成績が得られた (4日齢の対照群で54.7秒, CL 10 mg/kg 群44.7秒, 20 mg/kg 群40.3秒)。一方、4日齢のCL群では「転落」や「滑落」が対照群より多かった (対照群では「転落」12.5%, 「滑落」0%, CL 10 mg/kg 群ではそれぞれ32.5%と42.5%, 20 mg/kg 群では33.5%と75.0%)。上述の「転落」や「滑落」は、対照群では6日齢を過ぎるとほとんど見られなくなるのに対し、CL群では10日齢でも依然見られた。斜面上での姿勢の保持状態は運動機能発達過程の要因と考えられる。そこで、回転所要時間と「転落」や「滑落」を加味した次のようなRating Scaleを設定して成績の見直しを試みた。

- 0: 斜面に置かれた姿勢のまま滑落した場合
- 1: 回転途中でバランスを崩して転落した場合
- 2: 回転所要時間が60秒を越える場合
- 3: 回転所要時間が60秒以内の場合

その結果、4日齢時の平均点数は、対照群では2.2、CL 10 mg/kg 群で1.3、20 mg/kg 群で0.8であった。また、この点数は10日齢までの間CL群の方が対照群より低く、CL群におけるNG反射の発達遅延が示唆された。

NG試験の指標としては回転所要時間が従来一般に繁用されている。一方、上述の成績から、斜面上での姿勢の保持状態は、発育に伴う運動機能の変化を調べるうえの要因であることが示された。したが

って、NG試験による新生仔の行動発達試験では、それらの要因を加味したRating Scaleが、より有用な指標となると考える。

Rating Scaleについては、所要時間を含めず斜面上の回転状態のみを段階的に評価する方法も報告されているが、その判定にはある程度の熟練が必要と考えられる。むしろ、所要時間の測定とあわせて「転落」あるいは「滑落」した個体を記録し、測定終了後評価の方が実験操作上容易であり、測定者による誤差も少ないと考えられる。Rating Scaleを含めた試験基準については、映像解析装置を用いて更に詳細な検討を進めている。

Aoyagi, N., Kaniwa, N. and Ogata, H.*: **Effects of Food on Bioavailability of Two Indomethacin Capsules Containing Different Sizes of Particles**

Chem. Pharm. Bull., 38, 1338~1340 (1990)

50 μm 以下および 125~177 μm の異なる粒径のインドメタシンを含む2種のカプセルについて、絶食時、食後投与におけるバイオアベイラビリティを比較した。いずれの条件下でも粒子径の小さい製剤の方が最高血中濃度は高かったが、吸収量には差がみられなかった。食事は両製剤の最高血中濃度を低下させ、その到達時間を遅らせた。deconvolutionにより解析した結果、食事は両製剤の吸収速度を同じように遅らせることが判明した。食事摂取により製剤の胃内容物排出速度が遅延したためと推定される。

* 明治薬科大学

Kaniwa, N., Aoyagi, N., Ogata, H.*, and Ishii, M.*: **Application of the NONMEM Method to Evaluation of the Bioavailability of Drug Products**

J. Pharm. Sci., 78, 1116~1120 (1990)

population pharmacokinetics の解析法のひとつで、pharmacokinetic model 依存性の解析法である NONMEM 法によって、生物学的同等性試験データの解析を試みた。健康成人による多数回の採血点を伴った生物学的同等性試験データでは、pharmacokinetic model 非依存性の従来法および NONMEM 法で求めた、バイオアベイラビリティの量および速度を評価するパラメータの製剤間の平均値の差の信頼区間は、ほぼ等価であり、NONMEM 法によっても生物学的同等性の評価は正確に行えると考えられた。また、一人当りの採血点が少ない疑似データを作成し、NONMEM 法によって生物学的同等性を評価したところ、多数回の採血点のあるデータと等価の結果が導けた。これより、従来の方法では解析できなかった臨床データからも、NONMEM 法によって生物学的同等性の評価が行えることが示唆された。

* 明治薬科大学

Kaniwa, N., Ogata, H.*¹, Aoyagi, N., Ejima, A.,

Takahashi, T.*², Uezono, Y.*², and Imasato, Y.*²: **Bioavailability of Cyclandelate from Capsules in Beagle Dogs and Dissolution Rate: Correlation with Bioavailability in Humans**

J. Pharmacobio-Dyn., 14, 152~160 (1991)

ヒトで既に生物学的同等性試験を行ったことがある5種の市販シクランデレート・カプセルについて、イヌによる生物学的同等性試験および *in vitro* 溶出試験を行った。空腹時投与のイヌ生物学的同等性試験の結果はヒト生物学的同等性試験の結果と良い相関性を示し、ヒトでバイオアベイラビリティの低い製剤をイヌ試験から予測することが可能であると考えられた。しかし、食後投与の実験ではヒト試験の結果とイヌ試験の結果が異なり、モデル動物としてのイヌの使用は限定されると判断できた。一方、ヒト生物学的同等性試験と良い相関性を示した *in vitro* 溶出試験法は、Tween 80 を添加した 18 L の試験液を用いた方法であった。

*¹ 明治薬科大学

*² 大日本製薬製品研究所

Yoshioka, S., Aso, Y. and Takeda, Y.: **Statistical Evaluation of Accelerated Stability Data Obtained at a Single Temperature. I. Effect of Experimental Errors in Evaluation of Stability Data Obtained**

Chem. Pharm. Bull., 38, 1757~1759 (1990)

製剤の化学的安定性を、一水準の温度で得られた加速データに基づいて評価する時の信頼性を統計的に考察した。加速試験において規格値内の薬物含量が観察される確率は真の分解速度および活性化エネルギーによって決定されるが、その他に定量誤差、温度制御誤差によっても影響を受ける。それらの要因を定量的に解析した。

Yoshioka, S., Aso, Y. and Takeda, Y.: **Statistical Evaluation of Accelerated Stability Data Obtained at a Single Temperature. II. Estimation of Shelf-Life from Remaining Drug Content**

Chem. Pharm. Bull., 38, 1760~1762 (1990)

一水準の温度での安定性加速試験で観察される薬物残存量と、ある一定の危険率で推定される有効期

間との関係を解析した。定量および温度制御の精度が既知であれば、活性化エネルギーの関数として有効期間を推定できる関係式を展開した。

Kishida, A., Dressman, J. B.*, Yoshioka, S., Aso, Y., and Takeda, Y.: **Some Determinants of Morphology and Release Rate from Poly (L) Lactic Acid Microspheres**

J. Controlled Rel., **13**, 83~89 (1990)

ポリ乳酸マイクロスフェアの形態と薬物放出性を、薬物の含量および脂溶性、乳化剤、溶媒留去速度等を変化させて検討した。薬物含量を増加すると変形したマイクロスフェアの率が高まり、それに従って水溶性薬物のエトポシドでは放出速度が増大した。しかし、脂溶性薬物のモデルであるズガンIIIでは放出性の増大は見られず、脂溶性が放出性を大きく支配することが明らかになった。また乳化剤としてゼラチンを使用すると、マイクロスフェアの変形度は溶媒留去速度に依存したが、ポリビニルアルコールを用いた場合には、留去速度の影響は見られず、乳化系の安定性がマイクロスフェアの形態を決定する要因であることが明らかになった。

* University of Michigan, USA

Yoshioka, S. and Carstensen, J. T.*: **Nonlinear Estimation of Kinetic Parameters for Solid-State Hydrolysis of Water-Soluble Drugs. II: Rational Presentation Mode below the Critical Moisture Content**

J. Pharm. Sci., **79**, 799~801 (1990)

臨界湿度以下における塩酸メクロフェノキサートの加水分解を速度論的に検討し、水溶性固形医薬品の低湿度下における加水分解を表わす理論式を展開した。分解率を温度、水蒸気圧および時間の関数で表わし、非線形回帰によってパラメータを推定することによって、低湿度領域における安定性の予測を可能にした。

* University of Wisconsin, USA

Yoshioka, S. and Carstensen, J. T.*: **Rational Storage Conditions for Accelerated Testing of Stability of Solid Pharmaceuticals**

J. Pharm. Sci., **79**, 943~944 (1990)

安定性ガイドラインに示されている加速試験法を固形製剤に適用する場合、温度のみならず、湿度条

件も制御して行うことが必要であることを、科学的根拠を示して提唱した。

* University of Wisconsin, USA

Izumikawa, S., Yoshioka, S., Aso, Y. and Takeda, Y.: **Preparation of Poly(l-lactide) Microspheres of different crystalline Morphology and Effect of Crystalline Morphology on Drug Release Rate**

J. Controlled Release, **15**, 133~140 (1991)

液中乾燥法で作製したプロゲステロン内包のポリ(L)乳酸マイクロスフェアについて、比表面積、マトリックス中のポリマーの結晶化度、薬物の分散性などの物理化学的特性をDSC、粉末X線回折、FT-IRなどを用いて解析した。同時にマイクロスフェアの製造条件による物理化学的特性の変化、およびそれともなう薬物放出性の変動を検討した。その結果、マトリックスの結晶化度が製造過程における溶媒留去速度によって大きく影響され、それが薬物放出性を支配することが明らかになった。

Izutsu, K., Yoshioka, S. and Takeda, Y.: **Protein Denaturation in Dosage Forms Measured by Differential Scanning Calorimetry**

Chem. Pharm. Bull., **38**, 800~803 (1990)

製剤中のタンパク質の安定性をβ-ガラクトシダーゼ製剤をモデルとしてDSC(示差走査熱量計)を用いて検討した。一般型DSCを用いた測定では、高温保存後の製剤中タンパク質の熱変性による見かけのエンタルピーは残存活性とほぼ比例した。また、安定化剤である糖類や変性促進剤による変性温度の変化は溶液状態でのβ-ガラクトシダーゼ安定性との相関がみられた。一方、プリバロフ型断熱DSCによりトロンピンやカリジノゲナーゼ注射液など低濃度タンパク質溶液で熱変性を直接測定できることが明らかとなった。DSCを用いる方法は従来の化学的、生物学的な活性測定に比べ簡便なため、製剤中の未変性タンパク質測定や、製剤工程中のタンパク質安定性に影響を与える要因の検討に有用と考えられる。

Izutsu, K., Yoshioka, S. and Takeda, Y.: **The Effects of Additives on the Stability of Freeze-dried β-Galactosidase Stored at Elevated Temperature**

Int. J. Pharm., **71**, 137~146 (1991)

タンパク質凍結乾燥品の安定性に与える添加物質とその結晶化度の影響を検討した。β-ガラクトシダーゼと各種添加物質の凍結乾燥品を作製し高温乾燥空気中での保存による酵素活性の変化、および粉末X線回折により結晶化度を測定した。用いた添加剤はそれぞれ溶液中での酵素の熱安定性を向上させるものであるが、凍乾品では非晶質で存在する添加物質のみが安定化作用を示し、一方結晶が観察された試料では添加剤による安定化作用がみられなかった。結晶化によりタンパク質分子との相互作用が変化し、安定化作用に影響を及ぼすと考えられる。

石橋無味雄, 豊岡利正, 川村元一, 武田 寧: 非水溶液中における有機塩基の塩酸塩の滴定法 (その1) 硝酸ビスマスを用いる非水滴定法の検討
医薬品研究, **22**, 259~263 (1991)

日局の試験方法では、氷酢酸中で有機塩基の塩酸塩を過塩素酸で滴定することが多い。このときに塩酸の滴定に対する妨害を防止するため、酢酸第二水銀試液などが用いられる。この酢酸第二水銀の代りに無害な硝酸ビスマスを用いる方法が日局収載医薬品の試験法とし、使用できるかどうかを検討した。

Toyo'oka, T., Yamazaki, T., Tanimoto, T., Sato, K., Sato, M., Toyoda, M., Ishibashi, M., Yoshihira, K. and Uchiyama, M.: Characterization of Contaminants in EMS-associated L-Tryptophan Samples by High-performance Liquid Chromatography
Chem. Pharm. Bull., **39**(3), 820~822 (1991)

好酸球増多筋肉痛症 (EMS) に関連する不純物を確認するために、事故品のトリプトファン製剤に使用されたロット (ケースロット) および事故品とは無関係なロット (コントロールロット) を吸光度検出器および蛍光検出器付 HPLC により検索した。トリプトファン試料中には少量であるがたくさんの不純物ピークが認められ、それらの幾つかは 5-ヒドロキシトリプトファン、インドールアルデヒド、インドールなどと確認された。ケースロットに比較的含量が多い 2 種の不純物のうちのひとつは、ジトリプトファンアミナールオブアルデヒド (ピーク E) であることが明らかとなったが、他方の物質、UV-5 (FL-7) の構造は現在のところ不明である。

Nakahara, Y., Takahashi, K., Shimamine, M. and Takeda, Y.: Hair Analysis For Drug Abuse, Part I. Hair Analysis of Methamphetamine Abuse by Isotope Dilution Gas Chromatography/Mass Spectrometry
J. Forensic Sci., **45**, 67~78 (1991)

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 2 cm 毎に分画し、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バラツキを調べたところ、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わかった。この研究の結果、毛髪に分画分析により、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わかった。

Nakahara, Y. and Ishigami, A.: Inhalation Efficiency of Free-Base Cocaine by Pyrolysis of 'Crack' and Cocaine hydrochloride
J. Anal. Toxicology, **15**, 105~109 (1991)

塩酸コカインおよびクラック (遊離型コカイン) の加熱吸引実験により、コカイン吸入率を測定し、比較した。その結果、クラックの加熱吸引の場合、コカイン吸入率は 170°C では 73%、220°C では 62% であったが、270°C 以上に加熱するとコカインが著しく減少し、熱分解生成体の methylecgonidine (MEc) が生成し、その生成比は加熱温度の上昇に伴い増加した。一方、塩酸コカインの加熱吸引実験では主に carbomethoxy cycloheptatriene (CMCH) の 4 種の位置異性体が生成することが確認された。主生成物が MEc か CMCH かを確認する熱分解 GC/MS を用いて検体が塩酸コカインかクラックの識別法を確立した。

Fujimoto, S.*, Ishimitsu, S., Kanazawa, H.*, Ohara, A.* and Hayakawa, T.: Accelerating Effects of Glutathione on Hydroxylation of Phenylalanine by Stimulated Polymorphonuclear Leukocytes
Chem. Pharm. Bull., **38**, 1653~1655 (1990)

活性化された多形核白血球は活性酸素としてOHラジカルを生成し、これは phenylalanine の水酸化で検出できることを既に報告している。今回、活性化された多形核白血球による phenylalanine の水酸化が各種のSH化合物存在下で著しく促進されることが見いだされた。SH化合物の中では glutathione (G-SH) が最も効果的で白血球刺激剤の種類に応じて3~9倍の促進作用を示した。G-SHの効果は、スーパーオキシドジスムターゼや各種のOHラジカルスカベンジャーで顕著に阻害された。一方、人工的なスーパーオキシド→OHラジカル生成系ではG-SHはむしろ阻害的に作用した。これらの結果は、G-SHが活性化多形核白血球によるOHラジカル生成のいずれかの過程に特異的に関与し、ラジカル生成の方向に促進的に作用していることを示唆している。

* 京都薬科大学

Niimi, S., Hayakawa, T., Uchida, E. and Tanaka, A.: **Effects of glucocorticoids on deoxyribonucleic acid(DNA) synthesis stimulated by growth factors in cultured rat skin fibroblasts** *Chem. Pharm. Bull.*, 38, 1633~1638 (1990)

ラット皮膚繊維芽細胞における成長因子により促進されたDNA合成に及ぼす各種グルココルチコイドの作用について、構造活性相関の観点で調べ、さらに受容体への結合性についても検討を行った。その結果グルココルチコイドがDNA合成を抑制することを見だし、抑制に関与する構造を明らかにした。また受容体への結合性ととの比較から、抑制に関与する構造は二つのタイプに分かれることを示した。

Niimi, S., Hayakawa, T. and Tanaka, A.: **Hormonal regulation of growth hormone receptors in primary cultured rat hepatocytes** *Endocrinology*, 127, 688~694 (1990)

初代培養ラット肝細胞において成長ホルモン受容体の消長に関与しているホルモンを¹²⁵Iでラベルした成長ホルモンの結合を調べることにより明らかにした。さらにその作用機構について Scatchard plot 分析、阻害剤を用いた結合実験などにより調べた。その結果デキサメタゾンは蛋白合成を介して成長ホルモン受容体を増加させ、これに対しグルカゴンは促進的に、インスリンとEGFは抑制的に作用することを明らかにした。

Niimi, S., Hayakawa, T. and Tanaka, A.: **Effect of cell density on induction of growth hormone receptors by dexamethasone in primary cultured rat hepatocytes**

Biochem. Biophys. Res. Commun., 174, 928~933 (1991)

初代培養ラット肝細胞におけるデキサメタゾンによる成長ホルモン受容体の誘導に対する細胞密度の効果について¹²⁵Iでラベルした成長ホルモンの結合を調べることにより明らかにし、さらにその機構について Scatchard plot 分析、グルココルチコイドリセプターアッセイなどにより調べた。その結果デキサメタゾンによる成長ホルモン受容体の増加作用は、細胞密度に依存しており、細胞密度が高いほど作用が強いことを見いだした。一方デキサメタゾンの結合は細胞密度により変化しないことから、デキサメタゾンの作用は細胞密度によりグルココルチコイド受容体以降の段階で調節されることが示された。

Uchida, E., Shimokawa, S.*¹, Nishida, Y.*¹, Takasu, H.*¹, Ikehara, M.*¹, Uesugi, S.*¹, Tomita, K.*¹, Tanaka, A., Morikawa, M.*², Hayakawa, T. and Nishikawa, S.*¹: **An active site of growth hormone for eliciting the differentiation of preadipose 3T3-F442A cells to adipose cells**

Biochem. Biophys. Res. Commun., 172, 357~363 (1990)

ヒト成長ホルモン(hGH)の活性部位を検索するために蛋白質工学的手法を用いてhGH変換体を作製し、脂肪細胞分化活性および受容体結合活性を検討した。54-74番目のアミノ酸残基よりなるループ部分の主鎖の角度を固定しているPro残基のうち、Pro59を変換しても活性は変わらないがPro61を変換すると活性が約半分に低下した。また62-67位のアミノ酸残基を除去すると活性がほとんど失われた。この結果から62-67位付近のアミノ酸残基は受容体との相互作用、活性発現に極めて重要な活性部位のひとつであること、Pro61は活性高次構造形成に寄与していることが示唆された。

*¹ 大阪大学薬学部

*² ㈱東京免疫薬理研究所

Uchida, E., Uemura, H.*¹, Tanaka, T.*¹, Nishikawa, S.*¹, Uesugi, S.*¹, Tanaka, A., Mori-

kawa, M.*², Hayakawa, T. and Ikehara, M.*¹:
**Activity of artificial mutant variants of
human growth hormone deficient in a disulfide
bond between Cys53 and Cys165**

Chem. Pharm. Bull., **39**, 150~153 (1991)

ヒト成長ホルモン (hGH) に2箇所あるジスルフィド (S-S) 結合の1つを形成する53位と165位のCys残基を他のアミノ酸に変換することによりS-S結合を欠損したhGH変換体5種を蛋白質工学的手法を用いて作製し、S-S結合とCys残基がhGHの受容体への結合と生物活性発現に果たす役割を検討した。その結果53位と165位のCys残基、S-S結合はいずれも活性発現に必須ではないが、S-S結合の形成は受容体との完全な相互作用、完全な活性発現を引き起こすために必要な立体構造の保持に機能していることが示唆された。

*¹ 大阪大学薬学部

*² (株)東京免疫薬理研究所

Tomoda, A.*, Yoneyama, Y.*, Yamaguchi, T., Shirao, E.*, Kawasaki, K.*: **Mechanism of coloration of human lenses induced by near-ultraviolet-photo-oxidized 3-hydroxykynurenine**

Ophthalm. Res., **22**, 152~159 (1990)

3-hydroxykynurenine存在下に、ヒト白内障レンズ破砕液を紫外線照射することによりキサントマチン類似物質が生成された。この生成したキサントマチン類似物質の吸収スペクトルは、褐色着色白内障レンズのスペクトルと一致していた。これら結果より、褐色白内障レンズの生成には、3-hydroxykynurenineの縮合が関与することが示唆された。

* 金沢大学医学部

Kawamura, A.*, Imai, N.*, Kawaguchi, T.* and Hayakawa, T.: **Simple *in vivo* Bioassay for Erythropoietin**

British J. Haematology, **77**, 424~430 (1991)

エリスロポエチン (EPO) に関し、従来汎用されていた *in vivo* bioassay 法は動物に特殊な前処理を必要とすること、アイソトープを使用すること、試験に長期間を要することなど多くの難点があった。そこで、これらの難点を克服した新たなEPO力価測定法の開発を試みた。その過程で、EPO投与後の正常マウス末梢血中に、マイルドな溶血剤に抵抗

性でかつ白血球とはその粒子サイズにおいて識別できる細胞が出現する現象を見いだした。この現象を利用したEPO力価測定法の確立に関する基礎的検討を行った結果、正常マウスにEPOを1~8 IU/匹、3日間連続投与し、4日目に採血した末梢血を希釈、溶血剤処理後、マイクロセルカウンターで白血球よりサイズの小さい細胞画分を計数するとき、最も良好な用量・反応曲線が得られた。この計数は目視法による網状赤血球数とも良好な相関を示した。測定精度は従来の多血マウス法や飢餓ラット法より優れていた。

* 中外製薬(株)研究所

Hayakawa, T., Niimi, S. and Uchida, E.: **Control of Therapeutic Recombinant Human Growth Hormone—A View from Japan—**

Pharmeuropa, **3**, Special Issue (Human Growth Hormone), 33~40 (1991)

医療用組換え型ヒト成長ホルモン (r-hGH) のアッセイ法として従来より種々問題点が指摘されていた脳下垂体摘出ラット法 (*in vivo* 法) に代わる新しい試験法を模索する国際共同研究の一翼を担った。まず、脂肪前駆細胞の脂肪細胞への分化を指標とする新たな *in vitro* bioassay 法 (3T3 法) を確立するために、WHO標準品や各種のhGH変異体を用いて特異性、感度、精度、定量性などに関する検討を行った結果、力価測定法として利用できることを確認した。次に、各種化学的、酵素的処理を施し、かつブラインド状態にした各種hGH試料について、3T3法、SE-HPLC法、RP-HPLC法などによる測定を実施し、*in vivo* 法による力価検定結果と比較した。その結果、3T3法による測定結果が *in vivo* 法の結果と最もよく相関することを認め、生物活性を指標とする「力価」測定法として適切であると判断した。HPLC法は試料の種類によっては相関しないケースもあったが、きわめて高純度で均一なhGH製品の「含量」測定には簡便で、有用であった。しかし、生物活性に関わる活性高次構造が維持されているか否かを理化学的手段で検知できるというデータは得られなかった。以上の結果もふまえて、hGHを含むバイオテクノロジー由来タンパク質製剤の品質評価法の今後のあり方について論考した。

谷本 剛, 川崎ナナ, 周 玉, 田中 彰: ウロキ

ナーゼ製剤の簡易定量法に関する基礎的検討

医薬品研究, 21, 439~443 (1990)

ウロキナーゼ製剤の合成基質を用いる吸光度測定法および蛍光測定法を確立し、従来法の二段法との相関を検討した。ヒト尿由来製剤の吸光度測定法および蛍光測定法で得られた値は二段法の値より約10%および45%低かった。これはヒト尿由来製剤が高分子量型ウロキナーゼを主成分とするにもかかわらず、使用するウロキナーゼ標準品が低分子量型であることに起因するものであった。一方、低分子量型ウロキナーゼである組織培養由来製剤では三つの測定法でほぼ等しい値が得られた。これらの結果から、高分子量型ウロキナーゼを主成分とするヒト尿由来製剤の合成基質を用いた簡易測定法には高分子量型ウロキナーゼ標準品が必要であると指摘された。

Ohta, M., Tanimoto, T. and Tanaka, A.: Characterization of Aldose Reductase and Aldehyde Reductase from the Medulla of Rat Kidney

Chem. Pharm. Bull., 38, 1639~1643 (1990)

ラット腎臓髓質からアルドース還元酵素 (AR) とアルデヒド還元酵素 (ALR) を均一に精製し、その性質を詳しく調べた。分子量は AR: 37000, ALR: 39000 で、等電点は AR: 5.4, ALR: 6.2 であった。AR はグルコースやガラクトースなどのヘキソースに作用したが、ALR はまったく作用しなかった。各種基質に対する AR の Km は ALR のそれより低かった。AR は NADPH と NADH の両者を補酵素としたが、ALR は NADPH のみを補酵素に利用した。AR は硫酸イオンで著しく活性化されたが、ALR ではこの活性化は見られなかった。既知アルドース還元酵素阻害剤は AR, ALR ともに阻害したが、AR のほうが阻害剤に対する感受性が高かった。

赤木好男*, 照林宏文*, 田坂 宏*, 宮本嘉久*, 池部 均*, 高橋幸男*, 辻 俊明*, 茨木信博*, 堤 元信*, 横井則彦*, 松本康宏*, 馬嶋清如*, 岡本庄之助*, 森 和彦*, 谷本 剛: ラット糖尿病性白内障とアルドース還元酵素阻害剤

日本白内障学会誌, 2, 1~13 (1990)

白内障が薬剤投与で治癒するという、これまでの白内障水晶体研究史上ほとんど例のない薬剤が登場

した。これがアルドース還元酵素阻害剤 (ARI) である。本稿では、実験的糖白内障の発症様式、ARI がどのように白内障を抑制し治癒せしめるかを著者の動物実験結果を中心に論述した。さらに、アルドース還元酵素の免疫組織化学的観察からヒト糖尿病性白内障発症にも本酵素が関与することを示した。

* 京都府立医科大学

辻 俊明*, 松本康宏*, 茨木信博*, 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の効果 2. ラット糖尿病性白内障抑制効果

日本眼科紀要, 41, 1183~1188 (1990)

新アルドース還元酵素阻害剤 FR74366 のラット糖尿病性白内障に対する効果を組織学的、生化学的に調べた。3週齢ラットにストレプトゾトシンを静注して実験的糖尿病性白内障を発症させ、これと同時に高濃度 (0.075%) および低濃度 (0.025%) FR74366 含有食を与えた。実験開始後経時的に水晶体を摘出し、顕微鏡的観察およびソルビトール含量の測定を行った。この結果以下のことが明らかとなった。(1) FR 74366 は糖尿病性白内障の抑制効果を有する。(2) その効果は濃度依存性であり、低濃度薬剤は作用が弱く効果にばらつきがみられるが、高濃度薬剤は強力な効果を有する。

* 京都府立医科大学

茨木信博*, 松本康宏*, 照林宏文*, 池部 均*, 辻 俊明*, 赤木好男*, 川崎ナナ, 谷本 剛: ラットガラクトース白内障の発症・進展について その2

日本眼科紀要, 41, 1004~1009 (1990)

生後12週齢ラットを15, 25, 50%濃度ガラクトース含有食餌でそれぞれ飼育し、ヒト糖尿病性白内障の動物モデルであるガラクトース白内障を作成した。そして、経時的な水晶体ガラクトール量測定ならびに光顕による組織学的検索を行い、以下の結果を得た。

(1) ガラクチトールが一定濃度以上蓄積して水晶体線維は初めて膨化する。

(2) ガラクチトール蓄積が急速なときは赤道部、緩徐なときは前後表層皮質線維が膨化する。

(3) 低濃度のガラクトース負荷では水晶体線維に変化は起こらない。

この実験結果と既報告結果から、糖尿病症例で血

糖異常が同程度と仮定すると、表層性線維の膨化を初発症状とする糖尿病性白内障は若年者において容易に発症する可能性があり、これに対して高齢者では発症し難いと推論した。

* 京都府立医科大学

Kawasaki, N., Tanimoto, T. and Tanaka, A.: **Determination of Non-Protein-Bound Iron in Rat Tissue by Ion Chromatography with Electrochemical Detection**

Anal. Biochem., 192, 104~108 (1991)

生体試料中の非蛋白結合性 Fe(II) および Fe(III) の特異的高感度迅速分析法を電気化学的検出イオンクロマト HPLC で確立し、試料注入量 10 μ l で 0.5 μ M 以上の Fe(II) および Fe(III) が定量できた。この方法をラット肝サイトゾール画分中の Fe(II) および Fe(III) の測定に適用し、鉄結合蛋白からの鉄の遊離は pH に依存し、組織中の非蛋白結合鉄は低 pH で Fe(II) として測定された。

Tanimoto, T., Ohta, M., Tanaka, A., Ikemoto, I.* and Machida, T.*: **Purification and Characterization of Human Testis Aldose and Aldehyde Reductase**

Int. J. Biochem., 23, 421~428 (1991)

ヒト精巣からアルドース還元酵素 (AR) とアルデヒド還元酵素 (ALR) を均一に精製した。分子量は AR が 36 kD, ALR が 38 kD であり、等電点は AR が 5.9, ALR が 5.1 であった。AR はアルド糖に作用するが、ALR はほとんど作用しなかった。AR のグルコース、ガラクトース、キシロースに対する K_m 値はそれぞれ 57, 49, 6.2 mM であった。補酵素として、AR は NADPH と NADH の両者を、ALR は NADPH のみを利用した。AR は硫酸イオンで約 3 倍に活性化されたが、ALR はほとんど活性化されなかった。バルプロ酸は ALR を強く阻害したが、AR への阻害は非常に弱かった。既知アルドース還元酵素阻害剤 (ARI) は両酵素とも阻害したが、AR のほうが阻害剤への感受性は高かった。AR はピリドキサル 5-リン酸 (PLP) で 2 倍以上に活性化され、PLP で活性化された AR は ARI に対する感受性を失った。このことは PLP の結合部位であるリジン残基が ARI の作用部位に含まれていることを示唆するものである。

* 東京慈恵会医科大学

谷本 剛, 川崎ナナ, 田中 彰, 四方田千佳子, 村井真美, 岡田敏史, 木村俊夫: **ウロキナーゼ製剤の簡易定量法に関する研究—その 2—**

医薬品研究, 22, 255~258 (1991)

高分子量型ウロキナーゼ標準品を 5 機関の共同検定により試作した。この標準品を用いてヒト尿由来ウロキナーゼ製剤の合成基質を用いた吸光度測定法と二段法との相関を検討した。現ウロキナーゼ標準品 (低分子量型) を使用した場合、吸光度測定法では二段法より約 10% 低い値を与えたが、高分子量型標準品を用いると両測定法ではほぼ同じ値が得られた。高分子量型ウロキナーゼ標準品を制定することによって、ヒト尿由来製剤を合成基質を用いた吸光度測定法で迅速簡便に定量することが可能になった。

Fukuoka, M., Zhou, Y., Tanaka, A., Ikemoto, I.* and Machida, T.*: **Mechanism of testicular atrophy induced by di-n-butyl phthalate in rats. Part 2. The effects on some testicular enzymes**

J. Appl. Toxicol., 10, 285~293 (1990)

ジブチルフタレート を 2.4 g/kg 体重の割合で、単回経口投与し、右の精巣は生化学的検査に、一方左の精巣は固定後、病理組織的検査に用いた。病理組織的結果は単回投与も連続 7 日間投与と同じであり、生化学的結果は果糖、ブドウ糖、ソルビトール、イノシトール、コレステロール、タンパク質に変化が現れ、これらに関与する酵素活性が阻害されることが確認された。

* 東京慈恵会医科大学

Zhou, Y., Fukuoka, M. and Tanaka, A.: **Mechanism of testicular atrophy induced by di-n-butyl phthalate in rats. Part 3. Changes in the activity of some enzymes in the Sertoli and germ cells, and in the levels of metal ions**

J. Appl. Toxicol., 10, 447~453 (1990)

14 C-ジブチルフタレート を 2.4 g/kg 体重の割合で、単回経口投与後精巣を各細胞に分割し、各細胞中の代謝物を同定した。一方非標識体を投与後、精巣中の 41 種の金属量と各細胞中のエネルギー供給系酵素活性を対照群と比較検討した。その結果、セトリ細胞中のコハク酸脱水素酵素活性の減少と鉄の減少が観察された。

Ezaki, K., Satake, M., Kusumi, T.* and Kakisawa, H.*: **New dihydrophenanthrepyrans from *Cerelinga catenaeformis***

Tetrahedron Letters, 32, 2793~2796 (1991)

ペルー・アマゾンの民間薬ワイラスピ(*Cerelinga catenaeformis*, マメ科) から2種類の新規化合物を単離・同定した。この化合物はジヒドロフェナントレピランの誘導体で、セドランAおよびセドランBと命名した。

オトギリソウ科の植物から単離されていたパラリコリンAは光学異性体とされていたが、セドランAと比較検討したところ、両者は同一物であり、6位のイソプロベニール基を α 配位と訂正した。

セドランAは抗菌性活性が認められた。

* 筑波大学化学系

横田洋一*, 江尻千鶴子*, 斉藤晴夫*, 鈴木英世: **センソの品質について (第1報) - プフォステロイドの分析 -**

富山県薬事研究所年報, 17, 83~93 (1990)

センソ中のプフォステロイドであるプファリン, シノプファギンおよびレジブフォゲニンの高速液体クロマトグラフ法による簡易な定量法を作成した。本法により市販センソの品質を調査したところ、従来の報告と異なり、これら3成分の含量が非常にばらつくことを見出した。そこで、グラジエント高速液体クロマトグラフ法を用いて、他のプフォステロイドについて調べたところ、3成分の含量が低いものは、シノプフォタリンのようなより極性の大きなプフォステロイドを多く含有し、逆に3成分の含量の高いものは極性の大きなプフォステロイドの含量が低いことを認めた。

* 富山県薬事研究所

Ozaki, Y.: **Antiinflammatory Effect of *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. and Its Active Principles**

Chem. Pharm. Bull., 38, 1045~1048 (1990)

ショウガ科の本薬用植物の根茎は、インドネシアの民間で黄疸、胆石、化膿、リュウマチの治療および解熱薬として用いられている。これら使用目的から本植物に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投与により抗炎症作用および鎮痛作用が認められ、この活性はエーテルと水で分配して得られたエーテル画分、ヘキサン画分、さらにシリカゲルカラムクロマトグラフ、TLCにより分離、精製して得られ機器分析により同定したgermacroneへ移行した。また、この化合物はマウスでの酢酸誘発 writhing を抑制し鎮痛作用を示した。これらのことから、本薬用植物による抗炎症作用および鎮痛作用は含有される germacrone によることが明らかとなった。

Ozaki, Y., Ma, J.-P.*: **Inhibitory Effect of Tetramethylpyrazine and Ferulic Acid on Spontaneous Movement of Rat Uterus in Situ**

Chem. Pharm. Bull., 38, 1620~1623 (1990)

Tetramethylpyrazine は中国産川芎に含有されるアルカロイドの一つであり、ferulic acid は中国産川芎および当帰に含有される化合物である。川芎および当帰は日本におけると同様に中国においてもよく配合して使用されており、特に、婦人病の治療に用いられている。このことから、tetramethylpyrazine と ferulic acid および両化合物の併用によるラット子宮自発運動におよぼす作用を検討した。Tetramethylpyrazine(経口投与, 100~300 mg/kg, 静脈投与 10~50 mg/kg) および ferulic acid(経口投与, 300~1000 mg/kg, 静脈投与 30~100 mg/kg) はそれぞれ子宮自発運動を用量依存的に抑制した。また、子宮運動に対して抑制作用を示す両化合物のID₅₀ 値の半量の併用は50%以上の抑制作用を示し、この抑制作用は相乗作用であることが明らかとなった。

* 上海中医学院薬理学教室, 上海, 中国

Nakamura, A., Ikarashi, Y., Tsuchiya, T., Kaniwa, M.-A., Sato, M., Toyoda, K., Takahashi, M., Ohsawa, N.* and Uchima, T.*: **Correlations among chemical constituents, cytotoxicities and tissue responses: in the case of natural rubber latex materials**

Biomaterials, 11, BIOMAT 89, 92~94 (1990)

40種類の天然ゴム製ゴム手袋から得た材料の細胞毒性と筋肉内埋植による組織炎症について調べた。細胞毒性は、L 929細胞を用いた寒天重層法と著者らが開発したV 79細胞を用いるコロニー法で試験した。組織炎症の強さは炎症領域幅を測定すること

で定量的に表せることがわかった。ゴム材料中の加硫促進剤および酸化防止剤の定量値と細胞毒性指標、炎症領域幅との関連を多変量解析によって調べた結果、これらの毒性はジチオカーバメート系加硫促進剤によることが明らかとなった。また、細胞毒性と炎症領域幅の間にはよい相関がみられた。

* 民生科学協会

Kojima, S., Momma, J., Kaniwa, M., Ikarashi, Y., Sato, M., Nakaji, Y., Kurokawa, Y. and Nakamura, A.: **Phosgene(chlorophenyl)hydrazones, strong sensitizers found in yellow sweaters bleached with sodium hypochlorite, defined as causative allergens for contact dermatitis by an experimental screening method in animals**

Contact Dermatitis, 23, 129~141 (1990)

黄色綿セーターによる接触皮膚炎の原因物質を究明するために、事故品の抽出物を用いて作成した感作モルモットに、抽出物をクロマトグラフィーにより分画したものをパッチして、陽性反応を示す分画を選び出した。その結果、ホスゲン（クロロフェニル）ヒドラゾン化合物が強感作性物質であり、今回の事例の原因物質となっていたことを明らかにすることができた。

Kaniwa, M., Momma, J., Ikarashi, Y., Kojima, S., Nakamura, A., Nakaji, Y., Kurokawa, Y., Kantoh, H.* and Itoh, M.*: **Allergic contact dermatitis from rubber boots: investigation of causative chemicals by combination of patch tests (in patient and animal models) and chemical analysis**

Contact Dermatitis, 23, 250 (1990)

ゴム長靴による接触皮膚炎事例について、患者および動物モデル（感作モルモット）でのパッチテストと化学分析を組み合わせて、原因物質の検索を行った。患者でのパッチテストの結果から、加硫促進剤の mercaptobenzothiazole (MBT), dibenzothiazyl disulfide (MBTS) が原因物質となったことが明らかとなった。その結果を参考にしながら、感作モルモットでのパッチテストを用いて検討を行った結果、MBT, MBTS だけでなく、老化防止剤の styrenated phenol, S-置換されたと考えられる MBT 系化合物もまた原因物質となっていたことを

明らかにすることができた。

* 東邦大学医学部付属病院

Shono, M.*, Ezoe, K.*, Kaniwa, M., Ikarashi, Y., Kojima, S. and Nakamura, A.: **Allergic contact dermatitis from para-tertiary-butylphenol-formaldehyde resin in athletic tape**

Contact Dermatitis, 23, 253 (1990)

同種のテーピングテープで足に接触皮膚炎を生じた患者4名を経験した。そのうちの一人は、その後スニーカーによって再び足に接触皮膚炎を生じた。原因となったテーピングテープについてパッチテストおよび化学分析の結果、テーピングテープに粘着付与剤として配合されていた para-tertiary-butylphenol-formaldehyde resin (PTBP-FR) が原因物質であったことを明らかにすることができた。

* 埼玉県済生会川口総合病院

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**

皮膚, 32 (増刊第9号), 234~241 (1990)

ゴム長靴による接触皮膚炎事例を対象として、動物モデル（感作モルモット）でのパッチテストを用いて、原因となった製品の抽出物中の原因物質を検索する方法の有用性を明らかにした。すなわち、ゴム長靴の抽出物を各種のクロマトグラフィーにより分画した。その分画について、化学分析および感作モルモットでのパッチテストを行った。その結果、患者でのパッチテストにより検討した結果と同様に、加硫促進剤の mercaptobenzothiazole (MBT), dibenzothiazyl disulfide (MBTS) が原因物質であったことを明らかにすることができた。さらに、老化防止剤の styrenated phenol, S-置換 MBT 系化合物もまた原因物質となっていたことを明らかにすることができた。

* 東邦大学医学部付属病院

鹿庭正昭, 五十嵐良明, 小嶋茂雄, 中村晃忠, 生野麻美子*, 江副和彦*: **家庭用品による接触皮膚炎の原因化学物質の追求 (第7報): 市販の粘着テープ類, 靴およびゴム, 皮革用接着剤中の p-tert-Butylphenol Formaldehyde Resin**
衛生化学, 37, 58~67 (1991)

テーピングテープによって足に接触皮膚炎を生じた患者が、続いてスニーカーによって足に接触皮膚炎を生じた事例、および靴製造業者が手に接触皮膚炎を生じた事例について検討した結果、粘着付与剤として配合されていた *p*-tert-butylphenol formaldehyde resin (PTBP-FR) が原因化学物質であったことを明らかにした。そこで、市販のテーピングテープなど粘着テープ類、靴製品 (内張り, 中底クッション), ゴム, 皮革用接着剤について PTBP-FR が含まれているかどうかを分析調査した。その結果、1) 粘着テープ類および靴の内張り, 中底クッションには事故を起こした製品以外, PTBP-FR は使用されていないことが、2) 逆に、ほとんどのゴム, 皮革用接着剤には PTBP-FR が含まれていたことを明らかにすることができた。

* 埼玉県済生会川口総合病院

五十嵐良明, 鹿庭正昭, 小嶋茂雄, 中村晃忠: 高速液体クロマトグラフィーによるポリエステル製品中のヘキサプロモシクロドデカンの定量

衛生化学, 36(4), 326~331 (1990)

ポリエステル繊維用難燃剤として使われるヘキサプロモシクロドデカン (HBCD) の分析法を開発した。試料をジクロロメタンで抽出し、シリカゲルカラムにより精製後、高速液体クロマトグラフィーで定量した。HBCD は α , β , γ -の3つの立体異性体が存在することがわかった。本法による HBCD の検出限界は 0.5 mg/g であった。市販の防炎加工ポリエステルカーテンについて分析したところ、HBCD の含有量は 5.3~35.6 mg/g であり、製品により HBCD の立体異性体存在比が異なっていた。

五十嵐良明, 鹿庭正昭, 小嶋茂雄, 中村晃忠: 有機溶剤を含む家庭用品中のベンゼンの分析

衛生化学, 36(6), 516~524 (1990)

有機溶剤を含有する製品の実態調査とベンゼンの規制基準を作成する目的で、分析法の検討を行った。ベンゼンはエチルセロソルブを希釈溶剤としたヘッドスペース-GC法で分析した。またコンウェイ装置を用いて試料を精製した後、UV検出器を接続した HPLC で分析した。両法を30種類の市販製品に適用した結果、しみ抜き剤の1点に27%ベンゼンが含まれていた。他にしみ抜き剤とスキーワックス剥離剤の一部で2~3%のベンゼンを検出したが、

ほとんどの製品は1%以下であった。多方面に使われている家庭用品について分析するには GC, HPLC 両法の併用が必要であった。

Tsuchiya, T., Takahashi, A., Asada, S., Takakubo, F., Ohsumu-Yamashita, N.* and Eto, K.*: Comparative studies of embryo-toxic action of ethylenethiourea in rat whole embryo and embryonic cell culture

Teratology, 43, 319~324 (1991)

エチレンチオ尿素 (ETU) の催奇形性作用をラット全胚培養とラット胚の中脳および胚芽細胞の分化を指標とした細胞培養法で比較した。ETUによる全胚培養での形態形成阻害作用は、胚細胞での分化阻害作用と良く相関した。

* 東京医科歯科大学

Tsuchiya, T., Ikarashi, Y., Toyoda, K., Uchima, T.*¹, Miyahara, T.*², Takahashi, M. and Nakamura, A.: Toxicological evaluation for biomaterials: Status of RVNRL

Proceedings of International Symposium on Radiation Technology in Biomedical Materials, *JAERI-M 03-083*, 161~167 (1991)

V79細胞を用いたコロニー法は培地を改変することにより感度が上昇した。放射線加硫ゴム (RVNRL) を改変培地で試験した結果、弱い細胞毒性を示した。また、短期埋植試験を行い炎症領域の幅を測定した結果、RVNRLは弱いながら一過性の炎症反応を示した。さらに、数種のRVNRLの中で比較的強い溶血性を示す試料が一つ検出された。以上の結果より、RVNRLは、硫黄加硫ゴムに比べて細胞毒性および組織炎症反応は弱い、未知の弱い毒性物質が存在していることが判明した。

*¹ 民生科学協会研究所

*² 神奈川県衛生研究所

Tsuchiya, T., Bürgin, H.*¹, Tsuchiya, M.*¹, Winternitz, P.*². and Kistler, A.*¹: Embryolethality of new herbicides is not detected by the micromass teratogen tests

Arch Toxicol., 65, 145~149 (1991)

新合成除草剤のラット器官形成期投与試験を行った結果、催奇形性は発生しなかったものの、胎仔致死作用が検出された。最小胎仔致死作用を示す投与

量は 0.2~200 mg/kg の幅広い範囲を示した。In vivo での胎仔致死活性の強度と良く相関する in vitro 試験法を検討した結果、胚細胞の微小集積培養法での増殖阻害および分化阻害のいずれも相関しなかったが、V79 コロニー形成阻害強度と比較的良好な相関性が得られた。

*1 F. Hoffmann-La Roche Ltd.

*2 Dr. R. Maag Ltd.

Kistler, A.*, Tsuchiya, T., Tsuchiya, M.* and Klaus, M.*: **Teratogenicity of arotinoids (retinoids) in vivo and in vitro**

Arch. Toxicol., **64**, 616~622 (1990)

新しいタイプの合成アロチノイド 13 種について、マウスでの催奇形性試験を行った。テストした化合物群の催奇形性強度は、最少奇形発生投与量にして 10 万倍の差異がみられた。一方、ラット胚芽細胞 (LB) および中脳細胞 (MB) の micro-mass culture 法により 13 種の化合物の in vitro 試験を行った。アロチノイドの最少奇形発生投与量は、LB 細胞での軟骨分化阻害強度 (50%阻害濃度) と良く相関した ($r=0.81$)。

* F. Hoffmann-La Roche Ltd.

Hayashi, Y.: **Optimal peak separation derived from information theory of chromatography**

Anal. Sci., **6**, 257~260 (1990)

FUMI (ふみ) の最適化理論を展開して、最適分離の分離度 R_s を数学的に誘導した。最適分離とは、重なりすぎてもいなく、離れすぎてもいなく、最大の情報量を与える適切な分離である。この情報量は、Shannon の相互情報量で FUMI (Function of Mutual Information) と呼ばれている。この論文により、クロマトグラフィで最もよく知られている分離の関数 R_s が情報量を表す関数 FUMI に含まれていることもわかった。逆は成立しない。

Hayashi, Y. and Matsuda, R.: **Information theory of optimization in chromatography: Correlation of information functions in optimization**

Chromatographia, **29**, 446~448 (1990)

情報量を表す関数 (FUMI)、ピークの重なりによる情報の損失を表す関数 (情報損失)、個々のピークの情報量の範囲を表す関数 (情報レンジ) は液

体クロマトグラフィを最適化するために必要な関数である。この論文では、移動相組成の最適化において、これらの関数は相関があることを示した。相関のある関数のうちの 1 つを評価関数として用いるだけで、移動相組成の最適化は行える。さらに、相関のない最適化 (測定波長の最適化) も、例を挙げて示した。この場合は、全ての関数を評価関数として参照しなければ最適化は行えない。

Hayashi, Y., Matsuda, R. and Nakamura, A.: **Total chromatographic optimization (TOCO)**

I. Simultaneous optimization of many variables in liquid chromatography

Chromatographia, **30**, 85~90 (1990)

情報量 FUMI, 情報伝達速度, 情報損失, 情報レンジを評価関数として、風邪薬の液体クロマトグラフィ定量分析における、移動相組成, カラム長, 流速, 測定波長, 内部標準物質の量を同時に最適化した。内部標準物質は、6 つの候補の中から選んだ。このように多くのクロマト変数 (ここでは 6 個) を同時に最適化することを、TOCO (とうこ) と呼ぶ。FUMI は定量精度を表し、情報伝達速度は分析効率 (分析の迅速性) を表す。最も精度の高い分析条件 (FUMI を最大にする条件) と最も効率の良い分析条件 (情報伝達速度を最大にする条件) を提案し、それらを実際にも選ぶことができた。

Hayashi, Y. and Matsuda, R.: **Total chromatographic optimization (TOCO) II. Precision and efficiency of analysis**

Chromatographia, **30**, 171~175 (1990)

1 つのクロマトグラム (1 つの測定条件) は、FUMI の理論によれば、数値で表される定量精度 (情報量 Φ) と分析効率 (情報伝達速度 Θ) をもっている。1 つのクロマトグラムは Φ - Θ 平面の点で表される。そこで、測定条件 (例えば、移動相中のメタノール濃度) を連続的に変えれば、この最適化の過程は、 Φ - Θ 平面の曲線となる (Φ - Θ プロット)。この Φ - Θ 曲線は、クロマト変数によって異なる。定量分析は高い精度と効率を求めるものなので、この Φ - Θ 平面の曲線から、最も精度の高い分析条件や最も効率の良い条件を一目で知ることができ、また、 Φ - Θ 曲線の形から、クロマト変数の分析的性質を知ることができる。

Hayashi, Y. and Matsuda, R.: **Information theory of column chromatography on the basis of the information measure FUMI**

J. Chromatogr., **513**, 349~353 (1990)

理論段数 N のカラムは、保持比で指定されるピーク分離の下限をもっている。この下限より小さな保持比を持つピークは、どのように測定条件を変えても十分な精度で測定することはできない。このことを、FUMIの理論のシミュレーションにより示した。さらに、この保持比の下限を数学的に誘導した。

Hayashi, Y. and Matsuda, R.: **Comparison of optimization based on information theory with optimization of R_s in column chromatography**

Anal. Lett., **23**, 1765~1781 (1990)

FUMIの理論によるクロマトグラフィの最適化は、ピーク分離(重なり)、ピークの形(面積と幅)、ノイズレベルを全て考慮したクロマトグラフィ分析の評価である。一方、ピーク分離だけに着目した分離の最適化が今も行われている。FUMIの方法と従来の方法を比較した結果、前者が優れていることと前者が後者を含む一般的な方法であることを実験例を挙げて示した。

Hayashi, Y., Matsuda, R. and Nakamura, A.: **Quantity and wavelength optimization based on information theory of chromatography**

J. Chromatogr. Sci., **28**, 628~632 (1990)

風邪薬の液体クロマトグラフィ定量分析において、内部標準物質の量と測定波長の最適化を情報量FUMIを評価関数として行った。この2つのクロマト変数は、情報量FUMIに最も大きな影響を与えるので、総合的最適化(TOCO)において非常に重要である。それにもかかわらず、この2つのクロマト変数の最適化はほとんど行われていない。従来の分離の最適化で用いる関数 R_s は面積を含んでいないので、原理的に内部標準物質の量と測定波長の最適化を行えないのがその理由であろう。

Hayashi, Y. and Matsuda, R.: **A simple optimization strategy based on R_s -minimum and information theory of chromatography**

Chromatographia, **30**, 367~370 (1990)

R_s -minimumとは、ある R_s 以上の分離度 R_s をもつクロマトグラムの中で、測定時間が最小のものを最適とする方法である。この論文では、FUMIの理論が R_s -minimum を特別の場合として含むことを示す。さらに、 R_s とピーク面積と幅から、情報量FUMIを計算する簡単な方法を提出した。FUMIを計算するためのBASICプログラムを付録に付けた。

Matsuda, R. and Hayashi, Y.: **Information theory of optimization in chromatography: Analytical structure of optimization**

Chromatographia, **30**, 371~376 (1990)

Φ - Θ プロットは、クロマト変数(移動相組成など)が分析の精度(情報量FUMI, Φ)と効率(情報伝達速度 Θ)に与える影響を示す図形的方法である。定量分析は高い精度と効率を求めるものなので、 Φ - Θ プロットより、クロマト変数の分析的意義がわかる。 Φ - Θ プロットの分析的意味と最適化における有用性を、コンピューターシミュレーションを用いてわかりやすく解説した。

Hayashi, Y. and Matsuda, R.: **Information theory of optimization in chromatography: Optimal peak separation for various data processings**

Fresenius J. Anal. Chem., **338**, 597~601 (1990)

最適分離(分離度 R_s で示す)は、用いるデータ解析のピーク分離定量能力によって異なる。例えば、ピーク分離定量能力の低い縦切り法では、 $R_s=1.5$ が必要であろう。ところが、カルマンフィルターでは、 $R_s=1.1$ でも十分に精度の高い定量が行える。このデータ解析のピーク分離定量能力によって異なる最適分離をFUMIの理論で扱ったのがこの論文である。1つの任意定数を調節することによって、データ解析のピーク分離定量能力に応じた最適分離がFUMIの理論から導かれる。

Hayashi, Y. and Matsuda, R.: **Information theory of optimization in chromatography: Equivalence relation in chromatograms**

J. Chromatogr. Sci., **29**, 60~65 (1991)

もし、幾つかの測定条件(クロマトグラム)から得られるデータの定量精度が同じならば、これらのクロマトグラムの見かけ(分離等)がいくら違って

いても、これらのクロマトグラムは分析的には区別する必要はなく、同値であると考えてよい。FUMIの理論を展開すると、この分析的に同値なクロマトグラムを数学的な同値類として定義し、分類することができる。クロマトグラムを見かけで判断するのではなく、定量分析の目的(定量精度FUMI等)で評価するのが、分析の正しい方向であると思う。

Hayashi, Y. and Matsuda, R.: **Chromatographic optimization of flow rate and column length based on information theory**

Anal. Sci., 7, 9-13 (1991)

移動相流速とカラム長の最適化を、風邪薬の液体クロマトグラフィ定量分析に対して行った。最も精度の高い分析条件(FUMIを最大にする条件)と最も効率の良い分析条件(情報伝達速度を最大にする条件)では、クロマトグラム(測定条件)と測定時間がいかに違うかを示した。この論文は、FUMIの理論の初期の頃にかいたもので、 Φ - Θ プロットでの最適化の表示はない。

Hayashi, Y. and Matsuda, R.: **Information theory of precision and analytical efficiency in short-column chromatographic assays**

Anal. Sci., 7, 329-331 (1991)

クロマトグラフィ分析の評価は、分離度Rsとカラムの理論段数Nを評価基準にすることが多い。しかし、この評価方法はピークが分離していない時は納得のいくものであるが、ピークが十分に分離しているとクロマトグラファーの常識には一致しない。FUMIの理論を用いれば、どのような場合でもクロマトグラフィ分析を正当に評価することができる。以上のことを、理論的にかつ実験的に証明した。

新谷英晴, 中村晃忠: **poly-HEMA コーティングしたイオン交換樹脂混床と固定化ウレアーゼの組み合わせによる尿素の除去ならびにイオンバランスの補正**

生体材料, 8, 129-134 (1990)

我々は以前イオン交換樹脂混床を用いて血清中の尿素ならびに尿毒症成分の除去法について検討してきた。イオン交換樹脂を用いるに際し最も問題になるのは、樹脂処理前後で血清のpHならびにイオン量が増えることである。そこでいろいろなイオン型の強酸性カチオン交換樹脂を組み合わせ用い、

それらの混床の割合を変えて、どの組み合わせが最もpHならびにカチオン量の補正に優れているかを検討した。その結果、ナトリウムの補正を除いて優れた組み合わせを見いだした。ナトリウムは約16%補正されなかった。さらに尿素の除去も完全ではなかった。イオン交換樹脂の表面をポリ-HEMAでコーティングして、樹脂の生体適合性を高めても補正に変化はなかった。そこで完全に尿素を除去するため固定化ウレアーゼカラムで血清を処理して尿素をアンモニウムとしてイオン交換樹脂混床で除去することを試みた。そうしたところ、尿素の完全な除去とナトリウムの補正が同時に達成された。

Shintani, H., Kikuchi, H. and Nakamura, A.: **Effects of Gamma-ray Irradiation on the Change of Characteristics of Polyurethane**

J. Appl. Polym. Sci., 41, 661-675 (1990)

ガンマ線照射された熱可塑性ポリウレタン(PU)を用いその照射前後の分子量、メタノール溶出物の吸光度の変化ならびに物理的試験の変化などについて検討した。ゲルろ過クロマトグラフィー(GPC)のパターン、引張り試験、残留ラジカル量などの変化についても検討した。残留ラジカル量はケミルミネセンスを用いて測定した。鎖延長材として1,4-ブタンジオール(BD)が添加されたPUは照射により分子量の減少が見られたが、BDが添加されていないPUは照射により分子量の増加が見られた。分子量の減少ならびに増加はそれぞれ崩壊ならびに架橋による。G値(100 eVの放射線を吸収したとき増加ならびに減少する分子数)はそれぞれ1.1(崩壊)ならびに0.2(架橋)であった。残存ラジカル量との間には直線関係が認められた。照射直後と照射6箇月後の分子量間にほとんど差がなかったことから、残存ラジカルによる崩壊はほとんど認められないと思われる。メタノール溶出でPUオリゴマーの溶出がGPCで確認され、照射量が増えると高分子側のオリゴマーの溶出が増加した。引張り試験などの物理的試験の結果は分子量の変化と良く一致した。

Shintani, H. and Nakamura, A.: **Mechanism of Degradation and Cross-linking of Polyurethane when Irradiated by Gamma-rays**

J. Appl. Polym. Sci., 42, 1979-1987 (1991)

ガンマ線照射された熱可塑性ポリウレタン(PU)

の崩壊ならびに架橋のメカニズムについて検討した。ガンマ線照射による分子量、UV吸収(245 nm)、PUの末端アミノ基量、オリゴマーの溶出量の変化などを定量した。ウレタン結合の崩壊により、末端アミノ基の量は照射線量に直線的に比例して増加した。しかし生成した末端アミノ基の量は理論的に生成すると仮定される量の10~20%であったことから、大部分の崩壊はウレタン結合以外で起こっていることが考えられる。一方、架橋については様々な分子量のポリテトラメチレングリコール(PTMG)を用いて作成したPUに放射線を照射したところ、分子量の増加した割合とPTMGの分子量との間には直線関係が認められた。それゆえ架橋の大部分(90%以上)はPTMG部分で起こっていることが考えられる。

松村年郎, 亀谷勝昭, 伊藤寛二^{*1}, 村松 学^{*2}, 加藤真二^{*3}, 武田明治: 空気中の揮発性有機塩素化合物の個人モニタリング法

日本公衆衛生雑誌, 37, 273~280 (1990)

揮発性有機塩素化合物(1,1,1-トリクロロエタン, 四塩化炭素, トリクロロエチレン, テトラクロロエチレン)にヒトが一日の生活行動を通してどの程度暴露されているかを把握する目的で測定法の検討を行った。

本法は捕集剤にポラパックN(ポラパックNを充填した捕集管を使用), 試料空気採取にパーソナルポンプを用いた。試料空気採取後は捕集管を加熱し被検成分を脱離したのち、冷却したn-ヘキサンに捕集する。このヘキサン溶液の一部をGC-ECDに導入し、分析する方法である。本法の再現性は上記四物質においては変動係数が2.5%以内であった。

本法を個人暴露量の実測に適用した。その結果、主婦、学生、オフィス勤務者を含めた平均的な暴露量は、1,1,1-トリクロロエタンが3.4 ppb, 四塩化炭素0.4 ppb, トリクロロエチレン0.1 ppb, テトラクロロエチレン2.2 ppbであることが明らかとなった。

*1 カシユー株式会社

*2 埼玉医科大学

*3 リコー株式会社

Sasaki, K., Ishizaka, T., Suzuki, T., Takeda, M. and Uchiyama, M.: Accumulation Levels of

Organochlorine Pesticides in Human Adipose Tissue and Blood

Bull. Environ. Contam. Toxicol., 46, 662~669 (1991)

秋田県および沖縄県で採取した人体脂肪および血液中の有機塩素農薬を分析した結果、 β -HCH, *p*, *p'*-DDE, *trans*-Nonachlor, *cis*-Nonachlor, Oxy-chlordane, Heptachlor epoxide および dieldrin を検出した。体脂肪中の各農薬の濃度は互いに高い相関性を示した。また、各農薬の体脂肪中および血液中における濃度は0.65から0.95の高い相関性を示した。

鈴木 隆, 根本 了, 斎藤行生: ガスクロマトグラフィーによる果実および果実ジュース中の植物成長調整剤ダミノジッドおよび1,1-ジメチルヒドラジンの定量

食衛誌, 31(2), 177~181 (1990)

果実および果実ジュース中のppbレベルのダミノジッドおよび1,1-ジメチルヒドラジン(UDMH)の定量法を開発した。アルカリ分解によりダミノジッドをUDMHに変換したのち、もともと果実中に存在していたUDMHと共に蒸留した。留液を2-ニトロベンツアルデヒドで処理しヒドラゾン誘導体としたのち、アルミナカラムクロマトグラフィーにより精製し、ガスクロマトグラフィー用検液とした(ECD-GC)。市販の果実および果実ジュースの調査の結果ダミノジッドもしくはUDMHの検出率は極めて低かった。

根本 了, 鈴木 隆, 斎藤行生: ガスクロマトグラフィーによる輸入農産物中のエタルフルラリンの定量

食衛誌, 31(2), 182~186 (1990)

ガスクロマトグラフィーによる野菜中のエタルフルラリンの定量法を開発した。アセトン抽出後、溶媒を除き、5%食塩で希釈したのちヘキサン抽出した。抽出液を濃縮後、非脂肪食品はフロリジルで、脂肪食品はシリカゲルドライカラム後フロリジルカラムクロマトグラフィーにより精製した。0.01もしくは0.1 ppmでの添加回収試験の結果、回収率は87.1~97.3%であった。最小検出量は、大豆で0.002 ppm, 小麦, レモン, ならびにオレンジで0.001 ppmであった。大豆(6), 小麦(6), レモン(5), オレンジ(4)の調査の結果、いずれの試料か

らもエタルフルラリンは検出されなかった。

根本 了, 鈴木 隆, 斎藤行生: **ガスクロマトグラフィーによる輸入農産物中のテルブトリンの定量**

食衛誌, 31(4), 333~338 (1990)

ガスクロマトグラフィーによる野菜中のテルブトリンの定量法を開発した。アセトンで抽出し、これを留去したのち5%食塩で希釈し、ヘキサン抽出した。溶媒を留去したのち5%含水アルミナカラムクロマトグラフィーを行った。最初、ヘキサン-エーテル(93:7)で洗ったのちヘキサン-エーテル(4:1)で溶出した。溶媒を留去したのち熱イオン化検出器(FTD)付ガスクロマトグラフにより定量した。大豆、小麦、レモンに0.1~0.2 ppmのレベルで添加したテルブトリンは86.5~87.0%で回収された。また最小検出濃度は0.02 ppmであった。なおテルブトリンは輸入食品(大豆, 6;小麦, 12;レモン, 6;オレンジ, 4)からはいずれも検出されなかった。

Miyahara, M., Sasaki, K., Suzuki, T. and Saito, Y.: **Expanded coagulating cleanup procedures for simultaneous gas chromatographic determination of organophosphorus pesticides in crops and fruits**

Chem. Pharm. Bull., 39, 1055~1058 (1991)

7種の有機リン系農薬の一斉分析法を検討した。アセトンまたはアセトニトリルで抽出し凝固液(リン酸-塩化アンモニウム)を用いて色素類を沈澱させて、ろ過して取り除いた。これをFPD-GCで定量分析した。回収率は80%以上で、定量下限は0.005~0.05 ppmであった。

Uchiyama, S., Kawamura, Y. and Saito, Y.: **Identification of γ -irradiated spices by electron spin resonance (ESR) spectrometry**

J. Food Hyg. Soc. Japan, 31(6), 499~507 (1990)

照射した白コショウ(WP)、黒コショウ(BP)、トウガラシ(RP)のESRによる検知法を検討した。このうち、照射RPに加熱、日光暴露には見られない照射特有の副シグナルを見出した。この副シグナルは10~50 kGyの範囲で直線的に増加し、Dose-response関係が明確であるだけでなく、1年間の保存後でも検出できた。さらにこのシグナルを指標

とする検知法はRPのみならず他の *Capsicum* 属の照射香辛料にも適用できた。またコンピューターシミュレーション法を用いるESRデータ処理を行った結果、副シグナルはメチルラジカル由来と推定された。

河村葉子, 内山貞夫, 斎藤行生: **ブドウ中シアン化合物の定性試験法の検討**

食衛誌, 31(2), 189~192 (1990)

ブドウ中のシアン化合物についてピクリン酸紙法、CYANTESMO[®]紙法、Cyan-Test Wako[®]法、Merckoquant[®] Cyanid-Test法およびMicroquant[®] Cyanide法の5種類の定性試験法について比較検討を行った。シアン標準溶液を用いた定性試験においては、Microquant[®] Cyanide法が最も感度がよく、検出下限は0.02 ppmであった。しかし、いずれの試験法においてもブドウ成分共存時には発色の低下がみられた。ブドウホモジネートまたはブドウ果汁においてはピクリン酸紙法が最も高感度で、試料10gの場合、ブドウホモジネートでは0.5 ppm、ブドウ果汁では0.2 ppmから検出でき、定性試験法として十分実用可能であった。

河村葉子, 内山貞夫, 斎藤行生: **ブドウ中の天然シアン含量および添加シアンの減衰**

食衛誌, 31(3), 277~279 (1990)

ブドウ中のシアン混入事件に関連して、ブドウ中の天然由来のシアン含量および添加時の減衰を電気化学検出器付きイオンクロマトグラフにより検討した。果実中の存在量は2.7~4.1 ppbで品種または産地による差はみられなかった。また、シアン配糖体の存在も認められなかった。さらに、種子中のシアン含量も42.5 ppbと微量であった。一方シアンイオンとして400 μ gを注入または塗布して冷蔵保存した場合、経時的に速やかに減少し、35日後には各々11 μ gおよび24 μ gの残存量であった。

Toyoda, M., Adachi, K.*¹, Ida, T.*², Noda, K.*³ and Minagawa, N.*⁴: **Simple analytical method for organophosphorus pesticide residues in milk**

J. Assoc. Off. Anal. Chem., 73, 770~772 (1990)

残留農薬はアセトニトリル抽出し、脂肪は酢酸亜鉛添加により除去し、濃縮後ワイドポアキャピラリー-ガスクロマトグラフィーにより分析した。6農薬

の回収率は0.1 ppmで82.1~93.8%, 1.0 ppmで79.7~96.6%であった。3分析機関による6種農薬の平均回収率は80%以上であり、変動係数はダイアジノン2.9%, ジメトエート5.4%, マラチオン4.6%, パラチオン4.6%, EPN4.9%, ホサロン6.1%であった。

*1 兵庫県衛生研究所

*2 森永乳業中央研究所

*3 明治乳業中央研究所

*4 雪印乳業分析センター

Toyoda, M., Takagi, K., Tsurumizu, A.*¹, Saito, Y., Kikawa, H.*², Kawamura, T.*² and Sakabe, Y.*³: **Estimation of daily intake of four kinds of trihalomethane by Japanese housewives**

J. Food Safety, **10**, 191~200 (1990)

名古屋および横浜で連続3日間30人の主婦より陰膳試料を集め、パージトラップ法によりクロロホルム、プロモジクロロメタン (BDCM), クロロジプロモメタン (CDBM) およびプロモホルムを分析した。各陰膳試料中の4種トリハロメタンの平均濃度 (範囲) は、クロロホルム19.6±18.1 (n.d.~106.8) ppb, BDCM 0.3±0.3 (n.d.~1.7) ppb, CDBM 0.1±0.2 (n.d.~0.6) ppb, プロモホルム0.5±1.3 (n.d.~8.1) ppbであった。食事からの1日摂取量はクロロホルム40.0±25.4 µg, BDCM 0.6±0.5 µg, CDBM 0.3±0.3 µg, プロモホルム0.9±1.3 µgであった。

*1 北里大学付属北里保健衛生専門学院

*2 横浜市衛生研究所

*3 名古屋市衛生研究所

Sugita, T., Ishiwata, H., Yoshihira, K., Kozaki, M* and Maekawa, A.*: **Melamine inhibits growth of microorganisms**

J. Food Hyg. Soc. Japan, **31**, 187~188 (1990)

メラミンがある種の微生物の増殖を阻害することを認めた。試験した5種類の微生物のうち *Saccharomyces cerevisiae* および *Staphylococcus aureus* では培地に10 mMのメラミンを添加することにより、24時間後の増殖はコントロールと比べ各々22.2±0.5%, 6.6±2.0%であった。48時間培養では、後者はコントロールの73.8%に回復したが、前者ではほぼ半分に留まった。

* 東京農業大学

Sugita, T., Ishiwata, H., Yoshihira, K. and Maekawa, A.*: **Determination of melamine and three hydrolytic products by liquid chromatography**

Bull. Environm. Contam. Toxicol., **44**, 567~571 (1990)

メラミンは加水分解されてアンメリン、アンメリドを経てシアヌル酸となる。このうちアンメリンは鶏ヒナの盲目症の原因となる。そこで、これらの4種のs-トリアジン化合物の高速液体クロマトグラフィによる同時分析法を開発した。メラミン樹脂製食器を4%酢酸を用い95℃で30分間加熱して得た溶出液にこの方法を応用した。溶出液中には3.0~9.7 ppmのメラミンが認められたほかは、これらのs-トリアジン化合物は検出されなかった。検出限界は溶出液中で0.02 ppmである。

* 東京農業大学

Ishiwata, H., Martin, R. E*, Sugita, T., Yoshihira, K.: **Detection and determination of phenolic compounds released from plastic ware by the 4-aminoantipyrine method**

J. Food Hyg. Soc. Japan, **31**, 303~313 (1990)

プラスチック添加剤であるフェノール系化合物について4-アミノアンチピリンとの反応性をみた。試験に供した49化合物中21化合物が発色した。発色物を塩化メチレンで抽出した後、HPLCにより分離を行った。フェノール樹脂から得た水抽出液中にはフェノールとして2.6~6.0 ppmのフェノール性化合物が溶出した。フォトダイオードアレイを用いたHPLCにより、定量値の97%以上がフェノールであることが明らかとなった。

* Bureau of Food and Drugs, Philippines

Kawasaki, Y., Goda, Y., Yoshihira, K. and Noguchi, H.*: **A New Anthraquinone from *Rubia tinctorum***

Japan. J. Pharmacog., **44**, 95~97 (1990)

茜色素の原料植物である *Rubia tinctorum* から新規 anthraquinone を単離し、本化合物の構造を最終的に、¹³C-¹H}long range selective proton decoupling 実験により、7-hydroxy-2-methyl-

9,10-anthraquinone と決め、7 位に置換基をもつ初めての tectoquinone 誘導体であることから、7-hydroxytectoquinone と命名した。

* 東京大学薬学部

鈴木淳子, 合田幸広, 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 104 号中の臭化物の定量**

食衛誌, 32, 104~107 (1991)

食用赤色 104 号中の臭化物の定量に、酸性条件の溶媒と電気伝導度検出のイオンクロマトグラフィーを応用し、良好な結果を得た。さらに本法を用い、市販赤色 104 号, 3 社 39 検体について臭化物量を検討したところ、すべての検体で 0.01% 以上の臭化物が含まれていることが判明し、その定量平均値は 0.159% であった。

Okuyama, E., Sato, K. and Yoshihira, K.: **2-Ethoxycarbonyl-1-hydroxyanthraquinone from *Rubia akane***

Phytochemistry, 29, 3973~3974 (1990)

アカネの根から、1-hydroxy-2-methylanthraquinone と新規 anthraquinone である 2-ethoxycarbonyl-1-hydroxyanthraquinone を単離した。新規化合物の構造は各種機器分析と合成により決定した。

Sato, K., Yamazaki, T., Okuyama, E., Yoshihira, K. and Shimomura, K.: **Anthraquinone Production by Transformed Root Cultures of *Rubia tinctorum*: Influence of Phytohormones and sucrose concentration**

Phytochemistry, 30, 1507~1509 (1991)

セイヨウアカネ毛状根の成長および anthraquinone 生産に対する植物ホルモン (IAA, NAA, 2,4-D およびカイネチン) およびショ糖濃度の影響を検討した。液体培地で培養した毛状根は 5 μ M IAA で最も高い成長率と anthraquinone 生産が得られ、一方、カイネチンは影響がなかった。植物ホルモン (5 μ M IAA あるいは 0.5 μ M NAA) 存在下では、高濃度のショ糖 (6~18%) は成長を抑制したが、植物ホルモン非存在下では 12% ショ糖により、最も高い成長率と anthraquinone 生産が得られた。

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**

食衛誌, 32, 93~97 (1991)

次亜塩素酸ナトリウム, 亜塩素酸ナトリウムの識別定量や、これら混合物の分別定量を検討した。次亜塩素酸ナトリウムが炭酸水素ナトリウムの存在下でヨウ化カリウムと反応し、ヨウ素を遊離するが、この条件で亜塩素酸ナトリウムとは反応しにくい点に着目し、ヨウ素滴定・還元 2 段階滴定法を開発した。即ち、試料を低温下、炭酸水素ナトリウムとヨウ化カリウムを加え、反応後、チオ硫酸ナトリウム溶液で滴定し、次亜塩素酸ナトリウム量を求める。次に、硫酸酸性とし、さらに遊離するヨウ素をチオ硫酸ナトリウム溶液で滴定し、その消費量から亜塩素酸ナトリウム量を求める。自動滴定装置を用い、再現性のある定量値が得られ、操作も簡便化された。

Yoshihira, K., Kawasaki, Y., Yamazaki, T., Goda, Y. and Maitani, T.: **In vitro effects of synthetic dyes on the syntheses of prostaglandin E₂ (PGE₂) and 5-hydroxyeicosatetraenoic acid (5-HETE)**

J. Pharmacobio-Dyn., 14, 323~330 (1991)

合成タール色素の安全性を *in vitro* で調べる一環として、ウサギ腎髄質からの PG 生合成酵素と、ジャガイモ由来およびモルモット腹腔多形核白血球 (PMN) 由来のリボキシゲナーゼに対する、31 種のタール色素の阻害について調べた。その結果、ハロゲン置換基を持つキサンテン色素が、著しい PG 生合成酵素阻害を示した。また、食品添加物として許可されている色素で、2.5 mM で阻害を示したのは、キサンテン色素のみであった。そのキサンテン色素は、ジャガイモ由来および PMN 由来のリボキシゲナーゼに対し、それぞれ阻害および活性化作用を示した。

Miyata, N., Sakai, A. and Kamiya, S.: **Chemical properties of quinone metabolites derived from BHA (antioxidant) related to the generation of active oxygen species**

Free Radical Biology and Medicine, 9, 17 (1990)

BHA などの抗酸化剤由来のキノン代謝物の酸化還元特性を電気化学的な還元性および NADH によ

る非酵素的な還元性を比較することにより明らかにした。また、これらの化学的性質と培養細胞を用いた二段階トランスフォーメーション試験によるイニシエーション作用の強さとの相関についても検討を行った。

Fukuhara, K., Miyata, N. and Kamiya, S.: **Synthesis of 6-azabenz[*a*]pyrene**

Tetrahedron Letters, **31**, 3743~3744 (1990)

アザアレーンは発癌性を有する環境汚染物質として注目されている。ベンツ[*a*]ピレンの6位は化学的に活性な位置であり、今回、この位置に窒素原子を導入した新規6-アザベンツ[*a*]ピレンの合成を行った。6-アザベンツ[*a*]ピレンはペリナフテノンを出発原料とし、三行程で合成した。構造は、NMR, UV および Mass スペクトルで確認した。

Tanno, M., Sueyoshi, S. and Kamiya, S.: **Thermolysis of *N*-Aryl-*N*-nitrosoureas to Afford Aryl Isocyanates and Nitrosamines via *O*-Nitrosoisourea Intermediates**

Chem. Pharm. Bull., **38**, 2644~2649 (1990)

三置換 *N*-アリアル-*N*-ニトロソ尿素類 (1) をアルゴン下で熱分解させたところ、アリアルトリアゼン、ニトロ化合物、脱ニトロソ体のほかにアリアルイソシアナートとニトロソアミンが生成し、各々単離された。このことから *O*-ニトロソイソ尿素中間体の存在を提案した。この中間体は前報で述べた二置換 *N*-アリアル-*N*-ニトロソ尿素類の熱分解で予想された中間体に相当する。また、1 が分解する初期の段階でジアゾエステル分解によりアリアルトリアゼンを生成するとともに NO ラジカルと尿素ラジカルに分解するラジカル過程の存在することを金属錯体で NO ラジカルを捕足することにより明らかにした。なお、化合物 1 を合成する際、脱アルキルされた二置換 *N*-アルキル-*N*-ニトロソ尿素の生成することも明らかにし、その生成機構も述べた。

Fukuhara, K., Miyata, N., Matsui, M., Matsui, K., Ishidate, M. Jr. and Kamiya, S.: **Synthesis, chemical properties and mutagenicity of 1, 6- and 3, 6-dinitrobenzo[*a*]pyrenes**

Chem. pharm. Bull., **38**, 3158~3161 (1990)

ベンツ[*a*]ピレンが大気中の NO_x によりニトロ化されて生成すると予測される 1,6-ジニトロベン

ツ[*a*]ピレンおよび 3,6-ジニトロベンツ[*a*]ピレンを化学的に合成した。合成したジニトロ体は強力な変異原性を TA98 および TA98 NR で示した。また、酸化還元特性をサイクリックボルタメトリーで調べた結果、モノニトロベンツ[*a*]ピレンと比べ、最初の還元が起きやすく一度に二電子還元が生じることが判明し、この還元特性は、変異原性と関連することが示された。

Kamiya, S., Yamaguchi, K.*, Miyahara, M. and Miyata, N.: **Cyclization of 1-aryl-1-nitroso-3-(2-pyridylmethyl)ureas to 2-aryl-5-(2-pyridyl)-2,4-dihydro-1, 2, 4-triazol-3-ones**

Chem. Pharm. Bull., **38**, 3226~3229 (1990)

1-アリアル-1-ニトロソ-3-(2-ピリジルメチル)ウレア類をアセトンなどの有機溶媒中で加熱すると閉環体 2-アリアル-5-(2-ピリジル)-2,4-ジヒドロ-1,2,4-トリアゾール-3-オンが生成した。構造は X 線結晶解析により決定した。1-アリアル-1-ニトロソ-3-(4-ピリジルメチル)ウレア類の加熱反応では、閉環反応は進行せず、1,3-ビス(4-ピリジルメチル)ウレアが生成した。これらの反応の反応機構についても考察した。

* 昭和大学薬学部分析センター

Kato, K.*¹, Nakanishi, M.*¹, Arata, Y.*¹, Teshima, R., Terao, T., Miyamoto, H.*², Hanaka, F.*¹, Ui, M.*¹, Masuzawa, Y.*³, Hiraishi, S.*³, Ishii, H.*³ and Waku, K.*³: **Characterization of a new type of variant of rat basophilic leukemia 2H3 cells presenting a different pattern of calcium signal**

Exp. Cell Res., **188**, 247~253 (1990)

ラット好塩基球細胞株 (RBL-2H3) から自然発生した変異株 (3C7) の性質を調べたところ、抗原刺激に伴うイノシトールリン脂質代謝および細胞内 Ca²⁺ イオンの動態に特徴のあることがわかった。すなわち、抗原刺激に伴い、IP₂ が多量に産生されること、および、この細胞では、細胞外からの Ca²⁺ 流入が抑えられており、主に、細胞内の Ca²⁺ store からの Ca²⁺ イオンの動員が起きていること、そしてその動員のされ方に、オシレーション (リズム) 現象のあることが判明した。

*¹ 東京大学薬学部

*² 新技術開発事業団

*3 帝京大学薬学部

Teshima, R., Kawase, M., Tanaka, T., Hirai, K.*, Sato, M., Sawada, J., Ikebuchi, H., Ichinoe, M. and Terao, T.: **Production and characterization of a specific monoclonal antibody against mycotoxin zearalenone**

J. Agric. Food Chem., **38**, 1618~1622 (1990)

Fusarium 属のカビが産生するエストロゲン様カビ毒であるゼラレノン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。ゼラレノンに、新たにアミノ基を導入し、それをハプテンとしてマウスに免疫し、常法に従って、細胞融合を行ったところ、ゼラレノンに対する特異性の高いモノクローナル抗体 (Ab 7-1-144) が得られ、この抗体を用いる ELISA 法の測定感度は、15 pg/assay であった。この抗体は、特異性、感度の両方で、従来報告されている抗体を上回るものであった。

* 日本医科大学

Teshima, R., Ikebuchi, H., Terao, T., Miyagawa, T.*¹, Arata, Y.*¹ and Nakanishi M.*²: **A single cell observation of staurosporine effect on the Ca²⁺ signals in rat basophilic leukemia cells**

FEBS Letters, **270**, 115~118 (1990)

ラット好塩基球細胞株 (RBL-2H3) の抗原刺激に伴う Ca²⁺ 流入へのタンパク質リン酸化酵素阻害剤スタオロスポリンの影響を、単一細胞のレベルで調べるため、蛍光顕微鏡および画像処理法を用いて検討した。薬物の濃度に応じて、細胞内 Ca²⁺ 濃度の上昇が抑えられること、また、薬物に対する感受性が、細胞間で異なるという結果が得られた。

*¹ 東京大学薬学部

*² 名古屋市立大学薬学部

Teshima, R., Ikebuchi, H., Terao, T. and Nakanishi, M.*: **The effect of staurosporine on Ca²⁺ signals in rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells**

Chem. Pharm. Bull., **39**, 747~751 (1991)

ラット好塩基球細胞株の抗原刺激に伴う Ca²⁺ 流入に、タンパク質リン酸化反応が関与するか否かを検討するため、タンパク質リン酸化酵素阻害剤スタ

オロスポリンを、細胞外液に添加して、細胞の抗原刺激を行い、細胞内 Ca²⁺ 濃度の経時変化を蛍光光度計を用いて測定した。その結果、用量依存的に Ca²⁺ 流入の抑制がみられ、30 nM で、ほぼ完全に抑制された。この濃度で、ヒスタミン遊離の抑制もほぼ完全になされていた。したがって、スタオロスポリンの細胞からのヒスタミン遊離抑制作用は、主に、細胞外からの Ca²⁺ 流入の抑制によるものであることが考えられ、Ca²⁺ 流入に何らかのタンパク質リン酸化酵素の関与する可能性が示唆された。

* 名古屋市立大学薬学部

Iwata, N., Inazu, N.*¹ and Satoh, T.*²: **Changes and localization of ovarian carbonyl reductase during pseudopregnancy and pregnancy in rats**

Biol. Reprod., **43**, 397~403 (1990)

偽妊娠および妊娠期間におけるラット卵巣カルボニル還元酵素の活性と含量の変化を検討した。酵素活性は偽妊娠の開始から終わりまで徐々に減少した。妊娠初期の酵素活性は、偽妊娠の場合と同様に、妊娠の進行に伴って減少し、妊娠 14 日目にはほぼ最低値に達した。このレベルは分娩中まで続いたが、分娩の翌日に一過性の上昇が起った。一方、酵素含量は妊娠 12 日目まで有意な変化は認められなかったが、その後徐々に減少し活性と同様に分娩の翌日に著明な増加が観察された。カルボニル還元酵素の卵巣における局在は、性周期内では主として内莖膜細胞と間質細胞に認められるが、偽妊娠および妊娠ラットの卵巣では、黄体細胞にもその局在が認められた。

*¹ 帝京大学医学部

*² 千葉大学薬学部

Iwata, N., Inazu, N.*¹ and Satoh, T.*²: **The purification and properties of aldose reductase from rat ovary**

Arch. Biochem. Biophys., **282**, 70~77 (1990)

アルドース還元酵素 (AR) をラット卵巣から電気泳動的に均一に精製した。AR は分子量 40 kD, 等電点 5.4 の単量体であり、NADPH を補酵素として、グルコース、ガラクトースなどのアルド糖に加えて芳香族アルデヒド類を還元した。AR は硫酸イオンで著しく活性化され、SH 阻害剤や既知の AR 阻害剤によって強く阻害された。ウエスタンブ

ロツティングを用いてラットの臓器特異性を検討した結果、ARは副腎、脳、肺、心臓および雄雄の生殖臓器に比較的多量に存在することがわかった。また免疫組織染色により、ARは卵巣の顆粒膜細胞および卵細胞に局在することも明確になった。

*1 帝京大学医学部

*2 千葉大学薬学部

Inazu, N.*¹, Iwata, N. and Satoh, T.*²: **Inhibitory effect of glucocorticoid and stimulatory effect of human chorionic gonadotropin on ovarian carbonyl reductase in rats**

Life Sci., 46, 841~848 (1990)

ラット卵巣カルボニル還元酵素の活性、含量および排卵に及ぼす3種のグルコルチコイドの影響について検討した。ラットへのグルコルチコイドの処置は卵巣および子宮重量の有意な減少と排卵阻害を引き起こすとともに、酵素活性と含量を著しく減少させた。また、hCGの併用投与は卵巣重量、酵素活性、含量および排卵に対して、グルコルチコイドの阻害効果を回復させた。これらの結果は卵巣カルボニル還元酵素が排卵現象を含めた卵巣機能と密接な関係があるとともに黄体形成ホルモンによって調節されることを示唆する。

*1 帝京大学医学部

*2 千葉大学薬学部

Iwata, N., Inazu, N.*¹, Takeo, S.*² and Satoh, T.*³: **Carbonyl reductases from rat testis and vas deferens—Purification, properties and localization**

Eur. J. Biochem., 193, 75~81 (1990)

ラット精巣および輸精管から、それぞれ3種(T1, T2, T3)および2種(V1, V2)のカルボニル還元酵素のアイソザイムを均一に精製した。5種のアイソザイムは分子量32~33 kD, 等電点5.9~6.4, 補酵素要求性(NADPH依存性), 阻害剤感受性および免疫交叉性において先に報告した卵巣カルボニル還元酵素(*J. Biochem.* 105, 556~564 (1989))と極めて類似した性質を示した。T3, V1, V2アイソザイムはプロスタグランジンに対して高い親和性を示したが、T1, T2アイソザイムはキノン類と芳香族アルデヒドおよびケトン類のみに還元活性を示した。免疫組織染色により、カルボニル還元酵素は精巣のLeydig cellおよび輸精管の粘膜上

皮細胞に局在することが明確になった。

*1 帝京大学医学部

*2 東京薬科大学

*3 千葉大学薬学部

Suzuki, K., Suzuki, S.*¹, Saito, Y., Ikebuchi, H. and Terao, T.: **Human Growth Hormone-stimulated Growth of Human Cultured Lymphocytes (IM-9) and Its inhibition by Phorbol Diesters through Down-regulation of the Hormone Receptors. Possible Involvement of Phosphorylation of a 55,000 Molecular Weight Protein Associated with the Receptor in the Down-regulation**

J. Biol. Chem., 265, 11320~11327 (1990)

ヒト成長ホルモン(hGH)は、低濃度(3%)血清存在下で、ヒト由来培養リンパ球IM-9のgrowthを促進した。その、ホルモンによって上昇したgrowthは、ホルボールジエステルのPMA, PDBuによって阻害された。ホルボールジエステル処理したIM-9細胞、および可溶化した受容体への¹²⁵I-hGHの結合実験の結果から、ホルボールジエステルにより受容体は細胞表面から細胞の内部へ取り込まれたこと、および受容体の親和性に変化はなかったことが明らかになった。37度、30分のホルボールジエステル処理により約50%の受容体(1.4×10^3 分子/細胞)が取り込まれ、PMA, およびPDBuの50%効果濃度はそれぞれ5および35 nMであった。ホルボールジエステル処理した細胞を洗浄後、再び培養するとhGHに対する反応性も細胞表面上のhGH受容体の数も回復した。この受容体のダウンレギュレーションはほかのホルボールジエステル、PDDでも誘起されたが、ホルボールやホルボールモノエステルのPMおよびPAでは観察されなかった。また合成のプロテインキナーゼCの活性化剤OAGやSC-9もホルボールジエステル類と同様の効果を示した。プロテインキナーゼC阻害剤のスタウロsporinやスフィンゴシンはホルボールジエステルで誘起されるダウンレギュレーションを阻害し、その50%阻害濃度(IC₅₀)はそれぞれ8 nM, 130 μMであった。これらの結果からプロテインキナーゼCがこの反応に関与していると考えられた。³²PiでインキュベートしたIM-9細胞を、37度でPDBuによって刺激すると分子量55,000, 88,000, および114,000の蛋白の速いリン酸化の上昇が観察

された。PDBu で上昇した 55,000 蛋白のリン酸化は 10 nM のスタウロスポリンで抑えられ、その濃度は上記のダウンレギュレーションを阻害する濃度に対応していた。さらに、これら蛋白のうち 55,000 蛋白は次の 3 つの異なる方法により受容体とともに特異的に単離されてきた。即ち、①抗 hGH 受容体抗体を用いた免疫沈降法、②プロテイン A-セルロースのカラムを用いた免疫化学的単離法、③ hGH を固定したゲルによるアフィニティークロマトグラフィー、である。これらの結果から、ホルボールジエステルは hGH 受容体のダウンレギュレーションを介して hGH 依存性の growth を阻害すること、およびその反応には受容体に結合している 55,000 の蛋白が、プロテインキナーゼ C によるリン酸化を通じて、関与していることが示唆された。

* 国立公衆衛生院

Minegishi, K., Numbarc, S., Fukuoka, M., Tanaka, A. and Takahashi, A.: **Metabolism of Musk Xylene (MX) in Rats**

Eisei Kagaku, **37**, P-21 (1991)

代謝物を同定し、主な代謝物の定量を行い、代謝経路を推定した。

Kurebayashi, H., Tanaka, A. and Takahashi, A.: **Studies on deamination mechanisms of alicyclic primary amines by liver microsomes with use of stable isotopes**

J. Pharmacobio-Dyn., **13**, s-100 (1990)

人工甘味料サイクラミン酸の代謝物の一つである cyclohexylamine (CHA) を初めとする脂環族一級アミンは、NADPH および酸素存在下でウサギ肝ミクロソームにより脱アミノされる。この時、分子状酸素 18 が生成する脂環族ケトンおよびアルコールに取り込まれたことから、 α 位が水酸化されたカルビノールアミン中間体の重要性が明らかとなった。

次に、CHA の α 位重水素置換体を合成し、その脱アミノ化およびヒドロキシルアミンの生成速度への小さい重水素同位体効果を観察し、アミンの一電子酸化によるアミニウムイオンラジカルの生成および脱プロトン化を経て炭素ラジカルができ、カルビノールアミンを経てケトンに至る脂環族一級アミンの酸化的脱アミノ化の反応機構が推定された。

Kurebayashi, H., Miyata, N. and Takahashi, A.: **Enzymatic reduction of quinone derived from butylated hydroxyanisole in relation to activating dioxygen**

J. Pharmacobio-Dyn., **14**, s-42 (1991)

BHA (butylated hydroxyanisole) は肝ミクロソームでヒドロキノン体 (HQ) およびキノン体 (Q) に代謝される。この Q に変異原性や形質転換作用があるという報告が出されている。そこでフラビン酵素類でこの Q の還元反応を検討した。豚心臓および牛腸粘膜由来のリポアミドデヒドロゲナーゼおよびミルク由来のキサンチンオキシダーゼの酵素で Q を HQ に還元する作用を示した。また、これらの酵素で程度の差はあるが一電子還元体であるセミキノンラジカル (SQ) を生成することがわかった。この SQ は酸素と反応してスーパーオキシドラジカル O_2^- および過酸化水素などの活性酸素種を発生させる可能性がある。

小沼博隆：食品の微生物制御のためのサーベイランスシステムについて

食品と微生物, **7**, 63~64 (1990)

食品の総合的な微生物制御対策を実施していくためには、食品の原料から、製造加工、流通、販売、消費に至るすべての段階における微生物の関わりあいや、動態を把握することが必要である。すなわち、食中毒に関する情報、苦情食品に関する情報、微生物の生態学に関する情報、食品側の要因に関する情報、食品の製造から販売、消費に至る間の微生物の動態および汚染状況や汚染菌叢に関する情報、食品の特性や取扱い、加熱加工状況などに関する情報に加えて、気象状況などを含めた食品に関する様々な情報が必要になる。そこで、これらの情報を基にして食中毒や苦情発生などの異常の発見や、その可能性の予測あるいは確認を行い、食品による危険性を迅速に把握し、飲食に起因する微生物学的危害の発生を未然に防止することのできる情報システム構築を企てた。

これらの基本項目を念頭に入れた食品衛生サーベイランスシステムは、1.市販食品のデータベースシステム、2.給食調理食品のデータベースシステム、3.製造加工施設などのデータベースシステム、4.食中毒や苦情発見のためのデータベースシステム(食中毒発生速報システム、有症苦情発生速報システム、違反食品速報システム)、5.定点観測による食中毒

菌サーベイランスシステム, 6.食品の特性や微生物の増殖性に関するデータベースシステム, 7.食中毒, 苦情事例分離菌株のリファレンスサービスシステムなどが主な柱となる。

尾上洋一^{*1}, 小沼博隆: **食品の微生物制御のためのサーベイランスシステムの構築へ向けて, その考え方と手順**

食品と微生物, 7, 65~71 (1990)

情報システムの構築にあたってはデータベースを作成することが基本的な手段である。そこで, 食品衛生微生物に関するデータを有効に利用するための調査形式や入力法の検討を行った。さらにデータ蓄積, 運用, 検索機能のシステム化までの構想について検討した。先ず, 地方自治体における情報の流れおよび厚生省関係のサーベイランス, データベースシステムの現状分析を行った後, 神奈川県行政情報システム構想を検討した。これらの情報をもとに食品衛生微生物検査情報のデータベースの構想を案出し, 食品衛生微生物サーベイランスシステムの開発手順を確立した。そして本システムの機能と効果を解説した。

^{*1} 神奈川県立衛生研究所

丹野憲二^{*1}, 尾上洋一^{*2}, 小沼博隆: **市販食品の衛生微生物サーベイランスシステムの開発—微生物の制御要因に関する分類法の検討—**

食品と微生物, 7, 81~88 (1990)

市販食品の衛生微生物サーベイランスシステムを構築する上で基本となるデータベースを作成するためには, 簡便でかつ実用的な食品の分類法を確立する必要がある。食品には素材として分類(魚, 果物, 野菜など)されるものと, 同じなまへの魚, 果物, 野菜であっても長期保存を目的に缶詰, フィルム包装, 乾燥, 塩蔵, そのほか高度に加工されたものもある。したがって, 微生物学的見地からみれば食品の微生物制御要因が各々異なっているわけである。さらに, 同一食品であっても販売方法や喫食方法が異なるものもある。これらの点を考慮して, 食品の分類法を確立する際には, 食品の情報に基づく分類に加え, 微生物制御要因に基づく分類法を検討した。その結果, 食品の微生物制御要因を1.製造販売形態, 2.喫食方法, 3.加工形態, 4.包装形態, 5.包装助剤, 6.食品添加物, 7.販売状態の7項目に分類, コード化した。

^{*1} 日本食品分析センター

^{*2} 神奈川県立衛生研究所

Shinagawa, K.^{*1}, Watanabe, K.^{*2}, Matsusaka, N.^{*1}, Konuma, H., Sugii, S.^{*3}: **Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Staphylococcal Enterotoxins in Incriminated Foods and Clinical Specimens from Outbreaks of Food Poisoning**

Jpn. J. Vet. Sci., 52, 847~850 (1990)

精製抗エンテロトキシン-IgGを吸着したポリスチレンボールを用いるサンドイッチELISAによるブドウ球菌エンテロトキシン検出法を検討し, 微量(1 ng/ml)の毒素を特異的に, かつ5時間以内に検出できた。さらに, 本方法により食中毒原因食品および吐物からエンテロトキシン0.6~3.6 μgを直接検出することができた。

^{*1} 岩手大学農学部

^{*2} 仙台市立食肉検査所

^{*3} 北里大学衛生学部

和田正道^{*1}, 小沼博隆: **迅速検査法および従来法による食肉中のサルモネラ菌の検出**

長野県衛公研究報告, No. 13, 1~6 (1990)

馬肉, 鶏肉, 豚肉および牛肉について, 2種類の迅速検査法(フードテストサルモネラおよびサルモネラ1-2テスト)および従来法を用いてサルモネラ菌の検出を行い, 迅速検査法の食品への応用の可能性および最適な使用条件について検討し, 以下の知見を得た。1) フードテストサルモネラの検出率は, 従来法に比較し同等以上の結果を得たが, サルモネラ1-2テストは低い結果を得た。2) フードテストサルモネラの最も確実な使用法は, 分離平板上のコロニーを直接検査する方法であった。3) 馬肉からのサルモネラ検出率は, これまでのほかの報告例と比べ極めて低かったが, 鶏肉, 豚肉および牛肉からの検出率には大きな差は認められなかった。

^{*1} 長野県立衛生公害研究所

横山利幸^{*1}, 小沢佳良子^{*1}, 佐久間敦之^{*1}, 小林千博^{*1}, 金井 淳^{*1}, 森 健^{*1}, 山口達夫^{*2}, 一戸正勝: **ソフトコンタクトレンズ連続装用中に *Paecilomyces lilacinus* による重篤な角膜真菌症を生じた1症例**

日コレ誌, 32, 231~237 (1990)

白内障術後, 高含水率ソフトコンタクトレンズ連続装着中の高令の糖尿病患者に両眼性の角膜真菌症を経験し, 起因菌として *Paecilomyces lilacinus* を分離培養した。各種の抗真菌剤に抵抗して予後不良であった。ソフトコンタクトレンズおよび保存液からも同一菌株が検出され, 当真菌はコンタクトレンズを貫通して存在し, レンズ内での増殖が示唆された。

*1 順天堂大学医学部

*1 聖路加国際病院眼科

Miyahara, M., Kudoh, Y.* and Mise, K.: **Wide-spread occurrence of specific restriction endonucleases in *Salmonella infantis*, *Salmonella thompson*, and *Salmonella blockley* isolated from humans in Japan**

Appl. Environ. Microbiol., 56, 2248~2250 (1990)

サルモネラの三血清型 *S. infantis* 91 株, *S. thompson* 131 株と *S. blockley* 138 株より制限酵素産生の有無を検討した。その結果それぞれの型に対応した制限酵素が 91, 34 に 30% の検出率で見出された。*S. infantis* からは Ara II のアイソゾマー Sin I が, *S. thompson* からは Kpn I と Asp718 のアイソゾマー Sth I が, *S. blockley* からは Sty I のアイソゾマー Sbl I が産生されていることがわかった。*S. infantis* からは分離年にかかわらず高い検出率であったが, *S. thompson* からの検出率は分離年によって変動があった。これらの菌は東京で集められた菌株であるが, 近年, 制限酵素産生株の検出は減少傾向を示しており, 遺伝子の変異を推測させられる結果であった。

* 東京都立衛生研究所

Sakai, A. and Fujiki H.*: **Promotion of BALB/3T3 cell transformation by the okadaic acid class of tumor promoters, okadaic acid and dinophysistoxin-1**

Jpn. J. Cancer Res., 82, 518~523 (1991)

Okadaic acid(OA)と dinophysistoxin-1(DTX)は, マウス皮膚 2 段階発ガン実験において, TPA とは異なる機序でプロモーション作用を示し, 同一のレセプターに結合することから OA 類発ガンプロモーターに分類されている。OA と DTX, および生化学的に不活性な okadaic acid tetramethyl

ether (OAME) について BALB/3T3 細胞のトランスフォーメーションに対する作用を調べた。OA と DTX とは, 3-methyl-cholanthrene によって誘発されるトランスフォーメーションを促進したが, OAME は, 促進しなかった。OA には, トランスフォーメーションのイニシエーション作用は認められなかった。以上, OA 類発ガンプロモーターに関して, 動物実験と *in vitro* トランスフォーメーション実験との間により相関生が認められた。

* 国立がんセンター研究所

Sakai, A., Sasaki, K., Mizusawa, H. and Ishidate, M. Jr.: **Effects of quercetin, a plant flavonol, on the two-stage transformation *in vitro***

Teratog. Carcinog. Mutagen., 10, 333~340 (1990)

クエルセチンが BALB/3T3 細胞の 2 段階トランスフォーメーションに及ぼす影響を調べた。細胞は, クエルセチン単独ではトランスフォーメーションを起こさなかったが, TPA によるプロモーション処理を加えることによりトランスフォーメーションを起こし, クエルセチンに *in vitro* トランスフォーメーションのイニシエーション活性があることがわかった。一方, 3-メチルコラントレンでイニシエーション処理を受けた細胞に, TPA とクエルセチンとを並行して作用させると, TPA のプロモーション作用が抑制されることも明らかになった。

Sakai, A., Miyata, N. and Takahashi, A.: **Initiating activity of 3-tert-butyl-4-hydroxy-anisole(3-BHA) and its metabolites in two-stage transformation of BALB/3T3 cells**

Carcinogenesis, 11, 1985~1988 (1990)

BHA は, 実験動物の前胃に腫瘍を誘発するが, その機序や活性物質の本体は不明である。3-BHA とそのキノン代謝物, tert-butyl-1,4-benzoquinone (BQ) および 3-tert-butyl-5-methoxy-1,2-benzoquinone (BHAoQ) について, BALB/3T3 細胞 2 段階トランスフォーメーション実験法を用いてイニシエーション活性を調べた。3-BHA と BQ に統計学的に有意なイニシエーション活性が認められ, BQ の活性は, 3-BHA の約 100 倍であった。BHAoQ もトランスフォーメーション頻度を上昇させたが, 有意ではなかった。以上の結果から, BQ が BHA の活性代謝物である可能性が示唆された。

Matsutani, S. and Ohtsubo, E.*: **Complete sequence of IS629**

Nucleic Acids Research, 18, 1899 (1990)

Shigella sonnei の染色体から分離された IS629 の完全な塩基配列が決定された。全長は 1310 bp で、両端には、25 bp の不完全な逆位反復配列が存在した。IS629 には、*orfA* と *orfB* と名づけた二つの読み枠があり、*orfA* の開始コドンの上流には、プロモーター様の配列や SD 様の配列が位置していた。IS629 の塩基配列は、IS3, IS600, および、IS2 と部分的な相同性を示し、さらに、IS3411 とほとんど完全な相同性を示した。

* 東京大学応用微生物研究所

Tenzen, T.*, Matsutani, S. and Ohtsubo, E.*: **Site-specific transposition of insertion sequence IS630**

J. Bacteriol., 172, 3830~3836 (1990)

IS630 は、全長 1.15 kb で、*Shigella sonnei* に存在するが、ほかの多くの転移因子と異なり、レプリコン間の融合体をつくらない。そこで、IS630 の転移を調べるために、薬剤耐性遺伝子の両端に IS630 を逆向きに連結した複合転移因子を作製した。これらの複合転移因子は、*Escherichia coli* のなかで、プラスミド ColE1 に転移することがみつかった。また、その転移は、どの場合も、5'-TA-3' という塩基配列のところでききていた。ColE1 上には、より選択的に挿入される部位が 2 ヶ所あり、それらは両方とも、Rho 依存性の転写のターミネーターの 13 bp のステム領域の逆位反復配列の中にある TA であった。IS630 の両端には、もともと TA が連なって存在する。この TA を *in vitro* で変異させて塩基置換した場合でも、転移能力や、TA という挿入部位の特異性、または、標的部位の重複を起こす能力に変化は認められなかった。

* 東京大学応用微生物研究所

Kondo, S.*, Haishima, Y. and Hisatsune, K.*: **Analysis of the 2-keto-3-deoxy-octonate (KDO) region of lipopolysaccharides isolated from non-01 *Vibrio cholerae* 05R**

FEMS Microbiol. Lett., 68, 155~158 (1990)

ビブリオ科細菌 LPS の KDO region の化学構造を、non-01 コレラ菌 05 R 変異株 LPS を用いて検討した。グラム陰性細菌 LPS の常成分である

KDO は、LPS の inner core 部分に局在し、一般的に、[ヘプトース($\alpha 1 \rightarrow 5$)KDO($\alpha 2 \rightarrow 6'$)グルコサミン] の結合様式により多糖体部分とリポド A 部分を連結している。また、前記 KDO の 4 位には、さらに、second KDO あるいは KDO($\alpha 2 \rightarrow 4$) KDO disaccharide が分岐状に結合している。一方、常法では、KDO が検出されないビブリオ科細菌 LPS は、上記のような KDO の分岐構造を欠損し、主鎖に存在する KDO の 4 位の水酸基は、リン酸エステル化されていることが明らかになった。

* 城西大学薬学部

Haishima, Y., Kondo, S.* and Hisatsune, K.*: **The occurrence of $\alpha (1 \rightarrow 2)$ linked N-acetylperosamine-homopolymer in lipopolysaccharides of non-01 *vibrio cholerae* possessing an antigenic factor in common with 01 *V. cholerae***

Microbiol. Immunol., 34, 1049~1054 (1990)

激症コレラの起因菌である 01 コレラ菌と共通抗原性を持つ non-01 コレラ菌ハカタ株から分離・精製した LPS の化学構造を、メチル化分析、GC-MS 分析および NMR 解析により検討した。ハカタ株 LPS の 0-抗原特異多糖鎖は、7 ユニットの 4-(N-acetamido)-4,6-dideoxy-D-mannose が $\alpha (1 \rightarrow 2)$ 結合したホモポリマーから成り、 $\alpha (1 \rightarrow 2)$ 結合 4-(N-3-deoxy-L-glycerotetronyl)-4,6-dideoxy-D-mannose を特異成分とする 01 コレラ菌 LPS と非常に類似した構造を持つことが明らかになった。

* 城西大学薬学部

Igarashi, T., Sato, M.*¹, Katsube, Y.*¹, Takio, K.*², Tanaka, T.*³, Nakanishi, M.*³ and Arata, Y.*³: **Structure of a mouse immunoglobulin G that lacks the entire C_H1 domain: Protein sequencing and small-angle X-ray scattering studies**

Biochemistry, 29, 5727~5733 (1990)

IgG2a 抗体の変異体で、H 鎖が短い IgG2a 抗体の構造について報告する。この抗体は、可変領域のアミノ酸配列が同一で、H 鎖定常領域のアミノ酸配列のみが異なるマウス抗ゲンシル・スイッチヴァリント抗体群 (Dangl, J. L., Parks, D. R., Oi, V. T. and Herzenberg, L. A. *Cytometry*, 2, 395~401

(1982)) のメンバーである。アミノ酸一次配列の決定により、H鎖が短いIgG2a抗体はC_H1ドメインが完全に欠落していることと、ヒンジ領域には何ら欠損が無いことを明らかにした。H鎖が短いIgG2a抗体と、通常の長さのH鎖を持つIgG1, IgG2a, IgG2bスイッチヴァリント抗体について、X線小角散乱法による構造解析を行い、両者の構造を比較した。通常のIgG2a抗体の構造がY字型であったのに対し、H鎖が短いIgG2a抗体の構造は、Fabアングルが著しく小さく、棒状に伸びた分子型であることがわかった。この結果は、C_H1ドメインの欠落が抗体の分子構造に大きな構造変化をもたらしていることを示している。

*¹ 大阪大学蛋白質研究所

*² 理化学研究所

*³ 東京大学薬学部

Kato, K.*, Matsunaga, C.*, Igarashi, T., Kim, H.*, Odaka, A.*, Shimada, I.* and Arata, Y.*: **Complete assignment of the methionyl carbonyl carbon resonances in switch variant anti-dansyl antibodies labeled with [1-¹³C] methionine**

Biochemistry, **30**, 270~278 (1991)

マウス抗ダンシル・スイッチヴァリアント抗体群(Dangl et al. *Cytometry* **2**, 395~401 (1982))を対象とした、¹³C NMRの研究について報告する。これらの抗体群はV_H, V_L, C_Lドメインのアミノ酸配列が同一で、H鎖定常領域のアミノ酸配列のみが異なるという特徴を持つ。今回はスイッチヴァリアント抗体群のうちIgG1, IgG2a, IgG2bのサブクラスの抗体と、C_H1ドメインが完全に欠落したshort-chain IgG2a抗体を研究対象とした。血清を除いた培地中でハイブリドーマ細胞を培養し、Met残基のカルボニル炭素を、特異的に¹³Cで安定同位体ラベルした抗体を調製した。カルボニル炭素シグナルの残基特異的な帰属は、ダブル・ラベリング法(Kainosho M. and Tsuji T. *Biochemistry* **21**, 6273~6279 (1982))により決定した。抗体分子を限定分解したフラグメント分子と、H鎖L鎖いづれかのみをラベルした組み替え抗体を作製し、スイッチヴァリアント抗体分子由来のすべてのカルボニル炭素シグナルを帰属することができた。¹³Cラベルと同時に¹⁵Nラベルした抗体を作製する際、培養中に起こる¹⁵N同位体の希釈が深刻な問題となった

が、我々はβ-chloro-L-alanineが大変効果的に¹⁵N同位体の希釈を防ぐことを見いだした。これまで¹⁵NでラベルしたAla, His, Ile, Lys, Met, Ser, Thr, Tyr, Valのアミノ酸を用いた、ダブル・ラベリング法によるシグナルの帰属に成功している。得られた¹³C NMRの結果を基にして、抗体の構造と機能の関連について考察した。

* 東京大学薬学部

Yamanaka, S.*, Hashimoto, M.*, Tobe, M., Kobayashi, K., Sekizawa, J. and Nishimura, M.*: **A Simple Method for Screening Assessment of Acute Toxicity of Chemicals**

Arch. Toxicol., **64**, 262~268 (1990)

動物を用いた経口、経皮の急性毒性試験の簡易法を開発した。並行して既存のLD₅₀値データの統計的な解析を行い、固定用量試験の結果からおよそのLD₅₀値を推定する方法を開発した。すなわち、各群雌雄3匹ずつのラットとマウスを用いて2000, 200, 20 mg/kg体重の化合物をそれぞれの群に投与し、動物の生死と中毒症状の観察を行うものとした。統計的解析の結果からは、およそのLD₅₀値は死亡動物がいた時に、最大非致死用量の約2~2.5倍の間であると推定された。したがって高用量の投与群で死亡が認められなかった時には、低用量の投与試験は行う必要はないとされた。

* 東京歯科大学

関沢 純, 山本 都: **食品の安全性評価のための化学物質情報**

食衛誌, **31**, 457~468 (1990)

食品中に存在または混入する化学物質の代表的なものとして、食品添加物と、残留農薬などの汚染物質とがある。これらの物質が食品を経由して、人の健康に及ぼす影響を評価する上で必要とされる情報の種類、情報源について整理し、実際に行った情報調査の例について紹介した。

森本和滋: **Ha-ras 癌遺伝子産物 p21 のグアニンヌクレオチド結合部位の高次構造**

ファルマシア, **26**, 835~836 (1990)

p21タンパク質とGTPアナログとの複合体についての最近のX線結晶解析の報告を紹介した。発癌性のアルキル化剤ではHa-rasの遺伝子産物p21タンパク質の12番目のコドンの点突然変異が多く

報告されているが、グリシンが他のアミノ酸に変わった時どのようにタンパク質の高次構造が変化し、それが発癌過程にどのような影響を与えるかについて解説した。

Morimoto, K., Tsuji, K.*, Iio, T.*, Miyata, N., Uchida, A.*, Osawa, R., Kitsutaka, H. and Takahashi, A.: DNA damage in forestomach epithelium from male F344 rats following oral administration of *tert*-butylquinone, one of the forestomach metabolites of 3-BHA

Carcinogenesis, 12, 703~708 (1991)

BHAのフリー代謝物をF344ラットに経口投与し、前胃上皮細胞DNA損傷作用を調べたところ、*tert*-butylquinone (BQ)は1 μ g/mlから用量に依存してその作用が増加したが、BHQやBHAOHのようなキノン前駆体はBQで認められたような低濃度ではDNA損傷作用は認められなかった。またBQとベンジルチオールとの付加体にBQと同程度かそれ以上のDNA損傷作用が認められた。ラットをアクリル酸エチルで前処理するとその処理濃度に依存して、BQによるDNA損傷が減少したことから、BQがDNA損傷作用を有するためには生体内SH化合物が必要であることが示唆された。3-BHAを0.01~1.0%投与し、前胃粘膜中の代謝物をEC検出器付のHPLCで測定すると、BQが用量に依存して生成し、BHAの濃度の約1/4000程度のBQの生成が認められた。BHAの発癌においてBQおよびそのチオール付加体が活性代謝物として働いていることが示唆された。

* 昭和薬科大学

二村芳弘*, 松本清司*, 降矢 強: 実験動物の末梢白血球の染色性について

実験動物, 40, 121~125 (1991)

マウス, ラット, モルモット, ウサギ, イヌ, コモンマーモセットおよびカニクイザル末梢白血球の染色性について、pH 5から8のリン酸緩衝液によるライト・ギムザ染色ならびに酵素・脂肪染色を行ってそれらの染色性を検討した。

コモンマーモセットの好中球と好酸球の鑑別はリン酸緩衝液のpH 6以下で容易であった。またコモンマーモセットの好中球はほかの動物に比べ、ペルオキシダーゼ、ズダンブラック B 染色に強く反応するが、ウサギの好中球はエステラーゼおよび酸ホ

スファターゼ染色に強い反応を示すことがわかった。

*1 東邦大学医学部

*2 信州大学医学部

Umemura, T., Takada, K., Nakaji, Y., Ogawa, Y., Kamata, E., Kaneko, T., Tobe, M. and Kurokawa, Y.: Comparison of the Toxicity of *p*-Dichlorobenzene (*p*-DCB) Administered to Male F344 Rats Orally or by the Inhalation Route

Sci. Rep. Res. Inst. Tohoku Univ., -C, 36, 1~9 (1989)

雄のF344ラットに*p*-DCBの24時間500(H群)および125ppm(L群)の全身曝露(IH)および300mg/kgの一回強制経口投与(PO)を行ない、*p*-DCBの毒性と臓器内分布を経口と吸入経路で比較した。血清、肝臓、腎臓、脂肪組織中の*p*-DCB濃度を投与後24時間まで一定の間隔で測定した。IH群の血清中の*p*DCB濃度ピークはPO群のピークより低いが、*p*DCBの臓器/血清分布比はIH群で一部有意に高かった。IH群において血清の尿素窒素量、肝臓のGOT・GPTの増加、血清の総コレステロールの減少、腎尿管にeosinophilic droplets, swellingおよびdesquamationが認められた。

川崎 靖, 内田雄幸, 関田清司, 松本清司, 落合敏秋, 白井章夫, 中路幸男, 降矢 強, 黒川雄二, 戸部満寿夫: F344ラットによるNivalenolの単回および反復経口投与毒性試験

食衛誌, 31, 144~154 (1990)

F344ラットを用いてNivalenol (NIV)の単回および反復経口投与毒性試験を行った。単回投与試験では、一回強制投与後に鎮静、半眼、歩行踏跟および下痢が発現し、剖検では肺の充うっ血および消化管の充血が見られた。経口LD₅₀値は雌雄ともに19.5mg/kgであった。反復投与試験では、0.4および2.0mg/kg・bw/dayの用量で30日間の投与を行い、15および30日後にと殺した。血液学および血清生化学的検査では散発的に有意の差を示す所見が見られたが、一定の傾向は認められなかった。2.0mg/kg・bw/day群で肝臓および脾臓の重量が有意の増加を示したが、病理組織学的検査では変化が認められなかった。したがって、本実験条件下ではNIVによる明らかな毒性の発現は認められず、投

与量をさらに増量して検討する必要があると結論した。

Sai, K., Takagi, A., Umemura, T., Hasegawa, R. and Kurokawa, Y.: **Relation of 8-hydroxydeoxyguanosine formation in rat kidney to lipid peroxidation, glutathione level and relative organ weight after a single administration of potassium bromate**

Jpn. J. Cancer Res., **82**, 165~169 (1991)

ラット腎発がん剤臭素酸カリウム (KBrO_3) は発がんメカニズムに酸素ラジカル種の関与が示唆されている。既に KBrO_3 の経口投与により、活性酸素種による DNA 傷害産物の一つである 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OH-dG) が標的臓器腎で生成することが確認されているが、その生成機構については不明である。そこで本研究では、8-OH-dG 生成に関与する要因を調べるため、 KBrO_3 をラットへ単回腹腔内投与し、標的臓器腎における 8-OH-dG、過酸化脂質、グルタチオンレベルおよび腎比重量の経時変化および用量相関性に関して検索した。その結果、脂質過酸化が KBrO_3 による 8-OH-dG 生成に密接に関係していることが明らかとなった。

Denda, A.*, Sai, K., Tang, Q.*, Tsujiuchi, T.*, Tsutsumi, M.*, Amanuma, T.*, Murata, Y.*, Nakae, D.*, Maruyama, H.*, Kurokawa, Y. and Konishi, Y.*: **Induction of 8-hydroxydeoxyguanosine but not initiation of carcinogenesis by redox enzyme modulations with or without menadione in rat liver**

Carcinogenesis., **12**, 719~726 (1991)

酸化還元酵素系修飾下での menadione の肝に及ぼす酸化的傷害性および肝発がんイニシエーション活性について F344 ラットを用いて検討した。その結果、phenobarbital-Na, dicumarol, phorone, EDTA-Na-Fe (III) による酸化還元酵素系の修飾下では、menadione の処置、未処置にかかわらず、肝傷害および肝 8-hydroxydeoxyguanosine レベルの上昇 (酸化的傷害) がもたらされたが、GST-P 陽性巣および過形成結節は誘発されず、この酸化的傷害が肝発がんのイニシエーションに関与しないことが明らかとなった。

* 奈良県立医科大学

Umemura, T., Sai, K., Takagi, A., Hasegawa, R. and Kurokawa, Y.: **Oxidative DNA damage, lipid peroxidation and nephrotoxicity induced in the rat kidney after ferric nitrilotriacetate administration**

Cancer Lett., **54**, 95~100 (1990)

腎発癌性を有す鉄ニトリロ三酢酸 (Fe-NTA) を雄 Wistar ラットに 15 mg Fe/kg の用量で単回 i. p. 投与し、投与 1, 6, 24, 48 時間後の腎 DNA 中の 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OH-dG) レベル、脂質過酸化量 (LPO) を測定、また、投与量と腎 DNA 中の 8-OH-dG レベル、血清 CRN, BUN, 病理組織所見との関係についても検討した。その結果、15 mg Fe 投与 1 時間後で LPO は増加のピークに達したが、8-OH-dG レベルは 1~24 時間まで増加が認められた。一方、この 8-OH-dG レベル増加は腎傷害の程度と相関し、用量反応的に認められることが明らかとなった。

Takagi, A., Sai, K., Umemura, T., Hasegawa, R. and Kurokawa, Y.: **Relationship between hepatic peroxisome proliferation and 8-hydroxydeoxyguanosine formation in liver DNA of rats following long-term exposure to three peroxisome proliferators; di(2-ethylhexyl) phthalate, aluminium clofibrate and simfibrate**

Cancer Lett., **53**, 33~38 (1990)

肝発癌性を有すペルオキシソーム増殖剤による肝ペルオキシソーム増殖と酸化的 DNA 傷害の関連を明らかにするため、DEHP, アルミニウムクロフィプレート, シンフィプレートの三種のペルオキシソーム増殖剤を粉末飼料にそれぞれ 0.5, 0.5, 1.2% の濃度で添加し、雄 F-344 ラットに 12 カ月間混餌投与して 1, 2, 3, 6, 9, 12 カ月目に肝および腎 DNA 中の 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OH-dG) レベルを測定した。その結果、肝 DNA 中の 8-OH-dG レベルは投与期間を通し、対照群の 2 倍程度の持続的増加を示したが、腎ではこのような増加は認められず、ペルオキシソーム増殖と酸化的 DNA 傷害との関連が示唆された。

Takagi, A., Sai, K., Umemura, T., Hasegawa, R. and Kurokawa, Y.: **Short-term exposure to the peroxisome proliferators, perfluorooct-**

anoic acid and perfluorodecanoic acid, causes significant increase of 8-hydroxydeoxyguanosine in liver DNA of rats

Cancer Lett., 57, 55~60 (1991)

パーフルオロ系化合物によるペルオキシソーム増殖と酸化的 DNA 傷害の関係を明らかにするため、ペルオキシソーム増殖作用を有す perfluorooctanoic acid (PFOA) および perfluorodecanoic acid (PFDA) とペルオキシソーム増殖作用の無い perfluorobutyric acid (PFBA) および perfluorooctane (PFO) を F344 ラットに投与した。PFOA, PFBA および PFO の単回 i.p. 投与 (100 mg/kg) により PFOA 投与肝で 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OH-dG) の有意な増加を認めたが、PFBA, PFO の肝およびすべての群の腎では認められなかった。一方、0.02%PFOA および 0.01%PFDA の 2 週間混餌投与で肝 8-OH-dG レベルの有意な増加を認めたが、腎では 8-OH-dG レベルの変化は認められなかった。この結果、パーフルオロ系脂肪酸によるペルオキシソーム増殖と酸化的 DNA 傷害の密接な関連性が示唆された。

Hasegawa, R., Nakaji, Y., Kurokawa, Y. and Tobe, M.: Acute toxicity tests on 113 environmental chemicals

Sci. Rep. Res. Inst. Tohoku Univ., -C, 36, 10~16 (1989)

毒性部において過去に行われた 113 の環境化学物質の急性毒性値、肉眼所見、毒性の標的臓器などにつきまとめて報告した。化学物質の内訳は 23 の家庭用品, 11 の医薬品, 10 の医薬品添加物, 20 の食品添加物, 13 の工業用化学物質, 14 の環境汚染物質, 12 の農薬, 5 の有機溶剤である。

Hasegawa, R., Naitoh, K., Kawasaki, Y., Aida, Y., Momma, J., Saitoh, M., Nakaji, Y. and Kurokawa, Y.: Acute and subacute toxicity studies on 2,3-dichloropropionic acid and chlorinated polyacrylamide in rats

Wat. Res., 24, 661~666 (1990)

飲料水の製造の過程で使用されている塩素消毒によって生成される可能性のある副産物の毒性について検討した。ポリアクリルアミドは一部の国で既に浄化の過程で用いられており、その有用性から国内でも使用許可の要望が高い。塩素処理により生成さ

れる副産物としてジクロロプロピオン酸および塩素化ポリアクリルアミドについて急性および亜急性毒性試験を行った。ジクロロプロピオン酸はアクリルアミドと同程度の毒性を示したが、神経毒性は認められなかった。一方、塩素化ポリアクリルアミドについては認識できる毒性は認められなかった。

Sakai, T.*, Yamamoto, H.*, Taniguchi, Y.*, Kodama, Y., Horimoto, M.*, Hayakawa, T.*, Kurata, Y.* and Nagao, S.*: Toxic effect xylitol in mice

Bull. Coll. Agr. & Vet. Med., Nihon Univ., 47, 1~10 (1990)

五炭糖アルコールである Xylitol をマウスの静脈内に投与して、急性毒性および亜急性毒性を調べた。Xylitol の LD₅₀ は、雄 13,250 mg/kg, 雌 12,000 mg/kg であり、性差は認められなかった。急性試験では、一般症状として頻尿、自発運動の減少、呼吸速迫、振戦、間代性痙攣、呼吸困難が見られ、投与後 30 分以内に死亡が頻発した。肝臓には細胞浸潤と空胞変性を伴う肝細胞壊死巣が認められた。Xylitol を 1250 mg/kg, 2500 mg/kg, 5000 mg/kg の用量で 30 日間投与した場合、死亡例は見られず、臨床病理学的変化も認められなかった。

* 日本大学

児玉幸夫, 酒井健夫*¹, 内藤克司, 堀内茂友*²: ナキウサギ *Ochotona rufescens rufescens* の皮膚の生物学的特性 ナキウサギの皮膚のヒスタミン量

実験動物, 39, 401~406 (1990)

ナキウサギの皮膚の各局所におけるヒスタミン量を測定し、ウサギ、モルモットおよびラットと比較した。ナキウサギの皮膚の平均ヒスタミン量は、22.6 μg/g であったが、各局所のヒスタミン量は肛門周囲>腹部中央部>背部中央部=肩甲間部>腰部>頭部>耳介の順となった。ナキウサギの耳介を除く 6 局所の皮膚におけるヒスタミン量は、ウサギおよびモルモットの約 2~5 倍と高かったが、ラットとは肛門周囲を除く皮膚 6 局所のヒスタミン量はほぼ同様であった。耳介のヒスタミン量は、ナキウサギとウサギ、モルモット、ラットの間に大差はみられなかった。ナキウサギの皮膚のヒスタミン量は、ウサギよりラットに近かった。ヒスタミン定量と同時に測定したナキウサギの皮膚組織中の肥満細胞数

は平均 9.9 個/mm² で、皮膚 7 局所ともにラットより少なく、ウサギやモルモットより多かった。

*¹ 日本大学
*¹ 生物科学技術研究所

Kodama, Y., Sakai, S.*¹, Yoon, C.*², Horiuchi, S., Naito, K., Natori, S. and Lee, W.*²: **Carcinogenicity of bracken fern in ACI/N rats**

J. Korean Pub. Health Asso., **16**, 68~74 (1990)
ワラビの凍結乾燥エキス、スプレードライエキスおよび乾燥粉砕ワラビを飼料に添加し 27 週間 ACI/N 系ラットに投与し、次いでさらに 27 週間基本飼料を与えた結果、凍結乾燥エキス、スプレードライエキス両群では特に変化は認められなかったが、乾燥粉砕群では小腸および大腸に悪性腫瘍が認められた。

*¹ 日本大学
*¹ Konkuk University

児玉幸夫, 酒井健夫*¹, 内藤克司, 真木俊夫*², 堀内茂友*³: **実験動物用市販固形飼料中のニトロソジメチルアミン**

実験動物, **40**, 105~109 (1991)

実験動物用市販固形飼料の化学物質による汚染状況を知る一環としてマウス・ラット用飼料および同原料中のニトロソジメチルアミン (NDMA) の分析を行い、また飼料を保管および加熱した場合の NDMA の量的推移について検討した。飼料中の平均含有量は 10 ppb 以下であった。飼料原料ではアルファルファが高い NDMA 量を示した。室温および低温中で保管した飼料中の NDMA 量の増減に関しては、6 ヶ月までは一定の傾向は認められなかった。飼料を加熱した場合は、121℃では飼料中の NDMA 量に大きな影響は認められなかった。以上のことから、市販固形飼料中の NDMA による動物実験への影響は少ないものと思われた。

*¹ 日本大学
*² 東京都立衛生研究所
*³ 日本セイギケン総合研究所

Hagiwara, K.*, Naito, K., Kurokawa, Y. and Ichikawa, T.*: **Kidney injury induced by lipid peroxide produced by vitamin E deficiency and GSH depletion in rats**

J. Nutr. Sci. Vitaminol., **37**, 99~107 (1991)

ウィスターラットを用い、ビタミン E 欠乏または添加食を 6 週間与え、その後 buthionine sulfoximine (BSO) を 3 日間腹腔内投与した。その結果、ビタミン E 欠乏食と BSO 処理を行ったラットでは、グルタチオンの減少、脂質過酸化の上昇、および腎の傷害が顕著であった。

* 国立健康栄養研究所応用食品部

Nakazawa, K., Inoue, K., Fujimori, K. and Takanaka, A.: **Difference between substance P- and acetylcholine-induced currents in mammalian smooth muscle cells**

Eur. J. Pharmacol., **179**, 453~456 (1990)

モルモット単離腸管平滑筋細胞を用いて、膜電流におけるサブスタンス P (S-P) とアセチルコリン (Ach) の作用を比較した。マイナスに電位を固定した場合には S-P も Ach も内向電流を増加した。S-P 電流は -50 mV よりもマイナスの過分極により増加し、Ach 電流は減少した。以上の結果により、S-P 惹起内向き電流は Ach 活性化チャンネルとは異なるイオン経路を介して引き起こされることが示唆された。

Nakazawa, K., Inoue, K., Fujimori, K. and Takanaka, A.: **Neurokinin A suppresses a voltage-gated K current in smooth muscle cells from rat vas deference**

Eur. J. Pharmacol., **182**, 189~192 (1990)

ラット単離輸精管平滑筋細胞を用いて、ニューロキニン A (NKA) を電気生理学的に検討した。10⁻⁷ M の NKA は静止膜電位に影響せずに活動電位の持続時間を延長し、脱分極により惹起される外向きの K 電流を抑制した。10⁻⁷ M のサブスタンス P (S-P) は K 電流に影響しないので、NKA の K 電流抑制作用は輸精管平滑筋の収縮と同様に S-P よりも強いことが示唆されると同時に、K 伝導の抑制が NKA 惹起平滑筋収縮に関与していることが判明した。

Nakazawa, K., Fujimori, K., Takanaka, A. and Inoue, K.: **An ATP-activated conductance in pheochromocytoma cells and its suppression by extracellular calcium**

J. Physiol. (London), **428**, 257~272 (1990)

ATP-誘発内向き電流の性質について、PC 12 細

胞を用い whole-cell voltage-clamp 法により検討した。ATP (100 μ M) を外液から適用することにより、逆転電位が約+7 mV の内向き整流電流を惹起した。電流の不活性化は ATP 存在下においても数秒のうちに生じた。ATP 類似化合物の電流惹起作用の強度比は ATP>ATP γ S>ADP の順であり、AMP およびアデノシンは全く作用を示さなかった。この電流は外液のカチオンとして唯一カルシウムを含む条件下でも惹起された。したがって、ATP-感受性経路はカルシウムをも通すことが明らかとなった。

Nakazawa, K., Fujimori, K., Takanaka, A. and Inoue, K.: **Reversible and selective antagonism by suramin of ATP-activated inward current in PC12 pheochromocytoma cells**

Br. J. Pharmacol., **101**, 224~226 (1990)

ATP-誘発内向き電流に対するスラミンの効果について、PC12 細胞を用い whole-cell voltage-clamp 法により検討した。スラミンは ATP-誘発内向き電流を 30~300 μ M の濃度で用量依存的に抑制した。この抑制効果は可逆的であり、競合的であった。スラミンはニコチンによって誘発される電流およびメタコリンによって惹起される K 電流抑制作用に何の影響も及ぼさなかった。したがって、スラミンの効果は可逆的かつ特異的であることが明らかとなった。

Nakazawa, K., Inoue, K., Fujimori, K. and Takanaka, A.: **ATP-activated single channel currents recorded from cell-free patches of pheochromocytoma PC12 cells**

Neurosci. Lett., **119**, 5~8 (1990)

PC12 細胞から得た cell-free membrane パッチを用いて単一チャンネル記録を行った。ATP (50 μ M) は単離パッチにおいて単一チャンネル電流を惹起した。電流の不活性化は約 5 秒の時定数をもって発現した。単一チャンネルのコンダクタンスは 13 pS であった。単一チャンネルでの電流はホールセルレコーディングで得られたマクロ電流の性質とよく似ていた。

Inoue, K., Nakazawa, K., Obama, T., Fujimori, K. and Takanaka, A.: **Chlordecone inhibits three types of ion channel in a neural cell line**

Pharmacol. and Toxicol., **68**, 444~446 (1991)

クロルデコンは有機塩素系農薬であり、神経系に作用することがわかっているが、その作用機序は不明である。そこで神経系細胞 PC12 を用いイオンチャンネルに対するクロルデコンの影響を検討した。クロルデコンは 3~10 μ M の濃度で膜電位依存性カルシウム電流および脱分極刺激誘発 K 電流を用量依存的に抑制した。また、受容体作動性チャンネルとしての ATP 誘発内向き電流を抑制した。クロルデコンはこれらチャンネルを非特異的に抑制し、その抑制作用は完全には可逆的ではなかった。

Nakazawa, K., Fujimori, K., Takanaka, A. and Inoue, K.: **Comparison of adenosine triphosphate- and nicotine-activated inward currents in pheochromocytoma cells**

J. Physiol. (London), **434**, 647~660 (1991)

ATP-誘発内向き電流の性質について、ニコチン誘発内向き電流のそれとの比較研究を PC12 細胞を用い、whole-cell voltage-clamp 法により行った。ATP、ニコチンのいずれも逆転電位が 0 mV 付近にある内向き電流を惹起した。両者の電流電圧曲線は非常によく似ていた。ATP は、ニコチンに対して脱感作した細胞でも電流を惹起した。ATP の電流を抑制するスラミンはニコチン誘発電流には全く影響を及ぼさなかった。逆に、ニコチン電流を抑制するヘキサメソニウムは ATP 誘発電流には全く影響を及ぼさなかった。すなわち、両アゴニストの結合部位は明らかに異なることが示された。

Inoue, K., Nakazawa, K., Ohara-Imaizumi, M., Obama, T., Fujimori, K. and Takanaka, A.: **Selective and competitive antagonism by suramin of ATP-stimulated catecholamine-secretion from PC12 pheochromocytoma cells**

Br. J. Pharmacol., **102**, 581~584 (1991)

P2 アンタゴニスト候補スラミン (10~300 μ M) は PC12 細胞からの ATP 誘発ドーパミン放出を用量依存的に抑制した。スラミンは、300 μ M の濃度でも高濃度 K 刺激あるいはニコチン刺激によるドーパミン放出に影響を及ぼさなかった。スラミンによる抑制作用はほぼ完全な競合阻害であり、pA2 値は 4.52 であった。ATP は細胞内カルシウムの濃度を上昇させた。これに対してもスラミンは用量依存的に抑制し、その強さはドーパミン放出抑制作

用とほぼ同程度であった。

Inoue, K., Nakazawa, K., Ohara-Imaizumi, M., Obama, T., Fujimori, K. and Takanaka, A.: **Antagonism by reactive blue 2 but not by brilliant blue G of extracellular ATP-evoked responses in PC12 pheochromocytoma cells**
Br. J. Pharmacol., **102**, 851~854 (1991)

リアクティブブルー2 (RB2) とブリリアントブルーG (BBG) のPC12細胞におけるATP誘発反応に対する効果を検討した。RB2はATP誘発ドーパミン放出作用ならびに内向き電流惹起作用を10~100 μ Mの濃度で用量依存的に抑制した。RB2により、ATP誘発ドーパミン放出作用の最大反応は抑制された。一方BBGはATPによって惹起される反応のいずれに対しても影響を及ぼさなかった。以上の結果から、RB2はPC12細胞においてP2アンタゴニストとして働くことが明らかになった。

Kawanishi, T. and Lemasters, J. J.*: **Cytosolic Ca^{2+} response to hormonal stimulations in chemically injured hepatocytes**

Jpn. J. Pharmacol., **55**, 46P (1991)

単離肝細胞に各種ミトコンドリア機能阻害剤を加えたり、KCNとヨード酢酸処理により初代培養肝細胞を化学的低酸素状態に置くと、細胞障害が生じる。このような細胞障害時における細胞のホルモン刺激反応性を調べるため、ホルモン刺激による細胞内カルシウムイオン濃度の変化を検討した。通常肝細胞ではフェニレフリン刺激、あるいはバゾプレシン刺激によってカルシウムオッシレーションが生じるが、ミトコンドリア機能阻害剤で処置したり化学的低酸素状態に置くと、このオッシレーションは急速にかつ強く抑制された。化学的低酸素状態における抑制機序を検討した結果、(1)ホルモン刺激によるイノシトール三リン酸の生成増加が著しく抑制され、(2)化学的低酸素によって引き起こされる細胞内アシドーシス下では細胞内からのカルシウムイオン放出が抑制される、という2点を見出した。

* University of North Carolina at Chapel Hill, USA

Shimoji, N., Imaida, K., Hasegawa, R.*, Mat-suoka, C., Uneyama, C., Takahashi, M. and Hayashi, Y.: **Enhancing effect of oxymetho-**

lone, an anabolic steroid, on development of liver cell foci in rats initiated with N-diethylnitrosamine

Cancer Lett., **49**, 165~168 (1990)

蛋白同化ステロイド剤であるoxymetholone (OXM)の肝腫瘍発生に対する促進作用を検討した。実験にはF344雄ラットを用い、diethylnitrosamine (DEN)を100 mg/kgを単回腹腔内投与した。その1週間より4週間、0.2% OXMを、その後0.1% OXMを35週間経口投与した。実験期間40週で屠殺剖検し、肝のglutathione S-transferase placental form (GST-P)陽性細胞巣と明細胞巣(clear cell foci)の発生頻度ならびに面積を画像処理装置を用いて検索した。その結果、DEN-OXM群は対象群であるDEN群よりGST-P陽性細胞巣ならびに明細胞巣ともに単位面積あたりの面積ならびに陽性細胞数が有意に増加していた。以上の結果より、OXMには肝腫瘍発生過程において促進作用を有することが明らかとなった。

* 名古屋市立大学医学部

Takahashi, M., Furukawa, F., Toyoda, K., Sato, H., Hasegawa, R., Imaida, K. and Hayashi, Y.: **Effects of various prostaglandin synthesis inhibitors on pancreatic carcinogenesis in hamsters after initiation with N-nitrosobis(2-oxopropyl)-amine**

Carcinogenesis, **11**, 393~395 (1990)

ハムスターの実験肝癌は組織学的に管状腺癌で、ヒトの肝癌とよく類似している。N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine (BOP)をイニシエーターとして、2段階発癌のプロモーション時期におけるインドメタシンやフェニルブタゾンなどのプロスタグランディン合成阻害剤の影響について検討した。

6週齢の雌ハムスターに10 mg/kg BOPを週1回、5週投与し、イニシエーションとした。その後、各群には20 ppmインドメタシン含有飲料水、0.25%フェニルブタゾン含有飼料、1%アスピリン含有飼料、および対照群として通常の飼料と飲料水を27週間投与した。その結果、イニシエーション処理のみの群の肝癌が36個/28匹(1.29個/匹)に対し、インドメタシン群では12個/19匹(0.63個/匹)、フェニルブタゾン群では11個/19匹(0.58個/匹)、アスピリン群では16個/19匹(0.84個/匹)と減少していた。プロスタグランジン合成阻害

物質は肺癌発生のプロモーション過程で抑制作用を示すことが明らかとなった。

Miyakawa, Y., Sato, S.-I., Kakimoto, K., Takahashi, M. and Hayashi, Y.: **Induction of cutaneous mast cell tumors by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine followed by TPA in female mice of 4 out of 5 strains tested**
Cancer Lett., 49, 19-24 (1990)

肥伴細胞腫はマウスでは稀な疾患であるが、MNNGを雌マウスの皮膚に単回投与し、その後TPAを週3回投与したところ、5系統のうち4系統のマウスに皮膚肥伴細胞腫が高頻度に発生した。中には悪性化を示すものもあった。発生率はDBA/2マウスで27%、BOFマウスで22%、BALB/Cマウスで11%、CDFマウスで10%、であり、C57BL/6マウスでは発生をみなかった。一方、MNNGのイニシエーション処置だけの群では、いずれの系統においても肥伴細胞腫の発生は認められなかった。

発生した腫瘍のほとんどは肉眼的には見られず、組織学的に検索してはじめて見出されたもので、大きさは2mm以下であった。しかし、DBA/2マウスに見られた腫瘍は比較的大きく、20×10×5mmであった。

組織学的には、2例が悪性、ほかの17例は良性と考えられた。

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)

食塩は胃癌発生の重要な要因と考えられ、種々の研究により、その修飾因子と指摘されている。そこで、食塩の胃に対する作用を検討する目的でラット胃粘膜および尿中の過酸化脂質(MDA)量測定と病理組織学的検索を行なった。また、併わせてヒト尿中の過酸化脂質量の測定を行い様々な胃疾患との関連性について検討した。ラット胃粘膜および尿中過酸化脂質量は、摂取食塩の濃度依存的に増加を示し、1%以上の濃度では有意であり、比較的低濃度の0.25%においても増加傾向がみられた。病理組織学的変化は、4.0%投与群で胃底腺に軽度の腺窩上皮の延長がみられ、被覆上皮細胞の変性像もみられた。ヒト尿中過酸化脂質については、正常者と比

べ活動性潰瘍、慢性胃炎、ポリープを含む胃隆起性病変、そして胃癌の順にその増加が認められ、特に胃粘膜の増殖性病変では顕著であった。食塩投与による胃粘膜の過酸化脂質生成の亢進は、食塩の胃癌におけるプロモーション作用を考える上で興味ある知見と考えられた。

Maekawa, A.*, Todate, A., Onodera, H., Matushima, Y., Nagaoka, T., Shibutani, M., Ogasawara, H., Kodama, Y. and Hayashi, Y.: **Lack of Toxicity/Carcinogenicity of Monosodium Succinate in F344 Rats**

Fd. Chem. Toxicol. 28, 235-241 (1990)

食品添加物であるコハク酸1ナトリウム塩の毒性・癌原性をF344ラットを用いて検討した。経口投与によるコハク酸ナトリウムのLD₅₀は>8g/kgであった。13週間経口投与による亜慢性毒性試験においては、唯一の毒性徴候は2.5%群以上の群における体重増加抑制であった。この結果より、最大耐量はおよそ2-2.5%と推定した。長期毒性・癌原性試験では、コハク酸ナトリウムは0(対照群)、1および2%の濃度で水に溶解し、各群雌雄各50匹よりなるF344ラットに飲料水として2年間投与した。対照群を含む各群に多くの腫瘍発生がみられたが、雌の甲状腺C-細胞腫瘍を除き、いずれの腫瘍においても用量相関をもった発生増加はみられなかった。雌においては2%群で有意差はないものの、対照群にくらべC-細胞腫瘍の発生増加がみられ、かつ同腫瘍の発生に用量相関がみとめられた。しかし、同腫瘍はF344ラットには最もよくみられる自然発生腫瘍の1つであり、その発生にはロットにより変動がみられることが知られている。今回の実験ではC-細胞過形成の発生には差をみとめず、さらに雌対照群における同腫瘍の発生率は我々の背景データよりも低かった。これらのことより、雌投与群におけるC-細胞腫瘍の発生増加は検体投与によるものでなく、自然発生腫瘍の変動範囲内であると推定した。また種々の非腫瘍性病変が各群の動物にみられたが、何ら検体投与に起因する毒性病変は認められなかった。以上の結果より、コハク酸ナトリウムは1および2%の濃度を飲料水で2年間F344ラットに投与した時、何ら毒性・癌原性を示さないと結論した。

* 佐々木研究所

Hasegawa, R., Furukawa, F., Toyoda, K., Sato, H., Takahashi, M. and Hayashi, Y.: **Urothelial Damage and Tumor Initiation by Urinary Metabolites of Sodium *O*-Phenylphenate in the Urinary Bladder of Female Rats**

Jpn. J. Cancer Res. 81, 483~488 (1990)

Sodium *o*-phenylphenate (Na-OPP) の代謝産物である 2-phenyl-1,4-benzoquinone (PBQ) を雌の F344 ラットの膀胱内に注入すると、膀胱に遅延する炎症や上皮の過形成など急性の障害が現れた。また、PBQ を 5 週間に 10 回同様に膀胱内に注入し、その後 saccharin 添加飼料で 31 週間飼育すると膀胱癌の前癌病変の発生が認められた。Na-OPP かそれとも phenylhydroquinone には障害性や tumor initiation 活性のどちらもなく、Na-OPP の膀胱発がんは PBQ が重要な役割をする可能性が示された。

Maekawa, A.*, Nagaoka, T., Onodera, H., Matushima, Y., Todate, A., Shibutani, M., Ogasawara, H., Kodama, Y. and Hayashi, Y.: **Two-year Carcinogenicity Study of 6-Mercaptopurine in F344 Rats**

J. Cancer Res. Clin. Oncol., 116, 245~250 (1990)

制癌剤の 1 つである 6-メルカプトプリン (6-MP) の癌原性を F344 ラットを用い検討した。6-MP は 25 または 50 ppm の濃度に水に溶解し飲料水として 2 年間投与した。対照群を含む各群の多くの動物に種々の腫瘍がみられたが、腫瘍発生臓器の分布や腫瘍型はこの系統のラットに好発する自然発生腫瘍のそれと同じであった。雄においては個々の腫瘍発生頻度に群間で差はみられなかった。一方、雌においては、C-細胞腫瘍、褐色細胞腫、子宮腺癌および脳腫瘍の発生に positive trend がみられ、さらに 50 ppm 群における C-細胞腫瘍および褐色細胞腫の発生率は対照群にくらべて有意に高かった。総悪性腫瘍数も 50 ppm 群で増加していた。しかしながら、これら腫瘍の多くはこの系に好発する自然発生腫瘍であり、今回の対照群におけるこれら腫瘍の発生率は背景データよりも低く、これら腫瘍の前癌性病変の頻度や腫瘍発生時期に群間で差をみとめなかった。これらの結果から、6-MP の癌原性を完全に否定することはできないものの、たとえ癌原性があったとしても、その強さはきわめて弱いものであると考えられた。今回の実験条件下では、6-MP

の白血病誘発作用は認められなかった。

* 佐々木研究所

Maekawa, A., Matushima, Y., Onodera, H., Shibutani, M., Ogasawara, H., Kodama, Y., Kurokawa, Y. and Hayashi, Y.: **Long-Term Toxicity/Carcinogenicity of Musk Xylol in B6C3F₁ Mice**

Fd. Chem. Toxic., 28, 581~586 (1990)

Musk xylol の毒性と癌原性試験を B6C3F₁ マウスを用いて検討した。musk xylol を 0 (対照群)、0.075 および 0.15% の濃度で CRF-1 粉末飼料に混入し、80 週間自由に摂取させた。雌雄各群における良性、悪性を含めた全ての腫瘍発生率は雌雄各投与群で対照群に比べ有意に増加していた。肝細胞の腺腫と腺癌を合わせた腫瘍発生率は、雌雄投与群で対照群に比し明瞭に増加し、特に雄の肝細胞癌の発生には明瞭な positive trend が見られた。肺腫瘍、ハーダー氏腺腫瘍やリンパ腫についても発生率の上昇がみられた。さらに、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。この結果より、musk xylol は 0.075 または 0.15% の濃度で飼料に混餌 80 週間与えた時、雌雄 B6C3F₁ マウスに癌原性を示すことが明らかとなった。

Maekawa, A.*, Onodera, H., Matushima, Y., Nagaoka, T., Todate, A., Kanno, J., Shibutani, M., Ogasawara, H., Yoshida, J. and Hayashi, Y.: **High Yields of Granulosa Cell Tumors/Luteomas in F344 Rat Ovaries after Transplacental Administration of N-Nitrosobis(2-oxopropyl)amine**

Jpn. J. Cancer Res., 81, 1077~1080 (1990)

ラットにおいて、化学物質による卵巣腫瘍誘発に関する報告はきわめて少ない。F344 ラットを用い、BOP[N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine] 10 mg/kg を妊娠 14, 18 および 20 日目の計 3 回、母親に皮下投与することにより、その仔(雌)に高率に卵巣腫瘍が発生した。組織学的に卵巣腫瘍は全て顆粒膜細胞腫/黄体腫で、一部典型的な顆粒膜細胞腫、あるいは顆粒膜細胞腫と黄体腫が混在する例もみられたが、多くは空胞状の豊富な胞体を有する細胞が細い結合織性の間質で境され蜂巣状の増殖を示す典型的な黄体腫の像であった。この腫瘍は形態的にヒトのそれときわめて類似し、またその高い発生率を

考えると、ヒトにおける顆粒膜細胞腫/黄体腫の良い実験モデルになると考えられた。

* 佐々木研究所

Imaida, K., Hasegawa, R.*, Furukawa, F., Toyoda, K., Shimoji, N., Okamiya, H. and Takahashi, M.: **Effect of co-administration of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and sodium chloride as an initiation procedure for a promoting effect of ethoxyquin on glandular stomach tumorigenesis in F344 male rats**

J. Toxicologic Pathology, 3, 53~56 (1990)

酸化防止剤の1つである ethoxyquin (EQ) のラットの MNNG 胃癌の2段階発癌における影響を検索した。ラットに 100 mg/L の MNNG を飲料水中に混じて投与すると同時に 10% の NaCl 含有基礎飼料を 8 週間投与した。その後 1% の EQ 含有飼料を 32 週間投与した。また、それぞれの対照群を設けて、比較検討した。その結果、幽門腺領域に発生した腺癌の発生頻度は MNNG+NaCl/EQ 群 8/17 (47%)、MNNG/EQ 群 1/16 (6%)、NaCl/EQ 群 0/16 (0%)、MNNG+NaCl 群 2/10 (20%) であった。以上の結果より、EQ のラット胃癌の促進作用は MNNG+NaCl による initiation の時のみ認められるものであり、NaCl の併用投与をしていない MNNG のみの initiation の時には見られないことが明らかとなった。

* 名古屋市立大学医学部

Kanno, J.*¹, Matsuoka, C., Furuta, K., Onodera, H., Miyajima, H.*², Maekawa, A.*³ and Hayashi, Y.: **Tumor Promoting Effect of Goitrogens on the Rat Thyroid**

Toxicol. Pathol., 18, 239~246 (1990)

甲状腺腫瘍発生に対するゴイトロジェンのプロモーション作用の機序を評価するために、DHPN (N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine) でイニシエートされた雄性 F344 ラットに、異なった薬理作用を有する既知ゴイトロジェン、即ちチオ尿素、フェノバルビタール、チオシアン酸カリおよび食用色素赤色 105 号を飲料水に混じり 25 週間経口投与した。陽性対照としてヨード欠乏食を用いた。これらのゴイトロジェンは全てラット甲状腺腫瘍発生に対し、促進または促進傾向を示した。甲状腺の病理組織学的所見および甲状腺関連ホルモン値の動態から、こ

れらゴイトロジェンは二つの型、即ちヨード欠乏型プロモーターとヨード過剰型プロモーターに分類された。ヨード欠乏型プロモーターは TSH を介し、高円柱状濾胞上皮細胞で覆われた均一な濾胞よりなるびまん性甲状腺腫を誘発し、チオ尿素、チオシアン酸カリおよびフェノバルビタールはこの型に入るプロモーターであった。一方、ヨード過剰型プロモーターは、扁平な濾胞上皮細胞で覆われ、コロイドの豊富な濾胞と、立方状上皮細胞で覆われた常様濾胞とが混在してみられる甲状腺腫を誘発し、赤色 105 号はこの型であった。このような分類は、ゴイトロジェンのリスク・アセスメントに有用であると思われる。

*¹ 東京医科歯科大学

*² 武田薬品工業株式会社

*³ 佐々木研究所

Imaida, K., Sato, H., Ogasawara, H., Miyakawa, Y., Takahashi, M., Hayashi, Y.: **Scanning Electron Microscopic Observations on Preneoplastic and Neoplastic Lesions of the Trachea in Syrian Golden Hamsters Induced by Diethylnitrosamine.**

J. Toxicol. Pathology, 3, 231~237 (1990)

Diethylnitrosamine (DEN) を投与したハムスターの気道に発生した前腫瘍性ならびに腫瘍性病変の超微形態学的特性を走査型電子顕微鏡 (SEM) をもちいて検索した。実験には 6 週齢のシリアンゴールデンハムスターを用い、18 mg/kg の DEN を週 2 回、12 週間皮下に投与した。その後、2, 4, 8, 12 ならびに 16 週目に動物を屠殺し、病理形態学的な変化を対照群と比較検討した。その結果、2 週目に既に気道上皮纖毛の巣状の消失が SEM で観察された。4 週目にはこれらの変化は著明となり、8 週目には前腫瘍性病変ならびに腫瘍性病変の発生が観察されたが、その変化は SEM だけでなく、通常の顕微鏡でも観察可能であった。16 週には乳頭腫の発生が観察された。対照群には全くこれらの病変は観察されなかった。これらの結果より、SEM による観察は気道上皮の腫瘍発生の経時観察にきわめて有効な手段であると言える。

古川文夫：ハムスターの膵臓癌発生過程における内分泌細胞の免疫組織学的解析

名市大医誌, 41, 705~726 (1990)

新生仔および成熟ハムスターのラ氏島内・外における各種内分泌細胞の配列や分布を病理組織学および免疫組織化学的に検索した。さらにハムスターによる実験豚発癌のモデルを用い、経時的に豚癌発生過程を追求するとともに、ラ氏島の変化を検討した。生後7日までのハムスターの豚は成熟ハムスターの豚とは組織学的にも異なることが明らかとなった。ハムスターのラ氏島を構成する細胞のうちA細胞は辺縁部に環状に、B細胞は中心部に、D細胞はA、B細胞の間に位置した。F細胞は主に十二指腸葉のラ氏島内に存在した。ラ氏島内におけるこれらの陽性細胞の出現や分布には葉間、週齢により差異が認められた。BOP実験豚癌発生過程では早期に豚癌および異形成がみられ、その発育とともにラ氏島内のソマトスタチン陽性細胞面積の比率は増加し、グルカゴン陽性細胞とインシュリン陽性細胞面積の比率は減少した。これらの所見から耐糖能の異常を示す可能性が示された。

Sato, H., Toyoda, K., Takamura, N., Furukawa, F., Hasegawa, R.*, Fukuoka, M., Imaida, K., Takahashi, M. and Hayashi, Y.: **Effects of 2-phenyl-1,4-benzoquinone and 2,5-dihydroxybiphenyl on two-stage mouse skin carcinogenesis**

Cancer Lett., 55, 233~238 (1990)

Sodium *o*-phenylphenate (OPP-Na) の代謝体である 2-Phenyl-1,4-benzoquinone (PBQ) と 2,5-dihydroxybiphenyl (5-OH) の CD-1 マウスの皮膚発がんの initiation 作用, promotion 作用あるいは発がん作用の有無を検索した。7,12-dimethylbenzo[a]anthracene (DMBA) を投与したマウスに PBQ をマウス 1 匹あたり 1 mg を週 1 回 34 週間投与すると、陽性対照群である 12-*O*-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) と同様に皮膚に過形成が認められるものの、その作用は弱く有意差は見られなかった。一方、10 mg の 5-OH には腫瘍の促進作用は見られなかった。また、両化合物を 5 週間投与後に TPA を投与してもいずれも腫瘍の発生はみられず、ともに initiation 作用は無いことが明らかとなった。以上の結果より、OPP-Na そのものには皮膚腫瘍の促進作用が見られるものの、その代謝体である PBQ と 5-OH には皮膚腫瘍の促進作用が無いことが明らかとなった。

* 名古屋市立大学医学部

Imaida, K., Hirose, M.*, Yamaguchi, S.*, Takahashi, S.*, Ito, N.*: **Effects of naturally occurring antioxidants on combined 1,2-dimethylhydrazine- and 1-methyl-1-nitrosourea-initiated carcinogenesis in F344 male rats**

Cancer Lett., 55, 53~59 (1990)

天然の酸化防止作用を有する物質である selenium (SE), β -carotene (BC), ferulic acid (FA), esculin (ES) および eugenol (EU) の腫瘍の促進作用の有無を検索した。1,2-dimethylhydrazine (DMH, 40 mg/kg sc) と 1-methyl-1-nitrosourea (MNU, 20 mg/kg ip \times 2) を投与した雄 F344 ラットに、0.2% BC, 2 ppm SE, 1% FA, 1% ES, 0.8% EU をそれぞれ基礎飼料中に混じて第 2 週目より経口投与した。52 週で実験を終了し、各臓器の病理組織学的検索を行った。その結果、EU は前胃の過形成ならびに乳頭腫の発生頻度を促進した。BC ははじめその他の物質には大腸腫瘍をはじめとする腫瘍発生の抑制作用を有する傾向を示したが有意差はなかった。以上の結果より EU は前胃の腫瘍発生を促進する作用を有するが、その他の物質は逆に抑制する傾向を示した。

* 名古屋市立大学医学部

Wang, C. Y.*, Zukowski, K.*, Yamada, H.*, Imaida, K., Lee, M.-S.*: **Production of urothelial tumors in the heterotopic bladder of rats by benzidine derivatives**

Cancer Res., 50, 2868~2871 (1990)

ラットの膀胱腫瘍発生過程における 2-aminofluorene と N-hydroxy-2-acetylaminofluorene の N-glucuronide および O-glucuronide の役割について検討した。実験にはラットの異所性膀胱 (heterotopic bladder) の実験系を用い、それぞれの化合物を週 1 回ずつ 1 μ mol を異所性膀胱に接種し、50 週で実験を終了した。その結果、いずれの化合物にもこの異所性膀胱に腫瘍の発生は認められなかった。また、O-glucuronide は反応しやすい状態である pH 8.0 でも発がん性は見られなかった。陽性対照である N-hydroxy-2-aminofluorene の N-glucuronide は異所性膀胱に腫瘍の発生が高率に見られた。これらの結果は、arylamine の膀胱腫瘍の発生には hydroxamic acid の O-glucuronide ではなく、N-glucuronide が重要な代謝物であるという仮説を支持する結果といえる。

* Michigan Cancer Foundation, U.S.A.

Nagaoka, T., Onodera, H., Matsushima, Y., Todate, A., Shibutani, M., Ogasawara, H. and Maekawa, A.*: **Spontaneous Uterine Adenocarcinoma in Aged Rats and Their Relation to Endocrine Imbalance**

J. Cancer Res. Clin. Oncol., **116**, 623~628 (1990)

一般にラットにおいて子宮癌の自然発生はきわめて稀である。Donryu ラットにおいては、子宮体部癌の自然発生が高率 (35.1%) にみられ、過形成の発生頻度も高かった。子宮癌は子宮角部に多く発生し、組織学的には腺癌で、その半数近くに肺などへの転移がみとめられた。子宮癌の発生がみられたラットにおいては、子宮癌がみられなかった例にくらべ、卵巣の嚢胞および萎縮、膈上皮の角化などがより高率に認められ、Donryu ラットにおける子宮癌の発生に内分泌異常 (エストロゲン/プロゲステロン比 (E/P 比) の上昇) が関与していることが示唆された。子宮癌嫌発系の F344 ラットと比較してみると、Donryu ラットにおいては F344 ラットに較べ性周期の乱れがより早期よりみられ、組織学的にも E/P 比の上昇が示唆される所見であった。経時的に血中の性ホルモンを測定した結果、両系統ラットで加齢とともにエストロゲンおよびプロゲステロン値の低下がみられたが、Donryu ラットでは F344 ラットにくらべその低下が著しく、またエストロゲンよりもプロゲステロン値の低下がより大きく、その結果 12 ヶ月齢における Donryu ラットの E/P 比は F344 ラットのそれに較べおよそ 5 倍の高値を示した。これらの結果は、Donryu ラットにおける子宮体部癌の自然発生に内分泌異常、特に E/P 比の上昇が重要な働きをしていることを示しており、Donryu ラットはヒト子宮体部癌の発生機序を検討する上で良い実験モデルであると考えられた。

* 佐々木研究所

Watanabe, M., Ishidate, M. Jr. and Nohmi, T.: **Sensitive method for the detection of mutagenic nitroarenes and aromatic amines: new derivatives of *Salmonella typhimurium* tester strains possessing elevated O-acetyltransferase levels**

Mutat. Res., **234**, 337~348 (1990)

医薬品、化学合成品など生活関連物質、あるいは環境汚染物質としても知られるニトロアレーンおよび芳香族アミンの菌体内代謝活性化に関与する *S. typhimurium* O-アセチル転移酵素の遺伝子を、TA1538 株よりクローン化し、マルチコピープラスミド pBR322 に組み込み TA98, TA100 株へ導入した。得られた株 (YG1024, YG1029) は、対照株 TA1538 (pBR322) の約 100 倍の N-hydroxy-Glu-P-1 O-アセチル転移酵素活性を持ち、Ames 試験において、1,8-ジニトロピレン, Glu-P-1, 2-ヒドロキシアミノフルオレンなど大多数のニトロアレーン, 芳香族ヒドロキシルアミン, および芳香族アミンに高い感受性を示した。以上より、YG1024, YG1029 は、ニトロアレーンおよび芳香族アミンに対する高感受性株として極めて有用である。

Battista, J. R.*, Ohta, T.*, Nohmi, T., Sun, W.* and Walker, G. C.*: **Dominant negative *umuD* mutations decreasing RecA-mediated cleavage suggest roles for intact UmuD in modulation of SOS mutagenesis**

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **87**, 7190~7194 (1990)

UmuD, UmuC は、大腸菌の突然変異誘発に必要な役割をはたしている。UmuD 蛋白質は LexA やファージのリプレッサーとアミノ酸配列上の相同性を示し、RecA により開裂され活性型の UmuD' に転換する。*umuD* のミスセンス・ミュータントを 10 種類単離し、これらが RecA による開裂に対して抵抗性を示すことを明らかにした。これらのミュータントは野生型の *umuD*⁺ に対し優性を示した。UmuD および活性型の UmuD' はいずれもホモダイマーを形成するが、UmuD が UmuD' と共存すると、両者は選択的にヘテロダイマーを形成した。UmuD が SOS 突然変異の終息に関与している可能性について考察した。

* Massachusetts Institute of Technology, U.S.A.

Einisto, P.*, Nohmi, T., Watanabe, M. and Ishidate, M. Jr.: **Sensitivity of *Salmonella typhimurium* YG1024 to urine mutagenicity caused by cigarette smoking**

Mutat. Res., **245**, 87~92 (1990)

アセチル転移酵素の高生産株である *Salmonella typhimurium* YG1024 は、喫煙者の尿中変異原に対し従来から使われてきた TA98 株よりも約 7 倍高い感受性を示した。ニトロ還元酵素の高生産株である YG1021 株は TA98 と同程度の感受性を示した。このことからブルーレーヨンに吸着する喫煙者の尿中変異原は、芳香族アミンであることが示唆された。

* Institute of Occupational Health, Finland

Einisto, P.*, Watanabe, M., Ishidate, M. Jr. and Nohmi, T.: **Mutagenicity of 30 chemicals in *Salmonella typhimurium* strains possessing different nitroreductase or O-acetyltransferase activities**

Mutat. Res., 259, 95~102 (1991)

Salmonella typhimurium YG1021, YG1024, YG1026, YG1029 はニトロ還元酵素活性、あるいはアセチル転移酵素活性が高まった新しいサルモネラ指標菌株である。これらの菌株を用い 30 種類の変異原について試験を行い、その感度を従来株 (TA98, TA100) あるいはニトロ還元酵素, アセチル転移酵素欠損株 (NR 株, DNP 株) と比較した。その結果, ニトロ還元酵素活性の高まった株 (YG1021, YG1026) は芳香族ニトロ化合物に対し特異的に高い感受性を示し, アセチル転移酵素活性が高まった株 (YG1024, YG1029) は芳香族アミン, 芳香族ニトロ, 芳香族ヒドロキシルアミンに対し高い感受性を示すことが明らかになった。

* Institute of Occupational Health, Finland

Nohmi, T., Hakura, A., Nakai, Y.*¹, Watanabe, M., Murayama, S. Y.*² and Sofuni, T.: ***Salmonella typhimurium* has two homologous but different *umuDC* operons: Cloning of a new *umuDC*-like operons (*samAB*) present in a 60-megadalton cryptic plasmid of *Salmonella typhimurium***

J. Bacteriol., 173, 1051~1063 (1991)

umuDC は大腸菌の突然変異誘発に必須な役割をはたしている遺伝子である。 *Salmonella typhimurium* TA1538 から大腸菌の *umuDC* 変異を相補する遺伝子をクローニングし, *samAB* と命名した。 *samAB* 遺伝子は, *S. typhimurium* LT2 からクローニングされた *umuDC_{ST}* 遺伝子とはヌクレオチド・レベルで約 40%異なっていた。 サザン・ハイブ

リダイゼーション法により① *S. typhimurium* LT2, TA1538 には *samAB* と *umuDC_{ST}* の両方が存在すること② *umuDC_{ST}* が染色体上に存在するのに対し, *samAB* は細胞質中のクリプティック・プラスミド上に存在することを明らかにした。2種類の *umuDC* 様遺伝子と, *S. typhimurium* が示す変異原に対する低い感受性との関連について考察した。

*¹ 帝人(株)生物医学研究所

*² 帝京大学医学部

Matsuoka, A., Sofuni, T., Miyata, N. and Ishidate, M. Jr.: **Clastogenicity of 1-nitropyrene, dinitropyrenes, fluorene and mononitrofluorenes in cultured Chinese hamster cells**

Mutat. Res., 259, 103~110 (1991)

1-nitropyrene (NP), dinitropyrene (DNP), fluorene および nitrofluorene 類について染色体異常試験を行った。3種の DNP 類は S9 mix 非存在下低濃度で高頻度の染色体異常を誘発した。1-NP は細菌では直接変異原として知られているが, S9 mix 非存在下では染色体異常を誘発せず, S9 mix 存在下, しかも高濃度の S9 存在下で明らかな染色体異常を誘発した。1-NP は S9 mix によって 1-aminopyrene (AP) を含む数種の代謝物に変わる。しかし, 1-AP の明らかな染色体異常誘発性は認められず, 1-AP 以外に活性な染色体異常誘発性物質が存在することが示唆された。Fluorene は S9 mix 存在下でのみ染色体異常を誘発し, 4種の nitrofluorene 類は S9 mix 存在下で, 非存在下よりも高頻度の染色体異常を誘発した。

Matsuoka, A., Matsui, M., Miyata, N., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr.: **Mutagenicity of 3-tert-butyl-4-hydroxyanisole(BHA) and its metabolites in short-term tests *in vitro***

Mutat. Res., 241, 125~132 (1990)

3-tert-butyl-4-hydroxyanisole(BHA) およびその代謝物の変異原性を, サルモネラを用いる復帰突然変異試験および CHL 細胞を用いる染色体異常試験で検討した。BHA, tert-butyl-hydroquinone (BHQ), tert-butylquinone(BQ) および BHA dimer は復帰突然変異試験では陰性であった。染色体異常試験では, BHA, BHQ および BQ は S9 mix 存在下でのみ陽性で, 3-tert-butyl-4,5-dihydroxyanisole, 3-tert-butylanisole-4,5-qui-

none および *tert*-butylquinone oxide は S9 mix 非存在下、陽性であった。BHA dimer は S9 mix の有無にかかわらず陰性で、細胞毒性も示さなかった。

Hitotsumachi, S.*, Kimura, Y.*, Nakajima, Y.*, Hayashi, M. and Ishidate, M. Jr.: **Micronucleus test on quinacrine dihydrochloride in mice: a comparison of dosage regimens**

Mutation Research, 234, 141~145 (1990)

本研究は、小核試験における最適な投与回数を検討するために行われた国際共同研究の一環として行ったものである。小核と紛らわしい RNA 性の顆粒を誘発することで知られているキナクリン 2 塩酸塩を用いる小核試験を行い、投与回数による相違を検討した。また、RNA 性の顆粒によって、小核誘発頻度の精度を保証するために、アクリジン・オレンジ蛍光染色を用い、ギムザ染色によって得られた結果と比較検討した。結果は、キナクリン 2 塩酸塩によって真の小核の誘発は認められないことが確認された。

* 武田薬品工業(株)

Shimada, H.*, Satake, S.*, Itoh, S.*, Hattori, C.*, Hayashi, M. and Ishidate, M. Jr.: **Multiple-dosing effects of benzo[a]pyrene in the mouse bone marrow micronucleus test**

Mutation Research, 234, 179~181 (1990)

本研究は、小核試験における最適な投与回数を検討するために行われた国際共同研究の一環として行ったものである。ベンツピレンによるマウス骨髄中での小核誘発に関して、連続投与がどのような効果を持つかを検討したものである。その結果、2回投した場合に小核の誘発頻度が、単回または3回投した場合と比較して高かった。

* 第一製薬(株)

Collaborative Study Group for the Micronucleus Test: **Single versus multiple dosing in the micronucleus test: the summary of the 4th collaborative study by CSGMT/JEMS・MMS**

Mutation Research, 234, 205~222 (1990)

日本環境変異原学会の哺乳類試験分科会の下部組織である小核試験共同研究グループによる、第4回の共同研究のまとめである。単回、2回、4回被験物質を投与した後、最終投与後経時的に骨髄細胞の

塗抹標本を作製し、小核の出現頻度を比較した。その結果、今回検討した化学物質はすべて単回投与で小核を誘発した。2回投与後6時間での標本作製、および4回投与後の標本作製では連投の効果は期待できないことが判明した。よって、小核試験の投与計画としては、単回投与または2回投与が適していると考えられる。

Hayashi, M., Morita, T.*, Kodama, Y., Sofuni, T., Ishidate, M. Jr.: **The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using Acridine Orange coated slides**

Mutation Research, 245, 245~249 (1990)

従来小核試験はマウスの骨髄を用いる方法が主流を占めていたが、末梢血を用いることにより、多くの利点が得られることが報告されている。しかし、方法的に未熟であったためかあまり普及しなかった。ここで紹介した方法は、アクリジン・オレンジを先ずスライドグラスに塗布しておき、そこに末梢血を載せ、カバーグラスをかけて超生体染色を施し、蛍光顕微鏡で観察するだけの簡単なものである。この方法を用いて、末梢血を用いる手法が広く用いられることが期待される。

* 日本グラクソ東京研究所

岡田敏史, 木村俊夫*: **旋光計校正用標準物質について**

医薬品研究, 22, 264~269 (1991)

ショ糖を旋光計校正用標準物質として採用する場合、どのような品質のショ糖が適当であるか NBS の標準 Sucrose を対照として比較検討を行った。

試料は日局「精製白糖」1種、JIS 特級「サッカロース」4種を用い、同一の測定条件の下で各試料について5濃度レベルでの比旋光度測定を7施設において実施した。その結果、比旋光度値に試料間および施設間の差異は認められず、NBS 標準 Sucrose の値に一致した。すべての試料で0.15~0.24 mg/g の微量の還元糖が検出されたが、オリゴ糖または多糖は検出されなかった。この結果、日局精製白糖、JIS 特級サッカロースとも旋光計校正用標準物質として十分な品質を有することが明らかとなった。

* サンド薬品(株)

四方田千佳子, 小室徹雄, 木村俊夫: **キトサン膜**

のリゾチームによる分解と内包物質の放出

薬誌, 110, 442~448 (1990)

キトサン膜をキャスト法により調製し、そのリゾチームによる分解特性と内包させた物質の放出について検討した。キトサン膜のリゾチームによる分解速度はキトサンの脱アセチル化度および pH に依存し、脱アセチル化度が低いほど、pH が低いほど分解速度は速くなった。

数種の水溶性物質をキトサン膜に内包させたところ、キトサンと相互作用の強い色素や、分子量の大きい物質はキトサン膜によく保持され、キトサン膜が分解されるにしたがって放出された。

Komuro, T., Yomota, C. and Kimura, T.: *In vitro* Dissolution Properties of Indomethacin Extended-release Capsules*J. Pharm. Pharmacol.*, 43, 79~82 (1991)

市販インドメタシン徐放性カプセル剤のインビトロ溶出挙動をフロー法により検討した。得られた結果をパドル法および回転バスケット法により得られた結果と比較した。主薬の溶出率を時間の平方根に対してプロットするとフロー法の場合には直線関係が得られたが、パドル法や回転バスケット法の場合には得られなかった。フロー法は、標記徐放性製剤をインビトロで溶出試験する場合には他の2方法と比べると有利な点があることを示唆する結果を得た。

Komatsu, H. and Rowe, E. S.*: Effect of cholesterol on the ethanol-induced interdigitated gel phase in phosphatidyl-choline*Biochemistry*, 30, 2463~2479 (1991)

高濃度のエタノールの存在において形成される interdigitated 膜 (向かい合った脂質のアシル鎖と互いに噛み合うような脂質二分子膜, $L\beta I$) を検出する容易かつ直接的な方法を開発する目的で、アシル鎖の先端にピレン基を有した蛍光リン脂質を用いる方法を試み、 $L\beta I$ の検出法として有用であることを明らかにした。さらに、 $L\beta I$ 形成に及ぼすコレステロールの影響を調べた結果、コレステロールの添加量の増加とともに、 $L\beta I$ 相の含有量が減少し、20モル%以上では $L\beta I$ 相が消失した。このことから、エタノールによる $L\beta I$ 形成をコレステロールが抑制することを見出した。

* University of Kansas Medical Center

Komatsu, H., Guy, P. T.* and Rowe, E. S.*: Fluorescence studies of lipid interdigitation in extruded vesicles*Biophys. J.*, 59, 502a (1991)

超音波照射法およびエクストルージョン法を用いて粒径 20~400 nm のいろいろな大きさの一枚膜からなるリン脂質ベシクルを調製し、エタノールによる interdigitated 膜 (向かい合った脂質のアシル鎖と互いに噛み合うような脂質二分子膜) の形成に及ぼすベシクルの大きさの影響をピレンレシチンを蛍光プローブした蛍光法を用いて検討した。その結果、100 nm 以下の一枚膜ベシクルではエタノールによって interdigitated 膜が誘起されないが、ベシクルの粒径が大きくなるほど interdigitated 膜が誘起され易いことを明らかにした。

* University of Kansas Medical Center, KS, U.S.A. and Veterans Administration Medical Center, Kansas City, MO, U.S.A.

Handa, T.*, Komatsu, H., Kakee, A.* and Miyajima, K.*: Interaction of lecithin and pig apolipoproteins of high density lipoproteins at the surface monolayer of reconstituted very small particles*Chem. Pharm. Bull.*, 38, 2079~2082 (1990)

血漿リポ蛋白の分子集合構築におけるアポリポ蛋白の役割を明らかにするために卵黄レシチン、トリオレインおよび豚のアポリポ蛋白質の超音波照射により再構成粒子を調製し、脂質のみからなる微細エマルションよりも小さいことを見出した。調製時のレシチンとアポリポ蛋白の混合比と生成する再構成粒子の粒径との関係、および α -ヘリックス含量の測定からアポリポ蛋白の疎水部分が粒子の表面を覆っているレシチン単分子層に進入し、粒子の曲率を小さくすることにより小さな粒子が安定に存在することを明らかにした。

* 京都大学薬学部

Fujimoto, S.*, Kanazawa, H.*, Ishimitsu, S. and Ohara, A.*: On the mechanism of inactivation of papain by hydroxylamine*Chem. Pharm. Bull.*, 38, 546~548 (1990)

パパインのヒドロキシルアミンによる失活機構に関して検討したところ、失活の程度は pH に依存的であり、かつアルカリ領域で顕著であった。反応液

を窒素で置換するかラジカル捕捉剤の添加により失活は顕著に抑制された。失活の程度はパパインの活性SH基の減少と一致していた。また、失活したパパインを2-メルカプトエタノールで処理すると部分的な再活性化が認められた。これらの結果から、ヒドロキシルアミンによるパパインの失活はヒドロキシルアミンの直接的な作用ではなく、溶存酸素とヒドロキシルアミンとの反応により生成したある種の活性種によりパパインの活性SH基が修飾を受けるためと考えられた。

* 京都薬科大学

Ishimitsu, S., Fujimoto, S.* and Ohara, A.*:
Tyrosine formation from phenylalanine by ultraviolet irradiation

Chem. Pharm. Bull., 38, 1417~1418 (1990)

フェニルアラニンの水溶液を紫外線で照射すると、水酸化生成物として *p*-チロシン、*m*-チロシンと *o*-チロシンの生成が認められた。また、*p*-チロシンと *m*-チロシンの水溶液を照射するとドーパの生成が認められた。フェニルアラニンの水酸化はラジカル捕捉剤の添加により抑制された。水溶液中の溶存酸素を窒素で置換すると水酸化物の生成量は減少したが、完全には抑制されなかった。また、過酸化水素の添加は水酸化物の生成量を顕著に増加させた。これらの結果から、紫外線照射によるフェニルアラニンの水酸化反応には、水の分解により生成した水酸化ラジカルの関与が示唆された。

* 京都薬科大学

Tonogai, Y. and Tai, H. H.*: **Quantitation of 13-Hydroxyoctadecadienoic Acid (13-HODE) by Radioimmunoassay**

Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 39, 125~129 (1990)

13-HODEのRadioimmunoassayによる定量法の確立をおこない、血小板および白血球からの生成機構を検索した。RIA法による13-HODEの検出限界は50 pg/tubeであり、HPLC法より約100倍高感度であった。またOH基を持つ脂肪酸との交差反応性の結果から、本抗体は ω -6水酸基をより認識するものと思われた。血小板または白血球とA-23187との反応時にリノレイン酸を添加すると13-HODEの生成量は驚異的に増加したことから、13-HODEはリノレイン酸よりのArachidonate-15

-lipoxygenase生成物と考えられた。

* University of Kentucky

Hamano, T.*¹, Mitsuhashi, Y.*¹, Aoki, N.*¹, Yamamoto, S.*¹, Tsuji, S., Ito, Y. and Oji, Y.*²:
Enzymic method for the spectrophotometric determination of aspartame in beverages
Analyst, 115, 435~438 (1990)

高感度分光光度法による清涼飲料水中のアスパルテームの定量法を開発した。 α -キモトリブシン-アルコールオキシダーゼ系によるアスパルテームのホルムアルデヒドへの酵素変換後、4-アミノ-3-ペンテン-2-オンとの色素生成を原理とした。検量線はアスパルテーム2.0~30.0 μ g/mlの範囲で直線性が得られた。清涼飲料水中の通常成分は本法を妨害しなかった。種々の実際の清涼飲料水中のアスパルテームの含量を本法により定量し、HPLC法と比較した。

*¹ 神戸市環境保健研究所

*² 神戸大学農学部

Hasegawa, Y., Nakamura, Y., Tonogai, Y., Terasawa, S.*¹, Ito, Y., Uchiyama, M.: **Determination of ethyl carbamate in various fermented foods by selected ion monitoring**
J. Food Protect., 53, 1058~1061 (1990)

カルバミン酸エチル(ウレタン, EC)は発癌性を有する化合物であり、果実酒・日本酒などの発酵飲料中に微量に存在することが知られている。日本の伝統的な発酵食品、味噌・醤油・納豆・もろみなどについてECの存在を検討するため、GC/MS-SIMを用いる各種発酵食品中ECの簡便かつ高感度な分析法を開発した。EC 5 ppbを添加したところ、味噌86 \pm 8%, もろみ70 \pm 25%, 納豆89 \pm 11%, ヨーグルト71 \pm 21%, パン73 \pm 20%の回収率を得た。16品目、74銘柄の各種発酵食品中EC含有量を調査した結果、酒類、醤油では20 ppb以上の濃度で検出されたものがあつた。しかし味噌、納豆、みりんなどからの検出量は5 ppb以下であつた。

* (社)日本油料検定協会

長谷川ゆかり, 中村優美子, 外海泰秀, 伊藤誉志男, 富田 勲*, 下位香代子*, 曾布川能康*:
Collection of mutagens in tap water by membrane of microporous polyethylene hollow

fibers and identification of the mutagens by GC/MS

衛生化学, 37, P-16 (1991)

ポリエチレン多孔質中空糸膜 (EHF 膜) は水中微粒子や細菌を除去することが知られており, 水道水中の変異原物質を吸着除去したとの報告がある。本研究においては, EHF 膜を用いて東京・大阪・静岡の水道水中の微量汚染物質の捕集・濃縮を行った。そして最も強い変異活性を示した大阪の試料について, SEP-PAK シリカゲルカートリッジにより分画し, 各画分の変異活性を検討するとともに, GC/MS 法を用いて活性物質の検索および同定を試みた。その結果, 変異活性を示す画分から含塩素化合物が検出された。これらは水田除草剤のオキサジアゾンおよびブタクロールと同定され, それぞれの水道水中の濃度は前者が 2.18 ppt, 後者が 1.44 ppt であった。

* 静岡県立大学薬学部

Tsuji, S., Shibata, T., Ito, Y., Fujii, S.* and Tomita, K.*: **Stability constants of (RS)-1-isopropyl citrate metal complexes and phase transition of zinc (RS)-1-isopropyl citrate** *Chem. Pharm. Bull.*, 39, 1082~1084 (1991).

クエン酸二水素 (RS)-1-イソプロピルの酸解離定数ならびに Cu(II), Ca(II) および Zn(II) との金属錯体の安定度定数を電位差法で測定した。その亜鉛錯体は相転移が起こることを見だし TG/DTA, IR および X 線粉末法で検討した。その結果, 転移前後の物理化学的性質すなわち結晶水, 配位形態および結晶構造が変化することが明らかになった。

* 大阪大学薬学部

Nakamura, Y., Hasegawa, H., Tonogai, Y. and Ito, Y.: **Determination and identification of daminozide in fresh fruits purchased in Japan** *J. Food Protect.*, 53, 689~692 (1990)

日本国内で購入したおうとう, ぶどう, もも, りんご中のダミノジッド (Aldar, B-9) の残留量を比色法により調べた。ダミノジッドをアルカリ加水分解して 1,1-ジメチルヒドラジンとして捕集し, ナトリウムペンタシアノアミンフェロエートと pH 4.5 で反応させて赤色発色物を得, それを吸光度法で測定した。ダミノジッド残留濃度はおうとう (11 検体) で 0.07~1.39 ppm, ぶどう (10 検体) で 0~

0.36 ppm, もも (9 検体) で 0~0.42 ppm, りんご (10 検体) で 0~0.88 ppm であった。各検体で検出されたダミノジッドについては, メチルダミノジッドとして GC/MS により同定した。

Hamano, T.*¹, Mitsuhashi, Y.*¹, Aoki, N.*¹, Yamamoto, S.*¹, Tsuji, S., Ito, Y. and Oji, Y.*²: **Determination of glycerol in foods by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection**

J. Chromatogr., 541, 265~272 (1991)

食品中のグリセリンの HPLC 法を開発した。グリセリンを一連の酵素 (グリセロキナーゼ, グリセロ-3-フォスファターゼ, カタラーゼ) によりホルムアルデヒドに変換後, 4-アミノ-3-ペンテン-2-オンによる誘導体化を原理とした。検量線はグリセリン 0.1~4.0 μg/ml の範囲で直線性が得られた。食品中の多くの常在成分は本法を妨害しなかった。種々の食品へのグリセリンの添加回収率は 90% 以上であった。本法は簡単で精度が良かった。試料 5 g を定量したとき検出限界は 1.0 μg/g であった。

*¹ 神戸市環境保健研究所

*² 神戸大学農学部

Tsuji, S., Shibata, T., Ito, Y., Fujii, S.* and Tomita, K.*: **Structure of zinc (II) (RS)-1-isopropyl citrate tetrahydrate**

Acta Cryst., C47, 528~531 (1991)

抗酸化相乗剤クエン酸イソプロピルの主成分であるクエン酸二水素 (RS)-1-イソプロピルの亜鉛錯体の X 線結晶構造解析を行った。結晶は単斜晶系に属し空間群 $P 2_1/c$ であった。格子定数は $a=9.934(4)$, $b=29.692(3)$, $c=8.941(4)$ Å, $\beta=144.73(2)^\circ$ であり, $Z=4$, $R=3.46\%$ であった。各クエン酸 1-イソプロピル分子の 2 個のカルボニル基の O 原子と水酸基の O 原子との 3 座を分子内より提供し, 2 配位水の O 原子と他のクエン酸 1-イソプロピルのカルボニル基の O 原子の 3 座を提供して Zn イオンは 6 座配位八面体構造を取り, 立体的に連結していた。立体構造の空間に水分子が存在していた。

* 大阪大学薬学部

外海泰秀, 中村優美子, 長谷川ゆかり, 藤原守*, 伊藤蒼志男: キャピラリーカラム付き FPD

-GCによる食品中29種有機リン系農薬の一斉分析法

衛生化学, 36, 349~357 (1990)

キャピラリーカラム付き FPD-GC を用いて農作物中の 29 種有機リン系農薬の一斉分析法を作成した。きゅうり、みかんなどについては試料からの抽出濃縮液を直接 GC で測定し、53.2~102.2% の回収率を得た。にんにく、にら、玉葱などについては抽出濃縮液をシリカゲルカラムにかけエーテル含有ヘキサンおよびアセトン含有ヘキサンの溶出成分画することにより農薬と妨害ピークを分離し測定することができた。穀類、豆類などについては抽出濃縮液をヘキサン/アセトンニトリル分配して脱脂し、さらにシリカゲルカラムで精製した。

* 神戸農林規格検査所

長谷川ゆかり, 中村優美子, 外海泰秀, 大島辰之*, 伊藤誉志男: 生鮮魚類および野菜に対する亜塩素酸ナトリウムと次亜塩素酸ナトリウムの鮮度保持効果の比較

食衛誌, 31, 261~265 (1990)

亜塩素酸ナトリウム (NaClO₂) の魚類および野菜に対する抗菌作用ならびに鮮度保持効果について、次亜塩素酸ナトリウム (NaClO) を対照として検討した。生鮮丸イワシ、切身サバ、およびカットキャベツを各種濃度の NaClO₂ または NaClO 水溶液に浸漬した後 5° にて 1 または 2 週間貯蔵し、それらの生菌数および K 値、キャベツ褐変度を経日的に測定・観察した。魚類に対しては NaClO₂ および NaClO の抗菌作用は同程度であり、鮮度保持効果は双方とも認められなかった。しかしカットキャベツに使用した場合 NaClO₂ の抗菌作用は NaClO より強く、褐変防止作用も著しかった。

* 日本油料検定協会総合分析センター

中村優美子, 長谷川ゆかり, 外海泰秀, 伊藤誉志男: キャピラリー ECD-GC による農産物中の 7 種ピレスロイド系農薬の一斉分析法

衛生化学, 36, 525~537 (1990)

7 種のピレスロイド系農薬 (ピレトリン剤, ペルメトリン, シベルメトリン, フルシトリンネート, フェンバレート, フルバリネート, トラロメトリン) の一斉分析法を考案した。試料 2~20 g をアセトンでホモジナイズ後、ろ過し、50 ml まで濃縮し、同量の凝固液およびセライト 545.5 g を加え、30

分放置後吸引濾過した。緑茶は熱湯浸出液を飽和酢酸鉛溶液で脱タンニン操作したものを調製した。10% NaCl 100 ml を加え、n-ヘキサン 100 ml で 2 回抽出した。抽出液を 5 ml に濃縮し、試験液とした。夏みかんの皮、玄米、大豆などは n-ヘキサン・アセトニトリル分配による脱脂あるいはフロリジルカラムによる精製を行った。7 種ピレスロイド剤はキャピラリーカラム CBP 1 を用いた ECD-GC により定量した。11 種の農作物に 7 種のピレスロイド系農薬を 0.25~4.72 ppm 添加して添加回収実験を行ったところ、野菜、果実、ばれいしょについては 67.6~97.3%、脂質を含有する玄米、大豆については 27.4~82.7%、緑茶浸出液については 31.5~89.3% であった。しかし、夏みかんの外果皮については妨害ピークのため一部の農薬が定量できなかった。それぞれの試験液について GC/MS による同定を行ったところ、7 種ピレスロイド系農薬は検出されなかった。

中村優美子, 長谷川ゆかり, 外海泰秀, 伊藤誉志男: 胆汁酸 18 種およびコレステロールとその代謝物など 4 種のキャピラリー GC および GC/MS における挙動

衛生化学, 36, 437~448 (1990)

胆汁酸 18 種のヘキサフルオロイソプロピルエステルトリフルオロアセテート (HFIP-TFA) 誘導体およびメチルエステルトリフルオロアセテート (Me-TFA) 誘導体、ならびにコレステロールとその代謝物を含む 4 種中性ステロイドおよびその TFA 誘導体をキャピラリーカラムを用いた GC で分析した。胆汁酸 HFIP-TFA 誘導体は無極性あるいは微極性のカラム、Me-TFA 誘導体は無極性のカラムによる分析が適していると考えられた。4 種中性ステロイドは TFA 誘導体により完全に分離でき、無極性のカラムを用いる分析が適していると考えられた。さらに、18 種胆汁酸の HFIP-TFA 誘導体および 4 種中性ステロイドの TFA 誘導体を、EI あるいは CI モードでキャピラリーカラムを用いた GC/MS により分析した。分子イオンは必ずしも検出されなかったが、各化合物に特有なフラグメントイオンが検出された。これらのフラグメントイオンの強度について検討した。

中村優美子, 長谷川ゆかり, 外海泰秀, 金本正文*, 坪井尚弘*, 村上喜八郎*, 伊藤誉志男: 希

土類元素の生体影響に関する研究 (第一報) ジス
プロシウム, ユーロピウム, イッテルビウムおよ
びビトリウムの生体試料からの分析法の検討
衛生化学, 37, 28~38 (1991)

1) Dy, Eu, Yb および Y の 4 元素の定量を, 原子吸光分析法, 炎光分析法, ICP 発光分析法の 3 法で比較検討したところ, ICP 発光分析法での再現性が最も良く, 定量感度も高かった。2) 上記 4 種の希土類元素について, APDC-MIBK 系, D2-EH-PA 系の 2 種の溶媒系について, 溶媒抽出法を検討したが, いずれも満足な結果は得られなかった。3) 生体試料を用い, 4 元素を 25-2500 ppm 添加して, 乾式灰化法および湿式灰化法での回収率を比較検討した。乾式灰化法では, 灰化が完全に行われた臓器についてはほぼ良好な回収率を示したが, 灰化が不完全な糞および大腿骨では回収率は低くなった。一方, 湿式灰化法では, 4 元素の回収率は, 硫酸・硝酸による方法で 77.6~100.7%, 硝酸による方法で 85.3~100.5% と良好な値を示した。ただし, 前者では, Ca 含有量の高い試料で CaSO_4 の沈殿を生じた。4) したがって, 生体試料からの希土類の分析には, 硝酸を用いる湿式灰化法により試料液を調製し, ICP-AES で定量するのが最適であると考えられた。

* 京都光研(株)

Itami, T., Ema, M., Murai, T. and Kawasaki, H.: Teratogenic evaluation of tributyltin chloride in rats following oral exposure
Drug. Chem. Toxicol., 13, 283~295 (1990)

塩化トリブチルスズ (TBTCI) の母体および胎仔毒性をウイスターラットを用いて検討した。妊娠 7 日 (膣栓=0 日) から 15 日まで TBTCI を 25, 15, 9, 5 および 0 mg/kg/day 強制経口投与した。25, 15 および 9 mg 投与群で母体重と食餌摂取量の低下が認められた。25 mg 投与群では母体毒性の発現 (鎮静, 下痢, 垂誕) がみられ, 70% の母体が死亡しすべての胎仔の死亡が認められた。15 および 9 mg 群の雌性胎仔の体重が有意に低下した。25 mg 以下の投与群での生存胎仔数, 子宮内死亡率または胎仔の性比に差は認められず, 外表, 骨格および内臓の奇形も認められなかった。化骨遅延を含む骨格の変異および腎盂拡大などが散見されたが, 有意差には至らなかった。しかし, 胎盤の重量は対照群に比べ何れの投与群でも増加の傾向がみとめられ, 投

与量に対応していた。以上の結果, TBTCI は上記の条件では催奇形性を示さないが, 胎盤に異常を引き起こすことが明らかになった。

Ema, M., Murai, T., Itami, T. and Kawasaki, H.: Evaluation of the teratogenic potential of the plasticizer butyl benzyl phthalate in rats
J. Appl. Toxicol., 10, 339~343 (1990)

ブチルベンジルフタレート (BBP) の発生毒性をウイスターラットを用いて検討した。BBP 0.25, 0.5, 1.0 または 2.0% を含む飼料を妊娠 0 日から 20 日まで与えた。それぞれの群の BBP 平均摂取量は 185, 375, 645 および 974 mg/kg であった。子宮を除いた母体重増加は 1.0 および 2.0% 群で有意に低かった。0.25 および 0.5% 群の飼料摂取量は対照群と同様であった。2.0% 群では, すべての母体で全胚吸収が観察された。生存胎仔の検査の結果, 催奇形性を示す知見は得られなかった。これらの結果から, ラットにおける母体毒性および胚-胎仔毒性の BBP の no-observable-effect-levels (NOEL) は, それぞれ 0.5 および 1.0% と考えられた。

Ema, M., Itami, T. and Kawasaki, H.: Evaluation of the embryoletality of butyl benzyl phthalate by conventional and pair-feeding studies in rats

J. Appl. Toxicol., 11, 39~42 (1991)

ブチルベンジルフタレート (BBP) の胚致死作用をウイスターラットを用いて検討した。BBP 2.0% を含む飼料を妊娠 0 日から 20 日まで与えたところ, 全胚吸収が全母体で観察され, 飼料摂取量および母体重増加の著しい減少がみられた。胚致死作用が飼料摂取量の減少によるものか否かを調べるために, 2.0% 群の飼料摂取と同量の飼料を与えた pair-fed 群を設けて検討した。pair-fed 群では, 対照群に比べて, 着床後の胚死亡の増加, 生存胎仔数の低下が認められたが, 全胚吸収した母体は一例もなかった。これらの結果から, 2.0% BBP 群で観察された胚致死作用は, 飼料中の BBP によることが示唆された。

Murai, T., Ogawa, Y. and Kawasaki, H.: Effect of streptococcal pyrogenic exotoxin on rabbit macrophage functions in vitro: mediation by splenic lymphocytes

FEMS Microbiol. Lett., **69**, 201~204 (1990)

A群溶血性連鎖球菌発熱性外毒素 (SPE) は *in vitro* でウサギ腹腔マクロファージに対して何ら直接作用を示さなかったが、マクロファージ培養系に脾臓由来のリンパ球を添加することにより、マクロファージのグルコース消費およびスーパーオキシドアニオン (O₂⁻) 産生を著しく増強し、また同時に、細胞の viability を損なうことなく食能を低下させた。このような SPE の、リンパ球を介するマクロファージ活性化作用について検討を加えた結果、この作用は、SPE 刺激によってリンパ球から産生されるある種の液性因子、すなわちリンフォカインによって担われていることが明らかとなった。

Itami, T., Ema, M., Amano, H. and Kawasaki, H.: **Simple determination of tin in Biological materials by atomic absorption spectrometry with a graphite furnace**

J. Anal. Toxicol., **15**, 119~122 (1991)

生物試料 (血液, 脳, 肝臓, 腎臓など) 中のスズの定量にファーンズ原子吸光分析法の適用を可能にした。従来, 同法によるスズの分析は感度, 再現性および操作の簡便性において難点があるとされていた。生体試料を湿式灰化した後アスコルビン酸を加える前処理で共雑物 (鉄イオンなど) による干渉作用を抑制し, 上述の難点を解決することができた。この方法は有機溶媒による共雑物の除去などの煩雑な処理を必要としないので一度に多数の試料を処理でき, しかも試料量は少量でよい。生物試料中の最小検出濃度は 0.02 ug/g と感度も高い。

鈴鹿 紀, 柴田敏郎: **長白山とその山麓の植物について**

京都園芸, 第 85 集, 27~40 (1990)

第 9 回生薬研究者訪中団々員として 1990 年 7 月 23 日から 8 月 3 日まで中国東北部の医学科学院・農業科学院・中医中薬研究院・薬用植物園などを訪れ, 学術交流および視察を行ったが, その折り, 長白山の自生植物を調査する機会を得た。

山麓から頂上までは①針葉・闊葉混交林帯, ②針葉樹林帯, ③岳樺林帯, ④高山帯に分けられ, それぞれ特長ある植物が分布しており, 山麓の長白山自然保護区は原始林を形成し, 多数の下草が見られた。その一帯で調査し得た植物は次のようである。

裸子植物 1 科 7 種

被子植物 44 科 134 種

羊歯植物 3 科 12 種

Ishimaru, K., Sudo, H.*, Satake, M., Matsunaga, Y.*, Hasegawa, Y.*, Takemoto, S.* and Shimomura, K.: **Amarogentin, amaroswerin and four xanthenes from hairy root cultures of *Swertia japonica***

Phytochem., **29**, 1563~1565 (1990)

センブリの毛状根培養を確立し, 毛状根におけるキサントン類および苦味成分の生産を調べた。毛状根から, bellidifolin, swertianolin と新規キサントン誘導体である 8-O-primeverosylbellidifolin を単離同定した。また, センブリの 2 つの苦味成分 amarogentin と amaroswerin も毛状根中に検出された。

* ㈱鐘紡生化学研究所

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., **9**, 121~124 (1990)

Ri プラスミドを利用したバイナリーベクター法を用いて, キメラ遺伝子 neo と gus を効率良くジギタリスの染色体中に導入するのに成功した。外来遺伝子の存在は, サザンブロットとオパインの検出で確認した。ネオマイシンフォスフォトランスフェラーゼと β-グルクロニダーゼ活性の測定を行い, 植物組織内における neo と gus の発現を調べたところ, 外来遺伝子の発現が種々のプロモーターにより調節されていることが判明した。また, ELISA 法で毛状根中の強心配糖体を調べると, 緑色毛状根が比較的高い生産性を示した。

* 千葉大学薬学部

Yonemitsu, H.*¹, Shimomura, K., Satake, M., Mochida, S.*¹, Tanaka, M.*¹, Endo, T.*¹ and Kaji, A.*¹: **Lobeline production by hairy root culture of *Lobelia inflata* L.**

Plant Cell Rep., **9**, 307~310 (1990)

Agrobacterium rhizogenes strain ATCC 15834 をロベリア *Lobelia inflata* の茎に感染させて毛状根を誘導した。形質転換の確認はオパインの検出で行

った。毛状根の生育と lobeline 生産のための培養条件を、種々の培地を用いて検討した。いずれの基本培地においても毛状根中の lobeline 含量は、親植物の根と同じオーダーであったが、Nitsch and Nitsch 培地で培養した毛状根は、生育が他の培地の約 1/3 で、また、その形態も変化した。

*1 ㈱ツムラ分子遺伝学研究所

*2 School of medicine, University of Pennsylvania, USA

Sauerwein, M. and Shimomura K.: **17 α -O-methyl-yohimbine and vallesiachotamine from roots of *Amsonia elliptica***

Phytochem., **29**, 3377~3379 (1990)

新規 yohimbane 誘導体である 17 α -O-methyl-yohimbine をチョウジソウ *Amsonia elliptica* の根から単離同定した。A. *brevifolia* の成分として知られている vallesiachotamine もこの植物から初めて単離同定された。

Yoshimatsu, K., Hatano, T.*¹, Katayama, M.*¹, Marumo, S.*¹, Kamada, K.*² and Shimomura, K.: **IAA derivative induced tropane alkaloid production in root cultures of a *Duboisia* hybrid**

Phytochem., **29**, 3525~3528 (1990)

ズボイシアの不定根培養を用いて、IAA のクロロ誘導体である 4-chloro-IAA と 5,6-dichloro-IAA の効果を調べ、通常汎用されているオーキシン IAA, NAA および 2,4-D の効果と比較した。IAA のクロロ誘導体は、IAA や NAA よりかなり低い濃度で根の生育を促進した。不定根培養によるトロパンアルカロイドの生産を経時的に調べると、IAA クロロ誘導体を添加した培地では、培養 9 週間後全スコポラミン量の約 50% が培地中に検出された。

*1 名古屋大学農学部

*2 筑波大学遺伝子実験センター

Ishimaru, K., Sudo, H.*¹, Satake, M. and Shimomura, K.: **Phenyl glucosides from a hairy root culture of *Swertia japonica***

Phytochem., **29**, 3823~3825 (1990)

2 つの新規 phenyl glucoside, 5-(3'-glucosyl)benzoyloxygentisic acid と 2,6-dimethoxy-4-hy-

droxyphenol-1-glucoside および 1-sinapoyl glucoside をセンブリ *Swertia japonica* の毛状根から単離同定した。

* ㈱鐘紡生化学研究所

Ishimaru, K., Hirose, H.*¹, Takahashi, K.*¹, Koyama, K.*² and Shimomura, K.: **Tannin production in root culture of *Sanguisorba officinalis***

Phytochem., **29**, 3827~3830 (1990)

ワレモコウ *Sanguisorba officinalis* の正常根培養を確立し、8 種のタンニン類の生産を調べた。根の生育およびタンニン類の生産、ともに MS 培地が最も良好であった。NAA 1 mg/l を培地に添加するとタンニン類の生産量が上昇したが、さらにジベレリンを添加すると生育阻害が観察された。

* 明治薬科大学

Ishimaru, K., Satake, M. and Shimomura, K.: **Production of (+)-catechin in root and cell suspension cultures of *Rheum palmatum* L.**

Plant Tissue Culture Letters, **7**, 159~163 (1990)

ダイオウ *Rheum palmatum* L. の葉柄よりカルスおよび不定根を誘導し、それらの液体培養系を確立した。細胞懸濁培養では、1 mg/l 2,4-D 添加 MS 培地、不定根培養では 2 mg/l NAA 添加 MS 培地において、良好な生育と (+)-catechin 生産が認められた。

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. Natl. Prod., **53**, 1498~1502 (1990)

ケジギタリス *Digitalis lanata* の毛状根中の強心配糖体を分析するために、ジゴキシンに対する特異抗体を用いた ELISA 法を確立した。この方法では、0.2~2 nM のジゴキシン誘導体の分析が可能であった。暗黒下で培養した毛状根 5 クロウンを分析すると非常にわずかな量のジゴキシン誘導体が検出されたが、同じ毛状根を照明下で培養して緑化させると、その生産量が最高 600 倍になった。

Yoshimatsu, K. and Shimomura, K.: **Emetic**

alkaloid formation in root culture of *Cephaelis ipecacuanha*

Phytochem., 30, 505~507 (1991)

トコン *Cephaelis ipecacuanha* のシュート培養の葉から不定根培養を確立し、トコンアルカロイド生産のための培養条件を検討した。5,6-dichloro-IAA 0.01 mg/l を添加した MS 液体培地 (50 ml 液体培地/100 ml 三角フラスコ) で7週間培養した不定根培養には、フラスコ当り 0.6 mg の emetine と 2.4 mg の cephaeline が検出され、この量は、温室で1年間栽培した一植物体の根に含まれる量に匹敵するものであった。

Ishimaru, K. and Shimomura, K.: Tannin production in hairy root culture of *Geranium thunbergii*

Phytochem., 30, 825~828 (1991)

ゲンノショウコ *Geranium thunbergii* の葉柄に *Agrobacterium rhizogenes* strain A4 を感染させて、毛状根を誘導した。毛状根から、9種のタンニン類, gallic acid, ellagic acid, (+)-catechin, β -glucogallin, 1,6-di-O- β -D-glucose, 1,2,3,6-tetra-O-galloyl- β -D-glucose, 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -D-glucose, corilagin および geraniin が単離同定された。基本培地の種類により主生産物が変わり、1/2 MS 培地では 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -D-glucose が主生産物であったが、Gamborg B5 培地では geraniin が主生産物であった。

Yoshimatsu, K. and Shimomura, K.: Efficient shoot formation on internodal segments and alkaloid formation in the regenerates of *Cephaelis ipecacuanha* A. Richard

Plant Cell Rep., 9, 567~570 (1991)

節間切片からの不定芽形成を利用した、トコン *Cephaelis ipecacuanha* 植物体の新しい増殖法を確立した。シュート培養の節間を固形培地に植え付けると、カルスを経由せずに多数の不定芽が形成し、低濃度のサイトカイニン添加あるいは16時間照明下での培養は、切片当りのシュート数を増加させた。このようにして形成したシュートを分割して、植物生長調節物質無添加培地に移植すると容易に発根し、その後土壌へ移植しての栽培が可能であった。1年間温室栽培した再分化体のアルカロイド含量は、親植物とほぼ同等であった。

Sauerwein, M., Yamazaki, T. and Shimomura, K.: Hernandulcin production in hairy roots of *Lippia dulcis*

Plant Cell Rep., 9, 579~581 (1991)

Agrobacterium rhizogenes A4 による形質転換で、*Lippia dulcis* の毛状根培養を確立した。毛状根は、2%しょ糖を含む MS 培地で良く生育し、16時間照明下で培養すると緑色になった。緑色毛状根は、甘い sesquiterpene である hernandulcin を乾燥重量当り 0.25 mg/g 生産し、また、そのほか約20種類の mono-あるいは sesquiterpene を生産したが、正常根ではそれらの生産が認められなかった。毛状根の生育と hernandulcin の生産は、培地へのオーキシンの添加と低濃度のキトサンの添加に影響を受けた。

Sauerwein, M., Ishimaru, K. and Shimomura, K.: Indole alkaloids in hairy roots of *Amsonia elliptica*

Phytochem., 30, 1153~1155 (1991)

Agrobacterium rhizogenes A4 の直接感染により、チョウジソウ *Amsonia elliptica* の毛状根を誘導した。毛状根は、正常根培養や親植物と同様なインドールアルカロイドを生産したが、その含量は低かった。培地に 0.5 mg/l の NAA を添加すると、毛状根の生育およびアルカロイド生産が著明に促進された。

Sauerwein, M. and Shimomura, K.: Degradation of 17 α -O-methyl-yohimbine in *Amsonia elliptica* Roem. et Schult. during sample preparation

Phytochem., 30, 1449~1450 (1991)

チョウジソウの根を空气中で乾燥させると、始めの30時間に、そのアルカロイド含量が、乾燥前の約65%まで低下することが判明した。乾燥前には認められた 17 α -O-methyl-yohimbine は、乾燥開始60時間後、TLC および HPLC 分析ともに検出されなくなった。これに対し、脱メチル体である yohimbine の含量は、乾燥開始後30時間の間に急激に増加した。なお、収穫後直ちに液体窒素で凍結し乾燥させた根では、pleiocarpamine が主アルカロイドでその他 17 α -O-methyl-yohimbine と vallesiachotamine が検出されたが、yohimbine は認められなかった。

Wake, H.*¹, Umetsu, H.*¹, Ozeki, Y.*², Shimomura, K. and Matsunaga, T.*¹: **Extracts of marine cyanobacteria stimulated somatic embryogenesis of *Daucus carota* L.**

Plant Cell Rep., 9, 655~658 (1991)

ニンジン *Daucus carota* L.の不定胚形成に対するラン藻エキスの効果を調べた。21種のラン藻の熱水エキスは、不定胚からの植物体再生を促進し、4種のラン藻のエキスは、植物体形成数を3.7倍に増加した。エキスを透析膜で低分子分画と高分子分画に分離し効果を調べると、絨毛状細胞を形成するラン藻では低分子分画が、単細胞になるラン藻では高分子分画の方がより効果があった。これらのラン藻エキスの中には、2年間以上不定胚を形成する能力が認められなかった培養細胞での不定胚組織の誘導を示すものがあった。

*¹ 東京農工大学生物工学部

*² 東京大学教養学部

Okamura, N.*, Kobayashi, K.*, Yagi, A.*, Kitazawa, T. and Shimomura, K.: **High-performance liquid chromatography of abietane-type compounds**

J. Chromato., 542, 317~326 (1991)

順相カラムを用いたHPLCによるabietane-type化合物 tanshinone II A, I, cryptotanshinone および dihydrotanshinone I の高感度な同時定量法を確立した。また、逆相HPLCによる極性の強い tanshinone 類, tanshinone V と VI の定量法および ferruginol や他の tanshinone 類の存在を調べるためのHPLC法も確立した。これらの方法を用いて、タンジン *Salvia miltiorrhiza* の種々の組織培養系における abietane-type 化合物の分析を行った。

* 福山大学薬学部

Sauerwein, M., Flores, H. E.*, Yamazaki, T. and Shimomura, K.: ***Lippia dulcis* shoot culture as a source of the sweet sesquiterpene hernandulcin**

Plant Cell Rep., 9, 663~666 (1991)

Lippia dulcis の節切片を3%しょ糖を含むMS培地に植え付けて、シュート培養を確立した。シュートを種々の液体および固形培地に植え付けたところ、Woody Plant 液体培地が最もシュートの増殖に対し効果的であったが、hernandulcin の生産量は低

かった。2%しょ糖を含むMS固形培地で28日間培養したシュートは、最も良好なhernandulcin含量を示した。培地にキトサンを添加すると、特に液体培地でのシュートの生育とhernandulcin生産を促進した。

* Biotechnology Institute, Pennsylvania State University, USA

細田勝子, 野口 衛: **ミシマサイコの栽培法に関する研究(第2報) 土壌強制通気の生育, サポニン含量への影響**

生薬, 110, 828~833 (1990)

川砂, 山砂, 粘土質畑土, 砂質畑土, 山土よりなる試験圃場に通気, 散水処理した場合のミシマサイコの成長を比較したところ, これらの土壌処理により開花が促進, 根の形態が変化し, 根の収量, サイコサポニン含量ともに増加した。

Noguchi, M., Hosoda, K.: **Studies on the quality evaluation of Kijitsu, dried un-ripe citrus fruits**

Planta Med. 56, 579~580 (1990)

生薬“枳実”の原料植物の種類とフラボノイドならびにシネフリン含量の関係, 調製加工法の成分含量に及ぼす影響, 抽出エキスの薬理試験結果をまとめ, 品質評価法について考察した。

細田勝子, 井本芳則*, 常風潤一*, 野口 衛: **漢方製剤の品質評価(第1報) 半夏厚朴湯の指標物質の分析**

薬誌, 110, 755~758 (1990)

半夏厚朴湯の自家煎剤ならびに市販エキス製剤12種について, 6-gingerol, guanosine, rosmarinic acid の分析法を検討し, 最適条件を確立した。

* 国保日高総合病院薬局

井本芳則*, 橋本清史*, 白井恵一*, 常風潤一*, 細田勝子, 野口 衛: **半夏厚朴湯エキス製剤の官能試験, 重量偏差試験と指標物質含量の関係**

病院薬学, 17, 46~51 (1991)

半夏厚朴湯の自家煎剤ならびに市販エキス製剤12種について, 味覚テスト(匂い, 苦み, 辛み, 飲みやすさ), HPLCによるパターン分析, 重量偏差試験を行い, 試験結果相互の関係を考察, 医療現場における簡便な品質評価法について提案した。

* 国保日高総合病院薬局

細田勝子, 野口 衛, 陳 王盤*, 許 鴻源*: 枳実の調製と評価に関する研究 (第4報) 各種柑橘類未熟果実の生物活性について

薬誌, 111, 188~192 (1991)

八朔, 夏橙とその変種田の浦, 甘夏の未熟果実より自家調製した枳実の50% EtOH エキスについて, 毒性, 抗ヒスタミン作用, 冠状血管拡張作用, 小腸弛緩, 子宮弛緩, 抗喘息作用はじめ14項目の生物活性を測定, フラボノイド, シネフリン含量を比較し, 八朔がその他のカンキツ類と同様にキジツ原料として用い得ることを明らかにし, 生物学的同等待証明のモデルを提起した。

* 台湾必安研究所

内山 充: 近代化と国際化 ('90年代の局方の課題)

月刊薬事, 32, 461~465 (1990)

技術革新と国際交流の流れの中で, 第2世紀を迎えた日本薬局方の今後のあるべき姿として, 収載品目と各条規格の考え方を示し, さらに薬局方の国際化の原則と現在までの動向を説明した。

内山 充: レギュラトリーサイエンス

環境情報科学, 19-4, 56~57 (1990)

環境行政に携わる技術者に対して, レギュラトリーサイエンスの概念, 行政との関係および研究体制などについて解説した。なお, 具体的な問題についての質疑応答の記録が付記されている。

内山 充: 食品の機能と機能性食品

栄養日本, 33, 341~343 (1990)

食品のもつ機能性を, 消費者にとって最も望ましい形で生かすために認識しておくべき各種の原則を述べ, 機能性の評価の難しさなど注意すべき点を主として栄養士向けに解説した。

内山 充: 機能性食品の問題点について

日本薬剤師会雑誌, 42, 493~498 (1990)

いわゆる機能性食品に関する行政対応に対して, 薬剤師会に原則的反対論があるが, それに対して, 食品の機能性の研究の意義を示し, 食物のもつ保健

医療上の重要性とそれに関して薬剤師の取るべき立場を提言した。さらに, 食品と医薬品の区別を明らかにして, 今後登場する機能性食品が, 医薬品ではない形で正しく利用されるための問題点を示した。

内山 充: 第12改正の方針 (第12改正日本薬局方の改正点)

薬局, 42, 621~624 (1991)

日本薬局方の第12改正の意義, 懸案事項, および改正の概要につき解説した。

内山 充: 総論 (日本薬局方第12改正の概要)

月刊薬事, 33, 843~845 (1991)

日本薬局方第12改正の要点を解説し, 今後の問題点などに触れた。

石橋無味雄: 鎮暈薬中の塩酸メクリジン, ジメンヒドリナート, カフェインおよびジプロフィリンの迅速分析法

月刊薬事, 32, 1263~1269 (1990)

鎮暈薬中に含まれる塩酸メクリジン, ジメンヒドリナート, カフェインおよびジプロフィリンの高速液体クロマトグラフ法による定量分析法について解説した。

石橋無味雄: 医薬品の迅速分析法: ビタミン主薬製剤中の塩酸チアミン, 硝酸チアミン, リボフラビンおよび塩酸ピリドキシン

月刊薬事, 33, 143~149 (1991)

ビタミン主薬製剤中の塩酸チアミン, 硝酸チアミン, リボフラビンおよび塩酸ピリドキシンの高速液体クロマトグラフ法による定量分析法について解説した。

Imai, K.*, Uzu, S.* and Toyo'oka, T.: Fluorogenic Reagents, Having Benzofurazan Structure, in Liquid Chromatography

J. Pharm. Biomed. Anal., 7(12), 1395~1403 (1989)

最近新規合成したアミン類の発蛍光試薬, NBD-F および PBD-SO₂F, アミンおよびチオール用の DBD-F, チオール用の ABD-F および SBD-F について, 反応性, 蛍光特性, 安定性, 選択性, 有用性について記載した。

* 東京大学医学部附属病院分院

中原雄二：毛髪中の薬物分析-薬物使用歴の証明を目的として

病院薬学, 36, 100~109 (1990)

長期薬物乱用歴のモニタリングを目的とした毛髪中の薬物分析法を総説した。まず、毛髪中の薬物の測定法に関する報告をまとめ、それぞれの問題点を指摘した。毛髪の性質および毛髪試料の採取方法に関する注意点をあげ、精度の高いデータを得るための要点を記述した。さらに、著者らの行った毛髪分析と薬物使用歴の関係に関する研究成果を記載し、過去の薬物乱用歴を化学的に証明できることを示した。最後に、今後の毛髪分析の課題と可能性について述べた。

中原雄二：進歩総説「乱用薬物の分析と科学的研究」

ぶんせき, (1991) 437~443

世界的な薬物乱用の拡大に伴い、薬物犯罪の取り締まりや薬物中毒の原因究明のための検査の重要性が増している。また、スポーツ界や競争馬のドーピング検査の必要性の増大や米国における職場での薬物(麻薬)テストの導入などは裁判科学や中毒分析学にリンクしており、この分野の進歩と重要性を助長している。これらに関する研究の進歩について1987年後半から1990年に発表された乱用薬物の分析および分析を基本とした乱用薬物の科学に関する報告53報を取り上げて解説した。

Nakahara, Y.: Splitting Hairs

Look Japan, 36, 26~27 (1990)

毛髪中の薬物分析について、著者の研究成果を中心に、以下に示す内容について解説した。

1. 毛髪の構造
2. 毛髪分析による薬物の検出例
3. 毛髪分析法と試料の調製
4. 動物実験による毛髪中の薬物の検出
5. 薬物乱用歴と毛髪中の薬物分布の関係
6. 毛髪による長期薬物歴モニタリングの有用性

中原雄二：薬物乱用の科学 I. 薬物乱用の歴史と現状

News Letter Now, 13, 2~5 (1990)

薬物乱用の歴史と現状について以下の項目について解説した。

1. 乱用薬物とは

2. 薬物乱用の歴史と現状
3. 世界の麻薬不正取引の現状
4. 薬物乱用形態の流行の変化
5. 薬物乱用に関する最近の問題

中原雄二：薬物乱用の科学 II. 覚せい剤の科学

News Letter Now, 14, 2~5 (1990)

覚せい剤の科学について以下の項目について解説した。

1. 覚せい剤の誕生と歴史
2. 覚せい剤の性状と密造
3. 覚せい剤の代謝
4. 覚せい剤類縁物質
5. 覚せい剤の作用
6. 覚せい剤の検出

中原雄二：薬物乱用の科学 III. コカインの科学

News Letter Now, 15, 2~4 (1991)

コカインの科学について以下の項目について解説した。

1. コカ葉とコカインの歴史
2. コカ葉について
3. コカインの科学的性質
4. クラックについて
5. コカインの代謝と排泄
6. コカインの薬理作用・精神作用および毒性
7. コカイン戦争

中原雄二：尿中麻薬・覚せい剤検査の問題点

日本医事新報, 3442, 146~147 (1990)

病院などの医療機関において覚せい剤や麻薬中毒者が増加している今日、尿中麻薬・覚せい剤検査の問題点について以下の項目を中心に解説した。

1. 一般の医療機関において尿中麻薬・覚せい剤検査が可能かどうか
2. 尿中麻薬・覚せい剤検査を実施している民間機関について
3. 覚せい剤中毒者が患者として来たとき、どのように対処すればいいか

早川堯夫：バイオテクノロジー医薬品成分のアイデンティティを定めるもの：本質、有効性、安全性の観点からみた相互識別の必然性(その1)

医薬品研究, 21, 531~546 (1990)

バイオテクノロジーの発達により医薬品として有

用なタンパク質が容易に生産されるようになってきたことに伴って生じた新たな問題、すなわち、構造的にも機能的にもきわめて類似した高分子タンパク質相互を、本質、有効性、安全性の観点からみてどのように識別し、評価すべきかについて論考した。以下の課題を中心に論じた。1) 医薬品としてのアイデンティティを分かつもの、2) 医薬品成分としてのバイオ産物を相互識別するためのアプローチや基準におけるフレキシビリティ、3) ワクチンの有効成分のアイデンティティと医薬品成分としての取り扱い、4) モノクローナル抗体製剤の有効成分のアイデンティティと医薬品成分としての取り扱い、5) 血液製剤の有効成分のアイデンティティと医薬品成分としての取り扱い、6) ホルモン、サイトカインおよびその他調節因子などの有効成分のアイデンティティ、7) バイオ同種製品における有効成分の多様性の背景、8) 意図した特異的構造を有する単純ポリペプチドまたは単純タンパク質のアイデンティティと医薬品成分としての取り扱い、9) 遺伝情報発現時や翻訳後の過程での修飾などによるアイデンティティの行方、10) 糖タンパク質のアイデンティティと医薬品成分としての取り扱い。

早川堯夫：バイオテクノロジー医薬品成分のアイデンティティを定めるもの：本質、有効性、安全性の観点からみた相互識別の必然性（その2）

医薬品研究, 21, 964~972 (1990)

前報での論考をもとに、バイオ医薬品の一般的名称や標準物質（標準品）の設定をめぐってどのように対処すべきかを考察した。以下の課題を中心に論じた。1) 既存の単純ポリペプチドまたは単純タンパク質と全く同一の構造を有するバイオ産物の一般的名称、2) 目的単純ポリペプチド又は単純タンパク質関連成分の一般的名称、3) 新規単純ポリペプチドまたは単純タンパク質の一般的名称、4) 糖ペプチドや糖タンパク質の一般的名称、5) バイオ医薬品の一般的名称の定義、命名基準、6) バイオ医薬品の一般的名称における化学名または本質欄における必要情報、7) 理化学試験における標準物質、8) 生物活性（力価）の測定用としての標準物質。

藤野政彦*¹, 早川堯夫, 岩川精吾*², 小池博之*³: 蛋白およびペプチド性医薬品の開発における諸問題

ファルマシア, 26, 15~20 (1990)

蛋白およびペプチド性医薬品の開発における諸問題について論じた。主なトピックスは、①何をどう開発するか②生産過程での留意点と品質管理③免疫原性④生物学的同等性⑤投与方法⑥各国のガイドラインと国際協調⑦将来の展開などであった。

*¹ 武田薬品工業(株)

*² 神戸大学医学部

*³ 三共(株)

早川堯夫, 高橋道人, 田中 悟, 松本清司, 戸部満寿夫：バイオテクノロジー応用医薬品の安全性評価のための前臨床試験実施に関する考察

医薬品研究, 22, 28~40 (1991)

バイオテクノロジー応用医薬品の安全性評価のために、どのような考え方やアプローチで前臨床試験が実施されるべきであるかに関して、とくに毒性試験を中心に現状を調査研究し、今後のあるべき姿への模索や議論すべきポイントなどについて考察した。まず、国際的にも共通認識が得られつつある試験実施上の一般的留意事項をまとめ、確認した。次に、具体化への試みの一つとして、有効成分をその種類や生化学的特性、あるいは用量別に分類し、これと急性毒性試験など試験項目別にみた試験の留意事項とを組み合わせた試験実施要領試案を作製した。さらに、毒性試験の種類・項目および試験方法の取捨選択に際して考慮の対象となる事項についても提示した。

赤木好男*, 照林宏文*, 池部 均*, 谷本 剛：糖尿病性白内障 薬物療法の可能性

Diabetes Frontier, 1, 191~197 (1990)

白内障は眼科臨床における代表的かつ中心的な疾患であるが、現代日本のような高齢化社会においては特に糖尿病性白内障が大きな問題となっている。白内障治療薬として、動物実験の段階で水晶体研究史上例のないほど劇的な効果を示す薬剤が近年登場してきた。この薬剤がアルドース還元酵素阻害剤であり、アルドース還元酵素阻害剤を中心とした糖尿病性白内障の薬剤による治療の可能性について解説した。

* 京都府立医科大学

谷本 剛：医薬品の迅速分析法 その19-カリジノゲナーゼ（原体）およびその製剤

月刊薬事, 33, 357~360 (1991)

カリジノゲナーゼ製剤の品質を地方の所轄部署で監視・指導する機会が増え、そのために本製剤の迅速分析法の確立が必要になった。平成2年8月8日付で薬務局監視指導課から本製剤の迅速分析法が通知されたので、この分析法の利用者の便を考慮し、本迅速分析法を実施する上での留意点などを解説した。

赤木好男*, 照林宏文*, 岡本庄之助*, 谷本剛: **アルドース還元酵素と白内障**

眼科, 33, 119~125 (1991)

白内障の治療は人工水晶体の進歩により、外科的治療法がめざましく発達した。そのために薬物療法といった内科的治療法の研究はあまり注目されていなかった。近年、糖尿病の増加とともに糖尿病性白内障が大きな臨床的課題となってきた。この白内障の発症にアルドース還元酵素の関与が指摘されるようになり、糖尿病性白内障の内科的治療のためのアルドース還元酵素阻害剤 (ARI) の開発が多くなされてきた。動物の実験的糖白内障モデルでは ARI の点眼による局所投与や全身投与によって白内障の進行を抑制し、さらには治癒することが証明されてきており、糖尿病性白内障の薬物療法の可能性が強く示唆されてきている。

* 京都府立医科大学

谷本 剛: **タンパク質ハイブリッド形成法による酵素剤の有用化**

BIOMedica, 6, 276~279 (1991)

代謝異常症や血栓症などの治療に酵素を医薬品として利用する試みが多くある。しかし、酵素には通常医薬品とするには多くの欠点を有しており、理論的に臨床的有効性が期待されていても実際上の有用性が損なわれているものが少なくない。近年、酵素タンパクをポリエチレングリコール (PEG) などの高分子物質でハイブリッド化する技術が確立され、これによって酵素の安定化、脱免疫原性化、新触媒機能発現などの性状変化が可能になった。本稿では PEG による酵素タンパクのハイブリッド化法とハイブリッド化酵素の医薬品としての有用性に関して、いくつかの酵素を例にして概説した。

谷本 剛, 西村千尋*: **アルドース還元酵素の分子構造と機能**

医学のあゆみ, 156, 998~1002 (1991)

近年、糖尿病の進行に伴ってみられる種々の合併症の発症初期の細胞障害にアルドース還元酵素 (AR) を介した機構が関与していることが明らかとなり、AR は糖尿病合併症の発症起因酵素と位置付けられてきた。そのため、AR の生化学的性質および蛋白質構造を明らかにすることが糖尿病性合併症の病態発症機構の解明ならびに合併症治療薬としての AR 阻害剤の開発に重要になってきた。本論文では、現在までに明らかにされている AR の分子構造と機能についてまとめ、若干の考察を加えた。

* 国立小児病院

谷本 剛, 西村千尋*: **アルドース還元酵素の分子生物学**

実験医学, 9, 541~547 (1991)

アルドース還元酵素 (AR) は糖尿病合併症の発症起因酵素であるので、糖尿病合併症治療薬として AR 阻害剤の開発が多く試みられている。しかし、既存 AR 阻害剤の効果には種差がみられ、近縁酵素にも作用する。ヒト AR に選択的に作用する阻害剤の開発が本合併症の治療に必要であるが、それには AR 構造の分子レベルでの解明が必須である。著者らはヒト AR の cDNA クローンを網膜ライブラリーから単離し、塩基配列からその一次構造を決定した。さらにヒト AR の cDNA を組み込んだ組換えバキュロウイルスを昆虫株化細胞に感染させてヒト型 AR の大量生産に成功した。この組換えヒト AR の利用で AR 分子の高次構造の解明や特異的 AR 阻害剤のデザインの道が開かれた。

* 国立小児病院

原田正敏: **解熱鎮痛消炎薬—漢方処方における薬効群 (7)**

現代東洋医学, 11(2), 106~112 (1990)

一般用漢方製剤 210 処方の効能・効果に準拠して、解熱鎮痛消炎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 18 処方であり、麻黄以下 41 種の生薬が使われている。

原田正敏: **鎮痛薬—漢方処方における薬効群 (8)**

現代東洋医学, 11(3), 97~105 (1990)

前記事に引き続き、鎮痛薬とみなしうる処方を選択し、解説した。桂枝加朮附湯 (けいしかじゅつぶとう) 以下 26 処方であり、附子以下 59 種の生薬が使われている。

原田正敏：鎮痛鎮けい薬—漢方処方における薬効群 (9)

現代東洋医学, 11(4), 83~90 (1990)

前記事に引き続き、鎮痛鎮けい薬とみなしうる処方を選択し、解説した。芍薬甘草湯(しゃくやくかんぞうとう)以下21処方であり、芍薬以下34種の生薬が使われている。

原田正敏：健胃消化薬—漢方処方における薬効群 (10)

現代東洋医学, 12(1), 86~92 (1991)

前記事に引き続き、健胃消化薬とみなしうる処方を選択し、解説した。六君子湯(りっくんしとう)以下26処方であり、人参以下44種の生薬が使われている。

原田正敏：止瀉整腸薬—漢方処方における薬効群 (11)

現代東洋医学, 12(2), 100~106 (1991)

前記事に引き続き、止瀉整腸薬とみなしうる処方を選択し、解説した。桂枝加芍薬湯(けいしかしゃくやくとう)以下18処方であり、朮以下34種の生薬が使われている。

尾崎幸紘, 原田正敏：利胆作用をもつ漢方薬治療学, 24, 571~575 (1990)

利胆薬は胆道系の疾患、すなわち種々の原因による胆汁のうっ滞、炎症性産物の除去、あるいは胆砂、小結石の排泄除去などに用いられる薬物である。漢方処方でもこれら胆道系の疾患に用いられているものは多くある。これらの漢方処方に用いられている生薬で利胆作用を示す生薬について、その胆汁分泌の増加作用およびその活性成分について述べ、これら含有成分の化学構造と薬理活性との関連性について考察した。

中村晃忠：輸液用(ゴム栓・プラスチック容器)試験法と核磁気共鳴スペクトル測定法について薬局, 42, 649~650 (1991)

第12改正日本薬局方の改正点のうち、表記について解説した。

土屋利江：In vitro 催奇形性試験-embryoを用いる実験

ファルマシア, 26, 1126~1128 (1990)

In vitro の催奇形性試験として、ある程度の評価

を受けている Whole embryo culture, 中脳および肢芽細胞の分化を指標にした micro-mass culture およびヒト胎児の二次口蓋間葉系の細胞株を用いた増殖阻害試験法について概説し、各々の方法の短所および長所について述べた。さらに、今後、確立が期待されている方法論について言及した。

林 譲, 松田りえ子：コンピューターを用いたクロマトグラフィーの最適化の動向

ぶんせき, 901~903 (1990)

最近, J. Chromatogr.(vol. 485, Dec. 1989) に Computer-Assisted Method Development in Chromatography という特集号が刊行された。この号は24の論文を含み、700ページ近くもある厚い本である。この特集号は最適化の話題が最も多いので、最適化を中心に紹介した。そして、今も広く行われている分離の最適化の欠点を指摘した。

林 譲, 松田りえ子：情報理論に基づいたクロマトグラフィーの最適化理論:FUMI(フミ)とTOCO(トウコ)

ぶんせき, 57~61 (1991)

FUMIの理論とTOCOの最適化方法を創案した時の着想、問題点解決の経緯などを、従来の最適化の方法の問題点に触れ、わかりやすく説明した。著者らの最適化理論はわかりにくいとよく言われる。しかし、ここで述べたように、この理論の根底にある概念は単純である。しかも、クロマトグラフィの情報量を表す式(FUMI)も非常に簡単である。応用として、FUMIに基づいた、6つのクロマト変数(カラム長等)の総合的最適化(TOCO)について簡潔に紹介した。

池淵秀治：輸入食品の放射能汚染

臨床栄養, 78(3), 277~280 (1991)

主として食品の放射能汚染を取り上げて、放射線と放射能に関する基礎的知識および放射線の人体への影響について紹介して、さらに我が国における食品の放射能汚染の歴史と現状につき解説した。

奥平和穂, 杉山雄一*：薬物毒性のスケールアップ (1)

Pharm Tech Japan, 6, 667~675 (1990)

毒性を発現する投与量の種差が従来のアニマルスケールアップ理論に当てはまる理由について考察し

た。さらに、毒性発現に関わる代謝物のファーマコキネティクスについて理論的考察を行い、さらに活性代謝物の動態に関する非線形性の影響についてシミュレーションを行い、検討した。

* 東京大学薬学部

奥平和穂, 杉山雄一*: 薬物毒性のスケールアップ (2)

Pharm Tech Japan, 6, 793~803 (1990)

活性代謝物により誘起される毒性の種差について、アセトアミノフェンを例にして整理した。その結果、その毒性の種差は主に活性代謝物生成過程の種差に起因することが判明した。

* 東京大学薬学部

奥平和穂, 杉山雄一*: 薬物毒性のスケールアップ (3)

Pharm Tech Japan, 6, 913~919 (1990)

毒性発現の解明に関する生理学的薬物速度論の現状を紹介した。さらに、将来、期待される毒性予測法としてアニマルスケールアップ理論に基づく方法、および生理学的薬物速度論に基づいた *in vitro* から *in vivo* への外挿による方法について述べた。

* 東京大学薬学部

三瀬勝利: 「食品衛生検査指針 (微生物論)」の改訂版発行について

食品衛生研究, 41, 79~92 (1991)

平成2年12月に発刊された「厚生省生活衛生局監修・食品衛生検査指針 (微生物編)」の改訂版が発行されるまでのいきさつ、指針のポリシー、内容および今後に残された問題などについて、編集にたずさわった一人として、かなり私的な意見を含めて解説を加えた。

三瀬勝利: DNA 診断に有用な制限酵素の開発

BIOMedica, 6, 64~68 (1991)

制限酵素の一般的特徴について簡単な解説をほどこした後、DNA 診断などに有用な制限酵素の開発の現状と今後の問題点を論じた。特に病原性細菌などから安全かつ迅速に制限酵素産生菌を見出す方法や、制限酵素大量生産系の確立法などについても紹介した。

三瀬勝利: 食品衛生微生物分野における遺伝子組

換え技術の応用

食衛誌, 31, 209~221 (1990)

遺伝子組換え技術の食品衛生微生物分野における応用、特に食品の安全性をおびやかす食中毒細菌や経口感染伝染病起因細菌の、遺伝子組換え技術を応用した検出法 (DNA プローブ法) に焦点をあわせて、総合的な解説を行った。

三瀬勝利: 制限酵素の使用マニュアル

ファルマシア, 26, 428~430 (1990)

制限酵素と修飾酵素に関する簡単な解説をほどこした後、制限酵素による DNA 切断条件、制限酵素切断に関するメチル基の影響などについて論じた。また制限酵素実験のための参考書についても詳しく紹介した。

一戸正勝: 真菌の分離と分類同定, *Fusarium* 属

防菌防黴誌, 18, 399~406 (1990)

植物病原菌、土壌生息菌およびマイコトキシン生産菌として注目されているが、一般に同定の難しいとされている *Fusarium* 属につき病徴よりの分離、動物組織よりの分離、土壌試料からの選択的分離法について概説するとともに同定法につき解説を行った。代表的な菌種について分類学上の問題点、生態学的な意義に関しても述べた。

金子豊蔵: 医薬部外品の安全性—酸化染毛剤を中心に—

FRAGRANCE JOURNAL 臨時増刊, 11, 52~59 (1990)

医薬部外品のうち承認基準の作成が行われている染毛剤とくに主な酸化染料等の安全性について、変異原性、急性毒性、眼粘膜刺激性、皮膚感作性、催奇形性、慢性毒性、発癌性などを概説した。

長谷川隆一, 高木篤也, 佐井君江, 梅村隆志, 黒川雄二: 非変異原性発がん物質 (Non-mutagenic carcinogens) による DNA の酸化的傷害

Oncologia, 24, 22~30 (1991)

DNA 酸化傷害を *in vivo* で直接的に検索する手段として、デオキシグアノシンの酸化体である 8-OH-dG を分析する方法が開発され、私達は特に非変異原性発がん物質に注目し、その有用性と発がんとの関連性について調べてきた。その結果、非変異

原性発がん物質の中で理論的に酸化的DNA傷害が強く予測されたペルオキシゾーム増殖剤, Fe-NTAの投与により標的臓器で明らかな8-OH-dGの上昇を認め、DNAの酸化傷害が発がん機構における一つの重要な要素であることが示唆された。

會田喜崇：食品中に含まれる化学物質の安全性に対する国際機関の対応

モダンメディア別冊, 36, 394~400 (1990)

国家間における食品の流通が増大するにつれ、我が国においても輸入食品の有害物質汚染が問題となる。このような問題は一国の対応で解決する場合もあるがその多くは二国間または多国間で対応しなければ解決出来ない。このため幾つかの国際機関が積極的に活動している。今回は農業および添加物に焦点を絞ってこれら国際機関 (JECFA, JMPR, IPCS, IARC, IRPTC) の対応について述べる。

さらに、我が国における最近の輸入食品に関する問題点を探るために、新聞データベース (HINET-DATA BASE SERVICE) を利用してオンライン検索を行い、過去5年間に某全国紙に掲載された輸入食品にかかわる化学物質汚染に関する記事を収集し、その分析を試みた。

黒川雄二：非変異原性物質の発癌機構における酸化的DNA傷害、8-ヒドロキシデオキシグアノシンの発癌標的臓器での検索

医学のあゆみ, 154, 178 (1990)

近年、変異原性を示さないが発癌性が証明されるいわゆる「非変異原性発がん物質」の数が増加しており、発癌機構研究の上でもリスクアセスメントにおいても重要な問題化しつつある。これまで知られたそれらの発癌物質、作用機構、特に酸化的DNA傷害が少なくともペルオキシゾーム増殖剤による発癌機構に大きく関与していることを強調している。

Damstra, T.* and Kurokawa, Y.: U.S.-Japan joint meeting on the toxicological characterization of environmental chemicals of mutual interest

Environm. Health Perspect., 87, 301~307 (1990)

化学物質総合安全対策調査研究 (厚生省生活化学安全対策室) の一部である「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」の事業として第1回の日米合同会議が平成元年1月30日から2月

1日まで行われた。その際の日米からの毒性関連情報について詳細に記録し発表した。

* National Institute of Environmental Health Sciences, USA

Kurokawa, Y., Maekawa, A., Takahashi, M. and Hayashi, Y.: Toxicity and carcinogenicity of potassium bromate-A new renal carcinogen

Environm. Health Perspect., 87, 309~335 (1990)

食品添加物である臭素酸カリウムの発癌性が1983年に当所から発表された。それ以後発表されたこの物質に関する毒性、発癌性、変異原性、代謝、生化学、酸化的DNA傷害、リスクアセスメントなどに関する文献を検討し総説としてまとめた。

黒川雄二, 三森国敏*: 食品添加物, 農薬の発癌性

クリニカ, 14, 681~684 (1990)

7種の食品添加物, 11種の農薬の発癌性について、主としてIARCが1987年に行った発癌性評価に基づいて概説した。

* 残留農薬研究所毒性部

黒川雄二：OECDの既存化学物質総点検事業、反復投与毒性および生殖発生毒性併合試験
医学のあゆみ, 156, 732 (1991)

現在世界中には数万の環境化学物質が存在するとされているが、毒性情報があり安全性評価がなされたものの数は少ない。OECDではそのうち高生産量既存化学物質 (HPV, High Production Volume Chemicals) の安全性点検を開始することとし、日本も国際的協力事業の一環として参加することとなった。わが国は33物質を分担することとなり、現在最初の1年で行う9物質が決定している。今回のスクリーニングの目的のために特に生殖発生毒性を重要視した新しい試験法 (反復投与毒性および生殖発生毒性併合試験, Combined Repeated Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screen, ReproTox) が1990年1月に提案されているのでその紹介と説明を行った。

黒川雄二, 高木篤也：動物を用いる発癌性試験に関する最近の話題, Ames教授の論評から
医学のあゆみ, 157, 463 (1991)

Ames test の開発者として著名な Ames 教授が、発癌性試験に関する critique を最近連続して発表して論議的となっている。その結論としては、化学物質のヒトにおける発がんリスクは現在推測されているレベルよりもはるかに低いことを述べている。

黒川雄二, 大森義仁*: 化学物質のリスクアセスメント確立のための第3回日米会議報告

J. Toxicol. Sci., 16, i~ii (1991)

厚生省生活衛生局生活化学安全対策室では、昭和63年度から5ヵ年計画で化学物質総合安全対策調査研究を開始した。その研究分野 I. 「リスクアセスメント手法等の改善と確立などに関する研究」班(班長, 大森義仁)における研究活動の一環として、米国 NIEHS のスタッフとの間で年1回の定例会議を持つことになっている。今年度の第3回会議は平成3年2月4日から6日まで行われ、参加者は米国側から5名、日本側から5名であった。今回は特に発癌性試験全体に対する critique の形で問題点が提起され、毒性および変異原性と発癌性の相関関係の低さ、偽陽性試験結果の解釈、強毒性物質を試験する際の投与量と期間、回復試験を設定することの意義などについて討論がなされた。

* 慈恵医大客員教授

明星康裕*¹, 井上和秀, James G. Kenimer*², 東田陽博*¹: 神経様細胞におけるリン脂質代謝によるイオンチャネル応答と伝達物質遊離
蛋白質核酸酵素, 36, 615~619 (1991)

伝達物質はその受容体刺激により膜リン脂質代謝回転を上昇させ、膜の微量構成成分を加水分解してイノシトール三リン酸 (IP3) とジアシルグリセリド (DG) を産生する。これらは細胞内で独立にセカンドメッセンジャーとして働き、イオンチャネル応答と伝達物質遊離に深く関与している。NG 108-15 細胞ではブラジキニンによりリン脂質代謝が亢進し、アセチルコリンの遊離を促進している。一方、PC 12 細胞では ATP 刺激によりリン脂質代謝が亢進するが、同時に惹起される神経伝達物質放出はメカニズムが異なることが推察された。

*¹ 金沢大学医学部

*² Laboratory of Cellular Physiology,
Food and Drug Administration, USA

井上和秀: 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

Biomedica, 6, 513~517 (1991)

ヒューマンサイエンス財団の事業の一部として、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について検討し、その成果を発表した。最終目標は記憶・記憶障害の解明であり、その予防法・治療法の開発である。作業仮説として、記憶のトレーシング回路モデルを取り上げた。この研究は神経回路網が研究対象であるから、導入すべき技術として同時多点解析法を検討した。その結果、神経細胞末端から神経伝達物質とともに放出される ATP がシナプス形成にとってきわめて重要な役割を果たしていることが明らかとなった。また、ATP は完成されたシナプスにおいては神経伝達物質と同様な役割を担っていることが示唆された。

Herman, B.*¹, Gores, J. G.*¹, Nieminen, A-L.*¹, Kawanishi, T., Harman, A.*² and Lemasters, J. J.*²: Calcium and pH in anoxic and toxic injury
Crit. Rev. Toxicol., 21, 127~148 (1990)

細胞障害において可逆的障害が不可逆的障害へ変化する過程は不明であるが、最近カルシウムイオンは細胞膜のプレビングが生じる前に上昇し、細胞死を引き起こすという仮説が提出された。そこで、デジタル化ビデオ顕微鏡法を用いて、単一肝細胞における無酸素状態あるいは化学物質による細胞障害について、不可逆的障害の開始と細胞内遊離カルシウムイオン濃度、ミトコンドリア膜の膜電位、細胞内 pH および細胞膜プレビングとの関係を検討した。その結果以下の結論が得られた。(1) 細胞膜のプレビングはすべての細胞障害時に生じた。(2) 細胞死は細胞膜のプレビングの破裂に伴って起こる極めて速い過程である。(3) 細胞内カルシウムイオン濃度の上昇はプレビング形成の刺激とはならないし、細胞死に到る共通の過程とはいえない。(4) ミトコンドリアの膜電位の減少は細胞の生存率の減少に先立って起こる。(5) 細胞内 pH は化学的低酸素状態下で1以上低下し、この低下は細胞死を防ぐ。

* University of North Carolina at Chapel Hill, USA

大野泰雄: 毒性試験方法と LD₅₀ 値—その最近の

動向一

中毒研究, 4, 105~114 (1991)

中毒事故の治療に当たる臨床医を対象に医薬品・農薬・および化学物質の安全性に対する行政的な対応と毒性試験法, 毒性試験結果に影響を及ぼす様々な因子について解説した。特に, 中毒事故の処置の際に参考となる LD₅₀ 値についてヒトとマウスとで比較し, 体重当たりの LD₅₀ 値は, 多くの薬物の場合, ヒトの方が小さく, スコポラミン, アトロピン等の抗コリン薬や麻薬性鎮痛薬であるドロモランの静脈内投与における LD₅₀ 値はマウスの方が100倍以上大きく, ヒトの方が急性毒性が強く現れる傾向のあることを示した。また, LD₅₀ 値の計算方法, その測定における科学的・倫理的問題点, および急性毒性試験の改善案についての最近の動向についても解説した。

Maekawa, A.* and Mitsumori, K.: **Spontaneous occurrence and chemical induction of neurogenic tumors in rats-Influence of host factors and specificity of chemical structure**

Critical Reviews in Toxicology, 20, 287~310 (1990)

神経腫瘍誘発物質の有害性確認の見地から, ラットにおける自然発生性および発癌物質誘発性神経腫瘍の系統, 性, 発生年齢, 部位や種類などの宿主側の影響, 投与方法および神経腫瘍発現と化学構造式との関連性について文献的考察を加えた。さらに, 神経腫瘍の類症鑑別上の問題点も取り上げた。

神経腫瘍誘発物質としては, N-ニトロソ化合物が最も有名であり, それらの腫瘍の発生頻度, 発現部位や種類は, 化学構造式のみならず投与方法や宿主側の要因によっても影響をうける。MNUやENUのようなN-ニトロソ尿素は, 全身性投与により中枢および末梢神経腫瘍を誘発する。一方, N-ニトロソアミンは鼻腔に神経上皮腫を誘発する。N-アルキル-N-ニトロソ尿素のメチル鎖は, ラットの中枢や末梢神経組織に対して最も高い腫瘍誘発能を有している。経胎盤投与の場合には, エチル鎖の方が脳腫瘍誘発に重要な役割を果たしているようである。投与経路も腫瘍誘発に影響を及ぼしており, MNUの静脈内投与は他の投与に比し腫瘍発現率が高い。腫瘍発生は年令によっても左右され, 1日令のラットがENUによる腫瘍誘発に最も感受性が高い。胎仔のENUに対する感受性はさらに高いことが見

出されている。神経腫瘍誘発には系統差も認められ, 遺伝的要因が深く関与しているものと考えられる。

現時点では, 化学物質の神経腫瘍誘発能を検査するための動物種としてはラットが最も適しているようである。しかし, ラットを用いた発癌性試験における神経腫瘍誘発物質についてのリスク評価においていくつかの問題点が上げられており, これらについてのさらなる研究が必要である。

* 佐々木研究所

前川昭彦*: **癌原性化学物質のヒトに対する危険度評価**

放射線科学, 33, 203~211 (1990)

癌原性化学物質のヒトに対する発癌性リスク・アセスメントは大きく4つの段階, 即ち(1)有害性確認, (2)曝露アセスメント, (3)有害性または用量-反応アセスメント, (4)リスク判定に大別される。有害性確認は対象物質の動物での癌原性およびヒトでの関連データの定性的評価であり, 曝露アセスメントは曝露が予想されるヒトの数, 予想される曝露形式, 曝露量や曝露期間が対象であり, 有害性または用量-反応アセスメントは第一段階で検討した動物での癌原性のデータをもとにしての発癌強度の定量的検討であり, 最終的にこれらを含めた全ての情報を統合し, 当該物質のヒトにおける曝露条件での発癌性リスクを評価することになる。本論文ではこれら各段階の発癌性リスク・アセスメントについて概略を述べるとともに, 特に有害性または用量-反応アセスメントについて, 50%発癌量, 閾値や実質安全量などを中心に考察を加えた。

* 佐々木研究所

高橋道人: **発癌修飾因子 1) 発癌促進または増強物質**

クリニカ, 17, 609~702 (1990)

特集: 環境発癌物質と人癌発生の関連II, 発癌修飾因子

1) 発癌促進または増強物質

発癌の促進とは, 発癌過程において発癌を増強させる作用のことである。発癌過程には少なくともイニシエーションとプロモーションの2段階があり, 前者においては, ほかの化学物質(発癌性物質または非発癌性物質)が発癌物質の働きを強める作用をする。後者においては, プロモーター(非発癌性物質)があり, 器官特異性がある。内

容の目次は以下の通り。

1. はじめに
2. 発癌の促進
3. 2つ以上の発癌物質の促進効果
4. イニシエーションにおける非発癌物質の促進効果
5. プロモーター
6. おわりに

前川昭彦*：自然発生病変からみた F344 ラットの特性

Exp. Anim., 39, 507~517 (1990)

現在 F344 ラットは世界中で、特に NCI/NTP を中心とする米国および我国において各種毒性試験、なかでも癌原性試験に広く用いられてきており、多くの長期毒性・癌原性試験データから、このラットにおける背景病変としての自然発生腫瘍性および非腫瘍性病変についての多くの蓄積がなされてきている。本論文では我国や外国での F344 ラットの自然発生病変に関するこれまでの報告を基にして、F344 ラットにおける自然発生腫瘍の好発臓器、組織型および発生頻度、F344 ラット自然発生腫瘍の発生時期、F344 ラット自然発生腫瘍の年代およびロットによる変動、F344 ラット自然発生腫瘍の試験施設別比較、F344 ラット自然発生腫瘍の系統別比較やラット自然発生非腫瘍性病変などについて述べ、自然発生病変からみた F344 ラットの特性をまとめた。

* 佐々木研究所

林 裕造, 高橋道人, 吉村博之：抗癌剤の発癌性について

癌と化学療法, 17, 2293~2298 (1990)

化学療法の進歩に伴い癌患者の生存期間は有意な延長を示しているが、一方、化学療法剤、特にアルキル化剤の投与を受け長期間生存した患者に二次発癌、特に急性非リンパ性白血病の発生のリスクが増大している。本総説では二次発癌予防の観点から、抗癌剤の開発と臨床使用における実際的な問題点について解説した。内容は次の通りである。

はじめに

- I. 異時性多重癌としての二次発癌
- II. 抗癌剤と二次発癌との因果関係
- III. 抗癌剤の発癌性に関する知見
 1. IARC における発癌性の評価

2. 抗癌剤の種類と発癌性

- 1) Chlornaphazine, 2) アルキル化剤,
- 3) 抗生物質, 4) 代謝拮抗物質,
- 5) 紡錘体阻害剤

IV. 抗癌剤による発癌の機序

おわりに

林 裕造, 吉村博之：食物、栄養と癌

KARKINOS, 3, 891~897 (1990)

疫学研究によるヒトとがん発生の約 70% は外来性の要因 (環境要因) に起因し、その半分は食生活に関連すると言われている。その例としては、食物自体に通常成分として発がん物質を含有するもの—そてつ：サイカシンなどや、穀物のかび毒—アフラトキシンなどがある。また、食物の加熱調理過程で生じるヘテロサイクリックアミンのような genotoxic carcinogen もある。さらに食塩や脂肪なども発がんに関与し、特に高濃度の食塩を含有する食品の摂取は胃がん発生に関連するが、食塩は発がん物質ではなく、実験的には promotion 作用が示唆されている。一方では、Vitamin A や食物繊維のようながん発生を抑制するものもある。一般ヒト集団にみられるがんの発生は、種々の要因による複合影響として現れるが、特に食事要因もしくは栄養因子は様々ながんの発生に関与しており、がん発生の一次予防として特に重視しなければならない。

能美健彦, 渡辺雅彦, Einisto, P.*, 松岡厚子, 祖父尼俊雄, 石館 基：遺伝子工学的手法を用いた新しいサルモネラ指標菌株の開発

環境変異原研究, 12, 57~65 (1990)

ニトロアレーン、芳香族アミンに高感受性を示す新しいサルモネラ指標菌株 YG1021, YG1024, YG1026, YG1029 の開発の経過、ならび応用例について紹介した。またサルモネラのニトロ還元酵素遺伝子の塩基配列、サルモネラと高等生物のアセチル転移酵素のアミノ酸配列上の相同性、さらにニトロアレーン、芳香族アミンに高感受性を示す哺乳類細胞の開発の可能性について言及した。

* Institute of Occupational Health, Finland

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, 77~85 (1990)

細胞バンク運営において、利用された細胞株が有

効に使用されているか否かを推定する目的で、細胞の供給の際に、利用者による培養開始後の細胞株の状態について、報告を求めてきた。1988年5月から1989年4月の間約2500アンプルの細胞を供給したが、この間に回収された報告のうち、細胞株に何等かの異常があったとされたものは約60アンプル(2.5%)であった。増殖能、汚染発生、種特性異常に分類して、報告者と連絡をとりながら該当ロットをバンク独自に調査し、その全ては利用者側に問題があったとの結論を得た。

* 富山県立衛生研究所

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, 117~123 (1990)

厚生省(JCRB)細胞バンクは設立以来約6年を経過し、約500種類の細胞種を保存し、年間アンプル分譲量は3000アンプルを越えるようになった。すべての細胞の保存状態を管理し、分譲業務などをスムーズに行うためにはコンピュータを導入した効率の良い管理システムを確立する必要がある。筆者はこの目的のために、汎用データベースマネジメントシステムであるdBASEIIを導入し、細胞株保存管理情報システム(JDACS JCRB Data Control System)を構築してきた。これをさらに改良したdBASEIIIを基本ソフトとして用いた細胞バンク間共同運用システムを構築し、より充実したシステムとし、国内の細胞バンクで共同利用を始めている。

水沢 博：哺乳動物細胞バンク
遺伝, 別冊3号, 39~45 (1990)

研究材料確保および絶滅品種の保存などの視点から細胞バンクの重要性が再認識されつつある。本別冊ではそうした問題に焦点をあて、数多くの研究材料についての保存の現状および問題点について考察したものである。本稿では厚生省細胞バンクの簡単な歴史を紹介したうえで、品質管理を重視した細胞保存システムの確立と、実際の利用状況について報告した。さらに、国際的に共同できる体制を確立するにはわが国の細胞バンクが必ずしも十分に整備されていないことを指摘し、今後の課題について考察した。

Sasaki, K.*, Mizusawa, H., Ishidate, M. and Tanaka, N.*: Transformation of RAS trans-

ected BALB-3T3 clone (Bhas 42) by promoters: Application for screening and specificity of promoters

Toxicology In Vitro, 4/5, 657~659 (1990)

がんを引き起こす化学物質を迅速に検出する系を開発することは重要である。特に発ガンプロモーターを迅速に検出する系はまだ十分に確立されていない。BALB/3T3細胞に癌遺伝子の一つ、RAS, を導入した Bhas 42 細胞株は典型的な発ガンプロモーターである TPA により急激な形態変化が誘導された。さらに多くの発ガンプロモーターにより細胞の形態変化が誘導されることから、迅速な発ガンプロモーター検索に利用できることを明らかにした。

* 食品薬品安全センター秦野研究所

岡田敏史：薬局方標準品の取り扱いについて
月刊薬事, 33, 871~877 (1991)

第12改正日本薬局方における標準品の品目数は106品目となり、11局における53品目に比べて倍増した。これに伴いその取扱方法に大きな変化がみられ、従来どおり国立衛生試験所より製造・配布されるものと、新たに(財)日本公定書協会より配布されるものと二本立の供給体制がとられることとなった。このうち、日本公定書協会は主として新収載および既収載の製剤分析用の標準品を製造・配布することになる。

このような薬局方標準品の供給体制がとられるようになった背景と今後の薬局方標準品のあり方について若干の私見も交えて紹介した。

伊藤誉志男：食品汚染—残留農薬
公衆衛生, 55, 108~111 (1991)

良い農薬は、病虫害などに対する有効性、安価、持続性、取扱いの簡単さ、人畜に対する安全性などから判断される。農薬による害は、農薬製造過程での労働者の被害およびその工場排泄物、散布者の健康を損なう、作物に残留し消費者の健康を損なう、土壌や水などの環境汚染が考えられる。農薬の作用別分類では、殺菌剤、殺虫剤および除草剤が主であるが、その他に植物生長調整剤、殺そ剤、展着剤などがある。農薬に関する主な法律には農薬取締法、食品衛生法、毒物および劇物取締法などがある。農薬に関する主な基準としては農薬残留基準、登録保留基準、農薬安全使用基準がある。輸入食品における残留農薬では、現在、ポストハーベスト(収穫後

使用) 農薬および農薬のブーメラン現象が問題となっている。

辻 澄子：食品中の過酸化水素

臨床栄養, 78, 18 (1991)

過酸化水素 (H_2O_2) はうどんなどの殺菌剤として広く使用されてきたが、発癌性が認められたことから、現在では、使用した場合、残存しないように規制されている。

食品中の H_2O_2 の含有量は同じ酸素電極法でも分析法により大きく異なる。カタラーゼ活性の大きい鶏レバー中の H_2O_2 について、酵素系を抑えた方法(メタリン酸法)で測定すると、3.67 ppm となるが、抑えない方法(従来法)で測定すると検出限界以下になる。

単に磨砕しただけの従来法で種々の食品中の H_2O_2 の含有量を測定した結果、生鮮食品では 1 ppm 以上のものに、かれい、ほたて貝、ほたるいか、かにおよびピーナッツがあり、加工食品で 10 ppm 以上のものに、お茶類、コーヒー、ココアなどがある。

辻 澄子：生鮮食品中に常在するホウ酸

臨床栄養, 78, 466 (1991)

ホウ素 (B) は植物の必須元素であり、海藻類、動物中に常在する。B は薬としては安全な部類に属しているが、長期連用により消化管障害などがみられることから、食品衛生法はホウ酸 (H_3BO_3) を食品に添加することを禁止している。

食品中の H_3BO_3 の分析法としては寒天のアルカリ灰化後の中和滴定があり、1 g/kg 以下と規定している。アルカリ灰化は、灰化を上手に行わなければ測定値が低くなる傾向があることなどから、著者らは迅速簡便な分析法として食品中の H_3BO_3 を 2-エチル-1,3-ヘキサジオールを用いて有機溶剤によるキレート抽出し、クルクミン発色による比色法を開発した。

数種の食品中の H_3BO_3 は寒天が一番高く、塩蔵くらげおよびワインにも含まれていた。

辻 澄子：生鮮品中の亜硫酸

臨床栄養, 78, 242 (1991)

亜硫酸には、漂白作用のほか、保存、酸化防止などの作用があるため、多くの食品に広く、食品添加物として使用されている。

近年、アメリカで野菜サラダに使用された亜硫酸塩が原因で、アレルギー体質の人に死亡事故が発生したことから、10 ppm 以上残存する食品に表示が義務付けられた。

アメリカでは Monier-Williams 法を採用しているが、分析に長時間かかり、分析の検出限界も 10 ppm 程度である。日本では改良ランキン滴定法ならびに比色法が広く使用されている。

生鮮食品中の亜硫酸の自然含有量が 10 ppm 以上のものとしては、わけぎ、小たまねぎ、白ねぎ、青ねぎなどがある。

天野博夫：エンドトキシンショックと血管内皮 ファルマシア, 27, 452 (1991)

エンドトキシンにより誘発される諸種障害性生体反応の発生機序について、血管内皮由来血管弛緩因子の役割を中心に、新しい知見を紹介した。

佐竹元吉：薬用資源の収集と保存

遺伝, 別冊 No. 3 遺伝資源, 106~115 (1990)

薬用植物の収集には、世界植物区分を考慮して行う必要性および世界の 6 区域の薬用植物の特色をあげた。保存については、保存植物の種類および保存方法を述べ、保存植物の成分含量、種子の導入方法、薬用資源のデータベース化などについて述べた。

佐竹元吉：ハーブについて

香料, 166, 105~122 (1990)

ハーブの定義を明らかにし、その歴史をヨーロッパの薬用植物誌および各国の薬局方収載品目と比較しながら述べた。また、これからハーブとして考えられる植物の種類のリストを記載した。

佐竹元吉：種子競争と薬用植物

ファルマテック ジャパン, 7, 8~9 (1991)

医薬資源としての薬用植物の開発利用は、世界各国で行われており、国際的な知的所有権の問題として、法律的な適応がなされるようになってきた。これらの法律の紹介と薬用植物資源保存のチェンマイ宣言にも触れた。

下村謙一郎：薬用植物のバイオテクノロジー

ヒューマンサイエンス, 1, 6~11 (1990)

薬用植物の組織培養は、植物バイオテクノロジー研究の発展とともに、近年益々その重要性が増して

いる分野の一つである。特に最近になっては、*Agrobacterium* 属細菌による植物の形質転換あるいは、外来遺伝子の導入などの研究も数多く試みられるようになってきた。

本報では、植物組織培養研究の歴史を紹介するとともに、薬用植物の形質転換細胞の作出法とその利用について解説した。

下村講一郎, 石丸幹二: **植物組織培養に使われる培地成分の単位とその換算**

バイオホルティ, 4, 86~88 (1990)

植物組織培養においては、植物を無菌的に試験管内で培養するために、通常、無機塩類、糖、ビタミン、植物生長調節物質を含む培地を用いる。これまでに多くの研究者が、それぞれの植物の培養に適した培地を報告しているが、その培地成分濃度の表記方法は、統一されていないのが現状である。そこで本報では、論文や総説に比較的用いられている濃度単位について解説するとともに、主な植物生長調節物質の濃度換算表を付記し、研究者がそれぞれの培地成分を容易に理解できるようにした。

下村講一郎: **形質転換植物による物質生産 (上)**

バイオインダストリー, 7, 257~267 (1990)

植物の形質転換技術に汎用されている、グラム陰性の土壌細菌 *Agrobacterium* 属の特性、その利用方法およびそれらを用いた形質転換細胞の誘導と培養方法について記した。

下村講一郎: **形質転換植物による物質生産 (下)**

バイオインダストリー, 7, 332~339 (1990)

Agrobacterium 属細菌を用いて形質転換した植物細胞による有用物質生産の例を紹介した。

吉松嘉代, 下村講一郎, 澤田純一: **酵素免疫定量 (ELISA) 法を用いた植物二次代謝物の微量分析法**

植物組織培養, 7, 123~126 (1990)

現代医療の場で診断に汎用されている酵素免疫定量 (ELISA) 法を、植物組織培養による植物二次代謝物生産の研究に応用し、生産性の高い植物細胞

の選抜に用いるための技術を解説した。

下村講一郎, 石丸幹二*: **薬用植物のバイオテクノロジー 増殖と物質生産**

病態生理, 9, 697~706 (1990)

近年の漢方ブームに伴い関心が高まっている薬用植物について、最新の研究成果、特に薬用植物の植物組織培養による増殖、形質転換ならびに薬用成分の生産について紹介した。

* 佐賀大学農学部

下村講一郎, 吉松嘉代, Martina Sauerwein: **毛状根培養における物質生産と分泌**

組織培養, 16, 480~484 (1990)

毛状根培養における植物二次代謝物の生産と、その培養培地中への放出・分泌について、いままでに報告された研究の内容を解説しながら紹介した。

下村講一郎, 吉松嘉代, マルチナ・ザウエルヴァイン: **植物組織培養と有用物質生産の最近の進歩と動向**

Fragrance Journal, 19, 12~22 (1991)

植物組織培養による有用物質の生産は、限りある植物資源を有効に活用する手段として、非常に関心を集めている分野である。本報では、植物ごとに研究例をあげながら、植物組織培養による物質生産について紹介した。

細田勝子, 野口 衛: **薬草情報活動の経験から**

社会薬学, 9, 83~85 (1990)

現場で行ってきた薬草問い合わせに対する応答活動の記録を整理、その内容を解析し、国民の要求に応える研究課題発掘の手段としての情報活動の重要性について考察した。

野口 衛: **枳実**

日病薬誌, 27, 457~458 (1991)

生薬“枳実”の効能、品質、調製加工法に関する最近の研究を病院薬剤師のために概説したラジオ放送の記録である。

中原雄二：“コカイン”，加藤伸勝編，京文社，東京（1990）pp. 3～19

Hayakawa, T.: The Japanese Perspective Regarding Regulatory Concerns for Biotechnology Drugs and Their Scientific Basis. “**Drug Biotechnology Regulation: Scientific Basis and Practices**”, ed. Chiu Y. H. and Gueriguian, J. L., Marcel Dekker Inc., New York (1991) pp. 468～498

Hayakawa, T.: Nomenclature of Biotechnologically Derived Pharmaceutical Substances - A View from Japan. “**The Terminology of Biotechnology: A Multidisciplinary Problem**”, ed. Loening, K. L., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong (1990) pp. 115～123

Matsumoto, Y., Ikebe, H., Tsuji, T., Takahashi, Y., Mori, K., Terubayashi, H., Akagi, Y., Tanimoto, T. and Ohta, M.: “**Current Concepts of Aldose Reductase and Its Inhibitions**”, Congenital Cataracts in Offspring of Galactosemic Rats. ed. Sakamoto, N., Kinoshita, J. H., Kador, P. F. and Hotta, N., Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam (1990) pp. 203～206

Tanimoto, T., Ohta, M., Akagi, Y. and Terubayashi, H.: “**Current Concepts of Aldose Reductase and Its Inhibitions**”, Biochemical and Morphological Changes on Development of Sugar Cataract in Rat Lens. ed. Sakamoto, N., Kinoshita, J. H., Kador, P. F. and Hotta, N., Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam (1990) pp. 207～212

Ikebe, H., Tsuji, T., Terubayashi, H., Tsutsumi, M., Mori, K., Akagi, Y. and Tanimoto, T.: “**Current Concepts of Aldose Reductase and Its Inhibitions**”, Prevention of Rat Diabetic Cataract with Aldose Reductase Inhibitors FR74366. ed. Sakamoto, N., Kinoshita, J. H., Kador, P. F. and Hotta, N., Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam (1990) pp. 217～220

Nishimura, C., Matsuura, Y., Tanimoto, T., Yamaoka, T., Akera, T. and Flynn, T. J.: “**Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism**”, cDNA Cloning and Expression of Human Aldose Reductase. ed. Weiner, H. et al., Plenum Press, New York (1990) pp. 119～127

早川堯夫：“医薬品の開発”，14巻，医薬品の品質管理及び試験法，バイオテクノロジー関連医薬品，鈴木郁生編，広川書店，東京（1990）pp. 42～54

谷本 剛：“医薬品の開発”，14巻，医薬品の品質管理及び試験法，酵素製剤，鈴木郁生編，広川書店，東京（1990）pp. 19～42

谷本 剛：“酵素剤 基礎と実際”，広川書店，東京（1991）

原田正敏：“医薬品の開発”，第1巻，医薬品開発総論，生薬及びその製剤の進歩と将来，鈴木郁生編，廣川書店，東京（1990）pp. 11～26

原田正敏：“医薬品の開発”，第14巻，医薬品の品質管理及び試験法，医薬品の品質管理についての「最近の考え方」生薬，鈴木郁生編，廣川書店，東京（1990）pp. 54～66

中村晃忠：“医薬品の開発”，第14巻，医薬品の品質管理及び試験法，プラスチック容器，鈴木郁生編，廣川書店，東京（1990）pp. 92～103

中村晃忠：第6章 “高分子機能材料シリーズ”，9巻，医療機能材料，材料の安全性評価，林 寿郎，木村良晴編，共立出版，東京（1990）pp. 433～455

Shintani, H., and Suzuki, H.: Simultaneous analysis of serum uremic toxins and ionic compounds by chromatography using an immobilized enzyme column combined with a column-switching method. “**Bioinstrumentation and biosensors**”, ed. Donald L. Wise, Marcell Dekker, New York (1990) pp. 181～227

石綿 肇, 一戸正勝, 慶田雅洋, 小沼博隆, 斉藤紀子, 丹野憲二, 矢口行雄: “カラーグラフィック食品の品質管理”, 谷村顕雄監修, 広川書店, 東京 (1990)

Kirino, Y., Hirashima, N. and Saito, Y.: “Methods in Neurosciences Vol. 4: Electrophysiology and Microinjection”, Patch-Clamp Measurements of Ion Channels in Biomembrane Vesicles Reconstituted into Giant Proteoliposomes by Freeze-Thawing without Use of Detergent. ed. Conn, M. P., Academic Press, San Diego (1991) pp. 374~383

高橋 惇: “医薬品の開発”, 第20巻, 医薬品の安全性・毒性試験, 代謝試験と毒性. 大森義仁, 戸部満寿夫編, 広川書店, 東京 (1990) pp. 129~144

高橋 惇: “毒性薬理学”, 生体内動態. 亀山 勉編, 広川書店, 東京 (1990) pp. 9~26

Rietschel, E. T., Brade, L., Schade, U., Seydel, U., Zahringer, Z., Lindner, B., Moran, A. P., Kulshin, V. A., Haishima, Y., Holst, O., Röhrscheidt-Andrzeweski, E., Ulmer, A. J., Flad, H. D. and Brade, H.: “Chemical structure and biological activity of lipopolysaccharides”, Endotoxin from pathophysiology to therapeutic approaches. ed. Baumgartner, J. D., Calandra, T. and Carlet, J., Flammarion Medecine-Sciences, Paris (1990) pp. 6~18

Hisatsune, k., Haishima, Y. and Kondo, S.: **Advances in Research on Cholera and Related Diarrheas**, vol. 7. “0-antigenic lipopolysaccharides isolated from *Vibrio cholerae* bio-serogroup Hakata and *Vibrio fluvialis* each possessing common antigenic factor to 01 *Vibrio cholerae*”, ed. Sack, R. B and Zinnaka, Y., KTK Scientific Publishers, Tokyo (1990) pp. 287~297

関沢 純: “毒性試験講座第2巻「毒性情報の検索と管理」”, 規制情報の検索, 竹中祐典ほか編, 地人書館, 東京 (1989) pp. 153~179

Sekizawa, J. et al: Environmental Health Criteria 94, “Permethrin”, World Health Organization, Geneva (1990)

Sekizawa, J. et al: Environmental Health Criteria 95, “Fenvalerate”, World Health Organization, Geneva (1990)

Sekizawa, J. et al: Environmental Health Criteria 96, “d-Phenothrin”, World Health Organization, Geneva (1990)

Sekizawa, J. et al: Environmental Health Criteria 97, “Deltamethrin”, World Health Organization, Geneva (1990)

Sekizawa, J. et al: Environmental Health Criteria 98, “Tetramethrin”, World Health Organization, Geneva (1990)

Sekizawa, J. et al: “Summary of Toxicological Evaluations Performed by the Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues (JMPPR)”, International Programme on Chemical Safety, Geneva (1991)

田中 悟: 生殖・“医薬品の開発”, 第20巻, 医薬品の安全性・毒性試験, 発生毒性試験. 大森義仁, 戸部満寿夫編, 廣川書店, 東京 (1990) pp. 34~54

児玉幸夫: “毒性試験法講座”, 第4巻, 毒性試験に用いられる実験動物, 廃棄物処理施設. 藤原公策, 堀内茂友編, 地人書館, 東京 (1990) pp. 201~210

児玉幸夫: “毒性試験法講座”, 第4巻, 毒性試験に用いられる実験動物, 特殊科学物質投与動物の飼育管理. 藤原公策, 堀内茂友編, 地人書館, 東京 (1990) pp. 349~354

萩原清和, 内藤克司, 黒川雄二, 岡 純, 小篠 栄, 市川富夫: “ビタミンE研究の進歩, I”, ビタミンE欠乏ラットにおける過酸化脂質生成とグルタチオン低下による特異的腎臓傷害. ビタミンE研究会 (美濃 真) 編, エイド出版, 東京 (1990) pp. 173~179

大野泰雄：“医薬品の開発”，第20巻，安全性試験の代替法，現状と将来。大森義仁，戸部満寿夫編集，鈴木郁生ら総編集，広川書店，東京（1990）pp. 145～158

Lemasters, J. J., Nieminen, A-L., Gores, G. J., Dawson, T. L., Wray, B. W., Kawanishi, T., Tanaka, Y., Florine-Casteel, K., Bond, J. M. and Herman, B.: “**Optical Microscopy for Biology**”, Multiparameter digitized video microscopy (MDVM) of hypoxic cell injury. ed. Herman, B. and Jacobson, K., Wiley/Liss, New York (1990) pp. 559～573

Tatematsu, M., Imaida, K.: “**Atlas of Tumor Pathology of the Fischer Rat**”, Tumors of the Glandular Stomach. ed. Stinson, S. F., Schuller, H. M., Reznik G. K., CRC Press Inc., Florida (1990) pp. 95～116

Tatematsu, M., Imaida, K.: “**Atlas of Tumor Pathology of the Fischer Rat**”, Tumors of the Small Intestine. ed. Stinson, S. F., Schuller, H. M., Reznik G. K., CRC Press Inc., Florida (1990) pp. 117～132

Maekawa, A., Kurokawa, Y. and Kanno, J.: “**Atlas of Tumor Pathology of the Fischer Rat**” Neoplasms of the adrenal cortex and medulla. ed. Stinson, S. F., Shuller, H. M. and Reznik, G., CRC Press, Inc., Florida (1990) pp. 291～313

Boorman, G. A., Eustis, S. L. and Mitsumori, K.: “**Atlas of Tumor Pathology of the Fischer Rat**” Neoplasms of the seminal vesicle. ed. Stinson, S. F., Shuller, H. M. and Reznik, G., CRC Press Inc., Florida (1990) pp. 410～415

Maekawa, A.: “**Atlas of Tumor Pathology of the Fischer Rat**” Neoplasms of the female reproductive organs. ed. Stinson, S. F., Shuller, H. M. and Reznik, G., CRC Press, Inc., Florida (1990) pp. 431～472

Konishi, Y., Mii, Y., Maruyama, H., Tsutsumi, M.

and Maekawa, A.: “**Atlas of Tumor Pathology of the Fischer Rat**” Neoplasms of mesenchymal origin. ed. Stinson, S. F., Shuller, H. M. and Reznik, G., CRC Press, Inc., Florida (1990) pp. 527～537

林 裕造：“**毒性試験講座 1. 安全性評価の基礎と実際**”，I 安全性評価と毒性学，林 裕造，大沢仲昭編集，地人書館，東京（1990）pp. 1～24

林 裕造，今井田克己：“**毒性試験講座 1. 安全性評価の基礎と実際**”，II 安全性の方法と技術，2. 病理学，林 裕造，大沢仲昭編集，地人書館，東京（1990）pp. 41～55

高橋道人：“**毒性試験講座 1. 安全性評価の基礎と実際**”，II 安全性の方法と技術，IV 実験動物からヒトへの外挿，2 各論，2.3 発がん性の外挿，林裕造，大沢仲昭編集，地人書館，東京（1990）pp. 247～258

Nakamura, A., Ikarashi, Y., Tsuchiya, T., Kaniwa, M., Sato, M., Toyoda, K. and Takahashi, M.: “**Biomaterials Vol. II, BIOMAT 89**” Correlations among chemical constituents, cytotoxicities and tissue responses: in the case of natural rubber latex materials (1990)

福島昭治，今井田克己：外科的腫瘍学，“**新病理学大系 第10巻 A 腫瘍の外科 1**”，中山書店，東京（1990）pp. 28～49

Takahashi, M. and Hasegawa, R.: “**Pathology of Tumours in Laboratory Animals Vol. 1-Tumours of the Rats, Second Edition**” Tumours of the stomach, IARC Scientific publications No. 93, (1990) pp. 129～159

Maekawa, A.: “**Pathology of Tumours in Laboratory Animals Vol.1-Tumours of the Rats, Second Edition**” Tumours of the Ovary, IARC Scientific Publications No. 93, (1990) pp. 473～497

今井田克己，林 裕造：“**医薬品の開発**”，第20巻，医薬品の安全性・毒性試験，癌原性試験，大森義仁，

戸部満寿夫編集, 広川書店, 東京(1990)pp. 76~84

Mitsumori, K. and Boorman, G. A.: "**Pathology of the Fischer Rat**" Spinal cord and peripheral nerve. ed. Boorman, G. A. *et al.*, Academic Press, Florida (1990) pp. 179~192

Boorman, G. A., Chapin, R. E. and Mitsumori, K.: "**Pathology of the Fischer Rat**" Testis and epididymis. ed. Boorman, G. A. *et al.*, Academic Press, Florida (1990) pp. 405~418

Boorman, G. A., Elwell, M. R. and Mitsumori, K.: "**Pathology of the Fischer Rat**" Male accessory sex glands, penis, and scrotum. ed. Boorman, G. A. *et al.*, Academic Press, Florida (1990) pp. 419~428

Mitsumori, K.: "**Pathology of the Fischer Rat**" Blood and lymphatic vessels. ed. Boorman, G. A. *et al.*, Academic Press, Florida (1990) pp. 473~484

林 裕造, 高橋道人: "**Annual Report 1990 医薬品の副作用**", 17. 男性ホルモン/蛋白同化ステロイド製剤と肝腫瘍, 伊藤宗元, 海老原格, 北川照男, 高橋隆一, 塚田理康, 戸部満寿夫, 福室憲治編集, 中外医学社, 東京 (1990) pp. 103~108

能美健彦: "**微生物を用いる変異原性試験データ集**", 微生物を用いる変異原性試験: その読み方と総括. 石館 基監修, エル・アイ・シー, 東京(1991) pp. 11~22

能美健彦: "**微生物を用いる変異原性試験データ集**", エームス・テストの原理と新しいサルモネラ試験菌株の開発. 石館 基監修, エル・アイ・シー, 東京 (1991) pp. 23~36

水沢 博, 原沢 亮: "**バイオサイエンス戦略マニュアル**", マイコプラズマDNAプローブ. 瀬野編, 共立出版, 東京 (1990) pp. 358~362

水沢 博: "**細胞培養技術・新化学実験講座**", 18 巻, 第4章 (1) 細胞の選び方と所在情報, (2) 細

胞の同定, 東京化学同人, 東京 (1990) pp. 43~52

Sorsa, M., Hayashi, M., Maki-Paakkanen, J., Vainio, H.: "**Antimutagenesis and anticarcinogenesis mechanisms II**" Human biomonitoring in exposure to environmental genotoxicants. ed. Kuroda, Y., Shankel, D. M., Waters, M. D., Plenum Press, New York (1990) pp. 87~96

Norppa, H., Hayashi, M., Maki-Paakkanen, J., Sorsa, M.: "**Mutation and the environment, part B: metabolism, testing method and chromosomes**", The micronucleus assay in lymphocytes. John Wiley & Sons, Inc., New York (1990) pp. 207~216

林 真: "**小核試験**", サイエントリスト社, 東京 (1991)

Appelmelk, B. J., Donghui, S., Cohen, J., Verweij-van Vught, A. M. J. J., Hekker, T. A. M., Thijs, L. G., Burman, W. A., Komuro, T., Playfair, J. H. L. and MacLaren, D. M.: "**Cellular and Molecular Aspects of Endotoxin Reactions**", Bioactivity and immunochemistry of clone 20, a cross-protective monoclonal antibody directed at the Gram-negative lipopolysaccharide core region: A review, ed. Nowotony, A., Spitzer, J. J., Ziegler, E. J., Excerpta Medica, Amsterdam, New York, Oxford (1990) pp. 347~353

Kotani, S., Nagao, A., Tamura, T., Okamura, H., Nagata, A., Aoyama, K., Kusumoto, S., Kokeyuchi, S., Kato, K., Fujii, N., Usami, H., Yoshida, T., Akagawa, K., Tanaka, S., Komuro, T., Ikeda-Fujita, T., Kato, Y. and Utsunomiya, J.: "**Immunotherapeutic Prospects of Infectious Diseases**" Purification and Endotoxinlike Bioactivities of a Novel Amphiphile from *Mycobacterium bovis* BCGP ed. Noel Masihi, K. and Lange, W., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg (1990) pp. 19~36

Satake, M. and Iida, O.: "**The Studies of Japanese-Sino Joint Project on Quality of Tra-**

**ditional Drugs (Proceeding of Japanese-Sino
Joint Seminar)**, ed. Satake, M., Japan Health

Science Fundation, Tokyo (1990) pp. 5~10, pp.
202~210

乱用薬物鑑定法整備研究—毛髪分析法：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（昭和62年9月～平成3
年3月），平成3年4月厚生省薬務局麻薬課に報告。

フェネチルアミン類の代謝産物に関する研究：中原
雄二

厚生科学研究（平成元年4月～平成3年3月），平
成3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，木倉瑠理

委託研究（平成元年9月～平成3年3月），平成
3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，
木倉瑠理

厚生科学研究（平成元年2月～平成3年3月），平
成3年4月厚生省薬務局麻薬課に報告。

毛髪分析による薬物依存状態の診断に関する研究：
中原雄二，木倉瑠理

精神神経疾患研究（平成2年4月～平成3年3月），
平成3年3月厚生省国立精神・神経センターに報告。

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2年4月～平成3年3月），平
成3年3月厚生省薬務局新医薬品課に報告。

*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

バイオテクノロジー応用医薬品の有効性・安全性等
に関する規制と国際的ハーモナイゼーションの研
究：野島庄七*¹，林 祐造，早川堯夫，赤松 穰*²，
山内一也*³，豊島 聡*⁴

厚生科学研究（平成2年4月～平成3年3月），平
成3年3月厚生省薬務局新医薬品課に報告。

*¹ 帝京大学薬学部

*² 国立予防衛生研究所

*³ 東京大学医科学研究所

*⁴ 東京大学薬学部

細胞毒性試験：医療材料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，
秦 英代

厚生科学研究（昭和63年4月～平成3年3月），平
成3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2年4月～平成3年3月），平成
3年7月環境庁大気保全局自動車公害課に報告。

HPLCによる水中の農薬類の試験方法：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2年4月～平成3年3月），
平成3年3月厚生省生活衛生局水道環境部水道整備
課に報告。

水道用塗料の安全性に関する研究：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2年4月～平成3年3月），
平成3年3月厚生省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，関田 寛，神野透人，武田明治

厚生省科学研究費（平成2年4月～平成3年3月），
平成3年3月厚生省生活衛生局水道環境部水道整備
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2年
4月～3年3月），平成3年3月厚生省生活衛生局食
品化学課に報告。

照射食品の検知法に対する国際的な情報収集ならび
に研修・研究報告：内山貞夫

原子力関係在外研究（平成2年5月～8月），平成
2年10月科学技術庁原子力局調査国際協力課ならび
に厚生省生活衛生局食品保健課に報告。

輸入雑豆及び加工品中のシアン配糖体の分析法に関する調査及び研究報告書：河村葉子，内山貞夫，齋藤行生
厚生科学研究（平成2年4月～3年3月），平成3年4月厚生省生活衛生局食品保健課に報告。

国内産きのこの放射能に関する調査報告書：河村葉子，村山三徳，内山貞夫，齋藤行生
食品等試験検査費（平成3年2月～3年3月），平成3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：齋藤行生，村山三徳，内山貞夫，宮原 誠，鈴木 隆，田辺弘也*

輸入食肉・養殖魚介類安全確保対策費（平成2年12月～3年3月），平成2年10月厚生省生活衛生局乳肉衛生課に報告。

* 相模女子大学

合成抗菌剤の一斉分析法に関する報告書：村山三徳，内山貞夫，齋藤行生

輸入食肉・養殖魚介類安全確保対策費（平成2年12月～3年3月），平成2年12月厚生省生活衛生局乳肉衛生課に報告。

平成2年度輸入食肉残留合成抗菌剤等モニタリング報告書：村山三徳，河村葉子，内山貞夫，齋藤行生
輸入食肉・養殖魚介類安全確保対策費（平成2年12月～3年3月），平成3年4月厚生省生活衛生局乳肉衛生課に報告。

食品添加物の有用性に関する調査－臭素酸カリウムの有効性について：山田 隆，山本 都，義平邦利
食品添加物有用性等調査費（平成2年4月～3年3月），平成3年3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に関する調査－過硫酸アンモニウムの有効性について：山田 隆，山本 都，義平邦利

食品添加物有用性等調査費（平成2年4月～3年3月），平成3年3月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

グレープフルーツ中のチアベンダゾール（TBZ）

の分析：山田 隆，鈴木 隆，武田由比子，川崎洋子，山本 都，山崎 壮，義平邦利
食品添加物規格基準設定費（平成2年4月～3年3月），平成3年3月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

亜硫酸塩の海産甲殻類への使用と分析法に関する研究：山崎 壮，義平邦利
食品添加物規格基準設定費（平成2年4月～3年3月），平成3年5月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

食品添加物分析法の改良－新しい規格・試験法の開発及び適用－食用赤色40号の純度試験について：武田由比子，神蔵美枝子，義平邦利

食品添加物規格基準設定費（平成2年4月～3年3月），平成3年5月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

米国产フルーツカクテル缶詰中のカルミン使用さくらんぼの検討：米谷民雄，合田幸広，義平邦利

食品添加物規格基準設定費（平成2年4月～3年3月），平成3年3月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

天然添加物カラギーナン中のヒ素含量及びヒ素代謝研究へのHPLC-ICP法の応用：義平邦利，米谷民雄

食品添加物安全性再評価費（平成2年4月～3年3月），平成3年3月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

カラギーナン中のアルミニウムを含む多元素の分析及びアルミニウムの体内挙動に及ぼす共存有機酸の影響：義平邦利，米谷民雄

食品添加物安全性再評価費（平成2年4月～3年3月），平成3年3月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

食品添加物の国際的安全対策に関する調査研究：義平邦利，山本 都

厚生科学研究（平成2年4月～平成5年3月），平成3年3月厚生省生活衛生局食品化学課に中間報告。

陶磁器からの鉛の溶出：石綿 肇，杉田たき子，義

平邦利

食品等の規格基準の設定等に係わる試験検査費（平成元年4月～2年3月）、平成2年5月厚生省生活衛生局食品保健課に報告。

プラスチック製品および食品中のテトラメチルサクシノニトリルの試験検査について：石綿 肇，杉田たき子，義平邦利

食品添加物安全性再評価等の試験検査費（平成2年4月～2年10月）、平成2年11月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

陶磁器からのカドミウムの溶出：石綿 肇，杉田たき子，義平邦利

食品等の規格基準の設定等に係わる試験検査費（平成2年4月～3年2月）、平成3年3月厚生省生活衛生局食品保健課に報告。

Final report in analytical chemistry for food additives and contaminants：Ishiwata, H.

（平成2年8月～10月）、平成2年10月、Export Control and Inspection System for Food and Agricultural Products Project, FAO/UNDPに報告。

フィリピン国食品医薬品検定センタープロジェクトにおける食品衛生（器具・容器包装）に関する技術協力：石綿 肇

（平成2年12月～平成3年2月）、平成3年2月、国際協力事業団に報告。

レトリプトファンの食品添加物規格試験検査：義平邦利，山田 隆，米谷民雄，石綿 肇，武田由比子，川崎洋子，山本 都，山崎 壮，佐藤恭子，岩上敏

食品添加物安全性再評価等の試験検査費（平成2年6月）平成2年6月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

日本薬局法の国際化方策及び基盤整備に関する研究：寺尾允男，内山 充，綱川延孝*1，矢敷孝司*2
厚生科学研究（平成2年4月～3年3月）、平成3年3月厚生省薬務局安全課に報告。

*1 東京医薬品工業協会技術委員会

*2 大阪医薬品協会技術研究委員会

ビストリ-n-ブチルスズフタレートの代謝試験：嶺岸謙一郎，高橋 惇

既存化学物質委託費（平成元年4月～2年3月）、平成2年8月厚生省生活衛生局化学安全対策室へ報告。

食品添加物安息香酸ナトリウム塩（Na）とカリウム塩（K）のラットにおける代謝研究：高橋 惇，紅林秀雄，高橋昭江

食品等試験検査費（昭和60年～平成元年）、平成2年9月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

塩化メチレンの代謝試験に関する報告書：高橋 惇
既存化学物質委託費（平成2年9月～平成3年4月）、平成3年5月厚生省生活衛生局生活化学安全対策室へ報告。

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）：高橋 惇，鈴木和博，奥平和穂

厚生科学研究（平成2年4月～平成3年3月）、平成3年4月厚生省生活衛生局生活化学安全対策室へ報告。

無菌性，非発熱性の確認のための各種品質試験の利用等に関する研究：棚元憲一，配島由二，石関忠一，三瀬勝利

厚生科学研究費（平成2年4月～3年3月）、平成3年4月厚生省薬務局監視指導課に報告。

バイオ食品の安全性に関する研究：三瀬勝利

食品等試験検査費（平成2年1～3月）、平成2年4月厚生省生活衛生局食品保健課に報告。

エイズ医薬品候補スクリーニング研究（平成元年度）：三瀬勝利

ヒューマンサイエンス振興財団（平成元年4月～平成2年3月）、平成2年4月厚生省薬務局へ報告。

微生物農薬の安全性評価法の確立調査（平成元年度）：三瀬勝利，須藤隆一*1，北村 敬*2，岡 基*3，湊 一*3，都留信也*4

三菱化成安全科学研究所（平成元年4月～平成2年3月）、平成2年3月環境庁土壌農薬課へ報告。

*1 東北大学工学部

*2 国立予防衛生研究所

*3 家畜衛生試験所

*4 熱帯農業研究センター

「食品中の有害物質等に関する研究」輸入農作物のアフラトキシン汚染と残留臭素に関する研究：一戸正勝，諸角 聖*1，高橋治男*2，上村 尚*1
厚生科学研究（平成2年4月～平成3年3月），平成3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

細菌性食中毒防止のための基礎的サーベイ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，丹野憲二*5
厚生科学研究（昭和62年4月～平成3年3月），平成3年4月厚生省生活衛生局食品保健課に報告。

*1 神奈川県立衛生研究所

*2 岩手大学農学部

*3 静岡県立衛生環境センター

*4 名古屋市立衛生研究所

*5 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，徳丸雅一*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3年3月），平成3年4月厚生省生活衛生局乳肉衛生課に報告。

*1 日本大学農獣医学部

*2 新潟県立衛生公害研究所

*3 岩手県立衛生研究所

*4 岩手大学農学部

*5 埼玉県立衛生研究所

*6 静岡県立衛生環境センター

*7 国際学院短期大学

卵のサルモネラ汚染に関する調査研究：熊谷 進*1，小沼博隆，仲西寿男*2
厚生科学研究（昭和63年4月～平成3年3月），平成3年4月厚生省生活衛生局乳肉衛生課に報告。

*1 国立予防衛生研究所

*2 神戸市立環境保健研究所

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，戸部益夫，香川 順*2，関沢 純，金子豊蔵，加藤正信*3，八十川欣勇*4
厚生科学研究報告（平成2年4月～3年3月），平

成3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 三菱化成安全科学研究所

*4 日本海事検定協会

乱用薬物鑑定法整備に関する研究：関田清司，落合敏秋，高木篤也，村上 治，降矢 強，黒川雄二
厚生科学研究（平成2年8月～3年1月），平成3年3月厚生省薬務局麻薬課に報告。

ジベンテンダイマーの慢性毒性に関する研究：小川幸男，鈴木幸子，安原加寿雄，斉藤 実，鎌田栄一，廣瀬明彦，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3年3月），平成3年4月厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室に報告。

5-フッ化プロパノールの急性吸入毒性に関する研究：廣瀬明彦，高田幸一，斉藤 実，鈴木幸子，小川幸男，金子豊蔵，黒川雄二
既存化学物質毒性試験調査費（昭和64年4月～平成3年3月），平成3年4月厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室に報告。

5-フッ化プロパノールの亜急性吸入毒性に関する研究：廣瀬明彦，高田幸一，斉藤 実，鈴木幸子，小川幸男，金子豊蔵，黒川雄二
既存化学物質毒性試験調査費（昭和64年4月～平成3年3月），平成3年4月厚生省生活衛生局企画課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法に関する研究：金子豊蔵，廣瀬明彦，山本由徳，小川幸男，鈴木幸子，黒川雄二，戸部満寿夫
厚生科学研究（昭和63年4月～平成3年3月），平成3年4月厚生省薬務局安全課に報告。

医薬品等に用いられるフロンの代替品に関する研究—医薬品への利用が期待される代替フロンの安全性について：金子豊蔵，青柳伸男，近藤雅臣*
厚生科学研究（昭和64年4月～平成3年3月），平成3年4月厚生省薬務局審査課に報告。

* 大阪大学

生分解性プラスチック分解生成物の安全性に関する研究：黒川雄二，金子豊蔵，長谷川隆一，石綿 肇，会田喜崇，廣瀬明彦，小川幸男，鈴木幸子
厚生科学研究（平成2年4月～平成3年3月），平成3年4月厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室に報告。

接着剤アクリル酸エテルの毒性に関する文献調査：川崎 靖，中路幸男，黒川雄二
家庭用品等調査研究費（平成2年4月～3年3月），平成3年3月厚生省生活衛生局生活化学安全対策室に報告。

可塑剤フタル酸ブチルベンジルの慢性毒性及び発がん性に関する文献調査：大野圭子，中路幸男，黒川雄二
厚生省家庭用品等調査研究費（平成2年4月～3年3月），平成3年3月厚生省生活衛生局生活化学安全対策室に報告。

加硫促進剤ジメチルカルバミン酸亜鉛の慢性毒性及び発がん性に関する文献調査：中路幸男，黒川雄二
厚生省家庭用品等試験検査費（平成2年4月～3年3月），平成3年3月厚生省生活衛生局生活化学安全対策室に報告。

グルタルアルデヒドの急性毒性に関する文献調査：大野圭子，中路幸男，黒川雄二
厚生省家庭用品等試験検査費（平成2年4月～3年3月），平成3年3月厚生省生活衛生局生活化学安全対策室に報告。

ベンジリアセートの慢性毒性及び発がん性に関する文献調査：中路幸男，黒川雄二
厚生省家庭用品等調査研究費（平成2年4月～3年3月），平成3年5月厚生省生活衛生局生活化学安全対策室に報告。

消毒副生成物（塩素化酢酸塩）の毒性（1）ジクロロ酢酸に関する文献調査報告：黒川雄二，長谷川隆一
水質管理調査費（平成2年4月～平成3年3月），平成3年4月厚生省生活衛生局水道環境部水道整備課に報告。

消毒副生成物（塩素化酢酸塩）の毒性（2）トリクロロ酢酸に関する文献調査報告：黒川雄二，長谷川隆一
水質管理調査費（平成2年4月～平成3年3月），平成3年4月厚生省生活衛生局水道環境部水道整備課に報告。

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—短期毒性試験法の長期毒性予測性に関する研究（1）非形態学的指標の検討：戸部満寿夫，黒川雄二，長谷川隆一，佐井君江，小川幸男，金子豊蔵，鈴木幸子，高田幸一，鎌田栄一
厚生科学研究補助金（平成2年4月～平成3年3月），平成3年3月厚生省生活衛生局生活化学安全対策室に報告。

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—短期毒性試験法の長期毒性予測性に関する研究（2）形態学的指標の検討：黒川雄二，長谷川隆一，佐井君江，小川幸男，金子豊蔵，鈴木幸子，高田幸一，鎌田栄一
厚生科学研究補助金（平成2年4月～平成3年3月），平成3年3月厚生省生活衛生局生活化学安全対策室に報告。

生分解プラスチック分解生成物の安全性に関する研究—分解生成物の毒性評価：長谷川隆一，廣瀬明彦，小川幸男，鈴木幸子
厚生科学研究補助金（平成2年4月～平成3年3月），平成3年3月厚生省生活衛生局生活化学安全対策室に報告。

生分解プラスチック分解生成物の安全性に関する研究—生分解性ポリマーに関する情報：会田喜崇，鎌田栄一
厚生科学研究補助金（平成2年4月～平成3年3月），平成3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230号の（1）および青色204号のマウスの経皮急性毒性試験について：林 裕造，田中 悟，児玉幸夫
医薬品審査等業務庁費（平成2年4月～3年3月），平成3年5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 230 号の (1) および青色 204 号のウサギの経皮一次刺激性毒性試験について：林 裕造，田中悟，児玉幸夫
医薬品審査等業務庁費（平成 2 年 4 月～3 年 3 月），平成 3 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（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，會田喜崇，鎌田栄一
厚生科学研究（平成 2 年 4 月～平成 3 年 3 月），平成 3 年 3 月厚生省生活衛生局生活化学安全対策室に報告。

人体暴露量の予測（クロロホルム，1, 2-ジクロロエタン）：中館正弘
既存化学物質毒性試験調査費（平成 2 年 4 月～平成 3 年 3 月），平成 3 年 6 月厚生省生活衛生局生活化学安全対策室に報告。

OECD の最近の動向，特に既存化学物質総点検事業に於ける反復投与毒性及び生殖発生毒性併合試験（Repro Tox）について，化学物質の環境汚染に関する総合的研究：黒川雄二
環境庁公害防止等調査研究委託費（平成元年度），環境庁環境保健部保健調査室に報告。

Bis(tributyltin)phthalate のラットにおける催奇形性試験：川島邦夫，田中 悟，中浦楨介，高仲正
既存化学物質毒性試験調査費（昭和 62 年 4 月～平成 3 年 3 月），平成 3 年 4 月厚生省生活衛生局生活化学安全対策室に報告。

Bisphenol A のラットを用いた催奇形性試験：川島邦夫，宇佐見誠，高仲 正
既存化学物質毒性試験調査費（平成 2 年 4 月～平成 3 年 3 月），平成 3 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研究：高橋道人，豊田和弘
厚生科学研究（平成 2 年 4 月～3 年 3 月），平成 3 年 3 月厚生省薬務局審査課に報告。

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：林 裕造，高橋道人，今井田克巳，岡本直幸*1，佐藤秀隆*2
厚生科学研究（平成元年 4 月～2 年 3 月），平成 2 年 4 月厚生省薬務局安全課医薬品副作用情報室に報告。

*1 神奈川県がんセンター

*2 日本食品分析センター

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：松岡厚子，林 真，祖父尼俊雄
天然添加物安全性調査費（昭和 63 年 10 月～平成 3 年 3 月），平成 3 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
水質管理強化対策費（昭和 63 年 10 月～平成 3 年 3 月），平成 3 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：山田雅巳，渡辺雅彦，松井道子，松井恵子，能美健彦，祖父尼俊雄，(2) 哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験：松岡厚子，林 真，祖父尼俊雄
既存化学物質毒性試験調査費（昭和 63 年 5 月～平成 3 年 3 月），平成 3 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
労働省依託研究費（昭和 63 年 6 月～平成 3 年 3 月），平成 3 年 5 月労働省化学物質調査課に報告。

リスクアセスメント手法等の改善と確立に関する研究：林 真，松岡厚子，祖父尼俊雄
厚生科学研究（昭和 63 年 4 月～平成 3 年 3 月），平成 3 年 4 月厚生省生活衛生局生活化学安全対策室に報告。

医療用具及び医用材料の毒性試験体系の確立に関する研究：祖父尼俊雄

厚生科学研究 (昭和 63 年 4 月～平成 3 年 3 月), 平成 3 年 3 月厚生省薬務局審査第二課に報告。

食品由来成分の含有レベル調査研究—食品中の安息香酸の自然含有量調査研究 (その 1): 伊藤誉志男, 柴田 正, 辻 澄子

食品添加物規格基準設定費 (平成 2 年 4 月～平成 3 年 3 月), 平成 3 年 4 月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

食用タール色素, 製剤試験法の改良研究—食用タール色素における乾燥減量試験法とカールフィシャー法の比較検討: 伊藤誉志男, 柴田 正, 辻 澄子, 柿内 雅, 川本礼子

食品添加物規格基準設定費 (平成 2 年 4 月～平成 3 年 3 月), 平成 3 年 4 月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

日本人の食品添加物一日摂取量調査研究—加工食品原料中の天然由来物質 (B 群) の摂取量・予試験総合まとめ: 伊藤誉志男, 柴田 正, 辻 澄子

食品添加物規格基準設定費 (平成元年 4 月～平成 2 年 3 月), 平成 3 年 4 月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

日本人の食品添加物一日摂取量調査研究—加工食品原料中のグリセリン脂肪酸エステル, 硝酸及び亜硝酸の摂取量・本試験: 伊藤誉志男, 柴田 正, 辻 澄子

食品添加物規格基準設定費 (平成 2 年 4 月～平成 3 年 3 月), 平成 3 年 5 月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

残留農薬分析法の確立—食品中のジスルホトンの定量法の確立: 伊藤誉志男, 外海泰秀, 中村優美子, 長谷川ゆかり

国内登録農薬衛生対策費 (平成 2 年 4 月～9 月), 平成 2 年 5 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の消長移行等調査研究—サクラランおよびその加工品におけるポストハーベスト農薬の残留に関する研究: 伊藤誉志男, 外海泰秀, 中村優美子, 長谷川ゆかり

収穫後使用農薬衛生対策推進費 (平成 2 年 4 月～平成 3 年 3 月), 平成 2 年 12 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の消長移行等調査研究—ばれいしょからでんぷんを製造する際のポストハーベスト農薬の残留に関する研究: 伊藤誉志男, 外海泰秀, 中村優美子, 長谷川ゆかり

収穫後使用農薬衛生対策推進費 (平成 2 年 4 月～平成 3 年 3 月), 平成 3 年 5 月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

食品添加物有用性調査研究—クエン酸イソプロピルおよびエチレンジアミン四酢酸塩の有効性に関する研究: 伊藤誉志男, 柴田 正, 辻 澄子

食品添加物有用性等調査費 (平成 2 年 9 月～平成 3 年 3 月), 平成 3 年 5 月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

残留農薬分析法の確立—7 種ピレスロイド系農薬の一斉分析法の確立: 伊藤誉志男, 外海泰秀, 中村優美子, 長谷川ゆかり

食品残留農薬基準設定費 (平成 2 年 4 月～平成 3 年 3 月), 平成 2 年 7 月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

動植物由来の食品添加物の規格化に関する研究 (その 1): 伊藤誉志男, 柴田 正, 辻 澄子

厚生科学研究 (平成 2 年 11 月～平成 3 年 5 月), 平成 2 年 12 月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

動植物由来の食品添加物の規格化に関する研究 (その 2): 伊藤誉志男, 柴田 正, 辻 澄子

厚生科学研究 (平成 2 年 11 月～平成 3 年 5 月), 平成 3 年 4 月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

化学的合成品以外の食品添加物成分の同定に関する研究—加工食品中の α -アミラーゼの分析法の確立: 伊藤誉志男, 柴田 正, 辻 澄子

厚生科学研究 (平成 2 年 4 月～平成 3 年 3 月), 平成 3 年 5 月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

輸入食品の安全性確保に関する調査研究—輸入食品検査における高度機器の利用: 伊藤誉志男, 外海泰秀, 中村優美子, 長谷川ゆかり

厚生科学研究 (平成 3 年 1 月～3 月), 平成 3 年 4 月厚生省生活衛生局食品保健課に報告

青柳伸男, 鹿庭なほ子, 香取典子, 武田 寧: 日局製剤の溶出試験による実態調査とバイオアベイラビリティの予測

第27回全国衛生化学技術協議会 (1990.10)

青柳伸男: 生物薬剤学的評価技術における *in vitro* 試験

第5回日米生物薬剤学シンポジウム (1990.7)

鹿庭なほ子, 小室徹雄, 青柳伸男, 武田 寧, 緒方宏泰*: 市販製剤の溶出速度 (1) Convolution 法による生物学的非同等性の予測

日本薬学会第110年会 (1990.8)

* 明治薬科大学

小室徹雄, 鹿庭なほ子, 青柳伸男, 武田 寧: 市販製剤の溶出速度 (2)

日本薬学会第110年会 (1990.8)

青柳伸男, 鹿庭なほ子, 小室徹雄, 武田 寧: 市販製剤の溶出速度 (3)

日本薬学会第110年会 (1990.8)

香取典子, 青柳伸男, 武田 寧: Deconvolution による吸収挙動推定の信頼性の評価

日本薬学会第110年会 (1990.8)

Yoshioka, S.: Effect of Moisture on Solid State Stability of Pharmaceuticals

Faraday Division Symposium, Annual Chemical Congress of the Royal Society of Chemistry, UK (1990.4)

阿曾幸男, 吉岡澄江, 武田 寧: 生分解性高分子マトリックス中におけるフロモキセフ, AraC およびエトポシドの分解

第110回日本薬学会年会 (1990.8.)

伊豆津健一, 吉岡澄江, 武田 寧: 固体状態の酵素の安定性に対する糖などの影響

第110回日本薬学会年会 (1990.8.)

吉岡澄江, 伊豆津健一, 阿曾幸男, 武田 寧: タン

パク質変性の速度論と酵素製剤の安定性 (2)

第110回日本薬学会年会 (1990.8.)

泉川 智, 吉岡澄江, 武田 寧, 内山 充: ポリ乳酸マイクロスフェアの物性と溶出性

第110回日本薬学会年会 (1990.8.)

吉岡澄江, 泉川 智, 阿曾幸男, 武田 寧: 生分解性高分子マイクロスフェアの薬物放出性に及ぼす結晶化度の影響とその安定性

第6回日本薬剤学会年会 (1990.9.)

Aso, Y., Kishida, A., Izumikawa, S., Yoshioka, S. and Takeda, Y.: Polymer Degradation and Drug Stability in Biodegradable Polymer Matrices

NUS-JSPS Seminar, Recent Developments in Pharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Japan (1990.10.)

阿曾幸男, 吉岡澄江, 武田 寧: ¹⁷ONMR 緩和時間測定による数種の医薬品添加物と水分子の相互作用の検討

第111回日本薬学会年会 (1991.3.)

吉岡澄江, 阿曾幸男, 武田 寧: ゼラチンゲルにおける薬物の加水分解に関与する水の運動性について

第111回日本薬学会年会 (1991.3.)

石橋無味雄, 松田りえ子, 武田 寧, 一言日出樹, 田中龍夫: 日本薬局方 ヒ素試験法の改良

日本薬学会第110年会 (1990.8)

石橋無味雄, 豊岡利正, 武田 寧: ヒ素試験法の改良

第27回全国衛生化学協議会年会 (1990.10)

Carlson, R. G.*, Toyo'oka, T., Chokshi, H. P.*, Givens, R. S.* and Lunte, S. M.*: Oxazole-based fluorescent tagging reagents for the analysis of amines and thiols using high-performance liquid chromatography

Fourteenth International Symposium on Column Liquid Chromatography, Boston, U.S.A. (1990.5)

* University of Kansas, U.S.A.

豊岡利正, Richard S. Givens,* Robert G. Carlson,* and Susan M. Lunte*: 新規合成 Diphenyloxazole 発蛍光試薬を用いたアミノ酸の HPLC-化学発光分析

生物発光化学発光研究会, 第5回学術講演会 (1990.6)

* University of Kansas, U.S.A.

豊岡利正, Robert G. Carlson,* Richard S. Givens,* Susan M. Lunte,* and Theodore Kuwana*: 新規合成 Diphenyloxazole 誘導体(DIFOX, SAOX-Cl)の蛍光試薬

日本薬学会第110年会 (1990.8)

* University of Kansas, U.S.A.

豊岡利正, 石橋無味雄, 武田 寧, 今井一洋*: カルボン酸蛍光試薬の開発

日本薬学会第111年会 (1991.3)

* 東京大学医学部附属病院分院

豊岡利正, 山崎 壯, 谷本 剛, 佐藤 恭子, 佐藤道夫, 豊田正武, 石橋無味雄, 義平邦利, 内山充: L-トリプトファン中の不純物について (1)

日本食品衛生学会 第61回学術講演会 (1991.5)

中原雄二, 高橋一徳, 武田 寧: 薬物乱用歴推定のための毛髪分析 II. メトキシフェナミンの頭髪中の移動と安定性

日本薬学会第110年会 (1990.8)

高橋一徳, 武田 寧, 中原雄二: 薬物乱用歴推定のための毛髪分析 III. 覚せい剤類緑物質のヒゲへの排泄について

日本薬学会第110年会 (1990.8)

石上暁子, 高橋一徳, 中原雄二, 武田 寧: 覚せい剤類緑物質デプレニールと覚せい剤の使用の識別に関する分析化学的研究

日本薬学会第110年会 (1990.8)

島峯望彦, 武田 寧, 中原雄二: フェネチルアミン系向精神薬の HPLC フォトダイオード検出による

一斉分析

日本薬学会第110年会 (1990.8)

関根 均*, 中原雄二: 覚せい剤喫煙成績体シアノメチルメタンフェタミンの尿中代謝物

日本薬学会第110年会 (1990.8)

* 埼玉県警・科捜研

木倉瑠理, 島峯望彦, 武田 寧, 中原雄二: 覚せい剤検体の起源解明に関する研究 I 覚せい剤原料と覚せい剤の光学組成の関係

日本薬学会第111年会 (1991.3)

中原雄二, 高橋一徳, 武田 寧: 薬物乱用歴推定のための毛髪分析 IV 毛髪中のカンナビノイド

日本薬学会第111年会 (1991.3)

池部 均*, 赤木好男*, 照林宏文*, 堤 元信*, 森和彦*, 糸井素一*, 川崎ナナ, 谷本 剛: 加齢に伴うラットガラクトース白内障の発症・進展について

第94回日本眼科学会総会 (1990.5)

* 京都府立医科大学

堤 元信*, 松本康宏*, 森 和彦*, 池部 均*, 照林宏文*, 赤木好男*, 谷本 剛: ガラクトース血症による先天性白内障

第94回日本眼科学会総会 (1990.5)

* 京都府立医科大学

川崎ナナ, 谷本 剛, 田中 彰: 電気化学検出 HPLC による鉄 (III) および鉄 (II) の定量

日本薬学会第110年会 (1990.8)

谷本 剛, 西村千尋*: アルドース還元酵素阻害剤の一次スクリーニングおよび *in vitro* 効力評価法の標準化

日本薬学会第110年会 (1990.8)

* 国立小児病院

谷本 剛, 太田美矢子, 田中 彰, 浦山貞治*: 新規アルドース還元酵素阻害剤としての PQQ 誘導体

日本薬学会第110年会 (1990.8)

* 三菱瓦斯化学

太田美矢子, 谷本 剛, 田中 彰: イヌの腎臓のア

ルドース還元酵素及びアルデヒド還元酵素の精製及び性状

日本薬学会第 110 年会 (1990. 8)

Nishimura, C.*¹, Matsuura, Y.*², Tanimoto, T., Yamaoka, T.*¹, Akera, T.*¹ and Flynn, T. G.*³: **cDNA Cloning and Expression of Human Aldose Reductase**

5th Internatinal Workshop on Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism, Indiana, USA (1990. 6)

*¹ 国立小児病院

*² 国立予防衛生研究所

*³ Queen's University, Canada

谷本 剛, 太田美矢子, 川崎ナナ, 田中 彰: **ウロキナーゼ製剤の簡易定量法とその問題点**

第 27 回全国衛生化学技術協議会年会 (1990. 10)

西村千尋*¹, 山岡 孝*², 松浦善治*³, 谷本 剛, 明楽 泰*¹: **ヒトアルドースリダクテースの部位特異的変異体の作製**

第 83 回日本薬理学会関東部会 (1990. 10)

*¹ 国立小児病院

*² 筑波大学医学部

*³ 国立予防衛生研究所

Nishimura, C.*¹, Yamaoka, T.*², Mizutani, M.*², Yamashita, K.*² and Tanimoto, T.: **Characterization of Recombinant Human Aldose Reductase Expressed in Baculovirus Insect Cell System**

US-Japan Aldose Reductase Workshop, Hawaii, USA (1991. 2)

*¹ 国立小児病院

*² 筑波大学医学部

Ohta, M., Tanimoto, T. and Tanaka, A.: **Purification and Characterization of Aldose Reductase and Related Enzyme from Dog Kidney**
US-Japan Aldose Reductase Workshop, Hawaii, USA (1991. 2)

Tanimoto, T., Ohta, M., Tanaka, A., Urakami, T.*¹, Itoh, C.*¹ and Nishimura, C.*²: **Novel Aldose Reductase Inhibitors, Oxazopyrroloquinoline**

Analogues

US-Japan Aldose Reductase Workshop, Hawaii, USA (1991. 2)

*¹ 三菱瓦斯化学

*² 国立小児病院

Akagi, Y.*¹, Terubayashi, H.*¹, Tsutsumi, M.*¹, Okamoto, S.*¹, Inatomi, T.*¹, Ikebe, H.*¹ and Tanimoto, T.: **Aldose Reductase Activity of the Epithelium in the Galactosemic Rat Lens**

US-Japan Aldose Reductase Workshop, Hawaii, USA (1991. 2)

* 京都府立医科大学

Nishimura, C.*¹, Yamaoka, T.*², Matsuura, Y.*³, Tanimoto, T. and Akera, T.*¹: **Sitedirected Mutagenesis of Human Aldose Reductase, Effect on Ki Values for Various Inhibitors**

第 64 回日本薬理学会総会 (1991. 3)

*¹ 国立小児病院

*² 筑波大学医学部

*³ 国立予防衛生研究所

宮原直子*, 春日井容子*, 大桃善明*, 田中千秋*, 谷本 剛: **オキサゾール誘導体の合成とアルドース還元酵素阻害活性**

日本薬学会第 111 年会 (1991. 3)

* 大阪薬科大学

太田美矢子, 谷本 剛, 田中 彰: **イヌ腎臓の NADPH 依存性アルデヒド還元酵素のアルドース還元酵素への変換**

日本薬学会第 111 年会 (1991. 3)

Hayakawa, T., Niimi, S. and Uchida, E.: **Control of Recombinant Human Growth Hormone-A View from Japan**

International Workshop on Growth Hormone Assay Methodology, U.K. (1990. 7)

下川誠太郎*¹, 西田好孝*¹, 山縣ゆり子*¹, 富田研一*¹, 西川 論*², 上杉晴一*¹, 内田恵理子, 早川 堯夫, 池原森男*³: **蛋白質工学によるヒト成長ホルモン受容体結合部位の検索**

第 63 回日本生化学会大会 (1990. 9)

- *1 大阪大学薬学部
 *2 微生物工業技術研究所
 *3 (株)蛋白質工学研究所

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成長ホルモン受容体のホルモンによる調節

第6回初代培養肝細胞研究会 (1990.6)

新見伸吾, 早川堯夫, 田中 彰: 初代培養ラット肝細胞における成長ホルモン受容体のグルコースによる調節

第63回日本生化学会大会 (1990.9)

友田 夫*¹, 白尾悦子*¹, 河崎一夫*¹, 山口照英, 新家敏弘*², 松本 勇*²: 老人性白内障水晶体の褐色物質の抽出と分析

第63回日本生化学会大会 (1990.9)

- *¹ 金沢大学医学部
 *² 金沢医大総医研

山本行男*, 山口照英, 赤松紀子*, 岩口孝雄*: 好中球の細胞障害性に及ぼす調節因子の解析

第63回日本生化学会大会 (1990.9)

* 東京都臨床医学総合研究所

山口照英, 早川堯夫, 内田恵理子, 田中 彰, 山本行男*: 単クローン抗体を用いたヒト好中球チトクローム b558 の細胞内存在様式の解明

析第63回日本生化学会大会 (1990.9)

* 東京都臨床医学総合研究所

山本行男*, 小谷政晴*, 山口照英, 岩口孝雄*: 好中球の抗腫瘍活性の調節因子について

第20回日本免疫学会総会 (1990.11)

* 東京都臨床医学総合研究所

小林 哲, 福岡正道, 田中 彰: インスリン EIA キット間のインスリン血中濃度測定値の違いに関する研究

日本薬学会第110年会 (1990.8)

福岡正道, 周 玉*, 田中 彰, 富田 勳*: 精巣障害に関する研究 その4. Dibutyl phthalate によ

るラット精巣萎縮について

日本薬学会第110年会 (1990.8)

* 静岡県立大学薬学部

福岡正道, 佐藤岳道*, 小林 哲, 田中 彰, 久保寺昭子*: テクネチウム (99mTc) 大凝集アルブミン (MAA) に関する基礎的研究

日本薬学会第110年会 (1990.8)

* 東京理科大学薬学部

高田幸一, 福岡正道, 内藤克司, 田中 彰, 黒川雄二, 戸部満寿夫: Tris-(2,3-dibromopropyl) phosphate による腎障害に関する研究. 代謝物の発ガン性について

日本薬学会第111年会 (1991.3)

清原 剛*, 小島周二*, 久保寺昭子*, 小林 哲, 福岡正道, 田中 彰: 腎診断薬の開発に関する研究 第9報

日本薬学会第111年会 (1991.3)

* 東京理科大学薬学部

原田正敏: 各国の伝統医薬製剤 医療における生薬製剤の現況

第6回国際東洋医学会 (1990.10)

原田正敏: 食物の中のくすり 天然物の生薬としての展開

日本生薬学会関西支部 平成2年度秋期講演会 (1990.11)

鎌倉浩之, 原田正敏: dl-ノルエフェドリンの体内動態に関する光学異性体の影響

日本薬学会第110年会 (1990.8)

関田節子, 鈴木明子, 成田紀子, 原田正敏, 宇田川俊一: *Penicillium marneffeii* から分離された polyketide 赤色色素の化学構造

日本薬学会第110年会 (1990.8)

坂元史歩*, 小藤早苗*, 黒柳正典*, 上野 明*, 関田節子: シロツメクサの成分研究

日本薬学会第110年会 (1990.8)

* 静岡県立大・薬

王殿升, 関田節子, 原田正敏, 鈴木明子, 成田紀子, 宇田川俊一: 胃病患者の胃液から分離した *Aspergillus versicolor* の sterigmatocystin の生産性
日本薬学会第 111 年会 (1991. 3)

鈴木英世, 原田正敏, 青柳伸男, 菅 忠三*, 森本梯次郎*: オウレンとその培養細胞の溶出試験について

日本生薬学会第 37 回年会 (1990. 11)

* 三井石化

鈴木英世, 原田正敏, Bambang Mursito: HPLC 法によるピンロウジ中の Arecoline, Arecaidine の分析

日本薬学会第 111 年会 (1991. 3)

横田洋一*¹, 江尻千鶴子*¹, 斉藤晴夫*¹, 今村陽子*², 秋元駿一*², 浅水敬子*², 新水康子*², 島谷隆夫*², 正川 仁*², 長島美由紀*², 藤田博子*², 宮村芳昌*², 森井一仁*², 吉田直樹*², 鈴木英世: センソの品質評価について

第 19 回生薬分析討論会 (1990. 9)

*¹ 富山県薬事研究所

*² 富山県薬事研究会分析部会

尾崎幸紘: 組織培養生成物の医薬利用に関する有効性の薬理的評価—紫根および黄連を例として—
第 23 回日薬学術大会 (1990. 11)

尾崎幸紘, 馬 建平*, 李 儀奎*, 原田正敏: ラット生体位の子宮自発運動における tetramethylpyrazine および ferulic acid の抑制作用の研究

第 64 回日本薬理学会総会 (1991. 3)

* 上海中医学院薬理学教室, 上海, 中国

小野景義, Giles, W. R.*: Calcitonin generelated peptide のモルモット単離心筋細胞に対する作用—電気生理学的検討

第 64 回日本薬理学会総会 (1991. 3)

* カルガリー大学医学部生理学教室, カルガリー, カナダ

川原信夫, 尾崎幸紘, 原田正敏: インドネシア産シヨウガ科植物の抗炎症作用とその活性成分の検討
日本薬学会第 111 年会 (1991. 3)

中村晃忠: 医用材料の前臨床試験について
人工股関節 (THP) 集中討議 (1990. 5)

中村晃忠, 小嶋茂雄, 新谷英晴, 伊佐間和郎, 川崎靖, 会田喜崇, 高田幸一, 中路幸男, 栗原正明, 内間高夫*, 藤巻正人*: MDI/PTMG/1, 4-BD 系ポリウレタンのラット皮下長期埋入の影響について
第 19 回医用高分子シンポジウム (1990. 6)

* 民生科学協会研究所

小嶋茂雄, 伊佐間和郎, 新谷英晴, 中村晃忠, 藤巻正人*, 内間高夫*: 生体内埋入によるポリウレタンの劣化—1-FT-IR/ATR 法による検討—

日本薬学会第 110 年会 (1990. 8)

* 民生科学協会研究所

伊佐間和郎, 小嶋茂雄, 中村晃忠: 生体内埋入によるポリウレタンの劣化—2-カルボニルの吸収強度の変化に基づく考察—

日本薬学会第 110 年会 (1990. 8)

小嶋茂雄, 伊佐間和郎, 中村晃忠: PTMG/MDI/1, 4-BD 系ポリウレタンの IR, DSC, X 線回折法による分析—モデル化合物を用いた基礎的検討—

第 12 回日本バイオマテリアル学会大会 (1990. 10)

二木史朗*¹, 矢上 健, 大家孝志*², 秋田 正*¹, 北川 幸己*¹: p-(Methylsulphonyl)-benzyl:Msib 基をセリン水酸基の保護基として用いる硫酸化チロシン含有ペプチドの新規合成法

第 16 回反応と合成の進歩シンポジウム (1990. 11)

*¹ 徳島大学薬学部

*² 日本チバガイギー(株)

Kaniwa, M., Momma, J., Ikarashi, Y., Kojima, S., Nakamura, A., Nakaji, Y., Kurakawa, Y., Kantoh, H.* and Itoh, M.*: Allergic contact dermatitis from rubber boots: investigation of causative chemicals by combination of patch tests (in patient and animal models) and chemical analysis

9th International Symposium on Contact Dermatitis, Stockholm, Sweden (1990. 5)

* 東邦大学医学部付属病院学会発表

Shono, M.*, Ezoe, K.*, Kaniwa, M., Ikarashi, Y., Kojima, S. and Nakamura, A.: **Allergic contact dermatitis from para-tertiary-butylphenol-formaldehyde resin in athletic tape**

9th International Symposium on Contact Dermatitis, Stockholm, Sweden (1990.5)

* 埼玉県済生会川口総合病院

鹿庭正昭, 伊佐間和郎, 小嶋茂雄, 中村晃忠, 有巢加余子*, 早川律子*: **繊維製品による接触皮膚炎事例の検討—ポリウレタン (スパンデックス) 中のUV吸収剤—**

第27回全国衛生化学技術協議会 (1990.10)

* 名古屋大学医学部付属病院分院

有巢加余子*, 荻野泰子*, 鈴木真理*, 松永佳世子*, 早川律子*, 鹿庭正昭: **テヌビンPによる接触皮膚炎の1例**

日本皮膚科学会中部支部学術大会 (1990.10)

* 名古屋大学医学部付属病院分院

斎藤すみ*¹, 平井善雄*¹, 池澤善郎*², 鹿庭正昭: **ズック靴による接触皮膚炎の1例**

第15回日本接触皮膚炎学会学術大会 (1990.11)

*¹ 横浜赤十字病院

*² 横浜市立大学医学部

市川素子*, 早川律子*, 松永佳世子*, 荻野泰子*, 有巢加余子*, 有馬八重野*, 鹿庭正昭: **肝斑様色素沈着を伴ったゴム皮膚炎**

第15回日本接触皮膚炎学会学術大会 (1990.11)

* 名古屋大学医学部付属病院分院

Tsuchiya, T., Ikarashi, Y., Toyoda, K., Uchima, T., Takahashi, M. and Nakamura, A.: **Toxicological evaluation for biomaterials: Status of RVNRL**

International Symposium on Radiation Technology in Biomedical Materials, Takasaki, Japan (1990.10)

土屋利江, 五十嵐良明, 中村晃忠: **細胞培養による *in vitro* 催奇形性試験法**

第4回日本動物実験代替法学会 (1990.10)

土屋利江, 五十嵐良明, 中村晃忠: **医用材料の細胞毒性試験 (2) Crystal violet 染色法による高感度微量迅速測定法**

日本薬学会第110年会 (1991.3)

秦 英代, 土屋利江, 五十嵐良明, 藤巻正人*, 中村晃忠: **医用材料の細胞毒性試験 (1) L929 細胞によるコロニー法と寒天重層法の比較**

日本薬学会第110年会 (1991.3)

* 民生科学協会研究所

五十嵐良明, 土屋利江, 中村晃忠, 田中憲穂*¹, 佐々木澄志*¹, 秦 英代*², 藤巻正人*², 佐藤温重*³: **細胞毒性試験の標準化: 標準試料の作成とそれを用いた各種試験法の比較**

第12回日本バイオマテリアル学会大会 (1990.10)

*¹ 食品薬品安全センター

*² 民生科学協会研究所

*³ 東京医科歯科大学

五十嵐良明, 土屋利江, 中村晃忠: **眼刺激性試験の代替: ニュートラルレッド細胞毒性試験**

日本動物実験代替法学会第4回大会 (1990.10)

五十嵐良明, 土屋利江, 中村晃忠: **金属アレルギーの末梢リンパ節検査による評価**

日本薬学会第111年会 (1991.3)

叶多謙蔵: **放電型サーモスプレイ方式 LC/MS 用プローブ・デバイスの作製**

日本化学会第60秋期年会 (1990.10)

叶多謙蔵: **プラズマスプレイ方式 LC/MS 用プローブ・デバイスの作製**

日本分析化学会第39年会 (1990.10)

Kanohta, K. and Matsukura, T.*: **On MSSMS/CD-ROM: Mass Spectra Search/Match System for PC98 Series**

The Third Japanese-German Workshop on Spectral Databases (1991.4)

* 三洋情報システムズ

新谷英晴, 中村晃忠: **放射線滅菌による医療用ポリウレタンの物性変化のメカニズムについて**

高分子学会 (1990. 12)

新谷英晴, 中村晃忠: 血清中に混入した発がん物質,
4,4'-メチレンジアニリンの固相抽出ならびに逆
相分析について
薬学会 (1990. 11)

林 譲, 松田りえ子, 中村晃忠: 情報量に基づくク
ロマトグラムの分類
日本薬学会第 110 年会 (1990. 8)

林 譲, 松田りえ子, 中村晃忠: 液体クロマトグラ
フィの情報理論 III. 定量精度と分析効率の研究
日本薬学会第 110 年会 (1990. 8)

林 譲, 松田りえ子: クロマト変数の情報理論的意
味
第 34 回液体クロマトグラフ研究会 (1991. 1)

林 譲, 松田りえ子: 液体クロマトグラフィ分析の
より精度の高い条件への方
日本薬学会第 111 年会 (1991. 3)

林 譲, 松田りえ子: 最適分離に対するピーク面積
の影響
第 8 回液体クロマトグラフィー春季討論会 (1991.
5)

松村年郎, 浅田 誠, 亀谷勝昭, 武田明治: 化学物
質による室内汚染 (1) パラジクロロベンゼンの測
定法について
第 31 回大気汚染学会 (1991. 11)

松村年郎, 浅田 誠, 亀谷勝昭, 武田明治: 化学物
質による室内汚染 (2) パラジクロロベンゼンの個
人暴露および室内濃度について
第 31 回大気汚染学会 (1991. 11)

松村年郎, 亀谷勝昭, 武田明治: 化学物質による室
内汚染 (3) ホルムアルデヒドの個人モニタリング
法について
第 31 回大気汚染学会 (1991. 11)

木嶋敬二, 渡辺四男也*, 鈴木助治*, 石野正蔵*,
永山富雄*, 原田裕文*, 廣田 博*, 岩倉良平*, 澤

村邦夫*, 高松 翼*, 西島 靖*, 平松 功*: 香粧
品試験法 紫外線吸収剤
日本薬学会第 111 年会 (1991. 3)

* 日本薬学会 衛生化学調査委員会 香粧品試験
法専門委員会

木嶋敬二, 齊藤恵美子, 武田明治, 田頭朋子: 培養
表皮モデルを用いた香粧品原料の評価法 (1)
日本薬学会第 111 年会 (1991. 3)
* 北里大学衛生学部

Kijima, K., Saitou, E., Watanabe, Y.*¹, Nagasa-
wa, T.*² and Takeda, M: Simple and rapid deter-
mination of effective ingredients in cosmetic
products by HPLC

16th International Federation of Societies Cos-
metic Chemists, New York, USA (1990. 10)

*¹ Tokyo Metropolitan Research Laboratory
of Public Health

*² Tokyo College of Pharmacy

木嶋敬二, 齊藤恵美子, 渡辺四男也*¹, 永山富雄*²,
武田明治: 高速液体クロマトグラフィーによる化粧
品中の有用成分の簡易迅速測定法
日本化粧品技術者会 IFCC 発表論文報告会 (1991.
3)

*¹ 東京都立衛生研究所

*² 東京薬科大学

神野透人, 関田 寛, 安藤正典, 武田明治: 希土類
元素 La, Ce および Nd の初代培養ラット肝細胞に
対する影響
日本薬学会第 110 年会 (1990. 8)

関田 寛, 神野透人, 安藤正典, 武田明治: 水道水
中の非意図的変異原物質の濃縮方法の検討
日本薬学会第 110 年会 (1990. 8)

安藤正典, 武田明治: 厚生省通知に示した水道水中
のゴルフ場使用農薬の測定方法の開発の経過
第 27 回全国衛生化学技術協議会年会 (1990. 10)

安藤正典, 武田明治: 水道水質基準改定検討項目と
しての低沸点有機化合物の測定方法について
第 27 回全国衛生化学技術協議会年会 (1990. 10)

安藤正典：水中汚染化学物質のバイオアッセイ系の現状と問題点—有機塩素系化合物、塩素処理生成物を中心として—

第24回水質汚濁研究会 (1991.3)

畑野和広*, 神野透人, 関田 寛, 安藤正典, 武田明治：水道水の変異原性に対する残留塩素の影響

日本薬学会第111年会 (1991.3)

* 福岡市水道局

神野透人, 関田 寛, 安藤正典, 武田明治, 竹本晴子*：水道水 XAD 濃縮物による初代培養ラット肝細胞の傷害

日本薬学会第111年会 (1991.3)

* 東京理科大学薬学部

神野透人, 関田 寛, 安藤正典, 武田明治, 竹本晴子*：水道水の変異原性と肝細胞傷害性

日本薬学会第111年会 (1991.3)

* 東京理科大学薬学部

関田 寛, 神野透人, 安藤正典, 武田明治：La 連続投与におけるラットの Ca 及び P 代謝に及ぼす影響

日本薬学会第111年会 (1991.3)

鈴木 隆：日本における食品汚染物に関する最近の諸問題について

韓国食品衛生学会 (1990.8)

鈴木 隆, 佐々木久美子, 石坂 孝, 斎藤行生：有機スズ化合物の分析法および塩化ジブチルスズのラットによる代謝

第16回環境汚染物とそのトキシコロジーシンポジウム (1990.11)

宮原 誠, 鈴木 隆, 斎藤行生：種々の検出器の組み合わせによる農薬のガスクロマトグラフィー

日本薬学会第110年会 (1990.8)

宮原 誠, 鈴木 隆, 斎藤行生：塩素系農薬分析に用いられる脱脂用含水ドライカラムの再現性について

日本薬学会第111年会 (1991.3)

松田りえ子, 林 譲, 石橋無味雄, 武田 寧：ロボットによる溶出試験の自動化

日本薬学会第110年会 (1990.8)

松田りえ子, 林 譲, 鈴木 隆, 斎藤行生：Short column の定量分析における有用性

日本分析化学会第39年会 (1990.10)

岩木和夫*¹, 山崎満*¹, 二村典行*², 木下俊夫*², 松田りえ子, 林 譲：情報量 FUMI による光学分割固定相の評価

第34回液体クロマトグラフ研究会 (1991.1)

*¹ 北陸大学薬学部

*² 北里大学薬学部

松田りえ子, 河村葉子, 内山貞夫, 鈴木 隆, 斎藤行生：発芽による玄米及び玄麦の γ 線照射判別における多変量解析法的应用

日本食品衛生学会第61回学術講演会 (1991.5)

松田りえ子, 鈴木 隆, 斎藤行生, 大森秀昭*¹, 鄭榮鎬*²：高速液体クロマトグラフィーによる食品中のイマザリルの分析

日本食品衛生学会第61回学術講演会 (1991.5)

*¹ 広島市衛生研究所

*² 大韓民国国立捜査研究所

Uchiyama, S., Kawamura, Y., Toyo'oka, T, Murayama, M. and Saito, Y.: Analytical detection methods for irradiated food using ESR measurements, germination and other methods

First Research Co-ordination Meeting on Analytical Detection Methods for Irradiation Treatment of Foods, Poland (1990.5)

内山貞夫：照射食品の検知法に関する国際的動向

日本食品照射研究協議会 (1990.11)

内山貞夫, 杉木愛子*, 河村葉子, 村山三徳, 斎藤行生：ESR による照射シナモンとオールスパイスの検知法の研究

日本食品衛生学会第61回学術講演会 (1991.5)

* 共立薬科大学

河村葉子, 内山貞夫, 斎藤行生：玄米及び玄麦の発

芽に及ぼすγ線照射の影響

日本食品衛生学会第 59 回学術講演会 (1990. 5)

河村葉子, 内山貞夫, 斎藤行生, 引地志香*¹, 丸山浩治*²: シアン配糖体ーリナマリン直接分析と調理加工における減衰

日本食品衛生学会第 61 回学術講演会 (1991. 5)

*¹ 昭和大学薬学部*² (財)日本穀物検定協会

村山三徳, 内山貞夫, 斎藤行生: 畜水産食品に残留する動物用薬品の一斉分析法について

日本食品衛生学会第 60 回学術講演会 (1990. 9)

橋本英明*, 渡辺あけみ*, 高木加代子, 豊田正武, 斎藤行生: 酵母のセルレニン耐性遺伝子のクローニング

日本農芸化学会 1991 年度大会 (1991. 3)

* ニッカウキスキー(株)

山本 都, 山田 隆, 義平邦利, 川島邦夫, 田中悟, 高仲 正: HPLC-電気化学検出器 (ECD) を用いた生体試料からの BHA の高感度分析

日本薬学会第 110 年会 (1990. 8)

山崎 壮, Hector E. Flores*, 下村講一郎, 義平邦利: ステビアの組織培養によるステビオール配当体の生産

日本薬学会第 110 年会 (1990. 8)

* Pennsylvania State University, U.S.A.

米谷民雄, 義平邦利: ヒ素とセレンの生体内相互作用に対する亜鉛前投与の影響

日本薬学会第 110 年会 (1990. 8)

馬場二夫*, 岡本章良*, 福島正則*, 森田 茂*, 石綿 肇, 杉田たき子: 陶磁器食器溶出金属の ICP による多元素同時分析

日本薬学会第 110 年会 (1990. 8)

* 大阪環境科学研究所

杉田たき子, 石綿 肇, 前川昭男*: メラミンの衛生化学的研究 V. ラット消化管におけるメラミンの分布, 吸収, および尿中排泄

日本食品衛生学会第 60 回学術講演会 (1990. 9)

* 東京農業大学

杉田たき子, 石綿 肇, 小崎道雄*, 前川昭男*: メラミンの衛生化学的研究 VI. 微生物の増殖に及ぼすメラミンの影響

日本食品衛生学会第 60 回学術講演会 (1990. 9)

* 東京農業大学

Ishiwata, H.: Migration of melamine from tableware and its biological effects

Joint Meeting of Department of Medical Science and National Institute of Health, Thailand (1990. 10)

Hizo, C. B.*, Ong, A. M.*, Martin, R. E.* and Ishiwata, H.: Migration of monomers from melamine tableware

Echo-Seminar on the Food and Drugs Laboratories Project, Philippines (1991. 1)

* Bureau of Food and Drugs, Philippines

荒井永恵*, 石綿 肇, 杉田たき子: 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によるメラミンおよびその関連化合物の分析

第 36 回防衛衛生学会 (1991. 2)

* 陸上自衛隊衛生補給処

西島基弘*, 伊藤誉志男, 上条昌弥*, 白石隆幸*, 中岡正吉*, 成田弘子*, 本間 浩*, 宮田政明*, 宮本文夫*, 山田 隆: 保存料: 高速液体クロマトグラフィーによる定性および定量

日本薬学会第 111 年会 (1991. 3)

* 日本薬学会 衛生試験法部会 食品添加物専門委員会

西島基弘*, 伊藤誉志男, 上条昌弥*, 白石隆幸*, 中岡正吉*, 成田弘子*, 本間 浩*, 宮田政明*, 宮本文夫*, 山田 隆: 酸化防止剤: 高速液体クロマトグラフィーによる定性および定量

日本薬学会第 111 年会 (1991. 3)

* 日本薬学会 衛生試験法部会 食品添加物専門委員会

合田幸広, 義平邦利, L. J. Marnett*: LC-EC によ

るマロンジアルデヒド DNA 付加物の検出

日本薬学会第 111 年会 (1991.3)

* Vanderbilt University

鈴木淳子, 合田幸広, 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 104 号中の臭化物の定量**

日本食品衛生学会第 61 回学術講演会 (1991.5)

川崎洋子, 合田幸広, 義平邦利: **天然色素の研究 XIII 食品中のアカネ着色料の分析について**

日本食品衛生学会第 61 回学術講演会 (1991.5)

合田幸広, 鈴木淳子, 佐藤恭子, 義平邦利, 内山充: **レトリプトファン中の不純物について (2)**

日本食品衛生学会第 61 回学術講演会 (1991.5)

武田由比子, 神蔵美枝子, 義平邦利, 柴田 正, 伊藤誉志男: **食用赤色 40 号の純度試験について (1) 低スルホン化副成色素および高スルホン化副成色素の液体クロマトグラフィー**

日本食品衛生学会第 61 回学術講演会 (1991.5)

邢大業, 米谷民雄, 寺井里枝, 義平邦利: **食品添加物関連のアルミニウム分析への ICP の応用—特に超音波ネブライザーの有用性について—**

日本食品衛生学会第 61 回学術講演会 (1991.5)

佐藤恭子, 米谷民雄, 義平邦利: **セイヨウアカネ毛状根へのヒ素の移行に関する研究**

日本食品衛生学会第 61 回学術講演会 (1991.5)

Miyata, N., Sakai, A. and Kamiya, S.: **Chemical properties of quinone metabolites from BHA (an antioxidant) related to the generation of active oxygen species**

The 5th biennial meeting of the international society for free radical research, Pasadena, USA (1990.11)

Miyata, N.: **Synthesis and mutagenic properties of dinitrobenzo[*a*]pyrenes and their analogs**

NIH Oxidation Mechanism Seminar, Bethesda, USA (1990.11)

宮田直樹, 神谷庄造: **抗酸化剤 BHA の化学: キノン代謝物の還元性について**

日本薬学会第 110 年会 (1990.8)

丹野雅幸, 末吉祥子, 神谷庄造: **非酸性条件下 N-ニトロソ尿素類によるアニリン類の脱アルキル化とトランスニトロソ化**

日本薬学会第 110 年会 (1990.8)

末吉祥子, 丹野雅幸, 宮田直樹, 神谷庄造, 山口健太郎*: **ニトロソ尿素類における N-NO 解裂とジアゾエステル転移反応の制御**

日本薬学会第 110 年会 (1990.8)

* 昭和大学

栗原正明, 宮田直樹, 神谷庄造: **プロキラル中心を有する対称ジケトンの不斉アセタール化 (3)**

日本薬学会第 110 年会 (1990.8)

福原 潔, 宮田直樹, 神谷庄造: **6-アザベンツピレンの合成**

日本薬学会第 110 年会 (1990.8)

宮田直樹, 福原 潔, 神谷庄造: **ニトロアレーンの化学 (第 4 報) ジニトロアレーン類の還元特性について**

日本薬学会第 111 年会 (1991.3)

福原 潔, 宮田直樹, 神谷庄造: **ニトロアレーンの化学 (第 5 報) ジニトロアレーン類の酸化反応について**

日本薬学会第 111 年会 (1991.3)

末吉祥子, 丹野雅幸, 神谷庄造: **N-ニトロソ尿素による置換アニリン類の脱アルキルのトランスニトロソ化とニトロ化**

日本薬学会第 111 年会 (1991.3)

丹野雅幸, 末吉祥子, 宮田直樹, 神谷庄造, 山口健太郎*: **個体および溶液状態におけるニトロソ尿素類の分解反応の比較**

日本薬学会第 111 年会 (1991.3)

* 昭和大学

栗原正明, 宮田直樹, 神谷庄造: **不斉アセタール化**

反応によるケトンの速度論的分割

日本薬学会第 111 年会 (1991. 3)

栗原正明, 堤のぞみ*, 宮田直樹, 神谷庄造: 種々のケトンを用いた KHSO_5 によるエポキシ化反応の検討

日本薬学会第 111 年会 (1991. 3)

* 共立薬科大学

福原 潔, 宮田直樹, 武居美奈*¹, 松井道子, 松井恵子, 能美健彦, 祖父尼俊雄, 大森清美*², 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 2 報)

日本環境変異原学会第 19 会大会 (1990. 10)

*¹ 昭和薬科大学*² 神奈川県衛生研究所

福原 潔, 宮田直樹, 羽倉昌志, 能美健彦, 祖父尼俊雄, 神谷庄造: 6-アザベンツ[a]ピレンの合成と変異原性について

日本環境変異原学会第 19 会大会 (1990. 10)

菊池 裕*, 入江昌親*, 澤田純一, 池淵秀治, 寺尾允男: メタロチオネインに対する高親和性モノクローナル抗体 (MT45-5-3) の調整及び性質

日本薬学会第 110 年会 (1990. 8)

* 星薬科大学

澤田純一, 寺尾允男: 抗モルヒネモノクローナル抗体の可変領域の一次構造

第 20 回日本免疫学会 (1990. 11)

岩間正典*¹, 岡部循江*¹, 菊池 裕*¹, 扇 和子*¹, 入江昌親*¹, 澤田純一, 寺尾允男, 仁田一雄*², 河内廣明*², 高柳義男*²: ウシガエルの肝 RNase と卵レクチンを識別するモノクローナル抗体の作成

日本薬学会第 111 年会 (1991. 3)

*¹ 星薬科大学*² 東北薬科大学

手島玲子, 池淵秀治, 寺尾允男: RBL-2H3 細胞からの脱顆粒反応に及ぼすチロシンカイネース阻害剤の影響について

第 63 回日本生化学会大会 (1990. 9)

池淵秀治, 手島玲子, 川瀬雅子, 田中東一, 佐藤道夫, 澤田純一, 一戸正勝, 寺尾允男, 上村 尚*: モノクローナル抗体を用いるツェラレノンの免疫測定法について

日本薬学会 110 年会 (1990. 8)

* 東京都立衛生研究所

奥平和穂, 森本和滋, 高橋照江, 高橋 惇: ラットにおける BHA 活性代謝物の生成とその発癌性との関連について

第 21 回薬物代謝と薬効・毒性シンポジウム (1990. 10)

奥平和穂, 高橋 惇: ウレタンのトキシコキネティクス的研究 (2), ウレタン (ethyl 1-¹⁴C) の血漿中濃度推移

日本薬学会第 111 年会 (1991. 3)

高橋昭江, 森本和滋, 奥平和穂, 高橋 惇: ¹⁴C-3-BHA を用いた用量-反応評価の研究

日本薬学会第 111 年会 (1991. 3)

鈴木和博, 鈴木澄子*, 斎藤嘉朗, 池淵秀治, 寺尾允男: ヒト成長ホルモン受容体の Down-regulation について

第 12 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (1990. 11)

* 国立公衆衛生院

嶺岸謙一郎, 奥平和穂, 高橋 惇, 福岡正道: ムスクキシレン (MX) の代謝に関する研究 (5) MX およびその代謝物の定量について

日本薬学会第 110 年会 (1990. 8)

嶺岸謙一郎, 南原精一, 福岡正道, 田中 彰, 高橋惇: ムスクキシレンのラットにおける代謝

第 16 回環境汚染物質とそのトキシコロジーシンポジウム (1990. 11)

紅林秀雄, 高橋昭江, 高橋 惇: 食品添加物安息香酸のナトリウム塩とカリウム塩のラットにおける吸収, 分布, 代謝, 排泄

日本薬学会第 110 年会 (1990. 8)

紅林秀雄, 宮田直樹, 高橋 惇: BHA 由来のキノ

ンの酵素による還元反応と酸素の活性化

第21回薬物代謝と薬効・毒性シンポジウム (1990. 11)

Brade, H.*¹, Brade, L.*¹, Haishima, Y., Holst, O.*¹, Kuhn, H.-M.*¹, Rietschel, E. T.*¹, Yucai, F.*¹, Zahringer, U.*¹, Appelmelk, B. J.*², Kosma, P.*³, Kusumoto, S.*⁴ and Paulsen, H.*⁵: **Structure and function of the core polysaccharide**

The First Congress of International Endotoxin Society, USA (1990. 5)

*¹ Forschungsinstitut Borstel, FRG.

*² Frije Universiteit Amsterdam, Netherl ands.

*³ Institut für Chemie der Universitat für Bodenkultur, Austria.

*⁴ 大阪大学理学部

*⁵ Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg, FRG.

Hisatsune, K.*¹, Isshiki, Y.*¹, Haishima, Y. and Kondo, S.*¹: **Structural and immunochemical relationship between lipopolysaccharides from 01 *Vibrio cholerae*, *V. enterocolitica* 09 and non-01 *V. cholerae* Hakata**

The First Congress of International Endotoxin Society, USA (1990. 5)

* 城西大学薬学部

Haishima, Y., Holst, O.* and Brade, H.*: **Structural analysis of the inner core region of the lipopolysaccharide from *Escherichia coli* R3**
XVth International Carbohydrate Symposium, Japan (1990. 8)

* Forschungsinstitut Borstel, FRG.

近藤誠一*, 久恒和仁*, 靛島由二: **01 *Vibrio cholerae* NIH 41-R リポ多糖 (LPS) の構造研究**
第64回日本細菌学会総会 (1991. 3)

* 城西大学薬学部

一色恭徳*, 靛島由二, 近藤誠一*, 久恒和仁*: **01 コレラ菌のイナバ抗原因子Cの化学と免疫化学**
第64回日本細菌学会総会 (1991. 3)

* 城西大学薬学部

松谷佐知子: **細菌染色体上に多コピー存在する挿入因子 IS10**

第13回日本分子生物学会年会 (1990. 11)

酒井綾子, 宮田直樹, 高橋 惇: **BHAのキノン誘導体の培養細胞トランスフォーメーションに対するイニシエーション作用**

第49回日本癌学会総会 (1990. 7)

宮原美知子, 三瀬勝利: **大腸菌 Ly3 株からの制限酵素の精製**

日本薬学会第111年会 (1990. 3)

Mise, K. and Miyahara, M.: **Characterization of restriction endonucleases in *Salmonella* isolated in Japan**

UJNR 25th Toxic Microorganisms Meeting, Anchorage, U.S.A. (1990. 7)

小島満子, 藤原みち子, 外海泰秀, 津村ゆかり, 中村優美子, 伊藤誉志男: **水産食品由来腐敗酵母の微生物学的特性**

日本食品衛生学会第61回学術講演会 (1991. 5)

外海泰秀, 津村ゆかり, 中村優美子, 伊藤誉志男, 小島満子, 藤原みち子: **腐敗酵母による揮発性塩基窒素生成量の比較**

日本食品衛生学会第61回学術講演会 (1991. 5)

一戸正勝, 小泉信三*¹, 上村 尚*²: ***Fusarium sporotrichioides* のムギ病原性とトリコテセン系マイコトキシンの穀粒への蓄積**

日本植物病理学会1991年度大会 (1991. 4)

*¹ 国立農業研究センター

*² 東京都立衛生研究所

Ichinoe, M., Koizumi, S.*¹ and Kamimura, T.*²: **Pathogenicity and mycotoxigenicity of *Fusarium* spp. in wheat II.**

UJNR, 25th. Toxic Microorganisms Meeting, Anchorage, U.S.A. (1990. 7)

*¹ National Agricultural Research Center

*² Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

安形則雄*¹, 森 正司*¹, 品川邦汎*², 桑原祥浩*³,
小沼博隆: DNAプローブ法による *Bacillus thuringiensis* の検査法の検討

食品微生物学会第11回学術講演会 (1990.10)

*¹ 名古屋市立衛生研究所

*² 岩手大学農学部

*³ 女子栄養大学栄養学部

徳丸雅一*¹, 胡 東良*², 梅迫誠一*³, 小沼博隆,
品川邦汎*⁴: 食品中の黄色ブドウ球菌迅速検出法の
検討

食品微生物学会第11回学術講演会 (1990.10)

*¹ 埼玉県立衛生研究所

*² 吉林農業大学

*³ 奈良県立衛生研究所

*⁴ 岩手大学農学部

関沢 純: 曝露データを適用した農薬の発がん性評
価の試み

日本リスク研究学会第3回研究発表会 (1990.12)

森本和滋, 大沢良一, 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(その2)

第49回日本癌学会総会 (1990.7)

森本和滋, 木村真理, 大上徳子, 加納直子, 五十嵐
貴子, 神沼二眞, 林 裕造: 発癌物質のDNA付加
物量のデータベース化(1) 0⁶-アルキルグアニン
日本薬学会第111年会 (1991.3)

Nakata, K.: Statistical Analysis of Genetic
Sequence

Genes, Proteins and Computers, Chester, UK
(1990.4)

Mount Sinai School of Medicine, NY, USA

Nakata, K. and DeLisi, C.*: Polypeptide Mini-
mum Energy Conformation from Alpha Carbon
Coordinates

10th International Biophysics Congress, Van-
couver, Canada (1990.7)

Mount Sinai School of Medicine, NY, USA

* Boston University, MA, USA

落合敏秋, 関田清司, 大野昌子*, 角田健二*, 渡邊
富雄*, 高橋一徳, 島峯望彦: エタノール投与サル
における覚醒剤の代謝について

第74次日本法医学会総会 (1990.4)

* 昭和大学医学部

井上雅子*¹, 加藤義彦*¹, 松本清司*², 落合敏秋,
関田清司, 降矢 強, 二村芳弘*³: イヌ骨髄細胞の
画像解析における形態的特徴について

第37回実験動物学会総会 (1990.5)

*¹ オムロンライフサイエンス研

*² 信州大学医学部

*³ 東邦大学医学部

落合敏秋, 関田清司, 高橋一徳, 島峯望彦, 大野昌
子*, 角田健二*, 渡邊富雄*: エタノール4週間連
続投与サルにおける覚せい剤の代謝について

第75次日本法医学会総会 (1991.4)

* 昭和大学医学部

井上雅子*¹, 加藤義彦*¹, 松本清司*², 落合敏秋,
降矢 強: 自動血球分類装置(MICROX)を用い
たラット及びイヌ骨髄細胞の自動分類

第38回日本実験動物学会総会 (1991.5)

*¹ オムロンライフサイエンス研

*² 信州大学医学部

小川幸男, 鈴木幸子, 鎌田栄一, 斉藤 実, 梅村
隆, 内田雄幸, 金子豊蔵, 黒川雄二: Chlorpyri-
fosのラットにおける28日間反復投与毒性試験と
コリンエステラーゼ活性阻害について

第17回日本毒科学会総会 (1990.6)

鈴木幸子, 小川幸男, 鎌田栄一, 金子豊蔵, 黒川雄
二: 必須元素の臓器分布に関する研究

第17回日本毒科学会総会 (1990.6)

鈴木幸子, 小川幸男, 金子豊蔵, 千葉百子*: ラン
タン, イットリウムの実体影響

第61回日本衛生学会総会 (1991.4)

* 順天堂大学医学部

傳田阿由美*, 佐井君江, 辻内俊文*, 湯 晴*, 堤
雅弘*, 村田芳明*, 中江 大*, 黒川雄二, 小西陽
一*: ラット肝におけるH₂O₂とMenadione(MD)

による活性酸素産生系による 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OH-dG) の誘発と発癌 initiation 活性について

第 49 回日本癌学会総会 (1990. 7)

* 奈良県立医科大学

梅村隆志, 佐井君江, 高木篤也, 長谷川隆一, 金子豊蔵, 黒川雄二: 鉄ニトリロミ酢酸 (Fe-NTA) 腹腔内投与によるラット腎 8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-OH-dG) 生成における性差について

第 49 回日本癌学会総会 (1990. 7)

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 (KBrO₃) の活性酸素生成の検討

第 49 回日本癌学会総会 (1990. 7)

長谷川隆一, 佐井君江, 梅村隆志, 高木篤也, 金子豊蔵, 黒川雄二: 臓器中の 8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-OH-dG) の測定に関する基礎的検討

第 49 回日本癌学会総会 (1990. 7)

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: フタル酸系ペルオキシゾーム増殖剤短期投与ラット肝 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 49 回日本癌学会総会 (1990. 7)

長谷川隆一: 非変異原性発がん物質 (Non-mutagenic carcinogen) による酸化的 DNA 傷害

第 49 回日本癌学会総会 (1990. 7)

黒川雄二, 高木篤也, 梅村隆志, 佐井君江, 長谷川隆一: Non-genotoxic carcinogen (NGC) の発癌機構における酸化的 DNA 傷害

第 19 回日本環境変異原学会 (1990. 10)

Hasegawa, R., Takagi, A., Umemura, T., Sai, K. and Kurokawa, Y.: Oxidative DNA damage in rat liver and kidney induced by peroxisome proliferators (POP) or ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA)

The 5th Biennial Meeting of the International

Society for Free Radical Reserch, USA (1990. 11)

中館正弘, 林 真, 祖父尼俊雄, 鎌田栄一, 長田孝治, 石部 保, 坂村由紀子: 毒性予測知識ベースシステムの開発

第 13 回情報化学討論会 (1990. 11)

M. Nakadate, M. Hayashi, T. Sofuni, E. Kamata, Y. Aida, T. Osada, T. Ishibe, Y. Sakamura & M. Ishidate, Jr.: The expert system for toxicity prediction of chemicals based on the structure-activity relationship

Workshop for "Data Bases of Genotoxicity and Carcinogenicity and Their Usefulness for Hazard Evaluations, Italy (1991. 1)

Kurokawa, Y.: Role of Oxidative DNA Damages One of the Carcinogenic Mechanisms of Non-genotoxic Carcinogens

International Symposium on Toxicology, Beijing (1990. 10)

Inoue, K., Nakazawa, K., Fujimori, K. and Takanaka, A.: ATP applied externally evokes norepinephrine release coupled with receptor-operated Ca permeable channels in PC12 cells

Fourth International Symposium on Adenosine and Adenine Nucleotides, Japan (1990. 5)

大野泰雄, 広田晃一, 小宗幹子, 簾内桃子, 川西徹, 高伸 正: 初代培養肝細胞の薬物代謝活性の変動に対する細胞外基質の影響

第 82 回日本薬理学会関東部会 (1990. 6)

川西 徹, Brian Herman*, John J. Lemasters*: Na⁺ 指示薬 SBFI を用いた肝細胞中の Na⁺ 濃度の測定

第 82 回日本薬理学会関東部会 (1990. 6)

* University of North Carolina at Chapel Hill, USA

川西 徹, 高伸 正, L. Blank*, M. T. Smith*, R. Y. Tsien*: デジタル化ビデオ顕微鏡を用いた単一細胞のホルモン反応性へのミトコンドリア機能阻害剤の影響研究

第 17 回日本毒科学会学術年会 (1990. 6)

* University of California at Berkeley, USA

川島邦夫, 宇佐見誠, 中浦楨介*, 田中 悟, 高仲正: Bis(tributyltin)phthalate のラット胎児発生に及ぼす影響

第 17 回日本毒科学会学術年会 (1990. 6)

* 食品農医薬品安全性評価センター

中浦楨介*, 田中 悟, 宇佐見誠, 川島邦夫, 高仲正, 萩田孝一*, 小林和雄*, 榎本 真*: 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 (3) シクロホスファミドの *in vitro* 及び *in vivo* 胎芽の発育への影響

第 17 回日本毒科学会学術年会 (1990. 6)

* 食品農医薬品安全性評価センター

中浦楨介*, 田中 悟, 宇佐見誠, 川島邦夫, 高仲正, 萩田孝一*, 小林和雄*, 榎本 真*: 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 (4) シクロホスファミドの胚胎仔毒性の *in vitro* 及び *in vivo* における比較研究

第 30 回日本先天異常学会 (1990. 7)

* 食品農医薬品安全性評価センター

川島邦夫, 宇佐見誠, 中浦楨介*, 田中 悟, 高仲正: 3(2)-t-Butyl-4-hydroxyanisole のラット胎児発生に及ぼす影響

第 30 回日本先天異常学会 (1990. 7)

* 食品農医薬品安全性評価センター

Inoue, K., Nakazawa, K., Fujimori, K. and Takanaka, A.: Extracellular ATP-stimulated ^3H -norepinephrine release coupled with receptor-operated Ca influx in PC12 cells

XIth International Congress of Pharmacology, Netherland (1990. 7)

Usami, M., Kawashima, K. and Takanaka, A.: Species-specific factors required for culture of postimplantation rat embryos

日本動物実験代替法学会第 4 回大会 (1990. 10)

井上和秀, 中沢憲一, 今泉美佳, 小濱とも子, 藤森観之助, 高仲 正: PC12 細胞での ATP (P2) 受

容体刺激カテコールアミン放出

日本神経化学会 (1990. 10)

Inoue, K., Nakazawa, K., Fujimori, K. and Takanaka, A.: ATP receptor-operated Ca influx and ^3H -norepinephrine release in PC12 cells

Neuroscience Meeting, USA (1990. 11)

井上和秀: ATP-受容体作動性 Ca 流入とカテコールアミン放出

日本薬学会関東部会若手研究者の会 (1990. 12)

井上和秀: 外液 ATP の新しい生理的役割の可能性
ヒューマンサイエンス財団シンポジウム (1991. 2)

井上和秀, 中沢憲一, 今泉美佳, 小濱とも子, 藤森観之助, 高仲 正: PC12 細胞での ATP 誘発カテコールアミン放出のメカニズム

第 64 回日本薬理学会総会シンポジウム (1991. 3)

井上和秀, 中沢憲一, 今泉美佳, 小濱とも子, 藤森観之助, 高仲 正: PC12 細胞での ATP (P2) 受容体刺激誘発反応のリアクティブブルー 2 による抑制

第 64 回日本薬理学会総会 (1991. 3)

今泉美佳, 井上和秀, 中沢憲一, 小濱とも子, 佐藤仁美, 藤森観之助, 高仲 正: PC12 からのドーパミン放出に対するベンゾジアゼピン類の抑制作用

第 64 回日本薬理学会総会 (1991. 3)

中沢憲一, 井上和秀, 今泉美佳, 小濱とも子, 藤森観之助, 高仲 正: PC12 細胞での ATP 活性チャネルとニコチンチャネルとの類似性

第 64 回日本薬理学会総会 (1991. 3)

郭 新彪, 大野泰雄, 川西 徹, 簾内桃子, 高仲正: 初代培養肝細胞における薬物代謝酵素活性の維持及びメチルコラントレンによる影響に及ぼす亜セレン酸ナトリウムの影響

第 64 回日本薬理学会総会 (1991. 3)

郭 新彪, 大野泰雄, 川西 徹, 簾内桃子, 高仲正: 初代培養肝細胞における細胞間コミュニケーションに対するインジウムの影響

第111回日本薬学会総会 (1991.3)

川西 徹, ジョン・J・レマスターズ*: 肝障害時のホルモン刺激による細胞内カルシウムイオンの濃度変化

第64回日本薬理学会総会シンポジウム (1991.3)

* University of North Carolina at Chapel Hill, USA

川西 徹, 武井あや, 郭 新彪, 篠内桃子, 大野泰雄, 高仲 正: 初代培養肝細胞における細胞内ナトリウムイオン濃度の調節機構

第64回日本薬理学会総会 (1991.3)

前田かおり*, 木村雅昭*, 大野泰雄, 林 茂寛*: 活性酸素による培養冠動脈血管内皮細胞の傷害

第64回日本薬理学会総会 (1991.3)

* アップジョンファーマシューティカルリミテッド筑波総合研究所

今井田克己, 立松正衛*, 古川文夫, 高橋道人, 林裕造: ハムスター肺の Pepsinogen の存在: その同定と末梢気道上皮細胞内の局在

第78回日本病理学会総会 (1990.4)

* 名古屋市立大学医学部

古川文夫, 佐藤秀隆, 今井田克己, 高橋道人, 林裕造: 実験肺腫瘍発生過程におけるラ氏島の内分泌細胞の動態

第78回日本病理学会総会 (1990.4)

古川文夫, 今沢孝喜, 篠田和俊, 阿部 弘, 佐藤元信, 古田京子: 蛍光顕微鏡法における DIPI 染色法 (DNA 染色)

第15回実験動物病理組織技術懇話会 (1990.4)

今沢孝喜, 古川文夫, 佐藤元信, 篠田和俊, 阿部弘, 古田京子: Nucleolar Organizer Region (NOR) 染色について

第15回実験動物病理組織技術懇話会 (1990.4)

佐藤元信, 今沢孝喜, 古川文夫, 篠田和俊, 阿部弘, 古田京子: ランタン・トレーサー法による精巢毒性の解析

第15回実験動物病理組織技術懇話会 (1990.4)

林 裕造: 一次予防: 実験的見地から

第49回日本癌学会総会 (1990.7)

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 誘発肺腫瘍における蛋白分解酵素 (camostat) の同時投与による抑制効果

第49回日本癌学会総会 (1990.7)

小笠原裕之, 吉田順一, 下地尚史, 今井田克己, 古田京子, 林 裕造: 4NQO マウス肺腫瘍発生における permethrin (合成ピレスロイド) の影響

第49回日本癌学会総会 (1990.7)

吉田順一, 今井田克己, 今沢孝喜, 古田京子, 高橋道人, 林 裕造: EGF による DEN ハムスター気管腫瘍発生の促進作用

第49回日本癌学会総会 (1990.7)

今井田克己, 福原 潔, 宮田直樹, 畝山智香子, 佐藤秀隆, 吉田順一, 小笠原裕之: 6-Nitrochrysen (6NC) による発癌性の動物種差: ラット腸腫瘍とマウス肺腫瘍の誘発

第49回日本癌学会総会 (1990.7)

下地尚史, 今井田克己, 菅野 純*, 今沢孝喜, 古田京子, 小笠原裕之: DEN ラット肝発癌に及ぼす実験的肝線維症の影響

第49回日本癌学会総会 (1990.7)

* 東京医科歯科大学医学部

今沢孝喜, 古川文夫, 佐藤秀隆, 豊田和弘, 高橋道人, 林 裕造: ラット膵腺房細胞腫瘍の Nucleolar Organizer Region (NOR) の増加とその意義

第49回日本癌学会総会 (1990.7)

佐藤秀隆, 今井田克己, 豊田和弘, 岡宮英明, 菅野純*, 林 裕造: 3-メチルフラン(3-MF)の4NQO マウス肺腫瘍発生に対する影響

第49回日本癌学会総会 (1990.7)

* 東京医科歯科大学医学部

佐藤元信, 古川文夫, 篠田和俊, 岡宮英明, 高橋道人, 林 裕造: ハムスター BOP 誘発肺腫瘍のプロモーション過程における大豆トリプシンインヒビター

の影響

第 49 回日本癌学会総会 (1990. 7)

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 (1990. 7)

篠田和俊, 長谷川亨*, 古川文夫, 岡宮英明, 佐藤元信, 高橋道人: 胃発癌プロモーターによる胃粘膜脂質過酸化亢進とその生体指標としての意義

第 49 回日本癌学会総会 (1990. 7)

* 佐賀医科大学医学部

吉村博之, 菅野 純*, 豊田和弘, 古田京子, 春日孟*, 林 裕造: ヨウ素欠乏状態を指標とした TSH 上昇甲状腺発癌促進物質の評価の試み

第 49 回日本癌学会総会 (1990. 7)

* 東京医科歯科大学医学部

菅野 純*, 豊田和弘, 佐藤秀隆, 今沢孝喜, 春日孟*, 林 裕造: ヨウ素過剰摂取による甲状腺腫瘍発生の促進

第 49 回日本癌学会総会 (1990. 7)

* 東京医科歯科大学医学部

小野寺博志, 小笠原裕之, 松島裕子, 渋谷 淳, 外館あさひ, 前川昭彦, 林 裕造: 低用量フェノバルビタール投与によるラット肝プロモーション作用—用量相関—

第 49 回日本癌学会総会 (1990. 7)

松島裕子, 小野寺博志, 永岡隆晴, 外館あさひ, 渋谷淳, 小笠原裕之, 前川昭彦, 林 裕造, 黒川雄二: 乳酸カルシウムの F344 ラットにおける癌原性について

第 49 回日本癌学会総会 (1990. 7)

渋谷 淳, 松島裕子, 小笠原裕之, 小野寺博志, 前川昭彦, 林 裕造: ラット glioma の免疫組織化学的及び組織化学的検討—ヒト症例との比較研究—

第 49 回日本癌学会総会 (1990. 7)

豊田和弘, 佐藤秀隆, 古川文夫, 篠田和俊, 吉村博之, 高橋道人: 抗悪性腫瘍剤 5-fluorouracil のラ

ットにおける癌原性試験について

第 49 回日本癌学会総会 (1990. 7)

高橋道人, 豊田和弘, 古川文夫, 今井田克己, 畝山智香子, 今沢孝喜, 林 裕造: 大腸発癌における薬物性下痢のプロモーション作用

第 49 回日本癌学会総会 (1990. 7)

永岡隆晴, 小野寺博志, 前川昭彦: 自然発生ラット子宮内膜癌の発生機序に関する研究—内分泌異常と腺癌発生との関係

第 49 回日本癌学会総会 (1990. 7)

古川文夫, 下地尚史, 古田京子, 今井田克己, 篠田和俊, 高橋道人, 林 裕造: ラット肺のラ氏島腫瘍発生過程における cortisol acetate の影響と免疫組織化学的検討

第 21 回日本腫瘍学会 (1990. 7)

林 裕造: 日本における発がん物質の規制

発がん性物質のリスクアセスメントに関するサテライトシンポジウム (1990. 8)

渋谷 淳, 今沢孝喜, 小野寺博志, 松島裕子, 吉田順一, 前川昭彦, 林 裕造, 新井克彦*: ラットグリオーマを認識するモノクローナル抗体の作製とその特性

第 7 回日本毒性病理学会 (1991. 1)

* 東京農工大

永岡隆晴*, 小野寺博志, 前川昭彦: Estrogen および MNU によるラット子宮内膜がん誘発の試み

第 7 回日本毒性病理学会 (1991. 1)

* 吉富製薬

小笠原裕之, 佐藤秀隆, 畝山智香子, 矢沢るり, 古田京子, 今井田克己, 林 裕造: コリンエステラーゼ阻害剤の長期連続投与によるラット下垂体前葉への影響

第 7 回日本毒性病理学会 (1991. 1)

佐藤秀隆, 小笠原裕之, 古田京子, 林 修次, 今井田克己, 林 裕造: Furan, 2-methylfuran および 3-methylfuran の毒性について

第 7 回日本毒性病理学会 (1991. 1)

佐藤元信, 古川文夫, 吉村博之, 豊田和弘, 高村直子, 高橋道人: **p-Phenetidine** の 28 日間反復毒性試験

第 7 回日本毒性病理学会 (1991. 1)

吉田順一, 小野寺博志, 松島裕子, 渋谷 淳, 前川昭彦, 林 裕造: **m-Nitroaniline** のラットに対する毒性について

第 7 回日本毒性病理学会 (1991. 1)

松島裕子, 前川昭彦, 篠田和俊, 小野寺博志, 吉田順一, 渋谷 淳, 林 裕造: **F344** ラットを用いた **Diheptyl phthalate (DHP)** の 28 日間反復毒性試験について

第 7 回日本毒性病理学会 (1991. 1)

古川文夫, 今沢孝喜, 篠田和俊, 佐藤元信, 高橋道人, 林 裕造: **WBN/Kob** ラットの自然発症肺炎におよぼす **インドメタシンの影響**

第 7 回日本毒性病理学会 (1991. 1)

今沢孝喜, 古川文夫, 篠田和俊, 今井田克己, 高橋道人, 林 裕造: **キナクリン** によるラットおよびハムスターの肝, 腎における **ミエリン様小体** と **酸性ホスファターゼ** の電顕的局在

第 7 回日本毒性病理学会 (1991. 1)

豊田和弘, 高橋道人, 阿瀬善也, 五十嵐良明, 土屋利江, 中村晃忠: **医用材料の埋植試験による組織検索の評価的意義**

第 7 回日本毒性病理学会 (1991. 1)

阿瀬善也, 豊田和弘, 渋谷 淳, 今沢孝喜, 高橋道人: **F344** ラットに認められた自然発生 **paragan-glioma** の 1 例

第 7 回日本毒性病理学会 (1991. 1)

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: **喫煙曝露** における **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

第 7 回日本毒性病理学会 (1991. 1)

吉田敏則*, 三森国敏, 真板敬三*, 白須泰彦*: **ラットの自然発生性顆粒細胞腫** についての形態学的検討

第 7 回日本毒性病理学会 (1991. 1)

* 残留農薬研究所

山本 修*¹, 吉田敏則*², 三森国敏, 真板敬三*², 白須泰彦*²: **Wistar** 系雌ラットに認められた **松果体細胞腫** の一例

第 7 回日本毒性病理学会 (1991. 1)

*¹ 日産化学

*² 残留農薬研

林 裕造: **科学的情報とリスクアセスメント**

日米がん研究協力事業セミナー及び日米合同事業 (1991. 3)

水沢 博, 本間正充, 片岡英子, 品川保弘*¹, 野村信夫*², 竹内昌男*³, 大野忠夫*⁴: **細胞バンク** の品質管理における **DNA** profiling 法の利用

日本組織培養学会第 63 回大会 (1990. 5)

*¹ 富山県立衛生研究所

*² 日本獣医畜産大学

*³ 発酵研究所

*⁴ 理研ジーンバンク

水沢 博: **教育講演「細胞バンクとアイソザイム」**
日本電気泳動学会第 40 回春期大会 (1990. 6)

水沢 博: **厚生省細胞バンクの現状**

日本微生物株保存連盟平成 2 年度総会・シンポジウム (1990. 6)

Autio, K.*, Lindholm, C.*, Hayashi, M., Norppa, H.*, Sorsa, M.*: **Human lymphocyte micronucleus assay using antibromodeoxy uridine and cytochalasin B for the identification of 2nd cycle interphase cells**

CEC Contact Group Meeting, Finland (1990. 6)

* Institute of Occupational Health, Finland

Autio, B. K.*, Norppa, H.*, Hayashi, M., Miki-Paakanen, J.*, Sorsa, M.*: **Human lymphocyte micronucleus assay using antibromodeoxyuridine instead of cytochalasin B**

European Environmental Mutagen Society, U. K. (1990. 7)

* Institute of Occupational Health, Finland

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の条件

日本癌学会第 49 回総会 (1990. 7)

* 食品薬品安全センター秦野研究所

堀田国元*, 石川 淳*, 土屋治美*, 鈴木章一*, 林邦彦*, 本間正充, 水沢 博, 水野左敏*, 鈴木和男*: ヒト肺巨細胞癌細胞 LU65C が産生する多形核白血球走化性物質 LUCT/IL-8 遺伝子の構造

日本癌学会第 49 回総会 (1990. 7)

* 国立予防衛生研究所

Nohmi, T., Hakura, A., Nakai, Y.*, Watanabe, M., Sofuni, T.: *Salmonella typhimurium* has two sets of *umuDC* genes

Gordon Research Conference, USA (1990. 7)

* Teijin Co. Ltd

Norppa, H.*, Autio, K.*, Hayashi, M., Sorsa, M.*: Identification of 2nd cycle interphase cells by bromodeoxy uridine antibody in human for cell proliferation lymphocyte micronucleus assay

17th Meeting of the European Study Group, Finland (1990. 9)

* Institute of Occupational Health, Finland

祖父尼俊雄: 染色体異常試験のガイドラインとその問題点

日本動物実験代替法学会第 4 回大会 (1990. 10)

能美健彦, 羽倉昌志, 中井康晴*, 渡辺雅彦, 祖父尼俊雄: *Salmonella typhimurium* の変異誘発能と 2 種類の *umuDC* 遺伝子

日本環境変異原学会第 19 回大会 (1990. 10)

* 帝人(株)生物医学研究所

渡辺雅彦, 能美健彦, 祖父尼俊雄: *S. typhimurium* 高感受性株の分子的基礎 (その 2): NR 株, 1, 8-DNP 株における変異部位の同定, および活性中心の検索

日本環境変異原学会第 19 回大会 (1990. 10)

小田美光*, 渡辺雅彦, 能美健彦, 石館 基: ニトロ還元酵素遺伝子の導入によるニトロアレーンの高感受度変異原検出系

日本環境変異原学会第 19 回大会 (1990. 10)

* 大阪府立公衆衛生研究所

山田雅巳, 能美健彦, 祖父尼俊雄: Chlorambucil の *Salmonella typhimurium* に対する欠失突然変異誘発能

日本環境変異原学会第 19 回大会 (1990. 10)

松井道子, 能美健彦, 祖父尼俊雄: *Salmonella typhimurium* guanine phosphoribosyltransferase 遺伝子のクローニング及びその塩基配列

日本環境変異原学会第 19 回大会 (1990. 10)

羽倉昌志, 能美健彦, 森本和滋, 祖父尼俊雄: *Salmonella typhimurium* O⁶-メチルグアニン DNA メチル転移酵素遺伝子のクローニング及びその塩基配列

日本環境変異原学会第 19 回大会 (1990. 10)

Asita, A. O., 松井道子, 能美健彦, 松岡厚子, 林真, 祖父尼俊雄, Koyano, M.*, 松下秀鶴*: Mutagenicity of wood smoke in the Ames test

日本環境変異原学会第 19 回大会 (1990. 10)

* 国立公衆衛生院

林 真: 小核試験の最近の動向

日本環境変異原学会第 19 回大会 (1990. 10)

林 真, 鈴木孝昌, 松岡厚子, 祖父尼俊雄: 末梢網赤血球を用いる小核試験

日本環境変異原学会第 19 回大会 (1990. 10)

鈴木孝昌, 松岡厚子, 沢田 稔, 林 真, 宮田直樹, 祖父尼俊雄: Menadione 及び H₂O₂ 耐性 CHL 細胞株を用いた BHA 代謝産物の毒性発現機構の解析

日本環境変異原学会第 19 回大会 (1990. 10)

小核試験共同研究グループ: マウス末梢血を用いる小核試験

日本環境変異原学会第 19 回大会 (1990. 10)

玉井功一*, 栗田未来子*, 大槻穂刈*, 樋渡恒憲*, 林 真, 鈴木孝昌, 児玉幸夫, 祖父尼俊雄: 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene のマウス末梢血を用いた小核試験

日本環境変異原学会第19回大会 (1990.10)

* 保健科学研究所

青儀 功*, 児玉幸夫, 鈴木孝昌, 林 真, 祖父尼俊雄: ラット末梢血を用いる小核試験の検討

日本環境変異原学会第19回大会 (1990.10)

* 大塚製薬㈱

祖父尼俊雄, 山崎奈緒美, 松岡厚子, 鈴木孝昌, 林真: 国際協力による哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験の比較検討

日本環境変異原学会第19回大会 (1990.10)

渡辺雅彦, 能美健彦, 祖父尼俊雄: *Salmonella typhimurium* O-アセチル転移酵素の活性中心の解析

第13回日本分子生物学会年会 (1990.11)

能美健彦, 羽倉昌志, 中井康晴*, 渡辺雅彦: *Salmonella typhimurium* に存在する2種類の *umuDC* 遺伝子

第13回日本分子生物学会年会 (1990.11)

* 帝人㈱生物医学研究所

羽倉昌志, 能美健彦, 森本和滋, 祖父尼俊雄: *Salmonella typhimurium* O⁶-メチルグアニン DNA メチル転移酵素と *E. coli* Ada 蛋白の類似性ならびに適応応答との関係

第13回日本分子生物学会年会 (1990.11)

渡辺雅彦: 微生物を用いた変異原検出系の開発-芳香族アミン, ニトロアレーン高感度検出株を中心として

大気汚染研究協会関東支部がん・変異原性部会講演会 (1990.12)

林 真, 坂本 豊*¹, 橋本修二*², 浜田知久馬*³: 変異原性試験のデータ解析

毒性試験のための生物統計シンポジウム (1990.12)

*¹ 武田分析研究所

*² 国立公衆衛生院

*³ 武田薬品工業㈱

Hayashi, M.: A fact data base for toxicological data (BL Data Base) at National Institute of

Hygienic Sciences, Japan

Data Bases of Genotoxicity and Carcinogenicity and their Usefulness for Hazard Evaluation, Italy (1991.1)

Einisto, P*, Nohmi, T., Watanabe, M. and Ishidate, M. Jr.: Role of the nitroreductase and O-acetyltransferase activity of indicator strains in urine mutagenicity assay

First International Conference on Environmental Mutagenesis in Human Populations at Risk, Egypt (1991.1)

* Institute of Occupational Health, Finland

Hayashi, M.: Guidelines and protocols for mammalian erythrocyte assays/Japan

22nd annual meeting of U.S. Environmental Mutagen Society, USA (1991.4)

Hayashi, M.: Automation of micronucleus assay by image analysis and flow cytometry

22nd annual meeting of U.S. Environmental Mutagen Society, USA (1991.4)

Einisto, P*, Nohmi, T., Watanabe, M. and Ishidate, M. Jr.: Sensitivity and specificity of *Salmonella* strains with high nitroreductase or O-acetyltransferase activity in Ames test

Environmental Mutagen Society Annual Meeting, USA (1991.4)

* Institute of Occupational Health, Finland

Nohmi, T., Hakura, A., Watanabe, M., Yamada, M., Murayama, S. Y.* and Sofuni, T.: *Salmonella typhimurium* has two sets of *umuDC*-like operons: Role for *samAB* and *umuDC_{ST}* operons in UV and chemical mutagenesis in *S. typhimurium*

Third International Conference on mechanisms of antimutagenesis and anticarcinogenesis, Italy (1991.5)

* Teikyo University School of Medicine

Nohmi, T: DNA repair genes in *Salmonella typhimurium*

ICRF Clare Hall Laboratories Seminars, U.K. (1991. 5)

Watanabe, M., Einisto, P.*, Sofuni, T. and Nohmi, T.: **Construction and applications of new tester strains of *Salmonella typhimurium* highly sensitive to mutagenic aromatic amines and nitroarenes**

Fifth International Symposium on Toxicity Assessment, Japan (1991. 5)

* Institute of Occupational Health, Finland

田中正一, 石光進, 岡田敏史, 杉山隆之*, 夏賀徹*: **低分子化ヘパリンの抗 Xa 活性評価法について**

第 40 回日本薬学会近畿支部大会 (1990. 11)

* 清水製薬(株)

宮崎玉樹, 小室徹雄, 四方田千佳子, 岡田敏史: **イブプロフェンを含有する市販経口固形製剤に関する考察**

第 4 回日本薬学会近畿支部総会 (1990. 11)

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 (1990. 5)

四方田千佳子, 宮崎玉樹, 小室徹雄, 岡田敏史, 田中恵子*: **キトサンの分別試料における分子量および粘度**

日本薬学会第 110 年会 (1990. 8)

* 大阪市立工業試験所

四方田千佳子, 岡田敏史: **キトサンと CM-キチンから生成されるポリイオンコンプレックスゲルの特性**

日本薬学会第 111 年会 (1991. 3)

Appelmek, B. J.*¹, Donghui, S.*¹, Cohen, J.*², Brade, H.*³, Kosma, P.*⁴, Verweig-Van Vught, A. M. J. J.*¹, Hekker, J. A. M.*¹, Thijs, L. G.*⁵, Buurman, W. A.*⁶, Komuro, T., Playfair, J. H. L.*⁷ and Maclaren, D. M.*¹: **Protective mechanisms of monoclonal antibodies raised to Gram-negative lipopolysaccharide core region**

1st Congress of the International Endotoxin Society, USA (1990. 5)

*¹ Vrije Universiteit, The Netherlands

*² Hammersmith Hospital, UK

*³ Forschungsinstitut Borstel, FRG

*⁴ Universitat für Bodencultur, Austria

*⁵ Medical Intensive Care Unit, The Netherlands

*⁶ Rijksuniversiteit, The Netherlands

*⁷ University College and Middlesex School Medicine, UK

Komatsu, H. and Rowe, E. S.*: **Effect of cholesterol on the ethanol-induced interdigitated gel phase in phosphatidylcholine: Use of fluorophore pyrenelabeled phosphatidylcholine**

The 1990 International Congress on Membranes and Membrane Processes, USA (1990. 8)

* University of Kansas Medical Center, USA and Veterans Administration Medical Center, Kansas City, USA

Komatsu, H., Guy, P. T.* and Rowe, E. S.*: **Fluorescence studies of lipid interdigitation in extruded vesicles**

The 1991 Annual Meeting of Biophysical Society, USA (1991. 2)

* University of Kansas Medical Center, USA and Veterans Administration Medical Center, Kansas City, USA

小松裕明, Rowe, E.S.*: **エタノールによるリン脂質膜のインターディジテーションに及ぼすコレステロールの影響**

日本薬学会第 111 年会 (1991. 3)

* University of Kansas Medical Center, USA and Veterans Administration Medical Center, Kansas City, USA

石光進, 藤本貞毅*, 平山 悟*, 小原 晃*: **ミエロペルオキシダーゼ-過酸化水素系におけるフェニアラニンの水酸化反応について**

日本薬学会第 110 年会 (1990. 8)

* 京都薬科大学

石光進, 前田知己*, 藤本貞毅*, 小原 晃*: **アスコルビン酸と銅 (II) イオン投与によるモルモツ**

ト臓器中のフェニルアラニン及びチロシン水酸化酵素活性への影響

日本薬学会第110年会 (1990.8)

* 京都薬科大学

石光 進, 藤本貞毅*, 竹原 潤*, 山本みやび*, 小原 晃*: 血清中の o-及び m-チロシン含量の変化について—銅 (II) イオン投与の影響—

日本薬学会第111年会 (1991.3)

* 京都薬科大学

長谷川ゆかり, 中村優美子, 外海泰秀, 伊藤誉志男: 野菜の亜塩素酸ナトリウムおよび次亜塩素酸ナトリウム処理により生成する有機塩酸化合物

日本食品衛生学会第59回学術講演会 (1990.5)

柴田 正, 辻 澄子, 伊藤誉志男, 宇田川俊一, 鈴木明子, 成田紀子, 風間朗弘, 浅居良輝^{*1}, 佐藤孝義^{*1}, 相良一彦^{*1}, 本田恒男^{*2}, 平城里香^{*2}, 慶田雅洋^{*3}, 岡本勝利^{*4}, 望月悦生^{*5}, 菅沼 修^{*5}: チーズに用いたナクマイシンおよびソルビン酸の各貯蔵期における残存性, 浸透性および防カビ効果について

日本食品衛生学会第59回学術講演会 (1990.5)

^{*1} 雪印乳業(株)

^{*2} 協同乳業(株)

^{*3} ネッスル(株)

^{*4} 農林規格検査所大阪支所

^{*5} 日本国際酪農連盟

宮田政明*, 山田真記子*, 伊藤誉志男: フェノール系9種抗酸化剤のUV及びECD, HPLCによる定量法の検討

日本食品衛生学会第59回学術講演会 (1990.5)

* 三栄化学工業(株)

辻 澄子, 柴田 正, 伊藤誉志男, 藤井 敏*, 富田研一*: クエン酸1-モノイソプロピル亜鉛のX線結晶構造解析

日本薬学会110年会 (1990.8)

* 大阪大学薬学部

伊藤誉志男: 食品汚染物試験法について

日本薬学会第110年会 (1990.8)

古山みゆき^{*1}, 兼田 登^{*1}, 長谷幸子^{*1}, 尾田美子^{*2}, 藤原一也^{*2}, 鈴木宏^{*2}, 伊藤誉志男, 柴田正, 辻 澄子, 柿内 雅: 各種食品中の亜硫酸の自然含有量調査研究

日本食品衛生学会第60回学術講演会 (1990.9)

^{*1} 灘神戸生活協同組合商品検査センター

^{*2} 日本生活協同組合連合会商品検査センター

山田真記子*, 宮田政明*, 中村幹雄*, 柿内 雅, 川本礼子, 辻 澄子, 柴田 正, 伊藤誉志男: 逆相イオンクロマトグラフィーによる各種タール色素中の塩化物および硫酸塩の定量について

日本食品衛生学会第60回学術講演会 (1990.9)

* 三栄化学工業(株)

柿内 雅, 川本礼子, 辻 澄子, 柴田 正, 伊藤誉志男: 食用タール色素の結晶水, 付着水と乾燥減量との関連性に関する検討

日本食品衛生学会60回学術講演会 (1990.9)

長谷川ゆかり, 外海泰秀, 中村優美子, 伊藤誉志男: ばれいしょに収穫後使用した4種農薬の貯蔵及び加工過程における消長

日本食品衛生学会第60回学術講演会 (1990.9)

関根吉家*, 皆川憲夫*, 浅居良輝*, 柴田 正, 伊藤誉志男: リソチームの蛍光分析法の改良について

日本食品衛生学会第60回学術講演会 (1990.9)

* 雪印乳業(株)

宮田政明^{*1}, 山田真記子^{*1}, 中村幹雄^{*1}, 伊藤誉志男, 西島基弘^{*2}: 各種食品中のフェノール系9種酸化防止剤の抽出精製法の検討

日本食品衛生学会第60回学術講演会 (1990.9)

^{*1} 三栄化学工業(株)

^{*2} 東京都立衛生研究所

浜野 孝*, 三ツ橋幸正*, 青木伸實*, 山本進*, 辻 澄子, 伊藤誉志男: 酸素電極を用いた食品中のグリセリンの酸素分析法

第27回全国衛生化学技術協議会年会 (1990.10)

* 神戸市環境保健研究所

柴田 正, 川本礼子, 柿内 雅, 辻 澄子, 伊藤誉志男: 電気化学検出器付HPLCを用いた食品中の

パバインの分析法の開発

第 40 回日本薬学会近畿支部学術講演会 (1990.11)

辻 澄子, 柴田 正, 伊藤誉志男, 藤井 敏*, 富田研一*: **クエン酸 1-イソプロピル. 金属キレート**
の安定度定数の決定及び亜鉛キレート結晶の熱分析
第 40 回日本薬学会近畿支部学術講演会 (1990.11)

* 大阪大学薬学部

長谷川ゆかり, 中村優美子, 外海泰秀, 伊藤誉志男,
富田 勲*, 下位香代子*, 曾布川能康*: **ポリエチ**
レン多孔質中空糸膜を用いる水道小中変異原物質の
捕集および GC/MS による検索

第 16 回環境汚染物質とそのトキシコロジーシンポジウム (1990.11)

* 静岡県立大学薬学部

西島基弘*¹, 伊藤誉志男, 上条昌弥*², 白石隆幸*³,
中岡正吉*⁴, 成田弘子*⁵, 本間 浩*⁶, 宮田政明*⁷,
宮本文夫*⁸, 山田 隆: **食品添加物試験法—高速液**
体クロマトグラフィーによる定性および定量

日本薬学会第 111 年会 (1991.3)

- *¹ 東京都立衛生研究所
- *² 横浜市衛生研究所
- *³ 新潟薬科大学
- *⁴ 神奈川県衛生研究所
- *⁵ 静岡県衛生環境センター
- *⁶ 共立薬科大学
- *⁷ 三栄化学工業㈱
- *⁸ 千葉県衛生研究所

伊藤誉志男, 木川 寛*¹, 谷 孝之*², 中澤裕之*³,
中村好志*⁴, 西島基弘*⁵, 浜野 孝*⁶, 星野庸二*⁷,
堀伸二郎*⁸, 宮田秀明*⁹, 宮原 誠: **食品汚染物試**
験法—無機化合物の試験溶液の調製

日本薬学会 111 年会 (1991.3)

- *¹ 横浜市衛生研究所
- *¹ 神奈川県衛生研究所
- *¹ 国立公衆衛生院
- *¹ 静岡県立大学薬学部
- *¹ 東京都立衛生研究所
- *¹ 神戸市環境保健研究所
- *¹ 埼玉県衛生研究所
- *¹ 大阪府公衆衛生研究所
- *¹ 摂南大学薬学部

伊藤誉志男, 木川 寛*¹, 谷 孝之*², 中澤裕之*³,

中村好志*⁴, 西島基弘*⁵, 浜野 孝*⁶, 星野庸二*⁷,
堀伸二郎*⁸, 宮田秀明*⁹, 宮原 誠: **食品汚染物試**
験法—ポリ塩化ジフェニル (PCB)

日本薬学会 111 年会 (1991.3)

- *¹ 横浜市衛生研究所
- *² 神奈川県衛生研究所
- *³ 国立公衆衛生院
- *⁴ 静岡県立大学薬学部
- *⁵ 東京都立衛生研究所
- *⁶ 神戸市環境保健研究所
- *⁷ 埼玉県衛生研究所
- *⁸ 大阪府公衆衛生研究所
- *⁹ 摂南大学薬学部

伊藤誉志男, 木川 寛*¹, 谷 孝之*², 中澤裕之*³,
中村好志*⁴, 西島基弘*⁵, 浜野 孝*⁶, 星野庸二*⁷,
堀伸二郎*⁸, 宮田秀明*⁹, 宮原 誠: **食品汚染物試**
験法—有機リン系殺虫剤

日本薬学会 111 年会 (1991.3)

- *¹ 横浜市衛生研究所
- *² 神奈川県衛生研究所
- *³ 国立公衆衛生院
- *⁴ 静岡県立大学薬学部
- *⁵ 東京都立衛生研究所
- *⁶ 神戸市環境保健研究所
- *⁷ 埼玉県衛生研究所
- *⁸ 大阪府公衆衛生研究所
- *⁹ 摂南大学薬学部

小島満子, 藤原みち子, 外海泰秀, 津村ゆかり, 中
村優美子, 伊藤誉志男: **水産食品由来腐敗酵母の微**
生物学的特性

日本食品衛生学会第 61 回学術講演会 (1991.5)

外海泰秀, 津村ゆかり, 中村優美子, 伊藤誉志男,
小島満子, 藤原みち子: **腐敗酵母による揮発性塩基**
窒素生成量の比較

日本食品衛生学会第 61 回学術講演会 (1991.5)

津村ゆかり, 外海泰秀, 中村優美子, 伊藤誉志男:
柑橘果実中の収穫後使用農薬の系統的分析法
日本食品衛生学会第 61 回学術講演会 (1991.5)

武田由比子, 神蔵美枝子, 義平邦利, 柴田 正, 伊
藤誉志男: **食用赤色 40 号の純度試験について(1)—**
低スルホン化副成色素, 高スルホン化副成色素の液
体クロマトグラフィー

日本食品衛生学会第61回学術講演会 (1991.5)

柴田 正, 伊藤誉志男, 武田由比子, 神蔵美枝子,
義平邦利: 食用赤色40号の純度試験について(2)ー
原料および他の中間反応物質の液体クロマトグラフ
イー

日本食品衛生学会第61回学術講演会 (1991.5)

伊丹孝文, 江馬 眞, 川崎浩之進: 塩化トリブチル
スズ (TBT) によるラット胎盤の肥大
第30回日本先天異常学会総会 (1990.7)

江馬 眞, 村井敏美, 伊丹孝文, 川崎浩之進: ブチ
ルベンジルフタレート of ラットにおける胎仔毒性
第30回日本先天異常学会総会 (1990.7)

Ema, M., Itami, T. and Kawasaki, H.: Em-
bryolethality of butyl benzyl phthalate in rats
Federation of American Societies for Experimen-
tal Biology 75th Annual Meeting, Atlanta, USA
(1991.4)

小川義之, 村井敏美, 川崎浩之進, 田中憲穂*: 細
胞内 ATP 量を指標にした毒性評価ー無機金属の赤
血球に対する影響

第4回日本動物実験代替法学会大会 (1990.10)

* 食品薬品安全センター秦野研究所

田中憲穂*, 小川義之, 村井敏美, 川崎浩之進: 細
胞内 ATP 量を指標とする細胞毒性試験法の検討
第4回日本動物実験代替法学会大会 (1990.10)

* 食品薬品安全センター秦野研究所

小川義之, 村井敏美, 川崎浩之進: 医用材料の発熱
およびエンドトキシン試験法による評価法について
第12回日本バイオマテリアル学会大会 (1990.10)

小川義之, 村井敏美, 川崎浩之進: 医療用具のエン
ドトキシン試験法についてーリムルス試験と発熱試
験の関係

第18回日本防菌防黴学会大会 (1991.5)

天野博夫, 川崎浩之進, 小川義之, 佐藤公道*:
3T3-L1 前脂肪細胞を用いたインシュリンの *in*
vitro バイオアッセイ法の考案とインシュリン感受

性変異 3T3-L1 サブクローンの分離への応用

第64回日本薬理学会総会

* 京都大学薬学部

柴田敏郎, 畠山好雄: オクエノサイシン種子の発芽
特性について

第37回北海道薬学大会 (1990.6)

佐竹元吉: 日本における薬用植物資源

第2回天然抗癌資源の開発利用国際学術大会, 韓国
(1990.8)

佐竹元吉: 日本の薬用植物の栽培研究の動向

第1回薬用植物栽培シンポジウム, 韓国 (1991.3)

Yoshimatsu, K. and Shimomura, K.: Organoge-
nesis and alkaloid production in *Cephaelis ipe-*
cacuanha A. Richard

VIIth International Congress on Plant Tissue and
Cell Culture, Amsterdam, Holland (1990.6)

Shimomura, K. and Ishimaru, K.: Isolation and
distribution of 7 β -hydroxyhyoscyamine in sol-
anaceous plants

VIIth International Congress on Plant Tissue and
Cell Culture, Amsterdam, Holland (1990.6)

Sauerwein, M. and Shimomura, K.: Production of
indole alkaloids by various cultures of *Amsonia*
elliptica, Apocynaceae

VIIth International Congress on Plant Tissue and
Cell Culture, Amsterdam, Holland (1990.6)

神田博史*¹, 田中誠司*¹, 山岡康利*¹, 泉 宏昌*²,
布万里子*³, 後藤勝実*⁴, 磯田 進*⁵, 香月茂樹,
佐竹元吉: 国内の野生 *Panax* 属植物について(2)
日本薬学会第110年会 (1990.8)

*¹ 広島大学医学部

*² 東京薬科大学

*³ 帝京大学薬学部

*⁴ 京都薬科大学

*⁵ 昭和大学薬学部

江崎勝司, 佐竹元吉, 楠見武徳*, 柿澤 寛*: ベル
ー産生薬の成分研究 (2)

日本薬学会第 110 年会 (1990. 8)

* 筑波大学化学系学類

吉松嘉代, Powell, A. D., 鎌田 博*, 下村講一郎: 薬用植物への外来遺伝子導入法の開発 (4) トランスジェニックペラドンナ再分化個体の作出とその特性

日本薬学会第 110 年会 (1990. 8)

* 筑波大学遺伝子実験センター

斉藤和季*, 山崎真巳*, 下村講一郎, 吉松嘉代, 村越 勇*: ジギタリス (*Digitalis purpurea*) へのモデル外来遺伝子の導入, 形質発現および強心配糖体の生産

日本薬学会第 110 年会 (1990. 8)

* 千葉大学薬学部

山崎 壮, Flores, H. E.*, 下村講一郎, 義平邦利: ステビアの組織培養によるステビオール配糖体の生産

日本薬学会第 110 年会 (1990. 8)

* Pennsylvania State University

Sauerwein, M., Flores, H. E.* and Shimomura, K.: Production of the sweet sesquiterpene hennadiol by cultures of *Lippia dulcis*

日本薬学会第 110 年会 (1990. 8)

* Pennsylvania State University

Sauerwein, M. and Shimomura, K.: Indole alkaloids from *Amsonia elliptica* roots and its cultures

日本薬学会第 110 年会 (1990. 8)

石丸幹二, 佐竹元吉, 下村講一郎: センブリ毛状根培養とその成分 (2)

日本薬学会第 110 年会 (1990. 8)

石丸幹二*, 米光 裕*, 遠藤 徹*, 佐竹元吉, 下村講一郎: ロベリアの毛状根培養と成分研究

日本生薬学会第 37 回年会 (1990. 11)

*1 佐賀大学農学部

*2 (株) ツムラ分子遺伝学研究所

相見則郎*, 大矢菜穂子*, 海老沢康行*, 坂井進一郎*, 佐竹元吉: ペルー産植物 *Uncaria guianensis* に含まれる新規トリテルペノイド配糖体

日本薬学会第 111 年会 (1991. 3)

* 千葉大学薬学部

Olaniyi, A. A. and Satake, M.: Contributions to the phytochemistry of medicinal plants growing in Nigeria

日本薬学会第 111 年会 (1991. 3)

吉松嘉代, 下村講一郎, 向井録三郎*¹, 大澤勝次*², 鎌田 博*³, 山川 隆*⁴, 石丸幹二*⁵: 南米産薬用植物 *Phyllanthus niruri* に関する研究 1. 組織培養系の確立

日本薬学会第 111 年会 (1991. 3)

*¹ 国立予防衛生研究所・霊長類センター

*² 農水省生物資源研究所

*³ 筑波大学遺伝子実験センター

*⁴ 東京大学農学部

*⁵ 佐賀大学農学部

黒柳正典*, 内田幸作*, 上野 明*, 佐竹元吉, 下村講一郎: *Baccharis trinervis* の成分研究

日本薬学会第 111 年会 (1991. 3)

* 静岡県立大学薬学部

石丸幹二*¹, 山川 隆*², 鎌田 博*³, 向井録三郎*⁴, 吉松嘉代, 下村講一郎: 南米産薬用植物 *Phyllanthus niruri* に関する研究 2. 成分及び生理活性

日本農芸化学会 1991 年度大会 (1991. 4)

*¹ 佐賀大学農学部

*² 東京大学農学部

*³ 筑波大学遺伝子実験センター

*⁴ 国立予防衛生研究所・霊長類センター

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2年度に行った演題は次のとおりである。

第326回(平成2年4月10日)

1. 化粧品安全性を予測する評価法に関する研究(1)
——培養表皮モデルのPermeabilityを利用する *in vitro* 試験法——
環境衛生化学部 ○木 嶋 敬 二
齊 藤 恵美子
武 田 明 治
2. 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
大阪支所 食品試験部 長谷川 ゆかり
3. 大腸菌 *umuD* ミュータントの単離とその解析
変異遺伝部 能 美 健 彦
4. 8-ヒドロキシグアニンを指標とした非変異原性発がん物質の研究
毒 性 部 長谷川 隆 一
5. ビーグル犬の加齢による血清成分の推移
毒 性 部 齊 藤 実

第327回(平成2年5月8日)

1. ホルボールエステルによるヒト成長ホルモン受容体の down-regulation と蛋白質リン酸化反応の役割
機能生化学部 ○斎 藤 嘉 朗
代謝生化学部 鈴 木 和 博
2. デジタル化ビデオ顕微鏡法によって観察されるホルモン刺激によって生じる単一肝細胞の細胞内カルシウムオッシレーション
薬 理 部 川 西 徹
3. 単一神経細胞を用いた薬効薬理的研究: 環境汚染物質クロルディーコンの場合
薬 理 部 ○井 上 和 秀
中 沢 憲 一
藤 森 観之助
4. Musk xylol の B6C3F1 マウスにおける長期毒性/癌原性に関する研究
病 理 部 ○松 島 裕 子
小野寺 博 志

前 川 昭 彦

林 裕 造

毒 性 部 黒 川 雄 二

5. 染色体型異常を誘発するピリドンカルボン酸系誘導体について

変異遺伝部 祖父尼 俊 雄

6. Okadaic acid 及び類似化合物の培養細胞トランスフォーメーションに対するプロモーション作用

衛生微生物部 酒 井 綾 子

第328回(平成2年6月12日)

1. 玄米及び玄麦の発芽を用いた γ 線照射判別法
食 品 部 河 村 葉 子
2. 放射線滅菌されたポリウレタンの崩壊と架橋の機構について
療 品 部 新 谷 英 晴
3. 化学物質の安全性評価に関わる国際機関の活動と成果に基づくデータベースの作成と利用
化学物質情報部 ○関 沢 純
食品添加物部 山 本 都
4. サルを用いた薬物精神依存性試験と薬物自己投与装置について
毒 性 部 関 田 清 司
5. WBN/Kob ラットにおける精巣の萎縮性病変について
病 理 部 ○佐 藤 元 信
古 川 文 夫
今 沢 孝 喜
篠 田 和 俊
高 村 直 子
高 橋 道 人
6. 大腸菌のリン酸レギュロン遺伝子群の発現調節: *pho B* 及び *pho R* 突然変異体の解析
変異遺伝部 山 田 雅 巳

第329回(平成2年7月10日)

1. 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る組織中のタンパク質非結合鉄の定量
生 物 薬 品 部 ○川 崎 ナ ナ
谷 本 剛
2. 畜水産食品中の残留合成抗菌剤の一斉分析法について

- 食 品 部 村 山 三 徳
3. クロマトグラフィの定量精度と分離
療 品 部 ○林 謙
食 品 部 松 田 りえ子
4. 安息香酸ナトリウム塩およびカリウム塩の吸収、
分布、代謝、排泄
代謝生化学部 ○紅 林 秀 雄
高 橋 昭 江
5. Chlorpyrifos のラットにおける 28 日間反復経
口投与毒性試験とコリンエステラーゼ活性阻害
について
毒 性 部 ○小 川 幸 男
鈴 木 幸 子
内 田 雄 幸
金 子 豊 蔵
6. 電子レンジ湿式分解-ICP 発光分光法による生
体試料中の多元素同時分析
毒 性 部 鈴 木 幸 子
7. デジタル化ビデオ顕微鏡法の細胞毒性研究への
応用
薬 理 部 川 西 徹

第 330 回 (平成 2 年 9 月 11 日)

1. ESR 測定による臭素酸カリウムの活性酸素生
成の検討
毒 性 部 佐 井 君 江
2. 単一神経細胞を用いた薬効薬理的研究: ATP
誘発神経伝達物質放出について
薬 理 部 ○井 上 和 秀
中 沢 憲 一
藤 森 観之助
3. 4NQO マウス肺腫瘍発生における Permethrin
(合成ピレスロイド) の影響
病 理 部 ○小笠原 裕 之
矢 澤 る り
畝 山 智香子
古 田 京 子
佐 藤 秀 隆
今井田 克 己
林 裕 造
4. MDI/PTMG/1,4-BD 系ポリウレタンのラッ
ト皮下長期埋入の影響について
療 品 部 ○中 村 晃 忠
小 嶋 茂 雄
新 谷 英 晴

- 伊佐間 和 郎
- 毒 性 部 ○川 崎 靖
高 田 幸 一
中 路 幸 男
黒 川 雄 二
- 化学物質情報部 會 田 喜 崇
有 機 化 学 部 栗 原 正 明
宮 田 直 樹
- 変 異 遺 伝 部 祖 父 尼 俊 雄
民 生 科 学 協 会 研 究 所 内 間 高 夫
藤 卷 正 人

第 331 回 (平成 2 年 10 月 9 日)

1. ジフェニルオキサゾール発蛍光試薬の開発とそ
の応用
薬 品 部 豊 岡 利 正
2. PTMG/MDI/BD 系ポリウレタンの IR, DSC,
X 線回折法による分析
——モデル化合物を用いた基礎的検討——
療 品 部 ○伊佐間 和 郎
小 嶋 茂 雄
中 村 晃 忠
3. Tetramethylpyrazine 及び Ferulic acid のラ
ット子宮自発運動の抑制作用発現機序の検討
生 薬 部 ○馬 建 平
尾 崎 幸 紘
原 田 正 敏
4. ラット肝臓 2,4-Dienoyl-CoA Reductase の
cDNA クローニングと細胞内局在性
毒 性 部 廣 瀬 明 彦
5. 神経機能障害発現物質クロルテコンのイオン・
チャンネル阻害作用
薬 理 部 ○中 沢 憲 一
井 上 和 秀
藤 森 観之助
6. 喫煙曝露によるハムスターの気管・気管支およ
び肺の初期病変と過酸化脂質量
病 理 部 ○吉 村 博 之
篠 田 和 俊
岡 宮 英 明
古 川 文 夫
高 橋 道 人
佐 賀 医 大 長 谷 川 亨
7. HeLa 細胞の新しい分類について
変 異 遺 伝 部 ○片 岡 英 子

本間正充
大西清方
水沢博

第332回 (平成2年11月13日)

- convolution と deconvolution-薬物吸収量の推定および予測への応用
薬品部 香取典子
- 生分解性高分子マトリックス中におけるフロモキセフ, シトラビンおよびエトポシドの分解
薬品部 ○阿曾幸男
吉岡澄江
- 覚醒剤起源の解明のための HPLC による光学異性体分析
薬品部 ○木倉瑠理
島峯望彦
中原雄二
- キトサンの製剤への利用
大阪支所薬品試験部 小室徹雄
- 培養細胞を用いた眼刺激試験代替法
療品部 ○五十嵐良明
土屋利江
中村晃忠
- ミニサテライト遺伝子の Somatic Mutation
変異遺伝部 ○本間正充
片岡英子
大西清方
水沢博
- BHA のキノン誘導体の DNA 損傷作用とキノン体の生成
——前胃と腺胃の比較——
化学物質情報部 ○森本和滋
代謝生化学部 高橋昭江
奥平和穂

第333回 (平成2年12月11日)

- β -ガラクトシダーゼ凍結乾燥品の安定性に対する添加物質の影響
薬品部 伊豆津健一
- 低分子化ヘパリンの抗ファクター Xa 活性測定
大阪支所薬品試験部 石光進
- In vivo* 及び *in vitro* 試験での催奇形性活性相関
——ビタミンA類緑体を用いて——
療品部 土屋利江

- モノクローナル抗体を用いるツェラレノンの免疫測定法について
機能生化学部 ○池淵秀治
手島玲子
田中東一
沢田純一
衛生微生物部 一戸正勝
- 蛍光性ナトリウムイオン指示薬 SBF1 を用いた肝細胞内ナトリウムイオン濃度の測定
薬理部 川西徹
- 細胞バンク運営に利用するデータベースの確立
変異遺伝部 ○水沢博
片岡英子
本間正充
大西清方

第334回 (平成3年1月16日)

- 繊維製品による接触皮膚炎事例の検討
——ポリウレタン中の UV 吸収剤——
療品部 鹿庭正昭
- 色素製品検査の迅速化の試み
——色素中の塩化物, 硫酸塩試験法
並びに乾燥減量試験法の改良——
大阪支所食品試験部 ○柴田正
柿内雅
川本礼子
辻澄子
伊藤誉志男
- l-, d-, dl-ノルエフェドリンの体内動態の違いについて
生薬部 ○鎌倉浩之
原田正敏
- Menadione および H₂O₂ 耐性 CHL 細胞株を用いた BHA 代謝産物の毒性発現機構の解析
変異遺伝部 鈴木孝昌
- CH1 ドメインが欠損した免疫グロブリン G の構造と機能
化学物質情報部 五十嵐貴子

第335回 (平成3年2月12日)

- HPLC-ICP 直結法による多元素同時状態分析
食品添加物部 米谷民雄
- 紅麴より得られた黄色色素について
食品添加物部 ○佐藤恭子
岩上敏

- 合 田 幸 広
義 平 邦 利
3. 細胞内 ATP 量を指標にした毒性評価法の開発
——赤血球 ATP 量と溶血の関係——
大阪支所生物試験部 小 川 義 之
4. Salmonella typhimurium Ada タンパクと E. coli Ada タンパクとの比較研究
変異遺伝部 ○羽 倉 昌 志
能 美 健 彦
祖父尼 俊 雄
化学物質情報部 森 本 和 滋
5. HPLC-電気化学検出器 (ECD) を用いた生体試料からの BHA の分析法
食品添加物部 ○山 本 都
山 田 隆
兼 平 邦 利
毒 性 部 田 中 悟
薬 理 部 川 島 邦 夫
高 仲 正
6. メラミンの衛生化学的研究
——微生物の増殖におよぼすメラミンの影響——
食品添加物部 ○杉 田 たき子
石 綿 肇
- 大阪支所食品試験部 外 海 泰 秀
2. 化学発光法によるアミノ酸分析
薬 品 部 豊 岡 利 正
3. メタロチオネインに対する高親和性モノクローナル抗体 (MT 45-5-3) の調製および性質
機能生化学部 ○菊 池 裕
沢 田 純 一
4. 線虫 (C. elegans) を用いた毒性試験法の開発
1: 毒性指標の検討
化学物質情報部 ○小 原 理 佐
中 条 利 香
神 沼 二 真
毒 性 部 会 田 喜 崇
5. 線虫 (C. elegans) を用いた毒性試験法の開発
2: 自動分析法の検討
化学物質情報部 ○神 田 一 宏
高 橋 肇
神 沼 二 真
毒 性 部 会 田 喜 崇
6. Salmonella typhimurium 高感受性株の分子的基础: NR 株, 1,8-DNP 株における変異部位の同定, および活性中心の検索
変異遺伝部 ○渡 辺 雅 彦
能 美 健 彦
祖父尼 俊 雄
7. 蛍光色素 (Lucifer Yellow CH) を用いた肝細胞間コミュニケーションの測定と化学物質の影響について
薬 理 部 郭 新 彪

第 336 回 (平成 3 年 3 月 12 日)

1. レモン及びレモンジュース中の収穫後使用農薬 (DP, OPP, TBZ, 2,4-D 及びイマザリル) の一斉分析法

第 105 回 (平成 2 年 6 月 25 日)

1. 大阪支所の現状分析と将来への展望について
支 所 長 伊 阪 博
2. 薬品試験部の業務と研究について
薬 品 試 験 部 岡 田 敏 史
3. 大阪支所の将来について
生 物 試 験 部 川 崎 浩 之 進
4. 国立衛生試験所, 大阪支所そして食品試験部の
現状の問題点及び将来構想について
食 品 試 験 部 伊 藤 蒼 志 男

第 106 回 (平成 2 年 7 月 24 日)

1. 野菜の亜塩素酸ナトリウム及び次亜塩素酸ナト
リウム処理により生成する有機塩素化合物
食 品 試 験 部 長 谷 川 ゆ かり
2. ポリアクリルアミドスラブゲル電気泳動法によ
るインスリン注射液の分析
薬 品 試 験 部 宮 崎 玉 樹
3. 医療用具の発熱試験法について
生 物 試 験 部 小 川 義 之

第 107 回 (平成 2 年 10 月 29 日)

1. FPD-GC 及び GC-MS による輸入食品中有機
リン系農薬の一斉分析
食 品 試 験 部 外 海 泰 秀
2. 電気化学的検出器付 HPLC を用いた食品中の
パパインの高感度分析法
食 品 試 験 部 柴 田 正

第 108 回 (平成 2 年 11 月 26 日)

1. A 群溶血性レンサ球菌発熱性外毒素 (SPE) に
よる大腸菌内毒素の致死毒性増強機序について

(III) マクロファージに対する SPE の作用機構

- 生 物 試 験 部 村 井 敏 美
2. 各種食品中の亜硫酸の自然含有量調査研究
食 品 試 験 部 辻 澄 子
3. キチン・キトサンを基剤とした直打錠からの薬
物の溶出挙動
薬 品 試 験 部 小 室 徹 雄

第 109 回 (平成 2 年 12 月 21 日)

1. 培養細胞を用いたインシュリンの *in vitro* バイ
オッセイ法の考案: (第 2 報)
生 物 試 験 部 天 野 博 夫
2. キトサンの分子量及び粘度
薬 品 試 験 部 四 方 田 千 佳 子
3. 食品タール色素における乾燥減量試験法とカー
ルフィシャー法の比較検討
食 品 試 験 部 柿 内 雅

第 110 回 (平成 3 年 1 月 28 日)

1. ラット α_1 -酸性糖蛋白に対する β -ブロッカー
の立体特異的結合
薬 品 試 験 部 村 井 真 美
2. キャピラリー ECD-GC による農産物中の 7 種
のピレスロイド系農薬の一斉分析法
食 品 試 験 部 中 村 優 美 子
3. 胎仔毒性の生化学的指標に関する研究 長鎖ポ
リイソプレノイドアルコール (ドリコール) 類
について
生 物 試 験 部 伊 丹 孝 文
4. ブチルベンジルフタレート of ラットにおける胚
致死作用
生 物 試 験 部 江 馬 眞

 特別講演会

- 平成2年7月27日
 「毒性学における論議」について
 —国際的データベースの価値について—
 Centre for Medicines
 Research Prof. Stuart R. Walker
 「天然物の NMR による構造解析」について
 東京大学応用微生物研究所教授
 瀬戸 治 男
- 平成2年9月6日
 「アラキドン酸代謝異常と病態」について
 東京医科歯科大学教授 室 田 誠 逸
 平成2年12月14日
 「細胞障害性マクロファージの作用機構」について
 東京大学教授 大 沢 利 昭
- 平成2年10月3日
 「DNA複製における突然変異制御の分子機構」
 について
 九州大学医学博士 真 木 寿 治
 平成3年1月8日
 「P-450の研究の歩みと将来展望」について
 慶應義塾大学教授 加 藤 隆 一
- 平成2年10月17日
 「心血管系の新しいペプチド作動性調節」につい
 て
 筑波大学教授 後 藤 勝 年
 平成3年2月26日
 「ホスホリパーゼ A₂ と病態」について
 東京大学教授 井 上 圭 三
- 平成2年11月6日
 「薬物作用の速度論」について
 東京大学教授 花 野 学
 平成3年2月28日
 「*in vivo* ESR を用いた生体内ラジカルの測定」
 について
 昭和大学助教授 内 海 英 雄
- 平成2年11月21日
 「これからの細胞生物学」について
 東京都臨床医学総合研究所部長
 矢 原 一 郎
 平成3年3月20日
 「Transposons, DNA sequencing, and reverse
 genetics in *Escherichia coli*」について
 Washington University
 School of Medicine,
 St. Louis, Mo
 Prof. Douglas E. Berg
- 平成2年11月27日

 支所特別講演会

- 平成3年2月19日
 多成分系としての天然物（薬品，食品）の有効
 性，安全性をどう評価するか：方法論を考える
 国立京都病院臨床研究部
 内分泌代謝疾患センター 主任研究官
 田 代 眞 一

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, 有化, 代生, 衛微, 変異, 大食)
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性判定に関する研究(生物, 療品, 食添, 機生, 薬理, 病理, 大生)
Study on *in 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. 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(機生)
Study on improvement of radioimmunoassay by genetic engineering
2. 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(生物)
Study on the development of assay methods of radiopharmaceuticals by high-performance liquid chromatography
3. 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及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
4. 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及び有効性確保に関する研究(生物)
Study on acquirement of safety and efficacy of protein drugs by protein-hybrid formation

5. 化粧品安全性を予測する評価技術に関する研究(環境)
Evaluation methods for safety of cosmetics and quasi-drugs
6. リンパ球の分裂中期細胞集積法に関する研究(変異)
Establishment of the method to accumulate metaphases in cultured human lymphocytes
7. タンパク性アレルゲンの標識化合物を用いる高感度・特異的診断法の開発に関する研究(機生, 衛微)
Study on the development of sensitive radioassay systems for fungal allergens
8. 薬物レセプターの新簡易アフィニティラベル法の開発研究(機生, 代生)
Study on photoaffinity-labeling of drug receptors
9. 人工透析器の放射線滅菌による生体適合性の変化に関する研究(療品)
Effects of γ -ray sterilization on biocompatibility of hemodialyzers

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. 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
2. 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(筑植)
Research on production of new biologically active compounds by transgenic plants
3. 新しい植物実験系開発のための基盤技術に関する研究
 - (1) 形態分化と機能分化の相関に関する実験系の開発(筑植)

Research and development of basic technology for molecular and cellular analysis of plant system

- (1) Research and development of basic technology for the analysis of plant cell growth and differentiation

国立機関公害防止等試研究費（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 on the assessment of putative potential toxicity of environmental pollutants at low dose using culture systems

2. 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（大生、毒性、薬理）

Evaluation methods for the effects of environmental pollutants on brain and neuronal functions

3. 動物実験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（療品、有化、機生、代生、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（衛微）

Safety assessment 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、大食）

Evaluation methods 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及び安全性等に関する研究（環境）

Studies on the behaviors and safety assessment 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、大食）

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 pollutants related to high technology industries

厚生科学研究費補助金（厚生省）

1. 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

2. 難病の疾患モデル調査研究（変異）

Investigation of malignant disease models

3. 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

4. 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

5. 医療用具及び医用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）

Study on establishing guideline for preclinical toxicity evaluation of medical devices and biomaterials

6. 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、代生、情報、毒性、薬理、病理、変異）

Study on improvement of risk assessment from chemical exposure

7. 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（機生）

Studies on the quality control and clinical evaluation of the drugs for diagnosis by *in vitro* immunological reactions

8. 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）

Study on risk assessment of carcinogenic pharmaceuticals

9. 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

10. 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

11. 細菌性食中毒等防止に関する調査研究（衛微）

- Study on the surveillance system for control of bacterial food poisoning
12. 糖尿病の合併症に関する研究 (生物)
Study on diabetic complications
13. 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 for preparing guidelines of chemical and biological evaluation methods for dental materials
14. 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
15. 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
16. 食品中の有害物質等の実態に関する研究 (食品, 食添, 衛微)
National survey of pollutants in foods
17. 新開発食品素材健康影響評価研究 (所長)
Regulatory issues on newly developed foodstuffs
18. 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 methamphetamine sample
19. 画像処理法による好塩基球細胞株のカルシウム動態の解析 (機生)
Analysis of calcium signals in rat basophilic leukemia cells using a digital imaging fluorescence microscope
20. 食品添加物の国際的安全対策に関する調査研究 (食添)
Investigation on international countermeasure for safety of food additives
21. ネットワーク化に対応した高度情報技術支援部門の概念に関する研究 (情報)
On designing advanced informational support systems in the age of networks
22. 生分解性プラスチック分解生成物の安全性評価に関する研究 (毒性, 食添, 情報)
Sanitary indexes on biodegradative plastics
23. 動植物由来の食品添加物の規格化に関する研究 (食添, 大食)
Study on standardization of food additives made from animal and plant
24. 老化・疾病関連遺伝子探索に有用な DNA プローブの開発に関する研究 (病理)
Study on development of DNA probes useful for research of age-and disease-related genes
25. 内的及び外的因子による発がんの促進と抑制 (病理)
Enhancement and suppression of carcinogenesis by internal and external factors
26. 新規原料配合化粧品安全性評価のための試験法の研究 (薬理, 毒性)
Studies on the methods for the safety evaluation of cosmetics containing new chemicals
27. 臨床診断用医薬品原料規格の見直しのための基礎研究 (生物)
Studies on standardization of diagnostic Drugs
28. 省令タール色素中のレーキ色素の規格整備に関する研究 (環境)
Study on the standards of lakes of coal-tar colors listed in the ministerial ordinance
29. 諸外国で使用される新開発農薬の安全性評価方法に関する研究 (食品)
Safety evaluation of newly developed pesticides used in foreign countries
30. 好酸球増多・筋肉痛症候群 (EMS) 発症に対する L-トリプトファン含有食品の関与に関する研究 (所長, 薬品, 生物, 療品, 食品, 食添)
Investigation of the cause of Eosinophilia Myalgia Syndrome(EMS) associated with L-tryptophan-containing foods
31. バイオテクノロジー応用医薬品の有効性・安全性等に関する規制と国際的ハーモナイゼーションの研究 (センター長, 生物)
Studies on the international harmonization of regulatory policies on the testing and evaluation of quality, safety and efficacy of biotechnology drugs
32. 日本薬局法の国際化方策及び基盤整備に関する研究 (機生, 所長)
Study on the strategies of international harmonization and revision of the pharmacopoeia of Japan
33. 無菌性, 非発熱性の確認のための各種品質試験の利用等に関する研究 (衛微)
Study on new test systems for quality exami-

nation regarding sterilization and pyrogenicity

34. 中枢機生修復促進の薬効薬理手法に関する研究 (薬理)

Research on pharmacological methods to promote recovery from CNS disfunction

35. 食鳥の微生物制御に関する調査研究 (衛微)

Study on the technology for microbiological control of poultry meats

36. 卵のサルモネラ菌汚染に関する調査研究 (衛微)

Study on the incidence of Salmonella in freshly shelled eggs and egg products

37. 医薬品の規格及び試験法に関する研究 (薬品, 生物, 大薬)

Studies on the specifications and testing methods for drugs

38. 化学的合成品以外の食品添加物成分の同定に関する研究 (大食)

Identification methods for natural food additives from food products

39. 輸入食品の安全性確保に関する研究 (大食)

Study on maintenance of imported food safety

科学研究費補助金 (文部省)

1. コホート研究による発がん要因の評価に関する研究 (病理)

Assessment of carcinogenic risks using cohort study in human cancers

2. 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 (衛微)

Screening of restriction endonucleases and application to the epidemiology of detection of specific restriction endonucleases in *vibrio cholerae*

3. 成長ホルモンによる免疫機能の調節に関する研究 (機生)

Studies on the regulation of immune functions by growth hormone

4. エンドトキシン疾患の診断法の確立と治療へのアプローチ (衛微)

Establishment of diagnosis for endotoxiemia and the approach to its treatment

5. 3T3-L1 前脂肪細胞を用いたインシュリン感受性形質の発現に関する研究 (大生)

Studies on the expression of insulin sensitive phenotypes in 3T3-L1 preadipocytes

6. 膵癌発生の機構解析とその制御に関する研究 (病理)

Study on mechanism of pancreatic carcinogenesis and its prevention

がん研究助成金 (厚生省)

1. 亜硝酸処理により生成するN-ニトロソ化合物等の変異原性・がん原性物質に関する研究 (谷村前所長, 衛微)

Studies on mutagenic or carcinogenic substances, such as *N*-nitroso compounds, produced by treatment with nitrite

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. 発がん物質の規制決定に関する基礎的研究 (病理, 食添)

Basic study for regulation of environmental carcinogens

4. 発がん物質による環境汚染と生体影響の定量的解析 (環境)

Studies on quantitative analysis of carcinogenic pollutants in drinking water

5. 複数発がん要因によるリスク評価の基礎研究 (病理, 変異, 有化)

Basic study for risk evaluation by multiple carcinogenic factors

6. 環境化学物質による発がん修飾の評価に関する研究 (センター長, 病理, 有化)

Study on evaluation of modification of carcinogenesis by environmental chemicals

7. 体内ニトロソ化合物の発がん影響に関する研究 (薬理)

Studies on the nitroso compounds in the body and their carcinogenicity

8. 食品中に含まれる要因による消化器発がん発生の修飾 (病理)

Modification of gastro-intestinal carcinogenesis by factors found in food

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

乱用薬物基礎研究

1. 薬物乱用, 特に市販配合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 (センター長, 毒性, 薬品, 有化, 機生)
Study on the 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. ジメチルジチオカルバミン酸亜鉛のラットに対する催奇形性試験 (大生)
Teratogenic evaluation of zinc dimethyl-dithiocarbamate in rats

食品等試験検査費

1. 食品添加物の有用性に関する研究 (食添, 大食)
Study on efficacy of food additives
2. 食用タール色素の製品検査法の開発に関する研究 (食添, 大食)
Establishment and improvement of quality control methods for food colors
3. 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
4. 水道水中低沸点有化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
5. 日本人の食品添加物の一日摂取量調査に関する研究 (大食)
Estimation of daily intake of food additives according to market basket studies in Japan
6. 食品由来成分の含有量実態調査研究 (大食)
Investigation on some compounds originating in various natural foods
7. 残留農薬の多成分分析法の確立 (大食, 食品)
Establishment of systematic analytical methods for multipesticidal residue
8. 農作物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 (食品, 大食)
Decrease of post-harvest pesticides contained

in agricultural products by 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
2. 食品照射の検地法に関する国際調整および開発研究 (食品)
International co-ordinated research on analytical detection methods for irradiation treatment of foods

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 (機生)
Development of methods for isolation and functional analysis of neurotrophic factor 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 neurocircuit 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 (衛微)
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 (筑植)
The identification of morphological and chemical characteristics of transgenic plants cultivated under artificial system
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 materials of medici-

- nal 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 of screening methods for the efficacy or safety of drugs using culture systems and their evaluation
 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 (代生)
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 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 system and stability study of their physicochemical 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 (大薬)
Characterization of chitosan and its derivatives and their application to drug formulations
 17. 低分子化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 (大薬)
Studies on standardization of evaluating method of anti-coagulant 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形細胞形成能に関する研究 (療品)
Studies on tumorformation by materials for implant
 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 (大生)
Studies on safety evaluation methods and application of hemodialysis membranes and materials
 21. 多形核白血球の活性酸素産生系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 polymorphonuclear 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 (所長, 薬品)
Development of evaluation methodology for new pharmaceutical dosage forms
 2. 薬用資源植物の確保, 開発及び利用 (筑植, 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 (衛微)

Screening of restriction endonucleases useful for DNA diagnosis

対がん十カ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)

Assessment of exposure of man to carcinogens and related chemical in the environment

- 2. 生活環境中の発がん関連物質の究極活性物質の生体内生成の究明と安全性評価法の確立に関する研究 (代生, 有化, 毒性, 変異, 食添, 衛微)

Development of chemical, biochemical and toxicological methods for safety evaluation of environmental carcinogens; especially of non-genotoxic carcinogens

部 名 略 称

薬 品 部.....薬品
 生 物 薬 品 部.....生物

生 薬 部.....生薬
 療 品 部.....療品
 環 境 衛 生 化 学 部.....環境
 食 品 部.....食品
 食 品 添 加 物 部.....食添
 有 機 化 学 部.....有化
 機 能 生 化 学 部.....機生
 代 謝 生 化 学 部.....代生
 衛 生 微 生 物 部.....衛微
 化 学 物 質 情 報 部.....情報
 毒 性 部.....毒性
 薬 理 部.....薬理
 病 理 部.....病理
 変 異 遺 伝 部.....変異
 総 合 評 価 研 究 室.....評価
 大 阪 支 所 薬 品 試 験 部.....大薬
 大 阪 支 所 食 品 試 験 部.....大食
 大 阪 支 所 生 物 試 験 部.....大生
 北 海 道 薬 用 植 物 栽 培 試 験 場.....北植
 筑 波 薬 用 植 物 栽 培 試 験 場.....筑植
 伊 豆 薬 用 植 物 栽 培 試 験 場.....伊植
 和 歌 山 薬 用 植 物 栽 培 試 験 場.....和植
 種 子 島 薬 用 植 物 栽 培 試 験 場.....種植

国家検定および検査等の処理状況

Survey of the Results of National Tests

平成2年度の検定検査等の処理状況は次のとおりである。

区 分	平成2年度処理件数			対前年度 増減数	対前年度 増減率
	東 京	大 阪	合 計		
国 家 検 定	(0) 0	(91) 147	(91) 147	56	61.54
国 家 検 査	(0) 0	(79) 106	(79) 106	27	34.18
製 品 検 査	(422) 22	(489) 836	(911) 858	△ 53	△ 5.82
特 別 審 査 試 験	(165) 219	(0) 0	(165) 219	54	32.73
特 別 行 政 試 験	(134) 75	(2) 12	(136) 87	△ 49	△ 36.03
一 斉 取 締 試 験	(222) 197	(43) 55	(265) 252	△ 13	△ 4.91
輸 入 食 品 検 査	(166) 20	(65) 9	(231) 29	△ 202	△ 87.45
一 般 依 頼 試 験	(0) 2	(0) 0	(0) 2	2	—
合 計	(1,109) 535	(769) 1,165	(1,878) 1,700	△ 178	△ 9.48

() 内数字は平成元年度処理件数

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2年度国家検定品目別月別判定別件数
実績表…………… 392頁
- 平成2年度国家検査品目別月別判定別件数
実績表…………… 392頁
- 平成2年度製品検査月別判定別件数実績表… 394頁

- 平成2年度特別審査試験月別判定別件数
実績表…………… 394頁
- 平成2年度輸入食品検査月別判定別件数
実績表…………… 394頁
- 平成2年度特別行政試験実績表…………… 398頁
- 平成2年度一斉取締試験判定別件数実績表… 398頁

平成2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	2	—	2	2	—	2	1	—	1	2	—	2	2	—	2	1	—	1
ヒトイソフエンインシュリン水性懸濁注射液	大阪	3	—	3	6	—	6	2	—	2	5	—	5	2	—	2	2	—	2
半合成ヒトインスリン亜鉛水性懸濁注射液	大阪	1	—	1	6	—	6	2	—	2	0	—	0	4	—	4	2	—	2
半合成ヒト中性インスリン注射液	大阪	2	—	2	2	—	2	3	—	3	1	—	1	2	—	2	0	—	0
半合成ヒト結晶性インスリン亜鉛水性懸濁注射液	大阪	3	—	3	0	—	0	1	—	1	1	—	1	2	—	2	0	—	0
半合成ヒト二相性イソフエンインスリン水性懸濁注射液	大阪	1	—	1	5	—	5	0	—	0	1	—	1	2	—	2	2	—	2
半合成ヒトイソフエンインスリン水性懸濁注射液	大阪	2	—	2	0	—	0	0	—	0	1	—	1	0	—	0	0	—	0
計		14	—	14	21	—	21	9	—	9	11	—	11	14	—	14	7	—	7

平成2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	3	—	3	2	—	2	3	—	3	13	—	13	7	—	7	0	—	0
内訳	内容量 100 ml 未満	3	—	3	1	—	1	2	—	2	5	—	5	2	—	2	0	—	0
	内容量 100 ml 以上	0	—	0	1	—	1	1	—	1	8	—	8	5	—	5	0	—	0
結晶性インシュリン亜鉛水性懸濁注射液	大阪	0	—	0	0	—	0	0	—	0	0	—	0	1	—	1	0	—	0
インシュリン亜鉛水性懸濁注射液	大阪	0	—	0	0	—	0	2	—	2	0	—	0	1	—	1	2	—	2
インシュリン注射液	大阪	0	—	0	0	—	0	0	—	0	0	—	0	0	—	0	2	—	2
プロタミンインシュリン亜鉛水性懸濁注射液	大阪	0	—	0	1	—	1	0	—	0	0	—	0	0	—	0	0	—	0
無晶性インシュリン亜鉛水性懸濁注射液	大阪	0	—	0	0	—	0	0	—	0	0	—	0	0	—	0	0	—	0
イソフエンインシュリン水性懸濁注射液	大阪	0	—	0	0	—	0	1	—	1	1	—	1	0	—	0	0	—	0
計		3	—	3	3	—	3	6	—	6	14	—	14	9	—	9	4	—	4

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
3	—	3	3	—	3	2	—	2	1	—	1	2	—	2	3	—	3	24	—	24
3	—	3	5	—	5	5	—	5	1	—	1	3	—	3	3	—	3	40	—	40
3	—	3	0	—	0	3	—	3	2	—	2	1	—	1	1	—	1	25	—	25
2	—	2	1	—	1	2	—	2	2	—	2	0	—	0	5	—	5	22	—	22
1	—	1	0	—	0	0	—	0	0	—	0	1	—	1	1	—	1	10	—	10
1	—	1	2	—	2	1	—	1	0	—	0	4	—	4	2	—	2	21	—	21
0	—	0	0	—	0	0	—	0	0	—	0	1	—	1	1	—	1	5	—	5
13	—	13	11	—	11	13	—	13	6	—	6	12	—	12	16	—	16	147	—	147

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
5	—	5	14	—	14	18	—	18	8	—	8	6	—	6	4	—	4	83	—	83
5	—	5	11	—	11	15	—	15	8	—	8	6	—	6	4	—	4	62	—	62
0	—	0	3	—	3	3	—	3	0	—	0	0	—	0	0	—	0	21	—	21
0	—	0	0	—	0	0	—	0	0	—	0	0	—	0	0	—	0	1	—	1
0	—	0	0	—	0	1	—	1	0	—	0	1	—	1	1	—	1	8	—	8
0	—	0	2	—	2	0	—	0	0	—	0	1	—	1	1	—	1	6	—	6
0	—	0	0	—	0	0	—	0	0	—	0	0	—	0	0	—	0	1	—	1
0	—	0	0	—	0	1	—	1	0	—	0	0	—	0	0	—	0	1	—	1
1	—	1	1	—	1	0	—	0	0	—	0	2	—	2	0	—	0	6	—	6
6	—	6	17	—	17	20	—	20	8	—	8	10	—	10	6	—	6	106	—	106

平成2年度製品検査月別

区 分	4 月			5 月			6 月			7 月			8 月			9 月		
	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計
東 京	22	—	22	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
大 阪	52	—	52	69	—	69	115	—	115	56	—	56	78	—	78	60	—	60
計	74	—	74	69	—	69	115	—	115	56	—	56	78	—	78	60	—	60

平成2年度特別審査試験月別

区 分	4 月			5 月			6 月			7 月			8 月			9 月		
	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計
東 京	45	—	45	12	—	12	28	—	28	8	—	8	—	—	—	18	—	18
試 験 件 数	54	—	54	19	—	19	30	—	30	8	—	8	—	—	—	19	—	19

平成2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
農 産 物	東京	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
水 産 物	東京	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
畜 産 物	東京	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
か ん 詰 び 類	東京	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	3	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

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
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	22	-	22
91	-	91	64	-	64	84	-	84	29	-	29	67	-	67	71	-	71	836	-	836
91	-	91	64	-	64	84	-	84	29	-	29	67	-	67	71	-	71	858	-	858

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
11	-	11	36	-	36	22	-	22	11	-	11	15	-	15	13	-	13	219	-	219
14	-	14	37	-	37	34	-	34	11	-	11	20	-	20	14	-	14	260	-	260

月別判定別件数実績表 (No.1)

10 月				11 月				12 月				1 月				2 月				3 月				合 計				試験件数
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	合格	不合格	無判定	計	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	9	10	10
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	1	2
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	4	-	7	8

平成2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	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	大阪	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
酒精飲料	東京	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	大阪	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
飲用酒精原料	東京	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	大阪	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
清涼飲料	東京	-	-	4	4	-	-	6	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	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	-	-	4	4	-	-	6	6	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	9	9	-	-
大阪	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
合計	-	-	4	4	-	-	6	6	1	-	3	4	-	-	-	-	-	-	-	-	9	9	-	-

月別判定別件数実績表 (No.2)

10 月			11 月			12 月			1 月			2 月			3 月			合 計			試験件数
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	合格	不合格	無判定計	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	10
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	19	20	20
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	5	5	-	9	9	11
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	5	5	1	28	29	31	31

平成2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	12	支所生物試験部
	2. 医薬品等の試験について	2	薬品部
	3. 医薬品等の試験について	12	療品部
麻薬課	輸入生あへ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	輸入ミネラルウォーターのベンゼンに係る検査の依頼について	9	食品部
合 計		87	東 京 75件 大 阪 12件

平成2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	195	2	0	197
大 阪	55	0	0	55
合 計	250	2	0	252

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3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	16,600	・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	12,300	・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、インフュ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、インフュンインスリン水性懸濁注射液の純度試験
4	エストリオール	100mg入り 1本	11,000	・エストリオールの確認試験および定量法
5	エピチオスタノール	100mg入り 1本	9,400	・メビチオスタンの定量法
6	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
7	塩酸チアミン	1g入り 1本	15,900	・塩酸チアミン、同散、同注射液の定量法、硝酸チアミン、乾燥酵母の定量法
8	塩酸ピリドキシン	200mg入り 1本	19,900	・塩酸ピリドキシン注射液の定量法
9	エンドトキシン	2 μ g入り 1本	15,700	・注射用水のエンドトキシン試験
10	含糖ペプシン	5g入り 1本	16,300	・含糖ペプシンの定量法
11	d-カンフル	300mg入り 1本	13,300	・d-カンフルの定量法
12	dL-カンフル	300mg入り 1本	12,200	・dL-カンフルの定量法
13	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
14	ギトキシシン	20mg入り 1本	12,300	・ジゴキシシン、同錠、同注射液の純度試験
15	血清性性腺刺激ホルモン	800単位 2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
16	コハク酸トコフェロール	150mg入り 1本	13,500	・コハク酸トコフェロールカルシウムの定量法
17	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
18	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
19	酢酸クロルマジノン	100mg入り 1本	12,100	・酢酸クロルマジノンの確認試験および定量法
20	酢酸コルチゾン	100mg入り 1本	12,000	・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
21	酢酸トコフェロール	150mg入り 1本	13,500	・酢酸トコフェロールの確認試験および定量法
22	酢酸ヒドロコルチゾン	100mg入り 1本	12,600	・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
23	酢酸プレドニゾン	100mg入り 1本	12,500	・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
24	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
25	ジギタリス	1g入り 3本	12,100	・ジギタリス、同末の定量法

日本薬局方標準品

	標準品名	包装単位	価格	使用目的
26	ジギトキシン	50mg入り 1本	12,200 ^円	・ジギトキシン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
27	シクランデラート	300mg入り 1本	12,400	・シクランデラートの定量法
28	ジクロフェナミド	100mg入り 1本	9,300	・ジクロフェナミド、同錠の定量法
29	ジゴキシン	50mg入り 1本	12,100	・ジゴキシン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
30	酒石酸水素エビネフリン	50mg入り 1本	10,900	・エビネフリン、ノルエビネフリン、同注射液の純度試験
31	酒石酸水素ノルエビネフリン	50mg入り 1本	12,100	・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
32	ショ糖オクタ硫酸エステルカリウム	1g入り 1本	12,000	・スクラルファートの定量法
33	G-ストロファンチン	100mg入り 1本	12,600	・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
34	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
35	チロジン	500mg入り 1本	10,700	・パンクレアチンのたん白消化力試験
36	デキサメタゾン	100mg入り 1本	12,500	・デキサメタゾンの確認試験および定量法
37	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
38	トコフェロール	150mg入り 1本	13,500	・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、酢酸トコフェロールの純度試験
39	トリアムシノロン	100mg入り 1本	12,600	・トリアムシノロンの確認試験および定量法
40	トリアムシノロンアセトニド	100mg入り 1本	12,500	・トリアムシノロンアセトニドの確認試験および定量法
41	トルナフタート	200mg入り 1本	12,500	・トルナフタートの確認試験および定量法、同液の定量法
42	トロンピン	500単位 2本入り	29,500	・トロンピンの定量法
43	ニコチン酸	500mg入り 1本	13,200	・ニコチン酸注射液の定量法
44	ニコチン酸アミド	500mg入り 1本	14,300	・ニコチン酸アミド注射液の定量法
45	脳下垂体後葉	20mg入り 2本	12,300	・オキシトシン注射液、バソプレシン注射液の純度試験および定量法
46	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	3,550	・酢酸レチノール、パ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
47	薄層クロマトグラフ用 パルミチン酸レチノール	10,000単位入り 10カプセル	3,500	・酢酸レチノール、パ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
48	パラアミノベンゾイルグルタミン酸	500mg入り 1本	23,200	・葉酸の純度試験
49	ヒドロクロロチアジド	100mg入り 1本	11,900	・ヒドロクロロチアジドの定量法
50	ヒドロコルチゾン	100mg入り 1本	12,500	・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
51	フルオシノニド	100mg入り 1本	14,400	・フルオシノニドの確認試験および定量法
52	フルオシノロンアセトニド	50mg入り 1本	12,300	・フルオシノロンアセトニドの定量法
53	プレドニゾン	100mg入り 1本	12,300	・プレドニゾロンの確認試験および定量法、同錠の確認試験、溶出試験および含量均一性試験

日本薬局方標準品

	標準品名	包装単位	価格	使用目的
54	プロゲステロン	50mg入り 1本	12,200	・プロゲステロンの確認試験
55	プロピオン酸ベクロメタゾン	100mg入り 1本	15,600	・プロピオン酸ベクロメタゾンの確認試験および定量法
56	ベタメタゾン	100mg入り 1本	12,500	・ベタメタゾンの確認試験および定量法
57	ヘパリンナトリウム	1,200単位 1本入り	22,500	・ヘパリンナトリウム, 同注射液の定量法, 硫酸プロタミンおよび同注射液の抗ヘパリン試験
58	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
59	メストラノール	100mg入り 1本	11,700	・メストラノールの確認試験および定量法
60	メチルジゴキシン	50mg入り 1本	10,600	・メチルジゴキシンの確認試験および定量法
61	メトキサレン	200mg入り 1本	11,700	・メトキサレンの定量法
62	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
63	葉酸	500mg入り 1本	14,400	・葉酸, 同錠, 同注射液の定量法
64	ラナトシド C	100mg入り 1本	12,400	・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
65	リボフラビン	200mg入り 1本	16,300	・リボフラビンおよび同散の定量法, リン酸リボフラビンナトリウム, 同注射液の定量法
66	硫酸プロタミン	100mg入り 1本	22,100	・イソフェニンスリン水性懸濁注射液の純度試験
67	リン酸ヒドロコルチゾンナトリウム	100mg入り 1本	11,600	・リン酸ヒドロコルチゾンナトリウムの確認試験および定量法
68	リン酸ベタメタゾンナトリウム	100mg入り 1本	12,100	・リン酸ベタメタゾンナトリウムの確認試験および定量法
69	レセルピン	50mg入り 1本	24,000	・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3年4月1日現在）

	標準品名	包装単位	価格	使用目的
1	インドシアニングリーン	300mg入り1本	12,300	・インドシアニンググリーンおよびその製剤の定量法
2	ウロキナーゼ	1,000単位 1本入り	15,400	・ウロキナーゼおよびその製剤の定量法
3	エストラジオール	50mg入り 1本	12,300	・エストラジオールおよびその製剤の純度試験
4	エストロン	50mg入り 1本	12,400	・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	12,000	・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
9	テオブロミン	100mg入り1本	9,000	・ベントキシフィリンの純度試験
10	ヒアルロニダーゼ	500mg入り1本	14,600	・注射用ヒアルロニダーゼの定量法
11	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
12	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
13	プロピオン酸テストステロン	50mg入り 1本	12,100	・プロピオン酸テストステロンおよびその製剤の定量法
14	マレイン酸メチルエルゴメトリン	50mg入り 1本	12,100	・マレイン酸メチルエルゴメトリンの定量法
15	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	39,200	・融点測定用温度計, 同装置の補正
16	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
17	リゾチーム	500mg入り1本	21,000	・リゾチーム製品の定量法
18	リン酸デキサメタゾンナトリウム	100mg入り1本	11,700	・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
19	リン酸ヒスタミン	50mg入り 1本	10,300	・ヒスタミン試験
20	リン酸プレドニゾンナトリウム	100mg入り1本	11,700	・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

国立衛生試験所標準品 (色素試験用標準品)

(平成3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	・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3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2年度国立衛生試験所標準品出納状況

(医薬品等試験用標準品)

標準品名	前年度末 在庫数量	製造数量	売払数量	自家消費等 数量	年度末 在庫数量	備考
	個	個	個	個	個	
アスコルビン酸	160	200	253	1	106	
安息香酸エストラジオール	15	0	4	0	11	
インスリン	176	0	51	19	106	
ウロキナーゼ	104	100	119	0	85	
エストラジオール	12	50	36	0	26	
エストリオール	0	20	4	0	16	
エストロン	38	0	0	0	38	
エピチオスタノール	0	20	0	0	20	
エルゴカルシフェロール	14	150	68	1	95	
塩酸チアミン	117	200	182	0	135	
塩酸チアミン液	26	0	4	0	22	
塩酸ピリドキシン	96	300	327	1	68	
エンドトキシン	63	900	652	0	311	
カリジノゲナーゼ	48	150	117	0	81	
含糖ペプシン	70	0	20	0	50	
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	66	0	30	0	36	
ギトキシン	42	0	6	0	36	
血清性性腺刺激ホルモン	7	100	18	0	89	
コハク酸トコフェロール	55	50	77	0	28	
コハク酸ヒドロコルチゾン	12	0	0	0	12	
コレカルシフェロール	83	100	81	0	102	
酢酸クロルマジノン	51	0	12	0	39	
酢酸コルチゾン	63	0	6	0	57	
酢酸デキサメタゾン	48	0	0	0	48	
酢酸トコフェロール	30	575	462	4	139	
酢酸ヒドロコルチゾン	43	50	44	0	49	
酢酸ブレドニゾロン	16	50	42	0	24	
シアノコバラミン	124	200	314	2	8	
ジギタリス	15	0	0	0	15	
ジギトキシン	32	50	33	2	47	
ジクロフェナミド	0	20	0	0	20	
ジゴキシン	9	50	14	0	45	
酒石酸水素エピネフリン	35	52	14	0	73	
酒石酸水素ノルエピネフリン	10	50	3	0	57	
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	90	100	109	1	80	
チロジン	112	100	132	0	80	
テオプロミン	0	20	0	0	20	
デキサメタゾン	17	50	22	0	45	
デスラノシド	53	0	5	0	48	
トコフェロール	37	300	286	0	51	
トリアムシノロン	32	0	0	0	32	
トリアムシノロンアセトニド	51	0	4	0	47	

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	
トロンピン	30	100	61	0	69	
ニコチン酸	64	0	24	0	40	
ニコチン酸アミド	126	250	248	1	127	
脳下垂体後葉	12	47	23	1	35	
薄層クロマトグラフ用酢酸レチノール	80	60	26	66	48	
薄層クロマトグラフ用パルミチン酸レチノール	53	60	44	24	45	
パラアミノベンゾイルグルタミン酸	25	0	3	0	22	
ヒアルロニダーゼ	13	0	1	0	12	
ヒドロクロロチアジド	25	50	9	0	66	
ヒドロコルチゾン	34	50	27	0	57	
フルオシノニド	25	0	7	0	18	
フルオシノロンアセトニド	20	50	58	0	12	
フルオロメロン	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	39	50	70	2	17	
プロゲステロン	29	0	11	0	18	
プロビオン酸テストステロン	20	0	3	0	17	
プロビオン酸ベクロメタゾン	45	0	2	0	43	
ベタメタゾン	49	50	22	0	77	
ヘパリンナトリウム	76	150	67	0	159	
マレイン酸エルゴメトリン	73	0	17	0	56	
マレイン酸メチルエルゴメトリン	0	20	0	2	18	
メストラノール	50	0	0	1	49	
メチルジゴキシシン	50	0	0	0	50	
メトトレキサート	30	0	2	0	28	
融点測定用 (アセトアニリド, アセトフェネチジン, カフェイン, スルファニルアミド, スルファピリジン, ワニリン)	31	50	24	0	57	
葉酸	60	102	65	1	96	
酪酸ヒドロコルチゾン	43	0	0	0	43	
ラナトシドC	46	0	10	0	36	
リゾチーム	88	200	240	0	48	
リボフラビン	84	350	381	0	53	
硫酸プロタミン	35	0	1	0	34	
リン酸デキサメタゾンナトリウム	50	0	5	0	45	
リン酸ヒスタミン	58	50	16	0	92	
リン酸ヒドロコルチゾンナトリウム	50	0	5	0	45	
リン酸ブレドニゾロンナトリウム	50	0	0	0	50	
リン酸ベタメタゾンナトリウム	50	0	3	0	47	
ルチン	16	0	7	9	0	
レセルピン	23	0	15	0	8	
計	3,896	5,696	5,048	138	4,406	

(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
アシッドバイオレット6B	72	0	1	0	71	
アシッドレッド	0	0	0	0	0	
アズルビンエキストラ	83	0	10	0	73	
アマランス	452	0	1	0	451	
インジゴ	129	0	0	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	1	0	226	
オイルオレンジSS	223	0	0	0	223	
オイルレッドXO	201	0	0	0	201	
オレンジI	273	0	1	0	272	
オレンジII	154	0	0	0	154	
ギネアグリーンB	67	0	1	0	66	
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ロムフルオレセイン	149	0	0	0	149	
テトラブロムフルオレセイン	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	72	0	0	0	72	
ファストグリーンFCF	11	0	1	0	10	
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	2	0	185	
フロキシシン	333	0	1	0	332	
ボンソーR	246	0	1	0	245	
ボンソーSX	146	0	0	0	146	
ボンソー3R	155	0	0	0	155	
リソールルビンBCA	359	0	0	0	359	
レーキレッドC	384	0	0	0	384	
レーキレッドCBA	119	0	0	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	5,084	0	20	0	5,064	

衛生試験所報告第109号キーワード索引 (アルファベット順)

A

亜慢性毒性→毒性
 亜慢性毒性試験→毒性
 安全性評価資料 11
 AIDS 107
 alkylbenzene sulfonate
 Linear—(LAS) 83
 allura red AC 186
 8-anilino-1-naphthalene sulfonate 32
 anti-AIDS drugs 107
 authorization→認証

B

消炎加工剤 18, 25
 分析
 チアベンダゾールの— 100
 必須元素の— 115
 bis(2, 3-dibromopropyl) phosphate magnesium
 25
 brilliant blue FCF 183

C

d-camphor 176
 dl-camphor 176
 cesium-134 98
 cesium-137 98
 cholecalciferol 136
 coal-tar dye 178
 cyanoguanidine 61
 cyclandelate 168
 cyclophosphamide 119

D

毒性
 亜慢性— 61
 亜慢性—試験 48
 急性および亜急性—試験 25
 急性— 92
 腎— 25, 61
 精巢— 72
 慢性—試験 18
 —情報検索 11
 determination of monomer 105
 diclofenamide 148
 dye→色素

E

ESR法 1
 EHC
 the first draft of— 88, 110
 EHC monographs in 1990 110

EHC monograph 83
 epitiostanol 151
 erythrosine 181
 ergocalciferol 139
 essential metals 115
 7-ethoxycoumarin o-deethylase(7-ECDE) 55

F

フェノバルビタール 55
 封入体 61
 F344 ラット→ラット
 fluocinolone acetonide 145
 food color→食用色素
 food-contact plastic ware 105

G

グルタルアルデヒド 92
 giant cell 107
 γ-ray spectrometer 98
 gravimetric method 181

H

発ガン性試験 18
 必須元素 115
 標準品 181, 183, 184, 186
 品質評価 136, 139, 142, 145, 148, 151, 154, 157, 159,
 162, 165, 168, 171, 173, 176
 L-histidine 113
 history and improvements of commentary work
 88
 HIV 107
 hydrogen peroxide 113
 8-hydroxy-deoxyguanosine 113

I

イオンペアクロマトグラフィー 100
 ICP 115
 indocyanine green 157
 IPCS 110
 2, 2'-isobutylidene-bis(4, 6-dimethylphenol) 37

J

J. P. 標準品 136, 139, 142, 145, 148, 151, 154, 157,
 159, 162, 165, 168, 171, 173, 176
 腎毒性→毒性
 Japanese Food Sanitation Law 105
 JP Reference Stanrdrd→J. P. 標準品

K, L

化学発光法 1
 加齢効果 92
 甘味料 48

血液-精巣関門 67
 急性および亜急性毒性試験→毒性
 急性毒性→毒性
 kidney cells 32

ランタン・トレーサー法 67

M

マウス 18
 慢性毒性試験→毒性
 メトヘモグロビン 42
 メトヘモグロビン血症 72
 methoxalene 154
 methylethylergometrine maleate 165
 microplate methods 107
 mushroom 98

N

二段階肝発癌 55
 28日間反復投与試験 72
 認証 136, 139, 142, 145, 148, 151, 154, 157, 159, 162,
 165, 168, 171, 173, 176
 熱発光法 1
 m-nitroaniline 72
 normal range → 正常値

O

オンラインデータベース 11
 OECD 119
 official inspection → 製品検査
 on-line JICST data base 83
 organs → 臓器
 oxidative DNA damage 113

P, Q

プロモーション作用 55
 p-phenetidine 42
 potassium sucrose octa sulfate 171
 prednisolone acetate 142
 production → 製品

quality evaluation → 品質評価

R

老化防止剤 37
 ラット 25, 42, 92, 115
 F344— 48, 61
 WBN/Kob— 67
 rat → ラット
 renal cells
 freshly isolated— 32
 repeat dose toxicity 119

reproductive/developmental toxicity 119
 Repro Tox 119
 retinol acetate 162
 retinol palmitate 162
 riboflavin 173

S

催奇形性 37
 色素 181, 183, 184, 186
 照射食品 1
 照射食品の検知法 1
 食品添加物 11
 食用色素 178
 精巣萎縮 67
 精巣毒性→毒性
 正常値 115
 製品
 食用色素の— 178
 製品検査
 食用色素の— 178
 腺胃 92
 shelf-life → 有効期間
 standard → 標準品
 stability 81
 stevioside 48
 syrup preparation 81

T

チアベンダゾール 100
 取り込み
 有機陰イオンの— 32
 tartrazine 184
 Thai Food Act 105
 thin-layer chromatography 162
 titanium trichloride method 183, 184, 186
 tolnaftate 159
 tris(2-chloroethyl)phosphate 18

U, V, W

uptake → 取り込み

vitamin B₁ 81

WBN/Kob ラット → ラット

Y

有効期間 81
 溶血性貧血 72
 用量-反応 55

Z

臓器(肺, 肝, 腎, 脾) 115

衛生試験所報告への投稿について

投稿規定

1. 投稿資格：国立衛生試験所所員とする（共著者はこの限りでない）。
2. 内容：原稿は報文、ノート、資料とする。そのほか誌上発表、単行本、行政報告、学会発表、業務報告、総説などを掲載する。

報文：独創性に富み、新知見を含むまとまった研究業績。
 ノート：断片的な研究業績で、独創性や新知見が認められるもの。
 資料：試験、製造または調査などで、記録しておく必要のあるもの。
 誌上発表：衛生試験所報告以外の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。
 誌上発表：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し、所長宛の報告書を表紙の上に添えて、定められた原稿〆切期日までに図書館宛に提出する。
5. 原稿の審査：図書委員会は提出された原稿の採否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、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	キャンドラ	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。

ゴシック体~~~~	例：見出しなど	試薬
イタリック体——	例：学名など	<i>Papaver somniferum</i> L.
スモールキャピタル——	例：著者名など	L-ascorbic acid

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 Azuma

7・3 英文要旨：論文の内容を簡潔にまとめ、タイプライターで打つ。参考のため別紙に書いた和文を文献の次に添える。

7・4 本文：新しいページから書き始める。本文のスタイルは特に規定しないが、内容の重複を避ける。凸版にする図、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：本文の引用箇所の右肩に^{3), 2,5), 1-4)}のように記し、終わりに文献として引用順に書く。

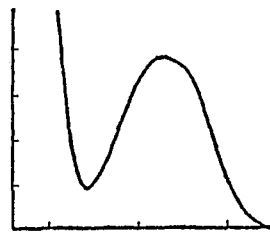
雑誌名は Chemical Abstracts および日本化学総覧の略記法による。外国雑誌名はイタリック体で表し、単行本は書名を省略せず、編者名や出版地も記載する。

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。

(例)



(原図)

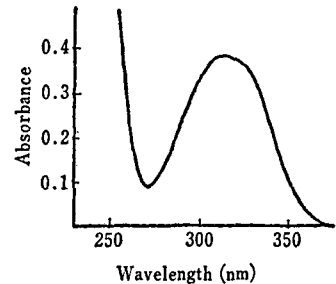


Fig. 2. Ultraviolet spectrum of material for "Ergometrine Maleate Reference Standard" (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (コピーにタイプ)

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¹⁾,²⁾, ……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. 誌上发表等の記載要領：誌上发表、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 3 年度 図書編集委員

原 田 正 敏	高 橋 惇	神 沼 二 真
伊豆津 健 一	小 林 哲	川 原 信 夫
新 谷 英 晴	佐々木 久美子	村 山 三 徳
武 田 由比子	福 原 潔	手 島 玲 子
最 上 知 子	小 嶋 満 子	津 田 充 宥
小野田 欽 一	川 西 徹	渡 邊 雅 彦
伊 丹 孝 文	下 村 講一郎	遠 山 中 夫
永 野 悦 子		

衛生試験所報告 第109号

平成 3 年 10 月 25 日 印刷
平成 3 年 11 月 1 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