

# 衛生試験所報告

平成6年

---

*Bulletin of  
National Institute of  
Health Sciences*

No. 112

1994

---



国立衛生試験所

# 衛生試験所報告

平成6年

---

## *Bulletin of National Institute of Health Sciences*

No. 112 1994

Published by  
National Institute of Health Sciences  
Tokyo, Japan

---

国立衛生試験所

## 目 次

## 総 説

水道水質基準と生活関連化学物質の暴露評価……………安藤正典………… 1

## 報 文

発癌物質の *in vivo* DNA 付加物量のデータベース化：O<sup>6</sup>-アルキルグアニン，O<sup>4</sup>-アルキルチミン，  
および 8-ヒドロキシグアニンについて

……………森本和茂・木村真理・村田朋美・今井 靖・大上徳子・  
五十嵐貴子・加納直子・神沼二眞・林 裕造…………17

難燃性可塑剤 tributoxyethyl phosphat e のラットにおける亜慢性毒性試験

……………齊藤 実・梅村隆志・川崎 靖・門馬純子・松島裕子・松本真美・江下希美・  
伊佐間和郎・鹿庭正昭・津田充宥・黒川雄二…………27

ホキシムのラットによる 28 日間反復経口投与毒性試験

……………鈴木幸子・小川幸男・鎌田栄一・内藤克司・梅村隆志・齊藤 実・金子豊蔵・黒川雄二…………40

コチニール (Cochineal) およびミョウバン (Alumium potassium sulfate) のラットにおける

13 週間同時反復投与毒性試験  
……………川崎 靖・梅村隆志・佐井君江・長谷川隆一・門馬純子・齊藤 実・  
松島裕子・中路幸男・津田充宥・黒川雄二…………48

F344 ラットを用いた L-ヒスチジン塩酸塩の 13 週間亜慢性毒性試験

……………池崎信一郎・西川秋佳・古川文夫・今沢孝喜・榎並倫宣・三井雅之・高橋道人…………57

F344 ラットにおける流動パラフィンの亜慢性毒性試験

……………豊田和弘・川西 徹・畝山智香子・高橋道人…………64

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

……………下 武男・小野寺博志・松島裕子・外館あさひ・三森国敏・前川昭彦・高橋道人…………71

パラオキシ安息香酸イソプロピルの F344 ラットにおける 13 週間亜慢性毒性試験

……………小野寺博志・三森国敏・安原加壽雄・下 武男・黒川典子・高橋道人…………82

Bisphenol A の B6C3F<sub>1</sub> マウスにおける 13 週間亜慢性毒性試験

……………古川文夫・西川秋佳・三井雅之・佐藤元信・鈴木順子・今沢孝喜・高橋道人…………89

薬用植物の補償作用に関する研究

光合成・蒸散速度からみたケシ葉の補償作用……………飯田 修・畠山好雄…………97

## ノ ー ト

輸入牛肉中の有機塩素系および有機リン系農薬の分析

……………高橋 巧・根本 了・松田りえ子・佐々木久美子・斎藤行生… 102

ECD ガスクロマトグラフィーによる食品中の総臭素の分析法

…………………………松田りえ子・佐々木久美子・斎藤行生… 108

フモニシン分析における各種蛍光誘導体化 HPLC 法の比較

…………………………穂山 浩・宮原 誠・豊田正武・斎藤行生… 112

## 研究に関する資料

Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry (LSUMS) による化学合成ペプチドの分析

…………………………矢上 健・佐藤道夫・中村晃忠… 118

乳酸鉄添加飼料中の二価鉄の安定性について……………武田由比子・石綿 肇・山田 隆… 128

エイズ医薬品候補スクリーニング研究 IV. 1992 年度報告

……………関根大正・大貫奈穂美・貞升健志・太田健爾・寺山 武・小林伸好・野口有三・松山雅子・  
秋吉京子・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・森下高行・小林慎一・三宅恭司・石原佑弼・鈴木亮而・齊藤隆行・

衛藤繁雄・大竹 徹・森 治代・森本素子・上羽 昇・千々和勝己・甲斐麻美子・常磐 寛・ 三瀬勝利・牛島廣治・清水博之・国貞孝夫・山崎修道…	131
IPCS 環境保健クライテリアのドラフトのコメント依頼について (1993 年度)	
……………大竹千代子・関沢 純…	134
MSDS の有害性情報の記載における留意点および情報の収集について ……	山本 都・神沼二眞… 138
国際化学物質安全性カード (ICSC) の作成および日本語への翻訳	
……………山本 都・中野達也・横手規子・神沼二眞…	143
化学物質安全性データシート作成のための有害性情報—エチレンチオ尿素—	山本 都・会田喜崇… 147
平成 5 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	
……………石光 進・木村実加・梅本美佳・辻 澄子・柴田 正・伊藤蒼志男…	152
<b>標準品に関する資料</b>	
国立衛生試験所ヒトインスリン標準品 (Control 921)	
……………四方田千佳子・江馬 真・小川義之・岡田敏史…	155
国立衛生試験所エルカトニン標準品 (Control 921)	
……………岡田敏史・四方田千佳子・江馬 真・小川義之…	161
国立衛生試験所デキサメタゾン標準品 (Control 931)	
……………北島 文・吉井公彦・小松裕明・石光 進・岡田敏史…	167
国立衛生試験所シアノコバラミン標準品 (Control 931)	
……………北島 文・吉井公彦・小松裕明・石光 進・岡田敏史…	170
国立衛生試験所プロゲステロン標準品 (Control 931)	
……………北島 文・吉井公彦・小松裕明・石光 進・岡田敏史…	175
国立衛生試験所エストラジオール標準品 (Control 931)	
……………北島 文・吉井公彦・小松裕明・石光 進・岡田敏史…	179
国立衛生試験所アスコルビン標準品 (Control 931)	
……………北島 文・吉井公彦・小松裕明・石光 進・岡田敏史…	183
国立衛生試験所シクランデラート標準品 (Control 931)	
……………北島 文・吉井公彦・小松裕明・石光 進・岡田敏史…	185
国立衛生試験所アルプロスタジル標準品 (Control 921)	
……………北島 文・吉井公彦・小松裕明・石光 進・岡田敏史…	188
国立衛生試験所塩酸チアミン標準品 (Control 931)	
……………北島 文・吉井公彦・小松裕明・石光 進・岡田敏史…	192
国立衛生試験所プロピオン酸テストステロン標準品 (Control 881)	
……………石光 進・北島 文・吉井公彦・小松裕明・岡田敏史…	196
<b>ステートメント</b>	
<b>レギュラトリーサイエンス討論会</b>	
日本薬局方のうごき……………内山 充…	199
重量偏差試験・含量均一性試験の判定についての統計学的考察……………香取典子…	200
タンパク性医薬品の assay における力価測定から理化学分析への移行の条件 ……	早川堯夫… 202
局方における医薬品プラスチック容器の品質規格に関する提案……………中村晃忠…	204
日本薬局方における微生物試験法の改定の動向……………三瀬勝利…	206
各種注射剤に対するエンドトキシン試験法の適用性の検討……………小川義之…	209
<b>レギュラトリーサイエンス関連会議報告</b> ……………	212
<b>業務報告</b> ……………	231
<b>特別研究報告</b> ……………	280
<b>誌上発表</b> ……………	313

---

単行本	367
行政報告	369
学会発表	376
衛試例会	400
平成5年度に行った主な研究課題	404
国家検定および検査等の処理状況	413
国立衛生試験所標準品	418
衛生試験所報告第112号キーワード索引	429

## CONTENTS

## Review

Masanori Ando: New Regulation of Tap Water Quality and Exposure Assessment .....	1
--	---

## Originals

Kazushige Morimoto, Mari Kimura, Tomomi Murata, Yasushi Imai, Noriko Ookami, Takako Igarashi, Naoko Kanoh, Tsuguchika Kaminuma and Yuzo Hayashi: An <i>in vivo</i> DNA adducts database of carcinogens: O <sup>6</sup> -alkylguanine, O <sup>4</sup> -alkylthymine and 8-hydroxyguanine .....	17
Minoru Saitoh, Takashi Umemura, Yasushi Kawasaki, Junko Momma, Yuko Matsushima, Mami Matsumoto, Nozomi Eshita, Kazuo Isama, Masaaki Kaniwa, Mitsuhiro Tsuda and Yuji Kurokawa: Subchronic Toxicity Study of Tributoxyethyl Phosphate in Wistar Rats .....	27
Sachiko Suzuki, Yukio Ogawa, Eiichi Kamata, Katsui Naito, Takasi Umemura, Minoru Saito, Toyozo Kaneko and Yuji Kurokawa: A 28-day repeated dose toxicity test of Phoxim in Wistar Rats .....	40
Yasushi Kawasaki, Takashi Umemura, Kimie Sai, Ryuichi Hasegawa, Junko Momma, Minoru Saitoh, Yuko Matsushima, Yukio Nakaji, Mitsuhiro Tsuda and Yuji Kurokawa: A 13-week Toxicity Study of Simultaneous Administration of Cochineal and Aluminum Potassium Sulfate in Rats .....	48
Shinichiro Ikezaki, Akiyoshi Nishikawa, Fumio Furukawa, Takayoshi Imazawa, Tomonori Enami, Masayuki Mitsui and Michihito Takahashi: 13-Week Subchronic Toxicity Study of L-Histidine Monohydrochloride in F344 Rats .....	57
Kazuhiro Toyoda, Toru Kawanishi, Chikako Uneyama and Michihito Takahashi: Subchronic Toxicity Study of Liquid Paraffin in F344 Rats .....	64
Takeo Shimo, Hiroshi Onodera, Yuko Matsushima, Asahi Todate, Kunitoshi Mitsumori, Akihiko Maekawa and Michihito Takahashi: A 28-Day Repeated Dose Toxicity Study of Nitrobenzene in F344 Rats .....	71
Hiroshi Onodera, Kunitoshi Mitsumori, Kazuo Yasuhara, Takeo Shimo, Noriko Kurokawa and Michihito Takahashi: 13-week Subchronic Oral Toxicity Study of Isopropyl <i>p</i> -Hydroxybenzoate in F344 Rats .....	82
Fumio Furukawa, Akiyoshi Nishikawa, Masayuki Mitsui, Motonobu Sato, Junko Suzuki, Takayoshi Imazawa and Michihito Takahashi: A 13-week Subchronic Toxicity Study of Bisphenol A in B6C3F <sub>1</sub> Mice .....	89
Osamu Iida and Yoshio Hatakeyama: Studies on compensation in medicinal plants Compensative effect of leaves of <i>Papaver somniferum</i> L. on photosynthetic and transpiration rates .....	97
<b>Notes</b>	
Satoshi Takatsuki, Satoru Nemoto, Rieko Matsuda, Kumiko Sasaki and Yukio Saito: Determination of Organochlorine and Organophosphorus Pesticides levels in Imported Beef .....	102
Rieko Matsuda, Kumiko Sasaki and Yukio Saito: Determination of total bromine in foods by ECD gas chromatograph .....	108
Hiroshi Akiyama, Makoto Miyahara, Masatake Toyoda and Yukio Saito: Comparison of several fluorescence HPLC methods for fumonisin analysis. ....	112

**Technical Data**

Tekeshi Yagami, Michio Sato and Akitada Nakamura: Analysis of Chemically Synthesized Peptides by Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry (LSIMS) .....	118
Yuiko Takeda, Hajimu Ishiwata and Takashi Yamada: Studies on the stability of ferrous ion in the feeds added iron lactate during storage .....	128
Hiromasa Sekine, Nahomi Ohnuki, Kenji Sadamasu, Kenji Ohta, Takeshi Terayama, Nobuyoshi Kobayashi, Yuzo Noguchi, Masako Matsuyama, Kyoko Akiyoshi, Shinichi Noro, Nanao Sato, Norio Sakurada, Nobuya Fujita, Tohru Ishizaki, Noriko Kamimura, Yukio Yoshida, Tetsuro Ono, Nobuya Ohtomo, Takayuki Morishita, Shinichi Kobayashi, Takashi Miyake, Yuichi Ishiwara, Ryoji Suzuki, Takayuki Saito, Shigeo Etoh, Tohru Ohtake, Haruyo Mori, Motoko Morimoto, Noboru Ueba, Katsumi Chijiwa, Mamiko Kai, Hiroshi Tokiwa, Katsutoshi Mise, Hiroshi Ushijima, Hiroyuki Shimizu, Takao Kunisada and Shudo Yamazaki: Preliminary Screening for Antiviral AIDS Drugs. IV. Report on fiscal year 1992 .....	131
Chiyoko Ohtake and Jun Sekizawa: First Drafts of Environmental Health Criteria (EHC) Circulated for Comments by IPCS in 1993~1994 .....	134
Miyako Yamamoto and Tsuguchika Kaminuma: Important Points and References for the Description of the Hazard Information on MSDS .....	138
Miyako Yamamoto, Tatsuya Nakano, Noriko Yokote and Tsuguchika Kaminuma: Preparation of International Chemical Safety Card (ICSC) and their Translation into Japanese .....	143
Miyako Yamamoto and Yoshitaka Aida: Hazard Information for the Preparation of Material Safety Data Sheets (MSDS) – Ethylenethiourea – .....	147
Susumu Ishimitsu, Mika Kimura, Mika Umemoto, Sumiko Tsuji, Tadashi Shibata and Yoshio Ito: Official Inspection Estimated Production of Coal-Tar Dyes (including Dye Aluminum Lakes) in 1993~1994 .....	152

**Reference Standard Data**

Chikako Yomota, Makoto Ema, Yoshiyuki Ogawa and Satoshi Okada: The Human Insulin Reference Standard (Control 921) of the National Institute of Health Sciences .....	155
Satoshi Okada, Chikako Yomota, Makoto Ema and Yoshiyuki Ogawa: Elcation Reference Standard (Control 921) of National Institute of Health Sciences .....	161
Aya Kitajima, Kimihiko Yoshii, Hiroaki Komatsu, Susumu Ishimitsu and Satoshi Okada: The Dexamethasone Reference Standard (Control 931) of the National Institute of Health Sciences .....	167
Aya Kitajima, Kimihiko Yoshii, Hiroaki Komatsu, Susumu Ishimitsu and Satoshi Okada: The Cyanocobalamin Reference Standard (Control 931) of the National Institute of Health Sciences .....	170
Aya Kitajima, Kimihiko Yoshii, Hiroaki Komatsu, Susumu Ishimitsu and Satoshi Okada: The Progesterone Reference Standard (Control 931) of the National Institute of Health Sciences .....	175
Aya Kitajima, Kimihiko Yoshii, Hiroaki Komatsu, Susumu Ishimitsu and Satoshi Okada: Estradiol Reference Standard (Control 931) of National Institute of Health Sciences .....	179
Aya Kitajima, Kimihiko Yoshii, Hiroaki Komatsu, Susumu Ishimitsu and Satoshi Okada: The Ascorbic Acid Reference Standard (Control 931) of the National Institute of Health Sciences .....	183

---

Aya Kitajima, Kimihiko Yoshii, Hiroaki Komatsu, Susumu Ishimitsu and Satoshi Okada: The Cyclandelate Reference Standard (Control 931) of the National Institute of Health Sciences.....	185
Aya Kitajima, Kimihiko Yoshii, Hiroaki Komatsu, Susumu Ishimitsu and Satoshi Okada: The Alprostajil Reference Standard (Control 921) of the National Institute of Health Sciences.....	188
Aya Kitajima, Kimihiko Yoshii, Hiroaki Komatsu, Susumu Ishimitsu and Satoshi Okada: The Thiamine Hydrochloride Reference Standard (Control 931) of the National Institute of Health Sciences .....	192
Susumu Ishimitsu, Aya Kitajima, Kimihiko Yoshii, Hiroaki Komatsu and Satoshi Okada: The Testosterone Propionate Reference Standard (Control 881) of the National Institute of Health Sciences .....	196
<b>Statements</b>	
<b>Regulatory Science Forum</b>	
Mitsuru Uchiyama: The Current Trend of the Pharmacopoeia of Japan .....	199
Noriko Katori: Statistical Considerations for Weight Variation and Content Uniformity Tests.....	200
Takao Hayakawa: Scientific Rational for the Replacement of <i>in Vivo</i> Bioassay for Protein Drugs with a Physico-chemical Assay .....	202
Akitada Nakamura: Proposal on JP Standards of Plastic Containers for Pharmaceuticals .....	204
Katsutoshi Mise: On the Revision of Microbial Tests in the Pharmacopoeia of Japan .....	206
Yoshiyuki Ogawa: Application of a Bacterial Endotoxins Test for Parenteral Drugs .....	209
<b>Meeting Reports Related to Regulatory Science</b> .....	212
<b>Annual Reports of Divisions</b> .....	231
<b>Report of Collaborative Study</b> .....	280
<b>Summaries of Papers Published in Other Journals</b> .....	313
<b>Title of Scientific Books</b> .....	367
<b>Scientific Reports to Governmental Agencies</b> .....	369
<b>Titles of Speeches at Scientific Meetings etc.</b> .....	377
<b>NIHS Seminars</b> .....	400
<b>Main Research Projects Carried Out in Fiscal Year 1993</b> .....	404
<b>Survey of the Results of National Tests</b> .....	413
<b>Reference Standards Prepared by National Institute of Health Sciences</b> .....	418
<b>Subject Index</b> .....	429



## 水道水質基準と生活関連化学物質の暴露評価

安藤正典

## New Regulation of Tap Water Quality and Exposure Assessment

MASANORI ANDO

Recently, social concerns regarding tap water quality have increased, mainly because of the possible reduction in safety due to contamination of tap water by various chemicals and more frequent occurrence of the strange odors and tastes in as a result of resource water eutrophication. Consequently, the Ministry of Health and Welfare conducted a detailed two-year investigation of the Water Quality Standards of the Water Works Law by summoning an expert committee, and as a result, totally revised the Standards in December 1992. This was the first overall revision since 1958 when the Water Quality Standards were established, and an additional 21 items, including mainly hazardous chemicals including pesticides and chlorinated by-products, were newly added. Values and testing methods are now listed for 46 items, and the Law obliges every water supply to conduct periodical water testing for the necessary items almost every month with ad-hoc testing, as required of hydrants. Simultaneously, 26 monitoring items are listed in hazardous contaminants guidelines which should be checked, when necessary. The new Water Quality Standards and the guidelines were brought into force in December 1993, and the quality of all parts of the water supply is now tested in accordance.

Risk assessment is a scientific process that includes some form of measurement as one of its central elements. In many cases, the measured parameter is the level of exposure to a hazard. Also, measurements are essential in establishing the quantitative relationship between exposure and response, and in determining natural baseline conditions in the environment.

Exposure assessment is the process of measuring or estimating the intensity, frequency, and duration of human or other population exposures to risk agents. Exposures may occur in a variety of ways, such as through ingestion, dermal contact, or inhalation. For many risk assessments, exposure assessment is the most difficult task. The reason for this is that exposure assessment often depends on factors that are hard to estimate and for which there are few data. Critical information on the conditions of exposure is often lacking. To be comprehensive, an exposure assessment must describe the levels of exposure and all conditions that might be needed to assess the effects of such exposures, including their magnitude, duration, schedule, and route. This report presents the various problems covered in exposure assessment relevant to monitoring, testing, and methodology.

**Keywords :** Drinking Water Standard, Tap Water Quality, regulatory science, risk assessment, exposure assessment

(Received May 31, 1994)

### 1. はじめに

生活環境には数え切れないほどの化学物質が存在し、その発生源も極めて多様である。大部分の化学物質は、食品、水等を介して経口的に、また居住空間や労働環境あるいは大気を通して経気道的に、さらに化粧品等の故意の接触や家庭用品や建築資材などの居住環境を通して経皮的にヒトを絶えず暴露し

ている。このことから、人が暴露する化学物質についての安全性を評価して、これを基に行政措置を行うことは国民の健康保持のために重要な課題である。この安全性から基準値設定までの道筋の研究であるレギュラトリーサイエンスの方法として、リスクアセスメントとそれに続くリスクマネージメントの考え方が生まれた。

リスクアセスメントの考え方が定着した今日では、

我が国<sup>1)</sup>をはじめとして米国<sup>2,3)</sup>やWHO<sup>4)</sup>でも飲料水、大気等、種々の分野でガイドラインあるいは基準にこの考え方が広く利用されている。

厚生省では、この考え方を基にした水道水質基準を示し、昨年12月1日より施行している。今回の水質基準の改正の必要性は近年の各種工業の発展は種々の化学物質による自然水域の汚染を進行させることになり、その対応に苦慮する機会が多くなってきたことによる<sup>5,6)</sup>。最近の例にみると、ゴルフ場使用農薬や空中散布農薬の水道水源の汚染、使用農薬の環境での生物活性物質への変化あるいは肥料の使用による地下水汚染は大きな社会問題となり、山間僻地の開発や農用地の多面的利用による地域の活性化と上水道水源の確保という地域住民にとってあい矛盾する問題となっている。また、ハイテク産業などに広く使われる揮発性物質は地下水を汚染し、ここ10年来改善傾向はみられず、汚染域はむしろ拡大する傾向が指摘されている。閉鎖系水域では臭気性藻類の増殖による異臭味の発生にも悩まされている。さらに、水道の普及によって衛生性の基本である水系伝染病の発生はほとんど認められなくなったが<sup>7)</sup>、小規模あるいは個人レベルの井戸では管理の不備による衛生細菌の汚染問題も指摘されている。一方、ミネラルウォーター等のボトルドウォーターや家庭用浄水器の生産量、輸入量は年々急増している。この伸びの要因には、国民がより質の高い飲料水を求めている現れと同時に、水道水の安全性に対する漠然とした不安や懸念を抱いている表れともいえる。

そこで、新しい水質基準の考え方を述べるとともに、リスクアセスメントの一つである暴露評価の問題を整理してみた。

## 2. 新しい水質基準とその考え方

### 2.1. 水道水における公衆衛生確保の要件

水道水の利用に伴う公衆衛生の向上と生活環境の改善に寄与するための要件にはどのようなものが必要であろうか。第1には、水系伝染病の防止が公衆衛生の最重要課題であることは言うまでもない。第2には有害化学物質の安全性評価値(許容値)の設定であり、近年の化学技術の進歩に伴う新しい化学物質の出現に対する対処の必要性である。第3にはヒトにとって5感で感ずることも重要な衛生の因子であり、快適性も衛生性の範疇と考えられ、商品価値としての問題が挙げられる。

第1の病原生物および第3の快適性についての考え方は旧法と大きくは変わらないと思われるので、本項では、第2の化学物質の安全性評価の考え方と対象項目について記述する。

### 2.2. 水道水質基準の対象項目

#### 1) 水道水質基準の対象項目の変遷

公衆衛生の確保の要件の一つである清浄な水質とは、安全性評価がなされた化学物質や生物が水質基準に適合していることであり、昔も今もその概念には変わりはない。社会状況の変化に応じて、公衆衛生に係わる安全性の対象は時代とともに以下のような背景から変化してきた。第1には、科学技術の進歩に伴って利用する化学物質が変化し、環境に出現する対象項目が変わってきたこと、第2に毒性情報の集積と、リスクの評価手法や概念が構築されたり、変化してきたこと、第3には分析技術の進歩に伴って種々の物質の測定が可能になったこと、第4に水処理過程における化学物質の生成、挙動および処理方法が明らかになってきたこと等が挙げられる。

#### 2) 水道水で対象となる物質

水道水で対象となる物質は多岐にわたる。Fig. 1に示すように、まず水道原水を汚染する先端技術産業で用いられる揮発性有機ハロゲン化合物や芳香族有機化合物、ゴルフ場等のレジャー産業や農業で使用される殺虫剤、殺菌剤、除草剤等の農薬類、あるいは工場排水などの汚染物質が挙げられる。また、浄水処理過程で生成するトリハロメタンやその後明らかにされてきた消毒副生成物も大きな問題を抱えた化合物として挙げられる。さらに、浄水処理で使用する水道添加剤、給配水経路に使用される資機材やそれに用いる塗料等から溶出する化学物質も対象として考えておく必要がある。

### 2.3. 水質基準設定の考え方

このように水道原水、浄水処理過程および配給水から多くの化学物質が進入する可能性がある。水質基準設定に当たっては、これらの物質に対する安全性の評価法と基準値設定方法を決めておく必要がある。

従来の基準値設定の考え方は最大無作用量からのADIによって設定する方法に近い手法がとられてきた。しかし、発がん物質に対する基準値設定については世界の各国共苦慮するところであった。この考え方を発展させるものとして化学物質の生物に対する影響には閾値があるものと閾値が存在しないものとに分類される考え方が生まれた。閾値のある化

学物質については従来の考え方を、閾値のない化学物質については発がんの確率を用いた発がん物質の基準値設定の考え方が提案され、最近ではこの考え方を基準値設定の拠り所としている<sup>8)</sup>。

1) 閾値のある化学物質と不確実性

水道水の化学物質基準の設定において、ヒトが生涯飲用する場合の評価方法として利用できる試験は慢性毒性試験である。ほとんどの化学物質は生物に対して用量-反応曲線を示し、生物に対する影響が0%の量、すなわち、NOAEL (no-observed adverse effect level) あるいは LOAEL (low-observed adverse effect level) を示すと理解されている。

しかし、実験の内容によってすべての化学物質についてのNOAELが求められているわけではない。試験方法等データの完成度、動物とヒトとの感受性や個体差の違いを見込んだ不確実係数100またはそれ以上で除せられ、これを1日最大許容摂取量ADI (Acceptable Daily Intake) として求める。

2) 閾値のない化学物質と外挿

一方、発がん性物質の場合は、動物実験より発がんの発生率0%の用量を求めることはできない。また、高濃度の投与実験では発がんのデータを得ることはできるが、低濃度暴露では癌の発生を確認することは難しい。また、発がん物質は暴露濃度をいく

ら下げても発がんの可能性は存在することから、発がん物質には閾値が存在しないとの考え方に立つ。したがって2つ以上の高暴露濃度の発生率から外挿法によって、がんの発生の確率を暴露量で算出する。これより生涯暴露した場合の指標として実質安全量VSD (Virtually Safe Dose) を求め極めて低い確率(10万人に一人(10<sup>-5</sup>), 100万人に一人の確立(10<sup>-6</sup>)等)でがんを発生させるのに必要な1日暴露量を推定値するものである。この考え方は、WHOをはじめ、多くの国として世界的にコンセンサスが得られている。

3) 水道水への応用

上記の方法に従って算出したADIあるいはVSDの値は化学物質が飲料水によってすべて暴露された場合を想定したものであり、飲料水からの暴露の寄与率は化学物質によって異なる。そこで、本来は各化学物質についてヒトの全暴露量に対する各暴露経路毎の寄与する割合を求めるが、化学物質の暴露実態は必ずしも明確に把握されているわけではないので、通常は10%から1%の寄与率と計算される。

水道水に混入する化学物質の水質基準の設定の手順は、Fig.2に示すように3つの方法が考えられる。第1は発がんの可能性が全くない物質についてはADIに不確実係数を除して算出するもので、第2

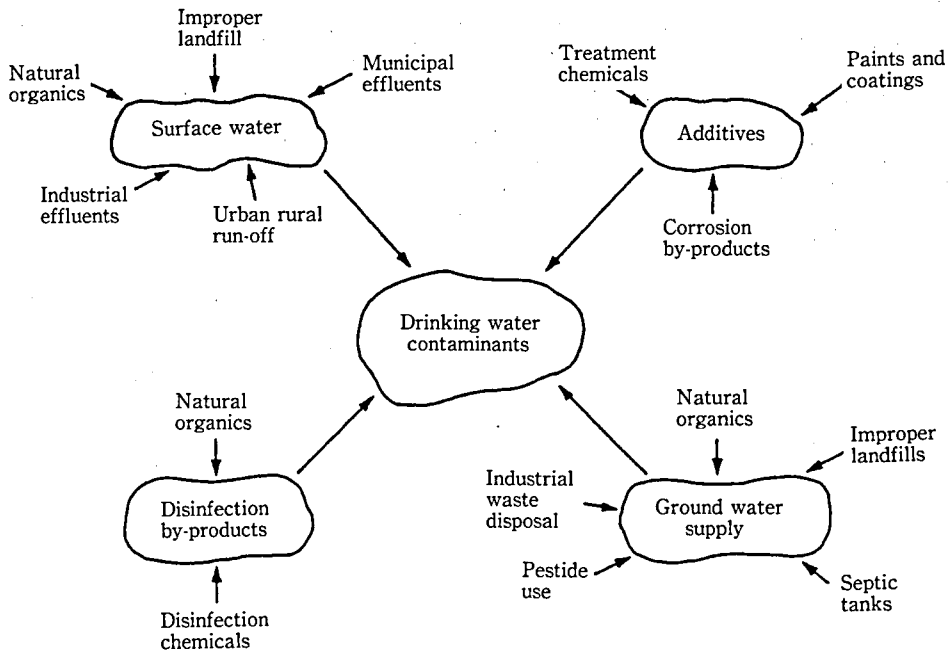


Fig 1. Chemicals listed for drinking water standards and guidelines

のグループは発がんあるいは遺伝毒性の可能性のある物質で、これらはADIに不確実係数で除した後、さらに発がん性あるいは遺伝毒性を考慮した係数で除したもので、第3のグループは発がん性の評価がなされた物質で、リスク外挿法によって算出するものである。

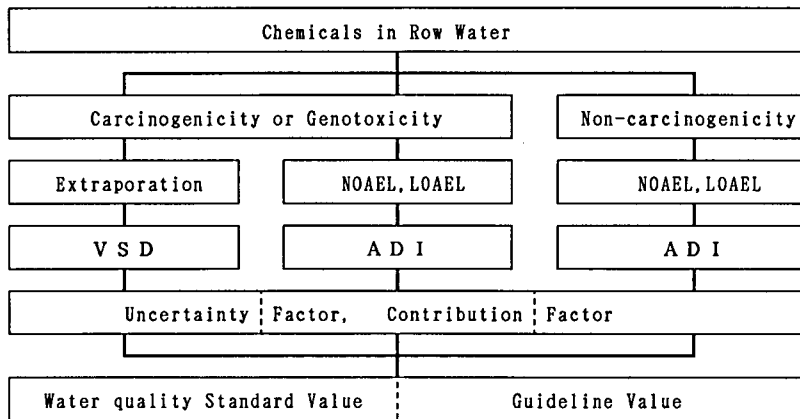
#### 2.4. 新しい水質基準の概要

新しい水質基準は、Fig. 3のように水道水に混入する化学物質を人の安全性と検出頻度から基準項目、監視項目および快適水質項目の3つに分類している。

すなわち、人の安全性を考慮する項目は、我が国で汚染の可能性を有する基準項目と汚染の割合が少ない監視項目である。

##### 1) 基準項目

新省令は Table 1 に示す通り、46項目からなっている。1から29までの項目は、生涯にわたって連続して摂取してもヒトの健康に影響が生じない水準を基にして設定された健康に関連する項目であり、上記の考え方で設定されたと考えて良い。項目30から46までは、水道水として生活利用上（色、濁



VSD: Virtually Safe Dose, ADI: Acceptable Daily Intake

Fig. 2. New regulation systems for drinking water quality standards and guidelines

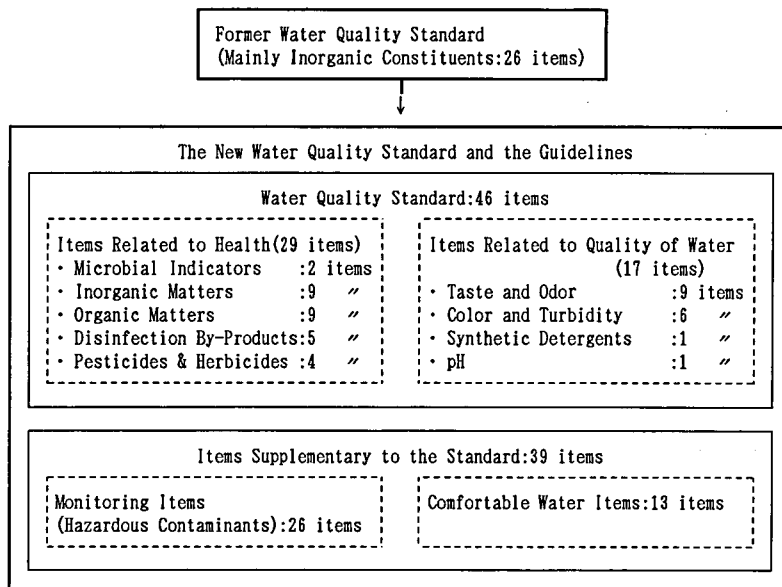


Fig. 3. Revised the drinking water quality standards and guidelines

Table 1. Drinking water quality standard

◎ Items Related to Health (29 items)			◎ Items Related to Quality of Water (17 items)		
No	Item	Standard Values	No	Item	Standard Values
1	Standard plate count	100/1 ml	30	Chloride	200 mg/l
2	Coliform group	Not to be detected	31	Organic substance	10 mg/l
3	Cyanide	0.01 mg/l	32	Copper	1.0 mg/l
4	Mercury	0.0005 mg/l	33	Iron	0.3 mg/l
5	Lead	0.05 mg/l	34	Manganese	0.05 mg/l
6	Hexavalent Chromium	0.01 mg/l	35	Zinc	1.0 mg/l
7	Cadmium	0.01 mg/l	36	Sodium	200 mg/l
8	Selenium	0.01 mg/l	37	Hardness (Ca, Mg)	300 mg/l
9	Arsenic	0.01 mg/l	38	Evaporation residue	500 mg/l
10	Fluoride	0.8 mg/l	39	Phenols	0.005 mg/l
11	Nitrite nitrogen and Nitrate nitrogen	10 mg/l	40	1,1,1-Trichloroethane	0.3 mg/l
12	Trichloroethylene	0.03 mg/l	41	Anion surfactants	0.2 mg/l
13	Tetrachloroethylene	0.01 mg/l	42	pH value	5.8~8.6
14	Carbon tetrachloride	0.002 mg/l	43	Odor	Not abnormal
15	1,1,2-Trichloroethane	0.006 mg/l	44	Taste	Not abnormal
16	1,2-Dichloroethane	0.004 mg/l	45	Color	5 degree
17	1,1-Dichloroethylene	0.02 mg/l	46	Turbidity	2 degree
18	cis-1,2-Dichloroethylene	0.04 mg/l			
19	Dichloromethane	0.02 mg/l			
20	Benzene	0.01 mg/l			
21	Total Trihalomethanes	0.1 mg/l			
22	Chloroform	0.06 mg/l			
23	Bromodichloromethane	0.03 mg/l			
24	Dibromochloromethane	0.1 mg/l			
25	Bromoform	0.09 mg/l			
26	Thiuram	0.006 mg/l			
27	Simazine (CAT)	0.003 mg/l			
28	Thiobencarb	0.02 mg/l			
29	1,3-Dichloropropene (D-D)	0.002 mg/l			

Standard values: Not more than  $\chi$  mg/l

り、臭い)あるいは水道施設の管理上の障害が生ずるおそれのない水準を基準にして、水道水が有すべき性状に関連する項目として設定したものである。基準項目は水道事業では検査の遵守および厚生省への報告の義務がある。

## 2) 水質基準を補完する項目の設定

水道水の安全性の確保に万全を期すとともに、水道水に対する国民のニーズの高度化に対応して、おいしい水などより質の高い水道水をめざすため水質基準を補完する項目として「快適水質項目」および「監視項目」を設定した<sup>1)</sup>。

(1) 快適水質項目：快適水質項目の13項目はTable 2のように、より質の高い水道水を供給するために管理すべき項目である。快適水質項目の採用は本来は個々の水道事業者等の判断に委ねるものである。

(2) 監視項目：監視項目26項目は、基準項目の健康関連項目と同様の考え方で設定されたものでTable 3に示すように健康に関連するもののうち、将来にわたって水道水の安全性を確保できるよう、水道を水系に従って体系的組織的な監視を行うこととし、都道府県の水道行政担当部局が管理計画を策

Table 2. Items supplementary to the standard conformable water items (13 items)

No.	Item	Standard Values
1	Manganese	0.01 mg/l
2	Aluminium	0.2 mg/l
3	Residual Chlorine	1 mg/l
4	2-Methylisoborneol (PAC) (GAC)	0.00002 mg/l 0.00001 mg/l
5	Geosmin (PAC) (GAC)	0.00002 mg/l 0.00001 mg/l
6	Free carbonate	20 mg/l
7	Organic substances	3 mg/l
8	Hardness (Ca, Mg)	10~100 mg/l
9	Evaporation residue	30~200 mg/l
10	Turbidity (tap water) (distribution system)	1 degree 0.1 degree
11	Threshold Odor Number	3
12	Langelier Index	-1 to 0
13	pH value	7.5

Standard values: Not more than  $\chi$  mg/l

PAC: Powered activated carbon treatment

GAC: Granular activated carbon treatment

定し実施し、定期的に報告することとした。

### 3. リスクアセスメント

#### 3.1. 環境中 Xenobiotics のレギュラトリーサイエンス

今回の水質基準の設定は、Fig. 4 に示すように生活環境から発生する化学物質を十分な科学的根拠に基づいて客観的に安全性を評価するリスクアセスメントと、その実現の可能性を調整するリスクマネー

Table 3. Items supplementary to the standard monitoring items (26 items)

No.	Item	Standard Values
1	trans-1,2-Dichloroethylene	0.04 mg/l
2	Toluene	0.6 mg/l
3	Xylene	0.4 mg/l
4	p-Dichlorobenzene	0.3 mg/l
5	1,2-Dichloropropane	0.06 mg/l
6	Diethylhexyl phtalate	0.06 mg/l
7	Nickel	0.01 mg/l
8	Antimony	0.002 mg/l
9	Boron	0.2 mg/l
10	Molybdenum	0.07 mg/l
11	Formaldehyde	0.08 mg/l
12	Dichloroacetic acid	0.04 mg/l
13	Trichloroacetic acid	0.3 mg/l
14	Dichloroacetoneitrile	0.08 mg/l
15	Chloral hydrate	0.03 mg/l
16	Isoxathion	0.008 mg/l
17	Diazinon	0.005 mg/l
18	Fenitrothion (MEP)	0.003 mg/l
19	Isoprothioran	0.04 mg/l
20	Chlorothalonil (TPN)	0.04 mg/l
21	Propyzamide	0.008 mg/l
22	Dichlorvos (DDVP)	0.01 mg/l
23	Fenobucarb (BPMC)	0.02 mg/l
24	Chlornitrofen (CNP)	0.005 mg/l
25	Iprobenfos (IBP)	0.008 mg/l
26	EPN	0.006 mg/l

Standard values: Not more than  $\chi$  mg/l

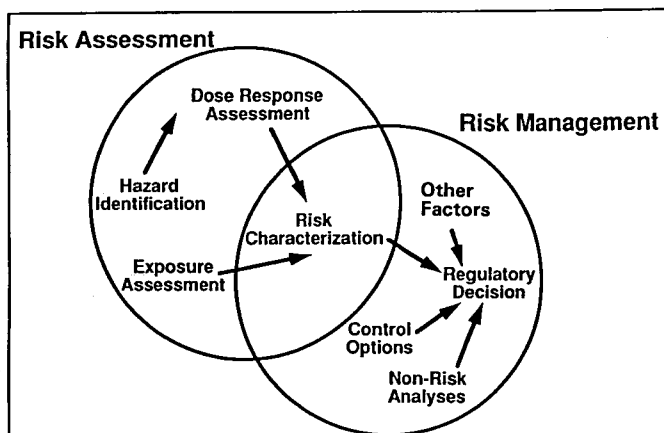


Fig. 4. Procedure of regulatory science for environmental chemicals (U.S.EPA)

ジメントからなるレギュラトリーサイエンスによって<sup>9,10</sup> 設定され、施行されたものである。このうち、リスクアセスメントについては、米国では飲料水、大気等、種々の分野の基準作成がこの考え方で行われている<sup>11</sup>。我が国でも同様の考え方が受け入れられ、水道水質基準設定をはじめとして他の分野にも利用されている。しかしながら、この考え方は未だ多くの解決すべき問題を有している。そこで、リスクアセスメントの進め方を略記するとともに、リスクアセスメントのもう一つの評価指標である暴露評価の概念についての問題を中心に述べてみたい。なお、リスクアセスメントのプロセスの一つである用量-反応評価 (dose-response assessment) の問題については既に本誌やその他の総説に林らが<sup>12-15</sup> 詳しく述べているので参照されたい。

リスクアセスメントの手順を略記すると以下のようプロセスを経る。

(1) 障害性の確認 (hazard identification)

第1には、ある化学物質の人に対する障害性についての証明である。疫学情報あるいは動物実験結果との判断が行われる。この段階で化学物質の規制の必要性の有無が区別される。

(2) 用量-反応評価 (dose-response assessment)

障害性が確認された場合は、発がんあるいは疾病の発生率と用量の関係を推定する。特に発がん性

については、数理モデルを用いた低濃度への外挿が必要となる。

(3) 暴露評価 (exposure assessment)

第2段階は、化学物質の人への暴露量の推定である。このデータは疫学調査あるいはリスク判定にも利用される。

(4) リスク判定 (risk characterization)

最終的に、上に示した用量-反応評価と暴露評価の2つの結果を総合して人における発がんのリスクを判定する。

このリスク判定結果を基に、行政的規制を行うに当たっての経済性、分析法、その他の要因等の問題点を洗い直しリスクマネジメントを行って規制値を設定することになる。

3.2. 用量-反応評価と暴露評価のレベルの違い

改正した水道水質基準は、現段階では最も新しい考え方でリスクアセスメントしたものである。しかしながら、科学の進歩に伴って新しい知見が集積され、従来の考え方や試算を修正もしくは用量-反応評価や暴露評価の見直しが必要となる場合がある。ここにいくつかの化学物質について経路別暴露量の算定例を示す。

クロロホルムを例にとると、我が国の水質基準もWHOあるいは米国もほぼ同程度の値を設定している。米国の例について経路別に暴露量を推定すると

Table 4. Potentially exposures to chloroform in general population

Exposures routes	Concentration	μg/day
Air		
Remote	$2 \times 10^{-5} \sim 5 \times 10^{-5}$ ppm	2~5
Urban	$6 \times 10^{-5} \sim 2 \times 10^{-3}$ ppm	6~200
Source-dominated area	$8.2 \times 10^{-4} \sim 2.2 \times 10^{-2}$ ppm	82~2200
Water	2~68 μg/L	4~88
Food	—	—

Table 5. Three estimates of ratio of cancer risk from all exposure pathways to cancer risk from ingestion

Exposure pathway	Cancer risk relative to ingestion cancer risk		
	Typical ratio (low estimate)	Typical ratio (high estimate)	Upper-bound ratio estimate
Ingestion	1.0	1.0	1.0
Inhalation	8.1	20.0	76.3
Dermal	<u>0.3</u>	<u>0.3</u>	<u>1.8</u>
All pathways	9.4	21.3	79.1

Table 6. Existing information on health effects of chloroform

	Inhalation		Oral		Dermal	
	Human	Animal	Human	Animal	Human	Animal
Death	●	●	●	●		●
Systemic	●	●	●	●	●	●
Intermed.	●	●		●		
Chronic	●		●	●		
Immunologic		●		●		
Neurologic	●	●	●	●		
Developmental		●		●		
Reproductive		●		●		
Genotoxic		●		●		
Carcinogenic			●	●		
Estimated Human Lifetime Risk 1 µg/l						
Osborne-Mendel rats		—		5.1×10 <sup>-8</sup> <sup>18)</sup>		—
B6C3F <sub>1</sub> mice		—		1.5×10 <sup>-6</sup> <sup>18)</sup>		—
				1.7×10 <sup>-8</sup> <sup>19)</sup>		
				5.7×10 <sup>-7</sup> <sup>20)</sup>		
ICI mice		—		1.6×10 <sup>-5</sup> <sup>21)</sup>		—

Table 7. Predicted routes of human exposure to formaldehyde

Source	Average exposure (mg/day)
Air	
Ambient air (10% of the time)	0.02
Indoor air	
Home (65% of the time)	
-Conventional	0.5~2
-Prefabricated (particle board)	1~10
Work-place air (25% of the time)	
-Without occupational exposure	0.2~0.8
-Exposed occupationally to 1 mg/m <sup>3</sup>	5
-Enviromental tobacco smoke	0.1~1.0
Smoking	
20 cigarettes/day	1.0
Drinking water (2l)	0.2
Food	1.5~14

Table 4 のようである。飲料水からの摂取量は 4~88 µg/day であるのに対し、空気環境からの暴露量は数~数十倍も高い<sup>16)</sup>。また、その発がんのリスクは Table 5 に Maxwell ら<sup>17)</sup> が示したように経口暴露に比較して経気道暴露が 8~70 倍以上も高いことが示されている。クロロホルムは蒸気圧が高いた

め気相に移行しやすく、経口暴露に比較して経気暴露の方が遙かに大きいことは物理化学的性質や挙動から明らかである。一方、暴露経路別の毒性の報告例でみると、Table 6 に示すように動物を用いた経口暴露の実験から水中クロロホルム 1 µg/L の発がんリスク値を 1.7×10<sup>-8</sup>~1.6×10<sup>-5</sup> <sup>18-21)</sup> としてい



る。しかし、暴露量の最も多い経気道暴露の発がん試験データは報告例がない。先にも記したように、クロロホルムについては水道水質基準は示されたが、暴露の最も多い空気については何らの考え方は示されていない。このように、経路別暴露量とそれぞれの経路における規制や評価方法は未だ整合性がとれていないことも事実である。

また、ホルムアルデヒドは、人の身近にある化学物質の中で経気道暴露によると発がんリスク評価値が極めて高い可能性が指摘されているものである<sup>22-26)</sup>。このため、我が国では水道水の監視項目を設定し、水道水からの寄与率を10%程度として指針値を示した。これに対して米国では、人に対して明確な発がんの評価が導かれていないとして基準値であるMCL (maximum contaminant level) あるいはMCLG(maximum contaminant level goal) を示していない。ホルムアルデヒドは、Table 7のように衣服、建築資材、大気、飲料水、食品等あらゆる製品や自然界から絶えず揮散し、空気環境から絶えず暴露している。一方、ホルムアルデヒドの規制は、水道水での規制は始まったものの、空気、特

に室内空気の最も大きい暴露源である建築資材や家庭用品については何等の規制がなされていないのが現状である。

#### 4. 暴露評価

##### 4.1. 暴露評価研究の概要

用量-反応の評価を厳密な方法に従って評価値を算出したとしても、暴露評価が不正確ならばリスク判定あるいはリスクマネジメント作業の段階に不確実性を生ずることになる。暴露量を過大に評価しすぎてマネジメントの段階で化学物質の基準を低濃度に設定しすぎると社会経済活動や人が不利益を被り、また過小評価しすぎると結果として疾病やがんの発生率を増大させることになり、国民に与える影響は計り知れない。したがって、用量-反応評価と暴露評価は、同程度のレベルの精度であることが望ましい。Mackay and Paterson<sup>27)</sup>は、モデル物質について数理モデルを用いた環境での濃度からの暴露推定量と実測暴露量との比較を行い、Table 8に示すように発生量から計算された暴露濃度と実測値が大きく懸け離れていることを示した。

Table 8. Comparison of environmental concentrations and human intake rates with effect levels

Comparison of environmental effect concentrations with predicted concentrations					
	Effect level	Actual level	Quotient or ratio		
Air pollution ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	15	2.82	5.3		
Fish toxicity ( $\text{g}/\text{m}^3$ )	5	$2.91 \times 10^{-4}$	17,160		
Soil contamination ( $\mu\text{g}/\text{g}$ )	5	$3.58 \times 10^{-2}$	140		
Comparison of allowable human intake with predicted intakes <sup>a</sup>					
	Concentration ( $\text{g}/\text{m}^3$ )	Volume of intake ( $\text{m}^3$ )	Actual intake ( $\mu\text{g}/\text{day}$ )	Percent of permissible intake	Percent of actual intake
Ingestion of food and water					
Fish	0.140	0.00025	35	0.7	34
Meat products	0.140	0.00005	7	0.14	6.8
Dairy products	$2.9 \times 10^{-4}$	0.00025	0.073	0.001	0.07
Vegetable products	$2.9 \times 10^{-4}$	0.00045	0.13	0.003	0.13
Water	$2.9 \times 10^{-4}$	0.002	0.58	0.012	0.56
Air inhalation	$2.82 \times 10^{-6}$	20	56	1.1	54.4
Domestic exposure			1	0.02	1
Occupational exposure			3	0.06	3
Total			103 <sup>b</sup>	2.04	100

<sup>a</sup> Average daily intake (ADI) 5000= $\mu\text{g}/\text{day}$ .

<sup>b</sup> Ratio of ADI/intake=103=48.5

リスクアセスメントのうち、障害性の確認についてはIARC等<sup>28)</sup>でまとめられている動物試験データや人での調査データ等の資料を基に化学物質の選定が行われている。また、用量-反応評価については国際的なコンセンサスがなされ、理論に基づいた試験方法が確立されつつある<sup>29)</sup>。しかしながら、暴露評価については、具体的なデータの取り方や計算方法あるいは評価手法は確立されていない。

USEPAは、今まで暴露評価の指針を公表し<sup>30)</sup>、その計画に沿って現在まで進めてきた。しかし、下記のようなことのため人間の暴露評価研究が遅れていることを指摘している<sup>31)</sup>。

- ・化学物質の発生源から人までの流れは極めて複雑で、様々な環境媒体がある。
- ・暴露量の推定に最低どれだけのパラメーターが

必要かが明らかでない。

- ・暴露解析には、多くの組み合わせの外挿モデルができ、これについて合意がなされていない。
  - ・暴露解析では健康影響を決定する重要なパラメーターで説明することができない場合が多い。
- 等としており、これらの問題については我が国ではさらに深刻である。

暴露評価は、Fig. 5に示すように発生源からの暴露の規模、頻度、期間、経路等の要因から暴露を定量的に導き、暴露人口を推定し、総合的に評価することである。ここで得られた暴露評価は、用量-反応評価による発がんの強さを組み合わせて暴露による潜在的なリスクが推定される。

まず、暴露量調査の第1段階は化学物質の人から見た化学物質の暴露及び挙動と、生態系を含めた環

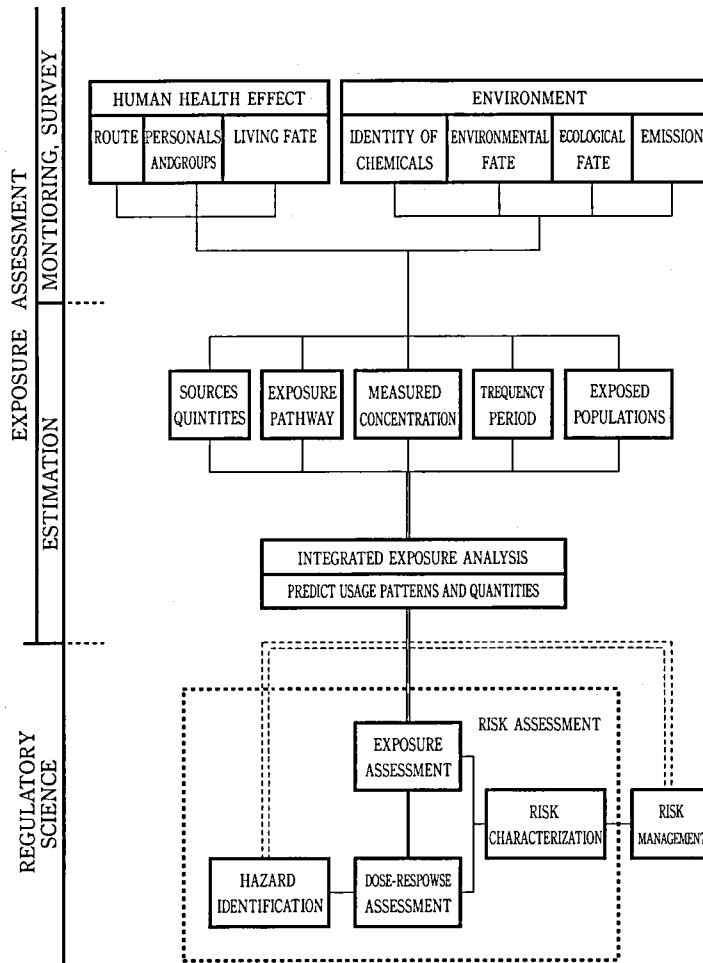


Fig. 5. Procedure of exposure assessment for environmental chemicals

境から観た化学物質の収支と挙動を明らかにすることである。人への暴露の研究は、種々の変動要因毎、個人・集団毎の暴露量の調査および生体内挙動の研究を実施する。環境の面からは、物理化学的性質からの数理モデルの構築、発生から消失までの量と挙動、環境および生態系での挙動を把握する。

人および化学物質の面から収集した各々のデータは、各要因毎に解析し、これらを統合して総合的な暴露量の推定と評価を行うことになる。発生源では、製品の製造、販売、使用、廃棄の各段階での環境中に放出する可能性の程度を探る。暴露経路と環境中の挙動では、化学物質の発生源から環境を経て人に暴露する過程における物質の移動と変換についての研究が扱われる。暴露人口の推定は、化学物質の存在状況によって明らかになり、リスク判定の重要な判断材料となる。暴露評価の最終段階では、発生量、経路、化学物質の挙動、環境濃度の推定と暴露人口の情報を組み合わせて、各段階および総合的な数理

統計モデルを用いた担定と評価を行う。

いずれの測定や調査も、組織的なデータの収集システムは確立されていないが、この分野について如何に詳細に暴露量と化学物質の挙動を把握し、実測していくかが、リスク評価値の信頼性を得る鍵を握っている。

4.2. 暴露の仕組み

1) 暴露の仕組み

社会経済活動の仕組みに従って化学物質の暴露の機会をみると、Fig.6のように暴露発生源（汚染源）、使用および環境の3段階のカテゴリーのそれぞれで人は暴露する<sup>32)</sup>。

1次発生源からの直接的暴露は、原料処理、生産加工の段階で原料、製品等の製造業に従事する人が摂取あるいは接触して暴露することを意味し、高濃度であることが多く、主に生産活動における労働環境などがその顕著な例で、化学物質と疾病との関係を明らかにする疫学的研究の解析に有効に生かすこ

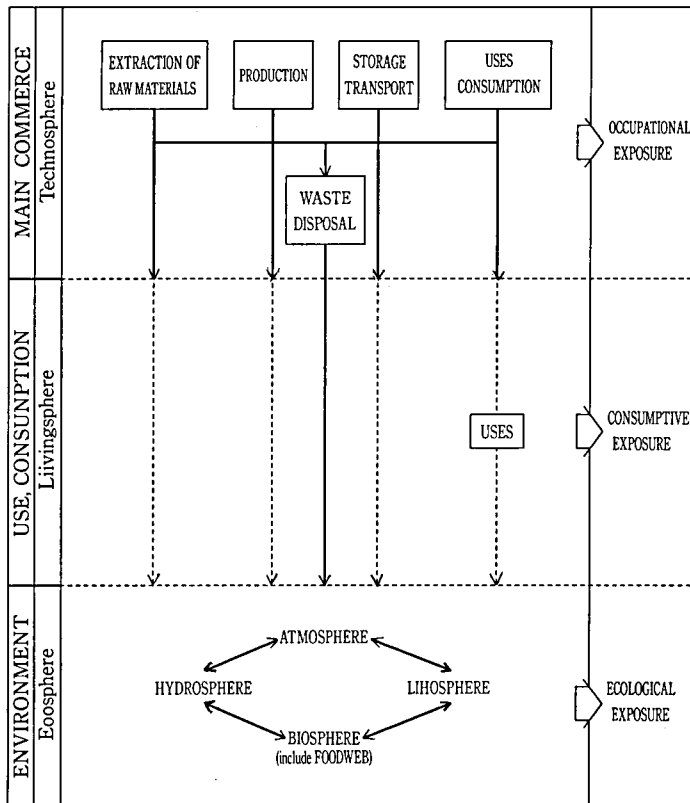


Fig. 6. Interconnection among the three compartments of exposure system

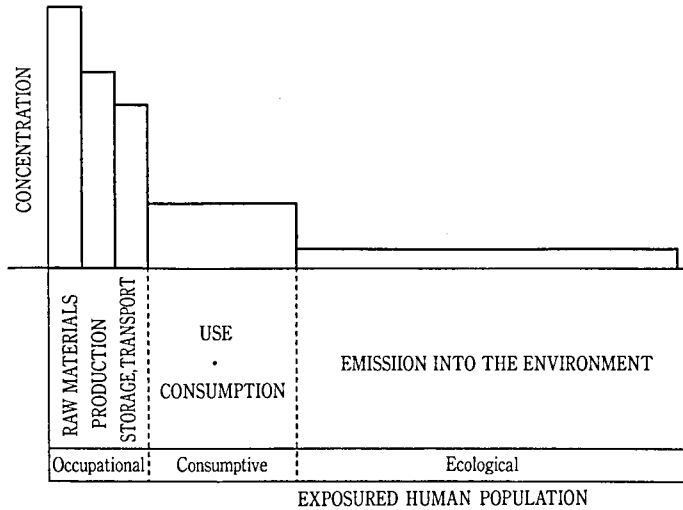


Fig. 7. Relationship between concentration and human population to exposure

とができる。

第2段階は、食品、水、生活用品、家庭用品、化粧品、建築資材、室内空気等の製品の中に製造などに際して原材料物中の不純物や汚染物が混入し、消費者がそれらの製品の利用、使用を通して経口的、経気道的あるいは経皮的に暴露する段階である。

第3段階では、廃棄あるいは使用、消費によって環境中に放出された化学物質は気圏、水圏、岩石圏および生物圏に拡散していく。気圏での拡散は人に直接影響を及ぼす。水圏や生物圏を介した化学物質は生物濃縮を考慮に入れる必要もある。さらに、化学物質は物理的、化学的あるいは生物学的な分解や生成などにより変化し、場合によっては新たな化学物質として追跡する必要がある場合もある。また、元の化学物質は生物活性を有するものを対象としているため生態系にも影響を及ぼすと考えられ、エコシステムでの変化が間接的な人への影響を考慮する必要があり、近年、この分野での研究が盛んに行われるようになってきている。

#### 2) 暴露濃度レベルと暴露範囲 (人口)

暴露の仕組みを濃度レベルと範囲 (人口) の観点からみると Fig. 7 のようである。化学物質の濃度からみると、第1段階の発生源に接する機会の多い集団は高濃度暴露される可能性が高いが、暴露人口は少ない。ついで第2段階、さらに第3段階と暴露濃度は低くなるが、発生源から遠くなるに従って暴露の範囲は広がり、不特定多数が暴露されることになり、このことは Table 4 におけるクロロホルム

の測定結果からも明らかである。これに対して暴露の頻度、期間は、いずれの段階でも条件によって異なる。したがって、化学物質の暴露評価は、種々の暴露段階によるリスクレベル (濃度) と暴露頻度、期間および人口との組み合わせによる評価が求められる。

#### 4.3. 定量的暴露量と要因の解明

##### 1) 人への暴露量の解析

人への定量的暴露量の解析には、集団の暴露変動要因毎の測定が重要である。人または集団の変動要因は、暴露経路、暴露の強さ、暴露の期間・頻度の3つに大きく分類できる。

##### (1) 暴露経路

同じ化学物質でも暴露経路が異なる場合、化学物質の体内への吸収率、挙動、運命、あるいは臨界臓器は異なる。暴露経路は、主に経口、経気道および経皮からの暴露が考えられる。

経口暴露は、主要な暴露経路の一つである。経口暴露に関する調査は、食品を介する実態調査法および調査システムがほぼ確立し、当所 食品部の主導の下、全国の衛生研究所を中心とした組織で行われている。また、水道水質のモニタリングは全国の水道事業体から厚生省への報告の義務と集計のシステムが確立している。

経気道暴露は、化学物質の物理化学的性状によって大きく左右され、最近の環境汚染物質には多くのものがこの経路によって暴露されている。化学物質の経気道暴露量の測定は、極めて立ち遅れ労働環境

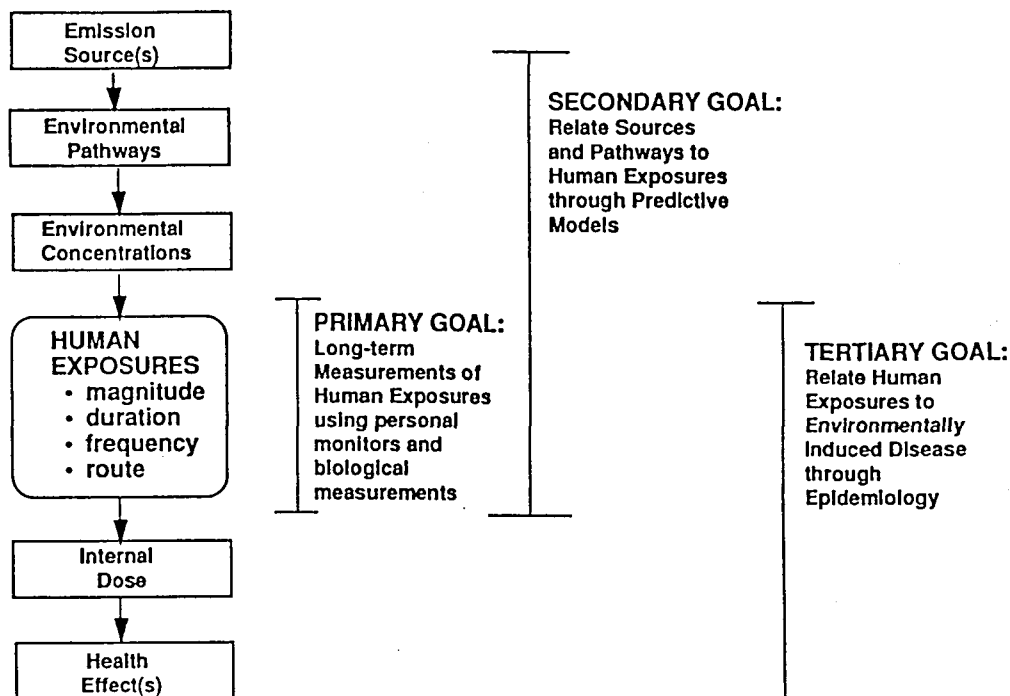


Fig. 8. National human exposure assessment survey (NHEXAS) (U.S. EPA)

や大気環境での報告例からの推計がほとんどである。しかしながら、人の生活時間は1日の8~9割が室内空気環境で占めていることから、大気中濃度と室内空気濃度からの暴露量の推定モデルの検討が必要である。また、室内環境空気は個人レベルの問題であることから室内空気暴露量が把握されておらず、未だ測定体制も確立されていないのが現状であり、早急な対応が望まれる。USEPAでは既にこのことを指摘し、具体的な対応について模索しているところである<sup>33)</sup>。

経皮暴露は、化粧品や家庭用品として身近に接する機会が多いにも関わらず、そのデータは極めて少ない。経皮的な暴露による健康影響の原因の究明および暴露量の推定は困難なことが多く、USEPAでもほとんどデータを持っておらず研究の必要性を述べている。

#### (2) 強さ (暴露量)

暴露量 (濃度) には、限定された化学物質の高濃度暴露が発生する労働環境、比較的高濃度暴露の可能性のある特定施設、低濃度暴露の一般大気、多くの化学物質が混在してしかも低濃度、高濃度が入り交じった居住環境や自然環境等それぞれの場所におけるきめ細かな濃度の把握が必要である。

#### (3) 暴露期間, 頻度

暴露集団を規定するもう一つの因子は暴露の継続性ととも期間, 頻度, 時期である。強さと同様に、種々の集団における実状の把握が必要である。アスベストの例にみれば、暴露から10から20年の経過の後に発症する場合もある化学物質の存在は過去における詳細な調査の必要性が認識される。

#### 2) 環境からの暴露の解明

##### (1) 化学物質の発生と挙動

化学物質の発生量と挙動を明らかにすることによって、その情報を用いて将来の暴露予測が可能である。化学物質の暴露発生源での挙動はもちろんのこと、利用・使用の段階および廃棄に伴う環境および暴露経路別の各段階での物理・化学的挙動を把握しておかなければならない。

生物学的性質および挙動については、生物濃縮の他、生態系への影響についても考慮する必要があり、EPAではこの問題の取り組みをはじめている<sup>34)</sup>。

##### (2) その他, 環境中での挙動

種々の発生源から放出された化学物質はいろいろな媒体を通して拡散される。また、化学物質は拡散ばかりでなく、大気、水および土壌等の媒体におけるマトリックスや、光、温度、季節、周辺環境等の

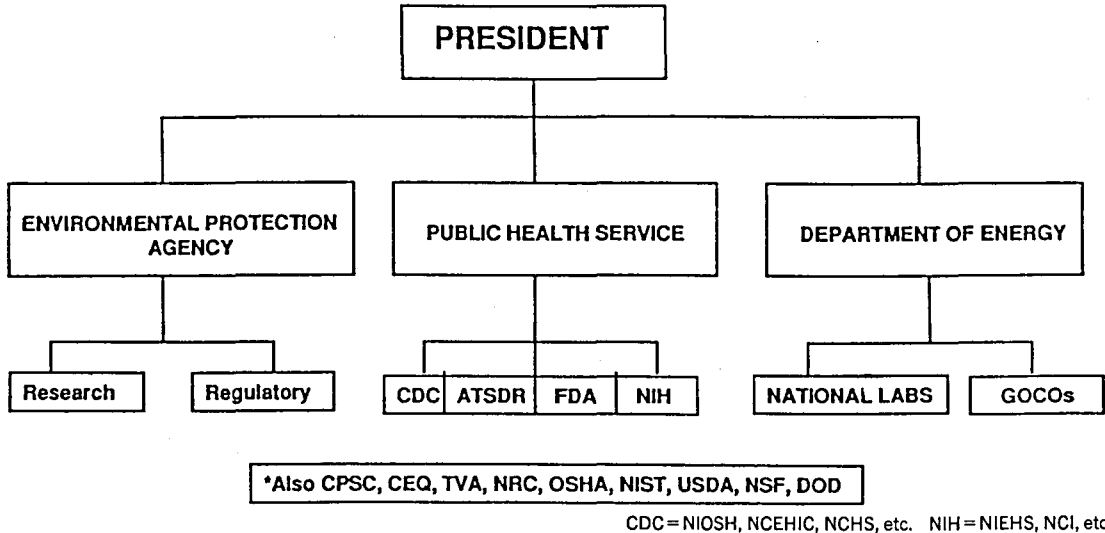


Fig. 9. Now Organization for Environmental exposure assessment (U.S. EPA)

ATSDR: Agency for Toxic Substances and Disease Registry. CDC: National Center for Disease Control and Prevention. CEQ: Council on Environmental Quality. CPSC: Consumer Product Safety Commission. FDA: Food and Drug Administration. NCI: National Cancer Institute. NIEHS: National Institute of Environmental Health Sciences. NIH: National Institute of Health. NIOSH: National Institute of Occupational Safety and Health. NRC: National Research Council. NSF: National Science Foundation. OSHA: Occupational Safety and Health Administration. USDA: U.S. Department of Agriculture.

気象条件によって種々に変化する。また、地理的、地形的な拡散の因子によって暴露量は影響される。そのほかにも、交通、労働環境など変動要因は種々存在し、きめ細かく測定を実施し、最大、最少および平均的な暴露量の把握に努めるべきである。

#### 4.4. 暴露評価の今後

##### 1) 米国における暴露評価研究の方向

暴露評価については、国際的にもその概念は理解されているものの、具体的手法や作業は未だ明確でない。また、これを我が国で実施していくには、多くの問題を解決しなければならない。

現在までの規制の考え方は Fig. 4 に従って行ってきたが、いくつかの問題が明らかになり、今後の解決すべき課題として EPA では以下のことを取り上げようとしている。第 1 には、毒性評価手法の開発と評価についてであり、その一部は前に記した。第 2 には、暴露について評価手法と体制をどのようにするかである。現段階では、全米からの限られたデータを基に暴露評価がなされ、規制値に直接反映させてきた。ヒトに対する暴露の評価手法は、ヒトが暴露する可能性のある物質のモニタリングと試算方法の開発が必要である。試算方法については

1988 年に、環境での汚染状況、挙動、ヒトへの影響などについては 1991 年に個々に指摘されたにすぎない。そのため、USEPA は、暴露評価研究を 3 段階に分けて確立していく考え方を示し、NRC (National Research Council) は、Fig. 8 のように National Human Exposure Assessment Survey (NHEXAS) (Office of Health Research) を EPA を中心として組織する計画である<sup>11)</sup>。また、この実現には USEPA のみの体制では不可能とし、Fig. 9 に示すように省際研究のプロジェクトとし、他の機関との連携を行っていくとしている。さらに、USEPA は情報収集とデータベース (Drinking Water Regulations and Health Advisories)<sup>35)</sup> およびネットワークシステム (IRIS)<sup>36,37)</sup> を確立し、一部は既に運営している。

##### 2) 我が国の暴露評価の問題点

我が国では未だ暴露評価の方法、Monitoring 方法、数理モデル、暴露量その他多くの暴露を評価する因子についてほとんど総合的な試験がなされていないのが現状であり、データの集積と暴露評価の見直しが必要である。

また、我が国では暴露の発生源や評価に関連する

行政機関が複数にまたがっている。最も人に近い生活環境に関連する厚生省のほか、環境でのデータを積んでいる環境庁、発生源あるいは製品での資料を多く持っている通産省や農水省、その他多くの省庁に及んでいる。このことから、暴露評価には省際にまたがる研究協力の実現が望まれる。

さらに、リスクアセスメント作業周辺の特殊性は、我が国の暴露評価研究には限界にある。まず第1に行政主導の調査研究データは取扱いが難しいこと、第2に negative データの価値が低いこと、第3には実態調査による測定データは学問的価値を低くみる傾向があること、第4にモニタリングに対する評価に低いことなどが挙げられる。

そのほかに、都道府県衛生公害研究機関との連携と情報交換の全国ネットワークシステムの確立等の問題の解決も必要である。

## 5. 最後 に

以上に示したように、厚生省では他に先駆けて水道水質基準策定にレギュラトリーサイエンスの考え方を導入し、その基本概念は確立したものと考えられる。しかし、人が暴露する他の製品の分野にも導入されたわけではなく、多少の時間が必要と思われる。また、リスクアセスメントの考え方もすべてが確立したわけではなく、不十分な部分があることは明らかである。このことから今後速やかな暴露評価の体制の確立を望むところである。

## 文 献

- 水道水質基準に関する省令平成4年12月21日厚生省令第69号厚生大臣
- Natioanl Primary and Secondary Drinking Water Regulations: 49CFR Parts 141 and 143 [WH-FRL-4685-4].
- Code of Federal Regulations, National Primary Drinking Water Regulations, 40 CFR 141, U. S. Environmental Protection Agency, Office of the Federal Register, Washington, D. C.
- Guidelines for Drinking-water Quality, 2nd ed. vol.1, World Health Organization, Geneva, 1993.
- Rook, J. J. Formation of haloforms during chlorination of natural water. *Water Treatment. Exam.*, **23**, 234 (1974).
- Rook, J. J. Haloforms in drinking waters. *J. AWWA*, **68**, 168 (1976).
- 上水試験方法解説 1993 日本水道協会
- Drinking Water and Health: safe Drinking Water Committee, Advisory Center on Toxicology, Assembly of Life Sciences National Research Council. Natinal Academy of Sciences. Washington, D.C. 1977.
- 内山 充：化学物質のリスクアセスメント手法に関する調査研究（環境庁）日本公衆衛生協会 1~13 (1987).
- 内山 充：厚生科学の最前線 4-レギュラトリーサイエンス, 厚生 1989 32~33, (1989).
- Charles, O. Abernathy and Welford, C. Roberts. Risk Assessment in the Environmental Protection Agency. (Draft) Human Risk Assessment Rranch, Office of Water, U.S. EPA, Washington, DC
- Ken, Sexton: Natioanl human exposure assessment survey (NHEXAS). Draft (11-1-91) Office of Health Research, U.S. EPA.
- Federal Register Part II. Office of Science and Technology Policy: Chemical Carcinogenesis; A Review of the Science and its Associated Principles (1985).
- 林 裕造, 高橋道人：代謝, **22**, 臨時増刊号「癌'85」, 3~7 (1985).
- 林 裕造：厚生省がん研究助成金による研究報告集 462 (1987).
- Hayashi, Y.: Carcinogenesis, In Risk Assessment-The Common Ground, Proceedings of the Life Science Research Symposium held in Tokyo 1987, pp. 156~13 (1989).
- Toxicological Profile for Chloroform, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, 1993.
- Maxwell, N. I. *et al.*, Trihalomethanes and maximum contaminant levels: The significance of inhalation and dermal exposures to chloroform in household water. *Regulatory Toxicol. Pharmacol.* **14**, 297~312 (1991).
- Jorgenson, T. A., *et al.*, Carcinogenicity of chloroform in drinking water to mice. *Environ. Health Perspect.* **69**, 89~95 (1985).
- NCI. Report on the carcinogenesis bioassay of chloroform. Natioanlo Cancer Insti-tute, Bethesda, Md.(pp.64)PB-264-018/AS.(1977).
- Roe, F. J. C. *et al.*, Safety evaluation of tooth paste containing chloroform. I. Long-term studies in mice. *J. Environ. Pathol. Toxicol.* **2**, 799~819 (1979).
- NTP Technical report Series No. 282. National Toxicology Program, U.S. Department of Health and Human Servieds, Research Triangle Park, N.C. 174 pp. (1985).
- Drinking Water and Health: disinfectants and disinfectant by-products. vol. 7, Natioanl Academy Press. 111~133 (1987).
- Albert, R. *et al.*, Gaseous formaldehyde and hydrogenchloride induction of nasal cancer in

- the rat. *J. Nat. Cancer Inst.* 68, 597~603 (1982).
- 24) Swenberg, J. A. *et al.*, Induction of squamous cell carcinomas of the rat nasal cavity by inhalation exposure to formaldehyde vapor. *Cancer Res.* 40, 3398~3402 (1980).
- 25) Star, T. B., and Buck, R. B. The importance of delivered dose in estimating low-dose cancer risk from inhalation exposure to formaldehyde. *Fund. Appl. Toxicol.* 4, 740~753 (1984).
- 26) Pharmacokinetics in risk assessment. Drinking water and health. vol.8 pp.327~333 (1987).
- 27) Donald Mackay and Sally Paterson. Partitioning Models. In Carcinogen Risk Assessment. Curtis C. Travis ed. Plenum Press, New York and London 1988.
- 28) WHO: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenicity: An Updating of IARC Monographs vol. 1 to 42. IARC Monographs of the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Suppl. 7 (1987).
- 29) WHO: Statistical Methods in Cancer Research. vol. III: The design and analysis of long-term animal experiments, IARC Scientific Publications No. 79 (1986).
- 30) Federal Register 51, 34043 U.S. EPA (1986)
- 31) U.S. EPA: National Air Toxics Information Clearinghouse: Qualitative and Quantitative Carcinogenic Risk Assessment. PB - 88 - 113188, NTIS, Springfield (1987).
- 32) Lawrence Fishbein, Critical Elements in Priority Selections and Ranking Systems for Risk Assessments of Chemicals. In Advances in Modern Environmental Toxicology. vol. X. Safety Evaluation: Toxicology, Methods, Concepts and Risk Assessment. M. A. ed. Mehlaman, Princeton Scientific Publishing. New Jersey, 1987.
- 33) Environmental Quality, The 22nd Annual Report of the Council on Environmental Quality with The President's Message to Congress Council on Environmental Quality 382, 1992.
- 34) Donald J, Klemm, *et al.*, Macroinvertebrate field and Laboratory Methods for Evaluating the Biological Integrity of surface waters. EPA/600/4-90/030, 1990.
- 35) U.S. EPA: Drinking Water Regulations and Health Advisories. Office of Water. Washington, DC, 1993.
- 36) Federal Register: Part III. Environmental Protection Agency. Integrated Risk Information System (IRIS). 58, 36 11490~11494 1993
- 37) IRIS Background Paper. Office of Health and Environmental Assessment, Office of Research and Development. ver 1.0 1993.



発癌物質の *in vivo* DNA 付加物量のデータベース化：O<sup>6</sup>-アルキルグアニン，  
O<sup>4</sup>-アルキルチミン，および8-ヒドロキシグアニンについて

森本和滋・木村真理・村田朋美・今井 靖・大上徳子  
五十嵐貴子・加納直子・神沼二眞・林 裕造

An *in vivo* DNA adduct database for carcinogens: O<sup>6</sup>-alkylguanine,  
O<sup>4</sup>-alkylthymine and 8-hydroxyguanine

Kazushige Morimoto, Mari Kimura, Tomomi Murata,  
Yasushi Imai, Noriko Ookami, Takako Igarashi,  
Naoko Kanoh, Tsuguchika Kaminuma and Yuzo Hayashi

Many carcinogens react with DNA and form critical DNA adducts, such as O<sup>6</sup>-alkylguanine (O<sup>6</sup>-AG), O<sup>4</sup>-alkylthymine (O<sup>4</sup>-AT), and 8-hydroxyguanine (8-OHG).

This study provides a database that can be used for molecular dosimetry of these DNA adducts. A literature survey on DNA binding *in vivo* was done by the Dialog search from the MEDLINE database. We propose a Critical Covalent Binding Index (CCBI) for the assessment of *in vivo* DNA binding level (expressed as  $\mu\text{mol}$  chemical bound per mol G or T/mmol chemical administered per kg body weight). The number of records and compounds in parenthesis of O<sup>6</sup>-AG, O<sup>4</sup>-AT, and 8-OHG were 245(13), 54(4), 79(15), respectively.

Since the CCBI values for *N*-nitrosamine in target organ were higher than for non-target organ, they may provide a useful index for estimation of target organ site and carcinogenic potency. As a case example, CCBI values for O<sup>4</sup>-AT from animal data were applied for diethylnitrosamine human exposure estimation by diethylnitrosamine.

**Keywords** : Critical Covalent Binding Index (CCBI), DNA adducts database, O<sup>6</sup>-alkylguanine, O<sup>4</sup>-alkylthymine, 8-hydroxyguanine

(Received May 31, 1994)

はじめに

環境中には、様々な癌原性物質が存在し、多くは細胞内に取り込まれると、直接あるいは代謝活性化を受けて核酸塩基やリン酸と共有結合してDNA付加物を生成する。癌原性物質の中で古くからヒトへの影響が問題となっており、数多くの研究が行われているものとして、*N*-ニトロソ化合物を中心とするアルキル化剤がある。これら化合物の研究は、DNA付加物の研究から、その修復機構や、癌遺伝子の研究へと進展している<sup>1-3)</sup>。

アルキル化剤によるDNAの修飾部位は、12ヶ所あるが、ミスコーディングを起こすことが分かっている修飾部位は、グアニン(G)のO<sup>6</sup>位とチミン(T)のO<sup>4</sup>位で、前者の方が結合量が多く、し

たがって、その研究も進んでいる<sup>4)</sup>。

しかしながら、少量のジエチルニトロサミン(DEN)を長期連続投与すると、O<sup>4</sup>エチルチミン(O<sup>4</sup>-EtT)の方がO<sup>6</sup>エチルグアニンよりはるかに高い結合量を示すことから、O<sup>4</sup>-AT付加物についても発癌性における寄与の重要性が注目されている<sup>5)</sup>。

また、活性酸素によるDNA修飾の中で、ミスコーディングを起こすDNA付加物として、8-ヒドロキシグアニン(8-OHG)がヒトへの発癌との関連で注目されている<sup>6)</sup>。

癌原性物質のデータベース化は、Goldらが、770物質について長期動物試験より得られたTD<sub>50</sub>値(tumorigenic dose rate 50)についてデータベース化し<sup>7)</sup>、ひき続いて、199物質についてデータベー

ス化した<sup>8)</sup>。

また, Soderman らは, 811 の化合物について化学構造別分類ファイル<sup>9)</sup>と, 標的臓器ファイル<sup>10)</sup>を作成した。しかし, 当時は, 上述の DNA 付加物量のデータも少なく, ただ発癌強度や標的臓器と化学構造との関係を論じているにとどまっている。

また, Lutz<sup>11,12)</sup> は, 発癌物質の *in vivo* における DNA への総結合量を, Covalent Binding Index (CBI) を用いて表現し, ラットにおける肝発癌性の強さと, ラット肝臓 DNA の CBI との相関関係について報告したが, *N*-ニトロソ化合物では, 良好な相関は得られなかったし, また, データベース化も行っていない。

今回, 我々の試みた発癌データベース化は, この 10 年間のめざましい分子生物学の進歩によって得られた, 発癌に重要な関連を有する DNA 付加物量の情報を収集し, データベース化したものである。

すなわち, 現在ヒトへの環境変異原物質曝露のバイオマーカーとして注目されている, O<sup>6</sup>-アルキルグアニン (O<sup>6</sup>-AG), O<sup>4</sup>-アルキルチミン (O<sup>4</sup>-AT), 8-OHG を選び, *in vivo* における DNA 付加物量と, その修復についての情報を集めてデータシートを作成した後, データベース化を行い, Critical Covalent Binding Index (CCBI) 値の有用性について考察した。

## 方 法

### 1. 文献検索

MEDLINE で検索した (1966 年~1990 年 9 月) ところ, O<sup>6</sup>-AG がタイトルとなっていて, しかも, 動物を材料として用いたものが 134 件あった。

さらにオフラインプリントを入手し, その内容を検討した。データシート作成可能な内容を含んでいる文献として, 24 報<sup>13-36)</sup> を選んだ。

O<sup>4</sup>-AT について, 必要とする条件を満たすものは, 1985 年~1991 年 11 月の間に 107 件得られた。その中で, *in vivo* の実験で, かつデータベース入力可能な内容を含むものは, 11 報<sup>5,37-46)</sup> に絞られた。

8-OHG についても同様に行った結果, 1985 年~1991 年 3 月の間に 65 件得られ, 12 報<sup>47-56)</sup> がデータベース入力可能な文献であった。

### 2. データシート作成

得られた文献から, 化合物名, CAS No., 分子量, 化学構造, 動物種, 系統, 性, 投与経路, 単

回・反復投与の別, 複合投与の有無, 投与量, 投与後の時間, 臓器, 細胞の種類, 代謝活性化に関係する酵素名, 活性代謝物, DNA 付加物量, CCBI 値, 修復速度 (半減期), 文献名, 本化合物の発癌実験データ等, 27 項目をデータシートに記入した。

### 3. CCBI 値の計算法

CCBI 値の計算方法は, Lutz<sup>11)</sup> の考案した CBI を応用して, 以下の式によった。

$$CCBI = \frac{O^6\text{-AG 生成量 (G 1 mol 当たりの化合物の O}^6\text{-G への結合量 } \mu\text{mol)}}{\text{投与量 (動物体重 kg 当りに投与した化合物の量 mmol)}}$$

同様に, O<sup>4</sup>-AT の CCBI 値は, O<sup>4</sup>-AT 生成量 ( $\mu\text{mol/mol T}$ ), また, 8-OHG の CCBI 値は, 8-OHG の生成量 ( $\mu\text{mol/mol G}$ ) をそれぞれ上述の式の分子に導入し算出した。

なお, O<sup>4</sup>-AT や 8-OHG は, 連続投与の実験が多いため, 投与量は, 動物の体重を考慮した上で, 曝露開始時から DNA 付加物量の測定時までの総投与量から計算した。

その際, DNA 量が重量や重量百分率で与えられている場合は, 塩基当たりの mol 数に換算して計算を行った。

また, 8-OHG においては, 無投与群の場合でも, ある程度の 8-OHG が生成されるので, 対照群の値との差を実際の生成量とした。

### 4. データベース化

使用システムは, ハードウェアは, NEC PC-9801 シリーズを, ソフトウェアは, 日本アシュトン・テイト(株) dBASE III PLUS (2) を使用し, 必要事項を入力して, データベースを作成した。入力終了後, データベース内のデータを呼び出し解析した。

## 結 果

### 1. データシート作成

#### 1) O<sup>6</sup>-AG

化合物としては, 13 品目のアルキル化剤のうち, 非酵素的に分解し, DNA を修飾するアルキル化剤として, 1-methyl-1-nitrosourea (MNU), 1-ethyl-1-nitrosourea (ENU), 1-n-propyl-1-nitrosourea (PNU), *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG), および *N*-nitrosocimetidine の 4 品目, また, 生体内で代謝活性化を受けて DNA を修飾するアルキル化剤としては, *N,N*-dimethylnitrosamine (DMN), *N*-methylethyl nitrosamine (NMEA),

*N*-nitrosomethyl-(2-hydroxyethyl) amine (NMH-EA), *N*-methylamyl nitrosamine (NMAA), *N*-methylbenzyl nitrosamine (MBN), 4-(*N*-methyl-*N*-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK), *N,N*-diethylnitrosamine (DEN), 1,2-dimethylhydrazine (SDMH), および procarbazine の 9 品目を選び、データシートを 30 枚作成した。

## 2) O<sup>4</sup>-AT

文献より得られたアルキル化剤は、メチル化剤である MNU と SDMH, エチル化剤である ENU と DEN の 4 品目のみであった。データシートを 18 枚作成した。

## 3) 8-OHG

文献より得られた化合物は、肝臓と腎臓に癌を起こすものがほとんどであった。

すなわち、肝臓に癌を起こす化合物としては、perfluorodecanoic acid (PFDA), perfluorooctanoic acid (PFOA), di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), nafenopin, ciprofibrate, simfibrate, aluminium clofibrate, 1-nitropropane (1-NP), 2-nitropropane (2-NP), acetoxime, 腎臓に癌を起こす化合物としては、potassium bromate, ferric nitrilotriacetate, diethylstilbestrol (DES), 17 $\beta$ -estradiol, その他に menadione の 15 品目であり、データシートとしては 30 枚を作成した。

## 2. データベース化

### 1) O<sup>6</sup>-AG

それぞれのデータシートにより、データベース化したところ、レコード数 (データ件数) は合計 245 件となった。

Table 1 には、O<sup>6</sup>-AG のデータファイル、すなわち、総ページ 8 ページの第 1 ページ目を例として、その出力例を示した。臓器別データより分類すると、全データの 46% は肝臓、20% は肺、11% は腎臓であり、これら 3 臓器で約 80% を占め、その他の臓器としては、脳、鼻腔粘膜、腸管等であった。

Fig. 1 には、CCBI 値の範囲別データ数を示した。CCBI 値は、最も高い値は、5,035 で、1,000 以上が 29 件、100~999 が 92 件、1~99 が 92 件を示した。

CCBI 値は、投与量が増加してもほぼ一定の値を示すことを、DMN と DEN で確認した。即ち、Table 2 に示したように、それぞれ 40 倍と 20 倍の濃度範囲で、CCBI 値は、2,000 前後と 400 前後のほぼ一定の値を示し、投与量の増加とともに、付加物量もパラレルに増加していることが明らかとなっ

た。従って、CCBI 値より、DMN や DEN の構造活性相関の解析も可能であることがわかった。

Table 3 には、標的臓器や細胞別の CCBI 値を比較した。タバコ特異ニトロサミン、NNK のクララ細胞における CCBI 値は、5,035 と最も高い値を示し、DMN や DMHEA も、標的臓器で高かった。

一方、代謝活性化を必要としないニトロソ尿素では、CCBI 値は臓器間でこのような大きな差は認められなかった (Table 4)。

Table 5 には、O<sup>6</sup>-AG の修復速度を比較した。DMN と DEN で比較すると、エチルの方がメチルより修復速度が遅く、MNU や ENU の結果より、標的臓器の脳での修復速度がきわめて遅かった。

### 2) O<sup>4</sup>-AT

レコード数は、54 件得られ、ほとんどが DEN と ENU のデータで、DEN については、長期連続投与で肝臓のデータが多かった。

それぞれの化合物についての代表例を、Table 6 に示した。その CCBI 値は、標的臓器である肝臓で、10 前後であった。修復速度は、エチル化剤の方がメチル化剤に比べてかなり遅かった。

但し、メチル化剤である MNU を、直接膀胱内に投与した時の CCBI 値は、240.0 と最高値を示した。

さらに、求めた CCBI 値を、グラフ化したところ (Fig. 1), 1.0 以下が 4 件、1~9 に 36 件、10~19 に 12 件、20~99 に 1 件、200~250 に 1 件得られ、ほぼ 1~9 の範囲に集中していた。

### 3) 8-OHG の場合

レコード数は、79 件得られ、化合物数は、15 品目にわたり、それぞれの化合物についての代表例をまとめたところ (Table 7), CCBI 値は、KBrO<sub>3</sub>, PFOA, ferric nitrilotriacetate など高い値を示した。

一方、長期連続投与で初めて 8-OHG の生成が認められる、DEHP, aluminium clofibrate, simfibrate では、極めて低い値を示した。

また、8-OHG 生成量が、無投与群より低い値を示すこともあり、CCBI 値がマイナスのものも見られた。

求めた CCBI 値をグラフ化したところ (Fig. 1), CCBI 値が、1 以下および 1~9 を合計すると 48 件と多く、20~99 に、23 件と 2 つのピークが見られた。これは、上述した様に、CCBI 値が高い値を示すものと、長期連続投与によるため、極めて低い値

Table 1. Example of the CCBI

ページ番号 1  
03/26/91

CCBI データ

SPE- CIES	STRAIN	性別	AGE (DAY)	体重 (下限)	体重 (上限)	投与 経路	器官	CELLTYPE
** 付加生成物 N-PR								
• 化合物名	PROPYL-1-NITROSOUREA							
R	F344	M	35	999	999	IP	THY	
** 付加生成物 ET								
• 化合物名	N-ETHYL-N-NITROSOUREA							
R	BD-IX	9	10	999	999	IP	BRA	
R	BD-IX	9	10	999	999	IP	BRA	
R	BD-IX	9	10	999	999	IP	LIV	
R	BD-IX	9	10	999	999	IP	LIV	
** 付加生成物 ME								
• 化合物名	DIMETHYLNITROSAMINE							
R	SPRAGUE-DAWLEY	M	999	200	200	IP	LIV	
R	SPRAGUE-DAWLEY	M	999	200	200	IP	LIV	
R	SPRAGUE-DAWLEY	M	999	200	200	IP	LIV	
R	SPRAGUE-DAWLEY	M	999	200	200	IP	LIV	
R	SPRAGUE-DAWLEY	M	999	200	200	IP	LIV	
** 付加生成物 ET								
• 化合物名	DIETHYLNITROSAMINE							
R	SPRAGUE-DAWLEY	M	999	200	200	IP	LIV	
R	SPRAGUE-DAWLEY	M	999	200	200	IP	LIV	
R	SPRAGUE-DAWLEY	M	999	200	200	IP	LIV	
R	SPRAGUE-DAWLEY	M	999	200	200	IP	LIV	
R	SPRAGUE-DAWLEY	M	999	200	200	IP	LIV	
** 付加生成物 ME								
• 化合物名	4-(N-METHYL-N-NITROSAMINO)-1-(3-PYRIDYL)-1-BUTANONE							
R	F344	M	999	175	200	IP	LUN	WHOLE LUNG
R	F344	M	999	175	200	IP	LUN	A. SMALL CEL
R	F344	M	999	175	200	IP	LUN	A. MACROPHAG
R	F344	M	999	175	200	IP	LUN	TYPE II CELL
R	F344	M	999	175	200	IP	LUN	CLARA CELLS
R	F344	M	999	175	200	IP	LUN	CLARA CELLS*
R	F344	M	999	175	200	IP	LUN	WHOLE LUNG
R	F344	M	999	175	200	IP	LUN	A. SMALL CEL
R	F344	M	999	175	200	IP	LUN	A. MACROPHAG
R	F344	M	999	175	200	IP	LUN	TYPE II CELL
R	F344	M	999	175	200	IP	LUN	CLARA CELLS
R	F344	M	999	175	200	IP	LUN	CLARA CELLS*
R	F344	M	999	999	999	SC	LIV	
R	F344	M	999	999	999	SC	LIV	
R	F344	M	999	999	999	SC	LIV	
R	F344	M	999	999	999	SC	LIV	
R	F344	M	999	999	999	SC	LIV	
R	F344	M	999	999	999	SC	LIV	
R	F344	M	999	999	999	SC	LUN	
R	F344	M	999	999	999	SC	LUN	

を示すものに分かれたためである。

## 考 察

発癌過程の最も初期段階における、癌原性物質の分子レベルでの定量的な寄与、として注目されている発癌に重要な関連を有するDNA付加物量について、まず、O<sup>6</sup>-AGについて、化学構造との相関を解析した。

代謝活性化を要するニトロサミンでは、CCBIの値の高さと、発癌標的臓器との間に、相関が認められた。特に、NNKのラット肺の発癌標的細胞におけるCCBI値は、今回入力データ中で最も高い値を示し、O<sup>6</sup>-AG量が、発癌の臓器特異性の重要な決定因子の一つであることが示唆された。

一方、代謝活性化を必要としないニトロソ尿素では、CCBI値は、臓器間で大きな差は認められず、

data base of O<sup>6</sup>-AG

DOSE	単独 投与	複合 投与	TIME	HALE- LIFE	CCBI	標的 臓器	参考 文献
0.760000	1	0	1.0	9999.9	0.9	Y	801
0.640000	1	0	1.0	229.0	18.8	Y	802
0.640000	1	0	114.0	229.0	8.8	Y	802
0.640000	1	0	1.0	36.0	26.6	N	802
0.640000	1	0	114.0	36.0	0.8	N	802
0.000067	1	0	4.0	0.7	2089.6	Y	803
0.000340	1	0	4.0	0.7	2147.1	Y	803
0.000670	1	0	4.0	0.9	1970.1	Y	803
0.001350	1	0	4.0	0.9	2200.0	Y	803
0.002700	1	0	4.0	0.8	2074.1	Y	803
0.000980	1	0	4.0	2.8	398.0	Y	803
0.002450	1	0	4.0	2.6	355.1	Y	803
0.004900	1	0	4.0	3.1	398.0	Y	803
0.009790	1	0	4.0	2.9	367.7	Y	803
0.019580	1	0	4.0	3.1	403.5	Y	803
0.001400	0	0	4.0	9999.9	160.7	Y	804
0.001400	0	0	4.0	9999.9	267.9	Y	804
0.001400	0	0	4.0	9999.9	678.6	Y	804
0.001400	0	0	4.0	9999.9	196.4	Y	804
0.001400	0	0	4.0	9999.9	1785.7	Y	804
0.001400	0	0	4.0	9999.9	5035.7	Y	804
0.480000	0	0	4.0	9999.9	22.4	Y	804
0.480000	0	0	4.0	9999.9	20.8	Y	804
0.480000	0	0	4.0	9999.9	90.1	Y	804
0.480000	0	0	4.0	9999.9	22.9	Y	804
0.480000	0	0	4.0	9999.9	75.5	Y	804
0.480000	0	0	4.0	9999.9	132.3	Y	804
0.390000	1	0	1.0	9999.9	66.7	Y	805
0.390000	1	0	4.0	9999.9	189.7	Y	805
0.390000	1	0	12.0	9999.9	276.9	Y	805
0.390000	1	0	24.0	9999.9	223.1	Y	805
0.390000	1	0	36.0	9999.9	130.8	Y	805
0.390000	1	0	48.0	9999.9	46.2	Y	805
0.390000	1	0	1.0	9999.9	0.0	Y	805
0.390000	1	0	4.0	9999.9	7.7	Y	805

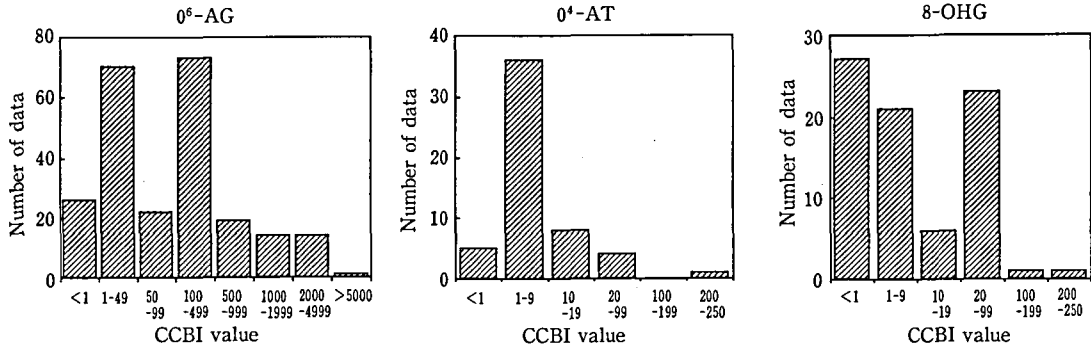
標的臓器の決定因子としては、修復速度が重要であることが示唆された (Table 5)。

O<sup>6</sup>-AG は、化合物数 13 品目、レコード数は、245 件であるのに対して、O<sup>4</sup>-AT の報告は少なく、化合物数も少なかった。

その理由として、O<sup>4</sup>-AT の生成量が低いことや、モノクローナル抗体を用いた分析方法など分析の困難さのために、その研究報告が少ないことがあげら

れる<sup>37)</sup>。

DEN を数段階の濃度で長期連続投与したデータ<sup>37)</sup> から、肝毒性を生じた 100 ppm を除く、0.4~40 ppm の 100 倍の濃度範囲で、CCBI 値は、ほぼ一定の値 (約 10) を示すことがわかった。この結果から、代謝活性化能を正常に保持している限り、CCBI 値は、O<sup>4</sup>-AT において、化合物の投与量に影響を受けないことが証明された。

Fig. 1. Distribution of CCBI values of O<sup>6</sup>-AG, O<sup>4</sup>-AT, and 8-OHGTable 2. Comparison of CCBI values of O<sup>6</sup>-AG of various dose of alkylnitrosamine

Compound	Dose (mmol/kg)	Species	Route	Period (hr)	Organ	CCBI
DMN	0.00007	Rat	IP	4	Liver	2090
	0.00034			4		2147
	0.00067			4		1970
	0.0014			4		2200
	0.0027			4		2074
DEN	0.0010	Rat	IP	4	Liver	398
	0.0025			4		355
	0.0050			4		398
	0.010			4		368
	0.020			4		404

Table 3. Comparison of CCBI values of O<sup>6</sup>-AG of alkylnitrosamine obtained from different organs or cells

Compound	Dose (mmol/kg)	Species	Route	Period (hr)	Organ	CCBI
NNK	0.0014	Rat	IP	4	Clara cells	5035
				4	Macrophages	679
				4	Small cells	268
				4	Type II cells	196
				4	Whole lung	161
DMN	0.39	Rat	SC	4	Liver	2513
				4	Nasal mucosa	974
				4	Lung	182
DMHEA	0.24	Rat	PO	4	Liver	479
				4	Lung	75
				4	Kidney	17
DMN	0.027	Rat	IP	6	Nonparenchymal cells	161
				6	Parenchymal cells	119

Table 4. Comparison of CCBI values of O<sup>6</sup>-AG of direct alkylating agents

Compound	Dose (mmol/kg)	Species	Route	Period (hr)	Organ	CCBI
MNU	0.29	Hamster	IP	5	Intestine	238
				5	Lung	200
				5	Kidney	190
				5	Brain	169
				5	Liver	155
				5	Testis	107
ENU	0.64	Rat	IP	1	Brain	19
				1	Liver	27
PNU	0.76	Rat	IP	1	Thymus	0.9

Table 5. Comparison of repair rate of O<sup>6</sup>-AG

Compound	Species	Strain	Organ	Half-life (hr)
DMN	Rat	SD	Liver	0.7~0.9
DEN	Rat	SD	Liver	2.6~3.1
MNU	Hamster	Syrian golden	Intestine	69.0
			Kidney	406.0
			Brain	754.0
ENU	Rat	BD IX	Liver	36.0
			Brain	229.0

Table 6. Comparison of CCBI values of O<sup>4</sup>-AT

Compound	Species	Strain	Route	Period (day)	Half-life (day)	Organ	CCBI
DEN	Rat	F344	PO	4	—	Liver	9.4
		F344	PO	7	—	Liver	10.7
		F344	PO	2	7.0	Liver	9.8
ENU	Rat	SD	PO	0.125	5.8	Liver	10.2
	Rat	Wistar	IP	0.083	17.0	Liver	3.3
		Wistar	IP	0.083	32.0	Kidney	2.4
		Wistar	IP	0.083	75.0	Brain	2.1
	Rat	BD IX	IP	0.042	—	Liver	7.2
BD IX		IP	0.042	—	Brain	10.8	
SDNH	Rat	F344	PO	8	—	Liver	1.5
MNU	Rat	SD	IU <sup>a)</sup>	0.083	—	Bladder	240.0

a) intra-urinary bladder

Table 7. Comparison of CCBI values of 8-OHG

Compound	Species	Strain	Route	Period (day)	Organ	CCBI
Potassium bromate	Rat	F344	IP	1	Kidney	87.10
		F344	PO	1	Kidney	18.60
		F344	PO	1	Liver	1.71
PFOA	Rat	F344	IP	3	Liver	83.10
PFDA	Rat	F344	PO	14	Liver	50.70
DEHP	Rat	F344	PO	365	Liver	0.03
Aluminium clofibrate	Rat	F344	PO	365	Liver	0.10
Simfibrate	Rat	F344	PO	365	Liver	0.07
Ciprofibrate	Rat	F344	PO	280	Liver	2.14
Ferric nitrilo-triacetate	Rat	Wistar	IP	0.25	Kidney	85.50
Acetoxime	Rat	F344	IP	0.25	Liver	8.04
DES	Hamster	Syrian	IP	0.17	Kidney	26.80
17 $\beta$ -Estradiol	Hamster	Syrian	IM <sup>a)</sup>	15	Kidney	36.30
2-NP	Rat	SD	IP	0.25	Liver	24.40
1-NP	Rat	SD	IP	0.25	Liver	5.45
Nafenopin	Rat	TIF: RAI f	PO	60	Liver	0.15
Menadione	Rat	F344	PO	0.17	Liver	27.60

## a) implant

そこで、ヒトにおける O<sup>4</sup>-EtT 生成量のデータから、肝癌患者の DNA 付加物量を例に取り、ヒトへの DEN 曝露量の子測を試みた。Huhら<sup>42)</sup>の、ヒトにおける肝癌患者の O<sup>4</sup>-EtT 付加物量 (0.821  $\mu$ mol/mol T) から、DEN で曝露されたと仮定し、その曝露量の子測した。

$$10 = 0.821 / \text{曝露量}$$

$$\text{曝露量} = 0.0821 / \text{kg 体重}$$

となり、体重 60 kg のヒトでは、DEN に換算してその曝露量は、502.8 mg となる。

したがって、1 ppm DEN を含む水を毎日 2 リットル飲むと、約 250 日でこの曝露量に達することになる。

O<sup>6</sup>-AG においても、CCBI 値は、DMN や DEN で 20 倍の濃度範囲で一定の値を示した。

動物実験における投与量は、個々の実験者によってまちまちであるが、CCBI 値の導入によって、投与量の相違を除いた尺度で、DNA 付加物量を化学構造から論じることが可能となった。

O<sup>6</sup>-AG や O<sup>4</sup>-AT の場合は、投与量が変わっても CCBI 値は、一定値を示すため、曝露量の子測できると考えられるが、8-OHG については、一定値を示さないで、子測は困難であった。

これは、O<sup>6</sup>-AG や O<sup>4</sup>-AT では、アルキル化剤が直接、あるいは、代謝活性化を受けて、DNA と結合するため、その生成量は、投与量に依存するが、8-OHG の場合は、ほとんどが DNA に直接作用しない、non-genotoxic carcinogen であり、活性酸素を介した、間接的な DNA 修飾によって、付加物が生成するため、曝露量が、直接 8-OHG 量に反映しなかった。

8-OHG を生成する、ペルオキシゾーム増殖剤の化学構造上の共通点は、カルボン酸またはカルボン酸塩で、ベンゼン核を有するものが多く、フッ素や塩素などのハロゲン元素を含むものも見られた。

以上、CCBI 値を用いることによって、DNA 付加物の反応機構を把握することや、反応機構の同じものについては構造活性相関、アルキル化剤のように用量が変わっても一定値をもつ付加物では、曝露量の子測することが可能となった。

例えば、ヒトの細胞を採取し、分子容量評価を行うことによって、CCBI 値を癌子防の手掛かりとして活用できると考えられる。

本 CCBI 値は、化学構造から *in vivo* における DNA 付加物量を子測しうる有用な尺度であり、疫学者には、リスクアセスメントのデータベースとし



て利用されることが期待される。

おわりに

本研究の一部は，厚生省がん研究助成金によった。

## 文 献

- 1) 森本和滋：トキシコロジーフォーラム，**10**，41～54 (1987)
- 2) 森本和滋：アルキル化と突然変異。“続医薬品の開発”，第11巻，医薬品の変異原性・遺伝毒性，鈴木郁生編，廣川書店，東京 (1991)，pp. 277～303
- 3) Shibuya, T. and Morimoto, K.: *Mutat. Res.*, **297**, 3～38 (1993)
- 4) Basu, A. K. and Essigmann J. M.: *Chem. Res. Toxicol.*, **1**, 1～18 (1988)
- 5) Swenberg, J. A., Dyroff, M. C., Bedell, M. A., Popp, J. A., Huh, N., Kirstein, U., and Rajewsky, M. F.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 1692～1695 (1984)
- 6) 葛西 宏： *Oncologia*, **24**, 15～21 (1991)
- 7) Gold, L. S., Sawyer, C. B., Magaw, R., Backman, G. M., Veciana, M., Levinson, R., Hooper, N. K., Havender, W. R., Bernstein, L., Peto, R., Pike, M.C., and Ames, B. N.: *Environ. Health Perspect.*, **58**, 9～319 (1984)
- 8) Gold, L. S., Slone, T. H., Backmann, G. M., Magaw, R., Costa, M. D., Lopipero, P., Blumental, M., and Ames, B. N.: *Environ. Health Perspect.*, **74**, 237～329 (1987)
- 9) Soderman, J. V.: CRC handbook of Identified Carcinogens and Noncarcinogens: Carcinogenicity-Mutagenicity Database, Vol. I, Chemical Class File, CRC Press, Florida, (1982) pp. 1～655
- 10) Soderman, J. V.: CRC handbook of Identified Carcinogens and Noncarcinogens: Carcinogenicity-Mutagenicity Database, Vol. II, Target Organ File, CRC Press, Florida, (1982) pp. 1～599
- 11) Lutz, W. K.: *Mutat. Res.*, **65**, 289～356 (1979)
- 12) Lutz, W. K.: *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **112**, 85～91 (1986)
- 13) Morimoto, K., Tanaka, A., Yamaha, T., and Takahashi, A.: *Carcinogenesis*, **9**, 853～856 (1988)
- 14) Goth, R. and Rajewsky, M. F.: *Z. Krebsforsch.*, **82**, 37～64 (1974)
- 15) Pegg, A. E., Scicchitano, D., Dolan, M. E.: *Cancer Res.*, **44**, 3806～3811 (1984)
- 16) Belinsky, S. A., White, C. M., Devereux, T. R., Swenberg, J. A., and Anderson, M. W.: *Cancer Res.*, **47**, 1143～1148 (1987)
- 17) Hecht, S. S., Trushin, N., Castonguay, A., and Rivenson, A.: *Cancer Res.*, **46**, 498～502 (1986)
- 18) Likhachev, A. J., Ivanov, M. N., Bresil, H., Planche-Martel, G., Montesano, R., and Margison, G. P.: *Cancer Res.*, **43**, 829～833 (1983)
- 19) Richardson, F. C., Dyroff, M. C., Boucheron, J. A., and Swenberg, J. A.: *Carcinogenesis*, **6**, 625～629 (1985)
- 20) Koepke, S. R., Kroeger-Koepke, M. B., Bosan, W., Thomas, B. J., Alvord, W. G., and Michejda, C. J.: *Cancer Res.*, **48**, 1537～1542 (1988)
- 21) Koenigsmann, M., Schmerold, I., Jeltsch, W., Ludeke, B., Kleihues, P., and Wiessler, M.: *Cancer Res.*, **48**, 5482～5486 (1988)
- 22) Hofe, E. V., Kleihues, P., and Keefer, L. K.: *Carcinogenesis*, **7**, 1335～1337 (1986)
- 23) Muller, R. and Rajewsky, M. F.: *Cancer Res.*, **43**, 2897～2904 (1983)
- 24) Pegg, A. E. and Perry, W.: *Cancer Res.*, **41**, 3128～3132 (1981)
- 25) Planche-Martel, G., Likhachev, A., Wild, C. P., and Montesano, R.: *Cancer Res.*, **45**, 4768～4773 (1985)
- 26) Chang, M. J. W., Hart, R. W., and Koestner, A.: *Cancer Lett.*, **9**, 199～205 (1980)
- 27) Montesano, R., Bresil, H., Planche-Martel, G., Margison, G. P., and Pegg, A.E.: *Cancer Res.*, **39**, 5003～5009 (1979)
- 28) Pegg, A. E. and Balog, B.: *Cancer Res.*, **39**, 5003～5009 (1979)
- 29) Kyrtopoulos, S. A., Hadjiloucas, E., and Vrotsou, B.: *Cancer Res.*, **42**, 1962～1966 (1982)
- 30) Bull, A. W., Burd, A. D., and Nigro, N. D.: *Cancer Res.*, **41**, 4938～4941 (1981)
- 31) Fong, A. T. and Rasmussen, R. E.: *Toxicology*, **43**, 289～299 (1987)
- 32) Chu, Y. H., Craig, A. W., and O'Connor, P. J.: *Br. J. Cancer*, **43**, 850～855 (1981)
- 33) Rabes, H. M., Wilhelm, R., Kerler, R., and Rode, G.: *Cancer Res.*, **42**, 3814～3821 (1982)
- 34) Souliotis, V. L., Kaila, S., Boussiotis, V. A., Pangalis, G. A., Kyrtopoulos, S. A.: *Cancer Res.*, **50**, 2759～2764 (1990)
- 35) Silinskis, K. C., Zucker, P. F., Labuc, G. E., Archer, M. C.: *Carcinogenesis*, **5**, 541～542 (1984)
- 36) Barch, D. H. and Fox, C. C.: *Carcinogenesis*, **8**, 1461～1464 (1987)
- 37) Boucheron, J. A., Richardson, F. C., Morgan, P. H., and Swenberg, J. A.: *Cancer Res.*, **47**,

- 1577~1581 (1987)
- 38) Richardson, F. C., Dyroff, M. C., Boucheron, J. A., and Swenberg, J. A.: *Carcinogenesis*, **6**, 625~629 (1985)
- 39) Huh, N., Satoh, M. S., Shiga, J., Rajewsky, M. F., and Kuroki, T.: *Cancer Res.*, **49**, 93~97 (1989)
- 40) Den Engelse, L., Graaf, A. D., De Brij, R. J., and Menkveld, G. J.: *Carcinogenesis*, **8**, 751~757 (1987)
- 41) Den Engelse, L., Menkveld, G. J., De Brij, R. J., and Bates, A. D.: *Carcinogenesis*, **7**, 393~403 (1986)
- 42) Huh, N., Satoh, M. S., Shiga, J., and Kuroki, T.: *IARC Sci. Publ.*, **89**, 292~295 (1988)
- 43) Sherer, E., Timmer, A. P., and Emmelot, P.: *Cancer Lett.*, **10**, 1~6 (1980)
- 44) Dyroff, M. C., Richardson, F. C., Popp, J. A., Bedell, M. A., and Swenberg, J. A.: *Carcinogenesis*, **7**, 241~246 (1986)
- 45) Kadlubar, F. F., Baranek, D. T., Weis, C. C., Evans, F. E., Cox, R., and Irving, C. C.: *Carcinogenesis*, **5**, 587~592 (1984)
- 46) Muller, R. and Rajewsky, M. F.: *Z. Naturforsch.*, **38**, 1023~1029 (1983)
- 47) Sai, K., Takagi, A., Umemura, T., Hasegawa, R., and Kurokawa, Y.: *Cancer Res.*, **82**, 165~169 (1991)
- 48) Kasai, H., Nishimura, S., Kurokawa, Y., and Hayashi, Y.: *Carcinogenesis*, **8**, 1959~1961 (1987)
- 49) Takagi, A., Sai, K., Umemura, T., Hasegawa, R., Kurokawa, Y.: *Cancer Lett.*, **57**, 50~60 (1991)
- 50) Takagi, A., Sai, K., Umemura, T., Hasegawa, R., Kurokawa, Y.: *Cancer Lett.*, **53**, 33~38 (1990)
- 51) Kasai, H., Okada, Y., Nishimura, S., Rao, M. S., and Reddy, J. K.: *Cancer Res.*, **49**, 2603~2605 (1989)
- 52) Umemura, T., Sai, K., Takagi, A., Hasegawa, R., and Kurokawa, Y.: *Cancer Lett.*, **54**, 95~100 (1990)
- 53) Hussain, N. S., Conaway, C. C., Guo, N., Asaad, W., and Fiala, E. S.: *Carcinogenesis*, **11**, 1013~1016 (1990)
- 54) Roy, D., Floyd, R. A., and Liehr, J. G.: *Cancer Res.*, **51**, 3882~3885 (1991)
- 55) Fiala, E. S., Conaway, C. C., and Mathis, J. E.: *Cancer Res.*, **49**, 5518~5522 (1989)
- 56) Hegi, M. E., Ulrich, D., Sagelsdorff, P., Richter, C., and Lutz, W. K.: *Mutat. Res.*, **238**, 325~329 (1990)
- 57) Guo, N., Conaway, C. C., Hussain, N. S., and Fiala, E. S.: *Carcinogenesis*, **11**, 1659~1662 (1990)
- 58) Denda, A., Sai, K., Tang, Q., Tsujiuchi, T., Tsutsumi, M., Amamura, T., Murata, Y., Nakae, D., Maruyama, H., Kurokawa, Y., and Konishi, Y.: *Carcinogenesis*, **12**, 719~726 (1991)

## 難燃性可塑剤 tributoxyethyl phosphate のラットにおける亜慢性毒性試験

齊藤 実・梅村隆志・川崎 靖・門馬純子・松島裕子  
松本真美・江下希美・伊佐間和郎  
鹿庭正昭・津田充宥・黒川雄二

## Subchronic Toxicity Study of Tributoxyethyl Phosphate in Wistar Rats

Minoru Saitoh, Takashi Umemura, Yasushi Kawasaki, Junko Momma,  
Yuko Matsushima, Mami Matsumoto, Nozomi Eshita, Kazuo Isama,  
Masaaki Kaniwa, Mitsuhiro Tsuda and Yuji Kurokawa

Tributoxyethyl phosphate (TBEP) is widely used in household materials such as plasticizer, floor polish and flame retardant in plastic resins and synthetic rubbers. This compound has been detected at ppb level in underground water.

In order to elucidate the toxicity of TBEP, a 14-week oral toxicity study was conducted. Wistar rats (5-weeks old, male & female, 15 rats/group) were given diet containing 0, 0.03, 0.3 or 3.0% TBEP. Suppression of body weight gain was observed in both sexes of the 3.0% group. Serum cholinesterase activity was significantly decreased in both sexes of the 0.3 and 3.0% groups and serum  $\gamma$ -glutamyl transferase activity was significantly increased in both sexes of the 3.0% group after 5 and 14 weeks exposure. Amylase in serum was also increased in 0.3 and 3.0% group males and 3.0% group females.

Absolute and relative liver weights in both sexes were significantly increased in the 3.0% group after 5 and 14 weeks of exposure.

Histopathological examination revealed moderate periportal hepatocyte swelling in male rats of the 3.0% group after 14 weeks exposure but this change was not found in male rats given 0.3% or less of TBEP in the diet or in any of the females.

These findings indicated that the liver is a target organ for TBEP toxicity. We concluded a no-observed effect level (NOEL) of TBEP in the diet of 0.03% (male: 20 mg/kg/day, female: 22 mg/kg/day) under the conditions of this toxicity study.

**Keywords** : tributoxyethyl phosphate, floor polisher, rat, subchronic toxicity study, liver injury.

(Received May 31, 1994)

## 緒 言

Tributoxyethyl phosphate (TBEP) は種々のプラスチックや合成ゴム用耐寒可塑剤、工業用コーティングの均質化剤、研磨、光沢剤、フィルムのちじみ防止剤、床磨きワックス用添加剤、消泡剤や防炎加工等の目的で広く使用されている有機リン酸トリアルキルエステル化合物である<sup>1-5)</sup>。最近、中島ら<sup>6)</sup>は家庭用ワックスよりTBEPが1%を越える濃度で検出されたと報告している。TBEPは環境汚染物質として、地下水等からも微量ではあるが検出されている<sup>6)</sup>。

TBEPのLD<sub>50</sub>として3000 mg/kg (ラット、経口)<sup>7)</sup>が知られている。急性毒性症状としては、Lahamら<sup>3)</sup>が経口投与において運動失調、体温低下、立毛、振せん、下痢などを報告している。一方、TBEPの亜慢性毒性試験としては、Lahamら<sup>2,4)</sup>がラットに対する18週間の強制経口投与(低用量群0.25 ml/kg/day, 高用量群0.5 ml/kg/day, 5 day/week)による試験を既に実施しているが、安全性評価の立場からの検討はなされていない。

今回、家庭用品に使用される化学物質の安全性評価の一環として、TBEPのラットへの14週間混餌投与による亜慢性毒性試験を実施した。

## 試験材料および方法

### 1. 被験物質

TBEPは大八化学工業より入手した (Lot No, K 31002).  $(C_4H_9OC_2H_4O)_3P=O$ , 分子量 398.48, CAS Reg. No. 78-51-3

本品は沸点 222°C (4 mmHg), 比重 1.02 (20°C) の微黄色透明, 有臭の液体で, 水には 0.11% 溶解する。

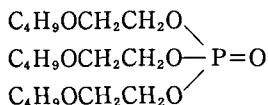


Fig. 1. Tributoxyethyl phosphate (TBEP)

### 2. 試験動物および飼育条件

4週令のWistar系ラット (SPF, 日本エスエルシー) を購入, 1週間馴化飼育後, 5週令で試験に供した。動物の群分けは山崎ら<sup>8)</sup> のノルム値を用いる方法により雌雄各々72匹から, 1群15匹を割り付け, 4群とした。ラットは金網ケージ (W: 220×L: 220×H: 170 mm) に個別収容し, 室温 23±1°C, 湿度 55±5%, 自動タイマーによる12時間明暗サイクル (5時~17時) のバリア方式飼育室で維持した。飼料はラット飼育用固形飼料 (船橋農場製 F-2) を与え, 飲料水は水道水を自由に摂取させた。

### 3. 投与用量の設定および投与方法

検体添加粉末飼料 (船橋農場製 F-2, 0.2, 1.0, 3.0 および 5.0% w/w) による1ヶ月間の予備投与試験における体重変化, 血液学的ならびに血清生化学的検査, 解剖時における肝臓, 腎臓, 脾臓の重量測定結果を基に, 本試験における混餌検体濃度 (% W/W) を以下の如く決定した。すなわち, 予備投与試験における雌, 0.2% 投与群で, ChE 活性の明らかな減少が見られたこと, 3ヶ月間の投与期間等を考慮して, 3.0% を高用量 (H群) として, 以下, 公比10で0.3% (中用量, M群) および0.03% (低用量, L群) の3用量群を設定し, 添加固形飼料を調製 (船橋農場) した。対照群としてTBEP無添加飼料群を設けた。本調製添加飼料を14週間, 自由摂取させた。ただし, H群に関しては予備試験結果より摂餌忌避が予想されたため0.3%添加飼料を1週間投与後, 2週目から所定の3%添加飼料に切り替えた。

添加飼料中からのTBEPの回収率: TBEP添加飼料各100 mgを20 mlの酢酸エチルで室温下, 30

分間振とうして抽出した。ろ過後, 残余を10 mlの酢酸エチルで同様に抽出し, 抽出液を合わせ, ロータリーエバポレーターを用いて溶媒を留去した。抽出物をアセトンに溶解し, その1 μlを下記の条件でガスクロマトグラフ法 (NP検出器使用) により分析した。

装置: NP検出器装着ガスクロマトグラフ (Hewlett Packard 5890A), カラム: J&W DB-1 fused silica megabore column, 15 m×0.528 mm, カラム温度: 100~260°C, 昇温: 16°C/min, 注入口および検出器温度: 280°C, キャリアガス: N<sub>2</sub> 10 ml/min

### 4. 検査項目

#### 1) 一般状態

混餌投与期間中1日1回, 一般状態および生死の有無を観察した。

#### 2) 体重および摂餌量: 各週1回測定した。

#### 3) 血液学的および血清生化学的検査

投与開始5週目 (1群各7匹) および14週目 (全生存動物) に実施した。16時間の絶食後, エーテル麻酔下で眼窩静脈叢より採血し, 血液学的検査, 血清生化学的検査の試料とした。

血液学的検査: 血球数は自動血球計数装置 Sysmex M-2000 (東亜医用電子製) により測定した。白血球百分比は, 血液塗末標本を作製し, ライト染色を施して桿状核好中球, 分葉核好中球, 好酸球, リンパ球, 単球を血液細胞自動分析装置マイクロックス (MICROX HEG-70, オムロン社) を用いて測定した。

血清生化学的検査: Table 1に掲げた項目について日立7150型自動分析装置を用いて測定した。

#### 4) 臓器重量および病理学的検査

血液学的検査用の採血後, 頸動脈切断により放血, 致死させ, 諸臓器, 組織を肉眼的に観察し, 以下の各臓器を摘出, 臓器重量測定ならびに病理組織学的検査を行った。

臓器重量: 脳, 心臓, 肺, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 精巣, 卵巣, 脳下垂体, 甲状腺, 副腎, 唾液腺 (顎下腺および舌下腺) および胸腺の重量を測定した。

病理組織学的検査: 脳, 心臓, 肺, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 膵臓, 精巣, 精巣上体, 卵巣, 子宮, 脳下垂体, 甲状腺, 副腎, 胸腺, 唾液腺 (顎下腺および舌下腺), 胃, 食道, 舌, 腸管, 腸間膜リンパ節, 膀胱, 脊髄, 坐骨神経, 骨格筋, 胸骨, 大腿骨を摘出, これらの摘出臓器を10%中性緩衝ホルマリン液で

Table 1. Serum biochemical and hematological examinations

Items of measurement	Abbreviation	Kit Maker
<b>Biochemistry</b>		
Total protein	TP	Wako <sup>1)</sup>
Albumin	Alb	Wako
Albumin-globulin ratio	A/G	
Blood urea nitrogen	BUN	Shinotest <sup>2)</sup>
Creatinine	CRN	BM <sup>3)</sup>
Glucose	Glc	BM
Non-esterified fatty acid	NEFA	Wako
Phospholipid	PL	Wako
Triglycerides	TG	BM
Total cholesterol	TCho	BM
Alkaline phosphatase	AlP	BM
Alanine aminotransferase	ALT (GPT)	BM
$\alpha$ -Amylase	Amy	BM
Aspartate aminotransferase	AsT (GOT)	BM
Cholinesterase <sup>5)</sup>	ChE	BM
Creatine kinase	CK	BM
$\gamma$ -glutamyltransferase	$\gamma$ -GT	BM
Leucine aminopeptidase	LAP	BM
Lactate dehydrogenase	LDH	BM
Calcium	Ca	Wako
Magnesium	Mg	Wako
Inorganic phosphorus	P	Wako
Sodium	Na	Daiichi <sup>4)</sup>
Potassium	K	Daiichi
Chlorine	Cl	Daiichi
<b>Hematology</b>		
Red blood cell count	RBC	
Hemoglobin concentration	Hb	
Packed cell volume	PCV	
Mean cell volume	MCV	
Mean cell hemoglobin	MCH	
Mean cell hemoglobin concentration	MCHC	
Platelet count	Plt	
White blood cell count	WBC	

- 1) Wako Pure Chemical Industries, 2) Shinotest Laboratory,  
 3) Boehringer Mannheim, 4) Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd.,  
 5) Butyrylthiocholine as substrate.

固定し、常法に従いパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン-エオジン染色を施し、病理組織学的検査を実施した。

5) 統計学的解析

体重変化、血液学的検査、血清生化学的検査、臓

器重量の測定結果は Bartlett の方法により分散の  
 一様性の検定を行い、分散が一様の場合には、一元  
 配置の分散分析を行った。群間に有意差が認められ、  
 各群の動物数が一定である場合は Dunnett 法、不  
 定の場合は Scheffe の方法によって、対照群に対す

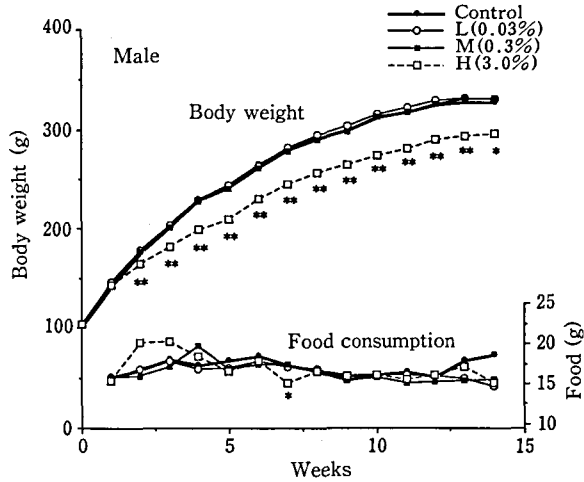


Fig. 2. Body weight and food consumption curves of male Wistar rats fed TBEP for 14 weeks

\* and \*\* show significant difference from the control at  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively.

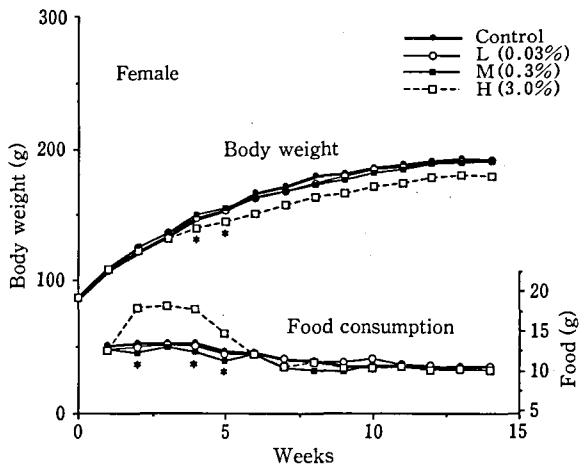


Fig. 3. Body weight and food consumption curves of female Wistar rats fed TBEP for 14 weeks

\* and \*\* show significant difference from the control at  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively.

各群の平均値の一对比較検定を行った。等分散が認められない場合は、Kruskal-Wallisの検定を行い、有意差が認められた場合は、対照群と各投与群間においてノンパラメトリックのDunnett法またはScheffeの方法による検定を行った。

## 試験結果

### 1. 一般状態

投与期間中の動物の死亡例はなかった。雌雄共、

全投与期間を通じて検体投与による毒性症状は、H群で軽度の自発運動低下が見られた以外、特に認められなかった。

### 2. 体重変化および摂餌量 (Fig. 2, 3)

体重増加推移は、対照群に比して、雄H群で2週目以後有意の増加抑制 ( $p < 0.01$ )、雌H群で4週目以後有意の増加抑制傾向 ( $p < 0.01$ )を示した。雌雄ともにM群以下では体重増加推移に対照群との有意差は見られなかった。摂餌量は、H群で雌

Table 2. Serum biochemistry and hematology in male Wistar rats fed tributoxyethyl phosphate for 5 weeks

Group ( % )		Control	L(0.03)	M(0.3)	H(3.0)
No. of Animals		7	7	7	7
Serum biochemistry					
TP	g/dl	6.48±0.14	6.43±0.14	6.49±0.21	6.75±0.18*
Alb	g/dl	4.69±0.11	4.59±0.13	4.68±0.09	4.68±0.25
A/G		2.65±0.32	2.50±0.20	2.60±0.22	2.30±0.34
BUN	mg/dl	14.2±1.4	12.4±1.6	13.1±0.9	14.1±2.2
CRN	mg/dl	0.36±0.03	0.39±0.02	0.37±0.03	0.37±0.03
Glc	mg/dl	139±7	148±10	143±9	129±11
NEFA	mEq/l	0.80±0.12	0.87±0.12	0.90±0.10	0.98±0.04**
PL	mg/dl	126±8	121±7	129±9	137±16
TG	mg/dl	152±28	138±22	136±30	103±14**
TCho	mg/dl	61±6	59±8	65±6	73±9*
AlP	mU/ml	257±12	253±21	252±22	231±26
AlT	mU/ml	38±8	37±8	36±6	39±3
Amy	mU/ml	6336±254	6358±421	7158±400**	8046±414**
AsT	mU/ml	70±7	77±6	71±3	69±7
ChE	mU/ml	126±16	123±20	92±7**	76±10**
CK	mU/ml	346±157	402±129	287±94	299±73
γ-GT	mU/ml	0.34±0.51	0.14±0.23	0.41±0.53	2.99±0.99**
LAP	mU/ml	46±2	46±1	45±2	43±4*
LDH	mU/ml	479±266	640±224	413±138	515±177
Ca	mg/dl	10.2±0.3	10.2±0.3	10.3±0.3	10.6±0.3*
Mg	mg/dl	2.22±0.13	2.16±0.10	2.13±0.10	2.20±0.13
P	mg/dl	7.5±0.5	7.2±0.2	7.5±0.4	7.6±0.5
Na	mEq/l	139±1	138±2	139±1	139±1
K	mEq/l	4.5±0.2	4.7±0.3*	4.4±0.2	4.4±0.1
Cl	mEq/l	103±1	103±1	104±1	102±1
Hematology					
RBC	10 <sup>12</sup> /l	9.34±0.27	9.35±0.19	9.25±0.14	9.15±0.27
Hb	g/dl	16.4±0.4	16.0±0.5	16.0±0.2	15.7±0.3**
PCV	%	46.4±1.5	46.0±1.1	45.5±0.6	44.8±1.0
MCV	fl	49.7±0.6	49.2±0.4	49.2±0.4	49.0±0.7
MCH	pg	17.5±0.3	17.1±0.3**	17.2±0.2	17.1±0.3*
MCHC	g/dl	35.3±0.6	34.8±0.3	35.1±0.2	35.0±0.4
Plt	10 <sup>12</sup> /l	0.86±0.10	0.86±0.07	0.92±0.06	0.90±0.07
WBC	10 <sup>9</sup> /l	7.27±0.83	7.54±1.38	7.39±0.99	7.34±1.14

Values represent mean ± S.D.

\* and \*\* show significant difference from the control at p<0.05 and p<0.01, respectively.

雄ともに投与初期において摂餌忌避による食いこぼしが見られたが、4週目以後は対照群と有意の差はなかった。

添加飼料中のTBEP濃度の分析結果は低濃度より、それぞれ0.028%、0.26%および2.82%であった。飼料中の平均残存率は91.6%であった。

### 3. 血液学的検査

5週目 (Table 2, 3) : 雌雄ともに、H群でHb

量に有意の減少が見られた。

14週目 (Table 4, 5) : 雄MおよびH群でMCVが用量依存的に、また、雄H群でMCHが有意の減少を示した。一方、雄M群でHb、PCVに有意の減少、雌H群で有意にMCVの減少、Pltの増加を示したが、用量依存性はなかった。

なお、5週目、14週目ともに、白血球百分比に有意の変化を示した項目はなかった。

Table 3. Serum biochemistry and hematology in female Wistar rats fed tributoxethyl phosphate for 5 weeks

Group ( % )		Control	L(0.03)	M(0.3)	H(3.0)
No. of Animals		7	7	7	7
Serum biochemistry					
TP	g/dl	6.24±0.16	6.31±0.18	6.41±0.24	6.63±0.15**
Alb	g/dl	4.74±0.11	4.74±0.09	4.71±0.18	4.75±0.14
A/G		3.19±0.30	3.03±0.24	2.80±0.26*	2.55±0.29**
BUN	mg/dl	15.0±1.0	14.7±1.0	13.7±0.9	15.9±1.9
CRN	mg/dl	0.30±0.03	0.29±0.04	0.28±0.05	0.29±0.03
Glc	mg/dl	136±10	134±6	137±20	133±13
NEFA	mEq/l	1.12±0.12	1.08±0.10	1.13±0.11	1.05±0.16
PL	mg/dl	156±16	168±17	170±23	200±15**
TG	mg/dl	89±14	103±12	114±33	109±26
TCho	mg/dl	79±12	91±12	96±16*	111±12**
AIP	mU/ml	215±22	191±29	181±19	179±32
AIT	mU/ml	43±13	42±6	35±4	36±4
Amy	mU/ml	4776±1465	3560±310	4037±752	5400±314
AsT	mU/ml	86±6	75±7*	76±11	69±8**
ChE	mU/ml	1754±243	1722±110	1278±168**	522±89**
CK	mU/ml	395±138	343±110	321±123	242±81
γ-GT	mU/ml	1.59±0.64	1.62±0.51	2.83±0.40	12.59±1.92**
LAP	mU/ml	52±3	52±6	50±5	50±7
LDH	mU/ml	575±146	540±177	513±168	386±145
Ca	mg/dl	9.8±0.3	9.9±0.2	9.9±0.2	10.2±0.2**
Mg	mg/dl	2.24±0.09	2.28±0.07	2.23±0.12	2.26±0.18
P	mg/dl	5.7±0.3	5.7±0.4	5.8±0.5	6.3±0.6
Na	mEq/l	138±0	137±0	138±1	139±1
K	mEq/l	4.1±0.2	4.1±0.3	4.2±0.4	3.9±0.2
Cl	mEq/l	105±1	104±1	105±1	103±1
Hematology					
RBC	10 <sup>12</sup> /l	9.73±0.26	9.39±0.35	9.52±0.26	9.44±0.33
Hb	g/dl	17.4±0.3	17.1±0.3	17.1±0.4	16.7±0.5**
PCV	%	48.2±0.8	47.0±1.4	47.5±1.2	46.8±1.2
MCV	fl	49.6±0.6	50.1±0.9	49.9±0.5	49.6±0.8
MCH	pg	17.9±0.4	18.2±0.4	18.0±0.3	17.7±0.3
MCHC	g/dl	36.0±0.6	36.4±0.6	36.0±0.4	35.6±0.3
Plt	10 <sup>12</sup> /l	0.67±0.17	0.75±0.13	0.68±0.08	0.64±0.15
WBC	10 <sup>9</sup> /l	8.24±0.68	7.63±1.20	7.51±1.25	7.90±1.16

Values represent mean ± S.D.

\* and \*\* show significant difference from the control at p<0.05 and p<0.01, respectively.

#### 4. 血清生化学的検査

5週目 (Table 2, 3)

雄：MおよびH群でChEが有意に減少し、Amyが有意に増加した。H群でTP、NEFA、TCho、γ-GTおよびCaが有意の増加、TGおよびLAPが有意の減少を示した。

雌：MおよびH群でTChoが有意の増加、A/GおよびChEが有意の減少を示した。H群でTP、

PL、γ-GTおよびCaが有意の増加、A/GおよびAsTが有意の減少を示した。

14週目 (Table 4, 5)

雄：MおよびH群でChEが有意の減少、Amyが有意の増加を示した。H群でTP、Albおよびγ-GTが有意の増加、TG、CRN、NEFA、CK、AsTおよびPが有意の減少を示した。

雌：MおよびH群でAlb、A/GおよびChEが



Table 4. Serum biochemistry and hematology in male Wistar rats fed tributoxyethyl phosphate for 14 weeks

Group ( % )	Control	L(0.03)	M(0.3)	H(3.0)
No. of Animals	8	8	8	8
Serum biochemistry				
TP g/dl	6.73±0.14	6.74±0.08	6.80±0.17	7.08±0.22**
Alb g/dl	4.84±0.07	4.80±0.09	4.81±0.10	5.03±0.18*
A/G	2.57±0.09	2.47±0.13	2.42±0.18	2.47±0.24
BUN mg/dl	14.7±1.4	13.8±1.1	14.4±1.4	14.8±1.2
CRN mg/dl	0.30±0.03	0.29±0.03	0.29±0.01	0.27±0.02*
Glc mg/dl	143±15	143±10	151±14	140±7
NEFA mEq/l	1.02±0.20	0.91±0.13	0.99±0.16	0.77±0.10**
PL mg/dl	146±18	153±19	174±28	162±14
TG mg/dl	221±49	217±49	253±81	134±32*
TCho mg/dl	77±12	81±12	98±21*	88±10
AlP mU/ml	114±8	112±9	113±6	111±9
AlT mU/ml	53±6	57±8	56±8	53±9
Amy mU/ml	6235±300	6411±572	6782±210	7918±557**
AsT mU/ml	78±10	80±13	73±7	63±4**
ChE mU/ml	205±28	223±32	162±18**	111±18**
CK mU/ml	264±81	365±330	201±42	168±46*
γ-GT mU/ml	0.12±0.29	0.10±0.13	0.05±0.07	2.97±0.43**
LAP mU/ml	44±2	44±2	42±2	41±2*
LDH mU/ml	353±130	339±128	310±78	284±103
Ca mg/dl	9.9±0.1	9.9±0.1	10.0±0.2	10.1±0.2
Mg mg/dl	2.10±0.11	2.01±0.07	2.24±0.48	2.09±0.11
P mg/dl	5.1±0.5	5.1±0.3	5.0±0.5	4.5±0.3*
Na mEq/l	138±1	138±1	138±1	138±1
K mEq/l	4.5±0.2	4.4±0.3	4.4±0.4	4.5±0.2
Cl mEq/l	103±1	103±1	103±1	102±1
Hematology				
RBC 10 <sup>12</sup> /l	9.95±0.44	9.65±0.38	9.32±0.79	9.95±0.30
Hb g/dl	17.1±0.7	16.4±0.6	15.7±1.3**	16.1±0.5
PCV %	49.1±1.8	47.7±1.9	44.9±3.4**	46.8±1.6
MCV fl	49.3±0.8	49.5±0.5	48.2±0.8*	47.0±0.7**
MCH pg	17.2±0.3	17.0±0.2	16.9±0.3	16.2±0.3**
MCHC g/dl	34.8±0.7	34.3±0.3	35.0±0.9	34.5±0.5
Plt 10 <sup>12</sup> /l	0.92±0.03	0.85±0.05	0.86±0.08	0.93±0.07
WBC 10 <sup>9</sup> /l	9.64±0.83	9.26±0.57	9.10±0.35	9.59±1.16

Values represent mean ± S.D..

\* and \*\* show significant difference from the control at p<0.05 and p<0.01, respectively.

有意の減少を示した。H群でPL, TCho, Ca, γ-GTおよびAmyが有意の増加を示し、NEFAおよびAsTが有意の減少した。

### 5. 臓器重量

5週目 (Table 6, 7)

雄：H群で脳、肝臓、甲状腺および副腎の比重量が有意に増加した。

雌：H群で肝臓の実重量、比重量がともに有意

の増加を示した。

14週目 (Table 8, 9)

雄：H群で肝臓実重量、MおよびH群で肝臓比重量が有意に増加した。H群で腎臓、精巣の比重量が、また、MおよびH群で甲状腺の比重量が有意の増加を示した。

雌：H群の肝臓において実重量、比重量がともに有意に増加した。

Table 5. Serum biochemistry and hematology in female Wistar rats fed tributoxethyl phosphate for 14 weeks

Group ( % )		Control	L(0.03)	M(0.3)	H(3.0)
No. of Animals		8	8	8	8
Serum biochemistry					
TP	g/dl	6.83±0.19	6.84±0.17	6.84±0.19	7.00±0.19
Alb	g/dl	5.04±0.13	4.97±0.18	4.83±0.19*	4.74±0.18**
A/G		2.82±0.09	2.68±0.18	2.40±0.18**	2.10±0.10**
BUN	mg/dl	15.6±0.8	14.5±1.4	14.3±1.2	15.2±2.0
CRN	mg/dl	0.28±0.03	0.30±0.02	0.27±0.02	0.28±0.03
Glc	mg/dl	118±5	126±10	129±12	128±8
NEFA	mEq/l	1.09±0.14	1.05±0.21	1.00±0.10	0.86±0.09**
PL	mg/dl	188±8	184±14	188±11	220±17**
TG	mg/dl	102±18	95±17	104±30	82±13
TCho	mg/dl	102±8	97±9	103±9	129±11**
AIP	mU/ml	97±7	96±17	88±10	93±15
AIT	mU/ml	53±26	50±10	43±6	43±7
Amy	mU/ml	3267±300	3588±626	4145±925	5281±966**
AsT	mU/ml	96±35	91±19	81±12	72±8*
ChE	mU/ml	2633±220	2385±259	1846±251*	656±75**
CK	mU/ml	411±246	276±102	514±564	289±273
γ-GT	mU/ml	2.76±1.57	2.23±0.31	2.09±0.52	12.98±1.68**
LAP	mU/ml	44±3	45±3	43±2	44±2
LDH	mU/ml	501±154	414±172	367±142	329±127
Ca	mg/dl	9.7±0.1	9.7±0.3	10.0±0.1	10.2±0.3**
Mg	mg/dl	2.20±0.09	2.24±0.09	2.19±0.07	2.22±0.10
P	mg/dl	4.3±0.7	4.1±0.5	3.9±0.3	4.4±0.4
Na	mEq/l	138±1	138±1	138±1	138±1
K	mEq/l	4.4±0.3	4.4±0.2	4.4±0.2	4.4±0.5
Cl	mEq/l	103±1	103±1	104±1	103±2
Hematology					
RBC	10 <sup>12</sup> /l	8.32±0.55	8.45±0.20	8.46±0.15	8.36±0.33
Hb	g/dl	15.4±0.8	15.5±0.3	15.4±0.3	15.1±0.4
PCV	%	44.5±2.6	45.1±0.9	45.2±1.1	43.9±1.6
MCV	fl	53.6±0.7	53.3±0.7	53.4±0.9	52.5±0.7*
MCH	pg	18.6±0.4	18.4±0.4	18.3±0.4	18.0±0.3
MCHC	g/dl	34.6±0.5	34.5±0.8	34.2±0.6	34.3±0.4
Plt	10 <sup>12</sup> /l	0.77±0.08	0.74±0.07	0.82±0.03	0.86±0.05*
WBC	10 <sup>9</sup> /l	6.57±1.18	6.83±1.28	7.10±1.24	7.08±0.90

Values represent mean ± S.D.

\* and \*\* show significant difference from the control at p<0.05 and p<0.01, respectively.

## 6. 病理学的検査

### 1) 肉眼的所見:

5週目:雌雄ともにH群で肝臓の軽度の腫脹が認められた。14週目:H群の雄で、肝臓の顕著な腫脹が認められた。その他の臓器に著変は認められなかった。

### 2) 組織学的所見:(Table 10)

5週目:雄の全群で心筋の線維化,腎尿管管内へ

の好酸性小体の蓄積,また,散発的に肝細胞壊死巣,腎間質細胞浸潤,精巣間質の浮腫が認められ,雌の全群で肝細胞の萎縮,雌雄の全群に肺血管周囲の浮腫,肝小肉芽,散発的に肺胞壁の肥厚,肺血管周囲の細胞浸潤,肝細胞空胞化,膵臓腺細胞の変化が認められたが,これらの変化はいずれも軽微なもので対照群にも認められた。

14週目:上記の変化に加え,雄で甲状腺濾胞の

Table 6. Organ weight of male Wistar rats fed tributoxyethyl phosphate for 5 weeks

Group ( % )	Control	L(0.03)	M(0.3)	H(3.0)
No. of Animals	7	7	7	7
Body weight g	233±12	231±15	229±10	201±19**
Absolute organ weight				
Brain g	1.79±0.07	1.81±0.05	1.77±0.05	1.73±0.05
Heart g	0.69±0.07	0.65±0.04	0.66±0.03	0.60±0.06**
Lung g	0.79±0.05	0.74±0.05	0.81±0.10	0.69±0.06*
Liver g	7.22±0.64	6.97±0.91	7.32±0.46	8.14±1.09
Kidney g	1.55±0.11	1.53±0.10	1.49±0.07	1.41±0.12
Spleen g	0.47±0.05	0.44±0.04	0.43±0.03	0.38±0.04**
Testis g	2.60±0.11	2.62±0.15	2.62±0.14	2.43±0.25
Pituitary mg	6.9±1.0	6.9±1.7	6.1±1.0	6.6±2.6
Thyroid mg	10.5±1.9	10.9±2.3	10.4±2.0	12.0±3.1
Adrenal mg	35.9±4.2	35.4±2.9	35.5±3.8	36.2±4.6
Salivary Gl. g	0.38±0.02	0.38±0.06	0.36±0.03	0.33±0.04
Thymus g	0.35±0.03	0.34±0.07	0.31±0.03	0.29±0.06
Relative organ weight				
Brain g%	0.77±0.04	0.78±0.05	0.77±0.03	0.87±0.06**
Heart g%	0.29±0.02	0.28±0.03	0.29±0.01	0.30±0.01
Lung g%	0.34±0.03	0.32±0.02	0.35±0.05	0.35±0.03
Liver g%	3.09±0.12	3.02±0.34	3.20±0.13	4.05±0.26**
Kidney g%	0.67±0.04	0.66±0.05	0.65±0.02	0.70±0.03
Spleen g%	0.20±0.02	0.19±0.01	0.19±0.01	0.19±0.01
Testis g%	1.11±0.07	1.14±0.07	1.14±0.05	1.21±0.09
Pituitary mg%	3.0±0.5	3.0±0.6	2.6±0.4	3.2±1.1
Thyroid mg%	4.5±0.8	4.7±0.9	4.5±0.8	5.9±1.2*
Adrenal mg%	15.4±1.4	15.4±2.0	15.5±1.5	18.0±1.7**
Salivary Gl. g%	0.16±0.01	0.16±0.02	0.16±0.01	0.17±0.01
Thymus g%	0.15±0.02	0.15±0.03	0.14±0.01	0.14±0.01

Values represent mean ± S.D.

\* and \*\* show significant difference from the control at  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively.

拡張，雌雄全群で脾臓にヘモンデリンの沈着，散発的に肝細胞の単細胞壊死が認められた。一方，雄H群で肉眼所見と一致して，小葉周辺性の肝細胞の腫大が軽度から中等度に認められた。しかし，この変化は雄のM群以下および雌においては認められなかった。

## 考 察

肝臓に対する影響：雌雄ともに肝重量の増加が用量依存性に認められ，肝臓への影響を示唆したが，四塩化炭素投与時に見られるようなAITおよびAsT活性の増加は認められず，これらの酵素の逸脱を伴うような肝障害はないと思われた。一方，H

群では雌雄ともに血清  $\gamma$ -GT 活性の顕著な増加を示したが，雄に認められたような小葉周辺性の肝細胞腫大を反映したものと考えられ，高用量のTBEPによる肝臓への慢性影響と思われる。TBEPは有機リン系化合物であることからChEの不可逆的阻害作用による血清中ChE活性の減少が考えられるが，Lahamら<sup>4,9)</sup>のTBEPやtri-n-butyl phosphateの強制経口投与では血清中ChE活性の減少は見られなかったとしている。一方，血清中ChEは肝臓で合成され，血中に放出されることから，肝実質細胞の障害およびその回復を鋭敏に反映して変化する。したがって，本実験で見られた血清中ChEの減少も肝臓に対する影響に関係した変化の可能性も考え

Table 7. Organ weight of female Wistar rats fed tributoxethyl phosphate for 5 weeks

Group ( % )	Control	L(0.03)	M(0.3)	H(3.0)
No. of Animals	7	7	7	7
Body weight g	145±9	145±8	148±9	139±8
Absolute organ weight				
Brain g	1.65±0.05	1.64±0.05	1.64±0.02	1.63±0.03
Heart g	0.46±0.03	0.49±0.03	0.47±0.02	0.44±0.02
Lung g	0.57±0.04	0.59±0.04	0.58±0.03	0.55±0.04
Liver g	4.10±0.56	4.03±0.37	4.22±0.33	5.48±0.42**
Kidney g	1.00±0.06	0.99±0.08	1.02±0.04	0.99±0.09
Spleen g	0.29±0.05	0.31±0.03	0.29±0.03	0.26±0.03
Ovary mg	47.2±8.7	50.0±5.7	49.3±5.0	41.8±10.2
Pituitary mg	7.3±1.9	8.7±1.7	7.7±0.7	7.1±1.5
Thyroid mg	8.0±2.5	10.3±2.2	8.5±1.4	9.4±2.4
Adrenal mg	43.7±4.8	45.7±3.9	46.6±6.2	47.5±6.2
Salivary Gl. g	0.27±0.03	0.28±0.02	0.28±0.01	0.27±0.02
Thymus g	0.26±0.05	0.25±0.05	0.25±0.05	0.25±0.02
Relative organ weight				
Brain g%	1.14±0.07	1.13±0.05	1.11±0.06	1.17±0.07
Heart g%	0.32±0.03	0.34±0.01	0.32±0.01	0.32±0.02
Lung g%	0.39±0.02	0.41±0.02	0.39±0.02	0.40±0.02
Liver g%	2.82±0.29	2.77±0.14	2.84±0.15	3.95±0.24**
Kidney g%	0.69±0.03	0.68±0.03	0.69±0.04	0.71±0.04
Spleen g%	0.20±0.02	0.21±0.02	0.20±0.01	0.19±0.01
Ovary mg%	32.5±5.8	34.5±3.3	33.4±4.2	30.0±6.7
Pituitary mg%	5.0±1.3	6.0±1.2	5.2±0.6	5.1±1.2
Thyroid mg%	5.5±1.7	7.1±1.4	5.8±1.0	6.8±1.7
Adrenal mg%	30.1±2.9	31.5±1.7	31.7±5.3	34.2±3.6
Salivary Gl. g%	0.18±0.01	0.19±0.01	0.19±0.01	0.20±0.02
Thymus g%	0.18±0.02	0.17±0.03	0.17±0.02	0.18±0.02

Values represent mean ± S.D.

\* and \*\* show significant difference from the control at  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively.

られる。

中枢神経系への影響：TBEPが有機リン酸エステル化合物であることから中枢神経系への障害が予測されたが、本化合物の混餌投与期間中に、投与に起因すると思われる症状変化として、H群でやや自発運動低下が認められたものの、特に、神経系への強い影響を示唆するものではなかった。病理組織学的にも脊髄、坐骨神経組織に変化は認められなかった。

Carringtonら<sup>10)</sup>はTBEPの遅発性神経毒性についてニワトリを用いて単回経口投与(5000 mg/kg)試験を実施しているが、脳中neurotoxic esterase (NTE)活性の減少がみられなかったことが

ら、TBEPの遅発性神経毒性のリスクは強い神経毒性物質であるtri-*o*-cresyl phosphateに比して無視出来るほどと評価している。一方、Lahamら<sup>2)</sup>は、SDラットへのTBEPの18週間強制経口投与(低用量群0.25 ml/kg, 高用量群0.5 ml/kg, 5 days/week)において、投与期間中呼吸困難、運動失調、振せん、立毛および流涙などを観察している。また、神経伝達速度の低下、反射時間の上昇が見られたこと、さらに、光顕および電子顕微鏡検索で、坐骨神経において軸索突起の腫脹を伴ったミエリン鞘の変性を報告している。著者らが実施した14週間混餌投与では、平均摂餌量より換算したTBEP摂取量は、H群で2000 mg/kg/day以上と

Table 8. Organ weight of male Wistar rats fed tributoxyethyl phosphate for 14 weeks

Group ( % )	Control	L(0.03)	M(0.3)	H(3.0)
No. of Animals	8	8	8	8
Body weight g	315±16	318±20	318±17	283±20**
Absolute organ weight				
Brain g	1.86±0.05	1.80±0.10	1.83±0.05	1.82±0.03
Heart g	0.79±0.06	0.82±0.06	0.80±0.04	0.73±0.08
Lung g	0.86±0.05	0.85±0.07	0.85±0.07	0.79±0.05
Liver g	8.36±0.82	8.28±0.68	9.14±0.63	10.43±1.04**
Kidney g	1.76±0.12	1.73±0.12	1.74±0.09	1.67±0.12
Spleen g	0.54±0.04	0.56±0.06	0.55±0.07	0.48±0.06
Testis g	2.79±0.12	2.75±0.15	2.76±0.11	2.75±0.10
Pituitary mg	7.7±2.0	6.8±1.2	7.1±2.1	5.8±1.4
Thyroid mg	11.6±3.4	13.3±3.0	14.7±2.3	14.6±2.4
Adrenal mg	39.0±1.3	36.8±3.9	39.9±4.5	36.3±3.9
Salivary Gl. g	0.45±0.05	0.45±0.05	0.45±0.06	0.42±0.04
Thymus g	0.25±0.05	0.24±0.02	0.25±0.04	0.21±0.05
Relative organ weight				
Brain g%	0.59±0.02	0.57±0.03	0.58±0.02	0.65±0.05
Heart g%	0.25±0.01	0.26±0.01	0.25±0.01	0.26±0.02
Lung g%	0.28±0.01	0.27±0.01	0.27±0.02	0.28±0.01
Liver g%	2.65±0.17	2.60±0.10	2.87±0.11**	3.68±0.15**
Kidney g%	0.56±0.02	0.54±0.03	0.55±0.02	0.59±0.01**
Spleen g%	0.17±0.01	0.18±0.01	0.17±0.02	0.17±0.02
Testis g%	0.89±0.06	0.87±0.06	0.87±0.03	0.97±0.07**
Pituitary mg%	2.4±0.5	2.1±0.3	2.3±0.7	2.1±0.5
Thyroid mg%	3.6±0.9	4.2±1.0	4.6±0.6*	5.2±0.8**
Adrenal mg%	12.4±0.8	11.6±1.0	12.6±1.3	12.9±1.3
Salivary Gl. g%	0.14±0.01	0.14±0.01	0.14±0.02	0.15±0.01
Thymus g%	0.08±0.01	0.08±0.01	0.08±0.01	0.08±0.02

Values represent mean ± S.D.

\* and \*\* show significant difference from the control at  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively.

なり, Lahamら<sup>2,4)</sup>の高用量群より4倍程度高い暴露を受けていることになる。本実験では電子顕微鏡検査または生理学的実験などによって神経障害を精査してないが、神経障害を示唆する結果は得られなかった。投与期間の差に加えて、混餌投与と強制経口投与による血中濃度等の差が、毒性発現に大きく影響したものと考えられる。すなわち、強制経口投与では、投与毎に高い血中濃度が達成されるのに対し、混餌投与では相対的に低い血中濃度しか得られないことに起因した差と考えられる。

その他の影響：雄において甲状腺重量が用量依存性に増加し、甲状腺機能への影響が示唆されたが本実験では血清中甲状腺ホルモンの測定を実施してい

ないため、その詳細は不明である。しかし、病理組織学的に変化は認められず、その毒性影響としては小さいと思われる。また、血清中 Amy 活性の増加が雌雄とも M 群以上でみられ、TBEP の膵臓または唾液腺への影響を示唆したが、これらの臓器の病理組織学的変化は認められず、その毒性学的意義は小さいと思われる。さらに、雌雄ともに血清中脂質に変動が認められ、特に雌の H 群において PL および TCho が投与期間を通じて増加を示した。しかし全般的にはその変動方向が雌雄、投与期間で一定しておらず、TBEP の脂質代謝への影響について結論を出すには、さらに検討が必要である。

TBEP のラットへの 14 週間混餌経口投与におけ

Table 9. Organ weight of female Wistar rats fed tributoxylethyl phosphate for 14 weeks

Group ( % )	Control	L(0.03)	M(0.3)	H(3.0)
No. of Animals	8	8	8	8
Body weight g	184±14	183±13	182±14	171±15
Absolute organ weight				
Brain g	1.74±0.06	1.71±0.04	1.73±0.04	1.71±0.06
Heart g	0.54±0.03	0.54±0.02	0.53±0.04	0.52±0.05
Lung g	0.70±0.06	0.65±0.05	0.65±0.04	0.61±0.04**
Liver g	4.52±0.41	4.32±0.20	4.46±0.34	5.68±0.44**
Kidney g	1.16±0.09	1.08±0.06*	1.08±0.06*	1.05±0.05**
Spleen g	0.35±0.03	0.35±0.05	0.34±0.02	0.33±0.06
Ovary mg	51.6±7.4	51.4±3.1	47.3±7.9	45.4±3.3*
Pituitary mg	10.5±1.6	10.3±1.5	11.6±3.4	9.6±1.5
Thyroid mg	10.7±3.7	10.1±2.1	10.3±2.8	10.9±1.7
Adrenal mg	48.2±11.8	47.8±3.9	47.2±4.5	45.6±7.6
Salivary Gl. g	0.33±0.03	0.31±0.01	0.32±0.03	0.31±0.03
Thymus g	0.19±0.03	0.19±0.02	0.19±0.03	0.18±0.03
Relative organ weight				
Brain g%	0.95±0.06	0.94±0.07	0.95±0.08	1.01±0.08
Heart g%	0.29±0.02	0.30±0.02	0.29±0.02	0.31±0.03
Lung g%	0.38±0.02	0.36±0.03	0.36±0.03	0.36±0.02
Liver g%	2.46±0.15	2.37±0.12	2.45±0.11	3.33±0.09**
Kidney g%	0.63±0.04	0.59±0.02	0.59±0.03	0.61±0.04
Spleen g%	0.19±0.02	0.19±0.02	0.19±0.02	0.19±0.02
Ovary mg%	28.1±3.7	28.3±2.9	26.0±3.9	26.6±2.0
Pituitary mg%	5.7±0.8	5.7±1.0	6.4±1.8	5.6±0.6
Thyroid mg%	5.8±2.0	5.6±1.3	5.6±1.6	6.4±0.9
Adrenal mg%	26.2±6.1	26.3±2.2	26.0±2.5	26.8±4.8
Salivary Gl. g%	0.18±0.01	0.17±0.02	0.18±0.02	0.18±0.02
Thymus g%	0.10±0.01	0.10±0.01	0.10±0.02	0.11±0.02

Values represent mean ± S.D.

\* and \*\* show significant difference from the control at  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively.

る無作用量 (NOEL) は混餌濃度 0.03% と判断した。したがって、ラットの L 群の平均摂餌量を基に、その NOEL は雄で 20 mg/kg/day, 雌では 22 mg/kg/day と算定された。

## 文 献

- 1) 11892 の化学商品, 898 頁, 化学工業日報社, 1992
- 2) Laham, S., Long, G. & Schrader, K., Induction of Electrophysiological and Morphological Changes in Sprague-Dawley Rats fed Tributoxylethyl Phosphate, *J. Applied Toxicol.*, 4, 42~48, 1984
- 3) Laham, S., Szabo, J., Long, G. & Schrader, K., Dose-Response Toxicity Studies on Tributoxylethyl Phosphate Orally Administered to Sprague-Dawley Rats, *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 46, 442~448, 1985
- 4) Laham, S., Long, G. W. & Broxup, B. R., Subchronic Oral Toxicity of Tributoxylethyl Phosphate in the Sprague-Dawley Rat, *Arch. Environ. Health*, 40, 12~17, 1985
- 5) 中島晴信, 松木一朗, 宮野直子, キャピラリーガスクロマトグラフィーによる繊維製品および家庭用ワックス類中のトリリス (2-ブトキシエチル) フォスフェイトの定量, 衛生化学, 39, 549~553, 1993
- 6) 環境庁保健調査室, 化学物質と環境, 542 頁, 環境庁, 1993

Table 10. Histopathological changes of liver in Wistar rats fed tributoxyethyl phosphate for 5 and 14 weeks

Duration of exposure	5 weeks								14 weeks								
	Male				Female				Male				Female				
Dose (%)	0	0.03	0.3	3.0	0	0.03	0.3	3.0	0	0.03	0.3	3.0	0	0.03	0.3	3.0	
No. of animals examined	7	7	7	7	7	7	7	7	8	8	8	8	8	8	8	8	
Periportal liver cell swelling	±	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0
	++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0
Liver cell vacuolation	±	1	1	1	0	1	0	0	1	4	2	3	1	0	0	0	0
Liver cell atrophy	±	0	0	0	0	2	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
Focal cell necrosis	±	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Single cell necrosis	±	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
Microgranuloma	±	2	2	1	2	2	1	2	0	1	2	1	3	0	1	0	0
Interstitial cell infiltration	±	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0

±: slight +: moderate ++: severe

- 7) The Sigma-Aldrich Library of Chemical Safety Data, Edition I, Edited by Lenga, R. E., Sigma-Aldrich Corporation, 1985
- 8) 山崎 実他, 武田研究所報, **40**, 163, 1981
- 9) Laham, S. and Long, G., Subacute Oral Toxicity of Tri-n-butyl Phosphate in the Sprague-Dawley Rats, *J. Appl. Toxicol.*, **4**, 150~154, 1984
- 10) Carrington, C. D., Lapadula, D. M., Othman, M., Farr, C., Nair, R. S., Johannsen, F. and Abou-Donia, M. B., Assessment of Delayed Neurotoxicity of Tributylphosphate, Tributoxyethylphosphate, and Dibutylphenylphosphate, *Toxicol. Indust. Health*, **6**, 415~423, 1989

## ホキシムのラットによる28日間反復経口投与毒性試験

鈴木幸子・小川幸男・鎌田栄一・内藤克司  
梅村隆志・斉藤 実・金子豊蔵・黒川雄二

## A 28-day repeated dose toxicity test of Phoxim in Wistar Rats

Sachiko Suzuki, Yukio Ogawa, Eiichi Kamata, Katusi Naito,  
Takasi Umemura, Minoru Saito, Toyozo Kaneko and Yuji Kurokawa

A 28-day oral toxicity test of Phoxim was carried out in male and female Slc: Wistar rats given dose levels of 0, 7.5, 75 and 750 mg/kg/day by gavage. A 14-day recovery test was conducted for animals receiving the 750 mg/kg dose level. There were no deaths with any dose and food consumption and growth were not affected. No specific changes were observed in any of the hematological parameters investigated. At the 750 mg/kg level, significant increases of liver, kidney, and adrenal gland weights were observed in both sexes, which persisted throughout the recovery period. Hepatic lesions with necrosis and swelling of hepatocytes were also observed with the highest dose, but these changes appeared to be reversible because they were no longer present after the recovery period.

At doses of 7.5 mg/kg and above, remarkable inhibition of the serum cholinesterase activity was observed in both sexes. This persisting in females after the recovery period. Based on these results, the no-observed-effect level (NOEL) was concluded to be less than 7.5 mg/kg/day under the present experimental conditions.

**Keywords :** phoxim, twenty-eight-day repeated dose toxicity study, cholinesterase, rat

(Received May 31, 1994)

## はじめに

長い間白アリ防除剤として使用されてきたクロロデンは、難分解性、蓄積性、慢性毒性を理由に昭和61年9月、特定化学物質に指定され、白アリ防除剤としての使用が全面的に禁止されている。この時期と相前後して、白アリ防除剤として種々の新規薬剤が開発されている。そのうちで現在、白アリ防除剤として数種類の薬剤が使用されているが、市場の大部分は6種類の有機リン系薬剤で占められている。この有機リン系薬剤の一つがホキシムである。現在、公表されている毒性試験に関する報告のほとんどが急性毒性に関するものである<sup>1)</sup>。そこで今回我々はホキシムの安全性を調べる目的で、雌雄ラットを用いて化審法ガイドラインに従って28日間の反復投与毒性試験を行ったので報告する。

## 実験材料および方法

**被験物質 :** 試験には西独デソワークバイエル社製、

商品名バリシウム I-コンク 441 (輸入元: 武田薬品工業株式会社) を用いた。バリシウム I-コンク 441 はホキシム [*o, o*-diethyl-*o*-( $\alpha$ -cyanobenzylideneamino)thyophosphate] (CAS No. 14816-18-3) 65%, 石油ナフサ 27%, 1-ブタノール 8% を含む暗赤色の液体であった。ホキシムの構造式を Fig. 1 に示した。

**動物および飼育条件 :** 日本エスエルシーより Slc: Wistar ラット (SPF) 雌雄各 90 匹を 4 週齢で購入し、1 週間の馴化の後、山崎らの方法<sup>2)</sup> により雄、雌各 60 匹を選び、対照群・低用量群 (L)・中用量群 (M)・高用量群 (H) の他に回復群として対照群と高用量群 (H) を加えて計 6 群に雌雄各 10

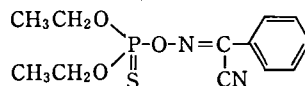


Fig. 1. Chemical structure of phoxim



Table 1. Experimental groups in the 28-day repeated dose toxicity test of Phoxim

Dose	mg/kg/day	Number of rats			
		28-day administration group		2-week recovery group	
		male	Female	Male	Female
Control	0	10	10	10	10
Phoxim L	7.5	10	10		
Phoxim M	75	10	10		
Phoxim H	750	10	10	10	10

Table 2. Hematological and biochemical examination

Items of measurement	abbreviation	Kit(maker)
Hematology		
Coulter Count Model SP		
Red blood cell count	RBC	
Hemoglobin concentration	Hb	
Packed cell volume	PCV	
White blood cell count	WBC	
Sysmex Platelet Counter PL-100		
Platelet count	Plt	
Microx Heg 30A		
Differential count of white blood cell		
Reticulocyte count	Ret	
Biochemistry (Serum) Gensaec Automatic Fast Analyzer Type IV		
Total protein	T-PRO	Wako
Blood urea nitrogen	BUN	Wako
Creatinine	CRN	Shinotest
Glucose	GLU	BMJ
Triglycerides	T-GLY	BMJ
Total Cholesterol	T-CHO	BMJ
Alkaline phosphatase	ALP	Wako
Cholinesterase	CHE	BMJ
Aspartate aminotransferase	AsT	Eiken
Alanine aminotransferase	ALT	Eiken
$\gamma$ -Glutamyltransferase	$\gamma$ -GTP	BMJ
Lactate dehydrogenase	LDH	Shinotest
Calcium	Ca	Wako
Inorganic phosphorus	P	Wako
Sodium	Na	Daiichi
Potassium	P	Daiichi
Blood Coagulability Amelung coagurometer KC-10		
Fibrinogen	Fib	Midorijuji
Hepaplastin	Hep	Eisai

BMJ:Boehringer Mannheim Yamanouchi. EIKEN:Eiken kagaku Co.,Ltd.  
 DAIICHI:Daiichi Pure Chemical Co.,Ltd. SHINOTEST:Shinotest Laboratory.  
 WAKO:Wako Pure Chemical Industries.

匹を割り付けた。投与開始時の体重は雄で119～129g, 雌で102～110gであった。

動物は床敷を入れたポリカーボネート製ケージに5匹ずつ収容し, 温度23±1℃, 湿度55±5%, 照明12時間(6時～18時)に設定したSPF動物室で飼育した。固形飼料(F2:船橋農場)および水(水道水)は自由に摂取させた。

群構成および投与量(Table 1):投与量の決定

はLD<sub>50</sub>値(雄ラット2170mg/kg, 雌ラット1976mg/kg)<sup>1)</sup>を参考にして, そのおよそ1/4量である500mg/kgを5週齢の雌雄ラットに5日間強制投与した予備試験を行った。その結果, 血清コリンエステラーゼ活性の著しい低下および肝重量の軽度の増加以外特に変化は認められなかったため, LD<sub>50</sub>値のおよそ1/3量が摂取される量, すなわち750mg/kg(H)を最高とし以下公比10で75(M)お

よび7.5 mg/kg (L) の3用量および対照群を用いた。被験物質は体重1 kgに対して2 mlを投与するように各群の検体を5%アラビアゴム溶液に懸濁した。毎朝体重を測定し、その体重から投与量を計算し、胃ゾンデを用いて1日1回28日間強制経口投与した。対照群には5%アラビアゴム溶液2 ml/kgを与えた。H群については28日間投与後、14日間の回復群を設けた。

**観察および検査項目：**投与期間中一般状態の観察、死亡の有無および体重、摂餌量の測定を行った。最終投与日の夕刻に尿検査を行った。最終投与24時間後と回復期間終了後、各群10匹中5匹について血液学、血清生化学、病理学的検査を行い、残りの5匹について血液凝固能検査を行った。

### 1. 一般状態、体重および摂餌量

投与後全動物の一般状態を毎日観察し、体重および摂餌量は週一回測定した。

### 2. 血液学的検査および血清生化学的検査

投与あるいは回復期間終了後に各群雌雄5匹について、16時間の絶食後、エーテル麻酔下で眼窩静脈叢より採血し、血液学的検査項目および血清生化学的検査項目について測定した (Table 2)。

### 3. 病理学的検査

放血、屠殺後、肉眼的な観察を行ったのち、脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、精巣、卵巣、副腎、胸腺を摘出し重量を測定した。上記の臓器に加えて甲状腺、下垂体、胃、小腸、大腸および肉眼的に変化の認められた臓器、組織を摘出し、10%中性ホルマリンで固定した。固定臓器は通常の方法によりパラフィン包埋して薄切切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施し、病理組織学的な検索を行った。

### 4. 血液凝固能検査

血液学的検査、血清生化学的検査および病理学的検査で用いた動物とは別の雌雄各群5匹について16時間絶食後、エーテル麻酔下で頸静脈より、3.8%クエン酸3ナトリウム0.2 mlを入れた注射筒で採血し、分離した血漿についてフィブリノーゲンとヘパラスチンを血液凝固能測定装置アメルングKC-40を用いて測定した。

### 5. 尿検査

最終投与日の夕刻に強制排尿により得た尿について、尿検査用試験紙 (ラプスティック3:マイルス三共) を用いて、蛋白、ケトン体、ブドウ糖、潜血、pHの5項目を検査した。

### 6. 統計学的処理

体重および摂餌量はt検定を行った。血液学的検査、血清生化学的検査、臓器重量の結果はBartlettの方法によりまず分散の一様性の検定を行い、分散が一様の場合には、一元配置の分散分析を行った。群間に有意性が認められ、各群の動物数が一定である場合Dannett法、不定の場合Scheffeの方法によって対照群に対する各群の平均値の対比較検定を行った。等分散が認められない場合、Kruskal-Wallisの検定を行い、有意性が認められた場合は、対照群と各投与群間においてノンパラメトリックのDannett法またはScheffeの方法によって検定を行った。

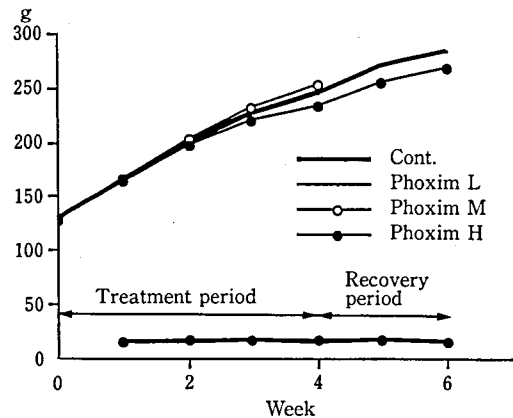


Fig. 2. Body weight and food consumption curves of male rats treated with phoxim

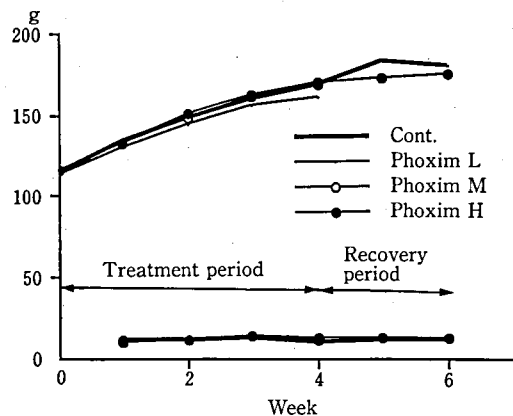


Fig. 3. Body weight and food consumption curves of female rats treated with phoxim

Table 3. Hematological findings in male rats after 28 days treatment of Phoxim and 14 days untreated recovery period

Group(Dose)	Control	L(7.5mg/kg)	M(75mg/kg)	H(750mg/kg)	Recovery		
					Control	H(750mg/kg)	
<b>Male</b>							
RBC	10 <sup>6</sup>	9.18±0.14	9.13±0.18	9.24±0.14	8.76±0.42	9.70±0.19	9.12±0.22**
HGB	g/dl	17.1±0.13	17.1±0.25	17.1±0.31	15.9±0.46**	17.2±0.33	15.6±0.44**
HCT	%	46.3±0.60	46.3±0.79	46.7±0.64	44.4±1.70*	47.6±0.94	44.2±0.90**
PLT	10 <sup>3</sup>	915±41.9	1005±85.9	959±60.7	1235±73.9**	797±42.8	893±50.5**
WBC	10 <sup>3</sup>	8.22±0.55	8.20±1.30	9.59±2.65	10.5±1.47	9.78±1.00	9.84±1.55
BAND	%	0.50±0.75	1.10±1.34	0.20±0.20	0.30±0.17	0.30±0.36	0.70±0.45
	10 <sup>3</sup>	0.04±0.06	0.09±0.10	0.01±0.02	0.03±0.02	0.03±0.03	0.07±0.45
SEG	%	23.6±6.01	23.8±4.02	18.5±2.48	15.9±3.91*	26.6±2.96	27.4±7.61
	10 <sup>3</sup>	1.92±0.38	1.92±0.24	1.76±0.48	1.66±0.52	2.60±0.35	2.66±0.78
EOSINO	%	1.46±0.74	1.44±0.90	1.16±0.79	1.00±0.79	1.22±1.13	2.94±0.32*
	10 <sup>3</sup>	0.12±0.06	0.11±0.06	0.11±0.07	0.10±0.06	0.12±0.12	0.29±0.05*
LYMPHO	%	72.9±6.92	71.8±4.34	78.9±3.50	80.9±4.01*	69.8±3.80	67.6±8.22
	10 <sup>3</sup>	6.01±0.94	5.93±1.28	7.59±2.23	8.49±1.40	6.84±0.87	6.68±1.52
MONO	%	1.54±0.7	1.84±1.08	1.24±0.92	1.96±1.07	2.08±0.87	1.60±0.65
	10 <sup>3</sup>	0.12±0.06	0.15±0.09	0.12±0.07	0.19±0.08	0.20±0.09	0.17±0.09
RETICUR	%	1.48±0.28	1.56±0.25	1.80±0.30	0.24±1.28	1.58±0.55	1.44±0.21
	10 <sup>3</sup>	0.12±0.03	0.13±0.02	0.17±0.05	0.24±0.10	0.15±0.04	0.14±0.03
<b>Female</b>							
RBC	10 <sup>6</sup>	8.48±0.18	8.82±0.21*	8.53±0.20	8.35±0.14	8.94±0.23	8.70±0.20
HGB	g/dl	16.5±0.19	17.0±0.24*	16.3±0.26	15.6±0.29**	16.8±0.20	16.2±0.48*
HCT	%	44.0±0.95	45.4±0.65*	43.9±0.70	42.9±0.61	46.1±0.66	44.2±1.30*
PLT	10 <sup>3</sup>	922±45.8	806±114	829±126	937±162	810±98.3	920±47.6
WBC	10 <sup>3</sup>	6.35±0.85	6.61±0.51	7.30±0.66	7.72±0.65*	7.38±0.85	6.70±0.38
BAND	%	0.50±0.75	0.70±0.67	1.16±0.42	0.70±0.45	0.70±0.45	0.58±0.66
	10 <sup>3</sup>	0.03±0.05	0.05±0.05	0.08±0.03	0.06±0.04	0.55±0.04	0.04±0.04
SEG	%	26.5±2.74	22.9±3.96	26.8±8.67	18.0±3.41	20.7±6.20	18.0±4.00
	10 <sup>3</sup>	1.67±0.20	1.52±0.31	1.98±0.72	1.37±0.17	1.51±0.45	1.21±0.29
EOSINO	%	2.18±0.54	1.48±0.90	2.24±1.12	1.50±0.94	1.38±0.92	1.80±0.57
	10 <sup>3</sup>	0.14±0.05	0.10±0.07	0.17±0.09	0.11±0.07	0.10±0.08	0.12±0.04
LYMPHO	%	69.4±2.81	73.7±3.19	69.1±9.54	78.6±4.01	74.7±4.77	77.1±4.26
	10 <sup>3</sup>	4.41±0.65	4.86±0.29	5.02±0.65	6.08±0.78**	5.52±0.83	5.16±0.35
MONO	%	1.38±0.70	1.30±0.76	0.68±0.41	1.26±0.78	2.58±2.02	2.48±0.92
	10 <sup>3</sup>	0.09±0.06	0.09±0.05	0.05±0.03	0.10±0.06	0.19±0.14	0.17±0.07
RETICUR	%	1.82±0.83	1.44±0.19	1.42±0.49	3.24±0.36	1.34±0.18	1.22±0.43
	10 <sup>3</sup>	0.11±0.05	0.10±0.02	0.10±0.03	0.25±0.01	0.10±0.02	0.08±0.03

Values indicate mean±S.D.(n=5)

Level of significance : \* P&lt;0.05, \*\* P&lt;0.01

## 結 果

### 1. 一般状態, 体重および摂餌量 (Fig. 2, 3)

一般状態では雌雄ともにH群で投与後軽度の流涎を認めた以外, 検体投与によると思われる明らかな変化は見られなかった。体重はH群の雌で3週以降, 雄では4週以降増加抑制傾向が見られた。摂餌量は雌雄ともに対照群との差は認められなかった。

### 2. 血液学的検査 (Table 3)

28日間投与後, 雄のH群では対照群に比し, HGB, HCTが減少, PLTが増加した。雌のL群ではRBC, HGB, HCTの増加, H群でHGBの減少, WBCの増加が認められた。回復期間終了後, H群の雄ではRBC, HGB, HCTの減少, PLTの増加が認められた。雌ではHGB, HCTの減少が

認められた。しかし, いずれの変化も軽度であり, 当部のバックグラウンドデータの範囲内であった。

### 3. 血清生化学的検査 (Table 4)

被験物質が有機リン製剤であるため, CHEに対する作用は強く, 雌雄ともにL群から減少が認められた。雄では対照群の値が640±141 mU/mlに対して, L群では452±77.2 mU/ml, M群では388±183 mU/ml, H群では143±39.7 mU/mlと減少を示した。対照群の値を100とした各群の残存率は, L群から71%, 61%, 22%であった。雌では対照群の値が1401±123 mU/mlに対して, それぞれ406±47.8, 192±48.0, 308±126 mU/mlと減少を示した。対照群の値を100とした各群の残存率は, 29%, 13%, 22%であった。14日間の回復期間後は雌雄ともに対照群と比較して低い値を示した

Table 4. Biochemical findings in male rats after 28 days treatment of Phoxim and 14 days untreated recovery period

Group(Dose)	Control	L(7.5mg/kg)	M(75mg/kg)	H(750mg/kg)	Recovery	
					Control	H(750mg/kg)
<b>Male</b>						
T-PRO g/dl	6.68±0.21	6.72±0.11	6.77±0.08	7.27±0.25**	6.70±0.05	6.75±0.07
ALB g/dl	4.17±0.06	4.21±0.04	4.31±0.06*	4.67±0.13**	4.12±0.04	4.23±0.05**
A/G	1.66±0.09	1.68±0.07	1.75±0.07	1.80±0.06*	1.59±0.03	1.68±0.03**
BUN mg/dl	17.3±0.86	18.4±1.48	19.5±2.33	22.7±1.83**	22.7±1.26	23.9±1.86
CRN mg/dl	0.53±0.05	0.54±0.04	0.52±0.07	0.53±0.05	0.51±0.04	0.50±0.06
GLU mg/dl	155±8.70	140±6.42	135±13.4*	133±11.0**	143±4.82	126±6.66**
T-GLY mg/dl	161±47.5	126±25.0	120±59.2	50.7±22.8**	184±33.77	135±53.6
T-CHO mg/dl	59.3±8.43	55.5±5.73	60.8±6.33	68.0±7.19	82.0±7.89	87.3±7.94
ALP mU/ml	571±47.2	627±70.5	561±33.6	448±39.7**	425±30.8	340±21.1**
CHE mU/ml	640±141	452±77.2**	388±183**	143±57.8**	617±88.9	474±137
GOT mU/ml	61.9±6.03	65.3±5.01	61.1±4.25	55.1±8.74	54.3±6.82	59.9±4.72
GPT mU/ml	28.7±3.88	32.3±4.39	32.3±2.71	26.5±3.70	28.1±2.43	29.0±2.60
γ-GTP mU/ml	0.01±0.00	0.17±0.22	0.06±0.11	1.24±0.37**	0.01±0.0	0.15±0.32
LDH-P mU/ml	806±271	830±375	618±196	520±334	413±261	413±171
Ca mg/dl	9.33±0.31	9.36±0.16	9.34±0.14	9.74±0.36	10.0±0.15	10.0±0.31
P mg/dl	7.56±0.56	7.53±0.37	7.44±0.30	8.18±0.30**	6.05±0.52	6.83±0.45*
Na mEq/l	133±4.79	137±4.22	136±3.71	135±7.69	151±8.11	155±8.69
K mEq/l	5.35±0.19	5.66±0.47	5.34±0.11	5.74±0.25	5.60±0.24	5.90±0.35
<b>Female</b>						
T-PRO g/dl	6.64±0.08	6.56±0.14	6.67±0.19	7.78±0.11**	6.77±0.28	6.76±0.14
ALB g/dl	4.30±0.08	4.28±0.06	4.28±0.06	4.94±0.08**	4.27±0.13	4.30±0.11
A/G	1.84±0.06	1.89±0.15	1.80±0.13	1.74±0.05	1.71±0.10	1.75±0.07
BUN mg/dl	18.5±1.60	17.8±0.96	18.1±1.54	21.1±2.69	24.5±1.86	23.7±2.18
CRN mg/dl	0.50±0.06	0.50±0.04	0.46±0.04	0.45±0.05	0.67±0.02	0.56±0.05**
GLU mg/dl	117±8.09	115±13.3	121±6.31	134±8.79*	139±10.9	125±5.42*
T-GLY mg/dl	83.4±30.9	83.5±9.83	78.4±12.9	114±44.7	119±32.0	159±27.33
T-CHO mg/dl	127±7.04	121±6.52	110±11.3*	79.9±6.30**	121±12.9	160±9.75**
ALP mU/ml	396±47.1	429±112	400±34.5	414±46.0	309±22.6	250±1.24**
CHE mU/ml	1401±123	406±47.8**	192±48.0**	308±126**	1481±424	929±84**
GOT mU/ml	56.9±8.88	56.3±6.72	57.9±15.3	49.7±1.80	52.1±6.81	52.3±2.40
GPT mU/ml	28.2±6.08	25.9±2.81	28.1±8.49	29.5±2.22	26.6±5.43	29.3±1.50
γ-GTP mU/ml	0.95±0.32	1.23±0.34	1.32±0.28	6.03±0.89**	0.15±0.32	0.45±0.61
LDH-P mU/ml	465±203	459±62.4	415±361	302±112	503±259	508±122
Ca mg/dl	10.1±0.33	10.1±0.23	9.80±0.35	10.5±0.29	9.85±0.52	9.86±0.12
P mg/dl	5.23±1.11	5.81±0.50	5.93±0.67	7.17±0.78**	3.81±0.61	4.58±0.35*
Na mEq/l	140±4.82	140±5.50	139±4.69	141±4.21	157±6.8	156±3.91
K mEq/l	5.16±0.19	5.06±0.11	5.02±0.33	5.50±0.22	4.78±0.18	4.94±0.30

Values indicate mean±S.D. (n=5)

Level of significance : \* P&lt;0.05, \*\* P&lt;0.01

が、雌ではその差が有意であった。その他、雄ではALBがM群から、T-PRO、A/G、BUN、γ-GTP、PはH群で有意に増加した。T-GLYとALPはH群で、GLUはM群から、CHEはL群から有意に減少した。雌ではT-PRO、ALB、GLU、γ-GTP、PがH群で有意に増加した。T-CHOはM群から、CHEはL群から有意に減少した。14日間の回復期間後、H群の雄ではALB、A/G、Pは有意に増加し、GLU、ALPは有意に減少した。雌ではT-CHO、Pが有意に増加し、CRN、GLU、ALP、CHEが有意に減少した。雄で認められたM群のALB、GLU、H群のGLU、ALP、Pおよび回復群のGLU、P値は当部のバックグラウンドデータの範囲内であった。さらに、雌についてはH群のGLU、Pおよ

び回復群のCRN、GLUの値は当部のバックグラウンドデータの範囲内であった。

#### 4. 臓器重量 (Table 5)

雌雄ともにL群では対照群との差は認められなかったが、M群から肝臓、腎臓、副腎の実重量および体重比で増加傾向を示し、H群ではその差が有意であった。14日の回復期間後のH群の雄では実重量で腎臓、甲状腺、体重比で肝臓、腎臓、脾臓、甲状腺重量の有意の増加が認められ、雌では実重量で肝臓の増加、体重比で肝臓、腎臓、副腎重量が有意に増加した。

#### 5. 病理組織学的検査 (Table 6, 7)

雌雄ともにH群で肝臓の中心静脈周囲の肝細胞の壊死、雌では肝細胞の膨化がそれぞれ3~4例認

Table 5. Organ weight findings in rats after 28 days treatment of Phoxim and 14 days untreated recovery period

Group(Dose)	Control	L(7.5mg/kg)	M(75mg/kg)	H(750mg/kg)	Recovery	
					Control	H(750mg/kg)
<b>Male</b>						
Body weight g	236±4.9	239±14.5	241±10.4	218±7.6*	272±15.5	260±17.6
Absolute Organ Weight						
Liver g	7.50±0.21	7.18±0.34	8.15±0.53	12.91±0.88**	7.74±0.72	8.82±0.99
Kidney g	1.52±0.09	1.50±0.08	1.61±0.28	2.15±0.09**	1.67±0.06	1.93±0.17*
Spleen g	0.52±0.03	0.50±0.03	0.49±0.03	0.49±0.03	0.53±0.04	0.64±0.09
Testis g	2.83±0.10	2.72±0.14	2.75±0.11	2.78±0.03	2.82±0.17	2.67±0.14
Thyroid mg	16.0±3.1	18.2±9.6	17.6±2.8	16.8±3.3	14.0±3.5	24.0±3.1**
Adrenal mg	42.2±6.0	41.4±2.6	45.2±3.8	51.6±4.3**	38.8±3.0	40.6±5.7
Relative Organ Weight						
Liver g%	3.17±0.16	3.01±0.11	3.38±0.10	5.92±0.22**	2.84±0.16	3.39±0.17**
Kidney g%	0.64±0.03	0.63±0.02	0.67±0.11	0.99±0.07*	0.61±0.01	0.74±0.02**
Spleen g%	0.22±0.01	0.21±0.01	0.21±0.01	0.23±0.01	0.19±0.01	0.24±0.02**
Testis g%	1.20±0.05	1.14±0.09	1.14±0.05	1.28±0.03	1.04±0.04	1.03±0.10
Thyroid mg%	6.8±1.4	7.7±4.0	7.3±1.3	7.8±1.7	5.2±1.2	9.2±0.9**
Adrenal mg %	17.9±2.5	17.4±1.8	18.8±1.7	23.7±2.0**	14.3±1.2	15.6±2.0
<b>Female</b>						
Body weight g	160±7.8	154±4.4	162±8.9	160±2.3	181±5.2	175±5.2
Absolute Organ Weight						
Liver g	4.52±0.19	4.23±0.17	5.27±0.45	9.99±0.11*	4.91±0.06	5.41±0.09**
Kidney g	1.04±0.04	1.05±0.03	1.19±0.11	1.36±0.04**	1.09±0.05	1.17±0.08
Spleen g	0.41±0.02	0.37±0.04	0.39±0.05	0.37±0.03	0.42±0.04	0.42±0.02
Testis g	66.0±4.70	66.0±4.5	65.4±6.6	57.8±8.9	76.2±16.6	74.8±12.5
Thyroid mg	13.0±1.6	11.6±0.9	14.8±3.3	16.6±5.7	15.6±5.2	19.8±5.4
Adrenal mg	45.8±5.6	46.2±1.8	55.4±8.0*	61.0±4.07**	45.0±2.3	48.0±2.4
Relative Organ Weight						
Liver g%	2.82±0.12	2.74±0.13	3.25±0.18**	6.26±0.09**	2.72±0.04	3.09±0.08**
Kidney g%	0.65±0.01	0.68±0.03	0.74±0.03**	0.85±0.03**	0.60±0.03	0.67±0.04*
Spleen g%	0.26±0.02	0.24±0.03	0.24±0.02	0.23±0.02	0.23±0.02	0.24±0.01
Testis g%	41.2±2.4	42.8±3.8	40.5±4.9	36.2±5.5	42.1±8.9	42.7±6.8
Thyroid mg%	8.1±0.8	7.5±0.6	9.2±2.4	10.4±3.5	8.6±2.8	11.3±3.0
Adrenal mg	28.6±2.4	30.0±1.7	34.3±6.0	38.2±2.7**	24.9±1.6	27.4±1.0*

Values indicate mean±S.D.(n=5) Level of significance : \* P<0.05 \*\* P<0.01

められた。雄では対照群を含む全群全例に腎尿細管上皮に好酸性小体が認められたが、M、H群ではその程度が強かった。雌では対照群を含む全群で腎尿細管内に石灰沈着が1~5例認められた。また、雄の尿管の再生像がH群を除き1~2例認められた。回復群では雄の対照群および高用量群の全例の尿管上皮に好酸性小体が認められた。さらに尿管上皮の再生像が雄の対照群(2/5)、H群(5/5)および雌のH群(3/5)に認められた。

#### 6. その他の検査

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

### 考 察

ホキシムは消化管あるいは皮膚を通してゆっくり吸収され、P-S結合のThiophosphate(P=S phoxim)が生体内で活性化された後に、P-O結合の

Phosphateに変化して、CHEを阻害する。体内でのホキシムの不活化、すなわち肝臓で解毒される過程としては酵素的加水分解が主な経路と考えられている<sup>3)</sup>。

今回の実験条件でのCHEの低下は著しく、雌雄ともにL群から認められ、その差は有意であった。特に雌に対する抑制が強く、14日間の回復期間で雄は殆ど回復したが、雌は回復しなかった。血清生化学的検査でCHEの変化以外、H群でγ-GTP、T-PRO、ALB、BUNの増加、T-GLYの減少が認められた。病理組織学的検査で雌雄ともにH群において肝臓の中心静脈周囲の肝細胞の壊死、雌では肝細胞の膨化が認められた。さらに雌雄ともに肝臓重量増加とT-PRO、ALBの増加との間に相関性が認められたため肝臓での蛋白合成促進およびγ-GTPの増加から考えて肝機能になんらかの変化を与えた可能性が示唆された。これらの変化は14日

Table 6. Summary of histological findings in rats given Phoxim for 28 days

Organs Findings	Sexes Groups	Male				Female			
		C	L	M	H	C	L	M	H
		5	5	5	5	5	5	5	5
Heart	No. of Animals								
Cell infiltration	±	1	1	0	0	0	0	0	0
	+	2	1	0	0	0	0	0	0
Liver									
Necrosis, Centrilobular	±	0	0	0	1	0	0	0	0
	+	0	0	0	0	0	0	0	1
	++	0	0	0	2	0	0	0	2
Focal necrosis	+	1	0	0	0	0	0	0	0
Hepatic cell swelling	±	0	0	0	2	0	0	0	0
	+	0	0	0	0	0	0	0	4
Focal cell infiltration	±	2	1	1	1	1	2	1	0
	+	0	0	0	0	0	0	1	1
Kidney (tubuli)									
Eosinophilic body	±	3	1	1	0	0	0	0	0
	+	2	4	3	2	0	0	0	0
	++	0	0	1	3	0	0	0	0
Epithelial cast	±	0	0	1	0	0	0	0	0
	+	0	0	1	0	0	0	0	0
Regeneration	±	2	1	0	1	0	0	0	0
	+	2	1	0	1	0	0	0	0
Calcification	±	0	0	0	0	4	1	5	3
Adrenal(cortex)									
Vacuolization	±	0	0	0	1	0	0	0	0

± : slight    + : mild    ++ : marked

間の回復期間後、回復ないしは回復傾向を示した。腎臓については被験物質との関連を示唆する変化は重量増加と尿素窒素の軽度の増加であった。病理組織学的検査では、雄の対照群を含む全群全例に腎尿細管上皮に好酸性小体が認められたが、M、H群ではその程度は増強されおり、本被験物質投与に起因する変化と考えられた。この変化は腎重量増加およびBUNの増加と関連するものと思われるが、雌では見られないことから確認はできなかった。回復群では雌雄ともに尿細管上皮の再生の発生頻度が増加していることから、投与中止により障害を受けた尿細管が再生するものと考えられる。肝臓、腎臓、副腎重量の有意の増加は14日間の回復期間では回復しなかった。

今回行ったホキシムの28日間強制経口投与による生体に対する主な影響はCHEの抑制、M、H群で見られた腎障害とH群で見られた軽度の肝障害であった。以上の結果から、本実験条件でのホキシムの無影響量はCHEが阻害されない量と考え、7.5 mg/kg未満であった。

## ま と め

有機燐系白アリ防除剤であるホキシムを主成分とするバリシウム1-コンク441を5週齢の雌雄ラットに7.5 mg/kg, 75 mg/kg, 750 mg/kgを28日間の反復強制経口投与および投与中止14日間の回復試験を行った。

1. 投与期間中いずれの群においても死亡例、体重、摂餌量の抑制はみられなかった。被験物質に起因する明らかな症状は認められなかった。

2. 被験物質が有機燐製剤であるため、血清コリンエステラーゼ活性阻害<sup>4)</sup>が投与全群に認められた。雄は用量相関的に抑制されているが、雌に対する作用は強くL群から29%まで低下した。

3. 雌雄ともに肝臓、腎臓、および副腎重量の増加が認められ、雄では750 mg/kg群、雌では75および750 mg/kg群でその差が有意であった。14日間の回復期間では完全に回復しなかった。

4. 病理組織学検査では雌雄ともに28日目に認められたH群の肝臓の変化は被験物質と関連性が考えられたが、14日間の回復期間後には認められ

Table 7. Summary of histological findings on rats after 14 days untreated recovery period following 28 days treatment of Phoxim

Organs Findings	Sexes Groups No. of Animals	Sexes			
		Male		Female	
		C	H	C	H
		5	5	5	5
Heart					
Cell infiltration	+	1	0	0	0
Liver					
Focal cellinfiltration	±	0	2	2	3
Kidney (tubuli)					
Eosinophilic body	±	0	3	0	0
	+	5	2	0	0
Calcification	±	0	0	4	0
Regeneration	±	2	0	0	2
	+	0	5	0	1
Cyst	±	0	0	0	1

± : slight    + : mild    ++ : marked

なかったため、可逆的变化であると推察された。腎臓では雄のM, H群で好酸性小体の増加が見られ、回復群では尿細管上皮の再生像が増加した。

5. 本試験条件下でのホキシムの無影響(NOEL)はCHEが阻害されない量と考え、7.5 mg/kg未満であった。

## 文 献

- 1) Gaines TB, Linder RE: *Fundam Appl Toxicol*, 7, No. 2, 299~308 (1986)
- 2) 山崎 実他, 武田研究所報, 40, No. 3 (1981)
- 3) March, R. B., Fukuto, T. R., Moxon, M. G.: *J. Econ. Entomol.* 49, 185 (1956)
- 4) 河合 忠, 玄番昭夫, 屋形 稔編: “異常値の出るメカニズム”, 189~194 (1989)

コチニール (Cochineal) およびミョウバン (Aluminum potassium sulfate)  
のラットにおける 13 週間同時反復投与毒性試験

川崎 靖・梅村隆志・佐井君江・長谷川隆一・門馬純子  
斉藤 実・松島裕子・中路幸男・津田充春・黒川雄二

A 13-week Toxicity Study of Simultaneous Administration of Cochineal  
and Aluminum Potassium Sulfate in Rats

Yasushi Kawasaki, Takashi Umemura, Kimie Sai, Ryuichi Hasegawa,  
Junko Momma, Minoru Saitoh, Yuko Matsushima,  
Yukio Nakaji, Mitsuhiro Tsuda and Yuji Kurokawa

Cochineal (C), a scarlet material extracted from the powdered pregnant insect, *Dactylopius Coccus Costa*, is used as a color food additive in the form of aluminum lakes. A 13 week subchronic toxicity study was conducted to investigate the effects of simultaneous administration of C and aluminum potassium sulfate (A). Male and female Wistar rats (5-weeks-old, 15 rats/group) were given diets containing 0.75%A and 0.75%C (1.5%AC), 1.5%A and 1.5%C (3%AC), 3%C alone or 3%A alone. The following results were obtained. 1) No toxic symptoms or death occurred in any treated group. Body weight gain in male rats of the 3%A group decreased significantly. 2) Serum levels of phospholipids, triglycerides (TG) and total cholesterol in male rats and TG in female rats fed 3%C, 3%A or 3%AC were significantly decreased at the 13th week. The serum level of glutamate dehydrogenase (GIDH) in male rats treated with 1.5% or 3%AC was increased at the 4th week but no difference from control was observed at the 13th week. 3) No histopathological changes attributable to A and/or C administration were observed. In this 13-week oral toxicity study, no dose-dependent synergistic effects of simultaneous administration of C and A were found except for an increase in serum GIDH.

**Keywords** : Cochineal, aluminum potassium sulfate, rat, subchronic toxicity study, simultaneous administration

(Received May 31, 1994)

## はじめに

コチニールはメキシコおよび中南米原産のサボテン (*Opuntia coccinifera*) に寄生する妊娠昆虫 (*Dactylopius coccus Costa*) を乾燥、粉末にしたものから得られた天然色素であり、古くから着色料として飲料、菓子類、化粧品等に使用されている。一方、ミョウバンは古くから漬物や煮物等の保色剤あるいはパン、菓子等の膨張剤として広く使用されている食品添加物である。これらの物質の単独投与による毒性試験は既にいくつかの報告がなされているが<sup>1-5)</sup>、毒性は極めて低いとされている。また、発癌性も認められていない<sup>5)</sup>。コチニールは一般的にレーキ色素として使用されるケースが多いが、わが

国では認められていない<sup>6)</sup>。使用に際してはミョウバンと混合して用いられることから、コチニールとミョウバンの併用による毒性を検査することは重要である。そこで今回、食品添加物の安全性再評価の一環として、両食品添加物のラットにおける 13 週間同時混餌投与による併用毒性試験を行った。

## 実験材料および方法

### 被験物質

ミョウバン ( $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot \text{K}_2\text{SO}_4 \cdot 24 \text{H}_2\text{O}$ , A) は無色無臭で収斂性を有する白色結晶性粉末であり、試薬特級 (WAKO) の硫酸アルミニウムカリウムを用いた。コチニール (主成分はコチニールカルミン,  $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_{13}$ , C) は深赤色の粉末で三栄化学工



Table 1. Hematological and serum biochemical examinations

Items of measurement	Abbreviation Kit (maker)	
Hematology (Blood) [Sysmex M-2000, Thoa Medical Electronics Co.]		
Red blood cell	RBC	
Hemoglobin	HGB	
Packed cell volume	PCV	
Mean corpuscular volume	MCV	
Mean corpuscular hemoglobin	MCH	
Mean corpuscular hemoglobin concentration	MCHC	
Platelet	Plt	
White blood cell	WBC	
Differential count [MICROX, Tateishi Electronics Co.]		
Biochemistry (Serum) [HITACHI 7150 Automatic Blood Chemistry Analyzer]		
Total protein	TP	Wako
Albumin	Alb	Wako
Albumin-globulin ratio	A/G	Calculation
Blood urea nitrogen	BUN	Shinotest
Creatinine	CRN	BMJ
Glucose	Glc	BMJ
Phospholipids	PL	Wako
Triglycerides	TG	BMJ
Total cholesterol	Tcho	BMJ
Alkaline phosphatase	AlP	BMJ
Alanine aminotransferase	AlT	BMJ
$\alpha$ -Amilase	Amy	BMJ
Aspartate aminotransferase	AsT	BMJ
Cholinesterase	ChE	BMJ
Glutamate dehydrogenase	GIDH	BMJ
$\gamma$ -Glutamyl transferase	$\gamma$ -GT	BMJ
Laucine aminopeptidase	LAP	BMJ
Lactate dehydrogenase	LDH	BMJ
Calcium	Ca	Wako
Phosphorus, inorganic	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.

業より入手した。

#### 使用動物

Slc: Wistar 系雌雄ラット (SPF) を 4 週齢で購入し、1 週間の馴化後、体重増加が順調で一般状態の良好な動物を選び、体重層別無作為法で群の平均体重がほぼ等しくなるよう一群雌雄各々 15 匹からなる 5 群に分け、5 週齢で実験に供した。

#### 飼育環境

動物は金網ケージ (W: 220×L: 220×H: 170 mm) で個別に飼育し、室温 23±1°C、湿度 55±5%、照明 12 時間 (6~18 時) 調節の SPF 動物室で飼育した。添加飼料 (F-2: 船橋農場) および水 (水道水) は自由に摂取させた。

## 投与量および投与方法

ミョウバン (A) は強い収斂作用を有する事から、ラット飼育用粉末飼料 (F-2) に混合した。5%A および 2%A 添加飼料による 1 週間の予備試験を行った結果、5%A 添加飼料では体重の強い増加抑制が認められ、2%A 添加飼料では軽度の増加抑制が認められたことから 13 週間の投与期間を考慮して、混餌投与の最高用量を 3.0% とした。すなわち、単独投与群として 3.0%A および 3.0% C の添加飼料を、併用投与群として飼料への添加量を揃えるため A および C を 1.5% ずつ混合した (配合比 1:1, W/W) 3.0% AC を、さらに併用効果の用量依存性を確認するため 1.5% AC 添加飼料を調製し、13 週間自由摂取させた。なお、対照群には無添加飼料を与えた。

## 観察および測定

実験開始後 4 週間目に各群雌雄 7 匹および 13 週間目に各群雌雄 8 匹を屠殺し、以下の諸検査を行った。なお、動物は屠殺前約 16 時間の絶食を行い剖検した。

### 1. 動物の一般状態、体重および摂餌量

投与期間中、動物の一般状態および死亡の有無は毎日観察し、体重および摂餌量は週 1 回の割合で測定した。

### 2. 血液学的検査

屠殺の 1 週間前に眼窩静脈叢より採取した血液は自動血球計数装置 Sysmex M-2000 (東亜医用電子製) および血液細胞自動分析装置 (立石電機製) を用いて、Table 1 に示した項目について測定した。

### 3. 血清生化学的検査

屠殺直前にエーテル麻酔下で眼窩静脈叢より採血を行い血清を分離した後、Table 1 に示す項目について自動分析装置 7150 型 (日立製) を用いて測定した。

### 4. 病理学的検査

エーテル軽麻酔下で頸動脈より放血後剖検時、肉眼検査を行い、脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、精巣、卵巣、下垂体、甲状腺および副腎を摘出後、直ちに重量を測定した。また、これらの諸臓器の他に顎下腺、胸腺、脊髄、消化管、膵臓、腸間膜リンパ節、精囊、精巣上部、子宮、膀胱、坐骨神経、筋肉 (骨格筋)、大腿骨および胸骨を摘出し、10% 等張中性ホルマリンで固定後、常法に従ってパラフィン包埋により薄切標本を作成し、H-E 染色を施して病理組織学的に検索した。

## 5. データの統計学的処理

体重および摂餌量は t 検定を行った。血液学的検査、血清生化学的検査および臓器重量は 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、それぞれ対照群と処置群の間で検定を行った。

## 実験結果

### 1. 一般状態

雌雄の各処置群ともに検体投与による特異的な症状の発現は認められなかった。

### 2. 体重および摂餌量 (Fig. 1, 2)

雄では、3.0%A 群が対照群に比べ軽度の増加抑制が見られたが、雌では各群ともに対照群と殆ど差が認められなかった。なお、摂餌量は各群の雌雄ともに殆んど差が見られなかった。

### 3. 血液学的検査 (Table 2, 3)

4 週間目: 雄では、3.0% AC 群で MCV および MCH が軽度の減少を示した。雌では各処置群で HGB および MCV が対照群に比べ軽度の減少を、3.0% AC 群および 3.0% A 群で PCV および MCH が軽度の減少を示した。

13 週間目: 雄では、3.0% AC 群で RBC が対照群に比べ増加を、MCV, MCH, MCHC および PLT が軽度の減少を示した。雌では 3.0% A 群を除く各群で MCV および MCH が対照群に比べ軽度の減少を示した。

### 4. 血清生化学的検査 (Table 4, 5)

4 週間目: 雄では、1.5% AC 群および 3.0% AC 群で ALT および GIDH が対照群に比べ増加を示した。その他有意の差を示す項目が散見されたが、その変化は軽度であった。雌では各処置群で  $\gamma$ -GT が対照群に比べ有意の増加を示した。

13 週間目: 雄では、3.0% AC 群、3.0% A 群および 3.0% C 群で PL, TG および TCho が対照群に比べ有意の減少ないしその傾向を示し、雌では各処置群で TG が有意の減少を示した。

### 5. 臓器重量 (Table 6, 7)

4 週間目: 雄では、3.0% A 群で腎臓の比重量が対照群に比べ増加を示した。雌では 3.0% C 群で脾臓が対照群に比べ軽度の減少を示した。

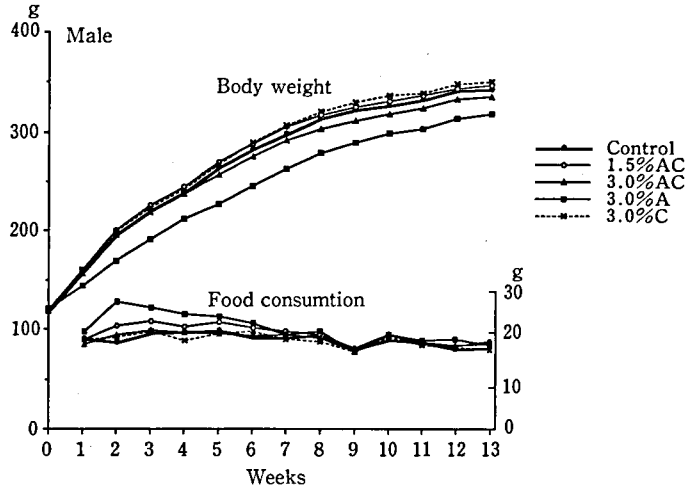


Fig. 1. Body weight and food consumption curves of male rats fed Aluminum potassium sulfate and Cochineal for 13 weeks

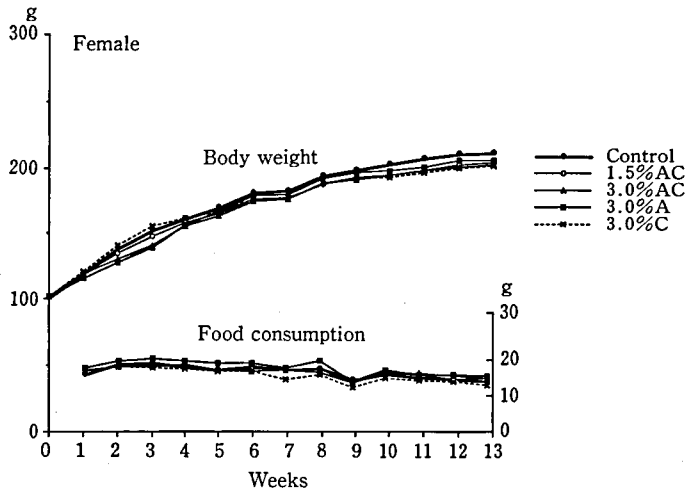


Fig. 2. Body weight and food consumption curves of female rats fed Aluminum potassium sulfate and Cochineal for 13 weeks

13 週間目：雄では、3.0%AC 群および 3.0%A 群で脾臓の実重量が対照群に比べ減少を示した。雌では、3.0%A 群および 3.0% C 群で脾臓および副腎が実重量・比重量ともに対照群に比べ減少を示した。

#### 6. 病理学的検査 (Table 8)

4 週目および 13 週目：雄では、3.0% C を除く全群で肺の血管周囲の細胞浸潤が 1~2 例に認められた。肝臓では対照群を含む全群で小肉芽形成および細胞浸潤が 1~2 例に認められた。腎臓では尿管上皮内に好酸性小体が対照群を含む全群の全例に認

められた。その他、下垂体でうっ血、肺の毛細血管内に血栓および腎臓の尿管上皮の再生等が散発的に認められた。雌では、肺に泡沫細胞の集簇および肉芽等が散発的に認められた。肝臓では小肉芽形成および細胞浸潤が散発的に認められた。雄で認められた尿管上皮細胞の好酸性小体は、雄ラットではしばしば認められる変化であり、その他の雌雄で認められた所見はいずれも散発的であり、検体投与による影響とは考えられない。

Table 2. Hematological findings of rats fed aluminum potassium sulfate and cochineal for 4 weeks

Tests Units	Dose				
	Control	1.5% AC	3.0% AC	3.0% A	3.0% C
No. of animals	7	7	7	7	7
Male					
RBC $\times 10^{12}/1$	9.03 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>	9.23 $\pm$ 0.15	9.23 $\pm$ 0.25	9.38 $\pm$ 0.20 <sup>**</sup>	9.37 $\pm$ 0.19
HGB g/dl	15.6 $\pm$ 0.2	15.6 $\pm$ 0.3	15.0 $\pm$ 0.7*	16.0 $\pm$ 0.3	15.6 $\pm$ 0.3
PCV %	50.6 $\pm$ 1.0	51.2 $\pm$ 0.6	49.6 $\pm$ 2.1	52.8 $\pm$ 1.1	52.0 $\pm$ 1.1
MCV fl	56.1 $\pm$ 0.3	55.4 $\pm$ 0.9	53.8 $\pm$ 1.7 <sup>**</sup>	56.3 $\pm$ 1.1	55.5 $\pm$ 0.5
MCH pg	17.3 $\pm$ 0.3	16.9 $\pm$ 0.3	16.3 $\pm$ 0.6 <sup>**</sup>	17.1 $\pm$ 0.2	16.7 $\pm$ 0.2 <sup>**</sup>
MCHC g/dl	30.9 $\pm$ 0.4	30.4 $\pm$ 0.4	30.3 $\pm$ 0.4*	30.3 $\pm$ 0.5*	30.0 $\pm$ 0.1 <sup>**</sup>
PLT $\times 10^{12}/1$	1.05 $\pm$ 0.05	1.06 $\pm$ 0.03	1.06 $\pm$ 0.06	1.05 $\pm$ 0.04	1.11 $\pm$ 0.04
WBC $\times 10^9/1$	8.47 $\pm$ 0.73	9.46 $\pm$ 0.70	8.71 $\pm$ 1.40	9.61 $\pm$ 1.72	9.44 $\pm$ 1.28
Female					
RBC $\times 10^{12}/1$	8.97 $\pm$ 0.38	8.93 $\pm$ 0.30	8.81 $\pm$ 0.19	8.92 $\pm$ 0.31	8.79 $\pm$ 0.36
HGB g/dl	18.2 $\pm$ 0.7	17.1 $\pm$ 0.5 <sup>**</sup>	16.6 $\pm$ 0.4 <sup>**</sup>	16.8 $\pm$ 0.3 <sup>**</sup>	17.3 $\pm$ 0.9*
PCV %	54.4 $\pm$ 2.3	52.8 $\pm$ 1.6	51.0 $\pm$ 1.1 <sup>**</sup>	51.4 $\pm$ 1.4*	51.7 $\pm$ 1.9*
MCV fl	60.6 $\pm$ 0.9	59.2 $\pm$ 0.8 <sup>**</sup>	57.9 $\pm$ 0.8 <sup>**</sup>	57.7 $\pm$ 0.7 <sup>**</sup>	58.8 $\pm$ 0.7 <sup>**</sup>
MCH pg	20.3 $\pm$ 1.0	19.1 $\pm$ 0.4	18.9 $\pm$ 0.6*	18.9 $\pm$ 0.4*	19.8 $\pm$ 1.4
MCHC g/dl	33.5 $\pm$ 1.8	32.3 $\pm$ 0.6	32.5 $\pm$ 0.9	32.7 $\pm$ 0.4	33.5 $\pm$ 2.0
PLT $\times 10^{12}/1$	0.96 $\pm$ 0.04	0.96 $\pm$ 0.06	0.96 $\pm$ 0.09	0.98 $\pm$ 0.05	0.99 $\pm$ 0.06
WBC $\times 10^9/1$	8.54 $\pm$ 1.67	8.50 $\pm$ 1.04	9.26 $\pm$ 1.67	9.11 $\pm$ 0.90	8.46 $\pm$ 0.81

<sup>a</sup>: Results are given as mean $\pm$ S.D.

\*: Significant at  $p < 0.05$  as compared with control

\*\* : Significant at  $p < 0.01$  as compared with control

Table 3. Hematological findings of rats fed aluminum potassium sulfate and cochineal for 13 weeks

Tests Units	Dose				
	Control	1.5% AC	3.0% AC	3.0% A	3.0% C
No. of animals	8	8	8	8	8
Male					
RBC $\times 10^{12}/1$	10.28 $\pm$ 0.29 <sup>a</sup>	10.35 $\pm$ 0.31	11.76 $\pm$ 0.97 <sup>**</sup>	10.40 $\pm$ 0.19	10.39 $\pm$ 0.31
HGB g/dl	16.0 $\pm$ 0.4	15.6 $\pm$ 0.3	16.4 $\pm$ 0.5	16.2 $\pm$ 0.2	15.9 $\pm$ 0.4
PCV %	51.3 $\pm$ 1.3	49.8 $\pm$ 1.1	53.0 $\pm$ 1.8*	51.6 $\pm$ 1.1	50.4 $\pm$ 1.4
MCV fl	49.7 $\pm$ 0.4	48.1 $\pm$ 0.8*	45.2 $\pm$ 2.7 <sup>**</sup>	49.6 $\pm$ 0.6	48.5 $\pm$ 0.8
MCH pg	15.6 $\pm$ 0.2	15.1 $\pm$ 0.3	14.0 $\pm$ 0.9 <sup>**</sup>	15.6 $\pm$ 0.1	15.3 $\pm$ 0.3
MCHC g/dl	31.3 $\pm$ 0.4	31.4 $\pm$ 0.3	30.9 $\pm$ 0.3*	31.4 $\pm$ 0.3	31.5 $\pm$ 0.2
PLT $\times 10^{12}/1$	0.98 $\pm$ 0.04	0.94 $\pm$ 0.05	0.85 $\pm$ 0.11 <sup>**</sup>	0.91 $\pm$ 0.07	0.92 $\pm$ 0.04
WBC $\times 10^9/1$	8.49 $\pm$ 2.03	8.68 $\pm$ 0.92	8.19 $\pm$ 1.15	8.69 $\pm$ 0.98	9.36 $\pm$ 1.24
Female					
RBC $\times 10^{12}/1$	9.30 $\pm$ 0.21	9.39 $\pm$ 0.20	9.32 $\pm$ 0.50	9.25 $\pm$ 0.17	9.35 $\pm$ 0.24
HGB g/dl	16.0 $\pm$ 0.1	15.8 $\pm$ 0.2	15.8 $\pm$ 0.4	15.8 $\pm$ 0.2	15.7 $\pm$ 0.3 <sup>**</sup>
PCV %	49.7 $\pm$ 1.0	49.3 $\pm$ 0.9	48.2 $\pm$ 2.5	48.9 $\pm$ 1.0	49.0 $\pm$ 1.1
MCV fl	53.4 $\pm$ 0.6	52.5 $\pm$ 0.6 <sup>**</sup>	51.7 $\pm$ 0.4 <sup>**</sup>	52.8 $\pm$ 0.4	52.4 $\pm$ 0.4 <sup>**</sup>
MCH pg	17.3 $\pm$ 0.4	16.8 $\pm$ 0.3	16.9 $\pm$ 0.7*	17.1 $\pm$ 0.2	16.8 $\pm$ 0.3*
MCHC g/dl	32.3 $\pm$ 0.7	32.0 $\pm$ 0.4	32.8 $\pm$ 1.3	32.3 $\pm$ 0.4	32.0 $\pm$ 0.3
PLT $\times 10^{12}/1$	0.81 $\pm$ 0.08	0.86 $\pm$ 0.06	0.82 $\pm$ 0.11	0.83 $\pm$ 0.06	0.91 $\pm$ 0.10
WBC $\times 10^9/1$	6.95 $\pm$ 0.88	6.13 $\pm$ 0.91	6.53 $\pm$ 0.74	6.24 $\pm$ 0.78	6.14 $\pm$ 0.75

<sup>a</sup>: Results are given as mean $\pm$ S.D.

\*: Significant at  $p < 0.05$  as compared with control

\*\* : Significant at  $p < 0.01$  as compared with control

Table 4. Biochemical findings of rats fed aluminum potassium sulfate and cochineal for 4 weeks

Tests Units	Dose				
	Control	1.5% AC	3.0% AC	3.0% A	3.0% C
No. of animals	7	7	7	7	7
<b>Male</b>					
TP g/dl	6.01±0.13 <sup>a</sup>	6.00±0.10	5.94±0.08	5.82±0.08 <sup>**</sup>	6.01±0.10
BUN mg/dl	13.7±1.0	13.3±1.4	13.6±1.2	15.1±1.8	13.5±1.1
PL mg/dl	120±8	155±14	109±12	121±10	114±17
TG mg/dl	139±29	142±45	121±41	127±17	101±24
TCho mg/dl	56±6	56±6	53±5	62±8	61±13
AIT mU/ml	40±5	50±5 <sup>*</sup>	50±9 <sup>*</sup>	39±4	45±6
GIDH mU/ml	5.62±0.72	7.07±0.65 <sup>*</sup>	8.71±3.31 <sup>**</sup>	6.47±1.64	6.88±0.92
γ-GT mU/ml	0.81±0.31	0.68±0.43	0.75±0.37	1.08±0.53	0.94±0.62
Ca mg/dl	10.2±0.1	10.4±0.3	10.4±0.5	10.9±0.6 <sup>*</sup>	11.2±1.0 <sup>*</sup>
<b>Female</b>					
TP g/dl	5.94±0.14	5.84±0.28	5.84±0.15	5.83±0.16	5.88±0.18
BUN mg/dl	14.0±1.1	13.9±1.3	14.2±0.8	15.1±1.6	14.1±1.0
PL mg/dl	144±11	144±13	141±11	138±13	130±13
TG mg/dl	63±6	63±11	58±6	73±32	49±18 <sup>*</sup>
TCho mg/dl	82±7	85±7	83±7	80±9	78±9
AIT mU/ml	40±8	45±9	45±7	42±9	41±5
GIDH mU/ml	6.38±1.76	8.06±2.23	8.98±3.91	7.16±1.89	7.58±1.96
γ-GT mU/ml	0.62±0.35	1.02±0.40	1.23±0.29 <sup>*</sup>	0.98±0.56	1.57±0.50 <sup>**</sup>
Ca mg/dl	10.1±0.2	9.9±0.4	9.8±0.1 <sup>*</sup>	9.8±0.2 <sup>*</sup>	9.9±0.1

<sup>a</sup>: Results are given as mean±S.D.

<sup>\*</sup>: Significant at p<0.05 as compared with control

<sup>\*\*</sup>: Significant at p<0.01 as compared with control

Table 5. Biochemical findings of rats fed aluminum potassium sulfate and cochineal for 13 weeks

Tests Units	Dose				
	Control	1.5% AC	3.0% AC	3.0% A	3.0% C
No. of animals	8	8	8	8	8
<b>Male</b>					
TP g/dl	6.87±0.08 <sup>a</sup>	6.80±0.10	6.64±0.17 <sup>**</sup>	6.70±0.09 <sup>*</sup>	6.85±0.13
BUN mg/dl	15.0±1.4	15.1±1.2	15.5±1.6	15.4±1.1	15.5±0.8
PL mg/dl	149±11	140±7	129±15 <sup>**</sup>	121±7 <sup>**</sup>	126±9 <sup>**</sup>
TG mg/dl	205±35	190±36	194±46	130±25 <sup>**</sup>	137±18 <sup>**</sup>
TCho mg/dl	75±8	68±6	61±10 <sup>**</sup>	60±5 <sup>**</sup>	67±7
AIT mU/ml	61±10	66±12	51±9	53±10	59±10
GIDH mU/ml	22.41±8.12	23.50±6.48	16.04±7.48	16.81±4.49	18.13±4.92
γ-GT mU/ml	0.59±0.71	0.76±0.62	0.80±1.14	0.31±0.16	1.25±1.00
Ca mg/dl	10.3±0.1	10.3±0.2	10.5±0.6	10.6±0.6	10.7±0.3 <sup>*</sup>
<b>Female</b>					
TP g/dl	6.75±0.21	6.67±0.15	6.70±0.27	6.74±0.22	6.79±0.24
BUN mg/dl	15.2±1.8	15.2±1.7	14.3±1.7	14.7±1.2	13.6±1.0
PL mg/dl	180±20	180±13	174±26	169±19	175±10
TG mg/dl	117±30	91±11	83±16 <sup>*</sup>	80±10 <sup>**</sup>	82±14 <sup>**</sup>
TCho mg/dl	96±11	97±6	93±15	90±10	93±8
AIT mU/ml	51±9	59±9	55±24	61±22	48±10
GIDH mU/ml	23.72±8.19	26.51±15.07	30.07±31.82	36.29±26.24	16.08±7.90
γ-GT mU/ml	1.77±0.75	1.72±0.32	2.41±0.70	2.34±0.79	3.34±1.19 <sup>*</sup>
Ca mg/dl	9.9±0.2	10.0±0.3	9.9±0.2	10.1±0.3	10.1±0.2

<sup>a</sup>: Results are given as mean±S.D.

<sup>\*</sup>: Significant at p<0.05 as compared with control

<sup>\*\*</sup>: Significant at p<0.01 as compared with control

Table 6. Organ weight of rats fed aluminum potassium sulfate and cochineal for 4 weeks

Dose		Control	1.5 % AC	3.0 % AC	3.0 % A	3.0 % C
No. of animals		7	7	7	7	7
<b>Male</b>						
Body weight	g	225.4±6.6 <sup>a</sup>	229.6±11.7	225.4±7.1	212.1±9.2	232.3±12.4
Liver	g	6.75±0.30	6.85±0.76	6.58±0.34	6.16±0.46	6.94±0.52
Kidney	g	1.47±0.09	1.49±0.05	1.51±0.03	1.48±0.10	1.52±0.11
Spleen	g	0.43±0.02	0.44±0.04	0.42±0.02	0.40±0.03	0.44±0.03
Testis	g	2.62±0.09	2.51±0.16	2.56±0.09	2.58±0.09	2.55±0.09
Adrenal	mg	34.9±1.5	34.4±3.6	36.0±3.3	34.6±4.4	33.0±4.8
Liver	g%	2.99±0.08	2.98±0.18	2.92±0.10	2.90±0.18	2.99±0.09
Kidney	g%	0.65±0.04	0.65±0.02	0.67±0.03	0.70±0.04*	0.66±0.02
Spleen	g%	0.19±0.01	0.19±0.01	0.19±0.01	0.19±0.01	0.19±0.01
Testis	g%	1.16±0.04	1.10±0.06	1.14±0.03	1.22±0.06	1.10±0.04
Adrenal	mg%	15.5±0.8	15.0±1.1	16.0±1.2	16.3±1.9	14.2±2.0
<b>Female</b>						
Body weight	g	157.6±7.3	156.0±7.17	154.1±7.4	152.9±8.2	162.3±7.8
Liver	g	4.30±0.26	4.06±0.14	4.13±0.32	4.15±0.37	4.25±0.28
Kidney	g	1.06±0.05	1.04±0.03	1.06±0.08	1.06±0.09	1.06±0.05
Spleen	g	0.32±0.04	0.31±0.04	0.32±0.03	0.29±0.05	0.32±0.03
Ovary	mg	62.6±9.6	58.3±5.3	62.4±7.9	53.4±11.3	54.0±9.6
Adrenal	mg	46.3±8.5	46.1±6.3	49.4±7.3	46.9±5.6	48.6±3.7
Liver	g%	2.73±0.07	2.60±0.09	2.68±0.10	2.71±0.10	2.62±0.12
Kidney	g%	0.67±0.01	0.67±0.03	0.69±0.03	0.69±0.04	0.66±0.02
Spleen	g%	0.21±0.02	0.20±0.01	0.10±0.01	0.19±0.02	0.19±0.01
Ovary	mg%	39.7±5.5	37.5±4.1	40.5±4.8	34.8±6.26	33.2±5.4
Adrenal	mg%	29.3±4.6	29.6±3.8	32.0±4.2	30.7±3.4	30.0±2.8

<sup>a</sup>: Results are given as mean±S.D.

\*: Significant at p<0.05 as compared with control

Table 7. Organ weight of rats fed aluminum potassium sulfate and cochineal for 13 weeks

Dose		Control	1.5% AC	3.0% AC	3.0% A	3.0% C
No. of animals		8	8	8	8	8
<b>Male</b>						
Body weight	g	330.1±26.4 <sup>a</sup>	332.6±12.3	322.4±11.5	303.4±13.8*	336.0±23.0
Liver	g	8.50±0.85	8.49±0.39	8.06±0.51	7.60±0.47*	8.40±0.55
Kidney	g	1.83±0.18	1.88±0.11	1.83±0.11	1.78±0.08	1.87±0.15
Spleen	g	0.59±0.04	0.56±0.07	0.52±0.03**	0.50±0.03**	0.58±0.04
Testis	g	2.91±0.19	2.72±0.15	2.80±0.10	2.77±0.11	2.84±0.20
Adrenal	mg	35.0±5.0	37.4±5.9	31.6±3.2	37.5±4.7	38.4±6.4
Liver	g%	2.57±0.10	2.55±0.07	2.50±0.07	2.50±0.08	2.50±0.06
Kidney	g%	0.55±0.03	0.57±0.03	0.57±0.02	0.59±0.03	0.56±0.02
Spleen	g%	0.18±0.01	0.17±0.02	0.16±0.01	0.17±0.01	0.17±0.01
Testis	g%	0.88±0.07	0.82±0.05*	0.87±0.04	0.91±0.04	0.85±0.05
Adrenal	mg%	10.6±1.5	11.2±1.7	9.8±1.0	12.4±1.3	11.4±1.4
<b>Female</b>						
Body weight	g	196.6±13.7	193.1±6.3	192.3±12.3	195.6±9.2	191.4±14.8
Liver	g	4.80±0.61	4.44±0.19	4.39±0.26	4.47±0.21	4.39±0.50
Kidney	g	1.18±0.08	1.14±0.05	1.13±0.07	1.18±0.06	1.14±0.08
Spleen	g	0.37±0.03	0.35±0.02	0.35±0.02	0.36±0.05	0.32±0.02**
Ovary	mg	55.0±5.9	57.1±6.2	54.9±15.2	53.9±6.13	51.1±8.3
Adrenal	mg	51.1±3.4	46.6±6.0	47.8±6.8	46.1±2.9**	41.9±3.8**
Liver	g%	2.45±0.28	2.30±0.08	2.28±0.07	2.29±0.13	2.29±0.15
Kidney	g%	0.60±0.03	0.59±0.02	0.59±0.02	0.60±0.03	0.60±0.02
Spleen	g%	0.19±0.01	0.18±0.01	0.18±0.02	0.18±0.02	0.17±0.01**
Ovary	mg%	28.2±4.4	29.6±3.0	28.4±7.3	27.5±2.6	26.7±3.4
Adrenal	mg%	26.1±2.5	24.2±3.1	24.8±2.5	23.6±1.8*	21.9±2.0**

<sup>a</sup>: Results are given as mean±S.D.

\*: Significant at p<0.05 as compared with control

\*\* : Significant at p<0.01 as compared with control

Table 8. Summary of histopathological findings in rats fed aluminum potassium sulfate and cochineal for 4 and 13 weeks

Sex	Male						Female						
	Control		1.5%AC		3.0%AC		Control		1.5%AC		3.0%AC		
	7	8	7	8	7	8	7	8	7	8	7	8	
No. of animals examined	4 W	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	
	13 W	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	
Pituitary gland	4 W	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	13 W	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	
	4 W	1	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	
	13 W	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
	4 W	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	13 W	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	
	13 W	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	
	4 W	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	
	4 W	0	0	0	0	0	0	2	0	0	1	0	
	13 W	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
	Liver	4 W	2	1	1	2	2	2	4	1	1	0	0
		13 W	4	1	1	1	1	1	2	0	3	0	0
		4 W	1	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0
13 W		1	3	0	1	1	1	0	3	1	2	2	
13 W		0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	
13 W		0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
bile duct hyperplasia	13 W	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
	4 W	7	7	7	7	7	7	0	0	0	0	0	
	13 W	8	8	8	8	8	8	0	0	0	0	0	
regeneration of epithelial cell	4 W	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
	13 W	2	1	3	3	2	0	0	0	0	0	0	
	13 W	2	4	1	1	0	0	0	0	0	0	0	

## 考 察

コチニールは食品添加物としてミョウバンと混合されて使用されていることから<sup>6)</sup>両者を併用した際の亜慢性毒性について検討した。コチニールに関しては3.0%単独投与において体重増加、摂餌量および臓器重量にいずれも変化はなかった。一方、ミョウバン3.0%単独投与では体重増加の抑制が認められたが、摂餌量には変化がなく、検体による影響と思われた。岩田ら<sup>5)</sup>はマウスによる3%および6%コチニール添加飼料を2年間投与した場合、6%群で体重増加の抑制傾向を示したとしている。また、Fordら<sup>3)</sup>はラットにおけるコチニールカルミンの混餌投与による2年間の慢性毒性試験を最高濃度500 mg/kg/dayで行ない、対照群に対し体重増加の差異は認めなかったとしている。また、2年間投与における病理組織学的所見においても用量相関を伴った毒性影響はみられなかったとしている。

本併用投与試験における1ヶ月間投与において、グルタール酸脱水素酵素 (GIDH) 活性が用量依存性に増加を示した。一方、3.0%A群、3.0%C群では対照群と比較して有意な変化を示さなかった。本酵素は主に肝実質細胞中のミトコンドリアに特異性が高く、1.5%AC群 ( $p < 0.05$ )、3.0%AC群 ( $P < 0.01$ ) で有意な活性上昇がみられた事は、コチニール-ミョウバン同時投与により肝ミトコンドリア障害が生じた可能性も考えられる。しかしながら3カ月目では対照群と差が見られなかったこと、また、病理組織学的検査においてAC群では肝の変化は認められていないことから、毒性学的意義は小さいものと考えられる。その他、血液学的検査ではHGB, MCV, MCH, MCHC等において、とりわけ併用群において有意な減少が観察された。この結果は、併用により血液毒性が生じる可能性を示すものの、いずれの変化も小さく、毒性学的意義は小さいと考えられる。また、血清生化学検査ではA, C, 単独

群およびAC併用群でTGレベルの減少が観察された。菅原ら<sup>2)</sup>はAl<sup>3+</sup>含有飼料をラットに投与した場合、同様なTGレベルの減少を報告しており、本実験のA群の結果と一致している。しかし、今回の結果ではC単独投与群が最も減少が大きく、何らかの代謝的な変化が生じている可能性も考えられる。

以上の結果、本条件下においてはいずれの群においても毒性は極めて低かった。また、ミョウバンおよびコチニールを1.5%単独添加した群がないためミョウバン-コチニールの相互作用を正確に評価しうる実験とはなっていないものの、併用群の毒性も弱いことから、問題とすべき相乗作用はないものと考えられた。

## 文 献

- 1) 加納晴三郎, 江馬 真, 川崎浩之進: 殺虫剤および食品添加物等のラットにおける胎仔毒性に関する研究 (第2報) ミョウバンの胎仔毒性, 応用薬理, 24, 65~69 (1982)
- 2) Sugawara, C., Sugawara, N., Kiyosawa, H., and Miyake, H.: Decrease of serum triglyceride in normal rat fed with 2000 ppm aluminum diet for 67 days *Fundam. Appl. Toxicol.* 10, 616~623 (1988)
- 3) Ford, G. P., Gopal, T., Grant, D., Gaunt, I. F., Evans, J. G. and Butler, W. H.: Chronic toxicity/carcinogenicity study of carmine of cochineal in the rat *Fd. Chem. Toxic.* 25, 897~902 (1987)
- 4) Grant, D. and Gaunt, I. F.: Three-generation reproduction study on carmine of cochineal in the rat *Fd. Chem. Toxic.* 25, 903~912 (1987)
- 5) 岩田 仁, 田中卓二, 森下紀雄, 森 良雄, 森秀樹: コチニールのB<sub>6</sub>C<sub>3</sub>F<sub>1</sub>マウスにおける癌原性の検索, 第49回日本癌学会総会記事, p. 101 (1990)
- 6) 食品添加物総覧, p. 47~48, 食品化学新聞社KK (1992)



## F344 ラットを用いた L-ヒスチジン塩酸塩の 13 週間亜慢性毒性試験

池崎信一郎・西川秋佳・古川文夫・今沢孝喜  
榎並倫宣・三井雅之・高橋道人

13-Week Subchronic Toxicity Study of L-Histidine  
Monohydrochloride in F344 Rats

Shinichiro Ikezaki, Akiyoshi Nishikawa, Fumio Furukawa, Takayoshi Imazawa,  
Tomonori Enami, Masayuki Mitsui and Michihito Takahashi

A 13-week subchronic toxicity study of L-histidine monohydrochloride was performed in male and female F344 rats at dose levels of 0, 0.31, 0.62, 1.25, 2.5 and 5.0% in the diet, to determine the maximum tolerable dose (MTD) for subsequent investigation of carcinogenicity. Rats were randomly allocated to 6 groups, each consisting of 10 males and 10 females.

No animals died during the administration period. Suppression of body weight gain and decrease in food consumption were observed in males of the 5.0% group along with hematological examination as revealed by increases in hemoglobin volume and hematocrit. Serum biochemical examination demonstrated increased levels of BUN and creatinine in females of the 5.0% group, and increased level of BUN in females of the 1.25% group. Histopathologically, sperm granulomas in the epididymis were found in half of the 5.0% group males.

Based on the results of the present study, it was concluded that the MTD of L-histidine monohydrochloride is 2.5% in diet, because the dietary dose level of 5.0% proved to exert significant toxicity reflected in suppression of body weight gain and formation of sperm granulomas.

**Keywords :** L-histidine monohydrochloride, rat, subchronic toxicity study, sperm granulomas

(Received May 31, 1994)

## はじめに

L-ヒスチジン塩酸塩は、Fig. 1 に示す構造を有する分子量 209.63 の化合物であり、アミノ酸輸液や総合アミノ酸製剤の重要な成分として、また準必須アミノ酸として乳幼児食に使用されている<sup>1)</sup>。

L-ヒスチジン塩酸塩のラットに対する毒性は、腹腔内投与による LD<sub>50</sub> が 23 mmol/kg であり、また 10% 添加飼料を投与することにより 2 ヶ月間にわたって発育が遅延し、死亡率が増加することが報告さ

れている<sup>1)</sup>。しかし、さらに長期間の投与による毒性については明らかにされていない。

今回、L-ヒスチジン塩酸塩の安全性評価の一環としてがん原性試験を実施するにあたり、本試験での投与用量を設定するために F344 ラットに 13 週間混餌投与する予備試験を実施し、その毒性について検索した。

## 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 60 匹を日本チャールス・リバー(株)より購入し、約 1 週間の馴化飼育の後、雌雄とも各群 10 匹ずつ 6 群に配した。

動物の飼育はバリエーションシステムの動物室にて行い、室内の環境条件は温度 24 ± 1℃、湿度 55 ± 5%、換気回数 18 回/時間、蛍光照明 12 時間 (7~19 時) とした。

動物は、ポリカーボネート製箱型ケージに 5 匹ずつ

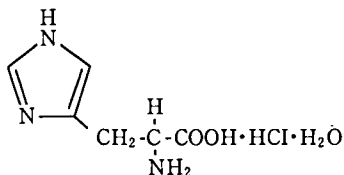


Fig. 1. Chemical structure of L-histidine monohydrochloride

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。動物には、粉末飼料(CRF-1:日本チャールス・リバー㈱)および飲水(水道水)を自由に摂取させた。

## 2. 被験物質ならびに投与量

L-ヒスチジン塩酸塩は味の素㈱より供与された。これを粉末飼料(CRF-1)に0.31, 0.62, 1.25, 2.5および5.0%濃度に混じて13週間自由に摂取させ、また対照群には粉末飼料のみを同様に摂取させた。

## 3. 観察ならびに検査方法

投与期間中、一般状態の観察を連日実施し、体重および摂餌量は毎週1回測定した。動物は、剖検日前日より一晩絶食させ、翌日エーテル麻酔下で腹部大動脈から採血後、屠殺剖検した。

血液学的検査は、自動血球計測装置(東亜医用電子社, Sysmex M-2000)を用いて、白血球数(WBC)、赤血球数(RBC)、ヘモグロビン量(Hb)、ヘマトクリット値(Ht)、MCV、MCH、MCHCおよび血小板数(PLT)について測定した。

血清生化学的検査は、分離した血清を凍結後、総蛋白(TP)、A/G比、アルブミン(Alb)、総コレステロール(T. Cho)、尿素窒素(BUN)、クレアチニン(CRN)、ナトリウム(Na)、塩素(Cl)、カリウム(K)、カルシウム(Ca)、無機リン(P)、AST、ALT、LDH、アルカリフォスファターゼ(ALP)、 $\gamma$ -GTPおよびコリンエステラーゼ(Cho-E)について測定した。

諸臓器は肉眼的に観察後摘出し、脳、肺、心臓、脾臓、肝臓、副腎、腎臓、精巣および卵巣の重量を測定した。上記の臓器に加え、眼球、ハーダー腺、脊髄、胃、小腸、大腸、膵臓、膀胱、皮膚、乳腺、リンパ節、気管、食道、甲状腺、舌、大腿筋、精巣上体、精囊、前立腺、子宮および膣を10%中性緩衝ホルマリン液にて固定した。固定臓器は、常法に従い、パラフィン包埋後薄切切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン(H.E.)染色を施し、病理組織学的検索を行った。

## 4. 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値は、Bartlett法にて等分散の検定を行い、等分散の場合には一元配置の分散分析を行い、不等分散の場合には、Kruskal-Wallis法により検定を行った。群間に有意差を認め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との有意差検定を行った<sup>2)</sup>。

## 結 果

### 1. 死亡動物および一般状態

投与期間を通じて、死亡動物は認められなかった。また、いずれの動物においても一般状態の異常はみられなかった。

### 2. 体重および摂餌量(Fig. 2, 3およびTable 1)

体重は、雄の5.0%投与群のみが投与直後から投与期間を通じて対照群を下回って推移し、最終体重

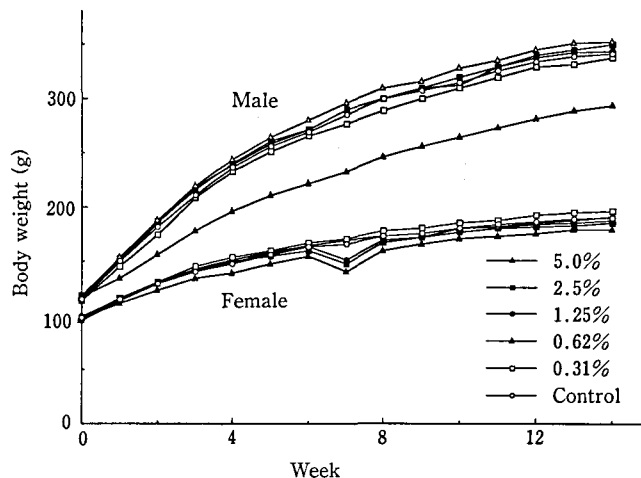


Fig. 2. Body weight curves for rats treated with L-histidine monohydrochloride

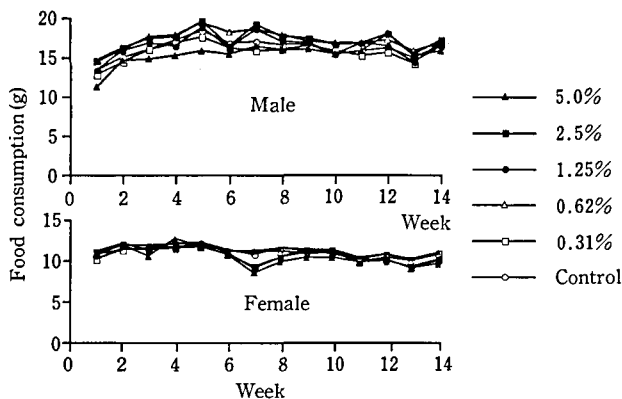


Fig. 3. Food consumption curves for rats treated with L-histidine monohydrochloride

Table 1. Food consumption and intake of L-histidine monohydrochloride

Group	Food consumption (g/animal/day)		Daily intake (mg/kg/day)		Total intake (g/kg)	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female
5.0%	15.4	10.7	3481	3592	341	352
2.5%	17.2	10.9	1631	1757	159	172
1.25%	16.4	11.0	782	874	76	85
0.62%	17.2	11.2	401	437	39	42
0.31%	15.8	11.4	193	216	19	21
Control	16.2	11.2	—	—	—	—

は対照群に比して14%少なかった。その他の雄の投与群および雌の各投与群は、投与期間を通じて対照群とほぼ同様に推移した。

摂餌量においては、雄の5.0%投与群で投与直後から投与5週頃まで対照群を軽度下回ったが、その後は異常はみられなかった。その他の雄の投与群および雌の各投与群は投与期間を通じて対照群とほぼ同様な推移を示した。また、投与期間を通じての雌雄各群の被験物質摂取量をTable 1に示した。

### 3. 血液学的検査 (Table 2 および 3)

雄では、5.0%投与群でHbおよびHtの有意な増加がみられた。雌の各投与群においては、異常はみられなかった。

### 4. 血清生化学的検査 (Table 2 および 3)

雌では、1.25および5.0%投与群でBUNの有意な増加が、また5.0%投与群でCRNの有意な増加がみられた。雄の各投与群においては異常は認められなかった。

### 5. 臓器重量 (Table 4 および 5)

いずれも体重比重量における片側性の変動であったが、雄では2.5%以上の投与群の腎臓、5.0%投与群の精巣、雌では5.0%投与群の腎臓において有意な増加がみられた。

### 6. 病理学的検索 (Table 6 および Fig. 4)

肉眼的検索では被験物質投与による変化は認められなかったが、病理組織学的検索により、雄の5.0%投与群において精巣上体の精子肉芽腫が10例中5例にみられた。

その他、腎臓、精巣および骨髄において軽度の組織学的変化がみられたが、いずれも用量相関性がないか、または、少数例での変化であった。

## 考 察

0.31, 0.62, 1.25, 2.5および5.0%のヒスチジンを、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ところ、雄の5.0%投与群におい

Table 2. Hematological and serum biochemical data of male rats treated with L-histidine monohydrochloride

Item	Dose level					
	Control	0.31%	0.62%	1.25%	2.5%	5.0%
<b>Hematology</b>						
WBC ( $\times 10^2/\mu 1$ )	43.5 $\pm$ 14.0	37.7 $\pm$ 7.74	40.0 $\pm$ 7.18	40.2 $\pm$ 8.42	40.8 $\pm$ 7.23	42.1 $\pm$ 7.27
RBC ( $\times 10^4/\mu 1$ )	929 $\pm$ 50.5	926 $\pm$ 45.2	948 $\pm$ 45.8	969 $\pm$ 21.8	952 $\pm$ 33.9	940 $\pm$ 27.6
Hb (g/dl)	14.8 $\pm$ 0.41	15.0 $\pm$ 0.42	14.9 $\pm$ 0.63	15.1 $\pm$ 0.27	15.1 $\pm$ 0.47	15.7 $\pm$ 0.38**
Ht (%)	47.3 $\pm$ 2.30	47.5 $\pm$ 1.81	48.2 $\pm$ 2.38	48.6 $\pm$ 1.16	48.3 $\pm$ 1.52	50.0 $\pm$ 1.33**
MCV (fl)	51.0 $\pm$ 0.72	51.3 $\pm$ 1.02	50.8 $\pm$ 1.29	50.2 $\pm$ 0.32	50.7 $\pm$ 1.63	53.2 $\pm$ 1.44
MCH (pg)	16.0 $\pm$ 0.53	16.2 $\pm$ 0.66	15.7 $\pm$ 0.29	15.6 $\pm$ 0.22	15.8 $\pm$ 0.57	16.7 $\pm$ 0.44
MCHC (g/dl)	31.4 $\pm$ 0.79	31.5 $\pm$ 0.73	31.0 $\pm$ 0.39	31.0 $\pm$ 0.41	31.2 $\pm$ 0.38	31.3 $\pm$ 0.26
PLT ( $\times 10^4/\mu 1$ )	88.9 $\pm$ 3.32	87.2 $\pm$ 3.96	87.2 $\pm$ 12.1	90.7 $\pm$ 4.59	86.4 $\pm$ 6.89	83.7 $\pm$ 6.04
<b>Serum biochemistry</b>						
TP (g/dl)	6.04 $\pm$ 0.50	6.35 $\pm$ 0.22	6.29 $\pm$ 0.26	6.20 $\pm$ 0.27	6.23 $\pm$ 0.24	6.18 $\pm$ 0.22
A/G	2.55 $\pm$ 0.26	2.52 $\pm$ 0.30	2.58 $\pm$ 0.19	2.57 $\pm$ 0.20	2.53 $\pm$ 0.22	2.62 $\pm$ 0.37
Alb (g/dl)	4.34 $\pm$ 0.42	4.52 $\pm$ 0.21	4.52 $\pm$ 0.19	4.45 $\pm$ 0.26	4.45 $\pm$ 0.19	4.46 $\pm$ 0.25
T.Cho (mg/dl)	54.3 $\pm$ 3.39	60.2 $\pm$ 5.77	54.7 $\pm$ 4.05	54.8 $\pm$ 5.49	53.0 $\pm$ 4.83	67.9 $\pm$ 9.25
BUN (mg/dl)	18.3 $\pm$ 1.19	18.2 $\pm$ 1.29	18.1 $\pm$ 2.16	17.4 $\pm$ 1.60	18.9 $\pm$ 1.62	19.5 $\pm$ 1.80
CRN (mg/dl)	0.55 $\pm$ 0.07	0.51 $\pm$ 0.06	0.54 $\pm$ 0.05	0.56 $\pm$ 0.05	0.56 $\pm$ 0.06	0.62 $\pm$ 0.09
Na (mEQ/dl)	145 $\pm$ 2.93	145 $\pm$ 1.99	146 $\pm$ 2.25	147 $\pm$ 3.81	146 $\pm$ 3.91	146 $\pm$ 2.31
Cl (mEQ/dl)	106 $\pm$ 2.38	107 $\pm$ 0.88	106 $\pm$ 2.27	106 $\pm$ 2.45	106 $\pm$ 2.89	107 $\pm$ 1.28
K (mEQ/dl)	4.53 $\pm$ 0.38	4.26 $\pm$ 0.13	4.31 $\pm$ 0.20	4.44 $\pm$ 0.21	4.47 $\pm$ 0.20	4.58 $\pm$ 0.30
Ca (mg/dl)	9.88 $\pm$ 0.40	10.0 $\pm$ 0.16	10.0 $\pm$ 0.15	9.90 $\pm$ 0.28	9.92 $\pm$ 0.35	10.0 $\pm$ 0.26
P (mg/dl)	6.06 $\pm$ 0.80	5.83 $\pm$ 0.94	6.09 $\pm$ 1.12	6.25 $\pm$ 1.38	4.95 $\pm$ 0.33	5.47 $\pm$ 0.32
AST (IU/l)	102 $\pm$ 15.0	94.7 $\pm$ 12.5	102 $\pm$ 11.1	99.5 $\pm$ 8.38	101 $\pm$ 11.9	104 $\pm$ 20.5
ALT (IU/l)	50.0 $\pm$ 11.6	48.7 $\pm$ 4.39	52.0 $\pm$ 6.11	48.0 $\pm$ 3.19	51.7 $\pm$ 3.71	53.3 $\pm$ 17.8
LDH (IU/l)	871 $\pm$ 409	914 $\pm$ 270	1112 $\pm$ 275	1150 $\pm$ 257	947 $\pm$ 558	1214 $\pm$ 321
ALP (IU/l)	247 $\pm$ 45.6	257 $\pm$ 21.3	254 $\pm$ 26.4	248 $\pm$ 23.6	267 $\pm$ 20.0	316 $\pm$ 48.0
$\gamma$ -GTP (IU/l)	0.44 $\pm$ 0.52	0.50 $\pm$ 0.92	0.60 $\pm$ 1.26	0.50 $\pm$ 0.97	0.70 $\pm$ 1.25	0.90 $\pm$ 1.10
Cho-E (IU/l)	4.88 $\pm$ 3.75	5.75 $\pm$ 2.31	6.20 $\pm$ 1.39	5.90 $\pm$ 2.55	4.80 $\pm$ 1.75	6.10 $\pm$ 2.46

Data represent mean values  $\pm$  S.D.

\*\* : Significantly different from the control at P &lt; 0.01

投与直後から投与期間終了時まで体重増加の抑制がみられ、また投与初期において軽度ながら摂餌量の低下も認められた。ヒスチジンは幼若ラットの生育に必須なアミノ酸であるが、逆に過量投与によって起こるアミノ酸インバランスは発育の遅延をもたらすことが知られている<sup>1,3)</sup>。従って、本試験においてもアミノ酸インバランスによって蛋白合成の低下がもたらされ、体重増加の抑制に深く関与したものと考えられた。

血液学的には、雄の5.0%投与群においてHbおよびHtの有意な増加がみられた。ヒスチジンはHbの主要な構成要素であることから<sup>4)</sup>、ヒスチジン投与によってHb合成量が増加した可能性も想定されるが、他の血液学的パラメーターの変動が必ずしも相関しなかったことから、HbおよびHtの変動の毒性学的意義については明らかではなかった。血液生化学的には、雌では5.0%投与群でBUNと

CRNの増加、2.5%投与群でBUNの増加がみられ、さらに臓器重量においては雄の2.5%以上の投与群と雌の5.0%投与群で片側性的変化であるが腎臓重量の増加がみられた。これらの変化はヒスチジンによる腎障害を示唆するものであるが、腎臓における明らかな組織障害性変化を伴わなかったこと、またBUNの上昇は過剰の蛋白食摂取によっても起こりうることから、本試験におけるこれら血液生化学的パラメーターの変動にヒスチジンの代謝が関与している可能性も考えられた。

さらに、病理組織学的には5%投与群の半数例で精巣上体の精子肉芽腫がみられた。一般にこの変化は、精巣上体管上皮の障害、壊死の後の精子に対する炎症反応と考えられており、DL-エチオニンおよびグアネシジン投与によって高率に発生することが知られている<sup>5-7)</sup>。したがって、本試験における精子肉芽腫の形成もヒスチジンによる精巣上体管上皮

Table 3. Hematological and serum biochemical data of female rats treated with L-histidine monohydrochloride

Item	Dose level					
	Control	0.31%	0.62%	1.25%	2.5%	5.0%
<b>Hematology</b>						
WBC ( $\times 10^2/\mu\text{l}$ )	26.9 $\pm$ 4.35	30.8 $\pm$ 4.89	25.6 $\pm$ 5.45	31.5 $\pm$ 7.50	32.2 $\pm$ 6.92	31.6 $\pm$ 7.74
RBC ( $\times 10^4/\mu\text{l}$ )	863 $\pm$ 36.3	888 $\pm$ 39.5	879 $\pm$ 44.6	889 $\pm$ 37.7	864 $\pm$ 18.9	871 $\pm$ 24.5
Hb (g/dl)	15.0 $\pm$ 0.38	15.5 $\pm$ 0.43	15.1 $\pm$ 0.59	15.2 $\pm$ 0.57	15.2 $\pm$ 0.22	15.2 $\pm$ 0.18
Ht (%)	46.7 $\pm$ 1.39	48.6 $\pm$ 1.73	47.7 $\pm$ 2.42	48.3 $\pm$ 2.17	46.8 $\pm$ 0.89	47.9 $\pm$ 1.22
MCV (fl)	54.2 $\pm$ 0.92	54.8 $\pm$ 0.87	54.3 $\pm$ 0.44	54.3 $\pm$ 0.93	54.2 $\pm$ 0.68	55.0 $\pm$ 0.42
MCH (pg)	17.4 $\pm$ 0.51	17.5 $\pm$ 0.47	17.2 $\pm$ 0.42	17.1 $\pm$ 0.34	17.5 $\pm$ 0.44	17.5 $\pm$ 0.41
MCHC (g/dl)	32.1 $\pm$ 0.57	31.9 $\pm$ 0.55	31.7 $\pm$ 0.72	31.5 $\pm$ 0.68	32.4 $\pm$ 0.63	31.8 $\pm$ 0.70
PLT ( $\times 10^4/\mu\text{l}$ )	71.5 $\pm$ 7.14	84.9 $\pm$ 5.24	—	—	—	—
<b>Serum biochemistry</b>						
TP (g/dl)	6.10 $\pm$ 0.18	6.03 $\pm$ 0.20	6.18 $\pm$ 0.29	6.22 $\pm$ 0.14	6.14 $\pm$ 0.18	6.21 $\pm$ 0.23
A/G	2.89 $\pm$ 0.30	3.15 $\pm$ 0.39	2.81 $\pm$ 0.41	2.56 $\pm$ 0.21	2.68 $\pm$ 0.40	2.59 $\pm$ 0.17
Alb (g/dl)	4.52 $\pm$ 0.13	4.56 $\pm$ 0.15	4.54 $\pm$ 0.21	4.48 $\pm$ 0.13	4.46 $\pm$ 0.27	4.48 $\pm$ 0.17
T.Cho (mg/dl)	86.4 $\pm$ 8.19	88.1 $\pm$ 10.6	83.9 $\pm$ 7.69	88.7 $\pm$ 4.78	88.2 $\pm$ 4.15	90.4 $\pm$ 5.37
BUN (mg/dl)	15.3 $\pm$ 1.50	16.8 $\pm$ 0.76	16.2 $\pm$ 1.53	17.3 $\pm$ 1.56**	16.7 $\pm$ 1.16	19.3 $\pm$ 1.19**
CRN (mg/dl)	0.48 $\pm$ 0.06	0.52 $\pm$ 0.04	0.51 $\pm$ 0.03	0.47 $\pm$ 0.04	0.54 $\pm$ 0.08	0.56 $\pm$ 0.06**
Na (mEQ/dl)	146 $\pm$ 2.82	145 $\pm$ 3.71	146 $\pm$ 1.77	147 $\pm$ 1.50	146 $\pm$ 3.15	146 $\pm$ 1.17
Cl (mEQ/dl)	108 $\pm$ 2.47	108 $\pm$ 2.98	109 $\pm$ 2.28	108 $\pm$ 1.25	109 $\pm$ 1.41	109 $\pm$ 1.31
K (mEQ/dl)	4.06 $\pm$ 0.38	3.98 $\pm$ 0.27	4.05 $\pm$ 0.30	3.93 $\pm$ 0.34	4.09 $\pm$ 0.40	4.14 $\pm$ 0.29
Ca (mg/dl)	9.84 $\pm$ 0.20	9.94 $\pm$ 0.23	9.85 $\pm$ 0.17	9.86 $\pm$ 0.29	9.81 $\pm$ 0.19	9.94 $\pm$ 0.24
P (mg/dl)	5.15 $\pm$ 0.46	5.52 $\pm$ 0.73	5.35 $\pm$ 0.95	5.2 $\pm$ 0.75	5.27 $\pm$ 0.78	5.15 $\pm$ 1.07
AST (IU/l)	91.3 $\pm$ 11.6	91.0 $\pm$ 7.05	96.8 $\pm$ 15.1	88.8 $\pm$ 3.04	92.6 $\pm$ 9.69	96.8 $\pm$ 6.54
ALT (IU/l)	39.2 $\pm$ 5.13	37.3 $\pm$ 2.35	38.2 $\pm$ 3.67	39.1 $\pm$ 3.44	36.8 $\pm$ 1.98	38.2 $\pm$ 3.82
LDH (IU/l)	885 $\pm$ 286	1010 $\pm$ 204	1276 $\pm$ 607	902 $\pm$ 188	816 $\pm$ 262	912 $\pm$ 307
ALP (IU/l)	188 $\pm$ 25.4	189 $\pm$ 17.0	180 $\pm$ 19.0	193 $\pm$ 15.6	181 $\pm$ 23.7	193 $\pm$ 21.9
$\gamma$ -GTP (IU/l)	0.80 $\pm$ 1.22	0.60 $\pm$ 0.51	1.10 $\pm$ 1.52	1.10 $\pm$ 1.19	1.30 $\pm$ 1.41	1.70 $\pm$ 1.63
Cho-E (IU/l)	7.40 $\pm$ 1.35	7.30 $\pm$ 3.09	7.40 $\pm$ 2.41	7.00 $\pm$ 1.49	8.10 $\pm$ 2.37	8.00 $\pm$ 1.63

Data represent mean values  $\pm$  S.D.\*\* : Significantly different from the control at  $P < 0.01$ 

の障害を示唆するものであったが、確定するにいたらなかった。

以上の如く、5.0%のヒスチジン投与により、雄で顕著な体重増加抑制、Ht および Hb の増加および精巣上体における精子肉芽腫がみられたが、2.5%以下のヒスチジン投与では顕著な毒性変化は認められなかった。したがって、ヒスチジンの混餌投与によるがん原性試験の最大耐量は2.5%とするのが妥当と判断された。

## 文 献

- 1) 谷村顕雄：L-ヒスチジン塩酸塩。第六版食品添加物公定書解説書。廣川書店、D-890 (1992)。
- 2) 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 (3/4)、163~187 (1981)。
- 3) Benevenga N. J. and Steele R. D.: Adverse

effects of excessive consumption of amino acids. *Ann. Rev. Nutr.*, 4, 157~181 (1984).

- 4) Life Sciences Research Office. Federation of American Societies for Experimental Biology.: Safety of amino acids used as dietary supplements. FDA Contract No. 223-88-2124 task order No. 8, 50~54, July (1992).
- 5) Gopinath C., Prentice D. E. and Lewis D. J.: Atlas of experimental toxicological pathology. The reproductive system. MTP Press Limited, 97 (1987).
- 6) Bhathal, P. S., Gerkens, J. F. and Mashford, M. L.: Spermatic granuloma of the epididymis in rats treated with guanethidine. *J. Pathol.*, 112, 19~26 (1974).
- 7) Benson, W. R. and Clarke, F. S.: Regenerative changes and spermatic granulomas in the rat testis after treatment with DL-ethionine. *Am. J. Pathol.*, 49, 981~991 (1966).

Table 4. Absolute and relative organ weights of male rats treated with L-histidine monohydrochloride

Item	Dose level					
	Control	0.31%	0.62%	1.25%	2.5%	5.0%
Body weight	320 ± 11.9	319 ± 32.0	331 ± 12.6	325 ± 21.4	328 ± 14.8	276 ± 24.7
Brain	1.95 ± 0.05 (0.61)	1.96 ± 0.07 (0.62)	1.97 ± 0.07 (0.59)	1.97 ± 0.08 (0.60)	1.99 ± 0.06 (0.60)	1.89 ± 0.08 (0.68)
Lung (R)	0.82 ± 0.19 (0.25)	0.70 ± 0.29 (0.22)	0.82 ± 0.14 (0.24)	0.76 ± 0.10 (0.23)	0.81 ± 0.17 (0.24)	0.67 ± 0.10 (0.24)
Lung (L)	0.42 ± 0.12 (0.13)	0.42 ± 0.09 (0.13)	0.43 ± 0.07 (0.13)	0.40 ± 0.05 (0.12)	0.40 ± 0.05 (0.12)	0.36 ± 0.06 (0.13)
Heart	0.96 ± 0.07 (0.30)	0.95 ± 0.07 (0.29)	1.00 ± 0.06 (0.30)	0.99 ± 0.11 (0.30)	1.00 ± 0.05 (0.30)	0.86 ± 0.09 (0.31)
Spleen	0.60 ± 0.03 (0.18)	0.59 ± 0.07 (0.18)	0.63 ± 0.04 (0.19)	0.62 ± 0.09 (0.18)	0.61 ± 0.04 (0.18)	0.58 ± 0.06 (0.21)
Liver	7.63 ± 0.40 (2.38)	7.83 ± 0.77 (2.46)	7.85 ± 0.43 (2.36)	7.72 ± 0.34 (2.37)	7.93 ± 0.43 (2.41)	6.94 ± 0.41 (2.52)
Adrenal (R)	0.020 ± 0.002(0.0063)	0.021 ± 0.003(0.0065)	0.021 ± 0.003(0.0063)	0.020 ± 0.005(0.0062)	0.022 ± 0.004(0.0067)	0.020 ± 0.002(0.0073)
Adrenal (L)	0.023 ± 0.003(0.0074)	0.023 ± 0.005(0.0074)	0.021 ± 0.001(0.0064)	0.023 ± 0.002(0.0071)	0.021 ± 0.002(0.0066)	0.021 ± 0.003(0.0078)
Kidney (R)	1.00 ± 0.08 (0.31)	1.02 ± 0.08 (0.32)	1.06 ± 0.07 (0.32)	1.08 ± 0.11 (0.33)	1.12 ± 0.07 (0.34*)	0.94 ± 0.08 (0.34**)
Kidney (L)	1.00 ± 0.05 (0.31)	1.00 ± 0.09 (0.31)	1.07 ± 0.09 (0.32)	1.07 ± 0.07 (0.32)	1.11 ± 0.06 (0.33)	0.95 ± 0.08 (0.34)
Testis (R)	1.48 ± 0.04 (0.46)	1.45 ± 0.12 (0.45)	1.55 ± 0.08 (0.46)	1.49 ± 0.12 (0.45)	1.50 ± 0.06 (0.45)	1.47 ± 0.06 (0.53**)
Testis (L)	1.49 ± 0.03 (0.46)	1.49 ± 0.13 (0.46)	1.54 ± 0.07 (0.46)	1.50 ± 0.14 (0.46)	1.50 ± 0.06 (0.45)	1.51 ± 0.06 (0.55)

Data represent mean values(g) ± S.D.

Relative organ weights are shown in parentheses(%)

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

Table 5. Absolute and relative organ weights of female rats treated with L-histidine monohydrochloride

Item	Dose level					
	Control	0.31%	0.62%	1.25%	2.5%	5.0%
Body weight	176 ± 10.8	183 ± 9.35	176 ± 6.96	172 ± 8.08	171 ± 4.32	167 ± 11.4
Brain	1.82 ± 0.07 (1.03)	1.82 ± 0.05 (1.00)	1.83 ± 0.05 (1.04)	1.80 ± 0.05 (1.04)	1.79 ± 0.04 (1.04)	1.80 ± 0.06 (1.08)
Lung (R)	0.59 ± 0.18 (0.33)	0.56 ± 0.07 (0.30)	0.54 ± 0.09 (0.30)	0.56 ± 0.07 (0.32)	0.56 ± 0.09 (0.32)	0.58 ± 0.15 (0.34)
Lung (L)	0.32 ± 0.07 (0.16)	0.29 ± 0.04 (0.16)	0.27 ± 0.02 (0.15)	0.30 ± 0.06 (0.17)	0.29 ± 0.04 (0.17)	0.28 ± 0.04 (0.17)
Heart	0.61 ± 0.06 (0.34)	0.62 ± 0.03 (0.34)	0.61 ± 0.03 (0.34)	0.60 ± 0.06 (0.35)	0.58 ± 0.02 (0.33)	0.60 ± 0.05 (0.36)
Spleen	0.38 ± 0.02 (0.21)	0.39 ± 0.02 (0.21)	0.37 ± 0.03 (0.21)	0.35 ± 0.03 (0.20)	0.36 ± 0.03 (0.21)	0.35 ± 0.03 (0.21)
Liver	4.10 ± 0.38 (2.31)	4.28 ± 0.29 (2.33)	4.13 ± 0.20 (2.34)	4.04 ± 0.25 (2.33)	4.00 ± 0.21 (2.33)	3.98 ± 0.21 (2.38)
Adrenal (R)	0.022 ± 0.004(0.012)	0.024 ± 0.003 (0.013)	0.022 ± 0.002(0.012)	0.022 ± 0.002(0.012)	0.022 ± 0.002(0.013)	0.022 ± 0.004(0.013)
Adrenal (L)	0.024 ± 0.003(0.013)	0.025 ± 0.002 (0.013)	0.023 ± 0.004(0.013)	0.023 ± 0.003(0.013)	0.023 ± 0.003(0.013)	0.022 ± 0.002(0.013)
Kidney (R)	0.59 ± 0.04 (0.33)	0.61 ± 0.02 (0.33)	0.59 ± 0.03 (0.34)	0.60 ± 0.04 (0.34)	0.58 ± 0.03 (0.34)	0.60 ± 0.04 (0.36*)
Kidney (L)	0.60 ± 0.04 (0.34)	0.62 ± 0.03 (0.34)	0.60 ± 0.02 (0.34)	0.60 ± 0.03 (0.34)	0.60 ± 0.05 (0.34)	0.59 ± 0.04 (0.35)
Ovary (R)	0.033 ± 0.012(0.019)	0.036 ± 0.007 (0.020)	0.032 ± 0.009(0.018)	0.029 ± 0.009(0.017)	0.034 ± 0.009(0.020)	0.032 ± 0.008(0.019)
Ovary (L)	0.032 ± 0.009(0.018)	0.032 ± 0.004 (0.017)	0.031 ± 0.008(0.017)	0.028 ± 0.007(0.016)	0.035 ± 0.007(0.020)	0.034 ± 0.012(0.020)

Data represent mean values(g) ± S.D.

Relative organ weights are shown in parentheses(%)

\*: Significantly different from the control at  $P < 0.05$

Table 6. Summary of histopathological findings

Organ	Findings	Dose(%)	0	0.31	0.62	1.25	2.5	5.0
			No. of animals	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
Male	Kidney	mineralization	0	0	0	0	0	1
	Epididymis	sperm granuloma	0	0	0	0	0	5
	Testis	atrophy	0	1	0	0	0	0
Female	Kidney	mineralization	7	8	7	7	5	3
	Bone marrow	focal inflammation	0	1	0	2	1	0



Fig. 4. Sperm granuloma in the epididymis of a rat in the 5.0% group

## F344 ラットにおける流動パラフィンの亜慢性毒性試験

豊田和弘・川西 徹・畝山智香子・高橋道人

## Subchronic Toxicity Study of Liquid Paraffin in F344 Rats

Kazuhiro Toyoda, Toru Kawanishi, Chikako Uneyama and Michihito Takahashi

A 13-week oral toxicity study of liquid paraffin was carried out in F344 rats at the dose levels of 5, 2.5, 1, 0.5, 0.2 and 0% in the powdered diet to select a suitable dose range for a 2-year carcinogenicity study. Each group consisted of 10 males and 10 females.

No animals showed decrease in body weights and food intakes in any group, and all animals were surviving at the end of the experiment. Changes indicating obvious toxicity of liquid paraffin were not observed in the hematological-, serum biochemical- and histopathological-examinations. Based on these data, a concentration of 5% or more in the diet was considered as the maximum tolerable dose of liquid paraffin for both sexes in F344 rats.

**Keywords** : liquid paraffin, food additive, subchronic toxicity study, rat, MTD

(Received May 31, 1994)

## 緒 言

流動パラフィン (Liquid paraffin) は石油から得た精製度の高い炭化水素類の混合物であり、その性状は無色透明の粘ちょうな液体で、無味無臭である<sup>1)</sup>。わが国における流動パラフィンの食品添加物としての使用は、パンの製造過程における自動分割機のカッターのデバイダーオイルとして、また、パンと型箱との離型を容易にするための天板油としての用途のみに限られており、製品としてのパンへの残存量は 0.1%以下に規定されている。したがって、わが国における食品からの流動パラフィンの摂取量は非常に少ないものと思われるが、欧米における食品への使用はパンのみに限らず広範囲に渡るため、輸入食品を含めると日本人が流動パラフィンを経口摂取する機会はさらに多くなる。また、わが国においても、食品以外での用途は幅広く、医薬・医療品、化学工業、化粧品、繊維等、様々な分野で用いられている。特にヒトが経口摂取する機会として、医薬品の分野での緩下剤としての用途が注目され、実際にヒトにおける流動パラフィンの毒性作用については、緩下剤として長期間大量に連用した際の消化器障害やビタミンの吸収阻害等の報告が多い<sup>2-6)</sup>。また、ラットに対する経口毒性については、国内メーカーの市販品における LD<sub>50</sub> 値が 10~20 g/kg 体重

量以上といわれており、低毒性の物質であるといえる。

流動パラフィンの発癌性については、特に報告はみられないが、他の石油製品中に含まれる多環芳香族炭化水素の中から多くの発癌性物質が見いだされていることから、石油製品の一つである流動パラフィンについても発癌性に関する関心が高まってきた。そこで今回、流動パラフィンの慢性毒性癌原性試験を計画し、その予備試験として 13 週間の亜慢性毒性試験を実施したので、その成果を報告する。

## 試験材料および方法

## 1. 被験物質および動物

被験物質として、日本流動パラフィン工業会より提供された流動パラフィンを用いた (第六版食品添加物公定書解説書における各種純度試験合格)。

動物は 4 週齢の F344/DuCrj 系ラット (SPF) 雌雄各 60 匹を日本チャールス・リバー社 (神奈川) より購入し、基礎飼料 (CRF-1 固型飼料, 日本チャールス・リバー社) と水道水で 1 週間馴化飼育した後、無作為に雌雄各 6 群 (各群 10 匹) に分け、試験に供した。

動物の飼育はバリエーションシステムの飼育室にて、室温 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ケージ（幅 26 cm, 長さ 42 cm, 高さ 17 cm）に 3 匹もしくは 4 匹ずつ収容し、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。飲料水として、水道水を試験期間中自由に摂取させた。

## 2. 試験方法

雌雄各 5 群を被験物質投与群とし、最高用量群は、慢性毒性癌原性試験において混餌投与の上限とされる 5% の割合で、以下それぞれ、2.5%、1%、0.5%、0.2% の割合で流動パラフィンを含めた粉末飼料（CRF-1, 日本チャールス・リバー社）を 13 週間自由に摂取させた。その他に对照群として雌雄各 1 群には流動パラフィンを含まない基礎飼料（CRF-1 粉末飼料）を同期間自由に摂取させた。試験期間中、全動物の一般状態を連日観察し、体重および摂餌量の測定を週 1 回行った。投与最終日に全動物を一晩絶食させた後、エーテル麻酔下に開腹、腹部大動脈より採血し、瀉血、屠殺、剖検した。諸臓器は肉眼的に観察した後摘出し、脳、唾液腺、胸腺、肺、心臓、脾臓、肝臓、副腎、腎臓および精巣については重量測定の後、また鼻腔を含む頭蓋、下垂体、舌、気管、甲状腺、食道、胃、小腸、大腸、膵臓、膀胱、前立腺、精囊腺、卵巣、子宮、膣、乳腺、リンパ節、胸骨、大腿骨、脊髄、眼球、皮膚および筋肉等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。固定完了後、下垂体および卵巣の重量測定を行った。その後、各臓器および組織を切り出し、通常の方法によりパラフィン包埋後、薄切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン（H.E.）染色を施して、病理組織学的に検索を行った。採取した血液については、多項目自動血球計数装置（東亜医用電子社、兵庫、M-2000 型）にて白血球数（WBC）、赤血球数（RBC）、ヘモグロビン量（HGB）、血小板数（PLT）の測定を行ったほか、血液細胞自動分析装置（立石電機、東京、MICROX HEG-120A 型）にて白血球の型別分類を行った。また、血清を分離後、凍結し SRL 社（東京）に依頼し下記検査項目について測定を行った。

血清生化学的検査項目：総蛋白（TP）、アルブミン・グロブリン比（A/G）、アルブミン（Alb）、総コレステロール（TC）、尿素窒素（UN）、クレアチニン（CR）、カルシウム（Ca）、無機リン（P）、ナトリウム（Na）、クロール（Cl）、カリウム（K）、glutamic oxaloacetic transaminase（GOT）、glu-

tamic pyruvic transaminase（GPT）、アルカリホスファターゼ（ALP）、 $\gamma$ -glutamyl transpeptidase（ $\gamma$ -GTP）、コリンエステラーゼ（Cho-E）。

## 3. 統計学的処理方法

血液学的・血清生化学的検査結果および臓器の絶対重量と相対重量については、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。群間に有意差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、それぞれ对照群と各被験物質投与群との間で有意差検定を行った。

## 結 果

### 1. 一般状態

雄の 5% 投与群において、切歯の過成長による摂餌困難が原因で顕著な体重増加抑制を示す動物が 1 匹認められた。切歯の過成長は奇形の一種で F344 ラットにおいても稀に自然発生することが知られており<sup>7)</sup>、今回の例も偶発的な病変と判断して検索の対象から除外することとした。その他の動物の一般状態については、いずれの群においても試験期間を通して特記すべき変化は認められず、すべての動物が試験終了時まで生存した。

### 2. 体 重

試験期間中の各群の体重の推移を Fig. 1 に示した。雄の 0.5% 投与群において、試験後半で对照群に比べ軽度の体重増加傾向が認められたが、その他の群においては雌雄とも各被験物質投与群と对照群との間に差は認められなかった。

### 3. 摂餌量および被験物質摂取量

各群の摂餌量の推移については、雄では試験後半において、また、雌では試験期間を通して、高用量群の方が对照群よりも摂餌量が多い傾向がみられた（Fig. 2）。試験期間中のラット一匹一日当りの平均摂餌量については、特に雄の 5%、2.5%、0.5% 投与群および雌の 5% 投与群で多い傾向がみられたが、被験物質である流動パラフィンの摂取量については、雌雄とも被験物質の用量段階にほぼ相関していた（Table 1）。

### 4. 血液学および血清生化学的検査結果

血液学および血清生化学的検査の結果を Table 2, 3 に示した。对照群に対する有意差検定の結果、雄では、赤血球数とヘモグロビン量の減少が 5% お

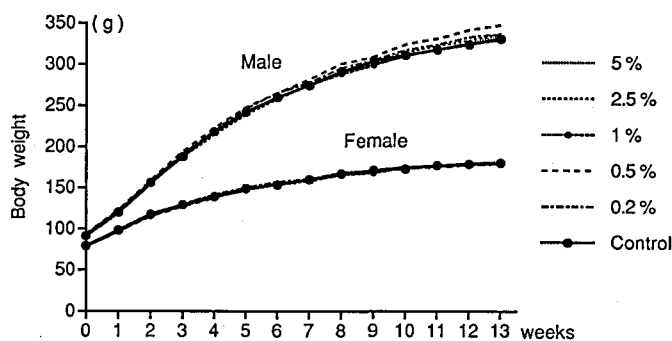


Fig. 1. Growth curves of F344 rats treated with liquid paraffin for 13 weeks

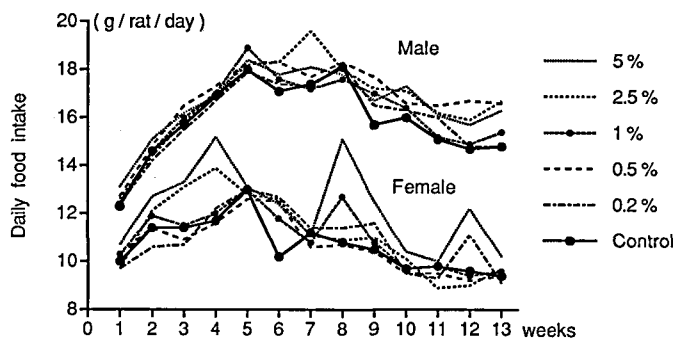


Fig. 2. Sequential changes of daily food intakes in F344 rats treated with liquid paraffin for 13 weeks

Table 1. Average daily intakes of food or liquid paraffin per rat

Sex	Groups	No. of rats examined	Daily intakes of	
			Food (g/rat)	Liquid paraffin (mg/rat)
Male	5%	10	16.58 ± 1.44 <sup>a)</sup>	829 ± 72
	2.5%	10	16.70 ± 1.81	418 ± 45
	1%	10	16.17 ± 1.68	162 ± 17
	0.5%	10	16.77 ± 1.57	84 ± 8
	0.2%	10	16.00 ± 1.64	32 ± 3
	Control	10	15.88 ± 1.63	—
Female	5%	10	12.22 ± 1.72	611 ± 86
	2.5%	10	11.15 ± 1.64	279 ± 41
	1%	10	11.02 ± 1.22	110 ± 12
	0.5%	10	10.66 ± 1.13	53 ± 6
	0.2%	10	10.95 ± 1.28	22 ± 3
	Control	10	10.67 ± 1.04	—

a) Values are means ± S. D.

および2.5%投与群で、UN値の低下が0.2%投与群で、CR値の低下が2.5%および0.2%投与群で、Ca値の上昇が2.5%投与群で、P値の上昇が1%および0.5%投与群で、K値の低下が0.2%投与群で、GOT値の低下が2.5%および0.2%投与群で、GPT値の上昇が5%投与群で、ALP値の低下が0.2%投与群で有意に認められた。また、雌では、白血球数の減少がすべての投与群で、ヘモグロビン量の減少が0.5%投与群で、TP値の低下が1%および0.2%投与群で、A/G値の上昇が1%投与群で、CR値の低下が0.5%および0.2%投与群で、P値の上昇が5%および2.5%投与群で、Cl値の低下が5%投与群で、GOT値の低下が5%、2.5%および0.2%投与群で、GPT値の低下が2.5%、1%、0.5%および0.2%投与群で有意に認められた。

この他、白血球の型別分類の結果、雄では、0.2%投与群で単球の比率が対照群の $0.8 \pm 0.7\%$ に対

Table 2. Hematological and serum biochemical data of F344 male rats treated with liquid paraffin for 13 weeks

Items of hematological and serum biochemical examinations	Groups of male rats					
	5% (8) <sup>a)</sup>	2.5% (10)	1% (10)	0.5% (10)	0.2% (10)	Control (9)
WBC ( $\times 10^2/\mu\text{l}$ )	40.8 $\pm$ 7.6 <sup>b)</sup>	39.7 $\pm$ 3.9	39.7 $\pm$ 6.7	41.8 $\pm$ 5.0	42.4 $\pm$ 4.0	45.3 $\pm$ 9.9
RBC ( $\times 10^4/\mu\text{l}$ )	886 $\pm$ 78 *	900 $\pm$ 19 *	926 $\pm$ 22	911 $\pm$ 24	915 $\pm$ 24	996 $\pm$ 94
HGB (g/dl)	14.5 $\pm$ 1.3 *	14.9 $\pm$ 0.3 *	15.2 $\pm$ 0.3	15.0 $\pm$ 0.4	14.9 $\pm$ 0.4	16.0 $\pm$ 1.5
PLT ( $\times 10^4/\mu\text{l}$ )	73.6 $\pm$ 8.8	77.4 $\pm$ 4.2	77.1 $\pm$ 1.9	77.2 $\pm$ 2.4	77.9 $\pm$ 1.8	81.2 $\pm$ 8.6
TP (g/dl)	6.21 $\pm$ 0.16	6.25 $\pm$ 0.13	6.30 $\pm$ 0.15	6.34 $\pm$ 0.16	6.21 $\pm$ 0.12	6.33 $\pm$ 0.28
A/G	2.93 $\pm$ 0.13	2.87 $\pm$ 0.12	2.90 $\pm$ 0.21	2.93 $\pm$ 0.21	2.93 $\pm$ 0.13	2.87 $\pm$ 0.11
Alb (g/dl)	4.63 $\pm$ 0.10	4.63 $\pm$ 0.09	4.68 $\pm$ 0.14	4.72 $\pm$ 0.09	4.63 $\pm$ 0.09	4.69 $\pm$ 0.21
TC (mg/dl)	56.4 $\pm$ 3.0	55.2 $\pm$ 6.5	49.4 $\pm$ 4.6	51.9 $\pm$ 3.0	48.8 $\pm$ 4.2	51.6 $\pm$ 6.1
UN (mg/dl)	16.9 $\pm$ 1.5	16.2 $\pm$ 0.9	17.1 $\pm$ 1.4	16.4 $\pm$ 1.5	15.2 $\pm$ 1.9 **	18.3 $\pm$ 2.1
CR (mg/dl)	0.54 $\pm$ 0.05	0.49 $\pm$ 0.06 **	0.53 $\pm$ 0.07	0.53 $\pm$ 0.07	0.50 $\pm$ 0.05 *	0.61 $\pm$ 0.08
Ca (mg/dl)	10.6 $\pm$ 0.1	10.8 $\pm$ 0.2 *	10.6 $\pm$ 0.3	10.5 $\pm$ 0.1	10.6 $\pm$ 0.1	10.6 $\pm$ 0.4
P (mg/dl)	6.26 $\pm$ 0.40	6.41 $\pm$ 0.18	6.77 $\pm$ 0.21 **	6.68 $\pm$ 0.31 *	6.46 $\pm$ 0.29	6.10 $\pm$ 0.43
Na (mEq/l)	146 $\pm$ 1	145 $\pm$ 1	147 $\pm$ 1	146 $\pm$ 1	145 $\pm$ 1	145 $\pm$ 2
Cl (mEq/l)	104 $\pm$ 2	104 $\pm$ 1	103 $\pm$ 1	103 $\pm$ 1	104 $\pm$ 2	102 $\pm$ 1
K (mEq/l)	4.50 $\pm$ 0.56	4.19 $\pm$ 0.24	4.20 $\pm$ 0.51	4.34 $\pm$ 0.12	4.03 $\pm$ 0.18 *	4.43 $\pm$ 0.16
GOT (IU/l/37°C)	95.3 $\pm$ 5.5	83.1 $\pm$ 8.1 *	87.4 $\pm$ 13.3	102.0 $\pm$ 7.6	75.2 $\pm$ 5.0 *	104.2 $\pm$ 5.4
GPT (IU/l/37°C)	54.5 $\pm$ 3.3 **	45.5 $\pm$ 3.6	45.3 $\pm$ 3.8	43.6 $\pm$ 3.7	40.7 $\pm$ 3.5	43.0 $\pm$ 4.0
ALP (IU/l/37°C)	302 $\pm$ 24	281 $\pm$ 22	275 $\pm$ 24	278 $\pm$ 16	255 $\pm$ 19 **	305 $\pm$ 36
$\gamma$ -GTP (IU/l/37°C)	0.13 $\pm$ 0.35	0.50 $\pm$ 1.08	0.10 $\pm$ 0.32	0.60 $\pm$ 1.26	0.30 $\pm$ 0.67	0.00 $\pm$ 0.00
Cho-E (IU/l/37°C)	4.75 $\pm$ 2.82	3.00 $\pm$ 1.56	4.20 $\pm$ 2.15	3.90 $\pm$ 2.13	4.50 $\pm$ 4.06	4.67 $\pm$ 1.66

a) Numbers in parenthesis represent the number of samples examined

b) Values are means  $\pm$  S. D.\*\*, \* : Significantly different from the control group value at  $P < 0.01$  and  $P < 0.05$ , respectively

Table 3. Hematological and serum biochemical data of F344 female rats treated with liquid paraffin for 13 weeks

Items of hematological and serum biochemical examinations	Groups of female rats					
	5% (10) <sup>a)</sup>	2.5% (10)	1% (10)	0.5% (10)	0.2% (10)	Control (10)
WBC ( $\times 10^2/\mu\text{l}$ )	27.7 $\pm$ 4.7 ** b)	27.3 $\pm$ 4.6 **	26.4 $\pm$ 4.2 **	25.9 $\pm$ 5.6 **	26.8 $\pm$ 3.4 **	36.7 $\pm$ 4.2
RBC ( $\times 10^4/\mu\text{l}$ )	873 $\pm$ 24	856 $\pm$ 36	857 $\pm$ 26	836 $\pm$ 11	857 $\pm$ 26	860 $\pm$ 29
HGB (g/dl)	15.4 $\pm$ 0.4	15.2 $\pm$ 0.6	15.2 $\pm$ 0.4	14.8 $\pm$ 0.2 *	15.3 $\pm$ 0.3	15.4 $\pm$ 0.4
PLT ( $\times 10^4/\mu\text{l}$ )	80.3 $\pm$ 3.3	80.9 $\pm$ 5.3	77.2 $\pm$ 3.0	79.3 $\pm$ 2.4	80.8 $\pm$ 2.8	79.9 $\pm$ 3.0
TP (g/dl)	6.10 $\pm$ 0.13	6.20 $\pm$ 0.23	6.04 $\pm$ 0.18 *	6.18 $\pm$ 0.27	6.07 $\pm$ 0.23 *	6.34 $\pm$ 0.23
A/G	3.17 $\pm$ 0.33	3.17 $\pm$ 0.19	3.29 $\pm$ 0.14 **	2.98 $\pm$ 0.13	3.03 $\pm$ 0.18	2.93 $\pm$ 0.24
Alb (g/dl)	4.63 $\pm$ 0.11	4.71 $\pm$ 0.20	4.63 $\pm$ 0.15	4.63 $\pm$ 0.22	4.56 $\pm$ 0.18	4.72 $\pm$ 0.15
TC (mg/dl)	86.6 $\pm$ 11.1	89.7 $\pm$ 6.7	84.7 $\pm$ 9.0	90.1 $\pm$ 10.5	86.3 $\pm$ 7.4	83.9 $\pm$ 3.9
UN (mg/dl)	15.2 $\pm$ 1.6	14.8 $\pm$ 0.9	14.5 $\pm$ 1.5	14.2 $\pm$ 1.5	14.7 $\pm$ 1.1	14.8 $\pm$ 1.7
CR (mg/dl)	0.49 $\pm$ 0.03	0.51 $\pm$ 0.09	0.50 $\pm$ 0.07	0.45 $\pm$ 0.07 **	0.43 $\pm$ 0.07 **	0.55 $\pm$ 0.05
Ca (mg/dl)	10.7 $\pm$ 0.3	10.7 $\pm$ 0.3	10.3 $\pm$ 0.3	10.3 $\pm$ 0.2	10.4 $\pm$ 0.3	10.4 $\pm$ 0.2
P (mg/dl)	6.62 $\pm$ 0.82 **	6.31 $\pm$ 0.65 *	5.30 $\pm$ 0.71	5.66 $\pm$ 0.49	6.10 $\pm$ 0.47	5.58 $\pm$ 0.44
Na (mEq/l)	146 $\pm$ 2	146 $\pm$ 2	146 $\pm$ 1	145 $\pm$ 2	147 $\pm$ 2	146 $\pm$ 2
Cl (mEq/l)	103 $\pm$ 2 *	106 $\pm$ 2	106 $\pm$ 1	105 $\pm$ 2	105 $\pm$ 1	106 $\pm$ 2
K (mEq/l)	4.35 $\pm$ 0.33	3.96 $\pm$ 0.33	4.32 $\pm$ 0.29	4.47 $\pm$ 0.38	4.28 $\pm$ 0.48	4.18 $\pm$ 0.19
GOT (IU/l/37°C)	82.4 $\pm$ 4.2 *	76.9 $\pm$ 5.1 **	85.1 $\pm$ 7.8	87.2 $\pm$ 7.2	74.8 $\pm$ 4.7 **	90.6 $\pm$ 4.8
GPT (IU/l/37°C)	36.3 $\pm$ 2.8	35.2 $\pm$ 3.2 *	34.7 $\pm$ 3.7 *	33.8 $\pm$ 2.5 **	32.2 $\pm$ 3.3 **	39.1 $\pm$ 3.9
ALP (IU/l/37°C)	186 $\pm$ 27	186 $\pm$ 12	169 $\pm$ 26	177 $\pm$ 25	164 $\pm$ 11	181 $\pm$ 21
$\gamma$ -GTP (IU/l/37°C)	0.30 $\pm$ 0.48	0.70 $\pm$ 0.95	0.10 $\pm$ 0.32	0.60 $\pm$ 0.70	0.80 $\pm$ 1.55	0.30 $\pm$ 0.67
Cho-E (IU/l/37°C)	7.90 $\pm$ 3.18	8.50 $\pm$ 2.68	7.50 $\pm$ 2.80	7.30 $\pm$ 1.77	6.20 $\pm$ 2.94	8.60 $\pm$ 2.12

a) Numbers in parenthesis represent the number of samples examined

b) Values are means  $\pm$  S. D.\*\*, \* : Significantly different from the control group value at  $P < 0.01$  and  $P < 0.05$ , respectively

Table 4. Absolute organ weight (g) of F344 male rats treated with liquid paraffin for 13 weeks

Organs	Groups of male rats					
	5% (9) <sup>a)</sup>	2.5% (10)	1% (10)	0.5% (10)	0.2% (10)	Control (10)
Body weight	319.4 ± 16.3 <sup>b)</sup>	322.9 ± 24.3	316.1 ± 19.3	331.6 ± 13.9	322.0 ± 16.0	317.0 ± 21.7
Brain	1.951 ± 0.044	1.950 ± 0.037	1.950 ± 0.044	1.958 ± 0.038	1.959 ± 0.030	1.918 ± 0.059
Pituitary g.	0.010 ± 0.001	0.010 ± 0.002	0.009 ± 0.001	0.010 ± 0.001	0.010 ± 0.001	0.010 ± 0.001
Salivary g.	0.478 ± 0.165	0.545 ± 0.053	0.536 ± 0.054	0.575 ± 0.058	0.551 ± 0.040	0.499 ± 0.129
Thymus	0.192 ± 0.029	0.212 ± 0.049	0.211 ± 0.056	0.203 ± 0.070	0.226 ± 0.043	0.220 ± 0.131
Lung (R)	0.720 ± 0.069	0.711 ± 0.081	0.714 ± 0.075	0.672 ± 0.116	0.673 ± 0.122	0.670 ± 0.050
Lung (L)	0.377 ± 0.031	0.393 ± 0.035	0.373 ± 0.040	0.392 ± 0.133	0.380 ± 0.105	0.349 ± 0.028
Heart	0.961 ± 0.076	1.013 ± 0.100	1.000 ± 0.109	0.985 ± 0.072	0.942 ± 0.053	0.935 ± 0.091
Spleen	0.638 ± 0.045	0.676 ± 0.085	0.622 ± 0.048	0.663 ± 0.052	0.637 ± 0.020	0.621 ± 0.048
Liver	7.861 ± 0.903	7.755 ± 0.742	7.742 ± 0.709	8.185 ± 0.541	7.722 ± 0.451	7.901 ± 0.701
Adrenal g. (R)	0.019 ± 0.003	0.019 ± 0.003	0.021 ± 0.003	0.021 ± 0.003	0.020 ± 0.003	0.020 ± 0.007
Adrenal g. (L)	0.020 ± 0.002	0.023 ± 0.004	0.022 ± 0.003	0.022 ± 0.003	0.022 ± 0.003	0.022 ± 0.005
Kidney (R)	0.977 ± 0.094	0.987 ± 0.113	0.960 ± 0.098	1.016 ± 0.062	0.974 ± 0.041	0.946 ± 0.089
Kidney (L)	0.995 ± 0.117	1.005 ± 0.126	0.965 ± 0.094	1.012 ± 0.056	1.004 ± 0.064	0.983 ± 0.074
Testis (R)	1.366 ± 0.203	1.483 ± 0.061	1.437 ± 0.112	1.480 ± 0.043	1.478 ± 0.073	1.409 ± 0.117
Testis (L)	1.401 ± 0.208	1.540 ± 0.060	1.518 ± 0.089	1.535 ± 0.057	1.507 ± 0.085	1.435 ± 0.109

a) Numbers in parenthesis represent the number of samples examined

b) Values are means ± S. D.

Table 5. Absolute organ weight (g) and relative organ weight (%) of F344 female rats treated with liquid paraffin for 13 weeks

Organs	Groups of female rats					
	5% (10) <sup>a)</sup>	2.5% (10)	1% (10)	0.5% (10)	0.2% (10)	Control (10)
Body weight	172.2 ± 7.7 <sup>b)</sup>	171.0 ± 5.7	171.3 ± 8.2	170.4 ± 14.2	169.5 ± 7.5	171.4 ± 8.8
Brain	1.764 ± 0.032	1.768 ± 0.035	1.781 ± 0.059	1.764 ± 0.056	1.792 ± 0.039	1.776 ± 0.065
Pituitary g.	0.013 ± 0.002	0.013 ± 0.001	0.013 ± 0.001	0.014 ± 0.003	0.014 ± 0.001	0.014 ± 0.002
Salivary g.	0.343 ± 0.016	0.362 ± 0.029	0.352 ± 0.040	0.345 ± 0.025	0.342 ± 0.029	0.361 ± 0.053
Thymus	0.173 ± 0.027	0.183 ± 0.018	0.170 ± 0.025	0.169 ± 0.024	0.182 ± 0.016	0.167 ± 0.028
Lung (R)	0.493 ± 0.032	0.500 ± 0.031	0.489 ± 0.049	0.490 ± 0.052	0.510 ± 0.037	0.535 ± 0.049
Lung (L)	0.257 ± 0.015	0.257 ± 0.021	0.268 ± 0.029	0.264 ± 0.023	0.271 ± 0.014	0.332 ± 0.161
Heart	0.592 ± 0.048	0.590 ± 0.021	0.597 ± 0.058	0.592 ± 0.048	0.580 ± 0.029	0.610 ± 0.047
Spleen	0.407 ± 0.030	0.402 ± 0.017	0.393 ± 0.036	0.402 ± 0.028	0.402 ± 0.024	0.425 ± 0.032
Liver	4.145 ± 0.203	4.032 ± 0.193	3.982 ± 0.272	3.971 ± 0.361	3.955 ± 0.206	4.027 ± 0.304
Adrenal g. (R)	0.021 ± 0.004	0.023 ± 0.002	0.023 ± 0.004	0.022 ± 0.003	0.022 ± 0.003	0.023 ± 0.003
Adrenal g. (L)	0.022 ± 0.003	0.026 ± 0.005	0.024 ± 0.003	0.023 ± 0.003	0.025 ± 0.003	0.024 ± 0.004
Kidney (R)	0.566 ± 0.020	0.551 ± 0.030	0.567 ± 0.045	0.573 ± 0.046	0.563 ± 0.032	0.568 ± 0.040
Kidney (L)	0.569 ± 0.020	0.571 ± 0.041	0.577 ± 0.038	0.578 ± 0.054	0.577 ± 0.027	0.596 ± 0.050
Ovary (R)	0.036 ± 0.006 <sup>*</sup>	0.029 ± 0.004	0.028 ± 0.003	0.027 ± 0.004	0.028 ± 0.004	0.027 ± 0.008
Ovary (L)	0.037 ± 0.007	0.028 ± 0.003	0.027 ± 0.006	0.028 ± 0.004	0.027 ± 0.004	0.031 ± 0.005
Ovary (R) <sup>c)</sup>	0.021 ± 0.003 <sup>**</sup>	0.017 ± 0.002	0.016 ± 0.002	0.016 ± 0.002	0.017 ± 0.002	0.016 ± 0.004
Ovary (L) <sup>c)</sup>	0.022 ± 0.004	0.016 ± 0.002	0.016 ± 0.003	0.017 ± 0.003	0.016 ± 0.002	0.018 ± 0.002

a) Numbers in parenthesis represent the number of samples examined

b) Values are means ± S. D.

c) Relative organ weight as a percentage of body weight

<sup>\*\*</sup>, <sup>\*</sup>: Significantly different from the control group value at  $P < 0.01$  and  $P < 0.05$ , respectively

し $2.1 \pm 1.1\%$ と有意に高かった ( $P < 0.05$ )。また、雌では、いずれの型の白血球においても被験物質投与群と対照群との間に差はみられなかった。

#### 5. 臓器の絶対重量および相対重量

雄では、いずれの臓器においても絶対重量 (Table 4)、相対重量ともに被験物質投与群と対照群との間に有意な差は認められなかった。また、雌では、5%投与群において卵巣 (右側) の絶対重量と相対重量の有意な増加が認められたが (Table 5)、その他の臓器については絶対重量、相対重量ともに対照群との間に差はみられなかった。

#### 6. 病理組織学的検索結果

雄では、精巣の精細管萎縮 (精上皮の変性、壊死、脱落等) が5%投与群で1匹、1%投与群で1匹にみられた。前者では両側性にすべての精細管が傷害され、精巣上体管内には細胞残渣が貯留し、成熟精子は全く認められなかった。また、後者では片側の精巣の3分の1程度の精細管が傷害されていたが、精巣上体管内には成熟精子が多数貯留していた。この他、下垂体において絨毛上皮に覆われた囊胞の形成が2.5%投与群で1匹 (前葉と中間葉の間)、1%投与群で1匹 (中間葉と後葉の間) に、腺房形成 (後葉) が2.5%投与群で1匹に認められた。また、前胃粘膜下の表皮囊胞が5%投与群で1匹にみられた。雌では、下垂体において絨毛上皮に覆われた囊胞の形成が対照群で1匹 (前葉内) にみられたほか、白内障 (水晶体線維の変性、片側性) が1%投与群で1匹に認められた。以上のほかには、雌雄ともに特記すべき病変は認められなかった。

### 考 察

流動パラフィン消化管においてはほとんど消化吸収されず、下剤としての作用機序は、消化管粘膜に対する粘滑作用や便の軟化による排便促進であるといわれている<sup>2)</sup>。ヒトにおいて下剤として長期連用 (経口摂取) した際の副作用としては、脂溶性ビタミンやカルシウム、リン酸塩等の吸収不良、消化管や細網内皮系組織における肉芽腫性変化、誤吸入によるリビド性肺炎等が報告されている<sup>2-6)</sup>。

今回、F344 ラットを用いて、流動パラフィンの混餌投与による13週間の亜慢性毒性試験を実施した結果、血液学的検査において、雄で赤血球数およびヘモグロビン量の減少が、雌で白血球数の減少が認められた。前者の変化については、ヒトにおける副作用の報告から、赤血球系細胞を障害し得る要因

としてビタミン等の栄養素の吸収不良による可能性が考えられる。しかし、今回の試験では、血清中のカルシウムや無機リン値の低下が認められなかったこと、一般状態として便の軟化や下痢、動物の体重増加抑制等が観察されなかったこと、組織学的に赤血球数の減少を裏付ける所見が認められなかったこと等から栄養素の吸収不良による可能性は少ないものと思われる。また、雌の白血球数の減少については、ヒトにおける消化管や細網内皮系組織での肉芽腫性変化、およびリビド性肺炎の報告より、局所の炎症による血管外での白血球の利用が要因の一つとして考えられるが<sup>6)</sup>、今回の組織学的検索結果では、いずれの臓器・組織においても特に投与に依存すると思われるような炎症性変化は認められなかった。白血球型別分類の結果においても、対照群との間に違いはみられず、さらに白血球系造血の障害を示唆するような組織所見も認められなかった。赤血球数や白血球数の減少については、他にもいくつかの要因が考えられるが、今回の変化についてはいずれも、投与用量との間に明らかな相関性がみられず、組織学的にもそれらの変化を裏付ける所見が認められなかったこと等から、毒性学的意義の強い変化であるとは考え難い。

このほか、いくつかの血清生化学的検査項目および雄の単球数の比率の変動については、いずれも投与用量との間に明らかな相関性はみられず、その変動幅も軽度であったこと、また、組織学的にそれらの変化を裏付ける所見も認められなかったことから、毒性学的意義は少ないものと考えられた。

病理組織学的検索の結果認められた精巣の精細管萎縮、下垂体の絨毛上皮に覆われた囊胞の形成と腺房形成、前胃粘膜下の表皮囊胞、および白内障については、いずれも発生例数が少なく、流動パラフィンの投与用量との間に明らかな相関性が認められなかったこと、また、いずれもF344ラットでの自然発生が知られている病変であることから、偶発的な変化であると考えられた<sup>7)</sup>。

このほか、雌の5%投与群における卵巣重量の増加については、組織学的に特に異常は認められず、毒性学的意義は少ないものと思われた。

以上、いずれの投与群においても体重増加抑制および中途死亡例が無く、組織学的に明らかな毒性所見も認められなかったことから、ラットでの混餌投与による流動パラフィンの最大耐量 (MTD) は5%以上であると判断し、慢性毒性癌原性試験におけ

る投与用量を、雌雄とも高用量群は混餌投与の上限とされる5%に、低用量群はその半量の2.5%に決定して本試験を開始した。

### 文 献

- 1) 石館守三, 鈴木郁生, 谷村顕雄(監修): 第六版 食品添加物公定書解説書, 廣川書店, 東京 (1992)
- 2) 伊東 宏: 薬理学, 榮光堂, 東京 (1980)
- 3) Dukes, M. N. G. and Aronson, J. K. (eds): "Side Effects of Drugs Annual 16". pp. 425~426, Elsevier Science Publishers, Amsterdam (1993)
- 4) Dukes, M. N. G. (ed): "Meyler's Side Effects of Drugs, 12th Edition". P. 947, Elsevier Science Publishers, Amsterdam (1992)
- 5) Fox, B.: Liquid paraffin pneumonia - with chemical analysis and electronmicroscopy. *Virchows Arch. A Pathol. Pathol. Anat.*, **382**, 339~346 (1979)
- 6) Nochomovits, L. E., Uys, C. J. and Epstein, S.: Massive deposition of mineral oil after prolonged ingestion. *S. Afr. Med. J.*, **49**, 2187~2190 (1975)
- 7) Boorman, G. A., Eustis, S. L., Elwell, M. R., Montgomery, C. A., Jr. and Mackenzie, W. F. (eds): "Pathology of the Fischer rat, Reference and Atlas". Academic Press, San Diego (1990)
- 8) 前川昭彦, 林 裕造(編集): 毒性試験講座5・毒性病理学, 地人書館, 東京 (1991)

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

下 武男・小野寺博志・松島裕子<sup>1)</sup>・外館あさひ  
三森国敏・前川昭彦<sup>2)</sup>・高橋道人

## A 28-Day Repeated Dose Toxicity Study of Nitrobenzene in F344 Rats

Takeo Shimo, Hiroshi Onodera, Yuko Matsushima<sup>1)</sup>, Asahi Todate,  
Kunitoshi Mitsumori, Akihiko Maekawa<sup>2)</sup>, and Michihito Takahashi

To examine toxicities of nitrobenzene as part of the re-evaluation of toxicities of existing chemicals, a 28-day repeat dose toxicity study was performed in male and female F344 rats at dosages of 0, 5, 25 and 125 mg/kg/day of nitrobenzene. All rats in each group consisting of 6 males and 6 females received a daily intragastric administration of this chemical for 28 days. Additional two groups of animals exposed to 0 and 125 mg/kg/day were used for examinations of subsequent recovery for 2 weeks. One female in the 125 mg/kg group died on day 27. Decreased movement, pale skin, gait abnormality and decreases of body weights or their gains were seen in the 125 mg/kg group. Hematology revealed decreases of RBC, Hb and Ht in the 25 and/or 125 mg/kg groups. Blood biochemistry revealed increases of total cholesterol and albumin and decreases of BUN in the 25 and 125 mg/kg groups, and increases of A/G ratio in both sexes and ALT, ALP and total protein in females in the 125 mg/kg group. In the organ weight, increases of the liver, spleen, kidney weight and decreases of the testis and thymus were seen in the 125 mg/kg group. In addition, the increased liver weight was also seen in males receiving 5 mg/kg, and the increased spleen weight in both sexes receiving 25 mg/kg. Histopathology revealed spongiotic changes and brown pigmentation in perivascular region of the cerebellum, increased extramedullary hematopoiesis of the liver, brown pigmentation of renal tubular epithelium and degeneration of seminiferous tubular epithelium and atrophy of seminiferous tubule in the 125 mg/kg group, and congestion, increased brown pigmentation in red pulp and increased extramedullary hematopoiesis of the spleen and increased hematopoiesis of the bone marrow in treated groups. Findings mentioned above disappeared or tended to be decreased during or at the end of the recovery period. Although no effect-dose level was detected in this study, severe anemia and disorder of spermatogenesis and central nervous system which have been reported in the long-term toxicity study could be reconfirmed.

**Keywords** : nitrobenzene, rats, anemia, disorder of spermatogenesis, disorder of central nervous system, twenty-eight-day repeated dose toxicity study

(Received May 31, 1994)

## はじめに

ニトロベンゼン (nitrobenzene;  $C_6H_5NO_2$ ) は分子量 123.06 の芳香族化合物で、特有の芳香を有す

る黄色油状の液体である。本物質はアニリン等の染料や香料の原料や工業用の溶剤として広く生産、使用されているが、その液体、蒸気ともに生体に対して強い障害性を有する。主な毒性としては、血液中でのメトヘモグロビン形成による貧血と、それに伴う造血器および肝臓の障害に加えて、精子形成障害ならびに中枢神経障害など多くの臓器組織に毒性を示すことが報告されている<sup>1,2)</sup>。実験動物を用いた毒性試験としては、ラット単回経口投与の  $LD_{50}$  値は 640 mg/kg であったとの報告<sup>3)</sup>や、ラットおよ

1) Division of Toxicology

2) Department of Pathology, Sasaki Institute, 2-2, Kandasurugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101, Japan

1) 毒性部

2) 佐々木研究所 病理部

びマウスを用いた90<sup>9</sup>ないし98<sup>9</sup>日間の吸入暴露毒性試験等があり、上記の毒性が報告されている。これらの長期毒性試験の投与経路は、ヒトへの暴露環境を考慮して吸入暴露がほとんどであり、他の投与経路による試験報告は少ない。また、より短期間の投与においても同様の病変が誘発されるか否かについての報告もない。

今回、我々は既存化学物質の安全性再評価の目的も含めて、比較的短期間の反復曝露によるニトロベンゼンの毒性を検索する目的で、雌雄F344ラットを用いて28日間の反復強制経口投与試験を実施した。

### 材料および方法

5週齢の雌雄F344ラットを日本チャールスリバー(株)より購入し、1週間の馴化飼育後、一般状態に異常の認められない動物を雌雄とも各群6匹として6群に分け実験に供した。温度24±1℃、湿度55±5%、換気回数18/hr(オールフレッシュ)、照明12時間/日のバリエーションシステムの飼育室で、プラスチックケージに動物を6匹ずつ収容し、床敷はソフトチップ(三共ラボサービス)を用い、固型飼料(CRF-1;日本チャールスリバー)および水道水を自由に摂取させた。被験物質は和光純薬工業(株)の純度99%のニトロベンゼン(CAS NO.98-95-3)を用い、投与液量が5ml/kg体重となるようにオリーブ油に溶解し、投与量に応じて濃度を調整した。投与量は125mg/kg/dayを最高用量とし、以下25および5mg/kg/dayの3用量ならびにオリーブ油のみを投与する対照群の4群に加えて、最高用量群および対照群では、28日間の投与終了後14日間休薬する群を設けた。投与は強制経口投与とし、ラット用金属製胃ゾンデを用い、一日一回、28日間連日投与を行った。

毎日投与後一般状態を観察し、定期的に体重と摂餌量を測定した。最終投与日または休薬14日目から動物を一晩絶食させ、翌日にエーテル深麻酔下で、腹部大動脈より採血した後、屠殺剖検した。血液学的検査は血球自動分析装置(東亜CC-150)を用いて赤血球数、白血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、MCV(%)を測定した。血清生化学的検査はAST、ALT、ALP、コリンエステラーゼ、総コレステロール、総タンパク、アルブミン、A/G比、尿素窒素、クレアチニン、カルシウム、無機リン、ナトリウム、カリウム、塩素の各項目について

測定した。

剖検時、臓器を肉眼的に観察した後摘出し、脳、下垂体、唾液腺、胸腺、心臓、肺、肝臓、腎臓、副腎、脾臓、精巣および卵巣については重量を測定した。上記臓器に加えて、眼球、脊髄、舌、気管、甲状腺、大動脈、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、腸間膜リンパ節、睪臓、膀胱、精のう、前立腺、膣、副鼻腔、骨髓(胸骨および大腿骨)、皮膚および乳腺を10%中性緩衝ホルマリン液で固定後、常法に従いパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン-エオジン染色を施し、病理組織学的検索を行った。

血液学的検査、血清生化学的検査および臓器重量の測定値は、まず分散比をBartlett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、例数が等しければDunnett型で、例数が異なればScheffe型で、それぞれ対照群と各投与群間の有意差検定を行った。なお、回復群ではt-検定を行った。

### 結 果

125mg/kg投与群の雌1例が投与27日目に死亡した。死亡動物は、死亡前日に自発運動の減少、皮膚の蒼白化および体温低下を示し、著明な体重減少が認められた。剖検では、脾臓の腫大ならびに肺と肝臓の暗赤色変化が認められた。病理組織学的には、小脳の海綿状変化、肝臓の髄外造血亢進、クッパー細胞内の褐色色素沈着、腎尿細管上皮内褐色色素沈着、脾臓のうっ血と赤脾臓の褐色色素沈着亢進および髄外造血亢進、白脾臓の萎縮、骨髓の造血亢進および肺における強度のうっ血ならびに水腫が認められた。

生存動物の一般状態では125mg/kg投与群の雌雄全例で、投与直後一時的に自発運動の減少および皮膚の蒼白化がみられた。また、同群で雌雄の多数例に投与3週目より歩行異常が観察された。これらの症状は休薬期間中に消失した。

125mg/kg投与群の雌雄で投与3週目より体重増加抑制ないし体重減少がみられた(Fig.1)。休薬期間に入り雌では体重が増加し回復する傾向がみられたが、雄では体重が増加したものの対照群を下回って推移した。摂餌量では125mg/kg投与群の雄で投与期間を通じて、同群の雌で投与3週目以降



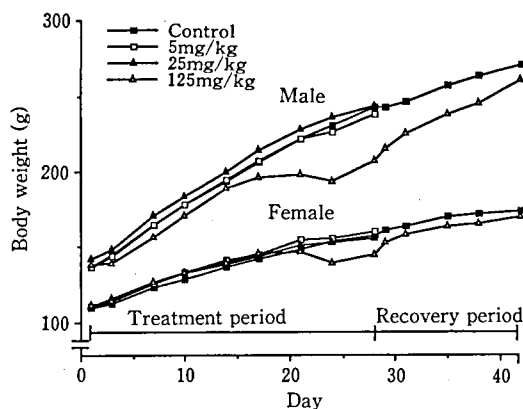


Fig. 1. Body weight changes in rats treated with nitrobenzene for 28 days and after a recovery period for 14 days

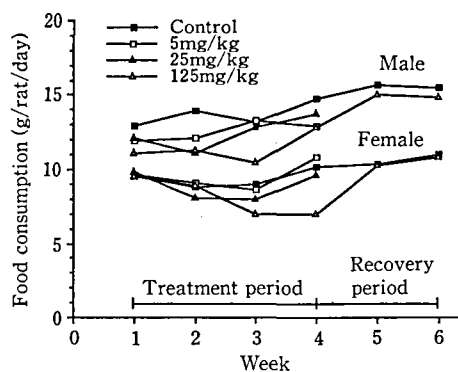


Fig. 2. Food consumption in rats treated with nitrobenzene for 28 days and after a recovery period for 14 days

Table 1. Hematology in rats treated with nitrobenzene for 28 days after a recovery period for 14 days

Group	28-day dosing study				14-day recovery study	
	Control	5mg/kg	25mg/kg	125mg/kg	Control	125mg/kg
No. of rats	6	6	6	6	6	6
<b>Male</b>						
RBC ( $\times 10^4 / \text{mm}^3$ )	761 $\pm$ 117 <sup>a)</sup>	670 $\pm$ 54	524 $\pm$ 36**	412 $\pm$ 54**	727 $\pm$ 93	724 $\pm$ 100
Hb (g/dl)	16.9 $\pm$ 0.6	16.6 $\pm$ 0.6	14.5 $\pm$ 0.5**	14.2 $\pm$ 0.5**	16.7 $\pm$ 0.7	17.7 $\pm$ 0.6*
Ht (%)	41.6 $\pm$ 6.3	35.6 $\pm$ 3.3	32.3 $\pm$ 2.4*	34.9 $\pm$ 3.4*	38.2 $\pm$ 4.9	45.7 $\pm$ 6.6*
MCV (fl)	54.7 $\pm$ 0.8	53.0 $\pm$ 0.9	61.3 $\pm$ 2.7**	84.8 $\pm$ 5.5**	52.7 $\pm$ 1.4	63.0 $\pm$ 1.4**
WBC ( $\times 10^2 / \text{mm}^3$ )	44 $\pm$ 14	45 $\pm$ 8	122 $\pm$ 44**	1426 $\pm$ 521**	46 $\pm$ 5	40 $\pm$ 16
<b>Female</b>						
RBC ( $\times 10^4 / \text{mm}^3$ )	708 $\pm$ 63	718 $\pm$ 129	635 $\pm$ 126	458 $\pm$ 43**	694 $\pm$ 79	674 $\pm$ 86
Hb (g/dl)	17.5 $\pm$ 0.9	16.3 $\pm$ 1.0	15.5 $\pm$ 0.6**	14.5 $\pm$ 0.8**	16.8 $\pm$ 0.4	18.0 $\pm$ 1.2
Ht (%)	38.1 $\pm$ 3.2	37.8 $\pm$ 6.5	37.7 $\pm$ 7.4	35.4 $\pm$ 3.4	36.7 $\pm$ 4.6	39.5 $\pm$ 5.1
MCV (fl)	53.8 $\pm$ 1.2	52.7 $\pm$ 0.5	59.5 $\pm$ 1.6**	77.2 $\pm$ 1.6**	52.8 $\pm$ 0.8	58.3 $\pm$ 5.2*
WBC ( $\times 10^2 / \text{mm}^3$ )	40 $\pm$ 12	43 $\pm$ 8	73 $\pm$ 44	1990 $\pm$ 298**	42 $\pm$ 4	47 $\pm$ 6

<sup>a)</sup> Mean  $\pm$  S. D.

\*, p < 0.05, \*\*, p < 0.01 : Significant difference from control

Table 2. Blood biochemistry in rats treated with nitrobenzene for 28 days and after a recovery period for 14 days

Group No. of rats	28-day dosing study				14-day recovery study	
	Control 6	5mg/kg 6	25mg/kg 6	125mg/kg 6	Control 6	125mg/kg 6
<b>Male</b>						
AST (IU/l)	111±14 <sup>a)</sup>	81±6**	86±6**	105±17	89±9	94±10
ALT (IU/l)	40±6	43±5	38±4	47±9	35±7	37±4
ALP (IU/l)	510±31	504±20	449±30**	461±63	403±19	454±46*
ChE (IU/l)	7.2±2.4	7.7±3.2	5.8±1.3	7.5±1.2	5.5±2.3	7.6±1.9
TP (g/dl)	6.7±0.2	6.5±0.2	6.8±0.2	6.6±0.1	6.4±0.1	6.2±0.1
T. cho (mg/dl)	57.5±2.4	59.0±3.5	66.0±5.1**	72.7±7.6**	54.7±3.7	52.2±2.9
BUN (mg/dl)	17.8±1.1	16.1±1.5*	14.1±2.4**	12.7±1.2**	16.8±2.5	17.5±1.1
CRN (mg/dl)	0.42±0.08	0.40±0.06	0.38±0.06	0.35±0.05	0.43±0.08	0.40±0.07
ALB (g/dl)	4.7±0.2	4.7±0.2	5.0±0.1*	5.1±0.1**	4.6±0.1	4.5±0.1
A/G ratio	2.48±0.17	2.63±0.05	2.63±0.16	3.38±0.25**	2.57±0.10	2.70±0.10
Na (mEq/l)	144±1	145±1	144±1	144±1	142±0	143±2
K (mEq/l)	4.37±0.92	4.12±0.45	4.52±0.31	4.55±0.45	4.15±0.29	4.02±0.31
Cl (mEq/l)	104±2	104±1	103±2	104±3	104±2	102±2
Ca (mg/dl)	10.0±0.1	10.4±0.4	10.4±0.2	10.3±0.4	10.4±0.3	9.9±0.4
P (mg/dl)	7.9±1.0	8.2±0.8	8.0±0.4	8.5±0.4	7.0±0.4	7.6±0.3*
<hr/>						
Group No. of rats	Control 6	5mg/kg 6	25mg/kg 6	125mg/kg 5	Control 6	125mg/kg 6
<b>Female</b>						
AST (IU/l)	96±5	79±5**	85±9*	94±10	77±5	79±5
ALT (IU/l)	39±5	36±4	42±8	53±14*	40±2	31±5**
ALP (IU/l)	399±24	358±20*	360±37	628±164*	294±20	358±66
ChE (IU/l)	5.8±2.5	4.3±1.2	6.0±1.7	7.0±2.7	6.3±2.4	5.5±1.4
TP (g/dl)	6.3±0.3	6.2±0.1	6.5±0.2	7.0±0.5*	6.5±0.3	6.4±0.3
T. Cho (mg/dl)	73.7±10.1	89.8±9.3*	93.2±9.3**	81.6±5.3	84.7±5.7	82.5±5.7
BUN (mg/dl)	17.5±2.2	14.2±1.0**	12.8±2.2**	12.3±3.4*	18.9±3.9	16.8±1.9
CRN (mg/dl)	0.47±0.08	0.40±0.09	0.43±0.05	0.42±0.04	0.45±0.05	0.42±0.044
ALB (g/dl)	4.5±0.3	4.5±0.1	4.7±0.1	5.3±0.4**	4.6±0.2	4.5±0.3
A/G ratio	2.57±0.48	2.65±0.10	2.72±0.13	3.22±0.47*	2.47±0.16	2.52±0.155
Na (mEq/l)	147±3	145±2	145±3	146±4	143±1	143±1
K (mEq/l)	3.88±0.57	3.50±0.31	4.25±0.61	3.90±0.30	3.50±0.19	3.80±0.222*
Cl (mEq/l)	105±1	107±1**	106±1	106±1	107±2	106±2
Ca (mg/dl)	9.9±0.4	10.1±0.1	10.0±0.6	10.4±0.7	10.1±0.2	10.0±0.2
P (mg/dl)	7.9±0.9	6.5±0.3*	7.7±1.2	7.5±0.6	5.9±0.4	6.2±0.7

<sup>a)</sup> Mean±S. D.

\*:p&lt;0.05, \*\*:p&lt;0.01 : Significant difference from control

Table 3. Absolute organ weights rats treated with nitrobenzene for 28 days and after a recovery period for 14 days

Group	28-day dosing study				14-day recovery study	
	Control	5mg/kg	25mg/kg	125mg/kg	Control	125mg/kg
No. of rats	6	6	6	6	6	6
<b>Male</b>						
Brain (g)	1.85±0.06 <sup>a)</sup>	1.88±0.07	1.93±0.02**	1.83±0.10	1.99±0.06	1.95±0.08
Pituitary (mg)	9.8±0.8	9.3±0.5	9.8±0.8	9.5±1.0	10.2±0.8	9.2±0.4
Salivary gl. (g)	0.44±0.03	0.44±0.03	0.47±0.03	0.39±0.04	0.54±0.04	0.48±0.07
Thymus (g)	0.37±0.03	0.35±0.01	0.35±0.03	0.27±0.07**	0.35±0.02	0.34±0.04
Lung (g)	0.93±0.10	0.88±0.06	0.91±0.04	0.87±0.07	0.99±0.14	1.14±0.14
Heart (g)	0.77±0.06	0.76±0.06	0.80±0.03	0.74±0.07	0.83±0.04	0.87±0.04
Spleen (g)	0.50±0.04	0.50±0.03	1.06±0.11**	1.90±0.26**	0.62±0.07	0.85±0.07**
Liver (g)	6.97±0.44	7.33±0.49	9.18±0.38**	8.30±0.83**	7.34±0.79	7.67±1.41
Adrenal (mg)	48.3±10.6	42.3±7.8	47.5±1.8	44.5±8.6	49.8±8.9	48.2±3.9
Kidney (g)	1.57±0.12	1.56±0.07	1.70±0.07*	1.56±0.12	1.80±0.15	1.75±0.19
Testis (g)	2.73±0.13	2.70±0.05	2.73±0.07	0.82±0.05**	2.84±0.11	1.52±0.21**
<b>Female</b>						
Brain (g)	1.76±0.06	1.78±0.05	1.80±0.06	1.84±0.06*	1.86±0.06	1.84±0.02
Pituitary (mg)	9.8±1.2	10.3±1.0	10.0±1.1	9.2±0.4	11.7±1.0	10.8±1.5
Salivary gl. (g)	0.32±0.02	0.31±0.03	0.33±0.05	0.33±0.03	0.38±0.02	0.34±0.02
Thymus (g)	0.27±0.07	0.31±0.04	0.27±0.06	0.19±0.04*	0.30±0.02	0.32±0.02
Lung (g)	0.71±0.06	0.70±0.06	0.70±0.07	0.77±0.07	0.78±0.08	0.78±0.07
Heart (g)	0.52±0.05	0.54±0.02	0.56±0.06	0.55±0.03	0.59±0.03	0.59±0.05
Spleen (g)	0.40±0.10	0.39±0.04	0.64±0.05**	1.40±0.16**	0.43±0.04	0.54±0.13
Liver (g)	4.23±0.34	4.27±0.20	5.36±0.38**	7.67±0.23**	4.35±0.19	4.77±0.61
Adrenal (mg)	56.0±5.7	44.0±4.8**	59.0±8.1	45.8±6.5*	50.5±7.7	48.8±4.1
Kidney (g)	1.03±0.08	1.02±0.02	1.07±0.07	1.16±0.04**	1.12±0.04	1.14±0.08
Ovary (mg)	57.7±4.8	64.4±4.5*	60.0±7.6	55.2±3.6	64.2±5.5	68.0±10.7

<sup>a)</sup> Mean±S. D.

\*:p&lt;0.05, \*\*:p&lt;0.01 : Significant difference from control

他の群と比べて少ない傾向がみられた (Fig. 2)。また、25 mg/kg 投与群の雄で投与 2 週目に他の群と比べて少ない傾向がみられた。休薬期間中は対照群との間に差は認められなかった。

投与終了時の血液学的検査では、赤血球数の減少ないし減少傾向および白血球数の増加ないし増加傾向が 125 mg/kg および 25 mg/kg 投与群の雌雄に、

へモグロビン量の減少および MCV の増加が 25 mg/kg 以上の投与群の雌雄に、へマトクリット値の減少ないし減少傾向が 25 mg/kg 以上の雄と 125 mg/kg 投与群の雌にみられた (Table 1)。休薬後の検査では、投与終了時に認められた MCV の増加が雌雄 125 mg/kg 投与群でみられたが、へモグロビン量およびへマトクリット値は逆に軽度ながら増

Table 4. Relative organ weights rats treated with nitrobenzene for 28 days and after a recovery period for 14 days

Group	28-day dosing study				14-day recovery study	
	Control	5mg/kg	25mg/kg	125mg/kg	Control	125mg/kg
No. of rats	6	6	6	6	6	6
<b>Male</b>						
Body weight (g)	231±10 <sup>a)</sup>	226±13	233±8	192±17	259±12	246±14
Brain (g%)	0.86±0.03	0.84±0.07	0.83±0.03	0.96±0.11*	0.77±0.03	0.79±0.03
Pituitary (mg%)	4.3±0.3	4.2±0.2	4.2±0.4	5.0±0.5*	3.9±0.2	3.8±0.3
Salivary gl. (g%)	0.19±0.01	0.20±0.01	0.20±0.02	0.20±0.02	0.21±0.01	0.19±0.02
Thymus (g%)	0.16±0.01	0.15±0.01	0.15±0.01	0.14±0.04	0.13±0.01	0.14±0.02
Lung (g%)	0.41±0.05	0.39±0.03	0.40±0.03	0.46±0.05	0.38±0.05	0.45±0.05*
Heart (g%)	0.33±0.02	0.34±0.03	0.34±0.03	0.39±0.05*	0.32±0.01	0.35±0.02**
Spleen (g%)	0.22±0.01	0.22±0.01	0.46±0.04**	0.99±0.18**	0.24±0.02	0.35±0.03**
Liver (g%)	3.02±0.07	3.25±0.20*	3.94±0.21**	4.34±0.52**	2.83±0.19	3.10±0.41
Adrenal (mg%)	20.9±4.3	18.8±1.6	20.4±1.3	22.3±3.7	19.3±4.0	19.6±1.9
Kidney (g%)	0.69±0.04	0.69±0.02	0.73±0.02	0.80±0.10*	0.69±0.04	0.71±0.05
Testis (g%)	1.19±0.06	1.20±0.05	1.17±0.03	0.43±0.04**	1.10±0.08	0.62±0.07**
<b>Female</b>						
Body weight (g)	148±6	154±4	151±6	144±5	169±2	172±9
Brain (g%)	1.19±0.07	1.16±0.05	1.19±0.08	1.29±0.04*	1.11±0.04	1.07±0.06
Pituitary (mg%)	6.6±0.7	6.7±0.5	6.6±0.7	6.4±0.3	6.9±0.6	6.3±0.8
Salivary gl. (g%)	0.22±0.02	0.21±0.02	0.22±0.03	0.23±0.03	0.22±0.01	0.20±0.02
Thymus (g%)	0.18±0.04	0.20±0.02	0.18±0.04	0.13±0.03*	0.19±0.02	0.19±0.02
Lung (g%)	0.48±0.05	0.46±0.04	0.47±0.05	0.53±0.04	0.46±0.05	0.45±0.05
Heart (g%)	0.35±0.03	0.35±0.02	0.37±0.04	0.39±0.02*	0.35±0.02	0.35±0.04
Spleen (g%)	0.27±0.07	0.26±0.02	0.42±0.03**	0.97±0.09**	0.26±0.02	0.32±0.09
Liver (g%)	2.86±0.23	2.78±0.08	3.54±0.23**	5.34±0.26**	2.58±0.11	2.79±0.46
Adrenal (mg%)	37.9±4.4	28.8±2.8**	39.1±5.7	31.9±4.4	29.9±4.5	28.5±2.2
Kidney (g%)	0.70±0.04	0.67±0.02	0.71±0.05	0.81±0.04**	0.67±0.02	0.67±0.07
Ovary (mg%)	39.0±4.3	42.0±2.6	39.9±6.6	38.4±1.7	38.1±3.4	39.8±7.5

<sup>a)</sup> Mean±S. D.

\*;p<0.05, \*\*;p<0.01 : Significant difference from control

加が認められた。赤血球および白血球数には変化が認められなかった。

投与終了時の血清生化学的検査では、雌雄各投与群で用量に相関した総コレステロールの増加ないし

増加傾向および尿素窒素の減少が、アルブミンの増加ないし増加傾向が25 mg/kg以上の投与群でみられた (Table 2)。また、A/G比の上昇が125 mg/kg投与群の雌雄で、ALT、ALPおよび総タンパ

Table 5. Microscopic findings in rats after 28 days of oral administration of nitrobenzene

Group	Male				Female																		
	Control	5mg/kg	25mg/kg	125mg/kg	Control	5mg/kg	25mg/kg	125mg/kg															
No. of rats	6	6	6	6	6	6	6	5															
Grade	- + + +	- + + +	- + + +	- + + +	- + + +	- + + +	- + + +	- + + +															
<b>Cerebellum</b>																							
Spongiotic change	6	0	0	0	1	5	6	0	0	2	3												
Brown pigmentation in perivascular region	6	0	0	0	1	4	1	6	0	0	2	2	1										
<b>Liver</b>																							
Increased extramedullary hematopoiesis	6	0	0	0	6	0	0	1	5	0	6	0	0	3	2	0							
Brown pigmentation in Kupffer's cell	6	0	0	0	6	0	0	5	1	6	0	0	6	0	0	4	1						
<b>Kidney</b>																							
Brown pigmentation in tubular epithelium	6	0	0	0	6	0	0	5	1	6	0	0	6	0	0	0	5	0					
<b>Spleen</b>																							
Congestion	6	0	0	0	2	4	0	0	0	6	0	0	5	1	0	2	4	0	0	5			
Increased brown pigmentation in red pulp	6	0	0	0	1	5	0	0	0	6	0	0	5	1	0	0	6	0	0	3	2		
Increased extramedullary hematopoiesis	6	0	0	3	3	0	0	6	0	0	0	6	6	0	0	3	3	0	0	6	0	0	5
<b>Bone marrow</b>																							
Increased hematopoiesis	6	0	0	6	0	0	0	6	0	0	6	6	0	0	5	1	0	3	3	0	0	5	
<b>Testis</b>																							
Degeneration of seminiferous tubular epithelium	6	0	0	6	0	0	6	0	0	0	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Atrophy of seminiferous tubule	6	0	0	6	0	0	6	0	0	0	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<b>Epididymis</b>																							
Reduction of spermatozoa	6	0	0	6	0	0	6	0	0	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Grade: - : no changes, + : moderate, ++ : severe.

Table 6. Microscopic findings in rats after 14 days of recovery from oral administration of nitrobenzene for 28 days

Group	Male			Female		
	Control	125mg/kg		Control	125mg/kg	
No. of rats	6	6		6	6	
Grade	- + ++	- + ++		- + ++	- + ++	
<b>Cerebellum</b>						
Spongiotic change	6 0 0	1 3 2		6 0 0	2 3 1	
Brown pigmentation in perivascular region	6 0 0	3 3 0		6 0 0	4 2 0	
<b>Liver</b>						
Brown pigmentation in Kupffer's cell	6 0 0	0 6 0		6 0 0	3 3 0	
<b>Kidney</b>						
Brown pigmentation in tubular epithelium	6 0 0	0 5 1		6 0 0	0 6 0	
<b>Spleen</b>						
Increased brown pigmentation in red pulp	6 0 0	0 2 4		6 0 0	3 3 0	
Increased extramedullary hematopoiesis	6 0 0	5 1 0		6 0 0	6 0 0	
<b>Bone marrow</b>						
Increased hematopoiesis	6 0 0	6 0 0		6 0 0	3 3 0	
<b>Testis</b>						
Degeneration of seminiferous tubular epithelium	6 0 0	0 5 1		-	-	
Atrophy of seminiferous tubule	6 0 0	0 5 1		-	-	
<b>Epididymis</b>						
Reduction of spermatozoa	6 0 0	0 0 6		-	-	

Grade: - ; no changes, + ; moderate, ++ ; severe.

クの増加が 125 mg/kg 投与群の雌でみられた。他に、AST の減少 (5 および 25 mg/kg 投与群の雌雄)、ALP の減少 (25 mg/kg 投与群の雄, 5 mg/kg 投与群の雌)、塩素の増加 (5 mg/kg 投与群の雌)、無機リンの減少 (5 mg/kg 投与群の雌) がみられたが、いずれも用量相関性はなく、偶発的な変化とみなした。休薬後の検査では、ALP および無機リンの増加が 125 mg/kg 投与群の雄で、ALT の減少およびカリウムの増加が同群の雌で認められたのみで、いずれも軽度な変化であった。

125 mg/kg 投与群の雌雄で肝臓、脾臓および腎臓重量の増加ならびに胸腺重量の減少がみられ、雄では精巣重量の減少がみられた (Table 3, 4)。肝重量の増加は 25 mg/kg 投与群の雌雄および 5 mg/kg 投与群の雄、脾重量の増加が 25 mg/kg 投与群の雌雄でも認められた。また、脳重量の増加が 25 mg/kg 以上の投与群の雄および 125 mg/kg 投与群

の雌でみられた。他に、副腎重量の減少が 5 および 125 mg/kg 投与群の雌でみられたが、用量相関性がなく、雄では認められないことより偶発的な変化とみなされた。休薬後の検査では、脾重量の増加、精巣重量の減少が 125 mg/kg 投与群の雄でみられた。体重比重量において肺重量の増加が同群に認められた。

剖検では、脾臓の腫大が 25 mg/kg 以上の投与群の雌雄全例に、精巣の萎縮が 125 mg/kg 投与群の雄全例に、また、腎臓の黒色調化が 125 mg/kg 投与群の雌雄各 2 例に認められた。休薬後の剖検では、脾臓の軽度腫大および精巣の軽度萎縮が 125 mg/kg 投与群の雄全例に認められた。

病理組織学的には、以下の臓器に投与に起因した変化がみられた (Table 5, 6)。

小脳：小脳核から橋被蓋にかけて両側性的大海綿状病変が 125 mg/kg 投与群の雌雄全例にみられ (Fig.

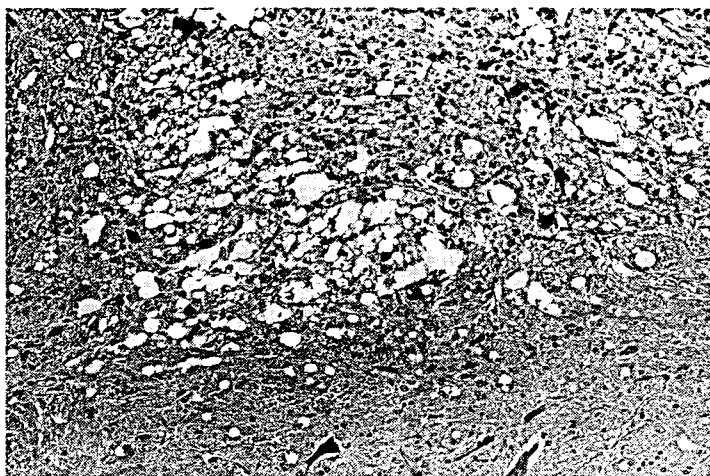


Fig. 3.

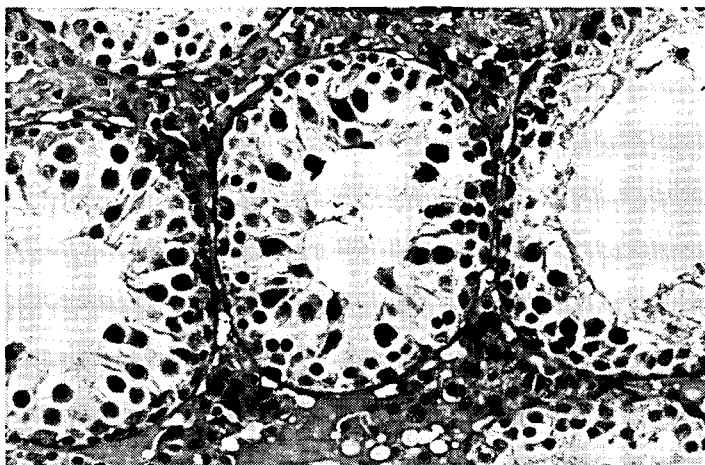


Fig. 4.

3), その病変部血管周囲に褐色色素沈着が同群の雄 5/6 例, 雌 3/5 例に認められた。休薬群では, 小脳のスポンジ状病変が 125 mg/kg 投与群の雄 5/6 例, 雌 4/6 例に, 褐色色素沈着が同群の雄 3/6 例, 雌 2/6 例にみられたが, いずれも投与終了時に比べ病変が軽減する傾向がみられた。

肝臓：髄外造血の亢進が 125 mg/kg 投与群の雄で 5/6 例, 雌で 2/5 例に, クッパー細胞内の褐色色素沈着が雌雄全例にみられた。休薬群では, クッパー細胞内の褐色色素沈着が 125 mg/kg 投与群の雄全例, 雌 3/6 例にみられた。

腎臓：尿細管上皮内の褐色色素沈着が 125 mg/kg 投与群の雌雄全例にみられ, 休薬群でも同群の雌雄全例に認められた。

脾臓：うっ血が 125 mg/kg 投与群の雌雄全例,

25 mg/kg 投与群の雌雄各 4/6 例, 5 mg/kg 投与群の雌 1/6 例に, 赤脾髄の褐色色素沈着の増加が 25 mg/kg 以上の投与群の雌雄ほぼ全例と 5 mg/kg 投与群の 1/6 例に, 髄外造血の亢進が 25 mg/kg 以上の投与群の雌雄全例と 5 mg/kg 投与群の雌雄各 3/6 例に認められた。休薬群では, 赤脾の褐色色素沈着の増加が 125 mg/kg 投与群の雄全例, 雌 3/6 例にみられたが, うっ血は認められなかった。

骨髄：造血亢進が 125 mg/kg 投与群の雌雄全例, 25 mg/kg 投与群の雌 3/6 例, 5 mg/kg 投与群の雌 1/6 例に認められた。休薬群では, 軽度な造血亢進が 125 mg/kg 投与群の雌 3/6 例に認められた。

精巣：精細管上皮の変性および精細管の萎縮が 125 mg/kg 投与群の雄全例にみられた (Fig. 4)。休薬群でも同様な変化が 125 mg/kg 投与群の全例

に認められたが、変化は軽度であり、回復する傾向が認められた。

精巣上体：強度の精子減少が125 mg/kg 投与群の雄全例で認められ、休薬後においても回復がみられなかった。

## 考 察

一般状態において、125 mg/kg 投与群の雌雄で、投与直後一時的に自発運動の減少および皮膚の蒼白化がみられ、投与後期には歩行異常が観察された。投与27日目に同群の雌1例が死亡した。この動物の主な病理組織学的所見は、小脳の実質状変化、肝臓および脾臓におけるヘモジデリン様褐色色素の沈着ならびに髄外造血を主体とする貧血所見、肺のうっ血、水腫であり、被験物質投与による強度の貧血および中枢神経障害による衰弱死と考えられた。

死亡動物における所見で認められたように、本試験において被験物質投与に起因すると考えられる変化は、主として赤血球数、ヘマトクリット値およびヘモグロビン量の減少等によって示される貧血所見ならびに貧血に起因する二次的な病理学的変化であり、雌雄ともに低用量群から認められた。25 mg/kg 以上の投与群でみられた白血球数の増加は、脾や骨髓にみられた造血亢進およびMCVの増加で示されるように赤芽球の増加が発現しているものと考えられ、用いた血球分析装置が白血球と赤芽球の両者を自動的に計測したことに起因するものと推察された。これに加えて、最高用量群の雄で精子形成障害、雌雄で小脳の実質状変化が認められた。病理学的諸変化のうち、肝臓、脾臓および腎臓におけるヘモジデリン様褐色色素沈着や髄外造血の亢進は、これら臓器における変性・崩壊した赤血球の処理の亢進と貧血に対する造血機能の亢進を意味するものであり、血液学的所見に関連する変化であった。

ニトロベンゼンは血液中で強力なメトヘモグロビン形成能を有し、ラットを用いた90<sup>4)</sup>ないし98<sup>5)</sup>日間の吸入亜急性毒性試験においても、血液中のメトヘモグロビンの増加による溶血性貧血と造血の亢進およびそれに伴う脾重量の増加ならびに造血器系の病理組織学的変化が報告されており、今回の結果とよく一致していた。しかしながら、これらの試験で報告されている中心性肝細胞壊死あるいは変性像は、今回の試験では認められず、肝重量の増加が認められたものの、肝細胞の腫大は光顕的観察では明らかではなかった。ニトロベンゼンによるメトヘモ

グロビン形成には、腸内細菌叢による親化合物の代謝が不可欠であることが報告されている<sup>6,7)</sup>、90日間の吸入毒性試験報告があるが、投与期間と投与量が異なるので本実験との比較は困難である。しかし、腸内細菌叢の影響を考慮するとメトヘモグロビン血症誘発能に関しては経口投与の方が吸入暴露より強い可能性が推察された。

精巣の精子形成障害については、上記の長期吸入毒性試験の他に、単回経口投与でも誘発され、また休薬により回復することが報告されている<sup>8)</sup>。また、類似物質であるジニトロベンゼンでも同様の変化が認められ、この変化は薬物のセルトリ細胞障害に起因する可能性が示唆されている<sup>9)</sup>。今回、精巣の変化は最高用量群でのみ認められ、14日間の休薬後も成熟精子を認めなかったものの、障害の程度は28日投与終了時に比べて軽度であり、可逆的な変化であることが推察された。

上記の造血器、精巣の病変に加え、最高用量群の雌雄で歩行異常を伴う中枢神経系の病変が観察された。病変の発生部位はいずれも小脳核および橋被蓋の特定の神経核に局限しており、かつ両側性に認められた。変化は海綿状病変を主体とし、神経細胞の変性、脱落も認められた。病変部では血管周囲にヘモジデリンの沈着と軽度な血管増生が散見され、限局性の循環障害が病理発生機序として考えられた。なお、中枢神経の器質的変化としてはラットを用いた長期吸入曝露試験<sup>10)</sup>において浮腫性的変化が報告されているが、今回の変化はその発生部位および組織像ともに異なるものと考えられ、投与経路の違いによる中枢神経系への障害に差があることが判明した。

以上の結果から、本実験条件下におけるニトロベンゼンの無影響量は5 mg/kg 未満と考えられた。今回の検索では、ニトロベンゼンの長期投与試験で報告されたメトヘモグロビン形成による強度の貧血、精子形成障害および中枢神経障害が確認され、化審法で要求されている28日間反復投与試験がこの種の化学物質の慢性毒性試験の結果予測や、最大安全量の推定に有力な資料を提供するものと考えられる。

## 文 献

- 1) U. S. EPA. (1980). Nitrobenzene, Health and Environment Effects Profile No. 134 Wash., DC, Office of Solid Waste.
- 2) Beauchamp, Jr., R. O., R. D. Irons, D. E.



- Rickert, D. D. Couch, and T. E. Hamm, Jr. (1982). A critical review of the literature on nitrobenzene toxicity. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* **11**, 33~84.
- 3) U. S. EPA. (1980). Ambient Water Quality Criteria for Nitrobenzene. Environmental Criteria and Assessment Office, Cincinnati, OH. EPA 440/4-80-061. NTIS PB 81-11723.
- 4) Haam, T. E., Jr., M. Phelps, T. H. Raynor and R. D. Irons (1984). A 90-day inhalation study of nitrobenzene in F-344 rats, CD rats and B6C3F1 mice. *Toxicologist.* **4**, 181~189.
- 5) Andreeshcheva, N. G., (1970). Features and criteria of toxication of some nitro and amino benzenes. *Gig. Sanit.* **35**, 44~47.
- 6) Reddy, B. G., I. R. Pohl and G. Krishna. (1976). The requirement of the gut flora in nitrobenzene-induced methemoglobinemia in rats. *Biochem. Pharmacol.* **25**, 1119~1122.
- 7) Goldstein, R. S., J. P. Chism, J. M. Shrrill and T. E. Hamm, Jr. (1984). Influence of dietary pectin on intestinal microfloral metabolism and toxicity of nitrobenzene. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **75**, 547~553.
- 8) Bond, J. A., J. P. Chism, D. E. Rickert and J. A. Popp. (1981). Induction of hepatic and testicular lesions in Fischer-344 rats by single oral doses of nitrobenzene. *Fund. Appl. Toxicol.* **1**, 389~394.
- 9) Blackburn, D. M., A. J. Gray, S. C. Lloyd, C. M. Sheard and M. D. Foster. (1988). A comparison of the effects of three isomers of dinitrobenzene on the testis in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **92**, 54~64.
- 10) Khanin, A. G., (1969). Pathological changes in the central nervous system and viscera of experimental animals after chronic continuous inhalation of toxic substances. *Tr. Tsent. Inst. Uroversh. Vrachei.* **135**, 97~106.

## パラオキシ安息香酸イソプロピルのF344ラットにおける13週間亜慢性毒性試験

小野寺博志・三森国敏・安原加壽雄・下 武男  
黒川典子・高橋道人

13-week Subchronic Oral Toxicity Study of Isopropyl  
*p*-Hydroxybenzoate in F344 Rats

Hiroshi Onodera, Kunitoshi Mitsumori, Kazuo Yasuhara,  
Takeo Shimo, Noriko Kurokawa and Michihito Takahashi

A 13-week subchronic oral toxicity study of isopropyl *p*-hydroxybenzoate was performed in both sexes of F344 rats. CRF-1 diet containing 0, 0.25, 1.25, 2.5 or 5% isopropyl *p*-hydroxybenzoate was fed to 5 randomly constituted groups of animals, each consisting of 10 males and 10 females, to determine appropriate dose levels for a subsequent 2-year carcinogenicity study. No animals died during the administration period. Significant suppression of body weight gain was observed in males of the 2.5% and 5% isopropyl *p*-hydroxybenzoate groups, and in females of the groups treated with 1.25% or above as compared with the control group. Serum biochemistry evaluations revealed increases in  $\gamma$ -GTP and total cholesterol in male groups treated with 2.5% or more and increases in  $\gamma$ -GTP, ALP and BUN in female groups treated with 1.25% or more, as compared to the controls. Histopathologically, centrilobular hepatocellular swelling was observed in males treated with 2.5% or more and in females of the 5% group. In the affected populations, hepatocytes filled with small vacuoles, possibly of lipid nature, were sometimes found. An increased severity of intracytoplasmic eosinophilic globule formation in the renal proximal tubular epithelia of males of the 5% group was noted.

Based on these results, a dietary concentration of 1% in males or 0.5% in females was concluded to be a suitable maximum tolerable dose (MTD) of this chemical for a 2-year carcinogenicity study in rats.

**Keywords** : isopropyl *p*-hydroxybenzoate, rat, subchronic toxicity study

(Received May 31, 1994)

## はじめに

パラオキシ安息香酸エステル類（パラベン）の抗菌力は1920年代に見いだされ、日本では昭和23年に食品添加物として許可（パラオキシ安息香酸イソプロピルは38年）されて以来、低毒性や安定性が高い等の理由から現在まで保存料、防カビ剤として主として醤油に、また化粧品、医薬品等の防腐剤として広く用いられている。エステル類にはエチル、*n*-プロピル、イソブチル、*n*-ブチル等があり、現在までにこれらのエステル類の長期毒性試験がいくつか報告されているが、癌原性に関する報告はパラオキシ安息香酸 *n*-ブチルのみである。今回、F344ラットを用いたパラオキシ安息香酸イソプロピルの

癌原性試験を実施するにあたり、短期間大量投与での毒性を明らかにし、かつ癌原性試験の用量設定を行う目的で、13週間の反復投与試験を行ったので報告する。

## 実験材料および方法

### 1. 被験物質

Isopropyl *p*-hydroxybenzoate (C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>, 分子量180.20, CAS No. 4191-73-5) は無色の結晶または白色の結晶性の粉末で無臭である。溶解性は水に対して1g (/100g) 以下で難溶、アルコール、アセトン、エーテルに対しては易溶である。試験には上野製薬(株)より供与されたパラオキシ安息香酸イソプロピル（純度99.0%以上）を用いた。

また、調製飼料中でのパラオキシ安息香酸イソプロピルの安定性を確認する目的で、飼料入荷時を 0 週として、その後 2, 4 週, 2 および 3 ヶ月経過後の高用量 (5%) と低用量 (0.25%) についてそれぞれ室温保存と冷蔵保存したものを HPLC 法を用いて分析した。また、動物飼育室内で、2 週間開封放置した飼料についてもその安定性を検討した。その結果、各検査時期において、高用量および低用量ともに冷蔵、室温保存状態で平均残存量は 97% 以上と良好な結果が得られ、パラオキシ安息香酸イソプロピルは飼料中においても 13 週間は安定であることが確認された。

## 2. 動物および方法

5 週齢の雌雄 F344 ラットを日本チャールス・リバー (厚木) より購入し、1 週間馴化させた後、実験に供した。ラットはプラスチックケージに 1 ケージ当たり雌雄いずれも 5 匹ずつ収容し、室温  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度  $55 \pm 5\%$ 、12 時間明暗サイクルに制御されたバリアーシステムの動物室にて飼育した。

パラオキシ安息香酸イソプロピルは基礎飼料 (CRF-1) に 0 (対照群), 0.25, 1.25, 2.5 および 5% の濃度で混入した固形飼料として 13 週間ラットに自由に摂取させた。飼料調製はオリエンタル酵母 (株) で行った。調製した被験物質飼料は使用時まで  $4^\circ\text{C}$  に維持された飼料保管室にて保存した。飲料水は水道水を自由に摂取させた。体重および飼料摂取量は毎週測定した。一般状態および死亡動物の有無を毎日観察し、投与開始 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。血液学的検査には多項目自動血球計数装置 (東亜医用電子, M-2000 型) を用い、赤血球数 (RBC)、ヘモグロビン濃度 (HGB)、ヘマトクリット値 (HCT)、白血球数 (WBC) および血小板数 (PLT) を測定した。Total protein, A/G, Albumin, Total cholesterol, BUN, Creatinine, Na, Cl, K, Ca, P, GOT, GPT, ALP,  $\gamma$ -GTP の各項目について血清生化学的検査を実施した。動物は剖検後、脳、心、肺、腎、副腎、脾、肝および精巢の重量を測定した。また、上記臓器に加え、主要臓器を 10% 中性緩衝ホルマリン液で固定した後、常法に従い薄切切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施し、対照群と最高用量群について病理組織学的検索を行った。また、2.5% および 1.25% 群については肝および腎についても病理組織学的

に検索した。

## 3. 統計学的解析

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、不等分散の場合には Kruskal-Wallis の方法により検定を行った。群間に有意差が認められた場合の多重比較は例数が等しいので Dunnett 型で対照群と各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、一般状態においても被験物質投与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、雄においては 2.5, 5.0% 群で投与開始時から対照群に比べ体重増加抑制がみられ特に 5% 群で著明だった。雌では用量に相関した増加抑制が明瞭で、投与終了時で雄は 2.5 および 5%, 雌は 1.25% 以上の投与群で対照群に比べ有意な体重増加抑制が認められた (Fig. 1, Table 1)。飼料摂取量は雄の 5% 群でやや低下する傾向が認められたが、他の群では差は認められなかった。雌において

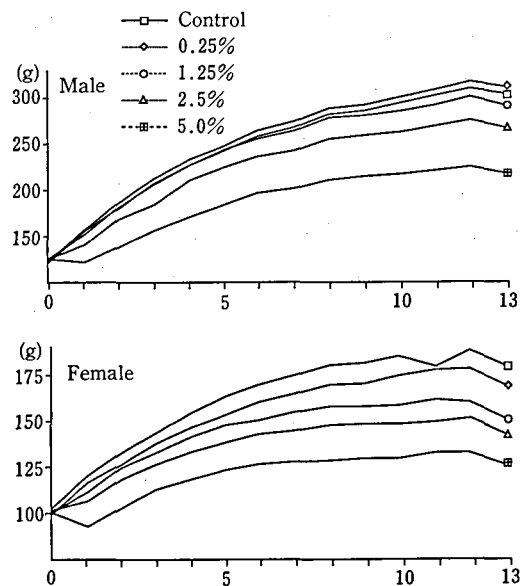


Fig. 1. Body weight curves for rats administered isopropyl p-hydroxybenzoate for 13 weeks

Table 1. Body weight, food intake and total chemical intake in rats fed diet containing isopropyl p-hydroxybenzoate for 13 weeks

	Group (%)	Final body weight (g)	Diet intake (g/rat/day)	Total chemical intake (g/rat/13 wk)
Male	0	298.5 ± 17.4	13.8	-
	0.25	306.5 ± 9.9	14.0	3.2
	1.25	287.4 ± 7.7	14.1	15.9
	2.5	262.6 ± 6.1*	13.8	31.1
	5	213.6 ± 13.0*	11.9	53.7
Female	0	179.9 ± 16.0	9.7	-
	0.25	168.7 ± 5.4	9.1	2.0
	1.25	151.0 ± 5.5*	8.5	9.5
	2.5	142.4 ± 3.3*	8.0	18.1
	5	126.2 ± 5.6*	7.9	35.5

\* : Significantly different from the control at  $p < 0.01$ .

Table 2. Hematological changes in rats treated with isopropyl p-hydroxybenzoate for 13 weeks

Group (%)	WBC $\times 10^2/\mu\text{l}$	RBC $\times 10^4/\mu\text{l}$	HGB (g/dl)	HCT (%)	PLT $\times 10^4/\mu\text{l}$
Male					
0	45 ± 5	972 ± 40	15.7 ± 0.6	46.7 ± 1.8	73.3 ± 3.7
0.25	37 ± 5**	934 ± 22*	14.9 ± 0.4**	44.5 ± 1.3**	69.3 ± 3.1*
1.25	32 ± 4**	930 ± 25*	15.0 ± 0.4**	44.7 ± 1.3*	69.0 ± 3.1*
2.5	41 ± 8	976 ± 24	15.7 ± 0.3	46.8 ± 1.1	70.7 ± 2.6
5	39 ± 4**	964 ± 28	15.7 ± 0.2	47.0 ± 1.1	68.7 ± 4.7*
Female					
0	26 ± 3	884 ± 21	15.5 ± 0.4	45.0 ± 0.9	91.5 ± 6.7
0.25	31 ± 7	863 ± 31	14.9 ± 0.7*	43.5 ± 1.7*	83.3 ± 18.5
1.25	37 ± 5**	881 ± 30	15.6 ± 0.4	44.7 ± 1.5	76.5 ± 4.3**
2.5	31 ± 6*	877 ± 29	15.4 ± 0.4	44.4 ± 1.4	71.5 ± 3.0**
5	29 ± 6	875 ± 18	15.3 ± 0.2**	43.9 ± 1.0*	63.0 ± 4.2**

Values are mean ± S.D

\*,\*\* : Significantly different from the control at \*  $p < 0.05$  and \*\*  $p < 0.01$ , respectively.

は用量に依存した軽度の飼料摂取量の低下が認められた。

### 3. 血液学および血清生化学的検査

血液学的検査では (Table 2), 雄の5%群でWBCの減少, PLTの減少がみられ, 雌の5%群ではHGB, HCTの減少とPLTの減少が認められた。

PLTは雌の2.5と1.25%の群においても用量相関性に減少した。その他, いくつかの測定項目で対照群と比べ有意な変動が認められたが, これらは用量相関性がないか, あるいは変動傾向が一定ではなく, 偶発的な変動とみなした。

血清生化学的検査 (Table 3, 4) では, 雄でTP

Table 3. Serum chemistry in male rats treated with isopropyl p-hydroxybenzoate for 13 weeks

	Dose level (%)				
	0	0.25	1.25	2.5	5
T.protein (g/dl)	6.6 ± 0.1	6.4 ± 0.1**	6.5 ± 0.2	6.7 ± 0.1**	6.4 ± 0.1**
A/G	2.3 ± 0.1	2.5 ± 0.1**	2.5 ± 0.1**	2.6 ± 0.1**	3.0 ± 0.2**
Albumin (g/dl)	4.6 ± 0.1	4.5 ± 0.1*	4.6 ± 0.1	4.8 ± 0.1**	4.8 ± 0.1**
T.cholesterol (mg/dl)	60 ± 2	59 ± 4	62 ± 4	69 ± 2**	72 ± 5**
BUN (mg/dl)	20.7 ± 1.4	20.6 ± 0.9	19.9 ± 0.7	21.5 ± 1.6	20.7 ± 1.5
Creatinine (mg/dl)	0.6 ± 0	0.6 ± 0	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0	0.5 ± 0.1
Na (mEQ/l)	145 ± 1	144 ± 1*	145 ± 1	146 ± 1*	145 ± 1
Cl (mEQ/l)	104 ± 1	106 ± 1	106 ± 1	105 ± 1	104 ± 0
K (mEQ/l)	4.3 ± 0.1	4.3 ± 0.2	4.4 ± 0.2	4.4 ± 0.3	4.2 ± 0.1*
Ca (mg/dl)	10.2 ± 0.2	10.4 ± 0.2*	10.3 ± 0.2	10.7 ± 0.2**	10.7 ± 0.2**
P (mg/dl)	4.9 ± 0.2	4.8 ± 0.1	5.4 ± 0.2**	6.1 ± 0.7*	6.4 ± 0.2**
GOT (IU/l)	101 ± 6	94 ± 10	86 ± 9**	88 ± 7**	90 ± 11*
GPT (IU/l)	42 ± 5	44 ± 5	37 ± 3*	42 ± 3	46 ± 4
ALP (IU/l)	316 ± 24	316 ± 12	291 ± 14*	303 ± 17	332 ± 21
γ-GTP (IU/l)	0.2 ± 0.4	0.4 ± 0.9	0.9 ± 1.3	1.1 ± 0.5**	4.6 ± 1.0**

\*,\*\* : Significantly different from the control at \* p < 0.05 and \*\* p < 0.01, respectively.

Table 4. Serum chemistry in female rats treated with isopropyl p-hydroxybenzoate for 13 weeks

	Dose level (%)				
	0	0.25	1.25	2.5	5
T.protein (g/dl)	6.6 ± 0.2	6.6 ± 0.2	6.4 ± 0.1*	6.3 ± 0.2*	6.2 ± 0.2**
A/G	3.0 ± 0.3	3.0 ± 0.6	2.9 ± 0.3	3.2 ± 0.2	3.2 ± 0.2
Albumin (g/dl)	5.0 ± 0.1	4.9 ± 0.4	4.7 ± 0.1**	4.8 ± 0.1**	4.7 ± 0.2**
T.cholesterol (mg/dl)	87 ± 7	84 ± 14	96 ± 11*	89 ± 6	93 ± 9
BUN (mg/dl)	18.1 ± 1.2	17.0 ± 1.8	19.5 ± 1.5*	20.0 ± 2.1*	20.2 ± 1.5*
Creatinine (mg/dl)	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0
Na (mEQ/l)	146 ± 1	147 ± 1*	148 ± 1**	146 ± 1	146 ± 1
Cl (mEQ/l)	108 ± 1	106 ± 2*	107 ± 1*	107 ± 1*	107 ± 1*
K (mEQ/l)	4.0 ± 0.2	4.4 ± 0.3*	4.1 ± 0.3	4.1 ± 0.2	4.2 ± 0.2*
Ca (mg/dl)	10.6 ± 0.2	10.5 ± 0.2	10.5 ± 0.1	10.4 ± 0.2*	10.6 ± 0.2
P (mg/dl)	6.1 ± 0.3	5.8 ± 0.3*	5.9 ± 0.5	5.6 ± 0.2**	6.2 ± 0.3
GOT (IU/l)	84 ± 7	90 ± 9	83 ± 7	92 ± 4*	88 ± 3
GPT (IU/l)	40 ± 4	38 ± 4	39 ± 4	36 ± 3*	41 ± 4
ALP (IU/l)	177 ± 22	174 ± 24	225 ± 15**	257 ± 19**	331 ± 42**
γ-GTP (IU/l)	1.6 ± 0.8	1.1 ± 0.8	3.3 ± 1.3*	4.9 ± 0.9**	7.5 ± 1.4**

\*,\*\* : Significantly different from the control at \* p < 0.05 and \*\* p < 0.01, respectively.

Table 5. Organ weights of male rats treated with isopropyl p-hydroxybenzoate for 13 weeks

	Dose level (%)				
	0	0.25	1.25	2.5	5
B.W (g)	298.5 ± 17.4	306.5 ± 9.9	287.4 ± 7.7	262.6 ± 6.1**	213.6 ± 13.0**
Absolute					
Brain (mg)	1972 ± 189	1909 ± 41	1924 ± 53	1897 ± 39	1854 ± 57
Lung (mg)	949 ± 44	986 ± 60	938 ± 46	897 ± 42*	773 ± 86**
Heart (mg)	848 ± 45	885 ± 47	849 ± 40	809 ± 50	671 ± 76**
Spleen (mg)	556 ± 37	580 ± 35	572 ± 24	553 ± 35	455 ± 48**
Liver (mg)	7528 ± 519	7801 ± 491	7703 ± 309	7656 ± 271	7149 ± 726
Adrenal (mg)	38 ± 5	37 ± 4	39 ± 5	35 ± 4	33 ± 6
Kidney (mg)	1798 ± 88	1916 ± 71**	1838 ± 96	1722 ± 92	1537 ± 154**
Testis (mg)	2765 ± 124	2827 ± 66	2841 ± 113	2826 ± 99	2795 ± 113
Relative					
Brain (%/mg)	661 ± 56	623 ± 15	670 ± 27	723 ± 27*	870 ± 39**
Lung (%/mg)	319 ± 15	322 ± 19	326 ± 13	342 ± 16**	361 ± 22**
Heart (%/mg)	284 ± 9	289 ± 13	296 ± 13*	308 ± 19**	313 ± 23**
Spleen (%/mg)	186 ± 8	189 ± 9	199 ± 11	211 ± 10**	213 ± 12**
Liver (%/mg)	2521 ± 71	2544 ± 104	2680 ± 62**	2915 ± 63**	3338 ± 160**
Adrenal (%/mg)	13 ± 2	12 ± 1	14 ± 2	13 ± 2	16 ± 3*
Kidney (%/mg)	603 ± 27	626 ± 30	640 ± 31*	656 ± 30**	718 ± 37**
Testis (%/mg)	927 ± 20	923 ± 29	989 ± 40**	1076 ± 35**	1310 ± 59**

\*,\*\* : Significantly different from the control at \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, respectively

Table 6. Organ weights of female rats treated with isopropyl p-hydroxybenzoate for 13 weeks

	Dose level (%)				
	0	0.25	1.25	2.5	5
B.W (g)	179.9 ± 16.0	168.7 ± 5.4	151.0 ± 5.5**	142.4 ± 3.3**	126.2 ± 5.6**
Absolute					
Brain (mg)	1772 ± 82	1761 ± 69	1790 ± 47	1747 ± 39	1707 ± 69
Lung (mg)	701 ± 66	687 ± 52	676 ± 54	609 ± 34**	569 ± 49**
Heart (mg)	548 ± 60	553 ± 61	497 ± 30*	438 ± 55**	399 ± 35**
Spleen (mg)	384 ± 38	363 ± 29	365 ± 36	355 ± 47	302 ± 16**
Liver (mg)	3923 ± 346	3874 ± 426	3713 ± 172	3584 ± 59*	3768 ± 256
Adrenal (mg)	44 ± 6	42 ± 6	39 ± 7	34 ± 3**	30 ± 4**
Kidney (mg)	1074 ± 114	1053 ± 70	978 ± 43*	921 ± 39**	872 ± 48**
Relative					
Brain (%/mg)	990 ± 57	1044 ± 28*	1187 ± 53**	1228 ± 37**	1355 ± 68**
Lung (%/mg)	391 ± 33	407 ± 25	448 ± 42**	428 ± 24*	451 ± 37**
Heart (%/mg)	304 ± 21	327 ± 30	329 ± 23*	308 ± 37	316 ± 21
Spleen (%/mg)	214 ± 17	215 ± 14	242 ± 29*	250 ± 34**	239 ± 7**
Liver (%/mg)	2182 ± 93	2293 ± 199	2463 ± 164**	2519 ± 66**	2986 ± 152**
Adrenal (%/mg)	25 ± 2	25 ± 4	26 ± 5	24 ± 2	24 ± 3
Kidney (%/mg)	597 ± 40	624 ± 26	649 ± 44*	648 ± 38**	691 ± 29**

\*,\*\* : Significantly different from the control at \* p < 0.05 and \*\* p < 0.01, respectively.

が5%群で減少し、T.cholと $\gamma$ -GTPは2.5%以上の群で増加した。雌と同じ変動ではなかったが、A/G比は0.25%以上の群で増加し、Kは5%群で減少した。CaとAlbの増加は2.5%以上の群、Pの増加は1.25%以上の群で各々認められた。

雌では、1.25%以上の群でALPと $\gamma$ -GTPが顕著に、また、BUNも軽度ながら増加し、TPとAlbは減少した。その他、雄と同じ変動ではなかったが、Clが0.25%以上の群で減少し、Kは5%群で増加した。

その他、種々の測定項目に変動がみられたが用量相関性のあるものではなかった。

#### 4. 臓器重量

雄の5%群において体重の増加抑制に対応して、脳、肝、副腎、精巣以外の全計測臓器で臓器重量が有意に減少し、相対重量ではすべての臓器で有意な増加を認めた (Table 5)。同様に、雄の2.5%群の肺実重量は有意に減少し、2.5%群の脳、肺、脾の相対重量と1.25%以上の群の心、肝、腎、精巣の相対重量は有意に増加した。雌では腎の絶対重量が1.25%以上の群で、また、2.5%以上の群で肺、心、副腎の実重量が有意に減少した。雌の相対重量では、脳と肺が0.25%以上の群で、また、脾、肝、腎が1.25%以上の群で有意に増加した (Table 6)。

#### 5. 病理組織学的所見

2.5%と5%群の雄の肝臓において小葉中心性肝細胞腫大がみられ、それらの中では脂質の沈着と思われる小空胞を満たす肝細胞が散見された。雌では5%群において小葉中心性肝細胞腫大が軽度ながら認められた。雄の5%群の腎臓で近位尿管上皮に好酸性滴状物が対照群に比べ多く認められた。その他の臓器組織において投与に起因する変化は認められなかった。

## 考 察

パラオキシ安息香酸エステル類 (パラベン) は1924年 Sabalitschka によってその抗菌作用が報告されて以来、日本では昭和23年にパラオキシ安息香酸エチル、*n*-ブチル、*n*-プロピルが、また、38年にはイソプロピルが食品添加物として認可された。その後57年に使用基準が一部変更され現在に至っている。また、化粧品、医薬品などにおいても防腐剤として広く使われている。変異原性はいずれも陰性で、マウス経口投与による急性毒性試験においてもLD<sub>50</sub>値が2500 mg/kgと比較的低毒性である。

抗菌作用の指標である石炭酸係数はパラオキシ安息香酸が2.2、メチルエステルが3.7、エチルが5.3、*n*-プロピルが25、*n*-ブチルが40と*n*-ブチルが最も優れている<sup>1)</sup>。しかし、パラベンは水に対する溶解性が低いが、サイクロデキストリンの誘導体を結合させることにより溶解性が向上し、またパラベンのアルキル基が長い程その効果は高くなる<sup>2)</sup>。また、パラベンの抗菌作用はpHによって変化し弱酸性領域でその効果が増すことが知られている<sup>3)</sup>。しかしながら、パラベンの混合使用による抗菌効果は相乗作用ではなく単体の相加であると考えられる<sup>4)</sup>。それらの理由で現在の使用基準はパラベン総量で規定されている。各エステル類について毒性試験が行われたが、被験物質に起因する毒性は認められていない<sup>1)</sup>。しかしながら、ヒトにおいてパラベンによる接触皮膚炎やアレルギーが報告されており<sup>5-8)</sup>、喘息との関係も指摘されている<sup>9)</sup>。本試験における諸検査では対照群との間に統計学的に有意差が認められた項目が多くあったが、被験物質投与に関連する変化としては、雄の2.5%以上および雌の1.25%以上の投与群における有意な体重増加抑制が挙げられる。摂餌量に顕著な低下がこれらの群に認められなかったことから、この体重の変化は被験物質投与に起因した変動とみなすことができる。血清生化学的検査では、雄の2.5%以上の群で $\gamma$ -GPTとT.cholが増加し、 $\gamma$ -GTPの変化は雌の1.25%以上の群でも認められた。また、ALPは雌の1.25%以上の群で著しく増加し、BUNも同じ投与群で軽度増加したことから、被験物質には肝および腎への障害作用が存在するものと考えられる。

組織学的には雄の2.5%以上および雌の5%群で小葉中心性肝細胞腫大がみられ、また雄の5%群では腎尿管上皮に好酸性滴状物の発現が増強しており、これらの変化は血清生化学的検査でみられた $\gamma$ -GTP、T.chol、ALP、BUNの変動を強く支持するものである。パラベンは投与後、速やかに血中濃度が上昇し肝で代謝を受ける<sup>10,11)</sup>。また、肝臓内でビリルビン蛋白と結合することが知られており<sup>12)</sup>、今回の肝での変化との関連が疑われる。またブチルパラオキシ安息香酸イソプロピルはヒト精子の膜蛋白分解作用を有し、経膈避妊作用があるとの報告もある<sup>13)</sup>。その他の血清生化学的指標や臓器重量において投与群に種々の変動がみられたが、それらの多くは、体重増加抑制による栄養学的不均衡が主な原因と考えられた。現在までパラオキシ安息香酸ブチ

ルについてはラットとマウスで癌原性試験が行われ、いずれも発癌性は認められていない<sup>14)</sup>。しかし、これらの試験の、ラットにおける投与期間は76週であり、現在の発癌性試験ガイドラインに準拠した実験方法ではなく、より適切な最大耐量での2年間の発癌性試験データが必要である。今回の結果から癌原性試験の用量は体重増加抑制を考慮し雄で1および0.5%、雌は0.5%と0.25%が適当と考えられ、現在実施中である。

### 文 献

- 1) 谷村顕雄：パラオキシ安息香酸イソプロピル。第六版食品添加物公定書解説書。廣川書店、D-865 (1992)
- 2) Matsuda, H. et al: Inclusion complexation of *p*-hydroxybenzoic acid esters with 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrins. On changes in solubility and antimicrobial activity. *Chem. Pharm. Bull. Tokyo*, **41**, 1448~52 (1993)
- 3) Warth, AD: Relationships between the resistance of yeasts to acetic, propanoic and benzoic acids and to methyl paraben and pH. *Int. J. Food Microbio.* **8**, 343~9 (1989)
- 4) Gilliland, D., Po, AL. and Scott, E.: Kinetic evaluation of claimed synergistic paraben combinations using a factorial design. *J. Appl. Bacteriol.* **72**, 258~61 (1992)
- 5) Fisher, AA.: Paraben-induced dermatitis. *Arch. Dermatol.* **111**, 657~8 (1975)
- 6) Nagel, JE., Fuscaldo, JT. and Fireman, P.: Paraben allergy. *JAMA*, **237**, 1594~5 (1977)
- 7) Henry, JC., Tschen, EH. and Becker, LE.: Contact urticaria to parabens. *Arch. Dermatol.* **115**, 1231~2 (1979)
- 8) Wurbach, G., Schubert, H. and Phillipp, I.: Contact allergy to benzyl alcohol and bezyl paraben. *Contact Dermatitis.* **28**, 187~8 (1993)
- 9) Kitamura, S. et al: Experimental investigation on pathogenesis of paraben-induced asthma. *Nippon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi.* **17**, 244~9 (1979)
- 10) Kiwada, H., Awazu, S. and Hanano, M.: The study on the biological fate of paraben at the dose of practical usage in rat. *J. Pharmacobiodym.* **3**, 353~63 (1980)
- 11) Kang, D., Takeshige, K., Isobe, R. and Minakami, S.: Evidence that the decarboxylation reaction occurs before the first the methylation in ubiquinone biosynthesis in rat liver mitochondria. *Eur. J. Biochem.* **198**, 599~605 (1991)
- 12) Rasmussen, LF., Ahlfors, CE. and Wennberg, RP.: The effect of paraben preservatives on albumin binding of bilirubin. *J. Pediatr.* **89**, 475~8 (1976)
- 13) Song, BL. et al.: Evaluation of the effect of butyl *p*-hydroxybenzoate on the proteolytic activity and membrane function of human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* **91**, 435~40 (1991)
- 14) 福西：厚生省がん研究報告集。昭和54年



Bisphenol A の B6C3F<sub>1</sub> マウスにおける 13 週間亜慢性毒性試験古川文夫・西川秋佳・三井雅之・佐藤元信  
鈴木順子・今沢孝喜・高橋道人A 13-week Subchronic Toxicity Study of Bisphenol A in B6C3F<sub>1</sub> MiceFumio Furukawa, Akiyoshi Nishikawa, Masayuki Mitsui, Motonobu Sato,  
Junko Suzuki, Takayoshi Imazawa and Michihito Takahashi

A 13-week subchronic toxicity study of bisphenol A (BPA) was performed in male and female B6C3F<sub>1</sub> mice at dose levels of 0, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 and 4.0% in the diet, to facilitate dose selection for a subsequent carcinogenicity study. Mice were randomly allocated to 6 groups, each consisting of 10 males and 10 females.

Two 0.2% group males and two 4.0% group females died during the experimental period. Suppression of body weight gain and increase in food consumption were observed in males and females of the 4.0% groups. Hematological examination revealed decrease in number of erythrocytes, volume of hemoglobin and value of hematocrit in males and females of the groups receiving 1.0% or above, and an increase in number of platelets in males of 4.0% group. Decrease in number of erythrocytes and hematocrit value was also noticed in females of 0.5% group.

Histopathologically, cystic dilatation, degeneration or regeneration of renal tubules were found in males and females of 1.0% or higher groups, multinucleated hepatocytes were increased in mice of both sexes treated with any dose of BPA, and fibrous osteodystrophy was observed in males and females of the 4.0% groups.

Based on the results of the present study, it was concluded that the maximum tolerance dose (MTD) of BPA is 0.2% in diet, because the dose level of 0.5% proved to exert significant hematological toxicity.

**Keywords** : bisphenol A, mice, subchronic toxicity study

(Received May 31, 1994)

## はじめに

Bisphenol A (BPA) (4,4'-dihydroxydiphenyl-2,2-propane, 4,4'-(1-methylethylidene)bisphenol, 4,4'-isopropylidene diphenol, 2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane) は、既存化学物質 (4-123) の一つで、ポリカーボネート樹脂やエポキシ樹脂などの原料 (単量体) に、その他には可塑性ポリエステル、酸化防止剤、塩化ビニル安定剤など工業的に用いられている。一方、缶の内層コート、義歯、接着剤などの他、食物の梱包剤としても使用されており、特に梱包剤として使用される場合に、樹脂より食物表面に拡散することが知られている。

本化合物は皮膚に対して刺激性を有することが知られており<sup>1)</sup>、経口投与による急性毒性試験では

LD<sub>50</sub> 値がマウスで 2.5 g/kg であること<sup>2)</sup>、生殖毒性を有すること<sup>3)</sup>が報告されている。

今回、我々は既存化学物質の安全性評価の一環として、マウスにおける BPA の混餌投与による 13 週間亜慢性毒性試験を実施した。

## 実験材料および方法

## 1. 検体

BPA (CAS No. 80-05-7 : 分子量 228.3) は、Fig.

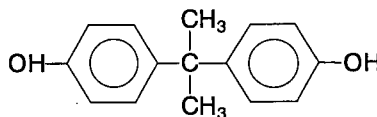


Fig. 1. Chemical structure of bisphenol A

1に示す化学構造を有し、水に難溶で、アセトン、エーテル、アルコールなどの有機溶媒に溶け易い白色の粉末状または粒子状物質である。実験には、日本ジーイープラスチック(株)より供与されたBPA (Lot No. 901219, 純度99.88%)を用いた。

## 2. 動物および飼育環境

動物は、B6C3F<sub>1</sub>系マウス雌雄各60匹を日本チャールスリバー社より5週齢にて購入し1週間の検疫馴化の後、雌雄各群10匹ずつ6群に配した。実験開始時の体重は雄が約24g、雌が約19gであった。動物飼育は、温度24±1℃、湿度55±5%、換気回数18回/時間、12時間照明に維持された動物室にて行い、動物はポリカーボネートケージに5匹ずつ収容し、床敷は三協ラボサービス(株)のソフトチップを用い、週2回交換した。

## 3. 実験方法

投与は混餌投与とし、粉末飼料(CRF-1:日本チャールスリバー(株))を用い、急性毒性試験から求めたLD<sub>50</sub>が4.1g/kgであったことから、今回の試験はBPAの4.0, 2.0, 1.0, 0.5, 0.2および0%含有飼料を作製し、13週間自由に摂取させた。また、飲水は水道水を自由に摂取させた。一般症状および死亡動物の有無を試験期間中、1日1回観察し、体重および摂餌量は週1回測定した。死亡動物は発見後速やかに剖検した。また、生存例は投与13週後に、エーテル麻酔下にて採血の上、屠殺・剖検した。

肉眼的に観察後、諸臓器を摘出採取し、脳、肺、

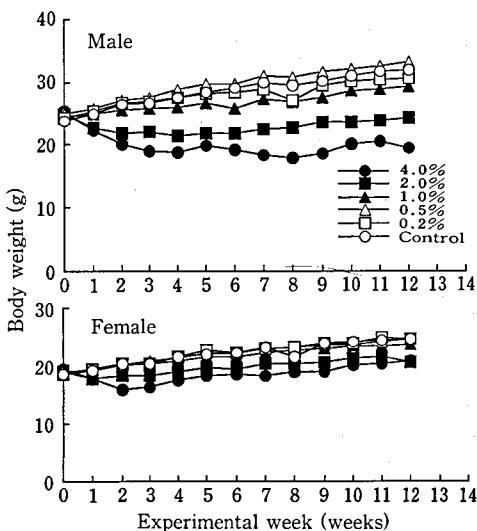


Fig. 2. Body weight curves of mice treated with bisphenol A for 13 weeks

心臓、脾臓、肝臓、腎臓、胸腺、副腎、精巣/卵巣および顎下腺の重量を測定した。これらの臓器に加え、脊髄、舌、食道、胃、小腸、大腸、膵臓、気管、膀胱、前立腺、精囊腺、精巣上体、子宮、膈、骨(骨髄)、腸間膜リンパ節、下垂体、甲状腺、眼球、皮膚、骨格筋、ハーダー腺を、10%中性緩衝ホルマリン液にて固定し、常法に従いパラフィン包埋後薄切の上、ヘマトキシリン・エオジン(H.E.)染色を施し、病理組織学的に検索した。採取した血液については、自動血球計数装置(M-2000:東亞医用電子(株))を用いて、赤血球数(RBC)、ヘモグロビン量(Hb)、ヘマトクリット値(Ht)、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球血色素量(MCH)、平均赤血球血色素濃度(MCHC)、白血球数(WBC)および血小板数の測定を行った。また、血液塗抹標本作製し、血液細胞自動分析装置(Microx HEG-120A:立石電機(株))を用いて白血球百分比を求めた。

体重、臓器重量および血液学的検査値の統計学的処理はBartlett法にて等分散の検定を行い、等分散の場合には、一元配置分散分析を行い、群間に有意差を認めた時はScheffé法にて多重比較検定を行った。不等分散の場合には、Kruskal-Wallis法を用い、群間に有意差を認めた場合はScheffé型検定法を用いて対照群と比較した。

## 結 果

投与期間中における死亡動物は、雄の0.2% BPA投与群で実験開始から71日と82日に各1例に、雌の4.0% BPA投与群では14日に2例、合計4例であった。

一般症状としては、雌雄の4.0% BPA投与群に消瘦が強く認められた。特に死亡動物は体重減少が顕著で、死亡時の体重は2匹とも約13gであった。その他には投与期間を通じて、特記すべきものは認められなかった。

体重推移は雌雄ともに4.0%および2.0% BPA投与群で顕著な体重増加抑制がみられた(Fig. 2)。最終体重では雌雄の4.0%および2.0% BPA投与群は対照群に比し、有意に体重増加抑制が認められた(雌の2.0%は $p < 0.05$ , その他は $p < 0.01$ )。

摂餌量は投与期間中、BPAの用量に相関した摂餌量の変動は認められなかったが、雌雄とも4.0% BPA投与群で喰いこぼしがみられた(Table 1)。摂餌量より投与期間中の雌雄各群の平均BPA摂取量を算出したところ、4.0% BPA群でやや高い値

Table 1. Food consumption and bisphenol A intake in mice

Group	Food consumption (g/animal/day)		Daily BPA intake (g/kg/day)		Total BPA intake (g/kg)	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female
4.0%	8.8	9.6	14.6	22.0	1329	2002
2.0%	6.1	6.0	5.5	6.3	501	573
1.0%	5.9	5.2	2.2	2.5	200	228
0.5%	5.6	5.7	1.0	1.3	91	118
0.2%	5.4	6.0	0.5	0.6	46	55
Control	6.3	6.9	0	0	0	0

BPA : Bisphenol A

Table 2-1. Hematological values of mice treated with bisphenol A for 13 weeks

Group	RBC ( $\times 10^4/\mu\text{l}$ )	Hb (g/dl)	Ht (%)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dl)	WBC ( $\times 10^2/\mu\text{l}$ )	Platelet ( $\times 10^4/\mu\text{l}$ )
Male	4.0%	850± 82*	11.8±1.20*	43.1±4.16*	50.7±1.43	13.8±0.51	27.3±1.15	33.9±14.7
	2.0%	970± 55	13.6±0.58	48.9±2.44	50.4±0.76	14.0±0.52	27.8±0.81	37.6±14.2
	1.0%	1055±120	14.9±1.45	54.3±6.07	51.5±0.31	14.1±0.38	27.5±0.69	33.4±10.2
	0.5%	1021± 45	14.2±0.64	52.1±2.43	51.0±0.60	13.9±0.34	27.3±0.66	37.4±12.1
	0.2%	996± 70	14.0±0.94	50.9±3.15	51.1±0.64	14.0±0.47	27.5±0.82	35.8±11.7
	Control	1039± 38	14.6±0.64	53.4±1.95	51.4±0.65	14.1±0.28	27.3±0.59	25.3±21.7
Female	4.0%	972± 64**	13.6±0.93*	49.4±2.25**	50.9±1.48	14.0±0.30	27.5±0.83	12.0±4.20
	2.0%	1019± 96**	14.4±1.06*	52.8±4.10**	51.9±1.18	14.2±0.68	27.4±0.98	10.7±2.16
	1.0%	991± 47**	14.5±0.51*	51.6±2.50**	52.0±0.33	14.6±0.40*	28.2±0.80*	16.6±5.74
	0.5%	1068± 65*	15.0±0.79	55.5±3.51*	52.0±0.41	14.1±0.22	27.1±0.42	11.1±3.98
	0.2%	1124± 53	15.7±0.49	58.4±2.75	52.0±0.52	14.0±0.39	27.0±0.66	20.1±3.28
	Control	1179± 36	16.4±0.41	60.9±2.08	51.6±0.49	13.9±0.19	27.0±0.48	15.4±5.30

Data represent mean values ± S.D.

\* or \*\*: Significantly different from control values at p&lt;0.05 or p&lt;0.01.

Table 2-2. Hemogram of mice treated with bisphenol A for 13 weeks

Sex	Group	Neutrophil(%)		Eosinophil (%)	Basophil (%)	Lymphocyte (%)	Monocyte (%)	Ebl (No./200WBC)
		Bandl	Segment.					
Male	4.0%	14.24±3.26	32.3± 8.7	1.20±0.98	0	52.2±10.9	0.05±0.16	2.50±3.87
	2.0%	6.06±1.77	20.2± 6.1	3.00±1.95	0	70.7± 6.8	0	0.22±0.44
	1.0%	4.69±1.35	15.3± 3.3	1.45±0.72	0	78.5± 3.4	0.05±0.16	0.30±0.48
	0.5%	5.24±1.52	16.2± 5.1	1.95±1.14	0	76.5± 6.2	0.10±0.32	0
	0.2%	5.53±2.12	16.1± 3.3	0.64±0.82	0	77.8± 4.9	0	0.38±0.52
	Control	5.98±3.87	22.1±15.1	0.10±0.32	0	71.7±18.5	0	0.90±0.88
Female	4.0%	11.04±7.02	35.0±12.1	0.76±1.58	0	53.2±16.5	0	7.14±4.91
	2.0%	6.84±3.41	19.0± 4.6	0.85±0.63	0	73.3± 5.9	0	1.00±1.63
	1.0%	4.06±1.91	7.0± 3.7	0.80±0.42	0	88.1± 4.8	0	0.60±0.70
	0.5%	3.80±2.24	9.2± 2.8	0.50±0.41	0	86.5± 4.0	0	0.20±0.63
	0.2%	1.50±1.27	12.7±10.8	2.24±4.03	0	83.8±11.3	0	0.50±0.71
	Control	1.55±1.17	10.3± 6.9	0.40±0.66	0	87.8± 8.1	0	0.80±1.03

Data represent mean values ± S.D.

Table 3-1. Absolute and relative organ weights of male mice treated with bisphenol A for 13 weeks

Item	Group						
	4.0%	2.0%	1.0%	0.5%	0.2%	Control	Control
Effective no.	10	10	10	10	8	10	10
Body weight	18.8±1.41**	21.7±0.82**	26.4±1.71	30.1±1.48	26.8±2.21	28.5±2.25	28.5±2.25
Brain	0.44±0.03** (2.4**)	0.48±0.02 (2.2**)	0.51±0.01 (2.0*)	0.50±0.02 (1.7)	0.50±0.02 (1.9)	0.49±0.02 (1.7)	0.49±0.02 (1.7)
Salivary gl.	0.14±0.05 (0.77)	0.17±0.04 (0.80)	0.19±0.06 (0.73)	0.20±0.08 (0.66)	0.24±0.05 (0.89)	0.22±0.05 (0.78)	0.22±0.05 (0.78)
Lung (R)	0.11±0.04 (0.61)	0.10±0.02 (0.47)	0.12±0.03 (0.47)	0.13±0.03 (0.44)	0.18±0.10 (0.66)	0.12±0.03 (0.43)	0.12±0.03 (0.43)
(L)	0.05±0.03 (0.30)	0.05±0.02 (0.25)	0.05±0.01 (0.20)	0.06±0.01 (0.20)	0.07±0.04 (0.27)	0.06±0.01 (0.20)	0.06±0.01 (0.20)
Heart	0.12±0.03* (0.64)	0.12±0.01 (0.54)	0.13±0.01 (0.50)	0.16±0.02 (0.52)	0.15±0.01 (0.57)	0.15±0.02 (0.51)	0.15±0.02 (0.51)
Spleen	0.11±0.02 (0.61)	0.08±0.02 (0.36)	0.06±0.01 (0.23)	0.12±0.03 (0.39)	0.09±0.03 (0.33)	0.09±0.02 (0.31)	0.09±0.02 (0.31)
Thymus	0.05±0.10 (0.32)	0.07±0.09 (0.33)	0.06±0.06 (0.21)	0.07±0.08 (0.24)	0.04±0.02 (0.15)	0.05±0.02 (0.16)	0.05±0.02 (0.16)
Liver	1.16±0.09 (6.2**)	1.14±0.11 (5.3**)	1.24±0.09 (4.7)	1.45±0.09** (4.8)	1.22±0.15 (4.5)	1.24±0.07 (4.3)	1.24±0.07 (4.3)
Adrenal (R)	0.003±0.001(0.018**)	0.003±0.000 (0.013*)	0.003±0.001 (0.010)	0.003±0.001 (0.011)	0.003±0.001 (0.011)	0.003±0.001 (0.010)	0.003±0.001 (0.010)
(L)	0.004±0.001 (0.022)	0.003±0.001 (0.012)	0.003±0.001 (0.010)	0.003±0.000 (0.011)	0.003±0.001 (0.011)	0.003±0.001 (0.011)	0.003±0.001 (0.011)
Kidney (R)	0.24±0.03 (1.33)	0.19±0.02* (0.88*)	0.27±0.01 (1.01)	0.31±0.02 (1.01)	0.26±0.02 (0.98)	0.27±0.04 (0.93)	0.27±0.04 (0.93)
(L)	0.22±0.02* (1.17)	0.18±0.01** (0.81*)	0.23±0.01 (0.88)	0.28±0.02* (0.92)	0.24±0.02 (0.90)	0.25±0.02 (0.87)	0.25±0.02 (0.87)
Testis (R)	0.06±0.02 (0.30)	0.09±0.02 (0.43)	0.11±0.02 (0.42)	0.12±0.03 (0.40)	0.11±0.01 (0.41)	0.11±0.01 (0.37)	0.11±0.01 (0.37)
(L)	0.06±0.02* (0.30)	0.09±0.03 (0.42)	0.11±0.02 (0.41)	0.12±0.03 (0.40)	0.11±0.01 (0.39)	0.10±0.01 (0.37)	0.10±0.01 (0.37)

Data represent mean values ± S.D.

Relative organ weights are shown in parentheses (%).

\* : Significantly different from control values at p&lt;0.05.

\*\* : Significantly different from control values at p&lt;0.01.

Table 3-2. Absolute and relative organ weights of female mice treated with bisphenol A for 13 weeks

Item	Group						
	4.0%	2.0%	1.0%	0.5%	0.2%	Control	
Effective no.	8	10	10	10	10	10	10
Body weight	17.2±1.29**	18.7±0.91*	21.0±0.66	20.7±0.83	21.3±1.12	20.8±1.80	
Brain	0.46±0.03* (2.7)	0.50±0.01 (2.7)	0.51±0.02 (2.4)	0.53±0.05 (2.6)	0.52±0.02 (2.5)	0.52±0.02 (2.5)	
Salivary gl.	0.10±0.03 (0.57)	0.12±0.03 (0.65)	0.14±0.02 (0.65)	0.12±0.02 (0.59)	0.13±0.03 (0.63)	0.13±0.02 (0.65)	
Lung (R)	0.11±0.05 (0.61)	0.12±0.03 (0.62)	0.13±0.04 (0.60)	0.12±0.03 (0.55)	0.13±0.03 (0.59)	0.12±0.04 (0.58)	
Lung (L)	0.06±0.03 (0.32)	0.05±0.02 (0.29)	0.06±0.02 (0.28)	0.06±0.01 (0.27)	0.06±0.01 (0.26)	0.06±0.03 (0.29)	
Heart	0.09±0.01 (0.53*)	0.11±0.01 (0.56)	0.12±0.01 (0.56)	0.13±0.02 (0.62)	0.13±0.01 (0.62)	0.14±0.03 (0.65)	
Spleen	0.11±0.04 (0.65)	0.07±0.01 (0.39)	0.08±0.01 (0.37)	0.07±0.01 (0.32)	0.07±0.01 (0.34)	0.07±0.01 (0.32)	
Thymus	0.03±0.02 (0.15)	0.04±0.01 (0.22)	0.05±0.01 (0.23)	0.04±0.01 (0.21)	0.04±0.01 (0.20)	0.04±0.01 (0.19)	
Liver	1.14±0.10** (6.6**)	0.99±0.10 (5.3*)	0.94±0.09 (4.5)	1.01±0.07 (4.9)	0.99±0.04 (4.7)	0.96±0.12 (4.6)	
Adrenal (R)	0.003±0.001 (0.020)	0.003±0.000 (0.017)	0.003±0.001 (0.016)	0.003±0.001 (0.016)	0.004±0.001 (0.017)	0.004±0.001 (0.021)	
(L)	0.004±0.001 (0.020)	0.004±0.001 (0.020)	0.004±0.001 (0.021)	0.004±0.001 (0.018)	0.004±0.001 (0.018)	0.004±0.001 (0.021)	
Kidney (R)	0.24±0.02* (1.39*)	0.18±0.01 (0.95)	0.18±0.01 (0.88)	0.20±0.01 (0.95)	0.19±0.01 (0.90)	0.18±0.01 (0.89)	
(L)	0.23±0.02* (1.33*)	0.16±0.00 (0.87)	0.17±0.01 (0.80)	0.18±0.02 (0.86)	0.18±0.01 (0.83)	0.17±0.02 (0.80)	
Ovary (R)	0.002±0.001** (0.011**)	0.004±0.001 (0.022*)	0.006±0.001 (0.028)	0.006±0.001 (0.027)	0.008±0.001 (0.035)	0.007±0.002 (0.034)	
(L)	0.003±0.001** (0.015*)	0.003±0.001** (0.018**)	0.006±0.001 (0.027)	0.006±0.001 (0.028)	0.006±0.001 (0.030)	0.006±0.002 (0.030)	

Data represent mean values ± S.D.

Relative organ weights are shown in parentheses (%)

\* : Significantly different from control values at p&lt;0.05.

\*\* : Significantly different from control values at p&lt;0.01.

Table 4. Histopathological findings of mice treated with bisphenol A for 13 weeks

Sex	Organs	Findings	Group	4.0%			2.0%			1.0%			0.5%			0.2%			Control			
			Grade	-	±	+	++	-	±	+	-	±	+	-	±	+	-	±	+	-	±	
Male	Heart	atrophy of myocytes		3	7	0	0	9	1	0	10	0	0	10	0	0	8	0	0	10	0	
		vacuolation of myocytes		7	3	0	0	10	0	0	10	0	0	10	0	0	8	0	0	10	0	
	Liver	multinucleated hepatocytes		0	10	0	0	5	5	0	0	0	10	0	0	0	1	7	10	0	0	
	Kidney	regeneration of renal tubules		0	0	8	2	0	4	6	3	7	0	10	0	0	8	0	0	10	0	
		cystic dilatation of renal tubules		0	0	3	7	0	8	2	10	0	0	10	0	0	8	0	0	10	0	
		focal fibrosis		0	1	9	0	0	9	1	8	2	0	10	0	0	8	0	0	10	0	
		degeneration of renal tubules		0	7	2	1	10	0	0	10	0	0	10	0	0	8	0	0	10	0	
		cast		0	8	2	0	0	1	9	9	1	0	10	0	0	8	0	0	10	0	
	Spleen	increased extramedullary hematopoiesis		1	6	3	0	9	1	0	10	0	0	8	2	0	5	3	0	9	1	
	Bone	Fibrous osteodystrophy		1	1	7	1	9	1	0	10	0	0	10	0	0	8	0	0	10	0	
Female	Heart	atrophy of myocytes		6	2	0	0	10	0	0	10	0	0	10	0	0	10	0	0	10	0	
		vacuolation of myocytes		7	1	0	0	10	0	0	10	0	0	10	0	0	10	0	0	10	0	
	Liver	multinucleated hepatocytes		0	7	1	0	0	10	0	0	0	9	1	2	8	0	9	1	0	10	0
	Kidney	regeneration of renal tubules		0	0	8	0	0	7	3	3	7	0	10	0	0	10	0	0	10	0	
		cystic dilatation of renal tubules		0	0	8	0	4	6	0	10	0	0	10	0	0	10	0	0	10	0	
		dilatation of renal tubules		8	0	0	0	6	4	0	8	2	0	10	0	0	10	0	0	10	0	
		focal fibrosis		0	4	4	0	2	8	0	9	1	0	10	0	0	10	0	0	10	0	
		degeneration of renal tubules		0	8	0	0	10	0	0	10	0	0	10	0	0	10	0	0	10	0	
	cast		0	8	0	0	10	0	0	10	0	0	10	0	0	10	0	0	10	0		
	Spleen	increased extramedullary hematopoiesis		1	7	0	0	8	2	0	8	2	0	10	0	0	10	0	0	10	0	
Bone	Fibrous osteodystrophy		0	6	2	0	10	0	0	10	0	0	10	0	0	10	0	0	10	0		

- : within normal limits, ±: slight, +: moderate, ++: severe

であったが、その他の群では用量公比にはほぼ相関した値となった。

血液学的検査は Table 2-1, 2 に示すように、雌雄の 4.0% BPA 投与群および雌の 2.0 および 1.0 % BPA 投与群で RBC, Ht および Hb の有意な低下がみられ、雌の 0.5% BPA 群でも RBC および Ht の低下が認められた。また、雌の 1.0% BPA 投与群では MCH および MCHC の有意な上昇もみられた。その他、雄の 4.0% BPA 群では血小板数の有意な増加が認められた。白血球百分比の結果では、雌雄とも 4.0% BPA 投与群において、リンパ球比率の減少傾向、好中球比率の増加傾向がみられ、また赤芽球 (Ebl) 数の増加傾向がみられた。

臓器重量は Table 3-1, 2 に示すように BPA 投与に起因すると考えられる変動として、雌雄の 4.0 および 2.0% BPA 投与群で、肝相対重量の有意な増加が、また雌雄の 4.0% BPA 投与群で腎の相対重量の増加傾向または有意な増加が認められた。そ

の他、雌の 2.0 および 4.0% BPA 投与群において卵巣相対重量の有意な低下が観察された。

病理組織学的検索では Table 4 に示すように腎において、尿細管の囊胞状拡張、尿細管上皮の変性・再生、囊胞周囲の線維増生、硝子尿円柱などの変化が雌雄の 1.0% 以上の群で用量依存性に観察された。また、雌雄の BPA 投与群において、用量相関性はないが、多核肝細胞の出現が認められた。大腿骨および胸骨において、線維性骨萎縮が雌雄の 4.0% 群の多数例および雄の 2.0% 群の 1 例に認められた。その他、脾の髄外造血の亢進が雌雄の 4.0 % 群で、軽度な心筋細胞の萎縮が雄の 4.0 および 2.0%、雌の 4.0% BPA 投与群においてみられた。

## 考 察

死亡動物は雄の 0.2% BPA 投与群で 2 匹、雌の 4.0% BPA 投与群で 2 匹みられた。雌の 4.0% BPA 投与群は摂餌拒否によるものと考えられたが、

雄の 0.2% BPA 投与群の死亡例については肉眼的および病理組織学的検索で死亡に起因する変化は明らかにできなかった。

本試験において肝重量の増加がみられたが、組織学的には明らかな肝細胞の腫大は認められなかった。NTP の亜慢性毒性試験では多核肝細胞が雄の 25000 ppm 群では 10 匹中 9 匹に認められたが、雌 2500 ppm 群では認められていない<sup>2)</sup>。本試験においても肝に多核肝細胞が認められたが、BPA の投与量に依存した変化ではなく、その毒性学的意義は不明である。しかし、同様の変化はラットにおいて加齢性の変化として発現する他に<sup>4)</sup>、各種の動物においてウイルス感染、毒素、化学物質等で誘発されることが報告されている<sup>5)</sup>。それらの発現機序としては細胞核の分裂亢進と細胞質の分裂不全<sup>6)</sup>や細胞間の癒合<sup>7)</sup>が推測されているが本試験における機序については明らかではない。今後、細胞増殖活性の検索、電子顕微鏡学的検索による検討が必要と考えられる。

骨の変化はマウスにおいて自然発症的に認められる所見であるが<sup>8-10)</sup>、通常雌において強く発現することから、本試験における変化は BPA 投与に起因する変化であることが強く示唆された。同様の変化は estrogen<sup>11)</sup> や prostaglandin E1 analogue<sup>12)</sup> によっても誘発され、ホルモンとの関係が強く示唆されていることから、本試験においても BPA 投与によるホルモンの変動が示唆された。

腎の病変はネフロン単位に発現しており、尿細管遠位部の障害を発端に生じた変化と考えられるが、その発生機序については明らかではない。しかし、BPA の用量に依存して発生しており、BPA 投与による毒性変化であることが強く示唆された。

心筋の変化については、炎症性細胞浸潤がほとんどなく、体重増加抑制（体重減少）がみられたことを考え併せると、低栄養状態に起因するものと考えられた。

血液学的検査値の変動は、腎の変化に伴う変動であると推察されるが、類似化合物であるテトラプロモビスフェノール A は *in vitro* の試験で、ミトコンドリアの脱共役作用と溶血作用が認められているが、BPA には溶血作用は認められていない<sup>13)</sup>。しかし BPA による造血系の抑制、溶血性貧血なども考慮すべきであると考えられる。

以上、本試験結果から BPA の主たる毒性標的臓器は腎と考えられ、総合的に解析すると、本試験条

件下における無影響量は 0.2%、すなわち約 550 mg/kg/day と判断された。

## 文 献

- 1) Freeman, K. and Warin, A. P.: Contact dermatitis due to bisphenol A in semisynthetic waxes. *Contact Dermatitis*, **11**, 259~260 (1984)
- 2) National Toxicology Program (NTP): NTP Technical Report on the Carcinogenesis Bioassay of Bisphenol A (CAS No. 80-05-7) in F344 Rats and B6C3F<sub>1</sub> Mice (Feed Study). Technical Report Series No. 215, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Environmental Health, Sciences Research Triangle Park, North Carolina and Bethesda, Maryland (1982)
- 3) Morrissey, R. E., George, J. D., Price C. J., Tyl, R. W., Marr, M. C., and Kimmel, C. A.: The developmental toxicity of bisphenol A in rats and mice. *Fundam. Appl. Toxicol.*, **8**, 571~582 (1987)
- 4) Burek, P. D.: Pathology of aging rats. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 58~70 (1978)
- 5) Scanpini, G., Nava, A., Newman, A. J., Torre, P. D., and Mazue, G.: Multi-nucleated hepatocytes induced by rifabutin in rats. *Toxicol. Pathol.*, **21**, 369~376 (1993)
- 6) Campbell, L. V. and Gilbert, E. F.: Experimental giant-cell transformation in the liver induced by E. coli endotoxin. *Am. J. Pathol.*, **51**, 855~868 (1967)
- 7) Jones, G. and Butier, W. H.: A morphological study of the liver lesion induced by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-diox in rats. *J. Pathol.*, **112**, 93~97 (1974)
- 8) Ward, J. M., Goodman, D. G., Squire, R. A., Chu, K. C., and Linhart, M. S.: Neoplastic and nonneoplastic lesions in aging (C57BL/6N X C3H/HeN) F<sub>1</sub> (B6C3F<sub>1</sub>) mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, **63**, 849~854 (1979)
- 9) Sass, B. and Montali, R. J.: Spontaneous fibroosseous lesions in aging female mice. *Lab. Anim. Sci.*, **30**, 907~909 (1980)
- 10) Albassam, M. A., Wojcinski, Z. W., Barsoum, N. J. and Smith, G. S.: Spontaneous fibroosseous proliferative lesions in the sternums and femura of B6C3F<sub>1</sub> mice. *Vet. Pathol.*, **28**, 381~388 (1991)
- 11) Simmons, D. J.: Collagen formation and endochondral ossification in estrogen treated mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **121**, 1165~

- 1168 (1968)
- 12) Dodd, D. C. and Prort, C. D.: Hyperostosis of the marrow cavity caused by misoprostol in CD-1 strain mice. *Vet. Pathol.*, 24, 545~548 (1987)
- 13) Inoue, B., Katayama, Y., Ishida, T., Ogata, M. and Utsumi, K.: Effects of aromatic bromine compounds on the function of biological membranes. *Toxicol. Appl. pharmacol.*, 48, 467~477 (1979)



薬用植物の補償作用に関する研究  
光合成・蒸散速度からみたケシ葉の補償作用

飯田 修・畠山好雄

Studies on compensation in medicinal plants  
Compensative effects in leaves of *Papaver somniferum* L.  
on photosynthetic and transpiration rates

Osamu Iida and Yoshio Hatakeyama

To investigate compensative effects in leaves of *Papaver somniferum* L., the relation between photosynthetic rate and light density and leaf temperature, and the influences on photosynthetic and transpiration rates of removal of the three upper leaves were examined under field conditions.

The light saturation point in leaves of *P. somniferum* was about  $900 \mu\text{molm}^{-2}\text{sec}^{-1}$  and the photosynthetic rate at the light saturation point was about  $13.5 \mu\text{molm}^{-2}\text{sec}^{-1}$  between 23 and 28°C in leaf temperature. The light compensation point in leaves was nearly  $50 \mu\text{molm}^{-2}\text{sec}^{-1}$ . The influence of leaf temperature on photosynthetic rate was significant, so that the latter showed a remarkable decrease when the leaf temperature was above 30°C.

When the three upper leaves were removed, the photosynthetic and transpiration rates in the 4th leaf tended to increase as compared with control level, although the increases were not significant.

**Keywords** : *Papaver somniferum*, compensative effect, photosynthetic rate, light saturation point, light compensation point

(Received May 31, 1994)

著者らは、植物の生育において、植物体器官の一部が損傷を受けた時、他の器官が機能を補完し得るのではないかとの推測のもと、種実、莖葉および根を生産目的とする各種薬用植物を選定し、植物の補償作用と栽培学的意義について研究を行っている。

植物の補償作用の適例は、欠株と収量の関係に見られ、ある程度の欠株が生じても欠株の周囲の株の生長量が増大し、すなわち周囲株の補償作用により、結果的には収量の減少が見られないことがある。このような観点から今回、ケシの剪葉処理による残存葉の補償作用について検討を行った。

ケシは、その含有するモルヒネ、コデインを主体とするアヘンアルカロイドが鎮痛、鎮静作用を有し、古代から重要な医薬品として用いられてきた<sup>1)</sup>。ケシ植物体からのアヘンの採取は、古くから世界的に未熟果実(さく果)を切傷して行われ、今日に受け継がれてきている<sup>2)</sup>。

さく果からのアヘンの溢出量は気象<sup>3)</sup>・栽培条件および植物体の生長量に大きく関係している<sup>4)</sup>。ま

た、生理的には、体内の膨圧と深く関係していると推察されるが、直接的な証明がなされていない。

そこで、光合成・蒸散作用からケシ植物の生理的活力を捉えることを試みるため、まずはじめに光合成速度と光および温度の関係を検討し、ケシ葉の光合成特性を求め、次に上位葉の剪葉処理による残存葉の光合成・蒸散速度の変化を測定した。

## 材料および方法

### 1. 栽培概要

1992年に北海道薬用植物栽培試験場で採取したケシ *Papaver somniferum* L. 「一貫種」の種子を、1993年5月6日当场圃場に播種した。肥料は複合化成(14-4-14)を10アール当たり100 kg、全量基肥として全層に施用した。栽植距離は条間60 cm、株間20 cm、1株1本植えとした。開花始めは7月6日、開花盛期は7月13日であった。

### 2. 測定機器

光合成・蒸散速度の測定は携帯式光合成・蒸散測

定装置 (SPB-H3 島津) により行い, 同化箱は広葉用 PLC3B (受光面積  $2.5 \times 2.5 = 6.25 \text{ cm}^2$ ) を用いた。

### 3. 測定方法

#### 3.1 光・温度条件

異なる光強度下における光合成速度の測定は, 晴天日の8月4日と6日の午前中に, 圃場条件下で行った。種々の光強度は白色および黒色寒令紗を同化箱の上に適宜重ねて, 入射光量を調節して設定した。各々の測定は主茎葉の上位6枚を用い, 3個体について, 同化箱セット後30秒に行った。同化箱内への外気流量は  $350 \text{ ml/min}$ , 気温および同化箱内温度は成りゆきとし, 葉温は装置内蔵の熱吸収測定法により算出した値を用いた。

#### 3.2 剪葉処理

光合成・蒸散速度の測定は, 晴天日の8月3日から4日にかけて, 主として午前中に圃場条件下で行った。主茎葉最上位から3枚を剪葉処理し, 第4葉の光合成・蒸散速度を処理直前, 処理後10分, 60分および1日に測定した。処理, 無処理ともに生育同程度の株各10個体を供し, 各測定時ともに, 両

者の葉を交互に30秒間同化箱にセットして測定を行い, 測定後は次回の測定まで両者株とも自然状態に放置した。その他の測定条件は3.1と同様とした。

### 結果および考察

#### 1. 光-光合成曲線

ケシ葉における光強度と光合成速度の関係について, 8月4日に得られたすべての測定値を Fig. 1 に示した。測定値は極めて広範囲に分布したが, 同一葉においてはほぼ1本の曲線にのり, 個葉間の変動が大きいことが認められた。

光強度と光合成速度の関係に個葉間の変動とともに葉温の影響が認められたため, 葉温別に光-光合成曲線を求めた (Fig. 2)。最も高い光合成速度を示した葉温  $23.2 \sim 27.6^\circ\text{C}$  における曲線から, ケシ葉の光飽和点は  $900 \mu\text{molm}^{-2}\text{sec}^{-1}$  ( $\mu\text{mol}$ ) ( $47.5 \text{ klux}$  に相当) 前後に見られ, 光飽和点における光合成速度は約  $13.5 \mu\text{molm}^{-2}\text{sec}^{-1}$  ( $\mu\text{mol}$ ) であった。また, 光補償点は  $50 \mu\text{mol}$  前後に見られた。

このことから, ケシ葉における十分な光合成量を調べるためには,  $900 \mu\text{mol}$  以上の光条件を必要と

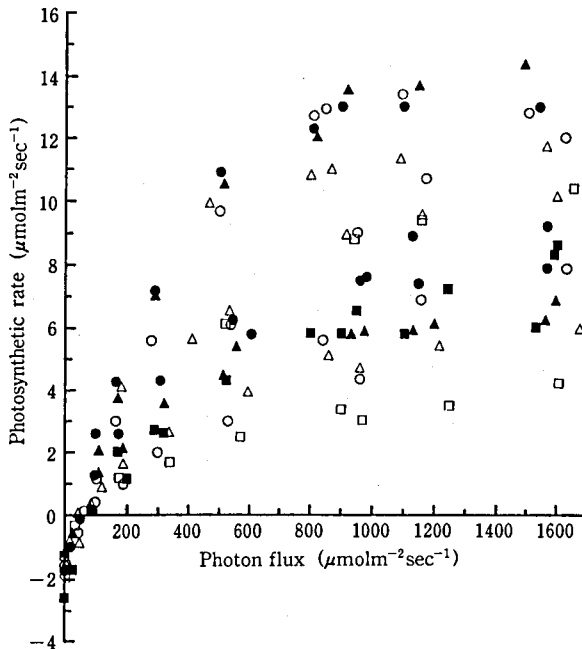


Fig. 1. Relation between photosynthetic photon flux density and photosynthetic rate in leaves of *P. somniferum*. Leaf positions on main stem are numbered from the top.  
○: 1st, △: 2nd, □: 3rd, ●: 4th, ▲: 5th, ■: 6th leaf

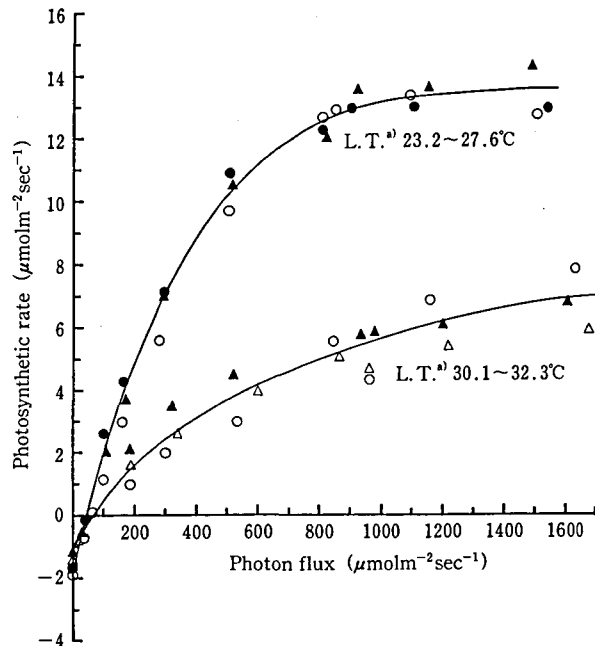


Fig. 2. Light-photosynthesis curves in leaves of *P. somniferum*

Symbols are the same as those in Fig. 1.

a) L. T.: Leaf temperature

することが明らかとなった。

光合成速度は光の強さとともに直線的に増加し、やがて飽和し、光の強さに無関係に一定となる。この時の光の強さを光飽和点と呼び、水稻、テンサイ、ダイズ等多くの作物では30~50 klux (586~947  $\mu\text{mol}$ ) にあり<sup>5)</sup>、ケシ葉の光飽和点もこの範囲にあり、陽性植物としての特性を示した。本実験で用いた光合成測定装置と同一機種による果樹の報告<sup>6)</sup>によると、ケシ葉の光飽和点900  $\mu\text{mol}$  はブドウ「巨峰」と同程度であった。また、リンゴ「ふじ」における光飽和点は1100  $\mu\text{mol}$ 、モモ「大久保」では1000  $\mu\text{mol}$  で、100~200  $\mu\text{mol}$  程度のわずかな差異が植物種あるいは「品種」の特性差を示すものと思われる。

同様に、光補償点は暗中の $\text{CO}_2$ の排出速度と光存在下での $\text{CO}_2$ の取り込み速度が等しくなり、みかけ上光合成速度は0になる光の強さを示しているが、ケシ葉では約50  $\mu\text{mol}$  であり、モモ「大久保」と同程度であったが、この値は陽性植物の平均的な値と一致していた。

光飽和点および光補償点とも、正常な条件下で生育した植物ではほぼ一定の値を示すが、生育環境に

よって異なってくる。光補償点は、通常陰性植物では低く、陽性植物でも光の弱い場所や光の弱い時期に育った葉では低くなる。ケシにおいては、アヘン収穫前の寒冷紗による遮光処理がアヘン収量を減少させるという結果が得られており、その時の光補償点は低下しているものと推察される。

陽性植物であるケシに対する弱光処理がどのような機構により収量の低下を招くのか、さらに、機能回復の可能性について検討するために、光合成量を測定する意義があると思われる。

## 2. 葉温と光合成速度の関係

葉温の違いにより光-光合成曲線が異なり、光合成速度における葉温の影響が大きいため、Fig. 1において光飽和に近い光強度800  $\mu\text{mol}$  以上の測定値を用い、両者の関係を検討した (Fig. 3)。

葉温23~28°C間では光合成速度は10.8~14.3  $\mu\text{mol}$  の範囲でほぼ一定状態にあり、30°Cから33°Cにかけて急激な低下が見られた。

今回、低温域における光合成速度を測定していないため、光合成適温を特定できなかったが、葉温23~28°Cは適温域に含まれると思われる。落葉果樹においても光合成適温は20~30°Cにあり、気温が

30℃を越えると光合成速度が急低下することが報告されている<sup>7)</sup>。また、光合成適温は一般に暖地植物で高く、寒冷地植物で低いことと本実験の結果から、ケシは低温性植物であることがうかがわれた。

同化箱内の気温は太陽光による放射熱および同化箱内ファンモーターの放熱により、外気温より高くなる傾向にあり、とくに本実験では、1枚の葉の同一カ所で連続測定を行ったため、温度の上昇を招いた。ケシの光合成測定時には、30℃を超えない温度域での測定が望ましい。

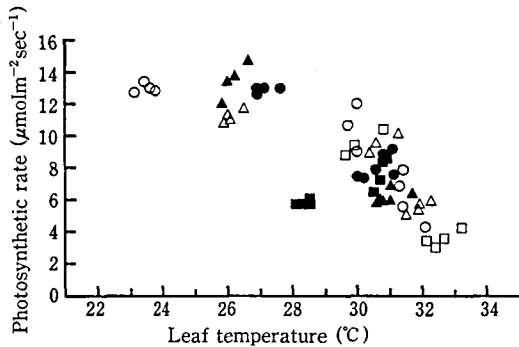


Fig. 3. Relation between leaf temperature and photosynthetic rate in leaves of *P. somniferum* when photosynthetic photon flux density is above  $800 \mu\text{molm}^{-2}\text{sec}^{-1}$ . Symbols are the same as those in Fig. 1.

今後、温度制御下において、低温域を含む気・葉温と光合成速度の関係を検討する必要がある。

### 3. 補償作用

主茎葉最上位3枚を剪葉処理した時の、第4葉における光合成・蒸散速度の変化を Fig. 4 に示した。

第4葉における剪葉前の処理と無処理間の光合成速度の差は  $0.11 \mu\text{mol}$  であったが、処理後10分、60分および1日における両者の差は、それぞれ  $0.46$ ,  $0.68$  および  $0.87 \mu\text{mol}$  となり4~10%処理区が高く、剪葉処理直後から光合成速度が増加することが認められた。蒸散速度は処理後60分に処理区で増加したが、1日後には再び無処理区と同程度となり一時的な現象であった。なお、光合成・蒸散速度における処理、無処理間の差に有意性は認められなかった。

葉の切除による残存葉の光合成速度の増加は、クワにおける報告<sup>8)</sup>が見られ、切除直後から光合成速度は20~80%増加し、35日間継続した。本実験結果における10%程度の増加は、クワに比べ小さかったものの、増加が継続して見られたことから、残存葉の補完機能が働いたと思われる。今後、生長段階を考慮し、長期にわたる測定を行いたい。

クワおよびインゲンマメを用いた研究結果から、切除処理後の残存葉の光合成速度の増加は以下のような生理作用によると推察されている<sup>9)</sup>。すなわち、

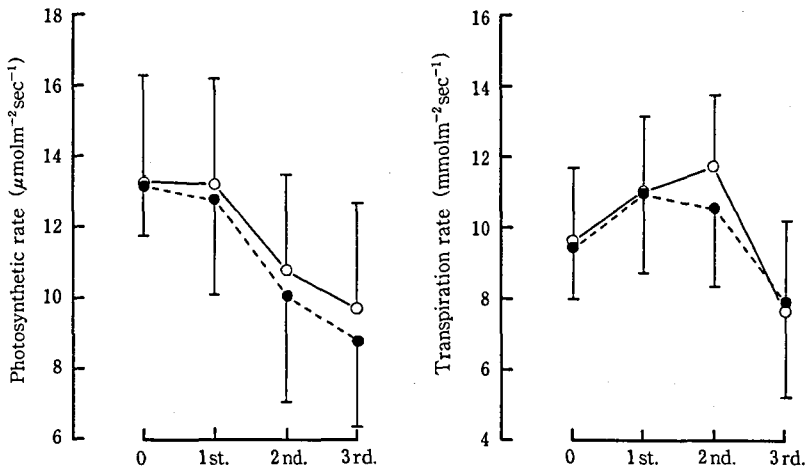


Fig. 4. Changes of photosynthetic rate (left) and transpiration rate (right) in 4th leaf after removing three upper leaves of *P. somniferum*. 0, 1st, 2nd and 3rd indicate before treatment, 10 min., 60 min and 1 day after treatment, respectively. ●: No treatment, ○: Treatment. Vertical bars indicate S. D. (n=10).

植物体内の無機塩類およびホルモン（オーキシン）の葉間の競争がなくなり、残存葉の濃度が高くなるため、さらにシンクソースの関係から、剪葉により一時的にシンクの割合を多くし、そのために残存葉の光合成速度が高くなる。

光合成速度は光強度、温度、湿度、土壤水分等の環境条件や植物体内水分、加齢等の植物条件により瞬時に変化する。これらのことから、処理、無処理ともに時間の経過とともに見られた光合成速度の低下は、60分後では主に気・葉温の上昇により、1日後では、やや高い葉温と測定が午後になったため気孔開度が低下したことによることが、気孔コンダクタンスの測定値から推察された。

光合成量と物質生産は深い関係にあるが、光合成量の高低と収量は生育期間中の何らかの障害により必ずしも結びつかない場合が生じる。これは、光合成量は瞬時の生理機能を示し、収量は長期間にわたる生長の結果を示すため、両者間に時間差があることによると思われる。高い光合成量を維持し、いかに収量に結びつけるかが今後の課題である。

自然条件下における葉の損傷あるいは葉の生理機能の低下を引き起こす要因として、虫害および寡照が想定される。正常な生長量に比べ、損傷を受けた場合の生長量は明らかに減少を示すが、減少の軽減を図ることが栽培技術と考える。そのために、植物の持つ機能回復能力を把握し、植物の補償作用とその栽培学的意義について、今後さらに検討を進めたい。

## 結 論

ケシ葉の補償作用を検討するため、光合成速度と光条件および葉温の関係、ならびに剪葉処理が残存葉の光合成・蒸散速度に及ぼす影響について圃場条件下で試験を行った。

1. 葉温 23~28℃の間において、ケシ葉の光飽

和点は  $900 \mu\text{molm}^{-2}\text{sec}^{-1}$  前後に見られ、光飽和点における光合成速度は約  $13.5 \mu\text{molm}^{-2}\text{sec}^{-1}$  であった。光補償点は  $50 \mu\text{molm}^{-2}\text{sec}^{-1}$  前後に見られた。

2. 光合成速度に与える葉温の影響は大きく、葉温が 30℃を超えると光合成速度の急激な低下が見られた。

3. 主茎最上位3葉を剪葉した時の第4葉の光合成・蒸散速度を測定したところ、前者は増加し、後者もまた一時的な増加を示した。

剪葉処理後の光合成速度の増加がさく果の生長およびアヘン量に及ぼす影響ならびに補償作用の栽培学的意義について、今後さらに検討する予定である。

## 文 献

- 1) 小川鼎三, 柴田承二, 大槻真一郎, 大塚恭男, 岸本良彦, 鷲谷いづみ: デイオスコリアスの薬物誌, pp. 561, エンタプライズ, 東京 (1983)
- 2) Kritikos, P. G. and Papadaki, S. P.: *Bulletin on Narcotics*, XIX, 6 (1967)
- 3) a) 大野忠郎, 木下孝三, 小峰常行: 生薬, 31, 44 (1977); b) 大野忠郎, 木下孝三, 小峰常行: 生薬, 33, 11 (1979); c) 大野忠郎, 木下孝三, 小峰常行: 生薬, 35, 38 (1981); d) 大野忠郎: 生薬, 36, 181 (1982)
- 4) a) 畠山好雄: 生薬, 35, 316 (1981); b) 畠山好雄: 生薬, 35, 321 (1981)
- 5) 戸苅義次監修: 作物の光合成と物質生産, pp. 35, 養賢堂, 東京 (1972)
- 6) 熊代克巳, 塚本卓郎, 阪本祐一: 信州大学農学部紀要, 26, 63 (1990)
- 7) 熊代克巳, 千葉直史, 塚本卓郎: 信州大学農学部紀要, 27, 15 (1990)
- 8) a) 佐藤光政, 間 和夫: 日作紀, 40, 7 (1971); b) 佐藤光政, 大山勝夫: 日作紀, 40, 525 (1971)
- 9) 村田吉男, 玖村敦彦, 石井龍一: 作物の光合成と生態, pp. 80, 農文協, 東京 (1976)

## 輸入牛肉中の有機塩素系および有機リン系農薬の分析

高附 巧・根本 了・松田りえ子・佐々木久美子・斎藤行生

Determination of Organochlorine and Organophosphorus  
Pesticide levels in Imported BeefSatoshi Takatsuki, Satoru Nemoto, Rieko Matsuda,  
Kumiko Sasaki and Yukio Saito

A simple and efficient cleanup method was established for capillary gas chromatographic determination of 12 organochlorine and 11 organophosphorus pesticides in beef. Extracted fat was subjected to silica gel dry column chromatography and further cleaned up by Florisil minicolumn chromatography for organochlorine pesticide analysis, while partitioning between *n*-hexane and acetonitrile of the extract and silica gel minicolumn chromatography were employed for the analysis of organophosphorus pesticides.

Several samples (imported Australian beef) were analyzed by the proposed method. DDT was detected in 14 (0.01~0.10 ppm). BHC was found in 11 (0.003~0.031 ppm) and dieldrin was demonstrated in 2 (0.004 and 0.008 ppm). Heptachlors and the 11 organophosphorus pesticides investigated were not detected in any of the meat samples.

**Keywords** : organochlorine pesticides, organophosphorus pesticides, imported beef, Florisil minicolumn, silica gel minicolumn

(Received May 31, 1994)

現在、わが国では輸入牛肉中の残留農薬基準としてヘプタクロル（ヘプタクロルエポキシサイドを含む）、ディルドリン（アルドリンを含む）および DDT（DDD, DDE を含む）にそれぞれ 0.2, 0.2 および 5.0 ppm の暫定基準が設けられている。これらの分析法は鈴木ら<sup>1)</sup>により検討され、厚生省より衛乳第 42 号<sup>2)</sup>として通知されている。今回、これらの有機塩素系農薬に加え、現在、輸入肉には基準値は設けられてはいないが他の農産物に対し残留基準の設けられている有機塩素系農薬の BHC ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -BHC) および肉について国際基準が設定されている 11 種の有機リン系農薬を対象とし、有機塩素系および有機リン系農薬について一斉分析法を検討した。また、これらの農薬についてオーストラリアからの輸入牛肉の実態調査を行ったので報告する。

## 実 験 方 法

## 1. 試 料

1) 有機塩素系農薬分析用：1993 年 10~11 月に東京と大阪でサンプリングされたオーストラリア産の輸入牛肉 30 検体を測定対象とした。

2) 有機リン系農薬分析用：1994 年 1 月に東京でサンプリングされたオーストラリア産の輸入牛肉 10 検体を測定対象とした。

## 2. 装 置

1) ガスクロマトグラフ：電子捕獲型検出器 (ECD) 付き GC-14A (島津製作所製) および炎光光度型検出器 (FPD) (フィルター：526 nm) 付き GC-9A (島津製作所製)

2) データ処理装置：クロマトパック C-R4A (島津製作所製)

## 3. 試薬・試液

## 3.1 標準品

和光純薬<sup>(株)</sup>または林純薬<sup>(株)</sup>製の農薬標準品を用い

た。

1) 有機塩素系農薬： $\alpha$ -BHC,  $\beta$ -BHC,  $\gamma$ -BHC,  $\delta$ -BHC, Heptachlor, Aldrin, Heptachlorepoxide, *pp'*-DDE, Dieldrin, *pp'*-DDD, *op'*-DDT, *pp'*-DDT

2) 有機リン系農薬：Diazinon, Fenitrothion, Fenthion, Chlorpyrifos,  $\alpha$ -chlorfenvinphos,  $\beta$ -chlorfenvinphos, Methidathion, Fensulfothion, Ethion, Carbophenithion, Phosmet

3) 農薬標準液：上記の各農薬標準品 10.0 mg を 100 ml のメスフラスコにとり、*n*-ヘキサンを加えて 100 ml としたものを原液とし適宜希釈して使用した。

### 3.2 10%含水シリカゲル

Kieselgel 60 Art.7734 (Merck 社製)

シリカゲルを 130°C で一昼夜加熱し、デシケーター中で放冷した後、シリカゲル 90 g に対し蒸留水 10 g の割合で加えたものを密栓してときどき振とうしながら 30 分間放置したものを使用した。

### 3.3 ミニカラム

Sep-Pak Florisil Classic (Original) cartridge (Waters 社製)、および Sep-Pak Silica gel Classic (Original) cartridge (Waters 社製)

その他の試薬は、残留農薬試験用を用いた。

## 4. ガスクロマトグラフ条件

### 1) 有機塩素系農薬分析用

カラム：DB-1 30 m×0.25 mm, 膜厚 0.25  $\mu$ m  
カラム昇温条件：50°C (1 min)–25°C/min–175°C–10°C/min–300°C (4 min) 検出器温度：320°C  
注入口温度：220°C 試料溶液注入方式：スプリットレス (スプリットタイム, 1 min) 試料溶液注入量：1  $\mu$ l キャリヤーガス：ヘリウム (1.17 ml/min) メイクアップガス：窒素ガス (50 ml/min)

### 2) 有機リン系農薬分析用

カラム：DB-5 30 m×0.25 mm, 膜厚 0.25  $\mu$ m  
カラム昇温条件：50°C (1 min)–25°C/min–175°C–8°C/min–300°C (4 min) 検出器温度：280°C  
注入口温度：220°C 試料溶液注入方式：スプリットレス (スプリットタイム, 1 min) 試料溶液注入量：1  $\mu$ l キャリヤーガス：ヘリウム (1.15 ml/min) フレームガス：水素ガスおよび空気 (それぞれ 60 ml/min) メイクアップガス：窒素ガス (50 ml/min)

## 5. 試験溶液調製法

### 5.1 有機塩素系農薬

#### 1) 脂肪の抽出

細切りにした牛肉 50 g に蒸留水 50 ml を加えホモジナイズし、*n*-ヘキサン-アセトン混液 (2:1) 150 ml を加えさらにホモジナイズした後、2500 回転で 5 分間遠心分離し、その上澄液を 300 ml の分液ロートに移した。残った残渣に、*n*-ヘキサン 50 ml を加えホモジナイズした後、再び遠心分離し、その上澄液を分液ロートに合わせた。

この上澄液に蒸留水 80 ml を加えて洗浄し、得られた有機層は、無水硫酸ナトリウムで脱水した後、ひだ付きろ紙でろ過し、減圧下、有機塩素系農薬は 45°C 以下で、有機リン系農薬は 40°C 以下で、*n*-ヘキサンを完全に留去し、脂肪を得た。

#### 2) 精製

シリカゲル 15 g を乾式充填したガラスカラム管 (2.2 cm×30 cm) に、抽出した脂肪 400–500 mg を正確に量り取り、少量のジクロロメタン-石油エーテル (20:80) で 3–4 回洗い込み、洗液も含めて合計 150 ml のジクロロメタン-石油エーテル混液で溶出し、減圧下で溶出液の溶媒を留去した。

あらかじめ 15 ml の *n*-ヘキサンで洗ったフロリジルミニカラムに、少量の 5% エーテル含有 *n*-ヘキサンで上記の残渣を繰り返し洗い込んだ後、洗液も含めて合計 30 ml の 5% エーテル含有 *n*-ヘキサンで溶出した。減圧下で溶出液の溶媒を留去し、残留物を *n*-ヘキサンで 2 ml に溶解して、ガスクロマトグラフィー用試験溶液とした。

### 5.2 有機リン系農薬

#### 1) 脂肪の抽出

有機塩素系農薬の 5.1, 1) に同じ。

#### 2) *n*-ヘキサン-アセトンニトリル分配

抽出した脂肪 1 g を正確に量り取り、*n*-ヘキサン 15 ml に溶解し分液ロートに移す。これを *n*-ヘキサン飽和アセトンニトリル 30 ml で 3 回抽出し、アセトンニトリル層を減圧下で濃縮し溶媒を留去した。

#### 3) 精製

上記の残留物を *n*-ヘキサン 1 ml に溶解し、あらかじめ 15 ml の *n*-ヘキサンで洗ったシリカゲルミニカラムに加え、*n*-ヘキサン 10 ml で洗浄した。ついで 10% アセトン-*n*-ヘキサン混液 10 ml および 20% アセトン-*n*-ヘキサン混液 20 ml で溶出し、各画分の溶媒を減圧下で留去し、それぞれの残留物を *n*-ヘキサンで 1 ml に溶解して、ガスクロマトグラフィー用検液とした。

## 6. 添加回収実験

### 1) 有機塩素系農薬

有機塩素系農薬の検出されなかった牛肉の抽出脂肪 500 mg に、各 0.04 ppm の 12 種類の有機塩素系農薬溶液 1 ml を添加して、上記 5.1, 2) の精製操作を行い回収率を求めた。

### 2) 有機リン系農薬

脂肪 1 g に、各 0.2 ppm の 11 種類の有機リン系農薬溶液 1 ml を添加し、上記 5.2, 2) および 3) の操作を行い回収率を求めた。

## 結果および考察

### 1. 有機塩素系農薬

通知の方法<sup>2)</sup>では、脱脂操作に用いるシリカゲルの調製は 450°C で 3 時間加熱し、水を添加後 12 時間置いてから使用することになっているが、Dieldrin の測定値に大きな変動が生じるとする報告<sup>3)</sup>があるため、130°C で活性化した後、水を添加し 30 分後に使用する方法<sup>3)</sup>を用いた。500 mg の牛脂をシリカゲルカラムに付加したとき、溶出した牛脂の量は 1~23 mg であった。フロリジルミニカラムに 20 mg の油脂を付加したときの油脂の溶出量は 0.7~1.7 mg である<sup>4)</sup>ことから本法によって充分な脱脂効果が得られることがわかった。

牛脂に対する添加回収実験の結果は各農薬で 94%~108% とほぼ良好な結果を得た (Table 1)。以上のことから本法は、牛肉中の BHC 類に対しても

Table 1. Recoveries of organochlorine pesticides from spiked beef tallow

	Recovery(%)	
	Sample 1	Sample 2
$\alpha$ -BHC	95.9	95.0
$\beta$ -BHC	103.5	108.2
$\gamma$ -BHC	107.2	102.4
$\delta$ -BHC	106.2	102.8
Heptachlor	93.7	95.2
Aldrin	101.3	104.7
Heptachlor epoxide	101.4	98.9
<i>pp'</i> -DDE	98.4	108.2
Dieldrin	101.0	102.1
<i>pp'</i> -DDD	106.0	100.2
<i>op'</i> -DDT	100.0	105.8
<i>pp'</i> -DDT	104.9	104.2

Spiked level : 0.08 ppm each pesticides

有効な分析法であることが確認されたので、本法を用いて輸入牛肉中の有機塩素系農薬について分析を行った。

その結果、本法を用いて試験した牛肉 30 検体のうち 14 検体から DDT 類が、11 検体から BHC 類が、2 検体から Dieldrin 類が検出されたが、それぞれ総量で 0.004 ppm~0.10 ppm であり基準値の設定されている DDT 類および Dieldrin 類については基準値の 50 分の 1 以下であった。また、Heptachlor 類は検出されなかった (Table 2)。

*pp'*-DDT については、バックドカラムで測定したとき、試薬ブランクのピークが重なることから通知の方法<sup>2)</sup>では、試薬ブランクを差し引くことにより定量することになっている。そこで *pp'*-DDT が検出された検体につき定量に用いた DB-1 の他に極性の異なる 2 種類のカラム (DB-5 および DB-17) を用いて確認した結果、定量値およびリテンションタイムが一致したのでキャピラリーカラムを用いた場合 *pp'*-DDT の測定値 (検出限界 0.01 ppm) に対し試薬ブランクの影響はないと考えられる。

### 2. 有機リン系農薬

わが国においては、牛肉中の有機リン系農薬の公定分析法は設定されていない。そこで、穀類、豆類等の高脂肪性農作物の分析法に用いられる *n*-ヘキサン-アセトニトリル分配により脱脂操作を行い、さらにシリカゲルミニカラムによる精製を行うこととした。

Table 3 にシリカゲルミニカラムからの回収率を示した。シリカゲルミニカラムからは対象とした 11 種の有機リン系農薬のうち Fensulfothion を除く 10 種は 10% アセトン-*n*-ヘキサン混液の画分に 80~108% が溶出した。Fensulfothion は 20% アセトン-*n*-ヘキサン混液の画分に 69% が溶出した。*n*-ヘキサン洗浄液および 50% アセトン-*n*-ヘキサン混液の画分にはいずれの農薬も溶出しなかった。50% アセトン-*n*-ヘキサン画分に fensulfothion がまったく溶出しなかったことから、操作中に吸着または分解するものと考えられた。

牛脂に対する添加回収実験では各農薬は 81~137% の回収率を得た (Table 4)。 $\alpha$ -chlorfenvinphos および fensulfothion の回収率は 120% を越える結果を得た。これは一般に有機リン系農薬は試料抽出液中のマトリックスの影響を受けてガスクロマトグラフでの感度が上昇することがあるため、共存する牛肉成分の影響によるものと考えられた。また、



Table 2. Contents of organochlorine pesticides in beef (ppm in fat)

Sample Lot. No.	$\alpha$ -BHC	$\beta$ -BHC	$\gamma$ -BHC	$\delta$ -BHC	Hepachlor Aldrin	Hepachlor epoxide	<i>pp'</i> -DDE	Dieldrin	<i>pp'</i> -DDD	<i>op'</i> -DDT	<i>pp'</i> -DDT	Total BHC	Total Hepachlor	Total Dieldrin	Total DDT
Tokyo 1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	ND	0.016	ND	ND	ND	ND	0.01	ND	ND	ND	ND	0.016	ND	ND	0.01
3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.01	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.01
4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.02	ND	ND	ND	0.01	ND	ND	ND	0.03
5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	ND	ND	0.004	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.004	ND	ND	ND
7	ND	0.012	ND	ND	ND	ND	0.01	ND	ND	ND	ND	0.012	ND	ND	0.01
8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.01	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.01
9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.02	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.02
10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
11	ND	0.027	ND	ND	ND	ND	0.02	ND	ND	ND	ND	0.027	ND	ND	0.02
12	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.02	ND	ND	0.02	0.06	ND	ND	ND	0.10
13	ND	ND	0.011	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.05	0.011	ND	ND	0.05
14	ND	0.015	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.02	0.015	ND	ND	0.02
15	ND	0.031	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.031	ND	ND	ND
16	ND	0.011	0.003	ND	0.008	ND	ND	ND	ND	ND	0.06	0.014	ND	0.008	0.06
17	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.01	ND	ND	ND	0.01	ND	ND	ND	0.02
18	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
19	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.02	ND	ND	ND	0.04	ND	ND	ND	0.06
20	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ohsaka 1	ND	ND	0.013	ND	ND	ND	0.01	ND	ND	ND	ND	0.013	ND	ND	0.01
2	ND	0.031	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.031	ND	ND	ND
3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.004	ND	ND	0.02	ND	ND	0.004	0.02
4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
10	ND	0.012	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.012	ND	ND	ND

ND; less than  $\alpha$ -BHC(0.002ppm),  $\beta$ -BHC(0.004ppm),  $\gamma$ -BHC(0.001ppm),  $\delta$ -BHC(0.001ppm), Hepachlor(0.004ppm), Aldrin(0.003ppm), Hepachlor epoxide(0.003ppm), *pp'*-DDE(0.01ppm), Dieldrin(0.004ppm), *pp'*-DDD(0.01ppm), *op'*-DDT(0.01ppm) and *pp'*-DDT(0.01ppm)

Table 3. Recoveries of organophosphorus pesticides from silica gel minicolumn

	<i>n</i> -Hexane	10%A-H	Recovery(%)		Total
			20%A-H	50%A-H	
Diazinon	ND	84.6	ND	ND	84.6
Fenitrothion	ND	98.6	ND	ND	98.6
Fenthion	ND	80.1	ND	ND	80.1
Chlorpyrifos	ND	90.0	ND	ND	90.0
$\alpha$ -chlorfenvinphos	ND	98.3	ND	ND	98.3
$\beta$ -chlorfenvinphos	ND	102.9	ND	ND	102.9
Methodathion	ND	107.6	ND	ND	107.6
Fensulfothion	ND	ND	69.2	ND	69.2
Ethion	ND	107.6	ND	ND	107.6
Carbophenthion	ND	91.4	ND	ND	91.4
Phosmet	ND	103.3	ND	ND	103.3

One ml of standard solution, containing 1  $\mu$  g of each pesticides, was load on the column. A-H: acetone-*n*-hexane, volumn of hexane, 10%A-H and 50%A-H fractions: 10 ml, volume of 20%A-H flaction: 20 ml, ND: less than 0.01 ppm

Table 4. Recoveries of organophosphorus pesticides from spiked beef tallow (n=3)

	Recovery(%)
	Mean $\pm$ S.D.
Diazinon	87.6 $\pm$ 9.6
Fenitrothion	99.0 $\pm$ 10.6
Fenthion	80.8 $\pm$ 10.5
Chlorpyrifos	83.5 $\pm$ 7.6
$\alpha$ -chlorfenvinphos	122.8 $\pm$ 17.3
$\beta$ -chlorfenvinphos	100.3 $\pm$ 16.0
Methodathion	99.9 $\pm$ 11.3
Fensulfothion	136.5 $\pm$ 14.8
Ethion	90.8 $\pm$ 10.9
Carbophenthion	83.2 $\pm$ 9.3
Phosmet	101.5 $\pm$ 10.4

Table 5. Contents of organophosphorus pesticides in beef (ppm in fat)

	Sample Lot. No.									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Diazinon	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Fenitrothion	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Fenthion	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Chlorpyrifos	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
$\alpha$ -chlorfenvinphos	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
$\beta$ -chlorfenvinphos	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Methodathion	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Fensulfothion	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ethion	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Carbophenthion	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Phosmet	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND: less than 0.01 ppm

fensulfotion については、ガスクロマトグラフ測定時のマトリックス効果に加え、シリカゲルミニカラムによるクリアップ操作時においてもマトリックス効果があると考えられる。以上の結果から *n*-ヘキサン-アセトニトリル分配とシリカゲルミニカラムによる精製が牛肉中の有機リン系農薬の分析法として妥当であることが確認できた。ただし、有機リン系農薬が検出された場合は、マトリックス効果を考慮し標準添加法により定量することが望ましいと考えられる。

本法を用いて輸入牛肉中の有機リン系農薬について分析を行い、Table 5 に分析結果を示した。すべての検体で今回の対象農薬は検出限界の 0.01 ppm

以下であった。

## 文 献

- 1) 鈴木 隆, 石坂 孝, 佐々木久美子, 斎藤行生, 福田 裕: 食衛誌, **30**, 48~53 (1989)
- 2) 厚生省生活衛生局乳肉衛生課: DDT 等の残留する輸入食肉の流通防止について, 乳衛 42 号 昭和 62 年 8 月 27 日 (1987)
- 3) Miyahara, M., Murayama, M., Suzuki, T. and Saito, Y.: *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 221~226 (1993)
- 4) 佐々木久美子, 鈴木 隆, 斎藤行生: 食衛誌, **29**, 205~209 (1988)

## ECD ガスクロマトグラフィーによる食品中の総臭素の分析法

松田りえ子・佐々木久美子・斎藤行生

## Determination of total bromine in foods by ECD gas chromatograph

Rieko Matsuda, Kumiko Sasaki and Yukio Saito

A determination method for total bromine that presents in various chemical forms in foods by gas chromatograph with ECD was investigated. Food samples were ashed with KOH at 600°C for 2h and the residue was dissolved in water and filtered. The filtrate was acidified with sulfuric acid, and potassium permanganate solution was added to the solution. The liberated bromine was reacted with cyclopentanone and the product was extracted with hexane and quantified by gas chromatograph with ECD. Recovery of bromine by this method was more than 80% and the detection limit was lower than that of the conventional method. The total bromide in the samples prepared for the total diet study program was quantified by this method and the total intake of bromine was estimated. The total intake of bromine was 8-12 mg and about 20% of ADI (1mg/kg/day).

**Keywords** : bromine, ECD gas chromatography, cyclopentanone

(Received May 31, 1993)

## 緒 言

食品を臭化メチルあるいは臭化エチレン等で燻蒸することにより、臭素が残留する。このような残留臭素の基準値は、果実、穀類等40種余りに設定されており、その値は20~180 ppmである。食品衛生法では臭素の分析法として、穀類にはアルカリを加えて灰化した後中和し、チオ硫酸ナトリウムで滴定する方法が定められている。また、果実では細切した試料を水で抽出した液を灰化し、中和後イオンペークロマトグラフィーで分析する方法が定められている。これらの方法での検出限界は穀類が5 ppm、果実が1 ppmである<sup>1)</sup>。食品衛生法の試験法では、特に穀類の場合は試料溶液の調製が煩雑であり、また、食品によって異なった分析法を用いなければならない。最近になって、果実、穀物等の臭素を灰化し、臭素イオンを酸性下過マンガン酸カリウムで酸化し、生じた臭素とシクロペンタノンの反応生成体を電子捕獲型検出器 (ECD) を用いたガスクロマトグラフィーにより分析する方法が報告された<sup>2)</sup>。そこで、このガスクロマトグラフ法による食品中の臭素の回収率、検出限界等を検討した。また、実試料への応用として、トータルダイエットスタディの保存試料中の臭素を分析し、臭素の1日摂取量を推定

したので報告する。

## 実 験

## 1. 試 薬

臭化カリウム Merck 社製, 99.5%以上。  
p-ブロムフェナシルプロマイド 東京化成工業製, G.R.

水酸化カリウム 和光純薬工業製, 精密分析用

スルファミン酸 和光純薬工業製, 特級

シクロペンタノン Aldrich 社製, 99%以上

ヘキサン 和光純薬工業製, 残留農薬分析用

硫酸 和光純薬工業製, 金属測定用

その他は、試薬特級を使用した。

実験に用いる水はすべて、Milli Q 水を使用した。

## 2. 試 料

1986年および1987年に大阪で調製された後、凍結保存されたトータルダイエットスタディ検体の1群~13群まで(1986年の4群および10群を除く)を分析用試料として用いた。

## 3. 装 置

ECD付きガスクロマトグラフ 島津製作所製 GC-9A

電気炉 池田理化製, MFP-400N

#### 4. 試験溶液の調製

果実試料は細切し、2~5gを精密に量ってニッケル製のつぼにとり、水酸化カリウム2gを加える。穀類試料は粉碎し、2~5gを精密に量ってニッケル製のつぼにとり、水酸化カリウム2gおよび蒸留水5mlを加え1晩放置する。次に、電熱器上で予備灰化する。始めは弱く加熱して水分を蒸発させた後、強く加熱して炭化する。この時、つぼ中の炭化した残留物をガラス棒で砕き、揮発性物質を十分に揮散させる。次に400℃の電気炉に入れ、1時間かけて電気炉の温度を600℃まで上昇させた後、600℃で2時間灰化する。つぼを電気炉から取り出し、内容物が冷える前に水40mlを加えて溶かしろ過する。ろ液に水を加え50mlとしたものを試験溶液とする。

臭素濃度に応じて試験溶液の1~10mlを共栓付き試験管にとり、水を加えて10mlとする。ここに、10%スルファミン酸溶液0.5mlを加え、シクロペンタノン0.05ml、0.1M過マンガン酸カリウム溶液0.5ml、10N硫酸1mlを加えて室温で5分間放置する。ヘキサン10mlを加えて激しく振り混ぜて抽出し、無水硫酸ナトリウムによりヘキサン層を脱水して試験溶液とする。

試料を除いて同様に操作したものを試薬ブランク溶液とする。

#### 5. 標準溶液の調製

臭化カリウム14.89mgを水に溶かし100mlとする。この溶液を臭素100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の標準原液とする。標準原液を水で希釈し、0.01~0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の溶液とする。この溶液10mlをとって、10%スルファミン酸溶液0.5mlを加え、シクロペンタノン0.05ml、0.1M過マンガン酸カリウム溶液0.5ml、10N硫酸1mlを加えて室温で5分間放置する。ヘキサン10mlを加えて激しく振り混ぜて抽出し、ヘキサン層を脱水し標準溶液とする。

#### 6. ガスクロマトグラフ条件

カラム	Ultra Bond 20M, 3mm $\times$ 1.5m
カラム温度	90℃
注入口温度	200℃
キャリアーガス	窒素
キャリアーガス流量	40 ml/min
検出器	ECD
検出器温度	200℃
注入量	2 $\mu\text{l}$

### 結果および考察

#### 1. 灰化条件の検討

穀類として米、果実としてリンゴを用いて、灰化条件を検討した。米は粉碎したものの2g、リンゴはホモジナイズしたものの5gを用いた。灰化時に加えるアルカリとして、水酸化テトラメチルアンモニウム水溶液と水酸化カリウムを比較した。どちらを用いても灰化は完全に行われた。水酸化カリウムは灰化終了後に冷却すると急速に固化するため、速やかに水を加えて溶解する必要があるが、前者はそのような事はなく操作が容易であるという利点があった。しかし、25%水酸化テトラメチルアンモニウム水溶液5mlには臭素が0.5 $\mu\text{g}$ 程度含まれており、試薬ブランクが大きいので、精密分析用水酸化カリウム(臭素0.14 $\mu\text{g}/2\text{g}$ )を使用することとした。

水酸化カリウムの量は1gでは米の灰化が不十分であったが、2gを用いることにより臭素が良好に回収された。

電熱器上での炭化時に試料が塊となると、揮発性物質の揮散が不十分となり、また試料が完全に炭化しない。このような状態で電気炉に入れると、高温で揮発性物質が発火して臭素が揮散し定量値の低下の原因となる。したがって、正確に定量するためには電気炉での灰化前に塊を砕いて均一な粉末とし、ガスを十分に発散させる事が重要であった。

電気炉の温度を500℃とするとやや灰化が不十分であったので、600℃で2時間灰化することとした。

#### 2. ガスクロマトグラフィー条件の検討

臭素とシクロペンタノンの反応生成物は熱に不安定であり、カラム温度を高くするとピーク高さが急速に減少した。このためカラム温度は90℃とした。本条件で臭素とシクロペンタノンの反応物は約2分で流出し、迅速な分析が可能であった。塩化ナトリウムを用いて臭化カリウムと同様に操作すると、保持時間約1.5分にピークを与えるが臭素のピークと完全に分離した。また、ピーク高さは臭素に比較して1/10000程度であり、高濃度の塩化物存在下でも臭素の定量が可能であった。その他の食品由来の成分の妨害は見られなかった。

0.01~0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の臭素標準溶液により作成した検量線は原点を通る直線となり、相関係数は0.9999であった。

#### 3. 添加回収実験

リンゴおよび米を用いて添加回収実験を行った。

Table 1. Recovery of inorganic and organic bromide

sample	weight (g)	spiked conc. (ppm)	recovery (%)	blank (ppm)
inorganic bromide				
rice	2	5	82.2 ± 2.97*	
organic bromide				
apple	5	2.5	94.07 ± 1.91	0.19
rice	2	6.25	88.90 ± 6.34	1.07

\* mean ± SD; n=3

無機臭素として臭化カリウムを用い、米に5 ppm 添加し分析法に従って操作し回収率を求めた。また、有機臭素として $\alpha$ -ブロムフェナシルプロマイドを用い、リンゴには臭素として2.5 ppm 米には6.25 ppm を添加した。結果を Table 1 に示す。回収率はいずれも80%以上であり、良好な結果が得られた。したがって、本方法では無機臭素だけではなく有機臭素を含めた総臭素が定量される。米においてややばらつきが大きいのは、リンゴよりも灰化が難しいことと、試料中に約1 ppm の臭素を含んでいるためサンプリングによるばらつきが大きいと考えられる。

Fig. 1 に臭化カリウムを添加した米およびリンゴと、それぞれのブランクのガスクロマトグラムを示す。臭素とシクロペンタノンの反応生成物は約2分

で流出する。食品由来の妨害もなく、短時間で分析が可能であった。

#### 4. 試薬ブランク

臭素は天然に広く分布しており、使用する試薬等にもわずかに含まれているため、試薬由来の臭素を分析して試薬ブランクとして、定量値を補正する必要がある。本実験で用いた試薬では、試薬由来の臭素は0.14  $\mu\text{g}$  であった。今回は精密分析用の水酸化カリウムを用いているが、特級の水酸化カリウムを用いるとやや高いブランク値が得られた。したがって、高感度に分析するためには、純度の高い試薬を使用することが重要である。

#### 5. 定量下限

実験で用いたECD付きガスクロマトグラフでは、臭素として0.001  $\mu\text{g}/\text{ml}$  程度まで測定可能である

Table 2. Daily intake ( $\mu\text{g}$ ) of bromine assumed from total diet study samples

Group	year		
	1986	1987	
1	rice and its products	98	154
2	wheat, potatoes, and their products	1010	695
3	sugar, biscuits, etc.	185	136
4	fat and oil	—	29
5	beans and their products	1220	1100
6	fruit	147	100
7	vegetables	1873	1682
8	vegetables	638	651
9	condiments and beverage	4880	1568
10	fish and its products	—	679
11	meat and egg	1172	870
12	milk and its products	529	655
13	processed food	26	134
	total	11777	8453

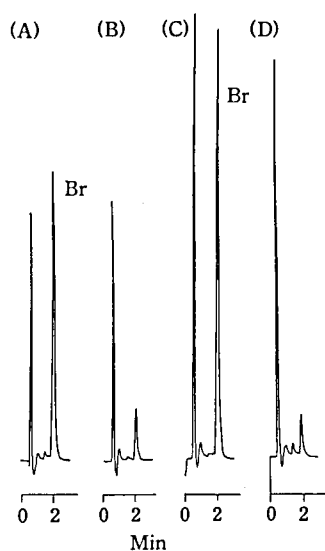


Fig. 1. Gas chromatograms of the bromide  
(A) spiked rice (B) blank rice (C) spiked apple (D) blank apple

が、先に述べたように試薬ブランクが $0.14 \mu\text{g}$ 程度あるので、実際に正確に定量可能な下限は試料中臭素量が $0.5 \mu\text{g}$ 程度である。試料 $5 \text{g}$ を用いるとすれば、定量下限は $0.1 \text{ppm}$ となる。

#### 6. トータルダイエットスタディ試料の分析

試料 $2 \text{g}$ を上記の分析法に従って分析した。1群および6群は臭素含量が小さいため、 $5 \text{g}$ を用いて

分析した。分析結果から、臭素の総摂取量を計算した。

種々の食品の混合物であるトータルダイエットスタディ試料中の臭素を分析したところ、いずれの群でも妨害なく総臭素の定量が可能であった。Table 2に各群からの臭素の摂取量および総摂取量を示す。臭素はすべての群から検出されたが、摂取量として大きいものは、5群(大豆製品)、7群(緑黄色野菜)、9群(嗜好品)であった。臭素は天然に塩素に伴って存在しており、塩分の高い群(5群、9群)では臭素濃度も高い傾向が見られた。臭素のADIは $1 \text{mg/kg/day}$ であり、推定された総摂取量 $8 \sim 12 \text{mg}$ はADIの $1/5$ 程度であった。

ガスクロマトグラフィーによる臭素の定量法は、灰化後の反応が簡便に短時間で行え、クロマトグラフィーによる分析時間も短いので、効率よく分析を行える利点があった。また、広い範囲の食品中の臭素の分析に適用可能であることが示された。さらに、高感度であり食品衛生法に規定された従来法の $1/10$ の濃度が定量可能であった。

#### 文 献

- 1) 食品衛生検査指針追補, 厚生省生活衛生局監修 (1993)
- 2) 三橋, 松下: 第66会食品衛生学会学術講演会要旨集 (1993)

## フモニシン分析による各種蛍光誘導体化 HPLC 法の比較

穂山 浩・宮原 誠・豊田正武・斎藤行生

## Comparison of several fluorescence HPLC methods for fumonisin analysis.

Hiroshi Akiyama, Makoto Miyahara, Masatake Toyoda and Yukio Saito

Fumonisin has no particular chromophore groups in its chemical structure applicable for trace analysis, and therefore requires derivatization prior to measurement. Currently, the analysis of fumonisin B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>), B<sub>2</sub> (FB<sub>2</sub>) is generally carried out after derivatizing FB<sub>1</sub> mainly with *o*-phthalaldehyde to make a fluorescent compound (OPA-F). The OPA-F is, however, not sufficiently stable for precise analysis, and we have thus examined other fluorescent derivatives including fluorescamine, FMOC, NBD-F and DBD-F. The analytical method using FMOC as fluorescent agent required column chromatography after the derivatizing reaction, while reaction of FB<sub>1</sub> with fluorescamine gave two chromatographic peaks. FMOC and fluorescamine are accordingly not desirable as fluorescent agents for analysis of small quantities of FB<sub>1</sub> and FB<sub>2</sub> in foods. In conclusion, for precise analysis of such trace amounts of FB<sub>1</sub> and FB<sub>2</sub>, NBD-F or DBD-F should be used as fluorescent agents.

**Keywords** : fumonisin B<sub>1</sub>, fumonisin B<sub>2</sub>, HPLC, NBD-F, DBD-F

(Received May 31, 1994)

## 緒 言

フモニシンは *Fusarium moniliforme* や *Fusarium proliferatum* などの真菌が産生する有毒代謝物であり、馬の灰白質脳炎<sup>1,2)</sup>、豚の肺浮腫や水胸症の原因とされている<sup>3)</sup>。近年、ラットを用いた実験において発癌プロモーター活性があるという報告<sup>4)</sup>や、とうもろこし等の食料や家畜の飼料に幅広く汚染が確認されており<sup>5)</sup>、人間の食生活への影響も危惧されている。

フモニシンの微量分析法において、化学構造上吸収の強い官能基を持っていないために、測定前に誘導体化が必要である (Fig. 1)。一般に、オルトフタルアルデヒド (OPA) を蛍光試薬とするプレラベル HPLC 法<sup>6)</sup>が用いられているが、OPA 誘導体化フモニシンは不安定であり、多数試料の場合にはオートサンブラを用いることができず、労力を要する問題点があった。近年、フルオレスカミン<sup>7)</sup>、9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC)<sup>8)</sup>、4-fluoro-7-nitrobenzofurazan (NBD-F)<sup>9)</sup> などの蛍光誘導体試薬による蛍光誘導体化が試みられているが、食品

試料への応用面において、クロマトグラム上における夾雑物との分離の悪さや食品からの低回収率などの問題点があり、一般的な方法には成り得ていない。

そこで著者らは、汚染の多いことが報告されている<sup>10)</sup> とうもろこしを試料として用い、食品試料への応用と多数試料の分析に適した方法の確立を目的とし、フルオレスカミン、FMOC、NBD-F、4-(N,N-dimethylaminosulphonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole (DBD-F) について、フモニシン分析への適用性を比較検討した。

## 実験方法

## 1. 試料

とうもろこし試料は、日本穀物検定協会から供与されたものを、とうもろこし加工食品は市販されているものを用いた。

## 2. 試薬および試液

フルオレスカミン、FMOC : Sigma 社製

NBD-F、DBD-F : 東京化成工業(株)製

フモニシン B<sub>1</sub>、フモニシン B<sub>2</sub> : Sigma 社製

アセトニトリル、メタノール、*n*-ペンタン : 和



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
FA <sub>1</sub>	OH	OH	CH <sub>3</sub> CO
FA <sub>2</sub>	H	OH	CH <sub>3</sub> CO
FB <sub>1</sub>	OH	OH	H
FB <sub>2</sub>	H	OH	H
FB <sub>3</sub>	OH	H	H

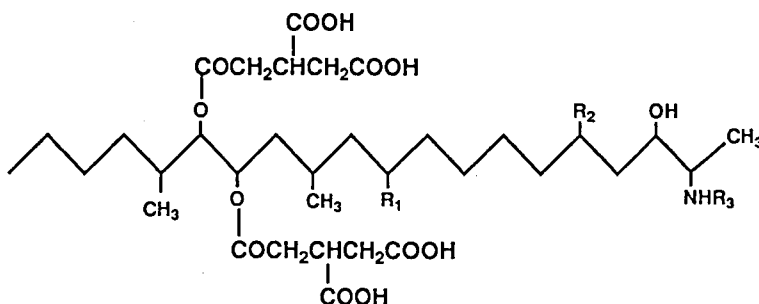


Fig. 1. Structures of fumonisins

光純薬工業㈱液体クロマトグラフ用

酢酸, クエン酸, ほう酸: 和光純薬㈱試薬特級  
Bond Elut SAX カートリッジ: Varian 社製を用い, あらかじめメタノール 5 ml およびメタノール-水 (3:1) 5 ml で順次洗浄した。

### 3. 装置および器具

インテリジェント HPLC ポンプ 880-PU: 日本分光㈱製

蛍光検出器 F-1080 型: 日立製作所㈱製

オートサンプラ-SIL-9A 型, クロマトパック C-R5A 型: 日立製作所㈱製

カラムオープン CO-8010 型: 東ソー㈱製

### 4. 試料溶液の調整法

とうもろこし試料 10 g を採り, メタノール-水 (3:1) を 50 ml 加えて 5 分間振とう, 抽出後, ろ過し, ろ液 10 ml を BondElut SAX カートリッジに通した。次にメタノール-水 (3:1) 8 ml, メタノール 3 ml で順次洗浄後, 1% 酢酸-メタノール溶液 10 ml で溶出し, 溶出液は減圧濃縮した。その残渣をメタノールまたは緩衝液 200 μl に溶解した後, 蛍光誘導体化反応を行い, 各種 HPLC 法で分析した。

### 5. 各種蛍光試薬による誘導体化条件および HPLC 法

#### 5.1. フルオレスカミン誘導体化 HPLC 法

##### 5.1.1 誘導体化法

Sydenham らの方法<sup>7)</sup>を改良して用いた。すなわち試料溶液 50 μl に 0.05 M 炭酸水素ナトリウム 200 μl を加え, 混和しながら 20 mg のフルオレスカミンをアセトン 1 ml に溶解した溶液を 50 μl 加え 1 分間さらに混和した。その後, 9000 xg で遠心後, その上清を HPLC に注入した。

##### 5.1.2 HPLC 条件

カラム: Inertsil ODS-2 (4.6 mm i.d.×250 mm)

移動相流速: 0.8 ml/min

移動相: 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.0)-アセトニトリル (1:1 V/V)

検出波長: Ex. 390 nm, Em. 475 nm

### 5.2. Fmoc 誘導体化 HPLC 法

#### 5.2.1 誘導体化条件

Holcomb らの方法<sup>9)</sup>を改良して用いた。すなわち試料溶液 100 μl に蒸留水 200 μl, メタノール 100 μl, 1 M ホウ酸緩衝液 (pH 7.5) 100 μl を加え, さらに Fmoc 3 mg をアセトニトリル 1 ml に溶解した溶液を 100 μl 加え混和し, 30 秒間放置した後, 過剰の試薬を除くために *n*-ペンタンで 2 回洗い, その上清 (50 μl) を HPLC で分析した。

#### 5.2.2 HPLC 条件

カラム: Inertsil ODS-2 (4.6 mm i.d.×250 mm)

カラム温度: 45°C

移動相流速: 0.7 ml/min.

移動相組成: A 液, クエン酸緩衝液 (pH 4.7)-

アセトニトリル (1:1 V/V)

B液, クエン酸緩衝液 (pH 4.7)-  
アセトニトリル (7:3 V/V)

クエン酸緩衝液: 15 mM クエン酸と 10 mM tetrabutylammonium phosphate をその濃度になるように水に溶解し, 5 M 水酸化ナトリウム溶液で pH 4.7 に調製した。

濃度勾配プログラム

B液 0% (0~5 min)

B液 0~100% (5~25 min Linear)

B液 100% (25~30 min)

検出波長: Ex. 263 nm, Em 313 nm

### 5.3. NBD-F 誘導体化 HPLC 法

#### 5.3.1 誘導体化条件

Scott らの方法<sup>9)</sup>を改良して用いた。すなわち試料溶液 50  $\mu$ l に 0.1 M ほう酸緩衝液 (pH 8.7) 100  $\mu$ l と 50 mM NBD-F 溶液 (エタノール溶液) 100  $\mu$ l を加えた後, 1 分間, 60°C でインキュベートし, 冷却後, HPLC 注入した。

#### 5.3.2 HPLC 条件

カラム: TSKgel ODS-80Ts (4.6 mm i.d.  $\times$  150 mm)

カラム温度: 45°C

移動相流速: 0.8 ml/min.

移動相組成: A 液, 0.05 M リン酸二水素ナトリウム (pH 5.0)-メタノール (1:1 V/V)

B 液, アセトニトリル (8:2 V/V)

濃度勾配プログラム

B液 0~15% (0~6 min Linear)

B液 15~90% (6~17 min Linear)

B液 90% (17~25 min)

B液 0% (25~35 min)

検出波長: Ex. 475 nm, Em 545 nm

### 5.4. DBD-F 誘導体化 HPLC 法

#### 5.4.1 誘導体化条件

試料溶液 50  $\mu$ l に 1 mM EDTA を含んだ 0.1 M ほう酸緩衝液 (pH 9.3) 100  $\mu$ l と 20 mM DBD-F 溶液 (アセトニトリル溶液) 100  $\mu$ l を加えた後, 60 分間, 60°C でインキュベートし, 冷却後, HPLC に注入した。

#### 5.4.2 HPLC 条件

カラム: TSKgel ODS-80Ts (4.6 mm i.d.  $\times$  150 mm)

カラム温度: 45°C

移動相流速: 0.8 ml/min.

移動相組成: A 液, 0.05 M リン酸二水素ナトリウム (pH 5.0)-メタノール (1:1 V/V)

B 液, アセトニトリル:水 (7.5:2.5 V/V)

濃度勾配プログラム 5.3.2 に同じ

検出波長: Ex. 450 nm, Em 590 nm

## 結果および考察

### 1. フルオレスカミン誘導体化 HPLC 法

フモニシン B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) 標準品フルオレスカミン誘導体の HPLC クロマトグラムを Fig. 2A, B に示した。カラム温度 30°C においては, ピークがわかれてしまう傾向を示したが, カラム温度を 50°C にすると一つのピークにまとまる傾向を示した。このことから互変異性体が形成されている可能性が示唆された。蛍光誘導体化物の安定性は約 20 時間であった。Fig. 2C にコーン試料に FB<sub>1</sub> を添加した試料について分析したクロマトグラムを示した。夾雑物との分離にやや問題点があるが, FB<sub>1</sub> の定性分析は可能であると思われた。定量下限は 50 ppb であった。フモニシン B<sub>2</sub> (FB<sub>2</sub>) に関しては良好な結果が得られなかった。

### 2. FMOC 誘導体化 HPLC 法

FMOC をラベル化剤として用いる方法は既に Holcomb により報告<sup>8)</sup>されているが, グラジェント溶離法に若干の改良を加え測定を行った。Fig. 3 に FMOC 誘導体化 FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub> の標準溶液のクロマトグラムと, とうもろこしに FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub> を添加した試料について分析したクロマトグラムを示す。標準溶液では FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub> が感度よく良好に分離分析ができ, 誘導体化の安定性も 4°C, 暗所で 2 日間安定であった。しかし, とうもろこし試料について分析を行うと, 非常に夾雑ピークが多く, 微量分析の際に定量が困難であり, さらなる精製かあるいは HPLC 条件の改良が必要であると思われた。

### 3. NBD-F 誘導体化 HPLC 法

NBD-F をラベル化剤として用いた方法は既に Scott らの報告<sup>9)</sup>があるが, とうもろこし試料の分析において, クロマトグラム上における夾雑物との分離にやや難があった。そこで Scott らの方法ではステップワイズ溶離法を用いているが, グラジェント溶離法に改良することにより夾雑物との分離も向上した。Fig. 4 に NBD-F 誘導体化 FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub> の標

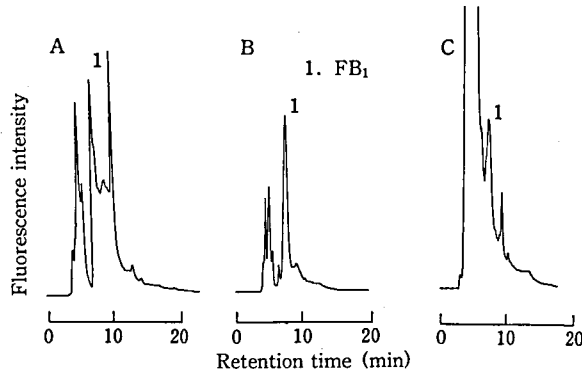


Fig. 2. Typical chromatograms of standard FB<sub>1</sub> and extract of corn spiked with 0.5 µg/g of FB<sub>1</sub> after derivatization with fluorescamine

- A: the fluorescamine derivatization of standard FB<sub>1</sub> (column temperature 30°C)
- B: the fluorescamine derivatization of standard FB<sub>1</sub> (column temperature 50°C)
- C: the extract of corn spiked with 0.5 µg/g of FB<sub>1</sub> after derivatization with fluorescamine

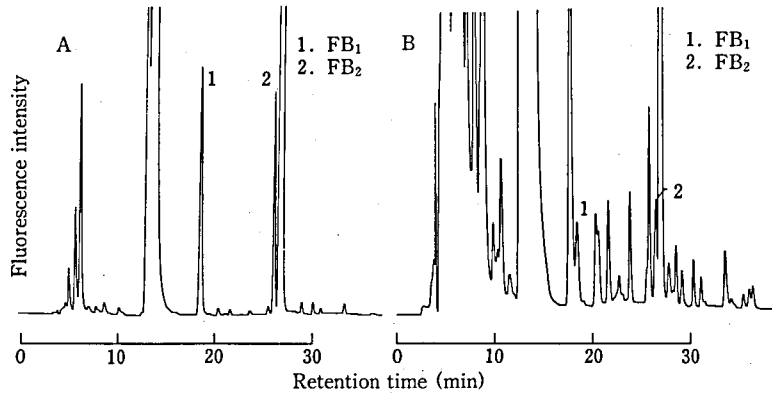


Fig. 3. Typical chromatograms of standard fumonisins and extract of corn spiked with 0.5 µg/g of fumonisins after derivatization with FMOC

- A: the FMOC derivatization of standard fumonisins
- B: the extract of corn spiked with 0.5 µg/g of fumonisins after derivatization with FMOC

準溶液のクロマトグラムとFB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub>をとうもろこしに添加した試料のクロマトグラムを示した。標準溶液では22分以内にFB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub>が感度よく良好に分離分析ができ、誘導体化物の安定性は4°C、暗所で約30時間であった。とうもろこし試料の分析においても夾雑物の影響がほとんどなく分析が可能であった。

0.5 ppm 添加した場合の回収率はFB<sub>1</sub>が88%、FB<sub>2</sub>が85%で、検出限界は10 ppbであり、感度もOPAとほぼ同等で高感度に分析が可能であった。

#### 4. DBD-F 誘導体化 HPLC 法

Fig. 5にDBD-F誘導体化FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub>の標準溶液のクロマトグラムととうもろこしにFB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub>を添加した試料のクロマトグラムを示した。標準溶液

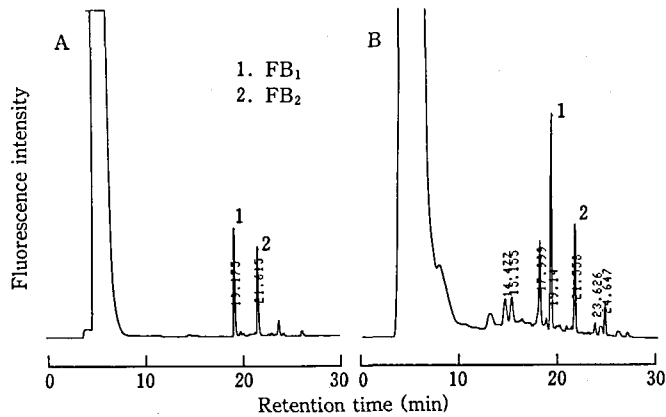


Fig. 4. Typical chromatograms of standard fumonisins and extract of corn spiked with  $0.5 \mu\text{g/g}$  of fumonisins after derivatization with NBD-F

A: the NBD-F derivatization of standard fumonisins  
 B: the extract of corn spiked with  $0.5 \mu\text{g/g}$  of fumonisins after derivatization with NBD-F

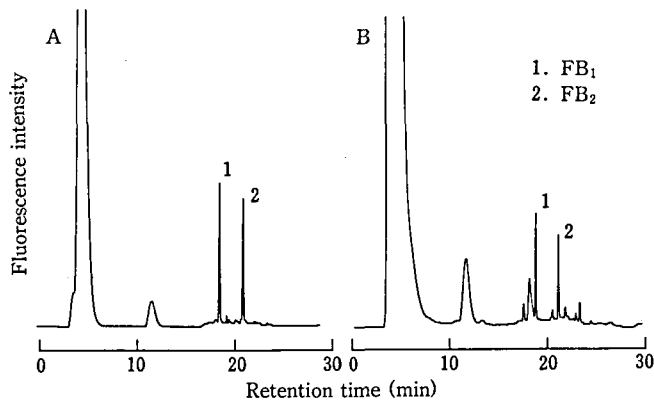


Fig. 5. Typical chromatograms of standard fumonisins and extract of corn spiked with  $0.5 \mu\text{g/g}$  of fumonisins after derivatization with DBD-F

A: the DBD-F derivatization of standard fumonisins  
 B: the extract of corn spiked with  $0.5 \mu\text{g/g}$  of fumonisins after derivatization with DBD-F

ではNBD-F同様にFB<sub>1</sub>、FB<sub>2</sub>が感度よく良好に分離分析が可能で、誘導体化物の安定性は4℃、暗所で約1週間は安定であった。添加試料の分析においても夾雑物の影響がほとんどなく分析が可能であった。0.5 ppm添加した場合の回収率はFB<sub>1</sub>が85%、FB<sub>2</sub>が86%と良好な回収率が得られた。検出限界は10 ppbで感度もOPA、NBD-Fとほぼ同等で分析が可能であった。DBD-F法は、NBD-F法と比べ、誘導体化に時間を要するが、誘導体化物が

安定であるほか、クロマトグラム上における試薬由来であると思われる unknown peakが減少した。

##### 5. とうもろこしおよびとうもろこし製品への応用

安定性が最も良好であったDBD-Fを用いた分析法によりとうもろこし試料と市販されているとうもろこし製品の分析に応用した (Table 1)。その結果からとうもろこし試料からFB<sub>1</sub>が0.028 ppmから0.227 ppm、FB<sub>2</sub>が0.013 ppmから0.080 ppm

Table 1. Determination of FB<sub>1</sub> and FB<sub>2</sub> in corn samples

Sample	FB <sub>1</sub> (μg/g)	FB <sub>2</sub> (μg/g)
Corn A	0.034	0.013
Corn B	0.045	0.018
Corn C	0.028	0.015
Corn D	0.090	0.025
Corn E	0.073	0.018
Corn F	0.068	0.019
Corn G	0.034	0.016
Corn H	0.227	0.080
Corn flour	0.560	0.310
Corn grits	0.089	0.030
Corn meal	N. D.	N. D.

(N.D.<10 ppb)

の範囲で検出された。とうもろこし製品では、コーンフラワーでFB<sub>1</sub>が0.560 ppm, FB<sub>2</sub>が0.310 ppmと調査試料の中では、一番高い値が検出された。

ま と め

フモニシンの多数試料の分析に適した方法の確立を目的にプレラベル蛍光試薬としてフルオレスカミン, FMOC, NBD-F, DBD-Fについて比較検討した結果を Table 2 にまとめた。フルオレスカミンは互変異性体の形成が示唆され、定性分析は可能だが定量分析には適していないと思われた。また FMOC 誘導体化法は感度面, 安定面でも良好だが、従来の試料の前処理法では夾雑物の妨害が多く、更なる精製が必要であると思われた。NBD-F, DBD-F 法は HPLC においてグラジエント溶出が必要であるが、とうもろこし試料の応用において夾雑物の

影響がほとんどなく、分析が可能であった。また、誘導体化物の安定面でも 4℃, 暗所で NBD-F が約 30 時間, DBD-F が約 1 週間安定であり、オートサンプラーの使用が可能となるため、多数試料の分析に適している。

文 献

- 1) Wilson, T. M., Ross, P. F., Owens, D. L., Rice, L. G., Green, S. A., Jenkins, S. J. and Nelson, H. A.: *Mycopathologia*, **117**, 115~120 (1992)
- 2) Kellerman, T. S., Marasa, T. F. O., Thiel, P. G., Gelderblom, W. C. A., Cawood, M. and Coetzer, J. A. W.: *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **57**, 269~275 (1990)
- 3) Harrison, L. R., Colvin, B. M., Greene, J. T., Newman, L. E. and Cole, J. R.: *J. Lab. Diagn. Invest.*, **2**, 217~221 (1990)
- 4) Gerderblom, W. C. A., Jasiewicz, K., Marasas, W. F. O., Thiel, P. G., Horak, R. M., Vleggaar, R. and Kriek, N. P.: *J. Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 1806~1811 (1988)
- 5) Hopmans, E. C. and Murphy, P. A.: *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 1655~1658 (1993)
- 6) Shephard, G. S., Sydenham, E. W., Thiel, P. G. and Gelderblom, W. C. A.: *J. Liq. Chromatogr.*, **13**, 2077~2087 (1990)
- 7) Sydenham, E. W., Gelderblom, W. C. A., Thiel, P. G. and Marasas, W. F. O.: *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 285~290 (1990)
- 8) Holcomb, M., Thompson, H. C. and Hankins, L. J.: *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 764~767 (1993)
- 9) Scoot P. M. and Lawrence G. A.: *Journal of AOAC International*, **75**, 829~834 (1992)
- 10) Scoot. P. M.: *International Journal of Food Microbiology*, **18**, 257~270 (1993)

Table 2. Comparison of five analytical methods for FB<sub>1</sub> and FB<sub>2</sub>

	Elution	LOD	Stability	Reaction
OPA	isocratic	10 ng/g	4~5 min.	1 min
Fluorescamine	isocratic	50 ng/g	ab. 20 hr.	1 min
FMOC	gradient	1 ng/ml (standard)	ab. 72~96hr.	1 min.
NBD-F	gradient	10 ng/g	ab. 30 hr.	1 min.
DBD-F	gradient	10 ng/g	ab. 168 hr.	60 min.

## Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry (LSIMS) による 化学合成ペプチドの分析

矢上 健・佐藤道夫・中村晃忠

### Analysis of Chemically Synthesized Peptides by Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry (LSIMS)

Takeshi Yagami, Michio Sato and Akitada Nakamura

Liquid secondary ion mass spectrometry (LSIMS) was proven to have advantage for analysis of chemically synthesized peptides. The molecular weights of large peptides were determined accurately, without difficulty in spite of only small sample quantities (50 pmol~10 nmol). This approach was also useful in comparing actual isotopic cluster-distribution of protonated molecular-ion with that derived theoretically for ascertaining peptide integrity. Sometimes LSIMS spectra showed abundant fragment ions from which partial peptide sequences were determinable and unexpected synthetic product could be easily identified from informative fragment ions in LSIMS spectra. The analytical procedure combining LSIMS and high performance liquid chromatography (HPLC) was very beneficial for detecting impurities having slight structural differences. Moreover, LSIMS proved excellent for use in analysis of tyrosine-*O*-sulfate [Tyr(SO<sub>3</sub>H)] containing peptides. Constant neutral loss (80 amu) spectra, measured in view of the specific fragmentation (-SO<sub>3</sub>), showed the complete sequence of a Tyr(SO<sub>3</sub>H) containing peptide. These results document the usefulness of LSIMS for analysis of peptide samples where difficulty is encountered in evaluation by traditional analytical methods.

**Keywords** : LSIMS, peptide, fragmentation, tyrosine-*O*-sulfate, constant neutral loss

(Received May 31, 1994)

### はじめに

近年、生理活性ペプチドの作用・機能についての研究あるいはペプチドをツールとした蛋白質機能解明の試み、ペプチド性医薬品の開発研究や抗原決定基の究明など、医学・生物化学の分野で化学合成ペプチドが広く用いられるようになった。このような状況は、R. B. Merrifield による固相ペプチド合成法の開発 (1963 年) と近年の固相合成法の進歩によりもたらされたものであると考えられる。従来の液相法によるペプチド合成が卓越した技術と長い経験および高度な有機化学的知識を必要としたのに対し、固相法による合成は専門的な知識と経験を必要とせず、全く有機合成の経験がない医学・生物学者でも自らの手で目的とするペプチドを短期間で合成することが可能である。現在では、様々な全自動

合成装置が市販されており、dollars in→peptide out (vending machine) といった感がある。

しかし、固相合成法には合成中間体の精製・構造確認ができないという本質的な問題点があり、合成したペプチドが目的物と異なる構造体であったり不純物を含んでいたりする場合が少なからずある。特に注意すべきは、通常の固相合成法では C-末端から N-末端へペプチド鎖を一アミノ酸残基ずつ延長させる段階的伸長法が採られるため合成途上でアミノ酸が一残基欠落してしまったような欠損ペプチドが生じやすい、という点である。たとえば、固相合成における各アミノ酸残基の縮合率が一律に 97% であったとすると、アミノ酸 31 残基からなるペプチドの収率は単純計算で  $(97\%)^{30} = 40\%$  でしかない。そして、残りの 60% をしめる欠損ペプチドと目的ペプチドとの物理化学的な差異は微少である場

合が多く、簡単な分析では構造を厳密に確認できなかつたり不純物の存在を検出できないことがある。Association of Biomolecular Resource Facilities (ABRF) が1991年にアメリカで行った調査によると、詳細に検査した合成ペプチドの17%が目的物とは異なる構造体であり、また、75%以上の純度を有する検体は粗精製品で28%、精製品で65%でしかなかった<sup>2)</sup>。このような状況を鑑みると、化学合成ペプチドを利用した研究データに信頼性を持たせるためにも、その精製・構造確認には細心の注意を払わなければならない。

合成ペプチドの純度・構造確認には従来各種クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography: HPLC, fast protein liquid chromatography: FPLC, thin layer chromatography: TLC など) やキャピラリー電気泳動, NMR, アミノ酸分析, アミノ酸配列分析, 元素分析, 質量分析, ペプチドマッピングなどが用いられてきた。特に質量分析は、液体マトリックスを使用する二次イオン質量分析法 (liquid secondary ion mass spectrometry: LSIMS) の出現により極性高分子にも適用可能となり、非常に有力な分析法として発展しつつある<sup>3-5)</sup>。さらに、HPLCとLSIMSを組み合わせた分析法は双方の利点を生かす形となり、迅速で高感度な分析法としてその実用性が期待されている。なお、一次ビームにイオンを用いるLSIMSに対して一次ビームに高速中性原子を用いる粒子衝撃イオン化質量分析法はfast atom bombardment mass spectrometry (FABMS) と呼ばれるが、LSIMSとFABMSがほとんど同一のスペクトルを与えるため両者は明確には区別されていない。

本報では、固相法により化学合成した高質量ペプチド、修飾アミノ酸を含むペプチドさらには欠陥構造部位を含むペプチドなど、従来法では分析が困難な化学合成ペプチドをLSIMSで分析した例について紹介する。

### 測定方法とデータ処理

LSIMSは二重収束質量分析計VG ZAB-2SEQとVG 11-250Jデータシステム(いずれもVG Analytical社製)を組み合わせて行った。ペプチド試料は特に記さない限りtrifluoroacetic acid (TFA)を0.1%含むH<sub>2</sub>O-CH<sub>3</sub>CN (1:1)に約2μg/μlの濃度になるように溶解させた。一回の測定には1~10μgのペプチドを使用し、ターゲット上で約2μlの

マトリックスと混合して測定に供した。マトリックスとしてはglycerol (G), thioglycerol (TG), 3-nitrobenzyl alcohol (NBA)を単独または組み合わせ用い、適宜TFAまたは10-camphorsulfonic acid (CSA)<sup>6)</sup>を添加した。質量分析計におけるイオン加速電圧は8kVに設定し、一次ビームには約22keVのCs<sup>+</sup>を使用した。通常の広質量域測定 (survey scan) は、磁場を変化させることによるexponential down scanningにより行った。このとき質量分析計の分解能は約1000に設定し、一回のスキャンが約18秒になるようスキャン速度を調節した。高分解能測定は、測定対象である疑似分子イオンの同位体ピークが明確に分離できるような分解能で行った。いずれの測定法においても、3~5スキャンをデータシステムのmulti-channel analyzer (MCA)に取り込んで積算した後、スムージングとピーク検出を行いMCA profile dataをラインスペクトルに変換した。マトリックスに由来するバックグラウンドの補正は行わなかった。質量校正はヨウ化セシウムのクラスターイオンを外部標準にして行った。一連のデータ取り込みと処理に要した時間は、一サンプル当たりおよそ15分であった。constant neutral loss spectrumは、第一自由飛行空間(1st. FFR)でヘリウムをcollision gasに用いてcollisionally activated dissociation (CAD)を起こさせるとともに(B/E)<sup>2</sup>·(E<sub>0</sub>-E)=constantのlinked scanを行うことにより測定した。ペプチドフラグメントイオンはRoepstorffとFohlmanの命名法<sup>7)</sup>にしたがって示した。また、ペプチドの疑似分子イオンの質量計算値は、同位体ピークが分離していない条件ではaverage mass (chemical mass)で、同位体ピークが分離している条件ではmonoisotopic massで計算した。

### 測定結果と考察

#### 1. 高質量ペプチドの分子量の測定

Fig. 1aにヒト2型ステロイド還元酵素の部分アミノ酸配列に相当する化学合成ペプチドのLSIMSスペクトル (survey scan)を示す。マトリックスにはG-TG (1:1)にTFAを1%添加したものをを用いた。(M+H)<sup>+</sup>および(M+2H)<sup>2+</sup>が明確に検出されており、測定質量も計算値 (average mass)によく一致している。Fig. 1bには約2500の分解能で(M+H)<sup>+</sup>付近を測定した結果のprofile dataを示す。プロトン付加分子イオンピークを構成する同

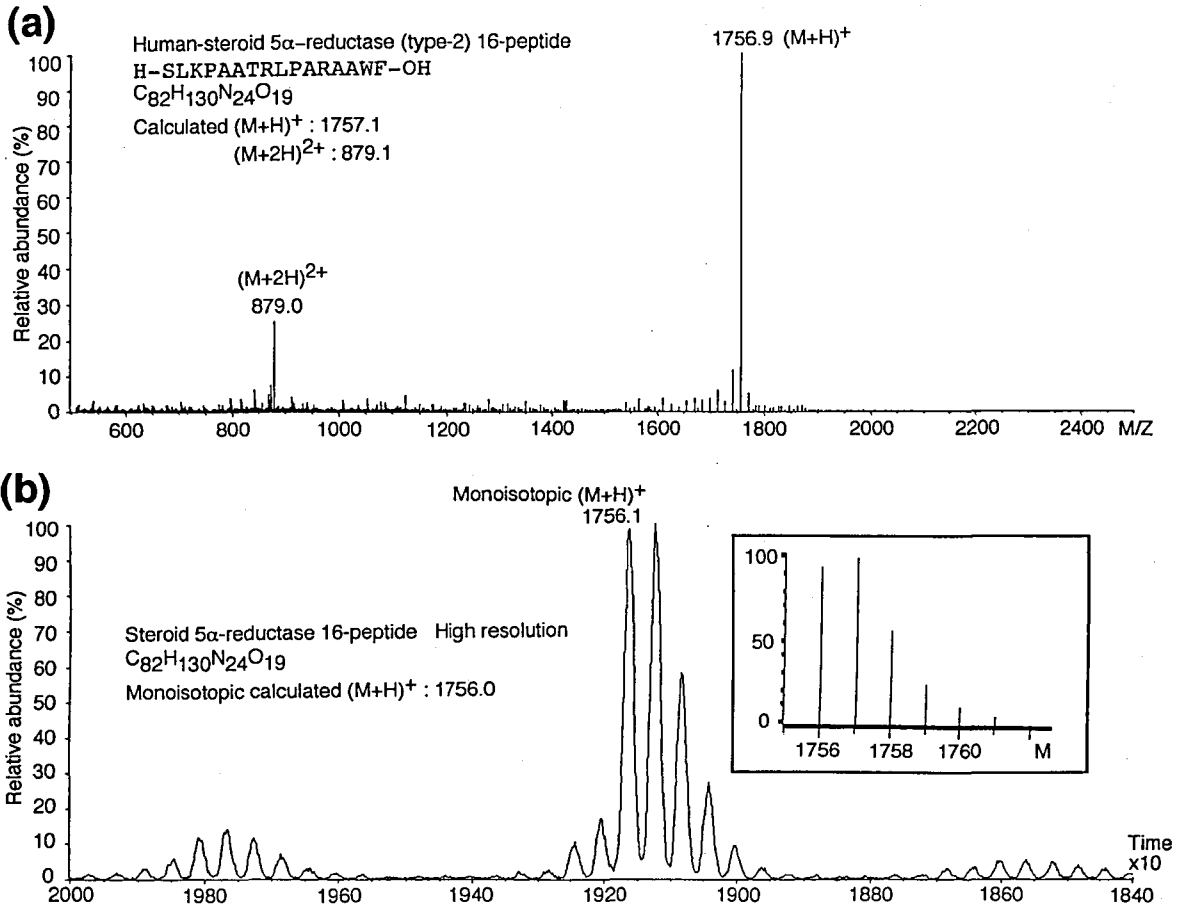


Fig. 1. LSIMS spectra of human-steroid 5 $\alpha$ -reductase (type-2) 16-peptide

(a) Survey mass spectrum recorded at resolution 1000.

(b) Monoisotopic mass measurement of the molecular region at resolution 2500.

Inset: Theoretical isotopic cluster distribution calculated for C<sub>82</sub>H<sub>131</sub>N<sub>24</sub>O<sub>19</sub>.

位体クラスターの分布は理論同位体分布 (挿入図) によく一致しており、また検出された monoisotopic mass も計算値に一致している。Fig. 2a は位置選択的ジスルフィド結合形成法<sup>8-10)</sup>で化学合成したヒト insulin の LSIMS スペクトルである。マトリックスには TFA を 1% 添加した NBA を使用した。(M+H)<sup>+</sup>、(M+2H)<sup>2+</sup> および (M+3H)<sup>3+</sup> が検出され、それらの測定質量も計算値によく一致している。約 6000 の分解能で (M+H)<sup>+</sup> 付近を測定した結果 (Fig. 2b) においても、プロトン付加分子イオンピークの同位体クラスター分布は理論同位体分布に一致している。このような結果は、化学合成が正しく行われ目的物が得られたということを支持するデータの一つになった。

Fig. 3 は蛋白質モデルを志向して化学合成<sup>11,12)</sup>し

た 4 本鎖  $\alpha$ -helix からなる人工蛋白質の LSIMS スペクトルである。マトリックスには NBA-G-TG (2:1:1) に CSA を 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  の濃度になるように添加したもの (Super Mixture) を使用した。わずか 0.5  $\mu\text{g}$  (約 50 pmol) という微量なサンプル量にもかかわらず、(M+H)<sup>+</sup> および (M+2H)<sup>2+</sup> が明確に検出され、これらの測定質量も計算値によく一致している。このように LSIMS は高質量ペプチドの分析に非常に有効であり、微量なサンプル量で精密に分子量を測定することができた。

## 2. 欠陥ペプチドの分析

activin A (84-116) を目的物として化学合成を行った後 HPLC を用いて精製したサンプルの LSIMS スペクトルを Fig. 4 に示す。検出された質量は目的物の分子量から予想される (M+H)<sup>+</sup> よ



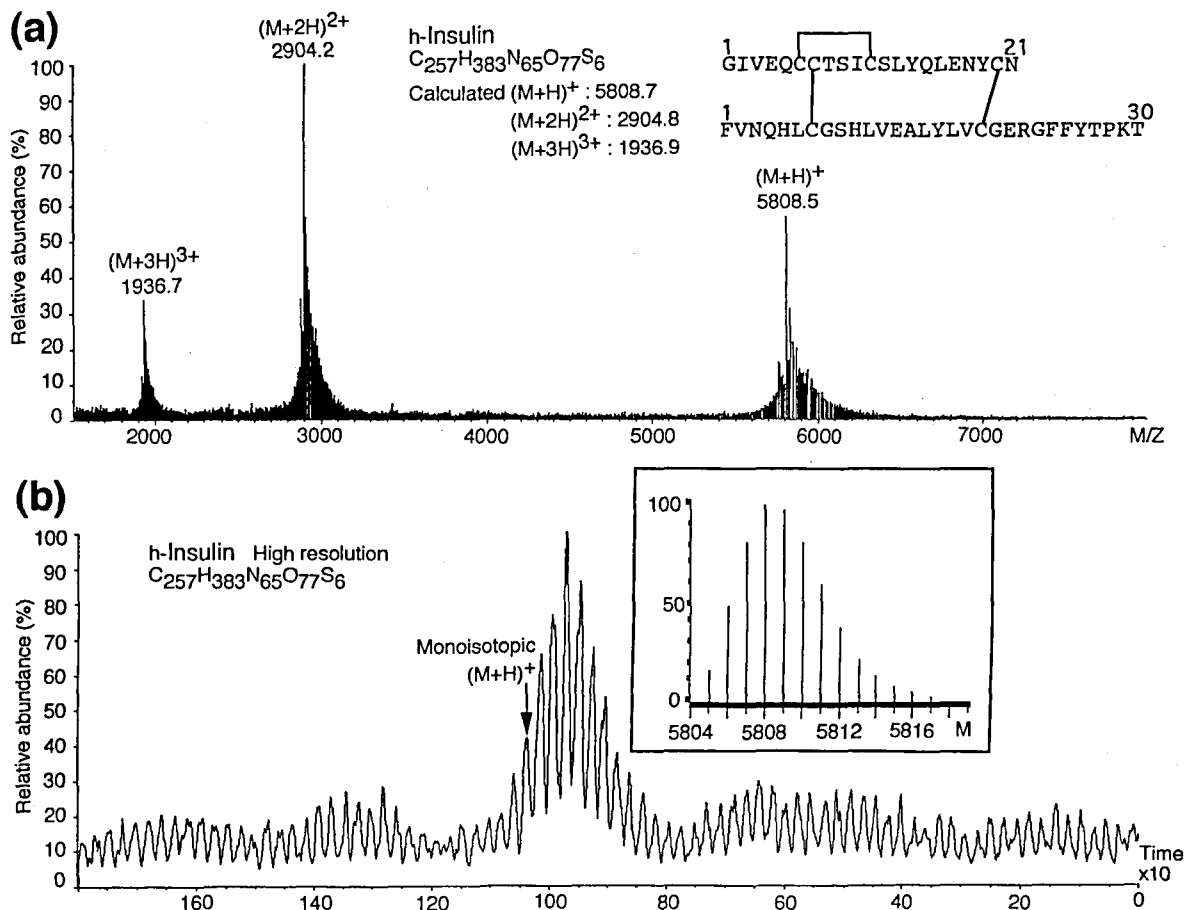


Fig. 2. LSIMS spectra of chemically synthesized human-insulin

(a) Survey mass spectrum recorded at resolution 1000.

(b) LSIMS profile data of the molecular ion region recorded at resolution 6000.

Inset: Theoretical isotopic cluster distribution calculated for  $C_{257}H_{384}N_{65}O_{77}S_6$ .

り 18 小さく、分析サンプルが目的物とは異なる構造体であることがわかった。分子量が 18 小さいことから合成途中で  $H_2O$  分子あるいは  $NH_4^+$  が脱離したのではないかと疑われたが、LSIMS スペクトル中のフラグメントイオンの解析 (Fig. 5) から Asp<sup>96</sup> の構造変化が原因であることがわかった。塩基で  $\alpha$ -アミノ保護基を除去しつつペプチド鎖を延長する Fmoc 型固相法<sup>13)</sup> により本ペプチドが合成されたことから考えて、 $\alpha$ -アミノ保護基の脱保護時あるいは酸を用いる最終脱保護時に Asp<sup>96</sup>-Gly<sup>97</sup> の間で aspartimide (Asi) が形成され  $H_2O$  分子に相当するグループが脱離した可能性が高い (Fig. 6)<sup>14)</sup>。この例で示したように、ペプチドの LSIMS スペクトル中には構造情報に富むフラグメントイオ

ンがしばしば出現し、部分アミノ酸配列が決定される場合も少なくない<sup>15,16)</sup>。

つぎに、固相法で化学合成し精製した activin A (45-75) の測定例について示す。このサンプルは逆相 HPLC (RP-HPLC) においてわずかに肩を有するほぼ単一のピークとして検出された (Fig. 7, 挿入図)。しかし、LSIMS で分析したところ、目的物の  $(M+H)^+$  以外にそれよりも 101 小さい質量が目的物の約半分の強度で検出された (Fig. 7)。101 という質量差は Thr 一残基分に相当する。目的ペプチドはその配列中に Thr を二残基有しているが、固相合成は樹脂上で C-末端アミノ酸から順次ペプチド鎖を伸長させていく合成法であることを考慮すると、N-末端が Val<sup>62</sup> であるペプチド鎖へ

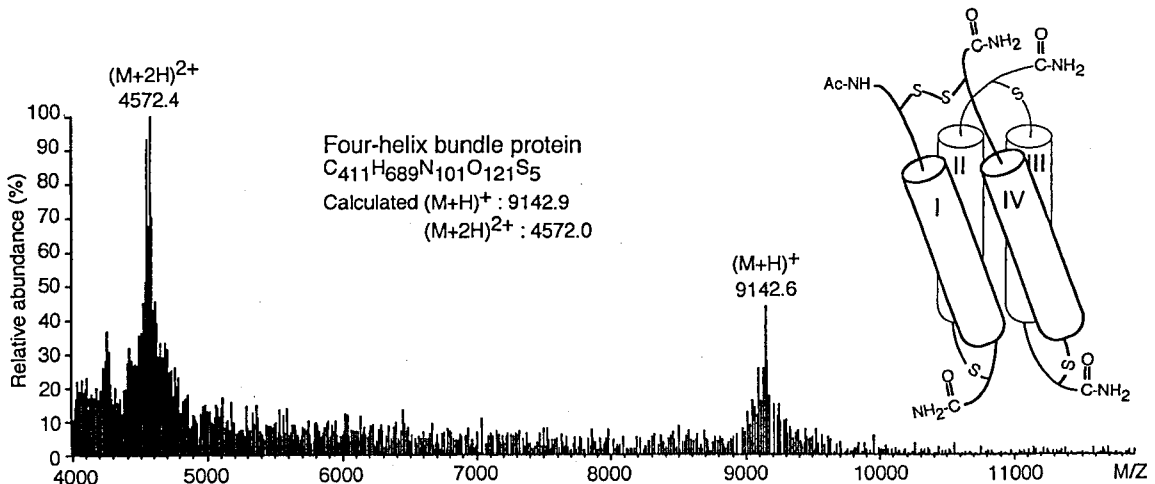


Fig. 3. LSIMS spectrum of chemically synthesized four-helix bundle protein  
 Survey mass spectrum of the peptide (0.5  $\mu$ g) was recorded at 1000 resolution by scanning the magnetic field from 12 kD to 4 kD.

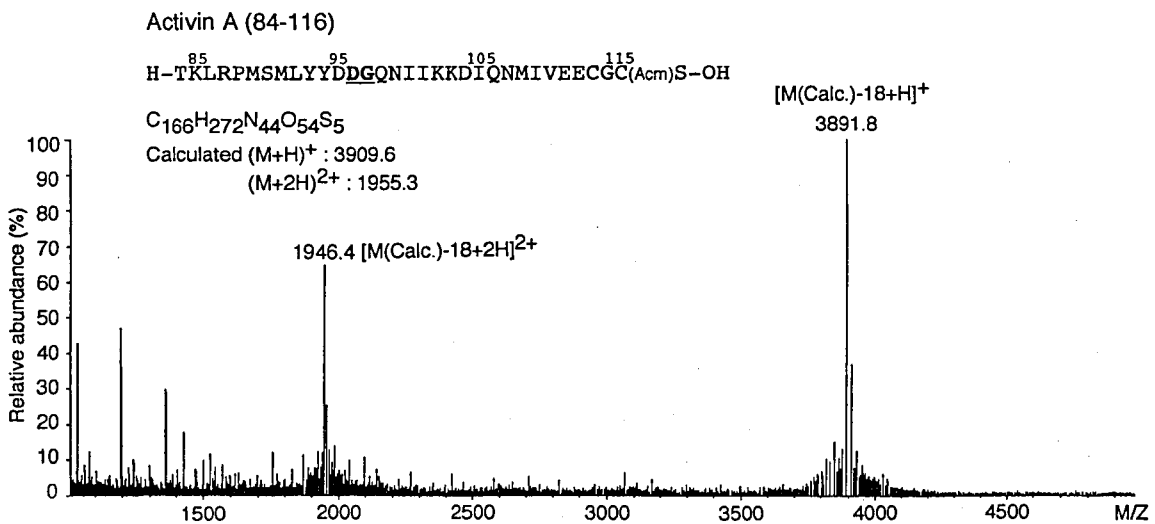


Fig. 4. LSIMS spectrum of the peptide synthesized for obtaining activin A (84-116)  
 The mercapto group of the Cys<sup>115</sup> was protected by acetamidomethyl (Acm) group.

の Thr<sup>61</sup> の縮合が Val<sup>62</sup> の立体障害のために完全には終結せず、その結果 Thr<sup>61</sup> が欠落したペプチドが混入してしまった可能性が高いと言える。このように、分離・検出の原理が全く異なる逆相 HPLC と LSIMS とを組み合わせた分析法は、構造上微少な差違しか持たないような不純物や混入物の検出に非常に有効であることがわかった。

### 3. 修飾アミノ酸を含むペプチドの分析

天然にはリン酸化や硫酸化、グリコシル化などの

翻訳後修飾を受けた蛋白質・ペプチドが存在する。蛋白質・ペプチドの分子量はこのような修飾により変化するのが普通である。したがって、ある蛋白質・ペプチドが修飾を受けているかどうか、また、どのような修飾を受けているかを調べる際、質量分析法は非常に有力な手段になる<sup>17)</sup>。

著者らは硫酸化チロシン [Tyr(SO<sub>3</sub>H)] を含有する生理活性ペプチドの化学合成を行ってきたが<sup>18-23)</sup>、Tyr(SO<sub>3</sub>H) が酸に不安定であるという

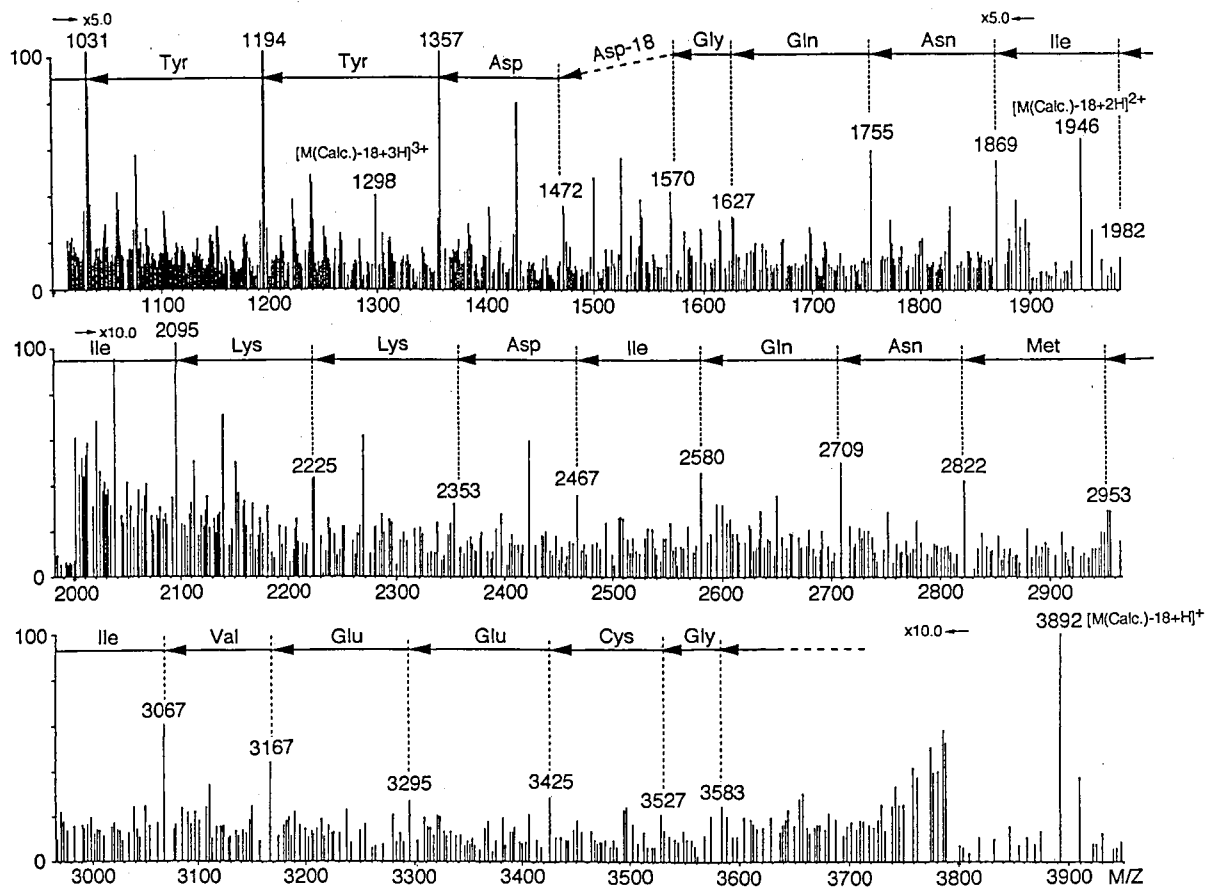


Fig. 5. Assignment of the fragment ions in the LSIMS spectrum shown in Fig. 4

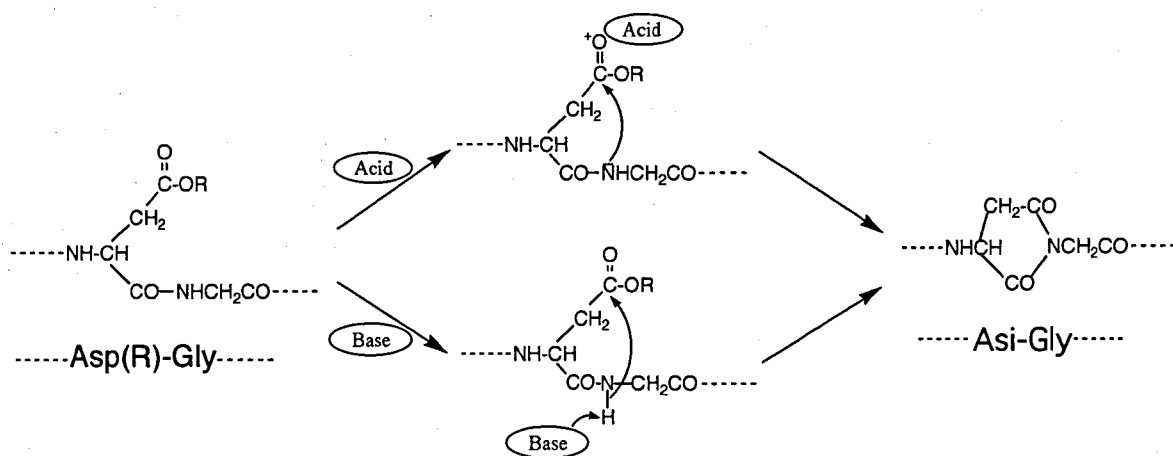


Fig. 6. Mechanisms for aspartimide (Asi) formation during peptide synthesis

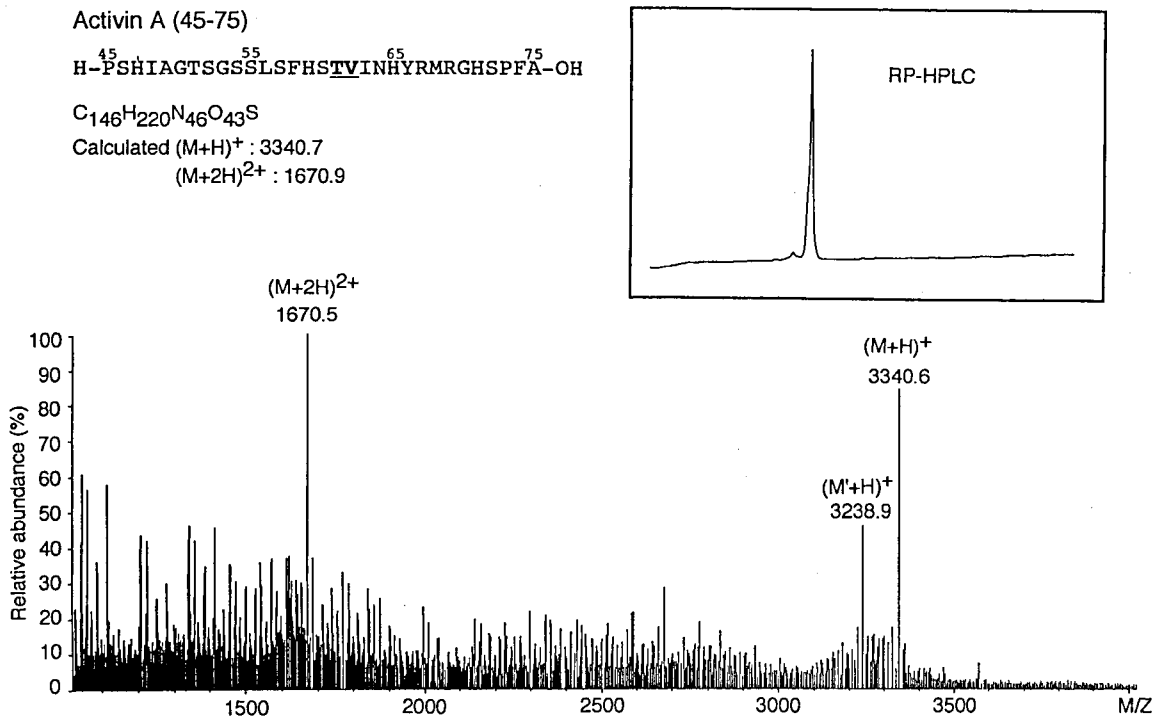


Fig. 7. LSIMS spectrum of the partially purified activin A (45-75)  
 Inset: Reversed phase-HPLC pattern of the peptide sample.

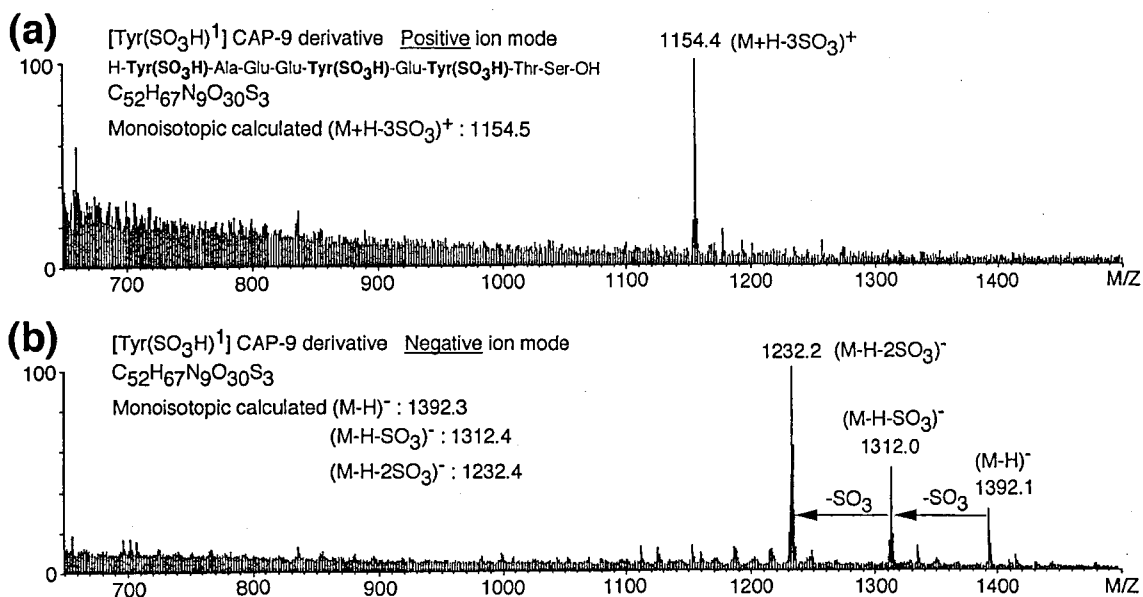


Fig. 8. LSIMS spectrum of  $[\text{Tyr}(\text{SO}_3\text{H})^1]$  CAP-9 derivative in the (a) positive ion mode and (b) negative ion mode

The peptide was dissolved in a neutral solvent and applied to the measurement.

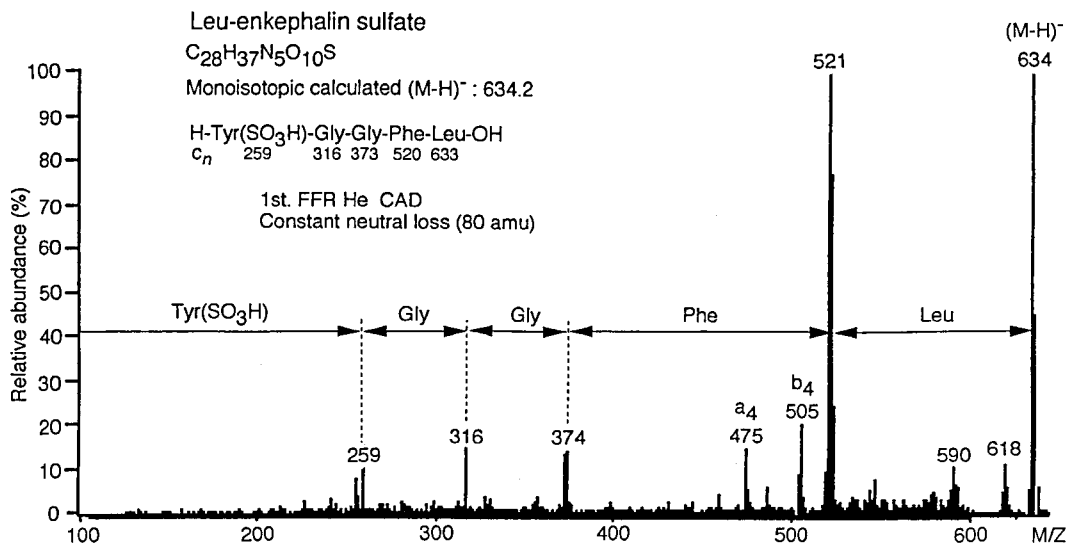


Fig. 9. Constant neutral loss (80 amu) spectrum of chemically synthesized Leu-enkephalin sulfate. The peptide was dissolved in a neutral solvent and applied to the measurement. Fragment ions are marked according to the nomenclature of Roepstorff and Fohlman<sup>7)</sup>.

理由から通常のEdman法によるアミノ酸配列決定法や酸分解後のアミノ酸分析法が使用できず、合成ペプチドの最終的な構造同定が不十分になる場合があった。そこで、Tyr(SO<sub>3</sub>H)含有ペプチドの分析にLSIMSを使用した。一例としてFig. 8に、Tyr(SO<sub>3</sub>H)を三残基含むCAP-9誘導体のpositive ion mode (a) およびnegative ion mode (b) でのLSIMSスペクトルを示す。positive ion modeでは(M+H-3SO<sub>3</sub>)<sup>+</sup>が主に検出されたが、negative ion modeでは(M-H)<sup>-</sup>に加え(M-H-SO<sub>3</sub>)<sup>-</sup>、(M-H-2SO<sub>3</sub>)<sup>-</sup>という特徴あるフラグメントイオンが検出された。また、positive ion modeのスペクトルとnegative ion modeのスペクトルを比較することにより、一分子中にTyr(SO<sub>3</sub>H)が何残基含まれているかという点について容易に推測できることがわかった<sup>24)</sup>。

さらに、Tyr(SO<sub>3</sub>H)残基を含有するペプチドが-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>(-80 amu)というフラグメンテーションを起こしやすいことに着目し、化学合成したLeu-enkephalin硫酸化体のconstant neutral loss (80 amu) spectrumをnegative ion modeで測定した結果をFig. 9に示す。(M-H)<sup>-</sup>に加えて構造情報に富むフラグメントイオンが感度よく検出され、ペプチドのシーケンスを確認することができた。constant neutral loss (80 amu) scanは、Tyr(SO<sub>3</sub>H)含有ペプチドの高感度検出・スクリーニング法としても

有用になると思われる。

#### おわりに

著者らはLSIMSを固相法で化学合成したペプチドの分析に適用し、その有用性を確認した。このような複雑な試料の最終的な構造確認・純度評価は原理の異なる複数の分析法を組み合わせるべきであるが、物質の質量の検出という比類のない原理に基づく質量分析法は欠くことのできない手法であると考えられる。特に高質量ペプチドの場合、元素分析はもちろんアミノ酸分析やNMRによる構造評価も困難であることから、質量分析の果たす役割は大きいと思われる。ここでは分子量一万程度までのペプチドのLSIMSスペクトルを例示したが、分子量が一万を越える蛋白質の測定例も報告されている<sup>25)</sup>。また、LSIMSとプロテアーゼ消化を組み合わせた蛋白質・ペプチドの構造解析法も実用化されている<sup>26,27)</sup>。どのような分析法をとるにせよ、固相法で化学合成したペプチドは必ずしも純粋な目的物であるとは限らないということを常に念頭に置き、その構造確認・純度評価には細心の注意を払うべきであろう。

本報ではLSIMSによる化学合成ペプチドの分析例について紹介したが、化学合成品に限らず遺伝子工学的手法を用いて作成された蛋白質・ペプチドあるいは天然に存在する蛋白質、糖質、脂質さらには

核酸などの分析にも LSIMS をはじめとする種々の質量分析法 (electrospray ionization-liquid chromatography/mass spectrometry: ESI-LC/MS, matrix assisted laser desorption-time of flight mass spectrometry: MALD-TOFMS など) が有用であることが数多く報告されている<sup>28-33)</sup>。今後、極性高分子の分析に質量分析法を適用する例は、確実に増加すると思われる<sup>34,35)</sup>。

### 謝 辞

貴重なペプチド試料を御提供して頂くとともに有益な御助言を賜りました北川幸己徳島大学薬学部助教、赤路健一京都薬科大学助教、二木史朗徳島大学薬学部附属医薬資源教育研究センター助教に深く感謝致します。また、質量分析計の操作法について御指導を頂きました叶多謙三国立衛生試験所療用品部前室長、さらに、質量分析計の保守に御尽力下さっているジャスコインタナショナル(株)播磨紀明氏に感謝致します。

### 文 献

- 1) 藤井信孝, 大高 章: “タンパク質 VI” 合成および発現, 新生物化学実験講座 1, 日本生化学会編集, 東京化学同人, 東京 (1992) p. 3
- 2) Smith, A. J., Young, J. D., Carr, S. A., Marshak, D. R., Williams, L. C. and Williams, K. R.: “Techniques in Protein Chemistry III”, ed. Angeletti, R. H., Academic Press, San Diego (1992) p. 219
- 3) Mathews, W. R., Runge, T. A., Haroldsen, P. E. and Gaskell, S. J.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **3**, 314 (1989)
- 4) Papayannopoulos, I. A. and Biemann, K.: *Peptide Res.*, **5**, 83 (1992)
- 5) Moore, W. T.: *Biol. Mass Spectrom.*, **22**, 149 (1993)
- 6) Agnello, A. and DePauw, E.: *Org. Mass Spectrom.*, **26**, 175 (1991)
- 7) Roepstorff, P. and Fohlman, J.: *Biomed. Mass Spectrom.*, **11**, 601 (1984)
- 8) Akaji, K., Tatsumi, T., Yoshida, M., Kimura, T., Fujiwara, Y. and Kiso, Y.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 167 (1991)
- 9) Akaji, K., Tatsumi, T., Yoshida, M., Kimura, T., Fujiwara, Y. and Kiso, Y.: *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 4137 (1992)
- 10) Akaji, K., Fujino, K., Tatsumi, T. and Kiso, Y.: *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 11384 (1993)
- 11) Futaki, S. and Kitagawa, K.: *Tetrahedron Lett.*, **35**, 1267 (1994)
- 12) Futaki, S., Ishikawa, T., Kitagawa, K. and Yagami, T.: “Peptide Chemistry 1993”, ed. Okada, Y., Protein Research Foundation, Osaka (1994) p. 409
- 13) Fields, G. B. and Noble R. L.: *Int. J. Peptide Protein Res.*, **35**, 161 (1990)
- 14) Dolling, R., Beyermann, M., Haenel, J., Kernchen, F., Krause, E., Franke, P., Brudel, M. and Bienert, M.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 853 (1994)
- 15) Tuong, A., Maftouh, M., Ponthus, C., Whitechurch, O., Roitsch, C. and Picard, C.: *Biochemistry*, **31**, 8291 (1992)
- 16) Ishibashi, Y., Yoshida, H., Mizuta, E. and Fukuda, T.: *Biol. Mass Spectrom.*, **22**, 98 (1993)
- 17) Carr, S. A., Roberts, G. D. and Hemling, M. E.: “Mass Spectrometry of Biological Materials”, ed. McEwen, C. N. and Larsen, B. S., Dekker, New York (1990) p. 87
- 18) Futaki, S., Taike, T., Akita, T. and Kitagawa, K.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 523 (1990)
- 19) Futaki, S., Taike, T., Akita, T. and Kitagawa, K.: *Tetrahedron*, **48**, 8899 (1992)
- 20) Yagami, T., Shiwa, S., Futaki, S. and Kitagawa, K.: *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 376 (1993)
- 21) Kitagawa, K., Futaki, S., Yagami, T., Taike, T. and Shiwa, S.: “Peptide Chemistry 1992”, ed. Yanaihara, N., ESCOM, Leiden (1993) p. 42
- 22) Kitagawa, K., Futaki, S., Yagami, T., Sumi, S. and Inoue, K.: *Int. J. Peptide Protein Res.*, **43**, 190 (1994)
- 23) 北川幸己, 二木史朗, 矢上 健: 有機合成化学協会誌, **52**, 675 (1994)
- 24) Kitagawa, K., Yagami, T., Shinomiya, S. and Futaki, S.: “Peptide Chemistry 1993”, ed. Okada, Y., Protein Research Foundation, Osaka (1994) p. 77
- 25) Barber, M. and Green, B. N.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1**, 80 (1987)
- 26) Wada, Y.: *Biol. Mass Spectrom.*, **21**, 617 (1992)
- 27) Lee, T. D. and Shively, J. E.: *Methods Enzymol.*, **193**, 361 (1990)
- 28) Boyot, P., Trifilieff, E., Van Dorsselaer, A. and Luu B.: *Anal. Biochem.*, **173**, 75 (1988)
- 29) Van Dorsselaar, A., Lepage, P., Bitsch, F., Whitechurch, O., Riehl-Bellon, N., Fraisse, D., Green, B. and Roitsch, C.: *Biochemistry*, **28**, 2949 (1989)
- 30) Maftouh, M., Ponthus, C., Tuong, A. and

- 
- Picard, C.: *J. Chromatogr.*, **562**, 421 (1991)
- 31) Carr, S. A., Hemling, M. E., Bean, M. F. and Roberts, G. D.: *Anal. Chem.*, **63**, 2802 (1991)
- 32) Biemann, K.: *Annu. Rev. Biochem.*, **61**, 977 (1992)
- 33) 松本 勇：衛生化学, 39, 266 (1993)
- 34) Gross, M. L., Cerny, R. L., Giblin, D. E., Rempel, D. L., MacMillan, D. K., Hu, P. and Holliman C. L.: *Anal. Chim. Acta*, **250**, 105 (1991)
- 35) 小川慶治：ふんせき, 219 (1994)

## 乳酸鉄添加飼料中の二価鉄の安定性について

武田由比子・石綿 肇・山田 隆

## Studies on the stability of ferrous ion in the feeds added iron lactate during storage

Yuiko Takeda, Hajimu Ishiwata and Takashi Yamada

Studies on the stability of ferrous ion in the feeds added iron lactate were conducted for a chronic toxicity test. No significant changes in contents of ferrous ion were observed in all samples when feeds containing 0.2 and 5% of iron lactate were stored in the dark at room temperature ( $25\pm 2^\circ\text{C}$ ) for 72 hours, or feeds containing 1 and 2% iron lactate stored at  $4^\circ\text{C}$  for 90 days.

**Keywords :** ferrous ion, ferric ion, colorimetry, iron lactate, feed for experimental animal

(Received May 31, 1994)

## 緒 言

乳酸鉄は変異原性があり、染色体異常を起こす疑いを持たれる等の報告<sup>1)</sup>があることから、貯蔵鉄と発ガンとの関連性はしばしば問題となる。食品添加物安全性再評価の一環として、当所病理部で乳酸鉄の慢性毒性試験の実施が計画されている。毒性試験のために乳酸鉄を添加した動物飼料では調製時および保存中の経過時間に伴う鉄のイオン価の変化等について検査する必要がある。食品添加物の規格に適合した使用乳酸鉄の鉄のイオン価は二価であるが、保存状態により、酸化されて三価鉄に変化する可能性もある。このことから、乳酸鉄の慢性毒性試験に先立ち、乳酸鉄を添加した実験動物用飼料中の二価および三価鉄を定量し、二価鉄の消長と酸化の動向を調査した。

## 実 験 方 法

## 1. 被験飼料

乳酸鉄慢性毒性試験用の試作飼料：実験動物用粉末飼料に乳酸鉄を a) 0.2%、あるいは5%の濃度で添加したもの（各濃度2検体）、b) 1%あるいは2%の濃度で添加したもの、および、対照として乳酸鉄無添加の飼料。これらの飼料は武蔵野化学(株)とオリエンタル工業(株)により調製されたものであり、当所病理部より分与を受けたものである。

## 2. 被験飼料の保存

被験飼料はポリエチレン袋に入れ、暗所室温 ( $25\pm 2^\circ\text{C}$ ) または暗所  $4^\circ\text{C}$  で保存した。

## 3. 試薬、試液

乳酸鉄：武蔵野化学(株)より供与された食品添加物規格に適合のもの（鉄17.6%表示）で被験飼料に添加した乳酸鉄と同ロットのものである。

オルトフェナントロリン溶液：オルトフェナントロリン塩酸塩（Merck製）0.12gを水に溶かして100mlとした。

塩酸ヒドロキシルアミン溶液：塩酸ヒドロキシルアミン（キシダ化学製）10gを水に溶かして100mlとした。

鉄標準溶液：硫酸第一鉄アンモニウム六水合物（和光純薬工業(株)製、純度99.5%）7.0216gを少量の水で溶かし、さらに10%の塩酸溶液3mlおよび水を加えて正確に1000mlとし、これを標準原液とする。この標準原液1.0mlをとり、水を加えて正確に100mlとし、鉄標準溶液とした。この鉄標準溶液1mlは0.01mgの二価鉄を含む。

酢酸緩衝液：酢酸アンモニウム15gを水に溶かして50mlとし、それに酢酸50mlを加え、100mlとした（pH4）。

## 4. 装 置

自記分光光度計：(株)島津製作所製 UV-240

超音波発生装置：(株)シャープ UT 51N



### 5. 試験液の調製<sup>3)</sup>

乳酸鉄試験液：乳酸鉄約 0.3 g を正確に量り、少量の水で溶かし、さらに 10% の塩酸 3 ml および水を加えて正確に 100 ml とし、試験原液とする。この試験原液 10 ml をとり、0.5 N 塩酸を加えて正確に 100 ml とし、これを試験液とする。

被験飼料試験液：飼料 2.0 g を共栓付き遠心管にとり、0.5 N 塩酸を正確に 50 ml 加え、超音波で試料を均一に分散した後、*n*-ヘキサン 20 ml および食塩 1 g を加え、10 分間の超音波抽出を行い、次いで軽く上・下層を混和する。遠心分離 (3500 回転/分、10 分間) し、上層の *n*-ヘキサン画分を捨て、下層の塩酸画分をとり、ろ紙 (東洋ろ紙 No. 5C) でろ過し、ろ液を試験液とする。

### 6. 比色法による測定操作<sup>3)</sup>

試験液 1~5 ml をそれぞれ比色管 A, B の 2 本にとり、それぞれに水を加えて 10 ml とし、5% アンモニア水 1.5 ml を加える。さらに、A には塩酸ヒドロキシルアミン溶液 0.5 ml, B には水 0.5 ml を加える。次にそれぞれにオルトフェナントロリン溶液 4 ml および酢酸緩衝液 4 ml を加え、それぞれ全量 20 ml とし、よく混和する。30 分間静置後、この溶液の吸光度を水を対照として波長 510 nm で測定する。また空試験として、オルトフェナントロリン溶液のかわりに水を加え、同様の操作を行い、吸光度を求め、ブランク値として差し引く。別に鉄標準溶液 1~10 ml を段階的にとり、水を加えて 10 ml とする。これにオルトフェナントロリン溶液 4 ml および酢酸緩衝液 4 ml を加え、以下前記と同様の操作を行い、検量線を作成し、これにより試料中の鉄の濃度を求める。A からは無機の総鉄含量が、

B からは二価鉄含量が得られる。したがって三価鉄含量は (A-B) から得られる。

### 結果および考察

#### 1. 抽出、精製および比色法について

加工食品からの抽出、精製および比色法については著者らが報告した<sup>3)</sup>。その方法は本実験の被験飼料に適用可能であった。定量下限は反応液 20 ml 中二価鉄として 5  $\mu$ g であった。

短時間で多くの検体の分析が可能であり、再現性にもすぐれていた。

#### 2. 添加回収実験

乳酸鉄無添加飼料に 2000  $\mu$ g 二価鉄/g の濃度 (乳酸鉄として 1.2% に相当) となるように乳酸鉄試験原液を添加し、本法により回収率を求めた。

飼料からの二価鉄の回収率は 72.5  $\pm$  2.8%, 総鉄の回収率は 97.5  $\pm$  2.5% であった。このことから、飼料に添加された乳酸鉄は抽出中に一部酸化されるものと考えられるが、大部分は二価鉄として回収された。

#### 3. 飼料中の二価鉄の消長

開封後、室温で 72 時間放置し、その間の鉄の存在形態の変化を測定した。提供された各濃度の被験飼料について得られた結果を Table 1 に示す。乳酸鉄 0.2% および 5% 添加飼料ともに鉄の酸化による変化はみられなかった。

また、乳酸鉄 1%, 2% 添加の被験飼料を 4°C で保存して鉄の存在形態の変化を 90 日間にわたり測定した結果を Table 2 に示す。二価鉄の濃度に有意の変化は認められず、したがって無機鉄の総量にも変化はみられなかった。

Table 1. Stability of Iron (II) in Iron Lactate Added Feeds During Storage at Room Temperature

Storage (hours)	Feed(0.2%)*		Feed(5%)*	
	No. 1	No. 2	No. 1	No. 2
0	0.35(100)	0.35(100)	9.5(100)	9.5(100)
6	0.34( 97)	0.38(108)	9.7(101)	9.7(102)
12	0.34( 97)	0.35(100)	9.2( 96)	9.4( 99)
24	0.37(106)	0.37(106)	9.1( 96)	9.2( 96)
48	0.33( 95)	0.40(114)	9.1( 96)	9.7(102)
72	0.35(100)	0.40(114)	9.4( 99)	9.2( 96)

Results: Mean value of iron(II) (mg/g, n=3). C.V. values: Less than 10%

\*: Content of Iron Lactate in feeds

Numerals in parentheses indicate the ratio (%) to initial (0 hour) value

Table 2. Stability of Iron (II) and Iron (II+III) in Iron Lactate Added Feeds During Storage at 4°C

Storage (days)	Feed(1%)*		Feed(2%)*	
	Iron(II)	Iron(II+III)	Iron(II)	Iron(II+III)
0	1.50(100)	1.58	3.41(100)	3.57
7	1.53(102)	1.65	3.35(98)	3.53
14	1.63(108)	1.68	3.50(102)	3.58
30	1.68(112)	1.71	3.50(102)	3.54
60	1.70(113)	1.75	3.60(105)	3.64
90	1.60(106)	1.62	3.41(100)	3.48

Results: Mean value(mg/g, n=3). C.V. values: Less than 10%

\*: Content of Iron Lactate in feeds

Numerals in parentheses indicate the ratio (%) to initial (0 day) value

以上の結果により、乳酸鉄を添加した飼料中の二価鉄は室温で3日間、あるいは4°Cで3カ月間の保存により変化することは無いものと考えられる。

### 結 語

乳酸鉄を0.2%、5%の濃度で添加した慢性毒性試験用飼料は、暗所室温、72時間放置で飼料中乳酸鉄の二価鉄含量に変化はなかった。また、乳酸鉄を1%、2%の濃度で添加した飼料を暗所4°Cで90日間保存した場合にも飼料中乳酸鉄の二価鉄含量に変化はなかった。0日目における飼料中の二価鉄含

量は表示濃度とほぼおなじである事から、飼料調製時の酸化もなかったものと考えられる。

### 文 献

- 1) 石館 基, 祖父尼俊男, 吉川邦衛: トキシコロジーフォーラム, 7, 634~643 (1984)
- 2) 石館 基, 祖父尼俊男, 吉川邦衛: 同上, 10, 649~654 (1987)
- 3) 武田由比子, 石綿 肇, 山田 隆: 日本食品衛生学会第66回学術講演会講演要旨集, p. 33 (1993)

## エイズ医薬品候補スクリーニング研究

## IV. 1992 年度報告

関根大正\*1・大貫奈穂美\*1・貞升健志\*1・太田健爾\*1・寺山 武\*1・小林伸好\*2  
 野口有三\*2・松山雅子\*3・秋吉京子\*3・野呂新一\*4・佐藤七七朗\*4・桜田教夫\*4  
 藤田宣哉\*5・石崎 徹\*5・神村紀子\*5・吉田幸雄\*5・小野哲郎\*6・大友信也\*6  
 森下高行\*7・小林慎一\*7・三宅恭司\*7・石原佑弐\*7・鈴木亮而\*7・斉藤隆行\*8  
 衛藤繁雄\*8・大竹 徹\*9・森 治代\*9・森本素子\*9・上羽 昇\*9・千々和勝巳\*10  
 甲斐麻美子\*10・常盤 寛\*10・三瀬勝利・牛島廣治\*11・清水博之\*11  
 国貞孝夫\*11・山崎修道\*11

## Preliminary Screening for Antiviral AIDS Drugs.

## IV. Report on fiscal year 1992

Hiromasa Sekine\*1, Nahomi Ohnuki\*1, Kenji Sadamasu\*1, Kenji Ohta\*1  
 Takeshi Terayama\*1, Nobuyoshi Kobayashi\*2, Yuzo Noguchi\*2, Masako Matsuyama\*3  
 Kyoko Akiyoshi\*3, Shinichi Noro\*4, Nanao Sato\*4, Norio Sakurada\*4  
 Nobuya Fujita\*5, Tohru Ishizaki\*5, Noriko Kamimura\*5, Yukio Yoshida\*5  
 Tetsuro Ono\*6, Nobuya Ohtomo\*6, Takayuki Morishita\*7, Shinichi Kobayashi\*7  
 Takashi Miyake\*7, Yuichi Ishiwara\*7, Ryoji Suzuki\*7, Takayuki Saito\*8  
 Shigeo Etoh\*8, Tohru Ohtake\*9, Haruyo Mori\*9, Motoko Morimoto\*9  
 Noboru Ueba\*9, Katsumi Chijiwa\*10, Mamiko Kai\*10, Hiroshi Tokiwa\*10  
 Katsutoshi Mise, Hiroshi Ushijima\*11, Hiroyuki Shimizu\*11  
 Takao Kunisada\*11 and Shudo Yamazaki\*11

Preliminary screening of antiviral AIDS drugs has been carried out using three different *in vitro* assay systems. Among 191 samples tested, seven were found to inhibit the growth of HIV *in vitro*. Four of seven have hopeful signs, as the ranges of effective doses of the samples are wide.

**Keywords** : AIDS, anti-HIV drugs, giant cell, HIV, microplate method.

(Received May 31, 1994)

## はじめに

エイズは数年の潜伏期を経て発症に至り、発症者のほとんどは5年以内に死に至るといわれている<sup>1,2)</sup>。エイズ患者を対象とする医薬品は AZT (3'-azido-3'-deoxythymidine) や ddI (2',3'-dideoxyinosine) など少数のものが知られているものの、効

力や副作用の点で問題が多く、決定的な治療薬は見出されていない<sup>3,4)</sup>。日本における患者数も次第に増加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。さらに米国ではエイズ患者を中心に結核がまんえんしており、健常者への感染も社会問題化している。

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、東京都立衛生研究所など10地方衛生研究所から成る研究班で、候

\*1 東京都立衛生研究所・\*2 横浜市衛生研究所・\*3 神戸市環境保健研究所・\*4 北海道立衛生研究所・\*5 京都府衛生公害研究所・\*6 大分県環境研究センター・\*7 愛知県衛生研究所・\*8 神奈川県衛生研究所・\*9 大阪府公衆衛生研究所・\*10 福岡県衛生公害センター・\*11 国立予防衛生研究所

補物質のスクリーニング研究を行った。平成4年度は191サンプルが提出され、このうち7サンプルが陽性を示した。

### 実験方法

スクリーニングはMT-4細胞のHIV-1感染による細胞障害性の抑制を指標としたマイクロプレート法を使用した。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<sup>2)</sup>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191サンプル中、抗HIV活性を示した7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、申し合わせにより禁じられている。これ

ら191サンプルは参加企業15社から提供されたものであり、国立予防衛生研究所と東京都立衛生研究所等の地方衛生研究所で抗HIV活性が調べられた。Table 1の7サンプル中3サンプルは化学合成物である。他の4サンプルはそれぞれ微生物二次代謝産物(1)、生薬抽出物(1)、放線菌生産物(1)および不明(1)である。

代表的な例として、Table 2と3に検体番号920910と920939のマイクロプレート法の結果を示す。いずれにおいてもHIVウイルス増加抑制が明らかに認められる。比較的有効濃度域の広いものの中で920910と920939が巨細胞形成抑制試験陽性であった。後者のデータをTable 4に示す。

### 考察

Table 1にまとめられているように、提供された191サンプル中7サンプルに、*in vitro*の試験で抗HIV活性が認められた。これらはいずれもこれま

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 ( $\mu\text{g/ml}$ )	Minimum cytotoxicity doses ( $\mu\text{g/ml}$ )	Chemicals	Companies
920856	25 - 100	$\geq 200$	Product of microorganism	G
920892	7.8 - 250	$\geq 500$	Unknown	J
920901	7.8	$\geq 15.6$	Product of fungi	K
920910	250 - 1000	$> 1000$	Extract of medical plant	L
920936	6.25 - 125	$\geq 250$	New chemical	M
920937	7.8 - 15.6	$> 31.2$	New chemical	N
920939	31.2 - 125	$\geq 250$	New chemical	N

Table 2. Anti-HIV activities of sample no. 920910 with microplate assay method

Tube no.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	UC	IC
Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	1000	500	250	125	62.5	31.3	15.6	7.8	3.9	2.0	1.0		
3 days incubation													
Cytotoxicity	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙
CPE	-	-	-	-	+	+	++	++	++	++	++	-	++
6 days incubation													
Cytotoxicity	⊙	⊙	⊙	○	○	○	○	○	○	○	○	⊙	⊙
CPE	-	-	-	++	++	++	++	++	++	++	++	-	++

UC, uninfected control; IC, infected control; CPE, cytopathogenic effect.

Cytotoxicity: ⊙, cells grew well as in UC; ○, growth of cells was partially 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. 920939 with microplate assay method

Tube no.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	UC	IC
Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	1000	500	250	125	62.5	31.3	15.6	7.8	3.9	2.0		
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. 920939 with multinucleated giant cell formation inhibition assay

Tube no.	1	2	3	4	5	6	UC	FC
Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	1000	500	250	125	62.5	31.3		
Cytotoxicity	◎	◎	○	○	○	○	◎	◎
CPE	-	-	++	++	++	++	-	++

UC, unfused control; FC, fused control.  
 Cytotoxicity: ◎, growth of cells was observed as in UC; ○, growth of cells was partially inhibited.  
 CPE: ++, 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.

で抗 HIV 活性が試験されていないものと思われる。これらのもののうちでも、検体番号 920856, 920892, 920910 および 920939 は、有効濃度の幅が広いところからリード化合物として有望と思われる。残りの陽性を示した 3 検体は、有効濃度の幅は非常に狭い。上記のものはいずれもエイズ医薬品候補とはなりえないが、今回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。

このように第一次スクリーニングとはいえ、前年度に続き、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いって良いであろう。

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'-deoxy-thymidine (BW A509U): 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, 斉藤隆行, 小田和正, 松崎 稔, 桜田教夫, 佐藤七七朗, 野呂新一, 三瀬勝利, 牛島広治, 清水博之, 大野田秀樹, 北村 敬, 徳永徹: 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)

## IPCS 環境保健クライテリアのドラフトのコメント依頼について (1993 年度)

大竹千代子・関沢 純

First Drafts of the Environmental Health Criteria (EHC) Circulated  
for Comments by IPCS in 1993~1994

Chiyoko Ohtake and Jun Sekizawa

Summaries of first drafts of Environmental Health Criteria (EHC), which were circulated for comments by IPCS in the period of 1993~1994, are presented. EHC drafts on 10 compounds were received in this period.

**Keywords :** EHC, IPCS

(Received May 31, 1994)

## はじめに

1993年4月から1994年3月までに、環境保健クライテリア (EHC) のドラフトに対する IPCS からのコメント依頼は 10 件あった。昨年度と同様の様式で所内に案内し、閲覧希望に応じ、コメントの提供をお願いした。配布した要約および入手したコメントについて報告する。

ドラフトの要約  
(日付は案内日)

## 1. Methylene chloride (1993/5/19)

methylene chloride はエーテル様の臭いを持ち、透明で、揮発性の高い不燃性液体である。その性質のため、大部分はグリース、プラスチックおよび塗料の溶剤などとして利用され、世界の生産量は年間 57 万 t と推定されている。methylene chloride の大部分は大気中へ放出され、光化学的分解を受け、その半減期は 6 カ月である。一般の人々への暴露は、塗料剥離剤のような製品の使用によって生じ、職業暴露は、先にあげたような使用現場で起きる。動物実験による有害な影響としては、単回暴露の急性毒性では吸入、経口による影響は小さく、高濃度 (17700 mg/m<sup>3</sup> 以上) の長期暴露では、中枢神経系への可逆的な影響および死亡がみられた。肝臓への影響はイヌやラットにみられ、他の生物では肺や腎臓にも観察された。in vitro で、ラットの肝細胞では染色体異常がみられた。発がん性については、吸

入による高濃度 (7100 および 14100 mg/m<sup>3</sup>)、26 週間暴露でマウスの肺と肝臓に発がんがみられた。人への直接接​​触の影響は、目と皮膚への刺激が報告されている。694 mg/m<sup>3</sup> で 1.5 から 3.3 時間暴露では神経生理学的障害がみられた。

2. Brominated Flame Retardants  
(1993/6/15)

ハロゲンの中でも、塩素と臭素は、高分子化合物の可燃性を減じる性質があるために、難燃剤として重要な役割をしている。現在、臭素化難燃剤の毒性と使用による環境への影響に、最も関心が注がれている。問題はハロゲン化された難燃剤が熱分解の過程でハロゲン化された dibenzofurans と dibenzodioxins を生成することにある。生産量は 1980 年にアメリカで 7~10 万トン、日本では 1986、1987 年とも 9 万トンを超えるほど急増している。tetra-bromobisphenol A は臭素化難燃剤の単一物質として最大の生産量になると予想されている (世界生産量は 1980 年までに 5 万トン)。Fire-master FF-1 という難燃剤からは、実験的に 20 分間に tetra-bromodibenzofurans (TBDFs) と penta-BDFs が生成され、他の実験でも、臭素の数が 1~8 までのフランやダイオキシンが生成された。PBDFs と PBDDs への職業暴露としては、ポリマーを含んだ PBDPE (decabromodiphenylether) の成形の際に、成形機のヘッド近くの空気中の PBDFs は 72.9 μg/m<sup>3</sup>、室内では 0.169~0.989 μg/m<sup>3</sup> の濃度であった。同様に全 PBDDs は 28.12 ng/m<sup>3</sup> であった。

また、廃棄物の燃焼によるこれらの物質の生成は、塩素化されたフランやダイオキシンほどではないが、実験的にみとめられている。難燃剤の貯蔵庫の火事で tetra-, penta-, hexa-, hepta- および octa-BDF がそれぞれ 123, 77.6, 51.7, 12.8 および 8.5 ng/m<sup>2</sup>（固体サンプルの拭き取り）が測定されている。臭素化難燃剤とその燃焼生成物の毒性に関しては、一般に塩素化合物より毒性は低く、臭化ビフェニルの毒性は臭素化の増加に伴い減少する。この他に 35 物質について評価されている。

### 3. Tris(2,3-dibromopropyl)phosphate および Bis(2,3-dibromopropyl)phosphate (1993/6/15)

a) tris(2,3-dibromopropyl)phosphate(TBPP) は淡緑黄色の透明で粘性のある液体である。水には溶けにくく、ヘキサンには不溶であるがアセトン、キシレン、ベンゼンなどの有機溶媒には溶ける。1959年に商品化され、子供のパジャマへの難燃剤としての利用が重要であったが、1977年にアメリカでは子供服への利用は禁止され、日本でも衣料品への使用が1981年に禁止された。子供服に処理されたTBPPが推定9 µg/kg体重が皮膚から吸収された例や、長期間に2~7 mg/kg体重が吸収された例が報告されている。ラットとウサギの胃腸管からは急速に、また皮膚からゆっくりと吸収される。ラットの経口による単回投与でのLD<sub>50</sub>は約5.25 g/kg体重であった。ウサギによる2.2から最大8.8 g/kg体重のTBPPの4週間経皮試験では、血液と尿から臭素が検出され、すべてのウサギが死んだ。腎臓と肝臓に著しい変化がみられ、コリンエステラーゼの明らかな減少があった。サルモネラ菌に対し、代謝活性化により突然変異原性が見いだされた。発がん性に関しては、1000 mg/kg体重までマウスに経口投与した場合、前胃のがんおよび肺腺腫と肺がんが増加した。

b) bis-(2,3-dibromopropyl)phosphate (bis-DBPP) およびその塩類は、1960、1970年代から bisDBPP および bisDBPP のマグネシウム塩とアンモニウム塩が繊維とプラスチックの防炎加工剤として特許が取られたが、最近ではこれらの物質は使用されていないようである。bisDBPP は研究室の活性汚泥システムでTBPPの主な生分解物として知られている。TBPPがラットに投与されてから bis-DBPP はほぼ5分以内にすべての器官から検出された。血漿中の75%は bisDBPP であり、この濃度

は1時間後まで増え、1~5日までに36%に下がった。bisDBPPの単回投与(0~200 mg/kg体重)では、高濃度で投与された場合に1匹が死亡した程度である。マグネシウム塩の bisDBPP はサルモネラ菌に対し、代謝活性化により突然変異原性を示した。

### 4. Chloroform (1993/7/5)

chloroform は透明、無色、独特の臭いをもつ、非常に揮発し易い液体である。chloroform は工業製品の中間生産物として製造され、溶剤として、あるいは薬品・化粧品中に直接使用される。chloroform の生産は年々増え、1987年の世界の生産量は44万トンであった。また、trichloroethene を含む大気中に光化学反応生成物として検出され、この過程によって生成される chloroform の量は、年間3000トンと推定されている。土壌中などの好気性生物によって分解されにくく、また魚類の生物濃縮係数は最大10ぐらいである。一般の人への暴露は、食品(乳製品中に1.4~33 mg/kg)や塩素殺菌された水道水(最高60 µg/lを日本で検出、WHO勧告値30 µg/l)の摂取、あるいはプール(室内プールの室内大気濃度10~380 µg/m<sup>3</sup>)での水泳やシャワーを浴びることによって暴露される。マウスに対し、5 mg/ml濃度の飲料水を親世代から投与し3世代観察した結果、オス・メスいずれにも死亡がみられ、2、3世代は成長が阻害された。また、17および60 mg/kg体重濃度で強制経口投与したマウスでは、いずれもメスに、それぞれの濃度で20/37、21/38(コントロール20/72)の割合で全がんが増加し、腎臓がんは高濃度投与の場合のみ3/38の割合でみられた。

### 5. Linear Alkylbenzene Sulfonates (LAS) and Related Compounds-Alkyl Olefin Sulfonates (AOS) and Alkyl Sulfates (AS)-(1993/7/12)

Linear Alkylbenzene Sulfonates (LAS) のNa塩は直鎖のalkylbenzene sulfonatesの構造をもつ白色固体であり、疎水部分の違いにより様々な物性を示す。1960年代初めに生分解され易いLASが洗剤の主要な成分として世界中で使われ始めた。1987年のLASの世界生産は140万トンである。ラットにLASのNa塩を経口投与した例では、15分後に血液で検出され、2時間後に最大となり時間とともに減少し、生物半減期は10.9時間と計算されている。経口によるLASのNa塩のLD<sub>50</sub>はラットで404~1470 mg/kg体重、マウスで1250~2850 mg/

kg 体重である。主な毒性の症状はラットの場合下痢であり、成長の阻害も見られる。0.5% LAS 溶液ではウサギの目に著しい炎症が起き、20~30% LAS 溶液のラットの背中への反復投与では、壊死がみられた。LAS は人に対して皮膚に弱い刺激性があり、表皮上では脱脂、湿润成分の逃散などが起こる。洗剤の場合、環境への影響にも最も関心がもたれているが、好気性条件下で LAS は容易に生分解される。LAS の濃度と共存物質に依存して7~30 日で主な生分解は完了する。高濃度では生分解が制限され、下水処理では LAS は吸収され沈澱し汚泥中に検出される。汚泥が土壤に施されると3 月以内に生分解は完了する。

Alkyl Olefin Sulfonates (AOS) および Alkyl Sulfates (AS) については要約を省略する。

本ドラフトは当衛生試験所の方々のご尽力によって作成された。

#### 6. Morpholine (1993/8/2)

morpholine は無色、油状で、アニリン様の臭いを伴って揮発する液体である。水には大量に、また通常の溶媒にもよく溶け、溶剤として利用されている。環境中や生理的条件下で、発がん性物質 N-nitrosomorpholine (NMOR) が生成される。世界の工業生産量は年間およそ2 万5 千~3 万トンである。ゴム産業で化学中間体や腐食防止剤として重要であり、農作物の保護剤や染料に乳化剤などとして広く使用されている。まだいくつかの国では、morpholine が化粧品類や食品添加物中に使われている。食品は果物のワックスによる処理や蒸気処理の過程で、また morpholine を含んだ包装品の使用による複数のルートから汚染される。柑橘類の皮から最高71 mg/kg、およびワックス処理されたリングから最高7.7 mg/kg の morpholine が、また NMOR は最高1.4  $\mu$ g/kg が検出された。洗面用具、哺乳瓶の乳首やおしゃぶりからも最高3.5 mg/kg の濃度で検出されている。職業的な暴露ではアメリカのタイル工場内で最高1.4 mg/m<sup>3</sup> 濃度の morpholine が、またゴム産業で最高濃度が250  $\mu$ g/m<sup>3</sup> の NMOR が検出された。ラットへの経口投与による LD<sub>50</sub> は1~2 g/kg 体重であり、短期試験では LD<sub>50</sub> の半分の量の投与で30 日以前にほとんど全部が死亡した。主な徴候は腎臓分泌管 (the secreting tubules of the kidney) の顕著な損傷、肝脂肪の変質などであった。ラットの長期吸入試験 (0.54 g/m<sup>3</sup>, 104 週間) では角膜の炎症などがみられた。人への影響

では、1% の morpholine を含むマスカラを直接に顔に塗布したテストで、数例目の刺激があった。

#### 7. Diesel Fuel and Exhaust Emissions

(1993/8/2)

diesel fuel (ジーゼル燃料) は原油の蒸留によって得られる。炭素の数 C<sub>9</sub>~C<sub>20</sub> の炭化水素の混合物からなり、沸点はおよそ163~357°C である。通常はジーゼル燃料のもつ流動性や爆発性の抑制のために添加剤が用いられている。ジーゼル燃料は輸送燃料として使われるが、火力発電所のガスタービンでも用いられる。使用量はアメリカで1 億3 千万トン、OECD 諸国では3 億7 千万トンである。職業暴露は広い分野に関連しているが、揮発性が低いために閉め切った場所以外では低濃度である。事故による人への影響では、無尿、腎不全、消化管の症状と皮膚の角化症を引き起こした例がある。

ジーゼルエンジンからの exhaust emissions (排気物質) は、排気物質中のガス相と粒子相に数千の化学成分を含んでいる。主なガス状生成物は二酸化炭素であり、ついで水蒸気、少量の一酸化炭素、二酸化イオウ、酸化窒素および非分解性の炭化水素とその誘導体等である。粒子状のばい煙は炭素原子からなり、微量金属とともに有機化合物を吸着している。マウスの長期吸入 (4 mg/kg 体重) 暴露では明らかに体重の減少がみられ、ラットやネコでも肺の機能が低下した。特にマウスの骨髄中にジーゼルのばい煙による遺伝子毒性がみられた。人への影響では短期的な職業暴露によって一時的な肺機能の低下が観察された。ジーゼル排気物質による暴露によって、トラックやバスの運転手に膀胱がんの増加が疫学調査から明らかにされている。

#### 8. Cresols (1993/9/21)

cresol はフェノールにメチル基が *o*-, *m*-, *p*- の位置に置換した cresol の異性体の総称である。常温では *m*- は液体、*o*- および *p*- は固体で、いずれもやや黄色がかっている。主な用途は溶剤と殺菌剤である。原油および石炭に cresol が含まれているため、環境への主な流出は、石油産業に関連した事故による漏出や生産工程からの排出によるものがあげられる。アメリカにおける cresol の生産量は3.83 万トン (1990 年) であった。水中の cresol は好気的および活性汚泥試験によって速やかに分解される。労働者の暴露では、フィンランドで木材ヘクレオソートを浸透させるときに使われた cresol などの影響のために大気中で0.6 mg/m<sup>3</sup> が検出され



た。マウスによる吸入試験では、毒性の影響として粘膜の刺激や神経筋の痙攣がみられた。cresolの経口による急性試験で死に至る場合は、昏睡、唾液過剰分泌、呼吸困難を伴っていた。長期毒性試験では、神経毒性を示し、また、*p*-cresolはがんのプロモータの役割をするのではないかとという研究もある。人への影響では、吸入暴露では口腔・咽頭の火傷、腹痛、嘔吐を伴い、標的臓器は主に中枢神経、血管系、腎臓であった。

#### 9. Methomyl (1993/10/18)

methomylは融点が77℃、蒸気圧が6.65ミリパスカル(25℃)の白い結晶である。水への溶解度は54.7g/l、オクタノール/水分配係数は1.24である。1966年に製造されて以来、世界中で、果物、ホップ、大豆、綿花などに使用されているカーバメート系殺虫剤である。methomylはラットの経口試験においてLD<sub>50</sub>が27~45mg/kgの高い急性毒性を示し、同様にエーロゾルによる吸入毒性も高く、LC<sub>50</sub>は0.26mg/lであった。唾液分泌過多、流涙症などを伴うコリンエステラーゼ阻害がみられた。人への影響では、事故と自殺による例があり、経口による事故で中毒を起こした5人の内、3人が3時間後に死亡した。死亡者のmethomyl摂取量は、12~15mg/kg体重と推定された。自殺による例では、母親は55mg/kg体重、6歳の子供は13mg/kg体重のmethomylを摂取したと推定された。

#### 10. Ethylbenzene (1994/2/1)

ethylbenzeneは沸点が136.2℃の、常温でガソリン様の臭気をもつ液体である。スチレンの生産に使用され、またペイント・ラッカーやゴムの溶剤としても用いられる。1983年の生産量はアメリカで400万トン、西ヨーロッパで300万トンと推定されている。ethylbenzeneは蓄積性の少ない物質で環境中

で分解され、水生生物に対する急性毒性は低い。人への暴露経路は呼吸と皮膚が主であり、肺での保持率は吸入量の40~60%である。100ppm濃度の8時間暴露で、疲労感、眠気、頭痛を催す。ethylbenzeneは顕著な変異原性を示さず、また人への発がん影響は知られていないが、ラットにおける長期試験では不確実ながら悪性腫瘍全体で発生率の増加がみられた。人の催奇形性や生殖影響のデータはないが、ラットやウサギの報告がある。

#### 寄せられたコメント

##### 1. Methylene Chloride

環境庁からコメントが寄せられ、その中で、例えば「10章 人の健康リスク」で「入手した情報によれば、Methylene chlorideの使用は環境に対して顕著な影響がなく、また人への影響はない」と述べられている点などに関し疑問を差し挟んでいる。

#### この1年に出版された EHC

- EHC 137: Electromagnetic Fields (300 Hz to 300 GHz)
- EHC 140: Polychlorinated Biphenyls and Terphenyls (Second Edition)
- EHC 143: Methyl Ethyl Ketone
- EHC 144: Principles for Evaluating Chemical Effects on the Aged Population
- EHC 145: Methyl paration
- EHC 146: 1,3-Dichloropropene, 1,2-Dichloropropene and Mixtures
- EHC 147: Propachlor
- EHC 148: Benomyl
- EHC 149: Carbenazim
- EHC 150: Benzene

## MSDSの有害性情報の記載における留意点および情報の収集について

山本 都・神沼二眞

## Important Points and References for the Description of Hazard Information in MSDS

Miyako Yamamoto and Tsuguchika Kaminuma

The preparation of MSDS (material safety data sheets) began in Japan in April 1993 with the notice of three Ministries, the Ministry of Health and Welfare, the Ministry of International Trade and Industry and the Ministry of Labor. MSDS are designed to provide chemical information to protect human health and the environment from chemical hazards. Important points in describing hazard information in MSDS are explained as well as references which are useful for preparation of MSDS. Problems for further discussion are also pointed out.

**Keywords :** MSDS, data sheets, safety documents

(Received May 31, 1994)

## はじめに

化学物質による被害を防止するための対策として、リスク評価、リスク管理などに加え、さらに化学物質の安全性に関する情報の伝達（リスクコミュニケーション）の重要性が認識されてきている。米国、カナダなどでは既に化学物質の製造・加工や輸入などに携わる業者にMSDS (material safety data sheets) の作成が義務付けられている。わが国でも、厚生省・通産省<sup>1)</sup>、および労働省<sup>2)</sup>による告示によって、該当する企業は1993年4月よりMSDSを作成することが行政指導でもとめられている。

一部を除き多くの企業にとってMSDSの作成は初めての経験となる。MSDSには、物理的・化学的危険性、健康への有害性情報、事故時の措置などいくつかの記載項目があるが、それぞれの項目に記載する内容は、国際的に整合性を持つものでなければならない。特に有害性情報に関する項目は複数あり、それぞれがもつめる内容が異なるので記載には注意が必要である。また有害性情報は、数多くの毒性データの中から記載すべき情報を選択しなければならないので記述がもっとも困難なものひとつであり、どのような資料を収集し参考にするかが重要なポイントとなる。本文ではMSDSへの有害性情報の記載における留意点および情報の収集についてまとめた。さらにMSDSも含め化学物質の安全性情報の

提供における今後の課題について整理した。

## 有害性情報の記載における留意点

## 1. MSDSの項目と記載すべき内容

従来よりMSDSを作成してきた国では独自の様式や規格を定めているところが多かったが、項目や様式が異なると輸出入の際に対応が困難なこともあり、国際的に整合性をはかろうという動きになってきている。MSDSの項目としては、ICCA (国際化学工業協会協議会) が作成しILO条約で採用されている16項目があり、物性、有害性情報、応急処置、火災や漏出時の措置など分野別に16に分けられている。ISO (国際標準化機構) の国際規格案、EC委員会指令<sup>3)</sup>、米国規格<sup>4)</sup>もこの16項目に準じており、わが国でも、厚生省・通産省の告示<sup>1)</sup>および日本化学工業協会の「製品安全データシートの作成指針」<sup>5)</sup>の項目はほぼこれに沿っている。

16項目のうち有害性情報に関する項目は、項目3と11であり、原文(英語)では、項目3は“hazards identification”，項目11は“toxicological information”となっている。各項目の記載内容については、ILOの実施コード<sup>6)</sup>、EC委員会指令<sup>3)</sup>、ISOの国際規格案、米国規格<sup>4)</sup>それぞれの解説があり、全般的にはほぼ一致している。これらが国際的に理解されている記載内容と考えてよいと思われるので、次に要約する。

- ・項目3 (Hazards identification)：物理的および人の健康や環境に関する最も重要な危険有害性 (hazards) について明瞭かつ簡潔に記載する。ILOや米国規格の解説では「緊急時の概要 (emergency overview)」としての性格も有することが要求されている。
- ・項目11 (Toxicological information)：身体への影響 (症状も含む) や暴露経路 (吸入, 経口摂取, 皮膚や眼との接触), 慢性影響など動物試験結果を含めた毒性学的情報を記載する。

すなわち, 項目3と11ではその目的が異なり, 項目3では, その物質を実際に扱う者や緊急時の対応責任者などが, その物質が及ぼす重大な影響の全体像を正確に把握できるような内容がまとめられる。毒性情報だけでなく, 物理的・化学的危険性, 環境への有害な影響も含まれる。例えば, 引火性, 爆発性, 自然発火性, 有毒ガスの放出, 刺激性や腐食性, 感作性, 発がん性といった重要な有害影響はここに含まれるであろう。一方, 項目11には, 動物試験結果やLD<sub>50</sub>, LC<sub>50</sub>などの毒性学的数値データも含むより詳しい毒性情報を記載する。項目3に記載された有害性情報を補足する役割も有する。

国際的整合性をはかるためには, わが国のMSDSの記述内容もこれと合致したものであることがのぞましい。しかしここで注意しなければならないことは, 英語の項目名とそれに対応する日本語の項目名との違いである。日本語の項目名は適切な訳語がないこともあり, 例えば項目3については「危険性又は有害性の種類」<sup>1)</sup>や「危険有害性の分類 (分類の名称等)」<sup>2)</sup>, 項目11については「有害性に関する事項」<sup>1)</sup>や「有害性情報」<sup>2)</sup>となっている。これらから, 項目3と11の目的の違いを正確に理解することは困難である。また項目3において, 種類や分類という言葉を誤解し, 危険有害性ではなく化学物質の分類のみを記載すると, 前述した国際的整合性を持つ内容と合致しなくなるので注意が必要である。

## 2. 毒性情報の選択

毒性試験はさまざまな実験条件で行われ, また人に対する影響の程度にも差がみられる。化学物質によっては非常に多くの報告が出されているものもある。MSDSを利用する人は毒性の専門家ではないので, 多数の毒性データがただ羅列されていてもどれが重要な情報なのか判断が難しい。したがってMSDSでは重要なデータがある程度選択され, 簡潔で理解しやすい記述がのぞましい。

一方, MSDSの作成者も必ずしも毒性の専門家ではなく, またMSDSに記載する情報に関して一定の選択基準といったものもない。作成者にとって数多くの一次資料 (原報など) の中から重要な毒性情報のみを選択し, MSDSのように限りあるスペースの中にまとめるのは容易ではない。MSDSの作成にあたっては, いかに関与性のある二次資料などの情報源にアクセスするか, すなわち適切な情報収集と効率的な検索が重要なポイントとなる。

## MSDSの作成における情報収集

当部ではIPCSの担当機関としてICSC (国際化学物質安全性カード) の原案を毎年作成している。ICSCに記載する毒性情報は人への影響を中心にまとめているが, 参考にする情報源や作成の手順はMSDSの場合とほとんど同じである。この中からMSDSの作成に参考になるとと思われる情報源および作成手順について, 毒性情報を中心にまとめる。

### 1. 情報収集の手順

情報源の種類や収集の手順は, 研究を行う場合とICSCやMSDSを作成する場合では異なる。研究の場合は, 通常, 検索対象の分野がしばられているので, 文献データベースから目的の原報を捜し出せばよい。一方, ICSCやMSDSに必要な情報は, 物理的・化学的性質, 急性症状や応急処置も含めた毒性全般, 環境影響, 火災・爆発, 貯蔵・廃棄など広い分野にまたがる。したがって最初から原報を検索するより, 次のような手順が効率的と考えられる。

1. その物質の全体像をつかむ (データ集, ファクトデータベース, 一般参考書)
2. 毒性影響, 環境への影響など個々の分野で, より詳しい情報を調べる (評価文書, レビュー類, グレイレポート類)
3. 必要に応じて原報を調べる (文献データベース, 引用文献からのまごびき)

### 2. 情報源の種類

MSDSの作成に際して参考になる情報源の種類について次に示す。利用形態としては, 印刷物, CD-ROM, オンライン検索, マイクロフィッシュなどがある。

(a) データ集, ファクトデータベース, 参考書

データ集やファクトデータベースは, 一次情報から目的に応じてデータを選択し, 整理・編集したものであるが, 大きく分けて物質ごとに編集したものとデータの種類 (例: 許容濃度, 物性値, 環境デー

タ、変異原性試験データなど)ごとに編集したものがある。物質ごとに編集しているものの場合、なるべく引用文献が付記されているものを参考にした方がよい。引用文献が付いていないデータ集は比較的多いが、中には古いデータからの引用を何度か繰り返すうちに不正確なデータが一人歩きしてしまっている例が少なくない。特に人についての暴露経路や有害影響の記述に関しては注意が必要である。

#### (b) 評価文書、レビュー類、グレイレポート類

評価文書やレビュー類は、特定の物質についての文献を網羅的に収集し整理あるいは評価した資料で、信頼性の高いものが多い。

グレイレポート類は、政府機関の報告書、ワーキングペーパーなど通常の販売ルートを通らないものであり、一部を除いて一般的な検索が難しい。しかし例えば、PBレポートなど米国政府機関や大学が作成している科学技術報告書は、文献データベースのNTIS (National Technical Information Service) を用いて検索することができ、よくまとまっていて非常に有用である。

#### (c) 文献データベース

(a)や(b)の資料に記載されている情報の確認や新しいデータの検索のために原報にアクセスする場合は、オンラインやCD-ROMにより文献データベースから検索する。ICSC作成の場合は最初にまずCA (Chemical Abstracts) とTOXLINEを検索し、必要に応じてその他の文献データベースを用いることが多い。またNTIS, Federal Register, Diogenesなどの文献データベースを用いてグレイレポート類を検索している。

各国のICSCの担当者が集まる原案検討会議では、引用文献の質や信頼性についてかなり率直な意見が出される。通常、このような情報が活字になることはめったになく、会議で得られるこれらの知識は貴重である。この点も考慮に入れ、ICSCを作成する際に有害性情報の記載に特に参考になる資料を文末の【MSDS作成のための参考資料】に示した。

### 安全性情報の提供における今後の課題

国際的な流れの中でわが国でもMSDSの作成が開始されたことは大きな進歩であるが、化学物質の安全性情報の提供をより効果的に進めるために今後検討が必要と思われる課題を要約する。

#### 1. 情報の質

MSDSは、誤まった取扱いや情報不足による事

故あるいは健康への有害影響を防止し、また事故がおこった場合被害を最小限に抑えるための情報提供を目的としている。したがって、いかに信頼性の高い適切な情報を提供するか、その内容と質が今後問われよう。

2. 利用者のニーズに応じた情報提供方法の検討  
化学物質に関する情報を必要とする人々は、化学工場の作業員、輸送する人、農薬を扱う人、消費者など多岐にわたる。被害の種類もさまざまで、ここ1, 2年の新聞を見ても、高速道路での横転事故によるクロロピクリンの流出、化学工場の爆発事故、防水スプレー事故などがみられた。ラベルやMSDSなど、対象グループの状況とニーズに応じたもっとも効果的な情報の提供方法を検討していく必要がある。

#### 3. 用語の整理・検討

安全性に関する用語に関しては定義や訳語が確立していないものが多い。前述した“hazard identification”の他、“hazard”, “danger”なども、定義を正確に説明しその違いがわかる適切な日本語に訳するのはかなり困難である。また危険性、有害性、危険有害性といった用語もよく用いられているが、明確に使い分けるのは難しい。用語の定義や訳がそれぞれの解釈で用いられると、場合によっては重大な誤解を招く可能性があるため、できるだけ整合性を持たせるように検討していく必要がある。

#### 4. 安全性情報を収集・整理・評価し提供できるシステム

現在、膨大な量の情報が印刷物や電子メディアなどさまざまな形で存在しているが、その存在が必ずしもその情報を必要としている人達に知られているとは限らない。安全性情報の提供にかかわる人達との会話の中でも必要な情報にアクセスすることの困難さをあげる声が少なくない。化学物質の安全性に関する情報を網羅的に収集・整理・蓄積し、必要に応じて評価もでき、しかも誰でも比較的手軽にアクセスできるようなシステムの存在が望まれる。

また、情報の収集・提供を効果的に行うために国際機関や外国の公的機関との情報交換や協力体制の整備も重要な課題である。

### 【MSDS作成のための主な参考資料 (特に有害性情報について)】

#### (1) データ集や参考書

(1) Clayton, G. D. and Clayton, F. E., ed.

- Patty's industrial hygiene and toxicology, 3rd ed. (1982), New York, John Wiley and Sons."
- (2) Chemical Safety Data Sheets, Vol. 1~5, The Royal Society of Chemistry, (1989~) Thomas Graham House, Cambridge, U. K.
  - (3) NIOSH/OSHA, Occupational Health Guidelines for Chemical Hazards, (1981~1989) DHHS, U. S.
  - (4) ACGIH (1993~1994) Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents and Biological Exposure Indices. American Conference of Governmental Industrial Hygienists. Cincinnati.
  - (5) ACGIH Documentation of the Threshold Limit Values and Biological Exposure Indices. 5th ed. (1986), American Conference of Governmental Industrial Hygienists, Cincinnati, Ohio.
  - (6) Encyclopedia of Occupational Health and Safety, 3rd ed. rev. (1989) International Labour Organization (ILO), Geneva.
  - (7) Gosselin, R. E et al., Clinical Toxicology of Commercial Products. Williams & Wilkins, Baltimore.
  - (8) Hayes, W. J., Pesticides studied in man, Baltimore: Williams & Wilkins (1982).
  - (9) 国際化学物質安全性カード (ICSC), IPCS, Geneva.
- (2) ファクトデータベース
- (1) HSDB (Hazardous Substances Data Bank)
  - (2) RTECS (Registry of Toxic Effects of Chemical Substances, NIOSH)
  - (3) CHEMINFO/CCOHS
  - (4) Poisindex
  - (5) THE AGROCHEMICALS HANDBOOK
- (3) 評価文書, レビュー類
- (1) 環境保健クライテリア (EHC: Environmental Health Criteria), IPCS.
  - (2) IARC モノグラフシリーズ (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans), IARC/WHO.
  - (3) FAO/WHO の Pesticide residues in food/JMPR シリーズ, FAO/WHO.
  - (4) ECETOC (European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals) の Joint Assessment of Commodity Chemicals シリーズ, 欧州.
  - (5) ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) の Toxicological Profile シリーズ, 米国.
  - (6) NTP テクニカルレポートシリーズ, NTP (National Toxicology Program), US Department of Health and Human Services (DHHS), 米国.
  - (7) BIBRA Toxicity Profile, BIBRA Toxicology International, 英国.
  - (8) 危険物輸送に関する国連勧告 (オレンジブック) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods/United Nations, 8th revised ed. (1993), 国連.
- (4) 文献データベース
- (1) CA SEARCH (or CAS Online)
  - (2) TOXLINE
  - (3) MEDLINE
  - (4) BIOSIS PREVIEWS
  - (5) NTIS (National Technical Information Service)
  - (6) CANCERLIT
  - (7) FEDERAL REGISTER
  - (8) DIOGENES
  - (9) OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH (NIOSH)
  - (10) CHEMICAL SAFETY NEWSBASE
  - (11) JICST 科学技術文献ファイル
- 文 献
- 1) 厚生省・通産省告示第1号「化学物質の安全性に係る情報提供に関する指針」平成5年3月26日
  - 2) 労働省告示第60号「化学物質等の危険有害性等の表示に関する指針」平成4年7月1日
  - 3) 「製品安全データシートの作成指針」平成4年8月, (社)日本化学工業協会
  - 4) Official Journal of the European Communities, Commission Directive 93/112/EC of 10 December 1993.
  - 5) American National Standard for Hazardous Industrial Chemicals-Material Safety Data

Sheets-Preparation, ANSI (American National Standards Institute, New York, USA.  
6) Safety in the Use of Chemicals at Work. An

ILO code of practice. International Labour Office, Geneva (1993)

## 国際化学物質安全性カード (ICSC) の作成および日本語への翻訳

山本 都・中野達也・横手規子・神沼二真

## Preparation of International Chemical Safety Cards (ICSC) and their Translation into Japanese

Miyako Yamamoto, Tatsuya Nakano, Noriko Yokote and Tsuguchika Kaminuma

Preparation of International Chemical Safety Cards (ICSC) is described. The main characteristics of the ICSC are the use of standard phrases, a compiler's guide and a program for their preparation by personal computer. Standard phrases harmonize expressions on ICSC and also facilitate translation into other languages. In our case more than 900 cards have been translated into Japanese and published. Recently, a new program to aid translation by personal computer has been developed.

**Keywords** : ICSC, IPCS

(Received May 31, 1994)

## ICSC 作成の目的

化学物質を取扱い、その安全性に関する情報を必要とする人は、化学工場の作業員や監督者、製造・加工・販売などの業者、農業従事者、さらには消費者など多岐にわたる。IPCS (国際化学物質安全性計画) では、EHC (環境保健クライテリア)、HSG (安全衛生ガイド)、ICSC (国際化学物質安全性カード) などいくつかのドキュメントを作成しているが、このうち ICSC は、現場で化学物質を取扱う人達に化学物質の安全性に関する情報を伝達することによって情報不足や誤使用による健康被害や事故を防止しようというものである。利用対象者として科学の専門家ではない人達を念頭においており、また開発途上国での安全性情報の提供手段やトレーニング材料となることも意図しているので、記載内容はわかりやすく簡潔にということが配慮されている。したがって、各化学物質ごとに表裏2ページからなる1枚のカードとなっており、表ページには、火災、爆発、各暴露経路ごとの急性症状や応急処置、漏洩物処理、貯蔵法など、裏ページには、物性、物理的・化学的危険性、許容濃度、暴露経路、短期および長期暴露影響、環境データその他が記載されている。

## ICSC の作成と原案検討会議

ICSC 作成の流れは次のようになる。

- ① 原案作成
- ② “Scientific editor” によるチェック、化学工業界への提示
- ③ 原案検討会議

すなわち、第一段階として、まず EC 各国、米国、カナダ、日本など十数機関の協力機関 (PI) が分担して原案を作成する。日本の場合は、PI である国立衛生試験所が各分野の専門家からなる ICSC 国内委員会を組織して原案作成およびチェックを行っている。

第二段階として、各国の PI は原案を “Scientific editor” に送る。“Scientific editor” は原案をチェックし、特に検討が必要な箇所を指摘する。これは原案検討会議の前にあらかじめ問題点を抽出しておくことによって、時間が限られた会議での検討もれを防ぐ意味で重要である。また IPCS は会議の前に原案を化学工業界に提示しコメントをもとめている。

第三段階は年2回各国の担当者が集まる原案検討会議である。全体会議には、EC、ILO (国際労働機関)、CEFIC (欧州化学工業連盟) といった関係機関の人も出席し、化学物質の安全性に関する活動についての全体的な動向も話し合われる。実務的な検討作業はケミカルグループおよびバイオロジカルグループに分かれて行い、個々の原案のデータと引用文献を詳しく検討する。発がん性、変異原性、生殖毒性などのデータの選択や記述はその分野の専門

家以外には判断が難しいものが多いので、IARC (国際がん研究機関)の専門家が参加しこの部分の検討に加わっている。

毎年200~250物質についてのICSCが作成されており、1988年に作成開始以来1992年末までに約1000物質のICSCが作成された。安全性カードや安全性データシートの類はデータの更新が重要なのでICSCは定期的に更新されることになっており、1993年には最初の2年間に作成したカードの更新が行われた。ICSCは、印刷物、CD-ROMで利用でき、近いうちにパソコン用検索ソフトでも利用できるようになる。

## ICSCの特徴

### 1. ICSCとMSDSの比較

米国、カナダなどいくつかの国では以前から化学物質の製造・加工などに携わる企業がMSDS(material safety data sheets)を作成している。ICSCとMSDSは、化学物質を現場で取扱う人達への情報提供の目的や記載項目など類似した部分が多い。一方、MSDSの場合は企業が作成し、国によっては法律で定められていて企業が法的責任を負うのに対し、ICSCは国際機関が作成するもので法的拘束力を持たない。また、ICSCはMSDSと異なり製剤や混合物を対象としていない。有害性に関する情報については、MSDSが動物試験結果も含めた毒性データを記述することが多いのに対し、ICSCは人への影響を中心に記載している。

既成のMSDSはさまざまなグループによって作成されており様式や表現がそれぞれ異なるが、利用者にとってはできるだけ統一性のある様式や表現の方が理解しやすい。ICSCは標準語句を使用することによって表現の統一化をはかっている。

### 2. 標準語句とコンパイラズガイド

標準語句は、物理的・化学的性質、毒性影響、急性症状、火災・爆発、曝露時の応急処置、漏洩物の処理、貯蔵など数十の項目ごとに、それぞれ高い頻度で用いられる単語や文章を設定したものである。各標準語句には固有の5桁の番号が割り振られ、全部で約600の標準語句が設定されている。

ICSCの作成者は、化学物質に関する情報を収集・検討した後、その物質に該当する表現を標準語句の中から選択して使用する。該当する標準語句がない場合は、自分で文章を新たに作成する(自由語句)。標準語句の使用により、同じ内容の情報につ

いて各自がばらばらな表現を用いるのを防ぐことができる。

ICSCは標準語句の選択に一定の基準を設けている。例えば、物質が有機溶媒の場合は標準語句の「液体を飲み込むと肺に吸引され、化学性肺炎を起こす危険がある」を選択するとか、腐食性物質や有機溶媒の場合は応急処置の項目で「吐かせてはならない」を選択する、といった基準がある。これらの基準をまとめて記載したものがコンパイラズガイドである。ガイドの指示と化学物質の物性から、消火剤の種類、火災・爆発・漏洩時の対応、貯蔵方法といった分野の標準語句がある程度自動的に選択できるようになっている。

標準語句使用の主な利点は次の3点である。(1) ICSCの作成者が異なっても、整合性のある語句や表現になる。(2) パソコンによる作成が容易になる。(3) 英語以外の言語への翻訳が容易になる。

### 3. パソコンによるICSCの作成

ICSCは、パソコンを用いて原案を作成している。作成用ソフトは米国労働安全衛生研究所(NIOSH)がICSC用に開発したもので、NIOSHプログラムと呼ばれている。このソフトにはあらかじめすべての標準語句が固有の5桁の番号とともに入っている。カード作成者がパソコン上で必要な標準語句に選択用のマークを付け、数値データや自由語句を書き加えた後、サブファイル作成命令を入力すると、選択しない標準語句が削除されてサブファイルが出来上がる。サブファイルは、標準語句、自由語句、数値データが番号順に羅列されたもので、各情報の末尾に引用文献の番号が記載され最後に文献名がまとめて記載されるようになっている。原案の検討はサブファイルを用いて行っている。カードの様式にするにはパソコン上でカード作成命令を入力してサブファイルから自動変換すればよい。スペースが限られているのでカード上には引用文献は記載されない。

## ICSCの翻訳

### 1. 他言語への翻訳

既に述べたようにIPCSが意図しているICSCの目的は、現場で化学物質を取扱う人達や開発途上国への情報提供である。主に専門家が利用するEHCに比べ対象がより広い範囲になるので、作成開始当初からICSCの他言語への翻訳は必須と考えられてきた。

標準語句およびパソコン用ソフト利用の大きな利



点は、他の言語に翻訳しやすいことである。すなわち、あらかじめ標準語句を他言語に翻訳しソフトに入力しておくことによって、翻訳に要する労力のかかりの部分をパソコン上で自動的に行うことができる。NIOSH プログラムには英語の他にフランス語、ドイツ語、スペイン語、オランダ語などいくつかのヨーロッパ言語の標準語句が入力されている。したがってこれらの言語に関しては、英語の場合と同じ手法で最初からカードを作成でき、また作成済みの英語のサブファイルから自動変換することもできる。これは各標準語句に固有の5桁の番号が付いているので、パソコンが同じ番号を持つ他言語の標準語句に容易に変換できるためである。ただし、自由語句については個々に翻訳する必要があり、語句の順序の入れ替えも必要である。

このNIOSHプログラムは、日本語、中国語、アラビア語といった文字や文法の異なる言語への翻訳には対応できない。

## 2. ICSCの日本語への翻訳

わが国では1993年4月から、化学物質の製造や加工に携わる企業はMSDSを作成することが行政指導でもとめられるようになった。ICSCの記載項目はMSDSと類似しているためMSDSの作成に参考になる情報が多い。こうした状況からICSCの日本語への翻訳を開始し、1992年8月に約490物質について日本語版第1集<sup>1)</sup>、1994年2月に約430物質について第2集<sup>2)</sup>を翻訳・出版した。

### (i) 作業の手順

ICSCの日本語版の作成手順をまとめると次のようになる。

- ① 標準語句の翻訳：カードの翻訳に先立ち標準語句を翻訳。日本語標準語句は英語標準語句と同じ5桁の番号を付け、パソコンに入力(1990~1991年)。
- ② 英文元原稿と同じ番号の日本語標準語句の選択。
- ③ 数値データの入力および自由語句の翻訳。
- ④ 語句の順序を入れ替え文章を完成。
- ⑤ 内容のチェックおよび問題点の抽出。専門家に問い合わせ。
- ⑥ 原稿完成。

翻訳上の問題点のひとつは、特に初期のICSCの毒性影響や症状など英語の医学用語にさまざまな自由語句が用いられていたことである。同じ意味の標準語句があるにもかかわらず別の自由語句を用いて

いる例も少なくなかった。表現の整合性やパソコンによる自動翻訳の点から、必要以上に自由語句を用いることは好ましくないため、現在ICSCの作成においてはできるだけ標準語句を用いるように指示されている。

NIOSHプログラムによるヨーロッパ言語への翻訳は上記の手順②および③を自動化しているが、日本語への翻訳には利用できないので第1集の作成時にはこの部分も手作業で行った。第2集ではAWK言語を用いた自動選択・変換プログラムを開発し、手順②および③の部分を実行できるようにした。

### (ii) AWK言語を用いた自動選択・変換プログラム<sup>3)</sup>

AWKには、Gnu Awk(gawk)2.11.1+2.9 (MS-DOS, SJIS)を用いた。本プログラムによる自動選択・変換作業に用いたものは次のとおりである。

- (a) 自動選択・変換プログラム
- (b) 元原稿となる英語版サブファイル
- (c) 日本語標準語句：日本語標準語句は本プログラム用に部分的に変更した。すなわち、自由語句用の空欄は、英語標準語句の自由語句欄が出てくる順に [1], [2] と置き換えた。また、元の英語をそのまま出力したい部分は“Eng”と指定した。

例：(英) 13381 “Reacts [ ] with [ ] oxidants [ ].”

(日) 13381 [2] 酸化剤 [3] と [1] 反応する。

- (d) 自由語句辞書：使用頻度の高い自由語句約400(化学物質名や医学用語も含む)を選び出して英語と日本語の対訳辞書を作成し、プログラムに組み込んだ。

(a)~(d)をハードディスクの作業ディレクトリに入れ変換命令を入力すると、英語サブファイルを次々に自動処理し、対応する日本語サブファイルが作られていく。すなわち、次のような作業が行われる。

①英語サブファイル(元原稿)と同じ番号の日本語標準語句の選択、②選択しない標準語句の削除、③英語の自由語句のうち、自由語句辞書の中にある語句は自動的に日本語に置換し、辞書の中に入らない語句は英語のまま日本語サブファイルの [ ] 内に入れる。数値データはそのまま [ ] 内に入れる、④日本語サブファイルの出力。

パソコン上で自動選択・変換を行った後、出力し

た日本語サブファイル中に残っている英語部分を翻訳し、語句の順序を入れ替えて完成した日本語とした。

このプログラムを用いることにより②および③の所要時間は第1集での約50~60分に比べ約20分と半分以下に短縮された。これは、NIOSHプログラムによるヨーロッパ言語への自動変換の所要時間にほぼ匹敵する。また、数値データの入力ミスや各番号の標準語句の選択・削除ミスがなくなったため、見かけ上の所要時間の短縮以外に見直しに要する労力が大幅に減少した。

## 文 献

- 1) 国際化学物質安全性カード (ICSC), 監修: 国立衛生試験所化学物質情報部および厚生省生活衛生局生活化学安全対策室, 監訳: ICSC 国内委員会, 化学工業日報社, 東京 (1992)
- 2) 国際化学物質安全性カード (ICSC) 第2集, 監修: 厚生省生活衛生局生活化学安全対策室, 編集: 国立衛生試験所化学物質情報部, 監訳: ICSC 国内委員会, 化学工業日報社, 東京 (1994)
- 3) 中野達也, 山本 都, 横手規子, 神沼二真: AWK を用いた国際化学物質安全性カードの日本語翻訳支援プログラム, 第16回情報化学討論会 (1993.11)

化学物質安全性データシート作成のための有害性情報  
—エチレンチオ尿素—

山本 都・会田喜崇

Hazard Information for the Preparation of Material  
Safety Data Sheets (MSDS)  
—Ethylenethiourea—

Miyako Yamamoto and Yoshitaka Aida

Information on ethylenethiourea (ETU) was collected to estimate the amount of actual intake into the body. Useful information such as physical properties, toxicological data and environmental data was selected and described for the preparation of material safety data sheets (MSDS).

**Keywords :** ETU, 2-imidazolidinethione, 2-imidazoline-2-thiol

(Received May 31, 1994)

目 的

化学物質による健康被害や事故を防止するために化学物質を取扱う人々への情報提供を目的として、わが国でも1993年4月よりMSDS(化学物質安全性データシート)の作成に関して厚生省、通産省および労働省による行政指導が実施されている。

MSDSは、化学物質やそれを含む製品に関する情報を、組成、物理的・化学的性質、危険有害性情報、環境情報、火災・爆発、保管方法など分野ごとに簡潔に記載し、取扱い上注意すべき情報を提供する。MSDSの利用者は科学の専門家ではなく、情報を記載するスペースも限られているので、MSDSにはある程度重要な情報だけを選択して記載する必要がある。

国立衛生試験所では化学物質に関するさまざまな情報を収集しまとめる機会が多いが、ここで集めた情報はMSDSの作成に際しても有用である。今回、指定化学物質であるエチレンチオ尿素的の摂取量予測調査を行うために情報を収集したので、その中からMSDSの項目に関連する物理的・化学的性質、毒性情報、環境情報を中心に選択してまとめた。

エチレンチオ尿素

(1) 物理的・化学的性質

1. 名称および別名<sup>1)</sup>

エチレンチオ尿素, 2-イミダゾリン-2-チオール, 2-イミダゾリジンチオン, 4,5-ジヒドロイミダゾール-2(3H)-チオン, 2-メルカプトイミダゾリン

本報告中では以後ETU(ethylenethiourea)と略する。

2. 識 別

CAS登録番号: 96-45-7

RTECS番号: NI 9625000

既存化学物質番号: 5-423

EINECS番号: 202-506-9

EC番号: 613-039-00-9

分子式:  $C_3H_6N_2S$

分子量: 102.17

3. 性 状<sup>2,3,4)</sup>

外観: 白色結晶。臭い: 無臭もしくはかすかにアミン臭。融点: 203~204°C。

水への溶解度: 2 g/100 ml (30°C), 9 g/100 ml (60°C), 44 g/100 ml (90°C)

他の溶媒への溶解性: メタノール, エタノール, エチレングリコール, ピリジンに溶ける。アセトン, エーテル, クロロホルム, ベンゼンに溶けない。

オクタノール/水分分配係数:  $\log Pow$  0.67<sup>4)</sup>,  $\log$

Kow = -0.66 (calc)<sup>5)</sup>

#### 4. 安定性および反応性

加水分解に対してはかなり安定である (pH 5~9, 90°C, 3ヶ月間)<sup>4,5)</sup>。光により分解しやすく、エチレン尿素 (EU), イミダゾール誘導体などいくつかの物質が生成する<sup>4)</sup>。

#### 5. 製造・用途など<sup>2,6)</sup>

エチレンジアミンと二硫化炭素を反応させ、塩素を加えて還流することにより製造<sup>6)</sup>。ネオプレンゴム製造における加硫促進剤として用いられる他、ポリアクリルゴム、合成樹脂の製造や抗酸化剤の中間体としても用いられることがある。また、エチレンビスジチオカーバメート系殺菌剤 (EBDC 類: エチレンビスジチオカルバミン酸の金属塩, ジネブ, マンネブ, マンゼブなど) の主要な分解産物でもある。

### (2) 環境中の挙動と影響

#### 1. 環境中の挙動

土壌中での分解は速い<sup>5)</sup>。生物的に活性な土壌中では ETU は二酸化炭素やヒダントインなどに分解される。滅菌した土壌中では、滅菌していない土壌中よりも分解が遅く、分解物としてはエチレン尿素 (EU) のみが見られる。通常の条件では ETU は土壌中に残存しない。湿った土壌中では非常に移動しやすい<sup>4)</sup>。

水の中では、加水分解に対して非常に安定である<sup>5)</sup>。光増感剤が存在すると速やかに酸化される。トリプトファンやチロシンなどのアミノ酸も ETU を酸化する<sup>4)</sup>。

米国の農業地域の井戸における ETU の分析調査 (1986~1987年) では一部の井戸に数 ppb の ETU が検出された<sup>7)</sup>。わが国では環境庁が 1983年に水質および底質中の ETU を測定しているが、どちらにも検出されなかった<sup>8)</sup>。

蒸気として空中に放出されると、光化学反応によりヒドロキシラジカルを生成する<sup>5)</sup>。

植物が ETU を取り込むと EU と 2-イミダゾリンが代謝物として検出された<sup>4)</sup>。

#### 2. 環境中の生物への影響<sup>4)</sup>

ETU の LC<sub>50</sub> は次のようなものである<sup>4)</sup>。

LC <sub>50</sub> : <i>Poecilia reticulata</i>	7500 mg/l (96 hr)
<i>Daphnia magna</i>	26.4 mg/l (48 hr)
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	

6600 mg/l (96 hr)

*Photobacterium phosphoreum*

2100 mg/l (15 min)

EHC<sup>4)</sup> ではこの結果から、ETU はバクテリア、藻類、甲殻類、魚類に低毒性であり、また log Pow が低く、生体内で速やかに変化するので、生物蓄積の可能性は低いとしている。

### (3) 人への暴露源と影響

#### 1. 人への暴露源<sup>4,7)</sup>

農作物をエチレンビスジチオカーバメート (EBDC) 系殺菌剤で処理すると、貯蔵、加工、調理などの過程で EBDC 類が分解して ETU が生成することがある<sup>8~10)</sup>。また ETU は不純物としても EBDC 系殺菌剤中に含まれている<sup>11~13)</sup>。農作物中の ETU 濃度については日本も含めていろいろ報告がなされているが<sup>4,5,8,11~18)</sup>、ETU レベルは通常 0.1 mg/kg 以下であると報告されている<sup>4,8)</sup>。人は食品の他に、ETU 製造工場やゴム製造工場における作業<sup>4,11,19)</sup>、あるいは EBDC 系殺菌剤の農作物への散布<sup>5,8)</sup> を通して暴露される可能性がある。

#### 2. 人への有害影響

人への影響に関する報告としては、英国の ETU 製造工場で働く作業員について 3年にわたって甲状腺機能を試験したものがあつた。ETU に暴露した混合作業者では血中の T<sub>4</sub> (thyroxine) 濃度が有意に低かつた。しかし加工作業者では変化はなかつた。甲状腺刺激ホルモンや甲状腺結合グロブリンに関しては影響はみられなかつた<sup>20)</sup>。

また、米国のゴム製品の工場で働く女性について流産の率について調べたところ、作業環境が生殖に対して及ぼす悪影響はみられなかつた<sup>21)</sup>。

ゴム製造工場数カ所および ETU を生産している工場一箇所働いていた 1929人の作業員について調べた結果、1957~1971年の間に甲状腺がんの症例は報告されていない<sup>4,21,22)</sup>。

#### (4) 薬物動態<sup>4,23)</sup>

哺乳動物で ETU は消化管から速やかに吸収され、代謝され、主に尿中に排泄された<sup>4,23)</sup>。妊娠したマウスおよびラットを用いた実験では胎仔にも移行し、6~9時間の半減期で主に尿中に排泄された<sup>21,24)</sup>。モルモットを用いた実験では、ETU は暴露経路に関係なく高濃度で甲状腺に蓄積し、ほとんどが未変化体として尿中に排泄された<sup>25)</sup>。

#### (5) 毒性試験データ

ETU の毒性に関してはさまざまな報告がなされ

ているが、IPCS (国際化学物質安全性計画) のEHC (環境保健クライテリア)<sup>4)</sup> および JMPR (FAO/WHO 合同残留農薬会議) の報告<sup>21,24)</sup> には各種の文献がまとめられ評価されている。また米国のNTP (国家毒性プログラム) もETUの毒性および発がん性試験を行った結果を1992年に発表している<sup>23)</sup>。このうち、JMPRの報告<sup>21,24)</sup> は最も新しく網羅的であるので、ここから毒性試験データを抜粋してまとめた。各試験の原報名はJMPRの報告中に記載されている。

### 1. 急性毒性

エチレンチオ尿素 (ETU) を哺乳動物に経口投与した場合の毒性はさほど強くなく、LD<sub>50</sub> はラットでは545~2400 mg/kg、マウスでは2400 mg/kg以上である (Table 1)。

### 2. 短期および長期暴露影響

短期暴露試験では、マウス、ラット、イヌを用いた試験があり、いずれも混餌法で実施されている。ここでは、実験結果でNOAELが特定できる報告を中心に記載する (Table 2)。甲状腺の重量増加、甲状腺の濾胞細胞の増殖、甲状腺ホルモンの異常が報告されている。

長期暴露の毒性影響はラットおよびマウスの混餌法投与での実験が報告されており、主に甲状腺の機能低下、および組織病理学的には甲状腺濾胞細胞の増殖、腺腫、腺がんの発生が報告されている

Table 1. Acute toxicity of ethylenethiourea<sup>21)</sup> by gavage

Animal	Sex	LD50
Mice	Male and female	4000
	Male and female	>3000
	Female(9 days of pregnancy)	>3000
	Male and female	about 2400
Rats	Male and female	about 2400
	Male	1832
	Male and female	940
	Female(13 days of pregnancy)	600
	Female	545
Hamster	Female	>3000
	Female(11 days of pregnancy)	>2400

(Table 2)。

### 3. 催奇形性および生殖能への影響

ETUの催奇形性についてはラット、ハムスターなどで明らかにされている (主に脳と骨格に異常)。しかし、マウスでは高用量投与でも変化はみられていない (Table 3)。

### 4. 遺伝毒性<sup>4,21)</sup>

ETUは数多くの *in vitro* および *in vivo* の試験系で試験されている。細菌を用いた高用量での変異原性試験で陽性の報告もあるが、他のほとんどの試験では陰性の成績が報告されている。1993年のJMPR会議ではETUは遺伝毒性物質ではないと評

Table 2. Short-and long-term toxicity of ethylenethiourea administered in the diet<sup>21)</sup>

Species	Exposure duration	NOAEL	Target organ(effect)
Short-term exposure			
Mice	13 weeks	250ppm(38mg/kg/bw)	Thyroid(Follicular cell hyperplasia),Liver(Cytomegaly)
	3 months	10ppm(1.7-2.4mg/kg/bw)	Thyroid(Follicular cell hyperplasia)Liver(Organ weight)
Rats	8 weeks	25ppm(2.6mg/kg/bw)	No change in the highest dose group
	13 weeks	<60ppm(3.0mg/kg/bw)	Thyroid(Follicular cell hyperplasia)
	90 days	25ppm(1.7-1.9mg/kg/bw)	Thyroid(Congestion)
Dogs	4 weeks	200ppm(6.7-7.4mg/kg/bw)	Thyroid(Hypertrophy)
	13 weeks	10ppm(0.39mg/kg/bw)	Hematology(Hemoglobin,hematocrit,serum biochemistr,cholesterol ↓)
	52 weeks	5ppm(0.18mg/kg/bw)	Body weight ( ↓),Thyroid(Hypertrophy),Liver(Pigment accumulation)
Long-term exposure			
Rats	2 years	5ppm(0.25mg/kg/bw)	Thyroid(Adenoma,adenocarcinoma)
	104 weeks	5ppm(0.37mg/kg/bw)	Thyroid(Organ weight ↑,follicular cell hyperplasia) Liver(Organ weight ↑)

Table 3. Reproduction and embryotoxicity/teratogenicity studies of ethylenethiourea<sup>21)</sup>

Species	Test method	Exposure duration	NOAEL	Target organ(effect)
Rats	Gavage	21-42 days before conception 6-15,20 days of pregnancy	5mg/kg/bw	Embryo/fetus(Meningoencephalocele, meningorrhagia,hydrocephalus, short or kinky tail)
	Gavage	6-20 days of pregnancy	15mg/kg/bw	Embryo/fetus(Delated brain ventricles)
	Gavage	Period of organogenesis	10mg/kg/bw	Embryo/fetus(Delated brain ventricles)
	Feed	2 generations	2.5ppm (0.16-0.38mg/kg/bw)	Thyroid(Follicular cell hyperplasia)
Mice	Gavage	Period of organogenesis	>800mg/kg/bw	No change in the highest dose group
Hamsters	Gavage	Period of organogenesis	90mg/kg/bw	Embryo/fetus(Body weight ↓)
Rabbits	Gavage	7-20 days of pregnancy	40mg/kg/bw	Embryo/fetus(Resorption site,brain weight ↓)

価された。

#### (6) 評価

##### (i) JMPRの人についてのADI<sup>8,9)</sup>

JMPRではこれまでETUのADIを暫定値0~0.002 mg/kg体重としていたが、1993年のJMPR会議でETUの毒性評価を行い、人についてのADI値を0~0.004 mg/kg体重と概算した。

##### (ii) 発がん性評価

IARCによる分類：2B (possibly carcinogenic to humans)

実験動物に対する発がん性の十分な証拠がある。人に関するデータはない。

EPA (米国環境保護庁) による分類：グループB<sup>27,26,27)</sup>

注：Group B: Probable human carcinogen (B1: indicates limited human evidence; B2: indicates sufficient evidence in animals and inadequate or no evidence in humans.)

#### 文 献

- 1) RTECS, CD-ROM/SilverPlatter Information, Inc.
- 2) IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, vol. 7, 45~50, IARC, Lyon (1974)
- 3) Merck Index, 11th edition (ed. S. B. Budavari), MERCK & Co., Inc., USA (1989)
- 4) Environmental Health Criteria 78: Dithiocarbamate Pesticides, Ethylenethiourea, and Propylenethiourea: A General Introduction, International Programme on Chemical Safety (IPCS), WHO, Geneva. (1988)
- 5) Hazardous Substance Data Bank, CD-ROM/SilverPlatter Information, Inc.
- 6) 環境科学辞典 編集：荒木峻他, 東京化学同人, 東京 (1985)
- 7) Frakes, R. A., Drinking Water Guideline for Ethylene Thiourea, a Metabolite of Ethylene Bisdithiocarbamate Fungicides, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 8, 207~218 (1988)
- 8) 平成5年版「化学物質と環境」平成5年12月, 環境庁環境保健部保健調査室
- 9) Ripley, B. D. and Cox, D. F., Residues of ethylenebis (dithiocarbamate) and ethylenethiourea in treated tomatoes and commercial tomato products., *J. Agric. Food Chem.*, 26 (5), 1137~1143 (1978)
- 10) Sumner, D. R. *et al.*, Leaf spot control, maneb, and ethylenethiourea residues in processed turnip greens treated with maneb. *Plant Dis.* 75(9), 878~882 (1991)
- 11) 宇野正清ら, 市販農作物および加工品中のエチレンチオウレアの残留について, 食品衛生学雑誌, 21(5), 392~397 (1980)
- 12) 吉沢朋子, 須釜安正, 鈴木尚典, 農作物中のエ

- チレンビスジチオカーバメート剤およびエチレンチオウレアの残留についてII, 栃木県衛生研究所報, **15**, 59~62 (1985)
- 13) 吉沢朋子, 中村洋子, 農作物中のエチレンビスジチオカーバメート剤およびエチレンチオウレアの残留について, 栃木県衛生研究所報, **16**, 67~70 (1986)
- 14) Casanova, M., Guichon, R., Residues of EBDC fungicides and ETU in experimental and commercial beverages (beer and wine). *J. Environ. Sci. Health Part B Pestic. Food Contam. Agric. Wastes.* **23**(2), 179~188 (1988)
- 15) Koeniger, M. *et al.*, Bestimmung von Ethylen-thioharnstoff in Weisswein. *Deutsch Lebensm. Rundsch.* **85**(1), 5~7 (1989)
- 16) Ripley, B. D. and Simpson, C. M., Residues of zineb and ethylenethiourea in orchard treated pears and commercial pear products. *Pestic. Sci.* **8**(5), 487~491 (1977)
- 17) Ripley, B. D. *et al.*, Residues of Dikar and ethylenethiourea in treated grapes and commercial grape products. *J. Agric. Food Chem.* **26**(1), 134~136 (1978)
- 18) 宇野正清ら, 農作物に残留する農薬分解生成物1, 農作物中のエチレンチオウレアの残留, 食品衛生学雑誌, **18**, 53~56 (1977)
- 19) IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, The Rubber Industry, **vol. 28**, p. 132, IARC, Lyon (1982)
- 20) Smith, D. M., Ethylene thiourea: thyroid function in two groups of exposed workers, *British Journal of Industrial Medicine*, **41**, 362~366 (1984)
- 21) Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues (JMPR), Pesticide residues in food-1993. EVALUATIONS 1993, Part II-TOXICOLOGY. Geneva, 20~29 September 1993, WHO, Geneva (1994)
- 22) IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, **Suppl. 7**, IARC, Lyon (1987)
- 23) National Toxicology Program, Technical Report Series No.388, Toxicology and Carcinogenesis Studies of Ethylene Thiourea in F344/N Rats and B6C3F<sub>1</sub> Mice (Feed Studies), U. S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, USA (1992)
- 24) Pesticide residues in food-1993. REPORT 1993. FAO Plant Production and Protection Paper 122. FAO, Rome (1993)
- 25) Teshima, R. *et al.*, *Eisei Kagaku* **27**(2), 85~90 (1981)
- 26) US-EPA Pesticide Fact Sheet Number 139 Ethylenethiourea (ETU), PB87-233755, US Department of Commerce, National Technical Information Service (NTIS), (1987)
- 27) Paxman, D. G. and Robinson, J. C., Regulation of Occupational Carcinogens under OSHA's Air Contaminants Standard, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **12**, 296~308 (1990)

## 平成5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

石光 進・木村実加・梅本美佳・辻 澄子  
柴田 正・伊藤誉志男Official Inspection Estimated Production of Coal-Tar Dyes  
(including Dye Aluminum Lakes) in 1993~1994Susumu Ishimitsu, Mika Kimura, Mika Umemoto, Sumiko Tsuji,  
Tadashi Shibata and Yoshio Ito

The number of official inspections of coal-tar dyes and their aluminum lakes from April 1993 till March 1994 were 734 in total, with the quantity which passed inspection amounting to 213 tons in Japan. Data for production by color for each month are 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 a 42.9% proportion of the total during this period.

**Keywords :** food color, coal-tar dye, official inspection

(Received May 31, 1994)

わが国では12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おり、その販売等に当たって製品検査が必要とされている。

製品検査申請書には申請数量(300kgまでを1件とする)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、試薬等他の用途に用いられるが、大部分は食品添加物として使用されている。

わが国における食用タール色素の製品検査はすべて大阪支所食品試験部で行われている。従って、申請数量から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事が出来る。

平成5年4月1日から平成6年3月31日までに申請された734検体について、各色素別に月別および製造社別の許可量統計を作成した。尚、検体の内訳は、赤色2号:12, 赤色3号:42, 赤色40号:3, 赤色102号:147, 赤色104号:16, 赤色105号:2, 赤色106号:25, 黄色4号:305, 黄色5号:113, 青色1号:29, 青色2号:4, 赤色3号レーキ:4, 黄色4号レーキ:13, 黄色5号レーキ:10, 青色1号レーキ:8, 青色2号レーキ:1検体であった。

各色素の月別許可量を表1に、また各色素の製造社別許可量を表2に示した。

平成4年度(前年度)<sup>1)</sup>と比較すると総量では

201トンから213トンと12トン(約6%)増加した。主な要因は食用黄色4号が9.7トン、食用赤色3号が1.3トン増加したためである。

各色素別では製造量の多いものから食用黄色4号、食用赤色102号、食用黄色5号、食用赤色3号、食用青色1号であり、前年度と順位は変わらなかった。また、食用緑色3号、食用赤色2号レーキ、食用赤色40号レーキおよび食用緑色3号レーキは製造されなかった。

色素別製造量では、第1位の食用黄色4号が82トンから91.7トンと増加し、第2位の食用赤色102号は43.7トンから43.9トンと変わらず、食用黄色5号は34.2トンから32.9トンと減少した。

製造社別では製造量の多い順にA, B, E, C, D, F社であり、C社とE社とが入れ替わった以外、平成4年度と順位に変動はなかった。

また、製造量ではA社が86.7トンと最も多く、ついでB社68.7トン、E社20.9トン、C社20.1トンであった。

## 文 献

- 1) 柴田 正, 木村実加, 梅本美佳, 辻 澄子, 伊藤誉志男:平成4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. 衛生試験, 111, 112~115 (1993)



表 1. 平成5年度 食用色素月別許可量

食用色素名	申請月 平成5年												平成5年度		平成4年度	
	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	合計	色素別比率(%)	合計	色素別比率(%)
	(単位: Kg)															
赤色2号	1500	---	600	300	---	---	200	---	300	---	---	480	3380	1.58	2000	0.99
赤色3号	1500	1200	300	900	1000	1200	300	600	550	1755	1660	1200	12165	5.69	10914	5.42
赤色4号	---	---	---	---	270	---	---	---	---	100	---	45	415	0.19	20	0.01
赤色102号	6600	4200	2100	4800	2700	2400	2600	4200	5400	1197	3300	4500	43997	20.58	43670	21.69
赤色104号	720	1200	600	---	600	150	300	300	---	---	---	50	3920	1.83	2825	1.40
赤色105号	---	---	---	300	50	---	---	---	---	---	---	---	350	0.16	200	0.10
赤色106号	940	900	---	300	620	300	600	1080	300	---	620	600	6260	2.93	6525	3.24
黄色4号	12900	7500	3600	12600	6900	5100	6855	5400	6288	4500	6892	13188	91723	42.91	82028	40.74
黄色5号	5300	2400	1500	2000	2000	2400	4400	1200	2900	3000	3100	2790	32990	15.43	34245	17.01
緑色3号	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0	0	0	0
青色1号	1000	900	---	1200	600	340	600	300	600	460	995	900	7895	3.69	8632	4.29
青色2号	200	---	---	---	300	---	---	230	230	---	---	---	960	0.45	1004	0.50
赤色2号レーキ	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0	0	0	0
赤色3号レーキ	200	---	---	---	---	---	300	---	---	300	---	300	1100	0.51	1170	0.58
赤色4号レーキ	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0	0	70	0.03
黄色4号レーキ	300	300	300	300	300	---	400	300	300	---	600	600	3700	1.73	2850	1.42
黄色5号レーキ	700	300	---	600	---	---	272	---	300	300	---	300	2772	1.30	3040	1.51
緑色3号レーキ	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0	0	0	0
青色1号レーキ	---	---	---	300	325	---	200	300	300	300	---	100	1825	0.85	1800	0.89
青色2号レーキ	300	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	300	0.14	360	0.18
合計	32160	18900	9000	23600	15665	12362	16855	13610	17468	11912	17167	25053	213752	---	---	---
月別比率(%)	15.05	8.84	4.21	11.04	7.33	5.78	7.89	6.37	8.17	5.57	8.03	9.45	---	100.00	---	---
前年度合計	22275	4800	20940	15967	22900	7540	32065	16642	14400	8600	15030	20185	---	---	201354	---
月別比率(%)	11.69	2.38	10.40	7.93	11.37	3.74	15.92	8.27	7.15	4.27	7.46	10.03	---	---	---	100.00

表 2. 平成5年度 食用色素製造社別許可量

(単位: Kg)

食用色素名	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
赤色2号	1380	600	300	---	900	200	---	---	---	---
赤色3号	5165	1800	600	2400	---	2100	---	100	---	---
赤色40号	100	270	45	---	---	---	---	---	---	---
赤色102号	11697	16200	6000	600	7500	1800	---	---	200	---
赤色104号	170	3000	---	150	---	300	---	300	---	---
赤色105号	---	---	---	---	---	300	---	50	---	---
赤色106号	1280	3300	300	900	300	180	---	---	---	---
黄色4号	37423	31800	10200	---	10500	1800	---	---	---	---
黄色5号	15690	7500	2700	5700	1200	200	---	---	---	---
緑色3号	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
青色1号	4895	2700	---	---	300	---	---	---	---	---
青色2号	430	300	---	---	230	---	---	---	---	---
赤色2号レーキ	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
赤色3号レーキ	1100	---	---	---	---	---	---	---	---	---
赤色40号レーキ	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
黄色4号レーキ	2800	900	---	---	---	---	---	---	---	---
黄色5号レーキ	2472	300	---	---	---	---	---	---	---	---
緑色3号レーキ	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
青色1号レーキ	1825	---	---	---	---	---	---	---	---	---
青色2号レーキ	300	---	---	---	---	---	---	---	---	---
合計	86727	68670	20145	9750	20930	6880	0	450	200	0
製造社別比率(%)	40.57	32.13	9.42	4.56	9.79	3.22	0	0.21	0.09	0
前年度合計	84495	67400	17925	10840	13800	6150	19.65	354	300	70
製造社別比率(%)	41.96	33.47	8.90	5.38	6.85	3.05	0.01	0.17	0.14	0.03

## 国立衛生試験所ヒトインスリン標準品 (Control 921)

四方田千佳子・江馬 真・小川義之・岡田敏史

The Human Insulin Reference Standard (Control 921) of the  
National Institute of Health Sciences

Chikako Yomota, Makoto Ema, Yoshiyuki Ogawa, and Satoshi Okada

Raw human insulin material was examined for preparation of the "Human Insulin Reference Standard". The candidate material was evaluated by a domestic collaborative study in which four laboratories participated. The biological activity was determined to be 26.0 Unit/mg against the International Human Insulin Reference Standard (Code 83/500), based on the rabbit blood-glucose method specified in the JP XII (1991). Because of the possibility of application as a chemical reference standard for assay by the HPLC method, a physico-chemical evaluation of the candidate material was also performed. The total desamide form, dimer and oligomer impurities were estimated to be about 1% by HPLC.

Based on the above findings, this raw material was authorized as the Human Insulin Reference Standard of the National Institute of Health Sciences.

**Keywords** : Human Insulin, quality evaluation, authorization, NIHS Reference Standard

(Received May 31, 1994)

昭和60年に遺伝子組換え型ヒトインスリン製剤が登場して以来、従来までの動物臓器由来インスリン製剤からヒトインスリン製剤へと急激な置換が進行している。現在、ヒトインスリン製剤は国家検定品目に指定されているが、検定基準におけるその定量法は承認時の規格および試験法に制約されて、日局のウサギ血糖降下法がそのまま採用されている。USP<sup>1)</sup>およびBP<sup>2)</sup>においてはヒトインスリンとその製剤が既に収載され、その定量法には液体クロマトグラフ (HPLC) 法が採用されている<sup>3)</sup>。

わが国においても、国際的調和および動物福祉の観点から、これらの製剤における定量法を生物検定法から化学的定量法へと変更する必要がある。当面、国家検定基準における定量法を生物検定法からHPLC法による化学的定量法へと変更するための前提条件として、ヒトインスリン標準品を準備する必要があるため、本標準品の製造を行った。

## 実験材料および実験方法

## 1. 候補標準品の調製

候補品用のヒトインスリンは、Novo Nordisk

A/S社 (Denmark) において、遺伝子組換え法により調製されたものであり、凍結乾燥品として供給された。製品の均一性を確保するため、購入後直ちに、バイアル瓶中に小分け・充填され (50 mg)、-20℃のフリーザー中に保存された。

## 2. 参照物質および試薬・試液

生物活性測定用およびHPLC法による定量用標準物質として、第1回ヒトインスリン国際標準品 (Code 83/500) を用いた。別に、USPのヒトインスリン標準品 (Lot F-2) を参考品として用いた。そのほか、理化学的試験に用いた試薬類は、JIS特級品または特級相当品を用いた。

## 3. 生物活性測定法

日局12「インスリン注射液」の定量法を準用し、ウサギ血糖降下法によりその生物活性を測定した。対照標準品としてヒトインスリン国際標準品 (26.0 IU/mg) を用いた。本試験は、4機関による共同検定により行い、使用動物 (ウサギ) の系統を特定することはせず、それぞれの機関において日常的に用いられているものを試験動物とした。

## 4. 理化学的品質試験法

候補品につき、HPLC法による純度試験のほか、窒素および亜鉛の定量、水分測定、さらにHPLC法による定量試験を行った。窒素、亜鉛および水分測定は日局一般試験法を準用し、HPLC法による純度および定量試験はUSPの方法を準用した<sup>1)</sup>。なお、これらの試験は、試験項目ごとに、2~4機関による共同実験が行われた。

本候補品の生物活性評価および理化学的品質評価は、下記の5機関による共同実験として行われた：塩野義製薬(株)、ノボルデイスクファーマ(株)、清水製薬(株)、Novo Nordisk A/S (Denmark)、国立衛生試験所大阪支所。

## 結果および考察

## 1. 生物活性

日局「インスリン注射液」の定量法を準用し、ウサギ血糖低下作用を指標とする試験を行った。4機関による計21回の繰り返し試験の結果、本品の加重平均力価26.00 IU/mgが得られた (Table 1)。なお、95%信頼限界は、26.59~25.42 IU/mgの範囲内にあった。

いずれの試験においてもL値<0.1212であり、本生物検定における試験精度は確保されていた (P=0.95)。また、 $\chi^2$ 検定によれば、4機関、計21回の繰り返し試験における分散の均一性も確保され

Table 1. Summary of the collaborative biological assay for candidate human insulin reference standard by the rabbit blood-sugar method in JP XII, 1991

Exp. no.	Lab. code	No. of animals	Log potency (M')	L	w*	Potency (I. U./mg)
1	A	24	-0.0067	0.1036	1622	25.6
2	A	24	0.0153	0.1045	1594	26.9
3	B	24	0.0315	0.1033	1632	28.0
4	B	24	-0.0077	0.0638	4279	25.5
5	B	24	0.0063	0.1109	1415	26.4
6	B	24	-0.0109	0.1144	1330	25.4
7	B	24	0.0059	0.0694	3617	26.4
8	B	24	0.0004	0.1053	1570	26.0
9	C	24	-0.0099	0.0961	1884	25.4
10	C	24	-0.0092	0.0609	4692	25.5
11	C	24	0.0111	0.0891	2192	26.7
12	C	24	-0.0059	0.0936	1986	25.6
13	C	24	-0.0078	0.0735	3222	25.5
14	C	24	0.0081	0.0669	3888	26.5
15	C	24	0.0008	0.0780	2861	26.1
16	D	24	0.0214	0.0818	2602	27.3
17	D	24	0.0022	0.0891	2194	26.1
18	D	24	0.0005	0.0854	2387	26.0
19	D	24	-0.0103	0.0896	2170	25.4
20	D	24	-0.0272	0.1031	1636	24.4
21	D	24	-0.0037	0.1124	1376	25.8

\*: Statistical weight, defined in the section of "Biological Tests and Assays" in USP XXII, 1990.

Table 2. Nitrogen content in the candidate reference standard

Laboratory	Nitrogen content(%)						Mean ± SD
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6	
A	14.54	14.33	14.50	14.31	14.29	14.23	14.37 ± 0.12
B	13.84	13.95	14.02	14.11	14.11	14.02	14.01 ± 0.10
C	14.09	14.53	14.23	14.27	14.34	14.33	14.30 ± 0.15
D	14.04	13.78	14.40	13.95	14.07	13.99	14.04 ± 0.19
Mean							14.18 ± 0.18

Table 3. Zinc content in the candidate reference standard

Laboratory	Zinc content(%)			Mean ± SD
	No. 1	No. 2	No. 3	
A	0.32	0.38	0.35	0.35 ± 0.03
B	0.37	0.39	0.39	0.38 ± 0.01
C	0.475	0.460	0.483	0.473 ± 0.012
D	0.406	0.400	0.400	0.402 ± 0.003
Mean				0.40 ± 0.052

ていた (P=0.95)。

## 2. 理化学的品質試験

### 2.1. 窒素定量

日局一般試験法窒素定量法により、本品中の窒素含量を求めた (Table 2)。

4機関による6回繰り返し試験の平均値は14.01~14.37%とよく一致し、平均値は14.18% (脱水物換算: 15.48%) となった。なお、アミノ酸組成から求められる理論窒素含量は15.67%であり、USPにおける窒素含量規格は、14.5~16.5% (脱水物換算) である。

### 2.2. 亜鉛含量

日局一般試験法原子吸光度法により、本品中の亜鉛含量を求めた (Table 3)。4機関による繰り返し3回測定の結果は、0.35~0.47%の範囲にあり、平均0.40% (脱水物換算: 0.44%) であった。なお、USPにおける亜鉛含量規格は、1.08% (脱水物換算) 以下である。

### 2.3. 水分含量

カールフィッシャー法 (電量滴定法) および熱天秤法による水分測定の結果を Table 4 に示した。3機関における数回の繰り返し測定の結果は、7.87~8.70%の範囲にあり、平均8.40%であった。

### 2.4. 純度試験

#### A. デスアミド体およびその他の類縁物質

USPの純度試験A法を準用し<sup>3)</sup>、デスアミド体とその他の類縁物質を求めた。この結果を Table 5 に、クロマトグラムの一例を Fig. 1 に示した。3機関各3回の繰り返し試験の結果、

デスアミド体 : 0.34~0.50% Aver. 0.41%

その他の類縁物質 : 0.34~0.52% Aver. 0.46%

であった。なお、USPにおいては、デスアミド体とその他の類縁物質の総量2.0%以下と規定している。

#### B. ダイマー等の高分子量蛋白質

USPの純度試験B法を準用し<sup>3)</sup>、候補品中のダイマー等の高分子量蛋白質成分の含量を求めた。この結果を Table 6 に、クロマトグラムの一例を

Table 4. Water content in the candidate reference standard

Laboratory	Water content(%)						Mean $\pm$ SD
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6	
A*	7.99	8.52	8.79	8.84	8.62	9.46	8.70 $\pm$ 0.48
B*	6.73	7.18	8.11	8.21	9.10	-	7.87 $\pm$ 0.93
D**	9.21	8.98	7.92	8.08	8.95	8.52	8.63 $\pm$ 0.52
Mean							8.40 $\pm$ 0.46

\* : Determined by the thermogravimetric analysis.

\*\* : Determined by the Karl Fisher method.

Table 5. Content of desamidoinsulin and other impurities in the candidate reference standard

Lab.	Desamidoinsulin(%)				Other impurities(%)			
	No. 1	No. 2	No. 3	Mean $\pm$ SD	No. 1	No. 2	No. 3	Mean $\pm$ SD
A	0.53	0.53	0.51	0.50 $\pm$ 0.01	0.53	0.53	0.51	0.52 $\pm$ 0.01
B	0.34	0.40	0.44	0.39 $\pm$ 0.05	0.28	0.37	0.36	0.34 $\pm$ 0.05
D	0.35	0.32	0.36	0.34 $\pm$ 0.02	0.45	0.60	0.52	0.52 $\pm$ 0.06
Mean				0.41 $\pm$ 0.08				0.46 $\pm$ 0.10

Fig. 2に示した, 3機関による測定値は互によく一致し, ダイマー成分のみが検出された。

ダイマー: 0.17~0.18% Aver. 0.18%

なお, ヒトインスリン中に混在するダイマー等の高分子量蛋白質につき, USPは1%以下と規定している。

この結果, A法によるデスアミド体とその他の類縁物質の合計量は, 平均0.87%, B法による不純物は, ダイマーのみで平均0.18%となった。したがって, 本候補品中の総不純物量は1.05%と推定された。このうち, デスアミド体(0.41%)はヒトインスリン本体より不可避免的に生成するものであり, 微量の混入は避けられないことに加えて, ヒトインスリンとほぼ同等の生物活性を有することから, これを除いた不純物総量は0.64%と推定された。

### 2.5. 定量

USPのヒトインスリン定量法を準用し, WHOのヒトインスリン国際標準品(26.0 IU/mg)を対照にHPLC法による定量試験を行い(3点検量線法), HPLC力価(IU/mg)を求めた。この結果をTable 7に示した。機関Aでやや低く, 機関B,

Dでやや高めの値が得られた。機関Eによる定量値は他機関のデータと比較して有意に低く, 繰り返し試験回数も少ないため, 除外した。この結果, A, B, D 3機関による単純平均値は101.44%であり, 力価に換算すると26.4 IU/mgとなる。この値は生物試験による評価値26.0 IU/mgに比べ1.4%ほど高い値であるが, 本候補品の総不純物含量が対照標準品に比べ約0.9%少ないことを考慮すれば(Table 7参照), 妥当な値と思われる。

なお, Novo Nordisk A/S社(Denmark)の提唱している窒素ベースでの活性評価法によれば, 窒素1mg当たりの力価は184単位と評価されていることから, 本候補品の窒素ベース力価は, 窒素含量の平均値14.18 mg (Table 2)を用いると26.1 IU/mgと評価される。

### 3. WHOおよびUSPヒトインスリン標準品の品質について

本候補品の生物活性評価およびHPLC法による化学的定量試験においては, いずれもWHOの国際標準品を対照として試験を行った。国際的に流通しているヒトインスリン標準品としては, 別に,

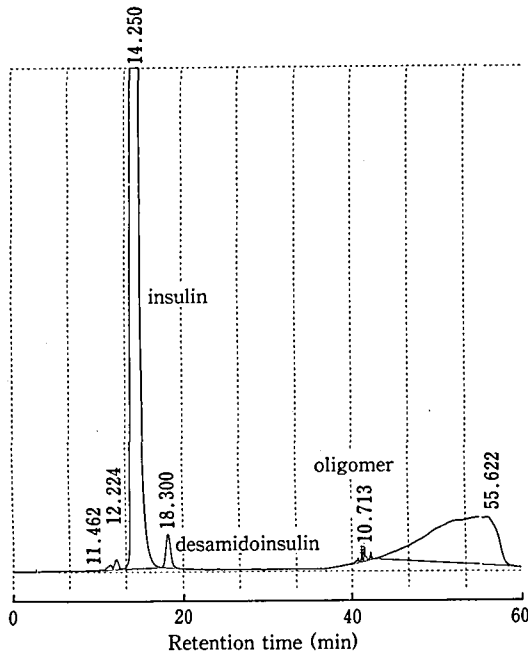


Fig. 1. HPLC chromatogram of the candidate reference standard in the purity test of method A

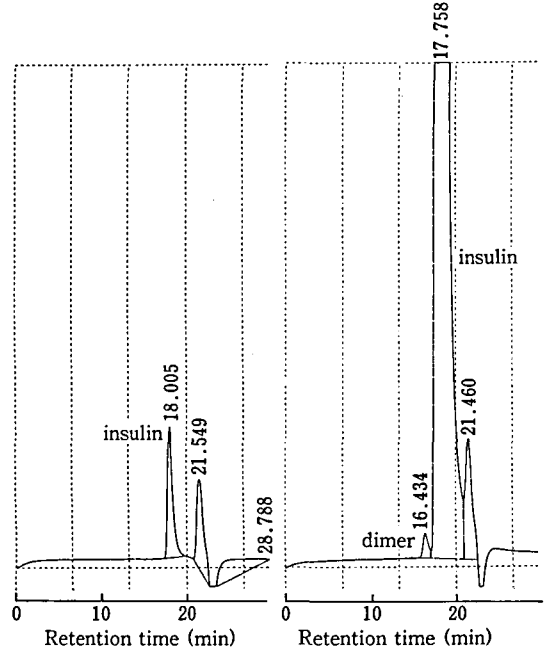


Fig. 2. HPLC chromatograms of the candidate reference standard in the purity test of method B

The right side is the chromatogram for the sample solution, and the left side is that for the diluted sample solution (1%).

Table 6. Content of dimer in the candidate reference standard

Laboratory	Dimer(%)			Mean $\pm$ SD
	No. 1	No. 2	No. 3	
A	0.18	0.19	0.18	0.18 $\pm$ 0.01
B	0.18	0.19	0.18	0.18 $\pm$ 0.01
D	0.16	0.17	0.17	0.17 $\pm$ 0.01
Mean				0.18 $\pm$ 0.01

Table 7. Results of assay by HPLC

Laboratory	Assay(%)						Mean $\pm$ SD
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6	
A	99.62	99.07	99.07	99.19	98.95	98.97	99.15 $\pm$ 0.25
B	101.61	101.92	103.07	105.46	103.69	102.73	103.08 $\pm$ 1.39
D	100.79	102.89	102.87	102.98	99.33	103.63	102.09 $\pm$ 1.66
E	97.8	97.3	-	-	-	-	97.5

Table 8. Purity tests for WHO and USP reference standards

Reference Standards	Method A		Method B	
	Desamidoinsulin (%)	Other impurities (%)	Dimer (%)	
WHO IS	0.56 (n=2)	1.02 (n=2)	0.32 ± 0.01 (n=3)	
USP RS	0.92 (n=2)	1.32 (n=2)	0.56 ± 0.02 (n=3)	
The Candidate*	0.32 ± 0.02 (n=3)	0.52 ± 0.06 (n=3)	0.17 ± 0.01 (n=3)	

\* The data obtained by Labo. D are indicated.

USP 標準品がある。本候補品の化学的純度の相対的評価のため、これらの標準品につき、同一条件 (2.4 参照) の下で行った純度試験の結果を Table 8 に示した。純度試験 A 法によるデスアミド体およびその他の類縁物質、また、B 法によるダイマー含量とも USP 標準品で最も多く、候補品で最も少ない。この結果、本候補品は WHO または USP 標準品に比し、優れた化学的純度を有することが明らかとなった。

### 結 論

以上の結果、本候補品の生物活性は、ヒトインスリン国際標準品を対照に日局「インスリン注射液」のウサギ血糖法により評価するとき、26.0 Unit/mg の値が、4 機関による国内共同検定の結果得られた。

また、HPLC 法による純度試験の結果、本候補品の化学的純度は極めて高く、HPLC 法による定量用標準品としても十分な品質を有することが明らか

かとなった。ヒトインスリン国際標準品を対照とする HPLC 法による定量試験によれば、本候補品の HPLC 力価は 26.4 Unit/mg と推定され、生物検定法による活性評価値の妥当性が裏付けられた。

終わりに、本候補品の品質評価につき、共同実験に参加いただいた塩野義製薬(株)、ノボノルディスクファーマ(株)、清水製薬(株)および Novo Nordisk A/S Co. の各社に深謝いたします。また、種々のご助言をいただきました生物薬品部長早川堯夫博士、同室長森本和滋博士に感謝いたします。

### 文 献

- 1) US Pharmacopoeia XXII, pp. 695~700 (1990)
- 2) British Pharmacopoeia 1993, pp. 355~357, pp. 961~965
- 3) USP Forum, 18(6), 4276~4286 (1992)
- 4) Novo Nordisk A/S Co., private communication.



## 国立衛生試験所エルカトニン標準品 (Control 921)

岡田敏史・四方田千佳子・江馬 真・小川義之

Elcatonin Reference Standard (Control 921) of National  
Institute of Health Sciences

Satoshi Okada, Chikako Yomota, Makoto Ema, and Yoshiyuki Ogawa

The raw material of elcatonin was examined for preparation of the "Elcatonin Reference Standard". The candidate material was evaluated by a domestic collaborative study in which five laboratories participated. The biological activity was determined to be 11.3 Unit/Amp. against the International Elcatonin Reference Standard (Code 84/614), based on one hour hypocalcaemia rat bioassay. In spite of the differences in rat strain, sex, administration method, dosage and assay method for serum calcium etc., the separately obtained biological activities for the candidate agreed closely with each other (95% confidence limits 11.08~11.53 Unit/Amp.). The physico-chemical evaluation of the candidate material was also performed, by using HPLC and amino acid chromatography.

Based on the above results, this raw material was authorized to be the Elcatonin Reference Standard of the National Institute of Health Sciences.

**Keywords** : Elcatonin, quality evaluation, authorization, NIHS Reference Standard

(Received May 31, 1994)

本品はウナギカルシトニンの誘導体であり、天然のウナギカルシトニン中に存在するジスルフィド結合をジエチレン結合に変換することにより、ペプチドの化学的安定化を図ったものである。生理的にはカルシウム代謝に係わるペプチド性ホルモンであり、近年、骨粗鬆症治療薬として繁用されている。13局収載候補品目に指定され、旭化成工業㈱より日局原案が提案される予定である。

本品の生物活性は、ラットの血清カルシウム低下作用により測定される。国立衛生試験所エルカトニン標準品の設定にあたり、エルカトニン国際標準品を対照に下記の5機関による国内共同検定が行われた：旭化成工業㈱大仁支社、帝国臓器製薬㈱川崎工場、三菱化成㈱鹿島工場、山之内製薬㈱焼津工場、国立衛生試験所大阪支所生物試験部

また、本品に対する理化学的品質評価は、旭化成工業㈱大仁支社および国立衛生試験所大阪支所薬品試験部において行われた。

## 実験材料および実験方法

## 1. 候補標準品の調製

エルカトニン標準品候補品の精製とそのアンプル中への小分け・充填および凍結乾燥は、旭化成工業㈱により行われた。1アンプル中の処方は下記のとおりである：

Rp. エルカトニン	2 µg/Amp.
トレハロース	10 mg/Amp.
牛血清アルブミン	0.05 mg/Amp.

本候補品の調製にあたっては、エルカトニン 10~12 Unit/Amp. を目標に充填が行われた。ほぼ目標どおりの充填がされことは、エルカトニン活性だけでなく、ポリペプチド含量としても液体クロマトグラフ法により確認された (平均 1.88 µg/Amp., CV1.52%, n=14)。

なお、本候補品は、-40℃以下のフリーザー中に保存された。

## 2. 参照物質および試薬・試液

生物活性測定用の対照標準品は、エルカトニン国際標準品 (Elcatonin 1st IS, Code 84/614, 11 IU/

Amp.)のほか、国際標準品を対照に検定された旭化成工業社内標準品 (ELWS 009, 11.8 IU/Amp.) を合わせて用いた。また、液体クロマトグラフ (HPLC) 法による定量用の標準物質として、旭化成工業㈱の HPLC 用エルカトニン社内標準品 (Lot No. HST-8, 13.32  $\mu$ g/Amp.) を用いた。そのほか、理化学的試験に用いた試薬類は、JIS 特級品または特級相当品を用いた。

### 3. 生物活性測定法

体重 100 g 前後のスプラグ・ドゥリー (SD) 系雄ラットを用い、血清カルシウムの変動を試料溶液と標準溶液の間で比較する生物活性測定法を基本とした。低用量、高用量の2用量による2-2平行線検定法を用い、力価の計算は、日局「胎盤性性腺刺激ホルモン」の定量法にしたがって行った。

本候補品および国際標準品は、0.1% BSA を含む酢酸ナトリウム溶液 (pH 6.0) に溶解し、エルカトニン 15.0 および 7.5 mU/0.2 ml となるように調製し、試料溶液 ( $T_H$  および  $T_L$ ) および標準溶液 ( $S_H$  および  $S_L$ ) とする。添字 H, L は高用量投与群および低用量投与群をそれぞれ表す。試料溶液および標準溶液 0.2 ml を各群 10 匹のラットの尾静脈内に投与し、2-2 平行線検定の可能な4群による試験を行う。投与1時間後に採血し、血清を分離後、除蛋白した後、血清中のカルシウムを原子吸光光度法により定量する。

上記の方法を基本としたが、1機関では SD 系雌ラットが、別の1機関では Wistar 系雄ラットが用いられた。また、2機関では背部皮下投与方法が採用され、投与量に若干の変更があった。血清カルシウム定量法は、1機関でキレート発色法が、別の1機関では EDTA による直接滴定法が採用された。

対照標準品としては、エルカトニン国際標準品 (11 IU/Amp.) および旭化成工業社内標準品 (11.8 IU/Amp.) を用いた。

### 4. 理化学的品質試験

4.1. アミノ酸クロマトグラフ法による確認試験  
エルカトニン原薬約 1 mg を加水分解用試験管にとり、2% フェノール含有 6 N 塩酸約 1 ml を加えて溶かし、窒素置換後、減圧下密封し、 $110 \pm 2^\circ\text{C}$  で 24 時間加熱する。冷後、加水分解液を蒸発乾固した後、残留物に 0.02 N 塩酸試液約 1 ml を加えて溶かし (0.2  $\mu$ mol/ml)、試料溶液とする。別に、アスパラギン酸ほか 14 種の構成アミノ酸 10  $\mu$ mol 相当量を正確に量り、0.02 N 塩酸試液に溶かし、

正確に 50 ml とし、標準溶液とする。試料溶液および標準溶液 10  $\mu$ l につき、日局一般試験法アミノ酸クロマトグラフ法により試験を行う。アミノ酸分析装置は、日立 M-8000 を用い、以下の操作条件により試験を行う。

#### 操作条件

検出器：可視吸光光度計 (測定波長：440 nm および 570 nm)

カラム：内径約 4 mm、長さ約 8 cm のステンレス管に 3  $\mu$ m のスチレンビニルベンゼン共重合体にスルホン酸基を結合した HPLC 用強酸性イオン交換樹脂を充填する。

カラム温度：温度プログラムにより、50→60→65→55→50 $^\circ\text{C}$  と順次、変化させる。

化学反応槽温度：130 $^\circ\text{C}$  付近の一定温度

移動相：pH およびナトリウムイオン濃度 (0.10 N~1.26 N) の異なる4種のクエン酸緩衝液 A~D を調製する。タイムプログラムにより、緩衝液 A→B→C→D→A と順次、移動相を切り替える。

反応試薬溶液：アミノ酸分析装置メーカー指定の処方により、酢酸リチウム二水和物を主成分とする A 液、ニンヒドリンを主成分とする B 液を調製し、使用前にこれらを混合し、反応試薬溶液とする。

流量：移動相および反応試薬とも 0.2 ml/min

#### 4.2. 液体クロマトグラフ (HPLC) 法による純度試験および定量

##### 4.2.1. 純度試験

本候補品の調製に用いられた、エルカトニン原薬約 1 mg を 0.1% トリフルオロ酢酸試液・アセトニトリル混液 (2:1) 1 ml に溶かし、試料溶液とする。試料溶液 10  $\mu$ l につき、次の条件で HPLC 法による試験を行った。

#### 操作条件

検出器：紫外吸光光度計 (測定波長：225 nm)

カラム：YMC ODS-AM 120-S5 (150 $\times$ 4.6 mmID)

カラム温度：40 $^\circ\text{C}$

移動相：A 液 0.1% トリフルオロ酢酸：アセトニトリル (85:15)

B 液 0.1% トリフルオロ酢酸：アセトニトリル (45:55)

40 分間で B 液を 0% から 100% とし、41 分後に 0% とする。

流量：1 ml/min

カラムの選定：本品 2 mg をトリブシン試液 200  $\mu$ l に溶かす。この液を 37 $^\circ\text{C}$  で 1 時間加温し、さら

に氷酢酸1滴を加え、95°Cで1分間加熱する。この液10  $\mu$ lにつき、上記の条件で操作するとき、エルカトニンピークの前に溶出する大きなフラグメントピークとエルカトニンピークの分離度が10以上であり、かつ、エルカトニンの保持時間が約25分の

ものを用いる。

#### 4.2.2. 定量法

HPLC定量用エルカトニン標準品 (13.32  $\mu$ g/Amp.) を対照にして、本候補品中のエルカトニン含量を求める。本候補品および標準品をエルカトニ

Table 1. Summary of the collaborative biological assay for the candidate elcatonin reference standard

Exp. no.	Lab. code	No. of rats	Log unit (M)	L	F'	W (4t <sup>2</sup> /L <sup>2</sup> )	Potency (U/Amp.)
1	A	40	1.028	0.13	0.258	975	10.7
2	A	40	1.055	0.13	0.568	975	11.3
3	A	40	1.027	0.13	0.164	975	10.7
4	A	40	1.040	0.13	0.500	975	11.0
5	A	40	1.058	0.12	2.562	1144	11.4
6	A	40	0.999	0.10	0.445	1648	10.0
7	A	40	1.026	0.09	0.966	2034	10.6
8	A	40	1.074	0.13	0.912	975	11.9
9	A	40	1.064	0.11	1.930	1362	11.6
10	A	40	1.091	0.12	0.000	1144	12.3
11	A	40	1.080	0.11	0.387	1362	12.0
12	A	40	1.075	0.12	0.009	1144	11.9
13	A	40	1.074	0.14	0.772	841	11.9
14	A	40	1.042	0.11	0.095	1362	11.0
15	A	40	1.054	0.12	1.041	1144	11.3
16	A	40	1.050	0.13	0.088	975	11.2
17	A	40	1.074	0.11	0.150	1362	11.9
18	A	40	1.081	0.14	0.007	841	12.1
19	A	40	1.065	0.08	0.830	2574	11.6
20	A	40	1.090	0.12	1.178	1144	12.3
21	A	40	1.047	0.13	0.217	975	11.2
22	A	40	1.078	0.11	0.061	1362	12.0
23	A	40	1.040	0.12	0.028	1144	11.0
24	A	40	1.055	0.10	0.000	1648	11.4
25	A	40	1.037	0.12	0.082	1144	10.9
26	B	40	1.043	0.14	3.437	841	11.0
27	B	40	1.008	0.13	1.472	975	10.2
28	B	40	1.070	0.14	1.147	841	11.8
29	C	40	1.038	0.11	1.351	1362	10.9
30	C	40	1.103	0.09	0.721	2034	12.7
31	C	40	1.025	0.11	2.632	1362	10.6
32	C	40	1.105	0.09	2.385	2034	12.7
33	C	40	1.082	0.07	3.780	3362	12.1
34	C	40	1.071	0.10	0.013	1648	11.8
35	D	40	1.048	0.11	0.010	1362	11.2
36	D	40	1.055	0.09	0.011	2034	11.4
37	D	40	1.024	0.11	0.411	1362	10.6
38	D	40	1.004	0.08	0.005	2574	10.1
39	D	40	0.988	0.14	0.067	841	9.7
40	E	40	0.996	0.14	1.770	841	9.9
41	E	40	1.083	0.19	1.619	456	12.1
42	E	40	0.986	0.15	0.933	732	9.7

Approx.  $\chi^2_M = 51.777 < 56.942$  ( $p = 0.05$ , d.f. = 41)

Weighted mean of M = 1.0530

Combined potency = 11.30 U/Amp.

Lc = 0.0173 (11.08 - 11.53 U/Amp.,  $p = 0.95$ )

ン溶解液 (0.02% Tween 80 含有 0.9% 塩化ナトリウム溶液) 1 ml に溶解し, 試料溶液および標準溶液とする。これらの液 100  $\mu$ l につき, 次の条件で液体クロマトグラフ法による試験を行った。

#### 操作条件

検出器: 紫外吸光度計 (測定波長 225 nm)

カラム: L-column ODS (150 $\times$ 4.6 mmID) + L-column 用ガードカラム

カラム温度: 40 $^{\circ}$ C

移動相: 0.1% トリフルオロ酢酸: アセトニトリル (2:1)

流量: 1 ml/min

なお, 試料溶液および標準溶液のエルカトニン濃度に差異があるが, 標準溶液の希釈系列を作製し (エルカトニン: 0.2~3.0  $\mu$ g/100  $\mu$ l), それらの間に良好な直線関係の得られることを確認する。

### 結果および考察

#### 1. 生物活性

5 機関による計 46 回の繰り返し試験が行われたが, このうち, 3 例は分散が大きすぎるため (F' $>$

4.119, DF=36), 1 例は平均値からの片寄りが大きすぎるため, 異常値として共同検定結果から除外することとした。この結果, 計 42 回の繰り返し試験による本候補品の加重平均力価 11.3 Unit/Amp. が求められた。なお, 95% 信頼限界は, 11.07~11.53 Unit/Amp. の範囲内にあった。Table 1 に本試験成績の一覧を示した。

本試験においては, 試験動物の系統および雌雄, 投与量, 投与方法, 血清カルシウム定量法など試験法の細部において, 各機関ごといくつかの差異があったにもかかわらず, 比較的まとまった結果が得られ, 95% 信頼限界の幅の狭い良好な試験成績が得られた。

#### 2. 化学的品質評価

##### 2.1. アミノ酸クロマトグラフ法による構成アミノ酸の確認

エルカトニンは, アスパラギン酸ほか 14 種のアミノ酸から構成される分子量: 3363.82 のポリペプチドである。このアミノ酸組成とそれぞれの相対含量はアミノ酸クロマトグラフ法により求められる。アラニンの分析値 (nmol/10  $\mu$ l) を 1 としたとき

Table 2. Amino acid composition of the candidate elcatonin reference standard

Amino acid	Composition (nmol/10 $\mu$ l)	Molar ratio(Ala=1)		
		Calculated*	Specified**	Theoretical
Asp	2.656	2.06	1.7~2.2	2
Thr	5.019	3.89	3.5~4.2	4
Ser	3.692	2.86	2.4~3.0	3
Glu	3.922	3.04	2.7~3.2	3
Pro	2.671	2.07	1.7~2.2	2
Gly	3.781	2.93	2.7~3.2	3
Ala	1.289	(1)	(1)	1
Val	2.464	1.91	1.6~2.2	2
Asu	1.388	1.08	0.8~1.2	1
Leu	6.451	5.00	4.5~5.2	5
Tyr	1.305	1.01	0.7~1.2	1
Lys	2.557	1.98	1.7~2.2	2
His	1.116	0.87	0.8~1.2	1
Arg	1.271	0.99	0.7~1.2	1

\*Molar ratio calculated from the values of composition(nmol/10  $\mu$ l).

\*\*Proposed specifications for JP XIII.

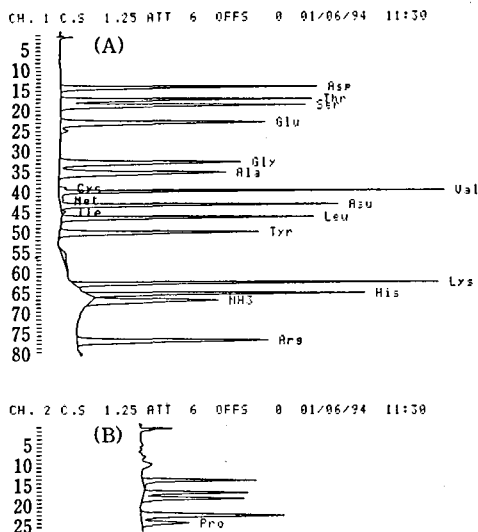


Fig. 1. Amino acid chromatograms of the amino acid standard

(A) the chromatogram detected at 570nm  
(B) the chromatogram at 440nm

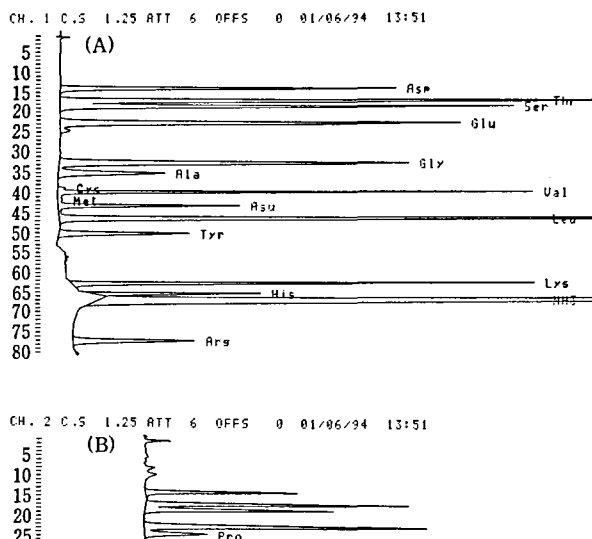


Fig. 2. Amino acid chromatograms of the candidate reference standard

(A) the chromatogram detected at 570nm  
(B) the chromatogram at 440nm

のエルカトニン原薬の構成アミノ酸の実測値 (nmol/10  $\mu$ l) とアラニンに対する相対値および承認規格における各アミノ酸の組成比 (規格値) を Table 2 に示した。

この結果、各構成アミノ酸の組成比は、いずれも日局規格 (案) の範囲内にあり、理論値にほぼ一致することから、原薬がエルカトニンであることが確認された。構成アミノ酸よりなる標準溶液とエルカトニン原薬の加水分解物のアミノ酸クロマトグラムを Fig. 1 および Fig. 2 に示した。

### 2.2. HPLC 法による純度試験 (類縁物質)

エルカトニン原薬中の類縁物質に関する純度試験を HPLC 法により行った。この結果、試料溶液中にはエルカトニン以外のピークは認められず、類縁物質量は 0.0% と推定された。クロマトグラムの一例を Fig. 3 に示した。Fig. 3 中、38 分付近のベースラインのゆらぎは、ブランク (移動相) 溶液においても認められ、ゴーストとみなされる。

同様の試験結果は、旭化成工業㈱においても得られており、本候補品の調製に用いられたエルカトニン原薬の化学的純度は、極めて高いことが明らかとなった。

### 2.3. HPLC 法による候補品中のエルカトニン含量

エルカトニンは合成ポリペプチドであり、その比

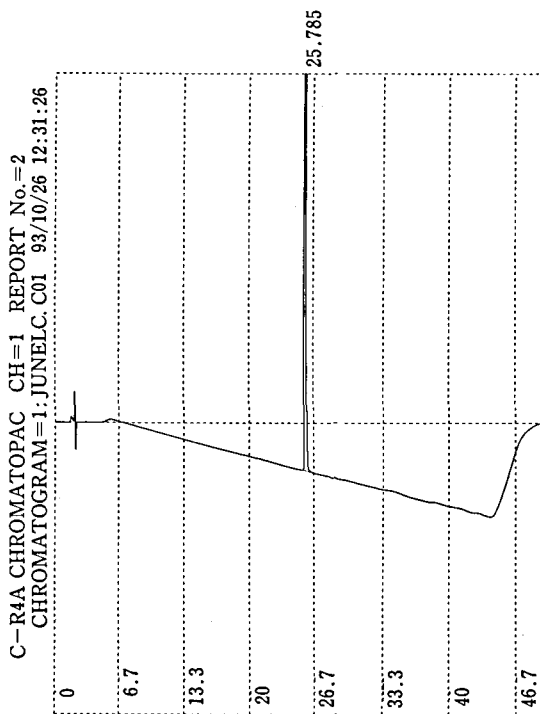


Fig. 3. HPLC chromatograms of the candidate reference standard in the purity test

Table 3. Estimation of elcatonin content in the candidate elcatonin reference standard by HPLC method

Test	HPLC assay								Mean±SD	Unit/ Amp.*
	(μg/Amp.)									
Labo. A										
Exp. 1	1.88	1.93	1.90	1.89	1.88	1.90	1.86	1.88±0.027	11.8	(n=14)
	1.90	1.91	1.87	1.85	1.86	1.84	1.83			
Labo. B										
Exp. 1	1.89	1.80	1.73	1.81	1.65	1.82		1.78±0.076	11.1	
Exp. 2	1.77	1.74	1.80	1.85	1.79	1.62		1.76±0.072	11.0	

\* HPLC potency was calculated by assuming the potency of the Elcatonin RS for HPLC as 6,250 Unit/mg.

活性は約 6000 Unit/mg とされている。生物活性測定法で用いられる標準品は、約 10 Unit/Amp. であることから、ペプチド含量としてみると約 1.7 μg/Amp. の極微量となる。したがって、1 アンプル中のペプチド含量を HPLC 法により定めることは、その検出感度からみて簡単ではないが、測定可能な範囲にある。バイオアッセイにより定められた本候補品のエルカトニン活性 (11.3 Unit/Amp.) を確認するため、HPLC 法によるエルカトニン含量の測定を試みた。

ここで用いられた HPLC 法の試験条件によれば、エルカトニン 0.2~3.0 μg/100 μl の範囲で検量線の直線性が成立し、本候補品中のエルカトニン含量を推定することができた。Labo. A, B の 2 機関による試験の結果、本候補品中のエルカトニン含量は、1.76~1.88 μg/Amp. と推定された (Table 3)。これを充填量とバイオアッセイの結果から推定された本品の比活性 6250 Unit/mg に基づいて、HPLC 力価 (Unit/Amp.) に換算した結果が、Table 3 右端欄に示されている。この結果、本候補品中のエルカトニン含量は 2 機関の平均として 11.5 Unit/Amp. の値が得られ、バイオアッセイによる推定値 11.3 Unit/Amp. を支持する試験成績が得られた。

## 結 論

5 機関による共同検定の結果、本候補品のエルカトニン活性は、11.3 Unit/Amp. と推定され、その 95% 信頼限界は、11.07~11.53 Unit/Amp. であった。別に、HPLC 法によりエルカトニン含量を求め、HPLC 力価を推定した結果 11.5 Unit/Amp. が得られ、バイオアッセイにより推定された本候補品のエルカトニン活性値が妥当なものであることが支持された。

また、アミノ酸クロマトグラフ法により本候補品の原薬ポリペプチドは 14 種のアミノ酸より構成され、それぞれのアミノ酸のアラニンに対する組成比は、日局規格 (案) で規定される範囲内にあることが確認された。さらに、HPLC 法による純度試験によれば、本候補品の原薬中に類縁のペプチド類は検出されなかった。

これらの結果、本候補品は 11.3 Unit/Amp. のエルカトニン活性を有するとともに、その原薬の構成アミノ酸および化学的純度に何等問題のないことが明らかとなり、国立衛生試験所標準品として認定された。

終わりに、本候補品の品質評価につき、共同実験に参加いただいた旭化成工業(株)、帝国臓器製薬(株)、三菱化成(株)、山之内製薬(株)の各社に深謝いたします。

## 国立衛生試験所デキサメタゾン標準品 (Control 931)

北島 文・吉井公彦・小松裕明・石光 進・岡田敏史

The Dexamethasone Reference Standard (Control 931) of the  
National Institute of Health SciencesAya Kitajima, Kimihiko Yoshii, Hiroaki Komatsu,  
Susumu Ishimitsu and Satoshi Okada

Raw dexamethasone material was tested for preparation of the "Dexamethasone Reference Standard (Control 931)". Analytical data obtained were as follows: melting point, 245.1°C (decomposition); infrared spectrum, the same as that of the JP Dexamethasone Reference Standard; optical rotation,  $[\alpha]_D^{25} = +76.75^\circ$ ; thin-layer chromatography, two impurities were detected; high-performance liquid chromatography (HPLC), one impurity was detected; loss on drying, 0.14%; assay result, 99.4% by HPLC.

Based on the above findings, the raw material was authorized as the JP Dexamethasone Reference Standard (Control 931).

**Keywords** : dexamethasone, quality evaluation, authorization, JP Reference Standard

(Received May 31, 1994)

第十二改正日本薬局方「デキサメタゾン」の確認試験および定量法に用いられる国立衛生試験所デキサメタゾン標準品 (Control 931) を製造したので報告する。

### 1. 原料

本標準品用の原料は、萬有製薬(株)より供給されたものである。同社による日局「デキサメタゾン」の規格および試験法に基づく、主な試験成績は以下のとおりである：融点, 246°C；旋光度 $[\alpha]_D^{25} = +77^\circ$ ；乾燥減量, 0.3%；定量, 102.0%。

### 2. 参照物質および試薬

第十二改正日本薬局方デキサメタゾン標準品 (Control 835；以後、日局標準品と略称する) を対照に試験を行った。試薬は JIS 特級品または特級相当品を用いた。

### 3. 装置

本標準品原料の品質試験にあたり、以下の測定装置を用いた：自記分光光度計 (日本分光, Ubest-50 型), 赤外分光光度計 (日本分光, FT-IR VALOR-III), 旋光計 (日本分光, DIP-370 型), 融点測定器 (宮本理研, PA-20S 型)。また、液体クロマトグラフ装置は、島津製作所製の LC-6A 型ポンプ, SPD-6A 型検出器, C-R6A 型データ処理装置を用

いた。

### 4. 試験方法

特に記すもののほかは、日局一般試験法および日局「デキサメタゾン」の規格および試験法を準用する。

#### 4.1. 薄層クロマトグラフ (TLC) 法による純度試験

薄層板：メルク社製プレコーテッド薄層板シリカゲル 60 (厚さ, 0.25 mm), 展開溶媒：ジクロルメタン・メタノール混液 (45 : 4), 試料溶液および標準溶液：本品および日局標準品を乾燥し, その 10.0 mg を正確に量り, それぞれにアセトン 1 ml を正確に加えて溶かし, 試料溶液および標準溶液とする。これらの液 2 ml ずつを正確に量り, アセトンを加えて正確に 100 ml とし, それぞれの希釈溶液とする。操作法および検出法：標準溶液, 試料溶液およびそれぞれの希釈溶液 10  $\mu$ l (デキサメタゾン 100  $\mu$ g および 2  $\mu$ g 相当量) をシリカゲル薄層板にプロットし, 約 15 cm 展開したのち, 風乾する。これに紫外線 (主波長 254 nm) を照射し, 不純物スポットの有無を観察する。

#### 4.2. 液体クロマトグラフ (HPLC) 法による純度試験

本品および日局標準品約10 mgずつを量り、それぞれを水・メタノール混液(1:1) 10 mlに溶かし、試料溶液および標準溶液とする。これらの液10  $\mu$ lにつき、次の条件で液体クロマトグラフ法により試験を行う。

#### 操作条件

検出器：紫外吸光度計(測定波長：254 nm)

カラム：Inertsil ODS (4.6 mm $\phi$ ×150 mmL)

カラム温度：25℃

移動相：水・アセトニトリル混液(2:1)

流量：2.7 ml/min

検出感度：試料注入量の1/100に相当する量を注入するとき、得られる主ピークの高さが記録紙のフルスケールの約10%になるように検出器の出力あるいは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<sup>1)</sup>。

#### 4.3. HPLC法による定量

日局「デキサメタゾン」の定量法を準用する。

#### 5. 試験結果

##### (1) 性状

白色の結晶性粉末で、おおいはない。

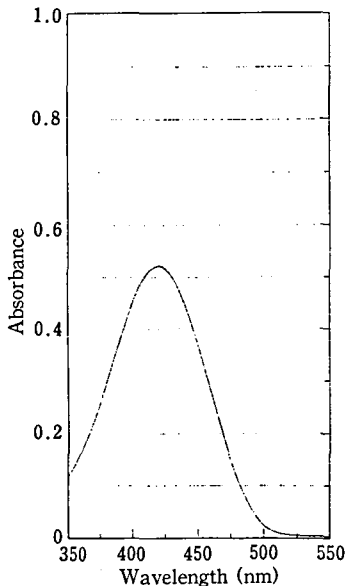


Fig. 1. Visible absorption spectrum for the candidate Dexamethasone Reference Standard (Control 931) after the treatment of phenylhydrazine

本品の融点は、245.1℃(分解)であった(日局規格：約245°(分解))。

##### (2) 可視吸収スペクトル

日局「デキサメタゾン」の確認試験(4)を準用し、エタノール中で生成させた本品のフェニルヒドラゾン体の吸収スペクトルを吸光度測定法により測定するとき、波長420 nmの位置に吸収の極大が認められた。また、極大吸収波長における吸光度は0.497であった(日局規格：極大吸収波長における吸光度は0.42以上)。本品のフェニルヒドラゾン体の紫外・可視吸収スペクトルをFig. 1に示した。

##### (3) 赤外吸収スペクトル

本品および日局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) 旋光度

本品の旋光度は、 $[\alpha]_D^{25} = +77.0^\circ$ (乾燥後、0.1 g, ジオキサン, 10 ml, 100 mm)であった(日局規格： $[\alpha]_D^{25} : +72 \sim +80^\circ$ )。

##### (5) 純度試験

(a) TLC法 本品および日局標準品の薄層クロマトグラムをFig. 3に示した。スポット量100  $\mu$ gでは、本品および日局標準品とも2個の微量不純物スポットが検出されたが、いずれのスポットの強さも希釈溶液のスポットより薄く、UV強度の比較から、いずれの不純物量も0.7%以下と推定された(日局規格：2%以下)。また、本法によるデキサメタゾンの検出限界は、0.05  $\mu$ gであった。

(b) HPLC法 本品および日局標準品につき、HPLC法による純度試験で得られた液体クロマトグラムをFig. 4に示した。本品(A)および日局標準品(B)とも、主成分(デキサメタゾン)ピークのほかに不純物ピークがそれぞれ1個または2個認められた。面積百分率法による不純物総量は、本品で $0.19 \pm 0.007\%$  (n=4)、日局標準品で $0.15 \pm 0.028\%$  (n=4)と推定された。

##### (6) 乾燥減量

本品の乾燥減量は、0.16% (0.2 g, 105℃, 3時間)であった(日局規格：0.5%以下)。

##### (7) 定量

日局「デキサメタゾン」の定量法を準用し、日局標準品を対照とし、パラオキシ安息香酸プロピルを内標準物質としてHPLC法による定量を行った結果、 $99.4 \pm 0.3\%$  (n=3)の値が得られた。



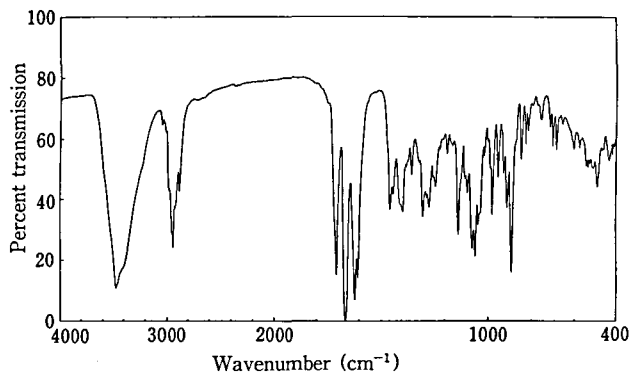


Fig. 2. Infrared absorption spectrum for the candidate Dexamethasone Reference Standard (Control 931)

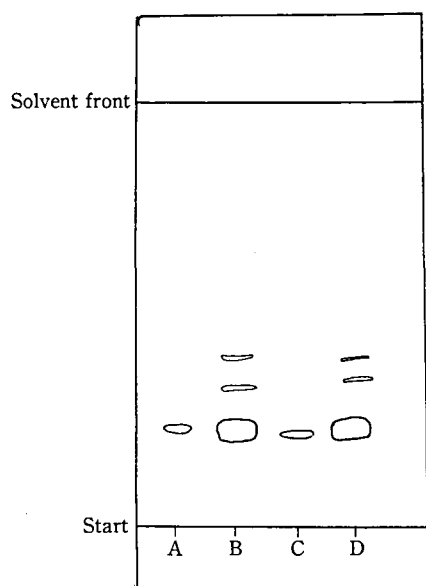


Fig. 3. Thin-layer chromatogram for the candidate and the JP Dexamethasone Reference Standard

Solvent system: dichloromethane · methanol (45 : 4)

Spot: A and B are 2  $\mu$ g and 100  $\mu$ g of JP Reference Standard, respectively. C and D are 2  $\mu$ g and 100  $\mu$ g of the candidate material, respectively.

### 結 論

デキサメタゾン標準品原料につき、日局標準品を対照に比較検討した結果、本標準品原料は、国立衛生試験所標準品（日本薬局方標準品）として十分な品質を有することが確認された。

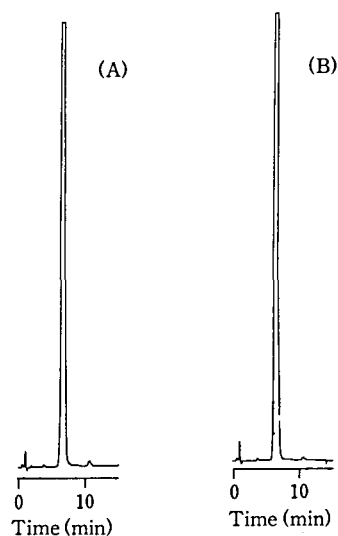


Fig. 4. High-performance liquid chromatograms for the candidate and the JP Dexamethasone Reference Standard

(A): the candidate material, (B): JP Dexamethasone Reference Standard

HPLC conditions: column, Inertsil ODS (4.6 mm $\phi$   $\times$  250 mmL); column temp., 25°C; mobile phase, a mixture of water and acetonitrile (2 : 1); flow rate, 2.7 ml/min; detection wavelength, 254 nm

終わりに、本標準品の製造にあたりご協力いただきました萬有製薬(株)に深謝いたします。

### 文 献

- 1) 木村俊夫, 網川延孝, 中守律夫: 副腎皮質ステロイドの標準品について, 医薬品研究, 17, 143 ~ 173 (1986)

## 国立衛生試験所シアノコバラミン標準品 (Control 931)

北島 文・吉井公彦・小松裕明・石光 進・岡田敏史

The Cyanocobalamin Reference Standard (Control 931) of the  
National Institute of Health SciencesAya Kitajima, Kimihiko Yoshii, Hiroaki Komatsu,  
Susumu Ishimitsu and Satoshi Okada

Raw cyanocobalamin material was tested for preparation of the "Cyanocobalamin Reference Standard (Control 931)". Analytical data obtained were as follows: loss on drying, 4.2%; infrared spectrum, the same as that of the JP Cyanocobalamin Reference Standard (Control 901); thin-layer chromatography, four impurities were detected; high-performance liquid chromatography (HPLC), seven to eight kinds of impurities were detected, but the total amount of impurities was only  $1.0 \pm 0.52\%$  ( $n=5$ ); assay results, 100.6% by spectrophotometry in the JP XII and 99.7% by HPLC.

Based on the above findings, the raw material was authorized as the JP Cyanocobalamin Reference Standard (Control 931).

**Keywords:** cyanocobalamin, quality evaluation, authorization, JP Reference Standard

(Received May 31, 1994)

第十二改正日本薬局方「シアノコバラミン」および「シアノコバラミン注射液」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に用いられる国立衛生試験所シアノコバラミン標準品 (Control 931) を製造したので報告する。

### 1. 原料

本標準品原料は、萬有製薬(株)より提供された。同社による日局「シアノコバラミン」の規格および試験法に基づく試験成績の主なもの以下のとおりである: 吸光度比,  $A_{278}/A_{361}=0.55$ ,  $A_{549}/A_{361}=0.31$ ; pH, 5.7; 乾燥減量, 5.3%; 定量, 100.0%。

### 2. 参照物質および試薬

第十二改正日本薬局方シアノコバラミン標準品 (Control 901; 以後, 日局標準品と略称する) を対照に試験を行った。試薬は JIS 試薬特級品または特級相当品を用いた。

### 3. 装置

本標準品原料の品質試験にあたり, 以下の測定装置を用いた: 自記分光光度計 (日本分光, Ubest-50 型), 赤外分光光度計 (日本分光, FT-IR VALOR-III)。また, 液体クロマトグラフ装置は, 島津製作所製の LC-10AD 型ポンプ, SPD-10A 型検出器, SCL-10A 型システムコントローラー, C-R6A 型

データ処理装置を用いた。

### 4. 試験方法

特に記すもののほかは, 日局一般試験法および日局「シアノコバラミン」の規格および試験法を準用する。

#### 4.1. 薄層クロマトグラフ (TLC) 法による純度試験

薄層板: メルク社製プレコーテッド薄層板シリカゲル 60F<sub>254</sub> (厚さ, 0.25 mm), 展開溶媒: (A) プロパノール・水・10%アンモニア水混液 (7:2:1), (B) *n*-ブタノール・水・クロロホルム・酢酸・メタノール混液 (25:11:10:9:5), 試料溶液および標準溶液の調製: 本品および日局標準品 5.0 mg ずつを正確に量り, それぞれをメタノール 1 ml に正確に溶かし, 試料溶液および標準溶液とする。操作法および検出法: 試料溶液および標準溶液の 40  $\mu$ l (シアノコバラミン 200  $\mu$ g 相当量) および 20  $\mu$ l をシリカゲル薄層板に線状にスポットし, 約 15 cm 展開したのち, 風乾する。これに裏面より白色光を照射して観察する。

#### 4.2. 液体クロマトグラフ (HPLC) 法による純度試験<sup>1)</sup>

本品および日局標準品 10.0 mg ずつを正確に量

り、それぞれを水に溶かし、水を加えて正確に 10 ml とし、試料溶液および標準溶液とする。これらの液 10  $\mu$ l につき、次の条件で液体クロマトグラフ法による試験を行う。

#### 操作条件

検出器：紫外吸光光度計 (測定波長：361 nm)

カラム：Inertsil ODS (4.6 mm $\phi$ ×150 mmL)

カラム温度：40℃

移動相：アセトニトリルと 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 3.0) の混液。ただし、0 分から 8 分まではアセトニトリル・リン酸緩衝液混液 (11 : 89) を用い、8 分から 35 分まではアセトニトリル濃度を 11 v/v % から 60 v/v % まで直線的に増加させ、その後アセトニトリル濃度 60 v/v % を 60 分まで維持する。

流量：0.7 ml/min

検出感度：試料注入量の 1/100 に相当する量を注入するとき、得られる主ピークの高さが記録紙のフルスケールの約 10% になるように検出器の出力あるいは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<sup>2)</sup>。

#### 4.3. HPLC 法による定量<sup>1)</sup>

本品および日局標準品 10 mg ずつを正確に量り、それぞれを内標準溶液に溶かし、正確に 50 ml とし、試料溶液および標準溶液とする。これらの液 10  $\mu$ l につき、次の条件で HPLC 法による試験を行い、内標準物質のピーク面積に対するシアノコバラミンのピーク面積の比を求め、試料中のシアノコバラミン量を求める。

内標準溶液：*p*-ヒドロキシ安息香酸の水溶液 (9  $\rightarrow$  200)

#### 操作条件

検出器：紫外吸光光度計 (測定波長：278 nm)

カラム： $\mu$ Bondapak C18 (3.9 mm $\phi$ ×150 mmL)

カラム温度：40℃

移動相：0.1 M リン酸緩衝液 (pH 3.0)・アセトニトリル混液 (22 : 3)

流量：1.0 ml/min

### 5. 試験結果

#### (1) 性状：

暗赤色の粉末である。

#### (2) 紫外および可視吸収スペクトル

日局「シアノコバラミン」の確認試験(1)を準用し、吸収スペクトルを測定するとき、波長 278, 361,

551 nm の位置に吸収の極大が認められた。また、それぞれの吸収極大の波長における吸光度を  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$  とするとき、吸光度比  $A_1/A_2$  は 0.55,  $A_3/A_2$  は 0.31 であった (日局規格： $A_1/A_2$  は 0.53~0.59,  $A_3/A_2$  は 0.29~0.32)。本品の紫外・可視吸収スペクトルを Fig. 1 に示した。

#### (3) 赤外吸収スペクトル

本品および日局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、同一波長のところに同様の強度の吸収が認められた (Fig. 2)。

#### (4) pH

本品の水溶液 (0.10 g, 煮沸冷却水 20 ml) の pH は 5.5 であった (日局規格：4.2~7.0)。

#### (5) 純度試験

(a) TLC 法 展開溶媒(A)および(B)で展開した本品およびシアノコバラミン日局標準品の薄層クロマトグラムを Fig. 3 に示した。本品および日局標準品ともスポット量 200  $\mu$ g で展開溶媒(A)で 4 個、(B)で 2 個の不純物スポットが検出された。展開溶媒(A)における  $R_f = 0.20$  の不純物は極微量であり、スポット量 100  $\mu$ g では検出されなかった。展開溶媒(A)は (B)に比べ、分離能および展開力において優れている。本法によるシアノコバラミンの検出限界は、それぞれ

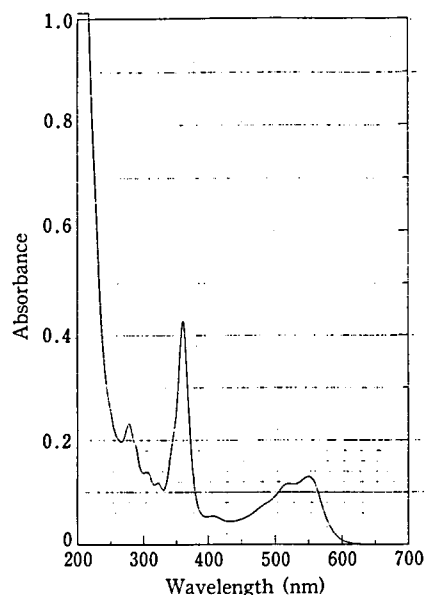


Fig. 1. Ultraviolet and visible absorption spectrum for the candidate cyanocobalamin reference standard (Control 931)

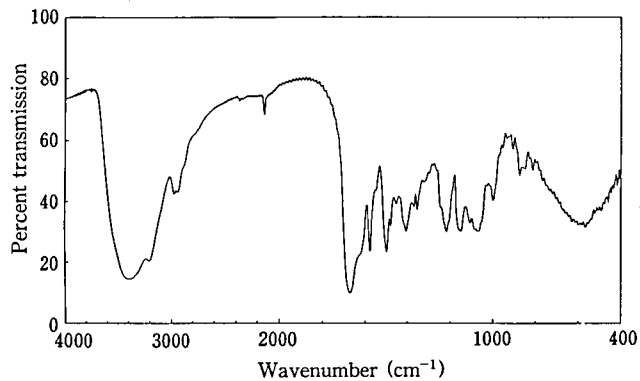


Fig. 2. Infrared absorption spectrum for the candidate cyanocobalamin reference standard (Control 931)

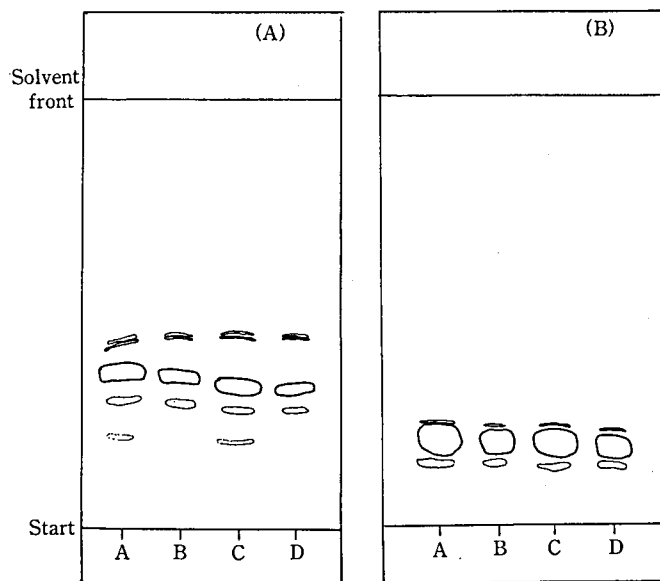


Fig. 3. Thin-layer chromatograms for the candidate and the JP Cyanocobalamin Reference Standard

Solvent system:

(A): *n*-propanol·water·10% aq. ammonia (7 : 2 : 1)

(B): *n*-butanol·water·chloroform·acetic acid·methanol (25 : 11 : 10 : 9 : 5)

Spot: A and B are the JP Reference Standard 200  $\mu$ g and 100  $\mu$ g, respectively.

C and D are the candidate material 200  $\mu$ g and 100  $\mu$ g, respectively.

れ展開溶媒(A)で0.1  $\mu$ g, (B)で0.05  $\mu$ gであり, 展開溶媒(A)における  $R_f$  値0.20の不純物は0.1%未満であることが明らかになった。

(b) HPLC法 本品および日局標準品につき, HPLC法による純度試験で得られた液体クロマト

グラムを Fig. 4 に示した。本品(A)および日局標準品(B)とも, シアノコバラミンのピークのほかに不純物ピークがそれぞれ7個または8個認められた。面積百分率法による不純物総量は, 本品で  $1.0 \pm 0.52\%$  ( $n=5$ ), 日局標準品で  $1.4 \pm 0.12\%$  ( $n=4$ ) で

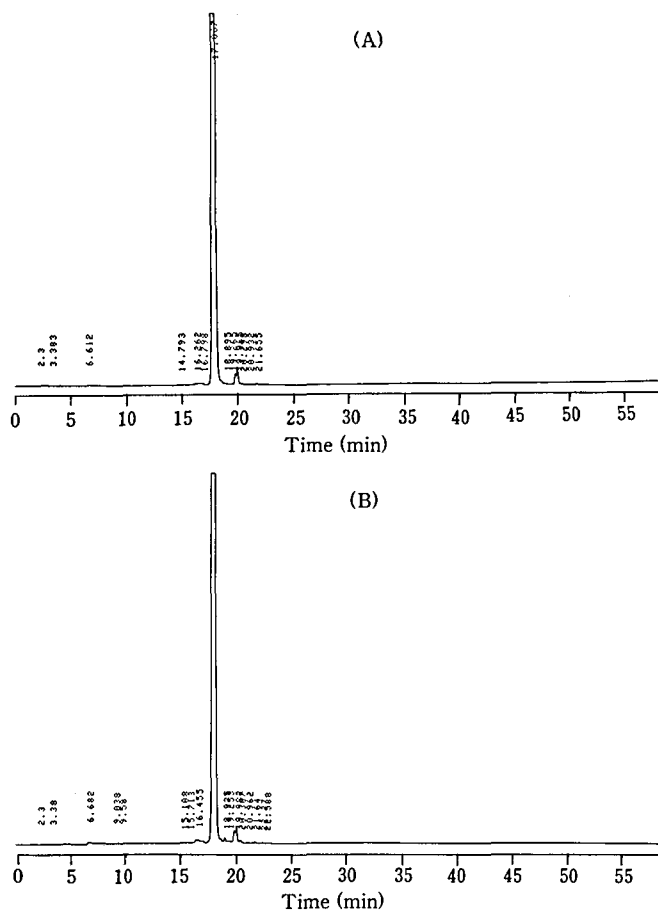


Fig. 4. High-performance liquid chromatograms for the candidate and the JP cyanocobalamin reference standard (A): the candidate material (B): the JP cyanocobalamin reference standard (Control 901)

Conditions: column, Inertsil ODS (4.6mm $\phi$ ×150mmL); column temp., 40°C; flow rate, 0.7 ml/min; detection wavelength, 361 nm; mobile phase, a mixture of acetonitrile (AcCN) and 0.1 M phosphate buffer (pH 3.0) was used. Gradient program was as follows: AcCN concentration was constant at 11% for the first 8 minutes, and then linearly increased to 60% during 27 minutes, thereafter 60% of AcCN level was maintained.

あった。本品および日局標準品を比較するとき、不純物の数および種類に明確な差異は認められないが、総不純物量に若干の差異が認められた。

(6) 乾燥減量：

本品の乾燥減量は、4.2% (0.05 g, 五酸化リン, 100°C, 4時間, 減圧 5 mmHg 以下) であった (日

局規格：12%以下)。

(7) 定量

日局「シアノコバラミン」の定量法を準用し、日局標準品を対照として吸光度測定法による定量を行った結果、 $100.6 \pm 0.3\%$  ( $n=4$ ) の値が得られた。別に、HPLC法による定量では、 $99.7 \pm 1.5\%$

(n=4) の値が得られた。

### 結 論

シアノコバラミン標準品原料につき、日局標準品を対照に比較検討した結果、国立衛生試験所標準品（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) 太田美矢子, 木村俊夫, 田中 彰: 高速液体クロマトグラフィーによるシアノコバラミンの分析, 衛生試報, **105**, 65~68 (1987)
- 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)

## 国立衛生試験所プロゲステロン標準品 (Control 931)

北島 文・吉井公彦・小松裕明・石光 進・岡田敏史

The Progesterone Reference Standard (Control 931) of the  
National Institute of Health SciencesAya Kitajima, Kimihiko Yoshii, Hiroaki Komatsu,  
Susumu Ishimitsu and Satoshi Okada

Raw progesterone material was tested for preparation of the "Progesterone Reference Standard (Control 931)". Analytical data obtained were as follows: melting point, 131.6°C; infrared spectrum, the same as that of the JP Progesterone Reference Standard; optical rotation,  $[\alpha]_D^{20} = +181.1^\circ$ ; thin-layer chromatography, no impurity was detected; high-performance liquid chromatography (HPLC), trace amounts of two impurities were detected; loss on drying, 0.23%; assay results, 99.4% by UV spectrophotometry in the JP XII and 100.5% by HPLC.

Based on the above findings, the raw material was authorized as the JP Progesterone Reference Standard (Control 931).

**Keywords** : progesterone, quality evaluation, authorization, JP Reference Standard

(Received May 31, 1994)

第十二改正日本薬局方「プロゲステロン」の確認試験に用いられる国立衛生試験所プロゲステロン標準品 (Control 931) を製造したので報告する。

### 1. 原料

本標準品原料は、帝国臓器製薬㈱より供与された。同社による日局「プロゲステロン」の規格および試験法による主な試験成績は以下のとおりである：融点, 131.4°C；旋光度  $[\alpha]_D^{20}$ , +179.11°；純度試験 (他のステロイド), 主スポット以外のスポットを認めない；定量, 100.04%。

### 2. 参照物質および試薬

第十二改正日本薬局方プロゲステロン標準品 (Control 724；以後, 日局標準品と略称する) を対照に試験を行った。試薬は JIS 試薬特級品または特級相当品を用いた。

### 3. 装置

本標準品原料の品質試験にあたり, 以下の測定装置を用いた：自記分光光度計 (日本分光, Ubest-50 型), 赤外分光光度計 (日本分光, FT-IR VALOR-III), 旋光計 (日本分光, DIP-370 型), 融点測定器 (宮本理研, PA-20S 型)。また, 液体クロマトグラフ装置は, 島津製作所製の LC-6A 型ポンプ, SPD-6A 型検出器, C-R6A 型データ処理装置を用

いた。

### 4. 試験方法

特に記すもののほかは, 日局一般試験法および日局「プロゲステロン」の規格および試験法を準用する。

#### 4.1. 薄層クロマトグラフ (TLC) 法による純度試験

薄層板：メルク社製プレコーテッド薄層板シリカゲル 60F<sub>254</sub> (厚さ, 0.25 mm), 展開溶媒：クロロホルム・ジエチルアミン混液 (19:1), 試料溶液および標準溶液の調製：本品および日局標準品 10.0 mg ずつを正確に量り, それぞれにメタノール 1 ml を正確に加えて溶かし, 試料溶液および標準溶液とする。操作法：標準溶液 20  $\mu$ l (200  $\mu$ g) および試料溶液とその希釈液 5~20  $\mu$ l (プロゲステロン 0.25~200  $\mu$ g 相当量) をシリカゲル薄層板にスポットし, 約 15 cm 展開したのち, 風乾する。これに紫外線 (主波長 254 nm) を照射し, 不純物スポットの有無を観察する。

#### 4.2. 液体クロマトグラフ (HPLC) 法による純度試験

本品および日局標準品 10.0 mg ずつを正確に量り, それぞれに薄めたエタノール (85→100) を加

えて溶かし、正確に 50 ml とし、試料溶液および標準溶液とする。これらの液 10  $\mu$ l につき、次の条件で液体クロマトグラフ法による試験を行う。

#### 操作条件

検出器：紫外吸光度計 (測定波長：241 nm)  
 カラム：Inertsil ODS (4.6 mm $\phi$ ×150 mmL)  
 カラム温度：35℃  
 移動相：アセトニトリル・水混液 (7:3)  
 流量：1.3 ml/min  
 検出感度：試料注入量の 1/100 に相当する量を注

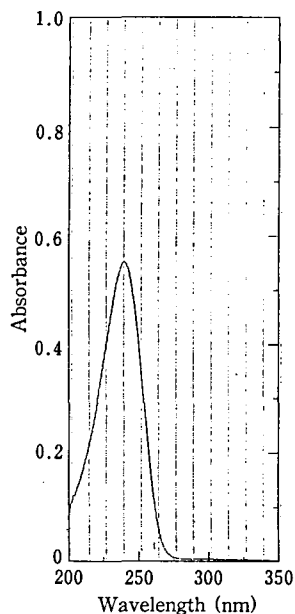


Fig. 1. Ultraviolet absorption spectrum for the candidate progesterone reference standard (Control 931)

入するとき、得られる主ピークの高さが記録紙のフルスケールの約 10% になるように検出器の出力あるいは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。

#### 4.3. HPLC 法による定量

本品および日局標準品 20 mg ずつを正確に量り、それぞれを薄めたエタノール (17→20) 20 ml に溶かす。この液 5 ml を正確に量り、内標準液 5 ml を加えた後、薄めたエタノール (17→20) を加えて 50 ml とし、試料溶液および標準溶液とする。これらの液 10  $\mu$ l につき、次の条件で HPLC 法により試験を行う。

内標準溶液：メチルテストステロンの薄めたエタノール (17→20) 溶液 (1→2000)

#### 操作条件

4.2 に記した純度試験における操作条件を準用する。

#### 5. 試験結果

##### (1) 性状

白色の結晶性粉末で、においはない。

##### (2) 紫外吸収スペクトル

日局「プロゲステロン」の定量法で用いる試料溶液につき、吸光度測定法により吸収スペクトルを測定するとき、波長 240 nm の位置に吸収の極大が認められた。また吸収極大波長における比吸光度  $E_{1\%}^{1cm}$  は 550 であった。本品の紫外吸収スペクトルを Fig. 1 に示した。

##### (3) 赤外吸収スペクトル

本品および日局標準品の赤外吸収スペクトルを臭

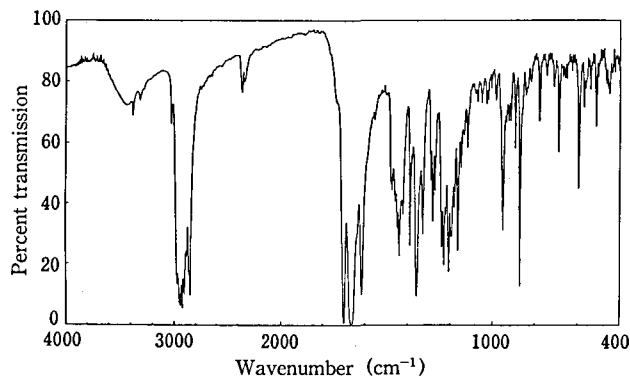


Fig. 2. Infrared absorption spectrum for the candidate progesterone reference standard (Control 931)



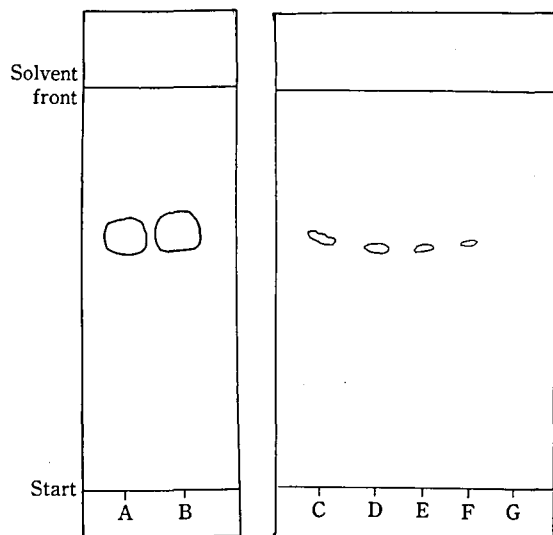


Fig. 3. Thin-layer chromatogram for the candidate material and the JP progesterone reference standard

Solvent system: chloroform·diethylamine (19 : 1)

Spot: A, C, D, E, F and G are the candidate material at the concentration of 200, 4, 2, 1, 0.5 and 0.25  $\mu\text{g}$ , respectively. B is 200  $\mu\text{g}$  of JP Reference Standard.

Detection: UV at 254 nm

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) 旋光度

本品の旋光度は、 $[\alpha]_D^{25} = +181.10^\circ$  (乾燥後, 0.2 g, ジオキサン, 10 ml, 100 mm) であった (日局規格:  $[\alpha]_D^{25} = +174 \sim +182^\circ$ ).

#### (5) 融点

本品の融点は、 $131.6^\circ\text{C}$  であった (日局規格:  $128 \sim 133^\circ$ ). この結果、本品の結晶形は  $\alpha$  体と推定された<sup>2)</sup>.

#### (6) 純度試験

(a) TLC 法 本品およびプロゲステロン標準品の薄層クロマトグラムを Fig. 3 に示した。スポット量 200  $\mu\text{g}$  で、本品および日局標準品とも主スポット以外の異種スポットは検出されなかった。また、本法によるプロゲステロンの検出限界は、0.5  $\mu\text{g}$  であった。

(b) HPLC 法 本品および日局標準品につき、

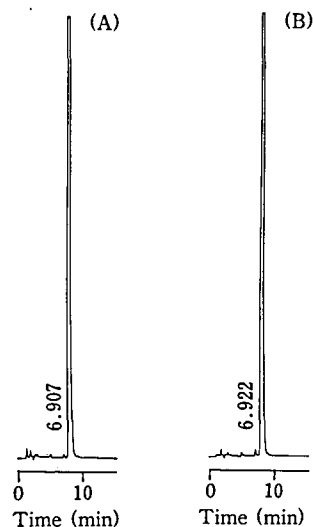


Fig. 4. High-performance liquid chromatograms for the candidate material and JP Progesterone Reference Standard

(A): the candidate material

(B): JP Progesterone Reference Standard (Control 724)

HPLC conditions: column, Inertsil ODS (4.6 mm $\phi$   $\times$  150 mmL); column temp.,  $35^\circ\text{C}$ ; mobile phase, acetonitrile·water (7 : 3); flow rate, 1.3 ml/min; detection wavelength, 241nm

HPLC 法による純度試験で得られた液体クロマトグラムを Fig. 4 に示した。本品(A)および日局標準品(B)とも、主成分 (プロゲステロン) ピークのほか、微小な不純物ピークがそれぞれ 2 個認められる。面積百分率法による不純物総量は、本品で  $0.08 \pm 0.00\%$  ( $n=5$ ), 日局標準品で  $0.19 \pm 0.01\%$  ( $n=4$ ) であった。

#### (7) 乾燥減量

本品の乾燥減量は、0.23% (0.5 g, 減圧, 五酸化リン, 3 時間) であった (日局規格: 0.5% 以下)。

#### (8) 定量

日局「プロゲステロン」の定量法を準用し、日局標準品を対照とし、吸光度測定法による定量を行った結果、 $101.3 \pm 0.4\%$  ( $n=3$ ) の値が得られた。また固定 E 値での定量では、 $99.9 \pm 0.4\%$  ( $n=3$ ) の値が得られた。別に、日局標準品を対照とした HPLC 法による定量試験では、 $100.5 \pm 0.4\%$  ( $n=3$ ) の値を得ている。

現行の日局「プロゲステロン」の定量法では、固

定E値を用いる吸光度測定法が採用されている。(6)において記したように、本標準品原料の純度は極めて高く、吸光度測定用標準品としてだけでなく、HPLC分析用標準品として十分な品質を有することから、日局「プロゲステロン」の定量法を、本標準品を用いる相対分析法へ改正することが期待される。

### 結 論

プロゲステロン標準品原料につき、日局標準品を対照に比較検討した結果、国立衛生試験所標準品

(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帝国臓器製薬㈱に深謝いたします。

### 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)
- 2) 第十二改正日本薬局方解説書, 廣川書店, p. C-1913, 1991

## 国立衛生試験所エストラジオール標準品 (Control 931)

北島 文・吉井公彦・小松裕明・石光 進・岡田敏史

Estradiol Reference Standard (Control 931) of National  
Institute of Health SciencesAya Kitajima, Kimihiko Yoshii, Hiroaki Komatsu,  
Susumu Ishimitsu and Satoshi Okada

The raw material for estradiol was examined for preparation of the "National Institute of Health Sciences (NIHS) Estradiol Reference Standard (Control 931)". Analytical data obtained were as follows: melting point, 179.0°C; infrared spectrum, the same as that of the present NIHS Estradiol Reference Standard; optical rotation,  $[\alpha]_D^{20} = +80.4$ ; thin-layer chromatography, no impurity was detected; high-performance liquid chromatography (HPLC), a trace amount of two impurities were detected; loss on drying, 0.24%; assay, 100.4% by UV spectrophotometry and 101.2% by HPLC.

Based on the above results, the raw material was authorized as the NIHS Estradiol Reference Standard (Control 931).

**Keywords** : estradiol, quality evaluation, authorization, NIHS Reference Standard

(Received May 31, 1994)

エストラジオールとその製剤の純度試験に用いられる国立衛生試験所エストラジオール標準品 (Control 931) を製造したので報告する。

#### 1. 原 料

本標準品原料は、帝国臓器製薬(株)より供与された。同社による日本薬局方外医薬品規格 (局外規) 「エストラジオール」の規格および試験法に基づく、主な試験成績は以下のとおりである：融点, 178.3°C；旋光度 +80.53°；定量, 100.35%。

#### 2. 参照物質および試薬

国立衛生試験所エストラジオール標準品 (Control 724；以後、ER 標準品と略称する) を対照に試験を行った。試薬類は JIS 試薬特級品または特級相当品を用いた。

#### 3. 装 置

本標準品原料の品質試験にあたり、以下の測定装置を用いた：自記分光光度計 (日本分光, Ubest-50 型), 赤外分光光度計 (日本分光, FT-IR VALOR-III), 旋光計 (日本分光, DIP-370 型), 融点測定器 (宮本理研, PA-20S 型)。また、液体クロマトグラフ装置は、島津製作所製の LC-6A 型ポンプ, SPD-6A 型検出器, C-R6A 型データ処理装置を用いた。

#### 4. 試験方法

特に記すもののほかは、日局一般試験法および局外規 (1993) 「エストラジオール」の規格および試験法を準用する。

##### 4.1. 薄層クロマトグラフ (TLC) 法による純度試験

薄層板：メルク社製プレコーテッド薄層板シリカゲル 60F<sub>254</sub> (厚さ, 0.25 mm), 展開溶媒：石油エーテル・エーテル・シクロヘキサノン混液 (3:1:1), 試料溶液：本品 100 mg をとり、エタノール 10 ml を正確に加えて溶かし、試料溶液とする。操作法および検出法：試料溶液 5  $\mu$ l (エストラジオール 50  $\mu$ g 相当量) およびその希釈液 1~20  $\mu$ l (0.025~2  $\mu$ g 相当量) をシリカゲル薄層板にスポットし、約 15 cm 展開したのち、風乾し、さらに 105°C で 10 分間加熱する。これに薄めた硫酸 (3→4) を噴霧した後、105°C で 3 分間加熱し、不純物スポットの有無を観察する。

##### 4.2. 液体クロマトグラフ (HPLC) 法による純度試験

本品および ER 標準品 5.0 mg ずつを正確に量り、それぞれをエタノール 5.0 ml に溶かし、試料溶液および標準溶液とする。これらの液 40  $\mu$ l につき、

次の条件で液体クロマトグラフ法による試験を行う。  
操作条件

検出器：紫外吸光度計（測定波長：280 nm）

カラム：Inertsil ODS-2 (4.6mmφ×150mmL)

カラム温度：35°C

移動相：アセトニトリル・水混液 (11:9)

流量：0.9 ml/min

検出感度：試料注入量の1/100に相当する量を注入するとき、得られる主ピークの高さが記録紙のフルスケールの約10%になるように検出器の出力あ

るいは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<sup>2)</sup>。

#### 4.3. HPLC法による定量

本品およびER標準品10 mgずつを正確に量り、それぞれをメタノールを加えて溶かし、正確に25 mlとする。これらの液5 mlずつを正確に量り、それぞれに内標準溶液2.5 mlおよびメタノール50 mlを加えた後、水を加えて正確に100 mlとし、試料溶液および標準溶液とする。これらの液25  $\mu$ lにつき、次の条件でHPLC法による試験を行う。

内標準溶液：パラオキシ安息香酸エチルのメタノール溶液 (3→5000)

操作条件

検出器：紫外吸光度計（測定波長：205 nm）

その他の操作条件は、4.2に記した純度試験における条件を準用する。

#### 5. 試験結果

##### (1) 性状

白色の結晶性粉末で、においはない。

##### (2) 紫外スペクトル

局外規「エストラジオール」の定量法における試料溶液につき、吸光度測定法により吸収スペクトルを測定するとき、波長281 nmの位置に吸収の極大が認められた（局外規規格：波長279～283 nmに吸収の極大を示す）。また、吸収極大における比吸光度  $E_{1\%}^{1cm}$  は76.1であった。本品の紫外吸収スペクトルを Fig. 1に示した。

##### (3) 赤外吸収スペクトル

本品およびER標準品の赤外吸収スペクトルを臭

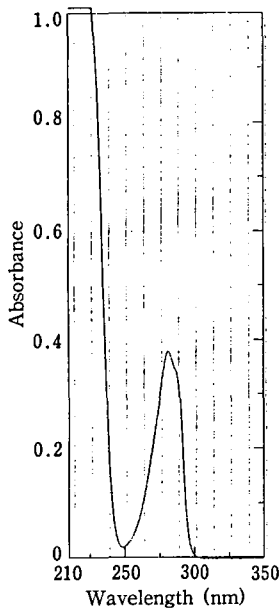


Fig. 1. Ultraviolet absorption spectrum for the candidate Estradiol Reference Standard (Control 931)

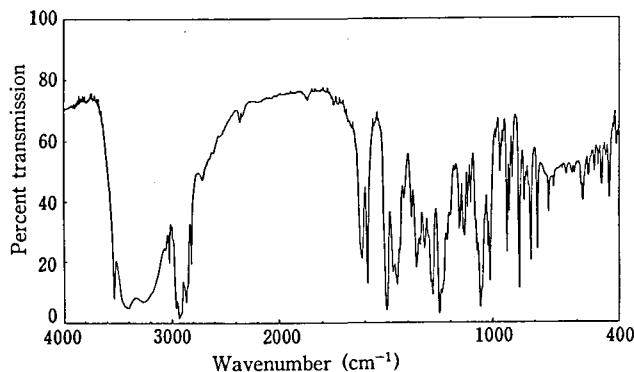


Fig. 2. Infrared absorption spectrum for the candidate Estradiol Reference Standard (Control 931)

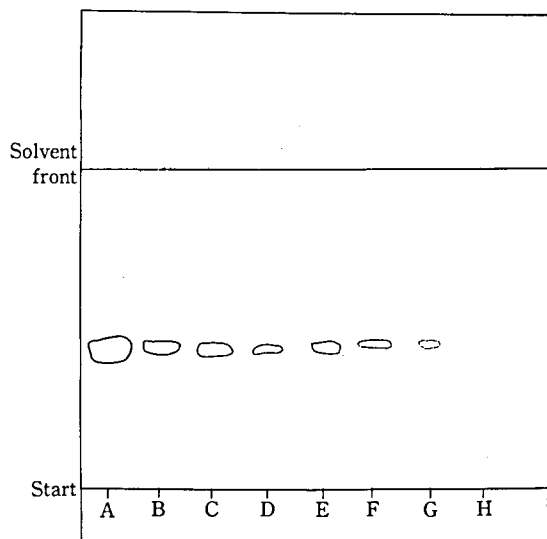


Fig. 3. Thin-layer chromatogram for the candidate Estradiol Reference Standard (Control 931)

Solvent system: petroleum ether · ether · cyclohexanone (3 : 1 : 1)

Spot: A to H are the candidate material at the concentrations of 50, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.05, and 0.025  $\mu\text{g}$ , respectively.

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) 旋光度

本品の旋光度  $[\alpha]_D^{25} = +80.4^\circ$  (乾燥後, 0.1 g, ジオキサン, 10 ml, 100 mm) であった (局外規規格:  $[\alpha]_D^{25} +75 \sim +82^\circ$ ).

(5) 融点

本品の融点は, 179.0°C であった (局外規規格: 175~180°).

(6) 純度試験

(a) TLC 法 本品の薄層クロマトグラムを Fig. 3 に示した。この結果、スポット量 50  $\mu\text{g}$  においても、主スポット以外の異種スポットは検出されなかった。なお、本法によるエストラジオールの検出限界は、0.05  $\mu\text{g}$  であった。

(b) HPLC 法 本品および ER 標準品につき、HPLC 法による純度試験で得られた液体クロマトグラムを Fig. 4 に示した。本品 (A) では、面積百分率 0.05% 以上の微量不純物が 2 個検出されたが、それらの不純物総量は、 $0.13 \pm 0.066\%$  ( $n=5$ ) と

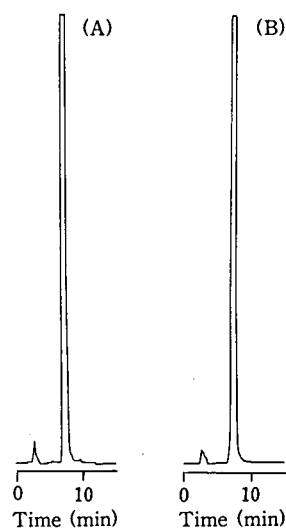


Fig. 4. High-performance liquid chromatograms for the candidate material and the NIHS Estradiol Reference Standard

(A): the candidate material

(B): NIHS Estradiol Reference Standard (Control 724)

HPLC conditions: column, Inertsil ODS-2 (4.6 mm  $\phi$   $\times$  150 mmL); column temp., 25°C; mobile phase, acetonitrile · water (11 : 9); flow rate, 0.9 ml/min; detection wavelength, 280 nm

推定された。一方、ER 標準品 (B) では、不純物ピークは検出されなかった。

本標準品原料で微量の不純物が検出されたが、その量は極微量であり、吸光度測定法による定量分析 (局外規, 1993) に影響を与えるような量でないことは明白であり、HPLC 法による定量分析用標準品としても十分な品質を有するものと判断される。

(7) 乾燥減量

本品の乾燥減量は、0.24% (0.5 g, 105°C, 3 時間) であった (局外規規格: 3.5% 以下)。

(8) 定量

局外規「エストラジオール」の定量法を準用し、ER 標準品を対照とし、吸光度測定法による定量を行った結果、 $100.4 \pm 0.4\%$  ( $n=4$ ) の値が得られた。

別に、ER 標準品を対照として HPLC 法による定量試験を行った結果、 $101.2 \pm 0.4\%$  ( $n=4$ ) の値が得られた。

## 結 論

エストラジオール標準品原料につき、現行のER標準品を対照に比較検討した結果、国立衛生試験所エストラジオール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帝国臓器製薬㈱に深謝いたします。

## 文 献

- 1) 徳永裕司, 木村俊夫, 川村次良: 国立衛生試験所標準品 (日本薬局方標準品) “エストラジオール標準品” について, 衛生試報, **94**, 105~106 (1976)
- 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)

## 国立衛生試験所アスコルビン酸標準品 (Control 931)

北島 文・吉井公彦・小松裕明・石光 進・岡田敏史

The Ascorbic Acid Reference Standard (Control 931) of the  
National Institute of Health SciencesAya Kitajima, Kimihiko Yoshii, Hiroaki Komatsu,  
Susumu Ishimitsu and Satoshi Okada

Raw ascorbic acid material was tested for preparation of the "Ascorbic Acid Reference Standard (Control 931)". Analytical data obtained were as follows: infrared spectrum, the same as that of the JP Ascorbic Acid Reference Standard; optical rotation  $[\alpha]_D^{20}$ ,  $+21.4^\circ$ ; melting point,  $190.3^\circ\text{C}$  (decomposition); loss on drying, 0.02%; assay result, 100.1% by iodometry.

Based on the above findings, the raw material was authorized as the JP Ascorbic Acid Reference Standard (Control 931).

**Keywords** : ascorbic acid, quality evaluation, authorization, JP Reference Standard

(Received May 31, 1994)

第十二改正日本薬局方「アスコルビン酸散」および「アスコルビン酸注射液」の定量法に用いられる国立衛生試験所アスコルビン酸標準品 (Control 931) を製造したので報告する。

### 1. 原料

本標準品原料は、武田薬品工業(株)より供給された。同社による日局「アスコルビン酸」に規格および試験法に基づく試験成績は以下のとおりである：融点、 $190^\circ$ ；旋光度、 $[\alpha]_D^{20} = +20.9^\circ$ ；pH, 2.3；乾燥減量, 0.01%；定量, 100.0%。

### 2. 参照物質および試薬

第十二改正日本薬局方アスコルビン酸標準品

(Control 894；以後、日局標準品と略称する) を対照に試験を行った。試薬類は、JIS 試薬特級品または特級相当品を用いた。

### 3. 装置

本標準品原料の品質試験にあたり、赤外分光光度計 (日本分光, FT-IR VALOR-III) および融点測定器 (宮本理研, PA-20S 型) を用いた。

### 4. 試験方法

特に記すもののほかは、日局一般試験法および日局「アスコルビン酸」の試験法を準用する。

### 5. 試験結果

#### (1) 性状

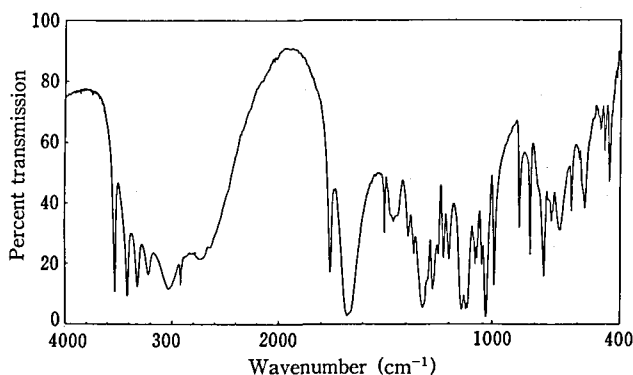


Fig. 1. Infrared absorption spectrum for the candidate Ascorbic Acid Reference Standard (Control 931)

白色の結晶でにおいはない。

(2) 赤外吸収スペクトル

本品および日局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. 1).

(3) 旋光度

本品の旋光度は、 $[\alpha]_D^{20} = +21.4^\circ$  (2.5 g, 水, 25 ml, 100 mm) であった (日局規格:  $[\alpha]_D^{20}$ :  $+20.5 \sim +21.5^\circ$ ).

(4) pH

本品 1.0 g を水 20 ml に溶かした液の pH は 2.4 であった (日局規格: 2.2~2.5).

(5) 乾燥減量

本品の乾燥減量は、0.02% (1 g, シリカゲル, 24 時間) であった (日局規格: 0.20%以下).

(6) 定量

日局「アスコルビン酸」の定量法を準用し、日局標準品を対照とし、ヨウ素法による定量試験を行った結果、 $100.1 \pm 0.7\%$  (n=4) の値が得られた。

### 結 論

アスコルビン酸標準品原料につき、日局標準品を対照に比較検討した結果、国立衛生試験所アスコルビン酸標準品 (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武田薬品工業㈱に深謝いたします。



## 国立衛生試験所シクランデラート標準品 (Control 931)

北島 文・吉井公彦・小松裕明・石光 進・岡田敏史

The Cyclandelate Reference Standard (Control 931) of the  
National Institute of Health SciencesAya Kitajima, Kimihiko Yoshii, Hiroaki Komatsu,  
Susumu Ishimitsu and Satoshi Okada

Raw cyclandelate material was tested for preparation of the "Cyclandelate Reference Standard (Control 931)". Analytical data obtained were as follows: melting point, 57.4°C; ultraviolet spectrum,  $\lambda_{\max}$  = 252.0, 258.1 and 264.1 nm and  $E_{1\%}^{1\text{cm}}$  = 5.85 (252.0 nm), 6.95 (258.1 nm), 5.30 (264.1 nm), respectively; infrared spectrum, the same as that of the JP Cyclandelate Reference Standard; thin-layer chromatography, no impurities were detected up to 1000  $\mu\text{g}$ ; high-performance liquid chromatography (HPLC), no impurities were detected; loss on drying, 0.03%; assay result, 101.4% by HPLC.

Based on the above findings, the raw material was authorized as the JP Cyclandelate Reference Standard (Control 931).

**Keywords** : cyclandelate, quality evaluation, authorization, JP Reference Standard

(Received May 31, 1994)

第十二改正日本薬局方「シクランデラート」の定量法に用いられる日本薬局方シクランデラート標準品 (Control 931) を製造したので報告する。

#### 1. 原料

本標準品原料は、山川薬品工業(株)より供給された、同社による液体クロマトグラフ (HPLC) 法による純度試験によれば、面積百分率法による純度は、99.86%と報告されている。そのほか、日局「シクランデラート」の規格および試験法に適合する。

#### 2. 参照物質および試薬

第十二改正日本薬局方シクランデラート標準品 (Control 902; 以後、日局標準品と略称する)<sup>1)</sup>を対照に試験を行った。試薬類は、JIS 試薬特級品または特級相当品を用いた。

#### 3. 装置

本標準品原料の品質試験にあたり、以下の測定装置を用いた：自記分光光度計 (日本分光, Ubest-50型), 赤外分光光度計 (日本分光, FT-IR VALOR-III), 融点測定器 (宮本理研, PA-20S型), 微量水分測定装置 (平沼産業, AQ-6型)。また、HPLC装置は、島津製作所製の LC-6A型ポンプ, SPD-6A型検出器, C-R6A型データ処理装置を用いた。

#### 4. 試験方法

特に記すもののほかは、日局一般試験法および日局「シクランデラート」の規格および試験法を準用する。

##### 4.1. 薄層クロマトグラフ (TLC) 法による純度試験

薄層板：メルク社製プレコーテッド薄層板シリカゲル 60F<sub>254</sub> (厚さ, 0.25 mm), 展開溶媒：ヘキサン・酢酸エチル・氷酢酸混液 (8:2:1), 試料溶液および標準溶液の調製：本品および日局標準品 500.0 mg ずつを正確に量り、それぞれにエタノール 5 ml を正確に加えて溶かし、試料溶液および標準溶液とする。別に、試料溶液および標準溶液の一部をとり、エタノールで希釈し、希釈試料溶液および希釈標準溶液を調製する。操作法および検出法：試料溶液および標準溶液 10  $\mu\text{l}$  と希釈試料溶液および希釈標準溶液 2~10  $\mu\text{l}$  をシリカゲル薄層板にプロットし、約 10 cm 展開したのち、風乾する。これに紫外線 (主波長 254 nm) を照射し、不純物スポットの有無を観察する。次いで、ヨウ素蒸気に暴露した後、同様に観察する。

##### 4.2. HPLC 法による純度試験

日局「シクランデラート」の純度試験法を準用す

る。

#### 操作条件

検出器：紫外吸光度計（測定波長：228 nm）

カラム：Inertsil ODS（4.6 mmφ×150 mmL）

カラム温度：30℃

移動相：アセトニトリル・水混液（4：1）

流量：0.5 ml/min

検出感度：試料注入量の1/100に相当する量を注入するとき、得られる主ピークの高さが記録紙のフルスケールの約10%になるように検出器の出力あ

るいは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<sup>2)</sup>。

#### 5. 試験結果

##### (1) 性状

白色の粉末で味は苦い。

本品の融点は、57.4℃であった（日局規格：約58℃）。

##### (2) 紫外吸収スペクトル

本品のエタノール溶液中における紫外吸収スペクトルを Fig. 1 に示した。波長 252.0、258.1、264.1 nm に吸収の極大が観察され、その UV スペクトルの形状は日局標準品のものとは一致した。また、三つの極大吸収波長における比吸光度は、それぞれ  $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 5.85$  (252.0 nm), 6.95 (258.1 nm), 5.30 (264.1 nm) であった。

極大吸収波長に関する日局規格：波長 250～254 nm, 256～260 nm および 262～266 nm

##### (3) 赤外吸収スペクトル

本品および日局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

(a) TLC 法 本品についての薄層クロマトグラムを Fig. 3 に示した。この結果、スポット量 1000  $\mu\text{g}$  においても、紫外線照射法またはヨウ素法のいずれの検出法によっても不純物スポットは検出されなかった。また、標準溶液（スポット量：500～1000  $\mu\text{g}$ ）についても、不純物スポットは検出されな

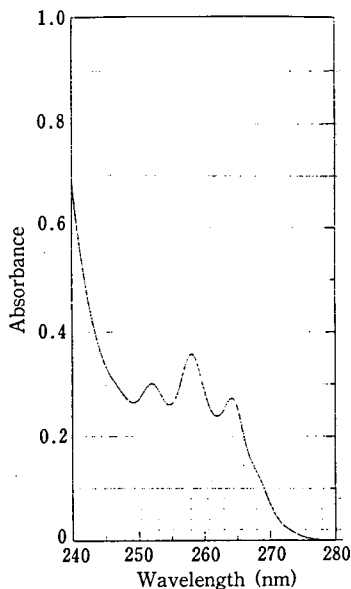


Fig. 1. Ultraviolet absorption spectrum for the candidate Cyclandelate Reference Standard (Control 931)

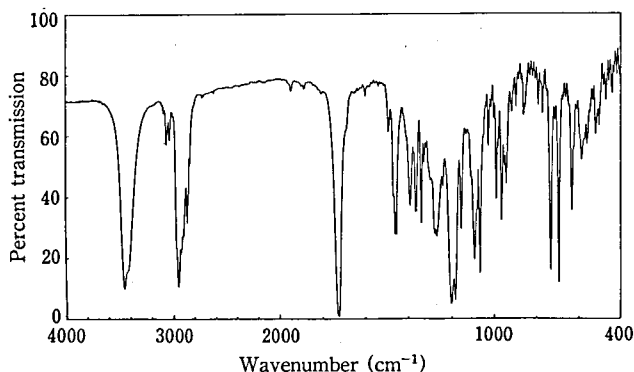


Fig. 2. Infrared absorption spectrum for the candidate Cyclandelate Reference Standard (Control 931)

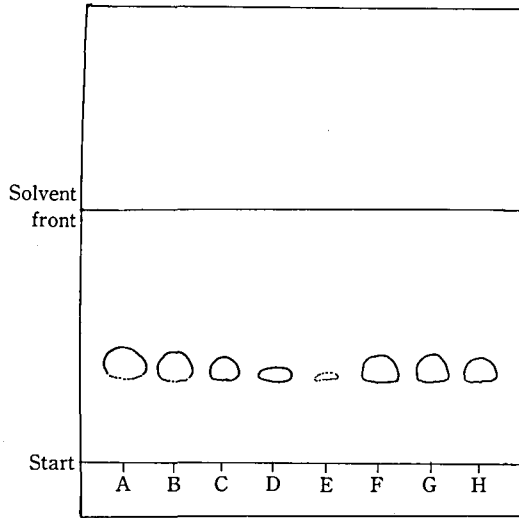


Fig. 3. Thin-layer chromatogram for the candidate Cyclandelate Reference Standard (Control 931)

Solvent system: hexane · ethyl acetate · acetic acid (8 : 2 : 1)

Spot: A to E are the candidate material 1000, 800, 500, 300 and 5 µg, respectively. F to H are JP Reference Standard 1000, 800 and 500 µg, respectively.

った。なお、本法によるシクランデラートの検出限界は、5 µgであった。

(b) HPLC法 本品および日局標準品につき、HPLC法による純度試験で得られたクロマトグラムをFig. 4に示した。本品(A)および日局標準品(B)とも、クロマトグラム上、主成分(シクランデラート)ピークの前後に、微小な不純物ピーク1~2個が検出されるが、これらの不純物量はいずれも面積百分率0.05%以下と推定された。

なお、日局においては、不純物ピークの合計面積は試料溶液の3%濃度に相当する「標準溶液のシクランデラートのピーク面積より大きくない」と規定していることから、日局「シクランデラート」に比べ、高純度の確保されていることが、明らかである。

#### (5) 乾燥減量

本標準品原料の乾燥減量は、0.03% (1g, シリカゲル, 24時間)であった(日局規格: 0.5%以下)。

#### (6) 定量

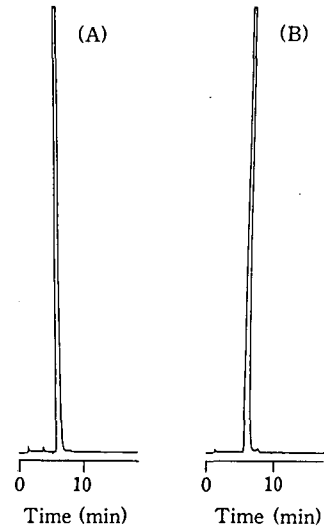


Fig. 4. High-performance liquid chromatograms for the candidate and the JP Cyclandelate Reference Standard

(A): the candidate material

(B): JP Cyclandelate Reference Standard (Control 902)

HPLC conditions: column, Inertsil ODS (4.6 mmφ × 150 mmL); column temp., 30°C; mobile phase, acetonitrile · water (4 : 1); flow rate, 0.5 ml/min; detection wavelength, 228nm

日局「シクランデラート」の定量法を準用し、日局標準品を対照とし、フタル酸ジシクロヘキシルを内標準物質としてHPLC法による定量試験を行った結果、 $101.4 \pm 0.63\%$  ( $n=4$ )の値が得られた。

## 結 論

シクランデラート標準品原料につき、日局標準品を対照に比較検討した結果、国立衛生試験所標準品(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山川薬品工業㈱に深謝いたします。

## 文 献

- 1) 笥 華子, 村井真美, 小松裕明, 石光 進, 岡田敏史: 国立衛生試験所シクランデラート標準品 (Control 901), 衛生試験報, **109**, 168~170 (1991)
- 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)

## 国立衛生試験所アルプロスタジル標準品 (Control 921)

北島 文・吉井公彦・小松裕明・石光 進・岡田敏史

The Alprostajil Reference Standard (Control 921) of the  
National Institute of Health SciencesAya Kitajima, Kimihiko Yoshii, Hiroaki Komatsu,  
Susumu Ishimitsu and Satoshi Okada

Raw alprostajil material was examined for preparation of the "Alprostajil Reference Standard (Control 921)". Analytical data obtained were as follows: infrared spectrum, the same as that of the USP Alprostajil Reference Standard; thin-layer chromatography, no impurities were detected up to 20  $\mu$ g; high-performance liquid chromatography (HPLC), no impurities were detected; assay result, 99.6% by HPLC.

Based on the above findings, this raw material was authorized as the NIHS Alprostajil Reference Standard (Control 921).

**Keywords** : alprostajil, quality evaluation, authorization, NIHS Reference Standard

(Received May 31, 1994)

本品はプロスタグランジン E<sub>1</sub> (PGE<sub>1</sub>) であり、13 局収載予定品目「アルプロスタジル アルファデクス」の液体クロマトグラフ (HPLC) 法による定量法において用いられる予定のものである。「アルプロスタジル アルファデクス」は、PGE<sub>1</sub> の  $\alpha$ -シクロデキストリン包接化合物であるが、その含量は PGE<sub>1</sub> の量で規定されるよう規格されているため、定量用標準品は包接化合物ではなく、PGE<sub>1</sub> (アルプロスタジル) で設定される予定である。

本品の品質評価は、赤外吸収スペクトル測定法による確認試験、薄層クロマトグラフ (TLC) 法および HPLC 法による純度試験および HPLC 法による定量試験により行った。なお、対照標準品としては、USP のアルプロスタジル標準品を用いた。

#### 1. 原料

本標準品原料は、小野薬品工業(株)より供給された。本品は、合成経路の複雑さに加え、熱、光および湿度に不安定であり、その合成コストは極めて高価なため、標準品用原料として必ずしも十分な量が確保できたわけではない。したがって、その品質試験も必要最小限にとどめざるを得ず、試験用の試料についても可能な限り少量での試験の実施を心がけた。本品の保存は、遮光気密容器中、冷所 (5℃以下) 保存とした。

同社による主な試験成績は以下のとおりである：純度試験 (TLC)、主スポット以外のスポットは認めない；純度試験 (HPLC)、不純物ピークを認めない；定量 (滴定法) 100.1%。

#### 2. 参照物質および試薬

参照物質としては、USP のアルプロスタジル標準品 (Lot F-1) を用いた。また、試薬類は、JIS 試薬特級品または特級相当品を用いた。

#### 3. 装置

本標準品原料の品質試験にあたり、フーリエ変換形赤外分光光度計 (日本分光, FT-IR Valor-III) および HPLC 装置 (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

##### 4.1. 赤外吸収スペクトル測定

本品又は USP アルプロスタジル標準品の 2 mg と赤外吸収スペクトル測定用臭化カリウム 130 mg をめのう乳鉢中で混合磨砕した後、マイクロ錠剤成形器により試料および対照標準品を含有する臭化カリウム錠剤を調製する。これらの試料および対照標準品につき、日局一般試験法「赤外吸収スペクトル測定法」により、吸収スペクトルを測定する。

##### 4.2. TLC 法による純度試験

本品 3.0 mg を正確に量り、酢酸エチル 1.5 ml に正確に溶かし、試料溶液とする。別に、プロスタグランジン A<sub>1</sub> (PGA<sub>1</sub>) 1.0 mg を正確に量り、酢酸エチルに溶かして正確に 10 ml とする。この液 1 ml をとり、酢酸エチルを加えて正確に 10 ml とし、PGA<sub>1</sub> 標準溶液とする。試料溶液及び PGA<sub>1</sub> 標準溶液 10  $\mu$ l につき、TLC 法により試験を行う。

#### TLC 条件

薄層板：プレコーテッド薄層板シリカゲル 60 (厚さ、0.25 mm；メルク社製)

展開溶媒：酢酸エチル・ヘキサン・氷酢酸混液 (10：2：1)

検出：リンモリブデン酸のエタノール溶液 (1→4) を噴霧し、100℃、5 分間加熱

#### 4.3. HPLC 法による純度試験

本品 2.0 mg を正確に量り、エタノール 2 ml に溶かし、試料溶液とする。別に、USP アルプロスタジル標準品につき、同様に操作し、USP 標準品溶液を調製した。試料溶液および USP 標準品溶液 10  $\mu$ l につき、定量法におけると同様の条件で HPLC 法による純度試験を行う。ただし、本試験における検出感度は、次のように設定する。

検出感度：試料注入量の 1/100 に相当する量を注入するとき、得られる主ピークの高さがフルスケールの約 10% になるように検出器の出力あるいは記録計の感度を調整する。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。

#### 4.4. HPLC 法による定量

本品および USP 標準品 3.0 mg ずつを正確に量

り、それぞれをエタノール 5 ml に溶かし、内標準溶液 5 ml を正確に加え、水を加えて 15 ml とし、試料溶液および標準溶液とする。これらの液 10  $\mu$ l につき、次の条件で HPLC 法により試験を行う。

内標準溶液 パラオキシ安息香酸プロピルのエタノール溶液 (1→15000)

#### 操作条件

検出器：紫外吸光光度計、島津 SPD-6A (測定波長：205 nm)

カラム：液体クロマトグラフ用 ODS 充填カラム、Inertsil ODS (4.6×150 mm, 5  $\mu$ m), GL サイエンス(株)

カラム温度：25℃ (カラムオープン, 島津 CTO-6A)

移動相：0.02 M リン酸二水素カリウム試液・アセトニトリル混液 (3：2)

流量：1.0 ml/min

カラムの選定：標準溶液 10  $\mu$ l につき、上記の条件で操作するとき、アルプロスタジル、内標準物質の順に溶出し、その分離度が 5 以上であることを確認する。

#### 5. 試験成績

##### (1) 赤外吸収スペクトル測定法による確認

本品および USP アルプロスタジル標準品の赤外吸収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、本品がアルプロスタジルであることが確認された。赤外吸収スペクトルを Fig. 1 に示した。

##### (2) 純度試験

###### (a) TLC 法

本品および PGA<sub>1</sub> の薄層クロマトグラムを Fig.

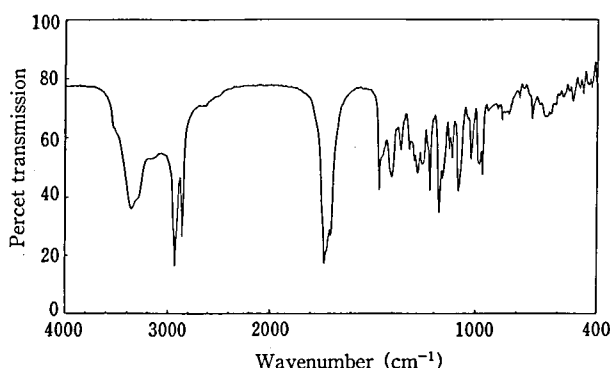


Fig. 1. Infrared absorption spectrum for the candidate Alprostadil Reference Standard (Control 921)

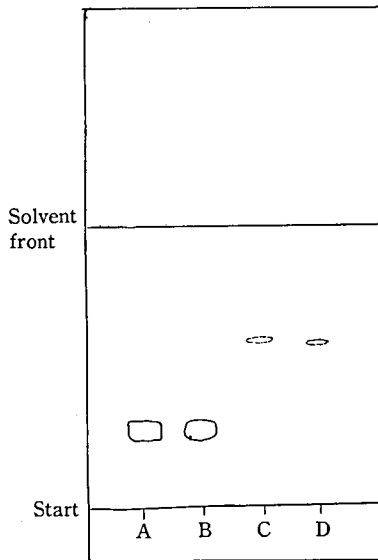


Fig. 2. Thin-layer chromatogram for the candidate Alprostadil Reference Standard (Control 921)

Solvent system: ethyl acetate · hexane · acetic acid (10 : 2 : 1)

Spot: A and B are the candidate material 20  $\mu$ g C and D are prostaglandin A<sub>1</sub> (PGA<sub>1</sub>) 100 ng

2に示した。本品 (PGE<sub>1</sub>) および PGA<sub>1</sub> の R<sub>f</sub> 値は、それぞれ 0.28, 0.59 であった。Fig. 2 に明らかなように、試料溶液 10  $\mu$ l (PGE<sub>1</sub> 20  $\mu$ g) のスポットにより、主スポット以外のスポットは認められず、PGA<sub>1</sub> とそれ以外の不純物スポットは、いずれも観察されなかった。PGA<sub>1</sub> のスポット量は 100 ng に相当することから、本品中の PGA<sub>1</sub> 量は 0.5% 以下と推定され、後述の HPLC 法による純度試験の結果と一致する。

#### (b) HPLC 法

本品および USP 標準品につき、HPLC 法による純度試験で得られたクロマトグラムの一例を Fig. 3 に示した。この結果、本品の液体クロマトグラムに面積百分率 0.05% 以上の不純物ピークは認められず、本品の HPLC 的純度は極めて高いものであることが明らかとなった。一方、USP 標準品については、保持時間 14.2 分付近に明瞭な不純物ピークが認められ、面積百分率法による不純物量は 0.7% と推定された。この不純物ピークの保持時間は、同一条件下における PGA<sub>1</sub> の保持時間に一致することから、PGA<sub>1</sub> と推定された。また、USP 標準品

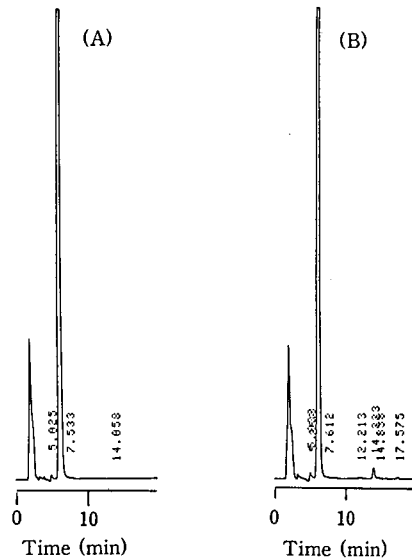


Fig. 3. High-performance liquid chromatograms for the candidate and the USP Alprostadil Reference Standard

(A): the candidate material

(B): USP Alprostadil Reference Standard

HPLC conditions: column, Inertsil ODS-2 (4.6 mm  $\phi$   $\times$  150 mmL); column temp., 30°C; mobile phase, 0.02 M potassium dihydrogenphosphate · acetonitrile (3 : 2); flow rate, 0.8 ml/min; detection wavelength, 205 nm

中には PGA<sub>1</sub> 以外に、面積百分率 0.05% 以上の不純物ピーク 4 個が観察されている。USP 標準品中のこれらの不純物総量は、1.01  $\pm$  0.06% (n=4) と推定された。

なお、液体クロマトグラム上、5.0 分付近の微小ピークは移動相由来のゴーストピークであることを確認している。

#### (3) HPLC 法による定量

USP アルプロスタジール標準品を対照とし、パラオキシ安息香酸プロピルを内標準物質として、HPLC 法による定量試験を行った結果、99.6  $\pm$  0.77% (n=3) の値が得られた。

## 結 論

本品は、HPLC 法および TLC 法による純度試験で検出される不純物はなく、HPLC 法による定量標準物質として十分な品質を有することが明らかとなり、国立衛生試験所アルプロスタジール標準品と

し認定された。なお、同一の HPLC 分析条件下で、USP のアルプロスタジル標準品は、プロスタグランジン A<sub>1</sub> と推定される不純物が 0.7% 相当量検出された。

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小野薬品工業㈱に深謝いたします。

## 文 献

- 1) 木村俊夫, 綱川延孝, 中川律夫: 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)

## 国立衛生試験所塩酸チアミン標準品 (Control 931)

北島 文・吉井公彦・小松裕明・石光 進・岡田敏史

The Thiamine Hydrochloride Reference Standard (Control 931) of the  
National Institute of Health SciencesAya Kitajima, Kimihiko Yoshii, Hiroaki Komatsu,  
Susumu Ishimitsu and Satoshi Okada

Raw thiamine hydrochloride material was tested for preparation of the "Thiamine Hydrochloride Reference Standard (Control 931)". Analytical data obtained were as follows: melting point, 242.7°C (decomposition); infrared spectrum, the same as that of the JP Thiamine Hydrochloride Reference Standard; thin-layer chromatography, one impurity was detected; high-performance liquid chromatography (HPLC), a trace amount of one impurity was detected; assay results, 100.4% by UV spectrophotometry and 100.0% by HPLC, respectively.

Based on the above findings, the raw material was authorized as the JP Thiamine Hydrochloride Reference Standard (Control 931).

**Keywords :** thiamine hydrochloride, quality evaluation, authorization, JP Reference Standard

(Received May 31, 1994)

第十二改正日本薬局方「塩酸チアミン」, 「塩酸チアミン散」および「塩酸チアミン注射液」の定量法, さらに「硝酸チアミン」および「乾燥酵母」の定量法に用いられる日本薬局方塩酸チアミン標準品 (Control 931) を製造したので報告する。

#### 1. 原料

本標準品原料は, 武田薬品工業(株)より供給された。同社による日局「塩酸チアミン」の規格および試験法に基づく主な試験成績は, 以下のとおりである: pH, 3.19; 水分, 2.16%; 定量, 100.1%; 塩素イオン含量, 99.9%。

#### 2. 参照物質および試薬

第十二改正日本薬局方塩酸チアミン標準品 (Control 894; 以後, 日局標準品と略称する)<sup>1)</sup>を対照に試験を行った。試薬は JIS 試薬特級品または特級相当品を用いた。

#### 3. 装置

本標準品原料の品質試験にあたり, 以下の測定装置を用いた: 自記分光光度計 (日本分光, Ubest-50型), 赤外分光光度計 (日本分光, FT-IR VALOR-III), 融点測定器 (宮本理研, PA-20S型), 微量水分測定装置 (平沼産業, AQ-6型)。また, 液体クロマトグラフ装置は, 島津製作所製の LC-6A 型ボ

ンプ, SPD-6A 型検出器, C-R6A 型データ処理装置を用いた。

#### 4. 試験方法

特に記すもののほかは, 日局一般試験法および日局「塩酸チアミン」の規格および試験法を準用する。

##### 4.1. 薄層クロマトグラフ (TLC) 法による純度試験

薄層板: メルク社製プレコーテッド薄層板シリカゲル 60F<sub>254</sub> (厚さ, 0.25 mm), 展開溶媒: 10% 酢酸ナトリウム・ベンゼン・アセトン・メタノール混液 (5:3:1:1) の下層溶液<sup>2)</sup>, 試料溶液および標準溶液の調製: 本品および日局標準品 10.0 mg を正確に量り, それぞれにメタノール 1 ml を正確に加えて溶かし, 試料溶液および標準溶液とする。操作法および検出法: 標準溶液 (塩酸チアミン 100 μg, 200 μg 相当量) および試料溶液とその希釈液 (塩酸チアミン 0.05~200 μg 相当量) をシリカゲル薄層板にスポットし, 約 10 cm 展開したのち, 風乾する。これに紫外線 (主波長 254 nm) を照射し, 不純物スポットの有無を観察する。

##### 4.2. 液体クロマトグラフ (HPLC) 法による純度試験

本品および日局標準品 50.0 mg ずつを正確に量



り、それぞれを移動相に溶かし、移動相を加えて正確に 25 ml とし、試料溶液および標準溶液とする。これらの液 10  $\mu$ l につき、次の条件で HPLC 法による試験を行う。

#### 操作条件

検出器：紫外吸光度計 (測定波長：254 nm)

カラム：Inertsil ODS-2 (4.6 mm $\phi$ ×150 mmL)

カラム温度：30℃

移動相：薄めた氷酢酸 (1→100)・メタノール・アセトニトリル混液 (15：6：4)。ただし、薄めた氷酢酸中には少量の1-オクタンスルホン酸ナトリウムが含まれる (1.1 g/1000 ml)。

流量：0.6 ml/min

検出感度：試料注入量の 1/100 に相当する量を注入するとき、得られる主ピークの高さが記録紙のフルスケールの約 10% になるように検出器の出力あるいは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<sup>2)</sup>。

## 5. 試験結果

### (1) 性状

白色の結晶性粉末である。

本品の融点は、242.7℃ (分解) であった (日局規格：約 245° (分解))。

### (2) 紫外吸収スペクトル

本品の 0.001 N 塩酸水溶液中 (1→100000) における紫外吸収スペクトルを Fig. 1 に示した。波長 246 nm に吸収の極大が観察され、スペクトルの形状は日局標準品のものと一致した。また、極大吸収波長 (246 nm) における比吸光度は、 $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ ：412

であった。

### (3) 赤外吸収スペクトル

本品および日局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) pH

本品の水溶液 (1 g, 水, 100 ml) の pH は 3.2 であった (日局規格：2.7~3.4)。

### (5) 純度試験

(a) TLC 法 本品および塩酸チアミン標準品の薄層クロマトグラムを Fig. 3 に示した。本品および

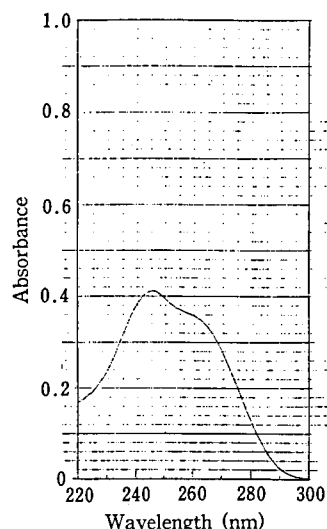


Fig. 1. Ultraviolet absorption spectrum for the candidate Thiamine Hydrochloride Reference Standard (Control 931)

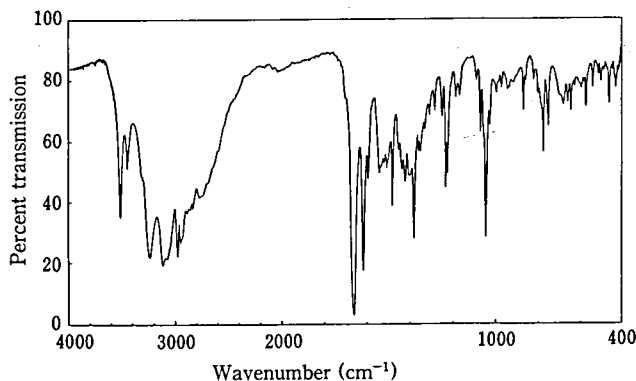


Fig. 2. Infrared absorption spectrum for the candidate Thiamine Hydrochloride Reference Standard (Control 931)

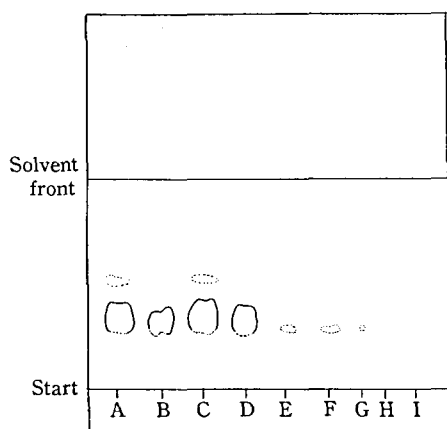


Fig. 3. Thin-layer chromatogram for the candidate and the JP Thiamine Hydrochloride Reference Standard

Solvent system: the lower layer of the mixture of 10% sodium sulfate · benzene · acetone · methanol (5 : 3 : 1 : 1)

Spot: A and B are JP Reference Standard 200  $\mu$ g and 100  $\mu$ g, respectively C to I are the candidate material 200, 100, 1, 0.5, 0.2, 0.1 and 0.05  $\mu$ g, respectively.

Detection: UV at 254 nm

日局標準品ともスポット量 200  $\mu$ g において 1 個の不純物スポットが検出されたが、スポット量 100  $\mu$ g ではこの不純物は検出されなかった。本法による塩酸チアミンの検出限界は 0.2  $\mu$ g であったことから、不純物量は 0.2% 以下と推定された。

(b) HPLC 法 本品および日局標準品につき、HPLC 法による純度試験で得られたクロマトグラムの一例を Fig. 4 に示した。本品(A)および日局標準品(B)とも、主成分(チアミン)ピークのほかに不純物ピークがそれぞれ 1 個認められた。面積百分率法による不純物総量は、本品で 0.12  $\pm$  0.003% (n=4)、日局標準品で 0.12  $\pm$  0.012% (n=4) と推定され、両者間に差異は認められなかった。

#### (6) 水分

電量滴定法による本品の水分は、2.4  $\pm$  0.04% (n=5) であった(日局規格: 5.0% 以下)。

#### (7) 定量

日局「塩酸チアミン」の定量法を準用し、日局標準品を対照とし、安息香酸メチルを内標準として HPLC 法による定量を行った結果、100.0  $\pm$  0.03% (n=4) の値が得られた。

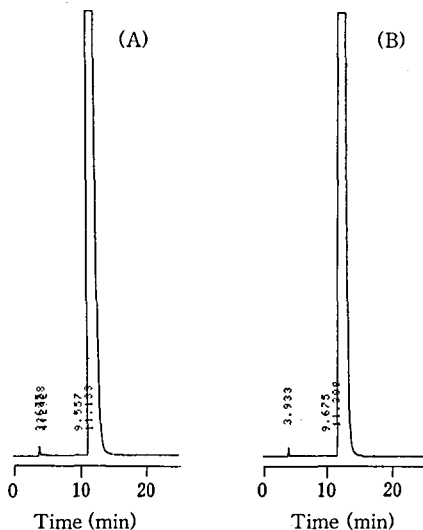


Fig. 4. High-performance liquid chromatograms for the candidate and the JP Thiamine Hydrochloride Reference Standard

(A): the candidate material

(B): JP Thiamine Hydrochloride Reference Standard (Control 894)

HPLC conditions: column, Inertsil ODS-2 (4.6 mm  $\phi$   $\times$  150 mmL); column temp., 30°C; mobile phase, a mixture of acetic acid · methanol · acetonitrile (15 : 6 : 4) containing 10 mM sodium octane sulfonate; flow rate, 0.6 ml/min; detection wavelength, 254 nm

別に、日局標準品を対照とする吸光度測定法(測定波長 246 nm)によれば、本品の含量は、100.4  $\pm$  0.48% (n=4) であった。

また、塩素イオン量をチオシアン酸アンモニウムによる過剰の銀イオンの逆滴定法(Volhard 法)により求めた結果、20.99% であり、理論値(21.03%)の 99.8  $\pm$  0.79% (n=4) であった。

## 結 論

塩酸チアミン標準品原料につき、日局標準品を対照に比較検討した結果、国立衛生試験所標準品(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武田薬品工業㈱に深謝いたします。

## 文 献

- 1) 岡田敏史, 広重律子, 田中正一, 村井真美, 木村

- 俊夫：国立衛生試験所塩酸チアミン標準品 (Control 891), 衛生試報, 108, 136~138 (1990)
- 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)

## 国立衛生試験所プロピオン酸テストステロン標準品 (Control 881)

石光 進・北島 文・吉井公彦・小松裕明・岡田敏史

The Testosterone Propionate Reference Standard (Control 881) of the  
National Institute of Health SciencesSusumu Ishimitsu, Aya Kitajima, Kimihiko Yoshii,  
Hiroaki Komatsu and Satoshi Okada

Raw testosterone propionate material was tested for preparation of the "Testosterone Propionate Reference Standard (Control 881)". Analytical data obtained were as follows: loss on drying, 0.1%; melting point, 120.6°C; optical rotation  $[\alpha]_D^{20} = +85.4^\circ$ ; ultraviolet spectrum,  $\lambda_{\max} = 241$  nm and specific absorbance  $E_{1\%}^{1\text{cm}}$  (241 nm) = 483; infrared spectrum, the same as that of the NIHS Testosterone Propionate Reference Standard; thin-layer chromatography, no impurities were detected; high-performance liquid chromatography (HPLC), one impurity was detected; assay result, 100.6% by UV spectrophotometry.

Based on the above findings, the raw material was authorized as the Testosterone Propionate Reference Standard (Control 881) of the National Institute of Health Sciences.

**Keywords** : testosterone propionate, quality evaluation, authorization, NIHS Reference Standard  
(Received May 31, 1994)

## 緒 言

プロピオン酸テストステロンおよびその製剤の定量法に用いられる国立衛生試験所プロピオン酸テストステロン標準品 (Control 881) を製造したので報告する。

## 1. 原 料

本標準品原料は、帝国臓器製薬(株)より供与された。

## 2. 参照物質および試薬

国立衛生試験所プロピオン酸テストステロン標準品 (Control 5412; 以後, TSP 標準品と略称する) を対照に試験を行った。試薬は JIS 試薬特級品または特級相当品を用いた。

## 3. 装 置

本標準品原料の品質試験にあたり、以下の測定装置を用いた: 自記分光光度計 (日立, U-3210 型), 赤外分光光度計 (日本分光, FT-IR VALOR-III), 融点測定器 (宮本理研, PA-20S 型)。また、液体クロマトグラフ装置は、東ソー製の CCPD 型ポンプ、島津製作所製の SPD-6AV 型検出器、C-R6A 型データ処理装置を用いた。

## 4. 試験方法

特に記すもののほかは、第十二改正日本薬局方 (日局) の一般試験法および日局「プロピオン酸テストステロン」の試験法を準用する。

## 4. 1 薄層クロマトグラフ (TLC) 法による純度試験

薄層板: メルク社製プレコートッド薄層板シリカゲル 60F<sub>254</sub> (厚さ, 0.25 mm), 展開溶媒: クロロホルム・ジエチルアミン混液 (19:1), 試料溶液および標準溶液の調製: 本品および標準品 10.0 mg ずつを正確に量り, それぞれにエタノール 1 ml を正確に加えて溶かし, 試料溶液および標準溶液とする。操作法: 標準溶液 10  $\mu$ l (プロピオン酸テストステロン (TSP) 100  $\mu$ g 相当量) および試料溶液とその希釈液 5~20  $\mu$ l (TSP 0.2~100  $\mu$ g 相当量) をシリカゲル薄層板にプロットし, 約 15 cm 展開したのち, 風乾する。これに紫外線 (主波長 254 nm) を照射し, 不純物スポットの有無を観察する。

## 4.2. 液体クロマトグラフ (HPLC) 法による純度試験

本品および TSP 標準品 10.0 mg ずつを正確に量り, それぞれにメタノールを加えて溶かし, 正確に 10 ml とし, 試料溶液および標準溶液とする。これ

らの液  $10 \mu\text{l}$  につき、次の条件で HPLC 法による試験を行う。

#### 操作条件

検出器：紫外吸光度計 (測定波長：241 nm)

カラム：Inertsil ODS ( $4.6 \text{ mm}\phi \times 150 \text{ mmL}$ )

カラム温度：35°C

移動相：アセトニトリル・水混液 (70 : 30)

流量：0.9 ml/min

検出感度：試料注入量の 1/100 に相当する量を注入するとき、得られる主ピークの高さが記録紙のフルスケールの約 10% になるように検出器の出力あるいは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<sup>1)</sup>。

### 5. 試験結果

#### (1) 性状

白色の結晶性粉末で、においはない。

#### (2) 紫外吸収スペクトル：

日局「プロピオン酸テストステロン」の定量法で得られた試料溶液につき、紫外吸収スペクトルを測定するとき、波長 241 nm に吸収の極大が観察され、スペクトルの形状は TSP 標準品のもものと一致した。また、吸収極大波長 241 nm における比吸光度  $E_{1\%}^{1\text{cm}}$  は 483 であった。本品の紫外吸収スペクトルを Fig. 1 に示した。

#### (3) 赤外吸収スペクトル

本品および TSP 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、同一波数のところで同様の強度の吸収が認められた (Fig. 2)。

#### (4) 純度試験

(a) TLC 法 本品および TSP 標準品の薄層クロマトグラムを Fig. 3 に示した。本品および TSP 標準品ともスポット量  $100 \mu\text{g}$  において不純物スポットは検出されなかった。また、本法によるプロピオン酸テストステロンの検出限界は、 $0.5 \mu\text{g}$  であった。

(b) HPLC 法 本品および TSP 標準品につき、HPLC 法による純度試験で得られたクロマトグラムの一例を Fig. 4 に示した。本品(A)および TSP 標準品(B)とも、プロピオン酸テストステロンのピークのほかに不純物ピークがそれぞれ 1 個または 3 個検出された。面積百分率法による不純物総量は、本品で  $0.08 \pm 0.00\%$  ( $n=4$ )、TSP 標準品で  $0.60 \pm 0.03\%$  ( $n=3$ ) と推定された。

#### (5) 乾燥減量

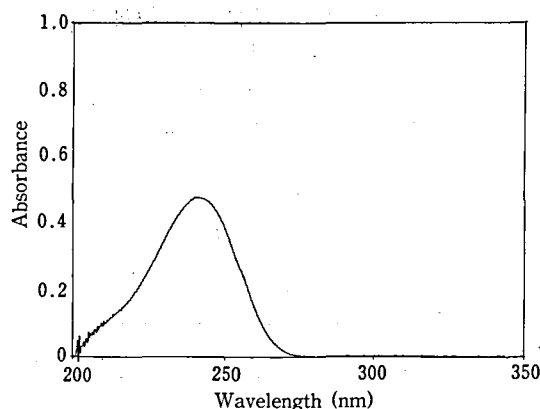


Fig. 1. Ultraviolet absorption spectrum for the candidate Teststerone Propionate Reference Standard (Control 881)

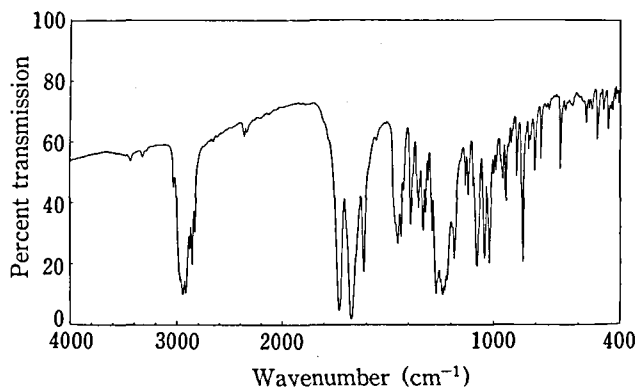


Fig. 2. Infrared absorption spectrum for the candidate Teststerone Propionate Reference Standard (Control 881)

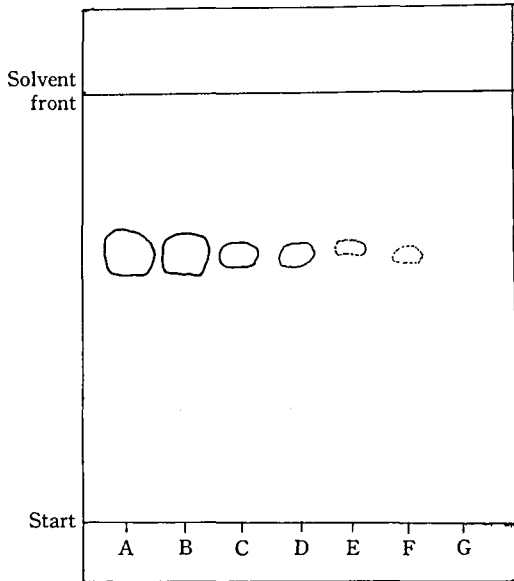


Fig. 3. Thin-layer chromatogram for the candidate Teststerone Propionate Reference Standard (Control 881)

Solvent system: chloroform·diethylamine (19 : 1)

Spot: A is NIHS Reference Standard 100  $\mu\text{g}$ . B, C, D, E, F and G are the candidate material 100, 10, 5, 1, 0.5 and 0.2  $\mu\text{g}$ , respectively.

本品の乾燥減量は、0.1% (0.5 g, 減圧, 五酸化リン, 4時間) であった (日局規格: 0.5%以下)。

#### (6) 定量

日局「プロピオン酸テストステロン」の定量法を準用し、TSP標準品を対照として吸光度測定法による定量を行った結果、 $100.6 \pm 0.8\%$ の値が得られた。

なお、プロピオン酸テストステロンについては、原体が日局収載品目であるだけでなく、その製剤「プロピオン酸テストステロン水性懸濁注射液」および「プロピオン酸テストステロン注射液」が日局収載品目となっている。それらの定量法は、原体においては固定E値を用いる吸光度測定法が、二つの製剤のうち「プロピオン酸テストステロン水性懸濁注射液」では重量法が、「プロピオン酸テストステロン注射液」では、定量用プロピオン酸テストステロンを対照とする吸光度測定法が採用されている。

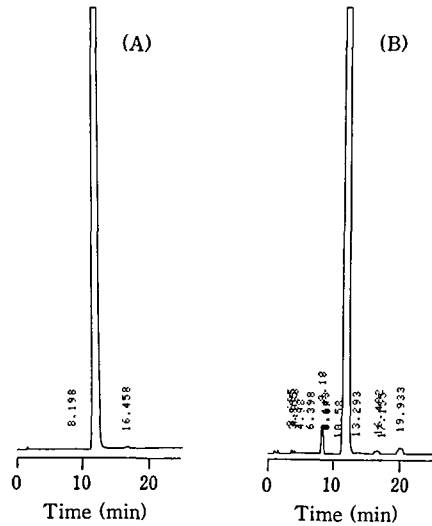


Fig. 4. High-performance liquid chromatograms for the candidate and NIHS Teststerone Propionate Reference Standard

(A): the candidate material

(B): NIHS Teststerone Propionate Reference Standard (Control 5412)

HPLC conditions: column, Inertsil ODS (4.6 mm $\phi$   $\times$  150 mmL); column temp., 35 $^{\circ}\text{C}$ ; mobile phase, acetonitrile·water (70 : 30); flow rate, 0.9 ml/min; detection wavelength, 241 nm

したがって、これらの定量法につき、国立衛生試験所プロピオン酸テストステロン標準品を用いる吸光度測定法または HPLC 法への改正が期待される。

## 結 論

プロピオン酸テストステロン標準品原料につき、TSP標準品を対照に比較検討した結果、国立衛生試験所プロピオン酸テストステロン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帝国臓器製薬㈱に深謝いたします。

## 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)

レギュラトリーサイエンス討論会

## 日本薬局方のうごき

内山 充

## The Current Trend of the Pharmacopoeia of Japan

Mitsuru Uchiyama

The Pharmacopoeia of Japan (JP) has played an important leading role in establishing standards of quality and official test methods for drugs and drug preparations in Japan. The JP XII's second supplement and the JP XIII are scheduled to come out by the end of 1994 and on April of 1996, respectively. To provide a more open revision process for JP and to announce the revision and future conception of the JP committees, the outlines of the current progress of each JP sub-committee were introduced.

**Keywords :** Pharmacopoeia of Japan, JP, revision of Pharmacopoeia

(Received May 31, 1994)

日本薬局方は、我が国の医薬品の質的基準と品質評価法の標準を示す公定書として、この数年来の薬事法改正、国際的調和、規制緩和など薬務行政を巡る急激な変化に合わせた改定が進められている。中央薬審の日本薬局方部会では、1994年12月発行予定の12局第2追補、および1996年4月の第13改正に向けて各委員会での審議が行われている。その現状と動向を紹介し、薬学会会員の意見と要望を論議した。

12局制定時に宿題となっていた事項のうち、確認試験でのIRの採用拡大と参照スペクトルの記載、溶出試験の追加、製剤の貯法の取り扱いなどは一部すでに1993年10月の第1追補で具体化された。

継続して努力中のものには、英文版の早期発刊、製剤収載数の増加、標準品の拡充と供給体制の確立、各条定量法への相対分析法の導入、各条試験におけ

る試料量の低減化、有害試薬および実験動物の使用抑制、固形製剤への溶出試験の適用拡充、製剤総則記載内容の全面的な見直し、発熱性物質試験法のエンドトキシン試験法への転換、JP-TIの刊行およびGeneral Informationの整備などがある。

一般試験法に関しては、局方各条での引用の有無にかかわらず、医薬品品質規格に利用し得る試験法を、試験法のバリデーションをも含め、国際的調和に留意しつつ積極的に収載するという方針は変わらない。特に、微生物学的試験法と物理特性試験法の整備拡充に努力したい。

なお、収載医薬品数を我が国医療の実情と流通医薬品の全貌に近づけるための新規収載の促進と、改定や原案作成のための先進諸国に匹敵する薬局方編纂体制の確立は、根本課題として依然残されている。

## 重量偏差試験・含量均一性試験の判定についての統計学的考察

香 取 典 子

Statistical Considerations for Weight Variation and  
Content Uniformity Tests

Noriko Katori

Weight variation and content uniformity tests are both intended to ensure the uniformity of dosage units. In the Japanese Pharmacopoeia, modifications to these tests have been proposed in thirteenth revision with new concepts based on statistical considerations. The points of change are as follows: 1. introduction of a variables requirement, 2. matching of sampling plans of weight variation and content uniformity tests, 3. clarification of conditions for application of content uniformity tests, 4. criterion of quality based on deviation not from the sample mean but from the label claim.

**Keywords** : content uniformity test, weight variation test, Pharmacopoeia of Japan, statistical basis, variables requirement

(Received May 31, 1994)

現在、日本薬局方には製剤の含量のバラツキを規制する試験法として「含量均一性試験」と「重量偏差試験」が採用されている。米国薬局方 (USP) は両者をついにまとめ「UNIFORMITY OF DOSAGE UNITS」とし、判定基準に相対標準偏差 (RSD) を取り入れている。そして、含量均一性試験の目的は、製造能力を検査することではなく、治療の質を保証することであり、試験は統計学的な背景を持つべきであると主張している<sup>1,2)</sup>。

日本薬局方 (12局) において判定の質を高め、国際的調和をはかる意味からも、試験法の改正を行うことは必要と考えられる。改正すべきと思われる点は次の通りである。

#### 1. 試験規格の統計学的背景を明らかにし、含量均一性試験および重量偏差試験のサンプリング方式を統一する

統計学的な試験の特性は検査特性 (OC) 曲線によって表される。良い製品が不合格になる危険  $\alpha$  (生産者危険) と悪い製品が合格してしまう危険  $\beta$  (消費者危険) は、試験個数と判定の限度値との兼ね合いによって決まる。日本薬局方の場合、サンプリング方式および判定基準は製剤毎に大きく異なっており、従って  $\alpha$  および  $\beta$  も製剤間で異なっている。試験に合格した製品の品質を同一水準で保証するためには、試験規格を統一する必要がある。

#### 2. 計量値 (標準偏差, 平均値等) を判定値として採用すること

日本薬局方の重量偏差試験および含量均一性試験は計数試験によるもので、個々の薬物の含量 (重量) を測定し、ある限度を超えたものの個数を数える試験法である。これに対し、USP では、計数試験に含量のバラツキを表す相対標準偏差 (RSD) を加えて、判定基準としている。RSD のようなパラメーターを用いた計量試験は、測定値すべての情報を利用するが、計数試験は一部の情報しか利用しないため、同じ試験個数ならば計量試験の方が信頼性の高い判定を行える<sup>1-3)</sup>。

#### 3. 個々の製剤の偏差を規定する判定値として、表示量からの偏差を用いること

USP は、含量の偏差を決める基準を表示量にしているが、日本薬局方や英国薬局方 (BP) は試料平均からとしている。後者の方法では、表示量と試料平均が大きく異なる場合でも、合格させてしまう危険性がある。USP のように、表示量からの偏差を規定すれば、この危険を避けることが出来る。

#### 4. 含量均一性試験および重量偏差試験の適用範囲を明確にすること

USP は、含量均一性試験と重量偏差試験を明確に定めており、重量偏差試験の適用を含量 50 mg 以上および重量比が 50% 以上の製剤で皮膜を施して



いないものに限定している。BP, ヨーロッパ薬局方 (EP) は含量 2 mg 以下の製剤に含量均一性試験を適用し、皮膜錠に対しては重量偏差試験を適用している。日本薬局方では明確ではないが、含量が 1 mg 以下の製剤にのみ含量均一性試験が適用されており、また被膜錠についてはいずれの試験も適用されない。含量の均一性は、本質的に含量が少ないほど保ちにくくなる<sup>4-6)</sup>ので、含量が一定以下の製剤に含量均一性試験を適用することは妥当である。しかしながら、単に含量の多寡だけではなく、薬理作用の強度、治療域をも考慮して試験の適用範囲を決めるのが妥当であると思われる。

### 5. 新判定基準の提案

現在の USP の判定は計数と計量の併用試験となっているが計数試験は不必要と考えられる。ところが、RSD は平均まわりの偏差のパラメータであるため、RSD のみでは表示量からの保証を行うことができない。そこで、平均値と表示量の差を考慮した、次の判定基準を新たに提案した。

ロットから採った  $n$  個のサンプルの平均値を  $m$ 、標準偏差を  $s$ 、表示量を  $M$  とするとき、

$$|M - m| + ks \leq L \quad (1)$$

ならば適合とする。ただし、 $k$  は合格判定係数、 $L$  は限度値である。この規格は、日本工業規格 JIS-Z 9004 計量基準型一回抜取試験 (標準偏差未知) を

基に作成された<sup>7)</sup>。これは、予想される平均値とそのまわり  $k\sigma$  の範囲が限度値の中にはいけば良いということを示している。したがって、試験の厳しさは、この  $k$  の値を変えることで調節できる。国際的整合性の観点からは、この試験規格の OC 曲線が USP のそれと重なるように、 $k$  を定めればよいと考えられる。

以上のような問題点の他にも、分析精度、増量仕込などの問題点があるが、まず基本的な含量の均一性試験の目的を確認し、有効でかつ負担の少ない試験法を定めることが重要であると思われる。

### 文 献

- 1) Cowdery, S. and Michaels, T.: *Pharmacopeial Forum*, 6, 614 (1980)
- 2) Tuckerman, M. M.: *Pharmacopeial Forum*, 7, 1031 (1981)
- 3) 香取典子他：薬剤学, 47(4), 233 (1987)
- 4) Willgress, S. W.: *Int. J. Pharm. Teck. & Prod. Mfr.*, 5(2), 13 (1984)
- 5) Yalkowsky, S. H., Bolton, S.: *Pharm. Res.*, 7(9), 962 (1990)
- 6) Egermann, H.: *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 3(2), 59 (1982)
- 7) “JIS ハンドブック品質管理—1991”, 第 1 版, 日本規格協会編, 日本規格協会, 東京 (1991) pp. 199~416

## タンパク性医薬品の assay における力価測定から理化学分析への移行の条件

早川 堯夫

Scientific Rationale for the Replacement of an *in Vivo* Bioassay  
for Protein Drugs with a Physico-chemical Assay

Takao Hayakawa

Recent progress in both protein drug production technologies including biotechnology and protein characterization methodologies has enabled us to mass-produce and extensively characterize highly purified protein drugs. The quality control of these protein drugs, being based on such a background, should be carried out using various modern protein analytical methodologies. One of the points to be considered regarding control strategies for these protein drugs should be the development and standardization of more specific, precise, simple and economical assay methodology. The replacement of existing *in vivo* bioassays with certain *in vitro* assays, including physico-chemical assays, is one possible direction along this line. This paper describes strategies for the replacement of an *in vivo* bioassay for protein drugs with a physico-chemical assay. Such approaches have been applied for recombinant human growth hormone and recombinant human insulin, the potencies of which have been estimated by *in vivo* bioassay. Scientific rationale for such approaches are also discussed.

**Keywords :** protein drug, *in vivo* bioassay, physico-chemical assay

(Received May 31, 1994)

## 緒 言

タンパク性医薬品は、従来、天然由来のものが多く、また、部分精製品がほとんどであり、その特性解析あるいは品質評価の中心は特有の生物活性を指標とする試験、すなわち bioassay にあった。Bioassay は、目的成分の確認、あるいは純度および力価検定に広く活用されてきた。力価の測定が、臨床上の有効性と密接に関連する場合が多いという点でも bioassay は固有の特徴を持ち、その意義は高いとされてきた。現在でもこのような framework の中でコントロールされている生物薬品は少なくない。

一方、最近の約 10 年間に医療上の大きな恩恵となったバイオテクノロジー医薬品は、生理活性タンパク質製剤の特性解析・品質評価という面からみても非常に大きいターニングポイントをもたらした。多種多様のバイテク製品の特性や品質を適正に解析する必要上から、そのための技術が著しく発展したこと、高純度製品が大量に得られるようになったこと、などである。これらの結果、品質管理面での物質的確認や純度検定に理化学分析が大きな威力を発

揮するようになってきた。Assay 法についてもより簡便、高感度、高精度、経済的な方法の開発が目指され、また、動物愛護の観点からなるべく動物を用いない assay 法の採用が望まれるようになった。そのゴールの一つは、理化学試験法による assay である。

1. 生物学的試験法から理化学試験法への  
切り替えへの要件と戦略

生物学的試験法から理化学試験法への切り替えへの要件と戦略としては、①開発段階での徹底的な生物学的特性解析の実施、②採用した製造方法を明確にしておき、その一定性を確保することにより特有の生物活性を保持する目的物質が再現性よく得られることの保証、③生物活性を保持する目的有効成分を選択的に識別し、定量することが可能な理化学試験系の確立（分析方法と標準物質）、などが挙げられる。

生物活性を保持する目的有効成分を選択的に識別し、定量することが可能な試験系の確立のための当然の前提条件は、生物活性（力価）と理化学試験測定値（含量）に相関があることである。そのために

まずとられるアプローチは、いくつかの製品ロットあるいは各種強制劣化試料についての生物活性測定結果と理化学試験法による含量測定結果をつきあわせることである。その結果、製品ロットや各種強制劣化試料についてすべて良好な相関性が得られればよいが、実際にはクリアな評価が難しいケースが多い。

本問題のキーポイントは、一たん理化学試験法に切り替えると、以降は、生物活性（力価）を測定することはないという状況の中で、理化学的測定結果（CONTENT）が同時に生物活性（POTENCY）を反映したものであることを意味する、ということである。具体的には、製造過程、保存中に目的物質の生物活性を変化させるとどのような事態が生じて、POTENCYのあるもののみを選択的に識別し、定量していることが保証された試験方法あるいはシステムを確立する必要があるということである。そのためには、i) おおよそその生物活性を確認するための半定量的測定法、いわゆる bioidentity test を別途設定、ii) 活性有効成分以外の類縁物質や不純物を別途コントロールする系の確立、iii) 活性有効成分のみを選択的に識別し、定量可能な試験系の確立、iv) これらの組合せ、などの方策が考えられる。

このうち、活性有効成分のみを選択的に識別し、定量可能な試験系確立のための validation study のポイントは、①製造過程および保存中に遭遇する可能性のある苛酷条件下で処理した試料について採用を検討している理化学試験系で測定し、②理化学的に定量された対象は、すべて完全な生物活性を保持することを立証することである。試験法選定にあたっては、コンフォメーションが変化して活性のない蛋白質は区別し、活性を有する重要な類縁物質の寄与はカウントできるような方策を講じる必要がある。

## 2. ヒト成長ホルモンおよびヒトインスリンの例

ヒト成長ホルモンおよびヒトインスリンは代表的な組換え医薬品であるが、定量はきわめて煩雑な *in vivo* bioassay に依っていたという点でも検討を要する代表格であった。

ヒト成長ホルモン（hGH）の定量は、従来、脳下垂体摘出ラットを用いる bioassay 法で行われていた。しかし、コスト、動物虐待、時間や労力、精度の面から問題が多く、国際的にも代替法の検討が行われてきた。そうした中では、hGH およびそれと同等の生物活性を有するデスアミド体などを同一ピークとして測定できる size exclusion (SE)-

HPLC 法が、従来の生物力価との継続性とも合わせ比較的有望とされてきた。しかし、こうした理化学試験法が生物活性にかかわるコンフォメーション変化の識別という点でどの程度保証を与えるかに関するデータは存在しなかった。ひとたび理化学試験法（SE-HPLC 法）に切り替えると、もはや bioassay は実施せず生物活性に関する直接的な情報が得られない中で、SE-HPLC 上で測定されるピークにのみ hGH 製品の生物活性（potency）に関する保証を求めざるを得なくなることを意味するが、果して SE-HPLC 法の hGH 領域のピークから得た値は、どのような場合であっても、常に正しく hGH の全活性を保証しているのかどうかという点が依然問題として残っていた。

この点を明らかにするために国内関係者と共同研究を行った。上記1項で示した戦略に基づき、hGH 蛋白質を変性させたり、分解あるいはコンフォメーション変化を起こさせるような苛酷条件に曝した後、SE-HPLC にかけて、クロマト上 hGH の領域にみられたピーク成分を分取して、*in vivo* bioassay, *in vitro* bioassay をはじめ、さらに、RRA, HPLC, CD などを行い、ピーク成分の活性や化学構造の解析を行った。その結果、hGH をいずれの苛酷条件に曝した後でも、SE-HPLC の hGH に相当するピークから分取した試料は、実験誤差の範囲内でいずれも hGH としての完全な活性を有することが確認された。また、この分画のペプチドマッピングから、hGH の一次構造が保持されていること、CD スペクトルなどから高次構造も intact な hGH と変わらないことが確認された。これらのことから、SE-HPLC 法は、完全な活性を有する hGH 成分のみを選択的に識別、定量できる系であることが明らかになった。

同様の検討を、ヒトインスリンについても行った。インスリンの場合は、reversed phase (RP)-HPLC 法が化学構造上の識別に関してはアミノ酸1個の違いでも識別可能なきわめてすぐれた分析法であることが既に判明していたが、分離されたインスリンのピークに存在する成分が常に完全な生物活性を有するものであるかどうかに関して直接に立証するデータはなかった。そこで、各種の苛酷条件に曝したインスリンを RP-HPLC にかけて、インスリンに相当するピークの生物活性を測定したところ、完全な活性を有するインスリンのみを選択的に識別、定量できる系であることが明らかになった。

## 局方における医薬品プラスチック容器の品質規格に関する提案

中村 晃 忠

## Proposal of JP Standards for Plastic Containers for Pharmaceuticals

Akitada Nakamura

A new approach to standardization of plastic containers for pharmaceuticals in the Pharmacopoeia of Japan (JP) has been proposed, structured into the following three parts: (1) "Plastic Containers for Pharmaceuticals" in the GENERAL INFORMATION section that describes the general requirements and rationales for conformity; (2) "Test Methods for Plastic Containers" in the GENERAL TESTS section that describes various test methods applicable for verifying conformity; (3) Special requirements and/or limit values for special containers such as infusion bags in a MONOGRAPH section. New standards should be designed to cover plastic containers of any shape and volume made of any kind of material.

**Keywords** : general requirements, Pharmacopoeia of Japan, plastic container

(Received May 31, 1994)

## 緒 言

日本薬局方 (JP) 一般試験法に「輸液用プラスチック容器試験法 (通称・輸プラ)」があるが、一般試験法委員会では、これを大幅に改正することを検討中である。その方向、構造、考え方を説明する。

医薬品容器としてのプラスチック容器に関する国内規定としては、輸プラしかない。そのために、輸プラがプラスチック製医薬品容器全般の規格として行政上運用されてきたきらいがあった。しかし、本来、輸プラは 500 ml 以上の容量の輸液容器の、それも限定された材料 (ポリエチレン: PE, ポリプロピレン: PP, ポリ塩化ビニル: PVC) の輸液容器の品質規格であるので、それを全般に準用することには無理があった。また、材料としては、規定された 3 種のもの以外にもおおくの優れた材料が開発されており、今のままでは、これらの優れた材料が医薬品容器へ利用されることを阻害しかねない状況になった。そこで、どんな材料にも、どんな形・容器にも適用可能な基準へ改正する方向で検討している。検討にあたっては、医薬品 GMP および医療用具 GMP の大幅改定や米国薬局方あるいは欧州薬局方との調和も考慮する必要がある。また、JP に GENERAL INFORMATION の部が新たに設けられることになったので、その利用も考慮した。

私は、かねてから、日本の規格・基準の全般的な傾向として、個別的、細部にわたった規定はあるが、どうあるべきかはほとんど記述されていない、と感じていた。これは製品品質保証 (しかも、国が罰則付きで監督する) をバックにしたためと考えられる。しかし、ISO 9000 シリーズを基礎とする新しい GMP においては、製造者における設計管理から製造品質保証、製品品質保証の一連の流れが重視されることになる。本提案はこの流れに沿って考えたものである。

本案では、プラスチック製医薬品容器の品質保証を以下のような 3 段階の構造によって規定する。(1) まず、GENERAL INFORMATION に「プラスチック製医薬品容器」という項目を設け、容器のあるべき姿、いかえれば、医薬品容器としての適合性の要件 (GMP の設計管理においては設計仕様) を示す。さらに、適合性検証と品質保証、ロット検査との関連性を明確にする。また、容器が各適合性の要件を充たしているかどうかの判断基準 (論理) もここに規定する。(2) 適合性は、当然ながら、試作品の各種試験によって検証されねばならないが、それらの試験方法を一般試験法の中に「プラスチック製医薬品容器試験法」として規定する。(3) 従来の 3 種の容器の規格値が、このままでは、宙に浮いてしまうので、これら (あるいは他の一般的な容器も) を第

2部の各条で規定する。あるいは、薬務局長通知のような形を採って、随時、規定していくのも一案である。

GENERAL INFORMATION「プラスチック製医薬品容器」の冒頭には、大原則を規定した。いわく、“容器が医薬品の有効性と安全性を損なうものであってはならない。個々のプラスチックはその特有の性質を持つし、容器に充填される医薬品の性質も様々であるので、プラスチック製医薬品容器の適合性は個別のプラスチックの性質と医薬品の性質の組み合わせの中で判断されるべきである。また、その適合性は適切な品質保証によって設計・製造・維持されねばならない。”また、このような設計管理を必要とする容器は、液状あるいは半液状の医薬品を充填するものに限ったかどうかと考える。

GENERAL INFORMATION「プラスチック製医薬品容器」は、この前文の後に3部に分けてある。第I部には、設計仕様（適合性の一般要件）を言葉で示した。内容は英国薬局方“Plastic Containers”とほとんど同じである。例えば、“容器からの溶出または移行物が内容医薬品の有効性と安全性を損なってはならない。”、“保存中に内容医薬品の品質が低下してはならない。”といったものである。第II部には、品質保証との関係を明示する。製造標準書に材料コンパウンドのメーカーや品番、主な添加剤などを特定することを求める一方、その受け入れ管理が正しく行われることを前提に、最終製品の容器ロット検査項目を最低限に減らす方向を打ち出した。第III部には、一般要件への適合性を検証するための基本規定と論理を明らかにした。例えば、プラスチック添加剤の医薬品への移行の安全量をどのようにして決めるか、材料の毒性評価のための試験項目の選択基準と判断原則、などである。

最低限のロット検査項目とは、例えば、灰化試験としての強熱残分、重金属；溶出物試験としてのpH変化、UV吸収スペクトル、KMnO<sub>4</sub>還元物質、

あわ立ち；生物試験としての細胞毒性試験、などが考えられる。

一般要件の検証原理のいくつかを以下に例示する。

容器から医薬品への移行物（溶出物）の限度値、例えば、PVCバッグからの可塑剤の溶出許容量、の考え方を提出した。すなわち、医薬品を摂取した時に付随して取り込む移行物の量が、その物質の最大無作用量（実験から得られる）に安全係数をかけた値より小さいことが原則となる。取り込み量の見積もり方、最大無作用量や安全係数の選び方などを記述する。

容器の光透過性や酸素透過性が内容医薬品に与える影響を評価するに、容器について別個に遮光性や酸素透過性を測定する必要はないと考えている。充填する医薬品を容器に詰めた状態で「(医薬品)安定性試験」を実施すれば、当該容器の評価も同時に行ったことになるからである。

毒性評価は、プラスチック添加剤そのものの毒性を評価する場合と、材料としての毒性評価とを分けて記述した。添加剤の毒性試験方法は原則的には医薬品毒性試験ガイドラインあるいは化審法毒性試験ガイドラインを準用すること、材料の毒性試験方法は「医療用具および医用材料の基礎的な毒性試験ガイドライン」を準用することとし、内容医薬品の使用期間・頻度、適用形態などによって必要な試験項目を選択する基準を表の形式にまとめた。例えば、材料の毒性試験の場合、細胞毒性試験はどんなカテゴリーの医薬品の容器の場合も必須とするが、感作性試験は内用剤容器には必要ではない、と考える。また、注射剤や血液製剤容器の場合には、溶血性試験やエンドトキシン試験を必須とする、が考えられよう。

この提案は、一般試験法委員会で審議中であり、東西医薬品工業（協）会・技術委員会を通じて業界の意見を求めながら、徐々に固めてゆくつもりである。

## 日本薬局方における微生物試験法の改定の動向

三 瀬 勝 利

## On the Revision of Microbial Tests in the Pharmacopoeia of Japan

Katsutoshi Mise

Revision of microbial tests in the Pharmacopoeia of Japan has been in progress since 1992. The affected areas include sterility tests, microbial limit tests, antimicrobial preservatives-effectiveness, and methods for sterilization. Here, the revision of sterility tests, as well as of microbial limit tests, is discussed in detail. Several problems in JPXII are also described.

**Keywords :** microbial tests, sterility tests, microbial limit tests, Pharmacopoeia of Japan

(Received May 31, 1994)

医薬品の品質保証とGMPにおける微生物試験法の重要性については、すでに複数のすぐれた報告が発表されている<sup>1,2)</sup>。注射剤や眼用剤については、その目的からも無菌である必要があり、これらの薬剤の微生物汚染は人に重大な健康障害を与える。また、必ずしも無菌性が要求されていない製剤についても、品質、安全性、安定性を確保するためには、微生物における汚染を最小限度にとどめておかねばならない。薬剤は患者、換言すれば、著しく生体防衛機能の劣った人に投与されるものであることを忘れてはならない。不幸にして過去にも、無菌製剤、非無菌製剤による微生物汚染やエンドトキシン汚染による健康障害が、数多く報告されている<sup>2)</sup>。エンドトキシンは非常に安定な物質であるため、一度汚染されると除去、または不活化させることが非常に難しい。環境中に常在する細菌に由来するだけに、汚染を起し易い。こうした理由が故に、薬局方における微生物試験法は、非常に重要である。

従来の薬局方・微生物試験法は、エンドトキシン試験法を除くと、無菌試験法と滅菌法の二つの試験法しか含まれていなかった。重要ないくつかの微生物試験法が抜けており、薬局方の重大な欠点とされていた。加うるに上記二つの試験法も諸外国の薬局方とのハーモナイゼーションの立場から問題も多く、記載も相当時代遅れのものがあつた。また、薬局方そのものとは直接かわりあいはないが、薬局方解説書の滅菌法解説には不適切な記述が有り、日本細菌学会バイオハザード委員会より強い抗議を受けて

いた。これらの欠点を是正した、時代の要求にマッチした薬局方微生物試験法の改訂・追加は、我々に課せられた緊急の課題ととらえている。

現在進行中の微生物試験法の改訂・追加項目には「無菌試験法」と「微生物限度試験法」があり、これらは第十二版薬局方追補版に収載予定となっている。平成六年度中に最終案を<フォーラム>に提示する予定である。そのほか十三版収載予定の試験法等としては、全面改訂された「滅菌法」のほかに、「保存効力試験法」、「生物学的指標」、「培地充填試験」、「各種注射用水の規定」などが含まれる。これらのうち、「保存効力試験法」を除く規定はGENERAL INFORMATIONに盛り込まれる予定になっている。

これらの試験法は、USP, BP, EPなどの各国薬局方とできるだけハーモナイズさせた、国際的にも通用するものでなければならない。また、薬局方の一般試験法やGENERAL INFORMATIONに盛り込まれない試験法や培地、機材、菌株などに関する項目は薬局方技術情報(JPTI)で論じたいと考えている。以下に、大幅に書き換えられる「無菌試験法」と、今回新たに収載される「微生物限度試験法」について、若干の紹介をする。

#### 1. 「無菌試験法」の改訂

従来の「無菌試験法」ではUSPやBPとはハーモナイズしていない個所が多かったが、今回は大幅に書きあらため、出来る限り外国の薬局方とハーモナイズさせるよう配慮した。それらの中では、培地

性能試験に使用される菌株、培養日数、再試験、などが含まれる。また、JPXII では、使用する試験管などについて、細かい規格が盛り込まれていたが、それらは削除したいと考えている。

薬局方解説書では無菌試験法のバリデーションの為の試験菌として *Clostridium tetani* (破傷風菌) が推薦してあったが、出版者に書き改めることを依頼している。本菌は P2b レベルの病原菌であり、その生産する毒素はボツリヌス毒素や志賀毒素とともに、最強の毒素とされている。バイオハザード防止の立場からも、この様な菌をバリデーションに使用することは、好ましいことではない。破傷風菌はとりわけ乳幼児にたいする致命率の高い病原体である。

## 2. 「微生物限度試験法」について

非無菌製剤などについての微生物試験法は、従来の薬局方には盛り込まれていなかった。これは USP, BP などの諸外国の薬局方と比較した場合、大きな欠点とされていた。厚生省・薬務局長からの各知事宛の「内容液剤および X 線造影剤の菌数限度および試験法について」の通知が昭和 51 年 4 月 1 日に通知されているが、すべての非無菌製剤に適用されるものではない。なお、この通知は安易に考えるべきものではないが、薬事法 42 条に該当する基準ではなく、指導基準である。上記通知の細菌真菌試験法と、USP, BP のそれとはいくつかの差異がある。通知では、特定微生物として、大腸菌、緑膿菌、黄色ブドウ球菌が検出されてはならないとされている。一方、USP, BP などでは、これらに加えて、サルモネラ試験が加えられている。

現在作成中の微生物試験法の項目は以下の通りである。

### A 生菌数試験法 (細菌真菌試験法)

- a 試料液の調製
- b 試験の手順
  - i メンブランフィルター法
  - ii 寒天平板混釈法
  - iii 寒天平板表面塗まつ法
  - iv 最確数法
- c バリデーション

### B 特定微生物試験法

- a 試料液の調製
- b 試験の手順
  - i 大腸菌
  - ii サルモネラ

表 1. 加熱滅菌の条件 (JPXII)

乾熱法：通例、直接加熱の場合は次の条件で行う。
135~145℃, 3~5 hours
160~170℃, 2~4 hours
180~200℃, 0.5~1 hour
高压蒸気法：通例、次の条件で行う。
115℃, 30 minutes
121℃, 20 minutes
126℃, 15 minutes

- iii 緑膿菌
- iv 黄色ブドウ球菌
- c バリデーション
- d 再試験

使用される buffer や培地も規定されている。本試験法はかなり膨大なものになる。BP や USP を参考にして、ほぼ完成に近いところまでできている。特定微生物として、上記 4 種の他に「嫌気性菌」、「腸内細菌」を加えてはどうかと言う意見もあるが、JPXII 追補版には時間的制約もあるので、JPXIII 以降に持ち越しとなっている。「黄色ブドウ球菌のコアグラウゼ試験」等についての解説は上記 JPTI にもりこまれることになろう。

## 3. 「滅菌法」ほか

滅菌法は無菌試験法とともに、その時代遅れが批判されてきた。例えば、加熱による滅菌法について表 1 のごとき記載がある。通常、加熱滅菌の効力は F 値によってあらわされるが、高压蒸気滅菌では 115℃, 30 分では F=7.5 になるに對し、126℃, 15 分では F=47.5 になる。乾熱滅菌ではこの差はさらに大きく、135℃, 3 時間では F=3.2 であるに對し、180℃, 0.5 時間では F=95.0 となる<sup>1)</sup>。滅菌効果がかくも異なる条件設定は、科学とは異質のものと言わねばならない。現在、大幅な改正を目指して、書き直しが始められている。

この他、上述の如く、「保存効力試験法」「生物学的指標」「注射用水の規定」等についても、資料が集められ、JPXIII に向けての収載作業が開始されている。また、無菌試験法がらみて、「培地充填試験」にも注目している。薬局方のうちで、微生物試験法が旧態依然たる状態で放置されてきた事は、早急に改めなければならない。このため各方面の方々の意見を聴き、改定のための指標としたいと考えている。

本報告のかなりのものが、1993 年 10 月に行われ

た第二回 PDA 年次大会での講演と重複している事を、お断りしておく。

文 献

- 1) 川村邦夫：“改訂・バリデーション総論”，薬業時報社 (1990)
- 2) 川村邦夫：“GMP 微生物試験法”，微生物管理の必要性, pp. 1~31, 講談社 (1993)



## 各種注射剤に対するエンドトキシン試験法の適用性の検討

小川 義之

## Application of a Bacterial Endotoxin Test for Parenteral Drugs

Yosiyuki Ogawa

The *Limulus* test, which has been adopted as the Test for Bacterial Endotoxins in the JP XII, can detect or quantitate endotoxins of Gram-negative bacterial origin using blood corpuscle extracts (*Limulus* amoebocyte lysate, LAL) of horseshoe crabs (*Limulus polyphemus*, *Tachypleus tridentatus*, etc.). It may be conducted by the gel-clot or spectrophotometric (turbidimetric and colorimetric) techniques, the former being based on gel formation due to the activation of LAL by endotoxins. The turbidimetric technique is based on the LAL turbidity change during the gel formation and the colorimetric technique on activation of peptide hydrolytic enzymes in LAL. The *Limulus* test has been unofficially utilized as a simple and highly sensitive method for the determination of endotoxins in parenteral drugs in lieu of the *in vivo* Pyrogen Test using rabbits. For the Bacterial Endotoxins Test of the JP XII, the gel-clot technique alone was adopted, the technique being only allowed for Injection. Although most parenteral drugs show inhibition or enhancement in practice, this test can be most easily conducted by eliminating interfering effects through dilution of specimens by a factor not exceeding the maximum valid dilution (MVD) with water. Since MVD is dependent on the sensitivity of applied methodology, the turbidimetric and colorimetric techniques, which are more sensitive than the gel-clot technique, have a distinct advantage. The JP, as the leading Pharmacopoeia for the international harmonization of Bacterial Endotoxins Testing, has presented a "Draft towards International Harmonization of Bacterial Endotoxins Test", whose main purpose is the introduction of supplementary turbidimetric and colorimetric techniques. Under these circumstances the following subjects are discussed: (1) the proposal that, with a view towards international harmonization of the technical requirements of Pharmacopoeias, both the turbidimetric and colorimetric techniques should be included together with the gel-clot technique, (2) the differences in the testing principles and/or conditions prescribed in the current Bacterial Endotoxins Test of JP, USP and EP, and (3) the worldwide situation for Endotoxin Reference Standards.

**Keywords :** Bacterial Endotoxins Test, parenteral drugs, *Limulus* test

(Received May 31, 1994)

エンドトキシンはカブトガニの血球抽出成分 LAL (*Limulus* amoebocyte lysate) と反応し pg オーダーのレベルでも LAL の凝固系のカスケードを活性化して、最終的には LAL のゲル化を引き起こす。注射剤においては安全性評価のために、ウサギを用いた発熱性物質試験法が適用されているが、LAL を用いたインビトロのエンドトキシン試験法がその代替法として採用されることが望まれている。日局 11 追補以降、既に注射用水の発熱性物質試験に代わり、エンドトキシン試験法が適用されているが、今後、輸液、各種の注射剤、さらには開発が進められている各種のバイオ医薬品などにも適用され

ることが期待されている。エンドトキシン試験法の各種注射剤への適用を図るに際して、エンドトキシン試験法とはどのようなものか、この試験法の重要性、適用の状況、国際調和の問題などについて以下に述べる。

エンドトキシンはグラム陰性菌の細胞壁に局在し、化学的にはリポ多糖である。エンドトキシンは様々な生理活性を示すが、エンドトキシンのことがパイロジェンとも呼ばれるように、その強い発熱活性が最も著名である。従来より、注射薬などに混在するエンドトキシンの検出にはウサギを用いた発熱試験法が行われてきた。しかし、2億年も前からほとんど

ど進化せず、「生きた化石」として知られるカプトガニの血球抽出蛋白質が極めて微量のエンドトキシンと特異的に反応して、この蛋白質をゲル化させることが発見され、エンドトキシン試験法として開発が行われた。

エンドトキシン試験法はまたはリムルステストとして知られるこのインビトロ試験法は多くの分野でエンドトキシンの検出に応用されている。製薬分野では、大容量・小容量の注射薬、ワクチン、生物学的製剤、放射性医薬品などに適用されている。そのほか、注射用水の製造、血漿蛋白、医療用具、製造工程の管理などがあり、さらに臨床領域では血液、脳脊髄液、尿などのエンドトキシンの測定にも利用されている。

リムルス反応の生化学的反應機構は、九州大学の岩永教授らにより明らかにされた。この研究は日本の研究者達が世界をリードした研究としてよく知られている。エンドトキシンにより不活性のC因子が活性化され、その活性化されたC因子はB因子を活性化する。次いで、活性化されたB因子がプロクロティンゲンゼンzymに作用し、活性化されたクロティンゲンゼンzymとなる。このクロティンゲンゼンzymの作用によりコアグロゲンのペプチドCが限定加水分解されて分離され、残った両端のAおよびB鎖によってコアグュリンというゲルが形成される。エンドトキシン試験法は、このようなカスケード反応系の増幅機構であることより、pgオーダーのエンドトキシンと鋭敏に反応するものと考えられる。ある特定の植物や真菌に存在する(1→3)- $\beta$ -D-グルカンもLAL中のG因子を活性化して、エンドトキシンと同じようにリムルス反応を示すが、エンドトキシンに比べるとその強さは重量比でおよそ1/1000程度である。なお、既に、 $\beta$ -グルカンと反応するG因子を除去またはG因子の作用を抑制することにより、エンドトキシンに特異的に反応するLAL試薬が汎用されている。さらに最近、G因子を精製して $\beta$ -グルカンと特異的に反応するLAL試薬が開発され、市販されるようになったので、エンドトキシン試験法において偽陽性物質として問題になっていた $\beta$ -グルカンとの分別定量がより容易になってきた。

エンドトキシン試験法には、ゲル化反応を指標としたゲル化法、ゲル形成過程に伴う濁度変化を指標とした比濁法、ペプチド水解能を指標とした比色法(合成基質法)がある。エンドトキシンの検出感度

は発熱試験法に比べると、ゲル化法でも100倍も鋭敏であり、さらに比濁法や比色法ではゲル化法よりも数倍高感度である。発熱試験法では、解熱剤、蛋白合成阻害剤、血圧降下剤などの医薬品では試験ができないが、エンドトキシン試験法は例え反応阻害を示す医薬品でも、ある一定範囲内で希釈して反応阻害を回避して試験ができるので適用範囲が広い、そのほか、測定時間、試験コストなどもエンドトキシン試験法は発熱試験法より負担が少ないことは明らかである。

エンドトキシン試験法を行うに際して、当然、試料溶液による反応の促進または阻害があるかを予備試験で調べる必要がある。リムルス反応機構はカスケード反応系の増幅機構により起こることにより、化学分析法などに比べると、残念ながら測定の日内変動やそのほかの測定条件の違いにより、かなり変動の大きい測定法である。したがって、測定の許容誤差は大きく採られており、反応の阻害または促進があるかを判定する基準は、ゲル化法の場合は、試料溶液にエンドトキシンをリムルス試薬のゲル化感度 $\lambda$ の2倍量、すなわち $2\lambda$ を添加したとき、エンドポイントの幾何平均が $0.5\lambda\sim 2\lambda$ の範囲内であれば、阻害も促進も無いものと判定される。比濁法と比色法の場合は、FDAのガイドライン<sup>1)</sup>に基づけば検量線の最小濃度のエンドトキシン量の4倍量を試料溶液に添加したときのエンドトキシン回収率が75%~125%の範囲であれば、阻害も促進も無いものと判定される。試料溶液による反応の阻害あるいは促進があった場合、許容範囲内で試料溶液を希釈して試験することができる。これを最大有効希釈といい、特定の式により求めることができるが、感度の高いリムルス試薬や比濁法あるいは比色法等の高感度な試験方法を用いれば、より大きな希釈を行って反応の干渉を避けることができる。この希釈法のほかに、限外ろ過膜やエンドトキシンの特異的吸着体等を用いて試験する方法も試みがなされている。

希釈法による反応阻害の回避がどの程度できるかをFDAが1980年と1981年に調査した結果がある。小容量の注射剤についてゲル化法によって調べたところ、1980年はトータル298品目のうち、希釈せずにそのまま試験ができたものは96品目であり、希釈により試験ができるようになったものが181品目、希釈しても阻害が回避できずに試験できなかったものが21品目、割合にすると7%であった。ま

た、翌年の結果でもトータル289品目のうち、希釈しても阻害が回避できずに試験出来なかったものが14品目、割合にすると5%であった。また、大容量の注射剤32品目についての調査結果では、そのままあるいは希釈することによって試験ができたと報告されている。

著者ら<sup>2)</sup>が13種の注射剤について検討した結果によると、ゲル化法、比濁法および比色法では、半合成ヒト中性インスリンはどの方法でも試験ができたが、そのほかの注射剤の原液では、阻害または沈殿が生じたりして試験ができない場合があった。しかし、最大有効希釈倍率まで希釈して試験すると阻害が見られずに試験ができるようになった。ただし、フルオレセインのみは、希釈してもゲル化法ではなお阻害が見られたが、比濁法または比色法を行えば試験ができることがわかった。

各種注射剤について、各国ではエンドトキシン試験法と発熱試験法がどのような割合で行われているかを調べてみると、USPでは1987年の時点で発熱試験が192品目で、エンドトキシン試験が30品目である。しかし、1991年の追補で発熱試験が適用されていた185品目についてエンドトキシン試験法が代替法として導入され、さらに、翌年の1992年の追補にはそれまで発熱試験も適用されていなかった175品目にエンドトキシン試験が導入されている。以後、若干の追加がなされ、エンドトキシン試験が適用されているのは404品目にも及んでいる。したがって、発熱試験はほとんど削除されたものと思われる。BPでは現在、発熱試験の対象が92品目であり、エンドトキシン試験対象は注射用水、ホルモン、大容量注射薬、ワクチン、放射性医薬品などに適用されており、その品目数は18となっている。我が国の場合は、日局12で発熱試験の対象が23あり、エンドトキシン試験の対象は注射用水のみが適用されている。そのほか、我が国の場合エンドトキシン試験の対象として、放射性医薬品基準に2品目、および生物学的製剤基準に平成4年10月よりインターフェロン等を対象に8品目が適用されている。

このように見てみると、リムルス反応機構に関する研究と合成基質法の開発などで我が国が先導的役割を果たしてきたにもかかわらず、エンドトキシン試験法としての応用が遅れていることを指摘するこ

とができる。

JP、USPおよびEP（BPはエンドトキシン標準品が異なるだけで試験法は全く同じである）の間に見られる試験方法の相違を比較してみると、JPとEPにはゲル化法のみしか収載されていないが、USPには、ゲル化法のほかに簡略ながら比濁法と比色法が収載されている。そのほか、JPが2種類のカプトガニを掲げていること、最大有効希釈法がJPに記載がないこと、エンドトキシン試験用水に対する考え方の違い、などいくつかの相違点が見られる。しかし、現在、JP、USPおよびEP間の国際的調和を図るための作業がなされていて、JPはエンドトキシン試験法の国際調和案作成を担当し、そのドラフトを平成6年の4月にJPフォーラムに掲載して、国内外からの意見を求める手筈になっている。このエンドトキシン試験法の国際調和案においては、ゲル化法のほかに比濁法と比色法（合成基質法）を盛り込むことが最も大きな目的とされている。

JP、USPおよびEP間の相違点として、そのほかの大きな問題点としては、エンドトキシン標準品がそれぞれ異なっていることである。この点についても、現在USPの提案により、第2回のWHOエンドトキシン標準品の国際的協同研究による設定作業と同時に、現在各局方で使用されている標準品の評価を同時に行うように計画がなされている。これによりJPの標準品も国際単位IUで表示ができるようになるものと思われる。

上記のように注射剤にエンドトキシン試験法の適用を図るためには、比濁法と比色法（合成基質法）がゲル化法の他に採用される必要があり、国際的調和も必要ではあるが、遅くとも日局13には収載されるように作業が進められている。

## 文 献

- 1) FDA: Guideline on Validation of the *Limulus* Amebocyte Lysate Test as an End-product Endotoxin Test for Human and Animal Parenteral Drugs, Biological Products, and Medical Devices (1987, 12)
- 2) 小川義之, 村井敏美, 川崎浩之進: 非経口投与薬に対するリムルス試験法の適用性の検討, 防菌防微誌, 21, 23-30 (1993)

所 長 内山 充

薬 品 部 小嶋 茂雄

会議名称：第2回医薬品添加剤の国際調和に関する  
日米欧三薬局方合同公開会議

開催場所、時期：St. Petersburg Beach (米国),  
1994年1月29日～2月2日

参加者内容、人数：13ヶ国の薬局方や政府機関の  
代表、添加剤協会の代表、医薬  
品や添加剤のメーカーからの参  
加者など約160名

会議の内容：この会議は、日米欧三薬局方間で進め  
られている医薬品添加剤の国際調和に関連した科学的  
・技術的諸問題を公開で討論することを目的とし  
たもので、今回の会議では、①粒子径、密度あるい  
は表面積などの粉体物性の測定法、②水と固体の相  
互作用や水分測定法などの水に関する問題、③添加  
剤のGMP、④各薬局方における刊行システムなど  
の話題が採り上げられた。医薬品添加剤の粉体物性  
は、医薬品製剤の機能性に大きな影響を与える重要  
な要素であることから、日本薬局方においてもその  
試験法の確立が必要とされているが、今回の会議は  
他の薬局方における検討の状況を知る絶好の機会と  
なった。粉体物性の測定では、装置や測定方法など  
結果に影響を及ぼす因子が多く、公的な測定法を設  
定するのはなかなか難しいと思われるが、日本薬局  
方としても検討を進め、国際調和された試験法の設  
定に努力する必要があると思われる。

副 所 長 寺尾 允男

大阪支所 武田 寧

薬 品 部 小嶋 茂雄

会議名称：日米欧薬局方調和検討会議 (Pharmaco-  
poeia Discussion Group Meeting)

開催場所、時期：オーランド (米国), 1993年10月  
23日～24日

参加者内容、人数：日本薬局方、米国薬局方、ヨー  
ロッパ薬局方関係者合わせて8  
名が参加した。日本から上記3  
名が、本省からは横田雅彦技官  
が出席した。

会議の内容：日米欧薬局方調和検討会議では、これ  
まで医薬品添加剤モノグラフおよび一般試験法の調  
和を進めてきたが、今回の会議では主として次の問

題について検討した。

①既に対象項目として合意している、調和を必要と  
する25品目の医薬品添加剤のモノグラフおよび一  
般試験法の原案作成の進捗状況を各々の原案作成薬  
局方が説明し、問題点の検討した。

②調和原案作成および薬局方収載の手続きを7段階  
に分けて行うこととした。

③遺伝子組換え技術で生産した医薬品のうち、調和  
原案を作成する必要のある品目の選定およびその手  
続きを検討し、決定した。

なお、本検討会議は年2回3薬局方間持ち回りで  
行う、informal closed meeting である。

副 所 長 寺尾 允男

会議名称：生命科学における実験動物代替法国際会  
議 (World Congress on Alternatives  
and Animal Use in the Life Sciences)

開催場所、時期：ボルチモア (米国), 1993年11月  
14日～19日

参加者内容、人数：動物代替法研究者など約300人  
が参加した。当所から寺尾允男  
のほか大野泰男薬理部室長が出  
席した。

会議の内容：動物代替法に関する研究発表とともに、  
多くのワークショップが行なわれた。このうち、  
「薬局方で要求する動物試験およびそれらの代替法  
についての国際調和に関するワークショップ」にお  
いて、日本薬局方における動物試験およびそれらの  
代替試験法についての考え方を述べた。

副 所 長 寺尾 允男

大阪支所 武田 寧

会議名称：ICH品質分野専門家ワーキンググルー  
プ会議

開催場所、時期：ワシントン (米国), 1993年6月  
22日～24日

参加者内容、人数：日米欧三極の品質分野の薬事規  
制当局および製薬団体関係者  
11名

会議の内容：10月にオーランド (米国) で開催さ  
れるICH-2の品質シンポジウムの運営方針、構成、  
時間配分、関係者の役割分担等につき協議し、ICH  
運営委員会に提案した。京都で開催した光安定性試

験法ガイドライン検討会議結果を ICH 運営委員会に報告した。

副 所 長 寺尾 允男  
大阪支所 武田 寧  
薬 品 部 小嶋 茂雄  
薬 品 部 吉岡 澄江  
薬 品 部 鹿庭なほ子  
毒 性 部 黒川 雄二

会議名称：ICH 品質分野専門家ワーキンググループ会議

開催場所，時期：オランダ（米国），1993年10月26日～27日

参加者内容，人数：日米欧三極の品質分野の薬事規制当局および製薬団体関係者約40名

会議の内容：ICH-2に先立ち，品質シンポジウムのバイテク関連以外のトピックについて，最終的な調整，打合せを行った。1) 光安定性試験法ガイドライン：近紫外光の光量測定法としてキニーネを用いる化学光量計システムの採択，製剤の試験条件について合意し，ガイドライン第3次案を作成した。2) 安定性試験法ガイドラインの拡張：新剤形医薬品に関する文書草案を作成し，承認事項一部変更時の安定性試験に関するガイドライン作成の前段階として，三極の規制の比較検討を行った。3) 不純物ガイドライン：新薬申請時の不純物についての提出資料に関するガイドライン内示案の最終的な調整を行った。品質については合意されたが不純物の安全性評価の手順および評価を必要とする下限値については最終合意には至らなかった。4) ICH-2品質シンポジウムの運営に関する最終的な打合せを行った。

副 所 長 寺尾 允男  
大阪支所 武田 寧  
薬 品 部 小嶋 茂雄  
吉岡 澄江  
鹿庭なほ子  
生物薬品部 早川 堯夫  
山口 照英  
毒 性 部 黒川 雄二

会議名称：ICH-2 品質シンポジウム

開催場所，時期：オランダ（米国），1993年10月27日～29日

参加者内容，人数：ICH-2には日米欧三極を中心とする30ヶ国以上の製薬企業，新薬審査担当当局からの約1600名が参加した。

会議の内容：品質シンポジウムには，安定性試験，分析法バリデーション，不純物，薬局方，バイオ医薬品の5課題が取り上げられ，ICH-2（1991年11月）以降専門家ワーキンググループが検討してきた国際調和ガイドライン案の紹介とそれに関する討論が行われた。課題別の概要は次のとおりである。

1. 安定性試験 (1)安定性試験法ガイドライン：ICH-2直前のICH運営委員会で採択された新医薬品の安定性試験に関するICHガイドラインが報告された。製薬業界へのインパクトが紹介された後，各域の薬事規制への今後の適用についてパネル討論が行われ，各行政当局の対処方針が紹介された。(2) ICHガイドラインの拡張：上記ICHガイドラインの適用範囲の拡大に関し，新剤形医薬品および承認事項一部変更時への適用，ならびにICHガイドラインを補完する光安定性試験法ガイドライン案の策定の経過，考え方等が報告された。2. 分析法バリデーション：分析法バリデーションのパラメーターの定義と各種の試験に要求されるバリデーションパラメーターを示したICHテキスト内示案の内容が報告された後，本テキストの拡張方針について規制当局および業界団体のコメントが紹介された。3. 不純物：不純物に関するICHガイドラインの概要が紹介された後，化学的観点および毒性学的観点からのコメントが紹介された。4. 薬局方：日米欧3薬局方が進めている薬局方の国際調和につき，薬局方調和の手順，調和候補項目，医薬品添加剤規格の調和の現状，残留溶媒試験法の調和の現状が報告された。パネル討論では，産業界からの薬局方調和推進への期待が具体的な調和要望項目を挙げて述べら

れた。5. バイオ医薬品：以下の3つのセッションに分れて行われた。即ち(1)バイオ製品の安定性試験のありかた：EC代表による基調報告に続いて、6極の代表によるパネルディスカッションが行われた。(2)組換え医薬品の品質の恒常性を確保するための遺伝的安定性に関する試験方法とその技術的要求のあり方：ECおよび米国の製薬団体の代表による、組換え体中の発現単位の変異の検出方法等に関する現在の解析技術の有効性や限界についての基調講演に続き、6極の代表によるパネルディスカッションが行われた。(3)ウィルスに関する評価方法：早川が細胞培養技術を用いて生産される医薬品のウィルス試験およびバリデーションについてICHテキスト草案を作成した立場からその概略を中心として報告し、ECおよび米国の規制当局代表による見解の表明があった。

安全性生物試験研究センター 林 裕造  
 毒性部 黒川 雄二  
 薬理部 大野 泰雄  
 病理部 高橋 道人  
 変異遺伝部 祖父尼俊雄  
 変異遺伝部 林 真

会議名称：IHC-2 (安全性グループ)

開催場所、時期：オランダ(米国), 1994年10月  
 24日~11月1日

参加者内容、人数：約1000名

会議の内容：総会において、生殖発生毒性試験ガイドラインについて3極間の合意が得られたこと(Step 4)等、ICH-1以降の成果が報告された。専門家作業部会では、発癌性試験「治療薬の発癌の可能性の評価における諸問題」、遺伝毒性試験「遺伝毒性試験のハーモナイゼーション」、およびトキシコキネティクス「前臨床における薬物動態試験のハーモナイゼーション」について論議された。

具体的な成果として、1) 発癌性試験における用量設定に関するガイドライン(高用量設定のために5つのクライテリア：薬力学的(薬物作用学的)指標、薬物動態学的指標(AUCの25倍以上「齧歯類：ヒト」)、毒性学的指標(MTD)、吸収の飽和する量、投与可能最大量 Maximum feasible dose)、2) 毒性試験における全身曝露評価に関するガイドライン(全身あるいは局所の毒性変化を薬物の血中濃度との関係で説明するためのトキシコキネティクスの手法)および3) 反復投与と組織分布試験に関す

るガイドランス(反復投与で血中濃度および組織・臓器における蓄積性や定常状態を調査すべき状況およびその手法)が作成され、各国での検討を受ける段階(Step 2)に達した。

遺伝毒性試験に関しては「最小限必要な試験の組み合わせ(minimal core battery)」、「Phase Iに関連した遺伝毒性試験実施のタイミング」等の基本問題について合意が得られなかったが、試験技術に関する事項は合意に達し、Notes for guidance on specific aspects of regulatory genotoxicity testsの作成に着手した。

センター長 林 裕造

会議名称：前臨床試験報告書の形式に関する国際的標準化を考えるためのDIAワークショップ

開催場所、時期：ミュンヘン, 1993年5月10日~  
 16日

参加者内容、人数：医薬品の安全性評価を担当する行政官および企業の研究者等、  
 約80名

会議の内容：医薬品を対象とする毒性試験法ガイドラインの国際調整に関する論議と具体的な対応がICHを中心に進められている。一方企業側で得られた情報が報告書を通じて各国の行政機関に伝えられる事実を考えると、ICHの最終目標である医薬品開発の促進の観点から、登録手続きに関する国際調整をはかるためには、報告書の形式についても国際的標準化を考える必要がある。本会議では、まず、各国において現在用いられている報告書の形式が紹介され、続いて標準化を進めるための問題点、特に、個別データの扱い、報告書の順序、要約の書き方と内容、表の作成、文書自身の信頼性保証、訂正/修正の方法について議論された。報告書の順序として、1) 序、2) ファルマコダイナミックス、3) ファルマコキネティックス、4) 一般毒性、5) 局所作用、6) 遺伝毒性、7) 発がん性、8) 生殖発生毒性、9) その他が適切との合意が得られた。報告書の要約は概要(日本)、Expert summary(EC)、Comprehensive summary(HPE)、NDA Summary(USA)に相当し、この部分の標準化の重要性が強調された。

センター長 林 裕造

会議名称：Redbook IIに関する国際会議付発がん性試験における用量設定に関する検討会

開催場所、時期：ワシントン（米国），1993年12月14日～19日

参加者内容、人数：食品等の安全性評価を担当する行政官および企業の研究者等，約120名

会議の内容：米国FDAは1982年に食品添加物，食品色素等の安全性を評価するための指針，通称Redbookを発刊した。その後11年が経過し，毒理学，分析技術等の進歩を基礎に，FDAはこの指針を全面的に書き改め，さらに神経毒性，免疫毒性等新しい領域を加えた改訂案（Redbook II）を発表した。この改訂案については画期的資料とみる意見と，理想に走り過ぎた実用性の低い資料とみる見解がある。本会議において，この文書について各国の行政官および研究者（日本：小島康平，林裕造）から意見が述べられ，その記録は500頁に達した。FDAはそれらの資料を参考にして，本年度中に最終案を官報に掲載するとの事。会議の最終日に，ICHで取り上げられている発がん性試験における用量設定法について議論が交わされ，結論として各国から約20名の行政官および研究者（日本：林裕造，三森国敏）が選ばれ，この問題について共同執筆によるモノグラムが刊行されることになった。

生物薬品部 早川 堯夫  
森本 和滋  
内田恵理子

会議名称：三局方間（欧州薬局方，日本薬局方，米国薬局方）オープン会議：バイオテクノロジー由来製品の規格基準のハーモナイゼーション

開催場所、時期：Glaxo会議センター，ヴェローナ（イタリア），1993年4月20日～22日

参加者内容、人数：日米欧の規制当局ならびに薬局方の各代表者，および製薬業界協会関係者，約150名

会議の内容：バイオテクノロジー応用医薬品の薬局方取載にかかわる初の国際会議として，ヨーロッパ評議会の主催で開催された。会議は全体会議でEP，USP，JPの現状；EC，米国，日本の製薬業界の見解；EC，米国，日本の規制当局の見解とそれらの

相互関係，についての発表があり，早川はわが国のバイオ医薬品の承認申請やJP収載に際しての考え方を述べた。円卓セッションは，参加者全員により，テーマA：一般試験法，ジェネラルモノグラフおよび名称，テーマB：標準品と共同検定，テーマC（議長，森本，共同司会，内田）：インスリン，hGH，IFN，EPO等，テーマD（共同司会，早川）：アルテプラーゼ，モノクローナル抗体等，の4ワークショップにおいて現状と今後の課題について意見が交わされる意義深いものであった。

生物薬品部 早川 堯夫  
森本 和滋  
山口 照英

会議名称：ICH-2準備委員会

開催場所、時期：アネシー（フランス），1993年7月6日～10日

参加者内容、人数：欧州，米，日，加のバイオテクノロジー医薬品の品質評価に関する行政および製薬団体の各代表専門家，約20名

会議の内容：ICH-2でのバイオ医薬品の品質に関する討議に向けての3回目の専門家会議であり，ICH-2本会議に向けての最終的な詰めを行うことを目的としていた。この会議の主な議題は，(1)バイオ医薬品のウイルス汚染を回避するための評価方法，viral validation，(2)組換え医薬品の品質の恒常性を確保するための遺伝的安定性に関する試験方法とその技術的要求のあり方について，genetic stability，さらに(3)バイオ製品の安定性試験のあり方，stability of biotechnological and biological productsについてであった。(1)に関して，日本側より提出したposition paperについて議論が行われ，このposition paperをviral validationのドラフトへ移行させることで合意が得られた。最も議論が分かれたのは，本ドラフトに含める医薬品の範囲についてであり，培養細胞由来医薬品に限定するべきか，血液製剤等にまで範囲を広げるかについてであった。この点に関しては，オランダにおいて再び議論することになった。(2)に関しては，第3次ドラフトについて活発な議論が交わされ，多くの点で合意が得られた。(3)に関してはCPMP（EC）より提出された第4次ドラフトのpredraftについて議論が交わされた。

生物薬品部 森本 和滋

**会議名称：**遺伝子組換えヒト成長ホルモン（ソマトロピン）に関する国際ワークショップ  
**開催場所，時期：**NIBSC (National Institute for Biological Standards and Control) ポッターズバー（英国），1993年9月21日～22日

**参加者内容，人数：**日米欧豪の規制当局，薬局方，製造および販売業者，臨床医の代表者等，約50名

**会議の内容：**本会議は，1989年NIBSCが欧州薬局方の協力を得て開始した国際標準品の検定に関する共同研究が端緒となり，その最終的なまとめの会議となった。ソマトロピン国際標準品（88/624）の国際共同研究の結果，結論，および，レコメンデーション，バイオアッセイと生物学的確認試験の必要性について，分析法の将来に向かっての開発，現在の表示法と将来の表示法，について討議された。国際標準品は，日本側の基本見解も踏まえ，力価：6.7 IU/ampoule，タンパク質含量：2.0 mg/ampouleと決定され，この結果は，モノマー含量や吸光係数も添付して，10月にWHOに諮問されることとなった。臨床投与における治療の継続性を保証するために，conversion factorを導入することについては，議論も分かれ，今後の課題として残った。

生物薬品部 早川 堯夫  
山口 照英

**会議名称：**ICH-2 準備委員会  
**開催場所，時期：**オーランド（米国），1993年10月26日～27日

**参加者内容，人数：**欧州，米，日，加のバイオテクノロジー医薬品の品質評価に関する行政および製薬団体の各代表専門家，約25名

**会議の内容：**ICH-2の本会議でのバイオ医薬品の品質に関する討議に向けての4回目の専門家会議であった。この会議では，引き続いて開催されたICH本会議に向けての最終討議を目的としており，議題としては，アネシーに引き続いて(1)バイオ医薬品のウイルス汚染を回避するための評価方法，viral validation，(2)組換え医薬品の品質の恒常性を確保するための遺伝的安定性に関する試験方法とその技術的要求のあり方について，genetic stability，さらに(3)バイオ製品の安定性試験のあり方，stability

of biotechnological and biological productsが取り上げられた。ウイルスに関する評価方法に関して，対象とすべき医薬品の範囲について活発な議論が交わされたが結論は得られず，再度各域内での議論を踏まえて東京会議で議論することになった。Genetic stabilityに関しては，第5次ドラフトについて活発な議論が交わされ，東京会議以降にStep 2への移行が可能であるとの認識で各極の合意が得られた。バイオ医薬品の安定性に関してはCPMP(EC)より提出された第4次ドラフトについて議論が交わされた。

療 品 部 中村 晃忠

**会議名称：**ISO/TC194/WG11「エチレンオキササイドなどの滅菌残留物」

**開催場所，時期：**ミネアポリス（米国），1993年9月23日～24日

**参加者内容，人数：**7ヶ国，15名

**会議の内容：**医療用具の承認に必要な生物学的安全性評価の枠組みと各種試験方法を標準化し，ISO基準をつくることを目的とする技術委員会の一作業グループである。エチレンオキササイド（EO）滅菌した医療用具に残留するEOなどの許容基準を作る作業を進めてきたが，国際規格第1次案の投票に反対と沢山のコメントが寄せられたために，修正して第2次案を作成する作業を行った。主たる問題点は以下の通り：リスクアセスメントに関する説明を付属書へ移動；短期間曝露医療用具の許容基準の論理；数学モデルによるVSD設定において用いた許容リスクレベルの根拠を記述する；眼内レンズ中の許容値の変更，等。以上の諸点を大幅に修正して第2次案とし，再度，投票にかけることを決定。



## 生薬部 関田 節子

会議名称：JICAのブラジル・アマゾン農業研究協力計画に基づく巡回指導、調査等

開催場所、時期：ブラジル、ベレン（ブラジル）、1994年2月20日～3月6日

参加者内容、人数：調査団 4名  
ブラジル側研究者 26名  
JICA派遣日本側研究者 6名  
計36名

会議の内容：本プロジェクトは、アマゾン地域の天然資源の利用と再生産技術の確率に関するCPATU（湿潤熱帯農牧センター）の調査研究活動を支援することを目的にブラジル政府の要請により設立され、5年間の協力期間の予定で1990年6月28日から活動している。国立衛試は薬用植物、食用色素のテーマに関与し、生薬部鎌倉研究員を始め、5名の短期専門家を派遣、6名の研修生を受け入れている。本会議では、第1回巡回指導調査団が策定した課題別活動計画の進捗状況をカウンターパートとの個別面談により調査、活動状況を機器の稼働調査、薬用植物ならびにコショウ栽培地の実地調査を通じて把握し、プロジェクト運営上の問題点および技術的問題点を討議した。次いでプロジェクト終了時までの活動計画を全体協議により策定しミニッツ署名により確認した（ベレン）。さらにブラジル農牧研究公社（EMBRAPA）でCPATUおよびJICAから提出された問題点、要請について協議し、今後の対応策を討議した（ブラジル）。

療品部 中村 晃忠  
土屋 利江  
毒性部 門馬 純子

会議名称：ISO/TC194「医療用具の生物学的評価」  
開催場所、時期：横浜（日本）、1994年1月18日～20日

参加者内容、人数：14ヶ国、83名

会議の内容：医療用具の承認に必要な生物学的安全性評価の枠組みと各種試験方法を標準化し、ISO基準をつくることを目的とするものである。以下のWG会議がもたれた。特記すべき事項をカッコ内に記した。WG2：材料の生体内分解問題（高分子材料とトキシコキネティックスの作業課題を議論した）；WG4：臨床試験（国際規格案を修正の上ISO 10993と違った番号で出版することになった）；WG8：刺激性・感作性試験（第2次案投票の結果、字句の修

正の後に国際規格として出版を決定）；WG9：血液との相互作用（溶血試験方法委員会案を作成）；WG11：エチレンオキシド等滅菌残留物（4つの新作業課題を決定：例、グルタルアルデヒドなどの残留許容基準）；WG12：試料の調製と標準材料（委員会案を修正の上、国際規格案とし投票にかけることを決定）

療品部全員が会議の準備と運営に携わった。

療品部 中村 晃忠  
土屋 利江  
新谷 英晴

会議名称：ISO/TC194「医療用具の生物学的評価」  
開催場所、時期：マーストリヒト（オランダ）、1993年4月19日～21日

参加者内容、人数：15ヶ国、約65名

会議の内容：医療用具の承認に必要な生物学的安全性評価の枠組みと各種試験方法を標準化し、ISO基準をつくることを目的とするものである。全部で12のワーキンググループ（WG）に分かれて作業を進めている。以下のWG会議がもたれた。特記すべき事項をカッコ内に記した。WG2：材料の生体内分解問題（新たに4つの作業課題を作ることに合意した）；WG3：動物福祉問題；WG4：臨床試験（国際規格案を再審議することになった）；WG8：刺激性・感作性試験（国際規格案を修正し、第2次案を投票にかけることに決定）；WG9：血液との相互作用（新作業課題として溶血試験方法案の作成が決定）；WG10：埋植試験（国際規格を最終決定）；WG11：エチレンオキシド滅菌残留物（眼内レンズ中の残留許容量については先送り）；WG12：試料の調製と標準材料（委員会案の承認、投票にかけることを決定）

療品部 新谷 英晴

会議名称：第5回ISO/TC198、医療用具の滅菌、に関するオタワ会議

開催場所、時期：オタワ（カナダ）、1993年8月1日～1993年8月12日

参加者内容、人数：86名（日本9名）

会議の内容：ISO/TC198 WG4, Biological Indicator, の日本の主査として国内委員会の決定に基づきD値の決定にDIS 11138-1 (General) のLSKP法に加えてSMC法も追加するよう要請した。そのために両法でのD値の算出のシミュレーション結

果を報告、提案した。シミュレーション結果によると両法で差がなく、寧ろ日本が提案したSMC法の方が優れていた。しかし、実験事実によるものでないためシミュレーションならびに実験結果に基づく両法でのD値の比較のデータの追加が求められた。一方、日本の提案したLSKP法中の字句の誤字訂正はすべて認められた。

SMC法に関する日本案の討議の結果は日本にとっては不満足ながらもある程度の成果をあげ、次回会議で日本からの比較データに基づいて再度討議することになった。

オタワ会議の帰路米国テキサス工科大学で滅菌された医療用具中に生成する毒性化合物の抽出法、分析法、生成機構に関する招待講演を行った。

療 品 部 新 谷 英 晴

会議名称：第6回ISO/TC198, 医療用具の滅菌、  
に関するヒルトーヘン会議

開催場所、時期：ヒルトーヘン (オランダ), 1994  
年3月21日~1994年3月25日

参加者内容、人数：86名

会議の内容：ISO/TC198 WG10, Liquid Chemical SterilizationならびにWG4, Biological Indicator, それぞれの日本の主査 (前者 三瀬勝利, 後者 新谷英晴) として出席した。それぞれの会議内容を以下に要約する。

WG10 液体化学剤滅菌

本WGは今回より正式に発足し、動物由来の医療用具の液体化学剤滅菌を主務とする。オランダのウインケルズがコンピーナーを務め、CEN (ヨーロッパ共同体基準) の中で既に議論されているためISOとCENとの間のウイーン合意に基づきISOでも議論されることになった。CENドキュメントに基づいて秘書国である米国AAMIがWD (ワーキングドラフト) を作成し、其に対するコメントをAAMIに送付し、次回第7回ベルリン会議でコメントを基にCD (委員会ドラフト) にするため議論することになった。

WG4 バイオロジカルインジケター (BI)

ISO DIS 11138-1.2 (一般)

DIS (国際規格案) 11138-1.2の2箇月投票結果の各国意見について議論した。WG4はBIのD値測定にSMCPを取り入れることに英国の反対を除いて同意した。本主張はD値測定におけるSMCPとLSKPの同等性を実験ならびにシミュレーション

で証明した日本案に基づき、SMCPは正式にISOに入れられることになった。

ISO DIS 11138-2 (エチレンオキシド滅菌)

DIS 11138-2の6箇月投票結果の各国意見について議論した。以上の結果本DISは賛成多数でISO (国際規格) になった。

ISO DIS 11138-3 (高圧蒸気滅菌)

本DISのタイトルをBI for moist heat sterilization processesに変更し、本文もタイトルに添って改正された。本件は賛成不十分ゆえ2度目のDISのため2箇月投票することになり、日本のコメントは了承されたゆえ日本は賛成投票することに決定した。

New work on guidance on the use of BI

本件の議論は時間切れで終わり、WG4の中にtask groupを作りそこで次回会議までに議論することになり、米国、日本 (新谷)、英国、オランダの主査が改正作業することになった。

環境衛生化学部 安藤 正典

薬 理 部 大野 泰雄

変異遺伝部 林 真

会議名称：新しい日米科学技術協力に関する研究  
(毒性学)

開催場所、時期：ワシントン, リサーチトライアングルパーク, シンシナティ, ジェファーソン, サンフランシスコ (米国), 1993年2月22日~3月5日

参加者内容、人数：

会議の内容：本研究は、昭和63年、科学技術における研究開発のための協力に関する日本国政府とアメリカ合衆国政府との間で締結された新協定に基づくもので、保健医療分野では化学物質毒性研究について研究データや情報の交換、研究者の派遣、共同研究等を行い、日米間のハーモナイゼーションを進める研究の一環である。

本年度は1) 生活関連化学物質の眼粘膜刺激性試験代替法を中心に、神経毒性、および毒性試験における薬理的試験に関する実情を知ること、2) *in vitro* の遺伝毒性試験の役割と評価、3) 生活関連化学物質の汚染と毒性情報からの安全性評価とヒトへの応用の開発研究等を中心に、米国における研究の現状を視察し、日本における研究の現況を紹介するとともに、意見交換を行って問題点を明らかにした。

FDA では、眼粘膜刺激性試験代替法の利用に関する米国行政機関の実情調査、FDA の化粧品・皮膚部門における化粧品および色素、動物管理、皮膚および眼毒性等について担当者との意見交換を行った。神経毒性評価、および毒性試験における薬理学的試験の意義に関する調査、遺伝毒性試験の現状、遺伝毒性試験に関する国際ハーモニゼーションについては、NIEHS の研究者を中心に、EPA, P&G Miami Valley Laboratories, NCTR および SRI International 等の専門家と討議した。また、米国で強く主張しているマウスリンパ腫細胞を用いる *in vitro* 突然変異検出系の抱える問題を討議し統計学的手法の確立が急務であることなどの問題が明らかになった。

環境汚染物質のプライオリティの選定、毒性評価法および Risk Assessment の手法と体制に関する研究では、Environmental Monitoring System Laboratory を訪れ、動物に対する毒性評価物質の環境での挙動や制御に関する研究体制について明らかにした。また、我が国で最も遅れている化学物質の環境影響評価に関しては、エコトキシコロジー研究の考え方の意見交換をし、これを踏まえた全米モニタリング体制の実状を調査した。さらに、Research Triangle Park の EPA の Health Effects research Laboratory では人への健康影響に関する研究、Cincinnati の EPA Research Laboratory ではモニタリングと浄水あるいは排水などの環境のコントロールに関する研究を調査した。

#### 食品添加物部 石綿 肇

会議名称：タイ国食品衛生強化計画事前調査(JICA)  
開催場所、時期：バンコク (タイ), 1994年1月10日～22日

参加者内容、人数：公衆衛生省医科学局および食品医薬品局、横浜検疫所川崎支所南俊作課長(当時)、国際協力事業団医療協力部医療協力第一課富田明子課員

会議の内容：タイ国公衆衛生省(Ministry of Public Health)と国際協力事業団(主たる国内対応機関は厚生省生活衛生局食品保健課)との間でタイ国食品衛生強化計画(Project on Strengthening of Food Sanitation Activities)が計画中之である。その一環として、プロジェクトの対象機関である医科学局(Department of Medical Sciences)および食品医薬品局(Food and Drug Administration)にお

いて事前調査を行った。主たる活動は供与機材の種類と機種を選定、専門家の派遣時期、研修員の受け入れ時期、現在使用している分析法、年間の検査件数等の調査、調整。その他、わが国の規格・基準の紹介、分析法や実験技術上の問題に対する相談、資料や文献の提供と収集、講演等。

これらの活動は、短期的にはR/D締結およびプロジェクトのスムーズなスタートに寄与し、長期的には5カ年プロジェクトの基礎となる。このプロジェクトの成功により、タイ国内の食品衛生の向上はもとより、その波及効果として日本向け輸出食品の衛生向上が期待できる。輸入食品の安全確保には、輸入時の検査強化以上に輸出国の衛生の向上が効果的であると考えられる。

#### 衛生微生物部 三瀬 勝利

会議名称：第14回UJNR全体会議  
開催場所、時期：シアトル(米国), 1993年7月21日～23日

参加者内容、人数：17部会の日米各部会長、またはその代理、および全体会議事務局、約40数名

会議の内容：主として以下の三点について討議された。1) UJNR各部会の活動報告；2) UJNRの拡大計画；3) 対外宣伝とUJNR 30周年誌の発行。1)については、かなりの部会が活動的であると評価された。特に我々の有毒微生物部会は成果をあげていると評価された。2)については、潜水部会の拡大と太平洋観測部会の新設が合意された。3)については1994年中に30周年誌を発行し、宣伝につとめることが合意された。

## 化学物質情報部 神沼 二眞

会議名称：IPCSの第7回計画諮問委員会出席なら  
びにIARCおよびIPCSにおけるデータ  
ベース作成等に関する打ち合わせ

開催場所，時期：ブリュッセル（ベルギー）・リヨン  
（フランス）・ジュネーブ（スイス），  
1993年10月4日～10月14日

参加者内容，人数：IPCS協力機関の代表，WHO/  
ILO/UNEPなど国際機関関係  
者，約50名

会議の内容：準備された資料に基づき，1989年に  
開かれた前回の会合（第6回のPAC）以後の1990  
～93年におけるIPCSの活動報告，1988～1993年  
の財務状況，国連環境開発会議（UNCED）のフォ  
ローアップとしてのIPCSを支える，3つの国際機  
関（ILO，UNEP，WHO）の事業，（UNCED）と  
の関連におけるIPCSの事業拡大計画，化学物質の  
分類と表示（ILO）および毒性情報交換に関する協  
力調整事業（UNEP），将来事業および財務計画，  
サイエンス・アドバイザー機構，NGOとの関係，  
などに関して報告と討議が行われた。

要約として，IPCSの事業は順調に拡大を続けて  
いるが，日本のような積極的な貢献をしている国が  
少なく，約束されたことが実行されていないことが  
少なくない。また事業計画に比べて予算が伸びず，  
セントラル・ユニットでは秘書などの人員を削減せ  
ざるを得ない状況にあり深刻である，などの問題点  
が指摘された。

## 化学物質情報部 神沼 二眞

会議名称：化学物質安全性国際会議（ICCS）の準  
備会議出席（ILO），IPCSにおける打ち  
合わせ

開催場所，時期：ジュネーブ（スイス），1993年12  
月4日～12月11日

参加者内容，人数：31ヶ国の政府関係者，WHO/  
ILO/UNEPなどの国際機関，  
NEG等日本からは厚生省（国  
際課）の他，環境庁，通産省も  
参加

会議の内容：本会議は明年4月24～28日にストック  
ホルムで開かれたICCSのための準備会であり，  
会議の基本的な性格を決める重要な会議であった。  
議題は，同会議で設立が予定されているフォーラム  
の性格を決めるための討議と，リオ会議（UNCED）

のアジェンダ21第19章に盛られた目標を実現する  
ための，具体的な行動計画に関する討議に大別され，  
いずれも事務局であるIPCSで準備された草案に基  
づいて進められた。

この結果，フォーラム自体は3～5年ごとの本会  
議（これ自信をフォーラムと呼ぶ）とその間に開か  
れるインターセッション委員会，それらのための事  
務局から構成されるが，全体として新規の組織とし  
てではなく，既存の組織を強化利用する形式で運営  
されること，事務局としてはIPCSの機能を強化し  
てこれに当てる案が提示された。また行動計画に関  
しては，アジェンダ21の第19章に掲げられた6項  
目の行動目標ごとに，1997年と2000年に分けてプ  
ライオリティと達成目標を設定した事務局の草案が  
検討され，追加，修正案が述べられた。

## 化学物質情報部 関沢 純

会議名称：有害廃棄物の健康影響に関する国際会議  
開催場所，時期：アトランタ（米国），1993年5月  
3日～5月6日

参加者内容，人数：米国の政府関係，大学の研究者，  
化学品業界，環境保護団体の代  
表，海外からの参加者（日本か  
らは関沢のみ；ただし招待）を  
あわせて総勢約800人。

会議の内容：環境浄化と補償に関するいわゆる“ス  
ーパーファンド法”にもとづく健康影響の調査と情  
報提供を担当する米国の有害物質疾病登録庁  
（Agency for Toxic Substances and Disease Regis-  
try: ATSDR）が主催する表題の国際会議に招待を  
受けて，“有害廃棄物についての情報交換”という  
分科会で，「クライテリアドキュメントデータベ  
ースの開発と利用」と題する講演を行った。

本会議は第一回であったが，米国での有害廃棄物  
とその健康影響についての関心の高さを反映して各  
方面から多数の参加を得，約150題の演題および  
100題のポスターの発表があった。連日午前中には  
招待講演があり，その内容は，分子レベルの毒性学，  
曝露評価，疫学，公衆衛生，情報提供，政策決定，  
国際協力に関すること，産業界および環境保護団体  
の見解までをカバーし，興味深いものであった。

有害廃棄物の規制と処理をめぐる環境問題の実情  
については，米国と日本では大きな違いがあるが，  
国が「地域住民の知る権利法」にもとづいて直接地  
域住民への情報提供（例としてToxicogy Profile

の発行)や教育訓練を政策化し、その過程でリスクアセスメントに関連する科学の進歩とリスクコミュニケーションの改善を図っている点など学ぶべきことも多くあり、これらを中心に討議を行った。

化学物質情報部 関沢 純

会議名称：“IPCS 地域間研究ユニット”および“米国環境保健研究所”における協議

開催場所、時期：リサーチトライアングルパーク (米国)、1993年5月7日～5月10日

参加者内容、人数：以下参照。

会議の内容：(1) IPCS 地域間研究ユニットにおける協議について

研究ユニットのヘッド Dr Becking と、「化学物質への曝露による人への健康リスクの評価の科学的原則」に関する環境保健クライテリア、および研究ユニットの設立経過と運営について討論した。

(2) 米国環境保健研究所 (NIEHS) における協議について

初めての訪問であったので以下の多くの人に予約をとり、NIEHS における国際協力、所外との研究協力、所内研究の管理、安全性評価と関連した情報処理などについて調査し、意見を交換した。(a) Dr Huff (Environmental Carcinogenesis Program) とは発癌リスクアセスメントについて討議した。(b) Dr Eustis (NTP 担当) とは、短期毒性試験データの慢性毒性予測可能性への活用、また当方の投与経路間の急性毒性予測の研究について討議した。(c) Dr Robertson (図書情報サービス担当) からは図書館での文献やデータ検索サービスシステム、ことに NLM の提供するデータベースおよび CD-ROM の活用状況について調査した。(d) Dr Wright (所内研究管理データベース作成を担当) には、各研究者からの報告の整理方法、対外的報告や予算申請への利用について尋ねた。(e) Dr Fjellstedt (対外研究調整担当) からは長期的な研究方向を見極め、NIH の環境保健関係の研究費の外部への配分を適切に管理し、研究を誘導する労力と重要性について聞いた。(f) Dr Damstra (国際協力担当) からは NIH の国際協力体制につき、各研究所は数名の国際協力専門官と補助スタッフをおき事務部に事務的な事柄をまかせ、国際的な共同研究計画を立案、推進している様子を聞いた。(g) NIEHS の新しい機関誌 “Environmental Health Perspectives” は、NCI (米国

国立ガン研究所) の “JNCI” と並んで環境保健分野のオピニオンリーダー誌として期待をもてた。(h) Dr Nehls (コンピュータ部門担当) からはサポートに十数人のスタッフがいること、Gopher による世界の他の研究機関のデータベースのアクセスなどにつき聞いた。

化学物質情報部 関沢 純

会議名称：化学物質のリスク評価のハーモナイゼーション検討会議

開催場所、時期：オタワ (カナダ)、1993年8月31日～9月1日

参加者内容、人数：16ヶ国、国際機関より20人

会議の内容：(a) 国連環境開発会議 (1992年) の決議により、IPCS はリスク評価法の改善と国際的ハーモナイゼーションを図り、評価結果の国際的活用を推進するイニシアティブをとるよう要請され、計画の具体化を検討することになった。(b) 例として各国で実施されている農薬のリスク評価手法について調査し、結果の分析と、会議における討論を通じて共通のガイドラインのもとにそれぞれの評価結果の相互受け入れを可能とする条件を検討することになった。(c) ハーモナイゼーションを可能とするため、IPCS で作成したリスクアセスメントの原則に関する環境保健クライテリア (Vol. 70, 104 と現在作成中の2巻) に使われている基本概念と用語の解説集を作成することにした。

化学物質情報部 関沢 純

会議名称：クライテリアドキュメント作成についての国際協力会議

開催場所、時期：オタワ (カナダ)、1993年9月1日～9月2日

参加者内容、人数：14ヶ国、国際機関より24人

会議の内容：(a) 各国で作成されている安全性評価資料 (クライテリアドキュメント) の現状 (内容、作成過程、フォーマットなど) について調査し、これらの作成に向けられる労力 (特に専門家の) の重複を省き、リスクアセスメントの分担と協力を目指す。(b) このため、クライテリアドキュメントの開発状況についてのデータベースを作ることになった。このようなデータベースは筆者らも作成しているほか、ECETOC (欧州化学工業連合毒性情報センター) でも同様の作業を進めており IPCS を中心に協力することになった。(c) 各国のリスクアセスメントの結

果の相互利用を容易にするために、一定のガイドライン (GRP: Good Reporting Practice) の必要が提案された。(d)リスクマネジメントに係わる人々が必要とする情報を、簡潔にまとめたドキュメントの開発が必要とされ、IPCSは環境保健クライテリアのほかに、この種のドキュメント開発に向け検討を開始することになった。

化学物質情報部 関沢 純

会議名称: LASと関連物質の環境保健クライテリア  
アドラフト検討タスクグループ

開催場所, 時期: ジュネーブ (スイス), 1993年10月18日~22日

参加者内容, 人数: 12ヶ国, 国際機関より14人

会議の内容: (a)本環境保健クライテリアのドラフト作成は、わが国で約12年前に開始されたが長期にわたり作業が中断されていた。筆者は3年前に引き継ぎ、引用文の不明、文章の重複や章立ての混乱を整備し、かつ内容をアップデートして1992年3月に、第一次ドラフトとしてIPCSに送付した。(b)本会議で筆者はRapporteurをつとめることになった。(c)LASにつき、かつて国内で問題となった催奇形性をめぐる研究に関しては、投与濃度が異常に高く、また陽性の結果が追試験で再現されないことから、人における催奇形性の可能性はないとされた。(d)LAS, AOS, ASともにある濃度以上で刺激性を示すこと、また、欧州では下水汚泥の農地への還元利用を行っている事情を背景に、かなり多数の新しいデータが追加され、詳細な議論がなされた。(e)途上国での使用状況(素手で扱う、河で水浴することがある)や、下水の完備していない地域での環境および人への影響につき十分注意を払う必要があることが指摘された。

化学物質情報部 関沢 純

会議名称: 第4回化学品の分類のハーモナイゼーションのためのIPCSの推進グループ会議  
(CG/HCCS)

開催場所, 時期: ジュネーブ (スイス), 1993年11月2日~3日

参加者内容, 人数: 23ヶ国, 国際機関より25人

会議の内容: (a)国連環境開発会議 (UNCED) の決議で、IPCSが中心となって有害化学物質の分類と表示のハーモナイゼーションを推進することが求められ、昨年以來、本グループによる検討が進められて

きている。(b)化学品の危険性分類に関する分野毎に、原案の作成を担当するフォーカルポイントと協力機関(国)を決めてあり、各フォーカルポイントから分担事項の進捗状況が報告された。(c)急性毒性による危険性分類については、OECD Clearing Houseが国連の危険物輸送専門家委員会、ECなどの危険性分類の基準をもとに作成した案を紹介した。LD50値によるカットオフについてはEC側からカットオフポイントの変更による混乱を極力避けるべきであるとの指摘があった。(d)生殖毒性/発生毒性による危険性分類については英国とオーストラリア、発癌性による分類についてはオランダとノルウェーがそれぞれ原案を検討している。(e)爆発、火災などの物理的危険性分類については、国連危険物輸送専門家委員会で検討することが約束された。(f)ILOの労働安全衛生情報センター(CIS)は、有害性情報伝達についてのフォーカルポイントとして、1994年1月末までに技術的な課題と解決方法につき整理し、作業計画を立案することになった。(g)環境影響に関する危険性分類については、1994年末にスウェーデンでワークショップの開催が予定されていることが報告された。(h)当グループの専門的独立性を損なわないよう、できる限り討議の自由を保障しつつ合意形成を目指すものとされた。また、グループ内で合意に至らない事項について交渉による解決を図るために、公的な機構を設置する必要が認められた。

化学物質情報部 山本 都

会議名称: ICSC原案検討会議

開催場所, 時期: ジュネーブ (スイス), 1993年4月24日~5月2日

参加者内容, 人数: EC各国, 米国, カナダ, 日本, IPCS, IARCの担当者, EC委員会, ILO, CEFIC等約20名

会議の内容: IPCSの国際化学物質安全性カード(ICSC)は、1988年に作成開始以來約1100物質についてのカードを作成してきているが、1993年は、1988年および1989年に作成したカードの更新を行うことになった。本検討会議で検討した更新原案のうち、日本分担分はピレスロイド類14カードだった。また、前回の会議で部分的に延期されていたカードについても再検討が行われた。日本分担分としてはトリエチレンテトラミンの原案が催奇形性部分の記述だけ延期になっていたが、さらに文献を収集してIARCの人を中心に詳しく再検討した結果、

カードには催奇形性を記載しないことになった。

作業は二つのバイオリジカルグループとケミカルグループに分かれて行った。今回から会議場にパソコンが持込まれ、画面を OHP で映写したスクリーンを見ながら検討作業を行い、訂正箇所をリアルタイムで修正していった。

化学物質情報部 山本 都

会議名称：ICSC 原案検討会議

開催場所、時期：モントリオール（カナダ）、1993年9月19日～26日

参加者内容、人数：EC 各国、米国、カナダ、日本、IPCS、IARC の担当者、EC 委員会、ILO 等、約 22 名

会議の内容：前回の検討会議に引き続き、1988 年および 1989 年に作成したカードの更新作業を行った。日本は 1989 年に米国 EPA（環境保護庁）が作成した 12 カードの更新を分担した。全体会議では、1993 年中にコンパイラズガイド（標準語句の選択基準を記載したガイド）の改正を行うことが決まった。

会議が開かれたケベック州労働安全衛生委員会（CSST）は ICSC の担当機関のひとつであり、情報部門が非常に整備されていて化学物質の安全性に関する情報収集や評価を行っている。ケベック州最大の情報量を持っており、市民にもオープンで、インデックスが完全に整備されていた。

最終日は CSST のスタッフを対象に、検討会議の出席者のうち 10 名がプレゼンテーションを行った。

「Recent Activities on Chemical Hazard Communication in Japan」のタイトルで 60 分話した。

化学物質情報部 山本 都

会議名称：IRPTC の法規制データベース担当者会議

開催場所、時期：ジュネーブ（スイス）、1993 年 10 月 12 日～17 日

参加者内容、人数：英国、ドイツ、ロシア、日本の担当者、IPCS、CIS/ILO、UN、IPTC の代表者等、約 20 名

会議の内容：IRPTC（国際有害化学物質登録制度）が作成している法規制データベースは、化学物質に関連する各国・各国際機関の法令を収載している。数年前から内容の大幅な更新が行われており、この

作業の過程で出てきた問題点や今後の方針を検討するために本会議が召集された。更新データの入力に際して IRPTC や各国の担当者が直面した問題点を報告しあったが、例えば、法令文の解釈が難しいものがあること、数カ国からのデータが IRPTC と異なるソフトを用いていたのでコンバートプログラムを新たに開発する必要があったこと、物質名や CAS 登録番号の確認が非常に困難な化合物の存在（日本の法令もこれに当てはまる）等があげられた。今後の更新にあたっては、優先順位が付けられた。順位の非常に高い分野は、農薬、環境基準、化学物質の分類と表示に関するものであり、少なくともこれらについては必ず更新することが確認された。

毒性部 黒川 雄二

会議名称：急性経口毒性試験代替法に関する OECD 専門家会議 (OECD ad hoc Expert Meeting)

開催場所、時期：ドイツ国ベルリン市、1994 年 1 月 26 日～28 日

参加者内容、人数：13 カ国、約 40 名の毒性専門家  
会議の内容：急性毒性試験の代替法はこれまでも英国毒性学会提案の固定用量法 (BTS 法) が検討されてきた。さらに、ドイツ厚生省提案の Acute Toxic Class Method (ATC 法) が 1991 年からドイツ国内 6 機関に続いて国際的にも 5 カ国 (オーストリア、米国、スイス、ベルギー、日本) 9 機関により validation が行なわれてきた。当部は、食薬センター、安評センターとともに LD<sub>50</sub> 既知の 20 検体につき検討を行った。今回、これらの全結果が評価され、ATC 法が有用であることが確認され今後、新しい OECD 毒性試験法として採用することが提案された。(方法の概略) ラット 1 群 3 匹 (雌雄どちらでも) を用い、25, 200, 2000 mg/kg 何れかの用量で第 1 回目の投与を行い、2～3 匹が死亡又は 0～1 匹が死亡するかにより次の用量に進み概略の経口 LD<sub>50</sub> 値が得られる。さらに、5, 50, 500, 5000 mg/kg の用量も投与できる。

## 毒性部 黒川 雄二

会議名称：OECD HAAB (Hazard Assessment Advisory Body) 会議

開催場所，時期：バリ，1993年9月23日～24日

参加者内容，人数：HAAB委員，9カ国，約20名

会議の内容：1. IPCSとOECDの各々がハザード・リスクアセスメントに果たすべき役割を明確にした。2. EPPO/CoEにより，農薬データのリスクアセスメント方法が検討されており現在，5つの農薬についてのすべてのデータを用いてその方法のバリデーションが進行中であり，1994年2月には報告される。3. 農薬を含む各種化学物質の環境影響のハザード・リスクアセスメントに関するワークショップを1994年5月頃英国で開催する。4. Good Assessment PracticeによるOECD加盟各国間での評価結果の相互受け入れを目指すために，以下の2点が提案されHAABで支持された。(1)加盟各国での評価方法の概要を作成すること(2)評価報告書に含まれる情報の詳細なリスト(特に，如何にしてデータの質を評価するか)。これらの作成は，今までのOECDのテストガイドライン作成の方法にならって進められることとなる。

## 毒性部 長谷川隆一

会議名称：リスクアセスメント手法(ガイダンス値の設定)に関するタスクグループミーティング

開催場所，時期：ジュネーブ(スイス)，1993年6月14日～18日

参加者内容，人数：米国，カナダ，英国，オランダ，WHO，IPCS，ILO，OECD，IARC，約20名

会議の内容：健康影響に基づく暴露限度のためのガイダンス値設定法のモノグラフを完成させることを目的とした会議である。原案について1ページ毎に討議，修正が行われたが，問題となったいくつかの点について述べると，ガイダンス値を設定するための対象となる小グループは子供，老人とすること，原案ではガイダンス値算出の基として，経口摂取量に対してTolerable Intake (TI)が，大気中の濃度としてTolerable Exposure (TE)が用いられていたが，TIに統一され，暴露経路により対応した単位で示すこととなった。TIに基づいて大気，食品，水などへの配分率を計算するに当たり，根拠となる暴露量の評価をどうするかについて，多くの議論が

交わされた。ここでは一般的な暴露比率を採用することとし，各国あるいは地域での対応については，それぞれの地域特異性を基に配分率を設定すべきであることを盛り込むこととなった。閾値のないと考えられる毒性(遺伝毒性を有する発がん性および生殖細胞での突然変異)については各国，各機関で各種の解析法が取られているが，合意の得られた科学的な解析法がないことから，ガイドライン値は設定しないこととなった。

## 毒性部 長谷川隆一

会議名称：環境の公平を確保するための健康研究と必要性に関するシンポジウムならびにNIEHSにおいて最近のリスクアセスメントおよび毒性学手法に関する情報交換

開催場所，時期：アーリントン(米国)，1994年2月10日～12日，リサーチトライアングルパーク，1994年2月14日～15日

参加者内容，人数：政府機関，地方行政機関の代表者，研究者，約1200名NIEHSの研究者，4名

会議の内容：全体会議，分科会，小検討会，ポスターをそれぞれ3日間行い，最後に小検討会の結果を全体会議で発表する形で会議が終了した。環境汚染については鉛，クロム，トリクロロエチレン，ベンゼン，四塩化炭素等の例が上げられ，また，対象となっている集団がアフリカ系米国人，ヒスパニック，メキシコ系米国人，米国原住民，アジア系米国人であることから，人種の差別問題が最も大きな討議の内容であった。地方行政機関の代表者はこうした集団の一員で，実際，家族に環境汚染により多くの健康障害の生じていることが述べられ，政府機関の代表者，特にEPAの責任が追求された。この種の全米規模の大会議で人種差別的環境問題が討議されたのは初めてであり，主催者側の予定を大幅に上回る白熱した議論が展開された。被災者の人権と根本的対応を要求する形で会議は終了した。今回の会議出席で，米国における環境問題とはほとんどが人種差別問題に根を發するものであり，本質的な解決は容易でない米国の特殊性について十分理解することが出来た。

NIEHSでは鉛の毒性，塩素処理副生成物の毒性試験，Benchmark Doseについての意見と現状について説明を受けた。



## 薬理部 大野 泰雄

**会議名称:** 医薬品国際一般名称委員会  
**開催場所, 時期:** ジュネーブ (スイス), 1993年4月28日~30日  
**参加者内容, 人数:** 11人, 内 WHO 臨時委員 8人, WHO 事務局 2人, オブザーバー 1人. なお, その他6人が一部の問題に関する協議に参加した.

**会議の内容:** 1) 新規申請 97 品目について国際一般名称 (INN) 策定作業を行った. わが国からの申請品目は 12 件で, その内 8 件は変更され, 1 件は INN 策定の必要なし, 1 件は継続審議とされた. 2) List 66, 67 掲載の p-INN へのコメントを審議し, 2 品目の p-INN を変更し, 1 品目を削除した. 3) バイオテクノロジー産物の命名法とその定義について審議した. 4) 血液凝固因子の命名法の案が作成された. 5) IL-1 拮抗剤, Ca 拮抗剤, コリン作動薬, benzoporphyrin 誘導体, TXA<sub>2</sub> 合成阻害剤, endothelin 拮抗剤について新たなシステムが作成された. また, 5-HT<sub>2</sub> 拮抗薬, モノクローナル抗体, およびテオフィリン型物質に対するシステムの定義が変更された. 6) 化学構造表記のガイドラインが原則的に合意された. 7) その他, コンタクトレンズ用物質の命名法, 錠剤への活性物質コードの表記, INN のコンピューター化等について審議された.

## 薬理部 藤森親之助

**会議名称:** 「メチルプロマイドの環境衛生基準」に関する IPCS タスクグループ会議  
**開催場所, 時期:** ハノーバー (ドイツ), 93年8月9日~13日  
**参加者内容, 人数:** 13名の委員 (日本を含む7か国の, 主として厚生, 農林水産, 環境各省庁所属の国立機関の, 行政科学, 安全性, 農・水産, 環境衛生の専門家) と, 5名のオブザーバー (企業, IUTOX, IARC, IPCS) からなる合計 18 名

**会議の内容:** 会議の目的は, メチルプロマイド (MeBr) の環境とヒトの健康に対する影響に関するモノグラフ作成のための最終作業であり, 毒性学的データならびに環境衛生および生態学的影響デー

タの再評価に基づいたモノグラフ素案を最終文書として完成すること, ならびにヒトの健康へのリスクと環境への影響の評価に関する文章作成, および今後の研究等の勧告文の作成であった. MeBr は沸点 3.5~4.6°C の無色のガスで, 主として殺菌, 殺虫, 殺鼠の目的で用いられている一方, 広く自然に生じる化合物であり, 海洋は MeBr の主要な源であると信じられている. 土壌燻蒸は全使用量の 77% で, 土壌内では水解と微生物により分解されるが, 約 50% が大気中に放出される. ヒトの健康への問題は, 警戒剤添加および燻蒸使用条件の規制が厳しく, 残留性もほとんど無いことから, 主要な問題とはされていない. MeBr に関する主な問題はオゾン層への影響である. MeBr は大気圏でハイドロキシラジカルと反応するが, いくらかは上方拡散で成層圏に移動し, 光分解を受ける. 活性ブロムは下層でオゾンと反応して, オゾン層破壊に関与する. 人工的 MeBr によるオゾン破壊は, オゾン層破壊全体の 3% と計算されている. これらの数値の計算根拠が今回の論議の中心であった. 今後望まれる研究は大気中への放出抑制方法の開発とされた.

薬理部 高仲 正  
藤森親之助

**会議名称:** FAO/WHO 残留農薬合同会議 (JMPR): 残留農薬 1 日摂取許容量設定に関する WHO 専門家会議  
**開催場所, 時期:** ジュネーブ (スイス), 1993年9月20日~29日  
**参加者内容, 人数:** WHO 関係 22 名 (事務局・専門委員・臨時顧問), FAO 専門委員 15 名の合計 37 名

**会議の内容:** WHO 残留農薬専門家グループの会議では 21 品目の農薬が取り上げられ, 該当農薬およびその代謝物の生化学および毒性データからなる WHO 作業資料 Working paper をもとに, データ分析とリスク評価を行った. 会議では最大無毒性量 (NOAEL) もしくは無影響量 (NOEL) を決定し, リスクに対する不確実度を考慮し, 安全係数を設定, あるいはヒトのデータの最小毒性量 (LOAEL) からヒトにおける ADI を決定した. 最終的に評価された品目は 19 で, その ADI (mg/kg) は次のとおりである.

amitrol 暫定 0.0005; bromopropylate 0.03; capatan 評価延期; diazinon 0.002; dichlorvos 0.004; di-

quat 0.002; ethephon 0.05; ethylenethiourea 0.004; ethophenprox 0.03; fenpropathrin 0.03; folpet 暫定 ADI の延長; mancozeb, group 0.05; maneb, group 0.05; metiram, group 0.03; monocrotophos 0.0006; phosalone 0.001; propineb 0.007; propylenethiourea 暫定 0.0002; triazophos 0.001; zineb, group 0.03.

#### 病理部 高橋 道人

会議名称: IARC モノグラフの優先順位計画に関する IARC 特別作業グループ会議

開催場所, 時期: リヨン (フランス), 1994 年 12 月 5 日~13 日

参加者内容, 人数: 34 名 (内 IARC 側 19 名)

会議の内容: IARC では既に種々の物質につき発癌性の評価を行い IARC モノグラフとして発刊されている。今回, 1995 年から 2000 年までに評価すべき物質の優先順位が検討された。あらかじめ 150 名の癌研究者にアンケートを送り抽出された物質につき評価の必要性が議論され, 優先性の高いものが選定された。それらは次の通り。

1. 職業的に曝露される 8 物質, 2. 物理的な対象として電磁場, 3. 産業化学物質 30 物質 (内 13 物質は再評価), 4. 線維物質としてアスベスト (再評価) など 3 物質, 5. 医薬品類 11 物質 (内 4 物質は再評価), 6. 殺虫剤等 8 物質, 7. 食品添加物および残留汚染物質 4 物質 (内 2 物質は再評価), 8. 天然あるいは自然発生物質 16 物質 (内 10 物質は再評価), 9. 環境汚染物質 10 物質 (内 4 物質は再評価), 10. 生物関連 (ビールスなど) では 5 ビールス (他 3 ビールス, 1 細菌, 5 寄生虫については評価中)

今後, これらについてワーキンググループのもとで評価が行われ IARC モノグラフとして刊行される予定である。

#### 病理部 西川 秋佳

会議名称: げっ歯類における化学発がんの予測に関する国際ワークショップ

開催場所, 時期: ノースカロライナ (米国), 1993 年 5 月 24 日~5 月 25 日

参加者内容, 人数: 討議参加者 27 名のほか, 米国はじめ英国, 仏国, イタリア, 日本から総勢約 150 名

会議の内容: げっ歯類を用いるがん原性試験は, 最終成績を得るまでに通常 3~4 年という長期間を要するため, がん原性試験への依存度を軽減する目的

で, 変異原性試験, 構造活性相関, 亜慢性毒性試験等の情報から, がん原性をどの程度予測できるかを 44 の化学物質について幾つかの施設で検討し, NTP によるがん原性試験の結果と比較した成績が討議された。44 の化学物質の内, ワークショップまでに NTP 試験が終了した 40 の物質についてみると, 動物実験の成績が明瞭であった 14 の物質は高い一致率をもってがん原性を予測できたが, 実験成績がやや不明瞭か曖昧であった 15 の物質の予測に関する一致率は低いものであった。このように, 種々の予測方法から蓄積される情報は, がん原性試験に供する被験物質を選択する際に導入されるべきことが示された。また, 予測の手順は, 発がん機序に関する将来の研究に負うところが大きいことが強調された。予測方法の導入は, 被験物質の検索順位の決定に有用であり, 使用動物節減と発がん機序解明の一助となりうる可能性が期待できることが結論として示された。

#### 病理部 三森 国敏

会議名称: FAO/WHO の第 42 回合同食品添加物専門家会議 (JECFA)

開催場所, 時期: ローマ (イタリア), 1994 年 1 月 31 日~2 月 12 日

参加者内容, 人数: JECFA 正委員, FAO/WHO 事務局, FAO 顧問, WHO 臨時顧問, 計 30 名

会議の内容: 残留動物用医薬品 (クロラムフェニコール, フルメキン, オラキンドックス, スペクチノマイシン, スルファジミジン, ロニダゾール, デキサメタゾン, ジミナゼン) の毒性と残留データに関する評価に基づく一日許容摂取量 (ADI) の設定と最大残留基準値 (MRL) の勧告がなされた。また, 抗菌剤の食品中残留に関しては, その抗菌性についての試験成績の信頼性が問題となっており, 以下の点についての討議がなされた。抗菌剤残留による微生物学的危険性の評価については, ADI は毒性試験成績からの NOEL に基づくものではなくて, 抗菌活性が消失する濃度から設定すべきである。その危険性を評価する適切な試験法に関して, より一般的な同意が科学者から得られるまで, ヒト消化管に対して有害作用が発現しないことを直接証明する方法の代替法として委員会は *in vitro* 試験成績を今後も受け入れることとした。

## 病 理 部 三 森 国 敏

会議名称：OECD の試験法ガイドラインの国際  
調和に関する会議

開催場所、時期：パリ（フランス）1993年10月24  
日～10月29日

参加者内容、人数：OECD 加盟国より計30名

会議の内容：試験ガイドライン計画の進行状況につ  
いての報告の後、水生生物毒性試験ガイドラインに  
おける実験計画と統計解析の評価の方法についての  
討議があり、草案作成には十分の時間をかけて対応  
する必要があるとの結論であった。世界の農薬規制  
を協調する目的から、OECD が農薬登録に必要な  
ガイドラインを整備することになっており、作業グ  
ループから改訂が必要なものや新たに作成すべきガ  
イドラインが示された。現在各国に配布されている  
専門家リストを再度見直し、農薬のガイドライン作  
成に必要なと思われる専門家を指定することとな  
った。ポリマーについての毒性試験実施ガイドライン  
を作成するため、提案されている物理・化学性状の決定  
方法を各国で検討し、最終案を作成することとな  
った。各国から提出された今後の作業計画案と農薬  
の作業グループからの計画案についての優先順位付  
けがなされた。

## 変異遺伝部 祖父尼俊雄

会議名称：ICH 遺伝毒性専門家会議

開催場所、時期：ワシントン（米国）、1993年6月  
21日～26日

参加者内容、人数：6極からの代表を含めた合計16  
名

会議の内容：これまで論議してきた11項目につ  
いて、意見の調整が容易なものより検討を行った。  
「復帰変異試験における大腸菌株の必要性」、「遺  
伝毒性試験の実施のタイミング」、「小核試験と骨髄  
での染色体異常試験との同等性」、「*In vitro* 試験で陽  
性結果が得られた場合に必要な試験」および「*In  
vitro* 試験での最高用量の設定」の5項目につ  
いては合意が得られた。残りの6項目、「*In vivo* 試験の  
陰性結果の validation」、「*In vitro* 試験での再試験  
の必要性」、「*In vitro* 試験での析出濃度での試験の  
実施」、「小核試験での雌雄動物の必要性」、「最少必  
要な試験の組合せ」および「哺乳類培養細胞を用  
いる突然変異試験の必要性」についても基本的な内容  
をまとめることができた。特に問題となった最後の  
2つの事項については、1) 微生物を用いる復帰変

異試験または哺乳類培養細胞を用いる突然変異試験、  
2) *in vitro* 細胞遺伝学試験、3) *in vivo* 細胞遺  
伝学試験の3つを組み合わせることとした。1) につ  
いては微生物を用いる復帰変異試験が適切でない場  
合、例えば強い抗菌作用を示す物質、DNA 前駆体  
類似物質、DNA 合成阻害剤および必要と考えられ  
るその他の物質（生物製剤など）については哺乳類  
培養細胞を用いる突然変異試験で代行することとし  
た。これらの案について6極よりコメントを求め、  
ICH-2以降の運営委員会にステップ2ガイドライ  
ンとして提出する予定である。

## 変異遺伝部 祖父尼俊雄

会議名称：OECD 第2回遺伝毒性諮問会議

開催場所、時期：オタワ（カナダ）、1994年1月29  
日～2月4日

参加者内容、人数：米国、カナダ、英国、ドイツ、  
日本からの遺伝毒性専門家およ  
び OECD 事務局からの計11名

会議の内容：遺伝毒性試験の OECD ガイドライン  
の見直し作業が進められており、7つの既存ガイド  
ラインの改訂と2つの新たに提案されたガイドライ  
ンについての最終案の作製のための検討が行われた。  
1992年の11月に第1回の会議がロンドンで行われ  
たが、その後の国際的な論議、1993年2月のメル  
ボルンでの第6回国際環境変異原学会で行われた遺  
伝毒性試験法の国際的調和に関するワークショップ  
の結果、およびこれまでに行われた ICH 専門家会  
議での合意事項を踏まえて、最終案の検討が進めら  
れた。OECD ガイドラインにもワークショップの  
結果や ICH の合意事項がかなり反映されたが、一  
部については修正の上取り入れられたり、全く受け  
入れられなかった事項もあった。最終的にはかなり  
の部分で合意が得られたが、最後まで合意が困難で  
取り合えずの取りまとめとなった部分もあった。  
1994年5～6月に最終案を会議参加者と各国代表に  
配布し、1994年9月に National Co-ordinator 会  
議で採択する予定である。

変異遺伝部 林 真

会議名称: *In vivo* 遺伝毒性試験の統計学的評価に関するワークショップ

開催場所, 時期: ノイエルベルク (ドイツ), 1993年9月12日~15日

参加者内容, 人数: *In vivo* 遺伝毒性学者, 統計学者, 10名

会議の内容: 本ワークショップは, 1993年2月にメルボルンで開催された「遺伝毒性試験法の標準化に関する国際ワークショップ」のポストミーティングとして開催された *in vivo* 遺伝毒性試験によって得られるデータを統計学的に評価するための標準化を目的とし, 各国より *in vivo* 遺伝毒性研究の専門家と統計学者が集まり, 少数で実質的な討議をする事を主な目的とした。取り上げられたテーマは, 小核試験, 骨髄および生殖細胞を用いる染色体異常試験, 優性致死試験であり, 具体的なデータを基に討議された。その結果, 遺伝毒性試験においては, 背景データを重視すること, 用量反応関係进行评估することで意見の一致を見た。また, 第1種の過誤は, 系全体として5%, また直線的に背景データの2倍になる反応を80%検出することとし, 実験計画法により試験の規模を検討した。成果は, *Mutation Research* 誌に投稿される。

会議の翌日には, GSF 研究所において, 「小核試験の最近の動向」について講演を行った。末梢血を用いる小核試験法および小核の分離濃縮, セントロメア染色法等について国立衛生試験所・変異遺伝部の現状を紹介し, その後質疑応答を行った。

総合評価研究室 中館 正弘

会議名称: 第20回 OECD 環境委員会および化学品グループの合同会議, および拡大運営委員会

開催場所, 時期: パリ (フランス), 1993年5月24日~28日

参加者内容, 人数: 加盟18カ国, IPCS, IRPTC, ILO, CEC 計109名

会議の内容: パリの OECD 本部で開催された第20回 OECD 環境委員会および化学品グループの合同会議に出席し, 以下の項目についての討議を行った。

1. 高生産量化学物質安全性点検計画を含む既存化学物質プログラムに関するステアリング会議の報告をもとに討議が行われ, 今後の計画が了承された。
2. 化学物質のリスクリダクション計画については,

現在行っている鉛, 水銀, カドミウム, メチレンクロライド, 臭素系難燃剤についての文書の内容, 今後の方向づけについて討議が行われた。

3. OECD 試験法ガイドラインについては, 現在作成中の試験法ガイドライン案と今後の計画が提案され, 了承された。

4. その他, GLP, 農薬, バイオテクノロジー, 事故対策について討議が行われた。なお, 合同会議に先立ち, 24日に開催されたステアリング会議に出席し, OECD 諸活動に関する具体的な作業計画案を作成した。

総合評価研究室 中館 正弘

会議名称: OECD 第3回高生産量化学物質安全性点検試験計画会議

開催場所, 時期: パリ (フランス), 1993年9月20日~24日

参加者内容, 人数: 加盟14カ国, IPCS, ITPTC, CEC, BIAC 61名

会議の内容: パリの OECD 本部で開催された第3回 OECD 高生産量既存化学物質安全性点検試験計画会議に出席し, 以下の項目についての討議を行った。

1. フェーズ-1 (初年度) の23物質に関する初期評価文書の再検討を行い, わが国担当の6物質についても改訂したレポートをもとに報告し, 討議を行った。
2. フェーズ-2 (2年目) の24物質に関する試験計画の再検討を行い, わが国担当の12物質についても報告し, 討議を行って試験計画が確定した。
3. フェーズ-3 (3年目) の63物質に関する試験計画の検討が行われ, わが国担当の12物質についても既存データの内容を説明し, 了承された。
4. 最終日に HAAB (有害性評価諮問委員会) が開催され, 報告書の統一化, 初期評価のためのガイダンスおよびフェーズ-4の物質選定に関する討議を行い, わが国はフェーズ-4 (4年目) で16物質を分担することとなった。

総合評価研究室 中館 正弘

会議名称：第21回 OECD 環境委員会および化学品グループの合同会議、運営委員会および有害性評価諮問委員会

開催場所，時期：パリ（フランス），1994年2月7日～11日

参加者内容，人数：加盟20カ国，IPCS，IRPTC，CEC，約100名

会議の内容：パリの OECD 本部で開催された第20回 OECD 環境委員会および化学品グループの合同会議に出席し，以下の項目についての討議を行った。

1. 農薬フォーラムにおいては，農薬に関する国際機関間の登録，試験法等の調和について討議した
2. 化学物質プログラムに関するステアリング会議では，高生産量化学物質安全性点検計画に関する実行上の諸問題について討議した
3. 前回に引続きリスクリダクション計画についての討議が行われ，鉛に関するリスクリダクション計画の策定，水銀およびカドミウム，臭素化難燃剤に関するリスクリダクション文書案の改訂，およびメチレンクロライドに関する文書案の作成計画が検討された。
4. OECD 試験法ガイドラインの改訂/作成計画が討議された。
5. その他の活動として GLP，バイオテクノロジー，化学物質事故対策についての進捗状況が報告され，討議された。
6. HAAB（有害性評価諮問委員会）においては，高生産量化学物質安全性点検計画で用いる初期評価ガイダンスの改訂等について討議を行った。

総合評価研究室 鎌田 栄一

会議名称：OECD の GLP 基準と手続きに関する会議

開催場所，時期：ベルリン（ドイツ），1993年12月6日～8日

参加者内容，人数：12名

会議の内容：先に OECD が各国に対して実施した多国間認証に関連した GLP 実施状況のアンケートの内容が不十分であったため再度アンケートを実施することとなり，その内容が本会議で討議され，原案が作成された。内容的には前回の案に加え，査察の仕方の詳細な情報，GLP 不適となった例等の情報および各国の GLP 基準の提出を求める内容となった。

大阪支所 武田 寧

会議名称：IHC 品質分野専門家ワーキンググループ会議

開催場所，時期：ワシントン（米国），1993年8月30日～9月1日

参加者内容，人数：日米欧三極の品質分野の薬事規制当局および製薬団体関係者，約40名

会議の内容：10月にオーランド（米国）で開催される ICH-2 の品質シンポジウムに報告する国際調和ガイドライン案の検討が行われた。1) ICH 安定性試験法ガイドラインの最終案の策定：三極調和ガイドライン案に対する三極の意見を集約し，ガイドライン最終案を作成した。内示案からの主な変更点は，試験試料のバッチスケールが実験室規模からパイロットプラント規模以上になったこと，実生産規模バッチの安定性試験実施が盛り込まれたこと，試験成績の統計処理が明記され統計手法が例示されたこと，加速試験の成績評価基準が明記されたことなどである。2) 分析法バリデーションに関するテキスト内示案の検討：原案の最終検討を行い，内示案を作成した。3) ICH-2 品質シンポジウムの運営に関する打合せを行った。

## 平成5年度業務概要

所長 内山 充

平成5年度は、いうまでもなく我が国の政治情勢が大きく変化した年であり、それに伴い行政にも経済にも教育にも改革の必要性があらためて認識された年であった。またそれとともにこの数年は、来るべき21世紀に向かって新しい方向性を見いだし確実な目標を定める重要な時期であるといえる。

## 試験研究業務

平成5年7月1日をもって、我々厚生省の一般会計7試験研究機関が、将来の秩序ある効果的な発展を目指して、従来の省内の所管部局を離れて官房厚生科学課のもとに一元化された。試験研究機関としては歴史的な出来事である。一元化後の各機関の在り方については厚生科学課より、旧所管課および各研究機関との討議を踏まえて、グランドデザインが示された。それによれば当所は、安全性評価・化学系研究機関群として、評価科学（レギュラトリーサイエンス）および創薬科学を推進する機関と位置付けられている。

レギュラトリーサイエンスはいうまでもなく、医薬品、食品、ならびに生活環境中における各種化学物質の、品質、有効性、安全性を適切に評価するために役立つ基礎研究、調査研究および行政試験検査である。昨年の本衛試報告139頁に説明したように、それらを学問的水準を保ちつつ、独自の価値観と目標をもつ科学の一分野として発展させ、国際的な調和を失うことなく、行政を通じて国民に還元することが我々の変わらぬ責任である。以下の各業務報告に見られるように、各部・室・場ともこの精神に沿って試験研究やそれぞれ業務の遂行に努力した。また、本年度も厚生科学課および生活衛生局化学物質安全対策室への併任官の派遣と、大阪支所食品試験部室長の神戸検疫所輸入食品検査センター理化学課長併任が行われ、行政との密接な連絡にも配慮した。

一方創薬科学としては、画期的な新薬の創製を目指して、大学および民間企業との明確な分担と効果的な協調を保ちつつ、国の責任として取り組むべき基盤的、先導的研究の体制を作ることが必要となる。そのために、平成7年度予算概算要求を目標に、

従来の大阪支所を「創薬基盤研究センター」に拡充改組して特色ある研究組織を作るとともに、融合領域の研究交流の場、および標準物質の供給や細胞バンクなどの研究支援機能を併設するべく検討中である。

用賀本所は、すでに政府機関の地方移転計画の中で、府中市浅間町への移転が閣議決定されているが、具体的移転の時期について東京都、府中市および本所の3者間で協議を開始した。

7月1日の省内所管の変更を機として、当所の英文名称を National Institute of Hygienic Sciences から National Institute of Health Sciences に変更し国内外の関係機関に通知した。また同時に、当所の責任業務である品質と有効性と安全性の確保への限りなき探求をイメージしたシンボルマークも設定した。

## 国際交流

国際交流は本年も昨年に増して盛んに行われた。当所の特徴として、厚生省をはじめとする技術行政関連の国際会議への、専門家としての参加が年々増加する傾向にある。平成5年度内の海外派遣は延べ104名であったが、留学の7名と2国間共同研究あるいは学会への招聘または参加の延べ32名、ならびにJICA等のプロジェクトによる途上国への技術援助の6名のほか、延べ59名が行政に関連する国際会議への出席者である。その中には、ICH（新薬審査資料の国際調和）23、IPCS（WHOの化学物質安全性計画、JMPPR（残留農薬評価）、JECFA（食品添加物評価）を含む）14、OECD 8、PDG（薬局方の3極会議）6、ISO（国際標準化機構）4、その他IARC（国際がん研究機構）、INN（WHO国際一般名）、UJNR（日米天然資源）等の会合が含まれているが、専門家とはいえ専門職ではないので担当者の負担が増えていることは否めない。なお、外国人研究員、留學生の受け入れは延べ14名であった。

中国天津市薬品検査所をプロジェクトサイトとするJICAの医療協力（医薬品検査技術）が、当所を中心に予研、大学あるいは企業の研究者の協力を得つつ、平成6年1月より5年間の予定で開始された。

## 関連集会

7月13日につくば国際交流センターで第3回薬用植物栽培技術フォーラムを開催した。

全国衛生化学技術協議会は、10月18～19両日、熊

本県衛生公害研究所の田中明所長を年会長として開催された。輸入食品に関するワークショップと食品、環境、薬品および家庭用品の分科会における会員の発表のほか、それぞれの分野で自由集会がもたれ、今後の国公立試験研究機関における行政研究の進め方と連携の在り方について検討がなされた。

### 人事異動

平成5年度における主な人事異動は次のとおりである。10月1日付けで伊藤食品試験部長が武庫川女子大学薬学部教授に転出、年度末に高仲薬理部長が定年退官した。平成6年4月1日付けで食品試験部長には柴田同部室長が、薬理部長には大野同部室長が昇任、香月主任研究官が種子島場長に昇任、一戸衛生微生物部室長が東京家政大学教授に転出した。

## 総務部

部長 福永幸雄

### 1. 定員

平成4年度末の定員は271名であったが、平成5年度は、安全性生物試験研究センター変異遺伝部第三室(細胞バンク)の定員として研究職1名(6ヵ月)の増員ならびに第8次定員削減計画に基づき行政職(-)1名、研究職2名、計3名の定員削減により、平成5年度末の定員は、指定職2名、行政職(-)44名、行政職(=)22名、研究職201名、計269名となった。

### 2. 予算

平成5年度の前算の概要は次のとおりである。

#### (1) 一般予算

予算額は、3,578,747千円で前年度に比較して7.57%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(研究員当積算庁費の単価アップに伴う増) | 4,768千円    |
| ② 標準品製造費(4品目追加による増)       | 6,187千円    |
| ③ 施設管理事務経費の増              | 3,838千円    |
| ④ 受託研究費の増                 | 6,144千円    |
| ⑤ 血清等製造および検定費の増           | 6,212千円    |
| ⑥ 施設整備費の増                 | 20,004千円   |
| ⑦ 移転調査検討費の減(基本構想図作成費等)    |            |
|                           | △ 16,504千円 |

等が挙げられる。

また、新規予算については、共同利用型高額研究機器整備費として、高分解能FT-NMR装置600M一式の借料等が、127,708千円認められた。

#### (2) 移替予算

予算額は、146,685千円で前年度に比較して12.70%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1課題(血液に接する医療器具に使用される放射線滅菌と揮発性物質に関する研究4,620千円)、国立機関公害防止等試験研究費において1課題(水生生物の細胞遺伝毒性を指標とした水質汚染モニタリング法の開発に関する研究15,798千円)が認められた。

なお、平成5年度事項別予算額は別表のとおりである。

### 3. 施設整備状況

平成5年度の施設整備については、当初予算に加え、補正予算として349,053千円が認められ、以下のとおり整備を行った。

#### (1) 当初予算関係

##### ① 11号館屋根防水改修工事

(施設整備費39,048千円)

##### ② 伊豆薬用植物栽培試験場温室保温パイプ取替工事(各所修繕費(特別修繕)4,000千円)

#### (2) 補正予算関係

##### (第1号補正)

##### ① 北海道薬用植物栽培試験場浄化槽等取付工事

10,417千円

##### ② 北海道薬用植物栽培試験場温室改築工事

46,725千円

##### ③ 北海道薬用植物栽培試験場庁舎改築工事

74,948千円

##### ④ 和歌山薬用植物栽培試験場単独処理浄化槽等取付工事

4,168千円

##### ⑤ 和歌山薬用植物栽培試験場庁舎改築工事

81,028千円

##### ⑥ 種子島薬用植物栽培試験場庁舎改築工事

74,028千円

##### ⑦ 伊豆薬用植物栽培試験場庁舎改築工事

49,107千円

##### (第2号補正)

##### ⑧ 筑波薬用植物栽培試験場人工気象室等改修工事

8,632千円

## 別表

## 平成 5 年 度 予 算 額

事 項	平成 4 年度 (A)	平成 5 年度 (B)	対前年度差 引増△減額 (B)-(A)	備 考
	(千円)	(千円)	(千円)	
(組織)厚生本省試験研究機関	3,327,035	3,578,747	251,712	
(項)厚生本省試験研究所	3,204,487	3,429,983	225,496	
人 件 費	2,113,027	2,213,201	100,174	
人 当 経 費	7,691	7,677	△14	
一般事務経費	43,776	44,746	970	
研 究 費	230,726	235,494	4,768	
官庁会計事務データ通信システム に必要な経費	3,554	8,049	4,495	
特 別 研 究 費	16,120	12,374	△3,746	1. 医薬品の適正な評価を志 向した光学異性体に関する 基礎研究 (4,657千円) 2. 生体関連反応指標の有意 性判定に関する研究 (7,717千円)
標準品製造費	33,177	39,364	6,187	
安全性生物試験研究センター運営費	205,232	206,039	807	
薬用植物栽培試験場運営費	104,837	104,943	106	
情報活動運営費	42,062	42,134	72	
施設管理事務経費	65,119	68,957	3,838	
対がん 10 カ年総合戦略経費	58,489	58,521	32	
受 託 研 究 費	129,374	135,518	6,144	1. ニューロ・トロフィック・ ファクター等の分離技術及 び機能の解析技術の開発 (8,286千円) 2. バイオテクノロジー応用 医薬品の評価技術の開発 (6,058千円) 3. バイオテクノロジーを利 用した食品の開発と安全性 評価技術の開発 (11,431千円) 4. バイオテクノロジーを応 用した毒性・薬効の新評価 技術の開発 (26,139千円) 5. 糖鎖含有タンパク製剤に おける糖鎖の機能解明と評 価技術の開発(12,416千円) 6. 糖鎖関与疾患の発症機構 の解明 (3,000千円) 7. 新医薬品製剤の有用性確 保技術の開発と評価技術の 確立 (26,194千円) 8. 医用材料と生体の相互作 用の総合化技術の開発 (10,136千円) 9. 新規生理活性物質の探索 技術の開発 (5,250千円) 10. 薬用植物の科学的研究 (12,049千円)



事 項	平成4年度	平成5年度	対前年度差	備 考
	(A)	(B)	引増△減額 (B)-(A)	
	(千円)	(千円)	(千円)	
				11. 免疫系による生体調節機構の解明と新規生体調節物質の開発 (3,000千円)
				12. 神経系の機能・病態の解析と応用 (7,335千円)
				13. 糖鎖利用による診断技術の開発 (3,000千円)
				14. 人工臓器に関する新滅菌法の研究 (1,224千円)
乱用薬物基礎研究費	18,837	12,256	△6,581	薬物乱用、特に市販配合剤乱用時の依存性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(12,256千円)
総合化学物質安全性研究費	112,407	109,447	△2,960	
移転調査検討費	20,059	3,555	△16,504	
共同利用型高額研究機器整備費	0	127,708	127,708	
(項)血清等製造および検定費	103,504	109,716	6,212	
一般事務経費	12,847	12,876	29	
事業費	90,657	96,840	6,183	
(項)厚生本省試験研究所施設費	19,044	39,048	20,004	11号館屋根防水改修工事 (39,048千円)
(移替予算)				
(組織)厚生本省試験研究機関	168,018	146,685	△21,333	
(項)国立機関原子力試験研究費	89,143	68,806	△20,337	
(項)国立機関公害防止等試験研究費	78,875	77,879	△996	
計	3,495,053	3,725,432	230,379	

\* 予算額については両年度とも当初予算額

#### 4. 国家検定品目等の改正

##### (1) 国家検定品目の追加

薬事法第43条第1項等の規定による検定を受けらるべき医薬品に、新たに「生合成ヒト二相性インスリン水性懸濁注射液」他2品目が追加された(平成5年10月1日厚生省告示第218号)。

この結果、当所の試験に係る国家検定品目は、5品目から8品目となった。

##### (2) 国立衛生試験所標準品交付規程の一部改正

医薬品等試験用標準品「アルプロスタジル標準品」他2品目(平成5年8月2日厚生省告示第176号)ならびに「ウリナスタチン標準品(平成6年3月1日厚生省告示第45号)を追加した。

これにより、当所が製造し、交付している標準品は医薬品等試験用標準品98品目、色素試験用標準品38品目、計136品目となった。

##### (3) 各種手数料の改正等

① 国立衛生試験所試験検査依頼手数料の改正(平成6年3月31日厚生省告示第142号)

② 国立衛生試験所標準品交付手数料の改正(平成6年3月31日厚生省告示第143号)

③ 国家検定手数料の改正(平成6年3月31日厚生省告示第144号)

それぞれ同年4月1日から適用となった。

併せて、製品検査手数料(食用タール色素)および国家検査手数料(18品目)の改定を行い、平成6年4月1日から適用となった。

なお、標準品の今後の需要増大に対応して、円滑な供給体制を整備する必要があることから、主として、日本薬局方標準品のうち、①品質評価の容易なもの、②原則として告示年度の古いものから、順次製造供給事業を公益法人(財団法人日本公定書協会)に移譲していく方向で検討を進めている(平成7年度から5ヵ年計画で約50品目)。

## 5. 移転関係

### (1) 本 所

昭和63年7月の閣議決定（多極分散型国土形成促進法に基づく79行政機関の移転）に基づき、府中市の米軍基地跡地（現在留保地）への移転に向けて関係省庁（大蔵省、建設省）、東京都および府中市との折衝を進めてきたが、府中市の市民斎場建設についての住民との調整が進まず、留保地全体の利用計画の策定に着手できなかったことから、当初計画した平成8年度の移転は断念せざるを得ない状況となった。

しかしながら、平成4年12月に市民参加の「市民斎場検討協議会」から当該地に建設することが適切との答申が出され、市民斎場問題が一応決着をみたことから、平成5年度からは、平成10年度移転完了を目的に留保地の全体利用計画策定（東京都、府中市および当所の三者協議）に着手している。

### (2) 大阪支所

国有地利用が非効率との大蔵省の指摘を受け、集約整備について別地移転を含め検討することとされており、平成3年度中には大蔵省の処理方針が決定されることとなっていたが、平成5年度末現在決定をみていない。

当所としては、

- ① 現在地が埋蔵文化財包蔵地であることにより、高層建築が不可能であること。
- ② 現在地が大阪市の中心地にあり、自動車等による振動、騒音、大気汚染等のため、研究業務を行ううえで適切な環境条件にないこと。
- ③ さらに、組織再編計画の一環として、大阪支所を「創薬基盤研究センター」に拡充改組する方針であること。

等の諸状況から、大阪府茨木市所在の国際文化公園都市西部地区ライフサイエンスパークへの移転が最適と考えており、当該地域の開発事業の進行に並行して具体的な検討を進めることとしている。

## 薬 品 部

部 長 小 嶋 茂 雄

### 概 要

平成5年度には、医薬品の品質規格に関する研究、製剤評価に関する研究、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

品質規格に関する研究では、医薬品の分析法に関する研究、ならびに日本薬局方の規格および試験方法に関する研究を行った。製剤評価に関する研究では、経口徐放性製剤や非経口製剤のバイオアベイラビリティに影響を与える因子を明らかにして、*in vivo*の結果とよく相関する*in vitro*の試験法を設定するための研究、製剤中の医薬品の安定性を予測しうる試験法を確立するための研究、ならびに添加剤による医薬品の安定化効果に関する研究などを行った。麻薬および依存性薬物に関する研究では、尿、血液、毛髪などの生体試料中の乱用薬物の分析法に関する研究、毛髪分析や尿分析による薬物使用の鑑定法を確立するための研究、ならびに毛髪への薬物の移行に関与する因子を明らかにするための研究などを行った。

小嶋茂雄部長は、日米欧薬局方の調和に関する推進会議/ICH品質分野専門家会議/第2回ICH会議（平成5年10月21日～11月1日）ならびに第2回医薬品添加剤の国際調和に関する日米欧薬局方合同公開会議（平成6年1月29日～2月4日）に出席するため、米国に出張した。

また、国際協力事業団の天津医薬品検査技術協力プロジェクト締結のための補充調査団の一員として中国天津市に出張し、協力の相手方である天津市薬品検査所の技術レベルや機器の保有状況について調査するとともに、専門家の派遣、研修員の受入れ、機材の供与などについて中国側と協議した（平成5年9月23日～29日）。

吉岡澄江室長は、HS国際共同研究の加速試験不適合製剤のShelf Lifeの予測法の開発に関する研究の打ち合せのため、英国に出張した（平成5年7月27日～8月2日）。中原雄二室長は、日米共同研究の毛髪などの生体試料中の乱用薬物の検出法に関する会議に出席するため、米国に出張した（平成5年9月26日～10月4日）。また、吉岡澄江室長ならびに鹿庭なほ子主任研究官は、ICH品質分野専門家会議および第2回ICH会議に出席するため、米国に出張した（平成5年10月24日～31日）。

### 業務成績

#### 1. 特別審査試験

新薬107件、かぜ薬等21件の合わせて128件について試験した。

#### 2. 一斉取締試験

硝酸イソソルビト徐放錠および徐放カプセル12件、臭化ブチルスコポラミンおよび臭化水素酸スコ

ポラミンを含有する注射剤11件, ならびに塩酸プロプラノロールおよびアテノロールを含有する固形製剤38件について試験した。

### 3. 特別行政試験

あへん中のモルヒネの含量試験を行った(国産あへん32件, 輸入あへん95件, 合計127件)。

### 4. 標準品の製造

GC-MS分析用として, 次の7種の重水素化体の標準品を製造した:

アンフェタミン-d<sub>4</sub> (5g), メタンフェタミン-d<sub>4</sub> (5g), コカイン-d<sub>3</sub> (5g), ベンゾイルエクゴニン-d<sub>3</sub> (5g), エクゴニンメチルエステル-d<sub>3</sub> (5g), モルヒネ-d<sub>3</sub> (5g), 6-アセチルモルヒネ-d<sub>3</sub> (5g)。

### 5. 国際協力

国際厚生事業団の第4回必須医薬品製造管理研修に協力し, アジア諸国の医薬品製造管理者に対する研修を行った。

国際協力事業団の天津医薬品検査技術協力プロジェクトの初年度(平成5年度)の研修員として平成6年3月29日に来日した天津市薬品検査所の林珊薬師は, 国立衛生試験所ならびに三共(株)においてGC-MSの研修中である(約6ヵ月間の予定)。

### 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規格および医薬品添加物規格の改正(薬務局審査課), 地方衛生研究所技術者講習会(薬務局監視指導課), 麻薬, 乱用薬物に関する情報収集(薬務局麻薬課)ならびにJISの改正(通商産業省)などに協力した。

## 研究業績

### 1. 医薬品の分析法に関する研究

$\beta$ -ブロッカー薬の迅速分析法を作成した(薬務局監視指導課委託研究費)。

官能基に特異的な発蛍光標識試薬を開発して, 光学異性体の高感度選択的分析法を確立し, 血中および尿中分析に応用した(厚生省特別研究費)。

シクロデキストリン類を添加試薬に用いてラセミ体の消炎鎮痛薬をキャピラリー電気泳動により光学分割する方法について検討を行った。また, 光学異性体医薬品の評価方法の確立を目指して, 吸収性による評価を行うためのモデル実験系について検討した。

抗マラリア作用をもつ熱帯病治療薬の開発のため, 候補となる物質の検索を行った(厚生科学研究費補助金)。

官能試験による不正医薬品の鑑別法を開発するとともに, 消炎鎮痛薬および水溶性ビタミン薬について薄層クロマトグラフ法を用いた簡便な鑑別法を開発した(技術移転振興対策事業研究費)。

### 2. 日本薬局方の規格および試験方法に関する研究

一般試験法に関連して, 「胃腸薬の制酸力試験法」を新設するための案, ならびに「赤外吸収スペクトル測定法」の改正案を作成した。また, 新規収載の21品目の赤外吸収スペクトルを測定し, 参照スペクトルを作成した。これらは十二改正日本薬局方第一追補に収載された。

一般試験法に関連して, 「吸光度測定法」の機器の校正法, ならびに「ヒ素試験法」の検液の調製法の改正案を作成した。これらは十二改正日本薬局方第二追補に収載される予定である。

残留溶媒試験法および油脂試験法の開発と改良を行い, これらの試験法の国際調和に関して提案を行った(厚生科学研究費補助金)。

電量滴定法を用いた医薬品の定量法の確立を目的として, 電極の形や材質などについて検討を行った。

### 3. 医薬品の有効性, 安全性に関する薬剤学的研究

アセトアミノフェン徐放錠を用いて, 薬物の放出に及ぼすヒトの消化管内の機械的破壊力の影響, ならびに結腸での薬物の放出性について検討したところ, 侵食型の徐放錠では *in vivo* の放出速度がパドル法の放出速度よりも速く, 消化管内で摩擦を受けて薬物の放出が促進されること, ならびに吸収速度が投与後4時間で急激に減少することから, 結腸での薬物の放出性が低いことが示唆された。また, 塩酸ロベラミドによりイヌの消化管運動および消化管通過時間をヒトに近づけることを試みたが, 個体差が大きく再現性に問題があることが分った(HS財団受託研究費)。

アセトアミノフェン坐剤のバイオアベイラビリティを直腸温度を制御した家兎を用いて測定した結果, 直腸温度が薬物のバイオアベイラビリティに影響を与えること, ならびに *in vivo* の結果は液量の少ない条件での回転透析セル法による測定結果とよく相関することを明らかにした(創薬科学総合研究費)。

バイオアベイラビリティに差が生じると予想される製剤についてヒトでの生物学的同等性の評価を行うことを目的として, アジマリン錠などの市販製剤について *in vitro* の溶出試験を行い, その結果から

予測される血中濃度を算出して、同等性の評価を行った。また、ポピュレーションファーマコキネティックスの有用性についても検討した（薬剤疫学的手法検討事業研究費）。

#### 4. 医薬品の物理・化学的安定性に関する研究

$\beta$ -ガラクトシダーゼの変性と凝集を速度論的に解析することにより、加速試験による安定性予測がタンパク質薬物に関しても可能であることを明らかにした。また、酵素製剤についても、失活の速度がアレニウスの関係を満足することがわかった（HS財団国際共同研究費）。

凍結乾燥製剤ならびに水溶液中でのタンパク質の変性や凝集の速度が、NMRによって測定した水分子の運動性と関連することを、牛血清アルブミンや $\beta$ -ガラクトシダーゼを用いて明らかにした（創薬科学総合研究費）。

タンパク質凍結乾燥物の保存安定性に及ぼす各種添加剤の安定化効果について検討した結果、結晶性が低い添加剤ほど安定化効果が大きいことがわかった。

非晶質薬物の保存時における結晶化を速度論的に検討する簡便で精度よい手法として、マイクロ熱量計を用いてその結晶化熱を経時的に測定する方法を確立した。この方法を用いて、非晶質ニフェジピンの結晶化速度の温度ならびに湿度依存性を明らかにした（HS財団受託研究費）。

$\gamma$ 線の照射によりポリ乳酸マイクロスフェアの高分子が線量依存的に分解すること、ならびに照射によるガラス転移温度の変化が薬物放出速度に大きな影響を与えることを見出した（国立機関原子力試験研究費）。

マイクロスフェアなどの生分解性高分子マトリックスにおける高分子の分解をモンテカルロ法によってシミュレートし、高分子の分解にはランダムな加水分解とともに、水溶性の高い高分子の選択的加水分解も寄与することを明らかにした（厚生科学研究費補助金）。

#### 5. 麻薬および依存性薬物に関する研究

尿検査では検出困難とされている薬物を投与した動物の毛髪をGC-MSを用いて分析することにより、LSD、トリアゾラム、フェンシクリジンおよびそれらの代謝物を検出することができた（厚生科学研究費補助金）。

毛髪への薬物の排泄に関与する因子を明らかにするため、26種の薬物のメラニン色素との親和性と

毛髪への排泄との関係について検討した結果、両者の間には比較的良好な相関関係（相関係数0.945）が認められたが、毛髪への薬物の移行性をメラニンへの親和性だけで説明するのは無理なことがわかった。

フェンシクリジンを動物に投与し、尿、血液、毛髪中のフェンシクリジンおよびその代謝物を検索した結果、シクロヘキサン環の4位とピペラジン環の4位にそれぞれ水酸基が導入された代謝物を同定した。また、尿中には主にこれらの代謝物がグルクロン酸抱合体として排泄されること、一方、毛髪中には未変化のフェンシクリジンが速やかに排泄されることがわかった。

新合成麻薬3種、覚醒剤の異性体5種、メタロン系向精神薬2種の分析マニュアルを作成した（薬務局麻薬課委託研究費）。

尿中乱用薬物標準試験法の第一次案の実用性について鑑定の現場で評価し、その結果に基づいて第二次案を作成した（厚生科学研究費補助金）。

覚醒剤を混ぜたタバコを喫煙することによって生成されるシアノメタンフェタミンの体内動態を検討した結果、尿中にフォルミルメタンフェタミンが特異的に排泄されることを見出し、その生成機構を検討した（乱用薬物基礎研究費）。

## 生物薬品部

部長 早川 堯夫

### 概 要

分子生物学をはじめとする生命科学分野の研究成果が速やかに薬学的応用に結びつき生物薬品の開発につながる傾向は一層顕著になっている。業務の変わらぬ基本命題は、生物薬品に関連するその時点の科学に通暁し、依拠し、あるいはこれを活用してより適切な科学的行政に役立たせること、さらにはその新たな地平を拓くことである。しかし、ますます急速に発展し、先鋭化していく関連分野の学問・技術の先端を見失わないようにしながら、多様な行政ニーズに先導的役割を演じ、かつ国際社会の一員としての貢献も果たすためには、置かれた立場への意識はもとより、卓抜した能力や努力、そして環境整備が必要である。あるべき姿により近づくには部レベルでの大きな飛躍が前提であるが、他機関との強力な連携、周囲の理解と支援などの要素も必要不可

欠である。業務報告として、こうした前置きが年を経る毎に短くなっていくことを願うばかりである。

平成5年度の主な研究業務としては、公定書医薬品の試験法改定や迅速化、バイオ医薬品のアッセイ法の高感度、高精度、簡便化に必要なデータの蓄積、糖タンパク製剤の特性・品質評価技術の開発、タンパク製剤の安定化および評価技術の開発、診断用医薬品の評価技術および関連基礎研究、生物薬品の有効性・安全性および生体機能や生体内活性物質の作用機序の解明などに関する生物化学的研究などを行った。

人事面では、春日井 勲博士が平成5年8月1日付けでHS財団流動研究員として派遣され、一方 Ahmed Abdu Said 博士が平成6年3月31日付けで派遣を解かれた。

短期海外出張は以下の通りであった。早川堯夫部長：薬事規制のハーモナイゼーションに関する国際会議 (ICH2) 準備委員会等出席 (フランス, イタリア, 平成5年7月3日~7月14日); ICH2 準備委員会および本会議出席 (米国, 平成5年10月24日~11月1日); 森本和滋室長: ICH2 準備委員会出席 (フランス, 平成5年7月3日~7月12日); 遺伝子組換えヒト成長ホルモンに関する国際ワークショップ出席 (英国, 平成5年9月19日~9月24日), 谷本 剛室長: 日米アルドース還元酵素ワークショップ出席 (米国, 平成6年2月19日~2月23日), 山口照英室長: ICH2 準備委員会等出席 (フランス, イタリア, 平成5年7月4日~7月14日); ICH2 準備委員会および本会議出席 (米国, 平成5年10月24日~11月1日)。

#### 業務成績

##### 1. 特別審査試験

新薬19件およびかぜ薬・解熱鎮痛薬35件, 合計54件について試験した。

##### 2. 一斉取締試験

消化酵素複合剤78検体のでんぷん消化力について試験した。

##### 3. その他

第12日本薬局方改正に伴う業務およびバイオ医薬品局方収載と国際調和に関する作業 (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), 組換えヒト成長ホルモンの新規国際標準品設定のための国際共同検定 (WHO), 平成5年度特別課程薬事衛生管理コース (国立公衆衛生院), 生物薬品の品質の評価

等に関する啓蒙活動 (HS財団講演会等), 各種国際協力事業などに協力した。

#### 研究業績

##### 1. 生物薬品の特性と品質評価技術に関する研究

i) トロンビンの日局定量法の問題点を明らかにし, その改良法を作成した。

ii) ウロキナーゼ製剤の迅速分析法原案を作成し, 薬務局監視指導課に提出した。

iii) キット間における血中インスリン濃度測定値のばらつきの原因の一つは塩濃度と蛋白質の濃度であることが判明した。

iv) 成長ホルモンによるプロテアーゼインヒター活性の誘導は生理的濃度で用量依存的に認められ, バイオアッセイの指標としての有用性が示唆された。

v) 組換えヒト成長ホルモンの *in vivo* bioassay の代替法として培養細胞を用いた *in vitro* bioassay 法を確立し, 品質管理試験としての妥当性を検討した (HS財団受託研究費)。

vi) 組換えヒトエリスロポエチン (r-hEPO) を陰イオン交換クロマトで分画し, 等電点の異なる10種の分画を得て, 生物活性と物理化学的性質の相関性を解析した (HS財団受託研究費)。

vii) r-hEPOの活性酸素による *in vivo* 生物活性消失の機構を検討する目的で, *in vitro* 生物活性を測定すると, 処理濃度に依存して活性消失が認められた。単糖組成分析やヒドラジン分解, PA化後の糖鎖パターンの比較ではほとんど変化は認められなかった (HS財団受託研究費)。

viii) 電気化学検出器を用いたイオンクロマトグラフィによる糖タンパク質の単糖組成分析およびオリゴ糖の分析法を検討し, r-hEPOの分析に応用した (HS財団受託研究費)。

ix) マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) レセプターである c-fms タンパクを高度に発現する細胞株を得るため, c-fms プラスミドを増幅し, 精製した (HS財団受託研究費)。

##### 2. 医薬品の有効性と安全性に関する生物化学的研究

i) 多形核白血球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の一環として, ホスファターゼ阻害剤であるカリクリン A の影響について検討を行った。その結果, カリクリン A 処理した好中球の fMLP 刺激による活性酸素生成は, 細胞外 Ca イオンを必要としないことを明らかにした。

ii) 生体関連反応指標の有意性判定に関する研究として、マクロファージの食食能および活性酸素生成活性に及ぼすカリクリン A の影響について検討し、カリクリン A が非常に低濃度で食食にともなう活性酸素生成を阻害することを明らかにした (特別研究)。

3. 生体内活性物質の作用機序と細胞機能に関する研究

i) イヌ腎臓 high-Km アルドース還元酵素の分子多様性について検討し、それに基づいて high-Km アルドース還元酵素のアルドース還元酵素への変換機構を明らかにした。

ii) 糖尿病性網膜症の発症と赤血球アルドース還元酵素量との相関について検討し、糖尿病合併症の薬物療法を最適化するためにアルドース還元酵素量の測定が有意義であることを示唆した (厚生科学研究費補助金, 保健医療局疾病対策課)。

iii) K562 細胞の赤芽球分化過程におけるヘモグロビン産生はトランスフェリンにより調節されることを明らかにした。

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、成長ホルモンによる分化誘導に対するホスファターゼ阻害剤の影響を検討した。

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の一環として、デキサメタゾンによるグルココルチコイド受容体 (GR) のリガンド結合能の誘導は GR 蛋白質そのものの誘導によるものではないことを明らかにした。

vi) 創薬のための微量生理活性蛋白質の探索とその構造解析および機能解析における放射性多重標識化の活用に関する基礎的研究として、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) による前骨髄性白血病細胞の好中球への分化促進に関与する因子について、ラジオマッピング等による解析を行った (国立機関原子力試験研究費, 科学技術庁)。

vii) 食細胞の活性酸素産生系の解明とその調節因子についての研究の一環として、G-CSF による HL 60 細胞の多形核白血球への分化促進作用について検討し、ホスフォリパーゼ D 以外のジアシルグリセロール生成系が G-CSF によって誘導されてくることを明らかにした (HS 財団受託研究費)。

viii) 炎症とサブスタンス P との関係を EIA 法を用いて検討した。

4. 先端技術を利用した生体成分関連医薬品の有

用性確保に関する基礎的研究

i) 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の一環として、ヒト成長ホルモンのループ領域の大きさ, コンフォメーションの異なる変換体を作成し, 活性発現への関与を検討した。

ii) tPA 等の血栓溶解酵素剤による血小板凝集は tPA 等によりプラスミノゲンから生成したプラスミンによることを明らかにし, プラスミンによる血小板の活性化機構について検討した (HS 財団受託研究費)。

iii) プロウロキナーゼの PEG 修飾や糖鎖除去修飾による安定化について検討し, PEG 修飾によってトロンビンやプラスミンに対する抵抗性が上昇し, 血漿中での安定性が改善されることを明らかにし, N 結合型糖鎖はプロウロキナーゼの安定性に寄与しないことが明らかになった (創薬科学総合研究費)。

5. 診断用医薬品に関する基礎的研究

i) 腎診断薬に関する研究として,  $^{99m}\text{Tc}$  サリチルグリシンと  $^{99m}\text{Tc}$  DMSA との比較検討を行った。

ii) 精巣診断薬に関する研究として, トランスフェリン, フェリチンおよびヘモシデリン等における鉄の挙動を検討した。

iii) 体外診断用医薬品の臨床評価に関する研究として, 腫瘍マーカー (AFP) のキット間の変動因子を測定原理, 抗体, 測定条件等より検討した。

## 生 薬 部

部 長 佐 竹 元 吉

### 概 要

前年度に引き続き, 主として生薬の規格・試験法の基礎研究および生薬成分, 天然物有害物質の化学的試験および安全性の試験, 生薬薬理学的研究および薬物動態学的研究を行った。

長寿科学総合研究の老人医療に用いられる生薬・漢方薬についての基礎研究および科学技術振興調整費による総合研究のエイズ等感染・発症制御のための基盤技術の開発に関する研究に参画した。ヒューマンサイエンス振興財団の受託研究では「生薬成分の生体応答」および「培養細胞を用いた電気生理的手法による糖鎖の役割の解明」の基礎研究を行った。検定検査として, 特別審査および漢方エキス製剤の

原料エキス末のエキス含量の一斉取締試験を行った。

海外出張は、関田節子主任研究官が平成5年10月18日から10月26日まで、湖北省の生薬研究者および天津薬物研究院との学術交流のため中国に、また平成6年2月20日から3月6日まで、ブラジル湿潤熱帯研究センターにおける国際協力事業団プロジェクトの巡回指導のためブラジルに、それぞれ出張した。また、鈴木英世室長が平成5年8月1日から28日まで、インドネシアの薬用植物園整備計画に係わる技術指導のためインドネシアに、平成6年3月27日から30日まで農村振興庁作物試験場での学術交流のため韓国に、それぞれ出張した。

研究者および研修員は、下村裕子客員研究員の受け入れを継続し、ペルーのサンマルコス大学の依頼で Flores Julia Diana 氏を、ペルーの生薬の成分の構造決定の研究のために平成5年4月1日から引き続き、1年間受け入れた。

#### 業務成績

##### 1. 特別審査

前年度と同様、生薬または漢方エキス剤を含む製剤(かぜ薬14件)について審査を行った。

##### 2. 一斉取締試験

漢方エキス剤の原料エキス末のエキス含量試験(23件)を行った。エタノールエキス含量が申請値を下回るもの1件を認めた。

##### 3. 調査に関する業務

生薬および生薬製剤の品質に関する調査

日本薬局方および日本薬局方外規格集に収載されている市場の生薬を、日本生薬連合会を中心に収集し、それらの品質について形態的および成分的な検討を行った。

#### 研究業績

##### 1. 生薬および生薬製剤の規格試験の研究

###### i) 生薬および生薬製剤の規格に関する研究

生薬製剤のエキス量測定について医薬品添加物、抽出溶媒、抽出方法の観点から検討し、その問題点の指摘と改善方法を見出した。

###### ii) 生薬の化学的品質評価の研究

ピンロウジのアルカロイド成分定量化の標品調製のため、その一成分 arecaidine の arecoline からの変換合成および生成物の IR および NMR による成分の同定を行った。

##### 2. 植物資源の医薬的利用に関する研究

i) 有用な薬理活性をもつ新たな植物の探索とその利用

ペルー産生薬 *piripiri* の内分泌系に及ぼす影響を検討し、活性の認められたクロロホルムエキスより得られた新規セスキテルペンの立体構造解析を行い、その相対配置を決定した。抗アンドロゲン作用を示す化合物の探索を続行し、*Dalbergia rutusa*, *D. cochinchinensis* より活性物質として新規化合物を含む10種のネオフラボン誘導体ならびに3種のイソフラボン誘導体を単離、構造決定した(HS財団受託研究)。

抗 HIV 活性を持つ薬用植物成分ならびに真菌代謝産物について、活性を増強しかつ細胞毒性を減弱する目的で各種の誘導化を試みた(科技厅エイズ研究)。

自然発症高血圧ラットの血圧上昇に対する降圧活性を検討する目的で七物降下湯エキスを調製し、含有成分の定量を行った(厚生科学研究・長寿)。

##### ii) 薬用生薬の成分検索とその生物活性の研究

妊娠ラットの子宮平滑筋の自動収縮に対する作用が日本産当帰と中国産当帰では異なることを確認し、作用物質の検出を検討した(HS財団受託研究)。

起源の異なる三稜を収集し、それらのうち荊三稜 *Scirpus flaviatilis* の含有成分4種を単離し、betulin については立体構造を検討した。

北海道、東北、北陸、近畿地方に自生する当帰を採集し、系統間による際を形態的、化学的に比較検討した(生活・地域流動研究費、科学技術庁)。

iii) 菌類生薬の活性成分検索と化学的分類に関する研究

中国産紫色馬勃 *Calvatia cyathiformis* の乾燥子実体塩化メチレン抽出エキスより2種の新規ステロイド *cyathisterone*, *cyathisterol* をそれぞれ単離し、その構造を決定した(生活・地域流動研究費、科学技術庁)。

##### iv) 生薬資源の薬理学および電気生理学的研究

カルシトニン遺伝子関連ペプチドおよびエンドセリンの心筋細胞膜イオン電流に対する作用を電気生理学的に解析し、これらペプチドの細胞内作用機序を明らかにした(HS財団創薬研究費)。

心筋細胞表面に存在する糖鎖の構造を糖鎖修飾酵素により修飾し、細胞膜の各種薬物受容体機能およびイオンチャネル機能に及ぼす変化を記録した。病態に伴う糖鎖構造の変化につき、基礎検討を行った(HS財団受託研究費)。

##### v) 漢方製剤の薬学的研究

中国産の硬紫根および軟紫根のエーテル抽出エキ

スに含まれるシコニン、アルカニンおよびアセチルシコニンのラットでの肉芽形成作用におよぼす作用を検討した。これら化合物は用量依存的に肉芽形成促進作用を示し、その効力は若干アルカニンが弱かったが、ほぼ同程度の効力を示した、この肉芽形成促進作用の発現には、これら化合物の光学異性による相違は影響が少なく、また、化学構造でシコニンおよびアルカニンの水酸基がアセチル化しても（アセチルシコニンの化学構造）影響が少なかった。

臨床で、解熱、鎮痛および抗炎症作用を目的として使用されている漢方処方、麻黄湯、葛根湯、葛根黄連黄芩湯、排膿湯および千金鶏鳴散の水抽出エキスの経口投与によりマウスでの酢酸誘発色素透過性の亢進の抑制、ラットでのカラゲニン誘発浮腫の抑制、綿球誘発肉芽形成の抑制などによる抗炎症作用が認められた。

#### vi) 生薬の薬物動態学的研究

マオウ含有アルカロイドのひとつである (-)-ノルエフェドリンおよびその光学異性体の血清蛋白質、組織蛋白質に対する結合の検討を行った。結合に立体選択性は認められず、分布の立体選択性に、これらの蛋白質に対する結合の関与はないものと考えられた。

#### vii) 生薬資源の保存と保護に関する研究

ガジュツ、キキョウ、センキュウ、ハトムギ、ベニバナの5品目を収載した薬用植物栽培・品質評価指針 Part 2 を作成、出版した（厚生科学研究・品質評価）。

国内外に自生する薬局方収載生薬の基原植物の分布図作成を目的として、大学、博物館、植物園所有の標本を検索しデータの作成を行った（厚生科学研究・保存と保護）。

### 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検討

薬用資源生物の保存と保護を図り、真菌の保存方法を検討するために *Emericella nidulans* の成分を精査した（厚生科学研究・保存と保護）。

## 療 品 部

部 長 中 村 晃 忠

### 概 要

中国薬品生物製品検定所・Xi Tingfei 博士は2年

2ヶ月間のHS流動研究員としての研究生活を終えて、1993年8月に帰国した。

厚生省薬務局医療機器開発課の諮問機関である医療機器政策検討会は、1993年10月1日に報告書を提出し、医療用具のクラス分けと、それに伴う規制体制の大幅な見直しを提言した。また、監視指導課は設計管理をも含めた新しい医療用具GMPを決定した。これらは、療品部の業務に少なからぬ影響を持つと予想される。

### 業務成績

#### 1. 家庭用品関係

試験計画に従って、次の試験を実施した。

分析法作成：4-isopropyl-3-methylphenol, Tinuvin P, Tinuvin 326, dibutylthiourea, dilaurylthiourea

細胞毒性試験：methyl-N-(2-benzimidazolyl) carbamate, 2-mercaptobenzimidazole, N-1, 3-dimethylbutyl-N'-phenyl-p-phenylenediamine, 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone

#### 2. 標準化と国際調和

ISO/TC194「医療用具の生物学的評価」全体会議を日本で開催する（1994.1.18～20, 横浜）ことになり、当部全員がその準備と運営を担った。医療用具関係のISO会議の主催としては日本で最初である。その他、以下の集會に出席して情報交換、相互理解などに務めた：ISO/TC194/WG11「エチレンオキサイドなどの滅菌残留物」(Mineapolis, 1993.9, 中村)；ISO/TC198「ヘルスケア製品の滅菌」(オタワ, 1993, 新谷)；同(Bilthoven, 1994.4, 新谷)；第4回グローバル医療機器会議（東京, 1993.10, 中村）。

3. 日本歯科医師会・歯科材料検討委員会の「歯科材料の評価基準」作成に協力した。

4. 医療用具関係ISO/TC（国際標準化機構・技術委員会）の国内検討委員会への関与：次のTC国内検討委員会へ参加している：TC194「医療用具の生物学的評価」；TC198「ヘルスケア製品の滅菌」；TC150「外科用インプラント」；TC157「避妊用具」など。

### 研究業務

#### 1. ポリウレタンの生体内変化に関する研究

*in vivo* でポリウレタン表面上に起こった変化（初期のオリゴマー溶出による分子量増加と後期のソフトセグメントの消失を伴う分子量低下）は、*in vitro* でメタノール洗浄することで再現できること



が判明した。生体内劣化の機構を考える上に有益な知見と思われる(厚生科学研究費補助金)。

## 2. 血液に接する医療用具に使用される放射線滅菌と揮発性物質に関する研究

医療用具を放射線滅菌したとき、高分子材料が分解する可能性がある。放射線に対する安定性は、通常は、照射後の材料を種々の手段で調べることで評価されているが、この手法では、起こった小さな変化が未変化の材料の情報に埋もれて検出できないことが多い。そこで、分解断片としての揮発性物質を分析して追跡することを考えた。まず、ポリメチルメタクリレート (PMMA) からのメチルメタクリレート (MMA) の生成について検討した(国立機関原子力試験研究費)。

## 3. ラテックス・ゴムによるI型アレルギーに関する研究

表題のアレルギーの抗原を決定することをめざしている。天然ゴム手袋からの水溶性蛋白質のSDS-PAGEには幾つものバンドがみられるが、どんなゴム製品にも共通にみられるバンドは少ない。27 kdのバンドは比較的共通性のあるものの一つである。これがリゾチーム活性を有する樹木の防禦を司る蛋白質の一種であることを明らかにした。

## 4. 歯科用レジンの安全性に関する研究

義歯床 PMMA 系レジンの安全性に関連して、義歯床中の MMA モノマーの分析法の妥当性が問題となった。ISO/TC106 推薦のガスクロマトグラフ (GLC) 法と我々が開発した液体クロマト (HPLC) 法とを比較し、HPLC 法が優れていることを示した(厚生科学研究費補助金)。

## 5. 医用材料の細胞毒性試験に関する研究

細胞毒性試験用陽性対照材料の標準化をめざしている。Zinc diethyldithiocarbamate (ZDEC) を添加したポリウレタンのキャスト溶媒としての tetrahydrofuran (THF) の品質が、陽性対照材料の毒性の強さの再現性におおきく影響することを確認した。また、17種の材料について、材料上への細胞接着性とコロニー法による細胞毒性試験を行い、*in vivo* の組織刺激性との関係を調べた。組織刺激性は細胞毒性強度と相関するが、接着性とは相関しないことが分かった。

## 6. 遅延型アレルギー試験法の確立に関する研究

Tinuvin P などの benzotriazole 系化合物の感作性と交差反応性について、高感度マウスリンパ節試験法(当部で開発)と mouse ear swelling test (ME-

ST) を用いて検討した。Tinuvin P のみに感作性を認め、その感作動物は他の benzotriazole 系化合物とは交差反応を示さないことが明らかになった。この結果は、maximization 法の結果と一致しており、高感度リンパ節試験法の有用性が確認された。

## 7. 金属材料による遅延型アレルギー発現モデルに関する研究

昨年度の予備実験をもとに、Fe-Cr 合金の皮下埋植によるラットの感作の本実験を行った。Cr 組成が 10~30%の合金によってラットの Cr による感作が成立したが、Cr 含量がこれより少なくても多くても感作は成立しなかった。また、Cr 15%、20%の合金を埋植したラットの尿中への Cr 排泄量が増加することが分かった。しかし、リンパ球の刺激応答性にはどの組成の合金でも変化は見られなかった(厚生科学研究費補助金、病理部、東京医科歯科大学と協同)。

## 8. 人工臓器の新滅菌法に関する研究

過酸化水素蒸気による滅菌法の導入が模索されている。滅菌後の材料の細胞毒性は材料に残留する  $H_2O_2$  によるものであり、残留性は材料の種類によって大きく異なることが分かった(新医療技術開発研究費)。

## 9. 高分子材料による MFH の素因の解析と短期検索法の開発

ポリウレタン (PU) シートをラット皮下に埋植すると、その局所に malignant fibrous histiocytoma (MFH) が発生し、その率は PU の種類によって異なる。また、シリコン (SL) の MFH 発生率は PU より有意に低いことが分かっている。そのような差が細胞の恒常性維持や情報連絡に関係する細胞間連絡協同の阻害活性に起因しているのではないかと、との仮説から各種材料およびその構成成分の細胞間連絡協同阻害活性を調べた結果、材料の動物実験の評価点と *in vitro* の阻害活性に相関があることが明らかになった。また、PU の構成モノマーの中で poly (tetramethylene oxide) が最も阻害活性が強かった。ポリエーテル構造を持たない PU は阻害活性を示さなかったため、PU による MFH 発生は溶出または分解物中のポリエーテル・ソフトセグメントの細胞間協同阻害による可能性が高い (HS 受託研究)。

## 10. 家庭用品による接触皮膚炎の原因究明に関する研究(家庭用品等試験検査費)

分析とパッチテストを組み合わせて以下の事例の

解明に取り組んだ。判明した原因製品と原因化学物質を列記する（名古屋大学、東邦大学などと協同）。

1) 膝補強具のアンダーカバー：p-tert-butylphenol formaldehyde resin (PTBP-FR)

2) 革製サンダル：PTBP-FR

3) イアリングのゴム部分：2-mercaptobenzothiazole (MBT) および dibenzothiazyl disulfide (MBTS)

4) 作業用ゴム手袋：zinc dimethyldithiocarbamate (ZDMC)

5) ネル寝間着：naphthol AS

6) 下着（ポリエステル）：polyethylene terephthalate oligomer (cyclic dimer)

11. ポリエステル・オリゴマーの感作性に関する研究

動物モデルを用いてポリエステル・オリゴマーの構造と感作性強度との関係、および交差反応性について調べている。

12. 防水スプレー吸入による呼吸器系障害（中毒）の原因究明に関する研究

主としてスキーシーズンに防水スプレーでスキーウェアを防水した際に、呼吸困難や咳、などの症状を呈する急性の中毒事故が多発したので、その原因と製品改良対策を研究した。研究は、商品情報の調査、中毒情報センターへの事故報告の調査、動物実験、撥水剤成分の分析、噴射粒子の粒度分布および附着性試験などを総合して考察した。その結果、溶剤、噴射剤、噴射圧、ノズル、その他の因子が総合的にからみあった結果として肺胞まで到達可能な微粒子の率が高い商品の場合に事故が多いことが分かった。症状はそうして肺胞に到達したフッ素系撥水剤によって呈したものである。安全な製品の開発には、粒度分布管理、附着性管理、製品の動物実験を行う必要がある（厚生科学研究費補助金、中毒情報センター、筑波大学医学部、産業医学総合研究所などと協同）。

13. 滅菌保証における統計的問題に関する研究

バイオリジカル・インジケーター(BI)を用いて行う滅菌条件決定法の妥当性は、医療用具の滅菌保証上の国際的な争点にもなっている。Limited Spearman Karber Procedure, Stumbo Murphy Cochran Procedure (SMCP), Most Probable Number Method (MPN) をシミュレーションと実験によって比較し、SMCPの妥当性を検証した (ISO/TC 198 国内検討委員会と協同)。

14. 情報理論の分析化学への応用に関する研究

従来、分析条件の最適化は経験的な関数を用いて行われてきたが、我々は情報理論から導かれた理論に基づいて統一的に扱えることを示してきた。その一貫として、シャノンの相互情報量とカルマンフィルターの理論より導いた式 (FUMI) を用いて液体クロマトグラフィーとキャピラリー電気泳動の測定条件の最適化を行った。

## 環境衛生化学部

部長 安藤 正典

## 概 要

生活環境分野では、室内空気関連において各種の空気汚染物質の分析方法の検討、汚染物質の個人暴露量の測定方法と暴露量の推定を行った。飲料水関連においては新たな水道水質基準の元で水質試験が実施されるのに伴い、水質検査方法の周知徹底の作業を行うとともに、検査体制の整備のための技術的支援を検査機関に対して行った。また、水中に生成する化学物質の安全性評価手法の開発を行った。

化粧品、医薬部外品は、薬事法で規制されている。この規制に関連してそれらの品質や安全性の確保および有用性の評価に関する業務を行った。品質確保においては「化粧品原料基準外成分規格」「医薬部外品原料規格」および「医薬品添加物規格」の作成について薬務局審査課に協力した。さらに、アスコルビン酸およびその誘導体を含有する医薬部外品のパウダーの一斉取締試験および育毛剤に係わる特別行政試験を実施した。また安全性および有用性に関しては経皮吸収、紫外線吸収剤の評価に関する研究も行った。

## 業務成績

### 1. 空気関係

前年度に引き続いて、東京都内3カ所の国設自動車排出ガス測定所において、各種自動計測器を用いて大気汚染物質（一酸化炭素、一酸化窒素、二酸化窒素、二酸化硫黄、オゾン、ホルムアルデヒド、メタン、非メタン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) 一斉取締試験

アスコルビン酸およびその誘導体を含む医薬部外

品パウダー 11 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

化粧品の品質確保のため、原料の規格を作成した (30 品目) (薬務局審査課)。

3) 化粧品原料基準外成分規格 (粧外規) の作成  
「粧外規」は昭和 61 年から定められてきたが、昨年は全面改訂および「化粧品原料基準外成分規格 (1993) およびその追補」の作成に協力した (薬務局審査課)。

## 4) 医薬部外品原料規格追補の作成

医薬部外品原料規格追補およびその 2 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水道事業対の協力の基に実施した (生活衛生局水道整備課)。

### 2) 測定方法の開発

水道水質基準の改正に伴う検査方法の開発を行った (生活衛生局水道整備課)。

### 3) 原水法への対応

原水法への対応としてのトリハロメタン生成有機物指標の考え方と検査方法について検討した (生活衛生局水道整備課)。

### 4) 水質基準の基礎資料

除草剤 CNP の安全性評価、水道水質基準への対応および検査方法の検討を行った。(生活衛生局水道整備課)。

## 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) 学校環境衛生に関する調査研究

東京都内の高等学校の教室において、呼吸器疾患の原因物質として知られている二酸化窒素、ホルムアルデヒドおよび換気の指標でもある二酸化炭素について、その実態を調査し、学校環境基準の達成率の実態を調査した。さらに、最近注目されている有機塩素系化合物の一つでもある 1,1,1-トリクロロエタン (TCE)、テトラクロロエチレン (PCE) および *p*-ジクロロベンゼン (DCB) 等の教室内外の実態を調査し、基準設定作成のための基礎資料の蓄積をはかった。

2) 喘息および発がん関連危険因子のヒト暴露量に関する調査研究

#### i) 酸性物質の暴露量調査

東京都内の集合住宅に居住する主婦を対象に、ギ酸の暴露量の実態調査 (夏期と冬期) を行った。さらに、他の汚染物質および環境因子との関連性を検討した。

ii) 揮発性有機塩素化合物の暴露量に関する調査研究

東京都内に在住する高校生 (20 人) およびその保護者 (20 人) を対象に、TCE、PCE および DCB の個人暴露量の実態調査を行った。同時に室内調査も行い、暴露量に及ぼす関連性を検討した。

## 2. 空気中の汚染物質の分析法に関する研究

1) 呼吸器疾患に関連する汚染物質の分析法の検討

粒子状ヒドロキシメタンスルホン酸およびホルムアルデヒドの高速液体クロマトグラフを用いた測定法について検討した。

2) 揮発性有機塩素化合物のパッシブサンプラー法の検討

TCE の簡易測定を目的として、四フッ化エチレン樹脂製のチューブを拡散層、捕集剤に Tenax GC を用いたパッシブサンプラーの検討を行い、実用性を明らかにした。

3. 化粧品用界面活性剤・油脂等の規格整備に関する研究

化粧品に用いられる界面活性剤・油脂について赤外吸収スペクトルを有効に利用する方法を検討し、規格作成整備を行った (厚生科学研究費補助金、東京都立衛生研究所と共同)。

4. 化粧品品の品質確保のための配合成分の相互作用に関する研究

製剤の品質保証等に関連しアラントイン配合化粧品品の試験法の確立および安定性に関する研究を行った。さらに酵素含有洗顔料について界面活性剤のフォリン試薬を用いる呈色反応に与える影響および配合成分の相互作用の基礎的検討を行った (厚生科学研究費補助金、東京都立衛生研究所と共同)。

## 5. 化粧品原料の品質試験法に関する研究

化粧品原料の品質や安全性を確保するために原料の試験は重要であるが、最近、安全性が高く、環境への影響を配慮した試薬を用いるクリーンアナリシスの重要性が叫ばれている。これに関する調査や、油脂のヨウ素価測定法の改良等に関する研究を行った (厚生科学研究費補助金、東京都立衛生研究所、北里大学と共同)。

## 6. 化粧品品の安全性評価法に関する研究

### 1) 化粧品安全性を予測する評価技術に関する研究

昨年度に引き続き、Franz型拡散セルにモルモットの腹部の剥離皮膚を用い、界面活性剤の剥離皮膚に与える影響を透過指標物質としてメチルパラベンおよびサリチル酸を用いて検討した(国立機関原子力試験研究費、科学技術庁)。

### 2) 太陽紫外線の生体影響とその防御に関する研究

ヘマトポルフィリン類のUVA増感が赤血球膜脂質および溶血に及ぼす影響を*in vitro*で検討した。さらに紫外線吸収剤を添加し溶血への影響を検討した(HS財団受託研究費)。

### 7. 水道用薬品または水道用品に関する研究

水道用コンクリート塗料として使用されるビニル樹脂などの塗料の規格設定のための安全性評価とその測定方法を確立した(生活衛生局水道整備課)。

### 8. 水道水の安全性評価に関する研究

#### 1) 水域環境におけるダイオキシン等非意図的有害物質の生成機構と安全性評価に関する研究

水中に含まれる非有害物質の塩素処理による非意図的有害物質の生成の可能性、その生成機構およびチトクロームP-450IA1による安全性の評価を行い、トリクロロダイオキシンでも強い生物活性を有することを認めた。さらに、pptレベルの超微量測定方法の確立などの研究を行った(環境庁企画調整局)。

#### 2) 発がん性物質による環境汚染と生体影響の定量的解析

水道水に混入する有機塩素化合物等の発がん性物質のリスク評価手法の確立のためラット肝薬物代謝酵素のアイソザイムによる特異性について研究した。

#### 3) 利水過程における農薬等化学物質の動態および分解生成物等の評価に関する研究

公共水域に確認される農薬類および分解生成物の初代ラット肝細胞を用いた生物活性について検討した(環境庁企画調整局)。

### 9. 水質試験方法の開発に関する研究

#### 1) 揮発性有機化合物の一斉分析方法の改良に関する検討を行った(生活衛生局水道整備課)。

#### 2) 農薬の固相抽出方法の開発を行った(生活衛生局水道整備課)。

## 食 品 部

部長 斎藤 行生

### 概 要

平成5年我が国は、作況指数75という米の凶作に見舞われ、オーストラリア、中国、タイおよび北米より米の輸入が開始された。ほぼ10年前(昭和59年)、我が国は韓国より米を輸入した経験がある。当時は彼の地で使用されている農薬についての情報が全くなく、見当をつけて多数の農薬等を食品部、総出で分析し、難局を切り抜けた。現在では、検査所における輸入食品の検査体制が確立され、さらに農薬に関する有用な情報が比較的容易に入手できるようになり、以前に比べると余程能率的な検査が行えるようになった。食品衛生に関する情報の活発な動きに対応し、食品部の業務遂行上の仕組みも少しずつ新たな方向への転換を迎えようとしている。本年度は昨年度に引き続き農薬の一般分析法の開発、照射食品の判別法、合成抗菌剤の一斉分析法の開発、有機スズ化合物に関する研究および種々の知見のまとめ等を継続して行うことになっている。

平成5年度には人事面の動きがあった。先ず、松田りえ子主任研究官は、併任官(平成5年6月1日付発令)として大臣官房厚生科学課において国立研究機関業務と厚生行政機関業務との間のレギュレーターとしての7ヶ月に及ぶ職責を果たし、平成6年1月1日付食品部第一室に完全復帰した。また、穂山 浩技官が平成5年7月1日付で千葉大学薬学部(大学院博士課程修了)より着任し、食品部第三室に配属され、マイコトキシン等食品中の有害微量成分に関する衛生化学的研究に従事することとなった。また、村山三徳技官は科学技術庁の長期在外研究員として1年間テキサス工科大学(Department of Chemistry and Biochemistry, Texas Tech. University, ダスグプタ教授)に出張していたが、ニトロ多環芳香化合物の微量分析に関する研究を終えて無事帰国した(平成5年1月10日~平成6年1月9日)。高木加代子技官(食品部第二室)は長年にわたり、主として食品中の有害成分の微量分析法の開発に従事し数々の業績をあげたが、この度一身上の理由により退職した(昭和60年4月大阪支所食品部、昭和61年4月~平成6年1月31日日本所食品部)。豊田正武第三室長は、遺伝子組換え食用作

物のアレルギー性に関する会議出席のためアナポリス(米国)へ出張した(平成5年4月17日~21日)。

#### 研究業績

##### 1. 食品中の有害物質に関する事項

###### ① 食品中の残留農薬の分析

###### 1) 輸入牛肉中の有機塩素系農薬の分析

従来の分析法に改良を加えより簡便な分析法を考案した(厚生省生活衛生局食品化学課)。

###### 2) 輸入牛肉中の有機リン系農薬の分析

油脂量の多い試料中の有機リン系農薬の一斉分析法について検討を加えた(厚生省生活衛生局乳肉衛生課)。

###### 3) ガスクロマトグラフィによる食品中の臭素の分析法に関する研究

調理食品中の臭素のGCによる分析法の検討を行った(厚生省生活衛生局食品化学課)。

###### 4) 保存検体中の残留農薬実態調査

調理食品中の残留農薬の分析法の検討を行うとともに、摂取量実態を明らかにした(厚生省生活衛生局食品化学課)。

###### 5) トウモロコシの保存および加工による収穫後使用農薬の減衰に関する研究

トウモロコシに付着残留した農薬の減衰パターンを明らかにし、残留農薬の安全性についての衛生行政上の基礎資料を提供した(厚生省生活衛生局食品化学課)。

###### 6) 流通農作物中の残留農薬実態調査

2, 3の代表的な農薬の残留実態の経年変化について調査した(厚生省生活衛生局食品化学課)。

###### 7) イベルメクチンの分析法

従来の分析法を追試するとともに、問題点を明らかにし、分析法を改良した(厚生省生活衛生局乳肉衛生課)。

###### ② 輸入雑豆中のアルカロイド

###### 1) Lupinus Angustifolius中の有毒アルカロイド含量について

オーストラリアより試験用に輸入したルピン豆の総アルカロイドの分析を行った(厚生省生活衛生局食品保健課)。

###### 2) オーストラリア産ルピン豆中のアルカロイド含量について

ルピン豆中の有毒アルカロイドの分布について検討を加えた(厚生省生活衛生局食品保健課)。

###### ③ 有機スズ化合物の海域環境中における動態の解明(国立機関公害防止等試験研究, 環境庁)。

###### ④ 第二種特定化学物質暴露調査

TBTO, TPTおよびトリクレンの食品経路摂取量の経年変化を調査した(厚生省生活衛生局生活化学安全対策室)。

###### ⑤ 食品中のダイオキシン類汚染実態調査研究

卵および魚介類中のダイオキシンおよび関連化合物の実態を調査した(厚生省生活衛生局乳肉衛生課)。

###### ⑥ 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

トポソメレースを用いる食品成分の抗がん性および発がん性について検討した(対がん10ヶ年総合戦略事業)。

###### ⑦ 穀類中のオクラトキシンの分析

穀類中のオクラトキシンの汚染実態について文献上の調査を行った(厚生省生活衛生局乳肉衛生課)。

##### 2. バイオテクノロジー応用食品に関する事項

###### ① バイオテクノロジー応用食品等の安全性評価に関する研究(厚生省生活衛生局食品保健課)

###### ② バイオテクノロジーを用いる乳酸菌の殺虫性発現について(HS財団受託研究)

##### 3. 汚染物モニタリングと情報

① 全国から集められたモニタリング情報は150万件以上に達した。得られたデータの一部は衛生行政のためにアウトプットし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10機関のデータの解析を行った。これらのデータの一部はWHOにも送付された(厚生省生活衛生局食品保健課)。

② 輸入食肉・養殖魚介類中の残留有害物質モニタリングのための制度管理(厚生省生活衛生局乳肉衛生課)

##### 4. 化学物質の生体影響

イガイを用いる有機スズ化合物の排出と蓄積についてフィールド研究を行い、食品および環境における有機スズ関連化合物の動態を明らかにした(国立研究機関公害防止等試験研究, 環境庁)。

#### 食品添加物部

部長 山田 隆

#### 概要

当部の主要業務である化学的合成添加物、化学的合成品以外の添加物、器具・容器包装等に関する試

験、研究業務に加えて、化学的合成品以外の食品添加物リスト（第二版）の作成に協力している。また、遺伝子操作技術等を利用した食品添加物の安全性評価のための分離分析に関する研究をヒューマンサイエンス振興財団の受託研究として行っている。

平成6年1月より8月まで、合田幸広主任研究官が大臣官房厚生科学課の併任官として厚生省に赴任した。石綿 肇室長が「タイ国食品衛生強化プロジェクト」の事前調査のためタイ国公衆衛生省医科学局および食品・医薬品局等に出張した（平成6年1月10日～1月21日）。

#### 業務成績

##### 1. 規格・基準の作成

(1) 衛生研究所、厚生省指定検査機関の協力の下に、オルトフェニルフェノールおよびそのナトリウム塩、ジフェニル、チアベンダゾール、サッカリンについて食品中からの分析法の検討を行った（食品添加物使用基準点検整備費，生活衛生局食品化学課）。

(2) 第七版食品添加物公定書作成の準備のため、第六版食品添加物公定書の問題点について整理した（食品添加物使用基準点検整備費，生活衛生局食品化学課）。

(3) 「第二版化学的合成品以外の食品添加物リスト」作成のために、各天然添加物の成分についての文献調査を実施し、さらに問題点の検討を行った。

(4) 天然添加物中の有機性不純物の分析法について検討し、製剤化時に添加された物質の妨害についても調べた。

(5) 医薬品添加物規格1993追補の作成（薬務局審査課），医薬品添加剤規格の国際調和（薬務局安全課，審査課），環境測定分析統一精度管理調査（環境庁企画調整局），水質環境基準検討調査（健康項目）などに協力した。

(6) 漆器からの鉛およびカドミウムの溶出について検討を行った（食品等規格基準設定費，生活衛生局食品保健課）。

#### 研究業績

##### 1. 食品添加物等の規格基準設定に関する研究

###### 1) 化学的合成添加物

(1) 食品添加物の1日摂取量に関する調査研究—B群食品添加物の摂取量（厚生科学研究費，生活衛生局食品化学課）。

(2) 鉄強化加工食品の二価、三価鉄分析法を開発し、市販食品中の鉄の定量に応用したところ、三価

鉄として添加された加工食品中で、二価鉄として検出されるものがあった（食品添加物安全性再評価費，生活衛生局食品化学課）。

###### 2) 化学的合成品以外の食品添加物

(1) カラメル色素の製造時に亜硫酸化合物を添加するカラメルIVについて、市販製品中のイオウの分布を、ゲルろ過カラムを装着したHPLC-ICP法を用いて調べた（厚生科学研究費，生活衛生局食品化学課）。

(2) カラギナンの規格としての硫酸基含量の分析に、真空型ICP発光分光法を応用し、従来の硫酸バリウム重量法とよい相関を得た（食品等規格基準設定費，生活衛生局食品保健課）。

(3) 天然着色料のうち、類別名としてアントシアニン色素が使える色素につき、それぞれがHPLCで識別可能か否かを検討した結果、特定が難しい色素も数種みつかった（食品等規格基準設定費，生活衛生局食品保健課）。

(4) ベニバナ黄色素の主色素成分の構造を、600MHz NMRを用いて決定した。

(5) 市販ベニバナ黄色素の主色素の分析を行い、標品として使用する際の、最良の製品を選択した（厚生科学研究費，生活衛生局食品化学課）。

###### 3) 間接添加物

(1) ポリカーボネート樹脂に含有される、原材料であるビスフェノールAおよびジフェニルカーボネート、ならびに重合調節剤であるフェノールおよび*p-t*-ブチルフェノールのグラジエント溶出を用いた液体クロマトグラフィーによる同時分析法を確立した。また触媒であるトリエチルアミンおよびトリブチルアミンのアルカリ熱イオン化検出器付キャピラリーガスクロマトグラフィーによる分析法を確立した（食品添加物安全性再評価費，生活衛生局食品化学課）。

(2) 熱発光を用いた照射香辛料の検知法について検討を行い、鉍物質抽出法、特に二次照射を用いた方法が有用であることを明らかにした（国立機関原子力試験研究費，科学技術庁）。

(3) Half-embryo testが照射リンゴや照射サランボの検知法として適用可能であることを明らかにした。

##### 2. 食品添加物等の安全性に関する研究

(1) 慢性毒性用飼料中に添加したシナムアルデヒドの安定性について試験を行った。0.2%あるいは0.4%を添加飼料を暗所室温で保存したところ、

1週間で約20%、1ヶ月後では約50%の減少が認められた(食品添加物安全性再評価費, 生活衛生局食品化学課)。

(2) 不許可保存料であるメチルパラベンの分析法を開発し、ローヤルゼリーに応用したところ、20~30 ppm 認められた。これは、養蜂業者により巣箱から直接採取されたローヤルゼリー中にも同程度の濃度で存在し、天然由来であることを明らかにした(厚生科学研究費, 生活衛生局食品保健課)。

(3) 慢性毒性用飼料中に添加した乳酸鉄の鉄の安定性について試験を行った。0.2%あるいは5%の添加飼料を暗所室温3日間保存で、二価鉄含量に変化はなく、1%、2%添加飼料を暗所、4℃、3ヶ月間保存後でも飼料中乳酸鉄の二価鉄含量に変化はなかった(食品添加物安全性再評価費, 生活衛生局食品化学課)。

(4) 天然着色料アカネ色素に含有される直接変異原物質ルシジンの活性メカニズムを解明するため、ヌクレオシドおよび核酸塩基付加体の単離を検討し、アデニンとの付加体2つ、グアニンとの付加体1つについて構造を決定した。

(5) 塩化カドミウム反復投与後の腎中カドミウム濃度と肝障害の関係を、一回投与で肝障害を起こしやすいBALB/cを含む3系統のマウスを用いて検討した(環境庁委託)。

(6) マルトールおよびコウジ酸の共存によるアルミニウムの体内挙動の変化を検討した(食品添加物安全性再評価費, 生活衛生局食品化学課)。

(7) ホウロウ引き製品について、鉛およびカドミウムの溶出に関する基礎的研究ならびに人体暴露量の推定等を行った(厚生科学研究費, 生活衛生局食品保健課)。

3. 遺伝子操作技術等を利用した食品添加物の安全性評価のための分離分析に関する研究

(1) セイヨウアカネ培養根の培地中にストレスとして銅イオンを添加し、アントラキノン系色素産生に及ぼす影響について検討した(HS財団受託研究費)。

(2) 植物培養細胞中に金属により誘導されるフィトケラチン様物質について、その構造を調べ、 $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}(n=2-5)$  および  $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n$  ( $n=2-4$ ) と同定した(HS財団受託研究費)。

(3) 辛味のあるトウガラシ2品種について、胎座中の辛味成分含量を、超臨界流体抽出/超臨界流体クロマトグラフィーおよびHPLC法により分析し、

両者の相関性を明らかにした(HS財団受託研究費)。

(4) トウガラシの辛い品種と辛くない品種について、胎座中の辛味成分および芳香族前駆体含量の、開花後の経時変化を調べた結果、胎座以外の場所で生合成された前駆体が胎座に運ばれ、そこで最終的にカプサイシン等の辛味成分に生合成される可能性が示唆された(HS財団受託研究費)。

(5) 形質転換植物培養細胞中に含まれるオパインの1種ククモピンについて、高純度のを合成した。変異遺伝部により、その倍数体誘発性はほとんどないことが明らかとされた(HS財団受託研究費)。

## 有機化学部

部長 宮田直樹

### 概要

平成5年度の研究業務として、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、等を行った。近年、光学活性医薬品の開発、特に、racemic switchと呼ばれる既存ラセミ医薬品の光学活性化による新規医薬品の開発が製薬企業の主要研究課題の一つになっており、光学活性化合物を高選択的に効率よく合成するための新規有用反応の開発が注目されている。栗原正明主任研究官らは、安価な酸化剤であるオキシソンをを用いた立体選択的酸化反応を研究し、活性酸素種ジオキシランによる立体選択的エポキシ化反応を開発した。本合成法は、医薬品や生理活性物質を立体選択的に合成する上で有用な反応として実用化が期待できる。末吉祥子室長、丹野雅幸主任研究官らは、昨年度に引き続き生体内でNOを発生する化合物の開発研究を行い酸化活性化を経由してNOを発生する新規化合物を見いだした。宮田直樹部長は、総理府技官を併任(平成5年度)し、科学技術庁放射線医学総合研究所薬理化学研究部において省際基礎研究「活性酸素に対する新しい生体内防御物質に関する研究」を行った。また、米国Columbia大学Still教授から、化学計算プログラムMacro-modelを導入し、生体制御物質の分子設計研究への利用を開始した。平成3年度より、薬品部、生薬部、食品部、療品部、

環境衛生化学部等と共同で、特別研究「医薬品の適正な評価を志向した光学異性体に関する基礎研究(第一次)」を実施してきたが、引続き平成6年度から第2次の研究を開始した。

人事面では、中嶋(山越)葉子技官が、「生体制御物質の立体選択的精密合成に関する研究」を行うため、富山医科薬科大学薬学部薬用資源学研究室(小泉徹教授)に科学技術庁国内留学生として出張中である(平成6年5月1日より11ヵ月の予定)。

平成5年度予算により、厚生省試験研究機関共同利用大型機器として、傾斜磁場型600MHz核磁気共鳴装置が導入され、佐藤由紀子非常勤職員が共同利用管理業務を行っている。既存の所内共同利用機器400MHzおよび300MHz核磁気共鳴装置の管理は、引続き福原潔技官らが行った。

平成5年度、有機化学部主催の特別講演会として、「膜界面におけるホスト-ゲスト認識と化学センシング(東京大学薬学部:小田嶋和徳助教授)」、「人工化合物による酵素活性化とDNA切断(京都大学化学研究所:大塚雅也助教授)」、「チトクロームP-450モデル研究の新しい展開(東京大学薬学部:廣部雅昭教授)」を開催した。

## 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) 医薬品の適正な評価を志向した光学異性体に関する基礎研究:光学異性体の高選択的合成法を検討し、触媒量のTMSOTf存在下、光学活性ジオールとアルコキシシランを用いた簡便かつ効率的なアセタール合成法を開発した。本方法は、種々のケトンおよびアルデヒドに適用可能である(特別研究費)。

2) 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及ぼす影響に関する研究:依存性薬物とレセプターとの相互作用を解析することを目的として、モルヒネ骨格の修飾を行い、新規の尿素およびチオ尿素誘導体を合成した。また、モルモット回腸縦走筋を用いてオピオイドレセプターに対する作用を調べた結果、これらの化合物はモルヒネと同じレセプターに作用し、モルヒネの1/3~1/100程度の効力を示すことが明らかになった(乱用薬物基礎研究費)。

3) 活性分子種を用いた合成技術の開発:炭素ラジカル種を用いた立体選択的炭素-炭素結合反応を開発することを目的として、モデル実験として分子

間反応を行い、基礎的な知見を得た。これに基づき、含窒素複素環の閉環反応を検討した(科学技術振興調整費)。

4) 生理活性物質におけるラジカル活性種の生成と反応に関する研究:生体内でNOラジカルを発生する化合物の開発研究を目的として各種の官能基について検討し、トリアゼノアミドキシム誘導体が、酸化活性化を経てNOラジカルを発生することを見出した。この化合物のNO発生量は、当部で合成した自発生型のN-ニトロソ化合物に及ばないが取り扱いが容易であり、NO発生量を増加させるために構造修飾を検討している(一般研究費)。

5) ジオキシランによる立体選択的酸化反応の開発に関する研究:種々のケトン由来のジオキシランを用いて、オレフィンの立体選択的エポキシ化反応を検討した結果、シクロヘキセン類において高いトランス選択性で立体選択的エポキシ化が進行することを見出した。また、ケトンの構造と選択性の相関も明らかにした(文部省科学研究費)。

### 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:ハロゲン化ハイドロキノンおよびカテコール類のP450モデル系における酸化反応および電気化学的酸化を検討し、一電子酸化反応を経由するハロゲン化フェノールの代謝機構を解析した(対がん10ヵ年総合戦略研究費)。

2) 新規環境汚染物質、ニトロアザレーンの合成と毒性発現機構の有機化学的解析:アザフェナンスレンのモノ、ジおよびトリニトロ体を合成し、これらの化合物の化学的性質と変異原性を調べ、構造活性相関を明らかにした(文部省科学研究費)。

3) クロノクロメトリー法を用いた活性酸素ラジカルの発生と消去反応の解析:クロノクロメトリー法を用いて、キノンおよびニトロアレン類によるスーパーオキシドの消去能を明らかにし、酸化還元特性との相関を解析した(文部省科学研究費)。

### 3. 薬物と生体分子の相互作用の解析に関する研究

1) 生体制御反応の設計と機能解析への応用:科学計算手法を用いて二重鎖DNAと相互作用する薬物分子の構造設計と相互作用様式の解析を行った。さらに、それらの結果に基づいて、二重鎖DNAと相互作用する化合物の合成法を検討した(科学技術



振興調整費)。

2) フラーレンの生体に及ぼす影響に関する研究：フラーレン類の生体に及ぼす影響を明らかにするための基礎的研究として、C60 および C70 の水溶化法について検討し、界面活性剤ポリビニルピロリドンを用いた時、最も高濃度で可溶化できることを見出した。さらに、これらの水溶液を用いて溶血試験を行い、本方法で調製した試験液が生物試験に適用できることを明らかにした(文部省科学研究費)。

以上の研究は、伊東幸子学士、宇賀神正代学士、山木元生学士(共立薬科大学有機薬化学教室：望月正隆教授)、西尾俊幸博士、袴田航氏(日本大学農獣医学部農芸化学科：奥忠武教授)、宮崎淳学士(昭和薬科大学公衆衛生学教室：太幡利一教授)、上田ゆみ子学士(東京理科大学薬学部衛生化学教室：鈴木潤三助教授)、福岡県保健環境研究所世良暢之博士、九州女子大常盤寛博士、神奈川県衛生研究所食品薬品部大森清美学士、東京医科大学法医学教室岩田修永博士、および、所内関連各部の協力を得て行った。また、研究の成果は、日本薬学会第114年会(東京)、日本環境変異原学会第22回大会(東京)、第20回日本毒科学会学術年会(千葉)、第6回C60シンポジウム(東京)、活性酸素の生物作用シンポジウム(北九州)、等で発表するとともに、Tetrahedron Letters, J. Chem. Soc., Chem. Commun., J. Org. Chem., Mutagenesis, 現代化学, 等の学会誌、専門誌、および、厚生省対がん10ヵ年総合戦略プロジェクト研究報告書、科学技術庁科学技術振興調整費(総合研究、省際研究)成果報告書、文部省科学研究費(重点領域、一般C、奨励研究)報告書、等に公表した。

## 機能生化学部

部長 澤田 純一

### 概要

平成5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。

人事面では、平成5年6月より、HS振興財団の

流動研究員として、L. Huq博士が採用され、当部に迎え入れることとなった。

### 研究業績

#### 1. 免疫担当細胞の機能に関する研究

(i) 昨年度に引き続き、免疫毒性試験法に関する国際共同研究(ICICIS) II期のとりまとめを毒性部と共同して行った。

(ii) 即時型アレルギー発症機構を解明する目的で、画像処理装置を用いた好塩基球細胞内カルシウムイオンの動態に関する研究を行い、フォスファターゼ阻害剤および不飽和脂肪酸のカルシウム動態への影響について検討を加えた(HS振興財団創薬科学研究費)。

#### 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細胞内移行および分解をモノクローナル抗体を利用して解析した(HS振興財団創薬科学研究費)。

(ii) 昨年度に引き続き、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検討した(国立機関原子力試験研究費)。

(iii) モルヒネ等の受容体との関連が示唆されているオピオイド結合タンパクの組織分布をモノクローナル抗体を利用して調べた(HS財団受託研究費)。

#### 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、穀物中のゼラレノンのイムノアッセイ法とHPLC測定法との相関関係を明らかにし、穀類の真菌汚染の評価への応用を検討した。

(ii) 前年度に引き続いて、真菌アレルギーの抗原検出法の開発を目的として、*Wallemia sebi* の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) メタロチオネインに対するモノクローナル抗体を利用して、神経系培養細胞におけるメタロチオネインの重金属およびサイトカイン類による誘導を明らかにした。

(iv) オンライン前処理カラムキャピラリー電気泳動を利用する薬物および生理活性物質の微量分析法の検討を行った(科学技術振興費)。

#### 4. モノクローナル抗体の機能変換等に関する研究

前年度に引き続き、モノクローナル抗ハブテン抗

体の機能変換を行う目的で、大腸菌での発現用プラスミドの構築を行った(科学研究費)。また、糖鎖検出プローブの基本骨格として用いる免疫グロブリンの発現用プラスミドの構築を行った(HS財団受託研究費)。

## 代謝生化学部

部長 高橋 惇

### 概 要

既存化学物質等の代謝試験・研究、リスクアセスメント手法の改善等に関する研究、生体における情報の受容・代謝変化に関する生化学的研究等を行った。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は本年度で終了した。

人事面では、紅林秀雄主任研究官はHS財団の助成金により、NIHに出張し、Korzekwa博士の研究グループで、ヒトP450のcDNAを発現するリンパ芽球細胞および各種ヒトP450分子種を用いた化学物質の代謝的活性化に関する研究に従事し、9月17日に帰国した。さらに、11月1日から、同研究グループで上記研究を遂行するため、1年間の予定で、再びNIHへ出張した。

### 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) N-モノ(またはジ)メチルフェニル-N-モノ(またはジ)メチルフェニルパラフェニレンジアミン(DMPD)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)

毒性部で実施している本化学物質の慢性毒性・発がん性試験に用いている飼料中のDMPD含量の定量、糞・尿、肝臓、腎臓、血液中のDMPDとその代謝物のGC/MSを用いた定量方法を確立した。

#### 2. 異物代謝に関与する酵素等の研究

##### 1) 腎細胞に対する細胞毒性の研究

腎上皮細胞の培養細胞を用いて、BHAおよびその代謝物のトランスポートと膜酵素への影響を検討している。

3. 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、対がん戦略研究事業、国立がんセンター運営部企画室)

ヒトP450のcDNAを発現しているリンパ芽球

細胞に対する細胞毒性はジクロロベンゼン(DCB)由来のキノン・ハイドロキノン体が最も強く、続いて、フェノール体、DCBの順で、代謝物が強い細胞毒性を示した。ヒトP450分子種では、毒性が強く発現する1,2-DCBの方が1,4-DCBより代謝され易く、代謝物数も多く生成し、P450の2E1, 2A6分子種でよく代謝されることが判明した。

5. リスクアセスメント手法等の改善と確立に関する研究

1) 肝細胞を用いた化学物質の代謝プロファイルの種差の定量的予測法に関する研究(厚生省科学研究費補助金、生活衛生局生活化学安全対策室、大森班)

ラット肝細胞を用いた*in vitro*における安息香酸の代謝試験を実施して代謝パラメータ値を算出し、*in vivo*における代謝パラメータ値と比較した。*In vitro*と*in vivo*における実験条件の違いを考慮して補正すると、*in vivo*と*in vitro*から求められたVmax, Km, 肝クリアランス値は比較的良好一致を示した。

2) 化学物質の生体との相互作用とその評価法に関する研究(HS財団受託研究費)

ムスクキシレンは*in vivo*において、P-450 1Aと2B subfamilyに属するP-450, DT-ジアフォラーゼ, GST Ya subunitなどを誘導し、肝細胞を用いた*in vitro*系においても、GST Ya subunitを濃度依存的に誘導させた。*In vivo*と*in vitro*におけるGST Ya subunitの誘導のKm値と最大誘導能は近い値を示した。

6. 生体における情報の受容、代謝変化に関する生化学的研究

1) 受容体の新簡易フォトアフィニティラベル法の開発研究(国立機関原子力試験研究費、科学技術庁)

紫外線照射により形成されるペプチド間の共有結合に関与するアミノ酸を検討した(機能生化学部との共同研究)。

2) 白血球の活性調節に関する研究(創薬基礎研究、HS財団研究費)

好中球様分化型HL-60細胞における刺激応答性蛋白質のリン酸化/脱リン酸化について、2次元電気泳動で詳細に検討し、21k蛋白質の脱リン酸化が重要であることを明らかにした。また、この蛋白質の一次構造を解析したところ、細胞骨格系蛋白質との相同性が示唆された。

3) 肝毒性の指標としての脂質代謝・分泌機構に関する研究 (厚生科学研究費)

血清脂質低下薬クロフィブラート類の作用機序を検討し、肝のホスファチジルコリン生合成 (メチル化経路) の阻害を介して VLDL 分泌を低下させるメカニズムを明らかにした。また、新規血清脂質調節物質の探索を開始し、胆汁酸の微生物代謝産物の一つが脂肪酸代謝に対してフィブラート類と類似の作用を示すことを見いだした。

## 衛生微生物部

部長 三瀬 勝利

### 概要

当部において30年以上の長期にわたり、真菌学の研究の発展に指導的な役割をはたし、また UJNR や JICA などを通じて国際協力の面でも多大の貢献をなしてこられた一戸正勝第三室長は、平成6年4月1日をもって東京家政大学教授に栄転された。新天地でのご活躍を祈念している。後任は5月31日現在未定である。

### 業務成績

#### 1. 一斉取締試験

ジプロフィリンを含有する注射剤7件について無菌試験 (細菌試験と真菌試験) を行った。いずれも陰性であった。

#### 2. 特別審査

合計11件について特別審査を行った。

#### 3. 規格、基準等

エイズ医薬品候補物質スクリーニング研究 (薬務局, HS 財団)、バイオ食品の安全性に関する研究、卵のサルモネラ汚染に関する調査研究、自動販売機の衛生管理に関する研究、魚肉すり身製造工場の微生物汚染実態調査、と蓄場の微生物制御の確立のための基礎的研究 (生活衛生局) などが行われた。

### 研究業績

#### 1. エンドトキシンに関する研究

リピド A の活性発現に及ぼす脂肪酸のアクセプターとしての遊離水酸基の関与について、種々の検討を行ったところ、リピド A の水酸基はエンドトキシン活性の発現のためには、必ずしも遊離基として存在する必要がない事が証明された。また、エンドトキシンの inner core 部分の共通成分をマーカーとした LPS の複数の化学的微量定量法を確立し

た。2-アミノピリジンにより蛍光ラベルした標準品では30ピコグラムの範囲で定量的に検出された (国立機関原子力試験研究費)。また、O1 コレラ菌と共通抗原を持つ *Vibrio bioserogroup 1875* の O 特異側鎖の化学構造をメチル化分析と NMR 解析により検討し、O 特異側鎖の構造を決定した。

#### 2. 制限酵素に関する研究

宿主依存性変異の発見が制限酵素の発見につながった事は、よく知られた事実である。しかし、チフス菌で見いだされた宿主依存性変異は最初に見いだされたにも関わらず、その分子機構は不明のままであった。上記変異は、酵素を直接分離する事で、II 型制限酵素の存在によっている事が証明された。この酵素の遺伝子座は小型プラスミド上に存在している (HS 財団研究費)。

#### 3. 食品微生物学に関する研究

BT 菌の抗 H 血清を作成し、穀物、野菜、土壌などにおける BT 菌の分布状況を調査した。また、魚類の簡易鮮度判定用 K 値測定キットを食鳥肉に応用し、当キットが処理工程や流通過程における品質管理に有効である事を証明した (厚生科学研究費他)。

#### 4. トランスポーソンに関する研究

*Shigella sonnei* で見いだされる IS1, IS600 等の合計5種のトランスポーソンの分布状況を様々な腸内細菌で調べた。*Shigella dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii*, *S. sonnei* では調べたすべての菌株で5種の IS をすべて持っていた。また、患者由来の大腸菌のいくつかが *Shigella* に似た分布パターンを示した。

#### 5. 真菌とマイコトキシンに関する研究

南西諸島の畑より収集した土壌から *Aspergillus flavus* を多数分離してアフラトキシン生産能を調べた。分離した60菌株の *Aspergillus* 中17株が *A. flavus* で12株にアフラトキシン生産が認められた。

#### 6. その他

前年に引き続き、発がんプロモーターに関する研究や酵母による食品の腐敗に関する研究などが行われた。

## 科学物質情報

部長 神 沼 二 真

## 概 要

当部は、1) 図書・情報サービス、2) 科学物質の安全性に関する国際協力、3) 全所的な情報基盤の整備などの研究支援業務と、それらを通じて開発、蓄積されたリソースを用いた基礎研究を併行的に展開している。

人事面では、4月1日付けで図書係の笹子久美子が業務課に転出、非常勤職員大矢博之が退職し、非常勤職員の田中利枝、村上真平が採用された。

## 支援業務（業務成績）

## 1. 図書・情報サービス

## (1) 図書室の運営

本年度は雑誌11タイトルを中止、4タイトルを新規に購入し、単行本324冊を購入した。この結果、購入中の雑誌は327タイトル、管理している単行本は9,384冊となった。文献の相互貸借については、外部から736件の依頼があり、外部へは1,391件を依頼している。

## (2) 情報検索サービス

パソコンを用いたCD-ROMベースの検索サービスとして、これまでのMEDLINEに加え、Chemical Abstracts 12th Collective Indexのサービスを開始した。

また所内LANが試験的に敷設されたので、Current Contents (Life Sciences)のネットワークによる利用を可能とした。外部の商用データベースのオンライン検索サービスも続けている。

## (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111号を作成し、所員ならびに所外に配布した。

## 2. 科学物質の安全性に関する国際協力

(1) 国際有害化学物質登録制度 (IRPTC) 事業への協力

IRPTC法規制データベースは、各国・各国国際機関の化学物質に関する法令や規制データを収録しており、各国の担当機関が毎年データの更新を行っている。今年度も日本の法規制（化審法、食品衛生法の残留農薬、環境法令等）についての更新を行った。また1993年10月ジュネーブで、今後の方針等についてワークショップが開かれ、山本 都主任研

究官が出席した。

(2) 国際化学物質安全性計画 (IPCS) への協力

## 1) 環境保健クライテリアの作成

すでに着手していたもののうち、「アセトニトリル」が、本年度に出版された。「陰イオン界面活性剤」については、1993年10月に関沢 純室長も出席したタスクグループ会議による検討がなされ、現在最終的な編集が行われている。また「エチレンジプロマイド (EDB)」については、すでに1993年10月に第一次ドラフトをIPCSに提出してあるが、現在各国に供覧されている。また「EDB」は、6年度中に他の農薬とともにIPCSの新しい安全性評価システムの対象として、とりあげられる予定になっている。

このように、この数年間懸案となっていた環境保健クライテリアの刊行のメドが立ったため、本年度よりいくつかの新規物質を取り上げることとした。そのため昨年度行った環境保健クライテリアの作成と利用に関するアンケートと7月の対象物質検討会議の討議にもとづいて、「ニトロアレン類」と「半導体産業で使用される化学物質」についてのドラフトの作成を、それぞれ、常磐教授（九州女子大）、大前助教授（慶応大医学部）らの協力を得て開始した。なお、環境保健クライテリアの第一次ドラフトについてのコメントの収集にも協力している。

## 2) IPCSの国際化学物質安全性カードの作成

8名の所外国内委員の協力を得て、日本分担分26物質の安全性カード原案を作成し、1993年4月（ジュネーブ）、9月（モンテリオール）の検討会議に山本 都主任研究官が出席した。また、IPCSでこれまで作成された安全性カードのうち432カードを邦訳し、1994年2月に日本語版第2集として出版した。

## 3) その他の活動

1993年10月（ブリュッセル）のIPCSのアドバイザリー委員会と、12月（ジュネーブ）のストックホルムの国際化学物質安全性会議のインフォーマルな専門家会議に神沼が出席した。これにもとづき、今後のIPCSの国内での取り組みに関し、とくに情報基盤の面で強化する方向を検討することになった。

## 3. コンピュータ環境の整備

当部は、数年前より研究支援と行政対応を目的とする全所的な研究情報基盤の整備に取り組んできたが、本年度は情報委員会と他部の協力を得て、NTTのINS64サービスを利用した外部ネットワーク

(インターネット)への接続や、イーサネットを用いたインハウスのネットワークの構築を進めた。また、昨年に引き続き、安全性および創薬研究を支援する基盤プログラムとデータベースの拡充が続いている。

#### 研究業績

1. 創薬と安全性研究を支援する基盤コンピュータシステムの研究

昨年まで開発してきた毒性予測のためのシステムと発癌物質のデータベースの内容を大幅に更新した。また、創薬研究支援をめざして、薬物の3次元構造を含む薬効データベースの開発を開始した。さらに分子のモデリング、グラフィックス、低分子および生体高分子のデータベースなど、安全性と創薬研究を支援する共通基盤を充実した。

2. 線虫とコンピュータを用いたスクリーニングシステムの開発

昨年に続き、線虫の胚発生過程の実時間追尾、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継続している。また、ヒ素の無機および有機化合物のC.エレガンスへの作用を定量的に評価する実験を行い、両者の違いのあることを確かめた。

3. 生体分子の構造と機能に関する研究

多細胞生物の生体反応で重要な役割を果たしている細胞内信号伝達に関与するタンパク質の構造と、機能の知識ベースの概念設計を行った。また、C.エレガンス由来のタンパク質キナーゼC類似タンパク質の3次元構造解析を調節部位と酵素部位に分け、実験とコンピュータによる解析の双方から進めている。

4. その他の研究

化学物質の安全性に関する情報の提供をテーマに、特にMSDSの作成に関連する用語集を作成している。本年度は、用語を収集・選択して各分野の専門家に解説を依頼した(厚生科学研究費補助金)。

厚生科学研究費による「残留農薬安全対策総合調査研究」を分担し、カーバメート系農薬の環境中における分解、代謝経路とその生成物の安全性について調査するとともに、各農薬の物性データをデータベースに入力した。また「医薬品等化学物質の毒性評価のための試験法と基準の整備に関する研究」を分担し、刺激性の判定のための簡易試験法の提案を行った。

また、指定化学物質である4,4'-ジアミノジフェ

ニルメタンおよび2-イミダゾリン-2-チオール(エチレンチオ尿素)に関する情報を収集・解析し、毒性、環境データ、人についての暴露予測等をまとめた(既存化学物質等試験検査費)。

家庭用品等試験検査費により、米国、ECなどの家庭用品に関わる規制基準について調査した。

既存化学物質等試験検査費によって翻訳した、「WHO環境保健委員会報告」が出版された。

#### 安全性生物試験研究センター

センター長 林 裕 造

人事面については、平成6年3月31日付で薬理部高仲部長が定年退官され、同年4月1日付で、同部第3室大野室長が後任部長に就任した他、本年度内に毒性部および病理部から各1名の研究官が退職、変異遺伝部および毒性部に各1名の研究官が新規採用された。

センター業務は、全般的に見て順調に進められ、ICH, JECFA, JMPR, IPCS, OECD等の国際協力事業ならびにGLP査察、各種調査会への出席等の業務についても積極的な協力が得られた。特にOECDによる高生産量化学物質(HPVC)の安全性点検事業については、方法論の基礎的検討および候補物質の選択のみならず、わが国が分担し、国内受託機関で実施された試験の結果の評価がセンター職員の協力により進められている。ICHについても、オランダで開催された第2回会議への参加の他、1995年に横浜で開催される予定の第3回会議に向けて、本省、製薬協、および国外関連機関との綿密な情報交換のもとに、準備されつつある。

各部からの報告にみられるように、国際協力事業の推進と関連してセンター職員の海外出張の回数は年々増加する傾向にあり、センター長自身も非臨床試験報告書の形式に関するDIAワークショップ(ミュンヘン、平成5年5月10日~16日)、ICHの臨時運営委員会および専門家作業グループ会議(ワシントン、平成5年6月21日~26日)、実験動物の呼吸器系病理に関するセミナー(ハノーバー、平成5年8月30日~9月5日)、ICHの第2回国際会議(オランダ、平成5年11月25日~28日)、食品添加物安全性評価指針、Redbook IIの検討会(平成5年12月4日~9日)および摂餌量制限による毒性/発がん性試験の方法と意義に関するシンポ

ジウム（平成6年2月27日～3月5日）に出席し、厚生省あるいは衛生試験所の見解を述べた。

上記の国際協力事業への参加と並行して、センター各部においても国際的あるいは産官学共同研究の色彩が濃厚になりつつある。一般的傾向として、特定の物質を対象とする試験の他に、試験結果を総合評価するための基礎研究ならびに、先端技術の導入による試験法の開発/改良等の仕事が増加している。

現在、各国の研究機関および国際的研究組織において、安全性評価の技術および基本的な考え方が研究の本来の目的であるヒトの健康と福祉の増進と地球環境の保善に向けて軌道修正が求められている。当センターもその例外ではなく、近未来の課題として、組織の見直し、職員の適正配置、研究テーマの適切な選択と修正等を含めて、センター全体の研究活動および運営方針の基本的な改革が必要になると考えられる。

## 毒 性 部

部 長 黒 川 雄 二

### 概 要

平成2年度採用の大野圭子技官が、3年5ヶ月の勤務のち平成5年8月31日付で辞職された。平成6年4月1日付で、北嶋 聡技官が第4室に採用された。同日付で、梅村隆志技官が主任研究官に、梶川信夫技官が動物飼育長にそれぞれ昇任した。小川幸男主任研究官は平成5年4月以来、生活衛生局生活化学安全対策室専門官を併任していたが、平成6年5月15日付で併任解除となった。部内では、川崎 靖主任研究官が第4室から第3室に、小川主任研究官が第3室から第2室にそれぞれ移動した。現在毒性部は、6室構成で技術補助員などを含め総勢36名である。

海外留学としては、佐井君江技官が働がん研究振興財団対がん10ヶ年総合戦略推進事業の外国への日本人研究者派遣事業として、米国 SRI International に平成5年7月から平成6年1月までの6ヶ月間滞在し、DNAの酸化と発がん性評価法に関する研究を行った。広瀬明彦技官は、働ヒューマンサイエンス振興財団の日本人研究者派遣事業として、米国環境保健科学研究所 (NIEHS) に平成6年1月から6ヶ月間の予定で滞在中で、薬物等による白血球機能の制御に関する研究を行っている。高木篤也

主任研究官は、科学技術庁の長期在外研究員として米国健康財団に平成6年2月から1年間の予定で滞在中で、活性酸素による組織障害の分子生物学的研究に従事している。

医薬品 GLP 査察には、7人が延べ10ヶ所（海外1を含む）に出張した。研究業務関連海外出張は、黒川雄二部長が OECD SIDS Initial Assessment および HAAB 会議（平成5年9月18日～26日、パリ）、米国医薬品添加物協会、招待講演、ICH-2 品質、安全性部門出席・講演（平成5年10月21日～11月1日、米国ラーウェイおよびオランダ）、OECD 急性毒性試験代替法会議（平成6年1月25日～1月31日、ベルリン）、降矢 強室長が第4回建国大学校・インターナショナルシンポジウム、招待講演および韓国科学研究所での技術指導〔平成5年10月26～30日、韓国〕、津田充宥室長が第11回アジア太平洋癌学会参加〔平成5年11月14～19日、バンコク、タイ国〕、長谷川隆一室長が IPCS リスクアセスメント手法（ガイダンス値の設定）に関するタスクグループミーティング〔平成5年6月14～18日、ジュネーブ〕、環境の公平を確保するための健康研究と必要性に関するシンポジウムならびに NIEHS において最近のリスクアセスメントおよび毒性学手法に関する情報交換（平成6年2月10～15日、米国アーリントン、リサーチトライアングルパーク）、田中 悟室長が化学物質安全性点検推進委員会・海外調査団〔平成5年10月2～16日、コペンハーゲン、ボン、パリ、ストックホルム〕、および OECD・GLP ワーキンググループ会議およびイタリア・ブラッコ社 GLP 査察〔平成5年12月11～20日、パリ、ミラノ〕、門馬純子主任研究官が米国毒科学会第33回年会参加〔平成6年3月11～21日、グラス（米国）〕、児玉主任研究官が韓国科学技術院遺伝工学研究所での技術指導〔平成5年12月19～22日、大田〕。

### 研究業務

#### 1. 厚生省厚生科学研究費補助金

1) 化学物質による健康リスク評価法に関する研究（生活衛生局生活化学安全対策室）

化学物質による毒性発現と酸化ストレスに関する研究として、化学物質の投与による臓器毒性の発現と臓器中の酸化的ストレスとの関連の認められた報告について調査整理した。

2) 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、代替法とされるいくつかの試験について第2次 validation を行った。

3) 毒・劇物指定のための急性毒性試験 (厚生省薬務局安全課)

5-フッ化リン, 3-臭化ホウ素, 6-フッ化タングステンの吸入急性毒性, アクリル酸およびメタクリル酸の経口・経皮急性毒性試験を行った。

4) 実験動物を用いる急性毒性試験等の簡易法に関してアンモニアおよびホルマリンについて経口, 経皮, 吸入急性毒性試験を行った (厚生省薬務局安全課)。

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) パラジクロルベンゼン

ラットにおける2年間の慢性吸入毒性試験を終了し, 病理組織学的検討を継続中である。

b) グルタルアルデヒド

ラットにおける2年間の経口慢性毒性試験を終了し, 病理組織学的検討を継続中である。

モルモットを用いる Maximization 法による皮膚感作性試験を実施した。

c) トリプトキシエチルホスフェート

ラットにおける90日間の混餌投与による亜慢性毒性試験を終了した。

d) N,N-ジエチルエタノールアミン

ラットにおける28日間強制経口による反復投与毒性試験を終了した。

e) オキサベンゾン

モルモットを用いる Maximization 法による皮膚感作性試験を実施した。

f) N-1,3ジメチル-N'-フェニル-p-フェニレンジアミン

モルモットを用いる Maximization 法による皮膚感作性試験を実施した。

g)  $\alpha$ -メチルベンジルフェノール

ラットにおける急性毒性試験および90日間の亜慢性毒性試験を終了し, 病理組織学的検査を実施中である。

h) トリアリルアミン

ラットにおける急性毒性試験および28日間強制経口反復投与による毒性試験を終了し, 病理組織学的検査を実施中である。

i) トリアリルフォスフェート

ラットにおける急性毒性試験および混餌投与による90日間亜慢性毒性試験を終了し, 病理組織学的検査を実施中である。

j) 3-メチル-4-イソプロピルフェノール

ラットにおける混餌投与による90日間亜慢性毒性試験を終了し, 病理組織標本を作製中である。

k) 2-メルカプトベンズイミダゾール

ラットにおける28日間強制経口反復投与による毒性試験を終了し, 病理組織学的検査を実施中である。

l) N-(フルオロジロロメチルチオ)フタルイミド

ラットにおける28日間強制経口反復投与による毒性試験を終了し, 病理組織学的検査を実施中である。

m) N-ジメチル-N'-フェニル-N'(フルオロジロロメチルチオ)-スルファミド

ラットにおける28日間強制経口反復投与による毒性試験を終了し, 病理組織学的検査を実施中である。

2) 既存化学物質

a) ジベンテンダイマー

ラットにおける慢性毒性試験の投与を終了し, 病理組織学的検査を継続中である。

b) 5-フッ化プロパノール

ラットにおける24ヶ月の慢性吸入曝露を終了し, 病理組織学検査を継続中である。

c) 1,1,2,2-テトラプロモエタン

ラットにおける亜急性毒性試験の投与を終了し, 病理組織学的検査を継続中である。

d) 2,2'-イソブチリデンビス(4,6-ジメチルフェノール)

ラットにおける慢性毒性試験を終了した。

e) N-モノ(orジ)メチルフェニル-N'-モノ(orジ)メチルフェニル-p-フェニレンジアミン

ラットにおける慢性・発癌性試験を開始した。

3. 厚生省生活衛生局水質試験検査費

鉛の疫学調査情報について, 文献ならびにシンポジウムから最新情報を収集整理し報告した。

4. 厚生省がんセンター企画調整室がん研究助成金

1) 環境化学物質による発がんの一次予防に関する研究

発癌抑制の評価法に関する研究として、各種の抗酸化物質を前投与し、肝発癌物質による DNA の酸化的損傷の抑制について解析した。

#### 5. 厚生省対がん 10 ヶ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生体内生成の究明と安全性評価法の確立に関する研究

臓器 DNA の酸化的損傷に関する研究として、肝発癌物質であるペンタクロロフェノーによる肝 DNA の酸化的損傷について解析した。

#### 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

亜鉛を高濃度に含有する酵母食品について慢性毒性試験を開始する準備を進めていたが、対策室で検体を入手することが不可能になったので、ギムネマに検体を変更して毒性試験を実施することになった。

#### 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

薬物の強化効果に及ぼす神経伝達物質の影響を調べる目的で、オンダンセトロン（5HT<sub>2</sub> 受容体アンタゴニスト）のコカイン摂取に及ぼす影響について、サル静脈内薬物自己投与試験法を用いて検討した。

#### 8. 厚生省医薬品審査等業務庁費（薬務局審査課）

##### 1) タール色素毒性研究に関する試験

a) 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。

b) 赤色 3 号について Maximization 法による皮膚感作性試験を実施した。

#### 9. 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終了し、病理組織学的検査を継続中である。

2) トランスジェニックマウスを用いる発癌性短期試験法に関する研究

ヒトプロト型 C-Ha-ras 遺伝子導入トランスジェニックマウスの発がん性試験における有用性を、genotoxic carcinogen として知られている cyclophosphamide および 4NQO を用いて検討した。両化合物とも悪性度の高い腫瘍を早期に高頻度に発生し、本トランスジェニックマウスはがん原性の短期検索に有用な試験系と考えられた。

#### 10. 特別研究「生体関連指標の有意性判定に関する研究」

研究」

霊長類の一種で、ラットとほぼ同程度の体重で、取扱い容易であるマーモセットを用いてサイクロスポリリン A の免疫毒性試験を行った。

11. 食品添加物安全性再評価等試験検査費（厚生省生活衛生局食品化学課）

1) アスコルビン酸ナトリウムと亜硝酸ナトリウムの相乗毒性を調べる目的で亜急性毒性試験を終了し、病理組織学的検査を継続中である。

2) ポリリン酸ナトリウムとソルビン酸の相乗毒性を調べる目的で急性毒性試験を行った。

#### 12. 総合化学物質安全性研究費

データベース構築に関する研究の一環として、一般状態に関する用語のデジタル化を行った。

#### 13. 急性毒性試験法に関する検討

ドイツ厚生省が提案している Acute Toxic Class Method について validation を行い、国内の他の 2 協力機関と討議し、その結果をドイツ厚生省に報告した。

#### 14. 麻薬等総合研究事業費（厚生省薬務局麻薬課）

有機溶剤の生殖発生に及ぼす影響を調べる目的で、妊娠前および妊娠初期のラットにトルエンを暴露し、雌雄の親動物における生殖能および胎児に対する影響と、ラットにおける 90 日間反復投与毒性試験を加味した試験を行った。

## 薬 理 部

部長 大野 泰雄

前部長 高 伸 正

## 概 要

平成 6 年 3 月 31 日付けで高伸 正部長は定年退職し、同年 4 月 1 日付けで大野泰雄第三室長が薬理部長に任命された。それに伴い、第三室長には小野田欽一第一室長が、また第一室長には井上和秀主任研究官が、それぞれ 4 月 1 日付けで配置替えとなった。

中沢憲一主任研究官は米国マサチューセッツ州ハーバード大学医学部細胞・分子生理学教室 Bruce Bean 教授の下での ATP 受容体チャネルの電気生理学的性質に関する研究を終え、平成 5 年 4 月 22 日に帰国し、現在その研究をさらに発展させている。ヒューマンサイエンス振興財団流動研究員として、小泉修一博士が継続採用され、また、張 宝旭博士



が平成5年7月1日より新規採用され、それぞれ脳高次機能改善を目的としてCa拮抗薬の作用評価法の開発、および初代培養肝細胞におけるgap junctionを介した細胞間連絡に及ぼす化学物質の影響に関する研究に従事している。

平成5年度における短期海外出張は、高仲 正部長と藤森観之助室長がジュネーブで開催されたFAO/WHO合同の残留農薬会議に参画し(9月26日~10月2日)、引き続き高仲部長はベルギーのブラッセルへ赴きIPCSの事業に係わる研究の必要性に関する諮問会議に出席した(~10月7日)。藤森観之助室長はドイツのハノーバーで開催されたIPCSタスクグループ会議におけるメチルプロマイドの環境基準作成作業に参画した(8月7日~15日)。大野泰雄室長はジュネーブで開催されたWHOの「国際一般名称調査会」に参画した(4月26日~5月2日)。さらに、米国ワシントンで開催されたICH準備会議に参画し(6月21日~6月25日)、引き続きイギリスでのGLPの日英合同査察を行った(6月28日~7月4日)。米国のオーランドで開催された第二回ICH会議においてトキシコキネティクスと反復投与組織分布試験に関するガイダンス案作成に参画した(10月24日~11月1日)。さらに、日米非エネルギー科学技術協力の一環として米国に出張し、FDA、NIEHS、EPA、NCTR等の政府研究機関およびP&G社、SRI社等の民間研究機関を訪問し、*in vitro*の代替試験法に関する情報交換を行った(2月20日~3月4日)。国外の学会出張としては、大野泰雄室長は米国ボルチモアで開催された第一回国際代替法学会に参加し、眼刺激性試験代替法のバリデーション結果について発表した。また、井上和秀主任研究官は米国ワシントンにおける第23回米国神経科学学会に参加し、研究成果を発表した(11月14日~11月19日)。

また、延4人が医薬品の国内GLP査察を行った。  
**研究業績**

### 1. 医薬品等の薬理作用に関する研究

i) 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)

PC12細胞における伝達物質間のクロストークについて検討し、アデノシンがはATPによる神経伝達物質遊離を低濃度で抑制し、高濃度で増強することを示した。

ii) 脳高次機能改善を目的としたCa拮抗薬の作

用評価法の開発

PC12細胞においてエンドセリンがL型のCaチャンネルをG蛋白を介して直接活性化していることを示した。

iii) 細胞内および細胞間情報伝達に対する化学物質の影響に関する研究(受託研究、公害防止等試験研究)

肝障害性除草剤(diquat)がgap junctionを介した初代培養肝細胞における細胞間連絡を可逆的に抑制すること、また、それが細胞内GSHの低下と対応することを示した。また、有機リン系農薬(diazinon)が膜電位依存性Caチャンネル依存性のドーパミン(DA)遊離を抑制する一方、受容体作動性Caチャンネル依存性のDA遊離を増加させることを示した。

iv) 残留農薬とその分解・代謝物の薬理作用、毒性、代謝に関する研究(厚生科学研究)

カルバメート系農薬のイソプロカルブとフェノカルブの芳香環の水酸化体がCa拮抗作用を持ち、神経伝達物質遊離を抑制することを示した。また、有機リン系農薬、カルバメート系農薬、およびそれらの分解・代謝物の細胞毒性発現機構は細胞に対する非特異的な毒性によるもの、肝細胞特異的な代謝経路によるもの、また、細胞構成成分に対する化学的反応によるものに分けられた。

2. 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) リスクアセスメント手法等の改善と確立に関する研究(厚生科学研究)

化学物質安全性評価法に関する研究として精子運動能に対するアドリアマイシンの影響を検討し、ビデオ記録コンピューター解析法により運動能低下を明らかにした。

平成5年度より5年計画で開始した。

ii) 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(厚生科学研究)

平成4年度までの結果を解析し、公表した。また、9種類の*in vitro*の眼刺激性試験代替法の施設間バリデーションを22機関の協力の下で遂行した。

iii) 若齢ラットにおける行動薬理試験法の検討  
抗鬱剤の遊泳行動に及ぼす影響を検討した。

iv) 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(文部省科学研究費)

胎芽の成長を指標として、蛋白性因子の一つを精製・同定した。

平成5年度で研究を終了した

v) 薬物代謝酵素の生産と薬効・毒性予測への応用(受託研究)

スunks肝 cyt. P-450IA 分子種の DNA 塩基配列の部分構造を明らかにした。

vi) 医薬品規制ホルモンイゼーションに関する国際共同研究(厚生科学研究)

生殖発生毒性および毒物動態学を分担し、実験、調査、および調整作業を行い、それぞれ ICH Step II の合意文書作成に至った。

vii) DNA 修復機能に関する研究

色素性乾皮症の DNA 修復異常に関与する酵素のクローニングを行い、その構造を明らかにした。

3. 医薬品等の後世代に及ぼす影響に関する薬理学的研究

i) 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)

ステビオサイドと亜塩素酸ナトリウムの催奇形性試験は陰性であった。

ii) *in vitro* 実験法を用いた化学物質の生殖・発生毒性の検索に関する研究

培養胎芽に対する亜セレン酸の毒性は GSH 低下で抑制されたが、セレン酸の毒性は増強された。

平成5年度で3年計画を終了した。

iii) 化学物質の生殖細胞の形成に対する障害性に関する研究

アドリアマイシンの雄性生殖障害を検討し、精巣の萎縮と精子数の低下を示した。

iv) 既存化学物質安全性点検支援システムの構築に関する研究

平成4年度に構築されたシステムのバリデーションを行い、データの入力を開始した。

平成5年度で4年計画を終了した。

## 病 理 部

部 長 高 橋 道 人

### 概 要

平成6年3月31日付けをもって第二室の古田京子技官が定年退官された。同技官は21年余の長期にわたり主として病理業務の技術面に中心的役割を果たしてこられ、その労に対し職員表彰をうけられた。平成5年4月1日付けで黒川典子が非常勤職員として採用された。第二室豊田和弘技官は平成5年

12月27日に名古屋市立大学より医学博士を授与された。

短期海外出張は高橋道人部長が、米国オーランドで開催された ICH-2 の総会および専門家作業部会(発癌性試験『治療薬の発がんの可能性の評価における諸問題』)に出席し、講演を行ったほか討議した(平成5年10月24日~11月1日)。さらにフランスのリヨンでの『IARC モノグラフの優先順位計画に関する IARC 特別作業グループ会議』に出席し討議した(平成5年12月5日~12月13日)。西川秋佳室長は米国ノースカロライナの NIEHS で開催された『げっ歯類における化学発がんの予測に関する国際ワークショップ』に参加した(平成5年5月24日~25日)。三森国敏室長はフランスのパリで開かれた『OECD の試験法ガイドラインの国際調和に関する会議』に出席、討議した(平成5年10月24日~10月29日)。またイタリアのローマでの『FAO/WHO の第42回合同食品添加物専門家会議(JECFA)』に出席、討議した(平成6年1月31日~2月12日)。

なお医薬品 GLP の査察には延べ5人が国内出張した。

### 研究業績

1. 食品添加物、農薬、医薬品等の安全性、特に発がん性に関する研究(食品等試験検査費)

タンニン酸、シアノグアニジン、ピロリン酸カリウムのがん原性試験を終了し、明らかな発がん性は認めなかった。さらに8種類の化学物質の試験を続行中である。

2. 発がん過程に影響を及ぼす諸因子の研究(厚生省がん研究助成金、文部省科学研究助成金、HS 財団受託研究)

種々の医薬品、食品関連物質、環境化学物質を動物に投与し、様々な器官および組織の腫瘍発生過程に及ぼす要因について検討した。チオウレアとビタミン A の同時投与による甲状腺増殖性病変の細胞増殖活性の増強、合成チオールによる膀胱発癌抑制、camostat による大腸発癌抑制作用等を見いだした。さらに発がんに対する医用材料のポリウレタンシートへの埋植による影響等の実験を行っている。

3. 動物発がんモデルの確立に関する研究(厚生科学研究補助金)

1) BOP 経胎盤投与による卵巣腫瘍モデルを検討した。

2) v-Ha-ras 遺伝子導入トランスジェニックマ

ウスヘチニルエストラジオールを投与すると転移性乳腺腫瘍が高頻度で誘発された。

3) HAQOによるラット膵腺房細胞腺腫の発がん過程において、標的臓器における核小体分離とDNA付加体形成の一致を観察した。

4. 自然発生病変の診断の確立に関する研究

以下の点について検討し、確認した。

1) WBN/Kob ラットの自然発症膵炎に対する合成ソマトスタチンの抑制作用。

2) ラット下垂体後葉における加齢性軸索ジストロフィーと老齢ラットの延髄背索核における軸索アトロフィーとの類似性。

5. 化学物質による臓器障害性に関する研究 (喫煙財団研究助成金, 厚生科学研究補助金)

1) ハムスターのプレオマイシン肺線維症発現が抗酸化剤によって抑制されることを見いだした。

2) アドリアマイシン反復投与ラットにおける精巢毒性を、精上皮サイクルを考慮しつつ計測形態学的に解析した。

6. 生体指標を用いたリスクアセスメントに関する研究 (厚生科学研究補助金, 厚生省がん研究助成金, 特別研究)

細胞増殖活性, 脂質過酸化と発がん過程との関連性を検討した。

1) 細胞増殖の指標

細胞増殖の生体指標として有用であると考えられるプロモデオキシウリジンの取り込み, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) と核小体形成体関連タンパク (AgNOR) について, 染色法をさらに改良し, 病理組織診断との関係を検討した。

2) 脂質過酸化の指標

3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX) はラット胃粘膜の細胞増殖活性および脂質過酸化を用量相関的に亢進させた。

3) 免疫毒性の生体内関連指標

ピペロニルプトキシド投与ラットにおけるリンパ造血器障害をモデルに生体内関連指標の検討を行った。

7. 病理診断用語の標準化に関する研究 (厚生省移替予算)

毒性病理学に関連する国内の大学, 法人, 企業の各研究機関の協力のもとに, 毒性試験で使用されている病理診断所見用語のコード化を終了した。これらの成果は毒性試験病理用語集として発刊される予定である。

8. 化学物質による細胞障害の細胞病理学的研究 (創薬科学総合研究費, 環境庁公害防止予算)

1) 画像解析法を用いた単一細胞レベルの研究  
高速走査型共焦点レーザー顕微鏡を用いて, 細胞内で生じるカルシウムウェーブのメカニズムを解析した。

2) 蛍光プローブを用いた細胞障害研究法の開発  
蛍光プローブを用いた細胞内過酸化物質および細胞内SH化合物の画像化を検討した。

3) 環境汚染物質の細胞内情報伝達系への影響の研究

初代培養肝細胞の細胞内情報伝達に係わる細胞内カルシウムイオンの貯蔵をトリプル錫が抑えることを明らかにした。

4) バッチクランプ法を用いた単一細胞レベルの研究

骨髄巨核球細胞におけるカルシウムオシレーションの発生メカニズムを解析した。

## 変異遺伝部

部長 祖父尼 俊雄

### 概要

第2室の渡辺雅彦厚生技官が平成5年4月1日付で主任研究官に昇格した。平成5年10月1日付で田辺秀之が第3室の厚生技官として採用された。平成5年10月1日より科学技術特別研究員として金秀良博士が採用され, 第2室にて突然変異誘発機構の研究に従事している。平成5年12月31日付で第1室の非常勤職員の山崎奈緒美が退所し, 平成6年4月2日付で坂本浩子が非常勤職員として採用された。

平成5年6月1日より科学技術庁STAフェローとして, フィンランド国立公衆衛生研究所 J. Maki-Paakkanen 博士を招へいし, 第1室にてマウス末梢血からの小核の分離とセントロメアの識別に関する研究に従事している。

平成5年7月1日より松前国際友好財団研究フェローとして, メキシコ生物医学研究所 J. Espinosa 博士を招へいし, 第2室にてサルモネラ菌の代謝酵素遺伝子のクローニングに関する研究に6ヵ月間従事し, 平成5年12月30日に帰国した。

平成5年8月1日よりHS財団流動研究員として, チェコ科学院実験植物学研究所 P. Gruz 博士を招へ

いし、第2室にてDNA損傷の修復および突然変異誘発機構に関する研究に従事している。

渡辺雅彦主任研究官は科学技術庁長期在外研究員として、平成5年9月1日より、米国ローレンスリバーモア国立研究所、Dr. H. W. Mohrenweiserのもとで、遺伝子突然変異の分子機構、特に生殖細胞での突然変異検出に関する研究に従事している。

科学技術庁STAフェローとして来所していたフィンランド国立職業健康研究所のP. Hackman博士が1年間にわたる培養細胞を用いる遺伝子突然変異の研究を終えて、平成6年1月4日に帰国した。

松岡厚子主任研究官はHS財団基礎研究支援事業として、平成6年3月21日よりドイツマインツ大学に出張し、代謝酵素遺伝子を導入した培養細胞を用いる研究に従事している。

HS財団創薬科学総合研究推進事業により、米国ハーバード大学で1年間にわたりヒトリンパ球由来細胞株を用いる遺伝子突然変異に関する研究に従事していた本間正充厚生技官が平成6年3月25日に帰国した。

短期海外出張としては、祖父尼俊雄部長が平成5年6月21日～26日にワシントンで行われたICH専門家会議に出席し、遺伝毒性試験の国際的調和の問題点について討論を行った。

平成5年10月24日～31日に米国オーランドにて行われたICH-2に、祖父尼俊雄部長は、林真室長とともに参加し、遺伝毒性試験の専門家会議に出席するとともに、本会議の遺伝毒性試験のテクニカルシンポジウムにおいて発表、討論を行った。

祖父尼俊雄部長は平成6年1月29日～2月4日にカナダのオタワで開かれたOECD遺伝毒性試験ガイドラインの改訂に関する会議に出席し、改訂案の作成作業に携わった。

平成6年2月16日～3月2日にかけて祖父尼俊雄部長は、フランスのリヨンの国際癌研究機構(IARC)に赴き、モノグラフ第60巻のための評価作業に携わった。その後、ドイツのマインツ大学、ニューヘルベルグ環境保健中央研究所、ベルリン連邦健康局医薬研究所に赴き、「遺伝毒性試験における新しい研究方法」、「小核の分離とセントロメアの識別」についてセミナーを行い、意見交換を行った。

林真室長は平成5年9月11日～17日までドイツ、ノイエベルグにて行われた「遺伝毒性試験に係わる統計学的ワークショップ」に出席し、主に小核試験結果の統計学的処理法について発表すると

ともに、小核試験の最近の動向についてセミナーを行い、意見交換を行った。

山田雅巳厚生技官は平成5年12月1日より12月23日まで米国マサチューセッツ工科大学において突然変異の分子機構に関する実験を行った。

能美健彦室長は平成6年1月13日よりカナダのウィスラーで開かれたリスクアセスメント会議に出席し、アセチル転移酵素を発現するCHL株について発表した。引き続き1月23日より2月12日まで米国マサチューセッツ工科大学においてUmu蛋白質の精製実験を行った。

林真室長は平成6年2月21日～3月4日に、日米科学技術協力に基づき米国NIEHS、NCTR、SRI等に赴き、*in vitro*試験系を用いた新しい毒性試験法の開発等についてセミナーを行い、情報交換を行った。

水沢博室長は平成5年6月4日～13日および平成6年3月16日～24日に米国に赴き、米国組織培養学会にし国際的な細胞バンク間の協議に参加し培養細胞株の品質管理手法などについての協議を行うとともに、ATCCと情報の交換を行い細胞株の交換について意見を交わした。

第3室においては、細胞バンク事業を継続し、昨年同様約150種の細胞を収集し、4000アンプルを供給した。また、細胞品質管理手法の国内統一マニュアルの作製、培養細胞株データベースの維持更新を行い、有償化へ向けて管理プログラムを更新した。また、職員の増加に伴って、これまで実施できなかった染色体の核型分析を品質管理に組み入れ、細胞バンクで樹立した垂株と親株間の相違点を明らかにする研究を開始した。第2室においても、新しく開発したYG株を国内11アンプル、国外77アンプルを供給し、エームス菌株は国内96アンプル、国外5アンプルを供給した。

#### 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. 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2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)。

##### 3. 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) を用いる染色体異常試験を行い、数種の chlorophenol 類について、塩素の置換数と染色体異常誘発性との相関について検討した (対がん 10 カ年総合戦略受託研究費, がん研究振興財団)。

#### 4. 農薬の変異原性に関する研究

4種の農薬, フェノカルブ, イソプロカルブ, ペンフラカルブおよびスウェップについて, 微生物を用いる遺伝子突然変異試験を行った (生活衛生局食品化学課)。

#### 5. げっ歯類の小核試験法による安全性評価に関する研究

ラットの末梢血を用いる小核試験の有用性を評価するため, 単回投与ならびに 28 日間反復投与毒性試験に用いられた動物より採血し, 小核の誘発性を検討した。

#### 6. 実験動物における複数発がん物質による遺伝毒性の研究

染色体異常には構造異常と数的異常とがあり, この両者から小核が派生する。この生成の違いを識別するために, マウス末梢血液より小核を分離濃縮する方法を開発し, さらにマウスセントロメア特異的 DNA プロブによる FISH 法を用いて, セントロメアを含む小核の識別を行い, 数的異常の誘発の有無を検討した (がん研究助成金による総合研究)。

#### 7. 水生生物の細胞遺伝毒性を指標とした水質汚染モニタリング法の開発に関する研究

既知小核誘発物質を用いて, 実験室内での淡水魚類における小核試験法の開発を行うとともに, 魚胚を用いる染色体異常試験法の技術的な問題点を検討した (国立機関公害防止等試験研究費, 環境庁)。

#### 8. 変異原性試験に有用な遺伝子のクローニングと外来遺伝子トランスフェクトによる革新的な試験系の開発に関する研究

マウス受精卵にトランスフェクトする遺伝子突然変異検出用ファージの作製, 取り出した標的遺伝子の突然変異検出用の大腸菌株の作製および標的遺伝子の変異部位の塩基配列の解析法の確立を行った (HS 財団受託研究費)。

#### 9. 化学物質による健康リスク評価法に関する研究

新しい *in vivo* 変異原性試験法としてのトランスジェニックマウスの開発を進めている。取り出した

標的遺伝子の突然変異検出系が有効に働くことを確認するために, 変異原で処理したファージをモデルにして標的遺伝子の突然変異がポジティブ・セレクション法で検出できることを確認した (生活衛生局生活化学安全対策室)。

#### 10. 生体外染色体異常試験の精度に関する研究

培養細胞を用いる小核試験について, 染色体異常試験で弱い陽性結果を示す化学物質 4 種をモデル化合物として, シャーレ法と Lab-Tek 法とを比較検討するとともに, 並行して行った染色体異常試験結果と小核試験結果を比較検討した (労働省化学物質情報課)。

#### 11. リンパ球の分裂中期細胞集積法に関する研究

ヒトリンパ球の染色体型異常を検出するための染色体ペインティング法を用いて, 放射線治療を受けた患者 3 名の染色体異常を解析し, 本法のヒトモニタリングへの有用性を検討した (国立機関原子力試験研究費, 科学技術庁)。

#### 12. 変異原性試験のための新しい実験材料の開発に関する研究

1) *ada<sub>ST</sub>*, *ogt<sub>ST</sub>* 欠損サルモネラ株について生化学的手法を用いて酵素の欠損を確認するとともにその自然突然変異頻度を測定した。

2) ミニサテライト DNA によるフィンガープリント法を用いて, MMS 投与マウスから生まれた仔マウスについて生殖細胞を経由する突然変異の有無について検討した (科学技術振興調整費, 科学技術庁)

3) 大腸菌の *lacI* 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを用いて, MeIQ の *in vivo* 遺伝子突然変異活性および末梢血小核誘発活性を比較検討した。

#### 13. 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) 突然変異の誘発を促進する MucAB, SamAB 蛋白質の大量発現系を構築した。

2) ステビオールによって誘発される *gpt<sup>+</sup>* 遺伝子突然変異の特徴を明らかにした。

#### 14. 変異原性試験の国際的標準化のためのデータベースを用いた試験法の解析

*In vitro* 染色体異常試験における難溶性物質についての試験成績を, 本邦のデータベースを用いて検討し, 析出する濃度においても濃度に依存して染色体異常が誘発する場合のあることが明らかとなった (薬務局新薬品課)。

15. 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

遺伝子突然変異試験、染色体異常試験および小核試験データの収集を行った。

16. 細胞バンクの運営に関する基礎的研究

1) 細胞株の収集、保存、供給

本年度の細胞収集数は約110株で、国内外からの収集総数は約1000株となり、また、細胞株の本年度供給数は2300アンプルとなり、保存および供給の限界に達したため、新たな収集は実施しなかった。

2) 汚染検査

複数のPCRプローブによるマイコプラズマ検出法を確立したので、品質管理として継続している。これによってマイコプラズマの由来種の同定が可能となった。

3) 細胞株の識別法

FISH法を取り入れた核型分析法を検討し新しい品質管理手法の確立をめざした。

4) 細胞株データベースの開発

培養細胞株データベースの充実を計り、主要なパーソナルコンピュータを対象とした画像データベースの作製を試みた。

5) 細胞株の開発に関する基礎的研究

HS60とHL60RG株について核型の共通性および差異について詳細な検討を加えた。

17. In situ hybridizationを利用した培養細胞株識別技術の確立に関する研究

20種類のヒト由来株細胞について通常染色法、GおよびQ分染法による核型分析を行い、さらに、免疫グロブリン遺伝子をマーカーに、ヒトとヒトに近縁な霊長類7種類の染色体解析を行い、本プローブがテロメア近傍のDNAマーカーとして有用であり、細胞株の相互比較にも役立つことが示唆された(HS財団受託研究費)。

## 総合評価研究室

室長 中 館 正 弘

### 概 要

総合評価研究室は、安全性生物試験研究センターの省令室として、現在中館正弘室長、會田喜崇主任研究官および鎌田栄一主任研究官の3名で構成されている。

本年度は昨年度に引き続き、安全性生物試験研究

センターの各部と連携して化審法に基づく新規および既存化学物質の安全性評価および現在進行中のOECD高生産量既存化学物質の安全性点検作業に関する業務を行っており、また研究面ではリスクアセスメント手法および毒性予測に関する研究を行っている。

海外出張としてはOECD関連で、中館正弘室長が第20回および第21回環境委員会/化学品グループ合同会合(平成5年5月、平成6年2月、いずれもフランス)および第3回高生産量化学物質安全性点検試験計画策定会議(平成5年9月、フランス)、鎌田栄一主任研究官がGLP基準と手続きに関する会議(平成5年12月、ドイツ)に出席した。化審法GLPの査察には、当室から7カ所、延べ7名が参加した。

### 業務成績

OECDの高生産量化学物質安全性点検計画においては、生産量が多く、安全性情報が少ない既存化学物質の安全性点検を加盟各国の協力で行うもので、3年間で154物質について安全性評価に必要な毒性試験を各国の分担で行うこととなっている。わが国はこのうち33品目を分担しており、必要な毒性試験を厚生省が外部受託試験機関に委託し、当所はこれらの試験データの管理と評価を分担している。昨年度は計画の初年度としてわが国が分担した9物質について、毒性関連の試験結果を安全性生物試験研究センター内でデータの評価作業を行った後報告書を作成してOECDに報告するとともに必要に応じて各国に提供した。なお、これらの試験データは、現在構築中の既存化学物質安全性点検体制支援システムに蓄積しており、評価手法の研究に利用している。さらに、平成5年度は、計画の2年目として行っている12物質に関する毒性試験データを基に評価作業を行っている。また、3年目として分担する12物質についても既存の情報を検索、収集し、加盟各国からの情報も整理し、安全性点検のための試験計画を作成し、OECDに提出した。

また、OECDのクリアリングハウス活動でわが国が分担している4物質について、未公表データを含めて加盟各国からのデータを収集し、整理して文書としてOECDに報告した。さらに、OECDでの情報交換として行っているEXICHEMデータベースに、わが国が行っている化学物質の国内点検状況のデータを入力し、OECDに提出した。

一方、化審法による新規化学物質の評価において

は、申請データのチェックおよび周辺情報の調査を行っているが、本年度はスクリーニング毒性129物質、高分子化合物46物質、良分解性物質30物質の計205物質が申請され、そのうち現在までに14物質が指定化学物質となった。

#### 研究業績

##### 1. リスクアセスメント手法等に関する研究

厚生科学研究費による化学物質による健康リスク評価法に関する研究の一環として以下の研究を実施した。昭和61年度に「化学物質の審査および製造等の規制に関する法律」の一部改正が行われ、新規化学物質は、種々の毒性試験等によりその安全性を確認した後に市場に出されることとなった。一方従来から安全性が確認されないままに使用されている既存化学物質の安全性の確認は、国の責任で点検を行うこととなっている。また、OECD加盟国間での分担点検事業も進められており、これらの安全性点検によって生じるデータは膨大なものとなっており、これらのデータの管理、利用の目的で、総合評価研究室と厚生省生活化学安全対策室が中心となって既存化学物質の点検支援および新規化学物質の試験結果の保存ならびに解析を目的とする2つのデータベース構築を行っている（厚生省生活衛生局生活化学安全対策室に報告）。

2. 食品に含まれる汚染物質の安全性評価に関する研究として、現在国際機関で実施されている安全性評価の方法を調査研究し、この方法に従ってジクロロプロパノールをはじめとする数物質についてヒトでの安全性評価を実施した（厚生省生活衛生局食品保健課に報告）。

##### 3. 家庭用品の安全性に関する研究

家庭用品試験検査費により、塩化メチレンに関する毒性について既存の情報を収集し、これを整理するとともにその安全性を検討した（厚生省生活衛生局生活化学安全対策室に報告）。

##### 4. リスクアセスメントに必要なデータベースの構築に関する研究

先に毒性関連のファクトデータベースであるバイオロジカルデータベースを構築したが、本年度もシステムの一部改良と変異原性試験、催奇形性試験、発癌性試験および反復投与毒性試験の各データを収集し、入力を行った。

OECDの高生産量化学物質安全性点検でのデータ管理と今後の安全性評価手法の研究に利用するために、主として厚生省が外部委託する毒性試験デー

タを管理するためのデータベースとして安全性点検体制支援システムの研究をセンター各部と協力して行っている。本研究は平成3年度にシステムの詳細設計、プログラム設計およびプログラムの作成を行い、システムを構築した。さらに、平成4年度は外部受託機関および厚生省との通信システムの作成を行い、平成5年度はシステムの有効性の検証を行ってシステムをほぼ完成し、細部にわたっての検証を行い最終的なシステムの完成に向かっての作業を行った。本システムは、データベースとしての役割以外に種々の統計処理機能を有しており、評価手法の研究等にも利用出来る設計となっている。

##### 5. 毒性予測に関する研究

安全性点検の優先順位設定やリスクアセスメントの種々の場面で毒性の予測が必要となることから、既存のデータを利用し、構造活性相関の手法を用いた毒性予測システム開発に関する研究を行っている。昨年度は、Ames試験に関する予測のための知識ベースシステムを構築したが、さらに小核試験など他の変異原性についての予測システムを検討中である。

## 大阪支所

支所長 武田 寧

近い将来に想定される国立衛生試験所組織改革による大阪支所の「(仮称)創薬基盤研究センター」への組織再編成への大きな期待と一抹の不安を抱きながら、本年度も大阪支所の現在の役割である検定・検査、標準品製造の業務とこれらの業務に関連する研究を例年どおりに実施した。なお、伊藤啓志男食品試験部長が平成5年10月1日付けで退職され、武庫川女子薬科大学教授に就任された。

検定・検査、標準品製造等の業務については、支所全体として、検定・検査は、医薬品の国家検定84件、医薬品の国家検査11件、食用タール色素製品検査734件、一斉取締試験17件、輸入食品検査2件、特別行政試験2件について実施し、標準品は医薬品試験用41品目(6480本)、色素試験用6品目(2805本)を製造した。これらの検定検査、標準品製造業務とともに、厚生科学研究4件、食品等試験検査研究4件、ヒューマンサイエンス振興財団受託研究3件、創薬科学総合研究2件、創薬科学総合研究推進事業国際共同研究1件をはじめとする研究を実施したが、その成果は以下の支所各部の業務報告

のとおりである。

研修指導としては、三試験部に大阪薬科大学学生(6名, 3ヶ月)、摂南大学薬学部学生(9名, 2週間)を受入れ、食品試験部に JICA 研修生(農薬コース6名, 輸入食品コース7名)を受入れたほか、7名の研修指導を行った。

また、支所運営に関しては、支所の国有地使用が非効率であるとの大蔵省からの指摘により別地移転が検討されているが、移転に向けて必要な内部的な準備を整えるため、支所研究委員会に移転小委員会を新設し、移転計画の策定に必要な基本構想の検討、予算要求の基礎資料の整備に着手した。

## 薬 品 試 験 部

部 長 岡 田 敏 史

### 概 要

HS財団の第3期官民共同プロジェクト研究事業の第III分野テーマ2. 新医薬品製剤の有用性確保技術の開発と評価技術の確立に二課題で参加し、それぞれに着実な進展がみられた。ヒトインスリン製剤の国家検定は、平成5年10月より新たに3製剤、19品目が検定対象品目に指定された。新規標準品はヒトインスリンなど4品目を新たに設定した。別に、(財)日本公定書協会より製造・配布される日本薬局方標準品3品目の新規設定のための品質評価試験を行った。

石光進室長は、米国薬局方協会へ出張し(平成5年8月2日~10月31日)、USP標準品の製造状況に関する視察および生物学的標準品の評価法に関する共同研究を行った。小松裕明主任研究官は、第4回国際膜学会(ドイツ、平成5年8月30日~9月14日)に出席し、リボソームにおける指組み膜構造の形成につき研究発表を行った。

人事面では、平成6年4月1日付で石光進室長が食品試験部第二室長へ配置換えとなり、後任に生物薬品部の谷本剛室長が、就任することとなった。同日付で前川京子技官が新規採用され、第二室に配属された。

### 業務成績

#### 1. 国家検定

ヒトインスリン製剤が84件で、全品合格であった。

#### 2. 国家検査

ブドウ糖注射液が9件、リンゲル液が2件で全品合格であった。

#### 3. 一斉取締試験

メシル酸ガベキサートを含有する注射剤11件および脂肪乳剤6件につき、定量試験そのほかを行った結果、全品合格であった。

#### 4. 特別行政試験

1) 国内産収納あへん5検体(岡山県)について、モルヒネ含量の定量試験を実施した。

2) (財)日本公定書協会より製造・配布される日本薬局方標準品5品目の品質評価試験を行った。

#### 5. 標準品製造

38品目につき、合計4980個の標準品の製造を行った。また、新規標準品4品目の設定を行った: アルプロスタジル、エルカトニン、ヒトインスリン、ウリナスタチン。

#### 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)、ヒトインスリン3製剤の国家検定基準の作成(監視指導課)等に協力した。

### 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) 熱分析法の応用に関する研究

日本薬局方一般試験法中に熱分析法は、未だ採用されていない。本研究においては、乾燥減量試験または水分測定法への熱重量測定法の応用につき、十数種の医薬品原体を用いて基礎的な検討を行った。その結果、熱的に不安定な試料、試験用の試料が十分に得られない試料、水分測定用溶媒への溶解性が不十分な試料などにつき、熱重量測定法の有用性が明らかにされた(公定書協会による規格および試験法研究費)。

##### i-2) 日局既収載医薬品の定量法の改正に関する研究

日局既収載医薬品中アセトアミノフェン、エテンザミド、プリミドン3品目の定量法には窒素定量法が採用されている。平成4年度にこれらの標準品が整備されたので、それらの定量法を標準品を対照とする吸光度測定法に変更できるよう改正案を作成した。別に、乾燥酵母中のチアミン定量法を有害試薬を用いる蛍光光度測定法からHPLC法に変更できるよう改正案を作成した。

##### ii) 標準品の品質規格の設定に関する研究



ii-1) ヒトインスリン標準品候補品の生物活性を国際標準品を対照に4機関による共同検定により定めた。また、化学的定量、純度試験、窒素および亜鉛含量の測定などにより、理化学的品質評価も合わせて行った。

ii-2) エルカトニン標準品候補品の生物活性を国際標準品を対照に5機関による共同検定により定めた。また、HPLC法による定量、アミノ酸分析、純度試験などにより、理化学的品質評価も合わせて行った。

ii-3) そのほか、アルプロスタジルおよびウリナスタチン標準品の新規設定を行った。

## 2. 高分子性医薬品および製剤材料の高分子特性評価とその有効利用に関する研究

i) ヒアルロン酸のキャラクタリゼーションおよび製剤材料としての利用に関する研究

(1) ヒアルロン酸とカチオン界面活性剤との相互作用を色素クーマシー・ブリリアントブルーのスペクトルシフトおよび界面活性剤選択性電極により検討した。ヒアルロン酸とカチオン界面活性剤との相互作用は、ヒアルロン酸と同様にカルボキシル基を持ち、電荷密度の小さなアニオン性多糖と比較してもかなり弱い。ヒアルロン酸の高分子電解質としての静電相互作用が、有機カチオンの分子サイズが大きくなるほど弱くなるのは、ヒアルロン酸が、水溶液中で極性基を包み込むような構造を取ることを示唆するものであった (HS 受託研究費)。

(2) ヒアルロン酸とテトラサイクリン (TC) 類との相互作用を水溶液の電気伝導度および粘度測定により検討した。TC間のわずかな構造の差によりヒアルロン酸との相互作用の強さにかかなりの差が見られることから、これらの相互作用が0.2%ヒアルロン酸水溶液中でのTCの拡散的移動に影響を及ぼすものと考えられた (HS 受託研究費)。

ii) 凝固系に係わる医薬品の抗凝血活性評価法およびその標準化に関する研究

生物検定法における平行線検定法と傾斜比法につき、低分子化ヘパリンの抗凝血活性を指標として比較検討を行った。また、平行線検定法における用量の設定数と試験精度につき検討を行った。

## 3. 分散系製剤の品質評価とその有効利用に関する研究

(1) 市販静注用脂肪乳剤、特に高カロリー輸液およびリポ化製剤の平均粒子径および粒度分布の測定を行った。平均粒子径は180~350 nmの範囲内に

あり、それぞれの製品の粒子径分布幅は狭く、単一分散性が確保されていた。また、分散系としての安定性や分散性の評価指標となり得る表面電位につき、ゼータ電位の観察から評価することを試みた。ゼータ電位は-24~-70 mVの範囲内にあり、製品間に差異がみられた。また、表面電位が分散系の安定化に寄与することが、粒径解析の結果からも裏付けられた (HS 受託研究費)。

(2) 分散系の長期安定性を予測するための加速試験の可能性につき、引き続き検討した。合成レシチンからなるリポソーム分散系 (平均粒径: 約100 nm) の場合、4℃保存下でのみ短期間での粒径変化が観察された。一方、天然由来の卵黄レシチンリポソームおよび静注用脂肪乳剤とも、保存温度および脂質濃度によらず極めて安定であり、現時点では分散系の安定性を予測し得るような、共通の保存試験条件を見い出せていない (HS 受託研究費)。

(3) リポソーム膜の透過性に及ぼすエタノールの影響について検討した。通常の2分子膜構造であるL $\beta$ '相、あるいは指組み膜構造であるL $\beta$ I相が見られるエタノール濃度範囲においては、膜透過性は低く、また両者に大きな差はなかったが、L $\beta$ '相とL $\beta$ I相の共存するエタノール濃度においては膜の透過性が亢進し、相分離状態における相境界での膜構造の不安定性から、高い膜透過性が得られるものと推定された (科学技術庁振興調整費)。

## 食品試験部

部長	柴田 正
前部長事務取扱	武田 寧
前部長	伊藤 誉志男

## 概要

平成5年10月1日付けで伊藤誉志男前部長が退職され、武庫川女子大学薬学部教授 (衛生化学) に転出された。武田 寧支所長が食品試験部長事務取扱を併任 (平成4年10月~平成6年3月) され、後任に平成6年4月1日付けで柴田 正第二室長が就任した。平成6年3月31日付けで外海泰秀室長が神戸検疫所輸入食品検査センター理化学課長併任 (平成4年10月1日~平成6年3月31日) を解除された。この期間当部第一室配属であった大阪検疫所の関口幸弘技官が併任を解除された。また平成6年4月1日付けで薬品試験部の石光 進室長が

第二室長に配置替えとなった。

中村優美子主任研究官が「希土類元素の生体影響に関する研究」で平成5年12月に大阪大学より薬学博士号を授与された。また、津村ゆかり技官は「農作物の貯蔵および加工過程における収穫後使用農薬の消長に関する研究」で平成6年5月に日本食品衛生学会より平成6年度奨励賞を授与された。

#### 業務成績

##### 1. 輸入食品検査

かんびん詰（ロブスタースープ）2検体のポリソルベートの2試験項目を検査した。

##### 2. 製品検査

食用タール色素734検体（平成5年4月1日～平成6年3月31日）について検査を行った。不合格はなかった。

##### 3. 標準品製造

エリスロシン（食用赤色3号）、アルラレッドAC（食用赤色40号）、ニューコクシン（食用赤色102号）、タートラジン（食用黄色4号）、プリリアントブルーFCF（食用青色1号）、インジゴカルミン（食用青色2号）の6品目、計2805個を製造した。

##### 4. 研修について

神戸農林水産消費技術センター技官2名の3ヵ月（平成5年8月23日～11月19日、平成5年10月1日～12月27日）研修および埼玉県衛生研究所技官1名（平成5年10月4日～12月17日）研修を行った。また国際協力事業団の輸出入食品検査技術コース（平成5年10月25日～10月29日）8名の研修を行った。その他大阪薬科大学研究生2名の3ヵ月の研修および摂南大学薬学部研究生3名の2週間の研修を行った。

#### 研究業績

##### 1. 食品添加物の規格基準の設定に関する研究

###### ① 食品添加物の1日摂取量に関する研究

地方衛研11機関と協力し調査研究を行った。本年度は高齢者の加工食品中のA群添加物（純合成型）70品目について検討し、当部は食用タール色素を分担した。食用タール色素12種の1日総摂取量は0.728mgとなり、食用黄色4号が0.477mgと最も多く、全体の約66%を占めた。また高齢者の総摂取量は成人の総摂取量1.780mgの約41%であり、学童の総摂取量0.671mgとほぼ同量であった（食品等試験検査費、生活衛生局食品化学課）。

###### ② 食用タール色素・製剤試験法の改良

食用タール色素アルミニウムレーキ中の水溶性塩

化物および水溶性硫酸塩試験法をさらに詳しく検討した。塩化物および硫酸塩はアルミニウムレーキに吸着され、低い回収率しか得られないため、アルミナレーキに強い吸着性を示す三価のリン酸イオンを添加して吸着を防ぎ、全水溶性塩化物および水溶性硫酸塩を測定できる試験法を開発した（食品等試験検査費、生活衛生局食品化学課）。

##### 2. 残留農薬の分析等に関する研究

###### ① 農作物中の残留農薬の多成分分析法に関する研究

農作物中の有機リン系、有機塩素系、有機含窒素系およびピレスロイド系農薬の同時試験溶液の調製法を考案し、FPD-、FTD-、ECD-GCおよびGC/MSで定性、定量する系統的な多成分分析法を作成した（食品等試験検査費、生活衛生局食品化学課）。

###### ② 残留農薬規格基準設定のための分析法に関する研究

農作物中カルベンダジム（MBC）のケイ光検出器付きHPLCによる分析法を作成した。本法は前年度に作成したチオファネートメチルおよびベノミル分析法とも整合性のとれた方法である（食品等試験検査費、生活衛生局食品化学課）。

###### ③ 農作物中の農薬代謝物および分解物の分析法に関する研究

カーバメイト系農薬であるアルジカルブ、エチオフェンカルブおよびメチオカルブならびにその酸化体であるスルホキシドおよびスルホン体のHPLCによる分別定量法を作成した。HPLCはアルカリ加水分解後OPAと反応させるポストカラムケイ光誘導体化法を採用し、高感度分析することが出来た（厚生科学研究費補助金、生活衛生局食品化学課）。

###### ④ 新開発食品素材健康影響評価研究、スクワレンの生体影響に関する研究

ラットにスクワレンを各0.1、0.5、1.0mlずつ毎日28日間連続経口投与し、血清および肝臓中のスクワレンおよびコレステロール濃度、糞中ステロイド排せつ量を測定した。さらにスクワレン0.1mlを1回投与した時の血清脂質および肝臓中の総コレステロール濃度の経時的変化を調べた。その結果seborrhea症状を示さない0.1ml投与時には、経口投与されたスクワレンは腸管より吸収され、一部は肝臓その他の組織に血流により輸送され、コレステロールや胆汁酸に代謝され糞中に排せつされると考えられた（厚生科学研究費補助金、生活衛生局食品保健課）。

### 3. 輸入食品の安全性確保に関する研究

① 輸入食品検査における高度検査機器利用に関する研究

輸入米中の各種農薬をGCで一斉分析し、GC/MSで確認する多成分分析法を作成した。本法を用いてタイ、米国、中国より輸入された精米および玄米について実態調査を行った（厚生科学研究費補助金、生活衛生局食品化学課）。

### 4. 希土類元素の生体影響に関する研究

① 4種希土類元素（Dy, Eu, Yb, Y）をラットに静脈内投与し、各臓器中の希土類元素濃度と9種ミネラル（Ca, Mg, P, Fe, Na, K, Cu, Zn, Mn）濃度との関係を調べた。希土類元素投与による顕著な影響が認められたミネラルはCaのみであった。Dy, Eu, Yについては高用量投与群で肝臓、脾臓、肺臓でCa濃度が数倍～数十倍に増加した。肝臓、脾臓、肺臓中のDy, Eu, Y濃度とCa濃度間にはそれぞれ強い正の相関があったが、Yb濃度とCa濃度間には有意な相関関係は認められなかった（厚生科学研究費補助金、厚生科学課）。

## 生物試験部

部長 小川 義之

### 概要

国立衛生試験所組織改革構想において支所の「(仮称)創薬基盤技術研究センター」への組織再編に向けて、平成4年度より開始された「創薬科学総合研究」(2件)および「創薬科学研究推進事業国際共同研究」(1件)を核とした研究体制の確立を図った。ヒューマンサイエンス振興財団受託研究(1件)と特別研究(1件)にも取り組んだ。人事面では、平成5年5月1日付けで黒坂麗子技術補助員が採用された。

### 業務成績

国家検定としてヒトインスリン製剤84件(生物試験、無菌試験)、国家検査としてブドウ糖注射液9件(発熱性物質試験、無菌試験)およびリング液2件(生物試験、無菌試験)、特別行政試験として輸液製剤トリパレン2号2件(発熱性物質試験)を行い全品目とも合格であった。

標準品製造は、エンドトキシンが1300個、胎盤性性腺刺激ホルモン100個、血清性性腺刺激ホルモン100個をそれぞれ製造した。

そのほか、日本薬局方の改正(業務局安全課)でのエンドトキシン試験法の国際調和案作成やJISの改正(通商産業省)などに協力した。

### 研究業績

#### 1. 発熱性物質に関する研究

##### Limulus試験法に関する研究

エンドトキシン試験用水の日本工業規格作成プロジェクトに昨年度に引き続き参加し、エンドトキシン試験用水の品質規格に関する研究と希釈度の少ない低含量エンドトキシン標準品試作品の評価を昨年度に引き続き行った。

#### 2. 医薬品等の有効性、安全性に関する研究

(1) 可塑剤 di-*n*-butyl phthalate (DBP) のラットに対する催奇形作用の感受性は、胚の発生段階によって変化することを明らかにした。

(2) 可塑剤 butyl benzyl phthalate (BBP) のラットに対する催奇形作用の感受性は、di-*n*-butyl phthalate (DBP) と同様に胚の発生段階によって変化することを明らかにした。

(3) ラットにおける di-*n*-butyl phthalate (DBP) の発生毒性の特徴は、DBP と同様に可塑剤として使われている butyl benzyl phthalate (BBP) の発生毒性の特徴と類似していることから、DBP および BBP の発生毒性発現には DBP および BBP の共通の代謝物の関わりが示唆された。

(4) *P*-*tert*-butylphenol formaldehyde resin は接着剤における粘着付与剤であるが、これは母体に対して毒性を発現するほどの量を妊娠ラットに与えても発生毒性を示さなかった。

#### 3. 生体関連反応指標の有意性判定に関する研究(第2次)

—マクロファージの免疫毒性評価指標としての有意性に関する基礎的検討—

分布組織の異なる M $\phi$  間で、免疫毒性評価指標としての有意性に差があるか否かを肺胞 M $\phi$  と腹腔 M $\phi$  で検討し、肺胞 M $\phi$  の方がより鋭敏な生体反応指標となり得ることが示唆された。さらに、M $\phi$  の活性ないし機能は、免疫ネットワークを介して、また、低栄養など様々な生体機構の異常変化を介して二次的な影響を受けやすいことが示唆された(厚生省特別研究)。

#### 4. 新医薬品・医用材料の評価技術の開発と応用

新規開発の  $\beta$ -グルカン定量 Limulus 試薬の評価、エンドトキシンの高分子膜素材への吸着特性、エンドトキシン特異的吸着剤の評価、エンドトキシン溶

出溶剤の開発研究、医療用具素材抽出液のサイトカイン産生誘導活性などについて検討した（HS財団：受託研究費）。

5. 自然発症疾患モデル動物の評価とそれら動物胚の凍結保存法の開発に関する研究（自己免疫疾患における熱ショック蛋白質の病因的意義に関する基礎的検討）

プロテインチロシンフォスファターゼ阻害剤として知られるバナジン酸ナトリウムに熱ショック蛋白質（HSP）誘導阻害作用があることを見出した。その作用機序を検討した結果、熱ショック転写因子の活性化が阻害されることが明らかとなり、またその作用はプロテインチロシンフォスファターゼ活性の阻害に基づいていることが示唆された（HS財団：創薬総合研究推進事業における国際共同研究、スタンフォード大学と共同研究）。

6. 自然発症疾患モデル動物の評価とそれら動物胚の凍結保存法の開発に関する研究

自然発症糖尿病モデルのKKおよびNODマウスについて、体外受精、緩慢法による凍結胚の保存を検討したところ、2系統間に差は認められなかった。産児での発生率は一般的な近交系と比較しても差の無いものであり、実用面からみて満足できるものであった。さらに、超急速ガラス化凍結法の技術改良も行った（HS財団：創薬総合研究推進事業、三菱化成生命科学研究所と共同研究）。

7. 中枢神経系幹細胞樹立細胞系の開発

ラット胎生12日胚（E12）より採取した単離神経上皮細胞の増殖と分化の性質を初代培養系において検討した。E12神経上皮細胞は未分化の中枢神経系幹細胞を主なコンポーネントとするものと推定された。増殖後の細胞を塩基性繊維芽細胞増殖因子を含む無血清培地中で長期培養すると、突起伸展性の細胞を派生した。この細胞を血清を添加した培地中で培養するとグリア細胞のマーカー蛋白であるGFAPの発現が誘導された。この細胞はアストロサイトの前駆細胞であると推測された（HS財団：創薬総合研究推進事業、京大および発酵研究所と共同研究）。

## 北海道薬用植物栽培試験場

場 長 畠 山 好 雄

### 概 要

施設面では、平成5年度政府補正予算を受け、研究本館（248.84 m<sup>2</sup>）と実験温室（155.52 m<sup>2</sup>）の新築および官舎3戸のトイレの水洗化改装が認められ、平成5年10月に着工し、平成6年3月竣工、引渡しとなった。

研究上は、例年どおり、厚生省審査課の委託である薬用植物栽培・品質評価指針作成に関する栽培試験を行い、「シャクヤク」の報告書を提出した。また、厚生省麻薬課の依託研究である「生態系農業に基づくけし栽培法の確立に関する研究」および「麻薬原料植物の管理生産システムの開発」についてもそれぞれ研究を実施した。厚生科学課の特別研究事業「老年性疾患に用いられる漢方方剤構成生薬の品質改善に関する研究」が終了し、引き続き「老人医療に用いられる生薬・漢方薬についての基礎研究」を開始した。その他、医薬品副作用被害救済・研究振興基金の幹旋共同研究「モッコウの栽培および品質評価」、5試験場の共同研究によるミシマサイコの栽培試験等を行った。

本年は、全国的に夏の低温、寡日照に見舞われ、当场においても種子生産を目的とする植物に影響が見られ、とくにハトムギの開花が遅れ、ほとんど結実しなかった。しかしながら、根部を目的とする植物には大きな影響は見られなかった。

人事面では、平成6年3月31日、行政職(二)職員三浦忠一技官が定年退職し、後任に平成6年4月1日、中西大樹技官が採用となった。また、作業長には沢井清道技官が発令された。

### 業務成績

#### 1. 種子交換

採取	198種	(筑波試験場へ送付)
受入れ	40件	207種
分譲	23件	79種

#### 2. 指導業務

ケシの講習会が平成5年7月29日に名寄で開催され、一般耕作者、関係機関に対し講習を行った。

### 研究業務

1. 生態系農業に基づくけし栽培法の確立に関する研究

有機物施用によるアヘン多収穫技術の開発を目的として試験を行った。供試した有機質肥料はフミトップおよび下川炭素で、化成肥料を対照区とした。

施肥の効果を植物体の各部位ごとに調べたが、処理間にはほとんど差異は見られなかった。分枝の芽かきを行い、主茎頂生果のみを残したアヘン採取区においても、主茎長、果径に差はなく、果重も全く同じであった。アヘン収量構成要素の中、果数は3処理ともほぼ規定どおり得られ、1果当たりアヘン重量はフミトップ>下川炭素>化成のみの順に大きかったが、有意差の見られるほどではなかった。有効果歩合は1回目は3区ともほぼ100%であり、2回目は70~80%であった。アヘン収量は、3回目の有効果歩合が低かったため、1、2回目の合計量であるが、3区とも100g/a前後で大差なく、いずれも平年作であった。

有機質肥料の効果は速効性とは思われないので、3年間の連用試験の結果を再検討したい。

ケシ葉の補償作用を検討するため、ケシ葉における光条件と光合成速度の関係および剪葉処理による残存葉の光合成・蒸散速度の変化を測定した。

ケシ葉の光飽和点は $900 \mu\text{molm}^{-2}\text{sec}^{-1}$  (47.5 klux) 前後にみられ、光飽和点における光合成速度は約 $13.5 \mu\text{molm}^{-2}\text{sec}^{-1}$ であった。光補償点は $50 \mu\text{molm}^{-2}\text{sec}^{-1}$  前後にみられた。主茎葉上位3枚を剪葉処理し、第4葉の光合成・蒸散速度の変化を測定したところ、両者ともに増加し、また、後者の増加は一時的であった。

## 2. モッコウの補償作用に関する研究

作物の補償作用を乾物重、生理生態面から把握し、その栽培的意義を検討する目的で、モッコウについて試験を行った。

1年生では植物体が小さく、個体間の競合がないので補償作用も働かないものと思われ、収量は欠株率(単位当たり株数)に支配され、欠株の小さい順に多かった。

2年生でも補償作用は働かず、1年生と同様、収量と欠株率は対応した。

モッコウは3年生になると腐敗したり、欠株が増加するので、個体重、収量の増加や補償作用は明らかではなかった。

## 3. ミシマサイコの栽培地の影響に関する研究

気象条件が異なる5試験場の立地条件を利用し、ミシマサイコの5場比較栽培試験を行った。2年間の試験期間が終了し、1年目の結果解析を北海道試

験場が担当することになった。

1年目の結果についてみると、抽苔率に地域間の差が大きく現れ、北海道で高く、南に向うほど低下し種子島で最も低かった。収量は種子島で最も高く、エキス量は暖地で高く、サイコサポニン含量は北海道で最も高かった。

## 筑波薬用植物栽培試験場

場長 西 孝三郎

### 概要

前年度に引き続き官民共同プロジェクト研究の一環として「バイオテクノロジーにより得られた有用形質の保存に関する研究」および「薬用植物の分子遺伝学的解析による分類法の確立に関する研究」を行い、また、創薬科学総合研究事業の一環として「薬用植物の生育および成分に及ぼす因子の解明」に関する研究も実施した。そのほか、厚生省麻薬課の委託研究「麻薬原料植物の管理生産システムの開発」および「生態系農業に基づくケシ栽培法の確立に関する研究」、さらに厚生科学研究費による「ハカマオニゲシ、オニゲシの簡易識別法に関する研究」等を行った。

施設整備関係では、ファイトトロン自然光室のガラス交換工事、実験および生活排水のポンプ交換工事を行った。

海外研究員の受け入れは、科学技術振興調整費による共同研究のため、韓国農村振興庁作物試験場からKim Kwan Suが平成5年6月1日より同年7月31日まで、また、Park Chung Heonが9月20日より10月19日まで来場した。

平成6年3月7日、8日の両日、当筑波試験場において、内山 充所長、寺尾允男副所長、生薬部の尾崎幸紘室長、依 拓也業務課長出席のもとに平成5年度薬用植物栽培試験場業務打ち合わせ会議を開催し、5試験場の研究業務の報告および平成6年度の試験研究計画について討議を行った。また、初日には講師に協和発酵工業(株)筑波研究所の長島 賢氏を招き、「最近の植物バイオテクノロジーについて」と題して特別講演を行った。

平成5年7月13日、昨年に引き続き「第3回薬用植物栽培技術フォーラム」を開催した。西岡五夫九州大学名誉教授、田中俊弘岐阜薬科大学助教授を招き特別講演を行ったほか、当所の5試験場の栽培

試験報告、和歌山県から薬用植物の栽培状況、常陸生薬栽培組合から組合の活動状況について発表があった。全国から170名の参加者があり、盛況のうち無事終了した。

海外出張は、西場長が平成5年9月23日から同年9月26日まで韓国に出張し、韓国薬用作物学会で講演を行った。また、平成6年3月25日から同年3月29日まで科学技術振興調整費による個別重要国際共同研究の打ち合わせのため、韓国に出張した。下村室長は平成5年10月2日から同年10月11日まで、ジュネーブ大学の招きでスイスに出張し、ツェルマットでローザンヌ大学との合同で開催された大学院生のための上級セミナーにおいて講義を行った。江崎主任研究官は科学技術振興調整費による共同研究のため、平成5年10月4日から同10月16日まで韓国に出張した。

#### 業務成績

種子保管数（貯蔵庫）	335種類	延べ1340缶
	948種類/1994年分	
交換用種子保管数	1085種類/1993年分	
入手種子数	59件	延べ333種類
分譲種子数	191件	延べ4568種類
種子目録配布数	68ヵ国	延べ412機関

#### 研究業績

##### 1. 薬用植物の栽培に関する研究

1) ミシマサイコの生育・収量およびエキス・サポニン含有量におよぼす栽培地域の影響

筑波、和歌山および伊豆試験場で採種した種子を供試し、生育・収量、希エタノールエキス含量について各系統間の比較を行った。和歌山系統は草丈、分枝数および地上部乾物重とも他の2系統に比べ有意に高かった。一方、伊豆系統は地上部のすべての形質において有意に小さく、筑波系統はその中間を示した。また、伊豆系統は抽苔率が他2系統に比べ著しく低く、それが草丈、分枝数の低い原因となった。収穫時における開花・結実状況も伊豆系統は著しく遅れ、結実した株はみられなかった。地下部の根頭部径および分枝根数とも伊豆系統は他2系統に比べ有意に小さく、収量においても最も少なかった。これらの結果は、昨年度とほぼ同様の傾向であり再現性が認められた。

希エタノールエキス含量試験は5試験場で栽培して得られた各3系統について、日本薬局方に準じて実施した。その結果、すべての試料は局方の規定(11.0%以上)を満足するものであった。希エタノール

エキス含量は直接生薬の品質を評価する基準ではないが、同一条件下で栽培・調製された生薬という限定された条件下では、その系統および栽培地による影響を比較する指標として採用し得るものと考えられた。分散分析した結果、地域間・系統間ともに危険率1%で有意差が認められ、栽培地の比較では温暖な地域ほど、希エタノールエキス含量は高くなる傾向を示した。また、系統間の比較ではいずれの地域でも伊豆系統の希エタノールエキス含量が高く、筑波、和歌山系統間には有意な差は認められなかった。

2) *Astragalus mongholicus* Bunge の栽培化のための技術の確立

本植物の種子は硬実性であるため、凍結処理による打破効果について検討した。液体窒素による急速冷凍は10分の処理で70%以上の発芽がみられ、打破効果は著しかった。この時、水とともに凍結させた方が打破効果は高かったが、子葉や胚軸に障害が高頻度で認められた。また、凍結時間を10分~24時間の間で比較したところ、打破効果は10分と24時間で差は認められなかった。冷蔵庫内での緩慢な-22℃の凍結処理では液体窒素処理に比べ打破効果はわずかに劣ったが、種子の死滅率および苗の障害率は有意に低かった。さらに、急速冷凍処理を-20℃~-196℃の間で比較したところ、-20℃24時間、-30℃1時間および-40℃1時間処理では良好な発芽が得られ、かつ子葉や胚軸への障害も少なかった。

以上の結果、-20℃での急速冷凍24時間処理・温湯での急速解凍処理により簡便に硬実は打破され、苗への障害もなく、良好な発芽が得られることが判明した。

##### 2. Ri プラスミドによる形質転換細胞の研究

1) トコン (*Cephaelis ipecacuanha*) の形質転換根(毛状根)の作出およびその特性について

トコンのシュート培養の葉に *Agrobacterium rhizogenes* 15834 株を共存培養法により感染させ、毛状根を誘導した。得られた毛状根は、500 mg/l クラフォランを含む培地で除菌後1/2 MS および B5 培地、25℃、暗所にて培養した。サザンハイブリダイゼーション法を用いて T-DNA の検出を行った。毛状根の生育とアルカロイド生産を検討するため、毛状根を種々のオーキシンを添加した MS、B5、WP 液体培地で培養した。なお、アルカロイドの分析は HPLC にて行った。得られた毛状根の形質転

換の確認のために、初めはオパイン分析を試みたが、非形質転換根にもオパインと酷似するスポットが検出されたため、この方法による確認が不相当であることが判明した。また、毛状根は植物ホルモン無添加培地では非常に緩慢な生育を示したので、各種基本培地に種々のオーキシンを添加し、毛状根培養への効果を調べた。その結果、IBA 0.5 mg/l を添加した B5 培地で生育が良好となり、培養8週間後のアルカロイド収量 (100 ml フラスコ当たり) も cephaline 5.5 mg, emetine 0.7 mg と改善された。さらに、毛状根を 1/2 MS 固形培地、25℃ 暗所で6ヶ月培養すると自然にシュートが分化し、そのシュートを新しい培地に移し、16時間照明下で培養すると植物体となった。形質転換は、葉幅が広くなる、根の分化が著しい等の形態異常を示し、また、非形質転換個体に比べ低いアルカロイド含量を示した。

2) トウキ (*Angelica acutiloba*) の形質転換根 (毛状根) の作出およびその特性について

大深トウキの種子を無菌的に播種して得られた幼植物の胚軸 (約 0.5 cm) を 1/2 MS 液体培地に植え付け、25℃、暗所で1日間、*A. rhizogenes* MAFF 03-01724 と共存培養し、毛状根を誘導した。各種培地を用いて、毛状根培養のための条件を検討した。毛状根のフタリド類 (ligustilide, butylidenephthalide) は、GC 分析を行った。

GC-MS 分析の結果、暗所および16時間照明下で培養した毛状根にも ligustilide の存在が確認できた。しかし、その含量は非常に低く、照明下の毛状根では 0.0004% dry weight であり、暗所の毛状根では検出限界以下であった。一方、再分化体の地上部は 0.1% dry weight の ligustilide を含有し、根には 0.004% dry weight の ligustilide が認められた。

### 伊豆薬用植物栽培試験場

場長事務取扱 寺尾 允 男

#### 概要

研究業務としては、前年度に引き続き、厚生省麻薬課の委託研究である生態系農業に基づくケシ栽培法の確立に関する研究、薬用植物・品質評価指針作成に関する栽培試験および5試験場の共同研究によるミシマサイコの栽培試験等を行った。施設面では庁舎の増築工事 (105 m<sup>2</sup>) および改築工事、温室配

管改修工事を行った。

#### 業務成績

##### 1. 種子交換

採種 181 種 (筑波試験場へ送付)

内訳 野生植物 76 種

標本植物 78 種

温室植物 27 種

受入 5 件、25 種

分譲 5 件、15 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植物の植生調査を行った。

#### 研究業績

##### 1. 生態系農業に基づくケシ栽培法の確立に関する研究

深耕による有機質肥料施用の栽培方法について検討した。試験区は I. 牛糞堆肥 300 kg/a 施用, II. 有機発酵肥料 (商品名: もぐら堆肥) 40 kg/a 施用, III. 有機発酵肥料 (商品名: 同) 80 kg/a 施用, IV. 有機発酵肥料 (商品名: 同) 160 kg/a 施用の4区を設け、トレンチャーを用いて約 60 cm に深耕する際、上記の有機質肥料を混和した。試験は第1圃場 (1a) と第2圃場 (1a) で行った。有機発酵肥料区の最大葉、茎の太さは 40 kg/a 施用区に比べて、80 kg/a, 160 kg/a 施用区で大きかった。また、部位別の葉重、茎重、根重についても、有機発酵肥料区では 80 kg/a, 160 kg/a 施用区が 40 kg/a 施用区に比べて重かった。第1圃場と第2圃場を平均した 1a 当たりのアヘン収量は牛糞堆肥区で 304.3 g, 有機発酵肥料区 40 kg/a, 80 kg/a, 160 kg/a 施用区でそれぞれ 288.2 g, 328.5 g, 293.1 g で、80 kg/a 施用区のアヘン収量が最も高かった。1果当たりのアヘン収量も有機発酵肥料 80 kg/a 施用区が 0.40 g で、最も高かった。モルヒネ含有率は有機発酵肥料区では施用量の多くなるほど高く、また、牛糞堆肥区に比較して、有機発酵肥料 80 kg/a, 160 kg/a 施用区が高かった。1a 当たりのモルヒネ収量では有機発酵肥料 80 kg/a 施用区が最大値を示し、160 kg/a 施用区がこれにつき、40 kg/a 施用区では牛糞堆肥区より低い収量を示した。今回の試験でアヘン収量およびモルヒネ収量は有機発酵肥料 80 kg/a, 160 kg/a 施用区が、牛糞堆肥区に比べて大となり、有機発酵肥料の施用効果が認められた。

##### 2. 薬用植物栽培・品質評価指針作成に関する栽培試験

## ① カミツレ

本年度は適性施肥を知る目的で、施肥量の検討を行った。試験区は化学肥料の基肥量が10a当たりN, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, K<sub>2</sub>Oの各成分量でそれぞれ、2kg, 4kg, 6kg, 8kg施用の4試験区を設けて、施肥量試験を実施した。分散分析の結果、地上部の諸形質では茎径に試験区間で有意差が認められ、2kg/10a施用区は他の区に比べて、有意に小さく、主茎長は基肥の施用量の多いほど長かった。1株当たりの頭花数と頭花重は試験区間による有意差はなかったが、頭花数は他の区に比べて、2kg/10a施用区で少なく、8kg/10a施用区で多い傾向があった。頭花重は8kg/10a施用区で他の区に比べて大きく、各試験区の1a当たりの頭花の風乾重は13.32~14.59kgで、頭花の収量は試験区間で有意差は認められなかったが、化学肥料の基肥量の少ない区でやや地上部の生育が小さくなる傾向があり、カミツレ栽培の化学肥料の基肥量は10a当たりN, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, K<sub>2</sub>Oの各成分量で、各4~6kgを標準として、施用すればよいことが示唆された。

## ② ゲンノショウコ

本年度は栽植密度試験における2年生の生育、収量についての調査および施肥量試験を行った。

栽植密度試験における2年生の1株当たりの部位別風乾重は葉重、茎重とも株間の違いにより、有意差が認められた。葉重は収穫時期が遅れ、葉が枯れたために1年生に比べ、株間45cm区を除いて小さかったが、茎重は株間15cm区で1年生の3.8倍、株間30cm区で3.3倍、株間45cm区で6.5倍だった。1a当たりの各試験区の葉重は11.8~19.4kgで、株間45cmの区で最も大きく、各試験区の茎重は61.7~83.8kgで、株間15cmの区で最も大きかった。1年生においては1a当たりの葉重、茎重ともに株間15cmの区で最大だったが、2年生における1a当たりの茎葉重の試験区間による差異は小さかった。

施肥量試験における試験区は化学肥料の基肥量が10a当たりN, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, K<sub>2</sub>Oの各成分量で2kg, 4kg, 8kg施用の3試験区で、栽植密度は条間60cm, 株間15cmとした。1株当たりの部位別風乾重は試験区により、有意差は認められなかったが、葉重は4kg/10a区で最も大きく、2kg/10a区, 8kg/10a区で小さかった。8kg/10a区で葉重が小さかったのは多肥による過繁茂のため、生育後期において、下葉の光の透過不足および風通しの悪化等

により、収穫時に下葉が枯れたためと推察される。今回の試験では化学肥料の基肥量の違いにより、収量に大きな差はなかったが、化学肥料の基肥量が少ない2kg/10a区でやや葉重が減少し、基肥量が多い8kg/10a区で葉が枯れる株が多くみられたことから、10a当たりN, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, K<sub>2</sub>Oの成分量で各4kg程度を標準量として施用すればよいと考えられた。

## 3. ミシマサイコの栽培環境の相違による生育と成分に関する研究

前年度からの継続試験で、2年生の生育、収量について比較、検討した。収穫は10月4日と1月10日の2回行った。10月収穫時の草丈、茎長、分枝数は伊豆系統が筑波、和歌山系統に比べ小さく、地上部の病害指数が高かった。和歌山系統は草丈、茎長、分枝数、地上部乾重ともに最も大きかった。10月収穫時の根乾物重(30個体の平均値)は筑波系統が2.31gで最も大きく、伊豆系統は1.78g、和歌山系統は1.62gだった。1月収穫時の草丈、茎長、分枝数、地上部乾重は10月収穫時と同様に、伊豆系統が最も小さく、他の系統に比べ、生育が劣った。1月収穫時の根乾物重(50個体の平均値)は筑波系統1.68g、和歌山系統2.07g、伊豆系統2.41gで、伊豆系統が最も大きかった。根乾物重は10月収穫時と比べ、和歌山系統、伊豆系統で上回ったが、筑波系統は10月収穫時に比べ、低かった。一方、1m<sup>2</sup>当たりの総乾燥根重は筑波系統で最も大きく、伊豆系統は病気に罹っている個体が多かったため、収穫本数が少なく、総乾燥根重は伊豆系統で最も小さかった。2年生収穫時の根重の増大率は1年生収穫時の根重=100とした場合、筑波系統で151、和歌山系統で190、伊豆系統で446で、2年生における根の肥大生長は伊豆系統で最も大きいことが明らかになった。伊豆系統は1年生では抽苔率が低く、根重も小さかったが、2年生での生長が大きい晩生系統であると考えられ、また、他の系統に比べ、病害抵抗性の弱い系統であることが明らかになった。

## 和歌山薬用植物栽培試験場

場 長 野 口 衛

## 概 要

当場では、薬用植物の栽培法、調製加工法と生薬



の品質の関係について検討を行っているが、本年3月に圃場作業員1名が停年退職したため残り1名となり、研究業務、圃場管理から宿日直業務まで2名でこなさなくてはならず、業務の遂行のみならず、職員の健康管理面でも問題が生じる危険を感じている。

施設設備面では、玄関、実験室、風呂、トイレの増改築、改修を行い、改装後の玄関に薬草生け花を常時展示することとした。

#### 業務成績

##### 1. 種子交換

採種	105
受入	1
分譲	8件 12種

##### 2. 指導業務

野口 衛場長は和歌山県薬務課主催の生薬資源開発推進検討委員会の事業に協力したほか、団体見学ならびに外部依頼計26回、参加者371名に薬草に関する講義、指導を行った。本年度の会場への薬草問い合わせ件数は年間18件で、その内訳は種苗依頼8、栽培法2、植物鑑定4、薬効(用法)2、調製加工法・分析法その他の情報2件であった。

また、会場の地域に対する影響力を確保し薬用植物生産を推進させるため、実行委員会形式で第1回生薬・薬用植物の生産に関する研究会(1993.10.29、印南町)を開催し、全国から参加者228名を迎えた。プログラムは、数編の総括的な啓蒙講演と西日本の産地および対応する各府県の特徴的な活動の報告を中心に、産地見学、交流会を組み入れた盛り沢山の内容で、参加者からの感想も上々であった。

また、1994.5.21には当地で薬草を広める会の定例年次総会を開催、全国からの参加者32名に改装した場内と圃場を開放し、会場の研究内容を披露した。

#### 研究業績

1. ミシマサイコの根の木化とサポニン含量に及ぼす栽培地の影響

砂質畑土よりなるほ場に10aあたり鶏糞200kg、ナタネ粕70kg、消石灰100kg、IB化成(604)50kg、パークミン5000kgを施し、3系統のミシマサイコ(筑波、伊豆、和歌山産種子)を栽培し、根の木化指数を測定したところ、伊豆種のみ低い値を示した。一方、野生品種子6種(三島、平尾台、秋吉台、湯布院、霧島、阿蘇)を長崎大薬用植物園で栽培すると、阿蘇種を別にすれば根の木化は全く認め

られないのに対し、同じ種子を和歌山で栽培すると、木化指数はいずれも高い値を示し、これらの結果から、異なる系統のものでも、暖地で栽培すれば木化しにくくなるものと推測された。

2. ミシマサイコの開花ならびにその木化と土壌物性、土壌通気性との関連について

ミシマサイコを5種の土壌を用い、通気、非通気条件下で栽培し、土壌の物理的性質の変化が開花と根の内部形態に及ぼす影響を検討した。その結果、空気通過速度および土壌酸素拡散速度が最大の値を示す山土で木化指数、開花数とも最大の値を示し、土壌通気が開花、根の木化を促進するものと推察された。

3. トウキの栽培条件の品質に及ぼす影響について

当地方をトウキの新しい産地とすることを目的として、自製トウキ苗約5000本を地元の農家15軒に配布し、一年後に生根約180kgを回収、生薬を調製し、土壌条件、栽培条件と収量との関係を調査した。その結果、温かい地域の砂地や骨粉施用圃場で根収量が高くなる傾向が見られた。また、水はけの良い畑で収量は高くなったが、水はけの悪い圃場や粘土質土壌でも収量が高くなる場合が一部認められた。これらの品質については、目下検討中である。

##### 4. トウキ組織培養苗の栽培試験

大和当帰の組織培養苗2品目と実生苗を4月に同一圃場に植え、生長を観察した。

組織培養苗は、実生苗に比べ根の長さ、太さとも大きく、地上部も細長く伸びていた。しかし、圃場に植え付けるとこのひょろ長い地上部はいったん枯れ、新しい芽が発生し、発育初期には、実生苗の方が地上部はやや育ちが良いようであった。

#### 種子島薬用植物栽培試験場

場長 香月茂樹

#### 概要

研究面では、薬用植物栽培・品質評価指針作成に関する栽培試験、厚生省麻薬課の委託研究である「生態系農業に基づくけし栽培法の確立に関する研究」および5試験場の共同研究であるミシマサイコの栽培試験等を実施した。

施設面では、庁舎(199.62m<sup>2</sup>)の新築が認められ、平成5年11月に着工、翌年3月竣工、引き渡

しとなった。また、この工事に合わせ、15 mm の水道本管を 50 mm に交換敷設した。旧庁舎は耐久性等について当分問題がないとのことで、資料庫として乾燥・液浸等の標本管理施設、書類・雑誌等の収納、また見学者の講習等の教育施設として活用することとした。

気象面では、梅雨期間がはっきりせず、夏(6・7月)・秋(9・11月)の降雨量が非常に多かった。台風の接近・通過は次のとおりであった。

8月9日 7号

瞬間最大風速 36 m/s・降雨量 151 mm

9月3日 13号

瞬間最大風速 43 m/s・降雨量 81 mm

(種子島測候所では 59.1 m/s)

13号は非常に強い勢力であったため、施設面ではガラス室のガラス・ガラス壁面の損壊、車庫の屋根瓦の飛散・ずれや雨樋の破損、樹木の倒伏による水道管の破損等が生じた。また、樹木類の倒伏・折損・裂葉が多く、15トン前後の処理を行った。試験対象植物・標本植物の被害も多く、枯死・生育不良・罹病等の株がかなり生じた。

#### 業務成績

##### 1. 種子交換

採種 176種 (筑波試験場へ送付)

内訳 野生種 115種

栽培種 61種

露地 58種

温室 3種

受入 41件 80種

分譲 49件 224種

##### 2. 指導業務

見学者 83件 561名以上

#### 研究業績

1. ケシの生態系農業に基づく栽培法の確立に関する研究(播種期と生育・収量との関係について)

極暖地における栽培法の確立のための基礎資料とするため本試験を行った。

北海道試験場の1993年産「一貫種」の種子を用い、11月～3月の毎月特定日に播種した。肥料条件を10a当たり、基肥として化学肥料(10-10-10)46.8kg、追肥として同120kgを出蕾期に側条に施肥した。

生育のいずれの時期も病害虫の発生が多く見られた。特に、立枯れ・葉枯れ、葉の食害・開花期の甲虫の子房への傷害(将来、果実の傷痕となりアヘン

採取の悪影響となる)等が顕著であった。風雨による倒伏が多発した。

莖長・葉位とも収穫期の時点では播種期による差はほとんど認められなかった。また開花期の生葉数も播種期による差はほとんど認められなかった。第1花の開花日までの期間は、播種期が遅くなるにつれ早まった。

アヘン収量は播種期が遅くなるとともに減少した。ただし、2・3月播種の場合、収穫に至らず枯死した。

2. ミシマサイコの栽培環境条件の相違による生育と成分に関する研究

筑波(T系)、伊豆(I系)、和歌山(W系)で採種した種子を供試し、生育・収量の比較試験を行った。

1年目ではT系・W系では7月から抽苔が始まり、収穫期の2月では39・43%であったが、I系では8%と著しく低かった。草丈・葉位は全期間を通じてW系>T系>I系という関係が見られた。生葉数は11月までは草丈と同様の関係が見られた。収穫期の根の乾物重はT系>W系>I系の関係であった。1m<sup>2</sup>当たりの株数はT系>W系>I系であり、乾物重でも同様の結果であったが、I系では著しく低い値であった。

2年目ではI系は9月にはすべて枯死した。草丈・葉位・抽苔率は全期間を通じてほぼW系>T系>I系という関係が見られた。1月の収穫期の1m<sup>2</sup>当たりの株数はT系>W系であり、乾物重でも同様の結果であったが、I系ではすべて枯死した。

種子島では本土と異なり、冬期に地上部の生長は鈍るものの枯死せず、周年生育する。

##### 3. 台風の植物に対する影響

9月3日に来襲した台風13号により、今までにない被害が生じた。このため今後の強風対策に資するため調査・検討した。

瞬間最大風速43m/s(種子島測候所では59.1m/s)14時40分頃南東の風。瞬間最大風速10m/s以上の時間は約21時間で、風向は南→南西→北西へと変化した。降雨量は81mmであった。種子島の場合、他地域とは次の点で異なる。風力が大であること。長時間に及ぶこと。全方向の風の影響を受けやすいこと。雨を伴わない場合、特に塩害の影響を受けやすいこと。

特に影響が著しい植物は次のとおりである。

木本類: 柑橘類, キナノキ, ズボイシア, セイロ

ンニッケイ, ニッケイ, ビワ, マテチャ (幼木),  
モリシマアカシア (成木), レイシ, ユーカリ類等

草本類: エビスグサ, オオバナオケラ, キダチト  
ウガラシ, クミスクチン, シソ, ステビア, チョウ  
センアサガオ類, パチョリ, ハトムギ, ミシマサイ  
コ (抽苔株), ヨウシュヤマゴボウ等

防風樹関係では, アカギ, モクマオウ等は枝の折  
損・倒伏が多く, 不適當と思われる。好適樹種と考  
えられるものとしては, アカテツ, イスノキ, イヌ  
マキ, ウバメガシ, ガジュマル, ビロウ, マテバシ  
イ, マルバニッケイ, ヤブツバキ等がある。

## 平成5年度所外研究員等受け入れ名簿

平成6年3月31日

(客員研究員) 5名

氏名	所 属	受 入 部	入所	退所	性別	備 考
岡本季彦	(財)結核予防会・八王子血液センター	衛生微生物部	2.5.1		男	
村裕子	東京薬科大学名誉教授	生 薬 部	4.10.1		女	
熊田秀文	神奈川歯科大学	衛生微生物部	4.10.22		男	
真下悟夫	東海大学教授	薬 品 部	5.6.21		男	
大島輝夫	化学安全管理研究所	化学物質情報部	5.11.15		男	

(協力研究員) 2名

氏名	所 属	受 入 部	入所	退所	性別	備 考
大西清方	(財)ヒューマンサイエンス振興財団	変異遺伝部	元.10.1		男	
吉村博之	昭和大学薬学部	病 理 部	4.9.15		男	

(流動研究員) 7名

氏名	所 属	受 入 部	入所	退所	性別	備 考
田辺秀之	(財)がん研究振興財団	変異遺伝部	3.10.1	5.9.30	男	
山口高正	(財)ヒューマンサイエンス振興財団	生物薬品部	3.7.25		男	
渋谷淳子	(財)ヒューマンサイエンス振興財団	薬 理 部	4.4.1	5.9.30	男	
大塚知修	(財)ヒューマンサイエンス振興財団	薬 品 部	4.4.1		女	
小泉一修	(財)ヒューマンサイエンス振興財団	薬 理 部	4.4.1		男	
小鈴木任	(財)ヒューマンサイエンス振興財団	変異遺伝部	4.7.1		男	
春日井勲	(財)ヒューマンサイエンス振興財団	生 物 薬 品 部	5.8.1		男	

(科学技術特別研究員) 2名

氏名	所 属	受 入 部	入所	退所	性別	備 考
和田幾江	新技術事業団	機能生化学部	5.10.1		女	
金秀良	新技術事業団	変異遺伝部	5.10.1		男	

(科学技術庁フェロー) 4名

氏名	国 籍	所 属	受 入 部	入所	退所	性別
P. J. V. Hackman	フィンランド	フィンランド労働衛生研究所	変異遺伝部	5.1.6	6.1.5	男
Yi-Ming Liu	中 国	湖南大学	薬 品 部	5.3.8		男
J. K. M. Paakkanen	フィンランド	フィンランド国立衛生研究所	変異遺伝部	5.6.2		男
C. F. Hossain	バングラデシュ	千葉大学大学院	生 薬 部	6.3.28		男

(財)ヒューマンサイエンス振興財団 国外流動研究員) 6名

氏名	国 籍	所 属	受 入 部	入所	退所	性別
A. A. Said	エジプト	ヒューマンサイエンス振興財団	生物薬品部	3.4.1	6.3.30	男
奚延斐	中 国	ヒューマンサイエンス振興財団	療 品 部	3.5.9	5.7.30	男
Mohammed Shammem	バングラデシュ	ヒューマンサイエンス振興財団	薬 品 部	5.6.7		男
Lubna Huq	イギリス	ヒューマンサイエンス振興財団	機能生化学部	5.6.7		女
張宝旭	中 国	ヒューマンサイエンス振興財団	薬 理 部	5.7.1		男
Petr Gruz	チ ェ コ	ヒューマンサイエンス振興財団	変異遺伝部	5.8.1		男

(その他) 4名

Florese Julia Diana 李相哲 黄和 顔妮	ハ 韓 韓 中	ル - 国 国 国	サンマルクス大学	生薬部	4. 4. 1	5. 4. 9 5. 4. 15	女
			慶北大学校農科大学	波薬験場	5. 1. 11		男
			忠南大学校理科大学	筑波試験場	5. 3. 1		男
			国家医薬管理局	生薬部	5. 4. 1		女

(研究生) 39名

氏名	所属	受入部	入所	退所	性別	備考
相澤浩	神奈川県衛生看護専門学校付属病院	薬理部	2. 9. 1	6. 3. 31	男	
北浦敬	徳島大学医学部	病理部	3. 4. 8	5. 4. 7	男	
三井雅	奈良県立医科大学	病理部	3. 6. 17	5. 6. 16	男	
榎並倫	奈良県立医科大学	病理部	3. 10. 1	5. 9. 30	男	
櫻山生	東邦大学医学部付属大橋病院	衛生微生物部	3. 11. 1		女	
朝生裕	昭和大学薬学部	病理部	4. 4. 1	6. 3. 31	男	
渡邊加	昭和女子大学家政学部	食品部	4. 4. 1	6. 3. 31	女	
松井元	(財)化学及血清療法研究所	食品部	4. 5. 6	5. 10. 31	男	
田川富	既存化学物質点検推進委員会	総合評価研究室	4. 5. 6		女	
田畑洋	日本セイギケン総合研究所	薬理部	4. 5. 11	5. 5. 10	男	
天野富	国立予防衛生研究所	機能生化学部	4. 8. 11		男	
関口裕	(財)民生科学協会	性病部	4. 9. 7	6. 3. 31	男	
下武男	金沢医科大学	病理部	4. 11. 4	6. 3. 31	男	
穂山浩	千葉大学大学院	食品部	5. 4. 1	5. 6. 30	男	
湾雅	那覇市水道局	環境衛生化学部	5. 4. 1	5. 9. 30	男	
大加藤	昭和大学薬学部	病理部	5. 4. 1		男	
坂本知	昭和薬科大学大学院	薬品部	5. 4. 12		男	
本口公	神奈川県警察科学捜査研究所	代謝生化学部	5. 4. 13		男	
飯田敏	昭和薬科大学大学院	衛生微生物部	5. 4. 15		男	
安住聡	昭和女子大学大学院	衛生微生物部	5. 4. 26		女	
岩田修	東京医科大学	代謝生化学部	5. 5. 1	6. 3. 31	男	
杉木靖	名古屋市立大学医学部	変異遺伝部	5. 5. 10		女	
井上か	(株)資生堂	薬理部	5. 6. 1		女	
池田真	日本大学大学院	薬理部	5. 6. 1	6. 3. 31	女	
岡本章	東京農業大学	変異遺伝部	5. 7. 14		女	
忠本吉	東京農林水産消費技術センター	食品部	5. 9. 1	5. 11. 30	男	
西尾俊	日本大学農獣医学部	有機化学部	5. 9. 1		男	
岡田克	東京女子医科大学第二病院	衛生微生物部	5. 9. 1	6. 2. 28	男	
池崎信	静岡県立大学大学院	病理部	5. 11. 1		男	
村野勢	広島市衛生研究所	食品部	5. 11. 17	5. 12. 13	女	
禪院洋	食糧庁検査課	食品部	6. 1. 17	6. 3. 11	男	
岡村達	(社)長野県農村工業研究所	食品部	6. 1. 17	6. 2. 25	男	
吉井幸	(財)日本公定書協会	支所薬品試験部	4. 5. 12	6. 3. 31	女	
寛華子	(財)日本公定書協会	支所薬品試験部	4. 12. 7	6. 3. 31	女	
村井真	(財)日本公定書協会	支所薬品試験部	5. 4. 1	6. 3. 31	女	
長谷亮	神戸農林水産消費技術センター大阪支所	支所食品試験部	5. 8. 16	5. 11. 15	男	
佐田真	埼玉県衛生研究所	支所食品試験部	5. 10. 4	5. 11. 26	男	
西田信	神戸農林水産消費技術センター	支所食品試験部	5. 10. 5	5. 12. 27	男	
高畑知	(財)日本公定書協会	支所薬品試験部	5. 12. 28	6. 3. 31		

(実習生) 47名

氏 名	所 属	受 入 部	入所	退所	性別	備 考
小島佳奈	昭和女子大学	食品部	4.10.19	6.3.10	女	
田まり恵	昭和女子大学	衛生微生物部	5.1.4	5.12.28	女	
山智子	昭和女子大学	食品添加物部	5.2.1	6.1.31	女	
川村さと	昭和女子大学	毒性部	5.2.1	6.1.28	女	
高橋理恵	昭和女子大学	毒性部	5.2.1	6.1.28	女	
松本真美	東京科学電子工業専門学校	毒性部	5.2.11	6.2.10	女	
春山展之	北里大学衛生学部	療品部	5.3.1	6.2.28	男	
宮崎淳	昭和薬科大学	有機化学部	5.4.1	6.3.31	男	
金築千恵	北里大学衛生学部	薬品情報部	5.4.1	6.3.31	女	
石川恵司	中央大学理工学部	化学物質情報部	5.4.1	6.3.31	男	
小野田千尋	北里大学衛生学部	環境衛生化学部	5.4.5	6.2.16	女	
野藤真美	昭和薬科大学	環境衛生化学部	5.4.5	5.12.27	女	
望月加子	昭和薬科大学	代謝生化学部	5.4.6	6.3.31	女	
上田ゆみ	東京理科大学薬学部	有機化学部	5.4.9	6.3.31	女	
伊勢浩子	日本大学農獣医学部	食品添加物部	5.4.12	6.2.28	女	
花野真紀	昭和薬科大学	代謝生化学部	5.4.14	6.1.31	女	
西野達哉	国際基督教大学	変異遺伝部	5.4.15	6.3.31	男	
古川徹也	北里大学衛生学部	衛生微生物部	5.5.6	5.12.28	男	
岩崎京子	北里大学衛生学部	食品添加物部	5.5.6	6.1.31	女	
伊崎洋子	昭和薬科大学	生物薬品部	5.5.6	6.1.5	女	
宇賀神正代	共立薬科大学	有機化学部	5.5.10	6.3.31	女	
山木元生	共立薬科大学	有機化学部	5.5.10	6.1.7	男	
三浦真	共立薬科大学	食品部	5.5.17	6.1.8	女	
大希代誠	日本大学理工学部	環境衛生化学部	5.5.17	6.2.25	男	
新沼正太	日本大学理工学部	環境衛生化学部	5.5.17	6.2.25	男	
秋山貴美	昭和女子大学家政学部	食品添加物部	5.5.19	6.3.25	女	
河原あすか	共立薬科大学	薬理部	5.5.31	6.2.15	女	
金井理江	昭和大学薬学部	薬理部	5.6.1	5.11.26	女	
丸川英子	相模女子大学芸学部	生薬部	5.6.1	6.3.31	女	
藤加名子	相模女子大学芸学部	生薬部	5.6.1	6.3.31	女	
片見誠美	昭和大学薬学部	代謝生化学部	5.6.23	5.11.30	女	
井浦明昌	静岡県立大学薬学部	変異遺伝部	5.8.1	6.3.31	男	
井佃昌俊	昭和薬科大学	薬品部	5.9.5	5.12.28	女	
袴田航	日本大学農獣医学部	食品添加物部	6.2.21		男	
岩淵佳美	日本大学農獣医学部	有機化学部	6.2.21		男	
江下希美	東京科学電子工業専門学校	毒性部	6.3.1		女	
辻下郁子	東京工業専門学校	毒性部	6.3.1		女	
小栗育一郎	昭和女子大学家政学部	食品添加物部	6.3.1		女	
濁川雄一	北里大学衛生学部	療品部	6.3.22		女	
杉本真紀	北里大学衛生学部	環境衛生化学部	6.3.22		男	
中島美枝	大阪薬科大学	支所薬品試験部	5.10.1	5.12.17	女	
栗原奈月	大阪薬科大学	支所薬品試験部	5.10.1	5.12.17	女	
山本知子	大阪薬科大学	支所食品試験部	5.10.1	5.12.17	女	
森知子	大阪薬科大学	支所食品試験部	5.10.1	5.12.17	女	
吉川佳代	大阪薬科大学	支所生物試験部	5.10.1	5.12.17	女	

医薬品の適正な評価を志向した光学異性体に関する研究 (第1次)  
(平成3年~平成5年)

世話人 有機化学部 宮田 直樹

現在市販されている医薬品の50%以上は、キラル中心を有しており一对のエナンチオマー(光学異性体)が存在する。しかし、これらのキラル中心を有する医薬品のうち約半数はラセミ体(*d*体と*l*体の等量混合物)である。特に合成医薬品については、そのうちわずか10%がホモキラル(光学的に純粋)化合物であり、残りの約90%はラセミ体として商品化されている。

一般に、体内に入った薬物は、内因性作用物質のアゴニストやアンタゴニストとして各種のレセプターや調節因子に結合し、薬理作用や副作用を発現する。その際、*d*体と*l*体とで基質結合部位への親和性に差があることが多く、時にはそれぞれ両者が異なった基質結合部位に結合する。さらに、薬物代謝酵素の多くは高い立体選択性を示すことから、ラセミ体の薬物が*d*体と*l*体とで異なった代謝を受け、一方の光学異性体が特異的に薬理活性を示す場合や、*d*体と*l*体とが異なった薬理作用や副作用を示す場合など、光学異性体に関して多くの事実が明らかになり、現在では、*d*体と*l*体とでは生理活性が異なるのは当然と考えられるようになった。その結果、キラル中心を有する医薬品をラセミ体で開発する際には、薬理活性、薬物動態を個々の光学異性体について明らかにし、毒性が認められた場合には毒性がどの光学異性体によるのかを確認する必要が生じてくる。またこのためには、光学異性体の品質、純度を保証する製造法および試験法を確立せねばならない。一方、最初から経済的に成り立つようなホモキラル医薬品の合成法を開発できれば、ラセミ医薬品に関する諸問題を完全に回避できる。それゆえ、ホモキラル化合物を合成する技術(chiral technology)の開発研究が活発化している。また、従来ラセミ体で商品化されていた医薬品については、それらのホモキラル化合物を開発する動き(racemic switch)も盛んである。特にこの“racemic switch”は、開発期間、開発コストの点で利点が多い。また、医療の現場で、“ラセミ医薬品よりもホモキラル医薬品

の方がよい”という考え方もあり、ホモキラル医薬品の開発は、今後一層加速すると考えられる。

このような状況下、光学異性体に関する諸研究を重点的に展開することは新医薬品の評価研究の領域において重要研究課題となっている。以上の見地より、次のような分担研究課題により、医薬品の適正な評価を志向した光学異性体に関する基礎研究(第1次:平成3~5年度)を実施した。

1. 新医薬品候補化合物の合成を目的とした立体選択的合成反応の開発に関する研究
2. 光学異性体の高感度識別システムの確立に関する研究
3. 天然由来の光学活性成分の分離・定量および薬効・薬理作用の比較に関する研究
4. 光学活性薬物の代謝および生体内動態の解明に関する研究

以下に、分担研究課題別に研究成果を報告する。

## 文 献

- 1) Chem. & Eng. News, Jun. 15, p. 5 (1992), *ibid*, Sep. 28, p. 46~79 (1992), *ibid*, Sep. 27, p. 38~65 (1993)
- 2) 化学増刊, 5月号, p. 157~158 (1993)

## 光学異性体の合成を目的とした立体選択的合成反応の開発

有機化学部 栗原 正明

**Keywords:** asymmetric acetalization, dioxirane, stereoselective epoxidation

現在、不斉炭素を有する医薬品の大部分は二つの光学異性体(鏡像体)が混合したラセミ体として使用されている。一方、光学異性体間で異なった薬理作用や副作用を示す多くの事例が報告されている。キラルな薬物の有効性、安全性を十分確保するためには、両鏡像体が異なった化合物であるとの認識に立ち、両鏡像体それぞれを評価しなくてはならない。そのためには、薬物が望ましい立体構造でしかも光

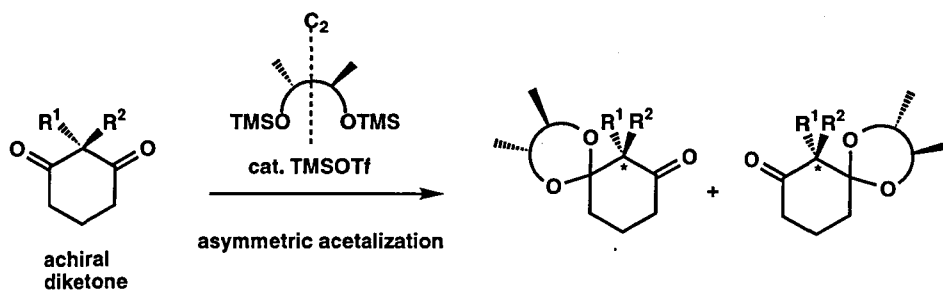


Fig. 1. Asymmetric acetalization of prochiral diketone

Table 1. Asymmetric acetalization of prochiral diketone

Entry	Diketone	Alkoxy silane	Yield (%)	Selectivity	Abs. config.
1			93	62:38	S
2			76	61:39	S
3			84	30:70	R
4			53	85:15	S
5			42	66:34	-
6			41	79:21	-

学的に純粋なかたちで効率よく供給されることが必要不可欠であり立体選択的な合成法の開発が必要である。

(1) C<sub>2</sub> 対称を有する光学活性ジオールによる不斉アセタール化反応の開発  
 エナンチオトピックな関係にある二つの官能基を

分子内に持つプロキラル化合物を用いた不斉合成法は光学活性体を得るための有用な方法論の一つである。この方法論は化学変換によって、一つの不斉源より両鏡像体を合成できる利点を有している。

そこで、プロキラル中心を有する対称ジケトンの C<sub>2</sub> 対称な光学活性ジオールによる不斉アセタール



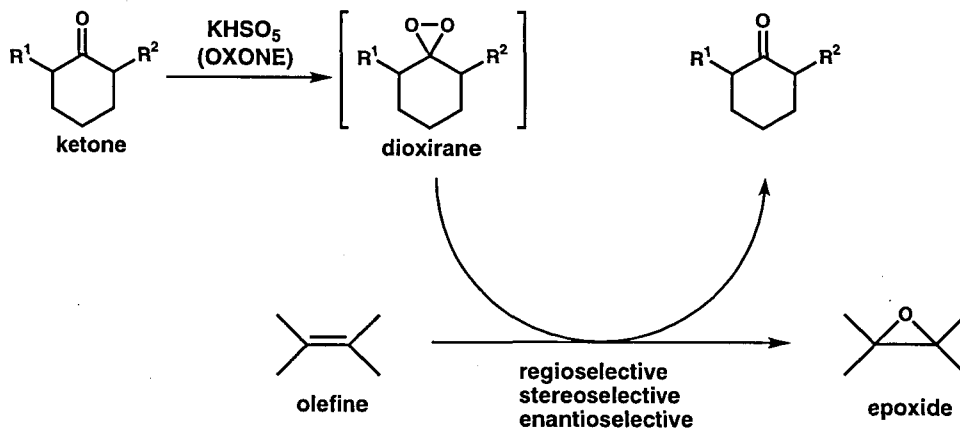


Fig. 2. Stereoselective epoxidation with dioxiranes generated from ketones

Table 2. Epoxidation of 2-Cyclohexen-1-ol

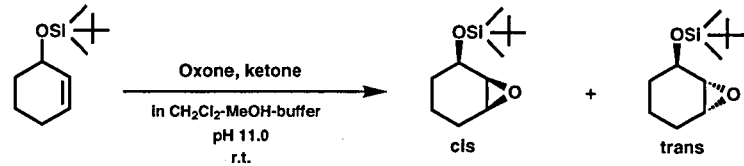
ketone	reaction time(h)	isolated yield (%)	selectivity (cis:trans)
	1.5	69	36 : 64
	3.5	63	29 : 71
	3.0	66	<b>23 : 77</b>
no ketone	3.0	46	<u>73 : 27</u>
<b>m-CPBA</b>		<b>83</b>	<b>95 : 5</b>


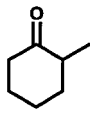
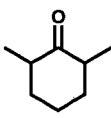
化反応の検討を行った (Fig. 1)。

対称ジケトンとしては有用性の高いジ置換のシクロペンタンジオンおよびシクロヘキサンジオンを用いた。ジケトンとジオールに酸触媒を加え、ベンゼン中加熱還流でアセタール化を行ったが高い選択性は得られなかった。そこで、対称ジケトンとジオー

ルの TMS 体とを用いて触媒量の TMSOTf 存在下、 $-20^{\circ}\text{C}$  で反応を行った結果、最高 85 : 15 の選択性でそれぞれのジアステレオマーが得られた (Table 1)。ここで得られたアセタール体は、医薬品候補化合物、生理活性天然物質 (Taxol など) の合成の重要な光学活性中間体となり得る。

Table 3. Epoxidation of TBDMS derivative of 2-Cyclohexen-1-ol



ketone	reaction time(h)	isolated yield (%)	selectivity (cis:trans)
	3.5	40	13 : 87
	1.5	77	10 : 90
	3.0	65	<b>7 : 93</b>
no ketone	3.0	0	-
<b>m-CPBA</b>	<b>3.5</b>	<b>85</b>	<b>18 : 82</b>

## (2) ジオキシランを用いた立体選択的エポキシ化反応の開発

酸化反応は立体選択的反応という観点からはまだ未開拓な分野の一つである。特にエポキシ化反応は合成上非常に有用なエポキシドを合成する応用性の広い反応である。酸化剤 potassium peroxomonosulfate (KHSO<sub>5</sub>) は、アセトンの存在下、ジメチルジオキシランを中間体としてオレフィンのエポキシ化する。この反応においてアセトン以外のケトンを用いれば、立体選択的なエポキシ化反応を行うことが出来ると考えられる (Fig. 2)。

しかし、アセトン以外のケトンを用いたエポキシ化の報告は少なく、ケトンの構造とエポキシ化の関係については不明な点が多い。その点を明らかにするとともに立体選択的エポキシ化反応について検討を行った。ケトンと KHSO<sub>5</sub> よりジオキシランを生成する通常の条件である中性条件では、カルボニル基が立体障害を受けたケトンではエポキシ化が進行しにくかった。そこで、反応条件の検討を行ったところ、塩化メチレン-メタノール-緩衝液の溶媒系で pH 11 の条件でエポキシ化を行うと、さまざま

な構造のケトンで高収率でエポキシ化が進行することを見いだした。

この条件で、種々のケトン由来のジオキシランによる立体選択的エポキシ化を検討した。基質のオレフィンとしてはシクロヘキサノール誘導体および 1,3-ジメチルシクロヘキセンを用いた。結果を Table 1, 2, 3 に示す。

いずれの場合も高い選択性 (最高 96 : 4) でトランス体が得られた。また、シクロヘキサノールについては、*m*-CPBA がシス選択性であるのにトランス選択性を示したことも興味深い。嵩高いケトンほどよい選択性を示した。のように、ジオキシランを用いると高い立体選択性でエポキシ化が行えることがわかった。今後、生理活性物質合成への応用が期待できる。

## 発表論文

- 1) M. Kurihara, S. Ito, N. Tsutsumi, N. Miyata Tetrahedron Lett., 1994, 35, 1577-1580
- 2) R. Floresca, M. Kurihara, D. S. Watt J. Org. Chem., 1993, 58, 2196-2200

Table 4. Epoxidation of 1, 3-dimethyl-1-cyclohexene

ketone	reaction time(h)	yield(%)	selectivity(cis:trans)
	3.0	56	14 : 86
	3.5	80	9 : 91
	3.5	83	12 : 88
	4.0	68	7 : 93
	3.0	100	4 : 96
	18.5	70	23 : 77
no ketone	2.5	28	25 : 75
m-CPBA	1.0	76	46 : 54

### 光学異性体医薬品の高感度分離分析法の開発

薬品部, 環境衛生化学部 豊岡 利正

**Keywords :** optical isomer, chiral derivatization, HPLC analysis

#### [目的]

医薬品等の有機化合物の中には光学異性体が存在するものが多数みられ, 光学異性体間で薬理作用や副作用が異なることがある。これらの作用が異性体間で著しく異なる場合には, 医薬品の有効性や安全性の点から, これらを精度よく分離測定することが必要不可欠である。

光学異性体の分離検出には, 液体クロマトグラフ(HPLC)法が一般的である。HPLCによる(+)-体, (-)-体の分析には, 次の3種の方法がよく用いられる。1) キラルな固定相を用いる直接分析法, 2) キラルな移動相を用い, アキラルな固定相で分

析する方法, 3) キラルな誘導体化試薬を用いて, 対応するジアステレオマーとしたあと, アキラルな固定相で分析する間接法。これらのうち 1) の方法は簡便で光学異性体を比較的良好に分離するが, 一般的には理論段数が低く, 高感度分析は望めない。これに対して 3) の間接法はやや操作が煩雑ではあるが, さまざまな種類の誘導体に導くことが可能であり, ODSなどの通常カラムで分離することができるため, 微量成分の高感度分析に適している。本研究では微量な光学活性カルボン酸, アルコールおよびアミン類の高感度分析を目的とし蛍光誘導体化試薬の開発を試み, これを医薬品等の光学活性化合物の分離検出に応用した。

#### [実験方法・結果]

カルボキシル基に特異的な6種の光学活性蛍光標識試薬 [DBD-APy, ABD-APy, NBD-APyの(+)-体および(-)-体] (Fig. 1)を新規合成した。これら試薬と光学活性カルボン酸との反応は, 2,2'-ジピリジルジスルフィドとトリフェニルフォスフィンの存在下室温約2時間で完結し, 対応する蛍光性のジアステレオマーを生成した。DBD-APy,

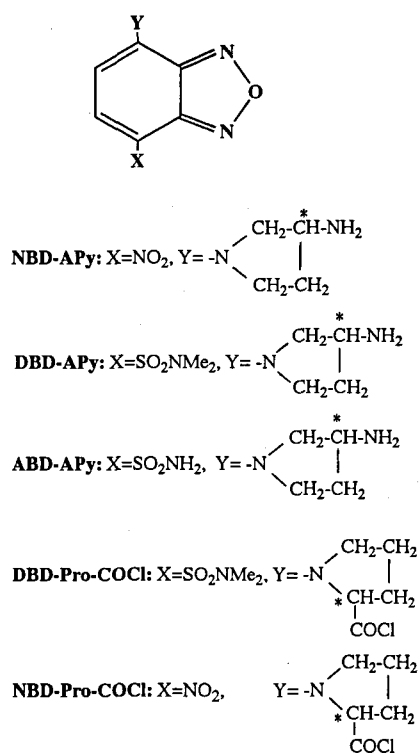


Fig. 1. Structures of fluorescent chiral tagging reagents

ABD-APy および NBD-APy より誘導されたジアステレオマーの励起, 蛍光波長は, それぞれ 580 nm (励起波長, 470 nm), 585 nm (励起波長, 470 nm) および 540 nm (励起波長, 470 nm) と長波長であった。抗炎症剤や N-アセチルアミノ酸の (±)-体より得られたジアステレオマーを逆相-HPLC で分離後蛍光検出したところ, それぞれの化合物の (+)-体および (-)-体を完全に分離することができ (順相系での Rs: 2.58~7.60, 逆相系での Rs: 1.62~6.96), 検出限界は 10~30 fmol と高感度であった。レーザー蛍光法や化学発光法では, さらに感度が向上し, 数 fmol の検出が可能となった。

アルコール, アミン分析用には 4 種 [DBD-Pro-COCl, NBD-Pro-COCl の (+)-体および (-)-体] を新規合成した (Fig. 1)。これらの試薬は, アルコール類あるいはアミン類とベンゼンなどの無水溶媒中ピリジンなどの脱酸剤の存在下加熱することにより対応する蛍光性のエステル型, アミド型のジアステレオマーを生成した。誘導体の蛍光波長は, DBD-APy や NBD-APy の場合と同様に長波長で

あり, アルコールやアミンの種差に影響されなかった。これら誘導体は, 逆相-HPLC 法では分離が不十分であったが, 順相-HPLC 法では完全に分離することができた。

#### [考察]

新規に開発した光学活性蛍光標識試薬は, 各官能基と緩やかな条件下反応し, 安定な蛍光性のジアステレオマーを生成した。HPLC と組み合わせることによって光学異性体を高感度に分離検出することが可能となった。さらにこれら試薬の (+)-体または (-)-体を使い分けることにより, 光学異性体の溶出位置を逆転させることができ, 微量混在する光学活性体の一方を, 多量に存在する他方より早く溶出させることができる。そのため従来, 多量に存在する光学活性体の妨害によって定量が困難であった微量成分を, 精度よく測定することができる。さらにレーザー蛍光検出法や化学発光検出法により, 感度の向上が期待される。加えて, ジアステレオマーの励起, 蛍光波長が長波長域にあるため, 測定試料溶液に混在する蛍光性化合物の妨害を受けにくく, 血液や尿などの生体試料中の目的化合物の測定に有利であろう。

#### 発表報文

- 1) Toyo'oka, T., Ishibashi, M., and Terao, T.: Fluorescence chiral derivatization reagents for carboxylic acid enantiomers in high-performance liquid chromatography. *Analyst*, **117**, 727~733 (1992)
- 2) Toyo'oka, T., Ishibashi, M., and Terao, T.: Resolution of carboxylic acid enantiomers by high-performance liquid chromatography with highly sensitive laser-induced fluorescence detection. *J. Chromatogr.*, **625**, 357~361 (1992)
- 3) Toyo'oka, T., Ishibashi, M., and Terao, T.: Resolution of carboxylic acid enantiomers by high-performance liquid chromatography with peroxyoxalate chemiluminescence detection. *J. Chromatogr.*, **627**, 75~86 (1992)
- 4) Toyo'oka, T., Ishibashi, M., and Terao, T.: Further studies for the Resolution of carboxylic acid enantiomers by high-performance liquid chromatography with fluorescence and laser-induced fluorescence detection. *Anal. Chim. Acta*, **278**, 71~81 (1993)
- 5) Toyo'oka, T., Ishibashi, M., Terao, T., and Imai, K.: 4-(N, N-dimethylaminosulfonyl)-7-

(2-chloroformylpyrrolidin-1-yl)-2,1,3-benzoxadiazole: Novel Fluorescent chiral derivatization reagents for the resolution of alcohol enantiomers by high-performance liquid chromatography. *Analyst*, **118**, 759~763 (1993)

- 6) Toyo'oka, T., Liu, Y.-M., Hanioka, N., Jinno, H., and Ando, M.: Determination of hydroxyls and amines, labelled with 4-(N,N-dimethylamino-sulfonyl)-7-(2-chloroformylpyrrolidin-1-yl)-2,1,3-benzoxadiazole, by high-performance liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta*, **285**, 343~351 (1994)
- 7) Toyo'oka, T., Liu, Y.-M., Jinno, H., Hanioka, N., Ando, M., and Imai, K.: Chiral separation of amines by high-performance liquid chromatography after tagging with 4-(N,N-dimethylamino-sulfonyl)-7-(2-chloroformylpyrrolidin-1-yl)-2,1,3-benzoxadiazole. *Biomed. Chromatogr.*, **8**, 85~89 (1994)
- 8) Toyo'oka, T., Liu, Y.-M., Hanioka, N., Jinno, H., Ando, M., and Imai, K.: Resolution of enantiomers of alcohols and amines by high-performance liquid chromatography after derivatization with novel fluorescent chiral reagent. *J. Chromatogr.*, **675**, 79~88 (1994)

#### 光学異性体の分離分析評価理論の確立と分析への応用

食品部 松田りえ子  
療品部 林 譲

**Keywords** : optimization, information theory, HPLC

クロマトグラフィは光学異性体分析で最も広く使用されている分析法である。精密な測定を行う分析法を設定するためには、種々の分析条件での分析の能力を適切に評価し最適な方法を選ばなければならない。そこで、クロマトグラフィによる光学異性体の分離分析の評価法について検討した。

光学異性体の特長は、一般に分離が困難で大きな分離度が得られないことである。さらに、非常に微量に含まれている光学異性体を定量して精密な光学純度を求める場合もあり、このような場合にはクロマトグラフィ分離の評価に用いられる分離度 (Rs) では的確な評価が難しい。そこで、本研究では、クロマトグラフィから得られる情報量を表す関数 FUMI (Function of Mutual Information) を評価関数にして、分離ではなく分析精度の観点から光学異性体の分析法評価を行った。FUMIは分離度の様なピーク間の関係に加えて、個々のピークの形 (高さ, 幅, 面積) とクロマトグラム上のノイズレベルからその定量精度を表す関数である。以下に、FUMIを用いて得られた研究成果について述べる。

まず、リガンドとして naphthylethylurea 基を結合したカラムの p-bromophenyl-carbamyl 化アミノ酸の光学異性体分離能力の評価を行った。スパーサーである polyethyleneamine のユニット数 1~4 のカラムに対して、光学異性体のクロマトグラフィから計算した FUMI と Rs を Fig. 1 に示す。分離度 Rs はユニット数によって大きく異なり、これから最適なユニット数を選ぶことは難しい。しかし、FUMI は精度を表しているので、最適なユニット数は 2 であることが容易に判断できる。ユニット数 1 で、Ala と Thr の情報量 FUMI が小さいが、こ

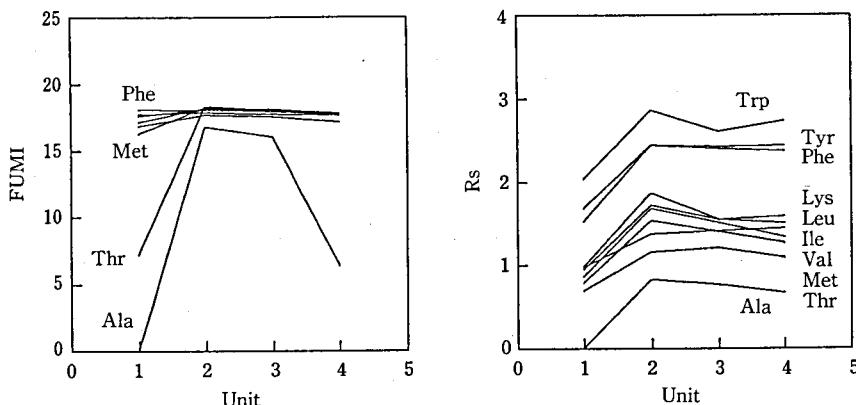


Fig. 1. ユニット数の違いによる光学異性アミノ酸分離の変化

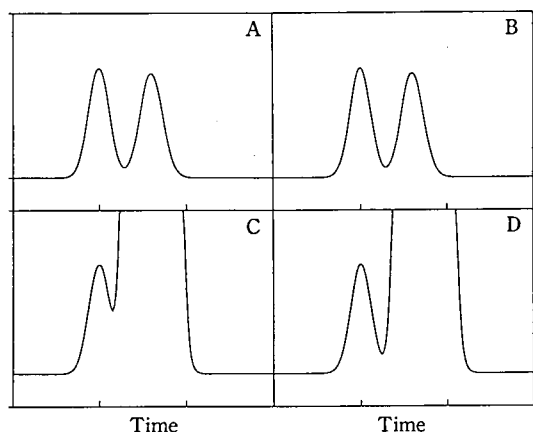


Fig. 2. ピーク分離とピーク面積

れは適度な分離が得られなかったためである。また、分析温度も検討し、最適温度も設定した。

一般に、2つのピークがほぼ完全に分離する分離度1.5以上が望ましい分析条件と考えられている。しかしながら、光学異性体分析によく見られるように、2つのピークの面積が大きく違う場合には、分離度1.5では正確な定量は困難でありより大きな分離度が要求される。Fig. 2Aは分離度1.22で面積が同じガウス型ピークを示す。分離度が同じでも、面積比が1:100になるとFig. 2Cのようにかなり重なってくる。これらの場合について、FUMIを使って得られた最適分離をFig. 2BとFig. 2Dに示す。ピーク的面積が同じ場合は、最適分離 (Fig. 2B) は元の分離 (Fig. 2A) と同じである。しかし、面積が100倍異なると、最適分離 (Fig. 2D) は元の分離 (Fig. 2C) よりかなり大きくなる。つまり、面積が大きく異なったピークはFig. 2Dに示すように分離しないと精度の高い分析は行えないことをFUMI理論は示している。

機器分析の定量精度は、一般にデータ解析の方法にも大きく依存する。市販のインテグレータでは、適当なアルゴリズムによりピークの範囲を定め、その全面積を積分で求めている。また、ピーク高さ法では最も高い1点の高さを測定している。しかし、ピーク両端では信号レベルとノイズレベルが近くあまり多くの情報は得られない。また、ピーク高さの測定では、他のデータポイントから得られるはずの情報を失うことになる。そこで、ノイズとしてホワイトノイズのみを考えた時のガウス型ピークの

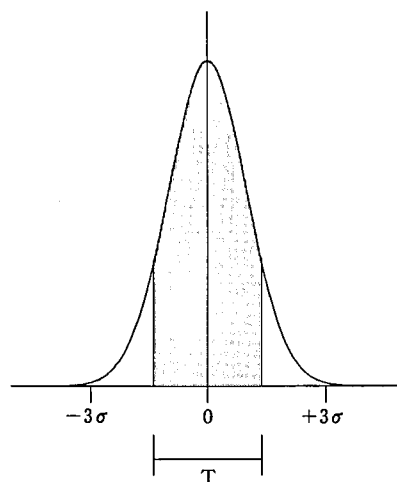


Fig. 3. ガウス型ピークの最適積分区間

解析から、最も精度の高い積分範囲を求めた。Fig. 3の斜線とTで示した領域がこの最適積分区間である。ピークトップの両側1.4s (sはガウス型ピークのSD (幅)) までの積分が、最も精度が高く、大きな情報が得られることがわかった。

実際の分析機器のノイズはホワイトノイズではなく、1/fノイズであることはよく知られている。上の研究では、問題を簡単にするためにホワイトノイズを用いた。しかし、実際のクロマトグラフィの実験でも、全面積を広い範囲で積分して求めるよりもピークトップ周辺の狭い領域だけで積分を行うほうが、得られた定量値の精度が高いことが表1に示してある。例えば、表1のnaphthaleneのピークを最も希薄な溶液で測定すると、広い範囲の積分 (Area) の定量精度は8.81%であるが、15ポイントの積分の定量値は4.42%であり、後者は前者の約半分である。このように、積分区間を変えるだけで分析精度が大きく変わることがわかる。濃い濃度の溶液の精度は、ノイズではなく注入誤差に大きく依存するので積分区間の違いによる精度の差は現われない。

一般に、分析条件の評価はカラムあるいは検出条件などが取扱われている。しかし、2つのピーク的面積比あるいは得られた信号を積分する範囲によっても、分析精度は大きく変化するので、化学分析と数学的データ解析を合わせた最適化を行う必要がある。FUMIを目的関数として用いることにより、このような広い意味の評価と最適化が可能となった。

Table 1. Observed RSD (%) of measurements obtained from different signal processing methods in HPLC (n=8).

Conc.*	Area**	Integration Domain			Peak Maximum Height	Least Squares
		$\pm 2.5\sigma$	$\pm 1.5\sigma$	15 points		
Naphthalene ( $\sigma = 12$ data points)						
1/500	8.81	6.63	5.28	4.42	4.33	5.29
1/200	4.89	3.73	2.66	2.07	2.15	2.78
1/100	2.36	2.29	2.14	2.02	1.94	2.36
1/50	0.55	0.51	0.45	0.44	0.44	0.42
1/20	0.29	0.26	0.27	0.26	0.22	0.35
1/10	0.20	0.19	0.24	0.26	0.22	0.43
1	0.17	0.16	0.25	0.33	0.29	0.28
Acenaphthene ( $\sigma = 14$ data points)						
1/500	19.91	13.66	10.82	8.88	8.09	10.95
1/200	5.36	2.97	2.14	2.01	2.67	2.30
1/100	4.13	3.59	3.24	2.94	2.48	3.18
1/50	1.85	1.42	1.16	1.20	1.13	1.19
1/20	0.85	0.52	0.39	0.32	0.42	0.46
1/10	0.48	0.36	0.31	0.29	0.35	0.40
1	0.23	0.20	0.22	0.33	0.53	0.26
Pyrene ( $\sigma = 17$ data points)						
1/500	7.11	6.70	5.83	4.96	4.63	5.99
1/200	3.64	2.51	1.90	1.52	1.51	2.30
1/100	3.21	2.81	2.57	2.51	2.38	2.51
1/50	0.75	0.62	0.58	0.53	0.50	0.78
1/20	0.45	0.35	0.26	0.24	0.27	0.26
1/10	0.56	0.23	0.23	0.24	0.28	0.37
1	0.38	0.23	0.21	0.31	0.25	0.22
Perylene ( $\sigma = 23$ data points)						
1/500	13.69	10.61	8.58	6.96	6.87	8.43
1/200	6.11	4.50	3.52	2.81	2.75	3.46
1/100	3.28	3.03	2.82	2.65	2.55	2.80
1/50	1.51	1.44	1.32	1.26	1.06	1.51
1/20	0.68	0.49	0.42	0.47	0.39	0.37
1/10	0.32	0.20	0.17	0.18	0.21	0.27
1	0.26	0.19	0.15	0.23	0.29	0.26

\*: unit concentration denotes 0.05 mg/mL for naphthalene and acenaphthene, 0.02 mg/mL for pyrene and 0.03 mg/mL for perylene (for detailed experimental conditions, see ref. [8]). \*\*: a wide integration domain which is equal to the working region for the least squares curve fitting;  $\pm 5\sigma$  for naphthalene;  $\pm 4\sigma$  for acenaphthene;  $\pm 5\sigma$  for pyrene;  $\pm 4\sigma$  for perylene.

### 発表論文

- 1) K. Iwaki, Y. Yamazaki, N. Nimura, T. Kinoshita, R. Matsuda and Y. Hayashi: *Chromatographia*, **37**, 156 (1993)
- 2) R. Matsuda, Y. Hayashi, T. Suzuki and Y. Saito: *Chromatographia*, **32**, 233 (1991)
- 3) Y. Hayashi and R. Matsuda: *Anal. Sci.*, **10**, 553 (1994)
- 4) Y. Hayashi and R. Matsuda: *Chemom. Intel. Lab. Sys.*, **18**, 1 (1993)
- 5) Y. Hayashi and R. Matsuda: *Advances in Chromatography*, **34**, 347 (1994)

ノルエフェドリン光学異性体の体内動態に関する研究

生薬部 鎌倉 浩之

**Keywords :** pharmacokinetics, stereoselective disposition, norephedrine enantiomers

[目的]

ノルエフェドリン (NE) は、生薬マオウに含まれるアルカロイドの一つで、不斉炭素を二つ持ち、立体異性体が存在する。マオウ中に存在するのはこれらのうち、1*R*, 2*S*-(-)-ノルエフェドリンと1*S*, 2*S*-(+)-プソイドノルエフェドリンの二つである。ノルエフェドリンは、覚醒剤であるアンフェタミンに類似の構造を持ち、日本では主に鼻炎用薬としてラセミ体で用いられている。今回我々が研究を行ったのは、そのラセミ体および光学活性体である(-)-NE, (+)-NEである。NEの薬理作用の大部分は(-)-体にあり、(+)-体にはほとんど活性がみられない。しかしながら(-)-体とラセミ体の薬理活性を比較すると、(+)-体にも弱いながら活性があるにもかかわらず、(-)-体はそれと同量の(-)-体を含むラセミ体と同等かより強い活性を示すとの報告<sup>1-3)</sup>がなされており、それは作用部位で

の競合によるものとしている。

今回我々は、体内動態の解析を行ったが、NEの体内動態の解析は、ラセミ体のままか、(-)-体だけで行われており、それぞれ光学分割して行っている報告はみられない。先に報告されている薬理学的知見から判断して、光学活性体間での相互作用も考えられる。これらの観点から我々は、本研究を行った。

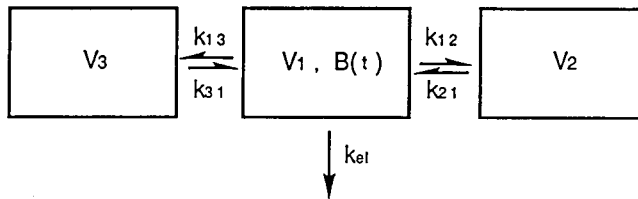
[方法]

1. 血漿中濃度ならびに尿中排泄量

ウィスター系雄ラットにネプタール麻酔下、NE (光学活性体 10 mg/kg またはラセミ体 20 mg/kg) 投与し、股動脈から経時的に採血した。血漿を遠心分離し、抽出後、減圧下乾固し、2,3,4,6-tetra-O-acetyl isothiocyanate (GITC) 誘導体とした後 HPLC で定量した。尿は除タンパクなどの処理を行ったあと同様に GITC 誘導体とし HPLC で定量した。

2. 血清ならびに組織たんぱく結合

ウィスター系雄ラットをエーテル麻酔下、腹部大動脈より脱血した後各組織を取り出した。分離した血清に各濃度になるように NE を加え、限外ろ過法で行った。定量は、血漿の場合と同様に行った。各組織は 25% ホモジネート (soerensen buffer pH



Plasma concentrations

$$B(t) = \frac{\text{Dose}}{V_1} \left\{ \frac{(k_{21} - \alpha)(k_{31} - \alpha)}{(\alpha - \beta)(\alpha - \gamma)} \exp(-\alpha t) + \frac{(k_{21} - \beta)(k_{31} - \beta)}{(\alpha - \beta)(\beta - \gamma)} \exp(-\beta t) + \frac{(k_{21} - \gamma)(k_{31} - \gamma)}{(\alpha - \gamma)(\beta - \gamma)} \exp(-\gamma t) \right\}$$

Renal Clearance

$$\frac{dE(t)}{dt} = Cl \cdot B(t) \tag{1}$$

$$E(t) = Cl \int_0^t B(\theta) d\theta = Cl \cdot \text{AUC}(t) \tag{2}$$

When the time - rag exists between urinary excretion E(t) and AUC(t),

$$E(t) = Cl \int_0^t W(t - \theta) \cdot \text{AUC}(\theta) d\theta$$

W : Weighting function for the time - rag (2)

$$W(t) = KL \cdot \exp(-KL \cdot t)$$

Fig. 1. Pharmacokinetic models for plasma and urinary excretion data



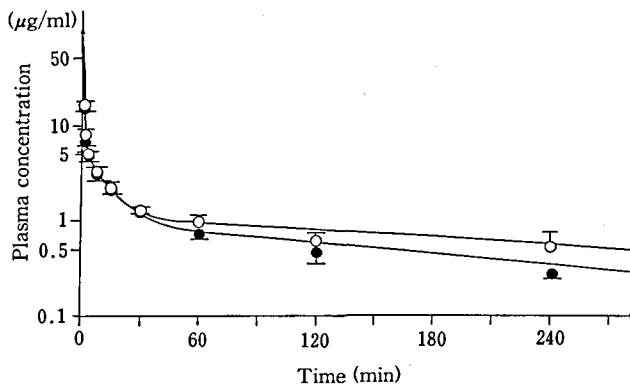


Fig. 2. Plasma concentration curve of (-)-norephedrine after intravenous administration of (-)-enantiomer or racemate in rats a), b), c), d)

- a) Values are the means  $\pm$  S.E. of six experiments  
 b) Enantiomer was injected at a dose of 10 mg/kg  
 c) Racemate was injected at a dose of 20 mg/kg  
 d) ○: enantiomer administration;  
 ●: racemate administration

Table 1. Pharmacokinetic parameters of (-)-norephedrine after intravenous administration of (-)-enantiomer or racemate in rats a), b)

- a) Values are the means  $\pm$  S.E. of six experiments  
 b) Enantiomer was injected at a dose of 10 mg/kg  
 c) Racemate was injected at a dose of 20 mg/kg  
 d) Significantly different from (-)-enantiomer administration ( $p < 0.025$ )

		(-)-form		(±)-form <sup>c)</sup>	
A	(µg/ml)	77.7	$\pm$ 20.8	38.1	$\pm$ 8.31
$\alpha$	(min <sup>-1</sup> )	1.82	$\pm$ 0.300	1.28	$\pm$ 0.230
B	(µg/ml)	5.65	$\pm$ 0.535	4.75	$\pm$ 0.745
$\beta$	(min <sup>-1</sup> )	0.114	$\pm$ 1.74 $\times 10^{-2}$	9.35 $\times 10^{-2}$	$\pm$ 1.30 $\times 10^{-2}$
C	(µg/ml)	1.14	$\pm$ 0.260	0.982	$\pm$ 0.202
$\gamma$	(min <sup>-1</sup> )	2.79 $\times 10^{-3}$	$\pm$ 8.60 $\times 10^{-4}$	4.31 $\times 10^{-3}$	$\pm$ 1.09 $\times 10^{-3}$
AUC	(µgmin/ml)	623.4	$\pm$ 106.7	388.0	$\pm$ 83.9
Cl <sub>tot</sub>	(ml/min/kg)	18.2	$\pm$ 2.61	29.9	$\pm$ 4.01 <sup>d)</sup>
V <sub>1</sub>	(ml/kg)	164.1	$\pm$ 43.2	255.0	$\pm$ 32.0
V <sub>dss</sub>	(l/kg)	7.66	$\pm$ 1.51	7.66	$\pm$ 2.12

7.4) とし、これに各濃度になるように NE を加え、限外ろ過法で行った。定量は抽出後 GITC 誘導体として行った。

### 3. 組織中濃度

ウィスター系雄ラットにネンブタール麻酔下、NE (光学活性体 10 mg/kg またはラセミ体 20 mg/kg) 投与し、一定時間後腹部大動脈より脱血したあと各組織を取り出した。定量は除たんぱく抽出後

GITC 誘導体として行った。

### 4. 解析

血漿中濃度は、Fig. 1 に示した 3-コンパートメントモデルにあてはめて解析した。尿中排泄であるが、一般に薬物処理速度は、血中濃度に比例し、その比例定数がクリアランスと定義される。これを積分して (2) 式が得られる。尿中排泄であるのでここで E (t) は尿中排泄量を表す。今回我々の行っ

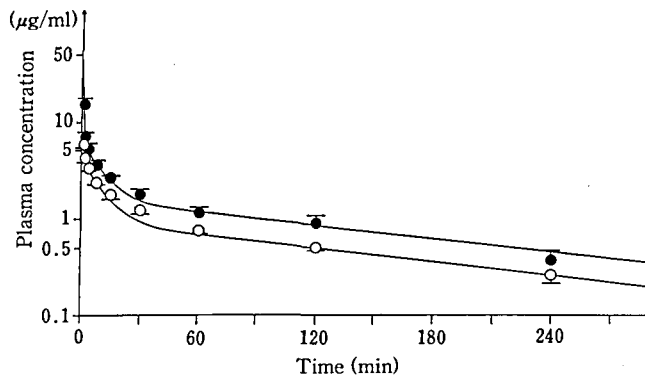


Fig. 3. Plasma concentration curve of (+)-norephedrine after intravenous administration of (+)-enantiomer or racemate in rats a), b), c), d)

- a) Values are the means  $\pm$  S.E. of six experiments
- b) Enantiomer was injected at a dose of 10 mg/kg
- c) Racemate was injected at a dose of 20 mg/kg
- d)  $\circ$ : enantiomer administration;  
 $\bullet$ : racemate administration

Table 2. Pharmacokinetic parameters of (+)-norephedrine after intravenous administration of (+)-enantiomer or racemate in rats a), b)

- a) Values are the means  $\pm$  S.E. of six experiments
- b) Enantiomer was injected at a dose of 10mg/kg
- c) Racemate was injected at a dose of 20mg/kg
- d) Significantly different from (+)-enantiomer administration ( $p < 0.025$ )
- e) ( $p < 0.05$ )

	(+)-form		( $\pm$ )-form <sup>c)</sup>	
A ( $\mu\text{g/ml}$ )	4.51	$\pm$ 0.727	45.0	$\pm$ 10.7 <sup>d)</sup>
$\alpha$ ( $\text{min}^{-1}$ )	0.833	$\pm$ 0.155	1.45	$\pm$ 0.266 <sup>d)</sup>
B ( $\mu\text{g/ml}$ )	3.22	$\pm$ 0.229	5.03	$\pm$ 0.851 <sup>e)</sup>
$\beta$ ( $\text{min}^{-1}$ )	0.107	$\pm$ $2.64 \times 10^{-2}$	0.109	$\pm$ $2.35 \times 10^{-2}$
C ( $\mu\text{g/ml}$ )	0.976	$\pm$ 0.124	1.66	$\pm$ 0.407
$\gamma$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$5.33 \times 10^{-3}$	$\pm$ $5.72 \times 10^{-4}$	$5.23 \times 10^{-3}$	$\pm$ $1.18 \times 10^{-3}$
AUC ( $\mu\text{g min/ml}$ )	230.0	$\pm$ 14.8	421.3	$\pm$ 42.2 <sup>d)</sup>
Cl <sub>tot</sub> ( $\text{ml/min/kg}$ )	44.4	$\pm$ 2.80	24.7	$\pm$ 1.88 <sup>d)</sup>
V <sub>1</sub> ( $\text{ml/kg}$ )	1210	$\pm$ 129.3	226.3	$\pm$ 35.6 <sup>d)</sup>
V <sub>dss</sub> ( $\text{l/kg}$ )	7.01	$\pm$ 0.656	5.48	$\pm$ 1.65

た実験において尿中排泄に遅延が観察されたために (2) 式を変形した下の式を用いた。W は遅延のための重み関数で、コンポリューションとして与えられる。

[結果・考察]

1. 血漿中濃度ならびに尿中排泄量

Fig. 2 に (-)-体およびラセミ体投与後の (-)-体の血漿中濃度推移ならびにシミュレーション曲線

を示した。30分まではそれぞれに大きな違いはみられないが、それ以降の消失に若干の違いがみられた。Table 1 に (-)-体およびラセミ体投与後の (-)-体の血漿中濃度の解析結果を示した。A,  $\alpha$ , B,  $\beta$ , C,  $\gamma$ , AUC, V<sub>1</sub>, V<sub>dss</sub> に有意差は認められなかった。A,  $\alpha$  の値は投与直後の血漿中濃度の低下がラセミ体投与時において若干緩やかなこと、C,  $\gamma$  の値は 30 分以降の消失が逆に光学活性体で

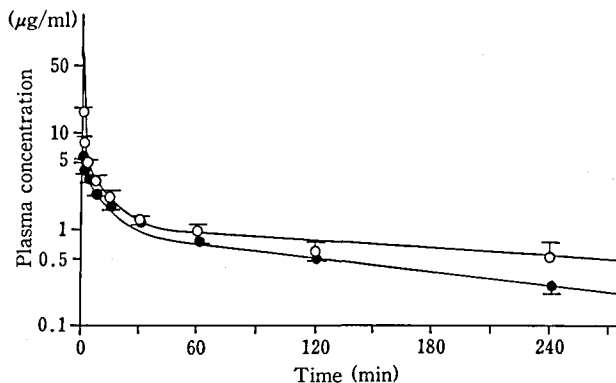


Fig. 4. Plasma concentration curve of (-)- and (+)-norephedrine after intravenous administration of each enantiomer in rats a), b), c)

- a) Values are the means  $\pm$  S.E. of six experiments  
 b) Enantiomer was injected at a dose of 10 mg/kg  
 c) ○: (-)-norephedrine; ●: (+)-norephedrine

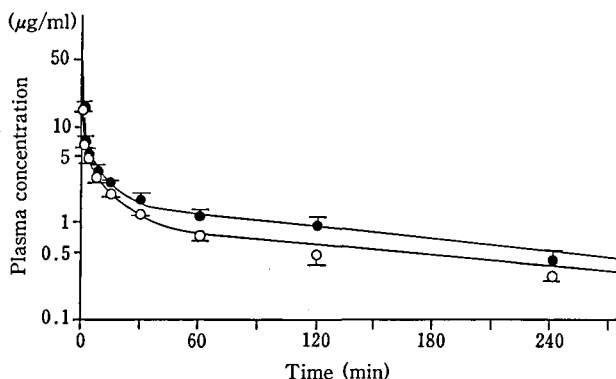


Fig. 5. Plasma concentration curve of (-)- and (+)-norephedrine after intravenous administration of racemate in rats a), b), c)

- a) Values are the means  $\pm$  S.E. of six experiments  
 b) Racemate was injected at a dose of 20 mg/kg  
 c) ○: (-)-norephedrine; ●: (+)-norephedrine

は緩やかなことに対応している。AUCに有意な差はみられなかったが、1.6倍異なっておりこれがクリアランスの差となって観測されたものと思われた。

Fig. 3に(+)-体およびラセミ体投与後の(+)-体の血漿中濃度推移ならびにシミュレーション曲線を示した。A,  $\alpha$ , B, AUC, クリアランス, V1に有意な差が認められた (Table 2)。

(-)-体と(+)-体の血漿中濃度推移は光学活性体投与時とラセミ体投与時では(-)-体は主に消失

過程に、(+)-体は分布の過程に差が認められた。また、光学活性体投与時には、(-)-体と(+)-体に大きな差が認められたが、ラセミ体投与時には殆ど差が認められなかった (Fig. 4, 5)。

Fig. 6, 7に尿中累積排泄量を示した。(-)-体は光学活性体投与時とラセミ体投与時とで大きな差が認められた。一方、(+)-体の方には、このように大きな差は認められなかった。Table 3に各クリアランス値をまとめたもの示した。トータルボディ

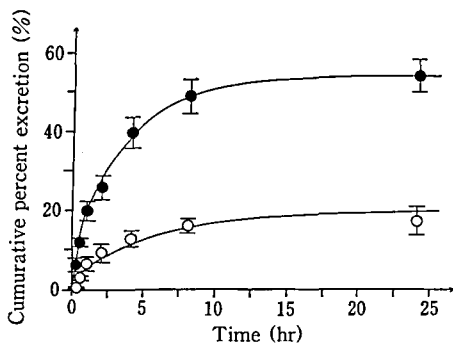


Fig. 6. Urinary excretion of (-)-norephedrine after intravenous administration of (-)-enantiomer of recemate in rats a), b), c), d)

- a) Values are the means  $\pm$  S.E. of six experiments
- b) Enantiomer was injected at a dose of 10 mg/kg
- c) Racemate was injected at a dose of 20 mg/kg
- d) ○: enantiomer administration;  
●: recemate administration

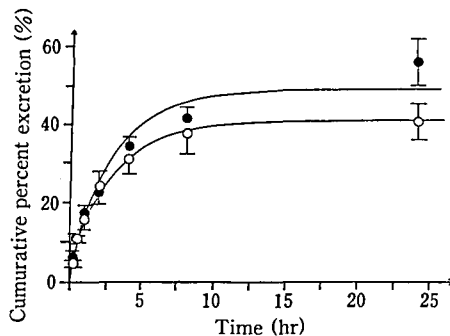


Fig. 7. Urinary excretion of (+)-norephedrine after intravenous administration of (+)-enantiomer of recemate in rats a), b), c), d)

- a) Values are the means  $\pm$  S.E. of six experiments
- b) Enantiomer was injected at a dose of 10 mg/kg
- c) Racemate was injected at a dose of 20 mg/kg
- d) ○: enantiomer administration;  
●: recemate administration

Table 3. Clearances

a)  $Cl_m = Cl_{tot} - Cl_r$

		(-)-Norephedrine		(+) -Norephedrine	
		(-)-form	(±)-form	(+)-form	(±)-form
Cl <sub>tot</sub>	(ml/min/kg)	18.2	29.9	44.4	24.7
Cl <sub>r</sub>	(ml/min/kg)	4.05	17.6	18.8	12.6
Cl <sub>m</sub> <sup>a)</sup>	(ml/min/kg)	14.2	12.3	25.6	12.1

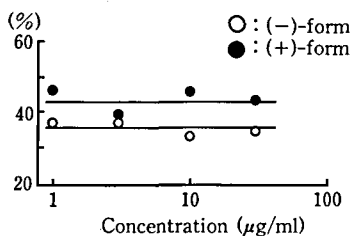


Fig. 8. *In vitro* rat serum protein binding of (-)- or (+)-norephedrine (n=3-4)

クリアランスは、血漿中濃度の解析により求めた値である。(-)体ではラセミ体投与時の方が大きな値を示したが、(+)体では逆に光学活性体投与時の方が大きな値を示した。尿中排泄クリアランスは、

(-)体ではラセミ体投与時の方が大きな値を示したが、(+)体ではわずかであるが光学活性体投与時の方が大きな値を示した。既に報告されているRIを用いた代謝に関する研究<sup>4)</sup>によると、ラット

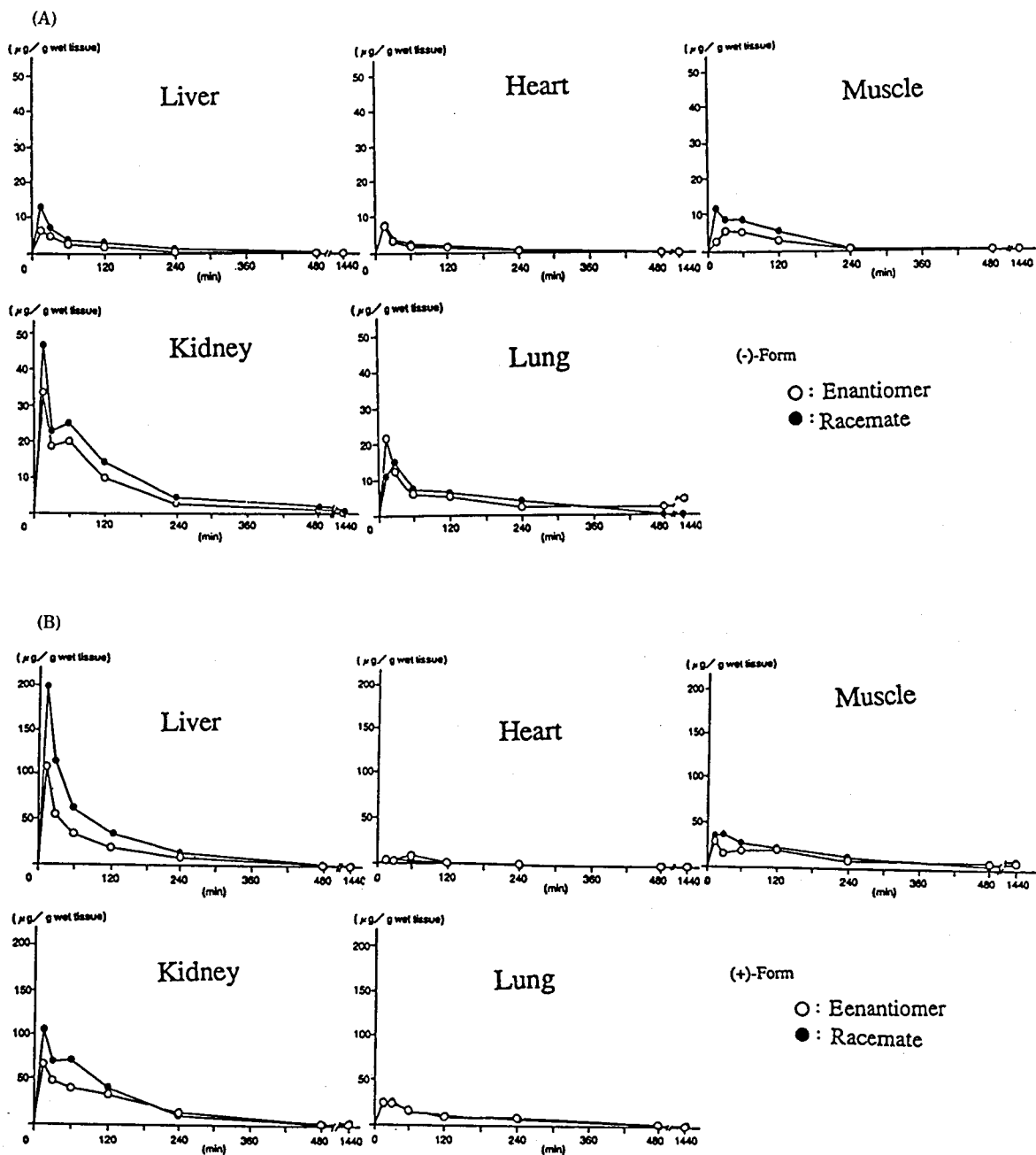


Fig. 9. Tissue distribution of (-)- or (+)-norephedrine after intravenous administration of (A) (-)-enantiomer (○) or racemate (●) and (B) (+)-enantiomer (○) or racemate (●) in rats (n=3-4)

においては投与したものの大部分が24時間以内に尿中に排泄されている。このことからトータルボディクリアランスと尿中排泄クリアランスの差を代謝

クリアランスとして求めた。

これらのことからトータルボディクリアランスの差は、(-)-体では主に尿中排泄クリアランスによ

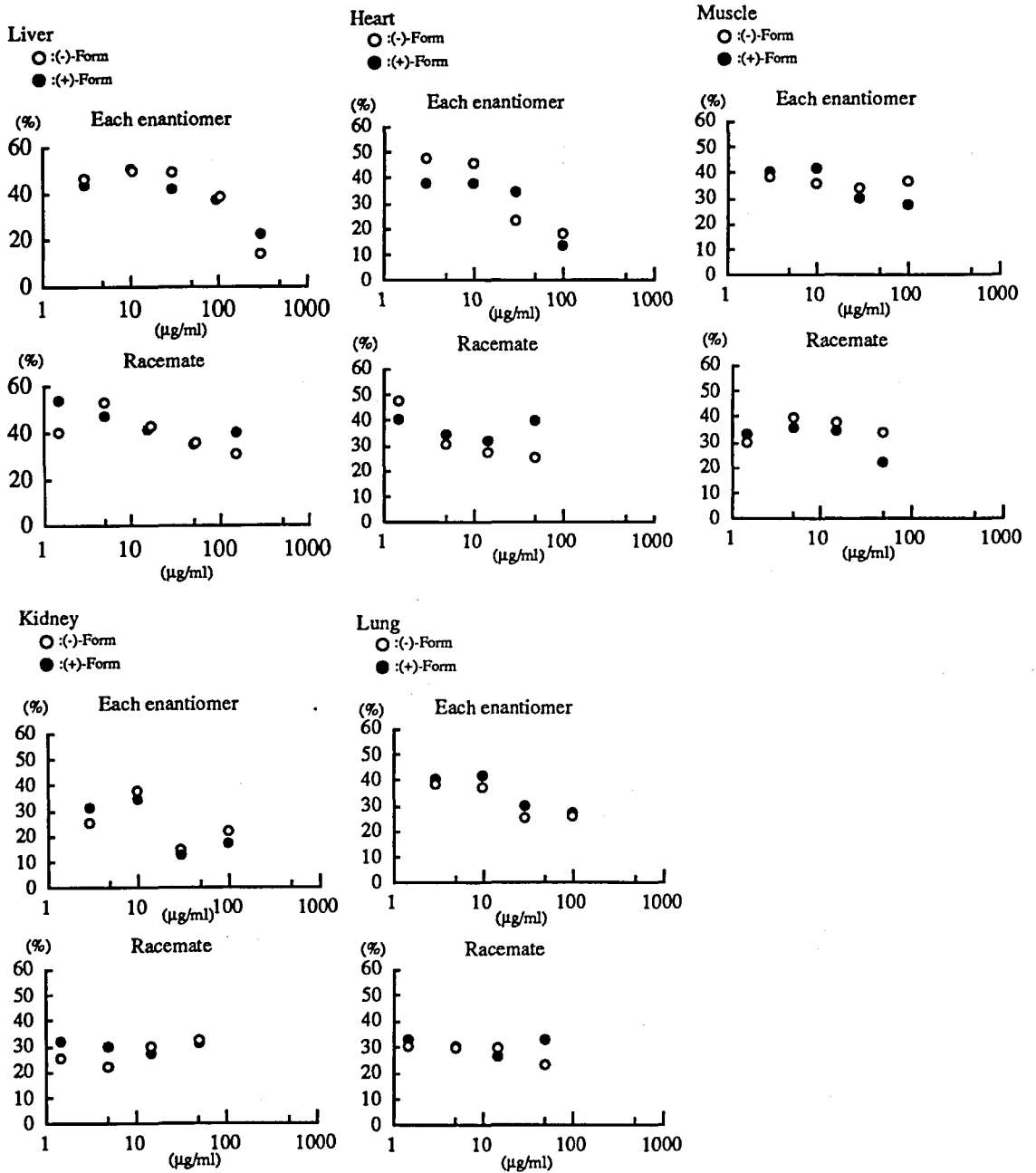


Fig. 10. *In vitro* rat tissue protein binding of (-)- or (+)-norephedrine (n=3-4)

って、(+)-体では主に代謝クリアランスによって差となって現われたものと思われた。

2. 血清ならびに組織たんぱく結合、組織分布  
血清蛋白結合率は、(+)-体の方が高い結合率を示

した (Fig. 8) が、大きな差ではなく異性体間の差に大きな関与はないものと思われた。

Fig. 9 に (-)-体の各臓器における分布を示した。腎における分布が他の臓器に比べて大きいこと、肝、

腎、筋においてはラセミ体投与時の方が高濃度で分布していることがわかった。一方、(+)-体は、肝、腎における分布が他の臓器に比べて大きいこと、肝、腎、筋においてはラセミ体投与時の方が高濃度で分布していること、(-)-体とは異なり腎よりも肝の方が高濃度で分布していることなどがわかった。心、肺においては光学活性体投与、ラセミ体投与とで、(-)-体、(+)-体ともに差は認められず、また光学異性体間での分布の差も認められなかったが、肝、腎、筋においは(-)-体、(+)-体ともにラセミ体投与時の方が高濃度で分布していること、(-)-体、(+)-体とで組織分布に肝で10倍、腎で2倍(+)-体の方が高濃度で分布しているのか認められた。

Fig. 10に各臓器に対するタンパク結合率を示した。異性体間、光学活性体投与時とラセミ体投与時との間ともに大きな差は認められなかったが、高濃度での飽和がみられた。これらの結果から、光学活性体投与時とラセミ体投与時での体内動態の違いは、立体選択的な血清タンパクあるいは組織タンパクとの結合が観察されなかったことから、NE自身の薬効に基づくものと考えられた。(-)-体は、ラセミ

体投与時には、作用部位での(+)-体による薬効の競合のために血流の低下が抑えられ、そのため尿中排泄クリアランスの増加、組織分布の増加が起きるものと思われた。一方、(+)-体は、(-)-体により血流の低下が起これるため尿中排泄クリアランス、代謝クリアランスの減少が起きるものと思われた。尿中排泄量が変わらないために、その分が血漿中濃度、組織内濃度の増加となって観察されたものと思われた。今後、実際に血流や代謝、レセプターレベルでの結合などを検討し、最終的には薬効と結び付けた解析を行う予定である。

#### 文 献

- 1) Moya-Huff, F. A., Maher, T. J., *J. Pharm. Pharmacol.*, **39**, 108~112 (1987)
- 2) Moya-Huff, F. A., Kiritsy, P. J., Maher, T. J., *J. Pharm. Sci.*, **76**, 114~116 (1987)
- 3) Moya-Huff, F. A., Maher, T. J., *J. Pharm. Pharmacol.*, **40**, 876~878 (1988)
- 4) Sinsheimer, J. E., Draham, L. G., Williams, R. T., *Biochem. J.* **136**, 763~771 (1973)

生体関連反応指標の有意性判定に関する研究 (第II期)  
(平成3年度~平成5年度)

Evaluation of *in vivo* and *in vitro* systems for the measurement of biological effects of drugs and chemicals (Second period) (1991~1993)

世話人 機能生化学部 澤田 純一

薬物等の有用性、安全性などを前臨床で評価するためには、従来、薬物の生体に対する影響を動物個体を用いる系で判定することが多かった。これら従来の方法は、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、これに要する費用も膨大なものになる。一方、最近の分子生物学や細胞生物学など、バイオテクノロジー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、分子レベルあるいは細胞レベル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の開発が可能と考えられるようになった。例えば、培養細胞を用いた短期間の *in vitro* 代替試験法も広く検討されるようになった。また、適切な病態動物モデルを用いたり、新たな手法をとり入れることにより、*in vivo* 試験での試験期間の短縮や判定精度の向上を図れる可能性もある。本研究は、このような新しい反応指標に基づく試験法の開発を最終目標としているが、このためには、先ず、さまざまな薬物が生体内で起こす諸反応を、分子レベル、細胞レベル、組織レベルで詳細に解析し、それらの反応が、個体レベルで現れる結果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。云うまでもなく、最終的には、動物個体を用いる *in vivo* 試験と有意な相関を示す反応指標を選択し、それを用いた薬物評価試験法を開発することが必要とされよう。

本研究第I期では、薬物が生体に及ぼす反応を、分子レベル、細胞レベル、組織レベル、個体レベルに分けて検討し、それらの薬物の有効性、安全性等の評価の指標としての有用性を検討した<sup>1)</sup>。今期、第II期では、第I期に検討した諸指標のうち、近年その重要性が指摘されている免疫毒性の指標となるものに焦点をあてた。従来から毒性試験に主として用いられているラットを中心に、細胞レベル、組織レベルでの生体諸反応をパラメーターとして選択し、

以下の検討が加えられた。これらのパラメーターを用いて得られる結果を、動物個体での試験結果と比較することにより、新しい指標に基づく免疫毒性評価法、あるいは、*in vitro* 試験法を用いた新しい免疫毒性評価法の開発をめざしたものである。

(1) 化学物質暴露動物から採取した細胞を用いた *in vitro* 試験

マクロファージの機能のうち、貪食能と腫瘍壊死因子 (TNF) 産生能を免疫毒性評価の指標として測定した場合、分布組織の異なる肺胞マクロファージと腹腔マクロファージでは、免疫毒性物質に対する感受性に違いのあることが示された。また、マクロファージを直接標的としないといわれている免疫毒性物質が、免疫ネットワークを介して、あるいは、生体機構の異常変化を介して、マクロファージの機能にも影響を及ぼす可能性があり得ることを示し、これらの指標が多くの情報を与える可能性が示唆された (大阪支所生物試験部)。

シクロスポリン A を 28 日間連続経口投与したラットから得たリンパ球を用いて、免疫機能検査を行った。抗体産生能試験、脾臓細胞幼若化反応試験、NK 細胞活性試験の組み合わせによって、シクロスポリン A の免疫抑制作用プロファイルを明確に検出できることが示された (機能生化学部)。

また、感作性試験法として有用と考えられる Local lymph node assay (LLNA) の改良を行った。アジュバントの使用と試験物質の2段階投与方法、およびリンパ節細胞 (LNC) 数の増加率を考慮した LNC 増殖指数の算出法を採用することで、従来の LLNA と比べて、高感度であり、かつ、マウス耳腫脹試験法の結果とも一致する試験法を開発した。これにより、従来からのモルモットによる Maximization test に比べて、短期間に客観的かつ定量的に判定できる試験法となり得る可能性を示した (療品部)。

(2) 化学物質暴露動物での一般毒性・病理組織学的検査



免疫系組織の免疫病理組織学的検査の有用性がいわれているが、検査手法の改良と検討が必要とされている。そこで、免疫病理組織学的検査にふさわしい組織固定法の改良を行った。また、リンパ組織の増殖細胞核抗原が、免疫毒性の免疫病理組織学的検査における指標になることを示した。さらに、動物への薬物投与試験において、飼料摂取量の減少に起因する低栄養状態が骨髄やリンパ組織への傷害を引き起こすため、試験物質本来の免疫毒性作用との鑑別に充分配慮する必要があることを示した(病理部)。

さらに、シクロスポリン A を 28 日間連続経口投与したラットを用いて、一般毒性・病理組織学的検査を行った。シクロスポリン A の免疫抑制作用を、末梢血および骨髄のリンパ球減少、胸腺と脾臓の組織学的変化として捉えることができた。また、リンパ球表面マーカーに対する抗体を用いた免疫組織学的検査の有効性が示された。病理組織学的検査を免疫系組織に拡大して一般毒性試験に組み込む方式の有用性が示された(毒性部)。

### (3) 培養細胞を用いた *in vitro* 試験

マクロファージの食食機能を活性酸素 ( $O_2^-$ ) 生成活性を指標にして測定した。免疫抑制剤 FK506 と Ser/Thr ホスファターゼ阻害剤カリクリン A をモデル化合物にして、*in vitro* でのマクロファージの食食に伴う活性酸素生成への影響を調べた。FK 506 は活性酸素生成、およびマクロファージのフィブリノーゲン膜への細胞接着に影響を与えなかったが、カリクリン A は、両者ともに阻害した(生物薬品部)。

以上述べたように、免疫毒性評価法の開発をめざした第 II 期の研究によって、化学物質暴露動物での一般毒性・病理組織学的検査、*in vitro* 機能試験の有用性が示された。特に、免疫組織学的手法の導入や、動物個体試験と適切な *in vitro* 機能試験との組み合わせは、今後の免疫毒性評価法の開発の方向性を示すものであり、今後の進展が期待される。

## 文 献

- 1) 寺尾允男: 衛生試験報, 109, 259 (1991)

## 1. 化学物質暴露動物から採取した細胞を用いた *in vitro* 試験

### マクロファージの免疫毒性評価指標としての有意性に関する基礎的検討

大阪支所生物試験部

中村ゆかり・村井敏美・小川義之

**Keywords** : macrophage, phagocytosis, TNF synthesis

#### [目的]

免疫応答の誘導時に抗原提示細胞として、また免疫成立後にはエフェクター細胞として機能するマクロファージ ( $M\phi$ ) は、化学物質の免疫毒性を評価する際の有用な生体反応指標となり得ると考えられる。 $M\phi$  を用いる試験系としては、化学物質を暴露した動物から  $M\phi$  を採取し、*in vitro* で  $M\phi$  の活性、機能を調べる *ex vivo* 試験系と、培養  $M\phi$  に直接化学物質を暴露して調べる *in vitro* 試験系が考えられるが、本研究では前者の試験系における  $M\phi$  の免疫毒性評価指標としての有意性について、以下の 2 つの観点から基礎的検討を加えた。

1)  $M\phi$  は生体の至るところに分布し、分布組織に応じて特有の分化を遂げているが、そのような分布組織の異なる  $M\phi$  間で、免疫毒性評価指標としての有意性に差があるか否か。

2) 免疫システムの特徴として、直接のまたは液性因子を介する細胞間相互作用により免疫調節ネットワークが働くが、 $M\phi$  を直接の標的としない免疫毒性物質、例えばリンパ球のみに選択的に毒性を示す物質の影響が免疫ネットワークを介して  $M\phi$  にまで及ぶか否か、すなわち、 $M\phi$  の活性を指標としてそのような化学物質の毒性が捉えられるか否か。

#### [方法]

1. 異なる組織より採取した  $M\phi$  での比較検討  
生体からの採取、調製の容易な  $M\phi$  として、肺胞  $M\phi$  と腹腔常在  $M\phi$  を選んだ。Wistar 雄性ラットに免疫毒性モデル物質として、 $M\phi$  に直接作用し、その機能を抑制することが知られているリン酸デキサメタゾンナトリウム (Dex) を投与した。Dex を 1.25, 5, 20 mg/kg の用量で 1 回皮下投与したのち、肺胞洗浄あるいは腹腔洗浄により肺胞  $M\phi$  と腹腔  $M\phi$  を採取した。これらの  $M\phi$  の食食能および腫瘍壊死因子 (TNF) 産生能を調べ、

Dex 投与の影響を M $\phi$  間で比較した。

## 2. M $\phi$ 以外の免疫担当細胞を標的とする免疫毒性物質の M $\phi$ 機能への影響

胸腺細胞を特異的な標的とする塩化ジブチルスズ (DBTC) を 20 ppm あるいは 100 ppm の濃度で飼料に添加し、ラットに生後 3 週令から 8 週令まで与えた後、肺胞および腹腔 M $\phi$  を採取し、食食能および TNF 産生能に DBTC 投与の影響がみられるかどうか調べた。

### [結果および考察]

## 1. 肺胞 M $\phi$ と腹腔 M $\phi$ での Dex 投与の影響の比較

肺胞 M $\phi$  と腹腔 M $\phi$  では明らかな差が認められた。まず食食能に関しては、肺胞 M $\phi$  では用量依存的な機能低下が認められたが、腹腔 M $\phi$  では全く影響は認められなかった。また TNF 産生能に関しても、肺胞 M $\phi$  の方が腹腔 M $\phi$  よりも Dex によって機能抑制を受けやすく、またその影響はより長時間持続することがわかった。このような M $\phi$  間での相違には、M $\phi$  自体の性状や活性の違いに加えて、それぞれの存在部位における Dex 濃度の違いや、サイトカインネットワーク等を介する間接的影響の受け方の違いなど、さまざまな要因が考えられるが、Dex 以外の免疫毒性物質に対しても、これらの要因の関与により、分布組織の異なる M $\phi$  はそれぞれに異なった反応を示す可能性が考えられる。肺胞 M $\phi$  と腹腔 M $\phi$  を比較すると、Dex に関しては肺胞 M $\phi$  の方がより鋭敏な生体反応指標であることが示唆される。肺胞 M $\phi$  は、その存在部位からわかるように、感染防御に重要な役割を担う活性の高い M $\phi$  であり、細胞レベルの免疫毒性評価指標の一つとして有用であると考えられる。

## 2. M $\phi$ 機能に及ぼす DBTC 投与の影響

剖検時の所見として、DBTC 投与量に依存した胸腺の萎縮が認められた。これらのラットの M $\phi$  機能を調べたところ、20 ppm 添加飼料投与群で、両 M $\phi$  の機能に若干の亢進傾向が認められた。この機能亢進については、T 細胞機能が強く抑制されることに対する代償的反応である可能性が考えられる。事実、胸腺欠失動物であるヌードマウスでは M $\phi$  の機能に亢進が認められるという報告がある。しかし、100 ppm 投与群においては M $\phi$  の機能亢進は認められず、肺胞 M $\phi$  ではむしろ機能が低下する傾向が認められた。またこの群では、飼料摂取量の低下によると思われる体重増加の抑制が認めら

れたが、低栄養状態では M $\phi$  の機能が低下することが知られていることから、栄養状態の悪化が機能亢進を相殺したのかも知れない。今回の実験成績から、M $\phi$  以外の免疫担当細胞を標的とする免疫毒性物質の毒性も、おそらく免疫ネットワークを介して、M $\phi$  の活性に反映され得ることが示唆される。しかしながら、リンパ球機能の低下による代償的な機能亢進など、M $\phi$  の反応は個体レベルの反応と必ずしもパラレルでないこと、また、免疫系のみならず栄養不良などさまざまな生体機構の異常変化を介して二次的な影響を受けやすいことから、M $\phi$  に生じた機能変化は、他の指標の変化とともに総合的に評価されるべきものと考えられる。

## 研究発表

- 1) 中村ゆかり, 村井敏美, 小川義之: マクロファージ (M $\phi$ ) 機能に及ぼすデキサメタゾン投与の影響—肺胞 M $\phi$  と腹腔 M $\phi$  での比較検討—. 日本薬学会第 114 年会 (1994.3)
- 2) Nakamura, Y., Murai, T. and Ogawa, Y.: Effect of systemic administration of dexamethasone on macrophage functions: comparison between alveolar and peritoneal macrophages. (投稿中)

## シクロスポリン A 投与ラットを用いた、免疫毒性試験法のための免疫機能試験の検討

機能生化学部

斎藤嘉朗・蜂須賀暁子・手島玲子  
山崎 壮・池淵秀治・澤田純一

**Keywords:** cyclosporin, immunotoxicity, functional tests

### [目的]

生体防御機構としての免疫系の役割の重要性を考えると、毒性試験における一指標として免疫毒性は重要であるが、公的な免疫毒性試験法ガイドラインは、日本はじめ、欧米でもまだ設定されていない。免疫毒性評価における最も大きな問題点は、免疫機能の多様性にある。多数の免疫機能をすべて検査することは不可能であるため、免疫毒性の指標として、どのような項目を選択したらよいか課題となっている。

我々は、組織・器官レベルで現れた毒性と、細胞レベルの免疫機能試験で現れた毒性とを比較検討し、

双方の反応指標の有意性を検討する目的で、シクロスポリン A (CsA) をモデル物質に選び、OECD 毒性試験ガイドライン 407 に免疫系臓器の病理組織学的検査を加えた拡大病理組織学的検査、および免疫機能検査を組み合わせる免疫毒性試験法とすることの有用性を、毒性部と共同で検討した。毒性部が一般毒性・病理組織学的検査を担当し、機能生化学部が免疫機能検査を担当した。ここでは、免疫機能検査の結果を報告する。

#### [実験材料および実験方法]

##### 1) 動物

雄性 F344 Du/Crj ラット (SPF) を 1 群 13 匹からなる 4 群に分け、免疫機能検査に用いた。

##### 2) 薬物投与

CsA をオリーブ油に溶解して、ラットに 0, 2.5, 10, 40 mg/kg/day (それぞれ、対照群, 低用量群, 中用量群, 高用量群) で 28 日間連続強制経口投与した。

##### 3) 免疫機能検査

###### 3-1) 抗体産生細胞 (PFC) 試験

CsA 投与ラット (各群 6 匹) を 25 日目にヒツジ赤血球 (SRBC,  $2 \times 10^8$  細胞) で免疫 (*i.v.* 投与) した。29 日目に脾臓細胞を得、Mishell and Dutton の方法で抗 SRBC IgM 抗体産生細胞 (PFC) を計数した。

###### 3-2) 脾臓細胞幼若化反応試験

CsA 投与ラット (各群 5 匹) の脾臓細胞 ( $5 \times 10^5$  細胞) をマイトージェン (Concanavalin A, *Salmonella tyhimurium* mitogen) と 48 時間培養し、 $^3\text{H}$ -チミジン ( $37 \text{ kBq}$ ) を添加してさらに 20 時間培養した。細胞に取り込まれた放射能を液体シンチレーションカウンターで測定した。

###### 3-3) NK 細胞活性試験

標的細胞として、 $^{51}\text{Cr}$  で標識した YAC-1 細胞を用いた。CsA 投与ラット (各群 5 匹, 脾臓細胞幼若化反応試験用と共用) の脾臓細胞 ( $1 \times 10^6$ – $2.5 \times 10^5$  細胞) と標的細胞 ( $1 \times 10^4$  細胞) を混合して 4 時間培養し、標的細胞から培地中に放出された  $^{51}\text{Cr}$  量を測定した。

3-4) リンパ球のマイトージェン刺激時の細胞内カルシウム動態

CsA 投与ラット (各群 2 匹) から得た脾臓細胞, 胸腺細胞 (それぞれ  $1 \times 10^7$  細胞/ml) を Fura-2-AM と 15 分間培養後、マイトージェン (Concanavalin A, *Salmonella tyhimurium* mitogen) を添加

して、335 nm と 362 nm の蛍光強度比を 10 分間連続測定した。

#### [結果]

##### 1) 抗体産生細胞 (PFC) 試験

PFC 試験に用いた SRBC 免疫ラットの脾臓重量と脾臓細胞数が、対照群と比べて、低用量群および中用量群では差が認められなかったが、高用量群でわずかに増加した。これは、非免疫ラットの脾臓重量の結果と同様であった。単位脾臓細胞当たりでも脾臓当たりでも、PFC 数が CsA の投与量の増加に依存して著しく減少した。低用量群は、一般毒性・病理組織学的検査では異常が認められなかったが、この用量で PFC が対照群の 52% にまで低下した。

##### 2) 脾臓細胞幼若化反応試験

T 細胞マイトージェンである Concanavalin A (Con A) に対する幼若化反応では、中、高用量群で反応抑制的影響が現れた。幼若化反応が極大になる Con A の至適濃度が、対照群, 低用量群で  $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$  であったのに対して、中用量群では  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$  に上昇し、リンパ球反応性の低下が見られた。高用量群では、反応性が消失した。また、Con A 反応試験で用いるべき濃度は、対照群での Con A 至適濃度を適用して試験すればよいことが示された。

B 細胞マイトージェンである *Salmonella tyhimurium* mitogen (STM) に対する幼若化反応では、対照群と比べて、低用量群, 中用量群では差が認められず、高用量群で著しい反応性の低下が見られた。

##### 3) NK 細胞活性試験

脾臓細胞の NK 細胞活性は、対照群, 低用量群, 中用量群で有意な差が認められず、高用量群でのみわずかに低下した。

4) リンパ球のマイトージェン刺激時の細胞内カルシウム動態

Con A ( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) 刺激により、対照群の脾臓細胞, 胸腺細胞ともに、細胞内カルシウム濃度が Con A 添加直後から上昇する。この反応系を指標にして検討を加えたが、CsA 投与の低, 中, 高用量群いずれにおいても対照群と同様のカルシウム上昇を示し、有意な差が認められなかった。また、STM 刺激では、対照群, CsA 投与群いずれにおいても、脾臓細胞, 胸腺細胞において STM 添加に伴うカルシウム濃度上昇は認められなかった。結果として、リンパ球のマイトージェン刺激直後の細胞内カルシウム動態では、CsA による影響を検出できなかった。

## [考察]

免疫機能検査では、PFC試験、脾臓細胞幼若化反応試験、NK細胞活性試験、マイトーゲン刺激時の細胞内カルシウム動態の測定を行った。その結果、PFC試験は、CsAの影響を非常に高感度に検出し得ることが示された。Con Aに対する幼若化反応は、中程度の感度であった。それに対して、STMに対する幼若化反応はCsAの影響を受けにくく、また、NK細胞活性は、ほとんど影響を受けなかった。また、リンパ球のマイトーゲン刺激時の細胞内カルシウム動態は、CsAによる影響を受けなかった。Con Aによるリンパ球幼若化反応では、初期反応として細胞内カルシウム濃度の上昇が知られている。CsAは、Con Aによるリンパ球幼若化( $^3\text{H}$ -チミジンの取り込み)を抑えたが、細胞内カルシウム濃度の上昇は抑えなかった。これは、CsAの作用点が、カルシウム濃度上昇以後のステップにあることを示している。これら4つの免疫機能検査の結果は、現在明らかになっているCsAの作用プロフィール<sup>1)</sup>を明確に反映している。CsAはT細胞からの各種リンフォカインの産生を阻害するために、それらが関与する免疫反応が広く阻害されると考えられている。T細胞依存性の高い抗原であるSRBCに対するIgM抗体産生細胞試験は、B細胞、T細胞、抗原提示細胞が複雑に関与した長い過程の結果を指標とする検査系である。そこに関与するT細胞由来リンフォカインの数も多く、結果としてCsAの影響が強く現れたと解釈できる。

以上のように、免疫機能検査の結果は、一般毒性・拡大病理組織学的検査の結果とほぼ平行する結果が得られた。

今回、免疫機能検査項目として、PFC試験、脾臓細胞幼若化反応試験、NK細胞活性試験、リンパ球のマイトーゲン刺激時の細胞内カルシウム動態を採用したが、免疫毒性の指標としてどのような項目を選択したらよいかは、重要な課題となっている。米国NTPの下で行われた、免疫毒性を検出するための免疫機能試験に関する研究結果では、PFC試験と、細胞表面マーカーに基づくリンパ球サブポピュレーションの解析が、最も多くの化合物の免疫異常を検出できたと報告している<sup>2,3)</sup>。PFC試験の有用性は、我々の研究結果でも実証された。また、NK細胞活性はCsAによって影響を受けなかったが、NKに影響を及ぼす物質がいくつか報告されており<sup>2)</sup>、国際的にも、NK細胞活性は検討する価値

のある検査項目だと考えられている。

以前我々は、azathioprine (AZP) を対象物質にして免疫毒性研究を行った<sup>4)</sup>。AZP研究と今回のCsA研究とを比較すると、免疫機能検査においても一般毒性・病理組織学的検査においても、いくつかの点でその毒性発現パターンに違いが認められた。AZPはリンパ球に対する細胞分裂抑制作用により免疫抑制作用を発現するのに対し、CsAは一部のT細胞の分化・増殖を選択的に抑制することで免疫抑制作用を発現する。両薬物における毒性の差異は、このような免疫抑制作用の違いに基づくものと考えられる。これらの結果から、今回我々の検討した、一般毒性・拡大病理組織学的検査と免疫機能検査との組み合わせによるラットでの試験が、免疫毒性の作用プロフィールの推定も含めた免疫毒性検出のための一次スクリーニング試験法の1つとして有用であることが示された。

## 文 献

- 1) Schreiber, S. L. and Crabtree, G. R.: *Immunology Today*, **13**, 136 (1992)
- 2) Luster, M. I., et al.: *Fund. Appl. Toxicol.* **18**, 200 (1992)
- 3) Luster, M. I., et al.: *Toxicol. Lett.* **64/65**, 71 (1992)
- 4) 松本清司, 他: 衛生試報, **106**, 34 (1990)  
なお、本研究成果の一部は、下記に発表した。
- 5) 落合敏秋, 他: 衛生試報, **111**, 91 (1993)

## リンパ節活性化を指標とした新しい感作性試験法の開発

療 品 部

五十嵐良明・土屋利江

**Keywords**: sensitization study, allergen, lymph node

第1期研究報告で、Local lymph node assay (LLNA) を用いて、試験物質の塗布部位所属のリンパ節細胞 (lymph node cell, LNC) の *in vitro* での増殖反応を調べた結果、その感作性の有無とよく一致することを報告した。

第2期の本研究では、まず *in vitro* でのLNCの増殖反応に加えて、*in vivo* でのリンパ節重量、LNC数の増加率などについても測定し、これらが感作性の有用な指標となり得るかどうかが検討した。

Table 1. The draining LNC proliferative activity, total LNC number and change in lymph node weight in the mice following exposure to metal salts

Chemical	Concentration (w/v%)	LNC proliferation <sup>3</sup> HTdR incorporation (mean cpm $\pm$ SD $\times 10^{-3}$ )	SI	Total LNC number ( $\times 10^6$ /group)	Lymph node weight (mg/group)
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	0	3.82 $\pm$ 0.60	—	23.21	19.0
	0.5	8.09 $\pm$ 0.78	2.12	57.89	30.0
	1	11.74 $\pm$ 0.18	3.07	52.14	37.4
	2.5	15.33 $\pm$ 0.93	4.01	57.62	46.4
	5	14.52 $\pm$ 0.70	3.80	30.59	39.2
CoCl <sub>2</sub>	0	5.59 $\pm$ 0.51	—	23.27	28.1
	0.5	11.65 $\pm$ 0.85	2.08	40.61	39.0
	1	19.66 $\pm$ 1.08	3.51	51.47	42.0
	2.5	21.12 $\pm$ 0.70	3.77	61.73	57.9
	5	40.35 $\pm$ 2.27	7.21	62.55	50.2
NiSO <sub>4</sub>	0	2.80 $\pm$ 0.25	—	25.63	21.8
	2.5	6.12 $\pm$ 0.42	2.19	35.48	26.1
	5	6.88 $\pm$ 0.26	2.46	37.10	34.3

さらにマウス、ラットおよびモルモットの感作性物質に対する反応性を比較した。次に、LLNAを多くの化学物質について適用したところ、本感度が十分でないことがわかってきた。そこで新たな感作性試験法を開発する事を目的として種々検討した。その結果、試験物質をアジュバントとともに注射し、さらに塗布を繰り返す二段階投与を行った後、総合的なリンパ節の活性化反応を指標として感作性を評価する方法を確立した。さらに、この試験法での結果を、従来の感作性試験法での結果と比較し、その有用性を評価した。

#### 1. LLNAにおける金属塩に対する動物種差<sup>1)</sup>

##### [実験方法]

1群3匹からなる雌性CBA/N系又はBALB/c系マウス(6~8週齢)、F344系ラット(6~8週齢)およびHartley系モルモット(300~350g)の両耳に試験溶液をそれぞれ25 $\mu$ l、100 $\mu$ lおよび200 $\mu$ lずつ3日間連続で塗布した。最終塗布翌日に耳介リンパ節を取り出し、実験群ごとにまとめ、リンパ節重量およびLNC数を測定した。LNC( $1 \times 10^6$  cells)は<sup>3</sup>H-thymidine (<sup>3</sup>HTdR, 0.5 $\mu$ Ci)と18時間培養し、その取り込み量(cpm)から増殖反応を測定した。溶媒のみを塗布したコントロール群に対する試験群の各々の指標の増加率 Stimulation index (SI)を求めた。

##### [結果と考察]

金属アレルギーは、臨床上最もよく知られている。

クロムやニッケルなどが原因物質として挙げられているが、これら感作強度は著しく異なり、特にニッケルは弱いとされている。そこで、3種の感作強度が異なる金属塩 potassium dichromate (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>)、cobalt chloride (CoCl<sub>2</sub>) および nickel sulfate (NiSO<sub>4</sub>) について試験し、これらに対する各動物種の反応性を比較し、最も感度が高い動物種ならびに感作性とよく相関するリンパ節反応の指標を選択した。その結果、いずれの動物種でも、K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>とCoCl<sub>2</sub>は著しい反応を示したが、NiSO<sub>4</sub>に対しては反応性は低かった。また、LNC増殖反応が3種の指標のうちで最も高いSI値を示し、感度よく感作性を評価できる事がわかった (Table 1)。LLNAに用いる動物種としては、コストや感度の面からマウスが最も適当であり、一方、従来から感作性試験に用いられているモルモットは、感度が特別高いわけではなく、個体差も大きいことからLLNAに用いる動物種としては適当ではなかった。

#### 2. 新たな高感度感作性試験法(SLNA)の開発<sup>2)</sup>

##### [実験方法]

雌性BALB/c系マウス(6~8週齢)(1群3匹)の腹部皮内に試験物質と Freund's complete adjuvant (FCA) とのエマルジョン 50 $\mu$ lを2カ所に分けて注射した。注射後5日目からマウスの両耳に試験溶液を25 $\mu$ lずつ3日間連続で塗布した。最終塗布翌日に耳介リンパ節を取り出し、実験群ごとにまとめ、リンパ節重量およびLNC数を測定した。以

Table 2. Results of the local lymph node assay and the sensitive lymph node assay performed with eleven chemicals

Chemical	Abbreviation	LLNA		SLNA	
		SI <sub>p</sub>	Classification	SI <sub>total</sub>	Classification
4-Aminobenzenesulfonic acid (sulfanilic acid)	SA	0.87	-	1.41	-
<i>p</i> -Chloroaniline	CA	1.15	-	3.48	+
2,4-Dinitrochlorobenzene	DNCB	12.86	+	53.63	+
<i>N,N'</i> -Diphenylthiourea	DPTU	1.41	-	37.49	+
Ethyl 4-aminobenzoate (benzocaine)	Benzocaine	1.05	-	15.28	+
4-Hydroxybenzoic acid	HBA	0.96	-	3.21	+
2-(2'-Hydroxy-5'-methyl-phenyl)benzotriazole (Tinuvin P)	TP	1.42	-	39.1	+
2-Mercaptobenzothiazole	MBT	2.51	+	28.21	+
Nickel sulfate	NiSO <sub>4</sub>	3.31	+	25.49	+
Sodium lauryl sulfate	SLS	1.61	-	1.93	-
Zinc diethyldithiocarbamate	ZDEC	1.48	-	15.75	+

下、前述の通り、LNCの<sup>3</sup>HTdR取り込み量から増殖反応を測定した。コントロール群は溶媒のみを同様に投与した。コントロール群に対する試験群のLNC数の増加率 (stimulation index of LNC number, SI<sub>n</sub>) および LNC 増殖反応の増加率 (stimulation index of LNC proliferation, SI<sub>p</sub>) を求め、さらにこれらをかけ合わせた値 (stimulation index of total lymph node response, SI<sub>total</sub>) を算出した。

#### [結果と考察]

まずマウス LLNA で、10 種の感作性物質と刺激性物質について試験した。SI<sub>p</sub> が 2 以上を示す物質を感作性があると判定したところ、10 種のうち 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB)、2-mercaptobenzothiazole (MBT) および NiSO<sub>4</sub> の 3 種しか検出することができず、従来からの SI<sub>p</sub> で判定する LLNA 法の感度は十分ではないことがわかった (Table 2)。

次に、弱感作性物質をも検出できるような新たな試験法を開発することにした。モデル化合物としては、ヒトでのパッチテストで感作性があることが知られているが、LLNA と同様に他の動物実験の結果からも感作強度が弱いとされる Tinuvin P (TP) を用いた。試験物質のアジュバントとのエマルジョンをマウスの肩に皮内注射すると、試験物質の有無に関わらず著しいリンパ節の活性化が引き起こされるが、SI<sub>p</sub> 値の増加は認めなかった。そこで皮内注射の部位を肩から腹部に変更し、加えて耳への塗布を行う二段階の方法で試験物質を適用することにした。皮内注射処理後の 5 日目から試験物質を両耳に塗布したところ、著しい LNC 増殖反応が認められ

た。

従来の LLNA では、一定数の細胞を培養して増殖反応を測定するため、*in vivo* での LNC 数の増加量については考慮していなかった。そこで新たに、LNC 増殖反応に LNC 数の増加率をかけた総合的なリンパ節活性化率 SI<sub>total</sub> を求め、これを感作性の指標とすることにした。以下、SI<sub>total</sub> が 3 以上を示す物質を感作性物質とし、種々の物質に適用した結果を Table 2 に示した。

TP を種々の濃度で注射および塗布した結果、リンパ節活性化には、皮内注射の濃度の方が、塗布濃度より大きな影響を及ぼすことがわかった。強感作性物質 DNCB の場合、皮内注射を組み合わせると、塗布だけを行った場合に比べて、より強い反応が現れたが、あまり高い濃度を注射すると逆に抑制が起こった。刺激性物質 sodium lauryl sulfate については、若干 SI<sub>total</sub> 値の上昇が認められたが、2 を越えることはなかった。Sulfanilic acid (SA) はモルモットでは感作性物質とされているが、ヒトでの感作の症例の報告はなく、本試験でも negative であった。SA 以外は、LLNA で negative と判定された感作性物質は、この方法ではいずれも positive として検出することができた。強感作性物質の MBT、diphenylthiourea は高い SI<sub>total</sub> 値を示し、感作性強度が弱いとされる *p*-chloroaniline、4-hydroxybenzoic acid などは低い値を示した。よって、SI<sub>total</sub> 値の大きさは試験物質の感作強度を定量的に順序づけるものと考えられた。

### 3. 従来の感作性試験法との比較

#### 3-1. マウス耳腫脹試験 (mouse ear swelling

test, MEST) との比較<sup>3)</sup>

#### [実験方法]

MEST法: 雌性 BALB/c 系マウス (6~8 週齢) の腹部皮内に試験溶液と FCA とのエマルジョンを 50  $\mu$ l 注射し, その5日目からマウスの両耳に試験溶液を 25  $\mu$ l ずつ3日間連続で塗布し感作誘導した。最終塗布5日後, 耳に試験物質を塗布して惹起し, 耳の厚さの増加率を求めた。

#### [結果と考察]

Tinuvin P (TP) およびその類似化合物である Tinuvin 326 (T326) を用いて検討した。TP は著しいリンパ節の活性化を引き起こし, T326 は反応を示さなかった。MEST法において, TP で感作誘導したマウスは TP の惹起により耳の腫れが認められ, 濃度依存的に厚さが増加したが, T326 で惹起しても反応は表れなかった。T326 で感作誘導したマウスは TP および T326 で惹起しても耳の腫脹は認めなかった。SLNA 法でのリンパ節活性化反応は, MEST法での耳の腫脹反応とよく一致した。TP は感作性物質, T326 は非感作性物質と評価された。今後さらに, 皮内注射と塗布による試験物質の二段階適用によって表れるリンパ節の反応を観察することにより, 類似構造をもつ物質の交差反応性の確認にも利用できるものと考えられる。

3-2. モルモット Maximization test (guinea pig maximization test, GPMT) との比較

チオウレア系ゴム加硫促進剤4種, diethylthiourea (DETU), dibutylthiourea (DBTU), dilaurylthiourea (DLTU) および diphenylthiourea (DPTU) について検討した。GPMT ではこれらはいずれも強い感作性物質として判定され, SLNA 法でもリンパ節の活性化反応が認められた。SLNA 法において  $SI_{total}$  値から各物質の感作強度を順序づけると, DPTU > DLTU > DBTU > DETU となった。これは, GPMT において各物質の最低感作濃度, 最低惹起濃度の値を総合して求めた感作強度の順序とほぼ一致した。

以上の結果をまとめると, マウスの腹部皮内に試験物質をアジュバントとともに皮内注射後, 両耳に再度試験物質を塗布し, 惹起された耳介リンパ節活性化反応を指標として評価することにより, 試験物質の感作性を従来の LLNA に比べ, より高感度に予測することができることがわかった。この新たに開発した SLNA 法は, MEST 法の結果と一致し, しかも, GPMT 法に比べて短期間に, 定量的かつ

客観的に判定できる試験法であり, 今後多くの試験物質の感作性の検索に利用できるものと考えられる。

### 発表論文

- 1) Y. Ikarashi, K. Ohno, T. Tsuchiya and A. Nakamura: *Toxicology*, **76**, 283 (1992)
- 2) Y. Ikarashi, T. Tsuchiya and A. Nakamura: *Arch. Toxicol.*, **67**, 629 (1993)
- 3) Y. Ikarashi, T. Tsuchiya and A. Nakamura: *Toxicol. Lett.*, **71**, 151 (1994)

#### 2. 化学物質暴露動物での一般毒性・病理組織学的検査

##### 免疫毒性試験における免疫病理組織学的検査手法の改善

病理部

三森国敏・安原加壽雄  
小野寺博志・高橋進人

**Keywords**: immunotoxicity, immunohistochemistry, proliferating cell nuclear antigen

#### [目的]

近年, 毒性試験ガイドラインに免疫毒性評価手法を導入して, 通常の毒性試験における免疫毒性の検出感度をさらに上げようとの試みが米国<sup>1)</sup> や OECD<sup>2)</sup> でなされている。しかし, 病理組織学的検査においては, 通常のヘマトキシリン・エオジン染色標本での病変解析には限界があり, リンパ組織における免疫関連細胞の機能型を分類することは困難である。また, 免疫組織病理学的検査においてはホルマリン固定パラフィン切片は適切ではなく, また, ラットに適応可能な細胞表面マーカー等の生体関連指標の抗体の種類が少ないこと等からラットを用いた免疫毒性試験における免疫病理学的検査法の改善が望まれている。以上のことから, 生体関連指標の抗体として市販されているものを用いて, 通常の病理検査においてよく用いられているパラフィン切片での免疫組織化学的検査手法の改善, および細胞増殖活性指標を用いた新しい評価手法の確立を目的として, 以下の研究を行った。

#### 1. 免疫組織化学検査のための組織固定法の検討

##### [実験方法]

通常の毒性試験でよく用いられているパラフィン切片において, どのような固定液が, T ないし B 細胞表面マーカー検出に最も適しているかについて検討するため, 無処置の Brown Norway ラットの

Table 1. Effect of dietary restriction on body weights and organ weights in BN rats

Group <sup>a</sup>	No. of animals	Body weight (g)	Thymus weight		Spleen weight	
			g	mg%	g	mg%
Control	5	187.4 ±8.2	0.539 ±0.061	2.87 ±0.22	0.442 ±0.031	2.35 ±0.13
70% restriction	5	129.5 ±10.4***	0.125 ±0.025***	0.97 ±0.19***	0.181 ±0.030***	1.40 ±0.16***

<sup>a</sup>: Dietary restriction was performed for 7 days.

\*\*\*:  $p < 0.001$

リンパ組織を過沃素酸リジンパラフォルムアルデヒド (PLP) 液, ブアン液, メタカーン (MC) 液の各固定液に固定した。PLP 液は, A 液 (0.2 M リジン塩酸, 0.1 M 第二リン酸ナトリウム, 0.1 M リン酸緩衝液) 3 容, B 液 (8% パラフォルムアルデヒド) 1 容と 0.1 M メタ過ヨウ素酸ナトリウムを混合することにより調製した。ブアン液は, ピクリン酸飽和水溶液 15 容, 酢酸 1 容とフォルマリン原液 5 容を混合することにより作製した。MC 液は, メタノール 6 容, クロロフォルム 3 容と酢酸 1 容を混合して作製した。これらの固定液に胸腺, 脾, リンパ節を固定し, パラフィン包埋し, 4-5 ミクロンの薄切標本を作製した。これらの切片に対し Pan T リンパ球抗体および Pan B リンパ球抗体 (生化学工業) を用いて免疫染色を行った。この染色には, Strept ABC キット (Dako) を用いて ABC 法により行い, 発色には DAB, 核染色にはヘマトキシリンを用いた。

#### [結果および考察]

B リンパ球は, いずれの固定液においても Pan B 抗体に染まったが, Pan T 抗体については MC 液固定がパラフィン切片での免疫組織化学的検査に最適であることが明らかとなった。

2. 低栄養状態における造血器官構成細胞の変動についての検討

#### [実験方法]

免疫毒性物質はリンパ組織を障害するが, 飼料摂取量の減少に伴う低栄養状態においても造血器官のリンパ球数は著しく減少する。このような低栄養状態における各リンパ組織の構成細胞がどのように変動するかを検討するため, 7 週齢の Brown Norway ラットにセルロースを 50 あるいは 70% 含有する飼料を 1 週間自由摂取させた。投与 1 週後に動物

を殺処分し, 胸腺と脾重量を秤量後, 胸腺, 脾と腸間膜リンパ節を MC 液で固定した。これらの組織をパラフィン包埋し, 4-5 ミクロンの薄切標本を作製した。これらの切片に対し Pan T リンパ球抗体および Pan B リンパ球抗体 (生化学工業) を用いて免疫染色を行った。この染色には, Strept ABC キット (Dako) を用いて ABC 法により行い, 発色には DAB, 核染色にはヘマトキシリンを用いた。

なお, Brown Norway ラットは免疫毒性に感受性が高い系統といわれていることから, その特徴を確認するため, 本実験および次の実験 3 において試験的に用いた。

#### [結果および考察]

低栄養に起因する変化は 70% セルロース添加群に顕著にみられ, 体重, 胸腺や脾重量は著しく減少した (Table 1)。Pan T や Pan B に対する抗体を用いた免疫組織化学検査では, 70% セルロース添加群における各リンパ組織のリンパ球の枯渇の程度は, 胸腺の T 細胞領域が最も重篤であり, ついで, 脾の T/B 細胞領域やリンパ節の T 細胞領域であり, リンパ節の B 細胞領域の枯渇の程度は軽度であった。以上のように, 低栄養状態が重度の場合には T 細胞が高度の障害をうけることが明らかとなり, 毒性試験においては免疫毒性を評価する場合には低栄養の影響を考慮すべきであることが強く示唆された。

3. 免疫毒性物質による造血組織の免疫組織化学的検討

#### [実験方法]

免疫毒性物質の投与によりラットリンパ組織の構成細胞がどのように変動するかを検討するため, 6 週齢 Brown Norway ラットに抗癌剤あるいは免疫毒性物質として知られている 6-mercaptopurine (6



Table 2. Effect of 6-mercaptopurine on body weights and organ weights in BN rats

Group <sup>a</sup>	No. of animals	Body weight (g)	Thymus weight		Spleen weight	
			g	mg%	g	mg%
Control	7	153.2 ±7.1	0.341 ±0.071	2.27 ±0.49	0.359 ±0.019	2.39 ±0.10
50 ppm	8	146.0 ±7.2	0.350 ±0.042	2.45 ±0.27	0.327 ±0.023	2.28 ±0.10
150 ppm	8	142.6 ±5.8	0.317 ±0.024	2.26 ±0.18	0.302 ±0.002**	2.15 ±0.12**
300 ppm	7	109.9 ±8.6**	0.250 ±0.100	2.29 ±0.87	0.246 ±0.022**	2.27 ±0.10

a: 6-Mercaptopurine was administered in the diet for 4 weeks.

\*\* : p<0.01

MP) を 300, 150, 50 ないし 0 ppm 含有する飼料を 4 週間投与した。6MP 投与 4 週後に動物を殺処分し、胸腺と脾重量を秤量後、胸腺、脾と腸間膜リンパ節を MC 液で固定した。これらの組織をパラフィン包埋し、4-5 ミクロンの薄切標本を作製した。これらの切片に対し Pan T リンパ球抗体および Pan B リンパ球抗体 (生化学工業) を用いて免疫染色を行った。この染色には、Strept ABC キット (Dako) を用いて ABC 法により行い、発色には DAB、核染色にはヘマトキシリンを用いた。

#### [結果および考察]

300 ppm 群では著しい体重増加抑制と脾重量の低下が認められ、150 ppm 群では体重に有意な変動はなかったが、脾重量が低下した (Table 2)。T/B 細胞マーカーによる免疫組織化学では、300 ppm 群におけるリンパ組織のリンパ球減少の程度は、脾の T 細胞領域が顕著であり、ついで、胸腺やリンパ節の T 細胞領域であり、脾やリンパ節の B 細胞領域のリンパ球の減少は軽度であった。以上のことから、6MP の高用量におけるリンパ組織の変化と低栄養により誘発された変化との鑑別は困難であり、免疫毒性評価を行う際には低栄養の影響を常に考慮すべきであることが示唆された。

4. 細胞増殖活性関連指標を用いた免疫病理検査法の免疫毒性評価法への応用

#### [実験方法]

細胞増殖反応を指標とする増殖細胞核抗原 (PCNA) の存在を証明する免疫組織化学検査法が近年開発されている<sup>3)</sup>。リンパ組織のリンパ球の細胞増殖活性は高く、免疫毒物質の曝露により、そ

の増殖活性が低下あるいは異物や抗原の攻撃によりその活性が著しく上昇することが予測される。そこで、ラットのリンパ造血組織切片に対して PCNA の免疫組織化学検査を実施し、免疫毒性検出法としてこの PCNA 法が有用か否かを検討した。10 週齢の無処置 F344 雄ラットを殺処分し、MC 液にて固定した骨髄、胸腺、脾と腸間膜リンパ節に対して抗 PCNA モノクローナル抗体を用いて免疫染色を行った。骨髄 (造血細胞)、胸腺 (T リンパ球領域)、脾 (T/B リンパ球領域)、腸間膜リンパ節 (胚中心) についてリンパ・骨髄細胞の PCNA 陽性の程度を検討した。

#### [結果および考察]

各リンパ組織の T/B 細胞領域において正常の状態ではリンパ球は高い PCNA 陽性率を示し、リンパ球の増殖活性を定量することが可能であり、免疫毒性評価手法として有用であることが示唆された。

5. 免疫毒性が疑われている化学物質についての免疫病理学的検討

#### [実験方法]

我々は、防虫用食品添加物であるピペロニル・ブトキサイド (PBX) のラット亜急性毒性試験において 3% 投与群で著しい体重増加抑制、肝細胞腫大、骨髄の低形成、脾・胸腺の萎縮を認めたり<sup>4)</sup>。しかし、これらリンパ・造血器障害が本化合物の作用か、低栄養状態に起因するものか明らかでなかった。そこで、我々は PBX 投与ラットのリンパ・造血組織を上記の免疫組織化学的手法を用いて検索し、低栄養状態ラットのリンパ系組織における変化と比較検討した。各群 5 匹からなる 6 週齢雄 F344 ラットに正

Table 3. In-life parameters and Organ weights in male rats treated with PBX for 2 weeks

Group	No. of animals	Body weight (g)	Food consumption (g/day/rat)	Thymus		Spleen	
				Absolute (mg)	Relative (mg/100g b.w.)	Absolute (mg)	Relative (mg/100g b.w.)
Control	5	203±19# <sup>a</sup>	17±1.2#	375±23#	187±30#	487±35#	241±8
Diet restriction	5	136±12*	6.2±1.1*	160±21*	118±148*	320±25*	236±4
2.5% PBX	5	136±12*	8.8±2.5*	162±34*	119±19*	331±57*	243±26

<sup>a</sup>: Mean±S.D. PBX: Piperonyl butoxide

\*: Significantly different from the control group at P<0.01 (by Student's *t* test).

#: Significantly different from the diet restriction group at P<0.01 (by Student's *t* test).

Table 4. Hematological findings in male rats treated with PBX for 2 weeks

Group	No. of animals	WBC ( $\times 10^2/\mu\text{l}$ )	RBC ( $\times 10^4/\mu\text{l}$ )	Hb (g/dl)	Ht (%)	Platelete ( $\times 10^4/\mu\text{l}$ )
Control	5	45±11 <sup>a</sup>	829±77#	14.2±1.1#	44.3±4.0#	95.6±5.4#
Diet restriction	5	48±7	998±36*	16.7±0.4*	51.5±1.7*	78.6±4.7*
2.5% PBX	5	52±12	831±61#	14.2±1.2#	44.1±3.6#	67.7±10.6*

<sup>a</sup>: Mean±S.D. PBX: Piperonyl butoxide.

\*: Significantly different from the control group at P<0.01 (by Student's *t* test).

#: Significantly different from the diet restriction group at P<0.01 (by Student's *t* test).

常飼料 (対照群), 制限飼料 (対照群の摂餌量の35%給餌: 制限食群) および2.5% PBX含有飼料 (PBX群) を2週間与えた。投与終了後に, 最終体重を測定後, 眼窩静脈叢より血液を採取し, 各群5匹についてM-2000型多項目自動血球計数装置 (東亜医用電子) を用いて赤血球数 (RBC), ヘモグロビン濃度 (Hb), ヘマトクリット値 (Ht), 白血球数 (WBC), 血小板数を測定した。血液塗抹標本にライト・ギムザ染色を施し, オムロンのMirox HEG120 A型セルアナライザーを用いて白血球分画比を測定した。その後全例を剖検し, リンパ・造血組織を摘出した。脾臓について臓器重量を測定した。胸腺, 脾臓, 腸間膜リンパ節, バイエル板および骨髓 (大腿骨, 胸骨) をMC液で固定し, パラフィン包埋し, 4-5  $\mu\text{m}$  で薄切し, HE染色を施して光顕的に検査した。さらに, これらの組織に

Pan Tリンパ球抗体およびPan Bリンパ球抗体 (生化学工業) あるいはPCNA抗体 (Dako) を用いて免疫染色を行った。この染色は, Strept ABCキット (Dako) を用いてABC法により行い, 発色にはDAB, 核染色にはヘマトキシリンを用いた。PCNA陽性率は次のようにして求めた。胸線のTリンパ球 (皮質) 領域, T/Bリンパ球領域, 腸間膜リンパ節とバイエル板のBリンパ球 (胚中心) 領域については, 3ないし5部位 (1部位は40倍の対物レンズの1視野中の限定面積) に含まれるPCNA陽性細胞数を計測することにより算出した。骨髓については, 1000個の有核細胞中に含まれるPCNA陽性細胞数を計測することにより算出した。さらに, 制限食群とPBX群の脾臓のTリンパ球領域についてTAS-plus画像解析装置 (Leitz Wetzlar) を用いて計測し, Tリンパ球領域の面積を1

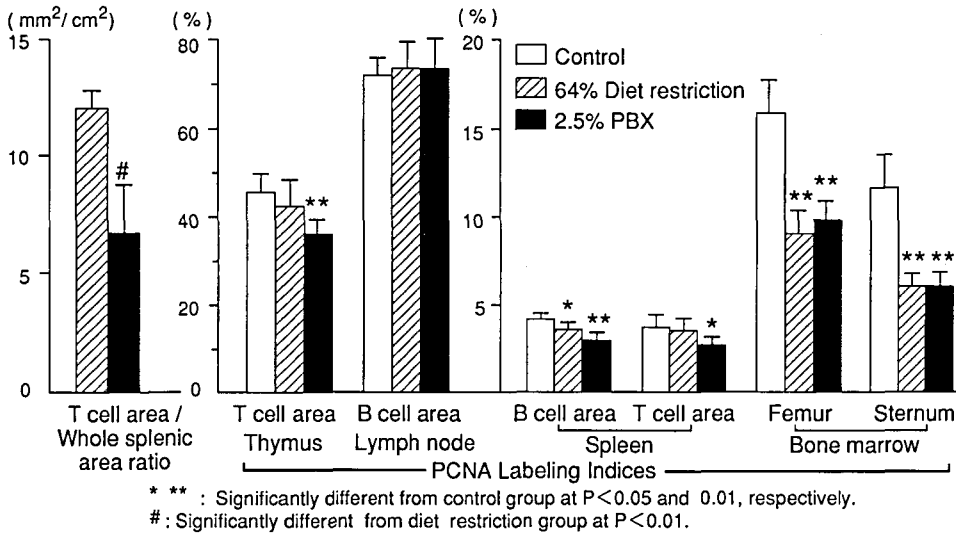


Fig. 1. Image analysis of splenic T cell area and PCNA labeling indices in lymphohematopoietic tissues in male rats treated with PBX for 2 weeks

切片当たりの全脾臓の面積に対する比率で表わした。

#### [結果および考察]

PBX 群の摂餌量は対照群に比し有意に減少したが、その摂餌量は制限食群のそれよりは明らかに高かった (Table 3)。PBX 群および制限食群では、軽度な体重減少、胸腺と脾の重量の減少が認められた。血液学的検査では、制限食群、PBX 群ともに血小板数の有意な減少が認められ、さらに制限食群では赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値が有意に減少した (Table 4)。組織学的に PBX 群および制限食群ともに骨髄低形成がみられ、免疫組織化学的には脾、胸腺の T/B リンパ球は軽度減少した。PBX 群では制限食群よりも胸腺 T リンパ球の減少が強かった。PCNA 陽性率においては PBX 群と制限食群では脾臓の B リンパ球、骨髄の有核細胞が有意に減少し、PBX 群ではさらに脾と胸腺の T リンパ球が制限食群に比べ明らかに減少した (Fig. 1)。以上より、PBX 群および制限食群で骨髄の低形成やリンパ系組織の萎縮ならびに PCNA 陽性有核細胞数の減少が同様に認められたことから、低栄養に起因する変化とも考えられた。しかし、PBX 群では制限食群と比較して摂餌量が多く、また胸腺や脾臓の T リンパ球の PCNA 陽性率がさらに低値を示したことから、PBX 群では低栄養に起因する変化に加えて、T リンパ球が PBX によりさらに障害を受けている可能性が示唆された<sup>5)</sup>。

#### [総合考察]

経済協力開発機構 (OECD) では、免疫毒性評価手法をさらに盛り込んだ反復投与毒性試験ガイドラインの修正案を作成している<sup>1)</sup>。それによると、現行のガイドラインに血清グロブリン分画、胸腺と脾重量の測定、病理組織学的検査 (胸腺、脾、腸間膜リンパ節、腸管リンパ装置) 等の検査指標を追加しようとの提案がなされている。また、さらに適切な追加指標として、骨髄細胞密度、フローサイトメトリを用いた脾のリンパ球分画や NK 細胞活性等の測定も提案されている。しかし、病理組織学的検査に関しては、依然ヘマトキシリン・エオジン染色標本での検索にとどまっており、具体的な免疫組織化学検査手法の採用については明記されていない。本研究においては、生体関連指標の抗体を用いて、通常の病理検査においてよく用いられているパラフィン切片での免疫組織化学的検査手法の改善を第一の目的とした。その結果、メタカーン固定をラットのリンパ造血組織に施すことにより、パラフィン包埋切片においても T/B 細胞の表面マーカーについての免疫組織化学検査の評価は可能であり、この手法が免疫毒性試験における免疫病理組織学的検査に応用でき得ることが示された。

また、免疫組織化学的手法を用いてリンパ・造血組織について T あるいは B リンパ球の量的把握を行うとともに、これら組織での増殖活性を検索することにより、リンパ球や造血細胞の増殖活性を検討

することが可能である。この手法を用いてPBXのリンパ・造血器への影響を検討したところ、PBX群では低栄養に起因する変化に加えて、Tリンパ球がPBXによりさらに障害を受けている可能性が示唆され、PCNA等の細胞増殖マーカーについての免疫染色を免疫病理組織学的検査に導入することにより、免疫組織の増殖活性の程度を容易に判定することが可能であることが強く示唆された。

以上の成績から、これらの生体関連指標を用いた免疫染色手法の改善および適用により、免疫毒性試験における免疫病理組織学的解析力がさらに向上し得るものと考えられる。

## 文 献

- 1) Luster, M. I., Munson, A. E., Thomas, P. T., Holsapple, M. P., Fenters, J. D., White, K. L., Lauer, L. D. D., Germolec, D. R., Rosenthal, G. J. and Dean, J. H.: Development of a testing battery to assess chemical-induced immunotoxicity: National Toxicology Program's guidelines for immunotoxicity evaluation in mice. *Fundam. Appl. Toxicol.* **10**, 2~19 (1988)
- 2) van Loveren, H. and Vos, J. G.: The Netherlands report on "Evaluation of OECD Guideline No. 407 for Assessment of Toxicity of Chemicals with Respect to Potential Adverse Effects to the Immune System". Report No. 158801001 (Unpublished OECD document). (1992)
- 3) Diebold, J., Lai, M. D. and Lohrs, U.: Analysis of proliferative activity in colorectal mucosa by immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen (PCNA). *Virchow Arch. B.* **62**, 283~289 (1992)
- 4) Maekawa, A., Onodera, H., Furuta, K., Tanigawa, H., Ogiu, T. and Hayashi, Y.: Lack of evidence of carcinogenicity of technical-grade piperonyl butoxide in F344 rats: Selective induction of ileocaecal ulcers. *Fd. Chem. Toxicol.* **23**, 675~682 (1985)
- 5) 下 武雄, 三森国敏, 北浦敬介, 小野寺博志, 安原加壽雄, 高橋道人: 第10回日本毒性病理学会講演要旨集, p. 60 (1994)

## シクロスポリン A 投与ラットを用いた免疫毒性試験法の検討

### 毒 性 部

小川幸男・内藤克司・関田清司  
降矢 強・黒川雄二・落合敏秋\*  
松本清司\*\*

\* 持田製薬(株) \*\* 信州大学医学部

**Keywords** : cyclosporin, immunotoxicity, rat

### 【目的】

従来毒性試験(一般毒性試験・発癌性試験・生殖発生毒性試験等)に免疫毒性の指標としてどのような検査項目を加えたら、免疫毒性評価が可能になるかを検討し、同時に公的免疫毒性試験法の確立を目的に本研究は実施された。

本研究では、モデル薬物として臓器移植後の免疫抑制剤として使用されているサイクロスポリン A (Cyclosporin A: CsA) を、OECD 毒性試験ガイドライン 407「げっ歯類を用いる 28 日間反復投与経口毒性試験」に免疫系組織の病理組織学的検査を加えた拡大病理組織学的検査 (Enhanced histopathological test) および免疫機能検査を組み合わせ、免疫毒性試験法とする方法の有用性を、機能生化学部と共同で検討した。機能生化学部が免疫機能検査を担当し、毒性部は一般毒性および拡大病理組織学的検査を担当した。ここでは、一般毒性および拡大病理組織学的検査の結果を報告する。なお、本試験の詳細については衛生試報第 111 号に掲載した<sup>1)</sup>。

### 【実験方法】

#### 1) 動物

1 群 10 匹からなる 4 群の 5 週齢、雄性 F344 Du/Crj ラット (日本チャールスリバー) を用いた。

#### 2) 薬物

サイクロスポリン A は Sandoz Pharmaceuticals 社製を用いた。

#### 3) 投与

CsA を局方オリーブ油に 0 (対照群), 0.5, 2 および 8 mg/ml の濃度に溶解し、それぞれ 5 ml/kg をラット用胃管で 28 日間連続強制経口投与した (0, 2.5, 10 および 40 mg/kg に相当、以下 C 群, L 群, M 群, H 群と略す)。

#### 4) 一般毒性および病理学的検査

一般状態を毎日観察するとともに、週 1 回体重を測定した。

最終投与の翌日、各群10匹のラットについてエーテル麻酔下で眼窩静脈叢より採血し、赤血球数(RBC)、血球容積比(PCV)、ヘモグロビン(Hb)、平均赤血球容積(MCV)、血小板数(Plt)、白血球数(WBC)および白血球百分比を測定した。さらに血清を分離し、総蛋白質(TP)、アルブミン(Alb)、A/G比および各蛋白分画(電気泳動法)を測定した。放血屠殺後、大腿骨骨髓の有核細胞数測定とその細胞分別を行った。脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、精巣、胸腺、副腎、腸間膜リンパ節、膝窩リンパ節および気管気管支リンパ節を摘出した。摘出臓器は秤量後、ホルマリン固定し、常法により組織標本作製し、ヘマトキシリン-エオジン染色を施した。脾臓についてはW3/13抗体で免疫組織学的に検査した<sup>2)</sup>。

#### [結果]

##### 1) 一般状態および体重

H群において実験終了時点で約10%の体重増加抑制が認められた。一般状態では変化はみられなかった。

##### 2) 血液学的検査

MおよびH群のWBCに、C群に比べ約50%の有意な減少が認められた。百分比測定の結果リンパ球の減少と判明した。

##### 3) 骨髓検査

H群の有核細胞数がC群に比べ約25%有意に減少した。細胞分別の結果赤芽球およびリンパ球の減少と判明した。

##### 4) 血清蛋白

H群においてTPの有意な減少が認められた。電気泳動の結果、Alb、 $\alpha_1$ -グロブリンおよびA/G比の減少が認められた。これは体重増加抑制に起因した変化と考えられた。

##### 5) 臓器重量

H群において心臓、脾臓および副腎の実および比重量が有意に変化した。被験物質投与に起因した変化とは考えられなかった。

##### 6) 病理組織学的検査

胸腺髄質の著明な萎縮がMおよびH群で認められた。同時に胸腺皮質のTingible body macrophageがMおよびH群でみられた。MおよびH群で腎臓尿管の石灰化および好酸性変化が認められた。

H-E染色では変化のみられなかった脾臓を抗ラットリンパ球抗体W3/13抗体で免疫染色したところ、動脈周囲鞘(PALS)のTリンパ球領域で陽

性を示す細胞の明らかな減少が認められた。そのほかの臓器には被験物質投与に起因した変化はみられなかった。

#### [考察]

リンパ球の減少による末梢WBCの減少、骨髓検査では赤芽球およびリンパ球の減少による有核細胞数の減少、病理組織学的検査では胸腺髄質の著明な萎縮および皮質のTingible body macrophageがMおよびH群で認められた。脾臓については、免疫組織学的検査によりTリンパ球の減少が認められた。この変化は通常のH-E染色標本による組織学的検査では検出できないものであり、免疫組織学的検査の有用性が示唆された。このようにCsAの持つ免疫抑制作用を末梢血、骨髓のリンパ球減少ならびに脾臓および胸腺の組織学的変化として捉えることができ、免疫機能検査の結果とはほぼ平行する結果が得られた。

米国NTPでは、抗体産生細胞(PFC)試験と細胞表面マーカーによるリンパ球サブポピュレーションの解析が免疫毒性試験に有用であったと報告している<sup>3,4)</sup>。今回の免疫組織学的検査は、リンパ球表面マーカーの解析を定行的に行える点で有利であり、一次スクリーニングの検査項目として有望と思われる。

以上のことから、一般毒性試験に免疫系組織の病理組織学的検査および免疫機能検査を組み合わせた本免疫毒性試験法による、ラットを用いた試験は、免疫毒性の検索あるいは一次スクリーニング試験法として有用なものであることが示唆された。

#### 文 献

- 1) 落合敏秋, 他: 衛生試験, 111, 92 (1993)
- 2) Hayashi, S., et al.: *Vet. Pathol.*, 26, 326 (1989)
- 3) Luster, M. I., et al.: *Fund. Appl. Toxicol.*, 18, 200 (1992)
- 4) Luster, M. I., et al.: *Toxicol. Lett.*, 64/65, 71 (1992)

### 3. 培養細胞を用いた *in vitro* 試験

#### マクロファージの食食機能の指標としての活性酸素生成活性測定系の確立に関する基礎的研究

生物薬品部

山口照英・押澤 正・早川堯夫

**Keywords:** macrophage, phagocytosis, superoxide radical

#### [目的]

マクロファージは、生体に侵入してくる細菌や異物を食食し殺菌を行うという生体防御の最前線の機能を担っていることはよく知られている。マクロファージは、異物の殺菌ばかりでなく食食した異種タンパク質を分解し、抗原提示するという免疫応答の初期過程の機能をも担っている。したがって、マクロファージの食食機能を測定することは医薬品や化学物質の免疫毒性を知る上で非常に重要であると考えられる。しかし、マクロファージ等の食細胞の食食機能を直接測定する方法に関して多くの報告があるものの、ある特定の指標をもとにその機能を測定しようとするとき、定量性や簡便性等において未だ共通の指標として適切なものはない。一方、食細胞は異物を食食するとともに毒性の強い活性酸素を生成し、殺菌を行うことが知られている。この、食食活性と活性酸素生成活性とは密接に関連していることが好中球を中心として明らかにされており、マクロファージの食食機能をこの活性酸素生成活性を指標として測定することができればその意義は大きい。

本研究では、ラットマクロファージの食食活性をスーパーオキシドラジカル ( $O_2^-$ ) 生成活性を指標として測定するための基礎的検討を行った。また、モデル化合物として、免疫抑制剤である FK506、および非ホルボール系発癌プロモーターであるカリクリン A を取り上げ、食食活性に及ぼす影響についても検討した。

#### [結果]

1. ラット腹腔にカゼインを投与し、4日後に浸出してきたマクロファージを採集した。食食粒子としては、新鮮血清を用いてオプソニン化したザイモザン (Op-ZY) ないしは抗ザイモザン抗体によりオプソニン化したザイモザン (IgG-ZY) を用いた。食食に伴うスーパーオキシドラジカル ( $O_2^-$ ) 生成活性はチトクローム c の還元を経時的に測定するこ

とにより求めた。そのために、wind-mill 型の細胞攪拌装置を用いてマクロファージおよび食食粒子の沈澱を防ぎながら連続的に  $O_2^-$  生成を測定した。

2. IgG-ZY および Op-ZY の添加により、ラット腹腔マクロファージは短時間の lag-time の後に  $O_2^-$  を生成した。Op-ZY を添加した場合、マクロファージは 30 秒ほどの lag-time の後、急激な  $O_2^-$  生成を示し、少なくとも 10 分以上はほぼ直線的に  $O_2^-$  を生成した。一方、IgG-ZY を添加した場合、 $O_2^-$  生成は 20 秒ほどの lag-time の後に認められたが、数分で急激に低下し、15 分後には殆ど認められなくなった。この  $O_2^-$  生成活性は、0.5 mg から 2 mg/ml の Op-ZY ないしは IgG-ZY 添加により用量依存的に増加し、2.5 mg/ml 以上でプラトーに達した。また、用いるマクロファージの濃度に関して、 $3 \times 10^6$  細胞/ml までほぼ直線的に  $O_2^-$  生成活性が増加した。以上の結果より、食食指標としての  $O_2^-$  生成活性は 2.5 mg/ml の Op-ZY ないしは IgG-ZY を  $1 \times 10^6$  細胞/ml のマクロファージに添加することにより測定可能であると結論した。

3. ラットマクロファージの食食機能に及ぼす種々の薬剤の影響を調べる目的で、FK506 およびカリクリン A を取り上げ  $O_2^-$  生成活性に及ぼす影響について検討した。その結果、FK506 は 1 mM まで添加してもラットマクロファージの  $O_2^-$  生成を全く阻害しなかった。一方、カリクリン A は 25 nM の非常に低濃度で約 80% の阻害作用を示し、50 nM ではほぼ 100% の阻害が認められた。このカリクリン A による  $O_2^-$  生成活性の阻害パターンは、IgG-ZY および Op-ZY のいずれを刺激剤として用いた場合でもほぼ同様の用量曲線を示した。

4. 次に、カリクリン A および FK506 の細胞接着に及ぼす影響について検討したところ、カリクリン A はラットマクロファージのフィブリノーゲンをコートした基質面への接着を顕著に阻害し、その阻害濃度は  $O_2^-$  生成活性に対する阻害濃度と同一であった。一方、FK506 はラットマクロファージの細胞接着を阻害しなかった。

一方カリクリン A は、ラットマクロファージの  $O_2^-$  生成活性および細胞接着を阻害するものの、Op-ZY のレセプターである C3bi レセプターの発現や F-アクチン含量に対しては全く影響を与えなかった。

#### [考察]

本研究では、免疫毒性試験法の 1 つとしてラット

マクロファージの食食機能を  $O_2^-$  生成活性を指標として測定する系の確立を目指した。その結果、2.5 mg/ml の Op-ZY ないしは IgG-ZY を  $1 \times 10^6$  細胞/ml のマクロファージに添加し、wind-mill 型の細胞攪拌装置を用いることにより食食指標としての  $O_2^-$  生成活性を感度よくかつ経時的に測定することを明らかにした。より高感度な活性酸素測定法として、ケミルミネッセンス (CL) による  $O_2^-$  測定法が知られているが、CL 法では生成された  $O_2^-$  生成と CL の強度に必ずしも直線的な関係が成立しないとの欠点も報告されている。一方、チトクローム c による  $O_2^-$  生成の測定は、CL 法に比較して感度は 10 倍程低いものの生成された  $O_2^-$  生成量とチトクローム c の還元量はよく相関しておりより定量性の高い方法であると考えられる。また、連続的な測定が可能なることから、 $O_2^-$  生成までの lag-time の測定やその持続時間を正確に測定することが可能であり、種々の被検物資の食食機能への影響をより多方面から解析することが可能である。食食粒子として用いた Op-ZY は補体第 3 因子の C3bi のレセプターを介して食食され、IgG-ZY は Fc レセプターを介して食食されるが、この 2 つの食食粒子により引き起こされるラットマクロファージの  $O_2^-$  生成パターンは大きく異なっていた。この様に食食粒子の違いによる、 $O_2^-$  生成パターンの違いが認められることを利用し、食食機能を阻害する物質の阻害作用機構をも推定することも可能であると考えられる。

次に、本法を用いてラットマクロファージの食食

指標としての  $O_2^-$  生成活性に及ぼす FK506 およびカリクリン A の影響について検討した。免疫抑制剤である FK506 は、Ca/カルモジュリン依存性ホスファターゼであるカルシニューリンの阻害剤として知られており、また非ホルボールエステル系の発ガンプロモーター作用を有するカリクリン A は、Ser/Thr ホスファターゼ 1 および 2A の強力な阻害剤であることが知られている。その結果、カリクリン A は非常に低濃度で  $O_2^-$  生成活性を阻害すること、また同じ濃度のカリクリン A はフィブリノーゲンをコートした基質面への接着も阻害することが明らかとなった。また、IgG-ZY および Op-ZY 刺激による活性酸素生成に対するカリクリン A の阻害の用量曲線は非常に似たパターンを示した。すなわち、異なるレセプターを介した食食活性がカリクリン A により同じ様に阻害されることは、カリクリン A による阻害がレセプターレベルでの阻害ではないことを示唆している。一方、カリクリン A は C3bi レセプターの発現や F-アクチン含量に対しては全く影響しなかった。以上の結果より、カリクリン A はレセプターの発現レベルや F-アクチンレベル以外のマクロファージの機能に作用し、細胞接着や食食機能を阻害している可能性が示唆された。一方、FK506 は、細胞接着を阻害するとの報告もあるが、ラットマクロファージの活性酸素生成およびフィブリノーゲンをコートした基質面への接着には全く影響を与えなかった。

Aoyagi, N., Kaniwa, N., Takeda, Y., and Uchiyama, M.: **The purpose of the dissolution test in Japanese Pharmacopoeia and its application principles**

*Japanese Pharmacopoeial Forum*, 3, 46~60 (1994)

シミュレーション試験により *in vitro/in vivo* 相関性を得ることの困難な原因は消化管環境の不均一性、変動性にあること、相関性を確立することは難しくとも溶出試験で生物学的非同等性を防ぐことが可能なことを示すとともに、インドメタシンカプセル、メトロニダゾール錠等の実験データを用いてこれを証明した。この結果に基づき、溶出試験による品質管理の目的が生物学的非同等性を防ぐこととすべきこと、溶出試験の適用条件は非同等性を検出しやすい条件とすべきこと、溶出試験に代えての崩壊試験の適用はそれで非同等な製剤を検出できる場合に限られること等を定めた。また、標準となる溶出試験規格の設定法についても言及した。

**Keywords** : dissolution, bioequivalence, bioavailability

青柳伸男, 鹿庭なほ子, 武田 寧, 内山 充: **日本薬局方における溶出試験の目的, 適用製剤および試験条件**

*医薬品研究*, 24, 1031~1041 (1993)

日本薬局方における溶出試験の目的, 試験条件および適用製剤について検討を行い, 本試験の目的は生物学的非同等性を防ぐことにあり, バイオアベイラビリティに差を生じるおそれのある製剤に溶出試験を適用すべきこと, 溶出試験の条件は製剤間の差を識別できる条件で行うべきこと等を結論した。これに基づき, パドル法 50 rpm が優先的試験条件であること, コーティング製剤には中性の試験液が望ましいこと, 有機溶媒の使用は適切でないことを定めた。また, 崩壊試験の適用範囲, 標準的規格の設定法についても述べた。

**Keywords** : dissolution, bioequivalence, bioavailability

Yoshioka, S., Aso, Y., Izutsu, K., and Terao, T.: **Aggregates Formed During Storage of  $\beta$ -galactosidase in solution and in the Freeze-Dried State**

*Pharm. Res.*, 10, 687~691 (1993)

凍結乾燥製剤および水溶液中における  $\beta$ -ガラクトシダーゼの凝集のメカニズムを明らかにした。凍結乾燥製剤は水分存在下での保存によって凝集し, 塩酸グアニジンによって溶解する不溶性タンパク質を生成する。この凝集体は変性体より大きな分子サイズをもつことがサイズ排除クロマトグラフィーによって示されたが, 還元剤のジチオトレイトールによって変性体のサイズに解離することから, ジスルフィド結合を介して生成されることが明らかになった。一方, 水溶液中で生成される水溶性の凝集体は,

塩酸グアニジンによって解離され, その解離に還元剤を必要としないことから疎水結合を介して生成される凝集体であることが明らかにされた。固体状態および溶液状態において観察された凝集メカニズムの差異は, タンパク質に対する水の比率の差に起因すると考えられた。

**Keywords** : aggregation, freeze-dried,  $\beta$ -galactosidase

Yoshioka, S., Aso, Y., Izutsu, K., and Terao, T.: **The effect of Salts on the Stability of  $\beta$ -galactosidase in aqueous solution, as related to the water mobility**

*Pharm. Res.*, 10, 1484~1487 (1993)

水溶液中における  $\beta$ -ガラクトシダーゼの安定性に及ぼす塩類の影響を水分子の運動性の変化の観点から検討した。KCl, KBr および NaCl のように水のスピン-格子緩和時間  $T_1$  に大きな影響を与えない塩類は, 塩濃度の上昇とともに  $\beta$ -ガラクトシダーゼの変性を促進するのに対して, KF,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  およびリン酸塩のように水の  $T_1$  を低下させる塩類は, 200 mM 以上の高濃度領域において変性を抑制し, タンパク質を安定化する効果をもつことが示された。水分子の運動性がタンパク質の安定性を支配する要因であることが明らかになった。

**Keywords** : salt, stability, water mobility

Yoshioka, S., and Carstensen, J. T.\*1: **Rebuttal to "Practical Testing of Solid-State Stability of Pharmaceuticals"**

*J. Pharm. Sci.*, 82, 674 (1993)

固体状態の医薬品の安定性予測において加速試験を活用することに対する否定的な主旨の論文に対して, その有用性を論理的に説明して反論を行った。不均一系における反応についても, 速度論的解析が可能であり, 加速条件で得られたデータに基づく安定性予測が固体状態の医薬品の安定性の評価において重要な役割をもつことを明らかにした。

**Keywords** : stability, prediction, accelerated testing

\*1 University of Wisconsin, USA

Hayashi, Y., Yoshioka, S., Aso, Y., LiWanPo, A.\*1, and Terao, T.: **Entrapment of proteins in poly (l-lactide) microspheres using reversed micelle solvent evaporation**

*Pharm. Res.*, 11, 337~340 (1994)

ポリ乳酸マイクロスフェアにタンパク質薬物を安定に内包する方法として, 脂肪酸ショ糖エステルを界面活性剤とした逆相ミセルによる液中乾燥法を開発した。この方法を用いてマイクロスフェアに内包させたスーパーオキシサイドスムターゼ,  $\beta$ -ガラクトシダーゼおよびヒト腫瘍壊死因子はそれぞれ持続性の薬物放出性を示し, 逆相ミセルによる方法が



タンパク質薬物の放出制御型製剤の調製法として利用できることが示唆された。

**Keywords** : microspheres, reversed micelle, drug delivery system

\*1 The Queen's University of Belfast, U

Otsuka, T., Yoshioka, S., Aso, Y., and Terao, T.: **Application of Microcalorimetry to Stability Testing of Meclofenoxate Hydrochloride and dl- $\alpha$ -Tocopherol**

*Chem. Pharm. Bull.*, **42**, 130~132 (1994)

マイクロ熱分析法による医薬品の安定性予測の可能性を、塩酸メクロフェノキサートの加水分解および $\alpha$ -トコフェロールの酸化反応をモデル反応として検討した。発熱量から計算した反応速度は、高速液体クロマトグラフィーによって測定した加速条件における経時的な分解量から計算した反応速度と一致し、マイクロ熱分析法は薬物の化学的分解速度の測定に有用であることが明らかになった。加速条件における $\alpha$ -トコフェロールの分解量の経時変化から計算した分解速度に基づいてそのアレニウスプロットの外挿によって推定した25°Cにおける分解速度は、マイクロ熱量計によって25°Cにおいて実測した速度に一致した。25°Cにおける分解速度を温度の外挿を行わずに分解量に基づいて実測するためには1年程度の期間にわたる経時的分解量のデータが必要であるが、マイクロ熱分析法では、1日間測定した発熱量のデータで精度よく分解速度を求めることができた。

**Keywords** : microcalorimetry, degradation rate, stability prediction

Jordan, G. M.\*1, Yoshioka, S., and Terao, T.: **The Aggregation of Bovine Serum Albumin in Solution and in the Solid State**

*J. Pharm. Pharmacol.*, **46**, 182~185 (1994)

牛血清アルブミン (BSA) の凝集のメカニズムと速度に及ぼす水分子の運動性の影響を検討した。BSAは固体および溶液のいずれの状態においても、ジスルフィド結合を介して凝集することが明らかになった。固体状態では水の比率が低い領域で速い凝集がみられたのに対して、溶液状態での凝集速度はタンパク質に対する水の比率が上昇して $^{17}\text{O}$ -NMRで測定した水のスピンの格子緩和時間  $T_1$  が増大するにつれて増大した。水分子の運動性がBSAの安定性に関連していることが明らかになった。

**Keywords** : aggregation, stability, water mobility

\*1 Trinity College, Republic Ireland

Aso, Y., Yoshioka, S., and Terao, T.: **Effect of the Binding of Water to Excipients as Measured by  $^2\text{H}$ -NMR Relaxation Time on Cephalothin Decomposition Rate**

*Chem. Pharm. Bull.*, **42**, 398~401 (1994)

添加剤共存下の医薬品の分解速度におよぼす水分の影響を明らかにするため、添加剤に吸着した重水

の $^2\text{H}$ -NMRスペクトルとスピン格子緩和時間の測定を行い、結晶セルロースあるいはトウモロコシデンプンとの混合粉体におけるセファロチンの分解速度を種々の湿度条件で測定した。分解速度および添加剤に吸着した重水のスピンの格子緩和時間は混合粉体の水分含量の増加に従って増加し、分解速度とスピン格子緩和時間が相関することが示された。固体状態における医薬品の分解速度に影響する水分子の運動性の指標として $^2\text{H}$ -NMRスピンの格子緩和時間が使えることが示唆された。

**Keywords** : stability, spin-lattice relaxation time, solid state

Aso, Y., Yoshioka, S., and Terao, T.: **Effect of storage on the physicochemical properties and release characteristics of progesterone-loaded poly (l-lactide) microspheres**

*Int. J. Pharm.*, **93**, 153~159 (1993)

プロゲステロンを内包したポリ(L-)乳酸マイクロスフェアの物理化学的な特性と薬物放出特性の保存安定性について検討した。マトリックスのガラス転移温度 ( $T_g$ ) 以上の温度条件に保存することにより、調製直後非晶質であった高分子マトリックスが結晶化し、マイクロスフェアからの薬物放出速度の増大が観測された。マトリックスの結晶化は乾燥状態よりも水分のある条件で速やかに起こり、水分が結晶化を促進することが示された。マトリックスの $T_g$ 以下の温度条件で保存した場合、高湿度条件においても実験期間中のマトリックスの結晶化は観測されなかった。しかしながら、高湿度条件で保存したマイクロスフェアでは $T_g$ の低下と薬物放出速度の上昇が観測された。 $T_g$ の低下は高分子の分解および水が可塑剤として作用することによるマトリックスの堅牢性の低下によるものと考えられ、その結果、薬物放出速度が上昇したのと考えられる。

**Keywords** : stability, microspheres, crystallization

Izutsu, K., Yoshioka, S., Terao, T.: **Decreased protein stabilizing effect of cryoprotectants due to crystallization**

*Pharm. Res.*, **10**, 1233~1238 (1993)

凍結乾燥品をはじめとするタンパク質製剤では、製造工程や保存時の失活を抑制する目的で各種の添加剤が用いられている。凍結乾燥品に含まれる物質は結晶や非晶質等さまざまな物理的状态で存在することから、*Aspergillus oryzae* 由来 $\beta$ -ガラクトシダーゼをモデルタンパク質として、凍結乾燥時の添加剤の結晶性とタンパク質保護作用の関係について検討した。凍結乾燥品がアモルファス状態であるショ糖やグルコースの保護作用は濃度依存的に増加した。一方、凍結乾燥試料中のマンニトールの結晶性は乾燥前のマンニトールや緩衝液の濃度等により異なり、マンニトールでは結晶の出現した試料では保護効果の減少がみられた。また、乾燥品中のマンニトール結晶の有無は凍結溶液の熱測定で観察されるマンニ

トールの結晶化ピークの有無と相関した。これらの結果から、凍結乾燥時の安定化には添加剤が非晶状態で存在する必要のあること、および凍結乾燥条件の設定に凍結試料の熱分析が有効であることが明らかとなった。

**Keywords** : freeze-drying, stabilization, crystallization

Izutsu, K., Yoshioka, S., Terao, T.: **Effect of mannitol crystallinity on the stabilization of enzymes during freeze-drying**

*Chem. Pharm. Bull.* 42, 5~8 (1994)

タンパク質凍結乾燥時の添加剤の結晶性と保護作用の関係について、添加剤としてマンニトール、タンパク質として起源および構造の異なる4種類の酵素を用いて検討した。何れの酵素の場合もマンニトールがアモルファス状態の凍結乾燥品では濃度依存的な保護作用がみられたが、マンニトールの結晶が現れた試料では保護作用の低下がみられた。また、凍結溶液の熱測定から結晶化の条件について検討した。

**Keywords** : freeze-drying, stabilization, crystallization

石橋無味雄, 豊岡利正, 武田 寧, 寺尾允男: **日本薬局方ヒ素試験法における「検液の調製法」方法の改正に関する提案**

医薬品研究, 24(5), 539~545 (1993)

日本薬局方ヒ素試験法の検液の調製法 第3法において、試料の灰化処理性と回収率の向上を目的とし、硝酸マグネシウムのエタノール溶液 (1→50) 10 ml を用いて灰化処理を行っている。しかし、本法で処理してもヒ素の回収率が低い医薬品がある。そこでその理由の解明と試験方法の改良を目的として実験を行い、回収率が低くなる原因は、試料医薬品のエタノールへの溶解性が低くいためにヒ酸マグネシウム化合物の生成割合が低くなることに起因することを明らかにし、その対策として硝酸マグネシウムのエタノール溶液の硝酸マグネシウム濃度を高くする方法、強過酸化水素を加える方法などを検討し、硝酸マグネシウム濃度を10倍とする方法とさらに強過酸化水素を加える改正試験法を開発した。

**Keywords** : arsenic limit, magnesium nitrate, pharmacopoeia

石橋無味雄, 豊岡利正, 寺尾允男: **日本薬局方吸光度測定法における「波長および吸光度目盛の補正」方法の改正に関する提案**

医薬品研究, 24(5), 546~557 (1993)

医薬品の開発資料の作成や品質管理に用いる分析装置の校正は日常的に行うことが必要である。そこで、その方法には信頼性があり、簡便な方法であることが求められる。そのような見地から一般試験法を調査すると、吸光度測定法において光度計(紫外可視分光光度計など)の校正に重クロム酸カリウムの0.01 M 硫酸溶液を用いることになっている。こ

の溶液は安定性が悪く、また正確な濃度に標準溶液を調製することにも困難な面が認められ、改正を検討することが必要と認められた。一方、日本分析機器工業会の調査などで、機器分析に必要な標準物質の第1順位に光学用フィルターが挙げられ、通産を中心に光学用フィルターの標準物質化が進められていた。そこで日本薬局方においてもガラスフィルターを用いて光度計の校正を行う方法を検討した結果、ホロニウムフィルターなどのガラスフィルターを用いて波長および透過率の簡便かつ迅速な光度計の校正を行うことが可能であることが明らかになった。そこでガラスフィルターを校正に用いる吸光度測定法の改正案を開発し、提案した。

**Keywords** : spectrophotometry, calibration wavelength, calibration absorbance

石橋無味雄, 寺尾允男: **稀用薬の安全管理**

治療, 75(11), 49~52 (1993)

マラリヤなどの熱帯稀用薬(未承認の物質)、13種の開発研究を物理化学的な面から行い、それらの性質、品質および試験方法などを明らかにし、また開発した結果を示した。また未承認の有効成分を含む製剤の安全性を確保するため、品質に関する試験方法を開発し、安定性を含めて製剤の品質の保持を行った。これにより国内における緊急な状態に対し有害な事態を引き起こすことなく安全に研究用医薬品を供給することが可能になった。さらに将来的に稀用薬の安定な供給を可能にするための稀用薬の供給に関し、一つの方策を提言した。

**Keywords** : orphan drug, tropical diseases, safety

最所和宏, 豊田正武, 高木加代子, 佐竹元吉, 高橋 悟\*<sup>1</sup>, 山本裕昭\*<sup>1</sup>, 葛西 健\*<sup>2</sup>, 橋本勢津\*<sup>2</sup>, 斎藤行生: **はちみつによる食中毒の病院物質について**

食衛誌, 35, 46~50 (1993)

平成4年4月岩手県岩泉町の山林において野生ミツバチのハチミツによる神経毒症状を呈する中毒事故が発生した。この食中毒の原因物質を検索するため、中毒ハチミツ中の花粉の鏡検を行い、Aconitum 属植物の花粉と形状のよく一致する花粉の存在が確認された。また、中毒ハチミツをラットに投与すると神経毒様症状を呈した。ハチミツ抽出物のTLCによりアコニチンと同一のRf値を示す物質の存在が認められ、GC-MSによりアコニチンと確認した。そこで、中毒ハチミツ中のアコニチン系アルカロイドを抽出し、HPLCにより定性・定量を行った。中毒ハチミツ中のアコニチンレベルは10.7 ppmであり、この濃度はヒメダカ致死試験による推定値と一致した。以上より、ハチミツによる本食中毒の原因物質はアコニチンであると推定した。

**Keywords** : honey, food poisoning, aconitine

\*<sup>1</sup> 岩手県衛生研究所

\*<sup>2</sup> 岩手県岩泉保健所

### Hair Analysis For Drugs of Abuse IV. The excretion of methoxyphenamine and methamphetamine into beards of human subjects

*Forensic Sci. Inter.*, 63, 109~119 (1993)

6人の健康な男性にメトキシフェタミン(覚せい剤のモデル化合物) 50 mgを1回および7回服用させ、翌日から検出不能までヒゲを採取し、薬物濃度を測定したところ、最終服用後2~3日目の採取分が最大濃度を示し、その後1回投与では10~12日まで、7回投与では12~14日まで検出された。尿試料に比較して長期間検出が可能であることが示された。さらに、ヒゲから代謝物を確認し、汚染によるものではないことも証明した。

**Keywords:** Hair analysis, methamphetamine abuse, excretion into beard

\* 国立下総療養所

### Nakahara Y., Kikura R.: Hair Analysis For Drugs of Abuse VII. The incorporation rates of cocaine, benzoylecgonine and ecgonine methyl ester into rat hair and hydrolysis of cocaine in rat hair

*Arch. Toxicol.*, 68, 54~59 (1994)

コカインおよびその主代謝物ベンゾイルエクゴニン(BE)とエクゴニンメチルエステル(EME)の血漿中AUCと比較した毛髪への取り込み率(H/A)を有色ラットをもちいて調べたところ、代謝物BE、EMEはAUCが高いにもかかわらず毛髪中では検出不能であった。重水素標識のBE、EMEを用いてH/Aを調べたところこれら代謝物はコカインとして毛髪に取り込まれた後毛髪中で加水分解され生成することが証明できた。

**Keywords:** hair, incorporation rate, cocaine

### Hayakawa, T.: Viral tests and validation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin (Part 1)

*IYAKUHIN KENKYU*, 24(12), 1282~1292 (1993)

ヒトまたは動物由来の細胞を用いて生産されるバイオテクノロジー医薬品におけるウイルス試験とウイルスバリデーションに関して、ICHハーモナイズドテキストの作成およびわが国での論議のたたき台とするべき意図で執筆された論文の第1報である。まず、細胞培養医薬品におけるウイルス安全性を保証するためには、3つの相補的アプローチ、すなわち、①出発素材である細胞基材その他の培地や試薬・試液の選択と試験、②医薬品生産工程のウイルス除去および不活化能力の試験、③生産段階の適切な段階での製品を対象としたウイルス試験、が必要であるとの概念を提示した。ついで、ウイルスの汚染源、ウイルス試験の定義、細胞レベルでのウイルス試験のあり方、ウイルス試験として適用可能な具体的方法の例示、ウイルスが存在する細胞基材の取り扱い、未精製バルクハーベストレベルでの試験のあり方などを論じた。

**Keywords:** viral test, viral validation, cell culture technology-derived drug

### Hayakawa, T.: Viral tests and validation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin (Part 2)

*IYAKUHIN KENKYU*, 25(1), 15~24 (1994)

前報に続いて、細胞レベルおよびバルクハーベストレベルでのウイルス試験の結果を受けての目的産物の精製工程でのプロセスバリデーションの実施要領、精製目的産物(精製バルク:最終バルク)レベルや最終製品各ロットレベルの品質管理試験での対処法を述べた。またウイルスの不活化・除去に関するプロセスバリデーションの留意事項として、①バリデーションに使用されるウイルスの選択、②バリデーション試験のデザインと実施要領、③試験結果の評価、④バリデーション試験の限界、⑤バリデーション試験における統計的処理、⑥製造工程や精製工程が変更された場合の再検証、などの事項について論じた。最後にウイルスに関して安全な細胞培養医薬品を生産するためには、①細胞基材でのウイルスの存在に関する徹底的な試験、②存在ウイルスのヒトへの感染性や疾病との関連性の解明、③製造工程にウイルスの不活化や除去に有効なプロセスの採用、④綿密なウイルスバリデーション試験のデザイン、⑤最大限のウイルス除去効果を得るために製造工程中に種類の異なるウイルス不活化・除去方法を採用、などの戦略が重要であることを強調した。

**Keywords:** viral validation, biotechnology-derived drug, viral safety

### Hayakawa, T.: Regulatory evaluation of biotechnology drugs: Current trends in Japan

*Pharmeuropa*, Special Edition (Interpharmacopoeial Open Conference: Harmonisation of Biotechnology-derived Products Standards: Proceedings of the conference and workshops), 65~72 (1993)

バイオテクノロジー医薬品の品質評価のあり方に関するわが国の現状について紹介した。次に、わが国の医薬品承認制度のもとで、バイオテクノロジー医薬品を薬局方に速やかに収載していくにはどうすればよいか、同時にこの件に関する国際的ハーモナイゼーションをどのように図っていけばよいかについての方策を論じた。

**Keywords:** biotechnology-derived drug, japanese pharmacopoeia, pharmacopoeia drug

### Tanaka, A.\*1, Morimoto, K. and Yamaha, T.\*2: Small scale synthesis of labeled diphenyl and its binding to mouse liver microsomes

*RADIOISOTOPES*, 42, 564~568 (1993)

わが国で食品添加物として使用されているジフェニルの安全性評価のために、標識ジフェニルの合成をおこなった。まず[U-<sup>14</sup>C]臭化ベンゼンを原料として、臭化フェニルマグネシウムを得た後、この

グリニヤール試薬を無水テトラヒドロフラン中で臭化タリウムの存在下、カップリング反応をおこなうことにより、約94%の高収率で目的の [<sup>14</sup>C]ジフェニルを得ることができた。

合成した高比放射能の標識ジフェニルは、マウス肝臓による代謝活性化後、肝ミクロソームと共有結合を形成した。しかし、著者らの条件下では、誘導剤であるベンゾピレンとカネクロール (KC-500) 投与による共有結合性への影響は明らかでなかった。

**Keywords** : labeled diphenyl, covalent binding

\*1 昭和薬科大学

\*2 ヒューマンサイエンス振興財団

徳永裕司, 森本和滋, 早川堯夫: 液体クロマトグラフ法によるプロピオン酸テストステロン, プロゲステロンおよび安息香酸エストラジオールの原末および同注射液の定量について

医薬品研究, 25(3), 186~194 (1994)

第十二改正日本薬局方のプロピオン酸テストステロン (TP), プロゲステロン (PS) および安息香酸エストラジオール (EB) の原末および同注射液の定量法は吸光度測定法および比色定量法が用いられている。これらの方法は原末中の不純物あるいは注射液中の賦形剤等の影響を受ける。これらの定量妨害を除去するため、著者らは高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法を確立した。市販の TP, PS および EB は TSKgel ODS-80TM のカラムを用いる HPLC 法で測定された。市販の注射液では、プレスクリーニング法としてシリカゲルカラムを用いることによりゴマ油あるいは賦形剤がほとんど除かれ、それらによる HPLC カラムの劣化あるいは目詰まりが避けられた。HPLC 法と従来法である吸光度測定法あるいは比色定量法により得られた測定値を比較したとき、両者の値は良い一致が認められた。

**Keywords** : testosterone propionate, HPLC, injections

Sakal, E.\*<sup>1</sup>, Tchelet, A.\*<sup>1</sup>, Uchida, E., Shimokawa, S.\*<sup>2</sup>, Nishikawa, S.\*<sup>2</sup>, Hayakawa, T., Krivi, G. G.\*<sup>3</sup>, and Gertler, A.\*<sup>1</sup>: Site-directed mutagenesis of hGH at the 54-74 loop selectively modifies its lactogenic receptor-mediated biological activity

Mol. Cell. Endocrinol., 97, 129~143 (1993)

ヒト成長ホルモン (hGH) の 54-74 ループの変換体についてプロラクチン (PRL) 受容体を介する 2 種類の生物活性および hGH 結合蛋白 (hGHBP) との結合活性を検討した。P59A, P61A, P59A-P61A の各変換体は HC-11 細胞に対する  $\beta$  カゼイン合成活性では低下が認められたが、Nb2 細胞増殖活性は変わらなかった。これらの変換体はいずれも hGHBP と 1:2 で複合体を形成するが、親和性は P51A で 8 倍、P59A-P61A で 14 倍低下した。Des62-67 変換体は hGHBP と複合体を形成せず、hGH と hGHBP の結合に対する競合も示さなかった。また、HC-11 細胞での活性は完全に失っていた

が、Nb2 細胞では hGH の 0.4% の活性を示した。以上の結果から、GH 受容体を介する hGH の結合と活性発現への Pro61 の関与が確認された。また、2 種類の PRL 受容体で変換体への反応性が異なることから、PRL 受容体は種、組織により異なることが強く示唆された。

**Keywords** : human growth hormone, site-directed mutagenesis, bioassay

\*1 The Hebrew University of Jerusalem, Israel

\*2 大阪大学薬学部

\*3 Monsanto Co., USA

内田恵理子, 森本和滋, 川崎ナナ, 早川堯夫: 培養細胞を用いたヒト成長ホルモンの *in vitro* bioassay 法の開発に関する研究

医薬品研究, 25, 348~353 (1994)

ヒト成長ホルモン (hGH) は培養細胞系の 3T3-F442A 脂肪前駆細胞に対して用量依存的に脂肪細胞への分化を誘導することが知られているが、この脂肪細胞分化活性に基づいた hGH の *in vitro* bioassay を開発した。アッセイ法は、コンフルエントに増殖した脂肪前駆細胞に hGH 希釈液を添加して約 10 日間培養後、脂肪細胞への分化をグリセリン酸脱水素酵素活性の誘導を指標として定量的に測定し、対数変換した用量反応曲線を用いて平行線定量法により求めるといものである。この *in vitro* bioassay は従来の hGH 定量法である *in vivo* bioassay と良好な相関性を示し、*in vivo* 法よりも感度、精度が高い方法であることから、hGH の生物活性を評価する有用な方法であることが示された。

**Keywords** : human growth hormone, *in vitro* bioassay

Said, A. A., Yamaguchi, T., Uchida, E., and Hayakawa, T.: Characterization of haemolyser-resistant cells increased in the blood of erythropoietin-treated mice

Br. J. Haematol., 86, 361~365 (1994)

エリスロポエチンをマウスに投与すると用量依存的に溶血剤抵抗性細胞が出現してくる。この溶血剤抵抗性細胞の性質を明らかにするために、種々の赤血球系細胞の分化マーカーの出現について検討した。その結果、この溶血剤抵抗性細胞は、グリコホリンおよびトランスフェリンを発現しており、未熟な網状赤血球であろうと結論した。

**Keywords** : erythropoietin, reticulocytes

Shima, H.\*<sup>1</sup>, Haneji, T.\*<sup>2</sup>, Hatano, Y.\*<sup>1</sup>, Kasugai, I., Sugimura, T.\*<sup>1</sup> and Nagao, M.\*<sup>1</sup>: Protein phosphatase 1 $\gamma$ 2 is associated with nuclei of meiotic cells in rat testis

Biochem. Biophys. Res. Commun., 194, 930~937 (1993)

著者らは、ラットの cDNA クローニングにより type 1 protein phosphatase (PP1) の触媒サブユニットに PP1 $\alpha$ , PP1 $\gamma$ 1, PP1 $\gamma$ 2, PP1 $\delta$  という少な

くとも四つの isotype が存在することを示している。これらの中で、PP1 $\gamma$ 2 の mRNA がラット精巣に豊富に存在することを見いだした。ラット精子形成における PP1 $\gamma$ 2 の役割を研究するために、PP1 $\gamma$ 2 の C 末端領域 21 mer に相当する合成ペプチドに対して、抗体を作製した。この抗体は青春期（出生後 25 日）以後のラット精巣から調製した 39 kDa のタンパク質と反応したが、未成熟な精巣や他の組織のタンパク質とは反応しなかった。さらに、抗体による間接蛍光染色や DNA 染色によりこのタンパク質が後期精母細胞および初期精子細胞の核に存在することが明らかとなった。これらの結果は、PP1 $\gamma$ 2 が精子形成の減数分裂の過程においてなんらかの役割を果たしているを示している。

**Keywords** : PP1 $\gamma$ 2, spermatogenesis

\*1 国立がんセンター研究所

\*2 千葉大学医学部

Ohta, M., Tanimoto, T., Tanaka, A., and Hayakawa, T.: **Conversion of a NADPH-dependent aldehyde reducing enzyme into aldose reductase**

*Int. J. Biochem.*, **25**, 1165~1174 (1993)

アルドース還元酵素 (AR) およびアルデヒド還元酵素と性質の異なる新規の還元酵素 (high-Km アルドース還元酵素: hAR) がイヌ腎内髄質に局在することを見いだした。hAR の分子量および免疫学的交叉反応性は AR と同じであったが、等電点、基質特異性および AR 阻害剤に対する感受性等は AR と著しく異なっていた。硫酸イオンにより AR は 2 倍以上に活性化されるが、hAR は阻害された。

一方、中性溶液中でインキュベートした hAR は硫酸イオンにより活性化され、アルドースに対する基質親和性や AR 阻害剤に対する感受性などの酵素化学的性質および等電点が AR と同じになった。AR 様の性質を獲得した hAR は AR と同じ分子量を示し、抗 AR 抗血清に対しても AR と完全に融合する 1 本の沈降線を生じた。これらの結果から hAR は AR に変換し、この変換は分子サイズの変化を伴わないコンフォメーションの変化によるものと推察された。

**Keywords** : aldose reductase, high-Km aldose reductase, conversion

Ohta, M., Tanimoto, T., and Hayakawa, T.: **Multiplicity of dog kidney high-Km aldose reductase and conversion mechanism into aldose reductase**

*Int. J. Biochem.*, **26**, 565~573 (1994)

イヌ腎臓 high-Km アルドース還元酵素 (hAR) は HPLC により a, b, c の 3 成分に分離された。これらの成分の HPLC 上の挙動ならびに酵素化学的性質から、hAR のアルドース還元酵素 (AR) への変換機構を次のように推定した。すなわち、① a 成分には硫酸イオンで活性化される AR (a1) と、

硫酸イオンで活性化されない AR 前駆体 (a2 および a3) が存在し、② c 成分は直接 AR に変換するか、または a2 成分を経て AR に変換し、③ b 成分は a3 成分に変換した後、a2 成分を経由して AR に変換する、ものと考えられた。イヌ腎臓から発見した hAR は分子多様性を示し、いずれの分子種も AR に変換しうる新しい酵素であることを明らかにし、現在まで不明であった AR の生体内活性調節に hAR を介した機構が存在することを示唆することができた。

**Keywords** : aldose reductase, high-Km aldose reductase, conversion mechanism

横田崎江, 福田秀男, 早川堯夫: **オキシトシン製剤の HPLC 法による定量の基礎的検討**

医薬品研究, **24**(6), 635~640 (1993)

オキシトシン注射液中のオキシトシンの定量法として日本薬局方で採用されているバイオアッセイ法 (ニワトリの血圧降下法) は、動物愛護の問題のほか、測定精度、簡便性などの点で欠点があり、より高精度で簡便な方法への変更が望ましく、諸外国でもこのような変更がなされていくと予想される。そこで現在わが国で市販されているオキシトシン製剤のほとんどを占める注射液についてオキシトシン定量法の HPLC 法への変更の可能性に関する基礎的検討を行った。その結果、今後 HPLC 法を適用するには、極めて高純度の標準品の確立とともに各製剤における適切な純度試験の設定等に関する検討が必要であることを明らかにした。

**Keywords** : oxytocin, assay, HPLC

Fukuoka, M., Kobayashi, T., Satoh, T.\*, Tanaka, A., and Kubodera, A.\*: **Studies of quality control of <sup>99m</sup>Tc-labelled macroaggregated albumin—Part 1. Aggregation of non-mercaptalbumin and its conformation**

*Nucl. Med. Biol.*, **20**, 643~648 (1993)

肺シンチグラム診断薬 MAA の品質評価に関して、非メルカプトアルブミンの凝集集を塩濃度、pH および緩衝液の種類から、また、その時のアルブミンのコンフォメーションから検討した。その結果、塩濃度、pH および緩衝液の種類は相互に作用し、それぞれの影響で凝集に対するメカニズムが異なることが判明した。

**Keywords** : MAA, aggregation, BSA

\* 東京理科大学

Ozaki, Y., Ohno, A.\*, Abe, K.\*, Saito, Y\*. and Satake, M.: **Comparative Study on the Accelerative Effect of "Koushikon" and "Nanshikon" and Their Constituents on Proliferation of Granuloma Tissue in Rats.**

*Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 683~685 (1993)

紫根は、中国では硬紫根および軟紫根の区別なく、解熱、消炎および火傷の治療などに用いられているが、日本では、硬紫根のみが認められており(局方

収載)、同様の目的で使用されている。この使用目的から、紫根の薬理作用として肉芽形成促進作用が期待されるので、中国産の硬紫根、軟紫根の含有成分の光学異性体の相違を含めての比較、また、肉芽形成促進作用の活性成分の比較検討を行い、その同等性を考察した。

両紫根のエーテルエキスに含まれるシコニン系色素の種類および量はそれぞれ異なっていたが、総シコニン系色素量を等しくした用量ではほぼ同程度のラットでの綿球誘発肉芽形成の促進作用を示した。また、これらシコニン系色素成分に含まれる光学異性体の割合を検討したところ、それぞれの割合もまた異なっていた。これらのことから、紫根のエーテルエキスの肉芽形成促進作用の発現には、光学異性体のシコニンおよびアルカニンを含むシコニン系色素成分における光学異性体の相違による影響は少なく、シコニン系色素成分がそれぞれ関与していることが明らかとなった。また、両紫根は含有されるシコニン系色素成分を同量にして肉芽形成促進作用を検討した場合、同程度の効力を示し、薬理学的にはほぼ同等であることが示唆された。

**Keywords:** *lithospermum erythrorhizon*, *Macrotomia euchroma*, granuloma tissue

\* 鐘紡漢方研究所

尾崎幸紘: 川芎の薬効・薬理

現代東洋医学, 14, 408~413 (1993)

日本では、川芎の基原植物としては *Cnidium officinale Makino* の一種類のみが認められており使用されている。この川芎は、漢方処方中で比較的高い頻度で使用されている生薬であり、特に、薬効分類上、女性用薬、消炎排膿薬や皮膚疾患用薬とみなされる処方によく用いられている。これらのことから、日本産の川芎の現在までに行った、あるいは報告されている薬理作用について検討し、川芎が配合されている漢方処方の効能、効果に対する川芎の薬理学的関与の程度について考察した。また、日本産の川芎とは基原が異なる中国産の川芎の薬理作用との比較について考察した。

**Keywords:** *cnidium officinale*, *ligusticum walliichii*, pharmacological effect

Suzuki, H., Zhang, B.-C., Harada, M., Iida, O., Satake, M.: **Quantitative Studies on Terpenes of Japanese and European Valerians.**

*Shoyakugaku Zasshi*, 47, 305~310 (1993)

数系統のカノコソウを日本とヨーロッパから導入し、それらを同一条件で栽培した。次にそれらの根および根茎を乾燥後、ジクロロメタンで抽出し、そのエキスにつきガスクロマトグラフ法による分析を行った。その結果、日本のものはヨーロッパのものに比べモノテルペンとセスキテルペンの種類が多い点およびその総量が多い点で異なっていた。日本のものは *kessyl glycol diacetate* (少量~1.89%),  $\alpha$ -*kessyl acetate* (少量~2.25%) が存在することに特徴があった。一方、ヨーロッパのものにはそれら

がほとんど検出されなかった。それゆえ、ヨーロッパ産カノコソウの鎮静作用はモノテルペンやセスキテルペンではなく、他の成分によることが強く示唆された。

**Keywords:** valerian, terpen, GC

Suzuki, H., Ozaki, Y., Suga, C.\*, Morimoto, T.\*, Satake, M. and Harada, M.: **Dissolution Tests of *Coptis Rhizome* and Cultured Cells of *Coptis japonica*.**

*Shoyakugaku Zasshi*, 47, 311~315 (1993)

天産物由来の生薬オウレンの代替としてバイオテクノロジーにより得られた薬用植物生成物(バイオプロダクト)の使用が可能かどうかを検討するために、両者を溶出試験の面から比較した。本試験では胃腸薬などに配合されるオウレン粉末を取上げ、試験溶液として人工胃液を用い、JP法の方法に準じて行った。その結果、生薬とバイオプロダクトはほぼ類似の溶出パターンを示した。すなわち両者とも酸性試験溶液では試験開始後10分後既に全含有量の90%以上に達した。中性試験溶液では、10分以内に50%溶出率に達し、30分~2時間で80%の溶出率となり、以後溶出は抑えられていた。

**Keywords:** plant cell culture, equivalence evaluation, dissolution test

\* 三井石油化学工業㈱

Suzuki, H., Ozaki, Y. and Satake, M.: **Changes of Components-dissolution from Prescription Containing *Coptis Rhizome* or Cultured Cells of *Coptis japonica* into the Decoction.**

*Shoyakugaku Zasshi*, 47, 396~401 (1993)

生薬オウレンとバイオテクノロジーにより得られたオウレン培養細胞について、両者の主要成分が処方から煎剤へ移行する割合を検討した。単味および複合処方に通常の漢方薬の調製方法である熱水抽出を実施したところ、ベルベリンの移行率は培養細胞の方がオウレンよりやや良好であった。次に、オウレンおよび培養細胞中のベルベリン含有量とその移行率を考慮して「葛根黄連黄芩湯」に配合するそれぞれの量を定め、オウレンは3gで、また培養細胞2gで処方した煎液を調製し、処方からベルベリンの移行性を比較して調べた。この時、ベルベリン、グリチルリチン酸、バイカリンおよびプエラリンを煎剤に溶けた成分量と不溶性成分を含むトータル量で見ると、生薬オウレンとオウレンの培養細胞でほぼ同等であった。

**Keywords:** cultured coptis cells, equivalence evaluation, decoction

関田節子: **食品・生薬原料でのマイコトキシンスクリーニング**

*マイコトキシン*, 37, 13~16 (1993)

食品およびインドネシア産生薬原料についてマイコトキシンのスクリーニングを行った際に用いたバイオアッセイ法、ケミカルアッセイ法について紹介

し、アフラトキシン類、インドロジテルペン類、ステリグマトシスチン類による汚染状況を示した。

**Keywords:** mycotoxins, bioassay, chemical assay

Nobuo Kawahara, Setsuko Sekita and Motoyoshi Satake: A Novel dimeric Steroid, Calvasterone from *Calvatia cyathiformis*

*Chem. Pharm. Bull.*, 41(7), 1318~1320 (1993)

馬勃は中国において止血等の目的で使用されている菌類生薬であるが、その成分に関する研究はほとんどなされていない。そこで中国産紫色馬勃 *Calvatia cyathiformis* の成分検索を行った結果、乾燥子実体塩化メチレン抽出エキスより新規ステロイド二量体 calvasterone を単離し、二次元 NMR 等の詳細な検討および化学変換からその構造を決定した。

calvasterone は ergostane 骨格を有するステロイド系化合物の二量体の初めての例である。

**Keywords:** calvasterone, steroid, *calvatia cyathiformis*

Emi Okuyama\*, Kazuhiro Umeyama\*, Yukie Saito\*, Mikio Yamazaki\* and Motoyoshi Satake: Ascaridole as a Pharmacologically Active Principle of "Paico", a Medicinal Peruvian Plant.

*Chem. Pharm. Bull.*, 41(7), 1309~1311 (1993)

"Paico" はペルーの伝統生薬で精神鎮静剤、抗リユーマチ薬、駆虫剤、通経剤として用いられている。この生薬および日本に野生化している同種と思われるケアリタソウ *Chenopodium ambrosioides* L. の鎮静作用および無痛作用を試験したところ、両種から単離されたアスカリドールがこの作用物質であることが証明された。

**Keywords:** *chenopodium ambrosioides*, ascaridole, analgesia.

\* Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chiba University

Hayakawa, R.\*<sup>1</sup>, Fujimoto, Y.\*<sup>1</sup> and Kaniwa, M.: Allergic pigmented lip dermatitis from Lithol Rubine BCA

*Am. J. Contact Dermatitis*, 5, 34~37 (1994)

口紅による唇の色素沈着性皮膚炎の事例について検討した。その結果、患者は使用していた口紅いずれにも陽性反応を示し、口紅の配合成分のうち、赤色顔料である Lithol Rubine BCA にのみ陽性反応を示した。Lithol Rubine BCA をメタノールで洗浄して得たメタノール可溶成分(不純物)の成分検索、およびパッチテストの結果より、Lithol Rubine BCA の free acid である 4-(*o*-sulfo-*p*-tolylazo)3-hydroxy-2-naphtioic acid が今回の事例の原因化学物質と確認できた。

**Keywords:** allergic pigmented lip dermatitis, lipstick, Lithol Rubine BCA

\*<sup>2</sup> 名古屋大学医学部付属病院分院

Kaniwa, M., Isama, K., Nakamura, A., Kantoh, H.\*<sup>1</sup>, Itoh, M.\*<sup>1</sup>, Miyoshi, K.\*<sup>2</sup>, Saito, S.\*<sup>3</sup> and Shono M.\*<sup>4</sup>: Identification of causative chemicals of allergic contact dermatitis using a combination of patch testing in patients and chemical analysis. Application to cases from rubber footwears

*Contact Dermatitis*, 30, 26~34 (1994)

ゴムはきものによるアレルギー性接触皮膚炎5例について、患者でのパッチテストおよび原因ゴム製品の化学分析を併用して検討した。その結果、子供用ゴム靴、女性用ゴム長靴、女性用ズック靴による3事例では代表的なアレルゲンである加硫促進剤の 2-mercaptobenzo-thiazole (MBT), dibenzothiazyl disulfide (MBTS) を、女性用ズック靴による事例では新たにアレルギー性物質と確認できた老化防止剤の styrenated phenol (SP) を、女性用スニーカーによる事例では既知アレルゲンである接着剤成分の *p*-tert-butylphenol formaldehyde resin (PTBP-FR) を原因化学物質として特定できた。

**Keywords:** allergic contact dermatitis, rubber footwear, rubber additive

\*<sup>1</sup> 東邦大学医学部

\*<sup>2</sup> 川崎医科大学皮膚科

\*<sup>3</sup> 横浜赤十字病院皮膚科

\*<sup>4</sup> 済生会川口総合病院皮膚科

Kaniwa, M., Isama, K., Nakamura, A., Kantoh, H.\*<sup>1</sup>, Itoh, M.\*<sup>1</sup>, Ichikawa, M.\*<sup>2</sup> and Hayakawa, R.\*<sup>2</sup>: Identification of causative chemicals of allergic contact dermatitis using a combination of patch testing in patients and chemical analysis. Application to cases from industrial rubber products

*Contact Dermatitis*, 30, 20~25 (1994)

工業用ゴム製品によるアレルギー性接触皮膚炎3例について、患者でのパッチテストおよびガスクロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー-マススペクトロメトリー、高速液体クロマトグラフィーを用いた原因ゴム製品の化学分析を併用して検討した。その結果、重作業用ゴム手袋による事例および自動車用黒色ゴムリングによる事例では代表的なゴムアレルゲンの *N*-isopropyl-*N'*-phenyl-*p*-phenylenediamine (IPPD) を原因化学物質として特定した。また、別の作業用ゴム手袋による事例ではジチオカーバメート系加硫促進剤の zinc ethylphenyldithiocarbamate (ZEPC) を原因化学物質として特定した。

**Keywords:** allergic contact dermatitis, industrial rubber product, rubber additive

\*<sup>1</sup> 東邦大学医学部

\*<sup>2</sup> 名古屋大学医学部付属病院分院

Kaniwa, M., Momma, J., Sikiguchi, Y., Isama, K., Nakamura, A., Tsuda, M. and Kurokawa, Y.: Identification of allergenic chemicals in

**rubber products: Usefulness of investigative procedures using chemical analysis and the Guinea Pig Maximization Test**

*J. Toxicol. Sci.*, 18, 373 (1993)

アレルギー性接触皮膚炎の原因究明の手法として、従来から検討されてきた患者でのパッチテストに加えて、原因製品の化学分析および Guinea Pig Maximization Test 法を併用することによって、より効果的な原因究明を行うことができることを、ゴム長靴、ゴム手袋による事例の検討結果をもとに明らかにした。

**Keywords** : allergic contact dermatitis, causative chemical investigation, rubber product

萩野泰子<sup>\*1</sup>, 早川律子<sup>\*1</sup>, 鈴木真理<sup>\*1</sup>, 松永佳世子<sup>\*2</sup>, 鈴木加余子<sup>\*3</sup>, 鹿庭正昭: **Paratertiary butylphenol formaldehyde resin による接触皮膚炎**

皮膚, 35(増刊第16号), 281~290 (1993)

膝固定用装具のパッドと合羽によるアレルギー性接触皮膚炎事例について検討した。装具のパッド, 合羽の布, para-tertiary butylphenol formaldehyde resin (PTBP-FR) に陽性反応を示した。装具のパッドに付着していた接着剤および合羽の布について化学分析を行った結果, いずれにも PTBP-FR が含まれていた。以上から, PTBP-FR を今回の事例の原因化学物質と考えた。

**Keywords** : allergic contact dermatitis, para-tertiary butylphenol formaldehyde resin

<sup>\*1</sup> 名古屋大学医学部付属病院分院

<sup>\*2</sup> タナカ皮膚科

<sup>\*3</sup> 市立池田病院皮膚科

水野栄支\*, 松永佳世子\*, 朝日国比古\*, 上田宏\*, 鹿庭正昭: **エポキシ樹脂による接触皮膚炎**

皮膚, 35(増刊第16号), 207~212 (1993)

塗装工におけるエポキシ樹脂系塗料による接触皮膚炎事例を検討した。患者が陽性反応を示したエポキシ樹脂の主剤, 硬化剤を分析した結果, 主剤として glycidyl ether of bis-phenol A, 硬化剤として *m*-xylylenediamine を確認した。両者を今回の事例の原因化学物質と考えた。

**Keywords** : occupational contact dermatitis, paint, epoxy resin

\* 藤田保健衛生大学医学部付属病院

鹿庭正昭, 伊佐間和郎, 中村晃忠, 門馬純子, 黒川雄二: **低アレルギー性手袋: ゴム添加剤と皮膚アレルギー性の関係**

皮膚, 35(増刊第16号), 197~206 (1993)

市販の“低アレルギー性 (hypoallergenic)”と表示された手術用ゴム手袋について, ゴムアレルギー患者用の代替製品としての適否を化学分析と guinea pig maximization test (GPMT) により検討した。その結果, ゴム手袋によるアレルギー性接触皮膚炎の原因化学物質となりうるということが確認されてい

るジチオカーバメート (DTC) 系加硫促進剤が使用されている製品, DTC 系化合物は含まれていないものの, アレルギー性物質を含んでいることが GPMT により確認された製品が低アレルギー性手袋として出回っている実態を明らかにした。

**Keywords** : hypoallergenic glove, rubber additive, allergenicity assessment

山崎玲子\*, 鹿庭正昭: **スニーカー皮膚炎**

皮膚, 35(増刊第16号), 196 (1993)

スニーカーによるアレルギー性接触皮膚炎事例を検討した。スニーカーの甲部のゴム系接着剤に加硫促進剤の tetramethylthiuram monosulfide (TMTM) が配合されており, パッチテストと化学分析の結果より, TMTM の分解生成物である dimethylamine が原因化学物質と考えられた。

**Keywords** : allergic contact dermatitis, sneaker, tetramethylthiuram monosulfide

\* 山崎医院

鹿庭正昭: **ゴムアレルギーの同定—化学分析の役割—**

皮膚, 35(増刊第16号), 21~36 (1993)

ゴム手袋, ゴムはきものなどのゴム製品によるアレルギー性接触皮膚炎事例について, 患者でのパッチテストと原因ゴム製品の化学分析を併用して原因化学物質の究明を行った。その結果, 原因ゴム製品と原因化学物質の関連を化学的に実証するとともに, 加硫促進剤, 老化防止剤および接着剤成分が主要な原因化学物質となっていたことを明らかにできた。さらに, 感作モルモットを用いたスクリーニングと化学分析を併用した方法により, 既知アレルギーとともに, 新規アレルギー, 加硫工程で生成した未知物質についてもそのアレルギー性を確認できた。以上の結果を特別講演として報告した。

**Keywords** : allergic contact dermatitis, rubber product, causative chemical investigation

新谷英晴: **Most Probable Number (MPN) 法での D 値測定における Limited Spearman Karber Procedure (LSKP) ならびに Stumbo Murphy Cochran Procedure (SMCP) の実験およびシミュレーションによる精度の比較**

医科器械学会誌, 64, 231 (1994)

Most Probable Number (MPN) 法での  $D_{10}$  (decimal reduction value, D) 値測定においては Limited Spearman Karber Procedure (LSKP) や Stumbo Murphy Cochran Procedure (SMCP) があり, その他に Fraction Negative Procedure や Survival Curve Method (EN) 等がある。その内 International Organization for Standardization (国際標準化機構, ISO) や米国薬局方 (USP) で採用されているのは LSKP で日本ドイツ等は専ら SMCP や EN を採用している。ISO の議論の途上で SMCP 法は LSKP 法に比べ精度の点で悪いという理由で削除された。それゆえその真偽を科学的に



確認するため両者をシミュレーションならびにBIER (Biological indicator evaluator resistometer) を用いての精度の比較実験を行った。その結果、両者に有意差はなく寧ろSMCPの方がLSKPより精度の点で優れているという結論が得られた。

**Keywords:** LSKP, SMCP, EN

伊佐間和郎, 鹿庭正昭, 中村晃忠: 抗菌防臭加工剤の安全性評価に関する研究: 電気掃除機用紙パック中の抗菌防臭加工剤の分析

衛生化学, 39(4), 350~355 (1993)

電気掃除機用紙パックの抗菌防臭加工剤の表示が、抗菌剤はベンズイミダゾール系やピグアナイド系へ、防虫剤はピレスロイド系へと変っていた。

市販7製品を分析し、ベンズイミダゾール系としてはチアベンダゾール(TBZ)とベンズイミダゾールカルバミン酸メチル(BCM)を検出した。HPLCで定量したところ、TBZは3製品に3~513 µg/g, BCMは2製品に1~160 µg/g含まれていた。ピグアナイド系としてはクロロヘキシジンを検出し、HPLCで定量したところ、1製品に1300 µg/g含まれていた。一方、ピレスロイド系としてはペルメトリンを検出し、GCで定量したところ、5製品に82~6310 µg/g含まれていた。

分析した大部分の紙パックにおいて、これら4つの化合物は外袋より内袋の方が高濃度であった。

**Keywords:** paper bag for electric vacuum cleaner, antimicrobial agent, insecticide

藤本佳子<sup>\*1</sup>, 早川律子<sup>\*1</sup>, 鈴木真理<sup>\*1</sup>, 荻野泰子<sup>\*1</sup>, 加藤佳美<sup>\*1</sup>, 鹿庭正昭, 伊佐間和郎, 田中隆義<sup>\*2</sup>: 赤色202号(Lithol Rubine BCA)によるアレルギー性接触皮膚炎

皮膚, 35(増刊16), 163~170 (1993)

22歳, 女性, 平成3年8月頃より4種類の口紅を日によって変えて, 使用していた。平成4年2月末, 口紅使用後に唇に痒みと小水泡が出現した。パッチテストで4種の口紅すべてに陽性反応を示した。口紅成分では陽性口紅に共通に用いられていた赤色202号1% pet. が陽性反応を呈した。赤色202号をメタノールで精製した際に得られた不純物0.1% pet. が陽性反応を呈した。さらに赤色202号の生成過程で生じる可能性のある副色素を合成し, パッチテストを施行した結果, 赤色202号のfree acid 0.1% pet. とそのスルホン基がmetaの位置にある4-(*m*-sulfo-*p*-tolylazo)-3-hydroxy-2-naphthoic acid 0.1% pet. が陽性反応を示した。パッチテスト陽性口紅の赤色202号を分析した結果, 赤色202号のfree acidが含有されていた。

**Keywords:** lithol rubine BCA, contact dermatitis, lipstick

\*1 名古屋大学医学部付属病院分院

\*2 タナカ皮膚科

朝日国比古\*, 松永佳世子\*, 鹿庭正昭, 伊佐間和郎, 中村晃忠, 土橋知子\*, 野田浩子\*, 稲坂博\*

上田 宏\*: ゴム製品によるアレルギー性接触皮膚炎の3例

日本皮膚アレルギー学会誌, 1, 18~27 (1993)

ゴム製品によるアレルギー性接触皮膚炎の3例を経験したので報告した。症例1は手術用ゴム手袋と消毒薬が原因で, 成分分析も行い, パッチテストをすることで原因物質はチウラム系加硫促進剤が原因と推定した。症例2はゴム指サックが原因で, 症例1と同様にして原因物質はMBT, MBTSであると特定することが出来た。症例3については下着のゴムが原因でDPGが陽性であるが, 成分分析中であるため, 原因物質がDPGであるかどうか特定できていない。症例1と2はパッチテストにより代替品を選定し, アレルギー性接触皮膚炎の再発を防止できた。

**Keywords:** allergic contact dermatitis, rubber products, patch test

\* 藤田保健衛生大学医学部

Tsuchiya, T., Arai, T.<sup>\*1</sup>, Ohhashi, J.<sup>\*1</sup>, Imai, K.<sup>\*2</sup>, Kojima, H.<sup>\*3</sup>, Miyamoto, S.<sup>\*3</sup>, Hata, H.<sup>\*4</sup>, Ikarashi, Y., Toyoda, K., Takahashi, M., and Nakamura, A.: Rabbit eye irritation caused by wearing toxic contact lenses and their cytotoxicities: *In vivo/in vitro* correlation study using standard reference materials.

*J. Biomed. Mater. Res.*, 27, 885~893 (1993)

コンタクトレンズを装着した時に誘発される眼刺激性強度と細胞毒性強度との関係を明らかにするために, 毒性強度の異なる標準材料をコートしたコンタクトレンズを作製した。

Zinc diethyldithiocarbamate (ZDEC) はウサギ眼への点眼試験で mild irritant として分類された。標準材料をコートしたレンズを装着した時, Draize score は, コート層中に含まれる ZDEC 濃度およびコートした時に使用したポリウレタンの濃度に比例した。Draize score は, 装着時採取した涙液中の乳酸脱水素酵素活性強度よりも, 材料の抽出液をコロニー法で試験して得られた細胞毒性強度と高い相関性 ( $r = -0.93$ ) があることが明らかになった。さらに, 同一標準材料で, ウサギ筋肉内短期埋植試験での炎症反応の強度と, ウサギ皮膚一次刺激性反応の強度を比較した結果, 眼粘膜 > 筋肉 >> 皮膚の順に, 刺激反応性が高いことが明らかになった。

**Keywords:** eye irritation, cytotoxicity, standard reference materials

\*1 メニコン(株)生物研究部

\*2 (財)食品薬品安全センター

\*3 日本メナード化粧品(株)生化学研究所

\*4 (財)民生科学協会

Tsuchiya, T., Ikarashi, Y., Hata, H.<sup>\*1</sup>, Toyoda, K., Takahashi, M., Uchima, T.<sup>\*1</sup>, Tanaka, N.<sup>\*2</sup>, Sasaki, T.<sup>\*2</sup>, and Nakamura, A.: Comparative studies of the toxicity of standard reference materials in various cytotoxicity tests and *in*

***vivo* implantation tests.**

*J. Applied Biomaterials*, 4, 153~156 (1993)

標準材料として Zinc diethyldithiocarbamate (ZDEC) と Zinc dibutyldithiocarbamate (ZDBC) を種々の濃度で含むポリウレタン (PU) フィルムを作製した。V79, L929 および Balb 3T3 の 3 種の細胞株を用いて、化学物質である ZDEC と ZDBC, および標準材料について 5 種の細胞毒性試験を行った。コロニー法は、寒天重層法, フィルター法, ニュートラルレッド法, 細胞増殖阻害試験法に比べて最も感度高く, 細胞毒性を検出できる事が明らかになった。標準材料の抽出液のコロニー法で得られた細胞毒性強度は, 標準材料中の ZDEC および ZDBC 濃度と相関した。標準材料および手術用ゴム手袋の細胞毒性強度は, これらの材料のウサギ筋肉内短期埋植試験での炎症反応の強度とも相関性がある事が明らかになった。これらの結果より, 標準材料は, 試験法の感度評価, および *in vivo* と *in vitro* の相関性を検索する時に有用な材料である。

**Keywords** : standard reference materials, colony assay, implantation

\*1 勸民生科学協会

\*2 勸食品薬品安全センター

Tsuchiya, T., Ikarashi, Y., Arai, T.\*<sup>1</sup>, Ohhashi, J.\*<sup>1</sup>, Isama, K., and Nakamura, A.: ***In vivo* tissue/biomaterials toxic responses—Correlation with cytotoxic potential but not cell attachment.**

*Clinical Materials*, 16, 1~8 (1994)

レンズ材料, 放射線加硫ゴム, および標準材料を用いて, 細胞接着性, 細胞毒性および *in vivo* での眼および筋肉組織刺激性との関係を明らかにした。ウサギ筋肉内短期炎症反応を示す 5 種の放射線加硫ゴムは, 細胞毒性を示し, 細胞接着性も著しく低下していた。また, 細胞毒性の強い標準材料ほど, 細胞の接着活性の低下が認められた。しかしながら, レンズ材料では, PMMA の場合, 細胞毒性は検出されなかったものの, 細胞の接着性は最も低く, 細胞毒性のある Fluorosilicone acrylate (FA) の細胞接着性は PMMA よりも高かった。さらに, レンズ装用試験での眼刺激性強度は細胞毒性強度とは相関し, 細胞接着活性とは相関しなかった。したがって, *in vivo* での組織刺激性強度は, 細胞毒性強度とは相関するものの, 細胞接着活性とは, 必ずしも相関しない事が明らかになった。また, 直接接触コロニー法において, 材料の細胞毒性によりコロニー形成は阻害されるが, 低い細胞接着活性によりコロニー形成は阻害されにくいことも明らかになった。

**Keywords** : cytotoxic potential, cell attachment, tissue response

\*<sup>1</sup> メニコン(株)生物研究所

Ikarashi, Y., Tsuchiya, T. and Nakamura, A.: **A sensitive mouse lymph node assay with two application phases for detection of contact**

**allergens**

*Arch. Toxicol.*, 67, 326~636 (1993)

マウスを用いた高感度の新しい感作性試験法を開発した。BALB/c マウスに試験物質をアジュバントとともに腹部に皮内注射した後, 二段階目として耳への塗布を行った。試験物質の感作性は, リンパ節細胞数およびリンパ球増殖反応の増加率を総合したリンパ節活性化を指標として判定した。この方法は従来のマウス試験法では検出できないような弱い感作性物質も検出できることが明らかになった。

**Keywords** : mouse, sensitization test, lymphocyte proliferation

Ikarashi, Y., Tsuchiya, T. and Nakamura, A.: **Contact sensitivity of Tinuvin® P in mice**  
*Contact Dermatitis*, 30, 226~230 (1994)

チヌビン P の皮膚感作性を local lymph node assay (LLNA) と改良マウス耳腫脹試験 (modified MEST) 法で調べた。チヌビン P の塗布のみを行う LLNA では感作性を認めなかった。一方 modified MEST 法では, チヌビン P を皮内注射しさらに塗布を繰り返して感作誘導すると, 惹起反応を示し, その感作性を確認した。チヌビン P で感作が成立したマウスは, 他の類似構造をもつ benzotriazole 系化合物とは交差反応を起こさなかった。

**Keywords** : local lymph node assay, mouse ear swelling test, 2-(2'-hydroxy-5'-methylphenyl)benzotriazole

Ikarashi, Y., Tsuchiya, T. and Nakamura, A.: **Contact sensitivity of and cross-sensitivity between 2-(2'-hydroxy-5'-methylphenyl)benzotriazole (Tinuvin® P) and 2-(2'-hydroxy-3'-tert-butyl-5'-methylphenyl)-5-chlorobenzotriazole (Tinuvin® 326) evaluated by lymph node cell proliferation and ear swelling response in mice**

*Toxicol. Lett.*, 71, 151~159 (1994)

BALB/c 系マウスにおけるチヌビン P (TP) とチヌビン 326 (T326) の皮膚感作性および交差感作性を, それぞれの物質を皮内注射および塗布した後, 所属リンパ節細胞 (LNC) の増殖反応と惹起による耳の腫脹反応を測定することによって調べた。TP を適用すると著しい LNC 増殖反応の増加を認めた。TP 処置マウスは TP で惹起した場合耳の腫脹を認めるが, T326 で惹起しても腫脹反応は起こらなかった。同様に T 326 で処置した場合には, LNC 反応の増加は起こらず, T326 および TP で惹起しても耳の腫脹反応は起こらなかった。耳の腫脹反応も同様の結果を示した。これらの結果より TP を感作性物質, T326 を非感作性物質であり, 両物質は交差感作を起こさないことが明らかになった。

**Keywords** : tinuvin, contact sensitivity, cross-sensitivity

Ikarashi, Y., Tsukamoto, Y.\*<sup>1</sup>, Tsuchiya, T. and

**Nakamura, A.: Influence of irritants on lymph node cell proliferation and the detection of contact sensitivity to metal salts in the murine local lymph node assay**

*Contact Dermatitis*, 29, 128~132 (1993)

ラウリル硫酸ナトリウム(SLS) やジメチルスルホキシド (DMSO) について local lymph node assay (LLNA) を用いて試験すると、リンパ節細胞の増殖反応が若干増加した。LLNAにおいて  $\text{NiSO}_4$  や  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  を SLS の存在下で塗布すると、リンパ節細胞の反応性が増加した。よって SLS を塗布溶媒に添加する方法は、DMSO を塗布溶媒とする場合と同様に、金属塩のような水溶性物質の感作性を LLNA で試験する場合に有効であることが示唆された。

**Keywords** : sodium lauryl sulfate, dimethylsulfoxide, nickel sulfate

\* 北里大学

**Xi, T.\*, Sato, M., Nakamura, A., Kawasaki, Y., Umemura, T., Tsuda, M., and Kurokawa, Y.: Degradation of polyetherurethane by subcutaneous implantation into rats. I. Molecular weight change and surface morphology**

*J. Biomed. Mater. Res.*, 28, 483~490 (1994)

2種のポリウレタン (PEU) (U3, U8) をエチレン・ビニルアルコール共重合体 (EVAL) のフィルム (厚さ 0.1 mm) に薄くコーティングした。U-3 は 4,4'-ジフェニルメタンイソシアネートとポリテトラメチレンオキササイド 1000 からなる非セグメント化 PEU で、U-8 はさらにブタンジオールを加えたセグメント化 PEU である。コーティングの厚さは各々  $6.8 \mu\text{m}$  および  $22 \mu\text{m}$  であった。これらのフィルムをラット皮下に埋植し、数週毎に摘出した。摘出後の PEU 層をテトラヒドロフランで溶出し、ゲルろ過法で分子量を測定した。U-3 の分子量は 2 週後まで増加した後、減少に転じており、10 週後には PEU は殆ど消失していた。U-8 では 4 週後に最大となり、次第に減少していた。U-3 の変化は速度、量ともに U-8 より大きかった。埋植初期段階では炎症によって生じた浸出液中に低分子量成分が溶出してフィルム上の PEU の分子量が増大し、後半ではマクロファージ等によって PEU の分解が起こっているものと考えられた。表面の形態変化についても走査電子顕微鏡を用いて検討を加えた。

**Keywords** : polyurethane, biodegradation, implantation

\* 中国薬品生物製品検定所

**Hayashi, Y., Matsuda, R. and Terabe, S.: Optimization of Precision and Throughput in Micellar Electrokinetic Chromatography**

*Chromatographia*, 37, 149~155 (1993)

FUMI 理論と呼ばれている最適化理論を動電クロマトグラフィに応用した。FUMI 理論は液体クロマトグラフィを対象にして作られたものであるが、

キャピラリー電気泳動にもそのまま適用できる。分離と時間を基準にして最適条件を探すのではなく、定量精度と分析効率を目的関数として最適化を行う。

**Keywords** : electrokinetic chromatography, capillary electrophoresis, information theory

\* 姫路工業大学

**Hayashi, Y., Rutan, S. C.\*, Helburn, R. S.\* and Pompano, J. M.\*: Information-Based Prediction of the Precision and Evaluation of the Accuracy of the Results from an Adaptive Filter,**

*Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 20, 163~171 (1993)

adaptive Kalman filter は通常の線形カルマンフィルターの変形であり、線形モデルが得られない妨害ピークからの分離定量に応用可能である。この論文では、adaptive Kalman filter の精度を情報量 FUMI に基づいて予測した。adaptive Kalman filter から得られる目的ピークと妨害ピークの重なり具合と面積の値を用いると、このフィルターの定量値の精度を理論的に予測できることを示した。

**Keywords** : Kalman filter, information theory, FUMI

\* Virginia Commonwealth University

植岡伸光, 神野透人, 関田 寛, 豊岡利正, 安藤正典, 小嶋茂雄, 武田明治\*: ランタン連続経口投与ラットにおけるカルシウムおよびリンの代謝について

衛生化学, 40, 26~33 (1994)

$\text{LaCl}_3$  を 5 週間連続経口投与したラットに  $^{45}\text{Ca}$  および  $^{32}\text{P}$  を経口投与し、その後 8 日間のそれらの排泄率および放射活性の生体内分布について検討した。 $\text{LaCl}_3$  を連続経口投与 (La-A 群) することにより、経口投与された  $^{45}\text{Ca}$  および  $^{32}\text{P}$  は大部分が糞中に排泄された。しかし、 $\text{LaCl}_3$  の連続経口投与を前投与期間終了 1 週間前で中止すると (La-B 群)、尿および糞中へのそれらの排泄率は、対照群のレベルにまで回復した。また、La-A 群の  $^{45}\text{Ca}$  あるいは  $^{32}\text{P}$  の放射活性は、ほとんどの組織で対照群より有意に低かったのに対し、La-B 群では骨中の  $^{45}\text{Ca}$  の値が対照群より高いことを除き、対照群と La-A 群の中間の分布傾向を示した。一方、 $^{45}\text{Ca}$  および  $^{32}\text{P}$  を静脈内投与した場合、La-A 群と対照群の間でこれらの排泄率および生体内分布に大きな差は認められなかった。これらの結果より、 $\text{LaCl}_3$  は  $^{45}\text{Ca}$  および  $^{32}\text{P}$  の吸収を一時的に阻害し、その作用は可逆的であることが示唆された。

**Keywords** : lanthanum chloride, calcium, phosphorus

\* 日本大学農獣医学部

松田りえ子, 林 譲, 鈴木 隆, 斎藤行生: 情報理論に基づいた N-メチルカルバメート系農薬の高速液体クロマトグラフィー分離の最適化

分析化学, 42, 881~886 (1993)

クロマトグラフィーから得られる相互情報量を表す関数 FUMI を評価関数として, 10 種類の N-メチルカルバメート系農薬の分離条件の最適化を行った。分離は逆相系で行い, メタノール, アセトニトリル, 水の 3 溶媒の混合系を移動相とした。予備実験のデータに基づいて保持予測を行い, 広い範囲の溶媒条件でのクロマトグラムを予測した。予測されたクロマトグラムから得られる情報量 FUMI を計算し, その最高となる条件を最適とした。FUMI を評価関数とした最適化では, 各ピークが分離しておりかつピークが鋭く分析時間が短いものが最適条件として選ばれる。N-メチルカルバメート系農薬の最適化では, 対象とした農薬が 30 分で分離できる条件が見いだされた。

**Keywords** : HPLC, optimization, information theory

Iwaki, K.\*<sup>1</sup>, Yamazaki, M.\*<sup>1</sup>, Nimura, N.\*<sup>2</sup>, Kinoshita, T.\*<sup>2</sup>, Matsuda, R., and Hayashi, Y.: **An information theory-based evaluation of stationary phases developed for optical resolution of amino acids**

*Chromatographia*, 37, 156~158 (1993)

アミノ酸の p-プロモフェニルカルバミル誘導体の光学異性体分離のために, ナフチルウレアを結合した固定相を合成した。ナフチルウレア基を結合するポリエチレンアミンスペーサーの長さの異なる固定相について, その光学異性体分離能を情報理論の見地から評価した。評価基準としてクロマトグラムから得られる情報量 FUMI を用いた。この結果スペーサーのユニット数が 2 のものが多くのアミノ酸の光学分離において最適であった。最適なカラムについて, 温度が異性体の分離に与える影響について検討し, 最適な分析温度を求めた。

**Keywords** : Optical resolution, optimization, information theory

\*<sup>1</sup> 北陸大学

\*<sup>2</sup> 北里大学

Matsuda, R., Hayashi, Y., Suzuki, T., and Saito, Y.: **Information theory of miniaturization advantages of column liquid chromatography for quantitative analysis**

*Furesenius J. Anal. Chem.*, 347, 225~229 (1993)

高速液体クロマトグラフィーのカラムの内径および長さを減少させたとき, それ分析の精密度および影響について検討した。一般に, カラムをミニチュア化すると理論段数の低下によりピーク形状が悪くなるが, 利点は溶媒消費が低下することと考えられている。しかし, 内径あるいはカラム長を低下した条件でのクロマトグラムから得られる情報量を従来のカラムと比較すると, ピークの重なりが起らない条件では小さいカラムで大きな情報量が得られ, 定量精度は良いことが予想された。4 種類のパラベン混合物の分析精度を実際に比較したところ,

特に低濃度での分析では内径の小さいカラムで小さい RSD が得られた。この結果から, 定量分析において対象物質が少なく分離が容易な場合には小さいカラムが好ましいことが明らかになった。特に低濃度では検出限界レベルが低下し, 分析の感度が向上した。

**Keywords** : column miniaturization, information theory

Matsuda, R., Hayashi, Y., Ishibashi, M., and Takeda, Y.: **Optimization of a liquid chromatographic method based on information theory: Application of method to dissolution testing**

*J. AOAC.*, 77, 338~343 (1994)

ラボラトリーロボットを用いて, 混合製剤の溶出試験を自動的に行うシステムを作成した。混合製剤の成分を分離定量するために高速液体クロマトグラフィーを用いた。本システムでは, 製剤の投入, 溶出試験液の採取, 内部標準溶液による希釈・混合, ろ過, 高速液体クロマトグラフへの注入までを自動的に行う。採取した溶出試験液は, 処理後直ちに HPLC により定量されるので, リアルタイムでの溶出曲線の作成が可能となった。本システムで感剤の溶出試験を行うために, HPLC 条件を最適化した。最適化の目的関数として情報量関数 FUMI を使用し, 短いカラム (5 cm) で高流量の条件を設定した。

アセトアミノフェン, カフェイン, サリチルアミドの 3 成分を含む徐放性顆粒から製造された錠剤およびカプセルの溶出試験を行ったところ, カフェインが他の 2 成分と異なる溶出挙動を示した。また, 錠剤ではカプセルに比較してカフェインの徐放性が失われ 15 分で 80% 以上が溶出した。

**Keywords** : dissolution testing, optimization, information theory

Suzuki, T., Matsuda, R., Saito, Y., and Yamada, H.\*: **Application of Helium Microwave-Induced Plasma Emission Detection System to Analysis of Organotin Compounds in Biological Samples**

*J. Agric. Food Chem.*, 42, 216~220 (1994)

ガスクロマトグラフィー/ヘリウムプラズマ/原子発光検出システム (GC/MIP/AED) による生体試料中の有機スズ化合物の分析法について検討した。抽出した有機スズ化合物を精製後, メチルマグネシウムプロミドで処理しテトラアルキルスズとしたのち, GC/MIP/AED により定性ならびに定量を行った。GC/MIP/AED によるカキ中の有機スズの分析の結果, 12 種類の有機スズ化合物の存在が明らかとなり, 定量結果はガスクロマトグラフィー/質量分析計/特定イオン検出器 (GC/MS/SIM) によるものとよく一致した。その上, GC/MIP/AED による有機スズ化合物の感度は GC/MS/SIM に優っていた。本法は海産物のみならず, ラット肝, 血液な

らびに尿のような動物試料にも適用しうることが判明した。

**Keywords**: organotin compounds, GC/MIP/AED, biological samples

\* 水産庁中央水産研究所

Toyoda, M., Saisho, K., Aoki, G., Kobayashi, A., Saito, Y. and Martinez, M. U.\*: **Repeated Use of a Single Immunoaffinity Column for Sample Clean-up in the HPLC determination of Aflatoxin M<sub>1</sub> in Powdered Milk**

*Int. Dairy Journal*, 4, 369~375 (1994)

単一アフィニティカラムの繰り返し使用の可能性を検討した。脱脂乳をアフィニティカラムにかけ、水およびDMSO-リン酸緩衝液(1:1)混液で溶出後、水およびリン酸緩衝液で洗浄し、再使用に供した。定量は蛍光検出器付逆相HPLCで行った。アフィニティカラムは6回まで再使用可能で、本法による標準試料の回収率も良好であった。

**Keywords**: aflatoxin M<sub>1</sub>, immunoaffinity column, powdered milk

\* Bureau of Food and Drugs, Philippines

Takagi, K., Toyoda, M., Shimizu, M.\*, Satoh, T.\* and Saito, Y.: **Determination of tomatine in foods by liquid chromatography after derivatization**

*J. Chromatogr. A*, 659, 127~131 (1994)

トマトおよびトマト製品中のトマチンの測定法を検討した。トマチンは1%酢酸水で抽出後、C<sub>18</sub>カートリッジで精製し、アセチル化後さらにC<sub>18</sub>カートリッジを通し、カラムにInertsil ODS-2を用いたUV検出器付HPLCで検知した。定量下限は1ppmで、トマトの緑色部分、トマトケチャップおよびトマトジュースより7ppm以下の量を検出した。

**Keywords**: tomato, tomatine, glycoalkaloid, ketchup, tomato juice

\* 北里大学

Miyahara, M., Saito, Y.: **Pesticide Removal Efficiencies of Soybean Oil Refining Processes.**

*J. Agric. Food Chem.*, 41, 731~734 (1993)

食用油の原料である大豆は主として輸入されており、保存や輸送のあいだ害虫から穀物を守るために、ポストハーベスト農薬が使用される可能性がある。この場合、高濃度の農薬が農産物中に残留することが考えられる。そこで、調理加工により、それらの農薬がどのように減少するのか、モデル的に検討した。工業的には連続工程によって大豆油は製造されており、これを水分調整、圧扁、抽出、脱ガム脱酸、脱色、脱臭の工程にわけて、実験室でシュミレートした。半製品について全部で11項目の検査を行うと同時にマテリアルバランスを測定し、工場の製品と同じように大豆油が精製されたことを確認した。各段階の中間製品に4種の農薬を添加し、精製処理

した後、残留している農薬の量を測定した。その結果、脱臭工程の段階で、農薬は完全に除去された。本研究により実験室的精油法を確立すると同時に、製品の油に農薬は移行しないことがわかった。

**Keywords**: oil refining, soybean oil, pesticides

Miyahara, M., Saito, Y.: **Effects of the Processing Steps in Tofu Production on Pesticide Residues**

*J. Agric. Food Chem.*, 42, 369~373 (1994)

ポストハーベスト農薬が付着している大豆を使用して、豆腐を製造したときどれくらいの農薬が豆腐に残留するのかを検討した。豆腐は古くからある加工食品なので、さまざまな製造工程や製品が知られており、便宜的に標準工程と標準豆腐を決めた。製造法は水洗い、つぶした大豆を煮たもの(ご)をつくる工程、豆乳を作る工程、凝固させる工程、豆腐を水にさらす工程からなりたっている。各工程については、乾燥重量によるマテリアルバランスを測定して工程を管理した。豆腐は固さ、pHなどを指標として標準の豆腐を作った。4種の農薬を添加した大豆を用いて、それらの消長移行を検討したところ、始めの水洗いで付着した農薬量の80~95%が洗い流されていることがわかった。本研究により、豆腐製造の標準化を行うことができ、さらに最終製品中に農薬が実質的残留しないことを明らかにした。

**Keywords**: tofu, pesticides, tofu production, pesticide residue

Akiyama, H., Shidawara, S.\*, Mada, A.\*, Toyoda, H.\*, Toshihiko, T.\* and Imanari, T.\*: **Chemiluminescence high-performance liquid chromatography for the determination of hyaluronic acid, chondroitin sulfate and dermatan sulfate**

*J. Chromatogr.*, 579, 203~207 (1992)

ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、デルマトン硫酸を定量するための高感度化学発光検出HPLC法を開発した。ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、デルマトン硫酸をコンドロイチナーゼABCあるいはコンドロイチナーゼACIIにより不飽和二糖に分解した後、ダンシルヒドラジンでその不飽和二糖を誘導体化した。得られた誘導体化合物をTDPO-過酸化水素を用いる化学発光検出HPLCにより分離定量した。本法による検出限界は100fmolであった。確立された分析法をラット腹腔肥満細胞中グリコサミノグリカンに応用した。

**Keywords**: hyaluronic acid, chondroitin sulfate, chemiluminescence

\* 千葉大学薬学部

元木一宏\*, 谷川雅彦\*, 穂山 浩, 戸井田敏彦\*, 豊田英尚\*, 奥石一郎\*, 今成登志男\*: **四塩化炭素投与ラットの体内におけるヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸およびデルマトン硫酸の変動**  
*衛生化学*, 38, 63~68 (1992)

慢性的に障害を受けている組織では、障害、再生、繊維化がダイナミックに繰り返されており、実質細胞を取り巻く環境すなわち細胞間マトリックスの組成に変化を来すことが予想される。そこで長期に渡り四塩化炭素を皮下投与し続けたラットの肝、腎、脾、血漿、尿中に存在するヒアルロン酸 (HA)、コンドロイチン硫酸 (CS)、デルマトン硫酸 (DS) の量的ならびに質的変動を調べた。その結果、肝、腎、血漿においては、四塩化炭素投与群と対照の間では、グリコサミノグリカン (HA, CS and DS) の組成変動および濃度変動には変化を示さなかった。しかし、脾と尿中のグリコサミノグリカンにおいては四塩化炭素投与群は対照に比べ顕著な増加を示した。

**Keywords** : glycosaminoglycan, hyaluronic acid, carbon tetrachloride

\* 千葉大学薬学部

Qiu, G\*, Tanikawa, M.\*, Akiyama, H., Toida, T.\*, Koshiishi, I.\* and Imanari, T.\*: **Separation and characterization of dermatan sulfate in normal human urine**

*Biol. Pharm. Bull.*, **16**(4), 340~342 (1993)

標準ヒト尿中に排泄されるデルマトン硫酸を TLC とセルロースアセテート膜電気泳動により単離し、解析した。これらの手法における分離方法において、デルマトン硫酸とコンドロイチン硫酸はコンドロイチナーゼ ABC, ACII, B により不飽和二糖に消化後、高感度ポストカラム HPLC 法により検出した。その結果、ヒト尿中デルマトン硫酸は主要なウロン酸はイズロン酸であり (総ウロン酸の 80~90%)、大部分のモノ硫酸化二糖単位 Di-4 S (89%) と少量の二硫酸化二糖単位 Di-diSB (7%)、Di-diSE (1%) で構成されていた。

**Keywords** : dermatan sulfate, TLC, cellulose acetate strip electrophoresis

\* 千葉大学薬学部

Takeda, Y., Goda, Y., Noguchi, H.\*, Yamada, T., Yoshihira, K. and Takeda, M.: **Spectroscopic characterization of SC-NTR: a subsidiary dye of Alura Red (FD&C Red No. 40)**

*Food Additives and Contaminants*, **11**, 97~104 (1994)

食用赤色 40 号 (R-40) の副成色素のうち、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-ナフタレンスルホン酸三ナトリウム塩 (SC-NTR) の略名で FDA が報告) の確認を行った。これは高速液体クロマトグラフィーにより、主成分 R-40 の直前に溶出する高いピークと推定され、この分取物について、<sup>1</sup>H-NMR を測定したところ、methoxy 基 methyl 基各 1 個および、7 つの芳香族性プロトン由来のシグナルが観察された。よって、この分取物の構造は、SC-NTR の構造として FDA が報告したものと明らかに異なることが判明し、芳香族プロトンの結合様式から、R-40 の異性体と考

えられた。さらに、<sup>13</sup>C-NMR 測定により、methoxy 炭素、methyl 炭素由来のシグナルの他、100 ppm より低磁場に R-40 と同数の 16 個のシグナルが観察された。分子量は FAB-MS により R-40 と同じであることを確認し、<sup>13</sup>C-NMR スペクトルの化学シフトの解析結果から、6-ヒドロキシ-5-(2-メトキシ-5-メチル-3-スルホフェニルアゾ)-2-ナフタレンスルホン酸二ナトリウム塩と同定された。

**Keywords** : Allura Red AC dye, Food Red No. 40, subsidiary dye

\* 東京大学

Ito, S.\*, Takeda, H.\*, Kobayashi, A.\*, Sakurai, H.\*, Tada, Y.\*, Aoki, G.\*, Hosogai, T.\*, Yamana, T.\*, Ishiwata, H.: **A simple and rapid method for determination of n-dibutylphthalate in imported vodka by FID-GC and GC/MS**

*J. Food Hyg. Soc. Japan*, **34**, 254~256 (1993)

ロシア産ウオッカ中のフタル酸ジブチルの迅速定量法を開発し、輸入時の行政検査に応用した。GC はキャピラリーカラム (DB-5, 0.25 mm×30 m) および FID によった。また、MS は QP-2000 を用いた。試料 4 ml を 10 ml 容の共栓試験管に採り、ヘキサン 2 ml を加えて 5 分間振とうした。静置後ヘキサン層を分取し、GC 用試験溶液とした。本法の回収率は、0.5, 3.0, 5.0 ppm でそれぞれ 98.5, 97.8, 92.7 ppm, また、検出限界は 0.1 ppm であった。全国の検疫所で保税中のロシア産ウオッカ中のフタル酸ジブチルの定量を本法で行ったところ、15 試料中 2 試料で 0.1 および 0.2 ppm 検出された。これらについては GC/MS でフタル酸ジブチルの存在が確認された。

**Keywords** : Russian vodka, dibutylphthalate, GC/MS

\* 横浜検疫所輸入食品・検疫検査センター

Kawasaki, Y., Goda, Y., Yoshihira, K., and Yamada, T.: **The mechanism of mutagenicity by anthraquinone isolated from *Rubia tinctorum***

*Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **40**, 32 (1994)

食品添加物原料であるイラン産セイヨウアカネ根の抽出エキスより、多数のアントラキノン (AQ) 類を単離し、そのうち lucidin を始めとする 1,3-dihydroxy-2-methyl-AQ 誘導体が強い変異原活性を持つことを明らかにした。本化合物群は、メチル基の酸化状態、水酸基の位置や、修飾状態により明確な構活性造相関が見られる。そこで、これらの化合物群の活性メカニズムを分子レベルで解明することを目的として、lucidin の核酸塩基付加体の形成について検討した。その結果、生理的条件下での主反応生成物として lucidin のベンジル位がアデニンの 3 および 7 位、グアニンの 9 位に結合した 3 つの化合物を単離同定した。lucidin はベンジル位で容易に脱水され、求電子性の強いエキソメチレン (EM) 体を生じることが推定される。これが究極物質とし

てアデニン、グアニンと反応した可能性が高い。また、EM体の平衡を考えると、これらのAQ類の構造活性相関をうまく説明出来ることが明らかになった。

**Keywords:** *Rubia tinctorum*, structure-mutagenicity relationship, lucidin-purine base adducts

Maitani, T., Nakayama, M., Uchiyama, S., and Saito, Y.: **Comparative nephrotoxicity of cadmium and mercury administered intravenously with penicillamine into mice**  
*Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, 39, 236~241 (1993)

Cdの慢性暴露では腎障害がおこるが、塩化カドミウムの1回大量投与では肝障害がおこる。1回投与時のCdとHgの腎毒性を比較するため、両金属の塩化物をペニシラミンと混合し錯体を形成させ、それをマウスに静脈内投与し、24時間後の腎障害を観察した。腎障害をひきおこす最少用量(モル単位)は、両金属でほぼ等しく、また、両金属の臨界濃度も同程度であった。腎障害が認められた用量域では、腎上清中の投与金属濃度は、用量が増加しても全く増加しなかった。以上の結果、Cdは腎に移行するような化学形態で投与すれば、1回大量投与においても、Hgと同程度の腎毒性を示すことが示唆された。

**Keywords:** cadmium, mercury, nephrotoxicity

Ueno, I.<sup>\*1</sup>, Hoshino, M.<sup>\*2</sup>, Maitani, T., Kanegasaki, S.<sup>\*1</sup>, and Ueno, Y.<sup>\*3</sup>: **Luteoskyrin, an anthraquinoid hepatotoxin, and ascorbic acid generate hydroxyl radical *in vitro* in the presence of a trace amount of ferrous iron**  
*Free Rad. Res. Comms.*, 19, S95~S100 (1993)

ルテオスキリンとアスコルビン酸を含むモデル系において、ヒドロキシラジカルが発生するかを、ESRスピントラップ法を用いて検討した。DMSOとDMPOの存在下で、DMPO-CH<sub>3</sub>が観測された。DMPO-CH<sub>3</sub>生成はデフェロキサミンとカタラーゼにより阻害されたが、SODは効果がなかった。

**Keywords:** DMPO-CH<sub>3</sub>, hydroxyl radical, luteoskyrin

\*<sup>1</sup> 東京大学医科学研究所

\*<sup>2</sup> 理化学研究所

\*<sup>3</sup> 東京理科大

米谷民雄, 那大栄, 池田千波\*, 合田幸広, 武田明治, 義平邦利: **カルミンのスクリーニングへの超音波ネブライザー装着 ICP 発光分光法の応用—缶詰さくらんぼ中アルミニウムの分析—**  
*食衛誌*, 35, 201~205 (1994)

市販の缶詰フルーツカクテル中のさくらんぼおよび缶詰さくらんぼのAl濃度を超音波ネブライザーを装着したICP発光分光法で分析し、Alレーキのカルミン使用を判定できるかについて検討した。無着色またはAlを含まないと考えられる色素が表示

された製品のAl濃度は、0.1~0.4 μg/gであり、表示からAlレーキのカルミン使用の可能性があった製品では、Al濃度はすべて1 μg/g前後であった。一方、天然添加物のコチニール色素とミョウバンで着色したものでは、Al濃度は4 μg/g程度であった。このように、Al濃度をカルミン使用のスクリーニングに使用できる可能性が示唆された。

**Keywords:** aluminium, carmine, cherry

\* 横浜検疫所輸入食品・検査検査センター

Maitani, T., Kubota, H., Hori, N., Yoshihira, K., and Takeda, M.: **Distribution and urinary excretion of aluminium injected with several organic acids into mice: Relationship with chemical state in serum studied by the HPLC-ICP method**

*J. Appl. Toxicol.*, 14, 257~261 (1994)

Alを有機酸と混合し、それを*in vivo*でマウスに投与した時のAlの臓器分布と尿中排泄を調べ、一方で、*in vitro*で血清中に添加した時のAlの存在状態をゲルろ過カラムを装着したHPLC-ICP法で調べた。Alの両系における挙動には、相関関係が認められた。

**Keywords:** aluminium, organic acid, HPLC-ICP

合田幸広, 坂元史歩: **高速液体クロマトグラフィーによるククモピン, ミキモピンの分析**  
*植物組織培養*, 10, 303~306 (1994)

形質転換細胞が産生する、非タンパク性アミノ酸であるオパインのうち、これまでHPLCでの分析が困難とされていた、ククモピン、ミキモピンについて、各種分析モードでの定量条件を検討し、逆相条件下、カーボンカラムを利用することで、細胞抽出物より直接簡便に、定量分析が可能なることを明らかにした。

**Keywords:** opine, cucumopine, mikimopine

Sakamoto, S., Tsuchiya, N.\*, Kuroyanagi, M.\* and Ueno, A.\*: **Biotransformation of germacrone by suspension cultured cells**  
*Phytochemistry*, 35, 1215~1219 (1994)

10員環セスキテルペンの1つであるゲルマクロンを、スイカズラ(*Lonicera japonica*), ミシマサイコ(*Bupleurum falcatum*), アイ(*Polygonum tinctorium*)およびセイタカアワダチソウ(*Solidago altissima*)の4種の液体懸濁培養細胞により変換した。変換の結果、グアイアン骨格, オイデスマン骨格, セコグアイアン骨格をもつ、計13種のセスキテルペン(うち4種は新規化合物)が得られ、それぞれ、各種スペクトルデータをもとに構造を決定した。得られた変換物の種類は、用いた培養細胞により若干異なっていた。また、得られた変換物のCDスペクトルを測定したところ、同一の化合物においても、用いた培養細胞により立体配置が異なる場合が見られ、反応の立体選択性に差があることがわかった。

**Keywords** : cell suspension culture, biotransformation, sesquiterpene

\* 静岡県立大学薬学部

Fukuhara, K., Hara, Y., and Miyata, N.: **Electron transfer from quinone and nitroarene anion radicals to molecular oxygen studied by the potential-step chronocoulometry method** *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 955~956 (1994)

キノンやニトロアレーンのアニオンラジカルが酸素分子を一電子還元すると活性酸素(スーパーオキシド)が生成する。ポテンシャルステップクロノメトリ法を用いて、DMF中でのキノンおよびニトロアレーンのアニオンラジカルから酸素分子への電子移動量(スーパーオキシドの発生能)を比較した。その結果、-1000 mV~-1400 mVに還元電位(Epc)を有する化合物に、アニオンラジカルから酸素分子への電子移動反応が見られた。特に、酸素の還元電位(-1437 mV)に近いEpcを有する化合物(5,12-ナフタセンキノン, 1-ニトロピレン)ほどスーパーオキシドを発生しやすいことが明らかとなった。同程度のEpcを有するニトロアレーンとキノンを比較した時、ニトロアレーンのスーパーオキシド発生量はキノンの約50%であった。

**Keywords** : superoxide, nitroarene, quinone

Sera, N.\*<sup>1</sup>, Fukuhara, K., Miyata, N., and Tokiwa, H.\*<sup>2</sup>: **Detection of nitro-azabenz[*a*]pyrene derivatives in the semivolatle phase originating from airborne particulate matter, diesel and gasoline vehicles**

*Mutagenesis*, 9, 47~52 (1994)

新規に合成したニトロアザベンツ[*a*]ピレンは強力な変異原物質である。環境中での存否を明らかにすることを目的として、大気中、ディーゼルおよびガソリン自動車の排出ガス濃度を検討した。試料はサンプラーにガラス繊維濾紙を装着し、次にXAD-4樹脂を装着して採取し、液-液分配、カラムクロマトグラフィーおよびHPLCで分画精製した後、直接導入法による質量分析で同定した。その結果、一般にニトロアレーンは粒子状物質に含まれているのに対し、ニトロアザアレーンは主としてガス状物質に含まれ、その濃度は大気中では1-および3-ニトロ-6-アザベンツ[*a*]ピレンが0.09~0.11 pg/m<sup>3</sup>、1-および3-ニトロ-6-アザベンツ[*a*]ピレン-N-オキシドが0.03~0.07 pg/m<sup>3</sup>であり、汚染源と考えられるディーゼル排ガス中には約2倍程度含まれていることが明らかとなった。

**Keywords** : nitroarene, aza-arene, benzo[*a*]pyrene

\*<sup>1</sup> 福岡県保健環境研究所

\*<sup>2</sup> 九州女子大学

Kurihara, M., Ito, S., Tsutsumi, N., Miyata, N.: **Stereoselective Epoxidation with Dioxiranes**

**Generated from Ketones**

*Tetrahedron Lett.*, 35, 1577~1580 (1994)

酸化剤 potassium peroxomonosulfate (KHSO<sub>5</sub>)は、アセトンの存在下、ジメチルジオキシランを中間体としてオレフィンをエポキシ化する。この反応においてアセトン以外のケトンを用いれば、立体選択的なエポキシ化反応を行うことが出来ると考えられる。しかし、アセトン以外のケトンを用いたエポキシ化の報告は少なく、ケトンの構造とエポキシ化の関係については不明な点が多い。その点を明らかにするとともに立体選択的なエポキシ化反応について検討を行った。塩化メチレン-メタノール-緩衝液の溶媒系でpH 11の条件でエポキシ化を行うと、様々な構造のケトンで高収率でエポキシ化が進行することを見いだした。この条件で、種々のケトン由来のジオキシランによる立体選択的なエポキシ化を検討した。基質のオレフィンとしてはシクロヘキセノール誘導体および1,3-デメチルシクロヘキセンを用いた。いずれの場合も高い選択性でトランス体が得られた。また、嵩高いケトンほど良い選択性を示した。

**Keywords** : dioxirane, stereoselective epoxidation, OXONE

Yamakoshi, Y. N., Yagami, T., Fukuhara, K., Sueyoshi, S., and Miyata, N.: **Solubilization of fullerenes into water with polyvinylpyrrolidone applicable to biological tests**

*J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 517~518 (1994)

1991年のMolecule of the yearに選ばれたフラーレン類は、有機系超伝導素材、新型炭素素材等として多方面で注目されているにもかかわらず、それ自体の生体への影響や生物活性に関しては全く報告されていない。その理由の一つとしてフラーレン類が水または水と混和する有機溶媒に不溶のため生物試験への適用が難しいことが挙げられる。今回、生物試験に利用できるフラーレン(C60およびC70)の水溶化法を確立する目的で界面活性剤を用いてC60およびC70の水溶化を検討した。その結果、界面活性剤として5%ポリビニルピロリドンを用いることにより、C60およびC70がそれぞれ最高400および200マイクログラムの濃度で水溶化できることを見いだした。いずれの水溶液も室温にて1カ月以上安定である。このようにして調整したC60水溶液を用いて溶血試験を行った結果、C60は最高200 μg/ml濃度まで溶血作用を示さなかった。ポリビニルピロリドンは医薬品や化粧品として広く使用され安全性が確認されており、本法はフラーレン類の生物試験を行うための水溶化法として有用である。

**Keywords** : fullerene, C60, polyvinylpyrrolidone

Sumi, Y.\*<sup>1</sup>, Kawahara, S.\*<sup>2</sup>, Kikuchi, Y., Sawada, J., Suzuki, T.\*<sup>1</sup>, and Suzuki, K.T.\*<sup>2,3</sup>: **Histochemical and immunochemical localization of copper, iron and metallothionein in the**



### liver and kidney of LEC rats

*Acta Histochem. Cytochem.*, 26, 5~9 (1993)

LECラットの肝臓および腎臓における銅、鉄およびメタロチオネインの分布を組織化学的に検討した。鉄および銅の著しい沈着が、肝 Kupffer 細胞に認められ、また腎では尿細管上皮細胞に分布することが示された。一方、メタロチオネインは肝 Kupffer 細胞、肝実質細胞および尿細管上皮細胞で観察された。これらの結果より、LECラットにおける肝炎発症に鉄および銅の著しい沈着が関与することが予想された。

**Keywords** : LEC rat, metal, metallothionein

\*1 聖マリアンナ医科大学

\*2 国立環境研究所

\*3 千葉大学薬学部

### Morita, I., and Sawada, J.: Capillary electrophoresis with on-line sample pretreatments for the direct injection analysis of biological samples

*J. Chromatogr.*, 641, 375~381 (1993)

目的成分の濃縮や不要成分の除去といった前処理をオンラインで行うキャピラリー電気泳動法の開発を試みた。すなわち、三方分岐型キャピラリーを用いて、試料導入に伴う固相抽出とキャピラリーカラムスイッチング法を組合せたキャピラリー電気泳動装置を試作し、本法の分析法としての可能性を血清試料中の薬物の直接注入分析に応用し検討した。キャピラリー先端部(試料注入口側)に前処理充填剤(protein-coated ODS)を少量封入したキャピラリーカラムの使用は、目的薬物(プロブナノロール)の濃縮と同時に血清蛋白の除蛋白が可能であった。その結果、少なくとも $1\mu\text{l}$ の試料の注入が可能で、検出限界濃度を約100倍改善する濃縮分析を行うことができた。また血清の直接注入分析において、血清中の妨害成分の影響を受けることなく分離用キャピラリー上で、 $100\text{fg}$ から $2\text{ng}$ の範囲でUV検出が可能であった。本法はキャピラリー電気泳動法の適用範囲を拡大する新分析法として期待される。

**Keywords** : capillary electrophoresis, direct injection analysis, sample pretreatment

### Teshima, R., Ikebuchi, H., Sawada, J., Miyachi, S.\*<sup>1</sup>, Kitani, S.\*<sup>2</sup>, Iwama, M.\*<sup>3</sup>, Irie, M.\*<sup>3</sup>, Ichinoe, M., and Terao T.: Isolation and characterization of a major allergenic component (gp55) of *Aspergillus fumigatus*

*J. Allergy Clin. Immunol.*, 92, 698~706 (1993)

気管支喘息等アレルギー性の疾患を引き起こすことの知られている真菌である *A. fumigatus* 菌の水溶性画分より主要アレルゲンを単離し、その化学的性質について解析を行い、気管支肺アスペルギルス症(ABPA)患者血清中IgE抗体との反応性についても検討を加えた。水溶性画分のゲルろ過を行うと、分子量450kDa附近の蛋白質に強いIgEとの反応性が観察された。この蛋白質のSDS-PAGEを行う

と55kDa附近(gp55)に反応性がみられた。gp55は、糖を23.1%含有する糖蛋白質で、糖鎖としてはN結合型糖鎖を有しており、抗原性は、糖鎖部分よりもむしろ蛋白質部分に存在することが明らかとなった。また、gp55は、それ自身蛋白分解酵素活性を有さないことおよびこの蛋白質のN末部分のアミノ酸配列がすでに *A. fumigatus* アレルゲンとして報告されている Asp f1 とは異なることから、新規のアレルゲンであると予想された。また、gp55は、すべてのABPA患者血清と反応したことから、*A. fumigatus* の主要アレルゲンであると思われる。

**Keywords** : *A. fumigatus*, allergen, Immunoglobulin E

\*1 関東中央病院

\*2 東京大学医学部

\*3 星薬科大学

### Teshima, R., Ikebuchi, H., Sawada, J., Furuno, T.\*<sup>1</sup>, Nakanishi, M.\*<sup>1</sup>, and Terao, T.: Effects of herbimycin A and ST638 on Fcε receptor-mediated histamine release and Ca<sup>2+</sup> signals in rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells

*Biochim. Biophys. Acta*, 1221, 37~46 (1994)

ラットがん化好塩基球(RBL-2H3)細胞からの抗原刺激に伴う脱顆粒反応への2種のチロシンリン酸化酵素阻害剤(herbimycinおよびST638)の影響を調べたところ、これら阻害剤はヒスタミン遊離、イノシトール1,4,5三リン酸の産生ならびに後期の細胞内カルシウム濃度上昇を顕著に抑制した。蛍光顕微鏡と画像解析装置を用い単一細胞内でのカルシウム濃度上昇に及ぼす影響を解析したところ、これら阻害剤が細胞内からのカルシウム動員よりも細胞外からのカルシウム流入を顕著に抑制することが示された。また、これら阻害剤は、カルシウムイオノホアA23187によるヒスタミン遊離ならびに細胞内カルシウム濃度上昇は抑制しなかった。これらの結果から、抗原刺激に伴って引き起こされる蛋白質チロシンリン酸化反応は、イノシトールリン脂質代謝ならびにカルシウム流入に関与しているものと考えられる。

**Keywords** : herbimycin, ST638, Ca<sup>2+</sup> signals

\*1 名古屋市立大学薬学部

### Tanaka, T., Teshima, R., Ikebuchi, H., Sawada, J., Terao, T., and Ichinoe, M.: Sensitive determination of zearalenone and α-zearalenol in barley and Job's-tears by liquid chromatography with fluorescence detection

*Journal of AOAC International*, 76, 1006~1009 (1993)

穀類中における *Fusarium* マイコトキシンとして知られているゼアレノンおよびゼアレノールの高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による高感度定量を試みた。HPLCは逆相系ODSカラム、移動相にアセトニトリル:酢酸緩衝液を用い内部標準(ゼ

ラレノン 6'-オキシム) 法により, 蛍光検出器を用い分析したところ, 4種ゼラレノン類緑化合物は良好な分離を示した。さらに穀類 (大麦, ハト麦) 中の前処理法は試料を含水メタノール, ついでジクロロメタン抽出後, 溶媒留去し残渣を piperidinohydroxypropyl Sephadex LH-20 (PHP-Sephadex LH-20) に通導し, 溶出物を濃縮, メタノールに溶解し任意量を HPLC に付した。その結果ゼラレノンおよびゼラレノールとも 5~250 ng/g で直線性を示し, 定量限界 2 ng/g であった。また回収率も, ゼラレノンで 96~103% (CV=3.3%), ゼラレノールで 96~102% (CV=3.6%) と良好な値が得られた。本法により穀類中のゼラレノンおよびゼラレノールの簡便かつ信頼性の高い高感度分析が可能となった。

**Keywords** : zearalenone, HPLC, PHP-Sephadex LH-20

Nishimaki-Mogami, T., Takahashi, A., Toyoda, K., and Hayashi, Y.: **Induction of peroxisomal  $\beta$ -oxidation by a microbial catabolite of cholic acid in rat liver and cultured rat hepatocytes**

*Biochem. J.*, 295, 217~220 (1993)

コール酸の *Corynebacterium equi* による代謝産物 DCQVA のラット肝の脂肪酸代謝系に及ぼす影響を検討した。0.3% DCQVA 添加飼料を 2 週間ラットに与えると, ペルオキシゾーム  $\beta$ -酸化, ミトコンドリアの 2,4-dienoyl reductase, ミクロゾームのラウリン酸  $\omega$ -酸化活性等のペルオキシゾーム関連脂肪酸代謝酵素の著しい誘導が認められた。ラット初代培養肝細胞を用いた系でも DCQVA は誘導活性を示し, その程度は代表的なペルオキシゾーム増殖剤であるクロフィブリン酸を上回っていた。したがって, DCQVA は内因性の, きわめて強力なペルオキシゾーム増殖剤であることが明らかとなった。

**Keywords** : peroxisome proliferator, cholic acid, beta-oxidation

Nishimaki-Mogami, T., Takahashi, A., and Hayashi, Y.: **Activation of peroxisome-proliferating catabolite of cholic acid to its CoA ester**

*Biochem. J.*, 296, 265~270 (1993)

ペルオキシゾーム増殖剤の作用発現に関わる代謝について検討した。胆汁酸由来の増殖剤 DCQVA はラット肝ミクロゾームで CoA エステルに活性化されることを明らかとし, 脂肪酸代謝の攪乱を介して脂肪酸由来の内因性増殖因子の産生を促す可能性を示した。また, 活性化は長鎖脂肪酸活性化酵素とは異なる酵素により触媒されることを見いだした。ミクロゾームには DCQVA-CoA 水解活性も含まれており, さらに異物である増殖剤の活性化は内因性の脂肪酸と競合することから, 条件によっては, CoA エステル化の活性は見かけ上低下するがある

いは完全に消失してしまうことなどを明らかとした。  
**Keywords** : peroxisome proliferator, acyl-CoA synthetase, fatty acids

Iwata, N.\*, Suzuki, K., Minegishi, K., Kawaniishi, T., Hara, S.\*, Endo, T.\*, and Takahashi, A.: **Induction of cytochrome P450 1A2 by musk analogues and other inducing agents in rat liver**

*Eur. J. Pharmacol.*, 248, 243~250 (1993)

非変異原性発癌物質ムスクキシレンとその構造類似化合物であるムスクアンブレットのラット肝 cytochrome P450 に対する誘導効果を, 典型的な cytochrome P450 1A1 の誘導剤である 3-メチルコランズレンおよび P450 1A2 の誘導剤であるイソサフロールと比較した。その結果, ムスクキシレンおよびムスクアンブレットの P450 に対する誘導は, 0.1 mmol/kg の投与量では P450 1A2 に特異的であり, P450 1A1 の誘導は観察されなかった。さらに, ムスクキシレンによる P450 1A2 の誘導能は mol dose で比較して, イソサフロールと同程度であった。

**Keywords** : cytochrome P-450, musk xylene, enzyme induction

\* 東京医科大学

Tanamoto, K.: **Free hydroxyl groups are not required for endotoxic activity of lipid A.**

*Infect. Immun.*, 62, 1705~1709 (1994)

サルモネラ菌内毒素の活性中心リピド A のフリーの水酸基にサクシニル基を導入すると, 内毒素活性が失われるとともにエンドトキシンのアンタゴニストに変わる。構造活性相関の解明とアンタゴニスト構造誘導への分子修飾の一環として, リピド A の活性発現に及ぼす, 脂肪酸のアクセプターとしての遊離水酸基の関与を, 化学合成した活性型リピド A の遊離水酸基にサクシニル基, およびアセチル基を導入することによって調べた。大腸菌型・サルモネラ型いずれのリピド A も, 調べたすべての内毒素活性を完全に保持していたことからリピド A の水酸基は活性発現するために必ずしも遊離基として存在する必要のないことを明らかにした。

**Keywords** : lipid A, endotoxin, TNF

Haishima, Y., and Tanamoto, K.: **A quantitative microanalysis of bacterial endotoxin using [<sup>3</sup>H]-labeled L-glycero-D-mannoheptitol as a marker**

*Microbiol. Immunol.*, 37, 813~816 (1993)

グラム陰性細菌エンドトキシン (LPS) の inner core 部分の共通成分である L-glycero-D-mannoheptose (LD-Hep) を還元的にトリチウム標識する LPS の化学的微量定量法を確立した。トリチウム標識した LD-Hep 標準品を HPLC により分離・精製した後, 液体シンチレーションカウンターにより検出した結果, 同標準品は 100 pg 以上の範囲で

定量的に検出された (検出限界 50 pg). サルモネラ LPS を加水分解し, 遊離した LD-Hep を本法により検出した結果, LPS 量として 2 ng 以上の範囲において定量性が認められた (検出限界 500 pg). 本法では放射性物質による環境汚染を避けるため, LD-Hep を標識する際にコールド化合物を用いているが (10 倍希釈), コールドを使用しなければ, 理論的には, 50 pg までの LPS を検出することが可能である.

**Keywords:** LPS, L-glycero-D-manno-heptose, limulus test

Haishima, Y., and Tanamoto, K.: A micro-quantitative method for direct detection of bacterial endotoxin by fluorescence labelling of L-glycero-D-manno-heptose

*FEMS Microbiol. Lett.*, **112**, 185~190 (1993)

グラム陰性細菌エンドトキシン (LPS) の inner core 部分の共通成分である L-glycero-D-manno-heptose (LD-Hep) をマーカーとした LPS の化学的微量定量法を確立した. 2-アミノピリジンにより蛍光ラベルした LD-Hep 標準品は, HPLC 分析により, 30 pg 以上の範囲で定量的に検出された (検出限界 20 pg). サルモネラ LPS を加水分解し, 遊離した LD-Hep を本法により検出した結果, LPS 量として 400 pg 以上の範囲において定量性が認められた (検出限界 200 pg).

**Keywords:** LPS, L-glycero-D-manno-heptose, limulus test

Kondo, S.\*, Watabe, T.\*, Haishima, Y., and Hisatsune, K.\*: Identificatin of oligosaccharides consisting of D-glucuronic acid and L-glycero-D-manno- and D-glycero-D-manno-heptose isolated from *Vibrio parahaemolyticus* O2 lipopolysaccharide

*Carbohydr. Res.*, **245**, 353~359 (1993)

腸炎ビブリオ O2 株リポ多糖 (LPS) の部分加水分解により得られる LPS inner core 由来のウロン酸含有ジサッカリドおよびトリサッカリドの構造をメチル化分析および NMR 解析により検討した結果, 両糖質は, それぞれ 2-O-( $\alpha$ -D-glucuronopyranosyl)-L-glycero-D-manno-heptose および 3-O-[2-O-( $\alpha$ -D-glucuronopyranosyl)-L-glycero-D-manno-heptosyl]-D-glycero-D-manno-heptose であることを証明した. 腸炎ビブリオの O1 から O13 の血清型中, LPS の構成糖としては稀少成分である D-glycero-D-manno-heptose を含有する LPS は, O2 株 LPS のみであり, 同菌株の LPS は, 他の血清型の腸炎ビブリオ LPS とは異なった inner core 構造を持つことが明らかになった.

**Keywords:** LPS, *V. parahaemolyticus*, D-glycero-D-manno-heptose

\* 城西大学

Kondo, S.\*, Ishida, K.\*, Haishima, Y., Iguchi,

T.\*, and Hisatsune, K.\*: N-3-Hydroxypropionyl- $\alpha$ -D-perosamine homopolymer constituting the O-chain of lipopolysaccharides from *Vibrio bioserogroup* 1875 possessing antigenic factor (s) in common with O1 *Vibrio cholerae*

*Biochem. J.*, **292**, 531~535 (1993)

O1 コレラ菌と共通抗原性を持つ海水ビブリオ *Vibrio bioserogroup* 1875 リポ多糖 (LPS) の O-特異側鎖の化学構造をメチル化分析および NMR 解析により検討した. その結果, 同 O-特異側鎖は, 4-(3-hydroxypropanamido)-4,6-dideoxy- $\alpha$ -D-mannopyranose の (1 $\rightarrow$ 2) 結合ホモポリマーにより構築されていることが明らかになった. この構造は, 4-(3-deoxy-L-glycero-tetronamido)-4,6-dideoxy- $\alpha$ -D-mannopyranose ホモポリマーから成る O1 コレラ菌および 4-acetamido-4,6-dideoxy- $\alpha$ -D-mannopyranose ホモポリマーにより構成されるコレラ菌ハカタ株 LPS の O-特異側鎖と非常に類似しており, これらの菌種間に見られる血清学的交叉反応性は, 各 LPS の O-特異側鎖の構造類似性に起因することが確認された.

**Keywords:** LPS, *Vibrio cholerae*, O-specific chain

\* 城西大学

Miyahara, M. and Mise, K.: Isolation and characterization of the StyD4I restriction endonuclease, a neoschizomer of ScrFI, from *Escherichia coli* K-12 carrying a small multicopy Hsd plasmid of *Salmonella typhi*

*Gene*, **129**, 83~86 (1993)

*Salmonella typhi* D4 株より制限酵素産生を見いだした. この酵素産生遺伝子はプラスミド上の上のっていることが分かった. そこでこのプラスミドと S-a の cotransformation を大腸菌株 WA803 に行ったところ, 制限酵素産生株が得られた. 大量培養により制限酵素を精製し, その特異性などを検討したところ, ScrFI の neoschizomer であることが分かった. また, dcm<sup>+</sup> の塩基配列は ScrFI や EcoRII と同様に切断されないことも判明した. この制限酵素産生株は菌としての取扱や酵素の精製などが容易であることから酵素産生源として有用であると思われる.

**Keywords:** ScrFI neoschizomer, restriction endonuclease, recombinant DNA

上田成子<sup>\*1</sup>, 桑原祥浩<sup>\*1</sup>, 小沼博隆, 品川邦汎<sup>\*2</sup>: 農薬および畑作土壌由来の *Bacillus thuringiensis* と BT 菌農薬製剤使用菌株との関連性

食品と微生物, **10**, 133~137 (1993)

*B. thuringiensis* 農薬製剤に広く使用されている 5 菌株 (Kurustaki, Aizawai, Thuringiensis, Sotto, Israelensis) を用いて, それぞれの抗 H 血清を作製し, 穀類, 野菜類および畑作土壌から分離した *B.*

*thuringiensis* の H 血清型別を行い、BT 農薬由来の汚染との関連性を検討し以下の結果を得た。

今回作製した抗 H 血清により、輸入穀類、野菜類および畑作土壌から分離した *B. thuringiensis* 84 株中 49 菌株 (58%) が型別された。型別された 49 株中 38 株 (78%) が Kurustaki, 7 菌株 (14%) が Aizawai, 3 菌株 (6%) が Sotto, 1 菌株 (2%) が Israelensis にそれぞれ型別された。特に、輸入トウモロコシから農薬製剤に使用されている *B. thuringiensis*, Kurustaki および Aizawai が効率に認められた。以上の結果から、これらの菌はプレハーベストあるいはポストハーベスト農薬として使用された BT 農薬に由来するものと考えられた。

**Keywords** : anti H-sera, crops, farmland soil

\*1 女子栄養大学

\*2 岩手大学

森 健\*1, 大畑克彦\*1, 三輪好伸\*1, 増田高志\*1, 内藤 満\*1, 赤羽荘資\*1, 仁科徳啓\*2, 小沼博隆, 品川邦汎\*3 : 食鳥肉の品質管理における K 値の評価

食品と微生物, 10, 71~75 (1993)

最近開発された魚介類の簡易鮮度判定用 K 値測定キットを食鳥肉に応用し、食鳥肉の流通段階での品質管理における K 値の有用性について検討し、以下の結果を得た。

1. モモ肉に比べ筋肉の種類が単純な胸肉の K 値が低く、バラツキも少なかった。それゆえ食鳥肉の K 値測定には胸肉が適している。

2. 食鳥処理場の各処理工程から採取した胸肉およびモモ肉の K 値はすべて 15% 以下であり、処理工程中での K 値の上昇はみられなかった。

3. 食鳥肉の K 値 (%) は、処理解体後 (6.4 ± 2.5) のものが -5°C, 2 日間凍結保存後 (18.3 ± 5.8) および食肉店での販売時 (43.7 ± 15.7) と上昇した。

4. 10°C, 25°C 保存では、食鳥肉の生菌数の増加に並行して K 値もほぼ上昇した。

以上の結果から、食鳥肉の K 値測定は処理場の処理工程および食鳥肉の流通過程における品質管理に有効であり、かつ今回用いた K 値測定キットは短時間にしかも簡易に行うことができた。

**Keywords** : K-value, chicken meat, quality control

\*1 静岡県衛生環境センター

\*2 静岡県東部食肉検査所

\*3 岩手大学

Matsutani, S., and Ohtsubo, E.\*: Distribution of the *Shigella sonnei* insertion elements in Enterobacteriaceae

Gene, 127, 111~115 (1993)

*Shigella sonnei* で見いだされた IS1, IS600, IS629, IS630, IS640 の分布を様々な種類の腸内細菌で調べた。*Shigella* 属の 4 種はこれらすべての IS を持っており、いくつかの IS は、多コピー存在した。また、種特異的な分布パターンを示した。その

他の菌種には殆ど存在しなかったが、例外的に、患者由来大腸菌のいくつかは、*Shigella* の菌種と似た分布パターンを示した。これは、それらの大腸菌が、*Shigella* により近縁であることを示唆している。IS を用いて細菌を分類したり、*Shigella* と大腸菌をアイデンティファイすることができるかもしれない。

**Keywords** : enteric bacteria, host range, taxonomy

\* 東京大学分子細胞生物学研究所

鈴木明子, 成田紀子, 菊池 裕, 一戸正勝 : 南西諸島の畑地土壌における *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* の選択的分離

マイコトキシン, 37, 23~29 (1993)

本邦におけるアフラトキシン産生菌の分布は主として九州南部と奄美、沖縄など南西諸島に限られていることが知られている。本研究では南西諸島における基幹農作物であるサトウキビ畑土壌を対象として *Aspergillus flavus* およびその近縁菌類を選択的に検出する選択的分離法を検討した。*A. flavus* などは *Aspergillus Flavus Parasiticus Agar* (AFPA) を選択培地として土壌試料中より希釈分散法で分離する方法と、土壌中の植物残渣したところを対象に 2 種の選択培地の PCNB/2-aminobutane medium および Demosan/PCNB Streptomycin medium 上に並置する方法で分離培養を行った。奄美大島、波照間島、沖縄本島のサトウキビ畑土壌 13 点より 60 菌株の *A. flavus* 近縁菌を検出分離した。分離した *A. flavus*, *A. parasiticus* のアフラトキシン生産性につき、TLC による定性試験、EIA によるアフラトキシン B1, G1 の生産量を検索したところ *A. flavus* の 17 株中 12 株に明らかな陽性菌株を得た他、*A. parasiticus* の 43 菌株はすべてアフラトキシン産生性を示した。

**Keywords** : *A. flavus*, aflatoxin, selective isolation

関沢 純, 大竹千代子, 楊 学伸 : クライテリアドキュメントによる化学物質のリスクコミュニケーション

日本リスク研究学会, 5(2), 23~28 (1994)

化学物質の安全性評価には、種々の専門家の協力、多大の費用と、労力が要求される。このようにして各国や国際機関で作られたさまざまな安全性評価資料の存在については必ずしもよく知られていない。化学物質の安全性評価を国際協力をおして一層効果的に推進する一助としてこのような安全性評価資料、すなわちクライテリアドキュメントに関するデータベースを作成し、どの物質について、どこで、どのようなクライテリアドキュメントが作られているかを容易に調べられるようにした。化学品の管理にたずさわる、あるいはそのリスクに曝される人々の間で、安全使用と管理に必要な科学的情報が十分共有されていないのが実情である。クライテリアドキュメントデータベースの作成と利用を国内外の協力により進めることで、化学品のリスクについての

関係者の間のコミュニケーションを活性化することを提唱した。

**Keywords** : criteria document, risk communication, database

Sekizawa, J., Yasuhara, K., Suyama, Y.\*<sup>1</sup>, Yamanaka, S.\*<sup>1</sup>, Tobe, M.\*<sup>2</sup>. and Nishimura, M.\*<sup>1</sup>: **A simple method for screening assessment of skin and eye irritation.**

*J. Toxicol. Sci.*, **19**, 25~35 (1994)

皮膚、眼刺激性の簡便なスクリーニング試験法を開発した。化学品の取扱における安全性を確保するためにおよその毒性を知っておく必要がある。本法は国際的な毒性試験法のハーモナイゼーションや動物愛護の動きも考慮に入れ、動物をできるだけ使わずに段階的に化学品の刺激性を試験しようとするものである。すなわち、まず pH 測定、次にアルミ板腐食性、3 番目に皮膚刺激性、4 番目に皮内反応、最後に眼刺激性の試験を行い、より前の段階で陽性の結果が得られればそれから先の試験は不要とする。刺激性について既知の 15 種類の化学物質を用い、国立衛生試験所と東京歯科大学の 2 箇所で行って試験を行ったところ、両者の試験結果の間できわめて良い一致がみられた。また刺激性試験には今回ラット、マウス、モルモットを用いたが、標準的に行われている白色兔を用いた試験データを毒性データベース中から抽出し、比較検討したところ満足すべき一致関係が得られた。アルミ板腐食性については国連危険物輸送委員会でも用いられているところから今回試験を試みたが、皮膚や眼の刺激性とは関連がみられず不必要と結論した。

**Keywords** : screening assessment, skin and eye irritation, industrial chemicals and pesticides

\*<sup>1</sup> 東京歯科大学

\*<sup>2</sup> 日本公定書協会

Gilbert, M.\*<sup>1</sup>, (訳)横手規子, 山本 都: **化学物質の安全性に関する情報とコミュニケーション変異原性試験**, 2(1), 47~58 (1993)

国際化学物質安全性計画 (IPCS) の Dr. Gilbert が、化学物質の安全性情報の提供に関する国際的な動向と IPCS の活動についてシンポジウムで講演した内容をまとめた。

**Keywords** : IPCS, ICSC, safety document

\*<sup>1</sup> International Programme on Chemical Safety/WHO

Damstra, T.\*<sup>1</sup> & Kurokawa, Y.: **The Fourth United States-Japan Meeting on the Toxicological Characterization of Environmental Chemicals.**

*Environment. Health Perspect.*, **101**, 644~649 (1993)

米国では、1978 年以來の National Toxicology Program (NTP) が、発がん性試験に重きをおいていたのを、今後はそれらの試験よりもそのメカニ

ズムへ、さらに発がん性に加え、生殖発生毒性を主とする他の毒性面への研究を重視する方向への転換と考えられる。既にその方針の下に、鉛毒性に関する基礎的、臨床的な研究が始まっている。今回重要なトピックスとして取り上げられたものは、生殖・発生毒性である。生殖毒性に関しては、雄性生殖能特に精巣毒性の検索法 (病理組織学および精子運動性の評価)、さらに雌性生殖能における卵巣毒性評価法などが紹介された。発生毒性については、ショウジョウバエ、カエル、ラット、マウス胚を用いた代替法の紹介もなされた。発がん性に関しては、NTP の発がん性試験結果評価のためのメカニズム解明の研究結果が数種の物質について討議された。

**Keywords** : risk assessment, NIEHS, toxicology

\*<sup>1</sup> National Institute of Environmental Health Sciences.

Judson W. Spalding\*<sup>1</sup>, Junko Momma, Michael R. Elwell\*<sup>1</sup> and Raymond W. Tennant\*<sup>1</sup>: **Chemically Induced Skin Carcinogenesis in a Transgenic Mouse Line (TG·AC) Carrying a v-Ha-ras gene**

*Carcinogenesis*, **14**(17), 1335~1341 (1993)

活性化 v-Ha-ras 遺伝子が導入された TG·AC マウスは、遺伝的に皮膚癌を引き起こすことがプログラムされているトランスジェニックマウスである。言い換えると、遺伝的に発癌がすでにインシエートされたマウスであり、このため、表皮に擦過傷を作ると 2~3 週間目に 100% の頻度でその部位に良性腫瘍 (papilloma) が発生する。このマウスを用い、皮膚発癌物質ならびにその促進物質として既に知られている TPA, BPO, 2-BUP 等、種々の皮膚発癌プロモーターを用いて背部皮膚に 20 週間塗布し、塗布部位における良性腫瘍および悪性腫瘍の発生時期、ならびに発生頻度について検討した。その結果、TPA および 2-BUP 群においては、2~3 週間目に多発性の papilloma が 100% の頻度で発生したほか、24 週目には扁平上皮発癌にまで至ったものもあり、時には肉腫を伴うものもあった。このように、癌遺伝子を組み込んだ TG·AC マウスはインシエーション段階を省略することができ、直ちに発癌プロモーター作用の検出が可能であることから、皮膚発癌のプロモーターのスクリーニングに有効であり、さらに、現行の長期発癌性試験期間を大幅に短縮できる可能性が示唆された。また、発癌物質の作用機序の解明にも応用できることから、極めて有用かつ重要なモデルであることが判明した。

**Keywords** : transgenic mouse, oncogene, skin carcinogenesis

\*<sup>1</sup> National Institute of Environmental Health Sciences, USA

Umamura, T., Tokumo, K.\*<sup>1</sup>, Sirma, H.\*<sup>2</sup>, Gebhardt R.\*<sup>2</sup>, Poirier, M. C.\*<sup>3</sup> and Williams, G. M.\*<sup>4</sup>: **Dose response effects of 2-acetylaminofluorene on DNA damage, cell proliferation**

**and neoplastic conversion in rat liver.***Cancer Lett.*, 73, 1~10 (1993)

2-Acetylaminofluorene (AAF) を雄の F344 ラットに 0.5 および 2.0 mmol/kg, 週 5 日, 8 週間強制経口投与し, さらに投与中止後 8 週間まで動物を飼育して, 肝臓における DNA 付加体 (N-doxyguanosine-(8-yl)-2-amonifluorene) の形成, Glutamine synthetase 陽性 (GS+) 肝細胞数, 細胞増殖の変動, 胎児型 Glutathione transferase 陽性 (GSTP) 肝細胞結節の発現について観察した。その結果, AAF の投与量が混餌投与に比べて正確に把握できるこの実験系で, AAF 投与による DNA 付加体形成と細胞病変発現との間に直線的な関連性が認められないことが明らかとなった。したがって, 変異原あるいは非変異原性物質の DNA に及ぼす影響がその発癌過程に果たす役割, あるいは発癌物質の閾値に関する研究にこの実験系が有用である事が示された。

**Keywords** : acetylaminofluorene, DNA damage<sup>\*1</sup> 広島大学医学部<sup>\*2</sup> Universitat Tubingen, Germany<sup>\*3</sup> National Cancer Institute, U.S.A.<sup>\*4</sup> American Health Foundation, U.S.A.

Tokumo, K<sup>\*1</sup>, Umemura, T., Sirma, H<sup>\*2</sup>, Gebhardt R<sup>\*2</sup>, Poirier, M. C.<sup>\*3</sup> and Williams, G. M.<sup>\*4</sup>: **Inhibition by gonadectomy of effects of 2-acetylaminofluorene in livers of male, but not female rats.**

*Carcinogenesis*, 14, 1747~1750 (1993)

2-Acetylaminofluorene (AAF) を雌雄およびそれぞれ去勢手術を施した F344 ラットに 0.5 および 2.0 mmol/kg, 週 5 日, 8 週間強制経口投与し, 肝臓における DNA 付加体 (N-doxyguanosine-(8-yl)-2-amonifluorene) の形成, Glutamine synthetase 陽性 (GS+) 肝細胞数, 胎児型 Glutathione transferase 陽性 (GSTP) 肝細胞結節の発現について観察した。その結果 AAF 投与により誘導される肝腫瘍性変化, DNA 付加体形成, GS+ 陽性肝細胞領域の減少, GSTP 陽性肝細胞結節の発現はいずれも雌に比べて雄に強く表れた。また, 去勢された雄ではこれらの変化は正常雄に比べて有意に減少した。したがって, AAF 投与によるこれらの変化は雄性ホルモンに依存したものである事が明らかとなった。

**Keywords** : acetylaminofluorene, gonadectomy, DNA damage<sup>\*1</sup> 広島大学医学部<sup>\*2</sup> Universitat Tubingen, Germany<sup>\*3</sup> National Cancer Institute, U.S.A.<sup>\*4</sup> American Health Foundation, U.S.A.

Umemura, T., Sai, K., Takagi, A., Hasegawa, R. and Kurokawa, Y.: **A possible role for cell proliferation in potassium bromate (KBrO<sub>3</sub>) carcinogenesis.**

*J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 119, 463~469

(1993)

雌雄の F344 ラットに臭素酸カリウム (KBrO<sub>3</sub>), 臭化カリウム (KBr), 臭素酸ナトリウム (NaBrO<sub>3</sub>) を飲水に混じて 8 週間投与し, 腎臓の  $\alpha$ 2u-globulin の蓄積および細胞増殖を観察した。その結果, KBrO<sub>3</sub> および NaBrO<sub>3</sub> 投与雄ラットに認められた腎臓近位尿細管内の硝子滴は  $\alpha$ 2u-globulin の免疫染色に陽性を示した。また, 投与後 2, 4 および 8 週目で, KBrO<sub>3</sub> および NaBrO<sub>3</sub> 投与雄ラットの近位尿細管で細胞増殖の誘導が観察された。しかし, KBrO<sub>3</sub> 投与雌ラットおよび KBr 投与雄ラットではこれらの変化は観察されなかった。したがって, KBrO<sub>3</sub> 投与により生じる腎臓近位尿細管の細胞増殖誘導に,  $\alpha$ 2u-globulin 蓄積により生じる腎障害に対する代償性の細胞増殖が含まれている事が強く示唆された。KBrO<sub>3</sub> の腎発癌過程には, KBrO<sub>3</sub> が持つ酸化的 DNA 障害性に加えて, この細胞増殖誘導が大きく関与している事が予想される。

**Keywords** : KBrO<sub>3</sub>,  $\alpha$ 2u-globulin, cell proliferation

Umemura, T., Ogawa, Y., Suzuki, S., Kaneko, T. and Kurokawa, Y.: **Accelerated development of chronic progressive nephrosis in male F344 rats after cessation of p-dichlorobenzene-treatment.**

*J. Toxicol. Pathol.*, 6, 81~87 (1993)

雄 F344 ラットに全身暴露チャンバーを用いて p-dichlorobenzene (p-DCB) を 600, 300 および 75 ppm の濃度で 6 時間/日, 7 日/週, 9 カ月間吸入暴露し暴露後 6 カ月後に解剖し, 腎臓を病理組織学的に検索した。暴露開始後 6 カ月目では, 腎臓近位尿細管に  $\alpha$ 2u-globulin の高度な沈着が観察され, 同時に尿管上皮細胞の壊死物質が皮髄境界部の近位直尿管がヘンレの細いわなに移行する部位に顕著に認められた。9 カ月の暴露後 6 カ月目では  $\alpha$ 2u-globulin の著しい沈着は認められず, 代わって, ボウマン嚢壁の肥厚, 尿管基底膜の肥厚, 尿管の再生像等慢性ネフロパチーの所見が用量相関性を持って認められた。また, 腎盂部には石灰沈着と, それに伴う移行上皮の過形成が認められた。したがって, これら変化は, p-DCB 投与により引き起こされる  $\alpha$ 2u-globulin の蓄積に始まる尿管障害が引き金となって生じている事が示唆された。

**Keywords** : p-dichlorobenzene,  $\alpha$ 2u-globulin, chronic progressive nephrosis

広松正児\*, 新家 真\*, 藤森親之助: **ラット虹彩毛様体のノルエピネフリン含量およびそれに対する  $\alpha$ 2 受容体刺激剤アブラクロニジン点眼の影響**  
日本眼科学会雑誌, 95(5), 580~586 (1992)

ラット虹彩毛様体中の交感神経伝達物質の検討を行い, さらに新眼圧降下剤である  $\alpha$ 2 受容体刺激剤アブラクロニジンの点眼効果を検討した。眼部にマイクロ波を照射することにより代謝酵素を不活性化し, 虹彩毛様体を剥離し, カテコールアミン含量を

HPLC-ECDで測定した。その結果、虹彩毛様体にはエピネフリン、ドパミンは検出されず（検出限界20 ng/g相当）、ノルエピネフリンだけが検出された。正常ラットの虹彩毛様体中の含量は3.56  $\mu\text{g/g}$ であった。また、対照生理食塩水点眼側では3.88  $\mu\text{g/g}$ であったのに対し、0.05%アプラクロニジン5  $\mu\text{l}$ 点眼側の値は有意に増加し（4.18  $\mu\text{g/g}$ ）、節前性の抑制作用が出現していた。

**Keywords:** apraclonidine, norepinephrine, rat iris-ciliary body

\* 東京大学

小泉修一, 井上和秀: Pertussis toxin 処理による PC12 細胞からのドパミン放出過程における Ca 感受性の亢進

神経化学, 32(1), 192~193 (1993)

ブラジキニン (BK) 刺激による DA 放出は細胞内で生産された  $\text{IP}_3$  による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  貯蔵部位からの  $\text{Ca}^{2+}$  遊離により惹起されたものと考えられる。外液から Ca を除去した条件での BK による PC12 細胞からのドパミン (DA) 放出について検討した。その結果、① BK 刺激による PC12 細胞からの DA 放出および  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の上昇は通常 B2 受容体を介して惹起され、B1 受容体は関与していない、② PTX 処理により惹起される DA 放出の増大は、B1 受容体を介する経路で引き起こされる、③ PTX 処理により惹起される DA 放出の増大は  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  のさらなる増大を伴わないことが明らかとなった。以上の結果は、PTX 処理により DA 放出過程における  $\text{Ca}^{2+}$  感受性が増大すること、それは B1 受容体を介する pathway で引き起こされることを示唆する結果である。

**Keywords:** bradykinin, dopamine release, pertussis toxin, intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration

井上和秀, 中沢憲一, 小泉修一, 綿野智一: ラット培養海馬細胞における ATP 受容体を介するシナプス伝達存在

神経化学, 32(1), 210~211 (1993)

ラット培養海馬細胞で観察される神経伝達について検討した。細胞内導入されたシナプス電流は急速に不活性化する電流と比較的緩やかに不活性化する電流で構成されていた。前者は non-NMDA 型グルタミン酸受容体の阻害薬で、後者は ATP 受容体の阻害薬でそれぞれ完全に消失した。fura-2 を用い細胞内カルシウムを測定した場合、ATP の投与により顕著な上昇が認められた。以上の結果は ATP が海馬において興奮性の神経伝達に関与することを強く示唆する。

**Keywords:** ATP, hippocampus, neurotransmission

Koizumi, S., Inoue, K., Kataoka, Y., Niwa, M., and Takanaka, A.: Endothelin-3 activates a voltage-gated Ca channel via a pertussis toxin sensitive mechanism leading to dopamine re-

lease from PC12 cells.

Neurosci. Lett., 166, 191~194 (1994)

Endothelin (ET) は、強力な血管収縮ペプチドであるが、神経系でもその存在は確認され、中枢神経系において神経伝達物質放出に関与していることが明らかとなった。また、脳虚血との関係も指摘されている。そこで ET により惹起される神経伝達物質遊離様式を詳細に検討した。ET-3 (0.01~1  $\mu\text{M}$ ) は用量依存的に PC12 細胞から DA 放出を引き起こした。この DA 放出は、オンセットが遅く10分間にも渡り観察される非常に特徴的なものであった。また外液  $\text{Ca}^{2+}$  除去により完全に、電位依存性 Ca channel 拮抗薬である  $\text{Cd}^{2+}$  および nicardipine により部分的に抑制された。ET-3 (0.01~1  $\mu\text{M}$ ) は PC12 細胞内  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  を持続的に上昇させた。この上昇も外液  $\text{Ca}^{2+}$  に完全に依存しており、他の細胞で認められている細胞内貯蔵部位からの  $\text{Ca}^{2+}$  遊離は認められなかった。  $\text{Cd}^{2+}$  および nicardipine はこの  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇を強く抑制した。また、百日咳毒素 (PTX) 処理を施した PC12 細胞細胞では、ET-3 による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇および DA 放出が顕著に抑制されること、PTX と Ca 拮抗薬の同時添加でもその抑制の程度に変化が無いこと、さらに ET-3 の作用は形質膜電位に依存していないことが明らかとなった。以上の結果より、ET-3 は PTX 感受性 G タンパク質を介する経路で電位依存性 Ca channel を持続的に活性化し、長時間にわたる細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  流入および DA 放出を惹起すると考えられる。

**Keywords:** endothelin, neurotransmitter release

Nakazawa, K., and Inoue, K.: ATP- and acetylcholine-activated channels co-existing in cell-free membrane patches from rat sympathetic neuron

Neurosci. Lett., 167, 97~100 (1993)

細胞外 ATP およびアセチルコリンにより活性化されるイオン・チャネルをラット交感神経細胞から剥離した細胞膜小片より電気的に記録し、両者の関連性を検討した。ATP により活性化されるチャネルとアセチルコリンにより活性化されるチャネルはきわめて高い確率で共存しており、また活性化されるチャネルの数にも高い相関がみとめられた。ATP 共存下ではアセチルコリンによる電流は減少した。これらの結果は ATP がアセチルコリン受容体チャネルを活性化するという我々の仮説を支持するものである。

**Keywords:** ATP, ion channels, acetylcholine

Tytgat, J.\*, Nakazawa, K., Gross, A.\*, and Hess, P.\*: Pursuing the voltage sensor of a voltage-gated mammalian potassium channel

J. Biol. Chem., 268, 23777~23779 (1993)

電位依存型イオン・チャネルは脱分極により開口する。開口を導く電位変化は電位感受性部位 (voltage sensor) により感知されると考えており、チャ

ネル・サブユニット構造中のS4とよばれる膜貫通部位がその働きを担うと推察されている。これは、S4部位に配列する正の電価をもつ7個の塩基性アミノ酸残基をcDNAの点突然変異により中性あるいは酸性アミノ酸に置換するとチャンネルの電位依存性が変化するという実験結果に基づいている。しかし、これらのうちいくつかの置換では機能的チャンネルが発現されなくなる(non-expressing)ことが知られていた。我々はこの現象がチャンネルの活性化電位が記録可能な範囲を外れてしまうためであると予測し、このことを確かめるため、ラット脳由来Kチャンネル(RCKチャンネル)のnon-expressing mutantとexpressing mutantをcDNAレベルで連結、サブユニットがいわば「タンデム構造」をとるようなチャンネルの形成を試みた。「タンデム」チャンネルは記録可能な電位範囲で活性化され我々の仮説は支持された。今回の報告でRCKチャンネルのS4部位の全塩基性アミノ酸残基に対する置換の結果が電位依存性チャンネルとしてはじめて揃ったことになり、voltage sensorに対する理解が一層深まると期待される。

**Keywords:** K channels, voltage-sensor, site-directed mutagenesis

\* Harvard Medical School

**Nakazawa, K.: ATP-activated current and its interaction with acetylcholine-activated current in rat sympathetic neurons**

*J. Neurosci.*, 14, 740~750 (1994)

ラット交感神経細胞における細胞外ATPにより活性化される内向きイオン電流の性質を検討した。電流はほとんどすべての細胞で認められた。EC50値は約60  $\mu$ Mであった。電流は強い内向き整流作用を示し、平衡電位は約0 mVであった。電流は非選択的なカチオン・チャンネルを介すると考えられ、カルシウムの透過も認められた。アセチルコリン(ACh)による電流もほとんどすべての細胞で認められた。ATPによる電流とAChによる電流の間には加算性が成立しなかった。ATP受容体の阻害薬であるスラミンはATPによる電流を抑制したがAChによる電流には影響しなかった。ACh受容体チャンネルのイオン透過阻害薬であるヘキサメトニウムおよびd-ツボクラリンはAChによる電流を選択的に抑制した。外液ナトリウムをグルコサミンで置換した場合、-150 mVにおいてATPのみが内向き電流を惹起した。以上のことから、ATPおよびAChは同じチャンネルを開くするが、導かれる開口状態は両者で異なる、と推察された。ATPはAChとともに交感神経節の興奮性伝達を担うと考えられている。よって、今回の報告は、神経伝達において二種類の伝達物質がシナプス後膜で同じイオン・チャンネルを開くという、新しいタイプの相互作用を概念として提示するものであるといえる。

**Keywords:** ATP-activated channels, sympathetic neurons, nicotinic receptor-channels

**Shibutani, M., Mitsumori, K., Okeda, R.\*<sup>1</sup>, Imazawa\*<sup>2</sup>, T., Maekawa, A.\*<sup>3</sup>, Hatanaka, H.\*<sup>4</sup>, Takahashi, M., Inoue, K. and Hayashi, Y.: Evidence for an origin of ethyl-nitrosourea-induced rat central nervous system tumors from pluripotent germinal neuroepithelium.**

*Acta Neuropathol.*, 87, 293~301 (1994)

F344ラットにethyl-nitrosourea (ENU)を経胎盤投与し脳内に発ガンさせることを免疫組織学的に検討した。その結果、いわゆるENU誘発グリオーマはpluripotent germinal neuroepitheliumに由来することを証明した。

**Keywords:** ethyl-nitrosourea, transplacental administration, central nervous system tumors

\*<sup>1</sup> 東京医科歯科大学

\*<sup>2</sup> 東京農工大学

\*<sup>3</sup> 佐々木癌研究所

\*<sup>4</sup> 大阪大学

**Taguchi, T.\*<sup>1</sup>, Miyake, K.\*<sup>2</sup>, Okada, N.\*<sup>3</sup>, Fujimori, K. and Takeo, S.\*<sup>4</sup>: Sustained change in acetylcholine and amino acid contents of brain regions following microsphere embolism in rats**

*Japan. J. Pharmacol.*, 62, 269~278 (1993)

48  $\mu$ mのマイクロスフェアを右側内頸動脈を介して注入することにより作製した持続性片側脳塞栓ラットについて、両側脳皮質、線状体、海馬の3部位の神経伝達物質レベルの変化と梗塞の進行度を経時的に検討した。塞栓3日後からtriphenyltetrazolium染色の著明な低下(梗塞マーカー)が右側脳のみには起き、その後も持続した。アセチルコリンは1日後から有意かつ著明に低下し、3日目に最大となり、その後回復は見られるものの、有意な低下は持続した。一方、グルタミン酸、GABA、アスパラギン酸、タウリンは1日後から有意に低下し、5日前後で最大となったが、その後はほぼ正常レベルに回復した。塞栓ラットの左側脳では、擬手術左右脳に比較すると有意な低下が認められるが、右脳に比べるとかなり影響は小さかった。このマイクロスフェア塞栓モデルは長期の脳虚血や脳梗塞時の研究に有用となるものと思われる。

**Keywords:** microsphere-embolism, brain infarction, neurotransmitter

\* 東京薬科大学

**Guo, X., Ohno, Y., Miyajima, A., Sunouti, M. and Takanaka, A.: Oxysterols inhibit gap junctional communication between rat hepatocytes in primary culture**

*Pharmacol. Toxicol.*, 73, 10~13 (1993)

さまざまな生理作用を有するコレステロール類のギャップジャンクションを介した細胞間連絡に対する作用を初代培養肝細胞を用いて検討し、血中に存在する程度の酸化コレステロールが、それを抑制することを示した。また、酸化コレステロール類の持



つコレステロール合成阻害作用によるものではないことを示した。

**Keywords:** primary cultured hepatocytes, gap junctional communication, oxysterol

**Guo, X., Ohno, Y. and Takanaka, A.: Inhibition of hepatocyte gap junctional communication by 25-hydroxycholesterol may be mediated through free radicals**

*Eur. J. Pharmacol.*, 248, 337~340 (1993)

初代培養肝細胞におけるギャップジャンクションを介した細胞間連絡は 25-hydroxycholesterol により抑制されるが、これは薬物代謝酵素阻害剤であるメチラボンや各種の酸化防止剤、ラジカルスカベンジャー、SOD 等で抑制されることから、チトクローム P-450 系の関係する代謝経路に関わる活性酸素ラジカル生成によるものであると結論した。

**Keywords:** primary cultured hepatocytes, gap junctional communication, oxysterol

**今泉 光\*, 永松国助\*, 長谷川明\*, 大野泰雄, 高仲 正: 有機リン系殺虫剤由来の酸性リン酸エステル類のラットにおける代謝と毒性**

*衛生化学*, 39, 566~571 (1993)

有機リン系農薬の分解・代謝物である有機リン系エステル類の吸収・分布・代謝・排泄について検討した。経口投与したジエチルリン酸、ジイソプロピルリン酸、ジエチルチオリン酸およびチオリン酸は、ほとんどが無機リンおよび有機リンの形で尿中へ排泄された。また、有機リン酸の無機化には主として腎の ALP が関与していることが示唆された。さらに、ジエチルチオリン酸は農薬原体よりもアセチルコリンエステラーゼ阻害作用が強く、急性毒性も強かった。

**Keywords:** acid phosphate ester, acetylcholinesterase, organophosphorous insecticide

\* 日本大学薬学部

**Usami, M., Sakemi, K., Tabata, H., Kawashima, K. nad Takanaka, A.: Developmental toxicity of 2-chlorodibenzofuran in cultured post-implantation rat embryos**

*Toxic. in vitro*, 7, 259~264 (1993)

水道水中に検出された汚染物質である 2-クロロジベンゾフラン (2-MCDF) の毒性を、ラット全胚培養法を用いて調べた。比較のために 3-クロロジベンゾフラン (3-MCDF) およびジベンゾフラン (DF) についても調べた。妊娠 9 日目のラット胚を被験物質 (0, 30, 100, 300 および 1000  $\mu$ M) を添加した培養液で 48 時間培養した。その結果、代謝活性化の有無にかかわらず、2-MCDF は 1000  $\mu$ M で胚の発育を抑制し、形態異常を増加させた。主な形態異常は尾部神経孔開存および体腔内出血であった。同様な影響は 3-MCDF または DF を添加した場合にも認められた。しかし、*in vivo* において全胚培養の培養期間に相当する妊娠 9~10 日に、母体

毒性が認められる量の 2-MCDF を経口投与した場合には、胚および胎児の発育には変化は認められなかった。これらの結果から、2-MCDF には強い催奇形性はなく、水道水中の濃度ではヒトの胚に対する危険性はほとんどないと結論された。2-MCDF の胚毒性はジベンゾフラン骨格により、DNA 損傷および Ah レセプターに依存しない機序を介して発現すると考えられた。

**Keywords:** 3-chlorodibenzofuran, dibenzofuran, teratogenicity

**Usami, M., Sakemi, K., Tabata, H., Kawashima, K. nad Takanaka, A.: Effects of 2-chlorodibenzofuran on fetal development in mice**

*Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 51, 748~755 (1993)

水道水中に検出された汚染物質である 2-クロロジベンゾフラン (2-MCDF) の催奇形性を、マウスを用いて調べた。妊娠マウスに、妊娠 6~15 日の 10 日間毎日 1 回、ゴマ油に懸濁した 2-MCDF (0, 125, 250 および 500 mg/kg/day) を強制経口投与した。妊娠 18 日目に解剖して、妊娠動物および胎児に及ぼす影響を調べた。その結果、2-MCDF 投与により妊娠動物の肝臓重量および胎児の骨格変異発生率が増加したが、催奇形性は認められなかった。2-MCDF の胎児に対する無影響量は 250 mg/kg/day であり、また母動物に対する無影響量は 125 mg/kg/day であると推定された。これらの結果から、水道水中に検出された濃度では、2-MCDF のヒト胚に対する危険性は無いと結論された。

**Keywords:** dibenzofuran, teratogenicity

**Furukawa, F., Nishikawa, A., Imaida, K., Imazawa, T., Shinoda, K., Takahashi, M. and Hayashi, Y.: Temporal dissociation between cell proliferation and eosinophilic foci development in the exocrine pancreas of rats initiated with 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide and administered soybean trypsin inhibitor**

*Carcinogenesis*, 14, 607~610 (1993)

4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide (HAQO) 膵腺腫瘍誘発モデルを用いて、プロモーションの時期に soybean trypsin inhibitor (SBTI) を与えて、経時的に膵腺細胞の増殖活性と腫瘍発生との関係を検索した。細胞増殖活性は HAQO と SBTI 投与群および SBTI 投与群では、投与後 2 日目にそれぞれ 12 倍および 11 倍の上昇を示したが、30 日後には無処置対照群と同様の値に戻った。一方、腺房細胞腫瘍の前駆病変である好酸性巣は HAQO と SBTI 投与群において 60 日目にはじめて出現し、以後急激に増加した。この時の好酸性巣以外の腺房細胞の増殖活性は、無処置対照群値と差を認めなかった。以上の結果、細胞増殖活性のピークと腫瘍発生との間には明らかに時間的な解離があることが明らかとなった。

**Keywords** : rat pancreas, 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide, soybean trypsin inhibitor

Inui, K.\*, Mitsumori, K., Harada, T., and Maita, K.: **Quantitative analysis of neuronal damage induced by tri-ortho-cresyl phosphate in Wistar rats.**

*Fundam. Appl. Toxicol.*, 20, 111~119 (1993)

tri-ortho-cresyl phosphate (TOCP) を 1500 mg/kg 単回経口投与された雄性 Wistar ラットの頸部脊髄薄束 (FG) における神経線維変性を計測病理学的に検索した。FG 組織は投与後 1, 2 および 3 週後に検索した。神経線維の Waller 変性は 2 週目よりみられた。その病変は 3 週後が最も著明であり、神経線維数も減少した。電顕的には、軸索内小器官の蓄積による軸索腫脹が Ranvier の絞輪部近くに発現し、傍節性変性の誘発が示唆された。以上のように、ラットにおいても TOCP の投与により遅発性神経毒性が誘発されることが確認された。さらに、有機りん剤により誘発された遅発性神経毒性 (OPIDN) における軸索の萎縮や腫脹をコンピュータを用いた画像解析装置により定量的に評価した。Nauta 法で染色した凍結切片および樹脂包埋準薄切片についての形態計測法はラットにおける OPIDN の評価に非常に有益であることが証明された。

**Keywords** : morphometry, delayed neurotoxicity, tri-o-cresyl phosphate

\* 残留農薬研究所

Aze, Y., Toyoda, K., Furukawa, F., Mitsumori, K., and Takahashi, M.: **Enhancing effect of ethanol on esophageal tumor development in rats by initiation of diethylnitrosamine**

*Carcinogenesis*, 14, 37~40 (1993)

食道の発癌イニシエーション時期におけるエタノール同時投与の影響を調べる目的で、雄 F344 ラットを用いて、発癌イニシエーション処置として diethylnitrosamine (DEN) を 50 ppm (50 ppm DEN 群) あるいは 33 ppm (33 ppm DEN 群) で 8 週間飲水投与する群、50 ppm DEN と 10% エタノールを同期併用投与する群、また 10% エタノールのみ投与する群を設けた。いずれの群も 9 週目より通常飼育にもどし、104 週目に全生存動物を屠殺剖検した。その結果、DEN とエタノールを併用投与した群では食道の扁平上皮過形成、扁平上皮乳頭腫および扁平上皮癌の発生率が、いずれも他の 3 群に比べ有意に高かった (DEN とエタノール併用投与群、50 ppm DEN 群、33 ppm DEN 群、エタノール群の順: 扁平上皮過形成, 100%, 57.1%, 46.2%, 3.6%; 扁平上皮乳頭腫, 38.5%, 7.1%, 3.9%, 0%; 扁平上皮癌, 30.8%, 3.6%, 0%, 0%)。以上の結果より、エタノールは、DEN の発癌イニシエーション時期に同時投与することによって、ラットの食道発癌を促進することが明らかとなった。

**Keywords** : ethanol, esophageal tumorigenesis, rat

Foiles, P. G.\*<sup>1</sup>, Miglietta, L. M.\*<sup>1</sup>, Nishikawa, A., Kusmierek, J.T.\*<sup>2</sup>, Singer, B.\*<sup>2</sup> and F.-L. Chung\*<sup>1</sup>: **Development of monoclonal antibodies specific for 1, N<sup>2</sup>-ethenodeoxyguanosine and N<sup>2</sup>, 3-ethenodeoxyguanosine and their use for quantitation of adducts in G12 cells exposed to chloroacetaldehyde**

*Carcinogenesis*, 14, 113~116 (1993)

N<sup>2</sup>, 3-ethenodeoxyguanosine (N<sup>2</sup>, 3-edGuo) および 1, N<sup>2</sup>-ethenodeoxyguanosine (1, N<sup>2</sup>-edGuo) に対する特異抗体を開発した。Competitive ELISA による 50% 結合抑制は、N<sup>2</sup>, 3-edGuo に対する特異抗体 (ETH1) および 1, N<sup>2</sup>-edGuo に対する特異抗体 (ETH2) でそれぞれ 18 fmol および 11 pmol であった。これらの抗体を用いたイムノアッセイは、25 μg の single-strand DNA から 48 fmol の ETH 1 と 340 fmol の ETH 2 の検出を可能にした。今回開発したアッセイ法と以前に確立した 1, N<sup>6</sup>-ethenodeoxyadenosine (1, N<sup>6</sup>-edAdo) および 3, N<sup>4</sup>-ethenodeoxycytidine (3, N<sup>4</sup>-edCyd) に対するイムノアッセイ法により、chloroacetaldehyde に曝露された G12 細胞の DNA における etheno 型付加体の生成レベルを測定したところ、最も豊富な付加体は 1, N<sup>6</sup>-edAdo であり、次いで 3, N<sup>4</sup>-edCyd および N<sup>2</sup>, 3-edGuo の順であった。1, N<sup>2</sup>-edGuo は検出されなかった。

**Keywords** : monoclonal antibody, etheno adduct, chloroacetaldehyde

\*<sup>1</sup> American Health Foundation

\*<sup>2</sup> University of California at Berkeley

Toyoda, K., Imaida, K.\*<sup>1</sup>, Shirai, T.\*<sup>1</sup>, Imazawa, T., and Takahashi, M.: **Relationship between bisacodyl-induced urolithiasis and rat urinary bladder tumorigenesis**

*J. Toxicol. Env. Health*, 39, 59~78 (1993)

緩下剤の一種であるピサコジルを雄の F344 ラットに混餌投与し、膀胱結石形成と移行上皮癌を含む膀胱粘膜の増殖性病変の発生を認めた。これらのピサコジル投与による膀胱結石形成と膀胱粘膜の増殖性病変の発生との関連性、およびそれらの性差を検索する目的で、雌雄の F344 ラットにピサコジルを 0.3%, 0.1%, 0.03%, 0% の割合で 32 週間混餌投与した。その結果、膀胱の結石形成と増殖性病変の発生は雄の 0.3% 群のみに認められ、雄のその他の群と雌では全くみられなかった。これらの膀胱粘膜の増殖性病変と細胞増殖活性の指標である bromodeoxyuridine (BrdU) の取込み率の増加は、いずれも膀胱結石を有する動物のみに認められた。また、増殖性病変の程度は形成された膀胱結石の量 (重量) に相関しており、病変の発生は膀胱頂部に顕著にみられた。以上の結果は、いずれも膀胱粘膜の増殖性病変が結石の物理的刺激によって誘発された病変であることを示唆しており、今回のピサコジル投与による膀胱粘膜の増殖性病変の発生は結石形成による二次的な変化であると考えられた。

**Keywords** : bisacodyl, urolithiasis, rat

\*<sup>1</sup> 名古屋大医学部

Nishikawa, A., Furukawa, F., Imazawa, T., Toyoda, K., Mitsui, M., Hasegawa, T. and Takahashi, M.: **Effects of hickory smoke condensate on gastric carcinogenesis in Wistar rats after treatment with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and sodium chloride** *Fd Chem. Toxic.*, **31**, 25~30 (1993)

N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) と食塩による腺胃発癌におけるヒッコリー薫液の修飾影響をウイスター系雄ラットを用いて検討した。イニシエーションの処置として、100ppmのMNNG溶液を飲水投与し、同時に5%のNaClを8週間にわたって混餌投与した。その後、1%ないし3%のヒッコリー薫液が32週間にわたって飲水投与された。全動物中、イニシエーション処置後に1%のヒッコリー薫液を投与したラットの2匹のみに腺癌が発生した。ヒッコリー薫液の摂取は胃底部および幽門部における異型の過形成ないし腺癌の発生をやや増加させる傾向を示したが、統計学的有意差はみられなかった。一方、ヒッコリー薫液の投与はラットの尿中および胃粘膜における脂質過酸化を有意に亢進させた。これらの成績から、ヒッコリー薫液はラットの二段階胃発癌モデルのプロモーションの時期に投与された場合、たとえあったとしてもその促進効果は非常に弱いものであることが示唆された。ただし、助イニシエーション活性の有無についてはさらに検討する必要がある。

**Keywords** : hickory smoke condensate, gastric carcinogenesis, MNNG

Ohgaki, H.\*<sup>1</sup>, Furukawa, F., Takahashi, M. and Kleihues, P.\*<sup>2</sup>: **K-ras mutations are frequent in pulmonary squamous cell carcinoma but not in adenocarcinomas of WBN/Kob rats induced by N-nitrosobis (2-oxopropyl) amine** *Carcinogenesis*, **14**, 1471~1473 (1993)

WBN/KobラットにN-nitrosobis(2-oxopropyl) amineを投与して発生した肺腫瘍のK-ras点突然変異をパラフィン包埋標本から検索した。K-ras遺伝子のコドン12の第2番目がG→Aに変換した担癌動物が24匹中6例(25%)に認められ、これらの腫瘍を病理組織学的に扁平上皮癌と腺癌に大別すると、扁平上皮癌では7匹中5例(71%)であるのに対し、腺癌では17匹中1例(6%)のみに認められた。これらの腫瘍は組織学的に明らかに異なる二つのタイプであり、腫瘍の様式に関しても異なる可能性が示唆された。

**Keywords** : K-ras mutations, pulmonary squamous cell carcinoma, WBN/Kob rats

\*<sup>1</sup> University of Zurich

Takahashi, M., Toyoda, K., Aze, Y., Furuta, K., Mitsumori, K., and Hayashi, Y.: **The rat uri-**

**nary bladder as a new target of heterocyclic amine carcinogenicity: tumor induction by 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole acetate**

*Jpn. J. Cancer Res.*, **84**, 852~858 (1993)

トリプトファンの加熱分解生成物の一つである3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole acetate (Trp-P-2)の発癌性を検索する目的で、雌雄のF344ラットにTrp-P-2を100 ppm, 30 ppm, 0 ppmの用量で112週間混餌投与した。その結果、100 ppm群では、雄の肝細胞腺腫、膀胱の移行上皮乳頭腫、乳腺の線維腺腫および線維腫と、雌の乳腺の線維腺腫および線維腫、悪性リンパ腫、陰核腺の腺腫の発生率が0 ppm群に比べ有意に高かった。以上の結果より、Trp-P-2がラットの肝臓、膀胱、乳腺、造血系組織、陰核腺と多くの臓器に対して発癌性を有することが明らかとなった。また、今回発癌性の認められた膀胱については他のheterocyclic amineも含めて現在までに発癌標的臓器としての報告はなく(経口投与時)、膀胱もheterocyclic amineの発癌標的となることが明らかとなった。

**Keywords** : Trp-P-2, Heterocyclic amine, carcinogenicity

Shibutani, M., Maekawa, A.\*<sup>1</sup>, Okeda, R.\*<sup>2</sup>, Mitsumori, K., Imazawa, T., Yosida, J., Onodera, H., and Hayashi, Y.: **An experimental model for anaplastic astrocytomas and glioblastomas using adult F344 rats and N-methyl-N-nitrosourea.**

*Acta Pathol. Japon.*, **43**, 464~474 (1993)

11週齢のF344およびACIラットに100ないし200 ppmのN-methyl-N-nitrosourea (MNU)を飲料水として42週間投与した。神経膠腫はいずれの群にも高率(82.5~92.5%)に誘発された。誘発された神経膠腫の多くは、ヒトで用いられている診断指標に当てはめられた場合、形態学的悪性度の最も強いものであった。肉眼的に認められた腫瘍の多くは異型星状神経膠腫と神経膠芽細胞腫であった。これらの腫瘍は免疫組織化学的にGFAPは陰性であったが、電顕的にはグリアフィラメントが腫瘍細胞内に観察された。F344ラットでは異型星状神経膠腫と神経膠芽細胞腫等の星状神経膠細胞腫が大部分をしめ、ACIラットでは稀突起膠細胞と星状膠細胞の混合型の神経膠芽細胞腫が殆どをしめた。以上の成績より、成獣のF344ラットへのMNUの投与により誘発される神経膠腫はヒトの神経膠腫の適切な実験モデルとなることが示された。

**Keywords** : astrocytoma, glioblastoma, MNU

\*<sup>1</sup> 佐々木研究所

\*<sup>2</sup> 東京医科歯科大学

Ogasawara, H., Mitsumori, K., Onodera, H., Imazawa, T., Shibutani, M., Takahashi, M., Ward, J.M.\*<sup>1</sup> and Maekawa A.\*<sup>2</sup>: **Spontaneous histiocytic sarcoma with possible origin from**

### the bone marrow and lymph node in Donryu and F-344 rats.

*Toxicol. Pathol.*, 21, 63~70 (1993)

5つの癌原性試験の対照群として用いられ、120週まで無処置のまま飼育されたDonryuラット(雄95, 雌96匹)とF-344ラット(雄244, 雌245匹)に発生した組織球性肉腫を組織学的に観察した。組織球性肉腫は骨髄、肝、リンパ節、脾および肺にみられた。認められた16例の内、15例の骨髄に本病変がみられ、1例のF344ラットではリンパ節のみに認められた。15例(6例のF344ラットと5例のDonryuラット)中11例には肝に病変がみられ、4例のDonryuラットには肝に病変はなく、リンパ節ないし脾に病変が発見した。1例では、骨髄のみに病変がみられた。肝と骨髄に病変を有していた11例では、病変はリンパ節、脾や肺にも病変が発生し、これらの臓器における病変の程度は骨髄のそれ程重篤ではなかった。ラットの組織球性肉腫は肝、腹腔や皮下が発生母地であると考えられているが、今回の検索から、DonryuやF344ラットの組織球性肉腫は骨髄やリンパ節からも原発することが強く示された。

**Keywords**: histiocytic sarcoma, bone marrow origin, rat

\*<sup>1</sup> U.S. National Cancer Institute

\*<sup>2</sup> 佐々木研究所

### Ohata, H., Kawanishi, T., Kawanishi, M.\*, Uneyama, C., Takahashi, M. and Momose, K.\*: Spontaneous oscillation of cytoplasmic free calcium ion concentration in cultured smooth muscle cells from guinea pig ileum

*Jpn. J. Pharmacol.* 63, 83~91 (1993)

Explant法によって培養したモルモット回腸縦走筋細胞では、外からの刺激なしに細胞質遊離カルシウムイオン濃度が上昇下降を繰り返す自律的カルシウムオシレーション現象がみられた。その割合は細胞のバッチごとに異なるが、25~70%の細胞で観察された。このカルシウムオシレーションは細胞毎に異なったタイミングで起こり、細胞外のカルシウムイオンの存在に強く依存していた。しかしカルシウム拮抗薬では抑制されず、小胞体のカルシウムポンプ阻害剤であるタプシガルジンによって強く抑制された事等の実験結果より、オシレーションにおける一つ一つのカルシウムイオンの上昇は細胞内の貯蔵部位からのカルシウムイオンの遊離によって示唆された。

**Keywords**: smooth muscle, calcium oscillation, thapsigargin

\* 昭和薬学部

### Onodera, H., Matsushima, Y., Mitsumori, K. and Maekawa A.\*: Supplementary Study of Phenylbutazone Prompting Effects Using Wide Organ Spectrum Two-stage Carcinogenesis Models in Rats

*J. Toxicol. Pathology*, 6, 175~180 (1993)

Phenylbutazone(PB)は非ステロイド系の抗炎症剤で広く使われている。しかし、PBを投与した患者に白血病が発生したという報告があり、PBと白血病との関連について疑われている。我々は先にPBの癌原性試験を行ったが発癌性は認められなかった。同時に、N-ethyl-N-nitrosourea(ENU)あるいはN-propyl-N-nitrosourea(PNU)をイニシエーターとし、PBのプロモーション作用を検討した結果、腎と甲状腺に弱いプロモーター作用を認められた。しかし、実験期間が104週と長期であったため自然発生腫瘍が多発し明確なプロモーター作用を確認することはできなかった。また、最近PBは肝臓に対してもプロモーター作用があるという結果が報告されている。そこで今回、これらの結果を再確認するため、多臓器発癌物質であるN-methyl-N-nitrosourea(MNU)とENUをイニシエーターとして用い、PBを24週間投与する実験を行った。

その結果、MNUとPBを投与した群ではMNU単独群と比べ腎の前癌性病変と腫瘍の合計が有意に増加した。ENUとPBを投与した群ではENU単独群と比べ甲状腺の濾胞上皮過形成および腫瘍を合計したもので有意に増加した。同様の結果が肝臓と腎臓でも認められPBが甲状腺と腎臓、肝臓に対してプロモーター作用があることが再確認された。しかしながら、白血病に対するプロモーター作用は今回の実験でも認められなかった。

**Keywords**: phenylbutazone, promoting effect, two-stage carcinogenesis model

\* 佐々木研究所

### Kitaura, K., Mitsumori, K., Imazawa, T., Furukawa, F., Onodera, H., Yasuhara, K., and Takahashi, M.: Cell proliferation in spontaneous proliferative lesions of the rat adrenal medulla: PCNA and AgNORs analysis.

*J. Toxicol. Pathol.*, 6, 195~204 (1993)

細胞の増殖動態を反映することが知られている核小体形成体(AgNORs)数の計測および増殖細胞核抗原(PCNA)の存在を証明する免疫組織化学的検索法を用いて、F344ラットに自然発生した副腎髄質の増殖性病変における細胞増殖活性を検索した。病変は、髄質過形成、高分化型髄質腫瘍、異型髄質腫瘍および悪性髄質腫瘍に分類し、正常髄質組織と比較検討した。PCNA陽性細胞数は、正常髄質細胞に比してすべての増殖性病変で有意に増加し、過形成から悪性腫瘍にわたり、組織学的異型度に相関した段階的な増加傾向を示した。細胞核当たりの平均AgNORs数も、PCNA標識率に一致した有意な段階的増加を示した。細胞増殖動態の解析から、異型髄質腫瘍は高分化型腫瘍と悪性腫瘍との中間的性格を有することが明らかとなった。以上のことから、異型性髄質腫瘍は転移や浸潤性増殖はみられなかったが、悪性腫瘍と分化型腫瘍の中間的性格を有することが示された。異型性髄質腫瘍の生物学的特徴を明らかにするにはさらに検討が必要であるが、癌

原性試験の組織学的検査においては、分化型髄質腫瘍と異型性髄質腫瘍を区別すべきであると考えられた。

**Keywords** : PCNA, AgNOR, adrenal medullary tumor

Chung, F.-L.\*<sup>1</sup>, Chen, H.-J.\*<sup>1</sup>, Guttenplan, J.B.\*<sup>2</sup> and Nishikawa, A. and Hard, G. C.\*<sup>1</sup>: 2,3-Epoxy-4-hydroxynonal as a potential tumor-initiating agent of lipid peroxidation *Carcinogenesis*, 14, 2073~2077 (1993)

脂質過酸化生成物である *trans*-4-hydroxy-2-nonenal (HNE) およびそのエポキシド 2,3-epoxy-4-hydroxynonal (EH) の腫瘍イニシエーターとしての活性について検索した。サルモネラ TA100 および TA104 による変異原性試験では、EH はいずれにも陽性所見を示したが、HNE はいずれも陰性であった。両物質を CD-1 マウスの皮膚に塗布し、その後に腫瘍プロモーターである TPA を反復塗布したところ、EH は用量に相関した有意な皮膚乳頭腫の発生増加を示した。HNE も皮膚腫瘍の発生を増加させる傾向を示したが、有意な変化ではなかった。また、両物質を新生仔 CD-1 マウスに腹腔内単回投与し、42 週後の時点で比較したところ、統計学的有意差はなかったが、EH および HNE はともに肝腫瘍を誘発した。さらに、EH は異型の尿細管の過形成を随伴する著明な慢性腎症を発現した。以上の成績から、EH は脂質過酸化に関連する腫瘍の発生に関与する可能性が示唆された。

**Keywords** : 2,3-epoxy-4-hydroxynonal, tumor-initiation, lipid peroxidation

\*<sup>1</sup> American Health Foundation

\*<sup>2</sup> New York University

Mitsui, M., Furukawa, F., Sato, M., Enami, T., Imazawa, T., Nishikawa, A. and Takahashi, M.: *Carcinogenicity study of 1,1-bis(tert-butylperoxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane in B6C3F<sub>1</sub> mice*

*Fd. Chem. Toxic.*, 31, 929~933 (1993)

ゴムの製造などにおいて工業的に広く使用されているフリーラジカル触媒である 1,1-bis(tert-butylperoxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane (BBTC) について、B6C3F<sub>1</sub> マウスを用いて癌原性の有無を検索した。投与は混餌投与とし、13 週間の予備試験において 1% 以上の BBTC 混餌飼料により体重増加抑制および肝細胞の腫脹が認められたことから、本試験における投与濃度は 0, 0.25, 0.5% とし、78 週間投与した。4 週間の回復期間を経た後、屠殺・剖検し、病理組織学的に検索した。対照群を含む全群で腫瘍の発生が認められたが、生存率および平均生存期間に群間による差は認められず、腫瘍の発生率および担腫瘍動物数についても BBTC 投与による増加は認められなかった。また、発生した腫瘍はすべて本系統マウスにおける自然発生腫瘍であり、特異な腫瘍の発生は見られなかった。以上の結

果から BBTC は本試験条件においては B6C3F<sub>1</sub> マウスに癌原性を示さないことが明らかとなった。

**Keywords** : carcinogenicity study, 1,1-bis(tert-butylperoxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane, B6C3F<sub>1</sub> mice

Uneyama, C., Uneyama, H.\*, and Akaike, N.\*: *Cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> oscillation in rat megakaryocytes evoked by a novel type of purinoceptor*

*J. Physiol.* 470, 731~749 (1993)

ラット骨髄巨核球において、ATP 刺激によって生じる K<sup>+</sup> 電流オシレーション現象を、ニスタチンを用いたホールセルパッチクランプ法によって見いだした。この電流は Ca<sup>2+</sup> 依存性 K<sup>+</sup> チャネル阻害剤のキニーネによって阻害され、Ca<sup>2+</sup> キレート剤である BAPTA や fura-2 によって阻害されることから、細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度を反映して開閉する Ca<sup>2+</sup> 依存性 K<sup>+</sup> チャネルを通る電流と考えられる。したがって、このオシレーションは ATP 受容体を介する受容体作動性カルシウムオシレーションの一例であるといえる。この K<sup>+</sup> 電流のオシレーションは ADP 刺激によっても見られたが、ADP の方が ATP より低い濃度で作用した。その他種々のプリン受容体アゴニストを用いて反応強度を調べたところ、巨核球のプリン受容体がこれまで報告されているプリン受容体サブタイプと異なる新しいものであることが明らかとなった。

**Keywords** : ATP, calcium oscillation, megakaryocyte

\* 東北大学医学部

Nagaoka, T.\*<sup>1</sup>, Takeuchi, M.\*<sup>1</sup>, Onodera, H., Mitsumori, K., JIN LU\*<sup>2</sup> and Maekawa, A.\*<sup>2</sup>: *Experimental Induction of Uterine Adenocarcinoma in Rats by Estrogen and N-Methyl-N-nitrosourea*

*in vivo* 7, 525~530 (1993)

ヒトにおける子宮内膜腺癌の動物モデルを作成する試みが多くなされているが、高頻度に子宮腺癌を誘発させた報告は少ない。特に、ラットでの誘発は困難であるとされている。また、Donryu 系ラットは自然発生子宮腫瘍で腺癌が高率に発生することが知られている。今回、Estradiol dipropionate (ED) と N-methyl-N-nitrosourea (MNU) を投与し子宮腺癌の誘発を子宮腺癌好発系の Donryu ラットと嫌発系である F344 ラットを用いて試みた。投与方法は 3 ヶ月齢のラットに ED を 100 µg/kg を週 1 回、4 週間皮下投与した。その後、MNU を 20 mg/kg を同様に週 1 回、4 週間腹腔内に投与した。動物は 15 ヶ月齢まで飼育し実験を終了した。性周期は Donryu の ED を投与した群では早期より発情期が高率に持続し、ED+MNU 群ではそれが終期において低下した。対照群では経過期間とともに恒常的発情の発生が増加する傾向を示した。それに対し F344 ラットでは ED 投与終了後一過性に発情期になった

ものの急速に対照群との差はなくなった。Donryu ラットの ED+MNU 群は子宮以外の腫瘍が多発したが、最終屠殺時での子宮内膜腺癌は発生率は 40%であった。F344 ラットでは子宮腺癌の発生は一例もなく、子宮腺癌の発生には発情周期がプロモーター作用として重要であることが示された。今後、発癌物質の用量を検討する必要があるが、Donryu ラットでの ED+MNU 投与は子宮内膜腺癌のモデルとして有用であることが確認された。

**Keywords:** uterine tumor, estrogen, methylnitrosourea

\*1 吉富製薬中央研究所

\*2 佐々木研究所

Uneyama, C., Uneyama, H.\*, Takahashi, M. and Akaike, N.\*: **Cytoplasmic pH regulates ATP-dependent K<sup>+</sup>-current oscillation in rat megakaryocytes**

*Biochem. J.*, **295**, 317~320 (1993)

ラット巨核球においてホールセルバッチクランプ法によって見いだされた ATP 刺激により誘発される Ca<sup>2+</sup> オシレーションへの、細胞質 pH の変化の影響を調べた。20 mM の塩化アンモニウムによって細胞内をアルカリ化するとオシレーションは抑制され、20 mM の酢酸ナトリウムによって酸性化するとオシレーションは促進された。Inositol 1, 4, 5-triphosphate によって生じるオシレーションは塩化アンモニウムによって抑制された。このオシレーションは酢酸ナトリウムによって影響をうけなかったが、guanosine 5'-[γ-thio]triphosphate によるオシレーションは抑制された。以上の結果から、ATP 刺激による反応は、pH の変化によって少なくとも 2 箇所以上で影響をうけることが示唆された。

**Keywords:** megakaryocyte, calcium oscillation, pH

\* 東北大学医学部

鈴木孝昌: **薬物の複合投与と効果の考え方—マウス小核試験における理論と実際**

*Bull. Jpn. Soc. Biopharm. Statics*, **38**, 33~41 (1993)

我々を取り巻く環境中には数多くの科学物質が存在しており、実際にはこれら複数の物質に同時に暴露されている。これら環境中の化学物質の安全性を評価する場合、より正しい評価を下すためには複数の物質に同時に暴露されたときの複合効果についても解析を行うことが重要である。そのための基礎的検討として、マウス小核試験を用いて、2種の薬物の同時処理による効果について調べた。アルキル化剤どうし、または紡錘体阻害剤どうしの組み合わせによる小核誘発性に見かけ上相乗効果が得られたが、それぞれ単独の効果を基に片方の薬物の投与量として変換を行うモデルにより、これらは相加効果として予測できることを示した。

**Keywords:** combined effect, micronucleus test, synergism

Honma, M., Mitani, K.\*<sup>1</sup>, Mizusawa, H., Hayaishi, M., Sofuni, T., Muramatsu, M.\*, Ryo Kominami, R.\*<sup>1</sup>: **A new VNTR polymorphism at locus D1S340**

*Human Molecular Genetics*, **2**, 1329 (1993)

ヒト遺伝子ライブラリーより VNTR 型の多型性マーカー ChdTC-5 をクローニングした。このマーカーは日本人集団で 57% のヘテロ接合性を示した。また遺伝子は 1 番染色体上にマップされた。

**Keywords:** VNTR, human genetics, gene mapping

\*1 新潟大学医学部生化学

\*2 埼玉医科大学大学生化学

Honma, M., Mitani, K.\*<sup>1</sup>, Mizusawa, H., Sofuni, T., Muramatsu, M.\*<sup>2</sup>, Ryo Kominami, R.\*<sup>1</sup>: **A new VNTR type RFLP probe (ChdTC-15) on chromosome 12 (D12S65)**

*Human Molecular Genetics*, **1**, 555 (1992)

ヒト遺伝子ライブラリーより VNTR 型の多型性マーカー ChdTC-15 をクローニングした。このマーカーは日本人集団で 91% のヘテロ接合性を示した。また遺伝子は 12 番染色体上にマップされた。

**Keywords:** VNTR, human genetics, gene mapping

\*1 新潟大学医学部生化学

\*2 埼玉医科大学大学生化学

Honma, M., Mitani, K.\*<sup>1</sup>, Mizusawa, H., Sofuni, T., Muramatsu, M.\*<sup>2</sup>, Kominami, R.\*<sup>1</sup>: **A new VNTR type RFLP probe (lambda TM-18) on chromosome 1 (D1S57)**

*Human Molecular Genetics*, **1**, 554 (1992)

ヒト遺伝子ライブラリーより VNTR 型の多型性マーカー lambda TM-18 をクローニングした。このマーカーは日本人集団で 75% のヘテロ接合性を示した。また遺伝子は 1 番染色体上にマップされた。

**Keywords:** VNTR, human genetics, gene mapping

\*1 新潟大学医学部生化学

\*2 埼玉医科大学大学生化学

Honma, M., Mitani, K.\*<sup>1</sup>, Mizusawa, H., Sofuni, T., Muramatsu, M.\*<sup>2</sup>, Kominami, R.\*<sup>3</sup>: **A new VNTR type RFLP probe (ChdTC-114) on chromosome 20p (D20S72)**

*Human Molecular Genetics*, **1**, 554 (1992)

ヒト遺伝子ライブラリーより VNTR 型の多型性マーカー ChdTC-114 をクローニングした。このマーカーは日本人集団で 68% のヘテロ接合性を示した。また遺伝子は 20 番染色体短腕上にマップされた。

**Keywords:** VNTR, human genetics, gene mapping

\*1 新潟大学医学部生化学

\*2 埼玉医科大学大学生化学

Honma, M., Mizusawa, H., Sasaki, K.\*<sup>1</sup>, Hayaishi, M., Ohno, T.\*<sup>2</sup>, Tanaka, N.\*<sup>1</sup> and Sofuni, T.: **Demonstration by DNA fingerprint analysis of genomic instability in mouse BALB3T3 cells during cell transformation**  
*Mutation Res.* **304**, 167~179 (1994)

新しい DNA fingerprint 法を用いて mous BALB 3T3 細胞が遺伝的に非常に不安定であることを証明し、このことが本細胞が非常にガン化しやすい原因となっていることを示唆した。また変異原物質であま MCA, UV はこのような遺伝的不安定性を誘発することが判明した。さらに発ガンプロモーターである TPA も遺伝的不安定性を高めることにより細胞のガン化を起しやすくする可能性が示唆された。

**Keywords**: DNA fingerprint, cell transformation, genetic instability

\*<sup>1</sup> 食品薬品安全センター

\*<sup>2</sup> 理化学研究所細胞バンク

Bai, L.\*<sup>1</sup>, Mihara, K.\*<sup>1</sup>, Kondo, Y.\*<sup>1</sup>, Honma, M. and Namba, M.\*<sup>2</sup>: **Immortalization of normal human fibroblasts by treatment with 4-nitroquinolinel-oxide**  
*International Journal of Cancer*, **53**, 451~456 (1993)

ヒト繊維芽細胞株 OUMS24 を 4NQO の連続処理により不死化することに成功した。本細胞 OUMS 24F は染色体構造が一定ではなく、*c-myc* の増幅がおこっていた。また、もとの細胞と比べ発現しているタンパクも異なっていた。これら細胞を比較することにより細胞不死化のメカニズムが解明できるかもしれない。

**Keywords**: human cells, immortalization, *c-myc*

\*<sup>1</sup> 岡山大学医学部細胞生物

Harasawa, R.\*<sup>1</sup>, Mizusawa, H., Nozawa, Y.\*<sup>2</sup>, Asada, K.\*<sup>2</sup>, and Kato, I.\*<sup>2</sup>: **Detection and tentative identification of dominant mycoplasma species in cell culture by restriction fragment lengths of the 16s-23s rRNA intergenic spacer regions.**

*Res. Microbiol.*, **144**, 489~493 (1993)

マイコプラズマ (*Mollicutes* 属) は広範囲に培養細胞に混入することが知られているが、汚染されても細胞の形態に変化をきたすことは少ないために汚染を見逃すことが多い。一方、マイコプラズマとウイルスは比較的類似性が高いため、汚染細胞からウイルスを分離するとウイルス分画にマイコプラズマが混入することとなる。最近ではこうした事例として、Human immuno deficiency virus (HIV) を培養ヒトリンパ球から分離する際に頻りに混入が見られることで大きな問題とされている。これは患者由来のリンパ球がマイコプラズマに汚染されていることに起因している。この場合の汚染マイコプラズマの種類は多くの場合 *M. Fermentans* である。そこ

で、ウイルスサンプル中のマイコプラズマ汚染を迅速に検出する目的で、PCR 法による検出を試みた。プライマー DNA は *M. fermentans* ゲノム DNA の塩基配列を検索し、16S-23S リボソーム RNA 遺伝子領域から他と相同性の無い部分を選び DNA シンセサイザーにより作成した。このプローブによりマイコプラズマは高感度に検出されたので、今後培養細胞に発生するマイコプラズマ汚染の検出を試みる予定である。

**Keywords**: mycoplasma contamination, cell culture, polymerase chain reaction

\*<sup>1</sup> 東京大学

\*<sup>2</sup> 宝酒造(株)

Harasawa, R.\*<sup>1</sup>, Hikiji, K.\*<sup>1</sup>, Tanabe, H., Takada, Y., and Mizusawa, H.: **Detection of adventitious pestivirus in cell cultures by polymerase chain reaction using nested-pair primers.**

*Tiss. Cult. Res. Commun.*, **12**, 215~220 (1993)

Pestivirus による培養細胞の汚染は頻りに発生していることが知られているが、JCRB 細胞バンクにおいては力量の不足から十分に検討することができなかった。そこで、検査体制を確立する事を目指し迅速な検出法の確立を試みた。ウイルスを検出するために、逆転写酵素を用いて RNA から DNA を合成し、これを標的にしてポリメラーゼチェーンリアクション (PCR) 法を行うことで高感度な検出法を確立した。プライマー DNA は主な *Pestivirus* 属のウイルスを検出することができるユニバーサルプライマーを使用した。この方法により JCRB 細胞バンクに保存されている CPA, CPAE, EBTr, HH, CKT-1, CRFK, Vero の各細胞株について調査したが、すべての細胞株からウイルスが検出された。検出されたものは牛嘔吐病ウイルスと考えられるが、病原性は無いものと思われる。しかし、すべての細胞株から検出されたことはこのウイルスが常時汚染していることを意味し、今後除去の方法について検討しなければならない。細胞培養には牛血清が利用されるので、汚染の主な原因は血清にあると考えられる。今後各メーカーの協力を得ることも必要になるであろう。

**Keywords**: polymerase chain reaction, viral contamination, cell cultures

\*<sup>1</sup> 東京大学

Takeuchi, M.\*<sup>1</sup>, Yoshida, T.\*<sup>1</sup>, Satoh, M.\*<sup>1</sup>, Kuno, H.\*<sup>1</sup>, Mizusawa, H., and Ohno, T.\*<sup>2</sup>: **Survey of mycoplasmal contamination in animal cell lines collected by three cell banks in Japan.**

*Bull JFCC*, **9**, 13~18 (1993)

国内の主要細胞バンク、醗酵研究所、JCRB 細胞バンク、理化学研究所細胞銀行、で保存されている培養細胞株についてマイコプラズマによる汚染の有無を検討した。検出法はマイコプラズマの直接培養

法, DNA 染色法, イミューノプロット法の3つの手法を用い, いずれか一つの方法で検出された場合に汚染ありと判定した。その結果, 1) 2,332種類の細胞のうち21%が汚染されていることが判明した。2) 汚染されていた細胞株のうち92株について汚染マイコプラズマの種類を同定を試みた結果, そのうち94%は *M. fermentans*, *M. hyorhinis*, *M. orale* and *M. hominis* のいずれかで汚染されていることが判明した。3) ほとんどの場合同一研究室で長期間維持されてきた培養細胞株は同種マイコプラズマで汚染されていた。4) 上記3機関では汚染細胞のうち134株について汚染の除去を試みてきたが, 80%について成功を納めた。

培養細胞にとってマイコプラズマによる汚染は様々な障害をもたらすとともに物質生産等に支障をきたす。今後とも資源化された培養細胞についての汚染検査は常時実施し, 汚染除去などを通じて汚染のないものを研究社会に提供する必要がある。

**Keywords:** mycoplasma contamination, cell bank, quality controls

\*1 醗酵研究所

\*2 理化学研究所

Yamada, M., Hakura, A.\*, Sofuni, T., and Nohmi, T.: **New Method for gene disruption in *Salmonella typhimurium* TA1535**

*J. Bacteriol.*, **175**, 5539~5547 (1993)

ネズミチフス菌における遺伝子破壊の方法を新しく開発した。この方法の重要なステップは制限酵素処理したDNA断片をライゲーションしてから, 電気穿孔法により細胞内に導入するところである。著者らはこの方法を用いてネズミチフス菌の *ada* 様遺伝子を染色体上でカナマイシン耐性遺伝子と置き換えた欠損株を作成した。できた株ではMNNGに対する致死感受性は高まったが突然変異誘発性は野生株と変わらなかった。

**Keywords:** *Salmonella typhimurium*, *ada*-like gene, gene disruption

\* エーザイ(株)安全性研究所

Kim, S.-R., Funayama, N\*1. and Komano, T\*2: **Nucleotide sequence and characterization of the *tra ABCD* region of IncII plasmid R64**

*J. Bacteriol.*, **175**, 5035~5042 (1993)

IncI 1プラスミド R64drd-11の接合伝達領域の内, 3.6-kbの *Bgl*II-*Sma*I領域の塩基配列を決定した。DNA塩基配列の解析から, この領域には *traA*, *traB*, *traC*, *traD*の4個の遺伝子の存在が示された。*traB*, *traC*, *traD* 遺伝子の発現はマキシセル法により, *traA* 遺伝子の発現は *traA-lacZ* 融合遺伝子の構築により確認した。各遺伝子へのフレームシフト突然変異の導入により, *traB*, *traC* 遺伝子が液内接合および表面接合に必須であることが示された。また, 両遺伝子はフェージIa, PR64FSのレセプターとしての細線毛の形成にも必要であることが示された。S1マッピングおよびブ

ライマー伸長法により, *traA* 遺伝子上流に大腸菌RNAポリメラーゼの $\sigma 70$ 因子に対するプロモーター配列を同定した。

**Keywords:** IncII, plasmid, conjugation

\*1 岡崎生理研

\*2 東京都立大学

Watanabe, M., Matsuoka, A., Yamazaki, N., Hayashi, M., Deguchi, T.\*, Nohmi, T. and Sofuni, T.: **New sublines of Chinese hamster CHL stably expressing human NAT1 or NAT2 N-acetyltransferases or *Salmonella typhimurium* O-acetyltransferase: comparison of the sensitivities to nitroarenes and aromatic amines using the *in vitro* micronucleus test.**

*Cancer Res.*, **54**, 1672~1677 (1994)

遺伝子導入法を用いてヒトのNAT1, NAT2 N-アセチル転移酵素, あるいは *S. typhimurium* のO-アセチル転移酵素を安定に発現するChinese hamster CHL細胞株を樹立した。これらの株のニトロアレーン, 芳香族アミンに対する感受性を比較したところ, ヒトのNAT2アセチル転移酵素を発現する細胞株は, 1,8-dinitropyrene, 2-nitrofluorene に対し最も高い感受性を示した。ヒトのNAT2アセチル転移酵素については遺伝的多型のあることが知られており, この結果はアセチル転移酵素に関する遺伝的多型が, ニトロアレーンに対するヒトの発癌感受性の決定に関与している可能性を示唆している。一方, ヘテロサイクリックアミン系の変異原であるIQに対しては, *S. typhimurium* のアセチル転移酵素を発現する株が最も高い感受性を示した。この結果は, ヒトの腸内細菌のアセチル転移酵素がIQの代謝活性化に関与している可能性を示唆している。今回樹立した細胞株は, ニトロアレーン, 芳香族アミンの①代謝活性化機構の研究や②ヒトに対する発癌リスクの推定に有用である。

**Keywords:** NAT2, O-acetyltransferase, polymorphism

\* 東京都神経科学研究所

Nohmi, T., Hakura, A., Nakai, Y., Watanabe, M., Yamada, M., Murayama, S. Y.\* and Sofuni, T.: **The two *umuDC*-like operons, *samAB* and *umuDC<sub>ST</sub>*, in *Salmonella typhimurium*: The *umuDC<sub>ST</sub>* operon may reduce UV-mutagenesis-promoting ability of the *samAB* operon.**

*Basic Life Sciences*, **61**, 247~255 (1993)

*Salmonella typhimurium* には2種類の *umuDC* 遺伝子, *umuDC<sub>ST</sub>* と *samAB* が存在し, *umuDC<sub>ST</sub>* が *S. typhimurium* の染色体上40分付近に存在するのに対し, *samAB* は60-MDa cryptic plasmid上に存在する。*umuDC<sub>ST</sub>* と *samAB* を同一のプラスミド上にサブクローニングしpYG8034を作製した。また *umuDC<sub>ST</sub>* だけをサブクローニングしたプラスミドpYG8031, *samAB* だけをサブクローニ



ングしたプラスミド pYG8032 も作製した。2つの遺伝子間の相互作用を調べるため、これらのプラスミドを *E. coli umuD44* 株, *E. coli umuCl22: Tn5* 株に導入し、その紫外線突然変異誘発能を比較した。pYG8032 (*samAB*) を導入した株は、pYG8031 (*umuDC<sub>ST</sub>*) を導入した株よりも高い紫外線突然変異誘発能を示した。興味あることに pYG8034 (*umuDC<sub>ST</sub> + samAB*) を導入した株は、pYG8031 (*umuDC<sub>ST</sub>*) を導入した株とほぼ同レベルの低い突然変異誘発能を示した。これらの結果は、*umuDC<sub>ST</sub>* が *samAB* に対し負の優性 (negative dominance) を示すことを示唆している。

**Keywords:** *umuDC<sub>ST</sub>*, *samAB*, UV mutability

\* 帝京大学医学部

Watanabe, M.\*, Nohmi, T. and Ohta, T.\*: **Effects of the *umuDC*, *mucAB*, and *samAB* operons on the mutational specificity of chemical mutagenesis in *Escherichia coli*: II. Base substitution mutagenesis.**

*Mutat. Res.*, **314**, 39~49 (1994)

*lacZ* 遺伝子に変異を持つ6種類の大腸菌株 (CC101, CC102, CC103, CC104, CC105, CC106) を用いて化学物質の突然変異スペクトラムを比較した。4-nitroquinoline 1-oxide は G:C→A:T, G:C→C:G, G:C→T:A 変異を誘発し、furylfuramide と mitomycin C はそれぞれ G:C→A:T, G:C→T:A 変異を特異的に誘発した。また *umuDC*, *mucAB*, *samAB* 遺伝子をコードしたプラスミドの導入効果について検討したところ、変異原の種類にかかわらず G:C→T:A 変異はプラスミドの導入により増強され、その増強の度合いの強さは *mucAB* > *umuDC* > *samAB* の順であった。*mucAB* は G:C→T:A 変異以外に A:T→C:G, A:T→T:A, G:C→A:T, G:C→C:G 変異も増強した。

**Keywords:** base analogue, *lacZ*, *mucAB*

\* 残留農薬研究所

Watanabe, M.\*, Nohmi, T. and Ohta, T.\*: **Effects of the *umuDC*, *mucAB*, and *samAB* operons on the mutational specificity of chemical mutagenesis in *Escherichia coli*: I. Frameshift mutagenesis.**

*Mutat. Res.*, **314**, 27~37 (1994)

*lacZ* 遺伝子に変異を持つ5種類の大腸菌株 (CC107, CC108, CC109, CC110, CC111) を用いて数種の化学物質の突然変異スペクトラムを比較した。また *umuDC*, *mucAB*, *samAB* 遺伝子をコードしたプラスミドの導入効果についても検討した。4-nitroquinoline 1-oxide, furylfuramide は -1G, -2 (CG), +1A 変異を誘発したが、このうち+1A 変異は *mucAB* プラスミドを導入することにより増大した。9-aminoacridine は +1G, -1G, -1A のフレームシフト変異を誘発し、ICR191 はすべてのタイプのフレームシフト変異を誘発した。ICR191 が誘発する

変異のうち+1A 変異は *mucAB* 遺伝子の導入により増大した。アデニン残基が連続する DNA 配列中で起こるフレームシフト変異は、グアニン残基が連続する部位で起こるフレームシフト変異に比べ、*mucAB* や *umuDC* により増大する傾向が見られた。

**Keywords:** frameshift mutation, *lacZ*, *mucAB*

\* 残留農薬研究所

Oda, Y.\*, Yamazaki, H.\*, Watanabe, M., Nohmi, T. and Shimada, T.\*: **Highly sensitive umu test system for the detection of mutagenic nitroarenes in *Salmonella typhimurium* NM3009 having high O-acetyltransferase and nitroreductase activity.**

*Environ. Mol. Mutagen.*, **21**, 357~364 (1993)

環境中に存在する微量のニトロアレーンの遺伝子損傷作用を高感度に検出するため、umu テスト用の新しい試験菌株 *S. typhimurium* NM3009 を作製した。この菌株の中にはアセチル転移酵素とニトロ還元酵素の遺伝子をサブクローニングしたプラスミド pNM13 と、*umuC'*-*'lacZ* 融合遺伝子を持つプラスミド pSK1002 が存在する。遺伝子損傷により誘導される *umuC* 遺伝子の発現は、細胞内の β-ガラクトシダーゼ活性を測定することによりモニタリングすることができる。17種類の芳香族ニトロ化合物について試験を行い、新たに作製した *S. typhimurium* NM3009 株の感受性をこれまで用いられてきた umu テスト用の標準株 *S. typhimurium* TA1535/pSK1002 株と比較した。その結果、NM3009 株は 1-nitropyrene, 1,8-dinitropyrene などの芳香族ニトロ化合物に対し極めて高い感受性を示すことが明らかになった。

**Keywords:** genotoxicity, umu test, *Salmonella typhimurium* NM3009

\* 大阪府立公衆衛生研究所

Hayashi, M., Maki-Paakkanen, J., Tanabe, H., Honma, M., Suzuki, T., Matsuoka, A., Mizusawa, H. and Sofuni, T.: **Isolation of micronuclei from mouse blood and fluorescence in situ hybridization with a mouse centromeric DNA probe.**

*Mutat. Res.*, **307**, 245~251 (1994)

小核は染色体の構造異常とともに数的な異常の結果として生成することが知られている。近年数的な異常である異数性が、ヒトの健康に対して重要な意味を持つ事例が報告され、関心を集めている。数的な異常にともなう小核は、染色体の断片ではなく全体が含まれていることが知られており、その結果としてセントロメアを含む。小核上でセントロメアを検出することにより、その小核が染色体の数的な異常に由来することが推定できる。マウスのセントロメアに特異的な塩基配列を持つ DNA を用いることにより、識別することが可能となった。ただし、小核の出現頻度は非常に低いので、精度の高いデータを得るためには工夫が必要である。我々は小核を末梢血より

分離濃縮することに成功し、多数の小核を短時間に解析することが可能となり、精度の高いデータを得ることが可能となった。

**Keywords** : isolation of micronuclei, fluorescence in situ hybridization, mouse centromeric DNA probe

Hagiwara, Y., Watanabe, M., Oda, Y.\*, Sofuni, T. and Nohmi, T.: **Specificity and sensitivity of *Salmonella typhimurium* YG1041 and YG1042 strains possessing elevated levels of both nitroreductase and acetyltransferase activity.** *Mutat. Res.*, **291**, 171~180 (1993)

アセチル転移酵素、ニトロ還元酵素はニトロアレン、芳香族アミンのサルモネラ菌体内における代謝活性化に関与している酵素である。アセチル転移酵素遺伝子とニトロ還元酵素遺伝子を持つプラスミド pYG233 を、*S. typhimurium* TA98, TA100 株に導入し、新しい変異原性試験用の菌株 *S. typhimurium* YG1041, YG1042 を作製した。YG1041, YG1042 は極めて高いアセチル転移酵素活性ならびにニトロ還元酵素活性を示し、2-nitrofluorene, 1-nitropyrene, p-nitrophenetole などの変異原性を示す芳香族ニトロ化合物に対し極めて高い感受性を示した。これらの菌株は、環境中に存在する芳香族ニトロ化合物の変異原性の高感度検出に有効である。

**Keywords** : nitroreductase, acetyltransferase, aromatic amines

\* 大阪府公衆衛生研究所

Matsuoka, A., J. D. Tucker\*, M. Hayashi, N. Yamazaki and T. Sofuni: **Chromosome painting analysis of X-ray-induced aderrations in human lymphocytes in vitro** *Mutagenesis*, **9**, 151~155 (1994)

X 線によってヒトリンパ球で誘発される染色体異常を、クロモソームペインティング法で解析した。解析にはヒトの1番、3番および4番染色体特異的 DNA プローブを用いた。4番染色体が関与した染色体異常(相互転座、二同動原体染色体、三同動原体染色体、挿入、染色体断片)をもつ細胞の頻度は、48時間および72時間培養で線量に依存して上昇した。今回得られた異常頻度は従来の分染法での結果とよく一致していた。クロモソームペインティング法は分染法に比べて、簡単で、客観的であり、より実際の染色体異常解析法といえる。

**Keywords** : human lymphocyte, chromosome painting method, chromosome aderration

\* Lawrence Livermore National Laboratory

岡田敏史, 小松裕明, 石橋無味雄, 寺尾允男: **赤外吸収スペクトル測定法への参照スペクトル測定法の応用 (II)**

医薬品研究, **25**, 295~299 (1994)

日本薬局方的一般試験法「赤外吸収スペクトル測定法」は、医薬品の確認のための優れた方法であり

ながら、対照となる標準品が供給できないなどの事情から、十分な活用が為されてこなかった。同定しようとする医薬品の赤外吸収スペクトルを参照スペクトル集の形であらかじめ用意しておき、これと対照することにより医薬品を確認する方法につき、ハードおよびソフト的な対応策を一般試験法として確立したので、その内容につき解説した。

**Keywords** : japanese pharmacopeia, infrared spectrophotometry, infrared reference spectra

四方田千佳子, 有菌知子, 岡田敏史: **ハロゲンイオンの定量試験における電位差滴定法への統一化について**

医薬品研究, **24**(6), 627~634 (1993)

日局 12 の医薬品各条においてハロゲンイオンの滴定による定量試験が多く品目で規定されているが、これらの滴定法は、指示薬による終点検出を容易にするために滴定液、溶媒添加物、終点検出法がそれぞれに工夫され多様化したものとなっている。ハロゲン化銀の生成による沈殿滴定の終点を電位差により検出可能であれば、滴定条件の統一および試験の自動化が可能と考えられる。そこで、日局収載品のうち、滴定液として硝酸銀を用いているものからヨード造影剤のイオパノ酸、イオタラム酸およびイオタラム酸メグルミン注射液を、滴定液にチオンアン酸アンモニウムを用いているものから被滴定液に有害薬のニトロベンゼンを添加するクロロブタノールおよび塩化ベタネコールを選び、電位差滴定法を適用して、現行の試験法と比較検討した。電位差滴定は、酢酸酸性下で 0.1 N 硝酸銀液、銀電極を用いる方法に統一した。検討した 5 種の医薬品の定量試験では、電位差滴定法の方が終点が明瞭で、定量値の標準偏差も現行の試験法よりも小さくなった。日局にハロゲンイオンの試験法が規定されている 35 品目の大部分で、この電位差滴定による統一試験法が適用可能と考えられた。

**Keywords** : halide ion, potentiometric titration, pharmacopeia

四方田千佳子, 宮崎玉樹, 岡田敏史: **キトサンとアルギン酸ナトリウムからなる直打錠の徐放化効果**

薬学雑誌, **114**, 257~263 (1994)

10%アルギン酸ナトリウムを添加したキトサンを賦形剤とする直打錠を調製し、錠剤からのテオフィリンの溶出試験を行ったところ、溶出試験液の pH にかかわらず溶出が遅延した。錠剤からの薬物の徐放化機構を、キトサンやアルギン酸ナトリウムの挙動により検討し、pH が低い場合には薬物の溶出はキトサンの溶解に律速され、中性付近ではアルギン酸ナトリウムの溶解に律速されることが明らかとなった。また、ビーグル犬に錠剤を経口投与することにより、*in vivo* においても徐放効果が裏づけられた。以上の結果より、アルギン酸ナトリウム添加キトサン直打錠は、pH 非依存性の徐放製剤としての可能性が示唆された。

**Keywords** : chitosan, alginate, compressed tablets

Miyajima, K.\*<sup>1</sup>, Komatsu, H., Sun, C.\*<sup>1</sup>, Aoki, H.\*<sup>1</sup>, Handa, T.\*<sup>1</sup>, Xu, H.\*<sup>2</sup>, Fuji, K.\*<sup>2</sup> and Okada, S.: **Effects of cholesterol on the miscibility of synthetic glucosamine diesters in lipid bilayers and the entrapment of superoxide dismutase into positively charged liposomes**

*Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 1889~1894 (1994)

レシチンからなるリポソーム膜にグルコサミンモノエステルをカチオン性脂質として混合することにより、リポソームの血中滞留性が增大することをすでに報告した。今回、このリポソームへのスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) の内封を目的として、種々の長さのアシル鎖を有するグルコサミンジエステル (Glc) を新規に合成し、Glcとレシチンからなる多重膜リポソームへのSODの取り込みに及ぼすコレステロール (Chol) の影響について検討した。Chol含量、またはGlc含量が多いほど、SODの保持率が增大した。調製したリポソーム膜中のGlc量を調べた結果、調製時のGlcがすべてリポソーム膜から回収できなかったが、Chol含量の増加とともに膜からのGlcの回収率が增大した。リポソーム膜の示差走査熱分析の結果、CholがGlcのリポソーム膜への溶解性を高めることを示唆した。すなわち、Cholの増加は、正電荷を持つGlcの増加(膜の正電荷量の増加)を導き、負電荷を有するSODと膜との静電的引力の増強、およびリポソーム膜層間の静電的反発による多重膜リポソーム内の水層の厚みの増加をもたらすことにより、SOD保持率の増大を導いたと考えられた。

**Keywords** : superoxide dismutase, liposome, glucosamine

\*<sup>1</sup> 京都大学薬学部

\*<sup>2</sup> 京都大学化学研究所

Komatsu, H., Takahata, T.\*<sup>1</sup>, Tanaka, M.\*<sup>2</sup>, Ishimitsu, S. and Okada, S.: **Determination of the molecular-weight distribution of low-molecular-weight heparins using high-performance gel permeation chromatography**

*Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 1189~1193 (1993)

ヘパリンは血栓塞栓症の治療や血液透析および術後の血栓予防に使用されているが、低分子化することにより、副作用である出血作用が軽減されることから、多くの企業が低分子化ヘパリン (LMWH) の開発を進めている。しかし、低分子化法に依存した様々な分子量プロファイルを持つLMWHが製造されている。したがって、これらの製品化にあたっては分子量規格を設定する必要があることから、その評価法を確立することが現在望まれている。すでに、著者らは高速ゲルろ過クロマトグラフィー (HPGPC) を用い、LMWHの平均分子量の測定を試み、報告値との比較を行った。しかし、報告値

は各社独自の測定法や分子量標準物質に基づいたものであり、測定値の統一的な評価が困難であった。そこで、英国生物学的標準品研究所 (NIBSC) より配布が開始されたLMWH分子量標準物質を用いてHPGPCによる市販されている8社のLMWH製品の平均分子量および分子量分布を測定した。分子量分布幅は様々であったが、単一分散と見なされた。また、数加重平均分子量は3500~5000と様々であった。種々の分子量パラメータの測定を行い、比較を行った。

**Keywords** : heparin, gel permeation chromatography, molecular weight

\*<sup>1</sup> 大阪薬科大学

\*<sup>2</sup> 九州大学薬学部

Komatsu, H., Guy, P. T.\*<sup>1</sup>, and Rowe, E. S.\*<sup>2</sup>: **Effect of unilamellar vesicle size on ethanol-induced interdigitation in palmitoylphosphatidylcholine**

*Chem. Phys. Lipids*, **65**, 11~21 (1993)

レシチン膜の指組み相 (向かい合った脂質のアシル鎖が互いに噛み合った相,  $L_{\beta} I$ ) 形成の簡便な検出法として、アシル鎖の先端にビレン基を有した蛍光リン脂質 (PyrPC) を用いる方法をすでに報告したが、今回は、エタノールによる  $L_{\beta} I$  形成に及ぼす一枚膜リポソームの粒径の影響を検討した。粒径20~400 nmのさまざまな大きさのジパルミトイルレシチン (DPPC) からなる一枚膜リポソーム (DPPC/PyrPC=100/1 モル比) を超音波照射法およびエクストルージョン法により調製した。ビレン基の蛍光の振動バンドの強度比を、極性の知られている溶媒中と膜中で比較することにより、膜中のビレン基のまわりの極性を評価し、膜中のビレン基の位置を推定し、 $L_{\beta} I$  形成を決定した。25°Cにおいて、リポソームの粒径が大きくなるほど低濃度のエタノールで  $L_{\beta} I$  が誘起されることがわかった。二分子膜の相対するアシル鎖領域に空隙が形成されたときのみ  $L_{\beta} I$  が形成されることを考えると、曲率の大きいリポソーム膜ほど外膜のアシル鎖領域は密であり、たとえエタノールがレシチン分子間を押し広げたとしても、 $L_{\beta} I$  を形成するほどアシル鎖領域に空隙が形成されないためだと考えられた。

**Keywords** : ethanol, interdigitation, liposome

\*<sup>1</sup> University of Kansas Medical Center and the Veterans Administration Medical Center, Kansas City, U.S.A.

Komatsu, H., Yoshii, K., Ishimitsu, S., Okada, S. and Takahata, T.\*<sup>1</sup>: **Molecular mass determination of low-molecular-mass heparin: Application of wide collection angle measurements of light scattering using a high-performance gel permeation chromatographic system equipped with a low-angle laser light-scattering photometer**

*J. Chromatogr.* **644**, 17~27 (1993)

低分子化ヘパリン (LMWH) は、出血作用の軽減された血栓塞栓症の治療薬であり、低分子化法に依存した種々の分子量プロファイル (平均分子量: 3,000~7,000) を持つ LMWH が開発されている。しかし、ヘパリンの抗凝血活性が分子量に依存することから、LMWH の分子量評価法の確立が望まれている。著者らは、すでに、高速ゲルろ過クロマトグラフィー (HPGFC) を用いる方法について報告したが、今回は、HPGFC を併用した低角度レーザー光散乱法について検討した。分子量既知の分画ヘパリンを用いて装置定数の分子量依存性を調べた結果、分子量 10,000 以下においてばらつきが見られた。原理的に、装置定数は分子量依存性を示さないことから、小さい分子量の物質ほど光散乱強度が小さく、信号雑音比の低下が原因と考えられ、このことが、分子量の小さな試料への適用を難しくしていると思われた。分画ヘパリンの分子量の測定値と報告値を比較した結果、分子量をわずかに大きく評価するものの、散乱光の測定角などを改良すれば、分子量 10,000 以下の試料にも適用できることが示唆された。

**Keywords:** heparin, light scattering, gel permeation chromatography

\* 大阪薬科大学

Murai-Kushiya, M., Okada, S., Kimura, T., Hasegawa, R.: **Effects of turpentine oil pretreatment on  $\beta$ -blocker pharmacokinetic parameters in rats**

*J. Pharm. Pharmacol.*, **45**, 836~838 (1993)

無処置、およびテルペン油 (0.2 ml/kg, s.c.) で前処置して血中  $\alpha_1$ -acid glycoprotein (AAG) を増加させたラットに、ラセミ体  $\beta$ -ブロッカーを投与 (5 mg/ml, iv) し、(+)-体および(-)-体の pharmacokinetic parameter を求めた。無処置の場合、(+)-プロプラノロールの見かけの分布容積および血漿中濃度下面積 (AUC) は (-)-体のそれぞれ 1/4 倍、2 倍であり、テルペン油処置によりその差は増大した。オクスプレノロールについては無処置の場合、異性体間で差はほとんど認められなかった。テルペン油処置後は (+)-、(-)-体ともに分布容積の減少、AUC の増加が認められたが、やはり異性体間での差は小さかった。アセプトロールでは異性体間で全く差は認められず、テルペン油処置による影響も全く受けなかった。これらの結果は、先に報告した *in vitro* における各薬物の精製 AAG に対する結合の立体特異性、すなわち、プロプラノロールは (+)-体の方が (-)-体より高い結合率を示すが、オクスプレノロールの結合率には異性体間で差はなく、またアセプトロールは AAG に全く結合しないという性質をよく反映していると考えられた。

**Keywords:**  $\beta$ -blockers, pharmacokinetic parameters, stereoselectivity

辻 澄子, 高坂雅子<sup>\*1</sup>, 森田幸博<sup>\*2</sup>, 柴田 正, 兼田 登<sup>\*3</sup>, 若林和子<sup>\*3</sup>, 内堀(長谷)幸子<sup>\*3</sup>, 井

出重明<sup>\*4</sup>, 藤原一也<sup>\*4</sup>, 鈴木 宏<sup>\*4</sup>, 伊藤誉志男: **生鮮食品および加工食品中の天然由来の硝酸根および亜硝酸根の含有量**

食衛誌, **34**, 294~302 (1993)

農産物、水産物、畜産物およびそれらの加工食品合計 199 種類 (774 検体) の硝酸根 ( $\text{NO}_3^-$ ) 測定用、亜硝酸根 ( $\text{NO}_2^-$ ) 測定用の試験溶液を同時に調製し、 $\text{NO}_3^-$  はイオンクロマトグラフィーにより、 $\text{NO}_2^-$  は比色法により測定した。その結果、(1)  $\text{NO}_3^-$  の天然由来の含有量は全般的に見て、加工食品より生鮮食品が多い傾向を示した。生鮮食品では野菜類に多く、中でも特に葉菜類に多く、1,000 mg/kg 以上のものが多く認められた。加工食品では海草加工食品中のりが最も多く、約 3,000 mg/kg 含有されていた。(2) 生鮮食品の  $\text{NO}_2^-$  の含有量はいずれも 10 mg/kg 以下であり、 $\text{NO}_3^-$  含有量の高い緑黄色野菜の  $\text{NO}_2^-$  の含有量は 5~10 mg/kg の範囲であった。加工食品では漬物類が 10 mg/kg 以上の高い含有量を示した。

**Keywords:** nitrite, nitrate, food

<sup>\*1</sup> (元)大阪薬科大学

<sup>\*2</sup> 神戸農林水産消費技術センター大阪支所

<sup>\*3</sup> 生活協同組合コープこうべ商品検査センター

<sup>\*4</sup> 日本生活協同組合連合会商品検査センター

辻 澄子, 藤原香里<sup>\*1</sup>, 柿内 雅<sup>\*2</sup>, 柴田 正, 内堀(長谷)幸子<sup>\*3</sup>, 古山みゆき<sup>\*3</sup>, 兼田 登<sup>\*3</sup>, 尾田美子<sup>\*4</sup>, 藤原一也<sup>\*4</sup>, 鈴木 宏<sup>\*4</sup>, 伊藤誉志男: **生鮮食品および加工食品中の天然由来の亜硫酸含有量**

食衛誌, **34**, 303~313 (1993)

生鮮および加工食品合計 213 種類 (864 検体) について、呈色陽性物質を除去して亜硫酸量 ( $\text{SO}_2$  として) を算出する改良ランキン-比色法を用いて、亜硫酸の自然含有量を測定した。生鮮食品中の亜硫酸の自然含有量が多いものの大部分は含硫化合物を含有する食品であり、10 mg/kg 以上含んでいるものはワケギ、小玉ネギ、白ネギ、青ネギ、玉ネギであった。それ以外のものは、いずれも 5.0 mg/kg 以下であった。加工食品中の亜硫酸の自然含有量は生鮮食品に比べて低く、すべて 10 mg/kg 以下であった。

**Keywords:** sulfite, modified Rankine-colorimetry, foods

<sup>\*1</sup> (現)積水化学工業(株)セキスイクリニカルラボラトリー

<sup>\*2</sup> (現)神戸学院大学薬学部

<sup>\*3</sup> 生活協同組合コープこうべ商品検査センター

<sup>\*4</sup> 日本生活協同組合連合会商品検査センター

辻 澄子, 柴田 正, 内堀伸健<sup>\*1</sup>, 小林建夫<sup>\*1</sup>, 鈴木 宏<sup>\*1</sup>, 内堀(長谷)幸子<sup>\*2</sup>, 室井順子<sup>\*2</sup>, 兼田 登<sup>\*2</sup>, 伊藤誉志男: **イオンクロマトグラフィーによる生鮮および加工食品中の天然由来のオルトリン酸イオンの含有量**

食衛誌, **35**, 56~65 (1994)

生鮮および加工食品中のオルトリン酸イオン ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) のイオンクロマトグラフィー (IC) による定量法を開発した。試料を塩酸性で抽出し、炭酸ナトリウムにより中和後、ホウ酸緩衝液 (pH 9.0) で定容とし、ろ紙でろ過後、さらに限外ろ過を行い、ICにより定量した。魚肉製品およびジャガイモへ添加したとき90%以上の回収率が得られた。本法を用いて各種食品中の  $\text{PO}_4^{3-}$  の含有量を測定した。生鮮食品中の天然由来の含有量はいずれも100 mg/kg以上であり、魚類が2,300~4,500 mg/kgと高い値を示した。加工食品中天然由来の含有量は煮干が最も高く13,000 mg/kgであった。

**Keywords**: ion chromatography, orthophosphate ion, foods

\*1 日本生活協同組合連合会商品検査センター

\*2 生活協同組合コープこうべ商品検査センター

山田真記子\*1, 井上哲夫\*1, 加藤喜昭\*1, 中村幹雄\*1, 柴田 正, 木村実加, 辻 澄子, 伊藤誉志男: HPLCによる食用黄色5号中の未反応原料, 反応中間体および付随色素の定量法とその実態調査

食衛誌, 34, 239~247 (1993)

HPLCを用いた食用黄色5号の未反応原料であるスルファニル酸 (SA), G塩 (GS), R塩 (RS), シェファー塩 (SS), 反応中間体である6,6'-オキシピス (2-ナフトレンスルホン酸) (DONS), 4,4'-(ジアゾアミノ)-ジベンゼンスルホン酸 (DAADB-SA) および付随色素である3-ヒドロキシ-4-[(4-スルファニル)アゾ]-2,7-ナフトレン-ジスルホン酸 (RS-SA) の定量法を作成した。なお、付随色素である4-[(2-ヒドロキシ-1-ナフトレニル)アゾ]ベンゼンスルホン酸 (2N-SA) と6-ヒドロキシ-5-(フェニルアゾ)2-ナフトレンスルホン酸 (SS-AN) とは分離できなかったため、両者の総和をSS-ANとして定量した。定量限界は0.05  $\mu\text{g/g}$ であった。また、市販品16検体を分析したところ、SA; ND~0.170%, GS; ND~0.080%, RS; ND~0.050%, SS; ND~0.281%, DONS; ND~0.250%, DAADB-SA; ND~0.210%, RS-SA; 0.024~3.54%, およびSS-AN; 0.015~0.360%であった。

**Keywords**: sunset yellow FCF, starting materials, intermediates

\*1 三栄源エフ・エフ(株)

津村ゆかり, 関口幸弘, 中村優美子, 外海泰秀, 伊藤誉志男: エトリンホスおよびその代謝物のFTD-GCによる同時定量

食衛誌, 34, 415~419 (1993)

野菜および果実中のエトリンホスおよびその酸化型代謝体であるエトリンホスオキシソンの同時定量法を開発した。試料をアセトンおよび酢酸エチルにより抽出後、減圧濃縮し、FTD-GCで定量した。いちご, キャベツ, 大根, 白菜, きゅうりの添加回収率は、添加量0.2 ppmでエトリンホスが84.2~103.5%であり、エトリンホスオキシソンが70.5~

99.2%であった。検出限界はエトリンホスが0.001 ppm, エトリンホスオキシソンが0.01 ppmであった。  
**Keywords**: etrimfos, etrimfos oxon, gas chromatography

Tsumura, Y., Matsuki, H.\*1, Tonogai, Y., Nakamura, Y., Kato, S.\*2, Ito, Y.: Simultaneous Determination of Vamidothion and Its Oxidation Metabolites in Potatoes and Apples by Gas Chromatography

*J. Food Protect.*, 56, 437~440 (1993)

ばれいしょおよびりんご中のバミドチオンおよびその代謝物バミドチオンスルホキシド (V1), バミドチオンスルホン (V2) を同時に定量する方法を開発した。試料50gをホモジナイズし、アセトン抽出した後減圧濃縮してアセトンを留去した。残った水層に10%塩化ナトリウム水溶液を加え、10%酢酸/n-ヘキサンで洗浄して不純物を除いた。V0, V1, V2はジクロロメタンで抽出した。ジクロロメタン層を減圧乾固して、酢酸エチルを加えて2 mlとした。その2  $\mu\text{l}$ をガスクロマトグラフ質量分析計 (SIMモード) にインジェクションした。カラムはCBP-1キャピラリーカラム (内径0.2 mm, 長さ25 m, 膜厚0.25  $\mu\text{m}$ ) を使用した。ガスクロ条件を詳細に検討し、無極性キャピラリーカラムのみで満足な結果を得た。分解していないV1の保持時間を初めて報告した。ばれいしょおよびりんごへの回収率は、0.01~5.0 ppm添加でV0が93~109%, V1が62~108%, V2が64~89%であった。検出限界はV0が0.01 ppm, V1が0.2 ppm, V2が0.05 ppmであった。

**Keywords**: vamidothion, metabolite, gas chromatography

\*1 サントリー

\*2 日本食品分析センター

津村ゆかり, 長谷川新\*1, 関口幸弘, 中村優美子, 外海泰秀, 伊藤誉志男: そばの貯蔵およびそば切り加工過程における収穫後使用農薬の消長

食衛誌, 35, 1~7 (1994)

そばに収穫後使用された5種の農薬の貯蔵およびそば切り加工過程における消長を検討した。玄そばにDDVP, クロルピリホスメチル, マラチオン, フェニトロチオンを噴霧後、または臭化メチルでくん蒸後、15°Cで保存し、農薬残存量を経時的に測定した。84日間の観察の結果、農薬の半減期は13日~124日であり、DDVPは最初は速やかに、続いて緩やかに減少する2相の片対数曲線を示した。また貯蔵3または5週間後のそばをそば切りに加工し、加工の各段階での農薬残存量を測定した。最終製品のそば切り (ゆで麺) にはクロルピリホスメチル61%, マラチオン40%, フェニトロチオン42%, 臭素21%が残留しており、DDVPは検出されなかった。

**Keywords**: buckwheat, postharvest application, pesticide

## \*1 神戸農林水産消費技術センター

中村優美子, 関口幸弘, 津村ゆかり, 外海泰秀, 伊藤誉志男: ガスクロマトグラフィーによるナレドおよびその還元型変化体ジクロロポスの同時分析

食衛誌, 34, 426~433 (1993)

食品中のナレドおよびその還元型(脱臭素)変化体であるジクロロポス(DDVP)の同時定量法を開発した。アセトンによる抽出を行い、塩化アンモニウムとリン酸水溶液による凝固法でクリーンアップし、酢酸エチルで抽出した後、FPD-GCによる定量を行った。りんご、キャベツ、だいこん、きゅうり、かぼちゃ、トマト、玄米、緑茶について0.2~0.4 ppm添加して添加回収実験を行った。ナレドは直ちにその一部がDDVPに変化するため、DDVP量に変数1.72を乗じてナレド量に換算したものを加えてナレドの回収率を求めた。DDVPの回収率は52.6~97.0%, ナレドの回収率は28.2~83.6%であり、ナレドの回収率はDDVPに変化する割合が高いほど低かった。なお、市販の上記8種農産物からはいずれの農薬も検出されなかった。

**Keywords:** naled, dichlorvos (DDVP), gas chromatography

Nakamura, Y., Sekiguchi, Y., Hasegawa, S.\*1, Tsumura, Y., Tonogai, Y. and Ito, Y.: **Reductions in postharvest-applied dichlorvos, chlorpyrifos-methyl, malathion, fenitrothion, and bromide in rice during storage and cooking processes.**

*J. Agric. Food Chem.*, 41, 1910~1915 (1993)

収穫後使用されるジクロロポス(DDVP), クロルピリホスメチル, マラチオン, フェニトロチオンおよび臭素(臭化メチル燻蒸)の貯蔵および加工行程(炊飯, ビーフン)における消長を梗および玄米について調べた。上記4種の有機リン系農薬は表面に残留したままで、経過時間とともに減少し(噴霧後92日目の梗で15.6~28.6%, 噴霧後85日目の玄米で0~35.4%が残留), 表面に留まったままだった。臭素は内部への浸透が認められ、梗では燻蒸後56日目までは減少しその後84日目まで59.0%に漸増し、玄米では84日目まで顕著な変化は認められなかった。上記4種の有機リン系農薬と臭素は水洗および蒸熱によりほとんど除去することができた。有機リン系農薬の残留率は炊飯では0~5.6%, ビーフンでは0%であり、臭素残留率は炊飯で41.2%, ビーフンで5.1%であった。

**Keywords:** rice, postharvest applied pesticides

\*1 神戸農林水産消費技術センター

Nakamura, Y., Tonogai, Y., Tsumura, Y. and Ito, Y.: **Determination of pyrethroid residues in vegetables, fruits, grains, beans, and green tea leaves: Applications to pyrethroid residue monitoring studies**

*J. AOAC Int.*, 76(6), 1348~1361 (1993)

農産物中のピレトリンおよび12種合成ピレスロイド系農薬残留量の測定について検討した。野菜および果物はアセトン抽出の後凝固液を加えてろ過し、*n*-ヘキサンへ分配した後フロリジルカラムによりクリーンアップを行った。ピレスロイド系農薬はメチルシリコン系のキャピラリーカラムを用いてECD-GCで定量し、各成分のピーク面積の和で算出した。穀物および豆類はアセトニトリル抽出の後*n*-ヘキサンへ分配し、フロリジルカラムによるクリーンアップを行いキャピラリーカラムを用いたECD-GCで定量した。凝固法は穀物や豆類のような脂質含有作物には回収率が低く適用できなかった。18種農産物に0.25~1.0 ppm添加した場合の添加回収率は60.0~103.5%であった。緑茶葉よりフルバリネートが0.89 ppm検出された以外には、18種農産物からはいずれのピレスロイド系農薬も検出されなかった。

**Keywords:** pyrethroids, coagulation method, gas chromatography

外海泰秀, 津村ゆかり, 中村優美子, 伊藤誉志男, 宮田昌弘\*1, 鎌倉和政\*1, 長谷川眞住\*1, 和田伊智朗\*2, 藤原靖士\*3: **FTD-GCによる野菜, 果実中の有機含窒素系殺菌剤8種の同時分析**

食衛誌, 34, 216~226 (1993)

野菜, 果実中に残留する有機含窒素系殺菌剤8種のFTD-GCによる一斉分析法を作成した。10種農産物に8種農薬を0.2 ppm添加したときの本法による回収率は67.8~112.5%であった。市販のバナナおよびパイナップルを検査した結果、前者の果皮部からトリアジメホン0.41~1.29 ppm, トリアジメノール0.22~1.03 ppmを、また後者の果皮部からピテルタノール0.27~0.95 ppmを検出した。

**Keywords:** GC, post-harvest pesticide, fungicide

\*1 神戸検疫所 輸入食品・検疫検査センター

\*2 日本生活共同組合連合会

\*3 生活共同組合コープこうべ

平原嘉親\*, 成田美加子\*, 岡本浩一郎\*, 長谷川眞住\*, 鯉口智\*, 山名孝善\*, 外海泰秀, 伊藤誉志男: **農産物中12種ピレスロイド系農薬および29種有機リン系農薬の同時分析法の検討**

食衛誌, 34, 496~507 (1993)

野菜, 果実, 茶, 穀類, 豆類中の12種ピレスロイド系農薬をNPD-GCで、また29種有機リン系農薬をFPD-GCで同時に分析し、GC/MSで確認する多成分一斉分析法を作成した。本法により輸入レモンおよびオレンジからクロルピリホスをそれぞれ175 ppbおよび83 ppb検出した。また輸入ウーロン茶からフェンバレートを157 ppb検出した。

**Keywords:** pesticide, GC, column chromatography

\* 神戸検疫所 輸入食品・検疫検査センター

Hamano, T.\*1, Mitsuhashi, Y.\*1, Kojima, N.\*1,

Aoki, N.\*<sup>1</sup>, Shibata, T., Ito, Y. and Oji, Y.\*<sup>2</sup>:  
**Sensitive Spectrophotometric Method for the  
 Determination of Ethylenediaminetetraacetic  
 Acid in Foods**

*Analyst*, **118**, 909~912 (1993)

食品中のエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) の吸光度定量法を検討した。試料中の EDTA に過剰の Fe<sup>3+</sup> を加えて EDTA-Fe キレートを生じ、ついで N-benzoyl-N-phenylhydroxylamine を加え、未反応の Fe<sup>3+</sup> を Fe-N-benzoyl-N-phenylhydroxylamine キレートとしてクロロホルムで抽出除去し、次に 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline-disulfonic acid を加え、Fe-色素を形成する。吸光度から鉄含量を求めた。検量線は 0.5-40.0 μg/ml の範囲で直線関係が得られた。市販食品の成分中妨害物質は殆ど認められなかった。各種食品への添加回収率は 90% 以上であった。また本法は HPLC の結果とよく一致した。

**Keywords** : ethylenediaminetetraacetic acid, spectrophotometry, 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline-disulfonic acid

\*<sup>1</sup> 神戸市環境保健研究所

\*<sup>2</sup> 神戸大学農学部

Ema, M., Amano, H. and Ogawa, Y.: **Characterization of the developmental toxicity of di-n-butyl phthalate in rats**

*Toxicology*, **86**, 163~174 (1994)

ラットにおける di-n-butyl phthalate (DBP) の発生毒性の特徴について検討した。Wistar ラットの妊娠 7 日から 9 日、妊娠 10 日から 12 日または妊娠 13 日から 15 日まで 0.75, 1.0 または 1.5 g/kg の DBP を経口投与し、妊娠 20 日に妊娠ラットを殺して胎児への影響を調べた。投与日にかかわらず、0.75 g/kg 以上の投与量で対照群に比べて有意に高い着床後の胚死亡率が認められ、1.5 g/kg 投与群では胚死亡率が 100% となった。妊娠 10~12 日の DBP 投与では奇形胎児の発現頻度の有意の上昇はみられなかったが、妊娠 7~9 日および妊娠 13~15 日の 0.75 および 1.0 g/kg 投与群においては奇形胎児の発現頻度が対照群に比べて有意に上昇した。妊娠 7~9 日の DBP 投与により頸椎、腰椎および肋骨の異常などの骨格奇形を有する胎児の発現頻度が有意に上昇したが、外表および内部器官における奇形の発現頻度の上昇は認められなかった。妊娠 13~15 日の DBP 投与により、口蓋裂および胸骨分節の癒合などの奇形を有する胎児の発現頻度が対照群に比べて有意に高くなった。奇形胎児の発現率の上昇は DBP の投与量に対応しており、妊娠 13~15 日に DBP を投与したときに最も高かった。これらの結果から、DBP による発生毒性の発現には投与時期による特異性があることが明らかとなり、DBP の発生毒性の特徴は DBP と同様可塑剤として使われている butyl benzyl phthalate (BBP) の発生毒性の特徴とよく類似していることから、DBP および BBP の発生毒性発現には DBP および BBP

の共通の代謝産物の関わりが示唆された。

**Keywords** : di-n-butyl phthalate, developmental toxicity, teratogenicity

Ema, M., Itami, T. and Kawasaki, H.: **Teratogenic evaluation of di-n-butyl phthalate in rats**

*Toxicol. Lett.*, **69**, 197~203 (1993)

可塑剤 di-n-butyl phthalate (DBP) の発生毒性について検討した。Wistar ラットの妊娠 7 日から妊娠 15 日まで 0.5, 0.63, 0.75 または 1.0 g/kg の DBP を経口投与し、妊娠 20 日に妊娠ラットを殺して胎児に対する影響を調べた。0.63 g/kg 以上の DBP の投与量で妊娠ラットの体重増加が対照群に比べて有意に抑制された。1.0 g/kg 投与群において 11 例中 2 母体に死亡がみられ、すべての生存母体に全胚吸収が観察され、生存胎児は得られなかった。0.63 および 0.75 g/kg 投与群において対照群に比べて着床後の胚死亡率が有意に高くなり、胎児体重が有意に低下した。また、0.63 および 0.75 g/kg 投与群において奇形胎児の発現頻度が上昇し、0.75 g/kg 投与群では対照群に比べて有意に高い奇形胎児の発現率が認められた。口蓋裂が最も多く観察された。

**Keywords** : di-n-butyl phthalate, developmental toxicity, teratogenicity

Ema, M., Itami, T. and Kawasaki, H.: **Teratogenic phase specificity of butyl benzyl phthalate in rats**

*Toxicology*, **79**, 11~19 (1993)

可塑剤として使われている butyl benzyl phthalate (BBP) の催奇形性の時期特異性についてラットを用いて検討した。Wistar ラットの妊娠 7 日から 9 日、妊娠 10 日から 12 日または妊娠 13 日から 15 日 (精子発見日=妊娠 0 日) まで、0.6, 0.75 または 1.0 g/kg の BBP を経口投与し、妊娠 20 日に妊娠ラットを殺して胎児に対する影響について調べた。BBP の投与日にかかわらず、0.75 g/kg 以上の投与量で着床後の胚死亡率が対照群に比べて有意に上昇した。妊娠 7~9 日または妊娠 13~15 日に BBP を投与したときに有意の催奇形性が認められたが、妊娠 10~12 日に BBP を投与したときには催奇形性は認められなかった。BBP の投与量に対応した奇形胎児発現率の上昇がみられた。妊娠 7~9 日に 0.75 g/kg 以上の BBP を投与したとき頸椎弓癒合や腰椎骨の異常などの骨格奇形を有する胎児の発現頻度が対照群に比べて有意に高くなったが、外表奇形および内部器官の奇形を有する胎児の発現頻度の上昇はみられなかった。妊娠 13~15 日に 0.75 g/kg 以上の BBP を投与したときには、口蓋裂や胸骨分節癒合などの外表奇形や骨格奇形を有する胎児の発現頻度が対照群に比べて有意に高くなった。BBP を妊娠 13~15 日に投与したときに最も高い奇形胎児の発現率がみられた。これらの結果から、BBP による催奇形性の感受性は BBP の投与時の

胚の発生段階によって変化することが明らかになった。

**Keywords:** butyl benzyl phthalate, developmental toxicity, teratogenicity

Itami, T., Ema, M. and Kawasaki, H.: **Teratogenic evaluation of *p*-tert-butylphenol formaldehyde resin (novolak type) in rats following oral exposure**

*Drug Chem. Toxicol.*, 16, 369~382 (1993)

クロロブレンゴム系接着剤に粘着付与剤として使用されているアルキルフェノール樹脂である *p*-tert-butylphenol formaldehyde resin, novolak type (PTBP-FR) の発生毒性についてラットを用いて検討した。Wistar ラットの妊娠 6 日から妊娠 15 日 (精子発見日=妊娠 0 日) まで 2.5, 5 または 10% の PTBP-FR を含む飼料を与え, 妊娠 20 日に妊娠ラットを殺して胎児に対する影響を調べた。5 および 10% 投与群において妊娠ラットの飼料摂取量の低下および体増加の抑制などの母体毒性が認められたが, 2.5% 投与群では母体に対する影響は観察されなかった。しかしながら, 生存胎児数, 死亡胎児および吸収胚数, 生存胎児の性比, 生存胎児体重および胎盤重量にはいずれの PTBP-FR 投与群とも対照群との間に有意の差は認められず, PTBP-FR 投与によると考えられる影響はみられなかった。生存胎児の検査の結果, 奇形を有する胎児および骨格の変異を有する胎児が PTBP-FR 投与群に散見されたが, これらの胎児の発現頻度はいずれの PTBP-FR 投与群においても低く, 対照群との間に発現頻度の差は認められず, PTBP-FR の催奇形作用を示す所見は得られなかった。これらの結果から, 母体に対して毒性を発現する量の PTBP-FR を妊娠ラットに投与したときでも発生毒性を現さないことが明らかとなった。

**Keywords:** *p*-tert-butylphenol formaldehyde resin (novolak type), developmental toxicity, teratogenicity

Nakamura, Y., Igimi, H.\*<sup>1</sup>, Takase, H.\*<sup>1</sup>, Nomura, Y.\*<sup>1</sup>, Takahashi, S.\*<sup>1</sup> and Uchida, K.\*<sup>1</sup>: **Trifluoroacetylation of murichoric acids and hyochoric acids**

*J. Chromatogr. A*, 655, 355~358 (1993)

胆汁酸をガスクロマトグラフィーで分析する場合, 一般に胆汁酸をメチル化後, 水酸基のトリフルオロアセチル化やトリメチルシリル化を行い分析に供する。通常, トリフルオロアセチル化は, 胆汁酸メチルエステルに無水トリフルオロ酢酸を過剰量加え, 室温 30 分間の反応条件で行われている。しかし, 上記の反応条件では, ほとんどの胆汁酸のトリフルオロアセチル化は完了するが, 3, 6 および 7 位に水酸基をもつ胆汁酸のうち,  $\alpha$ -ミュリコール酸,  $\alpha$ -および  $\beta$ -ヒオコール酸のトリフルオロアセチル化は, 不完全であることを明らかにした。さらに, これら 3 種の胆汁酸のトリフルオロアセチル化は, 室

温で 16 から 24 時間の反応条件が適当であることを示した。

**Keywords:** trifluoroacetylation, murichoric acid, hyocholic acid

\*<sup>1</sup> 塩野義製薬(株)診断医学部

Mivechi, N. F.\*<sup>1</sup>, Murai, T. and Hahn, G. M.\*<sup>1</sup>: **Inhibitors of tyrosine and ser/thr phosphatases modulate the heat shock response**

*J. Cellular Biochem.* 54(2), 186~197 (1994)

熱ショック蛋白質 (HSP) 遺伝子の発現は, 遺伝子の転写調節領域に存在する熱ショックエレメント (HSE) に, 熱ショックによって活性化された熱ショック転写因子 (HSF) が結合することにより誘導される。しかし, 熱ショックのシグナルがどのような経路で HSF に伝達され, またどのようにして HSF が活性化されるかはほとんどわかっていない。本研究で我々は, プロテインフォスファターゼ活性を阻害すると, 熱ショック応答が影響を受けることを見いだした。セリン/スレオニンフォスファターゼ阻害剤であるオキサゲンは熱ショック応答をわずかながら増強し, チロシンフォスファターゼ阻害剤であるバナジン酸ナトリウムは熱ショック応答をほぼ完全に阻害した。これらの増強あるいは阻害作用は, HSF の活性化の増強あるいは阻害に起因することが明らかとなった。これらの知見から, 熱ショック応答においても, 蛋白質のリン酸化反応/脱リン酸化反応が細胞内情報伝達系で重要な役割を果たしていることが示唆された。

**Keywords:** heat shock protein, heat shock factor, phosphorylation

\*<sup>1</sup> Stanford Univ.

兼俊明夫\*<sup>1</sup>, 林 隆章\*<sup>1</sup>, 姉帯正樹\*<sup>1</sup>, 金島弘恭\*<sup>1</sup>, 尾谷 賢\*<sup>2</sup>, 藁嶋裕典\*<sup>2</sup>, 内山智幸\*<sup>2</sup>, 畠山好雄, 飯田 修: **アンジオテンシン変換酵素阻害活性を指標とした北海当帰の調製加工法の検討** 道衛研所報, 43, 1~5 (1993)

アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害活性を指標として, 北海当帰の調製加工法の検討と調製品の品質評価を試みたところ, 乾燥法については, 熱風乾燥, 遠赤外線乾燥および凍結乾燥が有用と考えられた。また, 温湯洗いをを行った試料は熱風乾燥の影響を受け, その ACE 阻害活性が低下したことから, ホッカイトウキの温湯洗いは ACE 阻害活性を指標とした場合, 有用とは言えないと考えられる。

**Keywords:** *Angelica radix*, angiotensin I converting enzyme

\*<sup>1</sup> 道衛研

\*<sup>2</sup> 道工試

米田該典\*<sup>1</sup>, 西 章嘉\*<sup>1</sup>, 前平由紀\*<sup>1</sup>, 畠山好雄, 飯田 修: **生薬資源の研究 (第 10 報) モッコウの costunolid, dehydrocostuslacton の季節的変動について**

生薬, 48, 28~31 (1994)



costunolide および dehydrocostuslacton の含量は、積雪がはじまり、地上部が倒壊する時期になると増加し、越冬中にも大きな変動は認められなかった。また、根が2年目に顕著な生育を示すことや、3年目の発芽期以降は腐朽が急激にすすむことなどから収穫時期は3年目の春の発芽前とするのが適切である。摘心処理の効果については、costunolide, dehydrocostuslacton とともに含量に変化が認められなかった。したがって、摘心処理は不要である。

**Keywords:** *Saussurea lappa*, costunolide, dehydrocostuslactone

\*<sup>1</sup> 大阪大学

Jaziri, M., Diallo, B., Vanhaelen, M., Homès, J., Yoshimatsu, K., and Shimomura, K.: **Immuno-detection of artemisinin in *Artemisia annua* cultivated in a hydroponic conditions** *Phytochemistry*, **33**, 821~826 (1993)

*Artemisia annua* に含まれる抗マラリア作用を持つセスキテルペン artemisinin とその関連化合物を、高感度 (0.02~10 ng) で分析するための酵素免疫分析法 (ELISA) を確立し、5週間水耕栽培した *Artemisia annua* における artemisinin 関連化合物の分布を調べた。その結果、新葉にもっとも高い artemisinin 等量 (1.12%乾燥重量) が認められた。

**Keywords:** *Artemisia annua*, ELISA, artemisinin

\* Brussels Free University

Fauconnier, M.-L., Jaziri, M., Marlier, M., Roggemans, J., Wathélet, J.-P., Lognay, G., Severin, M., Homès, J. and Shimomura, K.: **Essential oil production by *Anthemis nobilis* L. Tissue culture**

*J. Plant Physiol.*, **141**, 759~761 (1993)

ローマカミツレ (*Anthemis nobilis*) の組織培養 (細胞, シュート, クラウンゴール) による精油の生産を行った。シュートは発根した幼植物体に比べて低い総精油含量であったが、酵母抽出物や植物組織から調製した多糖類を培地に添加すると、精油の構成成分が変化し、総精油量の増加が認められた。また、培養細胞は低い精油含量であったが、形質転換細胞であるクラウンゴールには花と同様な精油組成と総精油含量が認められた。

**Keywords:** *Anthemis nobilis*, crown-gall, essential oil production

\* Brussels Free University

Yoshimatsu, K. and Shimomura, K.: **Improved analysis of emetic alkaloids in tissue cultures and regenerates of *Cephaelis ipecacuanha* by ion pair high performance liquid chromatography**

*PHYTOCHEMICAL ANALYSIS*, **4**, 217~219 (1993)

カラムの種類と温度、移動層の組成と pH 等に検討を加え、トコン (*Cephaelis ipecacuanha*) の組織

培養物およびその再分化体中のトコンアルカロイドを高感度で分析するための、イオンペア HPLC 法を確立した。

**Keywords:** *Cephaelis ipecacuanha*, emetic alkaloid, ion pair high performance liquid chromatography

田中俊弘<sup>\*1</sup>, 鄭 太坤<sup>\*2</sup>, 加藤敦子<sup>\*1</sup>, 吉田将士<sup>\*3</sup>, 酒井英二: **車前草の生薬学的研究 (第10報) 中国産オオバコ属植物の葉の形態について**

生薬, **47**(2), 111~122 (1993)

生薬資源の国際化にともない、生薬「車前草」の資源も外国に求められることと考えられる。よって、中国産オオバコ属植物の品質規格について明らかにする目的で、中国産オオバコ属植物 15 種類の葉について比較解剖を行った。維管束の数、木部向軸面側の篩部の分布、柵状組織の分布等の特徴を明らかにし、検索表を作成した。この検索表は市場品鑑定の際に有用と考える。

**Keywords:** *Plantago* spp., anatomy, morphology

\*<sup>1</sup> 岐阜薬科大学

\*<sup>2</sup> 遼寧中医学院

\*<sup>3</sup> 本草製薬㈱

田中俊弘<sup>\*1</sup>, 鄭 太坤<sup>\*2</sup>, 加藤敦子<sup>\*1</sup>, 吉田将士<sup>\*3</sup>, 酒井英二: **車前草の生薬学的研究 (第11報) 中国および日本産オオバコ属植物の葉の表面形態について**

生薬, **47**(4), 356~366 (1993)

市場品生薬「車前草」の鑑定マニュアル作成を目的に、中国産および日本産オオバコ属植物 17 種類について葉の表皮の比較を行った。葉の大きさ等に影響を受けにくいために葉類生薬の鑑定に利用される stomatal index, palisade ratio 等を明らかにし、また腺毛、非腺毛の特徴を明らかにした。これによって、検索表を作成した。これらの知見はオオバコ属植物の分類に関して多くを補充するも考える。

**Keywords:** *Plantago* spp., anatomy, morphology

\*<sup>1</sup> 岐阜薬科大学

\*<sup>2</sup> 遼寧中医学院

\*<sup>3</sup> 本草製薬㈱

田中俊弘<sup>\*1</sup>, 酒井英二, 吉見真造<sup>\*1</sup>, 西部三省<sup>\*2</sup>, 武村仁志<sup>\*2</sup>: **羅布麻の生薬学的研究 (2) *Apocynum* と *Poacynum* の葉の比較解剖**

生薬, **47**(4), 388~395 (1993)

中国で栽培されている羅布麻 (*Apocynum venetum*) は繊維原料として利用される一方、葉は高血圧、腎炎等の治療に使用されている。中国には近縁の *Poacynum* 属植物が分布しているため、近年両者が混乱し市場に出回るようになってきた。そこで、*Apocynum* 属植物と *Poacynum* 属植物の葉の比較解剖を行い、鑑別点を明らかにした。その結果、市場品の中に *Poacynum hendersonii* を確認した。

**Keywords:** *Apocynum venetum*, *Poacynum hendersonii*, anatomy

\*1 岐阜薬科大学

\*2 東日本学閥大学薬学部

Ishimaru, K.\*, Arakawa, H.\*, Yamanaka, M.\*, and Shimomura, K.: Polyacetylenes in *Lobelia sessilifolia* hairy roots

*Phytochemistry*, 35, 365~369 (1994)

外国産と日本産アグロバクテリウムの感染によりサワギキョウ (*Lobelia sessilifolia*) 毛状根6クローンを確認し、種々の基本培地におけるポリアセチレン類の生産を調べた。その結果、日本産アグロバクテリウムにより誘起された毛状根は、照明下で緑色になり、良好な生育と最も高いポリアセチレン生産量を示した。

**Keywords**: *Lobelia sessilifolia*, hairy root, polyacetylene

\* 佐賀大学農学部

Jaziri, M.\*, Homès, J.\*, and Shimomura, K.: An unusual root tip formation in hairy root culture of *Hyoscyamus muticus*

*Plant Cell Reports*, 13, 349~352 (1994)

ヒヨス (*Hyoscyamus muticus*) の毛状根8クローンを確立し、種々の基本培地を用いてトロパンアルカロイドの生産を調べていたところ、1クローンに異常な形態変化が認められた。この毛状根クローンは1/2 Murashige-Skoog (MS) 培地では正常な毛状根として生育するが、1/2 MS 液体培地から塩類濃度の低い White 培地への移植すると多数の側根が形成し、やがてそれらが細かく分断された根端組織のみを持つ組織片となった。しかし、得られた根端組織を再び1/2 MS 固形培地へ移植すると、正常な毛状根としての生育を開始した。この現象は、毛状根をペクチナーゼで処理したときに得られる結果と酷似していた。

**Keywords**: *Hyoscyamus muticus*, hairy root, tropane alkaloid

\* Brussels Free University

鄭 太坤\*<sup>1</sup>, 田中俊弘\*<sup>2</sup>, 菱川恭子\*<sup>2</sup>, 野呂征男\*<sup>3</sup>, 久田陽一\*<sup>3</sup>, 吉田将士\*<sup>4</sup>, 酒井英二: 車前草の生薬学的研究 (第12報) 中国産オオバコ属植物の種子の形態について

*Natural Medicines*, 48(1), 63~70 (1994)

車前子の基原植物は中華人民共和国薬典で *Plantago asiatica*, *P. depressa* と規定されているが、遼寧省では規定と異なる種が流通しているとの報告がある。そこで、市場品車前子の基原を明らかにする目的で、中国産オオバコ属植物12種類の種子について比較解剖を行った。種子の形状、表面の模様、子葉の配列等に区別点を見出し、検索表を作成した。これをもとに中国市場品の鑑定を行い、*P. asiatica* および *P. major* を確認した。

**Keywords**: *Plantago* seed, anatomy, microscopic characteristic

\*<sup>1</sup> 遼寧中医学院\*<sup>2</sup> 岐阜薬科大学\*<sup>3</sup> 名城大学薬学部\*<sup>4</sup> 本草製薬(株)

山下善樹\*, 田中敬子\*, 玉置修身\*, 野口 衛, 細田勝子\*\* : 芍薬の優良品種の探索に関する研究 (第1報) 根収量ならびにペオニフロリンおよびタンニン含量

生薬, 47, 434~439 (1993)

芍薬の最適栽培条件を確立するため、41系統の根の収量ならびにペオニフロリン (P) およびタンニン含量を時期毎に測定したところ、両成分含量は5月に最大となり、その後根重の増加に伴って減少した。また、根重は10月に最大となるが、その収量は系統により変化した。なお、主根のP含量は根の他の部位に比べて低い値を示した。

**Keywords**: *Paeoniae Radix*; tannin; determination.

\* 和歌山県薬事指導所

\*\* 太田胃散筑波研究所

Kawaguchi, K.\*<sup>1</sup>, Asaka, I.\*<sup>1</sup>, Hirofumi, M.\*<sup>1</sup>, Furuya, T.\*<sup>1</sup> and Katsuki, S.: Cardenolides in the regenerated plants obtained from *Strophanthus divaricatus* calli

*Phytochem.*, 34, 1317~1321 (1993)

*Strophanthus divaricatus* には7種のカルデノライドの蓄積があるが、培養カルスからの再生植物には10種を有していた。同時に2種の新カルデノライドを単離し、スペクトル分析により構造決定した。カルデノライドの生成によってストロファンツスの種を明らかとした。

**Keywords**: *Strophanthus divaricatus*, regenerated plants, cardenolides

\*<sup>1</sup> 北里大学薬学部

中原雄二: 毛髪分析で何がわかるか? 尿検査の限界と毛髪の利用価値

法中毒, 11, 90~93 (1993)

現在の薬物検査の主流である尿検査の問題点を取り上げ、その欠点を補うことの出来る毛髪試料の有用性を筆者の研究を中心に示した。以下に小題目を上げる。

1.はじめに、2.乱用薬物の使用証明手段としての毛髪分析の歴史、3.毛髪試料の分析方法、4.毛髪分析により得られる結果と考察 (①どのような薬物が検出できるか、②薬物使用量と毛髪中薬物濃度は相関があるか、③毛髪中薬物は固定しているか、④薬物使用期間とバンド幅の関係、⑤薬物の血液から毛髪への移行率、⑥毛髪中で薬物の変化はあるか、⑦どのくらい過去まで遡れるか)

**Keywords**: drug test, hair analysis, urine analysis

中原雄二: 衛生化学領域における分析技術の最新の進歩シリーズII 乱用薬物のためのHPLCの

## 最近の進歩

衛生化学, 39, 369~380 (1993)

乱用薬物の分析のための HPLC の最近の進歩について 50 以上の文献を基に以下の項目別に解説した。

1. HPLC による生体中の乱用薬物のスクリーニング検査への利用と有用性
2. 乱用薬物の高感度分析のための検出方法の進歩
3. Amphetamine 類の光学異性体分析に関する新しい研究
4. 薬物の確認へのダイオードアレイ検出器や質量検出器の利用
5. カラムスイッチング法を利用した HPLC 分析の自動化
6. キャピラリー電気泳動による分離分析
7. 超臨界クロマトグラフィーによる応用

**Keywords:** HPLC, drugs of abuse, screening test

石橋無味雄: 制酸力試験法および胃腸薬の pH 試験法について

日本薬局方フォーラム, 2(2), 139~140 (1993)

一般試験法などに新たに収載した制酸力試験法および胃腸薬の pH 試験法について解説した。制酸力試験法は、制酸の効果をうたう医薬品原薬および製剤の制酸効果を 0.1 N 塩酸の消費量 (ml) で示す方法で、一定の条件で試験したときの酸中和量が定量的に求められる方法である。胃腸薬の pH 試験法は、制酸効果を標榜する製剤が一定量の 0.1 N 塩酸を加えて一定の条件で攪拌するとき、その溶液が pH が 3.5 以下になることを規定するもので、制酸の効能を表記するときの製剤が持たなければならない要件の一つを示し、その試験を行うものである。これらの試験法は制酸の効能を標榜しても、それらの試験法が異なり制酸力に関する尺度にする試験法がなく公正な評価が困難であったために設定された。

**Keywords:** acid-neutralizing capacity, gastrointestinal medicine, antacid test

石橋無味雄: 有機体炭素試験法について

日本薬局方フォーラム, 2(2), 141~142 (1993)

有機体炭素試験法は水に含まれる有機物に由来する炭素の量を測定するも方法である。これと同じ目的に使用される方法に過マンガン酸カリウム消費量などを求め、含まれる有機物の量を推定する方法があるが、この方法では過マンガン酸カリウムを消費しない有機物も多く存在し、定量的に有機物量を求めるときには不適切な方法となるときがある。日本薬局方において、注射用水の調製に超ろ過法を用いることができるが、ろ過は蒸留法とことなる面があり、その安全性を確保するために水の中の有機物を正確に測定する方法が必要不可欠であるとされ、そのために本試験法は開発、収載された。本法は他の国の薬局方には収載されていないが、製薬業界で用いる水の品質は製造する医薬品の品質に重大な影響を与えるので、その重要性はますます増加する。

**Keywords:** TOC, organic carbon, water for injection

## tion

石橋無味雄: レギュラトリーサイエンス討論会より

ファームテックジャパン, 9(6), 23~25 (1993)

日本薬学会第 113 年会のレギュラトリーサイエンス討論会の演題、公定試験法における分析バリデーションの方向、GMP におけるプロセスバリデーションの意義、医薬品および添加剤の規格における物理化学的特性の意義と重要性、生物製剤の規格試験方法設定における問題点、医薬品の生物学的同等性試験の検討課題について要約して紹介した。

**Keywords:** regulatory science, validation of analytical procedures, validation characteristics

木倉瑠理, 高橋一徳, 中原雄二: 毛髪分析による覚せい剤使用とデプレニール使用の識別法

中毒, 11, 100~101 (1993)

ラットにデプレニールを投与し、毛髪でのメタンフェタミン使用との識別が可能であるかどうかを調べるとともに、血漿中と毛髪中のデプレニール関連薬物濃度を測定し、毛髪への移行性を比較した。毛髪中にデプレニール由来のデスマチル代謝物が検出され、デプレニールの検出と合わせて、覚せい剤メタンフェタミン使用との識別が可能であることが明らかにできた。また、メタンフェタミンやアンフェタミンに比べ、デプレニールやデスマチル代謝物は毛髪への移行性は低いことが示された。

**Keywords:** discrimination of deprenyl in hair, hair analysis, metabolism of deprenyl

木倉瑠理, 中原雄二: アンフェタミン系医薬品 (Deprenyl, Benzphetamine, Fenproporex, Mefenorex) の血中から毛髪への移行

薬物動態, 8, S320 (1993)

アンフェタミン系医薬品 (Deprenyl, Benzphetamine, Fenproporex, Mefenorex) の血中から毛髪への移行性をラットを用いて調べた。その結果、Benzphetamine > Mefenorex > Methamphetamine > amphetamine > deprenyl の順に毛髪への移行性が高いことが明らかにされた。

**Keywords:** incorporation rate into hair, amphetamine-like drugs, drug disposition

早川堯夫: ヒト又は動物由来の細胞を用いて生産されるバイオテクノロジー医薬品におけるウイルス試験とウイルスバリデーション (その 1)

医薬品研究, 24(12), 1279~1281 (1993)

バイオテクノロジー医薬品の品質に関する ICH のトピックスの一つとして、医薬品のウイルス汚染をいかに防ぐか、その評価方法をどのようにするかというテーマが取り上げられることになった。本稿ではヒトまたは動物由来の細胞を用いて生産されるバイオテクノロジー医薬品におけるウイルス試験とウイルスバリデーションの話題に関して、ICH ハーモナイズドテキストの作成のためのたたき台とす

べき論文を筆者らが執筆した経緯および背景について述べた。また、同英文論文第1部の内容の概略について解説した。

**Keywords** : ICH, cell culture technology-derived drug, viral validation

早川堯夫：ヒトまたは動物由来の細胞を用いて生産されるバイオテクノロジー医薬品におけるウイルス試験とウイルスバリデーション (その2)

医薬品研究, 25(1), 12~14 (1994)

ヒトまたは動物由来の細胞を用いて生産されるバイオテクノロジー医薬品におけるウイルス試験とウイルスバリデーションの話題に関して、ICH ハーモナイズドテキスト作成のための議論のたたき台とすべき論文第2部の内容の概略について解説した。

また、ICHの専門家会議での「ウイルスの安全性に関するICHテキストのあるべき内容」をめぐる論議についても紹介した。さらに、本邦で当面この問題をどう考えるかについても述べた。

**Keywords** : ICH, cell culture technology-derived drug, viral validation

早川堯夫：バイオテクノロジーによる薬剤

総合臨床, 42(11), 3198~3203 (1993)

これまでわが国で承認されたバイオテクノロジー応用蛋白性医薬品37品目をホルモン、酵素、サイトカイン、ワクチン、モノクローナル抗体、血液凝固因子に分類し、それぞれの開発経緯、物性や生物学的作用面からみた特徴、品質や安全性の評価面での話題、臨床応用などについて解説した。

**Keywords** : biotechnology-derived drug

早川堯夫、森本和滋、内田恵理子、川崎ナナ、徳永裕司、山口照英、新見伸吾、押沢 正：タンパク性医薬品の品質評価方法の新しい流れ：遺伝子組換えヒト成長ホルモンの力価測定における *in vivo* bioassay から理化学的試験方法への移行のためのバリデーション

医薬品研究, 25, 339~347 (1994)

生理活性蛋白性医薬品のアッセイ法をめぐる最近の動向のひとつに従来の生物活性試験法をより簡便で高精度、高感度な試験法に切り替える方向がある。遺伝子組換えヒト成長ホルモンの生物活性(力価)測定法について、*in vivo* assay法から代替法への移行の試みのこれまでの経緯、すなわちWHOにより実施された *in vivo* bioassay の代替法開発に関する国際共同研究とその結果を受けての国際ワークショップでの議論、筆者らの見解およびヨーロッパのメーカー、NIBSC、FDAの見解を概説した。わが国ではさらに *in vivo* assay法から代替法への移行の是非についてのより確かな科学的根拠を得る目的で、代替アッセイ法に関する国内研究所間共同研究を実施した。その研究のstrategyと結果の概要、および代替法への移行の妥当性について述べた。

**Keywords** : human growth hormone, assay methodology

Shibuya, T.\* and Morimoto, K.: A review of the genotoxicity of 1-ethyl-1-nitrosourea  
*Mutation Res.*, 297, 3~38 (1993)

1-ethyl-1-nitrosourea (ENU) は強力なエチル化剤で多様な変異原性スペクトルを有し、癌原性も強い。ENUのDNA付加物としてはグアニンのO<sup>6</sup>位とチミンのO<sup>4</sup>位が変異原性と重要な関連を有しており、これら付加物量とその修復について、分子生物学的研究や分子遺伝学的研究のデータをまとめた。また1-methyl-1-nitrosourea (MNU)の変異原性スペクトルと比較し、ENUのDNAとの反応性の特徴をまとめた。ENUのタンパク質へのカルバモイル化についてもその意義をDNAと核タンパク質との相互作用の面より解説した。

変異原性のデータとしては、原核生物、カビ類、昆虫、哺乳動物細胞、マウス生殖細胞、マウス体細胞に分類し、ENUの遺伝毒性の全貌について解説した。

**Keywords** : 1-ethyl-1-nitrosourea, genotoxicity of 1-ethyl-1-nitrosourea

\* 食品薬品安全センター秦野研究所

谷本 剛、横田橋江：医薬品の迅速分析法、塩化リゾチームおよびその製剤

月刊薬事, 36, 411~416 (1994)

塩化リゾチームは医療用および一般用医薬品として広く使用されており、その品目数も多数にのぼり、地方の所轄機関等での品質監視の機会が増加している。そこで、これらの業務の効率化を図る目的で、本剤の迅速分析法の確立の必要性が認識され、平成3年度から厚生省薬務局監視指導課のもとで、本迅速分析法作成のための検討が開始された。その検討により作成された迅速分析法を「塩化リゾチームの迅速分析法」として平成4年9月24日付薬監第49号をもって関係機関に通知された。そこで、この迅速分析法を実施する上で留意すべき点等について、実施者の便を考えて解説した。

**Keywords** : lysozyme, rapid assay

鈴木英世：生薬一定量と標準物質一

ぶんせき, 3, 204~210 (1994)

現在、メーカーが生薬やそれらのエキスを配合した製剤を製品化する際には、原料生薬、抽出エキスおよび最終製品について化学成分の確認試験や指標成分の定量試験が求められ、生薬分析のニーズが高まっている。そこで、まずカラムスイッチングHPLC法、オーバプレッシャークロマトグラフ法などの生薬分析の新しい手法を紹介し、次に1990年から1993年までに発表された44種の生薬について定量分析の実用例を整理し、最近の分析対象、精製技術などの研究動向を検討した。最後に、現在市販されている100種類程の生薬成分を定量に用いる場合の問題点について述べた。

**Keywords** : analysis of herbal medicines, HPLC, standards of crude drugs

新谷英晴：国際標準化機構 (ISO)/技術委員会 (TC)198, バイオロジカルインジケーター (BI) 作業部会 (WG4) での D 値測定に於ける Spearman-Kärber 法と Stumbo-Murphy Cochran 法との精度のシミュレーション比較に関する日本案防菌防微, 22, 293 (1994)

D<sub>10</sub> 値測定に於て現在専ら用いられているのは Spearman-Kärber 法, Stumbo-Murphy Cochran 法, フラクシオンネガティブ法ならびに生存曲線法である。現在日本で専ら用いられている Stumbo-Murphy Cochran 法と USP あるいは AAMI に採用され米国で用いられている Spearman-Kärber 法との精度の比較を行った。菌の死滅の確率がポアソン分布に基づくと仮定してシミュレーションで両者の精度の確率を比較した。その結果 Stumbo-Murphy Cochran 法の方が Spearman-Kärber 法より精度の点で劣ることがないことが判明した。現在両者での比較実験を行っているが、シミュレーションを支持する中間結果を得ている。

**Keywords**: limited spearman-kärber procedure, stumbo-murphy cochran procedure, survival curve method

新谷英晴：ISO ならびに ISO/TC198 WG4 について—第 6 回会議までの動向(1)

ファーマテックジャパン, 10, 7~18 (1994)

ISO について解説し, ISO と GMP との関係 ISO と JIS との関係, ISO と CEN との関係などを解説した。その後, ISO/TC198 WG4, BI (バイオロジカルインジケーター, 生物指標) で議論の中心を解説し日本案の主眼点を解説した。

**Keywords**: ISO, CEN, BI

新谷英晴：ISO ならびに ISO/TC198 WG4 について—第 6 回会議までの動向(2)

ファーマテックジャパン, 10, 27~31 (1994)

ISO/TC198/WG4 の第 6 回会議までの国内の動向ならびに第 6 回会議での日本案の準備, 実験ならびにシミュレーション等について解説した。

**Keywords**: ISO, GMP, BI

新谷英晴：溶媒抽出でのアーティファクトの生成  
ぶんせき, 7, 541 (1993)

溶媒抽出に於て抽出溶媒と目的成分が反応して高毒性のアーティファクトが生成する可能性があり, それゆえ, 液-液抽出時に於ける抽出溶媒の選択の必要性を解説した。なぜならアーティファクトの生成の可能性の事実を見過ごせば高毒性の化合物を抽出したと誤認する可能性があるからである。

**Keywords**: solvent extraction, artifact formation, solid phase extraction

新谷英晴：血中成分の分別定量における問題点と解決法

ぶんせき, 1, 56~59 (1994)

現在の臨床化学で問題とされている特異的且つ選

択的臨症成分分析の必要性ならびにその問題点の解決法について解説した。

**Keywords**: clinical chemistry, selective analysis, differential analysis

新谷英晴：ISO/TC198 WG4, BI, バイオロジカルインジケーター, オタワ (8/4-8/6'93) 会議報告

医科器械学会誌, 63, 559~562 (1993)

昨年 8 月 4 日より 6 日までオタワで開催された第 5 回 ISO/TC 198 (医療用具の滅菌) の WG 4, バイオロジカルインジケーター, の主査として出席した。その時の議論の内容を日本の主張と比較しながら解説した。その時の日本案の内容はシミュレーションだけであったので, 次の会議のために実験を行うことにした。

**Keywords**: ISO, BI, Biological indicator

中村晃忠, 山中昭夫\*：前臨床生物学的評価法の国際標準化 (ISO/TC194)

IOL, 7, 225~230 (1993)

多種多様な医療用具の生物学的な評価方法は当然ながら一律ではありえない。また, 生物学的試験方法も多種多様である。1989 年, 国際標準化機構は第 194 技術委員会を組織して, 医療用具全般の生物学的評価の枠組みと試験方法の標準化にとりかかった。本報告では, その意義と現在の作業進行状況, およびそれをめぐる国際状況を説明した。

**Keywords**: ISO/TC194, medical device, preclinical test, biological evaluation

\* 神戸海星病院

中村晃忠：ヨーロッパの医療用具規制事情  
生体材料, 12, 39~42 (1994)

近年, あらゆる分野で規制体系, 基準や試験法の国際調和作業が活発化しているが, 医療用具分野も例外ではない。このような国際調和の嵐の中にいると, 自分の活動の意味や方向を見失ってしまうのではないか, という思いにとられる。そこで, 医療用具分野での国際調和の嵐の発生地点であるヨーロッパの規制状況を整理し, ISO9000 シリーズによる品質保証, GMP の国際調和, 医療用具に関する EC 指令および基本要件, これらと基準の調和との関連性について考察した。

**Keywords**: ISO9000, EC directives, medical device, essential requirements

松村年郎：大気中のホルムアルデヒドの発生源と環境レベルについて

空気清浄, 31, 336~349 (1994)

空気中のホルムアルデヒド (HCHO) は, 粘膜の刺激や呼吸器疾患等の原因物質, また, 最近ではヒトに対する発がん可能性物質として認定されており, ヒト暴露防止の見地から, 外国においては種々の行政対策が打ち出されている。本論文においては, HCHO による健康被害の未然防止, 公害防止対策

の推進等の基礎資料を得る観点から、種々の発生源からのHCHO発生量、室内環境レベルならびに環境基準等について、最近の文献を調査し、貴重な資料を提供した。

**Keywords:** formaldehyde (HCHO), production source, environmental level

斎藤行生：自然毒による食中毒—ジャガイモに含まれる有害アルカロイド—

臨床栄養, 83, 18 (1993)

ジャガイモ中の有害アルカロイドの毒性およびジャガイモ食品中の性質、分布等について概説した。

**Keywords:** Potatoes, solanine, chaconine, alkaloids

斎藤行生：魚介毒による食中毒

臨床栄養, 83, 258 (1993)

いくつかの魚介毒による中毒症状とその原因物質を表示し、さらに、最近、カナダ等で発生した魚介毒、ドモイ酸による食中毒の特性について概説した。

**Keywords:** paralytic shellfish poison, domoic acid

斎藤行生：輸入食品の安全性—農薬に着目して—  
臨床栄養, 83, 714 (1993)

我が国における輸入食品の検査体制および代表的な有機リン系農薬、マラチオンの食品経由暴露量等により、輸入食品の安全性がいかに確保されているかを説明した。

**Keywords:** malathion, imported food safety

斎藤行生：食品の安全性評価—農薬に着目して—  
公衆衛生研究, 42, 154~160 (1993)

国際機関による安全性評価の仕組、食品中の農薬のモニタリング、食品経由農薬摂取調査、および尿中の農薬の微量分析法等、農薬に関する最近の情報について概説した。

**Keywords:** pesticide, safety, exposure

斎藤行生 高畑寿太郎<sup>\*1</sup>、永山敏廣<sup>\*2</sup>、木川寛<sup>\*3</sup>、衛藤修一<sup>\*4</sup>：食品中の残留農薬をめぐる諸問題—簡易分析法をめざして—

食品衛生学雑誌, 34, 330~338 (1993)

日本食品衛生学会第65回学術講演会(1993年5月13日)における農薬分析法に関する自由集会の講演内容および講演後の討論の様相を紹介した。

**Keywords:** Residual Pesticide, Analytical method

\*1 仙台市衛生研究所

\*2 東京都立衛生研究所

\*3 横浜市衛生研究所

\*4 北九州市環境衛生研究所

豊田正武：わが国におけるバイオ食品研究の現状  
食品衛生研究, 43, 21~30 (1993)

バイオテクノロジー関連の公共機関126, 民間機

関122,合計248カ所を対象にアンケート調査した結果を報告した。公共機関で8割以上、民間機関で6割がバイオに取り組んでいた。バイオ技術としては、組換えDNA技術、細胞融合技術、組織培養技術等がほぼ横並びで研究開発されていた。実用化段階の食品項目は野菜、果実、畜水産動物が多い。組換え技術用の宿主、遺伝子、細胞融合、組織培養、バイオリアクタ等についてまとめた。

**Keywords:** foods, biotechnology

石綿 肇：食品用輸入プラスチック製品の安全性確保と監視

びーえる, 43, 14~17 (1994)

検疫所における輸入食品等の検査は年間40万件に達する。この内、食品衛生法違反となるものは約1千件である。輸入の器具・容器包装は約5万件で違反は82件となっている。違反の内訳はガラス、陶磁器、ほうろ引き製品からの鉛とカドミウムの溶出(39件)、合成樹脂材質中の鉛とカドミウムの含有(32件)が主なものである。違反の主な原因は生産国での違反製造ではなく、生産国とわが国との規格・基準の違いにある。わが国の規格・基準を周知していれば輸出しないで済んだものが多い。このような輸入食品等の現状解析から、解決策と今後の方針として、輸出時の検査、日本仕様の製品の製造、規格・基準と検査法の海外への提供、食品衛生監視員の海外派遣等について論じ、輸入食品衛生の守備から積極的向上を計る必要があることを提言した。

**Keywords:** imported foods, tableware, inspection

合田幸広：天然食品添加物を含む植物

植物細胞工学, 6(2), 98~108 (1994)

わが国では、天然食品添加物について、表示のために用いる名称が「化学的合成品以外の食品添加物リスト」として告示されている。ここでは、このリスト収載の添加物のうち、着色料、保存料、酸化防止剤、苦味料をとりあげ、主に、その基原植物、有効成分について紹介した。また、添加物基原植物由来の培養細胞を利用した有用二次代謝物の産生例についても述べた。

**Keywords:** non-synthetic food additives, plant-derived food additives, plant tissue culture

丹野雅幸、宮田直樹：生体内でNOを発生する化合物

現代化学, 227, 36~41 (1994)

NOは血管弛緩作用や、サイトカイン制御、神経伝達など多様な生理作用を示すことが明らかになるにつれて、最近、NO発生化合物が注目されるようになってきた。そこで、現在までに報告されているNO発生化合物を代謝経路別に整理するとともに、1) NO産生系を活性化する化合物 2) 代謝されてNOを発生する化合物 3) NO自発発生化合物の三系統に区別することを提案した。その上で、我々が合成したNO発生化合物が3)に属することと、NOが通常、気体であるためその微量を扱う場合、

3) の化合物が適していることなどの意義付けを行った。

**Keywords:** nitric oxide, NO radical, NO-donor

**Tanamoto, K.: Induction of prostaglandin release from Macrophages by bacterial endotoxin.**

*Methods in Enzymol.* (Clark, V. L., and Bavoil, P. M. eds) Academic Press 236, 31~41 (1994)

エンドトキシン活性の多くの反応は免疫細胞、特にマクロファージを介して発現される。ここではエンドトキシンによるマクロファージからの代表的なメデイエーターの一つであるプロスタグランジン産生に関する実験方法について解説した。まずグラム陰性菌からエンドトキシンを調製する方法、種々のマクロファージの調製法、エンドトキシンによるマクロファージからのプロスタグランジン産生、その精製、測定の実験条件、方法等をまとめた。

**Keywords:** endotoxin, Prostaglandin, macrophage

**小沼博隆: 食鳥処理場における微生物学的衛生管理**

鶏友, 672, 70~75 (1993)

平成4年4月にスタートした食鳥の検査制度に対応すべく、安全かつ高品質の食鳥肉生産を目指して食鳥処理場における微生物学的衛生管理マニュアルを作成した。本稿では、衛生管理マニュアルを作成するために必要な食鳥処理場における各処理工程ごとの微生物学的危害度分析ならびに重要衛生管理ポイントを見つけ出すための調査方法を解説した。

**Keywords:** Chicken meat, *Salmonella*, *Campylobacter*

**小沼博隆: 食鳥処理場における微生物学的衛生管理**

鶏友, 673, 70~76 (1993)

平成4年4月にスタートした食鳥の検査制度に対応すべく、安全かつ高品質の食鳥肉生産を目指して食鳥処理場における微生物学的衛生管理マニュアルを作成した。本稿では、衛生管理マニュアルを作成するために行った食鳥各処理工程の微生物汚染実態を基に微生物学的目標基準値と衛生管理ポイントの作成、監視・調査マニュアル、監視・調査結果に基づく措置・指導マニュアルおよび監視・調査のための検査マニュアルと汚染判断基準に必要な写真集作成までを解説した。

**Keywords:** chicken meat, ICMSF, HACCP

**小沼博隆, 品川邦汎\*1: 食鳥処理場における微生物学的衛生管理**

食肉の科学, 34, 165~177 (1993)

平成4年4月にスタートした食鳥の検査制度に対応すべく、安全かつ高品質の食鳥肉生産を目指して食鳥処理場における微生物学的衛生管理マニュアルを作成した。

本稿では、衛生管理マニュアルを作成するために必要な食鳥処理場における各処理工程ごとの微生物汚染実態を把握し、その実態調査結果に基づいて危害度分析ならびに重要衛生管理ポイントを明らかにするとともに微生物学的目標基準値と衛生管理ポイントの作成、監視・調査マニュアル、監視・調査結果に基づく措置・指導マニュアルおよび監視・調査のための検査マニュアルと汚染判断基準に必要な写真集作成までを解説した。

**Keywords:** chicken meat, ICMSF, HACCP

\*1 岩手大学

**小沼博隆: 食中毒**

笑顔, 24, 18~21 (1993)

日本で発生する代表的な食中毒菌について、その生息場所、増殖条件、症状および防止法などについて平易に解説した。

**Keywords:** *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*

**小沼博隆: 輸入食品と食品衛生**

東京都予防医学協会年報, 23, 78~84 (1994)

日本における輸入食品の現状を届出件数、輸入重量、検査件数と検査内容および違反件数と違反内容について紹介し、今後における輸入食品の安全確保の考え方を整理した。

**Keywords:** imported foods, NACCS, FAO/WHO

**酒井綾子, 梅田 誠\*1, 中村好志\*2, 佐々木澄志\*3, 岩瀬裕美子\*4: 発癌プロモーター *in vitro* 試験について**

環境変異原研究, 15, 131~153 (1993)

最近問題になっている非変異癌性物質のうちには、発癌プロモーション作用を主体とする物質も多いと考えられ、発癌プロモーター *in vitro* 試験の重要性が増している。

種々の発癌プロモーター *in vitro* 試験のうちIARCの癌原性物質長期短期試験法評価特別委員会の報告で有効とされている細胞トランスフォーメーション試験と細胞間連絡阻害試験を取り上げ、解説するとともに著者らの研究室での結果を報告した。これらの方法を用いて試験された物質について文献調査を行い、実験動物における結果との一致性を調べ、有用性について論じた。文献調査の結果は、試験法ごとに各物質についてのデータベースとしても利用できるよにまとめた。

**Keywords:** tumor promoter, *in vitro* assay, cell transformation

\*1 横浜市立大学木原生物学研究所

\*2 静岡県立大学薬学部

\*3 食品薬品安全センター秦野研究所

\*4 三菱化成総合研究所

**一戸正勝: 農作物のカビ毒汚染にかかわる圃場環境条件**

食品と微生物, 10, 9~14 (1993)

食品のカビ, カビ毒汚染機序と制御に関するシンポジウムにおいて, カビ毒(マイコトキシン)の汚染は農作物の栽培圃場から始まっている例が多く, カビ毒産生菌の感染経路, 栽培圃場における気象条件とカビ毒汚染, さらに収穫, 貯蔵条件とカビおよびカビ毒汚染などについての理解がきわめて重要であることを示した。具体的事例として, 国産麦類の植物病原性 *Fusarium* のトリコテセン生産性や, 圃場由来の *Gibberella zeae* のトリコテセンおよびゼアラレノン生産性, 麦類栽培土壌中に分布する *Fusarium* 菌種について解説した。さらに1988年のアメリカ中西部のトウモロコシ生産地域の異常気象の結果発生した, 輸入トウモロコシのアフラトキシン汚染につき菌学試験結果を示した。

**Keywords** : trichothecense, *fusarium*, aflatoxin

一戸正勝: まれな真菌症の原因菌の生態

日本医真菌学会雑誌, 34, 165~170 (1993)

ヒトの疾患に関与する真菌類のうち, 比較的まれな真菌症の原因菌に関するシンポジウムにおいて, 日和見感染菌などの自然界における生態について, *Alternaria*, *Fusarium*, *Penicillium* などに限定して, 空中浮遊真菌相, 室内塵真菌相, 土壌真菌相における位置付けを解説した。これらの菌類の分離条件として, 幅広い菌種の検出に適した万能培地と特定菌の分離を目的とした選択培地の適用例や, 培養温度による選択性などについて示し, 医真菌学分野における環境由来真菌の意義について論議した。

**Keywords** : airborne fungi, soil borne fungi, selective isolation

Sekizawa, J.: 定量リスク評価の手続き

日本リスク研究学会誌, 5(1), 59~62 (1909)

米国研究評議会が提唱し健康リスクの評価手続きとして広く採用されている方法について解説するとともに, 定量的なリスク評価として“無影響量をもとにした評価”と, “モデルをもとにした推計による評価”の実際について記した。またリスクの表現に使われるユニットリスク, 生涯リスク, 年間リスク, 相対危険度, 追加過剰リスクなどの用語についても説明を加えた。さらに EC で採用されている環境リスク評価手法と, より一般的な環境リスク評価の考え方についても概説した。

**Keywords** : quantitative risk assessment, scenario-based analysis

五十嵐貴子: 亜鉛フィンガーを標的とした AIDS 治療薬への期待

ファルマシア, 29, 1390 (1993)

亜鉛フィンガーから亜鉛を排除する働きを持つ芳香族 C ニトロ化合物の, 抗 AIDS ウイルス作用に関する最近の話題をまとめた。

**Keywords** : zinc finger, HIV-1, C-nitroso compound

津田充宥: NO 産性と体内ニトロソ化反応

実験医学, 11(18), 2463~2468 (1993)

体内で生成する発がん性ニトロソ化合物がヒトがん発生要因の一つと考えられている。この体内ニトロソ化合物生成は, 主として, 胃の酸性条件下で起こり, そのニトロソ化剤の供給源は, 食事由来の硝酸塩が口内細菌により還元されて生じた亜硝酸塩とされてきた。

マクロファージの活性化に伴う L-アルギニンのグアニド窒素からの大量の一酸化窒素 (NO) の産生は, 細菌などの異物侵入に対する生体防御反応である反面, 体内での発がん性ニトロソ化合物生成に対する, 新たなニトロソ化剤供給源としての可能性を示してきた。近年, NO が細胞間情報伝達物質として, 多彩な生理機能に係わっていることが明らかにされており, 生体での重要な役割が注目されているが, エンドトキシンショックなどの毒性面も明らかにされている。生体での NO の両刃の剣としての側面として, 体内 NO 産生と発がんとの係わりという影の面から, 体内ニトロソ化反応について著者らの研究を中心に解説を試みた。

**Keywords** : arginine-derived nitric oxide, macrophages, endogenous N-nitrosation

津田充宥: 炎症と発がん—一酸化窒素産生と発がん物質の体内生成

Cancer Res. Clinics, 2(4), Winter, 780~786 (1993)

近年, マクロファージの活性化に伴って, L-アルギニンを基質として一酸化窒素 (NO) を産生する酵素, nitric oxide synthase (NOS) の誘導が明らかにされてきた。この事は, ヒト体内ニトロソ化合物生成による発がんリスクを, 新たな観点から検討する必要性が生じたことを示している。本稿では, そのような背景を, 著者らの動物実験および分子疫学的研究の両面からの解説を試みた。

ラット腹腔内に *E. coli* の lipopolysaccharide (1 mg/kg) を投与した場合, 大量の一酸化窒素 (NO) の産生が起こる。ここで生じた NO の体内ニトロソ化への関与を, 亜硝酸捕捉剤チオプロリンを投与して, 生成したニトロソチオプロリンの尿中への排泄を指標として検討した。タイ東北部コンケン地方は胆管がんの多発地域として知られている。その発生要因として, 同地域に高頻度に見られる肝吸虫寄生感染との関係が示されている。著者らは, コンケン大学・医学部サクラ博士らとの共同研究で, 肝吸虫の慢性的寄生感染がヒト体内でのニトロソ化合物生成を促進するか否かを, 同地域住民ボランティアにプロリン賦課テストを実施する事により調査検討した。

**Keywords** : endogenous nitric oxide formation, liver fluke, carcinogenesis

佐井君江: 非変異・がん原物質による酸化的 DNA 傷害について—特に 8-OH-deoxyguanosine の測定—

環境変異原研究, 15, 123~130 (1993)



近年、数多くの環境化学物質の発がん性試験が実施され、その結果が蓄積するにともない、いわゆる非変異がん原物質の存在が問題視されるようになってきた。一方、活性酸素と発がんの関連が近年注目され始め、特に酸化了的DNA損傷の一つである8-OH-deoxyguanosine(8-OH-dG)は、*in vivo*における酸化了的DNA損傷の指標として、その生物学的意義、特に発がんにおける役割について多方面から研究が進められてきた。実際に発がん物質の投与により標的臓器中で特異的に8-OH-dGが生成すること、また8-OH-dGに対する特異的な修復酵素の存在、8-OH-dGの変異原性に関しても明らかとされ、8-OH-dG生成の発がんにおける重要性がさらに認識されつつある。本稿では、著者らが行った非変異・がん原物質(肝発がん性のペルオキシソーム増殖剤; アルミニウムクロフィブレート、シンフィブレート、ジエチルヘキシルフタレート、ペルフルオロオクタノ酸およびペルフルオロデカン酸、ならびに腎発がん性の鉄-ニトリロ三酢酸)の投与による短期実験例について紹介し、標的臓器中での8-OH-dGレベルの上昇と発がんとの関連性を示した。さらにそれらの結果から、*in vivo*における8-OH-dGの測定が、発がん過程の活性酸素が関与する非変異・がん原物質の短期スクリーニング試験に利用できる可能性について提示した。

**Keywords:** non-mutagenic carcinogen, oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine

#### 井上和秀: 新しい中枢性ニューロ・トランスミッター ATP

*Brain Medical*, 5(2), 100~101 (1993)

中枢神経系(CNS)でATPがなんらかの作用を示すことが解ったのはかなり昔のことであるが、1992年まで、研究報告がきわめて少なかった上に、適用されたATPがアデノシンにまで代謝され、両者の作用を合わせてみていたふしもあり、ATP研究は混乱の中にあった。1992年の我々の報告以降、CNSでのATPの研究報告が目立ってきた。我々は、海馬神経細胞でATPにより2種類の内向き電流が惹起されることを報告した。一つは、ATP受容体を直接介すると考えられる比較的小さな持続性内向き電流であり、もう一つは、神経終末からのグルタミン酸放出を経て間接的に惹起されると考えられる大きな一過性の内向き電流である。ついで9月には、孤束核神経細胞(急性単離法)でATP刺激によりP2<sub>2y</sub>受容体を介して大きな内向き電流が惹起されることを報告した。同年9月、手綱核においてATP受容体によるシナプス電流がスライスパッチ法により神経薬理学的に証明された。海馬培養系においては我々が1993年3月ATP受容体によるシナプス伝達を証明した。このように、ATPは中枢性神経伝達物質としての地位を確立しつつあると言える。

**Keywords:** ATP receptor, neurotransmitter, hippocampus

#### 井上和秀: 新しい中枢性神経伝達物質 ATP 蛋白質核酸酵素, 38(9), 63~64 (1993)

1992年手綱核においてATP受容体によるシナプス電流がスライスパッチ法により神経薬理学的に証明され、海馬培養系においては、1993年ATP受容体によるシナプス伝達の存在が初めて証明され、ATPは中枢性神経伝達物質としての地位をようやく確立しつつある。海馬神経細胞での早い興奮性シナプス伝達を担う主要な神経伝達物質がグルタミン酸であることは周知の事実であるが、それに加えてATPもそのような神経伝達物質である可能性が出てきた。しかもATPはグルタミン酸と同様に培養海馬神経細胞の細胞内Ca濃度を著明に高める。記憶・学習に関連して研究されている長期増強作用(LTP)、あるいは虚血後の神経細胞死が細胞内Ca濃度上昇と相関しているとの考えがあり、これを踏まえると、ATPによる細胞内Ca濃度上昇作用はきわめて重要な意味を持って来る。

**Keywords:** ATP receptor, intracellular Ca concentration, hippocampus

#### 中沢憲一: ATP受容体チャネル—そのカルシウム透過機構とニコチン様アセチルコリン受容体チャネルとの縮重性

血管, 16(3), 107~114 (1993)

細胞外ATPにより活性化されるカチオン透過型イオン・チャネルの性質、特にカルシウム透過機構およびアセチルコリン受容体チャネルとの関連性について我々の研究成果を中心に概説した。ATPにより活性化される単一チャネル電流はカルシウムにより減少する。これは、チャネルのカチオン結合部位においてカルシウムがナトリウムと競合するためと考えられる。ATPにより惹起される細胞レベルでの電流はニコチン様受容体作動薬による電流と加算性がない。この非加算性はATPがある種のアセチルコリン受容体チャネルを活性化する可能性を示唆する。

**Keywords:** ATP-activated channels, calcium, acetylcholine receptor-channels

#### 藤森観之助: 米国環境保護局の神経毒性スクリーニング総合検査法

*J. Toxicol. Sci.*, 18, App. 19~22 (1993)

農薬および化学物質について国際的に神経毒性ガイドラインを作成する動きがある中で、わが国でもスクリーニングの神経毒性試験について基礎データの蓄積が望まれる。そこで、今後国際的ガイドライン作成の核となると思われる米国環境保護局の神経毒性スクリーニング総合検査法について、実際に米国内の試験施設で行っている実験手法の内容を具体的に解説した。主な観察段階は、ケージ外、手に取った時、オープンフィールドに置く時、オープンフィールド内、反応検査、運動検査から成る。

**Keywords:** neurotoxicity, functional observation battery, EPA guideline

## 井上和秀：ATP (アデノシン 3 リン酸)一脳の神経伝達物質—

*Bio Industry*, 11 (6), 337~343 (1994)

「エネルギーの通貨」としてあらゆる細胞に普遍的に存在する ATP が神経伝達物質の一つであるとする仮説は、1970 年代に G. Burnstock により発表されたが、この考えは当時としてはかなり信じ難い大胆な仮説であった。ために ATP 研究は四半世紀の辛酸をなめることになったが、今日までの膨大な研究成果を踏まえ、いまや、生体のかなりの臓器・組織で ATP が神経伝達物質として働くことが信じられるようになってきた。しかしながら、情報量が圧倒的に少ないために、いまだ確たることが言えない部位の一つに脳・中枢神経系 (CNS) がある。本編では、まず ATP が CNS で神経伝達物質として働いている可能性について述べ、つづいて ATP 受容体関連化合物が向精神薬・抗痴呆薬として働きうるかという夢について語った。

**Keywords** : ATP, intracellular Ca concentration, memory/learning

## 林 裕造：臨床試験からみた前臨床試験の問題点—創薬研究における種間外挿の科学的基礎—

*臨床薬理*, 24, 289~292 (1993)

前臨床試験は現在、改善/強化されつつあるが、依然として前臨床試験において予測されなかった副作用の事例が新医薬品の臨床報告にあらわれる場合が少なくない。その最も大きな理由としては前臨床試験に用いる動物とヒトとの種差の問題があげられる。即ち動物実験で得られた結果をヒトに外挿する理論が充分ではなく、ケースバイケースの対応にたよらざるを得ないのが現状である。この問題を解決するには、認められた反応の発現機序にもとずく試験モデルによる実験成績、体内動態の比較調査、関連物質についての基礎/臨床知見を総合してヒトにおける事象の程度を予測する方法をとる必要がある。これを実現するためには、臨床副作用情報を積極的に活用し種間外挿理論を構築することが条件となり、そのためには製薬企業間および専門分野間のわくを越えた産官学の協同体制が必要であろう。

**Keywords** : preclinical test, clinical test, species difference

## 高橋道人：発がん動物モデル

*Oncologia*, 26, 68 (1993)

がん原性試験の本来の目的は、人間に対してがん原性のある物質を見つけることにある。人間にがんを発生させるほとんどの物質は、十分な投与量および長い実験期間を確保すればラットやマウスにもがんを生じることから、MTD (最大耐量) による1年半~2年のがん原性試験が実施されるようになった。しかし、多くの試験が行われるようになると偽陽性結果が問題となるようになった。それらをメカニズムから解析すれば、1) げっ歯類特有なもの (例：肝ペルオキシソーム増生剤による肝腫瘍、 $\alpha_{2u}$ -グロブリンと雄ラット腎腫瘍、プロラクチンと乳

腺腫瘍、異物と皮下腫瘍、TSH と甲状腺腫瘍、 $\beta$ -アドレナリン受容体刺激剤と卵巣間膜腫瘍、結晶や結石あるいは尿 pH 異常による膀胱腫瘍など)、2) 高用量時のみに生ずるもの (例：高カルシウム血症と副腎随質腫瘍、トリプシンインヒビターと膵腺房細胞腫瘍、胃酸分泌抑制剤による胃カルチノイド腫瘍)、3) プロモーター作用をもつもの (薬物代謝酵素誘導薬とマウス肝細胞腫瘍) などがあり、これらは本来のがん原性とは別の評価が必要と考えられる。

これらの物質の評価に際しては、この様な現象の存在を証明することによってこの特異的な発がん性を区別することが出来る。

**Keywords** : carcinogenicity test, animal model

## 高橋道人：毒性試験の判定基準

月刊フードケミカル, 8, 73~79 (1993)

すべての物質は、その曝露の仕方 (用量, 経路) によっては生体に対し有害な影響を与える可能性がある。したがって、物質の毒性を検出することが、その物質の生体に対するリスクを評価するための重要な第一歩となる。化学物質の毒性についての情報は、時にはヒトが曝露された結果、ヒトからの情報として得られることもあるが、通常、動物あるいはその他の実験系を用いた実験的研究のデータとして得られる。

1. 動物実験から得られる毒性情報；急性と慢性の反応がある。
2. 毒性試験の一般的性格；傷害の引き起こされる量, 器官, 病変, 病変の性格
3. 毒性反応の性格；曝露量が増すと発生率が増す。可逆性, 非可逆性など。
4. 用量・反応関係；動物種, 曝露時(期)間, 回数, 経路により影響を受ける。
5. 毒性試験の組み合わせ；必要かつ十分な試験の組み合わせ。
6. 無影響量, 無毒用量；実験を行った動物から NOEL, NOAEL を求める。
7. 発がん性；質的評価である。メカニズムを考慮に入れた評価が行われる。

**Keywords** : chemicals, toxicity test, risk assessment

## M. Takahashi &amp; H. Matsui: Mechanisms of testicular toxicity.

*J. Toxicol. Pathol.*, 6, 161~174 (1993)

精巣毒性の発現をそのメカニズムから総説的に述べたものであり、病理組織学的な検索においてそれらを理解することは極めて重要である。

1. 緒言；精巣は組織学的に構造が複雑な上に、複雑な精子形成サイクルが存在する。雄受精能の評価に際しては病理学的な精査が必要である。
2. 精巣の特異性；他の臓器と異なる点は、ホルモンの支配を受ける、細胞分裂が盛んである、血液精巣関門がある等である。
3. 精巣毒性の発生メカニズム；a) 精細管上皮への直接作用, b) ホルモンによる二次的作用が精子

形成に影響, c) 精子への直接的, 間接的影響, d) 循環障害による, e) その他の種々の作用。  
 4. 代表的な精巣毒性物質によって現れる形態学的変化 a. Cyclophosphamide: 精粗細胞の変性が特徴的。b. Nitrobenzene: セルトリ細胞の空胞化および精細胞の変性が見られる。c. Ethan-1, 2-dimethanesulfonate (EDS): テストステロンを産生するライディヒ細胞が傷害を受け, 二次的に精細管上皮が変性壊死に陥る。d. Cadmium chloride: 循環障害性の壊死性病変が特徴的で, 末期には繊維化。  
 5. 精巣毒性の評価: 精巣の病理組織学的検索は適切な固定法 (通常ブアン固定) を用いステージを考慮した検討が必要である。  
**Keywords**: testicular toxicity, ethane-1, 2-dimethanesulfonate, male reproductive toxicity

Suzuki, T., Hayashi, M. and Sofuni, T.: **Current aspects of transgenic mice for mutation research—Importance of the positive selection system—**

*MMSCom.*, 7, 31~38 (1993)

Transgenic mouse を用いた変異原性試験は, *in vivo* における遺伝子突然変異の検出系として大変注目されている。既に開発されている幾つかの試験系について概説するとともに, それらの抱えている問題点について指摘した。さらに MutaMouse を用いた試験系において, *IacZ* 遺伝子の mutant を positive selection する方法を用いて変異頻度の解析を行った結果を従来の色による判定法と比較し, その有効性を示すとともに, 今後この試験法が標準的な変異原試験法の一つとして確立されるために克服すべき課題について論じた。

**Keywords**: transgenic mouse, *IacZ* mutation, positive selection

Hayashi, M., Hashimoto, S., Sakamoto, Y., Hamada, C., Sofuni, T., and Yoshimura, I.: **Statistical analysis of data in mutagenicity assays: rodent micronucleus assay.**

*Environ. Health Perspect.*, 102 suppl 1, 49~52 (1994)

1991年5月23~25日に東京大学山上会館で開催された毒性研究のための計量生物国際会議のプロシーディングである。化学物質の安全性を評価するために多くの短期遺伝毒性試験が長期の動物試験とともに実施されている。それら遺伝毒性試験の方法論に関しては幅広く議論されているが, 得られた結果の統計学的な評価に関しては, 標準的な方法が示されていない。ここでは, 遺伝毒性試験によって得られるデータの特徴をまとめ, 他の動物試験等によって得られるデータの特徴と比較検討した。さらに, 遺伝毒性試験の一つの例として, マウスを用いる小核試験で得られるデータについて詳細に検討した。陰性対照群の背景データが2項分布に従うことを示し, 背景データとの比較ならびに用量反応関係を調

べる傾向検定を取り込んだ, 3段階法を紹介した。さらに, 2項乱数を発生させ, 3段階法の第1種および第2種の過誤の確立についてモンテカルロシミュレーション法によって検討した。その結果, それぞれのステップの有意水準を適切に設定することにより, 両種の過誤をとともに低く抑えることに成功した。

**Keywords**: historical control, binomial distribution, trend test

林 真: **小核試験の将来**

変異原性試験, 3, 55~63 (1994)

小核を観察する方法が今後どのような方向へ発展してゆくかの予測は難しいが, 今までのような化学物質の安全性に一手法としてばかりではなく, もっと幅広い分野への応用が予想される。ここでは先ず, 現在試みられている新しい方法について概説した後, 末梢網赤血球を用いる方法と, 小核試験の自動化について詳述する。現在試みられている新しい小核観察法としては, ヒトのリンパ球培養細胞を用い, 労働環境のモニタリングをする方法; 水生生物を用いて水質汚染のモニタリングを行う方法等, 環境の汚染の評価に用いようとするものがある。また, 動原体, セントロメアを特異的に染色する手法を用いて, 誘発された小核の誘発様式を推定しようとするものもある。さらに, 末梢血を用い, 被験動物を屠殺すること無く, 染色体異常の誘発率を検討する方法も一般化し, 他の毒性試験と実験動物を共有することも考えられている。

**Keywords**: micronucleus assay, automation, acridine orange supravital staining

能美健彦: **環境変異原検出系, 評価系の開発**

環境変異原研究, 15, 203~212 (1993)

環境変異原の検出に用いられるバクテリア・テスター株の開発の経過, ならびに環境変異原のヒトに対する危険性を評価する際に用いられる培養細胞株およびトランスジェニックマウスの開発について報告した。本論文は, 平成5年5月にヤクルト・ホールで行われたシンポジウム「ヒト環境発癌リスクの検出と評価」での講演内容に加筆して作製されたものである。

**Keywords**: acetyltransferase, aromatic amines, transgenic mice

能美健彦: **ニトロアレーン, 芳香族アミンに高感受性を示すサルモネラ菌株の開発**

環境変異原研究, 15, 1~11 (1993)

ニトロアレーン, 芳香族アミンに高感受性を示すサルモネラ・テスター株の開発の経過を紹介した。本論文は平成4年度日本環境変異原学会奨励賞受賞講演に加筆して作製されたものである。

**Keywords**: nitroarenes, aromatic amines, *Salmonella typhimurium*

能美健彦, 渡辺雅彦, 山田雅巳, 祖父尼俊雄, 小

田美光\*：高感受性サルモネラ・テスター株開発の  
ストラテジー：薬物代謝酵素遺伝子の導入と  
DNA 修復酵素遺伝子の破壊

環境変異原研究, 15, 13~21 (1993)

アルキル化剤, ニトロアレーン, 芳香族アミンなどの環境変異原に高感受性を示すエームス株また umu テスト用試験菌株の開発の現状について解説した。

**Keywords** : umu test, aromatic amines, alkylating agents

\* 大阪府立公衆衛生研究所

水沢 博, 本間忠充, 野村信夫\*：培養細胞株に  
おけるクロスカルチャーコンタミネーションの防  
止と DNA プロファイリング

組織培養, 19, 494~498, 543~546 (1993)

動物培養細胞においては細胞相互の混入や混乱(クロスカルチャーコンタミネーション)の発生率が極めて高い。細胞バンクにおいて調査した10件ほどから、ヒト細胞とブタ参謀相互の混入、マウス細胞とヒト細胞相互の混入などの事例を紹介するとともに、細胞バンクにおいて発生したヒト由来の MT-1 細胞と Molt4F 株とのクロスカルチャーコンタミネーションや原因追求の事例も紹介した。このような事故を防止する目的で本研究室においては DNA プロファイリング法を確立しており、極めて有効に機能している。日常的に培養細胞を利用しての研究者にとっても有効に活用できることから、実験手法について詳細に記述した。

**Keywords** : DNA profiling, cell identification, cell bank

\* 日本医科大学

岡田敏史, 石橋無味雄：赤外吸収スペクトル測定  
法の改正案について

日本薬局方フォーラム, 2, 126~134 (1993)

第十二改正日本薬局方第一追補において、一般試験法「赤外吸収スペクトル測定法」の改正を行った。改正のポイントは、1) 参照スペクトル法の採用と、2) 装置に関して従来までの分散形赤外分光光度計と合わせ、フーリエ変換形赤外分光光度計も利用できることを明確にすること、の二点にあった。そのほか、試料調製法に反射スペクトル法を追加するなど、上記二点の改正に伴う試験法の整備を行った。本稿では、これらの改正内容についての解説と背景説明を行った。

**Keywords** : japanese pharmacopeia, infrared spectrophotometry, revision proposal

四方田千佳子：ポリサッカライド膜の物性と機能  
膜, 18(3), 139~148 (1993)

医薬品分野における、ポリサッカライド膜特性と利用状況および最近応用が試みられてきたキトサン膜の特性について紹介した。医薬品分野におけるポリサッカライド膜は主としてコーティングフィルムやマイクロカプセル素材として用いられており、膜の

特性から見ると、膜の耐水性を利用した防水皮膜、膜の透過性を利用した半透膜もあるが、大部分は薬物の放出が膜の溶解や分解に律速されるものが多い。実用例では、セルロースはセルロースアセテートフタレート等の種々の誘導体化が可能で、合成ポリマーのようなモノマー残留性の危険がなく安全性が高いために、広く医用素材として用いられている。その他、プルランが糖衣の結合剤として使用されているが、コーティング剤としての用途も期待されている。応用研究が試みられているキトサン、キトサンでは、キトサン膜は耐酸性に、キトサン膜は耐アルカリ性に優れ、いずれも耐有機溶媒性は合成高分子よりかかるかに大きく、体内分解性を有するために、種々の誘導体化や複合膜としても応用が期待される。

**Keywords** : polysaccharide, membrane, excipient

四方田千佳子：キチン・キトサンの製剤素材とし  
ての特性

Pharm Tec Japan, 10, 73~80 (1994)

キトサンのフィルムや直打錠などの剤型における挙動と特性を概説した。キトサンフィルムの溶解性やリゾチームによる分解性は用いたキトサンの脱アセチル化度に依存した。また、キトサン膜に、キトサンと相互作用の強いものや、分子量大きな物質を内包させた場合には、放出はキトサンフィルムの分解によりコントロールされた。キトサンと CM-キチン、キトサンとヒアルロン酸との複合膜についても安定性と分解性について示し、キトサンと同様に生分解性膜としての可能性を示唆した。キトサン直打錠では、10%アルギン酸ナトリウム添加キトサン直打錠における pH 非依存性の徐放効果は、キトサンとアルギン酸ナトリウムの溶解性が pH によって異なることに起因していることを示した。

**Keywords** : chitin, chitosan, pharmaceutical materials

四方田千佳子：高分子—界面活性剤複合体からな  
る高吸水性ゲル

ファルマシア, 29(9), 1024~1025 (1993)

高吸水性ポリマーに関する最近の話題から、塩類の共存による性能劣化を防ぐ目的で、高分子に界面活性剤を添加した例を紹介した。N-イソプロピルアクリルアミド/アクリルアミド共重合体に陰イオン界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を添加することにより、イオン性ゲルと同等の吸水性を示すようになり、その相転移温度も転移体積変化も同様に NaCl 添加による妨害を受けないことが明らかとなった。このような良好な耐塩性は、紙オムツなどの吸水性ポリマーやさらに、機能性ゲルとして、徐放システムやセンサーなど医療、医薬分野での応用も期待される。

**Keywords** : surfactants, polymer, absorbency

外海泰秀：輸入食品の現状と課題

FFI ジャーナル, 153, 4~11 (1993)

年々増加の傾向を見せる輸入食品の現状を平成 4

年度の検査状況、違反事例を基に解説した。また食品衛生上の観点から、特にポストハーベスト農薬や放射線照射食品の問題点を指摘した。

**Keywords** : imported food, post-harvest pesticide

外海泰秀：日本のコメ問題を考える

*New Food Industry*, 36, 1~4 (1994)

平成5年のコメの大凶作によりタイ、米国、中国等からコメを緊急輸入することになった。今回の凶作の原因、食管法の問題点、輸入米の残留農薬検査体制等について解説した。

**Keywords** : rice, provision rationing law, pesticide

外海泰秀：日本のコメの行方はどうなる

*FFI* ジャーナル, 160, 115~119 (1994)

平成5年においてはコメの緊急輸入、ガット/ウルグアイラウンド受入れの正式決定があり、今後日本の農業はどのように変わるべきか、また日本政府の農業政策はどうあるべきか、さらに輸入米の安全対策等について意見を述べた。

**Keywords** : rice, GATT, pesticide

辻 澄子：野菜中にふえている硝酸イオン

たべもの通信, 5, 32 (1994)

硝酸イオンの性質および健康への影響を概説し、硝酸イオンの含有量が高い野菜には葉菜類が多く、

含有量には幅が或ることを示した。健康のためには種々の野菜の摂取が必要である。

**Keywords** : nitrate, vegetable

下村講一郎、吉松嘉代：薬用植物毛状根の誘導と培養

*ファルマシア*, 29, 609~612 (1993)

薬用成分生産の担い手として、また、薬用植物への新しい遺伝形質の付与を可能にするものとして期待されている薬用植物の毛状根について、毛状根誘導の原理から毛状根誘導のための細かいテクニックまで、当研究室で得られた研究成果をもとにわかりやすく解説した。

**Keywords** : *Agrobacterium rhizogenes*, hairy root, medicinal plant

下村講一郎、吉松嘉代、石丸幹二\*：毛状根による有用物質生産

遺伝, 47(7), 53~59 (1993)

薬用植物の毛状根の培養により、薬用植物に含まれる有用二次代謝物（フェノール性化合物、トリテルペン、アルカロイド、ポリアセチレン類等）を生産した研究例について解説した。

**Keywords** : *Agrobacterium rhizogenes*, hairy root, secondary metabolite production

\* 佐賀大学農学部

石橋無味雄, 河村芳男, 丸尾栄一, 桑島久雄, 石原弘之, 秋山 保, 木俣博文, 北沢恵子: “**卸管理試験法**”, 日本医薬品卸勤務薬剤師会試験検査検討委員会編, 薬業時報社, 東京 (1993)

Hayakawa, T.: “**Pharmacopoeias and quality control of drugs**”, Vol. 19, Development and standardization of assay methodologies for drugs derived from biotechnology, ed, Italian Pharmacopoeia Commission General Secretariat, Fondazione Rhone-Poulenc Rorer per le Scienze Mediche, Bologna (1993) pp. 207~212

Morimoto K. et al: **Environmental Health Criteria 154 “Acetonitrile”**, World Health Organization, Geneva (1993)

内田恵理子, 早川堯夫: “**ヒト成長ホルモン**”, GHの化学, 岡田義昭監修, メディカルレビュー社, 大阪 (1994) pp. 11~34

Shintani, H.: “**The Ohio Science Workbooks: Polymers**”, The monitoring and evaluation of degradation and cross-linking in polyurethane when irradiated by gamma-rays during sterilization, ed, Stewart, M. R., The Ohio Academy of Science, Ohio, USA (1993) pp. 93~107

Nakamura, A.: “**Biomedical Applications of Polymeric Materials**”, Biological safety of biomaterials and devices, ed, Tsuruta, T., Hayashi, T., Kataoka, K., Ishihara, K., and Kimura, Y., CRC Press, Boca Raton (1993) pp. 429~468

Hayashi, Y., Helburn, R. S. and Rutan, S. C.: “**Computer Enhanced Analytical Spectroscopy, Vol. 4**”, Resolving unmodeled components from UV-visible spectra with adaptive filtering, Plenum, New York (1994) pp. 257~274

松村年郎: “**クリーンルームの運転・管理・清浄化ハンドブック**”, 早川一也, 浅田敏勝監修, (株) NTS, 東京 (1993) pp. 573~581

斎藤行生: “**見直したい食の安全性**”, 第3章, 細貝祐太郎, 松本昌雄編, 女子栄養大出版部, 東京 (1993) pp. 69~76

内山貞夫, 村山三徳, 斎藤行生: “**食品衛生検査指針 追捕 I**”, 動物用医薬品・飼料添加物, 合成抗菌剤の一斉分析法, 厚生省生活衛生局監修, 日本食品衛生協会, 東京 (1993) pp. 313~332

山田 隆: “**食糧白書 食品・農産物の安全性**”, 食

品添加物——使用のための規制と規定, 食糧・農業政策研究センター, 東京 (1994) pp. 39~60

石綿 肇: “**総合食品安全事典**”, 容器と包装 定義と共通規格, 内山充他監修, 産業調査会事典出版センター, 東京 (1994) pp. 826~832

石綿 肇: “**工生検論文集**”, 日本食品工生法簡介, 艾有年, 叶世柏編, 北京大学出版社, 北京 (1993) pp. 1~3

石綿 肇: “**工生検論文集**”, Melamine 在生活環境中的存在及其生物活性, 艾有年, 叶世柏編, 北京大学出版社, 北京 (1993) pp. 3~5

米谷民雄: “**生体微量元素**”, 液体クロマトグラフ法, ヒ素, ゲルマニウム, アルミニウム, ストロンチウム, 桜井 弘, 田中英彦編集, 廣川書店, 東京 (1994) pp. 45~52, 202~206, 235~238, 240~243, 246~248

Vance, D. E., Hatch, G. M., Jamil, H., Nishimaki-Mogami, T., Samborski, R. W., Tijburg, L., and Utal, A.: “**Phospholipids and Signal Transmission**”, Control of phosphatidylcholine metabolism, ed, Massarelli, R., Horrocks, L. A., Kanfer, J. N., Löffelholz, K., Springer-Verlag, Berlin (1993) pp. 267~279

北脇秀敏, 関沢 純, 内田康策監訳: “**WHO 環境保健委員会報告 (われらが地球, われらが健康)**”, 環境産業新聞社, 東京 (1993) pp. 381

大竹千代子: “**UNEP レポート 地球の化学汚染—その過程と現象—(翻訳)**”, 開成出版, 東京 (1993) pp. 5~28, pp. 81~100

神沼二眞, 山本 都, 中野達也他: “**国際化学物質安全性カード (ICSC) 日本語版第2集**”, 厚生省生活衛生局生活化学安全対策室監修, 化学工業日報社, 東京 (1994)

Takagi, A., Sai, K., Umemura, T., Hasegawa, R. and Kurokawa, Y.: “**Peroxisomes Biology and Importance in Toxicology and Medicine**”, Production of 8-hydroxydeoxyguanosine in rodent liver by the administration of peroxisome proliferators, ed, Gibson, G. and Lake, B., Taylor & Francis, London·Washington, DC (1993) pp. 569~594

Mitsumori, K. and Elwell, M. R.: “**Monographs on Pathology of Tumours of the mouse. Second Edition**”, Tumours of the male accessory sex

gland, ed, Turusov, V., IARC Scientific Publication No. 111. IARC, Lyon (1993) pp. 125~135

高橋道人, 三森国敏, 古川文夫, 豊田和弘: “トキシコロジー用語集”, 日本毒科学会編, 薬事時報社, 東京 (1993)

本間正充: “臨床遺伝学 (III) 分子病”, DNA フィンガープリント法, 古庄敏行, 外村 晶, 清水信義, 北川照男編, 診断と治療社, 東京 (1993) pp. 76~85

Honma, M., Stacey, G. and Mizusawa, H.: “Cell & Tissue Culture: Laboratory Procedures”, DNA profiling with polymorphic DNA markers, ed, Doyle, A. Griffiths, J. B. and Newell, D. G., John Wiley & Sons, Chichester (1993) pp. 9A : 5.1~9A : 5.13

水沢 博, Y. C. リー, 掛樋一晃, 向井秀幸, 山下直秀, 金子周司: “医学理学系のための AT 互換機活用法”, 秀潤社, 東京 (1993) pp. 11~101, pp.

140~148, pp. 204~235

水沢 博: “新生化学実験講座 2・核酸 V”, 細胞培養の基礎, 日本生化学会編, 東京化学同人, 東京 (1993) pp. 6~24

Saito, K., Yamazaki, M., Shimomura, K., Yoshimatsu, K. and Murakoshi, I.: “Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 22. Plant Protoplast and Genetic Engineering III”, Genetic transformation of *Digitalis purpurea* L. (Foxglove), ed, Bajaj, Y. P.S., Springer-Verlag, Berlin Heidelberg (1993) pp. 182~189

Tanaka, M., Yonemitsu, H., Shimomura, K., Ishimaru, K., Mochida, S., Endo, T., and Kaji, A.: “Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 22. Plant Protoplast and Genetic Engineering III, Transformation in *Loberia*”, ed, Bajaj, Y. P.S., Springer-Verlag Berlin Heidelberg (1993) pp. 253~264

**日本薬局方の国際調和に関する研究**：石橋無味雄，佐竹元吉  
厚生科学研究（平成5年4月～平成8年3月），平成6年4月厚生省薬務局安全課に報告。

**医薬品の迅速分析法**：石橋無味雄，最所和宏  
厚生省迅速分析法作成費（昭和57年3月～），平成5年7月厚生省薬務局監視指導課に報告。

**不正医薬品の流通防止を目的とした「簡易分析法開発」に関する研究**：小嶋茂雄，石橋無味雄  
国際厚生事業団研究費（平成5年4月～），平成6年3月国際厚生事業団に報告。

**熱帯病治療薬の開発研究**：小嶋茂雄，石橋無味雄  
厚生科学研究費補助金新薬開発事業費（平成5年4月～），平成6年3月厚生省医薬品先端技術振興室に報告。

**生体試料中の薬物鑑定に関する総合的研究**：中原雄二，島峯望彦，高橋一徳，木倉瑠理  
厚生科学研究（平成4年4月～平成6年3月），平成6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6年3月），平成6年4月厚生省薬務局麻薬課に報告。

**覚せい剤検体のデータベースに関する研究**：中原雄二，島峯望彦，高橋一徳，木倉瑠理  
委託研究（平成4年9月～平成6年3月），平成6年4月厚生省薬務局麻薬課に報告。

**医薬品規制ハーモナイゼーション推進共同事業**：「**医薬品規制ハーモナイゼーション推進国際共同研究**」：前川 正<sup>\*1</sup>，寺尾九男，武田 寧，小嶋茂雄，早川堯夫，林 祐造，高仲 正，祖父尼俊雄，高橋道人，中館正弘，黒川雄二，田中 悟，内藤周幸<sup>\*2</sup>，上田慶二<sup>\*3</sup>，本間光夫<sup>\*4</sup>，秋月正史<sup>\*5</sup>，安原 一<sup>\*6</sup>，広津千尋<sup>\*7</sup>，清水直容<sup>\*8</sup>，紺野昌俊<sup>\*8</sup>  
厚生科学研究（平成4年3月～平成9年3月），平成6年3月厚生省薬務局新医薬品課に報告。

<sup>\*1</sup> 国立学校財務センター

<sup>\*2</sup> 東京通信病院

<sup>\*3</sup> 東京多摩老人医療センター

<sup>\*4</sup> 慶応義塾大学医学部名誉教授

<sup>\*5</sup> 慶応義塾大学医学部

<sup>\*6</sup> 昭和大学医学部

<sup>\*7</sup> 東京大学工学部

<sup>\*8</sup> 帝京大学医学部

**体外診断用医薬品の臨床評価に関する研究**：大久保昭行<sup>\*1</sup>，大橋靖雄<sup>\*1</sup>，福岡正道，小林 哲，中山年

正<sup>\*2</sup>，河合 忠<sup>\*3</sup>，大倉久直<sup>\*4</sup>，瀬戸四郎<sup>\*5</sup>  
厚生科学研究（平成5年4月～平成6年3月），平成6年3月厚生省薬務局審査課に報告。

<sup>\*1</sup> 東京大学医学部

<sup>\*2</sup> 虎ノ門病院

<sup>\*3</sup> 自治医科大学

<sup>\*4</sup> 国立がんセンター中央病院

<sup>\*5</sup> (株)日本臨床検査薬協会

**ポリウレタンの分解について（医用材料の生体内劣化・分解とそれに伴う毒性に関する研究）**：中村晃忠，佐藤道夫  
厚生科学研究（平成3年4月～平成6年3月），平成6年4月厚生省薬務局医療機器開発課へ報告。

**生体用金属材料の生体内劣化（腐食）に伴う感作性発現に関する研究**：医用材料の生体内劣化・分解とそれに伴う毒性に関する研究：土屋利江，五十嵐良明

厚生科学研究（平成3年4月～平成6年3月），平成6年3月厚生省薬務局医療機器開発課に報告。

**化学物質による健康リスク評価法に関する研究**：土屋利江，五十嵐良明，中村晃忠  
厚生科学研究（平成5年4月～平成10年3月），平成6年3月厚生省生活衛生局生活化学安全対策室に報告。

**Tinuvin P, Tinuvin 326, dibutylthiourea および dilaurylthiourea の細胞毒性試験**：五十嵐良明，土屋利江  
家庭用品等調査研究費（平成4年7月～平成5年6月），平成5年6月厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室に報告。

**国設自動車排出ガス測定所における大気汚染の調査研究**：松村年郎，関田 寛，安藤正典  
公害調査費（平成5年4月～平成6年3月），平成6年7月環境庁大気保全局自動車公害課へ報告。

**化粧品原料規格の作成に関する研究**：木嶋敬二，安藤正典  
医薬品等審査業務庁費（平成4年4月～平成5年3月），平成6年3月厚生省薬務局審査課化粧品審査室に報告。

**化粧品界面活性剤，油脂の規格整備に関する研究**：木嶋敬二，小嶋茂雄，鈴木助治<sup>\*1</sup>，西島 靖<sup>\*2</sup>  
厚生科学研究（平成5年4月～平成6年3月），平成6年4月厚生省薬務局審査課化粧品審査室に報告。

<sup>\*1</sup> 東京都立衛生研究所

<sup>\*2</sup> 日本化粧品工業会技術委員会



**香粧品の品質確保のための配合成分の相互作用に関する研究**：木嶋敬二，鈴木助治\*<sup>1</sup>，中村 弘\*<sup>1</sup>，藤山善雄\*<sup>2</sup>  
厚生科学研究 (平成5年4月～平成6年3月)，平成6年4月厚生省薬務局審査課化粧品審査室に報告。

\*<sup>1</sup> 東京都立衛生研究所

\*<sup>2</sup> 日本化粧品工業会技術委員会

**化粧品原料成分の品質試験方法に関する研究**：木嶋敬二，鈴木助治\*<sup>1</sup>，中村 弘\*<sup>1</sup>，西島 靖\*<sup>2</sup>  
厚生科学研究 (平成5年4月～平成6年3月)，平成6年4月厚生省薬務局審査課化粧品審査室に報告。

\*<sup>1</sup> 東京都立衛生研究所

\*<sup>2</sup> 日本化粧品工業会技術委員会

**輸入牛肉中の有機塩素系農薬の分析**：高附 巧，根本 了，松田りえ子，佐々木久美子，斎藤行生  
食品等試験検査費 (平成5年10月～平成5年11月)，平成5年11月厚生省生活衛生局乳肉衛生課に報告。

**輸入牛肉中の有機リン農薬の分析**：松田りえ子，根本 了，高附 巧，佐々木久美子，斎藤行生  
食品等試験検査費 (平成6年1月)，平成6年1月厚生省生活衛生局乳肉衛生課に報告。

**ガスクロマトグラフィーによる食品中の臭素の分析法に関する研究**：松田りえ子，佐々木久美子，斎藤行生  
食品等試験検査費 (平成5年12月～平成6年3月)，平成6年3月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

**保存検体中の残留農薬実態調査**：松田りえ子，佐々木久美子，斎藤行生  
食品等試験検査費 (平成5年12月～平成6年3月)，平成6年3月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

**トウモロコシの保存および加工による収穫後使用農薬の減衰に関する研究**：佐々木久美子，松田りえ子，高附 巧，斎藤行生  
食品等試験検査費 (平成5年12月～平成6年3月)，平成6年3月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

**精度管理について**：松田りえ子，村山三徳，斎藤行生  
食品等試験検査費 (平成5年2月～平成5年6月)，平成6年3月厚生省生活衛生局乳肉衛生課に報告。

**Lupinus Angustifolius 中の有毒アルカロイド含量について**：高木加代子，河村葉子，鈴木 隆，斎藤行生  
厚生科学研究 (平成5年4月～平成6年3月)，平成6年3月厚生省生活衛生局食品保健課に報告。

**オーストラリア産ルピン豆中のアルカロイド含量について**：斎藤行生，鈴木 隆，高木加代子  
食品等試験検査費 (平成5年9月～平成5年11月)，

平成6年3月厚生省生活衛生局食品保健課に報告。

**イベルメクチンの分析法**：村山三徳，鈴木 隆，斎藤行生  
厚生科学研究 (平成5年4月～平成6年3月)，平成6年3月厚生省生活衛生局乳肉衛生課に報告。

**食品等の規格基準の設定等に係る試験検査**：穀類中のオクラトキシンの分析：穂山 浩，豊田正武，斎藤行生  
厚生科学研究 (平成5年4月～平成6年3月)，平成6年4月厚生省生活衛生局食品保健課に報告。

**食品中臭素の分析**：宮原 誠，斎藤行生  
食品等試験検査費 (平成4年12月～平成5年3月)，平成5年4月厚生省生活衛生局食品保健課に報告。

**食品添加物の規格基準および試験法の設定に関する研究**「第6版訂定書の問題点の整理 第7版に向けて」：山田 隆  
食品添加物規格基準設定費 (平成5年4月～平成6年3月)，平成6年3月厚生省生活衛生局食品化学課へ報告。

**食品中の食品添加物分析法の設定 分析法の改良**：山田 隆，石綿 肇，武田由比子  
食品添加物規格基準設定費 (平成5年4月～平成6年3月)，平成6年3月厚生省生活衛生局食品化学課へ報告。

**慢性毒性試験被験物質の分析に関わる報告書—実験動物用飼料に添加したシンナムアルデヒドの安定性について**：石綿 肇，武田由比子，山田 隆  
食品添加物安全性再評価費 (平成4年3月～平成6年3月)，平成6年3月厚生省生活衛生局食品化学課へ報告。

**ロイヤルゼリーおよび蜜蜂によって生産される食品中の4-ヒドロキシ安息香酸メチル (メチルパラベン) の分析法の開発とその確認**：石綿 肇，武田由比子，山田 隆，渡辺芳則\*<sup>1</sup>，細貝 猛\*<sup>1</sup>，伊藤澄夫\*<sup>1</sup>，桜井裕之\*<sup>1</sup>，青木 岳\*<sup>1</sup>，牛尼進之\*<sup>1</sup>  
厚生科学研究 (平成5年4月～平成6年3月)，平成6年3月厚生省生活衛生局食品保健課へ報告。

\*<sup>1</sup> 横浜検疫所輸入食品・検疫検査センター

**輸入米中残留農薬の簡易分析法の開発**：石綿 肇，佐藤基秀\*<sup>1</sup>，小俣圭子\*<sup>2</sup>，渡辺秀子\*<sup>2</sup>，柏原文和\*<sup>3</sup>，渡辺佳子\*<sup>3</sup>，成瀬如高\*<sup>4</sup>，牛尼進之\*<sup>5</sup>，渡辺芳則\*<sup>5</sup>，伊藤澄夫\*<sup>5</sup>，細貝 猛\*<sup>5</sup>，武田 寿\*<sup>5</sup>，小林昭彦\*<sup>5</sup>，多田善彦\*<sup>5</sup>，桜井裕之\*<sup>5</sup>，青木 岳\*<sup>5</sup>，池田千波\*<sup>5</sup>，藤井明美\*<sup>5</sup>

厚生科学研究 (平成5年4月～平成6年3月)，平成6年3月厚生省生活衛生局食品保健課へ報告。

\*<sup>1</sup> 成田空港検疫所食品監視課

\*<sup>2</sup> 成田空港検疫所検査課

- \*3 東京検疫所食品監視課
- \*4 横浜検疫所食品監視課
- \*5 横浜検疫所輸入食品・検疫検査センター

慢性毒性試験被験物質の分析に関わる報告書—飼料中に乳酸鉄を添加した実験動物用飼料中の二価鉄の安定性について：武田由比子，石綿 肇，山田 隆  
食品添加物安全性再評価費（平成5年4月～平成6年3月），平成6年3月厚生省生活衛生局食品化学課へ報告。

食品中の食品添加物分析法の設定 新たな分析法の開発について—鉄強化食品等の二価三価鉄の比色法による分別定量法の開発と応用：武田由比子，石綿 肇，山田 隆  
食品添加物規格基準設定費（平成5年4月～平成6年3月），平成6年3月厚生省生活衛生局食品化学課へ報告。

天然添加物の国際的整合性に関する研究：山田 隆，米谷民雄  
厚生科学研究（平成5年4月～平成6年3月），平成6年3月厚生省生活衛生局食品化学課へ報告。

天然添加物中の有機性不純物の確認および分析法の検討：石綿 肇，武田由比子，川崎洋子，久保田浩樹，坂元史歩，佐藤恭子，合田幸広，米谷民雄，山田 隆  
食品添加物規格基準設定費（平成5年12月～平成6年2月），平成6年2月厚生省生活衛生局食品保健課へ報告。

市販ベニバナ黄色素の分析および標品としての可能性の検討：米谷民雄，合田幸広，佐藤恭子  
厚生科学研究（平成5年4月～平成6年3月），平成6年3月厚生省生活衛生局食品化学課へ報告。

マルトールとコウジ酸の共存によるアルミニウムの体内挙動の変化：米谷民雄，久保田浩樹，山田 隆  
食品添加物安全性再評価費・代謝等精密試験（平成5年4月～平成6年3月），平成6年3月厚生省生活衛生局食品化学課へ報告。

アントシアニン色素のHPLC法による識別に関する研究：佐藤恭子，米谷民雄，山田 隆  
食品添加物規格基準設定費（平成5年4月～平成6年3月），平成6年3月厚生省生活衛生局食品化学課へ報告。

ハウロウ引き製品からの鉛およびカドミウムの溶出に関する基礎的研究：山田 隆，河村葉子，杉田たき子，馬場二夫\*  
厚生科学研究（平成5年4月～平成6年3月），平成6年4月厚生省生活衛生局食品保健課へ報告。

\* 大阪市立環境科学研究所

高速液体クロマトグラフィーによるポリカーボネート樹脂中の残存モノマーおよび添加剤の同時分析法の検討，ポリカーボネート樹脂中のアミン類の分析法の検討：河村葉子，杉田たき子，山田 隆  
食品添加物安全性再評価等試験検査費（平成5年4月～平成6年3月），平成6年4月厚生省生活衛生局食品化学課へ報告。

漆器類からの鉛とカドミウムの溶出：河村葉子，杉田たき子，山田 隆  
食品等の規格基準設定費（平成5年4月～平成6年3月），平成6年4月平成6年4月厚生省生活衛生局食品保健課へ報告。

N-モノメチルフェニル-N'-モノメチルフェニル-p-フェニレンジアミンのラットにおける代謝試験：高橋 惇，嶺岸謙一郎  
既存化学物質委託費（平成4年10月～平成6年3月），平成6年4月生活衛生局化学安全対策室へ報告。

卵のサルモネラ汚染に関する調査研究：熊谷 進\*1，中村明子\*1，小沼博隆，仲西寿男\*2，品川邦汎\*3，今井忠平\*4  
厚生科学研究（昭和63年3月～平成6年3月），平成6年3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 神戸市環境保健研究所

\*3 岩手大学農学部

\*4 全国鶏卵加工協議会

自動販売機の衛生管理に関する研究：小沼博隆，一戸正勝，黒崎 貴\*1  
厚生科学研究（昭和63年3月～平成6年3月），平成6年3月厚生省生活衛生局食品保健課に報告。

\*1 日本自動販売機工業会

魚肉すり身製造工場の微生物汚染実態調査：小沼博隆，品川邦汎\*1，北上誠一\*2  
厚生行政研究（平成5年3月～），平成6年3月厚生省生活衛生局乳肉衛生課に報告。

\*1 岩手大学

\*2 社団法人全国すり身協会技術研究所

と畜場（牛肉）の微生物制御法の確立のための基礎的研究：小沼博隆，後藤公吉\*1，梅木久一\*2，品川邦汎\*3，徳丸雅一\*4，赤羽莊資\*5，仁科徳啓\*6，江崎覚夫\*7，特手洋美\*8，水吉団治\*9，西村 尚夫\*10，對馬 威\*11，柿本重治\*12，廣 幸音\*13，鍋倉裕一\*14，嶋守 久\*15，松本寿男\*16，合田潤暢\*17，梅迫誠一\*18，伏見 誠\*19  
厚生科学研究（平成4年度～平成6年3月）平成6年3月厚生省生活衛生局乳肉衛生課に報告。

\*1 新潟県立衛生公害研究所

\*2 岩手県立衛生研究所

- \*3 岩手大学農学部
- \*4 埼玉県立衛生研究所
- \*5 静岡県立衛生環境センター
- \*6 静岡県東部食肉衛生検査所
- \*7 埼玉県食肉検査センター
- \*8 鹿児島県保健環境部
- \*9 新潟県食肉衛生検査所長岡支所
- \*10 横浜市食肉衛生検査所
- \*11 北海道早来食肉検査事務所
- \*12 鹿児島県末吉食肉衛生検査所
- \*13 三重県松坂食肉衛生検査所
- \*14 宮崎県高崎食肉衛生検査所
- \*15 岩手県紫波食肉衛生検査所
- \*16 群馬県中央食肉衛生検査所
- \*17 鹿児島県知覧食肉衛生検査所
- \*18 奈良県衛生研究所
- \*19 奈良県食品衛生検査所

**食品中の有害物質に関する研究；1. カビおよびカビ毒に関するレビュー：**一戸正勝，上村 尚<sup>\*1</sup>，芳沢宅実<sup>\*2</sup>  
厚生科学研究（平成5年10月～平成6年3月），平成6年3月厚生省食品保健課に報告。

- \*1 東京都立衛生研究所
- \*2 香川大学農学部

**食品中の有害物質に関する研究；2. 本邦南西諸島畑土壌におけるアフラトキシン産生菌の分布：**一戸正勝，鈴木明子，成田紀子，菊池 裕，高橋治男<sup>\*1</sup>  
厚生科学研究（平成5年10月～平成6年3月），厚生省食品保健課へ報告。

- \*1 千葉県衛生研究所

**残留農薬の分解・代謝に関する調査研究：**齊藤行生，関沢 純，大竹千代子，豊田正武，外海泰秀  
残留農薬安全対策総合調査研究（平成5年4月～平成6年3月），平成6年3月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

**医薬品等化学物質の毒性評価のための試験法と基準の整備に関する研究：**西村正雄<sup>\*1</sup>，戸部益夫<sup>\*2</sup>，香川 順<sup>\*3</sup>，高江須義炬<sup>\*1</sup>，関沢 純，加藤正信<sup>\*4</sup>，八十川欣勇<sup>\*5</sup>，山中すみへ<sup>\*1</sup>  
厚生科学研究（平成5年4月～平成6年3月），平成6年3月厚生省薬務局安全課に報告。

- \*1 東京歯科大学
- \*2 公定書協会
- \*3 東京女子医科大学
- \*4 三菱化成工業
- \*5 日本海事検定協会

**家庭用品に使用される化学物質の安全対策調査：**中村晃忠，関沢 純  
家庭用品等試験検査費（平成5年4月～平成6年3月），平成6年3月厚生省生活衛生局生活化学安全対策室に報告。

**国際基準に基づく化学物質危険有害表示制度の研究：**石館 基<sup>\*1</sup>，興 重治<sup>\*2</sup>，関沢 純，桜井治彦<sup>\*3</sup>，清水英佑<sup>\*4</sup>，鶴田 寛<sup>\*5</sup>，松島泰次郎<sup>\*6</sup>，森崎 繁<sup>\*7</sup>，内野 篤<sup>\*8</sup>，西川洋三<sup>\*9</sup>，大島輝夫<sup>\*10</sup>  
労働省委託研究（平成5年4月～平成6年3月），平成6年3月労働省化学物質調査課に報告。

- \*1 オリパス工業(株)染色体研究センター
- \*2 中央労働災害防止協会
- \*3 慶応義塾大学医学部
- \*4 東京慈恵会医科大学
- \*5 労働省産業医学総合研究所
- \*6 日本バイオアッセイ研究センター
- \*7 労働省産業安全研究所
- \*8 (株)日本化学工業会
- \*9 三菱油化(株)
- \*10 (株)日本化学物質安全・情報センター

**指定化学物質（4,4'-ジアミノジフェニルメタンおよび2-イミダゾリン-2-チオール）摂取量予測調査：**山本 都  
既存化学物質等試験検査費（平成5年4月～平成6年3月），平成6年4月厚生省生活衛生局生活化学安全対策室に報告。

**化学物質による健康リスク評価法に関する研究；化学物質の安全性情報提供に関する研究：**神沼二真  
厚生科学研究（平成5年4月～平成6年3月），平成6年3月厚生省生活衛生局生活化学安全対策室に報告。

**防災加工剤 Hexabromocyclododecane のモルモットにおける皮膚一次刺激性・皮膚感作性・光毒性および光感作性試験：**門馬純子，川崎 靖，津田充有，黒川雄二  
家庭用品等調査研究（昭和59年4月～昭和60年3月），平成5年1月厚生省生活衛生局生活化学安全対策室に報告。

**有機溶剤の生殖に及ぼす影響に関する研究：**黒川雄二，降矢 強，関田清司，小川幸男，小野 敦，村上 治，金子豊蔵，鈴木幸子，広瀬明彦，内藤克司，齊藤 実，田中 悟，松本清司<sup>\*</sup>，三森国敏，安原加寿雄，川島邦夫，宇佐見 誠，酒見和枝  
厚生科学研究（平成4年4月～平成5年3月），平成5年3月厚生省薬務局麻薬課に報告。

- \* 信州大学医学部

**ホキシムの28日間反復投与毒性試験：**黒川雄二，鈴木幸子，金子豊蔵，鎌田栄一，小川幸男，内藤克司，梅村隆志，齊藤 実  
既存化学物質等調査研究費（昭和61年～平成5年），平成5年5月厚生省生活衛生局生活化学安全対策室へ報告。

**ダイオキシンの作用機序に関する研究（皮膚毒性）：**門馬純子，黒川雄二

厚生科学研究（平成3年4月～平成6年3月）、平成5年6月厚生省生活衛生局生活化学安全対策室に報告。

5フッ化リン、3臭化ホウ素、6フッ化タングステンの急性吸入毒性：黒川雄二、広瀬明彦、金子豊蔵、小川幸男  
毒物劇物指定調査費（平成4年4月～平成5年3月）、平成5年6月厚生省薬務局安全課へ報告。

ゴム加硫促進剤ジブチルチオウレア（DBTU）のモルモットによる皮膚感作性試験：門馬純子、川崎靖、津田充有、黒川雄二  
家庭用品等調査研究費（平成4年4月～平成5年3月）、平成5年7月厚生省生活衛生局生活化学安全対策室に報告。

ゴム加硫促進剤ジラウリルチオウレア（DLTU）のモルモットによる皮膚感作性試験：門馬純子、川崎靖、津田充有、黒川雄二  
家庭用品等調査研究費（平成4年4月～平成5年3月）、平成5年7月厚生省生活衛生局生活化学安全対策室に報告。

ダイオキシンの作用機序に関する研究（肝毒性）：高木篤也、黒川雄二  
厚生科学研究（平成3年4月～平成6年3月）、平成5年7月厚生省生活衛生局生活化学安全対策室に報告。

ラットにおけるコチニール（Cochineal）およびミョウバン（Alum）の13週間同時反復投与毒性試験：川崎靖、梅村隆志、佐井君江、長谷川隆一、門馬純子、斉藤実、松島裕子、中路幸男、津田充有、黒川雄二  
食品添加物安全性再評価費（昭和63年4月～平成4年3月）、平成5年8月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

2,2'-メチレンビス(4-メチル-6-tert-ブチルフェノール)のラットにおける慢性毒性試験：高木篤也、落合敏秋、松本清司、関田清司、斉藤実、高田幸一、内藤克司、降矢強、長谷川隆一、黒川雄二、戸部満寿夫  
家庭用品等調査研究費（平成元年4月～平成5年3月）、平成5年10月厚生省生活衛生局生活化学安全対策室に報告。

ゴム加硫促進剤N,N'-ジフェニルチオウレア（DPTU）のモルモットによる皮膚感作性試験：門馬純子、川崎靖、津田充有、黒川雄二  
家庭用品等調査研究費（平成3年4月～平成4年3月）、平成5年12月厚生省生活衛生局生活化学安全対策室に報告。

ゴム加硫促進剤ジブチルジチオカルバミン酸亜鉛

（ZDBC）のモルモットによる皮膚感作性試験：門馬純子、川崎靖、津田充有、黒川雄二  
家庭用品等調査研究費（平成3年4月～平成4年3月）、平成5年12月厚生省生活衛生局生活化学安全対策室に報告。

OECDの急性毒性試験法の有効性評価に関する研究：松島裕子、内藤克司、津田充有、黒川雄二  
平成5年12月ドイツ厚生省に報告。

鉛の疫学調査情報：黒川雄二、長谷川隆一  
水質管理調査費（平成5年4月～平成6年3月）、平成6年3月厚生省生活衛生局水道部に報告。

薬物の強化効果に及ぼす神経伝達物質の影響に関する研究：降矢強、関田清司、小野敦  
厚生科学研究（平成5年4月～平成6年3月）、平成6年3月厚生省薬務局麻薬課に報告。

ソルビン酸およびサッカリンの相乗毒性試験（中間報告）：内藤克司、内田雄幸、高田幸一、斉藤実、青柳千百合、黒川雄二  
食品添加物安全性再評価費（平成元年4月～平成2年3月）、平成6年3月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

亜硝酸ナトリウムおよびアスコルビン酸の相乗毒性試験（中間報告）：内藤克司、内田雄幸、高田幸一、斉藤実、青柳千百合、黒川雄二  
食品添加物安全性再評価費（平成3年4月～平成4年3月）、平成6年3月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

ソルビン酸およびポリリン酸の相乗毒性試験（中間報告）：内藤克司、内田雄幸、高田幸一、斉藤実、青柳千百合、黒川雄二  
食品添加物安全性再評価費（平成4年4月～平成5年3月）、平成6年3月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

実験動物を用いる急性毒性試験等の簡易法に関する研究：内藤克司、内田雄幸、高田幸一、梅村隆志、金子豊蔵、鈴木幸子、小川幸男、青柳千百合  
厚生科学研究（平成5年4月～平成6年3月）、平成6年3月厚生省薬務局安全課に報告。

化学物質による健康リスク調査研究—化学物質による毒性発現と酸化ストレスに関する研究：黒川雄二、佐井君江、長谷川隆一  
厚生科学研究（平成5年4月～平成6年3月）、平成6年4月厚生省生活衛生局生活化学安全対策室に報告。

毒物劇物指定調査のための毒性試験報告書、アクリル酸およびメタクリル酸の経口・経皮急性毒性試験：黒川雄二、金子豊蔵、鈴木幸子、小川幸男

毒物劇物指定調査費 (平成5年4月~平成6年3月), 平成6年4月厚生省薬務局安全課へ報告。

ラットによる p-Methylbenzenesulfonemethyl-diide の急性毒性試験および15週間反復経口投与毒性試験: 川崎 靖, 内田雄幸, 門馬純子, 齊藤 実, 伊佐間和郎, 津田充有, 黒川雄二  
家庭用品等調査研究費 (平成3年4月~平成5年3月), 平成6年5月厚生省生活衛生局生活化学安全対策室に報告。

ジクロロメタンの雄ラットによる吸入慢性毒性・発がん性試験: 黒川雄二, 鎌田栄一, 会田喜崇, 中館正弘, 内田雄幸, 齊藤 実, 小川幸男, 鈴木幸子, 金子豊蔵  
家庭用品等調査研究費 (昭和57年4月~平成6年3月), 平成6年5月厚生省生活衛生局生活化学安全対策室へ報告。

難燃性可塑剤 Tributoxyethyl Phosphate のラットによる14週間混餌投与毒性試験: 津田充有, 齊藤実, 梅村隆志, 川崎 靖, 門馬純子, 松島裕子, 松本真美, 伊佐間和郎, 鹿庭正昭, 黒川雄二  
家庭用品等調査研究費 (平成3年4月~平成4年3月), 平成6年5月厚生省生活衛生局生活化学安全対策室の報告。

ジョサマイシン毒性試験: 西川秋佳, 古川文夫, 今沢孝喜, 高橋道人  
食品等試験検査費 (平成5年4月~平成6年3月), 平成6年4月厚生省生活衛生局乳肉衛生課へ報告。

ヒスチジン塩酸塩慢性毒性試験: 西川秋佳, 古川文夫, 今沢孝喜, 高橋道人  
食品等試験検査費 (平成4年4月~平成6年3月), 平成6年4月厚生省生活衛生局食品化学課へ報告。

生体用金属材料の生体内劣化 (腐食) に伴う感作性発現に関する研究—病理組織学的検索結果—: 高橋道人  
厚生科学研究 (平成3年4月~平成6年3月), 平成6年4月厚生省薬務局医療機器開発課へ報告。

ピロリン酸カリウムの慢性試験: 豊田和弘, 川西徹, 古田京子, 畝山智香子, 高橋道人  
食品添加物再評価試験 (平成4年4月~平成6年3月), 平成6年4月厚生省生活衛生局食品化学課へ報告。

流動パラフィンの亜慢性試験および慢性毒性癌原性試験: 豊田和弘, 川西 徹, 古田京子, 畝山智香子, 高橋道人  
食品添加物再評価試験 (平成5年4月~平成6年3月), 平成6年3月厚生省生活衛生局食品化学課へ報告。

ヨウ化カリウム慢性毒性試験: 小野寺博志, 三森国敏, 安原加壽雄, 高橋道人  
食品添加物再評価試験 (平成4年4月~平成5年3月), 平成5年11月厚生省生活衛生局食品化学課へ報告。

食品添加物の変異原性試験に関する試験—哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験: 松岡厚子, 鈴木孝昌, 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6年3月), 平成6年3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, 松岡厚子, 鈴木孝昌, 祖父尼俊雄  
水質管理強化対策費 (昭和63年10月~平成6年3月), 平成6年3月厚生省生活衛生局水道環境部に報告。

生体外染色体異常試験のスクリーニングの制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, 鈴木孝昌, 松岡厚子, 祖父尼俊雄  
労働省委託研究費 (昭和63年6月~平成6年3月), 平成6年4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: 祖父尼俊雄  
厚生科学研究 (昭和63年4月~平成6年3月), 平成6年4月厚生省生活衛生局生活化学安全対策室に報告。

変異原性試験法の国際的標準化のためのデータベースを用いた試験法の解析: 祖父尼俊雄, 林 真, 能美健彦, 松岡厚子, 松井道子  
厚生科学研究 (平成4年4月~平成7年3月), 平成6年3月厚生省薬務局新薬品課に報告。

農薬の変異原性に関する研究: 祖父尼俊雄, 能美健彦, 松井道子, 渡辺雅彦, 山田雅巳, 松井恵子  
残留農薬の安全対策総合調査研究事業 (平成3年4月~平成8年3月), 平成6年3月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

化学物質による健康リスク評価法に関する研究: 大森義仁, 林 裕造, 黒川雄二, 高仲 正, 高橋道人, 祖父尼俊雄, 中館正弘, 齊藤行生, 中村晃忠, 高橋淳, 神沼二真  
厚生科学研究 (平成5年4月~平成10年3月), 平成6年3月厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室に報告。

食品等の安全性評価の在り方に関する研究: 和田攻<sup>\*1</sup>, 糸川嘉則<sup>\*2</sup>, 豊川裕之<sup>\*3</sup>, 森本兼曩<sup>\*4</sup>, 中館正弘, 栗原伸公<sup>\*1</sup>  
厚生科学研究 (平成5年度), 平成6年3月厚生省

生活衛生局食品保健課に報告。

- \*1 東京大学医学部
- \*2 京都大学医学部
- \*3 東邦大学医学部
- \*4 大阪大学医学部

**医薬品規制ハーモナイゼーション推進国際共同研究—動物実験等による薬物代謝および安全性評価等のための国際共同研究—**：林 裕造，黒川雄二，高仲正，高橋道人，祖父尼俊雄，中館正弘，田中 悟  
厚生科学研究（平成4年3月～平成9年3月），平成6年3月厚生省薬務局新医薬品課に報告。

**ダイオキシンの毒性発現機構に関する研究**：鈴木猛\*1，小島康平\*1，林 裕造，安田峯生\*2  
厚生科学研究（平成3年4月～平成6年3月），平成6年3月厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室に報告。

- \*1 麻布大学環境保健学部
- \*2 広島大学医学部

**一般用医薬品の品質試験方法に関する研究**：真弓忠範\*1，石橋無味雄，四方田千佳子，岩上正蔵\*2，岩佐 曜\*3，大住優子\*4，東海則明\*5，二之宮昭夫\*6，林 信一\*7，横田洋一\*8，吉田乗継\*9  
厚生科学研究（平成5年4月～平成6年3月），平成6年5月厚生省薬務局審査課に報告。

- \*1 大阪大学薬学部
- \*2 大阪府公衆衛生研究所
- \*3 エスエス製薬㈱
- \*4 奈良県薬事指導所
- \*5 武田薬品工業㈱
- \*6 三共㈱
- \*7 ロート製薬㈱
- \*8 富山県薬事研究所
- \*9 大正製薬㈱

**各種農作物中カルベンダジム（MBC）の分析法の作成**：外海泰秀，中村優美子，津村ゆかり，伊藤誉志男  
食品等試験検査費（平成5年4月～平成5年10月），平成5年8月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

**有機リン系23種，有機塩素系15種，有機含窒素系16種およびピレスロイド系7種の同時分析法の検討**：中村優美子，外海泰秀，津村ゆかり，伊藤誉志男  
食品等試験検査費（平成5年4月～平成6年3月），平成6年1月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

**食品添加物の1日摂取量調査に関する研究—高齢者の加工食品中のタール色素の1日摂取量**：辻 澄子，柴 田正，伊藤誉志男  
食品等試験検査費（平成5年4月～平成6年3月），平成6年3月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

**チオエーテル基を有するカルバメート系農薬とそれらの代謝物の分別定量法**：津村ゆかり，中村優美子，外海泰秀，伊藤誉志男  
厚生科学研究（平成5年4月～平成6年3月），平成5年10月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

**食用青色1号アルミニウムレーキ中の水溶性塩化物および硫酸塩試験法の検討**：柴田 正，辻 澄子，木村実加，梅本美佳，伊藤誉志男  
食品等試験検査費（平成5年4月～平成6年3月），平成6年3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研究—残留農薬の多成分一斉分析法の開発；輸入米中の有機リン系，有機塩素系，カーバメート系およびピレスロイド系農薬の一斉分析法の開発**：外海泰秀，中村優美子，津村ゆかり，関口幸弘，伊藤誉志男  
厚生科学研究（平成5年4月～平成6年3月），平成6年4月厚生省生活衛生局食品保健課に報告。

**希土類元素の生体影響に関する研究**：中村優美子，津村ゆかり，関口幸弘，外海泰秀，伊藤誉志男  
厚生科学研究（平成5年4月～平成6年3月），平成6年4月厚生省厚生科学課に報告。

**新開発食品素材健康影響評価研究，スクワレンの生体影響に関する研究**：中村優美子，関口幸弘，津村ゆかり，外海泰秀，内山 充  
厚生科学研究（平成5年4月～平成6年3月），平成6年3月厚生省生活衛生局食品保健課に報告。

Kaniwa, N., Aoyagi, N., and Terao, T.: **Application of the NONMEM method to evaluation of bioequivalence-simulation studies**

World Congress of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 1993, Tokyo (1993. 9)

Katori, N., Aoyagi, N., and Terao, T.: **Some aspects of *in vitro/in vivo* correlations of controlled release oral dosage forms**

World Congress of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 1993, Tokyo (1993. 9)

Aoyagi, N.: **Bioequivalence test in drug approval in Japan**

World Congress of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 1993, Tokyo (1993. 9)

小池良治\*<sup>1</sup>, 浜本好子\*<sup>2</sup>, 佐々木信夫\*<sup>2</sup>, 鹿庭なほ子, 青柳伸男: **鶏におけるスルファメトキサゾールの単回および連続投与時の薬物動態について**  
第 116 回日本獣医学会 (1993. 10)

\*<sup>1</sup> 農水省衛生課

\*<sup>2</sup> 農水省動物医薬品検査所

鹿庭なほ子, 青柳伸男, 寺尾允男: **生物学的同等性評価への NONMEM の適用—シミュレーション法によるサンプリング時間の検討**

日本薬学会第 114 年会 (1994. 3)

香取典子, 青柳伸男, 小嶋茂雄: **製剤からの薬物放出と消化管内攪拌力—*in vitro/in vivo* 相関性からの攪拌力の推定**

日本薬学会 114 年会 (1994. 3)

Shameem, M., Katori, N., Aoyagi, N., and Kojima, S.: **Performance of CR dosage forms in Humans: Role of mechanical stress and colonic release**

日本薬学会 114 年会 (1994. 3)

青柳伸男, Mohammed Shameem, 井浦明美, 香取典子, 鹿庭なほ子, 小嶋茂雄: **回転透析セル法での坐剤の放出に及ぼすセル内試験液量の影響**

日本薬学会第 114 年会 (1994. 3)

香取典子: **重量偏差試験, 含量均一性試験の判定についての統計学的考察**

日本薬学会 114 年会 (1994. 3)

Yoshioka, S., Aso, Y., Izutsu, K., and Terao, T.: **The effect of salts on the stability of beta-galactosidase in aqueous solution and in the freeze-dried state, as related to the water mobility**

53rd International Congress of Pharmaceutical Sciences, Tokyo, Japan (1993. 9)

Yoshioka, S., Aso, Y., and Kojima, S.: **Effect of  $\gamma$ -irradiation on drug release from poly(lactide) microspheres**

2nd International Symposium on Radiation Technology in Biomedical Materials, Takasaki, Japan (1994. 3)

吉岡澄江, 阿曾幸男, 小嶋茂雄: **ポリ乳酸マイクロスフェアの薬物放出性に及ぼす $\gamma$ 線照射の影響**  
日本薬学会第 114 年会 (1994. 3)

伊豆津健一, 吉岡澄江, 小嶋茂雄: **凍結溶液中および凍結乾燥物中の PEG の糖類による分散**  
日本薬学会第 114 年会 (1994. 3)

大塚知子, 吉岡澄江, 阿曾幸男, 小嶋茂雄: **医薬品添加物水溶液中での水の動的状態について**  
日本薬学会第 114 年会 (1994. 3)

阿曾幸男, 吉岡澄江, 小嶋茂雄: **誘電率とスペクトルに基づく水分子と数種の医薬品添加剤の相互作用の検討**

日本薬学会第 114 年会 (1994. 3)

鹿庭なほ子, 石橋無味雄: **分析バリデーションについて**

第 30 回全国衛生化学技術協議会年会 (1993. 5)

最所和宏, 石橋無味雄, 小嶋茂雄: **ラボラトリーオートメーション (LA) 用ロボットを用いた軟カプセル剤の自動化分析**

日本薬学会第 114 年会 (1994. 3)

中原雄二: **毛髪分析で何がわかるか? 尿検査の限界と毛髪の利用価値**

日本法中毒第 12 回年会 (1993. 6)

木倉瑠理, 中原雄二: **毛髪分析による覚せい剤使用とデプレニール使用の識別**

日本法中毒第 12 回年会 (1993. 6)

木倉瑠理, 中原雄二: **アンフェタミン系医薬品 (Deprenyl, Benzphetamine, Fenproporex, Mefenorex) の血中から毛髪への移行**

第 8 回日本薬物動態学会年会 (1993. 10)

中原雄二: **覚せい剤・コカイン等の使用証明法について—尿と毛髪の利用**

第 8 回依存性薬物情報研究会 (1993. 12)

中原雄二, 高橋一徳, 木倉瑠理, 小嶋茂雄: **薬物乱**

用歴推定のための毛髪分析 IX. LSD 投与ラットの毛髪からの LSD および代謝物の検出

日本薬学会第 114 年会 (1994. 3)

高橋一徳, 中原雄二, 小嶋茂雄: 薬物乱用歴推定のための毛髪分析 X. THC 投与ラットの毛髪からの 11-norTHC-9-carboxylic acid の検出

日本薬学会第 114 年会 (1994. 3)

木倉瑠理, 中原雄二, 小嶋茂雄: 薬物乱用歴推定のための毛髪分析 XI. Benzphetamine の毛髪への移行と毛髪の裁判化学的利用

日本薬学会第 114 年会 (1994. 3)

坂本知昭\*, 田中 彰\*, 中原雄二: 薬物乱用歴推定のための毛髪分析 XII. Phencyclidine 投与ラットの毛髪からの Phencyclidine とその代謝物の検出

日本薬学会第 114 年会 (1994. 3)

\* 昭和薬科大学

仁平 信\*, 林田真喜子\*, 大野曜吉\*, 中原雄二: 新しい immunoassay, EMIT 法ならびに Triage 法の尿中乱用薬物検査における 1 次スクリーニング法としての有用性

日本薬学会第 114 年会 (1994. 3)

\* 日本医科大学

Hayakawa, T.: Framework for the evaluation of viral safety: Biotechnological products derived from cell lines of human or animal origin

2nd International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Technical Symposium: Quality, Orlando, USA (1993. 10)

Hayakawa, T.: Stability testing of biotechnological/biological products—A view from Japan—

2nd International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Technical Symposium: Quality, Orlando, USA (1993. 10)

Hayakawa, T.: Evaluation of viral safety of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin

The Sixth Annual Meeting of Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT '93), Nagoya, Japan (1993. 11)

早川 堯夫: 生理活性タンパク質製剤の活性測定法の今後の動向

第 20 回ヒューマンサイエンス基礎研究セミナー (1993. 11)

早川 堯夫: タンパク性医薬品の assay における力

価測定から理化学分析への移行の条件

日本薬学会第 114 年会 (1994. 3)

森本和滋, A. A. Said, 内田恵理子, 早川 堯夫, 津田英資\*, 上田正次\*: 陰イオン交換クロマトで分離した組換え型 EPO の生物活性と物理化学的性質

日本薬学会第 114 年会 (1994. 3)

\* 雪印乳業(株)生物科学研究所

森本和滋, 内田恵理子, 川崎ナナ, 徳永裕司, A. A. Said, 春日井勲, 早川 堯夫: 糖鎖含有タンパク質における糖鎖の構造と機能—その情報解析—(II)

日本薬学会第 114 年会 (1994. 3)

内田恵理子, 森本和滋, 伊崎洋子, 川崎ナナ, A. A. Said, 早川 堯夫: エリスロポエチンの活性構造に及ぼす活性酸素の影響

日本薬学会第 114 年会 (1994. 3)

谷本 剛, 横田栞江, 太田美矢子, 早川 堯夫: 日本薬局方一般試験法消化力試験法について

第 30 回全国衛生化学技術協議会年会 (1993. 10)

Tanimoto, T., Ohta, M., and Hayakawa, H.: Heterogeneity of high-Km aldose reductase and conversion mechanism into aldose reductase

US-Japan Aldose Reductase Workshop, Kona, USA (1994. 2)

Nishimura, C.\*<sup>1</sup>, Saito, T.\*<sup>1</sup>, Ito, T.\*<sup>2</sup>, Omori, Y.\*<sup>2</sup>, and Tanimoto, T.: Quantitative determination of human aldose reductase by enzyme-linked immunosorbent assay, analysis in diabetic patients

US-Japan Aldose Reductase Workshop, Kona, USA (1994. 2)

\*<sup>1</sup> 国立小児病院

\*<sup>2</sup> 東京女子医科大学

太田美矢子, 谷本 剛, 早川 堯夫: ヒト腎臓アルドース還元酵素の活性調節

日本薬学会第 114 年会 (1994. 4)

立川智一\*<sup>1</sup>, 石川泰一\*<sup>1</sup>, 坪内二郎\*<sup>1</sup>, 浦上貞治\*<sup>1</sup>, 西村千尋\*<sup>2</sup>, 谷本 剛: ヒトアルドース還元酵素に対するモノクローナル抗体を用いた酵素免疫測定法の開発

日本薬学会第 114 年会 (1994. 4)

\*<sup>1</sup> 三菱ガス化学(株)

\*<sup>2</sup> 国立小児病院

浦上貞治\*<sup>1</sup>, 谷本 剛, 西村千尋\*<sup>2</sup>: 新規アルドース還元酵素阻害剤としての OPQ 化合物

日本薬学会第 114 年会 (1994. 4)

\*<sup>1</sup> 三菱ガス化学(株)

\*<sup>2</sup> 国立小児病院



濱田洋司\*<sup>1</sup>, 西村千尋\*<sup>2</sup>, 榊原文彦\*<sup>1</sup>, 成瀬桂子\*<sup>1</sup>, 共 尚樹\*<sup>1</sup>, 中村二郎\*<sup>1</sup>, 若尾孝明\*<sup>1</sup>, 谷本 剛, 堀田 鏡\*<sup>1</sup>, 坂本信夫\*<sup>1</sup>: **糖尿病患者における赤血球アルドース還元酵素活性と酵素蛋白量との相関**  
第37回日本糖尿病学会 (1994.5)

\*<sup>1</sup> 名古屋大学医学部

\*<sup>2</sup> 国立小児病院

山口照英, 山口高正, 押澤 正, 山本行男\*, 鈴木和博, 早川堯夫: **HL-60の分化誘導におけるG-CSFの影響について**  
第23回日本免疫学会総会 (1993.11)

\* 東京都臨床医学総合研究所

山本行男\*, 山口照英, 羽里忠彦\*: **Angiotensin IIIによる好中球の活性化に及ぼすリン酸化の効果**  
第23回日本免疫学会総会 (1993.11)

\* 東京都臨床医学総合研究所

新見伸吾, 山口照英, 早川堯夫: **ラット初代培養肝細胞におけるグルココルチコイド受容体のデキサメタゾンによる調節**  
第9回初代培養肝細胞研究会 (1993.6)

Yamaguchi, T., Yamaguchi, T., and Hayakawa, T.: **Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) enhances the maturation of O<sub>2</sub> generating system in HL-60 cells during the differentiation to neutrophil-like cells**  
Combined Meeting of the 8th International Lymphokine Workshop and the 4th International Workshop on Cytokines, Osaka, Japan (1993.10)

Yamaguchi, T., Oshizawa, T., Yamaguchi, T., Yamamoto, Y.\*, Suzuki, K., Takahashi, A., and Hayakawa, T.: **Dephosphorylation of 45kDa protein by granulocyte colony-stimulating factor in neutrophilic differentiation of HL-60 cells**  
Combined Meeting of the 8th International Lymphokine Workshop and the 4th International Workshop on Cytokines, Osaka, Japan (1993.10)

\* Tokyo Metropolitan Institute of Medical Sciences

小林 哲, 福岡正道, 早川堯夫: **AFP・EIA キット間のAFP血中濃度測定値の違いに関する研究**  
日本薬学会第114年会 (1994.3)

奥山恵美\*, 梅山一大\*, 大木紀子\*, 山崎幹夫\*, 佐竹元吉: **ペルー生薬 Huira-Huira (Culcitium canescens) の pentobarbital 睡眠延長作用成分**  
日本薬学会第114年会 (1994.3)

\* 千葉大学薬学部

藤野広春\*, 鈴木正一\*, 吉崎正雄\*, 神田博史\*\*,

佐竹元吉: **イトヒメハギの栽培研究**  
日本生薬学会第40年会 (1993.9)

\* 富山医科薬科大学

\*\* 広島大学医学部総合薬学

佐竹元吉: **漢方薬資源の現状と問題点**  
第4回21世紀の薬学を語る京都シンポジウム (1993.10)

佐竹元吉: **生薬・薬用植物の品質を考える**  
第1回生薬・薬用植物の生産に関する研究会 (1993.10)

鎌倉浩之, 佐竹元吉: **ノルエフェドリン光学異性体の血清, 組織タンパク結合の検討**  
日本薬学会114年会 (1994.3)

尾崎幸紘, 大野晶子\*, 斎藤雄二\*, 佐竹元吉: **シコニン, アルカニンおよびアセチルシコニンのラット肉芽組織形成促進作用**  
第67回日本薬理学会年会 (1994.3)

\* 鐘紡漢方研究所

鈴木英世, 尾崎幸紘, 佐竹元吉: **生薬製剤および漢方製剤のエキス含量に関する考察**  
第30回全国衛生化学協議会 (1993.10)

Flores, D., Kawahara, N., Sekita, S., and Satake, M.: **New Sesquiterpenoid from *Cypers articulatus***  
XV International Botanical Congress, Yokohama, Japan (1993.8)

Kawahara, N., Sekita, S., and Satake, M.: **Steroid Derivatives from *Calvatia cyathiformis***  
XV International Botanical Congress, Yokohama, Japan (1993.8)

川原信夫: **日本における薬用植物の生産, 消費の現状**  
天然抗癌資源の開発, 利用国際学術大会, ソウル, 韓国 (1993.8)

関田節子: **茯苓化学成分の分析学的研究**  
日中生薬研究学術講演会, 武漢, 中国 (1993.10)

川原信夫, 関田節子, 佐竹元吉: **馬勃の成分研究 (3)**  
日本薬学会114年会 (1994.3)

顔 妮, 川原信夫, 関田節子, 佐竹元吉: **三稜の化学成分の研究 (1)**  
日本薬学会114年会 (1994.3)

土田貴志\*<sup>1</sup>, 山本知枝\*<sup>1</sup>, 山本恵一\*<sup>1</sup>, 人見信之\*<sup>1</sup>, 鈴木 章\*<sup>1</sup>, 佐竹元吉, 関田節子, 難波恒雄\*<sup>2</sup>, 小

松かつ子\*<sup>2</sup>: 枳実・枳殻の成分分析  
日本薬学会 114 年会 (1994. 3)

\*<sup>1</sup> 鐘紡・漢方研

\*<sup>2</sup> 富山医薬大・和漢薬研

Eto, K.\*<sup>1</sup>, Ono, K., Shibata, K.\*<sup>1</sup>, Sakamoto, A.\*<sup>1</sup>, Hashimoto, K.\*<sup>2</sup>, and Tsujimoto, G.\*<sup>1</sup>: **Negative chronotropic effect of endothelin mediated through ET<sub>A</sub> receptor in guinea-pig atrium**  
日本薬理学会第 67 回年会 (1994. 3)

\*<sup>1</sup> Dept. Molecular and Cellular Pharmacol., National Children's Med Res Ctr

\*<sup>2</sup> Dept. Pharmacol., Yamanashi Med. Univ.

Ono, K., Eto, K.\*, Sakamoto, A.\*, Tsujimoto, G.\* and Satake, M.: **Endothelins inhibit calcium current and stimulate potassium current through ET<sub>A</sub> receptors in guinea-pig atrial myocytes**  
日本薬理学会第 67 回年会 (1994. 3)

\* Div. Mol. Cell. Pharmacol., Natl. Children's Med. Res. Center

奚 廷斐\*, 佐藤道夫, 中村晃忠, 川崎 靖, 梅村隆志, 津田充有: **ポリウレタンの埋植による生体内変化 (1) フィルム表面形態の変化等について**  
第 22 回医用高分子シンポジウム (1993. 6)

\* 中国薬品生物製品検定所

佐藤道夫, 奚 廷斐\*, 中村晃忠, 川崎 靖, 梅村隆志, 津田充有: **ポリウレタンの埋植による生体内変化 (2) 化学構造の変化について**  
第 22 回医用高分子シンポジウム (1993. 6)

\* 中国薬品生物製品検定所

Xi, T.\*, Sato, M., Nakamura, A., Kawasaki, Y., Umemura, T. and Tsuda, M.: **In Vivo degradation of polyurethane I: Molecular Weight Change and Surface Morphology of Materials**  
The 1st Far-Eastern Symposium on Biomedical Materials (1993. 10)

\* 中国薬品生物製品検定所

Nakamura, A., Xi, T.\*, Sato, M., Kawasaki, Y., Umemura, T. and Tsuda, M.: **In Vivo degradation of polyurethane II: Changes of Infrared and Nuclear Magnetic Resonance Spectra and Contact Angle**  
The 1st Far-Eastern Symposium on Biomedical Materials (1993. 10)

\* 中国薬品生物製品検定所

佐藤道夫, 中村晃忠, 奚 廷斐\*: **ポリウレタンの埋植による生体内変化 (溶媒浸漬実験との相関について)**

第 15 回日本バイオマテリアル学会大会 (1993. 10)  
\* 中国薬品生物製品検定所

矢上 健, 佐藤道夫, 中村晃忠, 生野麻美子\*: **天然ゴム製品による I 型アレルギーと天然ゴムに由来するリゾチームとの関連**  
日本薬学会第 114 年会 (1994. 3)

\* しょうの皮膚科医院

Shintani, H.: **Some problems of biochemical trace analysis**  
VI International Seminar on Chromatography (1993. 9)

Shintani, H.: **Toxic compound elution from medical devices**  
AAMI 29th Annual Meeting & Exposition (1994. 5)

Shintani, H.: **Current status of Japan for ISO/TC 198, WG 4, Biological indicator**  
AAMI 29th Annual Meeting & Exposition (1994. 5)

中村晃忠: **医療高分子材料の安全性評価 (ポリメチルメタクリレート・レジンを例として)**  
第 38 回医用高分子研究会 (1993. 10)

中村晃忠: **局方における医薬品プラスチック容器の品質規格に関する提案**  
日本薬学会第 114 年会 (1994. 3)

伊佐間和郎, 鹿庭正昭, 中村晃忠: **口紅によるアレルギー性接触皮膚炎の原因究明**  
第 30 回全国衛生化学技術協議会年会 (1993. 10)

鹿庭正昭, 伊佐間和郎, 中村晃忠: **市販ゴム長靴中のアミン系老化防止剤: アレルギー性接触皮膚炎の原因化学物質としての役割**  
第 30 回全国衛生化学技術協議会年会 (1993. 10)

鹿庭正昭, 伊佐間和郎: **農作業用ゴム長靴中のアミン系老化防止剤: アレルギー性接触皮膚炎の原因化学物質としての役割**  
日本薬学会第 114 年会 (1994. 3)

伊佐間和郎, 鹿庭正昭, 関口裕巳, 門馬純子, 中村晃忠: **ポリエステル抽出物のモルモットによる感作性**  
日本薬学会第 114 年会 (1994. 3)

大谷隆夫\*, 松永佳世子\*, 河島利華\*, 鹿庭正昭: **嫌気性封着剤に含まれた 2-ヒドロキシエチルメタクリレートによる職業性アレルギー性接触皮膚炎**  
第 23 回日本皮膚アレルギー学会 (1993. 7)

\* 藤田保健衛生大学医学部付属病院

鹿庭正昭, 門馬純子, 関口裕巳, 伊佐間和郎, 中村

晃忠, 津田充有, 黒川雄二: ゴム製品中のアレルギー性物質の確認: 化学分析と Guinea Pig Maximization Test を用いた検索法の有用性  
第20回日本毒科学会学術年会 (1993. 7)

Kaniwa, M. and Isama K.: Allergic contact dermatitis due to *p-tert-butylphenol formaldehyde resin*: an overview in the last decade  
2nd Asia-Pacific Environmental and Occupational Dermatology Symposium, Bangkok, Thailand (1993. 11)

関東裕美\*, 深澤 大\*, 小関光美\*, 鹿庭正昭: 半導体製造従業者に生じた脱色素斑の1例  
第18回日本接触皮膚炎学会 (1993. 12)

\* 日産厚生会玉川病院

鹿庭正昭, 伊佐間和郎, 中村晃忠, 生野麻美子\*<sup>1</sup>, 早川律子\*<sup>2</sup>, 請井智香子\*<sup>2</sup>, 荻野泰子\*<sup>2</sup>, 中川幹雄\*<sup>3</sup>, 河合敬一\*<sup>3</sup>: *p-tert-Butyl-phenol formaldehyde resin (PTBP-FR)* によるアレルギー性接触皮膚炎: まとめ  
第18回日本接触皮膚炎学会 (1993. 12)

\* しょうの皮膚科

\* 名古屋大学医学部付属病院分院

\* 河合医院

林 譲, 松田りえ子: 定量分析操作の不確定性構造の解明  
分析機器と解析システムに関する東京討論会 (1993. 9)

林 譲, 松田りえ子: 定量分析の不確定性構造と最適化について  
第37回日本薬学会関東支部大会 (1993. 11)

林 譲, 松田りえ子: クロマトグラフィにおける信号解析と情報量について  
第16回情報化学討論会 (1993. 11)

Tsuchiya, T., Hata, H., and Nakamura, A.: Detection of Tumor-promoting Activities of Biomaterials: Inhibitory Action of Polyurethane and Silicone on Metabolic Cooperation in Chinese Hamster Cells  
The First Far-Eastern Symposium on Biomedical Materials, Beijing, China (1993. 10)

Tsuchiya, T. and Nakamura, A.: Studies on the Causes of Tumorigenesis Induced by the Biomaterials  
Bionic Design Workshop '94, Tsukuba, Japan (1994. 2)

土屋利江, 五十嵐良明, 中村晃忠, 高原 淳\*<sup>1</sup>, 秦英代\*<sup>2</sup>: 高分子材料の発ガン性の短期検索法の確

立に関する研究 (1) 各種ポリウレタンおよび構成モノマー等の細胞間連絡阻害活性の検出  
第15回日本バイオマテリアル学会 (1993. 10)

\*<sup>1</sup> 九州大学工学部

\*<sup>2</sup> 民生科学協会

土屋利江, 中村晃忠: 高分子材料の発ガン性の短期検索法の確立に関する研究 (2) ポリウレタン材料の Balb 3T3 トランスフォーメーション作用の検出  
第15回日本バイオマテリアル学会 (1993. 10)

土屋利江: 医療用具および医用材料の基礎的な毒性試験のガイドライン案  
日本医療機器関係団体協議会平成4年度セミナー (1992. 3)

五十嵐良明, 土屋利江, 中村晃忠: 2-(2'-Hydroxy-5'-methylphenyl)benzotriazole (チヌピンP) の皮膚感作性試験  
第20回日本毒科学会学術年会 (1993. 7)

五十嵐良明, 土屋利江, 中村晃忠: 過酸化水素ガス滅菌された医用材料の安全性について  
第15回日本バイオマテリアル学会大会 (1993. 10)

五十嵐良明, 土屋利江, 中村晃忠: マウスを用いた高感度感作性試験法の開発  
日本薬学会第114年会 (1994. 3)

Ikarashi, Y., Tsuchiya, T. and Nakamura, A.: A sensitive mouse lymph node assay with two application phases for detection of contact allergens  
3rd Korea-Japan Symposium on Toxicological Sciences, Seoul, Korea (1993. 11)

松村年郎, 関田 寛, 村松 学\*: 化学物質による室内汚染 (9) 揮発性有機塩素化合物の個人暴露量の測定結果について  
第34回大気汚染学会 (1993. 12)

\* 東京都杉並西保健所

松村年郎, 関田 寛, 武田浩昭\*: 化学物質による室内汚染 (10) 室内空気中のギ酸濃度について  
第34回大気汚染学会 (1993. 12)

\* 純正化学㈱

松村年郎, 関田 寛, 長田英二\*: 化学物質による室内汚染 (11) 家庭の主婦を対象とした HCHO と NO<sub>2</sub> の個人暴露量の同時測定結果について  
第34回大気汚染学会 (1993. 12)

\* 電気化学計器㈱

松村年郎, 村松 学\*: 都立学校の環境調査について NO<sub>2</sub>, HCHO 濃度とダニ抗原量等による環境評

## 価について

第 34 回大気汚染学会 (1993. 12)

\* 東京都杉並西保健所

Matsumura, T., Kojima, S., and Muramatsu, S.\*: **Development of passive sampler of volatile organic compounds and its application to personal exposure measurement (*p*-dichlorobenzene)**

6th International Conference on Indoor Air Quality and Climate, Helsinki, Finland (1993. 7)

\* Suginami-Nishi Health Center, Tokyo (東京都杉並西保健所)

Osada, E.\*, and Matsumura, T.: **Development of passive sampler of formaldehyde and its application to exposure measurement**

6th International Conference on Indoor Air Quality and Climate, Helsinki, Finland (1993. 7)

\* DKK Corporation (㈱電気化学計器)

Muramatsu, S.\*, and Matsumura, T.: **The concentration of nitrogen dioxide and formaldehyde in indoor air and their exposure levels to students in Japan**

6th International Conference on Indoor Air Quality and Climate, Helsinki, Finland (1993. 7)

\* Suginami-Nishi Health Center, Tokyo (東京都杉並西保健所)

木嶋敬二, 山越葉子, 小嶋茂雄, 鈴木助治\*, 中村弘\*: **化粧品中の塩酸ピリドキシン, アスコルビン酸およびその誘導体の分析法 (化粧品の簡易迅速分析法第 6 報)**

第 18 回日本化粧品科学会学術大会 (1993. 6)

\* 東京都立衛生研究所

徳永裕司, 木嶋敬二, 安藤正典: **メチルパラベンを透過指標とした剝離皮膚への界面活性剤の影響**

日本薬学会第 114 年会 (1994. 3)

内野 正, 木嶋敬二, 安藤正典, 斎藤真美\*: **ヘマトポルフィリンの UVA 増感による溶血に対する紫外線吸収剤の影響**

日本薬学会第 114 年会 (1994. 3)

\* 昭和薬科大学

埴岡伸光, 神野透人, 豊岡利正, 安藤正典: **ラット肝 7-Ethoxycoumarin O-deethylase 活性に及ぼす Dioxin 類化合物の影響**

第 66 回日本生化学会 (1993. 10)

埴岡伸光, 神野透人, 豊岡利正, 安藤正典: **1, 2, 4-Trichlorodibenzo-*p*-dioxin によるラット薬物代謝酵素の誘導について**

日本薬学会第 114 年会 (1994. 3)

鈴木敏男\*, 神野透人, 埴岡伸光, 安藤正典, 小嶋茂雄: **ページ・トラップ-GC/MS によるアルデヒド類の分析と保持時間の規格化**

第 44 回全国水道研究発表会 (1993. 5)

\* 福島県郡山市水道局

神野透人, 大湾雅一\*, 羽生 努, 埴岡伸光, 豊岡利正, 安藤正典: **ヘッドスペース-クライオフォーカシング-GC/MS による揮発性有機化合物の分析**

第 28 回日本水環境学会年会 (1994. 3)

\* 那覇市水道局

神野透人, 埴岡伸光, 豊岡利正, 安藤正典: **Benthocarb 塩素処理生成物の肝細胞毒性**

日本薬学会第 114 年会 (1994. 3)

佐々木久美子, 村野勢津子\*, 岡村達雄\*, 斎藤行生: **HPLC によるマレイン酸ヒドラジドおよびヒドラジンの残留分析法**

日本食品衛生学会第 67 回学術講演会 (1994. 5)

\*<sup>1</sup> 広島市衛生研究所

\*<sup>2</sup> 長野県農村工業研究所

林 譲, 松田りえ子: **化学操作の不確定性構造の解明と最適定量分析システムの設計戦略の創造 I. サンプル調製と HPLC 測定**

日本分析化学会第 42 年会 (1993. 10)

松田りえ子, 林 譲, 佐々木久美子, 斎藤行生: **化学操作の不確定性構造の解明と最適定量分析システムの設計戦略の創造 II. 内部標準物質の添加と HPLC 測定**

日本分析化学会第 42 年会 (1993. 10)

松田りえ子, 根本 了, 林 譲, 佐々木久美子, 斎藤行生: **クロマトグラフィーにおける精密度について I. 内部標準法は分析の精密度を向上させるか?**

日本薬学会第 114 年会 (1994. 3)

松田りえ子, 根本 了, 林 譲, 佐々木久美子, 斎藤行生: **クロマトグラフィーにおける精密度について II. インテグレートによる積分値の精密度について**

日本薬学会第 114 年会 (1994. 3)

根本 了, 佐々木久美子, 斎藤行生: **GC-MS による農産物中残留農薬の多成分分析について**

日本薬学会第 114 年会 (1994. 3)

根本 了, 佐々木久美子, 斎藤行生: **農産物中のホキシムの分析法について**

日本食品衛生学会第 67 回学術講演会 (1994. 5)

鈴木 隆, 高木加代子, 斎藤行生: **生体試料中に含まれる有機スズ化合物の分析に対する原子発光検出**

## 器の応用

第18回環境トキシコロジーシンポジウム(1993.11)

豊田正武, 斎藤行生, 内山 充, A. L. Troy\*, M. W. Trucksess\*, S. W. Page\*: L-トリプトファン中の不純物 3-(phenylamino)-alanine の化学的生成について

日本食品衛生学会第 66 回学術講演会 (1993.10)

\* FDA (USA)

豊田正武, 斎藤行生: バイオ食品の化学的安全性評価と米国 FDA における現状

第 30 回全国衛生化学技術協議会年会 (1993.10)

豊田正武: 米国における EMS 関連トリプトファン研究について

食品総合研究所内講演会・招待講演 (1993.12)

豊田正武, 斎藤行生, 内山 充, A. L. Troy\*, M. W. Trucksess\*, S. W. Page\*: ケモメトリックスによる L-トリプトファン製造に使用された *Bacillus amyloliquefaciens* 株の識別

日本農芸化学会 1994 年度大会 (1994.4)

\* FDA (USA)

豊田正武, 宮原 誠, 穂山 浩, 斎藤行生: ケモメトリックスによるバイオ食品と従来食品との化学的同等性評価について—polygalacturonase antisense RNA 導入組換えトマトのデータ解析—

日本食品衛生学会第 67 回学術講演会 (1994.5)

浅居良輝\*<sup>1</sup>, 慶田雅洋\*<sup>2</sup>, 金子精一\*<sup>3</sup>, 工藤一郎\*<sup>4</sup>, 高橋 強\*<sup>5</sup>, 豊田正武, 中野 覚\*<sup>6</sup>, 野田勝彦\*<sup>7</sup>, 平山 寛\*<sup>8</sup>, 深沢喜延\*<sup>9</sup>, 松本昌雄\*<sup>10</sup>: チーズの保存料 (ナイシン, ナタマイシン, リゾチーム) バイオアッセイおよび高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による定性および定量

日本薬学会第 114 年会 (1994.3)

\*<sup>1</sup> 雪印乳業

\*<sup>2</sup> ネッスル

\*<sup>3</sup> 神奈川県栄養短大

\*<sup>4</sup> 東京大学

\*<sup>5</sup> 東京農業大

\*<sup>6</sup> 乳業技術協会

\*<sup>7</sup> 明治乳業

\*<sup>8</sup> 森永乳業

\*<sup>9</sup> 山梨県衛生公害研究所

\*<sup>10</sup> 国際学院短期大学

浅居良輝\*<sup>1</sup>, 慶田雅洋\*<sup>2</sup>, 金子精一\*<sup>3</sup>, 工藤一郎\*<sup>4</sup>, 高橋 強\*<sup>5</sup>, 豊田正武, 中野 覚\*<sup>6</sup>, 野田勝彦\*<sup>7</sup>, 平山 寛\*<sup>8</sup>, 深沢喜延\*<sup>9</sup>, 松本昌雄\*<sup>10</sup>: チーズ中の *Listeria monocytogenes* の検査法

日本薬学会第 114 年会 (1994.3)

\*<sup>1</sup> 雪印乳業

\*<sup>2</sup> ネッスル

\*<sup>3</sup> 神奈川県栄養短大

\*<sup>4</sup> 東京大学

\*<sup>5</sup> 東京農業大

\*<sup>6</sup> 乳業技術協会

\*<sup>7</sup> 明治乳業

\*<sup>8</sup> 森永乳業

\*<sup>9</sup> 山梨県衛生公害研究所

\*<sup>10</sup> 国際学院短期大学

一色賢司\*<sup>1</sup>, 浅野正博\*<sup>2</sup>, 城田浩治\*<sup>3</sup>, 豊田正武, 阿南豊正\*<sup>4</sup>: 培養動物細胞を用いた各種トマトのグリコアルカロイドの生物検定

日本食品衛生学会第 67 回学術講演会 (1994.5)

\*<sup>1</sup> 農林水産省食品総合研究所

\*<sup>2</sup> 京都府農総研

\*<sup>3</sup> 農林水産省野菜茶業試験場

宮原 誠, 穂山 浩, 豊田正武, 斎藤行生: 20 家庭から集めた食品中の低沸点有機塩素化合物の含有量および摂取量の推定

第 30 回全国衛生化学技術協議会年会 (1993.10)

宮原 誠, 穂山 浩, 豊田正武, 斎藤行生: HPLC-ポストカラム法によるフモニシンの分析

日本薬学会第 114 年会 (1994.3)

穂山 浩, 宮原 誠, 豊田正武, 斎藤行生: DBD-F を用いたプレカラム HPLC 法による食品中フモニシンの分析

日本薬学会第 114 年会 (1994.3)

穂山 浩, 宮原 誠, 豊田正武, 斎藤行生: フモニシン分析における各種蛍光誘導体化 HPLC 法の比較

日本食品衛生学会第 67 回学術講演会 (1994.5)

西島基弘\*, 浜野 孝\*, 伊藤啓志男, 加藤嘉昭\*, 上条昌弥\*, 白石隆幸\*, 鈴木 忍\*, 中岡正吉\*, 成田弘子\*, 本間 浩\*, 山田 隆, 渡部健二郎\*: イマザリル: 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 114 年会 (1994.3)

\* 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\*, 浜野 孝\*, 伊藤啓志男, 加藤嘉昭\*, 上条昌弥\*, 白石隆幸\*, 鈴木 忍\*, 中岡正吉\*, 成田弘子\*, 本間 浩\*, 山田 隆, 渡部健二郎\*: サッカリンおよびサッカリンナトリウム: 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 114 年会 (1994.3)

\* 日本薬学会 衛生試験法部会

食品添加物専門委員会

石綿 肇: 輸入食品と添加物

第30回全国衛生化学技術協議会年会 (1993. 10)

Ishiwata, H.: **Safety assurance of imported foods in Japan**

Special Meeting of the Department of Medical Science, Ministry of Public Health, Thailand (1994. 1)

辰濃 隆\*, 石綿 肇, 大出 譲\*, 風間成孔\*, 河村太郎\*, 小松美博\*, 里見弘治\*, 中村好志\*, 中沢裕之\*, 西村正美\*, 馬場二夫\*: **有機溶剤のヘッドスペース・ガスクロマトグラフィーによる定量**  
日本薬学会第114年会 (1994. 3)

\* 日本薬学会 衛生試験法部会  
容器・包装専門委員会

細貝 猛\*<sup>1</sup>, 青木 岳\*<sup>1</sup>, 桜井裕之\*<sup>1</sup>, 伊藤澄夫\*<sup>1</sup>, 渡辺芳則\*<sup>1</sup>, 牛尼進之\*<sup>1</sup>, 山田千恵子\*<sup>2</sup>, 石綿 肇, 武田由比子, 山田 隆: **輸入食品の安全確保に関する研究 (I) ロイヤルゼリー等蜜蜂により生成される食品中のパラオキシ安息香酸メチル**  
日本食品衛生学会第67回学術講演会 (1994. 5)

\*<sup>1</sup> 横浜検疫所輸入食品・検疫検査センター  
\*<sup>2</sup> 昭和女子大学

武田 寿\*, 神保真理\*, 小林昭彦\*, 池田千波\*, 藤井明美\*, 青木 岳\*, 多田善彦\*, 桜井裕之\*, 細貝猛\*, 伊藤澄夫\*, 渡辺芳則\*, 牛尼進之\*, 石綿肇: **HPLC (UV) による輸入米中のベンズルフロノメチルの簡易分析法**  
日本食品衛生学会第67回学術講演会 (1994. 5)

\* 横浜検疫所輸入食品・検疫検査センター

武田由比子, 石綿 肇, 山田 隆: **栄養強化食品等の二価および三価鉄の比色法による分別定量について**

日本食品衛生学会第66回学術講演会 (1994. 10)

川崎洋子, 合田幸広, 義平邦利\*, 山田 隆: **セイヨウアカネ由来のアントラキノン系天然色素の変異原性とそのメカニズムについて**  
第19回環境トキシコロジーシンポジウム (1993. 11)

\* 東亜大学

川崎洋子, 合田幸広, 山田 隆: **Lucidin-プリン修飾体および Lucidin-プリンヌクレオシド修飾体の構造について**

日本薬学会第114年会 (1994. 3)

米谷民雄, 久保田浩樹, 佐藤恭子, 合田幸広, 武田明治: **各種金属による色素産生植物培養細胞でのフィトケラチン様物質の誘導**  
第6回金属の関与する生体関連反応シンポジウム (1993. 6)

合田幸広, 鈴木淳子, 米谷民雄, 山田 隆: **ペニバナ黄色素中の主色素成分の構造について**  
日本薬学会第114年会 (1994. 3)

Sakamoto, S., Goda, Y., Maitani, T., Takeda, M., Yamada, T., Ishikawa, K.\*<sup>1</sup>, Inai, S.\*<sup>1</sup>, Nunomura, O.\*<sup>2</sup>, Kee, T. S.\*<sup>3</sup>, and Kamada, H.\*<sup>3</sup>: **Direct Interfacing of Supercritical Fluid Extraction and Supercritical Fluid Chromatography (SFE/SFC): Rapid Quantitation of Capsaicinoids (CAPS) for Plant Selection**  
XV International Botanical Congress, Japan (1993. 8)

\*<sup>1</sup> Faculty of Horticulture, Chiba University  
\*<sup>2</sup> Nihon Horticultural Production Institute  
\*<sup>3</sup> Institute of Biological Sciences, University of Tsukuba

坂元史歩, 合田幸広, 伊勢浩子, 米谷民雄, 山田隆, 布村 伊\*<sup>1</sup>, 石川恵子\*<sup>2</sup>: **HPLCによるトウガラシ (Capsicum annuum) 胎座中の capsaicinoids とその芳香族前駆体の分析**  
日本薬学会第114年会 (1994. 3)

\*<sup>1</sup> 日本園芸生産研究所  
\*<sup>2</sup> 千葉大学園芸学部

久保田浩樹, 佐藤恭子, 合田幸広, 米谷民雄, 山田隆: **カドミウムによりセイヨウアカネ培養根に誘導されるフィトケラチンについて**  
日本薬学会第114年会 (1994. 3)

伊藤誉志男\*, 星野庸二\*, 河村葉子, 谷 孝之\*, 外海泰秀, 中沢裕之\*, 中村好志\*, 西島基弘\*, 堀伸二郎\*, 宮田秀明\*: **合成抗菌剤: 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114年会 (1994. 3)

\* 日本薬学会 衛生試験法部会  
食品汚染物専門委員会

河村葉子, 杉田たき子, 山田 隆, 斎藤行生, 小島佳奈\*: **熱発光法による照射香辛料の検知について**  
日本食品衛生学会第67回学術講演会 (1994. 5)

\* 昭和女子大学

杉田たき子, 河村葉子, 山田 隆: **高速液体クロマトグラフィーによるポリカーボネート樹脂中の残存モノマーおよび添加剤の同時分析法**  
日本食品衛生学会第67回学術講演会 (1994. 5)

岩田修永\*, 原 修一\*, 遠藤任彦\*, 福原 潔, 鈴木和博, 高橋 惇, 宮田直樹: **ニトロナフタレン類の還元特性—酵素化学的還元特性と電気化学的還元性との相関**  
第20回日本毒科学会学術年会 (1993. 7)

\* 東京医科大学

福原 潔, 武居美奈, 影山晴秋, 楠間通代, 世良暢之\*<sup>1</sup>, 常盤 寛\*<sup>2</sup>, 宮田直樹: ニトロフェナンスレンおよびニトロアザフェナンスレンの合成, 変異原性, 還元特性の解析

第22回日本環境変異原学会 (1993. 11)

\*<sup>1</sup> 福岡県保健環境研究所

\*<sup>2</sup> 九州女子大学

大森清美\*<sup>1</sup>, 福原 潔, 岩田修永\*<sup>2</sup>, 堀口佳哉\*<sup>1</sup>, 遠藤任彦\*<sup>2</sup>, 宮田直樹: ニトロナフタレンを用いた Salmonella 3 菌株 (TA98, TA98NR, YG1021) の還元特性の解析

第22回日本環境変異原学会 (1993. 11)

\*<sup>1</sup> 神奈川県衛生研究所

\*<sup>2</sup> 東京医科大学

世良暢之\*<sup>1</sup>, 福原 潔, 宮田直樹, 堀川和美\*<sup>1</sup>, 常盤 寛\*<sup>2</sup>: ニトロアザベンツ[a]ピレンの変異原性と構造活性相関

第22回日本環境変異原学会 (1993. 11)

\*<sup>1</sup> 福岡県保健環境研究所

\*<sup>2</sup> 九州女子大学

山越葉子, 福原 潔, 末吉祥子, 宮田直樹: 界面活性剤を用いた C60 および C70 の水溶化

第6回 C60 シンポジウム (1994. 1)

福原 潔, 宮田直樹: PSCC 法による一電子移動反応の解析: 活性酸素の生成と消去

日本薬学会第114年会 (1994. 3)

栗原正明, 宮田直樹: アルコキシシランをシリル源とするジオールによるアセタール化 (2)

日本薬学会第114年会 (1994. 3)

栗原正明, 宇賀神正代, 伊東幸子, 宮田直樹: ジオキシシランを用いた酸化反応 (4) シクロヘキセン類の立体選択的エポキシ化

日本薬学会第114年会 (1994. 3)

伊東幸子, 末吉祥子, 宮田直樹: ピリジンおよびキノリン4級塩の有機スズ触媒下における分子内閉環反応

日本薬学会第114年会 (1994. 3)

山越葉子, 福原 潔, 末吉祥子, 宮田直樹: ポリビニルピロリドンによるフラレンの水溶化

日本薬学会第114年会 (1994. 3)

丹野雅幸, 末吉祥子, 山木元生, 宮田直樹: 新規トリアゼノアミドキシム誘導体の合成と一酸化窒素 (NO) の発生

日本薬学会第114年会 (1994. 3)

福原 潔, 宮田直樹: キノン, ニトロアレン類によるスーパーオキシドの生成と消去

活性酸素の生物作用シンポジウム (1994. 5)

Morita, I., Yamazaki, T., and Sawada, J.: Capillary electrophoresis with on-line sample pre-treatment for the direct injection analysis of biological fluids

The 206th American Chemical Society National Meeting, Chicago, USA (1993. 8)

手島玲子, 池淵秀治, 澤田純一, 中西 守\*<sup>1</sup>: 好塩基球の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/vanadate 刺激におけるチロシンリン酸化反応の役割について

第66回日本生化学会 (1993. 10)

\*<sup>1</sup> 名古屋市立大学薬学部

手島玲子, 池淵秀治, 澤田純一, 中西 守\*<sup>1</sup>: 好塩基球細胞の Ca<sup>2+</sup> 動態への蛋白質チロシンリン酸化反応の役割

第2回バイオイメージング学会 (1993. 10)

\*<sup>1</sup> 名古屋市立大学薬学部

堀越由美子\*<sup>1</sup>, 古野忠秀\*<sup>1</sup>, 手島玲子, 中西 守\*<sup>1</sup>: 好塩基球におけるアレルギー初期反応の画像解析

第2回バイオイメージング学会 (1993. 10)

\*<sup>1</sup> 名古屋市立大学薬学部

斎藤嘉郎, 山崎 壮, 池淵秀治, 澤田純一: ヒト IM-9 細胞におけるヒト成長ホルモン受容体のダウンレギュレーション

第46回日本細胞生物学会 (1993. 10)

木谷誠一\*<sup>1</sup>, 森田 寛\*<sup>1</sup>, 伊藤幸治\*<sup>1</sup>, 手島玲子: ラット好塩基球白血球細胞 (RBL-2H3) 活性化に及ぼす Ser/Thr フォスファターゼの関与

第43回日本アレルギー学会 (1993. 10)

\*<sup>1</sup> 東京大学医学部

手島玲子, 池淵秀治, 澤田純一, 木谷誠一\*<sup>1</sup>, 宮地純樹\*<sup>2</sup>, 一戸正勝: Aspergillus fumigatus 中に存在するアレルゲン (gp55) の性質について

第43回日本アレルギー学会 (1993. 10)

\*<sup>1</sup> 東京大学医学部

\*<sup>2</sup> 関東中央病院

森田幾江, 蜂須賀暁子, 山崎 壮, 澤田純一: オンライン前処理キャピラリー電気泳動法の開発 [II] 第13回キャピラリー電気泳動シンポジウム (1993. 12)

手島玲子, 池淵秀治, 澤田純一, 中西 守\*<sup>1</sup>: 好塩基球の pervanadate 刺激に伴う脱顆粒反応について

第114回日本薬学会 (1994. 3)

\*<sup>1</sup> 名古屋市立大学薬学部

田中東一, 斎藤嘉郎, 手島玲子, 池淵秀治, 澤田純一, 一戸正勝: **ゼラレノン免疫測定法の穀類への応用について—免疫測定法と HPLC 法の相関性**  
第 114 回日本薬学会 (1994. 3)

天野富美夫\*<sup>1</sup>, 野田徹二\*<sup>1</sup>, 赤松 稔\*<sup>1</sup>, 斎藤嘉郎, 澤田純一: **成長ホルモンによる LPS 誘導マクロファージ活性化の調節機構**  
第 67 回日本細菌学会 (1994. 3)

\*<sup>1</sup> 予防衛生研究所

嶺岸謙一郎, 高橋 惇: **5-FP (ペンタフルオロプロパノール) の代謝 (2) 組織分布について**  
日本薬学会第 114 年会 (1994. 3)

鈴木和博, 押澤 正, 山口照英, 山本行男\*, 田中寿一, 早川堯夫: **分化型 HL-60 細胞の活性酸素産生に対するオカダ酸の効果**  
第 23 回日本免疫学会総会 (1993. 11)

\* 東京都臨床医学総合研究所

最上(西巻)知子, 豊田和弘, 高橋 惇, 林 裕造: **胆汁酸微生物代謝産物によるラット肝ペルオキシソームの増殖と脂質代謝の変動**  
第 15 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (1993. 11)

最上(西巻)知子, 高橋 惇, 林 裕造: **ペルオキシソーム増殖活性を持つ胆汁酸微生物代謝産物の CoA エステルへの活性化**  
日本薬学会第 114 年会 (1994. 3)

岩田修永\*<sup>1</sup>, 栗岩ふみ\*<sup>1</sup>, 原 修一\*<sup>1</sup>, 遠藤任彦\*<sup>1</sup>, 五十嵐 隆\*<sup>2</sup>, 佐藤哲男\*<sup>2</sup>, 鈴木和博, 嶺岸謙一郎, 高橋 惇: **発癌物質ムスクキシレンによるマウス肝グルタチオン S-トランスフェラーゼの誘導**  
第 8 回日本薬物動態学会年会 (1993. 10)

\*<sup>1</sup> 東京医科大学

\*<sup>2</sup> 千葉大学薬学部

三瀬勝利: **局方・微生物試験法の改訂案について**  
日本 PDA 第 2 回年会 (1993. 10)

三瀬勝利: **農業利用における日和感染菌の安全性**  
日本植物病理学会, バイオコントロール研究会 (1994. 4)

棚元憲一: **サクシニル化リピド A は内毒素による B 細胞, マクロファージいずれの活性化をも抑制する**  
第 67 回日本細菌学会総会 (1994. 3)

佐野保広\*, 一色恭徳\*, 近藤誠一\*, 配島由二, 久恒和仁\*: **Non-O1 *Vibrio cholerae* O76 の LPS 多糖部の構造解析**  
第 67 回日本細菌学会総会 (1994. 3)

\* 城西大学

熊田秀文\*, 梅本俊夫\*, 配島由二, 棚元憲一: ***Porphyromonas gingivalis* LPS のリピド A の化学構造**  
第 67 回日本細菌学会総会 (1994. 3)

\* 神奈川歯科大学

飯田貴敏\*, 田中 彰\*, 配島由二, 棚元憲一: ***Alcaligenes faecalis* 由来リピド A の化学構造と生物活性**  
第 67 回日本細菌学会総会 (1994. 3)

\* 昭和薬科大学

佐野保広\*, 一色恭徳\*, 近藤誠一\*, 配島由二, 久恒和仁\*: **O 抗原リポ多糖 (LPS) の O 多糖鎖部に perosamine を持つ Non-O1 *Vibrio cholerae* O76 LPS の構造解析**  
第 40 回毒素シンポジウム (1993. 7)

\* 城西大学

一色恭徳\*, 石田恵一\*, 近藤誠一\*, 配島由二, 久恒和仁\*: **O1 コレラ菌リポ多糖 (LPS) のオガワ特異物質の解析**  
第 40 回毒素シンポジウム (1993. 7)

\* 城西大学

久恒和仁\*, 一色恭徳\*, 配島由二, 近藤誠一\*: **O1 コレラ菌オガワ抗原因子 B に関する化学的・免疫化学的研究**  
第 27 回腸炎ビブリオシンポジウム (1993. 11)

\* 城西大学

宮原美知子, 三瀬勝利: **制限酵素を産生する病原性大腸菌株の解析**  
第 16 回日本分子生物学会年会 (1993. 12)

宮原美知子, 中村明子\*, 三瀬勝利: ***Salmonella Enteritidis* のプラスミドプロファイルと制限酵素**  
第 67 回日本細菌学会総会 (1994. 3)

\* 国立予防衛生研究所

宮原美知子, 小沼博隆, 三瀬勝利, 中村明子\*: ***Salmonella Enteritidis* におけるプラスミドプロファイルと制限酵素の疫学的利用法**  
日本食品衛生学会第 67 回学術講演会 (1994. 5)

\* 国立予防衛生研究所

徳丸雅一\*<sup>1</sup>, 梅迫誠一\*<sup>2</sup>, 増田高志\*<sup>3</sup>, 後藤公吉\*<sup>4</sup>, 熊谷 学\*<sup>5</sup>, 小沼博隆, 品川邦汎\*<sup>6</sup>: **鶏卵表面から卵内へのサルモネラ侵入性に関する研究 1. サルモネラ汚染水への浸漬による侵入**  
日本食品衛生学会第 66 回学術講演会 (1993. 9)

\*<sup>1</sup> 埼玉県衛生研究所



- \*2 奈良県衛生研究所
- \*3 静岡県衛生環境センター
- \*4 新潟県衛生公害研究所
- \*5 岩手県衛生研究所
- \*6 岩手大学

熊谷 学\*<sup>1</sup>, 梅迫誠一\*<sup>2</sup>, 増田高志\*<sup>3</sup>, 後藤公吉\*<sup>4</sup>, 徳丸雅一\*<sup>5</sup>, 小沼博隆, 品川邦汎\*<sup>6</sup>: 鶏卵表面から卵内へのサルモネラ侵入性に関する研究 2. サルモネラ汚染鶏糞の付着による侵入  
日本食品衛生学会第66回学術講演会 (1993.9)

- \*1 岩手県衛生研究所
- \*2 奈良県衛生研究所
- \*3 静岡県衛生環境センター
- \*4 新潟県衛生公害研究所
- \*5 埼玉県衛生研究所
- \*6 岩手大学

小沼博隆, 品川邦汎\*<sup>1</sup>, 梅迫誠一\*<sup>2</sup>, 増田高志\*<sup>3</sup>, 後藤公吉\*<sup>4</sup>, 熊谷 学\*<sup>5</sup>, 徳丸雅一\*<sup>6</sup>: 鶏卵表面から卵内へのサルモネラ侵入性に関する研究  
第116回日本獣医学会 (1993.10)

- \*1 岩手大学
- \*2 奈良県衛生研究所
- \*3 静岡県衛生環境センター
- \*4 新潟県衛生公害研究所
- \*5 岩手県衛生研究所
- \*6 埼玉県衛生研究所

高橋雅輝\*<sup>1</sup>, 上田成子\*<sup>2</sup>, 小黒美舎子\*<sup>3</sup>, 村上尚子\*<sup>4</sup>, 小沼博隆, 品川邦汎\*<sup>1</sup>: *Bacillus thuringiensis* 抗鞭毛(H)血清の作製と各種食品分離菌株の血清型別  
第116回日本獣医学会 (1993.10)

- \*1 岩手大学
- \*2 女子栄養大学
- \*3 仙台市衛生試験所
- \*4 山形県衛生研究所

仁科徳啓\*<sup>1</sup>, 松浦秀明\*<sup>1</sup>, 小泉勝義\*<sup>1</sup>, 岩田正明\*<sup>1</sup>, 梅木久一\*<sup>2</sup>, 熊谷 学\*<sup>2</sup>, 徳丸雅一\*<sup>3</sup>, 赤羽荘資\*<sup>4</sup>, 小沼博隆, 品川邦汎\*<sup>5</sup>: 食鳥処理場での屠体および手袋の消毒・殺菌剤の検討  
第14回日本食品微生物学会学術総会 (1993.11)

- \*1 静岡県東部食肉検査所
- \*2 岩手県衛生研究所
- \*3 埼玉県衛生研究所
- \*4 静岡県衛生環境センター
- \*5 岩手大学

上田成子\*<sup>1</sup>, 桑原祥浩\*<sup>1</sup>, 小沼博隆, 品川邦汎\*<sup>2</sup>: 日本における土壌中の *Bacillus thuringiensis* について  
第14回日本食品微生物学会学術総会 (1993.11)

- \*1 女子栄養大学

- \*2 岩手大学

小沼博隆: サルモネラの疫学と制御 4. 卵の流通・加工段階におけるサルモネラの動態とその制御  
日本獣医公衆衛生学会平成5年度年次学会 (1994.2)

後藤公吉\*<sup>1</sup>, 増田高志\*<sup>2</sup>, 梅木久一\*<sup>3</sup>, 徳丸雅一\*<sup>4</sup>, 小沼博隆, 品川邦汎\*<sup>5</sup>: 鶏卵表面の汚染サルモネラによる卵内への侵入性について  
日本獣医公衆衛生学会平成5年度年次学会 (1994.2)

- \*1 新潟県衛生公害研究所
- \*2 静岡県衛生環境センター
- \*3 岩手県衛生研究所
- \*4 埼玉県衛生研究所
- \*5 岩手大学

菅沼雅美\*<sup>1</sup>, 小森敦正\*<sup>1</sup>, 八並 淳\*<sup>1</sup>, 岡部幸子\*<sup>1</sup>, 末岡榮三郎\*<sup>1</sup>, 飯田直幸\*<sup>1</sup>, 酒井綾子, 佐々木澄志\*<sup>2</sup>, 藤木博太\*<sup>1</sup>: 発癌プロモーター, オカダ酸とTNF- $\alpha$ によるリン酸化亢進と発癌機構  
第66回日本生化学会大会 (1993.10)

- \*1 国立がんセンター研究所
- \*2 食品薬品安全センター秦野研究所

酒井綾子: 活性酸素産生物質によるBALB/3T3細胞のトランスフォーメーション  
第52回日本癌学会総会 (1993.10)

小森敦正\*<sup>1</sup>, 八並 淳\*<sup>1</sup>, 菅沼雅美\*<sup>1</sup>, 岡部幸子\*<sup>1</sup>, 酒井綾子, 佐々木澄志\*<sup>2</sup>, 藤木博太\*<sup>1</sup>: ヒト発癌プロモーターとしてのTNF- $\alpha$   
第52回日本癌学会総会 (1993.10)

- \*1 国立がんセンター研究所
- \*2 食品薬品安全センター秦野研究所

松谷佐知子: 挿入因子IS1の遺伝子発現と転移制御  
第16回日本分子生物学会年会 (1993.12)

一戸正勝, 鈴木明子, 成田紀子, 菊池 裕: 選択的識別培地による輸入食品の *Aspergillus flavus* 計測  
日本食品衛生学会第66回学術講演会 (1993.10)

古本広光\*<sup>1</sup>, 林 深雪\*<sup>1</sup>, 一戸正勝, 木村靖夫\*<sup>1</sup>, 浜崎 徹\*<sup>1</sup>: *Bipolaris* 属植物病原菌の生産する植物生理活性物質  
第28回植物化学調節学会大会 (1993.10)

- \*1 鳥取大学農学部

高橋 啓\*<sup>1</sup>, 山田仁美\*<sup>1</sup>, 村田久雄\*<sup>1</sup>, 直江史郎\*<sup>1</sup>, 一戸正勝, 西島基弘\*<sup>2</sup>: マウス動脈炎起因物質としての *Candida albicans* 菌体抽出物の解析  
第37回日本医真菌学会総会 (1993.10)

- \*1 東邦大学医学部
- \*2 都立衛生研究所

Kamimura, H.\*<sup>1</sup> and Ichinoe, M.: **Contamination of fumonisins in corn and producibility of fumonisins by *Fusarium* isolates in Japan.**

28th UJNR Toxic Microorganisms Joint Panel Meeting, Tokyo (1993. 11)

\*<sup>1</sup> Tokyo Metropolitan Public Health Institute

Ichinoe, M., Kikuchi, Y., Suzuki, M., and Narita, N.: **Selective and differential media for enumeration of toxigenic fungi in food and soil samples**  
28th UJNR Toxic Microorganisms Joint Panel Meeting, Tokyo (1993. 11)

外側正之\*<sup>1</sup>, 一戸正勝, 成田紀子, 野村明子\*<sup>1</sup>: **アテモヤの立枯れ症状から分離された *Fusarium decemcellurale***

平成6年度日本植物病理学会大会 (1994. 4)

\*<sup>1</sup> 静岡柑橘試

中島広光\*<sup>1</sup>, 磯見恵子\*<sup>1</sup>, 木村靖夫\*<sup>1</sup>, 一戸正勝, 浜崎 敏\*<sup>1</sup>: **植物病原菌 *Bipolaris sorokiniana* の生産する毒素の化学構造と活性**

1994年度日本農芸化学学会大会 (1994. 4)

\*<sup>1</sup> 鳥取大学農学部

岡田克樹\*<sup>1</sup>, 石橋康久\*<sup>1</sup>, 太刀川貴子\*<sup>1</sup>, 高沢朗子\*<sup>1</sup>, 藤沢佐代子\*<sup>1</sup>, 宮尾洋子\*<sup>1</sup>, アウン・キョニユソ\*<sup>1</sup>, 宮永嘉隆\*<sup>1</sup>, 一戸正勝, 菊池 裕: **コンタクトレンズと真菌第1報; 使用済みコンタクトレンズからの真菌培養**

第37回日本コンタクトレンズ学会総会 (1994. 5)

\*<sup>1</sup> 東京女子医大第2病院眼科

関沢 純, 大竹千代子, 大島輝夫\*<sup>1</sup>, 後藤京子\*<sup>2</sup>: **化学品安全管理のためのリスクコミュニケーション**  
日本リスク研究学会第6回研究発表会 (1993. 11)

\*<sup>1</sup> 化学品安全管理研究会

\*<sup>2</sup> 日本中毒情報センター

Nakata, K., Yoshino, T.\*<sup>1,2</sup>, Kubota, Y.\*<sup>1</sup>, and Sarai, A.\*<sup>2</sup>: **Prediction of Protein Coding Region in Genome Using Neural Network Algorithm**  
11th International Biophysics Congress, Budapest, Hungary (1993. 7)

\*<sup>1</sup> アドバンスド テクノロジー インスティテュート(株)

\*<sup>2</sup> 理化学研究所ライフサイエンス筑波研究センター

Nakata, K.: **Sequence Analysis of Zinc Finger Like DNA Binding Protein.**

Dynamics and Function of Biomolecules:

International Symposium on Biological Physics, Szeged (1993. 7-8)

中田琴子: **タンパク質の二次構造解析**  
第31回生物物理学会年会 (1993. 10)

Nakata, K.: **Sequence Analysis of Zinc Finger DNA Binding protein**

Genome Informatics Workshop IV. Yokohama (1993. 12)

中田琴子, 神沼二真: **受容体データベースの概念設計**

第16回日本分子生物学会年会 (1993. 12)

Nakata, K., Yoshino, T.\*<sup>1,2</sup>, Kubota, Y.\*<sup>1</sup>, and Sarai, A.\*<sup>2</sup>: **Prediction of Protein Coding Region in DNA Sequences**

International Workshop on Dynamism and Regulation in Non-linear Chemical Systems, Tsukuba (1994. 3)

\*<sup>1</sup> アドバンスド テクノロジー インスティテュート(株)

\*<sup>2</sup> 理化学研究所ライフサイエンス筑波研究センター

Yamamoto, M.: **Recent Activity on Chemical Hazard Communications in Japan**

Peer Review Meeting on the International Chemical Safety Card, Montreal, Canada (1993. 9)

Igarashi T., Tabuse Y.\*<sup>1</sup>, Sano T.\*<sup>1</sup>, Sassa T.\*<sup>1</sup>, Kaminuma T., and Miwa J.\*<sup>1</sup>: **The Phorbol Ester Binding Site of *tpa-1* Gene Product of *C. elegans***

9th *C. elegans* Meeting, Wisconsin, USA (1993. 6)

\*<sup>1</sup> NEC Corporation

五十嵐貴子, 灘岡陽子\*<sup>1</sup>, 神沼二真, 三輪錠司\*<sup>2</sup>: **線虫 *C. elegans* のプロテインキナーゼCの相同タンパク質 TAP-1**

第16回日本分子生物学会年会 (1993. 12)

\*<sup>1</sup> (財)東京都臨床医学総合研究所

\*<sup>2</sup> 日本電気(株)

神沼二真, 中野達也, 中田琴子, 五十嵐貴子: **創薬と安全性研究のための分子計算環境**

第16回情報化学討論会 (1993. 11)

中野達也, 五十嵐貴子, 平山令明\*<sup>1</sup>, 出口隆志\*<sup>2</sup>, 仲西 功\*<sup>3</sup>, 上猶 稔\*<sup>4</sup>: **構造活性相関のための発がん・変異原物質データベース**

第16回情報化学討論会 (1993. 11)

\*<sup>1</sup> 東海大学

\*<sup>2</sup> (株)協和安全性研究所

\*<sup>3</sup> (株)藤沢薬品工業安全性研究所

\*<sup>4</sup> (株)アドイン研究所

中野達也, 山本 都, 横手規子, 神沼二真: AWKを用いた国際化学物質安全性カードの日本語翻訳支援プログラム  
第16回情報化学討論会 (1993. 11)

林 裕造, 降矢 強: 今, 実験動物学に何を求めるか—安全性試験の立場から—  
第40回日本実験動物学会シンポジウム (1993. 6)

井上雅子<sup>\*1</sup>, 谷林保靖<sup>\*1</sup>, 蟹沢幸一<sup>\*2</sup>, 斉藤敬司<sup>\*2</sup>, 落合敏秋, 降矢 強, 松本清司<sup>\*3</sup>: 自動血球分類装置 (MICROX) を用いたラットおよびイヌ骨髓I細胞の自動分類 (第3報)  
第40回日本実験動物学会 (1993. 6)

<sup>\*1</sup> オムロンライフサイエンス研究所

<sup>\*2</sup> CSK リサーチパーク

<sup>\*3</sup> 信州大学医学部

津田充宥, 斉藤 実, 梅村隆志, 川崎 靖, 門馬純子, 松島裕子, 松本真美, 伊佐間和郎, 鹿庭正昭, 黒川雄二: 難燃性可塑剤Tributoxyethyl phosphate (TBEP) のラットにおける90日間反復投与毒性試験  
第20回日本毒科学会学術年会 (1993. 7)

門馬純子, 鹿庭正昭, 関口裕巳<sup>\*1</sup>, 中村晃忠, 川崎 靖, 津田充宥, 黒川雄二: テオウレア系ゴム加硫促進剤のモルモットにおける感作強度ならびに交差反応性試験  
第20回日本毒科学会学術年会 (1993. 7)

<sup>\*1</sup> 勸励民生科学協会総合研究所

川崎 靖, 梅村隆志, 佐井君江, 長谷川隆一, 門馬純子, 斉藤 実, 松島裕子, 中路幸男, 津田充宥, 黒川雄二: ラットにおけるコチニール (Cochineal) およびミョウバン (Alum) の13週間同時反復投与毒性試験  
第20回日本毒科学会学術年会 (1993. 7)

金子豊蔵, 下 武男, 安原加寿雄, 広瀬明彦, 小川幸男, 鈴木幸子, 中路幸男, 黒川雄二: o-Nitrotolueneのラットにおける28日間反復投与毒性  
第20回日本毒科学会学術年会 (1993. 7)

吉田秀信, 鈴木幸子, 高田幸一, 斉藤 実, 小川幸男, 広瀬明彦, 金子豊蔵, 黒川雄二: 生分解性プラスチックのラットにおける28日間混餌投与毒性  
第20回日本毒科学会学術年会 (1993. 7)

高木篤也, 高田幸一, 佐井君江, 門馬純子, 会田喜崇, 鈴木幸子, 内藤克司, 長谷川隆一, 黒川雄二: 2,2'-メチレンビス(4-エチル-6-tert-ブチルフェノール) のラットにおける長期反復投与毒性試験  
第20回日本毒科学会学術年会 (1993. 7)

長谷川隆一: 化学物質のリスクアセスメント—特に

水道水質基準設定の根拠となった毒性評価法について—  
京都大学環境工学研究会第15回シンポジウム (1993. 7)

長谷川隆一: 動物実験に基づいた毒性評価  
第2回バイオアッセイ研究会 (1993. 7)

鈴木幸子, 小川幸男: ICP 発光分析法によるラット臓器組織中の元素濃度  
第4回日本微量元素学会 (1993. 7)

関田清司, 降矢 強, 落合敏秋, 大野圭子, 黒川雄二: アカゲザルの Cocaine 静脈内摂取に及ぼす Buorenorphine の影響  
第23回日本精神神経薬理学会年会 (1993. 9)

児玉幸夫: GLP と実験動物の適正な飼育管理  
1993年日本QA研究会 (1993. 9)

津田充宥, Soisungwan Satarug<sup>\*1</sup>, Melissa Haswell-Elkins<sup>\*1</sup>, 黒川雄二, 江角浩安<sup>\*2</sup>, 杉村 隆<sup>\*2</sup>: タイ北東部住民の肝吸虫, *Opisthorchis viverrini* (OV) 感染と活性化窒素およびニトロ化合物 (NOC) の生成増加—胆管癌発生との相関  
第52回日本癌学会総会 (1993. 10)

<sup>\*1</sup> コンケン大学・医学部

<sup>\*2</sup> 国立がんセンター研究所

高木篤也, 佐井君江, 梅村隆志, 長谷川隆一, 黒川雄二: 肝 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OH-dG) 値の DNA 抽出法による差異の検討  
第52回日本癌学会総会 (1993. 10)

佐井君江, 高木篤也, 梅村隆志, 長谷川隆一, 黒川雄二: ペンタクロロフェノール投与によるマウス肝 DNA 中 8-ヒドロキシデオキシグアノシンの生成  
第52回日本癌学会総会 (1993. 10)

門馬純子, 中村晃忠, 関口裕巳<sup>\*1</sup>, 鹿庭正昭, 小嶋茂雄, 津田充宥, 黒川雄二, 野田 勉<sup>\*2</sup>, 山野哲夫<sup>\*2</sup>: 感作性強度の定量的パラメーターならびに実験的デザイン  
第18回日本接触皮膚炎学会学術大会 (1993. 12)

<sup>\*1</sup> 民生科学協会総合研究所

<sup>\*2</sup> 大阪環境科学研究所

児玉幸夫: 疾患モデル動物  
1993年韓国疾患モデル動物研究会 (1993. 12)

児玉幸夫: 動物実験施設・設備と品質管理  
1993年韓国科学技術院遺伝工学研究所シンポジウム (1993. 12)

梅村隆志, 斉藤 実, 高木篤也, 黒川雄二: ジクロロベンゼン3種異性体 (o-, m-, p-DCB) によるマ

## ウス肝細胞増殖

第10回日本毒性病理学会 (1994.1)

## Furuya, T.: Laboratory Animal Industry in Japan.

The 4th ARRC International Symposium, Seoul, Korea (1993.10)

S. Sitipong<sup>\*1</sup>, S. Satarug<sup>\*1</sup>, M. Tsuda, M. Matsumoto, P. Yongvanti<sup>\*1</sup>, Y. Kurokawa, C. Pairojikul<sup>\*1</sup>, P. Sithithaworn<sup>\*1</sup> and MR Haswell-Elkins<sup>\*1</sup>: Level of Nitrate, Antibodies and Hepatic Damage in Hamsters Immunized with *Opisthorchis* Antigens

The 11th Asia Pacific Cancer Conference, Bangkok, Thailand (1993.11)

<sup>\*1</sup> コンケン大学・医学部

Momma, J., Nakamura, A., Sekiguchi, H.<sup>\*1</sup>, Noda, T.<sup>\*2</sup>, Yamano, T.<sup>\*2</sup>, Kaniwa, M., Kojima, S., Tsuda, M. and Kurokawa, Y.: A New Protocol and Criteria for Quantitative Determination of Sensitization Potencies of Chemicals by Guinea Pig Maximization Test

Society of Toxicology the 33rd Annual Meeting, Dallas, Texas, USA (1994.3)

<sup>\*1</sup> Public Welfare Institute of Scientific Research

<sup>\*2</sup> Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences

## 中沢憲一: ATPにより活性化される単一チャンネル電流のカルシウムによる抑制

第24回クロム親和細胞研究会 (1993.6)

## 籾内桃子, 郭新彪, 宮島敦子, 大野泰雄, 高仲正: 有機リン系農薬および分解・代謝物の初代培養肝細胞に及ぼす影響

第20回日本毒科学会学術年会 (1993.7)

## 宮島敦子, 籾内桃子, 郭新彪, 大野泰雄, 高仲正: 有機リン系農薬および分解・代謝物の遊離肝細胞に及ぼす影響

第20回日本毒科学会学術年会 (1993.7)

## 田畑洋文, 宇佐見誠, 酒見和枝, 川島邦夫, 高仲正: セレンの胚毒性に及ぼす内因性グルタチオンの作用

第20回日本毒科学会学術年会 (1993.7)

## 川島邦夫, 宇佐見誠, 酒見和枝, 高仲正: 化学物質による精子の運動性, 数および形態変化と雄性生殖障害に関する研究

第20回日本毒科学会学術年会 (1993.7)

田畑洋文, 宇佐見誠, 酒見和枝, 川島邦夫, 高仲

## 正: セレン化合物の催奇形性に及ぼすアスコルビン酸およびメチオニンの影響

第33回日本先天異常学会学術集会 (1993.7)

## 川島邦夫, 宇佐見誠, 崎村雅憲\*, 田中 悟, 高仲正: Bis(tributyltin)phthalateのラット胎児発生に及ぼす影響 (II)

第33回日本先天異常学会学術集会 (1993.7)

\* テルモ株

## 大野泰雄: 代謝的活性化と臓器毒性 (2) 肝毒性

第15回日本学術会議毒科学研連シンポジウム (1993.9)

## Ohno, Y.: Guidance on repeated dose tissue distribution studies

第2回ICH会議 (1993.10)

## 井上和秀: PC12細胞でのATP-誘発電流に対するアデノシンの dual-modulation

平成5年度生理学研究所研究会 (1993.9)

## 井上和秀, 中沢憲一, 小泉修一, 綿野智一: ラット培養海馬細胞におけるATP受容体を介するシナプス伝達存在

第36回日本神経化学学会大会 (1993.10)

大野泰雄, 金子豊蔵, 小林敏明<sup>\*1</sup>, 井上 達<sup>\*2</sup>, 黒岩幸雄<sup>\*3</sup>, 吉田武美<sup>\*3</sup>, 林 真, 門馬純子, 藤井昭男<sup>\*1</sup>, 増田光輝<sup>\*1</sup>, 板垣 宏<sup>\*1</sup>, 大越健自<sup>\*1</sup>, 柿島 博<sup>\*1</sup>, 笠井 裕<sup>\*1</sup>, 栗下昭弘<sup>\*1</sup>, 小島肇夫<sup>\*1</sup>, 高野勝弘<sup>\*1</sup>, 高仲 正: First phase validation of the in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients.

第1回国際代替法学会 (1993.11)

<sup>\*1</sup> 日本化粧品工業連合会

<sup>\*2</sup> 横浜市立大学医学部

<sup>\*3</sup> 昭和大学薬学部

## Inoue, K., Nakazawa, K., Koizumi, K., Watano, T., Obama, T., Fujimori, K., and Takanaka, A.: ATP transmits synaptic responses and stimulates internal Ca increase in rat cultured hippocampal neurons

23rd Annual Meeting of Society for Neuroscience, Washington, D. C., USA (1993.11)

## 井上和秀: ラット培養海馬神経細胞でのATPによるシナプス伝達と細胞内Ca濃度上昇

第17回日本神経科学大会 (1993.12)

大野泰雄, 金子豊蔵, 小林敏明<sup>\*1</sup>, 井上 達<sup>\*2</sup>, 黒岩幸雄<sup>\*3</sup>, 吉田武美<sup>\*3</sup>, 林 真, 門馬純子, 藤井昭男<sup>\*1</sup>, 増田光輝<sup>\*1</sup>, 板垣 宏<sup>\*1</sup>, 大越健自<sup>\*1</sup>, 柿島 博<sup>\*1</sup>, 笠井 裕<sup>\*1</sup>, 栗下昭弘<sup>\*1</sup>, 小島肇夫<sup>\*1</sup>, 高野勝弘<sup>\*1</sup>, 高仲 正: 化粧品原料の安全性評価の

### ための眼刺激性試験代替法の一次バリデーションの結果について

第7回日本動物実験代替法学会シンポジウム2 (1993. 12)

\*1 日本化粧品工業連合会

\*2 横浜市立大学医学部

\*3 昭和大学薬学部

萩野滋延\*, 板垣 宏\*, 木下成美\*, 谷 尚子\*, 中村恒彰\*, 小野菜穂子\*, 小西貴美代\*, 小島肇夫\*, 高仲 正: ドレイズ眼粘膜刺激性試験代替法の一次バリデーション 1) 有精鶏卵の漿尿膜 (CAM) 試験

第7回日本動物実験代替法学会 (1993. 12)

\* 日本化粧品工業連合会

岡本裕子\*, 大越健自\*, 板垣 宏\*, 萩野滋延\*, 井上かおり\*, 柴田道男\*, 柿島 博\*, 小川朋康\*, 小西貴美代\*, 坂本一民\*, 瀧野嘉延\*, 金成美奈\*, 松川清治\*, 増田邦夫\*, 小島肇夫\*, 千葉勝由\*, 牧野育代\*, 金子豊蔵, 広瀬明彦, 高仲 正: ドレイズ眼粘膜刺激性試験代替法の一次バリデーション 2) 赤血球試験法

第7回日本動物実験代替法学会 (1993. 12)

\* 日本化粧品工業連合会

板垣 宏\*, 林 俊克\*, 柿島 博\*, 小川朋康\*, 小谷麻由美\*, 松川清治\*, 増田邦夫\*, 小島肇夫\*, 千葉勝由\*, 牧野育代\*, 坂本一民\*, 瀧野嘉延\*, 金成美奈\*, 金子豊蔵, 広瀬明彦, 高仲 正: ドレイズ眼粘膜刺激性試験代替法の一次バリデーション 3) ヘモグロビン変性試験

第7回日本動物実験代替法学会 (1993. 12)

\* 日本化粧品工業連合会

栗下昭弘\*, 加藤俊則\*, 古本 勉\*, 井上かおり\*, 岡本裕子\*, 小島肇夫\*, 片桐 稔\*, 上田裕之\*, 金子豊蔵, 広瀬明彦, 高仲 正: ドレイズ眼粘膜刺激性試験代替法の一次バリデーション 4) Skin 2 試験

第7回日本動物実験代替法学会 (1993. 12)

\* 日本化粧品工業連合会

笠井 裕\*, 岡田稔伸\*, 大内淳子\*, 中村恒彰\*, 鈴木幸一\*, 石橋卓也\*, 堀 洋\*, 西川多美子\*, 高仲 正: ドレイズ眼粘膜刺激性試験代替法の一次バリデーション 5) MATREX による刺激性試験

第7回日本動物実験代替法学会 (1993. 12)

\* 日本化粧品工業連合会

小島肇夫\*, 瀧野嘉延\*, 金成美奈\*, 坂本一民\*, 宮井恵里子\*, 秋山純一\*, 柴田道男\*, 鳥島久\*, 山本良平\*, 宮島敦子, 大野泰雄, 高仲 正: ドレイズ眼粘膜刺激性試験代替法の一次バリデーション 6) ウサギ角膜初代細胞 (Corne Pack)

### を用いた細胞毒性試験

第7回日本動物実験代替法学会 (1993. 12)

\*1 日本化粧品工業連合会

\*2 倉敷紡績

板垣 宏\*, 柴田道男\*, 谷 尚子\*, 木下成美\*, 柿島 博\*, 瀧山義明\*, 大内淳子\*, 笠井 裕\*, 岡田稔伸\*, 小島肇夫\*, 岡本裕子\*, 小谷麻由美\*, 大野泰雄, 宮島敦子, 高仲 正: ドレイズ眼粘膜刺激性試験代替法の一次バリデーション 7) ウサギ角膜由来細胞 (SIRC 細胞) を用いた試験

第7回日本動物実験代替法学会 (1993. 12)

\* 日本化粧品工業連合会

小島肇夫\*, 大内淳子\*, 笠井 裕\*, 岡田稔伸\*, 津雲勝義\*, 柿島 博\*, 宮井恵理子\*, 秋山純一\*, 岡本裕子\*, 小谷麻由美\*, 井上かおり\*, 柴田道夫\*, 奥村秀信\*, 荒島雅樹\*, 渥美隆正\*, 牧野育代\*, 千葉勝由\*, 高仲 正: ドレイズ眼粘膜刺激性試験代替法の一次バリデーション 8) 哺乳類培養細胞 (HeLaC および CHL 細胞) を用いた細胞毒性試験

第7回日本動物実験代替法学会 (1993. 12)

\* 日本化粧品工業連合会

柿島 博\*, 鈴木恵子\*, 島 康世\*, 松川清治\*, 増田邦夫\*, 中村恒彰\*, 水谷秋子\*, 金子豊蔵, 広瀬明彦, 新海輝夫\*, 高仲 正: ドレイズ眼粘膜刺激性試験代替法の一次バリデーション 9) EY-TEX 試験

第7回日本動物実験代替法学会 (1993. 12)

\*1 日本化粧品工業連合会

\*2 In Vitro International Japan

井上 達\*, 鈴木登志郎\*, 柿島 博\*, 増田光輝\*, 小林敏明\*, 金子豊蔵, 高仲 正: ドレイズ眼粘膜刺激性試験代替法の一次バリデーション 10) in vivo 試験結果

第7回日本動物実験代替法学会 (1993. 12)

\*1 横浜市立大学医学部

\*2 日本セイゲケン総合研究所

\*3 日本化粧品工業連合会

井上和秀, 中沢憲一, 小泉修一, 高仲 正: 海馬細胞での ATP 受容体を介するシナプス伝達と細胞内 Ca 濃度の上昇

第67回日本薬理学会年会 (1994. 3)

中沢憲一, 井上かおり, 小泉修一, 井上和秀, 藤森観之助, 高仲 正: PC12 細胞におけるセロトニンによる ATP 誘発電流の増強作用

第67回日本薬理学会年会 (1994. 3)

小泉修一, 中沢憲一, 藤森観之助, 高仲 正, 井上和秀: プラジキニン (BK) によるドーパミン放出の特徴: BK 受容体を介した Ca 利用効率の促進

第 67 回日本薬理学会年会 (1994. 3)

井上和秀, 中沢憲一, 小泉修一, 高仲 正: 海馬での ATP によるシナプス伝達とグルタミン酸神経との関係

第 67 回日本薬理学会年会 (1994. 3)

井上かおり, 中沢憲一, 小泉修一, 池田 真, 井上和秀, 藤森観之助, 高仲 正: カプサイシンによる PC12 細胞のアセチルコリンに対する反応の抑制

第 67 回日本薬理学会年会 (1994. 3)

高仲 正, 小泉修一, 中沢憲一, 小浜とも子, 藤森観之助, 河原あすか\*, 百瀬和享\*, 井上和秀: アデノシンによる ATP 誘発ドーパミン放出の制御機構

第 67 回日本薬理学会年会 (1994. 3)

\* 昭和大学

池田 真\*, 小泉修一, 中沢憲一, 小浜とも子, 永松國助\*, 長谷川明\*, 井上和秀, 高仲 正: セロトニンによる ATP 誘発ドーパミン遊離の制御

第 67 回日本薬理学会年会 (1994. 3)

\* 日本大学

大野泰雄: ICH 「トキシコキネティクス」での議論と合意事項および今後の問題  
薬物動態懇談会 (1994. 1)

上川雄一郎\*, 下 康郎\*, 大野泰雄: ヒトガラニンは選択的にヒト摘出気管支筋のコリン作動性神経伝達を抑制する

第 67 回日本薬理学会年会 (1994. 3)

\* 獨協医科大学

大野泰雄: トキシコキネティクスとは? その導入における問題点-ICH との関連において  
創薬薬理フォーラム (1994. 3)

大野泰雄: トキシコキネティクス 1. TK の意義 3) レギュレーションの立場から

第 2 回日本薬物動態学会ワークショップ (1994. 4)

大野泰雄: 安全性に関する話題; TOXICOKINETICS

ICH 新薬国際ハーモナイゼーションの成果と進展に関する講演会 (日本公定書協会主催) (1994. 4)

古川文夫, 西川秋佳, 吉村博之, 三井雅之, 榎並倫宣, 高橋道人: 自然発症肺炎ラット (WBN/Kob ラット) における BOP 投与による腫瘍発生の標的性について

第 82 回日本病理学会総会 (1993. 4)

西川秋佳, 古川文夫, 榎並倫宣, 三井雅之, Dietrich Hoffmann\*, 高橋道人: Betal quid の発癌性試験: 3-(methylnitrosamino)propionaldehyde のラッ

トにおける発癌性

第 82 回日本病理学会総会 (1993. 4)

\* American Health Foundation

川西 徹, 畝山智香子, 豊田和弘, 林 修次, 高橋道人: 初代培養肝細胞における細胞内 ATP の枯渇に伴う細胞膜ナトリウムイオン透過性の減少

第 82 回日本病理学会総会 (1993. 4)

Mitsumori, K., and Hayashi Y.: Future studies required for international harmonization and updating of toxicity tests.

The ILSI International Symposium "Future Development of Research in Toxicology" (1993. 4)

Kawanishi T.: The Use of Confocal Laser Microscope.

The ILSI International Symposium "Future Development of Research in Toxicology" (1993. 4)

Takahashi M.: Evaluation of Testicular Toxicology.

The ILSI International Symposium "Future Development of Research in Toxicology" (1993. 4)

鈴木順子, 古川文夫, 古田京子, 西川秋佳: 一般研究における Nucleolar organizer regions (NORs) 染色操作法について

第 20 回実験病理技術研究会関東部会 (1993. 5)

F.-L. Chung\*, H. J. Chen\*, J. Guttenplan\* and A. Nishikawa: 2,3-Epoxy-4-hydroxynonanal as a potential tumor initiating agent of lipid peroxidation.

第 80 回米国癌学会総会 (1993. 5)

\* American Health Foundation

朝生裕樹\*, 畝山智香子, 豊田和弘, 松井 元, 百瀬和享\*, 川西 徹, 高橋道人: トリブチル錫による初代培養肝細胞のカルシウム反応の抑制

第 20 回日本毒科学会 (1993. 7)

\* 昭和大薬学部

松井 元, 豊田和弘, 古田京子, 畝山智香子, 川西徹, 福原 潔, 宮田直樹, 高橋道人: Ethane-1,2-dimethanesulfonate の精巢上体への直接障害作用について

第 20 回日本毒科学会 (1993. 7)

小野寺博志, 三森国敏, 安原加壽雄, 下 武男, 前川昭彦\*, 高橋道人: 抗甲状腺作用物質の甲状腺腫瘍誘発用量と血中甲状腺刺激ホルモン (TSH) との関連性

第 20 回日本毒科学会 (1993. 7)

\* 佐々木研究所病理

安原加壽雄, 松井 元, 三森国敏, 小野寺博志, 下武男, 高橋道人: **精子形成ステージの精細胞数計測による Cyclophosphamide の精巣毒性評価**  
第20回日本毒科学会 (1993.7)

今沢孝喜, 渋谷 淳, 西川秋佳, 三井雅之, 古川文夫, 須田耕一\*, 高橋道人, 林 裕造: **HAQO 反復投与によるラット膀胱腫瘍の誘発**  
第52回日本癌学会総会 (1993.10)

\* 順天堂大医学部

小野寺博志, 三森国敏, 下武男, 安原加壽雄, 北浦敬介, 高橋正一\*, 高橋道人: **ラット甲状腺腫瘍発生における TSH の影響**  
第52回日本癌学会総会 (1993.10)

\* 佐々木研究所病理

三森国敏, 北浦敬介, 小笠原裕之, 小野寺博志, 安原加壽雄, 下武男, 高橋道人: **v-Ha-ras 遺伝子導入トランスジェニックマウスにおけるエストロジオール長期投与の影響**  
第52回日本癌学会総会 (1993.10)

安原加壽雄, 三森国敏, 吉村博之, 小野寺博志, 北浦敬介, 高橋道人, 林 裕造: **ハムスターにおける MNUR 誘発肺増殖性病変の細胞増殖活性**  
第52回日本癌学会総会 (1993.10)

下武男, 三森国敏, 小野寺博志, 安原加壽雄, 北浦敬介, 高橋道人, 林 裕造: **ラット甲状腺・肝・肺の増殖性病変に対する抗甲状腺物質の複合作用**  
第52回日本癌学会総会 (1993.10)

川西 徹, 畠山智香子, 豊田和弘, 林 修次, 松井元, 高橋道人: **ラット肝細胞における HGF 刺激により生じるカルシウムウェーブ**  
第52回日本癌学会総会 (1993.10)

林 修次, 今井田克己\*, 松井 元, 豊田和弘, 川西 徹, 高橋道人: **ラットにおける BOP 誘発腫瘍の系統差の検討**  
第52回日本癌学会総会 (1993.10)

\* 名古屋市大医学部

松井 元, 今井田克己\*, 小笠原裕之, 豊田和弘, 古田京子, 川西 徹, 高橋道人: **ラット肝の前癌病変を用いた中期発癌試験法による経口避妊薬成分の修飾作用の検討**  
第52回日本癌学会総会 (1993.10)

\* 名古屋市大医学部

榎並倫宣, 三井雅之, 古川文夫, 吉村博之, 今沢孝喜, 西川秋佳, 高橋道人: **ハムスターの BOP 誘発膀胱腫瘍モデルにおける NNAL の影響について**  
第52回日本癌学会総会 (1993.10)

西川秋佳, 古川文夫, 高橋道人, Fung-Lung Chung\*: **BBN 誘発ラット膀胱発癌における MESNA, PEITEC および PHITC の影響**  
第52回日本癌学会総会 (1993.10)

\* American Health Foundation

三井雅之, 古川文夫, 吉村博之, 榎並倫宣, 西川秋佳, 高橋道人: **ハムスターの BOP 誘発膀胱発癌における NNK の影響について**  
第52回日本癌学会総会 (1993.10)

豊田和弘, 高橋道人, 古田京子, 川西 徹, 畠山智香子, 林 修次, 林 裕造: **ラットの大腸発癌における camostat および CaCO<sub>3</sub> の発癌抑制作用の検討**  
第52回日本癌学会総会 (1993.10)

古川文夫, 西川秋佳, 吉村博之, 佐藤元信, 榎並倫宣, 高橋道人: **WBN/Kob ラットの HAQO 誘発膀胱腫瘍発生に対する camostat の影響**  
第52回日本癌学会総会 (1993.10)

畠山智香子, 畠山寿之\*, 高橋道人, 赤池紀扶\*: **ラット巨核球における ATP 誘発性 K<sup>+</sup> 電流オシレーションのサイクリックヌクレオチドによる調節**  
第66回日本生化学会大会 (1993.10)

\* 東北大医学部

石井正和\*, 清水俊一\*, 山元俊憲\*, 川西 徹, 百瀬和享\*: **培養ウシ大動脈内皮細胞の bradykinin 刺激時の細胞内酸化的ストレスの測定**  
第66回日本生化学会大会 (1993.10)

\* 昭和大薬学部

川西 徹, 加藤誠司\*<sup>1</sup>, 朝生裕樹\*<sup>1</sup>, 畠山智香子, 高橋道人, 大幡久之\*<sup>1</sup>, 百瀬和享\*<sup>1</sup>, 田中 光\*<sup>2</sup>, 松田智行\*<sup>2</sup>, 重信弘毅\*<sup>2</sup>: **共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡を用いた細胞内カルシウムイオンのリアルタイムイメージングの試み**

第2回バイオイメージング学会 (1993.10)

\*<sup>1</sup> 昭和大薬学部

\*<sup>2</sup> 東邦大薬学部

川西 徹, 朝生裕樹\*, 加藤誠司\*, 畠山智香子, 豊田和弘, 百瀬和享\*, 高橋道人: **共焦点レーザー顕微鏡と indo-1 を用いた単離肝細胞におけるカルシウムウェーブの画像化**  
第89回日本薬理学会関東部会 (1993.10)

\* 昭和大薬学部

田中 光\*, 松田智行\*, 川西 徹, 重信弘毅\*: **共焦点レーザー顕微鏡を用いた心筋細胞内カルシウムイオン画像化の試み**  
第89回日本薬理学会関東部会 (1993.10)

\* 東邦大薬学部

古川文夫, 古田京子, 鈴木順子, 西川秋佳: **IHS20 による反応条件と希釈倍率の検討**  
第 21 回実験病理組織技術研究会 (1993. 11)

西川秋佳, 古川文夫, 高橋道人, Fung-Lung Chung\*: **無処置ラット肝における DNA 付加体の検出とその由来に関する検討**  
日本癌学会シンポジウム (1993. 11)

\* American Health Foundation

安原加壽雄, 三森国敏, 吉村博之, 小野寺博志, 下武男, 高橋道人, 林 裕造: **ハムスターにおける MNUR 誘発肺増殖性病変と肺線維化巣との関連性**  
第 10 回毒性病理学会 (1994. 1)

豊田和弘, 松井 元, 畝山智香子, 古田京子, 川西徹, 高橋道人: **Bisacodyl 投与によるラット膀胱結石の形成機序についての検討**  
第 10 回毒性病理学会 (1994. 1)

小野寺博志, 三森国敏, 高橋正一\*, 安原加壽雄, 下武男, 高橋道人, 林 裕造: **ラットの甲状腺増殖性病変の発生・進展と血中 TSH 値の関連性**  
第 10 回毒性病理学会 (1994. 1)

\* 佐々木研究所病理

下武男, 三森国敏, 北浦敬介, 小野寺博志, 安原加壽雄: **ピペロニルブトキサイド 4 週間投与ラットのリンパ・造血組織についての免疫組織化学的観察**  
第 10 回毒性病理学会 (1994. 1)

今沢孝喜, 三森国敏, 小野寺博志, 安原加壽雄, 下武男, 西川秋佳, 高橋道人: **Diethyl dithiocarbamate 投与ラットにおける運動終板の超微形態学的観察**  
第 10 回毒性病理学会 (1994. 1)

榎並倫宣, 西川秋佳, 古川文夫, 三井雅之, 今沢孝喜, 畝山智香子, 福島昭治\*, 高橋道人: **抗酸化剤のブレオマイシン経気管投与誘発ハムスター肺線維症に対する抑制効果**  
第 10 回毒性病理学会 (1994. 1)

\* 大阪市大医学部

古川文夫, 西川秋佳, 吉村博之, 榎並倫宣, 三井雅之, 佐藤元信, 高橋道人: **WBN/Kob ラットの自然発症肺炎におよぼす合成ソマトスタチンの影響**  
第 10 回毒性病理学会 (1994. 1)

三井雅之, 古川文夫, 篠田和俊, 佐藤元信, 榎並倫宣, 西川秋佳, 高橋道人: **Bisphenol A の 13 週間投与によるマウス腎および肝病変について**  
第 10 回毒性病理学会 (1994. 1)

阿瀬善也, 三森国敏, 成田牧子\*, 今沢孝喜, 高橋道人: **F344 ラットにおける下垂体後葉の加齢性変**

化  
第 10 回毒性病理学会 (1994. 1)  
\* 小野薬品工業

三森国敏: **実験的間質性肺炎と肺癌発生**  
第 10 回毒性病理学会 (1994. 1)

西川秋佳, 榎並倫宣, 古川文夫, 三井雅之, 今沢孝喜, 豊田和弘, 高橋道人: **L-ヒスチジン塩酸塩の経口投与によるラット精子肉芽腫の形成**  
第 10 回毒性病理学会 (1994. 1)

松井 元, 豊田和弘, 畝山智香子, 古田京子, 古川文夫, 川西 徹, 高橋道人: **1,3-dinitrobenzene によるセルトリ細胞障害の精子形成サイクルに及ぼす影響**  
第 10 回毒性病理学会 (1994. 1)

畝山智香子, 畝山寿之\*, 高橋道人, 赤池紀扶\*: **ラット巨核球におけるカルシウムオシレーションの細胞内 pH による調節**  
第 67 回日本薬理学会総会 (1994. 3)  
\* 東北大医学部

畝山寿之\*, 畝山智香子, 赤池紀扶\*: **ラット巨核球における  $Ca^{2+}$ -ATPase の cGMP による活性化**  
第 67 回日本薬理学会総会 (1994. 3)  
\* 東北大医学部

加藤誠司\*, 朝生裕樹\*, 畝山智香子, 豊田和弘, 百瀬和享\*, 高橋道人, 川西 徹: **ラット肝細胞において各種アゴニスト刺激によって生じるカルシウムウェーブの比較**  
第 67 回日本薬理学会総会 (1994. 3)  
\* 昭和大薬学部

松田智行\*, 川西 徹, 田中 光\*, 重信弘毅\*: **共焦点レーザー走査顕微鏡により捉えられた培養心筋細胞内の二種類のカルシウムの動き: 薬理的検討**  
第 67 回日本薬理学会総会 (1994. 3)  
\* 東邦大薬学部

西川秋佳, 古川文夫, 三井雅之, 池崎信一郎, 高橋道人: **NaCl および KCl 投与ラットの胃粘膜におけるオルニチン脱炭酸酵素の免疫組織化学的検討**  
第 83 回日本病理学会総会 (1994. 3)

古川文夫, 西川秋佳, 吉村博之, 今井田克己\*, 高橋道人: **WBN/Kob および Wistar ラットの BOP 誘発腫瘍発生における系統差**  
第 83 回日本病理学会総会 (1994. 3)  
\* 名古屋大医学部

三森国敏, 小野寺博志, 前川昭彦\*, 下武男, 安原加壽雄, 高橋道人, 林 裕造: **ラット甲状腺増殖**



## 性病変に対するビタミンAの修飾作用

第83回日本病理学会総会 (1994.3)

\* 佐々木研究所病理

## 古川文夫：免疫染色の自動化について

第83回日本病理学会総会テクニカルセミナー (1994.3)

## 鈴木孝昌：薬物の複合投与効果の考え方—マウス小核試験における理論と実際

医薬安全性研究会第53回定例会 (1993.1)

## 能美健彦：環境変異原検出系の開発

日本環境変異原学会第14回公開シンポジウム「ヒト環境発癌リスクの検出と評価」(1993.5)

## 能美健彦：微生物遺伝学と変異原性試験

微生物変異原性試験連絡協議会講演会 (1993.6)

## 田辺秀之, 大西清方, 高田容子, 岡戸 清, 祖父尼俊雄, 水沢 博：ヒト急性前骨髄性白血病細胞株HL-60およびその変異株HL-60RGにおける染色体構成の比較研究

日本組織培養学会第66回大会, 工業技術院生命工学研究所, つくば (1993.6)

## 鈴木孝昌：トランスジェニックマウスを用いる試験の現状と問題点

日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会第23回定例会 (1993.6)

## 鈴木孝昌, 林 真, 落合雅子\*, 牛島俊和\*, 若林敬二\*, 長尾美奈子\*, 祖父尼俊雄：Big Blue Mouseを用いたMeIQの発癌機構の解析 I. 染色体異常および遺伝子突然変異誘発性

第52回日本癌学会総会 (1993.10)

\* 国立がんセンター研究所

## 落合雅子\*, 串田浩美\*, 若林敬二\*, 鈴木孝昌, 林真, 祖父尼俊雄, 杉村 隆\*, 長尾美奈子\*：Big Blue Mouseを用いたMeIQの発癌機構の解析 II. DNA付加体量・細胞増殖・突然変異の関係

第52回日本癌学会総会 (1993.10)

\* 国立がんセンター研究所

林 真：トランスジェニックアニマルを用いる *in vivo* 遺伝子突然変異試験一意義と問題点一：遺伝子突然変異と小核の同時検出系

日本環境変異原学会第22回大会 (1993.11)

## 能美健彦, 太田敏博\*：変異原性試験法の国際的標準化の現状と問題点—メルボルン国際ワークショップの報告を中心に—：微生物突然変異試験

日本環境変異原学会第22回大会 (1993.11)

\* 東京薬科大学

須藤鎮世\*<sup>1</sup>, 林 真, 島田弘康\*<sup>2</sup>：変異原性試験法の国際的標準化の現状と問題点—メルボルン国際ワークショップの報告を中心に—：げっ歯類の赤血球を用いる *in vivo* 小核試験—

日本環境変異原学会第22回大会 (1993.11)

\*<sup>1</sup> 伊藤ハム\*<sup>2</sup> 第一製薬長尾美奈子\*, 祖父尼俊雄：トランスジェニックアニマルを用いる *in vivo* 遺伝子突然変異試験一意義と問題点—：Big Blue Mouseを用いたMeIQ発癌機構の解析：各臓器におけるDNA付加体と *in vivo* 突然変異の相関

日本環境変異原学会第22回大会 (1993.11)

\* 国立がんセンター研究所

## 山田雅巳, 松井恵子, 能美健彦, 祖父尼俊雄：アルキル化剤に高感受性を示す新しいサルモネラ・テスター株の開発

日本環境変異原学会第22回大会 (1993.11)

## 能美健彦, 加藤基恵\*, 渡辺雅彦, 山田雅巳, 松井道子, 堀谷尚古\*, 祖父尼俊雄：突然変異検出用トランスジェニックマウスの開発：受精卵導入用ベクターと変異検出用大腸菌株の開発

日本環境変異原学会第22回大会 (1993.11)

\* 食品薬品安全センター

## 高橋宙子\*, 三浦邦彦\*, 畑中みどり\*, 能美健彦, 渡辺雅彦, 石館 基\*：ヒトおよびサルモネラのアセチル転移酵素を発現するチャイニーズハムスター培養細胞株のニトロアレーンおよびアミンに対する感受性

日本環境変異原学会第22回大会 (1993.11)

\* オリンパス光学工業(株)

## 鈴木孝昌, 林 真, 栗下昭弘\*, 小野哲也\*, 山本和生\*, 祖父尼俊雄：トランスジェニックマウスを用いたX線による変異原性の解析

日本環境変異原学会第22回大会 (1993.11)

\* 東北大学

Hackman, P., Honma, M., Hayashi, M., Suzuki, T., Yamazaki, N. and Sofuni, T.: Comparison of AS 52/*gpt* and CHO-K1/*hprt* systems for mutation assay

日本環境変異原学会第22回大会 (1993.11)

杉木靖子, 山崎奈緒美, 松岡厚子, 鈴木孝昌, 林真, 祖父尼俊雄：*In vivo* 染色体異常試験の濃度設定に用いる細胞毒性試験法の比較

日本環境変異原学会第22回大会 (1993.11)

## 田村博信\*, 山下康弘\*, 岩倉啓子\*, 渡辺正孝\*, 鷺見信好\*, 林 真：各種動物を用いる抹消血小核

## 試験

日本環境変異原学会第 22 回大会 (1993. 11)

\* 日本新薬

松井道子, 能美健彦, 祖父尼俊雄: ステピオールによって誘発された *Salmonella typhimurium gpt* 遺伝子突然変異の解析

日本環境変異原学会第 22 回大会 (1993. 11)

能美健彦, 加藤基恵\*, 渡辺雅彦, 山田雅巳, 松井道子, 堀谷尚古\*, 祖父尼俊雄: Cre-lox 系を利用した遺伝子突然変異検出用トランスジェニックマウスの開発

第 16 回日本分子生物学会年会 (1993. 12)

\* 食品薬品安全センター

鈴木 任, 山田雅巳, 葛西 宏\*, 祖父尼俊雄, 能美健彦: *Salmonellatyphimurium mutM* 遺伝子のクローニングとその遺伝子破壊

第 16 回日本分子生物学会年会 (1993. 12)

\* 産業医科大学

金 秀良, 駒野照弥\*: プラスミド R64 の接合伝達遺伝子の転写制御

第 16 回日本分子生物学会年会 (1993. 12)

\* 東京都立大学

駒野照弥\*<sup>1</sup>, 久保明弘\*<sup>2</sup>, 行田敦子\*<sup>1</sup>, 金 秀良, 古屋伸久\*<sup>1</sup>, 橋原宏次\*<sup>1</sup>, 吉田 哲\*<sup>1</sup>, 立花恵子\*<sup>1</sup>: プラスミド R64 の接合伝達遺伝子の転写制御

第 16 回日本分子生物学会年会 (1993. 12)

\*<sup>1</sup> 東京都立大学

\*<sup>2</sup> 環境研

吉田 哲\*, 金 秀良, 駒野照弥\*: IncII プラスミド ColIb, R64 の性線毛の精製

第 16 回日本分子生物学会年会 (1993. 12)

\* 東京都立大学

Nohmi, T.: O-acetyltransferase: A key enzyme for the metabolic activation of mutagenic nitroarenes and aromatic amines

University of Victoria, Bioseminar, Canada (1994. 1)

Nohmi, T., Watanabe, M., Matsuoka, A., Yamazaki, N., Hayashi, M., Deguchi, T.\*, and Sofuni, T.: Establishment of sublines of CHL cells stably expressing human or bacterial acetyltransferases: A new tool for the risk assessment of environmental nitroarenes and aromatic amines  
Risk assessment of environmental carcinogenesis, Canada (1994. 1)

\* Tokyo Metropolitan Institute for Neurosciences

能美健彦, 加藤基恵\*, 渡辺雅彦, 山田雅巳, 松井道子, 堀谷尚古\*, 祖父尼俊雄: Cre-lox 部位特異的組織換え系を利用した遺伝子突然変異検出用トランスジェニックマウスの開発

細胞工学シンポジウム「遺伝子導入研究の新しい展開」(1994. 4)

\* 食品薬品安全センター

鈴木 任, 山田雅巳, 葛西 宏\*, 祖父尼俊雄, 能美健彦: *Salmonella typhimurium mutM<sub>ST</sub>* 遺伝子のクローニングとその遺伝子破壊: 4-nitroquinoline 1-oxide による *mutM<sub>ST</sub>* 遺伝子の発現誘導  
日本環境変異原学会・日本放射線影響学会合同シンポジウム「活性酸素の生物作用」(1994. 5)

\* 産業医科大学

早乙女京子\*, 林 真, 祖父尼俊雄: ウニ胚でのマイトマイシン C による小核の誘発  
染色体学会第 44 回年会 (1993. 9)

\* 横浜市衛生研究所

岡田敏史: 医薬品試験検査における精度管理について

日本薬剤師会試験センター技術講習会 (1994. 1)

Yomota, C., and Okada, S.: Capillary zone electrophoresis and RPHPLC of human insulin  
World congress of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 1993, Tokyo (1993. 9)

四方田千佳子, 宮崎玉樹, 岡田敏史: 注射用デキストランの分子量分布

第 30 回全国衛生化学技術協議会 (1993. 10)

四方田千佳子, 岡田敏史, 中島美枝\*: ヒアルロン酸とカチオン界面活性剤との相互作用

日本薬学会第 114 年会 (1994. 3)

\* 大阪薬科大学

宮崎玉樹, 四方田千佳子, 岡田敏史: ヒアルロン酸と荷電性薬物の溶液中の相互作用について

日本薬学会第 114 年会 (1994. 3)

四方田千佳子, 岡田敏史: アニオン性多糖とカチオン界面活性剤との相互作用

第 43 回高分子学会年次大会 (1994. 5)

Komatsu, H., Okada S. and Rowe, E. S.\*: Ethanol-induced fusion of sonicated dipalmitoyl phosphatidylcholine liposomes

The 1993 International Congress on Membranes and Membrane Processes, Heidelberg, Germany (1993. 8)

\* University of Kansas Medical Center and the Veterans Administration Medical Center,

Kansas City, USA

小松裕明, Rowe, E. S.\*: エタノールによる小さな一枚膜リポソームの凝集と融合—指組み膜形成機構との共通性—

第11回麻酔メカニズム研究会 (1993. 7)

\* University of Kansas Medical Center and the Veterans Administration Medical Center, Kansas City, USA

吉井公彦, 小松裕明, 岡田敏史: 熱測定 of 医薬品試験への応用 (3) TG/MS による発生気体の分析  
第43回日本薬学会近畿支部大会 (1993. 10)

小松裕明, 岡田敏史, Rowe, E. S.\*: 小さな一枚膜リポソームのエタノールによる凝集と融合—指組み膜形成機構との共通性—

第15回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (1993. 11)

\* University of Kansas Medical Center and the Veterans Administration Medical Center, Kansas City, USA

小松裕明, 岡田敏史, Rowe, E. S.\*: 小さいリポソームのアルコールによる凝集・融合

膜シンポジウム '93 (1993. 12)

\* University of Kansas Medical Center and the Veterans Administration Medical Center, Kansas City, USA

半田哲郎\*, 伊藤伸哉\*, 宮嶋孝一郎\*, 小松裕明: レシチンとレチノールの相互作用と構造形成

日本薬学会第114年会 (1994. 3)

\* 京都大学薬学部

小松裕明, 北島 文, 岡田敏史: 脂質微小分散系製剤の評価技術—静注用脂肪乳剤の粒子径プロフィールと表面電位—

日本薬学会第114年会 (1994. 3)

小松裕明, 岡田敏史, 杉本真紀\*, Rowe, E. S.\*: リポソーム膜の透過性に及ぼすエタノールの影響—指組み膜の透過性—

日本薬学会第114年会 (1994. 3)

\*1 大阪薬科大学

\*2 University of Kansas Medical Center and the Veterans Administration Medical Center, Kansas City, USA

中西邦夫\*, 益川 徹\*, 吉井公彦, 岡田敏史, 宮嶋孝一郎\*: 疎水性シクロデキストリンを用いた持続性経口投与製剤の開発

日本薬学会第114年会 (1994. 3)

\*1 摂南大学薬学部

\*2 京都大学薬学部

石田恵津子\*, 儀賀豊達\*, 峯 孝則\*, 内堀幸子\*, 小泉 彰\*, 井出重明\*, 佐々木珠美\*, 藤原一也\*, 鈴木 宏\*, 辻 澄子, 柴田 正, 伊藤誉志男: 各種食品中のニコチン酸およびニコチン酸アミドの自然含有量実態調査研究

日本食品衛生学会第66回学術講演会 (1993. 10)

\*1 サントリー(株)基礎研究分析科学センター

\*2 生活協同組合コープこうべ商品検査センター

\*3 日本生活協同組合連合会商品検査センター

木村実加, 梅本美佳, 辻 澄子, 柴田 正, 伊藤誉志男: 食用タール色素中各種重金属のICPによる定量法の可能性について

日本食品衛生学会第66回学術講演会 (1993. 10)

柴田 正, 木村実加, 梅本美佳, 辻 澄子, 伊藤誉志男: ICPを用いた食用タール色素中ヒ素の新しい定量法への試み

日本食品衛生学会第66回学術講演会 (1993. 10)

辻 澄子, 木村実加, 梅本美佳, 柴田 正, 伊藤誉志男, 山田真記子\*, 加藤喜昭\*, 中村幹雄\*: 食用青色1号アルミニウムレーキ中の水溶性硫酸塩試験法について

日本食品衛生学会第66回学術講演会 (1993. 10)

\* 三栄源エフ・エフ・アイ(株)

伊藤誉志男, 木村実加, 梅本美佳, 辻 澄子, 柴田正, 山田真記子\*, 加藤喜昭\*, 中村幹雄\*: 食用青色1号アルミニウムレーキ中の塩化物の試験法について

日本食品衛生学会第66回学術講演会 (1993. 10)

\* 三栄源エフ・エフ・アイ(株)

山田真記子\*, 井上哲夫\*, 加藤喜昭\*, 中村幹雄\*, 柴田 正, 伊藤誉志男: 食用黄色5号の規格と変異原性

日本食品衛生学会第66回学術講演会 (1993. 10)

\* 三栄源エフ・エフ・アイ(株)

成田美加子\*, 平原嘉親\*, 岡本浩一郎\*, 宮田昌弘\*, 鯉口 智\*, 長谷川眞住\*, 鎌倉和政\*, 山名孝善\*, 外海泰秀, 伊藤誉志男: コーヒー豆中の残留農薬分析法の検討

日本食品衛生学会第66回学術講演会 (1993. 10)

\* 神戸検疫所 輸入食品・検疫検査センター

鯉口 智\*, 長谷川眞住\*, 鎌倉和政\*, 平原嘉親\*, 成田美加子\*, 岡本浩一郎\*, 宮田昌弘\*, 山名孝善\*, 外海泰秀, 伊藤誉志男: HPLCによる家畜臓器中の合成抗菌剤の一斉分析法の検討

日本食品衛生学会第66回学術講演会 (1993. 10)

\* 神戸検疫所 輸入食品・検疫検査センター

長谷川眞住\*, 鯉口 智\*, 鎌倉和政\*, 平原嘉親\*,

成田美加子\*, 岡本浩一郎\*, 宮田昌弘\*, 山名孝善\*, 外海泰秀, 伊藤登志男: 豚肉中スルファジミジンのフォトダイオードアレイ検出器付き HPLC による定量と GC-MS による確認法の検討  
日本食品衛生学会第 66 回学術講演会 (1993. 10)

\* 神戸検疫所 輸入食品・検疫検査センター

関口幸弘, 津村ゆかり, 中村優美子, 外海泰秀, 伊藤登志男, 長谷川新\*: そばの貯蔵およびそば切り加工過程における収穫後使用農薬の消長  
日本食品衛生学会第 66 回学術講演会 (1993. 10)

\* 神戸農林水産消費技術センター

平原嘉親\*, 成田美加子\*, 岡本浩一郎\*, 三好智子\*, 宮田昌弘\*, 鯉口 智\*, 長谷川眞住\*, 鎌倉和政\*, 山名孝善\*, 外海泰秀: 農薬標準溶液の経時的安定性について  
日本薬学会近畿支部大会 (1993. 10)

\* 神戸検疫所 輸入食品・検疫検査センター

市川富夫\*<sup>1</sup>, 石原英子\*<sup>2</sup>, 井出速雄\*<sup>3</sup>, 牛尾房雄\*<sup>4</sup>, 岡野登志夫\*<sup>5</sup>, 河村典久\*<sup>6</sup>, 大島晴美\*<sup>6</sup>, 菊川清見\*<sup>7</sup>, 別府正敏\*<sup>7</sup>, 工藤一郎\*<sup>8</sup>, 佐野満昭\*<sup>9</sup>, 外海泰秀, 萩原清和\*<sup>10</sup>: 飲食物試験法・食品成分試験法・特殊成分 ヘム鉄  
日本薬学会第 114 年会 (1994. 3)

\*<sup>1</sup> 武庫川女子大学家政学部

\*<sup>2</sup> 名古屋市立大学看護短期

\*<sup>3</sup> 東邦大学薬学部

\*<sup>4</sup> 都立衛生研究所

\*<sup>5</sup> 神戸女子薬科大学

\*<sup>6</sup> 愛知県衛生研究所

\*<sup>7</sup> 東京薬科大学

\*<sup>8</sup> 東京大学薬学部

\*<sup>9</sup> 静岡県立大学薬学部

\*<sup>10</sup> 国立健康・栄養研究所

伊藤登志男\*<sup>1</sup>, 星野庸二\*<sup>2</sup>, 河村葉子, 谷孝之\*<sup>3</sup>, 外海泰秀, 中沢裕之\*<sup>4</sup>, 中村好志\*<sup>5</sup>, 西島基弘\*<sup>6</sup>, 堀伸二郎\*<sup>7</sup>, 宮田秀明\*<sup>8</sup>: 飲食物試験法・食品汚染物試験法 合成抗菌剤高速液体クロマトグラフィによる定性および定量  
日本薬学会第 114 年会 (1994. 3)

\*<sup>1</sup> 武庫川大学薬学部

\*<sup>2</sup> 埼玉県衛生研究所

\*<sup>3</sup> 神奈川県衛生研究所

\*<sup>4</sup> 国立公衆衛生院

\*<sup>5</sup> 静岡県立大学薬学部

\*<sup>6</sup> 都立衛生研究所

\*<sup>7</sup> 大阪府公衆衛生研究所

\*<sup>8</sup> 摂南大学薬学部

津村ゆかり: 奨励賞受賞講演—農産物の貯蔵および加工過程における収穫後使用農薬の消長に関する研究

日本食品衛生学会第 67 回学術講演会 (1994. 5)

三好智子\*, 平原嘉親\*, 成田美加子\*, 岡本浩一郎\*, 宮田昌弘\*, 鯉口 智\*, 長谷川眞住\*, 鎌倉和政\*, 山名孝善\*, 外海泰秀: イオントラップ GC/MS による輸入米中各種農薬の一斉分析法  
日本食品衛生学会第 67 回学術講演会 (1994. 5)

\* 神戸検疫所 輸入食品・検疫検査センター

柴田 正, 木村実加, 梅本美佳, 辻 澄子: ICP を用いた食用タール色素レーキ中のアルミニウムの迅速定量法  
日本食品衛生学会第 67 回学術講演会 (1994. 5)

日本食品衛生学会第 67 回学術講演会 (1994. 5)

村井敏美, 中村ゆかり, 小川義之, Nahid F. Mivechi\*, George M. Hanh\*: パナジン酸ナトリウムに見出された熱ショック蛋白質 (HSP) 誘導阻害作用について  
日本薬学会第 114 年会 (1994. 3)

\* Stanford Univ.

小川義之: 各種注射剤に対するエンドトキシン試験法の適用性の検討  
日本薬学会第 114 年会 (1994. 3)

日本薬学会第 114 年会 (1994. 3)

中村ゆかり, 村井敏美, 小川義之: マクロファージ (M $\phi$ ) 機能に及ぼすデキサメタゾン投与の影響—肺胞 M $\phi$  と腹腔 M $\phi$  での比較検討—  
日本薬学会第 114 年会 (1994. 3)

日本薬学会第 114 年会 (1994. 3)

中村ゆかり, 黒坂麗子, 村井敏美, 小川義之: 医療用具抽出液のリムルス活性とサイトカイン誘導活性の検討  
日本防菌防霉学会第 21 年次大会 (1994. 5)

日本防菌防霉学会第 21 年次大会 (1994. 5)

江馬 真, 天野博夫, 川崎浩之進: ラットにおけるジブチルフルオアートの催奇形作用  
第 33 回日本先天異常学術集会 (1993. 7)

第 33 回日本先天異常学術集会 (1993. 7)

天野博夫, 前川京子, 南 雅文\*, 佐藤公道\*: 無血清培養ラット神経上皮細胞の増殖と分化  
第 17 回日本神経科学大会 (1993. 12)

第 17 回日本神経科学大会 (1993. 12)

\* 京都大学薬学部

平原嘉親\*, 成田美加子\*, 岡本浩一郎\*, 三好智子\*, 宮田昌弘\*, 鯉口 智\*, 長谷川眞住\*, 鎌倉和政\*, 山名孝善\*, 外海泰秀: 精米中各種農薬の簡易, 迅速な試験溶液の同時調製法  
日本食品衛生学会第 67 回学術講演会 (1994. 5)

日本食品衛生学会第 67 回学術講演会 (1994. 5)

\* 神戸検疫所 輸入食品・検疫検査センター

柴田敏郎: ケシの花芽分化と発育

第 3 回薬用植物栽培技術フォーラム (1993. 7)

佐々木和生\*<sup>1</sup>, 下村講一郎, 鎌田 博\*<sup>2</sup>, 原田 宏\*<sup>2</sup>:

ニンジンクラウンゴールにおける IAA 代謝について

第13回植物組織培養学会大会 (1993. 7)

- \*1 茨城県生物工学研究所  
\*2 筑波大学生物学系

青木俊夫\*<sup>1</sup>, 下村講一郎, 松永裕士\*<sup>2</sup>, 松本秀樹\*<sup>3</sup>: ペラドンナ毛状根の生育およびトロパンアルカロイド生産に対する基本培地の影響  
第13回植物組織培養学会大会 (1993. 7)

- \*1 姉岩手生物工学研究センター  
\*2 鐘紡(株)生化学研究所  
\*3 (株)ツムラ中央研究所生薬研究所

Shibata, T., Sakai, E., Shimomura, K., and Ohashi, H.\*: A simple method of hard-seed breaking by freezing treatment in *Astragalus mongholicus* (Leguminosae)

XV International Botanical Congress, Yokohama, Japan (1993. 8~9)

- \* 東北大学理学部

Sakai, E., Shibata, T., Ishimaru, K.\*, and Shimomura, K.: Growth and contents of phenolic compounds in *Geranium thunbergii* cultivated in various conditions

XV International Botanical Congress, Yokohama, Japan (1993. 8~9)

- \* 佐賀大学農学部

Yoshimatsu, K., and Shimomura, K.: Transformation of *Duboisia myoporoides* with *Agrobacterium rhizogenes* MAFF 03-01724

XV International Botanical Congress, Yokohama, Japan (1993. 8~9)

Ishimaru, K.\*, Yamanaka, M.\*, Toda, H.\*, Tanaka, N.\*, Yamaguchi, Y\*., and Shimomura, K.: Polyacetylenes in hairy roots of Campanulaceous plants

XV International Botanical Congress, Yokohama, Japan (1993. 8~9)

- \* 佐賀大学農学部

柴田敏郎, 酒井英二, 下村講一郎, 畠山好雄: *Astragalus* 属植物の栽培に関する研究 (第1報) *Astragalus mongholicus* Bunge 種子の発芽について

日本生薬学会第40回年会 (1993. 9)

酒井英二, 柴田敏郎, 下村講一郎: ゲンノショウコの栽培研究 催芽処理と生育特性

日本生薬学会第40回年会 (1993. 9)

國司 学\*<sup>1</sup>, 北中 進\*<sup>1</sup>, 高橋周七\*<sup>1</sup>, 滝戸道夫\*<sup>1</sup>,

下村講一郎, 吉松嘉代, 中島由郎\*<sup>2</sup>, 宮沢洋一\*<sup>2</sup>, 矢沢静江\*<sup>3</sup>: 薬用人参の品種改良 (2) 雑種人参 (アメリカニンジン×オタネニンジン) の組織培養

日本生薬学会第40回年会 (1993. 9)

- \*1 日本大学薬学部  
\*2 長野県営農技センター  
\*3 東京女子大

野呂征男\*<sup>1</sup>, 久田陽一\*<sup>1</sup>, 奥田和代\*<sup>1</sup>, 川村智子\*<sup>1</sup>, 田中俊弘\*<sup>2</sup>, 西部三省\*<sup>3</sup>, 官 秀慶\*<sup>4</sup>, 酒井英二: ゲンノショウコのフラボノイドについて

日本生薬学会第40回年会 (1993. 9)

- \*1 名城大学薬学部  
\*2 岐阜薬科大学  
\*3 東日本学術大学薬学部  
\*4 長崎大学医学部

柴野真喜雄\*, 二松 晃\*, 松本吉広\*, 喜多俊二\*, 草野源次郎\*, 柴田敏郎: 国内薬用植物園で栽培される *Glycyrrhiza* 属植物の実態調査と系統化のための基礎研究 (その1)

第43回日本生薬学会近畿支部総会・大会 (1993. 10)

- \* 大阪薬科大学

佐々木和生\*<sup>1</sup>, 下村講一郎, 鎌田 博\*<sup>2</sup>, 原田 宏\*<sup>2</sup>: ニンジン培養細胞における IAA 代謝に関する研究

植物化学調節学会第28回大会 (1993. 10)

- \*1 茨城県生物工学研究所  
\*2 筑波大学生物学系

柴田敏郎, 畠山好雄, 牧野桂子\*, 河野慕広\*: *Astragalus* 属植物の栽培に関する研究 (第2) *Astragalus mongholicus* Bunge 根の生育および形状に及ぼす土壌環境の影響

日本生薬学会第114年会 (1994. 3)

- \* 名古屋大学農学部

柴野真喜雄\*, 二松 晃\*, 松本吉広\*, 喜多俊二\*, 草野源次郎\*, 柴田敏郎: 国内薬用植物園で栽培される *Glycyrrhiza* 属植物の実態調査と系統化のための基礎研究 (その2)

日本生薬学会第114年会 (1994. 3)

- \* 大阪薬科大学

田中俊弘\*<sup>1</sup>, 河原江美\*<sup>1</sup>, 酒井英二, 田端 守\*<sup>2</sup>, 本多義昭\*<sup>2</sup>, 大場幸次\*<sup>3</sup>, Ekrem Sezik\*<sup>4</sup>, Erdem Yesilada\*<sup>4</sup>: トルコの民間薬の研究—フウロソウ科について

日本生薬学会第114年会 (1994. 3)

- \*1 岐阜薬科大学  
\*2 京都大学薬学部  
\*3 アスゲン製薬(株)  
\*4 GAZI University

吉松嘉代, 下村講一郎: 日本産 *Agrobacterium*

*rhizogenes* による薬用植物の形質転換 (IV) : トウキ (*Angelica acutiloba*) の形質転換  
日本薬学会第 114 年会 (1994. 3)

江崎勝司, 下村講一郎, 青木俊夫\*: チョウジソウ (*Amsonia elliptica*) のアルカロイドおよびフェノール性化合物  
日本薬学会第 114 年会 (1994. 3)

\* 徳岩手生物工学研究センター

國司 学\*, 北中 進\*, 滝戸道夫\*, 下村講一郎:  
交配薬用ニンジンの培養根におけるオーキシンの効果

日本薬学会第 114 年会 (1994. 3)

\* 日本大学薬学部

山崎真巳\*<sup>1</sup>, 斎藤和季\*<sup>1</sup>, 村越 勇\*<sup>1</sup>, 佐藤 文\*<sup>2</sup>,  
下村講一郎: *Glycyrrhiza* 属植物の RFLP 分析および RAPD 分析

日本薬学会第 114 年会 (1994. 3)

\*<sup>1</sup> 千葉大学薬学部

\*<sup>2</sup> 徳常磐植物化学研

佐々木和生\*<sup>1</sup>, 下村講一郎, 鎌田 博\*<sup>2</sup>, 原田

宏\*<sup>2</sup>: ニンジン培養細胞における不定胚形成能と IAA 代謝の関係

日本植物生理学会 1994 年度年会 (1994. 3)

\*<sup>1</sup> 茨城県生物工学研究所

\*<sup>2</sup> 筑波大学生物学系

熊谷健夫: サフランの栽培に関する研究  
第 3 回薬用植物栽培技術フォーラム (1993. 7)

野口 衛: ミシマサイコの栽培法とその品質  
第 3 回薬用植物栽培技術フォーラム (1993. 7. 13, 筑波)

野口 衛: 薬用植物の調製加工法の生薬の品質に及ぼす影響  
第 1 回生薬・薬用植物の生産に関する研究会 (1993. 10. 29, 和歌山)

野口 衛: 薬草を食べる  
薬草を広める会総会 (1994. 5. 21, 和歌山)

香月茂樹: 木本性薬用植物の繁殖法について  
第 3 回薬用植物栽培技術フォーラム (1993. 7)

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5年度に行った演題は次のとおりである。

#### 第358回 (平成5年4月13日)

1. ポリ乳酸マイクロスフェアの物理化学的特性と放出特性に及ぼす保存の影響  
薬品部 ○阿曾幸男  
吉岡澄江
2. 新しいバクテリアの遺伝子破壊法 (Pre-ligation法) について  
変異遺伝部 ○山田雅巳  
能美健彦
3. モノクローナル抗体を用いた成長ホルモン受容体の免疫化学的解析  
機能生化学部 斎藤嘉朗
4. モノクローナル抗体を用いたオピオイド結合タンパク (OBCAM) の脳内分布の解析  
機能生化学部 蜂須賀暁子
5. プレオマイシン誘発によるハムスターのびまん性肺胞障害に対する抗酸化剤の抑制効果  
病理部 ○榎並倫宣  
西川秋佳

#### 第359回 (平成5年5月11日)

1. 培養表皮モデルを用いた香料品原料の評価法 (II)  
環境衛生化学部 ○山越葉子  
木嶋敬二
2. 口紅によるアレルギー性接触皮膚炎  
療品部 伊佐間和郎
3. バクテリアおよび人の代謝活性化酵素遺伝子を組み込んだ変異原性試験用チャイニーズ・ハムスター細胞の樹立  
変異遺伝部 渡辺雅彦
4. Effects of Oxygen Radicals on the *in vivo* Activity of Erythropoietin in Mice  
生物薬品部 A. A. Said
5. ジオキシランを用いた立体選択的エポキシ化反応  
有機化学部 栗原正明

#### 第360回 (平成5年6月8日)

1. 高速走査型共焦点レーザー走査顕微鏡について  
病理部 川西徹
2. ラット中枢神経系起源幹細胞の増殖と分化  
大阪支所生物試験部 天野博夫
3. キトサン直打錠からの薬物放出とその機構  
大阪支所薬品試験部 宮崎玉樹
4. 馬勃の化学的研究 (1)  
生薬部 川原信夫
5. トポイソメラーゼを用いる生活関連物質の制癌性の検索に関する研究

6. 糖鎖含有タンパク質における糖鎖の構造と機能  
食品部 宮原誠  
生物薬品部 森本和滋

#### 第361回 (平成5年7月13日)

1. トランスジェニックマウスを用いたX線による変異原性の解析  
変異遺伝部 鈴木孝昌
2. 発癌プロモーターの *in vitro* 試験について  
衛生微生物部 酒井綾子
3. ヘッドスペース・キャピラリー・ガスクロマトグラフィーによるポリスチレン製品材質中の揮発性物質の測定法の検討  
食品添加物部 杉田たき子
4. 輸入食品・検査検査センター業務について  
食品添加物部 石綿肇

#### 第362回 (平成5年9月14日)

1. 熱測定法の医薬品への応用  
一熱重量測定法の乾燥減量試験および水分測定への適用—  
大阪支所薬品試験部 吉井公彦
2. DNAフィンガープリント法を用いた *Aspergillus flavus* の分類  
衛生微生物部 菊池裕  
変異遺伝部 本間正充
3. 植物由来アントラキノン類天然色素の変異原性メカニズムについて  
食品添加物部 川崎洋子
4. 精子形成ステージの精細胞数計測による Cyclophosphamide の精巣毒性評価  
病理部 安原加壽雄
5.  $\alpha$  2u-globulin 腎障害に誘発されるラット慢性ネフロパチーについて  
毒性部 梅村隆志
6. 2,2'-メチレンビス(4-エチル-6-tert-ブチルフェノール) のラットにおける長期反復投与毒性試験  
毒性部 高木篤也

#### 第363回 (平成5年10月12日)

1. ペンタフルオロプロパノールの急性、亜急性、慢性吸入毒性  
毒性部 広瀬明彦
2. ICP 発光分析法によるラット臓器組織中の元素濃度  
毒性部 鈴木幸子
3. 栄養強化食品等の二価および三価鉄の比色法による分別定量分析について  
食品添加物部 武田由比子

#### 第364回 (平成5年11月9日)

1. アンフェタミン系医薬品 (デプレニール, ベンツフェタミン, フェンプロボレックス, メフェ

ノレックス)の血中から毛髪への移行

薬 品 部 ○木 倉 瑠 理  
中 原 雄 二

2. ラット巨核球における ATP 誘発性 K 電流オシレーション—電気生理学的性質とプリン受容体の特徴について—

病 理 部 畝 山 智 香 子

3. チオウレア系ゴム加硫促進剤のモルモットにおける皮膚感作性の強度ならびに交差反応性

毒 性 部 門 馬 純 子

4. アカゲザルの cocaine 静脈内摂取に及ぼす buprenorphine の影響

毒 性 部 関 田 清 司

第 365 回 (平成 5 年 12 月 14 日)

1. クライテリアドキュメントのデータベース作成と利用について

化学物質情報部 ○大 竹 千 代 子  
関 沢 純

2. 異物発癌の素因の解析に関する研究 (1) —各種ポリウレタンおよび構成モノマー等の細胞間連絡阻害活性の検出—

療 品 部 土 屋 利 江

3. 半導体産業で使用される特殊材料ガスの急性吸入毒性

毒 性 部 広 瀬 明 彦

4. タイ東北部住民の肝吸虫, *Opisthorchis viverrini* (OV) 感染と反応性酸化窒素およびニトロソ化合物の生成増加—胆管癌発生との相関について

毒 性 部 津 田 充 有

第 366 回 (平成 6 年 1 月 11 日)

1. 20 家庭から集めた食品中の低沸点有機塩素化合物の含有量および摂取量の推定

食 品 部 宮 原 誠

2. 緊急輸入された米の農薬対策との一斉分析法の検討

大阪支所食品試験部 外 海 泰 秀

3. ヒトインスリンデスアミド体のキャピラリー電気泳動

大阪支所薬品試験部 四 方 田 千 佳 子

4. ラット胃発癌における NaCl, KCl, および CaCl<sub>2</sub> の影響

病 理 部 西 川 秋 佳

第 367 回 (平成 6 年 2 月 8 日)

1. ビペロニル・ブドキシサイド 4 週間投与ラットのリンパ・造血組織についての免疫組織化学的観察

病 理 部 下 武 男  
三 森 国 敏

2. 小さなリポソームのエタノールによる凝集と融合

大阪支所薬品試験部 小 松 裕 明

3. クロマトグラフィーにおける内部標準法の定量精度について

食 品 部 松 田 り え 子  
療 品 部 林 謙

4. 農産物中の残留農薬の GC/MS によるスクリーニング分析について

食 品 部 根 本 了

第 368 回 (平成 6 年 3 月 8 日)

1. bisacodyl 投与によるラット膀胱結石の形成機序についての検討

病 理 部 豊 田 和 弘

2. ジクロロベンゼン 3 種異性体 (*o*-, *m*-, *p*-DCB) によるマウス肝細胞増殖

毒 性 部 梅 村 隆 志

3. 好塩基球の Ca<sup>2+</sup> 動態への蛋白質チロシンリン酸化反応の役割

機能生化学部 手 島 玲 子

4. ヒト IM-9 細胞における成長ホルモン受容体のダウンレギュレーション

機能生化学部 齋 藤 嘉 朗

5. Molecular Mechanics (MM) 法を用いた分子間相互作用の解析

化学物質情報部 中 野 達 也

6. ペルー生薬 piripiri に関する研究 (1)

生 薬 部 Diana Flores

7. 三稜の成分に関する研究 (1)

関 田 節 子

生 薬 部 顔 妮

関 田 節 子



## 第125回(平成5年4月27日)

1. ラットにおけるジブチルフラートの催奇形作用  
生物試験部 江馬 真
2. 米の保存および調理加工工程(炊飯およびピーファン)における収穫後使用農薬の消長  
食品試験部 中村 優美子

## 第126回(平成5年5月25日)

1. カチオン性リポソームへのスーパーオキシドジスムターゼの取り込み—コレステロールの影響—  
薬品試験部 小松 裕明
2. そばの貯蔵およびそば切り加工過程における収穫後使用農薬の消長  
食品試験部 津村 ゆかり

## 第127回(平成5年6月22日)

1. ラット中枢神経系起源幹細胞の増殖と分化  
生物試験部 天野 博夫
2. 我が国での残留農薬問題の背景と国衛試の役割  
食品試験部 伊藤 誉志男

## 第128回(平成5年9月28日)

1. ヒトインスリンのキャピラリー電気泳動およびHPLC  
薬品試験部 四方田 千佳子
2. マクロファージの活性酸素産生を指標とする *in vitro*  
生物試験部 村井 敏美

## 第129回(平成5年11月2日)

1. ICPを用いた食用タール色素中ヒ素の新しい定量法への試み  
食品試験部 柴田 正
2. バイオプロセスの標準化に関する調査研究  
生物試験部 小川 義之

## 第130回(平成5年12月21日)

1. Oxytocin および Vasopressin のHPLCによる

品質評価と Low Molecular Weight Heparin の分子量測定

2. 薬品試験部 石光 進
2. 光安定性試験法のハーモナイゼーションについて  
支 所 長 武田 寧
3. 各食品中のニコチン酸およびニコチン酸アミドの自然含有量調査  
食品試験部 辻 澄子

## 第131回(平成6年1月25日)

1. ヒアルロン酸と荷電性薬物の相互作用  
薬品試験部 宮崎 玉樹
2. 緊急輸入された米の農薬対策とその一斉分析法の検討  
食品試験部 外海 泰秀

## 第132回(平成6年2月22日)

1. 医薬品等に係わる指定検査機関に対する信頼性保証制度の確立に関する研究  
II. リン酸ヒドロコルチゾンナトリウムの品質評価試験  
薬品試験部 岡田 敏史
2. 食用タール色素中各種重金属のICPによる定量法の可能性について  
食品試験部 木村 実加

## 第133回(平成6年3月22日)

1. 熱測定 of 医薬品試験への応用—TG/MSによる発生気体の分析—  
薬品試験部 吉井 公彦
2. ICPを用いた食用タール色素レーキ中のバリウムの迅速定量法  
食品試験部 梅本 美佳
3. マクロファージ機能に及ぼすデキサメタゾン投与の影響—肺胞マクロファージと腹腔マクロファージでの比較検討—  
生物試験部 中村 ゆかり

---

 特別講演会
 

---

- |  |        |   |        |
|--|--------|---|--------|
| 平成5年9月17日<br>MRSAの心臓毒<br>千葉大学医学部教授                   | 野田 公俊  | 平成5年11月19日<br>イソフラボノイドの生合成とその調節<br>東京大学薬学部助教授                                       | 海老塚 豊  |
| 平成5年9月30日<br>染色体の再編成とその制御<br>東京大学医科学研究所教授            | 池田 日出男 | 平成5年11月29日<br>DNAの酸化的傷害と修復<br>産業医科大学教授  | 葛西 宏   |
| 平成5年10月1日<br>薬物代謝の有機化学<br>東京大学薬学部教授                  | 広部 雅昭  | 平成5年12月15日<br>殺さない動物実験に向けて一熱測定による薬物<br>効果, 麻酔効果, 痛み, 発熱等の非損傷的動物<br>実験一<br>東海大学医学部教授 | 山村 雅一  |
| 平成5年10月8日<br>疾患における糖鎖の役割<br>東京大学薬学部教授                | 入村 達郎  | 平成6年2月25日<br>アルツハイマー病の危険因子としてのアルミニ<br>ウム<br>東京都神経科学研究所参事研究員                         | 黒田 洋一郎 |
| 平成5年10月28日<br>アサガオの花色素遺伝子発現とトランスポゾン<br>東京理科大学基礎工学部教授 | 飯田 滋   | 平成6年3月1日<br>遺伝子治療に向けてのウイルスベクターを用い<br>た血液細胞への遺伝子導入<br>東京大学医科学研究所講師                   | 谷 憲三朗  |
| 平成5年11月16日<br>地下水汚染リスクの評価と管理<br>滋賀県琵琶湖研究所総括研究員       | 中村 正久  |   |        |

---

 支所特別講演会
 

---

- |                             |        |  |       |
|-----------------------------|--------|--|-------|
| 平成5年9月16日<br>永山の一角<br>食品試験部 | 伊藤 誉志男 | 平成5年11月26日<br>発酵工学的技法によるヒト疾患モデル動物の作<br>成と利用<br>三菱化成生命科学研究所生殖工学開発室長 | 横山 峯介 |
|-----------------------------|--------|--|-------|

## 特別研究 (厚生省)

1. 医薬品の適正な評価を志向した光学異性体に関する基礎研究 (有機, 薬品, 食品)  
Chemical study on biologically active stereoisomers for the evaluation of enantiomeric drugs
2. 生体関連反応指標の有意性判定に関する研究 (薬品, 生物, 機能, 病理, 支生)  
Evaluation of *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. 化粧品品の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
2. 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
3. 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 (機能, 衛微)  
Study on the development of sensitive radioassay systems for fungal allergens
4. 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 (機能, 代謝)  
Study on photoaffinity-labeling of drug receptors
5. 標識化合物を利用した新しいエンドトキシン微量定量法の開発とエンドトキシン疾患の診断法の確立に関する研究 (衛微)  
Study on development of a new quantitative method for detection of endotoxin using radio-active materials and establishment of diagnosis for endotoxemia
6. 創薬のための微量生理活性蛋白質の探索とその構造および機能解析における放射性多重標識化の活用に関する基礎的研究 (生物)  
Utilization of radioisotope-multilabelling for investigation of new trace bioactive proteins for new drug development
7. 生分解性高分子ドラッグデリバリーシステムの薬物放出制御に対する放射線エネルギー負荷の影響に関する研究 (薬品)  
Effect of gamma-irradiation on biodegradable controlled delivery systems
8. 照射香辛料等の検知法に関する研究 (食品)  
Study on detection method of irradiated spices
9. 血液に接する医療器具に使用される放射線滅菌と揮発性物質に関する研究 (薬品)  
Gamma-ray sterilization of blood contacting medical devices and formation of volatile

chemicals from the materials

## 科学技術振興調整費 (科学技術庁)

1. 発生・分化機構解明のための実験系の開発  
(1) 不定胚の誘導・発生機構解析のための実験系の開発 (筑植)  
① 薬用植物における不定胚誘導系の確立
1. Research and development of basic technology for molecular and cellular analysis of plant system  
(1) Research and development of basic technology for mechanism of growth and differentiation in plants  
① Establishment of embryogenesis in medicinal plants
2. 情報理論による分析法の開発と精度向上に関する研究 (食品)  
Study of analytical method development and improvement of precision based on the information theory
3. 類縁生薬の薬効評価に関する相同性の基礎研究 (生薬)  
Studies on a novel method for classifying taxonomically related medicinal plants based on their biological activities
4. HIV/HTLV 感染・発症の制御技術の開発に関する研究  
(1) ウィルス感染制御技術の開発に関する研究 (生薬)  
(1) Research of natural products for anti-virus (HIV)
5. 生体制御物質の分子設計と精密合成のための基盤技術開発に関する研究 (有機, 情報)  
Research and development of basic technology for molecular design and efficient synthesis of bioregulators
6. 薬用植物の探索, 収集, 評価, 利用に関する研究 (筑植)  
Studies on the research, collection, evaluation and utilization of medicinal plants
7. 突然変異と DNA 修復の分子機構 (変異)  
Molecular mechanism of mutagenesis and DNA repair
8. 中枢神経系における脂質代謝および情報伝達を特異的に制御する微生物代謝産物の研究 (衛微)  
Studies on microbial metabolites for regulating the metabolism of lipids and signal transduction in central nervous system
9. 脂質分子集合体のドラッグキャリアーとしての有効利用とその製剤特性評価技術の開発に関する研究 (支薬)  
Studies on the establishment of the evaluating methods for lipid-dispersed system of micro-particles as a drug carrier

## 国立機関公害防止等試験研究費（環境庁）

1. 有機スズ化合物の海域環境中における動態の解明（食品）  
Behaviors of organotin compounds in marine aquatic environments
2. 水域環境におけるダイオキシン等非意図的有害物質の生成機構と安全性評価に関する研究（環境）  
Human risk assessment and exposure for chlorinated dibenzo-p-dioxines in freshwater
3. 細胞内および細胞間情報ネットワークへの影響面からみた環境汚染物質の有害反応の解析（薬理, 病理）  
Studies on Effects of Environmental Pollutants on Intracellular Signaling and Cell-to-cell Communication Network
4. 利水過程における農薬等化学物質の動態および分解生成物等の評価に関する研究（環境）  
Behavior and assessment of pesticide and its byproducts in water utilization system
5. 水生生物の細胞遺伝毒性を指標とした水質汚染モニタリング法の開発に関する研究（変異）  
Development of genotoxic-monitoring systems for water pollution using aquatic organisms

## 厚生科学研究費補助金（厚生省）

1. 医用材料の生体内劣化・分解とそれに伴う毒性に関する研究（療品, 毒性, 病理, 薬品）  
Studies on deterioration and/or degradation of biomaterials in biological environment and accompanied toxic effects
2. Porphyromonas gingivalisによる成人性歯周炎の発症機構の解明（衛微）
3. 化粧品品の品質確保のための配分成分の相互作用に関する研究（環境）  
Study on the interaction of ingredients for quality control of cosmetics and quasi-drugs
4. 肝毒性の指標としての脂質代謝・分泌機構の研究（代謝）  
Study on the mechanism of VLDL secretion from hepatocytes
5. 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（変異）  
Study on development of DNA probes useful for research of age- and disease-related genes
6. 線虫(C.elegans)由来プロテインキナーゼCの発癌プロモータ結合ドメインの三次元構造解析（情報）  
The Three Dimensional Structure of Tumor Promotor Binding Domain of Protein Kinase C of C. elegans
7. 老人医療に応用される生薬・漢方薬についての基礎研究（生薬, 機能, 北植）  
Basic on Kampo medicines applied for geron-totherapy studies
8. 清涼飲料水の新殺菌（除菌）法の妥当性に関す

- る研究（衛微）  
Studies on utilization of new methods in pasteurization of beverage
9. 有機溶剤の生殖に及ぼす影響に関する研究（毒性）  
Toxicological study on the effects of Organic solvent to Reproduction
10. 家庭用品による健康被害の防止方法に関する研究（療品）  
Strategie study for prevention of health hazards caused by household products
11. 体外診断用医薬品の臨床評価に関する研究（生物）  
Study on the clinical evaluation of the *in vitro* diagnostic drugs
12. 衛生研究所および保健所における行政検査の質の向上に関する研究（食品）  
Study on improvement of quality on administrative inspection in prefectural health institutes and health centers
13. 薬物依存の発現機序に関する神経化学的研究（毒性）  
Nurochemical study on dependence-producting mechanisms
14. 内的および外的因子による発がんの促進と抑制（センター長）  
Enhancement and suppression of carcinogenesis by internal and external factors
15. 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（代謝, 有機, 衛微, 毒性, 変異）  
Development of chemical, biochemical and toxicological methods for safty evaluation of environmental carcinogens; especially of non genotoxic carcinogens
16. DNAフィンガープリント法を用いた真菌の分類法および同定法の開発（衛微）
17. 医薬品規制ハーモナイゼーション推進国際共同研究（副所長, センター長）  
International collaborative study on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals
18. 糖尿病の合併症に関する研究（生物）  
Study on diabetes mellitus
19. 生活環境中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（食品）  
Study on the evaluation of total exposure to carcinogens /mutagens in daily life
20. 生体試料中の薬物鑑定に関する総合的研究（薬品）  
Comprehensive Study on drug testing of biological specimens
21. 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

22. 食品添加物の規格基準の国際的整合性に関する研究 (食添)  
International harmonization of standards and specifications on food additives
23. ダイオキシンの毒性発現機構に関する調査研究 (センター長)  
Studies on mechanisms of toxicological manifestation from exposure to dioxins
24. 食品添加物1日摂取量に関する調査 (食添)  
Estimation of daily intake of food additive
25. 化学物質による健康リスク評価法に関する研究 (センター長, 療品, 食品, 代謝, 情報, 毒性, 薬理, 病理, 変異, 評価)  
Studies on methodologies for safety evaluation of chemicals
26. 食品中のダイオキシン類汚染実態調査研究 (食品)  
Studies on food contamination with dioxins
27. 必須アミノ酸製品等による健康影響に関する調査研究 (所長, 食品)  
Investigation of the health effects associated with essential amino acid products
28. 農薬の分解・代謝物の安全性評価研究 (センター長)  
Study on methodologies for safety evaluation of degradation products and metabolites of agrochemicals
29. 農薬の分解・代謝物の生体内運命および化学構造と毒性の相関性に関する研究 (薬理)  
Studies for toxicokinetics and structure-toxicity relationships of decomposed and/or metabolized substances of insecticide
30. 新開発食品素材健康影響評価研究 (所長, 支食)  
Regulatory issues on newly developed food-stuffs
31. バイオテクノロジー応用食品等の安全性評価に関する研究 (食品, 衛微)  
Study on safety evaluation of new food developed through biotechnology
32. 器具・容器包装の健康影響等に関する研究 (食添, 衛微)  
Study on health effect of food apparatus and container-package
33. 食品等の安全性評価の在り方に関する研究 (評価)  
Study on safety evaluation of foods and food contaminants
34. 日本薬局方の改正と国際調和に関する研究 (薬品, 生薬)  
Studies on international harmonization of the pharmacopoeia of Japan
35. 残留農薬の分解・代謝に関する研究 (食品, 情報)  
Studies on decomposition and metabolism of pesticides
36. 熱帯病治療薬の開発研究 (薬品)  
Development of drugs for tropical diseases
37. ハカマオニゲシの簡易識別法に関する研究 (筑植)  
Establishment of the simple method for distinguishing among *Papaver bracteatum* Lindl., *P. orientale* L. and *P. pseudo-orientale* Fedde.
38. 化粧品原料成分の品質試験方法に関する研究 (環境)  
Study on the methods of quality test for cosmetics ingredients
39. 化粧品用界面活性剤, 油脂等の規格整備に関する研究 (薬品)  
Study on the standards of surface active agents, oil and fats for cosmetics
40. 合成抗菌剤等の分析法に関する研究 (食品)  
Study on analytical method for residual antibacterials
41. 食品中の有害物質等の分析評価に関する研究 (食品, 衛微)  
Studies on the analytical evaluation of environmental contamination
42. 防水スプレーの中毒機序に関する研究 (療品)  
Studies on mechanisms of pulmonary foxic syndrome found among the users of water-proof sprays
43. 薬用生物資源の保存および保護に関する研究 (生薬, 衛微, 北植, 筑植, 和植, 種植)  
Studies on storage and conservation of the medicinal plants
44. 遺伝子治療における薬効評価法の確立に関する研究 (副所長, 生物, 衛微, 変異)  
Preclinical study on methodologies for evaluation of agents used for gene therapy
45. 体外診断用医薬品原料規格の作成に関する研究 (生物)  
Establishment of the standards on the *in vitro* diagnostic materials
46. 一般用医薬品の品質試験方法に関する研究 (薬品, 支薬)  
Studies on the methods of quality test for generic drugs
47. 医用・歯科用有機高分子材料の溶出試験等のガイドラインの作成に関する研究 (療品)  
Establishment of guidelines of extraction test and other subjects on organic polymers for medical and dental uses
48. 輸入食品の安全性確保に関する調査研究 (食添)  
Safety assurance of imported foods
49. 動脈硬化症, 高血圧症, に用いられる漢方処方および構成生薬の薬効に関する研究 (生薬)  
Study on efficacy of kampo formula used for arteriosclerosis and hypertension and their component crude drugs
50. 薬用植物栽培・品質評価指針作成に関する研究

(生薬)

Study on preparing guidelines of medicinal plants for cultivation and evaluation of the quality

51. 農作物中の残留農薬およびその代謝物、分解物の分析法に関する研究 (食品, 支食)

Study on determination methods of pesticide, its metabolites and its decomposed compounds from agricultural products

52. 輸入食品検査における高度検査機器利用に関する研究 (支食)

Utilization of high level analytical apparatus on inspection of imported foods

53. 希土類元素の生体影響に関する研究 (支食)

Study on the biological effect of rare earth elements

**科学研究費補助金 (文部省)**

1. 環境因子の発癌リスク評価 (病理)

Assessment of carcinogenic risks in environmental factors

2. コホート研究による発がん要因の評価に関する研究 (センター長)

Assessment of carcinogenic risks using cohort study in human cancers

3. 膵の多段階発がんに対する制御機構に関する研究 (病理)

Studies on mechanisms controlling tumor development in multi-stage pancreatic carcinogenesis

4. 炭素クラスター (有機)

Carbon clusters

5. 非特定多様有害物質の毒性低減化に向けた新評価法の開発 (環境)

Studies on the role and mechanism of ATPase Q1 in the DNA repair deflection on Xeroderma pigmentosum

6. トランスジェニックマウスを用いる発がん性短期試験法に関する研究 (センター長, 毒性)

Study on short-term carcinogenicity test using transgenic mice

7. 遺伝子配列解析およびタンパク質の構造解析 (情報)

Genetic Sequence Analyses and Protein Structure Analyses

8. クロノクローメトリ法を用いた活性酸素ラジカルの発生と消去反応の解析 (有機)

Clonocoulometric study on the catalytic action of quinone and nitroarene as generators or scavengers of superoxide anion radical

9. モノクローナル抗体の機能変換に関する研究 (機能)

Studies on engineering of monoclonal antibodies

10. 発展性を備えた情報系のモデル的研究 (情報)

Informational system that has some develop-

mental nature

11. ジオキシランによる立体選択的エポキシ化反応および不斉エポキシ化反応の開発 (有機)

Stereoselective epoxidation with dioxiranes generated from ketones

12. 新規環境汚染物質ニトロアザアレーンの合成と毒性発現機構の有機化学的解析 (有機)

Chemical study on the newly synthesized nitrated aza-arenes as environmental pollutants

13. ラット全胚培養の培養液中に必要な血清高分子の精製 (薬理)

Purification of serum macromolecule required for culture of postimplantation rat embryos

14. カルシトニン遺伝子関連ペプチドによる心筋イオンチャネル機能調節の分子機序の解明 (生薬)

Electrophysiological and molecular biological study on the mechanisms of ion-channel regulation by calcitonin gene-related peptide

15. 色素性乾皮症のDNA修復異常におけるATPase Q1の役割と機能に関する研究 (薬理)

Studies on the role and mechanism of ATPase Q1 in the DNA repair deflection on Xeroderma pigmentosum

**がん研究助成金 (厚生省)**

1. 環境化学物質による発がんの一次予防に関する研究 (センター長, 毒性, 病理)

Studies on primary prevention of environmental carcinogenesis

2. 消化器がん発生に影響する食品中の要因に関する研究 (病理)

Studies on dietary factors affecting tumorigenesis in the digestive organs

3. ヒトがん発生の複数要因の相互作用に関する基礎的・臨床的研究 (変異)

Basic and clinical studies on interaction of some factors in human carcinogenesis

**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, 有機, 機能)

Study on dependence, behavior and biological effects of drug abuse especially polydrug abuse

2. ヒトがん発生の複数要因の相互作用に関する基礎的・臨床的研究 (変異)

Basic and clinical studies on interaction of some factors in human carcinogenesis

**食品等試験検査費**

1. 食品添加物規格基準および試験法の設定 (食添, 支食)

Establishment of standards, specifications and test methods of food additive

2. 食品中の食品添加物分析法の設定 (食添, 支食)

Establishment of analytical methods for food additives in foods

3. 化学的合成品以外の食品添加物の規格基準の設定 (食添)  
Establishment of stands and specifications of food additives other than chemical synthetics
  4. 食品添加物安全性再評価・慢性毒性試験 (ヒスチジン塩酸塩) (病理)  
Chronic toxicity test of histidine monohydrochloride
  5. 食品添加物安全性再評価・慢性毒性試験 (乳酸鉄) (病理)  
Chronic toxicity test of iron lactate
  6. 食品添加物安全性再評価・慢性毒性試験 (パラオキシ安息香酸イソプロピル) (病理)  
Chronic toxicity test of isopropyl-hydroxybenzoate
  7. 食品添加物安全性再評価・慢性毒性試験 (ソルビン酸×ポリリン酸ナトリウム) (病理)  
Chronic toxicity test of sorbic acid
  8. 食品添加物安全性再評価・催奇形性試験 (薬理)  
Teratogenicity study of food additives
  9. 食品添加物安全性再評価・微量金属の代謝試験 (食添)  
Metabolism of trace metals
  10. 食品添加物安全性再評価・変異原性試験 (変異)  
Mutagenicity of food additives
  11. 流通農産物中の残留農薬実態調査 (食品)  
Survey of pesticide residue in agricultural products
  12. 残留農薬の調理加工による減衰に係る調査 (食品)  
Effect of food processing and cooking on pesticide residue
  13. 保存検体中の残留農薬調査 (食品)  
Survey of pesticide residue in preserved food samples
  14. ポストハーベスト農薬消長移行等調査 (食品)  
Study on behavior of pesticides applied harvest
  15. 残留農薬分析法の検討 (食品, 支食)  
Study on analytical method for pesticide residue
  16. 残留農薬同時分析法検討 (支食)  
Study on simultaneous analysis of pesticide residue
  17. ポリカーボネート樹脂中の残存モノマーおよび添加剤の分析法の検討 (食添)  
Establishment of analytical methods for residual monomers and additives in polycarbonate products
  18. 畜水産食品中の残留農薬に係るモニタリング検査 (食品)  
Monitoring study on pesticide residue in livestock product and sea foods
  19. 畜水産食品中の残留有害物質に係る毒性試験 (ジョサマイシン) (病理)  
Chronic toxicity test of josamycin
  20. 畜産食品中の農薬残留実態調査 (有機塩素系農薬) (食品)  
Survey of pesticide residue in livestock products
  21. 魚肉すり身製造工場の微生物汚染実態調査 (衛微)  
Study on bacterial contamination of surimi processing plant
  22. 食品等の規格基準の設定等に係る試験検査 (食品, 食添, 衛微, 毒性)  
Inspection with relation to establishment of specification and standards for foods
  23. 水質管理調査に係る鉛の疫学調査情報 (毒性)  
Survey on the epidemiological information of lead toxicity relevant to drinking water quality management
  24. 水質管理強化対策に係わる変異原性スクリーニング試験 (変異)  
Screening of mutagenicity of contaminants in drinking water
  25. 食用タール色素の製品検査法の開発に関する研究 (食添, 支食)  
Establishment and improvement of quality control methods for food colors
  26. 日本人の食品添加物の一日摂取量調査に関する研究 (支食)  
Estimation of daily intake of food additives based on market basket studies in Japan
  27. 残留農薬の多成分分析法の確立 (支食, 食品)  
Establishment of systematic analytical methods for multipesticidal residue
  28. 残留農薬の公定分析法の設定のための研究 (支食)  
Establishment of official methods for pesticides from agricultural products
- 家庭用品等試験検査費 (厚生省生活衛生局)**
1. 既存化学物質の試験検査 (N-モノ(又はジ)メチルフェニル-N'-モノ(又はジ)-メチルフェニル-P-フェニレンジアミンの慢性毒性試験) (毒性)  
Chronic toxicity study of N,N'-dimethylphenyl-p-phenylenediamine
  2. 既存化学物質の試験検査 (N-モノ(又はジ)メチルフェニル-N'-モノ(又はジ)-メチルフェニル-P-フェニレンジアミンの生殖毒性試験) (薬理)  
Teratogenicity study of N-methylphenyl-N'-methylphenyl-p-phenylenediamine
  3. 家庭用品に使用される化学物質の試験検査 (N-(フルオロジクロロメチルチオ)フタルイミド, N-ジメチル-N'-(フルオロジクロロメチルチオ)-スルファミド, 2-メルカプトベンズルイミダゾール) の 28 日間連続投与毒性試験 (毒性)  
Oral 28-day repeated-dose toxicity studies of 2-mercaptobenzimidazole, N-dimethyl-N'-phenyl-N'-(fluorodichlorothio)sulfamide and

- N-(fluorodichlorothio)-phthalimide
4. 家庭用品に使用される化学物質の試験検査 (2-メルカプトベンズルイミダゾールの生殖/発生毒性試験) (毒性)  
Teratogenicity study of 2-mercaptobenzimidazole
  5. 家庭用品に使用される化学物質の試験検査 (メチル-N-(2-ベンズイミダゾール, N-1, 3-ジメチルプチル-N'-フェニル-P-フェニレンジアミンの感作用性試験) (毒性)  
Skin sensitization tests of methyl-N-(2-benzimidazolyl)carbamate and N-1-1, 3-dimethylbutyl-N'-phenylenediamine
  6. 家庭用品に使用される化学物質の試験検査 (2-メルカプトベンズルイミダゾール, N-1, 3-ジメチルプチル-N'-フェニル-P-フェニレンジアミン, メチル-N-(2-ベンズイミダゾール), 2-ヒドロキシ-4-メトキシベンゾフェノンの細胞毒性試験) (療品)  
Cytotoxicity test of 2-mercaptobenzimidazole, N-1, 3-dimethylbutyl-N'-phenyl-p-phenylenediamine, methyl-N-(2-benzimidazolyl)carbamate and 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone
  7. 家庭用品に使用される化学物質の試験検査 (ビス(2-クロロエチル)エーテルの吸入毒性試験) (毒性)  
Chronic inhalation toxicity study of bis(2-chloroethyl) ether
  8. 家庭用品に使用される化学物質の試験検査 (4-イソプロピル-3-メチルフェノール, チヌビン P, チヌビン 326, ジブチルチオウレア, ジラウリルチオウレアの分析試験法設定) (療品)  
Development of analytical methods for 4-isopropyl-3-methylphenol, Tinuvin P, Tinuvin 326, dibutylthiourea and dilaurylthiourea
  9. 第二種特定化学物質曝露量調査 (食品)  
Survey of exposure to Class two Specified Chemical substances
  10. 指定化学物質摂取量予測調査 (4, 4'-ジアミノジフェニルメタン, 2-イミダゾリン-2-チオール) (情報)  
Estimation of intake of the designated chemical substances (4, 4'-diaminodiphenylmethan, 2-imidazolone-2-thiol)
  11. OECD・HPV点検化学物質安全性調査 (評価)  
Studies on screening information data set of OECD high production volume chemicals
- 厚生本省医薬品等審査業務庁費 (厚生省薬務局)**
1. 毒物劇物指定調査のための毒性試験 (アクリル酸, メタクリル酸の経皮急性毒性試験) (毒性)  
Acute dermal toxicity studies of acrylic acid and metacrylic acid
- 厚生本省あへん等取扱業務庁費**
1. 生態系農業に基づくけし栽培方法の確立に関する研究 (北植, 筑植, 伊植, 種植)  
Establishment of new cultivation method of opium poppy on the basis of ecosystem
- その他**
1. 肺の線維化過程における細胞増殖・癌化機構に関する研究 (病理) 喫煙科学研究財団研究助成金  
Studies on mechanism of cell proliferation and carcinogenesis in the process of pulmonary fibrosis
- 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 (ヒューマンサイエンス基礎科学研究事業)**
1. オピオイドレセプターの構造と機能の解明に関する研究 (機能)  
Studies on the structure and function of opioid 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性栄養因子とモデュレータの機能評価の開発 (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. 各種細菌からの遺伝子操作関連試薬の探索と開発 (衛微)  
Screening of bio-engineering reagents produced in various bacteria
  4. バイオテクノロジー応用医薬品の品質等評価試験方法の開発に関する研究 (生物)  
Development of evaluating methods for the characterization and control of biotechnologically drugs
  5. 遺伝子操作技術等を用いた食品添加物の開発とその安全性評価のための分離分析に関する研究 (食添)  
Development of food additives using biotechnology and separation analysis forevaluation of them
  6. 食品中の活性成分の検索と産生に関する研究 (食品)  
Preliminary screening and production through biotechnology of bioactive components in foods
  7. 化学物質の生体との相互作用とその評価方法に関する研究 (代謝)  
Studies on the chemico-biological interaction and its application for risk assessment
  8. バイオテクノロジーを用いた薬物代謝酵素の生産と薬効・毒性予測への応用 (薬理)  
Biotechnological production of drug metabolizing enzymes and their application to efficacy and toxicity prediction
  9. 太陽紫外線の生体影響とその防御に関する研究 (環境)  
Studies on the protection and effects of vital functions by the solar UV radiation in sunlight



10. 変異原性試験に有用な遺伝子クローニングと外来遺伝子トランスフェクト法による革新的な試験系の開発に関する研究 (変異)  
Cloning of genes useful for mutagenicity tests and development of novel test systems by transfection method of external genes
11. バイオテクノロジーを用いた細胞間相互作用と薬効・毒性との関わりに関する研究 (薬理)  
Studies on the relationship between cell-to-cell communication and efficacy/toxicity of drugs
12. コンピュータによる分子モデリングとグラフィック技法を用いた構造と薬効・毒性の相関解析法の開発 (情報)  
Structure-Pharmacology and Toxicology Relation Based on Computer-based Molecular Modeling and Graphics
13. 培養細胞を用いた電気生理学的手法による糖鎖の役割の解明 (生薬)  
Electrophysiological studies on the physiological and functional roles of carbohydrates using isolated and cultured cardiac myocytes
14. 糖鎖含有タンパク製剤における糖鎖の機能解明と特性・品質等評価試験方法の開発に関する基礎的研究 (生物)  
Studies on the characterization, standardization and control of glycoprotein products
15. 放出制御等の製剤機能を支配する物理化学的特性の安定化とその評価 (薬品)  
Stabilization and stability evaluation of the physicochemical properties of controlled delivery systems
16. 新医薬品製剤の生物薬剤学的評価に関する基礎的研究 (薬品)  
Study on biopharmaceutical evaluation of new dosage forms
17. エマルションおよびリポプロテインを薬物担体とする組織指向性製剤の開発とその評価法に関する研究 (支薬)  
Research and development of tissue-targeting preparations by using emulsion and lipoprotein as a drug carrier, and the establishment of the evaluation method of their drug formulations
18. ヒアルロン酸のキャラクタリゼーションおよび製剤材料としての利用に関する研究 (支薬)  
Characterization of hyaluronic acid and its application as a drug formulation material
19. 細胞接着因子関連医薬品の有用性確保のための基礎的研究 (生物)  
Study on acquisition of usefulness of protein drugs related with cell adhesive factor
20. 高分子材料によるMFHの素因の解析と短期検索法の開発 (療品)  
Studies on the mechanisms of malignant fibrous histiocytoma (MFH) induced by polymeric materials and development of short-term test methods
21. 新医薬品・医用材料の評価技術の開発と応用 (支生)  
Development of evaluation methods for new drugs and biomaterials
22. 生薬成分と生体応答の研究 (生薬)  
Studies on bioactive principles of medicinal plants and their interactions with living materials
23. バイオテクノロジーにより得られた有用形質の保存に関する研究 (筑植)  
Research on preservation of important traits by plant biotechnology
24. 食細胞の活性酸素産生系の解明との調節因子についての研究 (生物)  
Study on the mechanism of active oxygen-generating system and its regulatory factor in phagocytic cell
25. 脳高次機能障害改善を目的としたCa拮抗薬の作用評価法の開発 (薬理)  
Studies on the development of new evaluating methods for drugs improving brain damages: Ca-antagonist as a candidate
26. 糖鎖検出プローブの開発に関する研究 (機能)  
Development of probes for detection of sugar chains
27. 薬用植物の分子遺伝学的解析による分類法の確立に関する研究 (筑植)  
Study on the system of classification of medicinal plant by the molecular genetic analysis
- ヒューマンサイエンス振興財団国際共同研究事業**
1. バイオテクノロジー由来食品—ヒトの健康との関連について— (所長, 食品, 食添)  
Foods and food products produced by biotechnology: Human health implications
2. 加速試験不適合製剤の Shelf-life 予測法の開発研究 (薬品)  
Applicability of accelerated testing for shelf-life prediction of novel dosage forms
- 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のスクリーニング研究 (衛微)  
Preliminary screening for antiviral AIDS drugs
- ヒューマンサイエンス振興財団創薬科学総合研究事業**
1. 抗ウイルス剤開発のための基礎的研究—ウイルス遺伝子の特異的発現機構の解明— (衛微)  
Mechanisms of virus-specific gene expression
2. 神経伝達物質および抗不整脈薬による心筋イオンチャンネル機能の調節機構の解明 (生薬)  
Studies on the intracellular mechanisms of ion-channel regulation in cardiac muscle by

- neurotransmitters and antiarrhythmic drugs
- 3. 成長ホルモン受容体の細胞下動態に関する研究 (機能)  
Subcellular metabolism and translocation of growth-hormone receptor
- 4. 薬物等による白血球機能の制御に関する研究 (代謝)  
Studies on regulation of leukocyte functions by drugs
- 5. ヒト平滑筋臓器における自律神経支配と薬物受容体分布の特性に関する研究 (薬理)  
Studies on autonomic innervation and receptor distribution in human smooth muscle
- 6. 水分子の動的挙動の解析に基づく医薬品製剤の安定性予測理論に関する研究 (薬品)  
Physicochemical implications of water mobility in the stability prediction of pharmaceuticals
- 7. タンパク性医薬品の分子修飾による安定化戦略 (生物)  
Stabilization of protein drugs by molecular modification
- 8. 非経口固形剤のバイオアベイラビリティ調整因子に関する研究 (薬品)  
Pharmaceutical and Biological factors affecting Bioavailability of Nonoral Solid Dosage Forms
- 9. In Situ Hybridization を利用した培養細胞株識別技術の確立に関する研究 (変異)  
Study of development for recognition technique of cell line using in situ hybridization
- 10. 中枢神経系幹細胞樹立細胞系の開発 (支生)  
Development of the CNS stem cell lines
- 11. 自然発症疾患モデル動物の評価とそれら動物胚の凍結保存法の開発に関する研究 (支生)  
Evaluation of animal models for human diseases and development for the cryopreservation methods of their embryos
- 12. ヒト由来遺伝子導入トランスジェニックマウスによる短期試験法の実用化に関する研究 (センター長)  
Establishment of short-term test method using transgenic mouse introduced human-derived gene
- 13. 薬用植物の増殖および成分に及ぼす因子の解析 (筑植)

- Analysis of factors affecting growth and secondary metabolism of medicinal plants
- 14. 高速高分解能細胞内カルシウムイオン濃度画像解析技術の開発 (病理)  
High speed and high resolution imaging of intracellular calcium ion concentration
- 15. 画像処理法による免疫細胞の細胞内物質動態の検出技術の開発 (機能)  
Imaging analysis for tracing functional components in living cells
- 16. 薬用生物資源の保存および保護に関する研究 (種植)  
Studies on storage and conservation of the medicinal plant

新医療技術開発研究事業

- 1. 人工臓器に関する新滅菌法の研究 (療品)  
Studies on a new sterilization method for artificial organs

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	有機
機 能 生 化 学 部	機能
代 謝 生 化 学 部	代謝
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	支薬
大阪支所食品試験部	支食
大阪支所生物試験部	支生
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5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5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	( 79) 84	( 79) 84	5	106.33
国 家 検 査	( 0) 0	( 55) 11	( 55) 11	△ 44	20.00
製 品 検 査	( 0) 0	( 711) 734	( 711) 734	23	103.23
特 別 審 査 試 験	( 256) 166	( 0) 0	( 256) 166	△ 90	64.84
特 別 行 政 試 験	( 95) 102	( 8) 2	( 103) 104	1	100.97
一 斉 取 締 試 験	( 184) 172	( 23) 17	( 207) 189	△ 18	91.30
輸 入 食 品 検 査	( 0) 40	( 19) 2	( 19) 42	23	221.05
一 般 依 頼 検 査	( 0) 0	( 0) 0	( 0) 0	—	—
合 計	( 535) 480	( 895) 850	(1,430) 1,330	△ 100	93.01

( ) 内数字は平成4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5年度国家検定品目別月別判定別件数 実績表	414頁
○平成5年度国家検査品目別月別判定別件数 実績表	414頁
○平成5年度製品検査月別判定別件数実績 表	416頁

○平成5年度特別審査試験月別判定別件数 実績表	416頁
○平成5年度輸入食品検査月別判定別件数 実績表	416頁
○平成5年度特別行政試験実績表	417頁
○平成5年度一斉取締試験判定別件数実績 表	417頁

## 平成5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
半合成ヒト二相性 イソフェンインスリン 水性懸濁注射液	大阪	5	—	5	2	—	2	0	—	0	2	—	2	1	—	1	4	—	4
半合成ヒトイソフェン インスリン水性懸濁注射液	大阪	2	—	2	0	—	0	1	—	1	0	—	0	1	—	1	2	—	2
生合成ヒト中性イン スリン注射液	大阪	2	—	2	0	—	0	1	—	1	1	—	1	3	—	3	0	—	0
生合成ヒトインスリン 亜鉛水性懸濁注射液	大阪	1	—	1	1	—	1	1	—	1	0	—	0	1	—	1	1	—	1
ヒト結晶性インスリン 亜鉛水性懸濁注射液	大阪	0	—	0	1	—	1	0	—	0	0	—	0	0	—	0	1	—	1
生合成ヒト二相性 イソフェンインスリン 水性懸濁注射液	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
生合成ヒトイソフェン インスリン水性懸濁注射液	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
生合成ヒト結晶性 インスリン亜鉛水性 懸濁注射液	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
計		10	—	10	4	—	4	3	—	3	3	—	3	6	—	6	8	—	8

## 平成5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	1	—	1	1	—	1	0	—	0	5	—	5	0	—	0	1	—	1	
内 訳	内容量 100 ml 未満	大阪	0	—	0	0	—	0	0	—	0	0	—	0	0	—	0	0	—	0
	内容量 100 ml 以上	大阪	1	—	1	1	—	1	0	—	0	5	—	5	0	—	0	1	—	1
リンゲル液	大阪	0	—	0	1	—	1	0	—	0	0	—	0	0	—	0	0	—	0	
計		1	—	1	2	—	2	0	—	0	5	—	5	0	—	0	1	—	1	

月別判定別件数実績表

10 月			11 月			12 月			1 月			2 月			3 月			合 計		
合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計
2	—	2	2	—	2	0	—	0	2	—	2	3	—	3	4	—	4	27	—	27
1	—	1	1	—	1	0	—	0	3	—	3	0	—	0	1	—	1	12	—	12
2	—	2	2	—	2	2	—	2	1	—	1	0	—	0	2	—	2	16	—	16
1	—	1	1	—	1	2	—	2	0	—	0	0	—	0	2	—	2	11	—	11
0	—	0	0	—	0	0	—	0	0	—	0	0	—	0	0	—	0	2	—	2
0	—	0	0	—	0	0	—	0	2	—	2	4	—	4	4	—	4	10	—	10
0	—	0	0	—	0	1	—	1	1	—	1	1	—	1	1	—	1	4	—	4
0	—	0	0	—	0	2	—	2	0	—	0	0	—	0	0	—	0	2	—	2
6	—	6	6	—	6	7	—	7	9	—	9	8	—	8	14	—	14	84	—	84

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
0	—	0	0	—	0	0	—	0	0	—	0	0	—	0	1	—	1	9	—	9
0	—	0	0	—	0	0	—	0	0	—	0	0	—	0	0	—	0	0	—	0
0	—	0	0	—	0	0	—	0	0	—	0	0	—	0	1	—	1	9	—	9
0	—	0	0	—	0	1	—	1	0	—	0	0	—	0	0	—	0	2	—	2
0	—	0	0	—	0	1	—	1	0	—	0	0	—	0	1	—	1	11	—	11

## 平成5年度製品検査品目別

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
大 阪	79	—	79	57	—	57	69	—	69	79	—	79	56	—	56	43	—	43
計	79	—	79	57	—	57	69	—	69	79	—	79	56	—	56	43	—	43

## 平成5年度輸入食品検査月別判定別件数別実績表

区 分		11 月		12 月		2 月		合 計		試 験 件 数
		無 判 定	計	無 判 定	計	無 判 定	計	無 判 定	計	
畜 産 物	東 京	30	30	—	—	10	10	40	40	40
水 産 物	大 阪	—	—	2	2	—	—	2	2	2
合 計		30	30	2	2	10	10	42	42	42

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
58	—	58	46	—	46	59	—	59	41	—	41	60	—	60	87	—	87	734	—	734
58	—	58	46	—	46	59	—	59	41	—	41	60	—	60	87	—	87	734	—	734

平成5年度特別行政試験実績表

局 (部)	課 (室)	品 (項) 目	件数	担 当 部
薬 務 局	監視指導課	1. 輸液製剤の試験について	2	支所生物試験部
		2. 医薬部外品(薬用育毛剤)の試験について	1	環境衛生化学部
		3. 医薬部外品(液体石鹼)の試験について	3	衛生微生物部
	麻 薬 課	輸入生あへんのモルヒネ含有率試験について	95	薬品部
名古屋地方裁判所		鑑定依頼について	1	薬品部
茨城県警石岡警察署		鑑定依頼について	1	筑波薬用植物栽培試験場
岐阜県警恵那警察署		鑑定依頼について	1	筑波薬用植物栽培試験場
合 計			104	東京等 102 件 大 阪 2 件

平成5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	167	5	0	172
大 阪	17	0	0	17
合 計	184	5	0	189

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6年4月1日現在)

番号	標準品名	包装単位	価格	使用目的
			円	
1	アスコルビン酸	1g入り 1本	19,800	・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	14,600	・安息香酸エストラジオールの純度試験、同注射液、同水性懸濁注射液の確認試験および定量法
3	インスリン	20mg入り 1本	22,900	・インスリン、インスリン注射液、インスリン亜鉛水性懸濁注射液、結晶性インスリン亜鉛水性懸濁注射液、無晶性インスリン亜鉛水性懸濁注射液、プロタミンインスリン亜鉛水性懸濁注射液、イソフェンインスリン水性懸濁注射液、中性インスリン注射液の定量法、イソフェンインスリン水性懸濁注射液の純度試験
4	エストリオール	100mg入り 1本	12,700	・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	11,100	・メピ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	16,100	・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	19,000	・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	塩酸ピリドキシリン	200mg入り 1本	23,700	・塩酸ピリドキシリン注射液の定量法
9	エンドトキシリン	2 $\mu$ g入り 1本	18,500	・注射用水のエンドトキシリン試験
10	含糖ペプシン	5g入り 1本	19,500	・含糖ペプシンの定量法
11	d-カンフル	300mg入り 1本	15,300	・d-カンフルの定量法
12	dl-カンフル	300mg入り 1本	14,200	・dl-カンフルの定量法
13	吉草酸ベタメタゾン	100mg入り 1本	16,100	・吉草酸ベタメタゾンの確認試験および定量法
14	ジトキシリン	20mg入り 1本	14,600	・ジトキシリン、同錠、同注射液の純度試験
15	血清性性腺刺激ホルモン	800単位入り 2本	32,300	・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	16,000	・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	16,100	・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	16,100	・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	14,000	・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	14,300	・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	16,000	・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	14,900	・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	14,800	・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



## 日本薬局方標準品

番号	標準品名	包装単位	価格	使用目的
			円	
24	シアノコバラミン	200 mg入り 1本	13,300	・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	1 g入り 3本	13,900	・ジギタリス、同末の定量法
26	ジギトキシン	50 mg入り 1本	14,500	・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	300 mg入り 1本	14,400	・シクランデラートの定量法
28	ジクロフェナミド	100 mg入り 1本	11,000	・ジクロフェナミド、同錠の定量法
29	ジゴキシン	50 mg入り 1本	14,400	・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	酒石酸水素エピネフリン	50 mg入り 1本	12,900	・エピネフリン、ノルエピネフリン、同注射液の純度試験
31	酒石酸水素ノルエピネフリン	50 mg入り 1本	14,300	・エピネフリン、ノルエピネフリンの純度試験同注射液の純度試験および定量法
32	ショ糖オクタ硫酸エステルカリウム	1 g入り 1本	14,000	・スクラルファートの定量法
33	G-ストロファンチン	100 mg入り 1本	14,900	・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	30,800	・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	500 mg入り 1本	12,700	・パンクレアチンのたん白消化力試験
36	デキサメタゾン	100 mg入り 1本	14,800	・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	100 mg入り 1本	15,200	・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	150 mg入り 1本	16,000	・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	100 mg入り 1本	14,900	・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	100 mg入り 1本	14,800	・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	200 mg入り 1本	14,500	・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単位入り 2本	33,600	・トロンピンの定量法
43	ニコチン酸	500 mg入り 1本	15,700	・ニコチン酸注射液の定量法
44	ニコチン酸アミド	500 mg入り 1本	17,100	・ニコチン酸アミド注射液の定量法
45	脳下垂体後葉	20 mg入り 2本	14,700	・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	4,200	・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	4,150	・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	500 mg入り 1本	27,700	・葉酸の純度試験
49	ヒドロクロロチアジド	100 mg入り 1本	14,200	・ヒドロクロロチアジドの定量法
50	ヒドロコルチゾン	100 mg入り 1本	14,800	・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

## 日本薬局方標準品

番号	標準品名	包装単位	価格	使用目的
			円	
51	フルオシノニド	100 mg 入り 1本	16,100	・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	50 mg 入り 1本	14,500	・フルオシノロンアセトニドの定量法
53	プレドニゾン	100 mg 入り 1本	14,500	・プレドニゾ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
54	プロゲステロン	50 mg 入り 1本	14,500	・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	100 mg 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	100 mg 入り 1本	14,800	・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	26,900	・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	50 mg 入り 1本	15,300	・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	100 mg 入り 1本	13,500	・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	50 mg 入り 1本	12,200	・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	200 mg 入り 1本	13,700	・メトキサレンの定量法
62	メトトレキサート	200 mg 入り 1本	19,500	・メトトレキサートの確認試験および定量法
63	葉酸	500 mg 入り 1本	17,100	・葉酸, 同錠, 同注射液の定量法
64	ラナトシド C	100 mg 入り 1本	14,700	・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	200 mg 入り 1本	19,300	・リボフラビンおよび同散の定量法。リン酸リボフラビナトリウム, 同注射液の定量法
66	硫酸プロタミン	100 mg 入り 1本	26,400	・イソフェンイ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	100 mg 入り 1本	13,600	・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	100 mg 入り 1本	13,900	・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	50 mg 入り 1本	28,700	・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6年4月1日現在)

番号	標準品名	包装単位	価格	使用目的
			円	
1	アセトアミノフェン	300 mg入り 1本	14,900	・アセトアミノフェン, その製剤の確認試験および定量法
2	アルプロスタジル	10 mg入り 1本	56,400	・アルプロスタジル, アルプロスタジル ・アルファテクスとそれらの製剤の定量法
3	インドシアニングリーン	300 mg入り 1本	14,300	・インドシアニングリーンおよびその製剤の定量法
4	ウロキナーゼ	1,000 単位 1本 入り	15,700	・ウロキナーゼおよびその製剤の定量法
5	ウイナスタチン	3,600 単位 1本 入り	29,300	・ウイナスタチンおよびその製剤の定量法
6	エストラジオール	50 mg入り 1本	14,600	・エストラジオールおよびその製剤の純度試験
7	エストロン	50 mg入り 1本	14,700	・エストロンおよびその製剤の確認試験及び定量法
8	エルカトニン	各10 単位 2本 入り	37,300	・エルカトニンおよびその製剤の定量法
9	塩酸チアミン液	1 mg入り 10本	8,500	・チアミンおよびその製剤の定量法
10	エテンザミド	300 mg入り 1本	14,500	・エテンザミド, その製剤の確認試験および定量法
11	カリジノゲナーゼ	100単位入り 1本	13,500	・カリジノゲナーゼおよびその製剤の生物活性試験および定量法
12	吉草酸ジフルコルトロン	100 mg入り 1本	13,900	・吉草酸ジフルコルトロンおよびその製剤の定量法
13	高分子量ウロキナーゼ	800 単位入り 1本	19,300	・ウロキナーゼ, その製剤の確認試験および定量法
14	酢酸デキサメタゾン	100 mg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
15	低分子量ヘパリン	10 mg入り 1本	26,200	・低分子量ヘパリン, その製剤の確認試験および定量法
16	テオプロミン	100 mg入り 1本	10,600	・ペントキシフィリンの純度試験
17	ヒアルロニダーゼ	500 mg入り 1本	17,300	・注射用ヒアルロニダーゼの定量法
18	ヒトインスリン	50 mg入り 1本	26,400	・ヒトインスリンおよびその製剤の定量法
19	プリミドン	300 mg入り 1本	14,800	・プリミドン, その製剤の確認試験および定量法
20	フルオロメトロン	100 mg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
21	フルドロキシコルチド	100 mg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
22	プロピオン酸テストステロン	50 mg入り 1本	14,300	・プロピオン酸テストステロンおよびその製剤の定量法
23	マレイン酸メチルエルゴメトリン	50 mg入り 1本	14,100	・マレイン酸メチルエルゴメトリンの定量法
24	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1 g入り 6本	46,800	・融点測定用温度計, 同装置の補正
25	酪酸ヒドロコルチゾン	100 mg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

## 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6年4月1日現在)

番号	標準品名	包装単位	価格	使用目的
			円	
26	リゾチー ム	500 mg 入り 1 本	25,000	・リゾチー ム製品の定量法
27	リン酸デキサメタゾンナトリウム	100 mg 入り 1 本	13,500	・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
28	リン酸ヒスタミン	50 mg 入り 1 本	12,300	・ヒスタミン試験
29	リン酸プレドニゾンナトリウム	100 mg 入り 1 本	13,600	・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6年4月1日現在)

番号	標準品名	包装単位	価格	使用目的
			円	
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	アゾルピンエキストラ	1g入り 1本	2,750	・粘膜以外医薬品, 化粧品および製剤中のアゾルピンエキストラの確認試験
4	アマランス	1g入り 1本	2,700	・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	アルラレッド AC	1g入り 1本	4,850	・食品, 医薬品, 化粧品および製剤中のアルラレッド AC の確認試験
6	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
7	インジゴカルミン	1g入り 1本	2,700	・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
8	エオシン	1g入り 1本	2,750	・医薬品, 化粧品および製剤中のエオシンの確認試験
9	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
10	オイルエロー AB	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イルエロー AB の確認試験
11	オイルエロー OB	1g入り 1本	2,550	・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
12	オイルオレンジ SS	1g入り 1本	2,550	・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
13	オイルレッド XO	1g入り 1本	2,550	・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
14	オレンジ I	1g入り 1本	2,650	・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
15	オレンジ II	1g入り 1本	2,700	・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
16	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
17	サンセットエロー FCF	1g入り 1本	2,650	・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
18	タートラジン	1g入り 1本	2,650	・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
19	テトラクロルテトラブロムフルオレセイン	1g入り 1本	2,750	・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ロムフルオレセインの確認試験
20	テトラブロムフルオレセイン	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ロムフルオレセインの確認試験
21	トルイジンレッド	1g入り 1本	2,500	・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
22	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
23	ニューコクシン	1g入り 1本	2,650	・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
24	パーマメントオレンジ	1g入り 1本	2,550	・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
25	ハンサエロー	1g入り 1本	2,550	・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

## 国立衛生試験所標準品 (色素試験用標準品)

(平成6年4月1日現在)

番号	標準品名	包装単位	価格	使用目的
			円	
26	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
27	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
28	ブリリアントブルー FCF	1g入り 1本	2,850	・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
29	フルオレセイン	1g入り 1本	2,750	・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
30	フロキシシン	1g入り 1本	2,750	・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
31	ボンソー R	1g入り 1本	2,750	・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
32	ボンソー SX	1g入り 1本	2,750	・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
33	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
34	リゾールルビン BCA	1g入り 1本	2,850	・外用医薬品、化粧品および製剤中のリゾールルビン BCA の確認試験
35	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
36	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
37	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
38	ローズベンガル	1g入り 1本	2,750	・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5年度国立衛生試験所標準品出納状況

(医薬品試験用標準品)

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	47	161	183	0	25	
アセトアミノフェン	60	0	5	0	55	
アルプロスタジル	-	50	0	0	50	
安息香酸エストラジオール	8	30	1	0	37	
インスリン	58	0	23	3	32	
インドシアニングリーン	20	0	0	0	20	
ウリナスタチン	-	0	0	0	0	
ウロキナーゼ	71	0	67	0	4	
エストラジオール	0	50	46	0	4	
エストリオール	6	50	5	0	51	
エストロン	37	0	5	0	32	
エテンザミド	30	0	2	0	28	
エピチオスタノール	6	50	17	0	39	
エルカトニン	-	50	0	0	50	
エルゴカルシフェロール	42	100	114	0	28	
塩酸チアミン	123	168	262	0	29	
塩酸チアミン液	22	0	10	0	12	
塩酸ピリドキシン	162	310	303	1	168	
エンドトキシン	141	1,300	1,116	0	325	
カリジノゲナーゼ	87	0	74	0	13	
含糖ペプシン	95	0	20	0	75	
d-カンフル	90	0	28	0	62	
d/-カンフル	94	0	88	0	6	
吉草酸ジフルコルトロン	42	0	2	0	40	
吉草酸ベタメタゾン	28	20	20	0	28	
ギトキシシン	22	0	12	0	10	
血清性性腺刺激ホルモン	27	100	28	0	99	
高分子量ウロキナーゼ	50	0	3	5	42	
コハク酸トコフェロール	15	100	74	0	41	
コハク酸ヒドロコルチゾン	42	0	3	0	39	
コレカルシフェロール	12	200	142	0	70	
酢酸クロルマジノン	83	0	31	0	52	
酢酸コルチゾン	83	0	4	0	79	
酢酸デキサメタゾン	40	0	4	0	36	
酢酸トコフェロール	6	881	626	1	260	
酢酸ヒドロコルチゾン	42	50	80	0	12	
酢酸プレドニゾロン	58	30	40	0	48	
シアノコバアミン	0	460	356	0	104	
ジギタリス	15	0	0	0	15	
ジギトキシシン	28	100	51	0	77	
シクランデラート	40	0	5	0	35	
ジクロフェナミド	15	0	3	0	12	
ジゴキシシン	21	50	19	0	52	
酒石酸水素エピネフリン	56	0	16	0	40	

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	
酒石酸水素ノルエピネフリン	50	0	6	0	44	
ショ糖オクタエステル硫酸カリウム	37	0	27	0	10	
G-ストロファンチン	26	0	0	0	26	
胎盤性性腺刺激ホルモン	23	100	87	0	36	
チロジン	35	150	127	0	58	
低分子量ヘパリン	50	0	11	0	39	
テオプロミン	20	0	0	0	20	
デキサメタゾン	26	100	20	0	106	
デスラノシド	32	0	10	0	22	
トコフェロール	3	300	270	1	32	
トリアムシノロン	25	0	1	0	24	
トリアムシノロンアセトニド	28	0	7	0	21	
トルナフタート	33	0	10	0	23	
トロンピン	33	100	99	12	22	
ニコチン酸	9	50	11	0	48	
ニコチン酸アミド	81	150	167	0	64	
脳下垂体後葉	56	0	16	0	40	
薄層クロマトグラフ用酢酸レチノール	11	50	8	0	53	
薄層クロマトグラフ用バルミン酸レチノール	64	0	26	0	38	
パラアミノベンゾイルグルタミン酸	10	50	9	0	51	
ヒアルロニダーゼ	9	50	6	0	53	
ヒトインスリン	-	50	0	0	50	
ヒドロクロロチアジド	47	0	10	0	37	
ヒドロコルチゾン	39	0	23	0	16	
ブリミドン	30	0	0	0	30	
フルオシノニド	51	0	13	0	38	
フルオシノロンアセトニド	25	50	40	0	35	
フルオロメトロン	46	0	0	0	46	
フルドロキシコルチド	49	0	0	0	49	
ブレドニゾン	37	50	72	0	15	
プロゲステロン	43	0	7	0	36	
プロピオン酸テストステロン	7	0	1	0	6	
プロピオン酸ベクロメタゾン	64	0	13	0	51	
ベタメタゾン	70	0	18	0	52	
ヘパリンナトリウム	145	150	70	0	225	
マレイン酸エルゴメトリン	24	0	10	0	14	
マレイン酸メチルエルゴメトリン	6	20	0	0	26	
メストラノール	45	0	3	0	42	
メチルジゴキシシン	45	0	5	0	40	
メトキサレン	20	0	0	0	20	
メトトレキサート	26	0	2	0	24	



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
融点測定用 〔アセトアニリド, アセトフ エネチジン, カフェイン, スルファニルアミド, スル ファピリジン, ワニリン〕	13	50	42	0	21	
葉酸	90	0	59	0	31	
酪酸ヒドロコルチゾン	41	0	14	0	27	
ラナトシドC	14	0	12	0	2	
リゾチーム	52	200	232	0	20	
リボフラビン	35	400	350	0	85	
硫酸プロタミン	34	0	7	0	27	
リン酸デキサメタゾンナトリ ウム	19	50	10	0	59	
リン酸ヒスタミン	38	0	32	0	6	
リン酸ヒドロコルチゾンナト リウム	34	0	20	0	14	
リン酸プレドニゾロンナト リウム	50	0	0	0	50	
リン酸ベタメタゾンナトリ ウム	29	50	20	0	59	
レセルピン	31	0	10	0	21	
計	3,884	6,480	5,901	23	4,440	

## (色素試験用標準品)

標準品名	前年度末 在庫数量	製造数量	売払数量	自家消費等 数量	年度末 在庫数量	備考
	個	個	個	個	個	
アシッドバイオレット 6B	69	0	3	0	66	
アシッドレッド	0	504	1	0	503	
アゾルビンエキストラ	71	0	1	0	70	
アマランス	447	0	3	0	444	
アルラレッド AC	47	309	10	0	346	
インジゴ	128	0	2	0	126	
インジゴカルミン	0	548	2	1	545	
エオシン	114	0	3	0	111	
エリスロシン	492	0	7	0	485	
オイルエロー AC	217	0	2	0	215	
オイルエロー OB	225	0	2	0	223	
オイルオレンジ SS	223	0	0	0	223	
オイルレッド XO	201	0	2	0	199	
オレンジ I	271	0	3	0	268	
オレンジ II	152	0	3	0	149	
ギネアグリーン B	65	0	4	0	61	
サンセットエロー FCF	0	503	1	1	501	
タートラジン	34	441	7	1	467	
テトラクロロテトラブROMフルオレセイン	149	0	2	0	147	
テトラブROMフルオレセイン	110	0	2	0	108	
トルイジンレッド	76	0	2	0	74	
ナフトールエロー S	139	0	4	0	135	
ニューコクシン	0	500	3	0	497	
パーマネントオレンジ	28	0	2	0	26	
ハンサエロー	72	0	0	0	72	
ファストグリーン FCF	1	0	1	0	0	
ファストレッド S	196	0	2	0	194	
ブリリアントブルー FCF	464	0	6	0	458	
フルオレセイン	185	0	2	0	183	
フロキシシン	325	0	4	0	321	
ボンソー R	245	0	3	0	242	
ボンソー SX	145	0	3	0	142	
ボンソー 3R	154	0	3	0	151	
リソールルビン BCA	358	0	0	0	358	
レーキレッド C	383	0	2	0	381	
レーキレッド CBA	118	0	0	0	118	
レーキレッド DBA	158	0	2	0	156	
ローズベンガル	0	0	0	0	0	
計	6,062	2,805	99	3	8,765	

## 衛生試験所報告第 112 号キーワード索引 (アルファベット順)

## A

*A. flavays* 333  
*A. fumigatus* 330  
absorbency 365  
accelerated testing 313  
acetylaminofluorene 335  
acetylcholine 336  
acetylcholine receptor-channels 362  
acetylcholineesterase 338  
acetyltransferase 347, 364  
acid phosphate ester 338  
acid-neutralizing capacity 356  
aconitine 315  
acridine orange supravital staining 364  
acyl-CoA synthetase 331  
*ada-laike* gene 345  
adrenal medullary tumor 342  
aflatoxin 333, 361  
aflatoxin M1 326  
aggregation 313, 314, 318  
AgNOR 342  
*Agrobacterium rhizogenes* 366  
AIDS 131  
airborne fungi 361  
aldose reductase 318  
alginate 348  
alkaloids 359  
alkylating agents 365  
allergen 301, 330  
allergenicity assessment 321  
allergic contact dermatitis 320, 321, 322  
allergic pigmented lip dermatitis 320  
Allura Red AC dye 327  
alprostajil 188  
aluminium 328  
aluminium potassium sulfate 48  
amphetamine-like drugs 356  
analgesia 320  
analysis of herbal medicines 357  
Analytical method 359  
anatomy 354, 355  
anemia 71  
Angelicae radix 353  
angiotensin I converting enzyme 353  
animal model 363  
antacid test 356  
*Anthemis nobilis* 354  
anti H-sera 333  
anti-HIV drugs 131  
antimicrobial agent 322  
*Apocynum venetum* 354

apraclonidine 336  
arsenic limit 315  
arginine-derived nitric oxide 361  
aromatic amines 347, 364, 365  
*Artemisia annua* 354  
artemisinin 354  
artifact formation 358  
ascaridole 320  
ascorbic acid 183  
assay 318  
assay methodology 357  
astrocytoma 340  
asymmetric acetalization 280  
ATP 336, 342, 363  
ATP receptor 362  
ATP-activated channels 337, 362  
authorization 155, 161, 167, 170, 175, 179, 183,  
185, 188, 192, 196  
automation 364  
aza-arene 329

## B

B6C3F<sub>1</sub> mice 342  
bace analogue 346  
Bacterial Endotoxin Test 209  
benzo[a]pyrene 329  
beta-oxidation 331  
BI 358  
binomial distribution 364  
bioassay 317, 320  
bioavailability 313  
biodegradation 324  
bioequivalence 313  
biological evaluation 358  
Biological indicator 358  
biological samples 326  
biotechnology 359  
biotechnology-derived drug 316, 357  
biotransformation 329  
1, 1-bis(*tert*-butylperoxy)-3, 3, 5-trimethylcyclo-  
hexane 342  
bisacodyl 340  
bishenol A 89  
 $\beta$ -blockers 349  
bone marrow origin 341  
bradykinin 336  
brain infarction 337  
bromine 108  
BSA 318  
buckwheat 350  
butyl benzyl phthalate 353

## C

C60 329  
*c-myc* 344  
 C-nitroso compound 361  
 Ca<sup>2+</sup> signals 330  
 cadmium 328  
 calcium 324, 362  
 calcium oscillation 341, 342, 343  
 calibration absorbance 315  
 calibration wavelength 315  
 calvasterone 320  
*calvatia cyathiformis* 320  
*Campylobacter* 360  
 capillary electrophoresis 324, 330  
 carbon tetrachloride 327  
 carcinogenecity test 363  
 carcinogenesis 361  
 carcinogenicity 340  
 carcinogenicity study 342  
*cardenolides* 355  
 carmine 328  
 causative chemical investigation 321  
 CCBI → Critical Covalent Binding Index 17  
 cell attachment 323  
 cell bank 345, 365  
 cell culture(s) 344  
 cell culture technology-derived drug 316, 357  
 cell indentification 365  
 cell proliferation 335  
 cell suspension culture 329  
 cell transformation 344, 360  
 cellulose acetate strip electrophoresis 327  
 central nervous system tumors 337  
 CEN 358  
*Cephaelis ipecacuanha* 354  
 chaconine 359  
 chemical assay 320  
 chemicals 363  
 chemiluminescence 326  
*chenopodium ambrosioides* 320  
 cherry 328  
 chicken meat (Chicken meat) 333, 360  
 chiral derivatization 284  
 chitin 365  
 chitosan 348, 365  
 chloroacetaldehyde 339  
 3-chlorodibenzofuran 338  
 cholic acid 331  
 cholinesterase 40  
 chondroitin sulfate 326  
 chromosome aderration 347  
 chromosome painting method 347  
 chronic progressive nephrosis 335  
 clinical chemistry 358

clinical test 363  
*cnidium officinale* 319  
 coagulation method 351  
 coal-tar dye 152  
 cocaine 316  
 Cochineal 48  
 colony assay 323  
 colorimetry 128  
 column chromatography 351  
 column miniaturization 325  
 combined effect 343  
 compensative effect 97  
 compressed tablets 348  
 conjugation 345  
 constant neutral loss 118  
 contact dermatitis 322  
 contact sensitivity 323  
 content uniformity test 200  
 conversion 318  
 conversion mechanism 318  
 costunolide 354  
 covalent binding 317  
 criteria document 334  
 Critical Covalent Binding Index → CCBI 17  
 crops 333  
 cross-sensitivity 323  
 crown-gall 354  
 crystallization 314, 315  
 cucumopine 328  
 cultured coptis cells 319  
 cyanocobalamin 170  
 cyclandelate 185  
 cyclopentanone 108  
 cyclosporin 299, 309  
 cytochrome P-450 331  
 cytotoxic potential 323  
 cytotoxicity 322

## D

D-glycero-D-manno-heptose 332  
 data sheets 138  
 database 334  
 DBD-F → 4-(N, N-dimethylaminosulphonyl)-7-fluoro-2, 1, 3-benzoxadiazole 112  
 decoction 319  
 degradation rate 314  
 dehydrocostuslactone 354  
 delayed neurotoxicity 339  
 dermatan sulfate 327  
 determination 355  
 developmental toxicity 352, 353  
 dexamethasone 167  
 di-*n*-butyl phthalate 352  
 dibenzofuran 338  
 dibutylphthalate 327

- dichlorvos(DDVP) 351  
differential analysis 358  
4-(N,N-dimethylaminosulphonyl)-7-fluoro-2,1,  
3-benzoxadiazole → DBD-F 112  
dimethylsulfoxide 324  
dioxirane 280, 329  
4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline-disulfonic  
acid 352  
direct injection analysis 330  
discrimination of deprenyl in hair 356  
disorder of central nervous system 71  
disorder of spermatogenesis 71  
dissolution 313  
dissolution test 319  
dissolution testing 325  
DMPO-CH<sub>3</sub> 328  
DNA adducts database 17  
DNA damage 335  
DNA fingerprint 344  
DNA profiling 365  
domoic acid 359  
dopamine release 336  
Drinking Water Standard 1  
drug delivery system 314  
drug disposition 356  
drug test 355  
drugs of abuse 356
- E**
- EC directives 358  
ECD gas chromatography 108  
EHC → Environmental Health Criteria 134  
ELISA 354  
Elcatonin 161  
electrokintec chromatography 324  
emetic alkaloid 354  
EN 322  
endogenous N-nitrosation 361  
endogenous nitric oxide formation 361  
endothlin 336  
endotoxin 331, 360  
enteric bacteria 333  
Environmental Health Criteria → EHC 134  
environmental level 359  
enzyme induction 331  
EPA guideline 362  
epoxy resin 321  
2,3-epoxy-4-hydroxynonanal 342  
equivalence evaluation 319  
erythropoietin 317  
esophageal tumorigenesis 339  
essential oil production 354  
essential requirements 358  
estradiol 179  
estrogen 343
- ethanol 339, 348  
ethane-1,2-dimethanesulfonate 364  
etheno adduct 339  
1-ethyl-1-nitrosourea 357  
ethyl-nitrosourea 337  
ethylenediaminetetraacetic acid 352  
ethylenethiourea → ETU 147  
etrimfos 350  
etrimfos oxon 350  
ETU → ethylenethiourea 147  
excipient 365  
excretion into beard 316  
exposure 359  
exposure assemet 1  
eye irritation 322
- F**
- FAO/WHO 360  
farmland soil 333  
fatty acids 331  
feed for experimental animal 128  
ferric ion 128  
ferrous ion 128  
floor polisher 27  
florisil minicolumn 102  
fluorescence in situ hybridization 347  
4-fluoro-7-nitrobenzohurazan → NBD-F 112  
food(s) 349, 350, 359  
food additive 64  
food color 152  
food poisoning 315  
Food Red No. 40 327  
formaldehyde(HCHO) 359  
fragmentation 118  
frameshift mutation 346  
freeze-dried 313  
freeze-drying 315  
fullerene 329  
FUMI 324  
fumonisin B<sub>1</sub> 112  
fumonisin B<sub>2</sub> 112  
functional observation battery 362  
functional tests 299  
fungicide 351  
*fusarium* 361
- G**
- $\beta$ -galactosidase 313  
GATT 366  
gap junctional communication 338  
gas chromatography 350, 351  
gastric carcinogenesis 340  
gastrointestinal medicine 356  
GC 319, 351  
GC/MIP/AED 326

GC/MS 327  
 gel permeation chromatography 348, 349  
 gene disruption 345  
 gene mapping 343  
 general requirements 204  
 genetic instability 344  
 genotoxicity 346  
 genotoxicity of 1-ethyl-1-nitrosourea 357  
 giant cell 131  
 glioblastoma 340  
 $\alpha$ 2u-globulin 335  
 glucosamine 348  
 glycoalkaloid 326  
 glycosaminoglycan 327  
 GMP 358  
 gonadectomy 335  
 granuloma tissue 319

**H**

HACCP 360  
 hair 316  
 hair analysis(Hair analysis) 316, 355, 356  
 hairy root 355, 366  
 halide ion 347  
 heat shock factor 353  
 heat shock protein 353  
 heparin 348, 349  
 herbmycin 330  
 Heterocyclic amine 340  
 hickory smoke condensate 340  
 High Performance Liquid Chromatography →  
 HPLC 112, 286, 317, 318, 325, 331, 356, 357  
 high-Km aldose reductase 318  
 hippocampus 336, 362  
 histiocytic sarcoma 341  
 historical control 364  
 HIV 131  
 HIV-1 361  
 honey 315  
 host range 333  
 HPLC → High Performance Liquid Chromatography 112, 286, 317, 318, 325, 331, 356, 357  
 HPLC analysis 284  
 HPLC-ICP 328  
 human cells 344  
 human genetics 343  
 human growth hormone 317, 357  
 Human Insulin 155  
 human lymphocyte 347  
 hyaluronic acid 326, 327  
 hydroxyl radical 328  
 2-(2'-hydroxy-5'-methylphenyl) benzotriazole 323  
 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide 339  
 8-hydroxydeoxyguanosine 362

8-hydroxyguanine 17  
 hyocholic acid 353  
*Hyoscyamus muticus* 355  
 hypoallergenic glove 321

**I**

ICH 357  
 ICMSF 360  
 ICSC → international chemical safety cards 143, 334  
 2-imidazolidinethione 147  
 2-imidazoline-2-thiol 147  
 immortalization 344  
 immunoaffinity column 326  
 Immunoglobulin E 330  
 immunohistochemistry 304  
 immunotoxicity 299, 304, 309  
 implantation 323, 324  
 imported beef 102  
 imported food(s) 359, 360, 366  
 imported food safety 359  
*in vitro* assay 360  
*in vitro* bioassay 202, 317  
 Inc11 345  
 incorporation rate 316  
 incorporation rate into hair 356  
 industrial chemicals and pesticides 334  
 industrial rubber product 320  
 information theory 286, 324, 325  
 infrared reference spectra 347  
 infrared spectrophotometry 347, 365  
 injections 317  
 insecticide 322  
 inspection 359  
 interdigitation 348  
 intermediates 350  
 international chemical safety cards → ICSC 143, 334  
 international programme on chemical safety →  
 IPCS 134, 143, 334  
 intracellular Ca concentration 362, 363  
 intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration 336  
 ion channels 336  
 ion chromatography 350  
 ion pair high performance liquid chromatography 354  
 IPCS → international programme on chemical safety 134, 143, 334  
 iron lactate 128  
 ISO 358  
 ISO/TC194 358  
 ISO9000 358  
 isolation of micronuclei 347  
 isopropyl p-hydroxybenzoate 82

## J

japanese pharmacopeia (Japanese Pharmacopeia) 316, 347, 365  
JP 199  
JP Reference Standard 167, 170, 175, 183, 185, 192

## K

K channels 337  
K-ras mutations 340  
K-value 333  
Kalman filter 324  
KBrO<sub>3</sub> 335  
ketchup 326

## L

L-glycero-D-manno-heptose 332  
L-histidine monohydrochloride 57  
labeled diphenyl 317  
*lacZ* 346  
*lacZ* mutation 364  
lanthanum chloride 324  
LEC rat 330  
light compensation point 97  
light saturation point 97  
light scattering 349  
*ligusticum wallichii* 319  
limited spearman-karber procedure 358  
*Limulus* test (limulus test) 209, 332  
lipid A 331  
lipid peroxidation 342  
liposome 348  
lipstick 320  
Lipsthol Rubine BCA 320  
liquid paraffin 64  
liquid secondary ion mass spectrometry → LSIMS 118  
lithol rubine BCA 322  
*lithospermum erythrorhizon* 319  
liver fluke 361  
liver injury 27  
Limited Spearman Karber Procedure → LSKP 322  
*Lobelia sessilifolia* 355  
local lymph node assay 323  
LPS 332  
LSIMS → liquid secondary ion mass spectrometry 118  
LSKP → Limited Spearman Karber Procedure 322  
lucidin-purine base adducts 328  
luteoskyrin 328  
lymph node 301  
lymphocyte proliferation 323

Lysozyme 357

## M

MAA 318  
*Macrotomia euchroma* 319  
macrophage 298, 311, 360, 361  
magnesium nitrate 315  
malathion 359  
male reproductive toxicity 364  
material safety data sheet → MSDS 138  
Maximum Tolerable Dose → MTD 64  
medical device 358  
medicinal plant 366  
megakaryocyte 342, 343  
membrane 365  
memory/learning 363  
mercury 328  
metabolism of deprenyl 356  
metabolite 350  
metal 330  
metallothionein 330  
methamphetamine abuse 316  
methylnitrosourea 343  
microbial limit tests 206  
microbial tests 206  
microcalorimetry 314  
micronucleus assay 364  
micronucleus test 343  
microplate method 131  
microscopic characteristic 355  
microsphere-embolism 337  
microspheres 314  
mikimopine 328  
MNNG 340  
MNU 340  
modified Rankine-colorimetry 349  
molecular weight 348  
monoclonal antibody 339  
morphology 354  
morphometry 339  
mouse (mice) 89, 323  
mouse centromeric DNA probe 347  
mouse ear swelling test 323  
MSDS → material safety data sheets 138  
MTD → Maximum Tolerable Dose 64  
*mucAB* 346  
murichoric acid 353  
musk xylene 331  
mycoplasma contamination 344, 345  
mycotoxins 320

## N

NACCS 360  
NAT2 345  
NBD-F → 4-fluoro-7-nitrobenzohurazan 112

naled 351  
 nephrotoxicity 328  
 neurotoxicity 362  
 neurotransmission 336  
 neurotransmitter 337, 362  
 neurotransmitter release 336  
 nickel sulfate 324  
 nicotinic receptor-channels 337  
 NIEHS 334  
 NIHS Reference Standard 155, 161, 179, 188, 196  
 nitrate 349, 366  
 nitric oxide 360  
 nitrite 349  
 nitroarene(s) 329, 364  
 nitrobenzene 71  
 nitroreductase 347  
 NO radical 360  
 NO-donor 360  
 non-mutagenic carcinogen 362  
 non-synthetic food additives 359  
 norephedrine enantiomers 289  
 norepinephrine 336

## O

*O*-acetyltransferase 345  
*O*-specific chain 332  
*O*<sup>4</sup>-alkylthymine 17  
*O*<sup>6</sup>-alkylguanine 17  
 occupational contact dermatitis 321  
 official inspection 152  
 oil refining 326  
 oncogene 334  
 opine 328  
 optical isomer 284  
 Optical resolution 325  
 optimization 286, 325  
 organic acid 328  
 organic carbon 356  
 organochlorine pesticides 102  
 organophosphorous insecticide 338  
 organophosphorus pesticides 102  
 organotin compounds 326  
 orphan drug 315  
 orthophosphate ion 350  
 oxidative DNA damage 362  
 OXONE 329  
 oxysterol 338  
 oxytocin 318

## P

*p*-dichlorobenzene 335  
*p-tert*-butylphenol formaldehyde resin (novolak type) 353  
*Paeoniae Radix* 355  
 paint 321

*Papaver somniferum* 97  
 paper bag for electric vacuum cleaner 322  
 para-tertiary butylphenol formaldehyde resin 321  
 paralytic shellfish poison 359  
 parenteral drugs 209  
 patch test 322  
 PCNA 342  
 peptide 118  
 peroxisome proliferator 331  
 pertussis toxin 336  
 pesticide(s) 326, 350, 351, 359, 366  
 pesticide residue 326  
 pH 343  
 phagocytosis 298, 311  
 pharmaceutical materials 365  
 pharmacokinetic parameters 349  
 pharmacokinetics 289  
 pharmacological effect 319  
 pharmacopoeia 315, 347  
 pharmacopoeia drug 316  
 Pharmacopoeia of Japan 199, 200, 204, 206  
 phenylbutazone 341  
 phosphorus 324  
 phosphorylation 353  
 photosynthetic rate 97  
 phoxim 40  
 PHP-Sephadex LH-20 331  
 physico-chemical assay 202  
 plant cell culture 319  
 plant tissue culture 359  
 plant-derived food additives 359  
*Plantago* seed 355  
*Plantago* spp. 354  
 plasmid 345  
 plastic container 204  
*Poa cynosuroides* 354  
 polyacetylene 355  
 polymer 365  
 polymerase chain reaction 344  
 polymorphism 345  
 polysaccharide 365  
 polyurethane 324  
 polyvinylpyrrolidone 329  
 positive selection 364  
 post-harvest pesticide 351, 366  
 postharvest application 350  
 postharvest applied pesticides 351  
 potentiometric titration 347  
 Potatoes 359  
 powdered milk 326  
 PP1γ2 318  
 preclinical test 358, 363  
 prediction 313  
 primary cultured hepatocytes 338



production source 359  
progesterone 175  
proliferating cell nuclear antigen 304  
promoting effect 341  
Prostaglandin 360  
protein drug 202  
provision rationing law 366  
pulmonary squamous cell carcinoma 340  
pyrethroids 351

## Q

quality control(s) 333, 345  
quality evaluation 155, 161, 167, 170, 175, 179, 183,  
185, 188, 192, 196  
quantitative risk assessment 361  
quinone 329

## R

rapid assay 357  
rat(s) 27, 40, 48, 57, 64, 71, 82, 309, 339, 340, 341  
rat iris-ciliary body 336  
rat pancreas 339  
recombinant DNA 332  
*regenerated plants* 355  
regulatory science 1, 356  
Residual Pesticide 359  
restriction endonuclease 332  
reticulocytes 317  
reversed micelle 314  
revision of Pharmacopoeia 199  
revision proposal 365  
rice 351, 366  
risk assessment 1, 334, 363  
risk communication 334  
rubber additive 320, 321  
rubber footwear 320  
rubber product(s) 320, 321, 322  
*Rubia tinctorum* 328  
Russian vodka 327

## S

safety 315, 359  
safety document 138, 334  
*Salmonella* 360  
*Salmonella typhimurium* 345, 364  
*Salmonella typhimurium* NM3009 346  
salt 313  
*samAB* 346  
sample pretreatment 330  
Saussurea lappa 354  
scenario-based analysis 361  
screening assessment 334  
screening test 356  
ScrFI neoschizomer 332  
secondary metabolite production 366

selective analysis 358  
selective isolation 333, 361  
sensitization study 301  
sensitization test 323  
sesquiterpene 329  
silica gel minicolumn 102  
simultaneous administration 48  
site-directed mutagenesis 317, 337  
skin and eye irritation 334  
skin carcinogenesis 334  
SMCP → Stumbo Murphy Cochran Procedure  
322  
smooth muscle 341  
sneaker 321  
sodium lauryl sulfate 324  
soil borne fungi 361  
solanine 359  
solid phase extraction 358  
solid state 314  
solvent extraction 358  
soybean oil 326  
soybean trypsin inhibitor 339  
species difference 363  
spectrophotometry 315, 352  
sperm granulomas 57  
spermatogenesis 318  
spin-lattice relaxation time 314  
ST638 330  
stability 313, 314  
stability prediction 314  
stabilization 315  
standard reference materials 322, 323  
standards of crude drugs 357  
*Staphylococcus aureus* 360  
starting materials 350  
statistical basis 200  
stereoselective disposition 289  
stereoselective epoxidation 280, 329  
stereoselectivity 349  
sterility tests 206  
steroid 320  
*Strophanthus divaricatus* 355  
structure-mutagenicity relationship 328  
stumbo-murphy cochran procedure 358  
subchronic toxicity study 27, 48, 57, 64, 82, 89  
subsidiary dye 327  
sulfite 349  
sunset yellow FCF 350  
superoxide 329  
superoxide dismutase 348  
superoxide radical 311  
surfactants 365  
survival curve method 358  
sympathetic neurons 337  
synergism 343

## T

tableware 359  
tannin 355  
taxonomy 333  
teratogenicity 338, 352, 353  
terpen 319  
testicular toxicity 364  
testosterone propionate 196, 317  
tetramethylthiuram monosulfide 321  
Tap Water Quality 1  
thapsigargin 341  
thiamine hydrochloride 192  
tinuvin 323  
tissue response 323  
TLC 327  
TNF 331  
TNF synthesis 298  
TOC 356  
tofu 326  
tofu production 326  
tomatine 326  
tomato 326  
tomato juice 326  
toxicity test 363  
toxicology 334  
transgenic mouse(mice) 334, 364  
transplacental administration 337  
trend test 364  
tri-o-cresyl phosphate 339  
tributoxyethyl phosphate 27  
trichothecene 361  
trifluoroacetylation 353  
tropene alkaloid 355  
tropical diseases 315  
Trp-P-2 340  
tumor promoter 360  
tumor-initiation 342  
twenty-eight-day repeated dose toxicity study

40, 71

two-stage carcinogenesis model 341  
tyrosine-O-sulfate 118

## U

umu test 346, 365  
*umuDC<sub>ST</sub>* 346  
urine analysis 355  
urolithiasis 340  
uterine tumor 343  
UV mutability 346

## V

*V. parahaemolyticus* 332  
valerian 319  
validation characteristics 356  
validation of analytical procedures 356  
vamidothion 350  
variable requirement 200  
vegetable 366  
*Vibrio cholerae* 332  
*Vibrio parahaemolyticus* 360  
viral cotamination 344  
viral safety 316  
viral test 316  
viral validation 316, 357  
VNTR 343  
voltage-sensor 337

## W

water for injection 356  
water mobility 313, 314  
WBN/Kob rats 340  
weight variation test 200

## Z

zearalenone 331  
zinc finger 361

# 衛生試験所報告への投稿について

## 投 稿 規 定

1. 投稿資格：国立衛生試験所所員とする（共著者はこの限りでない）。
2. 内 容：原稿は報文、ノート、資料とする。そのほか誌上发表、単行本、行政報告、学会発表、業務報告、総説などを掲載する。
  - 報 文：独創性に富、新知見を含むまとまった研究業績。
  - 研究に関する研究：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。
  - 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。
  - 標準品に関する資料：標準品に関する試験、製造または調査などで、記録しておく必要のあるもの。
  - ステートメント：学会等の発表および会議内容の記録。
  - 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：原則としてA4用紙（40字×25字）を用いる。原稿の長さは表、図、写真を含め刷り上がりページ数で下記の規定に従う（日本語および英語の場合、刷り上がり1ページはそれぞれA4用紙約2枚および約3枚に相当。表、図、写真は平均して各2枚がA4用紙1枚分として概算）。
  - 報 文：8ページ以内。
  - ノートおよび資料：5ページ以内。
  - ステートメント：2ページ以内。
  - 総 説：原稿を依頼するとき別に定める。
  - 誌 上 発 表：一題目について要約部分が500字以内。
  - 業 務 報 告：各部および各薬用植物栽培試験場について2ページ以内。
4. 原稿の提出：原稿は表紙（第1ページとする）、英文要旨、本文、文献、英文要旨の和文（参考）、最後に図表を入れた封筒の順に左上をひもなどでとじ、表紙右上に報文、ノート、資料のうち希望する分類を朱書きし、所長宛の報告書を表紙の上に添えて、定められた原稿の切期日までに図書係宛に提出する。
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、新おくりがなの、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、タイプライターあるいはワードプロセッサを用い、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：次の例示のほかの慣例に従う。また、物質名あるいは分析法などを略記するときは、

和文、英文とも最初は正式な名称とともに示す。例えば、イソニコチン酸 (INA)、示差熱分析法-ガスクロマトグラフィー (DTA-GC) と書き (以下 INA と略す)、などとしなない。

3.1 単位のべき指数表記には、次の記号を用いる。

テ	ラ (tera)	$10^{12}$	T	ミ	リ (milli)	$10^{-3}$	m
ギ	ガ (giga)	$10^9$	G	マイクロ	(micro)	$10^{-6}$	$\mu$
メ	ガ (mega)	$10^6$	M	ナ	ノ (nano)	$10^{-9}$	n
キ	ロ (kilo)	$10^3$	k	ピ	コ (pico)	$10^{-12}$	p
デ	シ (deci)	$10^{-1}$	d	フェムト	(femto)	$10^{-15}$	f
セン	チ (centi)	$10^{-2}$	c	ア	ト (atto)	$10^{-18}$	a

3.1 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(セルシウム)	°C	parts per billion	ppb
マイクロメートル	$\mu\text{m}$	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
( $m\mu$ を用いない)		カウント毎分	cpm	施光度	$\alpha$
オングストローム	Å	(cps を用いない)		吸光度	A
平方メートル	$\text{m}^2$	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	Km
(L を用いない)		サイクル	cycle	Rf 値	Rf
ミリリットル	ml	回毎分	rpm	保持時間	tr
(cc を用いない)		ヘルツ	Hz	50%致死量	LD <sub>50</sub>
マイクロリットル	$\mu\text{l}$	キャンドラ	cd	50%有効量	ED <sub>50</sub>
( $\lambda$ を用いない)		ルクス	lx	経口投与	p. o.
立法メートル	$\text{m}^3$	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	$\mu\text{g}$	トル	Torr	皮下投与	s. c.
( $\gamma$ 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	$\text{cm}^{-1}$	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	$\Omega$	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	%	施光分散	ORD
ジュール	J	容量/重量パーセント	v/w%	円偏光二色性	CD
カロリー	cal	parts per million	ppm	マススペクトル	MS

4. 句読点: , . を用い、, 。 としない。

5. 数字: アラビア数字を用いる。千の単位にコンマをつけない。ただし、成語となっている数字は漢字とする。

6. 字体の指定: 文字の下に赤で次のように記す。

ゴ ッ シ ャ 体~~~~~例: 見出しなど 試薬  
 イ タ リ ッ ク 体———例: 学名など Papaver somniferum L.  
 スモールキャピタル=====例: 著者名など L-ascorbic acid

## 7. 報文、ノート、資料、ステートメントの記載要領：

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）をこれを当てる。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、ワードプロセッサあるいは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 キーワード：

1) キーワードは英語（必要に応じ、ラテン名）とし、選定数は5個以内とする。

2) 英文要旨のあと2行あけて“Keywords”の項目をつける。固有名詞、略語を除き、小文字で記すこと。各キーワードはカンマで区切り、続けて記載すること。

3) 単語、句、略語のいずれを用いてもよい。特殊な場合（例：tablets）を除き、単数形とする。また、冠詞はつけない。

7.5 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。

7.6 文献：本文の引用箇所の右肩に<sup>3)</sup>, <sup>2,5)</sup>, <sup>1-4)</sup>のように記し、終わりに文献として引用順に書く。雑誌名はChemical Abstracts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。

7.7 図表：図、写真、表は本文とは別にし、それらのそう入位置を本文の左欄に朱筆する。図、表は原則として英語で書く。図は白紙あるいは青色方眼用紙に2倍程度の大きさに黒で鮮明に描く。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。表は1ページにおさまるように作る。

図の番号はFig. 1., Fig. 2., …とし、表題、説明は別のA4用紙にまとめて書く。表中の項目に関する注は右肩に<sup>a)</sup>, <sup>b)</sup>, …のように記して表す。なお、表題、説明も原則として英語で書き、表題は大文字ではじめ、最後に.をつけない。

例：Fig. 1. Influence of enzyme concentration on reductive suger production

Fig. 2. Reaction of ephedrine and pseudoephedrine with acetone as a function of time

図および表は、その裏に番号、題名、著者、本文中の挿入ページを記す。また、電子顕微鏡写真には希望する縮尺を記入する。提出するときは一括して封筒に入れ、そのおもてに論文題名、著者名、ならびに図、表のそれぞれの枚数を記し、原稿の最後にとじる。

8. 誌上発表等の記載要領：誌上発表、単行本、行政報告、学会発表については、別に定める記載要領および例示に従う。

## 校 正

初校は著者が行う。人名、化学名、数値、文献などは特に綿密に校正する。内容の追加、行数の増加は認めない。

国立衛生試験所図書委員会

平成6年度図書編集委員

寺尾 允 男	*高橋 道人	神 沼 二 眞	最 所 和 宏
*内 田 恵理子	小 野 景 義	林 護	関 田 寛
根 本 了	*河 村 葉 子	丹 野 雅 幸	手 島 玲 子
嶺 岸 謙一郎	*棚 元 憲 一	津 田 充 宥	小野田 欽 一
*川 西 徹	山 田 雅 巳	*鎌 田 栄 一	*四方田 千佳子
酒 井 英 二	*遠 山 中 夫	*藤 井 厚 美	

(\*は編集委員)

衛生試験所報告 第112号

平成6年10月25日 印刷

平成6年10月30日 発行

発行所 国立衛生試験所化学物質情報部  
東京都世田谷区上用賀1丁目18番1号

印刷所 サンコー印刷株式会社  
東京都文京区小石川2-25-12-903