

ISSN 1343-4292  
CODEN : KISHFC

# 国立医薬品食品衛生研究所報告

平成9年

---

## Bulletin of National Institute of Health Sciences

No.115

1997

---



国立医薬品食品衛生研究所

国立医薬品食品衛生研究所報告第115号正誤表

ページ	位置, 行	誤	正
197	Fig. 1 y 軸	Adsorbance	Absorbance
210	Fig. 3 説明 左下 脚注	Thin-ayer 記載もれ	Thin-layer To whom correspondence should be addressed: Yoshiyuki Ogawa; Hoenzaka 1-1-43, Chuo-ku, Osaka 540, Japan; Tel: 06-941-1533; Fax: 06-942-0716; E-mail: ogawa@nihs.go.jp
263 304	下表内上 7 左上 32, 34, 38, 42	村井 真実 Sep-Pak <sup>®</sup> C <sub>18</sub>	村井 真美 Sep-Pak <sup>®</sup> C <sub>18</sub>

# 国立医薬品食品衛生研究所報告

平成 9 年

---

## Bulletin of National Institute of Health Sciences

No.115 1997

Published by  
National Institute of Health Sciences  
Tokyo, Japan

---

国立医薬品食品衛生研究所

## ま え が き

厚生省の薬事行政組織の再編と試験研究機関の重点整備・再構築の一環として、医薬品や食品等の品質、安全性、有効性に関する国における調査研究を総合的に推進するとともに、医薬品、医療機器等の承認審査を独立強化するために、平成9年7月1日をもって国立衛生試験所を改組し、名称を国立医薬品食品衛生研究所（略称：国立衛研）と改めた。同時に、当所は医薬品医療機器審査センターを組織の1つとして新設し、審査体制の充実強化を図るとともに、医薬品等の安全性の一層の確保と健康被害の再発を防止を目指している。

最近では医薬品、食品、生活環境など広範囲な分野において安全性が最重要課題となり、国民の関心も極めて高い。これまで、国立衛生試験所では医薬品や食品のほか、生活環境中に存在する種々の化学物質について、品質、安全性及び有効性を評価するための試験、研究並びに調査などを行ってきたが、国立医薬品食品研究所においても引き続きこれらの研究を継続し、更に発展させる所存である。

一方、医薬品医療機器審査センターでは医薬品等の治験から承認審査・市販後に至るまで一貫した審査を、薬学、医学、獣医学、統計学等の専門の審査官による多面的な検討を通じて行う「チーム審査」で実施することとした。

我々は研究と審査という2つの使命を担うこととなったが、これらの業務はすべて国民生活に密接に関係したものである。医薬品の審査にあたっては、研究部門と審査部門はよく協調しあい、最先端の科学に立脚した審査を行うとともに、研究においても社会のニーズを十分認識し、その成果を厚生行政を通じて国民の健康と生活環境の維持向上にこれまで以上に役立たせるよう努力したい。

衛生試験所報告は、本号から国立医薬品食品衛生研究所報告と名称のみを変更し、巻号は第115号とし従来からの継続性を持たせることとした。

平成9年12月

国立医薬品食品衛生研究所  
所長 寺尾 允 男

## 目 次

## 国立医薬品食品衛生研究所報告第115号第一部

## 特論

ICH-トキシコネティクスガイダンスの意義とその実際 —より安全な医薬品の開発を目指して—

.....津田充宥・大野泰雄..... 1

行政の健康危機管理に対応した研究情報基盤の構築について.....神沼二眞.....15

## 総説

細胞表面におけるヒト成長ホルモン受容体レベルの制御機構に関する研究.....齋藤嘉朗.....27

一酸化窒素を遊離するN-ニトロソ化合物の研究.....末吉祥子・丹野雅幸・宮田直樹.....40

プリン受容体による巨核球の細胞質カルシウムオシレーション.....畝山智香子.....49

ニトロ多環芳香族炭化水素の酸化と還元：毒性発現機構の解析.....福原 潔・宮田直樹.....72

## 原著論文

89農薬の有機溶媒中での安定性について.....根本 了・高附 巧・佐々木久美子・豊田正武.....86

カロブ色素のF344ラットを用いた13週間亜慢性毒性試験

.....高田幸一・豊田和弘・正田俊之・畝山智香子・田村 啓・高橋道人.....93

ファフィア色素の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・竹川 潔・高橋道人.....99

アミノ酸加熱分解産物 MeIQ<sub>x</sub> のラットにおける16週間混餌投与の影響

.....笠原健一郎・古川文夫・西川秋佳・田中丸善洋・金 亨津・池崎信一郎・高橋道人... 107

マグネシウム欠乏の栄養生理学的研究 —特に超微形態学的検討—

.....池田尚子・木村修一・今沢孝喜・西川秋佳・高橋道人... 112

ペクチン分解物のラットにおける13週間亜急性毒性試験

.....高木久宜・安原加壽雄・三森国敏・小野寺博志・竹川 潔・高橋道人... 119

## ノート

食品添加物公定書に記載される *d*-ボルネオールの立体構造の確認について

.....江崎勝司・関田節子・川原信夫・代田 修・鎌倉浩之・佐竹元吉... 125

家庭用品に使用される化学物質の細胞毒性：平成3～8年度対象化学物質の眼刺激性の予測

.....五十嵐良明・土屋利江・中村晃忠... 130

分取HPLCおよびGC-ECDを用いたDeltamethrinおよびTralomethrinの分別定量法

.....高附 巧・根本 了・佐々木久美子・豊田正武... 135

ヒトインスリン製剤中のB3デスアミド体の液体クロマトグラフ法による分析

.....四方田千佳子・田頭洋子・宮崎玉樹・岡田敏史... 140

医薬品の乾燥減量試験及び水分含量測定への熱重量分析法の応用.....左 志輝・北島 文・谷本 剛・岡田敏史... 144

## 研究に関する資料

ミネラルウォーターの容器およびプラスチック等の混入異物に関する研究

.....河村葉子・杉田たき子・渡辺悠二・高野忠夫・板倉 武・池川豊吉・山田 隆... 147

エイズ医薬品候補スクリーニング研究 VIII. 1995年度報告

.....森下高行・小林慎一・佐藤克彦・栄 堅司・石川直久・小林伸好・野口有三・秋吉京子・

須賀知子・小川 淳・野呂新一・沢田春美・木村浩男・山田 明・石崎 徹・神村紀子・

岩島昭夫・小野哲郎・橋 宣洋・関根大正・大貫葉穂美・風間公夫・貞増健志・太田健爾・

工藤泰雄・斎藤隆行・衛藤繁雄・大竹 徹・森 治代・森本素子・上羽 昇・

千千和勝巳・森 良一・牛島廣治・森次保雄・西尾 治・三瀬勝利... 152

病原性大腸菌O-157を例とする健康被害分布図の作成とWWWによる提供 .....神沼二眞・蕪山典子・石川恵司... 155

WWWによる国際化学物質安全性カード(ICSC)日本語版の提供

.....山本 都・横手規子・森田真理子・中野達也・石川恵司・神沼二眞... 161

IPCS からコメントを依頼された環境保健クライテリア (EHC) のドラフトについて(1996年度) ……	大竹千代子…	166
平成8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・三島郁子・辻 澄子・柴田 正…	171
HPLC による食用アゾ色素中の未反応原料, 反応中間体および付随色素の定量法とその実態調査 ……………	石光 進・三島郁子・辻 澄子・柴田 正…	175
<b>標準品に関する資料</b>		
国立医薬品食品衛生研究所酒石酸水素エピネフリン標準品 (Control 951) ……………	北島 文・田頭洋子・前川京子・吉井公彦・小松裕明・谷本 剛・岡田敏史…	181
国立医薬品食品衛生研究所リボフラビン標準品 (Control 951) ……………	北島 文・田頭洋子・前川京子・吉井公彦・小松裕明・谷本 剛・岡田敏史…	184
国立医薬品食品衛生研究所エストラジオール標準品 (Control 961) ……………	北島 文・田頭洋子・前川京子・吉井公彦・小松裕明・谷本 剛・岡田敏史…	187
国立医薬品食品衛生研究所 dl-カンフル標準品 (Control 961) ……………	北島 文・田頭洋子・前川京子・吉井公彦・小松裕明・谷本 剛・岡田敏史…	190
国立医薬品食品衛生研究所酢酸クロルマジノン標準品 (Control 961) ……………	北島 文・田頭洋子・前川京子・吉井公彦・小松裕明・谷本 剛・岡田敏史…	193
国立医薬品食品衛生研究所酢酸ヒドロコルチゾン標準品 (Control 961) ……………	田頭洋子・北島 文・前川京子・吉井公彦・谷本 剛・岡田敏史…	196
国立医薬品食品衛生研究所ウリナスタチン標準品 (Control 971) ……	前川京子・谷本 剛・岡田敏史…	199
国立医薬品食品衛生研究所エンドトキシン標準品 (日本薬局方エンドトキシン標準品) (Control 971) ……………	村井敏美・中川ゆかり・宮脇英美子・小川義之・堀内善信…	202
<b>ステートメント</b>		
第13改正日本薬局方含量均一性試験および重量偏差試験の適用例および in-process tests としての可能性 ……………	香取典子・青柳伸男・小嶋茂雄…	204
分析機器における測定値の確からしさを知る方法について……………	林 譲・松田りえ子…	206
検量デザインと分析値精度の関係について……………	松田りえ子・林 譲・佐々木久美子・豊田正武…	208
非経口投与薬のエンドトキシン規格の設定方法案……………	小川義之…	210
サイズ排除クロマトグラフィーにおける分子量標準品に関する考察 —水溶性高分子における分子量標準品の統一化の可能性—……………	四方田千佳子・岡田敏史…	213
<b>国立医薬品食品衛生研究所報告第115号第二部</b>		
業務報告……………		217
誌上発表……………		265
単行本……………		318
行政報告……………		321
学会発表……………		327
レギュラトリーサイエンス関連会議報告……………		354
衛試例会……………		366
平成8年度に行った主な研究課題……………		370
国家検定及び検査等の処理状況……………		377
国立医薬品食品衛生研究所標準品……………		382
国立医薬品食品衛生研究所報告第115号キーワード索引……………		391

## CONTENTS

**Bulletin of National Institute of Health Sciences, No. 115, Part1****Special Reports**

- Significance of ICH-Toxicokinetics Guidance and its Practice -A useful approach for Safety drug development-  
 .....Mitsuhiro Tsuda and Yasuo Ohno..... 1
- Building Information Infrastructure at Research Institutions That Support Health Hazard Control...Tsuguchika Kaminuma.....15

**Reviews**

- Modulations of human growth hormone receptor level on the cell surface.....Yoshiro Saito.....27
- Study of *N*-Nitroso Compounds which have NO-Release Ability.....Shoko Sueyoshi, Masayuki Tanno and Naoki Miyata.....40
- Purinoreceptor-induced cytoplasmic calcium oscillation in megakaryocytes.....Chikako Uneyama.....49
- Oxidation and Reduction of Nitroarene as Environmental Mutagens.....Kiyoshi Fukuhara and Naoki Miyata.....72

**Originals**

- Studies on the stability of 89 pesticides in organic solvent  
 .....Satoru Nemoto, Satoshi Takatsuki, Kumiko Sasaki and Masatake Toyoda.....86
- A 13-week Subchronic Oral Toxicity Study of Carob Germ Colour in F344 Rats  
 .....Koichi Takada, Kazuhiro Toyoda, Toshiyuki Shoda, Chikako Uneyama,  
 Tohru Tamura and Michihito Takahashi.....93
- 13-week Subchronic Oral Toxicity Study of Phaffia Colour in F344 Rats  
 .....Hiroshi Onodera, Kunitoshi Mitsumori, Kazuo Yasuhara, Kiyoshi Takegawa and Michihito Takahashi.....99
- Effects of 16-week dietary administration of 2-amino-3, 8-dimethylimidazo[4, 5-f]quinoxaline in rats  
 .....Ken-ichiro Kasahara, Fumio Furukawa, Akiyoshi Nishikawa, Zen-yo Tanakamaru,  
 Hyoung-Chin Kim, Shinichiro Ikezaki and Michihito Takahashi... 107
- Effects of Dietary Magnesium Deficiency in the Rat: with Special Reference to Ultrastructural Examination  
 ..... Takako Ikeda, Shuichi Kimura, Takayoshi Imazawa, Akiyoshi Nishikawa and Michihito Takahashi... 112
- A 13-week Subacute Oral Toxicity Study of Pectin digests in Rats  
 .....Hisayoshi Takagi, Kazuo Yasuhara, Kunitoshi Mitsumori, Hiroshi Onodera,  
 Kiyoshi Takegawa and Michihito Takahashi... 119

**Notes**

- Stereochemical structure of *d*-borneol in "The Japanese Standards of Food Additives"  
 .....Katsushi Ezaki, Setsuko Sekita, Nobuo Kawahara, Osamu Shiota,  
 Hiroyuki Kamakura and Motoyoshi Satake... 125
- Cytotoxicity of chemicals used in household products: Estimation of eye irritating potency of 25 chemicals tested  
 during 1991-1996..... Yoshiaki Ikarashi, Yoshie Tsuchiya and Akitada Nakamura... 130
- Specific Determination of Deltamethrin and Tralomethrin by Preparative HPLC and GC-ECD  
 ..... Satoshi Takatsuki, Satoru Nemoto, Kumiko Sasaki and Masatake Toyoda... 135
- Analysis of B-3 desamido insulin in human insulin preparations by HPLC  
 ..... Chikako Yomota, Yoko Tagashira, Tamaki Miyazaki and Satoshi Okada... 140
- Application of Thermogravimetry to Loss on Drying Test and Water-content Determination of Drugs  
 ..... Zua Zhi Hui, Aya Kitajima, Tsuyoshi Tanimoto and Satoshi Okada... 144

**Technical Data**

- Studies on the Bottles of Mineral Water and the Foreign Plastic Like Substances  
 .....Yoko Kawamura, Takiko Sugita, Yuji Watanabe, Tadao Takano,  
 Takeshi Itakura, Toyokichi Ikegawa and Takashi Yamada... 147
- Preliminary Screening for Antiviral AIDS Drugs. VIII. Report for fiscal year 1995  
 .....Takayuki Morishita, Shinichi Kobayashi, Katsuhiko Sato, Kenji Sakae, Naohisa Ishikawa,

Nobuyoshi Kobayashi, Yuzo Noguchi, Kyouko Akiyoshi, Tomoko Suga, Atsushi Ogawa, Shinichi Noro, Harumi Sawada, Hiroo Kimura, Akira Yamada, Tohru Ishizaki, Noriko Kamimura, Akio Iwashima, Tetsuo ono, Nobuyoshi Tachibana, Hiromasa Sekine, Nahomi Ohnuki, Kimio Kazama, Kenji Sadamasu, Kenji Ohta, Yasuo Kudoh, Takayuki Saito, Shigeo Etoh, Tohru Ohtake, Haruyo Mori, Motoko Morimoto, Noboru Ueba, Katsumi Chijiwa, Ryouichi Mori, Hiroshi Ushijima, Yasuo Moritugu, Osamu Nishio and Katsutoshi Mise···	152
Development of a Geographical Information System and Its Application to <i>Escherichia</i> Coil O-157 Patient Distribution ····· Tsuguchika Kaminuma, Noriko Kabuyama and Keiji Ishikawa···	155
Dissemination of the Japanese version of the International Chemical Safety Card (ICSC) on the World Wide Web (WWW) ·····Miyako Yamamoto, Noriko Yokota, Mariko Morita, Tatsuya Nakano, Keiji Ishikawa and Tsuguchika Kamanuma···	161
First Drafts of the Environmental Health Criteria (EHC) Circulated for Comments by IPCS in 1996. 4~1997. 3 ····· Chiyoko Ohtake···	166
Estimated Production by the Official Inspection of Coal-Tar Dyes (including Dye Aluminum Lakes) in 1996. ····· Susumu Ishimitsu, Ikuko Mishima, Sumiko Tsuji and Tadashi Shibata···	171
Determination and Survey of Starting Materials, Intermediates, and Subsidiary Colors in Food Color of Azo Dye by High Performance Liquid Chromatography ····· Susumu Ishimitsu, Ikuko Mishima, Sumiko Tsuji and Tadashi Shibata···	175
<b>Reference Standard Data</b>	
Epinephrine Bitartrate Reference Standard (Control 951) of National Institute of Health Sciences ·····Aya Kitajima, Yoko Tagashira, Keiko Maekawa, Kimihiko Yoshii, Hiroaki Komatsu, Tsuyoshi Tanimoto and Satoshi Okada···	181
Riboflavin Reference Standard (Control 951) of National Institute of Health Sciences ·····Aya Kitajima, Yoko Tagashira, Keiko Maekawa, Kimihiko Yoshii, Hiroaki Komatsu, Tsuyoshi Tanimoto and Satoshi Okada···	184
Estradiol Reference Standard (Control 961) of National Institute of Health Sciences ·····Aya Kitajima, Yoko Tagashira, Keiko Maekawa, Kimihiko Yoshii, Hiroaki Komatsu, Tsuyoshi Tanimoto and Satoshi Okada···	187
<i>d/l</i> -Camphor Reference Standard (Control 961) of National Institute of Health Sciences ·····Aya Kitajima, Yoko Tagashira, Keiko Maekawa, Kimihiko Yoshii, Hiroaki Komatsu, Tsuyoshi Tanimoto and Satoshi Okada···	190
Chlormadinone Acetate Reference Standard (Control 961) of National Institute of Health Sciences ·····Aya Kitajima, Yoko Tagashira, Keiko Maekawa, Kimihiko Yoshii, Hiroaki Komatsu, Tsuyoshi Tanimoto and Satoshi Okada···	193
Hydrocortisone Acetate Reference Standard (Control 961) of the National Institute of Health Sciences ·····Yoko Tagashira, Aya Kitajima, Keiko Maekawa, Kimihiko Yoshii, Tsuyoshi Tanimoto and Satoshi Okada···	196
Ulinastatin Reference Standard (Control 971) of the National Institute of Health Sciences ····· Keiko Maekawa, Tsuyoshi Tanimoto and Satoshi Okada···	199
The Endotoxin Reference Standard of the National Institute of Health Sciences (the Japanese Pharmacopoeia Endotoxin Reference Standard) (Control 971) ····· Toshimi Murai, Yukari Nakagawa, Emiko Miyawaki, Yoshiyuki Ogawa and Yoshinobu Horiuchi···	202
<b>Statements</b>	
Exceptional Application of Content Uniformity Test and Weight Variation Test in The Japanese Pharmacopoeia 13 revision and Usage of these Tests for In-process tests····· Noriko Katori, Nobuo Aoyagi and Sigeo Kojima···	204



A Method for Knowing the Statistical Reliability of Instrumental Measurements.....	Yuzuru Hayashi and Rieko Matsuda...	206
Relationship between design of calibration and precision of measurement		
.....	Rieko Matsuda, Yuzuru Hayashi, Kumiko Sasaki and Masatake Toyoda...	208
A Proposal by the Japanese Pharmacopoeia for a Method to Set an Endotoxin Limit for Parenteral Drugs to be Tested		
.....	Yoshiyuki Ogawa...	210
Studies on the molecular weight standards for size-exclusion chromatograph		
-Standardization of a molecular weight standard for water-soluble polymers -.....	Chikako Yomota and Satoshi Okada...	213
 <b>Bulletin of National Institute of Health Sciences, No. 115, Part 2</b>		
<b>Annual Reports of Divisions</b> .....		217
<b>Summaries of Papers Published in Other Journals</b> .....		265
<b>Title of Scientific Books</b> .....		318
<b>Scientific Reports to Governmental Agencies</b> .....		321
<b>Titles of Speeches at Scientific Meetings etc.</b> .....		327
<b>Meeting Reports Related to Regulatory Science</b> .....		354
<b>NIHS Seminars</b> .....		366
<b>Main Research Projects Carried Out in Fiscal Year 1996</b> .....		370
<b>Survey of the Results of National Tests</b> .....		377
<b>Reference Standards Prepared by the National Institute of Health Sciences</b> .....		382
 <b>Subject Index</b> .....		391

## ICH—トキシコキネティクスガイダンスの意義とその実際 —より安全な医薬品の開発を目指して—

津田 充宥\*, 大野 泰雄

## Significance of ICH—Toxicokinetics Guidance and its Practice —A useful approach for safety drug development—

Mitsuhiro Tsuda\* and Yasuo Ohno

In the International Conference on Harmonization (ICH), "Note for Guidance on Toxicokinetics: the Assessment of Systemic Exposure in Toxicity Studies (ICH Harmonized Tripartite Guideline) was signed off in October 1994 by 6 parties of Japan, EU and the United States. The Ministry of Health and Welfare, Japan, has issued the notification "Upon the Guidance for Toxicokinetics (Assessment of Systemic Exposure in Toxicity Studies)" (Yakushin No. 443 dated July 2, 1996). The notification stated that pivotal toxicity study which initiates on and after January 1st, 1997 should include appropriate Toxicokinetic study.

In the ICH Guidance for pharmaceuticals, TK is defined as the generation of pharmacokinetic data, either as an integral component in the conduct of non-clinical toxicity studies or in specially designed supportive studies, in order to assess systemic exposure. These data may be used in the interpretation of toxicology findings and their relevance to clinical safety issues. TK study is considered to be indispensable for safety assessment, and thus should be conducted in compliance with the GLP regulations. The ICH guidance also emphasizes that the exposure assessment in individual toxicity studies should be based on a flexible and step by step and a case by case decision making process.

In this review article, the background for the introduction of this TK Guidance, the outline of the ICH-TK Guidance, the definition and fundamental principles of the ICH-TK, and its toxicological significance and practical problems in the conduct of TK study are described.

**Keywords:** ICH-TK Guidance, toxicity study, concomitant toxicokinetics, systemic exposure, GLP compliance

(Received May 30, 1997)

### 1. はじめに

1994年10月27日に日米欧、三極の産官はICH (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 医薬品規制ハーモナイゼーション国際会議) の場でトキシコキネティクス (TK) に関するガイダンス<sup>1)</sup>に合意した (Step 4, 註1)。我が国でもその内容が平成8年 (1996) 7月2日に厚生省薬務局審査課長より薬審第443号<sup>2)</sup>として通知され, 平成9年1月1日以降に開始される主要な毒性試験についてはTKを適切な形で組み込んで実施することが, 原則として必要となった。

本稿では, このICH-TKガイダンスの内容を紹介し, その成立背景, 合意にいたる経緯, その意義と実施における諸問題などについて概説する (註2)。

### 2. ICH-TKガイダンスを策定することとなった背景

医薬品開発における動物実験の目的は, 当該医薬品の臨床効果を裏付ける薬理作用以外に, その臨床用量と関連して, ヒトに対してどのような副作用を, どのような用量, 暴露経路, 暴露時間で発現するかを推定するために実施するものであり, その結果から

- 1) 無毒性用量 (NOAEL)
- 2) 最小毒性発現用量 (LOAEL)
- 3) 毒性の種類
- 4) 標的臓器
- 5) 毒性発現における用量依存性

などが明らかにされると共に, 場合によっては発現した毒性の可逆性 (回復性) も検討される。従来, このような実験動物を用いた毒性試験の結果から得られた無毒性用量 (mg/kg, 体重) を臨床用量 (mg/kg, 体重) で割ることにより安全域 (Safety Margin) を算定し, 医薬品の安全性評価の目安としてきた (Fig.1)。

化学物質の毒性発現においては個体差, 性差, 系統差や

\* To whom correspondence should be addressed: Mitsuhiro Tsuda; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo 158, Japan; Tel: 03-3700-9762; Fax: 03-3707-6950; E-mail: mtsuda@nihs.go.jp

$$\text{安全域 (用量/体重)} = \frac{\text{無毒性用量 (mg/kg)}}{\text{臨床用量 (mg/kg)}}$$

又は

$$\text{安全域 (用量/体表面積)} = \frac{\text{無毒性用量 (mg/m}^2\text{)}}{\text{臨床用量 (mg/m}^2\text{)}}$$

↓

$$\text{安全域 (血中濃度)} = \frac{\text{無毒性用量時の血中濃度 (Cmax, AUC)}}{\text{臨床用量時の血中濃度 (Cmax, AUC)}}$$

Fig. 1. 医薬品の安全域

Table 1. 毒性応答に影響を及ぼす因子

遺伝的因子：種，系統，性，個体
生理学的因子：年齢，時刻，妊娠，ストレス・・・
病理学的因子：疾患（肝障害，腎障害，・・・）
環境因子：温度，音，明暗，ケージ内動物数など
薬剤学的因子：安定性，溶媒（水性，油性，pH，・・・）
投与形態（液，粉，錠剤，カプセルなど）
懸濁液中の粒子径，結晶形など
実験的因子：投与経路，投与速度，投与容量，混餌，強制，
摂餌，絶食
薬物相互作用：例，ソリブジンと5-FU

種差，また，おかれた環境など，Table 1 に示すような様々な内的，外的要因による差があり，動物からヒトへの外挿をしばしば困難なものとしてきた。例えば，加藤<sup>3)</sup>はストリキニーネによる痙攣死における性差が神経の感受性によるものではなく，代謝速度の違いに起因する血中濃度の違いによるものであることを示した。以来，既に35年近く経ち，毒性発現の差の多くに薬物動態（Pharmacokinetics, PK）における差が関与していることが多くの薬物で明らかにされてきた。Table 2, 3に強心配糖体ジゴキシンの急性毒性の種差と代謝速度（ $t_{1/2}$ ）の関係<sup>4)</sup>及びヘキソバルピタールの代謝速度と作用時間における種差<sup>5)</sup>について例示した。

このように，体重または体表面積当たりの換算用量を同一投与経路で動物に投与しても，用いた動物種のADME（吸収，分布，代謝及び排泄）に及ぼす内的要因（Table 4）の相違から，薬物の血中濃度に種差，系統差，性差，個体差が生じやすく，投与用量に基づいた動物からヒトへの外挿には限界が存在することは周知の事となっている。しかしながら，医薬品の毒性試験計画の立案や結果の解釈において，毒性データとPKデータとを直接結び付けて考察することの重要性が一般的に認識され，医薬品の安全性評価の現場に取り入れられてきたのは，せいぜい10年ほど前，1980年代後半からであるとされている。しかし，現在では，医薬品の安全性評価においてPKは不可欠な情報としての認識が高まってきた<sup>6)</sup>。例えば，FDAのデータベースによれば，がん原性試験における用量設定に関して，調査した医薬品のがん原性試験のうちの10%位において，最高用量での血中濃度が臨床用量でのヒトの血中濃度を越えていなかった（Dr. DeGeorge, 私信）。臨床用量での血中濃度に達

Table 2. シゴキシンの急性毒性の種差と代謝速度

動物種	LD50* mg/kg	LD50** mg/m <sup>2</sup>	半減期 t <sub>1/2</sub> (h)
ラット	12.0	72.0	9
モルモット	0.8	5.6	16
ネコ	0.36	2.9	27
イヌ	0.6	12.0	27
ヒト（推定値）	<0.15	<5.6	44

\*：体重当たり \*\*：体表面積当たり

Table 3. ヘキソバルピタールの代謝と作用時間の種差

動物	作用時間 (min)	半減期 (min)	覚醒時血中濃度 (µg/ml)	代謝酵素活性* (µg/hr)
マウス	12	19	89	598
ウサギ	49	60	57	196
ラット	90	140	64	134
イヌ**	315	260	19	36
ヒト	—	360	20	—

Broclie, B. B., Clin. Pharmacol. Therap., 3, 374 (1962)

\*肝ミクロゾーム \*\*イヌは50mg/kg静脈内注射，その他の動物は100mg/kg腹腔内注射

Table 4. ADME に及ぼす内的要因

吸収/生物学的利用性
蛋白結合
代謝速度/代謝経路，誘導，阻害
経口投与時の初回通過効果
組織分布
排泄（臓器障害）など

してないからといって，そのような毒性試験を全く否定するものではない。しかし，そもそも医薬品の毒性試験は当該医薬品をヒトで用いた場合の安全性を推定するために行われるものであるから，そのような毒性試験結果の解釈には十分注意することが必要である。

加藤<sup>7)</sup>は183種の薬物について文献調査を行って安全域及び血漿中半減期比（ヒト/ラットまたはヒト/イヌ）の度数分布を明らかにした。Fig. 2は体重当たりの臨床用量と動物実験での無毒性用量から安全域を算出し，その度数分布を示したものである。ラットでの無毒性用量から得られた安全域は16~31倍の差を示すものが最も多い度数分布を示しており，中央値（n=183）は30倍であった。薬物により安全域は非常に広い巾を示していることが判る。一方，薬物によっては臨床用量よりも動物実験における無毒性用量の方が低い事例が存在することもFig. 2は示している。すなわち，動物で毒性が発現する用量を臨床用量として用いている医薬品がある可能性を示唆している。イヌを用いた毒性試験における無毒性用量をもとに得られた安全域の度数分布も同様であるが，イヌの方が無毒性用量と臨床用量の比（安全域）が小さい医薬品が多いことを示している。一方，Fig. 3には同じく加藤<sup>7)</sup>がまとめた薬物の血中

半減期比をヒト/ラットまたはヒト/イヌで比較した結果が示されている。ヒトとラットの血中半減期比の中央値は約3 (n=153) であり、イヌとの中央値は約2 (n=130) である。これは一般に、ヒトに比べて実験動物では代謝が速く、体内半減期が短くなることを示している<sup>8)</sup>。

また、Fig. 4は日本製薬工業協会（製薬協）で集めた150の事例について実施した調査結果で、医薬品の反復投与毒性試験で毒性の現れた時の血中濃度 Cmax と臨床用量でのヒト血中濃度 (Cmax) の相関を示したものである<sup>9)</sup>。すなわち、毒性試験で毒性が観察された用量をヒト臨床用量で割った値を横軸に、そのときの動物の血中薬物濃度を臨床用量でのヒト血中薬物濃度で割った値を縦軸にとり比較したものである。投与用量と血中濃度との間に1対1の対応があれば直線 (y=x) 上に乗るはずであるが、実際はこの線より多くの場合、下に現れる。縦軸で1以下の薬物が3種類あり、その1例はラット、2例はイヌの結果である。すなわち、臨床用量での血中濃度よりも、動物実験で毒性の現れた時の血中濃度の方が低い薬物が存在することを示している。臨床用量での血中濃度より低いレベルで毒性が現れたからといって、その薬物の臨床使用が必ずしも否定

されるわけではない。しかし、それを知らずに医薬品として使用することは危険である。

更に、Fig. 5はオランダで新薬として承認申請 (1990-1992) された経口投与薬物の臨床用量と動物試験におけるNOAEL値に対応する用量より算定した安全域 (mg/kg または mg/m<sup>2</sup>) を臨床用量投与時及びNOAEL値に対応する用量投与時の血中濃度レベル (Cmax または AUC) より求めた安全域 (Cmax または AUC) で割った値の度数分布を示したものである<sup>10)</sup>。多くの場合、体重または体表面積当たりの投与用量から求めた安全域値が血中濃度レベルに基づく安全域値より大きくなることを示している。すなわち、投与用量から算定する方法では安全域を過大評価している可能性が高い。

このような多くの薬物に関する文献や資料調査の結果、体重換算用量を投与してもヒトと動物の血中濃度は大きくばらついており、毒性発現時の投与用量との関係から安全域を求めてきた従来の安全性評価、あるいはヒトへの外挿は現在では、非科学的であり、ヒトと実験動物での血中濃度を基準とする比較の重要性が認識され、血中濃度を指標とした全身的暴露評価の必要性が指摘されてきた

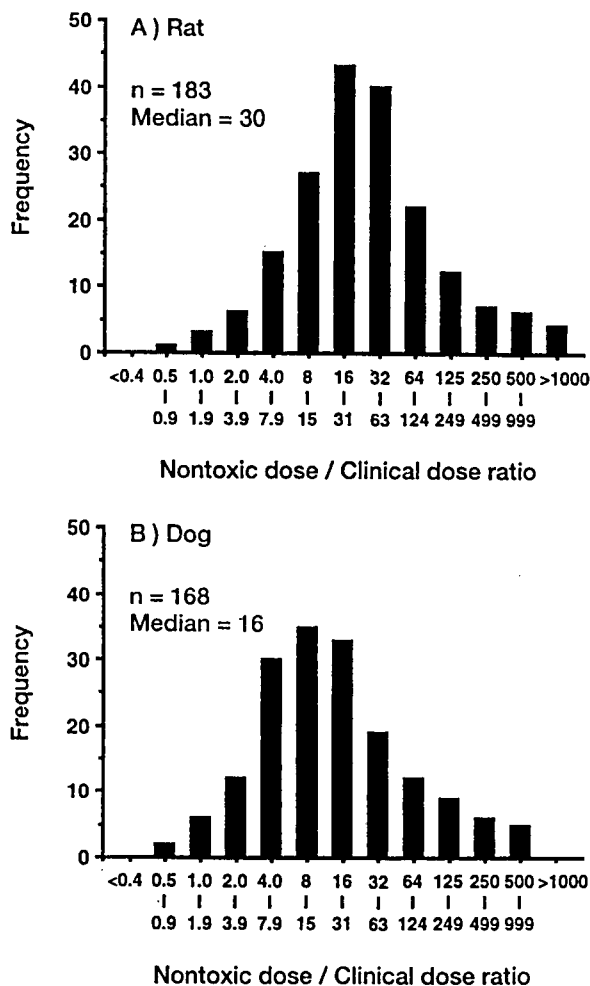


Fig. 2. ラット及びイヌの反復投与における薬物の無毒性用量と臨床用量の比の度数分布 (加藤隆一原図)<sup>7)</sup>

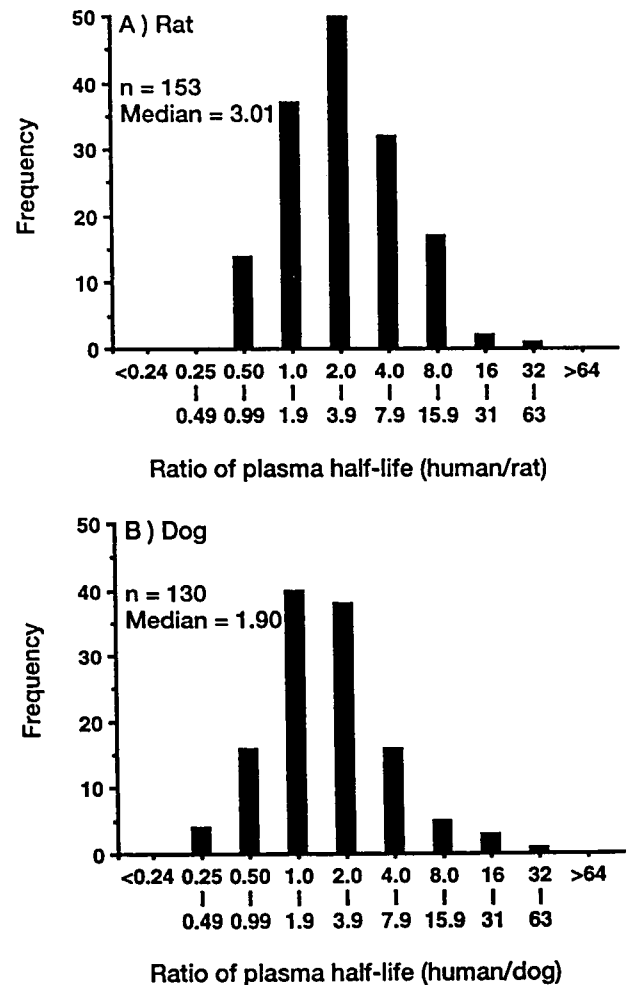


Fig. 3. 薬物の血漿中半減期のヒト/ラット比及びヒト/イヌ比の度数分布 (加藤隆一原図)<sup>7)</sup>

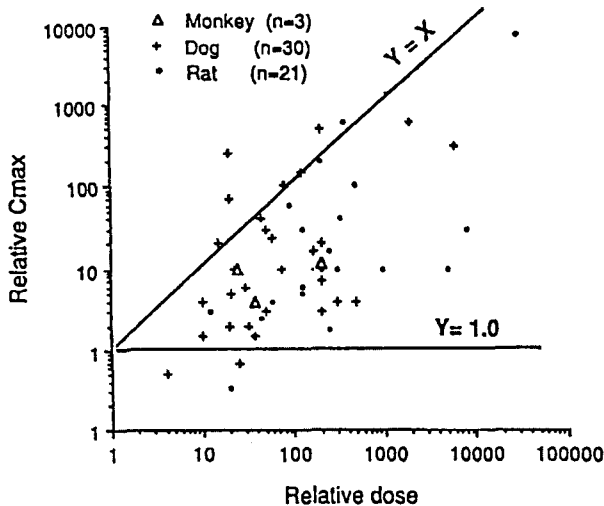


Fig. 4. 毒性発現用量における血中濃度 (五十嵐俊二原因)<sup>9)</sup>  
横軸は動物で毒性の現れた用量を臨床用量で割ったもので、縦軸は毒性の現れた用量における動物の血中濃度 (Cmax) を臨床用量での血中濃度 (Cmax) で割ったもの

(Fig. 1)<sup>6)</sup>。以上のような背景から、医薬品の毒性試験の妥当性を判断し、その結果をヒトに外挿するための「判断材料」として、毒性試験を実施している動物での薬物の体内動態 (Concomitant TK) に関するデータへの要求が高まってきた。

しかし、そのような TK 試験の内容や GLP 適合性に対する要求度などには、日米欧の間で大きな隔たりがあった。また、従来、がん原性試験における最高用量は、反復投与毒性試験で得られたデータに基づく最大耐量や投与可能最大用量が用いられてきた。しかし、毒性が極めて弱く、また、極めて微量で作用し、高価な薬物についてはこのような用量は現実的ではなく、日本や EU では臨床用量の 100 倍という目安が定められていた。一方、米国ではヒトの暴露レベルとの関係において最高用量を決定すべきであるとの考えがあった。そこで、ICH として毒性試験における被験物質の体内動態に関する国際的にハーモナイズされたガイドラインを作成することにより、動物種や用量の選択に対する日米欧規制 3 極での共通の認識を確立し、試験結果の国際的な相互受入れの促進が企画された<sup>11)</sup>。

ICH での検討に関与した主な専門家は Dr Richard Lee (EU), Dr Alan Tayler, Dr Joseph DeGeorge (FDA), Dr Yasuo Ohno (MHW), Dr Gerd Bode, Dr David Case (European Federation of Pharmaceutical Industry Associations, EFPIA), Dr Thomas Marriott (US Pharmaceutical Manufacturers Association), Dr Toshiji Igarashi, Dr Hiroshi Mayahara, Dr Hideyo Shindo (JPMA) 及び Dr Per Sjöberg (Sweden) であり、Dr Marriott がコーディネーターをつとめた。ガイドラインの起草とコメントに基づいた修正作業は Dr Bode と Dr Case を中心とする EFPIA のグループが担当した。上記、ICH 専門家による検討は EU の draft 7 (ICH draft 1) の段階から始

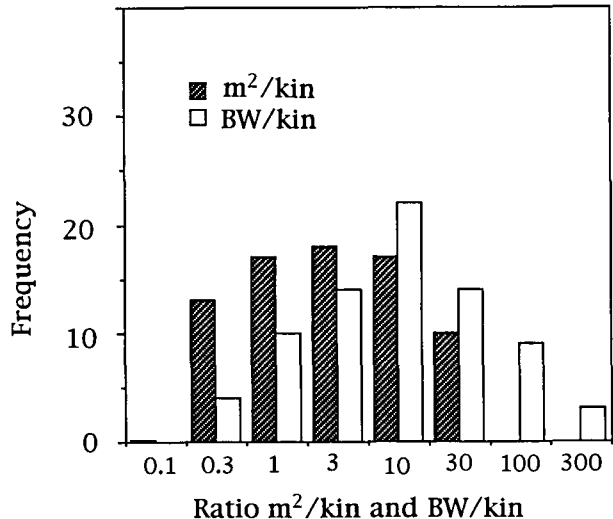


Fig. 5. 投与用量と臨床用量から算定した安全域と血中濃度にもとづいた安全域の比の度数分布 (n=76)  
m<sup>2</sup>/kin: 安全域 (用量/体表面積) / 安全域 (血中濃度)  
BW/kin: 安全域 (用量/体重) / 安全域 (血中濃度)  
(Fig. 1 参照)

まり、ICH draft 6 で Step 2 の合意に達した (1993, 10, 23)。以後は行政サイドが中心に検討する段階であり、EU の Dr Lee が修正作業を担当し、ICH draft 10 で Step 4 の合意に達したものである<sup>11,12)</sup>。

なお、厚生省では ICH の TK グループに対応する作業を行うために、高仲 正、大野泰雄、長谷川隆一、三森国敏 (国立衛生試験所, 現国立医薬品食品衛生研究所), 奥平和穂 (東京理科大), 栗津荘司 (東京薬大), 伊賀立二 (東大), 加藤隆一 (慶応大学), 五十嵐俊二及び進藤英世 (製薬協) からなる研究班を組織して、検討がなされた<sup>13,14)</sup>。

### 3. ICH-TK ガイドラインの内容と論点

#### 3.1 TK の定義について

ICH における最初の議論は「TK とは？」ということであった。TK という用語を文献上、最初に用いたのは 1973 年ロシアの Filov<sup>15)</sup> であった。Toxline 検索によれば “Pharmako-and toxicokinetics are the study of the processes of entry, distribution, metabolism and excretion of drugs and toxins with respect to time, i. e., the concentration of substances in various parts.” と記されている<sup>16)</sup>。すなわち、医薬品や毒物の体内濃度とその経時変化を究明する体内動態の研究の内、毒物の動態に対して用いたものであった。この TK の用語はその後、Toxline 上の検索では 1979 年までの 5 年間に 25 件検索される。Medline 上では 1976 年に初めて 1 件、殺虫剤チオキノキサリンの TK として検索され<sup>17)</sup>、その後、次第にその頻度が増している (Fig. 6)。しかし、その多くが有害化学物質、とりわけ環境汚染物質の ADME に関する研究を取り扱ったものであった。

1980 年に Tuey が著わした “Introduction to Biochemical

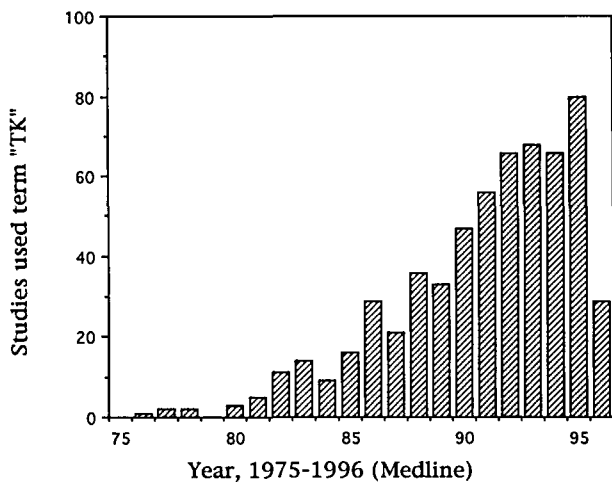


Fig. 6. “トキシコキネティクス”で検索した時の論文数の年次推移 (Medline)

Toxicology”<sup>18)</sup>では「Pharmacokineticsは化学物質などの生体における動態を取り扱う学問であり、その目標は化学物質の吸収、分布、代謝、及び排泄の動的な過程を定量的に表現することにある。——、Toxicokineticsは毒性学者の特殊な関心を強調するために用いられている。」と述べられている。すなわち、毒性学者は毒性を避けることや安全レベル、また、安全レベルそのものの有無について、関心があることから、「TKは毒性学者の特殊な関心やそれに基づく試験内容の相違を強調するために用いられている。」と記述されている。

一方、1981年に出されたOECDの化学物質の毒性試験ガイドライン (No.417)におけるTK試験においては、「TKとは被験物質の吸収、分布、排泄及び代謝に関する研究」と定義されている。更に、1986年に出版されたEnvironmental Health Criteria No. 57 (ICPS)の“Principles of Toxicokinetic Studies”<sup>19)</sup>での内容は1.分析法、2.吸収、3.分布、4.結合、5.代謝、6.排泄、7.速度論モデル、8.ヒトへの暴露を評価するTK的方法論、9.TK試験結果の評価の各項目からなっている。すなわち、ここでは一般的に医薬品について薬物動態として行われている項目のほとんどをTKの内容に含めている。なお、1985年及び1987年に通知された、わが国の農薬毒性試験法や化学物質毒性試験法のガイドラインでは「生体内運命に関する試験」とされており、TKや薬物動態試験という言葉は使われていない。一方、1990年に通知された医薬品の薬物動態試験ガイドラインでは、「体内動態に関するデータは、動物における毒性及び薬理試験の設定に役立つのみならず、それらの結果を評価・理解することにより、ヒトにおける有効性と安全性を確保するための適切な使用方法を定めるのに必須のものである。」というように、TKの用語は用いられていないが、毒性学的意味あいも含んだものとして、薬物動態という用語を用いている。

さて、1992年の9月に日本側が初めて接したEU案 (EU draft7)では、それまで我が国でPKとして行ってきた項目の多くがTKに含まれ、それとの重複によるGLP適用範囲の拡大が危惧された。議論の結果、毒性試験において薬物動態データを得ることの「最も重要な目的は毒性試験の妥当性を示すこと、その結果の解釈に役立つこと、及びヒトへの外挿を容易にするということであり、そのためには動物が被験物質にどの程度暴露されているかを明らかにすれば良い」という事になり、最終的にTKとは「医薬品の開発における毒性試験の不可欠な構成要素として、あるいは特にデザインされた補助的試験として、全身的曝露を評価するために、薬物動態データを得ること」と定義された。すなわち、毒性試験で使われないような動物種や剤形、飼育状態などにおける薬物動態は対象外として、言及しないとされた。なお、そのような限局された内容のものについてTKという用語を使用することについて反対もあった。また、TKのような用語は行政が定義すべきものではないというコメントもあった。しかし、最終的に、このガイダンスにおけるTKの意味についてはガイダンス中で定義すれば良いとされたものである<sup>13,14)</sup>。

### 3.2 ICH-TKの目的について

その結果、最終的に1994年10月に3極で合意 (Step 4) に達したガイダンス<sup>12)</sup>におけるTKの主目的は「毒性試験における動物の全身曝露の実態を用量及び時間経過との関連において記述すること」とされた。用量との関連とは薬物動態が用量との関係において直線性があるか否かということ、時間経過との関連とは薬物により自己阻害や誘導、また、腎障害や加齢などにより変化する場合のあることを念頭にいたものである。二次的な目的として、

- 暴露実態と毒性知見とを関係づけ、臨床上の安全性評価に役立てること。
- 毒性試験の計画やその妥当性の判断に寄与すること。
- 毒性知見と共に、以後の毒性試験の計画に役立つ情報を提供すること、があげられた。

毒性発現に影響を及ぼす可能性のある因子には、薬物の投与粒子 (Table 5)<sup>20)</sup>、剤形 (Fig. 7)<sup>21)</sup>や溶媒、投与経路、投与条件、実験室の環境、動物の種や系統、年齢や時刻などの生理的な因子、病的状態など様々なものがある (Table 1)。また、これらの因子の影響は薬物の生体内での動きに関するPKに対する影響と、生体側の応答性に関するPharmacodynamics (PD)に対する影響に大別される。今回、合意に達したICHガイダンスに基づく、医薬品の毒性試験へのTKの導入によって、被験物質に対する動物の全身的曝露の実態が明らかになり、毒性試験の計画や妥当性の確認、また、その結果の説明に役立てることにより、毒性試験結果のヒトへの外挿において障害となっている大きな要因の一つである、PKの差に起因するもの多くを

Table 5. 薬物の血中濃度に及ぼす懸濁液の粒子径の影響<sup>20)</sup>

調製 No	粒子径* ( $\mu\text{m}$ )	Tmax (hrs)	Cmax ( $\mu\text{g/ml}$ )	AUC <sub>0-24</sub> ( $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$ )
1	10.759	4	0.59 $\pm$ 0.08	12.56 $\pm$ 0.87
2	8.968	2	1.04 $\pm$ 0.21	14.46 $\pm$ 6.12
3	5.117	2	9.26 $\pm$ 1.10	120.14 $\pm$ 13.39
4	3.774	2	17.27 $\pm$ 0.72	203.63 $\pm$ 38.96

A case (compound X) of effects of particle sizes in prepared suspension on plasma concentration after a single oral dose of 300 mg/kg in monkeys (mean $\pm$ SD, n=2). \* : Median values  
Mayahara, H.: J. Toxicol. Sci., **18**: 229-233 (1993) より引用

取り除けるのではないかと期待している。

### 3.3 ICH-TK ガイドラインの基本的な考え方

1994年のICH ガイドラインに現れたTK や毒性試験に関する基本的な考え方は以下のa) ~f) のように要約できる。

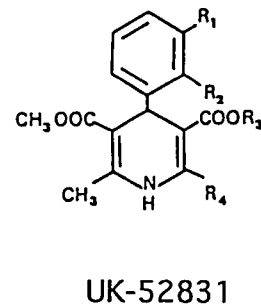
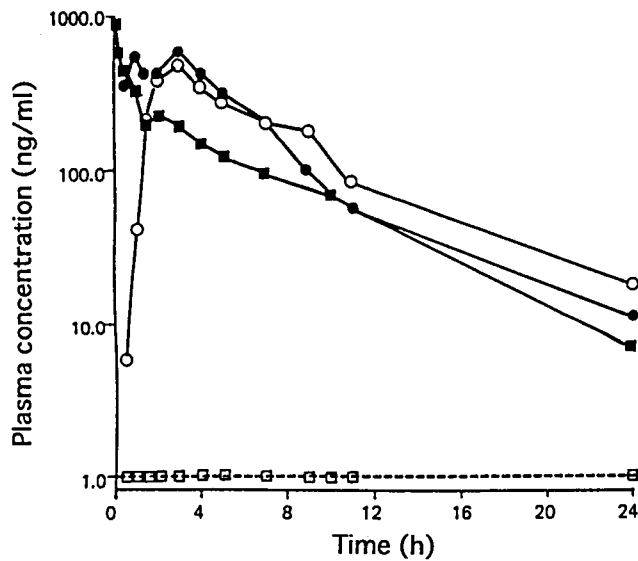
- a) 「適切なレベルの暴露評価が行われていることが示されていない毒性試験結果は原則として受け入れられない。」ただし、既に行われた試験により十分なTKに関する知見が得られている場合には、TKを行う範囲を削減することができる。
- b) 「使用動物数は必要最小限とする。」これは動物愛護や

福祉を考慮したものであるが、科学的根拠に基づかない、無駄な試験は可能な限り避けることは当然のことである。

c) 毒性試験の妥当性の判断はあくまでもヒトへの外挿を念頭に置いてなされるべきであることから、本ガイドラインでは「なるべく早い段階でヒトでの試験を行い、動物試験結果との突き合わせを頻繁に行って、お互いの試験計画に反映させる continuous feedback が必要である。」としている。ただし、なるべく早くといっても、当然、そこには倫理的、科学的に保証された明確なステップと判断が必要である。この点に関しては日欧米でその差が大きく、ICH の場でも、臨床試験との関連において非臨床試験の実施タイミングのハーモナイゼーションを目指して検討中である。

d) 「本ガイドラインは rigid なものとしてではなく、科学的根拠に基づいて、flexible に理解すべきである」とされている。また、日本では欧米と異なり行政担当者との事前の話し合いがなく、企業の責任で判断せざるを得ないという問題が提起されている。

e) 「統計学的解析については、使用動物数が限られていることから、高レベルの厳密性は要求しない。また、平均値や中央値などの値よりも動物個々の値の方が毒性解釈に



- Free base in PEG 400 : glycerin : water (85 : 5 : 1) in hard gelatin capsules.
- Maleate salt mixed with excipients (manitol, maize starch) in soft gelatin capsules.
- Free base with excipients in soft gelatin capsules.
- intravenous dose (0.5mg/kg).

Fig. 7. 医薬品の経口投与時の剤形による血中濃度への影響  
UK-52831を種々の剤形でイヌに単回投与 (1mg/kg, n=3)

Table 6. TK 試験実施上の基本原則

- 1) 適切な暴露評価の実施が示されていない毒性試験結果は原則として受け入れられない。
- 2) 全身の暴露は主として、血中の未変化体濃度により評価する。
- 3) TK 測定に用いる試料は毒性試験に用いられた動物群またはサテライト群 (Concomitant TK), あるいは毒性試験に非常に類似した条件の動物群 (Retrospective TK) から得る。
- 4) TK 試験の必要性和その程度は、薬物の特性や先行する毒性試験, TK/PK 試験, 及び臨床試験結果に基づいて、case by case かつ段階的に決定する。
- 5) 薬物動態上の詳細なパラメーターを明らかにすることを目的としていない。
- 6) 使用動物数は必要最小限とする。
- 7) 統計学的な意味での厳密さは、必ずしも求めない。
- 8) TK 試験 (測定) は GLP 適用下で実施する。
- 9) 通常と異なった方式の採用は拒まないが、その根拠の提示が必要。

重要であるかもしれない。」としている。なお、毒性試験で使用される用量は、通常広範囲にわたることから、対数変換を行った上で統計解析することの有用性<sup>22,25)</sup>や個体動物からの頻回採血による負担を軽減するため少数回サンプリングによる TK 実施法なども提案<sup>26)</sup>されている。また、f) ガイダンスには必ずしもとらわれず、科学的に妥当な根拠の提示があれば、通常と異なった方式の採用を拒まないとしている。

全般的に、本 ICH-TK ガイダンスにおいては case by case で flexible な科学的判断と step by step の approach が考え方の基調となっている。

### 3.4 TK 試験の対象となる毒性試験の範囲

TK 試験 (註3) を行うことを考慮すべき毒性試験は単回投与毒性試験から反復投与毒性試験、生殖・発生毒性試験、遺伝毒性試験、及びがん原性試験に限定されている。当初、単回投与毒性試験についても反復投与毒性試験と同様に TK 試験を行うように規定されていた。しかし、通常、単回投与毒性試験は開発初期に行われ、血中の薬物分析法が開発されていないことが多いこと。また、単回投与毒性試験においては毒性症状の詳細な観察が最も重要であるが、それが頻回採血により妨害される可能性があることが提議された。そこで、開発初期での実施や小動物での TK 試験は困難であろうとされた。また、当初、生殖・発生毒性試験では様々な妊娠時期において胚や胎児の暴露を一般的に評価すべきと表現されていたが、生殖・発生毒性試験では他の毒性試験とは異なり、必ずしも明白な毒性が認められるまで用量をあげる必要はないこと、胚や胎児への被験物質の移行を前提としていないこと、また、薬物の胎児移行は妊娠動物を用いた組織分布試験から得られるなどの意見が出された。議論の結果、妊娠動物における TK 試験は毒性徴候などにより十分な暴露がなされていることが示されない場合に行う、とされた。また、遺伝毒性試験における骨髄の暴露の検討は陰性結果の得られた場合のみ必要であるとされた。なお、通常は骨髄の暴露測定は血中濃度の測定で代替しようと考えられている。

### 3.5 毒性試験における用量設定への TK データ利用

通常、用量設定は毒性発現や薬理的応答により行われ

るが、これらの結果で最高用量を特定出来ない場合には TK データが重要となる。その際の原則的な考え方は

- a) 高用量は最大暴露を起こす最低の用量以上、
- b) 低用量での暴露レベルは臨床での定常状態を越えている、
- c) 中用量は低用量の何倍、あるいは高用量の何分の一に設定するとされている。なお、用量と暴露レベルの関係の非線形性は必ずしも用量の限界を示すものではない。また、がん原性試験についての ICH 合意文書では臨床での暴露レベルの25倍以上が最高用量の目安とされている。なお、種特異的な性質によりこのような事が達成されない場合には、その根拠の提示が必要とされている。

### 3.6 TK 測定のための生体試料について (註3)

通常、暴露評価は血漿中の薬物レベルをもとにした Cmax や AUC, Ctime の測定により達成される。薬物の作用は投与用量よりも作用部位での濃度に、より良く対応するが、ヒトの作用部位での濃度は一般的には測定出来ない。しかし、一般的に、作用部位への血液供給が多い場合にはその部位での濃度は血中あるいは血漿中濃度と平衡関係にあるとみなすことができる。そこで、毒性試験においても血漿中の濃度を測定し、それをヒトと比較することが、暴露評価において、有益であろうと考えたものである。しかし、必要に応じて、全血、血清、あるいは組織中の薬物レベル、血漿蛋白非結合分画、また、尿中排泄量などで評価すべき特別な場合もある。

このような特殊な生体試料の測定を考慮すべき状況として、血液中レベルが非常に低いが、特定の臓器に集中し、組織中レベルの測定が暴露評価の唯一の手段である場合がある。投与した原体 (未変化体) ではなく代謝物を測定することを考慮すべき状況としては、

- a) プロドラッグの場合に活性代謝物を測定する必要がある場合。
- b) 薬理的または毒性学的に活性な代謝物が生成し、動物の薬理的、毒性学的応答に有意な貢献をする場合。
- c) 投与した薬物が急速に代謝され、主代謝物の測定が暴露評価の唯一の手段である場合。
- d) 動物実験においてその妥当性を示すために、ヒト代謝



物への暴露の記述が必要な場合などが想定される。

### 3.7 生体試料のサンプリングについて

TKにおいては毒性試験を行っている動物そのもの、あるいはTK用に設けたサテライト群の動物からサンプリングし、暴露評価を行う場合 (Concomitant TK)、及び毒性試験が行われたのと極めて類似した条件で、後追的に行われる場合 (Retrospective TK または Supportive TK) がある。極めて類似した条件とは種、系統、性、週令について同一の動物を用い、同じような環境で飼育し、同じような剤形、投与経路及び投与方法で被験物質を投与した動物から同じ方法でサンプリングするものである。後追いTK試験は毒性試験の結果から生じた特定の疑問に答えるために行われるものである。これらがICH ガイダンスで対象としているTK試験で、これらとは別に試験を計画し、基本的なPKパラメーターを得るTKは対象としていない。

サンプリングに関しては、モニタリングとプロファイリングという二つの状況がある。モニタリングとは投与間隔内に1-3回サンプリングを行いCtimeやCmaxを求めるものである。比較的短期の試験では試験の初日と最終日に行うもので、長期にわたる試験の場合はその中間程度の時期にも行われる。なお、がん原性試験では6ヶ月以降には行う必要はないとされている。プロファイリングとは投与間隔内に4-8回サンプリングし、CtimeやCmaxを求めると共に、AUCを計算するために行われる。なお、長期にわたる反復投与毒性試験やがん原性試験において、適切な時点で1回採血し、暴露レベルを確認することもモニタリングという言葉で表現される。

TK測定する動物は試験の全ての動物からサンプリングを行う場合、特定の群からのみ行う場合、サテライト群のみ行う場合、また、類似した試験系において行う場合があるが、それぞれ実験の種類及び毒性試験計画の中での置かれた状況に応じて、科学的判断に基づいて、case by caseで決定すべき事項である。通常、イヌやウサギ、サルなどの中動物では主毒性試験の動物からサンプルを採取し、げっ歯類ではサテライト群から採取されることが多いと思われる。

Concomitant TKにおけるサンプリング頻度については、必要・十分と思われる頻度で行われるべきであるとされている。毒性試験毎に十分であることを判断する根拠は、より以前の毒性試験で得られるTKデータ、予試験や用量設定試験、同じ動物種を用いた別の試験、及び信頼性のある他のモデルをもとに行う、とされている。ただし、毒性試験の正常な進行を妨げず、また、不適当と思われるような過度の生理的ストレスを与えない程度にとどめる必要がある。ラットやマウスなどの小動物では同じ動物からの頻繁な採血は困難であろうし、初期の反復投与毒性試験やがん原性試験の用量設定試験で詳細なプロフィールが得

られている場合には、より長期の試験ではモニタリング程度で良いと考えられる。Case by caseではあるが、科学的判断及び不必要に動物を消費しないとの原則に基づいて決定すべきである。なお、対照群についてもTKモニタリングを行うべきであるとの意見もあったが、生体内因性物質が分析対象の場合や分析上の必要性がある場合など、特殊な場合以外では必要ないと考えられる。ただし、処置群と対照群との間で実験条件の差が生ずることは好ましくないことからTK測定を行わない場合でも処置群と同様のサンプリング操作は行うべきである。

### 3.8 PK試験との重複について

TK試験から得られるデータと類似したデータは薬物動態試験ガイドラインでも要求されており、それらの間に重複がある。PKデータはGLP適用下で得られたものではないことから、主要なTKデータとしては使用することはできない。しかし、TKデータをPKデータの一部として利用することに特に問題はない。なお、ICH-TKガイダンス及びICHの反復投与組織分布試験ガイダンス<sup>27,28)</sup>の合意の内容を反映させるとともに、両ICHガイダンスとの重複を避ける方向で、現行の薬物動態試験ガイドラインについて見直し改訂作業が現在進行中である。

### 3.9 GLP適用についての経緯

TK試験のGLP適用に関しては当初 (ICH draft 1) の段階では、「GLPに則って行われた毒性試験のためのConcomitant TK試験はGLPを満足させなくてはならない」とされていたが、FDAは「GLPに則って行うのは良いが、要求すべきではない」とかEUは「GLPに則っていないデータは受け入れられない」とか、長い議論が続き、draft 4では一時削除された。しかし、draft 5で復活し「GLPに則って行われた毒性試験に付随して行われるTK試験はGLPを満足させなくてはならない」となり、draft 6では「Ancillary study (補助的に行われるTK試験)もGLPに従う」と追加された。しかし、その後“ancillary study”という用語の定義について合意が得られず、PK試験全体が包含されてしまうのではないかと危惧から、この用語を使用しないこととし、追加部分が「毒性試験に極めて類似した条件で特定のデータを得るためにretrospectivelyに計画されるTK試験もGLPを満足させなくてはならない。」と変更された。ICHでの議論では胎児移行や乳汁分泌試験など通常、薬物動態試験の範疇で行われるものであっても、特定の安全性評価上の問題に回答を与えるために計画された場合はGLPに則って行うべきとのことで合意 (Step 4) されている。

## 4. 毒性試験に組み込まれたTK試験実施とGLP

医薬品の安全性評価に直接係わる試験はGLP適用下で実施しなければならないと考えられている。毒性試験に組

み込まれた TK 試験 (Concomitant TK) の結果は、今後の安全性評価に欠かせないものであることから GLP 適用下で実施しなければならない。我が国の製薬企業サイドでも ICH での TK 試験に関する討議開始と共にその実施体制の整備に着手すると共に、製薬協や QA 研究会などが中心となってドラフトの翻訳<sup>29)</sup>やコメントの作成、アンケート調査<sup>30-32)</sup>などを実施して TK 導入に係わる諸問題の把握や GLP 適用下での円滑な実施に向けての検討がなされた。

TK 試験を GLP 適用下で実施する上での、一般的な留意点や検討課題を以下に記述した。医薬品開発における毒性試験において Concomitant TK を実施するための開発スケジュール及び GLP との関係図を Fig. 8 及び Fig. 9 に示した。

#### 4.1 組織と職員の問題

1996年に製薬協が実施した TK 測定の実施体制についてのアンケート調査結果<sup>40)</sup>を Fig. 10 に示した。それによると TK 測定の実施体制に関して「薬物動態実施部門と安全性試験実施部門が分かれており、TK 測定は薬物動態実施部門で実施する。」という回答が47%であったとしている。TK 試験実施において、被験物質の投与、TK 測定試料の採取は安全性試験実施部門 (GLP 適合施設) が担当し、分析法の開発・決定からそのバリデーションの実施及び TK 測定は薬物動態部門 (部分的 GLP 施設) で行うというのが当面の一般的な実施形態と想定される。それぞれの実施部門が独立した GLP 組織である場合には問題がないが、所在地が離れて存在し、一つの GLP 組織下で実施する場合は、運営管理者や信頼性保証部門 (QAU) の業務遂行に支障のないように特別の配慮が必要となる。

また、TK 測定に従事する担当職員の多くは GLP 適用下での業務に未経験と予想されることから GLP に対する認識を深める教育訓練が課題となる。

#### 4.2 分析法バリデーションの実施に関する問題点

毒性試験への TK 導入の結果、新薬開発の比較的早い時期からの分析法開発への着手と確立が必要となる。TK 測定に用いられる分析法は適切にバリデートされる必要がある。分析法バリデーションの実施を GLP 適用下で行うか否かについては当初から、論議的であった。しかし、この段階では a) 分析対象標準物質をマトリックスに添加した試料を用いて、試行錯誤しながらバリデーションデータを蓄積し、分析目的に十分合致するまで検討されるべきものであること、また、b) バリデーションの適正は GLP 適用下で行われる TK 実測定時の検量線やチャートなどで確認できることから、バリデーション過程での詳細を GLP 適用とはせず、到達した分析精度を分析法バリデーション報告書として作成し、それを証明する生データ (チャートやデータシートなど) と共に GLP 適用下で保管するとした。

TK 測定のための分析法は医薬品の非臨床試験から臨床試験を通じて同一であることが望ましいが、現実にはそれぞれの段階での必要性を満たす方法を採用し、開発の進展に応じて必要部分を改善するという状況が多いと思われる。そのような場合には変更の内容・程度に応じ、必要部分のバリデーションをやり直す必要がある。特に、開発の途中で測定原理に係わる変更がなされた場合には、旧分析法との同等性の確認が求められる。再バリデーションを実施すべき状況とその内容については、製薬協の基礎研究部会でまとめた報告<sup>33)</sup>が参考となる。

バリデーション実施項目としては特異性、真度、精度及びその再現性 (日内及び日間)、定量限界及び定量範囲、直線性、安定性、回収率などがあげられる。分析法バリデーションに関しては、ICH の品質部門でも検討されたが、そこで用語の統一が計られ、従来の正確度は真度 (Accuracy) とされた<sup>34)</sup>。また、第13改正薬局方では分析法バリ

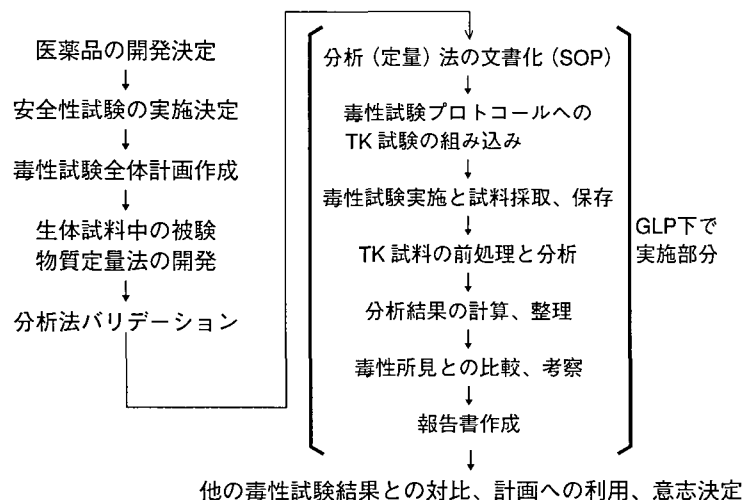


Fig. 8. 医薬品開発の中での TK 試験の位置と GLP 適用下での実施部分

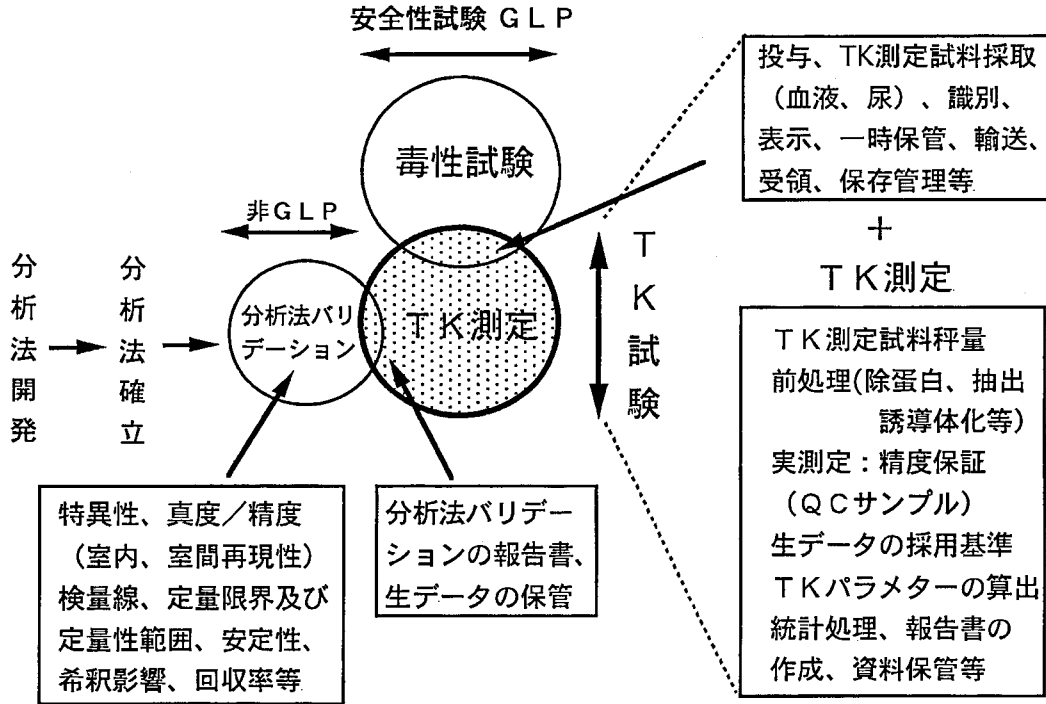


Fig. 9. 毒性試験に組み込まれたTK試験実施とGLP

レーションの項目が新設され、その方法の詳細が示されている。

4.3 TK試料の実測定における精度管理

TK測定を実施する分析法の妥当性が確認されたら、TK試料の実測定はGLP適用下で適切な精度管理(QC)下での実施が求められる。すなわち、この一連のTK試料の実測定では検量線用試料やQCサンプルを適切に組み入れて測定し、測定系の精度保証(QA)や測定中の試料の安定性保証、誤操作などの監査をはかる必要がある。この実測定で得られたデータはすべてGLP上の生データとして保管される。TK試験ではQCサンプルの果たす役割がとりわけ重要である<sup>30,35,36)</sup>(Table 7)。

データの採用基準<sup>30,31,35)</sup>はあらかじめSOP(標準操作手順書)またはプロトコル(試験計画書)のいずれかに記載されていることが必要である。また、再測定や再分析の必要な状況もあらかじめプロトコルまたはSOPに記載される必要があると共に、実施に際してはその理由を記録として残すことが必要である。

4.4 プロトコルとSOPによる相互補完

安全性評価に係わる毒性試験をGLP適用下で実施する体制整備のための主要かつ必須な作業としてSOPの整備がある。TK測定においては、被験物質の分析対象物質の特性により分析法やその取扱い条件は個別的であり、常法(ルーチン操作)としてSOPに規定し難い状況が想定され

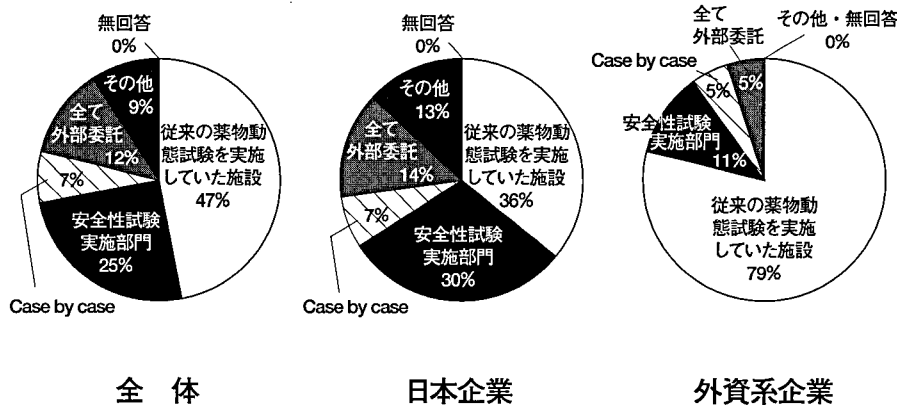


Fig. 10. TK試験の実施場所についての製薬協のアンケート結果

Table 7. Quality Control(QC)サンプルについて

<p>—既知量の分析対象標準物質が生体液（マトリックス）中に添加された試料</p> <p>—調製法：検量線範囲の3濃度</p> <p>定量限界付近、中間及び最高濃度付近、各n=2 少なくとも4QC サンプルが設定値の±20%以内の偏差、ただし、1濃度の内1検体は上記偏差以内</p> <p>—使用目的</p> <p>1) TK 試料実測時の測定系の精度管理（真度、精度）</p> <p>2) 測定中の試料の安定性保証</p> <p>3) 操作の管理</p> <p>4) TK 試料の採取時から実測定時までの保存中の安定性の保証—並行保存用 QC サンプル— TK 試料採取時に調製、分注して検体と同じ条件で保存</p>
---

る。従って、TK 測定に際してはプロトコール記載（特定操作部分）と SOP 記載（常法操作部分）とを適宜使い分け、相互補完することが大切である。

#### 4.5 TK 測定試料の取扱い

TK 試験では被験物質を投与した動物から採取された TK 測定試料が実測定されるに至るまでに、試料採取、直後処理、識別・表示、一時保管、輸送、受け渡し、保管などの多くの人為作業行程があり、その間の万全を期するため記録による確認が求められる。凍結保存管理においてもフリーザー内での試料の取り扱い防止や保存中の安定性確保並びに保証のための十分な対策が求められる。検体試料の輸送中や保存中の安定性保証のためには生体試料採取時に調製した QC サンプルの並行保存が考慮されるべきであろう。

### 5. 医薬品の毒性試験への TK 導入の意義

毒性試験に組み込まれた TK 試験の実施とは、端的に云うなら毒性試験における一般症状観察、血液検査や血清生化学的検査、病理解剖／組織学的検査などに加えて薬物動態学的検査がパラレルに加わった事を意味している (Fig. 11)。医薬品の毒性試験実施に際して、

- 1) 動物は薬物に全身暴露されていたか。AUC, Cmax, Ctime
- 2) 暴露レベルと投与用量との関係はどうなっていたか  
(吸収や代謝の飽和などによる非線形性は生じていなかったか)<sup>24,37)</sup>

3) 暴露レベルの時間経過はどうなっていたか。t<sub>1/2</sub>, Tmax などの TK 情報を入手することなしに、毒性所見の解釈をせざるを得なかった従来の毒性評価に比較するならば、TK 試験の導入は、毒性試験から得られる情報そのものの質的向上をもたらす、医薬品の安全性評価におけるヒトへの外挿性向上を目指すための有効な切り口 (tool)<sup>38,39)</sup> となることが期待される。また、PK データや臨床薬理データと合わせることで、薬効及び副作用発現時の血中濃度が明かとなり、薬物相互作用や体内動態における遺伝的多型の影響を、より適切に評価できるようになる。GLP 適用によるデータの信頼性確保は TK データの相互受け入れを促進し、莫大な費用を要する動物試験の無駄な重複を避ける事にもつながる。医薬品の開発においては、その効率化

が叫ばれているが、臨床試験での被験者に不適切なほどの苦痛や不可逆的な障害を与えないように、十分な配慮が必要である。TK による暴露評価を組み込んだ毒性試験データから、問題となる毒性の現れる用量及び血中濃度が明らかになり、臨床試験計画の立案にも非常に有用と思われる。

もちろん、このような血中濃度の測定に限局した TK 試験の実施には限界があり、また問題点も多々指摘されてきた。<sup>32,37,39-43)</sup>

Table 8. 薬物動態とコンコミタント TK の比較

薬物動態 (PK)	コンコミタント TK
薬効量	無毒性量～毒性量 (広濃度範囲)
生理的薬物動態	生理的～非生理的薬物動態 ADME の飽和による非線形性
詳細な速度論的解析	AUC, Cmax, Ct, t <sub>1/2</sub>
ADME の検討	全身的暴露評価
非 GLP	GLP 適用 (信頼性保証)

実施上の問題点としては以下のような指摘がなされている。

- 1) concomitant TK の実施には、極めて多数の試験動物とマンパワーを必要とする。資源節減のため、試験を効率的に進める工夫が必要である。
- 2) 毒性試験では、通常、低用量（無毒性量）から高用量（毒性量）まで広範囲（2桁を越える用量範囲）で実施されるため、TK として吸収、代謝過程で飽和の混在した試験系を一つにして取り扱っている可能性がある。
- 3) TK では高投与用量のため非生理的で特殊な ADME 状況下での体内動態を取り扱うことになる。
- 4) 生薬や配合剤のような複合有効成分系の場合、どの成分をモニタリングするか。
- 5) 初回通過効果のために血中薬物濃度が極端に低い（バイオアベイラビリティが低い）ため定量感度が達成されない場合どうするか。
- 6) 測定した血中薬物濃度が毒性発現時の値ではない場合、毒性学的考察に混乱がおこる。
- 7) サテライト群を用いて TK 試験を実施した場合、標的器官における毒性反応の有無や程度を調べなくてよいか。

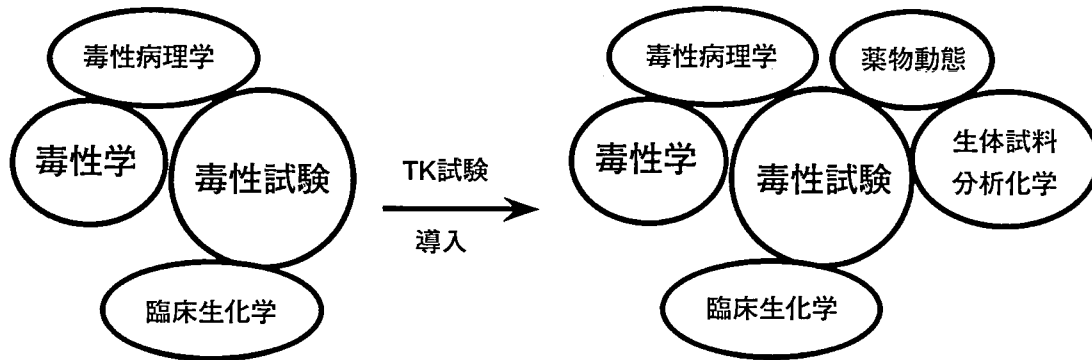


Fig.11. 毒性試験へのトキシコキネティクスの導入と関連分野の拡大

また、TKの限界としてつぎのような点があげられる。

- 1) 医薬品の長期投与では、薬物や代謝物による二次的あるいは三次的に毒性変化が引き起こされる場合がある。この種の薬物では毒性変化とTKデータとの関係の検討に限界がある。
- 2) TK情報からは、薬物作用部位における生体側の薬物応答性(毒性)に関するtoxicodynamics (TD)の情報が得られない。

## 6. おわりに

既存の分野に新たな手法を導入する場合、多かれ少かれ混乱と限界は伴うものである。例えば、30余年前、核磁気共鳴(NMR)を構造解析に応用したとき有機化学者の多くは、その原理に精通して用いたのではなかった。かなり大胆に動物的嗅覚(あるNMR専門家の表現)を働かせて複雑な天然物の構造解析に必要な情報を取り入れていった。また、そうした応用への要求は、更に高分解能NMR開発の牽引ともなった。そうした関連領域での研究成果のフィードバックと相互協力が境界領域の拡大をもたらし、今日の医療現場でのMRI診断技術を生み出した歴史に学ぶべき点が多い。そこには必要性から発せられる課題提起と解決への不断のチャレンジがみられた。

本TKガイダンスでは科学的考察に基づいた判断が要所々々で求められており、効率的な試験計画を立てる上で毒性学者の果たす役割が極めて重くなったといえる。

一方、審査するレギュレーション側にも科学的判断とcase by caseの柔軟な対応がこれまでも増して迫られることになる。

- 1) ヒトへの外挿を考慮した適切な毒性試験デザインがなされているか(動物種や投与法の選択など)
- 2) 特異的かつ十分な感度を備えた分析法が開発されているか。
- 3) 蛋白結合の評価がなされているか。
- 4) 全身暴露と毒性発現との関係づけがなされているか。などが安全性評価における留意点として加えられることに

なる。

更に、今後の課題(challenge)として以下のような点がTKの将来への提言としてあげられる。

- 1) 医薬品の副作用に関する臨床薬理とそのRetrospective TK研究の促進
- 2) 副作用発現も含めたヒト及び毒性試験のTKパラメータに関するデータベースの構築とヒトへの外挿に対する毒性評価モデルの確立
- 3) 科学技術の進歩に即応した医薬品のPK/PD及びTK/TD統合評価に向けての挑戦
- 4) 医薬品開発に携わる製薬企業内外の科学者間並びに評価レギュラトリーに携わる科学者間での相互情報交換最後に、FDAが主催した「合理的な医薬品開発におけるPK, PD及びTKの融合」に関する会議(1991, April)での結論<sup>4)</sup>を引用して本稿を終わる。

「新医薬品の前臨床試験に用いた動物種とヒトにおけるPK/PDの全貌の把握は、有効かつ合理的な医薬品開発に対する科学的基盤をもたらすものである。そしてこの成果は、患者個々に最適治療効果をもたらすための投与法の決定を可能にする。」

## 註 訳

註1: ICHのハーモナイゼーション作業の段階<sup>1)</sup>

- Step 1: 専門家ワーキンググループ(EWG)による討議: ガイドライン案の作成
- Step 2: 運営委員会によるガイドライン案の検討承認と3極行政による当該国・地域でのガイドライン案に対するコンサルテーション(意見収集)
- Step 3: コンサルテーションに基づくガイドライン案の訂正
- Step 4: 三極ハーモナイズ・ガイドラインの検討・承認
- Step 5: 当該国・地域における規制への反映

註2: 本稿は大野泰雄「ICH-トキシコキネティクスガイダンスについて」<sup>12)</sup>の内容と一部重複しています。

## 註3：TK 試験 vs TK 測定

TK 試験：動物への被験物質投与，生体試料採取から

TK 測定を包含

TK 測定：TK を目的に採取された生体試料中の測定対象物質の定量

## 文 献

- 1) International Conference on Harmonization: Note for Guidance on Toxicokinetics: The Assessment of Systemic Exposure in Toxicity Studies (1994)
- 2) 厚生省薬務局審査課長：トキシコキネティクス(毒性試験における全身的暴露の評価)に関するガイダンスについて，薬審第443号 (1996)
- 3) Kato, R., Chiesara, E. and Vassanelli, P.: Metabolic differences of strychnine in the rat in relation to sex. *Japan. J. Pharmacol.*, **12**: 26~33 (1962)
- 4) 大森義仁：臨床試験と毒性試験のかかわり「GLP の実際と毒性試験の進め方」，日本抗生物質学術協議会編，p73 (1991)
- 5) Broclie, B. B.: Difficulties in extrapolating data on metabolism of drugs from animals to man. *Clin. Pharmacol. Therap.*, **3**, 374~380 (1962)
- 6) Welling, P.G. and De La Iglesia, F. A. (Ed) : *Drug Toxicokinetics*, Marcel Dekker, Inc. (1993)
- 7) 加藤隆一：薬物の臨床用量と反復投与毒性試験における無毒性量および体内動態との関連. *臨床薬理*, **24** : 595~602 (1993)
- 8) Bachmann, K., Pardoe, D., and White, D.: Scaling basic toxicokinetic parameters from rat to man. *Environ. Health Perspect.*, **104**: 400~407 (1996)
- 9) Igarashi, T.: The use and abuse of toxicokinetics: What does actual data tell researchers? *Drug Info. J.*, **28**: 285~293 (1994)
- 10) Peters-Volleberg, G. W. M., De Waal, E. G. and Van Der Laan, L. W.: Interspecies Extrapolation in Safety Evaluation of Human Medicines in The Netherland (1990-1992) : Practical Considerations. *Regulatory Toxicol. Pharmacol.*, **20**: 248~258 (1994)
- 11) Case, D. E.: Toxicokinetics: Its significance and practical problems. 2. ICH-2 and Development of "Note for Guidance on Toxicokinetics". *J. Toxicol. Sciences*, **18**: 213~216 (1993)
- 12) 大野泰雄：ICH-トキシコキネティクスガイダンスについて. *J. Toxicol. Sciences*, **21**: App. 161~167 (1996)
- 13) 高伸 正他：医薬品の承認申請に添付されるべき資料としてのトキシコキネティクスデータの国際的ハーモナイゼーションに関する研究，厚生科学研究「医薬品規制ハーモナイゼーション推進」国際共同研究 平成5年度研究業績報告書 (班長，前川 正)，pp.66~71 (1994)
- 14) 大野泰雄他：医薬品の承認申請に添付されるべき資料としてのトキシコキネティクスデータの国際的ハーモナイゼーションに関わる研究，厚生科学研究「医薬品規制ハーモナイゼーション推進」国際共同研究 平成6年度研究業績報告書 (班長，前川 正)，pp83~89 (1995)
- 15) Filov, V. A.: Itogi. Nauki. Tekh, *Farmacol, Khimioter Sredstava. Toksikol.*, **5**: 9~80 (1973)
- 16) Filov, V. A.: Pharmacokinetics and Toxicokinetics. *Farmakol Toksikol (Mosc)*, **37**: 490~493 (1974)
- 17) Carrera, G., Mitjavira, S., Lacombe, C. et Derache, R: Toxicocinetique D'um Pesticide du Groupe des Thioquinoxalines: L'oxythioquinox. *Toxicology*, **6**: 161~171 (1976)
- 18) Tuey, D. B.: Toxicokinetics. In : Introduction to Biochemical Toxicology. Hudgson, E., Guthrie, F. E., eds., pp. 41~66, Blackwell, Melbourne (1980)
- 19) World Health Organization: Principles of Toxicokinetic Studies. *Environmental Health Criteria* No. 57 (1986)
- 20) Mayahara, H.: Practical Problems of Toxicokinetics; How to meet Scientific Needs. *J. Toxicol. Scien.*, **18**: 229~233 (1993)
- 21) Smith, D. A., Humphrey, M. J., and Charuel, C.: Design of toxicokinetic studies. *Xenobiotica*, **29**: 1187~1199 (1990)
- 22) Igarashi, T.: The rationale for using logarithmic transformation of concentration data: A comment on statistical evaluation of toxicokinetic data. *Drug Info. J.*, **28**: 191~194 (1994)
- 23) 五十嵐俊二, 矢部友邦, 野田耕世：トキシコキネティクス試験の目的, デザインと統計解析: 日本製薬工業協会の事例データベース102試験の解析結果について. 第5回日本毒科学会サテライトシンポジウム(福岡)“毒性試験の国際化と今後の課題”予報集 pp.38~44 (1996)
- 24) Igarashi, T., Tomobe, T. and Noda, K.: Study design and statistical analysis of toxicokinetics: A report of JPMA investigation of case studies. *J. Toxicol. Sciences*, **21**: 497~504 (1996)
- 25) Igarashi, T. and Sekido, T.: Case studies for statistical analysis of toxicokinetic data. *Regulatory Toxicol. Pharmacol.*, **23**: 193~208 (1996)
- 26) Pai, S. M., Fettner, S. H., Hajian, G., Cayen, M. N. and Batra, V. K.: Characterization of AUCs from sparsely sampled populations in toxicology studies. *Pharmaceutical Res.*, **13**: 1283~1290 (1996)
- 27) International Conference on Harmonization: Pharmacokinetics: Guidance for Repeated Dose Tissue Distribution Studies, ICH Harmonised Tripartite Guideline (1994)
- 28) 厚生省薬務局審査課長：薬審第442号，反復投与組織分布試験ガイダンスについて (1996)
- 29) 製薬協基礎研究部会トキシコキネティクスプロジェクト委員会：トキシコキネティクスに関する手引き書(毒性試験における全身的な暴露の評価のための手引き書), Note for Guidance on Toxicokinetics (A Guidance for Assessing Systemic Exposure in Toxicity Studies) の翻訳. 第2回日本毒科学会サテライトシンポジウム(千葉)トキシコキネティクスの意義と実際. 予報資料集 (1993)
- 30) 製薬協医薬品評価委員会基礎研究部会第4分科会：トキシコキネティクス試験における薬物濃度測定法の現状並びに今後の問題点に関する調査 資料 No. 66 (1995)
- 31) 製薬協医薬品評価委員会基礎研究部会第4分科会：トキシコキネティクスの円滑な導入のための GLP 上の留意点及びバリデーションの進め方. 資料 No. 76 (1997)
- 32) 日本 QA 研究会 教育部会 第1グループ: TK ガイダンスに関するまとめ. 資料 No. 12 (1996)
- 33) Yuzuriha, T., Aizawa, K., and Okada, J.: Points to be considered for conducting toxicokinetic studies under GLP and for validating analytical methods. *J. Toxicol. Scien.*, **21**: 505~509 (1996)
- 34) 鹿庭なほ子：分析法バリデーションについて. 医薬品

- 研究, 26: 1002~1020 (1995)
- 35) Shah, V. P., Midha, K. K., Dighe, S., McGilveray, I. J., Skelly, J. P., Yacobi, A., Layloff, T., Viswanathan, C. T., Cook, C. E., McDowall, R. D., Pittman, K. A. and Spector, S.: Analytical methods validation: Bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. Conference Report. *Europ. J. Drug Metabol. Pharmacokinetics*, 16: 249~255 (1991)
- 36) Wright, D. S.: Analytical Method Considerations for Toxicokinetic Studies.: In *Drug Toxicokinetics*, pp. 1~18, Ed. Welling, P. G. and De La Iglesia, F. A, Marcel Dekker, Inc. (1993)
- 37) 五十嵐俊二: ファーマコキネティクス手法の医薬品毒性試験への適用. *ファルマシア*, 30: 596~600 (1994)
- 38) DeGeorge, J. J.: Food and Drug Administration Viewpoints on Toxicokinetics: The view from review. *Toxicol. Pathology*, 23: 220~225 (1995)
- 39) 吉田武美, 堀井郁夫, 増田 裕, 野口英世(話題交換): トキシコキネティクスの有用性と問題点. *薬物動態*, 10: s172~179 (1995)
- 40) 野口英世: 薬物動態とトキシコキネティクス. *ファルマシア*, 30: 619~621 (1994)
- 41) Welling, P. G.: Differences between Pharmacokinetics and Toxicokinetics. *Toxicol. Pathology*, 23: 143~147 (1995)
- 42) Cayen, M. N.: Toxicokinetic Challenges in the Pharmaceutical Industry. *Toxicol. Pathology*, 23: 217~219 (1995)
- 43) Sugiyama, T., Ito, K., Tsuda, M and Horii, I.: Future perspectives for toxicokinetics: Its ability to predict drug adverse events in humans. *J. Toxicol. Scien.*, 21: 511~516 (1996)
- 44) Peck, C. C., Barr, W. H., Benet, L. Z., Collins, J., Desjardins, R. E., Furst, D. E., Harter, J. G., Levy, G., Ludden, T., Radman, J. H., Sanathanan, L., Schentag, J. J., Shah, V. P., Sheiner, L. B., Skelly, J. P., Stanski, D. R., Temple, R. J., Viswanathan, C. T., Weissinger, J., and Yacobi, A.: Conference Report, Opportunities for Integration of Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Toxicokinetics in Rational Drug Development. *Pharmaceutical Res.*, 9: 826~833 (1992)
- 45) 山田静雄, 出口芳春, 木村良平: ファーマコキネティクスとファーマコダイナミクスの融合を目指して - in vivo でのレセプター占有を中心に. *ファルマシア*, 31: 1381~1386 (1995)
- 46) 仲庭祐司: トキシコキネティクスなどに関するガイドランス. *GLP ガイドブック*, 薬事日報社, pp. 20~28 (1997)
- 47) 前川 正: 平成6年度総括報告. 厚生科学研究「医薬品規制ハーモナイゼーション推進」国際共同研究 平成6年度研究業績報告書(班長, 前川 正), pp. 1~10 (1995)
- 48) 製薬協医薬品評価委員会基礎研究部会第4分科会: トキシコキネティクス(TK)に関する調査結果報告, 製薬協基礎研 資料 No. 82 (1997)

## 行政の健康危機管理に対応した研究情報基盤の構築について

神沼 二真<sup>#</sup>

## Building Information Infrastructure at Research Institutions That Support Health Hazard Control

Tsuguchika Kaminuma<sup>#</sup>

In recent years the Ministry of Health and Welfare (MHW) encountered large scale health hazards and medicare incidents that required flexible, intersectional, and dynamic responses. Both research institutions under the MHW and their researchers got involved in project teams which were organized in order to cope these hazards and incidents. However it might be more effective if some information infrastructure for hazard control is built as one component of the MHW hazard management system. In this paper the design concept and implementation for such information infrastructure were discussed. The infrastructure consists of computer networks and systems which are based on the Internet and the related technologies such as WWW.

**Keywords:** health hazard, hazard management system, Internet, chemical hazard, information infrastructure

(Received May 30, 1997)

## 1. はじめに

この数年わが国においては、いわゆる危機管理への行政の対応能力の強化を求める声が高まっている。実際、松本および地下鉄サリン事件、阪神大震災、ソリブジンの相互作用による被害、薬害エイズ問題、腸管出血性大腸菌 O-157 (病原性大腸菌 O-157とも呼ばれることがある) の流行、遭難したタンカー・ナホトカからの重油流出事故、各地のゴミ焼却場からの高濃度なダイオキシンの排出など、厚生省としても迅速かつ緊急な対応が求められた大規模な健康被害や事件や問題が相次いで起きている。

そのため厚生省は省内に局課横断的な「厚生省健康危機管理調整会議」を設置するとともに、「健康危機管理基本指針」を策定した<sup>1)</sup>。こうした行政の健康危機管理に関しては、研究機関としても迅速かつ適切に対応できる体制の整備が求められるだろう。ただ、当所もそうであるが、厚生科学課傘下の研究機関は、もともと行政対応色の強いレギュラトリーな研究を柱としてきた<sup>2)</sup>。また、健康危機管理に直接対応するのは行政であることから、研究機関は行政から求められた調査や試験を行ったり、専門家として対策チームに参加するという従来どおりの対応で充分であ

る、という考えも成り立つ。

だが、わが国の行政が弱いと言われる危機管理の要因を一般的に分析してみると、情報とロジスティクス (Logistics, 軍隊における後方支援) の問題に行き当たる。欧米に較べてわが国の組織は伝統的に、この二つの要因を軽視してきた。あるいは、情報とロジスティクス思考を苦手としてきた。国際化が進む過程で、こうした弱点が顕在化してきたのは、当然なことであろう。したがって研究機関として健康危機管理への体制を改めて考えなければならないとすれば、とくに取り上げるべきは情報に関連した支援体制であろう。

事実、こうした行政の要請に応えるべく国立予防衛生研究所は感染症研究所への改組に際し、感染症情報センターを新に設置した。国立感染症研究所がバイオハザードに対応した研究所であれば、国立医薬品食品衛生研究所はケミカルハザードへの対応を大きな業務の柱としている。この意味で、国立医薬品食品衛生研究所にも感染症情報センターに類似した機能を有する部門があるべきであろう。国立医薬品食品衛生研究所には、化学物質情報部という「情報」部門がある。この部門は所内の情報計算基盤の構築とそれを自らも活用した (自主) 研究を行っているが、現在のところでは行政を直接支援することは業務とされていない。

一方、情報基盤に関しては、インターネットと WWW (World Wide Web, あるいは Web とも言う) を中核とする新しい情報技術の普及で、1990年代までにデザインされた

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed: Tsuguchika Kaminuma, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo158, Japan; Tel: 03-3700-9540, Fax: 03-3700-7592; e-mail: kaminuma@nihs.go.jp



ネットワークやシステムは、すべて時代遅れになってしまった<sup>3)</sup>。これからの情報ネットワークやシステムは、現在急発展しつつある情報技術を念頭に置いて、全く新しくデザインし直さなければならなくなっている。こうした新しい技術は、従来の仕事の仕方や、組織のあり方についても変容を迫るものである。

そこでこの総説では、ケミカルハザードを念頭に置きながらも、できるだけ一般的な立場から、行政の健康危機管理に対応した研究機関における情報基盤をどのように構築したらよいかについて考察してみたい。なお論すべき問題の性格上、以下の論説は科学的、客観的事実を提示することではなく、現状をどう認識し、何を提言するかにある。そこには判断が入ることは避けられない。これについては所はもちろん、関係者の間で合意したり、承認されたものではなく、あくまでも筆者個人のものであることをあらかじめお断りしておく。

## 2. ケミカルハザードに対処するための情報基盤

### 行政の危機管理対応の問題点

一般に危機管理に対する行政の機構と機能は脆弱である。なぜなら行政機構は本質的に、過去の事例にもとづいて対処方針と役割分担を決め、その枠の中で行動することが多いからだ。これに対して、いわゆる危機管理は、

- (1) どこで問題が発生するか、どの部署がどのように対処すべきか想像力が働きにくい
- (2) 問題自体が、過去の事例では把握できにくい新しいカテゴリーに属する
- (3) 関係機関、部署と充分連絡、協議をしていられないほど緊急である
- (4) 複数の機関、部署が連携して対処しなければならない
- (5) 予兆に気づいた人と対応すべき人のとのコミュニケーションが難しい
- (6) 問題解決能力を有する人と対応すべき人のとのコミュニケーションが難しいか、協力が難しい関係にある、というような特徴がある。

結局求められている対応は、問題への鋭い感受性、組織を横断した発想、バックグラウンドになる深い専門知識、対応の柔軟性、未経験な問題への適応性、素早い行動である。こうした問題への対処が、既存の行政組織で難しいのは当然であろう。とくにバックグラウンドになる深い専門知識に関しては、2年程度で職員が職場を変わるわが国の現在の行政組織ではやむを得ない問題であり、研究機関との連結が必要になってくるゆえんである。

結論として、すでに担当部署が明確であり、しかもパターン化されている問題には対応しやすいが、未知あるいは未確認、ないしは新しいカテゴリーの問題や出来事に対し

ては、対応が難しく、これをどう解決するかが問題の本質である。もちろんこうした問題解決への努力は行政において始まっており、先の厚生省健康危機管理調整会議はそのひとつの具体的な対応である。

### 健康危機管理を支援する情報基盤の条件

危機管理に関する仕事の性格は、そのままそうした仕事を支援する情報基盤（システム、ネットワーク、運用）にも、反映されなければならない。すなわち、未知の問題に遭遇する可能性があることから、監視網は広く、厚くなければならない。またネットワークには多くの関係者が参加できなければならないが、そのためには、ネットワークが広域であり、参加のためのコンピュータの環境づくりが容易で、通信コストが安くなければならない。

また、実際のネットワークは、状況に応じて容易に生成でき、必要がなくなればただちに廃止できる臨機応変なものでなければならない。さらに、そうしたネットワークに誰が参加するのか、どのような情報を交換するのかも臨機応変に管理できなければならない。また、ネットワーク自体が知識やデータの供給源として機能する必要がある。さらに、1ヶ所の機能が停止してもネットワークにつながっている他のセンターあるいはノードとなっているシステムが、これを補うというような堅牢さがなければならない。

詳しい技術的な議論は省くが、こうした要請に応えられる情報システムはインターネット（と関連技術）を基盤としなければ構築できない。実際インターネット以外にも、電話とFAXや、パソコン通信や、汎用機のホストにパソコンを（しばしば専用線で）端末として繋いだ閉鎖型のセンター方式（Fig.1）があるが、これらのシステムはインターネットを基盤としたシステムの機能を補うものであっても、それを代替できるものではない。

したがって、健康危機管理の情報基盤はインターネットを基盤をして再構築されなければならない。これは、緊急の課題である。

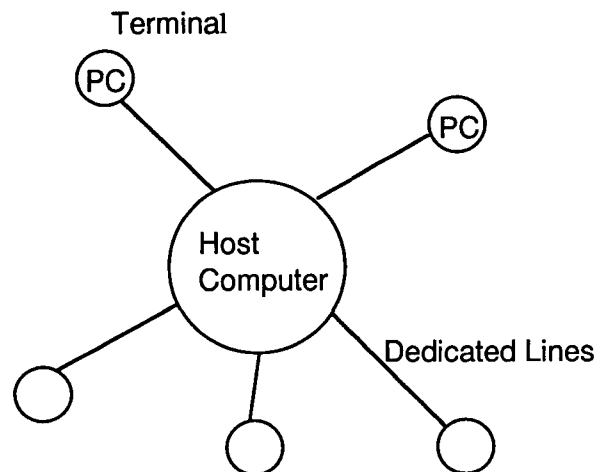


Fig.1. Host Computer Centered Network

## 健康危機管理におけるケミカルハザードの位置づけ

健康被害を原因から分類すると、フィジカルハザード(物理的危険)、ケミカルハザード(化学的危険)、バイオハザード(生物学的危険)に分類される(Fig.2)。フィジカルハザードの要因には、災害時の物理的な破壊、雷、放射線、その他の電気、電磁波、磁場などがある。ケミカルハザードには、食品、医薬品を含む幅広い化学物質による健康被害が含まれる。バイオハザードは、病原菌など生物要因による健康被害である。

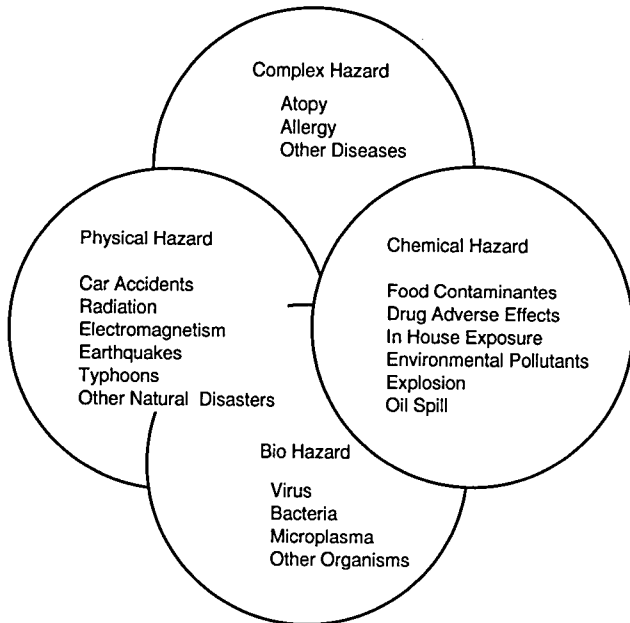


Fig. 2. Classification of Health Hazard

当所は、ケミカルハザードへの対処を主なミッションとしている。ただ、一般にケミカルハザードの概念はバイオハザードに較べて、成熟していない。例えば、(一部の)食中毒、薬の副作用あるいは相互作用、室内の空気、大気、水質、土壌など環境汚染による健康被害は、担当部署も異なり対策も異っている。しかし、これらの問題はいずれもケミカルハザードに関係している。

科学の立場からケミカルハザードを定義すれば、「化学物質が生体に作用することで引き起こされる健康被害」ということができよう。突き詰めれば、どのような物質が生体のどこにどのように作用するかが問題である。この問題の究明には物質を同定する化学分析の技術や知識だけでなく、生体への作用を解析する技術と知識が必要である。後者の研究は生物医学、毒性学に関係しているが、現在の生物医学や毒性学は分子生物学を基盤にしており、分子生物学は、遺伝子、タンパク質、糖、脂質など生体分子や細胞レベルの技術と知識を基盤としている。例えば、ベンツピレンのような環境汚染物質ではどのような遺伝子が損傷されるかが問題になり、エストロゲン類似物質<sup>4)</sup>ではどのようなタンパク質と結合して遺伝子発現にどのような影響

を及ぼし、それが正常な内分泌系の働きをどのように妨げるかが、研究されている。腸管出血性大腸菌 O-157 であれば、治療薬の開発にペロ毒素の 3 次元構造が必要になる。

このような現実を考えれば、ケミカルハザードに対処するためのバックグラウンド情報は化学分野だけでなく生物学の分野も深くカバーしていなければならないことがわかる。したがって研究機関の情報基盤から考えるならば、ケミカルハザードへの対処においてもバイオハザードに対処するのと同様のような学問的な知識と情報をバックグラウンドとして用意しておかなければならないことは明白である。

ただバイオハザードが感染症中心になるのに対し、ケミカルハザードは食品、医薬品、水道水、その他一般の化学物質など、問題のカテゴリーが複数あり、行政的にも多くの部署が関係している。そこで代表的な問題領域について、現在の問題点を簡単に考察しておきたい。

## 食品に関連した情報基盤

食品に関連した健康危機管理としては、食品由来の疾病、とくに感染症対策がひとつの柱であろう。事実、米国においては病原性大腸菌 O-157 などの被害を踏まえて、本年(97年)から食品安全国家計画(National Food Safety Initiative)が議論されている<sup>5)</sup>。この計画では大腸菌 O-157 以外にサルモネラ、キャンピロバクター、トキシプラズマ、クリプトスポリジウム、ノーウォークウイルスなどの病原菌及びウイルスに原因する疾病の大量発生をキャッチできるような公衆衛生サーベイランスのための早期警告システムを新たに開発するとしている。

具体的には、すでに存在している食品由来疾病監視ネットワーク(Active Foodborne Disease Surveillance Network)を強化することである。現在 CDC (Center for Disease Control), FDA (Food and Drug Administration)、農務省は全米 5ヶ所にある食品監視センター(Food Sentinel Sites)を支援しているが、これが 7ヶ所に拡張される。また、州を含む公衆衛生関連の分析センターの機能を拡充し、寄生性の病原微生物、ウイルスなどの検出能力を高める。とくに新しい DNA フィンガープリンティング技術を開発し、このデータ(電気泳動像)を交換できる全国規模のデータベースとネットワークを構築し、病原性細菌のタイプの同定が速やかに行える体制を整備する。この他に、CDC は病原性微生物の薬剤耐性に関する監視体制を強化する。

さらに情報交換が円滑に行くように、CDC, FDA、農務省の間で記録の管理方法などを調整する。この他に、家畜の飼料の影響をモニタリングすること、化学物質に対するリスク評価と同じようなリスク評価法<sup>6)</sup>を食品を汚染する病原因子にも開発すること、HACCP (Hazard Analysis and

Critical Control Point) の概念<sup>7),8)</sup>をより広い食品分野に拡張すること、予防のために食品の提供サービスに関わる関係者への教育研修の機会を増大することなどが検討されている。

この構想をわが国の現状と比較してみると、まず CDC, FDA, 農務省など食品の安全性に関わる主要機関の情報基盤がしっかりしていることが挙げられる。つぎに、それらの機関の情報システム（データベースやネットワーク）が単独ではなく、互いに連携することにより、食品由来の健康被害に対処するという姿勢が見られる。わが国では、行政と研究の個々の機関の情報基盤が貧弱なだけでなく、それらを相互に結ぶという構想もまだない。

なお、食品に関してもうひとつ注意を払うべき課題はバイオテクノロジーの進歩に伴う遺伝子組み換えにより生産された食品（農産物）<sup>9)</sup>である。この分野においても迅速な情報交換のための基盤が必要であろう。

#### 医薬品の情報基盤

上記の食品や後の一般化学物質に較べると、医薬品に関する情報基盤は形の上ではより整備されている。例えば、

- (1) 承認された医薬品に関する基本情報
- (2) 副作用情報
- (3) 上市後の追跡調査による再評価情報
- (4) 医療（医薬品）サービス機関への警告情報

などはすでに制度として存在している。こうした仕事に携わる関係者は、医薬品情報（DI, Drug Information）の専門家とされている。ただし、これはどちらかと言えば欧米での話である。

わが国においては、個々には同じような制度が存在するが、内容的にはまだ未熟である。その原因として、以下のような事情が考えられる。

- (1) 医薬品の供給側から独立した、臨床成績を踏まえた薬効評価体制が貧弱である。
- (2) 副作用情報のように、情報として集められ存在していても、活用する体制の整備まで手が回らないため、せっかくの情報が生かされていないことが少なくない。
- (3) 欧米では、医療関係者に限らず、患者や一般市民も容易にアクセスできる医薬品の情報が豊富である。これは政府としてのアカウントビリティ（Accountability, 自らの行為を説明する責任感）への姿勢の違いと、医療制度としてのインフォームド・コンセント（Informed Consent）の成熟度の違いによると思われる。
- (4) とくに米国と較べると情報基盤の整備が遅れているため、異なる情報を相互に参照したり、連結したりすることが難しい。

わが国における医薬品の審査、使用、評価の制度は再編成中である。したがって薬害を健康危機管理として捉えた指針はすでに発表されているが<sup>10)</sup>、医薬品情報の流通と利用も新しい制度の下で大きく変容すると思われる。インターネットなど情報技術の進歩はこうした変化を加速する大きな要因となっている。こうした状況の変化に対応して当所が医薬品情報の分野でどのような役割を果たすべきかを早急に考える必要がある。

#### 一般化学物質対策

感染症が緊急性を重要視しているのに較べると化学物質対策は一見緊急性に乏しく、危機管理の対象になりにくいと思われがちである。たしかに化学物質の安全管理への体系的な取り組みはどちらかと言えば、リスクアセスメントに偏っており、緊急対応は現場に任されているような印象がある。だが今日そうした状況になっているのは、実はヒ素鉍毒、有機水銀中毒、カネミ油症（PCB）、ヒ素混入ミルクなど数々の悲劇を経験することで、法整備が進められ、予防体制が整ってきたという歴史的経緯があるからである。つまり、緊急対応の必要性が感じられないのは、それだけ対策がうまく機能しており、予防効果が挙げられている証拠とも言える。

しかし、物質科学の進歩で新しい物質がつくられるピッチは上がっている。半導体素子の新素材、超伝導物質、C60（フラーレン）、カーボンナノチューブなどはその例である。こうした新しい物質は、最初はその優れた機能が注目され、新製品として期待されても、大量に使用される過程で予想外のネガティブな面を露呈することがある。アスベスト、フロン、DDT、PCB、ダイオキシンを含む枯れ葉剤（エージェントオレンジ）はそうした例である。また、製品ではよいが廃棄物や廃棄される過程で問題になる可能性を秘めたものもある。高速半導体に使われるガリウム砒素、プラスチック（可塑剤）はそうした例である。しかも、問題が顕在化するまでに被害要因は広く深く生体や環境に浸透してしまうことが起こりうる。また単独ではなく複合的な要因として働くケースも多いと思われるが、そうした危害の解明には多大な人手とコストが要求されることが多い。

したがって、緊急な対応が求められるのは、戦争、大規模災害、テロなどの事件、大規模な事故に限られようが、危害の早期発見、早期警告体制はやはり必要である。しかし、行政の関係している部署は多岐にわたっており、感染症のように情報を一元的に管理することはかなり難しいと思われる。とくに被害を全体として把握することが難しくなる。

例えば化学災害なら消防、職場での事故なら労働省である。建材からのホルムアルデヒドによる室内汚染やそれが

原因とされる健康被害がいわゆる化学物質過敏症などとして話題に上がっているが、一般に医療機関が化学物質を健康被害の原因と割り出すことは難しいことが多い。また急激な症状を示す家庭の事故は中毒情報センターでも把握されることがあるが、フォローアップは通常不可能である。また被害が地域保健行政機関で把握される事例もあるが、これを集計するような機構に欠けている。アメリカではEPAが農薬の事故を臨床医に報告させる制度があるが、わが国にはそうした制度はない。そもそも中毒情報センターも少なく、リソースも限られている。

結局、感染症と較べても、食品や医薬品と較べても、一般化学物質の被害は関連する分野が余りにも多いため、行政で言えば、どこかの課が中心となるような一元的なサーベイランスシステムで対応することが難しいのである<sup>11)~13)</sup>。

この問題を解決する一つの方法は、分野や行政区分を異にする多くの関係機関や関係者のインフラストラクチャーとしての情報基盤を整備しておき、日頃からよくコミュニケーションがとれるようにしておくことであろう<sup>14),15)</sup>。とくに研究機関は、これまでリスクアセスメント面では直接行政を支援してきており、コミュニケーションも密接であったが、予見的な情報収集や外部への情報発信事業における協力は無きに等しかった。上記の情報基盤はこうした状

況を改めるものでなければならない。

### 3. 整備すべき情報基盤

以上の考察を基に情報基盤の構築をより具体的なイメージで考えてみよう。ここでは問題対象をあまり限定せず、共通性のある要素をあげてみよう (Fig.3)。

#### (1) 健康被害要因監視網 (Hazard Surveillance Network)

健康危機管理でもっとも基本になるのは、すでにパターン化されている危害に対処するための監視網である。感染症サーベイランス、副作用報告制度、食中毒の届け出制度など、すでに存在している特定の疾患や危害に関する監視網がこれに当たる。ケミカルハザードに対象を限定すると、医薬品、食品、水道水などについては、対処システムが一応確立しているが、対象を限定しない化学物質一般による被害を監視し、報告するシステムがないことが問題である。

例えば、強い急性毒性を示す化学物質はいわゆる毒物劇物の扱いであり、化審法(化学物質審査)の対象となる物質とは局課が異なる。ダイオキシンに関しては、基準を扱う課と環境暴露を扱う課とは異なる。したがって今後強化するとすれば、直接担当する部署は同じでなくてもよいが、ネットワークを利用して化学物質の健康被害を一元的

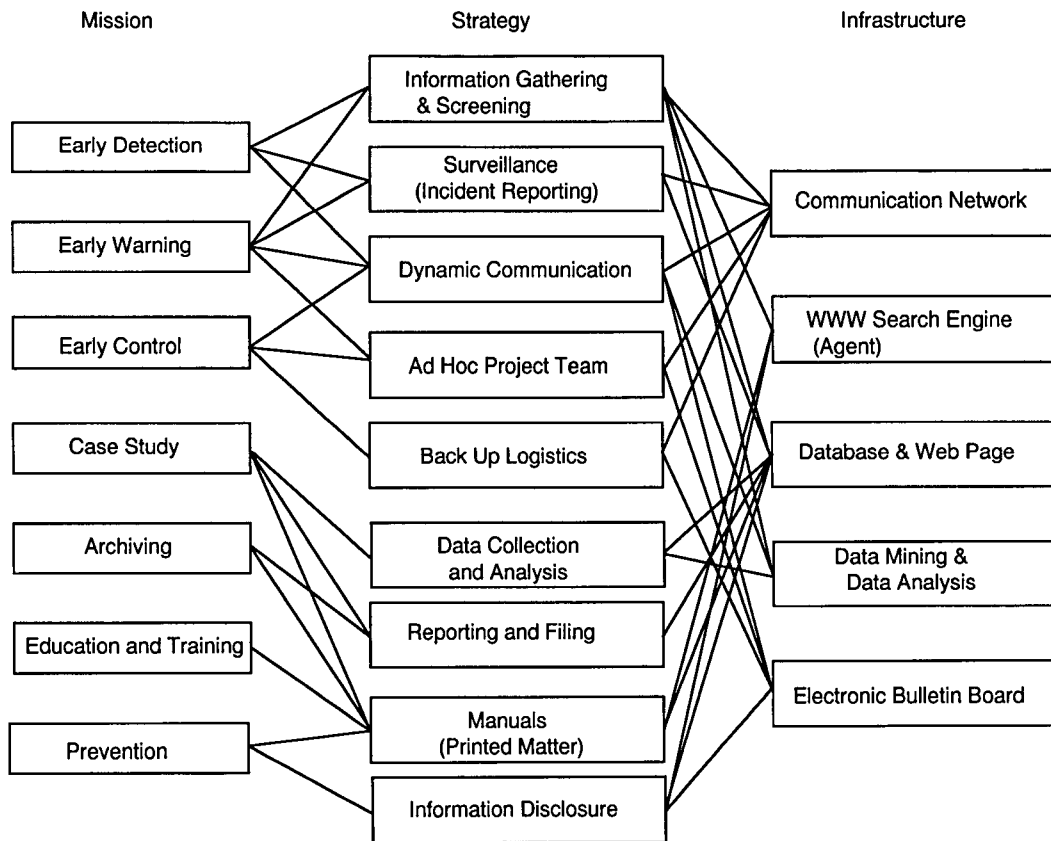


Fig. 3. Mission Strategy and Infrastructure of Health Hazard Control

に集められる仕組みをつくることである。こうして集められた記録は、1ヶ所で管理するより関係機関にネットワークを通じて配布するか、あるいはミラーリング（データベースなどで、あるシステムの内容を他のシステムに自動的に移して、内容を同じにする技術）しておくことがよいであろう。

化学物質の安全基準は場所に依存しないが、リスク（危害を受ける確率）は常に現実の場所に依存している。その意味ではケミカルハザードの監視網には、リスクアセスメントの基礎となる環境暴露（Exposure）の実測値の収集が含まれていた方がよいであろう。もっとも二つの監視機構は地図システムを媒介にすれば、容易に関係づけられる。この意味では、こうしたネットワークの整備の一環として、（健康環境）地理情報システムを整備しておくべきである。また、そうした基盤があれば環境中の健康被害と要因の相関解析（データマイニング）を行うことも容易であり、疫学調査などの先駆けになる。

## (2) 健康被害の早期発見のための情報システムの整備

健康危機管理に対処するためには、上記のようなパターン化された健康被害の監視情報だけでなく、より範囲を広くした健康被害や事故に関連した情報を普段から国内および海外で収集し、分析しておくことが必要である。さらにそれらの情報を必要ときに簡単に取り出して利用できるように蓄積しておくことが重要である。

インターネットの普及で WHO (World Health Organi-

zation), CDC, FDA などの重要な速報がネットワークから直接見られるようになった。もちろん受け身の姿勢では、膨大な情報のなかから必要な情報を探しだし、収集することは容易ではないが、少なくとも情報提供と情報収集の技術は画期的に進歩している。とくに、WWW を介して入手できる情報であれば、インターネット上を自動的に探して、収集してくれるシステムが研究されている。こうしたシステムはしばしばネットワーク上の情報 (WWW/DB) 探査エージェントとも呼ばれる。(エージェント (Agent) とは自分の代わりに仕事をしてくれる自動的なシステムを意味する。)

この種のシステムとして最もよく知られているのは、Yahoo, Infoseek, Alta Vista などの分野を問わない検索システムである。より専門分野に関しては、例えば化学物質に関連した ChemFinder や、医学分野の検索を目的とする MedExplorer などがある。

さらに信頼のおける使いやすいシステムは、自分達の目的用に独自に開発した情報収集と検索エンジンであろう。(検索エンジンとは、情報を自動的に検索してくれる情報システムを意味する。) われわれも、すでにこうしたシステムを開発始めている。

このような道具は、情報の収集能力を画期的に向上させるが、集めた情報の中から重要な情報を抽出するにはやはり人間の専門家が必要である。そもそもどのような情報を集めたらよいかは、専門家に依存している。したがって、このようなシステムは、本来専門家による情報収集とスク

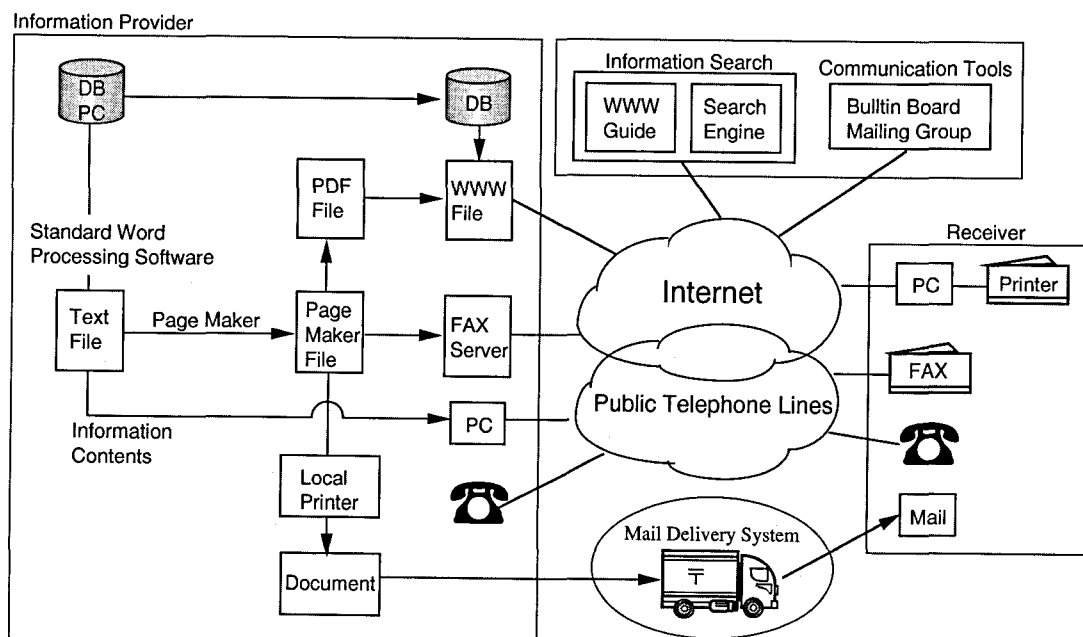


Fig. 4. Multimedia Health Hazard Communication Network

リーニングを支援するシステムでなければならない。

いずれにしても、収集され、スクリーニングされた情報（コンテンツ）は、健康危機管理の関係者に速報されなければならない。この目的には印刷物やFAXの他にWeb、インターネットを経由したFAX、電子メール、電子掲示板、ニュースグループ、放送型の技術など多くの新しい技術が使える。実用的な観点では、一つのメディア（情報媒体、コミュニケーション手法）でなく複数のメディアを組み合わせるべきであろう（Fig.4）。この中には、海外の専門機関や専門家に問い合わせをすることも含まれる。

関係者に配布された情報は、何らかのコメントが付けられて、関係者にフィードバックされるのが望ましい。

### (3) 早期対策を支援する情報システムの整備

実際に健康被害・事故が起こった際には、行政と地方の行政機関や衛生研究所を含む関連研究機関相互の迅速かつスムーズな情報交換ネットワークを緊急に立ち上げることが重要である。このためにはこれらの機関を結ぶ情報ネットワークと情報システムを平時から整備しておく必要がある。その中には、国の行政機関同士、国と地方の行政機関、国の行政と試験研究機関、国と地方の試験研究機関、さらに海外の行政および研究機関との情報交換が含まれる。

もちろん実際に情報が交換されるのは、その中から当面の問題の関係者だけである。ただ、誰が関係者かは状況によってダイナミックに変化するから、ネットワークの運用はこの変化に対応できなければならない。実際の情報交換はインターネットのWeb、FAX、電子メール、電子掲示板、ニュースグループ、放送型だけでなく、パソコン通信やクロードなネットワークも併用することになる。

### (4) 健康被害の記録管理システムの整備

健康被害は一過性のものと、継続的に発生するものがある。例えば砒素ミルク、サリンの被害は一過的であり、化学発がん因子による被害は継続性があり、毒キノコによるそれは反復性があると考えられる。いずれの場合も被害の事例を、テキスト、画像、音などマルチメディアで記録しておけば、研究や、教育研修、予防に役立てることができる。さらに、こうした記録の英語版を作成しておき、海外の行政や専門家の利用に呈することもできる。

こうした記録の対象になる事例としては、食中毒など食品による健康被害、医薬品の副作用、誤用など医薬品による健康被害、一般化学物質による健康被害、水質汚染、大気汚染、土壌汚染など環境要因による健康被害、タンカーからの油流出のような大規模事故、地震など大きな災害に原因する健康被害が考えられる。

### (5) 健康被害の事例研究

現に進行している被害や過去に起こった被害事例の状況や問題点を検討し、それらを教訓としてより適切な対応策を準備することによって、将来起こり得る同様の被害を未然もしくは最小限に防ぐことが可能となる。下記の情報公開とも関連するが、このような記録は内外の関係者と関係機関に提供しておかなければならない。また研究機関では事件対応の一過性のものでない長期的かつ高度な被害事例研究を行い行政を支援することが望まれる。

### (6) 健康被害の予防、対策教育システム

上記の(4)、(5)の事業によって整備された記録は、被害の再発防止のためのマニュアル作成の基礎資料となる。こうしたマニュアルには文書だけでなく、画像、図、写真、映像、音などをマルチメディアを用いることが考えられる。このような事例に基づいた（マルチメディア）の対策マニュアルをネットワーク上に置けば、いつでもどこからでも使えるトレーニング用のシミュレータとなる。

### (7) 情報の公開

一般論であるが、安全、健康、環境に関する情報発信事業は、純粋な研究業務と行政の仕事との間に位置するものが多く、どちらが担当すべきか区分は必ずしも明確ではない。例えば米国の場合、行政も研究機関も、さらに図書館も広報機能が強力な上に、情報提供のための専門機関も別にある。ところがわが国の場合、そのいずれの機能も貧弱である。

また、これも一般論であるが、行政からの情報発信には、2つの制約が付きまとうと想像される。第1は、研究機関であれば必要な情報を比較的自由に組み合わせることができるが、行政の場合、課単位の仕事の区分にどうしても縛られることである。第2は、担当者が比較的短い期間に交替することである。すでに述べたように、Webページの作成には、かなりの継続性、センス、専門能力が要求される。このことを考えれば、行政からの本格的な情報発信は当然その大部分を外注することになるであろう。ただ、これまで述べた分野に関しては、研究機関や研究者との連携なくして優れた情報コンテンツを作成することは実際問題として、極めて難しいのではないかと考える。

したがって、行政の情報発信に関しても研究機関は支援をする必要があり、また両者は、相補的な情報発信を行うべきであろう。この点COE（Center of Excellence）としての米国のNIH（National Institutes of Health）やNIEHS（The National Institute for Environmental Health Sciences）の情報発信事業は参考になる。さらに、研究機関として情報提供事業を手掛ける以上、コンテンツ（情報内容）もさるしながら、それを発信、流通させる情報技術自身の開発も研究の対象になると考えるべきである。例えば米国のNLM

(The National Library of Medicine, 国立医学図書館) には、  
 そうした情報技術開発のための部門が併設されている。

に対する効果を考えた、スピードのあるマネジメントの下  
 で動いていることである。

(8) 要員と運用

上で述べたような情報基盤、すなわちネットワーク、シ  
 ステム、コンテンツについての開発と整備、食品、医薬品、  
 一般化学物質のそれぞれの分野ごとに進めるべきであろ  
 う。またそれらを開発するためには、食品や医薬品や化学  
 物質の安全性に関わる研究者以外に、コンピュータや情報  
 学(統計学、データ解析、人工知能、パターン認識)の専  
 門家、計算化学や生命情報学(Bioinformatics)などの専  
 門家、情報サービス専門の要員などからなる学際チームが  
 必要である。さらに重要なのはこうしたチームが常に外部

(9) 行政と研究機関との協力関係

上記の(1)~(8)の情報基盤の要素は感染症とか医薬  
 品とか水道水とかいうように、それぞれの対象ごとに整備  
 されることになる。それらのシステムは、当所だけでなく  
 行政の複数の担当局課、外部の複数の研究機関にも関係し  
 ている。こうした問題対象ごとの情報ネットワークやシス  
 テムをさらに統括するのは、その問題の行政の担当局課で  
 ある。したがって、これらの情報基盤の有効性は、それぞ  
 れの担当局課がこうした基盤をうまく利用して、適切に情  
 報を集め、適切に判断を下し、適切に行動することにかか

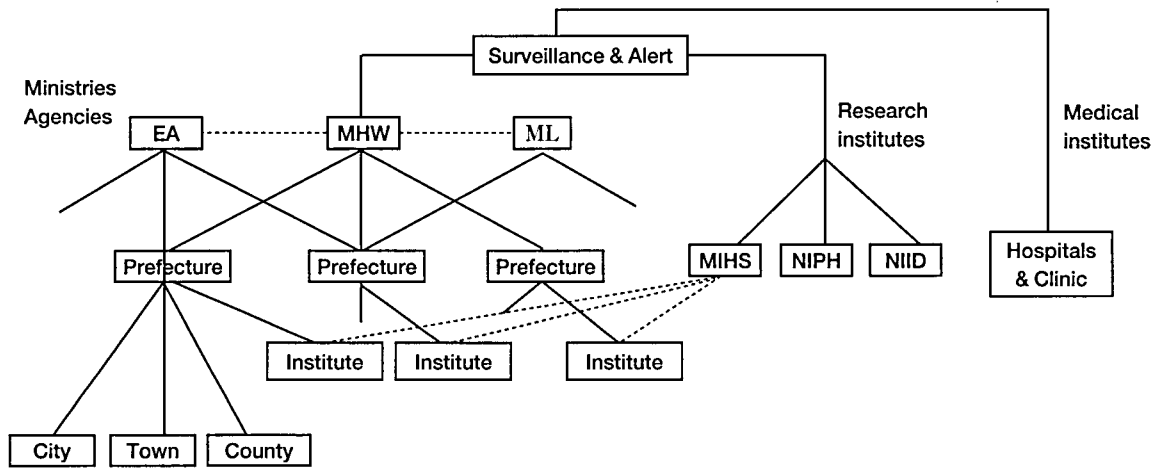


Fig. 5. Conventional Hierarchical Network for Health Hazard Control (MHW:Ministry of Health and Welfare, EA:Envi-  
 ronmental Agency, ML:Ministry of Labor, NIHS:National Institute of Health Sciences, NIID:National Institute of  
 Infectious Disease, NIPH:National Institute of Public Health)

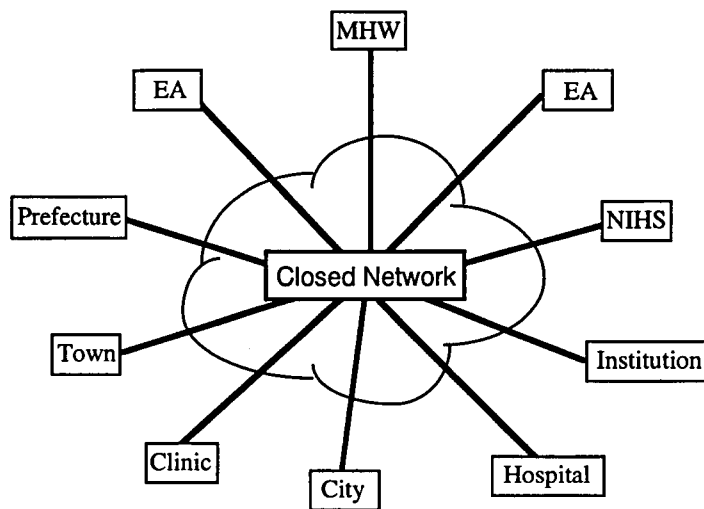


Fig. 6. Concept of Closed Network on the Internet (Extranet) for Health Hazard Control (MHW:Ministry of Health and  
 Welfare, EA:Environmental Agency, NIHS:National Institute of Health Sciences)

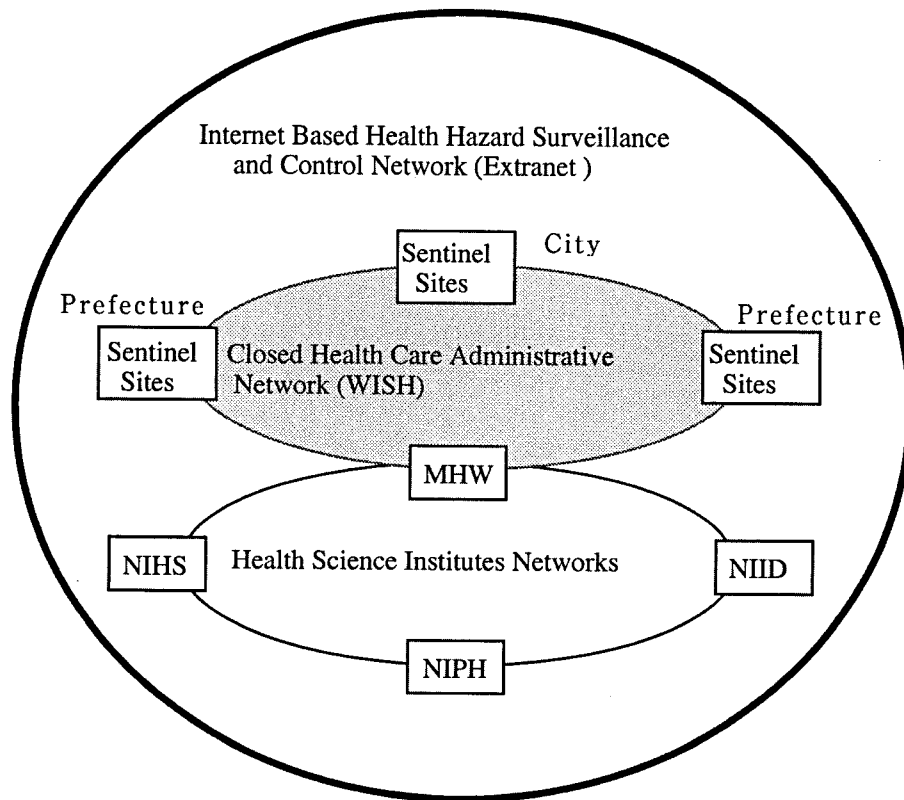


Fig. 7. Concept of the Information Infrastructure for Health Hazard Control (MHW:Ministry of Health and Welfare, NIHS: National Institute of Health Sciences, NIID:National Institute of Infectious Disease, NIPH:National Institute of Public Health)

っている。

しかし、こうした情報ネットワークや情報システムを、これまでのように (Fig.1のような) ホストコンピュータ中心の閉鎖的なネットワークとして担当局課がそれぞれ独立に構築したのでは、健康危機管理への対応としては、うまく行かない (Fig.5)。その理由は、健康危機管理を支援する情報基盤の一般論として、すでに2章で述べたところである。この問題を解決する最良の方法は、目的別の情報システムをネットワーク (インターネットあるいはイントラネット) を核として相互に接続した、広域のネットワーク (エキストラネット) を構築することである (Fig.6)。実際には従来の行政中心のネットワーク (WISH) と研究機関系のインターネットを接続したものになる (Fig.7)。また、それぞれの情報システムを支える技術は共通性が高いので、技術的な開発は一元的に進めた方が効率が良いはずである。

幸い健康危機管理に対応しては、厚生省 (大蔵官房) 厚生科学課が事務局となっているので、こうした情報基盤のデザインと運用 (あるいは調整) を同課が担当するならば、この問題は容易に解決できるであろう。

#### 4. 実現へのシナリオ

既に関発したシステム

以上で、一般論を終わり以下ではこの構想をどのように具体化して行くかについて簡単に考察しておきたい。上で述べたように、このような構想は厚生科学など、行政が先導的に進めるべきものと考えられる。しかしその中で、当所とくに化学物質情報部として、具体的にどのようなシステム開発に取り組むべきかについて考えてみたい。

こうした開発の基盤となる環境は、インターネットを基盤とする国立医薬品食品衛生研究所の基幹ネットワーク<sup>16)</sup>と情報発信機能<sup>17)</sup>である。この基幹ネットワークは、平成4年頃から筆者らが中心となって提案した厚生科学課傘下の7試験研究機関を結ぶ「厚生科学研究基幹ネットワーク」構想の一環である。この構想は、単に各研究機関の所内ネットワークを外部 (インターネット、科学技術庁の省際ネット) へ接続する環境を整備するだけでなく、研究機関間の有機的な連帯をもめざすものであった。

その後、平成6年度に感染研が、7年度には当所がそして8年度には公衆衛生院がインターネットに接続された。これにより、厚生科学課傘下の7試験研究機関の核となる基



幹ネットワークの整備が一段落したことになる。したがって、この機会に行政の健康危機管理を意識した研究機関間の具体的な「連携」に着手してもよいであろう。そうした連携の第一歩としては、健康危機に関する情報コンテンツの整備と、その Web あるいはデータベースによる提供および緊急時のコミュニケーション・ネットワークを優先すべきであろう。

すでに化学物質情報部では、ケミカルハザードを意識して、食品、医薬品、(一般)化学物質、環境という4分野に分類して、情報コンテンツを整備している<sup>18),19)</sup>。この中でも、とくに一般化学物質に関しては、化学物質の安全性に関する地球規模の情報ネットワークである GINC (Global Information Network on Chemicals) という計画があり、情報の一元化への国際協力の路線が敷かれている。この GINC 構想は筆者らが提唱したものであるが、現在は国際化学物質安全性フォーラム (IFCS) を支える6つの国連および国際機関、すなわち WHO, ILO (International Labour Organization), UNEP (United Nations Environmental Programme), FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), OECD (Organizations for Economic Co-operation and Development), UNIDO (United Nations Industrial Development Organization) のプロジェクトとして認知されている。

さらに化学物質情報部は GINC の枠の中でパイロットスタディとしてアジア地域における化学物質の安全な管理をめざしたネットワーク、「GINC アジア」を提唱し、この中に Chemical Alert や Chemical Incidence Reporting に関連した情報交換システムを含めることを検討している。なおこの課題は97年10月に東京で化学物質情報部がホストとなって開催する予定の GINC アジアに関する会合で討議する予定である。

また国内の研究機関とのネットワークとしては、科学技術庁振興調整費による「生体影響物質データベース」研究において、科学技術振興事業団、理化学研究所、通産省工業技術院(生命工研および物質工研)、環境庁国立環境研究所など他省庁の研究機関との間で健康安全環境に関連した物質データベースの(インターネット上の)統合検索環境を構築中である。

食品に関しては、まだ十分な情報コンテンツが整備できてないが、昨年度病原性大腸菌 O-157 の患者の集団発生を機に、発生状況を地図で見るシステムを開発しインターネットで提供している<sup>20)</sup>。食品に関した状況は、輸入食品の増加や遺伝子組み換え食品の登場、食品由来の感染症の頻発、米国における HACCP 拡大の動きなどで大きく変化しており、研究機関としても情報提供機能、情報交換機能の強化が大きな課題になっている。これは当部というよりは、当所としていずれ対応することになる。

医薬品に関しては、WWW やデータベースで情報を提供するとともに主として外部に協力者を考えて、インターネットを基盤とした医薬品情報の流通と活用をめざす実験研究プロジェクト PHII (Pharmaceutical Information Infrastructure) を立ち上げた<sup>21)</sup>。このプロジェクトは医薬品の添付文書を含め、創薬から上市後の薬の再評価に至るまでの情報をシームレスに(相互に円滑に関連づけて)利用できる環境づくりをめざしている。

環境に関しては、環境庁の地球環境研究総合推進費などにより、環境と健康に関する地理情報システムを整備し、これを利用して食品、大気、水の中の環境汚染物質の分布を地図に表示することを試みている<sup>22)</sup>。

最後に健康被害の早期発見、早期対策に関連しては、本年1月に起きたタンカー・ナホトカによる重油流出時に、健康危機管理対策の事務局となっている厚生科学課と協力して化学物質情報部(山本都主任研究官)が電子メールによる情報交換、関係者のための Web ページの開設、情報の収集と提供などを実際に体験している。

以上述べた、化学物質情報部が開発、整備してきた具体的なネットワークやシステムは、健康危機管理のための情報基盤の文字通り基盤となりうると考えている。つぎに、現在検討している計画のつぎのステップの中から、とくに当部が優先的に取り組むことを考えている化学物質と医薬品に関連した情報基盤整備計画について紹介しておきたい。

#### 化学物質の安全性情報基盤の強化

上で述べたように、化学物質情報部は化学物質に関してはすでに健康危機管理のための(1)~(8)の対策のほとんどについて、実験的な試みを行っている。ただ、恒常的なサービス業務としては要員、予算などの裏付けがないため、つぎのステップにおいても研究開発や実験に重点を置かざるをえない。とくに優先度が高いと考えているのは、

- (1) 危害の早期発見のための情報探査、収集機能の強化
- (2) 大規模な危害に対処するための緊急情報ネットワーク、とくに行政、国の研究機関、地方衛生研究所、海外の専門機関とのコミュニケーションネットワークの強化。
- (3) 健康被害記録のインターネットによる公開と予防、再発防止への活用実験などである。

最後の項目に関してはすでに昨年度、化学物質による健康被害記録のインターネットによる提供実験を開始している<sup>23)</sup>。

#### 医薬品の安全な使用のための情報解析基盤の整備

医薬品の安全な使用は国民の大きな関心事であり、厚生省としても、とくにエイズ薬害を契機として研究機関の再

編を含む、全省的な構造改革に着手したところである。この問題への対応として当所の立場で考えられている事業のひとつは、国内外の医薬品の効能と安全性や正しい使用方法に関する情報を収集整備するとともに、薬害を早期に発見し、また過去のデータから危険性を予知し、早期に警告を発するための情報基盤を整備することである。

これはまさに健康危機管理の具体的な課題の一つであり、その実現には以下のような研究開発項目が考えられる。

- (1) インターネットの WWW やメーリングリスト（電子メール管理システム）、FAX の自動配信機能を利用して、医薬品の安全性や適正な使用に関心を有する専門家が常時最新の情報を入手し、意見を交換できるような協力ネットワークを整備する。
- (2) インターネットなどを利用して、医薬品に関する最新の情報を収集、編集、データベース化するとともに、統計学、パターン認識、人工知能、構造活性相関などの理論的手法を駆使して、副作用などの解析や予測を行う基盤システムを開発する。
- (3) インターネット上に提供されている WHO, CDC, FDA などの医薬品の安全性に関する速報的な情報を効率的に探索し重要な情報を抽出し、編集するエージェント（人間の専門家によって仕事をする知能的なソフト）を開発する。
- (4) 治療薬および上市後の医薬品の（3次元）構造と薬効および副作用、相互作用情報を統合的なデータベースとして整備し、構造活性相関のような理論的方法論を駆使して、薬害や副作用の可能性を早期に検出するためのサーベイランスシステムを開発する。

ただし医薬品に関しては、要員、予算とも化学物質よりさらに脆弱であり、計画の実現は当部あるいは当所の要求がどの程度認められるかに依存している。

## 5. とくに解決すべき課題

健康危機管理のための情報基盤の整備として、当所の情報的な機能部門の強化を中心として、考察したが、その実現にはトップダウンのマネジメントと情報部門以外の各部門の協力が必要なことは言うまでもない。この他にもう少し巨視的に見た解決すべき課題をいくつか挙げておきたい。

まず指摘しておきたいことは、厚生省の現在の研究体制にはバイオハザードとケミカルハザードに対応する研究機関はあるが、フィジカルハザードを扱う研究機関がないことである。すなわち放射線、電磁気、電磁場などによる健康影響に対処する直属の（専門）研究機関がない。これには何らかの解決策を考えておくべきであろう。

また行政が現在のところ主として依存しているパソコン

通信を基盤とするような閉鎖的な広域ネットワークは、できるだけインターネットを基盤とした新しい概念のそれに再構築することが必要である。さらに同じ厚生省関連の研究機関を横に結ぶ Web と電子メールを用いたコミュニケーション機構が必要である。同様なコミュニケーションは、医療機関、地方衛生研究所や公害研究所との間にも拡張されるべきである。そのためには、すべての医療機関や地方衛生研究所がインターネットへ接続されることが前提となる。後者に関しては当部としても、地研協議会や厚生科学研究費による広域保健情報ネットワークの構築とその地域保健サービスにおける有効利用に関する研究班などを通じて実現に努力している<sup>24), 25)</sup>。

同様なネットワークは潜在的な研究協力者との間にも構築されなければならない。さらに、こうした健康危機管理に対応した研究者間の情報交換のための定期的な会議を設置すべきであろう。だがこうしたコミュニケーション・ネットワークは関係機関がネットワーク（インターネット）に接続されてさえいれば容易に実現可能である。

## 6. おわりに

研究機関としての立場から、行政の健康危機管理を支援する情報基盤を如何に構築したらよいかを考察した。この情報基盤の実体はインターネットと WWW の技術を基礎とするコンピュータネットワークとシステムであり、現在全所的な体制で開発整備している所内の基盤ネットワークを中核として、国の他の国立研究機関や大学、地方衛生研究所や海外の研究機関、国際機関とのネットワークで構成される。

こうした情報基盤が構築できれば食品、医薬品を含む幅広い化学物質に原因する健康被害対策一般において、当所と本省をはじめとする行政部門との効果的な協力体制が確立できる。この体制は、とくに緊急時や大規模な被害が発生した場合、これまでより迅速かつ効果的な対応を可能にする。また、これまで気づきにくかった早期の警告情報をタイムリーに捉えることにも役立つと考えられる。さらに、過去の事例から学び、予防に役立てることに寄与すると考えられる。

もちろんこうした情報基盤を構築するには、予算的な措置、要員や施設などリソース（研究資源）への配慮が必要である。ただ、研究者にとっては研究資源はいつも不足気味である。重要なことは、新しい実験的な試みを積極的に行って必要なシステムのイメージをつくることである。

## 謝 辞

本論をまとめるにあたり、一般化学物質と食品に関しては、化学物質情報部の山本都主任研究官と大竹千代子氏、医薬品に関しては山本美智子氏にとくに協力していただいた

た。また、研究機関が行政をどう支援すべきかについては、寺尾允男所長、齋藤行生副所長との日頃の話し合いに負うところが大きい。さらに厚生科学課の西沢元仁研究企画官にも助言を戴いた。ここに感謝する。

## 文 献

- 1) 厚生省健康危機管理基本指針 (平成9年1月9日) および健康危機管理実施要領 (平成9年4月3日), 厚生省大臣官房厚生科学課
- 2) 厚生科学要覧'96, 厚生科学研究所, 1996年3月6日
- 3) 神沼二眞, 第三の開国—インターネットの衝撃, 紀伊国屋書店, 1994年
- 4) Colborn, T., Dumanoski, D. and Myers, J. P., Our Stolen Future, Dutton, N. Y., 1996
- 5) National Food Safety Initiative は FDA のホームページ (<http://vm.cfscan.fda.gov/list.html>) から辿れる。
- 6) Risk Management and Food Safety, Report of a Joint FAO/WHO Consultation, Rome 27-31 January, 1997
- 7) FDA, Hazard Analysis Critical Control Point (<http://vm.cfscan.fda.gov/-lrd/haccpsub.html>)
- 8) 熊谷進等, 危害分析重要管理点 (HACCP) システムによる食品の衛生管理, 食品衛生学雑誌, 第37巻 第1号
- 9) FDA の組み換え食品に関する情報はホームページのバイオテクノロジーの項から辿れる (<http://vm.cfscan.fda.gov/-lrd/biotechm.html>)
- 10) 厚生省薬務局, 医薬品等健康機器管理実施要領について, 薬務公報, 第1734号, 1997年, pp41~49
- 11) Health Aspects of Chemical Accidents, OECD Environment Monograph No. 81 UNEP IE/PAC Technical Report No. 19, 1994
- 12) IOMC (Inter-Organization Programme for the Sound Management of Chemicals): Guidance Concerning Health Aspects of Chemical Accidents, OCDE/GD, 1996
- 13) Hazardous Materials Exposure Information Service: Development, Analysis, and Medical Implications, Annals of Emergency Medicine 29-2, Feb. 1997
- 14) 日本中毒学会シンポジウム, サリン事件の中毒学, 中毒研究, Vol. 10, pp35~74, 1997
- 15) 日本中毒学会ワークショップ, 集団中毒事故とその対応, Vol. 9, pp43~74, 1996
- 16) 中田琴子, 中野達也, 神沼二眞: 国立衛生試験所における情報と計算のための基盤環境 (NICI), 国立衛生試験所, 衛生試験所報告 No. 114, 1996, P. 53~61の改訂版)
- 17) 神沼二眞, 中田琴子, 中野達也, 五十嵐貴子, 石川恵司, 蕪山典子: インターネットによる情報提供のための基盤システムの開発, 国立衛生試験所, 衛生試験所報告 No. 114, 1996, P. 62~70の改訂版)
- 18) 大竹千代子, 山本都, 中野達也, 中田琴子, 石川恵司, 神沼二眞: インターネットによる化学物質安全性情報の提供, 国立衛生試験所, 衛生試験所報告 No. 114, 1996, P. 76~83の改訂版)
- 19) 山本美智子, 中野達也, 五十嵐貴子, 石川 恵司, 神沼 二眞: インターネットによる医薬品情報提供, 国立衛生試験所, 衛生試験所報告 No. 114, 1996, P. 84~88の改訂版)
- 20) 神沼二眞, 大竹千代子: 地球規模の化学物質安全性情報ネットワーク, GINCにおける環境モニタリングデータの扱いについて, 第10回環境情報科学論文集 No. 10, 1996, P. 85~90)
- 21) 神沼二眞, 蕪山典子, 石川恵司: O-157を例とする健康被害分布図の作成とWWWによる提供, 国立衛生試験所, 衛生試験所報告 No. 115, 1997
- 22) <http://www.nihs.go.jp/phii/index.html>
- 23) 神沼二眞, 山本都: 化学物質による被害防止のための情報提供に関する研究報告書, 平成8年度厚生科学研究費補助金健康地球研究計画推進研究事業
- 24) 神沼二眞: インターネットを基盤とした厚生科学研究の広域ネットワークの構築について, 食品衛生学雑誌 第37巻 第3号 P.J-137~J-144
- 25) 片桐 進: 厚生科学研究費補助金 (地域保険対策総合研究事業) 広域保健情報ネットワークの構築とその地域保健サービスにおける有効利用に関する研究分担研究報告書, 平成8年3月, 平成9年3月

## 細胞表面におけるヒト成長ホルモン受容体レベルの制御機構に関する研究

齋藤 嘉朗<sup>#</sup>

## Modulations of human growth hormone receptor level on the cell surface

Yoshiro Saito<sup>#</sup>

Using a monoclonal antibody (GHRP2-88) raised against the extracellular portion of human growth hormone receptor (hGHR), the mechanisms on modulations of cellular levels of hGHR were investigated in human IM-9 cells. Upon stimulation with human growth hormone (hGH), hGHRs on the cell surface are down-regulated through internalization and degradation of hGHR. For hGHR internalization, hGH-mediated dimerization of hGHRs, but not staurosporine-sensitive phosphorylation is required. For hGHR degradation, however, staurosporine-sensitive phosphorylation is necessary. In the absence of hGH, hGHRs on the cell surface are cleaved to release human growth hormone-binding proteins (hGH-BPs), probably by a metalloprotease. In the presence of hGH, the hGH-BP release was rather decreased based on the reduction in cell surface hGHRs. Thus, the cell surface level of hGHR may be regulated post-translationally by the two mechanisms depending on the external hGH levels.

**Keywords** : growth hormone receptor, growth hormone-binding protein, modulation, monoclonal antibody

(Received May 30, 1997)

## はじめに

成長ホルモン (GH) は1944年に Li と Evans<sup>1)</sup>により見いだされた脳下垂体ペプチドホルモンの1つである。GHは脳下垂体前葉で産生・分泌され、個体の正常な成長、発育に必須であり、霊長類より魚類に至るまで、広く脊椎動物に存在している<sup>2,3)</sup>。このうち、ヒト成長ホルモン (hGH) は、191個のアミノ酸よりなる単鎖のポリペプチドホルモんで、糖は結合しておらず、その分子量は22,000である。GHの生理作用としては、成長促進に必須な軟骨細胞の増殖・分化作用、筋肉等における蛋白同化作用 (肝、筋におけるアミノ酸取り込み増加、蛋白合成促進)、糖および脂質代謝に関係したインスリン様作用 (糖の細胞への取り込み増加、糖酸化増加、グリコーゲン合成促進、脂肪分解抑制、脂質の合成促進等)、およびそれに引き続いて起こる抗インスリン様作用 (糖の取り込み抑制、脂質分解促進、脂質合成の抑制等) が知られている<sup>3,4)</sup>。さらに最近では神経系・内分泌系・免疫系の相互作用の点から、神経系及び免疫系に対する作用も注目を集めている<sup>5-7)</sup>。

hGHは、脳下垂体よりパルス的に放出され、その血中濃度は、個人により多少異なるものの、10 pM から 1 nM 程

度まで変動する<sup>8)</sup>。このGHの分泌には、視床下部で産生される成長ホルモン放出因子が促進的に、ソマトスタチンが抑制的に作用することが知られ、パルスの放出パターンは、これらの放出制御因子により形成されるものと考えられている<sup>3,9)</sup>。

GHが標的とする臓器の細胞膜上にはGHに特異的な受容体、即ち成長ホルモン受容体(GHR)が存在している。1987年に、LeungらによりウサギおよびヒトGHRがクローニングされ、その一次配列が決定された<sup>10)</sup>。成熟型のヒトGHR(hGHR)は、620個のアミノ酸よりなる単鎖のポリペプチドで、細胞膜を一回貫通する構造をとる。即ち、アミノ酸246個よりなる細胞外ドメイン、24個よりなる細胞膜貫通ドメイン、350個よりなる細胞内ドメインにより構成されている。遺伝子構造の解析も進んでおり、hGHRは9個のエクソンより成ること、即ち第2エクソンはシグナルペプチドと細胞外ドメインの一部、第3-7エクソンは細胞外ドメイン、第8エクソンは細胞膜貫通ドメイン、第9,10エクソンは細胞内ドメインをコードしている<sup>11)</sup>。<sup>125</sup>I-(標識)GHを用いたGHRのアフィニティラベル実験およびイムノブロット法による結果から、GHRの分子量は、110-130 kDaと報告されている<sup>12)</sup>。GHRは、そのmRNAの分布から、生体内のほとんどすべての臓器に存在していることが知られている<sup>13-15)</sup>。

近年の分子生物学および構造生物学の発達により、分子レベルからhGHの作用に関する解析が進んでいる。hGH

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed: Yoshiro Saito; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo 158, Japan; Tel: 03-3700-1141 ext. 242; Fax: 03-3707-6950; E-mail: yoshiro@nihhs.go.jp

の作用は、標的細胞上の hGHR に結合することにより開始されるが、この際、リガンドである hGH 1 分子に対し、hGHR は 2 分子結合することが、hGH と hGHR の細胞外ドメイン蛋白との X 線結晶構造解析等により明らかとされた<sup>16,17)</sup>。また、hGHR は細胞外ドメイン中のシステイン残基の位置、および細胞外ドメイン中の細胞膜貫通ドメイン近傍にある Trp-Ser-X-Trp-Ser (hGHR では Tyr-Gly-Glu-Phe-Ser) という配列の共通性から、サイトカイン受容体のスーパーファミリーに分類されている<sup>18,19)</sup>。

GH 作用の細胞内情報伝達分子としては、当初、protein kinase C の関与が示唆されていた<sup>20-23)</sup>。しかし、1993年に Argentsinger らにより、GH 作用にチロシンリン酸化酵素 JAK 2 が関与し、GH 刺激により JAK 2 が GHR に会合することが報告された<sup>24)</sup>。現在、GH 刺激により、GHR 分子のうち細胞膜近傍にあるプロリンに富む領域に会合した JAK 2 が活性化されて、これが signal transducer and activator of transcription (STAT) 分子のうち、STAT-1,3,5のいずれか又は複数を活性化し、これらの STAT 分子がホモ 2 量体またはヘテロ 2 量体を形成して核へ移行し、遺伝子の転写を活性化するというスキームが考えられている<sup>25-29)</sup>。

さて上記のように、GH の作用は、標的細胞上の GHR に結合することにより開始され、その情報が細胞内へと伝達される。従って、細胞表面の GHR 数は、GH の作用発現において重要な因子であると考えられる。GHR では、GH 刺激により GHR が細胞内移行 (internalize) し、細胞表面から一定時間消失すること (down-regulation) が、ヒト IM-9 細胞やラット脂肪細胞等で知られていた<sup>30-32)</sup>。この down-regulation は、膜表面の GHR レベルを制御している機構の 1 つ、特にリガンドである GH が制御している機構であると考えられ、細胞が GH 刺激に対して過剰に反応することを防いでいるものと推定される。しかし、細胞内に移行した GHR の運命、及び down-regulation のメカニズムなどに関しては明らかにされておらず、他の受容体での解析に比して進んでいなかった。この理由の一つとして、GHR をイムノプロット法で認識できる抗体が、ウサギの受容体に対するものを除いて、得られていなかったことがあげられる。そこで本研究の目的である、ヒトにおける細胞表面の GHR レベルの制御機構の解明のために、まず hGHR に対するモノクローナル抗体 (MAb) の調製を行った<sup>33)</sup>。その上で、ヒトリンパ球培養細胞 IM-9 を用い<sup>34)</sup>、hGH による hGHR の down-regulation のメカニズムを解析した<sup>35)</sup>。IM-9 細胞は、hGHR を生化学的に解析可能な程度発現していること、hGH が交差的に作用するプロラクチン受容体を発現していないこと、低血清条件下 hGH 依存的な増殖促進を示すことから、本研究に有用と考えた<sup>36,37)</sup>。本細胞は B 細胞株であり、IgG を産生する。なお、免疫担当細胞中で、B 細胞は GHR を最も多く発現していることが報告

されている<sup>38)</sup>。

一方、可溶性の GHR である成長ホルモン結合蛋白 (GH-BP) は、1985年にウサギ血中にその存在が確認された蛋白で、現在では、ほとんどの脊椎動物でその存在が報告されている<sup>39,40)</sup>。このうち、ヒト成長ホルモン結合蛋白 (hGH-BP) は、正常ヒト血漿中に約 1 nM の濃度で存在しており、その hGH に対する親和定数は、約  $5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ 、分子量は約 60 kDa である<sup>40-43)</sup>。その生理作用としては、in vivo の系で、血中 hGH の排泄抑制、分解抑制等による hGH の半減期増加や体内動態への影響が報告されている<sup>44,45)</sup>。一方、in vitro 系では、膜結合型受容体への hGH の結合抑制作用が報告されており<sup>46,47)</sup>、生体内における hGH 作用の制御を考える上で重要な因子である。GH-BP の生成機構としては、ラットおよびマウスで、GHR 遺伝子から alternative splicing により生成する 1.2-1.5 kb の mRNA が GH-BP をコードしていることが知られている<sup>48,49)</sup>。一方、ヒトでは、hGHR をコードする mRNA よりも短い mRNA は見いだされているものの、未だこれらの mRNA が hGH-BP をコードしているという確認は、なされていなかった<sup>50)</sup>。これらの知見より、hGH-BP は hGHR の切断により生成する可能性が考えられた。しかし、hGH-BP 生成を解析しうる in vitro 系は見いだされておらず、その生成機構は解明されていなかった。

本研究において、著者らは、hGHR の動態を解析する過程で、IM-9 細胞が hGH-BP を生成することを初めて見いだした。細胞表面における hGHR レベルの制御機構を解明する上で、この hGH-BP の生成も考慮に入れて解析することが必要であると考え、その生成機構の解明も行った<sup>51)</sup>。

## 1. 抗 hGHR ペプチド MAb の調製

本研究開始以前に、ラット GHR に対する MAb (MAb263, 細胞外ドメインを認識) が、ヒト GHR と交差反応性を示し、その免疫沈降および免疫組織染色に使用しうることは報告されていた<sup>52,53)</sup>。しかし、イムノプロット法に使用しうる抗体は報告されていなかった。そこで本研究ではまず、イムノプロット法への適用を主目的として、hGHR の細胞外ドメインペプチドに対する MAb を調製し、その詳しい性質を調べた。hGHR の細胞外ドメイン中親水性の部分 4 カ所を選び、それぞれのペプチド (GHRP 1 : N 末端より 30-47 残基, GHRP 2 : N 末端より 41-60 残基, GHRP 3 : N 末端より 70-89 残基, GHRP 4 : N 末端より 203-221 残基) を合成し、これをキャリアー蛋白 (牛血清アルブミン) と結合させた。これらのペプチドを免疫原として、MAb を産生する 20 株のハイブリドーマを樹立した。この 20 種の MAb のうち、4 種類の抗体 (GHRP 1-174, GHRP 2-88, GHRP 2-179 及び GHRP 3-56) が、ELISA (enzyme-linked immuno-

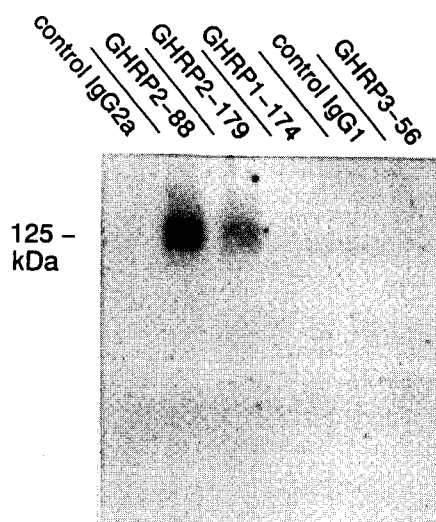


Fig. 1. Immunoblotting of crude membrane fractions from IM-9 cells using anti-hGHR monoclonal antibodies. The crude membrane fraction from human IM-9 cells was subjected to SDS-PAGE followed by immunoblotting using anti-hGHR monoclonal antibodies.

sorbent assay) 法において hGHR の細胞外ドメイン蛋白 (hGHR-ED)<sup>54)</sup> と高い反応性を示した。この中、ペプチドおよび hGHR-ED, いずれの固相抗原に対しても, GHRP 2-88 抗体が最も高い反応性を示した。これら 4 種類の抗体のアイソタイプを調べた結果, すべて IgG クラスであり, GHRP 3-56 抗体が ( $\gamma 1, \kappa$ ), 他の 3 種が ( $\gamma 2 a, \kappa$ ) であった。さらに, これら 4 種類の抗体が hGHR および hGH-BP のイムノプロット法による解析に使用しうるか否かを検討した。ヒトリンパ球培養細胞 IM-9 の粗膜画分を用いて, hGHR に対する反応性を検討したところ, GHRP 2-88 および GHRP 2-179 抗体を用いた場合に, 125 kDa の位置にバンドが出現した (Fig. 1)。これは以前,  $^{125}\text{I}$ -hGH との化学架橋実験により報告された hGHR の分子量とほぼ同じである<sup>55)</sup>。しかし, GHRP 1-174, GHRP 3-56 抗体を用いた場合には出現しなかった。ELISA 法及びイムノプロット法における結果を総合すると, GHRP 2-88 抗体が最も高い反応性を有していた。従って, 以下の実験では, この GHRP 2-88 抗体を用いることとした。本 GHRP 2-88 抗体を用いたイムノプロット法における感度を検討した。IM-9 細胞の hGHR に対する感度を調べたところ, その検出限界は IM-9 細胞の数にして約  $3.0 \times 10^5$  であった。IM-9 細胞 1 個当たり約 3,000 分子の hGHR が存在している<sup>56)</sup>, 計算により hGHR 量に換算すると, 約 200 pg となった。

hGHR 蛋白には Asn 結合型の糖鎖が結合していることが知られている<sup>55)</sup>, 抗体の反応性が受容体における糖鎖の有無により, 影響を受けるかどうかを検討した。IM-9 細胞を tunicamycin で処理することにより<sup>56)</sup>, hGHR の分子量は 125 kDa から 85 kDa に変化した。しかし, 抗体の反応性は変化しなかった。このことから, GHRP 2-88 抗体は糖鎖の有無にかかわらず, hGHR を認識していることが示唆された。

ヒト血中には hGH-BP が約 1 nM の濃度で存在している<sup>40)</sup>。GHRP 2-88 抗体を用いたイムノプロット法系がこの蛋白の検出に適用できるかどうか検討したところ, 2 種の正常ヒト血漿中, その両者において, 分子量 55 kDa のバンドが得られた。IM-9 細胞の粗膜画分中の hGHR を対照とするデンシトメトリーにより, その血中濃度を算出したところ, それぞれ 1.6 nM 及び 1.7 nM であった。本結果より, GHRP 2-88 抗体は hGH-BP とともに反応性を示すことが示唆された。

なお, 本 GHRP 2-88 抗体のイムノプロット法以外への適用であるが, 細胞の免疫染色法には使用可能であったが, 免疫沈降法には使用不能であった。

## 2. hGHR の internalization と分解

GHR を発現している細胞に GH を作用させると, 細胞膜表面の GHR が細胞内移行 (internalize) し, 細胞表面から一定時間消失すること (down-regulation) が, IM-9 細胞を含む種々の細胞で知られている。これはリガンド自らが, 作用する膜表面の受容体レベルを制御している 1 つの例と考えられる。結合後, 細胞内移行したリガンド GH はリソゾームへと送られ, そのほとんどが分解される<sup>57, 58)</sup>。

一方, GH 結合後の GHR の運命に関して, Roupas と Herington らは, ラット脂肪細胞において internalize された hGH の少なくとも 75% が分解されること<sup>59)</sup>, および受容体が recycle する場合に internalize したリガンドと受容体が解離する細胞内小器官であるエンドソーム内の pH とほぼ同じ pH 5.5 で細胞膜表面の GHR に結合した hGH を処理しても hGH は 20% しか解離しないことから<sup>60)</sup>, GHR は recycle しないのではないかと推測した<sup>61)</sup>。一方, Bick らは, ラット肝臓において, GH 刺激により膜表面の GHR レベル ( $^{125}\text{I}$ -hGH の結合活性) が減少し Golgi 体画分における

GHR レベルが上昇すること, GH レベルの低下とともに細胞膜上の GHR レベルが回復することから, GHR は recycle していると推定した<sup>62)</sup>. しかし, 細胞内移行した GHR の運命について, 直接 GHR を対象に解析した研究は, 動物種を問わずなされておらず, さらに down-regulation のメカニズムについての報告は皆無であった. そこで, ヒトにおける細胞表面の hGHR レベルの制御機構解明のために, 筆者らが調製した抗 hGHR 抗体 GHRP 2-88 を用い, IM-9 細胞における hGH による hGHR の down-regulation のメカニズムを解析した.

## 2.1 hGH 依存的な hGHR の down-regulation の実体

hGHR は, hGH 処理により細胞膜表面から細胞内へと internalize し, 細胞膜表面から一定時間消失すること (down-regulation) が知られているが, その機構は明らかにされていない. まず, GHRP 2-88 抗体を用いたイムノプロット法によりこの機構を解析した. hGH 処理により, IM-9 細胞の粗膜画分において, hGHR のバンド (分子量 125 kDa) の時間依存的な減少が見られた. hGH 無処理の細胞では, このような減少はみられなかった. 同条件下で, cytosol 画分及び培養上清において, GHRP 2-88 抗体反応物は量的に非常に少ないことから, hGHR は分解されたと考えられた. hGHR のバンドの放射能を BAS2000 により定量し, その減少量を解析したところ, 45 nM hGH 処理 120 分で細胞の受容体量は, 約 8.5% にまで減少した. hGH (45 nM) による hGHR の internalization をフローサイトメトリーで, 分解をイムノプロット法 (BAS2000 使用) で解析し, その時間依存性を検討した結果を Fig. 2 に示した. 45 nM hGH により, 膜表面の hGHR が 50% internalize される時間は, 刺激後 7.5 分, 50% 分解される時間は 27 分であった. 以上の結果から, hGH 刺激による hGHR の down-regulation の実体

は, 受容体の internalization 及びその細胞内における速やかな分解であることが明らかとなった.

次に受容体の分解に対するいくつかの薬物の影響を検討した. hGH による受容体の分解は, 細胞内酸性小器官の pH を上昇させる bafilomycin A<sub>1</sub> や chloroquine により<sup>63-65)</sup>, ほぼ完全に阻害された. また, 蛋白分解酵素阻害剤 leupeptin 及び pepstatin A によっても部分的に阻害された. なお, これらの薬物処理により, hGHR の internalization は阻害されなかった. これらの結果は, 細胞内における hGHR の分解はリソゾーム等の細胞内酸性小器官内で, 酵素的に引き起こされることを示唆するものと考えられた.

さらに, Percoll 密度勾配遠心法で IM-9 細胞を分画し, 細胞膜を含む細胞内小器官を 6 つの画分に分け, それぞれにおける hGHR 量を GHRP 2-88 抗体を用いたイムノプロット法で検討した. hGH 無処理の条件下, hGHR のほとんどは低密度画分に存在し, リソゾームのマーカー蛋白 (cathepsin D) が存在する高密度側には存在しなかった. しかし, hGH (45 nM) で 60 分処理すると, hGHR は高密度側にも分布するようになった. さらに, この時, hGHR の絶対量は, hGH 無処理時の約 25% に減少していた. この系に 200  $\mu$ M の chloroquine を加えると, hGHR は低密度画分に分布するようになり, 高密度画分には存在しなかった. リソゾームのマーカー蛋白の分布も chloroquine 処理により, 高密度側から低密度側に移行し, その分布パターンが hGHR のものと類似していることから, この結果も hGHR がリソゾームで分解されることを支持するものと考えられた.

## 2.2 hGHR の internalization 及び分解に関与する因子について

hGHR のエンドサイトーシス過程をより詳細に検討し, これに関与する因子を同定するため, 受容体の細胞膜表面

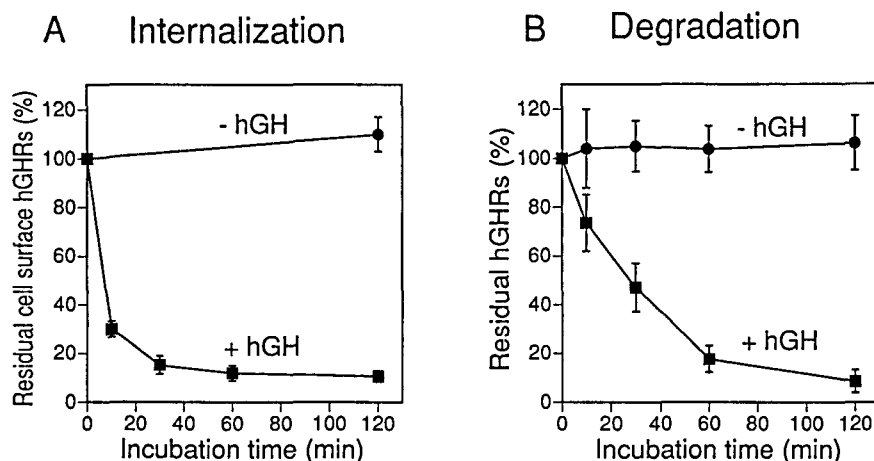


Fig. 2. Time course of hGH-induced internalization (A) and degradation (B) of hGHR. IM-9 cells were incubated with or without hGH (45 nM) at 37°C for indicated periods of time. (A) The cells were treated with MAb263 (anti-GHR) and *R*-phycoerythrin-labeled anti-mouse IgG, and analyzed by flow cytometry. (B) The crude membrane fractions from these cells were subjected to SDS-PAGE followed by immunoblotting using GHRP 2-88. The radioactivity of hGHR bands was determined with BAS2000.

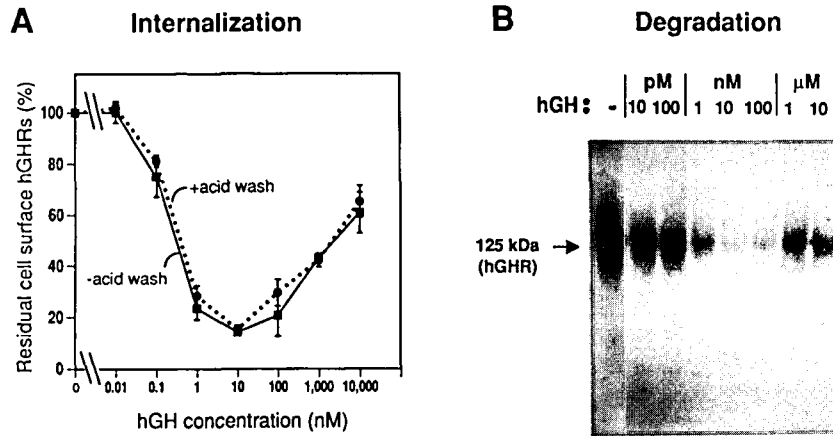


Fig. 3. Effect of hGH concentration on the internalization (A) and degradation (B) of hGHR. IM-9 cells were incubated with varying concentrations of hGH for 60 min at 37 °C. (A) The cells, acid-washed or unwashed, were treated with MAb263 and *R*-phycoerythrin-labeled anti-mouse IgG, and analyzed by flow cytometry. (B) The crude membrane fractions from these cells were subjected to SDS-PAGE followed by immunoblotting using GHRP 2-88.

からの internalization と細胞内での分解に分けて解析を行った。受容体の細胞膜表面からの internalization はフローサイトメトリーにより、細胞内での分解はイムノプロット法により解析した。

まず、hGH 濃度の影響を検討した。hGHR の internalization は、10 nM で最大となる逆釣り鐘状のパターンを示した(Fig. 3A)。分解についても同様のパターンを示した(Fig. 3B)。hGH は脳下垂体より間欠的に放出され、血中 hGH 濃度は約10 pM から 1 nM の幅で変動することが報告されている<sup>8)</sup>。本結果により、10 pM の hGH では、受容体はほとんど internalize および分解されず、1 nM では約80%がされることから、細胞表面の受容体レベルは、血中 hGH レベルに応じて、きわめて効率的に制御されていると考えられた。また、hGH は受容体と 1 : 2 の分子比で結合し、過剰量の hGH 濃度、即ち約 1 μM 以上では、この比が崩れ 1 : 1 の結合をすることが報告されている<sup>16,66)</sup>。hGH による受容体の internalization、さらには分解が、100 pM 以下及び 1 μM 以上で共に起きにくいことから、hGHR の internalization 及び分解には、hGH を介する受容体の 2 量体化が必要であることを示唆する結果であると考えられた。internalization における受容体 2 量体化の必要性に関しては、最近 Ilondo らも、hGHR と 1 : 1 の複合体しか形成しない hGH 変異体を用いた実験より、その必要性を示唆している<sup>67)</sup>。

次に、蛋白質リン酸化反応が GH の細胞内情報伝達に関与していると考えられているが、この蛋白質リン酸化反応が、受容体 internalization 及び分解にも関与しているの可否かを調べるため、蛋白質リン酸化酵素阻害剤 staurosporine の影響を検討した。staurosporine は、protein kinase C をはじめとして、protein kinase A, calcium/calmodulin kinase, tyrosine kinase 等、リン酸化酵素を幅広く阻害することが知られている<sup>68-71)</sup>。まず、実際に hGH 刺激により受容体会合蛋白が

リン酸化され、さらに staurosporine がそのリン酸化を阻害することを確認するために、<sup>32</sup>P により IM-9 細胞をラベルし、その粗膜画分を用いて抗 GHR 抗体 MAb263 による免疫沈降を行った。hGH 刺激後、2.5 分において分子量 135、69、60、35 及び 28 kDa の蛋白質のリン酸化が認められ、これらのリン酸化は staurosporine 処理により阻害された(Fig. 4)。さらにこれらのリン酸化される蛋白の中、135 kDa の蛋白はチロシンキナーゼ JAK 2 であり、hGH 刺激により hGHR に会合すると共に、チロシンリン酸化を受けることを免疫化学的に確認した。これらのリン酸化実験と同一条件の staurosporine 処理により、受容体の internalization

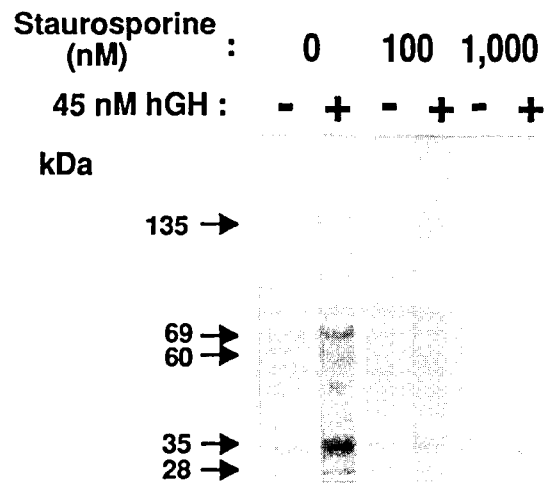


Fig. 4. hGH-induced phosphorylation of hGHR-associated proteins. IM-9 cells were metabolically labeled with [<sup>32</sup>P] Pi for 60 min at 37 °C. The cells were preincubated with staurosporine or vehicle (DMSO) for 15 min at 37 °C. After addition of hGH (45 nM) or medium alone, the cells were incubated for 2.5 min at 37 °C. Solubilized crude membrane fractions from these cells were immunoprecipitated with MAb263 and the immunoprecipitates were subjected to SDS-PAGE followed by autoradiography.



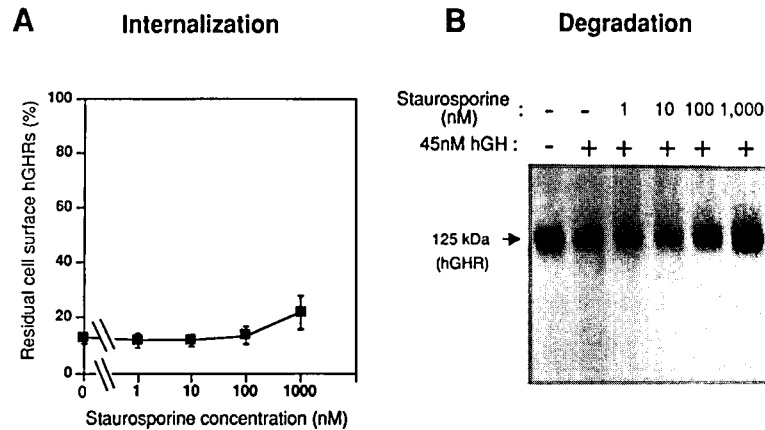


Fig. 5. Effect of staurosporine on the internalization (A) and degradation (B) of hGHR. IM-9 cells were preincubated with staurosporine or vehicle (DMSO) for 15 min at 37°C. After addition of hGH (45nM) or medium alone, the cells were incubated for 60 min at 37°C. (A) The cells were treated with MAb263 and *R*-phycoerythrin-labeled anti-mouse IgG, and analyzed by flow cytometry. (B) The crude membrane fractions from these cells were subjected to SDS-PAGE followed by immunoblotting using GHRP2-88.

は殆ど阻害されなかったが、分解は濃度依存的に阻害された (Fig. 5)。以上の結果から、hGHR の internalization には、hGH により引き起こされる staurosporine 感受性のリン酸化反応が必要とされないこと、しかし分解に至る過程には、何らかの蛋白リン酸化反応が関与していることが示唆された。

staurosporine 処理した IM-9 細胞を、Percoll 密度勾配遠心法で分画し、それぞれの hGHR 分布量を GHRP 2-88 抗体を用いたイムノプロット法で検討した。hGH 刺激により hGHR は高密度側に分布するようになるが、staurosporine 処理により、hGHR は、そのほとんどが低密度画分に存在するようになった。staurosporine 処理は Rab 5, cathepsin D の分布には、ほとんど影響を与えなかった。staurosporine 処理しても hGHR は internalize されること、初期エンドソームのマーカー蛋白である Rab 5 が低密度画分に存在し、かつその分布パターンが hGHR のものと類似していることから、staurosporine 処理により、hGHR は初期エンドソームに留まっている可能性が考えられた。

以上の結果より、hGH 刺激による受容体の down-regulation の実体が、hGHR の internalization に続く、その速やかな分解であることを明らかにした。また、そのメカニズムを解析し、hGHR の internalization には、hGH により引き起こされる受容体 2 量体化が必要であることを示唆する結果が得られた。この際、staurosporine 感受性のリン酸化は不必要であることが示唆された。しかし、hGHR が分解にいたる過程には staurosporine 感受性のリン酸化反応が必要であることが示唆された。

受容体の internalization におけるリン酸化反応の役割に関する研究は、EGF 受容体で最も進んでいる。EGF 受容体はその細胞内ドメインにリン酸化酵素活性を持っており、受容体自身もリガンドの結合によりリン酸化される

が、そのリン酸化酵素活性を失った変異体を用いても、internalization は起こることが知られている<sup>72)</sup>。また、macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) 受容体についても同様の結果が得られている<sup>73)</sup>。一方、insulin 受容体では、その internalization に受容体 kinase の活性が必要であることが報告されている<sup>74)</sup>。hGHR はそれ自体リン酸化酵素活性を持っていないが、本研究でも示唆されたように、hGH 刺激により hGHR にリン酸化酵素 JAK 2 が会合する。しかし、hGH 刺激により hGHR は、EGF 受容体や M-CSF 受容体と同様に、リン酸化に関係なく internalize されることが、本研究の結果から予想された。最近、Allevato らは、ラットの GHR 変異体をサル COS-7 細胞に transfect した系を用いて、Phe<sup>327</sup>-Ile-Glu-Leu の Phe を Ala に変異させると hGH 刺激による GHR の internalization が見られなくなること、GHR の細胞内ドメイン中 JAK 2 が会合する領域を除去しても internalization は見られることを報告した<sup>75)</sup>。この部分のアミノ酸は、ヒト GHR でも保存されていることから (Phe<sup>326</sup>-Ile-Glu-Leu)、ヒトにおいてもこの配列が internalization モチーフとして機能していると推定される。

EGF 受容体や M-CSF 受容体は、リガンドと共に internalize された後、分解されるが、この分解を受けるには受容体のリン酸化酵素活性が必要であり、受容体の自己リン酸化は必要ないことが知られている<sup>76-78)</sup>。一方、PDGF 受容体では、その分解に phosphatidylinositol 3-kinase または Nck の受容体への会合が必要である<sup>79)</sup>。本研究においてもリン酸化酵素阻害剤 staurosporine により hGHR の分解が抑えられたことから、受容体に会合するリン酸化酵素、または細胞内の別のリン酸化酵素による蛋白リン酸化が、受容体の分解に至る過程で、重要な役割を果たしているものと予想される。この候補として、まずは受容体に会合し

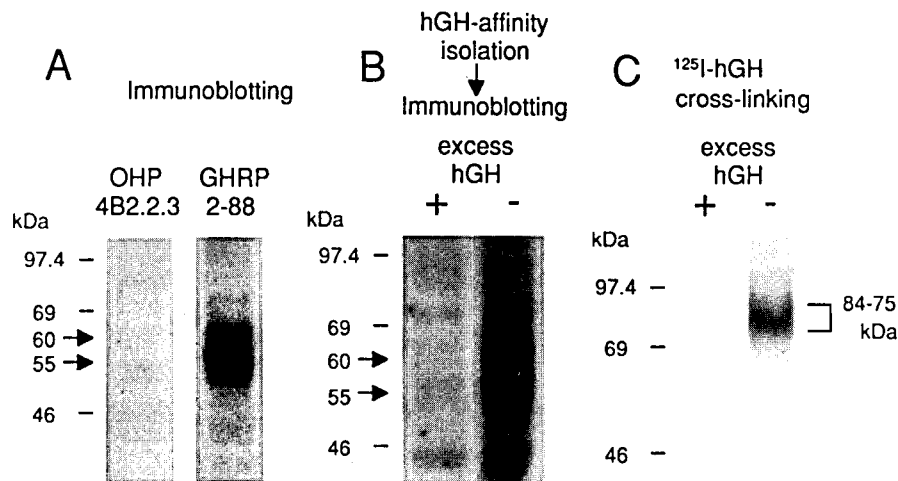
ている JAK 2 が挙げられる。この会合は、hGH 刺激後、2.5 分で最大となり、10分まで JAK 2 の会合が見られ、30分では見られなかった。hGHR の分解が30分で50%程度であることを考えると、もし JAK 2 が分解に関与しているとするれば、かなり早い段階で関与していると思われる。Percoll 密度勾配遠心法の結果から、staurosporine 処理により、hGHR は初期エンドソームに留まっていると推定されたことから、hGHR の分解過程、特に初期エンドソームにおいて、JAK 2 又は何らかのリン酸化酵素が作用している可能性が考えられる。一方、hGHR 会合蛋白に関しては、JAK 2 以外の蛋白の同定はできていない。EGF 受容体において、会合している annexin I が multivesicular body (後期エンドソーム) 内で、リン酸化されるという報告がある<sup>80)</sup>。そのため、hGHR に会合している35 kDa の蛋白は、annexin ではないかと考え、抗 GHR 抗体で免疫沈降した画分を、抗 annexin 抗体でイムノブロット法により解析した。しかし、抗 annexin 抗体に反応するバンドは得られず、35 kDa の蛋白は annexin 以外の蛋白であると考えられた。GH 刺激による細胞内蛋白質のリン酸化の解析は、主にマウス前脂肪細胞 (3T3-F442A) の系で、抗リン酸化チロシン抗体を用いたイムノブロット法による実験により、数多く報告されており<sup>24,81,82)</sup>、GH 刺激によりリン酸化される蛋白として、JAK 2 および STAT 以外に、insulin receptor substrate-1 (185 kDa)<sup>83)</sup> および MAP kinase (約40 kDa)<sup>84)</sup> が報告されている。しかし、<sup>32</sup>P を用いた metabolic labeling の実験は本研究以外に1報しかなく、Ser/Thr リン酸化の解析は進んでいない。

### 3. hGHR からの hGH-BP の生成

筆者らは、hGHR の down-regulation に関する実験において、hGH 非存在下の IM-9 細胞培養上清中に、抗 hGHR 抗体 GHRP 2-88 と反応する蛋白が存在することを見い出した。この蛋白は可溶性の受容体である hGH-BP の可能性が高いものと考えられた。研究開始時、hGH-BP の産生を解析しうる in vitro 系は報告されておらず、その hGH-BP の生成機構は解明されていなかった。そこで、細胞表面における hGHR レベルの制御機構を解明する上で、この hGH-BP の生成も考慮に入れて解析することが必要であると考え、その生成機構の解明を行った。

#### 3.1 IM-9 細胞からの hGH-BP の生成

IM-9 細胞を37°Cで一定時間インキュベートし、その培養上清を濃縮後、抗 hGHR 抗体を用いたイムノブロット法により解析したところ、分子量60 kDa 及び55 kDa のバンドが検出された (Fig. 6A)。GHRP 2-88抗体と同じクラス (IgG 2 a) の MAb である OHP 4B2.2.3抗体 (抗17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone 抗体; コントロール)<sup>85)</sup> では、これらのバンドは見られなかった。次に、hGH 固定化ゲルに結合した画分のイムノブロット法による解析により、これら2種の蛋白の hGH 結合能を調べたところ、これらに相当する分子量の位置に、バンドが得られた (Fig. 6B)。また、2価架橋試薬 DSS を用いた化学架橋反応を利用して、培養上清中に存在する、<sup>125</sup>I-hGH 結合活性のある蛋白を解析したところ、分子量84-75 kDa の幅の広いバンドが得られた (Fig. 6C)。hGH の分子量 (22 kDa) を84-75 kDa から引く



**Fig. 6.** Human growth hormone-binding proteins (hGH-BPs) release from IM-9 cells. (A) IM-9 cells were incubated for 120 min at 37°C. The supernatants were concentrated and subjected to SDS-PAGE followed by immunoblotting using OHP 4B2.2.3 (control antibody) or GHRP 2-88 (anti-hGHR). (B) The concentrated supernatants were absorbed with hGH-agarose in the presence or absence of excess hGH, and the absorbed proteins were subjected to SDS-PAGE followed by immunoblotting using GHRP 2-88. (C) hGH-BPs in the concentrated supernatants were cross-linked with <sup>125</sup>I-labeled hGH in the presence or absence of excess hGH and immunoprecipitated with MAb263 (anti-GHR). The immunoprecipitants were subjected to SDS-PAGE followed by autoradiography.

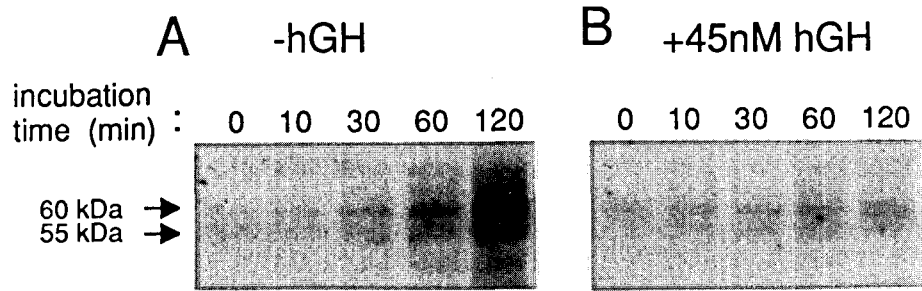


Fig. 7. Effect of hGH addition on hGH-BPs release. The IM-9 cells were incubated with medium alone (A) or 45nM hGH (B) at 37°C for indicated periods of time. The supernatants were concentrated and subjected to SDS-PAGE followed by immunoblotting using GHRP 2-88.

と、62-53 kDa となり、イムノプロット法により検出されたバンドの分子量に相当する。

さらに、IM-9 細胞培養上清中に放出されてくる hGH-BP の、hGH に対する親和定数を、Scatchard plot により解析したところ、 $4.6 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ であった。また、放出量は、1時間当たり、細胞膜上の hGHR の約 5%相当であった。

次に hGH-BP 放出の時間依存性を検討した。インキュベーション時間 2 時間までの条件下では、hGH-BP は時間依存的に放出された。この系にリガンドである hGH (45 nM) を添加した条件下では、hGH-BP の時間依存的放出が認められるものの、その放出量は逆に減少していた (Fig. 7)。

以上の結果より、IM-9 細胞より hGH 結合能を持つ分子量 60 kDa 及び 55 kDa の可溶性蛋白、即ち、hGH-BP が放出されてくることが示唆された。ヒト血清中に存在する hGH-BP の分子量は、約 60 kDa、また親和定数は  $3 - 9 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$  と報告されており、今回の結果は極めて近い値を示した<sup>40-43</sup>。さらに、インキュベーション時間 2 時間までの条件下では、hGH は hGH-BP 放出に負の制御因子として作用することが示唆されたが、これは膜表面の hGHR が hGH 刺激により internalize され、膜表面の hGHR レベルが低下することに起因するものと考えられる。また、2つの分子量の hGH-BP が認められたが、IM-9 細胞には、full-length の hGHR mRNA の他に、第 3 エクソンを欠損した hGHR mRNA が存在していることが知られている<sup>86</sup>。さらに、hGH に対する親和定数は、この第 3 エクソンの欠損により、全く影響を受けないことも報告されている<sup>87</sup>。従って、本研究において検出された、55 kDa の hGH-BP は、60 kDa の hGH-BP から第 3 エクソン部分が欠損したものであると推定される。この第 3 エクソンを欠損した hGHR は、欠損していない hGHR と共に (臓器によりその比率は異なるもの) ヒトのすべての臓器に分布している<sup>88</sup>。

### 3.2 hGH-BP の生成機構

まず、IM-9 細胞における hGH-BP の生成に、新たな蛋白合成が必要か否かを調べる目的で、IM-9 細胞を蛋白合成阻害剤、cycloheximide (50, 100, 200  $\mu\text{M}$ ) で処理した。これらの処理により、hGH-BP 放出量に変化はなかったこ

とから、新たな蛋白合成は必要ないことが示唆された。なお、これらの濃度の cycloheximide で蛋白合成は確かに阻害されていた。

さらに IM-9 細胞における hGH-BP の生成に、合成された蛋白の輸送系が必要か否かを調べる目的で、IM-9 細胞を、主に小胞体からゴルジ体への輸送を阻害することにより合成された蛋白質の分泌を阻害する brefeldin A (0.2, 1.0  $\mu\text{g/ml}$ ) で処理した<sup>89,90</sup>。これらの処理により、hGH-BP 放出量に変化はなかったことから、合成蛋白の輸送系は必要ないことが示唆された。これらの濃度の brefeldin A 処理した IM-9 細胞の粗膜画分中には、新たに分子量 105 kDa の hGHR が得られた。これは brefeldin A の作用により小胞体中に留まっている、糖鎖をプロセッシングされる前の hGHR と考えられた。

次に、hGH-BP が細胞膜上に存在する hGHR に由来することを明らかにする目的で、hGH 前処理を行った。これは hGH (45 nM, 2時間) 処理により細胞膜上の受容体の 90% 以上が internalize し、さらに速やかに分解されるという性質を利用したものである (Fig. 2)。この hGH 前処理によ

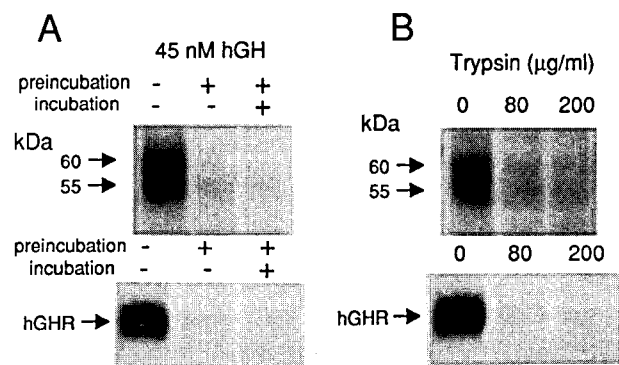


Fig. 8. Effect of hGH and trypsin-pretreatment on hGH-BPs release. (A) IM-9 cells were preincubated with or without hGH for 120 min at 37°C, washed and further incubated with or without hGH for 120 min at 37°C. (B) IM-9 cells were pretreated with or without trypsin for 6 min at 37°C, then added trypsin inhibitor (1 mg/ml). The cells were washed and further incubated for 120 min at 37°C. The supernatants and membrane fractions obtained in (A) and (B) were subjected to SDS-PAGE followed by immunoblotting using GHRP2-88.

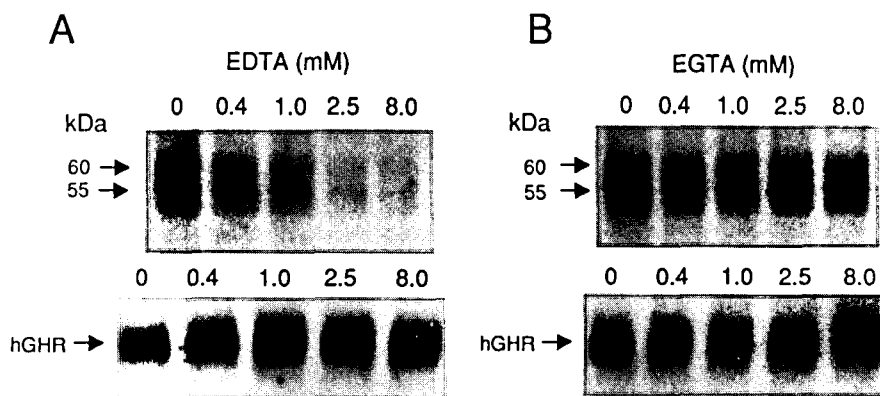


Fig. 9. Effect of EDTA or EGTA on hGH-BPs release. IM-9 cells were incubated with EDTA (A) or EGTA (B) for 120 min at 37°C. The supernatants and membrane fractions were subjected to SDS-PAGE followed by immunoblotting using GHRP2-88.

り、hGH-BPの放出はほとんど阻害された (Fig. 8A)。さらに、trypsin 前処理により細胞外部分の蛋白を分解した場合には、hGH-BP 放出は全く見られなかった (Fig. 8B)。なお、使用した濃度の trypsin により、細胞の cytosol 画分の蛋白の電気泳動パターンは、全く変わらないことから、trypsin は細胞内まで入っていないと考えられた。以上の結果から、IM-9 細胞より放出される hGH-BP は、細胞膜上の受容体に由来することが示唆された。

次に、hGH-BP 放出に対する蛋白分解酵素阻害剤の影響を検討した。試みた thiol-, serine-, acid-protease の阻害剤 (250  $\mu$ M APMSF, 10  $\mu$ M aprotinin, 100  $\mu$ M leupeptin 及び 100  $\mu$ M pepstatin A) および 250  $\mu$ M phosphoramidon (collagenase 等を阻害する) により、hGH-BP 放出は阻害されなかったが、0.4 mM EDTA では部分的に阻害された。この EDTA、および 1, 10-phenanthroline は hGH-BP 放出を濃度依存的に阻害したが、EGTA による阻害は部分的であった (Fig. 9)。種々の金属イオンに対するキレート安定度定数において、EDTA が EGTA よりも高い値を持つイオンのうち、特にその差の大きい  $Mg^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$  および  $Zn^{2+}$  について<sup>91-93)</sup>、EDTA の hGH-BP 放出阻害効果に対する回復作用を調べたところ、 $Mg^{2+}$  および  $Co^{2+}$  イオンの添加により、阻害の顕著な回復がみられたが、 $Mn^{2+}$  および  $Zn^{2+}$  の効果は部分的であった。これらの結果から、hGH-BP の放出には、細胞膜上の hGHR の、金属プロテアーゼによる切断が関与する可能性が考えられた。

以上の結果より、IM-9 細胞からの hGH-BP の放出には新たな蛋白合成は必要なく、細胞膜上の hGHR が切断されて生成することが示唆された。従って、細胞表面の hGHR レベルの制御を考える上で、その切断による hGH-BP 放出も考慮に入れる必要性が示唆された。さらに、この切断における金属プロテアーゼの関与の可能性が考えられた。

最近、ヒト Hep G 2 細胞および Hep 3 B 細胞より、hGH-BP が放出されることが相次いで報告された<sup>94,95)</sup>。まず、<sup>125</sup>I-hGH との化学架橋反応を利用した実験により、Hep G 2

細胞から、分子量 94 および 58 kDa の hGH-BP が放出されてくることが示された<sup>94)</sup>。しかし、著者らの研究では Hep G 2 細胞の膜表面に hGHR はほとんど存在せず、これらの報告の結果は追試できなかった。また、Hep 3 B 細胞からも <sup>125</sup>I-hGH で処理した培養上清のゲル濾過法による分析により、hGH 結合能を持つ可溶性蛋白 (分子量は不明) が放出されてくることが見出された<sup>95)</sup>。しかし、いずれの場合も、詳しい性質や生成機構に関する研究はなされていない。また、IM-9 細胞および Hep G 2 細胞を、SH 試薬 (20 mM 程度の iodoacetamide, 5-10 mM N-ethylmaleimide 等) と共にインキュベートすると、分子量 80 kDa の hGH 結合能を持つ可溶性蛋白が培養上清中に放出されてくることが報告されている<sup>96,97)</sup>。しかし、分子量が異なること、これらチオール基に作用する薬物は、生体内では存在しないことから、生理的な現象ではないと思われる。

ヒトにおいて血清中の hGH-BP のレベルが hGH により制御されるか否かについては、in vitro の報告はないが、in vivo での報告は多数存在する。しかし、相反する報告があり、未だ結論は得られていない<sup>98)</sup>。本研究の結果から、IM-9 細胞からの hGH-BP の放出には新たな蛋白合成は必要なく、細胞膜上の hGHR が切断されて生成することが示唆された。このことから、hGH-BP 放出は細胞膜上の hGHR レベルに依存するものと考えられ、in vivo においても、少なくとも短期的には、hGH 過剰の条件下では、hGH-BP 放出は hGHR の down-regulation に伴って減少するものと予想される。従って、本研究の結果は、hGH による hGH-BP 放出の負の制御という考えを支持する結果となった。しかし、hGHR をコードする mRNA 量の増減等が関与すると思われる、hGH による長期的な制御については、結論を出す段階ではない。

collagenase や gelatinase 等のマトリックスメタロプロテアーゼは、代表的な金属プロテアーゼであり、その活性中心には Zn 分子が存在する<sup>99)</sup>。近年、TNF- $\alpha$  前駆体の細胞膜表面における切断への、マトリックスメタロプロテアー

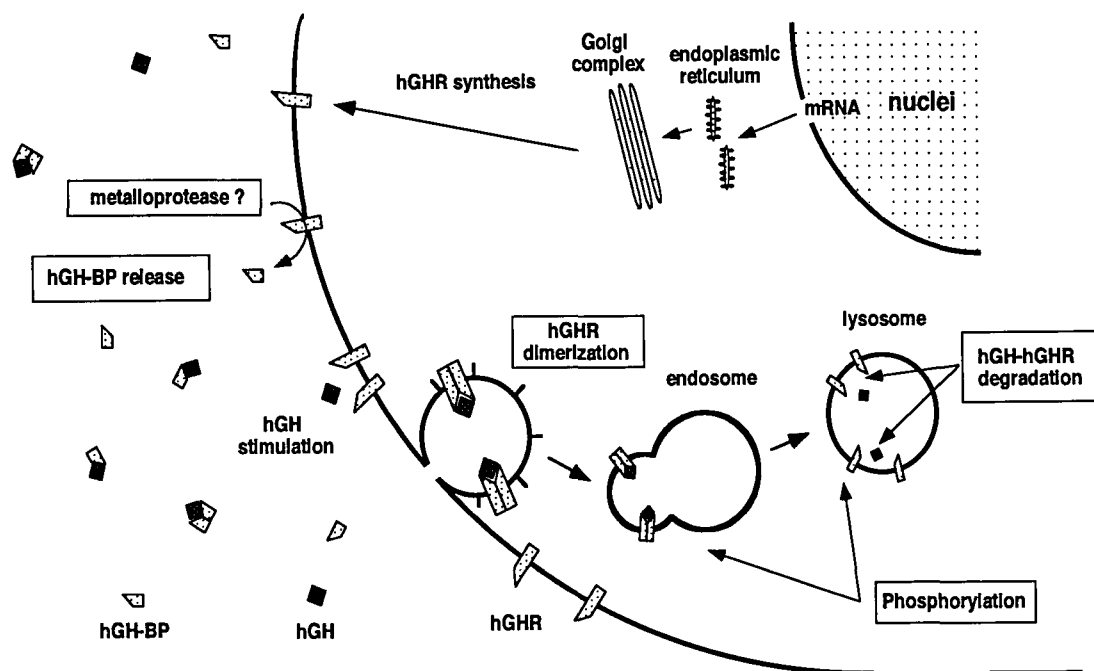


Fig.10. Modulations of hGHR level on the cell surface by internalization and degradation of hGHR, and by hGHR cleavage to generate hGH-BP.

への関与が有力となってきた。即ち、EDTAによるTNF- $\alpha$ 放出の阻害がZnCl<sub>2</sub>の添加により回復すること<sup>100)</sup>、TNF- $\alpha$ 前駆体の切断部位のアミノ酸配列が、collagenや $\alpha_1$ -macroglobulinのマトリックスメタロプロテアーゼによる切断部位の配列と相同性があること<sup>101)</sup>、マトリックスメタロプロテアーゼの添加によりTNF- $\alpha$ の放出がみられること<sup>102)</sup>、等の知見が得られてきている。しかし、EDTAによるhGH-BP放出の阻害がZn<sup>2+</sup>を添加しても部分的にしか回復しないこと、phosphoramidonによりhGH-BP放出が阻害されないことから、TNF- $\alpha$ 放出に関与するマトリックスメタロプロテアーゼがhGH-BP放出に関与している可能性は低いと思われる。

#### おわりに

ヒトにおける細胞膜表面hGHRレベルの制御機構を解析するため、hGH刺激によるhGHRのdown-regulation(internalizationおよび分解)及びhGHRの切断によるhGH-BP放出について検討した。現在までに得られた結果によれば、hGH刺激による受容体のdown-regulationはリガンドによる能動的な制御、hGH-BPの放出は構成的な制御と理解することができると思われる(Fig.10)。

hGH非存在下、IM-9細胞における膜表面のhGHRの半減期(50%代謝される時間)は約10時間であること<sup>30,61)</sup>、および本研究の結果、1時間当たり約5%の受容体が結合蛋白として放出されてくることが示唆されたので、10時間では約50%が放出されると算出される。即ち、hGHが存在しない状態、または濃度の低い状態(hGH非放出期の濃度である10 pM程度)では、hGH-BP放出が、hGHRの主

な代謝経路であり、一方、hGH濃度が高い状態(パルスのhGH放出のピーク濃度である1 nM程度)では細胞内へのinternalizationが主な代謝経路であるという仮説が考えられた。

細胞表面のhGHRレベルが変化している遺伝病として、Laron型小人症が知られている。この疾患は成長障害が起きているにも関わらず、血中hGHは高値であり、hGH治療に抵抗性の小人症である<sup>103)</sup>。本症の患者では、肝組織膜画分にhGHが結合しないこと、血中hGH-BPが欠損、あるいはわずかにしか存在しないことが報告されている<sup>104-106)</sup>。本症の原因として、hGHR遺伝子の欠失、点突然変異が報告されているが<sup>103,107)</sup>、多くの症例ではhGHR遺伝子の異常は認められておらず、本症の原因は多岐にわたると思われる。一方、Laron型小人症と同様に、hGH抵抗性を示すにもかかわらず、血中hGH-BPレベルの正常な疾患が報告されている<sup>108)</sup>。本研究の結果より、仮にhGH抵抗性であっても(即ち、細胞内情報伝達系等に欠陥が存在しても)、hGH結合活性のあるhGHRが膜表面に発現していれば、hGH-BPは構成的に放出され、hGH-BPレベルは正常値を示すと推定される。

さらに、hGHの生理的分泌が増加しているにも関わらず、血中のhGH-BP濃度が正常人の30-110倍高く、部分的な(hGH感受性の)成長障害を起こしている遺伝病も報告されている<sup>109)</sup>。また、肝内胆管減少症であるAlagille症候群でも、hGHの生理的分泌の増加、血中のhGH-BP濃度の上昇およびinsulin-like growth factor-I濃度の低下が起こることが知られており、その50%のヒトに成長障害がみられる<sup>110)</sup>。これらの原因は現在不明であるが、その可能性

の1つとして、細胞膜表面におけるhGHRの切断の亢進によるhGH-BP放出の増加が考えられる。このような遺伝病および疾病の原因解明および治療のためにも、切断酵素の同定を始めとする膜表面GHRレベルの制御機構のより詳細な解析が必要となろう。

### 謝 辞

本研究は、機能生化学部において、寺尾允男前部長および澤田純一現部長のご指導の下行われたものであり、両先生、および当初、直接ご指導いただいた鈴木和博現代謝生化学部室長に深く感謝いたします。また、終始、ご指導ご助言を賜りました、機能生化学部の皆様に深く感謝いたします。本論文は、著者の博士論文より一部抜粋したものであります。

### 文 献

- 1) Li, C. and Evans, H. M.: *Science*, **99**, 183~184 (1944)
- 2) 早川亮夫、内田恵理子: “ヒト成長ホルモン”, pp. 12-33, 岡田義昭編, メディカルレビュー社, 東京 (1994)
- 3) Strobl, J. S. and Thomas, M. J.: *Pharmacol. Rev.*, **46**, 1~34 (1994)
- 4) 対馬敏夫: “ヒト成長ホルモン”, pp. 74-97, 岡田義昭編, メディカルレビュー社, 東京 (1994)
- 5) Berci, I.: *Neuroimmunomodulation* **1**, 201~216 (1994)
- 6) Murphy, W. J., Rui, H. and Longo, D. L.: *Life Sci.*, **57**, 1~14 (1995)
- 7) Harvey, S.: “Growth hormone”, pp. 437-449, eds. Harvey, S., Scanes, C. G. and Daughaday, W. H., CRC Press, Boca Raton, FL (1995)
- 8) Winer, L. M., Shaw, M. A. and Baumann, G.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **70**, 1678~1686 (1990)
- 9) 加治秀介、千原和夫: “ヒト成長ホルモン”, pp. 174-194, 岡田義昭編, メディカルレビュー社, 東京 (1994)
- 10) Leung, D. W., Spencer, S. A., Cachianes, G., Hammonds, R. G., Collins, C., Henzel, W. J., Barnard, R., Waters, M. J. and Wood, W. I.: *Nature*, **330**, 537~543 (1987)
- 11) Godowski, P. J., Leung, D. W., Meacham, L. R., Galgani, J. P., Hellmiss, R., Keret, R., Rotwein, P. S., Parks, J. S., Laron, Z. and Wood, W. I.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 8083~8087 (1989)
- 12) Kerry, P. A., Djiane, J., Postel-Vinay, M. C. and Edery, M.: *Endocrine Rev.*, **12**, 235~251 (1991)
- 13) Mertani, H. C., Delehay-Zervas, M. C., Martini, J. F., Postel-Vinay, M. C. and Morel, G.: *Endocrine*, **3**, 135~142 (1995)
- 14) Mertani, H. C. and Morel, G.: *Mol. Cell. Endocrinol.*, **109**, 47~61 (1995)
- 15) Burton, K. A., Kabigting, E. B., Clifton, D. K. and Steiner, R. A.: *Endocrinology*, **131**, 958~963 (1992)
- 16) Cunningham, B. C., Ultsch, M., de Vos, A. M., Mulkerrin, M. G., Clauser, K. R. and Wells, J. A.: *Science*, **254**, 821~825 (1991)
- 17) de Vos, A. M., Ultsch, M. and Kossiakoff, A. A.: *Science*, **255**, 306~312 (1992)
- 18) Bazan, J. F.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **164**, 788~795 (1989)
- 19) Cosman, D., Lyman, S. D., Idzerda, R. L., Beckmann, M. P., Park, L. S., Goodwin, R. G. and March, C. J.: *Trends Biochem. Sci.*, **15**, 265~270 (1990)
- 20) Smal, J. and De Meyts, P.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **147**, 1232~1240 (1987)
- 21) Doglio, A., Dani, C., Grimaldi, P. and Ailhaud, G.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 1148~1152 (1989)
- 22) Smal, J. and De Meyts, P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 4705~4709 (1989)
- 23) Slootweg, M. C., de Groot, R. P., Herrmann-Erlee, M. P. M., Koornneef, I., Kruijer, W. and Kramer, Y. M.: *J. Mol. Endocrinol.*, **6**, 179~188 (1991)
- 24) Argetsinger, L. S., Campbell, G. S., Yang, X., Witthuhn, B. A., Silvennoinen, O., Ihle, J. N. and Carter-Su, C.: *Cell*, **74**, 237~244 (1993)
- 25) Goujon, L., Allevato, G., Simonin, G., Paquereau, L., Le Cam, A., Clark, J., Nielsen, J. H., Djiane, J., Postel-Vinay, M. C., Edery, M. and Kelly, P. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 957~961 (1994)
- 26) VanderKuur, J. A., Wang, X., Zhang, L., Campbell, G. S., Allevato, G., Billestrup, N., Norstedt, G. and Carter-Su, C.: *J. Biol. Chem.*, **269**, 21709~21717 (1994)
- 27) Finbloom, D. S., Petricoin, E. F. III, Hackett, R. H., David, M., Feldman, G. M., Igarashi, K., Fibach, E., Weber, M. J., Thorner, M. O., Silva, C. M. and Lerner, A. C.: *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 2113~2118 (1994)
- 28) Campbell, G. S., Meyer, D. J., Raz, R., Levy, D. E., Schwartz, J. and Carter-Su, C.: *J. Biol. Chem.*, **270**, 3974~3979 (1995)
- 29) Wood, T. J. J., Silva, D., Lobie, P. E., Pircher, T. J., Gouilleux, F., Wakao, H., Gustafsson, J. A., Groner, B., Norstedt, G. and Haldosen, L. A.: *J. Biol. Chem.*, **270**, 9448~9453 (1995)
- 30) Lesniak, M. A. and Roth, J.: *J. Biol. Chem.*, **251**, 3720~3729 (1976)
- 31) Gorin, E., Grichting, G. and Goodman, H. M.: *Endocrinology*, **115**, 467~475 (1984)
- 32) Wakai, K., Tsushima, T., Isozaki, O., Sato, Y., Sato, K. and Shizume, K.: *Endocrinology*, **114**, 1475~1482 (1984)
- 33) Saito, Y., Yamazaki, T., Suzuki, K., Ikebuchi, H., Asakura, A., Ota, Y., Sawada, J. and Terao, T.: *Biol. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **17**, 983~986 (1994)
- 34) Fahey, J. L., Buell, D. N. and Sox, H. C.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **190**, 221~234 (1971)
- 35) Saito, Y., Teshima, R., Yamazaki, T., Ikebuchi, H., and Sawada, J.: *Mol. Cell. Endocrinol.*, **106**, 67~74 (1994)
- 36) Suzuki, K., Suzuki, S., Saito, Y., Ikebuchi, H. and Terao, T.: *J. Biol. Chem.*, **265**, 11320~11327 (1990)
- 37) Lesniak, M. A., Gorden, P., Roth, J. and Gavin, J. R. III.: *J. Biol. Chem.*, **249**, 1661~1667 (1974)
- 38) Badolato, R., Bond, H. M., Valerio, G., Petrella, A., Morrone, G., Waters, M. J., Venuta, S. and Tenore, A.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **79**, 984~990 (1994)
- 39) Ymer, S. I. and Herington, A. C.: *Mol. Cell. Endocrinol.*, **41**, 153~161 (1985)
- 40) Baumann, G., Shaw, M. A. and Amburn, K.: *J. Endocrinol. Invest.*, **17**, 67~81 (1994)
- 41) Baumann, G., Stolar, M. W., Amburn, K., Barsano, C. P. and De Vries, B. C.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **62**, 134~141 (1986)
- 42) Herington, A. C., Ymer, S. I. and Stevenson, J. L.: *J. Clin. Invest.*, **77**, 1817~1823 (1986)
- 43) Herington, A. C., Ymer, S. I. and Stevenson, J. L.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **139**, 150~155 (1986)

- 44) Baumann, G., Amburn, K. D. and Buchanan, T. A.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **64**, 657~660 (1987)
- 45) Fairhall, K. M., Carmignac, D. F. and Robinson, I. C. A. F.: *Endocrinology*, **131**, 1963~1969 (1992)
- 46) Lim, L., Spencer, S. A., McKay, P. and Waters, M. J.: *Endocrinology*, **127**, 1287~1291 (1990)
- 47) Mannor, D. A., Winer, L. M., Shaw, M. A. and Baumann, G.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **73**, 30~34 (1991)
- 48) Baumbach, W. R., Horner, D. L. and Logan, J. S.: *Genes & Dev.*, **3**, 1199~1205 (1989)
- 49) Smith, W. C., Kuniyoshi, J. and Talamantes, F.: *Mol. Endocrinol.*, **3**, 984~990 (1989)
- 50) Herington, A. C., Tiong, T. S. and Ymer, S. I.: *Acta Paediatr. Scand. (suppl)*, **379**, 61~69 (1991)
- 51) Saito, Y., Ikebuchi, H., Yamazaki, T. and Sawada, J.: *J. Biochem.*, **118**, 521~525 (1995)
- 52) Barnard, R., Bundesen, P. G., Rylatt, D. B. and Waters, M. J.: *Biochem. J.*, **231**, 459~468 (1985)
- 53) Werther, G. A., Haynes, K. M., Barnard, R. and Waters, M. J.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **70**, 1725~1731 (1990)
- 54) Ota, Y., Asakura, A., Matsuura, Y., Kondo, H., Hitoshio, A., Iwane, A., Tanaka, T., Kikuchi, M. and Ikehara, M.: *Gene*, **106**, 159~164 (1991)
- 55) Asakawa, K., Hedro, J. A., McElduff, A., Rouiller, D. G., Waters, M. J. and Gorden, P.: *Biochem. J.*, **238**, 379~386 (1986)
- 56) Keefer, L. M. and Meyts, P. D.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **101**, 22~29 (1981)
- 57) Barazzone, P., Lesniak, M. A., Gorden, P., Van Obberghen, E., Carpentier, J. L. and Orci, L.: *J. Cell Biol.*, **87**, 360~369 (1980)
- 58) Hizuka, N., Gorden, P., Lesniak, M. A., Van Obberghen, E., Carpentier, J. L. and Orci, L.: *J. Biol. Chem.*, **256**, 4591~4597 (1981)
- 59) Roupas, P. and Herington, A. C.: *Endocrinology*, **120**, 2158~2165 (1987)
- 60) Roupas, P. and Herington, A. C.: *Mol. Cell. Endocrinol.*, **57**, 93~99 (1988)
- 61) Roupas, P. and Herington, A. C.: *Mol. Cell. Endocrinol.*, **61**, 1~12 (1989)
- 62) Bick, T., Youdim, M. B. H. and Hochberg, Z.: *Endocrinology*, **125**, 1718~1722 (1989)
- 63) Bowman, E. J., Siebers, A. and Altendorf, K.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 7972~7976 (1988)
- 64) Yoshimori, T., Yamamoto, A., Moriyama, Y., Futai, M. and Tashiro, Y.: *J. Biol. Chem.*, **266**, 17707~17712 (1991)
- 65) Seglen, P. O.: *Meth. Enzymol.*, **96**, 737~764 (1983)
- 66) Fuh, G., Cunningham, B. C., Fukunaga, R., Nagata, S., Goeddel, D. V. and Wells, J. A.: *Science*, **256**, 1677~1680 (1992)
- 67) Ilondo, M. M., Damholt, A. B., Cunningham, B. A., Wells, J. A., De Meyts, P. and Shymko, R. M.: *Endocrinology*, **134**, 2397~2403 (1994)
- 68) Tamaoki, T., Nomoto, H., Takahashi, I., Kato, Y., Morimoto, M. and Tomita, F.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **135**, 397~402 (1986)
- 69) Nakano, H., Kobayashi, E., Takahashi, I., Tamaoki, T., Kuzuu, Y. and Iba, H.: *J. Antibiot.*, **40**, 706~708 (1987)
- 70) Yanagihara, N., Tachikawa, E., Izumi, F., Yasugawa, S., Yamamoto, H. and Miyamoto, E.: *J. Neurochem.*, **56**, 294~298 (1991)
- 71) Fujita-Yamaguchi, Y. and Kathuria, S.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **157**, 955~962 (1988)
- 72) Honegger, A. M., Dull, T. J., Felder, S., Van Obberghen, E., Bellot, F., Szapary, D., Schmidt, A., Ullrich, A. and Schlessinger, J.: *Cell*, **51**, 199~209 (1987)
- 73) Carlberg, K., Tapley, P., Haystead, C. and Rohrschneider, L.: *EMBOJ*, **10**, 877~883 (1991)
- 74) McClain, D. A., Maegawa, H., Lee, J., Dull, T. J., Ulrich, A. and Olefsky, J. M.: *J. Biol. Chem.*, **262**, 14663~14671 (1987)
- 75) Allevato, G., Billestrup, N., Goujon, L., Galsgaard, E. D., Norstedt, G., Postel-Vinay, M. C., Kelly, P. A. and Nielsen, J. H.: *J. Biol. Chem.*, **270**, 17210~17214 (1995)
- 76) Honegger, A. M., Dull, T. J., Bellot, F., Van Obberghen, E., Szapary, D., Schmidt, A., Ullrich, A. and Schlessinger, J.: *EMBOJ*, **7**, 3045-3052 (1988)
- 77) Felder, S., Miller, K., Moehren, G., Ullrich, A., Schlessinger, J. and Hopkins, C. R.: *Cell*, **61**, 623~634 (1990)
- 78) Honegger, A. M., Schmidt, A., Ullrich, A. and Schlessinger, J.: *J. Cell Biol.*, **110**, 1541~1548 (1990)
- 79) Joly, M., Kazlauskas, A., Fay, F. S. and Corvera, S.: *Science*, **263**, 684~687 (1994)
- 80) Futter, C. E., Felder, S., Schlessinger, J., Ullrich, A. and Hopkins, C. R.: *J. Cell Biol.*, **120**, 77~83 (1993)
- 81) Wang, X., Uhler, M. D., Billestrup, N., Norstedt, G., Talamantes, F., Nielsen, J. H. and Carter-Su, C.: *J. Biol. Chem.*, **267**, 17390~17396 (1992)
- 82) Campbell, G. S., Christian, L. J. and Carter-Su, C.: *J. Biol. Chem.*, **268**, 7427~7434 (1993)
- 83) Souza, S. C., Frick, G. P., Yip, R., Lobo, R. B., Tai, L. R. and Goodman, H. M.: *J. Biol. Chem.*, **269**, 30085~30088 (1994)
- 84) Campbell, G. S., Pang, L., Miyasaka, T., Saltiel, A. R. and Carter-Su, C.: *J. Biol. Chem.*, **267**, 6074~6080 (1992)
- 85) Sawada, J., Terao, T., Itoh, S., Maeda, M., Tsuji, A., Hosoda, H. and Nambara, T.: *J. Steroid Biochem.*, **28**, 405~410 (1987)
- 86) Urbanek, M., MacLeod, J. N., Cooke, N. E., and Liebhaber, S. A.: *Mol. Endocrinol.*, **6**, 279~287 (1992)
- 87) Sobrier, M. L., Duquesnoy, P., Duriez, B., Amselem, S., and Goossens, M.: *FEBS Lett.*, **319**, 16~20 (1993)
- 88) Mercado, M., Davila, N., McLeod, J. F. and Baumann, G.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **78**, 731~735 (1994)
- 89) Takatsuki, A. and Tamura, G.: *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 899~902 (1985)
- 90) Klausner, R. D., Donaldson, J. G. and Lippincott-Schwartz, J.: *J. Cell Biol.*, **116**, 1071~1080 (1992)
- 91) Schwarzenbach, G., Gut, R., and Anderegg, G.: *Helv. Chim. Acta*, **37**, 937~957 (1954)
- 92) Schwarzenbach, G., and Anderegg, G.: *Helv. Chim. Acta*, **40**, 1773~1792 (1957)
- 93) Holloway, J. H., and Reilly, C. N.: *Anal. Chem.*, **32**, 249~256 (1960)
- 94) Amit, T., Hacham, H., Daily, O., Hertz, P., Barkey, R. J., and Hochberg, Z.: *Mol. Cell. Endocrinol.*, **101**, 29~36 (1994)
- 95) Esposito, N., Paterlini, P., Kelly, P. A., Postel-Vinay, M. C., and Finidori, J.: *Mol. Cell. Endocrinol.*, **103**, 13~20 (1994)
- 96) McGuffin, Jr, W. L., Gavin, III, J. R., Lesniak, M. A., Gorden, P., and Roth, J.: *Endocrinology*, **98**, 1401~1407 (1976)

- 97) Trivedi, B., and Daughaday, W. H.: *Endocrinology*, **123**, 2201~2206 (1988)
- 98) Baumann, G.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **202**, 392~400 (1993)
- 99) Woessner Jr., J. F.: *FASEBJ*, **5**, 2145~2154 (1991)
- 100) Mohler, K. M., Sleath, P. R., Fitzner, J. N., Cerretti, D. P., Alderson, M., Kerwar, S. S., Torrance, D. S., Otten ~ Evance, C., Greenstreet, T., Weerawarna, K., Kronheim, S. R., Petersen, M., Gerhart, M., Kozlosky, C. J., March, C. J. and Black, R. A.: *Nature*, **370**, 218~220 (1994)
- 101) Gearing, A. J. H., Beckett, P., Christodoulou, M., Churchill, M., Clements, J. M., Crimmin, M., Davidson, A. H., Drummond, A. H., Galloway, W. A., Gilbert, R., Gordon, J. L., Leber, T. M., Mangan, M., Miller, K., Nayee, P., Owen, K., Patal, S., Thomas, W., Wells, G., Wood, L. M. and Woolley, K.: *J. Leuk. Biol.*, **57**, 774~777 (1995)
- 102) Gearing, A. J. H., Beckett, P., Christodoulou, M., Churchill, M., Clements, J. M., Davidson, A. H., Drummond, A. H., Galloway, W. A., Gilbert, R., Gordon, J. L., Leber, T. M., Mangan, M., Miller, K., Nayee, P., Owen, K., Patal, S., Thomas, W., Wells, G., Wood, L. M. and Woolley, K.: *Nature*, **370**, 555~557 (1994)
- 103) Rosenfeld, R. G., Rosenbloom, A. L. and Guevara-Aguirre, J.: *Endocr. Rev.*, **15**, 369~390 (1994)
- 104) Eshet, R., Laron, Z., Pertzalan, A., Arnon, R. and Dintzman, M.: *Isr. J. Med. Sci.*, **20**, 8-11 (1984)
- 105) Baumann, G., Shaw, M. A. and Winter, R. J.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **65**, 814~816 (1987)
- 106) Daughaday, W. H. and Trivedi, B.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 4636~4640 (1987)
- 107) Duquesnoy, P., Sobrier, M. L., Amselem, S. and Goossens, M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 10272 ~ 10276 (1991)
- 108) Buchanan, C. R., Maheshwari, H. G., Norman, M. R., Morrell, D. J. and Preece, M. A.: *Clin. Endocrinol.*, **35**, 179~185 (1991)
- 109) Rieu, M., Le Bouc, Y., Villares, S. M. and Postel-Vinay MC.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **76**, 857~860 (1993)
- 110) Bucuvalas, J. C., Horn, J. A., Carlsson, L., Balistreri, W. F. and Chernaused, S. D.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **76**, 1477~1482 (1993)



一酸化窒素を遊離する *N*-ニトロソ化合物の研究末吉 祥子・丹野 雅幸<sup>#</sup>・宮田 直樹Study of *N*-Nitroso Compounds which have NO-Release AbilityShoko Sueyoshi, Masayuki Tanno<sup>#</sup> and Naoki Miyata

Nitric oxide (NO), which plays an important role in the vital functions of organisms, is gaseous and labile molecule. Much attention has been paid to the stability and easily handling of NO donors, for careful handling of NO is required during experimental work. We synthesized a series of aromatic *N*-nitrosoareas and *N*-nitrosamides which efficiently liberates NO at room temperature. Generation of NO from the aromatic *N*-nitroso compounds was chemically confirmed by the trapping of NO as a nitrosyl complex of tetraphenylporphyrinatocobalt (II) and spectrophotometrically quantified by means of the Griess reaction using a newly designed test apparatus. 3,3-Dibenzyl-1-(4-tolyl)-1-nitrosoarene showed the greatest NO-generating ability among the synthesized *N*-nitroso compounds. Further, the NO-generating ability was related to the reciprocal of the ID<sub>50</sub> value for growth inhibition of cultured L-5178Y cell by the aromatic *N*-nitroso compounds.

**Keywords** : nitric oxide, nitrosoarene, cytotoxicity, tetraphenylporphyrin, *N*-acetyl-*S*-nitroso-DL-penicillamine

(Received May 30, 1997)

## 1. はじめに

1987年に血管内皮由来弛緩因子 (EDRF) の本体が一酸化窒素 (NO) であるとする報告<sup>1)</sup>が発端となり、今や、NO 関連の論文は膨大な数にのぼっている。フリーラジカル分子である NO は生体内で酵素により合成され、血管、神経、免疫等の各系で重要な役割を演じている。特に、NO は細胞内あるいは細胞間を自由に移行することが可能であり、シグナル伝達のメッセンジャーとして働くことが明らかになった<sup>2)</sup>。このように多様な生理作用を示す NO は、ここ数年来、生理医学、薬学分野でのみならず、化学系分野でも超高感度分析法<sup>3)</sup>を巡って注目をあびている物質である。NO の前駆体は生体に豊富に存在する L-アルギニンであり、そのグアニジノ基の末端窒素の酵素的酸化により NO が生成することが 1988年に報告された<sup>4)</sup>。この酸化反応に関与する酵素は NO 合成酵素 (NOS) と呼ばれ、現在までに constitutive NOS (c NOS), inducible NOS (i NOS) の存在が明らかにされている。また、c NOS は神経系と内皮系でそれぞれ neuronal NOS (n NOS), endothelial NOS (e NOS) に分類されている。NOS に関しては、脳、マクロファージ、血管内皮細胞などにおける分布や酵素学的な解析や構造的解析等の多くの知見<sup>5)</sup>が得られている。最近では、発酵工学技術によってこれら 3 種類の NOS に対応する

NOS 欠損マウス (NOS ノックアウトマウス) の樹立に成功して<sup>6)</sup>更に生理的役割の解明も進んでいる。

一方、NO は大気汚染の元凶の一つといわれている NO<sub>x</sub> に属し、その化学的性質は古くから研究されてきた<sup>7)</sup>。最近、NO が活性酸素種であるスーパーオキシドアニオンラジカル (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) と反応してパーオキシナイトライト (ONOO<sup>-</sup>) を生成し、この化合物が生体にとって有害に作用するという報告もあり、ONOO<sup>-</sup>に関する論文も増加の傾向にある<sup>8)</sup>。そのために NO 消去剤の研究も盛んで、有用な生理作用とあわせて NO の二面性が論じられている<sup>9)</sup>。このような状況下、NO 関連の研究者の間では生理的条件下で NO を発生する NO 供与剤 (NO donor) と呼ばれる NO 代替品の合成研究に関心が集まっている<sup>10)</sup>。それは、NO を用いた研究において、ボンベで供給される NO 自身の取扱いが容易ではないからである。NO の半減期は 2-3 秒でラジカルとしては比較的安定な性質を持つといわれているが、通常、NO が気体であるうえに、ラジカルである酸素と反応して二酸化窒素 (NO<sub>2</sub>) に変わりやすい。このため NO 自身を正確に秤量したり、希釈するのは大変困難である。NO の多様な作用が明らかになるにつれて、論文によっては NO の作用について全く逆の結果が報告される例<sup>11)</sup>があり、厳密な実験系の確立が望まれていることから、NO を遊離する化合物 (NO donor) の開発が期待されている。

著者らは、芳香族 *N*-ニトロソ尿素類を溶媒に溶かし室

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed: Masayuki Tanno; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo 158, Japan; Tel: +81-3-3700-1141 ext. 223; Fax: +81-3-3707-6950; E-mail: tanno@nihs.go.jp

温に放置すると NO が生成することを見出した<sup>12)</sup>。通常、*N*-NO 基のラジカル分解は光または高温で起こると報告されていた<sup>13)</sup>ので、本反応のように照射なしで中性溶液中、室温放置という比較的温和な条件下での NO 脱離反応は新規な知見であった。そこで、*N*-ニトロソ化合物の NO donor としての機能性やこれらの化合物を用いた生理活性についても検討した。その結果、脂肪族 *N*-ニトロソ尿素類の生理活性の発現は、通常 DNA に対するアルキル化やカルバモイル化が主反応であるとする定説に対して<sup>14)</sup>、芳香族 *N*-ニトロソ尿素では NO 遊離による作用が期待出来ることがわかった<sup>15)</sup>。

本文では、NO donor として新規に合成した芳香族 *N*-ニトロソ化合物の構造化学的特徴を述べるとともにそれらの化合物から遊離する NO の量を新たに考案した測定装置を用いて測定した結果を述べる。さらに、NO の発生能と生物活性との関係も検討し、芳香族 *N*-ニトロソ化合物の NO donor としての有用性を考察する。

## 2. *N*-ニトロソ化合物の合成

一般に、*N*-ニトロソ化合物は、相当するアミン類をニトロソ化することにより得られる。ニトロソ化の方法には数種類の方法が知られ、相当する塩基（アミン、尿素類）を塩酸酸性条件下で亜硝酸ナトリウムの水溶液でニトロソ化する方法<sup>16)</sup>、酸性下で亜硝酸エステルでニトロソ化する方法<sup>17)</sup>、 $N_2O_4$  や  $N_2O_3$  のような窒素酸化物や NOCl のようなニトロソ化剤でニトロソ化する方法<sup>18)</sup>が一般的である。

芳香族 *N*-ニトロソ化合物 (Fig. 1, 1-4) の合成を塩酸酸性条件下亜硝酸ナトリウムの方法で行うと、目的のニトロソ体が得られない場合が多いことがわかった。そこで、99%ギ酸中で亜硝酸ナトリウムの粉末を加えてニトロソ化し、クロロホルムで抽出する方法<sup>12,19)</sup>、またはクロロホルム溶液中で亜硝酸イソアミルによる酸を用いないニトロソ化法<sup>20)</sup>を採用した。この方法でも、生成する芳香族ニトロソ化合物 (1-3) が熱分解しやすいので、冷却管を

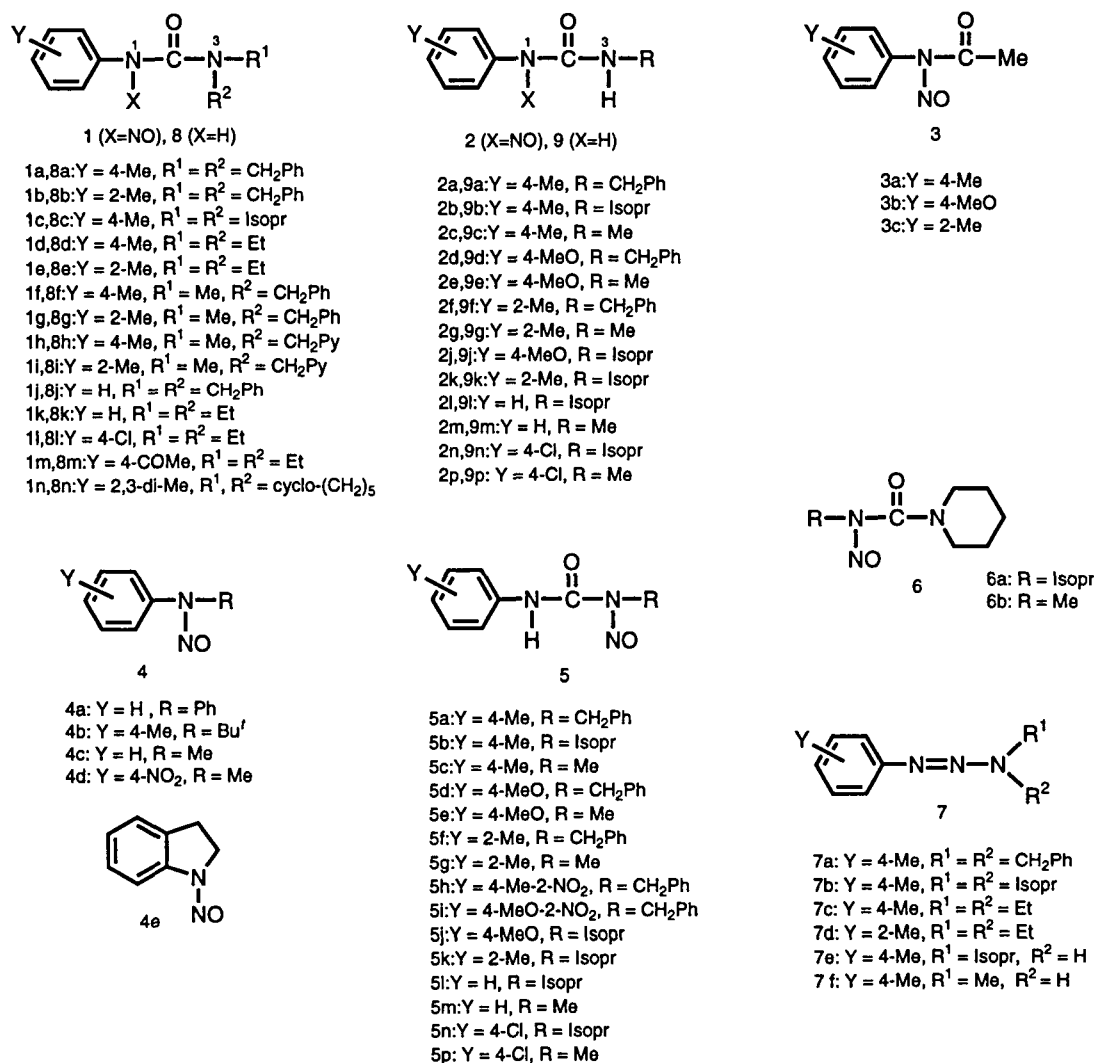


Fig. 1. Structure of *N*-Nitroso Compounds and Related Derivatives

利用したカラム管を用いて低温でクロマトグラフィーを行い、目的のニトロソ体を単離した。再結晶は予め氷冷した少量の *n*-ヘキサン-エーテル混液に化合物を溶かし、冷蔵庫中で再び結晶化させる方法を用いた。また、構造決定のための X 線構造解析実験も低温下で行った<sup>21)</sup>。合成した三置換ニトロソ尿素 (1 a-n) 及び二置換ニトロソ尿素 (2 a-p) の単離収率を Table 1 と Table 2 にそれぞれ記載した。

ギ酸中、亜硝酸ナトリウムの粉末を用いる方法で尿素類 (8) をニトロソ化する際、脱アルキル化を伴うという興味深い反応が見られた。この脱アルキル的ニトロソ化反応は N<sup>3</sup> 位にベンジル基を持つ尿素類 (8 a,f) でのみ起こる。尿素類 (8 a,f) をニトロソ化すると、N<sup>1</sup> 位がニトロソ化された 1 a,f の他に、N<sup>3</sup> 位に脱アルキル的ニトロソ化の起きた二置換ニトロソ尿素 (5 a) を副生した<sup>22)</sup>。ジエチル基やジイソプロピル基ではこの反応は起こらないので、この点では高温で脱アルキル化するジアルキルアニリン類とは異なる。二置換尿素誘導体 (9) のニトロソ化では、N<sup>1</sup>-ニトロソ体 (2) 及び N<sup>3</sup>-ニトロソ体 (5) の 2 種類のニトロソ異性体を与える<sup>19)</sup> (Table 2)。アルキル基とアリール基を有する二置換尿素 (9) のニトロソ化反応で酸を用いた場合、反応の初期ではアリール側のニトロソ体 (2) が生成していても酸触媒によりニトロソ基の 1,3-転位反応が起こり、結果として熱力学的に安定なアルキル側の N<sup>3</sup>-ニトロソ体 (5) のみが生じる。また、有機溶媒中亜硝酸イソアミルのニトロソ化については、カルバミン酸イソアミル誘導体の副生を避けるために反応を室温以下で行うほ

Table 1. Nitrosation of Ureas (8) by Various Methods

Urea <sup>a)</sup>	Method <sup>b)</sup>	Yield (%) of Nitrosourea (1)	
8 a	4-Tol-NHCON (Bn) <sub>2</sub>	B	42
8 b	2-Tol-NHCON (Bn) <sub>2</sub>	B	30
8 c	4-Tol-NHCON (Isopr) <sub>2</sub>	B	20
8 d	4-Tol-NHCON (Et) <sub>2</sub>	B	53
8 e	2-Tol-NHCON (Et) <sub>2</sub>	B	44
8 f	4-Tol-NHCON (Bn)Me	B	60
8 g	2-Tol-NHCON (Bn)Me	B	30
8 h	4-Tol-NHCON (Py)Me	A	46
8 i	2-Tol-NHCON (Py)Me	A	44
8 j	Ph-NHCON (Bn) <sub>2</sub>	B	30
8 k	Ph-NHCON (Et) <sub>2</sub>	B	35
8 l	4-Cl-Ph-NHCON (Et) <sub>2</sub>	B	67
8 m	4-MeCO-Ph-NHCON (Et) <sub>2</sub>	C	13
8 n	2,3-diMe-Ph-NHCO-Pip	B	10

a) Tol = methylphenyl, Bn = benzyl, Ph = phenyl, Py = pyridyl, Pip = piperidino

b) A: 10% HCl-NaNO<sub>2</sub>, B: 99% HCO<sub>2</sub>H-NaNO<sub>2</sub>, C: *iso*-Amyl Nitrite-CHCl<sub>3</sub>

Table 2. Nitrosation of Ureas (9) by Various Methods

Urea <sup>a)</sup>	Method <sup>b)</sup>	Yield (%) of Nitrosourea		
		N <sup>1</sup> -nitroso (2)	N <sup>3</sup> -nitroso (5)	
9 a	4-Tol-NHCONH (Bn)	C	10	80
9 b	4-Tol-NHCONH (Isopr)	B	15	37
		C	56	9
9 c	4-Tol-NHCONH (Me)	B	—	97
		C	2	95
9 d	4-MeO-Ph-NHCONH (Bn)	C	10	65
9 e	4-MeO-Ph-NHCONH (Me)	B	—	92
		C	77	10
9 f	2-Tol-NHCONH (Bn)	C	12	70
9 g	2-Tol-NHCONH (Me)	B	1	90
		C	2	87
9 j	4-MeO-Ph-NHCONH (Isopr)	B	26	27
		C	57	1
9 k	2-Tol-NHCONH (Isopr)	B	65	18
		C	76	15
9 l	Ph-NHCONH (Isopr)	B	—	78
		C	36	17
9 m	Ph-NHCONH (Me)	B	—	95
		C	1	85
9 n	4-Cl-Ph-NHCONH (Isopr)	B	—	40
		C	27	2
9 p	4-Cl-Ph-NHCONH (Me)	B	—	95
		C	1	93

a) Tol = methylphenyl, Bn = benzyl, Ph = phenyl.

b) B: 99% HCO<sub>2</sub>H = NaNO<sub>2</sub>, C: *iso*-Amyl Nitrite-CHCl<sub>3</sub>

うがよい。例えば、二置換尿素 (9 b) の亜硝酸イソアミルによるニトロソ化を 5-10°C で行くと 2 b 及び 5 b が生成する。一方、この反応を室温で行った場合には亜硝酸イソアミルの分解で生じたイソアミルアルコールと 5 b が反応して生じた 4-トリルカルバミン酸イソアミルが主生成物である。この副反応は反応温度を 10°C 以下に保つことにより抑制できる。

### 3. NO 生成の確認<sup>22a,b)</sup>

3,3-ジエチル-1-(4-トリル)-1-ニトロソ尿素 (1 d) を各種の有機溶媒に溶かすと、脱ニトロソ体 (8 d) が生成しベンゼン環がニトロ化された 3,3-ジエチル-1-(2-ニトロ-4-トリル)尿素が生成する。また、3,3-ジベンジル誘導体 (1 a) と *N,N'*-エチレンビス (サリシリデンイミナト) 鉄を反応させると NO<sub>3</sub>-錯体 (黒紫色粉末, Mass *m/z* 338 M: C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>FeN<sub>3</sub>O<sub>5</sub>) が単離される<sup>19,23)</sup>。この錯体は、*N,N'*-エチレンビス (サリシリデンイミナト) 鉄と NO ガスの反応により得られた化合物と一致した。熱分解による

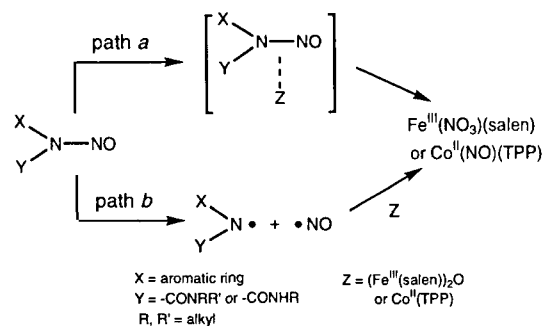


Chart 1. Possible Pathways for Production of NO<sup>-</sup> or NO<sub>3</sub><sup>-</sup> Complex by the Reaction of Aromatic *N*-Nitrosourea with Metal Complex in Chloroform.

ニトロ体の生成と、鉄錯体による NO<sub>3</sub><sup>-</sup>錯体の生成は、*N*-ニトロソ化合物から NO が遊離することを示している。しかし、これらは反応液中で NO を捕捉して得た結果なので Chart 1 の path a を経由して錯体が生成した可能性も否定できない<sup>22)</sup>。そこで、発生した NO はアルゴン雰囲気下でガス導入管を通して反応系外のポルフィリンコバルト液に導き、ポルフィリンコバルト-ニトロシル錯体とすることによって確認した。単離した錯体は、C<sub>44</sub>H<sub>28</sub>CoN<sub>5</sub>O の組成をもつ暗紫色の粉末で、赤外吸収スペクトルで 1685cm<sup>-1</sup> に、可視部吸収スペクトルで 414 および 538 nm に特徴的な吸収を示した。なお、アルゴン雰囲気下で市販の NO ガスをポルフィリンコバルトのクロロホルム溶液に通じて反応させ、ニトロシル錯体標品を別途に合成した。別途合成したニトロシル錯体と *N*-ニトロソ化合物より得られた錯体の分光学的データは一致<sup>24)</sup>し、*N*-ニトロソ化合物から NO が生成する (path b) ことが証明された。

#### 4. *N*-ニトロソ化合物から生じた NO 発生量の評価<sup>15,22)</sup>

##### 4.1 簡易型 NO 測定装置の試作<sup>22a, b)</sup>

NO を検出し、定量する方法としては ESR 法<sup>3a)</sup>、オゾンやルミノール/過酸化水素系による酸化反応を利用した化学発光法<sup>3b)</sup>のような比較的高価な装置を利用する方法が知られている。また、水系溶媒に限定されるものとして、特殊な電極を用いた電気化学測定法やグリース法<sup>3c)</sup>等がある。グリース法は、NO<sub>x</sub> から生じた NO<sub>2</sub><sup>-</sup> にスルファニル酸とナフチルアミンを反応させてアゾ色素にし、520 nm 付近の吸光度を測定して NO<sub>2</sub><sup>-</sup> を定量する方法である。上記に挙げた他の測定法に比べ感度の点でやや劣るものの比較的簡単な方法であり、この方法を改良したザルツマン法が環境化学における大気中の窒素酸化物の測定に用いられている。これらの方法はいずれも特殊な機器を必要とするかまたは溶媒を限定するものである。さらに、多種の化合物からの NO 遊離量を同時に測定するにはいずれも不適當であった。そこで、著者らは有機溶媒や水系溶媒の両方で使用可能で、しかも比較的簡単に NO 遊離量を測定できる

ように Fig.2 に示したような装置を考案した<sup>22)</sup>。この装置の原理はグリース法を応用したものである。NO 遊離化合

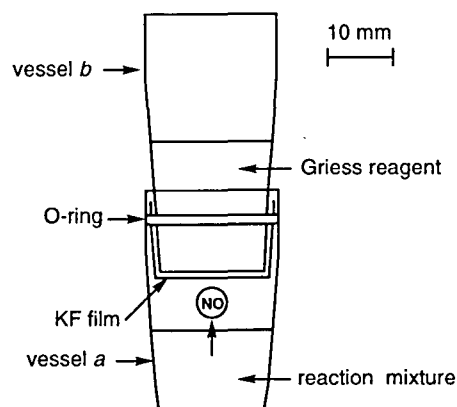


Fig. 2. Apparatus Used for the Evaluation of NO-Generating Ability

物から発生した NO を大気中の酸素により酸化して NO<sub>2</sub> とした後、NO<sub>2</sub> をグリース試薬に導くと、試薬中の水と反応して NO<sub>2</sub><sup>-</sup> になる。そこで、生成した NO<sub>2</sub><sup>-</sup> をグリース試薬により呈色させるものである。装置は vessel a (反応系) と vessel b (検出系) からなり、両 vessel 間に気体のみを通す薄膜 (呉羽化学製 KF-film, 孔径 0.2 μ) を有する。装置の vessel a において化合物の熱分解で生じた NO は、vessel a の気相中の酸素で NO<sub>2</sub> に酸化され、グリース試薬 (4-アミノベンゼンスルホン酸および *N*-ナフチルエチレンジアミンの希酢酸溶液) を入れた vessel b に導かれる。続いて NO<sub>2</sub> は vessel b 中の溶媒である水と反応して NO<sub>2</sub><sup>-</sup> になる。さらに NO<sub>2</sub><sup>-</sup> はグリース試薬と反応し発色する。生成したジアゾ化合物の 546 nm における吸光度測定により NO<sub>2</sub><sup>-</sup> が算出されるが、この NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 量にザルツマン係数を掛けることによって NO 量が計算できる。

##### 4.2 NO の発生量の測定

簡易型 NO 測定装置 (Fig.2) を用いて各種の *N*-ニトロソ化合物 (1-4) 及び NO donor として市販されている *S*-ニトロソ-*N*-アセチル-DL-ペニシラミン (SNAP) から生成する NO 量を測定した。各化合物のクロロホルム溶液を測定装置の vessel a に入れ 37°C で放置した後、グリース試薬を入れた vessel b の液について吸光度を測定した。37°C、2時間反応後に検出される NO<sub>2</sub><sup>-</sup> の量を著者らは化合物の NO 発生能 (NO Generating Ability) とした。一般に、NO donor から生成する NO または NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 量は NO donor の 100mM 当りで示される例が多いので、本研究でも NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 量は化合物の 100 mM 当りの発生量に換算し、さらに、SNAP から生成する NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 量を標準にした。すなわち、SNAP に対する比をとることで同一条件下で発生した量を比較しやすくした。結果は Table 3 に示してある。

化合物により NO 発生量に差が見られ, 芳香族 *N*-ニトロソ尿素 (1,2), 芳香族 *N*-ニトロソアミド (3) 類は比較的 NO を放出するが, 芳香族 *N*-ニトロソアミン (4) では低い発生量であった. 脂肪族 *N*-ニトロソ化合物 (5, 6)

Table 3. NO-Generating Ability of *N*-Nitroso Compounds

Compd. <sup>b)</sup>	NO-Generating Ability <sup>a)</sup>
1 a	4-Tol-N (NO)CON (Bn) <sub>2</sub> 4.79 (8.63)
1 b	2-Tol-N (NO)CON (Bn) <sub>2</sub> 2.12 (3.85)
1 c	4-Tol-N (NO)CON (Isopr) <sub>2</sub> 0.60 (1.09)
1 d	4-Tol-N (NO)CON (Et) <sub>2</sub> 0.35 (0.63)
1 e	2-Tol-N (NO)CON (Et) <sub>2</sub> 0.22 (0.39) <sup>d)</sup>
2 a	4-Tol-N (NO)CONHBn 1.06 (1.92)
2 c	4-Tol-N (NO)CONHMe 1.07 (1.93)
2 f	4-MeO-Ph-N (NO)CONHMe 2.52 (4.55)
3 a	4-Tol-N (NO)COMe 0.87 (1.56)
3 b	4-MeO-Ph-N (NO)COMe 0.75 (1.36)
3 c	2-Tol-N (NO)COMe 0.07 (0.12)
4 a	Ph-N (NO)-Ph 0.02 (0.03)
4 b	4-Tol-N (NO)-Bu <sup>t</sup> 0.00 (0.00)
4 c	Ph-N(NO)-Me 0.01 (0.02) <sup>d)</sup>
4 d	4-NO <sub>2</sub> -Ph-N (NO)-Me 0.11 (0.20) <sup>d)</sup>
4 e	<i>N</i> -Nitrosoindoline 0.03 (0.05) <sup>d)</sup>
5 a-i	Alkyl-N (NO)CONH-Aryl 0.00 (0.00) <sup>d)</sup>
6 a	Isopr-N (NO)CON (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> 0.00 (0.00) <sup>d)</sup>
6 b	Me-N (NO)CON (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> 0.00 (0.00) <sup>d)</sup>
SNAP	0.55 (1.00)

a) Concentration of each *N*-nitroso compound and SNAP for thermal decomposition in chloroform solution was  $1-10 \times 10^{-3}$  M. Reactions were carried out at 37°C for 2 h. The values are amounts (mM) of NO<sub>2</sub><sup>-</sup> generated *via* NO from the 100 mM chloroform solution of the compound, and those in parenthesis are the ratio to SNAP.

b) Tol = methylphenyl, Bn = benzyl. c) Reacted for 4 h. d) Reacted for 7 h.

類は, 37°C, 2時間の反応条件では NO を遊離しなかった. また, 芳香族 *N*-ニトロソ尿素 (1,2) 及び芳香族 *N*-ニトロソアミド (3) は, ジエチル尿素誘導体 (1 d 及び 1 e) を除いて, SNAP と同等もしくは同等以上の NO 発生能を有し, 特に, ジベンジル基を有する芳香族三置換尿素 (1 a) は, SNAP の約 8.6倍で NO を発生することが明らかになった. さらに, 化合物のパラ置換体 (1 a, 1d, 3a) と相当するオルト置換体 (1 b, 1e, 3c) をそれぞれ比較したとき, パラ置換体はオルト置換体よりも NO 量が多い. これは, オルト置換体ではニトロソ基に対するオルト置換基の立体障害のため, パラ置換体に比べ芳香環の π系と N-NO の π系がねじれた関係にある. 言い換えれば, 芳香環と N-NO 基が同一平面を取りやすいパラ置換体では, N<sup>1</sup>-窒素は環の π電子と共役し, 非局在化することにより N<sup>1</sup>-NO 結合が不安定になるのに対し, オルト置換体の N<sup>1</sup>-窒

素上の電子は局在化してニトロソ基との結合が安定しているためと考えられる. また, ともにパラ置換体である三置換体 (1 a) と二置換体 (2 a) を比較したときは, N<sup>3</sup> 位の置換基によるニトロソ基のまわりの立体障害のために 1 a の N-NO 結合が 2 a のそれよりも切れやすくなり NO の生成も増加したと推定した.

結局, 著者らが合成した一連の *N*-ニトロソ化合物のなかで, 単位時間当りの NO 発生量が最も大きいのは三置換 *N*-ニトロソ尿素体 (1 a) であることが判明した.

### 4.3 NO donor の比較<sup>22)</sup>

*N*-ニトロソ化合物群の中で最も NO の発生能が優れていた芳香族三置換 *N*-ニトロソ尿素 (1 a) と一般に使用されている数種の NO donor (NOC-18, SNAP, SIN-1, NOR-4, SNP) について, 37°C, 2時間の条件下での NO 遊離量を前述した簡易型 NO 測定装置を用いて比較した. NO donor の構造は Fig.3 に示してある.

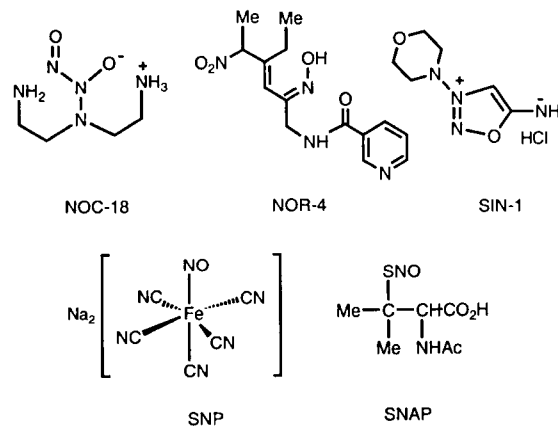


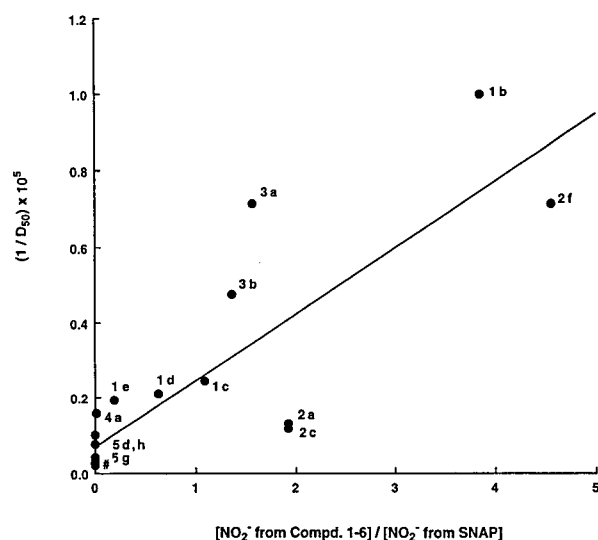
Fig. 3. Structure of NO Donors

Table 4. NO-Generating Ability of Aromatic *N*-Nitrosourea (1a) and Usual NO Donors

NO Donor	NO-Generating Ability <sup>a)</sup>
1a <sup>b)</sup>	0.45 (0.90)
NOC-18	0.95 (1.90)
NOR-4 <sup>b)</sup>	0.11 (0.22) <sup>d)</sup>
SIN-1	0.38 (0.76)
SNP	0.04 (0.08)
SNP <sup>c)</sup>	0.71 (1.42)
SNAP <sup>b)</sup>	0.50 (1.00)

a) Each compound ( $1.6 \times 10^{-3}$  M) was reacted in Krebs buffer (pH 7.4) at 37°C for 2 h and NO was detected as NO<sub>2</sub><sup>-</sup> using the Griess method. The values are amounts (mM) of NO<sub>2</sub><sup>-</sup> generated from 100 mM of 1a or NO donors, and those in parenthesis are the ratio to SNAP.

b) Reaction in the mixture of DMSO-Krebs buffer (1:9). c) Reaction in H<sub>2</sub>O (pH 6.4). d) Data for 3 h.



**Fig. 4.** Relationship between NO Generation and Cytotoxic Activity  
The figure shows the NO-generating ability per 2 h and  $1/ID_{50}$  from Tables 1 and 2, except for the data for 1 a. The NO-generating abilities of 1e and 4a were converted into values per 2h. The symbol # in the figure shows the data for 4 b, 5 a-c, e, f, i and 6 a, b.

本研究における *N*-ニトロソ化合物は水に難溶性であるため、最初に少量の DMSO に溶かした後、pH 7.4 の Krebs 緩衝液を加えて希釈して水溶液とした。NOR-4 および

SNAP も 10% DMSO を含む pH 7.4 の Krebs 緩衝液に溶かし、他は pH 7.4 の Krebs 緩衝液に溶解した。結果は Table 4 に示した。6 種の化合物について、NO の発生能を比較すると  $NOC-18 > SNAP > 1a > SIN-1 > NOR-4 > SNP$  の順であり、NOC-18 は NO 基を 2 個有しているため、1a や SNAP の約 2 倍の発生量を示した。SNP は、溶液の液性が酸性の場合に NO を遊離しやすいことがわかった。*N*-ニトロソ尿素 (1 a) は水系でも SNAP と同程度の NO を遊離したが、厳密には SNAP や 1 a は 10% の DMSO を含む水系で調べている。これらの化合物を化学修飾して水溶性を増加させれば、生物活性を調べる目的の NO 供与化合物として有用性が増すと考えられる。

### 5. *N*-ニトロソ化合物の細胞増殖阻害作用<sup>15)</sup>

細胞増殖阻害作用は、腫瘍細胞である L-5178Y 培養細胞を用いて、その生育を阻害する効果を調べる方法で行った。*N*-ニトロソ化合物は、10% DMSO を含有する PBS 緩衝液に溶かして試験し、増殖を 50% 阻害する濃度 ( $ID_{50}$ ) を求めた。Table 5 に記載したように、芳香族三置換 *N*-ニトロソ尿素 (1 a-e) 及び芳香族二置換 *N*-ニトロソ尿素 (2 a-g) の  $ID_{50}$  は約  $10^{-5}$  M であり、芳香族 *N*-ニトロソアミド (3 a,b) も同程度の値を示した。一方、脂肪族 *N*-ニトロソ尿素 (5 a-i, 6a,b) では、いずれの誘導体も  $ID_{50}$

**Table 5.** Cytotoxic Activity Against L-5178 Y Cell Line<sup>a)</sup> of *N*-Nitroso and Relative Compounds

Compd. <sup>b)</sup>	$ID_{50}$		Compd. <sup>b)</sup>	$ID_{50}$	
	$\mu\text{g/ml}$	$\times 10^{-5}$ M		$\mu\text{g/ml}$	$\times 10^{-5}$ M
1 a 4-Tol-N(NO)CON(Bn) <sub>2</sub>	6.3	1.8	5 b Isopr-N(NO)CONH(4-Tol)	75.0	33.9
1 b 2-Tol-N(NO)CON(Bn) <sub>2</sub>	3.6	1.0	5 c Me-N(NO)CONH(4-Tol)	57.0	29.3
1 c 4-Tol-N(NO)CON(Isopr) <sub>2</sub>	1.0	4.1	5 d Bn-N(NO)CONH(4-MeO-Ph)	29.0	10.0
1 d 4-Tol-N(NO)CON(Et) <sub>2</sub>	11.0	4.8	5 e Me-N(NO)CONH(4-MeO-Ph)	51.0	24.5
1 e 2-Tol-N(NO)CON(Et) <sub>2</sub>	12.0	5.2	5 f Bn-N(NO)CONH(2-Tol)	>100.0	>37.1
2 a 4-Tol-N(NO)CONHBn	20.0	7.6	5 g Me-N(NO)CONH(2-Tol)	25.0	13.0
2 b 4-Tol-N(NO)CONH(Isopr)	15.0	6.6	5 h Bn-N(NO)CONH(2-NO <sub>2</sub> -4-Tol)	>100.0	>10.0
2 c 4-Tol-N(NO)CONHMe	17.0	8.6	5 i Bn-N(NO)CONH(2-NO <sub>2</sub> -4-MeO-Ph)	>100.0	>30.3
2 d 4-MeO-Ph-N(NO)CONHBn	17.0	6.0	6 a Isopr-N(NO)CON(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub>	>100.0	>50.2
2 e 4-MeO-Ph-N(NO)CONH(Isopr)	4.0	1.6	6 b Me-N(NO)CON(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub>	71.0	42.3
2 f 4-MeO-Ph-N(NO)CONHMe	3.0	1.4	7 a 4-Tol-N=N-N(Bn) <sub>2</sub>	>100.0	>37.1
2 g 2-Tol-N(NO)CONHBn	16.0	6.1	7 b 4-Tol-N=N-N(Isopr) <sub>2</sub>	21.0	9.5
3 a 4-Tol-N(NO)COMe	2.4	1.4	7 c 4-Tol-N=N-N(Et) <sub>2</sub>	5.0	2.6
3 b 4-MeO-Ph-N(NO)COMe	4.0	2.1	7 d 2-Tol-N=N-N(Et) <sub>2</sub>	>100.0	>18.2
4 a (Ph) <sub>2</sub> NNO	2.5	6.3	7 e 4-Tol-N=N-NH(Isopr)	31.0	17.7
4 b 4-Tol-N(NO)-Bu <sup>r</sup>	70.5	36.7	7 f 4-Tol-N=N-NHMe	27.0	18.2
5 a Bn-N(NO)CONH(4-Tol)	>100.0	>37.1			

a) L-5178 Y Leukemia cells were cultured in a stoppered tube in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum at 37°C.

The growth inhibitory effect was determined as the ratio of cell numbers, which were counted visually with a microscope in treated and control groups (% treated/control) after incubation of  $10^5$  cells/ml for 48 h with various concentrations of each sample. To express the results, the  $ID_{50}$  (50% inhibiting) value was calculated by a probit diagramming analysis.

b) Tol=methylphenyl, Bn=benzyl.

値は $10^{-4}$  M以上であり活性は低下した。芳香族 *N*-ニトロソアミン (4a, b) 類の中では、*N*-ニトロソジフェニルアミン (4a) が活性が高く、*N*-ニトロソ-*t*-ブチルフェニルアミン (4b) の約6倍であった。これらの結果は、各種の *N*-ニトロソ化合物が生物活性を強く示すためには、それらの構造において芳香環に直結した N-NO 基を有することが必要であるということを示している。芳香族三置換 (1) と芳香族二置換 *N*-ニトロソ尿素 (2) 間では、三置換体が活性であり、三置換体の中ではジベンジル基を有する誘導体 (1a, b) の方がジエチル基やジイソプロピル基を有する誘導体 (1c-e) より強い活性を示した。また、三置換ニトロソ尿素体のジアゾ転位により生じるトリアゼン類は、ジエチル誘導体 (7c) を除いていずれも活性が低かった。

ニトロソ化合物における NO の発生のしやすさと培養細胞に対する増殖抑制作用の関係については、NO<sub>2</sub><sup>-</sup> の遊離量 (Table 3 では 1a を除く) と ID<sub>50</sub> 値 (Table 5) との間に相関係数 0.713 で直線的な相関性があることが明らかになった (Fig. 4)。従来、脂肪族 *N*-ニトロソ尿素類は、代謝によりジアゾアルカンに分解し、さらに非酵素的にアルキルカチオンに分解したのち DNA をアルキル化して活性を発現すると考えられてきた<sup>14)</sup>が、以上の結果は、ニトロソ化合物から発生した NO または NO 由来の化合物が作用の活性種である可能性を示している。

化合物 1a については、直線上からはずれた。これは、1a の分解速度が非常に大きいため、細胞に対し活性を示す前に過剰の NO が失われる結果、作用効率が低下すると推定された。この結果は、生物作用を検討する際、場合によっては徐々に NO を遊離する化合物が有効であることを示唆しているものと思われる。最近、NO donor による NO の徐放機能を考慮した化合物の合成や徐放機構に重点をおいた化合物の評価法が検討されている<sup>25)</sup>。

## 8. まとめ

*N*-アルキルまたは *N*-アリーールニトロソアミン (4) の化学的性質に基づいて、室温付近で効率よく NO を遊離する化合物の構造設計から、芳香族 *N*-ニトロソ尿素誘導体 (1, 2) 及び芳香族 *N*-ニトロソアミド誘導体 (3) が得られた。NO を遊離しやすい *N*-ニトロソ化合物の構造は、芳香環と隣接する共役した N-NO 基を有するものである。N<sup>+</sup>-窒素上の電子が芳香環の  $\pi$  電子と共役し非局在化するとき N-NO 結合がホモリティックに開裂しやすい。さらに、N-NO 基にカルボニル基が隣接すると、カルボニルの酸素とニトロソ基の酸素間の静電的反発により N-NO 結合は不安定性を増し切れやすくなる。尿素誘導体においては、ウレイドの N<sup>3</sup> 位の置換基の立体効果が N-NO 結合の安定性に影響し、立体障害の大きい芳香族三置換誘導体

(1) が効率よく NO を遊離する。NO donor として知られる SNAP<sup>22)</sup> と NO 発生量を比較すると、1a は SNAP の約 8.6 倍の NO 発生能を示した。さらに、置換基の位置や性質で NO の発生の起きやすさを制御できることが明らかになった。固体であるこれらの化合物は、常温で気体である NO に代わる簡便な NO 遊離化合物として利用が可能であると考えられる。

NO donor から遊離する NO 量を測定する簡易型 NO 測定装置を考案したが、この装置の利点は、有機溶媒や水系溶媒を問わず、多種の化合物からの NO 発生量を同条件下測定し比較することができることである。ただ、NO を反応系から検出系へ導く過程で損失が生じ、発生した NO の全量を定量できないという欠点がある。特に、水系溶媒中では NO が NO<sub>2</sub><sup>-</sup> になりやすく、有機溶媒の場合より検出量が低下するので、さらに改良が必要である。

NO は、ラジカル種であるために生体成分との反応性は高いと推測される。DNA に対しては核酸塩基の脱アミノ化<sup>26)</sup>に関与し、また、サルモネラ菌やヒトのリンパ芽球細胞に対して変異原性を示す。細胞の増殖に関与する種々の酵素は活性中心に非ヘム鉄やチオール基を有するので、NO はそれらと反応して酵素活性を失活させて細胞死を引き起こすと報告されている<sup>27)</sup>。NO 遊離化合物としての *N*-ニトロソ化合物の細胞毒性についての報告は著者らの例以外にはない。NO 遊離能と細胞増殖抑制作用との間に直線関係があることが明らかになったので、*N*-ニトロソ化合物の生物に対する作用機構に NO または NO 由来の活性種による作用発現機構を加えることができると考えている。

なお、NO donor に関する研究は始まったばかりであり、さらにより NO donor を得るために研究中である。

謝辞 本研究は、北陸大学中川重雄博士、静岡県立大学梅原 薫博士、及び千葉大学山口健太郎博士との協同で行いました。ここに感謝し、御礼申し上げます。また、NO 測定装置を考案するに当り KF film をご提供いただいた呉羽化学の久住信之博士と目黒和広博士に感謝致します。なお、本研究の一部は国立機関公害防止等試験研究費 (環境庁) によって行ったものです。ここに謝意を表します。

## 文 献

- 1) Palmer, R. M. J., Ferrige, A. G. and Moncada, S.: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium derived relaxing factor. *Nature*, **327**, 524~526 (1987)
- 2) 大島寛史: 一酸化窒素とがん, Modification of Cellular Substances by Nitric Oxide: Especially from the Viewpoint of Carcinogenesis. *Cancer Research and Clinics*, 中山書店, 東京, pp. 794~800 (1993)
- 3) a) Pronai, L., Ichimori, K., Nozaki, H., Nakazawa, H., Okino, H., Carmichael, A. J. and Arroyo C. M.: Investi-

- gation of the existence and biological role of L-arginine / nitric oxide pathway in human platelets by spin trapping / EPR studies. *Eur. J. Biochem.*, **202**, 923~930 (1991)
- b) Kikuchi, K., Nagano, T., Hayakawa, H., Hirata, Y. and Hirobe M.: Detection of nitric oxide production from a perfused organ by a luminol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system. *Anal. Chem.*, **65**, 1794~1799 (1993) c) Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S. and Tannernbaum S. R.: Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.*, **126**, 131~138 (1992) d) Ishida, Y., Hashimoto, M., Fukushima, S., Masumura, S., Sasaki, T., Nakayama, K., Tamura, K., Murakami, E., Isokawa, S. and Momose, K.: A Nitric Oxide-Sensitive Electrode: Requirement of Lower Oxygen Concentration for Detecting Nitric Oxide From the Tissue. *J. P. M.*, **35**, 19~24 (1995) e) Saltzman, B. E. and Mendenhall, A. L. Jr.: Design Parameters and Performance of a Miniaturized Colorimetric Recording Air Analyzer. *Anal. Chem.*, **36**, 1300~1304 (1964).
- 4) a) Leaf, C. et al.: Endogenous incorporation of nitric oxide from L-arginine into *N*-nitrosomorpholine stimulated by *Escherichia coli* lipopolysaccharide in the rat. *Carcinogenesis*, **12**, 537~539 (1991) b) Liu, R. H. et al.: Elevated formation of nitrate and *N*-nitrosodimethylamine in woodchucks (*Marmota monax*) associated with chronic woodchuck hepatitis virus infection. *Cancer Res.*, **51**, 3925~3929 (1991)
- 5) 浜中信行, 小林 馨: 合成酵素阻害薬, 別冊・医学の歩み NO のすべて (平田結喜緒・編), 医歯医薬出版, pp.41~47 (1996)
- 6) 大柳善彦: NOS の構造と機能. NO ラジカルの医学, 羊土社, pp.29~41 (1996)
- 7) 吉村哲彦: NO と化学特性と生物学的ポテンシャル, -臓器特性と分子病態-. NO とスーパーオキシド (井上正康・他編), 日本アクセルシュプリンガー出版, pp.10~18 (1995)
- 8) a) DeMaster, E. G. et al.: Reaction of nitric oxide with the free sulfhydryl group of human serum albumin yields a sulfenic acid and nitrous oxide. *Biochemistry*, **34**, 11494~11499 (1995) b) Kharitonov, V. G. et al.: Kinetics of nitrosation of thiols by nitric oxide in the presence of oxygen. *J. Biol. Chem.*, **270**, 28158~28164 (1995)
- 9) Akaike, T., Yoshida, M. and Miyamoto, Y.: Antagonistic action of imidazolineoxyl *N*-oxides against endothelium-derived relaxing factor / NO through a radical reaction. *Biochemistry*, **32**, 827~832 (1993)
- 10) a) 丹野雅幸, 末吉祥子, 宮田直樹: NO 産生化合物. 化学総説・NO-化学と生物 (大倉一郎・他編), 学会出版センター, pp.53~62 (1996) b) Wang, Y. X., Zhou, T. and Pang, C. C. Y.: A comparison of the inhibitory effects of sodium nitroprusside, pinacidil and nifedipine on pressor response to *N*<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine. *Br. J. Pharmacol.*, **108**, 398~404 (1993) c) Campbell, J. M., McCrae, F., Reglinski, J., Wilson, R., Smith, W. E. and Sturrock, R. D.: The interaction of sodium nitroprusside with peripheral white blood cells in vitro. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1156**, 327~333 (1993) d) Stowe, D. F., Baban, M. and Kampine, J. P.: Reperfusion with adenosine and nitroprusside improves preservation of isolated guinea pig hearts after 22 hours of cold perfusion with 2, 3-butanedione monoxime. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **21**, 578~586 (1993) e) Salvemini, D., Mollace, A. and Pistelli, A.: Metabolism of glyceryl trinitrate to nitric oxide by endothelial cells and smooth muscle cells and its induction by lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 982~986 (1992) f) Noack, E. and Feelisch, M.: Molecular aspects underlying the vasodilator action of molsidomine. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **14** (Suppl. 11), S 1~S 5 (1989) g) Ivanova, K., Schaefer, M., Drummer, C. and Gerzer, R.: Effects of nitric oxide-containing compounds on increases in cytosolic ionized Ca<sup>2+</sup> and on aggregation of human platelets. *Eur. J. Pharmacol. Mol. Pharmacol.*, **244**, 37~47 (1993) h) Maragos, C. M., Morley, D., Wink, D. A., Dunams, T. M., Saavedra, J. E., Hoffman, A., Bove, A. A., Isaac, L., Hrabie, J. A. and Keefer L. K.: Complexes of NO with Nucleophiles as Agents for the Controlled Biological Release of Nitric Oxide. Vasorelaxant Effects. *J. Med. Chem.*, **34**, 3242~3247 (1991)
- 11) a) Moncada, C., Lekieffre, D., Arvin, B. and Meldrum, B.: Effect of nitric oxide synthase inhibition on NMDA- and ischemia-induced hippocampal lesions. *NeuroReports*, **3**, 530~532 (1992) b) Siegfried, M. R., Erhardt, J., Rider, T., Ma. X. L. and Lefer, A. M.: Cardioprotection and attenuation of endothelial dysfunction by organic nitric oxide donors in myocardial ischemia-reperfusion. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **260**, 668~675 (1992) c) Woditsch, I., Strobach, H. and Schroer, K.: Oral cicaprost protects from hypercholesterolemia-induced impairment of coronary vasodilation. *Agents Actions Suppl.*, **37**, 297~304, (1992)
- 12) Sueyoshi, S. and Tanno, M.: Preparation and properties of 3,3-dialkyl-1-arylnitrosoureas and related Compounds. *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 488~491 (1985)
- 13) a) Tam, J. N., Yip, R. W. and Chow, Y. L.: Chemistry of Amido Radicals. Flash Photolysis of *N*-Nitroso-*N*-Alkyl-lacetamides. *J. Am. Chem. Soc.*, **96**, 4543~4554 (1974) b) Welzel, P.: Die thermische Spaltung einiger Diarylnitrosamine und-nitramine. *Chem. Ber.*, **104**, 808~821 (1971)
- 14) Gnewuch, C. T. and Sosnovsky, G.: A Critical Appraisal of the Evolution of *N*-Nitrosoureas as Anticancer Drugs. *Chem. Rev.*, **97**, 829~1013 (1997)
- 15) Tanno, M., Sueyoshi, S., Miyata, N. and Umehara K.: Characterization of the Cytotoxic Activity of Nitric Oxide Generating *N*-Nitroso Compounds. *Chem. Pharm. Bull.*, **45**, 595~598 (1997)
- 16) Hatt, H. H.: *Org. Synth.*, II, 211 (1943)
- 17) Semon, W. L. and Damerell, V. R.: *Org. Synth.*, II, 204 (1943)
- 18) Challis, B. C. and Kyrtopoulos, S. A.: The Chemistry of Nitroso Compounds. Part 12. The Mechanism of Nitrosation and Nitration of Aqueous Piperidine by Gaseous Dinitrogen Tetraoxide and Dinitrogen Trioxide in Aqueous Alkaline Solutions. Evidence for the Existence of Molecular Isomers of Dinitrogen Tetraoxide and Dinitrogen Trioxide. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. II*, 1978, 1296~1302
- 19) Tanno, M. S., Sueyoshi, S. and Kamiya, S.: Thermolysis of *N*-Aryl-*N*-nitrosoureas to Afford Aryl Isocyanates and Nitrosamines via *O*-Nitrosoisourea Intermediates. *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 2644~2649 (1990)
- 20) a) Tanno, M. and Sueyoshi, S.: Preparation and Prop-



- erties of 3-Alkyl-1-arylnitrosoureas and Related Compounds. *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 1360-1371 (1987) b) Tanno, M., Sueyoshi, S. and Kamiya, S.: 1, 3-Nitroso Rearrangement and Transnitrosation of 1-Aryl-3-benzyl-1-nitrosoureas which Decompose to Liberate Nitrosyl Radical under Mild Conditions. *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 49~54 (1990)
- 21) Yamaguchi, K., Matsumura, G., Tanno, M., Sueyoshi, S. and Miyata, N.: Structure of *N*-Aryl-*N*-nitrosoureas. *Acta Cryst.*, **C48**, 1051~1054 (1992)
- 22) a) Tanno, M., Sueyoshi, S. and Miyata, N.: Nitric oxide generation from aromatic *N*-nitrosoureas at ambient temperature. *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 1849~1852 (1996) b) 丹野雅幸, 末吉祥子, 宮田直樹, 梅原薫, : 一酸化窒素 (NO) 発生剤の研究 (I) 自発発生化合物の開発と NO 検出法産生化合物, 磁気共鳴と医学, **7**, 227~229 (1996)
- 23) Croisy, A. F., Fanning, J. C., Keefer, L. K., Slavin, B. W. and Uhm, S. -J.: Metal complexes as promoters of *N*-nitrosation reaction. *IARC. Sci. Publ.*, **31**, 83~93 (1980)
- 24) a) Scheidt, W. R. and Hoard, J. L.: Stereochemistry of Low-Spin Cobalt Porphyrins. I. Structure and Bonding in a Nitrosylcobalt Porphyrin and Their Bearing on One Rational Model for the Oxygenated Protoheme. *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 8281~8288 (1973) b) Wayland, B. B., Minkiewicz, J. V. and Abd-Elmageed, M. E.: Reactions of Nitric Oxide with Cobalt(II)Tetraphenylporphyrin: A Unique Bis Nitric Oxide Complex. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1976, 1015~1016
- 25) Ramamurthi, A. and Lewis, R. S.: Measurement and modeling of nitric oxide release rates for nitric oxide donors. *Chem. Res. Toxicol.*, **10**, 408~413 (1997)
- 26) deRojas-Walker, T., Tamir, S., Ji, H., Wishnok, J. S. and Tannenbaum, S. R.: Nitric Oxide Induces Oxidative Damage in Addition to Deamination in Macrophage DNA. *Chem. Res. Toxicol.*, **8**, 473~477 (1995)
- 27) Kellerl, R., Bassetti, S., Keistl, R., Mulsch, A. and Klauser, S.: Induction of Nitric Oxide Synthase is a Necessary Precondition for Expression of Tumor Necrosis Factor-Independent Tumoricidal Activity by Activated Macrophages. *Biochem. & Biophys. Res. Commun.*, **184**, 1364~1371 (1992)

## プリン受容体による巨核球の細胞質カルシウムオシレーション

畝山智香子<sup>#</sup>

## Purinoreceptor-induced cytoplasmic calcium oscillation in megakaryocytes

Chikako Uneyama<sup>#</sup>

Megakaryocytes isolated from rat bone marrow respond to externally applied ATP and ADP, showing a periodic K<sup>+</sup> current that reflects oscillation in cytoplasmic calcium concentration. The agonist selectivity of the purinoreceptor on the megakaryocyte is unique. In addition, the intracellular mechanism of calcium oscillation and the effects of many modulating factors were investigated.

**Keywords:** megakaryocytes, patch-clamp, Ca<sup>2+</sup> oscillation

(Received May 30, 1997)

## 1. はじめに

人間をはじめとする動物は全身をめぐる血液によって各器官が維持されている。血液中には様々な細胞成分が含まれるが、その中でも赤血球と並んで血中に特有かつ不可欠な成分が血小板である。血小板は血液凝固の主役であると同時に多数の細胞増殖因子などの生理活性物質を含み、生体が傷害を受けて出血をおこしたような場合に出血を止め、傷害部位の修復に関与する。さらに脳内出血や心筋梗塞などの重篤な循環系の疾患に関与することから、薬物治療のターゲットとしても注目されている。

血小板は骨髄の多分化能幹細胞から巨核球系の幹細胞(CFUM)を経て生じる巨核球からつくられるとされる。巨核球は骨髄中での成熟の際に細胞分裂を伴わない遺伝子複製により2Nから64Nにまで倍数性が増加し、細胞質もそれと同時に増大するため、他の細胞と明確に判別できる直径50-70μmの巨大細胞になる。巨核球には細胞内に demarcation membrane system と呼ばれる発達した膜系が存在し、この膜はもともとは巨核球の細胞表面が陥落して生じたもので将来は血小板の形質膜となるとされる<sup>1)</sup>。従ってこの膜系は細胞外と連絡していて、巨核球の小胞体などの膜系とは異なる。生体内で巨核球は細長い偽足様の突起をのびし、それが切断されて血小板になるとされている<sup>2)</sup>。巨核球一つからはその大きさにもよるが4000-8000の血小板ができる<sup>3)</sup>とされる。しかし巨核球の demarcation membrane system が直ちに血小板の形質膜と同じ性質を持つ

は限らず<sup>3)</sup>、血小板生成機構にはなお謎が多い。

血小板は核を持たないため自身で新規蛋白質を合成する能力は小さいとみなされること、血小板の膜の組成などが巨核球と類似すること<sup>4,5)</sup>などから基本的には巨核球と血小板は同じ様な性質を持つものとみなされることが多い。血小板の関与する病態の中でも血小板減少症は巨核球にその原因がある場合があり<sup>6)</sup>、巨核球の成長因子であるトロンボポエチンやインターロイキン-6などが血小板減少症治療薬として開発されつつある<sup>7,8)</sup>。また近年神経伝達物質などの生理活性物質としても注目されるようになったアデニンヌクレオチド類の代謝においても血小板と巨核球が重要な役割を担っている<sup>9)</sup>。

さらに血小板は動物やヒトから採取しやすいことなどもあって生化学的な解析の進んでいる細胞でもある。血小板は細胞内に蛋白質性の成分を多く含むα顆粒と、アデニンヌクレオチド類やセロトニンなどを多く含むdense bodyとをもち、それらが刺激に応じて放出されて様々な生体反応を引き起こす。その分泌反応には細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇とプロテインキナーゼCの活性化が関与すること<sup>10,12)</sup>、アゴニストにはトロンビンのような強いものやADPのような弱いものがあること、信号伝達経路にアラキドン酸代謝が関与することなどが知られている<sup>13)</sup>。このように血小板をめぐる話題は極めて多様で重要なものが多いが、血小板の性質から単一細胞レベルでの研究はわずかしかなか<sup>14)</sup>、必ずしも進んでいるとはいえない。

近年細胞の生理機能を単一細胞レベルで解析する技術が発達し、それまで全体としてとらえていた場合には予測されなかった様々な性質が個々の細胞にあることが知られるようになってきた。非興奮性細胞の細胞質遊離Ca<sup>2+</sup>濃度の周期的変化(オシレーション)もそうした現象の一つで

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed: Chikako Uneyama, Ph. D. Division of Pathology, Kamiyoga 1-18-1 Setagaya-Ku, Tokyo 158, Japan; Tel: 03-3700-1141; Fax: 03-3700-2348; E-mail: uneyama@nihs.go.jp

ある。たとえば細胞懸濁液や組織の断片を試料として用いる場合、結果として得られるのは全体の総和としての反応であって個々の細胞の反応ではない。つまり個々の細胞ではオシレーションが起きていても、周期が完全に一致しない限り総和としてみれば一過性の上昇になる。従ってこれまで単純に一過性の上昇といった反応が報告されてきた系でも単一細胞レベルで解析してみれば違った結果が得られる可能性がある。実際非興奮性細胞の  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションに関してはその報告は年々増えていて<sup>15-19)</sup>、現在では特殊な反応とはみなされていない。

$\text{Ca}^{2+}$  オシレーションは細胞が刺激に応じて細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇を周期的に繰り返す現象であり、筋細胞や神経細胞などの興奮性細胞ではかなり以前から認められていた。しかしこれらの興奮性細胞の場合は発達した  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルを介して細胞外から  $\text{Ca}^{2+}$  が流入するのがおもなメカニズムであり、非興奮性細胞の場合とは異なる。非興奮性細胞の  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションには  $\text{IP}_3$  による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  プールからの  $\text{Ca}^{2+}$  の放出が関わっていて、一般的には刺激の強さは振動の頻度に換算され、 $\text{Ca}^{2+}$  濃度が特に高くなる訳ではない。つまり低濃度のアゴニストでも酵素などの活性化に十分な  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇が確保され、高濃度でも細胞に毒性のあるようなレベルにまで  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が上昇することはないという点で極めて精巧なシステムといえることができる。この現象を説明するモデルもいくつかある<sup>20,21)</sup>。

ところで単一細胞の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の測定は、 $\text{Ca}^{2+}$  感受性の色素を用いた画像解析法や微小電極を用いるホールセルパッチクランプ法などで行われてきた。この方法は Horn ら<sup>22)</sup>により穿孔パッチ法が報告されたことでさらに洗練された技術になった。この方法は、従来のホールセル法では細胞膜を破って細胞内と電極内を通電させるのに対して、一価イオン透過性のイオノフォアであるニスタチンを電極内液に使うことで細胞膜に小孔を開けて電極と細胞を通電するもので、細胞内分子のピペット内への拡散による消失がおこらないという利点を持つ。従ってニスタチン穿孔法はこれまで研究しにくいとされてきたセカンドメッセンジャーを介する反応などに有効である。これまでどちらかといえば膜そのものの性質であるチャンネルなどがパッチクランプ法の得意分野であるとされてきたが、この方法により個々の細胞の生理的応答を、チャンネルの開閉を指標に解析できるようになったといえる。

さらに本研究では細胞に薬物を投与する方法として Y-チューブ法を採用した。この方法は神経細胞の早い応答を解析するために考案されたもので、細胞外液の交換が 20ms で完了する<sup>23,24)</sup>。パッチクランプ法では画像解析法とは違って位置情報は得られないものの画像をとるための時間的な制約がないため、記録は連続的にできる。従って Y-チューブとの組み合わせで時間分解能の極めて高い測定が可

能である。こうした事情を背景に、本研究では巨核球のアゴニスト応答を、主にニスタチン穿孔ホールセルパッチクランプ法を用いて解析した。なお巨核球の単一細胞レベルでの解析は他の方法で既にいくつか報告があり<sup>25,26)</sup>、それらの結果との比較も焦点のひとつとなる。

## 2. 実験方法

### i. 細胞の調製

体重 250 - 300g の雌雄 Wistar ラットを過剰量のジエチルエーテルで麻酔し、頸動脈切断により屠殺した。大腿骨を単離し、注射筒と針を用いて標準外液で洗浄することにより骨髓液を得た。75 $\mu\text{M}$  のナイロンメッシュで濾過して細胞の塊をのぞいた後、細胞懸濁液を記録用チャンバー (Falcon, Primaria tissue culture dish) に移した。記録用チャンバーは室温で数時間放置し、細胞が底に固着するのを待った。巨核球は位相差顕微鏡下ではその大きさから (40 - 50  $\mu\text{M}$ ) 容易に識別可能である。

### ii. 溶液

標準外液の組成は、150mM 塩化ナトリウム、5mM 塩化カリウム、2mM 塩化カルシウム、1mM 塩化マグネシウム、10mM グルコース、10mM N-2-hydroxyethylpiperadine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES) で、pH を tris (hydroxymethyl) aminoethane (Tris) -OH で 7.4 に調整した。穿孔パッチのピペット内液の組成は、150mM 塩化カリウム、10 $\mu\text{M}$  HEPES, pH 7.2 で、コンベンショナルホールセルパッチのピペット内液は、150mM 塩化カリウム、2mM ATP-Mg, 10mM HEPES, 0.3 または 1mM EGTA である。ニスタチンはピペット内液に最終濃度 50 - 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  に溶解して実験に用いた。

### iii. 電気生理学的測定

巨核球の全細胞電流は Horn らによる方法<sup>22)</sup>に従って室温 (21 - 24 $^{\circ}\text{C}$ ) で nystatin perforated 法により記録した。実験により conventional whole-cell patch clamp 法<sup>27)</sup>も用いた。電流と電圧の測定にはパッチクランプアンプ (List, EPC 7) を用い、同時にペンレコーダー (三栄, RECTI-HORIZ - 8K) で記録し、電気信号をデジタルオーディオプロセッサでデジタル方式に変換した後ビデオカセットレコーダー (三菱, VH-F32) で記録・保管した。

### iv. 薬物

UTP は Boehringer Mannheim, 2-メチルチオ ATP は RBI Biochemicals, HEPES, 1,2-bis (O-aminophenoxy) ethane N,N,N',N'-tetraacetic acid (BAPTA) -AM 及び sodium-binding benzofuran isophthalate (SBFI) -AM は同仁化学, pluronic F-127 は Molecular Probes 社, 他の試薬は和光純薬工業または Sigma Chemical 社 (USA) から購入した。

薬物の投与は Y-チューブ法により行った<sup>23,24)</sup>。この方法により、単離巨核球の周辺の溶液を 20ms 以内に交換でき

る。

#### v. データ解析

EC<sub>50</sub>値は薬物の用量-反応曲線から計算した。計算法の詳細は、中川らの論文<sup>21)</sup>による。pD<sub>2</sub>は $-\log EC_{50}$ である。

ATP<sup>i</sup>-濃度の計算は Dahlquist ら<sup>28)</sup>のデータを用いた Cockcroft らの方法<sup>29)</sup>に基づき、温度条件の違いを Taqui Khan らの求めた平衡定数<sup>30)</sup>を利用して補正した。計算式は

$$[ATP^i] = [ATP(\text{total})] / (103.97[Ca^{2+}] + 104.22[Mg^{2+}]) \dots (1)$$

式(1)はこの実験条件下で ATP が ATP<sup>i</sup>として存在し、 $ATP^i + M^{2+}(\text{metal}^{2+}) \leftrightarrow (ATP-M)^{2-}$ の反応に対し、 $\log K(Ca^{2+}) = 3.97$ ,  $\log K(Mg^{2+}) = 4.22$ として求めた。式(1)は  $(ATP-M)^{2-} \cong ATP(\text{total})$ ,  $Ca^{2+}(\text{free}) \cong Ca^{2+}(\text{total})$ ,  $Mg^{2+}(\text{free}) \cong Mg^{2+}(\text{total})$ の近似を含む。この近似は  $[ATP(\text{free})] \ll [(ATP-M)^{2-}]$ ,  $[(ATP-Ca)^{2-}] \ll [Ca^{2+}(\text{free})]$  および  $[(ATP-Mg)^{2-}] \ll [Mg^{2+}(\text{free})]$ の時に成り立つ。今回の実験条件下では ATP に対して二価陽イオンの濃度は大過剰なのでこれらの条件が成り立つ。

#### vi. 細胞内 pH の測定

細胞内 pH の測定は蛍光 pH 指示薬 2', 7' -bis- (2-carboxyethyl) - 5 (6) -carboxyfluorescein (BCECF) と Argus 50画像解析装置 (浜松フォトニクス) を用いて行った。このシステムでの最小記録間隔は 2 秒であった。

#### vii. セロトニンの定量

5-HT の測定は Nathenas らの方法<sup>31)</sup>により、日立 F-4010 蛍光光度計を用いて蛍光分光法で行った。各値は対照値で補正した。

#### viii. 走査型電子顕微鏡による観察

細胞は 1% グルタルアルデヒド (0.1M リン酸バッファー, pH7.4) で 2 時間前処理し、次いで 1% オスミウム酸 (0.1M リン酸バッファー, pH7.4) で 1 時間固定した。固定後、細胞をエタノール系列で脱水し、臨界点乾燥法で乾燥後金蒸着を行い、JSM-840A JEOL 走査型電子顕微鏡 (日本電子) で観察した。

### 3. 結 果

#### i. ラット巨核球の ATP 誘発性細胞質カルシウムオシレーション 巨核球の ATP 誘発性外向き電流の性質

穿孔パッチ法の電流固定条件下では巨核球の平均静置電位は  $-45 \pm 5$  mV であった ( $n=11$ )。この値は河によりコンベンショナル法で報告されたもの<sup>36)</sup>とほぼ等しい。10 $\mu$ M の ATP を投与すると膜電位は自発的に  $-43 \pm 6$  から  $-79 \pm 5$  mV に反復的に過分極した ( $n=5$ )。試験に用いた細胞 155 のうち 141 個が ATP に応答して電圧固定条件下で振動性の外向き電流を生じた。この周期的外向き電流は ATP 投与直後にみられ、薬物の除去により直ちに消失する。希に ATP 刺激なしでも自発的に周期的過分極をおこす細胞

がみられた。河の報告にもあるように巨核球のアゴニスト感受性に差があるため、感受性の違う細胞のアゴニストに対する相対反応強度を比較するためデータは 10 $\mu$ M ATP で誘発される反応を 1 として補正したものである。ATP を長時間投与すると delay が徐々に長くなる。電流の大きさと Iperiod は最初の一分間ほどは減衰するがその後は比較的一定値を保つ。ATP の長時間投与により反応が消失してもさらに高濃度の ATP を投与すれば振動性の反応が再度観察される。さらに ATP を除去して標準外液でしばらく放置することによっても反応性は回復する。従ってこうした減衰は受容体脱感作によるものと考えられる。

Fig. 1 に外液 K<sup>+</sup>濃度 5 mM で保持電位 (VH) を変えたときの ATP 誘発性電流 (I<sub>ATP</sub>) を示す。周期的電流は VH が -100, -60, -40, -20 mV の時観察される。Fig. 1B には内液 K<sup>+</sup>濃度が一定 ( $[K^+]_i = 150 \mu\text{M}$ ) で外液 K<sup>+</sup>濃度を変えたとき ( $[K^+]_o = 5, 10, 20, 50 \mu\text{M}$ ) の電流-電圧 (I-V) 相関を示す。各 I-V 曲線の電圧ゼロの値から I<sub>ATP</sub> の反転電位 (E<sub>ATP</sub>) を読みとると、 $[K^+]_o$  が 5, 10, 20, 50  $\mu\text{M}$  のときそれぞれ -82.3, -60.8, -45.5, -23.5 mV であった。これらの E<sub>ATP</sub> 値は Nernst の方程式から計算される K<sup>+</sup>の平衡電位 ( $[K^+]_o$  が 5, 10, 20, 50  $\mu\text{M}$  のときそれぞれ E<sub>K</sub> = -85.0, -68.0, -50.0, -27.0 mV) に極めて近く、 $[K^+]_o$  が 10 倍変化したときの E<sub>ATP</sub> の変化は 59.9 mV であった (Fig. 1C)。以上の結果から巨核球の ATP 誘発性の振動性電流は K<sup>+</sup>により運ばれると結論できる。

1990年に河がコンベンショナルホールセル法でモルモット巨核球の ADP 誘発性外向き電流について報告しているが、その形はニスタチン穿孔ホールセル法で得られるものと異なり、一過性電流であった。一方ニスタチン法でモルモット巨核球の ATP または ADP 応答を記録するとラットの場合と同じ振動性電流が観察され、ラット巨核球は ATP でも ADP でも振動性電流を生じた。そこで河の用いたものと同じ EGTA を含むピペット内液を用いてコンベンショナル法でラット巨核球の ATP 応答を記録してみた。結果を Fig. 2 に示す。ピペット内液が細胞内に十分拡散するように、記録はホールセルモード確立の 3 分後から行った。この条件下では ATP は河の報告したような単相性の電流を示した。さらに高濃度の ATP では、単相性電流の持続時間と大きさが増加した。またピペット内液中の EGTA 濃度を増加させると用量-反応曲線が高濃度側に移動する。さらに Fig. 2A の矢印で示したように、ATP 応答が比較的大きいときには ATP を洗浄した後も電流がテイリングとして残存する。ニスタチン法では K<sup>+</sup>電流は薬物の洗浄により直ちに消失するのでこのような現象はみられない。

さらに細胞内を EGTA で灌流する事の影響を調べるため、EGTA を含まないピペット内液を用いてコンベンショナル法でホールセル電流を記録した (Fig. 2B)。この条件

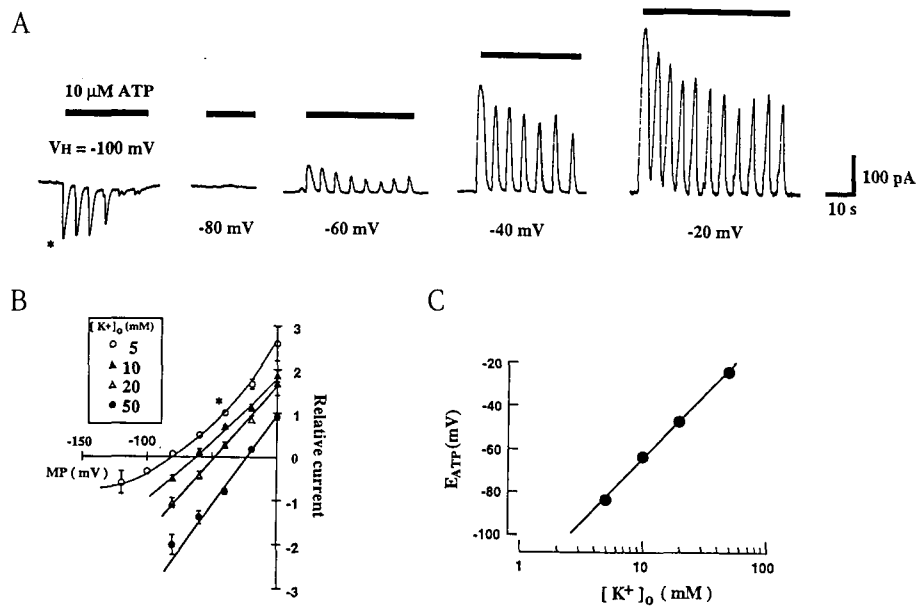


Fig. 1. ATP-induced oscillatory currents at various external  $K^+$  concentration ( $[K^+]_o$ ). A, ATP-evoked oscillatory currents recorded in standard external solution containing 5 mM- $K^+$  at VHs from -100mV to -20mV. Horizontal bars indicate the duration of application of 10mM-ATP. All records were obtained from the same cell. B, current-voltage (I-V) relationships for ATP response at various  $[K^+]_o$ . All current amplitudes were normalized to the peak amplitude of the first oscillatory current induced by 10mM ATP in external solution containing 5 mM  $K^+$  at a VH of -40mV (\*). Each point represents the mean S.E.M. of four to five measurements. C, relationship between  $E_{ATP}$  and  $[K^+]_o$ . Each point is the average of five to seven cells. A straight line has a slope of 59.9mV for a 10-fold change in  $[K^+]_o$ .

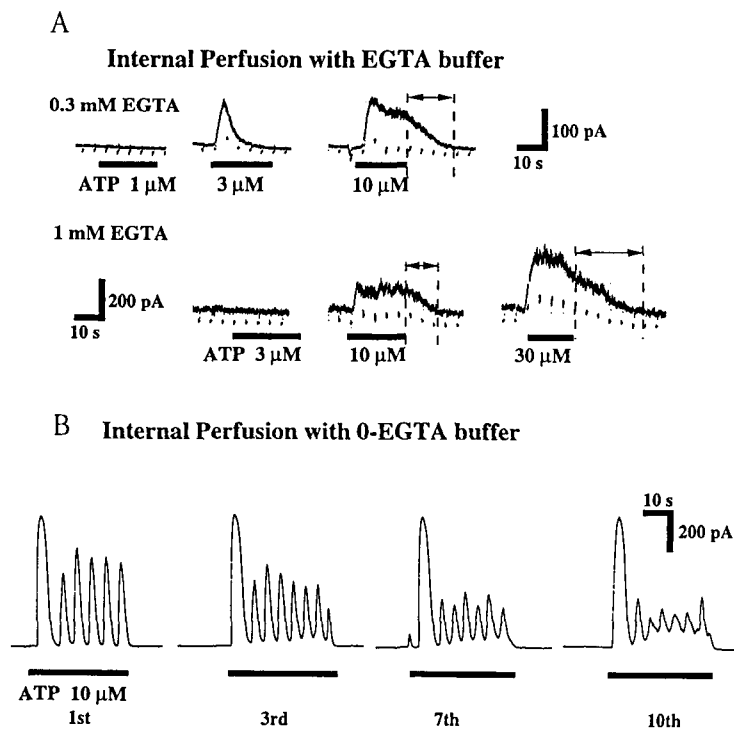


Fig. 2. Comparison of conventional (A) and nystatin-perforated (B) whole-cell patch preparations. A, current traces obtained by conventional whole-cell mode with pipette filled with internal solution containing 0.3 (upper panel) or 1.0 (lower panel) mM of EGTA. Recordings were obtained at least 3 min after establishment of whole-cell configuration. The VH was -40mV and hyperpolarizing pulses to -60mV were superimposed every 4 s. Closed horizontal bars under the current traces indicate a period of ATP application. Application of ATP was repeated at 2 min interval. Double-headed arrows indicate the residual current after removal of ATP. The current traces in the same row were obtained from the same cell, and they are typical ones from 3 cells examined. B, current traces obtained by whole-cell mode with EGTA-free internal solution at a VH of -40mV. ATP was applied repeatedly during the period indicated by closed horizontal bars. The current traces shown here are from single cells and typical ones of four experiments.

では ATP は最初のうちはニスタチン法の場合とほとんど同じ振動性の電流を示した。繰り返し反応させるうちに徐々に電流の形は変化するが、これは細胞内高分子がピペット内に拡散していったための、いわゆるランダウン現象と考えられる。しかしこうしてランダウンした場合でもテーリングはみられない。また EGTA の代わりに BAPTA を用いても同様の結果が得られ、EGTA 濃度を 30 $\mu$ M まで下げれば EGTA なしの時と同じような電流がみられる。EGTA や BAPTA は細胞内の  $Ca^{2+}$  緩衝作用によって細胞内の  $Ca^{2+}$  の動きを阻害する。従って、河の報告と今回の実験の結果との違いは、ピペット溶液中の  $Ca^{2+}$  キレート剤に起因すると考えられる。またこの結果からは巨核球の細胞内  $Ca^{2+}$  緩衝能力が比較的小さいことも示唆される。

#### 振動性電流は $Ca^{2+}$ 依存性 $K^+$ チャンネルにより運ばれる

巨核球の ATP 誘発性振動性電流の薬理的性質を検討した。 $Ca^{2+}$  依存性  $K^+$  チャンネルブロッカー、キニーネ (100  $\mu$ M) は ATP 誘発性電流の頻度には影響せず大きさを減少させた。同じ濃度範囲でキニジンもまた電流を減少させた。電流の大きさは 100 $\mu$ M のキニジンで  $72 \pm 6\%$  ( $n=4$ ), 100 $\mu$ M のキニーネで  $70 \pm 5\%$  ( $n=4$ ) 抑制された。一方で低伝導度  $Ca^{2+}$  依存性  $K^+$  チャンネルブロッカー、アパミンは最大 1 mM まで使っても ATP 誘発性の  $K^+$  電流に影響を与えなかった。高伝導度  $Ca^{2+}$  依存性  $K^+$  チャンネルブロッカー、イベリオトキシンも 100 nM で全く影響なかった。テトラエチルアンモニウム (30 nM), 4-アミノピリジン (10  $\mu$ M) も作用はなかった。

既に河が ADP 誘発性  $K^+$  電流は細胞内  $Ca^{2+}$  依存性であることを示唆しているが、この  $K^+$  電流が細胞質の  $Ca^{2+}$  濃度に依存することを確認する必要がある。そこでまず膜透過性の  $Ca^{2+}$  キレート剤 BAPTA-AM で細胞内遊離  $Ca^{2+}$  をキレートした。BAPTA-AM を負荷した細胞では BAPTA-AM の濃度に依存して ATP 応答が消失した。0.1  $\mu$ M の BAPTA-AM では振動性  $K^+$  電流はわずかに抑制され、0.3  $\mu$ M ではかなりの抑制、1  $\mu$ M ではわずかに最初のスパイクが残るのみで振動は消失、10  $\mu$ M では電流が全くみられない。BAPTA-AM を負荷した細胞に高濃度の ATP を投与すると、幅広の単相性電流になる。BAPTA-AM の代わりに SBFI-AM を負荷した場合には ATP 誘発性振動電流になんら変化がみられないことから、BAPTA-AM の作用は  $Ca^{2+}$  結合性によるもので AM 体による非特異的影響ではないといえる。従って ATP 誘発性  $K^+$  電流は細胞質  $Ca^{2+}$  濃度の増加によって活性化されるもので、 $K^+$  電流が振動するのは  $Ca^{2+}$  濃度の振動を反映するものであるといえる。さらに  $K^+$  チャンネルブロッカーと  $Ca^{2+}$  キレート剤は前者が  $K^+$  電流の頻度を変えないままに電流を抑制するのに対して、後者は電流の大きさにはそれほど影響しないが振動の頻度を抑制するという違いがあって、それぞれの作用点が  $K^+$  伝導度と細胞

内  $Ca^{2+}$  動員にあることを明確に示す結果となった。

#### 巨核球のプリン受容体

Fig. 3 に ATP で誘発される  $K^+$  電流を示した。この反応の閾値は約 1  $\mu$ M で、10  $\mu$ M 付近で最大に達する。反応強度には細胞間でばらつきがあるため、ATP 10  $\mu$ M での値を 1 として補正したデータを用いて用量相関性について解析した。「頻度」は 1 秒あたりに観察される外向き電流の数、「最大電流 ( $I_{max}$ )」は最大の電流値 (通常最初のスパイク)、「遅延時間 (latency)」は ATP 投与から最初の電流が観察されるまでの時間を意味する。ATP 濃度の増加に依存して頻度が増加し、遅延時間は短縮し、最大電流は増加する。変化の程度が最も大きいのは頻度で、反応強度の指標としては頻度が適当であると考えられる。

ラット巨核球は ADP にも応答するため、ADP の用量-反応性についても解析し、ATP の場合及び河の報告と比較した。Fig. 3 に示すように用量に依存して頻度と最大電流が増加し、遅延時間が減少するというパターンは ATP の場合と同様であった。しかし ATP に比較して ADP の作用強度は約 30 倍であった (ADP の  $EC_{50}$  は 0.1  $\mu$ M, ATP の  $EC_{50}$  は 3.1  $\mu$ M)。さらにその他のプリン受容体アゴニストの影響について Table 1 にまとめた。最も強力なアゴニストは 2-メチルチオ ATP で、次が ADP、そして ATP- $\gamma$ -S と続く。アデノシン、UTP、AMP-CPP は 1  $\mu$ M まで投与しても作用がみられなかった。ATP の非加水分解性の類似体である ATP- $\gamma$ -S が ATP より強い作用を示したことから、ATP が細胞表面でエクト ATP アーゼにより ADP に変換されて作用しているという可能性は否定される。また有効なアゴニスト間で誘発される最大電流や最大頻度には有意の差はなかった。

河の報告によればモルモット巨核球は 1-100  $\mu$ M の ADP に応答する。しかし本研究では  $K^+$  電流の活性化に必要な ADP の濃度は約 1/30 である。モルモットの巨核球を用いても今回の実験条件では 0.1  $\mu$ M の ADP が  $K^+$  電流オシレーションを誘発できることを確認している。従って河の報告との結果の違いは種差によるものではない。

Fig. 3 及び Table 1 のデータからは巨核球のプリン受容体の性質が既知のものとは異なることが示唆される。しかし ATP と ADP が別々の受容体を刺激しているという可能性があるので、ATP と ADP の交叉脱感作について調べた。ATP や ADP を繰り返し投与することにより脱感作を起こさせ、そのあとで ADP または ATP を投与するといずれの場合も反応は見られない。ATP や ADP の投与の順番を変えても結果は同じである。一方 ADP の連続投与で反応が消失した後、ATP をさらに投与してもなんの反応も見られないが、トロンピンは  $K^+$  電流オシレーションを誘発する。従って脱感作は細胞内  $Ca^{2+}$  ストアのレベルで起こるのではなく、受容体レベルで起こっているといえる。これ

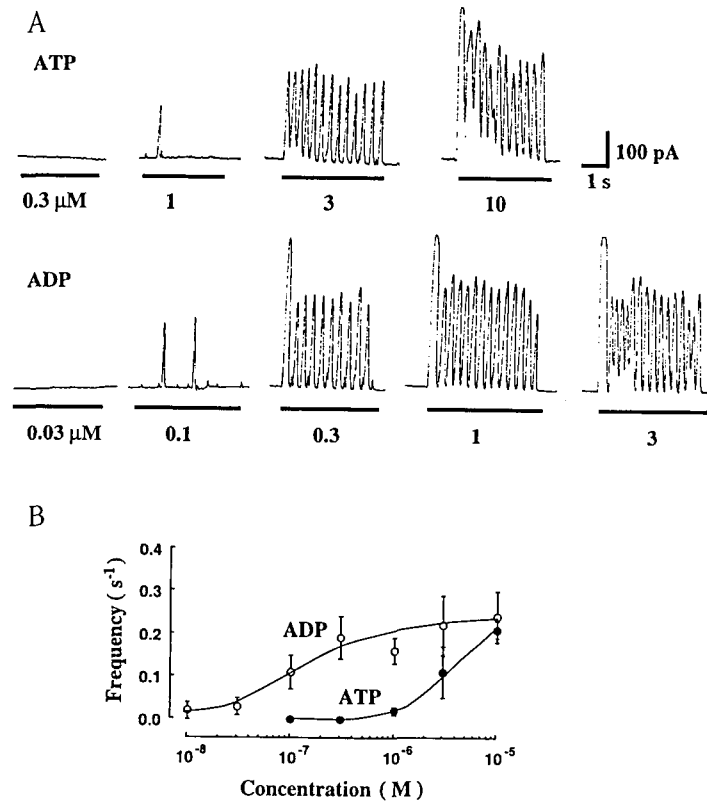


Fig. 3. Concentration-dependency of the oscillatory K<sup>+</sup> outward currents induced by ADP and ATP. A, typical oscillatory K<sup>+</sup> outward currents activated by ATP (upper panel) and ADP (lower panel). All recordings were obtained from the same cell. Horizontal bars indicate the application period of each agonist. B, concentration-response relationships of ATP (●) and ADP (○) to the maximum frequency. Each point and bar indicate the average frequency and the range of measured values, respectively. Number of measurements was four to seven for each point.

Table 1. Oscillatory K<sup>+</sup> outward currents induced by purinoceptor agonists

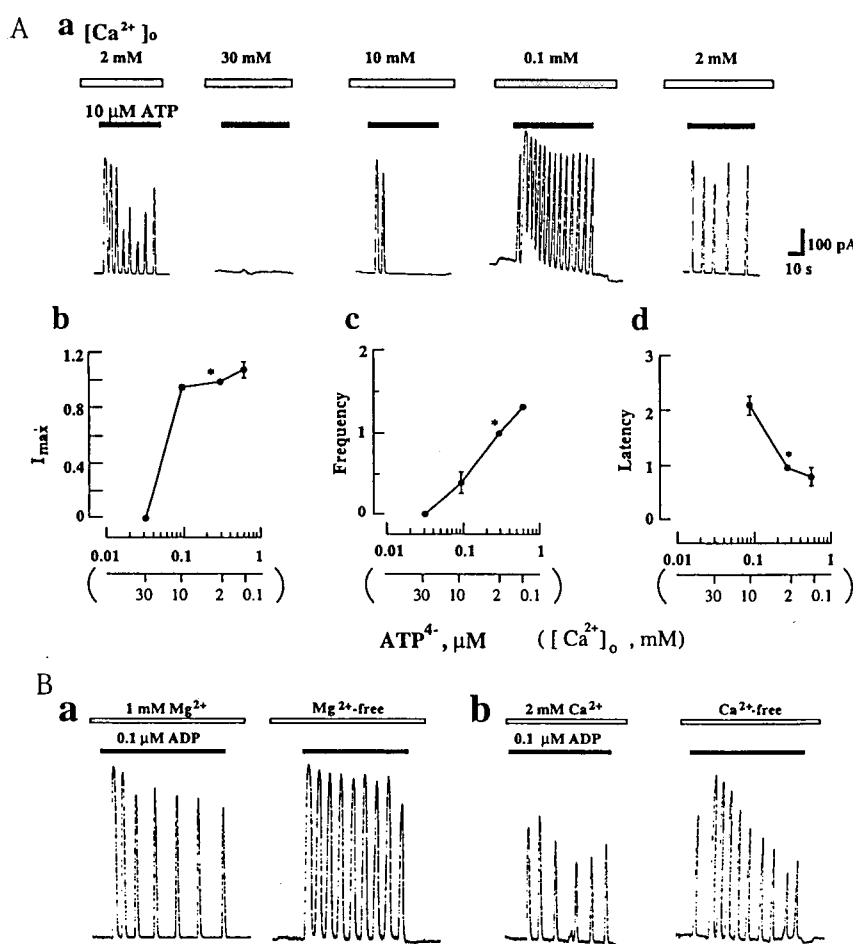
	n	pD <sub>2</sub>	maximum frequency	I <sub>max</sub>
ATP	8	5.51	1.0*	1.0*
ADP	8	6.98	1.07±0.09	1.05±0.06
2-methylthioATP	5	8.02	1.20±0.17	0.95±0.07
adenosine	5	< 3	—	—
UTP	5	< 3	—	—
AMP-CPP	5	< 3	—	—
ATP-γ-S	4	5.90	1.30±0.20	0.97±0.02

Effects of various purinoceptor agonists on megakaryocytes. Frequency and amplitude of oscillatory K<sup>+</sup> outward currents were normalized to those of ATP(10μM)-induced ones [max frequency, 0.21±0.02sec<sup>-1</sup>(n=7), max amplitude, 637.5±68.8pA(n=8)]. Each value represents mean±S.E.M. from four to eight cells. pD<sub>2</sub> was calculated as described in Methods. n, number of cells.

らの結果からは ATP と ADP は受容体を共有すると考えられる。

振動性の K<sup>+</sup>電流は細胞外液中 Ca<sup>2+</sup>が存在しないときにも観察される。この場合、振動性電流は通常の脱感作の時より早く消失し、消失後はたとえ長時間後も、高濃度でも ATP の再投与による反応は見られない。しかし細胞外液に Ca<sup>2+</sup>を添加することにより反応性が回復する。また Ca<sup>2+</sup>チャンネルブロッカーである 10mM LaCl<sub>3</sub>の存在下でも ATP 誘発性の K<sup>+</sup>電流オシレーションは観察される。従って La<sup>3+</sup>感受性の Ca<sup>2+</sup>チャンネルを介する Ca<sup>2+</sup>の流入は K<sup>+</sup>電流の誘導には必要ではない。これらの結果からは、振動性の K<sup>+</sup>電流は細胞内 Ca<sup>2+</sup>ストアから放出された Ca<sup>2+</sup>により活性化され、Ca<sup>2+</sup>ストアの Ca<sup>2+</sup>を再補給するには細胞外の Ca<sup>2+</sup>が必要であるといえる。

また外液 Ca<sup>2+</sup>フリーでは ATP 応答が増強されるように見えることから 10 μM ATP で誘発される反応に対する細胞外 Ca<sup>2+</sup>濃度 ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub>) の影響について検討した。Fig. 4 に示すように K<sup>+</sup>電流の I<sub>max</sub>, 頻度, 遅延時間のいずれもが [Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub> に依存して変化した。[Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub> の増加は ATP<sup>+</sup>濃度の減少に等しい作用を示す。同様の [Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub> 依存性が ATP 4- をアゴニストとする J744 マクロファージ<sup>32)</sup> とラット腹腔肥満細胞<sup>29)</sup> でも報告されているため、本実験条件での ATP<sup>+</sup>濃度を計算した。その結果は Fig. 4 に示す。ATP 誘発性の反応は ATP<sup>+</sup>の濃度に依存していることがわかる。同様の結果が細胞外 Mg<sup>2+</sup>濃度を変えたときにもみられ、10 μM ATP の作用は細胞外に Ca<sup>2+</sup>と Mg<sup>2+</sup>の両方が存在しないときに最も強くなる。1 μM ADP の反応も細胞外二価陽イオン濃度が減少することにより増強され、二価陽イオ



**Fig. 4.** A, Effect of extracellular Ca<sup>2+</sup> concentration ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub>) on the ATP-induced oscillatory K<sup>+</sup> currents. a, typical current traces in each condition from single cell. Standard external solution was substituted by test solutions which have various [Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub> before the application of ATP. b, relationship between maximum current amplitude (I<sub>max</sub>) and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub>. c, relationship between frequency and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub>. d, relationship between latency and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub>. In b, c and d, each point represents the mean normalized value of five to seven measurements. The point used as standard was indicated by a symbol (\*) in the respective figures. The concentrations of ATP<sup>+</sup> were calculated by the equation described in Methods. B, Effect of extracellular Mg<sup>2+</sup> (a) and Ca<sup>2+</sup> (b) concentration on the ADP-induced oscillatory K<sup>+</sup> current. Standard external solution containing 1 mM Mg<sup>2+</sup> and 2 mM Ca<sup>2+</sup> was substituted by test solutions without each of divalent cation before the application of ADP as indicated by open horizontal bars. ADP was applied during the period indicated by closed horizontal bars. The current traces indicated here are the typical ones from four experiments.



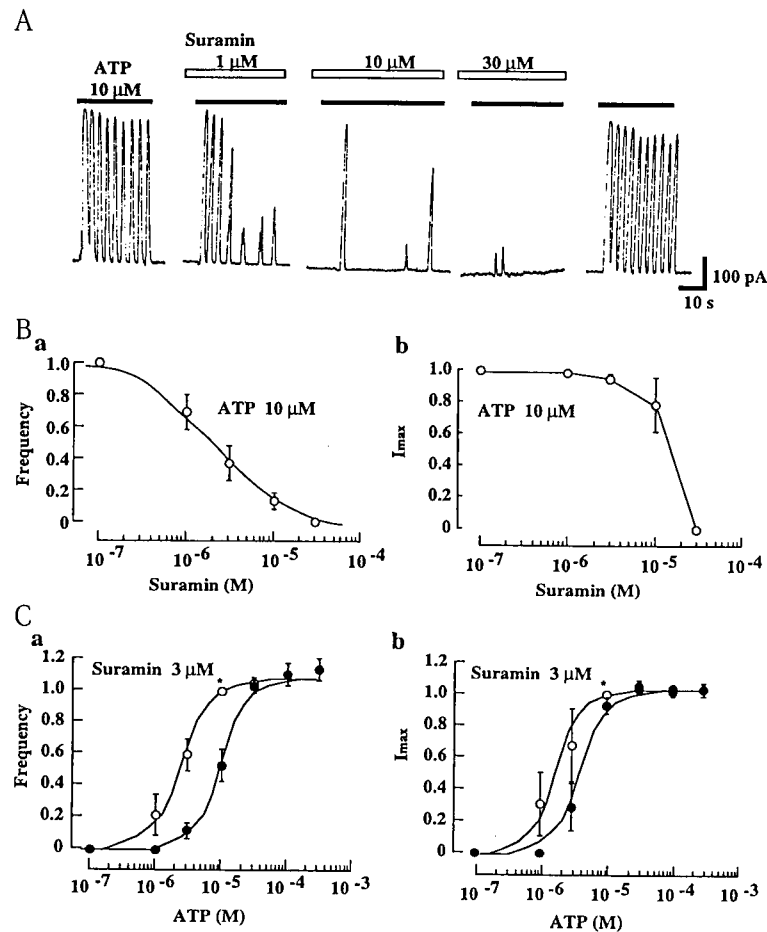
ン濃度がゼロの時にもやはり ATP よりも ADP の方が作用が強い。これらの結果からは ATP と ADP の実際のアゴニストの形は  $ATP^+$  と  $ADP^3$  であることが示唆される。

#### プリン受容体アンタゴニストの作用

プリン受容体アンタゴニストとして知られる薬物の巨核球プリン受容体に対する作用を検討した。Fig. 5 に示すように非選択的  $P_2$  受容体アンタゴニストとして知られるスラミンは ATP 誘発性の  $K^+$  電流オシレーションの頻度と電流を用量依存的に抑制する。スラミンの作用は先に ATP を投与した場合でも直ちに観察され、細胞を長時間処理しても特に作用強度に変化はみられない。Fig. 5b にはスラミンの用量依存性を、Fig. 5c にはスラミン  $3\mu M$  による ATP の用量-反応曲線のシフトについて示した。スラミンの  $10\mu M$  ATP に対する阻害作用は  $1\mu M$  からみられ、その作用は頻度に最も良く反映されるので頻度を指標にした場

合のスラミンの  $IC_{50}$  は  $2.3 \pm 1.2\mu M$  である。またスラミン  $3\mu M$  存在下では ATP の  $EC_{50}$  が  $2.9 \pm 1.0\mu M$  から  $8.8 \pm 1.5\mu M$  にシフトした。

また  $P_{2Y}$  サブタイプ of プリン受容体アンタゴニストである RB-2 およびその構造類似体 RB-4, RB-5 についても巨核球プリン受容体に対する作用を検討した。結果を Fig. 6 に示す。  $10\mu M$  ATP の誘発する  $K^+$  電流オシレーションに対して  $30\mu M$  の RB-2 と RB-5 は抑制作用を示したが RB-4 にはなんの作用も認められなかった。RB-2 はさらに低濃度でも抑制作用を示し、  $0.3\mu M$  から効果が認められた。用量-反応曲線から求めた ATP  $10\mu M$  の反応に対する  $IC_{50}$  値は RB-2 が  $1.3 \pm 0.3$ , RB-5 が  $10.2 \pm 1.1\mu M$  であった。また RB-  $23\mu M$  存在下では ATP の  $EC_{50}$  値は  $2.9 \pm 0.8\mu M$  から  $9.2 \pm 2.4\mu M$  にシフトした。こうした RB-2 または RB-5 の作用もスラミンの場合と同様可逆的で投与時間に依存せ



**Fig. 5.** Effect of suramin on ATP-induced  $K^+$  current oscillation of rat megakaryocyte. A, effects of 1, 10 and  $30\mu M$  suramin on  $10\mu M$  ATP-induced  $K^+$  current. ATP was applied during a period indicated by closed bars. Suramin at each concentration was applied 2 min prior to the application of ATP. The application was repeated at least 2 min after wash out. The current traces were obtained from single cell, and a typical one of 5 cells examined. B, concentration-dependency of the inhibitory effect of suramin on  $10\mu M$  ATP-induced  $K^+$  current oscillation. The value of frequency and maximum current amplitude ( $I_{max}$ ) were normalized to the value obtained by  $10\mu M$  ATP alone. Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. of five to seven cells. C, concentration-response relationships of ATP with ( $\Delta$ ) or without ( $\circ$ )  $3\mu M$  suramin. Each value represents mean  $\pm$  S. E. M. of normalized values of four or five cells. The mark (\*) indicates the value used to normalization.

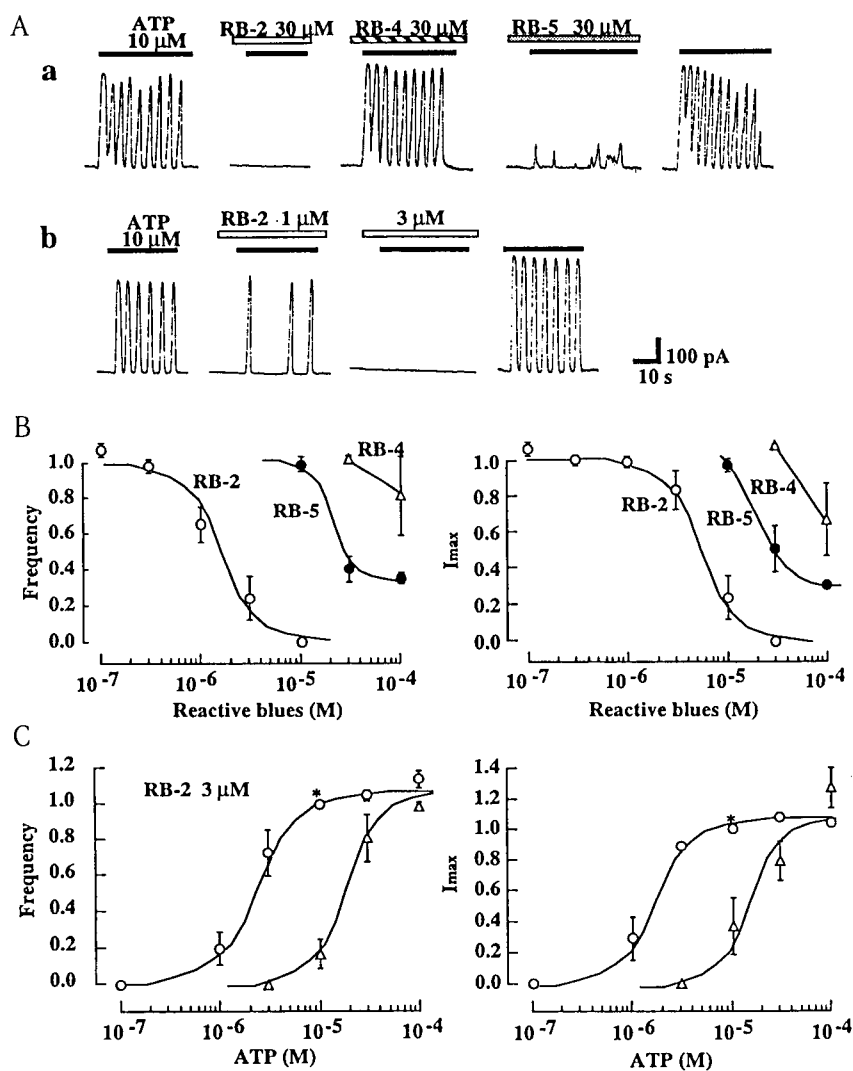
ず、反応の最大値には影響しなかった。なお非選択的 P<sub>1</sub> プリン受容体アンタゴニストである 7-クロロエチルテオフィリンは巨核球のプリン受容体にはなんの影響も与えなかった。

スラミン及び RB-2 は ADP 誘発性の K<sup>+</sup> 電流オシレーションに対しても ATP の場合と同様に抑制作用を示した。ADP の場合は ATP より低濃度で K<sup>+</sup> 電流オシレーションを誘発するがこれらアンタゴニストは同程度の反応強度の時間程度の濃度範囲で抑制作用を示した。その他の、抑制の可逆性などの性質もすべて ATP の場合と同様であった。また図には示さないがトロロンピンのように全くタイプの違うアゴニストによって誘発される K<sup>+</sup> 電流オシレーションにはこれらプリン受容体アンタゴニストは影響を与えなかった。これらの結果からスラミンや RB-2 は巨核球のプリン受容体のアンタゴニストとして作用すると考えられる。

## ii. 巨核球の ATP 誘発性細胞質カルシウムオシレーションのメカニズム

### オシレーションに関するカルシウムプール

非興奮性細胞のアゴニスト誘発性細胞内 Ca<sup>2+</sup> オシレーションのモデルは数種類あるが、はじめに Berridge らにより提唱された 2-プールモデル<sup>39</sup> が巨核球にも当てはまるかどうかを検証した。2-プールモデルでは IP<sub>3</sub> 感受性の Ca<sup>2+</sup> プール (ICR) のほかにカフェインやリアノジンに感受性の Ca<sup>2+</sup> 感受性 Ca<sup>2+</sup> プール (CICR) が存在するとされる。そこでこれらの薬物の作用を調べた。興奮性細胞の Ca<sup>2+</sup> プールから Ca<sup>2+</sup> を放出させる活性のあるリアノジン 10 μM またはカフェイン 10 μM, 及び筋小胞体からの Ca<sup>2+</sup> 放出を抑制する局所麻酔薬プロカイン 1 μM はいずれも巨核球の ATP 誘発性 K<sup>+</sup> 電流オシレーションに全く影響しなかった。さらにこれら薬物単独では巨核球になんら反応を惹



**Fig. 6.** Effects of Reactive Blue (RB) s on ATP-induced K<sup>+</sup> current oscillation of rat megakaryocyte. A, effects of 30 μM RBs (a) and lower concentrations of RB-2 (b) on 10 μM ATP-induced K<sup>+</sup> current oscillation. ATP was applied during a period indicated by closed horizontal bars. Each drug was applied 2 min prior to the application of ATP. Current traces in a and b were from single cell, respectively. B, concentration-dependent inhibitory actions of RBs. C, effect of 1 μM RB-2 on the concentration response relationships of ATP.

起しなかった。

さらに巨核球の  $\text{Ca}^{2+}$  プールについて検討した。  $\text{Ca}^{2+}$ -イオノフォアである A23187は  $1\ \mu\text{M}$  で標準外液内の巨核球に不可逆的な細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇を引き起こし、  $\text{I}_{\text{KCa}}$  を直線状に活性化する。  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 阻害剤で細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  プールから  $\text{Ca}^{2+}$  を放出させる作用のある<sup>31)</sup>  $1\ \mu\text{M}$  のタプシガルジンも数回のスパイクを誘発した後、 A23187と同様の直線状  $\text{I}_{\text{KCa}}$  を誘発する。  $3\ \mu\text{M}$  以上ではタプシガルジンの作用は A23187と見分けがつかない。  $0.1\ \mu\text{M}$  以下のタプシガルジンは、単独では見かけ上巨核球になんの影響もない。細胞外液を  $\text{Ca}^{2+}$  フリーにした場合、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇は細胞内プールからの放出によると考えられるので、これら薬物の作用を  $\text{Ca}^{2+}$  フリーの条件で検討した。 Fig. 7に示したように A23187もタプシガルジンも一過性の  $\text{I}_{\text{KCa}}$  を誘発し、巨核球内に  $\text{Ca}^{2+}$  プールが存在することを示す。 A

23187の投与後はタプシガルジンは  $\text{Ca}^{2+}$  放出を誘発できず、タプシガルジンの投与後は A23187は  $\text{Ca}^{2+}$  放出を誘発できない。従ってこれら薬物の作用点は共通である。どちらの薬物も作用は不可逆的なのでいったん投与した後は細胞外液を標準液にすれば持続的な  $\text{I}_{\text{KCa}}$  の活性化がみられる。外液  $\text{Ca}^{2+}$  フリー条件で ATP を投与すると  $\text{I}_{\text{KCa}}$  オシレーションが観察されるが、細胞外から  $\text{Ca}^{2+}$  が補充されないためやがて減衰する。しかしこうして ATP による  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションが起きない状態でも A23187やタプシガルジンは一過性の  $\text{I}_{\text{KCa}}$  活性化を誘発することができる (Fig. 7C) ことから、細胞内プールは空にはなっていない。また単独ではなんの作用もみられない  $0.1\ \mu\text{M}$  タプシガルジンの存在下で ATP を投与するとオシレーションのパターンが一過性のものに変化する (Fig. 7D)。これは  $\text{Ca}^{2+}$  ポンプの阻害作用によると考えられる。

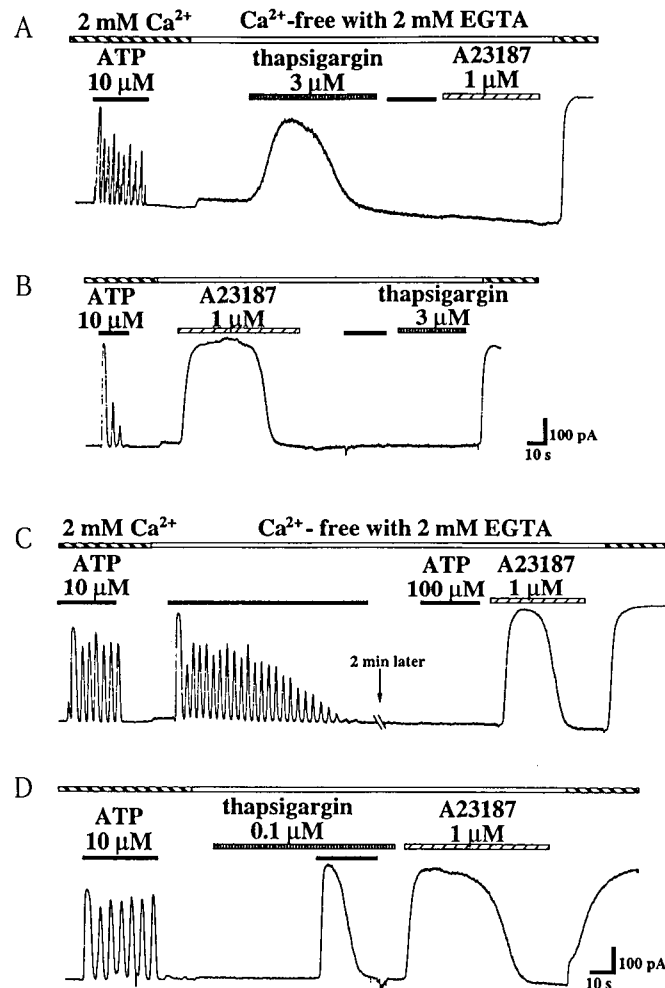


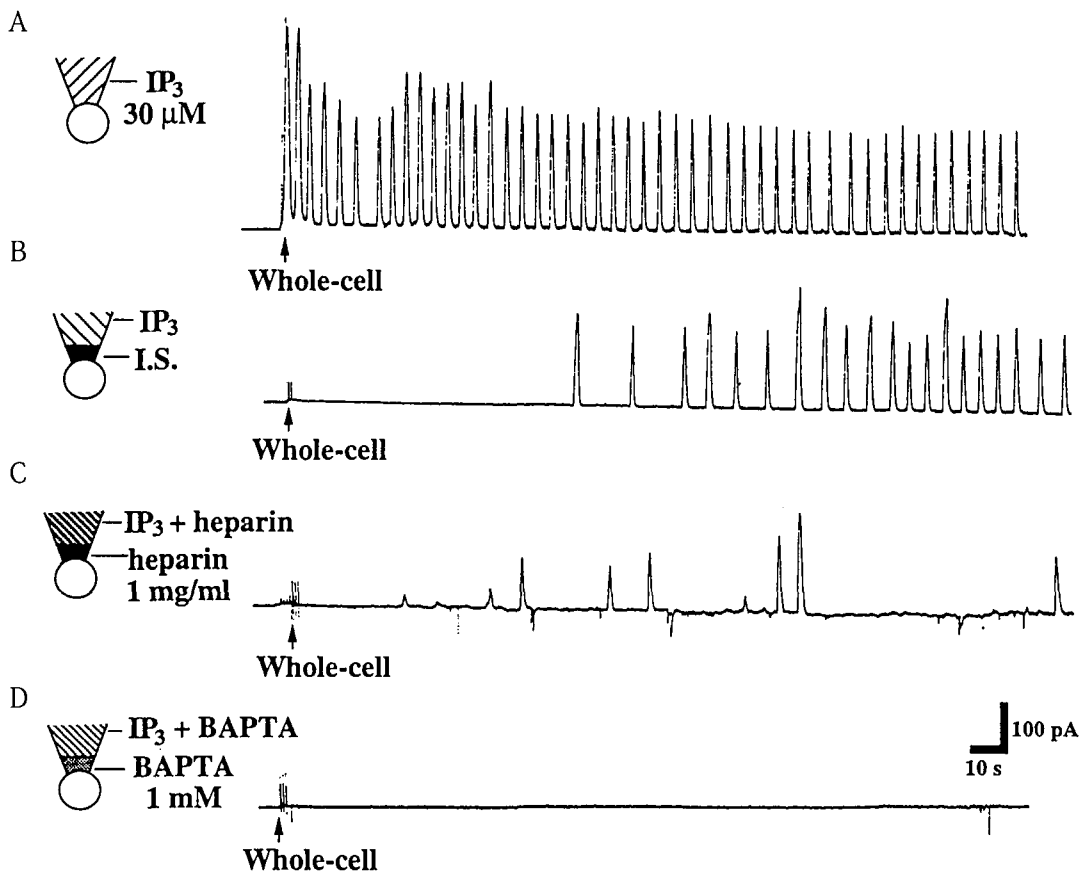
Fig. 7. Effects of thapsigargin and A23187 on megakaryocyte perfused with external solution with or without  $2\ \text{mM}\text{-Ca}^{2+}$ . The current traces were obtained by nystatin perforated whole-cell patch-clamp mode under voltage-clamp condition at a holding potential (VH) of  $-40\ \text{mV}$ . Extracellular solution was exchanged as indicated by upper horizontal bars. Drugs were applied during a period shown by lower horizontal bars. In each experiment, the first application of ATP in standard external solution was to confirm the activity of the cell. Then, the external solution was exchanged to  $\text{Ca}^{2+}$ -free solution and the drugs were applied successively as indicated. The current traces are typical one of five experiments.

次に  $IP_3$  感受性プールについて検討した。Fig. 8では記録はすべてコンベンショナル法により行った。記録電極内液に  $30\mu M$  の  $IP_3$  を含ませて細胞内に拡散により投与すると Fig. 8A のようなオシレーションがみられる。ピペットの先端に  $IP_3$  を含まない内液を入れて拡散を緩やかにしてやると Fig. 8B のように遅れてオシレーションが観察される。さらに  $IP_3$  感受性  $Ca^{2+}$  プールからの  $Ca^{2+}$  の放出を阻害するとされるヘパリンを共存させると Fig. 8C のように  $IP_3$  誘発性の  $I_{KCa}$  オシレーションは抑制される。 $Ca^{2+}$  キレート剤 BAPTA によってもオシレーションは抑制される (Fig. 8 D)。従って巨核球には  $IP_3$  感受性  $Ca^{2+}$  プールが存在し、それがオシレーションに関与しているといえる。

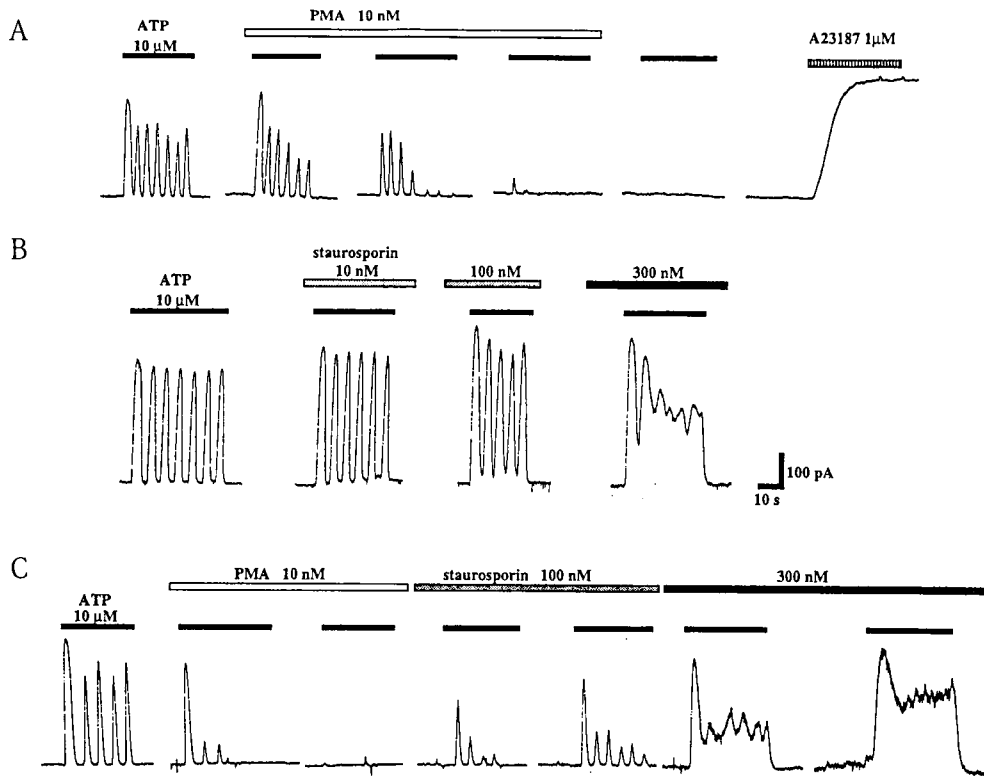
**プロテインキナーゼ C とカルモジュリンの関与**

次いでオシレーションのメカニズムに関与することが他の細胞で報告されている PKC について検討した。PMA は多少のラグタイムの後 ATP 誘発性の  $I_{KCa}$  を不可逆的に抑

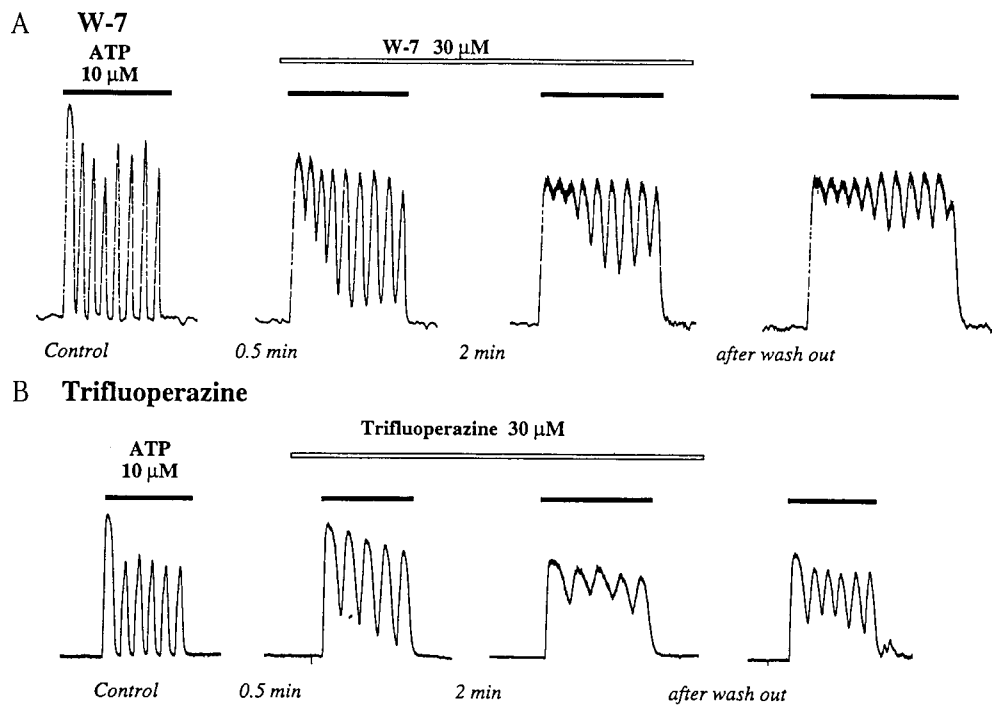
制する (Fig. 9)。PKC 阻害剤スタウロスポリンは  $I_{KCa}$  の活性化には影響しないが、一旦活性化された  $I_{KCa}$  が完全に元のレベルにまで回復するのを阻害することによってオシレーションのパターンを変化させる。この作用は濃度に依存し、高濃度では一過性に近い形になる (Fig. 9B)。この形は低濃度のタブシガルジンにより誘発されるものと類似することから、 $Ca^{2+}$ -ATP アーゼの阻害によるものと推察される。スタウロスポリンの作用も不可逆的で、一旦 ATP 誘発性のオシレーションが一過性の形に変化した細胞では、スタウロスポリンを洗浄しても元の形のオシレーションはみられない。それでも ATP を投与してから最初の  $I_{KCa}$  の活性化が起こるまでの時間と ATP を洗浄したときの速やかな回復には変化は認められず、スタウロスポリンは受容体機能そのものには影響していないと考えられる。そして Fig. 9C に示すように PMA によって抑制された反応はスタウロスポリンによって回復する。さらに図には示さない



**Fig. 8.** Effect of intracellular application of  $IP_3$ . All current traces in this figure were obtained by conventional whole-cell recording at a  $V_H$  of  $-40mV$ . Whole-cell recordings were started at the point indicated by arrows. In A,  $30\mu M$  of  $IP_3$  was dissolved in internal solution and recording pipette was filled with the solution containing  $IP_3$ . In B, the pipette tip was filled with internal solution (I.S.) without  $IP_3$  and the rest portion of pipette was filled with the internal solution containing  $30\mu M$   $IP_3$ . In this configuration,  $IP_3$  gradually diffused into the cell interior. In the same way, pipette tip was filled with internal solution containing  $1 mg/ml$  heparin (C) or  $1 mM$  BAPTA (D), and the rest portions of pipettes were filled with internal solution containing  $IP_3$  plus heparin or  $IP_3$  plus BAPTA, respectively. The current traces in A-D are typical ones from individual five cells



**Fig. 9.** Effects of PKC modulators on ATP-induced  $I_{KCa}$  oscillation. Recordings were made by nystatin-perforated mode. ATP and other drugs were applied during a period indicated by horizontal bars. Staurosporin and PMA were applied at least 30 sec prior to the application of ATP. The current traces during pretreatment time were excluded from the traces. The ATP application was made with 2 min intervals. The current traces in A are typical ones from six cells, and those in B and C are from five cells.



**Fig.10.** Effects of CaM antagonists on ATP-induced  $I_{KCa}$  oscillation. Recordings were by nystatin-perforated mode. ATP was applied during a period indicated by horizontal bars. W-7 and trifluoperazine were applied at least 30 sec prior to the application of ATP. The application interval was 2 min. The current traces in A are typical ones from six cells, and those in B are from three cells.

がスタウロスポリンの作用はPMAによって回復する。

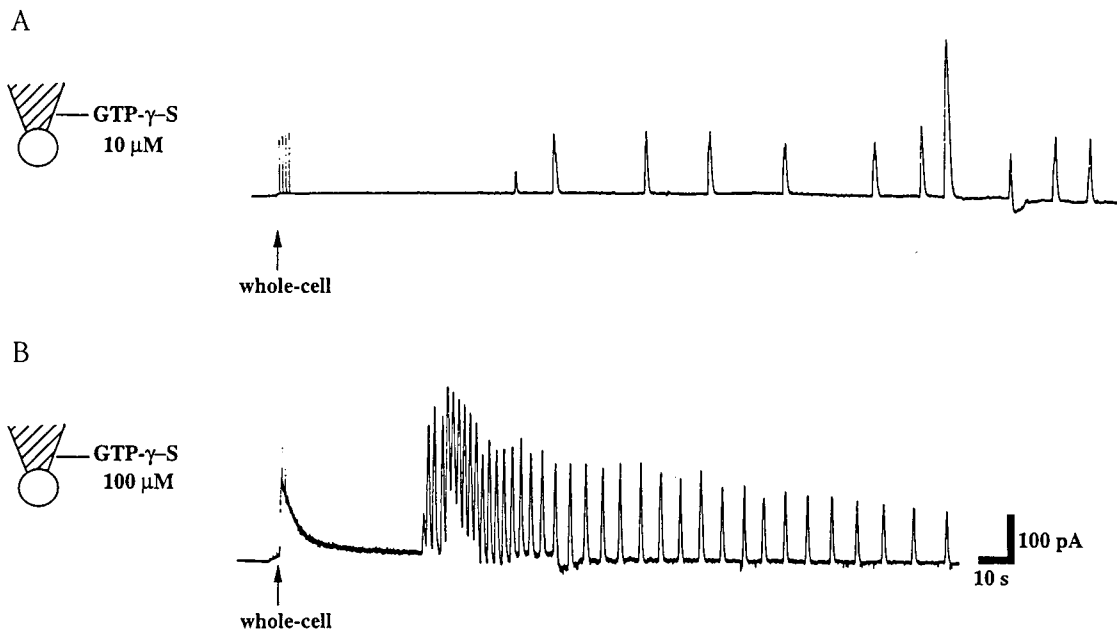
またCaM阻害剤であるW-7とトリフルオペラジンもスタウロスポリンと同様の振動性の消失をもたらす(Fig. 10)。CaM阻害作用とK<sup>+</sup>チャンネル阻害作用を合わせ持つクロロプロマジンの場合には振動性とK<sup>+</sup>電流の両方の阻害により小さな一過性電流が観察される。これら薬物の作用はすべて不可逆的であった。

**GTP結合蛋白質の関与とcAMPの影響**

GTPの非加水分解性類似体であるGTP- $\gamma$ -Sを細胞内に投与した場合にも濃度に依存したI<sub>KCa</sub>オシレーションがみられる(Fig. 11)。IP<sub>3</sub>の場合とは違って、細胞膜に穴があいてから最初の電流が観察されるまで多少のラグタイムがある。そこでIP<sub>3</sub>とGTP- $\gamma$ -Sの理論的時定数 $\tau$ をPuschらの方程式<sup>39)</sup>を用いて計算した。 $\tau$ は化合物の分子量と細胞の直径、ピペットのアクセス抵抗から計算でき、本実験の条件ではアクセス抵抗が3-5 M $\Omega$ 、細胞の直径が20-40 $\mu$ mであるから、IP<sub>3</sub>の場合で54-714s、GTP- $\gamma$ -Sの場合で57-766sである。細胞の直径とアクセス抵抗が等しい場合、GTP- $\gamma$ -Sの $\tau$ 値はIP<sub>3</sub>の $\tau$ 値よりわずかに10%程度大きいにすぎない。しかしながらIP<sub>3</sub>の細胞内投与の場合にはt値が大きくなるような条件でも常に速やかなI<sub>KCa</sub>の活性化がみられ、GTP- $\gamma$ -Sの細胞内投与の場合には常にいくらかの遅延が観察される。従って両者のI<sub>KCa</sub>活性化に要する時間の違いは、拡散速度の違いによるものではなくメカニズムの違い

によるものであると考えられる。つまりIP<sub>3</sub>による細胞内Ca<sup>2+</sup>の動員は直接的なのに対してGTP- $\gamma$ -Sの場合は間接的またはより複雑な経路を経ると思われる。いずれにしてもG蛋白質の活性化がI<sub>KCa</sub>オシレーションに関与するといえる。

次にATP誘発性のI<sub>KCa</sub>オシレーションに関与するG蛋白質の種類について検討を加えた。500 ng/mlの百日咳毒素(PTX)で8時間前処理してもATP応答になんの影響も与えなかったが100ng/mlのコレラ毒素(CTX)で1時間前処理した場合にはオシレーションが抑制された。PTXの処理条件は存在する基質の完全なADP-リボシル化に十分であることからPTX感受性のG蛋白質はオシレーションに関与しないといえる。一方CTXは細胞内cAMP量を増加させる作用のあることが知られており、この抑制が必ずしもCTX感受性G蛋白質の関与を示すとはいえない。そこでcAMPの影響についても検討した。アデニル酸シクラーゼを活性化するホルスコリンを投与するとFig. 12AのようにI<sub>KCa</sub>オシレーションが抑制される。ホスホジエステラーゼ阻害剤IBMXも濃度依存的にI<sub>KCa</sub>オシレーションを抑制する(Fig. 12B)。さらにこれらの薬物はIP<sub>3</sub>誘発性のオシレーションも抑制する。IBMXによる抑制作用が可逆的なのに対してホルスコリンの作用が非可逆的なのが両者の作用の違いである。従って巨核球のI<sub>KCa</sub>オシレーションはcAMPによって抑制されると結論される。



**Fig. 11.** Effect of intracellular application of GTP- $\gamma$ -S. Recordings were made by conventional whole-cell mode. Recording pipettes were filled with internal solution containing 30 (A) or 100 $\mu$ M (B) of GTP- $\gamma$ -S. Note some delay before the first oscillation appeared.

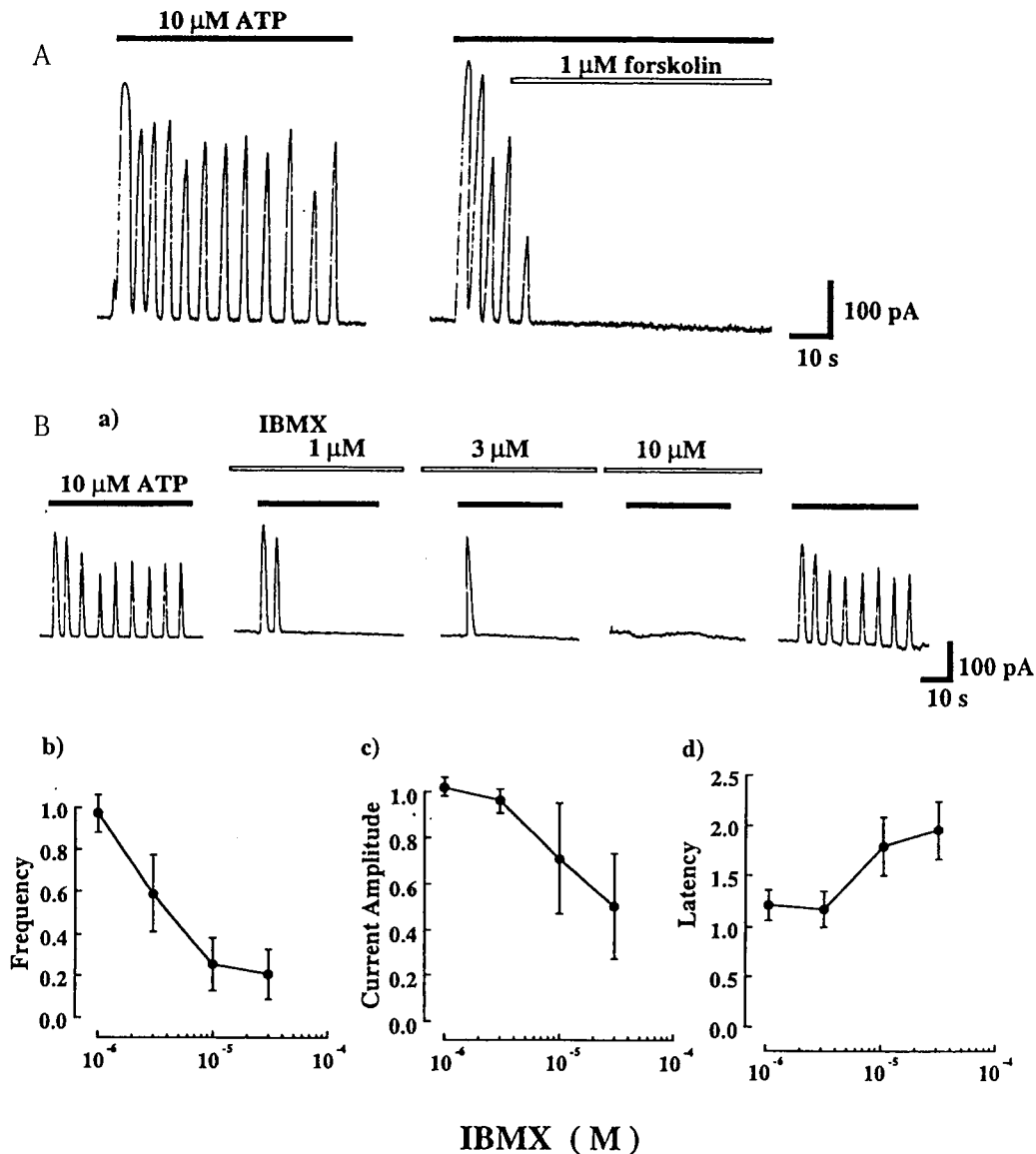


Fig.12. Effect of cAMP on ATP-induced  $I_{kca}$  oscillation. Drugs were applied during a period shown by horizontal bars. A, Effect of 1mM forskolin. B, Effect of IBMX. a, Typical current traces indicating the inhibitory effect of IBMX. b, c and d are concentration-dependent effect of IBMX on 10mM ATP-induced response. The frequency is the number of spikes observed per one second (b), the maximum current amplitude ( $I_{max}$ ) is the largest current amplitude (c) and the latency is the period required to activate the  $K^+$  channel after ATP application (d). Each value is normalized to that of 10mM-ATP-induced response (frequency,  $0.21 \pm 0.02 \text{ sec}^{-1}$  ( $n=7$ );  $I_{max}$ ,  $637.5 \pm 68.8 \text{ pA}$  ( $n=8$ ); latency,  $0.96 \pm 0.19 \text{ sec}$  ( $n=8$ )) and represents mean  $\pm$  S.E.M. from five to seven cells.

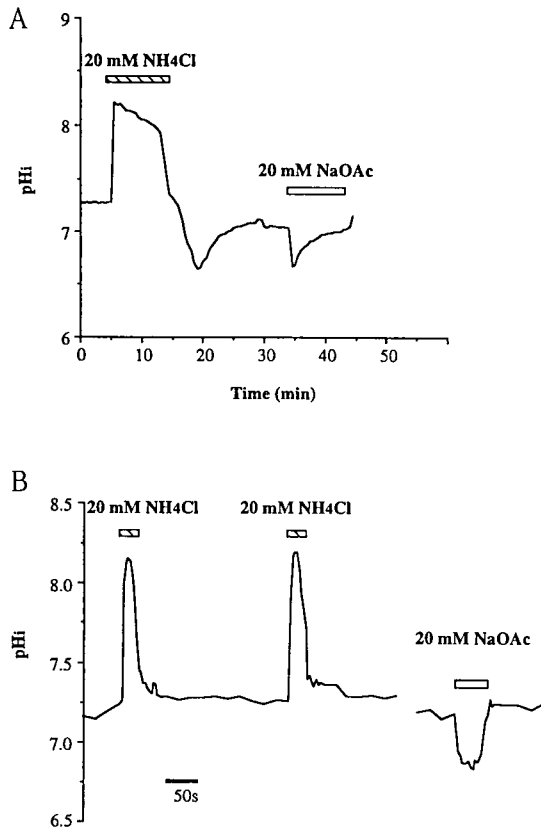
### iii. ラット巨核球の ATP 誘発性細胞質カルシウムオシレーションに与える各種因子の影響

前章までにラット巨核球の ATP 誘発性  $I_{kca}$  オシレーションが、非興奮性細胞のアゴニスト作動性細胞内  $Ca^{2+}$  オシレーションのモデルとして利用できることを明らかにした。そこでこの実験系を用いて、様々な因子の細胞内  $Ca^{2+}$  濃度調節機構に与える影響を検討してみた。

#### 巨核球の細胞内 pH 変化の影響

ある種の生物活性物質は細胞内の pH に影響を与えること

が知られている。たとえば血液凝固因子トロンビンは血小板の細胞内 pH を最初は酸性側に、後にはアルカリ側にシフトさせる<sup>36,37)</sup>。しかしこの細胞内 pH の変化が細胞の機能に与える影響については明らかではなく、血小板の  $Ca^{2+}$  動員に与える影響については相反する報告がなされてもいる<sup>38,39)</sup>。こうした混乱の原因の一つは血小板が非常に小さくて単一細胞レベルでの解析が難しく、血小板の懸濁液を用いての実験では凝集などの影響が混入してしまうことにあると考えられる。そこで血小板の前駆体でトロンピンな

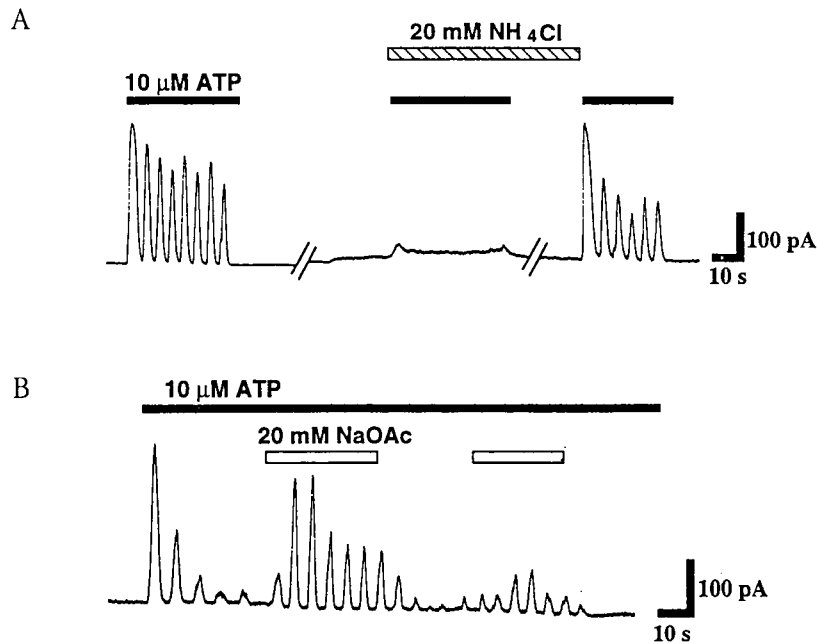


**Fig.13.** The  $pH_i$  changes evoked by 20mM  $NH_4Cl$  and 20mM  $NaOAc$ . The ratio images of single megakaryocyte loaded with BCECF were obtained with 20s interval and calibrated to  $pH_i$ . The drugs were applied during the period of each horizontal bar. The line represent a typical one from five experiments.

どには血小板と同様の反応性がある巨核球を用いて  $pH_i$  の影響の解析を試みた。

巨核球の細胞内  $pH_i$  は静止状態では  $7.29 \pm 0.23$  ( $n=7$ ) であった。Fig. 13A に示すように 20mM 塩化アンモニウムは速やかなアルカローシスを誘発し、投与期間中持続する。細胞内  $pH_i$  の上昇値は最大  $0.81 \pm 0.15$  で、投与直後に最大に上昇した後、徐々に回復傾向を示す。塩化アンモニウムを洗浄した後は酸性側に細胞内  $pH_i$  が変化し、その後しばらくして元のレベルに回復する。このときの酸性側への  $pH_i$  変化は静止レベルから 0.5-0.75 程度であった。塩化アンモニウム洗浄後のアシドーシスの程度は塩化アンモニウムの投与時間に依存する。一方 20mM 酢酸ナトリウムは急速で一時的な細胞内  $pH_i$  の酸性化を誘発する。 $pH_i$  の変化は最大  $0.51 \pm 0.05$  ( $n=4$ ) で、酢酸ナトリウムが持続的に存在していても元のレベルに回復し、酢酸ナトリウムを洗浄した後は特に変化はみられない。典型的には細胞内  $pH_i$  の酸性化は 2-3 分持続するがその回復の時間には細胞間でばらつきがある。

Fig. 13B には塩化アンモニウムと酢酸ナトリウムの短時間投与の場合の細胞内  $pH_i$  の変化を示した。細胞内  $pH_i$  の変化は薬物投与後 2 秒以内におこり洗浄により速やかに回復している。さらに短時間投与の場合には塩化アンモニウムの洗浄後のアシドーシスはみられない。そこで塩化アンモニウムと酢酸ナトリウムを短時間投与で用いることにした。なお ATP  $10\mu M$  は細胞内  $pH_i$  にはなんら影響しなかった。



**Fig.14.** Effects of 20mM  $NH_4Cl$  and 20mM  $NaOAc$  on the  $10\mu M$  ATP-induced oscillatory  $K^+$ -currents. The current traces were obtained by nystatin perforated patch recording configuration at a holding potential of  $-40mV$ . Each drug was applied during a period indicated by horizontal bars. The current traces are typical ones from nine (A) and seven (B) experiments.



ATP 10 $\mu$ M により誘発される  $I_{KCa}$  オシレーションに対する pH の影響について検討した。Fig. 14 に示すように 20 $\mu$ M 塩化アンモニウムは振動性  $K^+$  電流をほぼ完全に抑制した。その抑制作用は可逆的で洗浄により反応は完全に回復する。一方 20 $\mu$ M 酢酸ナトリウムは ATP 誘発性  $K^+$  電流オシレーションを増強する。ATP 10 $\mu$ M は通常はほぼ最大に近い反応を誘発するため増強作用は観察されにくい。反応性の悪い細胞では弱い反応しか惹起されないため Fig. 14B に示すような結果が得られる。この細胞では振動性の  $K^+$  電流は極めて早く減衰しているがそこに 20 $\mu$ M 酢酸ナトリウムを投与すると ATP 応答の回復（頻度と電流の大きさの増加）がみられる。同様の増強作用は 1 $\mu$ M ATP を投与したふつうの反応性を持つ細胞でもみられる（データは示していない）。

細胞内 pH の影響についてさらに細胞内に  $IP_3$  を直接投与した場合の  $I_{KCa}$  オシレーションの系で検討した。この系では電極内液に 3-10 $\mu$ M の  $IP_3$  を含む記録電極を用い、コンベンショナル法で生じる細胞膜上の小孔から細胞内へ  $IP_3$  を拡散により投与するもので、細胞外から ATP を投与した場合と同様に  $I_{KCa}$  オシレーションが観察される。20 $\mu$ M 酢酸ナトリウムによる細胞内の酸性化は  $IP_3$  誘発性の  $I_{KCa}$  オシレーションにはなら影響を与えなかった。一方 20 $\mu$ M 塩化アンモニウムは可逆的に  $IP_3$  誘発性の  $I_{KCa}$  オシレーションを抑制した。

GTP- $\gamma$ S の細胞内投与も  $I_{KCa}$  オシレーションを誘発する。この系に対しては 20 $\mu$ M 酢酸ナトリウムは反応の増強作用を示した。ただしその増強の様子は ATP の細胞外投与の場合とは多少異なり、酢酸ナトリウムの投与から反応が現れるまでわずかではあるが時間がかかることと洗浄後もすぐには効果が消失しないことが特徴といえる。20 $\mu$ M 塩化アンモニウムはこの系の場合でも可逆的に反応を抑制した。

#### ミトコンドリア脱共役剤の影響

プロトンイオノフォアでミトコンドリア脱共役剤として知られている FCCP<sup>40)</sup> は、細胞に ATP の枯渇をもたらすため、虚血または低酸素細胞モデルをつくるのによく使われる<sup>41-43)</sup>。また FCCP には、ミトコンドリア内膜のプロトン勾配を破壊することにより単離ミトコンドリアから  $Ca^{2+}$  を放出させ、 $Ca^{2+}$  取り込みを阻害する作用がある<sup>44)</sup>。さらに小胞体膜のプロトン勾配も破壊するため<sup>45)</sup>、ATP の枯渇や脱分極以外にも生きている細胞に様々な影響があると考えられる。例えば神経細胞や膵細胞で FCCP がミトコンドリア以外の  $Ca^{2+}$  プールから  $Ca^{2+}$  を放出させるという報告がある<sup>46,47)</sup>。そこで FCCP の巨核球  $Ca^{2+}$  オシレーションに対する影響についても検討した。

まず巨核球に対する FCCP 単独での作用を調べたが、0.1-1 $\mu$ M の FCCP を最長で 10 分間投与したが、電気的応答は

全く検出されなかった。次いで ATP 誘発性の  $I_{KCa}$  オシレーションに対する影響を調べた。10 $\mu$ M ATP で誘発される反応に対する 1 $\mu$ M FCCP の作用は細胞により異なる。最初のスパイク以外の  $I_{KCa}$  電流を抑制するタイプが 8 細胞中 5 細胞で、電流の大きさに加えて活性化された  $K^+$  チャンネルのベースラインへの回復も抑制し、一過性の電流のような形に変えるタイプが 8 細胞中 3 細胞で観察された。このような電流の回復の阻害は  $Ca^{2+}$ -ATPase 阻害剤タプシガルジンによっても誘発されることを先の章で紹介している。FCCP は二番目以降のスパイクの大きさを対照群の  $13 \pm 9\%$  に抑制した ( $n=8$ )。いずれのタイプでも FCCP の作用は可逆的で、洗浄後約 1 分で元の反応性が回復する。さらに ATP の濃度を変えて FCCP の作用について検討すると 1 $\mu$ M ATP の反応に対しては実験に用いた 6 細胞のすべてで完全な抑制、100 $\mu$ M ATP の反応に対しては実験に用いた 6 細胞のすべてでオシレーションのパターンの阻害が観察された。

細胞内  $IP_3$  投与による  $I_{KCa}$  オシレーションに対する FCCP の影響についても検討した。10 $\mu$ M  $IP_3$  を含む電極内液を満たした記録電極を用いて細胞内に  $IP_3$  を投与して誘発した  $I_{KCa}$  オシレーションを、FCCP は完全に抑制（7 細胞中 5 細胞）または回復の抑制による持続的  $I_{KCa}$  の活性化に変化させた（7 細胞中 2 細胞）。このパターンは ATP 誘発性のオシレーションの場合と同様である。また 100 $\mu$ M  $IP_3$  を用いた場合には 4 細胞中 4 細胞で後者のパターンによる修飾がみられた。従って FCCP 感受性のステップは細胞内プールからの  $Ca^{2+}$  の放出以降にあると考えられる。

#### 巨核球のプリン受容体活性のアデニンによる修飾

アデニン、グアニン、シトシン、ウラシル各単独での巨核球に対する作用を調べたが最大 1 $\mu$ M まで用いてもなんの反応も惹起しなかった。しかしアデニンには 1 $\mu$ M ATP または 0.01 $\mu$ M ADP により誘発される  $I_{KCa}$  オシレーションを増強する作用があった。グアニン、シトシン、ウラシルには最大 1 $\mu$ M まで用いてもなんの修飾作用も認められなかった。アデニンの作用は投与後  $14 \pm 3$  秒で観察され、洗浄後は  $31 \pm 11$  秒で消失した（いずれも  $n=7$ ）。3 $\mu$ M ATP により誘発される  $I_{KCa}$  オシレーションに対するアデニンの作用の用量-反応相関について検討した。結果を Fig. 15 に示す。アデニンは 1 $\mu$ M から  $I_{KCa}$  オシレーションの頻度を増強したが電流の大きさにはほとんど影響しなかった。アデニンの  $ED_{50}$  値は約 80 $\mu$ M であった。

また ATP 以外の受容体を刺激して巨核球に  $I_{KCa}$  オシレーションを誘発する トロンピン 5 U/ml の反応に対してはアデニンは全く影響を与えなかった。トロンピン 5 U/ml は ATP 1 $\mu$ M とほぼ同様の強さの反応を誘発する濃度である。そしてアデニン 300 $\mu$ M による ATP 1 $\mu$ M の反応の増強作用は cAMP 依存性プロテインキナーゼ阻害剤である H

-8やアデニル酸シクラーゼ活性化剤であるホルスコリンの存在下でも全く影響されない。さらに細胞外液中  $Ca^{2+}$  や  $Mg^{2+}$  を除去した場合にもアデニンの作用に変化はみられなかった。

ラット巨核球の形態変化のセカンドメッセンジャー

巨核球の  $I_{KCa}$  オシレーションについては、主にATPをアゴニストとして用いて解析を進めてきた。しかしこれまでも何度か言及したようにトロンピンにも巨核球の  $I_{KCa}$  オシレーションを誘発する作用がある。巨核球から生じる血小板では、トロンピンは単独で強い凝集を誘発する「強いアゴニスト」、ADPは他の刺激が共存したときにのみ凝集や顆粒成分の放出を誘発する「弱いアゴニスト」として分類されている<sup>19)</sup>。そこでここでは巨核球の場合について、ATPとトロンピンの作用の違いを  $I_{KCa}$  の測定による  $Ca^{2+}$  動員、蛍光分光法による5-HTの放出、走査電子顕微鏡(SEM)による形態観察の三点から解析した。

$Ca^{2+}$  動員：ATPとトロンピンはいずれも保持電位-43mVで巨核球に  $I_{KCa}$  オシレーションを誘発する。最大電流及び最大頻度両方のパラメーターでATP, ADP, トロンピンの間になんら違いは認められなかった。さらにホルスコリン

1  $\mu M$  または IBMX 10  $\mu M$  による抑制についても調べたがATPとトロンピンいずれの反応もこれら薬物により完全に抑制された。

セロトニンの放出：次に巨核球のセロトニン(5-HT)放出に対するATPとトロンピンの作用を検討した。トロンピンは3 U/ml以上から濃度依存的に5-HTの放出を引き起こす。一方ATPとADPは全く作用がみられない。同じ動物から採取した血小板はADPにより凝集する活性があった。細胞内  $Ca^{2+}$  濃度を不可逆的に上昇させるA23187は5-HT放出を起こさせるが、この場合は細胞がほとんど消失しているので細胞の融解によると考えられる。すなわち最大放出値とみなすことができる。ATPやADPとトロンピンを同時に投与しても相加作用はみられなかった。トロンピンには細胞内  $Ca^{2+}$  濃度を上げると同時に  $G_i$  を活性化することにより細胞内cAMP濃度を減少させる作用のあることが知られているので、cAMP増加薬の影響についても調べた。ホルスコリンには対照群及びトロンピンによる5-HTの放出を弱いながら抑制する活性があった。IBMXでは有意差はないが抑制傾向があった。従って5-HTの放出にはcAMPが負の調節因子として関与する可能性が示唆

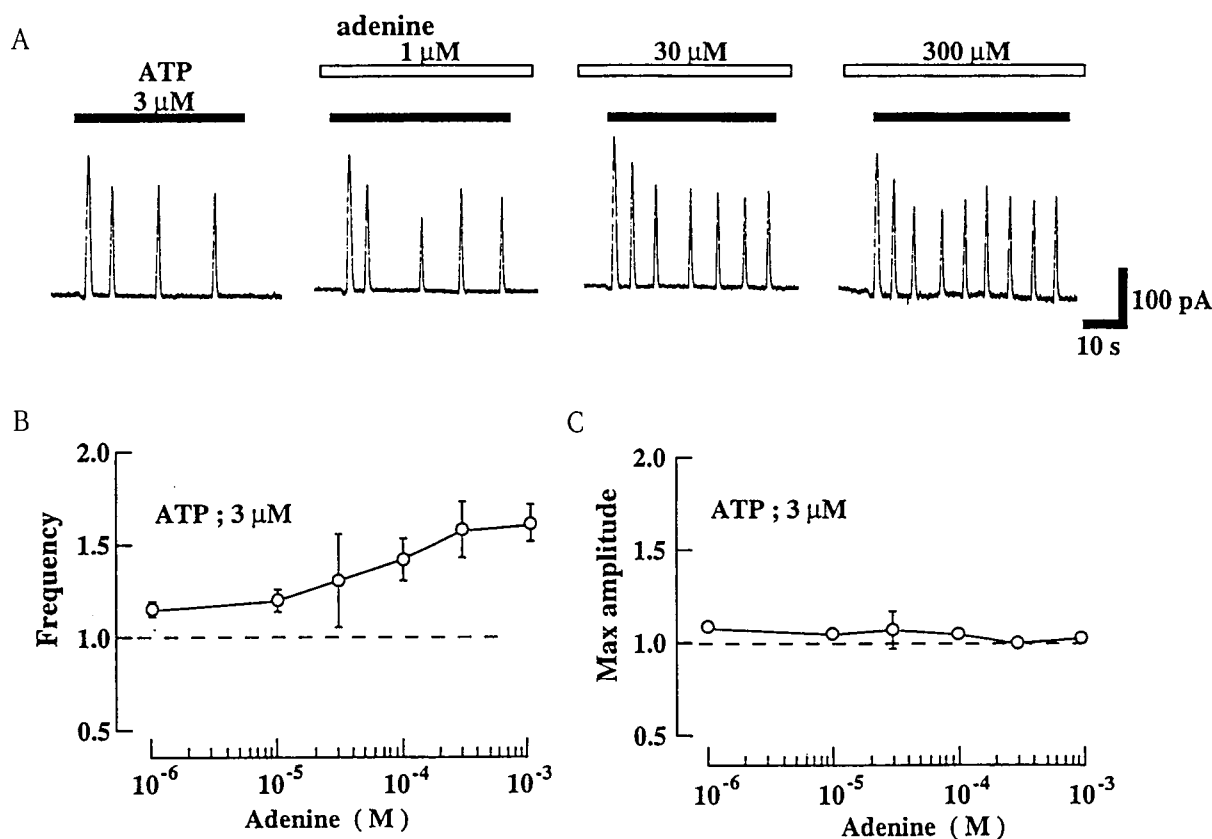


Fig.15. Concentration-dependent enhance by adenine of the ATP-induced  $I_{KCa}$  oscillation. A; Typical current traces obtained from the same cell.  $V_{H}$  was -40mV. Adenine at each concentration was applied 1 min prior to the application of ATP. The current traces were obtained from single cell, and a typical one of 5 cells examined. B; Quantitative results obtained from A. The value of frequency and maximum current amplitude ( $I_{max}$ ) were normalized to the value obtained by 3  $\mu M$  ATP alone. Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. of five to six cells.

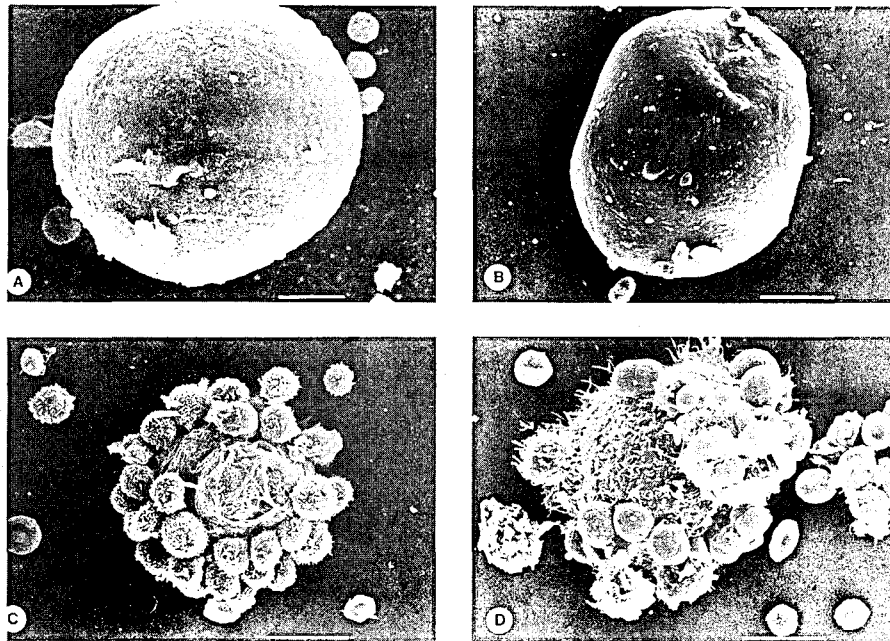


Fig.16. Scannig electron micrograph of megakaryocyte treated with agonists. The treatments were as follows: standard external solution for 30 min (A), ATP 30  $\mu$ M for 30 min (B), thrombin 10U/ml for 30 min (C) and H-8 3  $\mu$ M for 2 hours (D). The horizontal bars in the each photomicrograph represent 10 $\mu$ m.

された。

形態変化：これまでの実験結果から巨核球の  $Ca^{2+}$  動員だけでは5-HTの放出はおこらないことが示唆された。さらに超微形態学的にATPとトロンビンの作用を調べた。Fig. 16に示すように骨髄から単離した巨核球はSEMで観察すると比較的表面のなだらかな球状をしている。細胞の大きさは様々であるが細胞表面の様子はいずれも同様であった。こうした性質はATPの処理によってもほとんど変わらない (Fig. 16B) がトロンピンでは大きく変化する (Fig. 16C)。トロンピンは巨核球やその他の骨髄細胞の細胞表面に絨毛様の突起を生じさせ、凝集塊を形成する。こうした性質からトロンピン処理した骨髄細胞懸濁液中には中心の細胞が観察できないような細胞塊が多数存在し、対照群でみられたような巨核球単独での姿はほとんど観察できない。従って細胞塊の中で、他の細胞の隙間から巨核球を観察する事になるが、そうして観察される巨核球の細胞表面は極めて不規則な偽足様構造に変化したり、時には細胞質が不規則な小球を形成して核を裸にして凝集している様子が見られる。同様の形態変化はcAMP依存性プロテインキナーゼ阻害剤であるH-8で処理することによってもみられた (Fig. 16D)。H-8はトロンピンの作用よりは弱いものの巨核球の細胞表面に不規則な絨毛または偽足様構造を誘発した。同様の形態変化はcAMPのアンタゴニストであるRp-cAMPS<sup>9)</sup>によっても誘発された。したがって、巨核球の細胞形態変化には細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇よりもcAMP量の減少の方が重要な因子であるといえる。

#### 4. 考 察

ラット巨核球は細胞外から投与したATPに反応して周期的外向き電流を発生する。この外向き電流は細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の振動を反映した  $Ca^{2+}$ -依存性  $K^+$  チャンネルを通る  $K^+$  電流であることを明らかにした。  $K^+$  チャンネルの性質については、先にコンベンショナルホールセル法でモルモット巨核球を調べている河の報告とほぼ一致している。しかし本実験の結果で河の報告と異なる点がいくつか存在する。一つにはアゴニストに反応して生じる電流がアゴニストの洗浄により速やかに消失し、テーリングはみられないこと、二つ目は全体的にアゴニスト濃度がかなり低いこと、最後は電流の形が一過性ではなくオシレーションであること、である。  $Ca^{2+}$  キレート剤EGTAを含まない電極内液を用いてコンベンショナルホールセル法で記録を取ればニスタチン法の場合と同様の結果が得られることから、こうした違いは  $Ca^{2+}$  キレート剤によるものと推測される。この結果から巨核球の細胞内  $Ca^{2+}$  に対する緩衝能は比較的小さいということもいえる。たぶんそれが原因でfura-2を負荷した巨核球の画像解析ではオシレーションが検出できず、一過性の上昇になる<sup>25,26)</sup>ものと考えられる。  $Ca^{2+}$  オシレーションの場合、細胞外からの信号の強さは頻度に換算されるため、一定の  $Ca^{2+}$  濃度上昇で弱い反応から強い反応にまで幅広く、しかもかなり長時間にわたって対応できる。細胞にとっては細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇は時に致命的であるため、一過性の上昇で応答する場合には上昇の

程度に限度があるし、あまり長時間持続的に高濃度を維持することは不可能である。従ってオシレーションの方が信号伝達機能としては優れており、これが細胞の本来の生理機能であると考えられる。こうしたことから、巨核球の生理機能解明にはニスタチン穿孔ホールセルパッチクランプ法が適しているといえよう。

巨核球の $K^+$ 電流オシレーションはアゴニスト濃度が増加すると頻度が増加し遅延時間が短縮されるが、最大電流は比較的一定である。オシレーションには細胞外 $Ca^{2+}$ は必要ではないため、 $Ca^{2+}$ は細胞内プールから放出されるものと考えられる。 $Ca^{2+}$ チャンネルブロッカーである $10\mu M$   $La^{3+}$ がATP誘発性のオシレーションに影響しないことからこのことがいえる。血小板ではADPが $Ca^{2+}$ 電流を誘発するという報告があるが本実験条件では巨核球に $Ca^{2+}$ 電流は検出されなかった。これは巨核球と血小板とで異なる点かもしれない。

ATPを持続的に投与したときに徐々に各スパイクの間隔があいていって最後には電流が観察されなくなる現象については、高濃度のアゴニストを投与すれば反応は惹起されることと洗浄して間隔を開ければ反応性が回復することから、受容体の脱感作によると推定される。こうした脱感作現象は他の非興奮性細胞の $Ca^{2+}$ オシレーションの場合でも観察されている<sup>48-51</sup>。

巨核球のプリン受容体のアゴニスト選択性はこれまで知られているプリン受容体サブタイプに当てはまらず、独特のものである。既知のプリン受容体の中では血小板の $P_{2T}$ がATPよりADPに親和性の高い唯一のものである<sup>52</sup>が、 $P_{2T}$ ではATPはADPのアンタゴニストとして働き、アゴニストとしての作用はない。巨核球は血小板の前駆細胞であることから同じ受容体を持つものと考えられてきたが、ATPの作用については巨核球と血小板では全く違うことを明らかにした。ATPとADPがそれぞれ別々の受容体に作用している可能性は両アゴニストの間で交差脱感作がみられることから否定される。さらにATPとADPは、他の $P_2$ 受容体でも報告のあるように実際には $ATP^{i4}$ と $ADP^3$ として作用していることを示唆した。またATP  $10\mu M$ に対するアンタゴニスト、スラミンおよびRB-2の $EC_{50}$ が $10\mu M$ 以下であるということからも、実際のアゴニストは $ATP^{i4}$ と $ADP^3$ であることが示唆される。本来のアゴニストより親和性の高いアンタゴニストが見つかる可能性はそう高くはなく、本実験で用いた条件下では約1/30になる $ATP^{i4}$ や $ADP^3$ が実際のアゴニストと考える方が自然である。スラミンは非選択的 $P_2$ 受容体アンタゴニスト<sup>53,54</sup>、RB-2は $P_{2T}$ 受容体選択的アンタゴニスト<sup>55</sup>とされる。この両者が巨核球のプリン受容体のアンタゴニストとして働くことから、ADPの方がATPより強いアゴニストであるという点のぞいて、巨核球のプリン受容体は $P_{2T}$ に類似する。い

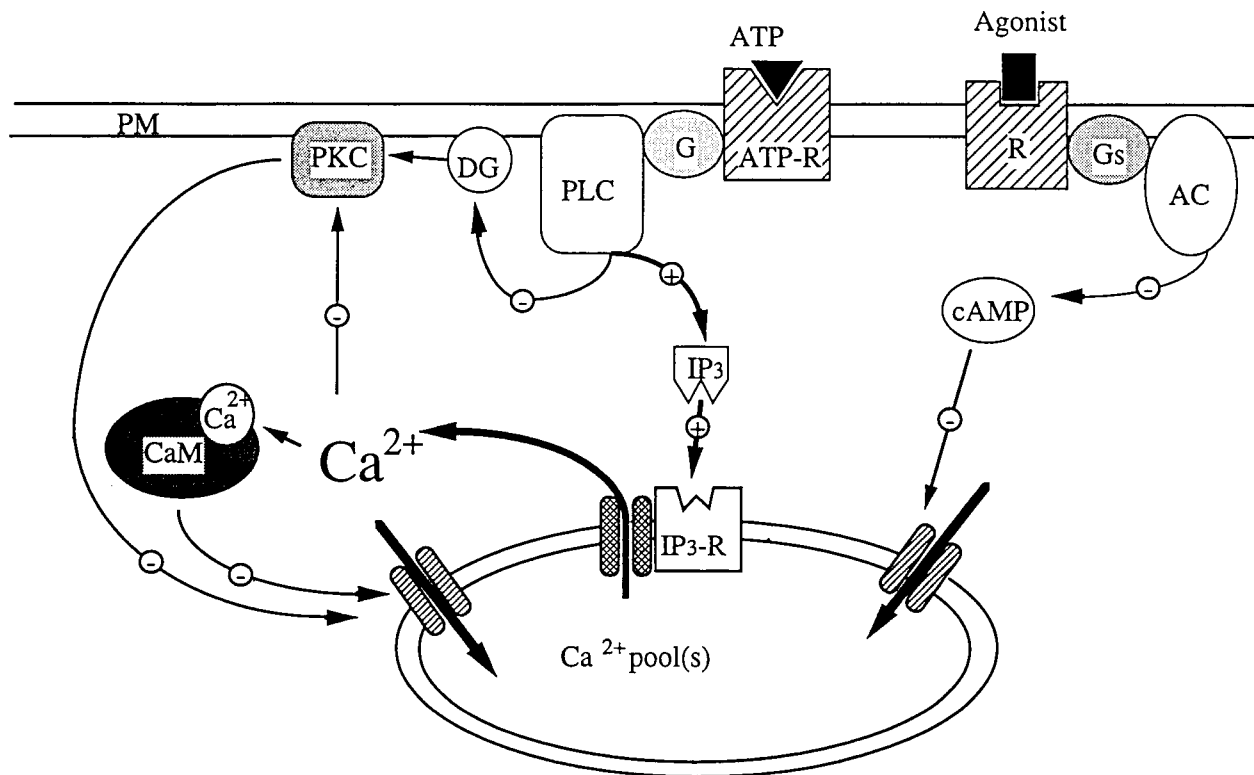
ずれにしる巨核球のプリン受容体の性質はこれまで知られていなかったものである。つけ加えるならばここで用いたATPやアンタゴニストなどの濃度は他の実験系で用いられている濃度と比較してもかなり低く<sup>56,57</sup>、従って抑制作用が薬物の細胞毒性である可能性は極めて小さい。

最終的な受容体の同定には遺伝子のクローニングなどの方法が必要ではあるが巨核球と血小板とで受容体の性質が変わる仕組みなどにも興味を持たれる。

次に巨核球のATP誘発性 $Ca^{2+}$ オシレーションのメカニズムについて、これまでに提出されたモデルを参考にしながら検討した。はじめに2-プールモデルで必要とされるCICRの存在を調べたが、CICRに作用する薬物は巨核球になんの影響も与えず、典型的なCICRは巨核球には存在しないことがわかった。しかし外液 $Ca^{2+}$ フリーでATP誘発性の反応が消失した後でもなお $Ca^{2+}$ -ATPase感受性のプール内に $Ca^{2+}$ が残存することから、巨核球の $Ca^{2+}$ プールはオシレーションに関与するものとそうでないものとの二種類があるか、オシレーションに関与する機能的に異なるプールが二種以上あってその容量が異なるという可能性が考えられる。いずれにしてもこれまでに報告されているモデルとは異なるようである。

IICRについてはFig. 8に示すように明らかに巨核球の $Ca^{2+}$ オシレーションに関与する。この場合、細胞内に投与している $IP_3$ の濃度は振動していない。従って、Cobboldらが肝細胞で<sup>49</sup>、Harootunianらが繊維芽細胞で<sup>50</sup>提唱しているような $IP_3$ 濃度が振動しているというモデルは巨核球には当てはまらない。 $IP_3$ によるオシレーションに関しては涌井らが膵腺傍細胞で報告している<sup>20</sup>ものによく似ている。ただし巨核球には膵腺傍細胞のようなカフェイン感受性のプールは存在しない。

PKC活性化と阻害によるオシレーションの阻害とパターンの変化から、PKCの活性化が細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度を下げる方向に働くことが予想される。CaMの場合も同様で $Ca^{2+}$ /CaM複合体は細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度を下げると考えられる。つまり受容体活性化により放出された $Ca^{2+}$ はPKCを活性化し、CaMを活性化し、これらが $Ca^{2+}$ 濃度を下げる方向に働くと予測される。CaMは形質膜及び筋小胞体の $Ca^{2+}$ ポンプを活性化して細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度を下げることが知られている<sup>58,60</sup>。非興奮性細胞の細胞内 $Ca^{2+}$ プールにそのようなポンプの存在は知られていないが、形質膜だけではなく細胞内貯蔵部位にもこうしたポンプがある可能性はあると考えられる。巨核球の場合はdemarcation channelと呼ばれる発達した膜系が細胞質にあって、これらは将来血小板の形質膜になるとされる。Enyediらの報告<sup>61</sup>によればヒト血小板には形質膜タイプと筋小胞体タイプの二種類の $Ca^{2+}$ ポンプがあり、これらはいずれも巨核球由来である。さらにPollockらの研究<sup>62</sup>ではPKCは血小板形質膜の $Ca^{2+}$



**Fig.17.** Schematic representation for ATP-induced  $I_{kCa}$  oscillation in megakaryocyte. The + marks on the arrow indicate the signal which act to raise  $[Ca^{2+}]_i$ , and - marks indicate the signal which act to reduce  $[Ca^{2+}]_i$ . This diagram does not depict entry and exit pathways for  $Ca^{2+}$  across the plasma membrane to avoid complexity. AC = adenylate cyclase, CaM = calmodulin, G = GTP-binding protein, DG = diacylglycerol,  $IP_3$  = D-myoinositol triphosphate, PKC = protein kinase C, PLC = phospholipase C, PM = plasma membrane, R = receptor.

ポンプを活性化することが示唆されており、これらのことを考えあわせると巨核球の細胞内  $Ca^{2+}$  プールに PKC/CaM 感受性の  $Ca^{2+}$  ポンプが存在する可能性は高い。

巨核球の  $I_{kCa}$  オシレーションは細胞内に GTP- $\gamma$ -S を投与することでも惹起される。これは G 蛋白質の活性化が関与することを示すもので、その G 蛋白質の種類についても検討した。PTX 感受性の G 蛋白質の関与はないといえるが CTX 感受性 G 蛋白質については巨核球が cAMP により調節を受けるため断定できない。cAMP の作用点については、cAMP 量を上げる薬物が  $IP_3$  誘発性のオシレーションも抑制することから、 $IP_3$  の作用点以後での作用、すなわち  $Ca^{2+}$  貯蔵部位からの放出の阻害または  $Ca^{2+}$  取り込みの活性化が考えられる。cAMP は血小板でも凝集や分泌を抑制することが知られており<sup>63,64</sup>、この cAMP による負の調節は血小板と巨核球で共通であるといえる。

以上の実験結果に基づいて、巨核球の ATP 誘発性  $I_{kCa}$  オシレーションのモデルを作成した (Fig. 17)。細胞外から投与した ATP は受容体に結合して受容体共役 G 蛋白質を活性化する。G 蛋白質は信号をホスホリパーゼ C に伝え、細胞膜磷脂質から  $IP_3$  とジアシルグリセロールを産生する。 $IP_3$  は  $IP_3$  感受性の細胞内  $Ca^{2+}$  ストアから  $Ca^{2+}$  を動員

する。こうして動員された  $Ca^{2+}$  は先に産生されたジアシルグリセロールと協調して PKC を活性化し、PKC は細胞内  $Ca^{2+}$  濃度を下げる方向に働く。 $Ca^{2+}$  により活性化される  $Ca^{2+}$ /CaM 複合体もまた細胞内  $Ca^{2+}$  濃度を下げる方向に働く。Payne らによって提唱されている<sup>65</sup> ように高い細胞内  $Ca^{2+}$  濃度による  $IP_3$  への負のフィードバック機構も関与しているかもしれない。しかし  $IP_3$  や GTP- $\gamma$ -S の濃度が振動しなくても  $I_{kCa}$  オシレーションはおきることから PKC による ATP 受容体のダウンレギュレーションは必ずしも必要ではない。この系に対して cAMP もまた負の調節を行い、その作用点は  $Ca^{2+}$  貯蔵部位からの  $Ca^{2+}$  放出の阻害または  $Ca^{2+}$  取り込みの活性化であると推定される。なお血小板においては ATP が cAMP 濃度を上げることにより凝集を阻害することが知られていて<sup>66,67</sup>、巨核球の場合と大きく異なる。

このモデルにおいては複数の  $Ca^{2+}$  プールは必ずしも必要ではないが、プールが一つであるといえる証拠もない。巨核球は細胞内に複雑な膜系を持ち、その構成要素には少なくとも巨核球自身の小胞体と将来血小板の形質膜及び細胞内膜系になる部分とがある。これらの機能的に異なる膜系が機能の異なる細胞内  $Ca^{2+}$  プールとして存在している

可能性は大いにあると考えられる。

巨核球の  $I_{KCa}$  オシレーションは、その頻度が極めて大きいことが非興奮性細胞の  $Ca^{2+}$  オシレーションとしては特異的であるが、それが解析に要する時間が少ないというメリットでもある。ここで示したようにそのメカニズムには他の細胞と共通する部分も多く、再現性の良いことなどから  $Ca^{2+}$  オシレーションのモデルとしても極めて有用であると考えられる。

20mM 塩化アンモニウムと酢酸ナトリウムの短期投与により巨核球の細胞内 pH を再現性良くアルカリ性化または酸性化することができた。20mM 塩化アンモニウムによるアルカローシスは ATP 及び  $IP_3$  誘発性の  $I_{KCa}$  オシレーションをほぼ完全に抑制した。20mM 塩化アンモニウムは  $K^+$  伝導度に対して弱い阻害作用があるが、その程度が 5% と小さいことから 20mM 塩化アンモニウムによるオシレーションの阻害は  $K^+$  チャンネルへの直接作用によるものではないといえる。20  $\mu$ M 酢酸ナトリウムによるアシドーシスは ATP 及び  $IP_3$  誘発性の  $I_{KCa}$  オシレーションを増強する作用があった。ある種の細胞では酸性の pH により  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  チャンネルの開閉頻度が抑制されるという報告がある<sup>68)</sup>が、巨核球を whole-cell レベルで調べた場合にはそのような作用はみられなかった。従ってここで用いた薬物の  $K^+$  チャンネルへの直接作用は無視できる程度であると結論でき、 $Ca^{2+}$  オシレーションがアルカローシスにより抑制され、アシドーシスにより増強されるといえる。

種々の細胞でアゴニスト刺激による細胞内 pH の変化が報告されており、細胞内 pH の役割に関する考察もなされてきた<sup>69,70)</sup>。しかし細胞内 pH の本当の作用点については明らかになってはいない。Worley ら<sup>71)</sup>は細胞内 pH が  $IP_3$  の受容体への結合に影響することを示唆しているが Dettbarn ら<sup>72)</sup>は細胞内 pH は  $Ca^{2+}$  の放出に影響があると主張している。本研究では細胞内 pH の影響するポイントを同定することも目的とした。先の章で明らかにしたように巨核球の ATP 誘発性  $I_{KCa}$  オシレーションは、受容体刺激-G 蛋白質活性化- $IP_3$  産生-細胞内プールからの  $Ca^{2+}$  の放出- $Ca^{2+}$  の再取り込みまたは排出という信号伝達経路を介する。アシドーシスの場合は ATP 及び GTP- $\gamma$ -S 誘発性の  $I_{KCa}$  オシレーションを増強するが  $IP_3$  誘発性のオシレーションには影響しないため、酸性の pH で修飾されるのは  $IP_3$  産生以前で G 蛋白質活性化以後の点であるといえる。一方アルカローシスの場合は ATP, GTP- $\gamma$ -S,  $IP_3$  により誘発される  $I_{KCa}$  オシレーションのすべてに対して抑制作用を示したことから、アルカリ性の pH が影響するのは  $IP_3$  産生以降の過程、つまり受容体への  $IP_3$  の結合か細胞内ストアからの  $Ca^{2+}$  の放出そのものであるといえる。この結果は信号伝達経路には複数の pH 感受性ステップがあることを明らかにするものである。

FCCP については巨核球の  $I_{KCa}$  オシレーションに対する二つの異なる作用が観察された。一つは単純な抑制、もう一つはオシレーションのパターンを持続的な上昇に変えることである。どちらの作用も ATP 誘発性でも  $IP_3$  誘発性のオシレーションでもみられたことから作用点は信号伝達経路の  $IP_3$  以降にあるといえる。

さらにアデニンが巨核球のプリン受容体誘発性の  $I_{KCa}$  オシレーションを濃度依存的に増強することを見いだした。他の核酸塩基には調べた限りではなんの作用も認められなかった。このアデニンによる修飾作用には cAMP や外液二価陽イオンは関与しない。先に明らかにしているように巨核球の ATP 誘発性  $I_{KCa}$  オシレーションは細胞外液二価陽イオンや細胞内 cAMP 濃度に影響されるが、アデニンの作用にはこうした因子は関与しない。さらに ATP と同様に  $I_{KCa}$  オシレーションを誘発するトロンビンの作用にもアデニンは影響しない。従ってアデニンは巨核球の細胞表面、つまりアデニン受容体に作用していると推定される。この受容体はプリン受容体と何らかの相互作用を示し、場合によってはプリン受容体の一部である可能性もある。通常「プリン受容体」という単語は実際にはそのアゴニストがプリンヌクレオチドまたはプリンヌクレオシドである受容体に対して用いられてきたもの<sup>73)</sup>であるが、プリンそのものであるアデニンに反応する受容体があるとするこの用語は必ずしも適切とはいいがたくなることなどから、本発見はこの分野にとっても興味深い知見である。

また ATP とトロンビンの作用の違いを、パッチクランプ法による細胞内  $Ca^{2+}$  動員、蛍光法による 5-HT の放出、SEM による形態変化を調べることで検討した。ATP は  $I_{KCa}$  オシレーションを誘発するが放出反応や形態変化はおこさない。一方トロンビンは  $I_{KCa}$  オシレーション、放出反応、形態変化のすべてを誘発する。ATP とトロンビンにより誘発される  $I_{KCa}$  オシレーションについてはその性質に大きな違いはなく、同じメカニズムによるものと考えられる。しかし放出反応と形態変化はトロンビンに特異的である。トロンビンは  $G_q$  および  $G_i$  の両方を活性化することが知られており、ATP は  $G_q$  様の G 蛋白質を活性化する。従ってこの ATP と違うトロンビンの作用は  $G_i$  蛋白質の活性化による細胞内 cAMP 濃度の減少によるものである可能性がある。実際に cAMP を増加させるホルスコリンや cAMP アンタゴニスト Rp-cAMPS, A-キナーゼ阻害剤 H-8 はトロンビンの作用を抑制する方向に働いた。

血小板を始め多数の細胞で細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇とプロテインキナーゼ C の活性化が放出反応を引き起こすことが報告されている<sup>13,14)</sup>中で、巨核球の場合は  $Ca^{2+}$  が重要ではなく cAMP が重要だという結果は意外ともいえる。しかし巨核球の場合は ATP は細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇とプロテインキナーゼ C の活性化を誘発するにも関わらず形態

変化を誘発しないので、たとえある細胞とその直前の前駆細胞との間であっても細胞によりセカンドメッセンジャーの役割は異なるものと結論される。こうした違いは何らかの生理的役割の違いを反映するものと考えられるが現時点ではその意義までは明らかではない。しかし今後の研究課題として極めて興味深いものである。

以上、巨核球のATP誘発性Ca<sup>2+</sup>オシレーションをめぐって、受容体や細胞内信号伝達経路、薬物による影響などの様々な点について解明した。こうした研究により巨核球及びその他の生きている細胞の生理機能に関する知見がいつそう深まることを期待する。

本稿は以下の報告を要約したものである。

- i) Uneyama, C., Uneyama, H. and Akaike, N.: Cytoplasmic calcium oscillation of rat megakaryocyte evoked by novel type of purinoceptor. *J. Physiol. (Lond)*, **470**, 731~749 (1993)
  - ii) Uneyama, H., Uneyama, C., Ebihara, S. and Akaike, N.: Suramin and reactive blue2 are antagonists for newly identified purinoceptor on rat megakaryocyte. *Br. J. Pharmacol.*, **111**, 245~249 (1994)
  - iii) Uneyama, H., Uneyama, C. and Akaike, N.: Intracellular mechanisms of cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> oscillation in rat megakaryocyte. *J. Biol. Chem.*, **268**, 168~174 (1993)
  - iv) Uneyama, C., Uneyama, H., Takahashi, M. and Akaike, N.: Cytoplasmic pH regulates ATP~induced Ca<sup>2+</sup> dependent K<sup>+</sup> current oscillation in rat megakaryocyte. *Biochem. J.*, **295**, 317~320 (1993)
  - v) Uneyama, C., Imazawa, T., Uneyama, H., Akaike, N., Kawanishi, T. and Takahashi, M.: Not Ca<sup>2+</sup> but cAMP is the second messenger for morphological changes in rat megakaryocyte. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **211**, 282~288 (1995)
  - vi) Uneyama, C., Uneyama, H., Takahashi, M. and Akaike, N.: FCCP modulation of Ca<sup>2+</sup> oscillation in rat megakaryocytes. *Eur. J. Pharmacol.*, **268**, 455~458 (1994)
  - vii) Uneyama, C., Uneyama, H., Takahashi, M. and Akaike, N.: Biological actions of purines on rat megakaryocytes: potentiation by adenine of the purinoceptor~operated cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> oscillation. *Br. J. Pharmacol.*, **112**, 349~351 (1994)
- さらに関連論文として以下のものがある
- viii) Akaike, N., Uneyama, H., Kawa, K. and Yamashita, Y.: Existence of rolipram-sensitive phosphodiesterase in rat megakaryocyte. *Br. J. Pharmacol.*, **109**, 1020~1023 (1993)
  - ix) Akaike, N. and Uneyama, H.: ATP-induced K<sup>+</sup> current oscillation in megakaryocytes: A unique purinoceptor. *News In Physiological Sciences*, **9**, 49~53 (1994)
  - x) Uneyama, C., Uneyama, H., Takahashi, M. and Akaike, N.: Pharmacological studies on mechanisms involved in Ca<sup>2+</sup> oscillations in rat megakaryocytes. *Eur. J. Pharmacol.*, **291**, 381~386 (1995)
  - xi) Uneyama, C., Uneyama, H., Narisawa, K., Takahashi, M. and Akaike, N.: Kinetic characteristics of thrombin

receptor-mediated responses in rat megakaryocytes. *Eur. J. Pharmacol.*, **319**, 299~305 (1997)

## 文 献

- 1) Tavassoli, M.: *Blood*, **55**, 537-545 (1980)
- 2) Radly, J. M. and Scurfield, G.: *Blood*, **56**, 996~999 (1980)
- 3) Zucker-Franklin, D. and Petursson, S.: *J. Cell Biol.*, **99**, 390~402 (1984)
- 4) Schick, B. P., Schick, P. K. and Chase, P. R.: *Biochim. Biophys. Acta.*, **663**, 239~248 (1981)
- 5) Rabellino, E. M., Nachman, R. L., Williams, N., Winchester, R. J. and Ross, G. D.: *J. Exp. Med.*, **149**, 1273~1287 (1979)
- 6) Leven, R. M. and Tablin, F.: *Am. J. Pathol.*, **132**, 417~426 (1988)
- 7) Hill, R. J., Leven, R. M., Leven, F. C. and Levin, J.: *Experimental Hematology*, **17**, 903~907 (1989)
- 8) Nagasawa, T., Et Al.: *FEBS Letters*, **260**, 176~178 (1990)
- 9) Shaw, T.: *Mutat. Res.*, **200**, 67~97 (1988)
- 10) Nishizuka, Y.: *Nature*, **308**, 693~698 (1984)
- 11) Walker, T. R. and Watson, S. P.: *Biochem. J.*, **289**, 277~282 (1993)
- 12) Rink, T. J.: *Annu. Rev. Physiol.*, **52**, 431~449 (1990)
- 13) Kroll, M. H. and Schafer, A. I.: *Blood*, **74**, 1181~1195 (1989)
- 14) Maruyama, Y.: *J. Physiol.*, **391**, 467~485 (1987)
- 15) Sanchez-Bueno, A., Dixon, C. J., Woods, N. M. and Cuthbertson, K. S. R.: *Biochem. J.*, **268**, 627~632 (1990)
- 16) Osipchuk, Y. V., Wakui, M., Yule, D. I., Gallacher, D. V. and Petersen, O. H.: *EMBO J.*, **9**, 697-704 (1990)
- 17) Jacob, R.: *Biochim. Biophys. Acta*, **1052**, 427~438 (1990)
- 18) Tse, A. and Hille, B.: *Science*, **255**, 462~464 (1992)
- 19) Sage, S. O., Adams, D. J. and Van Breemen, C.: *J. Biol. Chem.*, **264**, 6~9 (1989)
- 20) Wakui, M., Potter, B. V. L. and Petersen, O. H.: *Nature*, **339**, 317~320 (1989)
- 21) Meyer, T. and Stryer, L.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 5051~5055 (1988)
- 22) Horn, R. and Marty, A.: *J. Gen. Physiol.*, **92**, 145~159 (1988)
- 23) Murase, K., Ryu, T. D. and Randic, M.: *Neurosci. Lett.*, **103**, 56~63 (1989)
- 24) Nakagawa, T., Komune, S., Uemura, T. and Akaike, N.: *J. Neurophysiol.*, **65**, 715~723 (1991)
- 25) Ikeda, M., Kurokawa, K. and Maruyama, Y.: *J. Physiol.*, **447**, 711~728 (1992)
- 26) Kawa, K.: *J. Physiol.*, **431**, 207~224 (1990)
- 27) Marty, A. and Neher, E. Tight-Seal Whole-Cell Recording. 1-107-122 (Plenum Press, New York, London, 1983).
- 28) Dahlquist, R. and Diamant, B.: *Acta Pharmacologica Et Toxicologica*, **34**, 368~384 (1974)
- 29) Cockcroft, S. and Gomperts, B. D.: *J. Physiol.*, **296**, 229~243 (1979)
- 30) Taqui-Khan, M. M. and Martell, A. E.: *Journal Of American Chemical Society*, **88**, 668~671 (1966)
- 31) Nathenas, J., Dexter, J. and Katzman, R.: *Biochem. Med.*, **8**, 257~267 (1973)
- 32) Greenberg, S., Virgilio, F. D., Steinberg, T. H. and Silver-

- stein, S. C.: *J. Biol. Chem.*, **263**, 10337~10343 (1988)
- 33) Berridge, M. J. and Irvine, R. F.: *Nature*, **341**, 197~205 (1989)
- 34) Thastrup, O., Cullen, P. J., Drobak, B. K., Hanley, M. R. and Dawson, A. P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 2466~2470 (1990)
- 35) Pusch, M. and Neher, E.: *Pflügers Arch*, **411**, 204~211 (1988)
- 36) Sage, S. O., Jobson, T. M. and Rink, T. J.: *J. Physiol.*, **420**, 31~45 (1990)
- 37) Zavoico, G. B., Edward J. Cragoe, J. and Feinstein, M. B.: *J. Biol. Chem.*, **261**, 13160~13167 (1986)
- 38) Siffert, W. and Akkerman, J. W. N.: *Nature*, **325**, 456~458 (1987)
- 39) Zavoico, G. B. and Edward J. Cragoe, J.: *J. Biol. Chem.*, **263**, 9635~9639 (1988)
- 40) Heytler, P. G.: *Meth. Enzymol.*, **55**, 462~471 (1979)
- 41) Biscoe, T. J. and Duchen, M. R.: *J. Physiol.*, **428**, 39~59 (1990)
- 42) Duchen, M. R., Valdeolillos, M., O'Neill, S. C. and Eisner, D. A.: *J. Physiol.*, **424**, 411~426 (1990)
- 43) Duchen, M. R. and Biscoe, T. J.: *J. Physiol.*, **450**, 33~61 (1992)
- 44) Mclaughlin, S. G. A. and Dilger, J. P.: *Physiol. Rev.*, **60**, 825~863 (1980)
- 45) Galvan, A. and Lucas, M.: *Biomed. Biochem. Acta*, **46**, 677~682 (1987)
- 46) Lucas, M., Galvan, A., Solano, P. and Goberna, R.: *Biochim. Biophys. Acta*, **731**, 129~136 (1983)
- 47) Jensen, J. R. and Rehder, V.: *Brain Res.*, **551**, 311~314 (1991)
- 48) Woods, N. M., Cuthbertson, K. S. R. and Cobbold, P. H.: *Nature*, **319**, 600~602 (1986)
- 49) Woods, N. M., Cuthbertson, K. S. R. and Cobbold, P. H.: *Cell Calcium*, **8**, 79~100 (1987)
- 50) Rooney, T. A., Sass, E. J. and Thomas, A. P.: *J. Biol. Chem.*, **264**, 17131~17141 (1989)
- 51) Harootunian, A. T., Kao, J. P. Y. and Tsien, R. Y.: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **53**, 935~943 (1989)
- 52) Gordon, J. L.: *Biochem. J.*, **233**, 309~319 (1986)
- 53) Hourani, S. M. O., Hall, D. A. and Nieman, C. J.: *Br. J. Pharmacol.*, **105**, 453~457 (1992)
- 54) Dunn, P. M. and Blakeley, A. G. H.: *Br. J. Pharmacol.*, **93**, 243~245 (1988)
- 55) Burnstock, G. and Warland, J. J. I.: *Br. J. Pharmacol.*, **90**, 383~391 (1987)
- 56) Hertog, A. D., Nelemans, A. and Akker, J. V. D.: *Eur. J. Pharmacol.*, **166**, 531~534 (1989)
- 57) Inoue, K., Nakazawa, K., Ohara-Imaizumi, M., Obama, T., Fujimori, K. and Takanaka, A.: *Br. J. Pharmacol.*, **102**, 581~584 (1991)
- 58) Harootunian, A. T., Kao, J. P. Y., Paranjapse, S., Adams, S. R., Potter, B. V. L. and Tsien, R. Y.: *Cell Calcium*, **12**, 153~164 (1991)
- 59) Carafoli, E.: *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **12**, S77-S84 (1988)
- 60) Edes, I. and Kranias, E. G.: *Membr. Biochem.*, **7**, 175~192 (1987)
- 61) Enyedi, A., Sarkadi, B., Foldes-Papp, Z., Monostry, S. and Gardos, G.: *J. Biol. Chem.*, **261**, 9558~9563 (1986)
- 62) Pollock, W. K., Sage, S. O. and Rink, T. J.: *FEBS Lett.*, **210**, 132~136 (1987)
- 63) Ushiyama, S., Handa, S. and Yamazaki, M.: *Prostaglandins*, **36**, 477~489 (1988)
- 64) Kroll, M. H. and Schafer, A. I.: *Blood*, **74**, 1181~1195 (1989)
- 65) Payne, R., Flores, T. M. and Fein, A.: *Neuron*, **4**, 547~555 (1990)
- 66) Krishnamurthi, S., Patel, Y. and Kakkar, V. V.: *Biochem. J.*, **250**, 209~214 (1988)
- 67) Soslau, G. and Parker, J.: *Blood*, **74**, 984~993 (1989)
- 68) Kume, H., Takagi, K., Satake, T., Tokuno, H. and Tomita, T.: *J. Physiol.*, **424**, 445~457 (1990)
- 69) Ives, H. E. and Daniel, T. O.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 1950~1954 (1987)
- 70) Danthuluri, N. R., Kim, D. and Brock, T. A.: *J. Biol. Chem.*, **265**, 19071~19076 (1990)
- 71) Worley, P. F., Baraban, J. M., Supattapone, S., Wilson, V. S. and Snyder, S. H.: *J. Biol. Chem.*, **262**, 12132~12136 (1987)
- 72) Dettbarn, C. and Palade, P.: *J. Biol. Chem.*, **266**, 8993~9001 (1991)
- 73) Burnstock, G. In Cell Membrane Receptors For Drugs And Hormones: A Multidisciplinary Approach (Eds. Bolis, L. & Straub, R. W.) 107~118 (Raven Press, New York, 1978).



ニトロ多環芳香族炭化水素の酸化と還元：毒性発現機構の解析<sup>#1</sup>福原 潔<sup>#2</sup>・宮田 直樹

## Oxidation and Reduction of Nitroarene as Environmental Mutagens

Kiyoshi Fukuhara<sup>#2</sup> and Naoki Miyata

Newly synthesized dinitrobenzo[a]pyrenes and 6-aza analogues of 1- and 3-nitrobenzo[a]pyrenes showed strong mutagenic activity in *Salmonella* assays (TA98 and TA98NR). Nitroreduction is essential for metabolic activation of nitroarene. The structure activity relationships of mono-, di- and trinitrophenanthrene were studied. Electrochemical ease of nitroreduction and dihedral angles of nitro substituents to aromatic rings is found to be important factor to determine their mutagenic potency. Nitroarene is oxidatively metabolized to form hydroxylated and nitrosubstituted derivatives and the same oxidative products were obtained by the reaction of nitroarene with chemically generated superoxide anion radical, suggesting the participation of superoxide in metabolic oxidation of nitroarene. Catalytic activity of nitroarene as a mediator in the reductive activation of molecular oxygen was also evaluated by using potential step chronocoulometry method. The potential relevance of toxicity caused by redox cycling could be solved by using this method.

**Keywords:** mutagenicity, nitroarene, nitrobenzo[a]pyrene, nitrophenanthrene, superoxide  
(Received May 30, 1997)

## 1. はじめに

ニトロ多環芳香族炭化水素(以下ニトロアレーンと略す)は、有機化合物の燃焼過程で生成する多環芳香族炭化水素がNO<sub>x</sub>によってニトロ化されることによって生成し、強力な発がん性および変異原性を有することから人への影響が注目される化合物である。歴史的には19世紀後半、1-ニトロピレン<sup>1)</sup>と6-ニトロクリセン<sup>2)</sup>が初めて合成されて以来、多くのニトロアレーンが明らかにされてきたが、生物活性に関する研究は、1950年に2-ニトロフルオランテン<sup>3)</sup>の発がん性が報告されるまではほとんど行なわれていなかった。しかし、1975年、Amesらによって開発された変異原性試験によって、ニトロアレーンが酸化代謝活性化酵素を必要としない直接変異原性物質であることが明らかとなり<sup>4)</sup>、また、Pittsらによって、ニトロアレーンは大気中NO<sub>x</sub>によって容易に生成し、環境中に高濃度に存在することが報告されて以来<sup>5)</sup>、多くの研究が展開されてきた。特に、1980年、Rosenkranzらによってコピーのトナー(carbon black)に含まれているピレンのジニトロ体が、アフラトキシンB1に匹敵する非常に強力な変異原物質であることが明らか

となり<sup>6)</sup>、現在、ニトロアレーンは人への影響が最も懸念される環境汚染化学物質として注目されている。ニトロアレーンは、酸化代謝活性化を必要としない直接変異原性物質であり、ニトロ基がヒドロキシルアミノ体に還元的に代謝活性化された後、DNAと付加体を形成することにより毒性を発現する(Fig.1)。しかし、ニトロアレーンの毒性の強さは、ニトロ基が付加している芳香環の種類、ニトロ基の数および付加位置によってかなり異なる。例えば、ピレンのジニトロ体はモノニトロ体と比べて非常に強力な変異原性を示し、その毒性はアフラトキシンB1に匹敵する<sup>7)</sup>。また、ベンツ[a]ピレンの1-および3-ニトロ体は強力な直接変異原性を示すのに対し、6-ニトロ体はほとんど変異原性を示さない<sup>8,9)</sup>。構造活性相関に関する研究は、ニトロ基の還元代謝機構の解析を中心に展開されている。しかし、良い化学的な相関は得られていない。更に、最近、ニトロアレーンの生体内での毒性発現には、酸化代謝反応も関与していることが明らかにされた<sup>8)</sup>。例えば、1-ニトロピレンは、母核が水酸化代謝されると変異原性が増加することが知られている<sup>10)</sup>。

筆者らは、ニトロアレーンの毒性発現に影響を与える構造化学的因子を明らかにし、毒性発現機構の予測と解析を行なうことを目的として、新規ニトロアレーンおよびニトロアザアレーンを合成し、ニトロ基の還元代謝活性化に影響を与えるニトロ基の還元特性と立体効果を明らかにした。また、母核の水酸化代謝反応の酸化活性種を明らかに

<sup>#1</sup> 本総説は学位論文「ニトロ多環芳香族炭化水素の酸化と還元—毒性発現機構の解析—」(東京大学大学院薬学系研究科博士号, 1995.4)の内容の一部を要約したものである。

<sup>#2</sup> To whom correspondong should be addressed: Kiyoshi Fukuhara; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo 158, Japan; Tel: 03-3700-1141ext223; Fax: 03-3707-6950; E-mail: fukuhara@nihs.go.jp

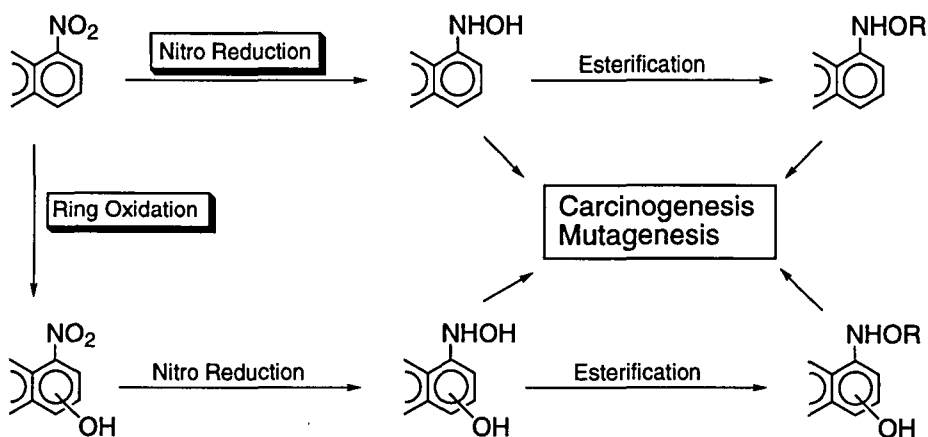


Fig. 1. Possible metabolic pathways for nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons

し、水酸化反応機構の特徴と反応機構の解析を行なった。さらに、ニトロアレンによるスーパーオキシドの生成反応を明らかにしキノンと比較した。以上の結果について、概説する。

## 2. ニトロ基の還元特性と変異原性<sup>11-14)</sup>

ディーゼル排ガス等の汚染源によって大量に排出されている多環芳香族炭化水素は、大気中のNO<sub>x</sub>と反応してニトロ体が生成する。ピレンは硝酸等によるニトロ化反応によりモノおよびジニトロ体が生成する。これらは大気中に存在し、ジニトロ体は最も強力な変異原性物質であることが明らかとなっている。一方、大気中高濃度に存在するベンツ[a]ピレンも、ピレンと同様にNO<sub>x</sub>により種々のニトロ体の生成が予測される。しかし、ベンツ[a]ピレンのニ

トロ体に関する研究報告はモノニトロ体に限られている。筆者らは、ベンツ[a]ピレンのポリニトロ化反応を試み、ジニトロ体を新規に合成した。更に、変異原性と還元特性の解析を行なった。ベンツ[a]ピレンをピレンと同様、濃硝酸によるニトロ化反応を行なったところ、1,6-及び3,6-ジニトロ体が生成した。1,6-及び3,6-ジニトロベンツ[a]ピレンは有機溶媒中、非常に不安定な化合物である。この性質は、6位のニトロ基がペリ位（5位及び7位）のプロトンによる立体障害<sup>15)</sup>の影響で非常に不安定な状態であることに起因していることが考えられる。そこでジニトロ化反応混合物は、NaSHにより1位及び3位のニトロ基をアミノ体を選択的に還元してより安定な1-アミノ-6-ニトロ体と3-アミノ-6-ニトロ体に変換後、各異性体の単離生成を行なった。さらにアミノ基はジアゾニウム塩を経由して

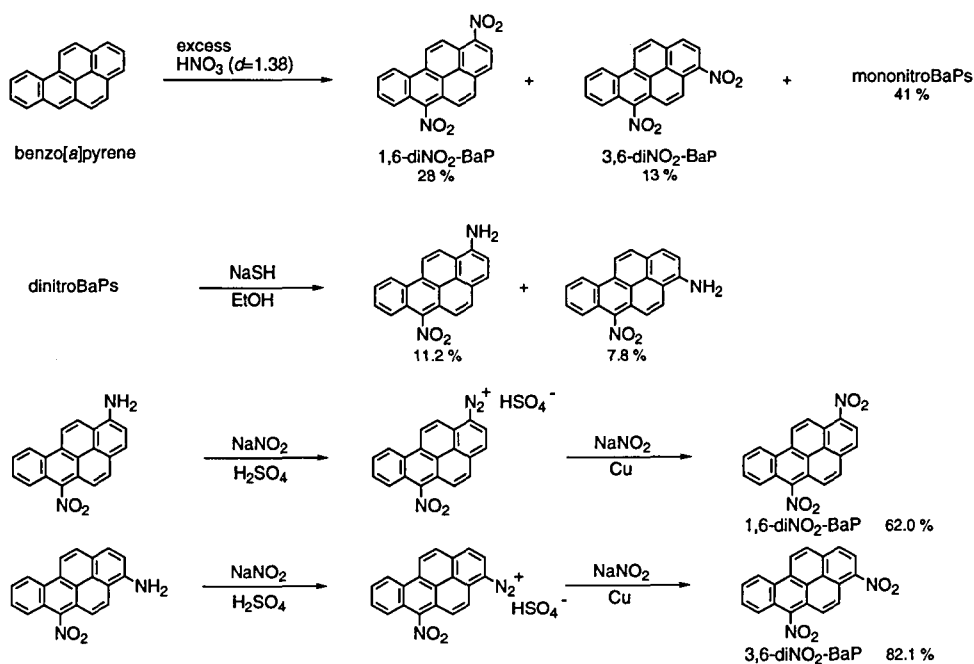


Fig. 2. Synthesis of 1,6- and 3,6-dinitrobenzo[a]pyrene

1,6-及び3,6-ジニトロ体へと変換した (Fig. 2). 1,6-及び3,6-ジニトロベンツ[a]ピレンの変異原性 (*Salmonella typhimurium* TA98及びTA98NR, -S9) と電気化学的の一電子目 (E1 (1/2)) と二電子目 (E2 (1/2)) の還元のされやすさをモノニトロベンツ[a]ピレン及びジニトロピレンと比較した (Table 1). その結果, ジニトロベンツ[a]ピレンは, TA98及びTA98ニトロレダクターゼ欠損株 (TA98NR) でモノニトロベンツ[a]ピレンと比べて強力な変異原性を示し, その強さは1,6-及び1,8-ジニトロピレンに匹敵した. 化学的には二電子還元性が増加し, ニトロソ体へ容易に還元されやすいことが明らかとなった. ジニトロベンツ[a]ピレンの6位のニトロ基は, 立体障害により化学的, 生物的にも反応性が低い. 新規に合成したジニ

トロベンツ[a]ピレンのニトロ基の還元は, 1位または3位のニトロ基に選択的に進行する. そのため, ジニトロベンツ[a]ピレンの強力な変異原性は, 6位のニトロ基の置換基効果が1位又は3位のニトロ基の還元性を増加させ, 還元代謝反応を起きやすくしていることによると考えられた. 6位のニトロ基の置換基効果を明らかにする為に合成した, 1-及び3-ニトロベンツ[a]ピレンの6位にシアノ基を導入してニトロ基の還元性を増加させたシアノニトロベンツ[a]ピレンは, ジニトロベンツ[a]ピレンと類似した還元特性と強力な変異原性を示した (Table 1). この結果よりジニトロベンツ[a]ピレンの強力な変異原性は, 1-及び3-ニトロベンツ[a]ピレンと比べて1位および3位のニトロ基の化学的な還元性が増加した結果であること, 更に, ニト

Table 1. Mutagenicity and reduction potentials of nitrobenzo[a]pyrenes and nitropyrenes

compounds	mutagenicity of <i>Salmonella typhimurium</i> strains (rev/nmol/plate)		electrochemical reduction potentials (-mV vs SCE)	
	TA98	TA98NR	E1(1/2)	E2(1/2)
1-NO <sub>2</sub> -BaP	653	113	915	1 420
3-NO <sub>2</sub> -BaP	1370	238	921	1 459
6-NO <sub>2</sub> -BaP	0	0	1 020	1 360
1,6-diNO <sub>2</sub> -BaP	1 500	308	645	645
3,6-diNO <sub>2</sub> -BaP	137 000	87 600	665	665
1-NO <sub>2</sub> -6-CN-BaP	43 100	17 400	691	1 026
3-NO <sub>2</sub> -6-CN-BaP	174 000	50 200	688	1 031
1-NO <sub>2</sub> -pyrene	484	49	972	1 580
1-NO <sub>2</sub> -3-CN-pyrene	39 900	1 960	758	1 352
1-NO <sub>2</sub> -6-CN-pyrene	28 300	2 640	786	1 204
1-NO <sub>2</sub> -8-CN-pyrene	102 000	16 900	785	1 210
1,3-diNO <sub>2</sub> -pyrene	130 000	17 000	684	1 242
1,6-diNO <sub>2</sub> -pyrene	60 000	63 000	707	755
1,8-diNO <sub>2</sub> -pyrene	140 000	190 000	699	778

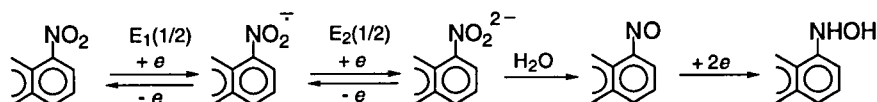
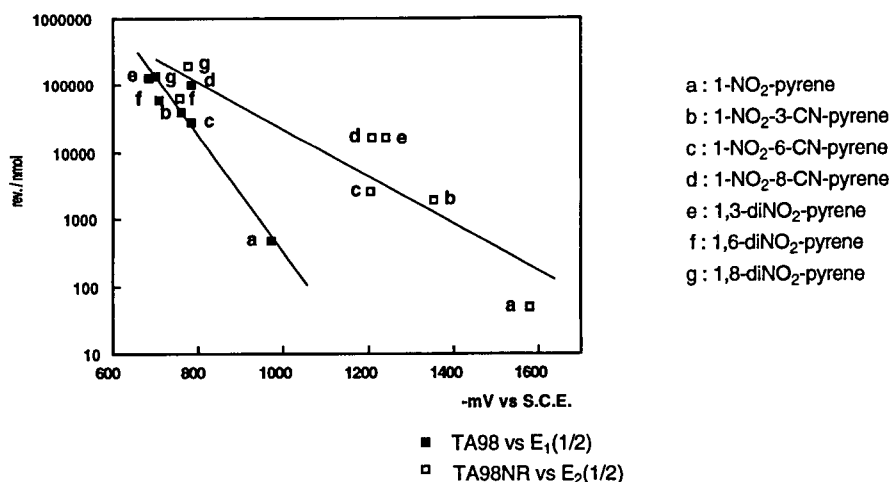


Fig. 3. Correlation between reduction potentials and mutagenicity of nitropyrenes and 1-nitrocyanopyrenes



ロ基の還元代謝活性化反応は、化学的なニトロ基の還元されやすさと相関することが明らかとなった。

ピレンの1,6-及び1,8-ジニトロ体はTA98で強力な変異原性を示し、TA98ニトロレダクターゼ欠損株 (TA98NR) でも同程度の変異原性を維持している。一方、1,3-ジニトロピレンのTA98NRでの変異原性はTA98の約10分の1程度に低下する。ピレンの1,3-ジニトロ体の化学的な一電子還元性は、1,6-及び1,8-ジニトロ体と同程度に還元されやすいが、二電子目の還元は起きにくく、この化学的還元性の違いがTA98NRでの変異原性の違いに影響していることが考えられる。そこで変異原性と還元特性との相関を化学的に解析することを目的として、1-ニトロピレンの3位、6位及び8位にシアノ基を導入した1-ニトロピレンのシアノ誘導体を合成し、1,3-,1,6-及び1,8-ジニトロピレンと一電子及び二電子還元性と変異原性を比較した。その結果、1-ニトロピレンのシアノ誘導体は、1,3-ジニトロピレンと類似した一電子及び二電子還元性とTA98及びTA98NRでの変異原性を示すことが明らかとなった。この結果は、一電子目の還元性がTA98の変異原性と相関すること、更に二電子目の還元性がTA98NRと相関することを示している (Fig.3)。

TA98によるニトロ基の還元代謝反応はクラシカルニトロレダクターゼによって進行し、その還元活性は強い。その為、ニトロアレーンの人に対する毒性の強さは、クラシカルニトロレダクターゼが欠損し、還元活性が低いTA98NR<sup>16)</sup>での変異原性の強さが指標となることが考えられる。一方、ニトロレダクターゼによるニトロアレーンの還元代謝反応は、好氣的条件下、阻害されることが明らかとなっている<sup>17)</sup>。これはニトロアレーンが一電子還元によって生成するニトロアレーンアニオンラジカルは、酸素が存在すると酸素への電子移動反応が進行して還元代謝が阻害さ

れていることを意味している。その為、ニトロ基の還元代謝活性化には一電子還元後速やかに二電子目の還元反応が進行して、ニトロソ体が生成することが必須であり、化学的な二電子還元のされやすさが毒性発現に重要であることが考えられる。化学的な二電子還元のされやすさとTA98NRでの変異原性の強さが相関したことは、ニトロアレーンの人への毒性の評価には、化学的な二電子還元性の解析が有効であることを示しており、この結果は新規に合成したジニトロベンツ[a]ピレンが1,6-及び1,8-ジニトロピレンと同様に人に対しても強い毒性を示すことを示唆している。

### 3. ニトロ-6-アザベンツ[a]ピレンの合成と変異原性<sup>18-22)</sup>

環境中には、多環芳香族炭化水素の母核に窒素原子が導入された多くの含窒素多環芳香族炭化水素(アザアレーン)の存在が明らかになっている<sup>23-26)</sup>。アザアレーンがNO<sub>x</sub>と反応してニトロ体が生成すると、母核の窒素原子の電子効果によりニトロ基の化学的還元性が増加して、強力な変異原性を示すことが予測される。大気試料中の塩基性画分はTA98で非常に強力な直接変異原性を示すことから、この画分中でのニトロアザアレーンの存在が示唆される。しかし、ニトロアザアレーンに関する研究は、4-ニトロキノリン-N-オキシド<sup>27,28)</sup>を除いてはほとんど行なわれていない。そこで筆者らは、1-及び3-ニトロベンツ[a]ピレンの6-アザ体及びそのN-オキシド体を新規に合成し、構造と変異原性との相関を解析した。6-アザベンツ[a]ピレンはペリナフテノン为原料として3工程で合成した (Fig.4)。また、そのN-オキシド体をニトロ化することにより、1-及び3-ニトロ体を合成した (Fig.5)。合成した1-及び3-ニトロ-6-アザベンツ[a]ピレンとそのN-オキシド体の一電子及び二電子還元性は、母核がN-オキシド体>6-アザ体

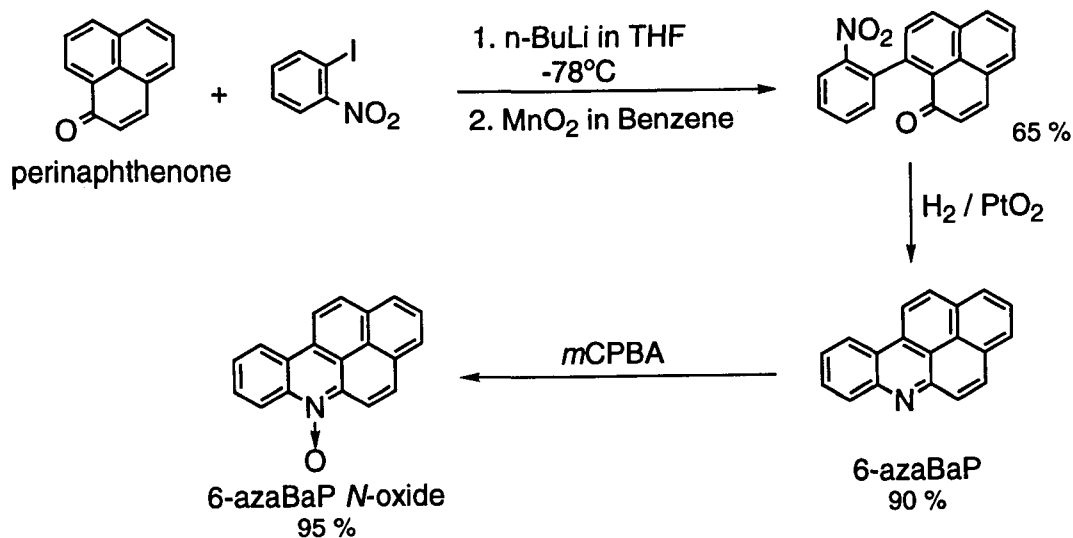


Fig. 4. Synthesis of 6-azabenz[a]pyrene and its N-oxide

Table 2. Mutagenicity and reduction potentials of nitroazabenz[a]pyrenes and their N-oxides

compounds	mutagenicity of <i>Salmonella typhimurium</i> strains (rev/nmol/plate)		electrochemical reduction potentials (-mV vs SCE)	
	TA98	TA98NR	E1 (1/2)	E2 (1/2)
1-NO <sub>2</sub> -BaP	653	113	915	1 420
3-NO <sub>2</sub> -BaP	1 370	238	921	1 459
6-NO <sub>2</sub> -BaP	0	0	1 020	1 360
1,6-diNO <sub>2</sub> -BaP	1 500	308	645	645
3,6-diNO <sub>2</sub> -BaP	137 000	87 600	665	665
1-NO <sub>2</sub> -6-azaBaP	105 000	105 000	756	1 101
3-NO <sub>2</sub> -6-azaBaP	104 000	92 000	758	1 154
1-NO <sub>2</sub> -6-azaBaP N-oxide	36 100	38 600	657	978
3-NO <sub>2</sub> -6-azaBaP N-oxide	396 000	427 000	665	1 026

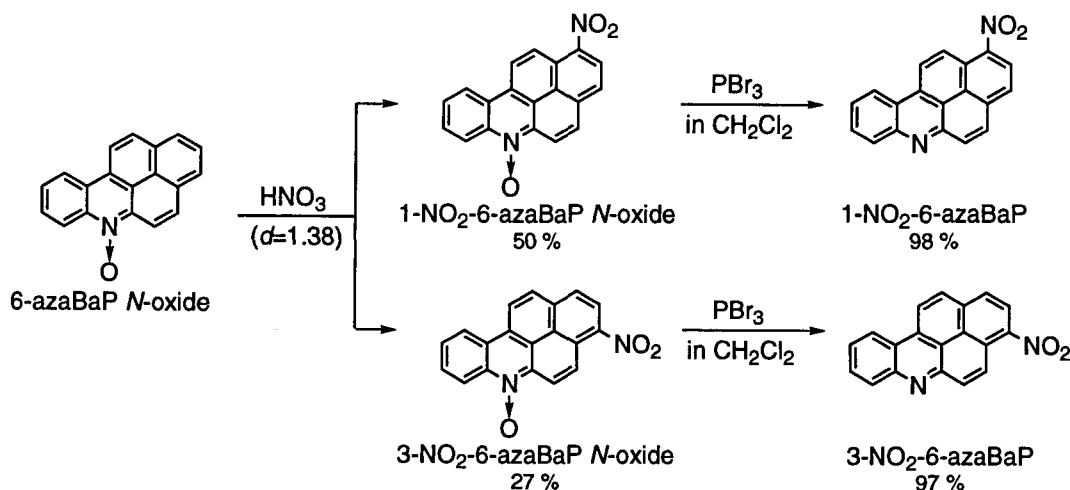


Fig. 5. Synthesis of 1- and 3-nitro-6-azabenz[a]pyrenes and their N-oxides

>ベンツ[a]ピレンの順で増加し、特にN-オキシドのニトロ体はジニトロベンツ[a]ピレンと同程度に一電子還元されやすいことが明らかとなった (Table 2)。また、変異原性試験によりこれらの化合物は、TA98で、1-及び3-ニトロベンツ[a]ピレンと比べ、40~170倍強い直接変異原性を示した。また、ニトロレクターゼ欠損株 (TA98NR) でも変異原性の低下は見られなかった。特に3-ニトロ-6-アザベンツ[a]ピレン N-オキシドは TA98で396,000rev/nmol, TA98NRで427,000rev/nmol という強力な変異原性を示し、3,6-ジニトロベンツ[a]ピレンやジニトロピレン類よりもさらに強力な変異原物質であることが明らかとなった。今回合成した1-及び3-ニトロベンツ[a]ピレンの6-アザ体とそのN-オキシド体は、母核に導入した窒素原子の効果によりニトロ基の化学的な還元性が増加している。その結果、ニトロ基のニトロソ体への還元代謝活性化反応

が起きやすくなり、強力な変異原性を示したことが推定される。

大気試料中、ニトロアレーンはそのほとんどが中性画分に含まれている。しかし、強力な直接変異原性を示す塩基性画分に関しては、その成分は全く明らかにされていなかった。環境中濃度を検討した結果、これらの新規化合物は大気中に存在していることが明らかとなった (Table 3)。本研究でニトロアザベンツ[a]ピレンが塩基性画分に存在していること、また、環境中にはアザフェナンスレンやベンズアントラセン、アザピレン等の多くのアザアレーンの存在が明らかとなっていることを考えると、種々のニトロアザアレーンは環境中のアザアレーンが NO<sub>x</sub> によってニトロ化されることによって生成し、ニトロアレーンよりも更に強力な変異原性や発がん性を示す環境汚染物質として大気中に存在している可能性が示唆される。

Table 3. Concentration of nitrobenzo[a]pyrenes and nitroazabenz[a]pyrenes in diesel emission and airborne particulate

compounds	concentration (ng/g of particulate) in	
	diesel emission	airborne particulate
1-NO <sub>2</sub> -BaP	35.2 (31.7)	20.0 (18.0)
3-NO <sub>2</sub> -BaP	52.3 (50.0)	43.0 (41.0)
1,6-diNO <sub>2</sub> -BaP	ND	ND
3,6-diNO <sub>2</sub> -BaP	2.8 (0.26)	1.8 (0.17)
1-NO <sub>2</sub> -6-azaBaP	2.1 (0.18)	1.1 (0.09)
3-NO <sub>2</sub> -6-azaBaP	2.8 (0.26)	1.2 (0.11)
1-NO <sub>2</sub> -6-azaBaP <i>N</i> -oxide	1.5 (0.13)	0.8 (0.07)
3-NO <sub>2</sub> -6-azaBaP <i>N</i> -oxide	1.1 (0.11)	0.3 (0.03)

( ) : pg/m<sup>3</sup>

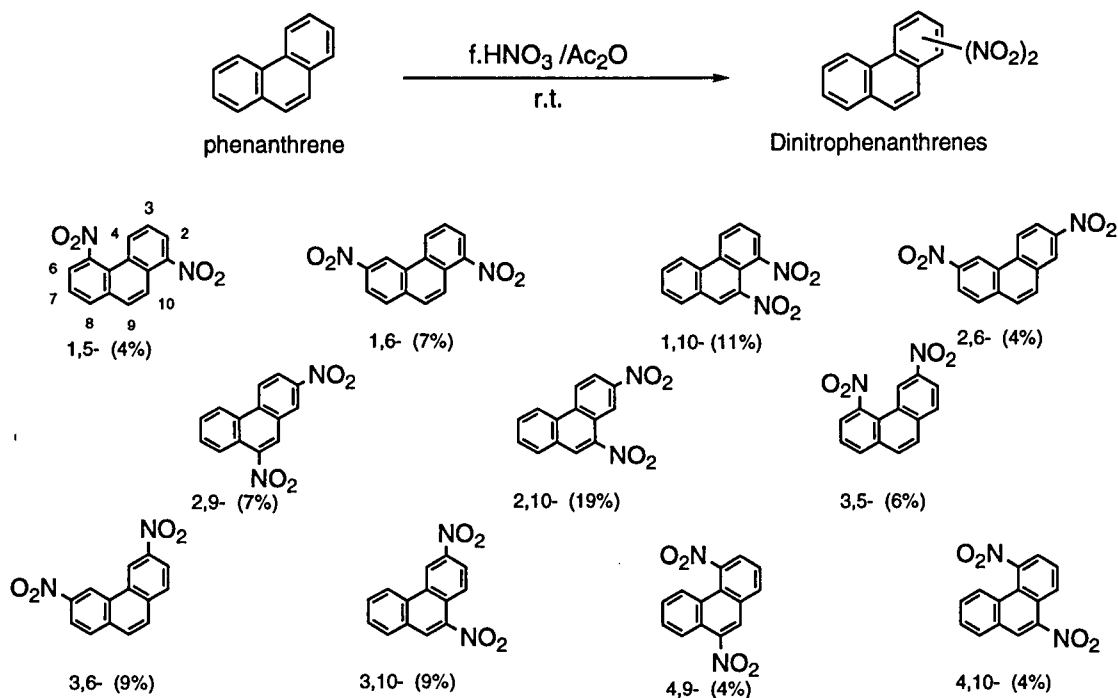


Fig. 6. Synthesis of dinitrophenanthrenes

#### 4. ニトロ基の立体効果と変異原性<sup>12,13,29,30)</sup>

ニトロアレーンの変異原性を化学的に解析することを試み、ニトロ基の一電子及び二電子還元のされやすさがTA98とTA98NRの変異原性の強さと相関することを明らかにしてきた。一方、ベンツ[a]ピレンの1-及び3-ニトロ体と6-ニトロ体は同様の電気化学的な還元特性を示すにもかかわらず、6-ニトロ体はほとんど直接変異原性を示さない。この活性の違いは、6位のニトロ基の還元代謝活性化反応が5位と7位のペリ位のプロトンによる立体障害のた

め起きにくいことで説明される。また、この結果は新規に合成した1,6-及び3,6-ジニトロベンツ[a]ピレンのニトロ基の還元代謝反応が1位および3位のニトロ基に選択的に進行することからも証明される。この様にニトロアレーンの変異原性の化学的な解析には、ニトロ基の還元特性に加えてニトロ基の立体的な構造因子との相関を明らかにすることが必要である。そこで、ニトロ基の還元特性に加えてニトロアレーンの変異原性の強さに影響を与えるもう一つの重要な化学的因子と考えられるニトロ基の立体構造の解析をフェナンスレンのモノ、ジ、およびトリニトロ体で行

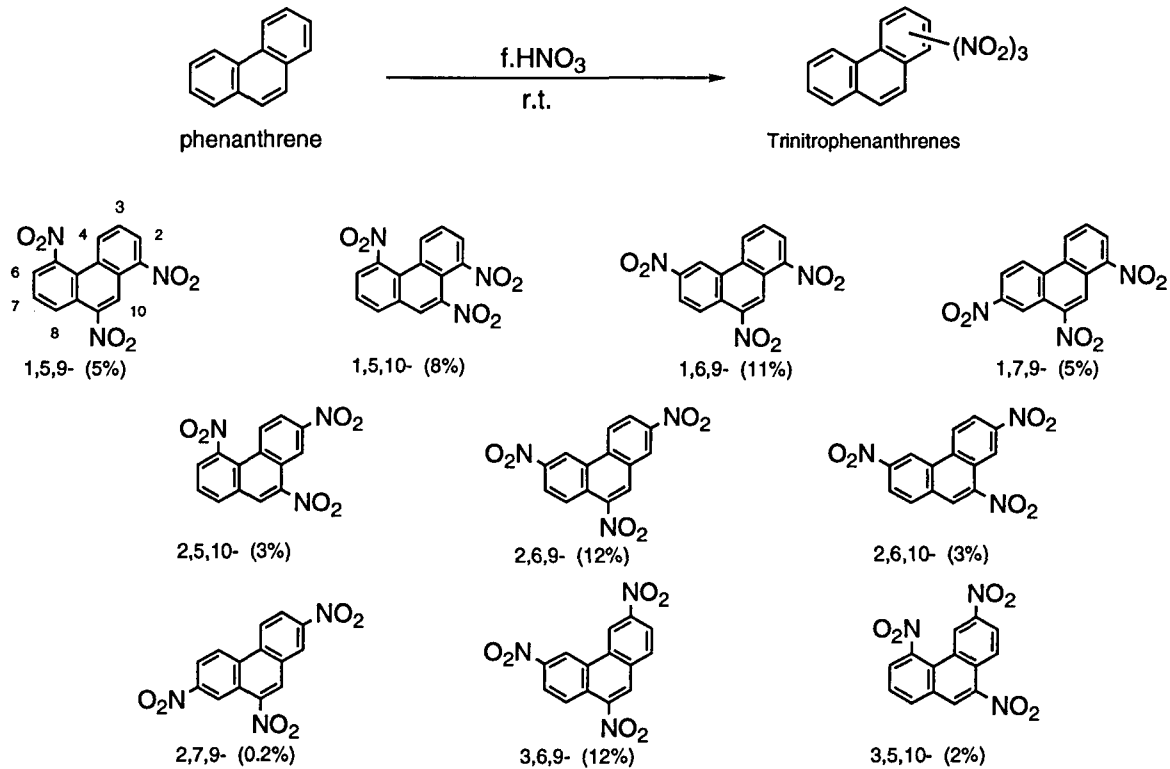


Fig. 7. Synthesis of trinitrophenanthrenes

なった。フェナンスレンのニトロ化は、ニトロ化の条件を調整することにより、ジニトロ体11種（1,5-, 1,6-, 1,10-, 2,6-, 2,9-, 3,5-, 3,6-, 3,10-, 4,9-, 4,10-ジニトロ体）及びトリニトロ体10種（1,5,9-, 1,5,10-, 1,6,9-, 1,7,9-, 2,5,10-, 2,6,9-, 2,6,10-, 2,7,9-, 3,5,10-, 3,6,9-トリニトロ体）を新規に合成し(Fig. 6, 7), ニトロ基の立体構造により変異原性を解析した。

モノ、ジ、及びトリニトロフェナンスレンの変異原性を *Salmonella typhimurium* TA98及びTA100を用いてS9非存在下で行なった。また、分子軌道計算(AM1法)によりモノ、ジ、トリニトロフェナンスレンの最低空軌道(LUMO)及びニトロ基とフェナンスレン骨格との二面角を求めた(Table 4)。その結果、フェナンスレンのニトロ体は、TA98に比べTA100で強力な変異原性を示すことから、塩基対置換型の変異原物質であることが明らかとなった。モノニトロ体では、特に3-ニトロ体が強い変異原性を示した(620rev/nmol)。またジニトロ体では、1,6-, 2,6-, 3,6-及び3,10-ジニトロ体(1,200~2,100rev/nmol)、トリニトロ体では1,7,9-, 2,6,9-及び3,6,9-トリニトロ体(1,200~1,300rev/nmol)が強力な変異原物質であることが明らかとなった。これらの強力な変異原性を有するニトロ体は二面角が小さい。一方、二面角が大きい1,5-, 1,10-, 4,9-及び4,10-ジニトロ体、1,5,9-, 1,5,10-及び3,5,10-トリニトロ体は、変異原性が低いことが明らかとなった。

次にTA100の変異原性の強さをLUMOおよび二面角で

解析した(Fig. 8)。その結果、二面角が小さく平面性がよい化合物が強い変異原性を示すことが明らかとなった。また、二面角が同程度のニトロ体のなかでは、LUMOが低く化学的に一電子還元されやすい3,6-ジニトロ体や1,7,9-トリニトロ体が特に強力な変異原性を示した。一方、二面角は小さいがLUMOが高い1-及び3-ニトロ体や、LUMOは低い二面角が大きい1,5,9-, 1,5,10-及び3,5,10-トリニトロ体は、変異原性が弱いことが明らかとなった。以上の結果より、ニトロフェナンスレンの変異原性の強さは、ニトロ基の化学的な還元されやすさに加えてニトロ基の立体的な因子が大きく影響し、二面角が小さくニトロ基がフェナンスレン骨格と平面性がよい程、強力な変異原性を示すことが明らかとなった。

立体的な因子による変異原性の低下には主に二つの理由が考えられる。第一は、ニトロ基が還元代謝される段階で二面角が大きいと、ニトロレダクターゼの接近がペリ位の水素などによる立体障害のため阻害されて、還元代謝活性化反応が起き難くなっていること、第二の理由としては、還元代謝活性化後のDNAとの付加反応の阻害が考えられる。ポリニトロ体の場合、例えば、3,5-ジニトロ体と比べて3,5-ジニトロ体の変異原性は大きく低下した。これは、還元代謝活性化を受けることが予測される立体障害が少なく平面性がよい3位のニトロ基のDNAとの付加反応を二面角が大きい5位のニトロ基が阻害していることを意味している。DNAの塩基間の幅は約3.4Å<sup>30)</sup>であり、この大

Table 4. Mutagenicity and physical properties of mono-, di- and trinitrophenanthrenes (NPH, DNPH and TNPH)

compund	TA98	TA10	Epc1	Epc2	LUMO	Dihedral Angles					Sum of Dihedral Angles
						1(8)-	2(7)-	3(6)-	4(5)-	9(10)-	
1NPH	108	329	-1174	-1800	-1.345	16.9					16.9
3NPH	330	620	-1174	-1800	-1.367			0.3			0.3
9NPH	61	438	-1179	-1804	-1.413					11.1	11.1
2NPH					-1.300		2.5				2.5
4NPH					-1.065				85.4		85.4
1,5DNPH	4	5	-1005	-1225	-1.644	39.2			85.8		125.0
1,6DNPH	117	1244	-1077	-1207	-1.937	19.0		0.1			19.1
1,10DNPH	1	2	-965	-1551	-1.767	63.0				64.5	127.5
2,6DNPH	729	1788	-1058	-1202	-1.836		1.9	0.9			2.8
2,9DNPH	3	586	-928	-1176	-1.908		1.7			16.2	17.9
2,10DNPH	117	243	-904	-1178	-1.901		1.0			14.7	15.7
3,5DNPH	70	239	-1042	-1282	-1.735			1.3	86.0		87.3
3,6DNPH	93	2117	-997	-1117	-1.955			0.5, 0.5			1.0
3,10DNPH	107	1367	-914	-1408	-2.006			2.3		16.5	18.5
4,9DNPH	1	2	-905	-1325	-1.883				88.1	24.6	112.7
4,10DNPH	107	160	-961	-1372	-1.850				86.4	23.8	109.4
1,5,9TNPH	168	115	-737	-891	-2.345	38.0			84.0	29.6	151.6
1,5,10TNPH	14	4	-833	-1441	-2.228	53.1			82.2	56.5	191.8
1,6,9TNPH	358	720	-742	-897	-2.528	19.6		2.87		29.2	51.7
1,7,9TNPH	1034	1336	-726	-906	-2.422	20.7	9.1			28.0	57.8
2,5,10TNPH	63	370	-856	-995	-2.186		6.5		83.6	84.2	174.3
2,6,9TNPH	178	1212	-728	-1263	-2.432		0.5	1.5		33.7	35.7
3,5,10TNPH	50	44	-796	-1248	-2.394			8.0	87.9	26.2	122.1
3,6,9TNPH	531	1282	-663	-763	-2.643			0.74, 1.19		20.5	22.4

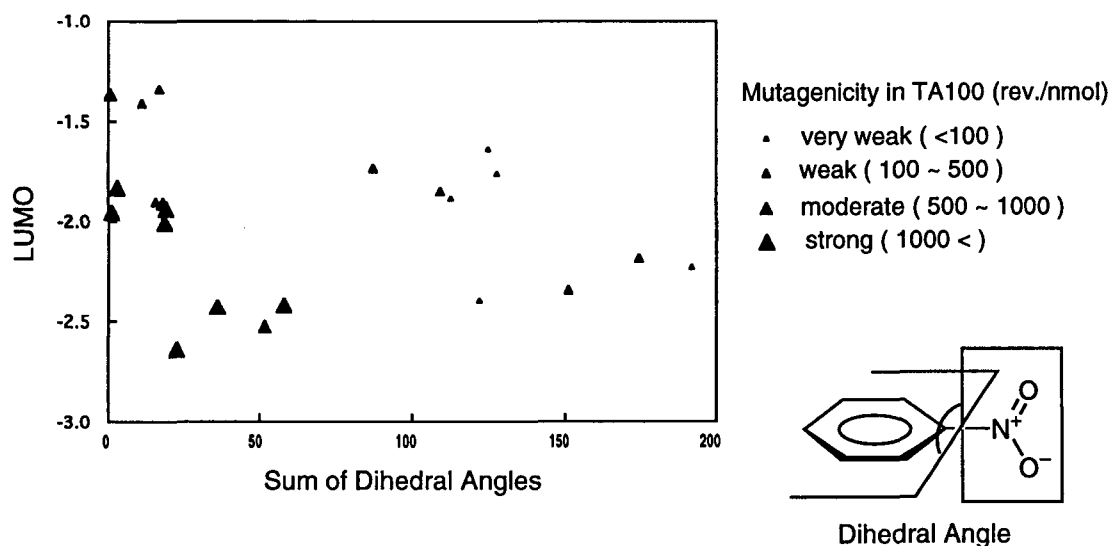
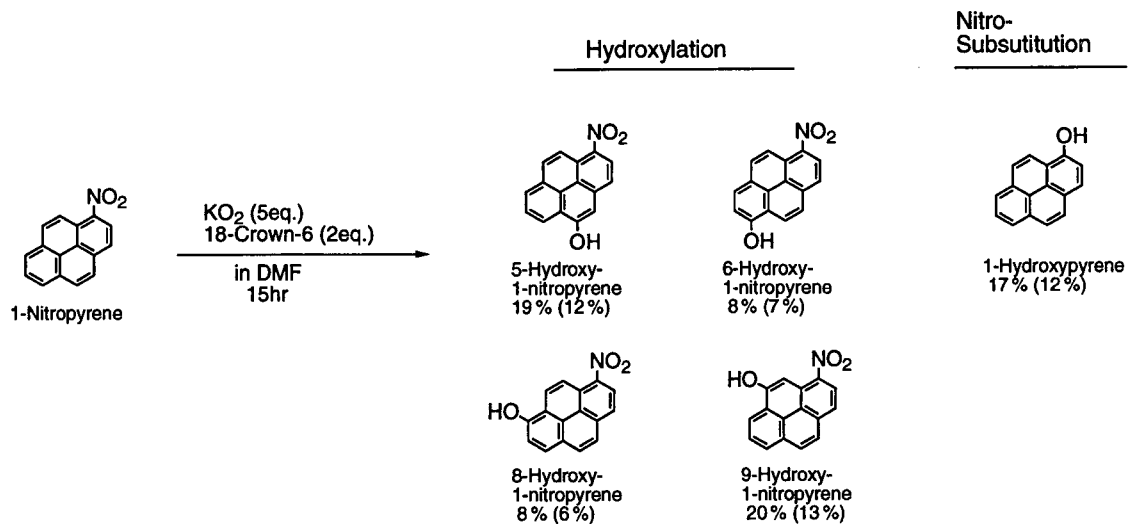


Fig. 8. Effects of LUMO energy and dihedral angles toward mutagenic potencies of mono-, di- and trinitrophenanthrenes





( ): Reaction was run under anaerobic condition for 2hr.

Fig. 9. Oxidation of 1-nitropyrene with  $\text{KO}_2$ /18-crown-6

きはニトロ基の酸素原子間の距離とはほぼ等しい。そのため、還元代謝反応が進行するニトロ基の他に二面角が大きいニトロ基が存在すると、DNA との付加反応はニトロ基が立体障害となって阻害され、変異原性が低下することが考えられる。以上、ニトロアレンの変異原性の強さは、ニトロ基の立体構造に大きく影響すること、一方、同程度の二面角を示すニトロアレンの場合、変異原性の強さはニトロ基の化学的な還元性とよい相関がみられることが明らかとなった。これらの結果より、ニトロアレンの変異原性の発現過程で、ニトロレダクターゼによる還元代謝活性化反応にはニトロ基の化学的な還元されやすさとニトロ基の母核との平面性が、また、DNA との付加反応には分子全体の平面性が変異原活性の強さに影響を与える重要な化学的因子であることが示された。

##### 5. ニトロアレンの水酸化代謝反応の化学的解析<sup>32,33)</sup>

ニトロアレンは、ニトロ基が還元代謝されて変異原性を発現するが、生体内での毒性発現にはニトロ基の還元代謝活性化反応に加え、母核の酸化代謝反応も関与していることが近年明らかとなっている。1-ニトロピレンは、ニトロ基が還元代謝活性化されて変異原性を発現する。しかし、ラット肝 S9 存在下、1-ニトロピレンは酸化代謝が進行して 3 位、6 位、8 位及び 10 位が水酸化されたヒドロキシニトロピレンとニトロ基が水酸基に置換した 1-ヒドロキシピレンが生成すること、また、この酸化代謝体の中に 1-ニトロピレンよりもさらに強力な変異原性を有する化合物が存在することが El-Bayoumy と Hecht らによって報告された<sup>10)</sup>。この結果は、1-ニトロピレンは生体内では水酸化代謝された後、ニトロ基が還元代謝されて毒性を発現する

ことを示唆している。また、Howard らは発癌物質 3-ニトロフルオランテンが肝ミクロソームにより母核の酸化が進行して 1 位、6 位、7 位、8 位及び 9 位の水酸化体が生成し、この水酸化代謝反応が発がん活性化に関与していることを明らかにしている<sup>34)</sup>。このようにニトロアレンは酸化酵素によって容易に水酸化体へと代謝される。しかし、化学的にはニトロアレンはニトロ基の電子吸引効果により非常に酸化反応を受けにくい化合物である。特にニトロアレンの化学的な直接水酸化反応例はほとんどない。

多環芳香族炭化水素の水酸化反応は、直接酵素的に水酸化反応が進行する場合と、エポキシド体へと酸化代謝後、非酵素的に水酸化体へと変換される場合が考えられる。前者の場合、化学的には同様の反応はヒドロキシラジカルによって進行することが考えられる。また後者の場合、エポキシド体の生成は mCPBA 等の過酸化剤で同様の反応が進行する例が多い。1-ニトロピレンは mCPBA によって K 領域のエポキシド体が生成するが、収率は悪く反応に長時間を要する。そこで 1-ニトロピレンの酸化のモデル反応を種々の活性酸素（ヒドロキシラジカル、オキセン、スーパーオキシドなど）を化学的に発生させた系で試みた。その結果、1-ニトロピレンは  $\text{KO}_2$ /18-クラウン-6 の系で発生させたスーパーオキシドによって水酸化反応が容易に進行することが明らかとなり、5 位、6 位、8 位、及び 9 位への直接水酸化体とニトロ基の水酸基への置換体（1-ヒドロキシピレン）が高収率で得られた (Fig. 9)。このうち 6-および 8-ヒドロキシ-1-ニトロピレンと 1-ヒドロキシピレンは、1-ニトロピレンの酸化代謝体として明らかにされており、この結果は生体内での 1-ニトロピレンの酸化代謝反応にスーパーオキシドが関与している可能性を示唆して

いる。次に1-ニトロピレンとスーパーオキシドの反応の特徴を解析した。スーパーオキシドによる水酸化反応は、塩基性非プロトン溶液中（ジメチルホルムアミド）でスーパーオキシドの求核性を高めることによって進行し、ベンゼン中では反応は全く進行しなかった。また、反応はアルゴン置換による嫌氣的条件下で容易に進行し、反応に酸素分子は関与していないことが明らかとなった。一般にスーパーオキシドによる酸化は、1) 求核的に作用して開始される酸化、2) 一電子還元後、酸素分子が付加する酸化、3) 水素引き抜き反応で開始される酸化、の3つの反応機構で進行することが考えられるが、これらの結果より1-ニトロピレンの水酸化反応は、スーパーオキシドが1-ニトロピレンに求核的に反応して進行することが明らかとなった。

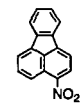
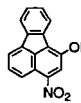
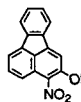
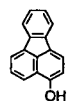
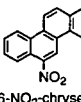
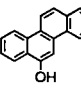
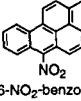
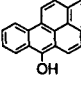
ジニトロピレンは二つのニトロ基の電子吸引効果により、1-ニトロピレンと比べて更に酸化され難い化合物であり、mCPBAやOsO<sub>4</sub>に対しても全く反応が進行しない。一方、スーパーオキシドに対しては容易に反応が進行し、1,3-, 1,6-及び1,8-ジニトロピレンは、それぞれニトロ基の水酸基への置換反応が選択的に進行して3-, 6-及び8-ヒドロキシ-1-ニトロピレンが生成した。ジニトロピレンの二つのニトロ基は電子引き抜きを伴う一般的な酸化反応に対しては不利に働く。しかし、求核的な付加反応によって開始されるスーパーオキシドの酸化に対しては、ジニトロ体は非常に良い基質になることが明らかとなった。

他のニトロアレンとスーパーオキシドとの反応についても検討してみた（Table 5）。その結果、生体内で水酸化代謝後、毒性を発現する環境発がん物質3-ニトロフルオランテン<sup>30</sup>は、母核への直接水酸化反応とニトロ基の水酸基への置換反応が進行して、1-及び2-ヒドロキシ-3-ニトロフルオランテンと3-ヒドロキシフルオランテンが生成した。一方、6-ニトロクリセンや6-ニトロベンツ[a]ピレンは、ニトロ基の水酸基への置換反応が選択的に進行して、6-ヒドロキシクリセン及び6-ヒドロキシベンツ[a]ピレンが生成した。

スーパーオキシドによる水酸化反応は、ニトロアレンに対しての特徴的な反応であり、ニトロ基の付加していないピレンやフルオランテン、ベンツ[a]ピレンはこれらのニトロ体の水酸化反応と同様の条件下、ほとんど反応が進行しなかった。このことは、ニトロ基の電子吸引効果によって電子欠損状態のニトロアレンが、スーパーオキシドによる求核的な水酸化反応の非常によい基質となることを示している。

以上、生体内での酸化反応の作用分子種と考えられる活性酸素種を化学的に発生させ、ニトロアレンの水酸化反応を検討した結果、ニトロアレンはKO<sub>2</sub>/18-クラウン-6の系で発生させたスーパーオキシドによって母核の直接水酸化反応とニトロ基の水酸基への置換反応が進行し、生

Table 5. Oxidation of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons with KO<sub>2</sub>/18-crown-6

entry	substrate	reaction conditions		product	yield (%)
		KO <sub>2</sub> /crown (eq.)	solvent, time		
1	 3-NO <sub>2</sub> -fluoranthene	8 / 2	DMF, 40min		36
					28
					22
2	 6-NO <sub>2</sub> -chrysene	10 / 4	DMF, 4h		65
3	 6-NO <sub>2</sub> -benzo[a]pyrene	10 / 4	DMF, 1h		70

体内での水酸化代謝体と同様の酸化体が生成することが明らかとなった。スーパーオキシドは、生体内ではキサンチンオキシダーゼによって発生し<sup>35</sup>、またチトクローム P450の酸化活性種の一つであること<sup>36</sup>から、スーパーオキシドによるニトロアレンの化学的な酸化反応が、生体内での水酸化代謝反応のモデル反応として有効であること、また、ほかの酸化剤では合成不可能な酸化代謝体の合成とその予測にも有効であることを示している。

## 6. ニトロアレンによるスーパーオキシドの生成反応の解析<sup>37,38</sup>

キノン系化合物によって生じる核酸の酸化的障害は、キノン系化合物が一電子還元酵素及び酸素分子とレドックスサイクルを形成することによって発生したスーパーオキシドによって引き起こされる<sup>39</sup>。すなわち一電子還元酵素によりキノン系化合物が還元されるとラジカル種（セミキノンアニオンラジカル）が生成する。セミキノンアニオンラジカルは、酸素分子と反応すると酸素が還元的に活性化されてスーパーオキシドが発生する。スーパーオキシドは、更にスーパーオキシドジスムターゼなどによる酵素的な反応や遷移金属触媒型 Haber-Weis 反応によって、過酸化水素やヒドロキシルラジカルを発生する。このようにして発生した活性酸素種が核酸に対して、核酸塩基の修飾（8-ヒドロキシグアニンやチミングリコール等の生成）、リボース部位の酸化分解、リン酸エステル鎖の切断等の損傷反応を引き起こすことが明らかとなっている。一方、ニトロ

アレーンのニトロ基の還元代謝活性化反応は好氣的条件下で阻害される<sup>40)</sup>。ニトロアレーンはキノン系化合物と類似した還元特性を示すことから、この阻害反応は、還元代謝過程で生成するアニオンラジカルから酸素分子への一電子移動反応（スーパーオキシドの生成反応）によって引き起こされることが考えられる (Fig.10)。そのため、ニトロアレーンは、キノン系化合物と同様に還元代謝過程で酸素分子とレドックスサイクルを形成してスーパーオキシドを発生することが示唆される。しかし、ニトロアレーンの毒性発現に活性酸素による酸素障害の関与を明らかにしている報告例はない。

キノン系化合物の酸化障害能の構造活性相関は、レドックスサイクルの第一のステップであるキノン系化合物の一電子還元反応を解析することによって明らかにされてきた<sup>41)</sup>。そして一電子還元の際やすさ（アニオンラジカルの生成のしやすさ）がスーパーオキシド発生能と相関することが報告されている<sup>42)</sup>。一方、レドックスサイクルの第二のステップである、セミキノンアニオンラジカルから酸素分子への電子移動反応は、スーパーオキシド生成のための直接的な反応であるにもかかわらず、この電子移動反応の解析はほとんど行なわれていない。そこで筆者らは電気化

学的手法を用いて、キノンおよびニトロアレーンと酸素分子との間の一電子移動反応の解析法を確立し、スーパーオキシドの生成反応の構造化学的な解析を行なった。種々のキノンと酸素分子との間の電子移動のいきやすさを比較する為には、電子移動反応の数値化が必要である。ポテンシャルステップクロノクーロメトリー法 (PSCC 法) は、電位をある値から第2の値にステップしたときに得られる電気量 (Q) の経時変化 (クーロメトリー) を調べる方法であり、電極反応の速度論的パラメータの解析に有効な手法である<sup>42,43)</sup>。そこで PSCC 法を用いて、キノンアニオンラジカルから酸素分子への一電子移動反応によって生じるレドックスサイクルの回数 (ターンオーバー数) を数値化し、キノン化合物のスーパーオキシド生成能を明らかにした。

測定は過塩素酸テトラエチルアンモチウム (0.1M) を支持電解質とした DMF 溶液中で行なった。初期電位は 0 mV に設定し、次いで電位をそれぞれの化合物の一電子還元電位 (Epc1) に250msec ステップした時の還元電気量の経時変化 (Q vs t) を測定した。還元電気量の対時間プロット曲線 (クロノクーログラム) は、Anson プロット (Q vs t<sup>1/2</sup>) 表示法により直線プロットへと変換した後、この直線プロットの勾配 (μC/msec<sup>1/2</sup>) を求めた。実験は、嫌

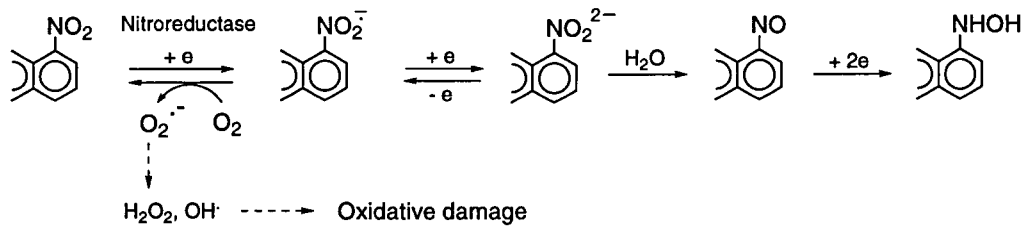


Fig.10. Superoxide generation by nitroarene anion radical with molecular oxygen

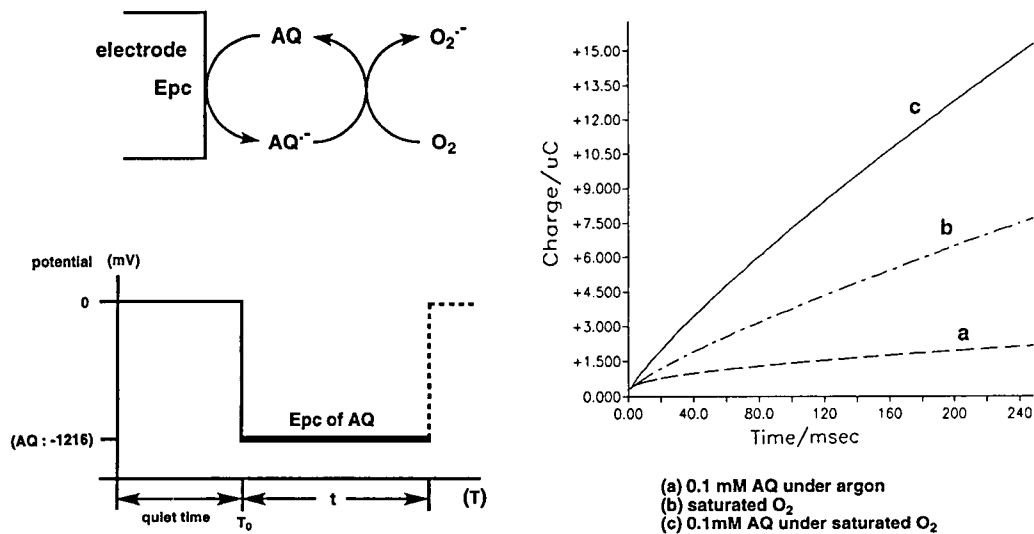


Fig.11. Catalytic activity of anthraquinone anion radical (AQ<sup>•-</sup>) for superoxide generation studied by potential step chronocoulometry (PSCC) technique

**Table 6.** Chronocoulometric data for quinones and nitroarenes in the presence or absence of oxygen: catalytic activity of quinone and nitroarene anion radicals for superoxide generation

compounds	Epc1 <sup>a</sup> (mV vs. Ag/Ag <sup>+</sup> )	Epa1 (mV vs. Ag/Ag <sup>+</sup> )	[S] <sup>b</sup> ( $\mu\text{C}/\text{msec}^{1/2}$ )	[S+O <sub>2</sub> ] <sup>b</sup> ( $\mu\text{C}/\text{msec}^{1/2}$ )	[O <sub>2</sub> ] <sup>b</sup> ( $\mu\text{C}/\text{msec}^{1/2}$ )	Amount of O <sub>2</sub> <sup>-c</sup> (mmol dm <sup>-3</sup> )	Turnover number <sup>d</sup>
<b>QUINONE</b>							
benzoquinone	-812	-731	0.022	0.027	0.006	1	0
1,4-naphthoquinone	-981	-910	0.019	0.037	0.017	3	0
1-OH-anthraquinone	-1052	-982	0.018	0.048	0.030	9	0.1
menadione	-1071	-998	0.018	0.060	0.035	46	0.5
1-Cl-anthraquinone	-1166	-1095	0.020	0.389	0.225	786	7.3
anthraquinone	-1216	-1148	0.018	0.755	0.480	1400	14.1
5,12-naphthacenequinone	-1319	-1252	0.019	1.667	1.087	3060	29.7
<b>NITROARENE</b>							
4-NO <sub>2</sub> -quinoline <i>N</i> -oxide	-1012	-942	0.017	0.041	0.015	43	0.5
1,3-diNO <sub>2</sub> -naphthalene	-1095	-1023	0.018	0.079	0.048	70	0.7
1,7-diNO <sub>2</sub> -naphthalene	-1134	-1065	0.019	0.198	0.107	395	3.9
3-NO <sub>2</sub> -fluoranthene	-1204	-1132	0.019	0.521	0.378	675	6.5
<i>m</i> -diNO <sub>2</sub> -benzene	-1227	-1152	0.018	0.560	0.400	773	7.8
1,6-diNO <sub>2</sub> -naphthalene	-1248	-1178	0.019	0.738	0.550	928	9.2
1-NO <sub>2</sub> -pyrene	-1325	-1257	0.018	1.394	1.086	1580	16.2

<sup>a</sup> Applied potential for PSCC experiment.

<sup>b</sup> The potentials were stepped from 0mV to Epc of compounds. The integrations of current were measured for 250ms with 0.1mM substrate under argon [S], 0.1mM substrate under saturated O<sub>2</sub> [S+O<sub>2</sub>] or saturated O<sub>2</sub> [O<sub>2</sub>] in DMF (1mL) containing 0.1mmol dm<sup>-3</sup> TEAP at a Pt electrode (diam. 1.6mm), and the diffusional slopes of a liner plot (charge vs t<sup>1/2</sup>; Anson plot) were obtained. All values were subtracted by [DMF] as background. The concentration and diffusion coefficient of saturated O<sub>2</sub> in DMF are 4.5 mmol dm<sup>-3</sup> and 4.7 × 10<sup>-5</sup> cm<sup>2</sup>/s.

<sup>c</sup> Amounts of generated superoxide = [S+O] - ([S]+[O]) × 5.45 × 1000.

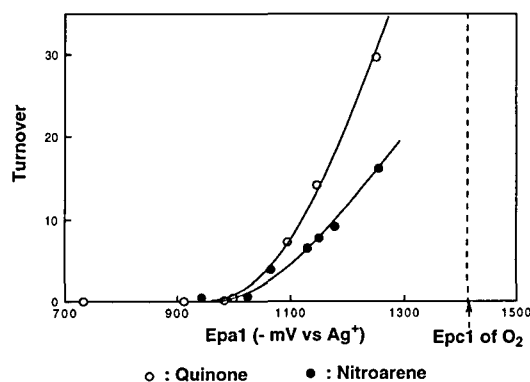
<sup>d</sup> Turnover numbers of redox cycling = ([S+O] - ([S]+[O]))/[S].

氣的条件下および化合物非存在下でも行い、これらの勾配値から化合物のスーパーオキシド生成量とターンオーバー数で表わした触媒能を算出した。アントラキノンの場合、一電子還元電位 (Epc 1) は -1216mV である為、この電位条件下でPSCC法を行なった (Fig. 11)。その結果、酸素飽和条件下、アントラキノン 0.1mM 溶液で測定された電気量 ([S+O<sub>2</sub>] = 0.755 $\mu\text{C}/\text{msec}^{1/2}$ ) は、嫌氣的条件下 ([S] = 0.018 $\mu\text{C}/\text{msec}^{1/2}$ ) およびアントラキノン非存在下 ([O<sub>2</sub>] = 0.480 $\mu\text{C}/\text{msec}^{1/2}$ ) での電気量をはるかに上回ることが示され、アントラキノンアニオンラジカルは酸素分子とレドックスサイクルを繰り返してスーパーオキシドの発生を触媒していることが示された。さらに Anson プロット変換で求めた電流量からスーパーオキシドの発生量は 1400mmol dm<sup>-3</sup>、ターンオーバー数は 14.1 であることが明らかとなった。

同様の実験をニトロアレーンについても行い、キノンと比較した (Table 6)。その結果、ニトロアレーンはキノンと同様に酸素分子への一電子移動反応が進行してスーパーオキシドの生成反応を触媒することが明らかとなった。更にこの電子移動反応は、酸化還元電位のギャップを乗り越えて進行し、酸化還元サイクルを形成することにより触媒的に活性化していること、スーパーオキシドの生成能は化合物に固有の一電子酸化電位 (Epa 1) に依存していることを明らかにした。すなわち、-1000mV ~ -1300mV に酸化電位 (Epa 1) を有するキノンやニトロアレーンは、ア

ニオンラジカルから酸素分子への電子移動反応がみられ、スーパーオキシドの発生を触媒していることが示された。特に酸素の還元電位 (Epc 1 = -1437mV) に近い Epa 1 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 Epa 1 を持つキノンとニトロアレーンと比較したとき、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 60% であった (Fig. 12)。

以上、ニトロアレーンはキノンと同様に好氣的条件下ではスーパーオキシドを発生することが示された。ニトロアレーンによるスーパーオキシドの生成反応は、ニトロアレーンがキノンと同程度の一電子還元性を有していることに



**Fig.12.** Correlation between catalytic activity for superoxide generation and one electron oxidation potentials (Epa 1) of quinone and nitroarene anion radicals

起因していると考えられる。また、ニトロアレンは一電子還元後、二電子目の還元が進行するとニトロソ体が不可逆的に生成する。その為、効率の良いレドックスサイクルの形成にはアニオンラジカルが生成後、二電子目の還元が起きにくいことが必須であると考えられる。このことは、一電子目の還元後、二電子目の還元が起きにくいニトロアレンは、ニトロソ体への還元代謝活性化機構を伴う毒性は弱い、好氣的条件下では酸素分子とレドックスサイクルを形成してスーパーオキシドを生成するため、酸素毒性を示すことが予測される。一方、TA98で強力な変異原性を示すニトロアレンは、化学的には一電子還元後、速やかに二電子還元反応が進行してニトロソ体を生成する為、ニトロ還元酵素による還元代謝活性化は酸素分子で阻害されにくく、好氣的条件下でも酸素毒性は低いことが予測される。

## 7. ま と め

ニトロ多環芳香族炭化水素 (ニトロアレン) はニトロ基の効果により無置換の多環芳香族炭化水素とはかなり異なった構造化学的特徴及び酸化還元特性を有し、この化学的特性が毒性の発現に大きく影響していることが考えられる。ニトロアレンはニトロ基が還元代謝活性化された後、DNA と付加体を形成して変異原性を発現する。ニトロ還元酵素によるニトロ基の還元反応は、化学的な一電子および二電子還元性に大きく影響し、特に二電子還元性が高くニトロソ体に還元されやすいニトロアレンがニトロレダクターゼ欠損株 (TA98NR) で強力な変異原性を示したことは、この二電子還元特性を有しているニトロアレンが人に対して強力な毒性を示す可能性が示唆される。また、ニトロ基の立体的な特徴がニトロ基の還元と DNA への付加反応に大きく影響していることが示唆された。すなわち、ニトロ基のペリ位の酸素と、ニトロ基の芳香環との二面角の大きさがニトロ還元酵素の接近を阻害していることが考えられた。また、DNA の塩基間の幅は約 3.4 Å であるため、ニトロアレンの平面性が DNA との付加反応に大きく影響し、還元代謝されていないニトロ基の二面角が大きいと付加反応が阻害されることが考えられた。なお新規に合成した、3,6-ジニトロベンツ[a]ピレン、6-アザベンツ[a]ピレンの1-及び3-ニトロ体およびそのN-オキシド体は、大気中に存在する環境汚染物質であることが明らかとなった。特にアザベンツ[a]ピレンのニトロ体が非常に強力な変異原性を示したことから、大気中に大量に存在している種々のアザアレンがニトロ化されると強力な変異原性を示すことが予測され、環境汚染物質としてのニトロアザアレンの重要性が示唆された。

ニトロアレンは、ニトロ基の還元代謝に加えて、近年、生体内では母核の水酸化代謝反応が毒性発現に関係していることが明らかにされている。種々の活性酸素のうち

スーパーオキシドが唯一ニトロアレンを水酸化すること、またスーパーオキシドは、P450やキサンチンオキシダーゼの酸化活性種であることから、ニトロアレンの生体内での水酸化代謝反応にスーパーオキシドが関与している可能性が考えられた。

またニトロアレンがキノンと類似した酸化還元特性を示すことからニトロアレンの毒性としてスーパーオキシドによる酸素毒性を予測した。ニトロアレンは、嫌氣的条件下ではニトロ基はニトロ還元酵素によって、ニトロソ体、ヒドロキシルアミノ体へと還元されて、DNA と付加することによって毒性を発現する。一方、好氣的条件下では、このニトロ還元酵素によるニトロ基の還元は阻害される。しかし、この阻害反応はニトロアニオンラジカルから酸素分子への一電子移動反応によってスーパーオキシドの生成を引き起こしている可能性が示唆された。

以上、ニトロアレンについてニトロ基の還元反応と母核の酸化反応を研究し、反応および構造化学的因子の有機化学的解析が毒性評価に有効であること、化学的な活性酸素発生系が酸化代謝体の予測に有効であること、毒性発現に活性酸素が関与する可能性が予測されることなどを明らかにした。これらの結果は、ニトロアレンの毒性発現機構の解析と予測に有効な知見を与えると考えられる。

## 謝 辞

本研究遂行に際し、ご協力を頂いた、前福岡県保険環境研究所常磐寛博士 (現九州女子大学教授)、福岡県保険環境研究所世良暢之博士に深く感謝いたします。また、本研究総括に際し、適切にご指導、ご鞭撻を賜りました前東京大学薬学部教授廣部雅昭博士に謹んで感謝致します。

## 文 献

- 1) Graebe, C.: *Liebigs Ann.*, **158**, 292 (1871)
- 2) Schmidt, J.: *J. Prakt. Chem.*, **9**, 250 (1874)
- 3) Morris, H. P., Dubnik, C. S. and J. M. Johnson, J. M.: *Natl. Cancer Inst.*, **10**, 1201 (1950)
- 4) McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E. and Ames, B. N.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 5135~5139 (1975)
- 5) Pitts, Jr., J. N., van Cauwenberghe, K. A., Grosjean, D., Schmid, J. P., Fitz, D. R., Belser, Jr., W. J., Knudson, G. B. and Hynds, P. M.: *Science*, **202**, 515~519 (1978)
- 6) Rosenkranz, H. S., McCoy, E. C., Sanders, D. R., Butler, M., Kiriazides, D. K. and Mermelstein, R.: *Science*, **209**, 1039~1043 (1980)
- 7) Mermelstein, R., Kiriazides, D. K., Butler, M., McCoy, E. C. and Rosenkranz, H. S.: *Mutat. Res.*, **89**, 187~196 (1981)
- 8) Pitts Jr., J. N., Zielinska, B. and Harger, W. P.: *Mutat. Res.*, **140**, 81~85 (1984)
- 9) Chou, M. W., Heflich, R. H., Caciono, D. A., Miller, D. W., Freeman, J. P., Evans F. E. and Fu, P. P.: *J. Med. Chem.*, **27**, 1156~1161 (1984)
- 10) El-Bayoumy, K. and Hecht, S. S.: *Cancer Res.* **43**, 3132~3137 (1983)

- 11) Fukuhara, K., Miyata, N., Matsui, M., Matsui, K., Ishidate, Jr. M. and Kamiya, S.: *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 3158~3161 (1990)
- 12) Fukuhara, K., Takei, M., Kageyama, H., Kusuma, M. and Miyata, N.: *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **39**, P- 3 (1993)
- 13) Iwata, N., Fukuhara, K., Suzuki, K., Miyata N. and Takahashi, A.: *Chem.-Biol. Interactions*, **85**, 187~197 (1992)
- 14) Drummond, L., Ohno, Y., Fukuhara, K., Miyata N. and Takahashi, A.: *Eisei Shikenjo Hokoku*, **110**, 7~14 (1992)
- 15) Miller, D. W., Evans, F. E. and Fu, P. P.: *Spectros. Int. J.*, **4**, 91 (1985)
- 16) Yamada, M., Espinosa-Aguirre, J. J., Watanabe, M., Matsui, K., Sofuni, T. and Nohmi, T.: *Mutat. Res.*, **375**, 9~17 (1997)
- 17) Djuric, Z., Potter, D. W., Heflich, R. H. and Beland, F. A.: *Chem.-Biol. Interactions*, **59**, 309 (1986)
- 18) Fukuhara, K., Hakura, A., Sera, N., Tokiwa H. and Miyata, N.: *Chem. Res. in Toxicology*, **5**, 149~153 (1992)
- 19) Fukuhara, K., Miyata N. and Kamiya, S.: *Tetrahedron Lett.*, **31**, 3743~3744 (1990)
- 20) Sera, N., Fukuhara, K., Miyata, N., Horikawa K. and Tokiwa, H.: *Mutat. Res.*, **280**, 81~85 (1992)
- 21) Sera, N., Kai, M., Horikawa, K., Fukuhara, K., Miyata N. and Tokiwa, H.: *Mutat. Res.*, **263**, 27~32 (1991)
- 22) Sera, N., Fukuhara, K., Miyata N. and Tokiwa, H.: *Mutagenesis*, **9**, 47~52 (1994)
- 23) M. Seixas, G., Andon, B. M., Hollingshead, P. G., and Thilly, W. G.: *Mutat. Res.*, **102**, 201~212 (1982)
- 24) Kosuge, T., Zenda, H., Nukaya, H., Terada, A., Okamoto, T., Shudo, K., Yamaguchi, K., Iitaka, Y., Sugiura, T., Nagao, M., Wakabayashi, K., Kosugi, A., and Saito, H.: *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 1535~1538 (1982)
- 25) Ho, C-H., Clark, B. R., Guerin, M. R., Barkenbus, B. D., Rao, T. K., and Epler, J. L.: *Mutat. Res.*, **85**, 335~345 (1981)
- 26) Shinohara, R., Kido, A., Okamoto, Y. and Takeshita, R.: *J. Chromatogr.*, **256**, 81~91 (1983)
- 27) Ochiai, E.: *Aromatic Amine Oxides*, Amsterdam: Elsevier, 1967
- 28) Tada, M., Kohda, K. H., and Kawazoe, Y.: *Jpn. J. Cancer Res.*, **75**, 976~985 (1984)
- 29) Fukuhara, K., Takei, M., Kageyama H. and Miyata, N.: *Chem. Res. in Toxicology*, **8**, 47~54 (1995)
- 30) Sera, N., Fukuhara, K., Miyata, N. and Tokiwa, H.: *Mutat. Res.*, **349**, 137~144 (1995)
- 31) Drew, H. R., Wing, R. M., Takano, T., Broka, C., Tanaka, S., Itakura, K. and Dickerson, R. E.: *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 2179~2183 (1981)
- 32) Fukuhara, K. and Miyata, N.: *Chem. Res. in Toxicology*, **8**, 27~33 (1995)
- 33) Imaida, K., Uneyama, C., Ogasawara, H., Hayashi, S., Fukuhara, K., Miyata, N. and Takahashi, M.: *Cancer Research*, **52**, 1542~1545 (1992)
- 34) Howawd, P. C., Flammang, T. J. and Beland, F. A.: *Carcinogenesis*, **6**, 243~249 (1985)
- 35) 中野稔, 浅田浩二, 大柳善彦編, “活性酸素-生物での生成・消去・作用の分子機構”, 共立出版 (1988)
- 36) Johansson, I. and Ingelman-Sundberg, M.: *J. Biol. Chem.*, **258**, 7311~7316 (1983)
- 37) Fukuhara, K. Hara Y. and Miyata, N.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 955~956 (1994)
- 38) Fukuhara, K., Hara Y. and Miyata, N.: *un Oxygen Radicals*, ed. Yagi, K., Kondo, M. Niki E. and Yoshikawa, T. Elsevier, Amsterdam, 11~14 (1992)
- 39) Monks, T. J., Hanzlik, R. P., Cohen, G. M., Ross, D. and Graham, D.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **112**, 2~16 (1992)
- 40) Wardman, P. and Clarke, E. D.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **67**, 1267~1274 (1975)
- 41) O'Brin, P. J.: *Chem.-Biol. Interact.*, **80**, 1~41 (1991)
- 42) O'Dom G. W. and Murray, R. W.: *Anal. Chem.*, **39**, 51~54 (1967)
- 43) Anson, F. C.: *Anal. Chem.*, **38**, 54~57 (1966)

## 89農薬の有機溶媒中での安定性について

根本 了<sup>#</sup>・高附 巧・佐々木久美子・豊田 正武

## Studies on the stability of 89 pesticides in organic solvent

Satoru Nemoto<sup>#</sup>, Satoshi Takatsuki,  
Kumiko Sasaki and Masatake Toyoda

The stability of 89 pesticides (17 organochlorine, 33 organophosphorus, 8 pyrethroid, 12 carbamate, and 19 other pesticides) in 6 kinds of organic solvents (methanol, ethanol, 2-propanol, ethyl acetate, n-hexane, and acetone) was investigated using gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). All of the investigated pesticides were stable in all of the tested organic solvents during storage for 6 hours at room temperature in the dark except captafol, captan, phosmet, chinomethionat, and dicofol. However, the decreases of captafol, captan, phosmet, and chinomethionat were observed in methanol. The decreases of captafol, captan, and phosmet were also observed in ethanol. Moreover, the decrease of dicofol was observed in acetone. The decrease of captafol dissolved in methanol at a concentration of 2 µg/ml was faster than those of captan, phosmet, and chinomethionat; the residual captafol was 75% after 30 min of storage.

Dicofol dissolved in acetone also decreased during storage in a refrigerator. 4,4'-dichlorobenzophenone (DCBP) and chlorobutanol were detected in the acetone solution of dicofol after storage. Furthermore, it was found that dicofol was decomposed by acetone at an injection port, and DCBP and chlorobutanol were formed when it was injected into GC with acetone.

**Keywords:** pesticides, stability, degradation, dicofol, GC/MS

(Received May 30, 1997)

## 緒 言

近年、残留農薬の多成分分析の抽出法として超臨界流体抽出 (SFE: Supercritical Fluid Extraction) が注目されている。多くの場合 SFE の抽出効率を上げるためにメタノールなどの有機溶媒のモディファイヤーが試料に直接添加されたり、あるいは抽出流体に混合される<sup>1-5)</sup>。しかし、セライトに農薬を添加し、更にメタノールをモディファイヤーとして直接添加して SFE を行い、農薬の回収率を比較検討したところ、カプタホル、キャプタン、ホスメット及びキノメチオネートでは経時的な回収率の減少が観察された<sup>6)</sup>。この回収率の減少は、抽出管内にメタノールを添加後、抽出開始までの放置時間が長いほど大きかった。また、このような回収率の減少は、水をモディファイヤーに用いた場合には見られなかったことから、保存中にこれらの農薬がメタノールにより分解されたためと推定された。そのため、モディファイヤーとして有機溶媒を用いる場合には、農薬の有機溶媒中での安定性について考慮する必要があると思われる。平原らは、農薬標準溶液の経時的安定

性について、アセトン、酢酸エチル及び n-ヘキサンを用いて検討している<sup>7)</sup>が、メタノールに関しての報告はない。そこで、SFE のモディファイヤーとして一般的に用いられるメタノールを含む各種有機溶媒中での農薬の安定性について検討した。検討には残留基準が設定されている農薬を中心に有機塩素系農薬17種類、有機リン系農薬33種類、ピレスロイド系農薬8種類、カーバメート系農薬12種類及びその他の農薬19種類の合計89種類の農薬を用い、ガスクロマトグラフィー/質量分析法 (GC/MS) で測定した。

## 実験方法

## 1. 試薬、試液

農薬標準品：各農薬標準品は林純薬工業または和光純薬工業製の残留農薬試験用試薬を用いた。Table 1 に検討に用いた農薬を示した。

農薬標準原液：各農薬標準品を n-ヘキサンで溶解して (溶解しにくい場合にはできるだけ少量のアセトンで溶解後 n-ヘキサンで希釈して) 1 mg/ml の濃度に調製し、冷凍庫 (-20℃) に保存した。

農薬標準混液：各農薬標準原液をとり、n-ヘキサンで 10 µg/ml (アセフェート、メタミドフォス及びプロパモカルブは 50 µg/ml) の濃度に調製し、冷凍庫 (-20℃) に保

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed: Satoru Nemoto; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo158, Japan; Tel: 03-3700-1141ext. 334; Fax: 03-3707-6950; E-mail: nemoto@nihs.go.jp

Table 1. Pesticides included in the study and their monitor ions(m/z) for GC/MS (SIM) analysis

Pesticides	Monitor Ion (m/z)	Pesticides	Monitor Ion (m/z)
Organochlorine (17)		Organophosphate (33)	
Aldrin	264.8	Acephate	136.0
α-BHC	218.9	Azinphos-ethyl	160.0
β-BHC	218.9	Azinphos-methyl	160.0
γ-BHC	218.9	Bromophos-ethyl	358.8
δ-BHC	218.9	(E)-Chlorfenvinphos	268.9
Captafol	79.0	(Z)-Chlorfenvinphos	268.9
Captan	79.0	Chlorpyrifos	313.9
Chlorobenzilate	250.9	Chlorpyrifos-methyl	285.9
p,p'-DDD	235.0	Diazinon	179.1
p,p'-DDE	246.0	Dichlorvos	109.0
o,p'-DDT	235.0	Dimethoate	87.0
p,p'-DDT	235.0	Dioxabenzofos	215.9
Dicofol	251.0	Disulfoton	88.0
Dieldrin	262.8	Edifenphos	310.0
Endrin	262.8	EPN	157.0
Heptachlor	271.8	Ethoporphos	157.9
Heptachlor epoxide	352.8	Etrimfos	292.1
Pyrethroid (8)		Fenitrothion	277.0
Cyfluthrin	226.1	Fensulfthion	292.0
Cyhalothrin	181.0	Fenthion	278.0
Cypermethrin	163.0	Malathion	173.1
Deltamethrin	181.0	Methamidophos	94.0
Fenvalerate	167.0	Methidathion	145.0
Flucythrinate	199.1	Parathion	291.0
Fluvalinate	250.0	Parathion-methyl	262.9
Permethrin	183.0	Phenthoate	273.9
Other (19)		Phosalone	181.9
Amitraz	293.2	Phosmet	160.0
Benalaxyl	148.1	Pirimiphos-methyl	290.0
Bitertanol	170.1	Prothiofos	309.0
Chinomethionat	234.0	Quinalphos	146.0
Dichlofluanid	123.0	Terbufos	231.0
Dimethipin	118.0	Thiometon	88.0
Flutolanil	173.0	Carbamate (12)	
Lenacil	153.0	Bendiocarb	151.0
Mefenacet	192.0	Chlorpropham	126.9
Mepronil	269.1	Diethofencarb	124.0
Methoprene	73.1	Esprocarb	222.1
Metribuzin	198.1	Ethiofencarb	107.1
Myclobutanil	179.0	Fenobucarb	121.0
Pendimethalin	252.1	Isoprocarb	121.0
Pretilachlor	238.1	Methiocarb	168.0
Propiconazole	259.1	Pirimicarb	166.1
Pyridaben	147.1	Propamocarb	58.1
Triadimefon	208.0	Propoxur	110.0
Triadimenol	112.0	Thiobencarb	100.1

存した。

内部標準溶液：アセナフテン-d<sub>10</sub>, フェナントレン-d<sub>10</sub>, クリセン-d<sub>12</sub>及びペリレン-d<sub>12</sub>はスペルコ社製の内部標準用混液 (2,000 µg/ml) を使用し, これをアセトンで希釈して0.2 µg/ml の濃度に調製した。

有機溶媒：エタノール及び2-プロパノールは高速液体クロマトグラフ用 (和光純薬工業製) を使用した。メタノール, アセトン, 酢酸エチル及びn-ヘキサンは残留農薬試験用 (和光純薬工業製) を使用した。

その他：クロルブタノールは和光純薬工業製特級試薬を使用した。

## 2. 試験法

以下に試験法を示したが, 農薬の安定性は, いずれも試験溶液を保存後の各農薬のピーク面積の変化で評価した。

### 2.1. 農薬の各種有機溶媒中での安定性

農薬標準混液20 µl をとり溶媒を窒素ガスで留去したのち, 検討に用いる有機溶媒 (メタノール, エタノール, 2-プロパノール, アセトン, 酢酸エチル及びn-ヘキサン)100 µl を添加して2 µg/ml (アセフェート, メタミドフォス及びプロパモカルブは10 µg/ml) の濃度に調製し試験溶液とした。試験溶液は調製直後及び室温で暗所に6時間保存後に20 µl をとり内部標準溶液180 µl を添加しGC/MSの選択イオン検出 (SIM: Selected ion monitoring) モードで測定した。

### 2.2. カプタホール, キャプタン, ホスメット及びキノメチオネートのメタノール溶液中での経時的安定性

農薬標準混液0.1 ml をとり溶媒を窒素ガスで留去したのち, メタノール0.5 ml を添加して2 µg/ml の濃度に調製し試験溶液とした。試験溶液は調製直後及び室温で暗所に保存し, 30, 60, 90, 120分後に20 µl をとり内部標準溶液180



$\mu\text{l}$ を添加しGC/MSのSIMモードで測定した。

### 2.3. ジコホルのアセトン溶液中での経時的安定性

ジコホル及び $\alpha$ -BHCの農薬標準原液を混合して、アセトン及びn-ヘキサンでそれぞれ20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に調製し試験溶液とした。試験溶液は調製直後及び冷蔵庫内(4°C)に保存し、3日及び10日後に $\alpha$ -BHCを内部標準としてGC/MSのスキャンモードで測定した。測定の際には、n-ヘキサン溶液では試験溶液をそのままGC/MSに注入した。一方、アセトン溶液では試験溶液を100  $\mu\text{l}$ とり、窒素気流下でアセトンを留去後、n-ヘキサン100  $\mu\text{l}$ を加えてよく攪拌してからGC/MSに注入した。

### 3. 測定方法

GC/MSのSIMモードで測定する場合には、アセナフテン- $d_{10}$  (m/z 164.1)、フェナントレン- $d_{10}$  (m/z 188.2)、クリセン- $d_{12}$  (m/z 240.2)及びペリレン- $d_{12}$  (m/z 264.2)を内部標準として測定した。各農薬の測定に使用したモニターイオンをTable 1に示した。

### 4. 装置

ガスクロマトグラフ/質量分析計: ヒューレットパッカード社製ガスクロマトグラフHP5890シリーズII型及び質量分析計HP5972型を用いた。

### 5. GC/MS測定条件

GCカラム: J&W Scientific社製のキャピラリーカラムDB-5 ms (内径0.25 mm, 長さ30 m, 膜厚0.25  $\mu\text{m}$ )

カラム温度: 50°C (1 min) -25°C/min-125°C-10°C/min-300°C (3.5 min)

注入口温度: 250°C

トランスファーライン温度: 310°C

イオン化電圧: EI (70eV)

SIMモード: モニターイオンはTable 1参照

SCANモード: スキャン範囲35~500 amu

キャリアーガス: He

キャリアーガス圧力プログラム: 7.5 psi-99 psi/min-40 psi (0.1 min)-99 psi/min-7.5 psi (定流量モード, 1 ml/min)

注入量: 2  $\mu\text{l}$  (スプリットレス)

## 結果及び考察

### 1. 農薬の各種有機溶媒中での安定性

農薬の有機溶媒中での安定性をSFEのモディファイヤーとして一般的に使用されるメタノール, エタノール, 2-プロパノール, 酢酸エチル, n-ヘキサン及びアセトンの6種類の有機溶媒を用いて検討した。保存時間は, SFEの試料調製から抽出終了までの放置時間が最大でも6時間以内であったことから6時間とした。また, 残存率は, 保存前の試料について得られた各農薬のピーク面積に対する保存後の農薬のピーク面積の百分率で表した。

検討した89種類の農薬のうち, 有機塩素系農薬14種類,

有機リン系農薬32種類, ピレスロイド系農薬8種類, カバメート系農薬12種類及びその他の農薬18種類の合計84種類の農薬については, 室温で暗所に6時間保存後も農薬の減少は認められず, これらの農薬はこの保存条件下では検討に用いたすべての有機溶媒中でいずれも安定であった。平原らは46種類の農薬のアセトン, 酢酸エチル及びn-ヘキサン溶液中での安定性について調べ, 室温で遮光条件下で3週間安定であったと報告している<sup>7)</sup>。今回の検討では保存時間が6時間と短時間であったが, 同じ農薬と溶媒の組み合わせでは平原らの報告と同様な結果となった。

しかし, カプタホル, キャプタン, ホスメット, キノメチオネート及びジコホルでは農薬の減少が観察され, その結果をTable 2に示した。カプタホル, キャプタン, ホスメット及びキノメチオネートは, メタノール溶液中では大きな減少が認められ, 6時間後にはカプタホルのピークは消失し, キャプタン, ホスメット及びキノメチオネートの残存率はそれぞれ19, 37及び59%であった。カプタホルはエタノール溶液中でも大きな減少が見られ, 残存率は6時間後で55%であった。また, エタノール溶液中ではキャプタン及びホスメットでも若干減少が認められたが, キノメチオネートでは減少は見られなかった。以上のように, これらの農薬はメタノール次いでエタノール中で減少しやすかったが, それ以外の有機溶媒中では安定であった。なお, 測定に当たっては, GC注入時の溶媒の違いによる影響を避けるため, 試験溶液を内部標準溶液(アセトン溶液)で希釈して, アセトンを多量に加えた状態でGC注入を行った。これら4種類の農薬は, アセトン溶液中では安定であったことから, 試験溶液を内部標準溶液で希釈してからGCに注入するまでの間に分解したのではなく, 保存中に分解したものと思われた。

一方, ジコホルについては, メタノール, エタノール, 2-プロパノール, 酢酸エチル及びn-ヘキサン溶液中では安定であったが, アセトン中に保存した場合には大きな減少が見られ, 6時間後にはピークは完全に消失した。

### 2. カプタホル, キャプタン, ホスメット及びキノメチオネートのメタノール溶液中での経時的安定性

保存溶媒にメタノールを用いた場合, 6時間後にカプタホル, キャプタン, ホスメット及びキノメチオネートで大きな減少が見られたことから, これらの農薬のメタノール溶液中でのより短時間の安定性について, 保存時間を30, 60, 90及び120分として更に検討した。その結果, Fig. 1に示したようにいずれの農薬も室温暗所保存で経時的な減少が見られ, このことから農薬の保存中の分解が示された。また, 農薬の減少速度はカプタホル, キャプタン, ホスメット, キノメチオネートの順に速かった。この順番は6時間保存後の農薬の残存率の小さい順番と同じであった。特にカプタホルの減少は速く, 30分後の残存率は75%

Table 2. Losses of pesticides during storage for 6 hours in several organic solvents<sup>a</sup>

Pesticides	Residual pesticides (%), n = 2					
	Methanol	Ethanol	2-Propanol	Ethyl acetate	n-Hexane	Acetone
Captafol	nd <sup>b</sup>	55	91	96	102	98
Captan	19	86	93	94	103	99
Phosmet	37	87	98	98	98	101
Chinomethionat	59	96	96	101	106	103
Dicofol	102	98	101	104	96	nd <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Pesticide solutions were kept at room temperature in the dark.

<sup>b</sup> Not detected.

であり、120分後には約50%にまで減少した。また、メタノールをモディファイヤーに用いてSFEを行った場合も同様にカプタホール、キャプタン、ホスメット、キノメチオネートの順に回収率が低かった<sup>6)</sup>ことから、SFEで観察されたこれらの農薬の低回収率は、メタノールが原因であることが示唆された。なお、このようなカプタホール、キャプタン、ホスメット及びキノメチオネートのメタノール溶液中での減少は、各農薬単独の溶液でも同様に観察された。また、メタノール溶液中で減少が見られたカプタホール、キャプタン、ホスメット及びキノメチオネートの構造式をFig.2に示した。カプタホール、キャプタン及びホスメットは、いずれも共通してスクシンイミド構造部分を有していることから、この構造がこれらの農薬のメタノール溶液中での減少や、メタノールをモディファイヤーに用いてSFEを行ったときの低回収率に関与しているものと思われる。

### 3. ジコホルルのGC注入時のアセトンによる分解

先の検討では、アセトン溶液でジコホルルの減少が認められたが、ジコホルルはGC注入口で4,4'-ジクロロベンゾフェノン (DCBP) に分解されることが知られている<sup>8)</sup>ことから、ジコホルルの減少がGC注入時の分解によるものである可能性もあるので、GC注入時のジコホルルの分解

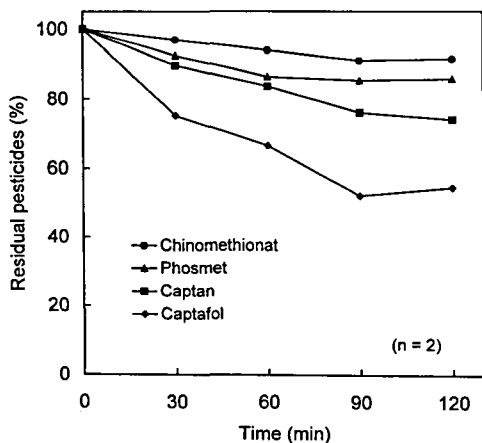


Fig. 1. Losses of captafol, captan, phosmet, and chinomethionat during storage in methanol

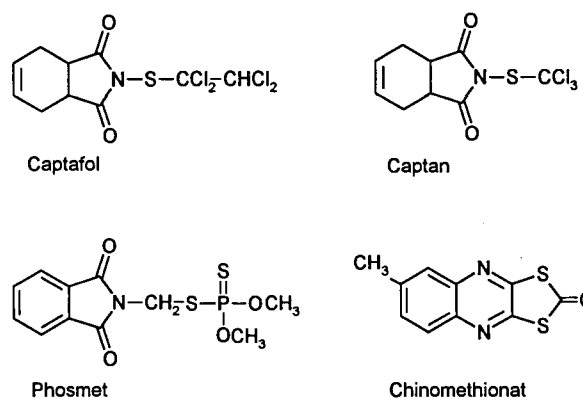


Fig. 2. Structures of captafol, captan, phosmet, and chinomethionat

性について、アセトンの影響も含めて検討した。

ジコホルルの農薬標準原液をn-ヘキサン及びアセトンで希釈してそれぞれ50 µg/mlの濃度の溶液を調製し、これらを直ちにGC/MSに注入してスキャンモードで測定した時のトータルイオンクロマトグラムをFig.3に示した。n-ヘキサン溶液を注入した場合には、大部分はジコホルルのままであり、わずかにDCBPのピークが観察された。一方、アセトン溶液を注入した場合には、ジコホルルのピーク面積は1/8以下になり、DCBPのピークの大幅な増大が観察された。また、アセトン溶液を注入した場合には新たにピーク1が観察され、このピークは標準品とマスマスペクトル及び保持時間が一致したことからクロルブタノールと推定された (Fig.4)。ジコホルルはアルカリ性溶液中で不安定で、DCBPとクロロホルムに分解することが知られている<sup>9)</sup>。クロルブタノールはアセトンとクロロホルムが縮合した構造をしていることから、GC注入時にジコホルルの分解によって生じたクロロホルムとアセトンが反応して生成したものと推定された。

アセトン溶液のGCへの注入は、溶液調製後直ちに行っていたが、ジコホルルの分解がGC注入までの短時間の間に起こったのか、あるいはGC注入後に起こったのかを調べるために、アセトン溶液の溶媒を窒素気流下で留去し、n-ヘキサンで置換した溶液をGCに注入して検討した。その

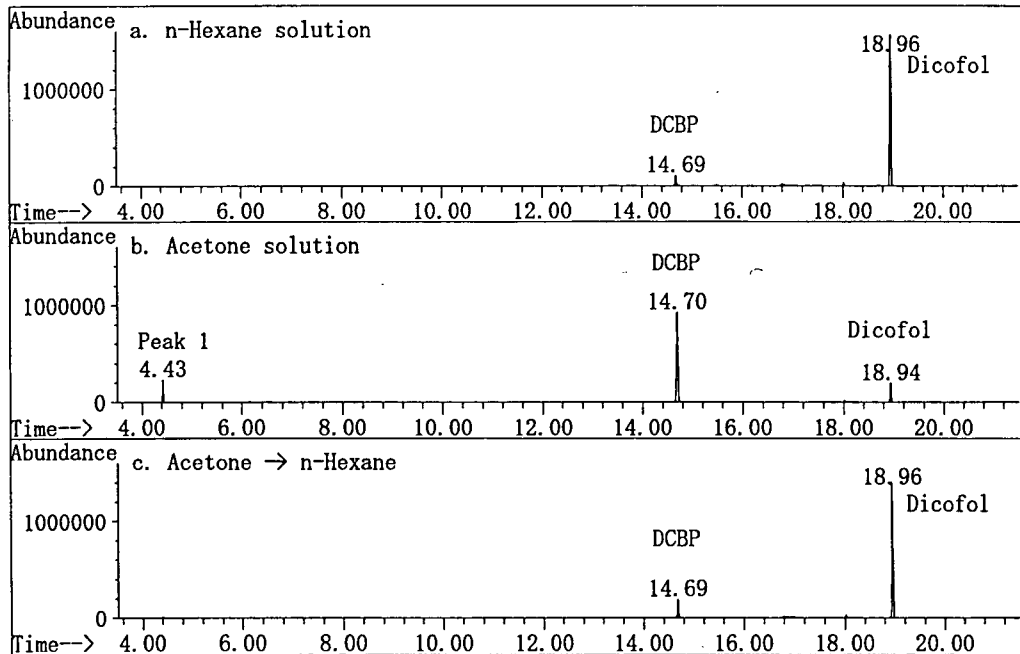


Fig. 3. Total ion chromatograms of dicofol solutions by GC/MS (SCAN)

a. n-Hexane solution : 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of dicofol in n-hexane

b. Acetone solution : 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of dicofol in acetone

c. Acetone  $\rightarrow$  n-Hexane: the acetone of the acetone solution was replaced with n-hexane after evaporation under nitrogen gas flow.

結果, Fig. 3のcに示したように, クロルブタノールのピークは消失し, ジコホール及びDCBPのクロマトグラムはn-ヘキサン溶液の場合とほぼ同じになった. このように, アセトン溶液の溶媒をn-ヘキサンで置換したことによって分解が抑えられたことから, GC注入後にジコホールがアセトンにより分解されてDCBPとクロルブタノールが生成されたものと思われた.

前述のようにジコホールはアセトン溶液で室温暗所に保存した場合, 6時間後にはピークが消失したが, これはGCへの注入をアセトン溶液で行ったため, 注入口でアセトンによりジコホールが分解されたことが原因である可能性がある. そのため, ジコホールのアセトン溶液中での経時的安定性を検討するためには, GC注入の際に溶媒をn-ヘキサンなどのアセトン以外の有機溶媒に置換する必要があると思われた.

#### 4. ジコホールのアセトン中での経時的安定性

ジコホールはアセトン溶液でGC注入した場合, アセトンにより分解されることがわかったため, 改めてジコホールをアセトン溶液とした場合の保存中の安定性について検討した. すなわち, ジコホールのn-ヘキサン溶液及びアセトン溶液を冷蔵庫内に保存し, 3日及び10日後にGC/MSのスキャンモードで測定し, 分解物も同時に検索して検討した. アセトン溶液を測定する場合には, GC注入時のアセトンによるジコホールの分解を避けるために, 溶媒を窒素ガスで留去後, n-ヘキサンで置換してから行った. そ

の結果, Table 3に示したようにジコホールはn-ヘキサン溶液中では10日間安定であったのに対して, アセトン溶液中では, 3日後には63%に, 10日後には33%に減少した. このときアセトン溶液中には, いずれもDCBP及びクロルブタノールが検出された. 以上の結果から, ジコホールはGC注入時にアセトンにより分解されるほか, 冷蔵保存でもアセトン溶液中で分解することがわかった.

従来, 有機塩素系農薬はn-ヘキサンで溶解されていたため, ジコホールの保存中の分解は問題とならなかった. しかし, 多成分分析のために農薬の標準混合溶液を調製する場合には, n-ヘキサンに溶解しにくい農薬をアセトンで溶解して混合する場合もあり得る. その場合には, アセトンによりジコホールが分解する可能性があり, 注意する必要があると思われる.

## 結 語

1. 農薬の有機溶媒中での安定性を室温暗所に6時間保存する条件で, メタノール, エタノール, 2-プロパノール, 酢酸エチル, n-ヘキサン及びアセトンの6種類の有機溶媒を用いて検討したところ, 検討した89種類の農薬のうち, 84種類の農薬については, 検討に用いたすべての有機溶媒中でいずれも安定であった. しかし, カプタホール, キャプタン, ホスメット及びキノメチオネートはメタノール溶液中で減少が観察された. このうちカプタホール, キャプタン及びホスメットはエタノール溶液中でも減少が認

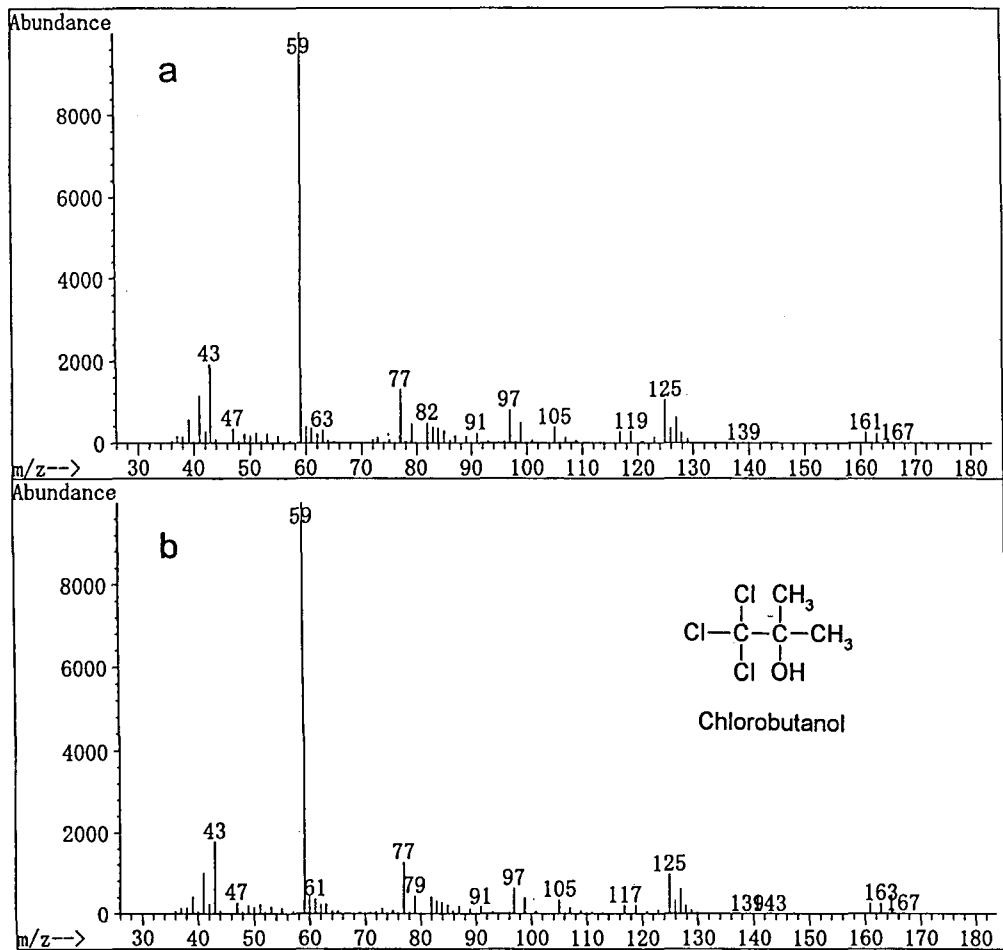


Fig. 4. Mass spectra of peak 1 in Fig. 3 and chlorobutanol by GC/MS (SCAN)  
 a. mass spectrum of peak 1 in Fig. 3  
 b. mass spectrum of chlorobutanol (RT=4.41 min)

められた。また、ジコホールはアセトン溶液中で減少が観察された。

2. カプタホール、キャプタン、ホスメット及びキノメチオネートは、メタノール溶液とした場合、室温暗所保存で経時的な減少が見られた。この減少は比較的短時間で起こり、これら4農薬のうち最も減少の速かったカプタホールの残存率は、保存30分後で75%であった。

3. ジコホールのアセトン溶液をGCに注入した場合、ジコホールがアセトンにより分解されDCBPとクロルブタノールが生成されることがわかった。また、ジコホールは、アセトン溶液中では冷蔵保存でも分解し、DCBPとクロルブタノールを生成した。

4. 以上の結果から、農薬と有機溶媒の組み合わせによっては短時間で農薬が減少することがわかった。有機溶媒をSFEのモディファイヤーとして使用したり、あるいは農薬の標準混合溶液を調製する場合には、農薬の有機溶媒中での安定性に注意する必要があると思われる。特に、SFEのモディファイヤーとして使用する場合、カプタホール、キャプタン、ホスメット及びキノメチオネートの分析に

は、メタノールの使用は避けたほうがよく、また、ジコホールの分析にはアセトンの使用は避けたほうがよいことがわかった。

### 文 献

- 1) Locke, M.A.: Supercritical CO<sub>2</sub> fluid extraction of fluometuron herbicides from soil. *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 1081~1084 (1993)
- 2) Wuchner, K., Ghijsen, R. T., Brinkman, U. A. T., Grob, R., and Mathieu, J.: Extraction of organophosphorus pesticides from soil by off-line supercritical fluid extraction. *Analyst.*, **118**, 11~16 (1993)
- 3) Fahmy, T. M., Paulaitis, M. E., Johnson, D. M., and McNally, M. E. P.: Modifier effects in the supercritical fluid extraction of solutes from clay, soil, and plant materials. *Anal. Chem.*, **65**, 1462~1469 (1993)
- 4) Aharonson, N., Lehotay, S. J., and Ibrahim, M. A.: Supercritical fluid extraction and HPLC analysis of benzimidazole fungicides in potato, apple, and banana. *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 2817~2823 (1994)
- 5) Alzaga, R., Bayona, J. M., and Barcelo, D.: Use of supercritical fluid extraction for pirimicarb determination in soil. *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 395~400 (1995)
- 6) Nemoto, S., Sasaki, K., Toyoda, M., and Saito, Y.: Effect of

Table 3. Loss of dicofol during storage in n-hexane and acetone<sup>a</sup>

	Residual dicofol (%)		
	Time (day)		
	0	3	10
n-Hexane solution	100	100	107
Acetone solution	100	63	33

<sup>a</sup> Each solution was kept in a refrigerator.

extraction conditions and modifiers on the supercritical fluid extraction of 88 pesticides. *J. Chromatogr. Sci.*, **35**, 467~477 (1997)

- 7) 平原嘉親, 成田美加子, 岡本浩一郎, 三好智子, 宮田昌弘, 鯉口聡, 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. *衛生化学*, **40**, 393~398 (1994)

- 8) Zweig, G. and Sherma, J.: "Pesticides and plant growth regulators - Volume VI Gas chromatographic analysis", ed, Zweig, G., Academic Press, New York and London (1972), pp. 415~416

- 9) 武田明治他: "最新 農薬の残留分析法" 農薬残留分析研究班編集, 中央法規出版, 東京 (1995)

## カロブ色素の F344 ラットを用いた 13 週間亜慢性毒性試験

高田 幸一<sup>#</sup>・豊田 和弘・正田 俊之・畝山智香子  
田村 啓・高橋 道人

## A 13-week Subchronic Oral Toxicity Study of Carob Germ Colour in F344 Rats

Koichi Takada<sup>#</sup>, Kazuhiro Toyoda, Toshiyuki Shoda, Chikako Uneyama,  
Tohru Tamura and Michihito Takahashi

A 13-week subchronic oral toxicity study of carob germ colour, one of natural colour additives was carried out in F344 rats at dose levels of 5.0, 1.7, 0.6, 0.2 and 0 % in the powdered diet. Rats were randomly allocated to 5 groups, each consisting of 10 males and 10 females. No animals died during the experiment and no changes in body weights and food intakes were observed in any dosed groups. Changes indicating obvious toxicity of carob germ colour were not observed in the organ weights, hematological, serum biochemical and histopathological examinations. These findings indicate that the treatment of 5 % carob germ colour in diet for 13 weeks did not cause any significant toxicity in rat.

**Keywords:** carob germ colour, subchronic toxicity study, F344 rats, food additive  
(Received May 30, 1997)

## 緒 言

現行の食品衛生法では、食品添加物は“化学的合成添加物”と“天然添加物”を区別せず、どちらも指定制をとることになっている。ただし、従来から使用されてきた天然添加物は既存添加物として指定制の対象から外されている<sup>1)</sup>。天然着色料は天然物由来であるという科学的根拠のない安心感、食用タール色素に対する不安感などから、食品分野への応用は増加の一途を辿っている。多くの天然着色料はその名が示すように天然物（動・植物）の抽出エキスであり、性状が多岐に亘る色素成分・非色素成分の混合物である。しかし、安全性の面からみれば経験的に使用されてきたものが多く、毒性データに欠けるものが少なくない。カロブ色素（別名：Carob germ colour）はフラボノイド系色素の一つである。フラボノイド系色素にはベニバナ赤色素、ベニバナ黄色素、カカオ色素、タマリンド色素およびタマネギ色素などがある。カロブ色素は、地中海沿岸に植生するマメ科植物のイナゴマメ（*Ceratonia siliqua*）の種子でその胚芽を粉碎して着色料として用いられるもので、主成分はポリフェノールと考えられている<sup>2)</sup>。カロブ色素は種々の食品に対し黄色系の色素として利用されてい

る。さらに、蛋白質を多量に含み必須アミノ酸の含有量が非常に高く、日本では中華麺の着色などに使用されているが、欧米では栄養価が高いため、パン、ビスケット、ドーナツ等の製造に用いられている。使用方法としては中華麺では0.5～1.0%、パン類では3.0%前後添加する<sup>3)</sup>。毒性情報としてはラットおよびマウスでの急性毒性での LD<sub>50</sub>値はともに 5 g/kg 以上であり、変異原性は Ames test およびチャニーズハムスターでの染色体異常はともに陰性である<sup>4,5)</sup>。今回、この色素の安全性評価の一環として、13週間亜慢性毒性試験を実施した。

## 試験材料および方法

## 1. 被験物質および動物

カロブ色素は（株）タイショーテクノスより提供されたものを用いた（Lot No. 501917）。本品は淡黄色の微粉末で僅かに特有の臭気をもち、アルカリ性になるに従い黄色が強くなる。動物は 5 週齢の F344/DuCrj 系ラット（SPF）雌雄各 100 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 固形飼料；オリエンタル酵母社）と水道水で 1 週間馴化飼育した後、体重層別無作為抽出により雌雄各 5 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

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed: Koichi Takada; Division of Pathology, Kamiyoga 1-18-1, Setagaya-ku, Tokyo 158, Japan Tel: 03-3700-9821 Fax: 03-3700-2348 E-mail: ktakada@nihs.go.jp

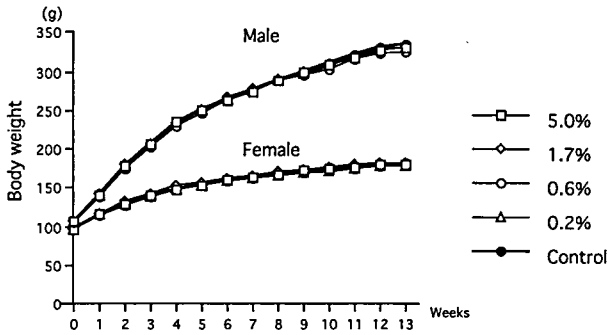


Fig. 1. Growth curves of F344 rats treated with carob germ colour for 13 weeks

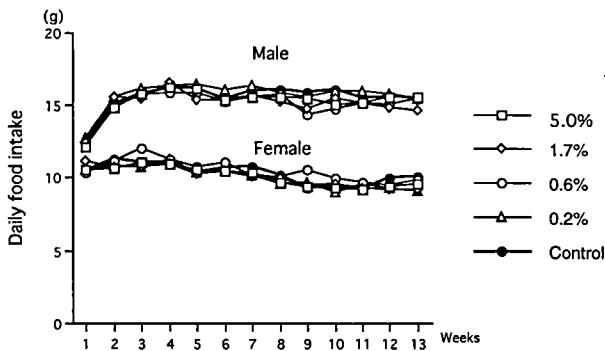


Fig. 2. Sequential changes of daily food intakes in F344 rats treated with carob germ colour for 13 weeks

物は透明なポリカーボネート製ケージ（幅26cm，長さ42cm，高さ17cm）に5匹ずつ飼育し，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4群を被験物質投与群とし，2週間の用量設定試験の結果より，5%，1.7%，0.6%および0.2%の割合でカロブ色素を混合した粉末飼料（CRF-1，オリエンタル酵母社）を13週間自由に摂取させた．その他に対照群として雌雄各1群にはカロブ色素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．なお，混合飼料は週1回作製した．試験期間中，全動物の一般状態を毎日観察し，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，エーテル麻酔下で開腹，腹部大動脈より採血し，放血，屠殺，剖検した．諸臓器は肉眼的に観察した後摘出し，脳，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後に，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，精嚢腺，卵巣，子宮，膣，乳房，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．なお，精巣は対照群および最高用量群各5匹（番号の小さいものから）をブアン液にて固定して検索した．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，多項目自動血球計測装置（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（Hb），ヘマトクリット値（Ht），平均赤血球容積（MCV），平均赤血球色素量（MCH），平均赤血球色素濃度（MCHC），血小板（PLT）の測定を行ったほか，血液細胞自動分析装置（立石電気，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）に依頼し下記の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），トリグリセライド（TG），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），クロール（Cl），カリウム（K），カルシウム（Ca），無機リン（Pi），aspartate aminotransferase（ASAT），alanine aminotransferase（ALAT），アルカリホスファターゼ（ALP）， $\gamma$ -glutamyl transpeptidase（ $\gamma$ -GT）．

## 3. 統計学的処理方法<sup>6)</sup>

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，それぞれ対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

試験期間中の動物の一般状態については，いずれの群においても特記すべき変化は認められず，全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．雌雄とも各被験物質投与群と対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を Fig. 2 に示した．試験期間中のラット一日一匹当たりの平均摂餌量は，雌雄とも対照群と被験物質投与群との間に大きな差はみられず，雄で約15g，雌で約10gであり，また，被験物質であるカロブ色素の13

Table 1. Average intakes of food or carob germ colour per rat

Sex	Group	No. of rats examined	Daily intakes of		Total intakes of Carob colour (g / rat / 13 weeks)
			Food (g / rat)	Carob color (g / rat)	
Male	Control	10	15.43	—	—
	0.2%	10	15.64	0.031	2.79
	0.6%	10	15.02	0.090	8.10
	1.7%	10	15.06	0.256	23.04
	5.0%	10	15.21	0.761	68.49
Female	Control	10	10.24	—	—
	0.2%	10	10.02	0.020	1.80
	0.6%	10	10.40	0.062	5.58
	1.7%	10	10.05	0.171	15.39
	5.0%	10	10.06	0.503	45.27

Table 2. Hematological and biochemical findings of F344 male rats treated with carob germ colour for 13 weeks

Item		Dose level				
		Control (10) <sup>a)</sup>	0.2% (10)	0.6% (10)	1.7% (10)	5.0% (10)
WBC	10 <sup>2</sup> / μl	47.0 ± 4.7 <sup>b)</sup>	48.7 ± 6.4	40.9 ± 3.5 *	45.3 ± 4.9	46.2 ± 4.0
RBC	10 <sup>4</sup> / μl	940 ± 20	952 ± 34	929 ± 45	954 ± 26	986 ± 47 *
Hb	g / dl	15.2 ± 0.2	15.4 ± 0.4	15.1 ± 0.6	15.4 ± 0.4	15.9 ± 0.7
Ht	%	45.0 ± 1.2	44.9 ± 1.5	44.0 ± 2.2	45.1 ± 1.3	46.1 ± 2.3
MCV	fl	47.9 ± 0.4	47.2 ± 0.3 **	47.3 ± 0.2 **	47.2 ± 0.3 **	46.8 ± 0.4 **
MCH	pg	16.2 ± 0.3	16.2 ± 0.2	16.3 ± 0.1	16.2 ± 0.2	16.1 ± 0.1
MCHC	g / dl	33.8 ± 0.8	34.4 ± 0.4	34.3 ± 0.4	34.2 ± 0.5	34.5 ± 0.2
PLT	10 <sup>12</sup> / μl	79.0 ± 4.0	79.0 ± 3.0	80.0 ± 4.0	80.0 ± 3.0	81.0 ± 6.0
TP	g / dl	6.6 ± 0.2	6.6 ± 0.2	6.6 ± 0.2	6.6 ± 0.1	6.5 ± 0.2
A/G		2.4 ± 0.2	2.5 ± 0.2	2.4 ± 0.1	2.5 ± 0.1	2.4 ± 0.1
Alb	g / dl	4.7 ± 0.1	4.7 ± 0.2	4.7 ± 0.1	4.7 ± 0.1	4.6 ± 0.2
TG	mg / dl	75 ± 19	97 ± 33	94 ± 20	99 ± 24	83 ± 18
T-Cho	mg / dl	65 ± 6	64 ± 5	65 ± 5	68 ± 4	63 ± 6
BUN	mg / dl	18.0 ± 1.4	19.9 ± 1.1 **	19.5 ± 1.2 *	18.8 ± 1.3	19.2 ± 1.5
CRN	mg / dl	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0
Na	mEQ / l	145 ± 1	145 ± 1	144 ± 1	145 ± 1	144 ± 1
Cl	mEQ / l	103 ± 1	104 ± 1	102 ± 1	103 ± 1	102 ± 1
K	mEQ / l	4.3 ± 0.3	3.9 ± 0.2 **	4.2 ± 0.3	3.9 ± 0.3 **	4.3 ± 0.3
Ca	mg / dl	10.3 ± 0.1	10.7 ± 0.1 **	10.5 ± 0.2	10.6 ± 0.2 **	10.4 ± 0.3
Pi	mg / dl	6.9 ± 0.5	6.4 ± 0.3	6.6 ± 0.4	6.4 ± 0.6	6.5 ± 0.6
ASAT	IU / l	93 ± 8	70 ± 4 **	84 ± 7 *	76 ± 11 **	98 ± 8
ALAT	IU / l	57 ± 6	56 ± 3	56 ± 9	56 ± 6	58 ± 9
ALP	IU / l	314 ± 30	305 ± 23	323 ± 25	313 ± 17	317 ± 29

a) Numbers in parenthesis represent the number of samples examined

b) Values are means ± S. D.

\*, \*\*: Significantly different from the control at p &lt; 0.05, p &lt; 0.01, respectively

週間の総摂取量は、雄では 5% 群で 68.5g, 1.7% 群で 23.0g, 0.6% 群で 8.1g, 0.2% 群で 2.8g, 雌では 5% 群で 45.3g, 1.7% 群で 15.4g, 0.6% 群で 5.6g, 0.2% 群で 1.8g であり、雌雄ともに被験物質の用量段階にはほぼ相関していた (Table 1)。

#### 4. 血液学的検査および血清生化学的検査

血液学的および血清生化学的検査の結果を Table 2, 3 に示した。対照群に対する有意差検定の結果、投与用量に相関した変化として、血液学的検査では雄で平均赤血球容積 (MCV) の減少が 0.2%, 0.6%, 1.7% および 5.0% 群で有意に認められた。また、雌では白血球数の増加が 1.7% および 5.0% 群で、平均赤血球色素量 (MCH) の減少が 1.7% および 5.0% 群で、平均赤血球色素濃度 (MCHC) の減少が 0.6%, 1.7% および 5.0% 群で有意に認められた。また、白血球の型別分類の結果、雌雄ともにいずれの型の白

血球においても被験物質投与群と対照群との間に差は認められなかった。血清生化学的検査では BUN, Ca および ASAT など種々の項目で有意差が散見されたが、明らかな用量相関性は認められなかった。なお、γ-GT はすべての群で測定値が 0 であった。

#### 5. 臓器重量

臓器の絶対重量および相対重量の結果を Table 4, 5 に示した。対照群に対する有意差検定の結果、雄では胸腺の相対重量の減少が 1.7% 群で、雌では脳の絶対重量の増加が 0.6% および 1.7% 群で、腎 (R) の相対重量の減少が 5% 群で有意に認められた。その他の臓器の絶対重量および相対重量については雌雄とも対照群との間に有意差は認められなかった。

#### 6. 病理組織学的検索

病理組織学的検査の結果、雄で心臓の線維症、肺の細胞



Table 3. Hematological and biochemical findings of F344 female rats treated with carob germ colour for 13 weeks

Item		Dose level				
		Control (10) <sup>a)</sup>	0.2%(10)	0.6%(10)	1.7%(10)	5.0%(10)
WBC	10 <sup>2</sup> /μl	30.4 ± 4.9 <sup>b)</sup>	34.8 ± 4.9	31.9 ± 4.8	36.8 ± 4.1 *	36.5 ± 5.6 *
RBC	10 <sup>4</sup> /μl	862 ± 29	848 ± 36	870 ± 48	883 ± 40	880 ± 37
Hb	g/dl	15.6 ± 0.4	15.4 ± 0.7	15.6 ± 0.8	15.8 ± 0.7	15.6 ± 0.6
Ht	%	43.4 ± 1.5	42.8 ± 1.9	44.2 ± 2.4	44.8 ± 2.1	44.6 ± 1.9
MCV	fl	50.4 ± 0.4	50.5 ± 0.3	50.8 ± 0.3	50.7 ± 0.4	50.6 ± 0.3
MCH	pg	18.2 ± 0.2	18.2 ± 0.3	18.0 ± 0.2	17.8 ± 0.2 **	17.7 ± 0.2 **
MCHC	g/dl	36.0 ± 0.6	36.0 ± 0.4	35.5 ± 0.5 *	35.2 ± 0.4 **	35.0 ± 0.4 **
PLT	10 <sup>12</sup> /μl	76.0 ± 5.0	85.0 ± 27	81.0 ± 5.0	83.0 ± 5.0 **	79.0 ± 3.0
TP	g/dl	6.4 ± 0.1	6.4 ± 0.2	6.5 ± 0.2	6.4 ± 0.3	6.3 ± 0.1
A/G		2.8 ± 0.1	2.8 ± 0.5	3.0 ± 0.2	2.9 ± 0.2	3.0 ± 0.3
Alb	g/dl	4.7 ± 0.1	4.7 ± 0.4	4.8 ± 0.2	4.8 ± 0.2	4.7 ± 0.1
TG	mg/dl	20 ± 8	20 ± 9	17 ± 6	16 ± 6	18 ± 5
T-Cho	mg/dl	82 ± 9	82 ± 15	82 ± 7	82 ± 11	79 ± 8
BUN	mg/dl	15.8 ± 1.7	16.0 ± 1.5	16.2 ± 2.1	15.7 ± 1.3	15.9 ± 0.9
CRN	mg/dl	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0
Na	mEQ/l	144 ± 2	143 ± 1	145 ± 2	144 ± 2	144 ± 2
Cl	mEQ/l	106 ± 1	105 ± 1	105 ± 2	105 ± 2	105 ± 2
K	mEQ/l	4.0 ± 0.2	4.1 ± 0.3	4.0 ± 0.2	4.2 ± 0.3	4.2 ± 0.3
Ca	mg/dl	10.1 ± 0.2	10.1 ± 0.2	10.3 ± 0.2	10.4 ± 0.2 **	10.3 ± 0.2
Pi	mg/dl	6.0 ± 0.3	5.9 ± 0.2	5.8 ± 0.4	5.6 ± 0.5	5.7 ± 0.4
ASAT	IU/l	73 ± 4	76 ± 4	75 ± 4	76 ± 7	77 ± 6
ALAT	IU/l	39 ± 2	41 ± 3	40 ± 4	41 ± 6	40 ± 4
ALP	IU/l	211 ± 15	208 ± 20	209 ± 23	239 ± 86	219 ± 28

a) Numbers in parenthesis represent the number of samples examined

b) Values are means ± S. D.

\*, \*\* : Significantly different from the control at p &lt; 0.05, p &lt; 0.01, respectively

Table 4. Absolute and relative organ weight of F344 male rats treated with carob germ colour for 13 weeks

Organ	Dose level				
	Control (3) <sup>a)</sup>	0.2%(10)	0.6%(10)	1.7%(10)	5.0%(10)
Body weight	318.2 ± 10.37 <sup>b)</sup>	314.6 ± 8.61	310.3 ± 12.75	316.5 ± 12.20	315.9 ± 14.18
Brain	1.950 ± 0.048	1.946 ± 0.035	1.951 ± 0.028	1.951 ± 0.042	1.961 ± 0.025
Thymus	0.204 ± 0.044	0.195 ± 0.026	0.202 ± 0.042	0.200 ± 0.032	0.195 ± 0.030
Lung (R)	0.656 ± 0.034	0.675 ± 0.039	0.675 ± 0.042	0.661 ± 0.037	0.676 ± 0.041
Lung (L)	0.352 ± 0.019	0.357 ± 0.013	0.360 ± 0.030	0.368 ± 0.027	0.363 ± 0.023
Heart	0.940 ± 0.071	0.956 ± 0.057	0.941 ± 0.058	0.932 ± 0.039	0.939 ± 0.054
Spleen	0.672 ± 0.064	0.644 ± 0.032	0.629 ± 0.028	0.664 ± 0.035	0.644 ± 0.038
Liver	7.887 ± 0.278	7.986 ± 0.400	7.841 ± 0.534	7.974 ± 0.492	7.909 ± 0.377
Adrenal (R)	0.019 ± 0.001	0.019 ± 0.002	0.019 ± 0.002	0.019 ± 0.004	0.018 ± 0.001
Adrenal (L)	0.022 ± 0.003	0.022 ± 0.004	0.022 ± 0.003	0.021 ± 0.002	0.021 ± 0.004
Kidney (R)	0.982 ± 0.074	0.961 ± 0.026	0.925 ± 0.042	0.957 ± 0.037	0.979 ± 0.058
Kidney (L)	0.994 ± 0.061	0.979 ± 0.018	0.956 ± 0.039	0.948 ± 0.042	0.985 ± 0.056
Testis (R)	1.466 ± 0.077	1.491 ± 0.058	1.498 ± 0.041	1.485 ± 0.062	1.476 ± 0.048
Testis (L)	1.510 ± 0.082	1.535 ± 0.041	1.515 ± 0.043	1.508 ± 0.073	1.519 ± 0.040
Thymus <sup>c)</sup>	0.064 ± 0.012	0.062 ± 0.008	0.065 ± 0.012	0.051 ± 0.002 *	0.062 ± 0.011

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

\* : Significantly different from the control at p &lt; 0.05,

浸潤, 肝臓の細胞浸潤, 脾臓の褐色色素沈着および腎尿管の塩基化, 雌で肝臓の細胞浸潤, 小肉芽, 腎臓の鉍質沈着, 脾臓の褐色沈着が認められたが群間に差は認められなかった。

### 考 察

フラボノイド系色素の毒性としては, ベニバナ黄色素,

タマネギ色素およびカカオ色素の LD<sub>50</sub>値はいずれも 5g 以上<sup>7)</sup>で, カロブ色素とはほぼ同様の値を示し, さらに, 変異原性においていずれの色素も陰性であった<sup>8)</sup>。またベニバナ黄色素の SD ラットを用いた 6 ヶ月間試験では 10% を与えても体重, 摂餌量, 病理組織学的検査に変化は認められていない<sup>9)</sup>。さらに, タマネギ色素ではマウスに 90 日間, 5% を与えても毒性を示さず<sup>10)</sup>, また, カカオ色素ではマウス

Table 5. Absolute and relative organ weight of F344 female rats treated with carob germ colour for 13 weeks

Organ	Dose level				
	Control (10) <sup>a)</sup>	0.2% (10)	0.6% (10)	1.7% (10)	5.0% (10)
Body weight	167.4 ± 10.01 <sup>b)</sup>	166.9 ± 7.58	170.3 ± 4.86	171.6 ± 6.22	170.5 ± 7.76
Brain	1.746 ± 0.030	1.785 ± 0.025	1.793 ± 0.033*	1.793 ± 0.032*	1.764 ± 0.060
Thymus	0.162 ± 0.017	0.161 ± 0.021	0.170 ± 0.019	0.171 ± 0.019	0.173 ± 0.023
Lung (R)	0.476 ± 0.032	0.469 ± 0.022	0.490 ± 0.028	0.486 ± 0.037	0.486 ± 0.036
Lung (L)	0.250 ± 0.012	0.249 ± 0.009	0.263 ± 0.020	0.266 ± 0.031	0.257 ± 0.014
Heart	0.566 ± 0.037	0.567 ± 0.030	0.596 ± 0.027	0.585 ± 0.035	0.570 ± 0.034
Spleen	0.397 ± 0.022	0.400 ± 0.069	0.416 ± 0.029	0.424 ± 0.039	0.395 ± 0.023
Liver	3.665 ± 0.224	3.659 ± 0.209	3.771 ± 0.211	3.917 ± 0.320	3.736 ± 0.210
Adrenal (R)	0.021 ± 0.003	0.019 ± 0.002	0.023 ± 0.002	0.021 ± 0.002	0.022 ± 0.008
Adrenal (L)	0.024 ± 0.004	0.022 ± 0.002	0.024 ± 0.003	0.023 ± 0.003	0.022 ± 0.002
Kidney (R)	0.570 ± 0.027	0.573 ± 0.028	0.576 ± 0.030	0.574 ± 0.038	0.547 ± 0.030
Kidney (L)	0.576 ± 0.027	0.570 ± 0.029	0.588 ± 0.025	0.567 ± 0.041	0.554 ± 0.033
Kidney (R) <sup>c)</sup>	0.341 ± 0.021	0.344 ± 0.011	0.338 ± 0.016	0.334 ± 0.015	0.321 ± 0.017*

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

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

に6週間、10%を与えても毒性変化は示さなかった<sup>9)</sup>。

今回、カロブ色素を0.2%、0.6%、1.7%および5.0%の濃度で、F344ラットに13週間混餌投与する亜慢性毒性試験を実施した。その結果、死亡動物および一般状態の変化は試験期間を通して認められなかった。体重増加および摂餌量は対照群と被験物質投与群間において大きな差は認められなかった。また、被験物質の摂取量もほぼ用量相関的に認められた。血液学的検査では雄で平均赤血球容積(MCV)の減少が0.2%、0.6%、1.7%および5.0%群で、雌では白血球数の増加が1.7%および5.0%群で、平均赤血球色素量(MCH)の減少が1.7%および5.0%群で、平均赤血球色素濃度(MCHC)の減少が0.6%、1.7%および5.0%群で認められたが、極軽度な変化であり、亜慢性毒性試験の対照群の背景データ(池崎<sup>11)</sup>、池崎<sup>12)</sup>、今沢<sup>13)</sup>)の範囲内であり、他の関連するパラメーターにも変化が認められなかったことから毒性学的意義に乏しい変化と考えられた。

血清生化学的検査において、雄でBUNの増加、ASATの減少など種々の項目において有意差を認められたが、明らかな用量相関性の認められない軽度な変動であり、また病理組織学的に組織傷害性変化は認められなかった。従ってこれら検査項目における変動はいずれも毒性学的意義は乏しいものと考えられた。

剖検における肉眼的観察では、消化管および各臓器とも変化は認められず、また、カロブ色素の沈着は対照群を含むいずれの臓器にも認められなかった。

病理組織学的検索の結果、雄で認められた心臓の線維症、肝臓の細胞浸潤、脾臓の褐色色素沈着、雌で認められた腎臓の鉍物沈着、脾臓の褐色色素沈着などはいずれも対照群にも発生し、カロブ色素の投与による発生頻度の増加

も認められず、また、F344ラットでの生理的に発生が知られている病変であることから、偶発的な病変であると考えられた<sup>6,7)</sup>。

以上、いずれの投与群においても途中死亡例が無く、体重増加抑制も認められず、また、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、カロブ色素の毒性は極めて低いものと考えられた。

## 文 献

- 1) 広門雅子：天然添加物の品質調査。食品・食品添加物研究誌, 172, 29~36 (1997)
- 2) 合田幸広：天然食品添加物を含む植物。植物細胞工学, 6, 98~108 (1994)
- 3) “食品加工のための天然添加物の使い方” pp. 165食品化学新聞社 東京 (1972)
- 4) 石館 基, 吉川邦衛, 祖父尼俊雄：食品添加物の変異原性試験成績。トキシコロジーフォーラム, 6, 671~678 (1983)
- 5) 蜂谷紀之, 滝澤行雄, 河村太郎ら：天然添加物の急性毒性および各種変異原性試験の概要。トキシコロジーフォーラム, 8, 91~105, (1985)。
- 6) 山崎 実, 野口雄次, 丹田 勝, 新谷 茂：ラット一般毒性試験における統計的手法の検討。武田研究所報, 40, 163~187, (1981)。
- 7) 清水 充：化学的合成品以外の食品添加物のマウスおよびラットにおける急性経口毒性について。生活衛生, 37, 215~219 (1993)
- 8) 谷村顕雄, 片山 脩, 遠藤英美, 黒川和男, 吉積智司：“天然着色料ハンドブック” 光琳 東京 (1979)
- 9) 藤井正美 監修, 清水孝重, 中村幹雄著：“概説「食用天然色素」” pp. 105~120 光琳 東京 (1993)
- 10) Kojima, T. Tanaka, T. Mori, H. Kato, Y. and Nakamura, M.: Acute and subacute toxicity test of onion coat, natural colorant extracted from onion (*Allium cepa* L.), in (C57BL/6 x C3H)F<sub>1</sub> mice. *J. Toxicol. Environ. Health*, 38, 89~101 (1993)

- 11) 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: 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. 衛試報告, **112**, 57~63 (1994)
- 12) 池崎信一郎, 西川秋佳, 古川文夫, 今沢孝喜, 三井雅之, 榎並倫宣, 高橋道人: ジョサマイシンのF344ラットにおける13週間亜慢性毒性試験. 衛試報告, **113**, 44~50 (1995)
- 13) 今沢孝喜, 西川秋佳, 古川文夫, 田中丸善洋, 李 仁善, 金 享津, 高橋道人: クチナシ青色素のF344ラットにおける13週間亜慢性毒性試験. 衛試報告, **114**, 27~32 (1996)
- 14) Boorman, G. A., Eustis, S. L., Montgomery, C. A., Jr. and Mackenzie, W. F. II (eds): "Pathology of the Fischer rat, Reference and Atlas" Academic Press, San Diego (1990)
- 15) 前川昭彦, 小野寺博志: ACL, F344, Wistar および Donryu 系各ラットにおける自然発生腫瘍および非腫瘍性病変. *J. Toxicol. Pathol.*, **1**, 13~17 (1988)

## ファフィア色素の F344ラットにおける13週間亜慢性毒性試験

小野寺博志<sup>#</sup>・三森 国敏・安原加壽雄・竹川 潔・高橋 道人

## 13-week Subchronic Oral Toxicity Study of Phaffia Colour in F344 Rats

Hiroshi Onodera<sup>#</sup>, Kunitoshi Mitsumori, Kazuo Yasuhara,  
Kiyoshi Takegawa and Michihito Takahashi

A 13-week subchronic oral toxicity study of phaffia colour was performed in both sexes of F344 rats by feeding of CRF-1 powder diet containing 0, 0.2, 0.6, 1.7 and 5%. Rats were randomly divided into 5 groups, each consisting of 10 males and 10 females. No animals died during the administration period. There were no treatment-related changes in body weight gain, hematological and blood biochemical examination. No treatment-related histopathological changes were also observed in any dosed groups. These findings indicate that the treatment of 5% phaffia colour in diet for 13 weeks does not cause any toxicological changes in rats.

**Keywords :** phaffia colour, astaxanthin, F344 rats, subchronic toxicity study,  
(Received May 30, 1997)

## はじめに

アスタキサンチンは、鮭、鯛、海老および蟹など水産物の赤色調の主成分であり、色調、熱安定性に優れ、天然食用色素として有用性が期待されている。さらに、アスタキサンチンには活性酸素消去能<sup>1)</sup>や免疫賦活能<sup>2)</sup>、化学物質による発がん抑制作用<sup>3,4)</sup>などの報告もあり、機能性を有する色素としても注目されている。従来、アスタキサンチンは天然物から抽出精製していたが、色素濃度の均一性や原料由来の臭気、経済性などの面から実用化には至っていない。一方、酵母の一種である *Phaffia rhodozyma* は、高率にアスタキサンチンを産生することから、その培養液より抽出された Phaffia colour (ファフィア色素) がアスタキサンチンの代用として実用化されている<sup>5)</sup>。高濃度のファフィア色素は特有の臭い(酵母臭)があるが、色調の均一性、安定性は優れている。この種の天然色素についての毒性データは少ないことから今回、ファフィア色素のラットにおける13週間亜慢性毒性試験を行ったので報告する。

## 試験材料および方法

## 1. 被験物質ならびに投与量

ファフィア色素 (Phaffia colour) はヤエガキ発酵技研(株)より供与されたものを用いた。ファフィア色素は培養液よ

りアセトンで抽出後、溶媒を除去したものであり、暗褐色のペースト状で特有の発酵臭を持つ。13週間亜急性毒性試験を行うにあたり、混合飼料中の色素安定性、および動物の被験物質混入飼料の忌避を確認する目的で、5%を最高濃度とする2週間の予備投与試験を行った。ファフィア色素はアセトンで溶解し飼料に混じるため、同量のアセトンを添加した対照群を設けたが、アセトンによる摂餌量の減少などの影響は認められず、5%、2.5%、1.25%および0.6%とも体重の増加程度および被験物質混餌飼料摂取量で対照群との間に差は認められなかった。また、混餌飼料中の色素の安定性についても室温保存で各濃度90%以上の色素含有を保持し、冷蔵保存ではそれ以上であり問題はなかった。その結果 (Table 1) に基づいて、13週間亜急性毒性試験におけるファフィア色素の最高用量を5%とし、以下公比3で減じ、1.7、0.6、および0.2% (端数切り上げ) に設定した。各濃度の色素含有飼料の調製は、ファフィア色素原体をアセトンで溶解し、粉末基礎飼料 (オリエンタル酵母(株) CRF-1) と混合して20%色素含有飼料を調製、一晚ドラフト内でアセトンを除去した後、各濃度に希釈し、懸架式粉末給餌器を用いて13週間自由に摂取させた。対照群には粉末基礎飼料のみを同様に与えた。飲料水は水道水を自由に与えた。ファフィア色素製剤は、ファフィア色素15%と大豆油85%から構成されているが、今回用いた被験物質はファフィア色素100%のものを用い、実験中の用量表示濃度は製剤全体での濃度に換算した。従って、今回、実験に用いた5%ファフィア色素含有飼料中のファフィア色素含有量は0.075%と換算された。

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed: Hiroshi Onodera, Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo 158, Japan; Tel: 03-3700-9845; Fax: 03-3700-2348; E-mail: onodera@nihs.go.jp

## 2. 動物および方法

5週齢のSPF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ケージ当り雌雄いずれも5匹づつ収容し、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システムの動物室にて飼育した。

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、週2回交換した。一般状態および死亡動物の有無を毎日観察し、体重および飼料摂取量は毎週測定した。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(Hb)、ヘマトクリット値(Ht)、白血球数(WBC)および血小板数(PLT)を測定するとともに、血液塗末標本を作製し、血液細胞自動分析装置(立石電気、MICROX HEG-120A型)を用いて以下の血液像について分類した。分葉核好中球(Seg)、好酸球(Eosin)、リンパ球(Lymph)、単球(Mono)、有核赤血球(Ebl)、総蛋白(TP)、アルブミン・グロブリン比(A/G)、総コレステロール(TC)、トリグリセライド(TG)、尿素窒素(UN)、クレアチニン(CRE)、カルシウム(Ca)、無機リン(P)、ナトリウム(Na)、カリウム(K)、クロール(Cl)、グルタミンク オキサロアセテック トランスアミラーゼ(GOT)、グルタミンク ピルビック トランスアミラーゼ(GPT)、アルカリホスファターゼ(ALP)、およびアルブミン(Alb)の各項目について血清生化学的検査を(株)SRLで実施した。動物を剖検後、脳、胸腺、心、肺、腎、副腎、脾、肝および精巣の重量を測定した。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。

## 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Dunnnett型で対照群と各群間との有意差検定を行った<sup>9)</sup>。

## 結 果

### 1. 一般状態および死亡動物

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

2週間の予備投与においては各群の最終体重や平均飼料摂取量に投与群と対照群間に差はみられず、被験物質混入による忌避も認められなかった(Table 1)。13週間の試験期間中、雌0.2%群が投与開始時から対照群に比べて軽度の体重増加抑制がみられた。雄の5%群では全期間を通じむしろ高い傾向を示した(Fig. 1)。摂餌量においても雌雄で対照群との間に差は認められず、被験物質の摂取量も設定濃度と相関していた(Table 2)。

### 3. 血液学的および血清生化学的検査

血液学的検査では、雌の1.7%群ではPLT、0.6%群ではRBCとPLTの増加、0.2%群ではRBC、Hb、およびPLTの増加が認められたが、これらに用量相関性はみられず、また変動傾向が一定でないことから、偶発的な変動とみなした。雄においては対照群と比べ明らかな変動のある項目は認められなかった(Table 3)。血液像での白血球百分率では、雄の投与全群でSegおよびLymphの増加あるいは減少する傾向がみられたが、用量に相関性は認められなかった。雌においては、対照群に比べて明らかな変動のある項目は認められなかった(Table 4)。

血清生化学的検査では、雄の投与全群でNaおよびClが

Table 1. Body weight and food consumption in rats fed diet containing phaffia colour for 2 weeks

	Body weight		Average food consumption (g/day/rat)
	0 week	2 weeks	
5 %	146±3.4	198±5.0	15.2
2.5 %	145±6.8	203±7.8	15.4
1.25 %	145±6.0	201±8.8	15.1
0.6 %	144±3.3	197±6.6	15.1
Control (acetone)	141±4.6	197±6.2	15.6
Control	138±5.5	190±10.6	14.7

Table 2. Food consumption and chemical intake in rats fed diet containing phaffia colour for 13 weeks

Group	Food consumption (g / animal / day)		Daily food intake (mg / kg / day)		Total food intake (g / kg)		Phaffia colour intake (mg / kg / day)	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
5 %	15.6	10.5	2956	3255	269	296	448	493
1.7 %	14.7	9.7	977	1055	89	96	148	160
0.6 %	14.4	10.2	340	356	31	35	52	58
0.2 %	14.4	9.9	113	123	10	11	17	18
Control	14.5	10.2	-	-	-	-	-	-

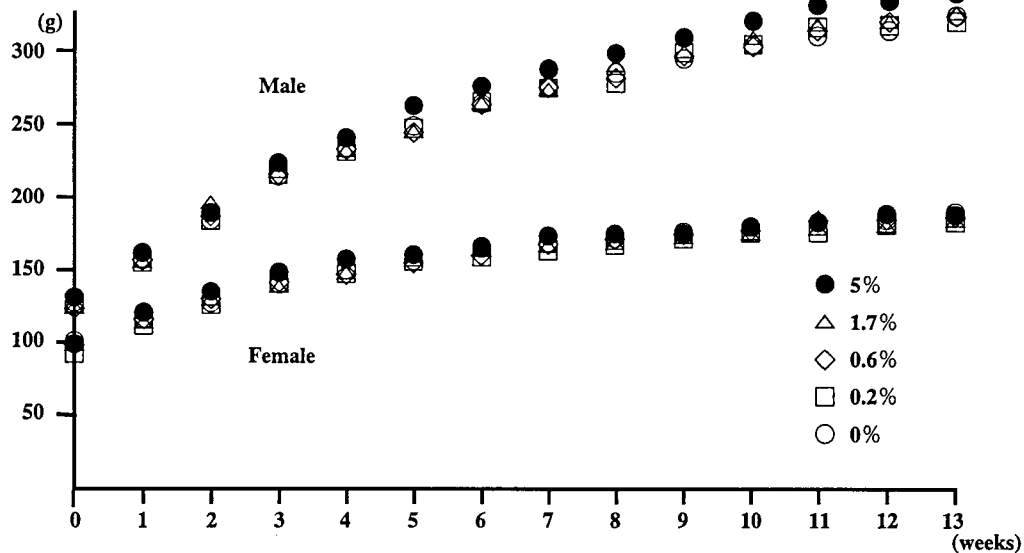


Fig. 1. Body weight curves in rats fed diet containing phaffia colour for 13 weeks

増加, 0.6%群以上の投与群で GOT の減少が認められた。また, 0.2%と0.6%群で TG の減少と P の増加傾向, さらに, 0.6%群では K と ALP の減少および GPT の増加がみられたが, これらは用量相関性のあるものではなかった (Table 5)。

雌では, 0.2%と0.6%の群で UN の減少, 0.2%群で K, GOT の減少, 0.6%群で GOT, GPT の減少, 1.7%群で Na の増加, 5%群で GOT の減少が認められた。しかし, これらの変動は用量相関性のあるものではなかった。

#### 4. 臓器重量

雄の 5%群で, 脳, 肝の実重量の増加, 脳の相対重量の減少, 1.7%群で脳の実重量, 相対重量の増加および, 脾の実重量, 相対重量の増加および 0.6%群で脳の実重量の増加, 0.2%群で脳の実重量, 相対重量は有意に減少した (Table 6)。一方, 雌において, 1.7, 0.6, 0.2%群で

脳の実重量, 1.7%群で心の実重量, および0.2%群で腎の実重量が有意に減少した (Table 7)。しかし, これらの減少は相対重量では対照群に比べ有意な変動は認められなかった。

#### 5. 病理組織学的所見

雌の 5%群に肝臓の小肉芽腫が 3 例, 対照群に 1 例, 雄の対照群の心臓に, 心筋繊維症が 6 例, 5%群に 3 例認められた (Table 8)。これらの所見は投与群と比べてその程度や大きさに差異はなく, 発生頻度にも有意な差は認められなかった。その他の臓器に種々の所見が散発的に認められた。

#### 考 察

ファフィア色素はその色調の主成分がアスタキサンチンである。天然食用色素は, 添加物の安全性への関心から近

Table 3. Hematological data in rats fed diet containing phaffia colour for 13 weeks

Group	WBC (x 10 <sup>2</sup> / ul)	RBC (x 10 <sup>4</sup> / ul)	Hb (g / dl)	Ht (%)	PLT (x 10 <sup>4</sup> / ul)
Male					
5 %	41 ± 5 <sup>a)</sup>	929 ± 44	15.8 ± 0.7	44.1 ± 2.3	77.3 ± 6.0
1.7 %	40 ± 6	920 ± 31	15.6 ± 0.4	43.7 ± 1.4	74.3 ± 2.5
0.6 %	41 ± 7	931 ± 29	15.9 ± 0.5	43.8 ± 1.3	75.9 ± 2.9
0.2 %	39 ± 4	939 ± 31	15.8 ± 0.5	44.7 ± 1.5	77.8 ± 4.0
Control	45 ± 9	936 ± 81	15.9 ± 1.4	44.8 ± 3.8	74.0 ± 7.7
Female					
5 %	35 ± 6	864 ± 38	15.9 ± 0.7	43.3 ± 1.8	79.3 ± 3.7
1.7 %	35 ± 6	899 ± 54	16.4 ± 1.0	44.9 ± 2.8	88.0 ± 5.2 **
0.6 %	36 ± 7	919 ± 45**	16.4 ± 0.8	46.6 ± 2.3	112.4 ± 6.0 **
0.2 %	38 ± 4	928 ± 37**	16.7 ± 0.6*	46.6 ± 1.9	105.6 ± 10.5**
Control	36 ± 6	859 ± 29	15.9 ± 0.5	43.0 ± 1.4	79.4 ± 3.1

a) : Mean ± S.D.

\* \*\* : Significantly different from the control at \* p&lt;0.05, \*\* p&lt;0.01, respectively

Table 4. Differential leukocyte counts in rats fed diet containing phaffia colour for 13 weeks

Group	Seg (%)	Eosin (%)	Lymph (%)	Mono (%)	Ebl (no.)
Male					
5 %	21.4 ± 4.5 <sup>a)</sup> *	1.5 ± 0.9	77.1 ± 4.3 *	0.1 ± 0.2	1.8 ± 2.1
1.7 %	24.4 ± 4.1 **	1.3 ± 0.5	74.0 ± 3.8**	0.3 ± 0.3	1.8 ± 1.8
0.6 %	25.0 ± 2.7**	1.6 ± 0.7	73.4 ± 3.1**	0.1 ± 0.2	3.1 ± 2.3
0.2 %	22.5 ± 3.8**	1.3 ± 1.1	76.0 ± 3.6**	0.2 ± 0.2	1.9 ± 1.2
Control	17.3 ± 3.6	1.3 ± 0.5	81.3 ± 3.5	0.1 ± 0.2	2.2 ± 1.8
Female					
5 %	15.4 ± 3.6	1.1 ± 1.1	83.3 ± 3.8	0.2 ± 0.3	3.7 ± 2.9
1.7 %	19.3 ± 6.0	0.9 ± 0.7	79.6 ± 5.7	0.2 ± 0.3	2.5 ± 1.6
0.6 %	13.8 ± 4.9	1.4 ± 0.8	84.6 ± 5.5	0.2 ± 0.2	4.1 ± 2.1
0.2 %	16.2 ± 2.5	1.3 ± 0.9	82.3 ± 2.9	0.2 ± 0.3	3.6 ± 2.9
Control	17.5 ± 5.3	1.3 ± 0.8	81.1 ± 5.2	0.2 ± 0.3	4.6 ± 3.7

a) : Mean ± S.D.

\* \*\* : Significantly different from the control at \* p&lt;0.05, \*\* p&lt;0.01, respectively

年需要が増大している。特に暖色系色素は視覚的に食進増強作用があり食用色素中に占める割合も高い。しかし、天然色素は原料の品質によって、色調の均一性にばらつきが生じる場合が多い。アスタキサンチンは鮭、鯛、海老など魚介類の赤色色調の主成分であり、主にオキアミや甲殻類

からの抽出によって得られているが、色素濃度、原料由来の臭気等、品質と経済性から問題が多い。一方、1976年にアスタキサンチンを特異的に産生するファフィア酵母が見つかり、その後、菌株の選択、培養条件の改良により高率にアスタキサンチンを生産することが可能となった<sup>5)</sup>経緯

Table 5. Serum biochemical data in rats fed diet containing phaffia colour for 13 weeks

Group	TP (g/dl)	A/G	TC (mg/dl)	TG (mg/dl)	UN (mg/dl)	Ca (mg/dl)	P (mg/dl)
<b>Male</b>							
5 %	6.4±0.1 <sup>a)</sup>	2.4±0.1	73.7±5.3	96.9±29.8	18.8±1.6	10.4±0.2	5.3±0.3
1.7 %	6.5±0.1	2.5±0.1	72.4±4.1	90.7±28.5	19.9±1.1	10.4±0.2	5.5±0.3
0.6 %	6.4±0.2	2.6±0.2	72.4±5.9	84.1±25.4**	19.3±2.0	10.6±0.1	5.8±0.3*
0.2 %	6.5±0.1	2.5±0.2	68.4±5.5	65.1±17.3**	19.7±1.2	10.4±0.1	6.8±0.4**
Control	6.4±0.2	2.4±0.1	72.8±4.8	113.1±13.1	20.1±1.8	10.5±0.2	5.5±0.3
<b>Female</b>							
5 %	6.6±0.2	3.0±0.2	103.9±9.4	25.2±6.5	19.2±2.0	10.4±0.2	6.1±0.3
1.7 %	6.5±0.2	3.0±0.2	97.8±7.6	20.5±9.1	18.7±1.8	10.3±0.4	6.0±0.5
0.6 %	6.5±0.2	3.0±0.2	97.3±9.8	23.5±7.4	18.5±1.4*	10.4±0.2	6.1±0.4
0.2 %	6.5±0.2	2.9±0.2	96.3±6.2	22.2±10.0	17.9±1.3**	10.5±0.2	6.1±0.4
Control	6.5±0.2	2.9±0.2	98.3±7.5	28.5±9.3	20.4±2.1	10.6±0.2	6.1±0.4

a) : Mean ± S.D.

\* \*\* : Significantly different from the control at \* p&lt;0.05, \*\* p&lt;0.01, respectively

Table 5. Serum biochemical data in rats fed diet containing phaffia colour for 13 weeks (continued)

Group	Na (mEQ/l)	K (mEQ/l)	Cl (mEQ/l)	GOT (IU/l)	GPT (IU/l)	ALP (IU/l)	Alb (g/dl)
<b>Male</b>							
5 %	144.8±0.9 <sup>a)</sup>	4.3±0.3	106.0±0.6**	75.5±8.5**	53.0±3.0	348.5±16.5	4.5±0.1
1.7 %	145.0±0.9**	4.3±0.2	106.3±0.7**	74.5±8.9**	51.2±4.0	338.8±20.6	4.6±0.1
0.6 %	144.6±1.0**	4.1±0.2**	105.5±1.8*	76.7±11.5*	56.7±5.0*	324.0±23.5*	4.6±0.1
0.2 %	146.5±1.0**	4.4±0.2	104.8±0.8*	89.1±5.1	51.2±5.5	341.7±18.9	4.6±0.1
Control	142.9±0.7	4.4±0.1	103.8±0.8	90.9±12.5	52.4±4.1	343.1±15.7	4.5±0.1
<b>Female</b>							
5 %	144.0±1.2	4.1±0.1	105.4±1.0	70.7±4.9**	39.4±7.9	232.1±31.3	5.0±0.2
1.7 %	146.0±1.2*	4.1±0.2	105.3±1.6	77.7±6.4	39.8±2.7	222.4±16.6	4.8±0.1
0.6 %	143.9±1.4	4.0±0.2	105.2±1.1	69.8±3.7**	37.1±3.3**	223.7±35.0	4.9±0.1
0.2 %	144.8±1.1	3.8±0.2*	105.1±1.7	67.9±4.1**	41.9±6.5	229.6±18.4	4.8±0.2
Control	144.8±1.1	4.1±0.2	106.4±2.2	80.0±4.0	41.6±2.6	248.7±46.6	4.8±0.2

a) : Mean ± S.D.

\* , \*\* : Significantly different from the control at \* p&lt;0.05, \*\* p&lt;0.01, respectively

があるが、その毒性についての情報はほとんどない。ファフィア色素製剤の構成は色素15%と大豆油85%であるが、大豆油の影響を除去するため、今回供与されたファフィア色素原体はファフィア100%のものを使った。実験に用いた用量は製剤での濃度とし、その濃度に含有しているファフィア色素量を実際に添加した。色素としての実際の摂取

量は Table 2 のファフィア色素摂取量に表記した。今回用いたファフィア色素中のアスタキサンチンは78%であった。血液学的検査において雌の投与群で PLT や赤血球の増加傾向が認められたが、用量相関や雌雄差等はなく、偶発的な変動と考えられた。白血球の血液像分類では雄の投与群で分葉核好中球の増加とリンパ球の減少が投与群で認



Table 6. Organ weights of male in rats fed diet containing phaffia colour for 13 weeks

	Dose level (%)				
	0	0.2	0.6	1.7	5
<b>Absolute</b>					
Body (g)	312.0±16.1 <sup>a)</sup>	314.2±10.3	314.2±17.4	314.6±12.8	327.4±13.1*
Brain(mg)	1911±4	1905±5 *	1923±5**	1946±4**	1946±4**
Thymus(mg)	199±26	208±44	229±46	210±43	215±47
Lung(g) R	0.66±0.08	0.66±0.05	0.67±0.04	0.67±0.04	0.69±0.04
L	0.35±0.02	0.35±0.02	0.35±0.02	0.35±0.02	0.36±0.01
Heart(g)	0.93±0.09	0.95±0.05	0.92±0.05	0.93±0.05	0.97±0.07
Spleen(g)	0.62±0.04	0.65±0.04	0.64±0.05	0.67±0.05*	0.64±0.03
<b>Relative</b>					
Brain (mg)	614±3	607±2 *	613±3	619±2 **	595±2**
Thymus (mg)	64±6	66±15	73±12	67±12	66±14
Lung (mg) R	211±23	209±17	214±10	213±14	211±10
L	113±5	112±7	110±4	113±8	108±3
Heart (mg)	298±18	301±16	294±14	296±15	295±15
Spleen (mg)	197±10	207±12	203±11	213±15*	197±10

a) : Mean± S.D.

\* ,\*\* : Significantly different from the control at \* p&lt;0.05, \*\* p&lt;0.01, respectively

Table 6. Organ weights of male in rats fed diet containing phaffia colour for 13 weeks (continued)

	Dose level (%)				
	0	0.2	0.6	1.7	5
<b>Absolute</b>					
Liver (g)	7.58±0.43 <sup>a)</sup>	7.28±0.41	7.36±0.60	7.70±0.47	7.98±0.38*
Adrenal (mg) R	17±3.0	17±1.6	17±2.0	16±2.0	16±2.1
L	18±2.1	17±4.5	19±1.5	19±3.3	18±3.6
Kidney (g) R	0.95±0.06	0.95±0.06	0.94±0.06	0.95±0.04	0.99±0.08
L	0.97±0.08	0.93±0.05	0.96±0.05	0.98±0.05	1.01±0.07
Testis (g) R	1.49±0.05	1.51±0.02	1.44±0.27	1.51±0.04	1.52±0.07
L	1.43±0.23	1.56±0.09	1.48±0.27	1.55±0.05	1.53±0.06
<b>Relative</b>					
Liver (g)	2.43±0.09	2.32±0.07	2.34±0.09	2.45±0.10	2.44±0.06
Adrenal (mg) R	5.4±0.9	5.4±0.6	5.3±0.5	5.1±0.6	4.9±0.6
L	5.8±0.6	5.8±0.7	6.1±0.5	6.1±1.2	5.5±1.1
Kidney (g) R	0.30±0.01	0.30±0.01	0.30±0.01	0.30±0.01	0.30±0.02
L	0.31±0.02	0.30±0.01	0.31±0.01	0.31±0.01	0.31±0.02
Testis (g) R	0.48±0.03	0.48±0.02	0.46±0.09	0.48±0.02	0.46±0.02
L	0.46±0.08	0.50±0.03	0.47±0.09	0.49±0.03	0.47±0.02

a) : Mean± S.D.

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

Table 7. Organ weights of female in rats fed diet containing phaffia colour for 13 weeks

	Dose level (%)				
	0	0.2	0.6	1.7	5
<b>Absolute</b>					
Body (g)	178.6±6.0 <sup>a)</sup>	172.3±5.5*	178.1±8.1	175.0±10.3	179.9±6.8
Brain(mg)	1796±4	1787±5**	1775±5**	1776±3**	1797±3
Thymus(mg)	164±28	155±34	166±20	176±28	175±36
Lung(g) R	0.47±0.03	0.48±0.03	0.47±0.03	0.47±0.02	0.49±0.02
L	0.26±0.02	0.25±0.02	0.25±0.02	0.25±0.02	0.26±0.02
Heart(g)	0.61±0.04	0.59±0.05	0.60±0.04	0.57±0.02*	0.61±0.03
Spleen(g)	0.41±0.02	0.39±0.03	0.40±0.06	0.40±0.03	0.40±0.01
<b>Relative</b>					
Brain (mg)	1007±34	1038±45	998±35	1017±49	1000±49
Thymus (mg)	92±16	90±19	93±11	100±13	97±21
Lung (mg) R	265±11	279±20	265±19	270±17	272±18
L	146±11	148±11	142±11	145±8	145±11
Heart (mg)	340±31	343±26	338±20	325±18	338±23
Spleen (mg)	230±16	229±20	225±34	228±11	225±10

a) : Mean ± S.D.

\*,\*\* : Significantly different from the control at \* p&lt;0.05, \*\* p&lt;0.01, respectively

Table 7. Organ weights of female in rats fed diet containing phaffia colour for 13 weeks (continued)

	Dose level (%)				
	0	0.2	0.6	1.7	5
<b>Absolute</b>					
Liver (g)	4.00±0.24	3.85±0.19	3.94±0.20	3.78±0.27	4.02±0.14
Adrenal (mg) R	20±2.4	21±3.0	21±1.8	19±2.2	20±3.5
L	23±3.0	23±3.2	21±2.0	21±2.6	22±2.0
Kidney (g) R	0.60±0.04	0.56±0.03*	0.58±0.04	0.57±0.04	0.60±0.04
L	0.61±0.03	0.57±0.03*	0.59±0.05	0.59±0.03	0.62±0.04
<b>Relative</b>					
Liver (g)	2.24±0.15	2.23±0.11	2.21±0.06	2.16±0.12	2.24±0.08
Adrenal (mg) R	11.1±1.4	11.9±1.8	11.6±1.2	10.7±1.0	11.2±1.8
L	12.8±1.8	13.5±2.1	11.9±1.0	12.0±1.1	12.2±1.1
Kidney (g) R	0.33±0.02	0.33±0.02	0.33±0.02	0.32±0.01	0.33±0.02
L	0.34±0.02	0.33±0.02	0.33±0.02	0.34±0.01	0.34±0.02

a) : Mean ± S.D.

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

Table 8. Histopathological findings in rats fed diet containing phaffia colour for 13 weeks

Organ	Findings	Male		Female	
		0 %	5%	0%	5%
Stomach	Squamous metaplasia in glandular stomach +	1	0	0	0
	Ectopic gland in forestomach +	0	1	0	0
Liver	Microgranuloma +	1	1	1	3
Pancreas	Acinar atrophy +	1	1	0	0
	Cell infiltration +	0	0	1	0
Heart	Myocarditis ±	6	3	0	0
Lung	Perivascular cell infiltration +	0	1	0	0
Peyer's patch in small intestine	Calcification +	0	1	0	0
Thymus	Cyst +	0	1	0	0
Pituitary	Dilatation of sinusoid +	0	1	0	0
	Rathke's pouch +	0	1	0	1
Testis	Focal atrophy +	1	0	-	-
	Diffuse atrophy +	1	0	-	-
Prostate	Cell infiltration +	1	0	-	-
		0	1	-	-
Abdominal cavity	Accessory spleen +	0	0	0	1

められたが、用量相関性や雄のみの変動、白血球総数の変化や炎症等の対応する病理組織所見がなかったことから、投与に起因するものではないと考えられた。血液生化学的検査においては、雌雄ともに用量相関性のある変化ではなく散発的な変動であり、被験物質の影響は認められなかった。雌の0.2%群で体重の増加抑制が認められた、しかし減少率は対照群の96%であり、この抑制程度は投与開始時に対照群との間に認められたものと同じであった。臓器重量において雄の5%群で肝実重量の有意な増加が認められたが、相対重量や組織学的に肝細胞の腫大など重量増加を示唆する所見は認められず、投与に関連する変化が否か明らかにすることができなかった。雄の0.6%以上の投与群で脳重量が有意に増加したが、対応する組織学的変化が見られなかったことから投与に起因した変化ではないと考えられた。病理組織学的所見の多くは異所性臓器の出現や胎生期の遺残などであり、投与に起因したものではなかった。また、小肉芽腫や細胞浸潤が種々の臓器・組織に見られたが、散発的で、発生傾向や程度に同一性がなかったことから、偶発的な自然発生の病変と考えられた<sup>7-8)</sup>。

以上の結果より、ファフィア色素5% (ファフィア色素量として0.075%) 飼料に混じり、13週間雌雄F344ラットに投与したが、被験物質に起因する毒性所見は認められず、本物質の食品添加物としての安全性に問題ないことが示唆された。

## 文 献

- 1) Schroeder WA, Johnson EA: Singlet oxygen and peroxy radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. *J. Biol. Chem.* **270**(31):18374~9, (1995)
- 2) Jyonouchi H, Zhang L, Tomita Y: Studies of immunomodulating actions of carotenoids. II. Astaxanthin enhances in vitro antibody production to T-dependent antigens without facilitating polyclonal B-cell activation. *Nutr. Cancer* **19**(3):269~80, (1993)
- 3) Tanaka T, Morishita Y, Suzui M, Kojima T, Okumura A, Mori H: Chemoprevention of mouse urinary bladder carcinogenesis by the naturally occurring carotenoid astaxanthin. *Carcinogenesis* **15**(1):15~9, (1994)
- 4) Tanaka T, Makita H, Ohnishi M, Mori H, Satoh K, Hara A: Chemoprevention of rat oral carcinogenesis by naturally occurring xanthophylls, astaxanthin and canthaxanthin. *Cancer Res.* **55** (18):4059~64 (1995)
- 5) 「6」アスタキサンチン産生微生物を用いた色素生産技術の開発。新しい食品素材への挑戦、食品機能の変換・高度化技術。フードデザイン技術研究組合 (1994)
- 6) 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)
- 7) 豊田和弘, 林修次, 畝山智香子, 川西徹, 高田幸一, 高橋道人:  $\beta$ -cyclodextrin13週間経口投与 F344ラットにおける肝病変。衛生試験所報告 **113**, 36~43 (1995)
- 8) 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)

## アミノ酸加熱分解産物 MeIQx のラットにおける16週間混餌投与の影響

笠原健一郎<sup>#</sup>・古川 文夫・西川 秋佳・田中丸善洋  
金 亨津<sup>\*</sup>・池崎信一郎・高橋 道人

Effects of 16-week dietary administration of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline in rats

Ken-ichiro Kasahara<sup>#</sup>, Fumio Furukawa, Akiyoshi Nishikawa,  
Zen-yo Tanakamaru, Hyung-Chin Kim<sup>\*</sup>,  
Shinichiro Ikezaki and Michihito Takahashi

2-Amino-3, 8-dimethylimidazo[4, 5-*f*]quinoxaline (MeIQx), a heterocyclic amine found in cooked meats, is carcinogenic in mice and rats at high doses. In order to examine the toxicity including preneoplastic changes at the lower doses, a total of 170 male Fischer 344 rats were administered MeIQx for 16 weeks at a dose of 100, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 ppm or 0 ppm in the diet. The numbers of GST-P positive foci and BrdU-labeling indices in the liver were significantly increased by the dietary administration of 10 ppm and 1 ppm or more of MeIQx respectively, when compared with the basal diet-fed control rats. Aberrant crypt foci (ACF) were also significantly increased in the 100 ppm MeIQx group as compared to the control value. No histopathological changes indicating obvious toxicity of MeIQx were observed in the major organs other than the liver and large intestine. In conclusion, our results clearly indicate that MeIQx selectively targets the liver and large intestine of rats as organs for the toxicity, but dose not affect the other major organs at low doses.

**Keywords:** MeIQx, toxicity, liver, colon

(Received May 30, 1997)

## 緒 言

2-Amino-3, 8-dimethylimidazo[4, 5-*f*]quinoxaline (MeIQx) は加熱した食品, 特に焦げた部分に多く含まれるアミノ酸加熱分解産物 heterocyclic amines (HCAs) の一つで, Kasai らによって1981年に fried beef から分離された<sup>1)</sup> (Fig. 1). HCAs はクレアチニン, アミノ酸, 糖などの混合物が加熱されることにより生成され, ラットにおける長期投与では400ppmの混餌投与で肝臓, ジンバル腺, 陰核腺および皮膚に<sup>2)</sup>, マウスでは600ppmの混餌投与で肝臓, 肺および造血器における腫瘍発生が報告されている<sup>3)</sup>. しかしながら, MeIQxを含めたHCAsの低濃度域における生体への影響については十分な知見が得られていない. 今回, 低濃度域を含む MeIQx を用いた16週間の亜慢性毒性試験を行い, ラットの主要臓器における毒性影響について病理組織学的に検索した.

## 試験材料および方法

## 1. 被験物質および使用動物

MeIQx はナード研究所 (大阪) より購入した. 3週齢の F344/DuCrj 系雄性ラット (SPF), 170匹を日本チャールス・リバー社 (神奈川) より購入し, 無作為に7群 (1, 2群; 各群10匹, 3~7群; 各群30匹) に分け試験に供した. 動物の飼育は, 室温24±1℃, 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時間消灯のバリエーションシステム飼育室にて行った. 動物はポリカーボネート製ケージに5匹ずつ収容した. 床敷は三協ラボサービ

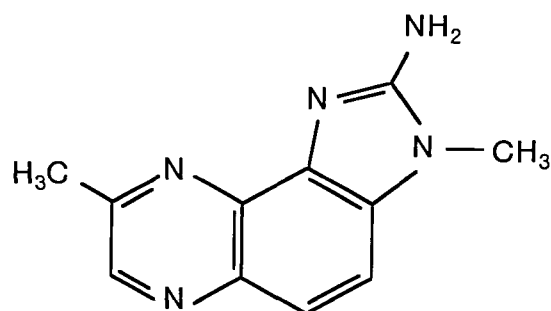


Fig. 1. Chemical structure of MeIQx

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed: Ken-ichiro Kasahara; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya-ku, Tokyo, 158, Japan; Tel: 03-3700-9819 Fax: 03-3700-2348 E-mail: Kasahara@nihs.go.jp

<sup>\*</sup> 韓国化学研

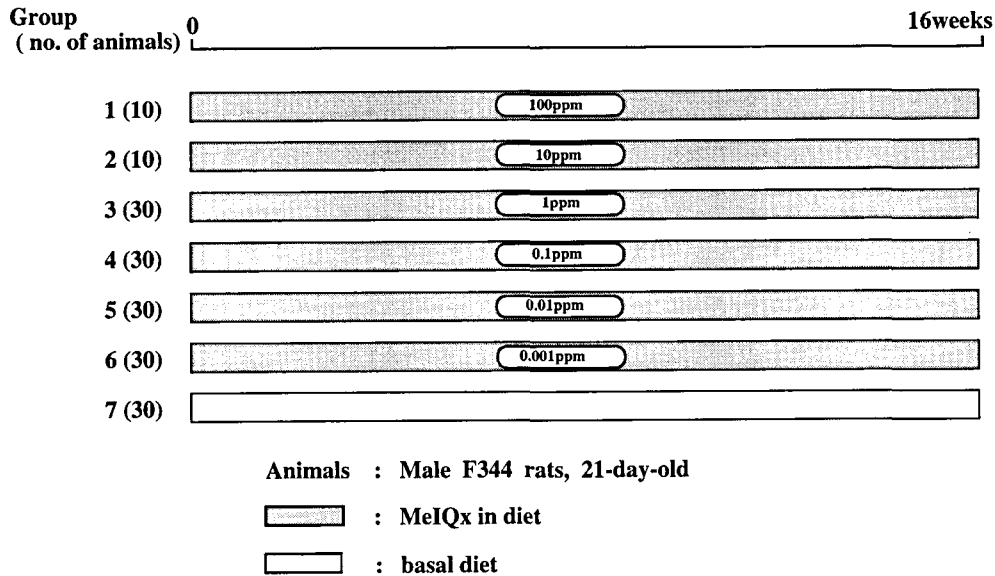


Fig. 2. Experimental design

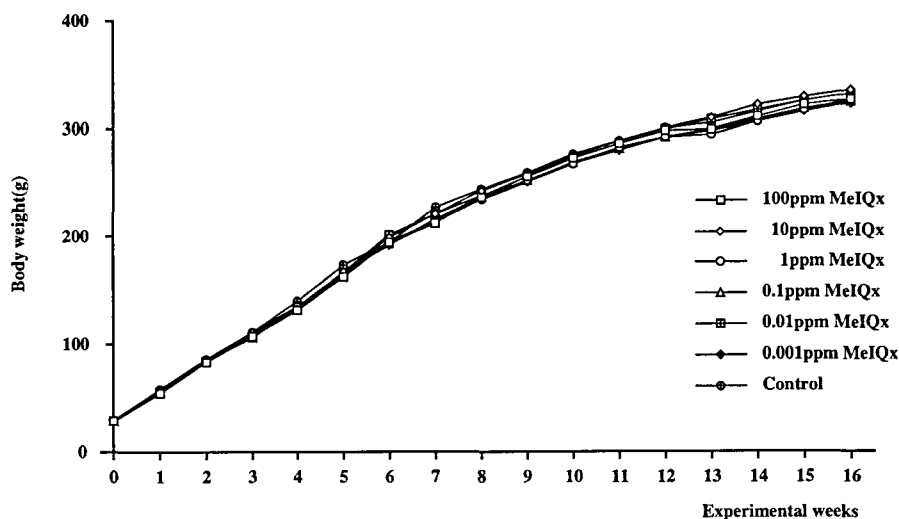


Fig. 3. Body weight curves for rats treated with MeIQx for 16 weeks

ス社(東京)のソフトチップ用い, 週2回の交換を行った。飲料水は水道水を自由摂取させた。

## 2. 試験方法

被験物質投与群(1~6群)は最高用量を100ppmとし, 以下公比10で減じて最低用量を0.001ppmとした MeIQx を, 基礎飼料 MF 粉に混合し(オリエンタル酵母工業(株), 東京), 16週間自由摂取させた。また, 対照群(7群)には同期間基礎飼料のみを与えた(Fig. 2)。試験期間中, 全動物の一般状態を観察し, 体重を週1回, 摂餌量を第4週まで週1回, その後4週間に1回の計測を行った。投与最終日に全動物を一晩絶食させた。エーテル麻酔下で開腹, 腹部大動脈より放血死させた後, 剖検を行い, 諸臓器を摘出後, 肉眼的に観察した。心臓, 肺, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 副

腎, 精巣は臓器重量測定後, 甲状腺(上皮小体を含む), 胸腺, 脾臓, 消化管, 生殖器, 膀胱, 皮膚および肉眼的異常部位と共に10%中性緩衝ホルマリン液にて固定した。固定後, 各臓器および組織を切り出し, 常法に従ってパラフィン包埋後薄切, ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を施し, 対照群および最高用量群について病理組織学的検索を行った。また, いずれかの臓器に変化が見られた場合, 当該臓器の全用量群について同様の検索を行った。肝臓は解剖時に全動物の左葉1ヶ所, 中間葉2ヶ所を切り出した。これらの組織切片は冷ホルマリン液で固定し, パラフィン包埋後薄切, glutathione S-transferase placental form (GST-P) および 5-bromodeoxyuridine (BrdU) について免疫組織化学的染色を実施した。GST-P 染色は抗 GST-P 抗

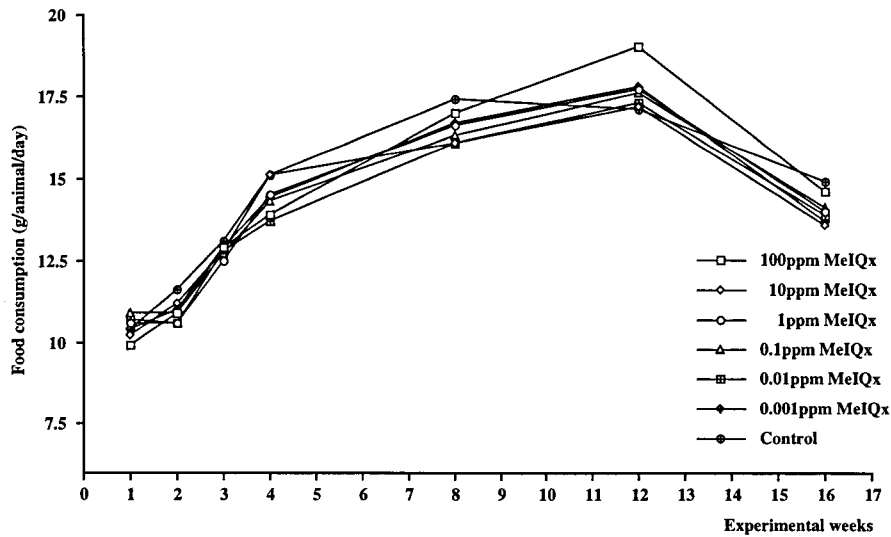


Fig. 4. Food consumption of rats treated with MeIQx for 16 weeks

Table 1. Histopathological findings of major organs other than the liver and large intestine

Control(No. rats examined= 30)				100ppm MeIQx(No.rats examined=10)			
Organ	Findings	No. of rats with	%	Organ	Findings	No. of rats with	%
Thyroid	ultimobranchial cyst	3	10.0	Thyroid	ultimobranchial cyst	2	20.0
Heart	cellular infiltration	6	20.0	Heart	ectopic thymus	1	10.0
Lung	calcification of arterial wall	1	3.3	Heart	cellular infiltration	1	10.0
	ossification	1	3.3	Kidney	tubular basophilia	1	10.0
Spleen	capsulitis	1	3.3	Prostate	cellular infiltration	1	10.0
Kidney	tubular basophilia	2	6.7				
	hyaline cast	3	10.0				
Pancreas	focal atrophy	2	6.7				
Testis	atrophy of seminiferous tubule	1	3.3				

体 (MBL, 名古屋), BrdU 染色は抗 BrdU 抗体 (DAKO, 京都) を用いた. GST-P は Vectastain Elite ABC キット (フナコシ, 東京) で, また, BrdU はストレプトアビジン-ビオチン複合体法により行った. 染色後, 全葉の GST-P 陽性肝細胞巢数および単位面積あたりの BrdU 陽性率を光学顕微鏡下で計測した. 大腸は全動物について, ホルマリン固定後, 2% メチレンブルーで粘膜面を染色し, 透過顕微鏡下で aberrant crypt foci (ACF) の発生個数を計測した. 計測後, 他臓器と同様に組織学的検索に供した. 体重, 臓器重量, 摂餌量および摂水量, 肝 GST-P 陽性細胞巢数, BrdU 陽性率および大腸 ACF 数について各群毎に平均値および標準偏差を求め, 対照群との差を Student の t 検定により

統計学的に解析した.

## 結 果

### 1. 一般状態

試験期間中の動物の一般状態については, いずれの群においても特記すべき変化は見られず, すべての動物が試験終了時まで生存した.

### 2. 体重および臓器重量

試験期間中の各群の体重推移を Fig. 3 に示す. いずれの投与群も対照群との間に差は見られなかった. また臓器重量においても各投与群とも対照群との間に差は見られなかった.

### 3. 摂餌量

各群の摂餌量を Fig. 4に示す。いずれの投与群も試験期間を通して対照群との間に差は見られなかった。

### 4. 病理組織学的検索

HE染色標本による光顕的検索では、100ppm MeIQx 投与群の肝臓において好塩基性肝細胞巣が観察されたが、10 ppm以下の群では観察されなかった。免疫染色の結果、単位面積当たりのGST-P陽性肝細胞巣数(／cm<sup>2</sup>)は10ppmおよび100ppm群で各々平均1.04および58.25であり、対照群の平均0.38に比し、有意な増加(p<0.05および0.001)がみられた。また、肝細胞のBrdU陽性率(%)は1 ppm, 10 ppmおよび100ppm投与群で、各々平均0.28, 0.36および0.50であり、対照群の平均0.18に比し、有意に(p<0.05或いは0.01)増加した。大腸ACFは大型の杯細胞を多数有するcryptからなり、対照群を含む全群に観察されたが、対照群および投与群の間に形態学的な差異は認められなかった。また、その数は100ppm MeIQx 投与群の平均4.1個であり対照群の平均1.0個に比し、有意に(p<0.01)増加した。

その他の臓器では、甲状腺における鰓後体遺残(対照群3例, 100ppm MeIQx 投与群2例)および異所性胸腺(100 ppm MeIQx 投与群1例)、心筋間質におけるリンパ球、マクロファージを主とする細胞浸潤(対照群6例, 100ppm MeIQx 投与群1例)、肺における血管壁の石灰化(対照群1例)および骨化生(対照群1例)、脾臓における被膜炎(対照群1例)、腎臓における好塩基性尿管(対照群2例, 100ppm MeIQx 投与群1例)および硝子様円柱(対照群3例)、膵腺房の限局性萎縮(対照群2例)、前立腺間質における細胞浸潤(100ppm MeIQx 投与群1例)、精巣における精細管萎縮(対照群1例)が観察された。しかしながら、発生例数および変化の程度において対照群と100ppm MeIQx 投与群との間に明らかな差異は見られなかった(Table 1)。

## 考 察

<sup>32</sup>P-postlabeling methodによる検索では、0.4~400ppmのMeIQx投与によって、用量および投与期間に相関した肝臓におけるDNA-adduct formationが報告されている<sup>9)</sup>。また、MeIQxおよびそのDNA-adductが投与終了後も数日間検出されており、標的臓器における停滞が示唆されている<sup>9)</sup>。HE標本による検索では100ppm投与群に肝細胞の小増殖巣が観察されたが、本実験でみられたように好塩基性を示す小増殖巣は、その後結節性増殖巣、さらには肝癌に進展するものが多いと考えられている<sup>9)</sup>。GST-PおよびBrdUによる免疫組織化学的検索によって、各々10ppmおよび1 ppm投与における単位面積当たりの陽性細胞巣数あるいは陽性率の有意な増加が観察され、より低い濃度で

の前腫瘍性病変の検索が可能となった。また、投与12週時における0.1ppm, 0.01ppm, 0.001ppm各投与群ラットのMeIQx平均摂取量は各々1.80, 0.17, 0.018μg/rat/dayであったが、ヒトにおけるMeIQx曝露量(0.2~2.6μg/person/day)に近似しており<sup>9)</sup>、MeIQxの発癌リスクを評価する上で有用な結果と考えられた。

他のHCAsである2-hydroxyamino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline(IQ)および2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-c]pyridine(PIhP)によるラット大腸の腫瘍発生が知られているが<sup>7,8)</sup>、MeIQx投与による大腸腫瘍そのものの発生は観察されていない<sup>9)</sup>。しかしながら、MeIQxを含めこれらHCAsによるACFの誘発実験では、いずれにおいても有意な増加が認められており<sup>9,10)</sup>。IQによって増加したACFではKi-ras geneのtransversion(codon12; GGT→GAT, codon13; GGC→GCC)が報告されている。Azoxymethane誘発の大腸腫瘍ではras geneのmutationが<sup>8)</sup>観察されているにもかかわらず、IQによる大腸腫瘍ではras mutationは認められていないことから、これらHCAsによるACF誘発は大腸腫瘍発生における初期段階の変化と考えられている<sup>11)</sup>。今回の実験においても100ppmのMeIQx投与によってACFが有意に増加し、MeIQx投与群でc-K-ras geneのtransversion(codon12; GGT→GAT)が1例のみ観察されたが、その形態を含め、対照群との間に明らかな差異は見られなかった<sup>12)</sup>。ACFの生物学的な意義および大腸発癌との関連性については今後さらに詳細な検討が必要と思われる。

一方、PIhPの長期投与によってラットの心筋細胞に変性、壊死などの毒性病変が観察されており、その作用機序として心筋ミトコンドリアにおけるDNA-adduct formationが考えられている<sup>13)</sup>。このような心臓病変を形成するPIhPのadduct formationは主として心臓、肺、膵臓および大腸であり、肝臓では最も低い頻度であることが報告されている。これに対して、MeIQx投与によって形成されるDNA-adduct formationは主として肝臓、腎臓、膵臓および大腸で認められているが<sup>14)</sup>、400ppmのMeIQx投与によって、ごく僅かながら心臓におけるDNA-adduct formationが観察されており<sup>15)</sup>、心病変誘発の可能性は否定できない。しかしながら、今回の実験で観察された心臓における軽度の細胞浸潤は対照群を含む全群に見られ、またその程度も軽微なものであった。従って、本実験条件下で観察された心病変は、他の臓器に観察された病変同様、発生例数、およびその病理学組織学的性状から本系統ラットに好発する自然発生病変と考えられた。

以上、16週間のMeIQx投与によって、肝臓および大腸に前腫瘍性病変が増加し、MeIQxによる発癌の標的性を示唆する所見が得られたが、その他の臓器では100ppmのMeIQx投与においても顕著な毒性影響は見られなかった。

## 文 献

- 1) Kasai, H., Shiomi, T., Sugimura, T. and Nishimura, S.: Synthesis of 2-amino-3, 8-dimethylimidazo[4, 5-f]quinoxaline (MelQx), a potent mutagen isolated from fried beef. *Chem. Lett.*, 675~678(1981)
- 2) Kato, T., Ohgaki, H., Hasegawa, H., Sato, S., Takayama, S. and Sugimura, T.: Carcinogenicity in rats of a mutagenic compound, 2-amino-3, 8-dimethylimidazo[4, 5-f]quinoxaline. *Carcinogenesis*, 9, 71~73(1988)
- 3) Ohgaki, H., Hasegawa, H., Suenaga, M., Sato, S., Takayama, S. and Sugimura, T.: Carcinogenicity in mice of mutagenic compound, 2-amino-3, 8-dimethylimidazo[4, 5-f]quinoxaline (MelQx) from cooked food. *Carcinogenesis*, 8, 665~668(1987)
- 4) Yamashita, K., Adachi, M., Kato, S., Nakagama, H., Ochiai, M., Wakabayashi, K., Sato, S., Nagao, M. and Sugimura, T.: DNA adducts formed by 2-amino-3, 8-dimethylimidazo[4, 5-f]quinoxaline in rat liver: dose-response on chronic administration. *Jpn. J. Cancer Res.*, 81, 470~476(1990)
- 5) Franz, C. E., Bangerter, C., Fultz, E., Mayer, K. M., Vogel, J. S. and Turteltaub, K. W.: Dose-response studies of MelQx in rat liver and liver DNA at low doses. *Carcinogenesis*, 16, 367-373(1995)
- 6) Williams, G. M.: The pathogenesis of rat liver cancer caused by chemical carcinogens. *Biochem. Biophys. Acta*, 605, 167~189 (1980)
- 7) Takayama, S., Nakatsuru, Y., Masuda, M., Ohgaki, H., Sato, S. and Sugimura, T.: Demonstration of carcinogenicity in F344rats of 2-amino-3-methylimidazo[4, 5-f]quinoline from broiled sardine, fried beef and beef extract. *Gann*, 75, 467~470(1984)
- 8) Shirai, T., Tamano, S., Sano, M., Masui, T., Hasegawa, R. and Ito, N.: Carcinogenicity of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4, 5-b] pyridine in rats. *Princess Takamatsu Symp.*, 23, 232~239(1995)
- 9) Kristiansen, E.: The role of aberrant crypt foci induced by the two heterocyclic amines 2-amino-3-methylimidazo[4, 5-f]quinoline (IQ) and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4, 5-b]pyridine (PhIP) in the development of colon cancer in mice. *Cancer Lett.*, 110, 187~192(1996)
- 10) Okonogi, H., Ushijima, T., Shimizu, H., Sugimura, T. and Nagao, M.: Induction of aberrant crypt foci in C57BL/6N mice by 2-amino-9H-pyrido[2, 3-b]indole and 2-amino-3, 8-dimethylimidazo[4, 5-f]quinoxaline (MelQx). *Cancer Lett.*, 111, 105~109(1997)
- 11) Tachino, N., Hayashi, R., Liew, C., Bailey, G. and Dashwood, R.: Evidence for ras gene mutation in 2-amino-3-methylimidazo[4, 5-f]quinoline induced colonic aberrant crypts in the rat. *Molecular Carcinogenesis*, 12, 187~192(1995)
- 12) 田中丸善洋, 森 郁生, 西川秋佳, 古川文夫, 金亨津, 池崎信一郎, 野々山孝, 高橋道人: F344ラットの大腸粘膜にみられた aberrant crypt foci の性状-MelQx 誘発例と自然発症例の比較. 第13回日本毒性病理学会, 81 (1997)
- 13) Takahashi, S., Imaida, K., Shirai, T., Wakabayashi, K., Nagao, M., Sugimura, T. and Ito, N.: Chronic administration of the mutagenic heterocyclic amine 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4, 5-b]pyridine induces cardiac damage with characteristic mitochondrial changes in Fischer rats. *Toxicol. Pathol.*, 24, 273~277(1996)
- 14) Takayama, K., Yamashita, K., Wakabayashi, K., Sugimura, T. and Nagao, M.: DNA modification by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4, 5-b]pyridine in rats. *Jpn. J. Cancer Res.*, 80, 1145~1148 (1989)
- 15) Overvik, E., Ochiai, M., Hirose, M., Sugimura, T. and Nagao, M.: The formation of heart DNA adducts in F344rat following dietary administration of heterocyclic amines. *Mutat. Res.*, 256, 37~43(1991)



マグネシウム欠乏の栄養生理学的研究  
-特に超微形態学的検討-

池田 尚子<sup>#</sup>・木村 修一<sup>\*</sup>・今沢 孝喜・西川 秋佳・高橋 道人

Effects of Dietary Magnesium Deficiency in the Rat: with Special  
Reference to Ultrastructural Examination

Takako Ikeda<sup>#</sup>, Shuichi Kimura<sup>\*</sup>, Takayoshi Imazawa,  
Akiyoshi Nishikawa and Michihito Takahashi

Epidemiologically, it has been suggested that dietary magnesium/calcium imbalance is associated with the risk of heart diseases. In the present study, the effects of magnesium deficiency and/or calcium over intake were investigated in rats. Male Sprague-Dawley rats were divided into 4 groups, and respectively fed basal diet (AIN-76) alone (Group 1), calcium-doubled AIN-76 diet (Group 2), magnesium-deficient AIN-76 diet (Group 3) and magnesium-deficient / calcium-doubled AIN-76 diet (Group 4) for 19 days. A biochemical assay using inductively coupled plasma showed that the magnesium concentrations of the femoral bone and serum were significantly ( $p < 0.001$ ) lower in Groups 3 and 4 than in Group 1. The lipid peroxides of the heart in Group 4 and of the liver in Groups 3 and 4 were increased as compared to the Group 1 values although there was no statistical significance. Ultrastructurally, degenerative changes of organelles including mitochondria were observed in myocardial, liver and renal tubule cells of Groups 2-4. Severe degeneration such as disorganization, lysis and disarrangement of myofibrils was most evident in myocardial cells of Group 4. Our results thus suggest that dietary magnesium deficiency gives rise to retrogressive changes in some organs including the heart, and concurrent calcium overintake synergistically enhances the myocardial injury due to magnesium deficiency.

**Keywords** : magnesium, calcium, heart, ultrastructure, rat  
(Received May 30, 1997)

緒 言

人体内に七番目に多く存在する必須ミネラルであるマグネシウム ( $Mg^{2+}$ ) の生体構成成分は、体重70kgの成人で約834~1,200mmol (約20~28g)<sup>1)</sup>で、そのうち60~65%は骨中、27%は筋肉中、6~7%は他の組織中、1%は細胞外液中に存在する<sup>2)</sup>。Mgは情報を司る核酸、タンパク質の機能維持、体温調節、神経の興奮、筋肉の収縮、ホルモンの分泌などに関与している<sup>3)</sup>。

$Mg^{2+}$ が生理機能を発揮する上でナトリウム ( $Na^+$ )、カルシウム ( $Ca^{2+}$ )、カリウム ( $K^+$ ) 等との存在比率が重要であることが指摘されており、なかでも  $Na^+$ - $K^+$ -dependent ATPase あるいは  $Ca^{2+}$ -dependent ATPase は Mg と結合した ATP だけを基質とするため、この酵素が関与する能動輸送などの生理機能に Mg は必須である<sup>4)</sup>。Mg 欠乏になると

能動輸送が円滑に働かなくなり、細胞外に多い  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  が細胞内に流入し、細胞内に多い  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$  は細胞外に流出しはじめる。 $Na^+$ が細胞内に増加すると、 $Na^+$ - $Ca^{2+}$  exchange pump が働き、 $Ca^{2+}$  はさらに細胞内に増える<sup>5)</sup>。このような現象が血管壁の細胞に起こると、血管壁が緊張して攣縮が発生するため血管は細くなり循環器疾患の要因となる<sup>6)</sup>。

1978年、Karppanen らは食品からの Mg や Ca 摂取量と循環器疾患の関連を検討した<sup>7)</sup>。その結果、アメリカ、オランダ、フィンランドのように Ca/Mg 比の高い食事を摂っている国は虚血性心疾患の死亡率が高く、その比が低い食事を摂っている日本、ギリシア、ユーゴスラビアでは虚血性心疾患による死亡率が比較的低いことが報告されている。このことから Ca 摂取量を控えて Mg 摂取量を多く摂ることが、虚血性心疾患を予防する一因であり、特に循環器疾患の予防に対する Mg 摂取量の重要性を強調されている<sup>8,9)</sup>。

生体が Mg 欠乏状態に陥ると、心臓、顎下腺、腸管、腎臓への Mg の取り込みが他の臓器に比べて多くなることが報告されている<sup>10)</sup>。そこで今回、循環器疾患の要因である Mg と Ca のバランスに着目し、ラットを用いて食餌によ

\* 昭和女子大学

# To whom correspondence should be addressed: Takako Ikeda; 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158, Japan; Tel: 03-3700-1141 ext. 427; Fax: 03-3700-2348; E-mail: taiked@nihs.go.jp

る Mg 欠乏と Ca 過剰の組み合わせの実験を実施し、主に超微形態学的に検討した。

### 実験および方法

#### 1. 実験動物ならびに飼育条件

実験動物として5週齢の Sprague-Dawley 系雄ラット(日本チャールス・リバー社)を3日間の馴化飼育の後、各群6匹ずつ4群に配した。動物はステンレス製個別ケージに収容し、室内の環境条件は温度 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、12時間(7時~19時)照明、12時間非照明の条件下で飼育した。飲料水には蒸留水を用い、飲料水および飼料は自由摂取とした。

#### 2. 実験飼料

実験に用いた飼料の組成は AIN-76<sup>1)</sup> のミネラル組成に準じ、Table 1 に示した。Group 1 は対照群として Mg および Ca が AIN-76 と等倍量の群、Group 2 は Mg 等倍量、Ca 2 倍量 (1.04%W/W) の群、Group 3 は Mg 欠乏 (検出限界以下)、Ca 等倍量の群、Group 4 は Mg 欠乏 (検出限界以下)、Ca 2 倍量 (1.04%W/W) の群とした。

飼料原料はオリエンタル酵母(株)より購入し、タンパク質源はカゼイン、糖質源は蔗糖、脂肪源はコーン油を用い、ビタミン混合は AIN-76 の組成に従った。馴化飼育期間中はどの群も Group 1 の飼料を与えた。

#### 3. 実験方法

実験期間は19日間とし、実験期間中、一般状態の観察を連日実施し、体重および摂餌量は1日おきに測定した。

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、臓器重量測定後に以下の生化学的検査および超微形態学的検査に供した。

#### A) 生化学的検査

##### a. ICP (Inductively Coupled Plasma) 発光分析法

##### 1. 測定対象臓器および元素

対象は心臓、肝臓、腎臓、大腿筋、大腿骨の5臓器および血清とし、測定元素は Mg, Ca およびリン (P) の3元素とした。

##### 2. 試薬および標準溶液

Mg および Ca の標準溶液は原子吸光分析用1,000ppm 標準溶液(和光純薬製)を希釈混合して使用した。P 標準溶液は光電用 P 標準溶液 1 mg/kg (和光純薬製)を希釈して使用した。

##### 3. 装置および測定条件

ICP 発光分光分析装置は真空多元素同時分析型 Thermo-Jarrell Ash 社製 ICAP-61、電子レンジ用試料分解容器は三愛科学製、電子レンジは日立製作所製 MR-M26を用いた。

##### 4. 実験溶液の調製および分析法

心臓、肝臓、腎臓、大腿筋および血清は湿重量で約50mg および大腿骨は湿重量で約5mgを精秤し、テフロン製の小容器に取り、濃硝酸3mlと過塩素酸1mlを加え、電子レンジで試料を湿式分解した<sup>12)</sup>。放冷後開栓し、分解液をホットプレート上で殆ど蒸発乾固するまで加熱し、放冷後、0.1M 硝酸で一定重量として測定用検体とした。単位は大腿骨以外は湿重量当たりの $\mu\text{g/g}$ で表し、大腿骨は湿重量当たりの%で表した。

Table 1. Composition of experimental diets (%)

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
$\alpha$ -Corn starch	55.50	54.46	55.50	54.46
Milk casein	25.00	25.00	25.00	25.00
Corn oil	5.00	5.00	5.00	5.00
Cellulose powder	5.00	5.00	5.00	5.00
Sucrose	5.00	5.00	5.00	5.00
Mineral mixture <sup>1)</sup>	3.50	3.50	—	—
Mineral mixture <sup>2)</sup>	—	—	3.50	3.50
Vitamin mixture <sup>3)</sup>	1.00	1.00	1.00	1.00
CaCO <sub>3</sub>	—	1.04	—	1.04
Total	100	100	100	100

1) AIN-76 Mineral mixture

2) AIN-76 Mineral mixture except Mg deficiency

3) AIN-76 Vitamin mixture

b. 過酸化脂質測定 (八木法<sup>13)</sup>)

## 1. 測定対象臓器

心臓および肝臓の2臓器を測定に供した。

## 2. 試薬および標準溶液

ドデシル硫酸ナトリウム(SDS), 2-チオバルピツール酸(TBA), n-ブタノール:ピリジン (15:1) 10 nmol/ml テトラメトキシプロパンを標準溶液として使用した。試薬はすべて特級を使用した。

## 3. 装置および測定条件

分光蛍光光度計は日立製作所製650-60形(励起波長515 nm, 蛍光波長553nm), 遠心分離器は日立製作所製 SCT 5 BA (3000rpm, 10min) を用いた。

## 4. 実験溶液の調製および測定法

各組織をホモジナイズし, 1.15%塩化カリウムを加え, 遠心分離し, 上清に8.1%SDSを加えた。この溶液に0.4% 2-TBA (10%酢酸溶液:pH3.5), 蒸留水およびn-ブタノール:ピリジン (15:1) を加え50回激しく振盪後, 遠心分離し, 上層を測定用検体とした。TBA 反応産物(TBARS) 値は  $1 \text{ (nmol)} \times 20 \times 10 \times f/F \text{ (nmol/g 湿重量)}$  で求めた。(F:標準試料の蛍光強度, f:検体の蛍光強度)

5. 統計処理<sup>14)</sup>

体重, 臓器重量, 臓器中の元素濃度および臓器中のTBARS 値は, Student の t 検定を用いて統計学的に解析し

た。

## B) 超微形態学的検査

各群2匹の動物から心臓(左心室心尖部), 肝臓(尾状葉)および腎臓(皮質)を採取し, 2.5%グルタルアルデヒド溶液(0.1Mリン酸緩衝溶液:pH7.4)で固定した後, 1%オスミウム酸溶液で後固定を行い, 常法に従いエポック812樹脂包埋した。包埋した標本はオープンで硬化させ, ウルトラカット(Reichert-Jung型)で厚切り切片および超薄切片を作製し, 酢酸ウランおよびクエン酸鉛の二重電子染色を施し, 透過型電子顕微鏡(日本電子:JEM-100CXS)にて超微形態学的に検索した。

## 結 果

## 1. 死亡動物および一般状態

実験期間を通じて, 死亡動物は認められなかった。

Group 3,4に関しては, 耳介部を中心とした皮膚炎の発症が実験開始5日目に観察された。Group 1の便の色は白色だったのに対し, Group 3,4では黄褐色のものが実験開始14日目に観察された。

## 2. 体重および摂餌量

Group 3,4はGroup 1に比して, 13日目以降, 成長の遅延や体重増加の抑制がみられ, 実験終了時まで続いた(Fig. 1)。Group 3,4の最終体重はGroup 1に比して, 有意

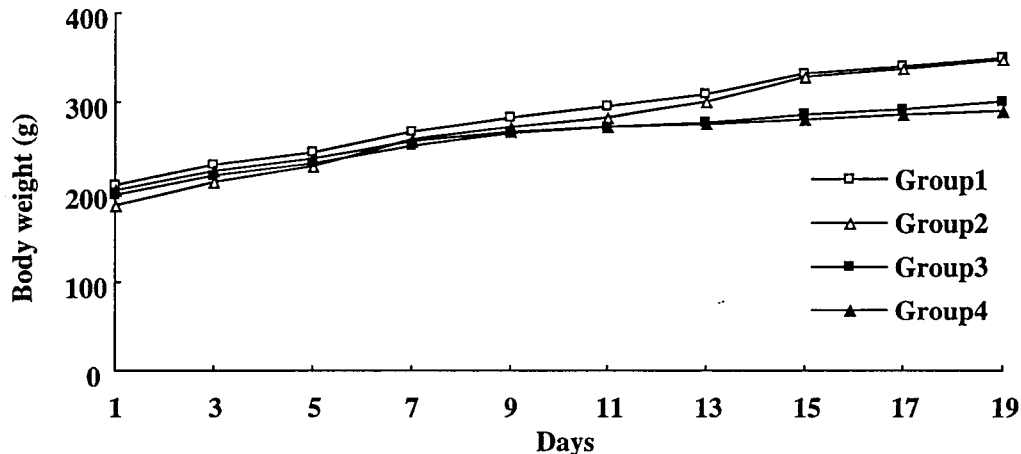


Fig. 1. Body weight curves

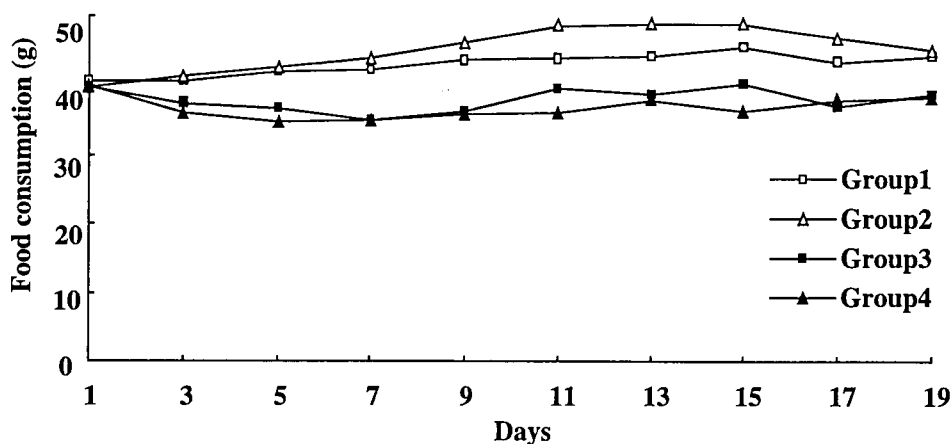


Fig. 2. Food consumption curves

Table 2. Absolute organ weights and organ/body weight ratios

Group	Body weight	Heart	Liver	Kidney(R)	Kidney(L)
1	352.5 ± 8.93	1.26 ± 0.16(0.36)	10.23 ± 0.62(2.90)	1.26 ± 0.07(0.36)	1.23 ± 0.08(0.35)
2	348.2 ± 9.43	1.26 ± 0.15(0.36)	9.87 ± 0.62(2.84)	1.19 ± 0.09(0.34)	1.18 ± 0.05(0.34)
3	292.6 ± 12.8***	1.09 ± 0.10(0.38)	9.01 ± 0.44**(3.08)	1.41 ± 0.19(0.48)	1.39 ± 0.24(0.47*)
4	276.5 ± 12.3***	1.09 ± 0.12(0.40)	8.58 ± 0.28*** (3.11*)	1.28 ± 0.04(0.46)	1.28 ± 0.06(0.46***)

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

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

\*,\*\*,\*\*\*: Significantly different from the control (group 1) values at \*p<0.05, \*\*p<0.01 and \*\*\*p<0.001, respectively.

Table 3. Concentrations of Mg, Ca and P

	Group	Bone (%)	Heart (μ g/g)	Kidney (μ g/g)	Liver (μ g/g)	Muscle (μ g/g)	Serum (μ g/g)
Mg	1	0.30 ± 0.04	200 ± 25.6	171 ± 25.2	182 ± 25.2	272 ± 14.3	13.1 ± 2.07
	2	0.30 ± 0.04	205 ± 11.6	151 ± 17.9	209 ± 13.6*	272 ± 10.5	12.2 ± 1.05
	3	0.16 ± 0.05***	207 ± 7.51	144 ± 32.7	224 ± 26.9*	241 ± 19.8*	5.27 ± 0.92***
	4	0.14 ± 0.04***	171 ± 32.5	154 ± 22.1	219 ± 22.7*	249 ± 13.8*	6.72 ± 1.04***
Ca	1	14.3 ± 1.99	80.2 ± 19.7	122 ± 48.2	32.8 ± 9.57	54.8 ± 4.68	107 ± 26.5
	2	15.8 ± 1.56	77.3 ± 13.9	104 ± 79.1	38.0 ± 5.26	56.6 ± 5.92	159 ± 73.6
	3	14.9 ± 3.07	98.1 ± 43.9	774 ± 419*	44.2 ± 8.93	71.3 ± 9.71***	139 ± 33.2
	4	16.3 ± 1.77	97.2 ± 16.7	1327 ± 910*	68.9 ± 19.1**	77.7 ± 20.1*	172 ± 63.0*
P	1	7.74 ± 1.07	2079 ± 344	2194 ± 460	2539 ± 323	2235 ± 120	96.8 ± 11.0
	2	8.51 ± 1.07	2111 ± 191	1801 ± 327	2988 ± 266*	2284 ± 51.1	101.0 ± 16.0
	3	7.80 ± 1.59	2189 ± 97.2	2221 ± 880	3431 ± 451**	2056 ± 169	88.7 ± 8.00
	4	8.32 ± 0.90	1606 ± 479	2789 ± 1098	3175 ± 477*	2166 ± 138	87.6 ± 9.64

Data represent mean values ± S.D.

\*,\*\*,\*\*\*: Significantly different from the control (group 1) values at \*p<0.05, \*\*p<0.01 and \*\*\*p<0.001, respectively.

な減少を示した (Table 2)。摂餌量は、Group 3,4では飼育直後から飼育期間を通じて、Group 1を下回って推移した (Fig.2)。

### 3. 臓器重量 (Table 2)

Group 3,4の最終体重と肝臓重量はGroup 1に比して、有意な減少を示した。体重比ではGroup 3,4の左腎が対照群に比して、有意な増加を示した。

### 4. 生化学的検査

a) Mg, Ca および P の各臓器における濃度を Table 3 に示した。Mg 濃度は Group 3,4の大腿骨と血清において Group 1の値の約 1/2 であり、有意に減少していた。Ca 濃度は Group 3,4の腎臓および大腿筋において Group 1 に比して、有意に増加していた。

b) TBARS 値を Table 4 に示した。統計学的有意差はなかったが、Group 4の心臓および Group 3,4の肝臓では Group 1 に比して、高い傾向を示した。

Table 4. Thiobarbituric acid reaction substance (n/mol/g)

Group	Heart	Liver
1	105 ± 84.6	38.3 ± 9.53
2	109 ± 56.2	38.6 ± 23.7
3	105 ± 28.7	101.0 ± 60.7
4	173 ± 61.0	66.8 ± 30.6

Data represent mean values ± S.D.

### 5. 超微形態学的検査

Group 1 の心臓組織は電顕的にはほぼ正常構造を示し、動脈を構成する細胞 (Fig.3) や心筋細胞のミトコンドリアおよび筋原線維 (Fig.4) には異常は認められなかった。Group 2,3および4 の心筋層内小動脈内皮細胞には血管腔内に突出した空胞変性が認められ (Fig.5), さらに心筋細胞のミトコンドリアの空胞変性, 腫大化, クリスタ配列の乱れおよび崩壊が認められた (Fig.6)。特に Group 4 の心筋細胞の変性が強く, 筋原線維の断裂, 融解および配列の乱れ等が観察され (Fig.7), またミトコンドリアの変性も他の Group よりも強く, ミトコンドリア周囲にグリコーゲン顆粒の蓄積も認められた (Fig.8)。ミトコンドリアの変性は, Group 4 以外では Group 2 で強くみられた。

Group 1 の肝細胞は電顕的にはほぼ正常構造を示し, 核, ミトコンドリア, 粗面小胞体, ペルオキシソームなどには異常は認められなかった (Fig.9)。Group 2 および3 の肝細胞内には脂肪滴やミエリン様物質の出現が認められ, Group 4 ではさらに小管状物質の増生が観察された (Fig.10)。

Group 1 の腎尿細管上皮細胞は電顕的にはほぼ正常構造を示し, 糸球体および尿細管の上皮細胞に異常は認められなかった (Fig.11)。Group 2,3および4 の近位尿細管上皮細胞にはミトコンドリアの空胞変性, ライソゾームの増加 (Fig.12), 小胞体腔の拡張やミトコンドリアの変性等が観察された。

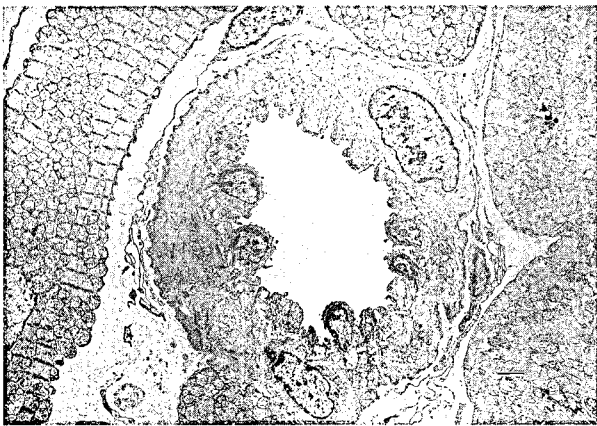


Fig. 3. Electron micrograph of normal cardiac myocytes and an arteriole in the heart  
×3,400  
Bar = 2  $\mu$ m (group 1)



Fig. 4. Electron micrograph of normal mitochondria of cardiac myocytes, and myofibril in the heart  
×17,000  
Bar = 1  $\mu$ m (group 1)



Fig. 5. Cardiac arteriolar endothelial cells showing vacuoles  
×2,000  
Bar = 5  $\mu$ m (group 2)

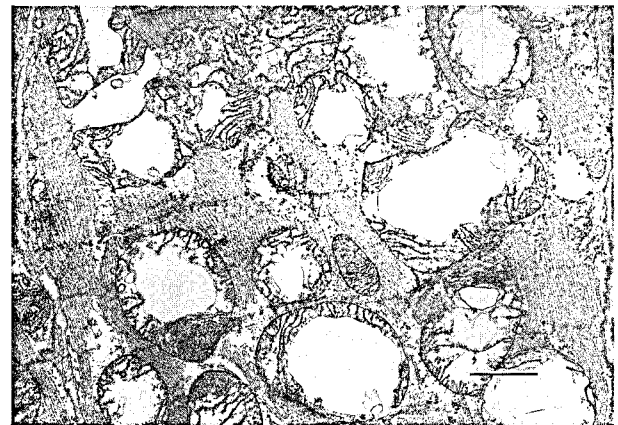


Fig. 6. Swollen mitochondria with disorientated and disintegrated cristae in a myocardial cell  
×17,000  
Bar = 1  $\mu$ m (group 2)

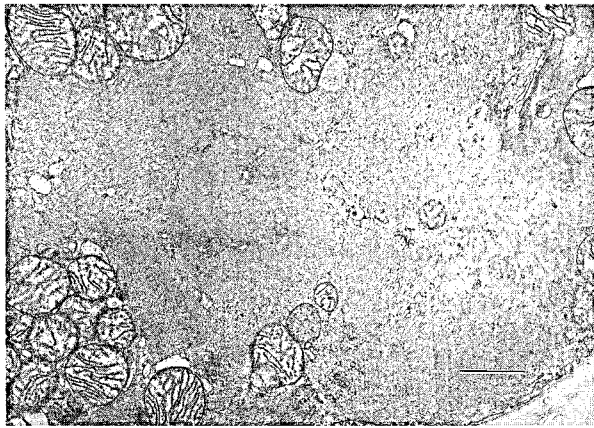


Fig. 7. Z-bands of a myocardial cell are disorganized, lysed and disarranged  
 ×17,000  
 Bar = 1 μm (group 4)

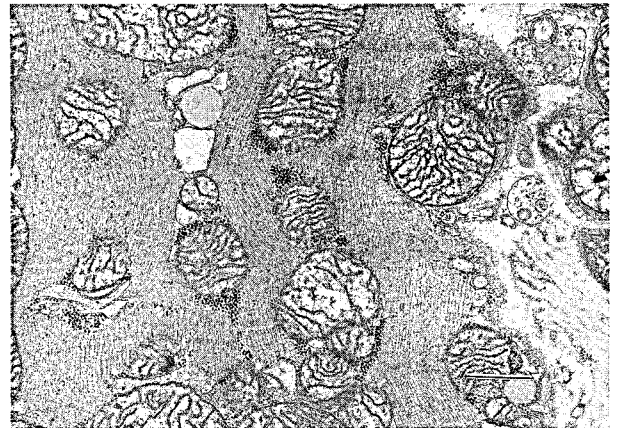


Fig. 8. Slightly altered and disintegrated mitochondrial cristae, and accumulation of glycogen granules in a myocardial cell  
 ×17,000  
 Bar = 1 μm (group 4)

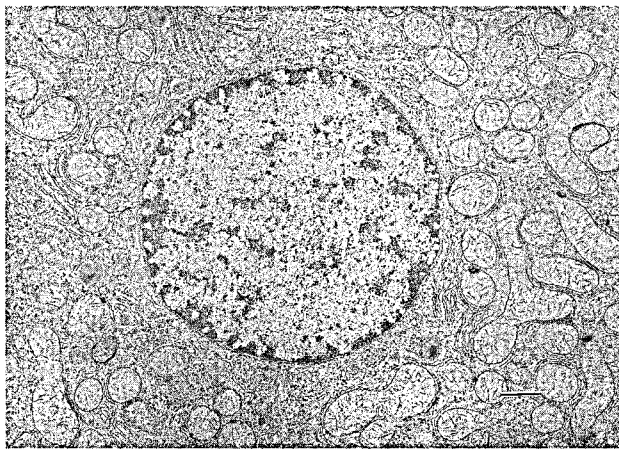


Fig. 9. Electron micrograph showing normal mitochondria, endoplasmic reticulum and peroxisome in a hepatocyte  
 ×10,200  
 Bar = 1 μm (group 1)

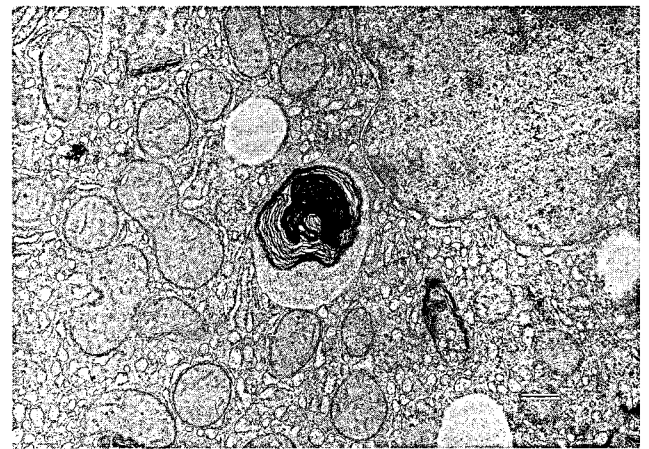


Fig. 10. Hepatocyte showing increase of vesicular endoplasmic reticulum and myelin-like materials in the cytoplasm  
 ×20,400  
 Bar = 0.5 μm (group 4)

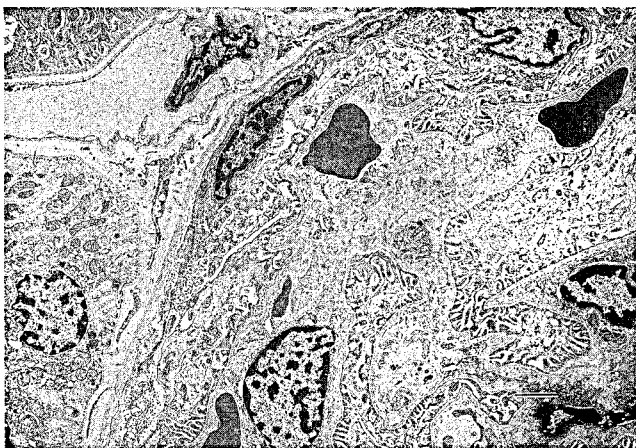


Fig. 11. Electron micrograph showing a normal glomerulus and renal tubule epithelial cells  
 ×5,100  
 Bar = 2 μm (group 1)

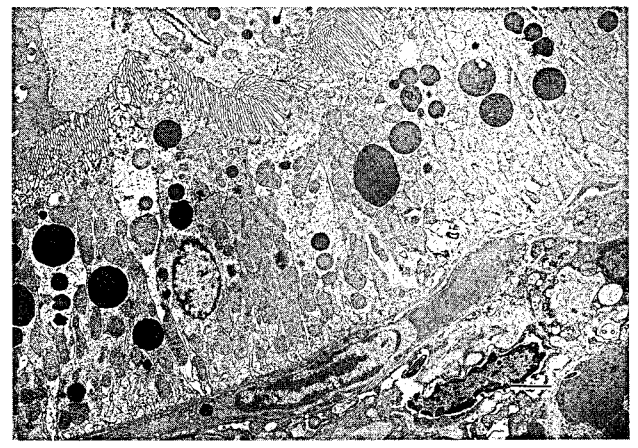


Fig. 12. Marked increase of lysosomes in proximal renal tubule epithelial cells  
 ×5,100  
 Bar = 2 μm (group 3)

## 考 察

ラットを用いて、食餌による Mg 欠乏の生体に及ぼす影響について、Ca の混合比率を変えた実験条件を加え、主に超微形態学的に検討した。

骨の Mg 濃度は Group 1 に比して Group 3,4 で有意に減少していた。これは Mg 欠乏群である Group 3,4 では第一貯蔵庫である骨に十分な Mg の蓄積がなかったこと、もしくは Group 3,4 が必要としている Mg は骨から供給されて、骨中の Mg が減少したものと思われる。

TBARS 値は肝臓で Group 1 に比して Group 3,4 が高い傾向を示したことから、Mg が酸化的ストレスに対して何らかの生理作用を介して抑制的に働いている可能性が考えられる。

超微形態学的に、Group 1 を除いてどの群にも心筋層内小動脈の内皮細胞に空胞変性が観察された。これは Mg 欠乏や Ca 過剰のために細胞内外の浸透圧平衡が崩れ、水や電解質等が細胞質内に蓄積して細胞が膨化し<sup>15)</sup>、形態学的に空胞変性として現れたものと思われる。同様に、Group 1 を除いた群の心筋細胞にミトコンドリアの変性が観察されたのは、Mg や Ca により生体内のミネラルバランスが崩れたため、心筋細胞のミトコンドリアに膨化、空胞変性、クリスタの消失等の様々な形態学的変化が現れたものと思われる。特にミトコンドリアの変性が強かったのは、Group 2 および Group 4 の高 Ca 群であることから、Ca の過剰摂取はミトコンドリアの変性を引き、ひいては細胞内の活動低下の要因となる可能性がある。Group 4 の心筋細胞のミトコンドリア周囲にグリコーゲン顆粒の蓄積が観察されたのは、Group 4 は Mg 欠乏で高 Ca 群であるので、Mg と Ca の不均衡が影響したものと推察される。グリコーゲンの蓄積は、心筋細胞の退行変性もしくはエネルギー代謝への影響を示唆するが、その発現機序の解明については今後の課題である。さらに筋原線維の断裂および融解が観察されたが、これらの変化は病理組織学的検索において虚血性心疾患の初期によくみられる病変である<sup>16)</sup>。しかしながら、これらの病変が心筋層内小動脈の内腔狭窄に伴う軽度の虚血性心筋障害であるが、細胞質レベルでの代謝異常に伴う心筋の異常、即ち代謝性心筋障害であるのかは今回の実験からだけでは断定できない。いずれにしても、Mg 欠乏における Ca の過剰 (通常の 2 倍) は虚血性心疾患あるいは代謝性心筋障害の誘因となる可能性を示唆する。

肝臓では Group 1 を除いて、どの群も肝細胞に脂質の蓄積がみられたが、ミネラル (特に Mg, Ca) の微妙なバランスの変化により肝細胞の脂質代謝障害として発現したほか、心機能低下によるうっ血肝に伴う二次的な変化としてみられた可能性があるが、相対肝重量には大きな変動はないことから、後者の影響は少ないものと思われる。

腎臓中の Ca 濃度は Group 3,4 が Group 1 に比して有意に増加したことから、超微形態学的に観察された Group 3,4 における腎尿管上皮細胞の変化は、Ca の異常な蓄積に関連するものと思われる。

Ca 摂取量が多いと Mg の必要量が増加することが報告されており<sup>17,18)</sup>、Ca の過剰摂取は相対的に Mg 欠乏を助長する可能性がある。また今回の電顕的検索で明らかにされたように、Ca 過剰が単独で細胞内の活動低下の要因になる可能性がある。以上より、今回の成績は食事中的 Mg の欠乏が心臓を含む諸臓器の退行変性を引き、それが Ca の過剰摂取により増強される可能性を示唆する。

## 文 献

- 1) Elin, R. J.: Assessment of magnesium status. *Clin. Chem.*, **33**, 1965~1970 (1987)
- 2) Elin, R. J.: Laboratory tests for the assessment of magnesium status in humans. *Magnes. Trace Elem.*, **10**, 172~181 (1991)
- 3) 糸川嘉則: 栄養の生理学. 裳華房, pp. 103 (1990)
- 4) Altur, B. M.: Basic biochemistry and physiology of magnesium: A brief review. *Magnes. Trace Elem.*, **10**, 167~171 (1991)
- 5) Iseri, L. T. and French, J. H.: Magnesium nature's physiologic calcium blocker. *Am. Heart J.*, **108**, 188 (1984)
- 6) 糸川嘉則: 栄養生理学. 裳華房, pp. 67~72 (1990)
- 7) Karppanen, H., Pennanen, R. and Passinen, L.: Mineral-coronary heart disease and sudden coronary death. *Adv. Cardiol.*, **25**, 9~24 (1978)
- 8) 糸川嘉則: マグネシウム. 光生館, pp. 3~13 (1995)
- 9) Galland, L.: Magnesium stress and neuropsychiatric disorders. *Magnes. Trace Elem.*, **10**, 287~301 (1991)
- 10) 木村修一, 中津川研一, 北原美智子, 堀朋子, 藤崎美由紀, 川村美笑子, 岩田錬, 舟木善仁, 井戸達雄: 微量栄養素研究, **11**, 171 (1994)
- 11) Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Committee on Standards for Nutritional Studies. *J. Nutr.*, **103**, 1340~1348 (1977)
- 12) Kojima, I., Uchida, T. and Iida, C.: Pressurized microwave digestion of biological samples for metal determination. *Analytical Sciences*, **4**, 211~214 (1988)
- 13) Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K.: Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, **95**, 351~358 (1979)
- 14) 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, **40** (3/4), 163~187 (1981)
- 15) 畠山茂: 病理学. 医歯薬出版, pp. 20~57 (1988)
- 16) 関口守衛, 阿部一彦: カテーテル心生検による心筋疾患の電顕的観察. 細胞, **16**, 140 (1984)
- 17) Heaton, F. W., Hodgkinson, A. and Rose, G. A.: Observations on the relation between calcium and magnesium metabolism in man. *Clin. Sci.*, **27**, 31~40 (1964)
- 18) Labeeuw, M., Pozet, N., Zech, P. and Traeger, J.: Urinary magnesium in response to an oral calcium load. *Nephron*, **43**, 158~159 (1986)

## ペクチン分解物のラットにおける13週間亜急性毒性試験

高木 久宜<sup>#</sup>・安原加壽雄・三森 国敏・小野寺博志  
竹川 潔・高橋 道人

### A 13-week Subacute Oral Toxicity Study of Pectin digests in Rats

Hisayoshi Takagi<sup>#</sup>, Kazuo Yasuhara, Kunitoshi Mitsumori,  
Hiroshi Onodera, Kiyoshi Takegawa and Michihito Takahashi

A 13-week subacute oral toxicity study of pectin digests was performed in both sexes of F344 rats. Water containing 0, 0.15, 0.5, 1.5 or 5 % pectin digests was fed to 10 males and 10 females per group to detect its toxicity. No animals died during the administration period. Body weight gain was suppressed in male of the 5 % group compared with the 0 % group. Serum biochemistry analysis revealed a significant increase in BUN in male group treated with 5 % and increases in CRN in male group treated with 1.5 % or more. The weight of liver was significantly increased in female groups treated with 1.5 % or more. Histopathologically, no treatment-related damage was observed in any dosed groups.

Based on these results, the NOEL of pectin digests for both sexes in F344 rats was considered to be 0.5 % in drinking water (male 545, female 657 mg/kg/day).

**Keywords :** pectin digests, rat, subacute toxicity study  
(Received May 30, 1997)

#### はじめに

ペクチンは、マツの形成層、ハリモミヤトオヒ等の内部樹皮、レモンの皮、リンゴ等に含まれるプロトペクチンとして自然界に存在し、ジャム、マーマレード等のゲル化剤等、食品工業や飲料加工、製菓領域で広く使用されている。<sup>1,2)</sup>現在はヨーグルト等の乳化安定剤や増粘剤等にも用いられており、1994年にはこの用途で使用される物質の約60%を占め、世界需要の約10%が日本市場で消費されている。<sup>3,4)</sup>ペクチンには整腸作用、除菌作用、抗菌作用がある。これらはペクチンが親水性コロイドで腸管内でゲル化されることによって膨化し、吸着作用や緩衝作用を持つことにより、またペクチンの非解離型カルボキシル基が弱い殺菌作用を持つことにより作用するといわれる。<sup>5)</sup>このペクチンの主成分であるプロトペクチンを酵素で分解する事によって得られる物質がペクチン分解物であり、その主成分はガラクトロン酸である。このペクチン分解物には pH 5.5以下でグラム陽性菌、陰性菌、特に乳酸菌に対して強い抗菌力を持つことが知られている。<sup>6)</sup>また、これらは果実等に含まれるペクチンの分解物であるため、食品素材のみで構成された保存料としてめんつゆ、各種タレ、ソース、

漬物等一般に使用されている。しかし、安全性評価のための毒性に関する十分な知見が未だ得られていない。そこで今回、ラットを用いてペクチン分解物の短期間大量投与での毒性を明らかにする目的で、最高用量を5%とする13週間の反復投与試験を行った。

#### 実験材料および方法

##### 1. 被験物質

ペクチン分解物は淡色～褐色の液体またはペーストで、酸味を有する。また、水に可溶でエタノール、油脂には不溶である。今回の実験にはアサマ化成株式会社より入手したペクチン分解物濃縮液（固形分含量：58.7%）を原体として飲料水中に添加した。

##### 2. 動物および方法

5週令 F344/DuCrj ラット (SPF) 雌雄各50匹を日本チャールス・リバー(株)より購入し、1週間の馴化飼育後実験に共した。

動物は温度 $24 \pm 1$  °C、湿度 $55 \pm 5$  %、換気回数18回/時(オールフレッシュ)、12時間明暗サイクルに制御されたバリアーシステムの飼育室で飼育した。ラットはプラスチックケージに1ケージあたり5匹ずつ収容し、床敷として三共ラボサービス(株)のソフトチップを使用して週2回の頻度でケージを交換した。

雌雄それぞれ1群あたり10匹からなる5群に分け、その

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed: Hisayoshi Takagi; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya-Ku, Tokyo, 158, Japan; Tel: 03-3700-9845 Fax: 03-3700-2348 E-mail: htakagi@nihs.go.jp



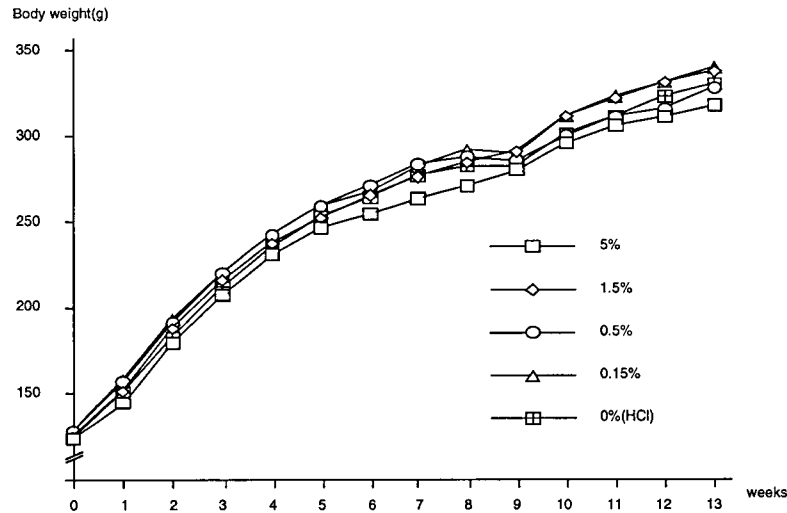


Fig. 1. Body weight curves for male rats fed water containing pectin digests for 13 week

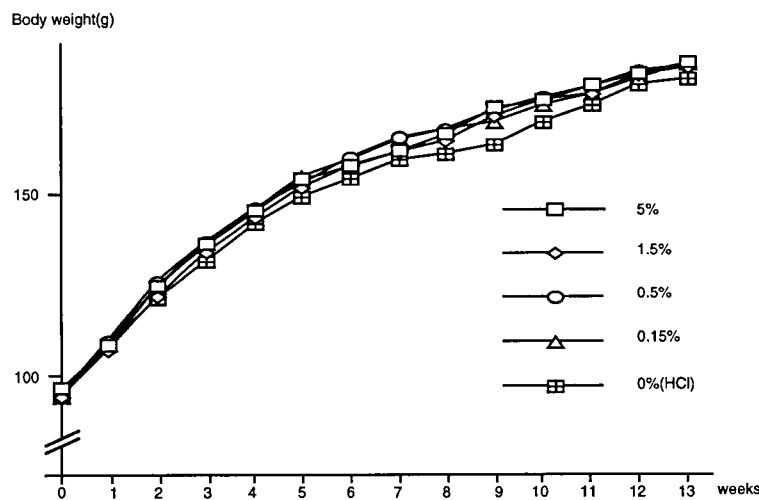


Fig. 2. Body weight curves for female rats fed water containing pectin digests for 13 week

うち4群を被験物質投与群としてペクチン分解物原体を5, 1.5, 0.5, 0.15%添加させた飲料水を13週間投与し, 1群を対照群としてpH2.4に調節したイオン交換水を同期間自由摂取させた。被験物質を添加した飲料水の調製は, 週に2度の頻度で行った。ペクチン分解物原液は調製時まで4℃に維持された試料保管室において保存した。ペクチン分解物は12.5%の濃度で飲料水に添加した場合, 室温で1週間は安定であることが確認されている。飼料としてCRF-1 (日本チャールス・リバー) を使用した。

体重および飲料水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と殺剖検し試験を終了した。動物はと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。採血した血液は多項目自動血球計数装置 (東亜医用電子社, 兵庫, M-2000型) を用い, 赤血球数 (RBC), ヘモグロビン量 (Hb), ヘマトクリット値 (PCV), 平均赤血球容積 (MCV), 平均赤血球色素量 (MCH), 平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCHC), 血小板数 (Plt), および白血球数 (WBC) の各項目を測定した。血清生化学的検査として, 総蛋白 (TP), アルブミン (Alb), アルブミン・グロブリン比 (A/G), 尿素窒素 (BUN), クレアチニン (CRN), グルコース (Glc), トリグリセライド (TG), 総コレステロール (TCho), 総ビリルビン (TBil), アルカリ性フォスファターゼ (ALP), アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT), アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AsT),  $\gamma$ -グルタミルトランスフェラーゼ ( $\gamma$ -GT), カ

Table 1. Body weight, Water consumption, food intake and total chemical intake in rats fed water containing pectin digests

Group(%)	Final body weight(g)	Water consumption (g/rat/day)	Diet intake (g/rat/day)	Total chemical intake (mg/kg/day)	
Male	0	316.0±12.5	26.0	14.8	3366
	0.15	325.7±7.6	25.7	15.0	1231
	0.5	316.2±11.8	27.6	14.8	545
	1.5	324.2±13.0	20.5	14.5	148
	5	307.0±10.0	17.6	13.4	0
Female	0	171.0±5.8	18.6	9.7	3916
	0.15	174.3±7.3	19.5	9.8	1290
	0.5	175.6±9.7	19.8	9.9	657
	1.5	175.0±9.7	12.4	9.3	204
	5	177.5±10.1	12.0	8.5	0

Table 2. Hematological changes in male rats fed water containing pectin digests for 13 week

Dose level (%)	0	0.15	0.5	1.5	5
No. of animals	10	10	10	10	10
RBC 10 <sup>12</sup> /l	9.65±0.36 <sup>a</sup>	9.48±0.26	9.61±0.19	9.61±0.31	9.58±0.28
Hb g/dl	15.9±0.6	15.5±0.4	15.6±0.3	15.6±0.5	15.8±0.3
PCV %	46.3±1.9	45.5±1.7	45.7±0.9	46.0±1.5	46.0±1.4
MCV fl	48.0±0.2	48.0±0.7	47.5±0.3	47.9±0.4	48.0±0.4
MCH pg	16.5±0.2	16.4±0.3	16.2±0.1 <sup>**</sup>	16.3±0.2	16.5±0.2
MCHC g/dl	34.4±0.3	34.1±0.9	34.1±0.3	34.0±0.6	34.4±0.4
Plt 10 <sup>12</sup> /l	0.81±0.04	0.79±0.04	0.81±0.04	0.80±0.04	0.79±0.06
Ebl count/200 WBC	0.4±0.2	0.4±0.3	0.5±0.4	0.2±0.2	0.3±0.3
WBC 10 <sup>9</sup> /l	4.70±0.44	4.17±0.42	4.27±0.68	4.43±0.46	5.28±0.71
Differential cell count(%)					
Neut-B	0.6±0.6	0.8±1.0	0.6±0.6	0.6±0.7	0.7±0.6
Baso	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
Eosino	1.3±1.2	1.7±1.0	0.7±0.5	1.2±0.6	0.9±0.4
Neut-S	22.5±8.3	18.5±9.8	22.0±9.6	21.4±5.1	19.5±4.1
Lympho	74.2±8.4	78.3±10.3	75.7±9.3	76.2±5.3	78.0±4.0
Mono	1.4±0.6	0.8±0.5	1.0±0.7	0.7±0.5	1.0±0.6

a) Mean ± S.D.

\*,\*\* : Significantly different from the control at \* p&lt;0.05, \*\* p&lt;0.01, respectively

ルシウム (Ca), 無機リン (P), ナトリウム (Na), カリウム (K), クロール (Cl) の各項目の測定を行った。採血の終了した動物は放血と殺して剖検した後、脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、副腎、脾臓、精巣、および胸腺の重量を測定した。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、定法に従い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、対照群と投与群について病理組織学検索を行った。

### 3. 統計学的処理方法

体重、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 Bartlett の方法による等分散の検定を行い、分散が等しい場合には一元配置分散分析を行った。群間に有意な差が認められた場合、各群の動物数が等しい時には Dunnett 法、また、動物数が等しくない場合は Scheffe 法により平均値の比較を行った。分散が等しくない場合には

Kruskal-Wallis の検定を行い、有意差が認められた場合はノンパラメトリックの Dunnett 法または Scheffe 法による検定を行った。

## 結 果

### 1. 死亡動物

実験期間中を通じて雌雄各群に死亡動物は認められなかった。

### 2. 体重、飲水量および摂餌量

実験期間後半、雄の5%投与群において、対照群と比較して7, 8, 12および13週に有意な体重増加抑制が認められた (Fig. 1, 2)。飲水量は雌雄とも1.5%以上の投与群で低下する傾向が認められた。飼料摂取量は雌雄とも5%投与群でやや低下する傾向が認められた (Table. 1)。

### 3. 血液学的検査および血清生化学的検査結果

Table 3. Hematological changes in female rats fed water containing pectin digests for 13 week

Dose level (%)		0	0.15	0.5	1.5	5
No. of animals		10	10	10	10	10
RBC	10 <sup>9</sup> /l	8.88±0.26 <sup>a)</sup>	9.06±0.33	8.92±0.15	9.25±0.31*	8.92±0.35
Hb	g/dl	16.1±0.4	16.3±0.5	16.0±0.4	16.6±0.5	16.0±0.5
PCV	%	45.1±1.3	46.0±1.5	45.0±0.8	47.3±1.7**	45.7±1.8
MCV	fl	50.7±0.2	50.8±0.4	50.5±0.4	51.2±0.3*	51.3±0.3**
MCH	pg	18.2±0.2	18.0±0.1	17.9±0.2	18.0±0.2	18.0±0.2
MCHC	g/dl	35.8±0.3	35.5±0.2	35.5±0.5	35.2±0.5*	35.0±0.5**
Plt	10 <sup>9</sup> /l	0.82±0.03	0.84±0.04	0.81±0.03	0.84±0.04	0.81±0.04
Ebl	count/200 WBC	0.7±0.3	0.9±0.5	0.6±0.3	0.6±0.3	0.6±0.3
WBC	10 <sup>9</sup> /l	3.42±0.40	4.00±0.71	3.30±0.63	4.31±0.36**	3.92±0.47
Differential cell count (%)						
Neut-B		0.4±0.5	0.1±0.3	0.4±0.4	0.4±0.4	0.4±0.4
Baso		0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
Eosino		0.7±0.5	0.9±0.9	0.8±0.9	0.7±0.5	0.8±0.5
Neut-S		9.8±7.0	9.1±7.6	8.7±7.3	10.9±6.7	10.9±5.9
Lympho		88.1±7.3	89.0±8.1	89.3±8.2	87.3±6.8	87.1±6.5
Mono		1.1±0.9	0.9±0.6	0.9±0.6	0.7±0.7	0.9±0.8

a) Mean ± S.D.

\*, \*\*: Significantly different from the control at \*p&lt;0.05, \*\*p&lt;0.01, respectively

Table 4. Serum chemistry in male rats treated with pectin digests for 13 week

Dose level (%)		0	0.15	0.5	1.5	5
No. of animals		10	10	10	10	10
TP	g/dl	7.26±0.28 <sup>a)</sup>	7.27±0.41	7.17±0.16	7.39±0.37	7.44±0.34
Alb	g/dl	4.04±0.11	4.00±0.22	3.92±0.01	4.03±0.16	4.06±0.21
A/G		1.26±0.05	1.23±0.06	1.21±0.08	1.20±0.06	1.20±0.06
BUN	mg/dl	20.2±1.1	18.3±1.2*	18.6±1.6	20.5±2.2	23.3±1.9**
CRN	mg/dl	0.30±0.02	0.31±0.02	0.32±0.02	0.35±0.02**	0.36±0.02**
Glc	mg/dl	171±12	161±18	156±11	168±16	163±15
TG	mg/dl	73±19	60±14	66±17	92±16	118±28**
TCho	mg/dl	65±9	60±8	60±3	65±8	63±5
TBil	mg/dl	0.04±0.01	0.04±0.01	0.14±0.01	0.04±0.00	0.04±0.01
Alp	mU/ml	352±26	337±32	332±28	367±23	370±38
ALT	mU/dl	71±8	69±6	65±5	68±8	72±6
AST	mU/dl	94±12	98±15	82±9	93±9	111±13**
γ-GT	mU/dl	0.40±0.30	0.45±0.30	0.37±0.16	0.33±0.27	0.39±0.21
Ca	mg/dl	10.1±0.4	10.2±0.5	10.2±0.2	10.4±0.6	10.3±0.5
P	mg/dl	6.8±0.5	6.7±0.6	6.6±0.4	6.4±0.6	6.2±0.5
Na	mEq/l	147±7	143±5	143±5	144±7	144±6
K	mEq/l	4.8±0.3	4.3±0.3	4.3±0.2**	4.5±0.5	4.4±0.3*
Cl	mEq/l	104±6	99±4	101±2	101±5	101±5

a) : Mean ± S.D.

\*, \*\*: Significantly different from the control at \*p&lt;0.05, \*\*p&lt;0.01, respectively

Table 5. Serum chemistry in female rats treated with pectin digests for 13 week

Dose level (%)		0	0.15	0.5	1.5	5
No. of animals		10	10	10	10	10
TP	g/dl	6.81±0.18 <sup>a)</sup>	7.01±0.25	6.96±0.24	7.28±0.34**	7.05±0.44
Alb	g/dl	4.06±0.12	4.16±0.22	4.14±0.14	4.31±0.19*	4.09±0.21
A/G		1.48±0.08	1.46±0.13	1.47±0.06	1.45±0.07	1.38±0.07
BUN	mg/dl	17.9±1.4	18.4±1.7	17.9±2.0	18.2±2.6	18.9±2.0
CRN	mg/dl	0.29±0.02	0.32±0.01*	0.33±0.03**	0.32±0.01*	0.30±0.01
Glc	mg/dl	124±15	108±12*	117±9	128±8	125±11
TG	mg/dl	27±4	35±16	26±10	50±13**	34±13
TCho	mg/dl	76±7	82±6	80±7	78±9	75±7
TBil	mg/dl	0.06±0.01	0.06±0.01	0.07±0.01	0.06±0.01	0.08±0.01**
Alp	mU/ml	232±20	219±31	217±20	242±26	214±14
ALT	mU/dl	56±5	53±4	54±4	56±6	50±8
AST	mU/dl	80±8	84±6	86±7	84±9	81±17
γ-GT	mU/dl	0.13±0.33	0.11±0.21	0.05±0.10	0.21±0.43	0.14±0.18
Ca	mg/dl	9.7±0.3	9.9±0.3	9.8±0.2	10.3±0.3**	9.9±0.4
P	mg/dl	5.5±0.5	6.1±0.2**	5.8±0.4	5.9±0.5	5.7±0.4
Na	mEq/l	141±2	142±3	143±2	144±2	141±4
K	mEq/l	4.1±0.3	4.0±0.2	4.1±0.2	4.1±0.1	4.2±0.5
Cl	mEq/l	101±4	101±5	101±2	100±2	101±3

a) : Mean ± S.D.

\*, \*\*: Significantly different from the control at \*p&lt;0.05, \*\*p&lt;0.01, respectively

血液学的検査において、雄では0.5%投与群でMCHの有意な減少が認められたが、これは用量に相関するもので

はないため、偶発的な変動とみなした (Table.2)。雌では、1.5%以上の群で用量に相関してMCVは増加し、MCHC

Table 6. Organ weight of male rats treated with pectin digests for 13 week

	Dose level (%)				
	0	0.15	0.5	1.5	5
Body weight (g)	316.0±12.5	325.7±7.6	316.2±11.8	324.2±13.0	307.0±10.0
Absolute (g)					
Brain	1.937±0.031 <sup>a)</sup>	1.932±0.165	1.975±0.051	1.987±0.049*	1.948±0.036
Thymus	0.193±0.023	0.201±0.023	0.179±0.033	0.192±0.037	0.191±0.036
Lung	1.008±0.060	1.036±0.038	1.052±0.074	1.046±0.046	0.984±0.070
Heart	0.958±0.060	0.981±0.074	0.956±0.040	0.944±0.035	0.903±0.045*
Spleen	0.628±0.042	0.660±0.064	0.664±0.030*	0.661±0.036	0.624±0.044
Liver	7.527±0.379	7.626±0.115	7.573±0.338	7.856±0.481	7.579±0.337
Adrenal	0.036±0.003	0.039±0.004	0.037±0.006	0.038±0.004	0.036±0.003
Kidney	1.898±0.035	1.988±0.084*	1.948±0.129	1.915±0.105	1.855±0.084
Testis	3.074±0.084	3.161±0.132	3.166±0.132	2.897±0.709	3.007±0.064
Relative (g/100g B.W.)					
Brain	0.614±0.027	0.594±0.055	0.625±0.013	0.614±0.026	0.635±0.018
Thymus	0.061±0.006	0.062±0.007	0.056±0.010	0.059±0.010	0.062±0.013
Lung	0.319±0.008	0.318±0.010	0.333±0.016*	0.323±0.014	0.320±0.017
Heart	0.303±0.012	0.301±0.020	0.302±0.008	0.292±0.013	0.294±0.009
Spleen	0.199±0.010	0.203±0.019	0.210±0.012*	0.204±0.007	0.203±0.010
Liver	2.382±0.096	2.342±0.055	2.396±0.081	2.422±0.079	2.469±0.058*
Adrenal	0.011±0.001	0.012±0.001	0.012±0.002	0.012±0.001	0.012±0.001
Kidney	0.601±0.017	0.610±0.020	0.616±0.031	0.591±0.026	0.604±0.017
Testis	0.974±0.043	0.912±0.194	1.000±0.040	0.894±0.218	0.980±0.025

a) : Mean±S.D.

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

Table 7. Organ weight of female rats treated with pectin digests for 13 week

	Dose level (%)				
	0	0.15	0.5	1.5	5
Body weight (g)	171.0±5.8	174.3±7.3	175.6±9.7	175.0±9.7	177.5±10.1
Absolute (g)					
Brain	1.789±0.034 <sup>a)</sup>	1.794±0.049	1.783±0.038	1.757±0.034	1.800±0.038
Thymus	0.166±0.022	0.164±0.024	0.157±0.020	0.152±0.029	0.174±0.020
Lung	0.716±0.027	0.727±0.040	0.749±0.078	0.717±0.047	0.732±0.049
Heart	0.579±0.029	0.615±0.046*	0.596±0.034	0.576±0.031	0.598±0.044
Spleen	0.382±0.021	0.407±0.024*	0.404±0.043	0.391±0.012	0.416±0.021**
Liver	3.694±0.146	3.837±0.244	3.875±0.253	3.972±0.293*	4.002±0.263**
Adrenal	0.045±0.004	0.044±0.004	0.044±0.004	0.045±0.006	0.043±0.005
Kidney	1.115±0.041	1.098±0.052	1.122±0.071	1.108±0.060	1.215±0.074**
Relative (g/100g B.W.)					
Brain	1.048±0.048	1.031±0.057	1.018±0.058	1.006±0.054	1.010±0.043
Thymus	0.097±0.013	0.094±0.013	0.090±0.012	0.087±0.017	0.098±0.014
Lung	0.419±0.015	0.417±0.016	0.426±0.032	0.410±0.013	0.413±0.021
Heart	0.339±0.012	0.353±0.025	0.339±0.014	0.329±0.013	0.337±0.010
Spleen	0.223±0.012	0.234±0.011	0.230±0.015	0.224±0.009	0.235±0.007*
Liver	2.162±0.060	2.203±0.125	2.206±0.074	2.268±0.067**	2.256±0.115*
Adrenal	0.026±0.002	0.025±0.002	0.025±0.002	0.026±0.003	0.024±0.002
Kidney	0.653±0.019	0.631±0.030	0.640±0.041	0.634±0.026	0.685±0.021**

a) : Mean±S.D.

\* , \*\* : Significantly different from the control at \*p&lt;0.05, \*\* p&lt;0.01, respectively

は減少した (Table.3)。その他、いくつかの測定項目で対照群と比較して有意な変動がみられたが、これらは用量に相関するものではなく、偶発的な変動とみなした。血清生化学的検査では雄の BUN, TG, AST が 5% 投与群で CRN が 1.5% 以上の投与群で有意に増加し、K が 5% 投与群で有意に減少した (Table.4)。雌では TBil が 5% 投与群で有意に増加し、CRN が 0.15, 0.5, 1.5% 投与群で有意に増加したが用量に相関するものではなかった (Table.5)。その他、いくつかの測定項目で対照群と比較して有意な変動がみられたが、これらは用量に相関するものではなく、偶発的な変動とみなした。

#### 4. 臓器重量

雄の 5% 投与群では、体重の増加抑制に対応して心臓の絶対重量が有意に減少し、相対重量では肝臓で有意な増加を認めた (Table.6)。雌では脾臓、肝臓、腎臓が 5% 投与群で、肝臓が 1.5% 投与群で絶対重量と相対重量が有意に増加した (Table.7)。その他、いくつかの測定項目で対照群と比較して有意な変動がみられたが、これらは用量に相関するものではなく、偶発的な変動とみなした。

#### 5. 病理組織学的所見

投与群の各臓器組織では対照群と比較して、投与に起因する変化は認められなかった。

## 考 察

日本で保存料として食品添加物に認可されているペクチン分解物は、Nozaki等によりその抗菌性が報告されている。その抗菌作用はオリゴガラクトロン酸およびガラクトロン酸の非解離型カルボキシル基による殺菌効果と、オリゴガラクトロン酸による増殖阻害効果によるものであるとされている。<sup>5)</sup>マウス経口投与による急性毒性試験において、LD50値は4350mg/kgと低毒性である事が報告されている。<sup>6)</sup>雄の5%投与群では投与7, 8, 12, および13週に有意な体重増加抑制がみられ、飲水量と摂餌量も減少したことから、これらの変化は投与に関連する可能性が推察された。血清生化学的検査では、雄の1.5%以上の投与群でCRNが、5%投与群でBUNが増加した。組織学的には腎に明らかな変化は見られなかったがこれらの検査値の変動は軽度であったが有意であったことから、本物質を長期投与することにより腎障害が発現する可能性も考えられた。雌の1.5%以上の投与群で肝重量の有意な増加が認められた。肝障害を示唆する酵素の有意な変動は認められなかったこ

とから、軽度の薬物代謝酵素誘導による肝重量の増加の可能性が考えられた。以上の結果から、本実験条件下におけるペクチン分解物の無影響量 (NOEL) は0.5% (雄545, 雌657mg/kg/day) であると考えられた。なお、今回認められた血清学的変化や体重増加抑制を考慮し、現在この結果を元に最高用量を5%として慢性毒性試験では同じ用量 (5, 2.5, 1.5, 0%) で1年間、癌原性試験では5, 2.5および0%の3用量で2年間の試験を実施中である。

## 文 献

- 1) 今堀和友, 山川民夫 (監修): 生化学事典第2版, 東京化学同人, 1192 (1990)
- 2) 山田常雄, 前川文夫, 江上不二夫, 八杉竜一, 小関治男, 古谷雅樹, 日高敏隆 (編集): 岩波生物学事典第3版, 岩波書店, 1175 (1983)
- 3) 林吉純: ペクチンの特性と利用法. 食品・食品添加物研究誌, 167, 22~30 (1996)
- 4) 食品添加物総覧1992年版, 食品化学新聞社, 59-60 (1992)
- 5) 野崎一彦, 横塚弘毅: ペクチン分解物の抗菌性. 天然物による食品の保蔵技術, 1~20 (1985)
- 6) アサマ化成株式会社社内報

食品添加物公定書に記載される *d*-ボルネオールの立体構造の確認について江崎 勝司・関田 節子・川原 信夫・代田 修  
鎌倉 浩之・佐竹 元吉Stereochemical structure of *d*-borneol  
in "The Japanese Standards of Food Additives"Katsushi Ezaki, Setsuko Sekita, Nobuo Kawahara, Osamu Shirota,  
Hiroyuki Kamakura and Motoyoshi Satake

*d*-Borneol is shown at "The Japanese Standards of Food Additives" the sixth edition<sup>1)</sup>. Though the absolute stereochemistry of this compound is described as *1S*, *2R*-form, the opposite optical rotation for the same structure is described in other literatures. The application of improved Mosher's method to *d*-borneol resulted in *1R*, *2S*-form for its absolute stereochemistry.

**Keywords** : borneol, food additive, absolute stereochemistry, *Drybalanops aromatica*  
(Received May 30, 1997)

## はじめに

*d*-ボルネオールは食品添加物公定書第6版(1992)<sup>1)</sup>(Fig.1)に記載され、香粧品、薫香料として用いられる化合物である。その純度は、旋光度により規定され、公定書に記載される化合物は、必ずしも化学的に純粋な *d*-ボルネオールを指す物ではない。食品添加物公定書は現在第7版への改訂作業が進められている段階であるが、本化合物の立体及びその表記法について混乱が認められたため、検討を行うこととした。

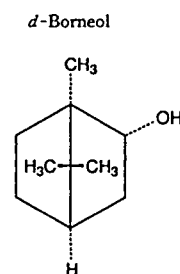
*d*-ボルネオール [464-43-7] は、著名な香料として珍重される龍脳中に多く含まれており、その構造が1928年に報告<sup>2)</sup>されている。龍脳は、ボルネオ近辺に産するフタバガキ科植物リュウノウジュ (*Drybalanops aromatica*) の樹脂で宗教的薫香料としても用いられていた。また、ボルネオール [570-70-0] は1958年に出版された Karrer の書籍<sup>3)</sup>によると、その時点までに、150種以上の植物から単離されているとの記載がある。その中で *d*-ボルネオールを含む植物は、フタバガキ科リュウノウジュの他、ウマノスズクサ科、ヒノキ科、ニクズク科、ショウガ科等であり、一方、*l*-ボルネオール [464-45-9] を含む植物はキク科、フトモモ科、クスノキ科、オミナエシ科等であると報告されている。また、イネ科、シソ科等においては *d*, *l* 両異性体の報告がなされている (Table 1)。その他、現在では GC-MS の普及により、立体に言及していないものを含めて自然界の多くの植物にその存在が報告されている。

ボルネオールはその分子中に3個の不斉中心を有し、理論的には8個の異性体が存在する。しかし、架橋構造を有

する bornane 骨格を母核とするため、架橋があたかも1つの不斉のような挙動を示し、その結果として立体異性体は4個のみが存在する (Fig.2)。

*d*-ボルネオールの *d*-は古くから化合物の旋光性の表現法として用いられており、*d*-は右旋性を、*l*-は左旋性を表す。食品添加物公定書に *d*-ボルネオールの名称で記載されている化合物は、各条にその比旋光度が +16~37° と規定されている。

慣用的には水酸基が6員環に向く場合を *endo* 型と表現し5員環に向く場合を *exo* 型と表現してきたが、現在は混乱のない *R,S* 表示が望ましいと考えられる。一部の文献においては、水酸基が *endo* 型の配置をとるものをボルネオール、*exo* 型をとるものをイソボルネオールとする

*d*-ボルネオールC<sub>10</sub>H<sub>18</sub>O

分子量154.25

**含量** 本品は、*d*-ボルネオール (C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>O) 95.0%以上を含む。

**性状** 本品は、白色の結晶、結晶性の粉末又は塊で、リュウノウのようなにおいがある。

**純度試験** (1)比旋光度[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>=+16.0~37.0° (2.5g, エタノール, 25ml)

Fig. 1. *d*-Borneol listed in "The Japanese Standards of Food Additives" sixth edition

Table 1. The plants of list including borneol described in Karrer<sup>3)</sup>

<i>d</i> -Borneol	
<i>Aristolochia zenkeri</i> Engl.	Aristolochiaceae
<i>Thuja occidentalis</i> L.	Cupressaceae
<i>Dryobalanus aromatica</i> Gaertn. f.	Dipterocarpaceae
<i>Cymbopogon flexuosus</i> (DC) Stapf	Graminae
<i>Rosamarinus officinalis</i> L.	Labiatae
<i>Lavandula spica</i> Cav.	Labiatae
<i>Lavandula vera</i> DC.	Labiatae
<i>Myristica fragrans</i> Van Houtt.	Myristicaceae
<i>Amomum cardamomum</i> L.	Zingiberaceae
<i>Amomum kravanhia</i> Pierr ex Gagnep.	Zingiberaceae
<i>Amomum villosum</i> Lour.	Zingiberaceae
<i>Amomum xanthioides</i> Wallich	Zingiberaceae
<i>Zingiber officinale</i> Rosc.	Zingiberaceae
<i>l</i> -Borneol	
<i>Achillea millefolium</i> L.	Compositae
<i>Blumeria balsamifera</i> DC.	Compositae
<i>Matricaria parthenium</i> L.	Compositae
<i>Andropogon nardus</i>	Graminae
<i>Rosamarinus officinalis</i> L.	Labiatae
<i>Thymus vulgaris</i> L.	Labiatae
<i>Lindera strychnifolia</i> Vill.	Lauraceae
<i>Baeckea frutescens</i> L.	Myrtaceae

記述が見られる。しかし、水酸基の絶対配置と旋光性との関係については、実験結果に基づく明確な記載が見いだせなかった。

現在ボルネオールの立体の表現と旋光性との関係についてどのような混乱が見られているかを、MERCK INDEX<sup>4)</sup>, MERCK 社の試薬カタログ<sup>5)</sup>, Aldrich 社の試薬カタログ<sup>6)</sup>, 他の書籍<sup>7,8)</sup>の記載を例に比較した。(Table 2)

Aldrich 社の試薬カタログの記載は、MERCK INDEX の *d*-ボルネオールの項と同じ *1S, 2R (endo)*-form の構造式に対して [(1*S*)-endo]-(*-*)-ボルネオールという名称で記載されている。この *1S, 2R (endo)*-form は、食品添加物公定書に記載されている *d*-ボルネオールの構造と同一であることから、公定書では右旋性である化合物が左旋性を示す化合物として Aldrich 社から市販されているという矛盾が生じている。さらに、他の書籍において、*d*-ボルネオールは *1R, 2S (endo)*-form であると記載されていることから、これらの情報のみからでは、その正誤を論じることが難しい。そこで我々は、二級水酸基の絶対配置決定法として、改良 Mosher 法<sup>9)</sup>をボルネオールに適用し、絶対構造と旋光性の関係について検討した。

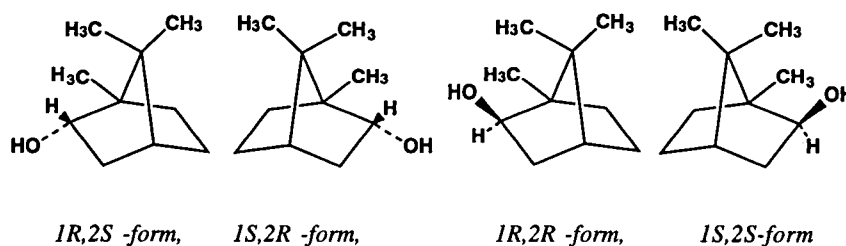
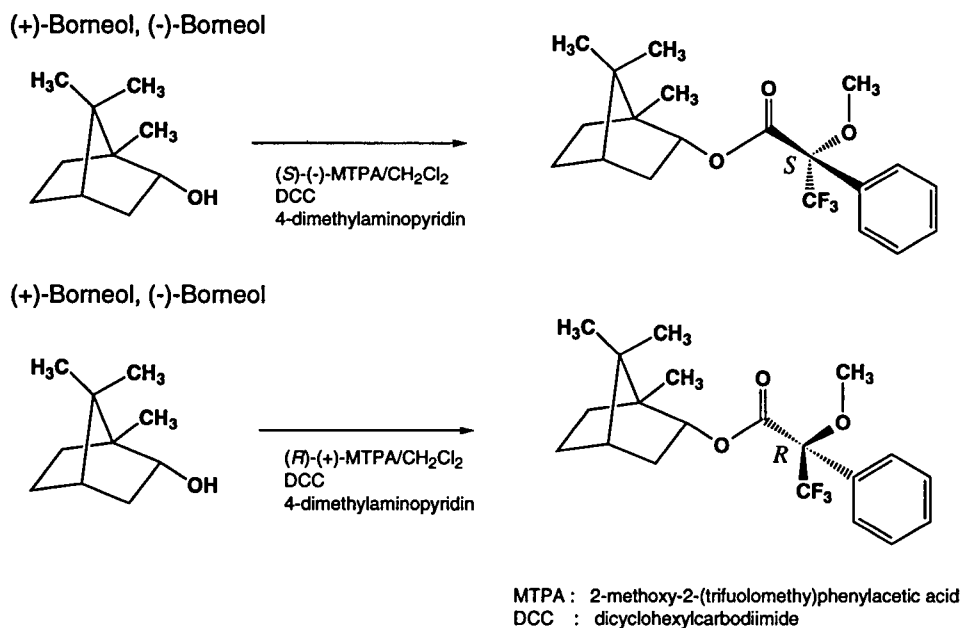


Fig. 2. Possible stereo isomers of borneol

Table 2. Optical rotation and stereochemistry of borneol described in literatures

literature	form	optical rotation	compound name
The Japanese standard of food additive (6th ed.) 1992	<i>1S, 2R</i>	(+)	<i>d</i> -borneol
MERCK INDEX (12th ed.)	<i>1S, 2R</i>	(+)	<i>d</i> -borneol
MERCK Reagents Diagnostics Chemicals 1992/93	<i>1S, 2S</i>	(-)	(1 <i>S</i> )-( <i>-</i> )-borneol [464-45-9]
Catalog Handbook of Fine Chemicals Aldrich, 1996-1997	<i>1S, 2R</i>	(-)	[(1 <i>S</i> )-endo]-( <i>-</i> )-borneol [464-45-9]
Dictionary of Organic Compounds (5th ed.) 1982	<i>1S, 2S</i>	(+)	7,7,7-Trimethylbicyclo [2.2.1] heptan-2-ol (+)-borneol [464-43-7]
Dictionary of Terpenoids 1991	<i>1S, 2S</i>	(+)	(+)-borneol [464-43-7]
Chemical abstract	<i>1S, 2S</i>		Bicyclo [2,2,1] heptan-2-ol, 7,7,7 trimethyl-(1 <i>R</i> -endo)- [464-43-7]



Scheme 1. Synthesis of borneol (+) and (-) MTPA esters

### 実験材料及び方法

試薬として市販され入手可能なボルネオール(5検体), (±)-ボルネオール(2検体), (-)-ボルネオール(6検体), (+)-ボルネオール(1検体), (±)-イソボルネオール(3検体)の他, 食品添加物 *d*-ボルネオール(1検体)を購入し, 本試験に用いた。

NMRは, 各試料を重クロロホルムに溶解し Varian 社 Gemini-300及び Unity plus 400にて測定し, 比旋光度は食品添加物公定書の記載に従い, 日本分光(株)旋光度計 DIP-370型を用いて測定した。

$\alpha$ -methoxy- $\alpha$ -(trifluoromethyl) phenylacetic acid (MTPA) エステルへの誘導 (Scheme 1) : ボルネオール (10mg) をジクロロメタン 0.5ml に溶解し, MTPA (55mg), dicyclohexylcarbodiimide (85mg), dimethylaminopyridine (25mg) を加えて90分間攪拌した。反応物はろ過し, 沈殿物を少量のジクロロメタンで洗浄し, ろ液と合わせて溶媒を留去後, 低圧液体クロマトグラフィーを用いて精製した。

### 結 果

改良 Mosher 法は2級の水酸基を MTPA エステルに誘導し, MTPA の異方性効果の差により, 水酸基の絶対配置を決定する方法である。まず, ボルネオールのプロトン及びカーボンのケミカルシフトの帰属を一次元 NMR 及び, 各種二次元 NMR を用いて行った (Table 3)。<sup>1</sup>H-NMR スペクトルにおいて, 5位, 6位のメチレンプロトンシグナルに重なりが認められたが, すべてのプロトン及びカーボンのケ

ミカルシフトの帰属が可能であった。

次に, (+) の旋光性を有するボルネオールから (*S*)-(-)-MTPA エステル及び (*R*)-(+)-MTPA エステルを誘導し, それぞれのプロトンシグナルの帰属を行ったのち, (*S*)-(-)-MTPA エステルの各プロトンシグナルのケミカルシフト値と (*R*)-(+)-MTPA エステルのケミカルシフト値との差を取り,  $\Delta\delta$  値を算出した (Table 4)。これらの  $\Delta\delta$  値は, 10位のメチルプロトンが大きな正の値を示し, 3 $\alpha$ , 6 $\beta$  のプロトンが大きい負の値を示した。そこで, 水酸基の付け根を中心に MTPA を  $\beta$  に, プロトンを  $\alpha$  に固定し, 3 $\alpha$ , 6 $\beta$  のプロトンを左に, 10位のメチル基を右に配置することにより (+)-ボルネオールの水酸基の絶

Table 3. <sup>13</sup>C- and <sup>1</sup>H-NMR chemical shifts of borneol

No.	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H
1	49.5 s	—
2	77.4 d	4.01 br.d
3	39.1 t	2.28 br.t dd 0.94 m
4	45.2 d	1.63 m
5	28.3 t	1.73 m 1.25 m
6	26.0 t	1.88 m 1.25 m
7	48.1 s	—
8	20.2 q	0.87 s
9	18.7 q	0.86 s
10	13.4 q	0.85 s

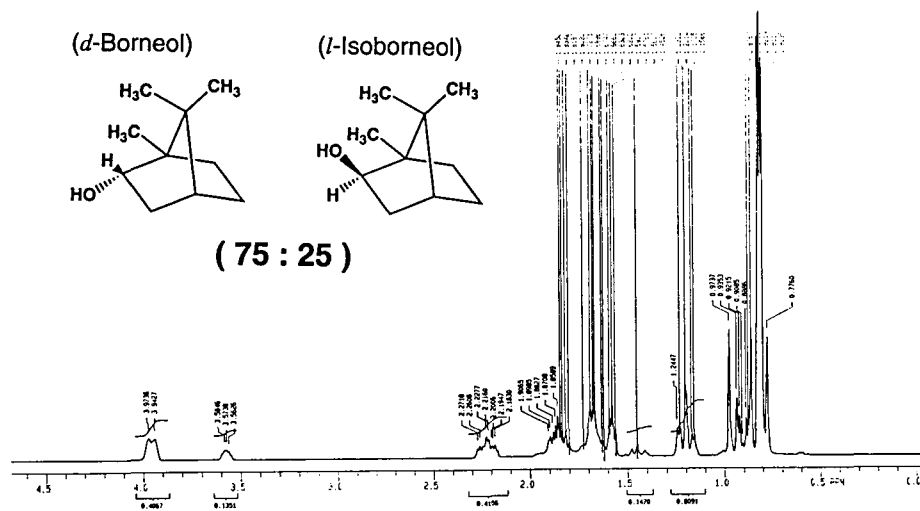


Table 4.  $^1\text{H}$ -NMR chemical shifts and  $\Delta\delta$  (ppm) of (+)-borneol MTPA esters

$^1\text{H}$	(S)-(-)MTPA (ppm)	(R)-(+MTPA (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
2	5.0697	5.1071	-0.0374
4	1.7137	1.7291	-0.0154
3 $\alpha$	1.0035	1.1042	-0.1007
3 $\beta$	2.4525	5.4530	-0.0004
5 $\alpha$	1.2725	1.2800	-0.0075
5 $\beta$	1.8181	1.8100	0.0081
6 $\alpha$	1.7912	1.7675	0.0237
6 $\beta$	1.1194	1.2000	-0.0806
8	0.8862	0.8779	0.0083
9	0.9281	0.9264	0.0017
10	0.8807	0.8051	0.0756

Table 5.  $^1\text{H}$ -NMR chemical shifts and  $\Delta\delta$  (ppm) of (-)-borneol MTPA esters

$^1\text{H}$	(S)-(-)MTPA (ppm)	(R)-(+MTPA (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
2	5.1075	5.0684	0.0390
4	4.7300	1.7135	0.0165
3 $\alpha$	1.1044	1.0022	0.1022
3 $\beta$	2.4539	2.4516	0.0023
5 $\alpha$	1.2720	1.2687	0.0033
5 $\beta$	1.8119	1.8281	-0.0162
6 $\alpha$	1.7787	1.8053	-0.0266
6 $\beta$	1.2029	1.1189	0.0840
8	0.8788	0.8853	-0.0065
9	0.9273	0.9275	-0.0002
10	0.8056	0.8807	-0.0751

Fig. 3.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of *d*-borneol used as a food additive

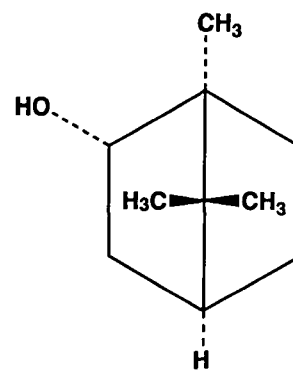
対配置は *S* であると決定された。同様に (-)-ボルネオールから誘導した (S)-(-)-MTPA 及び (R)-(+)-MTPA エステルのプロトンシグナルの帰属を行い、 $\Delta\delta$  値 (Table 5) を算出した。 $\Delta\delta$  値は、3 $\alpha$ 、6 $\beta$  のプロトンが大きい正の値を示し、10位のメチルプロトンが大きな負の値を示すことから、(-)-ボルネオールの水酸基の絶対配置は *R* であると決定された。

### 考 察

(+)-ボルネオール (*d*-ボルネオール) の絶対配置は 1*R*, 2*S*-form をであり、(-)-ボルネオール (*l*-ボルネオール) の絶対配置は 1*S*, 2*R*-form であることを明らかにした。また、今回入手した食品添加物 *d*-ボルネオールの  $^1\text{H}$ -NMR スペクトル (Fig. 3) は、*d*-ボルネオールと *l*-イソボルネオールとの混合物であることを示し、2位水酸基の付け根のプロトンの積分値から推察するとその存在比は (75:25) であると考えられた。このことは現在ボルネオールは *d*-カンフル等を原料にした合成物であり、合成反応の副生成物として *l*-イソボルネオールが混入するため

と考えられる。ただし今回、試験に用いた食品添加物用 *d*-ボルネオールの旋光度は  $+18^\circ$  であり、公定書の規格を満たしていた。

ボルネオールと表示された試料は 6 検体とも (±)-ボルネオールと (±)-イソボルネオールの混合物であり、その旋光度は  $\pm 0$  であった。(+) -ボルネオール、(-)-ボルネオールと表示された試料は光学的にも単一な化合物であった。

Fig. 4. Revised structure of *d*-borneol

以上のように、我々は (+) の旋光性を示す *d*-ボルネオールの絶対構造が 1 *R*, 2 *S*-form であることを確認した。この結果を踏まえて、食品添加物公定書第7版における、*d*-ボルネオールの構造式を Fig. 4 のような記載に訂正する方向で検討を進められている。

#### 文 献

- 1) 食品添加物公定書第6版469, 1992.
- 2) E. Gildemeister, F. Hoffman, *die Atherischen ole* (Schimmel, Leipzig, 3rd ed.) 475~481, 1928.
- 3) Walter Karrer, *Konstitution Und Vorkommen der organischen Pflanzenstoffe*, Birkhäuser verlag basel und stuttgart, 129, 1958.
- 4) THE MERCK INDEX (Twelfth edition) 1336, 1996.
- 5) MERCK Reagents Diagnostics Chemicals 191, 1992/93.
- 6) Catalog Handbook of Fine Chemicals Aldrich, 203, 1996~1997.
- 7) J. Buckingham, *et al.*, *Dictionary of Organic Compounds* (5th ed.), (CHAPMAN AND HALL), 5549, 1982.
- 8) J. D Connolly and R. A. Hill, *dictionary of Terpenoids*, (CHAPMAN AND HALL), 132, 1991.
- 9) 第32回天然有機化合物討論会講演要旨集245, 1990.

家庭用品に使用される化学物質の細胞毒性：平成3～8年度  
対象化学物質の眼刺激性の予測

五十嵐良明\*・土屋 利江・中村 晃忠

Cytotoxicity of chemicals used in household products: Estimation of eye  
irritating potency of 25 chemicals tested during 1991 - 1996

Yoshiaki Ikarashi<sup>#</sup>, Toshie Tsuchiya and Akitada Nakamura

Cytotoxicity potential of chemicals was evaluated by determining the concentrations inducing 50% reduction of neutral red (NR) uptake into Chinese hamster fibroblast V79 cells compared with control culture (IC<sub>50</sub>). The results of cytotoxicity test for surfactants with the data produced by the *in vivo* Draize eye and skin irritation test were compared. There was a good correlation between cytotoxicity and eye irritation score obtained from the Draize test. In contrast, no correlation was observed between Draize skin irritation score and cytotoxic potential of chemicals. Therefore, the NR cytotoxicity test was regarded as a possible *in vitro* model for predicting eye irritation. Based on the IC<sub>50</sub> values in the NR cytotoxicity test, the eye irritation classification (weak, moderate and strong) for each chemical used in household products has been established. We evaluated the cytotoxicity of 25 chemicals used for antimicrobial, rubber accelerator, rubber antioxidant, ultraviolet absorber *etc.* in household products, and estimated the eye irritating potency of these test chemicals according to the criterion.

**Keywords** : cytotoxicity, household product, eye irritation, classification  
(Received May 30, 1997)

緒 言

家庭用品にはさまざまな化学物質が使用されており、日常生活のいろいろな場面で有益な作用をもたらしている。しかし、こうした家庭用化学製品は消費者が直接接触する機会が多いため、その利用法によっては思わぬ健康被害を引き起こす可能性がある。そのため、家庭用品の製造段階から使用する化学物質の適切なリスク管理を行うことが求められるが、現状では十分に行われているとは言えない。厚生省においては、「有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律」に基づき、規制基準の設定など必要な安全対策を講じると同時に、健康危害の防止対策として、平成3年度から使用頻度や事故、文献情報をもとに毎年4品目程度の化学物質を選定し、安全性評価の試験検査を行っている。試験項目としては、変異原性試験、28日または90日連続投与試験、生殖/発生毒性試験、感作性試験及び細胞毒性試験がある。

家庭用品による健康被害としては手のあれが常に上位にランクされており、使用される化学物質による刺激が一つの原因とされている。化学物質の眼及び皮膚に対する刺激

性を評価する試験法としては、古くからウサギを用いたドレイズ法が用いられている<sup>1)</sup>。しかし、判定が肉眼による主観の評価で定量性、再現性に欠けるなどの問題点が多く指摘されている。多くの研究者によって、種々の細胞を用いた細胞毒性試験はドレイズ眼刺激性試験法の代替法として有用であるとの報告がされており<sup>2-8)</sup>、我々もニュートラルレッド (neutral red, NR) の細胞内への取り込みを指標とする方法が、ドレイズ法の眼刺激性データとよく相関することを報告した<sup>9)</sup>。大野らは、ドレイズ眼刺激性試験の代替法として上げられる12種の試験法について、10種の試験物質を20の研究室で評価し、比較した。その結果、NRの取り込みなどで判定する細胞毒性試験法は、細胞の種類に関係なく、ドレイズ試験法と良好な相関性があることを示している<sup>10)</sup>。したがって、化学物質の細胞毒性強度を知ることが、これらを使用する家庭用化学製品による眼刺激性などの事故防止に有用な情報を与えるものとする。その一方で、皮膚刺激性との相関性の有無について確かめた実験は少ない。

本研究は最初に、細胞毒性試験から *in vivo* の刺激性強度を予測する基準設定のための検討を行った。そのためにまず、先の NR 法のデータ<sup>9)</sup>を眼刺激強度のランク別に比較した。次に、化粧品に使われる界面活性剤について眼刺激性と同時に皮膚刺激性の定量的なデータを検索し、これ

\* To whom correspondence should be addressed : Yoshiaki Ikarashi ; Kamiyoga 1 -18-1, Setagaya, Tokyo 158, Japan ; Tel : 03-3700-1141 ext. 390 ; Fax : 03-3707-6950 ; E-mail : ikarashi@nihs.go.jp

らについて細胞毒性試験を行い、*in vitro* と *in vivo* とのデータ間の相関性を調べた。その結果、細胞毒性試験は眼刺激性については比較的高い相関性で評価ができるものの皮膚刺激性を予測するには十分でないことがわかった。以上の検討から、家庭用品に使われる化学物質の細胞毒性の強度、すなわち眼刺激性をクラス分けする基準を設定した。さらに、平成3年度から8年度に選定した25品目について細胞毒性試験の結果を示し、先の基準をもとに刺激性のランク付けを行った。数種の品目についてはコロニー法<sup>11)</sup>による細胞毒性試験を行ったので、併せて結果を報告する。

## 実験方法

### 1. 細胞

チャイニーズハムスター由来線維芽細胞株 V79細胞を用いた。細胞は牛胎児血清を5%または10%含有させた Eagle's MEM 培地で培養した。

### 2. 細胞毒性試験

ニュートラルレッド (NR) 法：Borenfreund らの方法<sup>9)</sup> をもとに、既報<sup>9)</sup>に従って行った。すなわち、牛胎児血清を5%含有させた Eagle's MEM 培地に浮遊させた V79細胞を96穴プレートの各穴に  $9 \times 10^3$  cells/200  $\mu$ l ずつ入れ、37°C、5%CO<sub>2</sub>インキュベーターで24時間培養後、培地を除き、種々の濃度の被験物質を含有した培地200  $\mu$ l を加えて、さらに24時間培養した。次に、NR 溶液を加えて4時間培養後、ホルマリン溶液で細胞を固定洗浄後、酢酸エタノール溶液を加えて細胞内に取り込まれた NR を抽出し、540 nm における吸光度を測定した。各被験物質について濃度と吸光度との関係をグラフにプロットして、吸光度をコントロールの50%に減少させる濃度 (IC<sub>50</sub>( $\mu$ g/ml)) を求めた。

コロニー法<sup>11)</sup>：牛胎児血清を10%含有させた Eagle's MEM 培地に浮遊させた V79細胞を24穴プレートの各穴に 50 cells/500  $\mu$ l ずつ入れ、37°C、5%CO<sub>2</sub>インキュベーターで4時間培養後、培地を除き、種々の濃度の被験物質を含有した培地500  $\mu$ l を加えて、7日間培養した。ホルマリン溶液で細胞を固定後、ギムザ染色して、各穴に形成されたコロニー数を数えた。各化学物質についてコロニー数をコントロールの50%に減少させる濃度 (IC<sub>50</sub>( $\mu$ g/ml)) を求めた。

## 結果と考察

### 1. 細胞毒性試験とドレイズ試験との比較による刺激性のランク付けの設定

細胞毒性試験の眼刺激性試験法の *in vitro* 代替法としての可能性を見るためには、*in vivo* ドレイズ眼刺激性試験においても定量的な値を示し、それと比較することが重要である。Watanabe らは、ドレイズ試験において、種々の

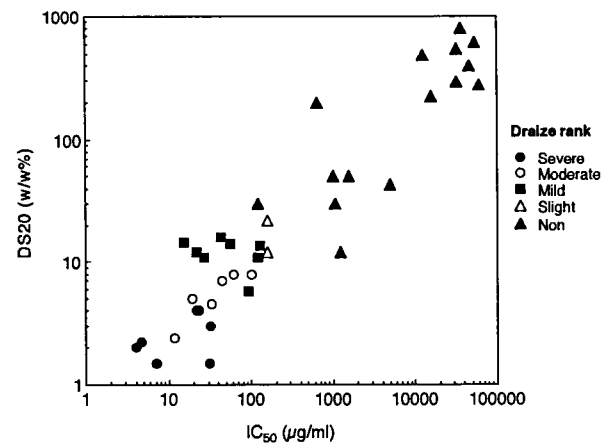


Fig. 1. Correlation between cytotoxicity *in vitro* and eye irritation in the Draize test

IC<sub>50</sub> value is the concentration that reduces the absorbance by 50% of control with neutral red cytotoxicity assay (ref. 9). DS 20 value is the concentration of each chemical extrapolated from the dose-response curve giving a Draize test score of 20 in the rabbit eye (ref. 4). Draize rank (ocular irritancy classification) was based on Draize test scores according to the scale of ref. 12 (ref. 4). The regression coefficient is  $\gamma = 0.93$ .

濃度で試験物質を適用し、各濃度におけるドレイズスコアを求めて濃度反応曲線を作成した。次に、このグラフよりドレイズスコア=20を示す濃度 (DS20(w/w%)) を求め、これを眼刺激性強度の定量的な値とした<sup>9)</sup>。既に我々は、このうち38種の化学物質について NR 法によって細胞毒性試験を行い、その IC<sub>50</sub>値と DS20値とは相関係数0.93が得られることを報告した<sup>9)</sup>。今回は、細胞毒性強度による *in vivo* 眼刺激性強度のクラス分けを目的として、眼刺激性強度ランク (severe, moderate, mild, non) 別に記号の種類を変えて比較し直した (Fig. 1)。グラフ中には DS20が100以上の値を示すものがあるが、これは、その物質の刺激性が非常に弱いことを示している。すなわち、刺激性が非常に弱い物質は100%原液でもドレイズ試験で20のスコアを示さないが、この場合は濃度反応曲線を外挿していくため、結果として DS20値が100以上の値を示すことによる<sup>9)</sup>。眼刺激性ランクは Kay and Calandra のスケール<sup>12)</sup>によってドレイズ試験のスコアから分類したものである<sup>9)</sup>。眼刺激性が非常に強い severe な物質はいずれも IC<sub>50</sub>値は35  $\mu$ g/ml 以下、弱い (slight~non) 物質は100  $\mu$ g/ml 以上の値を示した (Fig. 1)。

小島らは、化粧品原料の界面活性剤13種 (Table 1) の眼刺激性と皮膚刺激性について定量的な評価を行っている<sup>13-15)</sup>。彼らは10%水溶液をウサギに点眼後1~168時間後の反応をドレイズ基準に従って評価し、最高の評点から試験物質の眼刺激性強度を表した<sup>13,14)</sup>。皮膚刺激性については、24時間閉塞貼布し除去後1時間目の評点から判定した<sup>13,15)</sup>。皮膚反応は評点の差が少なく、眼及び皮膚刺激評点の大きさの順序及びドレイズランクは必ずしも一致しな

Table 1. Draize eye and skin irritation in vivo and IC<sub>50</sub> values in neutral red cytotoxicity test in vitro for 13 surfactants

Chemical	Abbreviation	Draize test <sup>a)</sup>				Cytotoxicity test IC <sub>50</sub> (μg/ml) <sup>b)</sup>
		Eye irritation		Skin irritation		
		Score	Draize rank	Score	Draize rank	
<b>Cationic surfactants</b>						
Stearyl dihydroxyethoxyethyl hydroxyethyl ammonium chloride (20% solution)	SDAC	54.3	Severe	3.0	Severe	25.8
Stearyl trimethyl ammonium chloride (63% solution)	STAC	85.7	Severe	4.5	Severe	4.0
Alkyl benzyl dimethyl ammonium chloride (50% solution)	ABAC	85.3	Severe	8.0	Severe	12.4
Benzethonium chloride	BC	96.7	Severe	5.7	Severe	10.7
<b>Anionic surfactants</b>						
Sodium lauryl sulfate	SLS	55.7	Moderate	8.0	Severe	30.7
Sodium polyethylene laurylether sulfate (3 E.O.)	SPLS3	21.0	Slight	2.0	Moderate	138
Sodium polyoxyethylene laurylether sulfate (12 E.O.)	SPLS12	57.0	Moderate	3.7	Severe	330
Sodium tetradecenesulphonate (37% solution)	ST	36.7	Slight	4.3	Severe	263
Potassium laurate	PL	85.3	Moderate	4.2	Severe	36.1
<b>Nonionic surfactants</b>						
Polyethylene lauryl ether (9 E.O.)	POE-LE	63.0	Severe	1.2	Moderate	23.3
Polyethylene nonyl phenyl ether (10 E.O.)	POE-NPE	57.0	Moderate	0.7	Non	23.5
Sucrose lauric acid ester (38% solution)	SLAE	21.0	Slight	3.0	Severe	147
<b>Amphoeric surfactants</b>						
Lauryl dimethylaminoacetic acid betaine (31% solution)	LDAB	61.0	Moderate	3.0	Severe	126

<sup>a)</sup> All Draize eye and skin irritation data of test chemicals were quoted from the data of Kojima et al. (refs.13, 14).

Eye irritation score was maximal average Draize eye score from 3 rabbit after application of 10% solution of test chemical.

Skin irritation score was average Draize skin score at 1 h after 24 h closed application of test chemical.

<sup>b)</sup> IC<sub>50</sub> was the concentration that reduced the absorbance by 50 % of control with neutral red cytotoxicity test.

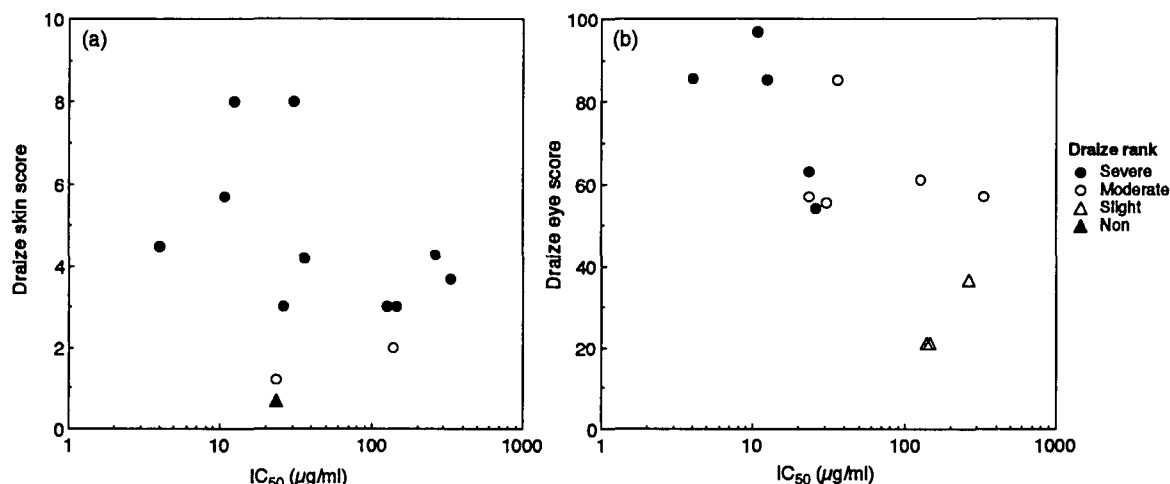


Fig. 2. Comparison of cytotoxicity with Draize skin score (a) or Draize eye score (b) for 13 surfactants  
Draize test data were quoted from refs. 13 and 14.

いことがわかる (Table 1). これらの化学物質について NR 細胞毒性試験を行った結果, 最も強い細胞毒性を示したものは STAC であり, 陽イオン性界面活性剤はいずれも強い細胞毒性を示した. 一方, 陰イオン性界面活性剤は高い IC<sub>50</sub> 値を示すものが多かった (Table 1).

眼刺激性及び皮膚刺激性試験での評点と細胞毒性試験での IC<sub>50</sub> 値をグラフにプロットした (Fig. 2). 眼刺激性と細胞毒性とは相関係数  $\gamma=0.73$  であり, 眼刺激性が severe と判定された物質の IC<sub>50</sub> 値はいずれも 26 μg/ml 未満であり, slight な物質は 100 μg/ml 以上であった. 一方, moderate クラスの物質は幅広い IC<sub>50</sub> 値をとった. 皮膚刺激性と細胞毒性との関係については, 皮膚刺激性が severe と同じランク付けされる物質でも IC<sub>50</sub> 値には大きな差が認められ, ランクが non とされた物質よりも高い IC<sub>50</sub> 値を示すものもあった. NR 細胞毒性試験と皮膚刺激性試験との間に相関

は認められなかった ( $\gamma=0.28$ ). したがって, 細胞毒性試験は化学物質の眼刺激性を予測するには有用であるが, 皮膚刺激性を予測するには不十分であると結論した. 皮膚の角質層への浸透性を考慮する因子が今回用いた細胞毒性試験にはないことが理由として考えられる. 近年, 皮膚刺激性の代替試験法として摘出皮膚培養キットなどの可能性が検討され始めている<sup>15)</sup>.

以上の結果から, Table 2 のような判定基準を作成した. ドレイズ試験でのスコア 20 は角膜が少し混濁する程度の非常に弱い反応であり<sup>1)</sup>, Watanabe らの報告<sup>4)</sup>にある DS 20 値が 200% 以上を示す物質は, ウサギの眼の感受性の高さを考えると, ヒトに対しても問題がないものと考えられる. また, 小島らのデータ<sup>13,14)</sup>との比較においても, 眼刺激性が slight な物質は NR 細胞毒性試験の IC<sub>50</sub> 値は 100 μg/ml 以上であった. 以上の事実と, 安全性評価のためでき

**Table 2.** Classification of chemicals into three different ranks of cytotoxic potentials judged from the IC<sub>50</sub> values in neutral red assay

IC <sub>50</sub> (µg/ml)	Rank of cytotoxicity	Prediction of eye irritancy
≤35	Strong	High possibility to induce a strong eye irritancy
35~350	Moderate	Possibility to induce a moderate eye irritancy
≥350	Weak	Scarcely possibility to induce an eye irritancy

**Table 3.** List of test chemicals

Chemical	Abbreviation
<b>Antimicrobial</b>	
1,2-Benzisothiazolin-3-one	BIT
2-Hydroxy-4-isopropyl-2,4,6-cycloheptatrien-1-one	HICHO
Isobornylthiocyanacetate	IBTA
Methyl- <i>N</i> -(2-benzimidazolyl)carbamate	MBIC
3,4,4'-Trichlorocarbaniide	TCC
2,3,5,6-Tetrachloroisophthalonitrile	TPN
<b>Rubber accelerator</b>	
<i>N,N'</i> -Dibutylthiourea	DBTU
<i>N,N'</i> -Dilaurylthiourea	DLTU
<i>N,N'</i> -Diphenylthiourea	DPTU
Zinc dibutylthiocarbamate	ZDBC
Zinc diethyldithiocarbamate	ZDEC
<b>Rubber antioxidant</b>	
2,5-Di- <i>tert</i> -amylhydroquinone	DAHQ
2,5-Di- <i>tert</i> -butylhydroquinone	DBHQ
<i>N</i> -1,3-Dimethylbutyl- <i>N'</i> -phenyl- <i>p</i> -phenylenediamine	DMBPPD
<i>N,N'</i> -Dimethylphenyl- <i>p</i> -phenylenediamine	DMPDP
6-Ethoxy-2,2,4-trimethyl-1,2-dihydroquinoline	ETMDQ
2-Mercaptobenzimidazole	MBI
$\alpha$ -Methylbenzylphenol	MBP
Poly-2,2,4-trimethyl-1,2-dihydroquinoline	PTMDQ
<b>UV absorber</b>	
2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone	HMBP
<i>p-tert</i> -Butylphenylsalicylate	PTBPS
2-(2'-Hydroxy-3'- <i>tert</i> -butylphenyl)-5-chlorobenzotriazole	Tinuvin 326
2-(2'-Hydroxy-5'-methylphenyl)benzotriazole	Tinuvin P
<b>Solvent</b>	
<i>N,N</i> -Diethylethanolamine	DEEA
<b>Synergist</b>	
2,3,3,3,2',3',3',3'-Octachlorodipropylether	OCDFE

るだけ偽陰性の判定を少なくする方向で基準の作成を行うという点から、NR 細胞毒性試験で350 µg/ml 以上の IC<sub>50</sub>値を示す物質は弱い細胞毒性物質で眼刺激性を起こす可能性がほとんどないとし、35 µg/ml 以下の物質は強い細胞毒性物質で明らかな眼刺激性を起こす危険性があるとした。In vivo の眼刺激性は moderate, mild 及び slight と細かいクラス分けがされているが、相関性を見た結果からは細胞毒性試験でそこまでの細かい分類は不可能と判断した。よって、35~350 µg/ml の IC<sub>50</sub>値を示す物質は中程度の強度の細胞毒性物質として、眼刺激性が誘発される可能性がある物質と判定することにした。この判定基準は試験方法の改良や文献データの集積により、今後変更される可能性もある。

## 2. 家庭用品に使用される化学物質の細胞毒性試験

平成3年度から8年度までに試験対象物質として選定し、細胞毒性試験を行った物質を Table 3 に示した。抗菌剤6種、ゴム加硫促進剤5種、ゴム老化防止剤8種、紫外

線吸収剤4種、溶剤1種及び共力剤1種の計25種である。このうち、ZDEC は試験法の感度及び再現性を確かめるための標準物質として用いた。ZDEC は医用材料の生物学的安全性試験、細胞毒性試験の項目での標準物質として用いられている<sup>16)</sup>。それぞれの物質について試験した結果を Table 4 に示した。NR 法の IC<sub>50</sub> 値より Table 2 の判定基準に従って刺激性強度を求めた。加硫促進剤のうち carbamate 系はいずれも強い細胞毒性を示したが、thiourea 系の細胞毒性は弱く、同じ使用目的の物質でも毒性強度に大きな差が認められた。老化防止剤や抗菌剤も全般的に強い細胞毒性を示した。これに対して、紫外線吸収剤の細胞毒性はそれほど強くなかった。

コロニー法での IC<sub>50</sub> 値は NR 法に比べて、ほとんどの物質で小さな値をとった (Table 4)。NR 法とコロニー法での結果の比較をした結果、両者の間には良好な相関 ( $\gamma=0.84$ ) が認められ (Fig. 3)、試験法が変わっても評価に大きな変化はないことが明らかになった。1週間の培養では単に細胞膜破壊、タンパク質変性などによる毒性だけでなく、物質に暴露される細胞密度の違い及び代謝や細胞増殖能に対する影響が関わってくる。一部 NR 法とコロニー法で差が認められた物質もあったが、こうした点が原因となっているものと考えられる。既に、コロニー法はゴム製品の筋肉内埋植による組織炎症反応とよく相関することが報告されているが<sup>17)</sup>、今後多くの物質についてコロニー法で試験を行いドレイズ試験データとの比較をすることによって、コロニー法による眼刺激性予測基準も作成できると思われる。

以上、家庭用品に使用される物質の中には強い細胞毒性を示すものがあり、使用法によっては眼刺激性を引き起こす可能性があることがわかった。実際、ゴム製手袋や尿道カテーテルなどによる組織障害が報告されており、ゴム製品からの加硫促進剤の溶出が原因であることがわかっている<sup>18)</sup>。よって、製品からのこうした物質の発散、溶出を抑えるなどの処理は家庭用品による事故防止に有効である。また、毒性が弱い物質に切り替えるのも一つと思われる。しかし、その使用目的と方法によってはこうした処理ができない場合があるが、その場合は使用に当たって注意するよう情報を提供することが重要である。一方、強い細胞毒性を示すものでも使用量や配合量によっては問題のない可能性もある。実際の製品中の量的な問題については細胞毒性試験の IC<sub>50</sub> 一点の値だけでは予測しにくいこともある。こうした点については、例えば、試験時の用量反応曲線を参考に考えていく必要がある。

Table 4. Results of cytotoxicity tests

Chemical	NR assay		Colony assay
	IC <sub>50</sub> (μg/ml)	Classification	IC <sub>50</sub> (μg/ml)
<b>Antimicrobial</b>			
BIT	4.03	Strong	0.20
HICHO	29.0	Strong	0.76
IBTA	32.3	Strong	1.45
MBIC	23.1	Strong	- <sup>a)</sup>
TCC	407	Weak	3.4
TPN	0.65	Strong	0.034
<b>Rubber accelerator</b>			
DBTU	518	Weak	19
DLTU	1825	Weak	1260
DPTU	366	Weak	75
ZDBC	2.80	Strong	7.3
ZDEC	1.36	Strong	0.087
<b>Rubber antioxidant</b>			
DAHQ	5.40	Strong	3.2
DBHQ	35.0	Strong	-
DMBPPD	15.2	Strong	-
DMPPD	6.60	Strong	-
ETMDQ	64.0	Moderate	2.3
MBI	393.8	Weak	-
MBP	23.0	Strong	27.8
PTMDQ	118	Moderate	29
<b>UV absorber</b>			
HMBP	87.8	Moderate	-
PTBPS	53.3	Moderate	-
Tinuvin 326	226	Moderate	59
Tinuvin P	>500	Weak	139
<b>Solvent</b>			
DEEA	480	Weak	178
<b>Synergist</b>			
OCDPE	44.5	Moderate	-

<sup>a)</sup>Not tested.

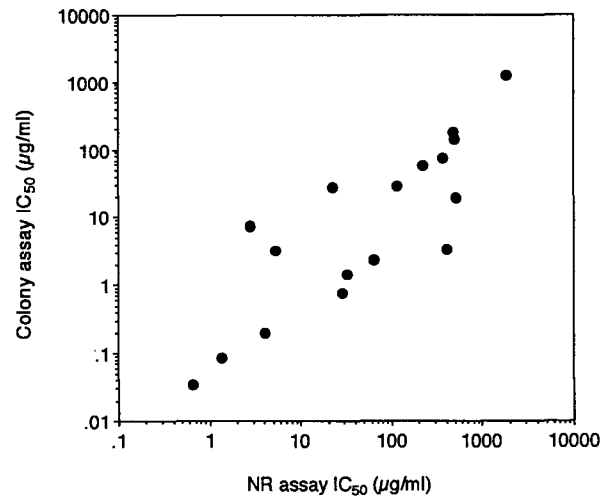


Fig. 3. Comparison of IC<sub>50</sub> values in neutral red (NR) assay with those in colony assay for 17 chemicals used in household products

## 文 献

- 1) J. H. Draize, G. Woodward and H. O. Calvery: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **82**, 377~390 (1994)
- 2) E. Borenfreund and O. Borrero: *Cell Biol. Toxicol.*, **1**, 55~65 (1984)
- 3) K. Y. Chan: *Alt. Methods Toxicol.*, **3**, 405~422 (1985)
- 4) M. Watanabe, K. Watanabe, K. Suzuki, O. Nikaido, I. Ishii, H. Konishi, N. Tanaka and T. Sugahara: *Toxicol. In Vitro*, **3**, 329~334 (1989)
- 5) C. Shopsis and S. Sathe: *Toxicology*, **29**, 195~206 (1984)
- 6) E. Borenfreund and J. A. Puerner: *Toxicol. Lett.*, **24**, 119~124 (1985)
- 7) H. North-Root, F. Yackovich, J. Demetrulias, M. Gacula, Jr. and E. Heinze: *Toxicol. Lett.*, **14**, 207~212 (1982)
- 8) H. Torishima, H. Arakawa, S. Matsui and M. Watanabe: *AATEX*, **1**, 20~26 (1990)
- 9) Y. Ikarashi, T. Tsuchiya and A. Nakamura: *J. Toxicol. - Cut. & Ocular Toxicol.*, **12**, 15~24 (1993)
- 10) Y. Ohno, T. Kaneko, T. Kobayashi, T. Inoue, Y. Kuroiwa, T. Yoshida, J. Momma, M. Hayashi, J. Akiyama, T. Atsumi, K. Chiba, T. Endo, A. Fujii, H. Kakishima, H. Kojima, K. Masamoto, M. Masuda, S. Matsukawa, K. Ohkoshi, J. Okada, S. Sakamoto, K. Takano and A. Takanaka: *In Vitro Toxicol.*, **7**, 89~94 (1994)
- 11) A. Nakamura, Y. Ikarashi, T. Tsuchiya, M.-A. Kaniwa, M. Sato, K. Toyoda and M. Takahashi: *Biomaterials*, **11**, BIOMAT 89, 92~94 (1990)
- 12) J. H. Kay and I. C. Calandra: *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **13**, 281~289 (1962)
- 13) 小島肇夫, 花村朝夫, 佐藤 淳, 小西宏明, 吉村 功: 日本動物実験代替法学会第6回大会要旨集, pp. 126~127 (1992)
- 14) H. Kojima, A. Hanamura, S. Miyomoto, A. Sato, H. Konishi and I. Yoshimura: *Toxic. In Vitro*, **9**, 333~340 (1995)
- 15) 小島肇夫, 森 栄治, 花村朝夫, 佐々木哲治, 真鍋幸子: 粧技誌, **30**, 402~409 (1996)
- 16) 厚生省薬務局医療機器開発課監修: 医療用具及び医用材料の基礎的な生物学的試験のガイドライン1995解説, 薬事日報社 (1996)

## 分取 HPLC および GC-ECD を用いた Deltamethrin および Tralomethrin の分別定量法

高附 巧<sup>#</sup>・根本 了・佐々木久美子・豊田 正武

### Specific Determination of Deltamethrin and Tralomethrin by Preparative HPLC and GC-ECD

Satoshi Takatsuki<sup>#</sup>, Satoru Nemoto, Kumiko Sasaki and Masatake Toyoda

Tralomethrin quickly changes to deltamethrin in gas chromatograph by debromination. Therefore deltamethrin and tralomethrin are not able to be distinguished by gas chromatographic determination. A method for specific determination of deltamethrin and tralomethrin was established. The method consists of fractionation by high performance liquid chromatography and determination by gas chromatography.

Recoveries of deltamethrin and tralomethrin spiked to three agricultural products were from 42 to 78% and from 18 to 76%, respectively with relative standard deviations ranging from 0.3 to 15%.

From the analysis of samples spiked with tralomethrin, it was found that a part of tralomethrin quickly changed to deltamethrin in homogenate of agricultural products. The addition of phosphoric acid to the homogenate did not prevent the change of tralomethrin.

**Keywords** : specific determination, deltamethrin, tralomethrin, pyrethroid pesticides, HPLC, GC  
(Received May 30, 1997)

Deltamethrin (Delta) と tralomethrin (Tralo) はいずれもフランスのルセル・ユクラフ社が開発した果樹、野菜などの広範囲の害虫に効果を示すピレスロイド系農薬であり、GC-ECD で高感度に測定することが可能である<sup>1)</sup>。

しかし、Tralo はガスクロマトグラフ (GC) 中ではほぼ定量的に Delta に変化するため、GC では Tralo と Delta を分別定量することが出来ない<sup>2)</sup>。また、植物に適用された Tralo が栽培中に植物体内で Delta に変化すること<sup>3)</sup>、SH 基を有する化合物により Tralo が Delta に変化すること<sup>4)</sup>が知られている。

食品衛生法では Delta と Tralo にそれぞれに残留基準が設定されており、両者を分別定量できる分析法の確立が必要である。そこで今回、高速液体クロマトグラフ (HPLC) と GC を用いた Delta と Tralo の分別定量法について検討を行ない、更に農産物ホモジネート中での Tralo の安定性を検討したので報告する。

### 実験方法

#### 1. 試料

東京都世田谷区で購入したりんご、だいこん、きゅうりおよび当所で保存していた大豆 (米国産) を試料とした。

#### 2. 試薬・試液

標準品：deltamethrin (99%) ; Riedel-de Haën 製, tralomethrin (98.8 および 97%) ; 林純薬工業 (株) 製および和光純薬工業 (株) 製の農薬標準品を用いた。( ) 内は純度。

HPLC 用有機溶媒：アセトニトリルは、片山化学 (株) 製の HPLC 用溶媒を用いた。

各種有機溶媒：アセトニトリル、アセトン、ジエチルエーテルおよびヘキサンは、関東化学 (株) 社製の残留農薬試験用のものを使用した。

セライト：セライト No. 545 (和光純薬工業 (株) 製)  
フロリジル：Florasil PR (和光純薬工業 (株) 製) を 130°C で 1 昼夜加熱し、デシケーター中で放冷した後、使用した。

その他の試薬：塩化ナトリウムおよびリン酸は和光純薬工業 (株) 製試薬特級、無水硫酸ナトリウムは和光純薬工業 (株) 製残留農薬試験用を用いた。

農薬標準原液：Delta および Tralo 各 10.0mg をそれぞれ 100ml のメスフラスコにとり、ヘキサンを加えて 100ml とした。

添加用 deltamethrin 溶液：Delta の含量が 4.0μg/ml となるようにヘキサンで希釈調製した。

添加用 tralomethrin 溶液：Tralo の含量が 4.0μg/ml となるようにヘキサンで希釈調製した。

HPLC 用農薬標準混合溶液：Delta および Tralo を 1.0μg/ml および 5.0μg/ml になるように各農薬標準原液を混合

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed: Satoshi Takatsuki; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo 158, Japan; Tel: 03-3700-1141 ext. 334; Fax: 03-3707-6950; E-mail: takatsuk@nihs.go.jp.



し、窒素気流中でヘキサンを除去した後、70%アセトニトリル溶液で希釈調製した。

C<sub>18</sub>カートリッジ：Sep-Pak Plus<sup>®</sup> C18 cartridge (Waters社製)、Clean-up CEC181M6 cartridge (1g/6ml) (United Chemical Technologies, Inc. 製)

### 3. 装置

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(株)製)

オートインジェクター：AOC-14 (島津製作所(株)製)

データ処理装置：クロマトパック C-R4A (島津製作所(株)製)

送液ポンプ：LC-6A (島津製作所(株)製)

カラムオープン：CTO-6A (島津製作所(株)製)

検出器：UV 検出器 SPD-6A (島津製作所(株)製)

デガッサー：ERC-3320 (Elma Optical Works Ltd. 製)

データ処理装置：クロマトパック C-R2AX (島津製作所(株)製)

### 4. GC 条件

カラム：DB-1 (ID. 0.25mm x 30m, 膜厚：0.25 $\mu$ m) (J & W Scientific 社製)

キャリアーガス：ヘリウム (2.0kg/cm<sup>3</sup>)

カラム温度：50 $^{\circ}$ C (1 min) -25 $^{\circ}$ C/min-175 $^{\circ}$ C (0 min) -10 $^{\circ}$ C/min-300 $^{\circ}$ C (4 min)

検出器：ECD (320 $^{\circ}$ C)

メイクアップガス：窒素 (30ml/min)

注入口：スプリットレス (サンプリング時間 1 min ; 280 $^{\circ}$ C)

注入量：1.0 $\mu$ l

### 5. HPLC 条件

カラム：Inertsil ODS 2 (ID. 4.6mm x 150mm) (GLサイエンス(株)社製)

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

移動相：70%アセトニトリル溶液 (1 ml/min)

検出器：UV (220nm)

注入量：100 $\mu$ l

### 6. 試料抽出溶液の調製

#### (1) 野菜・果実

破碎した試料20.0gにアセトン100mlを加え2分間ホモジナイズした後、セライトを厚さ約1cmに敷いたろ紙 (No. 5B) を用いて吸引ろ過し、セライト上の残渣にアセトン50mlを加えて同様に操作し、ろ液を合わせて40 $^{\circ}$ C以下で約30mlとなるまで濃縮した。これに10%塩化ナトリウム溶液100mlを加え、ヘキサン100mlおよび50mlで2回抽出した。ヘキサン層を合わせて無水硫酸ナトリウムで脱水後、40 $^{\circ}$ C以下で濃縮乾固した。この残渣を5%エーテル含有ヘキサンに溶解して正確に4mlとして試料抽出溶液とした。

#### (2) 大豆

破碎した試料10.0gに水20mlを加え2時間放置した。これにアセトン100mlを加え2分間ホモジナイズした後、セライトを厚さ約1cmに敷いたろ紙 (No. 5B) を用いて吸引ろ過し、セライト上の残渣にアセトン50mlを加えて同様に操作し、ろ液を合わせて40 $^{\circ}$ C以下で約30mlとなるまで濃縮した。これに10%塩化ナトリウム溶液100mlを加え、ヘキサン100mlおよび50mlで2回抽出した。ヘキサン層を合わせて無水硫酸ナトリウムで脱水後、40 $^{\circ}$ C以下で濃縮乾固した。

この残渣をヘキサン30mlに溶解し、ヘキサン飽和アセトニトリル30mlで3回抽出した。アセトニトリル層を合わせて40 $^{\circ}$ C以下で濃縮乾固し、残渣を5%エーテル含有ヘキサンに溶解し正確に4mlとして試料抽出溶液とした。

### 7. 精製

内径1.5cmのガラスカラムに活性化フロリジル5.0gをヘキサンで湿式充填し、その上部に無水硫酸ナトリウム5gをフロリジルと同様に充填しカラムを作成した。

上記6で調製した試料抽出溶液1.0mlを注入し、5%エーテル含有ヘキサン80mlで溶出し、溶出液は捨てた。次に25%エーテル含有ヘキサン80mlで溶出し、この溶出液を濃縮乾固した。残渣をヘキサンに溶解して正確に2mlとして、分別前のGC分析用試験溶液とした。

### 8. Delta と Tralo の分別定量

前述7で得られたGC分析用試験溶液を窒素気流中で乾固した後、残渣を70%アセトニトリル溶液400 $\mu$ lに溶解し、0.5 $\mu$ mのフィルターでろ過し、100 $\mu$ lをHPLCに注入し、Delta と Tralo の溶出画分をそれぞれ分取した。分取画分は、Fig. 1を例にとると、Delta は19.3~21.0分、Tralo は21.0~22.5および25.5~27.5分であり、予めHPLCに農薬標準混合溶液を注入してDelta およびTraloの溶出時間を調べて決めた。分取した各画分に10%塩化ナトリウム溶液50mlを加え、ヘキサン50mlで2回抽出した。これを無水硫酸ナトリウムで脱水後、40 $^{\circ}$ C以下で濃縮乾固した。この残渣をそれぞれヘキサンに溶解し、正確に0.5mlとして分別後のGC分析用試験溶液とした。

### 9. 添加回収実験

だいこん、りんご20gまたは大豆10gに添加用農薬溶液各1.0ml (試料あたり0.2または0.4ppm相当) を別々に添加し、上記操作6,7および8を行った。

### 結果および考察

#### 1. HPLC および C<sub>18</sub>カートリッジによる Delta および Tralo の分離条件の検討

Tralo はGC中ではほぼ定量的にDeltaに変化することから、GCによる分析ではDeltaとTraloの判別はできない。そこでHPLCによる分別定量を検討したところ、実験方

法 5 に示した条件で, Delta と Tralo を分離することができた. その時のクロマトグラムを Fig. 1 (A) に示した.

Tralo が HPLC 上で 2 つのピークとして観測されるのは Tralo が Fig. 2 に示した 2 種の異性体混合物のためである. 保持時間の短い異性体を Tralo A, 長い異性体を Tralo B とし, 文献から Tralo A は 1'S - 体, Tralo B は 1'R - 体と推定された<sup>5,6)</sup>.

HPLC では Delta と Tralo を分離できたが, Table 1 に示したように検出感度は GC に比べて低く, 定量限界も残留基準値とほぼ同じであった. また, Fig. 1 に示した各農産物のクロマトグラムからわかるように Tralo は作物成分の妨害を受けやすいため, 実試料を HPLC のみで定量することは不可能であった.

そこで予め C<sub>18</sub> カートリッジで Delta と Tralo を分離した後, GC 分析することを考え, C<sub>18</sub> カートリッジによる両者の分離を検討した. しかし, 80~50% のアセトニトリル溶液を溶出溶媒として検討を行った結果, C<sub>18</sub> カートリッジでは Delta と Tralo を分離することはできなかった. そこで, HPLC により分離した Delta と Tralo を分取し, それぞれの画分を濃縮後十分な感度の得られる GC により分析することが適当であると判断した.

Delta または Tralo の 2.5ppm 標準溶液 (野菜・果実試料 20g あたり 0.2ppm に相当) を 100 $\mu$ l ずつ HPLC に注入し分取した後, GC で測定した結果, それぞれ 77.8, 110.2% の回収率が得られた (n=1). よって, 本法のように HPLC で分取し, 十分な感度の得られる GC で測定することにより, Delta では残留基準値の約 1/3, Tralo では約 1/8 の定量限界で分別定量が可能なが判明した.

## 2. Delta および Tralo の添加回収実験

HPLC による Delta と Tralo の分離・分取と GC による定量について実験方法 9 に従い, だいこん, りんごおよび大豆に Delta と Tralo を別々に添加して添加回収試験を行い, その結果を Table 2 に示した.

分別前の Delta と Tralo の回収率は, それぞれ 80.4 から 97.5% および 81.0 から 115.3% で標準偏差は 2 から 10% と良好な結果を得た.

分別後の結果については, Delta を添加した農産物のうち, 大豆から Tralo が約 1% 検出されたが, これは HPLC において Delta と Tralo A の保持時間が近いために Delta の一部が Tralo の画分に混入したためと考えられる.

一方, Tralo を添加した全ての農産物で, 3 から 30% が Delta として検出され, とくに Delta への変化が大きかっただいこん, 大豆においては, HPLC 上でも Delta としてのピークが認められたことから, Tralo の一部が農産物に含まれる成分, 光および分析操作などにより Delta に変化したものと推定された. だいこんホモジネートに Tralo を添加して直ちに抽出した場合, Tralo の回収率は 39.8%

Table 1. Limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ) of deltamethrin and tralomethrin

Pesticides	LOD (ng) <sup>a)</sup>		LOQ (ppm) <sup>b)</sup>	
	GC	HPLC	GC	HPLC
Deltamethrin	0.002	3	0.003	0.01
Tralomethrin	0.004	16	0.006	0.06

a) : S/N = 3, b) : S/N = 12, LOQ for vegetables and fruits

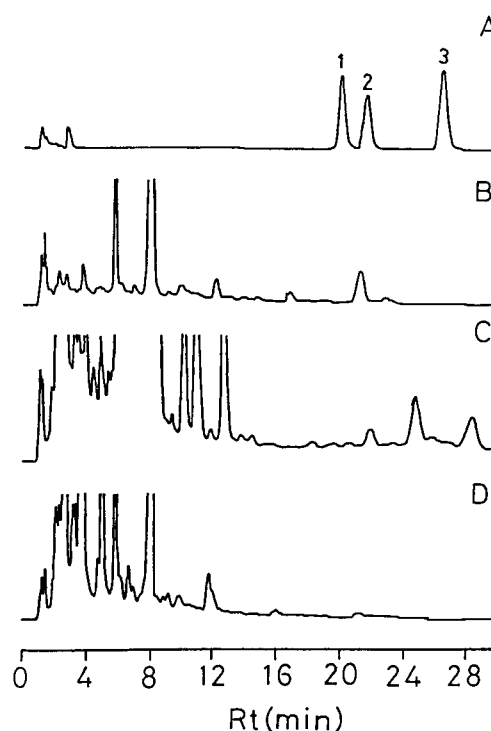


Fig. 1. High performance liquid chromatograms of standard (A), and unspiked samples (B-D)

A : 1. deltamethrin (50ng), 2. tralomethrin A, 3. tralomethrin B (tralomethrin A + B ; 250ng)  
B : Japanese radish, C : apple, D : soybean

で, Delta が 31.1% 生成していた (Table 2). 添加 3 時間後に抽出したときの Tralo の回収率は 40.7% で, Delta の生成率は 26.2% であったことから Tralo はホモジネートに添加後直ちに Delta に変化し, その後は変化しにくいものと考えられる.

大豆では分別後の回収率が低いが, これは試験溶液中に残った大豆の脂質の影響により 70% アセトニトリル溶液に農薬が完全には溶解しなかったためと推定された. HPLC に注入する試料溶液は Delta と Tralo A の良好な分離をはかるため, 移動相の 70% アセトニトリル溶液で調製する必要があった.

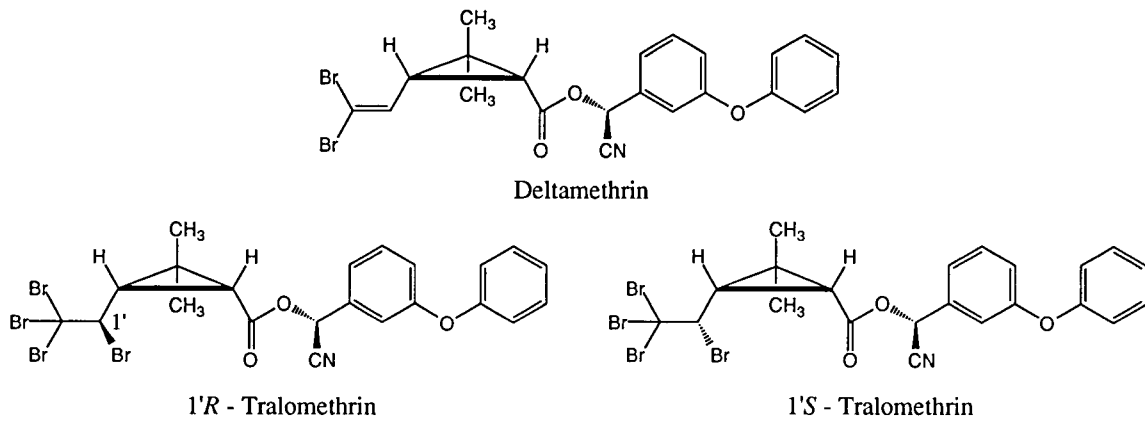
Fig. 2. Structures of deltamethrin, 1' *R*- and 1' *S*-tralomethrin

Table 2. Recovery of deltamethrin and tralomethrin spiked to agricultural

Spiked Pesticides	Detected Pesticides	Recovery (% , mean $\pm$ SD, n=3)		
		Japanese radish	Apple	Soybean
<i>Before Fractionation</i>				
Deltamethrin		97.5 $\pm$ 9.6	80.4 $\pm$ 5.6	85.5 $\pm$ 7.6
Tralomethrin		92.7 $\pm$ 3.1	115.3 $\pm$ 5.9	81.0 $\pm$ 2.4
<i>After Fractionation</i>				
Deltamethrin	Deltamethrin	78.0 $\pm$ 1.1	58.6 $\pm$ 14.8	42.3 $\pm$ 8.7
	Tralomethrin	0.0	0.0	0.8 $\pm$ 1.4
	Total	78.0 $\pm$ 1.1	58.6 $\pm$ 14.8	43.1 $\pm$ 8.1
Tralomethrin	Deltamethrin	31.1 $\pm$ 0.6	3.3 $\pm$ 0.6	6.3 $\pm$ 0.3
	Tralomethrin	39.8 $\pm$ 6.0	76.8 $\pm$ 14.9	18.0 $\pm$ 1.5
	Total	70.9 $\pm$ 5.8	80.1 $\pm$ 15.4	24.3 $\pm$ 1.3

### 3. リン酸添加による Delta の生成抑制効果について

Tralo が分析操作もしくは農産物成分により Delta に変化することが判明したことから Delta への変化率が一番高かっただいこんときゅうりを用いて Delta の生成抑制について検討した。

試料に Tralo を添加した後、3時間放置したもの (control) と試料20g 当たりリン酸 2 ml を添加した後、Tralo を添加し、3時間放置したものについて、分別定量を行った。その結果を Table 3 に示す。分別前の GC 分析では、リン酸を添加した試料、control とともに85から117%の良好な回収率を得た。

一方、分別定量ではリン酸を添加しただいこんで5.2%が Delta として検出され、リン酸無添加の場合の26.2%に対して、Delta の生成は抑制されたが、完全に抑制することはできなかった。また、きゅうりでは、リン酸添加の有無に関わらず約13%が Delta として検出され、リン酸添加による Delta の生成抑制効果は認められなかった。以上の結果から、試料から Delta が検出された場合、その Delta が試料に本来残留していたものなのか、分析操作中に Tralo

から生成したものなのかの正確な判別は不可能であることが明らかとなった。多くの作物では Delta の残留基準は Tralo より低く設定されている (例 だいこん, Delta で 0.01ppm, Tralo で 0.5ppm) ため、操作中の Tralo から Delta への変化を完全には防止できない以上は、両者を分別せずに Delta として測定し、基準への適合性を判断することが合理的であると考えられた。

### 4. Tralo 標準品中の Delta 含量

Tralo は光分解などにより一部は Delta に変化する<sup>7)</sup>ことから、林純薬と和光純薬の 2 社から購入した残留農薬試験用標準品について HPLC により分析した結果、異性体比に多少の違いが観られたが、Delta は検出されなかった。

### まとめ

Delta および Tralo の分別定量法および、Tralo の農産物ホモジネート中での Delta への変化に関する検討を行い、以下のような結果を得た。

1. Delta と Tralo は、C<sub>18</sub>カートリッジカラムでは分離できないが、C<sub>18</sub>カラムを用いた逆相 HPLC により十分な

Table 3. Inhibitory effect of phosphoric acid on the decomposition of tralomethrin to deltamethrin in the homogenate of vegetables

Pesticides	Recovery (% , mean $\pm$ SD, n=3)			
	Japanese radish <sup>a)</sup>		Cucumber	
	Control	P-acid added <sup>b)</sup>	Control	P-acid added
<i>Before Fractionation</i>				
Tralomethrin	84.6	100.9 $\pm$ 5.6	116.6 $\pm$ 4.1	90.0 $\pm$ 8.4
<i>After Fractionation</i>				
Deltamethrin	26.2	5.2 $\pm$ 0.7	12.9 $\pm$ 1.7	12.7 $\pm$ 3.8
Tralomethrin	40.7	75.8 $\pm$ 1.1	75.0 $\pm$ 7.3	58.2 $\pm$ 5.0
Total	66.9	81.0 $\pm$ 0.5	87.9 $\pm$ 7.1	70.9 $\pm$ 8.8

a) : Control of Japanese radish ; n=1. b) : "P-acid added" is the agricultural products added with phosphoric acid before tralomethrin addition.

分離を得ることができた。

2. Delta と Tralo に対する HPLC 感度が十分でないの  
で、分取 HPLC と GC 分析を組み合わせることにより両者を  
分別定量する方法を確立した。

3. Tralo は、分析操作中に一部が Delta に変化し、変  
化率は農産物により異なった。また、農産物ホモジネート  
にリン酸を添加しても Delta の生成を完全に抑制すること  
はできなかつた。

4. Tralo の分析用標準品には、Delta は含まれていなか  
つた。

## 文 献

- 1) 農薬残留分析法研究班編集：“最新農薬の残留分析法”  
中央法規出版，p.198(1995)；同，pp.638-640.
- 2) 後藤真康，加藤誠哉：“増補 残留農薬分析法”ソフト  
サイエンス社，pp.66-68(1987).
- 3) L. M. Cole, J. E. Casida and L. O. Ruzo: *J. Agric. Food  
Chem.*, **29**, 702~706 (1981).
- 4) 金子秀雄，高松泰子，北村紀子，吉武 彬，宮本純之：  
日本農薬学会誌，**11**，533~540 (1986).
- 5) C. Meinard, P. Bruneau and M. Roche: *J. Chromatogr.*,  
**349**, 105~108 (1985).
- 6) S. N. Irving and T. E. M. Fraser: *J. Agric. Food Chem.*,  
**32**, 111~113 (1984).
- 7) L. O. Ruzo and J. E. Casida: *J. Agric. Food Chem.*, **30**,  
916~920 (1982).

## ヒトインスリン製剤中の B-3 デスアミド体の液体クロマトグラフ法による分析

四方田千佳子<sup>#</sup>・田頭 洋子・宮崎 玉樹・岡田 敏史

## Analysis of B-3 desamido insulin in human insulin preparations by HPLC

Chikako Yomota<sup>#</sup>, Yoko Tagashira, Tamaki Miyazaki and Satoshi Okada

The content of A-21 desamido insulin (A-21 DI) and B-3 desamido insulin (B-3 DI) in human insulin preparations was measured by new RP-HPLC method using a neutral eluent (pH 6.5). Sometimes the content of B-3 DI in human insulin preparations was about two times larger than that of A-21 DI. In particular, in the case of neutral insulin injection, the content of B-3 DI has increased remarkably as the increase of total desamido content. The content of B-3 DI obtained by the new RP-HPLC method will open the new aspect of the impurity test for insulin preparations.

**Keywords:** human insulin preparations, A-21 desamido insulin, B-3 desamido insulin, RP-HPLC, impurity test

(Received May 30, 1997)

## 諸 言

ヒトインスリン製剤の国家検定及び国家検査の純度試験では、デスアミド体含量はその承認申請書の内容の違いに応じて、RP-HPLC法(A法)またはポリアクリルアミドディスクゲル電気泳動法(B法)が採用されている。ヒトインスリン製剤中に含まれる主なデスアミド体はA-21デスアミド体とB-3デスアミド体であるが、通常のRP-HPLCで分離されるのはA-21デスアミド体のみであり、B-3デスアミド体はヒトインスリンピークに含まれている。他方、電気泳動ではヒトインスリン、A-21デスアミド体、B-3デスアミド体のバンドが分離される。

B法の電気泳動ではB-3デスアミド体を分離することはできるが、染色されたデスアミド体の二つのバンドの色の和を標準バンドの色と比較して濃くないといった、定性的な試験法となっている。この問題を解決するため種々の検討を行い、ヒトインスリン中のB-3デスアミド体は、キャピラリー電気泳動法、またはpH 6.5~pH 9の溶離液を用いるRP-HPLCにより定量的に分析可能なこと、さらに、ヒトインスリン製剤を冷蔵庫で保存中にB-3デスアミド体含量が増加することをすでに報告した<sup>1)</sup>。A-21デスアミド体は酸性条件下で速やかに生成するため、インスリン原体の製造工程における品質管理上重要な意味を持つものであるが、中性条件下ではA-21デスアミド体はあまり増加しないが、B-3デスアミド体は冷蔵下でも徐々に生成

することを考慮すると、製剤においてはむしろB-3デスアミド体含量の追跡に意味があると思われる。

そこで、本報では、1996年10月より1997年3月における国家検定あるいは国家検査対象品目のすべての製剤に、pH 6.5の溶離液を用いるRP-HPLCを適用し、A-21デスアミド体及びB-3デスアミド体含量の測定を試みたので結果を報告する。なお、1997年3月末にヒトインスリン製剤の国家検定は廃止されたが、現在は国家検査として同様の純度試験が継続されている。

## 実験方法

## 1. 試料

1996年秋から1997年3月までのヒトインスリン製剤の国家検定及び国家検査対象品目を製剤用試料とした。

## 2. 装置

島津製作所製のLC-10A型送液ポンプ、SPD-10A型検出器、CTO-10A型カラムオーブン、SCL-10A型システムコントローラー、C-R4A型データ処理装置及びWaters社製のWaters717オートサンプラーを用いた。

## 3. 操作条件

検出器：紫外吸光光度計 (検出波長：210 nm)

カラム：Waters NOVA pack C18(3.9mm I.D. ×150 mm)

カラム温度：40℃

移動相：0.1Mリン酸緩衝液 (pH 6.5) /アセトニトリル (73.5 : 26.5) または硫酸ナトリウム・リン酸緩衝液 (pH 2.3) /アセトニトリル (73.5 : 26.5)

流速：0.8 ml/min

試料溶液の調製：ヒトインスリン製剤の20単位を含む容

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed: Chikako Yomota; Hoenzaka1-1-43, Chuo-ku, Osaka 540, Japan; Tel: 06-941-1533; Fax: 06-942-0716; E-mail: yomota@nihs.go.jp

**Table 1.** Limit of desamido content in human insulin preparations in Japanese national test

Method A: RP-HPLC in acidic condition	
Neutral insulin injection	≤ 5 %
Isophane insulin injection	≤ 4 %
Crystalline insulin zinc injection	≤ 4 %
Biphasic isophane insulin injection	≤ 4 %
Method B: Polyacrylamide-dicsgel-electrophoresis	
Neutral insulin injection	<6.7%
Isophane insulin injection	<4.0%
Crystalline insulin zinc injection	<4.0%
Insulin zinc injection	<4.0%
Biphasic isophane insulin injection	<4.0%

量を正確に量り、0.01N 塩酸試液で全量を 1 ml とし、試料溶液とする。これらの液 20 μl につき、上記の条件で HPLC 法による試験を行う。

#### 4. デスアミドインスリン含量

デスアミドインスリン含量 [%] = (デスアミドインスリンピーク面積) ÷ (インスリンピーク面積 + デスアミドインスリンピーク面積) × 100

#### 結果及び考察

はじめに、現在の国家検査におけるヒトインスリン製剤中のデスアミド体含量規格についてまとめ、Table 1 に A 法、B 法が採用されている製剤とその規格を記した。同種の製剤でも二つの方法が採られている。

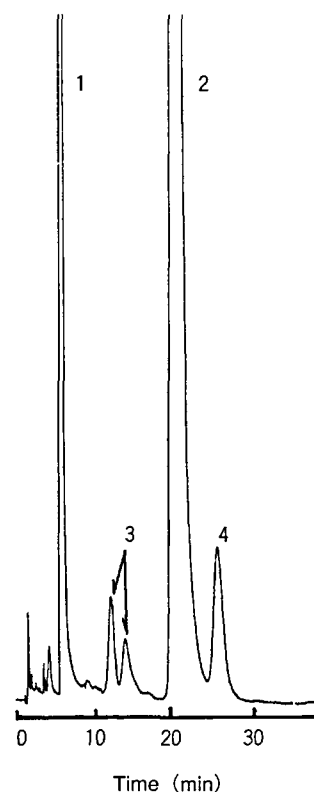
A 法は A-21 デスアミド体のみを測定し、B 法では A-21 及び B-3 デスアミド体の両方を測定することになるが、限度値にそれほど差は見られない。

それぞれのヒトインスリン製剤中の A-21 及び B-3 デスアミド体の含量を中性溶離液を用いる RP-HPLC で同時に測定し、その HPLC チャート例を Fig. 1 に示した。中性インスリン注射液のチャートを示したが、B-3 デスアミド体はインスリンピークの前に、A-21 デスアミドピークはインスリンピークの後に溶出した。ピーク 1 の m-クレゾールは保存剤である。さらに、Fig. 2 に 2 種類の中性インスリン製剤 (A)、(B) のクロマトグラム例を示した。(B) 製剤のクロマトグラムに見られるように、インスリンメインピークの前にかなり大きな 2 本の不純物ピークが現れることがあり、B-3 デスアミド体ピークはその前に溶出した。なお、Fig. 1 よりもインスリンピークの溶出が早い条件のため、A-21 デスアミド体の分離はやや悪い。Fig. 3 には、Fig. 2 と同じ製剤を pH2.3 の溶離液で溶出したときの HPLC チャートを示した。B-3 デスアミド体ピークは溶出

しなくなるが、(B) 製剤の 2 本の不純物ピーク 5 は、同じように溶出した。なお、この不純物ピークに関しては、現在国家検査で検査項目として該当するものが設定されていないが、中性インスリンでは 0.36-1.91%、イソフェンインスリン水性懸濁注射液では、0.1-0.56%、二相性製剤では 0.35-0.82% と既知のデスアミド体よりもかなり多く含まれていた。

製剤における B-3 デスアミド体及び A-21 デスアミド体のそれぞれの含量を二種のデスアミド体含量の和に対して図示して、Fig. 4 に中性インスリン (A)、イソフェンインスリン水性懸濁注射液 (B)、二相性イソフェンインスリン水性懸濁注射液 (C)、結晶性インスリン亜鉛水性懸濁注射液及びインスリン亜鉛水性懸濁注射液 (D) の順に示した。

数値的にはすべての製剤が Table 1 に示した製剤の純度試験規格に適合していたが、製剤間で比較すると、(A) の中性製剤では、Total デスアミド体含量はやや他の製剤よりも多く、特に Total 含量が増えるに従って B-3 デスアミド体含量が増えていく傾向が認められた。中性製剤ではヒトインスリンが中性条件で完全に溶解している状態のため製剤化後の B-3 デスアミド体の生成が多いのではない



**Fig. 1.** HPLC chromatogram of neutral insulin injection using a eluent at pH 6.5. Peaks: 1 = m-cresol; 2 = human insulin; 3 = B-3desamido human insulin; 4 = A-21desamido human insulin.

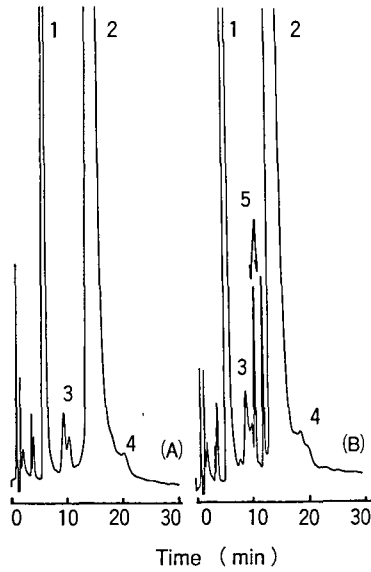


Fig. 2. HPLC chromatograms of 2 kinds of neutral insulin injection using a eluent at pH 6.5. Peaks: 1=m-cresol; 2=human insulin; 3=B-3-desamido human insulin; 4=A-21-desamido human insulin; 5=unknown peaks.

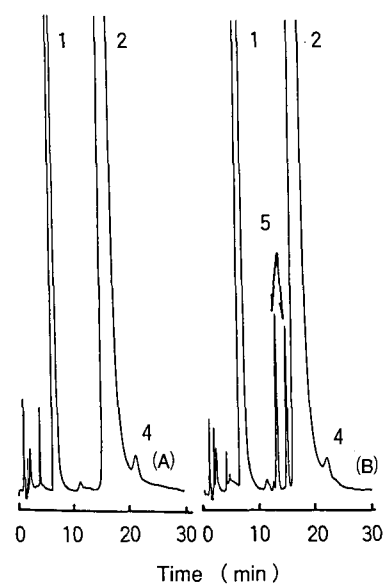


Fig. 3. HPLC chromatograms of the same preparations shown in Fig.2 using a eluent at pH 2.3. Peaks: 1=m-cresol; 2=human insulin; 4=A-21-desamido human insulin; 5=unknown peaks.

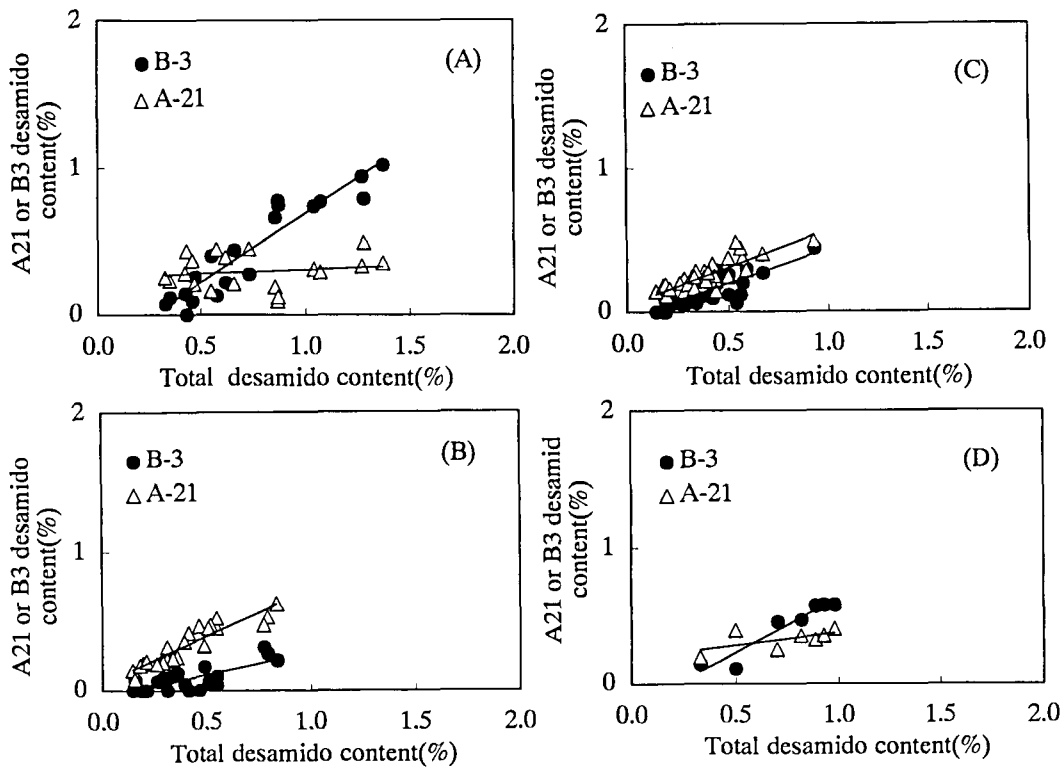


Fig. 4. A-21 or B-3 desamido content plotted against total desamido content in the case of (A) neutral insulin injection, (B) isophane insulin injection, (C) biphasic isophane insulin injection, (D) crystalline insulin zinc injection and insulin zinc injection.

かと考えられる。また、ヒトインスリンがイソフェン状態で不溶化されている場合 (B) や、50~70%程度の結晶が混在している二相性製剤 (C)、85%以上あるいは62-73%

が結晶状態にある場合 (D) では (A) の場合よりもデアミド体含量はやや少なく、その差は主に B-3 デサミド体含量の差といえる。

現在、ヨーロッパ薬局方1997では、ヒトインスリンのA-21デスアミド体含量を酸性溶離液を用いる RP-HPLC 法 (A 法) で規定しており、ヒトインスリン原体では 2.0% 以下、動物インスリン原体では 3.0% 以下、すべての注射用製剤で 5.0% 以下と限度を定めているが、B-3 デスアミド体に対する規格はない。本報で試験を行った製剤中、A-21 デスアミド体含量の最高値は 0.62% であるが、B-3 デスアミド体含量では最高 1.02% とむしろ B-3 のほうが多い場合がある。従来の B-3 デスアミド体の分析法であるポリアクリルアミドゲル電気泳動では、操作が煩雑なわりには正確な測定値を得ることができず、B-3 デスアミド体の規格設定が困難であった。ここに報告した中性の溶離液

を用いる HPLC 法では、どの製剤においても A-21 デスアミド体と B-3 デスアミド体を容易に同時に定量することが可能である。ヒトインスリン製剤中の B-3 デスアミド体含量が製品化直後に A-21 デスアミド体より多い場合があり、製剤化後も冷蔵中に徐々に増加することを考えあわせると、ヒトインスリン製剤におけるデスアミド体の純度試験では中性付近での RP-HPLC を適用して B-3 デスアミド体をも含めた規格設定にすることが望ましいと考えられる。

#### 文 献

- 1) Yomota, C., Yoshii, Y., Takahata, T. and Okada, S.: *J. Chromatogr.*, **721**, 89-96 (1996)



## 医薬品の乾燥減量試験及び水分含量測定への熱重量分析法の応用

左 志輝・北島 文・谷本 剛\*・岡田 敏史

Application of Thermogravimetry to Loss on Drying  
Test and Water-content Determination of Drugs

Zuo Zhi Hui, Aya Kitajima, Tsuyoshi Tanimoto\* and Satoshi Okada

Thermogravimetry, one of the techniques of thermal analysis, was applied to the quality control of drug raw materials as a "Loss on Drying" or for "Water Content Determination". Twenty two kinds of drugs were selected for the comparison of the applicability of thermogravimetry with that of Loss on Drying Test and/or Water Content Determination by the Karl-Fisher method. In all kinds of drugs, it was ascertained that the results with thermogravimetry agreed well with those obtained by Loss on Drying test and/or Karl-Fisher method. In conclusion, thermogravimetry can be used as a substitute for the Loss on Drying test in cases where drug possess a water bound strongly. Further, thermogravimetry can be utilized for some drugs to which the Karl-Fisher method cannot be applied due to their insolubility in Karl-Fisher reagents.

**Keywords:** Thermogravimetry, Thermal analysis, Loss on drying, Water-content  
(Received May 30, 1997)

## はじめに

熱分析法には熱重量分析法(Thermogravimetry; TG), 示差走査熱量分析法(Differential Scanning Calorimetry; DSC), 示差熱分析法(Differential Thermal Analysis; DTA)があり, 融点・沸点・凝固点などの相転移を伴う物理的变化に関する試験, 類縁物質に関する純度試験, 乾燥減量又は水分に関する試験などに応用することができる。熱分析法はアメリカ薬局方(USP)<sup>1)</sup>に熱重量分析法, 示差走査熱量分析法, 示差熱分析法が, イギリス薬局方(BP)<sup>2)</sup>及びヨーロッパ薬局方(EP)<sup>3)</sup>に熱重量分析法が一般試験法として記載されており, 日本薬局方(JP)においてもその一般試験法への記載が現在, 検討されている。本研究では, USP, BP及びEPに共通して記載されている熱重量分析法について, 日局及び局外基収載医薬品22品目の乾燥減量及び水分の試験への適用を試み, 熱重量分析法と乾燥減量試験法あるいは水分測定法の間の測定値の相関について検討した。

## 実験材料及び実験方法

## 1. 試料

Table 1 に示す22品目の医薬品を試料とした。このうち酢酸デキサメタゾン<sup>4)</sup>は局外基収載品目であり, 他はすべて日局収載品目である。クエン酸ナトリウム, ヨウ化ナトリ

ウム, 硫酸キニジン, 乳酸カルシウム, スルピリン, タンニン酸, タンニン酸アルブミン, メルカプトプリンは和光純薬から購入した。酢酸デキサメタゾンは国立衛生試験所標準品を, その他は日本薬局方標準品を用いた。

## 2. 熱重量分析

島津製作所製熱分析装置 TA-50WS 及び熱重量計 TGA-50を用いて測定し, データの解析は解析プログラム Ver. 2.03で行った。装置の温度校正は高純度ニッケル(99.999%)のキューリー点, 353°Cを用いて行い, 質量スケールの校正は標準分銅を用いて行った。

測定の操作条件は次の通りである。

試料容器: アルミニウムパン (径: 6 mm, 深さ: 2.5 mm)

昇温速度: 5°C/min

温度範囲: 室温~230°C

雰囲気ガス流量: 窒素ガス 20 ml/min

なお, 空セルを用いた対照実験を別に行い, 試料についての実測データよりブランク値を差し引き, 試料の質量変化とした。

## 3. 水分測定(カールフィッシャー法)

平沼産業(株)製カールフィッシャー水分測定装置 AQ-6を用い, 電量滴定法により水分を測定した。カールフィッシャー水分測定用試薬は Riedel-de Hauen 社製のハイドラナールを使用した。水分量が100µg以上になる試料量を採取し, セルに投入し, 滴定した。滴定操作中の水分の吸収は同一操作時間における空試験値を求め, 補正した。

\* To whom correspondence should be addressed: Tsuyoshi Tanimoto; Hoenzaka 1-1-43, Chuo-ku, Osaka 540, Japan; Tel: 06-941-4419; Fax: 06-942-0716; E-mail: tanimoto@nihs.go.jp

Table 1. List of test samples

No.	Drugs
1	Albumin tannate (Loss on drying; 1 g, 105°C, 3hours)
2	Ascorbic acid (Loss on drying; 1 g, silica gel, 24hours)
3	Atropine sulfate (Loss on drying; 0.5g, in vacuum, P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> , 110°C, 4hours)
4	Calcium lactate (Loss on drying; 1 g, 80°C, 1 hours at first, then 120°C, 4hours)
5	Cyanocobalamin (Loss on drying; 0.05g, in vacuum at a pressure not exceeding 0.67kPa, P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> , 100°C, 4 hours)
6	Dexamethasone acetate monohydrate (Loss on drying; 1g, in vacuum, 105°C, 3hours)
7	Folic acid (Water)
8	Hydrocortisone sodium phosphate (Loss on drying; 1g, in vacuum, 80°C, 5hours)
9	Hydrocortisone succinate (Loss on drying; 0.5g, 105°C, 3hours)
10	Indometacin (Loss on drying; 1g, 105°C, 4hours)
11	Lactose (Loss on drying; 1g, 80°C, 2hours : Water; 1g, direct titration)
12	Maltose (Loss on drying; 1g, 80°C, 4hours)
13	Mercaptopurine. (Water; 0.2g, back titration)
14	Methotrexate (Water)
15	Nicotinic acid (Loss on drying; 1g, 105°C, 1hours)
16	Nicotinamide (Loss on drying; 1g, in vacuum, silica gel, 4hours)
17	Quinidine sulfate (Loss on drying; 1g, 130°C, 3hours)
18	Riboflavin (Loss on drying; 0.5g, 105°C, 2hours)
19	Sodium citrate (Loss on drying; 1g, 180°C, 2hours)
20	Sodium iodide (Loss on drying; 2g, 120°C, 2hours)
21	Sulpyrine (Loss on drying; 1g, 105°C, 4hours)
22	Tannic acid (Loss on drying; 1g, 105°C, 2hours)

The conditions specified in JP or JSPI were shown in parentheses

#### 4. 乾燥減量

日局一般試験法の乾燥減量試験法に従って測定した。試験条件は日局又は局外基の医薬品各条の規定に従ったが、参考までに Table 1 にも示した。

#### 結果及び考察

22品目の医薬品について、熱重量分析法、乾燥減量試験法及び水分測定法の3法でそれぞれ試験し、その結果を Table 2 に示した。また、熱重量分析法と乾燥減量試験法による測定値の相関及び熱重量分析法と水分測定法による測定値の相関を Fig. 1 に示した。

硫酸アトロピン、乳酸カルシウム、シアノコバラミン、酢酸デキサメタゾン、リン酸ヒドロコルチゾンナトリウム、コハク酸ヒドロコルチゾン、メトトレキサート、スルピリン、タンニン酸の9品目では熱重量分析法、乾燥減量試験法及び水分測定法の3法による測定値がよく一致していた。葉酸、乳糖、マルトース、メルカプトプリン、硫酸キニジン、ヨウ化ナトリウムの6品目では熱重量分析法と水分測定法の値はよく一致していたが、乾燥減量試験法による値は前二者の値に比べて著しく低値であった。これは医薬品に含まれる結晶水又は吸着水が局方に規定されている乾燥条件では揮散しにくいためであると考えられる。例えば、乳糖は強固に結合した1分子の結晶水を持ち、この

結晶水は局方の乾燥条件(80°C, 2時間)では揮散しないので、局方条件下での乾燥減量は0.01%以下であったが、水分測定法で測定するとその水分含量は理論値(4.996%)に近似した約4.7%であり、熱重量分析法では理論値に等しい値(4.98%)が得られた。

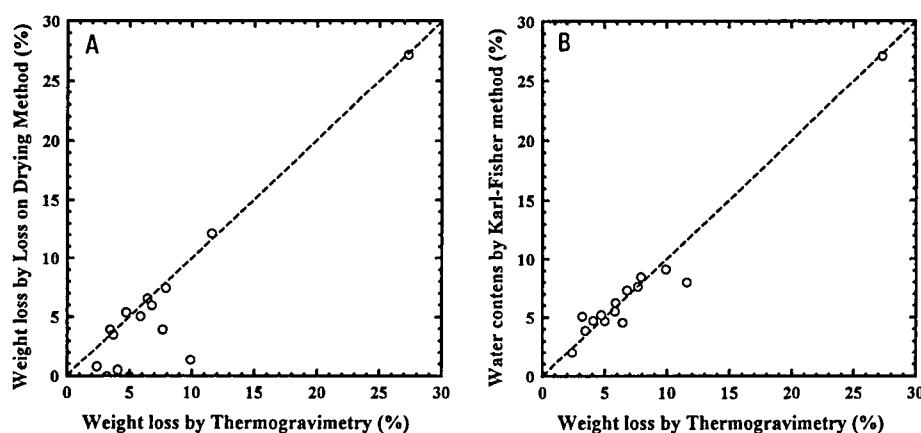
タンニン酸アルブミン、クエン酸ナトリウムの2品目では熱重量分析法と乾燥減量試験法の2法で求めた値はよく一致していたが、水分測定法での値は若干低かった。このことの原因の一つはこれら医薬品のカールフィッシャー試験への溶解性が低いことにあると考えられる。

アスコルビン酸、インドメタシン、ニコチン酸、ニコチン酸アミド、リボフラビンの5品目は、日局の乾燥減量規格値がそれぞれ0.20, 0.5, 0.5, 0.5, 1.5%であり、実測値もそれぞれ<0.01, 0.14, 0.09, <0.01, 0.27%と低値である。これらの医薬品を水分測定法で試験してもその値は乾燥減量試験法での値とほぼ同様の低値である。このように水分あるいは揮発性混在物の含有量が極めて少ない医薬品の場合、熱重量分析法においても当然低値を示したが、実質的にはほとんど重量変化が認められなかった。

今回の検討結果から、多くの医薬品において熱重量分析法での値は乾燥減量試験法や水分測定法での値とよく相関することが示され、乾燥減量試験法や水分測定法が適用しにくい医薬品、例えば揮散しにくい水分をもつ医薬品やカ

**Table 2.** Weight loss determined by thermogravimetry and Loss on Drying test and water content determined by Karl-Fischer method

Drugs	Weight loss (%)		Water content (%)
	Thermogravimetry	Loss on Drying	
1 Albumin tannate	6.40	6.57	4.56
2 Ascorbic acid	<0.01	<0.01	—
3 Atropine sulfate	3.43	3.95	3.88
4 Calcium lactate	27.3	27.2	27.1
5 Cyanocobalamin	5.85	5.06	6.25
6 Dexamethasone acetate	3.77	3.74	3.84
7 Folic acid	7.62	3.94	7.63
8 Hydrocortisone sodium phosphate	7.86	7.44	8.46
9 Hydrocortisone succinate	3.66	3.51	3.50
10 Indometacin	<0.01	0.14	0.035
11 Lactose	4.98	<0.01	4.68
12 Maltose	3.17	<0.01	5.10
13 Mercaptopurine	9.87	1.34	9.11
14 Methotrexate	4.69	5.38	5.21
15 Nicotinic acid	<0.01	0.093	0.085
16 Nicotinamide	0.27	<0.01	0.058
17 Quinidine sulfate	4.06	0.45	4.71
18 Riboflavin	<0.01	0.27	0.26
19 Sodium citrate	11.56	12.14	8.01
20 Sodium iodide	2.37	0.78	2.01
21 Sulpyrine	5.78	5.00	5.50
22 Tannic acid	6.75	5.96	7.30



**Fig. 1.** Correlations of thermogravimetric data for various drug raw materials with data by different analytical methods

A) Weight loss by "Loss on Drying test"

B) Water content by Karl-Fisher method

ールフィッシャー試薬に溶けにくい医薬品などの水分及び揮発性混在物の測定に対して熱重量分析法は有力な試験方法になるものと考えられた。更に、熱重量分析法では用いる試料の量が通常15~20mgの少量で十分であり、試料量の低減を図ることができた。一方、水分・揮発性物質の混在量が極めて微量である場合、熱重量分析法では試料の量を十分に増量することができないので、これら混在物の定

量的評価を行うことは困難であるかもしれない。しかし、限度試験としての評価手段としては熱重量分析法も十分有用な手段になると考えられた。

#### 文 献

- 1) US Pharmacopeia 23, p. 1837 (1995)
- 2) British Pharmacopoeia, A121 (1993)
- 3) European Pharmacopoeia 2 nd. Ed., V. 6 . 24. 1 (1991)

## ミネラルウォーターの容器およびプラスチック等の混入異物に関する研究

河村 葉子<sup>#</sup>・杉田たき子・渡辺 悠二<sup>\*1</sup>・高野 忠夫<sup>\*2</sup>・板倉 武<sup>\*3</sup>  
池川 豊吉<sup>\*3</sup>・山田 隆

## Studies on the Bottles of Mineral Water and the Foreign Plastic Like Substances

Yoko Kawamura<sup>#</sup>, Takiko Sugita, Yuji Watanabe<sup>\*1</sup>, Tadao Takano<sup>\*2</sup>,  
Takeshi Itakura<sup>\*3</sup>, Toyokichi Ikegawa<sup>\*3</sup> and Takashi Yamada

The containers of mineral water and the foreign plastic substances which were found in the mineral water were investigated. Most of plastic bottles were made of polyethylene terephthalate (PET) and the caps were made of polypropylene (PP), polyethylene (PE) or aluminum. PE liners were attached to some caps. Most of the foreign plastic substances were PET while others were PE, PP, Teflon and rubber. Some bottles had a scratch on the top inside. The origin of most PET fragments was presumed to be scraped off the bottles by the lowering of the injection nozzle during the water filling process. The sources of the other substances were also determined.

**Keywords** : Foreign substance, plastic, mineral water, bottle, polyethylene terephthalate  
(Received May 30, 1997)

## はじめに

1995年9月、ニュージーランド産のミネラルウォーター中に白色浮遊物が検出され、これがカビであったことが報道された。それ以降、国産および輸入品の多くのミネラルウォーターから、様々な異物が検出されたという報告が相次ぎ、大きな社会問題となった。1995年9月～12月の4ヶ月間に、厚生省により異物検出が確認されたミネラルウォーターは45銘柄にのぼった。検出された異物の大半はカビであったが、その他、細菌塊、植物片、昆虫片等があり、プラスチック片等も約20%を占めた。

ミネラルウォーターへの異物混入の原因解明において、「容器」は二つの面から注目された。その一つはプラスチック等の異物の起源としてであり、もう一つはカビ等が混入する要因としての容器の品質や管理等である。

そこで、ミネラルウォーターの容器の材質、漏水の有無、キャップのゆるみ等について調査を行うとともに、ミネラルウォーターよりプラスチックおよびゴム製の異物が検出された事例について、異物およびその容器を詳細に調査した。さらに、製造工程等を検討し、異物混入の発生原因の究明を行うとともに、その防止策を検討したので報告する。

## 実験方法

## 1. 試料

国産および輸入ミネラルウォーター24銘柄25種類312本。試料GおよびG'は、同一銘柄であるが、ボトルがガラス製とポリエチレンテレフタレート (PET) 製の2種類であったため、別の種類として試験を行った。これらの試料は、検疫所において目視により異物が検出され、確認のため送付された試料、および事故品と同一銘柄またはそれ以外の銘柄で調査のために送付された試料であった。

## 2. 開封前の検査

全試料について、キャップのゆるみを調べ、次に倒立にして漏水を検査した。また、目視により異物のチェックを行った。一部の試料については、これらの検査は検疫所において行われた。

## 3. 混入異物の検査

微生物または異物の担当者が、試料をフィルターを過して混入物を採取し、顕微鏡等で観察した。それらの検査において、7銘柄 (A, G, J, K, M, O, X) からプラスチックまたはゴム様の異物が検出された。これらのうち、プラスチック様異物は赤外吸収スペクトルおよび熱分解ガスクロマトグラフにより、ゴム様異物はX線回折により材質の鑑別を行った。これらのプラスチックおよびゴム製異物については、さらに形状、色調等を顕微鏡または拡大鏡により詳細に観察した。

## 4. 赤外吸収スペクトル測定条件

装置：フーリエ変換赤外分光光度計 (FTIR)

\*1 東京都衛生研究所

\*2 財高分子素材センター

\*3 PET ボトル協議会

# To whom correspondence should be addressed: Yoko Kawamura; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo 158, Japan

Table 1. materials and condition of mineral water bottle

Sample	Volume (L)	Material & color			Leakage of water <sup>a)</sup>	Cap looseness <sup>a)</sup>	Falling test				
		Bottle	Cap	Liner			25 cm	30 cm	50 cm	80 cm	
A	1.5	PET, clear	PP, white	PE, blue	3/86 <sup>c)</sup>	3/86 <sup>c)</sup>		pass	pass		
B	1.5	PET, blue	PE, blue	-	2/9 <sup>c)</sup>	2/9 <sup>c)</sup>		pass	pass		
C	1.5	PET, clear	PP, white	PE, semiclear	0/24	0/24		pass	pass		
D	1.5	PET, blue	PP, white	PE, blue	0/24	2/24		pass	pass		
E	2.0	PET, clear	Aluminum	PE, white	0/12	0/12	pass	pass			
F	1.5	PET, blue	PP, blue	PE, blue	0/24	0/24		pass	pass		
G	0.33	PET, clear	PP, white	-	0/5	0/5			pass	pass	
G'	0.27	Glass, green	Aluminum	PE, white	0/11	0/11					pass
H	1.5	PET, clear	PP, white	-	0/5	0/5		pass	pass		
I	0.5	PET, clear	PP, white <sup>b)</sup>	-	0/4	1/4		pass	pass		
J	0.5	PET, blue	PE, semiclear	-	0/5	0/5		pass	pass		
K	0.5	PET, clear	PP, black <sup>b)</sup>	-	1/4 <sup>c)</sup>	1/4 <sup>c)</sup>		pass	pass		
L	1.5	PET, clear	PP, white	-	0/5	0/5		pass	pass		
M	1.0	PET, clear	PE, semiclear	-	0/12	1/12		pass	pass		
N	1.5	PET, clear	PE, blue	-	0/12	0/12		pass	pass		
O	1.5	PET, clear	PE, blue	-	0/7	0/7		pass	pass		
P	2.0	PET, clear	Aluminum	PE, white	0/6	0/6	pass	pass			
Q	2.0	PET, clear	PP, white	PE, clear	0/6	0/6	pass	pass			
R	2.0	PET, clear	PP, white	PE, blue	0/6	0/6	pass	pass			
S	1.5	PET, clear	Aluminum	PE, white	0/10	0/10		pass	pass		
T	1.5	PET, clear	PP, white	PE, blue	0/8	0/8		pass	pass		
U	2.0	PET, clear	PP, white	PE, blue	0/6	0/6	pass	pass			
V	1.5	PET, clear	PP, white	PE, lightblue	0/12	0/12		pass	pass		
W	1.5	PET, clear	PP, white	PE, blue	0/8	0/8		pass	pass		
X	0.33	PET, clear	PP, white	-	0/1	0/1			pass	pass	

PET: polyethylene terephthalate, PP: polypropylene, PE: polyethylene

a): number of leaked or cap-loosed samples/number of tested samples

b): cap with nozzle, c): confirmed at quarantine stations

赤外線顕微鏡 (MCT 検出器付), ダイヤモンドセル

波長範囲: 4000~400cm<sup>-1</sup> (MCT 検出器の場合4000~750cm<sup>-1</sup>)

分解能: 4 cm<sup>-1</sup>

### 5. 熱分解ガスクロマトグラフ法

装置: 熱分解装置ガスクロマトグラフ (FID 検出器付)

キャピラリーカラム: 14% Cyanopropyl phenylmethyl silicone, 長さ25m, 内径0.25mm, 膜厚1.2μm

熱分解温度: 590℃

熱分解オープンおよびニードル温度: 300℃

注入口および検出器温度: 280℃

カラム温度: 50℃→250℃ (4min), 10℃/min

キャリアーガス流量: 2 ml/min

スプリット比: 1:10

### 6. 容器の検査

異物検査を行った後の空容器について, 本体およびキャップの材質, キャップライナーの有無等を調べた。さらに, 本体およびキャップの異状の有無を拡大鏡により観察した。

次に, 本体がプラスチック製の試料については, 同一銘柄各2本について, 内容量に相当する水を充填し, 食品衛生法「器具および容器包装の規格基準」の落下試験<sup>1)</sup>に準

じ, 総重量により定められた高さ(100g未満:80cm, 100g以上400g未満:50cm, 400g以上2,000g未満:30cm, 2,000g以上:25cm), および1ランク上の高さから2回ずつ落下させ, 外観の変化および水漏れの有無を調べた。但し, 試料Xについては1本のみで行った。

## 実験結果

### 1. ミネラルウォーターの容器について

ミネラルウォーター容器の品質や管理状況を明らかにするため, 24銘柄25種類について, 未開封時の漏水の有無およびキャップのゆるみ, 本体, キャップ, ライナーの材質, および落下強度を調べた (Table 1)。

容器本体の材質は, 24試料がポリエチレンテレフタレート (PET) 製であり, 1試料のみがガラス製で, 他の材質はみられなかった。キャップは, ポリプロピレン (PP) 製が17試料と最も多く, ポリエチレン (PE) 製が4試料, アルミ製が4試料であった。また, ライナーは, PE製のキャップには装着されておらず, PP製キャップの2/3にあたる11試料とアルミ製キャップの全品4試料の合計15試料にPE製ライナーが装着されていた。

漏水およびキャップのゆるみについては, 検疫所における検査で, 試料Aの3検体, 試料Bの2検体および試料

Table 2. Foreign plastic substances found in mineral water

Sample	Foreign substance		State of bottle and cap
	Shape & size	Material	
A-1	Flake, 1 mm	PET	Normal
A-2	Shaving, 5 mm	PET	Scraping line on the top inside of the bottle
A-3	Flake, 2 mm×2 mm	PET	Normal
A-4	Filament, 5 mm	PET	Normal
A-5	Shaving, 1 mm	PET	Rubbing mark on the top inside of the bottle
A-6	Filament, 1 mm	PP	Filamented projections inside the cap
A-7	Filament, 3 mm	PP	Filamented projections inside the cap
A-8	Filament, 1 mm	PET	Normal
A-9	Fine-grain, black	Rubber	Normal
G	Shaving	PET	Normal
J-1	Shaving	PET	Scraping line on the top inside of the bottle
J-2	Mass, 10×15 mm	PET	Scraping line on the top inside of the bottle
K	Filament, 2 mm	PET	Normal
M	Splinter, 5×2 mm	PET	Not confirmed <sup>a)</sup>
O-1	Filament, 25 mm	PET	Normal
O-2	Shaving, 5 mm, blue	PE	Normal
X	Splinter, 7×2 mm	PET	Scraping around the top of the bottle

a): The cap was fixed on the top of the bottle.

Kの1検体について、ゆるみおよび漏水が報告されていた。一方、直接検査した試料の中では試料Dの2検体、試料Iおよび試料Mの各1検体にキャップのゆるみが見られたが、これらについては漏水はみられなかった。

容器の強度を調べるため、PET製の24種類について、食品衛生法に準じて落下試験を行ったところ、いずれも十分な強度をもっており、1ランク上の高さからの落下においても、全く問題はみられなかった。また、輸送中にへこみを生じた試料が数検体みられたが、そのいずれにもピンホールや漏水はみられなかった。

## 2. 混入異物について

ミネラルウォーター7銘柄(A, G, J, K, M, O, X)17検体から検出されたプラスチックまたはゴム様異物について、その形状を顕微鏡等で観察するとともに、赤外吸収スペクトル法、熱分解ガスクロマトグラフ法およびX線回折法により材質を鑑別し、また当該容器本体およびキャップの状況について調べた(Table 2)。

異物の材質として最も多かったのは、ポリエチレンテレフタレート(PET)で、13検体であった。その他ポリプロピレン(PP)が2検体、ポリエチレン(PE)が1検体、ゴムが1検体であった。

異物の形状としては、PETでは糸状3検体、削状3検体、破片2検体、薄片2検体および塊状1検体であった。また、PPでは2検体とも糸状、PE1検体は削状、ゴム1検体は黒点状であった。

一方、プラスチック等の混入物が検出された17検体の容器については、異常が見られないもの9検体、本体口部内側に縦に削れまたは擦り傷のあるもの4検体、本体口部天面の内周に削れがあるもの1検体、キャップに糸状のバリがあるもの2検体であった。なお1検体は、口部にプルアップ式キャップが固定されており、口部およびキャップ内面の確認は出来なかった。

## 考 察

ミネラルウォーターに混入したプラスチック、ゴム等の異物、およびその容器について調査した結果、容器の材質および強度に特に問題は見られなかった。キャップのゆるみおよび漏水が散見され、管理の徹底が望まれたが、カビ等の異物の混入との関連はみられなかった。

一方、検出された異物については、その材質毎に発生原因を推定し、防止策の検討を行った。

### 1. PETの場合

プラスチック製異物の材質として最も頻度が高いのがPETであり、7銘柄13検体と全体の3/4以上を占めていた。PETはボトルの主な素材であり、異物はボトルに由来すると考えられた。

試料A-2、J-1およびJ-2においては、ミネラルウォーター中からPET片が検出されるとともに、容器本体口部内側に縦に削れた痕が見いだされ、この削片がミネラルウォーター中に混入したと推定された。J-2では、長

い削片がまるまって塊状になったものと考えられた。

これらの発生原因について検討した結果、ミネラルウォーターを容器に注水する工程において、注水ノズルが上下動する際にボトルと接触し削れを生じたものと結論された。このノズルはステンレス製であり、極めて高速で容器口部に下降し、注水後高速で上昇する。またノズルの太さと容器の口径の差は小さく、容器の位置がわずかにずれるとノズルの外側面とボトルの口部が接触し、削れを生じる。

上記のように削片がそのまま容器中に落ちて混入する場合もあるが、ノズルが濡れているため、削片がノズル先端に付着し、次の容器または数本後の容器中に落ちることもあり、A-5およびGは異物の形状からその可能性が極めて高かった。また、A-1、A-3、A-4およびA-8はA-2およびA-5と近接した製造番号であり、同様の原因によると推定された。

一方、試料Xについては、容器本体の口部天面の内周が周に沿って三日月状に7mm程度破損していたが、この形状とミネラルウォーターから検出された混入異物の形状は一致していた。この発生原因としては、ミネラルウォーター注水ノズルと容器の位置のずれがさらに大きくなり、ノズルが本体口部に高速で衝突したことにより、衝突部分を破損し、破片が落下したものと結論された。

以上のように、PET片混入の主たる原因は、注水ノズルによる容器の削れまたは破損であると結論され、次のような防止策が考えられた。まず、注水時の容器の位置合わせを適切に行うことが重要である。また、ノズルの外側部の形状を角がない丸みを帯びた形状にすることが望ましい。国内で製造されている注水機のノズルでは丸みを帯びたものが多いが、外国製の注水機のノズルには角ばった形状のものがあるようである。また、国内産で使用頻度が高い、本体口部が結晶化されて硬質となったPET容器を用いることも、削れを減少させることに有効と考えられる。さらに、工場において、ノズルとボトルの接触や削れが発見された場合には、その前後の多くの製品について、入念にチェックすることが必要であろう。

試料Mは、注水後PE製のプルキャップを容器本体にはめこむ構造となっていた。そのため、容器口部について観察することができなかったが、検出された混入物が破片状であり、プルキャップをはめこむ時点で本体が破損した可能性が高い。

試料O-1の混入物は長い糸状であり、容器の製造時に生じたバリが容器中に混入したものと推定された。しかし、このような異物がボトル製造時に混入したとしても、洗浄工程で除去されるはずであり、容器の洗浄が不十分であった可能性がある。試料Oの洗浄工程は不明であるが、見学した工場の中には洗浄が十分とはいえないところもあ

った。洗浄水が一定時間容器の底まで届き、容器内が十分に洗浄されることが重要である。

## 2. 混入物がPPまたはPEの場合

PPおよびPEはキャップの材質であり、これらの混入は主にキャップに由来することが考えられる。しかし、PEは、ライナーやミネラルウォーターのシュリンクラベル、およびボトル製造工場から出荷時の包装用シュリンクフィルムの材料としても使用されている。

試料A-6およびA-7の混入物はいずれもPPの糸状物であった。これらの試料は、同一ロットであり、キャップには、いずれもライナー周辺に糸状のバリがみられ、これがキャップ装着時にこすりとり、ボトル内に混入したものと推定された。同一銘柄の他のロットではこのようなバリは観察されておらず、キャップの不良が原因と考えられた。また、試料Uのキャップにも多数のバリが観察されたものがあつた。ミネラルウォーター中にはプラスチック混入物は検出されなかったが、使用前のキャップについても十分なチェックが必要である。

試料O-2はPEの青色削片が検出された。これはキャップ装着時にゆがみが生じ、本体とのすれによりキャップの突出している部分が削られたものと推定された。キャップの装着不良を生じた場合には、製造工程および製品の点検が不可欠である。

さらに、微小であるためプラスチック製混入物として鑑別されていない白点状の異物の中にキャップ由来のものが含まれていることが推測される。これらは、キャップを整理させるためのキャップホッパー内で、キャップ同士がぶつかりあう時に生じる。キャップホッパーに吸引装置を取り付けることにより改善可能である。

## 3. 混入物がゴムまたはテフロンの場合

混入物の材質がゴムであることが確認されたのは、A-9のみであるが、未確認の黒点状混入物の中には、ゴムまたはテフロンに由来するものがさらに含まれているものと考えられる。これらの発生原因としては、ボトリング装置、特に注水部分に使用されているゴムまたはテフロン製のガスケットが劣化し、これが容器との接触や振動等により剥離して混入したものと推定される。他の検査機関で検出された異物の中にも黒色の固形物があり、この異物に関しては、製造元でテフロンであることを確認し、ガスケットの剥離が原因であることを認めている。これらの事故を防止するためには、ガスケットは良質なものを用い、また、早めに交換することが望まれる。

## 結 論

ミネラルウォーターへの異物混入に際して、容器に関連する事項について検討を行った。容器の材質および強度には特に問題はみられなかった。一部の試料にキャップのゆ

るみや漏水がみられたが、カビ等の混入との関連はみられなかった。プラスチック等の異物混入の原因として、ボトルやキャップの品質不良によるバリの落下や、容器の製造時にプラスチック片が混入したと推定される事例もみられたが、多くはミネラルウォーターの充填工程において発生しており、注水ノズルに起因するものが大部分であった。

これらの混入物の防止対策として、ミネラルウォーターの充填工程、特に注水ノズルに関する問題を中心に、容器の洗浄工程およびキャッピング工程の管理を十分に行うことにより、プラスチック、ゴム等の異物の混入は大幅に改善されるであろう。

しかし、これらの混入を、製造工程で完全に防止することは困難である。そのため、目視検査をさらに徹底させるとともに、機器による異物チェックについても充実させる必要がある。

本研究は、平成7年度厚生科学研究「ミネラルウォーターの衛生確保に関する研究」の一部として行われた。

#### 文 献

- 1) 厚生省生活衛生局食品保健課，乳肉衛生課，食品化学課監修：平成9年版食品衛生小六法，p.971～972（1996）新日本法規



## エイズ医薬品候補スクリーニング研究

## VIII. 1995年度報告

森下 高行<sup>\*1</sup>・小林 慎一<sup>\*1</sup>・佐藤 克彦<sup>\*1</sup>・栄 堅司<sup>\*1</sup>・石川 直久<sup>\*1</sup>・小林 伸好<sup>\*2</sup>  
 野口 有三<sup>\*2</sup>・秋吉 京子<sup>\*3</sup>・須賀 知子<sup>\*3</sup>・小川 淳<sup>\*3</sup>・野呂 新一<sup>\*4</sup>・沢田 春美<sup>\*4</sup>  
 木村 浩男<sup>\*4</sup>・山田 明<sup>\*5</sup>・石崎 徹<sup>\*5</sup>・神村 紀子<sup>\*5</sup>・岩島 昭夫<sup>\*5</sup>・小野 哲郎<sup>\*6</sup>  
 橋 宣洋<sup>\*6</sup>・関根 大正<sup>\*7</sup>・大貫菜穂美<sup>\*7</sup>・風間 公夫<sup>\*7</sup>・貞増 健志<sup>\*7</sup>・太田 健爾<sup>\*7</sup>  
 工藤 泰雄<sup>\*7</sup>・斉藤 隆行<sup>\*8</sup>・衛藤 繁雄<sup>\*8</sup>・大竹 徹<sup>\*9</sup>・森 治代<sup>\*9</sup>・森本 素子<sup>\*9</sup>  
 上羽 昇<sup>\*9</sup>・千千和勝巳<sup>\*10</sup>・森 良一<sup>\*10</sup>・牛島 廣治<sup>\*11</sup>・森次 保雄<sup>\*11</sup>・  
 西尾 治<sup>\*12</sup>・三瀬 勝利

## Preliminary Screening for Antiviral AIDS Drugs.

## VIII. Report for fiscal year 1995

Takayuki Morishita<sup>\*1</sup>, Shinichi Kobayashi<sup>\*1</sup>, Katsuhiko Sato<sup>\*1</sup>, Kenji Sakae<sup>\*1</sup>,  
 Naohisa Ishikawa<sup>\*1</sup>, Nobuyoshi Kobayashi<sup>\*2</sup>, Yuzo Noguchi<sup>\*2</sup>, Kyouko Akiyoshi<sup>\*3</sup>,  
 Tomoko Suga<sup>\*3</sup>, Atsushi Ogawa<sup>\*3</sup>, Shinichi Noro<sup>\*4</sup>, Harumi Sawada<sup>\*4</sup>, Hiroo Kimura<sup>\*4</sup>,  
 Akira Yamada<sup>\*5</sup>, Tohru Ishizaki<sup>\*5</sup>, Noriko Kamimura<sup>\*5</sup>, Akio Iwashima<sup>\*5</sup>, Tetsuo Ono<sup>\*6</sup>,  
 Nobuyoshi Tachibana<sup>\*6</sup>, Hiromasa Sekine<sup>\*7</sup>, Nahomi Ohnuki<sup>\*7</sup>, Kimio Kazama<sup>\*7</sup>,  
 Kenji Sadamasu<sup>\*7</sup>, Kenji Ohta<sup>\*7</sup>, Yasuo Kudoh<sup>\*7</sup>, Takayuki Saito<sup>\*8</sup>, Shigeo Etoh<sup>\*8</sup>,  
 Tohru Ohtake<sup>\*9</sup>, Haruyo Mori<sup>\*9</sup>, Motoko Morimoto<sup>\*9</sup>, Noboru Ueba<sup>\*9</sup>, Katsumi Chijiwa<sup>\*10</sup>,  
 Ryouichi Mori<sup>\*10</sup>, Hiroshi Ushijima<sup>\*11</sup>, Yasuo Moritugu<sup>\*11</sup>, Osamu Nishio<sup>\*12</sup> and Katsutoshi Mise

Preliminary screening of antiviral AIDS drugs has been carried out using three different *in vitro* assay systems. Among 96 samples of different origin tested, two were shown to inhibit the growth of HIV *in vitro*. One of the positive samples (plant origin) has hopeful signs, as the ranges of effective doses are wider than those of most of positive samples which had been found by us.

**Keywords:** AIDS, anti-HIV drugs, HIV-1, AZT, microplate method.

(Received May 30, 1997)

## はじめに

日本におけるエイズ患者は血友病患者を中心にかなりの数が報告されている。近年三剤併用療法などの導入により、エイズ患者の死亡率が低下していることは喜ばしいことではあるが、効力や副作用などの問題がある。薬剤耐性の問題も解決していない。HIVの迅速検出法の考案と共に、効力の高い副作用の少ない種々のエイズ医薬品の開発が待望されている<sup>1-3)</sup>。

エイズ治療薬の開発を目的として、昭和63年度より、厚生省とヒューマンサイエンス振興財団が中心となって、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。

この班では医薬品関連企業から提供される化学合成物や生薬抽出物などについて、国立衛生試験所、国立予防衛生研究所（現国立感染症研究所）、北海道立衛生研究所など10地方衛生研究所よりなる研究班で、候補物質のスクリーニング研究を行ってきた。これまで、千を超える提供物質から約20数種のHIVの増殖を抑制する物質を見いだしている。そのうちいくつかの物がエイズ医薬品候補物質として、別の班で研究されている。この中で医薬品となった物は、現在の所残念ながら存在しないが、エイズの治療の困難さを思うと、やむを得ないところもある。

平成7年度は例年より少ない96サンプルが提供され、このうち2サンプルがHIVの増殖を*in vitro*で抑制した。このうち1サンプル（植物抽出物）は有効濃度域が広がったところから候補物質となり得ると考えている。

\*1 愛知県衛生研究所, \*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 東京都立衛生研究所, \*8 神奈川県衛生研究所, \*9 大阪府立公衆衛生研究所, \*10 福岡県保健環境研究所, \*11 国立予防衛生研究所（現国立感染症研究所）, \*12 国立公衆衛生院

Table 1. Screening of anti HIV drugs tested in fiscal year 1995.

Number	Effective doses ( $\mu\text{g/ml}$ )	Minimum cytotoxicity ( $\mu\text{g/ml}$ )	Chemicals
950012	15.6 - 500	1,000 or more	Extract of medicinal plant
950013	125 - 500	1,000 or more	Extract of medicinal plant

Number of samples tested was 96.

Table 2. Anti-HIV activities of sample no. 950012 with microplate assay method

Tube no.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	UC	IC
Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	500	250	125	62.5	31.3	15.6	7.8	3.9	2.0	1.0		
3 days incubation Cytotoxicity	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
CPE	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+
6 days incubation Cytotoxicity	G	G	G	G	G	G					G	
CPE	-	-	-	-	-	-	++	++	++	++	-	++

UC, uninfected control; IC, infected control; CPE, cytopathogenic effects; G, cells grew well as in UC; -, CPE was not observed; +, CPE was partially observed; ++, CPE was observed as in IC.

Table 3. Anti-HIV activities of sample no. 950013 with microplate assay method

Tube no.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	UC	IC
Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	500	250	125	62.5	31.3	15.6	7.8	3.9	2.0	1.0		
3 days incubation Cytotoxicity	F	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
CPE	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+
6 days incubation Cytotoxicity	F	G	G	G							G	
CPE	-	-	-	-	+	++	++	++	++	++	-	++

UC, IC, CPE, G, -, +, and ++, same as described in the legend to Table 2; F, growth of cells was partially inhibited by the chemical added.

## 実験方法

医薬品候補物質の第一次スクリーニング法として、本班では終始一貫してマイクロプレート法 (microplate method) を採用している。この方法の詳細は文献4)に記載された通りであるが、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ている。マイクロプレート法で陽性となった物は、生細胞数測定法または巨細胞形成抑制法<sup>4)</sup>で抗HIV活性を確認している。

## 結果

マイクロプレート法で試験されたサンプル数は96であり、これらは参加企業7社より提供されたものである。2サンプルが抗HIV活性を示した (Table 1)。陽性を示した950012と950013のマイクロプレート法の生データを Table 2と Table 3に示す。両者は巨細胞形成抑制法でも抗HIV活性弱陽性であった。両者とも植物抽出物である。企業の特許に触れるので、具体的な植物名は記載できない。

## 考察

Table 1に示されているように、本年度は2サンプルの抗HIV活性陽性の物が見いだされた。例年より<sup>5-10)</sup>有望な物が少なかったが、いずれもこれまで抗HIV活性が試されていない物と想像される (被検サンプルの詳しい内容は我々には伏せられることが多い)。このうち950012は有効濃度域の広さから、十分に候補物質となり得ると期待される。

## 文献

- 1) Bridge, T. P., Mirsky, A. F. and Goodwin, F. K.: "psychological, neuropsychiatric, and substance abuse aspects of AIDS". Raven Press, New York (1988)
- 2) Dalgleish, A. G. and Weis, R. A.: "AIDS and New Viruses". Academic Press, London (1990)
- 3) Ehrlich, G. D. and Greenberg, S. J.: "PCR-based Diagnostics in Infectious Disease". Blackwell Scientific Publications, Boston (1994)
- 4) 三木隆他34名: 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)

- 5) 野呂新一他35名：エイズ医薬品候補スクリーニング研究, II. 1989年度報告, 衛生試報, **109**, 107~110 (1991)
- 6) 大竹徹他40名：エイズ医薬品候補スクリーニング研究, III. 1990年度報告, 衛生試報, **110**, 88~91 (1992)
- 7) 小林伸好他37名：エイズ医薬品候補スクリーニング研究, IV. 1991年度報告, 衛生試報, **111**, 100~102 (1993)
- 8) 関根大正他36名：エイズ医薬品候補スクリーニング研究, V. 1992年度報告, 衛生試報, **112**, 13~133 (1994)
- 9) 牛島広治他35名：エイズ医薬品候補スクリーニング研究, VI. 1993年度報告, 衛生試報, **114**, 48~49 (1996)
- 10) 大貫菜穂美他36名：エイズ医薬品候補スクリーニング研究, VII. 1994年度報告, 衛生試報, **114**, 50~52 (1996)

## 病原性大腸菌 O-157 を例とする健康被害分布図の作成と WWW による提供

神沼 二真\*<sup>1</sup>, 燕山 典子, 石川 恵司\*<sup>2</sup>Development of a Geographical Information System and Its Application to *Escherichia coli* O-157 Patient DistributionTsuguchika Kaminuma\*<sup>1</sup>, Noriko Kabuyama and Keiji Ishikawa\*<sup>2</sup>

The so called Geographical Information System (GIS) is one of the basic tools for wide range of public health applications. We had developed a general purpose GIS and applied it to represent geographical distribution of patients of the bacterium *E. coli* O-157 which bursted out in Japan last early summer particularly at Sakai City in Osaka Prefecture. The patient record have been supplied from the Food Safety Office of the Ministry of Health and Welfare. These records were handled by EXCEL. The basic geographical data was constructed from the map data provided by Japan Geographical Survey Institute, and ArcView 2 was used as the map system. The maps were converted to Graphics Interchange Format (GIF) files and put on our Web server.

**Keywords:** GIS, ArcView, *E. coli* O-157, World Wide Web  
(Received May 30, 1997)

## 1. はじめに

健康被害の直接の要因は、フィジカルハザード、バイオハザード、ケミカルハザードに分類される。フィジカルハザードとは、交通事故、地震、爆発、放射線、電磁波などである。バイオハザードの典型例は、ウイルスや細菌、寄生虫などによるいわゆる感染である。ケミカルハザードは、毒物、劇物、煙草の煙、食品中の有害成分、環境汚染物質などである。一般にこれらの健康被害が起きるとその原因(ハザード要因)との因果関係の解明が問題になるが、こうした研究に地図を用いた地理的表現が必要になることが多い。こうした一過性の“事件”でなくとも、健康被害の分布図の作成は、公衆衛生、疫学、環境問題、さらに最近医療福祉においても基本的な道具であることが認識されるようになった。

われわれは、化学物質情報部が進めている Center of Excellence (COE) としての国立衛生試験所(衛試)の情報基盤構築の一環として、健康に影響すると思われる環境要因や健康被害を地図上にマッピングするシステムの開発を行っていたが、1996年の夏、病原性大腸菌 O-157(O-157)に原因する健康被害が発生したため、開発中の地理情報システムを急遽この問題に適用してみることにした。以下では、そのために開発したシステムと結果について報告する。

## 2. 基盤となる地理情報システム

われわれの地理情報システムは、地図データを扱う地図(地理)システム、地図データ、作成した地図をインターネットの World Wide Web (WWW) によって提供するシステムという3つの要素から構成される。

以下で、それぞれの要素について簡単に説明する。なお、これらのシステムの基盤となるのは、われわれが開発している国立衛生試験所情報計算基盤(NIHS Information and Computing Infrastructure, NICI)<sup>1)</sup>とその関連システム<sup>2)</sup>である。NICIは科学技術庁の省際ネットワークに接続されているインターネット(IMnet)を基盤とするシステムである。NICIもそうであるが、われわれの地理情報システムも個別問題への対応ではない汎用的な用途をめざしている。Fig.1に全体の作業手順の概念を示す。

## 2.1 地図(地理)システム

基本となる地図システムとしては、国内、国外のいくつかの地図システムのうち、一般に普及しているものを探したが、米国 ESRI 社の ARC/INFO と米国 MapInfo 社の MapInfo がよく普及しているように思われた。そのうちでも長い実績を有する ARC/INFO 系の簡易版システムである ArcView 2 を用いることにした。また、ハードウェアとしては、IBM AT 互換機パーソナルコンピュータ(PC)をベースとして、Windows95と Windows NT を併用できる環境を用意することとした。

## 2.2 地図データ

地図の扱いで難しいのは、スケールや精度の異なる地図を同時に扱うことである。われわれの場合、地球全体、日

\*<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed: Tsuguchika Kaminuma, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158, Japan; Tel: 03-3700-9540, Fax: 03-3700-7592; e-mail: kaminuma@nihs.go.jp

\*<sup>2</sup> 石川電気株式会社

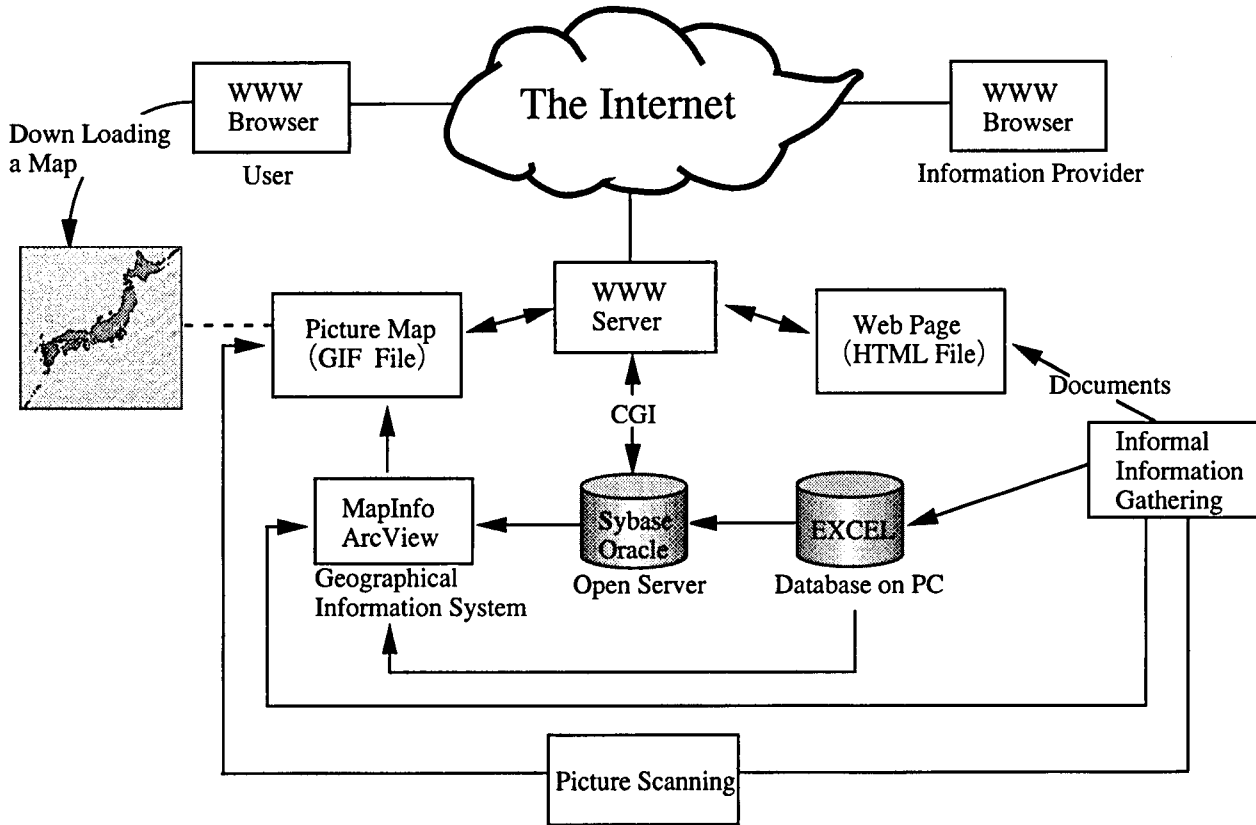


Fig. 1. Geographical distribution map system of foodborne illness

Table 1. cases reports

都道府県名	政令市名	群名	市区町村名	届け出保健所	保健所探知日	有症者数	無症者数	入院者数	死亡者数	年齢	性別	発症日	病原菌	検出日	原因食品等	HUS	備考
01北海道	札幌市	-	-	-	1月29日	1	0	0	0	67	女	1月26日	O157(VT)	1月30日	-		1/27初診
01北海道	札幌市	-	-	-	4月23日	1	0	0	0	5	女	4月11日	O157(VT)	4月23日	-		
01北海道	札幌市	-	-	-	5月3日	0	1	0	0	-	女	-	O157(VT)	5月7日	-		50歳代
01北海道	札幌市	-	-	-	6月16日	0	1	0	0	-	女	-	O157(VT)	6月16日	-		40歳代。定期検便で検出
01北海道 計						2	2	0	0								
02青森県	-	-	弘前保健所管内	-	3月25日	2	2	0	0	-	-	3月12日	O157(VT1,2)	3月25日	-		有症者は小学1年男子、小学3年女子。無症者は父、母
02青森県 計						2	2	0	0								
03岩手県	-	-	-	遠野保健所	1月9日	1	0	1	0	-	男	1月4日	O157(VT1,2)	1月9日	-		
03岩手県	-	-	-	遠野保健所	1月14日	0	1	0	0	-	女	-	O157(VT1,2)	1月14日	-		1/4発症の家族
03岩手県	-	-	-	岩手保健所	2月14日	1	0	1	0	-	女	2月11日	O157(VT1,2)	2月14日	-		
03岩手県	-	-	-	二戸保健所	4月22日	1	0	1	0	-	女	4月17日	O157(VT1,2)	4月22日	-		
03岩手県	-	-	水沢保健所管内	水沢保健所	5月29日	1	0	1	0	-	女	5月23日	O157(VT1,2)	5月31日	-		80歳代
03岩手県	-	-	二戸保健所管内	二戸保健所	6月17日	0	1	0	0	-	女	-	O157(VT)	6月16日	-		40歳代前半
03岩手県 計						4	2	4	0								

本全体，都道府県，市町村の行政区という基本レイヤーを考え，それぞれのレイヤーに対応したベクトル型の地図を用意することとした。こうした地図データとそれを扱う地図システムは対応していなければならないため，今回これらの地図データは，とくに ArcView 2 に対応して用意し

た。日本で基本となる地図データは，国土地理院数値地図 (1/25000)，国土数値地図 (FD マップ：国土数値情報の骨格情報をフロッピーディスクに収めたもの)，国土地理院数値地図 (1/10000) である。ただし，国土地理院数値地図 (1/10000) はまだ全国をカバーしていない。そ

ここで今回は以下のようなデータを用意した。

まず、世界地図として Digital Chart of the World を用意した。日本地図としては全国 (88枚) の、国土地理院数値地図 (1/25000) を統合した合成地図を作成した。道路、鉄道などは、国土数値地図 (FD マップ) を全国 (85枚) として統合し、さらに両者の緯度、経度データを統合することにした。さらに都道府県別の地図として、上記の合成地図から各都道府県を切り出し、さらに詳細な行政界地図を作成した。

### 2.3 WWW システム

Fig.1の手順にしたがって、集められたデータは PC 上の EXCEL に蓄積される。ArcView 2 はそれらのデータから地図を作成し、Graphics Interchange Format (GIF) ファイルに変換した後、NICI の WWW サーバにおいてインターネットで利用できるようにした。また、1997年の発症例に関しては、個別の詳細情報 (テキスト情報) を UNIX 上のデータベース管理システムである Sybase に入力し、Web-sql を用いることによって WWW ブラウザ上での検索を可能とした。検索の条件には都道府県名、郡名、政令都市名、

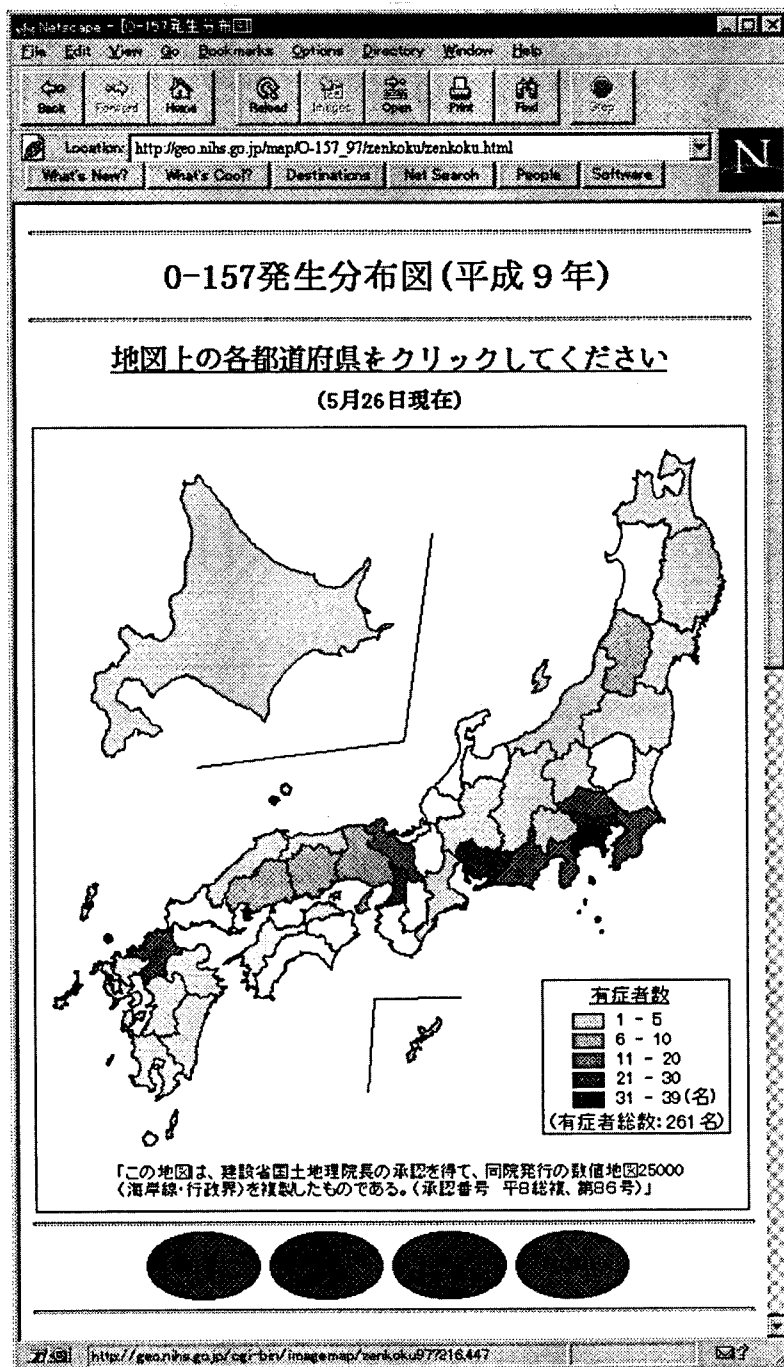


Fig. 2. The entry map of over all Japanese *E. coli* O-157 cases

市区町村名, 発症月日, 性別, 年齢, 病原菌, 原因食品, 溶血性尿毒症候群 (HUS) 発症の有無を用いた。これらの情報のうち最低1つの条件を入力すれば検索が可能である。

### 3. 健康被害データ

今回扱ったO-157に原因する健康被害の発生のデータは全国の医療行政部門から厚生省食品保健課に集められたTable 1のような記録である。これらのデータはインターネットでも公開されており, 厚生省のホームページ (<http://www.mhw.go.jp/>) から見る事ができる。こうしたデータ形式は食中毒事故の報告としては一般的なものであ

る。例えば, 同課でまとめている食中毒全体に関する報告書も基本的に同じような形式である。

表から容易に察せられるように, こうした記録を地図にマッピングするには, 表の内容を地図システムで扱える形に整理しなければならない。1996年のデータについては, 食品保健課から一太郎で提供された被害発生報告書のデータの表現形式を一部手直ししてEXCELに蓄積し, EXCELからArcView 2にデータを渡す方式を採用した。これに対して1997年のデータは直接EXCELで提供してもらっている。

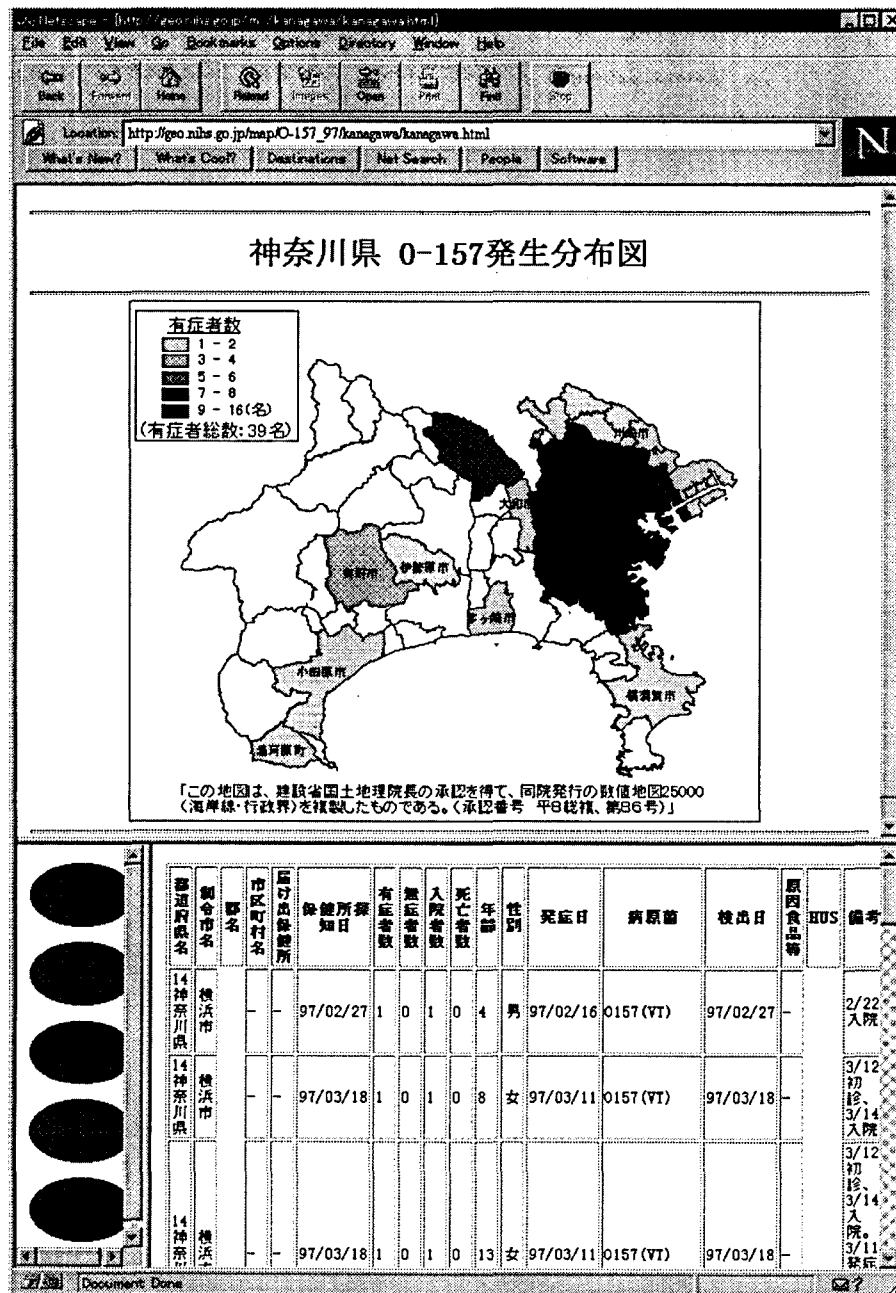


Fig. 3. Geographic Distribution of *E. coli* O - 157 patients in Kanagawa prefecture

#### 4. 結果

Fig.2はO-157の発生を都道府県別、都道府県ごとの行政区別に表示した例である。発生頻度はカラーに対応させてある。実は全国地図の上位ページには、世界地図があり、それぞれのレベルの地図は、WWW上で(GIFファイルとして)クリッカブルマップとなっている。この地図の都道府県のいずれかをクリックすると、地域別の地図が表示される。

例えばFig.2の中の一つの都道府県である神奈川県をクリックすると、Fig.3のような県内の行政区を識別できる地図の表示となる。ここで最も下位に当たる市町村地図をクリックすると、対応する発症の詳細情報が表データで表示される。これらの地図データは、最初すべてArcView2で作成され、つぎにGIFファイルに変換される。このファイルを基に、有症者数とカラーの対応などの説明部分を加えて、ブラウジング可能なWWW用のファイルが作成される。ただしFig.2で分かるように、北海道と沖縄を、うまく配置する作業がここで必要である。

この他に、月単位の累積発生数や男女別の発生数などをグラフとして表示することも試みた。

また、発症日を5日毎に区切り、日付毎の有症者別に色分けした全国地図を作成し、これらを連続表示させることでアニメーション表示も行った。この方法を用いると、一目で発症の増加の様子を理解することができる。ただし、アニメーションを見るためには、WWWブラウザ側に動画表示用のプラグイン(QuickTime Movie)が必要である。

なお日本以外のO-157の発生分布図があるのは米国(州単位,1994年)だけである。これらの地図はO-157関連の他の情報とリンクした形で、衛試のホームページから見ることができる。

Fig.3はO-157地域別の累計発症地図であり、上のウィンドウで各行政区をクリックすると、下のように表データの対応する部分が表示される。左下のボタンは上位のレイヤーに戻るためのものである。

#### 5. 考察

今回開発したシステムは、データがすでに表形式で整理されており、内容も簡単で、多少の手直しですんだこと、基本地図データの作成に(株)パスコの協力が得られたこと、インターネット関連の環境が整っていたことなどが幸いして、プロトタイプは2週間ほどで開発できた。しかし、発生件数がシステムの開発に着手した時点ですでに8000件もあり、その後も、週平均数百件、1ヶ月で数千件も増加していったため、人手による手直しをしながらのEXCELへの入力作業には多大の労力を必要とした。

また、(株)パスコに依頼した、国土地理院の地図データFDで88枚を基にした全国地図の合成と、都道府県別の切り出しも、かなりの手作業を必要とした。基本地図の作成は一

度ですむが、発生状況の更新はずっと続けなければならない。

当初は、これらの基本データが整い、EXCELにデータを入力しさえすれば、GIFファイルの作成とWWWによる提供はほとんど自動的にできると考えていた。しかし実際には大きな問題点が2つあることがわかった。

##### (1) EXCELからArcView2へのデータ変換

EXCELデータは、個別症例のデータであり、ArcView2の入力データは統計データである。統計データを地図上に表示するためには、Japanese Industrial Standards (JIS)コードが必要である。JISコードは各都道府県および各市区町村に付けられたもので、ArcView2はJISコードによって地図データと統計データを結び付ける。しかしながら、提供される個別症例にはJISコードは付いていないので、EXCELデータから都道府県及び市区町村毎に有症者数を集計し、JISコードを付加する必要があるが、ここで、提供されるEXCELデータの住所の記述方法に統一がとられていないという問題点がある。すなわち個別の症例データは、各都道府県から厚生省に報告があったものをまとめたものであるため、都道府県毎(あるいは保健所毎)に異なった住所の記述方法がとられているのである。市区町村行政区の地図を作成するためには、市区町村名までの記述を必要とするが、中には郡名だけ、あるいは管轄の保健所名だけというものも少なくない。このような場合、JISコードの付加が難しくなる。データを自動作成するためには、まず元となるデータの住所の記述方法を統一する必要がある。

##### (2) ArcView2から地図のGIFファイル作成

地図をWWW上で表示するには、画像データとしてGIFファイルを作成しなければならない。しかし、ArcView2から直接GIFファイルを作成する方法はない。現在はArcView2から地図をビットマップファイルとして作成し、変換ツールを用いてGIFファイルを作成している。地図を自動作成するには、ArcView2から直接GIFファイルを生成する方法を開発する必要がある。

また、上の2つの問題点とは別に、クリッカブルマップ作成のための座標入力という問題点もある。ただし、これは最初に作成しておけばよく、更新のたびに変更する必要はない。

クリッカブルマップを作成するためにはGIFファイルの領域と、クリックした時のリンク先を指定しなければならない。GIFファイルの領域の指定は、任意の形状の各頂点の座標を羅列する必要がある。全国地図上で、各都道府県をクリックし、それぞれの都道府県の詳細な地図を表示するためには、全国地図の各都道府県の境界線の座標列を記述しなければならない。現在は、クリッカブルマップ作成のためのツールを使い、おおまかな境界線を手で入力し



ているが、全国地図だけでなく、各都道府県の行政区を入力するとなると、大変な手間となる。Arc View 2の数値地図データから自動的に作成する方法を考える必要がある。

上記のような問題は残されているが、1996年10月正式に公開してより、WWW上に置かれたO-157の発生状況地図へのアクセスは、衛試のホームページでも常にトップに位置するほど反響があった。また、学校や県の食品安全指導に当たっている関係者、企業の保健関係者からは役に立っているという便りが届いている。また、研究者からは同様な地図を作成したいという問い合わせもある。

なお今回は、「被害地図を作成してWWWで見られるようにする」ことを優先したため、疫学的な参考資料となるようなまとめ方や、方法についてはほとんど検討していない。英語版の作成も含めて、これらも今後の課題である。

## 6. おわりに

O-157による患者発生状況の分布図作成を例として、ArcView 2を用いた健康被害地図作成について報告した。今回開発したシステムと、データ処理の手順は、O-157以外の食中毒や、その他の健康被害についても適応可能であり、モデルシステムになると考える。インターネットのWWWによる情報提供は、情報流通の手段として強力であり、今後より広く使われるようになると思われる。

最後に、この地図の作成は「基盤的な道具を用意することが個別問題への対応、とくに健康危機管理に迅速に対応するには絶対に必要である」ことを証明したいと考え着手したが、地図データの作成にはどんなに早くても数週間

かかる。また、国土地理院の地図をインターネット上に提供するには同院の許可が必要であり、これにも少なくとも1ヶ月かかる。したがって、こうした基盤がなく、われわれのような地図を作成し、一般に提供するには少なくとも2ヶ月はかかる。これではとても緊急時の対応にならない。この意味で、われわれの考えの正しさは証明できたと考える。その後、国立予防衛生研究所(現・感染症研究所)の感染症情報センターが発足したが、現在はその関係者と話し合い、準備が整い次第この仕事を移管することになっている。

## 謝 辞

今回用いた地図情報システムは、平成7年度に実施した環境庁地球環境研究総合推進費、またデータ作成の一部は科学技術庁省際ネットワーク研究「生体影響物質データベース」の研究費によっている。またO-157のデータは厚生省食品保健課(江島氏)から提供されたものを用いた。データの更新は村瀬尚子さんに協力して戴いた。ここに感謝する。

## 文 献

- 1) 中田, 中野, 神沼: 国立衛生試験所における情報と計算のための基盤環境(NICI), 衛生試報, 114, 53~61 (1996)
- 2) 神沼, 中田, 中野, 五十嵐, 石川, 燕山: インターネットによる情報提供のための基盤システムの開発, 衛生試報, 114, 62~70 (1996)
- 3) 厚生省生活衛生局食品保健課編: 全国食中毒事件録, p.61 (平成6年)

## WWWによる国際化学物質安全性カード (ICSC) 日本語版の提供

山本 都<sup>#</sup>・横手 規子・森田真理子・中野 達也  
石川 恵司・神沼 二真

## Dissemination of the Japanese version of the International Chemical Safety Card (ICSC) on the World Wide Web (WWW)

Miyako Yamamoto<sup>#</sup>, Noriko Yokote, Mariko Morita, Tatsuya Nakano,  
Keiji Ishikawa and Tsuguchika Kaminuma

We set up the World Wide Web (WWW) homepage of the Japanese version of the International Chemical Safety Cards (ICSC). We prepared the Japanese text files of ICSC, converted them into HTML files and also prepared the dictionary database for the retrieval system, using programs which we developed. These programs shortened the time of work remarkably. 2D-and 3D-structures of chemicals were also incorporated in each ICSC page. Approximately 900 ICSCs in Japanese are provided at the moment on the homepage.

**Keywords**: ICSC, chemical safety, World Wide Web, Internet  
(Received May 30, 1997)

## はじめに

IPCS (国際化学物質安全性計画) が各国の協力のもとに作成している国際化学物質安全性カード (ICSC) は, 化学物質に関する情報をわかりやすい形で伝えることによって事故や健康被害を防止する目的で作成されている。利用対象は, 化学工場などの現場や日常生活の中で化学物質を取扱っていてかつ化学や毒性の専門家でない人々および開発途上国の人々である。毎年各国がそれぞれ約20物質の原案 (英語) を分担して作成し全体の検討会議を経て最終的な ICSC となる。日本では国立衛生試験所化学物質情報部が担当機関となっている。

ICSC の各国での利用をはかるためにはそれぞれの国の言語への翻訳が必須である。現在, 10ヶ国語以上への翻訳が進行中あるいは予定されている。われわれはこれまでに約900物質の ICSC についての日本語訳を終了し<sup>1)</sup>, 本として第1集 (1992年) および第2集 (1994年) を出版した<sup>2,3)</sup>。現在第3集を準備中である。しかし一方でここ1~2年の間に日本でもインターネットによる情報提供が急速に進みつつある。ICSC 日本語版もより広い普及を目的としてインターネット (WWW) による提供を開始することとした。

WWW 上で見られるようにするためには約900物質についてのテキストファイルを HTML ファイルに書き換える

必要がある。ICSC 数は今後も増えることが予想されるため, HTML ファイルへの自動変換ソフトや辞書データベースの作成ソフトを開発するなどできるだけ作業をパソコン上で自動化できる方法を考えた。また WWW での提供にあたっては, 引用文献や構造 (2次元および3次元) を付加した。これらについて報告する。

## 方法および結果

## 1. 使用した市販ソフトウェア

(1) Microsoft Access 95, (2) Microsoft Excel 95, (3) ChemDraw Pro Ver. 3.5.1 (Cambridge Soft), (4) Chem 3 D Pro Ver. 3.5 (Cambridge Soft), (5) ChemWeb Ver. 3.1.4 (Soft Shell)

## 2. 翻訳原稿

IPCS から提供された英語の ICSC テキストファイル (サブファイル) を翻訳原稿とした。著作権は, 英語版は IPCS, 翻訳版は各国の ICSC 担当機関に属することになっている。

## 3. WWW による ICSC の提供様式

ICSC の記載項目には, 物性, 危険性, 許容濃度, 短期・長期暴露影響, 急性症状, 応急処置, 環境データ, 火災・爆発などがある。印刷物の場合は英語版, 日本語版共に1化合物につき2ページに, 項目ごとに区割りした表形式でデータを記載している (図1)。これは必要な情報を一目で理解しやすくするためである。しかし表形式ではスペースがないため引用文献は記載していない。これに対し原

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed: Miyako Yamamoto; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo 158, Japan; Tel: 03-3700-1141ext. 337; Fax: 03-5717-7180; E-mail: yamamoto@nihs.go.jp

ICSC 番号 [0529]			
シュウ酸: OXALIC ACID CAS 番号 [144-62-7] Ethanedioic acid RTECS 番号 [RO2450000] C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O <sub>4</sub> /(COOH) <sub>2</sub> ICSC 番号 [0529] 分子量: 90.0 国連番号 [2923] EC 番号 [607-006-00-8]			
災害/曝露のタイプ	一時災害/急性症状	予防	応急処置/消火薬剤
火災	特定の条件下で可燃性。火災時に有毒なフェュームを放出する。	裸火禁止。酸化物質との接触禁止。	粉末消火薬剤、水溶性液体用泡消火薬剤、水噴霧、二酸化炭素。
爆発			火災時: ドラム缶などに水を噴霧して冷却する。
身体への曝露		粉塵の拡散を防ぐ! 作業環境管理を厳密に! 青少年、小児への曝露を避ける!	いずれの場合も医師に相談!
吸入	鼻やのどの灼熱感、咳、息苦しき、咽頭痛: 遅れて現われる症状: 「注」参照。	局所排気または呼吸用保護具。	新鮮な空気と安静。半座位。必要な場合には人工呼吸。医療機関に連絡。
皮膚	発赤、皮膚熱傷、痛み、水疱。	保護衣。	汚染された衣服を脱がせる。多量の水かシャワーで皮膚を洗い流す。医療機関に連絡。
眼	発赤、痛み、眼のかすみ、視力喪失、重度の熱傷。	顔面シールド、または、粉末の場合には呼吸用保護具と眼用保護具の併用。	数分間多量の水で洗い流し(できればコンタクトレンズをはずして)、医師に連れて行く。
経口摂取	灼熱感、しびれ、咽頭痛、嘔吐、ショック、腹痛。	作業中は飲食、喫煙をしない。	口をすすぐ。安静。医療機関に連絡。
漏洩物処理		貯蔵	包装・表示
こぼれた物質を内側をプラスチックで覆った容器内に掃き入れ、残留分を多量の水で洗い流す。(特別個人用保護具:P2有害粒子用フィルター付マスク)。		強塩基、酸化物質、食品や飼料から離しておく。涼しい場所。乾燥。換気の良い場所に保管。	食品や飼料と一緒に輸送してはならない。 UN Haz. Class [国連危険物分類]: [8] UN Subsidiary Risks [国連の副次的危険性による分類]: [6.1]
物理的状态/外観: 無色で吸湿性の結晶または白色の粉末。 物理的危険性: 化学的危険性: 高温面あるいは炎に触れると分解してギ酸および一酸化炭素を生成する。水溶液は中程度の塩酸である。強酸化剤と激しく反応し、火災や爆発の危険をもたらす。ある種の銀化合物と反応し、爆発性のしゅう酸銀を生成する。 許容濃度: TLV: 1 mg/m <sup>3</sup> (TWA として); 2 mg/m <sup>3</sup> (STEL として) (ACGIH 1990-1991) 曝露の経過: エアゾルの吸入、もしくは経口摂取により体内に吸収されることがある。 吸入の危険性: 20℃ではごくわずかしが酸化しないが、粉末の場合は浮遊粒子が急速に有害濃度に達することがある。 短期曝露の影響: 腐食性、眼、皮膚、気道に対して腐食性を示す。経口摂取すると腐食性を示す。エアゾルを吸入すると肺水腫を起こすことがある(「注」参照)。腎臓に影響を与えることがある。許容濃度を超えると、鼻出血、頭痛、痙攣を起こすことがある。死に至ることがある。医学的な経過観察が必要。 長期または反復曝露の影響: 反復または長期にわたる皮膚との接触により皮膚炎を起こすことがある。腎臓に影響を与え、結石を生じることがある。 物理的性質: 昇華点: -157℃ 融点(分解): 189.5℃ 比重: 1.9 水への溶解性: 溶ける (8.34g/100ml, 20℃) log Pow (オクタノール/水分配係数): -0.7 (概算値) 環境に関するデータ: 環境毒性: 注: ・肺水腫の症状は2~3時間経過するまで現れないことがしばしばあり、安静を保たないと悪化する。したがって、安静と経過観察が不可欠である。 ・Transport Emergency Card [輸送時応急処置カード]: Tec(R)-80G38			
1991.10			

Fig. 1. International Chemical Safety Cards (ICSC) (Table format)

案作成時や全体の検討会議では、各データを順番に並べたテキスト形式(サブファイル)を用いており、これには引用文献番号も付記されている。WWWで提供する場合はスペースの制限がないので、引用文献を付記したテキスト形式で提供することとした。

4. ICSCの日本語テキストファイルの作成(翻訳)

ICSCでは、(1)文章の整合化、(2)パソコンで作成しやすくする、(3)各国語への翻訳を容易にする等の目的から、使用頻度の高い単語や文章について標準語句を設定し、それぞれに固有の5桁の番号を付けている。そこで既に報告したように<sup>1)</sup>、まずAWK言語を用いて標準語句自動変換ソフトを開発し、英語の標準語句を同じ番号の日本語標準語句に自動変換した。数値データはそのままコピーされる。さらに標準語句以外の語句の翻訳、語句の順序の並べ替えなどをして日本語テキストファイルを完成させた。

標準語句自動変換ソフトを使用することにより、それ以前と比べて翻訳時間が大幅に短縮すると共に、数値の入力ミスがなくなった。

5. ICSC日本語版のWWWによる提供

ICSCをWWWで提供するための作業を図2に示した。

5-1 テキストファイルからHTMLファイルへの変換

日本語版ICSCをWWW上で見られるようにするためには、テキストファイルをHypertext Markup Language (HTML)ファイルに変換する必要がある。しかし現時点で約900物質ある日本語テキストファイルをひとつずつHTMLファイルに書き換えるのは非常に労力を要する作業である。したがって、大量のICSCテキストファイルをパソコン上で自動的にHTMLファイルに変換できるソフトをPERL言語を用いて開発した。これにより、約900個の日本語テキストファイルが10秒程度でHTMLファイルに変換された。

これらのHTMLファイルはUNIXのWWWサーバー上に置いた。

5-2 ICSCホームページ画面の作成

ICSCホームページのURLは、http://www.nihs.go.jp/ICSC/である(図3)。ホームページ画面から目的の物質を探す

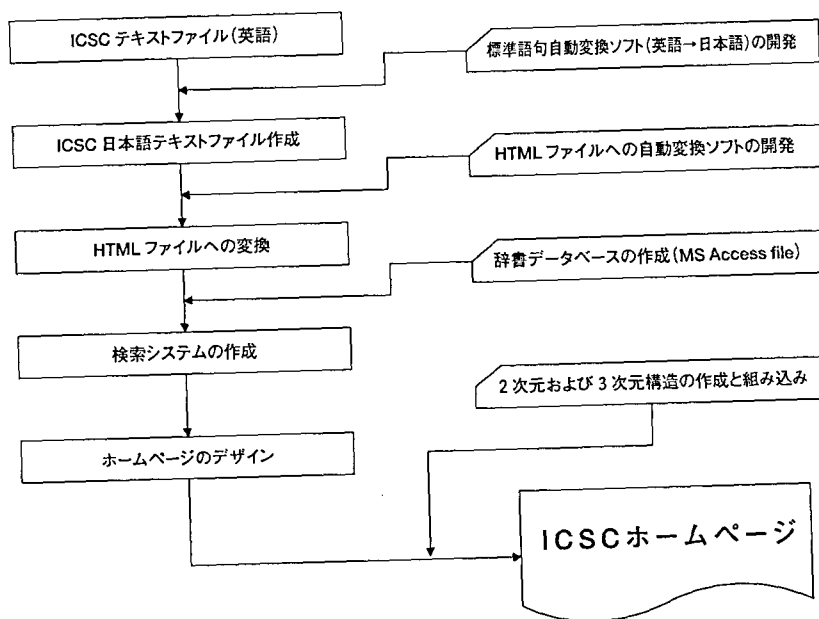


Fig. 2. Flow chart to prepare the web homepage of ICSC

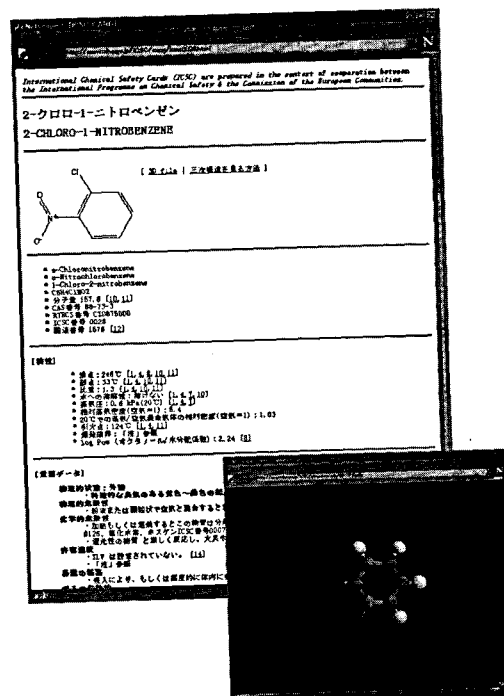
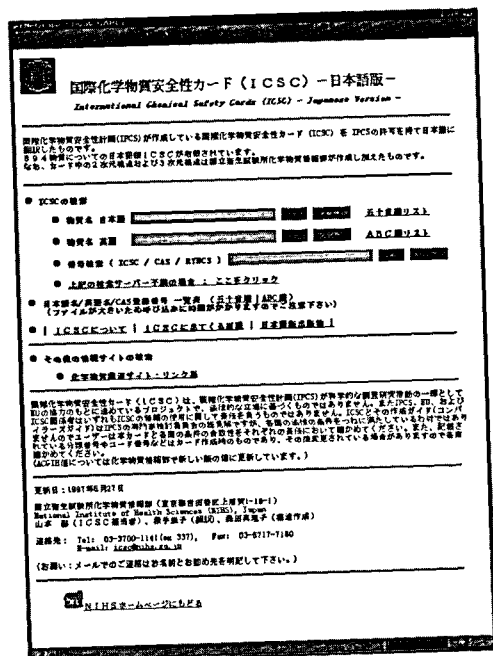


Fig. 3. ICSC homepage on the Internet

Fig. 4. ICSC page of each chemical and its 3-D-structure

方法として、検索システム（検索画面）および物質リストの2種類を用意した。すなわち、検索画面では日本語名、英語名、CAS番号等を入力フィールドに入力し検索ボタンを押すと、目的の物質のICSC画面が開く。CAS番号が不明の場合や正確な物質名がわからない場合は、検索画面にこれらを入力できないので、物質の五十音順リストおよびABC順リストから選択できる画面も併設した。

ホームページ画面にはこの他、ICSCプロジェクトの説明、使用されている用語の解説、出版物の案内、化学物質に関する他のWebサイトへのリンクなどを掲載した。

### 5-3 WWW上における検索システムの作成

Windows NT サーバー上に Microsoft Access ファイルの辞書データベースを置いて WWW 上から検索できるようにした。辞書データベースの作成方法は次のとおりである。

まず約900のICSCテキストファイルから日本語化合物名、英語化合物名（別名も含む）、CAS登録番号、RTECS番号、ICSC番号等を自動的に抜き出し Microsoft Excel ファイルを作成するソフトを PERL 言語を用いて開発した。この Excel ファイルをさらに Microsoft Access ファイルに変換し、検索用辞書データベースとした。さらに WWW 上で化学名や CAS 番号などからこの辞書データベースを検索するのに必要ないくつかのファイル (elist.htx, elist.idc, ename.htx, ename.idc, number.htx, number.idc 等) を作成し、辞書データベースと共に Windows NT サーバー上に置いた。

### 5-4 各物質の ICSC 画面

それぞれの物質の ICSC 画面 (図4) は、項目ごとにデータを並べたテキスト形式にし、各データのうしろに引用文献番号を付記した。また、この番号をクリックすれば文末の引用文献リストの該当番号にページがとぶようにした。

### 5-5 2次元および3次元構造の作成および ICSC 画面への組み込み

ChemDraw で2次元構造を作成し (ファイル名:\*\*\*.chm), これを ChemWeb で gif ファイル (2次元) に、Chem 3D で pdb ファイル (3次元) にそれぞれ変換した。

図4の各物質の WWW 画面からその物質の2次元および3次元構造が見られるように、各 ICSC の HTML ファイ

ルに gif ファイルおよび pdb ファイルを組み込んだ。gif ファイルはそのまま誰でも画面から見るができるが、pdb ファイルを見るには WWW ブラウザーに Chemscape Chime をプラグインしておく必要がある。Chemscape Chime を使ったことのないユーザーでも容易にプラグインして ICSC 画面から3次元構造を見ることができるようになるため、「3次元構造を見る方法」のマニュアルを作成し、画面上に組み込んだ。(図4)

現時点で構造を組み込み済みの ICSC はまだ約20%であるが、今後順次追加予定である。

## 考 察

### 1. ICSC ホームページの利用度と WWW による提供の利点

ICSC ホームページは、1995年末に数十物質の ICSC を掲載して試験的に開設して以来、物質数を増やし検索機能などを充実させて現在に至っている。1997年5月には現時点で IPCS から翻訳用に提供されている約900の ICSC すべてが完了した。

WWW 上で各種化学物質の物性や毒性情報を検索できるページは米国にはいくつもある。主なものは、NTP テクニカルレポート、NTP Chemical Health & Safety Data、ATSDR ToxFAQs、各種 MSDS などである。しかし現時点ではこれに類する日本語ページはほとんどなく、ICSC ホームページの他には同じく国立衛生試験所化学物質情報部が提供している環境保健クライテリア (EHC) の日本語抄録 (40物質)、中毒情報 (山口大学医学部付属病院) などきわめてわずかである。ICSC は物質数が約900と多いこともあり、外部機関からの ICSC ホームページへのアクセス件数は表1に示したように、毎月増加の傾向を示している。

印刷物と WWW による提供はそれぞれ特徴がある。印刷物の利点は、誰でも簡単に利用できるいろいろな場所への持ち運びが容易な点である。WWW は利用者数が急増してはいるものの現在まだ誰もが利用できるところまでは至っていない。一方、WWW での情報提供は迅速さが大きな特徴であり、情報内容の訂正や更新に即座に対応できる。このように印刷物と WWW はその特徴の違いから互いに補完する関係にあり、ユーザーは各自の状況に応じて両者を使い分けることになろう。

### 2. ICSC 作成方法の利点

化学物質を取扱う人への情報提供を目的として、わが国では1993年4月より MSDS (化学物質安全性データシート) の作成に関する行政指導が実施されている。これに伴い多くの化学品メーカーや試薬会社などが MSDS を作成しているが、ICSC の作成方法は MSDS の作成に際して参考になる部分が多いと考えられる。特に固有の番号 (ICSC の場

Table 1. Access log of ICSC homepage

	1996							
	Jan.	Feb.	Mar.	Apr.	May	June	July	Aug.
Access Log	139	226	331	299	317	299	369	474
	1996				1997			
	Sep.	Oct.	Nov.	Dec.	Jan.	Feb.	Mar.	Apr.
Access Log	523	746	1041	968	1146	1349	1252	1470

合は5桁の番号)を付けた標準語句の存在は文章の整合化をはかるだけでなく、その後のさまざまな作業過程においてパソコンによる自動化を可能にする。

ICSCの場合、翻訳、HTMLファイルへの書換え、辞書データベースの作成といった作業を新たに開発した3種類のソフトで自動的に行わせることによって、時間と労力を飛躍的に少なくすることができ、また手作業による入力ミスを防止することができた。ICSCが1988年の作成開始に先だち設定した標準語句という「作戦」が、おそらく当初の予定にはなかったであろうインターネットによる提供のための作業にも非常に有効に生きたことになり、プロジェクト開始の際のプランニングがいかに重要であるかについてのいい例となろう。

## 文 献

- 1) 山本都ら：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，衛生試験所報告第112号，p.143，(1994)
- 2) 国際化学物質安全性カード（ICSC）日本語版，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）
- 3) 国際化学物質安全性カード（ICSC）日本語版第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）

IPCS からコメントを依頼された環境保健クライテリア (EHC)  
のドラフトについて (1996年度)

大竹千代子\*

First Drafts of the Environmental Health Criteria (EHC) Circulated for  
Comments by IPCS in 1996.4~1997.3.

Chiyoko Ohtake\*

Summaries of the first draft of Environmental Health Criteria (EHC), which were circulated for comments by IPCS in the period of 1996.4~1997.3, are presented. EHC drafts on 9 compounds were received in this period.

**Keywords:** EHC, IPCS

(Received May 30, 1997)

はじめに

1996年4月から1997年3月末までに、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9件あった。例年通り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)

**No.1 Tris-(2-butoxyethyl)phosphate** (1996/4/23)  
(化学式:  $C_{18}H_{39}O_7P$ , 分子量: 398.54)

Tris-(2-butoxyethyl) phosphate (TBTP) はラバーやプラスチックの可塑剤や難燃剤として、またラッカーや床仕上げ剤として利用されている。世界の生産量は他のリン酸エステルより多くはない。ヨーロッパの生産量は、年間1,000トンより少ないと推定されている。

TBTP は環境中に人間活動の結果として検出される。環境中での分布量は、300ng/l は越えることはない。魚類からは検出されていない。TBTP は一般の大気汚染物質ではないが、室内の微量粒子中などからも検出されている。ヒトへの暴露の量的な推定はないが、TBTP が ppb レベルでヒトの脂肪組織中から検出されている。

水生生物への毒性は弱く、ミジンコに対する48時間  $LC_{50}$  は75mg/l, Pimephales に対する96時間  $LC_{50}$  は16mg/l である。

急性毒性、皮膚および目の刺激は弱い。単回投与による

神経毒性は、10,000mg/kg 体重まで影響がない。脳のアセチルコリンエステラーゼと血液ブチルコリンエステラーゼはわずかに抑制される。

ラットの神経毒性影響は一律ではない。反復強制経口投与された動物には可逆的な神経毒性がみられた。短期投与試験では、肝臓における弱い変化と、Sprague-Dawley ラットの焦点性心筋炎が促進される可能性が含まれている。

長期毒性と発がん性の研究はないが、変異原性に関するバクテリアと哺乳類の細胞テストでは陰性であった。(原著45 ページ)

**No.2 Tris-(2-ethylhexyl) phosphate** (1996/4/23)  
(化学式:  $C_{24}H_{51}O_4P$ , 分子量: 434.64)

Tris-(2-ethylhexyl) phosphate (TEHP) は引火性のない、無色の液体であり、水溶解性は低い。蒸気圧が低いために、PVC やセルロースアセテートの可塑剤や難燃剤としてあるいはまた溶剤として利用される。世界の生産量は年間1,000~5,000トンと推定されている。

TEHP は生産と利用の際に少量環境に放出される。大気中では検出されず、室内で10ng/m<sup>3</sup>以下の濃度で検出されている。汚染された河川水中からは、2,000ng/l, また底質中から2~70ng/g 乾燥重量以下の濃度が検出されている。TEHP は天然水中で急速に生分解されるが、活性汚泥による試験結果ははっきりしない。

TEHP の急性水生毒性は弱い。バクテリアに対する  $IC_{50}$  は100mg/l より大であり、ゼブラフィッシュに対する96時間  $LC_{50}$  は100mg/l より大きい。TEHP は哺乳類に対しては弱い急性毒性を示し、経口  $LD_{50}$  は10,000mg/kg 体重以上である。ウサギに対しては、皮膚に弱い紅斑および目に弱い結膜炎を起こす。

\* To whom correspondence should be addressed: Chiyoko Ohtake; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo, 158, Japan; Tel: 03-3700-1141 ext 361; Fax: 03-3700-7592; E-mail: ohtake@nihs.go.jp

13週間にわたるラットの経口試験では、4,000mg/kg 体重、ウサギでは8,000mg/kg 体重までは、体重のわずかな減少以外の影響は見られなかった。ウサギに対する20日間の0.1mlの皮膚試験では、全身性の毒性は見られなかった。3ヶ月間の吸入試験では、イヌとサルに対して85.0mgTEHP/m<sup>3</sup>までの濃度では生物化学的および血液学的な影響が見られなかった。イヌの肺には弱い炎症があらわれ、濃度に依存して、訓練の際の条件反射が悪化することが分かった。顕微鏡による所見では、モルモットに対し1.6あるいは9.6mg/m<sup>3</sup>の濃度では、腎細胞の可逆的な変化が見られた。THEPの慢性毒性と発がん性は、メスのマウスに肝細胞がんが1,000mg/kg 体重の濃度で増加した。

メスのマウスに投与したTEHPの結果から判断して、TEHPはヒトの発がん性ありとする評価の妥当性は疑わしい。(原著 37ページ)

### No. 3 Carbon tetrachloride (四塩化炭素) (1996/4/23)

(化学式：CCl<sub>4</sub>, 分子量：153.8)

四塩化炭素は透明で特徴的な甘い臭いを伴った、揮発性の液体である。ほとんどの脂肪族溶剤には溶け、それ自体強力な溶剤である。環境に存在する四塩化炭素の大部分は人為的起源による。CFCs類および他の塩素炭化水素の生産に利用されている。世界の生産量は1987年には96万トンであった。しかし、1990年以来、CFCsの段階的廃止の目的により、生産および使用は減少している。

一般人の四塩化炭素の空気、食品および飲料水からの暴露量は一日あたり1μg/kg 体重と推定されている。

四塩化炭素はヒトと動物の呼吸器系と消化器系から吸収され、皮膚からの吸収は低い。吸収後は全身に分布し、特に肝臓、脳、腎臓、筋肉などに高い濃度で蓄積する。

酸化的な生物変化では、ホスゲンを産生する反応性の高いtrichloro-methylperoxylラジカルを形成する過程が重要である。

14日間の腹腔内投与によるLD<sub>50</sub>は、イヌの場合は2,391mg/kg 体重と弱く、ラットでは2,821~6,603mg/kg 体重であった。経口によるラットの12週間のNOAEL (5日/週)は1mg/kg 体重であり、マウスでは90日間試験によるNOAELは1.2mg/kg 体重であった。吸入によるラットの6ヶ月試験ではNOAELは32mg/m<sup>3</sup>であり、肝臓の形態変化に基づくLOAELは、63mg/m<sup>3</sup>であった。他に、ラットの90日試験によるNOAELが、6.41mg/m<sup>3</sup>と報告されている。

ラットの2年間の長期毒性試験では、200mg/kg 体重の濃度で経口投与された結果、13ヶ月を過ぎると慢性呼吸器疾患のために生存率が著しく低下することが特筆されるべき点である。

結論として、ラットに対し、母体毒性が観察された用量

では胎児毒性と胎児死亡を引き起こす。

マウスとラットに対して行われた試験では肝細胞がんを誘発する。

ラットに対して四塩化炭素を12週間経口投与した結果、NOAELは1mg/kg 体重となり、これを基に1,000の不確定係数を用いて、TDIとして0.71μg/kg 体重の値が得られたが、これは控えめな見積もりである。(原著 108ページ)

### No. 4 Copper (銅) (1996/4/23)

(元素記号：Cu, 原子量：63.55)

銅は周期率表のグループIBの元素であり、天然に元素の形態で存在し、第一銅イオンは水溶液中で第二銅イオンと元素の銅を形成し、塩化第二銅のような不溶性の化合物を作る。

天然起源の銅は火山、植物の腐敗、森林火災および海のしぶきなどからである。人工的な放出は製錬所、鋳造所、発電所および自治体の焼却場からの燃焼発生源である。大気への主な銅の放出は銅精練所からである。

大気中の銅濃度は上記の施設等との近接の程度に依存する。平均濃度は農村地区で5~50ng/m<sup>3</sup>、都市地域では20~200ng/m<sup>3</sup>ある。表層水では0.5~1,000μg/lであり、中間値は10μg/lである。海水中の濃度は1~5μg/lである。汚染されていない陸水の底質では800~5,000mg/kg 乾燥重量、海の底質では2~740mg/kg である。

さまざまな銅塩類の経口急性毒性は範囲が広く、LD<sub>50</sub>は15~1,664mgCu/kg 体重であり、もっとも溶解性の高い塩類は毒性も高い。ラットは家畜に比較して銅に対し耐性が強い。銅毒性の特徴は、唾液の過多、嘔吐、下痢、胃の出血、心拍数の増加、低血圧、溶血発症および痙攣などである。経皮暴露によるラットおよびマウスのLD<sub>50</sub>はそれぞれ1,124, 2,058mg/kg 体重以上であった。

ラットおよびマウスに対する経口長期毒性として、成長遅延が138mgCu/kg 体重/日および1,000mgCu/kg 体重/日でみられ、NOELはラット、マウスのオスおよびメスでそれぞれ17,44および126mgCu/kg 体重であった。その際、肝臓の炎症と腎尿細管上皮の変性がみられた。

ヒトへの影響は、一般人にはほとんど見られないが、職業暴露は知られている。銅と銅塩類は人によっては皮膚接触アレルギーを起こす。また、銅を含んだ埃、蒸気、煙およびスプレーの吸入によって肺が暴露され、肺や体内に摂取され、蓄積される。(原著 182ページ)

### No. 5 「IPCS Guidelines for Strengthening National Capabilities for Chemical Safety」(化学物質安全性に対する国家能力の強化に関するIPCS指針) (1996/6/20)

目次の概略

第1章

化学物質安全性計画の進展と更新に関するガイドライン



- 1.1 化学物質のマネージメント
- 1.2 各国相互の協力
- 1.3 化学物質の情報
- 1.4 化学物質によるリスクの確認と評価
- 1.5 リスクマネージメント
- 1.6 事故と緊急時のマネージメント
- 1.7 リスクコミュニケーション, 教育および一般への周知

## 第2章

### 途上国と国際機関のプログラム, 支援および責任

- 2.1 途上国のニーズ
- 2.2 国際機関の責任
- 2.3 各国政府の責任
- 2.4 産業界の責任
- 2.5 IFCS (化学物質の安全性に関する政府間フォーラム)の優先的な行動計画

#### No. 6 Zinc (亜鉛) (1996/6/25)

(元素記号: Zn, 原子量: 65.38)

亜鉛は原子番号30, 原子量が65.38の光沢のある白い金属である。2価の化合物を作る。反応性に富み, 強アルカリに溶ける。ほとんどの岩石, 鉱物は多量の亜鉛を含む。商業的には閃亜鉛鉱 (ZnS) が重要な鉱物である。1994年の世界の亜鉛生産量はおよそ709万トンであり, 亜鉛金属の消費量はおよそ690万トンである。亜鉛は他の金属の塗装, ダイカスト, 建設業および合金などに広く利用されている。

自然放出の大部分は侵食によるものである。大気への放出の主なものは燃焼放出と森林火災による。亜鉛の人為的放出量は自然による量をはるかに越え, 亜鉛精錬, 生産施設, 亜鉛を含んだ原料の処理, 石炭や化石燃料の燃焼, および廃棄物焼却場などが主な発生源である。

生物以外のサンプルでは, 淡水中に $<0.1\sim 40\mu\text{g/l}$ , 土壌中に $10\sim 300\text{mg/kg}$  乾燥重量, 底質中に $95\text{mg/kg}$  乾燥重量以下, 大気中には $300\text{ng/m}^3$ 以下である。人為的に汚染されたサンプルでは, 亜鉛の濃度は水中で $4\text{mg/l}$ , 土壌中で $29\text{g/kg}$ , 最高 $118\text{g/kg}$ , 大気中では $8\mu\text{g/m}^3$ であった。

勧告された亜鉛の一日許容摂取量は, 大人が $15\text{mg}$ , 妊婦および授乳婦が $20\sim 25\text{mg}$ である。一日当たり摂取量は $4.7\sim 18.6\text{mg/日}$ であり, 飲料水からの平均摂取量は $0.01\text{mg/日}$ と推定されている。

げっし動物への急性毒性は低く,  $\text{LD}_{50}$ は $60\sim 600\text{mg/kg}$  体重であり, 毒性は亜鉛塩の種類に依存する。症状の観察されないレベルはげっし類とラットでは $200$ , マウスで $400\text{mg/kg}$  体重/日である。

ヒトの暴露は食品や飲料水中に含まれる高濃度の亜鉛や亜鉛化合物の中毒事故により, 消化器系の苦痛, 吐き気および下痢を伴って引き起こされる。死にいたる場合もあ

る。腎臓透析患者が水道管の亜鉛に暴露されると, 亜鉛毒性が進む。

ヒトが $150\sim 1,000\text{mg}$  亜鉛/日を含む薬剤を長期摂取した場合, 鉄芽球性貧血, 白血球減少あるいは低色素性貧血などを起こす。 $50\text{mg/日}$ の摂取は, 血清中高密度リポ蛋白の病気の原因となる。(原著 201ページ)

亜鉛 (Zn) 追加 (ワーキンググループによる結論の要約) (1996/12/7)

- ・精製していない穀物やマメ類をベースにし, 生鮮食品の摂取量が低い国々では, 食餌の内容が改善され, 亜鉛の摂取が改善される必要がある。

- ・食餌によって得られる以上の亜鉛の摂取量の増加させるための調整食品として, 文献値の食餌による摂取量を越えないようにすべきであり, 亜鉛と銅の比率がおよそ7 (母乳中に検出されるような例) を確保できるように十分な銅を含む必要がある。

- ・亜鉛はヒトには相対的に弱い毒性であること, また, ヒトには限定された暴露源であること, の両方から, 亜鉛の本質的な特性は次のように述べるができる。正常で健康であり, 職業暴露されていない個人は, 亜鉛の環境暴露による影響よりも, 亜鉛欠乏に伴う有害な影響の方が, より大きなリスクを受ける状態にある。(追加分原著 28ページ)

#### No. 7 Methyl Tertiary-Butyl Ether (1996/7/8)

(化学式:  $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{O}$ , 分子量: 88.15)

Methyl Tertiary-Butyl Ether (MTBE) は揮発性があり, テルペンのような匂いのする無色の液体 (室温) である。粘性は低く, 沸点は $55.2^\circ\text{C}$ である。引火性があり, 空気と爆発性の混合気体を作成する。

MTBE は自然界での生成は知られていない。メタノールとイソブチレンからの触媒反応による誘導体であり, 70年代以来数ヶ国で作られ, 現在は50の高生産量化学物質に含まれる。1994年の生産量は米国で620万トンであり, 増加の傾向にある。ガソリン中のオクタン価の強化と酸素量の増加のため, また, 炭化水素, オゾン, 一酸化炭素, の大気中への放出を減らすために, 使用されている。しかし,  $\text{NO}_x$  とアルデヒドはやや増加する。

MTBE は揮発性が高く, 環境中に放出されると, 主に大気中に分布する。主な初期生成物は, 第3ブチル構造と2-メトキシ2-メチルプロパノールであり, 2-メトキシ2-メチルプロパノールとヒドロキシラジカルはさらにホルムアルデヒド, アセトンおよび二酸化炭素を生成する。

データは土壌中に限定されており, 土壌には吸収されないため土壌を通過して地下水に到達すると考えられている。56%は大気に, 43%が表層水に分布していると推定される。米国の都市の井戸のうち27%から $0.2\mu\text{g/l}$ のMTBEが検出されている。3%は $20\mu\text{g/l}$ を越えている。

急性経口毒性は弱く、ラットでは  $LD_{50}$  がおよそ 3,800mg/kg 体重であり、4時間経気暴露では、 $LC_{50}$  が 85mg/l 空気であった。ラットの 440 および 1,750mg/kg 体重の 28 日間経口試験では、一時的な流涎症、運動失調がみられ、後者の濃度の場合コレステロール濃度が著しく増加し、腎臓と肝臓の重量が増加した。

ヒトの暴露では、アラスカで 15% MTBE 添加のガソリンを冬期使用した際、頭痛、目の刺激、喉と鼻の灼熱感、悪心、嘔吐、めまいなど、健康被害が報告された。空気中濃度 6 mg/m<sup>3</sup> をヒトに 1 時間暴露した場合、弱い目の刺激があった。18.9~180mg/m<sup>3</sup> の濃度の 2 時間暴露では、極めて弱い中枢神経への影響、目の刺激、粘膜の炎症がみられた。(原著 149 ページ)

#### No. 8 Health Effects of Interactions Arising from Tobacco Use and Exposure to Chemical, Physical or Biological Agents (喫煙と化学物質、物理的因子、生物的因子との相互作用による健康影響) (1996/12/17)

タバコと、他の化学物質あるいは物理的因子の相互作用による健康への有害な影響について研究が進められてきており、多数の職業における職場の調査から、ある化学物質・物理的因子が存在する中で喫煙すると、一つは化学物質、もう一つはタバコの煙の 2 タイプの有害物質に暴露されることになり、それらの二つの相互作用も影響する。特にシガレット (巻き煙草) の喫煙は一般人のいくつかの重大な病気の主要原因となる。

このモノグラフの主な目的は、喫煙と他の薬品、化学物質、物理的・生物学的相互作用を確定することである。有害なタバコの煙と有害化学物質の相互作用は、いくつかのケースでは、摂取あるいは吸収された有害な薬品と喫煙の相互作用は報告されているが、大部分の場合は、空中輸送される有害物質に現われている。

タバコの使用は、経済収入の低い国々から高度に工業化された国々まで、世界中に広まっており、男・女、子供・大人に使用され、数百万人が無意識的に環境中のタバコの煙に曝されている。

多くの産業現場にリスクがあり、鉱山からの空中輸送される鉱物性ダスト、農業でのダストや生鮮物資を使用する産業からの生物的ダストがある。フェームは多種の産業において無機あるいは有機性の有害毒物を含むガス、スモーク、ミストおよび蒸気から成る。異常な熱や紫外線、精製におけるイオン放射や先端技術も害があるとされている。また、多くの職業で、労働者は過度の音や振動にさらされている。このような労働条件下では、快適に健康を維持するのは難しく、それらの影響は喫煙と結びつくと一層大きくなる。

このレビューにはタバコの使用 (原則的には喫煙) とそ

の他の暴露の影響の可能性に関して、ヒトのデータの文献調査が含まれている。

目次は以下の通りである。

1. 喫煙と、化学的、物理的因子および生物的ダストの双方による暴露により起こる相互作用の影響
2. 喫煙と他の化学物質の暴露からの組み合わせた健康影響
3. 別々の影響の組み合わせ：喫煙と他の化合物
4. 喫煙からの健康リスク
5. タバコとその利用の仕方 (原著 113 ページ)

#### No. 9 Dinitro-ortho-cresol (DNOC) (1997/3/31) (化学式: $C_7H_6N_2O_5$ , 分子量: 198.113)

オルトジニトロクレゾールは黄色い結晶で、馬鈴薯の葉の乾燥剤と同様に、殺うじ剤、殺卵剤および殺虫剤として用いられる。ジニトロフェノール族の代替用品である。融点は 88.2~89.9°C、蒸気圧は 25°C で  $1.6 \times 10^{-2}$  Pa である。DNOC は水には溶けにくく (20°C で 3.94g/l)、pH は 7 である。土壌中では不安定で、急速に分解される。水中での分解は遅い。

DNOC は表層水中には残留せず、半減期は 3~5 週間である。蒸気圧と水溶解性が低いために、表層水から揮発の可能性はない。土壌中の DNOC は微生物によって分解される。地下水への浸透もない。

哺乳類の代謝経路は動物種の中で定性的な類似性があるが、実験動物よりヒトの方が排泄が遅い。ヒトには蓄積性の可能性がある。ヒトへの暴露は工業および農業での使用に際して起こり、急性毒性と皮膚に濃い黄色の染みを作ることから、農作業者の皮膚接触を避けるための十分な保護服を着用する必要がある。

経口短期暴露 90 日までの試験で、ラットでは体重の減少、マウスとイヌでは食餌消費量の変化以外には影響がなかった。高濃度投与では肝臓の酵素活性が増加した。ウサギの皮膚への試験では、刺激の影響を示す紅斑、浮腫が見られた。工業用 DNOC の場合はモルモットに皮膚感作性を引き起こす。

妊娠ラットへの経口暴露試験では、25mg/kg 体重/日までの量で妊娠 6~15 日の投与では催奇形性は見られなかった。

ウサギでは 25mg/kg 体重/日で母体毒性がみられ、死に至った。この濃度で、小眼球/無眼球および水頭症/小頭症などの催奇形性が観察された。(原著 63 ページ)

#### その他の回覧

「IPCS/OECD Joint Project on the Harmonization of Chemical Hazard/Risk Assessment Terminology」(全 50 ページ)

このドラフトでは、Chemical Hazard/Risk Assessment に

用いられる“Key Generic Terms”を調査している段階である。これまでに、EHC, UNEP, ACDH, および US-EPA などの機関や出版物に、あるいは研究者によって用いられてきた用語の定義が、一つの用語に対し複数リストアップされており、その中からもっとも適したものを選び、またコメントのフィードバックを期待している。

**この1年間に出版された EHC および HSG (安全衛生ガイド)**

**EHC**

- No. 164 Methylene chloride (2nd edition)
- No. 165 Inorganic Lead
- No. 171 Diesel Fuel and Exhaust Emissions
- No. 172 Tetrabromobisphenol A and Derivatives
- No. 173 Tri (2,3 -dibromopropyl) phosphate and Bis (2,3 -dibromopropyl) phosphate
- No. 174 Isophorone
- No. 175 Anticoagulant rodenticides
- No. 177 1,2 -Dibromoethane
- No. 178 Methomyl
- No. 179 Morpholine

- No. 180 Principles and Methods for Assessing Direct Immunotoxicity Associated with Exposure to Chemicals
- No. 181 Chlorinated Paraffins
- No. 182 Thallium
- No. 183 Chlorothalonil
- No. 185 Chlorendic Acid and Anhydride
- No. 186 Ethylbenzene
- HSG
- No. 82 Carbendazim
- No. 83 Polybrominated biphenyls (PBBs)
- No. 84 Hexachlorobutadiene
- No. 86 Methyl bromide
- No. 90 Acetaldehyde
- No. 91 Isophorone
- No. 92 Morpholine
- No. 98 Chlorothalonil
- No. 99 Diflubenzuron
- No. 100 Cresols
- No. 101 Hydroquinone
- Users' Manual for The IPCS Health and Safety Guides

## 平成8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<sup>#</sup>・三島 郁子・辻 澄子・柴田 正Estimated Production by the Official Inspection of Coal-Tar Dyes  
(including Dye Aluminum Lakes) in 1996.Susumu Ishimitsu<sup>#</sup>, Ikuko Mishima, Sumiko Tsuji and Tadashi Shibata

The number of official inspection of coal-tar dyes and their lakes from April in 1996 till March in 1997 were 581 in total.

The quantity which passed inspection amounted to 164.5 ton in Japan.

The production of color in each month was summarised in Table1, and by each producing company in Table2.

The food coal-tar dye produced in the largest quantity was Food Yellow No. 4, occupying 43.4% in this period.

**Keywords :** food color, coal-tar dye, official inspection, production  
(Received May 30, 1997)

わが国の食用タール色素は、平成3年1月に食用赤色40号及びそのアルミニウムレーキが追加され、現在はタール色素12品目とそのアルミニウムレーキ8種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。

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、食用タール色素の需要の状況は、この色素が国の製品検査の対象になっていることから、明確に把握することが出来る。昨年度と比較れば検定数量および製造量は、ほとんど横這いである。

製品検査に関して平成7年度までの申請は、全て国内の製造メーカーよりのものであったが、本年度検定数量および製造量は少ないものの、イギリスで製造された黄色4号および青色1号がそれぞれ1検体製造メーカー以外の企業から申請された。今後、規制緩和が叫ばれているおりから、申請の増加が考えられる。

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医薬品、化粧品、食品の包装材料、アルミニウム食器、文具、玩具、浴用剤等に用いられるが、大部分は食品添加物として使用されている。

平成8年4月1日から平成9年3月31日までに申請された581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;10,

赤色3号;28,赤色40号;2,赤色102号;113,赤色104号;6,赤色105号;1,赤色106号;20,黄色4号;248,黄色5号;82,緑色3号;2,青色1号;31,青色2号;6,赤色3号レーキ;2,黄色4号レーキ;13,黄色5号レーキ;9,青色1号レーキ;6,青色2号レーキ;2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7年度(前年度)<sup>1)</sup>と比較すると総量では166.4トンから164.5トンとほぼ同量製造された。

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。新しく食用緑色3号が製造され,前年度製造された食用赤色40号レーキは製造されなかった。また,食用赤色2号レーキ及び食用緑色3号レーキは前年度と変わらず製造されなかった。

色素別製造量では,第1位の食用黄色4号が73トン(色素別比率43.9%)から71.3トン(43.4%),第2位の食用赤色102号は38.3トン(23.0%)から32.8トン(19.9%)と減少したのに対して,第3位の食用黄色5号は20.9トン(12.6%)から23.8トン(14.5%)と増加した。上位5色素の製造量合計は145.5トンで総製造量の88.4%であった。

製造社別では製造量の多い順にA,B,C,E,D,F社であり,平成7年度(前年度)<sup>1)</sup>の順位からE社とC社,F社とD社が入りかわった。また,昨年度申請製造社は9社であったが,本年度は11社に増加した。

製造量に関してはA社が68.3トン(製造社別比率41.5%)

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed: Susumu Ishimitsu; 1-1-43Hoenzaka, Chuo-ku, Osaka540, Japan; Tel: 06-941-1907; Fax: 06-942-0716; E-mail: ishimitsu@nihs.go.jp

Table 1. 平成8年度 食用色素月別許可量

(単位: Kg)

申請月	平成8年度												平成7年度				
	平成9年												平成8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(%)	
食用色素名	300	300	1200	2220	619.875	---	300	840	50	---	---	---	---	2469.875	1.50	1660	1.00
赤色2号	300	300	1200	2220	619.875	---	300	840	50	---	---	---	---	2469.875	1.50	1660	1.00
赤色3号	900	300	1200	2220	750	---	1730	840	840	300	850	---	---	10230	6.22	9171.95	5.51
赤色4号	---	---	90	---	---	---	---	---	---	---	220	---	---	310	0.19	565	0.34
赤色102号	1500	2850	2450	3600	860	---	2100	2100	2100	5620	2100	2100	3899.75	32779.75	19.93	38264.925	23.00
赤色104号	---	900	---	200	---	---	300	100	---	---	---	---	---	1500	0.92	2950	1.77
赤色105号	200	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	200	0.12	304.925	0.18
赤色106号	200	628	460	160	160	---	160	200	200	300	480	300	800	4648	2.83	3780	2.27
黄色4号	2570	3300	6338	2700	4925	---	9588	6288	5388	6300	7488	6288	10176	71349	43.37	72994	43.87
黄色5号	1500	1881	2090	3230	300	---	2870	1500	1800	2050	1500	1500	3600	23821	14.48	20929.925	12.58
緑色3号	---	---	20	---	---	---	---	---	---	32.5	---	---	---	52.5	0.03	0	0
青色1号	570	400	314.825	550	670	---	800	900	350	1130	450	540	600	7274.825	4.42	6241	3.75
青色2号	---	---	---	120	100	---	300	---	---	---	300	---	330	1150	0.70	710	0.43
赤色2号レーキ	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0	0	0	0
赤色3号レーキ	---	---	---	---	300	---	---	---	300	---	---	---	---	600	0.36	1504.825	0.90
赤色4号レーキ	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0	0	10	0.01
黄色4号レーキ	---	600	---	300	4.9	---	300	300	300	300	300	---	1200	3604.9	2.19	3120	1.87
黄色5号レーキ	300	300	---	---	300	---	300	---	---	300	---	600	600	2700	1.64	2400	1.44
緑色3号レーキ	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0	0	0	0
青色1号レーキ	---	300	---	---	304.875	---	300	300	---	---	---	---	300	1504.875	0.92	1800	1.08
青色2号レーキ	---	---	---	200	100	---	---	---	---	---	---	---	---	300	0.18	0	0
合計	8040	11759	12962.825	13899.875	8774.775	---	14928	11328	11328	16332.5	13688	11328	22405.75	164494.725	---	---	---
月別比率(%)	4.89	7.15	7.88	8.45	5.33	---	11.58	9.08	6.88	9.93	8.32	6.89	13.62	100.00	---	---	---
前年度合計	18850	10100	17194.675	10732.875	16341	---	6688	12817	18325	15600	17848	11820	10090	---	---	166406.55	---
月別比率(%)	11.33	6.07	10.33	6.45	9.82	---	4.02	7.70	11.01	9.37	10.73	7.10	6.06	---	---	---	100.00

Table 2. 平成8年度 食用色素月製造社別許可量

(単位：Kg)

食用色素名	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
赤色2号	900	600	600	---	300	---	---	---	---	19.875	50
赤色3号	4110	900	300	1500	2220	1200	---	---	---	---	---
赤色4号	220	---	90	---	---	---	---	---	---	---	---
赤色102号	9350	10560	4200	600	5700	1200	1169.75	---	---	---	---
赤色104号	300	900	300	---	---	---	---	---	---	---	---
赤色105号	---	---	---	---	---	200	---	---	---	---	---
赤色106号	1548	1200	900	300	---	400	---	300	---	---	---
黄色4号	31174	25200	6600	300	6900	900	50	---	225	---	---
黄色5号	10321	5400	2400	3900	1500	250	50	---	---	---	---
緑色3号	---	---	---	---	---	---	52.5	---	---	---	---
青色1号	2670	2700	900	40	300	200	30	300	70	14.825	50
青色2号	220	300	600	---	---	---	30	---	---	---	---
赤色2号レーキ	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
赤色3号レーキ	600	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
赤色4号レーキ	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
黄色4号レーキ	2700	600	300	---	---	---	---	---	---	4.9	---
黄色5号レーキ	2700	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
緑色3号レーキ	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
青色1号レーキ	1200	300	---	---	---	---	---	---	---	4.875	---
青色2号レーキ	300	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
合計	68313	48660	17190	6640	16920	4350	1382.25	600	295	44.475	100
製造社別比率(%)	41.53	29.58	10.45	4.04	10.29	2.64	0.84	0.36	0.18	0.03	0.06
前年度合計	67114	52600	13500	5591	20100	7100	257	0	0	24.55	120
製造社別比率(%)	40.33	31.61	8.11	3.36	12.08	4.27	0.15	0	0	0.02	0.07

と最も多く、ついでB社48.7トン(29.6%)、C社17.2トン(10.5%)、E社16.9トン(10.3%)であった。

#### 文 献

- 1) 石光 進, 三島郁子, 辻 澄子, 柴田 正:平成7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. 衛生試報, 114, 102~105 (1996)

## HPLCによる食用アゾ色素中の未反応原料，反応中間体および付随色素の定量法とその実態調査

石光 進<sup>#</sup>・三島 郁子・辻 澄子・柴田 正

### Determination and Survey of Starting Materials, Intermediates, and Subsidiary Colors in Food Color of Azo Dye by High Performance Liquid Chromatography

Susumu Ishimitsu<sup>#</sup>, Ikuko Mishima, Sumiko Tsuji and Tadashi Shibata

A method for determination of starting materials, intermediates and subsidiary colors in food color of azo dye was developed by use of HPLC. The following conditions were used for analysis: column, L-column ODS (4.6mmφ×250mmL); mobile phase, 0.02M ammonium acetate (A), acetonitrile (B); concentration gradient, perform the linear concentration gradient from A:B (100:0) to (60:40) for 40min; detection, starting materials and intermediates at 239nm, and subsidiary colors at 510nm.

Standard material, domestic product and imported product were analyzed by the present HPLC method and impurities were measured. Recoveries of each impurity from azo dye averaged 99.1~103.5%. The detection limit was 0.05μg/g for each impurity.

**Keywords**: azo dye, starting materials, intermediates, subsidiary colors, HPLC

(Received May 30, 1997)

#### はじめに

わが国では食用タール色素として，食用赤色40号 (allura red AC:R-40) およびそのアルミニウムレーキが追加され<sup>1)</sup>，現在はタール色素12品目と，そのアルミニウムレーキ8種が食品添加物として指定されている。

食用タール色素は，第六版食品添加物公定書<sup>2)</sup> (公定書)において含量，性状，確認試験，純度試験 (水不溶物，塩化物および硫酸塩，重金属，ヒ素，他の色素) および乾燥減量の規格値並びに試験法が定められている。この中で，R-40においてのみ純度試験として，未反応原料，反応中間体および付随色素の規格値並びに高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による試験法が設定されているが，他の11種類のタール色素には，これらの規格及び試験法が設定されていない。

HPLCを用いた食用タール色素の未反応原料，反応中間体および付随色素の分析法として，陰イオン交換カラムを用いる方法<sup>3-7)</sup>，C<sub>18</sub>カラムを用いて移動相にカウンターイオンを加えるイオンペアクロマトグラフィーによる方法<sup>8-11)</sup>および逆相系カラムを用いる方法<sup>12-15)</sup>などが報告されている。

近年，わが国では国際貿易の拡大のために諸外国との規

制の違いを調整する必要性が増大している。食用タール色素に関しても，各国で指定されている品目数が異なっており，指定されている品目でも規格が異なるため使用できないことがある。そこで，現在改訂中の第七版食品添加物公定書においてはR-40のみに設定されている未反応原料，反応中間体および付随色素の試験法を他のアゾ色素にも適用するため，個々のアゾ色素についての定義並びに限度規格の項が検討されている。

今回，食用タール色素の内R-40を含む5種類のアゾ色素について，分析法の検討を行うとともに市販品の実態調査を行った。

#### 実験方法

##### 1. 試料，製法および標品

試料：食用黄色4号 (tartrazine:Y-4) は国立医薬品食品衛生研究所標準品並びに市販国産品6社16試料，インド産品1試料およびパキスタン産品1試料；食用黄色5号 (sunset yellow FCF:Y-5) は国立医薬品食品衛生研究所標準品並びに市販国産品6社16試料およびパキスタン産品1試料；食用赤色2号 (amaranth:R-2) は国立医薬品食品衛生研究所標準品並びに市販国産品3社6試料；R-40は国立医薬品食品衛生研究所標準品並びに市販国産品3社5試料；食用赤色102号 (new coccine:R-102) は国立医薬品食品衛生研究所標準品並びに市販国産品7社17試料を用いた。

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed: Susumu Ishimitsu; 1-1-43 Hoenzaka, Chuo-ku, Osaka 540, Japan; Tel: 06-941-1907; Fax: 06-942-0716; E-mail: ishimitsu@nihs.go.jp



製法：食用アゾ色素の一般的な製法として以下に示す方法が考えられる。

R-2；ナフチオン酸 (NT) をジアゾ化し, 3-ヒドロキシナフタレン-2,7-ジスルホン酸 (RS) とカップリングさせた後, 塩析し, 精製して得られたものであり, 3-ヒドロキシ-4-(4-スルホナフチルアゾ)-2,7-ナフタレンジスルホン酸=三ナトリウム塩 ( $C_{20}H_{11}N_2Na_3O_{10}S_3$ ) を主成分とする。

R-40；p-クレシジンスルホン酸 (CSA) をジアゾ化し, シェファー塩 (SS) とカップリングさせた後, 塩析し, 精製して得られたものであり, 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)-2-ナフタレンスルホン酸=二ナトリウム塩 ( $C_{18}H_{14}Na_2O_8S_2$ ) を主成分とする。

R-102；ナフチオン酸 (NT) をジアゾ化し, 7-ヒドロキシナフタレン-1,3-ジスルホン酸 (GS) とカップリングさせた後, 塩析し, 精製して得られたものであり, 7-ヒドロキシ-8-(4-スルホナフチルアゾ)-1,3-ナフタレンジスルホン酸=三ナトリウム塩=1 $\frac{1}{2}$ 水和物 ( $C_{20}H_{11}N_2Na_3O_{10}S_3 \cdot 1\frac{1}{2}H_2O$ ) を主成分とする。

Y-4；スルファニル酸 (SA) をジアゾ化し, 5-ヒドロキシ-1-(4-スルホフェニル)-3-ピラゾールカルボン酸 (PyT) とカップリングさせた後, 塩析し, 精製して得

られたものであり, 5-ヒドロキシ-1-(4-スルホフェニル)-4-(4-スルホフェニルアゾ)-3-ピラゾールカルボン酸=三ナトリウム塩 ( $C_{16}H_9N_4Na_3O_9S_2$ ) を主成分とする。

Y-5；スルファニル酸 (SA) をジアゾ化し, シェファー塩 (SS) とカップリングさせた後, 塩析し, 精製して得られたものであり, 6-ヒドロキシ-5-(4-スルホフェニルアゾ)-2-ナフタレンスルホン酸=三ナトリウム塩 ( $C_{16}H_{10}N_2Na_3O_7S_2$ ) を主成分とする。

標品：これらの製法では不純物として, 下記の未反応原料, 反応中間体および付随色素が考えられる。

①未反応原料：ナフチオン酸 (NT), シェファー塩 (SS), 7-ヒドロキシナフタレン-1,3-ジスルホン酸 (GS), 3-ヒドロキシナフタレン-2,7-ジスルホン酸 (RS), p-クレシジンスルホン酸 (CSA), スルファニル酸 (SA) および 5-ヒドロキシ-1-(4-スルホフェニル)-3-ピラゾールカルボン酸 (PyT)

②反応中間体：6,6'-オキシビス(2-ナフタレンスルホン酸) (DONS), 7-ヒドロキシ-1,3,6-ナフタレントリスルホン酸 (TSA), 4-ヒドラジノベンゼンスルホン酸 (HS) および 4,4'-(ジアゾアミノ)-ジベンゼンスルホン酸 (DAADBSA)

③付随色素：クレシジンスルホン酸アゾ  $\beta$ -ナフトール (CSA-2N), クレシジンアゾシェファー塩 (CR-S), クレ

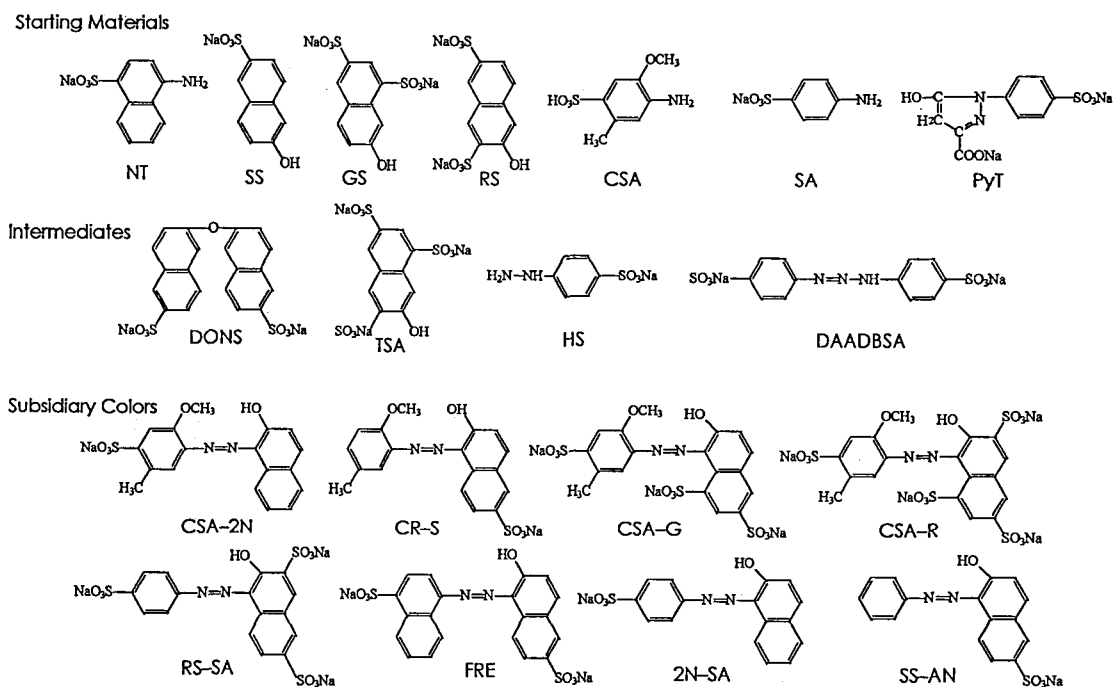


Fig. 1. Structures of Starting Materials, Intermediates and Subsidiary Colors

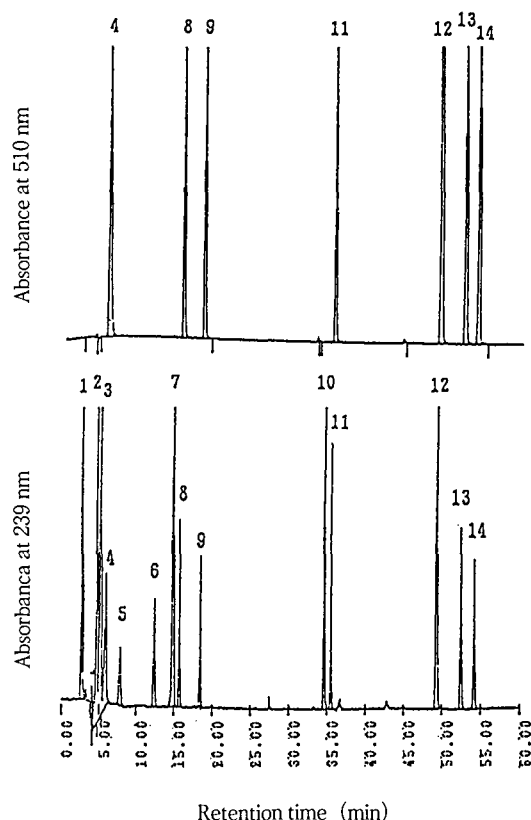


Fig. 2. Chromatogram of Starting Materials, Intermediates and Subsidiary Colors

1 : PyT + TSA	2 : GS	3 : RS	4 : RS-SA	5 : CSA
6 : DAADBSA	7 : SS	8 : CSA-R	9 : CSA-G	10 : DONS
11 : FRE	12 : 2 N-SA + SS-AN	13 : CR-S	14 : CSA-2 N	

Forty  $\mu$ l of solution containing approximately 0.2  $\mu$ g each of compounds was injected to HPLC.

シジンスルホン酸アゾ G (CSA-G), クレシジンスルホン酸アゾ R (CSA-R), 3-ヒドロキシ-4-[(4-スルホフェニル)アゾ]-2,7-ナフトレニルスルホン酸 (RS-SA), ファーストレッド E (FRE), 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 (2 N-SA) および 6-ヒドロキシ-5-(フェニルアゾ)2-ナフトレニルスルホン酸 (SS-AN)

それらの構造を Fig. 1 に示した。

## 2. 装置

高速液体クロマトグラフ：日本分光 (株) 製 880-PU 型ポンプ, 802-SC 型システムコントローラ, 851-AS 型オートサンプラー, 870-UV 型 UV/VIS 検出器, Sic 社製 Labchart 180 型データ処理器

## 3. HPLC 条件

カラム：化学検査協会製 L-column ODS (4.6mm $\phi$  × 250mmL), 移動相；0.02M 酢酸アンモニウム溶液 (A),

アセトニトリル (B), 濃度勾配；A:B (100 : 0) から (60 : 40) までの直線濃度勾配を 40 分間行い, そのまま 10 分間保持した<sup>10)</sup>. 流速；1.0ml/min, 検出波長；紫外；239nm, 可視；510nm, 注入量；40 $\mu$ l, 温度；30 $^{\circ}$ C

## 4. 試験溶液および標準溶液の調製

各試料は 24 時間硫酸デシケーターで減圧 (2.0kPa 以下) 乾燥したものを 250.0mg 量り, 0.02M 酢酸アンモニウム溶液を加えて溶解し, 全量を 100ml とした. また, 各標品は 10.0mg 量り, 0.02M 酢酸アンモニウム溶液を加えて溶解し, 全量を 100ml とした.

## 5. 検量線の作成

標準原液はそれぞれ 1.0~10.0 $\mu$ g/ml の範囲になるように, 0.02M 酢酸アンモニウム溶液で希釈し, その 40 $\mu$ l を HPLC に注入した. 検量線は各ピーク面積より絶対検量線法により作成した.

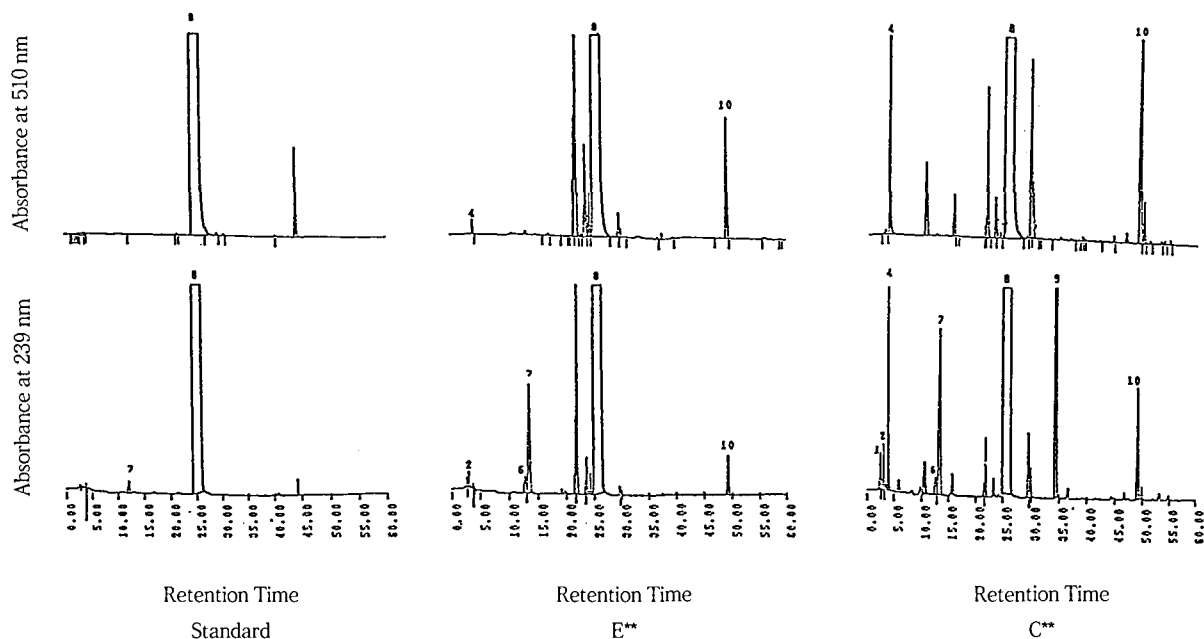


Fig. 3. Chromatograms of Standard and Commercial Sunset Yellow FCF

Peaks; 1:TSA 2:SA 3:GS 4:RS-SA 5:RS 6:DAADBSA 7:SS 8:Y-5 9:DONS 10:SS-AN+ 2N-SA

## 結果

### 1. カラムおよび溶離液の検討

公定書では、R-40の不純物分析用の充填剤として ODS を用いると記載されている。そこで、カラムとして L-column ODS および Inertsil ODS-2 (4.6mmφ×250mmL) を用いて分離能を検討した。両カラムとも良好な分離結果を示した。L-column ODS を用いて得られたクロマトグラムを Fig. 2 に示した。しかし、PyT と TSA 並びに 2N-SA と SS-AN は両カラムを用いても分離できなかった。そこで、PyT と TSA は別個に検討し、2N-SA と SS-AN は両者の総和として定量した。また、3.02分、3.22分および 8.80 分に溶出する HS, SA および NT は別個に検討した。

一方、移動相に関しては、R-40 に用いられているメタノールを溶離液としてグラジエントを行ったところ、アセトニトリルを溶離液として用いた時と比較してベースラインシフトが大きくなるクロマトグラムが得られた。

### 2. 標準品および市販品の実態調査

Y-4 は未反応原料の SA と PyT 並びに反応中間体の DAADBSA と HS、Y-5 は未反応原料の SA と SS、未反応原料夾雑物の GS と RS 並びに反応中間体の DONS, DAADBSA と TSA および付随色素の RS-SA, SS-AN と 2N-SA について検討した。また、R-2 は未反応原料の NT と RS、未反応原料夾雑物の SS と GS 並びに反応中間体の TSA および付随色素の FRE について、R-40 は公定書に記載されてい

る未反応原料の SS と CSA 並びに反応中間体の DONS および付随色素の CSA-R, CSA-G, CSA-2N と CR-S、他に未反応原料夾雑物並びに反応中間体の GS, RS と TSA について、また、R-102 は未反応原料の NT と GS、未反応原料夾雑物の SS と RS 並びに反応中間体の TSA および付随色素の FRE について検討した。

FAO/WHO<sup>9)</sup> および米国の The Code of Federal Regulations (CFR)<sup>9)</sup> の規格値と比較したところ、Y-5 において、FAO/WHO の規格では未反応原料 (SA と SS) および反応中間体 (TSA と DAADBSA) との総量は 0.5% 以下、また、CFR では反応中間体である DONS は 1.0% 以下と規定している。標準品、E 社製品および C 社製品を用いた時に得られたクロマトグラムを Fig. 3 に示した。その結果、市販品 3 検体 (C\*\* ; 1, 2 および 3) において規格の上限を越えていた (Table 1)。

また、R-102 の市販品 2 検体 (C\*\* ; 1 および 3) において、FAO/WHO の未反応原料 (NT と GS) の総量 (0.5% 以下) の規格値を上回る結果が得られた (Table 2)。

Y-4, R-2 および R-40 の検体においてはすべて規格値以下であった。それらの結果を Table 3, 4 および 5 に示した。

なお、HPLC を用いて得られた主色素の溶出時間は、R-2 ; 15.86分、R-40 ; 28.59分、R-102 ; 23.56分、Y-4 ; 12.14分および Y-5 ; 25.15分であった。

**Table 1.** Contents of Starting Materials, Intermediates and Subsidiary Colors in Sunset Yellow FCF

Sample	Contents (%)									
	SA	SS	GS	RS	TSA	DAADBSA	DONS	RS-SA	SS-AN+2N-SA	
Standard	ND	0.010	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
A*	1	0.110	0.093	ND	ND	0.041	0.037	6	0.001	0.018
	2	0.160	0.251	ND	ND	0.030	ND	ND	0.003	0.025
	3	0.033	0.101	ND	ND	0.028	ND	ND	0.015	0.017
B*	1	0.115	0.311	ND	ND	0.045	0.178	1.274	0.996	0.394
	2	0.040	0.299	ND	ND	0.034	0.196	1.362	1.025	0.387
	3	0.038	0.296	ND	ND	0.034	0.196	1.340	1.018	0.381
C*	1	ND	0.297	ND	ND	ND	ND	ND	0.149	0.099
	2	0.013	0.177	ND	ND	ND	ND	ND	0.012	0.051
	3	0.013	0.179	ND	ND	ND	ND	ND	0.012	0.052
D*	1	0.048	0.159	ND	ND	ND	ND	ND	0.117	0.102
	2	0.023	0.300	ND	ND	ND	0.010	ND	ND	0.064
	3	0.021	0.227	ND	ND	ND	0.008	ND	0.014	0.210
E*	1	0.013	0.025	ND	ND	ND	0.119	0.002	0.145	0.061
F*	1	0.048	0.161	ND	ND	ND	ND	ND	0.008	0.102
	2	0.039	0.036	ND	ND	ND	ND	0.103	ND	0.038
	3	0.023	0.016	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.090
G*	1	0.080	0.048	ND	ND	0.037	0.052	0.054	0.720	0.211
H**	1	0.080	0.048	ND	ND	0.037	0.052	0.054	0.720	0.211
Average***		0.046	0.183	ND	ND	0.013	0.047	0.255	0.255	0.213

ND: Not detected (&lt;0.00001%)

\*: Domestic product \*\*: Imported product

\*\*\*: Average of domestic products

**Table 3.** Contents of Starting Materials and Intermediates in Tartrazine

Sample	Contents (%)				
	SA	PyT	DAADBSA	HS	
Standard	ND	ND	—	ND	
A*	1	0.060	ND	—	ND
	2	0.043	ND	—	ND
	3	0.120	ND	—	ND
B*	1	0.052	ND	—	ND
	2	0.015	0.027	—	ND
	3	0.013	0.062	—	ND
C*	1	0.032	0.052	—	ND
	2	0.013	0.052	—	ND
	3	0.011	0.062	—	ND
D*	1	0.048	0.148	—	ND
E*	1	ND	0.086	—	ND
	2	0.010	0.084	—	ND
	3	0.011	0.056	—	ND
F*	1	0.055	ND	—	ND
	2	0.033	0.094	—	ND
	3	0.055	ND	—	ND
G**	1	0.062	ND	—	ND
H**	1	0.052	0.076	—	ND
Average***		0.035	0.045	—	ND

ND: Not detected (&lt;0.00001%) —: Same retention time to azo color

\*: Domestic product \*\*: Imported product

\*\*\*: Average of domestic products

**Table 2.** Contents of Starting Materials, Intermediates and Subsidiary Colors in New Coccine

Sample	Contents (%)						
	NT	SS	GS	RS	TSA	FRE	
Standard	ND	ND	0.033	ND	0.017	0.005	
A*	1	ND	ND	0.159	ND	0.065	0.034
	2	0.018	ND	0.172	ND	0.035	0.027
	3	0.023	ND	0.163	ND	0.040	0.039
B*	1	0.267	ND	0.258	ND	0.122	0.024
	2	0.131	ND	0.167	ND	0.039	0.014
	3	0.269	ND	0.321	ND	0.102	0.025
C*	1	0.036	ND	0.151	ND	0.061	0.035
	2	0.029	ND	0.251	ND	0.090	0.053
	3	0.029	ND	0.252	ND	0.079	0.035
D*	1	0.091	ND	0.106	ND	0.029	0.004
E*	1	ND	ND	0.169	ND	0.063	0.035
	2	0.036	ND	0.227	ND	0.031	0.144
	3	0.031	ND	0.198	ND	0.029	0.123
F*	1	0.049	ND	0.103	ND	0.035	0.004
	2	0.120	ND	0.117	ND	0.014	0.004
	3	0.058	ND	0.073	ND	0.012	0.003
G*	1	ND	ND	0.141	ND	0.078	0.049
Average**		0.070	ND	0.178	ND	0.054	0.038

ND: Not detected (&lt;0.00001%)

\*: Domestic product \*\*: Average of domestic products

**Table 4.** Contents of Starting Materials, Intermediates and Subsidiary Colors in Amarance

Sample	Contents (%)						
	NT	SS	GS	RS	TSA	FRE	
Standard	ND	ND	ND	0.020	0.013	0.004	
A*	1	0.200	ND	ND	0.034	0.063	0.046
	2	0.078	ND	ND	0.024	0.018	0.060
	3	0.024	ND	ND	0.025	0.005	0.026
B*	1	0.358	ND	ND	0.008	0.120	0.180
	2	0.067	ND	ND	0.015	0.020	0.035
C*	1	0.118	ND	ND	0.051	0.025	0.292
Average**		0.141	ND	ND	0.026	0.042	0.107

ND: Not detected (&lt;0.00001%)

\*: Domestic product \*\*: Average of domestic products

**Table 5.** Contents of Starting Materials, Intermediates and Subsidiary Colors in Allura Red AC

Sample	Contents (%)										
	SS	GS	RS	TSA	CSA	DONS	CSA-R	CSA-G	CSA-2N	CR-S	
Standard	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.017	ND	0.003	ND	
A*	1	ND	0.048	ND	ND	0.010	0.021	0.209	0.047	0.043	0.003
	2	ND	0.039	ND	ND	0.090	0.019	0.011	0.002	0.005	ND
B*	1	0.039	0.017	ND	ND	ND	0.167	0.180	0.040	0.383	0.010
	2	0.080	0.046	ND	ND	ND	0.011	0.013	0.001	0.024	0.001
C*	1	ND	0.061	ND	ND	ND	0.098	0.164	ND	0.111	0.015
Average**		0.024	0.042	ND	ND	0.020	0.063	0.115	0.018	0.113	0.006

ND: Not detected (&lt;0.00001%)

\*: Domestic product \*\*: Average of domestic products

## 考 察

- (1) すべての標準品は市販品と比較して不純物量は著しく少なかった。
- (2) DAADBSA と Y-4 は溶出時間が一致したことから、分析条件を検討する必要がある。
- (3) 外国産品は国産品と比較して不純物量に顕著な差は認められなかった。
- (4) 市販の食用色素 (Y-4, Y-5, R-2, R-40及びおよび R-102) の実態調査を行ったところ、Y-5色素の3検体およびR-102色素の2検体については、米国およびFAO/WHOの規格以上の未反応原料および反応中間体を含有していた。

## 謝 辞

本実験を行うに際して貴重な反応中間体および付随色素を提供して下さいました三栄源エフ・エフ・アイ (株) に感謝致します。

## 文 献

- 1) 厚生省告示第1号：官報 (号外第4号), 平成3年1月17日付, p.1~2, p.5~6 (1991).
- 2) 厚生省編：“第六版食品添加物公定書” p.307~333 (1992).
- 3) Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives:

“Specifications for Identity and Purity of Food Colours, FAO Food and Nutrition Paper31/1”, p. 131~132 (1984) Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

- 4) Assoc. Off. Anal. Chem.: “Official Methods of Analysis”, 15th Ed, p. 1130~1132 (1990).
- 5) Cox, E. A., McCluxe, F. D.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **65**, 933~940 (1982).
- 6) Cox, E. A., Reed, G. F.: *ibid.*, **64**, 324~331 (1981).
- 7) Tonogai, Y., Ito, Y., Iwaida, M.: *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **24**, 275~281 (1983).
- 8) Lancaster, F. E., Lawrence, J. F.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **65**, 1305~1310 (1982).
- 9) Lancaster, F. E., Lawrence, J. F.: *ibid.*, **66**, 1424~1432 (1983).
- 10) 植松洋子, 広門雅子, 中島和雄, 高橋 巖, 松井敬子, 風間成孔: 東京衛研年報, **38**, 245~252 (1987).
- 11) 植松洋子, 広門雅子, 中島和雄, 高橋 巖, 松井敬子, 風間成孔: 同上, **39**, 151~155 (1988).
- 12) Goldbelg, A. L., Calvey, R. J.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **65**, 103~107 (1982).
- 13) Calvey, R. J., Goldbelg, A. L.: *ibid.*, **65**, 1080~1085 (1982).
- 14) Bailey, J. E.: *ibid.*, **63**, 565~571 (1980).
- 15) Cox, E. A., Richfield-Fratz, N., Bailey, J. E., Albert, R. H.: *ibid.*, **67**, 240~249 (1984).
- 16) 山田真記子, 井上哲夫, 加藤喜昭, 中村幹雄, 柴田正, 木村美加, 辻 澄子, 伊藤誉志男: 食衛誌, **34**, 239~247 (1993).

国立医薬品食品衛生研究所酒石酸水素エピネフリン標準品  
(Control 951)

北島 文・田頭 洋子・前川 京子・吉井 公彦  
小松 裕明・谷本 剛・岡田 敏史<sup>#</sup>

Epinephrine Bitartrate Reference Standard (Control 951) of  
National Institute of Health Sciences

Aya Kitajima, Yoko Tagashira, Keiko Maekawa, Kimihiko Yoshii,  
Hiroaki Komatsu, Tsuyoshi Tanimoto and Satoshi Okada<sup>#</sup>

The raw material for epinephrine bitartrate was tested for preparation of the "Epinephrine Bitartrate Reference Standard (Control 951)" of National Institute of Health Sciences. Analytical data obtained were as follows: melting point, 148.6°C (decomposition); UV spectrum,  $\lambda$  max = 279 nm; IR spectrum, the same as that of JP Epinephrine Bitartrate Reference Standard (Control 792); optical rotation,  $[\alpha]_D^{20} = -52.8^\circ$ ; thin-layer chromatography, one impurity was detected; high-performance liquid chromatography, no impurity was detected; loss on drying, 0.01%; assay, 99.6% by potentiometric titration, 100.3% by spectrophotometry.

Based on the above results, the raw material was authorized as the Epinephrine Bitartrate Reference Standard (Control 951) of National Institute of Health Sciences (Japanese Pharmacopoeia).

**Keywords:** epinephrine bitartrate, quality evaluation, authorization, reference standard  
(Received May 30, 1997)

第十三改正日本薬局方に収載されている「エピネフリン」, 「ノルエピネフリン」及び「ノルエピネフリン注射液」の純度試験に用いられる国立医薬品食品衛生研究所(日本薬局方)酒石酸水素エピネフリン標準品(Control 951)を製造したので報告する。

### 1. 原料

酒石酸水素エピネフリン標準品原料はSigma社より購入した。

### 2. 参照物質及び試薬

参照物質には日本薬局方酒石酸水素エピネフリン標準品(Control 792; 以下, 日局標準品と略称する)<sup>1)</sup>を用いた。試薬は試薬特級品または特級相当品を用いた。

### 3. 装置

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 VAROL-III), 旋光計(日本分光, DIP-370型), 融点測定器(宮本理研, PA-20S型)非水滴定装置(京都電子, AT-400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データ処理装置を用いた。

### 4. 試験方法

別に記すもののほかは, 第十三改正日本薬局方の一般試験法を準用した。

#### 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薄層板シリカゲル60(厚さ, 0.25 mm)

展開溶媒: ブタノール/水/酢酸混液(4:2:1)

試料溶液及び標準溶液: 本品及び日局標準品を乾燥し, その約50 mgを精密に量り, それぞれに薄めた氷酢酸(1→10)を加えて溶かし, 正確に5 mlとし, 試料溶液及び標準溶液とする。

操作法及び検出法: 標準溶液2  $\mu$ l (20  $\mu$ g)及び試料溶液またはその希釈液の1~10  $\mu$ l (0.05~20  $\mu$ g)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。これにフォルリン試薬を噴霧し, 直ちにアンモニア蒸気中に置いて発色させ, 不純物スポットの有無を観察する。

#### 2) 液体クロマトグラフ(HPLC)法による純度試験

本品及び日局標準品約40 mgずつを精密に量り, それぞれを薄めた氷酢酸(1→100)を加えて溶かし, 正確に20

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed: Satoshi Okada; 1-1-43 Houenzaka, Chuoh-ku, Osaka 540, Japan; Tel: 06-941-1533; Fax: 06-942-0716; E-mail: okada@nihs.go.jp

mlとし、試料溶液及び標準溶液とする。これらの液10  $\mu$ lにつき、次の条件で分析を行った。

#### 操作条件

検出器：紫外吸光度計（測定波長：280 nm）  
 カラム：LiChrosorb RP-18（4.6 mm  $\phi$  x 150 mm）  
 移動相：薄めた氷酢酸（1  $\rightarrow$  100）  
 流量：0.4 ml/min  
 カラム温度：30 $^{\circ}$ C

検出感度：標準溶液 1 ml を正確に量り、薄めた氷酢酸（1  $\rightarrow$  100）を加えて正確に100 mlとした液10  $\mu$ lから得たエピネフリンのピーク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、標準溶液 1 ml を正確に量り、薄めた氷

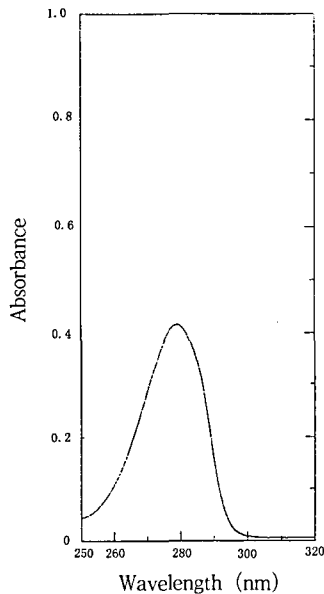


Fig. 1. Ultraviolet absorption spectrum of the raw material

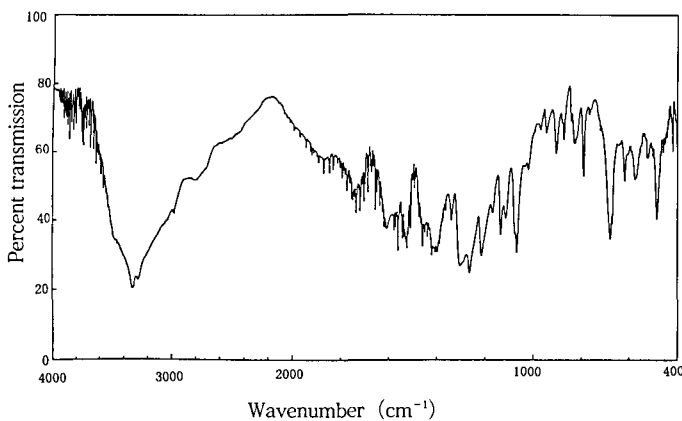


Fig. 2. Infrared absorption spectrum of the raw material

酢酸（1  $\rightarrow$  100）を加えて正確に2000 mlとした液10  $\mu$ lから得た酒石酸水素エピネフリンのピーク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。

面積測定範囲：溶媒ピークの後からエピネフリンの保持時間の約3倍の範囲

#### 3) 非水滴定による定量

本品を乾燥し、その約0.5 gを精密に量り、氷酢酸20 mlを加え、必要ならば加温して溶かし、0.1 N 過塩素酸で滴定する（電位差滴定法）。

同様の方法で空試験を行い、補正する。

0.1 N 過塩素酸 1 ml = 33.330 mg  $C_9H_{13}NO_3 \cdot C_4H_6O_6$

### 5. 試験結果

#### (1) 性状

白色の結晶性粉末で、においはない。

融点：148.6 $^{\circ}$ C（分解）

#### (2) 紫外吸収スペクトル

本品約0.01 gを量り、0.01 N 塩酸試液に溶かし200 mlとする。この液につき、0.01 N 塩酸試液を対照に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279 nmに吸収の極大が観察され（Fig. 1）、吸収極大波長における比吸光度  $E_{1\%}^{1cm}$  (279 nm) は82.6であった。

#### (3) 赤外吸収スペクトル

本品及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

本品の比旋光度  $[\alpha]_D^{25}$  は  $-52.8^{\circ}$ （0.2g, 0.5 N 塩酸試液 20 ml, 100 mm）であった。

#### (5) 純度試験：

(a) TLC法 本品及び日局標準品の薄層クロマトグラムを Fig. 3に示す。試料溶液においてスポット量 20  $\mu$ gで主スポット以外のスポットが1個検出された。また、本法による酒石酸水素エピネフリンの検出限界は、0.1  $\mu$ gであった。

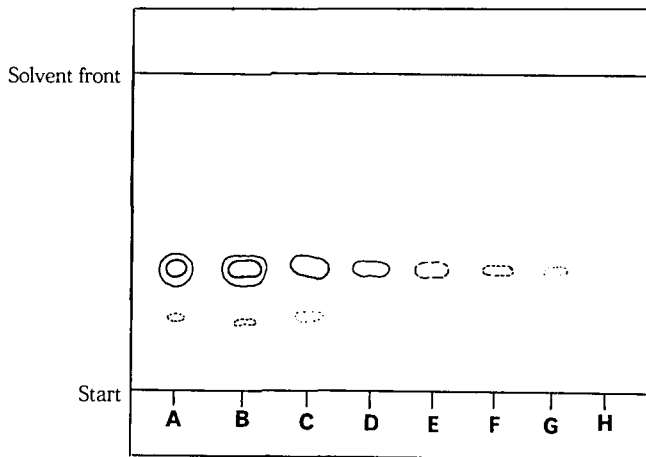
(b) HPLC法 本品及び日局標準品につき、HPLC法による純度試験で得られた液体クロマトグラムの一例を Fig. 4に示した。本品 (A) は面積百分率で0.05%以上の不純物ピークは観察されなかった。また、日局標準品 (B) においては面積百分率で0.05%以上の不純物ピーク1個が認められ、その量は  $0.05 \pm 0.007\%$  ( $n=3$ ) と推定された。

#### (6) 乾燥減量

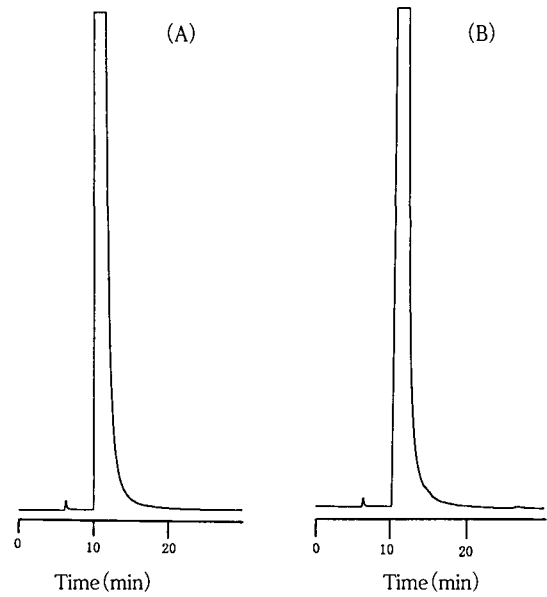
本品の乾燥減量は0.01%（シリカゲル, 3時間）であった。

#### (7) 定量

非水滴定で本品の定量を行った結果、 $99.6 \pm 0.9\%$  ( $n=3$ ) の値が得られた。また、日局標準品を対照に吸光度測



**Fig. 3.** Thin-layer chromatogram of the raw material and the JP Epinephrine Bitartrate Reference Standard  
Solvent system:butanol/water/acetic acid (9 : 2 : 1)  
Spot: A is 20  $\mu\text{g}$  of the JP Reference Standard.  
B to H are 20, 5, 1, 0.5, 0.2, 0.1 and 0.05 $\mu\text{g}$  of the raw material, respectively.



**Fig. 4.** High-performance liquid chromatograms of the raw material and the JP Epinephrine Bitartrate Reference Standard  
(A) : The raw material  
(B) : The JP Epinephrine Bitartrate Reference Standard

定法により、本品の定量を行った結果、 $100.3 \pm 1.7\%$  ( $n = 4$ ) の値が得られた。

### 結 論

標準品原料として入手した酒石酸水素エピネフリンにつき、日局酒石酸水素エピネフリン標準品を対照に比較検討した結果、本原料は国立医薬品食品衛生研究所標準品（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ので、国立医薬品食品衛生研究所（日本薬局方）酒石酸水素エピネフリン標準品（Control 951）として配布することとした。

### 文 献

- 1) 木村俊夫, 太田美矢子, 川村次良: 衛生試報, 99, 118 (1981)



## 国立医薬品食品衛生研究所リボフラビン標準品 (Control 951)

北島 文・田頭 洋子・前川 京子・吉井 公彦  
小松 裕明・谷本 剛・岡田 敏史\*

Riboflavin Reference Standard (Control 951) of  
National Institute of Health Sciences

Aya Kitajima, Yoko Tagashira, Keiko Maekawa, Kimihiko Yoshii,  
Hiroaki Komatsu, Tsuyoshi Tanimoto and Satoshi Okada\*

The raw material for riboflavin was tested for preparation of the "Riboflavin Reference Standard (Control 951)" of National Institute of Health Sciences. Analytical data obtained were as follows: melting point, 284.6°C (decomposition); specific absorbance,  $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ =857 (267 nm), 277 (373 nm), 326 (445 nm); IR spectrum, the same as that of JP Riboflavin Reference Standard (Control 921); optical rotation,  $[\alpha]_D^{20}$ =-135.6°; thin-layer chromatography, three impurities were detected; high-performance liquid chromatography, a small amount of 10 impurities were detected; loss on drying, 0.10%; assay, 100.4% by spectrophotometry.

Based on the above results, the raw material was authorized as the Riboflavin Reference Standard (Control 951) of National Institute of Health Sciences (Japanese Pharmacopoeia).

**Keywords:** riboflavin, quality evaluation, authorization, reference standard  
(Received May 30, 1997)

第十三改正日本薬局方に収載されている「リボフラン」、  
「リボフラビン散」、  
「リン酸リボフラビンナトリウム」及び  
「リン酸リボフラビンナトリウム注射液」の定量に用い  
られる国立医薬品食品衛生研究所（日本薬局方）リボフラ  
ビン標準品（Control 951）を製造したので報告する。

### 1. 原料

リボフラビン標準品原料は東京田辺製薬（株）より購入  
した。同社による試験成績は以下のとおりである：融  
点, 286°C；旋光度, -139°；乾燥減量, 0.08%；総窒  
素, 14.7%；比吸光度  $E_{1\%}^{1\text{cm}}$  (445 nm), 328.

### 2. 参照物質及び試薬

参照物質には日本薬局方リボフラビン標準品（Control  
921；以下、日局標準品と略称する）<sup>1)</sup>を用いた。試薬は試  
薬特級品または特級相当品を用いた。

### 3. 装置

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 VAROL-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-6 A

型ポンプ、SPD-6 A 型検出器、C-R 6 A 型データ処理装置  
を用いた。

### 4. 試験方法

別に記すもののほかは、第十三改正日本薬局方の一般試  
験法及び医薬品各条「リボフラビン」の試験法を準用した。

#### 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  
60 (厚さ, 0.25 mm)

展開溶媒：ジクロロメタン/メタノール/テトラメチルア  
ンモニウムヒドロキシド混液 (80:19:1)

試料溶液及び標準溶液：本品及び日局標準品を乾燥し、  
その約10 mg を精密に量り、それぞれに希水酸化ナトリウ  
ム試液 1 ml を加えて溶かした後、0.1N 塩酸試液 1 ml 及び  
メタノールを加えて正確に 50 ml とし、試料溶液及び標準  
溶液とする。

操作法及び検出法：標準溶液 20  $\mu$ l (4  $\mu$ g) 及び 30  $\mu$ l (6  
 $\mu$ g)、試料溶液またはその希釈液の 1~30  $\mu$ l (0.01~6  $\mu$ g)  
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 366 nm）を照射し、  
不純物スポットの有無を観察する。

#### 2) 液体クロマトグラフ (HPLC) 法による純度試験

本品及び日局標準品約 10 mg ずつを精密に量り、それぞ  
れを移動相に溶かして正確に 100 ml とし、試料溶液及び

\* To whom correspondence should be addressed: Satoshi Okada; 1-1-43  
Houenzaka, Chuo-ku, Osaka 540, Japan; Tel: 06-941-1533; Fax: 06-942-  
0716; E-mail: okada@nihs.go.jp

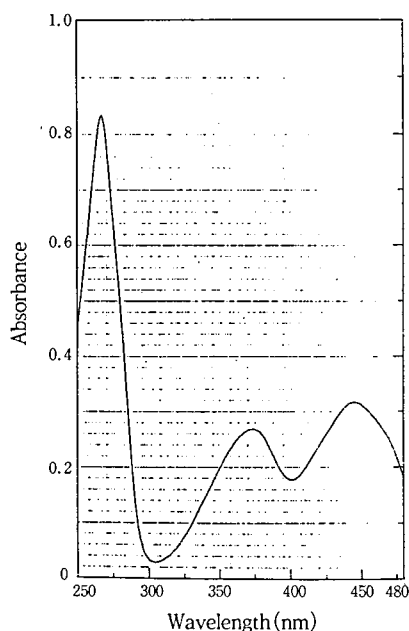


Fig. 1. Ultraviolet and visible absorption spectrum of the raw material

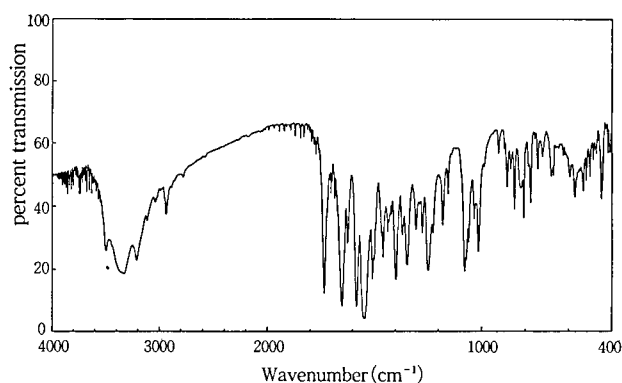


Fig. 2. Infrared absorption spectrum of the raw material

標準溶液とする。これらの液20  $\mu$ 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：紫外吸光光度計（測定波長：267 nm）

カラム：Inertsil ODS-2（4.6 mm $\phi$  x 150 mm）

移動相：0.005 M リン酸緩衝液（pH3.0）/アセトニト

リル混液（875：125）

流量：0.8 ml/min

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

検出感度：標準溶液1 mlを正確に量り、移動相を加えて正確に100 mlとした液20  $\mu$ lから得たりボフラビンのピーク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、標準溶液1 mlを正確に量り、移動相を加えて正確に2000 mlとした液20  $\mu$ lから得たりボフラビンのピーク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。

## 5. 試験結果

### (1) 性状

だいたい黄色の粉末で、わずかににおいがある。

融点：283.8 $^{\circ}$ C（分解）

### (2) 紫外及び可視吸収スペクトル

本品約0.01 gを精密に量り、pH7.0のリン酸緩衝液を加えて溶かし、正確に1000 mlとする。この液につき、リン酸緩衝液を対照に吸収スペクトルを測定するとき、波長267, 373, 446 nmに吸収の極大が認められた（Fig. 1）。それぞれの吸収極大波長における比吸光度  $E_{1\%}^{1\text{cm}}$  は857（267 nm）、277（373 nm）、326（445 nm）であった。また、それぞれの吸収極大における吸光度を  $A_1, A_2, A_3$  とするとき、 $A_2/A_1=0.323, A_3/A_1=0.380$  であり、日局の規格（ $A_2/A_1=0.314\sim0.333, A_3/A_1=0.364\sim0.388$ ）に適合した。

### (3) 赤外吸収スペクトル

本品及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

日局「リボフラビン」の旋光度の項の測定条件を準用して試験したときその比旋光度  $[\alpha]_D^{25}$  は $-135.6^{\circ}$  であった。

### (5) 純度試験

(a) TLC法 本品及び日局標準品の薄層クロマトグラムをFig. 3に示す。試料溶液、標準溶液とも6  $\mu$ gずつ塗布するとき、主スポット以外に3個のスポットが検出された。また、本法によるリボフラビンの検出限界は、0.02  $\mu$ gであった。

(b) HPLC法 本品及び日局標準品のHPLC法による純度試験で得られた液体クロマトグラムの一例をFig. 4に示す。本品（A）及び日局標準品（B）とも微量の不純物ピークが多数観察され、面積百分率0.05%以上の不純物ピークは10個を数えた。これらの不純物で総量は本品で $1.43\pm0.033\%$ （ $n=5$ ）、日局標準品で $1.48\pm0.132\%$ （ $n=3$ ）と推定された。

### (6) 乾燥減量

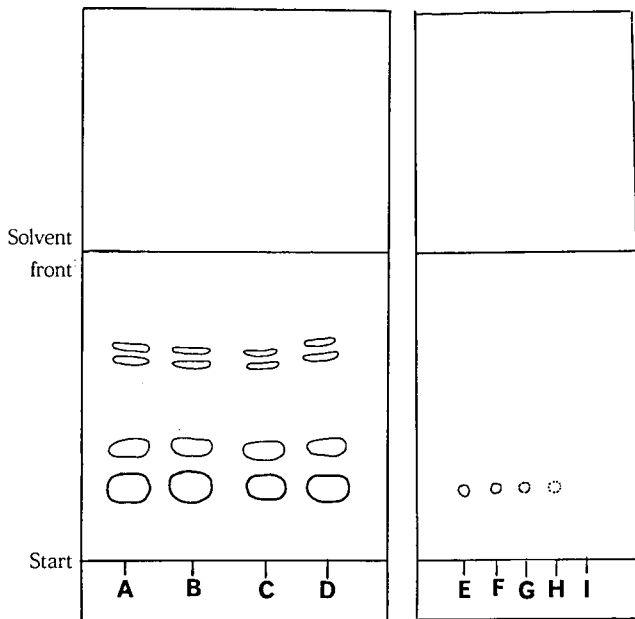
本品の乾燥減量は0.10%（0.5 g, 105 $^{\circ}$ C, 2時間）であった。

### (7) 定量

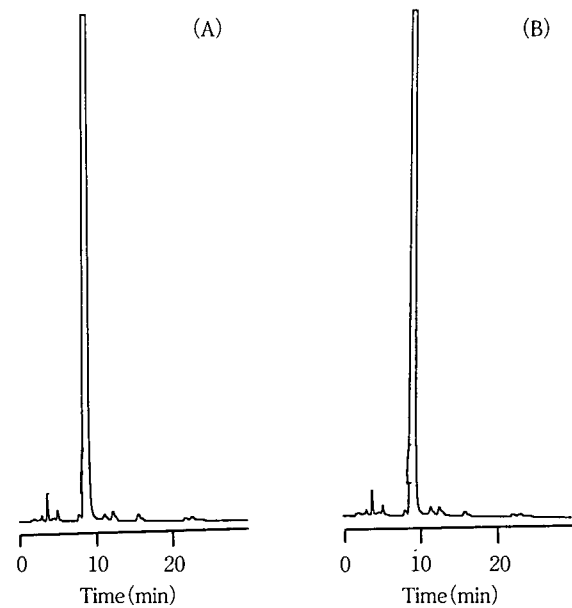
日局「リボフラビン」の定量法を準用し、日局標準品を対照に吸光度測定法により本品の定量を行った結果、 $100.4\pm0.3\%$ （ $n=4$ ）の値が得られた。

## 結 論

日局標準品は「リボフラビン」とそれらの製剤において、吸光度測定法による定量試験に用いられるものである。



**Fig. 3.** Thin-layer chromatograms of the raw material and the JP Riboflavin Reference Standard  
Solvent system: dichloromethane/methanol/tetramethylammonium hydroxide (80 : 19 : 1)  
Spot: A and C are 6  $\mu$ g and 4  $\mu$ g of the JP Reference Standard, respectively.  
B, D to H are 6, 4, 0.05, 0.04, 0.03, 0.02 and 0.01  $\mu$ g of the raw material, respectively.



**Fig. 4.** High-performance liquid chromatograms of the raw material and the JP Riboflavin Reference Standard  
(A) : The raw material  
(B) : The JP Riboflavin Reference Standard

HPLC 法による純度試験で明らかなように、本品の純度は HPLC 法による定量用標準物質として用いるには必ずしも十分なものではないが、吸光度測定法において用いる標準物質としては十分な品質を有する。したがって、本品を国立医薬品食品衛生研究所標準品とし、日本薬局方で規定される医薬品の品質試験に利用しうる品質を有するものと判断し、これを国立医薬品食品衛生研究所（日本薬局方）

リボフラビン標準品（Control 951）として配布することとした。

終わりに、本標準品の製造にあたりご協力いただきました東京田辺製薬（株）に深謝いたします。

#### 文 献

- 1) 泉 若江, 北島 文, 吉井公彦, 小松裕明, 石光 進, 岡田敏史: 衛生試報, **111**, 123 (1993)

## 国立医薬品食品衛生研究所エストラジオール標準品 (Control 961)

北島 文・田頭 洋子・前川 京子・吉井 公彦  
小松 裕明・谷本 剛・岡田 敏史<sup>#</sup>

### Estradiol Reference Standard (Control 961) of National Institute of Health Sciences

Aya Kitajima, Yoko Tagashira, Keiko Maekawa, Kimihiko Yoshii,  
Hiroaki Komatsu, Tsuyoshi Tanimoto and Satoshi Okada<sup>#</sup>

The raw material for estradiol was examined for preparation of the "Estradiol Reference Standard (Control 961)" of National Institute of Health Sciences. Analytical data obtained were as follows: melting point, 179.1 °C; UV spectrum,  $\lambda$  max = 281 nm; IR spectrum, the same as that of the Estradiol Reference Standard of National Institute of Health Sciences (Control 931); optical rotation,  $[\alpha]_D^{20} = +79.5^\circ$ ; thin-layer chromatography, one impurity was detected; high-performance liquid chromatography (HPLC), a trace amount of three impurities were detected; loss on drying, 3.17%; assay, 99.4% by UV spectrophotometry and 99.0% by HPLC.

Based on the above results, the raw material was authorized as the Estradiol Reference Standard (Control 961) of National Institute of Health Sciences.

**Keywords:** estradiol, quality evaluation, authorization, reference standard  
(Received May 30, 1997)

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医薬品食品衛生研究所エストラジオール標準品 (Control 961) を製造したので報告する。

#### 1. 原料

エストラジオール標準品原料は、帝国臓器製薬株式会社より供与された。同社による日本薬局方外医薬品規格「エストラジオール」の規格及び試験法に基づく、主な試験成績は以下のとおりである：融点, 177.8°C; 旋光度 +81.14°; 定量, 100.35%。

#### 2. 参照物質及び試薬

参照物質には国立医薬品食品衛生研究所エストラジオール標準品 (Control 931; 以下, ER 標準品と略称する)<sup>1)</sup>を用いた。試薬類は試薬特級品または特級相当品を用いた。

#### 3. 装置

エストラジオール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

別に記すもののほかは, 日局一般試験法及び局外規 (1993) 「エストラジオール」の規格及び試験法を準用した。

##### 4.1 薄層クロマトグラフ (TLC) 法による純度試験

薄層板: メルク社製プレコートッド薄層板シリカゲル60 F<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。

操作法及び検出法: 試料溶液 5  $\mu$ l (エストラジオール50  $\mu$ g 相当量) 及びその希釈液 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, 更に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

本品及び ER 標準品約5.0 mg ずつを精密に量り, それぞれをエタノールに溶かし, 正確に5 ml とし, 試料溶液及び標準溶液とする。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り試験を行う。

##### 操作条件

検出器: 紫外吸光光度計 (測定波長: 280 nm)

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed: Satoshi Okada; 1-1-43 Houenzaka, Chuoh-ku, Osaka 540, Japan; Tel: 06-941-1533; Fax: 06-942-0716; E-mail: okada@nihs.go.jp

カラム：Inertsil ODS-2 (4.6 mmφ x 150 mm)

カラム温度：30℃

移動相：水/アセトニトリル混液 (3 : 2)

流量：0.9 ml/min

検出感度：標準溶液 1 ml を正確に量り，エタノールを加えて正確に 100 ml とした液 40 μl から得たエストラジオールのピーク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，標準溶液 1 ml を正確に量り，エタノールを加えて正確に 2000 ml とした液 40 μl から得たエストラジオールのピーク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。

面積測定範囲：溶媒ピークの後からエストラジオールの保持時間の約 2 倍の範囲

#### 4.3 HPLC 法による定量

本品及び ER 標準品約 10 mg ずつを精密に量り，それぞれをメタノールに溶かし，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 及びメタノール 50 ml を正確に加えた後，水を加えて 100 ml とし，試料溶液及び標準溶液とする。これらの液 25 μl 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。

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) 紫外吸収スペクトル

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 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) (Fig. 1)。また，吸収極大波長における比吸光度  $E_{1\%}^{1cm}$  は 77.8 であった。

#### (3) 赤外吸収スペクトル

本品及び ER 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

本品の比旋光度  $[\alpha]_D^{25}$  は +79.5° (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 ~ +82°)。

#### (5) 融点

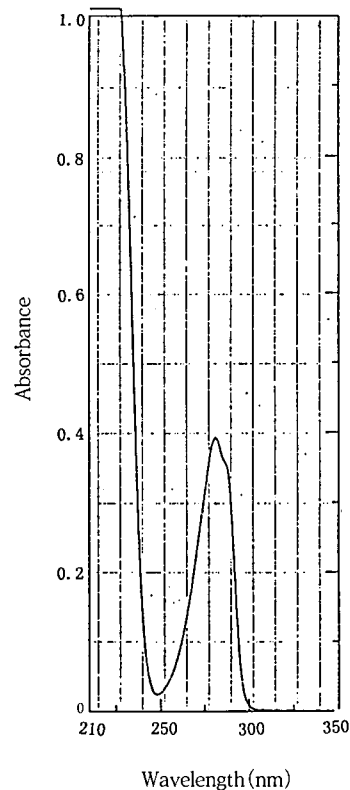


Fig. 1. Ultraviolet absorption spectrum of the raw material

本品の融点は，179.1℃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 μg において，主スポット以外のスポットが 1 個検出された。なお，本法によるエストラジオールの検出限界は，0.05 μg であった。

(b) HPLC 法 本品及び 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，面積百分率で 0.05% 以上の微量不純物が 3 個，ER 標準品 (B) では 2 個検出された。それらの不純物総量は，本品で  $0.28 \pm 0.006\%$  ( $n=3$ )，ER 標準品は  $0.17 \pm 0.003\%$  ( $n=3$ ) と推定された。本標準品原料で微量の不純物が検出されたが，その量は，吸光度測定法による定量分析 (局外規，1993) に影響を及ぼすものではないと判断し，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した。

#### (7) 乾燥減量

本品の乾燥減量は，3.17% (0.5g，105℃，4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， $99.4 \pm 0.2\%$  ( $n=4$ ) 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

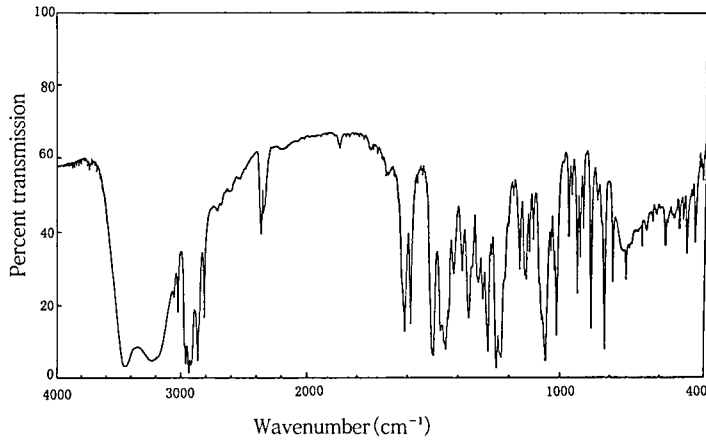


Fig. 2. Infrared absorption spectrum of the raw material

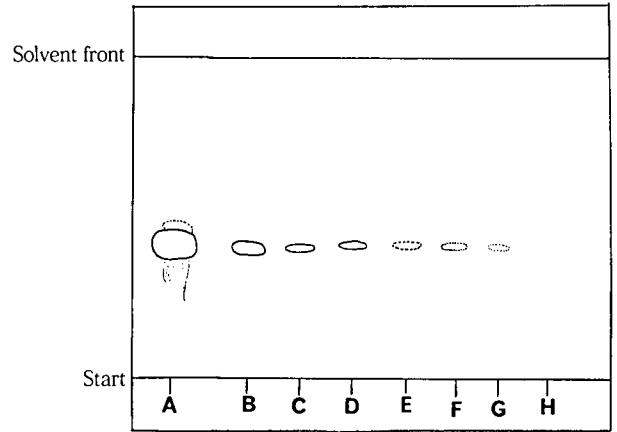


Fig. 3. Thin-layer chromatogram of the raw material  
Solvent system: petroleum ether/ether/cyclohexanone (3 : 1 : 1)  
Spot: A to H are 50, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.05 and 0.025  $\mu\text{g}$  of the raw material, respectively.

を行った結果,  $99.0 \pm 0.04\%$  ( $n = 4$ ) 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 (Control 931) を対照に比較検討した結果, 国立医薬品食品衛生研究所標準品として十分な品質を有することが認められたので, 国立医薬品食品衛生研究所エストラジオール標準品 (Control 961) として配布することとした。

終わりに, 本標準品の製造にあたりご協力いただきました帝国臓器製薬株式会社に深謝いたします。

### 文 献

- 1) 北島 文, 吉井公彦, 小松裕明, 石光 進, 岡田敏史: 衛生試報, **112**, 179 (1994)

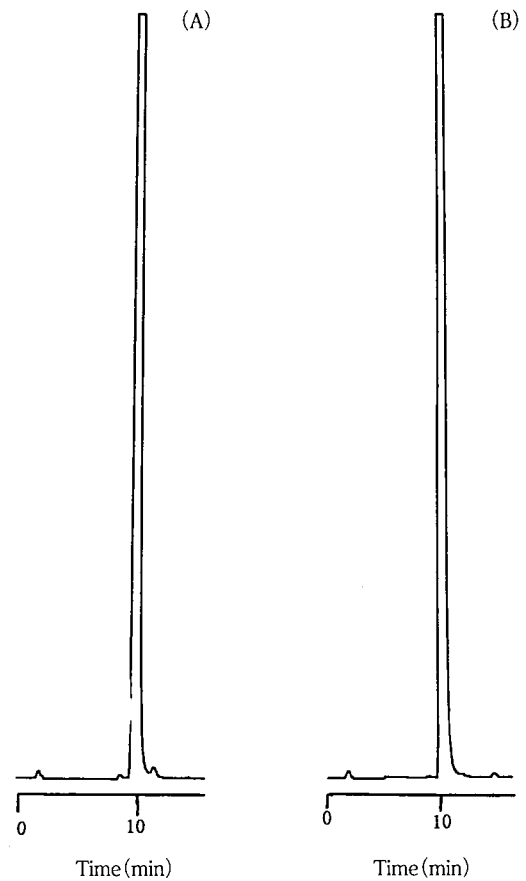


Fig. 4. High-performance liquid chromatograms of the raw material and Estradiol Reference Standard (Control 931)  
(A) : The raw material  
(B) : The Estradiol Reference Standard (Control 931)

国立医薬品食品衛生研究所 *dl*-カンフル標準品 (Control 961)

北島 文・田頭 洋子・前川 京子・吉井 公彦  
小松 裕明・谷本 剛・岡田 敏史<sup>#</sup>

*dl*-Camphor Reference Standard (Control 961) of  
National Institute of Health Sciences

Aya Kitajima, Yoko Tagashira, Keiko Maekawa, Kimihiko Yoshii,  
Hiroaki Komatsu, Tsuyoshi Tanimoto and Satoshi Okada<sup>#</sup>

The raw material of *dl*-camphor was examined for the preparation of the “*dl*-Camphor Reference Standard (Control 961)” of National Institute of Health Sciences. Analytical data obtained are as follows: UV spectrum,  $\lambda_{\max}=290$  nm; IR spectrum, the same as that of the present JP Camphor Reference Standard (Control 953); melting point, 179.1°C; purity test by gas-chromatography (GC), three kinds of impurities were detected; assay by GC, 99.8%.

Based on the above results, the candidate raw material was authorized as the *dl*-Camphor Reference standard (Control 961) National Institute of Health Sciences (Japanese Pharmacopoeia).

**Keywords:** *dl*-camphor, quality evaluation, authorization, reference standard  
(Received May 30, 1997)

第十三改正日本薬局方に収載されている「*dl*-カンフル」の定量法に用いる国立医薬品食品衛生研究所(日本薬局方)*dl*-カンフル標準品 (Control 961) を製造したので報告する。

**1. 標準品原料**

*dl*-カンフル標準品原料は、松浦薬業株式会社より購入した。同社による日本薬局方「*dl*-カンフル」の規格及び試験法に基づく、主な試験成績は以下のとおりである。比吸光度  $E_{1\%}^{1\text{cm}}$  (289 nm), 2.04; 融点, 177~178°C; 旋光度, 0; 液体クロマトグラフ法 (HPLC) による純度試験, 不純物量 0.32%。

**2. 参照物質及び試薬**

参照物質には日本薬局方 *dl*-カンフル標準品 (Control 953; 以下, 日局標準品と略称)<sup>1)</sup>を用いた。試薬は試薬特級品または特級相当品を用いた。

**3. 装置**

本品の品質評価試験にあたり, 以下の測定装置を用いた。セミマイクロ上皿電子天秤 (メトラー, AE-240型), 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 VAROL-Ⅲ), 融点測定器 (宮本理研工業, PA-20S型), 旋光計 (日本分光, DIP-370型)。また,

ガスクロマトグラフ装置には, 高津製作所製の GC-8A 及び資生堂製データ処理装置 S-MC を用いた。

**4. 試験方法**

別に記すもののほかは, 日局一般試験法及び医薬品各条「*dl*-カンフル」の試験法を準用した。

**4.1 紫外吸収スペクトル**

標準品原料約 0.120 g を精密に量り, エタノールを加えて溶かし正確に 50 ml とし, エタノールを対照にして吸光度測定法により紫外吸収スペクトルを測定する。

**4.2 ガスクロマトグラフ (GC) 法による純度試験**

日局「*dl*-カンフル」の定量法を準用し, 以下のようにして GC 法による純度試験を行った。

本品及び日局標準品約 0.040 g を精密に量り, エタノールを加えて溶かし正確に 2 ml とし, 試料溶液及び標準溶液とする。この液 2  $\mu$ l につき, 次の条件でガスクロマトグラフ法により試験を行う。

**操作条件**

検出器: 水素炎イオン化検出器

カラム: PEG 20 M10% Chromsorb WAW-DMCS (60/80 Mesh, 3.2 mm  $\phi$  x 3 m, ガスクロ工業)。なお, ガスクロマトグラフ用ケイソウ土 (Chromsorb W) は, 酸及びジメチルジクロロシラン処理されている。

カラム温度: 110°C

キャリアーガス: 窒素

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed: Satoshi Okada; 1-1-43 Houenzaka, Chuoh-ku, Osaka 540, Japan; Tel: 06-941-1533; Fax: 06-942-0716; E-mail: okada@nihns.go.jp

流量：*d,l*-カンフルの保持時間が約13分になるように調整する。

検出感度：標準溶液 1 ml を正確に量り、移動相を加えて正確に 100 ml とした液 20  $\mu$ l から得た *d,l*-カンフルのピーク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、標準溶液 1 ml を正確に量り、移動相を加えて正確に 2000 ml とした液 20  $\mu$ l から得た *d,l*-カンフルのピーク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。

## 5. 試験結果

### (1) 性状

無色の結晶性の粉末で、特異な芳香があり、味はわずかに苦い。

### (2) 紫外吸収スペクトル及び比吸光度

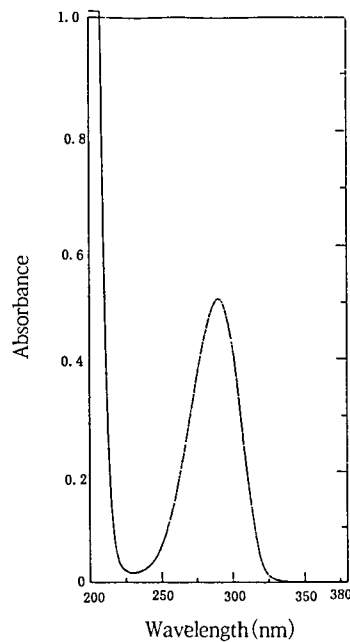


Fig. 1. Ultraviolet absorption spectrum of the raw material

波長 290 nm 付近に吸収の極大が観察され (Fig. 1), 吸収極大波長における比吸光度  $E_{1\%}^{1\text{cm}}$  (290 nm) は 2.06 であった。

### (3) 赤外吸収スペクトル

本品及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、同様の位置に同様の強度の吸収が認められた (Fig. 2)。

### (4) 旋光度

本品の比旋光度は、 $[\alpha]_D^{20} = -0.4^\circ$  (0.2 g, 無水エタノール, 100 mm) であり、日局規格に適合した (日局： $[\alpha]_D^{20} -1.5^\circ \sim +1.5^\circ$ )。

### (5) 融点

本品の融点は、179.1 $^\circ\text{C}$  であり、日局規格に適合した (日局：175 $^\circ\text{C}$ ~180 $^\circ\text{C}$ )。

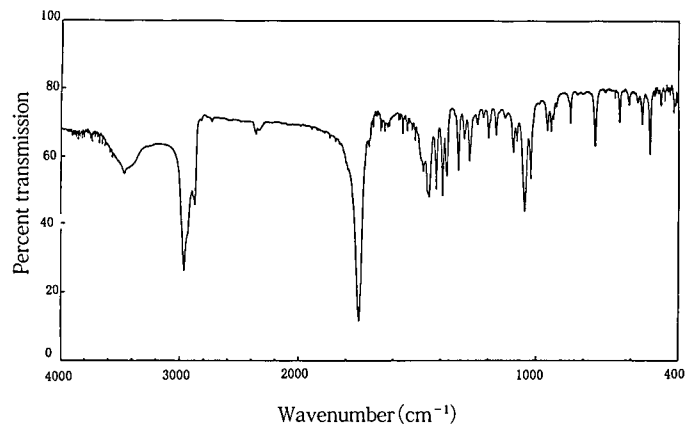


Fig. 2. Infrared absorption spectrum of the raw material

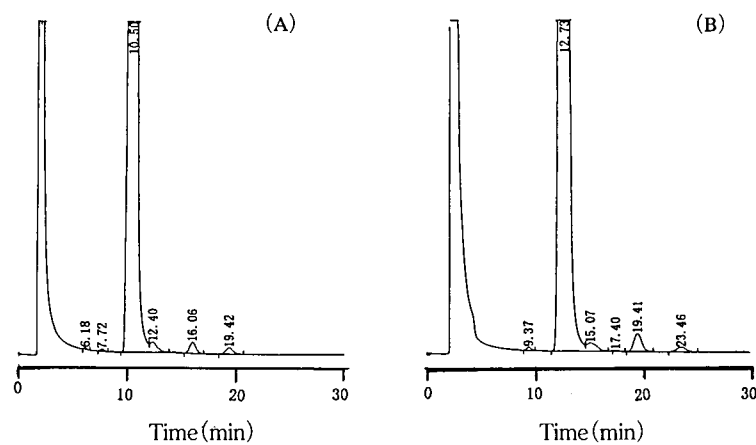


Fig. 3. Gas chromatograms of the raw material and the JP *d,l*-camphor Reference Standard

(A) : The raw material

(B) : The JP *d,l*-camphor Reference Standard



#### (6) GC法による純度試験

本品及び日局標準品につき、GC法による純度試験で得られたクロマトグラムをFig. 3に示す。このクロマトグラムから明らかなように、本品及び日局標準品とも主ピークの前後に微量の不純物ピークが3個検出され、それらは同種の不純物とみなすことができた。面積百分率法により、相対含量0.05%以上の不純物の総量を求めるとき、標準品原料では $0.55 \pm 0.005\%$ 、日局標準品では $0.81 \pm 0.001\%$ と推定された。

#### (7) 定量

日局「*dl*-カンフル」の定量法を準用し、日局標準品を対照としてGC法による定量を行った結果、 $99.8 \pm 0.284\%$  ( $n=4$ ) の値が得られた。

## 結 論

標準品原料として入手した *dl*-カンフルにつき、日局 *dl*-カンフル標準品を対照に比較検討した結果、本品は *dl*-カンフルの定量用標準品として十分な品質を有するものと判断し、これを国立医薬品食品衛生研究所衛生試験所（日本薬局方）*dl*-カンフル標準品（Control 961）として配布することとした。

終わりに、本標準品の製造にあたり、ご協力いただきました松浦薬業株式会社に深謝いたします。

## 文 献

- 1) 北島 文, 前川京子, 吉井公彦, 小松裕明, 谷本 剛, 岡田敏史: 衛生試験, 114, 125~127 (1996)

## 国立医薬品食品衛生研究所酢酸クロルマジノン標準品 (Control 961)

北島 文・田頭 洋子・前川 京子・吉井 公彦  
小松 裕明・谷本 剛・岡田 敏史<sup>#</sup>

### Chlormadinone Acetate Reference Standard (Control 961) of National Institute of Health Sciences

Aya Kitajima, Yoko Tagashira, Keiko Maekawa, Kimihiko Yoshii,  
Hiroaki Komatsu, Tsuyoshi Tanimoto and Satoshi Okada<sup>#</sup>

The raw material for chlormadinone acetate was tested for preparation of the "Chlormadinone Acetate Reference Standard (Control 961)" of National Institute of Health Sciences. Analytical data obtained were as follows: melting point, 215.3 °C; UV spectrum,  $\lambda$  max = 283.5 nm; IR spectrum, the same as that of JP Chlormadinone Acetate Reference Standard (Control 885); optical rotation,  $[\alpha]_{20} = -13.0^\circ$ ; thin-layer chromatography, one impurity was detected; high-performance liquid chromatography, two impurities were detected; loss on drying, 0.01%; assay, 99.4% by spectrophotometry and 99.5% by HPLC.

Based on the above results, the raw material was authorized as the Chlormadinone Acetate Reference Standard (Control 961) of National Institute of Health Sciences (Japanese Pharmacopoeia).

**Keywords** : chlormadinone acetate, quality evaluation, authorization, reference standard  
(Received May 30, 1997)

第十三改正日本薬局方に収載されている「酢酸クロルマジノン」の確認試験及び定量に用いられる国立医薬品食品衛生研究所 (日本薬局方) 酢酸クロルマジノン標準品 (Control 961) を製造したので報告する。

#### 1. 原料

酢酸クロルマジノン標準品原料は帝国臓器製薬 (株) より購入した。

#### 2. 参照物質及び試薬

参照物質には日本薬局方酢酸クロルマジノン標準品 (Control 885; 以下, 日局標準品と略称する)<sup>1)</sup>を用いた。試薬は試薬特級品または特級相当品を用いた。

#### 3. 装置

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 VAROL-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, データ処理装置は資生堂製 S-MCを用いた。

#### 4. 試験方法

別に記すもののほかは, 第十三改正日本薬局方の一般試

験法及び医薬品各条「酢酸クロルマジノン」の試験法を準用した。

#### 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: ジクロルメタン/エーテル混液 (9:1)

試料溶液及び標準溶液: 本品及び日局標準品を乾燥し, その約20 mgを精密に量り, それぞれにクロロホルム 1 mlを正確に加えて溶かし, 試料溶液及び標準溶液とする。

操作法及び検出法: 標準溶液 5  $\mu$ l (100  $\mu$ g) 及び10  $\mu$ l (200  $\mu$ g), 試料溶液またはその希釈液の 1~10  $\mu$ l (0.1~200  $\mu$ g) をシリカゲル薄層板にプロットし, 約13 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。

#### 2) 液体クロマトグラフ (HPLC) 法による純度試験

本品及び日局標準品約10 mgずつを精密に量り, それぞれを移動相に溶かし, 正確に100 mlとし, 試料溶液及び標準溶液とする。これらの液20  $\mu$ 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: 紫外吸光光度計 (測定波長: 236 nm)

カラム: TSK-GEL ODS-80Ts (4.6 mm $\phi$  x 150 mm)

移動相: アセトニトリル/水混液 (13:7)

流量: 0.7 ml/min

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed: Satoshi Okada; 1-1-43 Houenzaka, Chuoh-ku, Osaka 540, Japan; Tel: 06-941-1533; Fax: 06-942-0716; E-mail: okada@nihs.go.jp

カラム温度：25℃

検出感度：標準溶液 1 ml を正確に量り，移動相を加えて正確に 100 ml とした液 20  $\mu$ l から得た酢酸クロルマジノンのピーク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，標準溶液 1 ml を正確に量り，移動相を加えて正確に 2000 ml とした液 20  $\mu$ l から得た酢酸クロルマジノンのピーク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。

## 5. 試験結果

### (1) 性状

淡黄色の結晶性粉末で，においはない。

### (2) 紫外吸収スペクトル

本品約 0.01 g を量り，エタノールに溶かし 1000 ml とする。この液につき，エタノールを対照に吸収スペクトルを測定するとき，波長 283.5 nm に吸収の極大が認められた (Fig. 1)。

### (3) 赤外吸収スペクトル

本品及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

日局「酢酸クロルマジノン」の旋光度の項の測定条件を準用して試験したとき，その比旋光度  $[\alpha]_D^{25}$  は  $-13.0^\circ$  であった。

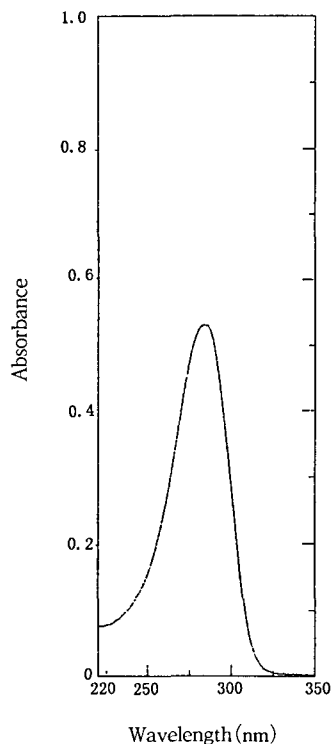


Fig. 1. Ultraviolet absorption spectrum of the raw material

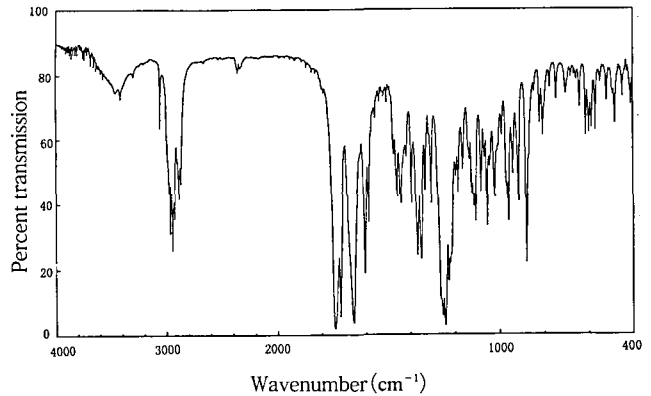


Fig. 2. Infrared absorption spectrum of the raw material

### (5) 融点

本品の融点は  $215.3^\circ\text{C}$  であった。(日局規格： $211\sim 215^\circ\text{C}$ )

### (6) 純度試験

(a) TLC 法 本品及び日局標準品の薄層クロマトグラムを Fig. 3 に示す。試料溶液 100  $\mu$ g を塗布するとき，不純物スポットが 1 個検出された。また，本法による酢酸クロルマジノンの検出限界は 2  $\mu$ g であった。

(b) HPLC 法 本品及び日局標準品の HPLC 法による純度試験で得られた液体クロマトグラムの一例を Fig. 4 に示す。本品 (A) 及び日局標準品 (B) とともに，数個の不純物ピークが観察された。面積百分率で 0.05% 以上の不純物ピークの総量は，本品で  $0.20\pm 0.018\%$  ( $n=4$ )，日局標準品で  $0.10\pm 0.0004\%$  ( $n=2$ ) と推定された。

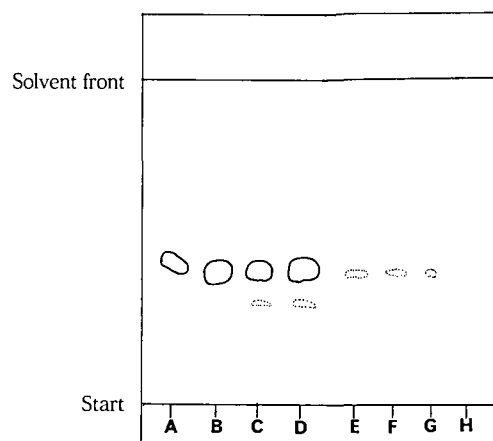


Fig. 3. Thin-layer chromatogram of the raw material and the JP Chloromadinone Acetate Reference Standard  
Solvent system: dichloromethane/ether (9 : 1)  
Spot: A and B are 100  $\mu$ g and 200  $\mu$ g of the JP Reference Standard, respectively.  
C to H are 100, 200, 10, 4, 2  $\mu$ g and 1  $\mu$ g of the raw material, respectively.

## (7) 乾燥減量

本品の乾燥減量は0.01% (0.5 g, 減圧, 五酸化リン, 4時間) であった。

## (8) 定量

日局「酢酸クロルマジノン」の定量法を準用し, 日局標準品を対照に吸光度測定法により本品の定量を行った結果,  $99.4 \pm 0.5\%$  ( $n=4$ ) の値が得られた。また, 日局標準品を対照に HPLC 法で本品の定量を行った結果,  $99.5 \pm 0.2\%$  ( $n=4$ ) の値が得られた。

## 結 論

標準品原料として入手した酢酸クロルマジノンにつき, 日局酢酸クロルマジノン標準品を対照に比較検討した結果, 本候補品は国立医薬品食品衛生研究所標準品 (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ので, 国立医薬品食品衛生研究所 (日本薬局方) 酢酸クロルマジノン標準品 (Control 961) として配布することとした。

終わりに, 本標準品の製造にあたりご協力いただきました帝国臓器製薬(株)に深謝いたします。

## 文 献

- 1) 田中正一, 村井真美, 徳永裕司, 木村俊夫, 岡田敏史: 衛生試報, **108**, 159 (1990)

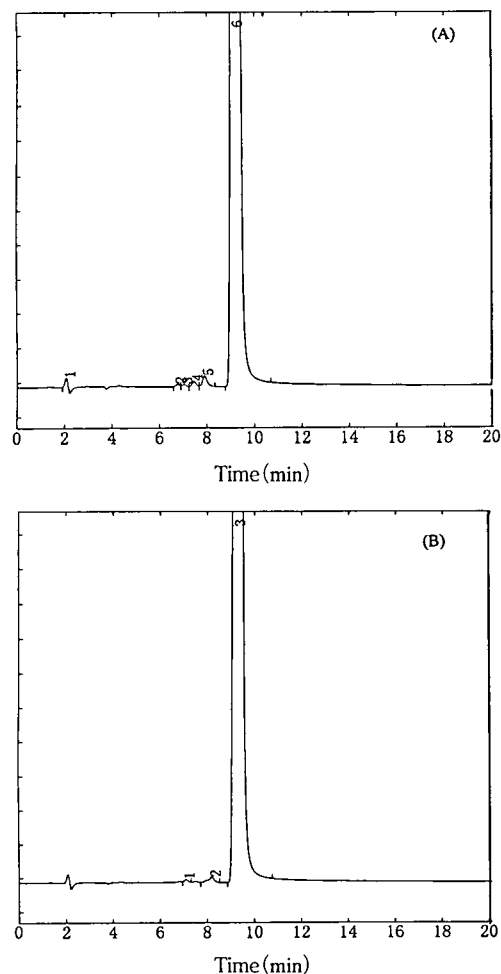


Fig. 4. High-performance liquid chromatograms of the raw material and the JP Chlormadinone Acetate Reference Standard  
(A) : The raw material  
(B) : The JP Chlormadinone Acetate Reference Standard

国立医薬品食品衛生研究所酢酸ヒドロコルチゾン標準品 (Control 961)

田頭 洋子・北島 文・前川 京子・吉井 公彦  
谷本 剛・岡田 敏史\*

Hydrocortisone Acetate Reference Standard (Control 961) of  
National Institute of Health Sciences

Yoko Tagashira, Aya Kitajima, Keiko Maekawa, Kimihiko Yoshii,  
Tsuyoshi Tanimoto and Satoshi Okada\*

The raw material of hydrocortisone acetate was tested for the preparation of the "Hydrocortisone Acetate Reference Standard (Control 961)". Analytical data obtained were as follows: IR spectrum, specific absorption wave numbers at 3428, 1748, 1723, 1631, and 1375  $\text{cm}^{-1}$ ; specific absorbance,  $E_{1\%}^{1\text{cm}}$  (242 nm) = 406; thin-layer chromatography, no impurities were detected until 0.05  $\mu\text{g}$ ; high-performance liquid chromatography (HPLC), 2 ~ 3 impurities were detected and the amount of the total impurities was estimated to be about 0.2%; assay by HPLC, 100.7%.

Based on the above results, the raw material was authorized as the Japanese Pharmacopoeia Reference Standard (Control 961).

**Keywords** : hydrocortisone acetate, quality evaluation, authorization, JP Reference Standard  
(Received May 30, 1997)

第十三改正日本薬局方「酢酸ヒドロコルチゾン」の確認試験及び定量試験に用いられる国立医薬品食品衛生研究所標準品 (日本薬局方標準品)「酢酸ヒドロコルチゾン標準品 (Control 961)」を製造したので報告する。

#### 1. 原料

本標準品原料は日本シェーリング (株) より購入した。

#### 2. 参照物質及び試薬

第十三改正日本薬局方酢酸ヒドロコルチゾン標準品 (Control 898 ; 日局標準品と略称)<sup>1)</sup>を対照物質とした。試薬及び溶媒類は、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評価試験にあたり、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), 旋光計 (日本分光, DIP-370型)。また、液体クロマトグラフ装置には島津製作所製の LC-6 A 型ポンプ, SPD-10A 型検出器, CTO-6 A 型カラムオープン, 資生堂製の S-MC Ver. 4.1型データ処理装置を用いた。

#### 4. 試験方法

別に記すもののほかは、日局一般試験法及び「酢酸ヒド

ロコルチゾン」の試験法を準用した。

4.1 薄層クロマトグラフ法 (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 F254 (厚さ, 0.25 mm)。展開溶媒：クロロホルム/メタノール混液 (9 : 1)。試料溶液及び標準溶液の調製：本候補品及び日局標準品 0.040 g をとり、クロロホルム/メタノール混液 (9 : 1) 25 ml に溶かし、試料溶液とする。この液 2 ml を正確に量り、クロロホルム/メタノール混液 (9 : 1) を加えて正確に 100 ml とし、標準溶液とする。操作法及び検出法：本候補品及び日局標準品の試料溶液、標準溶液を各 5  $\mu\text{l}$  及び 1 ml 中に本候補品 5  $\mu\text{g}$  ~ 40 mg を含む液 5  $\mu\text{l}$  ずつを薄層板にスポットし、約 12 cm 展開する。風乾後、紫外線照射法 (主波長 254 nm) 及びアルカリ性ブルーテトラゾリウム (BT) 試液を均等に噴霧してスポットを観察する。

#### 4.2 液体クロマトグラフ法による純度試験

本候補品及び日局標準品約 0.010 g ずつを量り、それぞれをメタノール 50 ml に溶かし、試料溶液及び標準溶液とする。これらの液 20  $\mu\text{l}$  につき、次の条件で液体クロマトグラフ法 (HPLC) 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：254 nm)

カラム：Inertsil ODS (4.6 mm $\phi$  × 250 mm)

移動相：アセトニトリル/水混液 (1 : 1)

\* To whom correspondence should be addressed: Satoshi Okada; 1-1-43 Hoenzaka, Chuo-ku, Osaka 540, Japan; Tel: 06-941-1533; Fax: 06-942-0716; E-mail: okada@nihs.go.jp

流量：0.8 ml/min

カラム温度：35℃

検出感度：試料注入量 (μg) の 1/100 に相当する量を注入し、得られた主ピークの高さが記録紙のフルスケールの約 10% の高さになるように検出器の出力あるいは記録計の感度を調整する。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、主ピーク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

白色の結晶または結晶性の粉末で、においはない。

融点：221.0° (分解)

2) 紫外吸収スペクトル及び比吸光度

波長 242 nm 付近に吸収の極大が観察され、極大吸収波長における比吸光度  $E_{1\%}^{1cm}$  (242 nm) は 406 (0.1 g, メタノール, 10000 ml) であった。本品の紫外吸収スペクトルを Fig. 1 に示す。

3) 赤外吸収スペクトル

本品及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た結果、波数 3428, 1748, 1723, 1631,

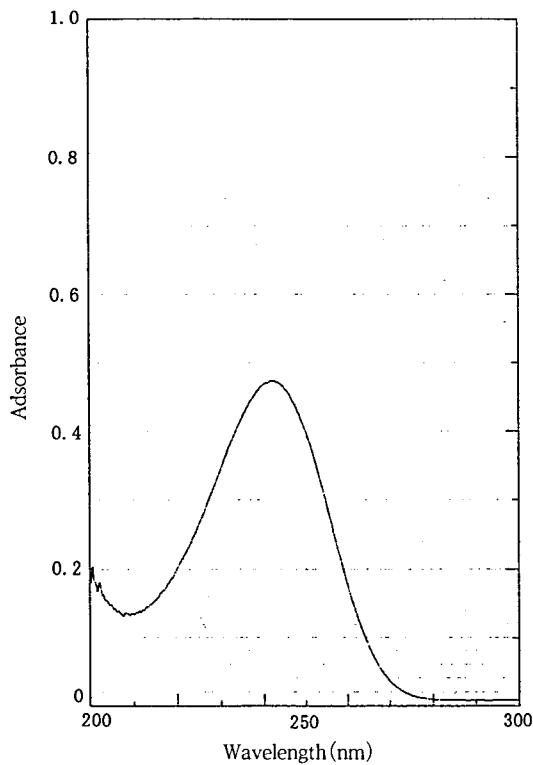


Fig. 1. Ultraviolet absorption spectrum for the candidate Hydrocortisone Acetate Reference Standard

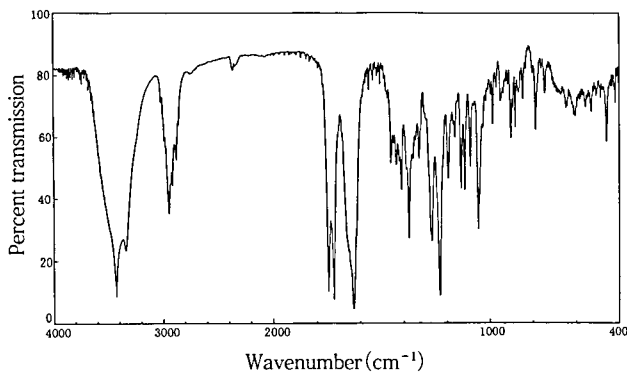


Fig. 2. Infrared absorption spectrum for the candidate Hydrocortisone Acetate Reference Standard

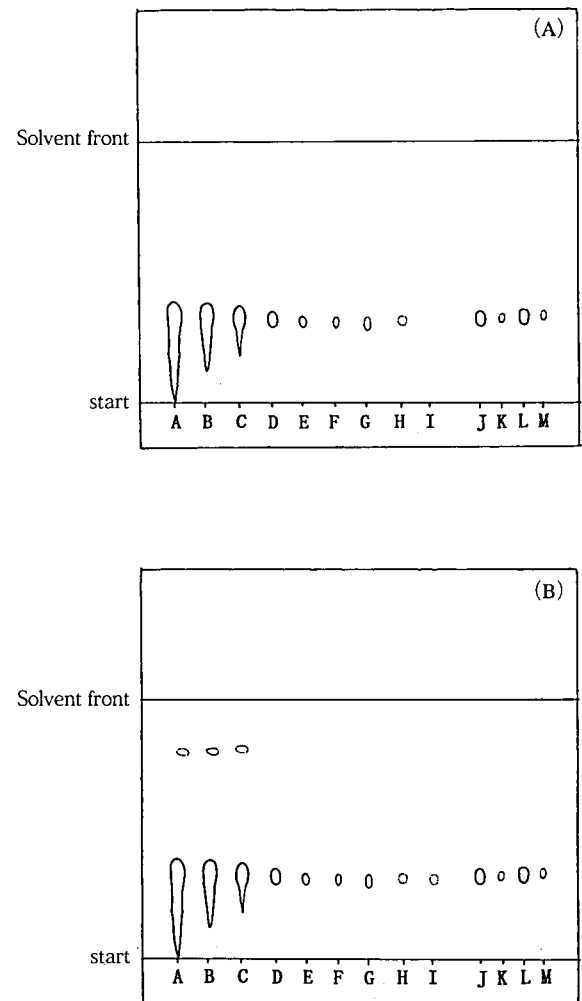


Fig. 3. Thin-layer chromatogram for the candidate and the JP Hydrocortisone Acetate Reference Standard  
Solvent system: chloroform/methanol (9 : 1)  
Spot: A, B, C, D, E, F, G, H and I are the candidate material 200, 100, 50, 10, 1, 0.5, 0.1, 0.05 and 0.025 μg, respectively.  
J and K are the candidate material 8 μg and 0.16 μg, respectively. L and M are the JP Reference Standard 8 μg and 0.16 μg, respectively.  
Detection : (A) Spraying alkaline blue tetrazolium TS on the plate (B) UV at 254 nm

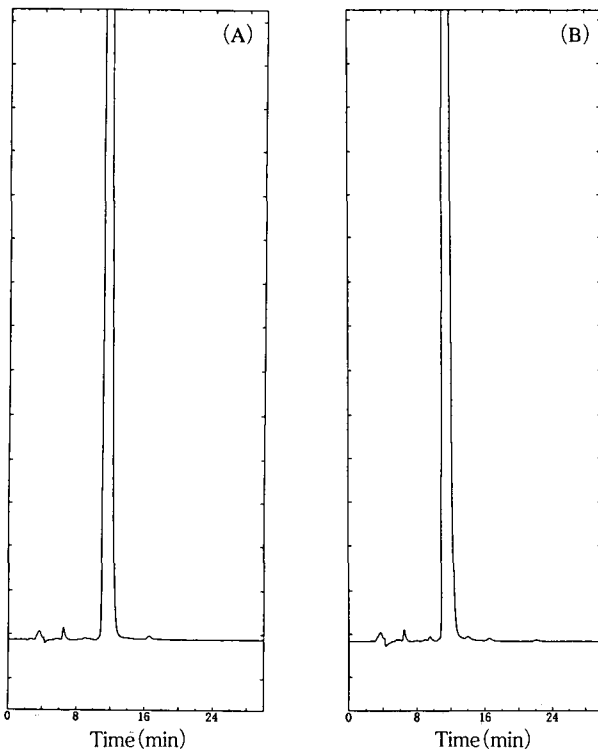


Fig. 4. High-performance liquid chromatograms for the candidate and the JP Hydrocortisone Acetate Reference Standard  
(A) : The candidate  
(B) : The JP Hydrocortisone Acetate Reference Standard  
Conditions: column, Inertsil ODS (4.6 mm $\phi$ ×250 mm); column temp, 35°C  
flow rate, 0.8 ml/min; detection wavelength, 254 nm; mobile phase, acetonitrile/water (1 : 1).

1375 cm<sup>-1</sup>付近に特性吸収を認めた。また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、 $[\alpha]_D^{25} = 164.3^\circ$  (乾燥後, 0.05 g, ジオキサン, 10ml, 100mm) であり, 日局規格に適合する (日局:  $[\alpha]_D^{25} = +158^\circ \sim +165^\circ$ )。

#### 5) 純度試験

(a) TLC 法 本品及び日局標準品の薄層クロマトグラム

を Fig. 3 に示す。本候補品及び日局標準品で調製した試料溶液には主スポット以外のスポットは検出されなかった。本法による検出限界は紫外線照射法で 0.025  $\mu$ g 以下, BT 試液による検出法で 0.05  $\mu$ g であり, 50  $\mu$ g 以上のスポット量では紫外線照射法及び BT 試液法共に主スポットはテーリングし, 紫外線照射法で不純物 1 個が観察された。

(b) HPLC 法 本品及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 に示す。本品及び日局標準品とも主ピークの前後に 2~5 個の不純物のピークが認められた。面積百分率法により推定される不純物総量は, 本品で  $0.16 \pm 0.03\%$ , 日局標準品で  $0.23 \pm 0.02\%$  と推定された。

TLC 法及び HPLC 法による純度試験の結果, 本品は日局標準品として利用できることが明らかとなった。

#### 6) 乾燥減量

本品の乾燥減量は, 0.10% (0.5 g, 105°C, 3時間) であり, 日局規格に適合する (日局: 1.0%以下)。

#### 7) 定量

日局「酢酸ヒドロコルチゾン」の定量法を準用し, 日局標準品を対照に液体クロマトグラフ法による定量試験を行った結果,  $100.7 \pm 0.29\%$  (n=3) の値が得られた。別に, 前回標準品を対照に吸光度測定法 (242 nm) により試験を行った結果,  $100.1 \pm 0.27\%$  の値が得られた。

## 結 論

酢酸ヒドロコルチ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, 国立医薬品食品衛生研究所標準品 (日本薬局方標準品) として十分な品質を有することを認め, Control 961として製造・配布を開始した。

終わりに, 標準品製造にあたりご協力いただきました日本シェーリング (株) 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・木村敏夫: 衛生試報, 108, 147~ (1990)
- 2) 木村俊夫, 網川延考, 中守律夫: 医薬品研究, 17, 143~173 (1986)

## 国立医薬品食品衛生研究所ウリナスタチン標準品 (Control 971)

前川 京子・谷本 剛<sup>#</sup>・岡田 敏史

### Ulinastatin Reference Standard (control 971) of the National Institute of Health Sciences

Keiko Maekawa, Tsuyoshi Tanimoto<sup>#</sup> and Satoshi Okada

The "Ulinastatin Reference Standard (control 971)" of National Institute of Health Sciences was prepared. The standard material was evaluated in collaboration with one domestic laboratory, and the potency of trypsin inhibiting activity was determined to be 3, 100 units/vial by relative assay method against the Ulinastatin Reference Standard (control 942). Other analytical data obtained were as follows: UV maximum absorption was observed at 277 nm, and the molecular weight was estimated to be about 66, 300 by gel filtration method. Maximum variance of material contents in 10 vials was 2.29%.

Based on the above results, this standard material was authorized to be the "Ulinastatin Reference Standard (control 971)" of the National Institute of Health Sciences.

**Keywords:** ulinastatin, NIHS Reference Standard, quality evaluation  
(Received May 30, 1997)

ウリナスタチンは、ヒト尿からイオン交換クロマト法などで分離精製された分子量67,000の糖たん白質であり、トリプシン阻害活性を有し、急性及び慢性再発性膵炎や各種ショックによる急性循環不全の治療に点滴用静脈注射剤として用いられる。ウリナスタチン原薬とその製剤の定量用に用いる国立衛生試験所ウリナスタチン標準品 (control 971) を製造したので、その結果を報告する。

#### 実験材料および実験方法

##### 1. 候補標準品の作製

本標準品原料はヒト尿から分離精製し、比活性3,000単位/mg以上の画分を集めたものであり、ゼラチンを加え、バイアル中に約3,000単位ずつ小分け充填し、凍結乾燥品として調製した。この調整品を候補標準品とし、保存は-20℃で行った。本品の作製は持田製薬株式会社に依頼して行った。

##### 2. 試薬・試液

N- $\alpha$ -ベンゾイル-L-アルギニン-p-ニトロアニリド塩酸塩および結晶トリプシンはSigma社から購入した。その他の試薬類はJIS特級品または特級相当品を用いた。

##### 3. 重量偏差試験

日周一般試験法、重量偏差試験法の注射剤の項に従って試験した。

##### 4. 紫外吸収スペクトル

候補標準品1バイアルの内容物を水に溶かし、表示単位に従い、その1 ml中に約2,000単位を含むように調製し、紫外吸収スペクトルを測定した。

##### 5. 分子量測定

リン酸緩衝液 (pH7.5) で平衡化した Sephadex G-100 カラム (2.6 x 100 cm) を用いて、Andrewsの方法<sup>1)</sup>に従って分子量を測定した。分子量標準にはウシ血清アルブミン (M.W.: 67,000)、卵白アルブミン (M.W.: 45,000)、キモトリプシノーゲン A (M.W.: 25,000)、ブルーデキストラン (M.W.: 2,000,000) を用いた。試料溶液は、候補標準品を1%塩化ナトリウムを含むリン酸緩衝液 (pH 7.5) に溶かし、その1 ml中に10,000単位を含むように調製した。

##### 6. ウリナスタチンのトリプシン阻害活性 (力価) 測定法

候補標準品の力価をウリナスタチン標準品 (control 942)<sup>2)</sup> を対照として測定した。

(1) 試料溶液 候補標準品1バイアルをとり、pH7.8のトリエタノールアミン (TEA) 緩衝液 5 ml を正確に加えて溶かす。この液の適量を取り、TEA 緩衝液を加えて2, 3, 4及び6倍に希釈した液をそれぞれ試料溶液1, 2, 3及び4とする。また、ウリナスタチンを含まないTEA 緩衝液を試料溶液5とする。

(2) 標準溶液 ウリナスタチン標準品 (control 942) 1バイアルをとり、試料溶液と同様に操作し、標準溶液1,

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed: Tsuyoshi Tanimoto; 1-1-43 Hoenzaka, Chuo-ku, Osaka 540, Japan; Tel: 06-941-1533 ext. 51; Fax: 06-942-0716; E-mail: tanimoto@nihs.go.jp



2, 3, 4とする。またウリナスタチンを含まない TEA 緩衝液を標準溶液 5 とする。

(3) トリプシン溶液 結晶トリプシン (比活性約 3400 ~ 3600 単位/mg) の適量を精密に量り, 1 mM 塩化カルシウムを含む 0.001 N 塩酸試液を加えて溶かし, 180 µg/ml となるよう調製する。用時調製し, 氷冷して保存する。

(4) 基質溶液 N-α-ベンゾイル-L-アルギニン-p-ニトロアニリド塩酸塩 0.1 g を水に溶かし, 100 ml とする。

(5) 操作法 試料溶液 1, 2, 3, 4 及び 5 の 0.1 ml をそれぞれ試験管に正確に量り, あらかじめ 25 ± 0.1 °C に保温した TEA 緩衝液 1.6 ml を正確に加えて振り混ぜ, 25 ± 0.1 °C の恒温槽に入れる。1 分後, それぞれの試験管に氷冷していたトリプシン溶液 0.2 ml を正確に加えて振り混ぜ, 再び恒温槽に戻し, さらに 1 分後に基質溶液 1 ml を正確に加えて振り混ぜる。2 分後, それぞれの試験管に薄めた酢酸 (1 → 2) 0.1 ml を正確に加えて振り混ぜ, 試料溶液 1, 2, 3, 4 及び 5 とする。別に, 試料溶液 1, 2, 3, 4 及び 5 の 0.1 ml をそれぞれ試験管に正確に量り, あらかじめ 25 ± 0.1 °C に保温した TEA 緩衝液 1.6 ml を正確に加えて振り混ぜ, 25 ± 0.1 °C の恒温槽に入れる。1 分後に薄めた酢酸 (1 → 2) 0.1 ml を正確に加えて振り混ぜた後, 氷冷していたトリプシン溶液 0.2 ml を正確に加えて振り混ぜ, 再び恒温槽に戻し, さらに 1 分後に基質溶液 1 ml を正確に加えて振り混ぜ, 対照液 1, 2, 3, 4 及び 5 とする。試料溶液 1, 2, 3, 4 及び 5 の波長 405 nm における吸光度 A1, A2, A3, A4 及び A5 をそれぞれの対照液を対照として測定する。試料溶液 1, 2, 3 及び 4 の希釈倍数の逆数を横軸に, 吸光度を縦軸にとり, 用量-反応直線を作成する。また標準溶液 1, 2, 3, 4 及び 5 を用いて同様に操作し, 標準用量-反応直線を作成する。これらの直線から, ウリナスタチンを含まない溶液 5 の吸光度の 1/2 の吸光度を示す試料溶液および標準溶液の希釈倍数を求め, 次式<sup>2)</sup>により候補標準品およびウリナスタチン標準品 1 バイアル中の単位を算出する。

$$\text{1 バイアル中のウリナスタチン単位} = \frac{M \times 0.2 \times DN}{V \times 2 \times 0.1} \times 5 \times 1.68$$

M: 結晶トリプシンの採取量 (µg)

V: 結晶トリプシンの溶解液量 (ml)

DN: ウリナスタチンを含まない溶液の吸光度の 1/2 の吸光度を示す試料溶液または標準溶液の希釈倍数

### 結果および考察

#### 1. 紫外吸収スペクトル

紫外吸収スペクトルの一例を Fig. 1 に示した。候補標準品は 277 nm に吸収の極大を示した。

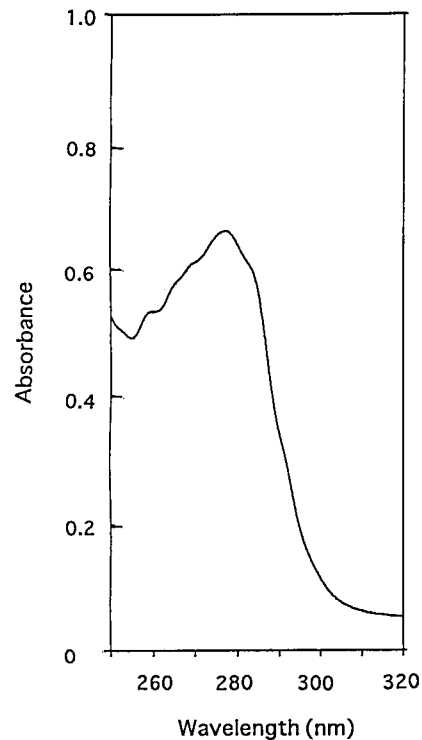


Fig. 1. Ultraviolet absorption spectrum of ulinastatin for NIH Reference Standard

#### 2. 分子量試験

ゲルろ過法で測定した候補標準品のウリナスタチンの分子量は約 66,300 であった。

#### 3. 重量偏差試験

本品のバイアル中への充填の均一性が確保されていることを確認するために, 内容物の重量偏差試験を行った。10 バイアルの平均充填量は 0.00568 g で, 最大偏差は 2.29% であった。この結果から, バイアル中の内容物重量は十分に管理されているものと判断された。

#### 4. 力価測定

ウリナスタチン標準品 (3,500 単位/バイアル) を対照として求めた候補標準品 1 バイアル当たりの力価を Table 1 に示した。2 機関での共同検定で測定した 17 回の力価の平均値は 3,088 ± 118 単位/バイアルであった。この結果から, ウリナスタチン候補標準品 1 バイアル中に含まれるウリナスタチン力価を 3,100 単位と決定した。

### 結 論

ヒト尿から精製したウリナスタチンをバイアル中に小分け・充填し, 凍結乾燥したものをウリナスタチン候補標準品とし, その含有力価を 2 機関で共同検定し, 1 バイアル中 3,100 単位のウリナスタチンを含有するものと認定した。また, 本候補標準品の充填変動は最大偏差が 2.29% であり, バイアル間の内容物重量は十分に管理されているも

Table 1. Determination of ulinastatin potency

Laboratory	Exp.	Potency of ulinastatin for NIHS Reference Standard (unit/vial)
A	1	3065
	2	2945
	3	2826
	4	3136
	5	3039
	6	2975
	7	2972
B	1	3133
	2	3297
	3	3080
	4	3073
	5	3247
	6	3133
	7	3043
	8	3150
	9	3187
	10	3203
mean $\pm$ SD		3088 $\pm$ 118

のと判断された。以上のことから、本候補標準品を国立医薬品食品衛生研究所ウリナスタチン標準品 (control 971) とした。

#### 謝 辞

本候補標準品の調製並びに力価測定等の共同検定に参加していただきました持田製薬株式会社に深謝いたします。

#### 文 献

- 1) P. Andrews, *Biochem. J.*, **91**, 222 (1964)
- 2) 前川京子, 谷本 剛, 岡田敏史: 国立衛生試験所ウリナスタチン標準品 (control 941), 衛生試報, **113**, 127~130 (1995)

国立医薬品食品衛生研究所エンドトキシン標準品  
(日本薬局方エンドトキシン標準品) (Control 971)

村井 敏美<sup>#</sup>・中川ゆかり・宮脇英美子・小川 義之・堀内 善信<sup>\*</sup>

The Endotoxin Reference Standard of the National Institute of Health Sciences  
(the Japanese Pharmacopoeia Endotoxin Reference Standard) (Control 971)

Toshimi Murai<sup>#</sup>, Yukari Nakagawa, Emiko Miyawaki,  
Yoshiyuki Ogawa and Yoshinobu Horiuchi<sup>\*</sup>

The third lot (Control 971) of the Endotoxin Reference Standard of the National Institute of Health Sciences (the Japanese Pharmacopoeia Endotoxin Reference Standard) was prepared. The potency of the new lot was assayed against USP Endotoxin Reference Standard (EC-6) and defined as containing 13,000 endotoxin units (EU) per vial by a collaborative study of 7 laboratories.

**Keywords** : endotoxin, reference standard

(Received May 30, 1997)

前回製造した国立医薬品食品衛生研究所エンドトキシン標準品 (日本薬局方エンドトキシン標準品) (Control 891) の在庫が僅少となったため、新ロットによる第3回標準品 (Control 971) を製造したので報告する。

### 実験材料及び方法

#### 1. 標準品原料

大腸菌 (*E. coli* UKT-B) 乾燥菌体より抽出精製したりポ多糖 LPS (前ロットで使用したものと同一原料で、 $-20^{\circ}\text{C}$  で保存したもの) を用いた。本原料をエンドトキシン試験用水に溶解し、これに賦形剤としてマンニトールを添加した後バイアルに無菌的に分注し (標準品原料  $2\ \mu\text{g}/\text{vial}$ , マンニトール  $40\ \text{mg}/\text{vial}$ ), 凍結乾燥したもの (和光純薬工業株式会社に依頼) を標準品候補品とした。

#### 2. 力価 (エンドトキシン単位, EU) の検定

対照標準品として米国薬局方 (USP) エンドトキシン標準品 (EC-6,  $10,000\ \text{EU}/\text{vial}$ ) を用い、これに対する相対力価を算出することにより標準品候補品の力価を求めた。力価検定に際しては、国立感染症研究所 (生物統計室), 東京都立駒込病院 (呼吸器内科), 和光純薬工業株式会社, 生化学工業株式会社, 第一化学薬品株式会社, 帝国臓器株式会社, 及び国立医薬品食品衛生研究所大阪支所 (生物試

験部) の計7機関による共同検定を実施した。

#### 3. 試験方法及び試薬

相対力価は、LAL 試薬を用いてカイネティック法、すなわち比濁法あるいは比色法により求めた。比濁法による測定には、和光純薬工業製の ES-II または ES-III、あるいは米国 ACC 社製の Pyrotell を、比色法による測定には、生化学工業社製の Endospecy あるいは第一化学薬品社製の Kinetic QCL Kit をそれぞれ用いた。測定に際しては、標準品候補品の力価を  $19,000\ \text{EU}/\text{vial}$  と仮定し、本候補品及び EC-6 ( $10,000\ \text{EU}/\text{vial}$ ) をそれぞれ大塚製薬社製注射用蒸留水で  $10,000\ \text{EU}/\text{ml}$  の濃度となる様に溶解し、この原液から独立した4つの希釈系列を作成するか (希釈法 I), あるいは1つの希釈系列から4回サンプリングすることにより (希釈法 II), 同一濃度について4回測定を繰り返した。得られた測定値は統計学的に処理し、用量反応回帰の直線性, 平行性が成立する回帰直線を用いて相対力価を算出した。

### 試験結果

力価を  $19,000\ \text{EU}/\text{vial}$  と仮定した標準品候補品の 1 EU の力価と、EC-6 の 1 EU の力価を比較することにより、EC-6 に対する標準品候補品の相対力価を求めた。Table 1 に、各機関で実施した計19回の測定成績を示した。

通常、これら各測定で得られた相対力価 (M) の平均値は、それぞれの分散 ( $V_m$ ) の逆数を重みとする加重幾何平均により求められる。しかし今回の測定値は、I と II, 2種

\* 国立感染症研究所

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed: Toshimi Murai; 1-1-43, Hoenzaka, Chuo-ku, Osaka 540, Japan; Tel: 06-941-1533 ext. 22; Fax: 06-942-0716; E-mail: murai@nihs.go.jp

**Table 1.** Summary of the collaborative study for determining relative potency of the candidate Endotoxin Reference Standard against USP Endotoxin Reference Standard (EC-6)

Exp. No.	Lab.	Reagent	M	ML	MU	Vm	Dil.
1	A	Endospey	0.591	0.563	0.620	0.00010	II
2	A	Endospey	0.585	0.556	0.614	0.00010	II
3	A	Endospey	0.682	0.650	0.715	0.00010	II
4	A	Endospey	0.669	0.636	0.704	0.00011	II
5	B	Endospey	0.706	0.661	0.754	0.00019	I
6	B	Endospey	0.638	0.597	0.681	0.00020	I
7	C	Endospey	0.610	0.555	0.669	0.00038	I
8	D	Endospey	0.597	0.581	0.612	0.00003	II
9	D	Endospey	0.586	0.562	0.611	0.00008	II
10	C	ES-II	0.882	0.822	0.947	0.00022	I
11	E	ES-II	0.779	0.750	0.810	0.00007	II
12	E	ES-II	0.773	0.737	0.811	0.00010	I
13	E	ES-II	0.887	0.854	0.922	0.00006	II
14	B	ES-III	0.683	0.639	0.730	0.00020	I
15	B	ES-III	0.717	0.671	0.766	0.00020	I
16	F	kinetic QCL	0.848	0.788	0.912	0.00240	I
17	F	kinetic QCL	0.967	0.902	1.038	0.00200	I
18	B	Pyrotell	0.644	0.572	0.723	0.00062	I
19	B	Pyrotell	0.704	0.626	0.790	0.00061	I

M: relative potency of the candidate Endotoxin Reference Standard against EC-6.

ML and MU: lower and upper limits of 95% confidential interval of relative potency (M), respectively.

Vm: variance of relative potency (M).

Dil: dilution method. I; multiple independent serial dilution. II; single serial dilution.

類の希釈法による成績を含んでおり、希釈法 I では変動因として希釈誤差が考慮されるが、希釈法 II では考慮されない。したがって、単純に得られた分散 (Vm) を用いて相対力価 (M) を加重平均すると、変動因の少ない希釈法 II の成績を過大に評価することとなり、実態とずれが生じる危険性がある。そこで、I, II 両希釈法の分散の大きさの比較をもとに重みの調整を行うことで、より実態に即した相対力価の近似推定が可能になると考えられた。ただし、用

いた測定法や試薬の違いにより、誤差分散や回帰係数が異なることから、各測定の回帰係数及び誤差分散とその自由度より精度係数  $\lambda$  ( $\lambda = s/b, s$ ; square root of variance,  $b$ ; regression coefficient) の平方を求め、この値を用いて I, II 両希釈法の比較を行うこととした。その結果、希釈法 I では  $\lambda^2 = 0.00222$ , 希釈法 II では  $\lambda^2 = 0.00043$  となり、約 5 倍の違いと推定された。そこで希釈法 II については Vm 値に 5 を乗じることで近似補正を行った上、Vm の逆数を重みとして加重幾何平均  $M(M = (\sum(M_i/V_{mi}))/\sum(1/V_{mi}))$ ,  $M_i$ ; relative potency in each measurement,  $V_{mi}$ ; variance of each relative potency) を求めた。その結果、EC-6 に対する標準品候補品の相対力価の平均値は 0.7013 と算出された。この成績から、標準品候補品の力価は 13,324 EU/vial と推定された。なおデータは示さないが、参考としてゲル化法により標準品候補品の力価を求めた結果、ほぼ同等の値が得られた。

以上の成績に基づき、本標準品候補品の力価を 13,000 EU/vial と決定した。

## 結 論

今回新たに製造したエンドトキシン標準品候補品の力価について、米国薬局方エンドトキシン標準品 (EC-6) を対照として国内 7 機関による共同検定を行った結果、候補品の力価は 13,324 EU/vial と推定された。この成績に基づき、本候補品を国立医薬品食品衛生研究所エンドトキシン標準品 (日本薬局方エンドトキシン標準品) (Control 971) とし、その 1 バイアル中にエンドトキシン 13,000 EU を含むものと認定した。

終わりに、本標準品の製造にご協力頂いた東京都立駒込病院呼吸器内科 後藤 元 先生をはじめ、和光純薬工業株式会社 (土谷正和 大阪研究所研究開発促進室課長)、生化学工業株式会社 (田中重則 試薬診断事業技術部開発企画グループリーダー)、第一化学薬品株式会社 (松川正之 試薬事業部学術主任)、帝国臓器株式会社 (古澤良雄 天然物研究部部長) の関係各位に深謝致します。

## 第13改正日本薬局方含量均一性試験および重量偏差試験の 適用例および in-process tests としての可能性

香取 典子<sup>#</sup>・青柳 伸男・小嶋 茂雄

### Exceptional Application of Content Uniformity Test and Weight Variation Test in the Japanese Pharmacopoeia 13 revision and Usage of these Tests for In-process Tests

Noriko Katori<sup>#</sup>, Nobuo Aoyagi and Sigeo Kojima

The criteria of Content Uniformity test and Weight Variation test in JP 13 were greatly changed to reduce consumer's risk. The new criteria were set to keep the rate of defectives in lots passing the tests less than the acceptable rate. However, in some cases, the new criteria can not directly be applied to some formulations and several modifications are needed in the criteria. In this report, the several resolution of this problem are represented. The applicability of these tests for in-process tests is also discussed

**Keywords :** Japanese Pharmacopoeia, Content Uniformity Test, Weight Variation Test  
(Received May 30, 1997)

含量均一性試験及び重量偏差試験は、第13改正日本薬局方 (JP13) で大きく変更された<sup>1)</sup>。もっとも大きな変更は、これらの試験法の目的が、消費者 (患者) に対し治療の質を保証する事であることをはっきりと示し、単にバラツキを規定するだけではなく、表示量からの偏差も規定するように変更されたことである<sup>2,3)</sup>。また、JP12までは個数で判定を行う、いわゆる計数型の試験であったが、JP13からは、サンプルから得られた平均値と標準偏差及び判定係数から判定値を求める計量型の試験に改められた。

日局13の含量均一性試験及び重量偏差試験の適否の判定は、判定値  $|M - \bar{X}| + ks$  が15.0を超えるか否かによって決まる。Mは表示量、 $\bar{X}$ は平均値、sは標準偏差である。数値は全て表示量に対する%に換算されてから計算され、Mは通常100.0となる。このときの判定係数kは試験個数 (サンプルサイズ) によって異なり、10個のときは2.2、30個のときは1.9である。

#### 1. 規格をそのまま適用するのが難しい場合の対応

しかしながら、このような変更に伴い、JP13の規格をそのまま適用するのが難しいケースが出て来た。例えば、主薬含量が表示量から大きく偏るか、または表示量に相当する値が決められない場合 (例: 生薬製剤、増量仕込みを行う製剤)、定量値が非常にばらつきやすい場合 (例: 酵素

製剤、ホルモン製剤、その他のバイオ医薬品) などである。このようなケースをまとめると

- A. 製剤の平均含量が表示量を大きく超える場合
  - B. 含量が範囲で規定されていて、その範囲が広いもの
  - C. 本質的に含量のバラツキの大きい製剤
  - D. 定量誤差が大きい場合
  - E. その他の場合
- に分類される。

#### 1) 平均値が表示量と大きく異なる可能性がある場合

前述の A および B のように製剤の平均含量と表示量の差が大きい場合、例えば増量仕込み、生薬製剤などのケースでは次のような対応が考えられる。

- ① 限度値を緩くする (15.0 → 他の値)
- ② 表示量からの偏差を無視し、標準偏差のみを規定する。 ( $ks \leq 15.0$ )
- ③ USP の「含量規格の中心値が表示量の100%を越す場合」に準ずる

①のような対応を行う場合、どこまで限度値を大きくするかは個々の例によって異なる。しかし、25.0%にしてもまだ適合が困難な場合には、もはや含量均一性試験を行う意義がないと考えられる。このような場合には、②のようにバラツキだけを規定するか、主薬が均一に分散しているものと仮定して、重量偏差試験を適用すべきであろう。しかし、医薬品として確実な治療効果が要求されるような薬物に関しては、増量仕込みといえども無制限に上側のはみ出しが許容されるわけではないので、③のような USP の判定法すなわち、「試験して得られた試料平均が含量規格の

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed: Noriko Katori; kami-yoga 1-18-1, Setagaya-ku, Tokyo 158, Japan (Tel: 03-3700-8486, Fax: 03-3707-6950, E. mail: katori@nins.go.jp)

本ステートメントは、日本薬学会第117回レギュラトリーサイエンス討論会 (1997.4, 東京) にて発表した内容をまとめたものである。

中心値を越すときは含量規格の中心値を、含量規格の中心値より小さくかつ表示量より大きいときは試料平均を、表示量より小さいときは表示量を偏差の基準値とする。」という方法を適用すべきと考えられる。

## 2) 個々の含量のバラツキが大きい場合

CおよびDのケースは、判定値  $|M - \bar{X}| + ks$  の中で  $s$  すなわち標準偏差が非常に大きくなる場合である。例えば、酵素、バイオ医薬品、定量誤差が非常に大などのようなケースが考えられる。このような場合には規格の限度値(15.0%)を適当な値に変える必要があると考えられる。どこまで限度値を大きくするかは個々の例によって異なるが、25.0%にしてもまだ適合が困難な場合にはもはや含量均一性試験を行う意義がないと考えられる。このような場合には、主薬が均一に分散しているものと仮定して、重量偏差試験を適用すべきである。判定計数  $k$  を小さくすることにより試験を緩くする方法は勧められない。なぜなら、試験によって保証される医薬品の品質(管理限界)自体が違ってしまふからである。

Eに該当するその他の疑問点としては、

- ・カプセルや糖衣錠をそのまま重量偏差試験してもよいか
  - ・多成分の製剤の場合はどうするか
  - ・使用期限ぎりぎりの製品の含量均一性試験
  - ・含量規格は、90~110%というように整数なのに、含量均一性試験および重量偏差試験では、なぜ限度値や  $M$  は100.0%と小数点以下第一位まで記載されているか
- などがあるが、日本薬局方フォーラム<sup>9)</sup>に詳しいQ&Aが掲載されているので参考にされたい。

## 2. 含量均一性および重量偏差試験の in-process tests としての可能性

日本ではこれらの試験を含む薬局方の試験法を最終試験として位置づけているが、GMPの推進に伴い製造工程での in-process tests としての位置づけも重要になっており、国際的にも承認の段階から in-process control を取り入れる方向にある。ICHのドラフト4.0, Q6Aでは「Uniformity of dosage units: ...If appropriate, these tests may be performed as in-process controls; the acceptance criteria should be included in the specification ....」の様に述べられており、新薬の承認申請書に記載する試験として、出荷試験だけでなく製造過程における試験(in-process tests)も認め、最終試験の負担を軽くする方向で議論が進められている。

例えば重量偏差試験を例にあげると、糖衣錠はコーティングを行う前の段階で重量偏差試験を行った方が、最終製品について行うより試験も簡便であり、また、精度よく試験できると考えられ。このような場合には、最終試験ではなく工程管理として行う in-process tests として位置づけた方がより合理的であると考えられる。

重量偏差試験の場合はどの製造段階で試験を行うかによってその性格付けが異なってくる。製造途中で工程試験として行った場合は製造状態のチェックとして性格づけられる。この場合は12局まで規格のような錠剤重量により限度値を変える、いわゆる従量規格を用いることが可能である。また、場合によっては重量を含量に換算する必要もないであろう。しかし、出荷(最終)試験あるいは製品の受入試験として重量偏差試験を行う場合は、重量偏差試験は含量均一性試験の代替法として位置づけられるため、重量が含量と関連することが前提となり、また、消費者危険を考慮した試験規格(サンプルサイズ、限度値)を採用する必要がある。また、一般に工程試験、出荷試験の場合には事前にロットについての情報がある程度蓄積されているため、全くの未知サンプルを試験する場合に比べてサンプルサイズを小さくできるが、現在のGMPでは、受入試験として位置づけられる局方の試験規格をそのまま出荷試験として用いている。これは推計学的な見地からいっても合理的とはいえない。状況の異なる場合にはそれに応じた試験規格を新たに考慮するのが妥当ではないかと考えられる。あるいは、薬局方の試験法にも、GMPに対応した試験(in-process test)を収載し、最終試験とは別に扱うことで、工程中の品質チェックを最終試験の代わりに用いることができれば無用な試験の手順を減らすことが可能になり、また試験の信頼性も向上すると考えられる。

## 文 献

- (1) 香取典子：第十三改正日本薬局方の改正点—含量均一性試験および重量偏差試験，薬局，47(5)，721(1996)
- (2) 香取典子，青柳伸男，小嶋茂雄：含量均一性試験・重量偏差試験法の改正案についての考察，日本薬局方フォーラム，4(2)，71-81(1995)
- (3) 厚生省薬務局研究開発振興課監修，「日本薬局方技術情報 1996」，薬業時報社，東京(1996)，p.76,99
- (4) 日局13含量均一性試験および重量偏差試験法の適用について—規格をそのまま適用するのが難しいケース—，日本薬局方フォーラム，6(1)，49-50(1997)

## 分析機器における測定値の確からしさを知る方法について

林 譲<sup>#</sup>・松田りえ子

## A Method for Knowing the Statistical Reliability of Instrumental Measurements

Yuzuru Hayashi<sup>#</sup> and Rieko Matsuda

The precision of instrumental measurements, usually expressed by SD (standard deviation) or RSD (relative standard deviation) is of importance in a society as well as in a world of analytical chemistry. For example, the detection limit and confidence intervals of calibration lines which are based on the precision are inevitable for regulatory science. As is well-known in statistics, however, a small number of repetitive experiments (e. g., 5) lead to a poor reliability of the precision. This presentation shows a method (called FUMI theory) which can provide a precision from a single measurement of noise and signal without any repetitive measurements. The statistical reliability of the precision from the FUMI theory corresponds to that from the repetitive method of 50 experiments.

**Keywords:** statistical reliability, instrumental analysis, FUMI theory  
(Received May 30, 1997)

測定値のSD (標準偏差) またはRSD (対標準偏差) で表される定量精度は定量分析法を評価する規準として、特にレギュラトリーサイエンスの分野において、近年その重要性を急激に増している。分析値の信頼性保証の考え方や制度が分析化学の実践的な領域に導入され始めた現在の社会状況もこれに反映している。

通常、測定値のSDは繰り返し測定から求められる。しかし、この様にして求めたSD値の信頼性は高くなく、統計学的に知られている(カイ2乗分布より)。例えば、5回の繰り返し測定から求めたSD値は、3倍異なることがあっても不思議ではないので、ブランク試料の定数倍と定義される検出限界も同様に3倍違う値が得られることもありえる。レギュラトリーサイエンスとしては、検出限界の実験的決定の曖昧さは重要な問題である。

数多くの繰り返し測定(例えば50回)から求めたSD値の信頼性は高い。しかし、クロマトグラフィーなどで多くの繰り返し測定を行うことは、時間的な問題のために実現は殆ど不可能である。

そこで、我々は繰り返し測定によらない方法で測定値のSDを正しく「予測」する理論・方法を確立した。この理論はFUMI理論と呼ばれている(FUNCTION of Mutual Informationの略)。1つのクロマトグラムから予測された測定値

のSDの統計的信頼性は、50回の繰り返し測定から得られたSDの信頼性にほぼ等しい。ここでは、FUMI理論とそのレギュラトリーサイエンスへの応用を概説する。

### 1. FUMI理論

分析機器の定量精度を理論的に求める研究は欧米諸国では1940年代から始まり、現在でもよく行われている。日本ではこの様な研究例は殆どなかったが、FUMI理論が1994年に林・松田により提案された<sup>1)</sup>。この理論では、分析機器のノイズとシグナルの確率論的性質から測定値のSDとRSDを予測する。サンプルが低濃度の時には、測定誤差は殆どバックグラウンドノイズに依存するので、検出限界などはこの理論から簡単に求めることが出来る。液体クロマトグラフィーの場合、高濃度のサンプルの測定誤差は注入誤差によるので、この誤差を考慮すれば、FUMI理論で広い濃度範囲の精度予測が可能である<sup>2)</sup>。

自然界の多くの現象が $1/f$ 揺らぎを示すことが知られている<sup>3)</sup>。 $f$ は周波数であり、波のエネルギーが周波数に反比例するのがこの名称の由来である。 $1/f$ 揺らぎでは低周波成分のエネルギーが高周波成分のエネルギーより大きい。レッドウッドの木目、模様やピバルディの四季も $1/f$ 揺らぎを示すのは驚きであるが、殆ど全ての分析機器ノイズが $1/f$ 揺らぎを示しても不思議ではない。そして、実際そのとおりである<sup>2)</sup>。

$1/f$ 揺らぎは数学的に扱えないので(発散するため)、 $1/f$ 揺らぎを示す分析機器ノイズから定量精度を予測することは簡単ではなかった。FUMI理論では、 $1/f$ 揺らぎを数学的に解析可能な確率過程(ホワイトノイズとマ

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed: Yuzuru Hayashi; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo 158, Japan; Tel: 03-3700-1141 ext. 283; Fax: 03-3707-6950; E-mail: fumi@nihs.go.jp  
本ステートメントは、日本薬学会第117回レギュラトリーサイエンス討論会(1997.4, 東京)にて発表した内容をまとめたものである。

ルコフ過程)の和で近似し、機器ノイズから定量精度を予測する。分析機器のノイズにホワイトノイズとマルコフ過程がそれぞれの程度含まれているかを、機器ノイズをフーリエ変換して決定する。一般に、ホワイトノイズとマルコフ過程の量は分析機器毎に異なるので、精度を求めたい機器のノイズを測定する必要がある。

定量精度(特にRSD)はシグナルの測定値が分からなければ計算することは出来ない。FUMI理論では、ノイズと同様にシグナルも測定し、高さ測定、全面積測定、部分積分測定などに伴う積分領域を決定しなければならない。

この様にして求めた、ノイズとシグナルのパラメータから定量精度を、繰り返し測定なしに、予測することが出来る。クロマトグラフィーでは、高さ測定と全面積測定ではどちらが精度が高いかが数十年に渡って議論されてきた。FUMI理論を用いればこの問題を解決することが出来る。どちらが良いかという一般的回答は得られないというのがFUMI理論の答えである。ノイズの性質は分析機器毎に異なるので、目的の分析機器のノイズとシグナルをFUMI理論で解析すれば上記の問題の答えが得られる。

## 2. 検出限界

第13改正日本薬局方の分析法バリテーションの定義では、ブランク試料の測定値の標準偏差の3.3倍を検出限界測定値としている。クロマトグラフィーではインテグレータを用いて定量するのが一般的であり、ブランク測定値の標準偏差を求めることは困難である。日本薬局方では、クロマトグラフ法では測定値の標準偏差の代わりにノイズ・レベルを用いることが出来ると記載してある。

実用的にはこれで十分であると思う。しかし、厳密に言えば、ノイズ・レベルからは検出限界の統計的性質が一意に導かれない。ノイズ・レベルが同じでも、測定値のSDが同じとは限らないからである。

日本薬局方にある統計的性質とは、検出限界における消費者及び生産者の危険率が5%以下となるように検出限界を定めることである。クロマトグラフ法に限ると、FUMI理論では、ベースラインノイズが作る「偽り」の測定値(面積値など)のSDをブランクの測定値のSDとする。このSD値はノイズをフーリエ変換することによって計算することが出来き、FUMI理論は検出限界に統計的性質を付随させる。例えば、ベースラインノイズの揺らぎをシグナルと見誤る確率が0.13%となるように検出限界を決定することが出来る。

## 3. 判別限界

濃度の異なるサンプルがある場合、このサンプルを測定で区別できる確率が95%であれば、この濃度差を95%判別限界という。測定で区別できるという意味は、高濃度のサンプルは低濃度のサンプルより大きい定量値を示すことである。判別限界(discrimination limit)は、検出限界を含む一般的な概念であるが、まだレギュラトリーサイエンスにおける応用例は少ない。ここでは、ヒトインスリンの純度試験の判別限界を述べる。

インスリンは分解するので、USPでは、分解物の濃度は全体の3%を越えてはならないと規定している。実際は、3%以上の分解物を含むインスリン製剤はまず存在しないが、仮想的な思考をしてみよう。検査機関は、3%以上の分解物を含むインスリン製剤は確実に検出し、却下したいであろう。しかし、測定は必ず誤差を含むので、例えば、3.2%の分解物を含む製剤の測定値が3%以上を示す確率は100%以下であろう。一方、5%の分解物を含む製剤を却下できる確率はほぼ100%であろう。

3.2%の分解物を含む製剤の測定値が3%以上を示す確率が95%であれば、この分解物濃度3.2%を95%判別限界と呼ぶ。一般に、判別限界は分析方法毎に異なり、その分析方法の信頼性を表す指標となる。例えば、95%判別限界が分解物濃度3.2%である方法Aは、分解物を3.5%で含む製剤を却下できる確率は95%以上である(100%に近いであろう)。しかし、95%判別限界が分解物濃度3.5%である方法Bは分解物濃度3.2%の製剤を却下できる確率は95%より小さい。この様に、判別限界が小さい分析法が良い分析法である。判別限界の上限を設定することは、分析法の信頼性を保証することにつながる。

キャピラリー電気泳動によるヒトインスリンの純度試験の判別限界の決定は、四方田らにより行われた(J. Chromatogr. B. 印刷中)。FUMI理論から得られた95%判別限界は、実験から得られた判別限界とよく一致した。この場合、繰り返し実験はFUMI理論を検証するために行われた。もし、繰り返し実験のみで正確な95%判別限界を求めようとすると、膨大な実験量が必要であろう。

## 文 献

- 1) Hayashi, Y., and Matsuda, R.: Analytical Chemistry, 66, 2874~2881 (1994)
- 2) 林 譲, 松田りえ子: ぶんせき, 195~200 (1995)
- 3) 武者利光: ゆらぎの世界, 講談社, 1993



## 検量デザインと分析値精度の関係について

松田りえ子<sup>#</sup>・林 譲・佐々木久美子・豊田 正武

## Relationship between design of calibration and precision of measurement

Rieko Matsuda<sup>#</sup>, Yuzuru Hayashi, Kumiko Sasaki and Masatake Toyoda

The method to estimate the confidence interval of calibration line was established. The method used the variance of measurement that can be predicted based on the background fluctuation. The validity of the estimated confidence interval was verified experimentally. The relationship between the calibration design and the analytical precision can be predicted with this method. The ill-designed calibration line deteriorates the trueness of the measurement as well as the precision.

**Keywords :** calibration, measurement precision

(Received May 30, 1997)

精密度または精度は、真度と共に分析値の品質の指標として重要であり、分析法バリデーションにおいても、分析精度を保証することが求められている。このために分析法の操作条件の設定に多くの注意が払われており、また、分析機器においても精度に影響する条件をコントロールすることが求められている。一方、多くの分析法では既知濃度の標準品の信号と比較して濃度を求める、つまり検量線によって試料中の分析対象の濃度を推定することが一般的である。従って、最終的に求められた分析値には分析操作による誤差に加えて検量線から生じる誤差も含まれる。特に製剤の分析のように、前処理操作からの誤差の寄与が小さい分析においては、この影響は大きい、あまり考慮されていないように思われる。本報告では検量線のデザインの分析の精度に対する影響について述べる。

### 1. 検量線の信頼区間の推定

検量線による誤差は、検量線の95%信頼区間として表すことが可能である。95%信頼区間とは、100本の検量線を作成したときに95本が含まれる範囲である。信頼区間は各測定点の測定精度と関係しており、大きな測定誤差を持つ方法で作成した検量線はその信頼区間が大きい。通常、信頼区間は、検量線と個々の測定点との距離から測定分散を推定し、それに基づいて計算される。一般的には各測定点の分散は全て等しいと仮定している。測定値から推定した分散はカイ2乗分布に従った分布を示すが、一般的な検量線で用いられる程度の測定点の数(5~20)はそれほど多

くないので、推定した分散の分布範囲が大きく、信頼区間の推定精度はあまりよくない。測定値の真の分散が精密に推定できれば、検量線の信頼区間も精密に求められる。また、従来の信頼区間の推定においては、各測定点の分散は全て等しいつまり等分散性を仮定しているため、信頼区間は検量線の重心で最も狭くなる。従って、検量線による推定の精度は重心付近が最も高い。しかしながら、測定法によっては測定対象物濃度にもよって測定精度も変化する(非等分散性)ため、真の信頼区間は異なった形となる。検量線の信頼区間を正確に推定するためには、各検量点における測定値の分散の大きさを正確に知らなくてはならない。

### 2. 濃度と測定精度の関係

我々はすでに、分析機器の出力の揺らぎから測定値の分散を精密に推定する方法を確立した<sup>1)</sup>。この方法では、ベースライン部分をFourier変換し、揺らぎをパラメータ化する。このようにして得られたパラメータを用い、信号に含まれる誤差の影響を推定する。これを用いて、実際の測定値の誤差と測定値の関係はどのようなものであるかを検討した。

高速液体クロマトグラフィ(HPLC)では測定対象物の濃度が低い範囲では、ピーク面積値の標準偏差はほぼ一定である。濃度が非常に高くなると、バックグラウンド揺らぎによる誤差よりも、注入誤差の影響が顕著になり、標準偏差が増加し、RSDが一定の値に近づく。

一方、原子吸光ではHPLCと異なり、濃度の増加と共に標準偏差が増加する。原子吸光の各濃度でのノイズレベルは、信号強度と共に増加し、このノイズの増加が測定値の誤差の原因となる。

このような、測定値が等分散性と非等分散性を示す2つ

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed: Rieko Matsuda; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo 158 Japan; Tel: 03-3700-1141 ext 334; Fax: 03-3707-6950; E-mail: matsuda@nihs.go.jp  
本ステートメントは、日本薬学会第117回レギュラトリーサイエンス討論会(1997,4,東京)にて発表したものをまとめたものである。

の手法において、検量線の信頼区間を推定した。また、実際の測定を繰り返して、3000本の検量線を作成した。このように推定した信頼区間の中には実測した検量線がほぼ収まり、この信頼区間が正当であることが分かる。HPLCの検量線の信頼区間は、検量線の重心付近で最も狭く、原子吸光では重心よりも低濃度側に最も狭い点が現れ、高濃度側で信頼区間が広がった。

実際に測定した検量線から、従来法により信頼区間を推定すると、大きなバラツキを示した。以上から、バックグラウンド揺らぎから推定した検量線の信頼区間は、正確でありまた精密であることが確認された。

### 3. 検量線とデザインと分析精度の関係

検量線の信頼区間の精密な推定法の確立により、検量のデザインと精度の関係を明らかにすることが可能となった。まず、測定点の数を同じにして、濃度範囲を大きくしたときの信頼区間を考える。測定値の分散が一定と考えられるHPLCにおいては、最も信頼区間が狭くなる場所は、高濃度側に移動するが、信頼区間のはばにの最小値は変化しない。低濃度の部分では検量線の区間を広げたことにより、信頼区間が広がり精度が低下する。一方、測定値の分散が濃度と共に増加する原子吸光では、検量線の濃度範囲を大きくすると信頼区間のはばが広がり、低濃度では2倍程度大きくなる場合がある。このように、濃度範囲を過度に大きくすると、低濃度側でかえって誤差が非常に大きくなる場合がある。

標準添加法では、常に検量線を外挿した点で未知試料濃度を推定するために、通常の検量線の場合よりもデザイン

が与える影響は大きい。原子吸光分析の例では、添加量のデザインが不適切である場合には、非常に推定の精度が低下する。

検量線または標準添加法を用いて推定した濃度の分布をモンテカルロシミュレーションにより求めた。検量線の中心部で推定した濃度は、ほぼ対称で正規分布に近い分布を示し、その平均値も真の値と一致した。しかし、信頼区間が広い検量線の端あるいは標準添加法を用いて推定した値は、非対称分布を示し、さらにその平均値あるいは再頻値が、真の値からずれている。従って、このような分析では、精度と共に真度が保証されなくなる。

以上述べたように、検量線のデザインは分析値の真度、精度に影響する。バリデーション時には、分析を繰り返して真度、精度を推定するが、検量線の信頼区間の推定値はバラツキが大きく、また、検量線を繰り返し測定して、信頼区間を求め、さらにこのような推定値の真度を求めるためには、膨大な回数が必要となる。今回、紹介した機器のノイズからの分析誤差と検量線信頼区間の推定法を用いれば、分析の真度、精度が容易に求められ、また必要な真度、精度を得るための検量線の設計も可能となる。

分析対象の濃度がおおよそ推定できるならば、目的とする濃度での誤差がなるべく小さくなる様なデザインを考慮する。測定対象濃度範囲が広いときには、適切に分割した検量線を用いる必要がある。

### 文 献

- 1) Hayashi, Y. and Matsuda, R.: Anal. Chem., 66, 2874~2881 (1994)

## 非経口投与薬のエンドトキシン規格の設定方法案

小川 義之

## A Proposal by the Japanese Pharmacopoeia for a Method to Set an Endotoxin Limit for Parenteral Drugs to be Tested

Yoshiyuki Ogawa

The Bacterial Endotoxins Test has been extensively revised in the JP 13. In addition to the limit test with gelation, adopted in the JP 12, quantitative methods using gel-clot, turbidimetric and chromogenic techniques have been adopted in the JP 13. As for the endotoxin limit for monographs, it was specified for Water for Injection alone in the JP 12. Since the issue of the JP 13 Supplement is under consideration, the possibility of replacing the Pyrogen Test (which is required for some main products in the current JP 13 monographs) with the Bacterial Endotoxins Test is now being discussed. For international harmonization of the Bacterial Endotoxins Test, it seems to be preferable to follow (if acceptable) the FDA method that was established in 1987 to set an endotoxin limit for products intended for parenteral use. This would then be followed by both the USP and EP. Thereby a draft for the Method to set the Endotoxin Limit, which is to be described in the Information chapter of the JP 13 Supplement, is being prepared. This report details an explanation of the draft, the definition of the endotoxin unit (EU) and its defined process, and the compliance with the replacement of the Pyrogen Test by the Bacterial Endotoxins Test, *etc.*

**Keywords :** bacterial endotoxins test, pyrogen test, endotoxin limit, parenteral drug, international harmonization

(Received May 30, 1997)

日局12の各条でエンドトキシン規格値が設定されていたのは注射用水のみであったが、日局13の各条において発熱性物質試験法が適用されている注射剤を主な対象として、日局13の第1追補でエンドトキシン試験法に切り替えるように作業が進められている<sup>1)</sup>。

各条のエンドトキシン規格値を定めるための方法は、既

に USP と EP で準拠して行われている1987年の FDA のガイドライン<sup>2)</sup>の方法に日局も準拠することが国際調和の観点からも望ましいものと考えられる。したがって、現在、日局の参考情報に収載するエンドトキシン規格の設定方法の作成作業がなされている。

まず最初にエンドトキシン規格値の設定法(案)の説明を行い、次いで「エンドトキシン規格」についての理解を容易にするために若干の解説を行う<sup>\*)</sup>。

## エンドトキシン規格値の設定法

非経口投与薬のエンドトキシン規格値は、下記の方法に従って設定される。

$$\text{エンドトキシン規格値} = \frac{K}{M}$$

ただし、K 値 (EU/kg) は、発熱を誘起するといわれる体重 kg 当たりのエンドトキシンの量であり、投与経路による区分に基づき、次のように設定される。

脊髄腔内投与薬を除く非経口投与薬では 5.0EU/kg であり、脊髄腔内投与薬では 0.05EU/kg である。

また、M 値は体重 kg 当たり 1 時間以内に投与する最大量である。M 値の単位は、投与量が製剤の容量に基づく場合は mL/kg、主薬の質量に基づく場合は mg/kg 又は mEq

<sup>\*)</sup> 本ステートメントは、日本薬学会第117年会レギュラトリーサイエンス討論会 (1997.4 東京) にて発表した内容をまとめたものである。

<sup>2)</sup> 脊髄腔内投与薬の K 値は、USP と EP のガイドラインではそれぞれ 0.2 EU/kg 及び 0.2IU/kg となっているが、日局はこの値を 0.05 EU/kg とするように提案している。  
なお、USP と EP のガイドラインには放射性医薬品の K 値についても 2.5 EU/kg (通常のエンドトキシン規格値の 1/2) と定めているが、この 1/2 に定めた根拠が明確に示されていないことと、放射性医薬品の規格設定については日局の担当ではないことから、放射性医薬品についての提案はなされていない。さらに、USP では体表面積に基づいて投与される抗癌剤については、次の式によりエンドトキシン規格値が設定されている。

$$\text{Endotoxin Limit} = \frac{K}{M \times 1.80 \text{sq.m}}$$

where K = 5 EU/kg and M = Maximum dose/kg/hour.

<sup>3)</sup> 3局がそれぞれ有するエンドトキシン標準品の整合性を図るため、1998年11月から翌年の2月末にかけて WHO の主催により国際共同研究が行われた。これには13カ国から26機関が参加し、我が国からは7機関が参加した。この国際共同研究結果に基づいて USP の新ロットエンドトキシン標準品 (lot F=EC-6) が WHO の第2回目のエンドトキシン標準品として設定され、IU と EU は等しい単位であると定められた。WHO は現行の USP, JP 及び EP のエンドトキシン標準品は新規の WHO 標準品に対して、[continuity of unitage] を有しているとの見解を示している。

/kg, 主薬の単位に基づく場合は Unit/kg でそれぞれ表す\*2)。

M値は、それぞれの製剤につき「体重 kg 当たり 1 時間以内に投与される最大量」と定義されることから、主薬含量の単位表現の差異 (mg, mEq, Unit) により、各条におけるエンドトキシンの限度規格は異なる単位で表現されることになる (EU/mg, EU/mEq, EU/Unit)。その他、注射液量に基づいて投与される注射剤の場合は、限度規格は EU/mL の単位で表現される。

M 値の設定に関しては、FDA 及び EP のガイドラインを参考にした。1987 年の FDA ガイドライン<sup>2)</sup>では、ウサギによる発熱試験での投与量と臨床での投与量とを比較して、より多い方の投与量を選択していた。しかし、1992 年にこのガイドラインはヒト投与量にのみ基づくように修正がなされている。また、EP のガイドライン<sup>3)</sup>もヒト投与量に基づいている。したがって、ウサギ投与量との関係は原則的には考慮されていない。

K 値 (EU/kg) は、本案では FDA 及び EP のガイドラインと同様に、末梢からの投与のときは 5.0 となっている。しかし、脊髄腔内投与薬の K 値は、本案では 0.05 であり、これは FDA 及び EP のガイドラインにおける 0.2 よりもさらに 4 倍厳しくなっている。エンドトキシンを中枢へ投与すると末梢からの投与に比較して、発熱作用は数百分の一の量で認められることが古くから知られている。リムルス試薬のエンドトキシンに対する測定感度は、その開発当初よりも飛躍的に高まっており、また、比色法や比濁法で行えばゲル化法よりも測定感度がよいことより、脊髄腔内投与薬の K 値を末梢投与の場合の 1/100 に設定しても測定上での問題はないものと考えられる。

K/M に基づいて設定されるエンドトキシン規格値は、体重 kg 当たりに基づいて投与される注射剤の場合は、欧米人の平均体重 (70kg) と日本人の平均体重 (60kg) との差は、エンドトキシン規格値に影響しない (注射剤のエンドトキシン規格値は欧米と同じでよい)。全量を投与する形態の注射剤の場合は、本案の方が FDA 及び EP のガイドラインによる規格値よりも 1 割程度 (日本規格値 = 欧米規格値 × 60/70) 厳しくなる。

輸液等の大容量の注射剤については、日局のエンドトキシン規格値は USP23 及び FDA ガイドラインの規格値と同様に 0.5EU/mL と設定される。これは、M 値は「体重 kg 当たり 1 時間以内に投与される最大量」という定義には必ずしも当てはまっていない。しかし、これは生理食塩液やブドウ糖注射液等のいわゆる大用量注射剤 (LVP) の品質確保が、ウサギを用いた発熱性物質試験法によって長年の間行われた実績と関連している。

エンドトキシン規格値は、エンドトキシンの最小発熱量に相当するものである。したがって、規格値未満を適合と

する判定基準でなければならない。

以下に、「エンドトキシン規格」についての理解を容易にするために若干の解説を行う。

#### エンドトキシン単位

エンドトキシン単位 (Endotoxin Unit: EU) は、米国 FDA が定めたものである。エンドトキシンの発熱活性は、抽出したグラム陰性菌の基原、エンドトキシンの精製度、あるいはエンドトキシンの分散状態などによっても異なるが、ウサギに対する最小発熱量は 0.001 ~ 2 µg/kg である。

FDA は 1980 年に *E. coli* O113:H10K から抽出精製した第 2 回目のロット (EC-2, バイアル当たり 1 µg) を製造して、これを 5,000EU/vial (5 EU/ng) と定めた。FDA の第 5 回目のロット (EC-5) から第 1 回 WHO エンドトキシン標準品が設定されたが、USP も EC-5 を原料として製造したものを lot F のエンドトキシン標準品として販売するようになった。しかし、このときのエンドトキシン単位は、バイアル当たりのエンドトキシン充てん量は EC-2 のときと同じく 1 µg であったが、エンドトキシン試験 (ゲル化法による) の結果、EC-5 は EC-2 よりもおよそ 2 倍活性が強いことが示された。したがって、USP のエンドトキシン標準品は 10,000EU/vial (10EU/ng) として販売されている\*3)。日局の RSE は、*E. coli* UKT-B 株から抽出精製されたエンドトキシンであり、日局の RSE の力価は EC-5 を基準にしてゲル化法により 16,000EU/vial と標定されたものである\*4)。

#### エンドトキシン試験法と発熱性物質試験法の関連性

医薬品原薬及び注射剤に対するエンドトキシン汚染の危険性は、従来より、エンドトキシンの発熱活性を指標として試験されるウサギを用いた *in vivo* の発熱性物質試験法によってチェックされてきた。発熱性物質試験法が開発されて 1942 年の USP 12 に収載されたのは、当時の輸液等の大容量注射剤 LVP による発熱事故の多発の原因が、LVP の製造に用いられた水のエンドトキシン汚染に起因することが解明されたためであった。発熱性物質試験法の当初の目的が主として LVP を対象としたエンドトキシンの汚染チェックであったことと、この試験法の感度が十分ではないため、ウサギに対して原則的には 10mL/kg を投与して試験が行われた。したがって、発熱を惹起しやすい投与経路である静脈内投与による注射剤で、かつ、比較的投与量の多い注射剤 (10mL 以上の容量のもの) が発熱試験の対象とされてきた。

化学合成医薬品よりなる注射剤の投与によって惹起される発熱事故の原因は、大部分が溶剤として用いられる水のエンドトキシン汚染によることが多いという事実と、さらに、容量が 10mL 未満の注射剤をウサギに 10mL/kg を投与すれば、その薬理作用によってエンドトキシンの発熱作用を修飾したり、ウサギが死亡することがあるために、局方

の製剤総則では10mL以上の容量の注射剤が発熱試験の対象となっている。しかし、医薬品各条において、例えば、ヘパリンナトリウム注射液の場合のように2.0mL/kgの投与量で行うように規定されている場合もあり、注射剤の安全性確保のために容量が10mL未満の注射剤についてもエンドトキシン試験法を将来的には適用することが望ましいであろう（USPではエンドトキシン試験法の適用に対する容量規定はなく、また、注射剤原末についてもエンドトキシン規格値を設定しているものがある）。

従来よりエンドトキシンがパイロジェンの同義語として用いられるほど注射剤による発熱原因物質はエンドトキシンと見なされている。グラム陽性菌由来の発熱性外毒素あるいはウイルスなどの発熱性因子は、熱に対する抵抗性が弱いので加熱滅菌された製剤では失活してしまう。グラム陽性菌の菌体成分による発熱は、細胞壁の構成成分であるペプチドグリカンであることが明らかにされているが、その発熱活性はエンドトキシンの数千～数万分の一である。加熱死菌を発熱性物質試験法で比較した場合、グラム陰性菌で発熱が認められるのは $10^8 \sim 10^9$  cells/mLであるのに対して、グラム陽性菌では $10^8$  cells/mLないしはそれ以上を必要とする。黴、酵母の場合は発熱因子の本体は、なお明らかではないがグラム陽性菌よりもさらに弱い活性を示す。

上述の根拠により、エンドトキシン試験法と発熱性物質試験法の測定原理は異なるものの、医薬品自体の薬理作用による体温調節機構の障害等に起因する発熱（これは当然発熱試験により医薬品の開発段階でチェックされるが）を除いて、原薬及び製剤中に混入するかも知れない微量のエンドトキシンを検出しようとする試験目的は同一である。したがって、エンドトキシン試験の適用性に関する十分なバリデーションが行われるなら、発熱性物質試験法の代替試験法として、エンドトキシン試験法を採用することができる。

エンドトキシンの発熱活性はエンドトキシンの溶解状態（主としてエンドトキシンのミセルサイズの大きさの変化）によって変動することより、注射剤の組成成分によって発

熱活性が増強または減弱される可能性もありうる。このようなエンドトキシンの分散状態の変化による発熱活性の変化はエンドトキシン試験法におけるリムルス反応性とよく並行していることよりほとんど問題とはならない。

しかし、注射剤がエンドトキシンに対する生体反応性を高める場合もあり得る。例えば、抗癌剤 Actinomycin D や Cyclophosphamide などはエンドトキシンの致死活性を著明に増強させる<sup>5)</sup>ので、エンドトキシン規格値の設定に際しては単純に本エンドトキシン規格の設定方法（日局では「参考情報」、USPとEPではガイドラインとして記載されており、いずれも non-mandatory な取扱となっている）を適用して規格値を設定することは避けなければならない。医薬品各条に記載されている注射剤のように、これまで既に長年の間発熱性物質試験法によって担保されてきたものについては、反応の阻害或いは促進作用の有無に関する詳細な検討を行った上で、エンドトキシン試験法に切り替えていくことは妥当であると考えられる。しかし、発熱性物質試験法での実績が乏しい注射剤や新規の注射剤にエンドトキシン試験法の適用を図るに際しては、それらの注射剤にはエンドトキシン以外の発熱性物質の存在が否定できるということだけではなく、生体機能を修飾することによって、エンドトキシンの発熱性や毒性に対する増強作用が無いかについても検討する必要がある。

## 文 献

- 1) 日本薬局方フォーラム, 6 (1), 14~30 (1997)
- 2) U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration (1987) : Guideline on validation of the limulus amoebocyte lysate test as an end-product endotoxin test for human and animal parenteral drugs, biological products, and medical devices.
- 3) Official announcement (1994). VIII. 16 Test for bacterial endotoxins. PHARMEUROPA, 6, No. 4, December, 389~394.
- 4) 日本薬局方フォーラム, 2 (1), 46~51 (1993)
- 5) Bradley, S. G.: Interactions between endotoxin and protein synthesis. In Handbook of Endotoxin, Vol. 3, pp 340~371, Berry, L. J. (Ed), Elsevier Science Publishers B. V. (1985)

サイズ排除クロマトグラフィーにおける分子量標準品に関する考察  
—水溶性高分子における分子量標準品の統一化の可能性—

四方田千佳子<sup>#</sup>・岡田 敏史

Studies on the molecular weight standards for size-exclusion chromatography  
—Standardization of a molecular weight standard for water-soluble polymers—

Chikako Yomota<sup>#</sup> and Satoshi Okada

**Summary** The possibility of the standardization of molecular weight standards for size-exclusion chromatography (SEC) was investigated in the case of water-soluble polysaccharides such as dextran, hyaluronate and chitosan. In the case of dextran, comparing the method adopted for dextran in EP and BP, it was shown that pullulan, one of commercially available molecular weight standards, can be used in usual SEC method. For hyaluronate and chitosan, applying the Mark-Houwink correction to the calibration curve obtained by pullulan, the acceptable molecular weights could be estimated.

**Keywords:** size-exclusion chromatography, dextran, hyaluronate, chitosan, pullulan  
(Received May 30, 1997)

医薬品や医薬品添加物において、たんぱく質、多糖類、合成高分子など、分子量が大きな物質でその生理作用や特性が分子量に大きく依存する場合には、分子量に関する規格を設定することが不可欠である。従来、日本薬局方 (JP) や英国薬局方 (BP) の一般試験法には、粘度試験法が採用されており、粘度規格を分子量規格として用いてきた。しかし、粘度規格ではあくまで粘度平均分子量の値を評価しているに過ぎず、広い分子量分布をもつ高分子の分子量分布や、2種の分布の異なるものが混合されている場合などでは、単に粘度による評価は不可能となるという問題をかかえている。分子量測定法には、末端基定量や浸透圧など数平均分子量 (Mn) を求めるものと、光散乱や沈降平衡などの重量平均分子量 (Mw) を求めるものがある。これらは、絶対分子量測定法であるが、そのほかに相対的な方法として粘度測定法やサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) がある。粘度測定法では、分子量分布が同程度で、分子量の異なる一連の試料について、光散乱などの絶対的測定法による Mw と、極限粘度の関係を求めておく必要がある。また、SEC ではやはり Mw が既知の一連の試料について Mw と溶出容量の関係から、較正曲線を求めておかななくてはならない。これらの分子量測定法は特殊な装置と高度の熟練を要するものが多いが、SEC は HPLC の一種

であるための装置、操作の一般性と、クロマトグラムから容易に分子量分布に関する情報を得ることができるという利点から、最も公定法として採用されやすい方法といえる。しかし、一方では、相対的測定法であるために分子量標準品を設定する必要があるという大きな問題点も抱えている。

最近、ヨーロッパ薬局方 (EP) や BP では、注射用デキストランにおける分子量分布の評価に SEC が採用され、米国薬局方フォーラム (USP Forum) でも類似案で提案されている。<sup>1,2,3)</sup>そこで、ここではデキストランにおける薬局方の動きを紹介するとともに、SEC を採用するにあたって考慮しなくてはならない分子量標準品の問題を取り上げてみた。

#### 1. デキストランにおける公定法の動き

デキストラン注射液は血漿増量剤として使用され、分子量1.5万以下ではすみやかに腎排泄されるが、5.5万以上では全く排泄されないというようにその効果は分子量に大きく依存することが知られている。従来、デキストランのモノグラフが収載されていた BP, JP では極限粘度で分子量規格を設定しており、全体の極限粘度のほかに、エタノールによる分別沈殿により得られる10%高分子分画部分、10%低分子分画部分の極限粘度範囲も定められており、分子量分布にも配慮した規格設定となっている。デキストランの分子量規格に関して1991年に USP フォーラムで、1992年に Pharmaeuropa で SEC の導入が相次いで提案された。その後、BP では1996年の Addendum で Appendix C. SEC の中にデキストランの分子量分布という項目が入れられ、EP

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed: Chikako Yomota; Hoenzaka 1-1-43, chuo-ku, Osaka 540, Japan; Tel: 06-941-1533; Fax: 06-942-0716; E-mail: yomota@nihs.go.jp

本ステートメントは、日本薬学会第117年会レギュラトリーサイエンス討論会 (1997.4, 東京) において発表した内容をまとめたものである。

では1997年に2.2.39. デキストランの分子量分布、という独立した項が設けられた。USPでは1995年のフォーラムで再提案の状態となっている。<sup>3)</sup>ここで、デキストランに採用された、あるいは提案中の分子量測定法は、通常のSECとは若干異なり、用いられるデキストラン分子量標準品がやや広い分子量分布を有しているために、較正曲線を求める際には、5種類のデキストラン標準品でSECにより計算される分子量が、光散乱による分子量の±5%以内の差で計算できるように最適化を行っている。<sup>4)</sup>そのために、この方法では標準品の他に、通常のGPCソフトには含まれない特殊な計算ソフト（あるいは高度の計算技術）が必要となるという問題点がある。以後この方法をDex法と記す。そこで、デキストランを通常の方法で評価することができないか検討することにした。

## 2. デキストランにおけるプルラン標準品の適用

一般に高分子の極限粘度と分子量の間には、Mark-Houwinkの粘度式 $[\eta] = K Mw^a$ が成立することが示されており、種々の高分子に対してK値やa値が求められている。SECにおける分離モードは分子量ではなく分子サイズであるため、標準とする高分子と、目的の高分子の分子量と粘度の関係、すなわち粘度式が大きく異なる場合には、妥当な分子量を見積もることはできない。河原らは、プルランの粘度式は分子量20万以下の範囲ではデキストランの粘度式とよく一致することを報告している。<sup>5)</sup>そこで注射用デキストランは分子量が数万と小さいため、SECにおいてプルランを分子量標準とすることができるのではないかと考え、Dex法を試みると同時に、プルランを分子量標準とした通常のSECの結果と比較検討した。Dex法とプルランによるそれぞれの較正曲線は、分子量20万以下の範囲ではよく一致し、計算されたデキストラン40、デキストラン70製剤の分子量値も、ややプルランを標準とした場合の方が大きな値となったが、その差は5%以内であり、分子量評価値として十分使用可能な範囲であった。従って、プルランを分子量標準として使用した通常のSECでも、Dex法とほぼ同様の分子量値が得られることから、特殊な解析ソフトを必要とするDex法に依らなくても、デキストランのSECによる分子量評価が可能であることが示された。

## 3. その他の荷電性多糖におけるSEC

その他の水溶性高分子の例として、カチオン性多糖としてキトサンをアニオン性多糖としてヒアルロン酸を取り上げ、同様にSECによる分子量測定を試みた。荷電性高分子では、分子上の荷電基間の反発により、分子が大きく広がっており、荷電のない高分子と比較すると、SECにおける溶出位置は同じ分子量で比較するとかなり早くなることが知られている。また、カラムとのイオン性相互作用を抑える目的で高濃度の電解質溶液を溶離液として用いること

が多い。

ヒアルロン酸のSECでは、0.2M NaClを溶離液とし、ヒアルロン酸の分子量の異なる一連の分画試料あるいはプルランを標準物質として分子量を求めた。ヒアルロン酸の分画試料はあらかじめ、光散乱法によりMw値が測定されている。ヒアルロン酸そのものを標準とした場合の分子量に比べ、プルランを標準としてヒアルロン酸の分子量を求めた場合は3-4倍の大きな分子量値が得られた。これは、プルランとヒアルロン酸では、同じ分子量でもその流体力学的半径が大きく異なることに起因する。SECの分離が、分子量ではなくその流体力学的半径に依存することから、水溶性合成高分子においては較正曲線の縦軸にMw $[\eta]$ をとること、すなわち粘度補正を行うことにより、この分子形態の差を補正できることが示されている。そこで、プルランを標準として、ヒアルロン酸およびプルランに関して報告されている粘度式 $[\eta] = K Mw^a$ を用いて粘度補正を行ったところ、ヒアルロン酸そのものを標準とした場合とほぼ一致する分子量値を得ることができた。ヒアルロン酸のSECにおいて、粘度補正を加えることにより、プルランを標準としてほぼ妥当な分子量値を見積もることができると考えられる。さらに、キトサンについても同様にキトサンの一連の分画試料及びプルランを用いてSECによる分子量測定を試みた。キトサンのSECでは、カラムに対する吸着を阻止するために、0.5M NaCl+0.5M 酢酸を溶離液としてSEC測定を行ったため、既報の粘度式を用いることができず、溶離液を溶解液とした場合の粘度式を求めて補正に適用した。<sup>6)</sup>キトサンにおいても同様に、粘度補正を行うことにより、プルランを標準としてもキトサンの分画試料を標準とした場合と類似した分子量が得られることが示された。

以上のように、デキストラン、ヒアルロン酸、キトサンのような水溶性多糖類に関して、すでに我が国で市販されているプルランを標準物質として統一化できる可能性が示唆された。

公定法におけるSEC法の採用にあたっては、個々の高分子について分子量分布の狭い標準品を調製するのが最良の方法であるが、膨大な労力と時間を投入しても不可能な場合も少なくないと思われる。個々の高分子物質の特性をふまえて、すでに確立された分子量標準品から最適なものを選び、ここで示したように粘度補正などにより絶対分子量に近い値を得る努力をするのが最も近道であると思われる。

あるいはより現実的な方法としては、プルランなどの分子量標準品を測定系を数値化するための手段として用い、粘度補正なども行わずにあくまで相対的評価であるとして、実際の絶対分子量とは全く異なるSECファクターとでも呼ぶべき値を規格値として設定することも考えられ

る。その場合にも、分子量分布に関わる  $M_w/M_n$  値などは、粘度補正を行った場合と同じ数値で与えられるため、得られる情報量に差はない。

昨年来、極めて特殊な Dex 法ではあるが、BP, EP と相次いで公定法に SEC が採用され、USP も同様の歩みを続けている。日本薬局方においても、早急に、SEC のカラム、機器メーカー、製薬企業の品質管理担当者などの協力の基に、分子量規格について対策を始めなくてはならない時期が来ている。

## 文 献

- 1) *European Pharmacopoeia*, 3rd Ed., 41~43 (1997)
- 2) *British Pharmacopoeia 1993*, Addendum 1996, Appendices A499-A501.
- 3) *US Pharmacopoeial Forum*, **21**, 1267~1282 (1995)
- 4) Nilsson, G. and Nilsson, K.: *J. Chromatgr.*, **101**, 137~153 (1974)
- 5) Kawahara, K., Ohta, K.: *Carbohydrate Polymer*, **4**, 335~356 (1984)
- 6) Yomota, C., Miyazaki, T., Okada, S.: *Colloid & Polym. Sci.*, **271**, 76~82 (1993)



## 平成8年度業務概要

所長 寺尾 允 男

平成7年度業務概要で報告した厚生省試験研究機関の組織再編計画とは別に、平成8年度において、薬事行政組織の再編の一環として、国立衛生試験所の名称を国立医薬品食品衛生研究所に変更すると共に、本研究所に医薬品医療機器審査センターを設置する案が検討され、平成9年7月から同センターを発足させると共に、名称変更も行うことが決定された。

## 試験研究業務

衛生試験所の業務目的は、医薬品、食品、医療用具、生活環境中の化学物質などの品質、安全性、有効性などについて適切に評価するための研究、調査及び行政試験などを行うことにある。

平成8年度に行った研究の成果として誌上発表した論文(原著論文)数は263編である。それらの論文の表題、要旨等は本誌265～309ページにまとめてある。また、平成8年度に行った主要研究テーマは370～375ページに示してある。

現在、所内コンピュータネットワークが完成し、所内各部からインターネットを通じて外部の機関との情報交換が可能となっている。当所が持っているさまざまな情報を可能な限り外部の研究者に提供すると共に、厚生省にも協力して、行政上重要な情報を当所のホームページにも掲載するようにしている。

## 国際共同研究

当所は多くの国際機関と連携し、国際共同研究を進めている。以下にそれらの主なものを示した。

1. 経済協力機構(OECD)化学プログラム
2. 国際化学物質安全計画(IPCS)
3. 国際化学物質安全性フォーラム(IFCS)
4. 日米欧医薬品承認審査ハーモナイゼーション国際会議(ICH)
5. 中国天津医薬品検疫所技術プログラム
6. 二国間科学技術協力(日米、日ポーランド)

## 国際交流

国際交流としては、厚生行政に関連する国際会議への専門家としての参加、国際学会あるいは外国の学会での発表及び招待講演、並びに外国人研修生の受け入れなどが主なものである。

平成8年度海外派遣者は延べ152名であった。内訳は留学9名、2国間共同研究あるいは学会への招聘又は参加、延べ82名、並びにJICA等のプロジェクトによる外国への技

術援助等12名のほか、延べ49名が行政に関連する国際会議への出席者であった。国際会議の内訳はICH17名、IPCS4名、IFCS5名、OECD9名、FAO/WHO合同会議7名、その他である。

外国人研究員及び留学生の受け入れは18名であった。

## 関連集会

7月9日につくば国際交流センターにおいて、薬用植物栽培技術の向上と、当所の薬用植物栽培試験場における研究成果を、広く国内の研究者及び栽培者に還元することと薬用植物の栽培、研究に携わっている人々の交流を目的として、第6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11月14日～15日京都市衛生公害研究所・今宿晋作所長を年会長として、京都市において開催された。分析法のGLPに関するワークショップと食品、環境、薬事及び家庭用品の分科会における会員の研究発表のほか、それぞれの分野で自由集會がもたれ、活発な議論を行った。

## 人事異動

平成8年度における部長以上の人事異動では、高橋 博 代謝生化学部部長が、平成9年3月31日をもって定年退職した。

総務部

部長 清水 義 勝

## 1. 定員

平成7年度末の定員は264名であったが、平成8年度は、インプラント用具の評価に係る研究業務の強化に伴う療部部の定員として1名(埋植医療用具研究室長・6カ月)増員、国立社会保障・人口問題研究所の新設に伴う体制の整備に伴う振替減1名、第8次定員削減計画に基づき研究職1名、並びに行政職(一)2名、計3名の定員削減により、平成8年度末の定員は、指定職2名、行政職(一)41名、行政職(二)19名、研究職199名、計261名となった。

## 2. 予算

平成8年度の予算の概要は次のとおりである。

## (1) 一般予算

予算額は、3,882,889千円で前年度に比較して117,185千円(3.1%)の増額が図られた。

増額、減額の主な項目としては、

- ① 増員要求に伴う経費の増 3,397千円
- ② 経常事務費の研究費の増(研究員当積算庁費単価アップに伴う増@1,360千円→@1,375千円) 1,7435千円
- ③ 標準品製造費の減(2品目追加に伴う増3,667千円、5品目委譲に伴う減△2,062千円、その他既存品目所

- 要額等の減△3,018千円) △1,413千円
- ④ 安全性生物試験研究センター運営費の増(光熱水料統一査定による減△1,908千円, 廃棄物処理施設維持管理費の増3,573千円) 1,717千円
- ⑤ 情報活動運営費の減(研究情報活動費基盤整備費に振替) △42,237千円
- ⑥ 施設管理事務経費の増(庁舎管理費に係るメンテナンス経費のベアUP分539千円, 4試験場庁舎等警備委託の平年度化による増2,325千円, 圃場用作業車の増3,114千円, 自動車交換差金の減△3,400千円, 国有資産所在市町村交付金の増29千円) 2,607千円
- ⑦ 総合化学物質安全性研究費の増(新規課題 生活環境暴露評価基盤研究による増23,928千円, 賃金の単価UPによる増72千円) 21,343千円
- ⑧ 共同利用型高額研究機器整備費の減(光熱水料統一査定による減) △106千円
- ⑨ 研究情報ネットワークシステム整備費の減(研究情報活動基盤整備費に振替) △42,310千円
- ⑩ 培養生物資源保存管理基盤整備費の増(光熱水料統一査定による減△338千円, 備品費の増12,339千円, 消耗品費の減△1,339千円, 賃金の増99千円) 10,761千円
- ⑪ 研究情報活動基盤整備の増(新規事項) 78,163千円
- ⑫ 摘出インプラント用具の適合性解析法研究費の増(新規事項) 35,540千円
- ⑬ 血清等製造および検定費の増(1品目追加に伴う増) 4,422千円

等が挙げられる。

#### (2) 移替予算

予算額は、159,033千円で前年度に比較して△6,702千円(4.4%)の減額となった。

新規課題としては、国立機関公害防止等試験研究費において2課題(水質汚染モニタリングのための遺伝毒性を指標としたバイオセンサー系の開発15,222千円, 有害金属の形態別分析技術の開発と地下水汚染機構解明に関する研究3,764千円)が認められた。

なお、平成8年度事項別予算額は別紙のとおりである。

### 3. 施設整備状況

平成8年度の施設整備については、以下のとおり整備を行った。

#### (1) 予算関係

- ① 筑波薬用植物栽培試験場 人工光室改修工事

### 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るべき医薬品に、新たに「ヒト二相性イソフェンインスリン水性懸濁注射液」の1品目が追加された。

この結果、当所の試験に係る国家検定品目は、8品目から9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により、医薬品等試験用標準品「セクレチン標準品」、及び「メシル酸ジヒドロエルゴトキシン標準品」を追加し、「アスコルビン酸標準品」、「チロジン標準品」、「ニコチン酸標準品」、「ニコチン酸アミド標準品」、「葉酸標準品」を(財)公定書協会に委譲した。

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97品目、色素試験用標準品38品目、計135品目となった。

### 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行政機関等の移転)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)、東京都及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、国有財産地方審議会での留保地解除のための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」からの答申が出され、市民斎場問題が決着を見たことにより、平成10年度の特定国有財産整備特別会計要求に向けて留保地の全体利用計画策定(東京都、府中市及び当所の三者協議)に着手可能となっている。

#### (2) 支所(大阪)

平成2年8月の近畿財務局による「行政財産等の使用状況」の実態調査の結果、国有地の非効率利用との指摘があり、集約整備について、別地移転を含め検討が必要とされており、

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、騒音及び大気汚染等のため、研究業務を行う上で適切な環境条件にないこと。
- ③ 更に、組織再編計画の一環として大阪支所を『国立厚生科学基盤技術開発研究所(仮称)』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」を候補地の1つとして、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。

別表	平成 8 年 度 予 算 額				備 考
	平成 7 年度 (A)	平成 8 年度 (B)	対前年度差 引増△減額 (B)－(A)		
	(千円)	(千円)	(千円)		
(組織) 厚生本省試験研究機関	3,765,704	3,882,889	117,185		
(項) 厚生本省試験研究所	3,542,101	3,670,134	128,033		
国立衛生試験所に必要な経費	3,542,101	3,670,134	128,033		
既成定員に伴う経費	2,281,659	2,339,990	58,331		
人件費	2,281,659	2,339,990	58,331		
増員要求に伴う経費	0	3,397	3,397		
人件費	0	2,635	2,635		
人当経費	0	52	52		
研究費	0	710	710		
経常事務費	301,714	303,148	1,434		
人当経費	7,664	7,625	△ 39		
一般事務経費	45,825	45,687	△ 138		
研究費	240,127	241,870	1,743		
官庁会計事務データ通信システムに必要な経費	8,098	7,966	△ 132		
特別研究費	16,396	16,412	16		1. 安全性評価のための迅速かつ鋭敏な毒性指標の確立に関する研究 (9,138千円) 2. 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 (7,274千円)
標準品製造費	48,243	46,830	△ 1,413		
安全性生物試験研究対センター運営費	204,507	206,224	1,717		
薬用植物栽培試験場運営費	103,423	101,832	△ 1,591		
情報活動運営費	42,237	0	△ 42,237	研究情報活動基盤整備費に振替	
施設管理事務経費	82,880	85,487	2,607		
受託研究費事項	167,454	166,955	△ 499		1. バイオテクノロジー応用医薬品の評価技術の開発 (6,972千円) 2. バイオテクノロジーを利用した食品の開発 (12,500千円) 3. 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 (20,578千円) 4. 糖鎖関与疾患の発症機構の解明 (3,000千円) 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 (14,956千円) 6. 遺伝子治療用ベクターの開発と評価技術の確立 (5,250千円) 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 (13,804千円) 8. 高機能を有する医用材料の創製・改良・修飾・及び周辺技術に関する研究 (8,000千円) 9. 医用材料と生体の相互作用の総合化技術の開発 (5,982千円) 10. 薬用植物の科学的研究 (13,794千円) 11. 免疫系による生体防御機構の解明と新規生体調節物質の開発 (31,000千円)

事 項	平成7年度 (B) (千円)	平成8年度 (B) (千円)	対前年度差 引増△減額 (B)-(A) (千円)	備 考
				12. 神経系の機能・病態の解析と医療への応用 (13,912千円)
				13. レセプターなどの細胞膜を介した生体調節機構の解明と医療への応用 (13,923千円)
				14. 代謝調節機能に及ぼす環境要因の解析 (2,060千円)
				15. 医療用具の滅菌保証の評価の基礎に関する研究 (1,224千円)
乱用薬物基礎研究費	19,067	19,103	36	薬物乱用、特に市販配合剤乱用時の依存性形成態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 (19,103千円)
総合化学物質安全性研究費	99,365	123,552	24,187	1. 安全性点検体制支援システム経費 (70,916千円) 2. 安全性試験法開発等研究費 (28,708千円) 3. 生活環境暴露評価基盤研究費 (23,928千円)
移 転 調 査 検 討 費	2,673	2,673		
共 同 利 用 型 高 額 研 究 機 器 整 備 費	99,505	99,399	△ 106	
研究情報ネットワーク システム整備費	42,310	0	△ 42,310	研究情報活動基盤整備費に振替
培養生物資源保存管理 基盤整備費	30,668	41,429	10,761	
研究情報活動費基盤整備費	0	78,163	78,163	1. 研究情報ネットワークシステム基盤整備費 (21,506千円) 2. 研究情報整備事業 (14,381千円) 3. 情報を基盤とする化学物質安全性国際協力事業 (42,276千円)
摘出インプラント用具の適 合性解析法研究費	0	35,540	35,540	
(項) 血清等製造および検定費	117,285	121,707	4,422	
医薬品の国家検定及び 検査等に必要経費	117,285	121,707	4,422	
一般事務経費	12,907	12,916	9	
事業費	104,378	108,791	4,413	
(項) 厚生本省試験研究所施設費	106,318	91,048	△ 15,270	
国立衛生試験施設整備費経費	106,318	91,048	△ 15,270	筑波薬用植物栽培試験場人工光室 改修工事
(移替予算)				
(組織) 厚生本省試験研究機関	165,735	159,033	△ 6,702	
(項) 国立機関公害防止等 試験研究費	57,407	64,326	6,919	
(項) 国立機関原子力試験研究費	108,328	94,707	△ 13,621	
	3,931,439	4,041,922	110,483	

\*予算額については両年度とも当初予算額

## 薬 品 部

部 長 小 嶋 茂 雄

## 概 要

平成8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、並びに麻薬及び依存性薬物に関する研究について試験・研究を実施した。ソリブジン事件やエイズ訴訟を契機として医薬品の安全性確保のための施策の強化が求められており、その一環として平成9年7月には国立衛生試験所に医薬品審査センターが設置されることになっている。薬品部においても、こうした医薬品を巡る動きをにらんで、業務の見直しを図っていく必要があると思われる。

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、並びに日本薬局方の規格及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、経口や非経口の製剤のバイオアベイラビリティに影響を与える生体内の諸因子を明らかにして、ヒトへの外挿性に優れたインビトロの試験系や動物を用いた試験系を確立するための研究、製剤中における医薬品の安定性を支配する因子を解明することにより、その安定性を予測し得る試験法を確立するための研究、並びに添加剤による医薬品の安定化に関する研究などを行った。

麻薬及び依存性薬物に関する研究では、血液、尿、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、毛髪や尿の分析による薬物使用の鑑定法の研究、並びに薬物乱用の原因究明への毛根の利用に関する基礎的研究などを行った。

島峯彦彦主任研究官は、平成9年3月31日付けで定年退職された。昭和34年以来38年間の長きにわたって当所において職務に精励され、所の発展に尽くされてきたことに感謝の意を表明するものである。

科学技術庁 STA フェローの Dr. Yi Luo (中国) は、平成8年7月から1年間の予定で薬品部において医薬品の安定性の研究に従事している。

長期の海外出張では、伊豆津技官は、米国コロラド大学薬学部・カーバンター教授の招請により、昨年度に引き続いて同教授の下に留学し、タンパク質含有医薬品の安定性評価法及び安定化に関する研究を行った。

短期の海外出張については、次のとおりである：

小嶋部長は、ICH 4 準備会合（品質分野）に出席するため、米国（平成8年4月～5月及び同年8月）並びに英国（平成8年11月）に出張した。

鹿庭主任研究官は、ICH 4 準備会合に出席するため、英

国に出張した（平成8年11月）。

吉岡室長は、HS 基礎研究・国際共同研究事業に係る研究打ち合わせのため、英国に出張した（平成8年8月）。また、欧州製薬協主催のシンポジウムにおいて講演を行うため、英国に出張した（平成8年10月）。更に、米国薬剤学会年会における研究発表、並びに ICH 4 準備会合への出席のため、米国並びに英国に出張した（平成8年10月～11月）。

石橋室長は、欧州薬局方主催の医薬品の品質に関する国際会議及び日米欧薬局方会議に出席のため、チェコに出張した（平成8年12月）。

中原室長は、国際法中毒学会において研究発表を行うため、スイスに出張した（平成8年8月）。また、国際乱用薬物シンポジウムにおいて招待講演を行うため、韓国に出張した（平成8年10月）。

## 業務成績

## 1. 特別審査試験

新薬82件について試験した。

## 2. 特別行政試験

あへん中のモルヒネの含量について試験を行った（国産あへん27件、輸入あへん84件、合計111件）。

## 3. 標準品の製造

次の2種の標準品を製造した：

(+)-トレオ-2-アミノ-1-フェニルプロパン-1-オール (21g), 2-(メチルアミノ)-1-フェニルプロパン-1-オン (5g)

## 4. 国際協力

国際厚生事業団の第7回必須医薬品製造管理研修に協力して、アジア諸国の医薬品製造管理者に対する研修を行った。

国際協力事業団の中国天津医薬品検査技術協力プロジェクトの第四年度（平成8年度）の研修員として平成8年5月12日に来日した天津市薬品検査所の劉軍薬師は、千葉県衛生研究所及び国立衛生試験所（薬品部）における6ヵ月間の FT-IR/不正医薬品鑑別分析などに関する研修を終えて、平成8年11月16日帰国した。また、平成8年5月28日に来日した王麗琴薬師は、国立衛生試験所（薬品部）における6ヵ月間の製剤分析に関する研修を終えて、平成8年11月30日帰国した。

小嶋部長は、国際協力事業団の中国天津医薬品検査技術協力プロジェクトの巡回指導調査団の一員として、中国天津市薬品検査所を訪問し、プロジェクトの進捗状況を視察すると共に、技術協力を進める上での問題点並びに今後の計画について中国側と協議した（平成8年9月）。

## 5. その他

中央薬事審議会の各種調査会における審議（薬務局審査課及び安全課）、日本薬局方の改正作業（薬務局研究開発

振興課), 日本薬局方外医薬品規格及び医薬品添加物規格の改正作業(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), 麻薬及び乱用薬物に関する情報収集(薬務局麻薬課)並びに日本工業規格(JIS)の改正作業(通商産業省)などに協力した。

後発医薬品の生物学的同等性試験ガイドライン(案)を作成した(薬務局審査課)。

## 研究業績

### 1. 医薬品の分析法に関する研究

H2 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)。

キャピラリー電気泳動を用いて, 生薬などが配合された胃腸薬中のアルジオキサの分析法を確立した。

熱帯病治療薬の開発のため, 抗マラリア剤の簡易迅速分析法を作成した(厚生科学研究費補助金)。

厚生大臣指定検査機関精度管理要項(案), 並びに試験検査実施に関する運用規準(案)の検査機関における運用について調査研究を行った(薬務局監視指導課委託研究費)。

前年度までに開発した不正医薬品の鑑別試験法を開発途上国において実用に供すべく, 英訳して製本化した(国際厚生事業団技術移転振興対策事業費)。

### 2. 日本薬局方の規格及び試験方法に関する研究

新たに日本薬局方に収載する一般試験法として, USP 及び EP と調和した残留溶媒試験法を開発した(厚生科学研究費補助金)。

### 3. 医薬品の有効性, 安全性に関する薬剤学的研究

ヒトと同じ程度の消化管内攪拌力を有するモデル動物の作成を目的として, その薬物による制御について検討を行い, リン酸コデインの投与が胃排出に影響を与えることなく, イヌの消化管内攪拌力をヒトと同程度まで低下させることを明らかにした(HS 財団受託研究費)。

溶出試験のバリテーション法について検討を行い, 装置の振動や溶媒の脱気が一部の製剤の溶出速度に著しい影響を与えることを明らかにした(生物学的同等性の評価に関する研究費)。

坐剤のインビトロ放出速度は, 人工膜の種類によって影響を受け, 坐剤が展延しやすい滑らかな膜の方がバイオアベイラビリティとの相関性がよいことを明らかにした。

### 4. 医薬品の物理・化学的安定性に関する研究

安定性の包装及び処方間変動を評価する方法として, 推定値の信頼区間に基づいて安定性の同等性を評価する方法の有用性を有意差検定による方法と比較検討した(HS 財団国際共同研究費)。

凍結乾燥製剤中のタンパク質の安定性が, NMR の緩和の測定から求められるタンパク質分子の運動性が急激に変化する温度  $T_m$ , 並びに高い運動性に起因する緩和過程の

比率  $P_{nm}$  などのパラメータと相関すること, これらのパラメータを用いて安定性が予測できることを明らかにした(創薬科学総合研究費)。

デキストランをゲルの骨格成分とし, 相転移現象を示すゼラチンを骨格に絡み合う成分として用いることにより, 温度変化にตอบสนองしてタンパク質を放出する機能を有するハイドロゲルを調製し, その温度応答性やタンパク質の放出速度に及ぼすゲル組成の影響を明らかにした(HS 財団受託研究費)。

$\gamma$ 線照射によって, ゼラチン誘導体のハイドロゲルに  $\beta$ -ガラクトシダーゼなどのタンパク質を安定に内包させることができた。 $\gamma$ 線の照射量を変化させてゲルの架橋度を調節することによって, 薬物放出速度を制御できることが明らかとなった(国立機関原子力試験研究費)。

### 5. 麻薬及び依存性薬物に関する研究

幻覚剤 MDMA を投与したラットから得られた毛髪を試料に用い, 毛髪中の MDMA 及びその主代謝物の定量法を確立した。この方法を用いて, MDMA を服用したヒトの頭髪から親化合物及び主代謝物を検出し, 診断に役立てることができた。

食欲減退剤のフェネチリンが体内で代謝を受け, 覚せい剤アンフェタミンに変化する過程を追跡し, 血液, 尿及び毛髪からの検出を試みた。その結果, 毛髪分析によりフェネチリンの使用と覚せい剤の使用とを識別できること, 一方, 他の生体試料の分析では両者を識別できないことが分かった。

麻薬及びメタカロン系向精神薬の6種の薬物について, 呈色反応, 並びに TLC, GC, HPLC 及び GC-MS により分析を行い, それらの測定結果に基づいて, 分析マニュアルを作成した(薬務局麻薬課委託研究費)。

急性中毒量の覚せい剤を動物に投与し, 毛根を採取して分析したところ, 毛根中に高濃度の覚せい剤を検出すると共に, 投与後, 数分で薬物が毛根に達することを見出した。この結果から, 毛根が急性中毒の原因解明の重要な試料となり得ることを確認した。

## 生物薬品部

部長 早川 堯 夫

## 概要

行政に科学的根拠を提供する研究を行うこと, 大学や企業がなしえない先端的基盤的研究を行うこと, 世界的に評価される独創的研究を行うことなど, 国の研究機関への要望や期待はますます高まっている。当部の業務対象である新たな生物薬品は, 高度化と多様化が急激に進行している生命科学研究のいろいろな分野からその先端的成果と医薬

品としての総合化の結晶として生み出されてきている。これに対応する研究の高度化や先端化に関しては、例えば分野をきわめて特定し、当該分野での研究基盤の整備に努め、集中して研究を展開していけば実現は可能であろう。しかし、このアプローチは多様化には有効とはいえない。この現実と国研に期待される、あるべき研究の姿との間で模索が続いている。一方で、行政需要による業務も少なくない。この一年、当部が多かれ少なかれ関与した新たな業務には、遺伝子治療薬や細胞治療薬の品質・安全性確保問題、海綿状脳症対策問題、O-157治療薬問題、エイズ治療薬問題等々があった。従来からの各種調査会、審議会、検討会への参画、バイオ医薬品関連のICHや局方の国際調和活動、国際協力活動にも変わらぬ業務要請があり、あるものは拡大の一途を辿ろうとしている。ICHで細胞基材及びウイルス安全性に関するGLがまとまってきたのは大きな成果であるが、払った時間と労力も非常に多大であった。局方の国際調和活動の進捗にはICH以上の仕事量と迅速な対応が必要と予測される。これらの行政に密着した業務と日常の研究活動をどうリンケージしていくのかも課題である。平成8年度の主な研究業務としては、生物薬品の特性・品質評価技術の開発に関する研究、医薬品の有効性・安全性に関する生物化学的研究、生体内活性物質の作用機序と細胞機能に関する研究、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、診断用医薬品の評価技術及び関連基礎研究などを行った。この中で遺伝子治療薬基盤研究が新たに一步を踏み出した。

人事面では、平成9年3月31日付けで診断用医薬品室長福岡正道氏が定年退官された。同氏は29年間の長きにわたり数々の研究業績を挙げられ当所の業務遂行と発展のために多大な貢献をされた。平成9年4月から昭和薬科大学教授としての傍ら、当部の客員研究員として研究を続けて頂くこととなった。新見伸吾主任研究官が平成8年10月1日付けで厚生科学課併任となり、平成9年4月1日併任解除となった。川崎ナナ研究員が平成9年4月1日付けで主任研究官に昇格した。平成8年8月1日付けで科学技術振興調整費：重点研究支援協力員制度による非常勤職員が採用され、配置された。橋本 統氏が平成9年4月1日付けでHS財団流動研究員として新たに派遣された。

海外出張は以下の通りであった。早川部長：ICH4に向けてのバイオ医薬品の品質分野の専門家準備会合並びに規格に関する国際シンポジウムに出席（米国、平成8年4月29日～5月6日）、O-157関連医薬品（Synsorb-pk）の現地における調査（カナダ、平成8年8月7日～8月11日）、ICH4に向けてのバイオ医薬品の品質分野の専門家準備会合並びにWHOシンポジウムに出席（フランス、平成8年9月24日～10月5日）、第8回医薬品規制当局国際会議（ICDRA）に出席（バーレーン、平成8年11月8日～11月13

日）、バイオテクノロジー医薬品に関する国際シンポジウムにおいて講演（韓国、平成8年11月25日～11月27日）、ICH4に向けてのバイオ医薬品の品質分野の専門家準備会合に出席（米国、平成9年1月8日～1月14日）、国家検定から国家検査への移行に伴う輸出国の現状調査（デンマーク・フランス、平成9年3月15日～3月23日）；森本室長：中国天津医薬品検査技術プロジェクトに生化学の専門家としてヒトインスリンや糖タンパク質の品質管理について技術指導に従事（平成8年8月28日～平成8年10月5日）；川西室長：ICH4に向けてのバイオ医薬品の品質分野の専門家準備会合並びにWHOシンポジウムに出席（フランス、平成8年9月24日～10月5日）、ICH4に向けてのバイオ医薬品の品質分野の専門家準備会合に出席（米国、平成9年1月8日～1月14日）；内田恵理子主任研究官：科学技術庁長期在外研究員として米国ハーバード大学医学部に留学し、細胞の増殖、分化の制御に関するシグナル伝達の分子機構の解明に関する研究に従事（平成7年9月1日～平成8年8月31日）；川崎ナナ研究員：HS基礎研究支援事業により米国ジョージア州ホプキンス大学生物学部で糖鎖含有医薬品の品質評価試験法に関する研究に従事（平成8年9月27日～平成9年3月26日）。

#### 業務成績

##### 1. 特別審査試験

新薬5件について試験した。

##### 2. その他

第13日本薬局方改正に伴う業務（薬務局研究開発振興課）、中央薬事審議会各種調査会・部会（薬務局審査課、研究開発振興課）、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）、治験薬GMP、生物学的製剤等GMP検討会（薬務局監視指導課）、食品添加物公定書第七版作成検討会（生活衛生局食品化学課）、厚生省HIV遺伝子治療研究作業部会／文部省遺伝子治療臨床研究（HIV）審査ワーキンググループ（厚生科学課／文部省研究助成課）、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) シアル酸含量の低い組換えヒト型エリスロポエチン（r-hEPO）に、 $\alpha 2, 6$ -sialyltransferaseと $\alpha 2, 3$ -sialyltransferaseを用いてシアル酸を導入し、*in vivo*生物活性の変化を調べたところ、いずれも同程度の活性の上昇が認められたことから、シアル酸の結合様式は*in vivo*活性に影響しないことがわかった（HS財団受託研究費）。

ii) r-hEPO製剤の糖鎖部分の品質評価法の確立を目的として、ANTS標識糖鎖の蛍光体支援糖質電気泳動法（FACE法）を用いて3種のEPOの糖鎖の逐次消化パターンを解析し、シーケンシング法がEPO糖鎖の分子多様性を解析する方法として有用であることがわかった（HS財団受

託研究費)。

iii) M-CSF レセプター高発現細胞株が親細胞株に比べて TPA による分化誘導に強い感受性を示す機構の一つとして、高発現細胞株においてプロテインチロシンホスファターゼの含量、生合成が増大していることが考えられた (HS 財団受託研究費)。

iv) バイオテクノロジー応用医薬品の評価技術の開発の一環として、トロンボモジュリン (TM) を取り上げ、各 TM の社内力価 (単位) の相互関係、二種類の測定系に対する反応性を調べた。その結果二種類の測定系において各社 TM は直線関係を示し、かつ同様な濃度依存性を示すこと、更に個々の社内力価 (単位) が相互に換算可能であることを確認した (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並びに各種薬剤の有害作用発現に関する生化学研究の一環として、L-plastin の至適量のリン酸化が活性酸素産生系の活性化に必要であることを見いだした。

ii) 血栓溶解剤 t-PA 投与後の血管再閉塞の原因とされているプラスミンによる血小板凝集について検討し、ヒト血小板のプラスミンに対する反応性が加齢と共に増加することを明らかにした。また、プラスミンによる血小板凝集は t-PA により促進され、ADP 及びトロンピンによる血小板凝集は逆に抑制される現象を見だし、プラスミンによる血小板凝集には ADP 及びトロンピンとは異なる機構が存在することを示した (HS 財団受託研究費)。

iii) 創薬研究の基盤技術として細胞内生化学現象の画像化法の開発を行い、細胞内貯蔵部位からのカルシウムイオン遊離の共焦点レーザー顕微鏡画像化に成功すると共に、高速ラインスキャン法を用いた心室筋細胞のカルシウムスパークと電気刺激によるカルシウム上昇の比較、血管壁組織中の血管内皮細胞内カルシウムイオン変動の解析を行った (HS 財団創薬科学総合研究事業)。

iv) 精巣萎縮が起こる要因をまとめた結果、精細管管腔液あるいは精細管液の変動が関与することが判明した。

## 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) ヒト赤芽球系培養細胞 K562 株を用いてヘモグロビン合成調節機構について検討し、ヘモグロビン合成はトランスフェリン受容体の発現によって調節されていること、また、ヘムはトランスフェリン受容体の発現を低下させることによってヘム合成を抑制することが明らかとなった (厚生科学研究費補助金)。

ii) ホルモン剤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、初代培養肝細胞におけるハービマイシン A によるグルココルチコイド受容体の減少作用について調べた結果、分解の亢進によるものであることを示唆する結果を得た。

iii) 細胞増殖、分化誘導の調節機構に関する研究として、増殖因子・サイトカイン刺激により誘導される Stat 3 のセリンリン酸化について検討し、EGF などのシグナル伝達系では主として MAPK が Stat 3 のセリンリン酸化に関与しているが、IL-6 では MAPK 以外のキナーゼが関与していることを明らかにした。

iv) カルシウムイオンと cAMP を介した細胞内情報伝達機構へ影響する環境汚染物質の検索法の総合評価を行った (環境庁公害予算)。

v) 心室筋細胞内で生じるカルシウムスパークは細胞内貯蔵部位からの一定単位の放出現象であることを示すと共に、cAMP はこの現象を強めることを明らかにした (文部省科学研究費補助金)。

vi) 食細胞の活性酸素産生系の調節因子の解明と機能分化に係わる因子についての研究の一環として、HL-60 細胞の好中球への分化に対する G-CSF の促進作用の解析を行い、機能分化の促進と Rac 2 の発現亢進が相関することを見いだした。また、G-CSF による HL-60 細胞の好中球分化への促進作用には Stat 3 の活性化が関与することを示唆する結果が得られた (HS 財団受託研究)。

vii) 病態時における生理活性ペプチドの変動に関する研究として、動物の肢の損傷により、反対側の肢においてサブスタンス P が減少することを観察した。

## 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研究

i) 膜融合リポソームの遺伝子導入特性解析の一環として末梢血リンパ球との反応性を解析し、monocyte, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>T 細胞へは本ベクターを用いた物質導入が可能であること、更に B 細胞, CD4<sup>+</sup>T 細胞, CD8<sup>+</sup>T 細胞は本ベクターとの融合が起こらないことを見いだした (厚生科学研究費補助金)。

ii) フォトニクス技術を用いた細胞内生化学現象の画像化法の高度化を計ると共に、細胞内 pH 画像化法を改良して、培養海馬ニューロンの細胞内カルシウムイオン、pH を画像化したところ、グルタミン酸刺激による細胞内アシドーシスへの細胞質カルシウムイオン濃度上昇以外の要因の関与を示唆する結果を得た (HS 財団創薬科学総合研究事業)。

## 5. 診断用医薬品に関する基礎的研究

i) 安全性評価のための迅速かつ鋭敏な毒性指標の確立に関する研究として、PCR を用い、肝臓毒による HGFmRNA の変動を迅速に定量することができた。

ii) アシアロ糖タンパク質受容体の RIA による定量法を確立した (科学技術庁国立機関原子力試験研究費)。



## 生 薬 部

部 長 佐 竹 元 吉

## 概 要

昨年度に引き続き、主として生薬の規格・試験法の基礎研究及び生薬成分、天然物有害物質の化学的試験及び安全性の試験、生薬薬理学的研究及び薬物動態学的研究を行った。薬局方の生薬基原植物を再検討し、13局の追補に反映させた。生薬の微生物汚染に関する研究を開始した。病態動物の心筋細胞が異常な活動電位持続時間の延長を示したので、そのイオン機序を解析した。国際的交流としてはブラジル湿潤熱帯研究センター及び天津医薬品検査技術プロジェクトへ技術援助を行った。

海外出張は JICA 天津医薬品検査技術プロジェクトの専門家として佐竹元吉部長が平成 8 年 9 月 17 日から平成 8 年 9 月 24 日まで、尾崎幸紘室長が 10 月 27 日から 11 月 2 日まで中国に出張した。関田節子主任研究官は、アメリカの薬局方と薬用植物のシンポジウムに参加のため平成 8 年 7 月 6 日から 7 月 11 日までアメリカへ、植物性麻薬及び薬局方生薬の調査のため平成 9 年 3 月 13 日から 3 月 23 日までフランスへ出張した。ペルー国際薬学会発表及びペルー薬用植物調査のため、関田節子主任研究官、川原信夫主任研究官及び代田修研究員は平成 8 年 11 月 19 日から 12 月 2 日までペルーへ出張した。代田修氏を科学技術庁特別研究員として平成 6 年 9 月 1 日より平成 9 年 3 月 31 日まで、また、バン格拉デシュの C.F.Hossain 氏をヒューマンサイエンス財団フェロー流動研究員として平成 6 年 3 月 29 日から平成 8 年 7 月まで、下村裕子氏を客員研究員として引き続き受け入れた。中国から天津医薬品検査技術プロジェクトで Rui 氏(平成 8 年 5 月 15 日から 6 か月間)及びインドから Vibha P. 氏(平成 7 年 5 月 15 日から 1 年間)を研究生として受け入れた。

## 業 務 成 績

1. 特別審査  
なし

## 研 究 業 績

## 1. 生薬及び生薬製剤の規格試験の研究

## i) 生薬の規格・試験法の基礎研究

アロエ、カッコンなど薬局方生薬の成分定量法を検討している。その他にゲンノショウコについて、HPLC 法によるゲラニンの簡易定量法をほぼ確立した。

ビンロウジを含む漢方製剤において、同生薬の薄層クロマトグラフ法による確認試験法を設定した。

国立衛生試験所標準品の製造で、支所薬品試験部と、メシル酸ジヒドロエルゴトキシンの規格設定を行った。

大麻の成分変種を分子生物学的手法により分類・同定す

る目的で、麻薬種、中間麻薬種及び繊維種よりゲノム DNA を抽出し、RAPD 分析及び RFLP 分析を適用した。その結果、これらの分析方法を組み合わせる用いることにより、成分変種である品種間での鑑別に応用できる可能性が示された(厚生科学研究)。

## ii) 生薬の化学的品質評価の研究

生薬、生薬製剤への照射による滅菌効果、含有成分への影響を HPLC, GC-MS により検討した(科技厅・原子力)。ビンロウジの確認試験で有害試薬を用いないクリーンアナリシスを志向し、薄層クロマトグラフ法によりアルカロイドを確認する方法を設定した。*d*-borneol に改良 Mosher 法を適用することにより絶対構造を確認し、旋光性の関係について検討を行った。

## iii) 生薬製剤の評価技術に関する研究

生薬の立体異性体成分の分析及び肉芽形成組織に対する作用を検討してきた。分析学的研究では、サイコ抽出物をミニカラムで処理するサイコサポニンの精製法を確立した。これと昨年までに達成した HPLC 法を結合し、市場のサイコの成分定量を行った(HS 研究)。

## 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

LH 基礎分泌抑制作用を示す piri-piri の *in vitro* アッセイ系として視床下部一下垂体共培養系を開発し、微量の GnRH 分泌を測定する高感度 EIA を確立した(HS 研究)。

ペルー産生薬 Herculampuri, yawar piri-pieri の成分検索を行い、前者のジクロロメタンエキスより新規 2 化合物の、後者のメタノールエキスより新規ナフトキノン 1 種及び新規アンスラキノン 1 種の化学構造を立体的な検討を含めて決定した(HS 研究)。

ペルー産植物生薬 Palo de sangre の微量成分の検索を引き続き行い、2 種の新規天然 Diels-Alder 型付加体を単離し、構造を決定した(HS 研究, 科技厅)。

## ii) 汎用生薬の成分検索とその生物活性の研究

大深当帰、北海当帰、中国産当帰の *in vivo* における子宮平滑筋収縮抑制作用を比較した。また、RAPD 分析により北海当帰の遺伝的特性を検討し、大深当帰とは異なる系統群であることを明らかにした(HS 研究)。

精子形成障害モデルアッセイ系により、インヨウカク、ケイヒ、ツルニンジンに活性を認め、インヨウカクの主活性成分としてイカリインを検討した(HS 研究)。

脳卒中易発症高血圧ラットとウイスターキョウトラットを用いて脂質過酸化とフリーラジカル関連酵素活性における七物降下湯の作用を検討した(厚生科学研究・長寿)。

## iii) 菌類生薬の活性成分検索と科学的分類に関する研究

大量培養した *Chromocleista malachitea* から HIV-protease 阻害物質として physcion を単離した。また、同菌 5 系統の酢酸エチルエステルエキスについて活性の強弱を比

較した。

Piri-piri の内生菌 *Balansia cyperi* の成分検索を行い、ジクロロメタンエキスより単離した2種の新規含窒素化合物の構造を決定した。

*Trichoderma* sp. の成分検索を行い、2種の新規化合物及び1種の既知化合物を単離し構造を解析した(厚生科学研究・健康地球環境)。

#### iv) 生薬資源の薬理学及び電気生理学的研究

エンドセリン受容体脱感作の分子機序の解析を行った。また、エンドセリンによる洞房結節ペースメーカー電位調節機序につき電気生理学的解析を行った(HS創薬科学研究)。心筋症ハムスターの発症原因を電気生理学的に解析した(HS研究)。

中国及び日本において、炎症の治療に用いられている処方構成生薬である連翹のメタノールエキスの抗炎症作用をラットでのカラゲニン誘発浮腫及び綿球誘発肉芽組織形成に対する作用、マウスでの酢酸誘発色素透過性亢進に対する作用更に酢酸誘発 writhing に対する作用を検討した。連翹エキスは経口投与で抗炎症作用及び鎮痛作用を示した。

紫根に含まれる光学異性体成分のシコニン及びアルカニンの局所投与での肉芽組織形成促進時の肉芽組織中の生化学的及び組織学的変化を比較検討した。両化合物の局所投与後、5日において皮下組織球、マクロファージ、単球等の浸潤細胞や新生血管が多数観察され、更に、10日において繊維芽細胞の増生が認められた(HS研究)。

#### v) 生薬の薬物動態学的研究

マオウ含有アルカロイドの一つである(-)-ノルエフェドリン及びその光学異性体の体内動態を検討した。(±)-ノルエフェドリンにおいては、(+)-体が(-)-体の動態に影響を与え、その結果として、(±)-ノルエフェドリンと(-)-ノルエフェドリンとで薬効の強さが異なって現れるものと考えられた(特別研究)。

#### vi) 生薬資源の保存と保護に関する研究

全国の野生薬用植物の分布図の作成を行っている。植物病原菌に拮抗作用を示す真菌 *Trichoderma* spp. の適正な保存条件を検討することを目的として代謝産物の検討を行い、指標となる特異的な構造を有したポリケタイド系の新規化合物2種と既知化合物1種を単離し、構造を決定した(厚生科学研究・健康地球環境)。

## 療 品 部

部 長 中 村 晃 忠

## 概 要

1996年9月より、HS財団流動研究員として王 春仁氏

が派遣され、活躍中である。1996年10月1日付けで埋植医療用具評価室が新設され、室長に佐藤道夫第1室長が異動した。1997年4月1日付けで葎島由二衛生微生物部主任研究官が第1室長に着任した。

## 業務成績

### 1. 家庭用品関係

例年通りに、家庭用品に係わる毒性試験の計画と評価に関する事務、分析法作成、試験物質の純度検定と動物飼料中の安定性試験、細胞毒性試験を担当した。なお、平成8年度の分析法設定及び細胞毒性試験品目は下記の通りである。

分析法設定：6-ethoxy-2,2,4-trimethyl-1,2-dihydroquinoline, poly-2,2,4-trimethyl-1,2-dihydroquinoline, zinc 2-mercaptobenzimidazole, 2,5-di-tert-amyl-hydroquinone, 2-hydroxy-4-isopropyl-2,4,6-cycloheptatrien-1-one

細胞毒性試験：3,4,4'-trichlorocarbanilide, isobornylthiocyanoacetate, 1,2-benzisothiazolin-3-one, 2,3,5,6-tetrachloroisophthalonitrile

### 2. 標準化と国際調和

i) 医療用具関係国際標準化機構技術委員会への参加：ISO/TC194/WG11&15「滅菌残留物/生物評価の戦略」(Arlington, 1996.10, 中村)；ISO/TC150「外科用インプラント」(幕張, 1996.10, 中村, 土屋, 佐藤)；ISO/TC172/SC7「眼鏡及び眼科用機器」(名古屋, 1997.4, 土屋)；ISO/TC194「医療用具の生物学的評価」(York, 1997.4, 中村)。

ii) 医療用具関係 ISO 国内委員会への参加：次の各 TC 国内委員会に委員として参加している：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」；TC210「ヘルスケア製品に関する一般的事項」。

iii) TC194国内委員会ホームページの開設：情報の流通と審議の透明化、広範囲からの意見聴取を目的に、インターネット・ホームページを開いた。将来の問題として、他 TC 国内委員会のホームページとのリンクを視野にいれている。

iv) 細胞毒性試験用の陽性対照標準材料の頒布体制が(財)食品薬品安全センターで整ったが、この標準材料を国際標準とするべく、ISO/TC194/WG5に働きかけた結果、国際的なラウンドロビン・テストを日本が主宰することが決定された。

v) 医療用具国内基準の国際調和の戦略についての提言：前年度までの厚生科学研究及びISOでの活動を踏まえて、医療用具基準の国際化の戦略(中村私案)を医療機器センター及び人工臓器学会で提言した。その骨子は、(1)基本要件の明確化；(2)国内基準の階層化とそれに対応する基準審議組織の明確化(透明化)；(3)国内基準審議組織とISO/TC国内委員会の共通化；(4)いわゆる42条基準の廃止を伴

う基準改正の柔軟性向上；(5)インターネットの利用による情報流通促進である。

## 研究業績

### 1. 天然ゴムラテックスによる即時型アレルギーに関する研究

「植物の生体防御蛋白質がラテックスアレルギーと植物性食品アレルギーの交差抗原である」という仮説をたてて研究を進めている。今年度は、ラテックスから生体防御に関与すると考えられるキチナーゼ/リゾチーム、 $\beta$ -1,3-グルカナーゼ及びエステラーゼを分離した。そして、これらがラテックスアレルギー患者及びアトピー患者血清中のIgE抗体によって認識される抗原であることを確認した(厚生科学研究費補助金)。

### 2. 歯科用レジンなどの安全性に関する研究

メタクリル酸メチル(MMA)の微量定量法(ヘッドスペース/クライオフォーカス/GC/MS)を確立し、それを利用して、義歯床を着用した時に唾液に溶出するMMA量を経時的に測定することを試みた。今回は予試験として、モデル義歯床を歯科医に着用してもらい、唾液を経時的に採取して測定した。およその溶出レベルと経時的減衰の傾向を掴むことができた(厚生科学研究費補助金)。

### 3. 高分子材料による異物発癌の素因の解析と短期検索法の開発

材料上での細胞間連絡協同阻害作用(プロモーション作用)が異物発癌の鍵になる要素であることを明らかにしてきたが、今年度は以下の興味ある知見を得た：(1)ポリエチレン(PE)によって阻害された代謝協同活性は細胞外マトリックスによる表面修飾で回復するが、この際、細胞間連絡に関与する蛋白質(コネキシン)の発現量も回復し、細胞同士の接着部位に局在している；(2)ポリウレタンの構成成分の中で、ハードセグメントはマクロファージからの活性酸素の産生を増強した。また、ソフトセグメントの成分であるポリエーテルグリコール5種を試験したところ、poly(tetramethylene oxide)のみが協同阻害活性を有することが分かった。また、その場合に、細胞膜上のコネキシン43の発現が低下していることが明らかとなった。(3)ポリプロピレン(PP)の異物発癌性は動物実験でPEと同程度であることが分かっているが、PPも強い細胞間連絡協同阻害活性を示すことが分かった(HS受託研究)。

### 4. 細胞・組織工学的手法を用いた医用高分子材料の開発に関する研究

PE上では細胞間連絡協同阻害が生じるが、初代細胞を用いた実験で細胞分化も阻害されることが分かった。一方、PEを細胞接着性ペプチドで被覆しても細胞間連絡協同は回復しなかったのに対し、上皮間葉2層系での細胞分化は正常にもどった(人当研究費)。

加熱処理したポリ乳酸(分子量が低下し、乳酸量が増加

する)の上で培養した骨芽細胞のアルカリホスファターゼ活性が上昇することが分かった(厚生科学研究費補助金)。

### 5. 医用材料の生体適合性評価に関する研究

医用材料の生体適合性に係わる種々の問題について検討した：(1)純ジルコニウム及びチタン・ジルコニウム合金(Ti/Zr)をラット皮下に8ヵ月埋植し、材料変化と生体反応を調べた結果、Ti/Zrが炎症反応も低く劣化も少なく優れていることが分かった；(2)ベンゾトリアゾール系UV吸収剤の細胞間連絡協同阻害活性は光で増感されないことが分かった。また、このUV吸収剤によってコネキシンがリン酸化されることが分かった。

### 6. マイクロマスカルチャーを用いた催奇形性試験に関する研究

Ti及びZrイオンの神経発生に及ぼす影響を調べた結果、Tiイオンの方がZrイオンより低濃度で強く阻害する傾向が判明した。しかし、その程度の違いでは純チタン及び純ジルコニウム金属板上での神経発生阻害強度の差を説明できなかった(人当研究費)。

### 7. インプラント用具の適合性評価に関する研究

各地域のインプラント・データシステムの状況、特に英国の状況を調査した。また、日本でのシステムを立ち上げるために、各学会の代表を含む準備会を設立し、適切なモデルの検討を開始した。用具不具合データベースの必要項目とフォーマットの検討を行い、データベースの雛形を作成した(抽出インプラント適合性研究費)。

### 8. マススペクトロメトリーを用いたペプチド化合物の分析に関する研究

ペプチド鎖中にある塩基性官能基とのイオン対形成に基づく硫酸化チロシンの安定化が、気相中においても有効に作用していることを液体二次イオン質量分析法を用いて示した(人当研究費)。

### 9. 化学分析のデータ解析に関する研究

フォトダイオードアレイを装備しているキャピラリー電気泳動における測定波長の最適化を精度を基準として行った。また、原子吸光分析でFUMI理論が正しいことを実験的に証明した。また、インスリンの判別限界の予測においても適用できることを確認した。医療機器のノイズの確率的性質について調査を開始した(創薬研究費)。

### 10. 化学物質の感作性強度及び交差感作性と化学構造に関する研究

種々のチオ尿素系化合物(一部は当部で合成)の感作性強度と交差反応性をGPMT法で調べた。その結果、mercaptobenzimidazole誘導体については、感作性強度は分配係数(log Pow)と相関することが分かった(家庭用品等試験検査費)。

### 11. 家庭用品による事故原因究明に関する研究(家庭用品等試験検査費)

皮膚科医との協同で以下の製品の原因物質を明らかにした(原因製品:原因化学物質;症状)。

1) 農作業用ゴム長靴: 2-mercaptobenzimidazole, poly-2,2,4-trimethyl-1,2-dihydroquinoline; 接触皮膚炎

2) 皮革製時計バンド: p-tert-butylphenol-formaldehyde resin; 接触皮膚炎

3) プラスチック眼鏡フレーム: 着色剤; 接触皮膚炎

12. 家庭用品に含まれる化学物質の安全性情報のデータベース化と情報提供

日本接触皮膚炎学会刊行の接触アレルギー解説書の英文版の改訂を行った。抗菌防臭加工製品の調査を行い、データベースを更新した(家庭用品等試験検査費)。

13. 防水スプレー中毒に関する研究

シリコンオイル配合錆止めスプレーでも防水スプレーと同様な急性中毒事故があったので、その製品も含めた市販錆止めスプレー製品の噴霧粒子径及び付着率を測定した。その結果、一部の製品で噴霧粒子径が小さく、付着率の低いものがあることが分かった(厚生科学研究費補助金)。

#### 環境衛生化学部

部長 安藤正典

#### 概要

室内空気、飲料水及び化粧品の3つの業務に加えて暴露評価研究が当部の大きな研究業務の柱となった。化学物質の「暴露評価」研究は、リスクアセスメント研究の一つで、製造段階での発生源から廃棄に伴う環境中への放出まで、ヒトが経口的、経気的あるいは経皮的に暴露する化学物質の総量を把握して健康影響を評価するものである。したがって、種々の媒体から発生量の把握と共に、特に室内での存在量や個人暴露量等の情報の収集と整理し、暴露実態の解明及び暴露評価法と暴露予測の研究を行うものである。平成8年度はその初年度に当たり、全国の都道府県衛生研究所に協力を求め、室内空気中のホルムアルデヒドの存在量とそこに居住する個人暴露量の測定を行った。この暴露評価研究は、全国衛生化学技術協議会において研究の趣旨を説明し、研究の参加を求めた。更に平成9年2月14日に暴露評価研究委員会を開催し25衛生研究所の参加を得て室内空気及び個人暴露の約2000試料の測定を実施した。

また、飲料水の安全性に関しては、水質基準の改定や未規制物質の実態調査を行った。金属類では、ヒ素、ウラニウム、アルミニウム等のWHOでの検討項目について研究を行った。また、非イオン界面活性剤については内分泌性攪乱物質の一つとされていることからその実態調査を開始した。更に、WHOが指定した農薬類についても検討した。

化粧品・医薬部外品及びそれらの原料については品質確保に関する試験研究、有用性及び安全性に関する基礎的研究を行った。特に有用性・安全性に関しては、赤血球の溶血を利用した紫外線吸収剤の評価、モルモットの剥離皮膚を用いた経皮吸収に関する研究を行った。

#### 業務成績

##### 1. 空気関係

###### 1) 大気汚染の調査研究

前年度に引き続き、東京都内3ヵ所(霞ヶ関、北の丸公園、新宿御苑)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、メタン、非メタン炭化水素、浮遊粒子状物質、ホルムアルデヒド並びに自動車交通量(霞ヶ関)の常時測定を実施した(環境庁大気保全局自動車環境対策第二課)。

##### 2. 化粧品関係

###### 化粧品・医薬部外品関係

化粧品種別配合成分規格(「粧配規」)の追補の作成並びに化粧品原料基準収載品目に新たに赤外吸収スペクトル測定法を導入するための基礎的な検討を行った(厚生省薬務局審査課化粧品審査室)。

##### 3. 水道水質関係

WHOの飲料水水質ガイドラインの改訂作業に伴って我が国における測定方法の確立と実態調査及びその毒性データの資料の収集を行った厚生省生活衛生局水道整備課。また、水質管理のための方策の検討と試験の自動化に関する検討も行った。

水道用コンクリート塗装剤の規格基準の設定を行った。

#### 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) 居住環境内における総揮発性有機化合物(TVOC)とホルムアルデヒド(HCHO)濃度の調査研究

地方及び首都圏に建立している31軒の一般住宅及び都内に建立するオフィス5棟を対象として、新築及び既築別のTVOCとHCHOの実態調査を行い、室内空気質のガイドライン設定の基礎資料の提出を図った(厚生省生活衛生局企画課)。

##### 2. 喘息及び発がん関連危険因子のヒト暴露量に関する調査研究

居住環境内における酸性物質の調査研究として東京都内のオフィスビル内(5棟)で、ガス状酸性物質(HNO<sub>2</sub>, HNO<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, HCOOH)の実態調査を行い、オフィスビル内の酸性物質の実態を明らかにした。

##### 3. 空気中の汚染物質の分析法に関する研究

1) 室内空気中揮発性有機物(VOC)の定量法の検討  
sick building syndromeやsick house syndrome等の原因物質として考えられている室内空気中のVOCについて、

Tenax GR 捕集-加熱脱着法及び個体捕集溶媒抽出法等の定量法について実用性を検討した。

#### 2) 室内空気中の有機リン酸エステル類の検討

内装材等から放散するガス状有機リン酸エステル類(トリリス(2-クロロエチル)ホスフェート, トリス( $\beta$ -イソプロピル)ホスフェート, トリス(2-ブトキシエチル)ホスフェート)の定量法を確立した。

#### 3) 拡散原理に基づいたホルムアルデヒド簡易サンプラーの検討

市販のDNPH-カートリッジを拡散型サンプラーに適用可能か否かの検討を行い, その実用性を明らかにした。本法を居住環境内のHCHOの実測に適用した。

#### 4) ホルムアルデヒド検知管の開発

居住環境レベルのHCHO測定用検知管の開発を行った。

#### 5) TVOC計の開発

大気中の非メタン炭化水素計をベースにし, 沸点50-260°Cの範囲のVOCを対象とした間欠型の自動計測器を製作した。本計測器はFIDを検出器とし, 測定値はトルエン換算値とした。測定値は10分平均値と1時間平均値が得られる間欠型自動計測器とした。

#### 6) 暴露評価基盤研究

暴露評価基盤研究の一環として, 平成8年度は対象物質としてHCHOを選定し, 全化協に加盟す23研究機関と協力してHCHOの暴露量及び室内濃度の調査研究を行い, 貴重なデータが得られた。現在, 集計解析中である。

#### 4. 化粧品の試験法に関する研究

化粧品に配合されるグルコン酸クロロヘキシジンの液体クロマトグラフ法について検討し, 試験法を作成した。

#### 5. 化粧品の安全性評価ガイドラインに関する基礎的研究

非イオン性界面活性剤のポリオキエチレン(EO)鎖の重合度の違いによる剥離皮膚への影響をEO鎖の異なるポリオキシエチレン・ノニル・フェニルエーテル(POE.NPE), ポリオキエチレン硬化ヒマシ油, ポリオキシエチレンラウリルエーテル(POE.LE)及びポリオキシエチレンオレイルエーテルについて検討し, 透過指標物質のメチルパラベン, エチルパラベン及びサリチル酸の皮膚透過速度と赤血球の溶血性がPOE.NPE及びPOE.LEの場合に認められた(厚生科学研究補助金)。

#### 6. 紫外線日射の波長依存性による生物作用とその防御に関する研究

ヘマトポルフィリン(HP)-UVA増感時における $skin^2$ の細胞毒性及び炎症反応への各種抗酸化剤の影響をin vitroで検討した結果, 細胞毒性や炎症反応の発現にUVA照射によって生成した $O_2^{\cdot}$ が関与していることが明らかとなった。また protection factor of UVA (PFA) 既知の紫外線

吸収剤の溶血あるいはRf・Met・NBT混液でのホルマザンの生成への影響を検討したところ, 溶血の抑制率あるいはホルマザンの生成と紫外線吸収剤のPFAは有意な相関性を示した(HS財団受託研究費)。

#### 7. 水質基準及び試験方法の設定に関する研究

##### 1) 水道水の標準分析方法に関する研究

水中標準分析法として多環芳香族炭化水素類の一斉分析方法について検討を行った(厚生省生活衛生局水道整備課)。

##### 2) 水中の環境汚染物質の分析方法に関する研究

水道原水中の可溶性有害汚染物質であるEDTAの分析方法の確立を行った(厚生省生活衛生局水道整備課)。

3) 水環境下における有害化学物質の動態に関する研究  
水中有害物質及び分解物質等の高感度, 特異的分析法を確立する。特に, 高温で分解しやすくGC/MSでは測定できない有害物質を対象として検討を行った(厚生省生活衛生局水道整備課)。

##### 4) 塩素処理副生成物の高感度分析に関する研究

水道水のハロ酢酸類の高感度測定方法を確立した。

##### 5) 水中生物の検査方法の開発に関する研究

水中障害生物の検査方法のハーモナイズ化の可能性について, 生物種の違いによる各種試験方法の精度の差を検討した。

#### 8. 水道用薬品又は水道用品の安全性に関する研究

##### 1) 水道用品等の安全性に関する研究

水道水へ混入する恐れのあるヒ素の化学形態と毒性の関係を研究の関係を検討し, 水道水由来のリスクを評価した(厚生省生活衛生局水道整備課)。

##### 2) 水道用塗料の衛生性に関する研究

水道用コンクリート水槽内面塗料の安全性について検討し, 規格を作製した。

#### 9. 水道水の安全性評価に関する研究

1) 水道水源水域及び利水過程における親水性利水障害物質の適正管理に関する研究

ラット肝細胞を用いて, 消毒副生成物クロロ酢酸類及びプロモ酢酸類のペルオキシソーム増殖作用とCYP4A誘導能を明らかにした(環境庁国立研究機関公害予算)。

2) 人を取り巻く生活環境におけるダイオキシン等及びその前駆物質の潜在的リスクアセスメントに関する研究

ラット肝においてダイオキシン前駆体であるIrgasan DP 300は, CYP2BサブファミリーP450分子種を強く誘導し, 強毒性の塩素化ダイオキシン化合物のP450誘導能と異なることを明らかにした。ラット肝細胞を用いて, Irgasan DP 300によるウロポルフィリノーゲンIIIシンターゼの阻害を明らかにした(環境庁国立研究機関公害予算)。

3) 水域環境汚染物質の毒性評価法の開発に関する研究  
マウスリンフォーマ試験法を用いて, 水道水中の有害環

境化学物質に対する毒性評価方法の有効性に関して検討を加えた(環境庁国立研究機関公害予算)。

#### 4) 消毒副生成物等の安全性に関する研究

浄水処理の際の消毒生成物等の安全性を生物の生理活性を指標として評価した。クロロ酢酸類、プロモ酢酸類及びクロロジプロモ酢酸の安全性を遺伝子毒性活性を指標として評価し、構造による差違を検討する(厚生省生活衛生局水道整備課)。

#### 5) バイオマーカーによる水質の安全性評価方法の開発に関する研究

シトクローム P450遺伝子の制御領域の化学物質に対する応答を利用し、生体に与える化学物質の相互作用として、1,2ジクロロエチレンについて検討した(環境庁国立研究機関公害予算)。

#### 10. 水道水質検査・管理システム構築に関する研究

##### 1) 水質試験法の精度管理に関する研究

水道法20条指定機関の精度管理の在り方について検討した。また、ビル管理法における指定機関の精度管理の在り方について検討した(厚生省生活衛生局企画課)。

##### 2) 水道水質検査・管理に関する研究

水道水質危機管理システムの研究開発を継続して行った。

##### 3) 水道データベースの構築に関する研究

水道に関連したデータベースを構築するために、データベースの形態や情報の種類などの検討を行った(厚生省生活衛生局水道整備課)。

#### 11. 化学物質による健康リスク評価法に関する暴露評価研究

生活環境におけるホルムアルデヒド等について total 暴露について検討した(厚生省生活衛生局生活化学安全対策室)。

#### 12. 生活関連化学物質の安全性評価に関する研究

##### 1) カドミウムの健康影響に関する研究

投与量の違いによる蓄積量を検討し、投与量が少ない場合は蓄積量が低いことを認めた(環境庁)。

##### 2) 重金属等の健康影響に関する研究

カドミウム含有米投与による蓄積量を検討実験の結果、吸収率が WHO の PTWI よりも 1/10 も少ないことを認めた(環境庁環境基本計画推進調査費)。

##### 3) 有害金属の形態別リスク評価に関する研究

ヒ素化合物の化学形態の違いによる毒性影響を検討するための培養細胞試験を実施した(環境公害予算地域密着型)。

##### 4) 生活環境におけるヒ素及びホウ素等の健康影響リスクに関する研究

地下水中のヒ素及びホウ素等の存在状況、化学形態の挙動及び毒性発現機構の解明について兵庫県公害研究所と共

同研究を行った(科学技術庁科学技術振興調整費)。

#### 5) 水道水中のアルミニウムに関する研究

水道原水及び水道水中のアルミニウムの存在状態について検討した(厚生科学研究費)。

## 食 品 部

部長 豊田正武

### 概 要

平成8年度の食品衛生分野において特記すべき事は、10月長崎県で完熟モロヘイヤを食した牛が死亡する事件が発生したことから、健康食品としてのモロヘイヤの安全性を確保するため厚生省の依頼により原因となった強心配糖体の分析に着手した。また平成9年1月には日本海でのロシアタンカー沈没に伴う重油流出事故が発生し、重油による海洋環境汚染の可能性が生じたため行政と共同で魚介類の重油汚染指標物質のバックグラウンド調査を実施した。更に食品衛生法の改正に基づく業務管理基準(GLP)が平成9年4月より公的検査機関へ導入されることとなり、精度管理の分野で行政に協力した。

通常業務としては、例年通り、食品中の有害成分としての残留農薬、残留動物用医薬品、環境汚染物質、天然有害物等に関する研究を行い、また有用成分として、抗アレルギー成分、抗酸化成分等の検索及び生化学的研究を続けている。

海外出張では豊田正武部長は、バイオテクノロジーと食品の安全性に関する FAO/WHO 合同会議に出席のためイタリア・ローマに出張(平成8年9月29日～10月7日)した。また食品の安全性に対するリスク管理の適用に関する FAO/WHO の合同専門家会議に出席のためイタリア・ローマに出張(平成9年1月26日～2月2日)した。更にナホトカ号重油流出事故に関連して米国関係機関との専門家会合に出席のため米国シアトルに出張(平成9年3月10日～15日)した。佐々木久美子第1室長は残留農薬に係わるワークショップに参加のためオランダ・アルクマールへ出張(平成8年6月8日～15日)した。松田りえ子主任研究官は AOAC 年次会議に参加のため米国オーランドに出張(平成8年9月7日～13日)した。根本 了厚生技官は第9回カリフォルニア残留農薬ワークショップに参加のため米国サクラメントへ出張(平成9年3月2日～3月8日)した。穂山浩厚生技官は第36回毒科学会に参加のため米国シンシナティーに出張(平成9年3月8日～15日)した。また根本 了厚生技官は米国農務省ベルツビル農業研究センターでの残留農薬のキャピラリー電気泳動による分析研究を終え(平成8年3月1日～8月31日)帰国した。

### 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

## イ) 残留農薬の迅速分析法の開発に関する研究

100農薬について固相抽出とGPCを用いた一斉分析法を開発し、その結果は生活衛生局長通知として公布された(厚生省生活衛生局食品化学課)。

## ロ) 保存検体中の残留農薬調査

デルタメトリン及びトラロメトリンの分別定量法の検討及び保存検体中の挙動について検討した(厚生省生活衛生局食品化学課)。

## ハ) 残留農薬基準未設定農薬の残留分析に関する研究

アクリナトリン及び告示ピレスロイド系農薬の一斉分析法を作成した(厚生省生活衛生局食品化学課)。

イミノクタジン・アルベシル酸塩の残留分析法を確立した(厚生省生活衛生局食品化学課)。

## ニ) 食品中の農薬分析の基礎的研究

茶葉及び茶浸出液中の残留農薬の分析法を確立した(厚生省生活衛生局食品化学課)。

## ホ) 農薬の分析法の評価と推定摂取量に関する研究

分析法バリデーションについて調査を行った(厚生省生活衛生局食品保健課)。

農薬推定摂取量の精密化について調査を行った(厚生省生活衛生局食品化学課)。

## ヘ) 農作物における複数農薬の残留実態調査研究

残留基準のない4種塩素系農薬の分析法を確立した(厚生省生活衛生局食品化学課)。

## 2) 食品中に溶出するアルミニウムの摂取実態に関する研究

トータルダイエツト試料中のアルミニウムを分析し、一日摂取量を推定した(厚生省生活衛生局食品保健課)。

## 3) 魚介類中の重油成分に関する研究

魚介類中の重油成分のGC/MSによる一斉分析法を確立し、バックグラウンド調査を行った(厚生省生活衛生局乳肉衛生課)。

## 4) 雑豆中のシアン化合物に関する研究

生あん中のシアン化合物の検査法を検討し、実態調査を行った(厚生省生活衛生局食品保健課)。

## 5) 畜水産食品中の残留動物用医薬品の試験法に関する研究

カルバドックス、スルファジミジン、アルペンダゾール、チアペンダゾール、イソメタジウムの試験法を作成した(厚生省生活衛生局乳肉衛生課)。

## 6) 食品中のダイオキシン類の汚染実態調査研究

輸入、国内産の魚中のダイオキシン関連化合物の実態調査を行った(厚生省生活衛生局乳肉衛生課)。

## 7) 必須アミノ酸等による健康影響に関する研究

EMS関連不純物のピークCが6-ヒドロキシトリプトフ

アンであることを明らかにした(厚生省生活衛生局食品保健課)。

## 8) モロヘイヤの安全性に関する研究

モロヘイヤ及びその加工品の強心配糖体含有量を調査した(厚生省生活衛生局食品保健課)。

## 9) かび毒による食品汚染と暴露に関する研究

## イ) かび毒の分析法に関する研究

フモニシンのポストカラム蛍光誘導体分析法を確立した。

## ロ) かび毒の汚染実態調査に関する研究

とうもろこしのフモニシン汚染実態調査を行った(厚生省生活衛生局食品保健課)。また味噌、醤油中のコウジ酸含量について実態調査を行った(厚生省生活衛生局食品化学課)。

## 10) 未経験食品の安全性に関する研究

日本人の食経験のない食品について諸外国の規制実態を調査した(厚生省生活衛生局食品保健課)。

## 2. 汚染物モニタリングと情報

イ) 全国から収集されたモニタリングデータは約201万件に達した。これらのデータを衛生行政上の情報として全国自治研究機関に提供した(厚生省生活衛生局食品保健課)。

ロ) 全国10機関からのトータルダイエツト試料をもとに約50種の汚染物について摂取量調査を行った。またデータの一部はWHOに送付した(厚生省生活衛生局食品保健課)。

## 3. 新開発食品の評価

イ) バイオテクノロジー応用食品について諸外国の規制実態を調査した(厚生省生活衛生局食品保健課)。

ロ) 食品蛋白質の簡易的抗原性評価手法の開発を行った。また野菜及び果実における抗アレルギー成分を検索した(HS財団受託研究)。

## 4. 照射食品

照射冷凍肉について照射と非照射の鑑別法を検討した(国立機関原子力試験研究費)。

## 食品添加物部

部長 山田 隆

## 概 要

当部の主要業務は化学的合成添加物、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、研究業務であるが、他に、第七版食品添加物公定書の作成や、ヒューマンサイエンス振興財団の受託研究として、遺伝子操作技術等を用いた食品添加物の開発とその化学的安全性評価に関する研究を行っている。

米谷民雄室長及び久保田浩樹厚生技官は、第9回高性能キャピラリー電気泳動及び関連微小技術国際シンポジウムに出席のため、米国アナハイムに出張した(平成9年1月25日～2月1日)。

米谷民雄室長は、FAO/WHO 合同食品規格委員会の分析・サンプリング部会に出席のため、ハンガリーブダペストに出張した(平成9年3月9日～16日)。

山田隆部長がFAO/WHO 合同国際食品規格委員会食品添加物汚染物質部会出席のため、オランダに出張した(平成9年3月13日～23日)。

#### 業務成績

(1) 衛生研究所、厚生省指定検査機関の協力の下に、化学的合成品以外の食品添加物の食品中からの分析法の検討を行った。本年度は、コウジ酸、苦味料、アルギン酸などについて検討した(食品添加物規格基準設定費、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各条、及び新規に掲載する天然添加物の規格について検討を行った。

(3) 食品添加物として新規に指定が検討されているキシリトール規格試験法について検討を行った(食品添加物規格基準設定費、生活衛生局食品化学課)。

(4) チューインガム用ガムベースであるポリ酢酸ビニル中の酢酸ビニルモノマーの分析法を検討し、市販のポリ酢酸ビニル中の酢酸ビニルモノマーを定量した(食品添加物規格基準設定費、生活衛生局食品化学課)。

(5) パン及び製パン用改良剤中の臭素酸の定量を行った(食品添加物安全性再評価費、厚生省生活衛生局食品化学課)。

(6) 「既存添加物名簿収載品目リスト」の訂正の申出につき、追加及び削除の妥当性の検討に協力した。

(7) 天然添加物のコウジ酸をエビに使用した場合の、残存量について検討した(食品添加物規格基準設定費、生活衛生局食品化学課)。

(8) ビートレッドの規格を設定する際に、ベタニンやイソベタニン量の規格、及び熱分解物の規格を設定する必要があるか否について検討した(食品添加物規格基準設定費、生活衛生局食品化学課)。

(9) 既存添加物の規格を第七版食品添加物公定書に収載する際に必要な、数種の新規一般試験法につき、その改正案を作成した。

(10) 医薬品添加剤規格の国際調和(日本薬局方調査会医薬品添加剤委員会、薬務局研究開発振興課)、医薬品添加物規格1997の作成(薬務局審査課)、環境測定分析統一精度管理調査(環境庁企画調整局環境研究技術課)に協力した。

(11) アルミニウム及びスチール製飲料缶からの鉛、カド

ミウム、アルミニウム、鉄の溶出について調査を行った(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) 食品中の指定外添加物であるポリソルベートについて、分析法及び検出感度について検討した(厚生科学研究費、生活衛生局食品保健課)。

(2) アルギン酸ナトリウムを加水分解後、構成糖のグルロン酸を単離精製し、各構成糖の呈色度を検討した。また、乳製品中からの定量法を確立した(食品添加物安全性再評価費、生活衛生局食品化学課)。

(3) 市販ウコン色素の色素成分を分析し、更に、分析用標品となるべき製品の条件について検討した(厚生科学研究費、生活衛生局食品化学課)。

(4) ベクチン規格の国際的整合性を目的として、二酸化硫黄の分析法、ガラクチュロン酸・アミド化度における滴定法、更に重金属試験の妥当性等につき検討した(厚生科学研究費、生活衛生局食品化学課)。

##### 2. 食品添加物等の安全性に関する研究

(1) 全国自治体の行政検査を基にした食品添加物の使用実態調査の結果を整理し、それに基づく摂取量の推定を行った。本年度は、保存料について整理した。(厚生科学研究費、生活衛生局食品化学課)。

(2) アルミニウムをマルトール及びその誘導体と共にマウスに投与した時の、アルミニウムの臓器分布と毒性について検討した。

##### 3. 遺伝子操作技術等を用いた食品添加物の開発とその化学的安全性評価技術に関する研究

(1) 植物組織培養法により生産されるビートレッドにつき、その色素成分の天然添加物との相同性を調べる目的で、培養細胞(カルス及び毛状根)中の色素成分を明らかにした(HS財団受託研究費)。

(2) 色素産生細胞の培地中に重金属を添加した時に誘導されるフィトケラチン類を、キャピラリー電気泳動法を用いて分析する方法を考案した(HS財団受託研究費)。

##### 4. 器具・容器包装の安全性に関する研究

(1) ポリエチレン中の酸化防止剤、紫外線吸収剤、滑剤等のGC/MSによる一斉分析法を開発し、市販品の調査を行った(食品添加物安全性再評価等試験検査費、生活衛生局食品化学課)。

(2) アルミ箔製品からのアルミニウムの溶出について、食品擬似溶媒における溶出条件の影響、製品による差異、各種食品素材への移行等を検討し、基礎的な溶出挙動を明らかにした(厚生科学研究費、生活衛生局食品保健課)。

(3) 塩化ビニリデン製容器包装について、海外における規格基準を調査すると共に、それらの試験法により国内製品の試験を行い、試験法の整合性を検討した(厚生科学研



究費，生活衛生局食品化学課）。

(4) ポリエチレン製品について， $\gamma$ 線照射による添加剤含量の変動，揮発性物質の生成量，引っ張り強度の変化等を検討し，それらの関連を明らかにした（国立機関原子力試験研究費，科学技術庁原子力局技術振興課）。

## 有機化学部

部長 宮田直樹

### 概要

平成8年度の研究業務として，1) 有用生理活性物質の合成及び化学反応性に関する研究，2) 有害物質の構造決定及び毒性評価に関する有機化学的研究，3) 薬物と生体分子の相互作用の解析に関する研究，などを行った。研究プロジェクトとしては，平成8年度から新規に科学技術庁科学技術振興調整費総合研究「生体制御物質の分子設計と精密合成のための基盤技術の開発に関する研究(第2期)」が始まった(担当：栗原正明第1室長)。また，平成6年度から引き続き環境庁の環境汚染物質の影響評価に関する総合研究として「NO遊離化合物を活用した環境汚染窒素酸化物に関する研究」を，当所代衛生化学部と共同で実施している(担当：末吉祥子第2室長，丹野雅幸主任研究官)。また，国立衛生試験所特別研究「医薬品の適正な評価を志向した光学異性体に関する研究(第2期)」は，平成8年度で終了した(担当：栗原正明第1室長)。平成8年度の研究成果としては，中島(山越)葉子技官らが行ったフラレン誘導体の合成とDNA切断実験が挙げられる。アクリジン置換基を導入したフラレンを新規に合成し，そのDNA切断作用を調べた結果，活性の増強が認められた。活性発現には光励起されたフラレンによって生成する活性酸素種が関与していると考えられ，フラレン構造がDNAに作用する生理活性物質の基本構造として有用であることを明らかにした。

人事面では，福原潔技官が，平成9年4月1日付けで主任研究官に昇格した。また，科学技術庁STAフェローとして，平成7年2月1日から栗原正明第1室長の指導の下で生理活性物質の立体選択的合成に関する研究を行っていたインド医薬品中央研究所のA. パサク博士が，研究を終了し平成8年7月31日帰国した。また，日本大学生物資源科学部農芸化学科講師西尾俊幸博士と昭和薬科大学薬学部講師小林茂樹博士が，協力研究員として核磁気共鳴装置及び化学計算コンピュータを利用した生理活性糖誘導体及びペプチド誘導体の合成・構造・機能解析に関する研究を行った。

海外出張は，中島(山越)葉子技官が，平成8年7月1日より8月31日まで米国ニューヨーク州のアメリカ健康財

団研究所(AHF)に出張し，F. -L. チャン博士の下で，DNA付加体の合成に関する研究を行った。また，宮田と中島(山越)葉子技官が，平成8年9月29日より10月7日までスペインに出張し，バルセロナ市で開かれた第8回国際フリーラジカル会議に出席し，光照射下におけるフラレン $C_{60}$ の変異原性発現作用，並びにフラレン $C_{60}$ 及びその誘導体のDNA切断作用に関する研究成果を発表した。また，栗原正明第1室長が，平成8年10月22日より29日まで米国に出張し，フロリダ州のゲインズビル市で開かれた第7回有機合成の最新のトレンドに関するシンポジウムに出席し，ケトン-オキソン系を用いた立体選択的エポキシ化反応に関する研究成果を発表した。また，宮田が，平成8年11月20日より27日まで米国に出張し，フロリダ州のマイアミビーチ市で開かれた第3回酸素ラジカル学会(Oxygen '96)に出席し，フラレン類の光照射によって引き起こされる生体分子の酸化的傷害に関する研究成果を発表した。また，福原潔主任研究官が，米国バージニア州のバージニア大学理学部化学科S. ヘクト教授の下で特別研究員としてDNAに作用する薬物の作用発現機構に関する研究を行っていたが，平成9年3月21日帰国した。また，宮田が，平成9年5月19日より25日までスイスに出張し，ジュネーブのWHOで開かれた第27回医薬品国際一般名(INN)策定委員会に出席した。

栗原正明第1室長及び福原潔主任研究官が，厚生省試験研究機関共同利用大型機器(傾斜磁場型600MHz核磁気共鳴装置)及び所内共同利用機器(400MHz及び300MHz核磁気共鳴装置)の管理を行った。なお，共同利用機器運用業務は，佐藤由紀子非常勤職員が行った。

平成8年度には，有機化学部主催の特別講演会として，「多環芳香族炭化水素類のバクテリアによる代謝(米国国立衛生研究所：八木治彦博士)」，及び，「有害大気汚染物質測定法の現状と今後の課題：ニトロアレーン(金沢大学薬学部教授：早川和一博士)」を開催した。

平成8年度には，大型機械としてパーセプティブ社製レーザーイオン化飛行時間型質量分析装置，及び，シリコングラフィクス社製化学計算用ワークステーション一式を購入した。

### 研究業績

#### 1. 有用生理活性物質の合成及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：キラルな鎖状アリルアルコールの立体選択的エポキシ化反応により，生理活性物質合成の重要中間体であるアミノアルコール誘導体の合成に成功した。(特別研究費)

2) 生体制御物質の分子設計と精密合成のための基盤技術の開発に関する研究：生体制御物質の合成のための選択

的官能基変換技術の開発研究を行い、リパーゼを用いた糖水酸基のエステル交換反応が高選択的に進行することを見いだした。(科学技術振興調整費)

3) 一酸化窒素とスーパーオキシドを同時に発生する化合物の合成と機能解析: 一酸化窒素とスーパーオキシドを同時に発生する化合物として、SIN-1と類似の構造を有する種々のニトロソ化合物の合成を行った。(文部省科学研究費)

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: NOを遊離する水溶性N-ニトロソ化合物の合成を目的として、カルボン酸基を有する種々のニトロソ尿素誘導体を合成した。また、これら化合物からのNOの生成速度を簡易型NO定量装置により測定した。(一般研究費)

5) 分子力場計算による反応メカニズムの解析に関する研究: 分子力場計算により鎖状のアリアルアルコールやアリアルエーテルのコンフォメーション解析を行い、これらの化合物がエポキシ化される際の立体選択性発現のメカニズムを明らかにした。(一般研究費)

6) 新規トリガーを有するエンジン類の合成に関する研究: 酵素加水分解をトリガーとして活性化シラジカルを生成するエンジン類の分子設計を分子力学法を用いて行い、いくつかの合成候補化合物を得た。(一般研究費)

2. 有害物質の構造決定及び毒性評価に関する有機化学的研究

1) NO遊離化合物を活用した環境汚染窒素酸化物に関する研究: 各種のN-ニトロソ化合物及び関連化合物について細胞毒性を調べ、NO発生量との相関性を明らかにした。(環境庁国立機関公害防止等試験研究費)

2) 化学計算による環境化学物質の毒性評価の新手法の開発: 分子軌道計算によりニトロアレン類の電子状態とニトロ基の立体構造の解析を行い、これらの因子が毒性評価の指標となることを明らかにした。(文部省科学研究費)

3) 過酸化脂質の立体選択的合成と化学的性質に関する研究: 脂質過酸化 2,3-エポキシ-4-ヒドロキシノナールの合成を行った。(一般研究費)

3. 薬物と生体分子の相互作用の解析に関する研究

1) 膜親和性フラレン誘導体の合成: 膜親和性を有するフラレン誘導体を合成する目的で、その前駆体となるカルボン酸側鎖を有するフラレン誘導体の合成に成功した。(文部省科学研究費)

2) 新規DNA切断分子の合成: フラレンを基本骨格にしたDNA切断分子を分子設計しその合成を行った。合成したフラレン誘導体は、基本骨格のフラレンよりも強いDNA切断活性を示した。(一般研究費)

以上の研究は、石井圭実習生(日本大学生物資源学部農芸化学科生物有機化学研究室: 奥忠武教授)、大村礼子、

及び小川祐子実習生(共立薬科大学有機薬化学教室: 望月正隆教授)、笠原容子実習生(昭和薬科大学薬品分析学研究室: 田中彰教授)、甲斐陽子実習生(昭和女子大学生活科学部: 谷村顕雄教授)、及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117年会(東京)、第11回フラレン総合シンポジウム(札幌)、第8回 Biennial Meeting of the International Society for Free Radical Research (Barcelona)、日本癌学会第55回総会(横浜)、第7回 Symposium on the Latest Trends in Organic Synthesis (Florida)、第22回反応と合成の進歩シンポジウム(岡山)、日本環境変異原学会第5回大会(東京)、第3回 Annual Meeting of the Oxygen Society (Oxygen '96) (Florida)、第12回フラレン総合シンポジウム(東京)などで発表すると共に、Chem. Pharm. Bull., J. Org. Chem., FEBS Lett., Fullerene Sci. Technol., Mutation Res., J. Toxicol. Pathology, Carcinogenesis, Cancer Lett., 放医研シンポジウムシリーズ No.27「活性酸素・フリーラジカル研究の新展開-基礎から臨床まで」、季刊化学総説 No.30「NO-化学と生物」、フリーラジカルの臨床、磁気共鳴と医学、などの雑誌及び単行本、及び、環境庁総合研究プロジェクト別環境保全研究成果集「環境汚染物質の影響評価に関する総合研究」、科学技術庁科学技術振興調整費(総合研究)成果報告書、文部省科学研究費(基盤研究C、萌芽的研究、奨励研究)報告書、などに公表した。

## 機能生化学部

部長 澤田 純一

## 概要

平成8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、生体高次機能に及ぼす薬物等の影響の分子論的解析技術の開発、モノクローナル抗体の機能変換等に関する研究、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た。人事面では、平成8年8月26日をもって高木加代子博士が、重点研究支援協力員として、研究に参加した。

## 研究業績

### 1. 免疫担当細胞の機能に関する研究

(i) 免疫毒性試験法及び薬物等による免疫毒性に関する調査研究を継続した。

(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て好塩基球細胞内情報伝達物質の動態に関する研究を行った(HS振興財団創薬科学研究費)。また、薬物過敏症の安全性評価への応用を目的として、細胞から遊離されるサイトカイン等の種々の因子の測定法の検討を

行った(HS 振興財団受託研究費)。更に、好塩基球細胞 IgE 受容体遺伝子変換体を用いるシグナル伝達機構の解明も行った(文部省科学研究費)。次いで、化学物質のアレルギー促進活性を調べるための動物モデルの開発に着手した(厚生科学研究費)。

## 2. 薬物受容体等の構造と機能に関する研究

ヒトリンパ球培養細胞 IM-9 からのヒト成長ホルモン結合蛋白生成を促進させるプロテインキナーゼ C の分子種について解析を行った(HS 振興財団創薬科学研究費)。また、ヒト成長ホルモン結合蛋白生成を阻害する合成ペプチドを調製した(文部省科学研究費)。

## 3. 生体高次機能に及ぼす薬物等の影響の分子論的解析技術の開発

(i) 神経系細胞に及ぼす真菌代謝産物の作用を検討した。

(ii) ニューロトリンの cDNA クローニングと組換えタンパクの大腸菌での発現を行った。更に、抗オピオイド結合タンパクモノクローナル抗体の反応特異性を調べた(HS 振興財団受託研究費)。

## 4. モノクローナル抗体の機能変換等に関する研究

(i) 大腸菌で発現させた抗体フラグメントと金属キレート蛋白との融合蛋白の大量調製のための精製法を検討した(国立機関原子力試験研究費)。

(ii) 抗モルヒネ抗体の立体構造及び抗体抗原結合様式を解析した。

## 5. 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を検討し、穀類の真菌汚染の評価を行った。

(ii) 抗生剤であるスペクチノマイシンのイムノアッセイ法を開発し、その血中濃度測定への応用を検討した。

(iii) 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及び抗原性に関する解析と、*A.Fumigatus* 抗原による血清学的検討を行った。

(iv) エストロゲン受容体と異なる受容体が関与する乳癌の診断法を開発するため、高比放射能標識化合物を合成した(国立機関原子力試験研究費)。

(v) 医薬品関連原材料へのウシ異常プリオンタンパクの汚染を想定して、イムノブロットングによるウシプリオンタンパク検出法の基礎的条件の検討を行った(科学技術振興調整費)。

## 代謝生化学部

部長 嶺岸 謙一郎

### 概要

既存化学物質の代謝試験は終了し、「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」及び HS 財団受託研究「脂質代謝を介する生体機能調節機構の解明と薬効解析・薬物開発への応用」を継続している。

人事面では平成 8 年 8 月に佐々木晴代さんが流動研究員として派遣された。昭和 41 年に当所薬理部第二室に採用されて以来、生化学薬理室長を経て、昭和 61 年 4 月に医化学部長、部名変更により代謝生化学部部長を歴任され、環境汚染物質の影響評価に関する総合研究、対がん 10 年総合戦略プロジェクト研究、行政研究等に、多くの業績を残されて、高橋惇部長は平成 9 年 3 月 31 日付けで定年退官された。平成 9 年 4 月 1 日付けで嶺岸謙一郎第二室長が代謝生化学部長に昇任し、同日付けで第二室長事務取扱となった。

### 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

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(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) DMPD は特に脂肪組織に蓄積し、その蓄積に飽和現象があることが観察され、1ヵ月の休薬期間により、精巣周辺脂質を除いて著しい分布の減少が観察された。

#### 2. 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) 白血球の活性制御に関する研究

活性化時のアクチン結合蛋白の動態を解析し、細胞質から細胞膜への移行することを明らかにした。

##### 2) NO の食細胞機能に対する効果に関する研究

NO 遊離化合物により食細胞の運動性が変化することを見いだすと共に、細胞骨格系の動態が影響を受けることを観察した。

##### 3) 好中球のコフィリンの役割に関する研究

オカダ酸による活性の二相性制御とコフィリンの細胞内分布変化が連関することを明らかにした。

##### 4) 脂質代謝を介する生体機能調節機構の解明と薬効解析・薬物開発への応用

フィブラート類によるホスファチジルエタノールアミンメチル化の阻害メカニズムを解析し、PPAR とは独立した反応であることを明らかにした。

## 衛生微生物部

部長 三瀬 勝利

## 概要

平成8年は腸管出血性大腸菌 O157や狂牛病の問題で久しぶりに微生物分野が注目を集めた年であった。当部も第二室と第三室が中心となり、これらの問題に対処しなければならなかった。平成8年7月の堺市の O157集団下痢症ではカイワレ大根が疑われており、このためにも膨大な試験や検査がなされた。平成9年にはいっても O157の流行は終わっておらず、それに比例して当部も多忙である。

人事に関しては7年間にわたって第一室でエンドトキシンの研究で国際的な業績をあげた配島由二主任研究官が療品部第一室長に転出した。後任は定員不補充政策のため埋められていない。多数の業務を抱え当部は大変苦しい状態にある。なお、カナダ国アルバータ大学で一年間研究生活を送っていた菊池裕研究員は1996年11月無事研究生活を終えて帰国した。

## 業務成績

## 1. 特別審査

合計6件について特別審査を行った。

## 2. 行政検査

抗ヒスタミン剤及び他のアレルギー用薬のうち、注射剤28件について無菌試験（細菌試験、真菌試験）を行った。いずれも陰性であった。

O157関連として以下の行政試験を行った：検食の保存の妥当性に関する試験, 1,400件；カイワレ大根の微生物汚染調査, カイワレの種子の微生物汚染調査, 30キログラム。

## 3. 規格・規準など

MRSA等の耐性獲得メカニズムの研究, 迅速判定法及びワクチン開発可能性についての基礎研究（薬務局安全課・健康政策局指導課：千葉大学, 北里大学の共同研究）, エイズ医薬品候補物質のスクリーニング研究（薬務局, HS財団）, 食材の保存条件と O157の変動に関する研究, 期限標示と保存方法の設定に関する研究（生活衛生局食品保健課）, 動物性加工食品の品質保証システムに関する研究, と畜場の微生物制御法の確立のための基礎研究, 卵のサルモネラ汚染に関する研究（生活衛生局乳肉衛生課）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

当部で最初に構造決定がなされた *P. gingivalis* のリピド A の性状が調べられた。このリピド A はリムルス活性などの内毒素活性を示したが、サルモネラ由来のそれと比較すると約百分の一の低毒性のものであった。低毒性の原因は4'位のリン酸の欠如と特異な脂肪酸組成によると思わ

れる。このリピド A は LPS 不応答性マウスを活性化し、脾臓細胞のマイトジェン活性、腹腔マクロファージからの TNF 産生を誘導した。また、桂皮中にエンドトキシン活性を抑制する物質が存在することが見いだされた。由来する菌種に関係なく、すべての LPS の活性を抑制した。更に、この物質を結合させた LPS はウサギの発熱活性を全然示さなかった。

## 2. 制限酵素に関する研究

ビブリオ属細菌である *Plesiomonas shigelloides* より AT/TAAT を認識切断する *Vsp I* のアイソゾマー精製され企業化された。チフス菌から発見された *Sty D 4 I* 遺伝子の全構造が決定され、ソンネ型赤痢菌由来の *SSo II* と 98.6% の高いホモロジーがあることが見いだされた。

## 3. 酵母の衛生学的研究

ニンニク抽出液は多種類の腐敗酵母に対して広く抗菌作用を持つことが認められた。抗菌活性は pH 4 - 7 付近で安定していることが分かった。抽出液と NaCl の併用効果は認められなかった。

## 4. 衛生細菌学的研究

O157の迅速簡易検出法, 牛肉の O157汚染の実態調査, O157によるカイワレの実験的汚染などの研究と共に、卵のサルモネラ汚染に対する殺菌剤やスプレー洗浄の効果が検討された。後者については、もっとも殺菌効果があった薬剤は第三リン酸ナトリウムであった。

## 5. BHA のプロモーション活性に関する研究

BHA (3-tert-butyl-4-hydroxyanisole) はイニシエーターとして作用するが、本年はプロモーション作用について研究した。BHA は 10-20µg/ml の濃度で BALB/3T3 細胞を用いる 2段階トランスフォーメーション実験でプロモーターとして作用することが分かった。

## 6. 転移因子の分子機構に関する研究

大腸菌や赤痢菌に見いだされる代表的な転移因子 IS 1 の転移機構について詳細な分子遺伝学的研究がなされ、興味ある知見が得られた (*J. Mol. Biol.*, 237, 548-569 (1997))。

## 7. 真菌とマイコトキシンに関する研究

ニンニク, タマネギ, ネギ等の真菌に対する抗菌活性を調べたところ、真菌に対しても強い抗菌活性を持っていることが証明された。また、ミネラルウォーターのかび汚染事故を教訓とした食品製造環境のかびについて衛生管理の観点から新たな提案をした。特に食品製造工程でのかび汚染は、マイコトキシン並びに環境被害と密接な関係があり、有毒かびのコントロールのための具体的な対策を示した。

## 化学物質情報部

部 長 神 沼 二 眞

## 概 要

当部は、1) 図書・情報サービス、2) 化学物質の安全性に関する国際協力、3) 全所的な研究情報計算基盤の整備、4) 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並行的に展開することを目指している。本年度もインターネットを基盤とする全所的な研究情報ネットワーク整備を継続し、1人1台体制及び情報発信の基盤を整備した。

## 支援業務（業務成績）

## 1. コンピュータ環境の整備

科技庁の省際ネットワーク（IM net）経由で、インターネットへ接続する全所的な研究情報基盤の整備を続け、各部の協力をえて全所的な1人1台体制を整えた。また、このインターネット環境を利用して、WWWサーバーとデータベース管理ソフト（SybaseとOracle）を立ち上げ、所内からの情報発信基盤を整え、化学物質の安全性情報や医薬品情報及び環境中の健康影響因子に関する情報の提供を開始した。

## 2. 化学物質の安全性に関する国際協力

## (1) UNEP Chemicals 事業への協力

国際有害化学物質登録制度（IRPTC）は1996年秋にUNEP Chemicalsと改称された。ここで作成している各国の化学物質法規制データベースのわが国の部分を当方のデータベース内で更新した。

## (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

「半導体産業で使用される化学物質」についてのドラフトをIPCSに送付した。なお、すでに送付済みの所内外の専門家の協力で作成された「エチレンジプロマイド」の冊子がWHOより出版された。

## 2) 国際簡潔評価文書（CICAD）の作成

「トリフェニルスズ」の一次ドラフトを作成した。また第1回CICADピアレビュー会議（ブラッセル、11月）に関沢室長が出席した。

## 3) IPCSの国際化学物質安全性カードの作成

所外国内委員の協力を得て、日本分担分25物質の安全性カードの更新原案を作成した。また1996年3月（カーシャルトン、英国）の検討会議に山本主任研究官が出席した。更に約900物質についての日本語訳をWWWで提供している。

## 4) GINC（Global Information Network on Chemicals）プロジェクトの推進

GINCのホームページの開発を続け、1996年6月マニラ

WHO西太平洋事務局における化学物質安全性のアジア会議、97年2月のオタワの第2回（国際化学物質安全性会議）IFCSなどでデモンストレーションを行った。

## 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

発がん物質、医薬品、環境汚染物質など生体に影響を与える化学物質に関し、3次元構造も含むデータベースの開発を継続している。本年度は、EHCの抄訳等にもとづくデータベースを開発すると共に既開発の各種のデータベースをSybaseとOracleに移植して、WWWを介して連結して検索するシステムを開発した。

## 2. 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受容体のデータベースと細胞内信号伝達に関する知識ベースの開発を継続している。本年はデータの追加とグラフィカルなビューア機能を追加した。

## 3. 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

線虫の胚発生過程の再構成システムをインターネット環境上に移植しVRMLのモデルを追加するなど大幅に機能を拡張した。また、実時間追尾、及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。

## 4. その他の研究

厚生科学研究費により、化学物質による事故・被害データベースを作成した。更に、このデータベースをWWW上で検索できるシステムを作成した。

「残留農薬安全対策総合調査研究」を分担し、農薬の環境影響データベースを作成しトリフェニルスズの影響評価に応用した。更に「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、吸入急性毒性の値を予測する研究を行った。

## 5. 図書・情報サービス

## (1) 図書情報検索サービス

所内LANの整備に伴い、図書雑誌の登録と検索を目的とする図書館システムの開発を継続している。そのために単行本を含め所蔵する全図書のコンピュータ入力を行い、バーコードラベル貼りを行った。また所内のイントラネット上にCD-ROM及びディスク上の文献検索サービスシステムを整備した。

## (2) 雑誌類の管理と相互貸借

本年度は雑誌14タイトルを中止、16タイトルを新規に購入し、単行本269冊を購入した。この結果、購入中の雑誌は332タイトル、管理している単行本は10,341冊となった。文献の相互貸借については、外部から1,106件の依頼があり、外部へは1,657件を依頼している。

### (3) 衛生試験所報告編集業務

衛生試験所報告編集委員会に協力し、同報告第114号を作成し、所員並びに所外に配布した。

#### 安全性生物試験研究センター

センター長 黒川雄二

平成9年3月末をもって、田中 悟毒性部動物管理室長、松井道子変異遺伝部主任研究官が定年退職され、両氏とも客員研究員となられた。4月には、川島邦夫毒性部第4室長が大阪支所生物試験部長とて移動、菅野 純東京医科歯科大学講師が毒性部第3室長として採用された。5月には、小沢正吾慶応大学医学部助手が薬理部主任研究官として採用された。併任官として、紅林秀雄薬理部室長が生活衛生局生活化学安全対策室へ平成8年5月より1年間勤務し、後任には、廣瀬明彦総合評価室主任研究官が、大臣官房厚生科学課へは新しく本間正充変異遺伝部主任研究官が、それぞれ任命された。従って平成9年5月末現在安全センターは、4部1省令室16室よりなり、構成人員はセンター長1、部長4、省令室長1、室長16、主任研究官28、研究員9、動物飼育長1で総計60名であり、更に技術・事務補助員13名、客員・協力・流動研究員9名、研究・実習生12名等が在籍している。

海外出張として安全センタースタッフが前年に続き科学技術庁の予算などにより頻繁に行政関連会議（ICH, OECD, JECFA, IPCS等）及び各種専門学会等に派遣された。黒川の海外出張は4ヵ所以下記の通り。① ICH 安全性分野専門家準備会合、ワシントン、1996年4月27日～5月5日。② 第3回日中薬品分析技術セミナーでの講演及び天津薬品検験所視察、中国天津市、1996年10月27日～30日③ IPCS EHC Meeting on Polybrominated Dibenzop-dioxins and Dibenzofurans、ドイツ国、ハノーバー市、1996年11月9日～17日。④ OECD/RAAB、パリ、1996年12月10日～15日。

昭和56年度より開始された日米科学技術協力協定に基づく海外専門家との交流事業；非エネルギー部門（テーマA 8 毒性学、日本側コンタクトパーソン、安全センター長）では、能美健彦変異遺伝部室長、松井道子変異遺伝部主任研究官、鈴木孝昌変異遺伝部研究員が遺伝毒性関連情報の交換及び講演等を、平林容子毒性部主任研究官が遺伝子改変動物に関する情報交換等を行なった。

ICHに関しては、厚生科学研究：医薬品等国際ハーモナイゼーション促進研究推進班（新名称）の安全性部門において、7名の研究協力者及びのべ20名の協力研究者として、発がん性（S1B, S1CR）、遺伝毒性（S2B）、反復投与毒性（S4B）、バイオ医薬品安全性評価（S6）、更に今年度から開始された一般薬理及び薬物動態試験（S7）、境界領

域の非臨床試験と臨床試験開始のタイミング（M3）の6分野についてのガイドライン作成等専門家会合に頻繁に参加・討論を行なった。それらの成果は平成9年7月のICH 4において発表・討論される。

医薬品に関するGLP調査は、医薬品機構（以下、機構）に移行してから約3年経つが、綱紀肅正を広義に解釈すると諸々の面での改善が必要と考えられた。事実、平成6年から8年度までの安全センター調査員のべ動員日数は647日に及んでおり、室長・主任研究官にとって大きな負担となり、通常の研究・業務の遂行に支障を来しつつあることが認識されている。これらをふまえ、安全センター運営会議で改善案を作成し、現GLP調査員からも意見を聞いた上で、機構に申し入れを行い更に予研の調査員も交えて討議を行った結果、平成9年度から下記のように対処することとなった。

- ① 基本的には、機構の職員に安全性試験の専門家が行く方式を今後も維持することとするが、過去のGLP適合性調査又は厚生省による査察結果が良好な施設については、機構の職員のみによる調査も差し支えないこととする。
- ② 調査に同行する安全性試験の専門家は、機構が嘱託職員として雇用すること等で対処する。
- ③ 特別な場合で安全センター又は予研の職員の同行が必要であると機構が判断した場合には、GLP評価委員会委員長と協議の上、決定する。

以上のように機構の全面的な協理解も得られ、今年度からの安全センター調査員の負担は大きく軽減することが明らかとなった（例外として、新しいトキシコキネティクスに関するGLP調査には同行が必要であり、これに関しては特にGLP調査検討会を開催した）。

OECD高生産量化学物質の安全性点検作業に関しては、今年度も安全センター各部の専門家等からなる毒性試験実施検討会及び化学物質国際安全対策委員会でデータを評価し、その結果をOECDに報告すると共に今後の試験物質についての情報整理、試験計画作成をも安全センター各部の協力の下に行なった。なおこれらの結果は、「化学物質毒性試験報告」（化学物質点検推進委員会発行）として平成5年度から年1巻ずつ発行されており、安全センター専門家はその編集委員となっていたが、上記GLP調査と同様な観点からその協力体制を改め、今後は外部専門家により編集作業が行われることとなった。更に、総合評価研究室の全面的協力の下に、国内外60人の専門家によるOECDのSIAM会議を開催し、28物質について評価した（平成8年6月20日から22日）。

安全センター予算であるOECDテストガイドラインなどの改訂・評価への応用を目指した総合化学物質安全性研究費に関しては、昨年度からその運用は各部のテーマを考

慮して重点的に配分した。それらの研究結果を積極的に学会・専門誌等に発表し、更に数年毎に総括的報告を衛試報告に掲載することとした。毒性関連のOECDテストガイドラインについてのコメント対応は、昨年度決定した各分野の責任者を中心として積極的に行っている。

化審法に基づく新規化学物質の審査は、現在安全センターの室長及び主任研究官で構成される「化学物質安全性評価委員会」で行われ、その後外部の専門家も加えた「化学物質専門委員会」で審議されている。しかし両委員会における評価結果が必ずしも一致しない事例もあることから、安全センターと生活化学安全対策室の関係者でその問題点を認識し討議するための会合、「化審法による新規化学物質の審査に関する懇談会」を平成7年度に開始しこれまで5回討議を行なった。その結果を「議論のまとめ」として作り、化学物質専門委員会に諮る予定である。

安全センターに関わる事項の審議・報告等は、安全センター運営会議においてなされているが、特に海外学会・会議等の報告書は、即衛試安全性生物試験研究センターホームページに掲載することとした。更に、Cancer Research, Vol. 57, April, 1997の表紙に安全センターが採用され、同時に紹介記事も掲載された。

当安全センターの研究・業務の目的は一言にしていえば、諸種化学物質の安全性評価であり、そのため各部において先端技術の導入による安全性評価手法の改善が常に積極的に試みられてきた。それらの蓄積をもととして、数年来準備が続けられてきた「化学物質のリスクアセスメント」(厚生科学研究;大森班)が、いよいよ本年夏を目処に出版の予定となったことは、極めて意義が大きい。

## 毒 性 部

部 長 井 上 達

### 概 要

平成9年3月31日付けで田中 悟動物管理室長が定年退官となった。また、川島邦夫第4室長は大阪支所生物試験部部長として転出した。これに伴って、平成9年4月1日、それまで協力研究員として研究に従事していた東京医科歯科大学医学部感染免疫病理学講座の菅野 純講師を第3室室長として採用した。また、降矢 強第2室長が動物管理室長に、金子豊蔵第3室長が第2室長に配置替えとなり、第4室長は井上 達毒性部長の事務取扱いとなった。佐々木研究所病理部長、前川昭彦氏には第1室客員研究員を引き続き要請した。加えて、5月21日付けにてSTA流動研究員 Kyung-Sun kang (康景宣) 博士を迎えた。以上により、毒性部は6室の構成で、技術補助員などを含めた総員は、平成9年5月31日現在、34名となっている。なお、田中

悟前動物管理室長にはその37年9月に及ぶ勤続と良好な勤務成績に対して内規に基づいて職員表彰が授与された。

試験・調査・研究などの業務関連での海外出張では、井上部長は、ICH 専門家会議への出席(平成8年4月29日~5月3日,ワシントン;11月3日~10日,ロンドン),米国ブルックヘブン国立研究所及びアメリカ健康財団医学研究所での講演と研究交流並びに国際実験血液学会への出席(8月19日~29日,ニューヨーク),欧州委員会の内分泌障害性化学物質に関するワークショップへの出席(平成8年12月1日~6日,ロンドン),日米食品パネルへの出席, FDA 及び EPA との研究交流(12月10日~16日,ワシントン), 内分泌障害性化学物質に関するスミソニアン・ワークショップへの出席(1月22日~26日,ワシントン), バイオ医薬品の安全性評価に関する医薬品研究国際センター(英)ワークショップでの講演(2月24日~27日,アッシュダウン)などを行った。内藤克司室長は後述の内田雄幸主任研究官と共に、11月30日~12月20日の期間 JICA による中国天津市薬品検験所派遣のために出張し、毒性病理学に関する技術移転と指導を行った。金子豊蔵室長は第2回国際代替法学会(平成8年10月20日~24日,ユトレヒト)及び第1回ヨーロッパ分子毒性学ワークショップ(平成8年10月28日~29日,コートダジュール,フランス)に参加し演題を発表した。長谷川隆一室長は OECD の高生産量物質初期評価会議(10月28日~30日,イスプラ,イタリア), IPCS のリスクアセスメントのハーモナイゼーション会議(平成8年12月12日~14日,ニューオリンズ,米国), IARC のダイオキシン類のヒト発がんリスク評価会議(平成9年2月4日~11日,リヨン,フランス),健康地球研究計画推進研究事業(大森班)による、内分泌障害性化学物質の情報交換・研究交流(平成9年3月26日~28日,リサーチトライアングルパーク,米国)のためにそれぞれ出張した。田中 悟動物管理室長は医薬品の評価等に関する日本医薬品機構と欧州医薬品審査庁との定期会議(平成8年12月4日~12日,ロンドン,イギリス及びアイルランド)に出張した。内田雄幸主任研究官は内藤室長と共に中国天津市薬品検験所に出張し(平成8年11月16日~12月6日)毒性病理学に関する技術移転と指導を行った。平林容子主任研究官は第25回実験血液学会への発表出席し,米国アメリカ健康財団に研究交流のため訪問した(平成8年8月20日~9月2日,ニューヨーク)。また,平林容子主任研究官は,日米科学研究協定に基づく厚生省関係の協力課題「毒性研究(主任研究者:大谷 明)」により出張し,米国環境保護庁(US EPA/NHEERL)米国国立環境保健科学研究所(NIEHS),毒性に関する化学工業技術研究所(CIIT)を訪問,「内分泌障害性化学物質の検出システム」の実態調査及び「遺伝子改変動物の毒性研究への応用」に関する研究交流を行った(平成9年2月16日~2月23日,リサーチト

ライアングルパーク)。佐井君江技官は、第1回ヨーロッパ分子毒性学ワークショップ(平成9年10月28日~29日、コートダジュール、フランス)への出席と演題発表を行い、また、化学発がんプロモーター機序に関する共同研究のためミシガン州立大学を訪問した(平成8年7月15日~8月16日)。小野 敦技官は、科学技術振興調整費により、キーストンシンポジウム(平成9年1月3日~13日、キーストン、米国)へ派遣された。北嶋 聡技官は、科学技術振興調整費により、第6回国際細胞生物学会(平成8年12月7日~11日、サンフランシスコ、米国)への出席、また第36回米国毒科学会(平成9年3月9日~13日、シンシナチ、米国)への出席と演題発表のため出張した。

この他に私費国外研修として、鈴木幸子主任研究官は第9回ヒトと動物の微量元素に関するシンポジウム(平成8年5月19日~24日、バンフ、カナダ)に参加した。

なお、医薬品GLPの調査のため平成8年4月1日より平成9年3月31日の1年間に、延べ19名が国内出張した。

#### 試験業務

##### 1. 既存化学物質などの安全性に関する試験

###### 1) 既存化学物質

ジベンテンダイマー、5-フッ化プロパノール、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、サイクロシクロヘキサンの安全性に関する試験を行った(生活化学安全対策室移し替え)。

###### 2) 希土類元素

金属毒性関連の従来の試験業務成績の整理に当たっている(生活化学安全対策室移し替え)。

###### 3) 水道及び水環境の水質

未規制物質基準化の検討の一環として、新規の消毒副生成物のうちジプロモクロ酢酸について、急性毒性試験並びに反復投与毒性予備試験を実施した(生活衛生局水質衛生検査費)。

###### 4) 2,4,6-トリクロロフェニル-4'-ニトロフェニルエーテル(CNP)

CNP(除草剤)のイヌを用いた亜慢性毒性試験を関連農薬、NIP、アラマイト、クロメトキシニル及びビフェノックスと共に実施した(食品化学課)。

##### 2. 家庭用品に含まれる化学物質の安全性に関する試験

パラジクロルベンゼンはじめ以下の20品目について、各種毒性試験を実施し、終了若しくは検索中である。すなわち、パラジクロルベンゼンのラットによる2年間の慢性吸入暴露、グルタルアルデヒドのラットによる慢性毒性試験の為の2年間の経口投与及びモルモット Magnusson&Kligman(M&K)法による皮膚感作性試験、 $\alpha$ -メチルベンジルフェノールのラットによる急性毒性試験及び、90日間の亜慢性毒性試験、トリアリルアミンのラットによる急性毒性試験及び28日間強制経口反復投与による毒性試験、トリ

アリルフォスフェートのラットによる急性毒性試験及び、混餌投与による90日間亜慢性毒性試験、3-メチル-4-イソプロピルフェノールのラットによる混餌投与90日間亜慢性毒性試験、N-ジメチル-N'-フェニル-N'(フルオロジクロロメチルチオ)-スルファミドのラットによる28日間強制経口反復投与毒性試験、2,2'-ジクロロジエチルエーテルのラットによる2年間慢性吸入毒性試験、N-1,3-dimethylbutyl-N'-phenyl-p-phenylenediamine(DMBPPD)、2,5-Di-tert-amyl-hydroquinone(DAHQ)、2,5-ジ-tert-ブチルヒドロキノロン、及び zinc salt of 2-mercaptobenzimidazole(ZMBI)の、それぞれラットによる28日間の経口反復投与、ブチルセルソルブのラットによる28日間吸入毒性試験のための暴露装置の検討、を行った。また、Isobornylthiocyanacetate(IBTA)、1,2-Benzisothiazolin-3-one及び3,4,4'-Trichlorocarbanilideのラットによる28日間反復投与試験の用量設定のための予備試験を終了、一部、28日間反復投与試験を実施中である。更に、6-エトキシ-2,2,4-トリメチル-1,2-ジヒドロキノリン、ポリ-2,2,4-トリメチル-1,2-ジヒドロキノリン、3,4,4'-Trichlorocarbanilide、Isobornylthiocyanacetateなどについて、モルモットを用いたM&K法による皮膚感作性試験を実施中である(生活化学安全対策室移し替え)。

##### 3. 食品及び食品添加物の毒性試験

健康食品の安全性に関して、ギムネマ・シルベスター、プロポリス(新規)について、ラットによる12ヵ月間の慢性毒性試験の実施、若しくは実施に当たっての予備試験を行っている(食品化学課健康食品対策室)。

また、食品添加物として、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による亜急性毒性試験、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による急性毒性試験及び、亜硝酸ナトリウムと赤色3号の相乗毒性を調べる目的による亜急性試験を終了したか若しくは実施中である。更に、ペクチン分解物の発生毒性を調べる目的で催奇形性試験を実施し、現在標本を検査中である。

更にベカンナツ色素、ヘマトコッカス藻色素、フクロノリ抽出物、西洋わさび抽出物などの各品目について、ラットによる90日間混餌投与を開始若しくは、そのための用量設定試験を実施中である。

##### 4. 医薬品及び医用材料の安全性に関する試験

###### 1) タール色素だいたい色206号

タール色素だいたい色206号について、モルモットを用いるM&K法による皮膚感作性試験を実施中である(薬務局審査課医薬品審査等業務庁費)。

###### 2) 医薬品等化学物質の急性毒性に関する試験

実験動物を用いる急性毒性試験等の簡易法に関して四塩化炭素、クロロホルム、酸化エチレンの3検体について、10



mg/l, 1mg/l の固定用量で吸入毒性試験を行なった（薬務局安全課）。

### 3) 毒・劇物指定のための急性毒性試験

次亜塩素酸カリウム, 次亜塩素酸ナトリウム, フタル酸, 硫酸水素ナトリウムの経口・経皮急性毒性試験及び皮膚刺激性試験及びトリフルオロメタンの単回吸入限度試験を行なった（薬務局安全課）。

## 調査業務

### 1. 化学物質による健康リスク評価

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性に関する実験を行った（生活衛生局生活化学安全対策室）。

### 2. 化粧品の眼刺激性試験代替法に関する調査

医薬品や化粧品等の眼粘膜刺激性試験で広く使用されているドレーズ試験の代替法として提案されている試験法のバリデーション結果の解析を行い、代替の可能性について検討した（薬務局審査課）。

### 3. ダイオキシンのリスクアセスメントに関する調査

ダイオキシンの中でもっとも毒性のつよい TCDD に関して調査分析を行った。新たにコプラナー PCB についての検討に入った（生活化学安全対策室）。

### 4. 医薬品ガイドラインと医薬品等国際調和業務への協力

ICH のバイオ医薬品の安全性試験のあり方、残留溶媒に関する品質性に関する考え方を中心に調査検討を実施している（薬務局審査課）。

## 研究業務

### 1. 分裂細胞系の組織障害性毒性に関する研究

#### 1) 化学物質や放射線による細胞障害機構、特にテロメア及びテロメアーゼの変化に関する研究

体細胞は分裂を繰り返す毎にテロメアの短縮をきたし、細胞障害にあってはこれが促進するものと考えられる。他方、発がん刺激をはじめとした細胞障害では、テロメアーゼの発現が観察され、これが持続増殖の基礎を形成している。これらの機構を研究し、テロメアの変化やテロメアーゼの発現を指標とした細胞障害（毒性）に対する鋭敏で本質的な評価系を構築することを検討している（科技厅国研原子力試験研究費）。

#### 2) BrdUrd と近紫外外部紫外線照射を組み合わせた細胞動態試験法の開発に関する研究

プロモデオキシウリジンを取り込んだ DNA 合成期の細胞は、300nm 以上の波長の近紫外外部紫外線に対する感受性が高まる。この性質を利用した鋭敏な細胞動態試験法の開発を研究している（厚生科学研究健康地球研究推進事業）。

#### 3) TGF- $\beta$ の増殖抑制機構に関する研究

上皮系及び造血幹細胞系での TGF- $\beta$  の抑制機構につい

て、それぞれ検討をすすめている（文部省科学研究補助金、など）。

#### 4) 遺伝子改変動物を用いる発癌性短期試験に関する研究

p53ノックアウトマウス、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など様々の遺伝子改変動物を用いた、発がん性特性に関する研究を行っている（厚生省がん特別研究指定研究）。

#### 5) 発がん機構における酸化的 DNA 傷害に関する研究

ペンタクロロフェノール (PCP) の発がんプロモーター作用に関して酸化的 DNA 損傷の誘導、細胞増殖作用ならびに、細胞間コミュニケーション阻害作用との関連性を調べ、発がんプロモーター作用の予測及びその機序の解明に関する研究を進めている（文部省科学研究費補助金）。

#### 6) 肝発がん物質による酸化的 DNA 傷害に対する緑茶の抑制効果

肝発がん性で、酸化的 DNA 傷害を引き起こす環境化学物質を対象物質として、これらの投与による 8-OHdG の生成に対する緑茶の前投与の効果を実験した。緑茶の飲用は、2-NP 並びに PCP による発がんの一次予防に有効である可能性が得られた。

#### 7) プロポリスの大腸における発がん抑制に関する研究

発がん抑制作用の知られるカフェ酸エステルなどを主成分とするプロポリスの大腸発がんに対する抑制作用機構研究のため、種々の条件設定を進めた（食品化学課）。

#### 8) 素材による発がん性修飾に関する研究

ポリウレタンのラットへの長期埋入実験を終了した (HS 財団共同プロジェクト研究)。

### 2. 非分裂細胞系の組織障害性毒性に関する研究

#### 1) 非分裂細胞系における細胞傷害をアポトーシスを指標として観察し、リスク評価系を樹立することを目的に、アポトーシスと酸化的 DNA 傷害 8-OHdG の関連を検討している（厚生科学研究健康地球研究推進事業）。

#### 2) 薬物乱用と薬物依存性の強化効果の修飾並びに薬物依存性評価法に関する基礎的研究

ラットによる精神依存性試験法の一つである場所嗜好性試験の実施ための基礎データを収集した。またアカゲザルによる薬物自己投与法の生体内カテーテルシステムの改善を行った（薬務局麻薬課）。

### 3. シグナル伝達系を介した組織障害性毒性に関する研究

#### 1) 免疫系シグナルを介した細胞傷害発現機構の研究

皮膚感作性試験として用いられている Magnusson & Kligman 法を用いる試験法の機構解析を行い、同試験法の改良のための基礎的検討を行って成果をまとめた。

#### 2) 内分泌障害性化学物質の作用機序と検出系の確立に関する研究

生殖をはじめとする内分泌器官の機能への影響が懸念される化学物質の作用機序の研究とその検出系の樹立のための研究を行っている（食品規制国際協調促進研究事業）。

### 3) 受容体・リガンドシステムを介した造血機構制御の研究

受容体遺伝子過剰発現マウスや、欠失導入マウスの作成によって、当該のリガンドの過剰若しくは欠失発現型での、造血機構の検討を進めている（文部省重点領域研究）。

### 4. 毒性試験法の開発に関する実験的研究

#### 1) 毒性指標としての生体内金属元素の無処置動物におけるデータベースの作製

4週齢の雌雄ラットを購入し、1ヵ月毎に屠殺し、血清、肺、心、肝、腎、脾、精巣及び肝細胞分画中の金属元素濃度を測定し、6ヵ月から24ヵ月までの正常値を集積した（特別研究「安全性評価のための迅速かつ鋭敏な毒性指標の確立に関する研究」平成6年度～平成8年度）。

#### 2) 28日間試験への神経毒性試験の導入のための基礎的検討

OECDの28日間試験の改訂にともなう、国内での神経毒性試験追加の指針となるべき、基礎的実験的検討を進めている（厚生科学研究，生活化学安全対策室移し替え）。

#### 3) 突然変異を導入した胚幹細胞を用いた薬剤性初期発生傷害の短期検知システム

胚幹細胞に薬剤傷害高感受性突然変異を導入し、このものに薬剤を暴露の後、培養条件下での変化と、擬妊娠マウス子宮に戻した後の初期発生様態を分析し、初期発生傷害観察の試験系の開発に関する基礎的検討を行っている（文部省科研費基盤研究A）。

## 薬 理 部

部 長 大 野 泰 雄

### 概 要

前年度に引き続き、神経科学及び細胞機能に関する薬理学的研究、有効性・安全性評価のための試験法に関する研究、及びトキシコキネティクス（TK）に関する研究を行った。行政協力の面では数多くの調査会に参画すると共に、ICHを通じた臨床試験との関係における非臨床試験実施タイミング（ICH-M3）、一般薬理試験及び薬物動態試験ガイドラインのハーモナイゼーションのための調査研究を行った。また、第10回日本動物実験代替法学会を主催した（12月5～6日）。

人事面では、ヒューマンサイエンス振興財団流動研究員として継続採用されてきた張宝旭博士は引き続き平成8年6月まで研究生として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

研究に従事した後、国立環境研究所に異動した。小泉修一技官は10月1日より3月31日までイギリス、ケンブリッジ大学バブラム研究所のベリッジ教授のもとで容量性カルシウム流入に関する研究のため留学した。上野伸哉博士は継続して科学技術特別研究員として採用され、中枢神経系における ATP の役割についての研究を継続している。また、新たに引間知広博士が科学技術特別研究員として採用され、10月1日より薬理部第3室において、皮膚吸収及び代謝に関する研究を行っている。

短期海外出張は藤森観之助第2室長がコペンハーゲンで開催された発達神経毒性についての OECD 作業会議に出席・討議した（6月16日～20日）。また、ローマで開催された残留農薬の ADI 設定に関する FAO/WHO 合同会議に参画した（9月14日～9月28日）。また、大野泰雄部長がロンドンで開催された ICH 会議に出席し、ICH-M3 のステップ2文書の作成に関わった（11月3日～11月7日）。篠内桃子主任研究官及び宮島敦子技官はフィラデルフィアにあるヒト臓器及び組織の提供機関である International Institute for the Advancement of Medicine 及び National Disease Research Interchange を訪問し、米国におけるヒト組織の供給、提供、管理等についての実体及び問題点について調査した（3月14日～17日）。

国外の学会出張としては、井上和秀第1室長、小泉修一技官、小浜とも子研究補助員、及び上野伸哉特別研究員がミラノで開催されたプリン化合物の分子生物学、薬理学及び臨床における進歩に関する国際シンポジウムに参加し、培養海馬神経細胞における ATP 等の作用について発表した（7月6日～7月9日）。また、大野泰雄部長はユトレヒトで開催された第二回国際動物実験代替法会議に出席し、わが国で行った眼刺激性試験の施設間バリデーションの結果をまとめて報告した（10月20日～24日）。篠内桃子主任研究官及び宮島敦子研究官はシンシナチで開催された米国毒科学会第36回年会に参加し、それぞれ尿素系農薬及びその代謝物の遊離肝細胞及び初代培養肝細胞に対する影響、及びジフェニルエーテル系農薬によるイヌ肝薬物代謝酵素誘導について発表した（3月9日～13日）。

なお、平成8年度は延べ6人が医薬品の国内 GLP 査察を行い、延べ3名が GLP 査察研修を行った。

### 研究業績

#### 1. 医薬品等の中枢機能に及ぼす影響に関する薬理学的研究

神経機能を維持している PC12 細胞において  $Zn^{2+}$  がイオンチャンネル型 ATP 受容体を介する内向き電流と細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇を増強し、G 蛋白結合型受容体刺激後の容量性 Ca 流入を抑制することを示した。また、同細胞を用いて電位依存性 Ca チャンネルに対する抗分裂病薬の作用を検討し、これまで作用機構が明らかでなかったピモジドのよ

うな陰性症状治療薬がハロヘリドールのような陽性症状治療薬の1,000倍から100万倍強い抑制を示すことを明らかにした(委長寿)。また、痛みの情報伝達におけるATP受容体の役割に対する研究ではP2x2, P2x3強制発現系を確立し、それらのヘテロオリゴマー発現系での電気生理学的現象と細胞内Ca動態が知覚ニューロンのそれと類似していることを示した(文科研)。

## 2. 生体機能における情報伝達に関する薬理学的研究

gap junctionを介した細胞間連絡を抑制するイブプロフェンが培養ラット胚において奇形発生率を増加させることを示した。また、ペルメトリンやその代謝物等の環境汚染物質が各種刺激による細胞内Ca濃度変化及び神経伝達物質遊離を変調させることを明らかにした(環公害)。

アフリカツメガエル卵母細胞に発現させたATP受容体チャンネルがドパミン、セロトニン及び2価イオンで増強されること、及びこの増強がP2x2とP2x4サブクラスに選択的であることを明らかにした。

神経伝達物質放出機構に関する研究では容量性Ca流入による神経伝達物質放出がリアノジン感受性Caプールを刺激しても引き起こされることを明らかにした。

## 3. トキシコキネティクス(TK)に関する研究

セレンの催奇形性には鳥類とマウスで種差が認められるが、ラット全胚培養系において各種セレン化合物を検討したところ、in vivoと類似した形態異常を誘発することを示すこと及び化合物により異常誘発濃度に大きな差が認められ、体内動態の差が催奇形性に種差及び物質による差が生ずる一因と推定された。

また、発癌抑制作用が期待されるチオプロリンの急性毒性を光学異性体間で比較したところD体のLD50値はL体の約2倍であった。また、甲状腺障害誘発性に大きな差のあるメルカプトベンズイミダゾールとそのメチル化体の経口投与による血中半減期は後者の方が小さく、毒性発現の差と良く対応していた。

## 4. 有効性・安全性評価のための科学技術開発に関する研究

化学物質の代謝的活性化の種差を簡便に予測する方法に関する研究では、ラットマイクロゾームを用いてTris(2-chloroethyl) phosphateの代謝を検討し、主にCYP3A及びCYP2Cで代謝されることを示した。また、本化合物はラットの場合と同様にヒト肝マイクロゾーム及び上清酵素により代謝されることを明らかにした(厚科研)。

化粧品及び化粧品原料の眼粘膜刺激性評価において動物を用いない代替法がどこまで利用できるか明らかにするために行ったバリデーション結果及び海外でのバリデーション結果から一つの代替法のみではドレイズ試験に置き換えることはできないこと、また、ドレイズ試験そのものには大きなバラツキがあることが明らかになった。これらを踏

まえ、複数の方法あるいはドレイズ試験と組み合わせたバッテリーの必要性が示された(厚科研)。

霊長類に近いスunksを安全性・有効性試験に利用するための研究の一環として、スunks肝チトクロームP450分子種(CYP1A)遺伝子のcDNA構造が明らかになった。そのアミノ酸配列はヒトのCYP1A2と最も相関性が高く、ラット、ハムスターとは大きな相違があることを示した。また、ラット全胚培養系を用いた試験系を確立するために、培養液中に存在する胚栄養因子を同定し、その定量法を確立した。また、最適なグルコース添加量を明らかにした(委長寿)。

化学物質の安全性評価手法における唾液分泌の意義に関する研究では、まず流涎を定量的に測定する方法を確立した。また、それを用いて有機リン系農薬等のラットにおける流涎発現と他の毒性症状との関係を調べ、神経性流涎では、多くの場合縮瞳や流涙を伴うが、ピロカルピンでは逆に瞳孔が散大すること、また、酸による流涎ではそのような自律神経症状を呈さないことを示した(厚科研)。

化学物質による障害感受性の内的遺伝子背景に関する研究ではブルーム症候群の原因遺伝子BLSの酵母相同遺伝子を用いてDNA修復、減数分裂における機能について検討し、ブルーム症候群の疾患発症との関連性を明らかにした。

## 6. その他

臨床試験との関係における非臨床試験実施タイミングに関するハーモナイゼーションの検討においては、ヒトに始めて投与する前に行っておくべき反復投与毒性試験の期間について検討し、げっ歯類では精巣に対する影響を検討するためには4週間必要であるが、非げっ歯類では2週間で良いとした(ICH-M3)。一般薬理試験及び薬物動態試験ガイドラインに関しては国際的ハーモナイゼーション及び最近の科学技術の進歩に応じた変更を行うための検討を行い、和文草案を作成し、更に検討中である(厚科研)。また、昨年度は薬物動態面での調査研究を通じて、ダイオキシンの暫定ADI策定に寄与したが、今年度はコプラナーPCB類の体内動態について文献調査を行った(厚科研)。

## 病 理 部

部 長 高 橋 道 人

## 概 要

平成7年12月より1年間の予定で来日し、第一室において協力研究員として研究に従事していた韓国啓明大学助教授李仁善博士は胃癌に対する化学的予防に関する研究で十分な業績を上げ、平成8年12月に帰国した。

短期海外出張は高橋道人部長が、米国・ワシントンで開

催された ICH 4 安全性分野専門家ワーキンググループに出席し、癌原性試験実施が必要となる条件について討議を行った（平成 8 年 4 月 28 日～5 月 5 日）。韓国・ソウルで OECD 主催による GLP 査察の実施に関するワークショップに出席し、講演及び討議を行った（平成 8 年 9 月 16 日～9 月 19 日）。英国・ロンドンで開催された ICH 4 安全性分野専門家ワーキンググループに出席し、反復投与毒性試験法ガイドラインについて討議した（平成 8 年 11 月 2 日～11 月 10 日）。デンマーク・コペンハーゲンで開催された日米 EU 医薬品規制ハーモナイゼーション官側専門家会議に出席し、問題症例について官側で評価を実施すると共に討議を行った（平成 9 年 1 月 12 日～1 月 16 日）。米国・ワシントンで開催された第 22 回トキシコロジーフォーラム冬季学術年會に出席し、討議した（平成 9 年 2 月 23 日～3 月 1 日）。西川秋佳室長は米国・ダラムで開催された「感受性とリスクに関する」第 3 回国際シンポジウムに出席し、討議を行った（平成 8 年 9 月 23 日～9 月 27 日）。米国・オースチンで開催された発がんリスクアセスメントに関する第 10 回国際コンファレンスに出席し、発表及び情報収集を行った（平成 8 年 12 月 4 日～12 月 7 日）。三森国敏室長はイタリア・ローマでの「FAO/WHO の第 47 回合同食品添加物（動物用）専門家会議（JECFA）」に出席し、討議を行った（平成 8 年 6 月 3 日～6 月 15 日）。また、フランス・パリにおいて OECD 主催の第 7 回試験法ガイドラインプログラムについてのナショナルコーディネーター会議に出席し、討議した（平成 8 年 9 月 16 日～9 月 21 日）。英国・ロンドンで開催された ICH での癌原性試験に関する専門家会議に出席し、討議した（平成 8 年 11 月 2 日～11 月 10 日）。スイス・ジュネーブでの「FAO/WHO の第 48 回合同食品添加物（動物用）専門家会議（JECFA）」に出席し、討議を行った（平成 9 年 2 月 17 日～3 月 1 日）。今沢孝喜主任研究官はフランス・ニースで開催された「がんの診断及び予知に関する生物工学の進歩と影響」についての第 3 回「国際シンポジウムに出席し、討議した（平成 8 年 10 月 24 日～10 月 30 日）。古川文夫及び小野寺博志主任研究官は米国・シンシナティーで開催された「第 36 回毒科学会年會」に出席し、発表討議した（平成 9 年 3 月 8 日～3 月 15 日）。豊田和弘技官はオーストラリア・ローンで開催された「第 9 回ローン癌学会及び米国癌学会主催の特別コンファレンス」に出席し、発表討議を行った（平成 9 年 2 月 11 日～2 月 18 日）。なお、医薬品 GLP 適合性調査には 6 人が延べ 8 カ所に出張した。

#### 研究業績

1. 自然発生病変の診断の確立に関する研究（厚生省がん研究助成金）

1) 自然発症肝炎ラットである LEC ラットの肝臓における脂質過酸化生成物の局在を免疫組織化学的に検索した

結果、肝炎発症から肝腫瘍発生にいたるまで肝細胞の細胞質内或いは核内に脂質過酸化生成物が発現した。

2) LEC ラットの肝炎発症に対するグルタチオン賦活剤の影響を検索した結果、死亡率を低下させる傾向を示したが、病理組織学的には顕著な影響を与えなかった。

3) ラットの下垂体神経葉に自然発生する管状増殖病変の病理発生を明らかにするため、これら自然発生性増殖性病変について種々の免疫組織化学的及び電顕的検討をした結果、この病変がラトケ嚢由来の頭蓋咽頭腫であることが示唆された。

2. 化学物質による臓器障害に関する研究（文部省科学研究費、厚生科学研究補助金）

1) 2,5-ジ-tert-ブチルヒドロキノン（DTBHQ）により誘発される神経毒性の病理発生を更に明らかにするため、DTBHQ 投与後の回復性を検討した結果、運動神経筋接合部の障害は一過性で時間の経過と共に回復することが明らかとなった。

2) ラットにアドレマイシンを投与し、初期障害メカニズムを形態学的及び免疫組織化学的に検討した結果、精祖細胞の壊死がアポトーシスに起因することが明らかとなった。

3) 塩化カドミウムをラットに 8 カ月間混餌投与し、その臓器障害性を検討した結果、40ppm 以下の濃度では腎に 150～200µg 蓄積したにも係わらず腎障害は誘発されなかった。

3. 食品添加物、農薬、医薬品等の安全性、特に癌原性に関する研究（食品等試験検査費）

1) 流動パラフィンの慢性・発癌性試験の結果、明らかな発癌性は認められなかったが投与群の腸間膜リンパ節に炎症性肉芽の増加が認められた。ヨードカリの 2 年間長期毒性試験をラットを用いて行った結果、1,000ppm の高用量群において唾液腺の扁平上皮癌が誘発された。また、パラオキシ安息香酸イソプロピル、乳酸鉄、クチナシ青、ジヨサマイシン及びペクチン分解物のがん原性試験を継続中である。

2) カロブ色素及びファフィア色素の亜慢性毒性試験の結果、毒性は非常に低い事が判明した。また、クロロフィル、納豆菌ガム、キチン及びシソ抽出物の亜慢性毒性試験を継続中である。

3) ラットにニトロフラゾン単回投与し、精子形成サイクルを考慮した精巣の組織学的検索の結果、ニトロフラゾンは直接 Sertoli 細胞を障害する可能性が示唆された。

4) フェバンテル及びその代謝物のフェンベンダゾールの肝腫瘍プロモーション作用の差異を検討するため DEN とガラクトサミンの処置を行った結果、フェバンテルが強いプロモーション作用を示し、キシラジンの大量投与後の血中濃度を調べたところ、急速に代謝され、ラットでは代

謝物の2,6-キシラジンの産生は低いことが明らかとなった。

5) マウスにメタベンズチアズロンを4週間投与し、肝臓の薬物代謝酵素誘導、細胞増殖活性及びコネクシンについて検討した結果、肝で肝細胞の肥大、滑面小胞体の増生、コネクシン32の減少、CYP1A1及び2B1の増加が認められ、メタベンズチアズロンがマウスの肝に対しプロモーション作用を有することが明らかとなった。

6) GST-P陽性細胞巢を指標としたラットの肝発癌中期検索法を用いてメタベンズチアズロンの肝腫瘍プロモーション作用を検討した結果、GST-P陽性細胞巢の増加を認め、メタベンズチアズロンがラットの肝に対してプロモーション作用を有することが判明した。

7) 雌トランスジェニックマウスにニトロフラゾンを含む餌投与した結果、卵巣、子宮萎縮がみられ、ホルモンの異常が卵巣腫瘍誘発に関与するものと考えられた。

8) チアンフェニコールをラットに単回投与した結果、精巢毒性は発現せず、その誘発には反復投与による暴露が必要であることが判明した。

9) DENによるラット二段階肝発がんモデルを用いてラットにピペロニルブトキサイドを反復投与した結果、GST-P陽性肝細胞巢が増加し、本物質が肝腫瘍プロモーターであることが強く示唆された。

4. 化学物質の安全性評価に関する研究(厚生科学研究補助金)

1) イヌの慢性毒性評価における9カ月間投与の必要性に関する文献及び各国の規制データを調査した結果、9カ月の薬物投与で慢性毒性を評価することが可能であるとの結論に達した。

2) ラット肝の細胞増殖活性を反応指標とするペルオキシダーゼ誘導剤に対する安全性評価法の可能性を示した。

3) 医薬品の発がん性検出のためのトランスジェニックマウスモデルの有用性についての検証作業を行い、ヒトプロト型c-Ha-ras導入トランスジェニックマウスが遺伝毒性発がん物質検出に有用であるとの結果を得た。

4) 神経毒性検出のための病理形態学的検索手法の改善についての検討を行った結果、神経終末を障害する物質については指端虫様筋の神経筋接合部についての電顕的解析が不可欠であることが示された。

5. 有害性評価の生体指標に関する研究(特別研究, 厚生省がん研究助成金)

各種化学物質のリスクアセスメントにおける、BrdU, PCNA, p53蛋白, DNA付加体などの種々の生体反応指標の有用性を検討した結果、DNA付加体形成や細胞増殖活性及び脂質過酸化の亢進が発がん過程に深い関連性を有することが明らかとなった。

6. 動物発がんモデルの確立に関する研究(厚生省がん

研究助成金, 厚生科学研究補助金, 文部省科学研究費)

1) p-クレシディンを6カ月間投与されたc-Ha-ras遺伝子導入及び非導入マウスにおける腫瘍発現の差異を検索した結果、膀胱腫瘍がいずれのマウスにも同頻度に誘発され、c-Ha-rasマウスに増える効果はみられなかった。

2) *lacI*遺伝子を導入したBig BlueマウスにDMNを投与し長期間観察後、*lacI*変異誘発性腫瘍の発生状況について検索した結果、肝腫瘍の発生が認められた。

3) Big BlueマウスにMeIQxを投与し、遺伝子突然変異誘発性と細胞増殖活性について検討した結果、標的臓器である肝臓と大腸で増加した。

4) 新生児マウスにイニシエーション処置としてENUを投与するための用量設定に関する予備的検討を行った。

7. 発癌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, 文部省科学研究費, HS財団受託研究費)

1) イソチオシアネート系化合物によってハムスターの肺及び脾の発がんが抑制されること、及びその機序に薬物代謝酵素系や細胞動態への影響が関与することを明らかにした。

2) ハムスター二段階脾発癌モデルのイニシエーション過程における魚粉と亜硝酸の同時投与による影響を検討した結果、脾を含めた諸臓器の腫瘍発生に明らかな影響を与えなかった。

3) ラットにMNNGを投与すると短期間に腺胃上皮の細胞増殖活性が亢進することを明らかにし、胃発がん修飾物質の短期検索モデルとしての可能性を示した。

4) 喫煙負荷したハムスターの肝臓から調製したS9は、ヘテロサイクリックアミンの変異原活性を上昇させるが、ニトロサミンに対してはその影響が乏しいことを明らかにした。

5) c-Ha-ras導入Tgマウスを用いて、ウレタン(UR)のみないし、MNURとURの投与により誘発される肺線維症と肺腫瘍との関連性を検討した結果、MNUR+URでは肺腫瘍の誘発が抑制された。

6) MNURによるハムスター肺線維症モデルを用いて、ビタミンAのような肺腫瘍プロモーターを投与し、MNUR誘発腫瘍に対する修飾作用について検討した結果、ビタミンAは腫瘍発生に何ら修飾作用を示さなかった。

7) ラットに高TSH血症を実験的に持続させ、誘発される腫瘍におけるk-ras及びp53遺伝子における変異の有無を検討した結果、腫瘍の進展にk-ras遺伝子の点突然変異の関与が示唆されたが、p53遺伝子に突然変異はみられなかった。

8. 化学物質データベースシステムの作成に関する研究(厚生省移替予算)

短期反復毒性試験においてみられる自然発生及び薬物誘発性病変についての組織写真と診断基準から構成される解

説書を作成する予定である。現在、組織写真と診断基準についての討論が終了し、その用語解説書草案を受託研究機関の協力を得て作成中である。

#### 9. 特殊化学物質のリスクアセスメントに関する研究(厚生科学研究補助金)

##### 1) ダイオキシンの発がん性を中心に調査を行った。

TCDDに関してはマウス及びラットでの長期試験が少数ながら実施されており、いずれも陽性所見がみとめられ、最大耐量よりもかなり低い用量で腫瘍発生が増加していた。

2) ホルムアルデヒドでは多くの研究が報告されており、発がん性についてはラットに鼻腔腫瘍(扁平上皮がん)が認められた。しかし用量-反応関係の研究から明確な閾値を示唆する結果が得られた。

3) ビフェニル及びパラジクロロベンゼンについて、作用機序を中心とした調査を行い、リスクアセスメントを行う。

4) 環境エストロゲン様化学物質の毒性に関する文献調査を行い、各物質についての毒性の特徴を総括した。

### 変異遺伝部

部長 祖父尼俊雄

#### 概要

第2室松井道子主任研究官は、平成9年3月31日をもって定年退官された。松井主任研究官は昭和44年に当所に入所後衛生微生物部にて勤務し、昭和60年4月より当部第2室において細菌を用いる復帰突然変異試験(Ames試験)に従事し、突然変異誘発機構に関する研究では、特にステピオールの突然変異誘発機構の研究において塩基配列の詳細な解析を行うなど、優れた業績を挙げられた。平成9年4月1日より当所客員研究員として受け入れられ、また職務に精励され当所の発展に尽くされたことにより表彰を受けられた。

平成8年2月15日より科学技術庁短期STAフェローとして第2室にて変異原・癌原物質に対する個人の感受性に関する研究に従事してきたカナダ、グエルフ大学・生化学教授 Dr. D. Josephy が平成8年5月16日に帰国された。

第2室山田雅巳主任研究官は、科学技術庁長期在外研究員として、平成7年7月25日より英国ICRF, Clare Hall laboratories, Dr. P. Karranのもとで遺伝子突然変異の分子機構の研究に従事していたが、平成8年7月24日に帰国した。

HS財団流動研究員として第2室で突然変異誘発機構の生化学的研究に従事してきた Petr Gruz は、平成8年8月1日より研究生として、平成8年12月1日より科学技術庁フェローとして引き続き研究に従事している。

科学技術特別研究員として第2室で酸化的障害に対する

修飾機構に関する研究に従事してきた金秀良は、平成8年10月1日より研究生として引き続き研究に従事している。

平成8年10月1日より昭和大学薬学部の松野淳美氏が協力研究員として第3室において培養細胞の形態学的解析及び増殖動態に関する研究に従事している。

平成7年9月1日より生体防御機構の分子生物学的研究に従事してきた第2室の鈴木任科学技術特別研究員は、平成9年3月31日に退所し、理化学研究所に赴任した。

平成7年10月1日より第3室にて細胞の培養技術などの研究に従事してきたHS振興財団の西村和子協力研究員は、平成8年12月27日に退所し、平成9年1月9日よりHS振興財団より榎松美治氏が協力研究員として細胞培養技術等の研究に従事している。

平成9年2月24日よりフランス、CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique) の Dr. J. Wagner が科学技術庁フェローとして第2室においてフレームシフト型自然突然変異の分子機構の研究に従事している。

平成8年4月1日より第3室にて実習生として培養細胞分譲に従事してきた岡戸清が平成9年3月31日に退所し、都立大大学院に進学した。

平成9年4月1日より第1室本間正充主任研究官が厚生省大臣官房厚生科学課に併任官として赴任した。

短期海外出張としては、祖父尼俊雄部長は平成8年4月27日～5月5日に米国のワシントン及び平成8年11月2日～11月10日に英国のロンドンにおけるICH-4準備会議での遺伝毒性専門家会議に出席した。

能美健彦第2室長は平成8年6月19日～6月30日に米国のローレンスリバモア研究所を訪問し、ボストンで開催されたゴードン・カンファレンスに参加し、当部で開発した変異原性試験用トランスジェニックマウスについて発表した。

林真第1室長は平成8年9月7日～9月19日に中国の華西医科大学のセミナーにおいて講演を行うと共に、第4回日中合同組織・細胞化学シンポジウムに参加し、マウスリンフォーマ細胞におけるFISH法を用いた細胞遺伝学的研究について発表を行った。

祖父尼部長は平成8年10月10日～10月13日に韓国のソウルで開かれた発がん性・分子毒性の最近の進歩に関する国際シンポジウムに出席し、マウスリンフォーマ試験の国際共同研究の成果について発表した。

能美室長は平成8年10月17日～10月27日にフランス、ストラスブルグのCNRS研究所と、ベルギー、ブリュッセル自由大学を訪問し、大腸菌 *dinP* 遺伝子によって促進される自然突然変異の機構について講演を行った。

林室長は平成8年11月18日～11月21日に英国のロンドンで行われたOECDのコンピュータシステムにおけるGLP査察に関するワークショップに出席し、施設と機器に関する

る報告を行った。

祖父尼部長は平成8年12月15日～12月22日にタイのピサノロケで開催された環境変異原・発がん物質・催奇形性物質検出のための短期試験法に関する第4回東南アジアワークショップに出席し、トランスジェニックマウスを用いた突然変異検出系について講演を行った

本間正充主任研究官は平成8年12月8日～12月12日にオーストラリアのヴィクトリアで開催された環境放射光に関するマウントプラー国際会議及びDNAのメチル化とEpi-geneticsに関するヘロン島ワークショップに出席した。

山田雅巳主任研究官は平成8年12月11日～12月18日に英国のロンドンにおいて開催されたDNA修復ネットワーク会議に出席し、ヒト誤対合修復蛋白によるシスプラチン-DNA付加体の認識について発表した。

能美室長、松井道子主任研究官及び鈴木孝昌主任研究官は、平成8年3月6日～3月17日に日米科学技術協定（非エネルギー部門、毒性学）の研究交流計画に基づいて、米国立健康研究所（NIH）、国立環境保健科学研究所（NIEHS）、デューク大学、化学工業毒性研究所（CIIT）及び国立毒性研究センター（NCTR）を訪問し、セミナー・講演を行い、遺伝子改変動物による毒性学試験への応用に関して多数の研究者と情報交換を行った。

第3室（細胞バンク）では、分譲業務をHS財団に移管したが、一部分譲用細胞の補充のために培養業務を通じてHS財団を支援している。同時に細胞バンク業務の重点を細胞バンク基盤整備に移し、品質管理体制及び細胞関連情報の強化、ヒト由来組織の研究資源化に関する研究並びに染色体分析ための新技術の導入を行った。細胞情報についてはインターネットを経由したWWWホームページを開設して本格的運用を開始した。

第2室においては、新しく開発したYG株を国内13アンプル、国外44アンプルを供給し、エームス菌株は国内54アンプル、国外2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

4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. 農薬の変異原性に関する研究

農薬の低濃度曝露による生じる変異原性を明らかにするため、DNAの酸化的損傷を修復する酵素を欠損した変異原性試験用のテスター株の開発を行った（生活衛生局食品化学課）。

### 3. 無機砒素化合物の変異原性に関する研究

酸化砒素及び塩化砒素についてマウスリンフォーマ細胞を用いた遺伝子突然変異試験を行った（環境庁企画調整局環境保健部）。

### 4. 異種遺伝子導入法を用いた新しい変異原性試験系の

## 開発に関する研究

新たに作製したトランスジェニックマウス（delta *gpt*）を用いて、ENUによって誘発された *gpt* 突然変異体及び  $\gamma$ 線によって誘発された Spi 変異体の DNA 塩基配列の解析を行い、塩基配列にそれぞれ特異性のあることを明らかにした（HS財団受託研究費）。

### 5. 突然変異誘発促進遺伝子のトランスジェニックマウスへの導入に関する研究

突然変異の誘発を促進する大腸菌 *dinP* 遺伝子の作用機構について研究を行い、*dinP* が主にフレームシフト型の自然突然変異を促進することを明らかにした（HS財団受託研究費（国際共同研究事業））。

### 6. 化学物質による健康リスク評価法に関する研究

トランスジェニックマウス変異原性試験用の大腸菌の *ada<sub>sr</sub>*, *ogt<sub>sr</sub>* 遺伝子を破壊し、これらの欠損株を作製した。Big Blue マウスより得られたラムダ DNA を ENU で処理した後にファージとして回収し、これを *ada<sub>sr</sub>*, *ogt<sub>sr</sub>* 欠損株に感染させたところ、野生株に比べ欠損株では変異頻度が明らかに上昇した（生活衛生局生活化学安全対策室）。

### 7. 哺乳類培養細胞を用いる試験の開発に関する研究

培養細胞を用いる小核試験の試験プロトコルを吟味するために、5-fluorouracil と 6-mercaptopurine について試験を行い、代謝拮抗剤における処理時間、標本作製時間などについて検討を行った（労働省化学物質情報課）。

### 8. トランスジェニックマウスを用いた変異原性試験に関する研究

5種類の制癌剤について、Muta Mouse を用いて遺伝子突然変異誘発性を検討すると共に、同一マウスに末梢血小核試験を適用して染色体異常誘発性を検討し、制癌剤の特性を吟味した（厚生省がん研究助成金）。

### 9. 医薬品規制ハーモナイゼーションに関する国際共同研究

マウスリンフォーマ試験（MLA）の1回目と2回目の共同研究の成果を集計し、総合的な評価を行った。その結果、35種の染色体異常誘発物質の中、21物質（60%）が MLA で陽性であったが、8物質（23%）は陰性で、残りの6物質（17%）は研究機関で結果が異なり、明確な結論が得られなかった。陰性の割合が20%を越えたことから、MLA が十分に染色体異常試験を補える物とは結論できなかった。しかし、24時間連続処理を導入すると陰性率が低下することから、この条件を検討する必要がある（薬務局審査課）。

### 10. 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

水生生物を用いる小核試験の検出感度を高めるために、イメージアナライザを用いる解析システムの改良を行った。自然水系で採取したサンプル水を実験室に輸送し、魚類及びウニの発生初期胚、アサリ、哺乳類培養細胞を用い

て、遺伝毒性、DNA 損傷性あるいは細胞毒性を検討した。静岡県用宗港沿岸の小型魚類における小核出現の季節変動の検討を継続し、更に複合汚染評価のための基礎的検討を開始した（国立機関公害防止等試験研究費，環境庁）。

#### 11. 変異細胞の選択技術の確立と突然変異の塩基配列の解析に関する研究

チミジンキナーゼ遺伝子をヘテロ ( $tk + / -$ ) にもつヒトリンパ球由来細胞株 TK6 を用いた遺伝子突然変異検出系を確立し、放射線に対する感受性を検討し、点突然変異等の小さな DNA の変異だけでなく、染色体レベルに及ぶような大きな DNA の欠失や染色体間の組換えによる変異を検出でき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）。

#### 12. 突然変異誘発機構の生化学的解析に関する研究

突然変異の誘発を促進する MucB 蛋白質の精製法を確立し、MucA' と MucB の相互作用について検討した（文部省科学研究費）。

#### 13. 環境変異原によって誘発されるヒト細胞ゲノム中の欠失型遺伝子突然変異の検出

p53 遺伝子に異常をもつヒトリンパ球由来の WTK-1 細胞を用いて各種の変異原に対する感受性や突然変異誘発性を検討し、p53 遺伝子の突然変異抑制効果を明らかにした。

#### 14. 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，染色体異常試験及び小核試験データの収集を行った。

#### 15. 研究資源としてのヒト正常上皮細胞（ケラチノサイト）の培養系の確立と分譲システムの確立に関する研究

正常ヒト子宮頸部組織の凍結保存法，解凍・培養法を改良し、分譲の技術的問題を解決した。また、ヒト上皮細胞の outgrowth 培養系での増殖促進機構を解析し、オートクリン増殖機構によること，トポインビションによる増殖停止が増殖促進機構のダウンレギュレーションによるのではなく、他の機構によることを明らかにした（HS 財団受託研究費）。

#### 16. ヒト初代培養系細胞の樹立と研究資源化に関する総合的研究

初代培養系細胞は正常 2 倍体細胞とも呼ばれ、生体内での性質を比較的良好に維持しているが、寿命があり研究資源としては有限量しか供給できない。そのため、新たな細胞を新規に確立するための研究を実施し、新しい形態の研究資源の確立を目指し、一部の細胞ではウイルスや化学発がん剤などを用いて無限増殖能を獲得した不死化細胞の樹立も試みた（厚生科学研究費補助金事業）。

#### 17. 培養細胞マスターバンク整備に必須な品質管理手法の開発と情報サーバー構築に関する研究

細胞株の保存管理に不可欠な品質管理のための実験技術として、培養に用いるウシ血清を介して感染する Pestivirus の検出手法の開発及び培養細胞の表現形質を検出するための高感度蛋白質 2 次元電気泳動法とそのデータベース化について検討を行った。細胞株情報の提供システムとして、インターネットと WWW を利用した情報公開の手法を確立した（厚生科学研究費補助金事業）。

### 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、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及び既存化学物質の安全性評価及び現在進行中の 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及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 OECD 主催の「高生産量既存化学物質初期評価会議」（平成 8 年 10 月、イタリア）、「第 25 回環境委員会／化学品グループ合同会合及び農薬フォーラム」（平成 8 年 10 月、フランス）に出席した。

なお、OECD 主催の「高生産量既存化学物質安全性点検計画」において、第 4 回初期評価会議を当所、厚生省、通産省、環境庁、労働省の協力のもとに平成 8 年 5 月に東京（ダイヤモンドホテル）で開催し、成功裡に会議を行うことができた。本計画においては、当室が中心となって安全性生物試験研究センターが国際協力の一環として多大の役割を果たしていると考えている。

化審法 GLP の査察には、当室から 6 カ所、延べ 6 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、1993 年度から 3 年間で 154 物質について安全性評価に必要な試験を各国の分担で行うことで開始された。わが国はこのうち 33 品目を分担し、必要な毒性試験を日本が分担で行うこととなっている化合物について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 12 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 に報告すると共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、現在後述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。更に、平成8年度は、計画の5年目として行った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、6年目として分担する16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。なお、当初は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たが、4年目以降も UNCED の決議に基づき全体で年間約50物質程度の安全性点検が続けられることが決定され、作業を行っている。

また、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及び周辺情報の調査、更に審査結果のデータベースへの入力を行っているが、本年度はスクリーニング毒性133物質、高分子化合物64物質、良分解性物質45物質の計242物質についての審査が実施され、その内43物質が指定化学物質に指定された。

## 研究業績

### 1. 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

当室は、これまでにリスクアセスメント及び毒性予測に必要な3種類のデータベースを構築し、これらのデータベースを利用しつつ下記に述べる種々の研究を行っている。

#### 1) 化学物質安全性点検支援システム

本データベースシステムは、国の責任で点検を行うこととなっている既存化学物質や OECD の高生産量化学物質の点検作業及び新規化学物質の審査業務によって生じるデータの管理、利用の目的で、総合評価研究室と安全性生物試験研究センター各部の連携で開発したものである。本システムは一昨年度末で一応完成したが、本年度も更に充実したものとするためデータ収集や帳票出力等について改良を加えた。現在までに OECD 担当32品目、国内点検29品目について、急性毒性試験31件、28日間反復投与毒性試験28件、反復投与毒性/生殖毒性併合試験14件、簡易生殖毒性試験7件、変異原性試験4件のデータを入力し、安全性評価作業に利用している。

#### 2) 化審法データベース

本データベースは、化審法の新規化学物質の安全性評価に利用するために厚生省生活化学安全対策室と共同で開発したもので、過去に申請された評価結果等を含む多くのデータが検索が可能となっている。現在約969品目のスクリーニングデータを入力し、利用している。なお、本データ

ベースは厚生省とオンラインで結合しており、両方でデータの入力、検索が可能なシステムとなっている。本データベースは、現在新規化学物質の安全性評価作業に非常に有効に利用されている。

#### 3) バイオロジカル・データベース

先に、文献等の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、本年度もシステムを一部改良し、DEC ネットを利用して NEC の PC98 端末からアクセスが可能となった。また、変異原性試験、催奇形性試験、発癌性試験及び反復投与毒性試験の各データを収集し、入力を行った。

#### 4) IUCLID データベース

本データベースは、ヨーロッパ連合 (EU) が開発したデータベースであるが、日/米/EU 化学物質安全対策協議の枠組みで、昨年、当所の VAX システムにインストールしたものである。今後、本データベースの有効性を検証しつつ、毒性試験データの国際的な情報交換を積極的に行う予定である。

### 2. 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。昨年度までに、前記安全性点検支援システム及び化審法データベースを利用し、28日間反復投与試験の流涎、精巣毒性について、投与物質との構造との相関について研究を行い、本年度は血中コレステロール値の変動等について同様の検討を行い、化学構造と毒性の関連性について多くの知見を得ている (厚生省生活衛生局生活化学安全対策室に報告)。

また、本年度は、以前より行われていた厚生科学研究費による「リスクアセスメント手法の改善と確立に関する研究」(研究班長:大森義仁元センター長)の一環として作成中の「科学物質のリスクアセスメントガイダンス」の最終取りまとめを当室が事務局となって行い、平成9年夏頃に出版の予定である (厚生省生活衛生局生活化学安全対策室に報告)。

### 3. 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の開発に関する研究を行っている。本年度は、昨年に引続き 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を検討し、更に染色体異常試験や小核試験などについて、予測システム構築のためのデータ入力を行い、検討を継続している (厚生省生活衛生局生活化学安全対策室に報告)。

## 大阪支所

支所長 小川 義之

大阪支所の発展的改組により、「国立厚生科学基盤技術開発研究所（仮称）」を創設することとなっており、当該研究所の創設に向けて平成8年4月に、「国立厚生科学基盤技術開発研究所（仮称）のあり方に関する検討会」が発足して第1回の会合が開かれたが、その後の開催は中断されている。しかしながら、科学技術基本計画に沿った厚生科学研究の柱として、当該研究所の基本構想策定費が厚生科学課から計上されて、平成9年度予算で確定したことより、間もなく具体的な動きが出てくるものと予想される。

本年度は本館と別館1号館の外壁改修・塗装工事が行われ、平成7年度に行われた梁補強工事・内壁等塗装工事と相まって、安全面と共に栄えも改善された。

インターフェロン等の国家検定の見直しが行われ、支所の担当してきたインスリン製剤9品目の国家検定は平成9年3月30日をもって廃止されたが、引き続き平成9年3月31日から2年間は国家検査が実施されることとなった。

支所情報小委員会とワーキンググループの活躍により、支所におけるイントラネットも開設されて、支所内における情報公開、情報伝達の迅速化、コミュニケーション手段の発達に伴う職員相互の融和の向上などの面において大きな成果が現れている。また、3試験部による事務部門に対する情報関連でのハード・ソフト面での支援により、可能な領域でのペーパーレスの事務処理化の実現も図られつつある。

本年度も大阪支所の現在の役割である検定・検査、標準品製造の業務を実施すると共に、研究面においても業務に関連する分野や将来を予測した分野での研究で成果を挙げることができた。

検定・検査、標準品製造等の支所3試験部全体としての業務実績は、医薬品国家検定134件、医薬品国家検査69件、食用タール色素製品検査581件、特別行政試験31件について実施し、標準品は医薬品試験用49品目（7,418個）を製造した。これらの検定・検査、標準品製造業務と共に、特別研究1課題、厚生科学研究5課題、食品等試験検査費3件、ヒューマンサイエンス振興財団受託研究5課題、創薬科学総合研究3課題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。

研修指導は、3試験部に大阪薬科大学学生（9名、3ヵ月）、薬品試験部に国際協力事業団研修生（1名、6ヵ月）、食品試験部に農林水産省神戸消費技術センター技官（1名、3ヵ月）などに対して行われた。

なお、平成9年4月1日付けで、小川義之支所長が生物試験部長事務取扱を免ぜられ、同日付けで川島邦夫毒性部

第四室長が生物試験部長に任命された。

薬品試験部

部長 岡田 敏史

## 概要

前年度に引き続き、医薬品の品質規格及び試験法に関する研究、医薬品分析法への機器分析法の応用に関する研究、ヒアルロン酸など高分子物質の特性解析とその応用に関する研究、エマルション及びリポソームなど微小分散系製剤の安定性及び製剤機能評価に関する研究、たん白質性医薬品の分子修飾による安定化に関する研究、薬物療法の最適化を指向した病因鑑別診断用医薬品の開発に関する研究などを行った。HS財団の第4期官民共同プロジェクト研究事業の「高機能を有する医用材料の創製・改良・修飾及び周辺技術に関する研究」に二課題で参加、また同財団の創薬科学総合研究事業の「製剤設計に関する研究」及び「分析・解析技術の開発に関する研究」に一課題づつ参加し、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件数は前年度に比べ大幅に増加し、新たに国家検査も加わった。ブドウ糖注射液の国家検査件数は、大幅に減少した。新規標準品としてメシル酸ジヒドロエルゴトキシンを新たに設定した。

四方田室長は、第110回 AOAC 国際会議に出席し、ヒトインスリンのキャピラリー電気泳動法による純度試験の判別限界に関する研究発表を行った（平成8年9月7日～13日、オランダ）。谷本室長は、米国薬剤学会1996年会に出席し、関連研究者との意見交換及び情報収集を行った（平成10月26日～11月2日、シアトル）。また、同室長は US-Japan AR Workshop に出席し、糖尿病合併症の発症とアルドース還元酵素量との関係に関する研究発表を行った（平成9年2月7～12日、ハワイ）。岡田部長、四方田室長は、国際 DDS シンポジウムに出席し、リポソームの凍結乾燥に及ぼすマルトースの保護効果に関する研究及びヒアルロン酸の水溶液中でのゲル形成に及ぼす界面活性剤の影響に関する研究発表をそれぞれ行った（平成9年2月23～3月1日、ソルトレーク）。

人事面では、平成8年6月30日付で小松裕明主任研究官が退職した。平成9年4月1日付で吉井公彦技官が食品試験部へ配置換えとなった。平成9年4月14日付で斎藤博幸氏を非常勤職員として採用したが、同人は同年5月1日付で正式採用となり、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134件で、全品合格であった。なお、本製剤9品目に対する国家検定は平成8年3月30日付

で廃止され、同年3月31日付で国家検査へと移行した。

## 2. 国家検査

ヒトインスリン製剤が26件、ブドウ糖注射液が42件、リンゲル液が1件であった。ブドウ糖注射液1件に不溶性異物が観察され、不適とされた。その他は、合格であった。

## 3. 一斉取締試験

ヒアルロン酸ナトリウムを含有する製剤25件につき、pH、浸透圧、極限粘度及び定量試験を行った結果、全品合格であった。

## 4. 特別行政試験

総合電解質液、アミノ酸補液など輸液製剤31検体につき、浸透圧、不溶性微粒子、ナトリウム含量、アミノ酸含量試験などを行った結果、全品規格に適合していた。

## 5. 標準品製造

46品目につき、合計5,188個の標準品の製造を行った。また、新規標準品1品目を新たに設定した：メシル酸ジヒドロエルゴトキシン。新規製造予定のセクレチン標準品は、現在、準備中であり、次年度に繰り越すこととした。

## 6. 国際協力

国際協力事業団の中国天津医薬品検査所技術協力プロジェクトの第4年度の研修員として左志輝薬師に対し、6か月間の技術研修（にせ薬の簡易鑑別試験法、熱分析法、キャピラリー電気泳動法）を実施した（平成8年9月15日～平成9年2月15日）。

## 7. その他

日本薬局方及び日本抗生物質基準の改正（薬務局研究開発振興課）、日本薬局方外医薬品成分規格の作成（薬務局審査課）、指定検査機関に対する精度管理基準の作成（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) 医薬品の規格及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

熱重量測定装置の校正用標準品として何を選択するか決定する必要があり、多くの有機物及び無機物の水和物に対するスクリーニング試験を実施し、4種の候補品目（いずれも有機酸の水和物）を選択した。これらの水和物につき、更に詳細な検討を行った結果、シュウ酸カルシウム水和物が標準品として最適であることを明らかにした。

##### i-2) 日局一般試験法の改正及び新規設定に関する研究

「ビタミンA定量法」にHPLC法による定量法を新たに採用し、製剤分析へ応用するための基礎的検討を行った。その結果、錠剤、カプセル剤及び散剤に適用可能な試験条件を明らかにすることができたので、HPLC法による製剤分析のための試験法案を作成した。

熱分析法及び電気泳動法に関する一般試験法（案）を新規に作成した。これらの案は、現在、局方調査会において

審議中であり、13局追補収載の見込みである。

#### i-3) 医薬品の迅速分析法の確立に関する研究

ビタミンA（酢酸レチノール及びパルミチン酸レチノール）含有製剤のHPLC法による簡便、迅速な定量法を確立し、薬務局監視指導課に報告した。

#### ii) 標準品の品質規格の設定に関する研究

ii-1) メシル酸ジヒドロエルゴトキシン標準品の候補品につき、生薬部を含む4機関での共同実験による品質評価試験を行い、赤外吸収スペクトル法による確認試験及びHPLC法による定量試験用の標準品を確立した。

ii-2) 日局収載予定品目「セクレチン」のHPLC法による定量試験用のセクレチン標準品規格作成のための調査研究を行った。

ii-3) そのほか、平成9年度新規製造予定の低分子ウロキナーゼ、ペオニフロリン、酢酸レチノール及びパルミチン酸レチノール標準品製造のための調査研究を行った。

### 2. 高分子性医薬品及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

(1) 水溶液中でラジカルを形成する医薬品の添加により、ヒアルロン酸の低分子化が起こることを明らかにした。ラジカルの形成過程が熱化学的であるオキシテトラサイクリンでは、温度が高いほど速やかにヒアルロン酸が分解されるのに対し、ラジカル形成に光エネルギーを必要とするフェノチアジン類では、UV照射することによりヒアルロン酸の分解が認められた。フェノチアジン類による低分子化では、活性酸素以外のラジカル種によるヒアルロン酸の分解が示唆された。

(2) ヒアルロン酸架橋ゲルを調製し、界面活性剤様の特性を有する医薬品としてフェノチアジン系薬物のプロマジンを追加するとき、その臨界ミセル濃度よりはるかに低い濃度でヒアルロン酸ゲルが急激に収縮することが観察された。また、ゲルの収縮が観察される領域では、医薬品がゲル中に強固に保持される現象を見出した（HS受託研究費）。

3. 分散系製剤の品質評価とその有効利用に関する研究  
典型的な固/液分散系（サスペンション）であるヒトインスリン水性懸濁注射剤のうち、結晶性インスリン製剤（2社3品目）及び二相性イソフェンインスリン製剤（2社5品目）につき、光回折法及び光遮蔽法により粒子径とその分布の実態調査を行い、固/液分散系製剤に対する製剤評価法を考案した。すなわち、分散の均一性、対称性、分布の範囲、平均粒子径、90%累積体積を示す粒子径などが評価指標となり得ることを明らかにした（HS受託研究費）。

### 4. 創薬基盤技術の開発に関する生物化学的研究

(1) 分子の動的挙動解析に基づくタンパク質製剤の安定化に関する研究

PEG修飾ビリルビンオキシダーゼの生物学的安定性、

製剤化工程の一つである凍結乾燥過程の安定性への影響につき検討し、更に PEG 修飾によるポリルビンオキシダーゼ安定化効果の発現を酵素反応速度論的に考察した(創薬科学総合研究費)。

(2) 薬物療法の最適化を指向した病因鑑別診断用医薬品の開発に関する研究

糖尿病患者の赤血球アルドース還元酵素 (AR) 量と糖尿病性神経障害の発症率との関係を明らかにし、糖尿病合併症治療薬としての AR 阻害剤の臨床適用に際しては患者個体の AR レベルを評価して適用すべきであることを明らかにした。

(3) 代謝異常性疾患治療薬の開発支援のための酵素評価系の確立に関する研究

組換えヒト型 AR を用いた AR 阻害剤の微量評価系を作成し、AR 阻害剤としての imidazopyrrologline 誘導体につき、in vitro での薬効評価を行った。

(4) 代謝性疾患の発症機序の解明に関する分子生物学的研究

糖尿病合併症の発症における AR 及び NO 合成酵素 (NOS) の関与を明らかにするために、正常及び糖尿病ラットの神経系における両酵素の発現動態を mRNA レベルで解析し、AR の mRNA は糖尿病状態で上昇することが明らかになった。

(5) 培養細胞の研究資源化に関する研究

ラットから単離した培養シュワン細胞における AR 及び NOS の発現における塩及び糖負荷の影響を PCR 法で検討した。AR は塩負荷、糖負荷のいずれにおいても発現が亢進し、iNOS は無処理シュワン細胞で検出されなかった。

## 食品試験部

部長 柴田 正

### 概要

昨年に引き続き製品検査、輸入食品検査、残留農薬の分析等に関する研究、食品添加物の安全性に関する研究、新開発食品素材の安全性に関する研究業務を行った。

人事面では吉井公彦技官が平成9年4月1日付けで配置換えされ、当部第1室に配属された。

短期海外出張では外海泰秀室長が平成9年3月1日より9日まで米国に出張し、サクラメントで開かれた第9回国際残留農薬ワークショップに出席し、演題を発表した。

### 業務成績

#### 1. 製品検査

食用タール色素581検体(平成8年4月1日~平成9年3月31日)について検査を行った。不合格検体はなかった。

#### 2. 研修

農林水産省神戸農林水産消費技術センター技官1名の研修(平成8年10月1日~12月27日)及び大阪薬科大学研究生3名の3ヵ月の研修を行った。また、外海泰秀室長は JICA 農薬利用コースの残留農薬分析の講義を行った(平成8年7月)。

### 研究業績

#### 1. 食品添加物等の安全性に関する研究

(1) 食品添加物の製品検査等の規格に関する試験法の作製

酸性条件下で食用色素を光照射すると、キサントン系及びインジゴ系においては色素の分解が認められ、照射時間の延長と共に分解は促進した。また、反応液中の溶存酸素を窒素ガスで置換したところ、色素の分解は抑制されたことより、色素の分解に溶存酸素の関与が示唆された。

(2) 食品中の添加物の分析法に関する研究

ビタミン E 同族体で酸化防止剤であるトコトリエノールの4種の異性体を逆相 HPLC で定量する方法を作成し、食品添加物「トコトリエノール」の異性体組成を測定した。その結果 $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ -トコトリエノール並びに $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ -トコフェロールの含量はそれぞれ22.8、3.1、40.5、8.7、22.5、0.3、1.0、0.4%であった。

(3) 化学的合成品以外の食品添加物の規格規準に関する研究

コウジ酸の呈示分析法の追試を行った。みそ、コウジからコウジ酸は検出されなかった。本法の100 $\mu$ g/g 添加時の回収率は84%以上であった。

#### 2. 残留農薬分析に関する研究

(1) 残留農薬基準告示分析法に関する研究

ネオニコチノイド系殺虫剤ニテンピラム及び代謝物 CPMA,CPMF の告示分析法を検討した。簡便化のため同時抽出を検討したが、CPMA,CPMF とも不安定で抽出効率が低いため、安定な CPF に変換する必要がある。検討の結果、基本的に登録保留基準の方法と同じ試験液調製法とした。変更点は、シリカゲルミニカラムに代えてオープンカラムを用いたこと、コメの場合には Extrelut 抽出でカラムが目詰まりしたため、液々抽出としたことである。この試験法による各作物の添加回収実験の結果、抹茶中の CPMA を除いて70%以上の良好な回収率が得られた。検出限界は、ニテンピラムが果実・野菜で0.0025 $\mu$ g/g、米で0.005 $\mu$ g/g、茶及び抹茶で0.01 $\mu$ g/g、CPMA 及び CPMF は果実・野菜で0.025 $\mu$ g/g、米で0.05 $\mu$ g/g、茶及び抹茶で0.05 $\mu$ g/g であった。

(2) 残留農薬迅速分析法開発に関する研究

試料からアセトンで抽出後濃縮し、NaCl を添加して、Chem Elut 1020に負荷し、酢酸エチルで溶出した。溶出液を濃縮し、GPC により一次精製を行った後 Sep-pak シリカ

及びフロリジルでクリーンアップし、GCで測定する一斉分析法を検討した。特に生産量の多いトリアジン系及びフェノキシ酢酸系除草剤について本法を適用したところ、良好な結果を得た。またトリアジン系の中でもメトリグジン及びその代謝物 DA,DK,DADK の同時分析法についても検討し、本法が有用であることを認めた。

### (3) 食品中残留農薬の簡易分析法の開発に関する研究

脂肪含有性食品中のピレスロイド系農薬分析における3種の脱脂法について検討した。アセトニトリル/n-ヘキサン分配法、Extrelut+Sep-pak C18法及びGPC法について比較した結果、10種ピレスロイド系農薬の回収率に関しては大差なかったが、脂質除去率及び操作の簡便性から固相抽出法を用いる Extrelut+Sep-pak C18法が有用と考えられた。

### (4) 農産物における複数農薬の残留実体の把握に関する研究

キントゼン、イソプロチオラン、トリフルラリン、ブタクロールの試料からの同時分析法について検討した。告示分析法である BHC,DDT 等有機塩素系農薬のグループ分析法を適用し上記4種農薬についても分析可能か否かを検討した。キントゼン、トリフルラリンについてはグループ分析法を適用できたが、イソプロチオラン、ブタクロールについては適用できず、フロリジルカラムからの回収が定量的になされなかった。従って、この2農薬については吸着剤の少ない Sep-pak フロリジルを使用し、20%酢酸エチル含有 n-ヘキサンで溶出して良好な結果が得られた。

### (5) 残留農薬分析の GLP 対応に関わるクロマトグラフィー手法の研究

有機リン系農薬代謝物であるエトリムホスオキソン、含窒素殺菌剤ピテルタノール、含塩素殺菌剤テクロフタラムについて、ガスクロマトグラフィーにおけるマトリックス効果の詳細を検討し、対処法を示した。また、マトリックス効果に関する国内外の研究状況を総説化した。

## 3. 輸入食品検査に関する研究

### (1) 輸入農産物の分析、試験法等に関する研究

残留農薬分析における自動化クリーンアップ法としてゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) を検討した。Siobead SX-3 を樹脂とした Optima GPC カラムと Envirosep ABC カラムを用い、脂質、天然色素と農薬の分離について調べた。ピレスロイド系農薬については一部妨害物質との分離が困難であったが、その他の農薬については有効であった。

### 4. 希土類元素の生体影響に関する研究

#### (1) 希土類の生体影響の評価法に関する研究

7種希土類元素 (Y,Ce,Pr,Eu,Dy,Yb,Rn) の塩化物の pH の存在形態の変化を調べた。また、静脈内投与時の血清及び血球への分布を調べた。

### 5. 新開発食品素材健康影響評価研究

(1) ギムネマ・シルベスタ葉抽出物を原料とする21種の健康食品中のギムネマ酸含量の実態調査を行った。また、3段階の精製度のギムネマ・シルベスタ葉抽出エキス (ギムネマ酸含有量: 9.4%), 酸沈殿物 (25.8%), 粗分画物 (58%) をそれぞれ 0.05-1.0g/kg, 並びに合成コンズリトール A 0.01-0.1g/kg を Wistar 系雄性ラットに投与しラットの生長、血清、肝臓脂質、血糖値及び血清インシュリン値に及ぼす影響を調べた。

## 6. 生体内生理活性物質の生化学的研究

### (1) 過酸化脂質と生体内抗酸化物質のバランスに関する研究

生体内抗酸化物質であるトコフェロールの逆相 HPLC 法を開発した。

## 生物試験部

部長 川島邦夫

前部長(支所長) 小川義之

## 概要

研究業務としてヒューマンサイエンス振興財団による第4期官民共同プロジェクト研究(1課題)並びに第2期「創薬科学総合研究事業」(1課題)、健康地球研究計画推進研究事業(1課題)のほか、厚生省特別研究(1課題)などを中心に取り組んだ。

国家検定の見直しに伴い、当部の担当してきたインスリン製剤9品目の国家検定は平成9年3月30日を以て削除され、引き続き平成9年3月31日から2年間は国家検査が実施されることとなった。

海外出張は、小川義之支所長(生物試験部長事務取扱)が国際協力事業団による中国天津医薬品検査技術プロジェクト計画の一環として行われた第3回日中薬品分析技術セミナーに出席し、「発熱物質試験及びエンドトキシン試験における標準化研究の国際的動向」という課題での講演のために、平成8年10月27日~11月2日まで天津市へ短期出張した。江馬真第二室長及び原園景技官は米国での毒科学会第36回年会(平成8年3月8日~15日)で塩酸トリフェニルスズによる着床数減少についての成績を発表した。研修指導としては、例年のように大阪薬科大学学生3名(3ヵ月)を受け入れて行った。

人事面では平成9年4月1日付けで小川義之支所長が生物試験部長事務取扱を免ぜられ、同日付けで川島邦夫毒性部第四室長が生物試験部長に任命された。平成8年4月1日から天野博夫主任研究官は厚生省大臣官房厚生科学課に併任官として赴任し、平成8年10月31日をもって併任が解除された。平成8年4月1日付けで、寺田衣子が非常勤職員として採用され、平成9年3月31日付けで退職した。

## 業務成績

### 1. 国家検定

ヒトインスリン製剤134件（生物試験，無菌試験）で，全品目とも合格であった。

### 2. 国家検査

インスリン製剤26件（生物試験，無菌試験），ブドウ糖注射液42件（発熱性物質試験，無菌試験）及びリンゲル液1件（生物試験，無菌試験）で，全品目とも合格であった。

### 3. 特別行政試験

輸液製剤6件（発熱性物質試験）を行い，全品目とも合格であった。

### 4. 標準品製造

エンドトキシン2,100個，胎盤性性腺刺激ホルモン100個，下垂体性性腺刺激ホルモン76個をそれぞれ製造した。なお，エンドトキシン標準品の新ロットを国立感染症研究所及び国内企業数社の協力を得て新規に製造した。

### 5. その他

日本薬局方の改正（薬務局研究開発振興課），特にエンドトキシン試験法の日局13改正案及び国際調和案作成協力のほか，生化学試薬及びエンドトキシン試験用水のJIS規格案の作成作業（通商産業省）に協力した。

## 研究業績

### 1. 発熱性物質に関する研究

エンドトキシン試験法の国際調和案の原案作成作業をほぼ完了し，その最終案に相当するものを提出した。また，本試験法の標準化に向けて，「エンドトキシン試験用の水」のJIS規格設定の協力をを行い，平成9年3月規格制定の運びとなった。更に，グラム陽性菌，陰性菌及び真菌の簡便かつ迅速な検出試薬として開発されたカイコプラズマ試薬の注射剤，飲料水，医療用具等への適用性を評価し，本試薬の有用性を実証する成績を得た。

### 2. サイトカイン産生誘導因子エンドトキシンの検出手法のシステム化に関する研究

(1)β-グルカンとエンドトキシンの分別定量法の確立，(2)医療用具等についてのエンドトキシン検出用抽出溶剤の開発，(3)脂質系製剤及びその原料に対するエンドトキシン試験法の確立，(4)リムス活性と発熱性サイトカイン誘導活性及び発熱活性との相関性の検討，(5)蛋白質の吸着が生じにくい高分子膜の設計理論の設定，等を課題として官民共同研究を実施し，各種注射剤，DDS製剤，医療用具，医用材料等についてのエンドトキシン検出手法システム化のための基礎知見を集積した。更に，既存のマウスマクロファージ様細胞株を用いてプロトタイプ的な発熱性物質検出系を作成し，本検出系の特長と有用性について検討を加え，ウサギ発熱性物質試験と高い相関を示すことなどを明らかにした（ヒューマンサイエンス振興財団：受託研究費）。

### 3. 医薬品等の有効性，安全性に関する研究

(1)可塑剤 butyl benzyl phthalate のラットにおける主要な代謝物の一つである mono-n-benzyl phthalate (MBeP) をラットの器官形成期に投与し，発生毒性を検討した結果，胚致死作用及び催奇形性があることが明らかになった。

(2)ラットの器官形成期を3日づつに分割して mono-n-butyl phthalate (MBuP) 及び mono-n-benzyl phthalate (MBeP) を経口投与して発生毒性を検討した。両化合物とも臨界期は妊娠7-9日及び妊娠13-15日にあることが明らかになった。

(3)妊娠8日のラットに投与したときに強い催奇形作用を示す di-n-butyltin dichloride (DBTCl) をラット培養胚に暴露し発生毒性を検討した。着床後ラット胚に対する胚毒性（頭腎長の低下，体節数の低下，顔頭部の異常，及び尾の異常など）があることが明らかになった。

(4)ラットの妊娠中期に dibutyl phthalate (DBP) を経口投与して発生毒性を検討した。着床阻害作用を有することが明らかとなった。

(5)ラットの妊娠初期に triphenyltin chloride (TPTCl) あるいは tributyltin chloride (TBTCl) を経口投与して発生毒性を検討した。両化合物とも着床阻害作用を有することが明らかとなった。

### 4. ラット脱落膜反応を用いた発生毒性検出システムの検討

ラットの妊娠初期に投与したとき，強い胚致死作用を示す butyl benzyl phthalate (BBP) 及び着床阻害作用を示す tributyltin chloride (TBTCl) を脱落膜反応を誘起した偽妊娠ラットに投与したところ，投与量依存的に脱落膜反応を抑制することが明らかになった。これらのことから，BBP による胚致死作用及び TBTCl による着床阻害作用は，脱落膜反応の抑制が関与していることが示唆された（厚生省特別研究「安全性評価のための迅速かつ鋭敏な毒性指標の確立に関する研究」での分担研究）。

### 5. 培養細胞の研究資源化に関する基盤的研究

評価科学領域における諸種培養細胞の研究資源化を目的として以下のような研究を行った（平成8年度厚生科学研究費補助金による健康地球研究計画推進研究事業：薬品試験部，（財）発酵研究所，京大分子作用制御学講座との共同研究）。

(1)中枢神経系等，特殊な組織に作用する物質の研究や，既存の細胞株を利用できないような物質の生体影響評価等，特定の研究用途を指向した細胞を，機能性初代培養細胞の長期培養化や不死化，既存株細胞への受容体遺伝子の導入等の方法により開発し，新たな研究資源とする試みを行った。

(2)マクロファージからの発熱性サイトカイン産生を指標とするエンドトキシンのバイオアッセイシステムの確立

を目的として、エンドトキシンに対して高感度に応答し、しかも大量の腫瘍壊死因子 (TNF) を産生するマウスマクロファージ様細胞株を得た。

(3) 糖尿病合併性神経症の病態モデル候補として、初代培養シュワン細胞を取り上げ、この細胞におけるアルドース還元酵素 (AR) の発現を、ノザンプロット法を用いて検出し病態を模した培養条件の影響を検討した。その結果、高食塩濃度、高グルコース濃度の複合条件下において ARmRNA 発現量の著明な上昇が認められた。

6. ヒト正常細胞の不死化及びラットに由来する多分化能を保持する中枢神経系幹細胞の培養化-ラットに由来する中枢神経系幹細胞の培養-

ラット胎生12日胚よりトリプシン処理により神経管を単離し、更にトリプシンで分解してシングルセルサスペンションとし、ポリリジンコートしたディッシュに播種した。基礎培地は、0.1% BSA 及び0.01% トランスフェリン添加 DMEM/F12混合無血清培地を用い、成長因子として添加したヒトインスリン、ヒト塩基性 FGF、ラット EGF それぞれの細胞増殖に及ぼす影響を観察した。インスリン、塩基性 FGF 添加培地中では、いずれも細胞の三次元的凝集と突起の進展を特徴とする分化の進行が観察されたのに対して、EGF 添加培地中では扁平な未分化細胞により構成される増殖性コロニーの発達が顕著であった。EGF 添加により増殖した細胞をトリプシン処理して分散し EGF 添加培地中で再培養すると、一部の細胞は容器底面に接着しアストロサイト様の形態を示す細胞に分化した。一方、それ以外の大半の細胞は容器底面に接着せず浮遊性の細胞塊を形成して長期 (2 ヶ月以上) 増殖を続けた。現在この浮遊性細胞の分化能を中心に検討を行っている (ヒューマンサイエンス振興財団創薬総合研究事業: 岡山大学医学部, 国立感染症研究所 (旧国立予防衛試研究所), (財)発酵研究所との共同研究)。

#### 北海道薬用植物栽培試験場

場 長 畠 山 好 雄

#### 概 要

平成7年に宿日直が廃止され、同8年より民間委託による警備保障が実施されるようになったが、施設管理・研究業務の両面で、小さな問題が続出し、最近、ようやく安定してきた。人事面では、栽培試験場行 (二) 研修の一環として、当場の中西大樹技官が平成8年10月21日~10月25日まで筑波試験場、和歌山試の山田和也技官が平成8年7月18日~7月22日まで会場において、それぞれ研修を行った。

研究業務としては、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」、厚生科学研究費補助金による「老人医療に応用される生薬・漢方薬についての基礎研究」をそれぞれ終了した。昨年に引続いて継続実施した研究は、麻薬課の「けしの直接抽出法に関する研究」、厚生省研究開発振興課の委託である薬用植物栽培・品質評価指針に関する諸試験、厚生科学研究費による「薬用植物種子の長期保存方法等に関する研究」などであり、後二者については報告書を作成、提出した。

海外出張は、畠山場長が平成8年8月3日から8月21日まで中国へ赴き、青海省及び甘粛省のダイオウ・カンゾウについて、種及び分布を調査した。

#### 業務成績

##### 1. 種子交換

採 取	258種 (筑波試験場へ送付)	
受け入れ	31件	62種
分 譲	22件	27種

##### 2. 指導業務

ケシの講習会が平成8年7月31日に下川町で開催され、一般耕作者及び関係機関に対し講習を行った。その他、例年どおり、多数の来場者に薬用植物の情報提供を行った。

#### 研究業務

##### 1. 生態系農業に基づくけし栽培の確立に関する研究

アヘン多収穫技術を開発する一環として、成型苗利用による移植栽培を試みた。育苗用のセルトレイには、セルトップ#128, #288, ニュープラグ#406, #128, #288, リプトレイ#200の6種類を供試した。従来、ケシの移植は不可能とされていたが、成型苗を利用した場合は80%以上活着し、十分実用化できる技術であった。温室内で2月6日に播種すると苗が大きくなりすぎ、トレイの中では生育できなくなるので、3月5日、ビニールポット (径7cm) に移植し、更にそれを5月1日に圃場に定植した。当初の目的は生育日数を延長し、植物体を大きくすることにあつたが、温室で育成した成型苗は早く開花・結実し、所期の目的は十分には果たせなかった。しかし、アヘン収量は従来の直播法に比べ1.3~2.4倍に達し、アヘン多収穫につながる栽培法であることを実証し得た。

##### 2. 薬用植物種子の長期保存方法等に関する研究

ダイオウ・エゾウコギ・ゲンチアナ・トウキ・チョウセントウキ・チョウセンゴミシの種子に人為的に加令処理を施し、各処理後の発芽率を調べた。温度0℃-湿度なりゆき-15日間→同30℃-なりゆき-15日間を1処理期間とし、1処理期間を1年間保存と仮定し、4処理まで行った。その結果、低温要求性あるいは上胚軸休眠をもつエゾウコギ・ゲンチアナ・チョウセンゴミシは処理の有無に関わらず、発芽が見られなかった。ダイオウ・トウキは加令を4反復しても発芽率の低下は見られず、チョウセントウキのみは4反復目に発芽率0%に低下した。

### 3. 薬用植物栽培・品質評価指針作成に関する研究

トリカブトの1年目の生育・収量に対するリン酸肥料施用量(0, 5, 10, 15kg/10a)の影響を調べたところ、施肥量の増加による収量増は明確には認められなかった。なお、生育、収量の結果から、リン酸施肥量5~10kg/10aが適当と考えられた。

#### 筑波薬用植物栽培試験場

場長 西孝三郎

#### 概要

創設時に設置されたファイトトロン人工光室が、経年劣化のため床及び壁面並びに冷温水配管等の金属部分の腐食が著しい状態にあり研究業務遂行上支障を来していたので、本年度の施設整備費により、保守管理が容易なキャビネット型の人工気象装置(人工光型グロースキャビネット)への更新を実施した。研究業務としては、前年度に引き続き、ヒューマンサイエンス振興財団の受託研究・官民共同プロジェクト研究の一環として、「大量培養を指向したスケールアップ時の律速因子の解明」及び「薬用植物の人為的交雑種における遺伝子の発現機構に関する研究」のほか、厚生科学研究費補助金により「薬用植物種子の長期保存方法等に関する研究」、「薬用生物資源の保存及び保護に関する研究」、「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」及び「毒物等誤嚥時の初期治療薬の開発研究」も実施した。また、厚生省薬務局麻薬課の委託研究「けしの直接抽出法に関する研究」及び「生態系農業に基づくけし栽培法の確立に関する研究」、厚生省薬務局研究開発振興課の委託研究である「薬用植物栽培・品質評価法に関する栽培試験」を実施した。平成8年4月1日から、ヒューマンサイエンス財団の流動研究員として「大量培養を指向したスケールアップ時における律速因子の解明」の研究を行っていた中西史は平成9年3月31日付けで退職し、東京学芸大学に就職した。また、平成8年10月1日付けで、Dr. Mia, Md. Wahiduzzamanが「薬用植物の根系形成及び薬用成分・エキス含量に及ぼす土壤環境条件の影響解析」の研究を行うため、科学技術庁の科学技術特別研究員として採用された。その他、協力研究員として受け入れていた韓国全南大学のDr. Jun Cheul Ahnが平成8年9月6日、実習生として受け入れていたSingapore Polytechnic (Chemical Process & Biotechnology Department)のMr. Gung Yeu Tzeh AndrewとMr. Elfie Jaar Arshadが平成8年6月28日、それぞれ研究及び研修を終わり帰国した。平成9年3月5~6日、当試験場の会議室において、寺尾所長、斉藤副所長、佐竹生薬部長、清水総務部長出席のもとに、平成8年度薬用植物栽培試験場業務打ち合わせ会議を開催し、

報告及び連絡事項、平成8年度試験研究業務報告及び平成9年度試験研究計画等について討議を行った。平成8年7月9日、昨年に引き続き「第6回薬用植物栽培技術フォーラム」を開催した。川口敷美三和生薬(株)技術顧問及び国立衛生試験所の佐竹元吉生薬部長を招き、特別講演を行ったほか、鈴木幸子東京都薬用植物園栽培担当係長の講演、当所の5試験場の研究報告を行った。全国から145名の参加者があり、盛況のうちに無事終了した。海外出張は、酒井英二研究員が平成8年7月19日から同年7月27日まで、中国(蒙古自治区)に出張し、麻黄、甘草、黄耆を中心に各薬用植物の栽培地及び野生地の視察並びに学术交流を行い、柴田敏郎室長が平成8年8月2日から同年8月20日まで、中国(青海省、吉林省)に出張し、薬用植物に関する共同調査研究、技術指導及び意見交換を行った。また、西孝三郎は平成8年10月31日から同年11月3日まで、韓国に出張し、韓国における薬用植物開発の戦略に関する第1回国際シンポジウムに出席し、講演及び討議を行った。

#### 業務成績

種子保管数(貯蔵庫)	350種類、延べ1,650缶
交換用種子保管数	1,119種類/1997年 1,127種類/1996年
入手種子数	61件、延べ405種類
分譲種子数	203件、延べ4,863種類
種子目録配布数	68カ国、438機関

#### 研究業績

##### 1. 薬用植物の栽培に関する研究

##### 1) キバナオウギの根の生育に及ぼす栽培圃場の耕起条件の影響

前年度に引き続き、直根性の生薬を高収量で生産するため、圃場の耕起条件の影響を2年株について栽培試験を実施した。

その結果、2年株においてもトレンチャーで耕うんした場合、主根が良く伸長し、分枝根の発生数、長さ及び乾物重共に有意に少なく、太い分枝根の発生の少ない形状の生薬が得られることが判明した。また、2年株では根腐れ株が目立ち、周皮の褐色化や中心が腐敗した株が多く認められ、外観上は1年目株に比べ劣るものであった。1年目株と生育を比較すると、主根の直径は増加したが、根部の合計乾物重量はいずれの区においても低下した。2年目における地上部の生育は極めて旺盛で草丈2mに達し、本設定の栽植密度では過繁茂による風通しの悪化から夏期に落葉し、それが2年目根の生育が低下した原因と考えられる。更に土壤の硬度を測定した結果、トレンチャーによる耕起を行えば、少なくとも2年間はほう軟な状態が保たれることが判明した。

##### 2) 茵陳蒿生産に関する研究(1) 地域間差

茵陳蒿の生産に先立ち、野生のカワラヨモギを全国から



集め、その地域間差を明らかにし、栽培に適した系統の選抜を行うことを目的に挿し木株及び種子繁殖株の生育、染色体数の観察、系統間(親株)の成分について比較検討を行った。

その結果、導入系統を外見上比較すると、茎が匍匐するタイプと直立するタイプに区別でき、挿し木株で導入系統間で花穂の収量に差が認められた。開花開始日は、概ね9月上旬であるが、種子島系統(TN)は遅く11月であった。また、染色体数は $2n=18$ で差は認められない。ただし、匍匐するタイプのTNについては $2n=16$ の株もあり、更に検討する必要がある。系統別成分量を比較した結果、概ね同様の傾向でDME(Dimethylesculetin) > CAP(Capillarisin), DME=CAP, DME < CAPであり他と異なっていた。

### 3) 茵陳蒿生産に関する研究(2)栽培環境要因の解明

カワラヨモギは、挿し木による栄養繁殖が可能であり、均一な個体群を生産するのに適していると考えられる。そこで、土壌による生育差、直播き法及び移植法による生育差、挿し木時期の違いによる生育差について検討した。また、乾燥方法、収穫時期の相違が成分含量に及ぼす影響についても検討した。

土壌の種類では、砂土で草丈が有意に高くなった。花穂収量はTS系統では差が見られなかったが、岐阜県川島町系統(KI)では褐色土で有意に高かった。花穂収量効率の点では、砂土は栽培に不向きと考えられる。静岡県中川根町(O)とKIの2系統について直播き及び移植栽培を行った結果、共に直播きの場合で有意に旺盛な生育が見られた。また、広島県大崎町(H)、茨城県大宮町(N)、国立科学博物館筑波実験植物園(ZN)の3系統について挿し木時期の検討を行った結果、より早い時期に挿し木を行う必要性が示唆された。更に5つの方法で、花穂を乾燥させた結果、成分含量に大きな差はなかったため、今後は40℃の通風乾燥をすることとした。更に、収穫時期により成分含量に差の生じることが明らかになったので、今後花の成熟度についても検討する必要があると思われる。

## 2. 薬用植物の組織培養に関する研究

### 1) *Atropa belladonna* 毛状根からのLittorineの単離、同定

HartmannらはGC-MSにより植物体、培養根、懸濁培養細胞より20種のアルカロイドを同定したが、その中にlittorineは含まれておらず、littorineの*A. belladonna*における存在は現在まで確認されていない。しかし、HPLC分析により*A. belladonna* 毛状根にlittorineを検出したので、littorineの単離・精製を試みた。毛状根(M8)のlittorine様物質の生産は、増殖の著しい2週間目に最も高くなることが明らかとなった。得られたアルカロイド画分3.44gをSiO<sub>2</sub>カラムクロマトグラフィーに供し、littorine様物質リッチな画分300mgを得た。更にODSカラムクロマトグラ

フィーを行い、160mgのlittorine様物質を得た。このうちの一部に対し、更にSiO<sub>2</sub>カラムクロマトグラフィーを繰り返し行った。その結果、単一物質24mgを得ることができ、重クロロホルム中でのNMR測定を行った。<sup>1</sup>H、<sup>13</sup>Cの一次元NMR、<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY、<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C COSYの二次元NMR測定を行い、<sup>13</sup>Cについては更にDEPT法による解析を行った。その結果、全てのH及びCのシグナルを帰属することができた。それらは1969年のCannonらの報告及び1989年のGriffinらのlittorineに関する報告と一致し、ペラドンナ毛状根中でのlittorineの存在を証明することに成功した。

### 2) 薬用植物の超低温保存に関する研究(3)

薬用植物資源を極長期にわたって保存するために、オタネニンジンの不定胚を供試し、簡便なガラス化法による超低温(-196℃)保存法について検討した。5-15%PVS3で前培養、ガラス化液処理を20分間あるいは30分間行い、約4時間液体窒素中に浸漬した後、解凍、再培養したところ、10%あるいは15%PVS3で前培養し、30分間のガラス化液処理を行った区が、最も生存率が高く、不定胚の生育も良好であった。更に、10-15%PVS3と同程度のsucroseを含み、1M glycerolを含む50%loading solutionで前培養し、30分間のガラス化液処理後、液体窒素中に保存した不定胚では、最高52.4%の再生率が得られた。超低温保存後再生した不定胚は、対照群(保存未処理)と同様、良好な生育とシュート分化及び植物体再生が認められ、また、ジンセノシドパターン及び含量にも大きな違いは認められなかった。

### 3) 薬用植物の不定胚誘導系の開発に関する研究(2)

薬用植物の不定胚形成系を確立するため、圃場栽培しているセリバオウレンの花茎、葉柄及び葉を常法により殺菌後、種々濃度の2,4-Dとkinetinを組み合わせて添加した1/2MS固形培地、25℃、暗所で8週間培養し、更に植物ホルモン無添加1/2MS固形培地に移植して、25℃暗所で培養し、不定胚を誘導した。また、採取直後の種子を常法により殺菌後、植物ホルモン無添加1/2MS固形培地、25℃、暗所で培養し、不定胚を誘導した。不定胚を経由して得られた幼植物は、植物ホルモン無添加1/2MS固形培地、25℃、16時間照明下で培養し、再生植物体を得た。花茎を外植片とした場合、高濃度(5-10mg/l)の2,4-Dを添加した培地で培養後、植物ホルモン無添加培地で培養すると不定胚が形成した。一方、葉柄を外植片とした場合、2,4-Dを0.5mg/l添加した培地で培養後、植物ホルモン無添加培地で培養すると、最も切片当たりの不定胚形成数が多かった。また、葉を外植片とした場合、2,4-D(0.5mg/l)とkinetin(1mg/l)を添加した培地で培養後、植物ホルモン無添加培地で培養すると、最も切片当たりの不定胚形成数が多かった。更に、種子を無菌的に植物ホルモン無添加1/2MS固形培

地に播種し培養すると、正常に発芽する植物体と共に不定胚を形成しながら発芽する個体が観察された。上記のいずれの不定胚も、植物ホルモン無添加1/2MS固形培地での増殖及び継代維持が可能であり、また再生植物体の形態も正常であった。

## 伊豆薬用植物栽培試験場

場長 飯田 修

### 概要

当场正門前を通る国道136号線のバイパス建設工事に伴い、平成8年4月、栽培圃場の北側の敷地一部362.09m<sup>2</sup>が厚生省から建設省に所管換えとなった。バイパスに面した部分の金網フェンスと門扉の更新及び樹木の移植が補償費用で行われた。バイパスは平成9年4月9日に開通した。

研究関係では、厚生省研究開発振興課の委託研究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、「ゲンノショウコ」の報告書を提出した。また、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」及び厚生科学研究費補助金による「薬用植物種子の長期保存方法等に関する研究」を実施した。

平成8年9月8日、NHKTV番組「趣味の園芸」の録画撮影が場内で行われ、身近な薬用植物についての栽培法などを紹介した。

### 業務成績

#### 1. 種子交換

採種 165 種 (筑波試験場へ送付)

内訳 野生植物 80 種  
標本植物 63 種  
温室植物 22 種

受入 25 件 65 種

分譲 3 件 58 種

#### 2. 指導業務

平成9年1月24日、長野県及び長野県薬用作物振興協議会共催の平成8年度長野県薬用作物・生薬研究会で飯田が「注目される生薬栽培の現状と長野県内での栽培適応性について」講演した。

#### 3. 薬用植物の自生地調査

例年どおり、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  
有機質肥料の施用効果について、連用2年目の検討を行った。併せて秋まきと春まき栽培の比較も行った。試験区

は前年度同様、Ⅰ. 自家製堆肥300kg/a, Ⅱ. 同600kg/a, Ⅲ. 有機カルシウム質土壌改良資材 (商品名: グリーンマイティ-) 150kg/a, Ⅳ. 同300kg/a の4区を設けた。今季は11月から翌年6月まで例年に比べ低温で推移したため、ケシの生育が1週間程度遅れた。アヘン収量は秋まき、春まき栽培共にⅣ区が最も高く、次いでⅡ区が高く、Ⅲ区、Ⅰ区は低かったが処理間の収量差は僅かであった。Ⅳ区における秋まき及び春まき栽培の1a当たりアヘン乾燥重量はそれぞれ212.25g, 142.14gであった。春まき栽培の収量は秋まきの63% (4区平均) であった。1株からのアヘン採取回数は秋まきでは4回であったが、春まきでは2回しか行えず、春まきにおける果実切傷後の株の疲弊は早かった。

#### 2. ゲンノショウコの種苗分類特性調査

伊豆試験場保存の白花種と種子島自生の赤花種を用い、両種の特性比較試験を行った。全体的な形状を比較すると、赤花種は白花種に比べ葉が濃緑色で、生育初期には草高が低く、分枝の発生が多く、伸長が旺盛であった。開花期が大きく異なり、開花初めは白花種が7月中旬、赤花種が8月下旬であった。両種の開花期の違いは遺伝的な特性あるいは生育環境が異なったことによる生態的な要因によるものかは不明であり、今後の検討課題となった。花の大きさは白花種が14.7cm, 赤花種が19.3cmであり赤花種が大花であった。開花初期における1株当たり乾燥茎葉重量は白花種が72.1g, 赤花種が121.9gであり、葉重/全重比はそれぞれ51.2%, 39.2%であった。

#### 3. 薬用植物種子の長期保存方法等に関する研究

##### 1) 種子の発芽適温及び貯蔵条件の検討

熱帯性及び海岸性植物を主として18種類の種子の発芽試験を15℃, 20℃, 25℃の温度条件下で行い発芽適温域を求め、更に上記種子の最適貯蔵条件を探るため、果実及び種子を乾燥 (室温25℃), 冷蔵 (2.5℃) 及び冷凍 (-20℃) 下に1ヵ月間貯蔵し発芽状況を調べた。ヤブニッケイ, シャリンバイ, シロダモ, タチシャリンバイ及びトベラは冷蔵処理下で発芽力を保持した。熱帯性植物のカカオはいずれの条件下でも種子貯蔵1週間で発芽力を失った。また、いずれの種子も採取直後の新鮮種子の冷凍貯蔵は不適であった。

##### 2) ガジュツの種苗特性調査

遺伝子資源の長期保存の一環として、種子が得られず栄養体で保存する植物について種苗特性調査を行う。今回、ガジュツを対象に、保存系統4種 (T, L, J, S系) の形質比較試験を行った。草高はJ系が高く、S系が低く、T, L系はその中間型である。葉裏の毛の有無はいずれも無であるが、S系は葉の裏に細毛がある。葉鞘のアントシアンの着色は、J, S系に見られ、前者が濃い紫色を帯びる。主根茎内面の色はJ, K系が淡紫色、S系はJ系より濃色な青紫色

である。

T, L系は種子島在来種由来の *Curcuma zedoaria* であり, J, K系はそれとは異なる別種と思われるが, 開花しなかったため花序を確認できず, 種を同定するに至らなかった。

## 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, 調製加工法の生薬の品質に及ぼす影響について検討を行い, また, 学会への協力活動, 地域住民への啓蒙普及活動にも力を入れてきた。

すなわち, 昨年8月には伊吹山麓で第3回薬用植物生産研究会を主催し, また本年3月には, 日本生薬学会関西支部の潮御崎・新宮地域見学会の準備を担当した。更に, 各地域住民からの依頼を受け薬草や薬草料理に関する啓蒙講演を行い, また, 新しい薬膳, 日高薬膳や熊野薬膳の創作に参加, 協力した。

施設整備面では, 圃場作業員控え室入り口のサッシュウを入れ, 戸棚及びテーブルを交換して居住性を改善し, また玄関に花鉢を飾り, 更に応接室に新しい書棚を入れ, また, 試作展示用標本園にはハーブを植え付け, 中央芝生部分に七人の小人の人形を飾る等(白雪姫は財政の都合で購入準備中), 環境を整備し美観を調べ, 見学者にくつろいだ雰囲気の中で薬草に親しんでもらえるようになった。

一方, マスコミ関連では, 施設整備直後に関西テレビのZIP探偵団, 本年に入り和歌山放送より当場の取材, 放送放映があり, その直後から電話での見学依頼等も増え, 少しは忙しくなったが, 場内整備に手を入れておいてよかったなと感じた。

また, 地元住民のサークル「薬草を食べる会」の機関紙に当場のページを設け, 設備, 業務, 研究等種々の活動の啓蒙普及を計っている。

現在パソコン通信用機材の購入を準備しており, 新年度には稼働可能になる予定である。

### 業務成績

#### 1. 種子交換

採種	124
受入	20
分譲	3件10種

#### 2. 指導業務

野口は, 8/9, 第三回薬用植物の生産に関する研究会にて「ミシマサイコの栽培法とその品質」について講演し, また, 10/20, 兵庫県山南町の漢方フェスティバルにおいて, 薬草料理の解説講演を行ったのをはじめ, 1/23には和歌山

県日高郡内市町村の「ふるさとの味交流会」にて「薬草を食べる」というテーマで, また3/6には, 日本生薬学会関西支部見学会にて創作薬草料理「熊野薬膳」の料理解説の講演を行った。

本年度は, 場の団体見学並びに外部依頼計16回, 参加者延べ600名に薬草に関する講義, 指導を行った。また当場への薬草問い合わせ件数は年間15件で, その内訳は種苗依頼8, 栽培法4, 植物鑑定2, 調製加工法・分析法その他の情報2件であった。また, 和歌山県下に設立準備中の華岡青洲記念館の薬草園設計の依頼を受け, 諸外国の庭園の構成の調査を行っている。

### 研究実績

#### 1. キキョウの栽培法並びに調製加工法に関する研究

キキョウの根は, その厚い皮のため, 皮付きのままでは非常に乾燥しにくく, 通常皮を剥いたものが生薬として使用されている。この皮部を除くため, 従来我が国では, 生根を水に漬けてから皮を剥ぐ方法を広く用いていたが, これでは成分の一部が逃げるため, 金属ブラシで擦り取り, 更に温風乾燥法を採用することにより, サポニンの分解を防ぎ, また稀エタノールエキス含量の有意に高い生薬が得られることを明らかにした。更に, 開花期には根の皮はリボン状に非常に簡単に剥げ, これは, 内部形態試験の結果, この時期, コルク形成層の部分が急激に増大し, 細胞も大形になり, 外部から前年のコルク層より生成した木化層, コルク層, そしてコルク形成層のところで剥けてしまうことを明らかにした。

キキョウは販売価格が安いとため, 現在のところ国内では殆んど生産していない。そこで, 付加価値のある商品の開発を目的に, 生の根から塩漬けによりサポニンを抜く方法を考案, エグ味を抜いた根は食用に, またサポニンは脱塩精製し, 試薬として用いることを試みた。

更に, 花に特徴のあるものを創生するため, 紫と白の奇麗にまじりあった個体より細胞組織を分離, 組織培養後植物体を復元し, 圃場にもどしたところである。

#### 2. シャクヤクの栽培法に関する研究

薬用シャクヤクの優良系統を探索するため, 北海道試験場より導入した38系統について根の収量及び品質を調べ, 高い値を示した11系統について第2次調査を行った。その結果, 第2次では全体に収量は低下したが, 3系統のみは増加した。そこで, 第1, 2次とも収量の高かった7系統について第3次の植え付けを行った。また, ペオニフロリン, タンニン含量についても比較した結果, 根収量の場合と同様に, 第1次に高い値を示した系統は第2次でも高い値を与え, 系統内では収量性, 品質共に維持されると結論された。但し, 第1次で示された「中位の太さの根のペオニフロリンの含量は, 太いものと細いものの中間の値を示し, 全体を粉碎して分析しなくても, 中位の根のみを分析すれ

ば全体が予測できる」という結果は必ずしも第2次では再現できない場合がみられた。

### 3. 薬膳に関する文献調査

1995年に中国成都市中の書店で購入した書物「中国薬膳大全」(四川科学技術出版社, 成都・1994)に記載された菜肴類薬膳, 粥, 飲料, 薬酒874品目中ジオウを用いたものをリストアップし, 用途, 効能を含め調査した。その結果は以下の通りである。

1) 文献記載菜肴類薬膳558品目中ジオウを用いたものは17品目, また粥, 飲料, 薬酒等316品目中14品目, 総出現率は3.5%強であった。

2) 用法は, 炒め物の場合は粉末又は粗末を材料に振りかけ, 煮物では, 予めスープを取り, これを料理に用いるか, 生薬を袋に入れ材料と一緒に煮る形式のものが多かった。但し, 一部, 鶏の腹の中に入れて煮込むものもみられた。

3) 生薬の組み合わせは基本的に漢方薬の処方と類似し, 漢方処方そのものも見られた。(十全大補湯, 四物湯, 六味地黄丸-牡丹皮, etc.)

4) 料理の効用は, 配合する生薬群が同じなら近似した。

但し, これらはすべて中国の薬方に依拠したものであり, 日本では薬としてあまり用いない強壯生薬もしばしば用いられている。

5) 薬酒としても, 地黄単独ではなく, トウキ, センキュウ, ビャクジュツ, 人參等と配合して用いるものも多くみられた。

## 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を実施し, 「ドクダミ」に関する原案を提出した。厚生省麻薬課の委託研究である「ケシの生態系農業に基づく栽培法の確立に関する研究」, 厚生科学研究費補助金による「薬用植物種子の長期保存に関する研究」等を実施した。

人事面では, 関寅一郎技官が平成8年3月11日~15日伊豆試験場において, 野崎トモ子技官が10月21日~25日の日程で本所・筑波試験場での研修を行った。

平成9年1月12日に落雷が試験場の至近にあり, 防犯・防災管理システム, 通信・気象観測・温室暖房の諸機器類に異常が生じたが, 経費を要する被害は軽微であった。

気象面では, 梅雨の期間は5月下旬から7月中旬で, 総降雨量は594.5mmであった。台風は接近・通過は次のとおりであるが, 被害は樹木・栽培植物等に見られただけで軽

微であった。

7月17日~18日 6号  
最大瞬間風速48.1m/s・総降雨量148.5mm  
9月28日~10月1日 21号  
最大瞬間風速28.2m/s・総降雨量181.5mm

### 業務成績

#### 1. 種子交換

採種 312種 (筑波試験場へ送付)

内訳	野生種	206種
	栽培種	106種
	露地	104種
	温室	2種

受入 23件 48種

分譲 31件 170種

#### 2. 指導業務

見学者 63件 380名以上

問い合わせ件数は21件以上あり, 内訳(重複あり)は種苗の入手法8, 栽培法11, 植物鑑定5, 薬効・用法8, その他8件であった。

### 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(尿素の葉面散布とその効果に関する研究)

1993年伊豆試験場より導入した「一貫種」の継代栽培した1995年産種子で, 12月20日に播種した。肥料条件は10a当たり, 基肥として化学肥料(1B化成10-10-10)46.8kg, 追肥として化学肥料(同)120.0kgを4月1日に側条施肥した。密度は条間75cm, 最終株間15cmとした。試験区は対照, 2.5, 5, 10, 25g/lとし, 5月9日(収穫前11日, 開花率90.3%)の夕方, 地上部に全面散布した。

各処理区間のあへん収量, 成分の差異は明確な結果は得られなかった。モルヒネ, ノスカピン, パパペリンの含有率は初回採取に多く, 2回目に少なく, コデイン, テバインでは逆の結果が得られた。モルヒネ, ノスカピン, パパペリンの含有率は日照量が多く, 地温の高いほとんどの濃度処理区で多い結果が得られた。濃度障害による葉縁部の枯死が25g/lの区で見られたが, 軽微であった。

2. 薬用植物の品質評価法に関する研究(ウコンの摘葉による影響に関する研究)

葉の強制的な摘葉を行うことにより, 台風災害の影響を推定することを目的に実施した。肥料条件は10a当たり, 基肥として堆肥1500kg, 化学肥料(1B化成10-10-10)100kg, 追肥として硫酸11.9kg, 塩化カリ14.05kgを7月10日に側条施肥した。

葉の損傷は生育の早期ほど収量(主根茎・総収量)への影響が大であった。主根茎の個数形成に及ぼす影響はいずれの時期においてもそれほど大きくはなかった(最大は8月の87.0%)。11月以降は収量への影響は軽微であった。

3. 薬用植物種子の長期保存に関する研究（薬用植物種子の発芽に関する研究）

昨年度に引き続き、種子島試験場で保存している植物について、導入に関するデータ、生薬名、用途、保存形態、生育特性、保存場所等を記述したデータシートの作成を継続した。

また発芽試験として、合成樹脂の透明密閉容器で濾紙を2枚敷き、水が飽和状態で12時間照明恒温条件下で実施した。次の条件では全く発芽しなかった。

ゲンノショウコ：30, 35℃

クチナシ, ヒトエノコクチナシ, オオカラスウリ：15℃

インドジャボク：25℃以下

4. 薬用生物資源の分布調査とその活用に関する研究（国内の重要な薬用植物の生体確認）

カギカズラ, ハマゴウ, ナンテン, サキシマボタンヅル, ヤマモモ, ハナミョウガ, クサスギカズラについて、視認確認、分布調査を実施した。

## 平成8年度所外研究員等受け入れ名簿

平成9年3月31日

## (客員研究員) 7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	
熊田秀文	神奈川県立大学	衛生微生物部	4.10.22		男	
下村裕子	東京薬科大学名誉教授	生薬部	4.10. 1		女	
一戸正勝	東京家政大学助教授	衛生微生物部	7. 4. 1		男	
林裕造	北里大学薬学部客員教授	総合評価研究室	7. 4. 1	9.3.31	男	
前川昭彦	(財)佐々木研究所病理部長	毒性部	7. 4. 1		男	
吉田あや	元京都大学	生薬部	8. 6.10		女	

## (協力研究員) 11名

氏名	所属	受入部	入所	退所	性別	備考
西尾俊幸	日本大学農獣医学部講師	有機化学部	6.12. 1		男	
若狭芳男	(財)実験動物中央研究所前臨床研究部	毒性部	7. 4. 1	9. 3.31	男	
西村和子	(財)ヒューマンサイエンス振興財団	変異遺伝部	7.10. 1	8.12.31	女	
李仁善	啓明大学校助教授	病理部	7.12. 1	8.10.31	女	
菅野純	東京医科歯科大学	毒性部	8. 4. 1	9. 3.31	男	
小林茂樹	昭和薬科大学	有機化学部	8. 6. 1		男	
松藤寛	日本大学	食品部	8. 6.10		男	
松野淳美	昭和大学	変異遺伝部	8.10. 1		男	
樽松美治	(財)ヒューマンサイエンス振興財団	変異遺伝部	9. 1. 9		女	
Ahn Jun-cheul	全南大学校自然科学大学	筑波試験場	8. 8. 8	8. 9. 6	男	
張宝旭	北京医科大学	薬理部	8. 4. 1	8. 6.30	男	

## (流動研究員) 11名

氏名	所属	受入部	入所	退所	性別	備考
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	8. 7.31	男	
小木美恵子	(財)ヒューマンサイエンス振興財団	生物薬品部	6.11. 1	9. 3.31	女	
Petr Gruz	(財)ヒューマンサイエンス振興財団	変異遺伝部	5. 8. 1	8. 7.31	男	
A. F. A. Alim	(財)ヒューマンサイエンス振興財団	生物薬品部	7. 2.20	8. 5.28	男	
C. f. Hossain	(財)ヒューマンサイエンス振興財団	生薬部	7. 4. 1	8. 7.19	男	
中西史	(財)ヒューマンサイエンス振興財団	筑波試験場	8. 4. 1	9. 3.31	女	
富永宏志	(財)ヒューマンサイエンス振興財団	衛生微生物部	8. 6. 1	8.10.31	男	
中井雄治	(財)ヒューマンサイエンス振興財団	薬品部	8. 4. 1		男	
山本雅幸	(財)ヒューマンサイエンス振興財団	生物薬品部	8. 4. 1		男	
王雪	(財)ヒューマンサイエンス振興財団	変異遺伝部	8. 4. 1		男	
王春仁	(財)ヒューマンサイエンス振興財団	療品部	8. 9. 4		男	

## (科学技術特別研究員) 6名

氏名	所属	受入部	入所	退所	性別	備考
金秀良	科学技術振興事業団	変異遺伝部	5.10. 1	8. 9.30	男	
代田修	科学技術振興事業団	生薬部	6. 9. 1	9. 3.31	男	
鈴木任	科学技術振興事業団	変異遺伝部	7. 9. 1	9. 3.31	男	
上野伸哉	科学技術振興事業団	薬理部	7.10. 1		男	
引間知広	科学技術振興事業団	薬理部	8.10. 1		男	
Mia. Md Wahiduzzama	科学技術振興事業団	筑波試験場	8.10. 1		男	

## (重点研究支援協力員) 6名

氏名	所属	受入部	入所	退所	性別	備考
ナディア・エル・ボライ	科学技術庁	生物薬品部	8. 8. 1	9. 3.31	女	
春日井勲	科学技術庁	生物薬品部	8. 8. 1	9. 3.31	男	
佐々木晴代	科学技術庁	代謝生化学部	8. 8. 1	9. 3.31	女	
豊田淑江	科学技術庁	生物薬品部	8. 8. 1	9. 3.31	女	
周玉	科学技術庁	生物薬品部	8. 8. 1	9. 3.31	女	
高木加代子	科学技術庁	機能生化学部	8. 8.26	9. 3.31	女	

## (科学技術庁フェロー) 9名

氏 名	国 籍	所 属	受 入 部	入 所	退 所	性別
A. K. Pathak	インド	Central Institute of Medicinal and Aromatic Plants	有機化学部	7. 2. 1	8. 7.31	男
Pablo Bonilla Rivera	ペルー	Organic Chemistry Institute Applied to Pharmacy	生 薬 部	8. 1.16	8. 4.15	男
David Josephy	カナダ	Dept. of Chemistry and Biochemistry University of Guelph	変異遺伝部	8. 2.16	8. 5.15	男
Ahmed Abdou Said	エジプト	ZAGAZIGU University	生物薬品部	8. 3. 4	8. 6. 1	男
Frans Sluyter	オランダ	University of Paris	薬 理 部	8. 3. 4	8. 6. 3	男
P. L. Foster	米国	Boston University School of Public Health	変異遺伝部	8. 5.28	8. 6.12	男
Y. LUO	中国	Beijing University	薬 品 部	8. 7. 8		男
Petr Gruz	チェコ	Institute of Experimental Botany Academy of Sciences of the Czech Republic	変異遺伝部	8.12. 1		男
Wagner Gerome	フランス	IRCAD	変異遺伝部	9. 2.24		男

## (研究生) 48名

氏 名	所 属	受 入 部	入 所	退 所	性別	備考
天野富美夫	国立予防衛生研究所	機能生化学部	4. 8.11	9. 3.31	男	
安住聡子	昭和女子大学	衛生微生物部	5. 4.26		女	
伊藤俊明	徳島大学	変異遺伝部	6.11. 7		男	
太田利子	相模女子大学	衛生微生物部	6.12. 1		女	
加藤仁美子	昭和薬科大学大学院	衛生微生物部	7. 4. 1	9. 3.31	女	
笈村華子	(財)日本公定書協会	支所薬品試験部	4.12. 7	9. 3.31	女	
高木井真知子	(財)日本公定書協会	支所薬品試験部	5. 4. 1	9. 3.31	女	
木内猛仁	(財)日本公定書協会	支所薬品試験部	5.12.28	9. 3.31	女	
Mrs. VIBHA PATHAK	昭和大学	生物薬品部	7. 4.10	9. 3.31	男	
竹川潔	Central Institute of Medicinal and Aromatic Plants	生 薬 部	7. 5. 1	8. 4.30	女	
田中善洋	名古屋市立大学	病 理 部	7. 5. 8		男	
大幡久之	岐阜大学	病 理 部	7. 5.15	8. 4.30	男	
正田俊之	昭和大学	生物薬品部	7. 5.15	9. 3.31	男	
尾崎正康	大阪府立大学	病 理 部	7. 6. 5	9. 6. 4	男	
小菅理恵乃	東北薬科大学	変異遺伝部	7.10. 1	8. 9.30	男	
Flores Chavez Julia Diana	麻布大学	衛生微生物部	7.10. 4		女	
高橋研仁	東邦大学	生 薬 部	7. 9.20		女	
池川直子	サンマルコス大学	生 薬 部	8. 4. 1	8.11.30	女	
永石恵子	(財)残留農薬研究所	毒 性 部	8. 4. 1		男	
尾崎正康	長崎大学	毒 性 部	8. 9. 1	8. 9.30	男	
戸渡秀法	麻布大学	毒 性 部	8. 4. 1	8. 8.31	男	
滝本明修	共立薬科大学	代謝生化学部	8. 4. 1	8. 9.30	女	
栗原紀子	東北薬科大学	変異遺伝部	7.10. 1	8. 8. 9	男	
村瀬繁樹	熊本市食肉衛生検査所	食 品 部	8. 7.22	8. 7.19	男	
伊藤明	秋田県衛生科学研究所	食 品 部	8. 7. 8	8.12.17	男	
福井みどり	農林水産省農薬検査所	毒 性 部	8. 9.17	8.12.31	男	
棚橋定衛	筑波大学	筑波試験場	8. 8.19	8.11. 8	女	
山岸宏司	岐阜県食肉衛生検査所	食 品 部	8.12. 7	8.10.31	男	
後藤之介	徳島大学	変異遺伝部	6.11. 7	8.12.27	男	
武余健	岡山県	衛生微生物部	9. 1.16	9. 2.14	女	
黄吉城	新潟市衛生試験所	食 品 部	9. 2. 3	9. 2.13	男	
石原健一	山梨県食肉衛生検査所	食 品 部	9. 2.17	9. 2.28	男	
前野希織	東京農林水産消費技術センター	食 品 部	9. 3.17	9. 3.28	男	
星相原真紀子	九州大学	変異遺伝部	8. 4. 1	8. 9.30	男	
山内山田野美	山海丹企業集団公司西安中医多学科研究所	環境衛生化学部	8. 4. 1	9. 3.31	男	
Petr Gruz	国立予防衛生研究所	衛生微生物部	8. 4.15	9. 3.23	男	
金秀良	昭和大学	生物薬品部	8. 4.22	9. 3.30	男	
磯部雄司	北里大学	病 理 部	8. 5. 7	9. 5. 6	男	
	星薬科大学	生物薬品部	8. 4. 1	9. 3.31	男	
	昭和女子大学	食 品 部	7. 4.17	9. 3.31	女	
	お茶の水女子大学	衛生微生物部	8. 6.24	9. 3.30	女	
	東京家政大学	食 品 部	8. 7.15	9. 3.31	女	
	東京医科大学	薬 理 部	8. 7.31	9. 3.31	男	
	東京医科大学	薬 理 部	8. 7.31	9. 3.31	男	
	東京医科大学	薬 理 部	8. 7.31	9. 3.31	男	
	東京薬科大学	食 品 部	8. 8. 1	8.11.30	男	
	東京薬科大学	食 品 部	8. 8. 1	8.11.30	男	
	東京都立大学	変異遺伝部	8.10. 1		男	
	静岡県立大学	毒 性 部	8.10. 1	9. 3.31	男	

(実習生) 56名

氏名	所属	受入部	入所	退所	性別	備考
花田真希子	昭和女子大学	食品添加物部	7. 4. 1		女	
甲斐幸恵	昭和女子大学	毒性部	7. 4. 1		女	
石井圭	日本大学	有機化学部	8. 3. 4	9. 3. 3	男	
三谷泰代	昭和女子大学	化学物質情報部	8. 3. 1	9. 2. 28	女	
武藤早紀子	昭和女子大学	化学物質情報部	8. 3. 1	9. 2. 28	女	
木下真澄	共立薬科大学	代謝生化学部	8. 5. 7	8.12.20	女	
左山桂代子	共立薬科大学	食品添加物部	8. 5.20	8.12.27	女	
石川智子	共立薬科大学	食品部	8. 5.13	8.12.27	女	
小川祐子	共立薬科大学	有機化学部	8. 5.23	8.12.28	女	
木村礼子	共立薬科大学	有機化学部	8. 5.23	8.12.28	女	
長谷川優穂	実践女子大学	食品部	8. 5.23	8.12.27	女	
山田陽子	実践女子大学	食品部	8. 5.23	8.12.27	女	
Gung Yeu Tzeh. Andrew	Singapore Polytevhnic Chemical Process and Biotechnology	筑波試験場	8. 5. 8	8. 6.28	男	
Mas Elfie Jaar b Arshad	Singapore Polytevhnic Chemical Process and Biotechnology	筑波試験場	8. 5. 8	8. 6.28	男	
菅谷桂	昭和女子大学	衛生微生物部	8. 1. 4	8.12.28	女	
武木田薫	昭和女子大学	毒性部	8. 1. 4	8.12.28	女	
米沢里香	昭和女子大学	食品添加物部	8. 1. 4	8.12.28	女	
伊藤美佳	昭和女子大学	総合評価研究室	8. 3. 1	9. 2.28	女	
渡辺一成	日本大学	食品添加物部	8. 3.12	9. 2.28	男	
永山暢子	日本大学	食品添加物部	8. 3.12	9. 2.28	女	
武笠隆	東京理科大学	生物薬品部	8. 4. 1	9. 3.31	男	
官野英嗣	東京理科大学	生薬部	8. 4. 1	9. 3.31	男	
野沢雅人	東京理科大学	生薬部	8. 4. 1	9. 3.31	男	
笠原容子	昭和薬科大学	有機化学部	8. 4. 1	9. 3.31	女	
小野瀬淳一	明治薬科大学	機能生化学部	8. 4. 1	9. 3.31	男	
梅原隆人	中央大学	化学物質情報部	8. 4. 1	9. 3.31	男	
村越貴司	中央大学	化学物質情報部	8. 4. 1	9. 3.31	男	
二葉哲男	中央大学	化学物質情報部	8. 4. 1	9. 3.31	男	
小笹知彦	北里大学	環境衛生化学部	8. 4. 1	9. 3.31	男	
長沢妙子	北里大学	食品部	8. 4. 1	9. 2.28	女	
新妻庸子	北里大学	食品添加物部	8. 4. 1	9. 2.28	女	
吉沢直子	北里大学	療品部	8. 4. 8	9. 2.28	女	
三浦絵理子	北里大学	薬品部	8. 4.10	9. 3.31	女	
原田尚子	東京理科大学	環境衛生化学部	8. 4.15	9. 3.31	女	
木下真澄	共立薬科大学	代謝生化学部	8. 5. 7	8.12.20	女	
名智幸江	日本大学	環境衛生化学部	8. 5.13	9. 2.28	女	
平野純子	日本大学	環境衛生化学部	8. 5.13	9. 2.28	女	
増山浩靖	日本大学	環境衛生化学部	8. 5.13	9. 2.28	男	
石川智子	共立薬科大学	食品部	8. 5.13	8.12.27	女	
左山佳代子	共立薬科大学	食品添加物部	8. 5.20	8.12.27	女	
小川祐子	共立薬科大学	有機化学部	8. 5.23	8.12.28	女	
大村礼子	共立薬科大学	有機化学部	8. 5.23	8.12.28	女	
長谷川優穂	実践女子大学	食品部	8. 5.23	8.12.27	女	
山田陽子	実践女子大学	食品部	8. 5.23	8.12.27	女	
中西礼子	お茶の水女子大学	衛生微生物部	8. 6.24		女	
高橋貴子	東京家政大学	食品添加物部	8. 7. 1	9. 2.28	女	
三枝幸子	日本獣医畜産大学	衛生微生物部	8. 7.15	9. 3. 1	女	
大塚直子	昭和女子大学	衛生微生物部	8. 9. 1		女	
伊大知理桂	昭和女子大学	衛生微生物部	8. 9. 1		女	
井上雅理	昭和女子大学	食品添加物部	8. 9. 1		女	
畑山こずえ	昭和女子大学	食品添加物部	8. 9. 1		女	
甲斐陽子	昭和女子大学	有機化学部	8. 9. 1		女	
阿部有希	昭和女子大学	食品部	8. 9. 1		女	
久保田薫	昭和女子大学	食品部	8. 9. 1		女	
岡戸清	東京都立大学	変異遺伝部	8.12. 6	9. 3.31	男	



Katori, N., Ma, W., Aoyagi, N. and Kojima, S.: **Effect of destruction force on drug release from multiple unit controlled release dosage forms in humans**

*Pharma. Res.*, 13, 1541~1546 (1996)

ヒトにおける薬物吸収に大きな影響を与える消化管内の機械的破壊力を推定するため、アセトアミノフェン徐放顆粒を用いて試験した。被験者に強度の異なる2種の顆粒AG及びBGを空腹時及び食後投与した結果、硬いAGは食事の影響を示さなかったが、湿潤することにより強度の低下するBGからの薬物放出は食後で増大し、食事により薬物の放出促進が起こったことが示された。このことから食事の摂取により消化管内の機械的破壊力が増大することが示され、物理的な力により放出促進を起こすようなタイプの徐放性製剤の場合は、食事によりdose dumpingが起こり、副作用を起こす危険のあることが示唆された。

**Keywords**: GI mechanical destructive forces, Colonic release, food effect

Katori, N., Aoyagi, N. and Kojima, S.: **Effects of atropine and loperamide on the agitating force and GI transit time in dogs for drug absorption studies**

*Biol. Pharm. Bull.*, 19, 1338~1340 (1996)

イヌの経口吸収モデル動物としての欠点を改善し、よりヒトに近い消化管条件に近づけるために、消化管の運動を抑制する硫酸アトロピン及び塩酸ロペラミドの前投与を試みた。アトロピン投与後は消化管の運動が過剰に抑制され、ヒトよりも更に遅くなった。また、塩酸ロペラミドの前投与によるイヌの大腸到達時間の延長及び、生物学的利用率の増大効果は見られなかった。薬物処理の場合はイヌによる感受性の差が大きく、一律の効果を得ることが困難であることも示された。

**Keywords**: drug absorption, GI mechanical destructive forces, GI transit time

Yoshioka, S., Aso, Y. and Kojima, S.: **Determination of molecular mobility of lyophilized bovine serum albumin and gamma-globulin by solid-state <sup>1</sup>H NMR and relation to aggregation-susceptibility**

*Pharm. Res.*, 13, 926~930 (1996)

凍結乾燥品中のタンパク質分子の運動性を測定する手段として、固体プロトンNMRの有用性を検討した。牛血清アルブミン及びγグロブリンをモデルタンパク質とし、水分含量の異なる凍結乾燥品中のタンパク質プロトンのスピン-スピン緩和時間(T<sub>2</sub>)をソリッドエコー法によって測定すると同時に、サイズ排除クロマトグラフィーによってタンパク質の変性速度を測定した。その結果、いずれのタンパク質の凍結乾燥品も、水分含量が結合水以上になり、弱く結合した水の量が増大するにしたがってタンパク質分子の運動性が上昇し、それに伴ってタンパク質の安定性が低下することが明らかになった。更に水分含量が上昇し、タンパク質分子内部の疎水結合が強化されると、タンパク質分子の運動性が低下しはじめ、それに伴ってタンパク質の安定性が上昇することが示された。凍結乾燥品中のタンパク質の安定性はT<sub>2</sub>によって測定される分子の運動性に強く相関することが明らかになり、T<sub>2</sub>がタンパク質凍結乾燥品の安定性の予測に有用な指標であることが分かった。

**Keywords**: NMR, spin-spin relaxation time, protein stability

Yoshioka, S., Aso, Y. and Kojima, S.: **Statistical evaluation**

**of shelf-life of pharmaceutical products estimated by matrixing**

*Drug Stability*, 1, 147~151 (1996)

包装及び処方複数ある製剤の有効期間を、マトリキシングを適用して推定する際の問題点をモンテカルロ法によって検討した。包装及び処方の違いによって薬物分解速度が10%以上変化する場合には、マトリキシングによる有効期間の一括推定では有意に長く不適切な推定値が得られることが分かり、マトリキシングの適用前に包装あるいは処方間の安定性の差を検定する必要があることが示された。包装あるいは処方間の有意差検定には、0.25の有意水準が適切であると考えられた。また有意差検定の検出力は分解データを得るための定量法の誤差の大きさに大きく依存することが示され、信頼性の高い有効期間を推定するためには、定量誤差を約0.5%以下に抑える必要があることが明らかになった。

**Keywords**: shelf-life, matrixing, ANOVA

Yoshioka, S., Aso, Y., Kojima, S. and LiWanPo, A.\*: **Power of analysis of variance for assessing batch-variation of stability data of pharmaceuticals**

*Chem. Pharm. Bull.*, 44, 1948~1950 (1996)

3ロットの試験データから推定される医薬品の有効期間に及ぼすロット間変動の影響をモンテカルロ法で検討した。月に0.2%のゼロ次分解を示す医薬品について、ロット間変動を評価するための有意差検定の検出力を有意水準及び定量誤差を変数として算出した。βエラーを20%に固定すると、25%の最小検出差を得るためには、0.25以上の有意水準が必要であることが明らかになった。得られた結果に基づいて、ICH国際調和ガイドラインに記されている有意水準の評価を行った。更に、定量誤差が増大するにしたがって検出力が著しく低下することを明らかにし、標準偏差0.5%以下の精度良い定量法を用いる必要性を明示した。

**Keywords**: shelf-life, batch-variation, ANOVA

\* School of Pharmacy, The University of Nottingham

Aso, Y., Yoshioka, S. and Kojima, S.: **Relationship between water mobility, measured as nuclear magnetic relaxation time, and the crystallization rate of amorphous nifedipine in the presence of some pharmaceutical excipients**

*Chem. Pharm. Bull.*, 44, 1065~1067 (1996)

医薬品添加剤との混合物におけるニフェジピンの結晶化速度を水分含量の関数として等温マイクロ熱量計を用いて測定した。同じ水分含量であっても、水のNMR緩和時間の小さい(すなわち、水分子の運動性の低い)添加剤ほど結晶化速度は小さく、ニフェジピンの安定であることが示された。結晶化速度は水がニフェジピンのマトリックスを可塑化することによって加速されるため、同じ水分含量であっても水の緩和時間の小さい添加剤は可塑化作用をもつ水の量が少ないことが明らかとなった。

**Keywords**: mobility, crystallization, NMR

Izutsu, K., Yoshioka, S., Kojima, S., Randolph, T. W.\*<sup>1</sup> and Carpenter, J. F.\*<sup>2</sup>: **Effect of sugars and polymers on crystallization of poly(ethylene glycol) in frozen solutions: Phase separation between incompatible polymers**

*Pharm. Res.*, 13, 1393~1400 (1996)

一般に水溶液を凍結すると氷の他に濃縮された過冷却 (アモルファス) 相や溶質結晶が生成することが知られる。これまで複数の溶質を含む過冷却相中では各種分子が均一に分散すると考えられてきたが、熱分析及びパルス NMR を用いた実験から、分子間の反発力などにより各溶質の局在 (相分離) が起こることを明らかにした。水性 2 相分離を起こす polyvinylpyrrolidone (PVP) と dextran などの高分子の組み合わせでは、複数のアモルファス相軟化温度が観察された。ショ糖や glucose は凍結溶液中で poly(ethylene glycol) (PEG) と混合アモルファス相を形成することで PEG 結晶化を抑制した。一方、dextran や trehalose などの添加では凍結溶液中で PEG 相と相分離し、結晶化抑制はみられなかった。凍結溶液中での相分離は水性 2 相分離を起こす濃度に比べはるかに低い濃度でも起こることから、氷の形成による過冷却相の濃縮が関与することが示唆された。タンパク質など比較的不安定な薬物やリポソームなど主薬と複数の添加剤を含む凍結乾燥薬品は年々増加しており、凍結溶液中の相分離など分子間相互作用を支配する物性の制御が製品の機能や安定性向上につながるものと考えられる。

**Keywords** : phase separation, freezing, molecular interaction

\*1 Department of Chemical Engineering, University of Colorado

\*2 School of Pharmacy, University of Colorado Health Sciences Center

石橋無味雄, 小島茂雄: 日本薬局方における試薬等の名称を IUPAC 名に整合させるための調査及び研究  
医薬品研究, 27, 177~189 (1996)

化合物の名称は、教科書や日本工業規格などにおいて、国際純正応用化学連合 (IUPAC) が定めた命名規則による名称 (英名) に整理統合される方向にあり、また、その日本名は日本化学会の定める化合物命名法の化合物名字訳基準により字訳したものが用いられている。しかし、日本薬局方 (JP) において用いている試薬の名称には旧来のものが数多くあり、その結果、薬学領域以外の学問分野や義務教育課程で用いられる教科書などとの間で化学物質の名称が異なる事態が生じている。一方、JP の目的や性格を考慮すると、その内容が国内的にも国際的にも誤りなく、かつ理解し易い方法で表記されている必要がある。このため JP 試薬の名称について、IUPAC に基づく名称と JP 名称との相違点などの調査を行い、その結果に基づき JP における試薬命名法の原則を定め、この原則により JP の改正を行い試薬の名称を試行的に改めた。

**Keywords** : pharmacopoeia, general tests, reagent

Nakahara, Y., Kikura, R., Takahashi, K., Foltz, R. L.\*1 and Mieczkowski, T.\*2: **Detection of LSD and norLSD in rat and human hair**

*J. Anal. Toxicol.*, 20, 323~329 (1996)

毛髪中の LSD 及びその代謝物の検出の可能性を調べるために、ラットに 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2 mg/kg を毎日 1 回、10 日間腹腔内投与し、背部の毛を 4 週後に刈り取り、GC/MS 及び HPLC - 蛍光検出で分析した。投与量と LSD 毛髪濃度はよい相関関係を示し、LSD は 0.05 mg/kg 投与群でも検出されたが、脱メチル代謝物は 2 mg/kg 投与のみで検出された。LSD の毛髪への薬物取込率 (ICR) は 0.3 - 0.4 を示し、有色ラットの毛髪に比較的好く取り込まれることを確認した。本法を LSD 乱用者の毛髪分析に応用したところ、17 人中 2 例で 10 pg/mg 以上の LSD の存在を認めた。

**Keywords** : hair analysis, LSD, GC-MS

\*1 Center for Human Toxicology, University of Utah,

\*2 Department of Criminology, South Florida University

Sekine, H.\*1, Itoh, S.\*2, Nakahara, Y. and Suzuki, Y.\*3: **Abuse of smoking MA mixed with tobacco. Chemical degradation of N-cyanomethyl methamphetamine in water and biological fluids**

*Jap. J. Toxicol. Environ. Health*, 42, 223~235 (1996)

タバコに混ぜた覚醒剤の喫煙熱分解物である N-cyano methyl methamphetamine (CMMA) の熱分解に関する物理化学的性質を熱重量-示差熱分析計と熱重量質量-分析計を用いて調べた。CMMA は遊離塩基で加熱されたときは、80°C から気化が始まり、物質自体は安定であったが、塩酸塩では、熱に不安定で、100°C 以上で分解が始まり、重量が減少した。更に、溶液中の CMMA の安定性を調べたところ、塩酸塩は水、生理食塩水及び血漿中では不安定で、4°C では 2 時間後に初期の 65% に減少し、37°C では、2 時間後は完全に全て分解した。分解物は methamphetamine, フォルムアルデヒド, 青酸であった。

**Keywords** : methamphetamine, tobacco, pyrolysis

\*1 埼玉県科捜研

\*2 東京医科歯科大学

\*3 東北大学薬学部

Nakahara, Y. and Kikura, R.: **Hair analysis for drug abuse: XIII. Effect of structural factors on incorporation of drugs into hair: the incorporation rates of amphetamine analogs**

*Arch. Toxicol.*, 70, 841~849 (1996)

血液から毛髪への薬物取込機構を明らかにする目的で、毛髪への薬物取込率 (ICR) に及ぼす化学構造の影響を調べた。32 種のアンフェタミン系薬物をそれぞれ単独にラットに投与し、血漿中 AUC と 4 週後の毛髪中薬物濃度を測定し、AUC に対する毛髪中薬物濃度を ICR として定義した。得られた ICR 値と化学構造の差異を比較した結果、以下のことが明らかになった。1. 窒素に置換した炭素側鎖の長さ (C3 > C2 > C1 > H) に従って毛髪への薬物取込は増加する。2. ベンゼンやフラン環の導入は毛髪への取込にプラスに強く働く。3. 水酸基は毛髪への薬物取込を低くするが、マイナスの程度は芳香環水酸基のほうが脂肪族水酸基より強く働く。4. シアノ基、ビニル基は毛髪への薬物取込にマイナスに働く。5. 窒素にアシル基を導入すると、毛髪への取込は消失する。6. 芳香環上の methylenedioxy 基やメトキシ基は毛髪への薬物取込を大きく上昇させる。7. ハロゲン置換基は毛髪への取込にプラスに働く。これらの結果は化学構造因子が毛髪への薬物の取込率に大きく影響することを示唆した。

**Keywords** : hair, drug disposition, structure relationship

Nakahara, Y. and Kikura, R.: **Hair analysis for drug abuse: XIV. Identification of substances causing acute poisonings using hair roots. I. Methamphetamine**

*Forensic Sci. Inter.*, 84, 157~164 (1997)

動物モデルでの覚醒剤中毒と覚醒剤死亡原因を証明するための検体として、毛根試料を検討した。有色毛のラットに覚醒剤の急性中毒量を投与し、経時的に毛根を採取した。毛根試料は、直接及び洗剤洗浄後、室温で 14 時間塩酸メタノールで抽出した。抽出物は、PFP 誘導体として、GC - MS で分析した。投与後 5 分から覚醒剤が毛根中に検出

され、最高150 ng/mgのメタンフェタミン (MA) と代謝物のアンフェタミン (AP) が検出された。生存ラットでは、2時間まで毛根中の覚醒剤濃度は上昇し、その後24時間まで徐々に減少していった。死亡ラットでは、死亡後の覚醒剤濃度の変化は見られなかった。この事は死亡により薬物の取込活動は停止したことを物語っている。AP/MA比は生存中のラットでは時間と共に上昇したが、死亡後は一定の値を示した。死亡により、代謝機能が停止したことを示唆した。これらの結果から、覚醒剤急性中毒の証明に良好な検査試料と成ることが実証された。

**Keywords** : hair root, methamphetamine, acute poisonings

Kikura, R., Nakahara, Y., Mieczkowski, T.\*<sup>1</sup> and Tagliaro, F.\*<sup>2</sup>: **Hair analysis for drug abuse: XV. Disposition of 3, 4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and its related compounds into rat hair and application to hair analysis for MDMA abuse**

*Forensic Sci. Inter.*, 84, 165~177 (1997)

毛髪への薬物の取込機構を究明するため、6種のメチレンジオキシ系幻覚剤の毛髪への分布を動物モデルで調べた。有色毛ラットに6種の薬物をそれぞれ毎日1回、10日間連続して腹腔内投与し、初回投与後の血液を経時的に採取すると共に、28日後の背部の毛を採取した。それぞれの薬物濃度をGC-MSにて測定し、血漿中のAUCに対する毛髪中濃度の比(ICR)を比較検討した結果、(1)ベンゼン環上のメチレンジオキシ基は毛髪への移行性を強めること、(2)Nの側鎖の炭素数に従い毛髪への移行性が高まること、(3)ベンゼン環上のメチレンジオキシ基の他にメトキシ基が加わるとICRが数倍高い値を示すこと、(4)水酸基は毛髪への移行性を低めることなどが明らかになった。一方、MDMA乱用者の頭髪を分析した結果、MDMAとその代謝物が全ての試料から検出された。また、いくつかの検体でエチル類縁体も併せて検出された。

**Keywords** : hair analysis, drug disposition, methylenedioxyamphetamines

\*<sup>1</sup> Department of Criminology, South Florida University, USA

\*<sup>2</sup> Institute of Forensic Medicine, University of Verona, Italy

Hayakawa, T.: **Viral safety and evaluation of viral clearance from biopharmaceutical products - Issues related to harmonization of testing requirements for viral safety**

*Dev. Biol. Stand.*, 88, 15~18 (1996)

バイオ医薬品におけるウイルス安全性を保証するために、どのような技術的アプローチが必要か、そのための国際ガイドライン作成にあたって、当面の主な課題は何かについてまとめた。その結果、(1)試験法の科学的合理性の明確化、(2)細胞レベルにおける細胞の適格性を明らかにするためのウイルス試験法とその程度並びに細胞培養工程評価に必要なウイルス試験法とその程度、(3)未精製バルクハーベストでのウイルス試験の範囲、程度、頻度、(4)存在の可能性があるウイルスに対して精製工程が示すクリアランス能力評価と、工程がウイルスクリアランスに関してどのような特性を有するかに関する解析を行う試験において、それぞれ選択すべきウイルスの種類などに関する討議がなされるべきことを指摘した。

**Keywords** : ICH document, viral safety, biotechnology drugs

Hayakawa, T.: **Viral safety and evaluation of viral clearance from biopharmaceutical products - Fu-**

**ture development harmonized guidelines**

*Dev. Biol. Stand.*, 88, 331~332 (1996)

生物薬品(バイオ医薬品/生物起源由来医薬品)のウイルス面での安全性確保に関して、歴史的体験、製品に関する情報、及び臨床上の用法、目的などの観点から寄せられた生データを集めて評価、総括した。更に詳細には、製品の種類に依存するウイルス試験法のあり方、一般的試験法と新たな試験法、セルバンクを含む製造工程での管理や試験のあり方、工程に採用が望まれるウイルス除去技術、工程を変更した際の対応、工程でのウイルスクリアランス評価と特性解析方法、治験を開始する初期段階におけるウイルス安全性評価のあり方と製品の臨床上の用法、目的に応じた試験の程度などについて論述した。将来、治験薬のウイルス安全性のあり方に関する国際調和ガイドラインが作成されることの必要性についても言及した。

**Keywords** : viral safety, biological products, evaluation of viral clearance

Kawakami, N.\*<sup>1</sup>, Shimohama, S.\*<sup>2</sup>, Hayakawa, T., Sumida, Y.\*<sup>1</sup> and Fujimoto, S.\*<sup>1</sup> : **Tyrosine phosphorylation and translocation of phospholipase C- $\gamma$  2 in polymorphonuclear leukocytes treated with pervanadate**

*Biochim. Biophys. Acta*, 1314, 167~174 (1996)

多形核白血球(PMNs)は、チロシンフォスファターゼ阻害剤である過バナジン酸処理により活性化され、活性酸素を産生するが、その過程で活性化に関与すると思われるタンパク質チロシンリン酸化について検討した。過バナジン酸はPMNsにおいて少なくとも11種以上のタンパク質にチロシンリン酸化を引き起こす。そのうち、145KDaを示すタンパク質がイノシトールリン脂質に特異性をもつフォスホオリパーゼC (PLC)  $\gamma$  2に対する特異抗体と反応することが判明した。PLC $\gamma$  2は活性化前のPMNsでは細胞質に局在しているが、過バナジン酸で活性化後は細胞質分画と膜分画に分布していた。また、活性化後のPMNsにおけるPLC $\gamma$  2活性はトータルとして活性化前のPMNsより上昇していたが、興味深いことに、活性化後のPMNsにおいて細胞質分画のPLC $\gamma$  2活性は有意な減少を示しているのに対し、膜分画のPLC $\gamma$  2活性は有意な増加を示していた。以上のことから、過バナジン酸処理によるPMNsの活性化過程のなかに、PLC $\gamma$  2のチロシン残基のリン酸化とリン酸化されたPLC $\gamma$  2の細胞質から膜へのトランスロケーションが含まれることが示唆された。

**Keywords** : polymorphonuclear leukocyte activation, tyrosine-phosphorylated protein, phospholipase C

\*<sup>1</sup> 京都薬科大学

\*<sup>2</sup> 京都大学医学部

Kawakami, N.\*<sup>1</sup>, Sumida, Y.\*<sup>1</sup>, Tanaka, J.\*<sup>1</sup>, Ohara, A.\*<sup>1</sup>, Hayakawa, T. and Fujimoto, S.\*<sup>1</sup>: **Inhibitory effect of acetylshikonin on the activation of NADPH oxidase from polymorphonuclear leukocytes in both whole cell and cell-free systems**

*Biol. Pharm. Bull.*, 19, 1266~1270 (1996)

シコニン誘導体は、火傷、炎症、創傷等の治療に効果があり、その機構の一つとして抗炎症作用を示すことが知られているが、その機構の詳細については明らかではない。本研究では多形核白血球(モルモットPMNs)のNADPH酸化酵素の活性化に及ぼすアセチルシコニン(AS)の影響を、細胞及び無細胞系を用いて検討した。PMNsをあらかじめASで処理し、PMAで活性化を誘導した場合、O<sub>2</sub><sup>-</sup>

の産生は著しく阻害されたが、PMA でいったん活性化を引き起こした PMNs には AS の効果は認められなかった。また AS は、細胞質分画で再構成した無細胞系におけるミリスチン酸による NADPH 酸化酵素の活性化を阻害したが、すでに活性化された酵素の活性は阻害しなかった。以上の結果から、AS は PMNs の活性化過程における NADPH 酸化酵素複合体の形成を阻害するが、すでに形成された活性化酵素は阻害しないことが示された。

**Keywords:** polymorphonuclear leukocyte activation, acetylshikonin, anti-inflammatory activity

\* 京都薬科大学

Nakagawa, T.\*<sup>1</sup>, Mizuguchi, H.\*<sup>1</sup>, Imazu, S.\*<sup>1</sup>, Nakanishi, M.\*<sup>2</sup>, Nakagawa, S.\*<sup>1</sup>, Hayakawa, T. and Mayumi, T.\*<sup>1</sup>: **Characterization of fusogenic liposomes as a gene transfer vector**

*Drug Delivery System*, 11, 411~417 (1996)

リポソームと不活化センダイウイルスより膜融合リポソームを調製し、遺伝子導入ベクターとしての特性を解析した。プラスミド DNA はルシフェラーゼを発現するもの (pCAL 2) として調製した。pCAL 2 封入膜融合リポソームをマウス L 細胞に作用させ、細胞における遺伝子発現パターンを調べたところ、1分間という短時間でも高い遺伝子発現が認められ、すみやかな細胞融合能を有することが明らかとなった。細胞障害性については非常に高濃度 (OD<sub>540</sub>=3.0, DNA 6.0μg/ml) においても認められなかった。遺伝子発現効率を、L, HeLa, MDCK, BAEC など各種細胞を用いて検討したところ、他のカチオンリポソーム・DNA 複合体に比し、1.5~100倍以上の効率を示した。また pCAL 濃度が低いほど、効率比の差は拡大した。S-180 腹水腫マウスを用いた *in vivo* 直接遺伝子導入を検討したところ、0.75μg の pCAL 封入膜融合リポソームの投与により、顕著な遺伝子発現が認められた。カチオンリポソーム・pCAL 2 複合体の場合、50倍以上の pCAL 2 投与でもほとんど発現はみられなかった。以上の実験から、膜融合リポソームが、ウイルスベクターの持つ高い遺伝子導入効率と、非ウイルスベクターが有する導入遺伝子選択の自由度や安全性を併せもつ、ハイブリッド型の新しい有用なベクターであることが示された。

**Keywords:** fusogenic liposomes, cationic liposome, gene transfer vector

\*<sup>1</sup> 大阪大学薬学部

\*<sup>2</sup> 大阪大学微生物病研究所

Tokumura, A.\*<sup>1</sup>, Moriyama, T.\*<sup>1</sup>, Minamino, H.\*<sup>1</sup>, Hayakawa, T. and Tsukatani, H.\*<sup>1</sup>: **Exogenous phosphatidic acid with saturated short-chain fatty acyl groups induces superoxide anion release from guinea-pig peritoneal polymorphonuclear leukocytes by three different mechanisms**

*Biochim. Biophys. Acta*, 1344, 87~102 (1997)

短鎖の脂肪酸を持つフォスファチデン酸 (PA) がモルモットの多形核白血球 (PMNs) の活性酸素産生を一定の lag time 後に引き起こすことを見いだした。4種の PA を用いて、脂肪酸の鎖の長さが活性化に及ぼす影響、細胞外カルシウムが PA の作用に及ぼす影響、各種プロテインキナーゼ阻害剤 (スタウロスポリン, H-7, TMB-8) が PA の作用に及ぼす影響、これら阻害剤の影響と PA 濃度との関係、PA の PMNs 中での代謝に及ぼすプロラノールの影響などについて詳細に解析した。その結果、多形核白血球の活性酸素産生の機構として、プロテインキナーゼ C 経

路及びプロテインキナーゼ C 非依存性経路 2 種の計 3 種が存在すること、この 3 経路において PA は、それ自体が代謝産物であるジアシルグリセロールより重要であることを示唆する結果を得た。

**Keywords:** polymorphonuclear leukocyte activation, phosphatidic acid, protein kinase C

\* 徳島大学薬学部

中西真人\*<sup>1</sup>, 真弓忠範\*<sup>2</sup>, 早川堯夫: **遺伝子治療の発展に必要な基盤技術の開発**

治療学, 31, 11~14 (1997)

遺伝子治療への取り組みとして、現在先行している 3つの領域、すなわち、①導入した遺伝子の発現産物を抗原として免疫を誘導し、感染症などをコントロールしようとする遺伝子ワクチン、②サイトカインなどを発現させて生体の抗癌作用の増強を目指す癌の遺伝子治療、③導入した遺伝子を永続的に発現させて新しい補充療法を目指す遺伝的代謝疾患の治療のそれぞれについて、技術的な面を中心に現在の問題点と将来への展望について考察した。更に、遺伝子治療における次世代基盤技術として著者らが開発を進めているハイブリッドベクター (ウイルスの必要機能を具備した非ウイルスベクター) のコンセプトと現状について論述した。

**Keywords:** gene therapy, hybrid vector

\*<sup>1</sup> 大阪大学微生物病研究所

\*<sup>2</sup> 大阪大学薬学部

Morimoto, K., Tsuda, E.\*<sup>1</sup>, Said, A. A.\*<sup>2</sup>, Uchida, E., Hatakeyama, S.\*<sup>1</sup>, Ueda, M.\*<sup>1</sup> and Hayakawa, T.: **Biological and physicochemical characterization of recombinant human erythropoietins fractionated by Mono Q column chromatography and their modification with sialyltransferase**

*Glycoconjugate J.*, 13, 1013~1020 (1996)

BHK 細胞由来ヒト EPO を Mono Q カラムにて 10 種類に分画した。各分画はシアル酸含量の違いに基づいて分画されており、それらのアシアロ糖鎖構造には大きな差異はなかった。また、生物活性の測定より、*in vitro* の生物活性の低下とシアル酸の増加とは、ほぼ規則的に良好な逆相関を示したが、*in vivo* 活性は、シアル酸の増加にもかかわらず、ある分画付近でプラトーになり、至適シアル酸含量は、11.5-12.1 mole/mole EPO と考えられた。シアル酸含量の低い分画では、酵素的なシアル酸の導入が観察され、その結果 *in vivo* 活性の上昇が認められた。シアル酸の導入の程度は、分画 a で 1.2 mole/mole 程度であり、特定箇所へのシアル酸の導入が生物活性の上昇に有効であることが示唆された。

**Keywords:** recombinant erythropoietin, sialic acid, bioactivity

\*<sup>1</sup> 雪印乳業(株)生物科学研究所

\*<sup>2</sup> Zagazig University

Niimi, S., Oshizawa, T. and Hayakawa, T.: **Comparison of potency of recombinant and urinary human thrombomodulins by two assay systems**

医薬品研究, 28, 337~342 (1997)

トロンボモジュリン (TM) は有望な抗血栓薬として現在開発中の糖タンパク質であるが、組換えヒト型 TM 及びヒト尿由来 TM の活性はそれぞれ蛍光強度を用いた系、吸光度を用いた系と異なった系で測定され、かつ力価 (単位) の定義は両者で異なっている。そこで各 TM の社内力価 (単

位)の相互関係,二種類の測定系に対する反応性を調べた。その結果,各TMは両測定系において直線関係を示し,かつ同様な濃度反応性を示した。更に両測定系においてある一定の換算係数を用い,それぞれ独自に設定された社内力価(単位)から新しい共通の単位に変換することが可能であることが示された。

**Keywords:** thrombomodulin potency, protein C - activating cofactor activity

Kogi, M., Yamaguchi, T., Oshizawa, T. and Hayakawa, T.: **Effects of calyculin A and FK506 on the  $O_2^-$  generation of rat peritoneal macrophages**

*Tokai J. Exp. Clin. Med.*, 21, 37~43 (1996)

食細胞の活性酸素産生系の制御機構におけるリン酸化反応の関与を明らかにする目的で,ラットの腹水マクロファージを用い,脱リン酸化阻害剤(カリクリンA)の活性酸素生成への影響について解析した。その結果,カリクリンAは低濃度でop-ZY及びIgG-ZYによって誘導される活性酸素生成を顕著に阻害することが認められた。この活性酸素生成活性の阻害パターンは,いずれを刺激剤として用いた場合でも同様の用量曲線を示した。本研究により,活性酸素産生系の活性化には,リン酸化だけでなく,ホスファターゼ1あるいは2Aが関与する脱リン酸化が必要であることが示唆された。

**Keywords:** calyculin A, hyperphosphorylation, superoxide

Kogi, M., Fukushige, S.\*, Lefevre, C.\*, Hadano, S.\* and Ikeda, J.\*: **A novel tandem repeat sequence located on human chromosome 4 p: Isolation and characterization**

*Genomics*, 42, 278~283 (1997)

ハンチントン病や他の遺伝病がマップされているヒト4番染色体の短腕端部(1/2)の染色体領域を解析するためにマイクロダイセクション法により,染色体領域特異的ゲノミックDNAライブラリーを作成し,プローブに用いて,ヒトゲノミックDNAのコスミドライブラリーのスクリーニングをおこなった。その結果,10個のポジティブクローンを得,そのうちの1つ4.7Kbをユニットとした反復配列を含むコスミドクローンを分離した。この反復配列は4p15に特異的に存在し,1ゲノム当たり50~70コピーあることが明らかになった。この基本ユニット4.7Kbのすべての塩基配列を決定したところ,4,752bpと算定され,この中に1,590bpのORFが含まれていた。このORFにはホモロジーがなく,新規なものであった。このような反復配列はX染色体にはその存在が知られているが,常染色体では初めてである。

**Keywords:** tandem repeat sequence, chromosome 4 p

\* 東海大学

Tanaka, H.\*, Kawanishi, T., Matsuda, T.\*, Takahashi, M. and Shigenobu, K.\*: **Intracellular free  $Ca^{2+}$  movement in cultured cardiac myocytes as revealed by rapid scanning confocal microscopy**

*J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 27, 761~769 (1996)

高速走査型共焦点レーザー顕微鏡を用いて,初代培養マウス心筋細胞の細胞内カルシウムイオン濃度変化の画像化を行った。マウス心筋細胞は培養直後には拍動していないが,1,2日培養すると自律的な拍動を示す細胞が現われる。この細胞の $[Ca^{2+}]_i$ を画像化してみると,二種類の動きが観察された。即ち細胞の特定の場所からカルシウムイオンが吹き出るように上昇し,周囲に拡散するようなウエ

ーブ状の動きと,拍動に伴い細胞全体が同期して0.1秒以内に最大濃度までスパイク状に上昇する動きである。これら二つのカルシウムイオンの動きは同一の細胞で観察されることもあるし,また一方のみが観察される細胞もある。薬理的検討の結果,前者は細胞内カルシウムイオン貯蔵部位からの $Ca^{2+}$ の放出及び $Ca^{2+}$ -induced- $Ca^{2+}$ -release機構による伝播,後者は細胞の電気的興奮に伴う筋繊維鞘からの $Ca^{2+}$ の流入が引き金となった細胞全体の上昇であることが明らかとなった。

**Keywords:** myocyte, confocal microscopy, calcium

\* 東邦大学

Tanaka, H.\*, Matsui, S.\*, Kawanishi, T. and Shigenobu, K.\*: **Use of chloride blockers: A novel approach for cardioprotection against ischemia-reperfusion damage**

*J. Pharmacol. Exper. Therap.*, 278, 854~861 (1996)

虚血-再灌流による心筋障害に対する二つのクロライドチャンネル阻害剤,anthracene-9-carboxylic acid(9-AC)と4-acetamide-4'-isothiocyanatostibene-2,2'-disulfonic acid(SITS)の防御効果を調べた。モルモット単離心室筋細胞ではイソプロテレノールによって増加したクロライド電流を9-ACは抑えたが,SITSは抑えなかった。次にモルモット摘出心室筋を無灌流状態に置くと,活動電位は減少し収縮力は消失したが,再灌流によって回復がみられた。9-AC及びSITSとも正常あるいは虚血時の心室筋の収縮力には影響しないが,9-ACは再灌流時の収縮力の回復をより強めた。また9-AC,SITSとも虚血時の活動電位の減少を抑制した。虚血時には細胞内pHは一時的に増加し,その後減少するが,この減少はSITSによって抑制された。以上のようにクロライドチャンネル阻害剤の9-ACとSITSは心筋抑制作用はないが,虚血再灌流障害に対する抑制効果を示す。

**Keywords:** chloride blocker, ischemia-reperfusion damage, pH

\* 東邦大学

Kobayashi, Y.\*, Yamashiro, T.\*, Jinnai, T.\*, Nakano, A.\*, Watanabe, N.\*, Kawanishi, T., Tanaka, H.\* and Shigenobu, K.\*: **Target cell-induced calcium signals in human Natural Killer leukemia cells as revealed by confocal fluorescence microscopy**

*Exp. Cell Res.*, 232, 42~46 (1997)

ナチュラルキラー細胞(NK細胞)において,標的細胞によって誘発されるカルシウム反応をindo-1と共焦点レーザー顕微鏡を用いて画像化した。実験にはヒト由来NK白血病細胞株YTNを用いたが,感受性標的細胞のJY細胞を加えるとラグタイムの後ほとんどの細胞で細胞内カルシウムイオンは上昇するが,非感受性標的細胞のK562細胞では上昇しなかった。この上昇反応は2mMのEGTAで阻害され,10 $\mu$ Mのニカルジピンでは上昇の大きさが半分程度にまで抑えられたが,この抑制の程度は細胞毒性活性と相関があった。これらの結果から,YTN細胞におけるカルシウム反応は細胞毒性発現に必須の過程であると考えられた。

**Keywords:** Natural Killer cell, calcium, confocal microscopy

\* 東邦大学

横田 崎江, 谷本 剛, 川西 徹, 早川 堯夫: **トロンビンの合成基質を用いた定量法の確立に関する研究(市販製剤への応用)**

医薬品研究, 27, 708~711 (1996)

日局トロンビンの定量法は操作が煩雑であると共に測定精度も低い。そこでトロンビンに対する特異性の高いペプチド合成基質を用いるトロンビン活性定量法が日局法に置き換わりうるか検討するため、市販製剤についてトロンビン活性を測定し、日局法との比較を行った。その結果、4種の代表的市販製剤において、製剤間に測定値の違いはみられたものの、各製剤について日局法と合成基質法の測定値はほぼ等しい値が得られた。またペプチド合成基質の基質特異性から問題となる可能性のあるトリプシンの影響に関しても、現状の製法で得られたトロンビンに関しては問題とならないことを示唆する結果が得られた。一方、他の報文に報告されている日局法と合成基質法との間の測定値の解離については本研究では確認されず、また現象そのものが異常な条件下で生じていることから、合成基質法への切り替えの支障にはならないと考えられた。以上、ペプチド合成基質を用いたトロンビン活性測定法は現在の日局法に変わりうるトロンビン測定法と考えられた。

**Keywords:** thrombin, colorimetric assay, chromogenic substrate

Fukuoka, M., Niimi, S., Zhou, Y.\*, Kobayashi, T. and Hayakawa, T.: **Responsiveness of rat nonparenchymal liver cells and spleen cells to the decomposition of erythrocytes exposed to DBP and its metabolite**  
*Biol. Pharm. Bull.*, 19, 1154~1159 (1996)

ジブチルフタル酸エステルとその代謝物によって変化を受けた赤血球の分解に、肝非実質細胞が関与することが示唆された。

**Keywords:** nonparenchymal liver cells, phthalate, erythrocytes

\* ファイザー

Fukuoka, M., Niimi, S., Kobayashi, T., Zhou, Y.\* and Hayakawa, T.: **Possible origin of testicular damage by phthalic acid esters**  
*Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, 43, p-21 (1997)

フタル酸エステルによる精巣障害の原因として、赤血球及びヘモグロビンとの関連を考察した。

**Keywords:** testicular damage, phthalate, erythrocytes

\* ファイザー

下村裕子, 佐竹元吉, 杉山玲子: **製剤中に含まれる粉末生薬の同定 (6), 柑橘類果実生薬の粉末**  
*Journal of Japanese Botany*, 71, 145~162 (1996)

胃腸薬承認基準の5種の柑橘類果実生薬の粉末について鏡検により粉末の構成要素を解明した。1. トウヒ, 枳殻またはキジツ, チンピ及び四花青皮は組織細胞の有無や形状の特徴, 細胞含有物の消長を指標として鏡検により鑑別することが可能である。2. 枳殻とキジツは識別は出来ない。

**Keywords:** powdered crude drugs, Citrus fruit, microscopical determination

Emi Okuyama\*, Yoshiko Okamoto\*, Mikio Yamazaki\* and Motoyoshi Satake: **Pharmacologically active components from Peruvian medicinal plant, Huanarpo (*Jatropha cillata*)**  
*Chem. Pharm. Bull.*, 44, 333~336 (1996)

ペルーの薬用植物から緩和安定作用のある化合物が数種単離された。活性のあったものはフラボノイドの化合物 isoorientin, orientin, fraxetin である。

**Keywords:** Peruvian medicinal plant, *Jatropha cillata*, Hua-

narpo

\* 千葉大学薬学部

杉山玲子, 下村裕子, 佐竹元吉: **局方粉末生薬の研究, ゲンノショウコ末**

*Natural Medicine*, 50, 212~217 (1996)

ゲンノショウコ末の形態的特徴を明らかにした。特徴は単細胞毛, 短腺毛, 長腺毛, 厚膜細胞, さく状組織中の1個のシユウ酸カルシウムの集晶, でんぷん粒などが認められ, 大きさ等で類似粉末との区別が可能である。

**Keywords:** powdered crude drugs, powdered *Geranium*, microscopical determination

杉山玲子, 佐竹元吉: **局方粉末生薬の研究, コウジン末**  
*Natural Medicine*, 50, 218~221 (1996)

コウジン末の形態的特徴を明らかにした。特徴はのり化したでんぷんを充満する柔組織, 厚壁細胞, コルク層, シユウ酸カルシウムの集晶等である。厚壁組織の肥厚の程度で, 類似した粉末との区別が可能である。

**Keywords:** powdered crude drugs, powdered red *Ginseng*, microscopical determination

樋口行人<sup>\*1</sup>, 山下樹三裕<sup>\*2</sup>, 谷山紘太郎<sup>\*2</sup>, 佐竹元吉, 尾崎正若<sup>\*1</sup>: **七物降下湯の脳卒中易発症性自然発症高血圧ラット (SHRSP) の脳卒中予防とフリーラジカル関連酵素活性に対する効果**

*日薬理誌*, 108, 13~22 (1996)

漢方処方七物降下湯を脳卒中易発症性自然発症高血圧ラット (SHRSP) に連続投与したところ, 脳卒中を起こさず, 延命効果が見られた。この作用はフリーラジカル関連酵素活性に対する阻害作用とフリーラジカル消去作用の両方によってもたらされる効果と推測された。

**Keywords:** Shichimotsukoukato, stroke-prone spontaneously hypertensive rats, free-radical-related enzyme

\*1 東亜大・大学院・総合学術

\*2 長崎大・医

Ozaki, Y., Lujian Xing and Satake, M.: **Anti-inflammatory effect of *Trichosanthes kirikowii* Maxim. and its effective parts**

*Biol. Pharm. Bull.*, 19, 1046~1048 (1996)

中国で種々炎症の治療に用いられている処方構成生薬の抗炎症作用を検討した。*Trichosanthes kirikowii* Maxim. の50%メタノールエキスは経口投与でマウスを用いての酢酸誘発色素透過性亢進の抑制, 酢酸誘発 writhing の抑制, ラットを用いてのカラゲニン誘発浮腫および綿球誘発肉芽組織形成の抑制などの抗炎症作用および鎮痛作用を示した。さらに, 活性成分を検討するためにこの生薬から種子を分離し, この種子の50%エタノールエキスも同様の方法により検討した結果, このエキスの経口投与は抗炎症作用および鎮痛作用を示した。これらのことから, この抗炎症作用は炎症過程での比較的早い過程, さらに, 遅い過程で発現していることが考えられた。さらに, これら抗炎症作用および鎮痛作用を示す活性成分は種子に存在することが明らかとなった。

**Keywords:** *Trichosanthes kirikowii* Maxim., anti-inflammatory effect, seed fraction

尾崎幸紘: **生薬の薬効評価に対する含有成分の薬理学的関与について**

*Antibac. Antifung. Agents*, 24, 415~420 (1996)

現在、生薬製剤およびこれに用いられている生薬の品質評価は、これら製剤および生薬に含まれる測定可能な成分を定性的あるいは定量的に検討することによりなされている。この場合、検討すべき成分は何が最もよいか、また、その含有量はどの程度必要であるかなどを明らかにすることは必要であり重要な課題である。このことから、種々の生薬の示す薬理作用を調べ、その薬理活性成分の本体を検討し、その成分のものと生薬が示す薬理効果への関与の程度を明らかにして、生薬中に含有されるどの成分を指標として生薬の品質を評価することが妥当であるかを検討するため、生薬の薬理作用の検討方法および得られた成果の解析、さらに、注意すべき点について、現在までに検討して得られた生薬の薬理作用の結果を参考にして解説した。

**Keywords:** pharmacological study of crude drugs, pharmacological evaluation of crude drugs, pharmacological experiment of crude drugs

相楽和彦<sup>\*1</sup>、平山総良<sup>\*1</sup>、宮川辰治<sup>\*1</sup>、伊藤裕二<sup>\*1</sup>、永井吉澄<sup>\*2</sup>、鈴木英世、佐竹元吉：高速液体クロマトグラフ法によるセンナ中のセンノシド A 及び B の定量法  
医薬品研究, 27, 291~296 (1996)

センナ中のセンノシド A 及び B の定量法を JP13 に収載するために、成分測定用センノシド A および B の規格、並びに臭化テトラ-n-ヘプチルアンモニウムをカウンターイオンとするイオンペア HPLC 法による検出性のある定量法を設定した。また、規格設定のために市場品について乾燥減量の測定及びセンノシド A および B の定量を行い、その結果から JP13 に収載する案として、乾燥減量 12% 以下、総センノシド含量 1.0% 以上が提案された。

**Keywords:** sennoside A, sennoside B, *Sennae Folium*

\*1 東京医薬品工業協会

\*2 日本生薬連合会

佐竹元吉、鈴木英世、永井吉澄<sup>\*1</sup>、岡田 稔<sup>\*2</sup>、相楽和彦<sup>\*3</sup>、檀浦國夫<sup>\*4</sup>、倉重満雄<sup>\*5</sup>：生薬の純度試験に関する検討

医薬品研究, 27, 467~480 (1996)

局方生薬の残留農薬について、これまでの文献調査並びに分析による実態調査をした。生薬の選定には、過去の汚染報告や、使用部位、需要量などを考慮に入れ、トウキなど 14 種類を選んだ。また農薬は、1990 年まで衛生試験法で対象としていた有機塩素剤 13 種類、有機リン剤 6 種、カルバメート剤 1 種とした。測定値で問題になったものは、センナ及びニンジンに残留する BHC と DDT であった。次にそれらの分析の標準測定法を設定すると共に、測定上の注意点を検討した。

**Keywords:** residual pesticide, Senna, Ginseng

\*1 日本生薬連合会

\*2 東京生薬協会

\*3 東京医薬品工業協会

\*4 大阪医薬品協会

\*5 日本植物油協会

佐竹元吉、関田節子、安田一郎<sup>\*1</sup>、藤田正雄<sup>\*2</sup>、白鳥誠<sup>\*2</sup>、人見信之<sup>\*3</sup>、清水製光<sup>\*3</sup>、岡田 稔<sup>\*2</sup>、箕浦修介<sup>\*2</sup>、新 邦夫<sup>\*3</sup>、永井吉澄<sup>\*4</sup>、有本恵子<sup>\*4</sup>：生薬の微生物限度に関する研究

医薬品研究, 27, 706~707 (1996)

日局 (JP12) に微生物限度試験法が収載されたことにより、生薬への同法の適用が提案されている。このため、今後の改正時に参考とする資料を作成し、生薬及び生薬製剤

への設定の可能性を検討するため、原形生薬、粉末生薬、生薬製剤、エキス剤について実態調査を行った。その結果カンゾウ、ニンジンに細菌数が、オウゴン、オウレン、ケイヒ、トウキに真菌数が多く検出され、粉末生薬でも同様の傾向が認められた。これらの生薬は、形状が複雑で土を落とし難いことが一因と考えられるが、調整時、保管時、輸送時等の諸条件について今後の調査が必要であることが認識された。

**Keywords:** plant medicines, microbial contamination, microbial limit test

\*1 東京都立衛生研究所

\*2 東京生薬協会

\*3 日本漢方生薬製剤

\*4 日本生薬連合会

Kuroyanagi, M.<sup>\*1</sup>, Ueno, A.<sup>\*1</sup>, Hirayama, Y.<sup>\*2</sup>, Hakamata, Y.<sup>\*2</sup>, Gokita, T.<sup>\*2</sup>, Ishimaru, T.<sup>\*2</sup>, Kameyama, S.<sup>\*2</sup>, Yanagawa, T.<sup>\*2</sup>, Satake, M. and Sekita, S.: **Anti-androgen active constituents from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre**  
*Natural Medicines*, 50, 408~412 (1996)

抗アンドロジェン活性を示す *Dalbergia cochinchinensis* の活性成分として 3 種の新規化合物を含む 10 化合物を単離し、構造決定を行った。主成分であるラテフォリンとメチルダルベルギオンはテストステロン 5 $\alpha$ -レダクターゼならびにジヒドロテストステロン受容体に対し強い競合型阻害活性を示した。

**Keywords:** *Dalbergia cochinchinensis* Pierre, neoflavone, anti-androgen activity

\*1 静岡県立大・薬

\*2 ライオン(株)

Ayer, W. A.<sup>\*</sup>, Cruz, E. R.<sup>\*</sup>, Kawahara, N, Muir, D. J.<sup>\*</sup> and Ptaszynska, K.<sup>\*</sup>: **Chemistry associated with black galls on aspen of *Lecythophora hoffmannii***  
*Rev. Latinoamer. Quim.*, 24, 183~190 (1996)

カナダにおいて最も重要な木材資源の一つであるアスペンは、その需要の増加に伴い、青変菌と呼ばれる植物病原菌による着色、腐食が大きな問題となってきている。現在までに青変菌に拮抗する菌類のスクリーニングより見出された真菌、*Lecythophora hoffmannii* の活性成分の検索を行い、米培地アセトン抽出エキスより新規抗真菌性物質 lecythophorin を単離、構造決定した。今回さらに lecythophorin の脂肪酸側鎖の水酸基の絶対配置を決定すると共に、液体培地による培養を試み、培養液の酢酸エチル抽出エキスより、lecythoside と命名した新規化合物を単離、構造決定した。

**Keywords:** lecythophorin, lecythoside, *Lecythophora hoffmannii*

\* アルバータ大

Nakamura, A., Kojima, S., Isama, K., Umemura, T., Kawasaki, Y., Takada, K., Tsuda, M. and Kurokawa, Y.: **The effects of oligomers content and surface morphology on foreign-body tumorigenesis with polyether-urethanes: Two years subcutaneous implantation study in rats**

*J. Long-Term Effects of Med. Devices*, 5, 263~273 (1995)

ポリエーテルウレタン (PEU) の異物発癌性に対するオリゴマーと表面性状の寄与を明らかにする目的で、以下の実験を行った。すなわち、オリゴマーを徹底的に抽出除去した PEU (UR)、未処理 PEU に抽出したオリゴマーを加

えたもの (UA), 未処理 PEU (UN) の3種類それぞれをテトラヒドロフラン (THF) 又はジメチルホルムアミド (DMF) に溶かした後, 溶媒を揮発させてフィルムを作成した. THF 溶液からは表面が平滑なフィルムが得られ, DMF 溶液からはフォーム状のものが得られた. これらの6種類をラット皮下に2年間埋植し, 腫瘍の発生と局所の病理検査を行った. 表面が平滑なフィルムでは, 腫瘍の発生率及び周囲組織の病理所見について, UR, UN, UA 群間に有意差はなかった. すなわち, オリゴマー量の違いは発癌性に影響を与えなかった. 一方, 表面が平滑なものとはフォーム状のものを比較すると, UR, UN, UA いずれから製したもので, フォーム状の方が平滑な場合に比べて, 腫瘍の発生時期が6~9ヶ月遅れ, 総発癌数も少なくなった.

**Keywords:** implant tumorigenesis, polyetherurethane, foamed material

**Kaniwa, M.: Chemical analysis to check relations between causative products and component chemicals in allergic contact dermatitis**

*Environmental Dermatology*, 3 (Suppl 1), 97~102 (1996)

アレルギー性接触皮膚炎における原因製品と原因化学物質の関連性を確認するために, メーカーからの製品情報の収集, 臨床皮膚科医による患者でのパッチテスト及び毒理学による動物実験におけるアレルギー性試験, 分析化学者による原因製品中のアレルギー性物質の分析調査等, 異分野の研究者間の共同研究における成果を総合することによって, 原因化学物質を効率良く, 的確に特定することができる.

**Keywords:** allergic contact dermatitis, causative product and chemical relevance

**Kaniwa, M.: Allergen explanation. diphenylguanidine (DPG), styrenated phenol (SP), dioxydiphenyl (DOD), p-tert-butylphenol formaldehyde resin (PTBP-FR)**

*Environmental Dermatology*, 3, 120~127 (1996)

ゴム製品によるアレルギー性接触皮膚炎の代表的なアレルギー性物質について, 化学的性状, 事例報告並びに患者でのパッチテスト結果, 感作性試験結果などを最新の文献などを参照しながらまとめた. すなわち, ゴム添加剤のうち, ゴム加硫促進剤として使用される diphenylguanidine (DPG), 老化防止剤として使用される styrenated phenol (SP), dioxydiphenyl (DOD), クロロブレンゴム系接着剤の樹脂成分として使用される p-tert-butylphenol formaldehyde resin (PTBP-FR) を取り上げ, 皮膚アレルギー性に関する情報をまとめた.

**Keywords:** allergic contact dermatitis, rubber, rubber additive

**Kaniwa, M., Nishioka, K.\*<sup>1</sup>, Miyako, F.\*<sup>2</sup>, Jidoi, J.\*<sup>2</sup>, Isama, K. and Nakamura, A.: Analysis of allergenic chemicals in farmer's rubber boots causing allergic contact dermatitis and a trial for hypoallergenic rubber boots**

*Environmental Dermatology*, 3, 64~70 (1996)

農作業用ゴム長靴によるアレルギー性接触皮膚炎事例7例について原因化学物質の究明を実施した結果, 代表的なゴムアレルゲンであるアミン系老化防止剤の N-isopropyl-N'-phenyl-p-phenylenediamine (IPPD) と共に, アレルギー性物質であることが確認されている老化防止剤の N-1,3-dimethylbutyl-N'-phenyl-p-phenylenediamine (DMBPPD),

6-ethoxy-2,2,4-trimethyl-1,2-dihydroquinoline (ETMDQ) が農作業用ゴム長靴によるアレルギー性接触皮膚炎事例の原因化学物質となっていたことを明らかにできた. 更に, 農作業用ゴム長靴メーカーの協力により, これらのアレルギー性老化防止剤を使用しない改良品を作成した.

**Keywords:** allergic contact dermatitis, farmer's rubber boot, amine-type antioxidant

\*<sup>1</sup> 山口赤十字病院皮膚科

\*<sup>2</sup> 島根医科大学皮膚科

**Nishioka, K.\*<sup>1</sup>, Murata, M.\*<sup>1</sup>, Ishikawa, T.\*<sup>1</sup> and Kaniwa, M.: Contact dermatitis due to rubber boots worn by Japanese farmers, with special attention to 6-ethoxy-2,2,4-trimethyl-1,2-dihydroquinoline (ETMDQ) sensitivity**

*Contact Dermatitis*, 35, 241~245 (1996)

農作業用ゴム長靴によるアレルギー性接触皮膚炎事例について, 6例, 9名の患者について検討した. 患者でのパッチテスト及び原因製品の分析調査により, ゴムアレルゲンとして知られる p-フェニレンジアミン系老化防止剤の N-isopropyl-N'-phenyl-p-phenylenediamine (IPPD), N-1,3-dimethylbutyl-N'-phenyl-p-phenylenediamine (DMBPPD) が原因化学物質として確認できた. 一方, 6-ethoxy-2,2,4-trimethyl-1,2-dihydroquinoline (ETMDQ) がゴム製品による事例において原因化学物質となっていたことが確認できたのは著者らの報告が最初である.

**Keywords:** allergic contact dermatitis, farmer's rubber boot, amine-type antioxidant

\*<sup>1</sup> 山口赤十字病院皮膚科

**Yagami, T., Sato, M., Nakamura, A. and Shono, M.\*: Esterase from ammoniated latex: Biochemical characterization and antigenicity**

*Food & Agric. Immunol.*, 8, 121~136 (1996)

ラテックスアレルギーの特徴の一つとして, 植物性食品や花粉に対する交差反応が挙げられる. しかし, 交差反応性抗原に対する具体的な説明はなされていない. 著者らは, 植物の生体防御蛋白質群が交差反応性抗原になる, という仮説を立てた. 本研究ではこの仮説を検証するため, ゴムの木の生体防御に関与すると考えられるエステラーゼをアンモニアラテックスから分離し, その性質及びラテックスアレルギーとの関連性について調べた. 分離されたエステラーゼは, 非変性条件下で約80kDの分子量を有するものの, 変性条件下では複数のユニットに解離することがゲル電気泳動法で確認できた. またこの酵素は, 液胞由来の lutoid から以前に分離されたエステラーゼ hevain ℓ に似た特徴を有していることがわかった. 更に, ラテックスアレルギー患者血清中の IgE 抗体によって特異的に認識されるラテックス抗原の一つであることが, イムノブロットングにより示された. 以上の結果は, このエステラーゼとラテックスアレルギーとの関連性を明示すると共に, 著者らの仮説の正当性を支持している.

**Keywords:** latex allergy, defense-related protein, esterase

\* しょうの皮膚科

**矢上 健: 植物のストレス誘導性蛋白質とラテックスアレルギー**

日本ラテックスアレルギー研究会会誌, 1, 38~41 (1997)

ラテックスアレルギーに伴う巾広い交差反応性に関連し, 植物の生体防御蛋白質群が交差反応をも引き起こすアレルゲンになる, という解釈を提言した. また, 市販され



ている天然ゴム製手袋やアンモニアラテックスの抽出液から検出したことを既に報告している, キチナーゼやリゾチーム,  $\beta$ -1,3-グルカナーゼ, エステラーゼに加えて, リボヌクレアーゼやアルカリ性プロテアーゼインヒビターの活性を天然ゴムラテックスの抽出液中に検出した結果を報告した. このような加水分解酵素及び酵素インヒビターは, 植物の生体防御反応に深く関与するとされているものである.

**Keywords:** latex allergy, defense-related protein, cross-reaction

Kitagawa, K.\*<sup>1</sup>, Aida, C.\*<sup>1</sup>, Fujiwara, H.\*<sup>1</sup>, Yagami, T. and Futaki, S.\*<sup>2</sup>: **Efficient solid-phase synthesis of sulfated tyrosine-containing peptides using 2-chlorotriptyl resin: Facile synthesis of gastrin/cholecystokinin peptides**

*Tetrahedron Lett.*, 38, 599~602 (1997)

硫酸化チロシン [Tyr(SO<sub>3</sub>H)] 含有ペプチドの, 効率的かつ簡便な化学合成法を開発した. この合成法は, 弱酸処理により切り出し可能な2-クロロトリチル樹脂を固相担体として用い, Tyr(SO<sub>3</sub>H)残基を直接導入するFmoc型固相法によりペプチド鎖を構築し, Tyr(SO<sub>3</sub>H)残基の脱硫酸化反応を最小限に抑制できる二段階の酸処理を施して目的の硫酸化ペプチドを得るという戦略からなる. 本合成手法を適用することで, 従来から化学合成が困難であるとされてきた様々な鎖長を有するガストリン-II及びゴレシストキニン(CCK)を, 収率良く合成することに成功した.

**Keywords:** peptide synthesis, tyrosine-O-sulfate, cholecystokinin

\*<sup>1</sup> 新潟薬科大学

\*<sup>2</sup> 徳島大学薬学部

Ikarashi, Y., Tsuchiya, T. and Nakamura, A.: **Application of sensitive mouse lymph node assay for detection of contact sensitization capacity of dyes**

*J. Appl. Toxicology*, 16, 349~354 (1996)

先に確立したマウスを用いた感作性試験法SLNAが着色性物質の皮膚感作性の検出に応用できるか検討した. リンパ節活性化反応を評価する本法での結果はヒトパッチテストやモルモット試験法での結果とよく一致した. SLNA法は試験物質の着色性に影響されず, 十分な感度をもつ優れた試験法であることがわかった.

**Keywords:** mouse, sensitization test, dye

Ikarashi, Y., Momma, J., Tsuchiya, T. and Nakamura, A.: **Evaluation of skin sensitization potential of nickel, chromium, titanium and zirconium salts using guinea-pigs and mice**

*Biomaterials*, 17, 2103~2108 (1996)

ニッケル, クロム, ジルコニウム及びチタン塩の感作性強度をモルモット Maximization 法及びマウスを用いたSLNA法により評価した. 感作及び惹起濃度から感作強度の順序を求めたところ, K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> > NiSO<sub>4</sub> > TiCl<sub>4</sub> > ZrCl<sub>4</sub> の順であった. これら金属塩間で交差反応は認めなかったことから, ニッケルアレルギーなどを有する患者はチタンなどが代替材料として用いられることを明らかにした.

**Keywords:** contact hypersensitivity, titanium, nickel

Nakaoka, R., Tsuchiya, T. and Nakamura, A.: **Studies on the tumor-promoting activity of polyethylene: in-**

**hibitory activity of metabolic cooperation of polyethylene films containing an antioxidant**

*J. Long-Term Effects Med. Implants*, 5, 253~262 (1995)

モデル酸化防止剤としてフェノール系化合物を含有したポリエチレンフィルムが細胞間連絡作用に与える影響を, 代謝協同阻害試験を用いて検討した. まず, 化合物に関して検討したところ, この化合物には阻害活性があることが認められた. 次に, フィルムから培地への溶出物に関して検討したところ, 化合物が非水溶性であるにもかかわらず, フィルム中の化合物含有量が増大するにしたがって溶出物の阻害作用が増強されることが明らかとなった. しかしながら, 化合物を含まないフィルムに関しては, 溶出物の阻害活性は認められないものの, その上で培養した細胞に対して代謝協同阻害活性があることが認められた. このことから, ポリエチレンの発癌プロモーター活性には, 添加物の種類や量だけでなくその表面特性が影響を与えることが示された.

**Keywords:** tumor-promotion, polyethylene film, metabolic cooperation assay

Nakaoka, R., Tabata, Y.\* and Ikada, Y.\*: **Antibody production by administration of biodegradable granules incorporating antigen through different injection routes**

*J. Controlled Release*, 40, 11~21 (1996)

モデル抗原であるオブアルブミン(OVA)を包含した生分解性高分子であるポリDL乳酸からなる微粉末を新規な方法で調製し, OVA徐放挙動を検討した. その結果, 微粉末からのOVAの放出は35日以上続くことが認められた. その微粉末をマウスに種々の方法で投与したあとの, OVA特異抗体の産生量変化をELISA法で検討したところ, 投与部位に関わらず, 抗原特異抗体の産生が長期にわたって増強された. これは, 投与部位に留まった微粉末からの抗原放出が長期間続いている上, その周囲での強い炎症反応により微粉末周囲の免疫系細胞の局所密度が大きいことによることが示唆された.

**Keywords:** immunological adjuvant, poly(DL-lactic acid) granule, antigen release

\* 京都大学生体医療工学研究センター

Nakaoka, R., Tabata, Y.\* and Ikada, Y.\*: **Production of interleukin 1 from macrophages incubated with poly(DL-lactic acid) granules containing ovalbumin.**

*Biomaterials*, 17, 2253~2258 (1996)

モデル抗原であるオブアルブミン(OVA)を包含した生分解性高分子であるポリDL乳酸からなる様々な微粉末を種々の条件で調製した. これらの微粉末をマウス腹腔内マクロファージと同時に培養し, 産生されるインターロイキン1(IL-1)の量を測定した. その結果, OVA含有微粉末を添加したところ, OVAと空の微粉末を混合して添加した場合と比較してIL-1の産生量は著しく増強されることが認められた. また, 微粉末によって誘導されたIL-1産生量は, OVAの初期放出量や添加された微粉末の量に影響を受けることが明らかとなった. これらのことから, OVA含有微粉末によるIL-1産生の増強には, マクロファージと微粉末が接触し, その近傍においてOVA放出が行われることにより, マクロファージが効率良く活性化された結果によることが示唆された.

**Keywords:** biodegradable granules, macrophage activation, protein release

\*京都大学生体医療工学研究センター

**Nakaoka, R., Inoue, Y.\*, Tabata, Y.\* and Ikada, Y.\*: Size effect on the antibody production induced by biodegradable microspheres containing antigen**

*Vaccine*, 14, 1251~1256 (1996)

液中乾燥法を用いてオプアルブミン (OVA) を包含したポリ乳酸微粒子を調製し、これらを細胞分画用エルトリエータを利用して種々の大きさに分画することができた。これらの粒子からの OVA の放出は、粒子径に関わらず、80 日以上にわたって認められた。これらの粒子をマウスに投与した後の OVA 特異抗体の産生を ELISA 法を用いて検討したところ、粒子径の減少にしたがって抗体産生は増強する傾向が認められた。このことは、粒子径の減少にしたがって投与される粒子数が増大し、粒子と抗原提示細胞との相互作用が生じ易いためだと考えられる。

**Keywords**: immunological adjuvant, poly(L-lactic acid) microspheres, size effect

\*京都大学生体医療工学研究センター

**Nakaoka, R., Tabata, Y.\* and Ikada, Y.\*: Adjuvant effect of biodegradable poly(DL-lactic acid) granules capable for antigen release following intraperitoneal injection**

*Vaccine*, 14, 1671~1676 (1996)

モデル抗原であるオプアルブミン (OVA) を包含した生分解性高分子であるポリ DL 乳酸からなる様々な微粉末を種々の条件で調製することで、種々の OVA 放出挙動をもつ微粉末を得た。これらの微粉末をマウス腹腔内に投与した後の OVA 特異抗体の産生量を ELISA 法で測定したところ、その粉末からの OVA 放出挙動に関わらず、いずれの微粉末の場合においても抗体産生量が増強されることが認められた。それに対して、抗体産生量は投与した微粉末量に影響され、その影響は微粉末を高分子のゲルからなるチューブ内に包含して埋入することでみられなくなった。これらのことから、微粉末による抗体産生の増強には、OVA が徐放されることが必須であるもののその徐放挙動による影響は小さく、投与された微粉末の量による影響が大きいことが明らかとなった。

**Keywords**: biodegradable granules, antigen release profile, antibody production

\*京都大学生体医療工学研究センター

**Tsuchiya, T. and Nakamura, A.: A new hypothesis of tumorigenesis induced by biomaterials: inhibitory potentials of intercellular communication play an important role on the tumor-promotion stage**

*J. Long-Term Effects Med. Implants*, 5, 233~242 (1995)

セグメント化ポリエーテルウレタンをモデル医用材料として、現在までに明らかになった腫瘍発生機構について、論じた。更に、我々の一連の研究結果から、医用材料で誘発される異物発癌において、ギャップ結合蛋白であるコネキシンの細胞間連絡機能が細胞/材料界面で破壊される活性強度が、異物発癌のプロモーション過程において重要な因子である仮説を提示した。

**Keywords**: biomaterials, tumor-promotion, gap-junctional intercellular communication

**Tsuchiya, T., Ikarashi, Y. and Nakamura, A.: Studies on the tumor-promoting activities of additives in biomaterials: inhibition of metabolic cooperation by addi-**

**tives such as pigments and phenolic antioxidants**

*J. Long-Term Effects Med. Implants*, 5, 243~252 (1995)

V79代謝協同阻害試験法を用いて、医療用材料等の添加物である色素のギャップ結合細胞間連絡阻害活性を調べた。6種の色素の中で、4種が阻害陽性反応を示した。sudan I 及び purple 201 は既知発癌プロモーターであるリトコール酸より低濃度で阻害作用を示すことが明らかになった。医療用材料中に含まれるオリゴマー、反応触媒、種々の添加物、材料表面特性等、材料による癌化を促進する可能性のある因子について論じた。

**Keywords**: tumor-promotion, pigments, gap-junctional intercellular communication

**Tsuchiya, T., Nakaoka, R., Degawa, H. and Nakamura, A.: Studies on the mechanisms of tumorigenesis induced by polyetherurethanes in rats: Leachable and biodegradable oligomers involving the diphenyl-carbamate structure acted as an initiator on the transformation of Balb 3 T 3 cells**

*J. Biomed. Mater. Res.*, 31, 299~303 (1996)

ポリエーテルウレタンのメタノール抽出物中に弱い発癌イニシエーション活性が検出された。ハードセグメントの部分モデル化合物は、Balb 3 T 3 細胞トランスフォーメーション試験でイニシエーション活性を示したが、ソフトセグメント構成ポリオールや、鎖延長剤では、活性は検出されなかった。

ガラスディッシュに発癌強度の異なるポリウレタン2種を半面コートし、トランスフォーメーション試験を行った結果、発癌強度の高い材料上で有意に高い形質転換活性が認められた。また、コート量を減少させると活性が消失した。従って、細胞と材料との直接の相互作用の結果、ポリウレタンが生分解をうけ、ハードセグメントによるイニシエーション作用が生じることを *in vitro* の結果から明らかにした。

**Keywords**: polyetherurethanes, hard segment, tumor-initiation

**Tsuchiya, T., Oguri, i., Nakajima Yamakoshi, Y. and Miyata, N.: Effects of [60]fullerene on the chondrogenesis in mouse embryonic limb bud cell culture system**

*Fullerene Sciences & Technology*, 4, 989~999 (1996)

ポリビニルピロリドンで水溶化した C<sub>60</sub> フラーレンが、マウス胎仔肢芽細胞の軟骨分化促進作用を示す事を明らかにした。高濃度フルーレンが誘発する細胞融解は、活性酸素スキベンジャーにより消失したことより、フルーレンは本実験条件下で活性酸素を産生し、高濃度存在下では細胞毒性の原因となる事を明らかにした。

**Keywords**: C<sub>60</sub> fullerene, mouse limb buds, chondrogenesis

**Tsuchiya, T., Oguri, i., Nakajima Yamakoshi, Y. and Miyata, N.: Novel harmful effects of [60]fullerene on the mouse embryos *in vitro* and *in vivo*.**

*FEBS Letters*, 393, 139~145 (1996)

C<sub>60</sub> フラーレンをポリビニルピロリドンで水溶化し、マウスの中脳細胞の分化培養系で試験した。フルーレンは神経分化及び増殖を強く阻害したが、溶媒コントロールであるポリビニルピロリドン単独よりも阻害活性は減弱していた。一方、マウス腹腔内へフルーレンを注入した結果、yolk sac 及び胎仔にフルーレンが移行し分布することが明らかになった。光学顕微鏡で観察した結果、マウスの神経管及び頭部に形態異常を生じている事、また、*in vitro* での結

果から、フラレンから産生される活性酸素がこれらの発生異常に関与している可能性を明らかにした。

**Keywords:** C<sub>60</sub>fullerene, neuronal differentiation, mid brain cells

Tsuchiya, T. and Nakamura, A.: **Research and regulatory situation of tissue engineering in Japan**

*Tissue Engineering*, 3, 105~108 (1997)

組織工学的手法を用いた人工臓器の開発研究が世界各国で行われており、欧米ではその市場化が現実のものとなっている。わが国ではそれらの医療用具を取り扱うためのガイドラインが現在ない。そこで、ガイドライン化にむけての問題点と基本的な枠組みについて述べた。

**Keywords:** tissue engineering products, safety, effectiveness

Hayashi, Y., Matsuda, R. and Poe, R.B.: **Probabilistic approach to confidence intervals of linear calibration**

*Analyst*, 121, 591~599 (1996)

同じ実験条件から得られた検量線のバラツキは検量線の信頼区間として表される。この論文では、実験値の標準偏差と理論的 (FUMI 理論により) に求めて検量線の信頼区間を計算する方法を示し、得られた信頼区間自体のバラツキが従来の方法より小さいことを示した。

**Keywords:** precision, calibration, confidence intervals

Shintani, H.: **Possibility of sterility resistance difference of microorganisms between biological indicator (BI) of one microorganism in single carrier and two microorganisms in single carrier**

*Biocontrol Science*, 2, 43~45 (1997)

生物指標 (BI) に関する国際規格 (ISO) である ISO11138 では 1 担体に多菌種添加した BI は個々の菌種間で干渉の影響が考えられるため除外された。この推察が正しいかどうかを確認するため個別と混在の菌で抵抗性 (D 値) が変化するかどうかを実験した。BI は 10<sup>6</sup> を有する *B. subtilis* 並びに *B. stearothermophilis* を個別並びに同一の濾紙に添加して作成した。BI 作成後 ISO11138-2 に従って滅菌した。個々並びに複合の *B. subtilis* の D 値は変化がなく、このことは抵抗性に影響が無いことを意味している。同様な結果が高圧蒸気滅菌で *B. stearothermophilis* の場合にも見られた。

**Keywords:** biological indicator, ethylene oxide sterilization, moist heat sterilization

新谷英晴: **イオン交換クロマトグラフィーによる人血清尿素の分析**

医科器械, 66, 414~416 (1996)

尿毒症に罹患すると血中に尿素等の尿毒症成分が蓄積するため、それらを除去する必要がある。その除去効果は血中尿素等を精度よく測定することによって行える。その目的のためには選択的分析法の開発が必要である。現在臨床検査で専ら用いられている尿素の分析にはイオン選択電極法、比色法、自動分析法等がある。これらの測定原理は尿素をウレアーゼでアンモニアにしアンモニアとして測るか (イオン選択電極法)、アンモニアを種々の試薬で発色させるか (例えばインドフェノール法)、専ら比色法を用いた自動分析機での測定、並びにトランスアミナーゼと補酵素 NAD を介して NADH の吸収 (340nm) で測定する方法等が用いられている。これらの方法を用いた場合、内因性アンモニアと尿素との分別分析が不可能な欠点がある。更に現在の臨床検査では結合型尿素と遊離型尿素との分別分

析が考慮されていない。遊離型尿素のみを特異的に測定する必要がある。以上の目的のために尿素分析を種々検討した結果、イオン交換クロマトグラフィーで血清尿素と夾雑成分並びに内因性アンモニアとの分別分析が達成された。選択的な遊離型尿素の分析は限外ろ過で達成された。

**Keywords:** urea, ion exchange chromatography, uremia

Shintani, H.: **Factors in the pretreatment of biological indicators that affect the decimal reduction time**

*Biomedical Instrumentation Technology*, 30, 449~453 (1996)

生物指標 (BI) に関する現行の国際標準化機構 (ISO) ドキュメント 11138 は BI 作成の菌懸濁液、菌担体並びに回収培養培地に関して具体的な記述が不十分である。BI の D 値に菌懸濁液、菌担体並びに菌培養培地が影響を与える可能性がある。菌懸濁液、菌担体並びに菌培養培地の個々の影響に関しては報告されているが、D 値に対するこれらの複合の影響に関しては報告されておらず、著者は既に報告されているのと異なり個々の因子の影響を認めることが出来なかった。乾燥時の菌懸濁液からの結晶と微生物を取り込む担体の孔との複合作用が滅菌を阻害したと推察される。培養培地の組成により D 値が異なり、それゆえ CD 14161 のソイビーンカゼインダイジェストの組成が正確な D 値を得るのに適当かどうかを確認する必要がある。

**Keywords:** biological indicator, ethylene oxide sterilization, ISO/TC198

Isozaki T.\*, Morita Y.\* and Matsumura T.: **Direct determination of lead in suspended particulate matter in air tungsten furnace-atomic absorption spectrometry with punching technique**

*Analytical Sciences*, 12, 755~759 (1996)

空気中の微量の鉛を原子吸光度法を用いて検討した。本法は空気中の粒子状鉛を low volume air sampler を用いてニトロセルロースフィルターに捕集する。捕集後、フィルターを直径 2 mm の大きさにパンチでくりぬき試料とする。この試料をタングステン炉にセットする。ついで塩化パラジウム溶液 (パラジウムとして 1 µg) を添加後、300°C で 30 秒乾燥、1000°C で 30 秒間灰化する。ついで、2000°C で 2 秒間原子化し、283.3nm でピークエリアを測定する。本法の変動係数は 14.3%、最小検出濃度は 0.035 µg/m<sup>3</sup> である。

**Keywords:** direct determination, lead, suspended particulate matter

徳永裕司, 木嶋敬二, 安藤正典: **サリチル酸を透過指標物質とする界面活性剤のモルモット剥離皮膚への影響**

医薬品研究, 27, 606~612 (1996)

モルモットの剥離皮膚に対する 6 種類のアニオン性界面活性剤、8 種類のカチオン性界面活性剤及び 13 種類のノニオン性界面活性剤の影響をサリチル酸 (SA) の皮膚透過速度を指標として検討した。アニオン性あるいはカチオン性界面活性剤で剥離皮膚を処理した時、界面活性剤の一番長い脂肪族炭化水素の炭素数が 12 あるいは 14 の場合に最も大きな SA の透過速度を与え、既に報告したメチルパラベンとの透過と非常によく相関関係を示した。ノニオン性界面活性剤の親水性親油性バランスと SA の透過速度の間に相関関係は認められなかった。

**Keywords:** salicylic acid, surfactant, skin permeation

内野 正, 徳永裕司, 安藤正典: **ヘマトポルフィリン-**

### UVA 増感による 3 次元培養細胞 (Skin<sup>2</sup>) 中の過酸化脂質含量への影響

化粧品誌, 20, 259~264 (1996)

UVA の生体影響を予測するために 3 次元培養細胞 (Skin<sup>2</sup>) に光増感剤であるヘマトポルフィリン (HP) 存在下 UVA (350 - 380nm) を照射し細胞の生存率及びスクワレンモノヒドロペルオキシド (SQOOH) と 2-thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS) 含量に与える影響を検討した。その結果、HP 非存在下では細胞毒性及び SQOOH, TBA-RS 含量の有意な増加は見られなかったが、HP 存在下では濃度依存的に細胞毒性及び SQOOH, TBA-RS 含量の有意な増加が見られた。これらの結果から、UVA 照射により生じた<sup>1</sup>O<sub>2</sub>により生成した SQOOH と、これより生じた TBA-RS が細胞毒性に関与していることを示唆した。

**Keywords:** UVA, Skin<sup>2</sup>, hematoporphyrin

### Uchino, T., Tokunaga, H. and Ando, M.: Effects of UV-sensitization of hematoporphyrin on lipid hydroperoxides in erythrocytes and on their hemolysis

*Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, 43, 101~107 (1997)

前報においてヘマトポルフィリン-UVA 増感による赤血球中の過酸化脂質含量及び溶血への影響について報告したが、今回は UVB 照射時において同様に検討を行い UVA 照射時との比較を行った。その結果、溶血に先立って過酸化脂質含量の増加が起こり、また UVB 照射時には phosphatidylethanolamine hydroperoxide (PEOOH) 及び 2-thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS) 含量が UVA 照射時より早く増加することを明らかにした。また抗酸化剤を添加し、UVA 及び UVB 照射時の溶血への影響について検討した結果、<sup>1</sup>O<sub>2</sub>阻害剤であるアジ化ナトリウムやヒスチジンはいずれも溶血を阻害したが OH ラジカル消去剤のマニトールやソルビトールは UVB 照射時は溶血を阻害しなかった。これらの結果から、UV 照射によって生じた<sup>1</sup>O<sub>2</sub>が赤血球膜脂質を過酸化し、それが自動酸化反応によってある一定レベル以上に増大して溶血にいたることを示唆した。

**Keywords:** UVA, UVB, hematoporphyrin

### Hanioka, N., Omae, E.\*<sup>1</sup>, Nishimura, T., Jinno, H., Onodera, S.\*<sup>2</sup>, Yoda, R.\*<sup>1</sup> and Ando, M.: interaction of 2,4,4'-trichloro-2'-hydroxydiphenyl ether with microsomal cytochrome P450-dependent monooxygenases in rat liver

*Chemosphere*, 33, 265~276 (1996)

2,4,4'-トリクロロ-2'-ヒドロキシジフェニルエーテル (Irgasan DP300) の毒性発現機構を解明するための一環として、*in vitro* 系におけるシトクロム P450 依存性酵素活性に及ぼす Irgasan DP300 の影響について検討した。3-メチルコランズレン、フェノバルビタール、ピリジン、デキサメタゾン及びクロフィブレートでそれぞれ処理したラット肝ミクロゾームに Irgasan DP300 を添加し、6 種類のシトクロム P450 依存性酵素活性を測定した。フェノバルビタール処理ラット肝ミクロゾームの 7-ペントキシレゾルフィン O-ペンチラーゼ活性は、Irgasan DP300 により非競合的に強く阻害された (Ki=1.48mM)。また、フェノバルビタール処理ラット肝ミクロゾームのフェナセチン O-デエチラーゼ及び p-ニトロフェノールヒドロキシラーゼ活性も Irgasan DP300 により競合的あるいは非競合的に阻害され、それらの Ki は、他の肝ミクロゾームより低かった。以上の結果より、Irgasan DP300 は、CYP 2B サブファミリーシトクロム P450 分子種と何らかの相互作用を起こし、

このシトクロム P450 分子種が Irgasan DP300 の代謝及び毒性に関与していることが示唆された。

**Keywords:** Irgasan DP300, cytochrome P450, liver microsomes

\*<sup>1</sup> 共立薬科大学

\*<sup>2</sup> 東京理科大学

### Hanioka, N., Jinno, H., Nishimura, T. and Ando, M.: Effect of 2,4,4'-trichloro-2'-hydroxydiphenyl ether on cytochrome P450 enzymes in the rat liver

*Chemosphere*, 34, 719~730 (1997)

2,4,4'-トリクロロ-2'-ヒドロキシジフェニルエーテル (Irgasan DP300) の毒性発現機構を解明するための一環として、ラットに Irgasan DP300 (0.2, 0.4 及び 0.8mmol/kg) を 1 日 1 回 4 日間腹腔内投与し、シトクロム P450 に及ぼす Irgasan DP300 の影響について検討した。CYP 2B1/2 依存性酵素である 7-ベンジルオキシレゾルフィン O-デベンジラーゼ及び 7-ペントキシレゾルフィン O-ペンチラーゼ活性は、Irgasan DP300 投与により用量依存的に増加した (5.6~22.3 倍及び 4.9~20.2 倍)。また、抗ラット CYP 2B1/2 抗体を用いたウエスタンブロッティングからも、Irgasan DP300 による CYP 2B1/2 タンパクの顕著な誘導が認められた。しかし、Irgasan DP300 は、他のシトクロム P450 分子種 (CYP 1A1/2, CYP 2C11/6, CYP 2E1, CYP 3A2/1 及び CYP 4A1) にはほとんど影響を与えず、Irgasan DP300 の毒性には CYP 2B サブファミリーシトクロム P450 分子種が何らかの形で関与していることが示唆された。

**Keywords:** Irgasan DP300, cytochrome P450, liver microsomes

### Hanioka, N., Omae, E.\*<sup>1</sup>, Yoda, R.\*<sup>1</sup>, Jinno, H., Nishimura, T. and Ando, M.: Effect of trichloroethylene on cytochrome P450 enzymes in the rat liver

*Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 58, 628~635 (1997)

トリクロロエチレンの毒性発現機構を解明するための一環として、ラットにトリクロロエチレン (400, 800 及び 1200 mg/kg) を 1 日 1 回 4 日間腹腔内投与し、シトクロム P450 に及ぼすトリクロロエチレンの影響について検討した。ラウリン酸 w-ヒドロキシラーゼ活性は、いずれの投与量のトリクロロエチレンでも有意に増加し、その誘導率は、対照群ラットの 2.9~3.0 倍であった。また、p-ニトロフェノールヒドロキシラーゼ及びテストステロン 6b-ヒドロキシラーゼ活性もトリクロロエチレンにより用量依存的に増加した。しかし、テストステロン 2a-ヒドロキシラーゼ活性は、1200mg/kg トリクロロエチレンで有意に低下した。更に、抗ラットシトクロム P450 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行ったところ、トリクロロエチレン投与による CYP 4A1 タンパクの顕著な誘導が認められた。また、トリクロロエチレン投与による CYP 2E1, CYP 3A2/1 タンパクの増加及び CYP 2C11/6 タンパクの減少も認められた。以上の結果より、トリクロロエチレンの毒性は、常在性シトクロム P450 分子種の変動により発現することが示唆された。

**Keywords:** trichloroethylene, cytochrome P450, liver microsomes

\* 共立薬科大学

### Watanabe, K.\*<sup>1</sup>, Toyoda, M., Hashimoto, H.\*<sup>2</sup>, Nakagawa, K.\*<sup>2</sup>, Nakamura, K.\*<sup>3</sup>, Yabusaki, Y.\*<sup>3</sup>, Tanimura, A.\*<sup>1</sup> and Saito, Y.: Expression of 135-kDa insecticidal protein

**gene from *Bacillus thuringiensis* in the yeast *Saccharomyces cerevisiae****Biosci. Biotech. Biochem.*, 60, 1483~1485 (1996)

*Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* は130-kDa 及び135-kDa (CryIA (a)) の殺虫蛋白質を生産する。 *Saccharomyces cerevisiae* を CryIA (a) 遺伝子含有ベクターで形質転換した場合、遺伝子の発現はなかった。そこで開始コドンの5'上流域を合成オリゴヌクレオチドで置換した場合、CryIA (a) 蛋白質は酵母中で成功裏に発現した。CryIA (a) 蛋白質を含む酵母抽出液は *Plutella xylostella* 幼虫に対し殺虫活性を示すことが分かった。

**Keywords:** *Bacillus thuringiensis*, insecticidal protein, yeast\*<sup>1</sup> 昭和女子大学\*<sup>2</sup> ニッカウイスキー生産技術研究所\*<sup>3</sup> 住友化学工業生命工学研究所**Suzuki, T., Yamada, H.\*<sup>1</sup>, Yamamoto, I.\*<sup>2</sup>, Nishimura, K.\*<sup>2</sup>, Kondo, K., Murayama, M. and Uchiyama, M.: Chemical species of organotin compounds in seawater and their seasonal variations***J. Agric. Food Chem.*, 44, 3989~3995 (1996)

トリ-*n*-ブチルスズ及びその分解物を横須賀市、油壺湾の最も深い位置に存在するマリーナにおいて1994年7月から1995年の8月にかけて測定した。トリブチルスズ及びジブチルスズの水酸化体、オキソ体、カルボキシル誘導体が夏期に生ずることが確認された。他のシーズンでは存在したとしても極く微量であった。これらの構造はGC/MIP/AED並びに4本のカラムを用いて合成標品との比較により確認した。1992年から1995年にかけての海水中の分解物のパターンと同一海域に棲息する牡蠣のパターンとは極めて類似していた。このことはトリブチルスズ化合物は夏期に増加する微生物によって分解されることを示唆する。

**Keywords:** seawater, seasonal variation, organotin compounds\*<sup>1</sup> 水産庁中央水産研究所\*<sup>2</sup> 北海道立衛生研究所**Yamamoto, I.\*<sup>1</sup>, Nishimura, K.\*<sup>1</sup>, Suzuki, T., Takagi, K., Yamada, H.\*<sup>2</sup>, Kondo, K. and Murayama, M.: Accumulation, transformation, and elimination of bis (tri-*n*-butyltin) oxide in red sea bream, *Pagrus major*, under laboratory conditions***J. Agric. Food Chem.*, 45, 1437~1446 (1997)

マダイ (*Pagrus major*) をビス (トリ-*n*-ブチルスズ) オキシド (TBTO) に実験室下に曝露し、筋肉、肝臓、鰹、消化管における蓄積、代謝、排泄について観察した。筋肉中ではトリ-*n*-ブチルスズクロリド (TBTC) 及びジ-*n*-ブチルスズクロリド (DBTC) のみが検出され、TBTO 処理後8週後には有機スズの96%以上をTBTCが占めていた。これらの化合物以外に、TBTC並びにDBTCの水酸化体、カルボン酸、及びオキソ体が肝臓、鰹、消化管に見いだされた。マダイの肝臓における代謝パターンは哺乳類のそれとは著しく異なるが、鰹、消化管との間で良く似ており、また以前に確認した自然環境下で採取した魚のパターンと一致した。

**Keywords:** TBTO, metabolism, elimination\*<sup>1</sup> 北海道立衛生研究所\*<sup>2</sup> 水産庁中央水産研究所**Murayama, M., Dasgupta, P. K.\*: Liquid chromatographic determination of nitro-substituted polynuclear aro-****matic hydrocarbons by sequential electrochemical and fluorescence detection***Anal. Chem.*, 68, 1226~1232 (1996)

ニトロ多環芳香族化合物の高速液体クロマトグラフィーによる分析法を確立した。クロマトグラフィーにより分離されたニトロ多環芳香族化合物を電気化学検出器により還元し、生じたアミノ多環芳香族化合物を蛍光検出器により測定した。定量は蛍光により行い、定性は電気化学及び蛍光のピークの保持時間が一致すること、また電気化学反応を行わないとき、蛍光が現れないことを利用して行った。9種類のニトロ多環芳香族化合物標準品について測定した結果、定量下限(S/N=3)は0.75~4.5pmolであり、RSD (n=8)は30pmolにおいて1.3~5.3%であった。ディーゼルエンジンの排気ガス中の粒子を集め、本法によりニトロ多環芳香族化合物の分析を行った結果、9-nitroanthraceneを検出した。

**Keywords:** nitro-substituted polynuclear aromatic hydrocarbons, electrochemical detector, fluorescence detector

\* Texas Tech University

**藤田和弘\*, 伊藤嘉奈子\*, 高山正彦\*, 丹野憲二\*, 村山三徳, 齋藤行生: プロポリス中の残留テトラサイクリン系抗生物質の分析法**

食衛誌, 37, 222~225 (1996)

プロポリス中のテトラサイクリン系抗生物質の分析法について検討した。0.001 M EDTA-2 Na 含有5%クエン酸溶液で抽出し、ヘキササン及びジエチルエーテルで洗浄した後、Sep-Pak Plus PS 2で精製し、更にプロポリス由来の抗菌性成分を除去するためにポリアミド樹脂により精製を行った。定量は円筒平板法による微生物学的方法を用い、同定はマイクロバイオオートグラフィーにより行った。平均回収率はオキシテトラサイクリン97.6%、テトラサイクリン92.7%、クロルテトラサイクリン86.3%であった。検出限界はオキシテトラサイクリン及びテトラサイクリン0.1 ppm、クロルテトラサイクリン0.02ppmであった。

**Keywords:** propolis, tetracycline, microbiology assay

\* 日本食品分析センター

**藤田和弘\*, 伊藤嘉奈子\*, 荒木恵美子\*, 丹野憲二\*, 村山三徳, 齋藤行生: 畜水産食品中の残留オキシテトラサイクリンの分析法**

食衛誌, 38, 12~15 (1997)

畜水産食品中のオキシテトラサイクリンの分析法について検討を行った。0.01M EDTA-2 Na 含有マッキルベイン緩衝液(pH4.0)で抽出し、ヘキササン洗浄した後、Sep-Pak Plus PS 2で精製し、HPLCにより定量する方法を確立した。本法による測定結果は微生物学的試験法と高い相関が認められ、本法による食品衛生法の残留基準値レベルでの平均回収率は90.4%であり、定量下限は肉、魚介類、牛乳中で0.02ppm、肝臓、腎臓、鶏卵中で0.04ppm、脂肪中で0.002ppmであった。

**Keywords:** oxytetracycline, microbiology assay, HPLC

\* 日本食品分析センター

**Goda, Y., Shimizu, T.\*<sup>1</sup>, Kato, Y.\*<sup>1</sup>, Nakamura, M.\*<sup>1</sup>, Maitani, T., Yamada, T., Terahara, M.\*<sup>2</sup> and Yamaguchi, M.\*<sup>2</sup>: Two acylated anthocyanins from purple sweet potato, *Ipomoea batatas****Phytochemistry*, 44, 183~186 (1997)

サツマイモ (*Ipomoea batatas*) の根より2つの新規アシル化アントシアニンを単離した。各種機器分析の結果より

これらの化合物を cyanidin と peonidin の 3-O-(6-O-trans-caffeoyl-2-O-β-glucopyranosyl-β-glucopyranoside)-5-O-β-glucoside と同定した。

**Keywords:** *Ipomoea batatas*, purple sweet potato, acylated anthocyanin

\*<sup>1</sup> 三栄源エフ・エフ・アイ (株)

\*<sup>2</sup> 南九州大学園芸学部

Yamada, M.\*, Nakamura, M.\*, Yamada, T., Maitani, T. and Goda, Y.: **Structural determination of unknown subsidiary colors in Food Yellow No. 5 (Sunset Yellow FCF)**

*Chem. Pharm. Bull.*, 44, 1624~1627 (1996)

食用黄色 5 号中の主付随色素 2 種の単離を行い、各種機器分析の結果から、付随色素 A, B の構造を、それぞれ trisodium salt of 6-hydroxy-7-(4-sulfophenyl)-5-(4-sulfophenylazo)-2-naphthalenesulfonic acid, disodium salt of 3-hydroxy-4-(4-sulfophenylazo)-2-naphthalenesulfonic acid と決定した。

**Keywords:** Food Yellow No. 5, Sunset Yellow FCF, subsidiary color

\* 三栄源エフ・エフ・アイ(株)

Goda, Y., Noguchi, H.\*, Maitani, T., Takeda, M. and Sankawa, U.\*: **Structural determination of bixin by nuclear magnetic resonance spectroscopy**

*Jap. J. Food Chem.*, 3, 27~29 (1996)

最も著名な天然着色料の一つであるアナトー色素の主色素成分ビキシンは、9つの二重結合のうち、1カ所(Z)構造をとることが知られている。本研究では、天然添加物の規格作成のための基礎的研究として、HMBC スペクトル測定を行い、(Z)二重結合が、既報で推定されていた位置(16位)で間違いないことを確認した。更に、主に本測定で得られた情報から、<sup>13</sup>C-NMR スペクトルの帰属を行った。これまで、ビキシンの全(E)異性体は、色々な名前前で呼称されてきたが、今後は、異性の位置を確定出来る(16E)-ビキシンの名称を用いることが好ましいものとする。

**Keywords:** bixin, annatto, *Bixa orellana*

\* 東京大学薬学部

山田真記子\*, 中村幹雄\*, 山田 隆, 米谷民雄, 合田幸広: **食用黄色 5 号中の副成色素, 原料物質及び反応中間体の実態調査**

日食化誌, 3, 151~155 (1996)

HPLC を用い、食用黄色 5 号中の副成色素, 原料物質及び反応中間体の実態調査を行った。その結果市販色素は、副成色素の存在パターンで、すべての副成色素が少ないもの、副成色素 A が多いもの、副成色素 B が多いもの、どの副成色素も比較的多いもの、特に RS-SA が多いものの 4 つのタイプに分類されることが判った。

**Keywords:** Food Yellow No. 5, Sunset Yellow FCF, HPLC

\* 三栄源エフ・エフ・アイ(株)

清水孝重\*, 市 隆人\*, 岩淵久克\*, 加藤喜昭\*, 合田幸広: **赤ダイコン (*Raphanus sativus* L.) の色素成分の化学構造**

日食化誌, 3, 5~9 (1996)

赤ダイコン色素の詳細な成分研究を行い、HPLC 及び LC/MS の結果から主色素成分として 8 種の色素があることを明らかにした。これらの色素成分のアグリコンはすべて pelargonidin で、この内 2 成分の構造を、5-O-β-glucopyra-

nosyl-pelargonidin 6-O-ferulyl-(2-O-(β-glucopyranosyl)-3-O-β-glucopyranoside) 及び、5-O-β-glucopyranosyl-pelargonidin 6-O-ferulyl-(2-O-(6-O-ferulyl-β-glucopyranosyl)-3-O-β-glucopyranoside) と決定した。

**Keywords:** *Raphanus sativus*, acylated anthocyanin, red radish pigments

\* 三栄源エフ・エフ・アイ(株)

Akiyama, H., Chen, D., Miyahara, M., Toyoda, M. and Saito, Y.: **Simple HPLC determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in nuts and corn**

*J. Food Hyg. Soc. Japan*, 37, 195~201 (1996)

ナッツ類とトウモロコシにおけるアフラトキシン B1, B2, G1, G2 の迅速、高感度な簡易分析法を作成した。その方法は、試料からアセトニトリル-水 (9:1, V/V) で抽出し、多機能固相抽出カラムにより精製し、蛍光検出 HPLC 法により分析するものである。確立された方法により有機塩素系の溶媒を使用しないで分析が可能となった。ナッツ類、トウモロコシへアフラトキシン B1, B2, G1, G2 を各 10ppb 添加した際の平均回収率は、各々 92.3%, 93.0%, 93.9%, 90.3% であった。ピーナッツにおけるアフラトキシン B1 の検出限界は 0.01ng/g であった。

**Keywords:** aflatoxins, solid phase extraction, nuts

Akiyama, H., Teshima, R., Akasaka, R., Fujimari, K., Goda, Y., Sawada, J. and Toyoda, M.: **Quantitative evaluation of passive cutaneous anaphylaxis (PCA) using a hand-held spectrophotometer**

*Biol. Pharm. Bull.*, 19, 1112~1114 (1996)

抗 TNP-IgE と TNP-BSA によって生じるラット PCA の定量的評価に分光測色計を用いた。分光測色計によって得られた値 (ΔE\*ab) と血清希釈液との間には良い相関性が得られた。また、ΔE\*ab の値と従来法である比色によるエバンスブルーの定量値の間に良い相関性が示された。本法は迅速で客観的に測定可能であり、従来法の代替法として有用であると思われる。

**Keywords:** passive cutaneous anaphylaxis (PCA), spectrophotometer, immediate-type hypersensitivity

Akiyama, H., Toyoda, M., Kato, M.\*, Igimi, S.\* and Kumagai, S.\*: **The degradation of several mycotoxins by human intestinal microflora cultured by continuous flow culture system**

*Mycotoxins*, 44, 21~27 (1997)

オクラトキシン A, パツリン, ゼアラレノン, シトリニン, アフラトキシン B1, フモニシン B1 及びフモニシン B2 のヒト腸内フローラによる影響を調査した。健康人糞便から得たヒト腸内フローラは、連続流動培養装置によって培養された。培養された腸内フローラと各 7 種マイコトキシンを 8 時間培養した後、各マイコトキシンを分析し、その回収率から分解性を検討した。その結果、オクラトキシン A とフモニシン B1 及び B2 は培養腸内フローラにより部分的な分解性を示唆した。

**Keywords:** human intestinal microflora, continuous flow culture system, ochratoxin A

\* 国立予防衛生研究所 (現: 国立感染症研究所)

石綿 肇, 西島基弘\*, 深澤喜延\*, 伊藤誉志男\*, 山田 隆: **日本における食品 (1994 年度) 中のソルビン酸濃度の実態及びそれに基づいた摂取量の推定**

食品衛生学雑誌, 37, 378~384 (1996)

1994年度の全国92自治体による食品の行政検査の結果を基にソルビン酸の使用実態と推定摂取量を求めた。検査件数は38,133検体、ソルビン酸の使用が許可されている食品からの検出率は53.9%、平均濃度は使用基準値の16.2%であった。基準値に最も近い濃度を示した食品は酢漬けの漬物で、基準値(0.5g/kg)の39.0%であった。使用対象外の食品では、対象外の漬物等で検出されたが、缶・ビン詰め、各種調味料、麺類等では検出されなかった。食品中の濃度に食品の摂取量を乗じて推定摂取量を算出したところ、29.0mg/日/人であった。魚肉ねり製品からの摂取量が最も高かった。

**Keywords** : sorbic acid, concentration in food, daily intake

\*1 東京都立衛生研究所

\*2 山梨県衛生公害研究所

\*3 武庫川女子大学薬学部

鈴木 仁<sup>\*1</sup>, 奥本千代美<sup>\*1</sup>, 勝木康隆<sup>\*1</sup>, 友松俊夫<sup>\*1</sup>, 田村行弘<sup>\*1</sup>, 伊藤誉志男<sup>\*2</sup>, 石綿 肇, 山田 隆, 西島基弘<sup>\*1</sup>: **UV 検出イオンクロマトグラフィーによる野菜及び鶏卵に使用された亜塩素酸ナトリウムの分析と水浸漬効果**

食品衛生学雑誌, 38, 22~26 (1997)

野菜及び鶏卵に使用された亜塩素酸ナトリウムの分析法を検討した。試料を水浸漬し、得られた浸漬液を ODS カートリッジに通したものを試験溶液とした。試験溶液は、カラムに TSKgel IC-Anion-PW<sub>50</sub>PEEK, 溶離液に 1 mmol/l ホウ酸塩緩衝液を用いたイオンクロマトグラフィーにより分析した。水浸漬液に標準添加したときの回収率は90%以上であり、検出限界は試料濃度で 1 mg/kg であった。また、水浸漬による残留亜塩素酸ナトリウムの洗浄効果が大きいことが判明した。

**Keywords** : sodium chlorite, UV-ion chromatography, residue in food

\*1 東京都立衛生研究所

\*2 武庫川女子大学薬学部

Ishiwata, H., Sugita, T. and Takeda, M.: **Enzymatic and non-enzymatic degradation of melamine resin products used for food contact ware**

*Jpn. J. Food Chem.*, 3, 145~150 (1996)

メラミン樹脂製の食器を粉碎したもの及び食器用の未硬化メラミン樹脂コンパウンド(粉末)を0.1mol/lリン酸緩衝液(pH4.5)中40℃でセルラーゼを48時間作用させたところ、コンパウンドではグルコースとして603ppm、コップ粉末では88ppmの糖が遊離した。遊離糖のHPLC分析を行ったところ、主成分はグルコースで、セロビオースは見られなかった。このとき、ホルムアルデヒドとメラミンモノマーの増加が認められたが、セルラーゼによる促進は認められなかった。コップ粉末での48時間後におけるこれら3種類の遊離モノマーの合計は原料の約3%であった。これらの結果により、メラミン樹脂は、自然環境下で酵素的、非酵素的に徐々に分解されることが示された。

**Keywords** : melamine resin, biodegradation, cellulase

Maitani, T., Kubota, H. and Yamada, T.: **Distribution profiles of sulfur in caramel colours on a gel-filtration column studied by HPLC-ICP**

*Food Additives and Contaminants*, 13, 1001-1008 (1996)

天然着色料のカaramelにおいては、カaramelⅣのように、亜硫酸化合物を加えて熱処理されるものがある。加えられた亜硫酸化合物がカaramel色素本体中のどのような画

分に結合して存在しているかを調べる目的で、市販のカaramelⅠ,Ⅲ,Ⅳにおけるイオウの分子量分布を、ゲルろ過カラム装着のHPLC-真空型ICP直結法で調べた。カaramel製品中のイオウ濃度に相応して、カaramelⅢでは小さなイオウピークが検出されたが、カaramelⅠではイオウのピークは検出されなかった。一方、カaramelⅣにおいては、高分子として存在するカaramel色素本体の画分において、イオウが連続的に分布していた。その画分中の炭素/イオウのモル比が14~25であったことから、もとのヘキサース2~4分子に1分子のイオウが結合していると考えられた。他方、イオウは着色に関係のない低分子画分においても多量に存在し、その量は色素本体に結合した量の倍以上であった。

**Keywords** : caramel, sulfur, sulfite compounds

Maitani, T., Suzuki, T., Iwasaki, K., Kubota, H. and Yamada, T.: **Comparative hepatotoxicity of aluminum administered with maltol and kojic acid to mice**

*Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, 42, 241~247 (1996)

マルトールは着色料として用いられる合成添加物であるが、アルミニウムをマルトールと共に投与すると、アルミニウムの脳神経細胞毒性が増強されることが知られている。一方、アルミニウムをマルトールと共に静脈内投与すると第一に肝に移行する。そこで、アルミニウム-マルトールの毒性を調べる目的で、アルミニウムをマルトール及びマルトールに構造が類似した天然添加物のコウジ酸と共にマウスに静脈内投与し、それらの肝毒性を比較した。アルミニウム:マルトール=1:4のモル比で、0.25mmol Al/kgの用量で投与した場合には、1:2のモル比やアルミニウム単独にくらべ肝中アルミニウム濃度が低いにもかかわらず、血漿中AST及びALT活性が有意に高く、また、肝中イオウ濃度の減少が認められた。HPLC-ICP法による分析の結果、肝中イオウの減少はタウリンの減少と対応していた。同時に、尿中タウリンレベルの上昇が認められた。アルミニウム単独、マルトール単独、アルミニウム:コウジ酸=1:4では、AST、ALT活性の上昇や、肝中必須元素レベルの変化は認められなかった。以上の結果から、tris(maltolato)aluminum(Ⅲ)は肝毒性も有すると考えられた。

**Keywords** : aluminum, maltol, kojic acid

米谷民雄, 久保田浩樹, 岩崎京子, 山田 隆: **天然添加物中の鉛を重金属試験法により評価する際の共存必須重金属の影響**

食品衛生学雑誌, 37, 210~214 (1996)

いわゆる日持向上剤として市販されている天然添加物中の重金属を分析したところ、Pbはすべての品目で3µg/g以下であったが、ペーパー抽出物ではCuが10µg/g以上、ペクチン分解物ではFeが200µg/g以上含まれていた。Cu又はFeが多量検出された品目について、重金属試験法への影響を調べたところ、PbとCuが最高値を示したペーパー抽出物では、規格値を20µg/gと仮定した比較液より濃くはなかったが、明らかに黒い呈色が認められた。Cu 100µgの呈色がPb 40µgに相当したことから、この呈色には、Cuの方が大きく寄与すると考えられた。HPLC-ICP法により、ペクチン分解物におけるFeの存在状態を調べた結果、主成分と結合して存在する可能性が考えられた。天然添加物中には、多種多量の金属が含まれる可能性があるため、有害金属の規格としては、Pb単独、重金属、ヒ素の各規格が必要と考えられた。

**Keywords** : lead, Heavy Metals Limit Test, natural food addi-

tives

清水孝重\*, 川原章弘\*, 中村幹雄\*, 加藤喜昭\*, 合田幸広, 米谷民雄: **食品中からのアントシアニン系色素の分析法**

日本食品化学学会誌, 3, 10~20 (1996)

天然着色料の市場でアントシアニン系色素は重量で約12%を占めている。しかし、簡略名又は類別名として「アントシアニン」や「アントシアニン色素」の名称が使用できるため、表示のみから色素を特定することは困難である。そこで、食品中からのアントシアニン系色素の分析を企図した。最初に、LC-ESI-MS及びフォトダイオードアレイ検出器を用いて、アントシアニン系色素の定性を行った。用いた試料はアカキャベツ色素、ムラサキイモ色素、ムラサキトウモロコシ色素、シソ色素、エルダーベリー色素、ボイセンベリー色素、ブドウ果皮色素、ブドウ果汁色素、ストロベリー色素である。ついで、モデル実験系(飲料、キャンディー、ゼリー)で添加回収実験を行ったところ、ブドウ果皮色素でかつLC-ESI-MSを用いた場合(40.9~45.0%)を除いては、良好な結果が得られた。更に、市販食品でアントシアニン系色素の品名が表示された食品やアントシアニン色素と表示された食品について、色素の定性/定量を行った。違反事例は認められなかった。

**Keywords**: anthocyanin color, food, LC-ESI-MS

\* 三栄源エフ・エフ・アイ株式会社

石川恵子\*<sup>1</sup>, 三柴啓一郎\*<sup>1</sup>, 藤田 毅\*<sup>2</sup>, 佐藤恭子, 三位正洋\*<sup>1</sup>: **異なる2種のビート毛状根における増殖とベタレイン含量の変化**

日本食品化学学会誌, 3, 43~46 (1996)

ビート (*Beta vulgaris* L.)の色素成分は赤紫色のベタニン系色素 (BC) と黄色のベタキサンチン系色素 (BX) からなり、これらの色素成分は総称してベタレインと呼ばれている。異なる2種のビート (デトロイトダークレッド (dd) 及び系統 C110) 毛状根を1/2Murashige-Skoog 液体培地にて培養し、増殖と BC 及び BX 含有率を調べた。培養1カ月で dd 毛状根は初期植え込み新鮮重の1800倍、C110 毛状根は1300倍に増加した。また、増殖に伴い、BC, BX 含量は増加し、定常期には最高値に達した。BC 含有率の最高値は2種で同様であったが、BX 含有率は C110 毛状根では dd 毛状根の半分であった。また、C110 毛状根では、BX の培養初期における含有率の急増はみられず、更に両色素の増加がより緩やかであった。この2種の毛状根では、ベタレイン合成の制御が異なることが示され、この合成系を研究する上で有用な材料であることが示された。

**Keywords**: *Beta vulgaris* L., betalain, hairy root cultures

\*<sup>1</sup> 千葉大学園芸学部

\*<sup>2</sup> 三栄源エフ・エフ・アイ株式会社

Sato, K., Kubota, H., Goda, Y., Yamada, T. and Maitani, T.: **Glutathione enhanced anthraquinone production in adventitious root cultures of *Rubia tinctorum* L.**

*Plant Biotechnology*, 14, 63~66 (1997)

セイヨウアカネ培養不定根におけるフィトケラチン (クラスⅢメタロチオネイン) 誘導とアントラキノン色素 (AQ) 産生に対する塩化銅とグルタチオン (GSH) の影響を調べた。銅イオン (100 $\mu$ mol/l) をインドール酢酸及びカイネチンを含む Murashige-Skoog 液体培地に添加した場合、GSH (2 mmol/l) の有無に関わりなく、フィトケラチンが誘導され、AQ 産生が増加した。GSH 単独添加では、フィトケラチンは誘導されなかったが、AQ 産生が顕著に増加

した。

**Keywords**: glutathione, anthraquinone, phytochelatin

Sato, K., Goda, Y., Sakamoto, S. S., Shibata, H., Maitani, T. and Yamada, T.: **Identification of major pigments containing D-amino acid units in commercial *Monascus* pigments**

*Chem. Pharm. Bull.*, 45, 227~229 (1997)

市販ベニコウジ色素より、8種類の主色素成分を単離し、NMR, MS 等により構造を決定した。これらの色素は、アザフィロン骨格をもつベニコウジ菌産生橙色色素である、モノスコルブリンとルプロパンクタチンの D-又は L-アラニンあるいは D-又は L-アスパラギン酸誘導体であった。

**Keywords**: *Monascus* pigments, D-amino acid, monascorubrin

坂元史歩, 佐藤恭子, 米谷民雄: **天然添加物「レモン果皮抽出物」の HPLC 及び LC/MS による成分分析**

日本食品化学学会誌, 3, 136~139 (1996)

天然添加物「レモン果皮抽出物」の市販製品の成分分析を、HPLC 及び LC/MS を用いて行った。HPLC 分析の結果、主成分としてシトラール (シス体及びトランス体) が検出されたが、ゲラニオールは検出されなかった。検出されたシトラールの濃度は、文献値から、本製品を柑橘系果実に0.2%添加した場合に抗かび効果を、2.0%添加した場合には抗菌効果も発揮できる量であると考えられた。更に、HPLC 分析の結果、化学的合成防かび剤のオルトフェニルフェノール (OPP) が残留している可能性が示唆されたため、大気圧化学イオン化 (APCI) 法による LC/MS 分析を行った結果、ネガティブモードで OPP が確認された。しかし、本製品中の OPP 濃度では、保存性向上に寄与するとは考えられなかった。

**Keywords**: lemon peel extract, *o*-phenylphenol, LC/MS

武田由比子, 石綿 肇: **アゾ系食用色素中の非スルホン化芳香族第一アミンの分析**

日本食品化学学会誌, 3, 130~135 (1996)

わが国で使用許可されているアゾ系食用色素である赤色2号 (アマランス), 40号 (アルラレッド AC), 102号 (ニューコクシン) と黄色4号 (タートラジン), 5号 (サンセットイエロー) 中の原料不純物である非スルホン化芳香族第一アミン類 (Unsulfonylated Primary Aromatic Amines, USAA と略) の比色定量による簡易分析法と HPLC による微量分析法を開発した。抽出液を二分し、その一部を塩酸で再抽出し、ジアゾカップリング反応終了後、比色による総 USAA を定量し、他方の抽出液は HPLC により各々の USAA の微量定量を行う同時分析が可能となった。各色素中の USAA である  $\alpha$ -ナフチルアミン (赤色2, 102号), *p*-クレシジン (赤色40号), アニリン (黄色4, 5号) の検出限界はいずれも0.05 $\mu$ g/g であった。本法はアゾ系食用色素の純度規格試験に適用可能と考えられる。

**Keywords**: unsulfonylated primary aromatic amines, coal tar dyes

河村葉子, 三浦麻記子, 杉田たき子, 山田 隆, 武田明治\*: **HPLC によるポリエチレン中の酸化防止剤及び紫外線吸収剤の一斉分析法**

食品衛生学雑誌, 37, 272~280 (1996)

ポリエチレン製品中に残存する酸化防止剤18種類及び紫外線吸収剤10種類の、HPLC による一斉分析法を開発した。浸漬及び超音波による抽出法を検討し、シクロヘキサ



ン-2-プロパノール混液 (1:1) を用い、37°Cで一晩浸漬により抽出することとした。また、抽出液を濃縮後、温アセトニトリルに溶解し、フィルターろ過することにより、オリゴマーを除去した。HPLCは逆相カラムを用いてアセトニトリル-水混液でグラジエント溶出し、UV 225nmで検出した。回収率は、20 $\mu$ g/g添加で86.8~127.0%, 100 $\mu$ g/g添加で70.4~93.6%, 定量限界は2.0~10.0 $\mu$ g/gであった。本法は、抽出溶媒等に環境規制物質を使用しておらず、しかも簡便であり、極めて有用な分析法であると考えられる。

**Keywords:** polyethylene, antioxidant, ultraviolet stabilizer

\* 日本大学生物資源科学部

河村葉子, 三浦麻記子, 杉田たき子, 山田 隆: **食品用ポリエチレン製品中の酸化防止剤及び紫外線吸収剤の残存と溶出**

食品衛生学雑誌, 38, 27~33 (1997)

ポリ袋, ラップフィルム, バラン, 調味料入, まな板等の市販ポリエチレン製品36検体, 及び市販食品の袋, ケース, ネット等の包装材16検体について, HPLC一斉分析法により, 酸化防止剤18種類及び紫外線吸収剤10種類の残存量を測定した。大部分の試料には1~3種類の添加剤が残存しており, 最も検出頻度が高かったのはIrganox1076, 次いでIrgafos 168, BHT, Irganox 1010で, 残存量は主に50~1,000 $\mu$ g/gの範囲であった。残存量の高い8検体について溶出試験を行ったところ, 水, 20%エタノール及び4%酢酸を溶出溶媒とし, 60°C30分間の溶出条件では, 溶出は認められなかったが, 脂肪性食品の疑似溶媒である*n*-ヘプタンを用い, 25°C1時間溶出試験を行ったところ, 一部の試料に溶出が認められた。

**Keywords:** polyethylene, antioxidant, ultraviolet stabilizer

河村葉子, 杉田たき子, 山田 隆, 森 悦男<sup>\*1</sup>, 渡辺悠二<sup>\*2</sup>, 平山クニ<sup>\*3</sup>, 西村正美<sup>\*4</sup>, 下村康夫<sup>\*5</sup>: **保冷剤含有プラスチック製品について**

食品衛生研究, 46, 37~45 (1996)

保冷剤含有マグカップによる事故が発生したことから, 保冷剤含有製品について検討を行った。流通製品は, 国産品と輸入品がほぼ半ずつで, 輸入品は台湾からが最も多く, 主たる製品はジョッキ, マグカップであった。原料樹脂は, 国産品ではすべてポリカーボネートであった。輸入品では, アクリル樹脂表示が多かったが, 鑑別の結果, メタクリル樹脂及びメタクリルスチレンであった。保冷剤成分は, 国産品では, 水のみ又はプロピレングリコールが多く, 輸入品ではエチレングリコール, ポリビニルアルコール, メチルセルロース等の多種類の増粘剤が使用されていた。数種類の製品について強度試験を行ったところ, ポリカーボネート製ジョッキで接合不十分な製品があったが, 事故品と同一製品も含めて耐衝撃強度等に問題はみられなかった。更に, 使用が想定される保冷剤成分について, 赤外吸収スペクトルを用いる系統的鑑別法を確立した。

**Keywords:** plasticware, coolant, ethylene glycol

<sup>\*1</sup> 川崎市衛生研究所

<sup>\*2</sup> 東京都立衛生研究所

<sup>\*3</sup> 神奈川県衛生研究所

<sup>\*4</sup> (財)日本食品分析センター

<sup>\*5</sup> (社)日本プラスチック日用品工業組合

Kawamura, Y., Sugita, T., Yamada, T. and Saito, Y.: **Half-embryo test for identification of irradiated citrus fruit: collaborative study**

*Radiation Physics and Chemistry*, 48, 665~668 (1996)

照射柑橘類の検知法として開発した half-embryo test について, 英国, ドイツ, フランス, オーストラリア及び日本の12機関による collaborative study を実施した。参加した12機関から48検体すべての結果が報告された。培養4日後では1検体が誤判定, 2検体が未判定であったが, 45検体(94%)が正しく判定された。また7日後では1検体が誤判定であったが残りの47検体(98%)は正しく判定された。非照射試料では, 2日後から発芽が観察され, 4日後までに92%が, 7日後には全検体が非照射と正しく判定された。また, 0.5kGy 照射試料では, 1検体で30%の発芽がみられたが, その他の検体では全く発芽がみられず, 4日後で全検体が照射と正しく判定された。一方, 0.2kGy 照射では, 4日後に8検体が発芽率0%, 3検体が50%以下で照射と判定されたが, 1検体のみ発芽率が60%となり, 非照射と誤判定された。以上, half-embryo test は再現性がよく, また判別の精度も高く, 検知法として十分実用可能であることが確認された。

**Keywords:** half-embryo test, irradiated citrus fruit, collaborative study

河村葉子, 三浦 綾, 井村弘美, 山田 隆, 斎藤行生: **パルスフィールドゲル電気泳動による穀類 DNA のガンマ線照射影響の検討**

食品照射, 31, 8-15 (1996)

トウモロコシ, 大豆及び小麦の核 DNA に対するガンマ線照射影響を, パルスフィールドゲル電気泳動により検討したところ, 6Mb 付近及び5 Mb 付近の画分は, 10kGy 以上の照射により減少した。一方, 50~数百 kb の画分は, 10kGy 以下の照射では, トウモロコシや大豆では増加がみられたが, 小麦では増加はみられなかった。また, それ以上の照射線量では大きく減少した。10kGy 以下の照射においては, 高分子量の DNA 画分が切断されて, 低分子量の DNA 画分が増加するが, 更に線量が高くなると, 低分子量の DNA 画分も切断を受け, 減少するものと推定された。

**Keywords:** gamma-irradiation, cereal DNA, pulsed-field gel electrophoresis

Tanno, M., Sueyoshi, S., Miyata, N. and Umehara, K.: **Characterization of the cytotoxic activity of nitric oxide generating *N*-nitroso compound**

*Chem. Pharm. Bull.*, 45, 595~598 (1997)

一酸化窒素 (NO) を室温で発生する芳香族 *N*-ニトロソ化合物 (*N*-ニトロソ尿素, *N*-ニトロソアミド, *N*-ニトロソアミン類) を合成し, 化学構造と NO 発生機構との関係を解析すると共に, それらの化合物の NO 発生能と腫瘍細胞 (L-5178Y cell) に対する殺細胞効果とが相関し, 直線関係を示すことを明らかにした。我々の条件下で脂肪族 *N*-ニトロソ尿素類や脂肪族 *N*-ニトロソアミン類からは NO 発生が認められず, 殺細胞効果も低かった。化合物中最大の NO 発生量を持つ, 3,3-ジベンジル-1-(4-トリル)-1-ニトロソ尿素は, この相関関係から大きく外れた。この理由として, この化合物の NO 発生速度が大きすぎるため, 細胞に取り込まれる前にガス体である NO が拡散し, 細胞に対して効率良く作用できないことが推定された。

**Keywords:** nitric oxide, nitrosourea, cytotoxic activity

\* 静岡県立大学

Tanno, M., Sueyoshi, S., Miyata, N. and Nakagawa, S.: **Nitric oxide generation from aromatic *N*-nitrosoureas at ambient temperature**

*Chem. Pharm. Bull.*, 44, 1849~1852 (1996)

有機溶媒中で室温に放置したとき、芳香族 *N*-ニトロソ尿素類が光分解ではなく熱分解により一酸化窒素 (NO) を放出することを見出した。NO の生成は、5, 10, 15, 20-テトラフェニルポルフィリナトコバルトでニトロシル錯体として NO を捕捉することにより証明した。更に、簡便な NO 定量装置を考案し、この装置を用いて有機溶媒中で各 *N*-ニトロソ尿素から発生する NO 量を測定した結果、3,3-ジベンジル-1-(4-トリル)-1-ニトロソ尿素が最大の値を示した。この化合物と数種類の市販 NO ドナーを Krebs Buffer に溶かし、2時間あたりの NO 発生量を比較したところ、ニトロソ尿素は、SNAP と同程度の NO 発生能を示し、NO ドナーとして有望であるという結論を得た。

**Keywords**: nitric oxide, nitrosoarea, tetraphenylporphyrin

\* 北陸大学

Yamakoshi, Y., Yagami, T., Sueyoshi, S. and Miyata, N.: **Acridine adduct of [60]fullerene with enhanced DNA-cleaving activity**

*J. Org. Chem.*, 61, 7236~7237 (1996)

[60]フラーレンを界面活性剤で可溶化し、pBR322を用いて照射下での DNA 切断活性を検討したところ、有意に切断がみられた。この活性を向上させるため、[60]フラーレンに DNA インターカレート能のあるアクリジン基を結合させた誘導体を設計し合成した。この誘導体の活性を検討した結果、照射下で [60]フラーレンそのものよりかなり活性が増強されていた。

**Keywords**: [60]fullerene, DNA-cleaving activity, acridine

Sera, N.\*<sup>1</sup>, Tokiwa, H.\*<sup>2</sup> and Miyata, N.: **Mutagenicity of the fullerene C<sub>60</sub>-generated singlet oxygen dependent formation of lipid peroxides**

*Carcinogenesis*, 17, 2163~2169 (1996)

ポリビニルピロリドンで水溶化したフラーレン C<sub>60</sub>が、照射条件ラット肝ミクロゾーム存在下で活性酸素に感受性の高いサルモネラ菌 (TA102株, TA104株, 及び, YG3003株) に対して変異原性を示すことを見いだした。活性酸素のスクヤベンジャーを用いた変異原性試験等により、フラーレン C<sub>60</sub>による変異原性発現には、光励起されたフラーレン C<sub>60</sub>によって生成する一重項酸素が関与していると推定した。

**Keywords**: fullerene, mutagenicity, singlet oxygen

\*<sup>1</sup> 福岡保健環境研究所

\*<sup>2</sup> 九州女子大

宮田直樹, 丹野雅幸, 末吉祥子: **NO の基礎: NO 発生化合物**

放医研シンポジウムシリーズ, 27, 192~200 (1996)

一酸化窒素 (NO) の生体に対する作用を、化学的あるいは生化学的実験によって解析するのに有用な NO 発生化合物を開発する目的で、一連の *N*-ニトロソ尿素類、及び、*N*-ニトロソウレア類を合成した。これらの化合物が、自己分解により NO を発生することは金属ニトロシル錯体の生成で確認した。これらの化合物の NO 発生能を Griess-Salzman 法により調べた結果、芳香族 *N*-ニトロソ化合物群が高い NO 発生能を示し、NO 発生化合物として有用であることを確認した。

**Keywords**: nitric oxide, *N*-nitrosoarea, NO-releasing compound

宮田直樹, 福原 潔: **電気化学的手法によるスーパーオ**

**キシド発生反応および消去反応の解析**

フリーラジカルの臨床, 11, 44~49 (1997)

電気化学的手法を用いてキノン及びニトロアレンと酸素との間の電子移動反応を調べ、スーパーオキシドの発生及び消去反応に及ぼす構造化学的特徴の解析を行った。その結果、電子移動反応が、酸化還元電位のギャップを乗り越えて触媒的に進行すること、スーパーオキシドの発生及び消去能は化合物に固有の一電子酸化電位 (Epa 1) 及び一電子還元電位 (Epc 1) にそれぞれ依存していること、ニトロアレンはキノンと同様に酸素への電子移動反応が進行してスーパーオキシドの発生及び消去反応を触媒すること等が明らかになった。

**Keywords**: superoxide, quinone, nitroarene

宮田直樹, 山越葉子, 末吉祥子, 世良暢之\*<sup>1</sup>, 常盤 寛\*<sup>2</sup>: **照射下における C<sub>60</sub>の生物作用—活性酸素種による生体分子損傷反応の解析—**

磁気共鳴と医学, 8, 189~192 (1997)

C<sub>60</sub>は、照射条件で弱い変異原性を有する。この作用は、C<sub>60</sub>の光増感作用によって生成する一重項酸素に起因すると考えられる。C<sub>60</sub>から発生した一重項酸素による生体分子損傷反応として、リノール酸の10, 12位の過酸化、及び、グアニンの8位の水酸化、グアニンラジカルの生成を確認した。C<sub>60</sub>は直径約7オングストロームの球状分子で非常に脂溶性が高いことから、C<sub>60</sub>は生体内で細胞膜に取り込まれやすく、膜に取り込まれたC<sub>60</sub>が効率良く一重項酸素を発生し脂質過酸化を引き起こすと推定した。C<sub>60</sub>によるグアニンの8位の水酸化も脂質存在下で効率良く進行することから、C<sub>60</sub>の変異原性発現に際しては、C<sub>60</sub>から発生した活性酸素種が直接 DNA を損傷する経路 (直接経路) に加え、脂質過酸化を経由する経路 (間接経路) が存在する可能性が示唆された。

**Keywords**: C<sub>60</sub>, lipid peroxidation, 8-hydroxy-dG

\*<sup>1</sup> 福岡保健環境研究所

\*<sup>2</sup> 九州女子大

Okabe, T.\*, Teshima, R., Furuno, T.\*, Torigoe, C.\*, Sawada, J. and Nakanishi, M.\*: **Confocal fluorescence microscopy for antibodies against a highly conserved sequence in SH 2 domain**

*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 223, 245~249 (1996)

チロシンリン酸化反応を介する情報伝達機構に重要な役割を果たしている SH 2 ドメインに対する単クローン抗体を作製し、抗原刺激に伴う好塩基球の SH 2 ドメインの細胞内動態を、共焦点レーザー走査顕微鏡を用いて、可視的に解析を行った。

**Keywords**: SH 2 domain, RBL-2 H3, confocal microscopy

\* 名古屋市立大学薬学部

Kitani, S.\*, Teshima, R., Nonomura, Y.\*, Morita, H.\* and Ito K.\*: **The effect of okadaic acid on histamine release, cell morphology and phosphorylation in rat basophilic leukemia (RBL-2 H3) cells, human basophils and rat peritoneal mast cells.**

*Int. Arch. Allergy Immunol.*, 110, 339~347 (1996)

プロテインセリン/スレオニンフォスファターゼ阻害剤であるオカダ酸のラット好塩基球 (RBL-2 H3) 細胞、ヒト好塩基球細胞、ラット肥満細胞からの脱顆粒 (ヒスタミン遊離)、蛋白質リン酸化反応、細胞内カルシウム動態への影響について検討し、即時型アレルギー反応への蛋白質セリン/スレオニンリン酸化の意義について検討した。オ

カダ酸は、RBL-2H3細胞及びヒト好塩基球細胞からのヒスタミン遊離を0.1-10 $\mu$ Mで抑制したが、ラット肥満細胞からのヒスタミン遊離に関しては1 $\mu$ Mでむしろ促進させる効果を有していた。オカダ酸は、細胞内カルシウム濃度変化には無影響であったので、カルシウム流入以降、ヒスタミン遊離に至る後期の過程にセリン/スレオニンリン酸化反応の関与している可能性が示唆された。

**Keywords:** basophil, mast cells, okadaic acid

\* 東京大学医学部

Akasaka, R., Teshima, R., Ikebuchi, H. and Sawada, J.: **Effects of three different Ca<sup>2+</sup>-ATPase inhibitors on Ca<sup>2+</sup> response and leukotriene release in RBL-2H3 cells.**

*Inflamm. Res.*, 45, 583~589 (1996)

3種の小胞体Ca<sup>2+</sup>-ATPase阻害剤(ジブチルヒドロキノン(DTBHQ), タブシガルギン(TG), サイクロピアゾニック酸(CPA))のRBL-2H3細胞からの脱顆粒, 細胞内カルシウム濃度上昇並びにロイコトリエン(LTC<sub>4</sub>)産生の影響を調べた。これらの3種の化合物はどれも, 細胞内カルシウム濃度上昇を引き起こし, そのED<sub>50</sub>は, DTBHQ; 2.9 $\mu$ M, TG; 1.6nM, CPA; 1.4 $\mu$ Mであった。また, これら3種の化合物は, TPA共存下での脱顆粒反応を, カルシウム濃度上昇を引き起こす濃度とはほぼ同じ濃度で引き起こした。一方, ロイコトリエン産生に関しては, TG, CPAのみが, LTC<sub>4</sub>産生を, TPA非存在下で促進したが, DTBHQには, LTC<sub>4</sub>遊離促進効果はなく, むしろ抗原刺激に伴うLTC<sub>4</sub>産生をも抑制する作用を有していた。この効果は, DTBHQの抗酸化剤としての作用によるものと思われた。これら3種の化合物を用いた結果から, RBL-2H3細胞において, 細胞内カルシウム濃度上昇から, 脱顆粒に至る経路と, ロイコトリエン産生に至る経路は, 独立した経路でおきていることが示唆された。

**Keywords:** Ca<sup>2+</sup>-ATPase inhibitor, calcium signal, LTC<sub>4</sub>

Nishimaki-Mogami, T., Suzuki, K., Okochi, E. and Takahashi, A.: **Bezafibrate and clofibrate acid are novel inhibitors of phosphatidylcholine synthesis via the methylation of phosphatidylethanolamine**

*Biochim. Biophys. Acta*, 1304, 11~20 (1996)

フィブレート系血清脂質低下薬である bezafibrate や clofibrate が, ホスファチジルエタノールアミンメチル化経路でのホスファチジルコリン合成の強力な阻害剤であることを見だし, その阻害機構を解析した。またこの作用はペルオキシゾーム増殖に関わる一連の作用とは区別されるものであることを示した。

**Keywords:** phosphatidylethanolamine methylation, bezafibrate, clofibrate acid

Nishimaki-Mogami, T., Suzuki, K. and Takahashi, A.: **The role of phosphatidylethanolamine methylation in the secretion of very low density lipoproteins by cultured rat hepatocytes: Rapid inhibition of phosphatidylethanolamine methylation by bezafibrate increases the density of apolipoprotein B 48-containing lipoproteins**

*Biochim. Biophys. Acta*, 1304, 21~31 (1996)

肝特異的なホスファチジルコリン(PC)合成経路としてホスファチジルエタノールアミン(PE)のメチル化経路が存在する。この経路の活性はラット肝細胞の培養にとっても低下するが, PE前駆体のエタノールアミンを培地

に補うことで維持が可能であった。PEメチル化阻害剤のVLDL分泌への影響を調べたところ, フィブレート類及び3-deazaadenosineは共に, エタノールアミンを補いPEメチル化がactiveな条件下でのみVLDL分泌を阻害した。またapoB48含有粒子自体の分泌は影響されず脂質含量が低下していることから, apoB48と脂質の会合過程の阻害が推定された。この結果はVLDL分泌調節にPEメチル化経路でのPC合成が重要な役割を持つことを示すと共に, フィブレート系血清脂質低下薬の作用機構を明らかとするものである。

**Keywords:** phosphatidylethanolamine methylation, VLDL, secretion

Tanamoto, K., Azumi, S., Haishima, Y., Kumada, H. and Umemoto, T.: **Endotoxic properties of free lipid A from *Porphyromonas gingivalis***

*Microbiology*, 143, 63~71 (1997)

我々が初めて単離に成功し, 構造決定を行った *P. gingivalis* 由来のリピドAの生物学的性状を調べた。このリピドAはその特徴的な構造にもかかわらず, リムルス活性, 致死毒性, マイトジェン活性, 各種マクロファージ細胞からのTNF及びNO産生活性の調べたいずれの内毒素活性も発現した。しかしながらその活性はサルモネラ由来LPSに比較して約1/100の低毒性リピドAであることがわかった。低毒性の原因は4'位のリン酸の欠如と特異な脂肪酸組成によるものと思われる。しかしこのリピドAは人細胞に対してはサルモネラLPSよりも強い活性を示した。このことは人とマウスの細胞の, レセプターを含む内毒素分子の認識機構が異なることを示唆している。

**Keywords:** *Porphyromonas gingivalis*, endotoxin, lipid A

\* 神奈川歯科大学

Tanamoto, K., Azumi, S., Haishima, Y., Kumada, H. and Umemoto, T.: **The lipid A moiety of *Porphyromonas gingivalis* LPS specifically mediates the activation of C3H/HeJ mice.**

*J. Immunol.*, 158, 4430~4436 (1997)

*P. gingivalis* 由来のリピドAはLPS不応答性マウスを活性化して, 脾臓細胞のマイトジェン活性, 腹腔マクロファージからのTNF産生を誘導した。この活性が微量の残存タンパクではなくリピドA構造自体によるものであることを証明するために, 化学処理によるリピドA構造の部分分解を行いその活性変化を調べたところ, 脱リン酸では部分的, 完全脱Oアシル化では完全に活性が喪失した。同様の活性現象はエンドトキシンに特異的なリムルス反応においても認められたほか, 対照のサルモネラ由来のリピドAの同化学処理化合物においてもまったく同様の活性減少が観察された。脱Oアシル化処理による残存アミノ酸の変化はなかった。更にこのLPS不応答性マウスの活性化は, 我々の開発したLPSの特異的なアンタゴニストであるサクシニル化リピドA前駆体によって, LPS応答性マウスと同じパターンで抑制されることがわかった。以上の結果, *P. gingivalis* リピドAによるLPS不応答性マウスの活性化は, リピドA構造体自身によることが証明された。

**Keywords:** *Porphyromonas gingivalis*, C3H/HeJ mice, endotoxin antagonist

\* 神奈川歯科大学

Tanamoto, K.: **Novel strategies to attenuate the effect of lipopolysaccharide on the immune response.**

*Curr. Opin. Infect Dis.*, 10, 177~182 (1997)

感染症に伴い重篤で致死的な疾患を引き起こすエンドトキシン疾患の治療法対策として, 1) LPS分子の直接の抑制(モノクロナール抗体, 血清成分, LPS結合分子), 2) メディエータ産生の調節(産生抑制, サイトカインの中和), 3) 情報伝達系の阻害, 4) エンドトキシンアンタゴニスト, の四つのカテゴリーにまとめて, 難治のエンドトキシン疾患に対する今後の新戦略について論じた。

**Keywords:** gram-negative bacterial infection, LPS, endotoxin diseases

Azumi, S., Tanimura, A.\* and Tanamoto, K.: **A novel inhibitor of bacterial endotoxin derived from cinnamon bark**

*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 234, 506~510 (1997)

植物由来としては初めて桂皮中にエンドトキシン活性を抑制する物質が存在することを見いだした。リムルス法を指標として精製と作用の検討を行った。エンドトキシンの抑制作用は, この物質がLPS分子と接触する事により起こるもので, 活性は両者の混合時の濃度と接触時間に比例した。また由来する菌種に関係なく, 調べたすべてのLPSの活性を抑制した。更にこの物質を結合させたLPSはウサギの発熱活性もまったく示さなかった。

**Keywords:** cinnamon bark, endotoxin inhibitor, LPS

\* 昭和女子大学

佐藤昭子<sup>\*1</sup>, 寺尾通徳<sup>\*2</sup>, 昆美也子<sup>\*2</sup>, 小島満子: **ニンニク抽出液の酵母に及ぼす抗菌作用**

日本食品微生物学会雑誌, 13, 121~125 (1996)

香辛料として食品に添加するニンニク抽出液の腐敗酵母に対する抗菌作用を調べた。ニンニクをホモジナイズし, 濾過滅菌したものを検疫とした。最小発育阻止濃度(MIC)は日本化学療法学会によって定められた方法により測定した。MICは2.50~0.31%の範囲であり, 多種類の腐敗酵母に対して広く抗菌作用を有することが認められた。また, ニンニク抽出液の腐敗酵母に対する殺菌試験を行った結果, *Trichosporon cutaneum* E-5では, 5~20%の濃度範囲で3~24時間後には死滅することが確認された。ニンニク抽出液の抗菌活性は, pH4~7付近で安定していることがわかった。抽出液とNaClの併用効果は認められなかった。

**Keywords:** garlic extract, spoilage yeasts, MIC

\*1 県立新潟女子短期大学

\*2 新潟県衛生公害研究所

Miyahara, M., Kimizuka, F.\*<sup>1</sup>, Kita, A.\*<sup>1</sup>, Matsushita, S.\*<sup>2</sup>, Kudo, Y.\*<sup>2</sup>, Shimada, T.\*<sup>3</sup> and Mise, K.: **isolation and Characterization of Restriction Endonuclease in *Plesiomonas shigelloides* and *Aeromonas* Species**

*Biol. Pharm. Bull.*, 19, 1506~1507 (1996)

制限酵素産生菌の検索を行った。検討した菌株はビブリオ科の菌株で, *Plesiomonas shigelloides* が196株で, エロモナス属は147株であった。そのなかで, 制限酵素の産生の検出されたものは, それぞれ, 5株と1株だけであり, 検出率は低かった。ただし, *Plesiomonas shigelloides* のTPS970より検出された制限酵素は, AT/TAATの塩基配列を認識・切断する酵素であり, すでに*VspI*酵素として登録されているものではあったが, 日本で産生菌株は入手できない酵素の一つであった。そこでこの菌株は貴重な遺伝子用試薬産生菌株として役立つことになった。この酵素は*PshBI*と名付けられ, 前に当研究室で発見された*PshAI*

(GACNNNGTC)酵素と共に試薬として現在使われている。

**Keywords:** *Vibrionaceae*, *Plesiomonas shigelloides*, *Aeromonas*

\*<sup>1</sup> 宝酒造(株)

\*<sup>2</sup> 東京都立衛生研究所

\*<sup>3</sup> 国立予防衛生研究所

Miyahara, M., Ishiwata, N.\*<sup>1</sup> and Yoshida, Y.\*<sup>2</sup>: **StyD4I restriction-modification system of *Salmonella* Typhi D4: Cloning and sequence analysis**

*Biol. Pharm. Bull.*, 20, 201~203 (1997)

*Salmonella* Typhi D4は制限酵素を産生しており, その産生遺伝子は5.4Kbpのプラスミド上にあることが知られている。そのプラスミドはすでに大腸菌WA803株に導入され, この株は制限酵素の産生が確認された。そこでそのプラスミドの解析を行って, 制限酵素産生遺伝子, 並びに, 修飾酵素として制限酵素と共に産生されなければならないメチレーズ産生遺伝子の配列を検索することにした。この酵素は/CCNGGのDNA塩基配列を認識・切断する酵素であり, 同様の配列を認識する酵素には*ScrFI*, *DsaV*, *SsoII*と*BssKI*などの産生遺伝子配列がすでに報告されていることから, *StyD4I*産生遺伝子配列を決定して, これらの酵素産生遺伝子とのホモロジー解析を行うこととした。プラスミドの解析にはdeletion mutantとinsertion mutantを使つての活性の変動を検索して, どの位置に遺伝子がのっているかを推定した。その結果, 5.4Kbpのプラスミドのうちで, 2537bpの配列を決定すれば, 両酵素の産生遺伝子をとらえることができることがわかり, この部分を含むmutantにより, 遺伝子配列を決定した。この産生遺伝子配列と先に挙げた酵素の遺伝子配列とのホモロジー解析を行ったところ, *SsoII*と98.6%の高いパーセンテージで類似していることがわかった。*SsoII*は, ソンネ赤痢菌47株のプラスミドP4が産生する制限酵素で, プラスミドの大きさも4.25Kbpと小型であり, 本体の細菌DNAのホモロジーは11~25%であることがわかっている。プラスミドでの遺伝子の伝播が考えられる。また, それ以外の酵素でも, *ScrFI*と*DsaV*とのメチレーズ産生遺伝子のホモロジーは, 68.4%と62.0%であった。これらの修飾酵素は, サイトシンの5位をメチル化する酵素であり, アミノ酸配列において, 一定の類似した配列を持つことが知られている。*StyD4I*もそのアミノ酸の一定配列を持っていることがわかった。

**Keywords:** restriction endonuclease, DNA (cytosine-5) methyltransferase, *StyD4I*

\*<sup>1</sup> 昭和女子大学

\*<sup>2</sup> 国立公衆衛生院

栗原健志<sup>\*1</sup>, 今井忠平<sup>\*1</sup>, 後藤公吉<sup>\*2</sup>, 小沼博隆, 品川邦汎<sup>\*3</sup>: **殻付卵表面の細菌汚染源に関する研究**

日食微誌, 13, 111~116 (1996)

卵殻表面の細菌汚染状況とその汚染源を追求するため, 食鳥処理場及び養鶏場から種々の鶏卵を採取し, 細菌数, 大腸菌群, 黄色ブドウ球菌, 及びサルモネラを調べ, 以下の結果を得た。

1. 産卵前卵管内の鶏卵の10%から細菌が検出された。
2. 産卵直後に無菌的に採取した鶏卵では10<sup>0</sup>cfu/卵の細菌が検出された。
3. GPセンターに搬入された鶏卵では10<sup>0</sup>cfu/卵の細菌が検出された。
4. サルモネラは, 検出されなかった。

**Keywords:** bacteria contamination, egg shell, transporting equipment,

\*1 キューピー (株)

\*2 新潟県衛生公害研究所

\*3 岩手大学

後藤公吉<sup>\*1</sup>, 増田高志今<sup>\*2</sup>, 村山尚子<sup>\*3</sup>, 今井忠平<sup>\*4</sup>, 小沼博隆, 品川邦汎<sup>\*5</sup>: **Salmonella Enteritidis のオンエッグ汚染に対する殺菌剤及びスプレー洗浄の効果**

食衛誌, 37, 165~172 (1996)

殻付卵のサルモネラオンエッグ汚染に対する有効な洗浄, 殺菌方法を検討し, 以下の結果を得た。

1. SE 汚染殻付卵に対し, 最も殺菌効果のあった薬剤は, 5~15%第3リン酸ナトリウムであったが, 卵黄と一緒に付着した SE 汚染に対してはほとんど効果はなかった。

2. 150ppm 次亜塩素酸ナトリウムの SE 殺菌効果は有効であったが, 糞便など有機物存在下ではほとんど効果はなかった。

3. SE 汚染殻付卵に対し, 最も洗浄効果のあった方法は, スプレー洗浄であった。

**Keywords:** bacteria contamination, egg shell, trisodium phosphate

\*1 新潟県衛生公害研究所

\*2 静岡県衛生環境センター

\*3 山形県衛生研究所

\*4 キューピー(株)

\*5 岩手大学

Sakai, A., Miyata, N. and Takahashi, A.: **Promoting activity of 3-tert-butyl-4-hydroxyanisole (BHA) in BALB/3 T 3 cell transformation**

*Cancer Letters*, 115, 213~220 (1997)

抗酸化剤, BHA は, BALB/3 T 3 細胞を用いる 2 段階トランスフォーメーション試験でイニシエーターとして作用し, TPA によるプロモーション処理を加えることにより, トランスフォーメーションを誘発する。この研究では, BHA のプロモーション作用について調べた。BHA は, 閾値濃度の 3-メチルコラントレンによって誘発されるトランスフォーメーションを濃度依存的に促進し, 10と20 $\mu$ g/ml では統計学的に有意差が認められた。しかしながら, イニシエーションとプロモーションの両方の段階における処理を BHA で行った場合には, トランスフォーメーションの誘発は認められず, この試験系で BHA のトランスフォーメーション活性を検出するには, 強力なイニシエーター又はプロモーターとの組み合わせが必要であると考えられた。接触による増殖阻止に至った細胞を BHA で処理しても細胞密度の増加や<sup>3</sup>Hチミジンの DNA への取り込みの増加を示さず, BHA による BALB/3T3細胞トランスフォーメーションの促進においては, 細胞増殖作用は, 関与していないと考えられた。

**Keywords:** 3-tert-butyl-4-hydroxyanisole, cell transformation, promotion

Matsutani, S.: **Genetic analyses of the interactions of the IS1-encoded proteins with the left end of IS1 and its insertion hotspot**

*J. Mol. Biol.*, 267, 548~560 (1997)

転移因子 IS1 は, 共通の DNA 結合モチーフをもつ三種類の蛋白質 InsA,  $\Delta$ InsAB, InsAB を産生する。InsA は IS1 の両端に結合し, IS1 の遺伝子発現や転移を制御する。 $\Delta$ Ins

AB や InsAB は, 転移酵素活性を持つと考えられてきた。ここでは, これらの蛋白質の, IS1 左端にあるプロモーター (*pinsL*) に対する *in vivo* での作用を調べた。InsA は *pinsL* による遺伝子発現をシスでもトランスでも抑制した。 $\Delta$ InsAB は, 自身を産生する構造物のそばに *pinsL* があつた時にのみ, 効果的に阻害した。 $\Delta$ InsAB は *pinsL* の-10領域に働き, InsA が特異的に結合する-35領域には作用しなかった。InsAB は *pinsL* に作用しないようだった。 $\Delta$ InsAB のシスの作用は, IS1 の転移酵素がシス優先的に働くという以前の観察と一致する。興味深いことに,  $\Delta$ InsAB は, 転移のホットスポットにある P3 プロモーターや, ホットスポットの外の別のプロモーターにも働いた。 $\Delta$ InsAB は一般的に, DNA ヘリックスの不安定なプロモーター領域と相互作用するのかもしれない。IS1 は AT に富む領域に転移しやすく, また, 転写の際, DNA はプロモーターの-10領域から解かれることに注目すべきである。 $\Delta$ InsAB がシスに作用する結果, 細胞内での IS1 の転移は全体的に減少し, 宿主との安定な共存をもたらすのだろう。

**Keywords:** IS1, recombination hotspot, transposition

Kuwano, A.\*, Oikawa, M.\* and Takatori, K.: **Pathomorphological findings in a case of onychomycosis of a racehorse**

*J. Vet. Med. Sci.*, 58, 1117~1120 (1996)

白線病, 蹄疾患を発症した競走馬の蹄組織について病理組織学的, 真菌学的観点からに検討した。疾患部の培養により純培養的に *Scedosporium apiospermum* が分離された。また組織の観察で PAS 陽性の真菌固有の褐色細胞を終末角質に多量に認め蹄真菌症と判定した。

**Keywords:** equine, onychomycosis, *Scedosporium*

\* 日本中央競馬会総合研究所栃木支所

Jong-Chul-Park, Takatori, K., H. J. Lee<sup>\*1</sup>, Matsuoka, H. <sup>\*2</sup> and Kurata, H.<sup>\*3</sup>: **Influence of antifungal pre-treatment in preparing test mycelium on MIC values of several antifungal agents against *Aspergillus niger***

*Mycoscience*, 37, 117~120 (1996)

*Aspergillus niger* 胞子に対する抗真菌剤の効果をバイオセルトレーサーを利用して測定した。抗真菌剤としてイミダゾール系薬剤 2 種とポリエン系薬剤 1 種を用い, *A.niger* 胞子をあらかじめ培養し, 菌糸伸張をさせながら経時的に薬剤を処理した。この菌形態差により MIC 値を測定したところ, ほぼ同値がえられた。しかし薬剤処理した菌要素は次第と適応性を示し, より高濃度でも活性が亢進した。

**Keywords:** *Aspergillus niger*, antifungal agents, MIC values

\*1 衛生微生物試験研究センター

\*2 東京農工大学

\*3 東京顕微鏡院

太田利子\*, 高鳥浩介: **ユリ科植物揮発性成分の抗真菌活性に関する研究**

防菌防黴, 24, 587~591 (1996)

植物で香味野菜の成分による抗真菌活性を定量的に測定した。ユリ科植物としてニンニク, ネギ, タマネギ, ニラを用い, その一定量をすりおろし, 定形密閉容器に揮発性成分を蒸散させた。供試真菌は植物病原真菌, 食品由来真菌の糸状菌, 酵母とし, その活性を測定した。ユリ科植物でもニンニクの成分は硫化化合物, 硫化アリルが主に含まれており, これらの成分により抗菌活性がすでに知られていたが, 真菌に関しても強い殺菌作用を有していた。これらの成分について真菌に対する作用機序を考察しながらま

とめた。

**Keywords:** Liliaceae, volatile components, antifungal activity

\* 相模女子大学

Jong-Chul-Park, Matsuoka, H.\*<sup>1</sup>, Takatori, K. and Kurata, H.\*<sup>2</sup>: **Adaptation of *Aspergillus niger* to acidic conditions and its relationship to salt stress and miconazole**

*Mycol. Res.*, 100, 869~874 (1996)

*A. niger* 菌糸を伸張させ、pH 2~4 下で動的活性度をバイオセルトレーサーを用いて測定した。胞子から菌糸増殖したあと pH を酸性にし、菌糸伸張を画像で追跡しながら、塩ストレスをかけたまま抗真菌剤を処理した。ストレスをかけはじめた頃は *A. niger* の反応は強かったが次第と馴化する傾向をみた。また抗真菌剤を酸性下で処理したが、菌糸伸張活性に強く影響をおよぼすことがなく、酸性下でのストレスは生じないものと結論された。

**Keywords:** adaptation, acidic conditions, salt stress

\*<sup>1</sup> 東京農工大学

\*<sup>2</sup> 東京顕微鏡院

Brindley, D. N.\*, Abousalham, A.\*, Kikuchi, Y., Wang, C. - N.\* and Waggoner, D. W.\*: **"Cross talk" between the bioactive glycerolipids and sphingolipids in signal transduction**

*Biochemistry and Cell Biology*, 74, 469~476 (1996)

phosphatidylcholine (PC) は受容体を介した phospholipase D (PLD) の刺激によって水解され lysophosphatidate (LPA) と diacylglycerol (DAG) に変換される。DAG はチロシンキナーゼと Ras-Raf-MAP キナーゼが phosphatidate (PA) と LPA によって刺激される経路においてプロテインキナーゼ C を活性化する。これらの3種類の脂質は細胞分化を誘導する。

TNF- $\alpha$  等によりスフィンゴミエリナーゼを活性化して生ずるセラミドは、逆に細胞分化を阻害してアポトーシスを誘導する。セラミドはスフィンゴシンやスフィンゴシン-1-リン酸に代謝され、PLD を刺激して細胞増殖能を示す。セラミドは PLD の活性化に必要な G-プロテイン (ARF と Rho) が PLD との相互作用を低下させ、PLD の活性化を阻害する。またセラミドは Mg<sup>2+</sup> 非特異的な PA 分解酵素を介して細胞内の PA, LPA, セラミド-1-リン酸, スフィンゴシン-1-リン酸の分解を促進する。TNF- $\alpha$  はインシュリン抵抗性を誘導するが、セラミドはこの作用機作の一部に関与している。細胞透過性セラミドはインシュリンが誘導する 3T3-L1 脂肪細胞のグルコース取り込みを 2-24 時間後に減少させ、その結果として全体的なグルコースの取り込みを亢進する。これらの作用は GLUT 1 と GLUT 4 を含有する小胞体の細胞内移動に関与するセラミドの作用によるもので、インシュリン受容体のチロシン残基リン酸化の減少、IRS-1, Pi 3 キナーゼと IRS-1 の相互作用に起因するものではない。以上の結果から、小胞体の細胞内移動、細胞分化、細胞死を司る情報伝達系において、スフィンゴ脂質とグリセロ脂質の相互作用がその制御に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

**Keywords:** ceramides, insulin resistance, phosphatidate, phospholipases

\* Department of Biochemistry, University of Alberta

Lee, H. J.\*<sup>1</sup>, Kasama, K.\*<sup>2</sup>, Takatori, K., Park, J. C. and Akiyama, K.\*<sup>3</sup>: **A plate method for detection of ex-**

**tracellular protease of *Alternaria***

*J. Antibact. Antifung. Agents*, 24, 457~460 (1996)

住環境にみる真菌の中で主要な *Alternaria* の生理活性を菌体外酵素プロテアーゼで検討した。*Alternaria* は中温性、好湿性であり、集落形成性は速やかであるが、微視的発育パターンは詳しく知られていない。そこで、胞子発芽から菌糸形成を経時的に追跡しかつ、時々刻々と形態変化させながら菌体外酵素プロテアーゼの活性を評価した。プロテアーゼは発芽により、菌糸形成する早い時期に産生することが解明され、この現象をアレルギーと関連させて考察した。

**Keywords:** extracellular protease, *Alternaria*, plate method

\*<sup>1</sup> 衛生微生物試験研究センター

\*<sup>2</sup> (財)食品薬品安全センター

\*<sup>3</sup> 国立相模原病院

関沢 純: **リスクコミュニケーションに関する最近の動向**

日本リスク研究学会誌, 8, 89~95 (1997)

環境庁委託研究の一環として、血液製剤エイズ感染に対する安全性確認と意思決定過程の透明性の問題、高速増殖炉原型炉「もんじゅ」事故における公表のあり方など最近のリスクコミュニケーションの動向を踏まえ、リスクコミュニケーションの新しい考え方、情報の整備と開示、伝達と表示の具体的手法について、今後の課題と提案をまとめた。

**Keywords:** risk communication, transparency, preparedness

Takagi, A., Kaneko, T. and Inoue, T.: **Biotechnology products: specific issues and ICH S 6**

*J. Toxicol. Sci.*, 21, 539~541 (1996)

ICH におけるバイオテクノロジープロダクトの前臨床安全性試験に関するワーキンググループ (S6) の考え方について解説すると共に、現時点での最新情報についても紹介した。

**Keywords:** biotechnology products, ICH S6, preclinical safety test

Kitajima, S., Kurokawa, Y. and Inoue, T.: **Single-dose toxicities of 2, 5-di (tert-butyl) -1, 4-hydroquinone in the rat: Toxicants as of hydroquinone derivative or a microsomal Ca<sup>2+</sup>ATPase inhibitor?**

*J. Toxicol. Sci.*, 21, 201~204 (1996)

酸化防止剤 2, 5-ジ(tert)ブチル-1, 4-ヒドロキノンのラットにおける急性毒性を構造活性相関を踏まえて検討し、その毒性が小胞体 Ca<sup>2+</sup>ATPase 阻害に起因する可能性、並びに神経・循環器系が毒性標的である可能性を示唆した。

**Keywords:** acute toxicity, 2, 5-(di(tert)-butyl)-1, 4-hydroquinone, Ca<sup>2+</sup>ATPase

Yoshida, K.\*, Inoue, T., Nojima, K.\*, Hirabayashi, Y. and Sado, T.\*: **Calorie restriction reduces the incidence of myeloid leukemia induced by a single whole-body radiation in C 3 H/He mice**

*Proc Natl Acad Sci USA*, 94, 2615~2619 (1997)

食餌制限、特にカロリー制限によって固形がんの発がん頻度が減少することは現象論としては100年以上前から記載がみられる。しかしながらこの論文は、放射線誘発骨髄性白血病についてもこれを適用し、発症の遅延のみならず、発症頻度の大幅な低下を証明した最初の論文である。更に、カロリー制限をする時期を誘発照射前からにする

か、照射後から開始するかによって、造血幹細胞数と発がん頻度との間の相関関係を明らかにするなど、機構の検討を行った。

**Keywords** : colorie restriction, radiation leukemogenesis, extent of lifespan

\* 放射線医学総合研究所

Nishimura, Y.<sup>\*1</sup>, Hirabayashi, Y., Matuszaki, Y.<sup>\*2</sup>, Musette, P.<sup>\*2</sup>, Ishii, A.<sup>\*3</sup>, Nakauchi, H.<sup>\*2</sup>, Inoue, T. and Yonehara, S.<sup>\*4</sup> : ***in vivo* analysis of Fas antigen-mediated apoptosis: Effects of agonistic anti-mouse Fas monoclonal antibody on thymus, spleen, and liver**

*Int Immunol*, 19, 307~316 (1997)

Fas 抗原は細胞表面の受容体蛋白でアポトーシス誘導シグナルを伝達する。このものの *in vivo* での機能を解析することを目的として、作用性の Fas 抗体を作成したところ、作用の異なる 2 種類の抗体 RK-8 と Jo2 とを得た。このうち RK-8 は *in vivo* (胸腺, 脾臓, 肝臓) でも *in vitro* (CD4 陽性細胞) でもアポトーシスを誘導するのに成体マウスを殺さない。他方 Jo2 では、*in vivo* 投与によってマウスが直ちに死に至る。ただし、RK-8 でも 1 週齢のマウスに投与すると死亡する。以上より、*in vivo* で死のシグナルを伝える機能的な Fas は、胸腺細胞, CD4 陽性脾細胞, 肝細胞 (成体では、僅かに、新生仔では大量に) に発現していることを明かにした。

**Keywords** : apoptosis, anti-Fas antigen, *in vivo* analysis

\*1 日本タバコ産業 (株) 基礎医薬研究所

\*2 筑波大学免疫学講座

\*3 東京都臨床研

\*4 京都大学ウイルス研究所

Sasaki, H.<sup>\*1</sup>, Matsuda, M.<sup>\*1</sup>, Lu, Y.<sup>\*1</sup>, Ikuta, K.<sup>\*1</sup>, Matuyama, S.<sup>\*1</sup>, Hirabayashi, Y., Mitsui, H.<sup>\*1</sup>, Matsumura, T.<sup>\*1</sup>, Muramatsu, M.<sup>\*2</sup>, Tsukada, T.<sup>\*3</sup>, Aizawa, S.<sup>\*3</sup> and Inoue, T. : **A fraction unresponsive to growth inhibition by TGF- $\beta$  among the high-proliferative potential progenitor cells in bone marrow of p53-deficient mice**

*Leukemia*, 11, 239~244 (1997)

血液前駆細胞レベルにおいて TGF- $\beta$  の抑制が認められることを初めて示した。更に、p53 と TGF- $\beta$  のそれぞれのシグナル伝達経路が重なり合うことを p53 欠失マウスを用いた、高増殖性造血前駆細胞の解析により示した。

**Keywords** : p53-deficient mice, TGF- $\beta$ , high-proliferative potential progenitor cells

\*1 横浜市立大学医学部

\*2 東京大学医科学研究所

\*3 熊本大学附属遺伝発生医学研究施設

Kabaya, K.<sup>\*1</sup>, Obuchi, M.<sup>\*1</sup>, Kuwaki, T.<sup>\*1</sup>, Shibuya, K.<sup>\*1</sup>, Watanabe, M.<sup>\*2</sup>, Nemoto, K.<sup>\*2</sup>, Yoshida, K.<sup>\*2</sup>, Kusaka, M.<sup>\*1</sup>, Inoue, T. and Seki, M.<sup>\*2</sup> : **Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on the growth potential of two murine myeloid leukemias**

*Leuk Res*, 20, 27~35 (1996)

ヒト顆粒球コロニー刺激因子のマウス骨髄性白血病細胞株の増殖に対する効果を系統的かつ詳細に検討した。受容体結合アッセイと比較したところ、これらの増殖能の差との相関が明確に把握された。

**Keywords** : rhG-CSF, G-CSF receptor, murine megakaryoblastic leukemia cell line

\*1 麒麟麦酒 (株) 医薬研究室

\*2 放射線医学総合研究所

Nomura, M.<sup>\*1</sup>, Nakata, Y.<sup>\*1</sup>, Inoue, T., Uzawa, A.<sup>\*1</sup>, Itamura, S.<sup>\*2</sup>, Nerome, K.<sup>\*2</sup>, Akashi, M.<sup>\*1</sup> and Suzuki, G.<sup>\*1</sup> : ***in vivo* induction of cytotoxic T lymphocytes specific for a single epitope introduced into an unrelated molecule**

*J. Immunol Methods*, 193, 41~49 (1996)

DNA ワクチン作成のモデルとして、抗原決定基に基づくプラスミッドベクターを構築しこのものを導入した細胞で抗原プロセッシングを引き起こすことを示した。構築した遺伝子は、ラック Z 遺伝子に抗原決定基遺伝子を挿入したもので、インフルエンザ A ウイルスの核蛋白遺伝子をモデルとして使用した。このプラスミッドを導入した細胞で免疫したマウスは、抗原特異的細胞傷害性 T 細胞を *in vivo* で誘導することができた。更には、プラスミッドが遺伝子ワクチンとして機能した。即ち、電気穿孔法によってマウスの真皮にプラスミッドを導入すると、抗原特異的細胞傷害性 T 細胞を *in vivo* で誘導できた。即ち、本法は抗原決定基に基づく抗原特異的細胞傷害性 T 細胞の *in vivo* における誘導に対するモデルとして新規手段であり、ユニークな位置にある。

**Keywords** : cytotoxic T lymphocyte, antigen presentation, antigen determinant

\*1 放射線医学総合研究所

\*2 国立予防衛生研究所

Matuzawa, T.\* , Morita N.\* , Hayashi, Y.\* , Nomura, M.\* , Unno, T.\* , Igarashi, T.\* , Furuya, T., Sekita, K., Ono, A., Kurokawa, Y. and Hayashi, Y. : **A survey of the results of hematological parameters, using a common rat blood sample in Japanese laboratories**

*Comp. Haematol. Int.*, 6, 125~133 (1996)

医薬品の開発研究における非臨床試験の過程で血液学的検査に使用されている自動分析器の精度について、同一のラット血液試料とヒト用標準血液を用いて、全国の98施設を対象にサンプルサーベオランスを行い、各施設間の変動を調査した。標準血液とラット血液共に高値や低値を示す施設が存在したが、一方だけが高値や低値を示すような施設は存在しなかったこのことから、一部に機種特有の値付けの問題が存在することが推察された。一部の施設では今回の結果を参考に機器の設定を再検討する必要があると推察された。

**Keywords** : control survey, hematology, rat

\* 日本製薬工業会医薬品評価研究委員会

Matuzawa, T.\* , Hayashi, Y.\* , Nomura, M.\* , Unno, T.\* , Igarashi, T.\* , Furuya, T., Sekita, K., Ono, A., Kurokawa, Y. and Hayashi, Y. : **A survey of the values of clinical chemistry parameters obtained for a common rat blood sample in ninety-eight Japanese laboratories**

*J. Toxicol. Sci.*, 22, 25~45 (1996)

医薬品の開発研究における非臨床試験の過程で血液生化学的検査に使用されている自動分析器の精度管理について、同一のラット血清試料とヒト正常及び異常血清を用いて、全国の98施設を対象にサンプルサーベオランスを行い、各施設間の変動を調査した。その結果、1) ヒト及びラットとも変動が小さい電解質、2) ヒト及びラットとも大きな変動を示す酵素系測定項目、3) ラットだけが大きな変動を示す項目に大別された。なお、酵素系の変動原因

としては測定原理の違いが要因として上げられた。また3)に該当する項目としてはアルブミン、クレアチニンなどが上げられたが、測定原理と試薬メーカーによる差を反映していることが明らかとなった。

**Keywords** : control survey, clinical chemistry, rat

\* 日本製薬工業会医薬品評価研究委員会

Ono, A., Sekita, K., Ogawa, Y., Hirose, A., Suzuki, S., Saito, M., Naito, K., Kaneko, T., Furuya, T., Kawashima, K., Yasuhara, K., Matsumoto, K., Tanaka, S., Inoue, T. and Kurokawa, Y.: **Reproductive and developmental toxicity studies of toluene; II. Effects of inhalation exposure on fertility in rats**

*J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, 15, 9~20 (1996)

我が国では、青少年を中心とした有機溶剤乱用が大きな社会問題となっており、次世代に及ぼす影響が危惧されている。本研究では有機溶剤の中でも特に乱用者の多いトルエンをラットへ吸入暴露して生殖発生に及ぼす影響を検討した。トルエン (0, 600及び2000ppm, 6h/d) を雌では排卵から着床にいたる期間 (交配前14日~妊娠7日)、雄では精子形成に要する期間を考慮して交配前60日から交配期間を含む90日間暴露して交配や胎児への影響及び雄生殖系への影響について検討を行った。雌では、2000ppm群で暴露に伴う流産が暴露開始20日頃より観察された。交配成績にはトルエン暴露の影響は認められなかったが、2000ppm群では死産率及び死亡胚を有する母動物数の増加傾向が認められトルエン暴露による胚・胎児毒性が示唆された。一方、雄では2000ppm群で精巣上体重量の低下と精子数の減少を認めトルエンの雄生殖系への影響が示唆された。更に同群では腎臓重量の増加と尿細管の壊死が認められ、高濃度トルエンの長期暴露による腎毒性が示唆された。

**Keywords** : toluene, reproduction, inhalation

\* 信州大学医学部

Umemura, T., Hasegawa, R., Sai, K., Nishikawa, A., Furukawa, F., Toyokuni, S.\*<sup>1</sup>, Uchida, K.\*<sup>2</sup>, Inoue, T. and Kurokawa, Y.: **Prevention by 2-mercaptoethane sulfonate and N-acetylcysteine of renal oxidative damage in rats treated with ferric nitrilotriacetate**

*Jpn. J. Cancer Res.*, 87, 882~886 (1996)

雄5週令のWistarラットにFe-NTA12mgFe/kgを腹腔内投与し、Fe-NTA投与前後1時間にMESNA100mg/kgあるいはNAC200mg/kgを強制経口投与した。Fe-NTA投与後3時間目に動物を解剖し、血清中のBUN及びクレアチニン量、腎臓のTBARSレベル、腎核内DNA中の8-OHdGレベルを測定し、またHNE蛋白複合体に対する抗体をもちいた免疫染色を実施した。Fe-NTA単独投与群では上記検索項目全てが対照群に比べて有意の高い値を示し、尿管細管に抗HNE抗体陽性顆粒が検出された。一方、MESNA及びNACを併用投与した群では検索項目全てが対照群レベルとなり、抗HNE抗体陽性顆粒も認められなかった。以上の結果、MESNA及びNACはFe-NTAが引き起こす酸化ストレスの抑制に有効であることが示唆された。

**Keywords** : ferric nitrilotriacetate, 2-mercaptoethane sulfonate, N-acetylcysteine

\*<sup>1</sup> 京都大学医学部

\*<sup>2</sup> 名古屋大学農学部

Jiang, H.\*<sup>1</sup>, Yamamoto, S.\*<sup>1</sup>, Ozawa, S., Shimada, M.\*<sup>2</sup>, Yamazoe, Y.\*<sup>2</sup> and Kato R.\*<sup>1</sup>: **Inhibitory effect of TMK688 on skin tumor initiation caused by 7,12-dimethylbenz[a]**

**anthracene in relation to inhibition of aryl hydrocarbon hydroxylase activity and Cyp1a1 mRNA induction**

*Pharmacology*, 53, 123~132 (1996)

7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)によるマウス皮膚腫瘍プロモーションがTMK688により抑制された。TMK688はDMBAの活性化酵素であるaryl hydrocarbon hydroxylase (AHH)の活性を抑制した。TMK688はAHHの実体であるCYP1a1をコードするmRNAのDMBAによる誘導を阻害した。以上の機構により、TMK688による腫瘍プロモーションが抑制されることを明かにした。

**Keywords** : DMBA, mouse skin, tumor promotion

\*<sup>1</sup> 慶応大学医学部

\*<sup>2</sup> 東北大学医学部

小泉修一, 井上和秀: **海馬初代培養神経細胞のCa<sup>2+</sup>-oscillationに対するATPの抑制作用**

*神経化学*, 35, 556~557 (1996)

海馬初代培養神経細胞における、自発的なカルシウム振動 (Ca<sup>2+</sup>-oscillation) に対するATPの作用を検討した。このCa<sup>2+</sup>-oscillationはグルタミン酸による神経伝達により誘発されているが、ATP刺激により神経前シナプスの抑制性ATP受容体を介し抑制していることが示唆された。

**Keywords** : ATP, Ca<sup>2+</sup>-oscillation, synapse

Nakazawa, K. and Ohno, Y.: **Dopamine and 5-hydroxytryptamine selectively potentiate neuronal type ATP receptor channels**

*Eur. J. Pharmacol.*, 96, 119~122 (1996)

細胞外ATPにより活性化されるチャネル形成型受容体であるP2X受容体に対する薬物の作用を、cDNAを用いてアフリカツメガエルの卵母細胞に受容体を発現させ検討した。ドパミン、セロトニン、亜鉛、カドミウムは神経型のサブクラスであるP2X2受容体を介するイオン電流を増強したが、平滑筋由来であるP2X1受容体を介する電流には影響しなかった。一方、アデノシンによる電流増強はP2X1, P2X2の両方で観察された。以上のことから、サブクラス間で薬物感受性が異なること、神経細胞でのドパミン等の作用が受容体そのものへの作用に帰することが明らかとなった。

**Keywords** : ATP, recombinant channels, pharmacology

Matsuki, N.\*<sup>1</sup>, Saito, H.\*<sup>1</sup> and Nakazawa, K.: **Region-dependent ATP-sensitive neurotransmission not related to smooth muscle cells excitability in rat vas deferens**

*Pharmacol. Toxicol.*, 78, 435~438 (1996)

ラット精管の収縮の部位による差を検討した。神経の電気刺激により収縮を惹起した場合、細胞外ATPは精囊側よりも精囊側の収縮を強く抑制した。これに対し、カルシウム・チャネル阻害薬であるニフェジピンは両部位で同等の抑制効果を示した。収縮を惹起する刺激の電流-時間関係より標本の興奮性を検討した場合、無処置では精囊側の方が低い興奮性を示したが、テトロドトキシンで神経を抑制した条件では両部位で差が認められなかった。以上のことからATPに対する感受性の差は平滑筋の興奮性の違いによるものではないことが示された。

**Keywords** : rat vas deferens smooth muscle, ATP, neurogenic contraction

\* 東京大学薬学部



Matsuki, N.\*, Saito, H.\*, and Nakazawa, K.: **Regional difference in sympathetic neurotransmitter- and Ca channel-mediated responses in rat vas deferens**

*Gen. Pharmacol.*, **27**, 689~693 (1996)

ラット精管における薬物感受性の部位差を検討した。その結果以下のような知見が得られた。1) ノルアドレナリンによる収縮は精巣側の方が著明である。2) プリン受容体を介する収縮は部位差は顕著でない。3) カルシウム・チャネルのアゴニストである Bay k8644 に対する感受性は精巣側の方が高いが、カルシウム・チャネルを介する応答はチャネルの活性化が完全な状態では部位差は認められない。

**Keywords**: rat vas deference, regional difference, pharmacology

\* 東京大学薬学部

Nakazawa, K., Inoue, K., Watano, T., Koizumi, S., Fujimori, K. and Inoue, K.: **Suppression by zinc of cationic conductance that may underlie facilitation of neurotransmission in rat hippocampal neurons**

*Int. Acad. Biomed. Drug. Res.*, **11**, 102~105 (1996)

ラットの培養海馬神経細胞を用いて微量生体内成分である亜鉛の作用を電気生理学的に検討した。亜鉛は静止膜電位付近で流れる内向き電流を抑制した。電流は非選択的なカチオン・コンダクタンスを介すると考えられた。また、亜鉛により non-NMDG 型グルタミン受容体チャネル依存性の GABA による神経伝達が増強された。内向き電流の抑制は過分極及び膜抵抗の増大を誘起し、神経伝達の増強に寄与する可能性が考えられる。

**Keywords**: rat hippocampal neuron, zinc, neurotransmission

Inoue, K., Nakazawa, K., Inoue, K., Fujimori, K., Ohno, Y., Takanaka, A., Itagaki, H.\*<sup>1</sup>, Kato, S.\*<sup>1</sup>, Kobayashi, T.\*<sup>1</sup> and Kuroiwa, Y.\*<sup>2</sup>: **Evaluation of stinging-inducing chemicals using cultured neuronal cells: an electrophysiological approach**

*Toxicol. in Vitro*, **10**, 455~462 (1996)

保存剤、紫外線吸収剤などの化粧品材料の細胞膜の電気的性質に対する影響をラット副腎髄質由来 PC12 細胞及びラット知覚神経細胞を用いて検討した。試みた 9 種類のうちのすべての化合物が PC12 細胞においてカリウム電流を抑制した。この中から 5 種類の化合物を知覚神経細胞に適用したところ、カリウム電流の抑制と非選択的なカチオン・チャネルを介する電流の活性化という 2 種類の応答が観察された。PC12 細胞のカリウム電流抑制における効力順位は細胞毒性試験である MTT 試験での結果とよく一致していた。このような電気生理学的手法は皮膚刺激試験の予備試験、あるいは皮膚刺激の機序の検討として役立つと考えられる。

**Keywords**: cosmetic ingredients, minor pain, electrophysiology

\*<sup>1</sup> (株)資生堂安全・分析センター

\*<sup>2</sup> 昭和大学薬学部

Ito, K., Nakazawa, K., Koizumi, S., Liu, M., Takeuchi, K.\*, Hashimoto, T.\*, Ohno, Y. and Inoue, K.: **Inhibition by antipsychotic drugs of L-type Ca channel current in PC12 cells**

*Eur. J. Pharmacol.*, **314**, 143~150 (1996)

向精神薬の L 型カルシウム・チャネルに対する作用をラット副腎髄質由来 PC12 細胞を用いて検討した。定型向精神薬であるハロペリロール、クロロプロマジン、 $\mu\text{M}$  以

上の濃度でカルシウム・チャネルを抑制した。一方、非定型向精神薬であるフルスピライレン、ピモジドは  $\text{nM}$  あるいはそれ以下の濃度よりチャネル抑制を示した。向精神薬と薬理的に関連するドパミン受容体遮断薬やカルモデュリン阻害薬でもチャネル抑制は観察されたが、いずれも  $\mu\text{M}$  以上の濃度が必要であり、GTP 結合タンパク質阻害薬の感受性も同じではなかった。以上のことから低濃度における L 型カルシウム・チャネルの抑制は非定型向精神薬に特異的であることが示唆された。この作用はこれらの薬物が選択的効果を示す精神分裂病の陰性症状の改善に寄与する可能性が考えられる。

**Keywords**: antipsychotic drugs, L-type Ca channels, schizophrenic negative symptoms

\* 明治薬大

Sunouchi, M., Miyajima, A., Zhang, B., Kurebayashi, H. and Ohno, Y.: **Comparison of effects of urea pesticides and the metabolites in rat freshly isolated and cultured hepatocytes**

*J. Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **36**, 341 (1997)

尿素系農薬である linuron, hexaflumuron, cinosulfuron 及び thifensulfuron methyl とその分解・代謝物の肝毒性と薬物代謝酵素誘導能について遊離肝細胞及び初代培養肝細胞を用いて検討した。hexaflumuron の細胞毒性は肝に特異的で、hexaflumuron の分解・代謝物の細胞毒性は母化合物より強かったが、cinosulfuron 及び thifensulfuron methyl では細胞毒性が認められなかった。また、linuron は薬物代謝酵素機能に影響をおよぼすことが示された。

**Keywords**: cytochrome P450, ethoxyresorfin O-deethylation, viability

Tada, S.\*, Yanagisawa, J.\*, Sonoyama, T.\*, Miyajima, A., Seki, M.\*, Uii, M.\* and Enomoto, T.\*: **Characterization of the properties of a human homologue of the Escherichia coli RecQ from Xeroderma Pigmentosum group C and from HeLa cells**

*Cell Structure and Function*, **21**, 123~132 (1996)

我々は FPLC Mono Q カラムを用いて DNA helicase Q 1 (Q1) を精製する際に、色素性乾皮症 C 群 (XP-C) においては他のヒト由来の細胞に比べて Q1 が高塩濃度で溶出されることを示した。今回我々は Q1 を XP-C 及び HeLa 細胞から精製し、その性質について比較検討を行なった。それぞれの細胞より精製した 73kDa の蛋白は、塩要求性及び温度感受性は同じであった。また Q1 抗体を用いて、両細胞における細胞内分布について検討したところ Q1 は共に核に局在していた、またリン酸化や ADP-リボシル化等の修飾は受けていなかった。更に免疫沈降を行い他の蛋白との相互作用について検討を行なったが差は認められなかった。

**Keywords**: ATPase, DNA helicase, Xeroderma Pigmentosum

\* 東京大学薬学部

Miyajima, A., Kawanishi, T., Guo, X., Sunouchi, M., Takanaka, A. and Ohno, Y.: **Metabolism of N-alkyl and cyclic nitrosamines in freshly isolated rat hepatocytes**

*IN VITRO TOXICOLOGY*, **9**, 149~155 (1996)

無処置雄及び雌ラット遊離肝細胞におけるニトロソアミンの代謝を測定した。直鎖型の代謝速度は雄の方が雌に比べて 1.5~2 倍高く、環状型では雄雌共に同程度であった。ことから直鎖型と環状型では、雄雌で主として代謝に関与する酵素が異なる可能性が示唆された。P-450 誘導剤の影

響について調べたところ、直鎖型の代謝については、ニトロソジメチルアミンの代謝は Iso 処置によってのみ増大し、PB, MC 処置では無処置の場合と差がみられなかった。またニトロソメチルブチルアミン、ニトロソメチルベンジルアミンの代謝は PB 処置により増大した。これらの結果は MS 分画や P-450 標本の結果とよく対応していた。環状型の代謝は、ニトロソピペリジンの代謝は Iso, PB, MC 処置によって同程度増大した。またニトロソピロリジン、ニトロソモルフォリンの代謝は、Iso 処置によってのみ増大し、P-450IIE 1 が代謝に関与している可能性が示唆された。

**Keywords:** *N*-nitrosamine, hepatocyte, cytochrome P-450

Usami, M. and Ohno, Y.: **Teratogenic effects of selenium compounds on cultured postimplantation rat embryos**

*Teratogen. Carcinogen. Mutagen.*, 16, 27~36 (1996)

セレン化合物の発生毒性をラット全胚培養法で調べた。セレン化合物は、亜セレン酸ナトリウム、>セレン酸ナトリウム、>セレノメチオニン=セレノシスチンの順に強い毒性、並びに胚の発育抑制及び形態異常が認められた。形態異常としては、脳及び眼の異常が認められた。これらの結果から、セレンは哺乳類においても催奇形性を有すること、及び哺乳類と鳥類ではセレン化合物に対する胚の感受性が異なることが考えられた。

**Keywords:** embryo culture, sodium selenite, selenomethionine

Usami, M. and Ohno, Y.: **Partial purification and characterization of serum embryotrophic factor required for early postimplantation growth of rat embryos in culture**

*J. Exp. Zool.*, 276, 403~414 (1996)

培養ラット胚の発育に必要な血清胚栄養因子を部分精製し、性状解析した。その結果、この因子はジスルフィド結合を有する分子量約18万の酸性糖タンパク質であることが明らかになった。

**Keywords:** embryo culture, embryotrophic factor

Suvachittanont, W.\*<sup>1</sup>, Kurashima, Y.\*<sup>2</sup>, Esumi, H.\*<sup>2</sup> and Tsuda, M.: **Formation of thiazolidine-4-carboxylic acid (thioprolin), an effective nitrite-trapping agent in human body, in *Parkia speciosa* seeds and other edible leguminous seeds in Thailand**

*Food Chem.*, 55, 359~363 (1996)

タイ国産食用豆類5種について、ヒト体内亜硝酸捕捉作用を有するチオプロリン (TPRO) 含量を測定した。タイ南部で広く食される *Parkia speciosa* では、未調理時には TPRO は検出されず加熱調理後に0.14mmol/100gへと著増した。未調理の *P. speciosa* からは相当量の HCHO 及びチオール化合物が検出され、これらは加熱により減少した。他の未調理食用豆、*P. javanica* 及び *Archidendron clypearia* の TPRO 含量は各々0.006及び0.31mmol/100gであった。これらは加熱により各々0.54及び2.95mmol/100gと顕著に増加した。*A. jirringa* 及び *Leucaena leucocephala* は未調理時、加熱調理時、共に TPRO の生成はみられなかった。

**Keywords:** edible beans, Thailand, thioprolin formation

\*<sup>1</sup>Biochemistry Dept., Faculty of Science, Prince of Songkla University, Thailand

\*<sup>2</sup> 国立がんセンター東・研究所

Satarug, S.\*<sup>1</sup>, Haswell-Elkins, M. R.\*<sup>1</sup>, Tsuda, M., Mairiang, P.\*<sup>1</sup>, Sithitha worn, P.\*<sup>1</sup>, Mairiang, E.\*<sup>1</sup>, Esumi, H.\*<sup>2</sup>, Sukprasert, S.\*<sup>1</sup>, Yongvanit, P.\*<sup>1</sup> and Elkins, D. B.\*<sup>3</sup>: **Thiocyanate-independent nitrosation in humans with carcinogenic parasite infection**

*Carcinogenesis*, 17, 1075~1081 (1996)

肝吸虫、*Opisthorchis viverrini*、寄生は胆管癌発生要因とされている。本発がんにおける寄与因子の一つは炎症細胞からの慢性的・局所的一酸化窒素 (NO) の産生による体内ニトロソ化合物の生成にあると考えられている。本報は、その分子疫学的証拠をもたらした。即ち、肝吸虫感染者群と非感染者群間でプロリントテストを実施した。血漿、尿及び唾液中のニトロソアミノ酸、硝酸/亜硝酸含量の解析結果は、感染者群において有意の高レベルを示した。更に、胃の酸性条件下でのニトロソ化反応促進因子である thiocyanate に非依存性の体内ニトロソ化が示されたことから、胃以外の部位でのニトロソ化反応の可能性が支持された。V.C 添加や駆虫剤服用により、この有意差は消失した。

**Keywords:** cholangiocarcinoma, liver fluke infection, endogenous nitrosation

\*<sup>1</sup> Faculty of Medicine, Khon Kaen University

\*<sup>2</sup> 国立がんセンター東・研究所

\*<sup>3</sup> Trop. Health Program, Queensland Inst. Med. Res.

Mizojiri, K.\*<sup>1</sup>, Shindo, H.\*<sup>2</sup> and Ohno, Y.: **The possibility of predicting tissue accumulation after repeated dosing using a single-dose tissue distribution study**

*J. Toxicol. Sci.*, 21, 523~527 (1996)

単回投与組織分布試験結果から反復投与時の蓄積性の予測がどの程度可能か検討した。その結果、組織中半減期が投与間隔の約3倍を越えると予測と実際との間の差が大きくなることが判明した。

**Keywords:** tissue accumulation, repeated-dose administration, tissue distribution

\*<sup>1</sup> 塩野義研究所

\*<sup>2</sup> 三共研究所

Fujii, H., Makinose, T., Ogasawara, H., Murata, A., Takagi, H., Furukawa, F., Onodera, H. and Hoshiya, T.: **Development of a toxicologic pathology system using personal computer network**

*J. Toxicol. Pathol.*, 9, 13~21 (1996)

毒性病理所見集計システムである MacMic を開発した。本システムはパソコンを使用し、安いコストと使い勝手の良さの両立を実現し、癌原性試験を含むすべての毒性試験をカバーしている。MacMic は検鏡者の使い勝手を第一に作られ、当該個体の体重、臓器重量、尿、血液学、血液生化学のデータが参照でき、またこれらを対照群のデータと比較する事ができる。診断名及び所見用語は、辞書から選択する。また所見を、当該試験における他の群、他の個体のデータから選択して入力することも可能である。すべての操作はファンクションキーに振り分けられており、これらのキーを押すだけで、目的の操作が実行できる。組織所見検査の進捗状況を容易に知る事も可能である。データ入力時における排他制御機能を備える事により、複数の病理研究者による同時入力も可能である。MacMic は、多くの研究機関でも適用でき、病理システムとしての汎用性が証明されている。

**Keywords:** toxicologic pathology system, MacMic, personal computer

Takahashi, M. and Maita, K.: **Problems in interpretation of carcinogenicity studies**

*J. Toxicol. Sci.*, 21, 493 (1996)

発がん性試験は現在までラットとマウスの2種を用いて実施されてきたが、マウスのデータは偽陽性結果が多いことから、2種を義務づけることに疑義が出された。ICHでは、マウスの発がん性試験の有用性につきデータベースによる検討を行った結果、その意義に否定的な考え方が示された。しかしながら、20年以上にわたってラット及びマウスの発がん性試験を義務づけてきたのはそれなりの理由もあるわけであり、医薬品のデータベースのみから不要であるとすぐに廃止に踏み切るほど完全にデータの収集ができたわけではない。ICHでは、まず2年間の発がん性試験を、マウスが感受性が高いことが示されている場合を除き、ラットを用いて実施しマウスの試験は必ずしもなくてもよいとされた。その代わりに、現在、開発中である2段階発がん試験法、トランスジェニックマウスを用いる方法、新生児動物を用いる方法など適切な試験を選び実施することを求めている。これらの方法はいずれも完成したものでないことから、将来、これらの方法が注目され改良が加えられることによって、信頼性の高い試験法が開発される可能性が期待されている。

**Keywords** : carcinogenicity study, ICH, transgenic mice

Kim, H.-C., Cha, S.-W., Ha, C.-S., Roh, J.-K., Lee, Y.-S., Furukawa, F., Nishikawa, A. and Takahashi, M.: **Reappraisal of eight representative carcinogenic and non-carcinogenic compounds in a new medium-term rat liver bioassay using D-galactosamine.**

*Cancer Lett.*, 104, 85~90 (1996)

我々が開発したD-ガラクトサミンによる、GST-Pを指標とした新しい中期肝発癌性検索モデルでアフラトキシンB<sub>1</sub>、ベンツピレン、ジェチルステイルベストロール、ウレタン、サッカリンナトリウム、ブセチン、D-マニトール、塩化ナトリウムの8種類の化合物の肝発癌性について検索した。肝発癌物質であるアフラトキシンB<sub>1</sub>、ジェチルステイルベストロール、ウレタンと非肝発癌物質であるベンツピレンは陽性を示し、サッカリンナトリウム、塩化ナトリウム、ブセチン、D-マニトールは陰性を示した。今までの肝部分切除処置を行う中期肝発癌検索モデルとの結果の一致が示された。以上の結果から、このモデルは有用であり、また鋭敏であることが示された。

**Keywords** : medium-term rat liver bioassay, GST-P, D-galactosamine

Furukawa, F., Nishikawa, A., Imazawa, T., Lee, I.-S., Kasahara, K. and Takahashi, M.: **inhibitory effects of nicotinamide on BOP-initiated pancreatic carcinogenesis in hamsters**

Recent Advances in Gastroenterological Carcinogenesis I. eds. by E. Tahara, K. Sugimachi and T. Oohara, Monduzzi Editore, Bologna, pp. 585~588 (1996)

Nicotinamide (NA)は広く食品に含まれ、ビタミンの強化剤としても使用されている。NAはpoly (ADP-ribose) polymeraseの活性化を抑制し、その構造類似化合物は膵及び肺の腫瘍発生を抑制する。ハムスターのN-nitrosobis (2-oxopropyl)amine (BOP)膵発癌モデルを用いてNAの影響を検討した。5週齢の雌シリアンゴールデンハムスターに10mg/kgのBOPを1週間に1回、計3回投与した。その1週間後から1群及び2群には0.5%及び0.2%の割合でNAを飲水中に混じて与え、3群はBOP単独群とした。実験

は52週後に終了した。異形成の発生率は3群に比し、1群と2群で有意に減少した。また、異形成の多発性は3群に比し、1群、2群で有意に減少した。また、膵腺癌の発生率には有意な差はなかった。腫瘍性病変(腺癌と異形成の合計)では3群に比し、1群で有意に減少した。NAはポストイニシエーション期に投与すると膵発癌に対し、抑制的に作用する可能性が示された。

**Keywords** : BOP, nicotinamide, pancreatic carcinogenesis

Mitsumori, K., Onodera, H., Takahashi, M.\*, Shimo, T., Yasuhara, K., Takegawa, K., Takahashi, M. and Hayashi, Y.: **Promoting effect of large amounts of vitamin A on cell proliferation of thyroid proliferative lesions induced by simultaneous treatment with thiourea**

*Cancer Lett.*, 103, 19~31 (1996)

ラット甲状腺腫瘍発生に対する過剰ビタミンA (VA) 及びthiourea (TU) 同時投与の影響を検討するため、雄F344ラットにN-bis (2-hydroxypropyl) nitrosamine 2800mg/kgを単回皮下投与し、1週間後より19週間にわたり0.1%VA添加飼料 (VA群)、0.2%TU添加飲料水 (TU群)、0.1%VA+0.2%TU (TU+VA群)、水道水及び基礎飼料 (対照群)を与えた。TU及びTU+VA群の血清T3及びT4は対照群に比べて有意に減少し、血清TSH値は顕著に増加した。T3, T4の減少及びTSHの増加の程度は、TU群よりもTU+VA群で顕著に強かった。甲状腺の腫瘍性病変はTU及びTU+VA群のみに発生した。被膜内濾胞上皮細胞増殖巣の多発性はTU群に比べてTU+VA群で有意に増加した。被膜下の肥大濾胞上皮細胞、過形成及び腺腫様腫瘍の細胞増殖活性は、TU単独よりもVAとの併用群で有意に高かった。肝臓においては、TU及びTU+VA群で肝細胞の小葉中心性肥大が認められ、それは特に後者で顕著であった。併用群のそれらの肥大肝細胞はGST-P抗体に対して強い陽性を示した。今回の結果から、TU及び過剰のVAの同時投与によりTSHが放出され、その刺激によって、ラット甲状腺濾胞上皮細胞の増殖性病変における細胞増殖活性が増強されることが示唆された。

**Keywords** : thyroid carcinogenesis, vitamin A, thiourea

\* 佐々木研究所

Mitsumori, K., Takegawa, K., Shimo, T., Onodera, H., Yasuhara, K. and Takahashi, M.: **Morphometric and immunohistochemical studies on atrophic changes in lympho-hematopoietic organs of rats treated with piperonyl butoxide or subjected to dietary restriction**

*Arch. Toxicol.*, 70, 809~814 (1996)

piperonyl butoxideを投与したラットにはリンパ・造血器系に萎縮性変化が認められるが、それが直接的な毒性影響によるものかあるいは低栄養によるものかは不明である。そこで雄のF344ラットに2週間にわたり2.5%のpiperonyl butoxideを添加した飼料を与える群、及び飼料摂取を64%制限する群(低栄養群)を設けた。低栄養群及び2.5% piperonyl butoxide群共に、体重増加の顕著な抑制、白血球数の減少、リンパ組織におけるT/Bリンパ球の減少、骨髄の低形成、これらの組織におけるPCNA陽性率の減少が認められた。PCNA陽性率及び脾臓のT細胞領域に関する画像解析の結果、胸腺及び脾臓におけるT細胞の減少は2.5% piperonyl butoxide群でより強かったが、piperonyl butoxide投与群にみられたこれらの変化は、制限食群の動物にみられたものと本質的に同等であった。これらの結果より、2.5% piperonyl butoxideを与えたラット

にみられたリンパ・造血器系の所見は、おそらく摂餌量減少による低栄養に起因するものであることが示唆された。

**Keywords:** piperonyl butoxide, diet restriction, atrophy of lympho-hematopoietic tissues

Yamamoto, K.\*<sup>1,2</sup>, Mitsumori, K., Kodama, Y., Matsunuma, N.\*<sup>3</sup>, Manabe, S.\*<sup>3</sup>, Okamiya, H.\*<sup>4</sup>, Suzuki, H.\*<sup>4</sup>, Fukuda, T.\*<sup>5</sup>, Sakamaki, Y.\*<sup>5</sup>, Sunaga, M.\*<sup>5</sup>, Nomura, G.\*<sup>6</sup>, Hioki, K.\*<sup>2</sup>, Wakana, S.\*<sup>2</sup>, Nomura, T.\*<sup>2</sup> and Hayashi, Y.: **Rapid induction of more malignant tumors by various genotoxic carcinogens in transgenic mice harboring a human prototype c-Ha-ras gene than in control non-transgenic mice**

*Carcinogenesis*, 17, 2455~2461 (1996)

ヒト型 c-Ha-ras 遺伝子を導入した CB 6 F 1 トランスジェニックマウス (rasH<sub>2</sub>) の短期発癌性試験系モデルの有用性評価の第一段階として、種々の遺伝毒性発癌物質に対する発癌感受性を検討し、対照の CB 6 F 1 マウス (non-Tg) と比較した。4-nitroquinoline-1-oxide, cyclophosphamide, N,N-dimethyl-nitrosamine, N-methyl-N-nitrosourea, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine 及び methylazoxymethanol について行った 6 ヶ月の短期発癌性試験の結果、rasH<sub>2</sub> は non-Tg に比べてこれらの遺伝毒性発癌物質に対して感受性が高いことが示された。すなわち、rasH<sub>2</sub> は non-Tg に比べて早く腫瘍を発現し、悪性腫瘍は発癌物質を投与した rasH<sub>2</sub> のみにみられた。各発癌物質は rasH<sub>2</sub> においてその標的臓器に腫瘍を誘発した。自然発生腫瘍としては肺の腺腫がわずかに発現したのみであった。以上のように、rasH<sub>2</sub> に種々の遺伝毒性発癌物質を投与した場合、non-Tg に比べてより早期に、高頻度かつより悪性度の高い腫瘍の発生が発現することが示された。rasH<sub>2</sub> は短期発癌性試験系を開発するにおいて有望な動物モデルの候補と考えられる。

**Keywords:** transgenic mouse, rasH<sub>2</sub>, carcinogenicity

\*<sup>1</sup> 慶応大学医学部

\*<sup>2</sup> 実験動物中央研究所

\*<sup>3</sup> 三共・安全性研究所

\*<sup>4</sup> 山之内製薬・安全性研究所

\*<sup>5</sup> 中外製薬・富士研究所

\*<sup>6</sup> 前臨床医学研究所

Mitsumori, K., and Nishikawa, A.: **Assessment of carcinogenicity using transgenic animals**

*J. Toxicol. Sci.*, 21, 479~482 (1996)

ICH の EWG より、*in vivo* における発癌性評価のための短期試験系として、トランスジェニック (Tg) 動物の使用が提案され、米国や日本でヒト型 c-Ha-ras 導入 Tg マウス (rasH<sub>2</sub>)、v-Ha-ras 導入 Tg マウス (TG.AC) 及び p53 ノックアウトマウス (p53KO) の検証試験が進行中である。rasH<sub>2</sub> に遺伝毒性発癌物質及び非遺伝毒性発癌物質を 26 週間投与して検討した結果、rasH<sub>2</sub> は遺伝毒性発癌物質の発癌性検出に有用であるとの成績が得られている。TG.AC に種々の化合物を投与して短期実験を行った結果、TG.AC は非遺伝毒性発癌物質の検出に有用であり、一部の遺伝毒性発癌物質にも有効であるとの報告がなされている。p53KO について遺伝毒性発癌物質、遺伝毒性非発癌物質及び非遺伝毒性発癌物質を用いた約 6 ヶ月の実験を行ったところ、遺伝毒性発癌物質について有用との結果が得られている。以上の結果より rasH<sub>2</sub> 及び p53KO マウスは遺伝毒性発癌物質の発癌性検出に適しており、TG.AC マウスは非遺伝毒性発癌物質の腫瘍プロモーション作用の検出に適していることが示唆されたが、Tg マウスを安全性評価に使

用するためには、さらなる実験と効果的なストラテジーの考案が必要である。

**Keywords:** ICH, transgenic, carcinogenicity

Okuno, Y.\*<sup>1</sup>, Kunimatsu, T.\*<sup>1</sup>, Tanahashi, K.\*<sup>1</sup>, Watanabe, T.\*<sup>1</sup>, Takahashi, M.\*<sup>2</sup>, Takegawa, K., Onodera, H. and Mitsumori, K.: **Effect of simultaneous treatment of large amounts of vitamin A and thiourea on thyroidal iodine uptake and organification in rats**

*J. Toxicol. Pathol.*, 9, 385~390 (1996)

Thiourea (TU) 誘発ラット甲状腺増殖性病変における細胞増殖活性に対する過剰のビタミン A (VA) の増強効果のメカニズムを検討するために以下の実験を行った。F 344 ラットに 4 週間にわたり 0.1% TU 添加飲料水 (TU 群), 0.1% VA 添加飼料 (VA 群), 0.1% TU+0.1% VA (TU+VA 群) 及び基礎飼料 (対照群) を与えた。対照群に比べて TU 及び TU+VA 群において、甲状腺、肝臓及び下垂体の重量が増加し、血清 T4 値が減少し、甲状腺へのヨウ素の取り込み及び有機化が減少した。ヨウ素の取り込みは VA 群においても減少した。しかし、TU 及び TU+VA 群との間にこれらのパラメーターに明らかな差は認められなかった。T3 及び TSH 値には投与の影響はみられなかった。組織学的に TU 及び TU+VA 群の甲状腺においてびまん性の濾胞上皮細胞の過形成が発現したが、甲状腺、肝臓及び下垂体の組織学的所見については両群間に顕著な差は認められなかった。今回の結果から、甲状腺の増殖性病変に対する VA の増強効果は甲状腺へのヨウ素の取り込みへの影響によるものではないことが示唆された。

**Keywords:** thyroid iodine uptake, vitamin A, thiourea

\*<sup>1</sup> 住友化学・環境生物科学研究所

\*<sup>2</sup> 佐々木研究所

三森国敏: **神経・免疫毒性試験ガイドラインの国際的動向と精巢毒性病理評価上の問題点**

静岡実験動物研究会会報, 23, 7~16 (1996)

神経毒性試験のガイドラインとしては、わが国では農水省及び化審法において遅発性神経毒性試験法のガイドラインが制定されているのみであるが、米国 EPA 及び OECD ではその他の哺乳動物を用いた神経毒性試験ガイドラインが公表されている。これらの他の試験法は莫大な設備や労力を要する上、必ずしも全ての神経毒性を検出できるとは限らないが、現行の試験では神経毒性を見逃す危険性が高いことから、わが国においても導入すべきであると考えられる。免疫毒性試験については、わが国では医薬品の免疫原性を検出するための試験が従来から実施されているが、化学物質によって免疫組織が障害を受け、免疫修飾作用が誘発される狭義の免疫毒性についての検査項目は追加されていない。一方、米国や欧州では近年これらの免疫修飾作用を検出する試験法が提案されている。わが国においても欧米諸国の免疫毒性試験法を考慮したガイドラインの作成が早急に望まれる。精巢毒性発現機序の解明のためには精子形成サイクルを考慮した解析が必要であることが明確になってきているが、その解析を実施する上でいくつかの問題点が存在する。今後この分野における鏡検担当者の知識の向上と種々の精巢毒性研究の蓄積が強く望まれる。

**Keywords:** neurotoxicity, immunotoxicity, testis

三森国敏, 安原加壽雄: **化学物質による精巢毒性とアポトーシス**

日本獣医病理学会会報特集号, 25~27 (1996)

化学物質による精巢毒性において Nitrobenzene (NB) は

セルトリ細胞, ethane-1-dimethanesulfonate (EDS) はライディッヒ細胞を障害すること, また, これらの細胞障害に続いて NB では投与後 1 日に, EDS では 3~5 日からパキテン期精母細胞が選択的に変性に陥ることが知られている。この原因としてナース細胞であるセルトリ細胞からの栄養障害やホルモンの不均衡などによる二次的な障害の可能性が推察され, アポトーシスの発現も推察されることから, その病理発生について検討を行った。NB あるいは EDS をラットに単回投与後定期的に精巣を摘出し, アポトーシス証明のため TUNEL 法による酵素組織化学, また, DNA の断片化を確認のためアガロースゲルで電気泳動を行った。NB では投与後 1 日に変性したパキテン期精母細胞は TUNEL 法で陽性を示し, DNA の断片化も認められた。また, EDS では投与後 1 日に変性したライディッヒ細胞及び 3~5 日に変性したパキテン期精母細胞ともに TUNEL 法で陽性を示した。これらの成績より, セルトリ細胞あるいはライディッヒ細胞障害物質においては, その誘発される毒性変化にアポトーシスの誘導が関与していることが示された。

**Keywords:** testicular toxicity, apoptosis

Yasuhara, K., Mitsumori, K., Imazawa, T., Yoshimura, H., Onodera, H., Takegawa, K., Takahashi, M., Shirai, W.\* and Hayashi, Y.: **Ultrastructure and cell proliferative activities of karyomegalic alveolar epithelial cells in early pulmonary inflammatory lesions of Syrian golden hamsters induced by N-methyl-N-nitrosourethane**

*J. Vet. Med. Sci.*, 58, 825~831 (1996)

MNUR 誘発肺炎炎症性病変における巨核肺胞上皮細胞の生物学的特徴を明らかにし, 更にこの細胞が前腫瘍性病変と成りうるか否かを検討するため, ハムスターに動物当り 0.6mg の MNUR を隔週 1 回, 計 5 回皮下投与し, 定期的に肺を検索した。1 週では, 間質の水腫, 細胞浸潤のために肺胞壁は著しく肥厚し, 肺胞壁に沿って再生上皮細胞がみられ, その中に巨大核を有する細胞が認められた。この細胞は電顕的に肺胞 II 型細胞とされ, 炎症性病変の軽減に伴い 4 週以降減少した。PCNA 陽性指数は 1 週で約 15 個であったが, 4 週以降は有意に減少した。これらの細胞の核 DNA 含量は正常細胞の 2 倍体に比べ広い範囲に亘る分布がみられた。これらの成績より, 巨核肺胞上皮細胞は MNUR 処置により発現した突然変異細胞と考えられ, これらの細胞が前腫瘍性病変と成り得る可能性は非常に低いものと推察された。

**Keywords:** karyomegalic alveolar epithelial cell, MNUR-induced pulmonary inflammatory lesions, cell proliferative activity

\* 日本大学生物資源科学部

Yasuhara, K., Mitsumori, K., Yoshimura, H., Imazawa, T., Onodera, H., Takegawa, K., Takahashi, M., Shirai, W.\*<sup>1</sup>, Fuziwara, K.\*<sup>1</sup> and Hayashi, Y.\*<sup>2</sup>: **Relationship between the pulmonary fibrosis and lung proliferative lesions induced by different doses of N-methyl-N-nitrosourethane in Syrian golden hamsters**

*J. Toxicol. Pathol.*, 9, 315~322 (1996)

びまん性間質性肺炎や肺線維症に肺癌が合併する事が疫学的に報告されているが, 肺線維症の発症から肺癌に至る過程には多くの要因が関与しているため, その機序は殆ど解明されていない。ハムスターに催炎性並びに肺発がん性が知られている MNUR 0.6mg を隔週 5 回皮下投与し, 誘

発された肺増殖性病変が炎症性病変に続発するか否かを検討した結果, 腫瘍は必ずしも随伴しなかったことから, より低い用量の MNUR を投与し, この関係の解明を行った。0.6mg を隔週 5 回投与群では全例に肺腫瘍が発現し, 35% に線維の増生が随伴したが, 0.2mg を毎週 5 回投与した群では肺腫瘍は 50% に発現するのみで, 線維の増生を伴うものは認められなかった。更に, 0.3mg 単回投与群では, 肺腫瘍は認められなかった。これらの成績より, MNUR 誘発肺腫瘍は線維化巣と関係して発生するものばかりでないことが示された。

**Keywords:** MNUR, pulmonary fibrosis, lung cancer

\*<sup>1</sup> 日本大学生物資源科学部

\*<sup>2</sup> 北里大学薬学部

Matsui, H., Toyoda, K., Kawanishi, T., Mitsumori, K., Takahashi, M., Fukuhara, K. and Miyata, N.: **Advantages of simplified quantitative morphometry using stage grouping analysis of spermatogenic cycle for evaluation of the testicular toxicity of ethylene-1,2-dimethanesulfonate in rats**

*J. Toxicol. Pathol.*, 9, 285~292 (1996)

精子形成サイクルのステージのグループ化による簡便的 精巣毒性評価法の有用性を検討するため, 10 週齢の雄ラットに 100mg/kg 体重量の ethylene-1,2-dimethanesulfonate (EDS) を単回強制経口投与し, 1, 3, 7, 14 及び 28 日後と経時的に屠殺する実験を行った。精子形成サイクルのステージを I~VI, VII~VIII, IX~XI, XII~XIV の 4 つのグループに分けて各グループにおける 5 精細管当たりの精上皮細胞数をカウントし, 従来からのより厳密なステージ解析による精上皮細胞数の検索結果と比較検討した。その結果, いずれの検索法においても同様に EDS 処置の 3 日後にはライディッヒ細胞の消失を認め, その後パキテン期精母細胞数と円形精子細胞数の減少を認めた。以上の結果から, 今回考案した簡便的ステージ解析法が従来からのより厳密なステージ解析法と同程度の精巣傷害検出感度を有することが明らかとなり, 我々の簡便的ステージ解析法が精巣毒性評価法として有用であることが証明された。

**Keywords:** ethylene-1,2-dimethanesulfonate, testicular toxicity, testicular histopathology

Nagaoka, T., Onodera, H., Hayashi, Y. and Maekawa, A.\*: **Influence of high-fat diets on the occurrence of spontaneous uterine endometrial adenocarcinomas in rats**

*Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, 15, 167~177 (1996)

子宮内腺癌好発系 Donryu ラットに高脂肪食を与え, 子宮内腺癌の自然発生におよぼす高脂肪摂取の影響を検討した。8 週齢の雌 Donryu ラット 90 匹を 3 群に分け, 第 1 群には基礎飼料 (固形) のみを, 第 2 群及び第 3 群には各々 10% および 20% コーン油含有粉末飼料を 66 週齢まで与えた。各動物について性周期を経時的に調べ, 66 週齢で生殖器の組織学的検査を行った。別に, 20% コーン油含有食を与えた動物について, 性ホルモンの測定と生殖器の組織学的検査を経時的に行った。

第 3 群では体重が明らかな高値を示したが, 第 2 群と第 1 群との間に差を認めなかった。カロリー摂取量及び腹腔内脂肪重量は第 2 群, 第 3 群で増加していた。第 2, 3 群共に, 第 1 群に比し持続的発情出現頻度が 8 ヶ月齢まで高値の傾向があった。最終屠殺動物については各群間で卵巣や膈の形態変化に差はみられなかったが, 子宮の腺癌・腺腫

の出現率が第1群の0%,7%に対して第2及び第3群では各々18%,14%及び7%,10%と,用量相関性はなかったが脂肪食を与えた群でやや増加する傾向にあった。経時的検索で20%コーン油含有食投与により,エストロゲン/プロゲステロン比が早期より高値の傾向を示し,また子宮や卵巣の組織変化も早期から発現する傾向が見られた。

以上のことから,わずかであるがDonryuラット子宮内膜腺癌の自然発生に対する高脂肪食の促進効果が示唆され,その原因として高脂肪食投与による内分泌環境の imbalance,特にE/P比の高値が関与している可能性が考えられた。

**Keywords:** high-fat, endometrial adenocarcinoma, Donryu rat

\* 佐々木研究所病理部

Nishikawa, A., Furukawa, F., Ikezaki, S., Tanakamaru, Z., Chung F.-L.\*, Takahashi, M. and Hayashi, Y.: **Chemopreventive effects of 3-phenylpropyl isothiocyanate on hamster lung tumorigenesis initiated with *N*-nitrosobis(2-oxopropyl)amine.**

*Jpn. J. Cancer Res.*, 87, 122-126 (1996)

ハムスターにおける *N*-nitrosobis(2-oxopropyl)amine (BOP) 誘発癌に対する 3-phenylpropyl isothiocyanate (PPITC) のイニシエーション期における化学予防効果を検討した。5週齢の雌シリアンゴールデンハムスターに20mg/kg の BOP を1週間に1回,計2回皮下投与した。BOP 投与2時間前に1群は100 $\mu$ mol,2群は10 $\mu$ mol の PPITC を,3群は溶媒対照でコーン油を投与した。その他に PPITC の陰性対照群を設け,実験は51週後に終了した。肺の腺腫及び腺癌は,発生率及び多発性で3群に比し,1群及び2群で有意に減少した。抑制率は1群で94%,2群で59%であり,PPITC の投与濃度に依存した抑制が認められた。その他の BOP の標的臓器である膵臓,肝臓及び腎臓については,肝臓を除いて抑制傾向を示した。今回の検索の結果,PPITC は発癌性及び明らかな毒性を示さず,ハムスター BOP 誘発の肺腫瘍において PPITC の化学予防効果が明らかとなった。

**Keywords:** isothiocyanate, chemoprevention, hamster

\* American Health Foundation

Nishikawa, A., Furukawa, F., Uneyama, C., Ikezaki, S., Tanakamaru, Z., Chung F.-L.\*, Takahashi, M. and Hayashi, Y.: **Chemopreventive effects of phenethyl isothiocyanate on lung and pancreatic tumorigenesis in *N*-nitrosobis(2-oxopropyl)amine-treated hamsters**

*Carcinogenesis*, 17, 1381-1384 (1996)

ハムスターにおける *N*-nitrosobis(2-oxopropyl)amine (BOP) 誘発癌に対する phenethyl isothiocyanate (PEITC) のイニシエーション期における化学予防効果を検討した。5週齢の雌シリアンゴールデンハムスターに20mg/kg の BOP を1週間に1回,計2回皮下投与した。BOP 投与2時間前に1群は100 $\mu$ mol,2群は10 $\mu$ mol の PEITC を,3群は溶媒対照でコーン油を投与した。その他に PEITC の陰性対照群を設け,実験は52週後に終了した。肺の腺腫及び腺癌は,発生率及び多発性で3群に比し,1群及び2群で有意に減少した ( $P < 0.01$  及び  $P < 0.05$ )。抑制率は1群で100%,2群で82%であり,PEITC の投与濃度に依存した抑制が認められた。膵腫瘍は3群に比し,1群が有意に減少し ( $P < 0.05$ )。肝及び腎の腫瘍は,1群及び2群で有意差はないが減少傾向を示した。今回の検索の結果,PEITC は明らかな毒性を示さず,ハムスター BOP 誘発の肺及び膵

腫瘍に対する PEITC の化学予防効果が明らかとなった。

**Keywords:** PEITC, chemoprevention, hamster

\* American Health Foundation

Nishikawa, A., Furukawa, F., Lee, I.-S., Uneyama, C., Imazawa, T., Tanakamaru, Z., Kasahara, K. and Takahashi, M.: **Chemopreventive effects of oltipraz on glandular stomach carcinogenesis in rats treated with *N*-methyl-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidine**

*Recent Advances in Gastroenterological Carcinogenesis I.* eds. E. Tahara, K. Sugimachi and T. Oohara, Monduzzi Editore, Bologna, pp. 1171-1174 (1996)

*N*-methyl-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG) によるラットの腺胃発癌に対する駆虫剤 4-methyl-5-(2-pyrazinyl)-1,2-dithiole-3-thione (oltipraz) のイニシエーション期における修飾効果を検討した。雄 Wistar 系ラット120匹を6群に配し,1-3群(各30匹)には100ppm の MNNG をそれぞれ飲料水に混じり10週間にわたって与えた。1及び2群には0.04%及び0.02%の oltipraz を MNNG 投与の1週間より12週間混餌投与し,3群には基礎食のみを与えた。4及び5群はイニシエーション処置せずに1及び2群の対照とし,6群は無処置対照群とした。全群とも81週で剖検に供し,腺胃の増殖性病変について組織学的に検索した。腺胃における腺癌の発現頻度は,1群(16.7%)では3群(56.7%)に比して有意に低かった。1群の腺癌の個体あたりの平均個数(0.20)は,3群(0.63)に比して有意に減少した。以上の如く,oltipraz をイニシエーション時期に投与することにより,ラット腺胃の発癌に対して化学予防効果を示すことが明らかになった。

**Keywords:** oltipraz, chemoprevention, stomach cancer

Lee, I.-S., Nishikawa, A., Furukawa, F., Uneyama, C., Kim, H.-C., Imazawa, T., Kasahara, K. and Takahashi, M.: **Effects of phenethyl isothiocyanate on xenobiotic metabolizing enzymes and cell kinetics in hamsters treated with *N*-nitrosobis(2-oxopropyl)amine.**

*Recent Advances in Gastroenterological Carcinogenesis I.* eds. E. Tahara, K. Sugimachi and T. Oohara, Monduzzi Editore, Bologna, pp. 1187-1191 (1996)

アブラナ科植物に豊富に含まれている phenethyl isothiocyanate (PEITC) の発癌抑制メカニズムを追究する目的で, *N*-nitrosobis(2-oxopropyl)amine (BOP) を処置したハムスターに PEITC を前投与し,生体異物代謝酵素系及び細胞増殖活性に及ぼす影響について検索した。5週齢の雌性シリアンゴールデンハムスターに, BOP 皮下投与の2時間前に PEITC を強制経口投与し, BOP 投与の6及び22時間後に組織を採取した。PEITC の前処置は, BOP の投与によって増加した肝臓における CYP 2B1 を含む幾つかの CYP 酵素を有意に減少させたが,膵臓及び肺における CYP レベルには影響を及ぼさなかった。一方, PEITC 前処置は, BOP 投与に関係なく,肝臓内の glutathione 量及び glutathione *S*-transferase 活性をむしろ低下させた。興味あることに, PEITC 前処置は標的細胞である膵臓の腺房及び導管,細気管支,及び腎尿細管における細胞増殖活性を用量相関性に低下させた。以上の成績は, PEITC が肝における生体異物代謝第1相酵素への影響と標的細胞における細胞回転の制御により化学的予防効果を発揮する可能性を示唆する。

**Keywords:** PEITC, chemoprevention, mechanism

Ikezaki, S., Nishikawa, A., Furukawa, F., Enami, T.,

Tanakamaru, Z., Kim, H.-C., Fukushima, S.\* and Takahashi, M.: **Improvement of hamster-lung fibrosis model by repeated intratracheal administration of bleomycin** *J. Toxicol. Pathol.*, 9, 23~28 (1996)

肺の線維化を効率よく発現し、死亡率の低いブレオマイシン (BLM) 誘発肺線維症モデルの作出をハムスターで検討した。6週齢の雄シリアンゴールデンハムスター25匹を5群 (各群5匹) に配した。1-4群は2.5U/kgのBLMを実験0日に気管内投与し、更に1及び2群では14日にそれぞれ2.5又は1.0U/kgのBLM (気管内) を、3群では7及び14日にそれぞれ1.0U/kgのBLM (気管内) を、4群では10及び14日に20U/kgのBLM (腹腔内) を投与した。5群は溶媒対照とし、全群とも28日に剖検に供した。1及び3群の生存率は4/5 (80%)、他群は全例生存した。死亡例では組織学的には顕著な線維化がみられ、更にうっ血、水腫、炎症性細胞浸潤及び出血を随伴して認められた。1群では計画屠殺時の肺重量が有意に増加し、組織学的には肺線維化が他群に比して広範に認められた。以上の如く、低頻度な死亡率及び顕著な肺線維化が発現したことから、ハムスターのBLM誘発肺線維症モデルの作出には2.5U/kgを2週間間隔で2回気管内投与する (1群) のが適当と考えられた。

**Keywords**: hamster, lung fibrosis, bleomycin

\* 大阪市立大学医学部第一病理学教室

Ikezaki, S., Nishikawa, A., Enami, T., Furukawa, F., Imazawa, T., Uneyana, C., Fukushima, S.\* and Takahashi, M.: **Inhibitory effects of the dietary antioxidants butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene on bronchioloalveolar cell proliferation during the bleomycin-induced pulmonary fibrosing process in hamsters**

*Fd. Chem. Toxic.*, 34, 327~335 (1996)

抗酸化剤 butylated hydroxyanisole (BHA) と butylated hydroxytoluene (BHT) の肺線維化に対する効果をブレオマイシン (BLM) 誘発肺線維症モデルを用い検討した。更に、線維化の進展過程で出現する細気管支肺胞上皮の過形成巣の細胞増殖活性に対する影響について、増殖細胞核抗原 (PCNA) 及び核小体形成部位関連蛋白 (AgNORs) を指標として検討した。6週齢の雄シリアンゴールデンハムスター90匹を6群に配し、1-3群 (各20匹) では2.5U/kgのBLMを2回 (0及び14日) 気管内投与し、更に1日からそれぞれ1% BHA食、1% BHT食及び基礎食を与えた。4-6群 (各10匹) はBLM処置なしに1% BHA食、1% BHT食及び基礎食を与え、全群とも42日に剖検に供した。1群 (BLM/BHA) の致死率 (5%) は2群 (BLM/BHT) 及び3群 (BLM) (それぞれ15及び20%) に比して低かった。BHA及びBHT処置はBLM誘発の肺重量の増加を抑制し、肺の線維化、マクロファージ集簇及び細気管支肺胞上皮の過形成を軽減した。肺胞上皮過形成巣のPCNA-labelling index及び核あたりの平均AgNORs数は、BHA及びBHT処置により有意に低下した。以上より、抗酸化剤BHA及びBHTはBLMによる肺線維化の進展と同時に、細気管支病変の増殖動態に対しても抑制的に作用することが明らかになった。

**Keywords**: pulmonary fibrosis, antioxidant, cell proliferative activity

\* 大阪市立大学医学部第一病理学教室

Ikezaki, S., Nishikawa, A., Furukawa, F., Tanakamaru, Z., Kim, H.-C., Mori, H.\* and Takahashi, M.: **Chemopreventive effects of 24R, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>, a vita-**

**min D<sub>3</sub> derivative, on glandular stomach carcinogenesis induced in rats by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and sodium chloride**

*Cancer Res.*, 56, 2767~2770 (1996)

N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) 及び塩化ナトリウムによる腺胃発癌過程におけるビタミンD<sub>3</sub>誘導体24R, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (24R, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) のプロモーション期における修飾効果を検討した。雄Wistar系ラット130匹を5群に配し、1-3群 (各30匹) には100ppmのMNNGと10%の塩化ナトリウムを、それぞれ飲料水及び基礎食に混じり8週間にわたって与えた。その後、1及び2群には5又は2.5ppmの24R, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>を57週間混餌投与し、3群には基礎食のみを与えた。4群はイニシエーション処置せずに1群の対照とし、5群は無処置対照群とした。全群とも65週で剖検に供し、腺胃の増殖性病変について組織学的に検索した。腺胃における増殖性病変 (異型の過形成巣と腺癌) の発現頻度は1群 (24%) では3群 (70%) に比して有意に低かった。1群 (0.31) 及び2群 (0.66) の異型の過形成巣又は腺癌の個体あたりの平均個数は、3群 (1.21) に比して有意に減少した。尿中へのカルシウム排泄はイニシエーション処置の有無に関わらず、10, 30, 62週の時期とも24R, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>の用量に相関して増加した。以上の如く、24R, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>をプロモーション時期に投与することにより、ラット腺胃の発がんに対して化学予防効果を示すことが明らかになった。

**Keywords**: 24R, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>, glandular stomach carcinogenesis, chemopreventive effect

\* 岐阜大学医学部第一病理学教室

Ikezaki, S., Nishikawa, A., Furukawa, F., Enami, T., Mitsui, M., Tanakamaru, Z., Kim, H.-C., Lee, I.-S., Imazawa, T. and Takahashi, M.: **Long-term toxicity/carcinogenicity study of L-histidine monohydrochloride in F344 rats** *Fd. Chem. Toxic.*, 34, 687~691 (1996)

ほとんどの動物種に必須のアミノ酸であるヒスチジンの長期毒性試験及び発がん性試験をFischer344 (F344) ラットで実施した。6週齢のF344ラット雌雄各150匹を3群に分け、0 (対照)、1.25及び2.5%のL-histidine monohydrochloride (HMHC) を104週間混餌投与した。用量は、5%の投与により体重増加抑制及び精巣上体の精子肉芽腫が発現し、最大耐量が2.5%であることを明らかにした亜慢性毒性試験の結果を基に設定した。すべての生存動物を107週で剖検に供した。2.5%群の雄で、赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値の上昇がみられた。対照群を含めた全群で腫瘍の発現がみられたが、すべての腫瘍性病変は本系統のラットで自然発生的にみられる腫瘍と組織学的に類似し、雌雄各群とも腫瘍の発現頻度は対照群に比して有意な増加は認められなかった。以上の如く、F344ラットに対するHMHCの発がん性は認められなかった。

**Keywords**: carcinogenicity study, L-histidine monohydrochloride, F344rats

Matsui, H., Toyoda, K., Kawanishi, T., Mitsumori, K., Takahashi, M., Fukuhara, K. and Miyata, N.: **Direct toxic effects of ethylene-1, 2-dimethanesulfonate (EDS) on the rat epididymis**

*J. Toxicol. Pathology*, 9, 65~72 (1996)

Ethylene-1, 2-dimethanesulfonate (EDS) によつて誘発された精巣及び精巣上体への毒性変化を病理形態学的に研究した。実験は10週齢の雄ラットにEDSを100mg/kg単回投与し、1, 3, 7, 14及び28日目に屠殺解剖し、精巣、精巣

上体, 前立腺及び精囊腺を病理組織学的に検索した. 投与動物において EDS 投与 3 日目以内に Leydig cell が消失し, パキテン期精母細胞や円形精子細胞の減少が投与後 7 日目から認められた. 投与後 1 日目において精巣上体上皮の壊死が認められ, 3 日目まで増強した. 投与 7 日目において Leydig cell の消失は継続されたが, 精巣上体の上皮は回復が認められた. 以上の結果から, EDS によって誘発された精巣上体の毒性傷害は精巣障害により二次的に起こるのではなく, むしろ物質の直接的な作用であることが示唆された.

**Keywords:** ethylene-1,2-dimethanesulfonate, epididymis, testicular toxicity

Suzuki, T., Honma, M., Sofuni, T. and Hayashi, M. : **Micronucleus induction by cis-diammine-dichloroplatinum (II) (cisplatin) assessed in mouse peripheral blood**

*MMS Commun.*, 4, 13~18 (1996)

制がん剤である cis-diammine-dichloroplatinum (II) (cisplatin) の *in vivo* における染色体異常誘発性について検討するため, マウス末梢血を用いる小核試験を行った. cisplatin 0.03-10mg/kg の腹腔内投与により用量依存的な小核の誘発が認められた. 小核を有する幼若赤血球の頻度は最大 5.2% (control は 0.1%) にまで達し, 他の制がん剤と同様に非常に強い染色体異常誘発性を有することが明らかとなった. この結果は cisplatin による二次発がんの危険性を考える上で重要な結果であると考えられる.

**Keywords:** cisplatin, peripheral blood micronucleus test

The collaborative Study Group for the Transgenic Mouse Mutation Assay/JEMS・MMS (Organizer in chief; Suzuki, T.) : **Organ variation in the mutagenicity of ethylnitrosourea in Muta™ Mouse: Results of the collaborative study on the transgenic mutation assay by JEMS/MMS**

*Environ. Mol. Mutagen.*, 28, 363~375 (1996)

日本環境変異原学会/哺乳動物試験研究会 (JEMS/MMS) の活動の一環として, トランスジェニックマウス (Muta™ Mouse) を用いる変異原性試験に関する共同研究を 26 機関が参加して行った. 本試験法はその有用性にもかかわらず, まだ国内への普及は十分でなく, 共同研究を行って技術伝搬をはかることは本試験法の普及の上からも重要である. 代表的変異原物質であるエチルニトロソ尿素の変異原性の臓器特異性及びその経時変化について解析すると共に, 本試験法のバリデーションを行った. 変異の検出には新しく開発されたポジティブセレクション法を用いることにより, 初心者においても比較的簡便に信頼性のあるデータが得られ, 標準 DNA サンプルの変異頻度の各機関間でのばらつきは小さかった. 150mg/kg ENU 投与後, 3 日目と 14 日目に肝臓, 骨髄, 腎臓, 肺, 脾臓, 膀胱, 脳について導入 lacZ 遺伝子の変異頻度を解析した結果, 脳を除くすべての臓器について変異頻度の上昇が認められ, 特に骨髄と脾臓において高い値が得られた. また, 肝臓, 脾臓, 肺, 膀胱においては 3 日目に比べて 14 日目で変異頻度の上昇が認められ, 変異の固定に要する時間が各臓器ごとに重要となることが示唆された.

**Keywords:** organ variation, transgenic mouse, ethylnitrosourea

Suzuki, T., Itoh, M., Hayashi, M., Nishikawa, A., Ikezaki, S., Furukawa, F., Takahashi, M. and Sofuni, T.: **Organ vari-**

**ation in the mutagenicity of dimethylnitrosamine in Big Blue mice**

*Environ. Mol. Mutagenesis*, 28, 348~353 (1996)

ジメチルニトロソアミン (DMN) による突然変異誘発の臓器特異性について検討を行うため, lacI 遺伝子を標的として導入したトランスジェニックマウスである Big-Blue を用いた解析を行った. 同時に末梢血小核試験により染色体異常誘発性を, PCNA 免疫染色法により細胞増殖活性の誘導についても検討を行った. DMN 1 mg/kg を 5 日間連続腹腔内投与し 1 週間後に肝臓, 腎臓, 肺, 膀胱, 骨髄, 精巣について lacI 遺伝子の変異頻度を調べたところ, 肝臓, 腎臓, 肺においてコントロールに対し, それぞれ 6.2 倍, 2.4 倍, 2.1 倍の上昇が検出された. これら 3 臓器はいずれも DMN による発がんの標的臓器として報告されており, 変異誘発性との間に相関が得られた. 細胞増殖活性の誘導は気管支においてのみ顕著に認められ, 発がんとの関連に興味を持たれた. また, 投与開始後 48 時間, 72 時間後に末梢血中の小核誘発頻度について調べたが, 有意な上昇は認められなかった. DMN 5, 10mg/kg の単回腹腔内投与では弱い小核誘発性が観察された. DMN は弱い染色体異常誘発性を持つと結論できた. 単回投与 2 週後の肝臓における変異頻度の値は, 連続投与時に比べて低く, 連続投与の有効性が示唆された.

**Keywords:** organ variation, lacI transgenic mouse, dimethylnitrosamine

Suzuki, T., Hayashi, M., Ochiai, M.\*, Wakabayashi, K.\*, Ushijima, T.\*, Sugimura, T.\*, Nagao, M.\* and Sofuni, T.: **Organ variation in the mutagenicity of MeIQ in Big Blue lacI transgenic mice**

*Mutat. Res.*, 369, 45~49 (1996)

2-amino-3,4-dimethylimidazo [4,5-f] quinoline (MeIQ) は魚の焼け焦げに含まれるヘテロサイクリックアミンであり, バクテリアに対して非常に強い変異原性を示すと共に, マウス, ラットに対しても発がん性を示すことが報告されている. 今回この MeIQ の *in vivo* での突然変異誘発性に関して, その臓器特異性を含め lacI 遺伝子を導入したトランスジェニックマウス Big Blue を使って検討をした. マウスに MeIQ 0.03% を含む飼料を食べさせて, 1, 4, 12 週後に肝臓, 大腸, 骨髄, 前胃, 心臓における lacI 遺伝子の変異頻度を調べた結果, 心臓以外の臓器において, 投与期間の延長に伴う変異頻度の上昇が得られた. 特に大腸における上昇は顕著で, 投与 1 週間からすでに明らかな変化が認められ, 12 週後ではコントロール群の 38 倍にも達した. また 12 週後における肝臓, 骨髄, 前胃の変異頻度はそれぞれ 5.8 倍, 4.6 倍, 2.6 倍に上昇していた. 投与期間中同時に末梢血を用いて小核誘発異性を調べたところ, 8 週後にわずかに上昇が認められたが, 全体としては陰性であり, MeIQ の染色体異常誘発性は弱いことがわかった. MeIQ は肝臓, 大腸, 前胃にがんを誘発することより, 発がんの標的臓器では変異頻度の上昇が認められたことになる. ただし, 発がん強度との相関や, 非発がん臓器である骨髄においても変異の上昇が見られたことより, 変異頻度の上昇と発がん性の間の相関には更に他のファクターも考慮する必要性があることが示唆された.

**Keywords:** organ variation, lacI transgenic mouse, MeIQ

\* 国立がんセンター研究所

Sofuni, T., Suzuki, T. and Hayashi, M.: **Initial consideration for use of transgenic mutation assays in a regulatory submission**



*Environ. Mol. Mutagenesis*, 28, 443~446 (1996)

トランスジェニックマウスを用いる変異原性試験は *in vivo* において遺伝子突然変異を検出する系として有用であり、医薬品等の申請時における安全性評価試験としての応用が期待される。そのような際に問題となる(1)他の変異原性試験の結果を踏まえ、どういった場合に本試験法が必要となるか?(2)陰性の保証のためにはどのぐらいのデータ(動物数、解析臓器、投与方法、最高用量、投与回数、サンプリングタイム、用量設定、対照群など)が必要か?(3)どのぐらいの変異頻度の上昇により陽性と判断するか?などの事項について初期の見解を示した。

**Keywords:** transgenic mouse mutation assay, regulation, data evaluation

Oka, H.\*, Ohuchida, A.\*, Suzuki, T., Sofuni, T. and Hayashi, M.: **Hydrazine monohydrochloride and 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride induce micronuclei in rats**

*MMS Commun.*, 4, 99~107 (1996)

ヒドラジン及び1,2ジメチルヒドラジンの染色体異常誘発性に関して、ラットを使った小核試験により検討した。ヒドラジンはSDラット骨髄を用いた検討で、75mg/kgの二回腹腔内投与により陽性を示したが、25mg/kg以下の4回投与実験では陰性であった。1,2ジメチルヒドラジンをF344ラットに50-200mg/kgで2回経口投与したところ、骨髄、末梢血中共に明らかな小核の誘発が認められた。これまで1,2ジメチルヒドラジンはマウスでは陽性なものの、ラットを用いた小核試験で陰性であり、種差のある化合物であるとされていたが、今回の結果により系統差を示すことが明らかとなった。

**Keywords:** micronucleus, hydrazine, 1,2-dimethylhydrazine

\* 大鵬薬品工業(株)

Suzuki, T., Itoh, S.\*<sup>1</sup>, Takemoto, N.\*<sup>2</sup>, Yajima, N.\*<sup>2</sup>, Miura, M.\*<sup>1</sup>, Hayashi, M., Shimada, H.\*<sup>1</sup> and Sofuni, T.: **Ethyl nitrosourea and methyl methanesulfonate mutagenicity in sperm and testicular germ cells of *lacZ* transgenic mice (Muta<sup>TM</sup>Mouse)**

*Mutat. Res.*, 388, 155~163 (1997)

生殖細胞に対する変異原物質として知られる、エチルニトロソ尿素(ENU)とメチルメタンサルホン酸(MMS)を用い、トランスジェニックマウス(Muta<sup>TM</sup>Mouse)を用いた変異原性試験が生殖細胞における変異原性の検出系として応用可能であるかについて検討を行った。生殖細胞としては精巣及び精子を用い、ENU 150mg/kg又は、MMS 40mg/kgを単回腹腔内投与後、3日目と14日目に *lacZ* 遺伝子の変異頻度を *galE* 欠損大腸菌を用いたポジティブセレクション法により調べた。その結果、まず溶媒対照群における自然突然変異頻度は、精巣で  $1 \times 10^{-5}$ 、精子で  $3 \times 10^{-5}$ と前者の方が低かった。これに対しENU投与群では、精巣において3日目14日目共に約5倍の変異頻度の上昇が観察された。しかし、精子においては変化が見られなかった。一方MMS投与群においては、精巣、精子共に変異頻度の上昇は認められなかった。なお、両化合物共に末梢血中の小核を有する幼若赤血球の顕著な増加が認められた。MMSの作用には染色体異常が強く関与すると思われる、このような化合物の検出にはトランスジェニックマウスの試験は向かないことが示唆された。ENUによる陽性結果より、本試験法は精巣における遺伝子突然変異の検出系としては有効であることが示された。なお本研究は国際共同研究の一環として行われた。

**Keywords:** germ cell, *lacZ* transgenic mouse

\*<sup>1</sup> 第一製薬(株)

\*<sup>2</sup> 雪印乳業(株)

Okonogi, H.\*<sup>1</sup>, Ushijima, T.\*<sup>1</sup>, Zhang, X. B.\*<sup>2</sup>, Heddle, J. A.\*<sup>2</sup>, Suzuki, T., Sofuni, T., Felton, J. S.\*<sup>3</sup>, Tucker, J. D.\*<sup>3</sup>, Sugimura, T.\*<sup>1</sup> and Nagao, M.\*<sup>1</sup>: **Agreement of mutational characteristics of heterocyclic amines in *lacI* of the Big Blue mouse with those in tumor related genes in rodents**

*Carcinogenesis*, 18, 745~748 (1997)

発がん性を有するヘテロサイクリックアミンであるMeIQ, PhIP, AαCについて、Big Blueマウスの大腸に誘発された突然変異のスペクトラムを比較した。MeIQ 300ppm, PhIP 400ppm, AαC 800ppm 混餌投与により得られたそれぞれ90, 115, 105個の変異体より92, 115, 105個の変異が同定でき、いずれの場合もG:CからA:Tへのトランスバージョン型塩基置換が主であることが明らかとなった。また、MeIQでは5'-GC-3'配列が、PhIPではGの並んだ配列が、そしてAαCでは5'-CGT-3'配列が変異のホットスポットとなるという特徴がみられた。MeIQにより得られた変異の特徴は、この化合物により誘発されたマウス前胃及びラットZymbal腺での腫瘍より得られたHa-ras遺伝子の変異の特徴と一致していた。またPhIPで見られた一塩基欠失はPhIPにより誘発されたラット大腸腫瘍のApc遺伝子の変異と一致していた。これらの結果は、トランスジェンを用いた突然変異の検出がマウスやラット本来の遺伝子上に起こる突然変異の予測に有用であることを示している。

**Keywords:** mutation spectrum, heterocyclic amine, *lacI* transgenic mouse

\*<sup>1</sup> 国立がんセンター研究所

\*<sup>2</sup> York Univ., Canada

\*<sup>3</sup> Lawrence Livermore National Laboratory, U.S.A.

Piegorsch, W. W.\*<sup>1</sup>, Lockhart, A. C.\*<sup>2</sup>, Carr, G. J.\*<sup>3</sup>, Margolin, B. H.\*<sup>4</sup>, Brooks, T.\*<sup>5</sup>, Douglas, G. R.\*<sup>6</sup>, Liegibel, U. M.\*<sup>7</sup>, Suzuki, T., Thybaud, V.\*<sup>8</sup>, van Delft, J. H. M.\*<sup>9</sup> and Gorelick, N. J.\*<sup>3</sup>: **Sources of variability in data from a positive selection *lacZ* transgenic mouse mutation assay: An interlaboratory study**

*Mutat. Res.*, 388, 249~289 (1997)

*lacZ* 遺伝子導入マウス Muta<sup>TM</sup>Mouse を用いた試験系におけるポジティブセレクション法により得られたデータの統計学的評価上重要となるデータのばらつきの素因について検討した。生殖細胞に関する国際共同研究より得られた5機関のデータについて、プレート間、パッケージング間、動物間でのばらつきを調べたところ、動物間においてのみ過度のばらつきが認められた。このばらつきを考慮し、処理群とコントロール群の間での有意差の検定法を選択し、実際のデータの評価を行った。

**Keywords:** statistically evaluation, transgenic mouse mutation assay

\*<sup>1</sup> Univ. of South Carolina, U.S.A.

\*<sup>2</sup> A.S.I., U.S.A.

\*<sup>3</sup> Procter and Gamble Co., U.S.A.

\*<sup>4</sup> Univ. of North Carolina, U.S.A.

\*<sup>5</sup> Hazleton Europe, U.K.

\*<sup>6</sup> Health Canada, Canada

\*<sup>7</sup> German Cancer Research Center, Germany

\*<sup>8</sup> Rhone-Poulenc Rorer, France

\*<sup>9</sup> TNO Nutrition and Food Research Institute, The Neth

erlands

Matsuoka, A., Yamakage, K.<sup>\*1</sup>, Kusakabe, H.<sup>\*1</sup>, Wakuri, S.<sup>\*1</sup>, Asakura, M.<sup>\*2</sup>, Noguchi, T.<sup>\*2</sup>, Sugiyama, T.<sup>\*2</sup>, Shimada, H.<sup>\*3</sup>, Nakayama, S.<sup>\*3</sup>, Kasahara, Y.<sup>\*4</sup>, Takahashi, Y.<sup>\*4</sup>, Miura, K. F.<sup>\*5</sup>, Hatanaka, M.<sup>\*5</sup>, Ishidate, M., Jr.<sup>\*5</sup>, Morita, T.<sup>\*6</sup>, Watanabe, K.<sup>\*6</sup>, Hara, M.<sup>\*7</sup>, Odawara, K.<sup>\*7</sup>, Tanaka, N.<sup>\*1</sup>, Hayashi, M. and Sofuni, T.: **Re-evaluation of chromosomal aberration induction on nine mouse lymphoma assay "unique positive" NTP carcinogens**

*Mutat. Res.*, 369, 243~252 (1996)

日本環境変異原学会、哺乳動物試験研究会で行った共同研究の結果である。これまで、米国 NTP 計画での遺伝毒性試験結果から、マウスリンフォーマ試験でのみ陽性と検出できる齧歯類発癌物質とされていた、9物質について、CHL 細胞を用いる染色体異常試験で再評価をおこなった。その結果、9物質中、6物質が染色体の構造異常あるいは数的異常を誘発し、マウスリンフォーマ試験でのみ陽性の物質ではないことが判明した。上記 6物質の、NTP 染色体異常試験結果と今回の結果の違いは、使用細胞、実験プロトコルに加えて、数的異常の解釈の違いによるものと考えられた。

**Keywords:** *in vitro* chromosomal aberration, NTP carcinogen, mouse lymphoma assay

<sup>\*1</sup> 食品薬品安全センター 秦野研究所

<sup>\*2</sup> 日本バイオアッセイ研究センター

<sup>\*3</sup> 第一製薬(株)

<sup>\*4</sup> 帝人

<sup>\*5</sup> オリパス光学工業(株)染色体研究センター

<sup>\*6</sup> 日本 Glaxo 筑波研究所

<sup>\*7</sup> 住友化学(株)

Kondo, K.<sup>\*1</sup>, Asano, N.<sup>\*2</sup>, Hitotsumachi, S.<sup>\*3</sup>, Kikuchi, Y.<sup>\*4</sup>, Kondo, Y.<sup>\*5</sup>, Miyamae, Y.<sup>\*6</sup>, Shimada, H.<sup>\*7</sup> and Hayashi, M.: **MMS Osaka Workshop, 1995-Case studies to evaluate genotoxicity test data based on the ICH consensus**

*MMS Commun.*, 4, 29~73 (1996)

日本環境変異原学会・哺乳動物試験研究会 (MMS) が 1995年11月に開催した同名のワークショップの記録である。実際の遺伝毒性のデータを、ICH の遺伝毒性グループのコンセンサスに基づいて評価することを目的とした。更に、同年12月に横浜で開催された ICH-3 に参加した海外からの S2 EWG メンバーを招き、小グループに分かれて英語で議論した。午前中のセッションでは5種類のシナリオ化合物について各グループで議論の後評価を下し、午後に全体会議で各グループの結論を発表し、更に議論を深めた。各シナリオは、微生物を用いる遺伝子突然変異試験、*in vitro* 染色体異常試験、*in vitro* 遺伝子突然変異試験、*in vitro* 小核試験等に関する実際のデータをまとめたものである。各グループでの各シナリオに対する結論は似かよっており、かなり客観的に評価できたようである。シナリオとは独立に、13の遺伝毒性試験結果に対する参加者のアンケート調査の結果も報告され、本論分に収録されている。

**Keywords:** MMS workshop, data evaluation, ICH

<sup>\*1</sup> Shionogi & Co., Ltd.

<sup>\*2</sup> Nitto Denko Corporation

<sup>\*3</sup> Takeda Chemical industries Ltd.

<sup>\*4</sup> Rabiton institute inc.

<sup>\*5</sup> Tanabe Seiyaku Co., Ltd.

<sup>\*6</sup> Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.

<sup>\*7</sup> Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd.

Matsuoka, A., Yamada, K.<sup>\*</sup>, Hayashi, M. and Sofuni, T.: **Chromosomal aberrations detected by chromosome painting in lymphocytes from cancer patients given high doses of therapeutic X-rays**

*J. Radiat. Res.*, 37, 257~265 (1996)

X線治療を受けた癌患者の末梢血リンパ球での染色体異常を、4番染色体 DNA ブローブを用いる FISH 法で解析した。その結果、患者での異常細胞出現頻度は 1.57% から 14.34% で、健康人での頻度、0.12% の10倍から100倍もの高頻度であった。FISH 法では、高頻度に観察される転座を簡便に検出でき、染色体異常検出の効率をあげることができる。治療のための X線被曝によるリスクのモニタリングの手段としての有用性が示唆された。

**Keywords:** radiotherapy, chromosome aberrations, chromosome painting

<sup>\*</sup> 国立国際医療センター研究所

Nonaka, M.<sup>\*</sup>, Omura, H.<sup>\*</sup>, Sofuni, T. and Hayashi, M.: **Kojic acid did not induce micronuclei in mouse bone marrow hematopoietic cells**

*MMS Commun.*, 4, 109~112 (1996)

麹酸の小核誘発性に関する論文である。麹酸は *Aspergillus* や *Penicillium* が産生する抗菌性のある代謝産物で、食品、化粧品等に広く用いられている。ddY 系の雄マウスに2回及び5回腹腔内投与し、骨髄中の幼若赤血球に出現する小核の頻度を計測した。最高用量の1000mg/kg 投与群では6匹中5匹のマウスが死亡した。従って、充分高用量まで試験したことになるが、小核を有する幼若赤血球の出現頻度の上昇は認められなかった。微生物を用いた遺伝子突然変異試験及び *in vitro* の培養細胞を用いて染色体異常試験で陽性の結果が報告されているが、共に非常に高濃度でのみの陽性であり、生体内での遺伝毒性は特に心配ないものと考えられた。

**Keywords:** kojic acid, mouse micronucleus test, genotoxicity

<sup>\*</sup> 九州大学農学部

Hauschke, D.<sup>\*1</sup>, Hayashi, M., Lin, K. K. <sup>\*2</sup>, Lovell, D. P.<sup>\*3</sup>, Robinson, W. D.<sup>\*4</sup> and Yoshimura, I.<sup>\*5</sup>: **Recommendations for biostatistics of mutagenicity studies**

*Drug information J.*, 31, 323~326 (1997)

1996年3月にベルギーで開催された「非臨床、毒性学における統計学的評価法」と題するワークショップの報告の一部である。変異原研究におけるデータに対する統計学的手法に関する考え方をまとめたものである。1) データ評価に当たって統計学は何かできるか、2) プロトコル、3) 実験計画、4) バイアスをさける方法、5) 何を単位としてデータを評価するか、6) 主な指標と補助的指標、7) データ解析、8) 結論と提案、の各項目についてアウトラインが述べられている。また、これらの提案は、ワークショップの期間中またドラフトに対する文書のやり取りによって得られたコンセンサスに基づいたものである。統計学的手法の詳細には言及していないので、提案されている考え方に従えば研究者の利用しやすい方法を用いてもよい自由度が与えられている。

**Keywords:** mutagenicity, biostatistics, recommendations

<sup>\*1</sup> Byk Gulden, Germany

<sup>\*2</sup> Food and Drug Administration, U.S.A.

<sup>\*3</sup> BiBRA International, U.K.

\*4 Glaxo Wellcome, U.K.

\*5 Science University of Tokyo

Morita, T.\*1, Asano, N.\*2, Awogi, T.\*3, Sasaki, Y. F.\*4, Sato, S.\*5, Shimada, H.\*6, Sutou, S.\*7, Suzuki, T., Wakata, A.\*8, Sofuni, T. and Hayashi, M.: **Evaluation of the rodent micronucleus assay in the screening of IARC carcinogens (Groups 1, 2A, and 2 B). The summary report of the 6th collaborative study by CSGMT/JEMS · MMS** *Mutat. Res.*, 389, 3 ~ 122 (1996)

日本環境変異原学会・哺乳動物試験研究会 (MMS) の小核試験検討グループによる第6回の共同研究の集大成である。51機関が参加し、IARCでグループ1, 2A, 及び2Bに分類された化学物質104種類について齧歯類を用いる小核試験を実施し、*in vivo* 小核試験の特性を明らかにした。信頼できる報告のデータも加味して総合的に見ると、グループ1の化学物質の約70%は小核試験陽性であり、2A及び2Bはそれぞれ約55%と46%であった。また、今回の共同研究により、小核試験で検出しやすい化合物グループと、検出が難しい化合物グループのあることが判明した。前者には aziridine, acyl 型 nitroso 化合物, hydrazines, amino-biphenyl, azo 化合物等が含まれ、後者には dialkyl 型 nitroso 化合物, シリカ, 金属, aromatic amines, ハロゲン化合物, ステロイドホルモン等が含まれる。これを基にした構造活性相関を考慮した場合、小核試験でのヒトがん原物質 (グループ1) に対する検出力は90%を超えることが判明した。

**Keywords**: rodent micronucleus test, IARC, collaborative study

\*1 Nippon Glaxo Ltd.

\*2 Nitto Denko co.

\*3 Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.

\*4 Hachinohe National College of Technology

\*5 Japan Tobacco Inc.

\*6 Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd.

\*7 itoham Foods Inc.

\*8 Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.

Sofuni, T., Honma, M., Hayashi, M., Shimada, H.\*1, Tanaka, N.\*2, Wakuri, S.\*2, Awogi\*3, T., Yamamoto, K.I.\*4, Nishi, Y.\*5 and Nakadate, M.: **Detection of *in vitro* clastogens and spindle poisons by the mouse lymphoma assay using the microwell method: interim report of an international collaborative study** *Mutagenesis*, 11, 349 ~ 355 (1996)

変異原性試験の最小必要な試験の組み合わせ論議の中で、マウスリンフォーマ試験 (MLA) が染色体異常誘発物質をいかに検出できるかが論点となっている。そのため、国内42機関、海外7機関が参加してエームス試験陰性、染色体異常試験陽性を示す20化合物について MLA 共同研究を行った。20化合物中15化合物は陽性と判定されたものの、他は陰性若しくは不確定とされた。MLAでは大部分の染色体異常誘発物質を検出できるが、一部の化合物については検出できない可能性があり、今後更に検討をする必要がある。現在、2回目の共同研究が進行中である。

**Keywords**: mouse lymphoma assay (MLA), ICH, Standard battery

\*1 第一製薬(株)

\*2 食品薬品安全センター秦野研究所

\*3 大塚製薬(株)

\*4 武田薬品工業(株)

\*5 日本たばこ産業(株)

Honma, M., Hayashi, M., Ohno, T.\*, Mizusawa, H., Saijo, K.\* and Sofuni, T.: **Heterogeneity of the Y chromosome following long-term culture of the human lung cancer cell line A549**

*In Vitro Cell Dev. Biol.-Animal*, 32, 262 ~ 264 (1996)

ヒト肺ガン細胞株 A549 は世界中で汎用されている細胞株のひとつであり、国立衛試、理研、ATCC の細胞バンクでも保存、供給されている。しかしながら、3つの細胞バンクの A549 細胞株の染色体を解析したところ、Y 染色体に著しい heterogeneity が観察された。理研の A549 細胞の 82% には Y 染色体はなく、また ATCC の細胞の 53% は 2 本以上の Y 染色体を保持していた。本細胞株は男性由来であることから、各細胞バンクで継代、維持していく過程で Y 染色体の欠失や増幅がランダムに起こり、このような変化が生じたものと考えられる。このことは、細胞バンクにおける細胞株の形質の維持や、管理の困難さを示している。

**Keywords**: A549, Y chromosome heterogeneity, cell banking

\* 理化学研究所細胞バンク

Zhang, L.-S.\*, Honma, M., Matsuoka, A., Suzuki, T., Sofuni, T. and Hayashi, M.: **Chromosome painting analysis of spontaneous and methyl methanesulfonate-induced trifluorothymidine-resistant L5178Y cell colonies** *Mutat. Res.*, 370, 181 ~ 190 (1996)

自然誘発及び MMS の誘発によって得られたマウスリンフォーマ L5178Y 細胞のチミジンキナーゼ (TK) 欠損変異体を TK 座位を有する 11 番染色体のペインティング法で解析した。小さいコロニーを形成する変異体の 77%、大きいコロニーを形成する変異体の 29% に転座や他の複雑な染色体異常が観察された。このことはマウスリンフォーマ細胞で検出される突然変異のかなりの部分は染色体異常を伴う大きな遺伝子の変異であるという従来の説を支持するものである。

**Keywords**: chromosome painting, L5178Y mouse lymphoma cell, translocation

\* 中国華西医科大学公共衛生学院

Zhang, L.-S.\*, Honma, M., Sofuni, T., Matsuoka, A., Suzuki, T. and Hayashi, M.: **The induction of micronuclei and gene mutations in L5178Y mouse lymphoma cells by hydroquinone and diethylstilbestrol: a comparison of short- and long-term treatments** *MMS Commun.*, 4, 113 ~ 120 (1996)

2つの染色体異数性誘発物質である hydroquinone (HQ) と diethylstilbestrol (DES) について、L5178Y 細胞を用いその小核誘発性と遺伝子突然変異誘発性を比較した。小核、遺伝子突然変異の誘発とも、3時間の短時間処理では不十分であったが24時間の連続処理では顕著な増加が観察された。このことは染色体異数性誘発物質のような細胞周期に依存した遺伝毒性物質の検出には長時間の連続処理が有効であることを示している。

**Keywords**: micronucleus, gene mutation, L5178Y mouse lymphoma cell

\* 中国華西医科大学公共衛生学院

Honma, M., Hayashi, M. and Sofuni, T.: **Cytotoxic and mutagenic responses to X-rays and chemical mutagens in normal and p53-mutated human lymphoblastoid cells**

*Mutat. Res.*, 374, 89~98 (1997)

ヒトリンパ芽球様細胞株 TK 6 と WTK-1 は WIL 2 細胞を親株とする同一細胞由来であるが、WTK-1 は p53 遺伝子に変異をもつ変異細胞である。両細胞の遺伝子突然変異頻度や環境変異原に対する感受性を比較し、細胞内の遺伝的安定化や、DNA 損傷に対する p53 の役割を明らかにした。WTK-1 細胞のチミジンキナーゼ (*tk*) 遺伝子座における自然突然変異頻度は TK 6 の 30 倍以上も高く、変異原の細胞毒性によるアポトーシスには抵抗性を示した。また、WTK-1 細胞で起こる *tk* 遺伝子での突然変異のほとんどは染色体間の組換えによる LOH 型の変異であった。これらのことから、p53 は細胞内の組換え反応、若しくは組換え修復機構を制御することにより遺伝子の安定化に寄与していることが示唆された。

**Keywords:** p53, thymidine kinase (*tk*), genomic stability

Honma, M., Hayashi, M., Hackman, P.\* and Sofuni, T.: **Chlorambucil - induced structural changes in the *gpt* gene of AS 52 cells**

*Mutat. Res.*, 389, 199~205 (1997)

クロラムブシル (CBC) はガン化学療法剤のひとつであり、生殖細胞においては高い頻度で欠失型の突然変異を引き起こすことが知られている。体細胞においてもこのような変異が起こるかどうかを検討するためチャイニーズハムスター由来の CHO 細胞に大腸菌の *gpt* 遺伝子を組み込んだトランスジェニック細胞 AS52 を用いてその変異原性を検討した。CBC は AS52 細胞での *gpt* 遺伝子突然変異を顕著に誘発し、その程度はマイトマイシンに匹敵するものであった。変異体の *gpt* 遺伝子を PCR 法によって解析したところ 81% に *gpt* 遺伝子の消失が認められた。このことから CBC はほ乳類培養細胞においても高率に欠失等の染色体レベルの異常を引き起こすことが明らかとなった。

**Keywords:** Chlorambucil (CBC), AS52/*gpt* assay, deletion

\* スウェーデンカロリンスカ研究所

Gruz, P., Matsui, K., Sofuni, T. and Nohmi, T.: **Construction of a new system for separate expression of mutagenesis proteins: the abilities to promote UV mutagenesis and interchangeability of MucA', MucB, SamA' and SamB proteins in *Salmonella typhimurium***

*Mutat. Res.*, 354, 157~170 (1996)

SamA', SamB, MucA', MucB は mutagenesis protein の一種であり、SamA' は SamB と、MucA' は MucB と共存した時のみ突然変異誘発を促進するものと考えられてきた。しかし、それぞれの蛋白質を個別に発現するプラスミドを構築し、*S. typhimurium* で起こる紫外線突然変異を促進する能力を測定すると、SamA' は MucB と、また MucA' は SamB と共存した場合にも部分的に突然変異誘発を促進することが明らかになった。また A'B 複合体の機能は、主に B 蛋白質の性質によって決定された。

**Keywords:** mutagenesis proteins, SamA'B, MucA'B

Ceccotti, S.\*<sup>1</sup>, Aquilina, G.\*<sup>1</sup>, Macpherson, P.\*<sup>2</sup>, Yamada, M., Karran, P.\*<sup>2</sup> and Bignami, M.\*<sup>1</sup>: **Processing of O<sup>6</sup>-methylguanine by mismatch correction in human cell extracts**

*Current Biology*, 6, 1528~1531 (1996)

ヒトの細胞抽出液は、O<sup>6</sup>-メチルグアニン (O<sup>6</sup>-meG) を修復するために異常な DNA 合成を行う。ミスマッチ修復系を欠損した細胞 (hMSH 2 欠損株: Lovo) ではこの異常な DNA 合成は起こらないが、精製した hMutSα を加える

と回復する。ミスマッチ修復系による O<sup>6</sup>-meG の修復合成には、PCNA が必要であった。メチル化剤耐性の HeLaMR 株は、*in vitro* でミスマッチ修復が出来ず高い自然突然変異を示すが、この株では O<sup>6</sup>-meG に依存する DNA 合成が起こらなかった。またメチル化剤に耐性を示す大腸菌由来の複数の細胞は、いずれも hMLH 1 の突然変異体であった。メチル化剤耐性細胞では O<sup>6</sup>-meG に依存した DNA 合成が起こらないという今回の結果は、O<sup>6</sup>-meG による細胞死の原因がミスマッチ修復系にあることを示す初めての生化学的な証拠である。

**Keywords:** O<sup>6</sup>-methylguanine, mismatch repair, PCNA

\*<sup>1</sup> Section of Chemical Carcinogenesis, Istituto Superiore di Sanita', Italy

\*<sup>2</sup> Clare Hall Laboratories, Imperial Cancer Research Fund, U.K.

Matsui, M., Sofuni, T. and Nohmi, T.: **Regionally-targeted mutagenesis by metabolically-activated steviol: DNA sequence analysis of steviol-induced mutants of guanine phosphoribosyltransferase (*gpt*) gene of *Salmonella typhimurium* TM677**

*Mutagenesis*, 11, 565~572 (1996)

天然甘味料ステビオシドのアグリコンであるステビオールは、代謝活性化されると *Salmonella typhimurium* TM677 株の *gpt* 遺伝子に突然変異を誘発する。しかし、ステビオールは代謝活性化されても *Styphimurium* を用いるエームス試験では陽性結果を示さない。ステビオールによって誘発される変異の特徴を明らかにするため、自然突然変異体 (16個) とステビオール誘発突然変異体 (26個) について *gpt* 遺伝子突然変異を同定した。ステビオール誘発突然変異の約 40% は、*gpt* 遺伝子内の約 50 塩基対の領域に集中していた。ステビオール処理により、特定の領域に変異が集中して起こる原因について考察した。

**Keywords:** steviol, stevioside, *gpt*

Matsui, M., Matsui, K., Kawasaki, Y., Oda, Y.\*<sup>1</sup>, Noguchi, T.\*<sup>2</sup>, Kitagawa, Y.\*<sup>3</sup>, Sawada, M.\*<sup>4</sup>, Hayashi, M., Nohmi, T., Yoshihira, K.\*<sup>5</sup>, Ishidate, M., Jr.\*<sup>6</sup> and Sofuni, T.: **Evaluation of the genotoxicity of stevioside and steviol using six *in vitro* and one *in vivo* mutagenicity assays**

*Mutagenesis*, 11, 573~579 (1996)

ステビオシドは日本で用いられている天然甘味料であり、ステビオールはそのアグリコンである。6種類の *in vitro* 変異原性試験と *in vivo* 小核試験により、これらの化合物の変異原性を検索した。ステビオシドに変異原性は検出されなかったが、ステビオールは微生物及び培養細胞を用いる試験で陽性の結果を示した。ステビオールのヒト遺伝子に対するリスクについて考察した。

**Keywords:** steviol, stevioside, genotoxicity

\*<sup>1</sup> 大阪府立公衆衛生研究所

\*<sup>2</sup> 日本バイオアッセイ研究センター

\*<sup>3</sup> サントリー応用微生物研究所

\*<sup>4</sup> 北海道薬科大学

\*<sup>5</sup> 東亜大学

\*<sup>6</sup> オリパス光学工業 (株) 染色体研究センター

Nohmi, T., Katoh, M.\*<sup>1</sup>, Suzuki, H.\*<sup>2</sup>, Matsui, M., Yamada, M., Watanabe, M.\*<sup>3</sup>, Suzuki, M., Horiya, N.\*<sup>4</sup>, Ueda, O.\*<sup>2</sup>, Shibuya, T.\*<sup>4</sup>, Ikeda, H.\*<sup>5</sup> and Sofuni, T.: **A new transgenic mouse mutagenicity test system using Spi-and6-thioguanin e selections**

*Environ. Mol. Mutagenesis*, 28, 465~470 (1996)

ラムダーファージベクター EG10をマウス受精卵へ導入することにより、変異原性試験用の新しいトランスジェニックマウス *gpt Δ* を作出した。このマウスの特徴は、2種類の異なる選択法 (Spi-選択法と6-チオグアニン選択法) を用いて、異なるタイプの変異 (欠失突然変異と点突然変異) を効率良く検出できる点にある。エチルニトロソ尿素処理により骨髄の *gpt* 遺伝子突然変異が増大し、ガンマー線処理により脾臓の Spi-突然変異頻度が増大することを明らかにした。

**Keywords:** transgenic mouse, point mutation, deletion mutation

\*<sup>1</sup> University of Chile

\*<sup>2</sup> 中外製薬探索研究所

\*<sup>3</sup> 国立がんセンター生化学部

\*<sup>4</sup> 食品薬品安全センター秦野研究所

\*<sup>5</sup> 東京大学医科学研究所

Moggs, J. G. \*<sup>1</sup>, Szymkowski, D. E. \*<sup>2</sup>, Yamada, M., Karran, P. \*<sup>1</sup> and Wood, R. D. \*<sup>1</sup>: **Differential human nucleotide excision repair of paired and mispaired cisplatin-DNA adducts**

*Nuc. Acids Res.*, 25, 480~490 (1997)

抗がん剤シスプラチン (CP) の作用機構を理解するために、シスプラチン-DNA 付加体がヌクレオチド除去修復系によって修復される効率を調べた。①隣り合ったグアニンの1位と2位の間にCPが結合した付加体 (1,2-GG) ②隣り合ったアデニンとグアニンの1位と2位の間にCPが結合した付加体 (1,2-AG) ③隣り合ったグアニンの1位と3位の間にCPが結合した付加体 (1,3-GG) ④2-アセチルアミノフルオレン付加体 (AAF) の4種類を基質に、ヌクレオチド除去修復を *in vitro* で行った。後者二つの付加体は、前者二つよりも15-20倍高い効率で修復された。ミスマッチ修復を欠損した細胞の粗抽出液を用いても、同様の結果が示されたことから、ミスマッチ修復蛋白のヌクレオチド除去修復蛋白に対する拮抗阻害の可能性は否定された。CPにより生じるDNA付加体の65%を占める1,2-GGは、対合するDNA鎖にチミンがあると、シトシンがある場合よりも効率良く修復された。この修復にはhMutSαは関与しなかった。

**Keywords:** nucleotide excision repair, mismatch repair, cisplatin-DNA adduct

\*<sup>1</sup> Clare Hall Laboratories, Imperial Cancer Research Fund, U.K.

\*<sup>2</sup> Roche Research Centre, U.K.

Yamada, M., O'Regan, E. \*<sup>1</sup>, Brown, R. \*<sup>2</sup> and Karran, P. \*<sup>1</sup>: **Selective recognition of cisplatin-DNA adduct by human mismatch repair proteins**

*Nuc. Acids Res.*, 25, 491~495 (1997)

抗がん剤であるシスプラチンは隣り合ったプリン塩基間にクロスリンクを作る。シスプラチンでクロスリンクされた2つのグアニンに、シトシンとチミンが対合しているDNA (5'-GCPG-3'/3'-CT-5') に対し、ヒト・ミスマッチ修復蛋白は効率良く結合した。結合効率は、クロスリンクのないグアニンとチミンのミスマッチ (5'-GG-3'/3'-CT-5') に対するものより数倍高かった。この結合は、細胞粗抽出液を用いた場合だけでなく、精製したhMutSα複合体を用いた場合にも確認された。hMutSα複合体を形成するhMSH2及びhMSH6の変異体では、この結合は観察されなかった。シスプラチンでクロスリンクされたグアニ

ンが、シトシンと対合したDNA (5'-GCPG-3'/3'-CC-5') には、ヒト・ミスマッチ蛋白はほとんど結合しなかった。グアニンがシスプラチンでクロスリンクされた時に起こる、DNA複製のバイパスについて考察した。

**Keywords:** mismatch repair, cisplatin-DNA adduct, cross-link

\*<sup>1</sup> Clare Hall Laboratories, Imperial Cancer Research Fund, U.K.

\*<sup>2</sup> CRC Department of Medical Oncology, Beaston Laboratories, U.K.

Yamada, M., Espinosa-Aguirre, J. J. \*<sup>1</sup>, Watanabe, M. \*<sup>2</sup>, Matsui, K., Sofuni, T. and Nohmi, T.: **Targeted disruption of the gene encoding the classical nitroreductase enzyme in *Salmonella typhimurium* Ames test strains TA1535 and TA1538**

*Mutat. Res.*, 375, 9~17 (1997)

エームテストに使われる *S. typhimurium* TA1535株、TA1538株の染色体上のニトロ還元酵素遺伝子 (*cnr*) を特異的に破壊した。TA1538株のニトロ還元酵素活性はほぼ完全に消失したが、TA1535株では約25%酵素活性が残存した。TA1535株のニトロ還元酵素活性はTA1538株よりも約4倍高かった。これらの結果は、*S. typhimurium* には少なくとも2種類のニトロ還元酵素が存在し、TA1538株ではその一方があらかじめ欠損していることを示唆している。第2のニトロ還元酵素がニトロ化合物を代謝活性化する役割について考察した。

**Keywords:** nitroreductase, mutagenicity, nitroarenes

\*<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones Biomedicas, U.N.A.M., Mexico

\*<sup>2</sup> 国立がんセンター生化学部

Tanabe, H., Ishida, T. \*, Ueda, S. \*, Sofuni, T. and Mizusawa, H.: **Molecular anatomy of human chromosome 9: comparative mapping of the immunoglobulin processed pseudogene C-epsilon 3 (IGHEP 2) in primates**

*Cytogenet. Cell Genet.*, 73, 92~96 (1996)

加工型偽遺伝子IGHEP2はヒト9番染色体 (HSA9) 上HSA9p24.2→p24.1に存在する。IGHEP2及びコスミドDNA, cCi9-37 (9q22.1→q22.2), cCi9-135 (9q22.32→q22.33), cCi9-208 (9p13.3→p13.2) をプローブとした霊長類7種 (チンパンジー (PTR), ビグミーチンパンジー (PPA), ゴリラ (GGO), オランウータン (PPY), シロテテナガザル (HLA), アジルテナガザル (HAG), ニホンザル (MFU)) の比較マッピングを行ない、霊長類のHSA9 homologous 染色体の由来を考察した。その結果、これらの染色体は2回の腕間逆位を伴う内部構造の再編成により形成されてきたことが示唆された。すなわち、ヒト及び大型類人猿の共通祖先型染色体はGGO13/PPY13型で、PPY13q16/13p13を切断点とした1回目の腕間逆位の結果、HSA・PTR/PPA 共通祖先型染色体が生じ、更にその内部で2回目の腕間逆位が生じた後、現在のPTR11/PPA11が形成されたものと考えられた。

**Keywords:** karyotypic evolution, human chromosome 9, fluorescence in situ hybridization

\* 東京大学理学部

Kobayashi, M. \*<sup>1</sup>, Masui, T., Kusuda, J. \*<sup>2</sup>, Kameoka, Y. \*<sup>2</sup>, Hashimoto, K. \*<sup>2</sup> and Iwashita, S. \*<sup>1</sup>: **Human ras GTPase-activating protein (human counterpart of GAP1<sup>m</sup>): sequence of the cDNA, primary structure of the**

**protein, production and chromosomal localization**  
*Gene*, 175, 173~177 (1996)

ラットのGTP加水分解酵素活性化因子のcDNAをプローブとして、ヒト子宮頸部上皮細胞の増殖停止cDNAライブラリーより、2つのヒト部分cDNAクローンを単離した。このクローンを元にヒト上皮腫瘍細胞A431の総RNAよりヒトGAP1<sup>m</sup>をクローニングした。ヒトのGAP1<sup>m</sup>はラットのそれに対して核酸レベルで87.7%、アミノ酸レベルで89.2%の相同性を有する。ヒトタンパク質はA431の細胞ライゼートのウエスタンブロットで予想される100Kdに検出される。染色体上では3q24-q26にマップされる。

**Keywords**: human GAP homologue, cDNA cloning, chromosome mapping

\*1 三菱化学生命科学研究所

\*2 国立予防衛生研究所

東條知子\*, 四方田千佳子, 岡田敏史, 川村次良\*: **ヒト成長ホルモンの逆相クロマトグラフ法による不純物の分析**

*医薬品研究*, 27, 815~820 (1996)

ヒト成長ホルモンのRP-HPLCによる純度試験においてC4及びC18の数種のカラムの性能を比較検討した。デスマイド体との分離度はアルカリ性溶媒(pH 8.5)を用いた場合に最も良く、耐アルカリ性C18カラムが有用であることが示唆された。

**Keywords**: human growth hormone, RP-HPLC, purity test

\* 日本公定書協会

Nakanishi, K.\*<sup>1</sup>, Masukawa, T.\*<sup>1</sup>, Nadai, T.\*<sup>1</sup>, Yoshii, K., Okada, S. and Miyajima, K.\*<sup>2</sup>: **Sustained release of flufenamic acid from a drug-triacetyl-β-cyclodextrin complex**

*Biol. Pharm. Bull.*, 20, 66~70 (1997)

フルフェナム酸(FA)とトリアセチル-βシクロデキストリン(TA-β-CyD)の包摂化合物を調製した。溶出試験を行った際、コントロールと比較して溶出時間の延長が見られた。またラットの十二指腸管腔内に投与したときに徐放性を示し、平均血中滞留時間の増加が観察された。この結果より、作用時間を延長し副作用を減少した経口投与剤としての、薬物-TA-β-CyD包摂化合物の可能性が明らかとなった。

**Keywords**: triacetyl-β-cyclodextrin, flufenamic acid, complex

\*1 摂南大学薬学部

\*2 京都大学薬学部

Urakami, T.\*<sup>1,2</sup>, Tanaka, A.\*<sup>1</sup>, Tanimoto, T. and Niki, E.\*<sup>2</sup>: **Synthesis and aldose reductase-inhibitory activity of imidazopyrroloquinoline esters**

*Chem. Pharm. Bull.*, 44, 1493-1497 (1996)

補酵素ピロキノリンキノン(PQQ)から誘導されるイミダゾピロキノリン(IPQ)及びそのエステル類を合成し、これらのアルドース還元酵素(AR)に対する阻害効果を測定した。標的酵素であるARはウサギ水晶体、イヌ腎臓から単離したもの及び組換えヒト型酵素を用いた。ヒト型酵素に対しては親化合物であるPQQの阻害活性は弱かったが、IPQはPQQの約300倍の阻害活性を示した。IPQはC1位、C3位、C9位に3個のカルボキシル基を有するが、C3位のカルボキシル基をエステル化することによって阻害活性が低下し、阻害活性発現にはC3位のカルボキシル基は遊離型である必要性が示唆された。C3位が遊

離型のIPQエステル類は赤血球へのソルビトールの蓄積も阻害した。

**Keywords**: aldose reductase inhibitor, imidazopyrroloquinoline

\*1 三菱ガス化学

\*2 東京大学

大西晃生\*<sup>1</sup>, 谷本 剛, 永木譲治\*<sup>2</sup>, 陣内富男\*<sup>2</sup>, 石津 注\*<sup>3</sup>: **糖尿病患者における赤血球アルドース還元酵素量と糖尿病合併症との関連**

*糖尿病*, 39, 783~788 (1996)

NIDDM患者96名の赤血球中アルドース還元酵素(AR)量を酵素免疫測定法で測定し、AR量と一般臨床症状、末梢神経障害、網膜症、腎症及び白内障との相関関係を検討した。AR量と年齢、糖尿病罹病期間、空腹時血糖、HbA<sub>1c</sub>との間に相関関係は認められなかった。糖尿病の罹病期間が10年以内の44名においては、AR量は末梢神経障害のある患者群(24名)がない患者群(20名)より高値(p<0.05)であった。同様に、AR量は網膜症のある患者群(23名)で非網膜症患者群(21名)より高値(p<0.05)であった。AR量と白内障及び腎症との間には相関関係は認められなかった。AR量は少なくとも糖尿病の比較的早期においては合併症発症に関連を有すると判断された。

**Keywords**: aldose reductase, diabetic complication, NIIDDM

\*1 産業医科大学

\*2 陣内内科病院

\*3 北九州市立医療センター

Komatsu, H. and Okada, S.: **Ethanol-enhanced permeation of phosphatidylcholine/phosphatidylethanolamine mixed liposomal membranes due to ethanol-induced lateral phase separation**

*Biochim. Biophys. Acta*, 1283, 73~79 (1996)

アルコールなどの存在において、ホスファチジルコリン(PC)からなるリポソーム膜が、指組み膜(向い合った脂質のアシル鎖が互いに噛み合った構造を有する膜)を形成することが知られているが、その膜透過性に及ぼす指組み膜形成の影響について、内封した蛍光色素のPC/ホスファチジルエタノールアミン(PE)混合リポソームからの漏れを指標として検討した。その結果、エタノール非共存下においては、安定な混合脂質膜を形成するため、低い膜透過性が観測された。一方、エタノール共存下では、指組み膜相と通常の二分子膜相との相分離状態が生じ、相境界付近での膜構造の歪みのために膜の透過性が亢進した。このことは、通常、相分離を起こさない膜に対し、エタノールが共存した場合、膜の相分離が誘起され、その膜透過性制御機能を乱される可能性を示唆すると共に、アルコールの生体に対する生理作用機構と指組み膜形成との関連性が強く示唆された。また、大腸菌等の菌体膜の主要脂質がPEであることから、アルコール殺菌機構と指組み膜形成との関連性も示唆された。

**Keywords**: liposome, ethanol, interdigitation

Komatsu, H., Kitajima, A., Nakata, Y.\* and Okada, S.: **Estimations of average particle sizes and size distribution of commercially available human-insulin aqueous suspensions using laser-light diffraction spectroscopy**

*Chem. Pharm. Bull.*, 44, 1966~1969 (1996)

光回折法による粒子径解析法を分散性製剤であるヒトインスリン水性懸濁注射液に適用し、それらの粒子径評価法

としての可能性を検討した。その結果、針状結晶であるイソフェンインスリンの場合、通常前処理として行われる攪拌及び超音波処理により粒子径分布の形状がわずかに変化し、見かけの粒子径が小さくなった。特に超音波照射の場合、見かけの粒子径の減少が顕著であった。これは、針状結晶の凝集体が超音波により再分散すると共に、一部の結晶が崩壊したためであることが顕微鏡観察から確認された。注射針を詰まらせないように品質管理を行なう本来の目的を考えれば、超音波処理の前処理が必要かどうか問題である。また、評価される粒子径は、あくまでも見かけの粒子径であり、イソフェンインスリンのような針状結晶の場合、評価された数値をどのように解釈すべきなのか、など今後解決しなければならない多くの問題点のあることを指摘した。

**Keywords** : insulin, average size, light diffraction

\* 堀場製作所

**Komatsu, H. and Okada, S.: Effects of ethanol on permeability of phosphatidylcholine/cholesterol mixed liposomal membranes**

*Chem. Phys. Lipids*, 85, 67~74 (1997)

低級アルコール、局所麻酔剤やグリセリンなどの共存下において、ホスファチジルコリン (PC) リポソーム膜が、指組み膜 (向い合った脂質のアシル鎖が互いに噛み合った構造) を形成し、膜透過性を亢進させることが知られているが、指組み膜形成に対して抑制効果を有するコレステロール (CH) と PC から成る混合リポソーム膜の透過性について、内封した蛍光色素の漏出速度を指標として検討した。その結果、エタノールが共存しない場合、CH を添加すると膜が安定化し、漏れが減少した。一方、PC 単独膜で指組み膜を形成するエタノール濃度においては、CH の増加と共に漏れは減少したが、25モル%以上では、漏れが激増した。これらのことは、通常、安定な膜であっても、エタノール共存下において膜の透過性が亢進する可能性を示唆した。生体膜の主成分が PC であり、また CH が25モル%以上含まれていることを考慮すると、これらの結果は、エタノールが生体膜の透過性制御機構を乱す可能性を示唆している。また、アルコールの生体に対する生理作用機構と指組み膜形成との関連性も強く示唆された。

**Keywords** : ethanol, cholesterol, liposomal membranes

**Komatsu, H., Okada, S. and Handa, T.\*: Suppressive effects of salts on droplet coalescence in a commercially available fat emulsion during freezing for storage**

*J. Pharm. Sci.*, 86, 497~502 (1997)

静脈注射用脂肪乳剤の凍結による凝集・合一に対する添加塩の効果について、市販の脂肪乳剤 (大豆油、卵黄レシチン、濃グリセリン) を用い、その長期保存法としての可能性を検討した。その結果、塩無添加では、凍結-融解サイクル数の増加と共に見かけの粒子径が増加した。しかしながら、脂肪乳剤の濃度低下と共に粒子径の増加が抑制されたことから、凍結による凝集・合一は、濃縮効果 (氷晶の形成により分散媒が減少し、見かけの脂肪乳剤の濃度が上昇すること) によることが明らかとなった。また、0.5M のナトリウムやカリウム塩の添加は、見かけの粒子径増加を完全に抑制した。示差走査熱量分析により、塩無添加系では、氷晶が凍結過程において形成されるが、塩添加系では、凍結過程における氷晶形成が抑制され、融解過程 (氷点下) で形成されることが示された。このことから、塩の添加は、凍結過程における粒子の濃縮効果を抑制し、エマ

ルジョン粒子の融合が抑制されることが明らかとなり、塩の添加により脂肪乳剤の凍結保存が可能であった。

**Keywords** : fat emulsion, fusion, frozen-storage

\* 京都大学薬学部

**岡田敏史, 吉井公彦, 小松裕明: 熱分析法の医薬品試験への応用 (3) 日局一般試験法への採用に向けて**  
医薬品研究, 27, 632~638 (1996)

USP, BP 及び EP における一般試験法としての熱分析法の概要と医薬品各条への適用事例について考察すると共に、熱重量測定法 (TG) 及び示差走査熱量測定法 (DSC) の医薬品試験への応用に関する著者らの試験成績を紹介した。また、DSC 法を不純物解析法として用いる場合の問題点及び応用の可能性などにつき考察した。

**Keywords** : thermal analysis, Japanese pharmacopoeia, general tests

**Saito, H., Minamida, T.\*, Arimoto, I.\*, Handa, T.\* and Miyajima, K.\*: Physical states of surface and core lipids in lipid emulsions and apolipoprotein binding to the emulsion surface**

*J. Biol. Chem.*, 271, 15515~15520 (1996)

エマルションの脂質組成変化、特に、表面コレステロールとコアのコレステリルエステル増加による表面膜とコアの構造変化について、蛍光プローブの定常光あるいは時間分解蛍光異方性の測定により評価した。コアがトリグリセライドからコレステリルエステルに置き換わることによりコア自身の流動性は大きく低下したが、この時、表面膜の流動性はコレステロールが存在する場合にのみ大きく変化した。更に、コレステロールの蛍光アナログを用いた蛍光消光の実験から、コアの組成変化は膜中のコレステロールの再配置を通して表面膜の構造を変化させていることが示された。また、エマルション表面に対する可溶性アポリポ蛋白質の結合性は、アポリポ蛋白質 C-II が表面コレステロールによって大きく低下するのに対し、アポリポ蛋白質 E はむしろコアの組成変化によって大きく減少した。これらアポリポ蛋白質の結合性の変化をエマルションの表面膜やコアの構造変化の点から議論し、血漿リポ蛋白質の代謝過程におけるコアの組成変化がもつ生理的役割について重要な示唆を与えた。

**Keywords** : emulsions, cholesterol, apolipoproteins

\* 京都大学薬学部

**Arimoto, I.\*, Fujita, M.\*, Saito, H., Handa, T.\* and Miyajima, K.\*: Activation and inhibition of lipoprotein lipase in mixed monolayers of medium or long chain-triglycerides and phospholipids**

*Colloid & Polym. Sci.*, 275, 60~66 (1997)

気/水界面に展開したリン脂質-トリグリセライド (TG) 混合単分子膜でのリポ蛋白質リパーゼ (LPL) による TG の加水分解について測定した。フォスファチジルコリン-TG 混合単分子膜中での TG 分子の配向性は TG のアシル鎖長によって異なり、中鎖 TG に比べてより配向した構造を持つ長鎖 TG の方が LPL の反応性が高かった。リン脂質としてスフィンゴミエリンを加えると、配向性の高い長鎖 TG で崩壊圧の上昇がみられ、混合膜がより安定化されていることが示された。このような安定混合単分子膜中では LPL による TG の加水分解は抑制された。これらの結果から、リン脂質-TG 混合単分子膜での TG 分子の配向性と、リン脂質と TG 分子間の相互作用が LPL の反応を調節していることが明らかとなり、スフィンゴミエリンによ

る反応の阻害はスフィンゴミエリンと TG 分子間の強い疎水性相互作用によることが示唆された。

**Keywords:** lipoprotein lipase, triglyceride, sphingomyelin

\* 京都大学薬学部

Saito, H., Miyako, Y.\*, Handa, T.\* and Miyajima, K.\*: **Effect of cholesterol on apolipoprotein A-I binding to lipid bilayers and emulsions**

*J. Lipid Res.*, 38, 287~294 (1997)

アポリポ蛋白質 A-I (apoA-I) は生体内でコレステロール逆転送系を担うアポリポ蛋白質であり、細胞からのコレステロールの引き抜きに関与していることが知られている。ブタ血漿から単離した apoA-I を用いて、細胞膜モデルとしての脂質二分子膜 (リポソーム) との相互作用を検討したところ、apoA-I のエマルションに対する結合性はコレステロールによって減少するのに対し、二分子膜では逆に増加することを見出した。これは、コレステロールによる二分子膜の表面付近の構造変化が apoA-I の結合に有利なためであることが、膜蛍光プローブによる表面構造の測定や内封した水溶性蛍光マーカーの漏出性から示された。これらの結果は、コレステロール逆転送に際し、コレステロールに富む細胞膜表面と apoA-I とのダイレクトな相互作用の可能性を示唆した。

**Keywords:** apolipoprotein A-I, cholesterol, bilayers

\* 京都大学薬学部

中村優美子, 津村ゆかり, 外海泰秀, 柴田 正: **サラダ油, 玄米及び大豆中のピレスロイド系農薬分析時における脱脂法の検討**

食品衛生学雑誌, 37, 151~157 (1996)

日本で汎用される農薬のうち親油性が高く分析時に脱脂が困難と考えられるピレスロイド系農薬の脱脂法について、GPC 法、*n*-ヘキサン/アセトニトリル分配法、エクストレルート/Sep-Pak <sup>18</sup>C<sub>18</sub>法の3法を比較検討した。サラダ油、玄米、大豆での脱脂効率はエクストレルート/Sep-Pak <sup>18</sup>C<sub>18</sub>法で73.8-98.4%、*n*-ヘキサン/アセトニトリル分配法で61.6-96.4%、酢酸エチル/シクロヘキサン混液を溶離液とする GPC 法で51.0-77.4%であった。また10種ピレスロイド系農薬0.2-0.4ppm 添加時の玄米での添加回収率はエクストレルート/Sep-Pak <sup>18</sup>C<sub>18</sub>法で61.5-96.3%、*n*-ヘキサン/アセトニトリル分配法で62.5-100%、GPC 法で72.2-130%であった。以上のことよりピレスロイド系農薬分析における脱脂方法としては脱脂効率及び簡便性の面からエクストレルート/Sep-Pak <sup>18</sup>C<sub>18</sub>法が最も適していると考えられた。

**Keywords:** gel permeation chromatography (GPC), *n*-hexane/ acetonitrile partition, solid phase extraction (SPE)

中村優美子, 津村ゆかり, 外海泰秀, 柴田 正: **2種のカラムを用いたゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) における農薬及び油, クロロフィル, カロチンの溶出挙動について**

食品衛生学雑誌, 37, 329~336 (1996)

2種の GPC カラム即ち Optima™ GPC カラムと Envirosep™-ABC カラムを用い、97種農薬及び食品由来成分である脂質、クロロフィル、β-カロチンの GPC での溶出パターンを比較検討した。全農薬は Optima™ GPC カラムでは37.5-87.5ml (7.5-17.5分) の画分に、Envirosep™-ABC カラムでは65.0-140ml (13.0-28.0分) の画分に溶出した。最も溶出の早いのはフルバリネート、最も遅いのはキノメチオネートであった。上記の画分を分取すると仮定す

ると、Optima™ GPC カラムでは玄米脂質の65.1%、ほうれんそう中クロロフィルの40.5%、Envirosep™-ABC カラムでは玄米脂質の62.0%、大豆脂質の77.4%、ほうれんそう中クロロフィルの30.5%、にんじん中 β-カロチンの10.7%が除去可能であった。

**Keywords:** gel permeation chromatography (GPC), pesticides, lipids

Nakamura, Y., Tonogai, Y., Tsumura, Y., Shibata, T. and Uchiyama, M.: **Effect of dietary squalene on the fecal steroid excretion and the lipid levels of serum and the liver in the rat**

*Nutrition Research*, 17, 243~257 (1997)

スクアレンをラットに連続 (8.622-86.2mg/日) あるいは1回経口投与 (86.2mg/日) し、血清及び肝臓脂質、糞中ステロイド排泄に及ぼす影響を調べた。連続経口投与実験では、血清総コレステロール、HDL コレステロール、トリグリセライド及びスクアレン濃度、肝臓総コレステロール及びスクアレン含量はスクアレン投与により変化しなかった。スクアレン86.2mg/日連続投与時には、血清リン脂質濃度が減少し、糞中への中性ステロイド及び胆汁酸排泄量が増加した。一方、スクアレン1回投与実験では、血清スクアレン及び総コレステロール濃度は投与6時間後に、肝臓スクアレン及び総コレステロール濃度はそれぞれ投与4時間後及び8時間後に最大となった。投与したスクアレンは糞中に0~1日目で35.1%、1~2日目で6.8%、2~4日目で0.42%が未変化で排泄された。糞中への中性ステロイド排泄量は、コプロスタノール排泄量が投与後0~2日目に有意に減少した以外に顕著な変動はなかった。糞中への胆汁酸排泄量は1~2日目に有意に増加したが、コール酸/ケノデオキシコール酸比は変化しなかった。

**Keywords:** squalene, neutral steroids, bile acids

石光 進, 梅本美佳, 三島郁子, 辻 澄子, 柴田 正: **食用色素アルミニウムレーキ中のバリウム試験法への ICP 発光分析法の適用**

食品衛生学雑誌, 37, 325~328 (1996)

食用色素アルミニウム (Al) レーキ中のバリウム (Ba) 試験法への ICP 発光分析法の適用について検討した。市販の5種の色素 Al レーキについて種々の試料溶液調製法を用いて検討した結果、操作性の点から硝酸を用いる方法が最適であった。5種の色素 Al レーキ中の Ba 含量は Al レーキ 1g 中18.5~21.6μg であった。Ba は色素 Al レーキ中で不溶性の化合物として存在していたが、色素 Al レーキを硝酸で溶解させることにより、定量性のある結果が得られた。ICP 発光分析法は色素 Al レーキ中の Ba 含量を測定するための分析法として優れていることが示された。

**Keywords:** food color aluminum lakes, ICP atomic emission spectrometry, barium

辻 澄子, 柴田 正, 西島基弘<sup>\*1</sup>, 深澤喜延<sup>\*2</sup>, 黒田弘之<sup>\*3</sup>, 後藤宗彦<sup>\*4</sup>, 坂部美雄<sup>\*5</sup>, 三島靖子<sup>\*6</sup>, 大城善昇<sup>\*7</sup>, 佐藤 稔<sup>\*8</sup>, 中村和夫<sup>\*9</sup>, 森田 茂<sup>\*10</sup>, 衛藤修一<sup>\*11</sup>, 佐々木弥生<sup>\*12</sup>, 内山壽紀<sup>\*12</sup>, 城 照雄<sup>\*13</sup>, 伊藤誉志男<sup>\*14</sup>: **食品加工の際に添加された天然にも存在する化学的合成添加物の日本人の1人1日摂取量の推定**

食衛誌, 37, 308~318 (1996)

化学的合成添加物のうち食品成分としても存在する49種について、マーケットバスケット方式により市販加工食品原料中の含有量を測定した。アミノ酸及び有機酸等の各加



工食品原料群中の含有量は100 $\mu$ g/g以上を示すものがあり、バラツキも大きかった。加工食品中の含有量から原料中の含有量を差し引くことにより、食品加工の際に添加して加工食品中に残存している添加物量を推察し、1日摂取量を推定した。食品加工の際に添加された化学的合成添加物の日本人1人当たりの1日摂取量の総量は推定で約3gとなった。

**Keywords** : processed foods, chemically synthesized food additive, daily intake

- \*1 東京都立衛生研究所
- \*2 山梨県衛生公害研究所
- \*3 香川県衛生研究所
- \*4 島根県衛生公害研究所
- \*5 名古屋市衛生研究所
- \*6 仙台市衛生研究所
- \*7 沖縄県衛生環境研究所
- \*8 札幌市衛生研究所
- \*9 長野県衛生公害研究所
- \*10 大阪市立環境科学研究所
- \*11 北九州市環境科学研究所
- \*12 厚生省生活衛生局食品化学課
- \*13 日本食品添加物協会
- \*14 武庫川女子大学薬学部

辻 澄子, 石光 進, 柴田 正: 電気化学検出器を用いた逆相 HPLC による食用油中のトコトリエノールの分析

ビタミン, 71, 192 (1997)

ビタミン E 同族体であるトコトリエノール (Toc-3) は酸化防止剤としてのみ認められている天然添加物であり、 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  の4種類の Toc-3 同族体及び  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  の4種類のトコフェロール (Toc) 同族体を含む混合物である。これまで、逆相 HPLC 法では、Toc-3 及び Toc 同族体の  $\beta$  及び  $\gamma$  が分離しなかったが、今回、SPELCO-SIL™-ABZ-PLUS の逆相カラムにより、電気化学検出器付き逆相 HPLC 法で、各同族体の  $\beta$  及び  $\gamma$  が分離定量出来た。食用油からの抽出にはイソプロパノールを用い、エタノールで希釈・冷凍法により、油分を除去し、HPLC カラムの汚染を最少にすることが出来た。

**Keywords** : tocotrienol, reversed-phase HPLC, edible oils

Tsumura, Y., Nakamura, Y., Tonogai, Y. and Shibata, T.: Potential interference by free fatty acids in determination of tricyclazole in brown rice by gas chromatography with flame thermionic detection

*J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 79, 1471~1476 (1996)

玄米中トリシクラゾールの簡便な分析法を開発した。アルカリ熱イオン化分析における遊離脂肪酸による妨害について初めて報告した。玄米はアセトンで抽出し、ろ過後減圧濃縮した。残さに10% (w/v) 塩化ナトリウム溶液を加え、酢酸エチルで再抽出した。抽出液を Sep-Pak Plus Silica に負荷し、玄米由来の遊離脂肪酸をジエチルエーテルで溶出した後、トリシクラゾールを50% (v/v) アセトン/*n*-ヘキサン混液で溶出した。トリシクラゾールは FTD-GC で DB-1 カラムを用いて測定した。リノール酸とオレイン酸は FTD で検出されないが、トリシクラゾールとほぼ同じ保持時間を持ち、Sep-Pak Plus Silica によるクリーンアップをしない場合にはトリシクラゾールのクロマトグラム中のピーク高さが、混在するリノール酸の濃度に応じて減少した。本法による玄米中のトリシクラゾールの回収率は、90.5 $\pm$ 9.4% (2 ppm 添加, n=5) 及び81.3 $\pm$ 10.6%

(0.1ppm 添加, n=5) であった。定量限界は0.05ppm であった。

**Keywords** : free fatty acids, tricyclazole, flame thermionic detection

平原嘉親\*1, 宮田昌弘\*1, 鎌倉和政\*1, 渡辺芳則\*1, 武田寿\*2, 前田憲二\*2, 外海泰秀: 農作物中9種フェノキシ酢酸系除草剤分析のためのメチル化及びペンタフルオロベンジル化の比較

衛生化学, 43, 129~139 (1997)

農作物中の遊離酸型及びエステル型フェノキシ酸系9種除草剤の同時抽出並びに GC 又は GC/MS による一斉分析法を作成した。遊離酸型のエステル化法として PFB 化とメチル化について比較した結果、操作性においてはメチル化が、GC 及び GC/MS の感度においては PFB 化が優れていた。PFB 試薬によるエステル化条件を検討した結果、PFB 試液濃度は登録保留基準の分析法にある1%では本法の場合不十分で回収率が低く、5-10%が必要であった。エステル型は試料液をクリーンアップ後 ECD-GC と GC/MS (SIM) で測定し、遊離酸型はエステル化後クリーンアップせずに GC/MS (SIM) で測定した。4種農作物に各農薬を1.25ppm 添加したときの本法による回収率は、エステル型は50.8-76.9%、遊離酸型は53.7-98.5%であった。

**Keywords** : phenoxy acid herbicide, GC, GC/MS

\*1 神戸検疫所輸入食品検査・検査センター

\*2 横浜検疫所輸入食品検査・検査センター

外海泰秀, 津村ゆかり, 中村優美子, 柴田 正: GC による農作物中トリアジン系除草剤の迅速分析法

食品衛生学雑誌, 37, 363~371 (1996)

農作物中の5種トリアジン系農薬及び3種メトリブジン代謝物の FTD-GC による一斉分析法を検討した。野菜・果実はメタノール抽出し、20%酢酸エチル含有 *n*-ヘキサンに転溶後、Sep-pak シリカでクリーンアップする方法を作成した。穀類・豆類はアセトニトリル抽出し、*n*-ヘキサンで洗浄・脱脂した後、Sep-pak シリカでクリーンアップする方法を作成した。各農薬及び代謝物 2 $\mu$ g を試料に添加し本法による回収率を測定した結果、メトリブジン代謝物及びシアナジンを除く他の農薬では、野菜・果実で50.3-92.9%、穀類・豆類で62.6-78.6%であった。

**Keywords** : pesticide, GC, Sep-pak silica

Yoshii, K.: Application of differential scanning calorimetry to the estimation of drug purity: Various problems and their solutions in purity analysis

*Chem. Pharm. Bull.*, 45, 338~343 (1997)

示差走査熱量測定による純度試験の問題点を明らかにし、更にその解決策を示した。適当な条件の下では、約2%までの不純物量を評価できることを明らかにした。

**Keywords** : DSC (differential scanning calorimetry), purity determination, pharmaceutical

宮田昌弘\*1, 平原嘉親\*1, 成田美加子\*1, 木村実加\*1, 渡辺芳則\*1, 伊藤澄夫\*2, 武田 寿\*2, 小林昭彦\*2, 外海泰秀, 中村優美子, 津村ゆかり, 柴田 正: 食品中残留農薬の多成分分析法における GC 及び GC/MS の比較検討

食品衛生学雑誌, 37, 158~164 (1996)

食品中残留農薬の多成分分析法における測定法として GC/GC/MS-EI 及びイオントラップ GC/MS-CI を比較し GC/MS の農薬一斉スクリーニング法への適用性について調べた。有機リン系農薬41種及び有機含窒素系農薬23種の添加

回収については、GCと両GC/MSはほぼ一致した値を示した。GC/MSではGCよりも妨害成分の影響を受けにくく、農薬の確認法としても有用なことから、GC/MSの農薬多成分分析法への適用性が認められた。

**Keywords:** pesticide, GC, GC/MS

\*1 神戸検疫所輸入食品検疫・検査センター

\*2 横浜検疫所輸入食品検疫・検査センター

Hirahara, Y., Tsumura, Y., Nakamura, Y., Tonogai, Y. and Shibata, T.: **Analysis of phenothrin and its metabolite 3-phenoxybenzoic acid (PBA) in agricultural products by GC and ion-trap GC/MS**

*J. Food Protect.*, 60, 1~5 (1997)

ペスト菌を媒介するネズミノミの駆除を目的に使用されるピレスロイド系殺虫剤フェノトリン及びその代謝物3-Phenoxybenzoic acid (PBA)のGC及びGC/MSによる定量法を検討した。PBAはヘキサフルオロイソプロピルアルコール及びジイソプロピルカルボジイミドで誘導体化した後ECD-GCで測定し、その検出下限値は0.01 $\mu$ g/mlであった。フェノトリンはECD-GC及びイソブタンガスで化学イオン化しイオントラップGC/MSで測定し、その検出下限値はいずれも0.1 $\mu$ g/mlであった。試料にフェノトリン及びPBAを0.5 $\mu$ g添加し、本報で作成した方法により測定した回収率は、前者で61.7-86.9%、後方で36.0-90.2%であった。本法により平成6年10月から12月に輸入された各農産物について実態調査を行った結果、すべての作物からフェノトリン及びPBAは検出されなかった。

**Keywords:** phenothrin, PBA, ECD-GC

\* 神戸検疫所輸入食品検疫・検査センター

Ema, M., Harazono, A., Miyawaki, E. and Ogawa, Y.: **Developmental toxicity of mono-*n*-benzyl phthalate, one of the major metabolites of the plasticizer *n*-butyl benzyl phthalate, in rats**

*Toxicol. Lett.*, 86, 19~25 (1996)

可塑剤 butyl benzyl phthalate のラットにおける主要な代謝物の一つである mono-*n*-benzyl phthalate (MBeP) をラットの器官形成期に投与して、その発生毒性について検討した。250, 313, 375, 438又は500 mg/kg の MBeP をラットの妊娠7日(精子発見日=妊娠0日)から妊娠15日まで経口投与し、妊娠20日にラットを帝王切開して胚-胎児に対する影響を調べた。313 mg/kg 以上の投与量における妊娠ラット体重増加の有意の抑制及び250 mg/kg 以上の投与量における飼料摂取量の有意の低下がみられた。438 mg/kg 以上の投与量で有意に高い着床後の胚-胎児死亡率及び375mg/kg 以上の投与量で有意に低い胎児体重が観察された。奇形を有する胎児の発現頻度は313 mg/kg 以上の投与量で有意に高く、頸及び胸椎弓の癒合、肋骨癒合及び腎盂拡張などの異常が多く観察された。

**Keywords:** monobenzyl phthalate, developmental toxicity, teratogenicity

Ema, M., Kurosaka, R., Harazono, A., Amano, H. and Ogawa, Y.: **Phase specificity of developmental toxicity after oral administration of mono-*n*-butyl phthalate in rats**

*Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 31, 170-176 (1996)

ラットの妊娠7~9日, 10~12日又は13~15日(精子発見日=妊娠0日)に500, 625又は750 mg/kg の mono-*n*-butyl phthalate (MBuP) を経口投与し、妊娠20日に帝王切開して胚-胎児に対する影響を調べた。妊娠7~9日及び

10~12日の625 mg/kg 以上の投与量、妊娠13~15日の500 mg/kg 以上の投与量で有意に高い胚死亡率が認められた。奇形胎児の発現頻度は妊娠10~12日の投与後には上昇しなかったが、妊娠7~9日の500 mg/kg 以上の投与量及び妊娠13~15日の625 mg/kg 以上の投与量で有意に上昇した。妊娠7~9日の投与後には頸椎弓の癒合又は欠損、妊娠13~15日の投与後には口蓋裂及び胸骨分節癒合が多く観察された。MBuPの発生毒性は親物質の dibutyl phthalate (DBP) 及び butyl benzyl phthalate (BBP) の発生毒性とよく類似していることから、DBP 及び BBP の発生毒性はその代謝物の MBuP を介して発現することが示唆された。

**Keywords:** monobutyl phthalate, developmental toxicity, teratogenicity

Ema, M., Harazono, A., Miyawaki, E. and Ogawa, Y.: **Characterization of developmental toxicity of mono-*n*-benzyl phthalate in rats**

*Reprod. Toxicol.*, 10, 365~372 (1996)

ラットの妊娠7~9日, 10~12日又は13~15日(精子発見日=妊娠0日)に250, 375, 500又は625 mg/kg の mono-*n*-benzyl phthalate (MBeP) を経口投与し、妊娠20日に帝王切開して胚-胎児に対する影響を調べた。妊娠7~9日, 10~12日及び13~15日に500 mg/kg 以上の MBeP を投与したときに有意に高い胚死亡率が認められた。奇形胎児の発現頻度は妊娠10~12日の投与後には認められなかったが、妊娠7~9日及び妊娠13~15日の375 mg/kg 以上の投与量で有意に上昇した。妊娠7~9日の投与後には頸、胸及び腰椎弓及び椎体の癒合又は欠損、肋骨の癒合又は欠損、腎盂拡張、妊娠13~15日の投与後には口蓋裂、胸骨分節癒合が多く観察された。MBePの発生毒性は親物質の butyl benzyl phthalate (BBP) の発生毒性とよく類似していることから、BBP の発生毒性はその代謝物の MBeP を介して発現することが示唆された。

**Keywords:** monobenzyl phthalate, developmental toxicity, teratogenicity

Ema, M., Iwase\*, T., Iwase\*, Y., Ohyama\*, N. and Ogawa, Y.: **Change of embryotoxic susceptibility to di-*n*-butyltin dichloride in cultured rat embryos**

*Arch. Toxicol.*, 70, 742-748 (1996)

妊娠8日のラットに投与したときに強い催奇形作用を示す di-*n*-butyltin dichloride (DBTCl) の全胚培養系における奇形誘発作用を検討した。妊娠8.5日, 9.5日及び11.5日のラット胚をそれぞれ68, 46及び48時間培養した。妊娠8.5日胚では培養の最初の24時間、妊娠9.5日胚では46時間、妊娠11.5日胚では培養の最後の46時間に DBTCl を暴露した。8.5日胚においては10 ng/ml 以上で胎盤径, 30 ng/ml で体節数及び形態指数の低下がみられた。9.5日胚においては100 ng/ml で卵黄嚢径及び頭腎長の低下, 50 ng/ml 以上で体節数の低下, 30 ng/ml 以上で形態指数の低下が観察された。11.5日胚においては300 ng/ml 暴露群においてもこれらの指標に変化は認められなかった。形態異常は8.5日胚, 9.5日胚及び11.5日胚においてそれぞれ10 ng/ml 以上, 50 ng/ml 以上及び300 ng/ml の暴露濃度において観察された。8.5日胚及び9.5日胚では顔頭部の異常, 11.5日胚では前肢及び尾の異常が多く観察された。これらの結果から、DBTCl の *in vitro* における着床後ラット胚に対する胚毒性は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:** dibutyltin dichloride, whole embryo culture, embryotoxicity

\* Toxicology Laboratory, Yokohama Research Center, Mitsubishi Chemical Co.

Emma, M., Harazono, A., Miyawaki, E. and Ogawa, Y.: **Embryolethality following maternal exposure to dibutyl phthalate during early pregnancy in rats**

*Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 58, 636~643 (1997)

ラットの妊娠0~11日(精子発見日=妊娠0日)に2.0%のdibutyl phthalate (DBP)を含む飼料を与え、妊娠20日にラットを帝王切開して胚-胎児に対する影響を調べたところ、黄体数、着床数及び着床前胚死亡率には対照群及びPair-fed (PF) 群との間に差はみられなかったが、着床後胚死亡率は99%に上昇した。これらの結果について詳しく調べるために、2.0%のDBPを含む飼料を妊娠0日から妊娠7日、9日又は11日まで与え、これらの日にラットを開腹して胚に対する影響を検討した。妊娠11日における着床後胚死亡率は対照群及びPF群に比べて著しく高かった。DBP群における妊娠11日の子宮重量、妊娠9日及び11日の卵巣重量は対照群及びPF群に比べて低かった。また、DBP群における妊娠7日の卵巣重量及び妊娠11日の母体血中のプロゲステロンは対照群に比べて有意に低かった。これらの結果は、DBPと同様にラットに投与したとき代謝物としてmonobutyl phthalateが産生されるbutyl benzyl phthalate (BBP)の胚致死作用と類似しているが、母体血中のプロゲステロンの低下はBBPを投与したときの方が著しく、DBPとBBPの胚致死作用の発現機作が異なることが示唆された。

**Keywords**: dibutyl phthalate, developmental toxicity, embryoletality

Emma, M., Miyawaki, E., Harazono, A. and Ogawa, Y.: **Effects of triphenyltin chloride on implantation and pregnancy in rats**

*Reprod. Toxicol.*, 11, 201~206 (1997)

ラットの妊娠0~3日(精子発見日=妊娠0日)に3.1, 4.7又は6.3 mg/kgのtriphenyltin chloride (TPTCI)又は妊娠4~6日に6.3, 12.5又は25.0 mg/kgのTPTCIを経口投与し、妊娠20日に帝王切開して胚-胎児に対する影響を調べた。妊娠0~3日の4.7及び6.3 mg/kg投与群、妊娠4~6日の12.5及び25.0 mg/kg投与群において妊娠率が有意に低下した。妊娠の成立したラットにおいては、妊娠0~3日及び妊娠4~6日のいずれのTPTCI投与群の着床数、生存胎児数、着床前及び後の胚死亡率とも対照群の値と同様であった。これらの結果から、TPTCIをラットの妊娠初期に投与したときにみられる着床阻害作用は妊娠のより早い時期にTPTCIを投与したときにより強く発現することが明らかになった。

**Keywords**: triphenyltin chloride, embryoletality, antiimplantaion

Harazono, A., Emma, M. and Ogawa, Y.: **Pre-implantation embryonic loss induced by tributyltin chloride in rats**

*Toxicol. Lett.*, 89, 185~190 (1996)

ラットの妊娠0~7日にtributyltin chloride (TBTCI)を0, 25, 37.5, 50 µmol/kg/dayの用量で経口投与し、妊娠20日に開腹して胚-胎児に対する影響を調べた。交配後妊娠の成立しなかったラット数は、対照群の10例中0例に対し、25, 37.5, 50 µmol/kg投与群ではそれぞれ11例中2例, 14例中10例, 13例中10例となり、TBTCIの用量の増加と共に妊娠率の減少がみられた。しかし、妊娠の成立した母

体においては黄体数、着床数及び生存胎児数に対照群とTBTCI投与群との間の差はみられなかった。また、TBTCI投与群における生存胎児の外表奇形の発現頻度の上昇はみられなかった。以上のことから、TBTCIは妊娠初期に投与したとき不妊効果を示すことが明らかになった。

**Keywords**: tributyltin chloride, pregnancy failure, pre-implantation loss

Amano, H., Kurosaka, R., Emma, M. and Ogawa, Y.: **Trypsin promotes C 6 gliomacell proliferation in serum-and growth factor-free medium**

*Neurosci. Res.*, 25, 203-208 (1996)

通常、血清添加培地で行うC6グリオーマ細胞の連続継代培養を無血清、成長因子無添加培地を用いて行った。播種時、一定細胞数に対して培地容量を段階的に増やすと、これに対応して細胞増殖率が低下し、初期細胞密度に相関した拡散性増殖因子の介在が示唆された。この相関関係は、細胞接着後早期(播種3時間後)に培地交換を行うことにより消失し、増殖率が著しく低下したので、培地中の因子は細胞自身が分泌するのではなく、トリプシン-EDTA処理時の細胞懸濁液の上清(SCS)に由来すると予測され、事実SCSはC6細胞の増殖率を濃度依存的に増大した。SCS中に存在する既知物質として低濃度のトリプシンの作用を検討したところ、SCSと同様の効果が認められた。SCS, トリプシンいずれの効果もダイズトリプシンインヒビターにより完全に抑制された。また、アフィニティ精製されたトリプシンもトリプシンインヒビター感受性の細胞増殖効果を示した。以上の結果より、C6細胞の無血清継代培養系において、継代時に培地中に移行する低濃度のトリプシンにより細胞の増殖が誘発され、この作用はトリプシンのプロテアーゼ活性に依存していることが明らかとなった。

**Keywords**: C 6 glioma cell, serum-free medium, trypsin

Murai, T., Nakagawa, Y. and Ogawa, Y.: **Potentiation of lethal endotoxin shock by streptococcal pyrogenic exotoxin in rabbits: Possible relevance of hyperre-activity of macrophages to endotoxin**

*FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 13, 269~272 (1996)

著者らは既に、A群溶血性レンサ球菌発熱性外毒素(SPE)で刺激したリンパ球の培養上清には、エンドトキシンの毒性発現に中心的役割を演じるマクロファージのエンドトキシン反応性を増強する作用があることを報告した。本研究では、SPE刺激リンパ球培養上清でウサギを前処置することにより、SPEで前処置した場合と同様に、エンドトキシンの致死毒性が増強されることを見出した。これらの事実から、SPEによるエンドトキシン致死毒性増強現象の発現要因は、SPEが誘導するリンフォカインによる、エンドトキシンに対するマクロファージの反応性の増強にあると考えられた。

**Keywords**: streptococcal pyrogenic exotoxin, endotoxin, macrophage

姉帯正樹\*, 兼俊明夫\*, 林 隆章\*, 青柳光敏\*, 飯田修, 畠山好雄: **北海道産木香の調製法と化学的品質評価**

*Natural Medicines*, 50, 284~288 (1996)

油気に富み内部の充実した木香を得るためには、ゆっくと時間をかけて自然乾燥する必要があり、その間にイヌリンが酵素により分解して単糖類が増加し、高いエキス含量を示すようになる。

**Keywords**: Saussureae Radix, preparation, chemical evalu

## ation

\* 北海道立衛生研究所

姉帯正樹\*, 兼俊明夫\*, 柴田敏郎, 飯田 修, 畠山好雄:  
ナイモウオウギを基原とする北海道産黄耆の化学的品質  
評価

*Natural Medicines*, 50, 163~169 (1996)

栽培年数と成分含量の間には明瞭な傾向が認められな  
かった。イソフラボノイドは部位による差が明瞭でなく、ア  
ストラガロサイドは主根より細い側根の含量が高かった。

**Keywords:** *Astragalus mongholicus*, isoflavonoid, astraga-  
loside

\* 道立衛生研所

Satou, T.\*, Mimaki, Y.\*, Kuroda, M.\*, Sashida, Y.\* and  
Hatakeyama, Y.: **A pyrroline glucoside ester and ster-  
oidal saponins from *Lilium martagon***

*Phytochemistry*, 41, 1225~1230 (1996)

マルタゴンリリーの新鮮球茎から新規物質のフェニール  
プロパノイドエステル1種, ステロイドサポニン2種が得  
られ, 構造決定された。マルタゴンリリーの二次代謝産物  
はタケシマユリに酷似しており, 二次代謝産物と交雑親和  
性の間には相関があるという好適例である。

**Keywords:** *Lilium martagon*, phenylpropanoid ester, steroi-  
dal saponins

\* 東京薬科大学

芝野真喜雄\*, 松本吉広\*, 草野源次郎\*, 柴田敏郎: 国  
内薬用植物園で植栽されるカンゾウ属植物の調査と優良  
品種選抜のための基礎研究 I, 地上部の HPLC パター  
ンと成分による比較

*Natural Medicines*, 50, 273~283 (1996)

優良品種育成のための基礎研究として, 国内各地43施設  
の薬草園で植栽されているカンゾウ属植物を材料にして,  
地上部の形態及び HPLC パターンによる成分の比較を行  
い, 5種類の *Glycyrrhiza* 属植物が判別できることを確認  
し, 17成分の同定を行った。また, *G. glabra* は成分的に4  
タイプ存在することも明らかにした。

**Keywords:** *Glycyrrhiza* spp., aerial part, HPLC

\* 大阪薬科大学

柴田敏郎, 酒井英二, 西孝三郎, 姉帯正樹\*: 異なる土  
壌で栽培したキバナオウギの生育及び配糖体含量につ  
いて

*Natural Medicines*, 50, 296~299 (1996)

生薬黄耆の基原植物 *Astragalus membranaceus* 根の生育  
・形状・品質に及ぼす土壌の種類の影響を検討し, 土壌の  
3相組成(気相, 液相, 固相)の違いは, 分枝根の発生に  
対する直接的な影響は少ないこと, また, 赤土や黒ボク土  
区などリン酸肥料の欠乏のため主根生育が劣った区にお  
いて, astragaloside 含量が高まる傾向を明らかにした。

**Keywords:** *Astragali Radix*, soil group, phosphoric acid

\* 北海道立衛生研究所

柴田敏郎, 酒井英二, 西孝三郎, 青柳光敏\*, 姉帯正樹\*:  
キバナオウギの生育及び配糖体含量に及ぼす栽培圃場の  
耕起条件の影響

*Natural Medicines*, 50, 349~353 (1996)

生薬黄耆の基原植物 *Astragalus membranaceus* 根の生育  
・形状・品質に及ぼす土壌硬度の影響を検討し, 土壌硬度  
が黄耆根の生育・形状に密接に関係すること, 貫入抵抗値

6~14kg/cm<sup>2</sup>以下の膨軟な土壌で栽培すれば, 分枝根の発  
生が抑制され, 主根が良く発達した形状の生薬生産が可能  
であることを明らかにした。

**Keywords:** *Astragali Radix*, tap root elongation, penetration  
resistance

\* 北海道立衛生研究所

Ahn, J. C.\*<sup>1</sup>, Hwang, B.\*<sup>1</sup>, Tada, H.\*<sup>2</sup>, Ishimaru, K.\*<sup>2</sup>, Sasaki, K.  
and Shimomura, K.: **Polyacetylenes in hairy roots of  
Korean balloon flower (*Platycodon grandiflorum*)**

*Phytochemistry*, 42, 69~72 (1996)

韓国産キキョウより毛状根を誘導し, クローン選抜と培  
地を選択することにより, 毛状根の生育及び polyacetylene  
類生産が飛躍的に改善された。既報の日本産のものより約  
5倍の polyacetylene 類含量であった。

**Keywords:** *Platycodon grandiflorum*, hairy root, poly-  
acetylene

\*<sup>1</sup> 韓国全南大学\*<sup>2</sup> 佐賀大学農学部

Tada, H.\*<sup>1</sup>, Murakami, Y.\*<sup>1</sup>, Omoto, T.\*<sup>2</sup>, Shimomura, K.  
and Ishimaru, K.\*<sup>1</sup>: **Rosmarinic acid and related phe-  
nolics in hairy root cultures of *Ocimum basilicum***

*Phytochemistry*, 42, 431~434 (1996)

抗酸化物質生産を目的に, *Ocimum basilicum* (スイー  
トバジル) の毛状根クローンを各種培地にて培養した結  
果, MS 培地で, 約14%の rosmarinic acid (乾燥重量) の  
含量であった。caffeic acid の3及び4量体は, それぞれ  
1.7%, 0.17%の含量であった。

**Keywords:** *Ocimum basilicum*, hairy root, rosmarinic acid

\*<sup>1</sup> 佐賀大学農学部\*<sup>2</sup> (株)三栄源エフ・エフ・アイ

Tanaka, N.\*, Yamada, Y.\*, Shimomura, K. and Ishimaru, K.\*:  
**Polyacetylene in tissue cultures of *Campanula glom-  
erata***

*Plant Tissue Culture letters*, 13, 215~217 (1996)

*Campanula glomerata* の種々の培養系を確立し, これま  
で我々が単離同定してきた polyacetylene の生産を調べ  
た。その結果, 日本産菌 *Agrobacterium rhizogenes* で誘導  
した毛状根が, glucose 配糖体である lobetyolin を最も大  
量に生産することを明らかにした。

**Keywords:** *Campanula glomerata*, tissue culture, polyacety-  
lene

\* 佐賀大学農学部

Ishimaru, K.\*<sup>1</sup>, Yamanaka, M.\*<sup>1</sup>, Terahara, N.\*<sup>2</sup>, Shimomura,  
K., Okamoto, D.\*<sup>3</sup> and Yoshihira, K.\*<sup>4</sup>: **Biotransforma-  
tion of phenolics by hairy root cultures of five  
herbal plants**

*Jnp. J. Food Chem.*, 3, 38~42 (1996)

5種類のハーブ (*Lobelia sessilifolia*, *L. cardinalis*, *Campa-  
nula medium*, *Ocimum basilicum*, *Fragaria x ananassa*) の  
毛状根による5種のフェノール類の生物変換反応を行っ  
た。ほとんどは, 配糖化反応が主であったが, 位置選択的  
な水酸化が, 用いた毛状根及びフェノール類で認められ  
た。

**Keywords:** biotransformation, phenolics, hairy root

\*<sup>1</sup> 佐賀大学農学部\*<sup>2</sup> 南九州大学園芸学部\*<sup>3</sup> タキイ種苗長沼試験農場

\*<sup>4</sup> 東亜大学大学院

Tanaka, N.\*<sup>1</sup>, Shimomura, K. and Ishimaru, K.\*: ***In vitro* shoot regeneration and polyacetylene production in callus cultures of *Lobelia erinus* L.**

*J. Plant Physiol.*, 149, 153~156 (1996)

南アフリカ原産の *Lobelia erinus* のカルス培養系を確立し、形態学的に異なる2種の再生 shoot を得た。キキョウ科の生産する polyacetylene 類を HPLC にて定量した結果、親植物よりカルス、細胞培養系は、2~4倍、再生 shoot も6~30倍の値であったが、正常形態を示す shoot の含量は、継代培養と共に、含量の低下が認められた。カルスから再生系が得られることより、トランスジェニック植物獲得の可能性を示唆した。

**Keywords:** *Lobelia erinus*, polyacetylene, shoot culture

\* 佐賀大学農学部

Tanaka, N.\*<sup>1</sup>, Yoshimatsu, K., Shimomura, K. and Ishimaru, K.\*: **Rutin and other polyphenols in *Fagopyrum esculentum* hairy roots**

*Natural Medicines*, 50, 269~272 (1996)

日本産菌 *Agrobacterium rhizogenes* の感染により誘導した毛状根が、Murashige-Skoog 培地で、最も良好な生育を示し、rutin が親植物の根の10倍の含量であることを明らかにした。また、rutin の他、5種類の polyphenol 類の含量を HPLC で分離定量した。

**Keywords:** *Fagopyrum esculentum*, hairy roots, rutin

\* 佐賀大学農学部

Aoki, T.\*<sup>1</sup>, Matsumoto, H.\*<sup>2</sup>, Asako, Y.\*<sup>3</sup>, Matsunaga, Y.\*<sup>4</sup> and Shimomura, K.: **Variation of alkaloid productivity among several clones of hairy roots and regenerated plants of *Atropa belladonna* transformed with *Agrobacterium rhizogenes* 15834**

*Plant Cell Reports*, 16, 282~286 (1997)

*Agrobacterium rhizogenes* 15834株の感染により確立した毛状根より5クローンを選抜し、トロパンアルカロイドの生産を検討した。また、これらクローンから再生した形態的に特徴を持つトランスジェニック植物体を水耕栽培し、試験管内培養個体とアルカロイド生産を比較した。

**Keywords:** *Atropa belladonna*, hairy root, tropane alkaloid

\*<sup>1</sup> 日本大学資源科学部

\*<sup>2</sup> (株)ツムラ分子生物学研究所

\*<sup>3</sup> 新日本製鐵海洋生物工学研究所

\*<sup>4</sup> (株)鐘紡生化学研究所

東 昭夫\*, 野口 衛, 細田勝子\*他: **キキョウの調製法の品質に及ぼす影響について**

*Natural Medicines*, 51, 56~62 (1997)

キキョウ根の Platycodin D (PD) 含量を HPLC を用いて測定した。皮剥きにより PD 含量は低下し、皮中の含量は皮剥き品に比べて3~10倍となった。また、皮及び皮剥き品の PD を合計しても皮付き品より著しく低い値を示した。皮付き品は、皮剥き品に比べ乾燥に著しく時間が必要となる。このことから、皮付きでは、乾燥時に他の物質から PD が生成する可能性が考えられる。また、白花のものは、青花のものに比べて PD 含量は高い値を示した。

**Keywords:** *Platycodon grandiflorum*, Platycodin D, HPLC

\* 生薬品質集談会

青柳伸男: **坐剤の放出試験**

医薬品研究, 28, 241~249 (1997)

放出試験は坐剤の開発、品質管理に重要な役割を果たすが、公的試験法は確立されていない。汎用されている3種の放出試験法(村西, 透析チューブ, 回転透析セル法)を取り上げ、データの再現性, *in vitro*/*in vivo* 相関性について検討を行った。そして, *in vitro* 放出速度, 再現性に影響を及ぼす重要な要因は坐剤周囲の水分量であることを示すと共に, 坐剤のバイオアベイラビリティは直腸温度の影響を受けること, 薬物, 基剤によってもたらされる直腸粘膜の損傷はバイオアベイラビリティに影響しないことを明らかとした。結論として現段階では, 水分の少ない条件で行う回転透析セル法, 改良透析チューブ法が有用な試験法であることを述べた。

**Keywords:** suppository, dissolution test, bioavailability

鹿庭なほ子: **第十三改正日本薬局方における分析法バリデーションをめぐって**

ぶんせき, 11, 919~921 (1996)

第十三改正日本薬局方の参考情報に「分析法バリデーション」が導入された。それに関連して, 分析結果の偏りとばらつきに関連する最近の考え方及び用語を紹介し, また, 用語の日本語訳を決定するときの経緯を紹介した。一方, 近年検出限界について, 第一種の過誤のみを考慮して決定する方法と, 第一種及び第二種の過誤の両者を考慮して決定する方法をめぐって論争が行われているが, 限度値以上の不純物を見逃してはならないという純度試験の目的から, JP では後者の立場を採っていることを明らかにした。

**Keywords:** trueness, precision, limit of detection

石橋無味雄: **医薬品に残留する有機溶媒のクラス分け及び限度値について**

食衛誌, 38, J-177~J-178 (1997)

日米欧医薬品規制ハーモナイゼーション会議 (ICH) の場において, 医薬品中に残留する溶媒の悪影響から患者を保護するため, 医薬品の製造に用いる溶媒の毒性データを収集評価して残留溶媒基準 (医薬品由来の残留溶媒許容一日摂取量; PDE) を定める作業が行われている。この内容について解説した。

**Keywords:** solvents in pharmaceutical products, pharmacopoeia, residual solvents

石橋無味雄: **分析に用いる溶媒の選択について—日本薬局方での考え方—**

食衛誌, 38, J-194~J-195 (1997)

日本薬局方 (JP) では, 「人及び環境に有害な試薬を用いた試験法の廃止」が JP 改正に際しての基本方針の一つとされている。これを実行するために JP では「有害な試薬」を, どのように考え, どのように定義したかについて解説し, JP の模索する医薬品の開発, 試験, 検査などの場における使用試薬に関する今後の考え方について解説した。

**Keywords:** reagents in pharmacopoeia, harmful reagents, japanese pharmacopoeia

石橋無味雄: **試薬・試液の名称改正について**

薬局, 47, 55~64 (1996)

日本薬局方 (JP) における試薬及び試液の名称について IUPAC に基づく名称と JP における名称との相違点などの調査を行い, その研究結果に基づき JP における試薬命名法の原則を定め, この原則により JP の改正を行い試薬

の名称を試行的に改めた。この改正内容について、試薬名命名法の原則、改正点、新旧名称の比較などを基にして解説した。

**Keywords** : reagents in pharmacopoeia, japanese pharmacopoeia, general tests

中原雄二：髪による薬物歴の診断—毛髪分析—  
武田薬報, 406, 14 (1996)

髪による薬物歴の診断について、毛髪の発生や成長サイクルなどの基礎的内容から、薬物の毛髪中の挙動やその応用に至るまでを解説した。

**Keywords** : hair analysis, drug monitoring, drug disposition in hair

川西 徹：高速走査型共焦点レーザー顕微鏡による細胞内カルシウムイオン濃度のリアルタイムイメージング  
バイオイメージング, 5, 23~25 (1996)

高速走査型共焦点レーザー顕微鏡の開発の経緯、及びそれを用いた細胞内カルシウムイオン濃度画像化の例を述べると共に、細胞内生化学現象の高分解能リアルタイム画像化の将来について記した。

**Keywords** : confocal microscopy, calcium, imaging

早川堯夫：ヒトとクスリの新たな関係—バイオ医薬品の品質確保について

薬局, 48, 105~112 (1997)

バイオ医薬品の品質確保をめぐる話題として、1) 医薬品の品質確保とは、2) バイオ医薬品の品質確保に関連する事項、3) バイオ医薬品の開発、承認、流通、臨床使用段階と品質確保のあり方、4) バイオ医薬品の製法、物性面での特徴、5) バイオ医薬品における構造・組成、諸性質の解析の重要性、6) 製造過程の検証とその恒常性維持の重要性、7) 規格及び試験法の位置づけと一般的留意事項、8) 市場での流通段階、臨床現場での保存や使用段階での品質確保、9) バイオ医薬品の品質確保に関する国際調和などの項目を取り上げ詳細に述べた。

**Keywords** : biotechnology drugs, quality control

佐竹元吉：第一三改正日本薬局方の改正点 生薬・生薬製剤及び油脂関連の改正点

薬局, 47, 737~840 (1996)

主な改正点は新規収載生薬6品目で、いずれも薬局方外生薬規格集に記載され、その内、粉末4品目はもとの生薬が既に収載品目となっている。生薬製剤1品目のトコンシロップは第6改正以来の再収載である。生薬の各条は(1) 定量法の改正・統一及び成分含量測定法の新設、(2) 基原植物の追加または削除等、(3) 性状記載の統一と一部変更(成分含有量に関する記載の削除)、(4) 確認試験の変更と有害試薬の削除、(5) 乾燥減量の新設と乾燥時間の規定、(6) 純度試験の削除、(7) 別名の漢字の変更である。

**Keywords** : herbal medicines, crude drug, Japanese pharmacopoeia

佐竹元吉：第一三改正日本薬局方の改正について 医薬品各条(生薬)

医薬品研究, 27, 522~526 (1996)

新規収載の7品目(アカメガシワ、インチンコウ、ウイキョウ末、サンヤク末、チョレイ末、トウニン末、トコンシロップ)及び既収載品目の一部の改正である。生薬の各条は定量法の改正・統一及び成分含量測定法の新設、基原植物の追加または削除等、確認試験の変更である。油脂関

連の各条は性状の有害試薬の削除、確認試験及びヨウ素価の有害試薬の変更である。

**Keywords** : herbal medicines, crude drug, Japanese pharmacopoeia

佐竹元吉：薬用資源植物の導入と作用の解明

ファルマシア, 32, 641~643 (1996)

国立衛生試験所生薬部の研究内容を紹介した。

1) 南米アマゾン産の避妊用の薬用植物、Piri-Piriには花芽は真菌が感染して、球状に萎縮する。この菌から麦角アルカロイド及び低分子のアルカロイドが発見された。C. araticularisの根茎からは新規のグアイアン型セスキテルペンが見出された。Piri-Piriの類似生薬の三稜から5種のフェニルプロパノイドの配糖体を発見した。2) 抗HIVウイルスアッセイ等の活性化合物の探索からマメ科植物に強い活性が認められた。3) 紫根の光学異性体成分の肉芽組織形成促進作用を明らかにした。4) エンドセリンの新しい心臓調節作用を明らかにした。

**Keywords** : herbal medicines, crude drug, Cyperus

佐竹元吉：Medicinal plants in the world

Farming Japan, 30, 10~13 (1996)

世界の薬用植物の数は膨大なものであり、世界の植物の約1割、3万種がそれと推測されている。これらを体系化された医療で用いる薬物と体系化された医療の無い地域で用いられる植物の二つのグループに分けて特徴を述べた。体系化された医療と古代文明の関係から、現在各地で用いられている薬用植物の歴史的な面も明らかにした。今後の医薬品開発の資源としての重要性についても述べた。

**Keywords** : medicinal plant, crude drug, traditional medicines

佐竹元吉：Medicinal plants in the Amazon and Andes regions

Farming Japan, 30, 29~35 (1996)

世界の植物は約27万種で、その16%がアマゾン・アンデスに分布している。この中の薬用植物数についての正確な記載はないが、約8,000種あっても不思議ではない。この広いアマゾン地域で利用されている薬用植物をペルーアンデスからアマゾン川河口ペレンに至るまでの各地域の薬用植物について述べてみる。代表的植物はRatania (*Krameria triandra*)、Pinco-pinco (Ephedra 属)、Erythroxylon coca、キナノキ (*Chincona officinalis*)、ピリピリ (*Cyperus spp.*)、Banisteriopsis caapi、ガラナ (*Paullinia cupana*)、トコン (*Cephaelis ipecacuanha*) 等である。

**Keywords** : medicinal plant, Amazone, Andes

佐竹元吉：人の営みに欠かせない薬用植物(アマゾン川流域の薬草を中心に)

海外農業開発: 9, 13~21 (1996)

海外の農業開発に携わる人へ、薬用植物資源の重要性とその保護・保存・開発の調和の重要性を、世界の薬用植物のルーツ、化学医薬品と薬用植物、アマゾン・アンデスの薬用植物を例にして述べた。

**Keywords** : medicinal plant, Amazone, conservetion

Kawahara, N.: Medicinal plants and crude drugs in Japan and guidelines for cultivation and quality evaluation of medicinal plants

Farming Japan, 30, 14~18 (1996)

日本における生薬・漢方製剤の消費状況と薬用植物の生

産状況について年次推移を示しながら解説した。さらに厚生省薬務局研究開発振興課が監修する“薬用植物栽培・品質評価指針”に関してその経緯、目的及び現状を述べると共に、本指針に記載されている3種の薬用植物を例に挙げ、生産・消費状況ならびに栽培法について解説した。

**Keywords** : medicinal plants, crude drugs, guidelines for cultivation and quality evaluation of medicinal plants

中村晃忠：医療用具に用いるプラスチックの生物学的安全性評価について

塩ビ食品衛生協議会会報, 116, 1~9 (1996)

プラスチックを医療用具材料として用いる場合の生物学的安全性評価の考え方を解説した。すなわち、ISOや厚生省のガイドライン、添加剤などの低分子量物質によるリスク、全身毒性作用と局所作用のどちらを重視するか、中・高分子量物質によるリスク、リスク分析の実例、細胞毒性試験および感作性試験の予見性、などについてである。

**Keywords** : biological safety evaluation, medical plastics, ISO and MHW guidelines

鹿庭正昭：特集「生活の中の化学物質」、化学物質とのつきあい方—化学物質の使用実態と健康被害の関連性—厚生, 12~13 (1997)

日常生活の中で係わる化学物質によってどのような健康被害を受けるかを考えるとき、どのような経路で曝露されるか、どのような症状を呈するかを明らかにすることが重要である。更に、健康被害の原因化学物質を究明していくうえで、原因化学物質の毒性だけでなく、使用実態に沿った曝露の量と頻度(用途, 含有量, 使用頻度)を把握することもまた重要である。そうした製品及び化学物質に関する情報をもとに、実際に発生した健康被害事例について原因究明を進め、製品の安全確保、事故発生の未然防止に資することが重要である。

**Keywords** : indoor environment, household chemical product, safety management

新谷英晴：ISO/TC198東京会議並びにオランダ、デルフト会議報告

医科器械, 66, 341~343 (1996)

1995年10月東京、並びに1996年2月オランダ、デルフトで開催されたISO/TC198, WG4, 生物指標、会議の報告を記載した。日本から提案した議案の多数は承諾された。

**Keywords** : biological indicator, ISO/TC198, WG 4

新谷英晴：第6回AAMI/FDA会議報告

医科器械, 66, 450 (1996)

1996年3月26日~27日米国ワシントンで開催された第6回AAMI/FDA会議での議事の内容を報告した。ISO/TC198のドキュメントは米国ではほぼそのまま国内規格にされようとしている。

**Keywords** : AAMI, FDA, ISO

新谷英晴：滅菌保証ならびに滅菌バリデーション

ファーマテックジャパン, 12, 1209~1221 (1996)

生物指標を用いて滅菌する際のバリデーションをISOドキュメントを基に解説した。

**Keywords** : biological indicator, validation, ISO

新谷英晴：生物指標あるいはバイオバーデン菌を用いる滅菌保証並びに滅菌バリデーション

防菌防黴, 24, 669~674 (1996)

生物指標あるいはバイオバーデン菌を用いて滅菌保証並びにバリデーションする方法をISO/TC198ドキュメントを基に解説した。

**Keywords** : biological indicator, bioburden, sterilization validation

新谷英晴：生物指標あるいはバイオバーデン菌を用いる滅菌保証

防菌防黴, 24, 770 (1996)

生物指標あるいはバイオバーデン菌を用いて滅菌保証する方法をISOドキュメントを基に解説した。

**Keywords** : biological indicator, bioburden, sterilization validation

安藤正典, 眞柄泰基\*：ヒ素の健康影響と西ベンガル州における地下水汚染

資源環境対策, 33, 113~122 (1997)

インド国西ベンガル州では近年地下水のヒ素汚染を招き、大きな問題となっている。この州では、ヒ素汚染面積8,300km<sup>2</sup>、汚染地域人口三千万人、汚染水飲用人口100万人、ヒ素中毒の発症者数二十万人に及ぶ世界で未曾有のヒ素中毒の深刻な事態に至っている。ヒ素による健康影響は古くから知られているが、その健康影響メカニズムはほとんど明らかにされていない。このためインド西ベンガル州におけるヒ素中毒の実状を明らかにした。また、動物や培養細胞を用いたヒ素の毒性の発現機構についての最近の知見を紹介した。

**Keywords** : arsen, carcinogenesis, west Bengal in India

\*国立公衆衛生院

松村年郎：化学物質による室内汚染について、—VOCとホルムアルデヒドについて—

大気環境学会誌, 31, A154~A164 (1996)

近年、sick building syndromeやsick house syndrome等に関連して、化学物質、特に、VOCとHCHOによる室内空気汚染が世界的に注目されている。本論文においてはVOCとHCHOについて、その発生源、建材等からの放散量、室内汚染の実態と挙動、ヒトに対する健康影響、ガイドライン等について内外の文献を参考に解説を行った。

**Keywords** : indoor air pollution, VOC, HCHO

豊田正武, 穂山 浩：アフラトキシンの分析法の改良

マイコトキシン, 43, 33~35 (1996)

我が国及び米国等における食品中アフラトキシンの分析法を比較し、有害有機溶剤を使用しない分析法を紹介した。

**Keywords** : aflatoxins

豊田正武：バイオテクノロジー応用食品の現状と安全性評価：主に組換え作物について

食衛誌, 37, 247~259 (1996)

既に食品としても販売されているバイオ食品、海外で開発されている組換え作物の現状、近年の諸外国及び国際機関における組換え作物の安全性評価、我が国における組換え作物の安全性評価等について解説した。

**Keywords** : genetically modified foods, biotechnology, substantial equivalence

豊田正武：食品中における農薬の実態調査と一日摂取量について

食品衛生研究, 47, 67~77 (1997)

平成8年度食品化学講習会で講演した内容、即ち食品化学課及び食品保健課で実施している残留農薬の実態調査結果、並びに残留農薬摂取量調査結果について概要を示した。

**Keywords:** pesticide residues, monitoring, daily intake

佐々木久美子, 松田りえ子: 英国農水産食糧省の「残留農薬分析のための品質管理一第2版」の紹介(翻訳) 食衛誌, 38, J-18~J-27 (1997)

我が国で残留農薬分析の品質管理を確立する際の参考とするために、英国農水産食糧省が1996年に作成した残留農薬分析の品質管理ガイドラインを翻訳して紹介した。

**Keywords:** pesticide residues analysis, quality control

佐々木久美子, 豊田正武(残留農薬迅速分析法開発検討委員会): 残留農薬迅速分析法の解説(その1) 食品衛生研究, 47, 27~41 (1997)

平成9年4月に厚生省生活衛生局が通知した残留農薬迅速分析法について、分析法作成にあたった開発検討委員会の検討内容を紹介すると共に、分析法及びその留意点を解説した。

**Keywords:** multiresidue pesticide analysis, gel permeation chromatography, solid phase extraction

山田 隆: 食品中の食品添加物分析法

ぶんせき, 1997, 296~301 (1997)

「進歩総説」という項に、1993年1月から1996年前半までの論文の内から、主として保存料、漂白剤、酸化防止剤、甘味料、着色料についての文献を簡単に紹介し、既存の方法との比較などについて記載した。

漂白剤としては、主として二酸化イオウに関する文献を取り上げ、着色料については、天然着色料についても触れている。上記の他、臭素酸カリウムや硝酸塩の分析法についても延べている。はじめに、前回この総説が書かれた時から現在までの食品添加物を巡る動きについて簡単に述べた。最後には、ある添加物の分析法が研究されるのは、新たな手法を試みる場合の他は、新たに添加物の使用が許可されたり、毒性が明らかになった場合などであるので、前回から今までに、このような問題があったものに研究が集中することを述べた。

**Keywords:** food additives, analysis

米谷民雄: 衛生化学に係る検査機関の精度管理

ファルマシア, 32, 1518~1521 (1996)

食品衛生法等の改正により、食品衛生法に基づく指定検査機関や地方衛生研究所では、GLPの導入が必要となった。そのGLPの内容については、たとえば指定検査機関に対しては、厚生省は「指定検査機関における製品検査の業務管理要領」を通知して示している。基本的には、①内部点検、②内部精度管理、③外部精度管理により、検査の信頼性を確保することになる。このうち、外部精度管理については、「国その他の適当と認められる者が行う精度管理に関する調査」と規定され、それを定期的に受けることが記されているが、現在のところ、厚生省は直接には食品検査機関を対象にした全国規模での精度管理調査を実施していない。そこで、環境庁が昭和50年から実施している環境測定分析統一精度管理調査について、1)実施体制と規模(参加申込機関は、地方公害研究所等の公的機関約100、薬剤師会や指定検査機関を含む民間機関約500)、2)分析対象試料(最近では重金属分析用と有機塩素化合物分析用の2つが用いられている)及び結果の解析、3)結果説明会(公

的機関には、全国公害研協議会の5つのブロック会議で、民間機関には東京と大阪での結果説明会で、結果説明と質疑応答が行われる)と研修、の項目につき解説。

**Keywords:** GLP, quality control, quality assurance system

中西 守\*, 手島玲子: 細胞の機能を見る

蛋白質核酸酵素, 42, 1047~1052 (1997)

共焦点レーザー顕微鏡を中心とした顕微光学技術の進展並びに適切な蛍光プローブの開発に伴い、細胞機能の可視化が可能になってきた。この総説では、レセプター動態、情報伝達、細胞内小器官、遺伝情報の発現、免疫・神経系の細胞の5項目に焦点をあて、蛍光プローブの活用により細胞機能の可視化解析がどのようにして可能になっているかについて解説した。

**Keywords:** signal transduction, Ca<sup>2+</sup> signal, exocytosis

\* 名古屋市立大学薬学部

手島玲子, 中西 守\*: 機能性分子プローブ

蛋白質核酸酵素, 42, 1134~1140 (1997)

この総説では、蛋白質の構造変化、酵素の活性化、細胞内情報伝達、蛋白質・DNA相互作用などにおいて利用できる機能性分子プローブを概観し、細胞内のセカンドメッセンジャーの動態や蛋白質リン酸化反応、遺伝情報の発現などの可視化解析における現状、並びにどのような展開が今後期待できるかを考察した。

**Keywords:** second messenger, protein phosphorylation, gene expression

\* 名古屋市立大学薬学部

鈴木和博: 白血球の活性化におけるコフィリン(アクチン・PIP<sub>2</sub>結合タンパク質)の脱リン酸化と細胞膜への移行

生化学, 69, 254~259 (1997)

標記に関する最近の研究成果を紹介、解説した。

**Keywords:** cofilin, dephosphorylation, translocation

高鳥浩介, 朴 鍾喆, 太田利子\*: 食品製造環境と有害カビ

クリーンテクノロジー, 6, 48~52 (1996)

ミネラルウォーターのカビによる事故を教訓として食品製造環境のカビについて衛生管理の観点からまとめた。特に食品製造工程での有害カビの汚染は、マイコトキシン並びに環境被害と重要な関連があり、有害カビをコントロールする基本的対策の具体例を挙げ解説した。

**Keywords:** harmful moulds, foods, food manufacturing process

\* 相模女子大学

三瀬勝利: 病原性大腸菌 O-157の災禍

日本薬剤師会雑誌, 48, 11~15 (1996)

平成8年に日本で大流行を起こした病原性大腸菌 O-157の性状、感染症の特徴、予防と治療、多発した原因などについて解説した。

**Keywords:** enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O-157, food-poisoning, HUS

三瀬勝利: 日本薬局方第十三改正の概要: 一般試験法(生物学的試験法)について

月刊薬事, 38, 49~51 (1996)

第十三改正日本薬局方・生物試験法全体の解説と第十四改正に向けての活動を紹介した。



**Keywords :** Microbial tests, Japanese pharmacopoeia

三瀬勝利, 佐々木次雄\* : 局方微生物試験法の国際調和に関する会議報告

医薬品研究, 27, 319~321 (1996)

1996年2月5~6日, バルセロナにおいて, 欧州薬局方委員会の主催で行われた日米欧薬局方の無菌試験法及び保存効力試験法に関する国際調和会議の内容を紹介した。

**Keywords :** Sterility tests, Efficacy of antimicrobial preservation, PDG

\* 国立予防衛生研究所 (現国立感染症研究所)

三瀬勝利 : 一般試験法 (生物学的試験法) について

医薬品研究, 27, 504~512 (1996)

第十三改正日本薬局方・微生物試験法について一般的な解説を行った。また, 微生物試験法の手技について寄せられた質問に回答した。

**Keywords :** Microbial limit tests, Japanese pharmacopoeia

Mise, K.: **International harmonization of Sterility tests and Efficacy of antimicrobial preservation: Efficacy of antimicrobial preservation: Viewpoint of the Japanese pharmacopoeia**

*Pharmaceuticals, Special issue*, 79~82 (1996)

国際調和の中にあつて, 保存効力試験法に限定して日本薬局方の立場を, 米国薬局方や欧州連合薬局方との差異を示しながら解説した。

**Keywords :** Sterility tests, Efficacy of antimicrobial preservation, international harmonization on pharmacopoeia

Mise, K., Halperin, J.\*<sup>1</sup>, and Schnaedelbach, D.\*<sup>2</sup>: **International harmonization of Sterility tests and Efficacy of antimicrobial preservation: Conclusion remarks.**

*Pharmaceuticals, Special Issue*, 100~102 (1996)

薬局方・微生物試験法の国際調和の重要性を日本, 米国, 及び欧州連合薬局方の立場から論じ, 早急に無菌試験法及び保存効力試験法の調和を図る努力をすることが確認された。

**Keywords :** International harmonization on microbial tests, Sterility tests, Efficacy of antimicrobial preservation

\*<sup>1</sup> 米国薬局方委員会

\*<sup>2</sup> 欧州連合薬局方委員会

三瀬勝利 : 第十三改正日本薬局方の生物学的試験法について

*Medical corner.*, 100, 13~15 (1997)

薬局方微生物試験法のうち, 近年新設されたエンドトキシン試験法, 保存効力試験法及び微生物限度試験法について, 臨床医のための解説を加えた。

**Keywords :** Endotoxin test, Efficacy of microbial preservation, Microbial limit tests

三瀬勝利, 芦田勝朗\*<sup>1</sup>, 山本茂貴\*<sup>2</sup>, 寺門誠致\*<sup>3</sup>, 田中健治\*<sup>4</sup>, 高島浩介, 熊谷進\*<sup>5</sup>, 中村優子\*<sup>6</sup> : **UJNR 有毒微生物専門部会第30回日米合同部会**

食品衛生研究, 46, 15~43 (1996)

天然資源開発利用に関する日米会議 (UJNR) 有毒微生物専門部会が平成7年11月に東京, 横浜, 及び仙台で行われた。その概要について報告した。

**Keywords :** UJNR, toxic microorganisms, food poisoning

\*<sup>1</sup> 水産庁中央水産研究所

\*<sup>2</sup> 国立公衆衛生院

\*<sup>3</sup> 農林水産省家畜衛生試験場

\*<sup>4</sup> 農林水産省食品総合研究所

\*<sup>5</sup> 国立予防衛生研究所 (現国立感染症研究所)

\*<sup>6</sup> 厚生省生活衛生局乳肉衛生課

三瀬勝利, 熊谷進\*<sup>1</sup>, 山本茂貴\*<sup>2</sup>, 寺門誠致\*<sup>3</sup> : **UJNR 有毒微生物専門部会第31回日米合同部会**

食品衛生研究, 47, 9~28 (1997)

UJNR 有毒微生物専門部会はタンパク質部会と合同で, 1997年7月にアラスカ州アンカレッジ市で合同会議を持った。その概要について報告した。

**Keywords :** UJNR, toxic microorganisms, *Escherichia coli* O157

\*<sup>1</sup> 国立予防衛生研究所 (現国立感染症研究所)

\*<sup>2</sup> 国立公衆衛生院

\*<sup>3</sup> 農林水産省家畜衛生試験場

小沼博隆 : **食中毒菌の迅速検出法—腸管出血性大腸菌 O157の簡易・迅速性を中心に**

モダンメディア, 43, 42~53 (1997)

腸管出血性大腸菌 O157の検査法, 特に簡易・迅速検出法を中心に紹介し, 解説した。主な項目は, ①腸管出血性大腸菌 O157の厚生省通知による検査法 (基本法, 酵素免疫法, ビーズ法) ②増菌培地, ③分離培地, ④鑑別培地, ⑤寒天培地に発育した集落を釣菌して大腸菌 O157を検出する簡易・迅速キット, ⑥EIA法を用いた腸菌 O157を検出する簡易・迅速キット及び⑦免疫磁気ビーズ法などである。

**Keywords :** *Escherichia coli* O157, rapid method, EIA,

小沼博隆 : **HACCP 方式による飲料の衛生管理**

食品と科学, 39, 102~115 (1997)

HACCP 方式による衛生管理の概要とミネラルウォーターを中心とした衛生管理の実体を解説した。主な項目は, ①ミネラルウォーターの現状, ②HACCP システムの特徴, ③各国における HACCP の導入状況, ④わが国の HACCP に関する現状と対応, ④HACCP システム適用のための12の手順, ⑤ミネラルウォーター製造施設の実態調査と考察などである。

**Keywords :** HACCP system, mineral water, hazard analysis,

関沢 純 : **リスク評価を万人に生かすことを目指して—リスク評価の国際的推進への IPCS の活動**

*J. Toxicol. Sci.*, 22, App. 35~43 (1997)

筆者が国際協力を担当している IPCS のリスク評価活動の概要, とりわけ環境保健クライテリアシリーズ中の評価法に関するモノグラフについて解説した。更にアジェンダ21決議により始められた新しい計画として各国の安全性評価の成果を国際的に活用する国際簡潔評価文書 (CICAD) について詳細に解説した。IPCS の活動が, 標準法確立というより, 科学の進歩と各国の自主性を尊重しつつ, 相互理解と協調を推進するところにあると特徴づけた。

**Keywords :** IPCS, risk assessment, methodology development

関沢 純 : **リスクコミュニケーション—家庭用品の安全性**

日本病院薬剤師会雑誌, 32, 1335~1337 (1996)

日本短波放送の「病院薬剤師の時間」に放送した内容に

加筆し、薬剤師向けにリスクコミュニケーションとは何かを概説した。更に家庭用品の安全のためのリスクコミュニケーションのあり方について、筆者の行った市民、女子大生を対象としたアンケート調査研究の成果をあげて具体的に解説した。

**Keywords:** risk communication, household products

田中 悟, 黒川雄二: **Topics on regulatory toxicology (3) ICH 三極調整・医薬品生殖毒性試験法ガイドラインについて**

*J. Toxicol. Sci.*, 21, Appendix197~204 (1996)

ICHにおけるS5A, S5Bとしての生殖毒性試験法について、その設定経過、内容について概説を述べた。

**Keywords:** regulatory toxicology, reproductive toxicity, ICH

井上 達, 小野 敦, 平林容子: **シンポジウムII-1 老化機構と造血幹細胞の老化**

日本網内系学会誌, 36, 217~225 (1996)

老化機構に関する最近の知見と、造血幹細胞並びに造血微小環境における老化の具体的所見について概括した。

**Keywords:** telomere, apoptosis, Gompeltz

長嶋洋治\*, 井上 達: **連載 病理領域における業務感染の問題点「新しい病理検査室のあり方・考え方」**

病理と臨床, 14, 219~220 (1996)

病理検査室での特殊感染症への取り組みの基本方針について概説した。

**Keywords:** autopsy, HIV infection, biohazard

\* 横浜市立大学医学部

長嶋洋治\*, 井上 達: **今月の主題 検査室の安全対策 バイオハザードとその対策「病理解剖」**

臨床検査, 40, 23~26 (1996)

病理解剖室での特殊感染症症例剖検への対応を、前任地横浜市大での解剖台を含む解剖室の改修の経験を交えて、概説した。

**Keywords:** autopsy, HIV infection, biohazard

\* 横浜市立大学医学部

Inoue, K., Koizumi, S. and Ueno, S.: **Implication of ATP receptors in brain functions**

*Progress in Neurobiology*, 50, 483~492 (1996)

脳内ATP受容体と脳機能並びに臨床とのかかわりについて述べた。特に、記憶・学習、分裂病、痛み、自律神経系の上位中枢制御などについてATP受容体サブクラスとの関係について現在までの報告を集めて紹介した。

**Keywords:** ATP, receptor, brain

桂木 猛\*, 井上和秀: **ATP受容体と細胞内シグナリング**

日薬理誌, 108, 166~168 (1996)

生体内のATP受容体と細胞内シグナリングについて述べた。ATP受容体にはイオンチャンネル型受容体とG-蛋白結合型受容体があり、脳、脊髄、自律神経系、末梢臓器などほとんどの部位にさまざまなサブクラスが発現していて、多様な生理機能を司っている。国内の研究者の仕事を紹介しながら、その生理的意義についても触れた。

**Keywords:** ATP, receptor, signalling

\* 福岡大学医学部

井上和秀: **ATP受容体**

蛋白質・核酸・酵素, 別冊「脳における情報伝達」, 42, 308~315 (1997)

神経機能素子と素過程という面から見た脳における情報伝達の中で、ATP受容体の神経機能素子としての働きを紹介した。ATP受容体がイオンチャンネル型(P2Xn)とG蛋白結合型(P2Yn)の2つに大別され、P2Xnは膜2回貫通型で、非選択性的カチオンチャンネルを形成し、早いシナプス伝達を担う。P2YnはG-蛋白結合膜7回貫通型ファミリーに属し、PLCβ活性化、細胞内Ca濃度上昇を引き起こし、シナプス伝達を長期的に変調させる。

**Keywords:** ATP, receptor, transmission

Sugiyama, Y.\*<sup>1</sup>, Ito, K.\*<sup>1</sup>, Tsuda, M. and Horii, I.\*<sup>2</sup>: **Future prospects for toxicokinetics: Its ability to predict drug adverse events in humans**

*J. Toxicol. Sciences*, 21, 511~516 (1996)

毒性試験を実施する上で、Toxicokinetics(TK)は必要不可欠なものとの認識が高まっている。ICHにおいて医薬品の「毒性試験における全身の暴露の評価に関するガイダンス」が示され、柔軟で段階的な取り組みとcase by caseな対応がTKを実施する上でとりわけ重要なことが強調されている。TK試験の最終目的が医薬品のヒトにおける副作用の回避にあるとの考えに基づいて、ヒト副作用発現の予測に有効なTK試験のデザインの在り方とTKパラメータの収集及び解析法、更にデータバンク構築の必要性について論じた。

**Keywords:** toxicokinetics, animal scale-up, extrapolate

\*<sup>1</sup> 東京大学薬学部

\*<sup>2</sup> 日本ロッシュ研究所

Tsuda, M. and Horii, I.\*: **Toxicokinetics, introductory remarks**

*J. Toxicol. Sciences*, 21, 495~496 (1996)

ICHの医薬品の毒性試験に組み込まれて実施されることになったトキシコキネティクス「毒性試験における全身の暴露の評価に関するガイダンス」の基調原則を概説し、ワークショップのポイントを紹介した。

**Keywords:** ICH, toxicokinetics, systemic exposure

\* 日本ロッシュ研究所

大野泰雄: **トキシコキネティクスとGLP, 一その意義と問題点**

トキシコキネティクス特別講演会講演集, 日本QA研究会編集, 33~48 (1996)

トキシコキネティクス試験結果は毒性評価に必須なものであることからGLPが適用される。本稿ではトキシコキネティクス試験におけるGLP適用の範囲について解説した。

**Keywords:** GLP, toxicokinetics

大野泰雄: **ICH トキシコキネティクスガイダンスについて**

*J. Toxicol. Sci.*, 21, 161~167 (1996)

化学物質等の毒性発現には大きな種差、系統差があり、動物実験で得られた結果をそのまま、ヒトに外挿することには問題がある。それらの差の原因としては薬物動態的な差と薬力学的な差に大別される。トキシコキネティクスの導入は前者による差を克服するために、毒性試験において被験物質の血中濃度を測定し、現れた種々毒性徴候と厳密に比較するものである。本稿ではこれらのトキシコキネティクスを導入することとなった背景、意義、具体的な試

験方法について解説した。

**Keywords** : toxicokinetics, ICH, guidance

Ohno, Y. and Shindo, H.\*: **Repeated dose tissue distribution studies**

*J. Toxicol. Sci.*, 21, 517~518 (1966)

ICHで合意された反復投与組織分布試験の必要な状況及びその背景について簡単に解説した。

**Keywords** : tissue distribution, ICH, repeated-dose administration

\* 三共研究所

大野泰雄: **細胞毒性試験法のバリデーション, 特集よせて**

細胞培養, 22, 205~206 (1996)

毒性試験代替法の開発が検討されているが, それらが現在の試験法と比較し, 同等以上のものでなくては, 受け入れることはできない。それを保証するためには, バリデーションを行う必要がある。本稿では代替試験法開発の目的と意義及び代替法を受け入れるための基準について述べた。

**Keywords** : cytotoxicity, alternative study, validation

大野泰雄: **眼刺激性試験代替法のバリデーション**

細胞培養, 22, 211~217 (1996)

ウサギの眼を用いた局所刺激性試験と *in vitro* の代替法とを得られる情報及び作用機序の両面で比較した。また, 通常の評価に用いられるドレイズスコアとの対比では代替法がかなり良い対応を示すことを, 衛試と化粧品工業連合会, その他との協力により行われたバリデーション結果を引用し, 説明した。また, 種々眼刺激性試験代替法の特徴を整理した。

**Keywords** : eye irritation, alternative study, validation

Hayashi, M.: **Evaluation by the micronucleus assay (in Japanese)**

水環境学会誌, 19, 775~779 (1996)

水質汚染のモニタリングは化学分析が主流を占めているが, 近年, 海, 河川より採取, 濃縮した汚染物質の変異原性が微生物を用いて検討されるようになってきた。しかし, その他の遺伝毒性の指標に関してはあまり検討されておらず, 特にその場に生息する生物を用いて直接試験する *in situ* 評価系は開発されていない。ここでは環境庁の国立機関公害防止等試験研究費による共同研究の成果を中心に現状を紹介した。水質汚染は多くの化学物質が複合的に作用するもので, 水生生物を用いて試験することにより総合的に評価することが可能となる。生物の遺伝物質に傷が付くか否かは, がん原性, 後世代への遺伝的影響を考えると, 水質汚染の指標として重要な位置を占めるものと考えられる。遺伝毒性の指標としては染色体異常, 遺伝子突然変異, 及びDNA損傷性が主なものである。ここでは主に染色体異常, 特に染色体異常に由来する小核を観察する方法を中心に紹介した。

**Keywords** : micronucleus assay, water pollution, combination effect

祖父尼俊雄: **放射線誘発染色体異常及び突然変異の解析の高精度化: 染色体ペインティング法と遺伝子導入系の利用**

原子力工業, 42, 9~13 (1996)

原子力基盤クロスオーバー研究の現状と今後の展開とい

う企画に同研究の担当分を紹介したものである。終了した, 第1期分「放射線による染色体異常の高速自動解析システムに関する研究」についてはリンパ球の分裂中期細胞集積法の検討及び染色体ペインティング法を用いる染色体異常解析について紹介した。これから始まる第2期分「変異細胞の選択技術の確立と突然変異の塩基配列の解析に関する研究」については, 放射線によって誘発される突然変異体の迅速な選択と, そのDNA塩基配列上の変化を効率良く解析することを目的として, 今後の計画と展望について紹介した。

**Keywords** : chromosome aberrations induced by radiation, chromosome painting, gene mutation

Honma, M., Hayashi, M. and Sofuni, T.: **Deletional and recombinational mutations at heterozygous thymidine kinase (*tk*) locus in human lymphoblastoid cells (in Japanese)**

*Environ. Mutagen Res.*, 18, 107~111 (1996)

常染色体遺伝子であるチミジンキナーゼ (*tk*) を利用した遺伝子突然変異試験は点突然変異から染色体レベルに及ぶ大きな欠失や組換え等の変異をも検出することができる。そのため, 従来のエームス試験で検出される Mutagen と染色体異常試験で検出される Clastogen の両者をカバーしうる試験法として注目されている。また, ここで検出される変異はヒトのガン組織で観察される遺伝子の変異とも対応しており, 細胞のガン化過程における遺伝子変化のモデルとしても有用性が高い。本研究ではヒトリンパ芽球様細胞 TK6 での *tk* 遺伝子突然変異検出系を利用し, 遺伝子突然変異に影響を与える外的因子 (環境変異原) 及び内的因子 (修復系) を検討した。

**Keywords** : thymidine kinase (*tk*), gene mutation, deletion and recombination

山田雅巳, Karran, P.\*: **特集 DNA 修復研究の最前線: ヒト細胞におけるミスマッチ修復の分子機構**

実験医学, 14, 1541~1547 (1996)

DNA ポリメラーゼは, 自らが間違っ取り込んだ塩基を修正する機能を持つ。DNA ミスマッチ修復は, その校正機能が見落としたエラーを複製後に正し, それがDNA複製の忠実度を上げている。また, 近縁種間の非相同的組換えを防ぐバリアの役目も果たしている。細胞がミスマッチ修復を効率よく行えなくなることは, 細胞分裂を調節している遺伝子を不活化するような突然変異が蓄積してしまう危険性ははらむ。ミスマッチ修復系の異常が, 明らかに HNPCC (遺伝性非線種症性大腸癌) の原因である事がこの考えを支持する。今までに分かっているヒトのミスマッチ修復に関与する蛋白が, バクテリアのホモログである事から, 全体的なミスマッチ修復のシステムがバクテリアからヒトまで保存されているであろうと予想される。本総説は, ミスマッチ修復の機構をヒトを中心に概説したものである。

**Keywords** : mismatch repair, methylation tolerance, HNPCC

\* Clare Hall Laboratories, Imperial Cancer Research Fund, U.K.

能美健彦: **発癌物質と変異原性試験**

モダンメディア, 42, 357~364 (1996)

環境化学物質の中から発癌物質を選別する際に果たす変異原性試験の役割について解説した。

**Keywords** : chemical carcinogens, mutagenicity tests

能美健彦：はじめに：環境変異原と生体によって誘発される突然変異

*Environ. Mutagen Res.*, 18, 169~171 (1996)

平成8年5月31日に東京ヤクルトホールで開かれた日本環境変異原学会主催の公開シンポジウム「突然変異誘発の調節機構」の世話人として、シンポジウムの趣旨と講演内容をまとめた。

**Keywords:** environmental mutagens, DNA repair, DNA replication

能美健彦：微生物を用いる変異原性試験：環境モニタリングへの応用と改良

水環境学会誌, 19, 764~769 (1996)

水中に存在する変異原を検出するのに有用な微生物株の開発の現状を解説した。

**Keywords:** bacterial tester strains, environmental mutagens, mutagenicity tests

Josephy, P.D. \*, Gruz, P. and Nohmi, T.: Recent advances in the construction of bacterial genotoxicity assays

*Mutat. Res.*, 386, 1~23 (1997)

微生物を用いる変異原性試験は、化学物質のリスク評価、変異原の環境モニタリングなどさまざまな領域で用いられている。近年、薬物代謝酵素遺伝子を導入したり、DNA修復遺伝子を破壊することにより、有用性を高めた変異原性試験用の菌株が開発されている。また、微生物の遺伝子をマウス受精卵に導入し、*in vivo*における突然変異のレポーターとするトランスジェニックマウス変異原性試験も開発されるようになった。微生物を用いる変異原性試験の近年における発展に関する総説である。

**Keywords:** mutagenicity test, cytochrome P-450, N-acetyltransferase

\* Department of Chemistry and Biochemistry, University of Guelph, Canada

増井 徹：上皮細胞特有の増殖と増殖停止との切り替え機構

蛋白質核酸酵素, 41, 1913~1919 (1996)

ほ乳類細胞の増殖調節については細胞周期調節にかかわる外部支配要因として増殖因子、増殖抑制因子等の液性因子以外の調節要因と細胞の反応に的を絞る。局所的液性環境、ジユクスタクライン機構は重要であるが、生体内で細胞の液性環境を急速に変化させることは困難であり、更に同じ液性環境の下でも同じ遺伝背景を持った細胞が様々に反応することは周知の事実である。我々は液性因子以外の側面から増殖と増殖停止の切り替え機構を研究することが重要であると信じる。そこで、まずはじめに、古典的ではあるがそのエレガントさで群を抜いている Dulbecco の仕事をこの機会を借りて少し詳しく紹介する。細胞周期の研究が進み細胞群特有の増殖特性の研究の出来る環境が調ってきた、このような時にこそ、ここで紹介する Dulbecco の研究は重要である。後半は我々の開発した outgrowth 培養システムの増殖動態について論じる。outgrowth 培養との関連で張力・斥力刺激と増殖調節についての研究を紹介する。最後に現在我々の取り組んでいる上皮細胞の増殖と増殖停止の切り替えメカニズムの解析について述べる。

**Keywords:** outgrowth culture, character of epithelium, growth regulation

岡田敏史：日局一般試験法「浸透圧測定法」の改正に向

けて

医薬品研究, 27, 639~643 (1996)

現行の日局一般試験法「浸透圧測定法」には重大な欠陥のあることが指摘されており〔嶋林：医薬品研究, 26, 674 (1995)〕, これに応じて早急な対応が必要であることを述べると共に、標準液の設定濃度範囲などいくつかの問題点が内在していることを指摘し、全体としての本試験法の改正の方向性を示した。

**Keywords:** osmolarity, osmotic pressure, Japanese pharmacopoeia

Tanimoto, T.: Aldose reductase and its inhibitors for prevention and treatment of diabetic complications

*Recent Res. Develop. Chem. Pharm. Sci.*, 1, 49~61 (1996)

糖尿病合併症の発症に関与するアルドース還元酵素 (AR) 及び合併症治療薬としての AR 阻害剤の現在までに得られている知見について、著者らの成績を中心に下記の項目についてまとめ、今後の合併症治療薬の開発についての新しいアプローチの仕方について考察した。

1. AR のヒト組織での分布
2. AR の高次構造と機能
3. AR 阻害剤の種類と分類
4. AR 阻害剤の *in vitro* 及び *in vivo* 効力
5. AR 阻害剤の臨床評価
6. AR 阻害剤の標的選択性
7. AR 阻害剤の *in vitro* 評価系の標準化
8. AR 阻害剤の開発の新アプローチ

**Keywords:** aldose reductase, aldose reductase inhibitor, diabetic complication

中村優美子, 津村ゆかり, 外海泰秀, 柴田 正：ギムネマ・シルベスタの健康影響について

食品衛生研究, 47, 49~60 (1997)

ギムネマ・シルベスタ葉を含む製品は、糖吸収抑制作用によりダイエット及び糖尿病に予防効果を発揮するといわれ、現在では健康食品として一般的に普及しており、その市場は年々拡大している。ギムネマ・シルベスタ *Gymnema sylvestre* R. Br. (Asclepiadaceae) はインド等に自生するガガイモ科の蔓性植物であり、インドの伝統医学アーユルヴェーダ生薬として、糖尿病、利尿、健胃、強壮等に効くとして使用されてきた。著者らは新開発食品の安全性を調べる一環として、ギムネマ・シルベスタ葉に含まれるギムネマ酸、グルマリリン及びコンズリトール A に関して文献調査を行った。これらの化合物の生理作用等について紹介した。

**Keywords:** gymnema sylvestre, health food, gymnemic acid

辻 澄子：ビタミン C を含むソフトドリンク中の過酸化水素の含有量について

ニューフードインダストリー, 38, 21~27 (1996)

新しい機能性飲料の開発に伴ってソフトドリンクの種類が多様化し、ソフトドリンクへのビタミン C (V.C.) の添加も多い。ところで、昭和61年に V.C. を含むソフトドリンク中に多量の過酸化水素 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) が検出されたという報告が大きな話題になり、著者らは、V.C. 含有ソフトドリンク中の多量の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> は分析中に生成した可能性があると考へて、原因究明を行い、測定方法の改良を提案した。再度、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の生成の原因、分析法の問題点、測定方法の改良点などをわかりやすく解説した。

**Keywords:** vitamin C, soft drinks, hydrogen peroxide

柴田敏郎, 畠山好雄, 有本恵子\*, 永井吉澄\*: 中国産生薬の基原・品質に関する調査・研究 (第1報)

*Natural Medicines*, 50, 58~64 (1996)

青海省東南部に野生するダイオウは *Rheum tanguticum*, *R. palmatum* 若しくは両者の中間型が混在していた。冬虫夏草・川赤芍・甘草の自生も確認し, 併せてその基原植物や環境についても調査した。

**Keywords**: Qinghai province, *Rheum tanguticum*, *Rheum palmatum*

\* 三国株式会社

Sakai, E.: Conservation of species as international plant resources and exchange with other countries

*FARMING JAPAN*, 30, 25~28 (1996)

「生物の多様性に関する条約」に見られる生物資源に対する世界的な考え方を紹介した。これを踏まえて, 薬用植物を取り扱う上での今後の考え方や, 薬用植物栽培試験場で現在行われている取り組みについて紹介した。

**Keywords**: plant resources, medicinal plant, Index Seminum

吉松嘉代, 下村講一郎: 毛状根の超低温保存

組織培養, 22, 366~370 (1996)

“植物培養細胞・組織超低温保存の展開”の特集号において, オタネニンジン毛状根の例を中心に, 毛状根の超低温保存の手順, 操作及びその有用性について解説した。

**Keywords**: cryopreservation, hairy roots, vitrification

Shimomura, K.: Plant biotechnology and medicinal plants

*FARMING JAPAN*, 30, 19~24 (1996)

薬用植物の組織培養法の基礎及び試験管内増殖, 二次代謝物質生産, 超低温保存等への応用について, これまで報告された例をあげて紹介した。

**Keywords**: plant biotechnology, medicinal plants, cryo-preservation

Jaziri, M.\*<sup>1</sup>, Zhiri, A.\*<sup>1</sup>, Guo, Y.-W.\*<sup>1</sup>, Dupon, J.-P.\*<sup>1</sup>, Shimomura, K., Hamada, H.\*<sup>2</sup>, Vanhaelen, M.\*<sup>1</sup> and Homés, J.\*<sup>1</sup>: *Taxus* sp. cell, tissue and organ cultures as alternative sources for taxoids production: a literature survey

*Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 46, 59~75 (1996)

Taxoid 類生産のための資源としての *Taxus* 属植物の組織培養に関する論文を紹介した。このレビューの目的は, 種々の *Taxus* 属植物の培養系の確立のために行われた方法や進行状況等, また, 企業における Taxoid 類生産の可能性についても纏めたものである。

**Keywords**: *Taxus* sp., paclitaxel, tissue culture

\*<sup>1</sup> ブリュッセル自由大学

\*<sup>2</sup> 岡山理科大学

野口 衛: 日高薬膳の創作

*CaN\**, 23, 17 (1996)

当帰, キキョウ等当試験場で試験栽培し, 産地化を検討している薬用植物を利用した新しい薬膳を開発し, 日高薬膳と命名した。

**Keywords**: cooking, platycodon Root, Angelica Root

\* WAKAYAMA Culture and Nature Magazine (21世紀への紀ノ国通信)

- Aoyagi, N.: "Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetic studies, Use of Dissolution Tests for Bioequivalence Assessment in Japan", ed, Midha, K. K. and Nagai, T., Business Center for Academic Societies, Tokyo (1996) pp. 259~264
- Kaniwa, N.: "Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetic studies, Application of NONMEM to the Evaluation of Bioequivalence", ed, Midha, K. K. and Nagai, T., Business Center for Academic Societies, Tokyo (1996) pp. 195~200
- 鹿庭なほ子: "第十三改正日本薬局方解説書", 鈴木郁生, 瀬崎 仁, 宇野豊三, 原田正敏, 田中 久, 中島暉躬, 福田英臣監修, 廣川書店, 東京 (1996)
- Hayakawa, T.: "Quality of Biotechnology Products: Viral Validation", Proceedings of The Third International Conference on Harmonisation, Yokohama 1995, ed, P. F. D'Arcy and D. W. G. Harron, Greystone Books Ltd., Northern Ireland (1996) pp. 167~174
- 早川堯夫: "品質に関するトピックの進展と今後の課題 2 - バイオテクノロジー応用医薬品の品質 -", ICH-3 横浜の成果と今後の展望, (財)公定書協会編, (株)ミクス, 東京 (1996) pp. 72~95
- 尾崎幸絃: "生薬学", 改訂第5版, 第VI章生薬の特徴と使われ方, 指田豊, 山崎和男編, 南江堂, 東京 (1997) pp. 69~100
- 矢上 健, 中村晃忠: "The 3rd Symposium of Asthma in Tokyo", ラテックスアレルギーと植物の生体防御蛋白質, 飯倉洋治, 伊東幸治監修, ライフサイエンス出版, 東京 (1996), pp. 17~28
- Shintani, H.: "Toxins associated with uremia (H. Shintani and J. Polonski, eds) in Handbook of Capillary Electrophoresis Applications, Chapman Hall, London, (1996)
- 新谷英晴: "ISO11138-1, 2, 3並びに CD14161 翻訳 (古橋正吉監修, 新谷英晴代表編集委員), ISO 翻訳滅菌方法, 滅菌バリデーション, 滅菌保証, 規格協会, 東京 (1996)
- 新谷英晴: "バイオバーデンによる滅菌保証 (佐々木次雄編), バイオバーデン試験法及び環境微生物試験法, 規格協会, 東京 (1996)
- 佐々木久美子: "食品衛生検査指針・追補II", EPN, エディフェンホス等試験法, ジクロロボス及びトリクロロン試験法, ジメチピン試験法, 厚生省生活衛生局監修, (社)日本食品衛生協会, 東京 (1996) pp. 49~64, pp. 136~144, pp. 161~164
- 村山三徳: "食品衛生検査指針 追補II", 厚生省生活衛生局監修, (社)日本食品衛生協会, 東京 (1996) pp. 375~387
- Ishiwata, H. et al.: "Migration from Food Contact Materials", Chapter 12. Real life and other special situations, Chapter 13. Regulations, ed. Katan, L. L., Blackie Academic & Professional, London (1996) pp. 251~276, pp. 277~291
- Ishiwata, H.: "Text Book for Mycotoxin Inspection in Food, F.Y.1996", Chapter 12. Food Safety Assurance on International Trading, Concerning on Microorganisms and Preservatives, JICA, Hyogo (1996) pp. 1~19
- 石綿 肇: "食とバイオサイエンス", 食品添加物, 鈴木隆雄監修, 建帛社, 東京 (1996) pp. 206~215
- 石綿 肇: "くらしの豆知識'97", 食品添加物の基礎知識, 国民生活センター, 東京 (1996) pp. 198~199
- 石綿 肇: "介護福祉士養成講座", 9巻, 栄養・調理, 食品添加物, 第一法規出版社, 東京 (1997) pp. 69~70
- 米谷民雄他: "分析実務者のための環境分析"Q&A", 環境庁企画調整局環境研究技術課監修, 環境測定分析検討会統一精度管理調査部会編, しらかば出版, 埼玉 (1997)
- Kawamura, Y., Murayama, M., Uchiyama, S. and Saito, Y.: "Detection Methods for Irradiated Foods-Current Status", ed. McMurray, C. H., Stewart, E. M., Gray, R. and Pearce, J., The Royal Society of Chemistry, Cambridge (1996) pp. 149~157, pp. 383~391
- 河村葉子: "食品衛生検査指針 追補II", 厚生省生活衛生局監修, (社)日本食品衛生協会, 東京 (1996) pp. 272~279
- 丹野雅幸, 末吉祥子, 宮田直樹: "季刊化学総説 30 NO 産生化合物", 学会出版センター, 東京 (1996) pp. 53~62
- 三瀬勝利, 井上富士男: "食品中の微生物検査法解説書" 講談社, 東京 (1996)
- 三瀬勝利: "食品衛生検査指針 追補II", 厚生省生活衛生局監修, (社)日本食品衛生協会, 東京 (1996) pp. 18~19, pp. 260~269
- 高鳥浩介: "バイオバーデン試験法及び環境微生物試験法" 検出菌の同定方法, 佐々木次雄編, 日本規格協会, 東京 (1996) pp. 112~142
- 高鳥浩介: "食品中の微生物検査法解説書" 第4章微生物の同定法 真菌, 三瀬勝利, 井上富士男編, 講談社サイエントイフイク, 東京 (1996) pp. 138~162
- 高鳥浩介: "コンタミネーションコントロール便覧" 第3章食品工業におけるコンタミネーションコントロール, 日本空気清浄協会編, オーム社, 東京 (1996) pp. 91~94, p 109
- Kikuchi, Y., Yamada, M., Honma, M., Takatori, K. and Ichinoe, M.: "Molecular Approaches to Food Safety." Issues Involving Toxic Microorganisms, Mouse minisatellite DNA probe detects the aflatoxin production by *Aspergillus flavus*, ed, Eklund, M., Richard, J.L., and Mise, K., Alaken, Inc., Fort Collins

(1995) pp. 99~105

Igarashi, T. and Kaminuma, T.: "**Biocomputing '97**", **Development of cell signaling networks database**, ed, Altman, R.B., Dunker, A.K., Hunter, L. and Klein, T. E., World Scientific, Singapore, (1997) pp. 187~197

Igarashi, T., Nadaoka, Y., and Kaminuma, T.: "**Computation in Cellular and Molecular Biological Systems**", **A Data and Knowledge Base for Cell Signaling Networks**, ed, Cuthbertson, R., Paton, R., and Holcombe, M., World Scientific, Singapore, (1997) pp. 77~89

井上 達: "医系病理学", 中村恭一他編, 中外医学社(1997) pp. 630~636

平林容子: "医系病理学", 中村恭一他編, 中外医学社(1997) pp. 637~641

井上和秀: "Bio Science 用語ライブラリー「脳神経」", 御子柴克彦編, 羊土社, 東京(1997) pp. 44~47, pp. 48~49, pp. 50~51, pp. 52~53, pp. 60~61

小泉修一: "Bio Science 用語ライブラリー「脳神経」", 御子柴克彦編, 羊土社, 東京(1997) pp. 54~55

上野伸哉: "Bio Science 用語ライブラリー「脳神経」", 御子柴克彦編, 羊土社, 東京(1997) pp. 56~57, pp. 58~59

Koizumi, S., Ikeda, M., Inoue, K., Nakazawa, K., Ohno, Y. and Inoue, K.: "Int. Acad. Biomed. Drug Res.: "**Preclinical and clinical strategies for the treatment of neurodegenerative, cerebrovascular and mental disorders.**" ed. by T. Shibuya. Kager, Basel (1996) pp. 180~186

Nakazawa, K., Inoue, K., Watano, T., Koizumi, S., Fujimori, K. and Inoue, K.: "Int. Acad. Biomed. Drug Res.: "**Preclinical and clinical strategies for the treatment of neurodegenerative, cerebrovascular and mental disorders.**" ed. by T. Shibuya. Kager, Basel (1996) pp. 102~105

Takahashi, M.: "**The use of rodents for carcinogenicity testing-Regulatory viewpoint**" Proceedings of The Third International Conference on Harmonisation, Yokohama, ed. R. F.D. Arcy and D.W.G. Harron (1995) pp. 277~279

Takahashi, M. and Okamiya, H.: "**Tumours of oral cavity, buccal pouch, oesophagus, forestomach and salivary glands**", ed. V. Turusov and U. Mohr, Pathology of Tumours in Laboratory Animals-Vol. 3, Tumours of the hamster (Second ed.), IARC Scientific publications (1996) No. 126, pp. 59~77

Takahashi, M. and Okamiya, H.: "**Tumours of the glandular stomach**", ed. V. Turusov and U. Mohr, Pathology of Tumours in Laboratory Animals-Vol. 3, Tumours of the hamster (Second ed.), IARC Scientific publications (1996) No. 126, pp. 127~135

Takahashi, M. and Okamiya, H.: "**Tumours of the intestine**",

ed. V. Turusov and U. Mohr, Pathology of Tumours in Laboratory Animals - Vol. 3, Tumours of the hamster (Second ed.), IARC Scientific publications (1996) No. 126, pp. 137~147

水沢 博: "第三版 組織培養の技術-基礎編", 3-14培養細胞の識別法, 日本組織培養学会編(編集委員: 丹羽 章, 伊井一夫, 梅田 誠, 大野忠夫, 沖垣 達, 西 義介, 増井 徹), 朝倉書店, 東京(1996) pp. 82~87

増井 徹: "第三版 組織培養の技術-基礎編", 4. 癌細胞培養法, 日本組織培養学会編(編集委員: 丹羽 章, 伊井一夫, 梅田 誠, 大野忠夫, 沖垣 達, 西 義介, 増井 徹), 朝倉書店, 東京(1996) pp. 88~89

増井 徹: "第三版 組織培養の技術-基礎編", 5-8子宮頸部上皮細胞培養法, 日本組織培養学会編(編集委員: 丹羽 章, 伊井一夫, 梅田 誠, 大野忠夫, 沖垣 達, 西 義介, 増井 徹), 朝倉書店, 東京(1996) pp. 143~145

増井 徹: "第三版 組織培養の技術-基礎編", 7. 分子・細胞生物学手法(1), 日本組織培養学会編(編集委員: 丹羽 章, 伊井一夫, 梅田 誠, 大野忠夫, 沖垣 達, 西 義介, 増井 徹), 朝倉書店, 東京(1996) pp. 199~202

増井 徹: "第三版 組織培養の技術-応用編", 10. 分子・細胞生物学手法(2), 日本組織培養学会編(編集委員: 丹羽 章, 伊井一夫, 梅田 誠, 大野忠夫, 沖垣 達, 西 義介, 増井 徹), 朝倉書店, 東京(1996) pp. 307

増井 徹: "第三版 組織培養の技術-応用編", 10-7 レセプター数測定法, 日本組織培養学会編(編集委員: 丹羽 章, 伊井一夫, 梅田 誠, 大野忠夫, 沖垣 達, 西 義介, 増井 徹), 朝倉書店, 東京(1996) pp. 344~346

西 義介, 増井 徹: "第三版 組織培養の技術-応用編", 16. 遺伝子工学的手法, 日本組織培養学会編(編集委員: 丹羽 章, 伊井一夫, 梅田 誠, 大野忠夫, 沖垣 達, 西 義介, 増井 徹), 朝倉書店, 東京(1996) pp. 512~516

本間正充: "分子細胞生物学辞典", 村松正実ほか編集, 東京化学同人, 東京(1997) pp. 259~260

Ishimaru, K., Shimomura, K.: "**Studies in Natural Products Chemistry**", vol. 17, **Transformation in *Lobelia***, ed, Rahman, A., Elsevier (1995) pp. 421~449

Ishimaru, K., Shimomura, K.: "**Biotechnology in agriculture and forestry**", vol. 33. Medicinal and Aromatic Plants VIII, ***Geranium thunbergii* : *n vitro* culture and the production of geraniin and other tannins**, ed, Bajaj, Y.P.S., Springer-Verlag Berlin Heidelberg (1995) pp. 232~247

Fauconnier, M.-L., Jaziri, M., Homés, M., Shimomura, K., Marlier, M.: "Biotechnology in agriculture and forestry", vol. 37. Medicinal and Aromatic Plants IX, ***Anthemis nobilis* L. (Roman Chamomile) : *In vitro* culture, micro-propagation, and the production of essential oils**, ed, Bajaj, Y.P.S., Springer-Verlag Berlin Heidelberg (1996) pp. 16~37

Yoshimatsu, K., Shimomura, K.: "Biotechnology in agriculture and forestry", vol. 38. Plant Protoplast and Genetic Engineering VII, **Genetic transformation in *Papaver somniferum* L. (Opium Poppy) for enhanced production of morphinan**, ed, Bajaj, Y.P.S., Springer-Verlag Berlin Heidelberg (1996) pp. 243~252

Ishimaru, K., Shimomura, K.: "Biotechnology in agriculture and

forestry", vol. 38. Plant Protoplast and Genetic Engineering VII, **Genetic transformation in *Swertia japonica***, ed, Bajaj, Y.P.S., Springer-Verlag Berlin Heidelberg (1996) pp. 308~317

下村講一郎: "ゲルテクノロジー", **植物におけるゲルの利用**, 阿部正彦, 村瀬則郎, 鈴木敏幸編集, 株式会社サイエンスフォーラム, 東京 (1997) pp. 162~170



**日本薬局方の国際調和に関する研究**：石橋無味雄，岡田敏史，嶋林三郎  
厚生科学研究（平成6年4月～），平成9年3月厚生省薬務局研究開発振興課に報告。

**一般用医薬品の品質試験方法に関する研究**：石橋無味雄  
厚生科学研究（平成4年4月～），平成9年3月厚生省薬務局審査課に報告。（主任研究者：真弓忠範大阪大学教授）

**医薬品の迅速分析法**：石橋無味雄，最所和宏，小嶋茂雄  
厚生省監視指導課迅速分析法作成費（昭和57年3月～），平成8年8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「簡易分析法の開発」に関する研究**：石橋無味雄，小嶋茂雄  
国際厚生事業団研究費（平成5年4月～），平成9年3月国際厚生事業団（厚生省大臣官房国際課）に報告。

**熱帯病治療薬の開発に関する研究**：石橋無味雄，小嶋茂雄  
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9年4月厚生省薬務局研究開発振興課に報告。

**医薬品規格および試験方法に関する研究**：石橋無味雄，小嶋茂雄  
日本公定書協会研究費（昭和56年4月～），平成9年3月に日本公定書協会（厚生省薬務局研究開発振興課）に報告。

**医薬品に関わる指定検査試験機関の信用保証精度の確立に関する研究**：石橋無味雄  
厚生省監視指導課信用保証精度確立費（平成5年4月～），平成8年11月厚生省薬務局監視指導課に報告。

**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8年4月～平成9年3月），平成9年3月厚生省薬務局麻薬課に報告。

**高分子有機材料中モノマーの唾液中への溶出量の定量分析に関する研究**：中村晃忠，佐藤道夫，劉軍<sup>\*1</sup>  
厚生科学研究（平成8年4月～平成9年3月），平成9年4月厚生省厚生科学課へ報告。

<sup>\*1</sup> 天津市薬品検驗所

**シリコンオイルを含有する家庭用エアゾル製品に関する研究**：鹿庭正昭，伊佐間和郎，中村晃忠，山下衛<sup>\*1</sup>  
厚生科学研究（平成8年4月～平成9年3月），平成9年4月厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室に報告。

<sup>\*1</sup> 筑波大学医学部附属病院救急部

**ジ-tert-ブチルヒドロキノンの分析法策定**：鹿庭正昭，伊佐間和郎，中村晃忠  
家庭用品等調査研究費（平成7年4月～平成8年3月），平成9年4月厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室に報告。

**2-メルカプトメチルベンズイミダゾールの分析法策定**：伊佐間和郎，鹿庭正昭，中村晃忠  
家庭用品等調査研究費（平成7年4月～平成8年3月），平成9年4月厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室に報告。

**N,N'-ジメチルフェニル-p-フェニレンジアミンの分析法策定**：伊佐間和郎，鹿庭正昭，中村晃忠  
家庭用品等調査研究費（平成7年4月～平成8年3月），平成9年4月厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室に報告。

**6-エトキシ-2,2,4-トリメチル-1,2-ジヒドロキノリンの分析法策定**：鹿庭正昭，伊佐間和郎，中村晃忠  
家庭用品等調査研究費（平成8年4月～平成9年3月），平成9年4月厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室に報告。

**ポリ-2,2,4-トリメチル-1,2-ジヒドロキノリンの分析法策定**：伊佐間和郎，鹿庭正昭，中村晃忠  
家庭用品等調査研究費（平成8年4月～平成9年3月），平成9年4月厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室に報告。

**2-メルカプトベンズイミダゾール亜鉛塩の分析法策定**：伊佐間和郎，鹿庭正昭，中村晃忠  
家庭用品等調査研究費（平成8年4月～平成9年3月），平成9年4月厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室に報告。

**6-Ethoxy-2,2,4-trimethyl-1,2-dihydroquinoline, poly-2,2,4-trimethyl-1,2-dihydroquinoline, 2,5-di-tert-amylhydroquinone 及び 2-hydroxy-4-isopropyl-2,4,6-cycloheptatrien-1-one 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7年7月～平成8年6月），平成8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実態調査**：松村年郎，関田寛，浜田実香，安藤正典  
環境庁環境保全費（平成8年4月～平成9年3月），平成9年7月環境庁大気保全局自動車環境対策第二課に報告。

**化粧品原料規格作成に関する研究**：徳永裕司，内野正，安藤正典  
厚生本省医薬品等審査業務庁費（平成8年4月～平成9年3月），平成9年3月厚生省薬務局審査課化粧品審査室に報告。

**食品中の有害物質等の評価に関する研究**：斎藤行生  
厚生科学研究（平成8年4月～平成9年3月），平成9年4月厚生省生活衛生局食品保健課に報告。

**食品中のダイオキシン類汚染実態調査研究**：豊田正武  
厚生科学研究（平成8年4月～平成9年3月），平成9年4月厚生省生活衛生局乳肉衛生課に報告。

**農産物における複数農薬の残留実態の把握に関する調査研究**：豊田正武，外海泰秀，加藤保博<sup>\*1</sup>，前田憲二<sup>\*2</sup>，伊藤誉志男<sup>\*3</sup>  
残留農薬安全対策総合調査研究（平成8年4月～平成9年3月）平成9年4月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

<sup>\*1</sup> 残留農薬研究所

<sup>\*2</sup> 横浜検疫所輸入食品検疫検査センター

<sup>\*3</sup> 武庫川女子大学

**輸入農産物の分析, 試験法等に関する調査研究; 分析等の評価に関する調査:** 松田りえ子

厚生科学研究 (平成8年4月~平成9年3月), 平成9年4月厚生省生活衛生局食品保健課に報告.

**食品中に溶出するアルミニウムの摂取実態に関する研究:** 松田りえ子, 佐々木久美子, 豊田正武

厚生科学研究 (平成8年4月~平成9年3月), 平成9年4月厚生省生活衛生局食品保健課に報告.

**魚介類中の重油成分の調査並びに一斉分析法の開発:** 根本了, 高附 巧, 松田りえ子, 佐々木久美子, 豊田正武

厚生科学研究 (平成8年4月~平成9年3月), 平成9年4月厚生省生活衛生局乳肉衛生課に報告.

**残留農薬迅速分析法の開発に関する研究:** 根本了, 佐々木久美子, 豊田正武

食品等試験検査費 (平成8年4月~平成9年3月), 平成9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調査; デルタメトリン及びトラロメトリンの分別定量法の検討及び保存検体中での挙動について:** 高附 巧, 佐々木久美子, 豊田正武

食品等試験検査費 (平成8年4月~平成9年3月), 平成9年3月厚生省生活衛生局食品化学課に報告.

**アクリナトリン及び告示ピレスロイド系農薬の一斉分析法:** 高附 巧, 佐々木久美子, 豊田正武

食品等試験検査費 (平成8年4月~平成9年3月), 平成9年3月厚生省生活衛生局食品化学課に報告.

**イミノクタジン・アルベシル酸塩の残留分析法:** 松田りえ子, 佐々木久美子, 豊田正武

食品等試験検査費 (平成8年4月~平成9年3月), 平成9年3月厚生省生活衛生局食品化学課に報告.

**茶葉及び茶浸出液中の残留農薬に関する研究:** 根本了, 佐々木久美子, 豊田正武

食品等試験検査費 (平成8年4月~平成9年3月), 平成9年3月厚生省生活衛生局食品化学課に報告.

**農薬推定摂取量の精密化に関する研究:** 楨 孝雄<sup>\*1</sup>, 池上幸江<sup>\*2</sup>, 内山貞夫<sup>\*3</sup>, 佐々木久美子, 永山敏廣<sup>\*4</sup>, 堀伸二郎<sup>\*5</sup>, 前川吉明<sup>\*6</sup>

厚生科学研究 (平成8年4月~平成9年3月), 平成9年4月厚生省生活衛生局食品化学課に報告.

\*1 (社)日本食品衛生協会

\*2 国立健康栄養研究所

\*3 (財)食品薬品安全センター

\*4 東京都立衛生研究所

\*5 大阪府立公衆衛生研究所

\*6 (財)日本食品分析センター

**生あん中のシアン化合物検査法に関する報告:** 村山三徳, 近藤一成, 鈴木 隆, 齋藤行生

厚生科学研究 (平成7年4月~平成8年3月), 平成8年3月厚生省生活衛生局食品保健課に報告.

**日本製生あん中のシアン化合物含有量実態調査結果報告:** 村山三徳, 近藤一成, 鈴木 隆, 齋藤行生

食品等試験検査費 (平成7年10月~平成8年1月), 平成

8年3月厚生省生活衛生局食品保健課に報告.

**畜産食品中の残留動物薬の試験法—カルバドックス, スルファジミジン, アルベンダゾール, チアベンダゾール, イソメタミジウム—:** 村山三徳, 齋藤行生

厚生科学研究 (平成8年4月~平成9年3月), 平成9年3月厚生省生活衛生局乳肉衛生課に報告.

**必須アミノ酸製品等の健康影響に関する研究:** 豊田正武, 合田幸広

厚生科学研究 (平成8年4月~平成9年3月), 平成9年4月厚生省生活衛生局食品保健課に報告.

**モロヘイヤの安全性に関する研究:** 豊田正武, 合田幸広, 穂山 浩, 近藤一成

厚生科学研究 (平成9年1月~平成9年3月), 平成9年4月厚生省生活衛生局食品保健課に報告.

**食品等の規格基準の設定等に係わる試験検査:** フモニシンの実態調査: 穂山 浩, 合田幸広, 豊田正武

厚生科学研究 (平成8年4月~平成9年3月), 平成9年4月厚生省食品保健課に報告.

**未経験食品の衛生対策に関する研究II:** 宮原 誠, 豊田正武

厚生科学研究 (平成7年4月~平成9年3月), 平成9年3月厚生省生活衛生局食品保健課に報告.

**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, 川崎洋子, 米谷民雄, 佐藤恭子

食品添加物規格基準設定費 (平成8年4月~平成9年3月), 平成9年3月厚生省生活衛生局食品化学課に報告.

**食品添加物としてのキシリトールの規格試験法の検討:** 石綿 肇, 川崎洋子, 杉田たき子, 山田 隆

食品添加物安全性再評価試験検査費 (平成8年4月~平成9年3月), 平成9年2月厚生省生活衛生局食品化学課に報告.

**食品添加物グレード酢酸ビニル樹脂中の酢酸ビニルモノマーの分析:** 石綿 肇, 川崎洋子, 杉田たき子, 山田 隆

食品添加物安全性再評価試験検査費 (平成8年4月~平成9年3月), 平成9年4月厚生省生活衛生局食品化学課に報告.

**全国行政検査 (1994年度) の結果を基に推定した食品中の食品添加物の濃度と摂取量:** 石綿 肇, 高橋貴子\*, 山田隆

平成8年度厚生科学研究費 (平成8年4月~平成9年3月), 平成9年3月厚生省生活衛生局食品化学課に報告.

\* 東京家政大学

**パン及び小麦粉改良剤中の臭素酸の定量:** 石綿 肇, 川崎洋子, 杉田たき子, 久保田浩樹, 山田 隆

平成8年度食品添加物安全性再評価費 (平成8年4月~平成9年3月), 平成9年3月厚生省生活衛生局食品化学課に報告.

**食品中の指定外添加物, 各種食品におけるポリソルベートに係わる分析法とその検出感度に関する検討:** 石綿 肇, 山田 隆, 桜井裕之<sup>\*1</sup>, 山中祥子<sup>\*1</sup>, 濃野正典<sup>\*1</sup>, 鎌倉和

政\*2, 渡邊芳則\*2

平成8年度厚生科学研究費費(平成8年4月~平成9年3月), 平成9年4月厚生省生活衛生局食品保健課に報告。

\*1 横浜検疫所輸入食品・検疫検査センター

\*2 神戸検疫所輸入食品・検疫検査センター

乳製品中のアルギン酸の定量分析法の検討: 川崎洋子, 石綿 肇, 山田 隆

食品添加物安全性再評価試験検査費(平成8年4月~平成9年3月), 平成9年4月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

ビートレッドの色素成分及び熱安定性に関する試験結果:

佐藤恭子, 佐々木史歩, 米谷民雄, 山田 隆

食品添加物規格基準設定費(平成8年4月~平成9年3月), 平成9年3月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

食品添加物として使用したコウジ酸の食品中への残存量に関する検討: 佐藤恭子, 佐々木史歩, 米谷民雄, 山田 隆  
食品添加物規格基準設定費(平成8年10月~平成9年3月), 平成9年3月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

ペクチンの成分規格の国際的整合性に関する研究: 山田

隆, 米谷民雄, 佐藤恭子

厚生科学研究(平成8年4月~平成9年3月), 平成9年3月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

市販ウコン色素の分析及び標品としての可能性の検討: 米谷民雄, 佐々木史歩

厚生科学研究(平成8年4月~平成9年3月), 平成9年3月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

アルミホイルからのアルミニウム溶出に関する検討: 山田隆, 河村葉子, 武田由比子

厚生科学研究(平成8年4月~平成9年3月), 平成9年4月厚生省生活衛生局食品保健課に報告。

GC/MSによるポリエチレン中の添加剤の分析: 河村葉子, 武田由比子, 山田 隆

食品添加物安全性再評価試験検査費(平成8年4月~平成9年3月), 平成9年4月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

金属製飲料缶からの金属の溶出に関する調査研究: 河村葉子, 武田由比子, 山田 隆

食品等の規格基準設定費(平成8年4月~平成9年3月), 平成9年4月厚生省生活衛生局食品保健課に報告。

ダイオキシンの免疫毒性について: 澤田純一

厚生科学研究(平成8年4月~平成9年3月), 平成9年2月厚生省生活衛生局生活化学安全対策室に報告。

農業の低濃度暴露による影響に関する調査研究—アレルギーモデルを用いる低濃度暴露影響評価法の開発: 澤田純一, 手島玲子, 小野 宏\*, 小島幸一\*, 金沢由基子\*

厚生科学研究(平成8年4月~平成9年3月), 平成9年5月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

\* 食品薬品安全センター

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長期投与代謝試験報

告(最終報告): 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9年3月), 平成9年3月厚生省生活衛生局化学安全対策室へ報告。

トリス(2-クロロエチル)ホスフェートの代謝試験: 高橋 惇, 嶺岸謙一郎, 大野泰雄, 紅林秀雄

既存化学物質委託費(平成7年11月~平成8年3月), 平成8年9月厚生省生活衛生局生活化学安全対策室に報告。

動物性加工食品の品質保証システムに関する研究: 小沼博隆, 熊谷 進\*1, 小久保彌太郎\*2, 豊福 肇\*3  
厚生科学研究(平成9年3月~), 平成9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 東京都立衛生研究所

\*3 国立公衆衛生院

期限表示と保存方法の設定に関する研究: 七野 護\*1, 小沼博隆, 山本茂貴\*2, 金子賢一\*3, 山田隆昭\*4  
厚生科学研究(平成9年3月~), 平成9年3月厚生省生活衛生局食品保健課に報告。

\*1 (社)日本食品衛生協会

\*2 東京都立衛生研究所

\*3 国立公衆衛生院

\*4 東京都衛生局生活環境部

医薬品等化学物質の急性毒性の分類と評価に関する研究:

高江洲義矩\*1, 香川 順\*2, 黒川雄二, 山中すみへ\*1, 小野 宏\*3, 関沢 純, 高月峰夫\*4, 金子豊蔵

厚生科学研究(平成8年4月~平成9年3月), 平成9年3月厚生省薬務局安全課に報告。

\*1 東京歯科大学

\*2 東京女子大学

\*3 食品医薬品安全センター

\*4 化学品検査協会

残留農薬安全対策総合調査研究「農薬の低濃度曝露による影響に関する調査研究」: 黒川雄二, 祖父尼俊雄, 関沢純, 井上和秀

厚生科学研究(平成8年4月~平成9年3月), 平成9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: 化学物質による被害防止のための情報提供に関する研究: 神沼二真

厚生科学研究(平成8年4月~9年3月), 平成9年3月厚生省生活衛生局生活化学安全対策室に報告。

毒性学的手法を用いたスクリーニング毒性評価に関する研究—高感度アポトーシス検知システムの開発: 井上 達,

北嶋 聡, 佐井君江, 高木篤也, 梅村隆志, 長谷川隆一  
厚生科学研究(平成5年4月~平成10年3月), 平成9年4月厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室に報告。

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: 関田清司, 小川幸男, 小野 敦, 降矢 強

厚生科学研究(平成8年4月~9年3月), 平成9年3月厚生省薬務局麻薬課に報告。

ギムネマ・シルベスターのラットによる12カ月間の慢性毒性試験(中間報告): 小川幸男, 梅村隆志, 斎藤 実, 関田清司, 小野 敦, 降矢 強, 井上 達

厚生科学研究(平成7年4月~9年3月),平成9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急性毒性の分類と評価に関する研究:**  
井上 達,金子豊蔵,内藤克司,鈴木幸子,川崎 靖,松  
島裕子,平林容子  
厚生科学研究(平成7年4月~9年3月),平成9年3月  
厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

**メタベンズチアズロンの肝腫瘍プロモーター作用に関する  
試験(最終報告):**豊田和弘,高田幸一,畝山智香子,高  
橋道人  
農薬衛生対策推進等試験検査経費(平成7年4月~平成8  
年3月),平成9年3月厚生省生活衛生局食品化学課へ報  
告。

**パラオキシ安息香酸イソプロピル(パラベン)のラットに  
おける癌原性試験(中間報告):**小野寺博志,三森国敏,  
安原加壽雄,高橋道人  
食品添加物安全性再評価費(平成3年4月~平成6年3  
月),平成9年3月厚生省生活衛生局食品化学課へ報告。

**ヨウ化カリウムのF344ラットにおける長期毒性・癌原性  
試験(中間報告):**小野寺博志,三森国敏,安原加壽雄,  
高橋道人  
食品添加物安全性再評価費(平成3年4月~平成6年3  
月),平成9年3月厚生省生活衛生局食品化学課へ報告。

**乳酸鉄のF344ラットにおける長期毒性・癌原性試験(中  
間報告):**安原加壽雄,小野寺博志,三森国敏,高橋道人  
食品添加物安全性再評価費(平成4年4月~平成6年3  
月),平成9年3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毒性試験および慢性毒性・癌原性  
試験(最終報告):**豊田和弘,高田幸一,畝山智香子,高  
橋道人  
食品添加物安全性再評価費(平成2年4月~平成5年3  
月),平成9年3月厚生省生活衛生局食品化学課へ報告。

**クチナシ青色素のF344ラットにおける癌原性試験(中間  
報告):**今沢孝喜,古川文夫,西川秋佳,高橋道人  
食品添加物安全性再評価費(平成6年4月~平成9年3  
月),平成9年3月厚生省生活衛生局食品化学課へ報告。

**ジョサマイシンのF344ラットにおける長期毒性・癌原性  
試験(中間報告):**古川文夫,今沢孝喜,西川秋佳,高橋  
道人  
食品等試験検査費(平成4年4月~平成7年3月),平成  
9年3月厚生省生活衛生局乳肉衛生課へ報告。

**クロロフィルの90日間毒性試験(中間報告):**古川文夫,  
今沢孝喜,西川秋佳,高橋道人  
食品添加物安全性再評価費(平成7年4月~平成8年3  
月),平成9年3月厚生省生活衛生局食品化学課へ報告。

**カロブ色素の90日間毒性試験(最終報告):**高田幸一,豊  
田和弘,畝山智香子,高橋道人  
食品添加物安全性再評価費(平成7年3月~平成8年3  
月),平成9年3月厚生省生活衛生局食品化学課へ報告。

**ファフィア色素の90日間毒性試験(中間報告):**小野寺博  
志,三森国敏,安原加壽雄,高橋道人  
食品添加物安全性再評価費(平成7年4月~平成8年3  
月),平成9年3月厚生省生活衛生局食品化学課へ報告。

**ニトロフラゾンの精巢毒性に関する研究(最終報告):**豊  
田和弘,高田幸一,畝山智香子,高橋道人  
畜水産食品中の残留有害物質に係るモニタリング検査等  
の実施等経費(平成7年3月~平成8年3月),平成9年3  
月厚生省生活衛生局乳肉衛生課へ報告。

**納豆菌ガムの90日間毒性試験(中間報告):**今沢孝喜,古  
川文夫,西川秋佳,高橋道人  
食品添加物安全性再評価費(平成8年4月~平成9年3  
月),平成9年3月厚生省生活衛生局食品化学課へ報告。

**キチンの90日間毒性試験(中間報告):**高田幸一,豊田和  
弘,畝山智香子,高橋道人  
食品添加物安全性再評価費(平成8年4月~平成9年3  
月),平成9年3月厚生省生活衛生局食品化学課へ報告。

**シソ抽出物の90日間毒性試験(中間報告):**小野寺博志,  
安原加壽雄,三森国敏,高橋道人  
食品添加物安全性再評価費(平成8年4月~平成9年3  
月),平成9年3月厚生省生活衛生局食品化学課へ報告。

**ペクチン分解物のF344ラットにおける慢性毒性・癌原性  
試験(中間報告):**安原加壽雄,小野寺博志,三森国敏,  
高橋道人  
食品添加物安全性再評価費(平成7年4月~平成10年3  
月),平成9年3月厚生省生活衛生局食品化学課へ報告。

**コウジ酸の甲状腺腫瘍発生プロモーション作用の検討(中  
間報告):**小野寺博志,三森国敏,安原加壽雄,高橋道人  
食品添加物安全性再評価費(平成8年度),平成9年3月  
厚生省生活衛生局食品化学課へ報告。

**ピペロニルブトキサイドの肝腫瘍プロモーター作用の検討  
(最終報告):**小野寺博志,三森国敏,安原加壽雄,高橋  
道人  
食品添加物安全性再評価費(平成8年度),平成9年3月  
厚生省生活衛生局食品化学課へ報告。

**ニトロフラゾンおよびチアンフェニコールに関する毒性メ  
カニズムに関する研究(中間報告):**三森国敏,安原加壽  
雄,小野寺博志,高橋道人  
畜水産食品中の残留有害物質に係るモニタリング検査等  
の実施等経費(平成7年3月~平成8年3月),平成9年3  
月厚生省生活衛生局乳肉衛生課へ報告。

**食品添加物の変異原性に関する研究—天然添加物の哺乳類  
培養細胞を用いる染色体異常試験:**松岡厚子,坂本浩子,  
本間正充,鈴木孝昌,林 真,祖父尼俊雄  
(昭和63年10月~平成9年3月),平成9年3月厚生省生活  
衛生局食品化学課に報告。

**残留農薬安全対策総合調査研究:**松井道子,松井恵子,増  
村健一,山田雅巳,能美健彦,祖父尼俊雄  
(平成3年4月~平成9年3月),平成9年3月厚生省生活  
衛生局食品化学課に報告。

生体外染色体異常試験の精度に関する研究：林 真，松岡厚子，本間正充，鈴木孝昌，祖父尼俊雄（平成元年4月～平成9年3月），平成9年3月労働省労働基準局化学物質調査課に報告。

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：林 真，松岡厚子，本間正充，鈴木孝昌，祖父尼俊雄（平成5年4月～平成9年3月），平成9年3月環境庁企画調整局環境技術課に報告。

変異細胞の選択技術の確立と突然変異の塩基配列の解析に関する研究：能美健彦，松井道子，増村健一，山田雅巳，松井恵子，祖父尼俊雄（平成6年4月～平成11年3月），平成9年3月科学技術庁原子力局技術振興課に報告。

化学物質の総合的安全性評価手法に関する研究：能美健彦，松井道子，松井恵子，祖父尼俊雄（平成5年4月～平成10年3月），平成9年3月厚生省生活衛生局生活化学安全対策室に報告。

医薬品規制ハーモナイゼーションに関する国際共同研究：本間正充，林 真，能美健彦，祖父尼俊雄（平成4年4月～平成9年3月），平成9年3月厚生省薬務局審査課に報告。

ヒト初代培養系細胞の樹立と研究資源化に関する総合的研究：増井 徹，田辺秀之，水沢 博，祖父尼俊雄（平成6年4月～平成10年3月），平成9年3月厚生省厚生科学課に報告。

培養細胞マスターバンク整備に必須な品質管理手法の開発と情報サーバー構築に関する研究：水沢 博，増井 徹，田辺秀之，祖父尼俊雄（平成6年4月～平成10年3月），平成9年3月厚生省厚生科学課に報告。

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，黒川雄二，井上 達，大野泰雄，高橋道人，祖父尼俊雄，中館正弘，安藤正典，神沼二真（厚生科学研究（平成8年4月～平成9年3月），平成9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。

化学物質による健康リスク評価法に関する研究—予測手法と既存情報を用いたリスクアセスメント手法に関する研究：中館正弘，広瀬明彦，鎌田栄一（厚生科学研究（平成8年4月～平成9年3月），平成9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。

ダイオキシンのリスクアセスメントに関する研究：黒川雄二，金城芳秀\*1，井上 達，大野泰雄，高橋道人，祖父尼俊雄，中館正弘，田中 悟，澤田純一（厚生科学研究（平成7年4月～平成9年3月），平成9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国立がんセンター研究所疫学部

OECD/HPV 点検化学物質安全性調査：中館正弘，鎌田栄一，広瀬明彦（家庭用品等試験検査費（平成3年4月～平成13年3月）平成9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。

一般医薬品の品質評価試験法に関する研究：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，岩崎英樹\*4，大住優子\*5，西 清司\*6，中西昭雄\*7，林 真一\*8，横田洋一\*9，盛岡茂夫\*8（厚生科学研究（平成8年4月～平成10年3月），平成9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(株)

\*4 大正製薬(株)

\*5 奈良県薬事指導所

\*6 武田薬品(株)

\*7 三共(株)

\*8 ロート製薬(株)

\*9 富山県薬事研究所

日本薬局方の国際調和に関する研究：石橋無味雄，岡田敏史（厚生科学研究（平成6年4月～），平成9年3月厚生省薬務局研究開発振興課に報告。

医薬品の迅速分析法：谷本 剛，北島 文，岡田敏史（迅速分析法作成費（昭和57年3月～），平成8年8月厚生省薬務局監視指導課に報告。

輸入農産物の分析・試験法等に関する調査研究，HPLC及びGCによる青果物中各種残留農薬の一斉分析法の検討：外海泰秀，中村優美子，津村ゆかり，柴田 正（厚生科学研究（平成8年4月～平成9年3月），平成9年4月厚生省生活衛生局食品保健課に報告。

食品中残留農薬迅速分析法開発検討委員会平成8年度報告書：中村優美子，津村ゆかり，外海泰秀，柴田 正（残留農薬簡易判定法開発検討費（平成8年4月～9年3月），平成9年3月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

新開発食品素材健康影響評価研究，新開発食品素材の健康障害に関する研究，ギムネマ酸及びコンズリトールAの健康障害に関する研究：中村優美子，津村ゆかり，外海泰秀，柴田 正（厚生科学研究（平成8年4月～平成9年3月），平成9年4月厚生省生活衛生局食品保健課新開発食品保健対策室に報告。

農産物における複数農薬の残留実態の把握に関する調査研究，キントゼン，トリフルラリン，イソプロチオラン，ブタクロール分析法の検討：中村優美子，津村ゆかり，外海泰秀，柴田 正（厚生科学研究（平成8年4月～平成9年3月），平成9年4月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

ニテンピラムの告示分析法の検討：津村ゆかり，中村優美子，外海泰秀，柴田 正（農薬衛生対策推進費，食品残留農薬告示分析検討費（平成8年4月～平成9年3月），平成8年3月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

残留農薬分析のGLP対応に関わるクロマトグラフィー手法の研究：津村ゆかり，中村優美子，外海泰秀，柴田 正

厚生科学研究 (平成8年4月～平成9年3月), 平成9年5月厚生省厚生科学課に報告.

**食品添加物規格基準設定費・食品添加物の規格基準および試験法の設定, 高速液体クロマトグラフィーによるアゾ系食用タール色素中の未反応原料, 反応中間体および付随色素の定量:**石光 進, 三島郁子, 辻 澄子, 柴田 正  
食品等試験検査費 (平成8年4月～平成9年3月), 平成9年3月厚生省生活衛生局食品化学課に報告.

**食品添加物規格基準設定費・食品中の食品添加物分析法の**

**設定, 新しい分析法の開発, トコトリエノール:**辻 澄子, 石光 進, 柴田 正  
食品等試験検査費 (平成8年4月～平成9年3月), 平成9年4月厚生省生活衛生局食品化学課に報告.

**食品添加物規格基準設定費・化学的合成品以外の食品添加物の規格基準の設定, コウジ酸の分析:**辻 澄子, 石光 進, 柴田 正  
食品等試験検査費 (平成8年4月～平成9年3月), 平成9年4月厚生省生活衛生局食品化学課に報告.

- 青柳伸男：WHO 生物学的同等性試験ガイドライン及び我が国の対応について  
日本公定書協会研修会 (1996.7)
- 青柳伸男：製剤の処方変更，スケールアップと生物学的同等性  
第5回製剤技術研究会 (1996.7)
- 鹿庭なほ子：生物学的同等性試験ガイドラインについて  
第67回医薬安全性研究会 (1996.8)
- Kaniwa, N.: **The State of the Art of Harmonization of Assay Validation in ICH Process**  
The 7th Pharmaceutical and Biological Analysis International Symposium, Osaka, Japan (1996.8)
- 鹿庭なほ子：消化管の生理的条件を考慮した溶出試験法  
第6回固形製剤処方研究会シンポジウム (1996.11)
- 鹿庭なほ子：分析法バリデーション  
第4回計量生物セミナー (1996.11)
- 鹿庭なほ子：分析法バリデーションについて  
日本分析化学会関東支部第2回東京セミナー (1996.12)
- 青柳伸男：医薬品の溶出試験  
日本薬剤師会研修会 (1997.1)
- 青柳伸男，鹿庭なほ子，香取典子，小嶋茂雄：アセトアミノフェン坐剤による直腸粘膜損傷とバイオアベイラビリティ  
日本薬学会第117年会 (1997.3)
- 鹿庭なほ子，青柳伸男，小嶋茂雄，杉山 隆\*，島田英世\*：  
**市販ジピリダモール錠のバイオアベイラビリティ**  
日本薬学会第117年会 (1997.3)  
\* 北里大薬学部
- 香取典子，鹿庭なほ子，青柳伸男，小嶋茂雄：日本薬局方溶出試験規格の統計学的考察—他の薬局方との比較および計量型試験の適用例—  
日本薬学会第117年会 (1997.3)
- 香取典子，青柳伸男，小嶋茂雄：第13改正日本薬局方含量均一性試験および重量偏差試験の適用例および in-process tests としての可能性  
日本薬学会第117年会 (1997.3)
- Aso, Y., Yoshioka, S. and Kojima, S.: **Determination of the Diffusion Coefficient of Poly (L-glutamic acid) by Pulsed-Fielded-Gradient Spin-Echo NMR and its Release Rate from Poly (vinyl alcohol)**  
23rd International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials (1996.7)
- Yoshioka, S.: **MHW's View on Matrixing and Bracketing Advanced Topics in Pharmaceutical Stability Testing—Building on the ICH Guideline—**  
EFPIA Symposium (1996.10)
- Yoshioka, S., Aso Y. and Kojima S.: **Aggregation during Storage of Lyophilized Bovine Serum Albumin and gamma-Globulin, and Molecular Mobility of Proteins as Measured by Solid-State <sup>1</sup>H NMR**  
10th American Association of Pharmaceutical Scientists Annual Meeting (1996.10)
- Izutsu, K., Yoshioka, S., Kojima, S., Randolph, T. W.\*<sup>1</sup> and Carpenter, J. F.\*<sup>2</sup>: **Effect of Sugars and Polymers on the Crystallization of Poly(ethylene glycol) in Frozen Solutions: Phase Separation between Incompatible Polymers.**  
10th American Association of Pharmaceutical Scientists Annual Meeting (1996.10),  
<sup>1</sup> Department of Chemical Engineering, University of Colorado  
<sup>2</sup> School of Pharmacy, University of Colorado Health Sciences Center
- Izutsu, K. and Carpenter, J. F.\*: **Freezing-induced Structural Change in  $\beta$ -Lactoglobulin B Studied by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR)**  
10th American Association of Pharmaceutical Scientists Annual Meeting (1996.10)  
\* School of Pharmacy, University of Colorado Health Sciences Center
- Anchordoquy, T. J.\*<sup>1</sup>, Izutsu, K., Randolph, T. W.\*<sup>2</sup> and Carpenter, J. F.\*<sup>1</sup>: **Inhibition of Lactate Dehydrogenase Dissociation in the Frozen State by Excipients**  
10th American Association of Pharmaceutical Scientists Annual Meeting (1996.10)  
<sup>1</sup> School of Pharmacy, University of Colorado Health Sciences Center  
<sup>2</sup> Department of Chemical Engineering, University of Colorado
- 吉岡澄江，阿曾幸男，小嶋茂雄：タンパク質プロトンのスピンスピン緩和時間から測定される牛血清アルブミンおよび  $\gamma$ -グロブリン凍結乾燥品の軟化温度とタンパク質の安定性の関係  
日本薬学会第117年会 (1997.3)
- 阿曾幸男，吉岡澄江，小嶋茂雄：架橋ゼラチン，架橋デキストランハイドロゲルからの薬物放出速度に及ぼす水および高分子の運動性の影響  
日本薬学会第117年会 (1997.3)
- 吉岡澄江：安定性試験法ガイドラインと包装  
日本薬剤学会第10回医薬品包装シンポジウム (1997.4)
- 最所和宏，石橋無味雄，小嶋茂雄：キャピラリー電気泳動による消化器官用薬中のアルジオキサの定量  
日本薬学会第117年会 (1997.3)
- Nakahara, Y. and Kikura R.: **Hair root analysis for acute MDMA poisonings**  
1996 International Association of Forensic Toxicologists (1996.8)

Nakahara, Y.: **The Basic Aspects of Hair Analysis and Its Application to Explication of Drug History. Focus on Pharmacological Study of Amphetamines in Hair.** International Symposium on Highly Abusable Substances (1996.10)

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 XIX. 毛根分析による覚せい剤急性中毒死の証明  
日本薬学会第117年会 (1997.3)

坂本知昭\*, 長崎重紀子\*, 渡辺佐智子\*, 田中 彰\*, 中原雄二: ラットを用いたフェンシクリジン (PCP) 急性中毒診断への毛根試料の有用性の検討  
日本薬学会第117年会 (1997.3)

\* 昭和薬科大学

Hayakawa, T.: **Some Aspects of Control of Biotechnology Drugs and International Endeavor Toward Harmonization**

8 th International Conference of Drug Regulatory Authorities (ICDRA), Manama, Bahrain (1996.11)

Hayakawa, T.: **Current Situation in International Harmonization Regarding Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell Lines of Human or Animal Origin**

International Symposium: Trends in ICH on the Biotechnological Products and Biologicals, Seoul, Korea (1996.11)

Nakanishi, M.\*<sup>1</sup>, Mizuguchi, H.\*<sup>1,2</sup>, Ashihara, K.\*<sup>2</sup>, Ashihara, K.\*<sup>2</sup>, Okabe, J.\*<sup>1</sup>, Nagoshi, E.\*<sup>1</sup>, Masago, A.\*<sup>1</sup>, Eguchi, A.\*<sup>1</sup>, Akuta, T.\*<sup>3</sup>, Hayakawa, T. and Mayumi, T.\*<sup>2</sup>: **Hybrid Vectors: A New Principle for Gene Transfer and Expression**

3 rd Internet World Congress on Biomedical Sciences: Molecular and Cellular Biology of Gene Therapy (1996.12)

\*<sup>1</sup> 大阪大学微生物病研究所

\*<sup>2</sup> 大阪大学薬学部

\*<sup>3</sup> デイナベック研究所(株)

Nakanishi, M.\*<sup>1</sup>, Mizuguchi, H.\*<sup>2</sup>, Ashihara, K.\*<sup>2</sup>, Akuta, T.\*<sup>3</sup>, Okabe, J.\*<sup>1</sup>, Nagoshi, E.\*<sup>1</sup>, Masago, A.\*<sup>1</sup>, Eguchi, A.\*<sup>1</sup>, Hayakawa, T. and Mayumi, T.\*<sup>2</sup>: **Gene Transfer Vectors Based on Sendai Virus,**

8 th International Symposium on Recent Advances in Drug Delivery Systems, Salt Lake City, USA (1997.2)

\*<sup>1</sup> 大阪大学微生物病研究所

\*<sup>2</sup> 大阪大学薬学部

\*<sup>3</sup> デイナベック研究所(株)

森本和滋, 早川堯夫, 前田 希\*, 豊島 聡\*: 蛍光体支援糖質電気泳動法 (FACE) 法による糖鎖含有タンパク質の糖鎖解析への応用 (その2) シークエンシング法による解析

日本薬学会第117年会 (1997.3)

\* 星薬科大学

春日井勲, 森本和滋, 早川堯夫: M-CSF レセプター高発現 HL-60細胞の TPA による分化: PTP1C の高発現と分化感受性

第69回日本生化学会・第19回日本分子生物学会合同年会

(1996.8)

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ハービマイシン A による調節  
第3回肝細胞研究会 (1996.6)

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ハービマイシン A による調節  
第69回日本生化学会・第19回日本分子生物学会合同年会 (1996.8)

押澤 正, 山口照英, 山口高正, 小木美恵子, 鈴木和博, 高橋 惇, 早川堯夫: G-CSF による HL-60細胞の活性酸素生成能の促進とセラミドの関与について  
第69回日本生化学会・第19回日本分子生物学会合同年会 (1996.8)

小木美恵子, 山口照英, 山口高正, 押澤 正, 鈴木和博, 岩田明子\*, 田中建志\*, 高橋 惇, 早川堯夫: G-CSF による HL-60細胞の活性酸素生成酵素の機能的成熟とそれに関わる因子の解析-II

第69回日本生化学会・第19回日本分子生物学会合同年会 (1996.8)

\*<sup>1</sup> 埼玉赤十字センター研究部

田中光\*<sup>1</sup>, 西丸和秀\*<sup>1</sup>, 川西 徹, 中村 竜\*<sup>2</sup>, 山垣浩司\*<sup>2</sup>, 重信弘毅\*<sup>1</sup>: 高速走査型共焦点レーザー顕微鏡による心筋 Ca<sup>2+</sup> スパークの二次元ミリ秒解析  
第5回日本バイオイメーjing学会学術集会 (1996.10)

\*<sup>1</sup> 東邦大学薬学部

\*<sup>2</sup> (株)ニコン顕微鏡設計

石崎 悟\*, 山本雅幸, 横田橋江, 大幡久之\*, 川西 徹, 百瀬和享\*, 早川堯夫: ラット初代培養肝細胞における Ca<sup>2+</sup> ウェーブの開始点は受容体蛋白質の局在部位と異なる  
第5回日本バイオイメーjing学会学術集会 (1996.10)

\* 昭和大学薬学部

木内猛仁\*, 山本雅幸, 太田美矢子, 小濱とも子, 百瀬和享\*, 早川堯夫, 井上和秀, 川西 徹: 海馬神経細胞におけるカルシウムウェーブの画像化  
第5回日本バイオイメーjing学会学術集会 (1996.10)

\* 昭和大学薬学部

川西 徹: 高速高分解画像化技術によって明らかにされた細胞内カルシウムイオンのダイナミクス: バイオイメーjing技術の最前線  
第21回日本薬学会関東支部学術講演会 (1997.1)

木内猛仁\*, 山本雅幸, 小濱とも子, 大幡久之\*, 百瀬和享\*, 井上和秀, 早川堯夫, 川西 徹: ラット海馬細胞で観察されたカルシウムウェーブの解析  
第70回日本薬理学会年会 (1997.3)

\* 昭和大学薬学部

山本雅幸, 木内猛仁\*, 小濱とも子, 大幡久之\*, 百瀬和享\*, 井上和秀, 早川堯夫, 川西 徹: ラット海馬細胞の高濃度グルタミン酸の短期間処理による細胞内カルシウムと pH 変化



## 第70回日本薬理学会年会 (1997.3)

\* 昭和大学薬学部

田中 光<sup>\*1</sup>, 西丸和秀<sup>\*1</sup>, 関根敏行<sup>\*1</sup>, 川西 徹, 中村 竜<sup>\*2</sup>, 山垣浩司<sup>\*2</sup>, 重信弘毅<sup>\*1</sup>: 高速走査型共焦点レーザー顕微鏡による心筋カルシウムスパークの二次元ミリ秒解析: イソプロテレノールによる振幅増大  
第70回日本薬理学会年会 (1997.3)

<sup>\*1</sup> 東邦大学薬学部<sup>\*2</sup> (株)ニコン顕微鏡設計

久光 隆\*, 大幡久之\*, 川西 徹, 石川明子\*, 百瀬和享\*: 平滑筋細胞の Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger と共役した細胞内ストアからの Ca<sup>2+</sup> 放出におけるベラトリジンの影響  
第70回日本薬理学会年会 (1997.3)

\* 昭和大学薬学部

石崎 悟<sup>\*1</sup>, 大幡久之<sup>\*1</sup>, 百瀬和享<sup>\*1</sup>, 山垣浩司<sup>\*2</sup>, 中村 竜<sup>\*2</sup>, 山本雅幸, 太田美矢子, 横田椅江, 川西 徹, 早川堯夫: 蛍光プローブ carboxy SNARF-1 を用いた肝細胞内 pH イメージングにおける問題点の検討  
日本薬学会第117年会 (1997.3)

<sup>\*1</sup> 昭和大学薬学部<sup>\*2</sup> (株)ニコン顕微鏡設計

川西 徹, 山本雅幸, 木内猛仁\*, 大幡久之\*, 百瀬和享\*, 井上和秀, 早川堯夫: 初代培養海馬細胞で見出されたカルシウムウェーブ  
レーザー顕微鏡研究会第19回講演会 (1997.5)

\* 昭和大学薬学部

中村 竜<sup>\*1</sup>, 田中 光<sup>\*2</sup>, 関根敏行<sup>\*2</sup>, 川西 徹, 重信弘毅<sup>\*2</sup>: 心筋カルシウムトランジェントの共焦点マイクロ秒解析  
レーザー顕微鏡研究会第19回講演会 (1997.5)

<sup>\*1</sup> (株)ニコン顕微鏡設計<sup>\*2</sup> 東邦大学薬学部

Watabe, A., Mizuguchi, H.<sup>\*1,2</sup>, Eguchi, A.<sup>\*1</sup>, Nakanishi, M.<sup>\*1</sup>, Yamaguchi, T., Uchida, E., Mayumi, T.<sup>\*2</sup> and Hayakawa, T.: Analysis of Fusogenic Liposome-mediated Macromolecule Delivery into Human Peripheral Blood Mononuclear Cells  
第3回日本遺伝子治療学会 (1997.5)

<sup>\*1</sup> 大阪大学微生物病研究所<sup>\*2</sup> 大阪大学薬学部

川西 徹: 細胞内カルシウムイオン画像化のためのプローブ  
第1回日本バイオイメージング学会講習会 (1997.5)

福岡正道, 新見伸吾, 小林 哲, 周 玉\*, 早川堯夫: フタル酸エステルによる精巣障害の可能な原因について  
第22回環境トキシコロジーシンポジウム (1996.10)

\* ファイザー

小林 哲, 福岡正道, 早川堯夫: HGF mRNA 定量の研究  
日本薬学会第117年会 (1997.3)

尾崎幸紘: 日本における生薬及び漢方薬の薬理研究の動向  
第三回日中薬品分析技術セミナー, 中国天津 (1996.10)

尾崎幸紘, 芮 菁, 佐竹元吉: 中国産 *Forsythia suspnsa* Vahl の果実の抗炎症作用

第70回日本薬理学会年会 (1997.3)

鈴木英世, 尾崎幸紘, 佐竹元吉, 相楽和彦<sup>\*1</sup>, 平山総良<sup>\*1</sup>: サイコサポニンの前処理カラムによる精製と HPLC による定量

第25回生薬分析シンポジウム (1996.11)

<sup>\*1</sup> 大正製薬株式会社

鈴木英世, 佐竹元吉: ビンロウジの確認試験とその漢方処方への応用

日本薬学会第117年会 (1997.3)

関田節子, Flores Diana, 川原信夫, 江崎勝司, 佐竹元吉: ペルー生薬 Yawaur piri-piri の成分研究, 新規 naphthoquinone 類縁体及び anthraquinone 類縁体の構造

日本薬学会第117年会 (1997.3)

小野景義, 田中 光<sup>\*1</sup>, 増宮晴子<sup>\*1</sup>, 四十九俊徳<sup>\*1</sup>, 阪本英二<sup>\*2</sup>, 眞崎知生<sup>\*3</sup>, 重信弘毅<sup>\*1</sup>, 佐竹元吉: エンドセリンによる洞房結節歩調取り電位調節機序の電気生理学的解析

第70回日本薬理学会年会 (1997.3)

<sup>\*1</sup> 東邦大・薬<sup>\*2</sup> 理研・細胞生理<sup>\*3</sup> 京大・医

江崎勝司, 関田節子, 川原信夫, 代田 修, 鎌倉浩之, 佐竹元吉: *d*-Borneol の立体構造式について  
日本薬学会第117年会 (1997.3)

川原信夫, 代田修, 関田節子, 佐竹元吉: *Balansia cyperi* の代謝産物の研究(2)

日本生薬学会第43年会 (1996.9)

川原信夫, 野沢雅人, 関田節子, 佐竹元吉: *Gentianella alborosea* の産生する新規セスタテルペン alborosin の構造

日本薬学会第117年会 (1997.3)

Kawahara, N., Nozawa, M., Flores, D., Bonilla, P., Sekita, S. and Satake, M.: Chemical Components of Peruvian Folk Medicine Hercampuri (*Gentianella alborosea*)

III Congreso Nacional De Ciencias Farmaceuticas y Bioquimicas, Lima, Peru (1996.11)

Flores, D., Kawahara, N., Sekita, S. and Satake, M.: A Novel Compound From Yawuar Piri-piri The Rhizome of *Eleutherine bulbosa* (Mill) Urban (Iridaceae)

III Congreso Nacional De Ciencias Farmaceuticas y Bioquimicas, Lima, Peru (1996.11)

羽田紀康<sup>\*1</sup>, 戸塚ゆ加里<sup>\*1</sup>, 渡辺雅彦<sup>\*1</sup>, 杉村 隆<sup>\*1</sup>, 若林敬二<sup>\*1</sup>, 川原信夫, 村上恭興<sup>\*2</sup>, 横山裕作<sup>\*2</sup>: Norharman と phenylhydroxylamine の共存により生成する変異原物質の構造

日本薬学会第117年会 (1997.3)

<sup>\*1</sup> 国立がんセンター研究所<sup>\*2</sup> 東邦大学薬学部

福田達男\*, 清水虎雄\*, 川原信夫: *Puccinia menthae* の生活環と各胞子の発芽生理について  
日本菌学会第41回大会 (1997.5)

\* 東京都薬用植物園

代田 修, 関田節子, 佐竹元吉, 渡部晶子\*, 山崎真巳\*, 斉藤和季\*, 芝野勝成\*: RAPD 分析による大麻 (*Cannabis sativa*) の系統解析  
日本生薬学会第43回年会 (1996.9)

\*1 千葉大学薬学部

\*2 近畿地区麻薬取締事務所

代田 修, Vibha Pathak, Chowdhury Faiz Hossain, 関田節子, 高鳥浩介, 佐竹元吉: *Trichoderma sp.* の二次代謝産物に関する研究  
日本薬学会第117年会 (1997.3)

Osamu Shirota, Setsuko Sekita, Kenji Takizawa and Motoyoshi Satake: Anti-androgenic Natural Diels-Alder Type Adducts from Peruvian Folk Medicine "Palo de Sangre" (*Brosimum rubescens*)  
III Congreso Nacional de Ciencias Farmaceuticas y Bioquimicas, Lima, Peru (1996.9)

Sato, M., and Nakamura, A.: Device Tracking and Retrieval in Japan.  
IDr 3-Implant Data Record, Report, Review, Buffalo, USA (1996.6)

中村晃忠: 医療用具基準の国際化  
第34回日本人工臓器学会大会 (1996.10.4)

中村晃忠: インプラント・データシステムの内外動向  
第9回日本バイオマテリアル学会公開講座"医療用具の追跡調査とデータベース化" (1996.7.30)

中村晃忠: ラテックスアレルギーに関する自分史  
第1回日本ラテックスアレルギー研究会 (1996.11.9)

伊佐間和郎, 門馬純子, 鹿庭正昭, 中村晃忠: 老化防止剤 2-メルカプトベンズイミダゾールおよびメチル-2-メルカプトベンズイミダゾールの皮膚感作性について  
第33回全国衛生化学技術協議会年会 (1996.11)

鹿庭正昭, 伊佐間和郎: 防水スプレーの安全対策 (その後): 粒子径測定法の検討及び市販製品の実態調査  
第32回全国衛生化学技術協議会 (1995.11)

矢上 健, 佐藤道夫, 中村晃忠, 生野麻美子\*, 赤澤 晃\*, 池澤善郎\*: 植物の生体防御蛋白質とラテックスアレルギー  
第46回日本アレルギー学会総会 (1996.10)

\*1 しょうの皮膚科

\*2 国立小児病院アレルギー科

\*3 横浜市立大学医学部

矢上 健: 植物のストレス誘導性蛋白質とラテックスアレルギー  
第1回日本ラテックスアレルギー研究会 (1996.11)

矢上 健, 佐藤道夫, 中村晃忠, 生野麻美子\*, 赤澤 晃\*,

池澤善郎\*: ラテックス抗原としての植物の生体防御酵素  
日本農芸化学会1997年度大会 (1997.4)

\*1 しょうの皮膚科

\*2 国立小児病院アレルギー科

\*3 横浜市立大学医学部

北川幸己\*, 間智嘉子\*, 藤原英俊\*, 二木史朗\*, 矢上健: 2-クロロトリチル樹脂を用いた硫酸化ペプチドの効率的固相合成とガストリン/CCK 関連ペプチドへの応用  
第34回ペプチド化学討論会 (1996.10)

\*1 新潟薬科大学

\*2 徳島大学薬学部

矢上 健, 北川幸己\*, 間智佳子\*, 藤原英俊\*, 二木史朗\*: ガストリン-II 及びコレシストキニンにおける硫酸化チロシンの安定性とマスペクトルの特性について  
日本薬学会第117年会 (1997.4)

\*1 新潟薬科大学

\*2 徳島大学薬学部

北川幸己\*, 間智佳子\*, 藤原英俊\*, 矢上 健, 二木史朗\*: 2-クロロトリチル樹脂を活用した固相フラグメント縮合によるビッグ・ガストリン-II の合成  
日本薬学会第117年会 (1997.4)

\*1 新潟薬科大学

\*2 徳島大学薬学部

北川幸己\*, 間智佳子\*, 藤原英俊\*, 矢上 健, 二木史朗\*: ヒト・コレシストキニン (CCK)-39の固相合成  
日本薬学会第117年会 (1997.4)

\*1 新潟薬科大学

\*2 徳島大学薬学部

Ikarashi, Y., Tsuchiya, T., Nakamura, A., Toyoda, K., Takahashi, M., Doi, H., Kobayashi, E. and Hamanaka, H.: Tissue reactions and sensitization of chromium, titanium and zirconium alloys  
5th World Biomaterials Congress, Toronto, Canada (1996.5)  
\* 東京医科歯科大学

中岡竜介, 土屋利江, 中村晃忠: ポリエチレンフィルム上での細胞分化について  
第6回バイオ・高分子シンポジウム (1996.7)

Nakaoka, R., Tsuchiya, T. and Nakamura, A.: Surface modification of biomaterials with various extracellular matrix molecules for reduction of their tumor promoting activity  
3rd Pan Pacific Connective Tissue Societies Symposium, Hawaii, USA (1996.12)

Tsuchiya, T., Takahara, A.\*, Cooper, S. L.\*2, Nakaoka, R., Degawa, H. and Nakamura, A.: A new hypothesis: Inhibitory potentials of the gap-junctional intercellular communication play an important role on the tumorigenesis induced by biomaterials  
15th Southern Biomedical Engineering Conference, Dayton, U.S.A. (1996.3)

\*1 九州大学工学部

\*2 デラウェア大学工学部

Tsuchiya, T. and Nakamura, A.: **Research and regulatory situation of tissue engineering in Japan**

Workshop on Tissue Engineering, the 5 th World Biomaterials Congress, Toronto, Canada (1996. 5)

土屋利江：金属系バイオマテリアルの安全性試験法  
第4回金属系バイオマテリアル研究会 (1996.7)

土屋利江, 中岡竜介, 中村晃忠：医用材料の発癌機構に関する研究：ポリウレタンによる癌遺伝子発現について  
第69回日本生化学会, 第19回日本分子生物学会合同年会 (1996.8)

Tsuchiya, T., Nakamura, A., Kobayashi, E.\*, Doi, H.\*, Yoneyama, T.\* and Hamanaka, H.\*: **Cellular responses to titanium and zirconium alloys in vitro**

1 st meeting of the Tissue Engineering Society, Orlando, U.S. A. (1996. 12)

\* 東京医科歯科大学

Hayashi, Y. and Matsuda, R.: **Uncertainty of measurement: Software, theory and practice.**

7 th International Symposium on Pharmaceutical and Bio-medical Analysis, Osaka, Japan (1996. 8)

Hayashi, Y. and Matsuda, R.: **Theory and software of discrimination limit of purity test.**

AOAC International 1996 Annual Meeting & Exposition, Orlando, USA (1996. 9)

石突幸治\*<sup>1</sup>, 加藤恒雄\*<sup>1</sup>, 石川雅章\*<sup>2</sup>, 山田修寧\*<sup>3</sup>, 松田りえ子, 林 譲：電気信号の揺らぎに基づく, 分析機器のパリテーション

日本分析化学会第45年会 (1996. 9)

\*<sup>1</sup> 分析機器校正協同組合

\*<sup>2</sup> 静岡県沼津保健所

\*<sup>3</sup> 静岡県浜松工業技術センター

石突幸治\*<sup>1</sup>, 加藤恒雄\*<sup>1</sup>, 石川雅章\*<sup>2</sup>, 山田修寧\*<sup>3</sup>, 松田りえ子, 林 譲：クロマトグラフィ分析にはどの程度のデータ取り込み間隔が適当か

1996機器分析東京討論会 (1996. 11)

\*<sup>1</sup> 分析機器校正協同組合

\*<sup>2</sup> 静岡県沼津保健所

\*<sup>3</sup> 静岡県浜松工業技術センター

林 譲, 松田りえ子：機器分析における測定値の確からしさを知る方法について

日本薬学会第117年会 (1997. 3)

林 譲, 松田りえ子：分析機器ノイズの自己相関が定量精度に与える影響について

第58回分析化学討論会 (1997. 5)

蒲生啓司\*<sup>1</sup>, 林 譲, 松田りえ子：定量精度に基づく LC-MS 計測法における最適化

第58回分析化学討論会 (1997. 5)

\*<sup>1</sup> 高知大学教育学部

Shintani, H.: **Automated system of the combination of solid phase extraction and HPLC for differential**

**analysis of blood urea**

20th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations, San Francisco, CA, USA (1996. 6)

Shintani, H.: **Several Parameters Affecting to D value of Biological Indicator,**

AAMI31st Annual Meeting & Exposition, Philadelphia, PA (1996. 6)

Shintani, H.: **Comparison of uremic toxin analysis by HPLC-SPE with MECC**

Gulf Coast conference, Houston, TX (1996. 9)

Shintani, H.: **Some aspect of biological compound analysis**

Maria-Curie Sklodowska University, Lublin, Poland (1996. 9)

Shintani, H.: **Comparison of separation efficiency of biological compound analysis between HPLC and HPCE**

Warsaw University, Warsaw, Poland (1996. 9)

新谷英晴：バイオバーデンによる滅菌保証

第4回日本 PDA 大会, 東京 (1996. 10)

Shintani, H.: **Comparison of support of SPE for blood urea analysis**

Torun University, Torn, Poland (1996. 12)

Shintani, H.: **How to attain appropriate separation efficiency free from complicated biological matrix**

Maria-Curie Sklodowska University, Lublin, Poland (1997. 1)

Shintani, H.: **Sterility assurance using rapid read-out enzyme type biological indicator**

PDA Asia symposium, Osaka (1997. 2)

Shintani, H.: **Benefit of extracted and immobilized enzyme type biological indicator**

32nd AAMI meeting, Washington, D,C (1997. 5)

Shintani, H.: **Proposal to attain reproducible constitute of soybean casein digest medium for bioburden**

32nd AAMI meeting, Washington, D,C (1997. 5)

Shintani, H.: **Simple and easy to handle spore forming 26 Bacillus species identification kit set**

32nd AAMI meeting, Washington, D,C (1997. 5)

Shintani, H.: **Different resistance of identical microorganism when differing carrier materials**

32nd AAMI meeting, Washington, D,C (1997. 5)

Shintani, H.: **Multiple microorganisms in identical one carrier vs single microorganism in identical one**

32nd AAMI meeting, Washington, D,C (1997. 5)

新谷英晴：種々の生物指標を用いた滅菌保証  
日本防菌防培学会, 大阪 (1997. 5)

新谷英晴：酵素型生物指標に拠る滅菌保証

日本医科器械学会, 東京 (1997.5)

安藤正典: **生活環境中の化学物質とその生体毒性の高感度検知**

文部省科学研究補助金基盤研究 (C) 公開シンポジウム (1997.1)

安藤正典: **社会基盤を支える分析化学**  
第58回分析化学討論会 (1997.5)

Matsumura T., Osada E.\* and Ando M.: **Development of continuous analyzer of formaldehyde in indoor air**  
The 7 th International Conference on Indoor Air Quality and Climate, Nagoya, Japan (1996.7)

\* DKK Corporation

Ito K.\*, Matsumura T. and Ando M.: **Development of analytical method of formic acid in indoor air and its application to practical measurement**

The 7 th International Conference on Indoor Air Quality and Climate, Nagoya, Japan (1996.7)

\* Cashew Corporation

Matsunobu K.\*, Matsumura T. and Ando M.: **Development of colorimetric dosimeter tube for nitrogen dioxide**

The 7 th International Conference on Indoor Air Quality and Climate, Nagoya, Japan (1996.7)

\* GASTEC Corporation

Muramatsu S.\*<sup>1</sup>, Okamoto S.\*<sup>2</sup> and Matsumura T.: **Formaldehyde concentration of airtight homes**

The 7 th International Conference on Indoor Air Quality and Climate, Nagoya, Japan (1996.7)

\*<sup>1</sup> Musashino Women's College

\*<sup>2</sup> Department of Hygienic Chemistry, College of Pharmacy, Nihon University

松村年郎, 関田 寛, 浜田実香, 安藤正典, 長田英二\*: **化学物質による室内汚染 (19) ホルムアルデヒドパッシブサンプラーの評価**

第37回大気環境学会年会 (1996.9)

\* 電気化学計器(株)

松村年郎, 関田 寛, 安藤正典, 名智幸江\*: **化学物質による室内汚染 (20) DNPH-カートリッジのホルムアルデヒドパッシブサンプラーへの適用**

第37回大気環境学会年会 (1996.9)

\* 日本大学理工学部

松村年郎, 関田 寛, 安藤正典: **化学物質による室内汚染 (21) トリス (2-クロロエチル) ホスフェートの分析法について**

第37回大気環境学会年会 (1996.9)

松村年郎, 関田 寛, 安藤正典: **室内空気中のガス状酸性物質の定量法の検討とその適用**

第33回全国衛生化学技術協議会年会 (1996.11)

関田 寛, 松村年郎, 安藤正典: **空気中のホルムアルデヒド自動計測器の開発**

第33回全国衛生化学技術協議会年会 (1996.11)

松村年郎, 関田 寛, 浜田実香, 安藤正典: **非メタン炭化水素計の改良と実測への適用**

第24回建築物環境衛生管理技術研究集会 (1997.1)

松村年郎, 浜田実香, 関田 寛, 安藤正典, 平野純子\*: **室内空気中の有機リン系化合物の測定法の検討とそのアプリケーションについて**

第15回空気清浄とコンタミネーションコントロール研究大会 (1997.4)

\* 柴田科学機械工業(株)

松村年郎: **化学物質による室内空気汚染について**

第14回大気環境学会関東支部総会講演会 (1996.9)

徳永裕司, 内野 正, 木嶋敬二, 安藤正典: **赤血球の溶血性に及ぼす界面活性剤の影響**

日本化粧品科学会第21回学術大会 (1996.6)

徳永裕司, 内野 正, 安藤正典: **界面活性剤の剥離皮膚及び赤血球の溶血性に及ぼす影響**

第33回全国衛生化学技術協議会年会 (1996.11)

徳永裕司, 内野 正, 安藤正典: **赤血球の溶血に及ぼす非イオン性界面活性剤のポリオキシエチレン (EO) 鎖の影響**

日本薬学会第117年会 (1997.3)

木嶋敬二\*<sup>1</sup>, 徳永裕司, 伊藤弘一\*<sup>2</sup>, 観 照雄\*<sup>2</sup>, 坂口洋\*<sup>3</sup>, 永山富雄\*<sup>4</sup>, 渡辺卓穂\*<sup>5</sup>, 岡谷吉雄\*<sup>6</sup>, 平松功\*<sup>6</sup>, 佐藤信夫\*<sup>7</sup>, 澤村邦夫\*<sup>8</sup>, 高橋 守\*<sup>9</sup>, 高松 翼\*<sup>10</sup>, 西島 靖\*<sup>11</sup>, 斎藤 恵美子\*<sup>12</sup>: **生活用品試験法・化粧品試験法 グルコン酸クロルヘキシジン, アラントイン: HPLC による定性および定量**

日本薬学会第117年会 (1997.3)

\*<sup>1</sup> 医薬品添加剤協会

\*<sup>2</sup> 東京都立衛生研究所

\*<sup>3</sup> 北里大学理学部

\*<sup>4</sup> 東京薬科大学

\*<sup>5</sup> 星薬科大学

\*<sup>6</sup> ポーラ化成工業(株)安全性・分析センター

\*<sup>7</sup> コーセイ(株)

\*<sup>8</sup> ライオン(株)

\*<sup>9</sup> 伊勢半(株)水海道研究所

\*<sup>10</sup> 資生堂(株)安全性分析センター

\*<sup>11</sup> 鐘紡(株)化粧品研究所

\*<sup>12</sup> 日本化粧品工業連合会

内野 正, 木嶋敬二, 徳永裕司, 安藤正典: **ヘマトポルフィリン-UVA 増感による3次元培養細胞 (Skin 2) 中の過酸化脂質含量への影響**

日本化粧品科学会第21回学術大会 (1996.6)

内野 正, 徳永裕司, 安藤正典: **ヘマトポルフィリン-UV 増感による赤血球中の過酸化脂質含量及び溶血への影響**

第4回生体パーオキシド研究会 (1996.9)

内野 正, 徳永裕司, 安藤正典: **3次元培養細胞 (Skin<sup>2</sup>) に対する UVA の影響 (第2報) 一紫外線吸収剤及び抗酸化剤の影響一**

日本薬学会第117年会 (1997.3)

西村哲治, 埴岡伸光, 神野透人, 安藤正典: マウスリンフォーマー試験によるハロ酢酸類の毒性試験  
第31回日本水環境学会年会 (1997.3)

埴岡伸光, 神野透人, 西村哲治, 安藤正典, 小野寺祐夫\*: 肝薬物代謝酵素に及ぼす Irgasan DP300の影響; ラット肝ミクロゾームにおけるシトクロム P450依存性酵素の速度論的解析  
第2回エコトキシコロジー研究会・バイオアッセイ研究会合同研究発表会 (1996.9)

\* 東京理科大学

神野透人, 埴岡伸光, 西村哲治, 安藤正典, 小野寺祐夫\*: Irgasan DP300のラット肝薬物代謝酵素およびポルフィリン代謝に対する影響  
第2回エコトキシコロジー研究会・バイオアッセイ研究会合同研究発表会 (1996.9)

\* 東京理科大学

神野透人, 埴岡伸光, 西村哲治, 安藤正典: 培養ラット肝細胞におけるハロ酢酸類の細胞毒性  
日本薬学会第117年会 (1997.3)

尾前恵美子, 埴岡伸光, 神野透人, 西村哲治, 与田玲子, 安藤正典: トリクロロエチレンによるラット肝シトクロム P450の変動  
第40回日本薬学会関東支部大会 (1996.10)

五十嵐敦子, 松田りえ子, 佐々木久美子, 豊田正武: 食品汚染物モニタリングデータの解析(2) 各種汚染物の検出限界値について  
第33回全国衛生化学技術協議会年会 (1996.11)

豊田正武: 食品衛生をめぐる最近の話題—マイコトキシン, 動物用医薬品, バイオ食品  
免疫化学測定法研究会第1回学術集会 (1996.6)

豊田正武: 輸入食品の化学的安全性  
平成8年度獣医公衆衛生学会教育講演 (1997.2)

豊田正武: 食品汚染物のモニタリングについて  
第5回食品化学シンポジウム (1997.3)

Matsuda, R., Hayashi, Y., Sasaki, K., Toyoda, M. and Iwaki, K.\*: **Uncertainty of measurement in instrumental analyses: Standard addition method for metals in atomic absorption spectrometry**  
110th AOAC International Annual Meeting and Exposition (1996.9)

\* 荏原総合研究所技術開発研究所

Yasui, Y.\*, Kawano, S.\*, Hayashi, M.\* and Matsuda, R.: **Post column derivatization for determination of iminocytazine in foods by HPLC**  
Japan-USA Pesticide Residue Workshop (1996.9)

\* 鳥津製作所

松田りえ子: 食品衛生 GLP にむけて  
第115回液体クロマトグラフィー研究懇談会 (1996.12)

松田りえ子: 海外輸入食品の検査

第2回分析信頼性エグゼクティブセミナー—分析の信頼性確保のための社内体制の構築法 (1997.1)

松田りえ子, 林 譲: 検量デザインと分析精度の関係について  
日本薬学会第117年会 (1997.3)

蒲生啓司\*, 松田りえ子, 林 譲: 定量精度に基づく LC-MS 計測法における最適化  
第58回分析化学討論会 (1997.5)

\* 高知大学教育学部

Lehotay, S. J.\*<sup>1</sup>, Nemoto, S. and Kim, J.\*<sup>2</sup>: **Analysis of herbicides in soybeans using supercritical fluid extraction, accelerated solvent extraction, and capillary electrophoresis**  
1st European Pesticide Residue Workshop (1996.6)

\*<sup>1</sup> USDA Agricultural Research Service

\*<sup>2</sup> National Agricultural Science and Technology Institute

Nemoto, S. and Lehotay, S. J.\*: **Application of capillary electrophoresis in the analysis of multiple polar herbicides in soybeans.**  
110th AOAC International Annual Meeting and Exposition (1996.9)

\* USDA Agricultural Research Service

根本 了, 佐々木久美子, 豊田正武, 斎藤行生: 農産物中の残留農薬分析に対する超臨界流体抽出の適用—穀類試料について—  
日本食品衛生学会第72回学術講演会 (1996.10)

根本 了: キャピラリー電気泳動による大豆中の除草剤分析法の検討  
農薬残留分析研究会談話会 (1997.1)

Nemoto, S., Sasaki, K., Toyoda, M. and Saito, Y.: **Multiresidue analysis of pesticides in grains by supercritical fluid extraction and GC/MS (SIM mode):**  
9th Annual California Pesticides Residue Workshop (1997.3)

高附 巧, 根本 了, 佐々木久美子, 豊田正武: 告示 pyrethroid 系農薬の一斉分析法と deltamethrin 及び tralomeprin の確認法の検討  
第33回衛生化学技術協議会年会 (1996.11)

高附 巧, 阿武木秀夫\*<sup>1</sup>, 前山晃子\*<sup>2</sup>, 成井孝雄\*<sup>2</sup>, 平賀敬夫\*<sup>2</sup>, 奥山徹\*<sup>2</sup>: 麦門冬の細胞毒性成分  
第43回日本生薬学会年会 (1996.9)

\*<sup>1</sup> 日本化薬(株)

\*<sup>2</sup> 明治薬科大学

澤田恵子\*<sup>1</sup>, 前山晃子\*<sup>1</sup>, 成井孝雄\*<sup>1</sup>, 平賀敬夫\*<sup>1</sup>, 奥山徹\*<sup>1</sup>, 高附 巧, Chicita F. Culbertson\*<sup>2</sup>, William Louis Culbertson\*<sup>2</sup>, 柴田承二\*<sup>3</sup>: **Umbilicariaceae (Ascomycotina) の代謝産物に関する研究**  
第43回日本生薬学会年会 (1996.9)

\*<sup>1</sup> 明治薬科大学

\*<sup>2</sup> デューク大学

\*<sup>3</sup> 柴田天然薬物研究室

澤田恵子<sup>\*1</sup>, 成井孝雄<sup>\*1</sup>, 奥山 徹<sup>\*1</sup>, 高附 巧, Chicita F. Culberson<sup>\*2</sup>, William Louis Culberson<sup>\*2</sup>, 柴田承二<sup>\*3</sup>: **Umbilicariaceae (Ascomycotina) の代謝産物に関する研究 (第II報)**

日本薬学会第117年会 (1997.3)

<sup>\*1</sup> 明治薬科大学

<sup>\*2</sup> デューク大学

<sup>\*3</sup> 柴田天然薬物研究室

近藤一成, 鈴木 隆, 豊田正武: **フラボノイドの Albumin 存在下での抗酸化活性**

日本薬学会第117年会 (1997.3)

近藤一成, 穂山 浩, 合田幸広, 鈴木 隆, 豊田正武: **モロヘイヤ (*Corchorus olerius*) の強心作用成分の分析について**

日本食品衛生学会第73回学術講演会 (1997.5)

山田真記子<sup>\*</sup>, 加藤喜昭<sup>\*</sup>, 中村幹雄<sup>\*</sup>, 合田幸広, 米谷民雄, 山田 隆: **食用黄色4号中の不純物とその実態調査**

日本食品衛生学会第72回学術講演会 (1996.10)

<sup>\*</sup> 三栄源エフ・エフ・アイ(株)

合田幸広, 中村裕道, 坂元史歩, 佐藤恭子, 米谷民雄, 山田 隆, 豊田正武, 布村伊<sup>\*1</sup>, 石川恵子<sup>\*2</sup>: **トウガラシ色素のエステル化反応と安定性について**

第38回天然有機化合物討論会 (1996.10)

<sup>\*1</sup> 日本園芸生産研究所

<sup>\*2</sup> 千葉大園芸学部

合田幸広: **天然添加物の主成分とその化学構造**

日本食品化学学会第4回食品化学シンポジウム (1996.11)

合田幸広, 石川智子, 星野香織, 穂山 浩, 豊田正武: **クレソン中の抗アレルギー活性成分について**

日本薬学会第117年会 (1997.3)

日下 崇<sup>\*</sup>, 松藤 寛<sup>\*</sup>, 千野 誠<sup>\*</sup>, 武田明治<sup>\*</sup>, 合田幸広: **食用青色1号に含まれる付随色素・不純物に関する研究 (第2報)**

日本食品科学工学会第44回大会講演会 (1997.3)

<sup>\*</sup> 日本大学生物資源科学部

合田幸広, 穂山 浩, 久保田薫, 阿部有希子, 豊田正武, 田中祐二<sup>\*</sup>, 浦野泰照<sup>\*</sup>, 樋口恒彦<sup>\*</sup>, 長野哲雄<sup>\*</sup>: **L-トリプトファン中の不純物について (4)**

日本食品衛生学会第73回学術講演会 (1997.5)

<sup>\*</sup> 東京大学薬学部

日下 崇<sup>\*</sup>, 松藤 寛<sup>\*</sup>, 千野 誠<sup>\*</sup>, 武田明治<sup>\*</sup>, 合田幸広: **食用青色1号中における付随色素に関する研究 (第3報)**

日本食品化学学会学術講演会 (1997.5)

<sup>\*</sup> 日本大学生物資源科学部

陳 大義<sup>\*</sup>, 穂山 浩, 宮原 誠, 合田幸広, 豊田正武: **固相抽出法を用いたコーヒー豆等中のオクラトキシンAの迅速定量法**

マイコトキシン研究会第43回学術講演会 (1996.8)

<sup>\*</sup> 四川省衛生管理干部学院

穂山 浩, 豊田正武, 五十君静信<sup>\*</sup>, 熊谷 進<sup>\*</sup>: **ヒト腸内**

**フローラ連続流動培養装置を用いた数種マイコトキシンの分解について**

マイコトキシン研究会第43回学術講演会 (1996.8)

<sup>\*</sup> 国立感染症研究所

穂山 浩, 手島玲子, 赤坂玲子, 合田幸広, 澤田純一, 豊田正武: **ハンディータイプ分光測色計を用いたPCAの定量的評価**

第3回免疫毒性研究会 (1996.9)

星野香織<sup>\*</sup>, 田中恵子<sup>\*</sup>, 谷村顕雄<sup>\*</sup>, 穂山 浩, 合田幸広, 豊田正武: **27種健康茶及び緑茶中の7種のフラボノイドの含有量に関する研究**

日本食品衛生学会第72回学術講演会 (1996.10)

<sup>\*</sup> 昭和女子大学

穂山 浩, 陳 大義<sup>\*</sup>, 宮原 誠, 合田幸広, 豊田正武: **数種食品中のオクラトキシンAの改良分析法に関する研究**

日本食品衛生学会第72回学術講演会 (1996.10)

<sup>\*</sup> 四川省衛生管理干部学院

穂山 浩, Mayuree Uraroongroj<sup>\*</sup>, 宮原 誠, 合田幸広, 豊田正武: **フモニシンのポストカラム蛍光誘導体化HPLCの改良分析法について**

日本食品衛生学会第73回学術講演会 (1997.5)

<sup>\*</sup> Department of Medical Sciences, THAILAND

星野香織<sup>\*</sup>, 谷村顕雄<sup>\*</sup>, 穂山 浩, 合田幸広, 豊田正武: **In vitro 試験法による野菜抽出画分の抗アレルギー活性評価について**

日本食品衛生学会第73回学術講演会 (1997.5)

<sup>\*</sup> 昭和女子大学

宮原 誠, 豊田正武, 斎藤行生, 伊藤 均<sup>\*1</sup>, 長沢妙子<sup>\*2</sup>, 狩谷真理<sup>\*2</sup>, 伊住慶子<sup>\*3</sup>, 北村真弓<sup>\*3</sup>, 田島 真<sup>\*3</sup>: **ガンマ線照射によるフェニルアラニンからのチロシンの生成 照射食品検知法の基礎的研究**

日本薬学会第117年会 (1997.4)

<sup>\*1</sup> 日本原子力研究所高崎研究所

<sup>\*2</sup> 北里大学

<sup>\*3</sup> 実践女子大学

山田 隆<sup>\*</sup>, 伊藤誉志男<sup>\*</sup>, 加藤嘉昭<sup>\*</sup>, 川名清子<sup>\*</sup>, 斎藤和夫<sup>\*</sup>, 白石隆幸<sup>\*</sup>, 鈴木 忍<sup>\*</sup>, 成田弘子<sup>\*</sup>, 西島基弘<sup>\*</sup>, 浜野 孝<sup>\*</sup>, 渡部健二郎<sup>\*</sup>: **酵素法による過酸化水素の定量**

日本薬学会第117年会 (1997.3)

<sup>\*</sup> 日本薬学会 衛生試験法部会 食品添加物専門委員会

鈴木 忍<sup>\*</sup>, 伊藤誉志男<sup>\*</sup>, 加藤嘉昭<sup>\*</sup>, 川名清子<sup>\*</sup>, 斎藤和夫<sup>\*</sup>, 白石隆幸<sup>\*</sup>, 成田弘子<sup>\*</sup>, 西島基弘<sup>\*</sup>, 浜野 孝<sup>\*</sup>, 山田 隆<sup>\*</sup>, 渡部健二郎<sup>\*</sup>: **HPLCによるサイクラミン酸の定性および定量**

日本薬学会第117年会 (1997.3)

<sup>\*</sup> 日本薬学会 衛生試験法部会 食品添加物専門委員会

山田 隆: **食品及び食品容器包装中の添加物に関する衛生化学的研究**

第73回日本食品衛生学会学術講演会 (1997.5)

石綿 肇, 西島基弘<sup>\*1</sup>, 深澤喜延<sup>\*2</sup>, 伊藤誉志男<sup>\*3</sup>, 山田

隆：日本における食品中のソルビン酸濃度の実態及びそれに基づいた摂取量の推定

第72回日本食品衛生学会学術講演会 (1996.10)

\*1 東京都立衛生研究所

\*2 山梨県衛生公害研究所

\*3 武庫川女子大学薬学部

石綿 肇, 高橋貴子, 西島基弘\*1, 深澤喜延\*2, 伊藤誉志男\*3, 山田 隆：日本における(1994年度)食品中の保存料濃度の実態及びそれに基づいた摂取量の推定

第73回日本食品衛生学会学術講演会 (1997.5)

\*1 東京都立衛生研究所

\*2 山梨県衛生公害研究所

\*3 武庫川女子大学薬学部

川崎洋子, 加藤千晶, 石綿 肇, 山田 隆：乳製品中のアレルギーの定量分析法について

日本食品衛生学会第73回学術講演会 (1997.5)

米谷民雄, 久保田浩樹, 佐藤恭子, 山田 隆：色素産生植物培養細胞を用いたクラスⅢメタロチオネイン(フィトケラチン)誘導の研究

メタロチオネイン96 (1996.11)

米谷民雄：天然添加物の公的規格の展望

日本食品化学学会第4回食品化学シンポジウム (1996.11)

坂元史歩, 佐藤恭子, 米谷民雄, 山田 隆：既存添加物レモン果皮抽出物及びグレープフルーツ種子抽出物の成分分析

第33回全国衛生化学技術協議会年会 (1996.11)

坂元(佐々木)史歩, 佐藤恭子, 米谷民雄, 山田 隆, 栗原紀子\*, 鎌田 博\*：セイヨウワサビ毛状根及びその再分化体中の辛味成分の分析

日本薬学会第117年会 (1997.3)

\* 筑波大学遺伝子実験センター

久保田浩樹, 佐藤恭子, 米谷民雄, 山田 隆：キャピラリー電気泳動によるフィトケラチンの分析

日本薬学会第117年会 (1997.3)

河村葉子, 三浦麻記子, 杉田たき子, 山田 隆：食品用ポリエチレン製品中の添加剤の残存と溶出

第5回日本包装学会年次大会 (1996.7)

河村葉子：ポリエチレン製品中の添加剤の分析

日本食品化学学会第4回食品化学シンポジウム (1996.11)

河村葉子：照射食品の検知技術の現状

第22回日本アイソトープ・放射線総合会議 (1996.12)

河村葉子, 渡辺一成, 左山佳代, 武田由比子, 山田 隆：GC-MSによるポリエチレン中の添加剤の分析

日本食品衛生学会第73回学術講演会 (1997.5)

武田由比子, 河村葉子, 山田 隆：アルミホイルからのアルミニウム溶出に関する検討

日本食品衛生学会第73回学術講演会 (1997.5)

山越葉子, 末吉祥子, 宮田直樹：C<sub>60</sub>およびC<sub>60</sub>-アクリジン

付加体のDNA切断活性

第11回フラーレン総合シンポジウム (1996.8)

常盤 寛\*1, 世良暢之\*2, 葛西 宏\*3, 山越葉子, 宮田直樹：フラーレン(C<sub>60</sub>)の光増感作用により発生する一重項酸素の脂質過酸化と突然変異誘発機構

日本癌学会第55回総会 (1996.10)

\*1 九州女子大

\*2 福岡県保健環境研究所

\*3 九州産業大

Miyata, N., Yamakoshi, Y., Sera, N.\*1 and Tokiwa, H.\*2: **Mutagenicity of [60]fullerene under photoirradiation** VIII Biennial Meeting of the International Society for Free Radical Research (1996.10)

\*1 福岡県保健環境研究所

\*2 九州女子大

Yamakoshi, Y., Sueyoshi, S. and Miyata, N.: **DNA-Cleaving Activities of [60]Fullerene and Its Derivative**

VIII Biennial Meeting of the International Society for Free Radical Research (1996.10)

Kurihara, M.: **Stereoselective Epoxidation Using Ketone-Oxone System**

The Seventh Symposium on the Latest Trends in Organic Synthesis (1996.10)

栗原正明, 石井 圭, 笠原容子, 亀田まり, 宮田直樹：ケトン-オキソン系によるアリル化合物の立体選択的エポキシ化反応

第22回反応と合成のシンポジウム (1996.11)

Miyata, N., Yamakoshi, Y., Sueyoshi, S., Sera N.\*1: **Oxidative damages caused by the photoirradiation of [60] fullerene (C<sub>60</sub>)**

Oxygen '96: The 3rd annual meeting of the oxygen society (1996.11)

\*1 福岡県保健環境研究所

宮田直樹, 山越葉子, 末吉祥子, 酒井綾子, 世良暢之\*1: **光励起フラーレンの生物作用**

第12回フラーレン総合シンポジウム (1997.1)

\*1 福岡県保健環境研究所

末吉祥子, 丹野雅幸, 大村礼子, 宮田直樹：**NO発生能を有する水溶性N-ニトロソ尿素の合成**

日本薬学会第117年会 (1997.3)

栗原正明, 林 多恵子, 宮田直樹：**光学活性一電子酸化剤を用いた不斉ラジカル化反応**

日本薬学会第117年会 (1997.3)

栗原正明, 石井 圭, 笠原容子, 宮田直樹：ケトン-オキソン系によるアリル化合物の立体選択的エポキシ化反応

日本薬学会第117年会 (1997.3)

小林茂樹\*1, 圧地なほみ\*1, 吉武美紀\*1, 石井耀子\*1, 田中 彰\*1, 宮田直樹：**ダブルストランドペプチドのガン細胞増殖阻害活性と構造活性相関**

日本薬学会第117年会 (1997.3)

\*<sup>1</sup> 昭和薬科大学

手島玲子, 赤坂玲子, 斎藤嘉朗, 池淵秀治, 澤田純一, 中西 守: **好塩基球細胞の Ca<sup>2+</sup> 応答, 脱顆粒への K252b の作用について**  
第69回日本生化学会大会 (1996.8)

斎藤嘉朗, 手島玲子, 山崎 壮, 池淵秀治, 澤田純一: **ホルボールエステルによるヒト成長ホルモン蛋白の放出促進**  
第69回日本生化学会大会 (1996.8)

手島玲子: **アレルギーと環境化学物質**  
第4回日本職業アレルギー学会 (1996.7)

古野忠秀\*, 岡部年真\*, 手島玲子, 近藤崇子\*, 澤田純一, 中西 守\*: **共焦点レーザー顕微鏡による好塩基球の SH 2 ドメインの動態解析**  
第69回日本生化学会大会 (1996.8)

\* 名古屋市立大学薬学部

鈴木真弓\*, 中島浩美\*, 古野忠秀\*, 手島玲子, 澤田純一, 中西 守\*: **培養神経細胞株 (PC12) の神経突起伸長に及ぼす好塩基球細胞由来の液性因子の影響**  
第5回バイオイメージング学会 (1996.10)

\* 名古屋市立大学薬学部

赤坂玲子, 手島玲子, 北嶋 聡, 門馬純子, 井上 達, 澤田純一: **即時型アレルギー反応への種々の抗酸化剤の影響について**  
第3回免疫毒性研究会 (1996.9)

手島玲子, 赤坂玲子, 北嶋 聡, 門馬純子, 井上 達, 澤田純一: **抗酸化剤 DTBHQ のヒスタミン遊離促進活性並びに皮膚発赤反応の誘起について**  
第46回日本アレルギー学会 (1996.10)

近藤崇子\*, 古野忠秀\*, 手島玲子, 澤田純一, 中西 守\*: **好塩基球 (RBL-2H3) の細胞内 SH 2 ドメインの画像解析**  
第18回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (1996.10)

\* 名古屋市立大学薬学部

古野忠秀\*, 岡部年真\*, 手島玲子, 近藤崇子\*, 澤田純一, 中西 守\*: **RBL-2H3 細胞の SH 2 ドメイン動態の画像解析**  
第26回日本免疫学会総会 (1996.11)

\* 名古屋市立大学薬学部

Saito, Y., Teshima, R., Yamazaki, T., Ikebuchi, H. and Sawada, J.: **Release of Growth Hormone Binding Proteins from Human IM-9 Lymphoblast Cells**  
International Society for Neuroimmunomodulation, The Third International Congress (1996.11)

手島玲子: **環境化学物質による過剰免疫**  
日本薬学会第117年会 (1997.3)

中島 治, 蜂須賀暁子, 山崎 壮, 澤田純一: **OBCAM (オピオイド結合性細胞接着分子) リコンビナント蛋白の調製および抗 OBCAM 抗体の性質**  
日本薬学会第117年会 (1997.3)

鈴木和博, 永石恵子\*, 山口照英, 川西 徹, 最上 (西巻) 知子, 笠原 忠\*, 早川堯夫, 高橋 惇: **白血球の活性化とコフィリンの動態**  
第69回日本生化学会大会, 第19回日本分子生物学会年会合同年会 (1996.8)

\* 共立薬科大学

永石恵子\*, 赤坂玲子, 山口照英, 早川堯夫, 笠原 忠\*, 鈴木和博: **白血球の活性化におけるコフィリンの脱リン酸化と細胞内分布変化**  
第26回日本免疫学会総会・学術集会 (1996.11)

\* 共立薬科大学

最上 (西巻) 知子, 大河内江里子, 鈴木和博, 高橋惇: **ラット肝細胞での apoB48 含有 VLDL 粒子形成機構**  
第69回日本生化学会大会, 第19回日本分子生物学会年会合同年会 (1996.8)

紅林秀雄, 大野泰雄, 高橋 惇, 吉田賢二\*<sup>1</sup>, 二宮真一\*<sup>1</sup>: **Tris (2-chloroethyl) phosphate のラットにおける代謝**  
第23回日本毒科学会 (1996, 7, 25)

\*<sup>1</sup> 第一化学薬品(株)東海研究所

吉田賢二\*<sup>1</sup>, 二宮真一\*<sup>1</sup>, 江角凱夫\*<sup>1</sup>, 嶺岸謙一郎, 紅林秀雄, 大野泰雄, 高橋 惇: **Tris (2-chloroethyl) phosphate のインハレーション後の体内動態試験**  
第23回日本毒科学会 (1996, 7, 25)

\*<sup>1</sup> 第一化学薬品(株)東海研究所

吉田賢二\*<sup>1</sup>, 二宮真一\*<sup>1</sup>, 江角凱夫\*<sup>1</sup>, 嶺岸謙一郎, 紅林秀雄, 大野泰雄, 高橋 惇: **インハレーションによる Tris (2-chloroethyl) phosphate の体内動態評価**  
日本薬物動態学会第11回年会 (1996, 10, 17)

\*<sup>1</sup> 第一化学薬品(株)東海研究所

吉田賢二\*<sup>1</sup>, 二宮真一\*<sup>1</sup>, 江角凱夫\*<sup>1</sup>, 紅林秀雄, 嶺岸謙一郎, 大野泰雄, 高橋 惇: **Tris (2-chloroethyl) phosphate の吸入暴露後の体内動態評価**  
第22回環境トキシコロジー-シンポジウム (1996, 10, 24)

\*<sup>1</sup> 第一化学薬品(株)東海研究所

紅林秀雄, 大野泰雄, 高橋 惇, 吉田賢二\*<sup>1</sup>, 二宮真一\*<sup>1</sup>: **Tris (2-chloroethyl) phosphate のラット肝ミクロソームおよび上清による代謝**  
日本薬学会第117年会 (1997, 3, 26)

\*<sup>1</sup> 第一化学薬品(株)東海研究所

嶺岸謙一郎, 鈴木幸子, 金子豊蔵, 井上 達, 高橋 惇: **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-p-フェニレンジアミン (DMPD) の長期投与試験における体内動態**  
日本薬学会第117年会 (1997.3)

三瀬勝利: **日本薬局方の微生物試験について**  
第33回全国薬事指導協議会 (1996.10)

Mise, K.: **Recent trends of food poisoning outbreaks in Japan and molecular approaches to diagnosis of food-borne pathogenic bacteria.**  
The 45th Annual Meeting of the Korean Society of Food Hy-



giene and Safety (1996. 11)

三瀬勝利：保存効力試験法，国際調和，USP/JP 案  
第十二回 GMP とバリデーションをめぐる諸問題に関する  
シンポジウム (1997. 3)

安住聡子，谷村顕雄\*，棚元憲一：桂皮中に存在する細菌  
内毒素活性抑制物質の抗菌作用  
第43回日本生薬学会年会 (1996. 9)

\* 昭和女子大学

Tanamoto K.: Production of nontoxic lipid A by chemical  
modification and its antagonistic effect of LPS ac-  
tivity.

The 4 th Conference of the Endotoxin Society (1996. 10)

Azumi S., Tanimura A.\* and Tanamoto K.: A novel inhibi-  
tor of bacterial endotoxin derived from *Cinnamomum*  
*Cassia*.

The 4 th Conference of the Endotoxin Society (1996. 10)

\* Showa Womens' University

Haishima Y., Kato H., Azumi S., Kumada H.\*, Watanabe K.\*,  
Umamoto T.\* and Tanamoto K.: Chemical and biological  
properties of low toxic lipid A containing iso-form  
fatty acids.

The 4 th Conference of the Endotoxin Society (1996. 10)

\* Kanagawa Dental College

棚元憲一，配島由二，隅田泰生\*，深瀬浩一\*，楠本正一\*：  
リポド A 前駆体の遊離水酸基の置換による活性変化  
第70回日本細菌学会総会 (1997. 3)

\* 大阪大学理学部

安住聡子，谷村顕雄\*，棚元憲一：桂皮中に存在する新規  
抗菌・抗内毒素活性物質の活性本体について  
第70回日本細菌学会総会 (1997. 3)

\* 昭和女子大学

配島由二，棚元憲一：完全脱 O-アシルリポド A の LPS-  
アンタゴニスト活性  
第70回日本細菌学会総会 (1997. 3)

細測和成\*，配島由二，棚元憲一：<sup>60</sup>Co- $\gamma$ 線によるエンド  
トキシンの不活化-2  
第24回日本防菌防黴学会年次大会 (1997. 5)

\* 東京都立産業技術研究所

宮原美知子，三瀬勝利：制限酵素関連修飾酵素の PCR に  
よる検索  
第75回日本細菌学会関東支部総会 (1996. 6)

宮原美知子：修飾酵素 DNA (cytosine-5) methyltrans-  
ferase 産生遺伝子の検索  
第19回日本分子生物学会 (1996. 8)

宮原美知子，菅谷桂\*，佐竹元吉：クワ科植物の PCR 法  
を使つての分類の試み  
日本薬学会第117年会 (1997. 3)

\* 昭和女子大学

小沼博隆：食品の衛生管理と品質保証における国内の現状  
と今後の動向  
日本防菌防黴学会第17回環境殺菌工学研究部会 (1997. 2)

小沼博隆：食品の汚染原因特定のための微生物試験とその  
精度管理  
日本防菌防黴学会第15回環境殺菌分野事例研究部会  
(1997. 1)

小沼博隆：食品の衛生管理と安全保証  
日本食品工学会第44回学術講演会 (1997. 3)

山根祐治\*<sup>1</sup>，小沼博隆，山口正恵\*<sup>1</sup>，太田博明\*<sup>1</sup>，井上  
武\*<sup>2</sup>：抗 SE ニワトリ抗体が SE の運動性および増殖性に  
与える影響  
第123回日本獣医学会 (1997. 4)

\*<sup>1</sup> CAF ラボ

\*<sup>2</sup> 山口大

小沼博隆，品川邦汎\*<sup>1</sup>，仁科徳啓\*<sup>2</sup>，片岡辰雄\*<sup>3</sup>，加地祥  
文\*<sup>4</sup>：牛および枝肉の腸管出血性大腸菌 (O157) 汚染と  
その予防対策  
第123回日本獣医学会 (1997. 4)

\*<sup>1</sup> 岩手大学

\*<sup>2</sup> 静岡県環境衛生科学研究所

\*<sup>3</sup> 芝浦食肉検査所

\*<sup>4</sup> 厚生省生活衛生局乳肉衛生課

春日文子\*<sup>1</sup>，小沼博隆，工藤由起子\*<sup>1</sup>，岩城正昭\*<sup>1</sup>，斉藤  
典子\*<sup>1</sup>，小西良子\*<sup>1</sup>，伊藤嘉典\*<sup>1</sup>，熊谷 進：腸管出血性  
大腸菌 *E. coli* O157:H7 による「カイワレ大根の実験的  
汚染  
第123回日本獣医学会 (1997. 4)

\*<sup>1</sup> 国立感染症研究所

\*<sup>1</sup> 新潟県衛生公害研究所

\*<sup>2</sup> (株)キューピー

\*<sup>3</sup> 岩手大学

小沼博隆：製造管理における衛生管理と品質保証—国際動  
向とわが国の現状  
日本防菌防黴学会環境殺菌分野事例研究会 (1996. 1)

小沼博隆：新しい検査法の標準化と導入  
第17回日本食品微生物学会学術総会 (1996. 10)

酒井綾子：酸化防止剤，2, 5-ジ-tert-ブチル-1, 4-ヒドロキ  
ノンの BALB/3T3 細胞 2 段階トランスフォーメーシ  
ョンに於けるプロモーション作用  
第55回日本癌学会総会 (1996. 10)

酒井綾子，山越葉子，宮田直樹：[60] フラーレンの光活  
性化：細胞毒性とトランスフォーメーション活性の惹起  
日本環境変異原学会第25回大会 (1996. 11)

Suganuma, M.\*, Okabe, S.\*, Sakai, A., Yatsunami, J.\*, Komori,  
A.\*, Sueoka, N.\*, Sueoka, N.\*, Tada, Y.\* and Fujiki, H.\*: Dif-  
fering roles of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , in tumor pro-  
motion

88th Annual Meeting of the American Association for Cancer  
Research (1997. 4)

\* Saitama Cancer Center Research Institute

松谷佐知子：**IS 1 ΔAB 蛋白質の転移標的部位への作用**  
第19回日本分子生物学会年会 (1996.8)

Matsutani, S.: **Genetic analyses of the interactions of the IS1-encoded proteins with the left end of IS1 and its insertion hotspot**

Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology ; Transposition and Site-Specific Recombination, Santa Fe, New Mexico (1997.3)

太田利子\*, 小菅旬子, 朴 鍾喆, 鈴木明子, 成田紀子, 高鳥浩介：**ハウスダスト中の真菌数計測**  
第23回日本防菌防黴学会 (1996.5)

\* 相模女子大学

Kikuchi Y., O'Brien, L.\* and Brindley, D. N.\*: **Effects of ceramide, lysophosphatidic acid and sphingosine-1-phosphate on mitogen-activated protein kinase activities in rat fibroblasts**

6 rh Fisher winter national symposium of the Canadian society of biochemistry and molecular and cellular biology (1996.3)

\* University of Alberta

関沢 純, 河島律子, 三谷泰代\*<sup>1</sup>, 武藤早紀子\*<sup>1</sup>, 山上毅\*<sup>2</sup>：**農薬の環境中生物への影響データベースの作成と生態リスク評価**

日本農薬学会第22回大会 (1997.3)

\*<sup>1</sup> 前昭和女子大学

\*<sup>2</sup> 前東京農業大学

関沢 純：**農薬の環境動態予測への PRZM モデルのわが国での適用と基礎となるデータベースの整備について**  
雑草の発生・生育と除草剤の動態モデルに関する研究会 (1996.10)

杉森伸吉\*<sup>1</sup>, 安部明美\*<sup>2</sup>, 鬼武一夫\*<sup>3</sup>, 島井哲史\*<sup>4</sup>, 武井玲子\*<sup>5</sup>, 関沢 純：**化学品リスクの認知と行動についてのアンケートの解析**

日本リスク研究学会第9回研究発表会137-142 (1996.11)

\*<sup>1</sup> 東京家政大学

\*<sup>2</sup> 神奈川県環境科学センター

\*<sup>3</sup> 日本生協連

\*<sup>4</sup> 神戸女学院大学

\*<sup>5</sup> ライオン(株)

関沢 純：**化学品の安全使用と管理のためのリスクコミュニケーション**

学術会議安全工学研連第26回安全工学シンポジウム (1996.10)

関沢 純：**リスクコミュニケーション—これまでの問題と今後のありかた**

リスクアセスメント・システム調査セミナー (1996.12)

関沢 純：**リスクコミュニケーションはどうあるべきか?**  
第14回環境科学セミナー (1997.3)

Nakata, K.: **Protein Secondary Structure and Sequence Characters**

XII International Biophysics Congress (1996.8)

Nakata, K., Hayakawa, M., Nakano, T. and Kaminuma, T. : **An Integrated Receptor Database**

15Th International Conference : Scientific Data In The Age Of Networking (1996.10)

中田琴子, 早川昌孝, 五十嵐貴子, 神沼二真：**ACEDB を用いた受容体データベース**

第34回日本生物物理学会 (1996.11)

Nakata, K., Hayakawa, M., Igarashi, T. and Kaminuma, T. : **Building A Receptor Database**

Genome Informatics Workshop VII (1996.12)

Igarashi, T. and Kaminuma, T. : **Development of a Cell Signaling Networks Database**

Pacific Symposium on Biocomputing '97 (1997.1)

Igarashi, T., Nadaoka, Y\* and Kaminuma, T. : **CSNDB as a Viewer for Biological Data on the Internet**

15Th International Conference : Scientific Data In The Age Of Networking (1996.10)

\*<sup>1</sup> (財)東京都臨床研

五十嵐貴子：**細胞内情報伝達系のデータベース化**

日本薬学会第117年会 (1997.3)

神沼二真, 村越貴司, 梅原隆人, 二葉哲男, 五十嵐貴子：**線虫(C. elegans)の胚発生における細胞集合体構造の表現**

第38回形の科学シンポジウム (1997.2)

中野達也, 長谷川式子, 山本 都, 神沼二真, 平山令明\*<sup>1</sup>, 川出 達\*<sup>2</sup>：**構造情報と相互作用情報を有する医薬品データベースの開発**

第19回情報化学討論会 (1996.11)

\*<sup>1</sup> 東海大学

\*<sup>2</sup> データインデックス(株)

中野達也, 神沼二真, 高田満雄\*<sup>1</sup>, 佐野 毅\*<sup>1</sup>, 川出 達\*<sup>2</sup>：**創薬のための副作用構造相関データベースの構築**

日本薬学会第117年会 (1997.3)

\*<sup>1</sup> ファイ研究会

\*<sup>2</sup> データインデックス(株)

高木篤也：**バイオ医薬品の特殊性と今後の ICH S6**

第5回日本毒科学会サテライトシンポジウム (1996.7)

門馬純子, 川島邦夫, 井上 達：**p-Phenylenediamine 系ゴム老化防止剤の皮膚感作性**

第23回日本毒科学会 (1996.7)

Momma, J., Kitajima, S. and Inoue, T.: **Reactivities of the Skin-Sensitization Test in Guinea Pig (GPMT) is a Function of Three Independent Parameters ; Induction Doses, Challenge Doses, and the Direct Exposure Level in Human Cases**

Society of Toxicology 36th Annual Meeting (1997.3)

平林容子, 梅村隆志, Cronkite, EP\*, 井上 達：**Azidothymidine (AZT) 長期投与による実験的骨髄異形成症候群-造血幹細胞動態と組織学的変化の検討**

第23回日本毒科学会学術年会 (1996.7)

\* ブルックヘブン米国国立研究所

Hirabayashi, Y, Matsumura, T<sup>\*1</sup>, Mitsui, H<sup>\*1</sup>, Matsuda M<sup>\*1</sup>, Sasak H<sup>\*1</sup>, Kuramoto, K<sup>\*2</sup>, Yoshida, K<sup>\*3</sup>, Umemura, T and Inoue, T.: **BRDURD-UV CYTOTOXICITY REVISITED: A NEW CONCEPT OF THE STEM CELL KINETICS OF THE BONE MARROW**

The 25th Annual Meeting of the International Society for Experimental Hematology (1996. 8)

<sup>\*1</sup> 横浜市立大学医学部

<sup>\*2</sup> 東京都老人研

<sup>\*3</sup> 放射線医学研究所

Inoue, T, Cronkite, EP<sup>\*1</sup>, Hirabayashi, Y, Yoshida, K<sup>\*2</sup>, Bullis, JE<sup>\*1</sup> and Umemura, T.: **LIFETIME TREATMENT OF MICE WITH AZT PRODUCES MYELODYSPLASIA**

The 25th Annual Meeting of the International Society for Experimental Hematology (1996. 8)

<sup>\*1</sup> ブルックヘブン米国国立研究所

<sup>\*2</sup> 放射線医学研究所

Eliason, JF<sup>\*</sup>, Hirabayashi, Y and Inoue, T.: **Inhibition of stem cell proliferation in long-term cultures by Mofarotene**

The 25th Annual Meeting of the International Society for Experimental Hematology (1996. 8)

\* Karmanos Cancer Institute, Detroit, MI

平林容子, 松田 基<sup>\*1</sup>, 佐々木秀樹<sup>\*1</sup>, 吉田和子<sup>\*2</sup>, 梅村隆志, 井上 達: **プロモデオキシユリジン投与と近紫外線照射を組み合わせた幹細胞動態解析 (BUUV) -ヒト c-myc 遺伝子導入マウスにおける特異な変化**  
第55回日本癌学会総会 (1996.10)

<sup>\*1</sup> 横浜市立大学医学部

<sup>\*2</sup> 放射線医学総合研究所

Inoue T: **Biotechnology derived pharmaceuticals in Japan: Present and future prospects**

Center for Medicines Research International Symposium on safety evaluation of biotechnologically-derived pharmaceuticals (1997.2)

平林容子, 横田 崇<sup>\*1</sup>, 佐々木秀樹<sup>\*2</sup>, 吉田和子<sup>\*3</sup>, 児玉幸夫, 井上 達: **ヒト IL-3 受容体遺伝子導入トランスジェニック・マウス骨髓細胞の IL-3 に対する反応性**  
第59回日本血液学会総会 (1997.3)

<sup>\*1</sup> 東京大学医科学研究所

<sup>\*2</sup> 横浜市立大学医学部

<sup>\*3</sup> 放射線医学総合研究所

佐々木秀樹\*, 生田孝一郎\*, 舟曳哲典\*, 後藤裕明\*, 渡辺由佳\*, 平林容子, 井上 達, 松山秀介: **Thrombopoietin のマウス未分化造血前駆細胞, 多能性幹細胞に対する増殖促進及び生存維持作用**

第59回日本血液学会総会 (1996.3)

\* 横浜市立大学医学部

小野 敦, 関田清司, 小川幸男, 広瀬明彦, 鈴木幸子, 斉藤 実, 内藤克司, 金子豊蔵, 降矢 強, 川島邦夫, 安原加寿雄, 松本清司\*, 田中 悟, 井上 達, 黒川雄二: **トルエン吸入暴露のラットにおける生殖発生毒性 II. 妊娠前**

及び妊娠初期暴露試験

第23回日本毒科学会学術年会 (1996. 7)

大野泰雄, 井上 達, 金子豊蔵, 門馬純子, 森川良広\*他26名: **化粧品原料の安全性評価のための眼刺激性試験法のバリデーションー1次から3次バリデーションまでのまとめー**

第23回日本毒科学会学術年会 (1996. 7)

\* 日本化粧品工業連合会

松島裕子, 内藤克司, 斉藤 実, 五十嵐良明, 津田充宥, 川崎 靖, 鈴木幸子, 金子豊蔵, 井上 達: **防かび剤 N-(Fluorodichloromethylthio) phthalimide のラット鼻粘膜および鼻咽頭管上皮への刺激作用**  
第23回日本毒科学会学術年会 (1996. 7)

T. Kaneko<sup>\*2</sup>, J. Momma, J. Kumakawa, T. Inoue, T. Suzuki<sup>\*1</sup>, H. Kakishima<sup>\*2</sup>, T. Nakamura<sup>\*2</sup>, H. Tatsumi<sup>\*2</sup>, S. Hagino<sup>\*2</sup> and Y. Ohno: **Interlaboratory validation of alternative methods to the eye irritation test for safety evaluation of cosmetic ingredients. XI. Results of the Draize eye irritation test and implications of their variation**  
Second World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (1996)

<sup>\*1</sup> Seigiken Research Center Co.Ltd

<sup>\*2</sup> In vivo Testing Control Group

金子豊蔵, 門馬純子, 熊川順子, 井上達, 鈴木登志郎<sup>\*1</sup>, 柿島 博<sup>\*2</sup>, 中村恒彰<sup>\*2</sup>, 萩野滋延<sup>\*2</sup>, 大野泰雄: **化粧品原料の安全性評価のための眼粘膜刺激性試験代替法のバリデーション(11) in vitro 試験結果**  
第10回日本動物実験代替法学会 (1996.12)

<sup>\*1</sup> 日本セイギケン総合研究所

<sup>\*2</sup> 日本化粧品工業連合会

梅村隆志, 小川幸男, 児玉幸夫, 小野 敦, 関田清司, 内藤克司, 降矢 強, 井上 達, 黒川雄二, 林 裕造\*: **アラマイトおよびジフェニルエーテル系農薬90日間投与によるイヌ肝臓および胆嚢への影響**  
第23回日本毒科学会学術年会 (1996. 7)

\* 北里大学薬学部

梅村隆志, 川崎 靖, 津田充宥, 井上 達, 黒川雄二: **形状の異なるポリウレタンシートのラット皮下埋植による組織反応および催腫瘍率の差異について**  
第55回日本癌学会総会 (1996.10)

梅村隆志, 佐井君江, 長谷川隆一, 井上 達, 黒川雄二: **腎発がん剤臭素酸カリウムおよびパラジクロロベンゼン13週間投与によるラット腎病変の比較**  
第13回日本毒性病理学会 (1997.1)

佐井君江, 甲斐幸恵\*, 梅村隆志, 長谷川隆一, 谷村顕雄\*, 黒川雄二, 井上 達: **2-Nitropropane の肝毒性における酸化ストレスの関与: 過酸化脂質の生成及び緑茶による抑制効果**  
第23回日本毒科学会学術年会 (1996. 7)

\* 昭和女子大学生生活機構研究科

佐井君江, 甲斐幸恵\*, 梅村隆志, 長谷川隆一, 黒川雄二, 井上 達: **2-Nitropropane によるラット肝の酸化的**

**DNA 損傷及び細胞増殖作用に対する緑茶の予防効果**

第55回日本癌学会総会 (1996.10)

\* 昭和女子大学生活機構研究所

Sai, K., Umemura, T., Hasegawa, R., Kurokawa Y and Inoue, T.: **Use of 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) as a biomarker for detection of carcinogenic and anti-carcinogenic potency: Significance of oxidative DNA damage in pentachlorophenol-induced mouse hepatic tumorigenesis and inhibitory effects of antioxidants**  
First European Workshop on Molecular Toxicology, Cote d'Azur (1997.10)

佐井君江, 甲斐幸恵\*, 谷村顕雄\*, 長谷川隆一, 井上 達:  
**2-ニトロプロパンのラット肝ミトコンドリア機能障害に対する緑茶の予防効果**  
第73回日本食品衛生学会学術講演会 (1997.5)

\* 昭和女子大学生活機構研究所

井上かおり\*<sup>1</sup>, 板垣 宏\*<sup>1</sup>, 市川秀之\*<sup>1</sup>, 森川良広\*<sup>1</sup>, 中澤憲一, 大野泰雄, 黒岩幸雄\*<sup>2</sup>: **培養細胞を用いる感覚刺激の in vitro 評価法: 電気生理学的手法及びサブスタンス P の遊離法の検討**  
日本粧香品学会 (1996.6)

\*<sup>1</sup> 資生堂\*<sup>2</sup> 昭和大学薬学部

簾内桃子, 宮島敦子, 張 宝旭, 酒見和枝, 大野泰雄: **トリアジン系農薬の代謝と肝細胞毒性**  
第23回日本毒科学学会学術年会 (1996.7)

紅林秀雄, 大野泰雄, 高橋 惇, 吉田賢二\*, 二宮真一\*: **Tris (2-chloroethyl) phosphate のラットにおける代謝**  
第23回日本毒科学学会学術年会 (1996.7)

\* 第一化学薬品(株)東海研究所

酒見和枝, 宇佐見誠, 伊藤理恵乃, 川崎 靖, 齊藤 実, 梅村隆志, 伊佐間和郎, 大野泰雄, 津田充宥: **甲状腺障害物質, 2-Mercaptobenzimidazole (MBI) 及びそのメチル誘導体のラットへの単回投与によるトキシコキネティクス (TK)**  
第23回日本毒科学学会学術年会 (1996.7)

大野泰雄, 井上 達, 金子豊蔵, 森川良広\*<sup>1</sup>, 吉田武美, 藤井昭男\*<sup>1</sup>, 増田光輝\*<sup>1</sup>, 大野忠夫\*<sup>2</sup>, 秋山純一\*<sup>1</sup>, 池田紀和\*<sup>1</sup>, 今西 豊\*<sup>1</sup>, 板垣 宏\*<sup>1</sup>, 宇佐見雅仁\*<sup>1</sup>, 大越健自\*<sup>1</sup>, 奥村秀信\*<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>, 西条 薫\*<sup>2</sup>, 坂本一民\*<sup>1</sup>, 簾内桃子, 高野勝弘\*<sup>1</sup>, 辰見 寿\*<sup>1</sup>, 谷 尚子\*<sup>1</sup>, 千葉勝由\*<sup>1</sup>, 中村恒彰\*<sup>1</sup>, 林 真, 松川清治\*<sup>1</sup>, 門馬純子, 渡辺理絵\*<sup>1</sup>: **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バリデーションー1次から3次バリデーションまでのまとめー**  
第23回日本毒科学学会学術年会 (1996.7)

\*<sup>1</sup> 日本化粧品工業連合会\*<sup>2</sup> 理研細ジーンバンク

宇佐見誠, 酒見和枝, 津田充宥, 大野泰雄: **培養ラット初期着床胚の発育に必要な血清胚栄養因子の N 末端アミノ酸配列分析による同定**  
第36回日本先天異常学会学術集会 (1996.7)

中島幹夫\*, 佐々木真敬\*, 小林洋四郎\*, 宇佐見誠, 大野泰雄: **ウサギ血清を用いたラット全胚培養系の検討**  
第36回日本先天異常学会学術集会 (1996.7)

\* 旭化成工業株式会社

Inoue, K., Koizumi, S. and Nakazawa, K.: **ATP-transmitted synaptic responses in cultured hippocampal neurons**  
International Congress Purine '96, Milan, Italy (1996.7)

Ueno, S., Nabekura\*, J., Akaike\*, N. and Inoue, K.: **Responses of ATP and Ach in the identified neurons of dorsal motor nucleus of the vagus**  
International Congress Purine '96, Milan, Italy (1996.7)

\* 九州大学医学部

Obama, T., Koizumi, S., Ohno, Y. and Inoue, K.: **Characterization of functional P2-purinoceptors in astrocytes from the rat hippocampus**  
International Congress Purine '96, Milan, Italy (1996.7)

Koizumi, S. and Inoue, K.: **Inhibition by ATP of Ca-wave in cultured rat hippocampal neurons**  
International Congress Purine '96, Milan, Italy (1996.7)

小野田文俊\*, 白鳥美和\*, 宮島敦子, 関 政幸\*, 榎本武美\*: **出芽酵母 RecQ ヘリカーゼの機能解析**  
第69回日本生化学会大会第19回日本分子生物学会年会合同年会 (1996.8)

\* 東北大学薬学部

Sluyter, F. and Fujimori, K.: **On the genetic relation between aggression and apomorphine-induced stereotypes in mice**  
2nd Meeting of European Neuroscience (1996.9)

Ozawa, S., Tang, Y-M.\*<sup>1</sup>, Yamazoe, Y.\*<sup>2</sup>, Kato, R.\*<sup>3</sup>, Lang, N. P.\*<sup>4</sup> and Kadlubar, F. F.\*<sup>1</sup>: **Polymorphisms in human liver and colon sulfotransferases (SULTs)**  
3rd International Sulfation Workshop (1996.9)

\*<sup>1</sup> National Center for Toxicological Research\*<sup>2</sup> Tohoku University\*<sup>3</sup> Keio University\*<sup>4</sup> Arkansas Cancer Research Center

Inoue, K.\*<sup>1</sup>, Itagaki, H.\*<sup>1</sup>, Ichikawa, H.\*<sup>1</sup>, Morikawa, Y.\*<sup>1</sup>, Nakazawa, K., Ohno, Y. and Kuroiwa, Y.\*<sup>2</sup>: **Evaluation of stinging-inducing chemicals using cultured neuronal cells: measurement of electrical signals and substance P release**  
2nd World Congress on Alternative and animal use in the Life Sciences, Yutorehito (1996.10)

\*<sup>1</sup> 資生堂\*<sup>2</sup> 昭和大学薬学部

Hagino, S.\*, Kinoshita, S.\*, Tani, N.\*, Nakamura, T.\*, Ono, N.\*, Konishi, K.\*, Iimura, H.\*, Kojima, H.\* and Ohno, Y.: **Inter-laboratory validation of alternative methods to eye irritation test for safety evaluation of cosmetic ingredients, 1) Evaluation of chorioallantoic membrane (CAM) tests**  
2nd World Congress on Alternative and animal use in the

Life Sciences, Yutorehito (1996, 10)

\* 日本化粧品工業連合会

Okamoto, Y.\*, Ohkoshi, K.\*, Kasai Y.\*, Ohuchi, J.\*, Kakishima, H.\*, Ogawa, T.\*, Tanaka, T.\*, Kojima, H.\*, Kaneko, T., Matsushima, H. and Ohno, Y.: **Inter-laboratory validation of alternative methods to eye irritation test for safety evaluation of cosmetic ingredients, 2) Evaluation of hemolysis tests**

2 nd World Congress on Alternative and animal use in the Life Sciences, Yutorehito (1996. 10)

\* 日本化粧品工業連合会

Hatao, M.\*, Takino, Y.\*, Ohnuma, M.\*, Kakishima, H.\*, Ogawa, T.\*, Kaneko, T., Momma, J., Kojima, H.\*, Chiba, K.\*, Yoshizawa, K.\* and Ohno, Y.: **Inter-laboratory validation of alternative methods to eye irritation test for safety evaluation of cosmetic ingredients, 3) Evaluation of hemoglobin denaturation tests**

2 nd World Congress on Alternative and animal use in the Life Sciences, Yutorehito (1996. 10)

\* 日本化粧品工業連合会

Kurishita, A.\*, Katoh, T.\*, Ohsawa, H.\*, Shibata, M.\*, Kuwahara, Y.\*, Kakishima, H.\*, Morito, Y.\*, Okamoto, Y.\*, Ohkoshi, K.\*, Mizutani, A.\*, Usami, M.\*, Nishifuji, M.\*, Sumida, Y.\* Ikeda, N.\*, Hayashi, N.\*, Katagiri, M.\*, Hirose, A., Kaneko, T., and Ohno, Y.: **Inter-laboratory validation of alternative methods to eye irritation test for safety evaluation of cosmetic ingredients, 4) Evaluation of Skin 2 ZK1100 and ZK1200 models**

2 nd World Congress on Alternative and animal use in the Life Sciences, Yutorehito (1996. 10)

\* 日本化粧品工業連合会

Ohuchi, J.\*, Kasai, Y.\*, Sakamoto, K.\*, Kawasaki, Y.\*, Ohnuma, M.\*, Kakishima, H.\*, Suzuki, K.\*, Kuwahara, H.\*, Imanishi, Y.\*, Tatsumi, H.\*, Kotani, A.\*, Inoue, K.\*, Okumura, H.\*, Arashima, M.\*, Kinoshita, S.\*, Tani, N.\*, Kojima, H.\*, Nakamura, T.\*, Suzuki, K.\*, Ishibashi, T.\*, Takahashi, H.\*, Kitano, Y.\* and Ohno, Y.: **Inter-laboratory validation of alternative methods to eye irritation test for safety evaluation of cosmetic ingredients, 5) Evaluation of MATREX**

2 nd World Congress on Alternative and animal use in the Life Sciences, Yutorehito (1996. 10)

\* 日本化粧品工業連合会

Uchiyama, T. \*<sup>1</sup>, Akiyama, J. \*<sup>1</sup>, Miyai, E. \*<sup>1</sup>, Ikeda, N. \*<sup>1</sup>, Sumida, Y. \*<sup>1</sup>, Chiba, K. \*<sup>1</sup>, Kawakami, K. \*<sup>1</sup>, Yamamoto, R. \*<sup>2</sup>, Torishima, H. \*<sup>2</sup>, Yanase, H. \*<sup>2</sup>, Miyajima, A., Sunouchi, M. and Ohno, Y.: **Inter-laboratory validation of alternative methods to eye irritation test for safety evaluation of cosmetic ingredients, 6) Evaluation of cytotoxicity test on CornePack**

2 nd World Congress on Alternative and animal use in the Life Sciences, Yutorehito (1996. 10)

\*<sup>1</sup> 日本化粧品工業連合会

\*<sup>2</sup> クラボウ

Itagaki, H. \*<sup>1</sup>, Kinoshita, S. \*<sup>1</sup>, Okamoto, Y. \*<sup>1</sup>, Kotani, M. \*<sup>1</sup>,

Usami, M. \*<sup>1</sup>, Kato, K. \*<sup>1</sup>, Ohno, T. \*<sup>2</sup>, Saijou, K. \*<sup>2</sup>, Kato, M. \*<sup>2</sup> and Ohno, Y.: **Inter-laboratory validation of alternative methods to eye irritation test for safety evaluation of cosmetic ingredients, 7) Evaluation of cytotoxicity tests on SIRC cells**

2 nd World Congress on Alternative and animal use in the Life Sciences, Yutorehito (1996. 10)

\*<sup>1</sup> 日本化粧品工業連合会

\*<sup>2</sup> 理研ジーンバンク

Chiba, K.\*, Makino, I.\*, Ohuchi, J.\*, Kasai, Y.\*, Uchiyama, T.\*, Miyai, E.\*, Akiyama, J.\*, Kojima, H.\*, Usami, M.\*, Katoh, K.\*, Ohosawa, H.\* and Ohno, Y.: **Inter-laboratory validation of alternative methods to eye irritation test for safety evaluation of cosmetic ingredients, 8) Evaluation of cytotoxicity tests on HeLa cells**

2 nd World Congress on Alternative and animal use in the Life Sciences, Yutorehito (1996. 10)

\* 日本化粧品工業連合会

Okumura, H.\*, Kotani, M.\*, Kojima, H.\*, Miyajima, A., Sunouchi, M. and Ohno, Y.: **Inter-laboratory validation of alternative methods to eye irritation test for safety evaluation of cosmetic ingredients, 9) Evaluation of cytotoxicity tests on CHL cells**

2 nd World Congress on Alternative and animal use in the Life Sciences, Yutorehito (1996. 10)

\* 日本化粧品工業連合会

Matsukawa, K. \*<sup>1</sup>, Masuda, K. \*<sup>1</sup>, Kakishima, H. \*<sup>1</sup>, Suzuki, K. \*<sup>1</sup>, Shima, Y. \*<sup>1</sup>, Matsushige, C. \*<sup>1</sup>, Imanishi, Y. \*<sup>1</sup>, Nakamura, T. \*<sup>1</sup>, Mizutani, A. \*<sup>1</sup>, Watanabe, R. \*<sup>1</sup>, Shingai, T. \*<sup>2</sup>, Kaneko, T., Hirose, A. and Ohno, Y.: **Inter-laboratory validation of alternative methods to eye irritation test for safety evaluation of cosmetic ingredients, 10) Evaluation of EYTEX**

2 nd World Congress on Alternative and animal use in the Life Sciences, Yutorehito (1996. 10)

\*<sup>1</sup> 日本化粧品工業連合会

\*<sup>2</sup> インビトロインターナショナル

Kaneko, T., Momma, J., Kumakawa, J., Inoue, T., Suzuki, T. \*<sup>1</sup>, Kakishima, H. \*<sup>2</sup>, Nakamura, T. \*<sup>2</sup>, Tatsumi, H. \*<sup>2</sup>, Hagino, S. \*<sup>2</sup> and Ohno, Y.: **Inter-laboratory validation of alternative methods to eye irritation test for safety evaluation of cosmetic ingredients, 11) Results of Draize eye irritation test and implications of their validation**

2 nd World Congress on Alternative and animal use in the Life Sciences, Yutorehito (1996. 10)

\*<sup>1</sup> 日本エスエルシー

\*<sup>2</sup> 日本化粧品工業連合会

Ohno, Y., Inoue, T., Kaneko, T., Morikawa, Y. \*<sup>1</sup>, Yoshida, T. \*<sup>2</sup>, Fujii, A. \*<sup>1</sup>, Masuda, M. \*<sup>1</sup>, Ohno, T. \*<sup>3</sup>, Akiyama, J. \*<sup>1</sup>, Ikeda, N. \*<sup>1</sup>, Imanishi, Y. \*<sup>1</sup>, Itagaki, H. \*<sup>1</sup>, Usami, M. \*<sup>1</sup>, Ohkoshi, K. \*<sup>1</sup>, Okumura, H. \*<sup>1</sup>, Kakishima, H. \*<sup>1</sup>, Kasai, Y. \*<sup>1</sup>, Kurishita, A. \*<sup>1</sup>, Kojima, H. \*<sup>1</sup>, Saijo, K. \*<sup>3</sup>, Sakamoto, K., Sunouchi, M., Takano, K. \*<sup>1</sup>, Tatsumi, H. \*<sup>1</sup>, Tani, N. \*<sup>1</sup>, Chiba, K. \*<sup>1</sup>, Makamura, T. \*<sup>1</sup>, Hayashi, M., Matsukawa, K. \*<sup>1</sup>, Momma, J. and Watanabe, R. \*<sup>1</sup>: **Overview of the inter-laboratory validation of alternative methods to eye irritation test for safety**

**evaluation of cosmetic ingredients**

2nd World Congress on Alternative and animal use in the Life Sciences, Yutorehito (1996. 10)

\*1 日本化粧品工業連合会

\*2 昭和大学薬学部

\*3 理研ジーンバンク

Ikeda, T.\*1, Ishigami, M.\*1, Komai, T.\*1, Yamazoe, Y.\*2 and Ohno, Y.: **Inhibition of CYP 3A by hydroxymethylglutaryl-CoA(HMG-CoA) reductase inhibitors**  
North American ISSX Meeting (1996. 10)

\*1 三共製薬

\*2 東北大学薬学部

岩崎一秀\*1, 白神歳文\*1, 成富洋一\*1, 戸塚善三郎\*1, 秦武久\*1, 長田清\*2, 山添康\*2, 大野泰雄: **ヒト及び動物より精製したスルホトランスフェラーゼの特徴**  
第11回日本薬物動態学会 (1996. 10)

\*1 藤沢薬品

\*2 東北大学薬学部

大野泰雄: **「薬物動態試験ガイドライン」の役割と改訂に向けての今後の予定**  
第11回日本薬物動態学会フォーラム (1996. 10)

宮島敦子, 関政幸\*, 大野泰雄, 榎本武美\*: **ブルーム症候群原因遺伝子の出芽酵母相同遺伝子 (SGS1/TPS1) の機能の解析**  
第55回日本癌学会総会 (1996. 10)

\* 東北大学薬学部

Okumura, H.\*1, \*2, Kotani, M.\*1, \*3, Kojima, H.\*1, \*4, Itagaki, H.\*1, \*5, Miyajima, A., Sunouchi, M. and Ohno, Y.: **INTERLABORATORY VALIDATION OF ALTERNATIVE METHODS TO THE EYE IRRITATION TEST FOR SAFETY EVALUATION OF COSMETIC INGREDIENTS. IX. EVALUATION OF CYTOTOXICITY TEST IN CHL CELLS**  
Second World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (1996. 10)

\*1 日本化粧品工業連合会

\*2 ノエビア

\*3 サンスター

\*4 日本メナード化粧品

\*5 資生堂

Uchiyama, T.\*1, \*2, Akiyama, J.\*1, \*2, Miyai, E.\*1, \*2, Ikeda, N.\*1, \*3, Sumida, Y.\*1, \*3, Chiba, K.\*1, \*4, Kawakami, K.\*1, \*4, Yamamoto, R.\*1, \*5, Torishima, H.\*1, \*5, Yanase, H.\*1, \*5, Miyajima, A., Sunouchi, M. and Ohno, Y.: **INTERLABORATORY VALIDATION OF ALTERNATIVE METHODS TO THE EYE IRRITATION TEST FOR SAFETY EVALUATION OF COSMETIC INGREDIENTS. VII. EVALUATION OF CYTOTOXICITY TEST IN CORNEPACK**  
Second World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (1996. 10)

\*1 日本化粧品工業連合会

\*2 加美乃素

\*3 クラブコスメテックス

\*4 ヤクルト本社

\*5 倉敷紡績

Ohno, Y., Inoue, T., Kaneko, T., Morikawa, Y.\*1, Yoshida, T.\*2, Fujii, A.\*1, Masuda, M.\*1, Ohno, T.\*3, Akiyama, J.\*1, Ikeda, N.\*1, Imanishi, Y.\*1, Itagaki, H.\*1, Usami, M.\*1, Ohkoshi, K.\*1, Okumura, H.\*1, Kakishima, H.\*1, Kasai, Y.\*1, Kurishita, A.\*1, Kojima, H.\*1, Saijo, K.\*3, Sakamoto, K.\*1, Sunouchi, M., Takano, K.\*1, Tatsumi, H.\*1, Tani, N.\*1, Chiba, K.\*1, Nakamura, T.\*1, Hayashi, M., Matsukawa, K.\*1, Momma, J. and Watanabe, R.\*1: **Overview of the interlaboratory validation of alternative methods to the eye irritation test for safety evaluation of cosmetic ingredients**  
Second World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (1996. 10)

\*1 日本化粧品工業会

\*2 昭和大

\*3 理研

Sluyter, F., 藤森観之助: **攻撃行動に関する近交系マウスを利用した神経精神薬理学的研究**  
日本精神薬理学会第26回年会 (1996. 10)

小泉修一, 井上和秀: **海馬初代培養神経細胞のCa<sup>2+</sup>-oscillationに対するATPの抑制作用**  
第39回神経化学学会大会 (1996. 10)

小泉修一, 井上和秀: **神経系細胞およびグリア細胞におけるグルタミン酸測定法の応用**  
第1回分子モニタリングシンポジウム (1996. 10)

Koizumi, S. and Inoue, K.: **Functional coupling of capacitative calcium entry and secretion in PC12 cells.**  
26th Annual Meeting of Society for Neuroscience, Washington D.C., USA (1996. 11)

篠内桃子, 大野泰雄: **肝細胞を用いた肝障害性の検討**  
第10回日本動物実験代替法学会 (1996. 12)

萩野滋延\*, 木下成美\*, 谷尚子\*, 中村恒彰\*, 小野菜穂子\*, 小西貴美代\*, 飯村浩\*, 小島肇夫\*, 大野泰雄: **化粧品原料の安全性評価のための眼粘膜刺激性試験代替法のバリデーション1)有精鶏卵の漿尿膜(CAM)を用いる試験**  
第10回日本動物実験代替法学会 (1996. 12)

\* 日本化粧品工業連合会

岡本裕子\*, 大越健自\*, 笠井裕\*, 大内淳子\*, 柿島博\*, 小川朋康\*, 田中亨\*, 小島肇夫\*, 金子豊蔵, 松島裕子, 大野泰雄: **化粧品原料の安全性評価のための眼粘膜刺激性試験代替法のバリデーション2)赤血球試験法-赤血球溶血試験**  
第10回日本動物実験代替法学会 (1996. 12)

\* 日本化粧品工業連合会

畑尾正人\*, 坂本一民\*, 大沼美由紀\*, 川崎由明\*, 柿島博\*, 小川朋康\*, 小島肇夫\*, 千葉勝由\*, 吉澤和彦\*, 金子豊蔵, 門馬純子, 大野泰雄: **化粧品原料の安全性評価のための眼粘膜刺激性試験代替法のバリデーション3)ヘモグロビン変性試験**  
第10回日本動物実験代替法学会 (1996. 12)

\* 日本化粧品工業連合会

栗下昭弘\*1, 柴田道男\*1, 桑原祐史\*1, 柿島博\*1, 森戸由

美子<sup>\*1</sup>, 岡本裕子<sup>\*1</sup>, 大越健自<sup>\*1</sup>, 中村恒彰<sup>\*1</sup>, 水谷秋子<sup>\*1</sup>, 宇佐美雅仁<sup>\*1</sup>, 西藤美紀<sup>\*1</sup>, 角田依子<sup>\*1</sup>, 池田紀和<sup>\*1</sup>, 林直木<sup>\*2</sup>, 片岡 稔<sup>\*2</sup>, 広瀬明彦, 金子豊蔵, 大野泰雄:化粧品原料の安全性評価のための眼粘膜刺激性試験代替法のバリデーション4)SKIN 2 エ ZK1100および ZK1200を用いる試験

第10回日本動物実験代替法学会 (1996.12)

<sup>\*1</sup> 日本化粧品工業連合会

<sup>\*2</sup> オリエンタル酵母

大内淳子<sup>\*1</sup>, 笠井 裕<sup>\*1</sup>, 坂本一民<sup>\*1</sup>, 大沼美由紀<sup>\*1</sup>, 北村美里<sup>\*1</sup>, 柿島 博<sup>\*1</sup>, 鈴木恵子<sup>\*1</sup>, 桑原裕史<sup>\*1</sup>, 今西 豊<sup>\*1</sup>, 辰見 寿<sup>\*1</sup>, 小谷麻由美<sup>\*1</sup>, 井上かおり<sup>\*1</sup>, 奥村秀信<sup>\*1</sup>, 荒島雅樹<sup>\*1</sup>, 木下成美<sup>\*1</sup>, 谷 尚子<sup>\*1</sup>, 小島肇夫<sup>\*1</sup>, 中村恒彰, 鈴木幸一<sup>\*1</sup>, 石橋卓也<sup>\*2</sup>, 高橋秀和<sup>\*2</sup>, 北野友紀<sup>\*2</sup>, 大野泰雄:化粧品原料の安全性評価のための眼粘膜刺激性試験代替法のバリデーション5)MATREX エによる刺激試験

第10回日本動物実験代替法学会 (1996.12)

<sup>\*1</sup> 日本化粧品工業連合会

<sup>\*2</sup> 東洋紡績

内山貴司<sup>\*1</sup>, 秋山純一<sup>\*1</sup>, 宮井恵里子<sup>\*1</sup>, 池田紀和<sup>\*1</sup>, 角田依子<sup>\*1</sup>, 千葉勝由<sup>\*1</sup>, 川上幸治<sup>\*1</sup>, 山本良平<sup>\*2</sup>, 鳥島 久<sup>\*2</sup>, 柳瀬 浩<sup>\*2</sup>, 宮島敦子, 篠内桃子, 大野泰雄:化粧品原料の安全性評価のための眼粘膜刺激性試験代替法のバリデーション6)正常ウサギ角膜上皮細胞 (CornePack イ)を用いる試験

第10回日本動物実験代替法学会 (1996.12)

<sup>\*1</sup> 日本化粧品工業連合会

<sup>\*2</sup> クラボウ

谷 尚子<sup>\*1</sup>, 木下成美<sup>\*1</sup>, 岡本裕子<sup>\*1</sup>, 小谷麻由美<sup>\*1</sup>, 板垣 宏<sup>\*1</sup>, 宇佐美雅仁<sup>\*1</sup>, 加藤久美子<sup>\*1</sup>, 大野忠夫<sup>\*2</sup>, 西條 薫<sup>\*2</sup>, 加藤麻矢子<sup>\*2</sup>, 大野泰雄:化粧品原料の安全性評価のための眼粘膜刺激性試験代替法のバリデーション7)ウサギ角膜由来細胞 (SIRC 細胞)を用いる方法

第10回日本動物実験代替法学会 (1996.12)

<sup>\*1</sup> 日本化粧品工業連合会

<sup>\*2</sup> 理化学研究所・細胞開発銀行

千葉勝由<sup>\*</sup>, 牧野育代<sup>\*</sup>, 大内淳子<sup>\*</sup>, 笠井 裕<sup>\*</sup>, 内山貴司<sup>\*</sup>, 宮井恵里子<sup>\*</sup>, 秋山純一<sup>\*</sup>, 小島肇夫<sup>\*</sup>, 宇佐美雅仁<sup>\*</sup>, 加藤久美子<sup>\*</sup>, 大澤宏行<sup>\*</sup>, 大野泰雄:化粧品原料の安全性評価のための眼粘膜刺激性試験代替法のバリデーション8)HeLa 細胞を用いる試験

第10回日本動物実験代替法学会 (1996.12)

<sup>\*</sup> 日本化粧品工業連合会

奥村秀信<sup>\*</sup>, 小谷麻由美<sup>\*</sup>, 小島肇夫<sup>\*</sup>, 篠内桃子, 宮島敦子, 大野泰雄:化粧品原料の安全性評価のための眼粘膜刺激性試験代替法のバリデーション9)CHL 細胞を用いる試験

第10回日本動物実験代替法学会 (1996.12)

<sup>\*</sup> 日本化粧品工業連合会

松川清治<sup>\*1</sup>, 増田邦夫<sup>\*1</sup>, 柿島 博<sup>\*1</sup>, 鈴木恵子<sup>\*1</sup>, 小川朋康<sup>\*1</sup>, 中川康世<sup>\*1</sup>, 松重知保<sup>\*1</sup>, 今西豊<sup>\*1</sup>, 中村恒彰<sup>\*1</sup>, 水谷秋子<sup>\*1</sup>, 渡辺理絵<sup>\*1</sup>, 新海輝夫<sup>\*2</sup>, 金子豊蔵, 広瀬明彦, 大野泰雄:化粧品原料の安全性評価のための眼粘膜刺激性試験代替法のバリデーション10)EYTEX イを用いる試験

第10回日本動物実験代替法学会 (1996.12)

<sup>\*1</sup>日本化粧品工業連合会

<sup>\*2</sup>In vitro International Co.

金子豊蔵, 門馬純子, 熊川順子, 井上 達, 鈴木登志郎<sup>\*1</sup>, 柿島 博<sup>\*2</sup>, 中村恒彰<sup>\*2</sup>, 辰見 寿<sup>\*2</sup>, 萩野滋延<sup>\*2</sup>, 大野泰雄:化粧品原料の安全性評価のための眼粘膜刺激性試験代替法のバリデーション11)in vivo 試験結果

第10回日本動物実験代替法学会 (1996.12)

<sup>\*1</sup> 日本エスエルシー

<sup>\*2</sup> 日本化粧品工業連合会

酒見和枝, 宇佐見誠, 津田充寿, 大野泰雄:ラット全胚培養における補体成分 C3 の胚栄養因子活性に関する研究

日本動物実験代替法学会第10回大会 (1996.12)

大野泰雄:薬の安全性と薬物相互作用, 医薬品の開発における薬物相互作用のとらえ方, 要望と将来動向

第32回ヒューマンサイエンス基礎研究セミナー (1997.1)

井上和秀, 小泉修一, 中沢憲一, 上野伸哉:Zn<sup>2+</sup>によるATP 受容体誘発反応の両方向性制御

第70回日本薬理学会年会シンポジウム (1997.3)

上野伸哉, 小泉修一, 井上和秀:P2X2, P2X3 サブユニットの電気生理的性質, および Ca に対する透過性の差異

第70回日本薬理学会年会 (1997.3)

小泉修一, 畝山寿之, 池田 真, 上野伸哉, 井上和秀:ラット PC12細胞における ATP 応答のイミプラミンによる抑制

第70回日本薬理学会年会 (1997.3)

畝山寿之, 前田和俊<sup>\*1</sup>, 堂本英樹<sup>\*1</sup>, 吉元良太<sup>\*1</sup>, 井上和秀, 赤池紀扶<sup>\*2</sup>:DHP 型 Ca 拮抗薬シルニジピンのラット交換神経節細胞カルシウムチャンネルに対する阻害作用について

第70回日本薬理学会年会 (1997.3)

<sup>\*1</sup> 味の素(株)中央研究所

<sup>\*2</sup> 九州大学医学部

内田裕久, 畝山寿之, 小泉修一, 上野伸哉, 吉元良太<sup>\*</sup>, 井上和秀:NGF 処理 PC12細胞におけるカテコラミン分泌および Ca 流入に対する DHP 型 Ca 拮抗薬シルニジピンの抑制効果

第70回日本薬理学会年会 (1997.3)

<sup>\*</sup> 味の素(株)中央研究所

木内猛仁, 山本雅幸, 小浜とも子, 大幡久之<sup>\*</sup>, 百瀬和享<sup>\*</sup>, 井上和秀, 早川堯夫, 川西 徹:ラット培養海馬細胞で観察されたカルシウムウェーブの解析

第70回日本薬理学会年会 (1997.3)

<sup>\*</sup> 昭和大学薬学部

山本雅幸, 木内猛仁, 横田橋江, 大幡久之<sup>\*</sup>, 百瀬和享<sup>\*</sup>, 井上和秀, 早川堯夫, 川西 徹:ラット培養海馬細胞の高濃度グルタミン酸の短期間処置による細胞内カルシウムと pH 変化

第70回日本薬理学会年会 (1997.3)

<sup>\*</sup> 昭和大学薬学部

中澤憲一, 大野泰雄: P2X受容体サブクラス間の神経アミンおよび2価イオンに対する感受性の差異  
第66回日本薬理学会総会 (1997.3)

劉 敏, 中澤憲一, 井上和秀, 大野泰雄: ランタンおよび他の三価イオンによるATP受容体チャネルの抑制  
日本薬学会第117年会 (1997.3)

紅林秀雄, 大野泰雄, 高橋 惇, 吉田賢二\*, 二宮真一\*: Tris (2-chloroethyl) phosphateのラット肝ミクロソームおよび上清による代謝  
日本薬学会第117年会 (1997.3)

\* 第一化学薬品(株)東海研究所

関 政幸\*, 王 文成\*, 小平浩代\*, 関 剛彦\*, 小野田文俊\*, 白鳥美和\*, 川辺洋一\*, 益子 高\*, 榎本武美\*, 宮島敦子: 哺乳類RecQヘリカゼファミリーの解析  
日本薬学会第117年会 (1997.3)

\* 東北大学薬学部

Miyajima, A., Sunouchi, M., Ogawa, Y., Baba, T. \*<sup>1</sup>, Iwasaki, K. \*<sup>2</sup>, Inoue, T. and Ohno, Y.: INDUCTION OF HEPATIC-DRUG METABOLIZING ENZYMES BY DIPHENYLETHER HERBICIDES IN DOGS  
1997 SOT Annual Meeting (1997.3)

\*<sup>1</sup> 塩野義製薬

\*<sup>2</sup> 藤沢薬品工業

Sunouchi, M., Miyajima, A., Zhang, B., Kurebayashi, H. and Ohno, Y.: COMPARISON OF EFFECTS OF UREA PESTICIDES AND THE METABOLITES IN RAT FRESHLY ISOLATED AND CULTURED HEPATOCYTES  
1997 SOT Annual Meeting (1997.3)

Ozawa, S., Lang, N.P. \*<sup>1</sup> and Kadlubar, F. F.\*<sup>2</sup>: Genetic polymorphisms in human liver and colon sulfotransferases (SULTs) involved in the bioactivation of carcinogenic N-hydroxy aromatic and heterocyclic amines  
Annual Meeting of American Association for Cancer Research (1997.4)

\*<sup>1</sup> Arkansas Cancer Research Center

\*<sup>2</sup> National Center for Toxicological Research

Ozawa, S., McDaniel, L. P. \*<sup>1</sup>, Tang, Y. -M. \*<sup>1</sup>, Schoket, B. \*<sup>2</sup>, Vincze, I. \*<sup>2</sup>, Kostic, S. \*<sup>3</sup> and Kadlubar, F. F. \*<sup>1</sup>: CYP2C9 and GSTP1 genetic polymorphisms in patients with smoking-related lung cancer  
Annual Meeting of American Association for Cancer Research (1997.4)

\*<sup>1</sup> National Center for Toxicological Research

\*<sup>2</sup> Natl. Inst. of Public Health, Budapest

\*<sup>3</sup> Natl. Inst. of Pulmonology, Budapest

古川文夫, 阿部 寛\*, 高橋道人, 須田耕一\*: 脾臓に対するステロイドホルモンの影響に関する定量形態学的解析  
第27回脾臓学会 (1996.4)

\* 順天堂大学

西川秋佳, 古川文夫, 高橋道人: 脂質過酸化生成物4-hydroxynonenalのBig Blueマウスにおける急性毒性  
第85回日本病理学会 (1996.4)

三森国敏: ラットの薬物誘発性神経筋接合部病変  
第5回獣医病理学会 スライドセミナー (1996.4)

三森国敏, 安原加壽雄: 化学物質による精巢毒性とアポトーシス  
第121回日本獣医学会 シンポジウム (1996.4)

三森国敏, 今沢孝喜, 北嶋 聡, 小野寺博志, 日高弘義\*: 小胞体Ca<sup>2+</sup>ATPase阻害剤2,5-di (tert-butyl)-1,4-hydroquinoneのラット運動終板に対する神経毒性  
第37回日本神経病理学会総会 (1996.5)

\* 名古屋大学医学部

Ikarashi, Y., Tsuchiya, T., Nakamura, A., Toyoda, K., Takahashi, M., Doi, H. \*, Kobayashi, E. \*, Yoneyama, T. \* and Hamanaka, H. \*: Tissue reaction and sensitization of chromium, titanium and zirconium alloys.  
Fifth World Biomaterials Congress Canada (1996.5)

\* 東京医科歯科大学

高橋道人, 増田 裕\*: セッション4, がん原性試験; 今後の問題点  
第5回日本毒科学会サテライトシンポジウム (1996.7)

\* 三共・安全研

三森国敏, 西川秋佳: セッション4, これからの発癌性試験; トランスジェニック動物による発癌性評価  
第5回日本毒科学会サテライトシンポジウム (1996.7)

小野寺博志, 三森国敏, 竹川 潔, 安原加壽雄, 渡辺知幸\*, 高橋道人: 細胞間結合蛋白シグナル伝達物質コネクシン32を用いたbenzimidazole系化合物の肝毒性  
第23回日本毒科学会学術年会 (1996.7)

\* 住友化学・生物環境科学研

高田幸一, 内藤克司, 内田雄幸, 梅村隆志, 豊田和弘, 畝山智香子, 正田俊之, 高橋道人: アスコルビン酸ナトリウムと亜硝酸ナトリウムの併用毒性試験  
第23回日本毒科学会学術年会 (1996.7)

古川文夫, 西川秋佳, 今沢孝喜, 李 仁善, 笠原健一郎, 池崎信一郎, 田中丸善洋, 金 亨津, 高橋道人: 副腎皮質ホルモン長期投与によるラット脾ラ氏島への影響  
第23回日本毒科学会学術年会 (1996.7)

西川秋佳, 古川文夫, 今沢孝喜, 池崎信一郎, 田中丸善洋, 李 仁善, 金 亨津, 笠原健一郎, 高橋道人: N-Nitrosopyrrolidine誘発ラット cholangiofibrosis に対するMESNAの抑制効果  
第23回日本毒科学会学術年会 (1996.7)

竹川 潔, 三森国敏, 小野寺博志, 高橋正一\*, 下 武男, 安原加壽雄, 高橋道人: 抗甲状腺物質投与ラットにおける下垂体TSH細胞肥大の推移に関する形態計測学的検討  
第23回日本毒科学会学術年会 (1996.7)

\* 佐々木研究所

安原加壽雄, 三森国敏, 竹川 潔, 小野寺博志, 山崎千尋\*, 星野二郎\*, 高橋道人: モノクロタリン誘発マウス肺毒性病変に対するレンチン化SODの抑制作用  
第23回日本毒科学会学術年会 (1996.7)



## \* 生化学工業(株)

古川文夫, 西川秋佳, 池崎信一郎, 今沢孝喜, 田中丸善洋, 金 亨津, 李 仁善, 高橋道人: ハムスター BOP 誘発膀胱癌に対する nicotinamide の抑制効果  
第3回がん予防研究会 (1996.8)

西川秋佳, 李 仁善, 畝山智香子, 古川文夫, 金 亨津, 田中丸善洋, 池崎信一郎, 今沢孝喜, 高橋道人: ハムスターにおける phenethyl isothiocyanate の化学発がん予防機序  
第3回がん予防研究会 (1996.8)

安原加壽雄, 三森国敏, 竹川 潔, 畝山智香子, 小野寺博志, 高橋道人, 松井 元: アドリアマイシン高用量単回投与によるラット精巢毒性病変の病理発生とその予後  
第122回日本獣医学会 (1996.8)

西川秋佳, 古川文夫, 高橋道人: *IacI* 遺伝子導入マウスによる発がんリスク評価法の検討  
第11回発癌病理研究会 (1996.8)

豊田和弘, 正田俊之, 畝山智香子, 高田幸一, 高橋道人: BrdU 標識率と TUNEL 標識率を指標とした免疫系組織の細胞動態評価法の検討  
第3回免疫毒性研究会 (1996.9)

田中丸善洋, 西川秋佳, 古川文夫, 池崎信一郎, 今沢孝喜, 金 亨津, 李 仁善, 高橋道人: ラット MNNG 誘発胃癌に対する Oltipraz の抑制効果  
第55回日本癌学会総会 (1996.10)

李 仁善, 西川秋佳, 畝山智香子, 古川文夫, 金 亨津, 田中丸善洋, 池崎信一郎, 今沢孝喜, 高橋道人: ハムスターの生体異物代謝酵素に対する phenethyl isothiocyanate の影響  
第55回日本癌学会総会 (1996.10)

古川文夫, 西川秋佳, 池崎信一郎, 今沢孝喜, 田中丸善洋, 金 亨津, 李 仁善, 高橋道人: ラット腎二段階発癌モデルにおける魚粉と亜硝酸の同時投与による影響  
第55回日本癌学会総会 (1996.10)

小出彰宏<sup>\*1</sup>, 森 幸雄<sup>\*1</sup>, 古川文夫, 西川秋佳, 高橋道人, 小西陽一<sup>\*2</sup>: 喫煙による実験膀胱癌発生の抑制機構  
第55回日本癌学会総会 (1996.10)

<sup>\*1</sup> 岐阜薬大  
<sup>\*2</sup> 奈良医大

西川秋佳, 鈴木孝昌, 古川文夫, 伊藤俊明, 林 真, 栗原正明, 宮田直樹, 祖父尼俊雄, 高橋道人: Big Blue マウスにおける脂質過酸化生成物 4-hydroxynonenal の変異原性および細胞増殖活性の検索  
第55回日本癌学会総会 (1996.10)

今沢孝喜, 西川秋佳, 古川文夫, 豊田和弘, 田中丸善洋, 李 仁善, 高橋道人: 4-Hydroxyaminoquinoline 1-oxide 投与ラット膀胱における Apoptosis と細胞増殖活性  
第55回日本癌学会総会 (1996.10)

正田俊之, 豊田和弘, 畝山智香子, 高田幸一, 高橋道人:

流動パラフィンの F344ラットにおける慢性毒性・癌原性試験

第55回日本癌学会総会 (1996.10)

高田幸一, 梅村隆志, 黒川雄二, 豊田和弘, 畝山智香子, 正田俊之, 高橋道人: Naphthol-AS の F344ラットにおける癌原性試験  
第55回日本癌学会総会 (1996.10)

豊田和弘, 川西 徹, 正田俊之, 畝山智香子, 高田幸一, 高橋道人: N-nitroso-diethylamine 誘発ラット食道発癌におけるエタノールの発癌増強機構についての検討  
第55回日本癌学会総会 (1996.10)

三森国敏, 山本 慧<sup>\*1</sup>, 児玉幸夫, 若菜茂晴<sup>\*2</sup>, 安原加壽雄, 野村達次<sup>\*2</sup>, 林 裕造<sup>\*3</sup>: Vinyl carbamate の短期発癌試験におけるヒトプロト型 c-Ha-ras トランスジェニックマウスの感受性および誘発癌の遺伝子解析  
第55回日本癌学会総会 (1996.10)

<sup>\*1</sup> 慶応大学医学部  
<sup>\*2</sup> 実中研  
<sup>\*3</sup> 北里大学薬学部

小野寺博志, 三森国敏, 竹川 潔, 安原加壽雄, 畝山智香子, 高橋道人: 動物用医薬品 fenbendazole と febantel のラット肝に対する肝 P450アインザイムの誘導と肝プロモーション作用  
第55回日本癌学会総会 (1996.10)

安原加壽雄, 三森国敏, 竹川 潔, 森 郁生<sup>\*1</sup>, 小野寺博志, 野々山孝<sup>\*1</sup>, 高橋道人, 野村達次<sup>\*2</sup>, 林 裕造<sup>\*3</sup>: c-Ha-ras トランスジェニックマウスの MNUR 誘発肺病変に対する urethane の修飾作用  
第55回日本癌学会総会 (1996.10)

<sup>\*1</sup> 武田薬品(株)・薬安研  
<sup>\*2</sup> 実中研  
<sup>\*3</sup> 北里大学薬学部

竹川 潔, 三森国敏, 小野寺博志, 下 武男, 安原加壽雄, 高橋道人: 抗甲状腺物質のラット肝及び肺に対する腫瘍プロモーション作用  
第55回日本癌学会総会 (1996.10)

福島昭治<sup>\*1</sup>, 高橋道人, 津田洋幸<sup>\*2</sup>, 若林敬二<sup>\*2</sup>, 長谷川良平<sup>\*3</sup>, 中江 大<sup>\*4</sup>, 増井恒夫<sup>\*5</sup>, 根元信雄<sup>\*6</sup>, 佐藤茂秋<sup>\*7</sup>: MeIQx の低濃度および高濃度における肝発がんリスク  
第55回日本癌学会総会 (1996.10)

<sup>\*1</sup> 大阪市大医学部  
<sup>\*2</sup> 国立がんセ・研  
<sup>\*3</sup> 名市大医学部  
<sup>\*4</sup> 奈良医大  
<sup>\*5</sup> 愛知がんセ・研  
<sup>\*6</sup> 癌研・研  
<sup>\*7</sup> 神戸大医学部

矢野善久<sup>\*</sup>, 高田信康<sup>\*</sup>, 堀 高明<sup>\*</sup>, 鰐淵英樹<sup>\*</sup>, 大谷周造<sup>\*</sup>, 西川秋佳, 福島昭治<sup>\*</sup>: 水浸拘束ストレスによるラット腺胃における上皮細胞増殖の亢進と early-response gene の発現  
第55回日本癌学会総会 (1996.10)

<sup>\*</sup> 大阪市大医学部

Lee, I. S., Nishikawa, A., Furukawa, F., Uneyama, C., Kim H.-C., Imazawa, T., Kasahara, K. and Takahashi, M. : **Effects of phenethyl isothiocyanate on xenobiotic metabolizing enzymes and cell kinetics in hamsters treated with *N*-Nitrosobis(2-oxopropyl)amine.**

The First International Conference on Gastroenterological Carcinogenesis (1996.10)

Furukawa, F., Nishikawa, A., Imazawa, T., Lee, I.-S., Kasahara K. and Takahashi, M. : **Inhibitory effects of nicotinamide on BOP-initiated pancreatic carcinogenesis in hamsters.**

The First International Conference on Gastroenterological Carcinogenesis (1996.10)

Nishikawa, A., Furukawa, F., Lee, I.-S., Uneyama, C., Imazawa, T., Tanakamaru, Z., Kasahara, K. and Takahashi, M. : **Inhibitory effects of oltipraz on glandular stomach carcinogenesis in rats treated with *N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine.**

The First International Conference on Gastroenterological Carcinogenesis (1996.10)

Nishikawa, A., Furukawa, F., Lee, I.-S., kasahara, K., Suzuki, T., Hayashi, M., Sofuni T. and Takahashi, M. : **Assessment of carcinogenic risk using *lacI* transgenic mice.**

10th International Conference on Carcinogenesis and Risk Assessment (1996.12)

Mori\*, Y., Koide\*, A., Nishikawa, A., Furukawa F. and Takahashi, M. : **Mechanism of preventive effect of cigarette smoke (CS) on experimental pancreas carcinogenicity.** 5th International Conference on Mechanisms of Antimutagenesis and Anticarcinogenesis (1996.12)

\* 岐阜薬大

田中丸善洋\*, 森 郁生\*, 西川秋佳, 古川文夫, 金 亨津, 池崎信一郎, 野々山孝\*, 高橋道人 : **F344ラットの大腸粘膜にみられた aberrant crypt foci の性状—MeIQx 誘発例と自然発生例の比較—**

第13回日本毒性病理学会 (1997.1)

\* 武田薬品(株)薬安研

豊田和弘, 正田俊之, 畝山智香子, 高田幸一, 高橋道人 : **Stevioside の癌原性試験で認められた所見に対する毒性学的評価**

第13回日本毒性病理学会 (1997.1)

高田幸一, 豊田和弘, 畝山智香子, 正田俊之, 高橋道人 : **防炎加工剤 Bis (2,3-dibromopropyl) phosphate のラットによる短期毒性検索について**

第13回日本毒性病理学会 (1997.1)

古川文夫, 西川秋佳, 李 仁善, 今沢孝喜, 笠原健一郎, 北浦敬介\*, 泉 啓介\*, 高橋道人 : **LEC ラットにおける脂質過酸化生成物と細胞増殖活性の経時的観察**

第13回日本毒性病理学会 (1997.1)

\* 徳島大学医学部

李 仁善, 西川秋佳, 古川文夫, 畝山智香子, 笠原健一郎, 田中卓二\*, 高橋道人 : **MNNG 投与ラットの胃粘膜上皮細**

**胞動態および肝代謝酵素系に及ぼす DFMO の影響**

第13回日本毒性病理学会 (1997.1)

\* 岐阜大学医学部

笠原健一郎, 古川文夫, 西川秋佳, 田中丸善洋, 金 亨津, 李 仁善, 池崎信一郎, 高橋道人 : **ラットの主要臓器におけるアミノ酸加熱分解産物 MeIQx の16週間混餌投与の影響**

第13回日本毒性病理学会 (1997.1)

安原加壽雄, 三森国敏, 森 郁生\*, 竹川 潔, 小野寺博志, 野々山孝\*, 高橋道人, 林 裕造\*: **MNUR 誘発ハムスター肺増殖性病変に対する高用量ビタミンAの修飾作用**

第13回日本毒性病理学会 (1997.1)

\*1 武田薬品(株)薬安研

\*2 北里大学薬学部

岡宮英明\*, 泉澤信行\*, 三森国敏, 小野寺博志, 安原加壽雄, 高橋道人 : **Piperonyl butoxide のラット肝発癌メカニズムに関する研究Ⅲ. DEN 投与ラットにおけるプロモーション作用の検討**

第13回日本毒性病理学会 (1997.1)

\*1 山之内製薬(株)創薬安全研

正田俊之, 豊田和弘, 畝山智香子, 松井 元\*, 高田幸一, 安原加壽雄, 三森国敏, 高橋道人 : **nitrofurazone のラットにおける精巢毒性の検討**

第13回日本毒性病理学会 (1997.1)

\* 化血研

林 新茂\*, 三森国敏, 小野寺博志, 安原加壽雄, 山本晋史\*, 陳 天新\*, 森 郁生\*, 野々山孝\*, 福島昭治\*, 高橋道人 : **DHPN 誘発ラット甲状腺濾胞上皮腫瘍における p53, H-ras, K-ras 遺伝子変異および遺伝子不安定性**

第13回日本毒性病理学会 (1997.1)

\*1 武田薬品(株)分子薬理研

\*2 大阪市大医学部

\*3 武田薬品(株)薬安研

小野寺博志, 三森国敏, 竹川 潔, 武田眞記夫\*, 渡辺知幸\*, 安原加壽雄, 高橋道人 : **非変異原性肝腫瘍誘発物質の評価法に関する研究**

第13回日本毒性病理学会 (1997.1)

\*1 残農研

\*2 住友化学学生物環境研

竹川 潔, 三森国敏, 安原加壽雄, 小野寺博志, 高橋道人, 野村達次\* : **ヒト型 c-Ha-ras 導入トランスジェニックマウスにおける nitrofurazone 誘発毒性病変の形態学的特徴**

第13回日本毒性病理学会 (1997.1)

\* 実中研

今沢孝喜, 三森国敏, 北嶋 聡, 小野寺博志, 西川秋佳, 日高弘義\*, 高橋道人 : **2,5-Di(*tert*-butyl)-1,4-hydroquinone 単回投与ラットにおける運動終板の超微形態学的変化およびその回復性**

第13回日本毒性病理学会 (1997.1)

\* 名古屋大学医学部

堀 高明\*, 鰐淵英樹\*, 高田信康\*, 西川秋佳, 福島昭治\* :  
水浸拘束ストレスによるラット消化管上皮細胞の増殖亢進  
とその機序

第13回日本毒性病理学会 (1997.1)

\* 大阪市大医学部

松井 元\*, 新屋希子\*, 志垣隆通\*, 豊田和弘, 正田俊之,  
高橋道人: ラット精子形成サイクルのステージのグルー  
化による簡便的精巣毒性評価法の確立

第13回日本毒性病理学会 (1997.1)

\* 化血研

西川秋佳: 非遺伝毒性肝発癌物質の評価法

第10回日本毒性病理学会スライドコンファレンス (1997.1)

畝山智香子, 畝山寿之, 井上和秀, 高田幸一, 高橋道人,  
赤池紀扶\*: ラット巨核球におけるトロンビン受容体誘発  
応答の速度論的解析

第70回日本薬理学会年会 (1997.3)

\* 九州大学医学部

Sofuni, T.: Report of an International Collaborative  
Study of the Mouse Lymphoma Assay Using the Mi-  
crowell Method

1996 International Symposium on "Recent Advances in Mo-  
lecular Toxicology and Carcinogenesis", Seoul, Korea  
(1996.10)

Sofuni, T.: Transgenic Mutation Assays

4 th Southeast Asian Workshop on "Short-Term Assays for  
Environmental Mutagens, Carcinogens and Teratogens", Phit-  
sanulok, Thai (1996.12)

本間正充, 林 真, 祖父尼俊雄: 変異型 p53によって引き  
起こされる遺伝的不安定性—LOH型遺伝子突然変異と染  
色体異常の誘発機構—

日本癌学会第55回総会 (1996.10)

鈴木孝昌, 王 雪, 林 真, 祖父尼俊雄: lacZ トランス  
ジェニックマウス (Muta™Mouse) を用いた ENU およ  
び EMS の *in vivo* における変異原性の比較

日本癌学会第55回総会 (1996.10)

伊藤俊明, 鈴木孝昌, 林 真, 西川秋佳, 池崎信一郎, 古  
川文夫, 高橋道人, 祖父尼俊雄: トランスジェニックマウ  
ス (Big Blue) を用いた MeIQx の発がん機構の解析

日本癌学会第55回総会 (1996.10)

小野哲也\*, 鈴木孝昌, 祖父尼俊雄: 自然突然変異の加令  
に伴う蓄積は組織により異なる

日本癌学会第55回総会 (1996.10)

\* 東北大学医学部

本間正充, 林 真, 祖父尼俊雄: 変異型 p53によって引き  
起こされる非相同組換えと遺伝的不安定性

日本放射線影響学会第39回大会 (1996.11)

小野哲也\*, 中村慎吾\*, 鈴木孝昌, 祖父尼俊雄: lacZ /  
トランスジェニックマウス睪丸における放射線誘発突然変  
異

日本放射線影響学会第39回大会 (1996.11)

\* 東北大学医学部

本間正充, 張 立実\*, 坂本浩子, 尾崎正康, 武下健次,  
林 真, 祖父尼俊雄: マウスリンフォーマ試験 (MLA) に  
おける24時間連続処理の有用性

日本環境変異原学会第25回大会 (1996.11)

\* 中国華西医科大学公共衛生学院

祖父尼俊雄, 本間正充, 林 真, 島田弘康\*<sup>1</sup>, 田中憲穂\*<sup>2</sup>,  
若栗 忍\*<sup>2</sup>, 青儀 巧\*<sup>3</sup>, 山本好一\*<sup>4</sup>, 生塩紀子\*<sup>4</sup>, 西 義  
介\*<sup>5</sup>, 中館正弘: 厚生省・製薬協マウスリンフォーマ試験  
(MLA) 国際共同研究 (第2報)

日本環境変異原学会第25回大会 (1996.11)

\*<sup>1</sup> 第一製薬

\*<sup>2</sup> 食品薬品安全センター秦野研究所

\*<sup>3</sup> 大塚製薬

\*<sup>4</sup> 武田薬品工業

\*<sup>5</sup> 日本たばこ

伊藤俊明, 鈴木孝昌, 本間正充, 松岡厚子, 林 真, 祖父  
尼俊雄: FISH によるトランスジェニックマウスの染色体  
異常検出系の開発

日本環境変異原学会第25回大会 (1996.11)

伊東 悟\*<sup>1</sup>, 鈴木孝昌, 竹本奈緒子\*<sup>2</sup>, 伊藤俊明, 堀谷尚  
古\*<sup>3</sup>, 矢嶋信浩\*<sup>2</sup>, 原 巧\*<sup>3</sup>: トランスジェニックマウス  
を用いる変異原性試験に関する共同研究Ⅱ. 共同研究の概  
要と Muta™Mouse Positive Selection 法の有用性

日本環境変異原学会第25回大会 (1996.11)

\*<sup>1</sup> 第一製薬

\*<sup>2</sup> 雪印乳業

\*<sup>3</sup> 食品薬品安全センター秦野研究所

王 雪, 鈴木孝昌, 伊藤俊明, 本間正充, 西川秋佳, 古川  
文夫, 高橋道人, 林 真, 祖父尼俊雄: Dimethylnitro-  
samine (DMN) により Big Blue マウスに誘発された突  
然変異のスペクトル

日本環境変異原学会第25回大会 (1996.11)

鈴木孝昌, 伊東悟\*<sup>1</sup>, 竹本奈緒子\*<sup>2</sup>, 伊藤俊明, 堀谷尚古\*<sup>3</sup>,  
矢嶋信浩\*<sup>2</sup>, 原 巧\*<sup>3</sup>: トランスジェニックマウスを用い  
る変異原性試験に関する共同研究Ⅱ. ENU による臓器特  
異的な変異原性の誘発

日本環境変異原学会第25回大会 (1996.11)

\*<sup>1</sup> 第一製薬

\*<sup>2</sup> 雪印乳業

\*<sup>3</sup> 食品薬品安全センター秦野研究所

宮前陽一\*<sup>1</sup>, 佐々木 有\*<sup>2</sup>, 小林 浩\*<sup>3</sup>, 五十嵐美由紀\*<sup>4</sup>,  
下位香代子\*<sup>5</sup>, 林 真: マウスの各種臓器を用いた *in vivo*  
SCG assay

日本環境変異原学会第25回大会 (1996.11)

\*<sup>1</sup> 藤沢薬品

\*<sup>2</sup> 八戸高専

\*<sup>3</sup> 資生堂

\*<sup>4</sup> 第一製薬

\*<sup>5</sup> 静岡県立大学

林 真: ゲノム変異としての小核発生

第6回日本サイトメトリー学会総会 (1996.6)

祖父尼俊雄：21世紀における安全性評価のための変異原性試験

日本環境変異原学会第25回大会(1996.11)

小林 浩\*, 森 眞輝\*, 勝村芳雄\*, 森川良広\*, 林 真, 祖父尼俊雄： comet assay：種々の変異原処理によって細胞に生じたDNA損傷の検出

日本環境変異原学会第25回大会(1996.11)

\* 資生堂

高井明德\*<sup>1</sup>, 上野紘一\*<sup>2</sup>, 林 真, 祖父尼俊雄：魚類鰓細胞を用いた小核試験法による水質汚染の細胞遺伝毒性影響評価

日本環境変異原学会第25回大会(1996.11)

\*<sup>1</sup> 大阪信愛短期大学

\*<sup>2</sup> 近畿大学

谷所達幸\*, 古都美千代\*, 下位香代子\*, 今村希美\*, 木苗直秀\*, 林 真, 祖父尼俊雄：魚類の小核試験は沿岸水域の変異原性物質をモニタリングすることが可能か

日本環境変異原学会第25回大会(1996.11)

\* 静岡県立大学

西館絵美\*, 泉山房子\*, 佐々木 有\*, 林 真, 祖父尼俊雄：ホタテ貝鰓細胞のSCG法による海水汚濁の検出

日本環境変異原学会第25回大会(1996.11)

\* 八戸高専

松岡厚子, 尾崎正康, 武下健次, 坂本浩子, 本間正充, Glatt, H.-R.\*, 林 真, 祖父尼俊雄：In vitro 培養細胞系における異性性の検出

日本環境変異原学会第25回大会(1996.11)

\* German Institute of Human Nutrition, Germany

Honma, M., Zhang, L.-S.\*, Hayashi, M., Sofuni, T.: Illegitimate recombination leading to allelic loss and unbalanced translocation in p53 mutated human lymphoblastoid cells

Mount Buller International Conferences on Environmental Radiation (1996.12)

\* West China University of Medical Sciences

Mäki-Paakkanen, J.\*, Hayashi, M., Suzuki, T., Sofuni, T.: Analysis by fluorescence in situ hybridization of micronuclei isolated from the blood of mice treated with diethylstilbestrol, thiabendazole or nospapine

European Environmental Mutagen Society (1996.9)

\* National Public Health Institute, Finland

Hayashi, M., Zhang, L.-S.\*: Chromosome painting analysis of spontaneous and chemically induced mutant colonies of L5178Y mouse lymphoma cells

The 4th China-Japan Joint Histochem-and Cytochemistry Symposium (1996.9)

\* West China University of Medical Sciences

田中憲穂\*<sup>1</sup>, 若栗 忍\*<sup>1</sup>, 前田 環\*<sup>1</sup>, 川村 亮\*<sup>1</sup>, 高橋淳子\*<sup>1</sup>, 伏脇裕一\*<sup>2</sup>, 浜村哲夫\*<sup>2</sup>, 林 真, 祖父尼俊雄：培養細胞を用いる河川水汚染の検定法

第2回バイオアッセイ研究会・エコトキシコロジー研究会合同研究発表会(1996.9)

\*<sup>1</sup> 食品薬品安全センター秦野研究所

\*<sup>2</sup> 神奈川県環境科学センター

宮田裕子\*, 佐伯憲一\*, 川添 豊\*, 鈴木孝昌：トランスジェニックマウスを用いたキノリンのin vivo突然変異誘発性の検討

日本薬学会第117年会(1997.3)

\* 名古屋市立大学

Hayashi, M.: Integration of genotoxicity evaluation into general toxicology studies: Blood micronucleus assay in rodent

28th Annual Meeting of Environmental Mutagen Society, USA (1997.4)

能美健彦：はじめに：環境変異原と生体によって誘発される突然変異

日本環境変異原学会公開シンポジウム(1996.5)

Nohmi, T., Katoh, M.\*<sup>1</sup>, Suzuki, H.\*<sup>2</sup>, Matsui, M., Yamada, M., Watanabe, M.\*<sup>3</sup>, Suzuki, M., Horiya, N.\*<sup>4</sup>, Ueda, O.\*<sup>2</sup>, Shibuya, T.\*<sup>4</sup>, Ikeda, H.\*<sup>5</sup> and Sofuni, T.: *gpt delta*: A new transgenic mouse for the detection of point mutations and deletion mutations in vivo

Gordon Research Conference "Mutagenesis" (1996.6)

\*<sup>1</sup> University of Chile

\*<sup>2</sup> 中外製薬探索研究所

\*<sup>3</sup> 国立がんセンター生化学部

\*<sup>4</sup> 食品薬品安全センター秦野研究所

\*<sup>5</sup> 東京大学医科学研究所

金 秀良, 大森治夫\*, 松井恵子, 山田雅巳, 祖父尼俊雄, 能美健彦：大腸菌 *dinP* 遺伝子が関与する自然突然変異の特異性

日本環境変異原学会第25回大会(1996.11)

\* 京都大学ウイルス研究所

増村健一, 松井道子, 加藤基恵\*<sup>1</sup>, 堀谷尚古\*<sup>2</sup>, 山田雅巳, 渋谷徹\*<sup>2</sup>, 能美健彦, 祖父尼俊雄：新しい遺伝子突然変異検出用トランスジェニックマウス *gptD* の開発：*gpt* 遺伝子上のENU誘発突然変異のスペクトラム

日本環境変異原学会第25回大会(1996.11)

\*<sup>1</sup> University of Chile

\*<sup>2</sup> 食品薬品安全センター秦野研究所

能美健彦, 加藤基恵\*<sup>1</sup>, 鈴木宏志\*<sup>2</sup>, 松井道子, 山田雅巳, 増村健一, 渡辺雅彦\*<sup>3</sup>, 鈴木 任, 堀谷尚古\*<sup>4</sup>, 上田乙也\*<sup>2</sup>, 渋谷 徹\*<sup>4</sup>, 池田日出男\*<sup>5</sup>, 祖父尼俊雄：点突然変異と欠失突然変異を迅速に検出するトランスジェニックマウスの開発

第11回ワークショップ遺伝的組換えとその制御(1996.7)

\*<sup>1</sup> University of Chile

\*<sup>2</sup> 中外製薬探索研究所

\*<sup>3</sup> 国立がんセンター生化学部

\*<sup>4</sup> 食品薬品安全センター秦野研究所

\*<sup>5</sup> 東京大学医科学研究所

松井道子, 増村健一, 金 秀良, 能美健彦, 祖父尼俊雄：大腸菌 *gpt* 遺伝子におけるγ線誘発突然変異のスペクトラム：DNA修復機能の影響

日本環境変異原学会第25回大会(1996.11)

鈴木 任, 祖父尼俊雄, 能美健彦: **大腸菌 *mutM* 遺伝子の発現誘導機構の解析**  
第19回日本分子生物学会年会 (1996.8)

金 秀良, 大森治夫\*, 山田雅巳, 祖父尼俊雄, 能美健彦: **大腸菌突然変異誘発への *dinP* 遺伝子の関与**  
第19回日本分子生物学会年会 (1996.8)

\* 京都大学ウイルス研究所

Gruz, P., Sofuni, T., Nohmi, T.: **Progress in the purification of MucA/B mutagenesis proteins**  
第19回日本分子生物学会年会 (1996.8)

能美健彦, 加藤基恵<sup>\*1</sup>, 鈴木宏志<sup>\*2</sup>, 松井道子, 堀谷尚古<sup>\*3</sup>, 上田乙也<sup>\*2</sup>, 山田雅巳, 鈴木 任, 渡辺雅彦<sup>\*4</sup>, 渋谷 徹<sup>\*3</sup>, 池田日出男<sup>\*5</sup>, 祖父尼俊雄: **点突然変異と欠失変異を検出するトランスジェニックマウスの開発**  
第19回日本分子生物学会年会 (1996.8)

<sup>\*1</sup> University of Chile

<sup>\*2</sup> 中外製薬探索研究所

<sup>\*3</sup> 国立ガンセンター生化学部

<sup>\*4</sup> 食品薬品安全センター秦野研究所

<sup>\*5</sup> 東京大学医科学研究所

金 秀良, 大森治夫<sup>\*1</sup>, Maenhaut-Michel, G. <sup>\*2</sup>, 松井恵子, 山田雅巳, 祖父尼俊雄, 能美健彦: **大腸菌 *dinP* 遺伝子の発現によるフレームシフト型自然突然変異の増加**  
ワークショップ「DNA repair and mutagenesis '96」  
(1996.12)

<sup>\*1</sup> 京都大学ウイルス研究所

<sup>\*2</sup> Universit · Libre de Bruxelles, Belgium

山田雅巳, Karran, P. \* : **シスプラチン-DNA 付加体のヒトミスマッチ修復による認識**  
ワークショップ「DNA repair and mutagenesis '96」  
(1996.12)

\* Imperial Cancer Research Fund, UK

Nohmi, T., Katoh, M. <sup>\*1</sup>, Suzuki, H. <sup>\*2</sup>, Matsui, M., Yamada, M., Watanabe, M. <sup>\*3</sup>, Suzuki, M., Horiya, N. <sup>\*4</sup>, Ueda, O. <sup>\*2</sup>, Shibuya, T. <sup>\*4</sup>, Ikeda, H. <sup>\*5</sup>, Sofuni, T.: **New transgenic mouse *gpt delta* for monitoring the mutagenesis and antimutagenesis in vivo**  
5th International Conference on Mechanisms for Antimutagenesis and Anticarcinogenesis (1996.12)

<sup>\*1</sup> University of Chile

<sup>\*2</sup> 中外製薬探索研究所

<sup>\*3</sup> 国立ガンセンター生化学部

<sup>\*4</sup> 食品薬品安全センター秦野研究所

<sup>\*5</sup> 東京大学医科学研究所

増村健一, 松井道子, 加藤基恵<sup>\*1</sup>, 鈴木宏志<sup>\*2</sup>, 山田雅巳, 渡辺雅彦<sup>\*3</sup>, 鈴木 任, 堀谷尚古<sup>\*4</sup>, 上田乙也<sup>\*2</sup>, 渋谷 徹<sup>\*4</sup>, 池田日出男<sup>\*5</sup>, 祖父尼俊雄, 能美健彦: **トランスジェニックマウスを使った突然変異の検出: エチルニトロソ尿素 (ENU) による変異スペクトラム**  
ワークショップ「DNA repair and mutagenesis '96」  
(1996.12)

<sup>\*1</sup> University of Chile

<sup>\*2</sup> 中外製薬探索研究所

<sup>\*3</sup> 国立ガンセンター生化学部

<sup>\*4</sup> 食品薬品安全センター秦野研究所

<sup>\*5</sup> 東京大学医科学研究所

能美健彦: **発生工学的手法を用い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**  
日本組織培養学会1996年度秋期公開シンポジウム  
(1996.12)

Yamada, M.: **Selective recognition of a cisplatin-DNA adduct by human mismatch repair proteins**  
DNA repair network Christmas meeting (1996.12)

能美健彦, 加藤基恵<sup>\*1</sup>, 鈴木宏志<sup>\*2</sup>, 松井道子, 山田雅巳, 増村健一, 渡辺雅彦<sup>\*3</sup>, 鈴木 任, 堀谷尚古<sup>\*4</sup>, 上田乙也<sup>\*2</sup>, 渋谷 徹<sup>\*4</sup>, 池田日出男<sup>\*5</sup>, 祖父尼俊雄: **遺伝子突然変異検出用トランスジェニックマウス *gpt D* の特性**  
日本環境変異原学会第25会大会 (1996.11)

<sup>\*1</sup> University of Chile

<sup>\*2</sup> 中外製薬探索研究所

<sup>\*3</sup> 国立ガンセンター生化学部

<sup>\*4</sup> 食品薬品安全センター秦野研究所

<sup>\*5</sup> 東京大学医科学研究所

能美健彦, 加藤基恵<sup>\*1</sup>, 鈴木宏志<sup>\*2</sup>, 松井道子, 山田雅巳, 渡辺雅彦<sup>\*3</sup>, 鈴木任, 堀谷尚古<sup>\*4</sup>, 上田乙也<sup>\*2</sup>, 渋谷徹<sup>\*4</sup>, 池田日出男<sup>\*5</sup>, 祖父尼俊雄: **発生工学的手法を用いた新しい遺伝毒性評価試験法の開発**  
日本実験動物代替法学会第10回大会 (1996.12)

<sup>\*1</sup> University of Chile

<sup>\*2</sup> 中外製薬探索研究所

<sup>\*3</sup> 国立ガンセンター生化学部

<sup>\*4</sup> 食品薬品安全センター秦野研究所

<sup>\*5</sup> 東京大学医科学研究所

高田容子, 増井 徹, 田辺秀之, 水沢 博, 西村和子<sup>\*1</sup>, 原沢 亮<sup>\*2</sup>: **培養細胞を汚染するマイコプラズマのPCR法による微量検出について**  
第3回日本微生物資源学会大会 (1996.6)

<sup>\*1</sup> ヒューマンサイエンス研究資源バンク

<sup>\*2</sup> 東京大学医学部附属動物実験施設

田辺秀之, 高田容子, 岡戸 清, 祖父尼俊雄, 水沢 博: **CGH法による細胞バンク細胞株のゲノムの性状解析**  
第55回日本癌学会総会 (1996.10)

井上 玲<sup>\*1</sup>, 横森欣司<sup>\*2</sup>, 田辺秀之, 林 泰秀<sup>\*2</sup>, 土田嘉昭<sup>\*2</sup>, 嶋武博之<sup>\*1</sup>: **複雑な染色体異常と N-myc 遺伝子 5' 領域の再構成をもつ神経芽腫細胞株の樹立**  
第55回日本癌学会総会 (1996.10)

<sup>\*1</sup> 東邦大学医学部

<sup>\*2</sup> 東京大学医学部

Inoue, A. <sup>\*1</sup>, Yokomori, K. <sup>\*2</sup>, Tanabe, H., Hayashi, Y. <sup>\*2</sup>, Tsuchida, Y. <sup>\*2</sup> and Shimatake, H. <sup>\*1</sup>: **Establishment of a neuroblastoma cell line bearing an N-myc gene amplified and rearranged**  
International Society of Paediatric Oncology (SIOP) XXVIIIth Meeting, Vienna (1996.10)

<sup>\*1</sup> Toho University School of Medicine

<sup>\*2</sup> Faculty of Medicine, University of Tokyo

田辺秀之, 石田貴文\*, 植田信太郎\*, 祖父尼俊雄, 水沢博: **FISH法によるヒト9番染色体の進化的系譜に関する新しいモデル**

日本人類遺伝学会第40回大会 (1996.10)

\* 東京大学理学部

Harasawa, R.\*, Mizusawa, H.: **Detection of Pestiviruses from Mammalian Cell Cultures by the Polymerase Chain Reaction**

The 3rd Internet World Congress on Biomedical Sciences, Symposium SBB0202 (1996.12)

\* 東京大学医学部附属動物実験施設

Mizusawa, H.: **Recent Topics on the Qualification of Cultured Biomedical Research Resources**

The 3rd Internet World Congress on Biomedical Sciences, Symposium SBB0202 (1996.12)

Tanabe, H., Sofuni, T., Mizusawa, H.: **Comparative Genomic Hybridization (CGH) Analysis for Whole Genomic Chromosomal Characterization of Cell Lines in JCRB Cell Bank**

The 3rd Internet World Congress on Biomedical Sciences, Symposium SBB0202 (1996.12)

田辺秀之, 祖父尼俊雄, 水沢博: **CGH (Comparative Genomic Hybridization) 法による細胞株染色体の性状解析**

第14回染色体ワークショップ (1997.2)

信国洋\*<sup>1,2</sup>, 小林まりこ\*<sup>1</sup>, 大森 彬\*<sup>1</sup>, 吉田幸代\*<sup>1</sup>, 岩永俊彦\*<sup>3</sup>, 橋本雄之\*<sup>4</sup>, 服部成介\*<sup>5</sup>, 貝淵弘三\*<sup>6</sup>, 増井 徹, 中村義一\*<sup>2</sup>, 岩下新太郎\*<sup>1</sup>: **Alu 関連反復配列様領域を ORF に含む新規蛋白質**

第69回日本生化学会大会・第19回日本分子生物学会年会・合同年会 (1996.8)

\*<sup>1</sup> 三菱化学生命科学研究所

\*<sup>2</sup> 東京大学医科学研究所

\*<sup>3</sup> 北海道大学獣医学科

\*<sup>4</sup> 国立予防衛生研究所

\*<sup>5</sup> 国立精神神経センター

\*<sup>6</sup> 奈良先端大学

増井 徹, 岩下新太郎\*, 高田容子, 岡戸 清, 祖父尼俊雄, 水沢博: **がん抑制遺伝子の候補である増殖停止関連遺伝子 eti-1 の構造と機能**

第55回日本癌学会総会 (1996.10)

\* 三菱化学生命科学研究所

岡田敏史: **医薬品分野における精度管理**  
全国衛生化学技術協議会 (1996.10)

岡田敏史: **薬事法に基づく指定試験検査機関の精度管理について**

日本薬剤師会技術講習会 (1997.1)

Yomota, C., Tojo, T., Okada, S., Matsuda, R., Hayashi, Y.: **Uncertainty of measurement in instrument analysis. Discrimination limit of purity test for human insulin in capillary electrophoresis.**

The 110th AOAC International Annual Meeting & Exposition

(1996.9)

宮崎玉樹, 四方田千佳子, 岡田敏史: **ヒアルロン酸の分解に伴う分子量分布の変化**

第46回日本薬学会近畿支部大会 (1996.10)

Yomota, C., Okada, S.: **Interaction of surfactant with hyaluronate gel. -Binding isotherms and shrinking behavior-**

Eighth International Symposium on Recent Advances in Drug Delivery Systems (1997.2)

宮崎玉樹, 四方田千佳子, 岡田敏史: **医薬品によるヒアルロン酸のラジカル分解**

日本薬学会第117年会 (1997.3)

四方田千佳子, 岡田敏史, 松田りえ子, 林 譲: **純度試験の判別限界について**

日本薬学会第117年会 (1997.3)

四方田千佳子, 宮崎玉樹, 松本泰誠, 岡田敏史: **ヒアルロン酸ナトリウム含有製剤のサイズ排除クロマトグラフィーによる分子量評価**

日本薬学会第117年会 (1997.3)

四方田千佳子, 岡田敏史: **サイズ排除クロマトグラフィーにおける分子量標準品に関する考察 -水溶性高分子における分子量標準品の統一化の可能性-**

日本薬学会第117年会 (1997.3)

Tsuzuki, S.\*, Kobayashi, T.\*, Inobe, K.\*, Oishi, N.\*, Kubo, E.\*, Takahashi, Y.\*, Akagi, Y.\* and Tanimoto, T.: **The amount of aldose reductase in red blood cell of galactose-fed dogs and diabetic patients**

XII International Congress of Eye Research, Yokohama (1996.9)

\* 福井医科大学

大石なみき\*, 都筑昌哉\*, 久保江理\*, 小林達治\*, 高橋幸男\*, 赤木好男\*, 前川京子, 谷本 剛: **ヒト糖尿病網膜症患者における赤血球アルドース還元酵素値と網膜症の関係**

第50回日本臨床眼科学会 (1996.10)

\* 福井医科大学

Tanimoto, T., Maekawa, K., Yoshii, K., Okada, S., Tachikawa, T.\*<sup>1</sup> and Akagi, Y.\*<sup>2</sup>: **Relationship between aldose reductase levels and retinopathy on galactose-fed dogs**

US-Japan Aldose Reductase Workshop, Hawaii, USA (1997.2)

\*<sup>1</sup> 三菱ガス化学

\*<sup>2</sup> 福井医科大学

Akagi, Y.\*, Kubo, E.\*, Maekawa, K. and Tanimoto, T.: **The amount of aldose reductase in red blood cell of diabetic patients**

US-Japan Aldose Reductase Workshop, Hawaii, USA (1997.2)

\* 福井医科大学

大石なみき\*, 都筑昌哉\*, 河合礼子\*, 久保江理\*, 小林達治\*, 高橋幸男\*, 赤木好男\*, 谷本 剛, 前川京子: **ヒトならび実験的糖尿病網膜症と赤血球アルドース還元酵素値**

第3回日本糖尿病眼科学会 (1997.3)

\* 福井医科大学

谷本 剛, 前川京子, 吉井公彦, 岡田敏史, 立川智一<sup>\*1</sup>, 赤木好男<sup>\*2</sup>: **ガラクトース負荷したイヌにおける網膜症発症へのポリオール経路の関与**  
日本薬学会第117年会 (1997.3)

<sup>\*1</sup> 三菱ガス化学<sup>\*2</sup> 福井医科大学

Akagi, Y.\*, Takahashi, Y.\*, Kubo, E.\*, Maekawa, K. and Tanimoto, T.: **The amount of aldose reductase in red blood cell of diabetic patients and galactosemic dogs.**  
1997 Annual Meeting of ARVO, Florida, USA (1997.5)

\* 福井医科大学

Komatsu, H., Handa, T.\* and Okada, S.: **Effects of Acyl Chain Composition of Lipids on the Maltose-Enhanced Stabilization of Freeze-Dried Liposomes**  
Eighth International Symposium on Recent Advances in Drug Delivery Systems (1997.2)

\* 京都大学薬学部

Handa, T.\*, Saito, H., Miyako, Y.\* and Miyajima, K.\*: **Apolipoprotein Binding to Emulsion and Liposome Particles**  
10th ACS Colloid and Surface Symposium, USA (1996.6)

\* 京都大学薬学部

Handa, T.\*, Saito, H. and Miyajima, K.\*: **Modulation of Apolipoprotein Binding to Emulsions by Cholesterol or its Ester**  
The Madison Conference on the Pharmaceutical Sciences, USA (1996.6)

\* 京都大学薬学部

Handa, T.\*, Saito, H. and Miyajima, K.\*: **Is Emulsion Surface Very Similar to Liposome Surface?**  
The 1996 International Congress on Membranes and Membrane Process, Yokohama (1996.8)

\* 京都大学薬学部

斎藤博幸, 南田 岳\*, 都 保啓\*, 半田哲郎\*, 宮嶋孝一郎\*: **脂質エマルションの表面膜およびコアの状態とアポリポ蛋白質の結合性**  
第18回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (1996.11)

\* 京都大学薬学部

斎藤博幸, 有本 達\*, 公文道子\*, 半田哲郎\*, 宮嶋孝一郎\*: **脂質エマルション表面膜のゲル-液晶相転移**  
日本薬学会第117年会 (1997.3)

\* 京都大学薬学部

有本 達\*, 斎藤博幸, 川島恭子\*, 半田哲郎\*, 宮嶋孝一郎\*: **脂質エマルションのリポリシスに及ぼす Sphingomyelin の影響**  
日本薬学会第117年会 (1997.3)

\* 京都大学薬学部

斎藤博幸, 有本 達\*, 南田 岳\*, 都 保啓\*, 半田哲郎\*, 宮嶋孝一郎\*: **脂質エマルションの表面膜構造**  
日本膜学会第19回年会 (1997.5)

\* 京都大学薬学部

石光 進, 三島郁子, 辻 澄子, 柴田 正: **食品添加物公定書ヒ素試験法における“検液の調製”の改良に関する検討**  
第33回全国衛生化学技術協議会年会 (1996.11)

石光 進, 三島郁子, 辻 澄子, 柴田 正, 宮本輝美\*: **リボフラビン5'-リン酸エステルナトリウムの光照射によるフリーラジカルの生成**  
日本薬学会第117年会 (1997.3)

\* 大阪薬科大学

辻 澄子, 石光 進, 柴田 正: **電気化学検出器付 HPLC による食用油中のトコフェロール同族体の分析法について**  
日本食品衛生学会第72回学術講演会 (1996.10)

辻 澄子, 石光 進, 柴田 正: **電気化学検出器を用いた逆相 HPLC による食用油中のトコトリエノールの分析**  
日本ビタミン学会第49回大会 (1997.5)

津村ゆかり, 中村優美子, 外海泰秀, 柴田 正: **イネ用殺菌剤テクロフタラム及び代謝物テクロフタラムイミドの分別定量法**  
第33回全国衛生化学技術協議会年会 (1996.11)

Yasuhide Tonogai, Yumiko Nakamura, Yukari Tsumura, Tadashi Shibata: **comparison for the removal of lipids in the analysis of pyrethroid pesticide residues in salad oil, brown rice and soy bean**  
9th Annual California Pesticide Residue Workshop (1997.3.3~6)

外海泰秀, 津村ゆかり, 中村優美子, 柴田 正: **HPLC による青果物中残留農薬及びその代謝物の一斉分析**  
日本食品衛生学会第73回学術講演会 (1997.5)

堀伸二郎<sup>\*1</sup>, 前川吉明<sup>\*2</sup>, 佐々木久美子, 永山敏廣<sup>\*3</sup>, 星野庸二<sup>\*4</sup>, 谷 孝之<sup>\*5</sup>, 中村好志<sup>\*6</sup>, 外海泰秀, 田中敏嗣<sup>\*7</sup>, 宮田秀明<sup>\*8</sup>: **飲食物試験法・食品汚染物試験法 酸化フェンブタスズおよびシヘキサチンのガス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117年会 (1997.3)

<sup>\*1</sup> 大阪府立公衆衛生研究所<sup>\*2</sup> 日本食品分析センター<sup>\*3</sup> 東京都立衛生研究所<sup>\*4</sup> 埼玉県衛生研究所<sup>\*5</sup> 神奈川県衛生研究所<sup>\*6</sup> 静岡県立大学薬学部<sup>\*7</sup> 神戸市環境保健研究所<sup>\*8</sup> 摂南大学薬学部

小川義之: **エンドトキシンの測定についての問題点**  
液体クロマトグラフ研究会・新解析技術研究会合同第2回研修会 (1996.8)

小川義之: **ワークショップ人工臓器とパイロジェン; エンドトキシン試験法**  
日本人工臓器学会第34回大会 (1996.10)

小川義之: **発熱物質試験及びエンドトキシン試験における**

## 標準化研究の国際的動向

第3回日中薬品分析技術セミナー(1996.10,中国天津市)

小川義之:微生物細胞壁成分を指標とする簡易試験法;医薬品の微生物汚染の検査への応用

日本防菌防黴学会第1回微生物迅速検査・同定に関するシンポジウム(1996.11)

Ogawa, Y., Tsuchiya, M.\*, Murai, T. and Matsuura, S.\*: **Development of a method to detect microbial contamination with silkworm larvae plasma**

PDA International Congress, Osaka, Japan (1997.2)

\* Wako Pure Chemical Industries, LTD

小川義之:非経口投与薬のエンドトキシン規格の設定方法案

日本薬学会第117年会(1997.3)

川島邦夫,北島聡,門馬純子,井上達:CASA-System (HTM-IVOS)を用いた精子試験II. Nitrobenzene 関連化合物

第36回日本先天異常学会(1996.7)

江馬眞,宮脇英美子,原園景,小川義之:Monobenzyl phthalateによるラットにおける発生毒性の投与時期による変化

第23回日本毒科学会学術年会(1996.7)

岩瀬隆之\*,江馬眞,稲沢圭子\*,大山直樹\*,小川義之:ラット培養胚を用いた3種ブチルスズの形態異常誘発能の比較

第36回日本先天異常学会学術集会(1996.7)

\* 三菱化学横浜総合研究所 安全性研究所

Ema, M., Harazono, A., Miyawaki, E. and Ogawa, Y.: **Implantation failure induced by triphenyltin chloride (TPTCl) in rats**

Society of Toxicology 36th Annual Meeting, Cincinnati, U. S. A. (1997.3)

原園景,江馬眞,小川義之:トリブチルスズの妊娠初期投与によるラット母体及び胚に対する影響

第23回日本毒科学会学術年会(1996.7)

金田吉弘\*,斎藤晃一\*,岸本洋子\*,徳山悟\*,村井敏美,江馬眞,中川ゆかり,原園景,小川義之:リン脂質中のエンドトキシン測定に関する研究

日本薬学会第117年会(1997.3)

\* 日本油脂(株)油化学研究所

村井敏美,中川ゆかり,宮脇英美子,寺田衣子,小川義之,金田吉弘\*,徳山悟\*:マクロファージを用いた発熱性物質の*in vitro* バイオアッセイシステムの開発(I) その特長と有用性について

日本防菌防黴学会第24回年次大会(1997.5)

\* 日本油脂(株)油化学研究所

中川ゆかり,村井敏美,宮脇英美子,寺田衣子,小川義之,高岡文\*,土谷正和\*:マクロファージを用いた発熱性物質の*in vitro* バイオアッセイシステムの開発(II) エンドトキシンに高感度に応答するマウスマクロファージ様細

## 胞株について

日本防菌防黴学会第24回年次大会(1997.5)

\* 和光純薬(株)大阪研究所

金田吉弘\*,斎藤晃一\*,岸本洋子\*,徳山悟\*,村井敏美,中川ゆかり,原園景,江馬眞,小川義之:水溶液中のエンドトキシン捕捉体としてのリン脂質の適用性に関する検討

日本防菌防黴学会第24回年次大会(1997.5)

\* 日本油脂(株)油化学研究所

熊谷健夫,畠山好雄,逸見文子\*,芝野真喜雄\*,草野源次郎\*:カンゾウの栽培および育種に関する研究(1)

日本生薬学会43回年会(1996.9)

\* 大阪薬科大学

畠山好雄,熊谷健夫,香月茂樹,本間尚治郎,石崎昌吾,三浦忠一,沢井清道,山岸喬\*,西沢信\*:シャクヤク薬用品種「北宰相」の特性について

日本生薬学会第43回年会(1996.9)

\* 道立衛生研究所

畠山好雄:ゲンチアナの栽培に関する研究

第6回薬用植物栽培技術フォーラム(1996.7)

姉帯正樹\*1,柴田敏郎,畠山好雄,増田隆広\*2,高杉光雄\*2:北海道産当帰の調製法と化学的品質評価

日本生薬学会北海道支部第21回例会(1997.5)

\*1 道立衛生研究所

\*2 北海道大学

姉帯正樹\*,青柳光敏\*,柴田敏郎,飯田修,畠山好雄:北海道産黄耆の調製法と化学的品質評価

日本生薬学会北海道支部第21回例会(1997.5)

\* 道立衛生研究所

嶋田康男\*1,十川陽子\*1,細井戸佐妃子\*1,古木益夫\*2,白井義数\*2,畠山好雄:モッコウの栽培・調製・評価について

第25回生薬分析シンポジウム(1996.11)

\*1 三星製薬所

\*2 国産生薬(株)

柴田敏郎:薬用植物資源の導入と種子保存について

第6回薬用植物栽培技術フォーラム(1996.7)

河内史子\*1,中居利恵\*1,正山征洋\*1,白石進\*2,柴田敏郎,西孝三郎:RAPDによる*Papaver* 属植物の分析

日本生薬学会第43回年会(1996.9)

\*1 九州大学薬学部

\*2 九州大学農学部

川原一仁\*1,柴田敏郎,田中俊弘\*2:中国産大黄について(1)四川省阿坝藏族羌族自治州における大黃の生産

日本生薬学会第43回年会(1996.9)

\*1 日野薬品

\*2 岐阜薬科大学

柴田敏郎:中国青海省東南部及び四川省北部地域における野生ダイオウ属植物について

日本生薬学会関西支部平成8年度秋期講演会(1996.12)



芝野真喜雄<sup>\*1</sup>, 逸見文子<sup>\*1</sup>, 抜井久司<sup>\*1</sup>, 草野源次郎<sup>\*1</sup>, 柴田敏郎, 大橋広好<sup>\*2</sup>, 宮瀬敏男<sup>\*3</sup>: 国内薬用植物園で植栽される *Glycyrrhiza* 属植物の調査と優良品種選抜のための基礎研究 (その7)

日本薬学会第117年会 (1997.3)

<sup>\*1</sup> 大阪薬科大学

<sup>\*2</sup> 東北大学理学部

<sup>\*3</sup> 静岡県立大学薬学部

酒井英二, 柴田敏郎, 西孝三郎: 国立衛試・薬用植物栽培試験場で保存している *Ephedra* 属植物について

日本生薬学会第43回年会 (1996.9)

中西 史, 佐々木和生<sup>\*1</sup>, A. W. Alfermann<sup>\*2</sup>, 下村講一郎: *Coleus forskohlii* における高 forskolin 生産毛状根の選抜

第5回植物細胞分子生物シンポジウム (1996.7)

<sup>\*1</sup> 青森大学工学部

<sup>\*2</sup> Institut für Entwicklungs-und Molekularbiologie der Pflanzen, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

吉松嘉代, 下村講一郎, 山口浩子<sup>\*</sup>: 薬用植物の超低温保存に関する研究 II. オタネニンジン不定胚について

日本生薬学会第43回年会 (1996.9)

<sup>\*</sup> 佐賀県薬業指導所

渡部晶子<sup>\*</sup>, 荒木さおり<sup>\*</sup>, 山崎真巳<sup>\*</sup>, 斉藤和季<sup>\*</sup>, 下村講

一郎: RAPD 法および RFLP 法によるトウキの系統解析  
日本生薬学会第43回年会 (1996.9)

<sup>\*</sup> 千葉大学薬学部

中西 史, 下村講一郎, 佐々木和生<sup>\*</sup>, 梅津博紀<sup>\*</sup>: ベラドンナ毛状根からの littorine の単離・同定およびその量的変動

日本薬学会第117年会 (1997.3)

<sup>\*</sup> 青森大学工学部

吉松嘉代, 下村講一郎, Shu Wendy<sup>\*</sup>: Somatic embryogenesis and cryopreservation in *Coptis japonica*

日本薬学会第117年会 (1997.3)

<sup>\*</sup> Singapore Polytechnic

成 忠基<sup>\*1</sup>, Da-Woo Jung<sup>\*1</sup>, 海老塚 豊<sup>\*2</sup>, 渋谷雅明<sup>\*2</sup>, 下村講一郎, 吉松嘉代: 柴胡の有効成分, saikosaponin a の ELISA 法の開発

日本薬学会第117年会 (1997.3)

<sup>\*1</sup> 全南大学校薬学大学

<sup>\*2</sup> 東京大学薬学部

野口 衛: 調製法の違いがキキョウの品質に及ぼす影響  
第6回薬用植物栽培技術フォーラム (1996.7.9)

野口 衛: ミシマサイコの栽培法とその品質

第3回薬用植物の生産・流通に関する研究会 (1996.8.9)

会議名：ICH 4 準備会合（品質分野）

出席者：薬品部 小嶋 茂雄（①～④に参加）  
 ♪ 吉岡 澄江（③ ♪）  
 ♪ 鹿庭なほ子（③ ♪）  
 ♪ 青柳 伸男（④ ♪）

開催場所，時期：①バージニア（米国），1996年4月29日～5月2日，②ワシントン（米国），1996年8月22日～23日，③ロンドン（英国），1996年11月4日～7日，④成田（日本），1997年3月3日～6日

参加者内訳，人数：日米欧3極の薬事規制当局及び製薬団体関係者

会議内容：専門家会議における検討の内容は次の通りである。

1. 光安定性試験ガイドライン（Q1B），安定性試験ガイドラインの新剤形への適用の際の取り扱い（Q1C），分析法バリデーション/評価方法に関するテキスト（Q2B）並びに製剤の不純物ガイドライン（Q3B）については，ロンドンの会議において，最終合意（ステップ4）に達した。

2. 残留溶媒ガイドライン（Q3C）に関しては，横浜でのICH3の後，バージニア及びワシントンでの会議を経て，ロンドンでの会議において基本的な合意に達し，ステップ2の段階に進んだ。原薬，医薬品添加物並びに製剤のいずれも本ガイドラインの適用対象とすることとされている。

3. 化学合成医薬品の品質規格に関するガイドライン（Q6A）は，横浜でのICH3で新しく取り上げられた課題で，これまでにバージニア，ワシントン，ロンドン及び成田の4回の会議で検討が行われてきており，ブリュッセルでのICH4において基本的合意が達成されることが期待されている。主要な論点は，次の通りである：

ア) periodic/skip testing, in-process tests, parametric release など，日本の医薬品承認・許可制度において採用されていない考え方が提案されていること（general concepts）：

これらの concepts は，医薬品の製造工程を厳しくコントロールすることが品質保証の上で重要であり，これを活用することによって最終製品での試験を軽減し得るとする最近の欧米における品質保証の考え方を反映したものである。日本では，従来，規格にある項目についてはすべて出荷時に試験する必要があるとしてきたことから，ワシントンの会議では，厚生省はこれらの concepts に反対の態度を表明したが，他のパーティはいずれも基本的に賛成の態度であり，合意に達することはできなかった。次のロンドンの会議では，厚生省が，日本にない考え方であるため，直ちに一律に実施するのは無理であり，一定の準備期間が必要であることが了解されるなら，これらの concepts は受け入れ可能であるとの態度を示し，他のパーティも理解を示したことから，これらの concepts を本ガイドラインに盛り込むことについては基本的に合意に達した。

イ) 日米欧三薬局間で試験法を統一することが要望されていること（compendial issues）：

ロンドンの会議では，企業側は，日米欧の三薬局方間で試験法に違いがあると試験を繰り返さなければならず，規格の項目について調和が達成されてもあまりメリットがないことになるので，三極の行政当局が違いのあるまま相互承認するか，違いを解消して統一した試験法とするための手立てをとることを強く主張した。これを巡って激しい議論が交わされた結果，1) 企業側が，問題となる12の試験法について日米欧三薬局方間の違いを調べて，対比表を作

成すると共に，違いを解消するための提言をまとめ，薬局方及び行政当局に提示する，2) 薬局方と各行政当局は，それぞれこの企業側が作成した資料に対する返事をまとめる，3) これらを基に，次回の成田での会議で検討することとされた。

成田での会議では，企業側が作成した資料に基づいて，薬局方側から，①判断基準の絡まない試験法については，薬局方間で2年以内に調和が可能である，②判断基準の絡む含量均一性試験，重量偏差試験，溶出試験，崩壊試験，保存効力試験及び微生物限度試験の6つの試験法については，薬局方だけでは調和が難しいので，ICH の場で行政当局との提案を行い，この方向が基本的に了承された。

ブリュッセルでのICH4の際の会議では，②の6つの試験法に関して，その判断基準の統一が可能かどうか議論の中心となるものと思われる。

会議名：ヨーロッパ薬局方国際協議会及び日米欧薬局方担当者会議

出席者：薬品部 石橋無味雄

開催場所，時期：チェコ共和国，プラハ，1996年12月10日～12月19日

参加内訳，人数：欧州，米国，アフリカ，アジア各国，約500名

会議内容：本会は，ヨーロッパ医薬品品質局主催の医薬品の品質に関する欧州会議で，医薬品規制当局の立場と役割並びにその活動と共同作業，医薬品品質の発展のための新しいアプローチ及び国際的アプローチ，化学薬品，生物医薬品，バイオテク医薬品などの規格などについてワークショップ討議，円卓会議などの形式で有益な講演及び討議が行われた。また，ヨーロッパ薬局方1997を中心に薬局方に関する討議が行われた。

薬局担当者会議では，一般試験法及び医薬品各条などに関する過去の合意事項の各国における実施状況，進行状態などの確認，今後の計画及び調和案の推進計画，日米欧医薬品規制ハーモナイゼーション会議（ICH）から提出されている一般試験法の調和要望書の取り扱いなどについて討議合意がなされた。

会議名：ICH バイオテクノロジー応用医薬品の品質関連会議

出席者：生物薬品部 早川堯夫（①②③④に参加）

♪ 森本和滋（④に参加）  
 ♪ 山口照英（④に参加）  
 ♪ 川西 徹（②③④に参加）

開催場所，時期：①専門家会議：サンフランシスコ（米国），1996年4月30日～5月4日，②アネシー（フランス），1996年9月25日～28日，③サンフランシスコ（米国），1997年1月9日～12日，④成田，1996年3月11日～14日

参加者内訳，人数：日米欧三極の品質分野の薬事規制当局及び製薬団体関係者約30名

会議内容：バイオテクノロジー医薬品（バイオ医薬品）の品質（Q5）に関する2つの課題及び規格（Q6）に関する課題の合計3つの課題について討議した。

1. VIRAL VALIDATION（ウイルス安全性）

正式ガイドライン名は「Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell Lines of Human or Animal Origin（ヒト及び動物細胞株由来のバイオテクノロジー製

品のウイルス安全性評価 (Q5A) である。厚生省の担当で昨年度の横浜での ICH 3 でステップ 2 となっていたが、成田の専門家会議でステップ 4 に達した。ステップ 2 からステップ 4 の段階では字句の修正及び内容の一部手直しがあったが、いずれも解釈を明確にしたり全体の整合性をはかるものであり、実質的内容の変化はなかった。ガイドラインは 7 つの章、30 近くのセクション、5 つの表、5 つの補遺、全 819 行からなるきわめて大部なものである。

## 2. CELL SUBSTRATE (細胞基材)

正式ガイドライン名は「Derivation and Characterization of Cell Substrate Used for Production of Biotechnological/Biological Products (バイオテクノロジー応用製品/生物起源由来製品の生産に用いられる細胞基材の由来に関する必要条件) (Q5D)」である。PhRMA が担当したもので、討議開始から一年半あまりの作業の末、1997年1月のサンフランシスコでの専門家会議でステップ 2 に達した。2 つの章、19 のセクション、1 つの補遺を含む全 749 行からなる。本ガイドラインの趣旨、目的は生物製品 (バイオ製品/生物起源由来製品) の生産基材として用いられるヒト、動物、微生物細胞の由来に関する適切な基準、細胞バンク樹立に関して要求されるデータ、明らかにしておくべき細胞特性やその特性を確認するための試験の実施要領、細胞の維持・管理方法、細胞の安定性評価に関連する事項について国際調和を図ることにある。ステップ 2 に至る主な論点は、1) 申請時要求事項、GMP 事項、参考事項の区別の明確化、2) 細胞特性評価項目に関する合意、3) 製品の品質恒常性確保の一環としての細胞の安定性評価のあり方、4) 細胞の無菌試験やマイコプラズマ試験に関する既存公定書の利用とデータの相互受け入れの可能性、5) 細胞基材の安全性試験としての染色体分析 (karyology) 試験及び造腫瘍性 (tumorigenesis) 試験の必要性、などであった。

## 3. SPECIFICATIONS OF BIOTECHNOLOGICAL/BIOLOGICAL PRODUCTS

ガイドライン名は「Specifications, Tests and Procedures for Biotechnological/Biological Products (バイオテクノロジー応用製品/生物起源由来製品の規格、試験方法) (Q6B)」である。EFPIA と FDA が共同で担当している。本ガイドラインの趣旨、目的は、十分な特性解析が可能である生物製品 (バイオテクノロジー応用製品/生物起源由来製品) を対象として、特性解析及び品質評価のあり方並びにバッチリリースにあたって定めるべき規格及び試験方法に関する指針の国際調和を図ることにある。1) 緒言、2) 生物製品の規格の設定にあたって考慮すべき問題、3) 規格設定の要件、4) 生物製品の規格、5) 用語から構成される。主な論点は 1) 同時に作成が進行している化学製品の規格に関するガイドライン (Q6A) との整合性、2) 薬局方の試験法との関係、3) 生物製品の特性を表す場合の Biological Activity の各極の考え方の違いの調和、4) 各極で承認書に含まれる書類の範囲の違いがあるため、規格に設定すべき要件が異なる場合の調和、などがあり、単に生物製品の規格の立場からのみでは調和がはかられにくい問題が浮かびあがっている。

**会議名:** O-157 関連医薬品 (Synsorb-pk) のカナダでの治験状況調査と関係者との意見交換会

**出席者:** 生物薬品部 早川堯夫

**開催場所, 時期:** オタワ市, カナダ, 1996年8月8日~9日

**参加者内訳, 人数:** 厚生省研究開発振興課及び審査課担当官各 1 名, 国立小児医療センター竹田部長, カナダ厚生省治験・審査担当官

4 名, Synsorb-pk 治験実施関係大学, 病院, 国立研究所からの代表者 7 名, カナダ外務省日本担当官 1 名, Synsorb-pk 製造関係者 2 名

**会議内容:** 病原性大腸菌 O-157 による集団中毒発生への緊急対策として、関連医薬品 (Synsorb-pk) についてフェーズ 3 の治験が行われているカナダに急遽派遣され、治験状況調査と関係者との意見交換を行った。Synsorb-pk はペロ毒素に対するレセプターを超微細シリコン樹脂に結合させたペロ毒素特異的吸着剤とされている。現地で調査、討議した主な内容は以下のとおりである。1) カナダにおける大腸菌感染、2) 1990~1994年カナダでの O-157 のアウトブレイク、3) 1993年シアトルでのアウトブレイク、4) これらの事態への対応、5) 小児における大腸菌と HUS に関するカナダでの研究、6) カナダにおける O-157 の診断・治療に関する最新情報、7) Synsorb-pk の品質、安定性、毒性、薬効、体内動態などに関する非臨床試験結果、8) Synsorb-pk の臨床フェーズ 1 試験結果、9) Synsorb-pk の臨床フェーズ 2 試験結果、10) Synsorb-pk の臨床フェーズ 3 試験実施状況、11) 現在までの試験結果に対するカナダ厚生省治験・審査担当官の評価、12) Synsorb-pk に関するデータの開示及び日本への輸出に際しての法的手続き。

**会議名:** IABS/WHO 主催の哺乳類細胞培養によって製造した生物製品の安全性に関する会議

**出席者:** 生物薬品部 早川堯夫

川西 徹

**開催場所, 時期:** アネシー (フランス), 1996年9月29日~10月4日

**参加者内訳, 人数:** 日・米・欧を中心とする研究者約 100 名

**会議内容:** WHO 生物基準専門委員会によって作成中であったガイドライン「生物製剤の生産に用いられるインビトロ細胞基材としての動物細胞使用基準“REQUIREMENTS FOR USE OF ANIMAL CELLS AS IN VITRO SUBSTRATES FOR THE PRODUCTION OF BIOLOGICALS (Requirements for Biological Substances No. 50)”」において、主要な論点についての考え方のコンセンサスを得るために行われた。1) セルバンクのウイルス汚染の検出、2) 生物製品製造原料についての安全性試験、3) 狂牛病等の非ウイルス汚染物質に対する対処法、4) ヒト由来二倍体細胞の特性試験としての karyology 試験及び tumorigenesis 試験の有用性、5) 生物製品に混入した DNA の安全性に対する考え方、6) 生物製品に混入した宿主細胞由来蛋白質の安全性に対する考え方、のそれぞれのテーマについてディスカッションを行った。以上の会議終了後、WHO 生物基準専門委員会のメンバーに ICH-バイオテクノロジー応用医薬品の品質問題の専門家グループの代表者を加えた合計約 20 人の非公開会議により、ガイドライン完成のための最終的な討議を行った。

**会議名:** 第 8 回医薬品規制当局国際会議 (ICDRA)

**出席者:** 生物薬品部 早川堯夫

**開催場所, 時期:** マナマ市, バーレーン, 1996年11月10日~13日

**参加者内訳, 人数:** 世界 130 ヶ国余の医薬品規制当局代表 (各国 1~10 名), WHO 本部, ICH 事務局代表など約 200 名

**会議内容:** 医薬品規制当局国際会議 (ICDRA) は 1980 年から始まり、2 年に一度定期的に開かれる会議で、現在までに米、伊、スウェーデン、日、仏、加、オランダの順に開催

されてきた。今回は発展途上で開催された初の会議であった。会議は4日間で 1)規制の国際調和, 2)医薬品規制当局の使命:組織, 職員及び財源, 3)アップデート, 4)ジェネリックの登録のための技術要件及びカレントトピックスというテーマ別に講演及び討議が行われた。早川は、バイオテクノロジー応用医薬品の品質確保のあり方に関する総論及びICHの「遺伝子安定性」, 「製品安定性」, 「ウイルス安全性」, 「細胞基材」などに関する国際調和ガイドライン並びにWHOの「動物細胞由来生物製品の安全性」に関するガイドラインをめぐる最新情報についての講演等を行った。これは、アップデートの中でバイオ医薬品が取り上げられ、上記のICHの各ガイドライン及びWHOガイドラインの作成の全てに参画した唯一の専門家であることから、各専門家グループの共通の代表としての講演が要請されたためである。

**会議名:** バイオテクノロジー及び生物起源由来医薬品に関するICHの動向に関する国際シンポジウム

**出席者:** 生物薬品部 早川堯夫

**開催場所, 時期:** ソウル市, 韓国, 1996年11月26日~27日

**参加者内訳, 人数:** 米国FDA, EU規制当局, 英国NIBSC, 韓国FDA, 米国ソーク研などからの演者7名, 韓国内の大学, 研究所などからの聴衆約200名

**会議内容:** 韓国FDAの主催で頭書の国際シンポジウムが開催された。各国からの演者により、「ICH概要」, 「cGMP」, 「ウイルスバリデーション」, 「遺伝子安定性」, 「細胞基材」, 「組換えB型肝炎ワクチンの開発と特性」, 「バイオ医薬品の品質評価に対するFAD基準と到達目標」に関する講演があった。早川はヒト及び動物細胞由来のバイオ医薬品のウイルス面からみた安全性評価のあり方と日・米・欧間での国際調和の最新情報についての講演と関連する討議を行った。更に、韓国FDAとバイオ医薬品などの品質確保についての情報交換を行った。

**会議名:** USP Open Conference / Botanicals for Medical and Dietary Uses: standards and Information Issues

**出席者:** 生薬部 関田節子

**開催場所, 時期:** ANA Hotel, Washington, D.C., USA, 1996年7月7日~9日

**参加者内訳, 人数:** 薬局方委員(中国, フランス, カナダ, EP, 米国), 政府機関職員(日本, インド, ネパール, スイス, ジャマイカ, FDA, NIH), 大学(ドイツ, 米国), 製薬, 食品, 香粧品各企業(日本, 米国)計約160名

**会議内容:** 米国薬局方(USP)は、1820年の作成初期には217種の生薬及び天然由来の薬物を収載していたが、時代を経るに従い合成医薬品が主流となり次第に数を減らし現在1/10になっている。ところが近年再び植物資源を見直す気運が高まり、多くの植物由来の医薬品、ダイエット食品を追加収載することが要求されている。USP委員会はこれらの要求に対する方針決定を目的に今回のUSP Open Conferenceを企画し、参加を要請された。米国は、中国、日本と異なり、系統立った伝統薬としての記録がなく、ヨーロッパのような民間薬としての習慣も少ないため、どのような生薬をどのような基準で採用するか、有効性と有害性の情報をどのような方法により選択するか、またその情報をいかにして消費者に還元するか、モノグラフ作成に必要な項目は何か、等々全く基礎的な見地から討議が始まっている。GMPに関しては、現在、USP主導とFDA主導の

ものが個別に施行されているため両者をどう扱うか、WHOなど他国のGMPとどう調和させるかを検討。dietary supplementsとdrugsに対してはそれぞれ別個のGMPが必要であるとの認識に到達した。規格の設定においては日本薬局方(JP)の内容が世界をリードしており、意見交換に大きな期待が寄せられた。今後は、JP, USP, ヨーロッパ薬局方, 中国薬局方の間での国際調和が検討される時期が来るとであろうと予想される。

**会議名:** ISO/TC194/WG11「医療用具の滅菌残留物」

ISO/TC194/WG15「生物学的アセスメントの戦略」

**出席者:** 療品部 中村晃忠

**開催場所, 時期:** アーリントン(米国), 1996年10月21日~24日

**参加者内訳, 人数:** 11カ国, 33人

**会議内容:** WG11では、(1)医療用具中に残留する種々の化学物質の残留許容値を決める標準的方法、(2)残留エチレンオキサイドの分析法の改訂について審議した。WG15では、この新しくできたWGの性格付けと当面の課題について議論し、今回の会議までの宿題を決めた。詳細は、ホームページ(<http://dmd.nih.gov/iso-tc194/>)を参照のこと。今回は、1997年4月に英国で行われる。

**会議名:** ISO/TC150「外科用インプラント」

**出席者:** 療品部 中村晃忠

〃 土屋利江

〃 佐藤道夫

**開催場所, 時期:** 幕張(千葉), 1996年10月28日~11月1日

**参加者内訳, 人数:** 15カ国, 約80人

**会議内容:** 体内に埋植する医療用具及び血液浄化医療用具、並びにそれに使う材料の国際標準化を審議した。主に、「抽出インプラントの解析」と「インプラント・データシステムのための最低データセット」、及びシリコン材料の標準化のグループに参加した。今回は、1997年10月にシンガポールで行われる。

**会議名:** ISO/TC172/SC7「眼鏡および眼科用機器」

**出席者:** 療品部 土屋利江

**開催場所, 時期:** 名古屋, 1997年4月3日~9日

**参加者内訳, 人数:** 17カ国, 200名

**会議内容:** 眼組織に使用するendotamponades, irrigating solutions, viscosurgical devices, solid ocular implantsの標準化のための作業が始まった。従来は、コンタクトレンズや、眼内レンズ、光学機器を主に取り扱っていたが、眼球内へ、ガス、溶液、ゲル、オイル状の種々の物質が使用されており、それらの標準化に向けて、必要なエキスパートの指名、商品名及びその種類の整理、それらの製造販売会社のリスト化等の作業を行った。眼組織という極めて重要な器官への適用であるから、毒性専門家、眼科医、製造業者の3者で今後の具体的な作業を進める事になった。欧米ではこれらの製品は、医療用具であるが、日本では、医薬品として分類されるものもあり、取り扱いの不一致が懸念された。日本での会議のため、米国からの委員が欠席となった。今回は、本年10月サンフランシスコで開催され、viscosurgical devicesとirrigating solutionsの標準化に関する専門家会議を開く予定である。SC7の全体会議は1998年4月23日~29日ストックホルムで開催される。

**会議名:** ISO/TC194「医療用具の生物学的評価」

**出席者:** 療品部 中村晃忠

**開催場所, 時期:** ヨーク(英国), 1997年4月21日~25日

**参加者内訳, 人数:** 15カ国, 約80人

**会議内容:** 医療用具の生物学的評価の枠組みと試験方法の国際調和をめざしている。それを更に促進するための課題を整理し、課題克服の戦略・優先順位を決めるための議論が行われた。また、具体的には、細胞毒性試験に用いる標準材料の国際ラウンドロビンテストを日本の材料を用いて開始することが決定されたことが特筆される。また、感作性試験の見直し、材料キャラクタリゼーションの議論が開始された。詳細は、ホームページ (<http://dmd.nihs.go.jp/iso-tc194/>) を参照のこと。次回は、1998年4月ワシントンDCで行われる。

**会議名:** ヨーロッパにおける空気質ガイドライン改訂の最終会議 (WHO)

**出席者:** 環境衛生化学部 安藤正典

**開催場所, 時期:** ビルトーベン (オランダ), 1996年10月28日~31日

**参加者内訳, 人数:** 日, 米, 欧などから27名, オブザーバー2名, 事務局7名

**会議内容:** 1) 概要: WHO ヨーロッパ事務局では、1987年に Air Quality Guidelines for Europe を発刊したが、科学的データや健康リスクアセスメントの方法の進歩に伴う再評価を EC 並びに IPCS の協力の下で1993年から行っている。Air Quality Guidelines の改訂作業を数次にわたり進めてきたが、1996年(10月28日~31日)の会議を最終とし、速やかに発刊作業に入ることとした。空気質の対象は、揮発性有機化合物、無機物質、PCB、PCDDs、PCDFs、古典的汚染物質、生態毒性への影響評価、室内空気中の6つのグループについての検討がなされた。2) 揮発性有機化合物: ベンゼン、ブタジエン、ジクロロメタン、ホルムアルデヒド、PAH、スチレン、トルエン、トリクロロエチレン、テトラクロロエチレンのガイドラインが示された。3) 無機物質: 発がん物質及び非発がん性物質のヒ素、クロム、ニッケル、カドミウム、フッ素、鉛、マンガン、水銀、白金についてガイドライン値を示した。4) PCB、PCDDs、PCDFs: リスク低減化のためには、新しい発生源の検索のほか、焼却プロセスや焼却化合物の情報は既知の発生源の制御する上で重要である。5) 古典的大気汚染物: オゾン、二酸化窒素、二酸化イオウ、浮遊粒子状物質及び一酸化炭素のガイドライン値を設けた。6) 生態毒性に関する影響: 表流水の浸食に対して最も高い評価因子である塩基性陽イオン濃度と雨量とを共に評価した。7) 室内空気: ラドンについて勧告した。

**会議名:** バイオテクノロジーと食品の安全性に関する FAO/WHO の合同会議

**出席者:** 食品部 豊田正武

**開催場所, 時期:** ローマ (イタリア), 1996年9月29日~10月7日

**参加者内訳, 人数:** タイ, オランダ, 中国, パキスタン, デンマーク, 日本, 南アフリカの8カ国の専門家11名, 各国際機関からのオブザーバー10名, 事務局8名の計29名参加

**会議内容:** 本会議は1990年の第1回合同専門家会議で「化学的並びに技術的進歩に照らして、この会議の勧告の妥当性を精査するための専門家会議を適当な時期に開催すべきである」との勧告を受けて開催された。消費者団体の代表も含めた専門家が参加した。本会議の目的は、バイオテクノロジー応用食品の安全性評価方法について国際的な指針を示そうとするものである。会議では食品の安全性評価に

ついて考慮すべき事項、安全性評価のポイントについて討議がなされ、組換え DNA 技術応用食品については既存の食品と同等である場合、既存の食品と明らかな差異以外同等である場合、既存の食品と実質的に同等でない場合に分類して安全性を評価することとなった。

**会議名:** 食品の安全性に対するリスク管理の適用に関する FAO/WHO の合同専門家会議

**出席者:** 食品部 豊田正武

**開催場所, 時期:** ローマ (イタリア), 1997年1月27日~31日

**参加者内訳, 人数:** 米国, カナダ, 英国, ニュージーランド, ウルガイ, フィリピン, ナイジェリア, デンマーク, スウェーデン, ドイツ, イラン, 日本, アルゼンチンの14カ国の専門家14名, 各国際機関よりのオブザーバー12名, 事務局10名の計約36名

**会議内容:** 一昨年の1995年3月 WHO にて開催された、FAO/WHO 合同専門家会議の「リスクアナリシスの食品規格問題への応用」において、リスクアナリシスはリスクアセスメント、リスク管理とリスクコミュニケーションとに分けて考えることが提案され、その会議では主にリスクアセスメントの手法について討議された。本会議では次のステップとしてのリスク管理の手法に関して討議がなされた。即ち、会議の目標、国際貿易、安全性と健全性(リスクの低減にはそのコストとベネフィットを考慮する)、リスク管理用語の定義、リスク管理の概要(リスク管理の要素: リスク評価, リスク管理用選択枝の評価, 管理の実行, モニタリングと評価)、食品の安全性へのリスク管理の概念、CODEX の機関による現在のリスク管理の実際について討議した。

**会議名:** FAO/WHO 合同食品規格委員会

第21回分析・サンプリング部会 (CCMAS)

**出席者:** 食品添加物部 米谷民雄

**開催場所, 時期:** ブダペスト (ハンガリー), 1997年3月10日~14日

**参加者内訳, 人数:** 42加盟国, 2オブザーバー国, 国際機関 (AOAC, EC, FAO, FAO/IAEA, IDF, ISO, IUPAC, OIV, FAO/WHO 事務局) から計120名が参加

**会議内容:** 以下の議題について議論された。①サンプリングに関する一般的ガイドライン, ②国際食品規格で採用できる分析法を評価するためのクライテリア, ③食品の公的輸出入管理に関わる試験検査機関の能力を評価するための客観的クライテリア, ④分析用語の調和, ⑤回収率補正した分析結果の報告法, ⑥Measurement Uncertainty, ⑦オゾン層破壊物質(四塩化炭素等)を用いた分析法の見直し, ⑧国際食品規格で用いられる分析法のタイプ分けとその承認, ⑨Codex Alimentarius Commission Procedural Manual のCCMAS に関連する部分の改訂作業, ⑩分析法に関する IAM (Inter-Agency Meeting) の報告, ⑪CCMAS への委任事項の変更。

③のクライテリア及び④の limits 以外の用語は、FAO/WHO 合同食品規格委員会に回された。⑦の各分析法については、今後 IAM で対応するよう要請された。⑧で、今回提案された分析法については承認された。⑩⑪は了承承認された。他の議題については、次回も継続して議論することとされた。なお、次回は同じブダペストで、1998年11月16日~20日に開催される予定である。

**会議名:** 第29回国際食品規格委員会食品添加物汚染物質部会

**出席者:** 食品添加物部 山田 隆

**開催場所, 時期:** ハーグ (オランダ), 1997年3月17日~21日 (14日~15日 ad hoc working group)

**参加者内訳, 人数:** 45カ国の政府機関代表, 約30の食品関連の国際機関・団体などから約200名

**会議内容:** 1月にローマで, また, 2月にジュネーブで開催されたJECFA会議の要点の報告が行われた。次回のJECFAで規格を作るべき食品添加物の品目, 規格改訂を求める品目の選定が行われた。国際食品規格委員会(CAC)に対して, 推奨規格として承認を求めべき品目の選定が行われた。食品添加物の一般規格の前文を6月のCACの会議にステップ8として提出することとなった。各国から寄せられた着色料, 色調安定剤と膨張剤について, 要約作業を行うこととなった。

食品汚染物質については, 食品及び飼料中のアフラトキシンについての他, オクラトキシンA, パツリン, 鉛, ヒ素, 錫, カドミウムについて討議がなされた。カドミウムについては, JECFAで1999年に再評価されるまで現在の指針のままにしておくこと, 鉛に関しては, 一般規格で, より厳しいレベルにすることについて, 各国の意見を求めることとなった。

**会議名:** 第26回医薬品国際一般名(INN)委員会

**出席者:** 有機化学部 宮田直樹

**開催場所, 時期:** ジュネーブ (スイス), 1996年4月24日~26日

**参加者内訳, 人数:** 日, 米, 欧などからINN委員5人, WHO事務局5人, オブザーバー2人

**会議内容:** WHOのDivision of Drug Management & Policiesの主催で, 26th Consultation on Nonproprietary Names for Pharmaceutical Substances (第26回医薬品国際一般名委員会)が開催され, 1)proposed INNリスト#76に収載するため, 医薬品92品目について国際一般名(INN)の選定及び見直し作業を行った。2)医薬品の国際一般名の選定に関する基本原則について審議を行い, システム名及び置換基名の見直しを行った。特に, 抗腫瘍薬及び抗ウイルス薬, アセチルコリンエステラーゼ阻害薬, セルロース誘導体, モノクローナル抗体等について, 国際一般名の命名法について検討した。更に, インターフェロン, インシュリン, ヘモグロビン誘導体等のシステム名及びサブシステム名について審議した。3)INNのデータベースの作成について必要性の検討を行った。

**会議名:** 免疫毒性試験ガイドラインに関するOECD専門家会議

**出席者:** 機能生化学部 澤田純一

**開催場所, 時期:** 米国EPA (Research Triangle Park), 1996年12月11日~12日

**参加者内訳, 人数:** 日米欧の研究者及び事務局, 約20名

**会議内容:** OECD毒性試験ガイドライン407は最近修正され, 免疫毒性関連の病理組織学的試験項目が追加されている。また, ガイドライン408も同様な修正が行われる予定となっている。しかしながら, 修正後のガイドラインにおいても, なお免疫毒性物質の検出が不可能とされる(擬陰性となる)例も示され, 検出率の増大のための免疫毒性試験項目の追加の必要性が指摘されていた。

討議の結果, Tier I (第一段階)として, ガイドライン407に追加すべき免疫毒性試験としては, ヒツジ赤血球等のT依存性抗原に対する抗体産生(ELISA又はPFC)が

妥当であるとの合意が得られた。その詳細としては, 1群8匹以上の4群(3段階の用量)の雌性動物を用いることが勧められるとされた。また, Tier II (第二段階)の試験項目として, 免疫組織化学, 細胞表面マーカー, 血清化学的検査, NK細胞活性, CTL活性, 遅延型過敏症(DTH), マクロファージ活性, リンパ球混合培養(MRL)等の複数の項目があげられ, 免疫毒性物質の分類に関しても討議されたが, 最終的な結論には至っていない。

**会議名:** 天然資源開発利用に関する日米会議・第31回有毒微生物部会

**出席者:** 衛生微生物部 三瀬勝利

**開催場所, 時期:** 米国, アラスカ州, アンカレッジ市, 1996年7月12日~21日

**参加者内訳, 人数:** 米国, 日本, カナダなど50人

**会議内容:** タンパク質部会と合同で科学会議を開催した。Proceedingsは平成8年末に刊行された。講演総数は36, そのうち4割が有毒微生物関係であった。ビジネスミーティングでは病原大腸菌O-157の制御が主たる話題となった。

**会議名:** 薬局方調和会議(PDG)

**出席者:** 衛生微生物部 三瀬勝利

薬品部 石橋無味雄

**開催場所, 時期:** チェコ国, プラハ市, 1996年12月14日~9日

**参加者内訳, 人数:** 日本薬局方3名(上記2名に加えて, 武田寧日本公定書協会専務理事), 米国薬局方2名, 欧州連合薬局方6名

**会議内容:** PDGでこれまで国際調和の対象となっている試験法の進捗状況, 各試験方法の内容に対する意見が述べられると共に, 新たに国際調和の対象とする試験法とLead Pharmacopoeiaが一部の試験法で決定された。新規に国際調和の対象となるものについては, 微生物限度試験法をはじめ, 微生物関連の試験法が多い。

**会議名:** IFCS (化学物質安全性国際フォーラム) アジア地域会議

**出席者:** 化学物質情報部 神沼 二真

山本 都

中野 達也

**開催場所, 時期:** フィリピン, マニラ, ニューワールドホテル, 1996年6月13日~14日

**参加者内訳, 人数:** 日本(衛試 神沼, 山本, 中野; 環境庁, 通産省), 中国, 韓国, フィリピン, イラン, オーストラリア, バングラディシュ, IPCS事務局, UNTAR, ILO/バンコック他23名

**会議内容:** 本年3月キャンベラで開かれたIFCSの中間会合と, 5月のオタワで開催された来年2月に同じオタワで開かれる第2回IFCSのための準備会合のフォローアップとして, 副議長を現在の3人制から4人制として, その代わりにラポターをなくすこと, 及び中間会合のアジア地域の代表国を選出する件に関して, 地域国としての意見が求められ, 副議長4名制に賛成が得られた。代表国については, 選出法も含めて結論は出なかった。これらの事項が, オタワ会議の前日開催される代表国による(nomination)会合で決定したいとの事務局の意向が伝えられた。また会場をWHO西太平洋事務所の会議室に移して, 衛試によりインターネットとGINCに関するデモが行われた。

**会議名:** POPsに関する専門家会議

**出席者:** 化学物質情報部 神沼 二眞  
山本 都

**開催場所, 時期:** フィリピン, マニラ, ニューワールドホテル, 1996年6月17日~19日

**参加者内訳, 人数:** IFCSの主要国, 国際機関(IPCS, IRPTC, FAD, UNIDOなど), NGO(グリーンピース, WWF, 国際農薬ネットワークなど)など約150名

**会議内容:** POPsはUNEPの政府間会議の決議事項(18/32)として取り組みが決まり, 行動目標a~eが採択され, これに基づいてこれまでに幾度かの会議がもたれた。この結果行動目標a, bまでが達成されており, 今回はcとdの達成が目標とされた。

現在問題とされているPOPsは, 農薬9種類, ダイオキシンとフラン, 他1物質である。このうち農薬は先進国ではほとんど生産及び使用されていないものであり, こうした規制を途上国にどう広げることが中心課題であった。ダイオキシンについては, 焼却炉の改良, 使用材の変更などで減少が図れるというドイツの発表があった。

**会議名:** IPCS(国際化学物質安全性計画)のプログラム・アドバイザー委員会

**出席者:** 化学物質情報部 神沼二眞

**開催場所, 時期:** カナダ, ハリファックス, デルタバリーングトンホテル, 1996年10月23日~25日

**参加者内訳, 人数:** IPCSの各国のアドバイザーとオブザーバー約25名

**会議内容:** 前回(第7回)のPACで, 会議のテーマが多岐にわたるようになってきたので, 1回ごとのテーマを絞ることになったことを受けて, 今回の主題はリスクアセスメントを中心とすることになった。

主な議題は:

- (1) 各国の既存の評価文書を基礎としたCICADの作成。
- (2) リスクアセスメントに関するOECDとIPCSとの重複の調整。(IPCSはヒトの健康への影響を, OECDは環境への影響を評価するという分業体制。)
- (3) IPCS事業の米国NGOなどからのクレームへの対処。
- (4) 評価文書をCD-ROMやGINCにより配布すること及び評価文書が広く使われるようにするための情報提供の必要性, GINCの活用。
- (5) 次回以後の予定であったとして更にPAC会の回数はこれまでより減らすこと, 次回は98年ぐらいになることが事務局から知らされた。

**会議名:** 第1回CICAD(国際簡潔評価文書)最終案検討会議

**出席者:** 化学物質情報部 関澤 純

**開催場所, 時期:** ブラッセル(ベルギー), 1996年11月18日~21日

**参加者内訳, 人数:** 委員13名(先進国10, 途上国3), 事務局・オブザーバー7名

**会議内容:** CICADは, 各国の安全性評価文書を基に国際的に有用な簡潔評価文書を作成するため, IPCSが中心に昨年より計画を開始した。今回初めて7物質(Biphenyl, 3,3'-Dichlorobenzidine, Limonene, Methyl methacrylate, 1,1,2,2-Tetrachloroethane, 1,1,1,2-Tetrafluoroethane, o-Toluidine)についてのCICAD原案最終検討会議が開かれた。クリティカルなデータのリスク評価を重点に検討した。リスク評価で使用する曝露評価モデルの選択と有効性が問題となった。印象的だったのは, 各CICAD草案執筆者が行った背

景となる各国の安全性評価文書の評価プロセスの厳密さと透明性を証明するプレゼンテーションである。わが国ではCICADの基にできる詳細な安全性評価文書がないため, 他の国の文書を基にCICAD作成協力を進めることになった。先進国でこのような公表文書を持たないのはわが国のみであり, この確立が今後必須と考える。

**会議名:** IFCS-II(化学物質安全性国際フォーラム)

**出席者:** 化学物質情報部 神沼 二眞  
中野 達也

**開催場所, 時期:** カナダ, オタワ, 1997年2月7日~15日

**参加者内訳, 人数:** 化学物質の安全性に関わる90カ国の政府の代表者, 国際機関, NGOなど300人

**会議内容:** この会議は, UNCEDのアジェンダ21のうち化学物質の安全管理をめざす第19章の6つの行動計画の推進のための政府間会議であり, 今回は特にアセスメントに関する行動計画A, 表示のハーモナイゼーションと分類に関するB, 情報交換に関するC, リスク削減に関するD, 各国の体制整備に関するEの現状と今後の課題に焦点が合わされた。

われわれは, 行動計画Cの重要課題として, GINC(地球規模の情報ネットワーク)の推進についての本会議報告と, ホームページなどのデモを行った。GINCはインターネットを基盤とする情報提供と, 情報交換をめざすものであるが, その重要性はカナダ来賓の開会の挨拶の中にも言及されただけでなく, 本会議, (アジア)地域会議などでも討議され, 最終報告書の中では, 行動計画Cの中だけでなくD, EなどでもGINCに関連したさまざまな行動目標が明記されることになった。

以上の他, 内分泌攪乱物質やPOPsへの取り組みが緊急課題として議論された。なお次回の第3回中間会合は1998年末に日本で, 次回第3回のフォーラムは2000年にブラジルで開催されること, 第4回中間会合は2002年に開催されることとなった。

**会議名:** IPCSのINTOXプロジェクトに関するワーキンググループ会議

**出席者:** 化学物質情報部 山本 都

**開催場所, 時期:** キャッスルトン(英国), 1997年3月8日~3月16日

**参加者内訳, 人数:** アルゼンチン, ウルグアイ, 南ア連邦, ヨルダン, アイルランド, 英国, 米国など約40名

**会議内容:** 前半は, 化学製品情報, 化学物質の存在場所, 輸送関連情報などを収集・記録するための統一様式を検討し, 化学製品に関する情報登録様式の原案を作成した。後半は化学物質による事故記録や情報交換のための統一様式を検討した。ここでは, この他に暴露・避難した人の記録の様式, 化学物質事故に関するトレーニング活動やマニュアルについても検討された。

**会議名:** ICH 専門家準備会合

**出席者:** 安全性生物試験研究センター 黒川雄二

**開催場所, 日時:** バージニア, メリイランド州, 米国, 1996年4月27日~5月5日

**参加者内訳, 人数:** 安全性分野専門家, 約50名

**会議内容:** 報告者は, 癌原性に関して二種を用いる問題に関する会議(S1B), 癌原性試験における最高投与量に関する会議(S1CR), 非げっし類反復投与試験法における投与期間に関する会議(S4B), 更に臨床試験に関連した

非臨床試験の実施タイミングの検討に関する会議(M3)に出席した。そのうち、S1Bに関しては試験法案がまとまり、Step2に入ることが出来たが、その他の課題については論議がまとまらず、その後の専門家準備会合にまわされた。

**会議名:** IPCS EHC Meeting on Polybrominated Dibenzop-dioxins and Dibenzofurans

**出席者:** 安全性生物試験研究センター 黒川雄二

**開催場所, 時期:** ドイツ国, ハノーバー市, Fraunhofer 研究所, 1996年11月11日~15日

**参加者内訳, 人数:** 6カ国(米国, カナダ, ドイツ, 日本, スウェーデン, オランダ, スイス)よりのメンバー, オブザーバー, IPCS関係者など15人

**会議内容:** ダイオキシンに関しては、これまで TCDD に代表される polychlorinated dibenzo-p-dioxin, dibenzofurans が問題にされ研究・評価されて、WHO 及び世界各国で TDI の設定も行われてきている。しかし、polybrominated dibenzo-p-dioxins, -dibenzofurans に関する情報をまとめた評価はされていなかった。そこで、IPCS は新しい Environmental Health Criteria としてこれらの物質に関するものを出版しようとしたものである。ドラフトはドイツの Fraunhofer 研究所の研究者によって作成され、今回その第2版が完成し各国の専門家によりその内容が討議された。ドラフトの内容は、化学、環境内運命、曝露、毒性などに渡っていたが、化学に比べて毒性データの不足が目立った。例えば、NOAEL を求めるにしても、未だラットの13週間投与試験のみしかない(その NOAEL 10ng/kg.bw は、TCDD と同じであった)。現時点のデータを評価した結果、これら polybrominated dioxins は polychlorinated dioxins に比べて低毒性である傾向があり、ダイオキシン全体の毒性としてはそれほど問題にならないようである。しかし臭素化難燃剤からの生成が極めて高いことから、今後代替品を開発し廃止の動きを取ると結論した。

**会議名:** OECD/RAAB

**出席者:** 安全性生物試験研究センター 黒川雄二

**開催場所, 時期:** OECD Annex Chardon Lagache, Paris. 1996年12月12日~13日

**参加者内訳, 人数:** OECD 加盟13カ国, 関連団体, OECD 事務局など約25名

**会議内容:** この会議はこれまで HAAB Hazard Assessment Advisory Body とされていたが、今回より各国の同意を得て、RAAB Risk Assessment Advisory Body と名称を変更し、より広義のリスクアセスメントに関する国際的な指導機構という性格を強めた。議題は以下の4つに大別される。1. Method Development, 2. Harmonization of Methods, 3. Good Assessment Practice, 4. Sharing Information About New Industrial Chemicals。大部分の話題は環境問題に関するものであり健康影響問題は少ない。出席者が特に関連したのは、1.の中の Human Health Hazard/Risk Assessment (IPCS との協力体制のもとに先ず生殖発生毒性のリスクアセスメントが出版され、今後、遺伝毒性、発がん性、一般毒性に進むこととされている)、3.の中の Harmonization of Terminology (generic and technical terms にわけて作成されつつあり、今後 Internet を通じて広くコメントが求められる)、Inventory/Compendium of Assessment Methods (各国における新規・既存化学物質、農薬等のリスクアセスメント手法とその評価結果の情報を Internet により広めようとする計画)などであった。結論として、今や当然の言葉

となった Harmonization が更に協調され情報を広くかつ早く公開することが必須となりつつあることを実感した。

**会議名:** ICH 専門家会議, バイオ医薬品の安全性に関するトピックグループ会議 (Expert Working Group Meeting on Preclinical Testing of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use.)

**出席者:** 毒性部 井上 達

**開催場所, 時期:** ①米国, ヴァージニア州, 1996年4月27日~5月5日, ②連合王国, ロンドン市 (Dockland, London), 1996年11月5日~7日

**参加者内訳, 人数:** Carstensen J. (EFPIA), Cavagnaro JA. (FDA, Rappateur), Inoue T. (MHW), Kawai M. (JPMA), Nakaniwa H. (MHW), Osterberg RE. (PhRMA), Sims J. (EC), Giaquinto A. (PhRMA), Vicari G. (EC)

**会議内容:** バイオ医薬品の安全性試験については、ICH 共通ガイドラインの作製が時期尚早との判断によりさしあたりこれを作製しないこととなっていた (ICH 1) が、その後のこの領域の開発の進展と相俟って各国の経験も豊富になる一方、それぞれの判断の状況が区々になってきたので、これを調整してプリシンプルという形で考え方を示すことになり、その原案が ICH 3 横浜会議にてプレ Step 2 に達した。引き続き1996年5月のワシントンにおける専門家会議では、ICH 3 で pre-step 2 で公開された文書への各局の意見を持ち寄って、これに即した必要な書き換えを行い、ほぼ討議を終了して Draft 9 にまとめあげた。このような経過に沿って、ロンドンの会議での主要な目標は、S 6 の pre-step 2 文書本体についての合意へむけての最終的な詰め作業を進めることにあった。実質的には、この文書をガイドラインと表現するかの如何、Pre-clinical testing の表現を non-clinical testing とするかどうかの如何、及び若干の字句上の問題を除いて、本体については留保条件なしに合意に達することが出来、ステップ・アップ (Step 2) への調印に達した。

**会議名:** 医薬品の評価等に関する日本医薬品機構と欧州医薬品審査庁 (The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, EMEA) との定期会議

**出席者:** 毒性部 田中 悟, 医薬品機構 手島邦和理事 (団長), 佐藤裕道調査第一課長, 齊藤匡人企画管理係長

**開催場所, 時期:** 連合王国 (ロンドン市), 1996年12月4日~12日

**会議内容:** EMEA 側出席者は R. Bass, N. Wathion, J. Torrent-Farnell, S. Fairchild, M. Rainey, M. Carr, E. Koskinen の7名、日本側出席者は上記4名の他に在連合王国日本国大使館の小出顕生一等書記官が同席した。

EMEA 施設を見学したあと、Dr. R. Bass (Human Medicines Evaluation Unit の責任者)、及びその他の出席者から EMEA の組織等について説明を受けた。EMEA は、ヒト及び動物用医薬品の審査を行っている。GLP, GCP, GMP の査察も行っている。新医薬品の開発等に関する事前相談も受け付けている。職員は現在115名であるが、数年後には倍増される予定である。職員以外の専門家として約150名が EU 各国から登録されており、必要によってこれらの専門家の協力を得ているとのことであった。



医薬品機構側は、日本の医薬品の審査体制について、厚生省と医薬品機構及び現在の国立衛生試験所内に設置される医薬品医療機器審査センターとが協力して医薬品の審査を行うようになることを説明した。

EMA と医薬品機構は多くの共通点を有する医薬品の評価組織であり、両者は定期会議を継続しながら、協力して行くことが合意され会議が終了した。

**会議名：**IPCS のリスクアセスメントのアプローチハーモニゼーション：全身毒性に関するワークショップ

**出席者：**毒性部 長谷川隆一

**開催場所，時期：**ニューオリンズ（アメリカ），1996年12月12日～14日

**参加者内訳，人数：**WHO/IPCS 事務局6名，日本1名，米国9名，イギリス2名，オランダ1名，カナダ1名，ドイツ2名，ノルウェー1名，オーストラリア1名，合計24名

**会議内容：**国際機関，EU，EPA 及びカナダでのリスクアセスメント法について説明があり，それぞれについて質疑応答が行われ，ハーモニゼーションを行うための主な課題を抽出した。抽出された以下の課題について討議された。1. Transparency（透明性）：それぞれのアセスメントデータそのもの，アプローチ手法，判断プロセス等を明確にする。2. Confidentiality（信頼性）：データの信頼性を明らかとすること。ただし，疫学調査では必ずしも保障されたデータばかりではない。3. Uncertainty and Variability（不確実性とばらつき）：種差及び個体差，短期毒性 NOAEL から長期毒性 NOAEL，Benchmark dose あるいは他の用量依存性モデル，曝露データの不確実性等。4. Margin of Safety：EU の16各国で既存化学物質の評価法として採用されているもので，OECD での事業となっているものである。これは，リスク管理を含めたアプローチであることが確認された。5. Estimates of risk above the tolerable intake（耐用量を超えたときのリスクの評価）：今後の問題とされた。以上のように，本課題のリスクアセスメントアプローチの類似点と相違点が明らかとなった。

**会議名：**塩素化・ダイオキシン類に関するヒトの発がんリスク評価の IARC モノグラフ第69巻作成会議

**出席者：**毒性部 長谷川隆一

**開催場所，時期：**リヨン（フランス），1997年2月4日～11日

**参加者内訳，人数：**正委員（原案作成及び評価委員）：米国9名，ドイツ5名，日本2名，スウェーデン2名，イタリア1名，フランス1名，スペイン1名，ロシア1名，スイス1名，オランダ1名及びその他21名，合計46名

**会議内容：**ポリクロロダイオキシン類及びポリクロロジベンゾフラン類に関する最新の情報をまとめ，ヒトにおける発がん性の再評価（前回の2,3,7,8-TCDD（ダイオキシンの中で最も強い生体作用物質）の評価は1984年で Class 2 B：ヒトに対して発がんの可能性のある物質）を行い，モノグラフを作成する会議である。全体を4つの小委員会（1：曝露，2：疫学，3：発がん試験，4：がん関連情報）に分け，4日間の討議が行われ，最後の3日間は全体会議で各小委員会からの原案について討議が行われた。最終評価で2,3,7,8-TCDD は Class 1（ヒトに対して発がん性あり）となり，その根拠はプロモーション作用が動物実験で明かなこと，発がん性試験で広範な臓器に発がん性が認められていること，疫学データで総発がん率の増加が認められる

こととされた。更に動物実験で強い発がん性があり，それは Ah レセプターを含む機構でおこる多くの証拠があること，Ah レセプターはヒトでも強く発現しており，動物と同様に機能していること，発がん性試験での2,3,7,8-TCDD の組織濃度はヒトが強く曝露されたときと同程度であると判断された。なお，他の物質についてはヒトでの発がん性の証拠が不十分とされた。

**会議名：**OECD 主催の発達神経毒性に関する検討会議（Consultation Meeting on Developmental Neurotoxicity）

**出席者：**薬理部 藤森観之助

**開催場所，時期：**コペンハーゲン（デンマーク），食糧庁，1996年6月17日～18日

**参加者内訳，人数：**11カ国（官関連9，学関連3，企業関連7）19名及び IPCS 1名，OECD 事務局2名，計22名

**会議内容：**今回の会議は1995年の生殖及び発生毒性試験に関する OECD 特別作業グループ会議及び神経毒性試験に関する OECD 特別作業グループ会議において，発達神経毒性試験に関する新しいガイドラインの必要性が同意され，いくつかの問題が討議された結果，神経毒性及び発生毒性の専門家を含めた小規模の作業グループを編成して発達神経毒性試験ガイドラインの考え方についての素案作成作業を行なうことが OECD に勧告された結果，開かれたものである。今回はその第一回の会議である。会議では米国環境庁 EPA から提出された素案 OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Guideline### Developmental Neurotoxicity Study を基に，試験の理念及び試験方法について討議した。主な論議は Weight of evidence の概念，First tier 試験の必要性，Stand alone 試験，試験内容，発達神経毒性 Endpoint であった。なおガイドラインの作業進行計画（次回）については OECD としては未定である。

**会議名：**FAO/WHO 残留農薬に関する合同会議（JMPR）

**出席者：**薬理部 藤森観之助

**開催場所，時期：**ローマ（イタリア），FAO 本部

**参加者内訳，人数：**WHO 毒性評価グループ正式メンバー6名，FAO 食品中残留パネル正式メンバー6名，事務局16名（WHO 3名，FAO 2名，CCPR 2名，臨時アドバイザー10名は事務局に属する。）

**会議内容：**WHO/FAO 残留農薬合同会議の毒性コア評価グループ会議に臨時アドバイザーとして参加し，12品目の農薬について農薬の動物における動態及びヒトを含む動物における毒性試験データからなる作業資料を基に毒性評価を行い，一日摂取許容量 ADI あるいは急性 Reference Dose (RfD) を設定する作業を行なった。本会議では評価過程に生じる問題点のみならず，毒性評価方法の妥当性，範囲及び応用方法についても論議している。以下に討議内容と各農薬の設定 ADI 及びその設定根拠並びに急性摂取リスク評価による急性 RfD 及びその設定根拠について報告する。会議で評価された品目は12品目で，ADI は新規評価品目では Flumethrin ADI= 0-0.004mg/kg bw/day, Tebufenozide ADI= 0-0.02mg/kg bw/day, 再評価品目では Carbaryl ADI= 0-0.003mg/kg bw/day (Mouse 2年，発ガン性，安全係数5000), Carbofuran ADI= 0-0.002mg/kg bw/day, 2,4-D ADI= 0-0.01mg/kg bw/day, Dimethoate ADI= 0-0.002mg/kg bw/day (Rat 生殖，生殖障害，安全係数500), Ferbam ADI= 0-0.003mg/kg bw/day, Ziram ADI= 0-0.003mg/kg bw/day (Rat 2年，LOAEL=2.5，安全係数1000), Maleic

hydrozide ADI=0-0.3mg/kg bw/day, Mevinphos ADI=0-0.0008mg/kg bw/day, Phorate ADI=0-0.0005mg/kg bw/day, 急性 RfD は Mevinphos RfD=0-0.003mg/kg bw/day, Disulfoton RfD=0-0.003mg/kg bw/day を設定した。今回の評価では Dose response approach の概念が NOAEL の新メンバー構成による最終決定に影響を与えている。ちなみに日本の安評では Dimethoate 暫定 ADI=0-0.02mg/kg bw/day, Ziram 暫定 ADI=0-0.0035mg/kg bw/day, 食品規格 Carbaryl ADI=0-0.02mg/kg bw/day であり、これらの大きな差についての報告を受けて、直ちに厚生省食品化学課と農林水産省農薬対策室が反応し、残留農薬安全性評価会議と協力して早急の対策を開始したことを報告する。

**会議名:** ICH-M3 会議 (臨床試験との関係における非臨床試験実施タイミングに関する国際的ハーモナイゼーション)

**出席者:** 薬理部 大野泰雄

**開催場所, 時期:** ロンドン (イギリス), ヨーロッパ医薬品庁, 1996年11月3日~7日

**参加者内訳, 人数:** 日米欧三極の行政サイド8名, 医薬品産業サイド5名あわせて13名

**会議内容:** ICH では医薬品の承認審査に関わる諸問題について、品質、安全性、有効性の3つのグループに分かれて、ハーモナイゼーションが図られてきた。ICH-M3 ではそれらの境界領域に関わる問題「臨床試験との関係における非臨床試験実施タイミング」についての検討を担当している。今回の会議は本年度は米国のバージニア (4月29日~5月2日) で開催された会議の結果をふまえ、また、今までの草案に対する各極からのコメントを踏まえ、ICH-M3 に関する合意された文書を作成するための作業を行った。その結果、1) 日本がヒトに初めて投与する前に行っておくべき毒性試験の投与期間を非齧歯類では2週間でも構わないとし、2) 倫理性、毒性試験における可逆性評価の重要性について本文に記入し、3) 臨床試験の名称についてもとの表現と第一相、第二相、第三相試験という表現が併記された。更に、いくつかの細かい修正を行った後ステップ II の合意に達した。但し、1) ヒトに初めて投与する前に行っておくべき齧歯類を用いた反復投与毒性試験の投与期間、2) 反復投与毒性試験を行わずに、単回投与毒性試験の結果のみに基づきヒトに初めて投与する場合、3) 妊娠可能女性に投与する前に行っておくべき生殖毒性試験の範囲、4) 6ヵ月をこえて臨床使用する場合に必要な非齧歯類での毒性試験の投与期間については合意できず、今後の検討課題として残された。

**会議名:** ICH 専門家会議 (S1B, S1C 及び S4B)

**出席者:** 病理部 高橋道人

**開催場所, 時期:** タイソンコーナー (米国) のシェラトン プレミアホテル, 1996年4月29日~5月4日

**参加者内訳, 人数:** 日米欧の産官から約10名

**会議内容:** S1B「医薬品の癌原性を調べる試験」がステップ2として合意された。主な内容は以下の通り。

現行では、3極 (EU, 日本, 米国) とともに、ラットとマウスの2種のげっ歯類を用いた長期発がん性試験を実施することが規定されている。ヒトでの安全性を損ねることなく2種の発がん性試験を減らすことが出来るかどうかを検討された。

討議の結果、長期癌原性試験を1種だけ実施し、他の1種の試験の代わりに現在開発中の他の実験方法へ転換する方策をとることになった。一つの長期試験と他の適切な実

験手法から得られたデータについてはいずれも総合的に評価し、発がん性リスクを判断する。

今回合意されたガイドラインでは発がん性を評価するためのいくつかの実験方法を概説されており、1) イニシエーション・プロモーションモデル、2) トランスジェニック動物を用いる法、3) 新生児動物を用いる法などが有望視されている。

また、S1Cの中で、用量設定において最大量1,000mg/kgを認めるかが議論されたが、合意に至らなかった。

**会議名:** 第47回 FAO/WHO 合同食品添加物専門家委員会 (JECFA)

**出席者:** 病理部 三森国敏

**開催場所, 時期:** ローマ (イタリア), 1996年6月3日~15日

**参加者内訳, 人数:** JECFA 正委員, FAO/WHO 事務局, FAO 顧問, WHO 臨時顧問, 計32名

**会議内容:** クレプトール, サイパーメスリン,  $\alpha$ -サイパーメスリン, ネオマイシン, チアンフェニコール, チルミコシン, キシラジンが審議され、これらの毒性と残留データに関する評価に基づき、キシラジンを除くそれぞれの物質について一日許容摂取量 (ADI) の設定と最大残留基準値 (MRL) 案の勧告がなされた。また、アバメクチン, テトラサイクリン系抗生物質, スピラマイシン, モキシデクチンについては、更に残留データが提出されたため、これらに対して新 MRL 案が勧告された。第38回 JECFA において提案された微生物学的 ADI 算定式については解明されていない点が多かったことから、今回、改訂算定式が提案された。チアンフェニコールについては、発癌性試験データが提出されていなかったが、我国の厚生省の委託によりこの物質の発癌性試験が佐々木研究所で実施されている旨が説明され、その最終報告を待って1999年に再度審議されることとなった。アバメクチンについては、第45回 JECFA において  $\Delta$ -8,9異性体は畜産物中には存在しないことから、ADIは1 $\mu$ g/kgと設定された。これは JMPR の ADI (0.2 $\mu$ g/kg) と異なることから、JECFA と JMPR が再度討議をし、JMPR は JECFA の決定に同意した。

**会議名:** 第7回 OECD (経済協力開発機構) の第7回試験法ガイドライン (TG) プログラムについてのナショナルコーディネーター (NC) 会議

**出席者:** 病理部 三森国敏

**会議場所, 時期:** パリ (フランス), 1996年9月16日~21日

**参加者内訳, 人数:** OECD 加盟各国の17カ国から38人

**会議内容:** LD50以外の急性毒性試験法としては、Fixed-Dose や Acute Toxic Class 法があるが、その他に、Up-and-down 法が検証中である。この検証が終了するまでは TG 401はそのままにし、徐々に廃止していくこととなった。神経毒性 TG の最終案については参加 NC により承諾され、新ガイドラインとして承認された。既存の6つのガイドライン (472, 473, 474, 475, 476, 483) の改訂と UDS TEST が新規 TG として承認された。米国が中心となり、繁殖毒性のガイダンスドキュメントを作成することとなった。また、最近、発達神経毒性試験の TG 案が提案されたばかりであることから、この発達神経毒性も含めてガイダンスドキュメントを作成することで同意が得られた。

英国から、内分泌攪乱物質についての詳細な総説報告 (DRP) 案を作成し、次回の NC 会議までにはそれを提出する計画であることが説明された。しかし、これらの物質についての毒性発現メカニズムは不明な点が多く、今後各国からの種々の情報提供が不可欠であることが強調され

た。TG化については、明確な提案はなされなかった。

**会議名：**OECDによるGLP及びその査察に関する新規加入ワークショップ

**出席者：**病理部 高橋道人

**開催場所、時期：**ソウル（韓国）、1996年9月17日～18日

**参加者内訳、人数：**OECD、イギリス、カナダ及び韓国の環境庁を中心とした行政及び関連研究所の約50名

**会議内容：**今回のワークショップは、韓国がOECDに加盟するに伴い、OECD-GLPをどのように遵守するのか、具体的な方法を説明するために行われたものである。韓国は日本と同じようにいわゆる縦割り行政であり、GLP導入に当たり各国間の相互乗り入れを目的とするOECD-GLPの実施を韓国としては積極的に取り組む姿勢がみられた。我が国では、各省庁がそれぞれ独自のGLPを持っており、研究機関によっては、GLP査察を頻回に受けることとなるなど研究面にも支障がでるとしてその弊害も指摘された。特に、日本の各種GLP（医薬品、化学物質、農薬、食品添加物、動物用医薬品及び食肉動物用飼料添加物、その他、労安法など）がそれぞれ独自に行っている査察は、悪い例として善処を求められた。将来、少なくとも共通部分に関してはOECD-GLPの相互乗り入れを認めるように希望され、もし独自の査察項目があれば、その部分についてのみ独自で査察を行い共通部分は認めあうよう求められた。

**会議名：**ICH準備会議における医薬品の安全性、主にがん原性試験に関する専門家会議

**出席者：**病理部 三森国敏

**開催場所、時期：**ロンドン（英国）、1996年11月2日～10日

**参加者内訳、人数：**日米欧3極の薬事規制当局と製薬団体からの専門家 計11名

**会議内容：**がん原性試験ガイドライン案が前回のEWGで提案された後、FDAではステップ2文書に対する米国内からのコメントが収集されたが、MHWとEUでは未だコメントを収集中である旨が説明された。また、米国の国際生命科学研究所（ILSI）が中心となり、トランスジェニックマウスや新生児動物を用いた短期がん原性試験法のバリデーション作業がPhRMAで進行中であり、JPMAやEFPIAもこの研究計画に参画する旨の説明があった。MHWからは、ヒトプロト型c-Ha-rasがん遺伝子導入トランスジェニックマウスを用いた短期発がん試験法の有用性を検証するための協同研究が現在進行中であり、次回のEWGまでには実験成績をまとめて検証する予定である旨の説明がなされた。

医薬品のがん原性試験における高用量選択のうち、混餌投与による投与可能最大量の設定については最終結論は出されていないことから、ヒトへの臨床医薬品投与量が1mg/kg/日以下の場合には動物への投与量限界を1,000mg/kgとしてもよいとの妥協案がFDAから提案された。会議中、PhRMAからの一部反対があったが、最終的にはこの妥協案を含んだステップ2の文書案に合意が得られ、以後、規制側による公開コメントを集める作業に入ることとなった。

**会議名：**ICH専門家会議S1B「非げっ歯類の反復投与毒性試験」

**出席者：**病理部 高橋道人

**開催場所、時期：**ロンドン（英国）、EMEA（欧州医療製品評価局）、1996年11月5日～7日

**参加者内訳、人数：**日米欧の官側の4名（ラポーター1名を含む）

**会議内容：**非げっ歯類（イヌ又はサル）を用いた反復投与毒性試験は、米国では12ヵ月間投与が要求されているのに対し、EU及び日本では6ヵ月間投与が要求されている。EWGではどのような症例が12ヵ月試験が必要な毒性学的な特性について全症例について完全な評価を行うことになった。また、9ヵ月試験の可能性についても今後検討する。次回3月のICH-EWGまでにステップ2文書を作成するには中間的な会議の開催が必須である。1997年1月にコペンハーゲンにてこの会議を開催することを提案され了承された。

**会議名：**ICH-EWG（S4B）「非げっ歯類の反復投与毒性試験の期間」

**出席者：**病理部 高橋道人

**開催場所、時期：**デンマーク・コペンハーゲン、1997年1月13日～14日

**参加者内訳、人数：**6ヵ国、7名

**会議内容：**非げっ歯類の反復投与毒性試験の投与期間については、各国で要求が異なることから、ICHでハーモナイズするよう求められた。過去のデータ（EFPIA、JPMA、FDA、CMR）において問題となる18の医薬品につき3極の行政サイドの専門家により検討することとなった。

評価はMHW、FDA、EUの評価担当官により平行して行われ、2回にわたる会議で得られた結論は次の通りである。16例が検討の対象とされた。一部の事例においては試験結果の評価に差があり、必ずしも行政者間で完全な一致を見たわけではない。更に、異なった試験期間の比較のため観察された所見を評価するには限界があった。しかしながら、16例を検討した結果、9ヵ月間の試験期間があれば、長期毒性所見を検出するのに適当であると考えられた。特に1)有効かつ安全な医薬品の開発の迅速化、2)部分的に重複する試験の実施による無駄を避ける、3)各極の行政が認めあった形で国民を守るための国際的に合意された方法を持つこと、の3点を考慮し、9ヵ月間の試験期間を提唱することとした。

**会議名：**第48回FAO/WHO合同食品添加物専門家委員会（JECFA）

**出席者：**病理部 三森国敏

**開催場所、時期：**ジュネーブ（スイス）、1997年2月17日～3月1日

**参加者内訳、人数：**JECFA正委員、FAO/WHO事務局、FAO顧問、WHO臨時顧問、計32名

**会議内容：**チアベンダゾール、セフチオフル、ダノフロキサシン、ディハイドロストレプトマイシン、エンロフロキサシン、フルメクイン、ゲンタマイシン、デキサメタゾン、シフルスリン、フルアズロンが審議され、ゲンタマイシンとデキサメタゾンを除くそれぞれの物質について一日許容摂取量（ADI）の設定と最大残留基準値（MRL）案の勧告がなされた。また、セフチオフル、スピラマイシン、モキシデクチンについては、更に新しい残留データが提出されたため、これらに対して新MRL案が勧告された。企業からの毒性試験データの殆どは、適切なGLP基準に従って実施されていることから、このGLP準拠がなされた試験か否かを明確にするため、モノグラフにその旨を記載することとなった。薬理作用の強い動物薬の摂取部位が一般消費者に食肉として摂取される可能性があることから、消費者への急性毒性が懸念される。今後、摂取部位についての安全性を考慮しながら、どのように規制していくかに

について検討することとなった。第36回JECFA以来、オキシテトラサイクリンのヒト腸内細菌種への影響についてのデータが入手できることから、これらの物質について再評価することとなった。

**会議名：**OECD-GLP Inspectors training course on the application of GLP principles to computerised systems

**出席者：**変異遺伝部 林 真

**開催場所、時期：**Jarvis International Hotel, Gatwick East, Crawley, United Kingdom, 1996年11月18日～21日

**参加者内訳、人数：**Austria, Belgium, Canada, Czech Republic, Denmark, Finland, France, Germany, Greece, Hungary, Ireland, Italy, Japan, The Netherlands, Portugal, Spain, Sweden, Switzerland, United States より42名が受講者として、また、United Kingdom, Japan, The Netherlands, United States, France, Germany より14名が Faculty として参加した。

**会議内容：**1995年に出版された OECD の GLP Consensus Document “The application of the principles on GLP to computerised systems”の内容を OECD 加盟国の GLP 査察官に解説し、模擬査察を小グループで行うことを目的とした会合で、本 document ができた経緯を含めた概論がなされた後、各節ごとに説明、解説する形で会合が進行した。また、後半の1日半で模擬査察と総括が行われた。報告者は faculty の一員として参加し、GLP のコンピュータシステムにおける「施設と機器」の部分を担当した。各論に関しては説明時間も短く、詳細な解説、議論もできなかった。バリデーションの部分に関してはかなり時間が割かれたが、特に目新しい議論はなかった。今回の会合で、フロッピディスクの信頼性の低さが指摘され、データの保管媒体には適さないとの暗黙の了解事項となった感がある。各国のコンピュータ (GLP とすべきか) 査察に関するレベルにかなり差があることがわかった。

**会議名：**ICH 専門家準備会議 (安全性分野：遺伝毒性)

**出席者：**変異遺伝部 祖父尼俊雄 (①②に参加)

**開催場所、時期：**①ワシントン (米国), 1996年4月27日～5月5日, ②ロンドン (英国), 1996年11月4～8日

**参加者内訳、人数：**日米欧3極の行政及び製薬業界の遺伝毒性分野の代表者9～10名

**会議内容：**ワシントンでの専門家会議では、遺伝毒性試験の標準的な試験の組合せについての論議に関連して行われたマウスリンフォーマ試験 (MLA) の国共同研究の成果を踏まえて、米国環境変異原学会第27回大会 (1996) において行われた MLA の試験プロトコルに関するワークショップで得られた合意事項に関する論文の原稿を配布した。

これらの成果に基づいて、標準的な試験の組合せについて Draft 6 を基に論議し、標準的な試験の組合せとして、1) 細菌を用いる復帰変異試験, 2) in vitro 染色体異常試験又は MLA, 3) in vivo 染色体異常試験 (小核試験), の3種とすることで合意が得られた。また、標準的な試験の組合せが必ずしも十分でない場合のオプションについても合意が得られた。これらの合意の基に Draft 7 が作成された。Draft 7 の最終的な確認を6月中旬までに行い、7月中に Step 2 の署名を行う予定とした。

Step 2 の署名は平成8年8月に書類の持ち回りにより行

われ、正式に Step 2 となり、3極内で公開され、コメントの収集のための手続きが開始された。

ロンドンでの専門家会議では、MLA について24時間連続処理法で陽性となった化合物の新たなデータを提出し、これを基に MLA と染色体異常試験の同等性について論議が行われた。その結果、MLA での24時間連続処理法の妥当性を更に検討する必要があるとの合意に達し、そのため新たに共同研究を行うこととし、そのための被験物質の選定が行われ、26物質が選択された。この共同研究では短時間処理法と連続処理法の比較に加えて、Microwell 法と Agar 法との比較を行うこととし、1997年2月までにデータの収集を行う予定とした。

FDA から標準的な組合せが不十分であると考えられる化合物について、30～40の実例が提示され、その化学構造や機能性の特殊性が説明され、それを基に論議が行われた。

発がん性の専門家との合同会議を行い、トランスジェニックマウスの有用性について論議を行った。また、バイオ医薬品の専門家との合同会議を行い、バイオ医薬品の遺伝毒性評価の問題点について論議した。

**会議名：**OECD の第5回高生産量化学物質安全性点検初期の評価会議

**出席者：**総合評価室 中館正弘  
毒性部 長谷川隆一

**開催場所、時期：**ベルギラート (イタリア), 1996年10月28日～30日

**参加者内訳、人数：**OECD 事務局4名、日本8名 (厚生省3名、環境庁関係3名、労働省1名、化研協1名)、米国2名、イギリス5名、オランダ2名、カナダ1名、スペイン3名、デンマーク2名、ドイツ3名、フランス2名、チェコ1名、フィンランド2名、ノルウェー3名、スウェーデン2名、スイス2名、BIAC 2名、EC 1名、IPCS 1名、業界20名、合計64名

**会議内容：**第4回の東京会議 (SIAM 4) に引き続き、23物質についての SIDS 初期評価に参加した。最初に SIAM 4 で議論された物質の報告案についてのコメントについて討議し、本会議の対象物質について議論された。ヒトの健康について低リスクで追加試験の必要がないとされた物質は Vanilin (ノルウェー), MIBK (アメリカ), DEGBE (ノルウェー), trichloroacetic acid (ドイツ), ethylene (ノルウェー), cumene (スペイン), butanal (アメリカ), iso-butanal (アメリカ), cyanobutane (フランス) である。But-2-yne, 1,4-diol (ドイツ) は環境データの追加が、aniline, 4-nitro-N-phenyl (ベルギー) は環境データの追加が要求されたが、低リスクとされた。Tetrachloroethylene (イギリス) はリスク軽減処置の必要性が、triethylene tetramine (ドイツ) 及び naphthalene (イギリス) は in vivo 遺伝毒性試験の追加とリスク軽減処置の必要性が、acrylamide (イギリス) はリスクが明らかであるため、現在のリスク軽減処置を保持することとされた。Methacrylic acid (ドイツ) はその methyl ester と一緒に、DODMAC (ドイツ) は DHTDMAC と一緒に次回以降に討議することとされた。

**会議名：**第23回 OECD 環境委員会及び化学品グループの合同会議

**出席者：**総合評価研究室 中館正弘

**開催場所、時期：**Chateau de la Muette, OECD, Paris (フ

ンス), 1996年11月5日～8日

**参加者内訳, 人数:** 加盟23カ国, IPCS, IRPTC, CEC 等合計  
147名

**会議内容:** パリの OECD 本部で開催された第25回 OECD 環境委員会及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再登録, 試験法等の調和等に関する進捗状況の報告と1997年の活動計画について討議した。

2. OECD 試験法ガイドラインの改訂/作成計画が討議された。

3. GLP の原則に関する改訂案が討議された。

4. 有害性評価については, HAAB (ハザードアセスメント諮問委員会) の進捗状況が報告され承認された。

5. 高生産量 (HPV) 化学物質点検計画の進捗状況が報告され, 今後の計画についても承認された。

6. 化合物分類についての検討経過報告がなされ, 討議された。

7. 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について詳細に議論がなされた。また, 水銀, カドミウム, 臭素系難燃剤に関するリスクリダクション文書案の改訂, 及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。

8. その他の活動として, 既存化学物質プログラム, 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。

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8年度に行った  
演題は次のとおりである。

#### 第391回 (平成8年4月9日)

1. 固相抽出法を用いたピーナッツ等中のアフラトキシン  
迅速定量法  
食 品 部 穂 山 浩
2. アミノ酸加熱分解産物 (MeIQx) の低濃度領域におけ  
る発癌リスク評価  
病 理 部 田中丸 善 洋  
古 川 文 夫
3. 細胞増殖能およびアポトーシスを指標とした精巢毒性  
の形態学的解析  
病 理 部 安 原 加壽雄

#### 第392回 (平成8年5月14日)

1. Butyl benzyl phthalate のラット発生毒性における  
Monobenzyl phthalate の役割  
大阪支所生物試験部 江 馬 真
2. DNA 損傷の早期マーカーとしての核小体分離; 4-Hy-  
droxyaminoquinoline1-oxide 投与ラットにおける検討  
病 理 部 今 沢 孝 喜
3. P53の突然変異によるゲノムの不安定化と多段階発ガ  
ン過程におけるその意義  
変 異 遺 伝 部 本 間 正 充

#### 第393回 (平成8年6月11日)

1. キャピラリー電気泳動によるカンゾウ含有総合感冒薬  
中のグリチルリチン酸と有効成分の一斉分析  
薬 品 部 最 所 和 宏
2. ラテックスアレルギーと植物の生体防御タンパク質  
療 品 部 矢 上 健
3. 市販ベニコウジ色素の分析と D-アミノ酸を含む主色  
素成分の構造決定  
食 品 添 加 物 部 佐 藤 恭 子  
合 田 幸 広
4. 化学計算を用いた立体選択的反応の解析と予測  
有 機 化 学 部 栗 原 正 明

#### 第394回 (平成8年7月9日)

1. メチルパラベン, エチルパラベンあるいはサリチル酸  
を透過指標物質とした非イオン性界面活性剤のポリオ  
キシエチレン (EO) 鎖の剥離皮膚への影響  
環 境 衛 生 化 学 部 徳 永 裕 司

2. トリブチルスズのラットにおける妊娠初期投与の母体  
及び胚に対する影響  
大阪支所生物試験部 原 園 景

3. 2,5-Di(*tert*-butyl)-1,4-hydroquinone 投与ラットの運  
動終板における超微形態的变化  
病 理 部 今 沢 孝 喜

#### 第395回 (平成8年9月10日)

1. アラマイトおよびフェニルエーテル系農薬90日間投与  
によるイヌ肝臓および胆嚢への影響  
毒 性 部 梅 村 隆 志
2. 大腸菌 mutM 遺伝子の発現誘導とその機構  
変 異 遺 伝 部 鈴 木 任
3. パルスドフィールドグラジエントスピネコー法による  
ハイドロゲル中の薬物の拡散係数の測定  
薬 品 部 阿 曾 幸 男
4. 三稜の成分に関する研究 (2)  
生 薬 部 代 田 修
5. 馬勃の化学的研究 (2)  
生 薬 部 川 原 信 夫

#### 第396回 (平成8年10月8日)

—特別例会—

「ネットワークの研究への応用と情報公開」

1. NICI (NIHS Information and Computing Infrastructure)  
の現状  
化学物質情報部 中 野 達 也
2. インターネットを利用した化学物質安全性情報の収集  
と提供  
化学物質情報部 山 本 都
3. 部内ネットワークの構築とインターネット活用事例  
療 品 部 伊 佐 間 和 郎
4. ホームページ作りの体験談—片手間にできる情報発信  
—  
変 異 遺 伝 部 鈴 木 孝 昌
5. PCネットワーク (ホームページ) による個人データ  
ベースの提供  
総合評価研究室 広 瀬 明 彦
6. FOLIO インフォベースサーバーの構築と培養細胞情  
報の提供  
変 異 遺 伝 部 水 沢 博  
祖父尼 俊 雄
7. 総合討論 (Q&A)

第397回 (平成8年11月12日)

1. ノルエフェドリン光学異性体の腎および肝血流におよぼす影響  
生 薬 部 鎌 倉 浩 之
2. Chromoclesta malachitea の代謝産物の研究  
生 薬 部 江 崎 勝 司
3. トルエン乱用による生殖発生への影響—ラットにおける妊娠前および妊娠初期吸入暴露による検討—  
毒 性 部 小 野 敦
4. *p*-Phenylenediamine 系ゴム老化防止剤の皮膚感作性  
毒 性 部 門 馬 純 子

第398回 (平成8年12月10日)

1. キャピラリー電気泳動による大豆中の除草剤の分析法の検討  
食 品 部 根 本 了
2. ベトナム産 *Dalbergia cochinchiensis* の成分に関する研究  
生 薬 部 代 田 修  
Vibha Pathak
3. エンドセリンの心臓抑制作用機序の解明  
生 薬 部 小 野 景 義
4. Irgasan DP300のラット肝薬物代謝酵素およびポルフィリン代謝に対する影響  
環 境 衛 生 化 学 部 神 野 透 人
5. クロルニトロフェン (CNP) および CNP アミノ体による肝薬物代謝酵素の変動  
環 境 衛 生 化 学 部 埴 岡 伸 光

第399回 (平成9年1月14日)

1. 食品含有フラボノイド類の溶液中及びリボソーム中での抗酸化活性  
食 品 部 近 藤 一 成
2. 農産物中の残留農薬分析に対する超臨界流体抽出の適用—穀類試料について—  
食 品 部 根 本 了
3. Dimethylnitrosamine (DMN) により Big Blue マウスに誘発された突然変異のスペクトル  
変 異 遺 伝 部 王 雪
4. In vitro 培養細胞系での Benzo[a]pyrene 及び7, 12-dimethyl-benz[a]anthracene の数的異常誘発  
変 異 遺 伝 部 松 岡 厚 子

5. ゴム老化防止剤メルカプトベンズイミダゾール及びそのメチル誘導体の甲状腺に及ぼす毒性のトキシコキネティクスによる比較検討  
薬 理 部 酒 見 和 枝
6. アドリアマイシン高容量単回投与によるラット精巣毒性病変の病理発生とその予後  
病 理 部 安 原 加 壽 雄

第400回 (平成9年2月12日)

1. RAPD 及び RFLP 分析による大麻 (*Cannabis satiba*) の系統解析  
生 薬 部 代 田 修
2. 攻撃行動に関する近交系マウスを利用した神経精神薬理学的研究  
薬 理 部 藤 森 観 之 助
3. 心筋細胞のカルシウムイオンダイナミクスの視覚化  
生 物 薬 品 部 川 西 徹
4. トランスジェニックマウスを用いる変異原性試験に関する共同研究の成果  
変 異 遺 伝 部 鈴 木 孝 昌

第401回 (平成9年3月11日)

1. 南米産生薬“palo de sangre” (*Brosimum rulescens*) の抗アンドロジェン活性成分に関する研究  
生 薬 部 代 田 修
2. 形状の異なるポリウレタンのラット皮下埋植による組織反応及び催腫瘍率の差異について  
毒 性 部 梅 村 隆 志
3. ウレタンとその代謝物に対する c-Ha-ras 遺伝子導入マウスの発癌感受性及び誘発腫瘍の遺伝的解析  
病 理 部 三 森 国 敏
4. 新しい変異原性試験法 マウスリンフォーマ試験 (MLA) の有用性について  
変 異 遺 伝 部 本 間 正 充
5. G-CSF による HL-60細胞の活性酸素生成酵素の機能的成熟とそれに関わる因子の解析  
生 物 薬 品 部 小 木 美 恵 子
6. アフリカツメガエル卵母細胞発現系を利用した ATP 受容体チャンネルの各種物質による調節に関する研究  
薬 理 部 中 澤 憲 一

## 支 所 例 会

## 第148回 (平成8年4月23日)

1. 脂肪乳剤の凍結時の粒子径増加に対する添加塩の抑制効果—静脈注射用脂肪乳剤の凍結保存法への応用—  
薬品試験部 小松 裕 明
2. ヒトインスリン水性懸濁注射剤の光回析法および光遮蔽法による粒度評価  
薬品試験部 北 島 文
3. サラダ油, 玄米, 大豆中ピレスロイド系農薬分析時における脱脂行程の検討  
食品試験部 中 村 優美子
4. ジ, トリおよびテトラブチルスズのラットにおける比較発生毒性  
生物試験部 江 馬 眞

## 第149回 (平成8年6月25日)

1. 玄米中トリシクラゾールのGC分析における遊離脂肪酸の影響とその除去法  
食品試験部 津 村 ゆかり
2. トリブチルスズの妊娠初期投与によるラット母体及び胚に対する影響  
生物試験部 原 園 景

## 第150回 (平成8年9月26日)

1. 低温DSC測定によるヒアルロン酸の水和挙動  
薬品試験部 四方田 千佳子
2. 食品添加物公定書ヒ素試験法における「検液の調整」の改良に関する検討  
食品試験部 石 光 進
3. キサンテン系食用色素の光照射による安定性およびハロゲンイオンの遊離  
食品試験部 三 島 郁 子

## 第151回 (平成8年10月22日)

1. 昆虫の特異な生体防御反応系と微生物検出試薬としての応用化  
支 所 長 小 川 義 之

2. ガラクトース負荷したイヌにおける網膜症発症へのポリオール経路の関与  
薬品試験部 谷 本 剛
3. ラット生体内におけるアルドース還元酵素及び一酸化窒素合成酵素 mRNA の発現  
薬品試験部 前 川 京 子
4. 天然にも存在する食品添加物 生鮮食品及び加工食品中の天然由来の食品添加物含有量調査研究  
食品試験部 柴 田 正

## 第152回 (平成8年12月24日)

1. 低分子化に伴うヒアルロン酸の分子量分布の変化  
薬品試験部 宮 崎 玉 樹
2. ヘパリンの力価測定法の現状と問題点  
薬品試験部 吉 井 公 彦
3. GCによる農作物中トリアジン系除草剤並びにその代謝物の迅速分析法に関する活動報告  
食品試験部 外 海 泰 秀

## 第153回 (平成9年1月28日)

1. 日局13「分析法バリデーション」について  
薬品試験部 岡 田 敏 史
2. 電気化学検出器を用いたトコトリエノールの逆相HPLCについて  
食品試験部 辻 澄 子
3. ヒトメラノーマ細胞に対するインターロイキン1の増殖抑制作用の解析  
生物試験部 村 井 敏 美
4. アスパラガス (*Asparagus officinalis*) 培養細胞の生産する芳香族アセチレン化合物に関する研究  
生物試験部 寺 田 衣 子



## 特別講演会

- 平成8年5月24日  
ヒュー・マウス（難疾患解明用モデル動物）の開発  
東海大学・医学部助教授 上山 義人
- 平成8年5月28日  
新しい放射線測定技術と薬物評価への応用  
1) 薬物評価研究におけるラジオルミノグラフィー  
東京薬科大名誉教授 馬場 茂雄  
2) 新しい放射線測定技術  
富士写真フィルム 浜岡 勤  
森 啓司
- 平成8年6月21日  
酵素として機能するRNA (ribozyme) のつくり方と  
つくり方  
京都大学教授 井上 丹
- 平成8年7月11日  
生物多様性条約と薬用資源植物の研究・開発  
日本大学薬学部教授 小山 鐵夫
- 平成8年7月12日  
ヨーロッパの規制システムについて  
オランダ国立公衆衛生環境研究所 Dr. van der Laan
- 平成8年7月16日  
Pharmaceutical Information on the Internet  
マンチェスター大学・薬学部 Dr. A. J. D' Emanuele
- 平成8年8月1日  
腸管出血性大腸菌 O157  
国立小児病院小児医療研究センター部長  
竹田 多恵
- 平成8年9月6日  
食品及び天然薬物中の殺線虫活性物質  
金沢大学薬学部 木内 文之
- 平成8年9月13日  
QOL と骨粗鬆症  
順天堂大学助教授 千葉 百子
- 平成8年9月24日  
Facilitating Clinical Trials of Novel Biotechnology-  
derived Therapies: Impact of Preclinical Safety Evalu-  
ation  
FDA・Center for Biologics Evaluation and Research  
Dr. Joy A. Cavagnaro
- 平成8年9月26日  
多環芳香族炭化水素類のバクテリアによる代謝  
NIDDK, NIH USA 八木 治彦
- 平成8年10月21日  
P450NULL MICE: AHR null mice and PPAR alpha null  
mice  
National Institutes of Health, USA  
Dr. Frank J. Gonzalez
- 平成8年10月30日  
有害大気汚染物質測定法の現状と今後の課題: ニトロ  
アレーン  
金沢大学薬学部教授 早川 和一
- 平成8年11月13日  
アポトーシスと病気  
佐々木研究所所長 橋本 嘉幸
- 平成8年11月15日  
家庭用殺虫剤の室内挙動予測と安全性評価  
住友化学工業株式会社生物環境科学研究所  
的場 好英
- 平成8年11月15日  
テロメア・テロメラゼと細胞の癌化  
広島大学教授 井出 利憲
- 平成8年11月22日  
Mechanisms of Carcinogenesis, as a basis for effective  
cancer prevention  
American Health Foundation, U. S. A.  
Dr. John H. Weisburger
- 平成8年12月17日  
ヒト上皮組織の再生維持機構と発癌  
神奈川県立癌センター研究所 安本 茂
- 平成8年12月20日  
エリスロポエチンの中枢神経系における新しい生理機能  
京都大学農学部教授 佐々木隆造
- 平成9年1月22日  
海洋産生理活性天然物の研究  
理化学研究所 中田 忠

## 支所特別講演会

- 平成8年11月26日  
ダイオキシン類汚染の現状とその対策  
摂南大学薬学部教授 宮田 秀明

## 平成8年度に行った主な研究課題

## Main Research Projects Carried Out in Fiscal Year 1996

## 特別研究 (厚生省)

1. 安全性評価のための迅速かつ鋭敏な毒性指標の確立に関する研究 (療品, 生物, 機能, 病理, 代謝, 毒性, 支生)  
Studies on establishment of early and sensitive toxicologic biomarkers in risk assessment
2. 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 (有機, 療品, 食品, 生薬)  
Chemical study on biologically active stereoisomers for the evaluation of enantiomeric drugs

## 国立機関原子力試験研究費 (科学技術庁)

1. 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 (療品)  
Gamma-ray sterilization of blood contacting medical devices and formation of volatile chemicals from the materials
2. 抗体工学を用いる新しい抗体の放射性標識法の開発に関する研究 (機能)  
Development of a novel method for radiolabeling antibodies by genetic engineering
3. 生薬の微生物汚染に対する放射線照射の研究 (生薬)  
Study on gamma-ray sterilization for microbial contamination in plant medicines
4. 変異細胞の選択技術の確立と突然変異の塩基配列の解析に関する研究 (変異)  
Establishment of selection technique for mutant cells and analysis for the DNA sequence of mutation sites
5. 照射冷凍食品等の検知法に関する研究 (食品)  
Detection procedures for irradiated frozen foods
6.  $\gamma$ 線照射により誘起される食品包装材料の科学的および物理的変動に関する研究 (食添)  
Chemical and physical changes of food packaging materials induced by gamma-irradiation
7. アシアロ糖タンパク質受容体の消長を指標とした肝疾患の診断法の確立 (生物)  
Diagnostic estimation of liver disorders by asialoglycoprotein
8. 新しい標識化合物を活用した乳癌の診断法の探索とその治療法に関する基礎的研究 (機能)  
Study on the development of diagnostic methods for mammary cancer using novel radioactive compounds
9.  $\gamma$ 線照射による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性の制御に関する研究 (薬品)  
 $\gamma$ -irradiation-controlled release of biodegradable drug delivery systems

## 科学技術振興調整費 (科学技術庁)

1. 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 deficient synthesis of bioregulators
2. 高次脳機能の分子機構解明に向けた基盤技術の開発に関する研究 (薬理)  
(1) 神経伝達物質遊離機構の解明  
Research and development of basic technology for molecular mechanism of brain function  
(1) Neurotransmitter release mechanism
3. 物質関連データ (生体影響, 食品成分, 表面分析) のデータベース化に関する研究 (情報)  
Development of bio-reactive substances database
4. 清浄で安心な生活環境の創造: 環境低負荷型浄化技術

## の開発と応用 (環境)

- 地下水中のヒ素, ホウ素等に関する物理化学的特性に関する研究  
Physical and chemical characteristic of arsenic and boron in ground water
5. 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
  6. 化学物質による生体高分子の修飾と生物学的障害および発現機序に関する分子生物学的研究 (変異)  
Studies on molecular biology of chemically modified biopolymer and biological defects, and their causing mechanisms
  7. ドラッグキャリアーとしての脂質微小分散系粒子の製剤評価技術に関する研究 (支薬)  
Studies on the establishment of the evaluating techniques for lipid-microdispersed systems as a drug-carrier
  8. インプラント材料の材料・生体相互作用の予測性に関する研究 (療品)  
Study on the prediction for interaction between implant material and tissue

## 国立機関公害防止等試験研究費 (環境庁)

1. 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 (生物, 薬理)  
Studies on effects of environmental pollutants on intracellular signaling and cell-to-cell communication network
2. NO遊離化合物を活用した環境汚染窒素酸化物に関する研究 (有機, 代謝)  
Chemical and biochemical studies on toxicity of nitrogen oxides as environmental pollutants using nitric oxide releasing compounds
3. 人を取り巻く生活環境におけるダイオキシン等およびその前駆物質の潜在的リスクアセスメント (環境)  
Risk assessment of chlorinated dibenzop-dioxins and their presubstances in life environment
4. 水道水源水域および利水過程における親水性利水障害物質の適正管理に関する研究 (環境)  
Comprehensive management of hazardous hydrophilic organic substances in drinking water source
5. 水質汚染モニタリングのための遺伝毒性を指標としたバイオセンサー系の開発 (変異)  
Development of a genotoxic-biosensor model for monitoring of water pollution

## 環境基本計画推進調査費 (環境庁)

1. カドミウムの安全性に関する緊急調査研究 (環境, 病理)  
Urgent study on the safety of cadmium

## 厚生科学研究費補助金 (厚生省)

1. ヒト培養細胞 K562株を用いた赤芽球分化誘導因子に関する研究 (生物)  
Study on erythroid-differentiating factors in K562 cells
2. カロテノイドの異性化反応と抗酸化能の関連 (食品)  
Studies on photo-isomerization and anti-oxidative activity of carotenoids
3. 薬物代謝酵素の分子多様性に基づくハイテク汚染物質の生体影響評価法の開発研究 (環境)  
Development of evaluation methods for biological effects

- of high technology pollutants based on the multiplicity of drug-metabolizing enzymes
4. 多量体蛋白分子による遺伝子発現調節 (衛微)  
Gene expression regulated by the bacterial IS11-encoded proteins
  5. 天然ゴム製品による I 型アレルギーと植物由来の防御タンパク質との関連性究明に関する研究 (療品)  
Study on the responsibility of defense-related proteins in plants for latex allergy
  6. 分子生物学的手法による発現細胞系での化学物質の作用の評価法に関する研究 (薬理)  
Studies on evaluation of effects of chemicals using molecular biological techniques in expression cell systems
  7. IN VITRO バイオアッセイによるハロ酢酸類の毒性評価に関する研究 (環境)  
Evaluation of *in vitro* bioassay for haloacetic acids
  8. 薬用植物寄生菌及び薬用菌類の資源化に関する研究 (生薬)  
Studies on the effective application of medicinal fungi and parasitic fungi on medicinal plants
  9. 残留農薬分析の GLP 対応に関わるクロマトグラフィー手法の研究 (支食)  
Development of standard protocol for GLP in chromatographic analysis of residual pesticides
  10. 器具・容器包装の健康影響に関する研究 (食添)  
Studies on safety evaluation of apparatus and container-package in contact with food
  11. 行政検査結果による食品添加物 1 日摂取量の推定 (食添)  
Evaluation of daily intake of food additives from the results of the official inspection
  12. 食品添加物等の規格基準の国際的整合性に関する調査研究 (食添)  
International harmonization of standards and specifications on food additives
  13. 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
  14. 輸入農産物の分析・試験法等に関する研究 (支食, 食添)  
Studies on analysis and determination method of imported agricultural products
  15. 農産物における複数農薬の残留実態の把握に関する調査研究 (支食, 食品)  
Studies on the survey of plurally residual pesticides in agricultural products
  16. 新開発食品素材健康影響評価研究 (支食)  
Regulatory issues on newly developed foodstuffs
  17. 培養細胞の研究資源化に関する基盤的研究 (支生)  
Fundamental study on application of cultured cells as research resources
  18. 薬用植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
  19. 毒物等誤嚥時の初期治療薬の開発研究 (筑植)  
Development of ipecac syrup as vomiting agent
  20. 薬用植物種子の長期保存方法等に関する研究 (北植, 筑植, 伊植, 和植, 種植)  
Studies on methods of long-term storage for seeds of medicinal plants
  21. 遺伝子治療における安全性評価に関する研究 (生物)  
Studies on safety evaluation in gene therapy
  22. 動物用医薬品の残留防止対策に関する研究 (病理, 食品)  
Studies on policies for prevention of veterinary drug residues in food of animal origin
  23. 癌原性試験の適用とその評価法の確立 (病理)  
Application of carcinogenicity testing for ICH and establishment of its assessment methods
  24. 化学物質のクライシス・マネジメントに関する研究: 内分泌攪乱物質 (病理)  
Studies on a crisis management of endocrine disrupting chemicals
  25. 細胞治療の安全性評価に関する研究 (生物)  
Safety evaluation of agents intended for use in cell therapy
- 科学研究費補助金 (文部省)**
1. 遺伝子改変動物の造血幹細胞動態制御を指標としたサイトカイン系薬剤評価モデルの開発 (毒性)  
Development of a model system to evaluate biopharmaceuticals using a parameter of hemopoietic stem cell kinetics in transgenic mouse carrying various cytokine receptors
  2. 突然変異検出系を導入した胚幹細胞による薬剤性初期発生傷害の短期検知システム (毒性)  
An *in vitro* assay for teratogens with cultures of biotechnical recombinant-embryonic stem cells
  3. P53欠失マウスにおける造血因子および TGFβ を介したシグナル伝達 (毒性)  
Signal transduction through hemopoietic factors and TGF-beta in the p53-deficient mouse
  4. 痛みの情報伝達における ATP 受容体群の役割に関する神経薬理学的研究 (薬理)  
Neuropharmacological study for the role of ATP receptors in nociception and primary afferent transmission
  5. 好塩基球受容体遺伝子変換体とシグナル伝達 (機能)  
Study on the signal transduction in mast cells transfected by IgE receptor mutant gene
  6. ラット甲状腺増殖性病変の組織表現型と癌遺伝子発現との関連性 (病理)  
Relationship between phenotype of thyroid proliferative lesions in rats and their oncogene mutations
  7. リピド A のアンタゴニスト構造を決定する構造因子の証明と, その抑制機構の解明 (衛微)  
Elucidation of the chemical factor controlling the antagonistic structure of the lipid A, and mechanism of its suppressive activity
  8. 一酸化窒素とスーパーオキシドを同時に発生する化合物の合成と機能解析 (有機)  
Synthesis of the *N*-nitroso compounds which have both nitric oxide- and superoxide-release abilities
  9. 化学計算による環境化学物質の毒性評価の新手法の開発 (有機)  
Development of a new method for the toxicity-evaluation of environmental pollutants using a computational calculation
  10. ラット全胚培養の培養液中に必要な血清胚栄養因子の一次構造及び機能の解析 (薬理)  
Analysis of primary structure and function of an embryotrophic factor required for culture of postimplantation rat embryos

11. 初代培養肝細胞におけるアポトーシス制御機構の解明(毒性)  
A mechanistic study about apoptosis in primary culture of hepatocytes
  12. 細菌内毒素アンタゴニスト構造体の分子モデリング(Ⅱ)ーアンタゴニスト活性に対するリン酸基の影響ー(衛徴)  
Molecular modelling of the antagonist structure to bacterial endotoxin(Ⅱ):effect of phosphate group to the antagonist activity
  13. 膜親和性フラレン誘導体の合成(有機)  
Synthesis of the fullerene derivative with membrane-affinity
  14. ヒト成長ホルモン結合蛋白の生成に関与するプロテアーゼに関する研究(機能)  
Study on the characterization of a protease which produces the human growth hormone-binding protein
  15. CGH法によるヒト培養細胞株のゲノム解析(新しい細胞株プロファイリング法の開発)(変異)  
Studies on the whole genomes of human cell lines by comparative genomic hybridization(Development of a new method for cell line profiling)
  16. 食細胞の活性化におけるコフィリン(アクチン・PIP2結合蛋白)の役割(代謝)  
Studies on the roles of cofilin(an actin and PIP2-binding protein) in activation of phagocytes
  17. 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
  18. カルシウムスパークの分子メカニズムの研究(生物)  
Studies on molecular mechanism of calcium spark
  19. 環境因子の発がんリスク評価に関する研究(病理)  
Studies on carcinogenic risk assessment of environmental factors
- がん研究助成金(厚生省)**
1. 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
  2. 動物による発がん性評価のための新手法の確立とその意義に関する研究(センター長)  
Studies on establishment of new methods for evaluation of carcinogenicity studies using animals and its implication
  3. ヒトがんの環境要因と個体特性に関する分子疫学的研究(病理)  
Molecular epidemiological studies on environmental factors and host characteristics of human cancers
  4. 動物の遺伝的背景の特徴をいかした発がん機構の解析に関する研究(病理)  
Analysis of the mechanisms carcinogenesis using the characteristics of genetic backgrounds of animals
  5. 実験動物を用いた多段階発がんに関する研究(病理)  
Studies on multi-stage carcinogenesis using experimental animals
  6. 遺伝子改変マウスを用いた短期 in vivo assay 系の開発(毒性)  
Development of a short-term in vivo assay system using transgenic mice

#### その他

1. 喫煙による発がんの抑制機構に関する研究(病理)

#### 喫煙科学研究財団研究助成金

Mechanistic studies on preventive effects of cigarette smoke against experimental carcinogenesis

2. 実験的肺線維症における肺腫瘍誘発に係る諸因子の解析(病理)  
Studies on the factors relating to lung tumor induction in experimental pulmonary fibrosis

#### 食品等試験検査費

1. 農薬衛生対策推進費・食品残留農薬告示分析法検討(食品, 支食)  
Study on analytical method for pesticide residue
2. 農薬衛生対策推進費・食品残留農薬告示分析検討費・ニテンピラム告示分析法の検討(支食)  
Study on the official analytical method of nitenpyram
3. 農薬衛生対策推進費・バナナ等の果皮と果肉との残留農薬比の分析(食品)  
Study on the comparison of residual amount of pesticides in banana skin and flesh
4. 農薬衛生対策推進費・保存検体中の残留農薬実態調査(食品)  
Survey of pesticide residue in preserved food samples
5. 残留農薬簡易判定法開発検討費(食品, 支食)  
Study on rapid analytical method of pesticide residue
6. 残留農薬簡易判定法開発検討費・食品中残留農薬迅速分析法の開発研究(食品, 支食)  
Development of simple analytical methods for pesticides in foods
7. 食品添加物規格基準設定費・食品添加物規格基準及び試験法の設定, 改良(食添, 支食)  
Establishment and improvement of standards, specifications and test methods of foods additives
8. 食品添加物規格基準設定費・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
9. 食品添加物規格基準設定費・化学的合成品以外の食品添加物の規格基準の設定(食添, 支食)  
Establishment of standards and specifications of food additives other than chemical synthetics
10. 食品添加物安全性再評価費・慢性毒性試験(ペクチン分解物)(病理)  
Chronic toxicity test of pectin-degradation products
11. 食品添加物安全性再評価費・慢性毒性試験(クチナシ色素)(病理)  
Chronic toxicity test of garden blue
12. 食品添加物安全性再評価費・変異原性試験(Chromosome 試験)(変異)  
Mutagenicity of food additives
13. 食品添加物安全性再評価費・90日間投与試験(クロロフィル, ファフィア色素, カロブ色素)(毒性, 病理)  
Ninety-day toxicity studies of natural color products(Chlorophyll, Phaffia color and Carob germ color)
14. 食品添加物安全性再評価費・90日間投与試験(シソ抽出物, 納豆菌ガム, キチン)(病理)  
Ninety-day toxicity studies of natural food additives(Perill extract, Chitin)
15. 食品添加物安全性再評価費・プロモーター試験(コウジ酸)(病理)  
Mechanistic study on tumor promoting effects of kojic acids in rats
16. 食品添加物有用性調査費(食添)

- Efficiency of food additives
17. 容器包装等試験検査費（食添）  
Studies on food package and container
18. 畜水産食品中の残留有害物質に係るモニタリング検査（サルファ剤）（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資料の収集・解析及び毒性試験（ニトロフラゾン，チアンフェニコール）（病理）  
Mechanistic studies on some veterinary drug residues in food of animal origin (nitroflazone and thianphenicol)
20. 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
21. 食品添加物安全性再評価費・化学的合成品以外の食品添加物の規格基準の設定（食添）（二次）  
Establishment of standards and specifications of food additives other than chemical synthetics
22. 食品添加物安全性再評価費・食品添加物の規格基準および試験法の設定，改良（食添，支食）（二次）  
Establishment and improvement of quality control methods for food additives
23. 食品添加物安全性再評価費・外国使用農薬安全性調査試験費（毒性，病理）（二次）  
Mechanistic study on tumor promoting effects of piperonyl butoxide in rats
24. 食品添加物安全性再評価費・プロモーター試験（コウジ酸）（病理）（二次）  
Mechanistic study on tumor promoting effects of kojic acids in rats
25. 食品添加物安全性再評価費・代謝試験（ジフェニル）（薬理）（二次）  
Metabolic studies of Biphenyl in rats and mice
26. 水質管理調査に係る WHO 飲料水水質ガイドライン改訂対象物質の標準試験（環境）  
Establishment of official method for diphenyl ether group -pesticides in drinking water
27. 未規制物質基準化検討に係る総合指標検討調査（バイオアッセイ）（毒性）  
Screening of mutagenicity of contaminants in drinking water
28. 未規制物質基準化検討に係る慢性毒性試験（2-クロロフェノール等）（毒性）  
Chronic toxicity studies of unregulated compounds for standardization (By-products of disinfectant)
- 家庭用品等試験検査費（厚生省生活衛生局）**
1. 既存化学物質の安全性試験（生殖毒性試験）（毒性）  
Teratogenicity study of pectin digests in rats
2. 家庭用品に使用される化学物質の試験検査（IBTA, BIT, 3, 4, 4'-trichlorocarbanilide）（毒性）  
Repeated-dose toxicity studies for a 28 day-subacute administration of IBTA, BIT, 3, 4, 4'-trichlorocarbanilide in rat
3. 家庭用品に使用される化学物質の試験検査（ETMDQ, PTMDQ/皮膚感作性試験）（毒性）  
Skin sensitization tests of 2-mercaptobenzimidazole and 2,5-di-t-butylhydroquinone
4. 家庭用品に使用される化学物質の試験検査（ETMDQ, PTMDQ, DAHQ, HICHO/細胞毒性試験（療品）
- Cytotoxicity test of chemicals used in household products: 6-ethoxy-2,2,4-trimethyl-1,2-dihydroquinoline, poly-2,2,4-trimethyl-1,2-dihydroquinidine, 2,5-di-tert-amylhydroquinone and 2-hydroxy-4-isopropyl-2,4,6-cycloheptatrien-1-one
5. 家庭用品に使用される化学物質の試験検査（吸入毒性試験）（毒性）  
Chronic inhalation toxicity study of bis (2-chloroethyl) ether
6. 家庭用品に使用される化学物質の試験検査（MMBI, DBHQ, DMPPD/分析法設定（療品）  
Development of analytical methods of chemicals used in household products: 2-mercaptomethylbenzimidazole, 2,5-di-tert-butyl hydroquinone and N,N'-dimethylphenyl-p-phenylenediamine
7. 家庭用品に使用される抗菌剤等化学物質の安全対策調査研究（トリス(2-クロロプロピル)フォスフェートの毒性強度の体系的評価）（療品）  
Systematic evaluation of toxic intensity for tris (2-chloroethyl) phosphate
8. エンドクリンディスプレイラプターに関する調査（情報）  
Survey of endocrine disruptors
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の検討（2-(チオアノメチルチオ)ベンゾチアール, 2,4-ジアミノトルエン）（情報）  
Estimation of intake of the designated chemical substances
11. OECD 試験法ガイドラインの導入に係わる国内試験法の改正（毒性）  
Revision of Japanese testing methods associated with revised OECD test guideline
12. 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
13. 構造活性相関導入国際協力事業への協力（評価）  
Studies on toxicity prediction systems using structure-activity relationship technique
14. 化審法の電子化事業に基づく基礎的研究（評価）  
The basic research for electronic registration system of Japanese chemical control law
- 厚生本省庁費（厚生省薬務局）**
1. 鑑識用向精神薬の標準品製造（薬品）  
Preparation of the reference standards of psychotropic drugs for the criminal identification
2. 向精神薬分析法作成（薬品）  
Analytical manuals for the detection of psychotropic drugs
3. 医薬品迅速分析法作成のための研究（H2拮抗薬，ビタミンA）（薬品，支薬）  
Studies on rapid examination method of drugs
- 厚生本省医薬品等審査業務庁費（厚生省薬務局）**
1. 化粧品成分の分析法に関する研究（環境）  
Study on the standards of cosmetics ingredients
2. タール色素毒性試験法のための研究（毒性）  
Toxicity tests of food additive Red-40
3. 毒物劇物指定調査のための毒性試験（毒性）  
Acute toxicity studies of trifluoromethane, sodium hypochlorite and potassium hypochlorite

## 4. 毒性試験代替法に関する比較試験 (毒性)

Intra-laboratory validation of alternative methods to eye irritation test for safety evaluation of cosmetic ingredients

## 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

## 2. けし直接抽出法に関する研究 (筑植)

Study on direct extract method for opium alkaloid from *papaver somniferum*

## 3. 生態系農業に基づくけし栽培法の確立に関する研究 (筑植)

Establishment of new cultivation method of opium poppy on the basis of ecosystem

## 環境庁環境保全調査費

## 1. 国設自動車排出ガス測定所における大気汚染測定調査 (環境)

Survey of air pollutants at National Auto-exhaust Monitoring Station in Tokyo

## 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. 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 biotechnological drugs

## 2. 新開発食品の食品化学的特性評価手法の開発に関する研究 (食品)

Studies on development of evaluating methods for food chemical characterization of new foods

## 3. 遺伝子操作技術等を応用した食品添加物の開発とその化学的安全性評価に関する研究 (食添)

Chemical assessment of food additives produced by biotechnology

## 4. トキシコキネティクスを考慮した発生毒性評価法に関する研究 (薬理)

Studies on evaluation of development toxicity using toxicokinetic data

## 5. 異種遺伝子導入法を用いた新しい変異原試験系の開発 (変異)

Development of a new mutagenicity test by transfection of foreign genes

## 6. バイオテクノロジーによる薬物代謝酵素の構築と分子レベルでの相互作用予測のための理論構築に関する研究 (薬理)

Studies on biotechnological construction of drug metabolizing enzymes and prediction of drug interaction

## 7. コンピュータによる分子モデリングとグラフィックス技法を用いた構造と薬効・毒性の相関解析法の開発 (情報)

Application of computer-based molecular modeling to structure activity relation

## 8. 心筋機能障害の発生における糖鎖の役割の検討 (生薬)

Study on the functional role of saccharides in the manifestation of cardiac injury

## 9. 糖鎖含有タンパク質および糖鎖関連医薬品における糖鎖の機能解析と特性・品質等評価試験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

## 10. 遺伝子治療用ベクターの開発と評価技術の確立 (衛微)

Research of vector for gene-therapy (development and evaluation method)

## 11. 製剤評価におけるヒトへの外挿性に優れた In Vitro 試験および動物試験のシステムの確立 (薬品)

Establishment of in vitro and animal testing systems for predicting the performance of dosage forms in humans

## 12. 製剤マトリックスの相転移と製剤機能 (薬品)

Phase transition and functions pharmaceutical dosage forms

## 13. バイオメディカルポリマーとしてのヒアルロン酸の特性評価と応用に関する研究 (支薬)

Properties of hyaluronate and its application as a biomedical polymer

## 14. 脂質微小分散系によるドラッグキャリアーの設計とその評価方法に関する研究 (支薬)

Studies on the design of drug-carrier using lipid-microdispersed systems and the establishment of the evaluation system for them

## 15. 材料/細胞・組織界面での生体適合性評価手法の開発に関する研究 (療品)

Studies on the development of evaluation method for the material/tissue interaction

## 16. 大量培養を指向したスケールアップ時における律速因子の解明 (筑植)

Research on factors affecting mass production of useful plants and substances

## 17. 生体応答に係る植物成分の解明 (生薬)

Studies on bioactive principles of medicinal plants and their interactions with living materials

## 18. 立体異性体を含む生薬製剤の評価技術に関する研究 (生薬)

Studies on the evaluation of crude-drug preparations containing stereoisomers

## 19. 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

## 20. 食細胞の活性酸素産生系の調節因子の解明とその機能分化についての研究 (生物)

Study on the regulatory factor of active oxygen generation system in phagocytic cell and the maturation of phagocytic cells

## 21. サイトカイン産生誘導因子エンドトキシンの検出手法のシステム化に関する基礎的研究 (支生)

Fundamental study on systematic methodology for detection of a cytokine-inducing agent, endotoxin

## 22. 細菌由来毒性物質に対する安全性確保のための対策, および防御法の開発に関する基礎的研究 (衛微)

Studies on protection against bacterial toxins

## 23. 薬物過敏症発現の分子機構の解明と安全性評価への応用 (機能)

Study on the mechanism of drug hypersensitivity and its application to risk assessment

## 24. 脳高次機能障害改善を目的とした Ca 拮抗薬等の薬効評価法の開発 (薬理)

Studies on the development of new evaluating methods for drugs improving brain damages: Ca-antagonist as a candidate

## 25. 神経系機能分子の同定技術および生理機能の解析技術の開発 (機能)

- Study on the development of methods for detection and functional analysis of neuromodulatory molecules
26. フォトニクス技術を利用した虚血性神経細胞死の機構の解明 (生物)  
Studies on neuronal cell death by anemia using phototoniques
27. 細胞接着制御関連因子に関する基礎的研究並びにその医薬品としての有用性確保に関する研究 (生物)  
Studies on factors regulating cell adhesion and acquisition of their usefulness as protein drugs
28. 脂質代謝を介する生体機能調節機構の解明と薬効解析・薬物開発への応用 (代謝)  
Studies on mechanisms of biological functions regulated through lipid metabolism and its application to development of medicine
29. ニューロサーキット同時多点解析法等を用いる神経栄養因子とモデュレータの機能評価評価法の開発 (薬理)  
Development of evaluating method for the effects of neurotrophic factors on neurocircuit using a real-time multipointing quantitative monitoring of intracellular free calcium ion
30. 紫外域日射の波長依存性による生物作用とその防御に関する研究 (環境)  
Studies on biological influence caused by the solar ultraviolet ray and procedure protected against the solar ultraviolet ray
31. 薬用植物の人為的交雑種における遺伝子の発現機構に関する研究 (筑植)  
Studies on gene expression of medicinal plants raised by artificial crossing

ヒューマンサイエンス振興財団国際共同研究事業

1. 突然変異誘発を促進する遺伝子のトランスジェニックマウスへの導入 (変異)  
Introduction of mutator genes into transgenic mice
2. タンパク質製剤および放出制御型製剤のための有効な安定性試験法の開発 (薬品)  
Design of stability testing for protein pharmaceuticals and controlled delivery systems
3. グリア・ニューロン・インターネットにおけるATPの生理機能 (薬理)  
Physiological function of ATP on glia-neuron-interaction

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. 神経伝達物質および内在ペプチドによる心筋イオンチャンネル調節の分子機序の解明 (生薬)  
Electrophysiological and molecular biological studies on mechanisms by which neurotransmitters and endogenous peptides regulate cardiac ion-channels
2. シナプス伝達におけるP2プリン受容体群の機能の解明 (薬理)  
Function of P2-purinoreceptors on synaptic transmission
3. 可溶性受容体の生成機構とその応用に関する研究 (機能)  
Study on the mechanism of the generation of soluble receptors

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. 分子の動的解析に基づくタンパク質製剤の安定化 (薬品, 支薬)  
Stabilization of protein pharmaceuticals based on molecular mobility
6. 研究資源としてのヒト正常上皮細胞(ケラチノサイト)の培養系の確立と分譲システムの確立に関する研究 (変異)  
Study on the establishment of culture and distribution system of normal human keratinocytes as research resources
7. 細胞内生化学現象の高速高分解能画像化技術の開発 (生物)  
High resolution imaging of intracellular biochemical reactions
8. 情報理論に基づいた分析値信頼性評価手法の研究 (療薬, 食品, 支薬)  
A method for evaluating the reliability of measurements on the basis of information theory
9. 画像処理法による免疫細胞の細胞内物質動態の解析技術の開発 (機能)  
The development of imaging analysis method for tracing functional components in living cells
10. ヒト正常細胞の不老化及びびラットに由来する多分化能を保持する中枢神経系幹細胞の培養化 (支生)  
Immortalization of normal human cells and the culture of multipotent rat central nervous system stem cells

部	名	略	称
	薬	品	部
	生	物	部
	生	薬	部
	療	薬	部
	環	境	部
	食	品	部
	有	機	部
	機	能	部
	代	謝	部
	衛	生	部
	化	学	部
	毒	性	部
	薬	理	部
	病	理	部
	変	異	部
	綜	合	部
	大	阪	部
	大	阪	部
	大	阪	部
	北	海	道
	筑	波	道
	伊	豆	県
	和	歌	山
	種	子	島

平成8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8年度処理件数			対前年増減数度	対前年度増減率
	東 京	大 阪	合 計		
	件	件	件	件	%
国 家 検 定	( 0) 0	( 102) 134	( 102) 134	32	131.37
国 家 検 査	( 0) 0	( 102) 69	( 102) 69	△ 33	67.65
製 品 検 査	( 0) 0	( 580) 581	( 580) 581	1	100.17
特 別 審 査 試 験	( 68) 93	( 0) 0	( 68) 93	25	136.76
特 別 行 政 試 験	( 92) 111	( 16) 37	( 108) 148	40	137.04
一 斉 取 締 試 験	( 15) 28	( 29) 25	( 44) 53	9	120.45
輸 入 食 品 検 査	( 245) 22	( 4) 0	( 249) 22	△ 227	8.84
一 般 依 頼 検 査	( 0) 0	( 0) 0	( 0) 0	—	—
合 計	( 420) 254	( 833) 846	( 1,253) 1,100	△ 153	87.79

( ) 内数字は平成7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8年度国家検定品目別月別判定別件数実績表 … 378頁
- 平成8年度国家検査品目別月別判定別件数実績表 … 378頁
- 平成8年度製品検査月別判定別件数実績表 … 380頁

- 平成8年度特別審査試験月別件数実績表 … 380頁
- 平成8年度特別行政試験実績表 … 380頁
- 平成8年度一斉取締試験判定別件数実績表 … 381頁
- 平成8年度輸入食品検査品目別月別判定別件数実績表 … 381頁



## 平成8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	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0
半合成ヒトイソフェンイン スリン水性懸濁注射液	大阪	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0
生合成ヒト中性インスリン 注射液	大阪	3	-	3	0	-	0	1	-	1	1	-	1	2	-	2	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	0	-	0	0	-	0	1	-	1	0	-	0	0	-	0
ヒト結晶性インスリン亜鉛 水性懸濁注射液	大阪	2	-	2	0	-	0	0	-	0	0	-	0	1	-	1	0	-	0
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	3	-	3	3	-	3	4	-	4	6	-	6	6	-	6	4	-	4
生合成ヒトイソフェンイン スリン水性懸濁注射液	大阪	1	-	1	1	-	1	2	-	2	3	-	3	2	-	2	3	-	3
生合成ヒト結晶性インスリン 亜鉛水性懸濁注射液	大阪	0	-	0	0	-	0	0	-	0	1	-	1	0	-	0	0	-	0
ヒト二相性イソフェンイン スリン水性懸濁注射液	大阪	0	-	0	0	-	0	1	-	1	0	-	0	0	-	0	1	-	1
計		10	-	10	4	-	4	8	-	8	12	-	12	11	-	11	8	-	8

## 平成8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	6	-	6	7	-	7	7	-	7	4	-	4	3	-	3	2	-	2	
内 訳	内容量100ml未満	大阪	4	-	4	2	-	2	1	-	1	2	-	2	1	-	1	1	-	1
	内容量100ml以上	大阪	2	-	2	5	-	5	6	-	6	2	-	2	2	-	2	1	-	1
ヒトイソフェンインスリン 水性懸濁注射液	大阪	0	-	0	0	-	0	0	-	0	2	-	2	0	-	0	1	-	1	
ヒトインスリン注射液	大阪	0	-	0	0	-	0	0	-	0	1	-	1	0	-	0	0	-	0	
リンゲル液	大阪	0	-	0	1	-	1	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	
計		6	-	6	8	-	8	7	-	7	7	-	7	3	-	3	3	-	3	

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	0	-	0	0	-	0	0	-	0
0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0
3	-	3	2	-	2	2	-	2	1	-	1	0	-	0	3	-	3	18	-	18			
0	-	0	2	-	2	1	-	1	0	-	0	0	-	0	2	-	2	7	-	7			
0	-	0	2	-	2	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	5	-	5			
7	-	7	8	-	8	5	-	5	3	-	3	5	-	5	6	-	6	60	-	60			
1	-	1	4	-	4	2	-	2	3	-	3	2	-	2	2	-	2	26	-	26			
0	-	0	1	-	1	1	-	1	0	-	0	0	-	0	0	-	0	3	-	3			
1	-	1	2	-	2	3	-	3	1	-	1	2	-	2	4	-	4	15	-	15			
12	-	12	21	-	21	14	-	14	8	-	8	9	-	9	17	-	17	134	-	134			

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	1	1	2	2	-	2	3	-	3	4	-	4	2	-	2	41	1	42			
0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	1	-	1	12	-	12			
0	-	0	1	1	2	2	-	2	3	-	3	4	-	4	1	-	1	29	1	30			
3	-	3	1	-	1	4	-	4	1	-	1	2	-	2	0	-	0	14	-	14			
3	-	3	4	-	4	2	-	2	1	-	1	0	-	0	1	-	1	12	-	12			
0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	1	-	1			
6	-	6	6	1	7	8	-	8	5	-	5	6	-	6	3	-	3	68	1	69			

## 平成8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	28	—	28	42	—	42	49	—	49	50	—	50	37	—	37	65	—	65
計	28	—	28	42	—	42	49	—	49	50	—	50	37	—	37	65	—	65

## 平成8年度特別審査試験月別件数実績表

	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	計
薬 品 部	2	4	—	1	2	3	25	10	1	9	—	25	82
生 物 薬 品 部	—	—	—	1	—	—	4	—	—	—	—	—	5
衛 生 微 生 物 部	—	3	—	1	—	—	1	—	—	1	—	—	6
	2	7	0	3	2	3	30	10	1	10	0	25	93

## 平成8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	輸液製剤の試験について	31	支所薬品試験部
		〃	6	支所生物試験部
	麻 薬 課	国産生あへのモルヒネ含有率試験について	27	薬 品 部
		輸入生あへのモルヒネ含有率試験について	84	薬 品 部
合 計			148	東 京 111件 大 阪 37件

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
49	—	49	42	—	42	57	—	57	18	—	18	68	—	68	76	—	76	581	—	581
49	—	49	42	—	42	57	—	57	18	—	18	68	—	68	76	—	76	581	—	581

平成8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	京 阪	28	0	0	28
大 阪		25	0	0	25
合 計		53	0	0	53

平成8年度輸入食品検査品目別月別判定別件数実績表

区 分		4 月		2 月		合 計		試 験 件 数
		無判定	計	無判定	計	無判定	計	
その他の飲料	東 京	10	10	12	12	22	22	22
合 計		10	10	12	12	22	22	22

国立医薬品食品衛生研究所において製造し、交付している標準品は別表のとおりである。

## 日本薬局方標準品

(平成9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	300mg入り 1本	17,500	・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	インスリン	20mg入り 1本	27,000	・インスリン、インスリン注射液、インスリン亜鉛水性懸濁注射液、結晶性インスリン亜鉛水性懸濁注射液、無晶性インスリン亜鉛水性懸濁注射液、プロタミンインスリン亜鉛水性懸濁注射液、イン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、インソフェンインスリン水性懸濁注射液の純度試験
3	ウロキナーゼ	1,000単位入り 1本	18,200	・ウロキナーゼおよびその製剤の定量法
4	エストリオール	100mg入り 1本	14,600	・エストリオールの確認試験および定量法
5	エテンザミド	300mg入り 1本	16,700	・エテンザミド、その製剤の確認試験および定量法
6	エピチオスタン	100mg入り 1本	13,100	・メピチオスタンの定量法
7	エルゴカルシフェロール	100mg入り 1本	18,500	・エルゴカルシフェロールの確認試験および定量法
8	塩化ベルベリン	30mg入り 1本	30,000	・オウレン、オウレン末、オウバク、オウバク末中の塩化ベルベリンの成分含量
9	エンドトキシン	2 µg 入り 1本	20,500	・注射用水のエンドトキシン試験
10	含糖ペプシン	5g 入り 1本	22,200	・含糖ペプシンの定量法
11	d-カンフル	300mg入り 1本	17,200	・d-カンフルの定量法
12	dl-カンフル	300mg入り 1本	16,000	・dl-カンフルの定量法
13	吉草酸ベタメタゾン	100mg入り 1本	19,500	・吉草酸ベタメタゾンの確認試験および定量法
14	ジゴキシン	20mg入り 1本	16,900	・ジゴキシン、同錠、同注射液の純度試験
15	グリチルリチン酸	30mg入り 1本	33,000	・カンゾウ、カンゾウ末の性状試験およびカンゾウエキス、カンゾウ粗エキス中のグリチルリチン酸の成分含量
16	血清性性腺刺激ホルモン	800単位入り 2本	37,700	・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
17	高分子量ウロキナーゼ	800単位入り 1本	22,800	・ウロキナーゼおよびその製剤の確認試験および定量法
18	コハク酸トコフェロール	150mg入り 1本	19,000	・コハク酸トコフェロールカルシウムの定量法
19	コハク酸ヒドロコルチゾン	100mg入り 1本	18,400	・コハク酸ヒドロコルチゾンの確認試験および定量法、同ナトリウムの定量法
20	コレカルシフェロール	100mg入り 1本	18,200	・コレカルシフェロールの確認試験および定量法
21	酢酸クロルマジノン	100mg入り 1本	15,900	・酢酸クロルマジノンの確認試験および定量法
22	酢酸トコフェロール	150mg入り 1本	19,000	・酢酸トコフェロールの確認試験および定量法
23	酢酸ヒドロコルチゾン	100mg入り 1本	17,200	・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
24	酢酸プレドニゾン	100mg入り 1本	16,900	・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
25	ジギタリス	1g 入り 3本	16,800	・ジギタリス、同末の定量法
26	ジギトキシン	50mg入り 1本	16,700	・ジギトキシンの確認試験および定量法、同錠の溶出試験、含量均一性試験および定量法
27	シクランデラート	300mg入り 1本	16,300	・シクランデラートの定量法
28	ジクロルフェナミド	100mg入り 1本	14,700	・ジクロルフェナミド、同錠の定量法
29	ジゴキシン	50mg入り 1本	16,600	・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	ショ糖オクタ硫酸エステルカリウム	1g 入り 1本	16,000	・スクラルファートの定量法
31	G-ストロファンチン	100mg入り 1本	17,300	・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
32	胎盤性性腺刺激ホルモン	1,000単位入り 1本	36,000	・胎盤性性腺刺激ホルモン、注射用胎盤性性腺刺激ホルモンの定量法
33	デキサメタゾン	100mg入り 1本	17,300	・デキサメタゾンの確認試験および定量法

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	
34	デスラノシド	100mg入り 1本	17,400	・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
35	トコフェロール	150mg入り 1本	19,000	・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
36	トリアムシノロン	100mg入り 1本	17,000	・トリアムシノロンの確認試験および定量法
37	トリアムシノロンアセトニド	100mg入り 1本	17,000	・トリアムシノロンアセトニドの確認試験および定量法
38	トルナフタート	200mg入り 1本	16,600	・トルナフタートの確認試験および定量法、同液の定量法
39	トロンビン	500単位入り 2本	39,000	・トロンビンの定量法
40	脳下垂体後葉	20mg入り 2本	16,700	・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
41	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	8,200	・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
42	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	6,200	・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
43	ヒドロクロロチアジド	100mg入り 1本	16,200	・ヒドロクロロチアジドの確認試験および定量法、プレドニゾロンの純度試験
44	ヒドロコルチゾン	100mg入り 1本	17,000	・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
45	プリミドン	300mg入り 1本	16,800	・プリミドン、その製剤の確認試験および定量法
46	フルオシノニド	100mg入り 1本	18,500	・フルオシノニドの確認試験および定量法
47	フルオシノロンアセトニド	50mg入り 1本	16,800	・フルオシノロンアセトニドの定量法
48	フルオロメトロン	100mg入り 1本	17,700	・フルオロメトロンおよびその製剤の定量法
49	プレドニゾロン	100mg入り 1本	16,700	・プレドニゾロンの確認試験および定量法、同錠の確認試験、溶出試験および含量均一性試験
50	プロピオン酸ベクロメタゾン	100mg入り 1本	17,800	・プロピオン酸ベクロメタゾンの確認試験および定量法
51	ベタメタゾン	100mg入り 1本	17,100	・ベタメタゾンの確認試験および定量法
52	ヘパリンナトリウム	1,200単位 1本	30,400	・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
53	メストラノール	100mg入り 1本	15,400	・メストラノールの確認試験および定量法
54	メチルジゴキシン	50mg入り 1本	14,100	・メチルジゴキシンの確認試験および定量法
55	メトキサレン	200mg入り 1本	15,700	・メトキサレンの定量法
56	ラナトシドC	100mg入り 1本	16,900	・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
57	硫酸プロタミン	100mg入り 1本	30,000	・イソフェンインスリン水性懸濁注射液の純度試験
58	リン酸ヒドロコルチゾンナトリウム	100mg入り 1本	15,500	・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
59	リン酸ベタメタゾンナトリウム	100mg入り 1本	16,100	・リン酸ベタメタゾンナトリウムの確認試験および定量法

## 国立医薬品食品衛生研究所標準品(医薬品等試験用標準品)局方外医薬品

(平成9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	アルプロスタジル	10mg入り 1本	60,500	・アルプロスタジル, アルプロスタジル・アルファデクスとそれらの製剤の定量法
2	インドシアニングリーン	300mg入り 1本	16,200	・インドシアニンググリーンおよびその製剤の定量法
3	ウリナスタチン	3,600単位入り 1本	33,000	・ウリナスタチンおよびその製剤の定量法
4	エストラジオール	50mg入り 1本	16,800	・エストラジオールおよびその製剤の純度試験
5	エストロン	50mg入り 1本	16,800	・エストロンおよびその製剤の確認試験及び定量法
6	エルカトニン	10単位入り 2本	40,500	・エルカトニンおよびその製剤の定量法
7	塩酸チアミン液	1mg入り 10本	10,000	・チアミンおよびその製剤の定量法
8	下垂体性性腺刺激ホルモン	20mg入り 1本	42,500	・下垂体性性腺刺激ホルモンのバイオアッセイ
9	カリジノゲナーゼ	100単位入り 1本	15,300	・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
10	吉草酸ジフルコルトロン	100mg入り 1本	16,000	・吉草酸ジフルコルトロンおよびその製剤の定量法
11	酢酸デキサメタゾン	100mg入り 1本	17,600	・酢酸デキサメタゾンおよびその製剤の定量法
12	センノシド	150mg入り 1本	24,000	・センノシドの定量
13	低分子量ヘパリン	10mg入り 1本	30,500	・低分子量ヘパリンおよびその製剤の確認試験および定量法
14	テオプロミン	100mg入り 1本	12,300	・ペントキシフィリンの純度試験
15	ヒアルロニターゼ	500mg入り 1本	20,000	・注射用ヒアルロニターゼの定量法
16	ヒトインスリン	50mg入り 1本	29,600	・ヒトインスリンおよびその製剤の定量法
17	ヒト成長ホルモン	4mg入り 1本	40,000	・ヒト成長ホルモンおよびその製剤の確認試験および定量法
18	フルドロキシコルチド	100mg入り 1本	20,800	・フルドロキシコルチドおよびその製剤の定量法
19	プロピオン酸テストステロン	50mg入り 1本	16,500	・プロピオン酸テストステロンおよびその製剤の定量法
20	マレイン酸メチルエルゴメトリン	50mg入り 1本	16,600	・マレイン酸メチルエルゴメトリンの定量法
21	メシル酸ジヒドロエルゴトキシン	100mg入り 1本	33,000	・メシル酸ジヒドロエルゴトキシンの定量法
22	融点測定用 〔アセトアニリド, アセトフェネチジン, カフェイン, スルファニルアミド, スルファピリジン, ワニリン〕	各1g入り 6本	53,000	・融点測定用温度計, 同装置の補正
23	酪酸ヒドロコルチゾン	100mg入り 1本	17,700	・酪酸ヒドロコルチゾンおよびその製剤の定量法
24	リゾチーム	500mg入り 1本	29,000	・リゾチーム製品の定量法
25	リン酸デキサメタゾンナトリウム	100mg入り 1本	15,600	・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
26	リン酸ヒスタミン	50mg入り 1本	14,000	・ヒスタミン試験
27	リン酸プレドニゾロンナトリウム	100mg入り 1本	15,500	・リン酸プレドニゾロンナトリウムおよびその製剤の定量法

国立医薬品食品衛生研究所標準品（色素試験用標準品）

（平成9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	3,500	・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	3,600	・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	アズルピンエキストラ	1g入り 1本	3,200	・粘膜以外医薬品、化粧品および製剤中のアズルピンエキストラの確認試験
4	アマランス	1g入り 1本	3,300	・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	5,300	・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	3,300	・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	3,200	・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	3,200	・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	3,300	・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	3,050	・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	3,050	・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	3,050	・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	3,050	・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	3,100	・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	3,100	・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	3,400	・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	3,100	・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	3,100	・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	テトラクロロテトラブromフルオレセイン	1g入り 1本	3,200	・外用医薬品、化粧品および製剤中のテトラクロロテトラブromフルオレセインの確認試験
20	テトラブromフルオレセイン	1g入り 1本	3,300	・外用医薬品、化粧品および製剤中のテトラブromフルオレセインの確認試験
21	トルイジンレッド	1g入り 1本	3,000	・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	3,150	・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	3,100	・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	3,000	・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	3,050	・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



## 国立医薬品食品衛生研究所標準品(色素試験用標準品)

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	4,200	・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	3,600	・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	3,400	・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	3,150	・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問題
30	フロキシシン	1g入り	1本	3,200	・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	3,300	・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	3,200	・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	3,300	・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	リソールルビン BCA	1g入り	1本	3,300	・外用医薬品, 化粧品および製剤中のリソールルビン BCA の確認試験
35	レーキレッド C	1g入り	1本	3,300	・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	3,300	・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	3,300	・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	3,200	・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8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	
アセトアミノフェン	0	150	150	0	0	
アルプロスタジル	49	0	19	0	30	
安息香酸エストラジオール	14	34	14	34	0	
インスリン	40	0	12	6	22	
インドシアニングリーン	14	0	0	0	14	
ウリナスタチン	0	86	55	0	31	
ウロキナーゼ	97	100	73	0	124	
エストラジオール	25	50	51	1	23	
エストリオール	44	0	15	0	29	
エストロン	30	0	4	0	26	
エテンザミド	9	50	49	0	10	
エピチオスタノール	28	0	11	0	17	
エルカトニン	40	0	5	0	35	
エルゴカルシフェロール	0	298	208	62	28	
塩化ベルベリン	43	100	91	1	51	
塩酸チアミン液	9	20	23	1	5	
エンドトキシン	194	2,100	1,995	4	295	
下垂体性性腺刺激ホルモン	0	76	26	0	50	
カリジノゲナーゼ	37	64	57	0	44	
含糖ペプシン	91	0	26	31	34	
d-カンフル	99	0	30	0	69	
dl-カンフル	9	232	141	0	100	
吉草酸ジフルコルトロン	37	0	4	0	33	
吉草酸ベタメタゾン	28	50	20	0	58	
ギトキシシン	38	0	11	0	27	
グリチルリチン酸	39	250	251	0	38	
血清性性腺刺激ホルモン	29	0	19	0	10	
高分子量ウロキナーゼ	16	100	70	0	46	
コハク酸トコフェロール	36	130	73	0	93	
コハク酸ヒドロコルチゾン	32	0	4	0	28	
コレカルシフェロール	15	200	122	5	88	
酢酸クロルマジノン	2	91	58	0	35	
酢酸コルチゾン	40	0	9	31	0	
酢酸デキサメタゾン	29	0	1	0	28	
酢酸トコフェロール	39	600	638	1	0	
酢酸ヒドロコルチゾン	44	42	44	0	42	
酢酸プレドニゾン	44	43	34	0	53	
シアノコバアミン	34	300	275	59	0	
ジギタリス	15	0	0	0	15	
ジギトキシシン	20	50	21	0	49	
シクランデラート	26	0	0	0	26	
ジクロルフェナミド	9	0	0	0	9	
ジゴキシシン	3	50	21	0	32	
酒石酸水素エピネフリン	0	34	17	17	0	
酒石酸水素ノルエピネフリン	33	0	4	29	0	
ショ糖オクタ硫酸エステルカリウム	19	63	55	0	27	
G-ストロファンチン	26	0	1	0	25	
センノシド	0	50	3	0	47	

標準品名	前年度末 在庫数量	製造数量	売払数量	自家消費等 数量	年度末 在庫数量	備考
	個	個	個	個	個	
胎盤性性腺刺激ホルモン	28	100	56	0	72	
低分子量ヘパリン	25	50	12	0	63	
テオプロミン	20	0	0	0	20	
デキサメタゾン	45	0	24	0	21	
デスラノシド	24	0	12	0	12	
トコフェロール	46	400	299	0	147	
トリアムシノロン	21	0	1	0	20	
トリアムシノロンアセトニド	0	50	30	0	20	
トルナフタート	33	50	25	0	58	
トロンピン	158	0	110	0	48	
脳下垂体後葉	7	30	8	0	29	
薄層クロマトグラフ用酢酸レチノール	36	0	10	0	26	
薄層クロマトグラフ用バルミチン酸 レチノール	36	60	56	0	40	
パラアミノベンゾイルグルタミン酸	19	50	18	51	0	
ヒアルロニダーゼ	24	50	27	0	47	
ヒトインスリン	32	0	22	1	9	
ヒト成長ホルモン	42	0	22	0	20	
ヒドロクロロチアジド	32	0	4	0	28	
ヒドロコルチゾン	5	50	35	0	20	
プリミドン	30	0	1	0	29	
フルオシノニド	69	0	14	0	55	
フルオシノロンアセトニド	27	50	33	0	44	
フルオロメトロン	43	0	22	0	21	
フルドロキシコルチド	49	0	0	0	49	
プレドニゾン	20	115	99	0	36	
プロピオン酸テストステロン	51	0	1	0	50	
プロピオン酸ベクロメタゾン	17	50	29	0	38	
ベタメタゾン	43	0	20	0	23	
ヘパリンナトリウム	18	150	88	0	80	
マレイン酸エルゴメトリン	1	50	8	43	0	
マレイン酸メチルエルゴメトリン	22	0	1	0	21	
メシル酸ジヒドロエルゴトキシン	—	0	0	0	0	*
メストラノール	40	0	3	0	37	
メチルジゴキシン	37	0	3	0	34	
メトキサレン	20	0	5	0	15	
メトトレキサート	22	0	2	20	0	
融点測定用 {アセトアニリド, アセトフェネチ ジン, カフェイン, スルファニルア ミド, スルファピリジン, ワニリン}	12	50	48	0	14	
酪酸ヒドロコルチゾン	12	0	1	0	11	
ラナトシドC	40	0	23	0	17	
リゾチーム	81	200	252	0	29	
リボフラビン	93	304	348	49	0	
硫酸プロタミン	24	0	2	0	22	
リン酸デキサメタゾンナトリウム	34	0	13	0	21	
リン酸ヒスタミン	0	46	32	0	14	

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	
リン酸ヒドロコルチゾンナトリウム	44	0	6	0	38	
リン酸プレドニゾロンナトリウム	48	0	0	0	48	
リン酸ベタメタゾンナトリウム	14	50	17	0	47	
レセルピン	0	50	23	27	0	
計	3,069	7,418	6,675	473	3,339	

備考欄の\*印については年度途中の追加品目。

(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	66	0	1	0	65	
アシッドレッド	483	0	10	0	473	
アゾルビンエキストラ	70	0	1	0	69	
アマランス	427	0	11	0	416	
アルラレッド AC	325	0	13	1	311	
インジゴ	126	0	1	0	125	
インジゴカルミン	525	0	9	0	516	
エオシン	109	0	1	0	108	
エリスロシン	467	0	10	1	456	
オイルエロー AB	214	0	3	1	210	
オイルエロー OB	222	0	3	0	219	
オイルオレンジ SS	222	0	1	0	221	
オイルレッド XO	198	0	3	0	195	
オレンジ I	268	0	1	0	267	
オレンジ II	148	0	1	0	147	
ギネアグリーン B	60	0	1	0	59	
サンセットエロー FCF	480	0	11	1	468	
タートラジン	448	0	10	0	438	
テトラクロルテトラブROMフルオレ セイン	147	0	1	0	146	
テトラブROMフルオレセイン	107	0	1	0	106	
トルイジンレッド	74	0	1	0	73	
ナフトールエロー S	135	0	2	0	133	
ニューコクシン	477	0	10	0	467	
パーマネントオレンジ	26	0	1	0	25	
ハンサエロー	72	0	1	0	71	
ファストグリーン FCF	0	0	0	0	0	
ファストレッド S	194	0	2	0	192	
ブリリアントブルー FCF	440	0	12	0	428	
フルオレセイン	183	0	1	0	182	
フロキシシン	304	0	10	1	293	
ボンソー R	242	0	1	0	241	
ボンソー SX	143	0	1	0	142	
ボンソー 3R	152	0	1	0	151	
リソールルビン BCA	357	0	1	0	356	
レーキレッド C	381	0	1	0	380	
レーキレッド CBA	118	0	1	0	117	
レーキレッド DBA	156	0	1	0	155	
ローズベンガル	439	0	11	1	427	
計	9,005	0	151	6	8,848	

国立医薬品食品衛生研究所報告第115号キーワード索引 (アルファベット順)

**A**

A-21desamido insulin 140  
 A549 299  
 AAMI 311  
 absolute stereochemistry 125  
 acetylshikonin 267  
 acidic conditions 286  
 acridine 282  
 acute poisonings 266  
 acute toxicity 286  
 acylated anthocyanin 277, 278  
 adaptation 286  
 aerial part 308  
*Aeromonas* 284  
 aflatoxins 278, 311  
 AIDS 152  
 aldose reductase 302, 316  
 aldose reductase inhibitor 302, 316  
 allergic contact dermatitis 272  
 altenative study 315  
*Alternaria* 286  
 alternative study 315  
 aluminum 279  
 Amazone 310  
 amine-type antioxidant 272  
*D*-amino acid 280  
 analysis 312  
 Andes 310  
 Angelica Root 317  
 animal scale-up 314  
 annatto 278  
 ANOVA 265  
 anthocyanin color 280  
 anthraquinone 280  
 anti-androgen activity 271  
 anti-Fas antigen 287  
 anti-HIV drugs 152  
 anti-inflammatory activity 267  
 anti-inflammatory effect 270  
 antibody production 274  
 antifungal activity 285  
 antigen determinant 287  
 antigen presentation 287  
 antigen release 273  
 antigen release profile 274  
 antiimplantaion 307  
 antioxidant 280, 281, 295  
 antipsychotic drugs 289  
 apolipoprotein A-I 304  
 apolipoproteins 303  
 apoptosis 287, 293, 314  
 ArcView 155  
 arsen 311  
 AS52/*gpt* assay 300  
*Aspergillus niger* 285  
 astaxanthin 99  
 Astragali Radix 308  
 astragaloside 308  
*Astragalus mongholicus* 308

ATP 288, 314  
 ATPase 289  
*Atropa belladonna* 309  
 atrophy of lympho-hematopoietic tissues 291  
 authorization 181, 184, 187, 190, 193, 196  
 antifungal agents 285  
 autopsy 314  
 average size 302  
 azo dye 175  
 AZT 152

**B**

B-3 desamido insulin 140  
*Bacillus thuringiensis* 276  
 bacteria contamination 284, 285  
 bacterial endotoxins test 210  
 bacterial tester strains 316  
 barium 304  
 basophil 282  
 batch-variation 265  
*Beta vulgaris* L. 280  
 betalain 280  
 bezafibrate 283  
 bilayers 304  
 bile acids 304  
 bioactivity 268  
 bioavailability 309  
 bioburden 311  
 biodegradable granules 273, 274  
 biodegradation 279  
 biohazard 314  
 biological indicator 275, 311  
 biological products 267  
 biological safety evaluation 311  
 biomaterials 274  
 biostatistics 298  
 biotechnological recombinant-mice 314  
 biotechnology 311  
 biotechnology drugs 267, 310  
 biotechnology products 286  
 biotransformation 308  
*Bixa orellana* 278  
 bixin 278  
 bleomycin 295  
 BOP 291  
 borneol 125  
 bottle 147  
 brain 314

**C**

C3H/HeJ mice 283  
 C6 glioma cell 307  
 C60 282  
 C60fullerene 274  
 $Ca^{2+}$ -ATPase inhibitor 283  
 $Ca^{2+}$ -oscillation 288  
 $Ca^{2+}$ ATPase 286  
 $Ca^{2+}$ oscillation 49  
 $Ca^{2+}$ signal 312  
 calcium 112, 269, 310

- calcium signal 283  
 calibration 208, 275  
 calyculin A 269  
*Campanula glomerata* 308  
 caramel 279  
 carcinogenicity 292  
 carcinogenicity study 291, 295  
 carcinogenesis 311  
 carob germ colour 93  
 cationic liposome 268  
 causative product and chemical relevance 272  
 cDNA cloning 301  
 cell banking 299  
 cell proliferative activity 293, 295  
 cell transformation 285  
 cellulase 279  
 ceramides 286  
 cereal DNA 281  
 character of epithelium 316  
 chemical carcinogens 315  
 chemical evaluation 307  
 chemical hazard 15  
 chemical safety 161  
 chemically synthesized food additive 304  
 chemoprevention 294  
 chemopreventive effect 295  
 chitosan 213  
 Chlorambucil(CBC) 300  
 chloride blocker 269  
 chlormadinone acetate 193  
 cholangiocarcinoma 290  
 cholecystokinin 273  
 cholesterol 303, 304  
 chondrogenesis 274  
 chromogenic substrate 269  
 chromosome 4p 269  
 chromosome aberrations 298  
 chromosome aberrations induced by radiation 315  
 chromosome mapping 301  
 chromosome painting 298, 299, 315  
 cinnamon bark 284  
 cisplatin 296  
 cisplatin-DNA adduct 301  
 Citrus fruit 270  
 classification 130  
 clinical chemistry 287  
 clofibric acid 283  
 coal-tar dye 171, 280  
 cofilin 312  
 collaborative study 281, 299  
 colon 107  
 Colonic release 265  
 calorie restriction 286  
 colorimetric assay 269  
 combination effect 315  
 complex 302  
 concentration in food 278  
 concomitant toxicokinetics 1  
 confidence intervals 275  
 confocal microscopy 269, 282, 310  
 conservation 310  
 contact hypersensitivity 273  
 Content Uniformity Test 204  
 continuous flow culture system 278  
 control survey 287  
 cooking 317  
 coolant 281  
 cosmetic ingredients 289  
 cross-link 301  
 cross-reaction 272  
 crude drug 310  
 cryopreservation 317  
 crystallization 265  
 Cyperus 310  
 cytochrome P450 276, 289, 316  
 cytotoxic activity 281  
 cytotoxic T lymphocyte 287  
 cytotoxicity 40, 130, 315
- D**
- daily intake 278, 304, 311  
*Dalbergia cochinchinensis* Pierre 271  
 data evaluation 296, 298  
 defense-related protein 272  
 degradation 86  
 deletion 300  
 deletion and recombination 315  
 deletion mutation 300  
 deltamethrin 135  
 dephosphorylation 312  
 developmental toxicity 306, 307  
 dextran 213  
 diabetic complication 302, 316  
 dibutyl phthalate 307  
 dibutyltin dichloride 306  
 dicofol 86  
 diet restriction 291  
 24R, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> 295  
 1,2-dimethylhydrazine 297  
 dimethylnitrosamine 296  
 direct determination 275  
 dissolution test 309  
 2,5-(di(*tert*)-butyl)-1,4-hydroquinone 286  
*dl*-camphor 190  
 DMBA 288  
 DNA(cytosine-5)methyltransferase 284  
 DNA helicase 289  
 DNA repair 316  
 DNA replication 316  
 DNA-cleaving activity 282  
 Donryu rat 293  
 drug absorption 265  
 drug disposition 266, 267  
 drug disposition in hair 310  
 drug monitoring 310  
*Drybalanops aromatica* 125  
 DSC(differential scanning calorimetry) 305  
 dye 273
- E**
- E. coli* O-157 155  
 ECD-GC 306  
 edible beans 290  
 edible oils 305  
 effectiveness 275  
 Efficacy of antimicrobial preservation 313

Efficacy of microbial preservation 313  
 egg shell 284, 285  
 EHC 166  
 EIA 313  
 electrochemical detector 277  
 electrophysiology 289  
 elimination 277  
 embryo culture 290  
 embryo lethality 307  
 embryotoxicity 306  
 embryotrophic factor 290  
 emulsions 303  
 endogenous nitrosation 290  
 endometrial adenocarcinoma 293  
 endotoxin 202, 283, 307  
 endotoxin antagonist 283  
 endotoxin diseases 283  
 endotoxin inhibitor 284  
 endotoxin limit 210  
 Endotoxin test 313  
 enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O-157 312  
 environmental mutagens 316  
 epididymis 295  
 epinephrine bitartrate 181  
 equine 285  
 erythrocytes 270  
*Escherichia coli* O157 313  
 esterase 272  
 estradiol 187  
 ethanol 302, 303  
 ethoxyresorfin *O*-deethylation 289  
 ethylene glycol 281  
 ethylene oxide sterilization 275  
 ethylene-1,2-dimethanesulfonate 293, 295  
 ethylnitrosourea 296  
 evaluation of viral clearance 267  
 exocytosis 312  
 extent of lifespan 286  
 extracellular protease 286  
 extrapolate 314  
 eye irritation 130, 315

**F**

F344rats 93, 99, 295  
*Fagopyrum esculentum* 309  
 farmer's rubber boot 272  
 fat emulsion 303  
 FDA 311  
 ferric nitrilotriacetate 288  
 flame thermionic detection 305  
 flufenamic acid 302  
 fluorescence detector 277  
 fluorescence in situ hybridization 301  
 foamed material 271  
 food 280  
 food additive 93, 125, 312  
 food color 171  
 food color aluminum lakes 304  
 food effect 265  
 food manufacturing process 312  
 food poisoning 313  
 Food Yellow No. 5 278  
 food-poisoning 312

foods 312  
 Foreign substance 147  
 free fatty acids 305  
 free-radical-related enzyme 270  
 freezing 265  
 frozen-storage 303  
 fullerene 282  
 [60]fullerene 282  
 FUMI theory 206  
 fusion 303  
 fusogenic liposomes 268

**G**

D-galactosamine 291  
 gamma-irradiation 281  
 gap-junctional intercellular communication 274  
 garlic extract 284  
 GC 135, 305  
 GC/MS 86, 266, 305  
 G-CSF receptor 287  
 gel permeation chromatography 304, 312  
 gene expression 312  
 gene mutation 299, 315  
 gene therapy 268  
 gene transfer vector 268  
 general tests 266, 303, 309  
 genetically modified foods 311  
 genomic stability 299  
 genotoxicity 298, 300  
 germ cell 297  
 GI mechanical destructive forces 265  
 GI transit time 265  
 Ginseng 271  
 GIS 155  
 glandular stomach carcinogenesis 295  
 GLP 312, 314  
 GLP compliance 1  
 glutathione 280  
*Glycyrrhiza* spp. 308  
 Gompeltz 314  
*gpt* 300  
 gram-negative bacterial infection 283  
 growth hormone receptor 27  
 growth hormone-binding protein 27  
 growth regulation 316  
 GSTP 291  
 guidance 314  
 guidelines for cultivation and quality evaluation of medicinal plants 310  
 gymnema sylvestre 316  
 gymnemic acid 316

**H**

HACCP system 313  
 hair 266  
 hair analysis 266, 267, 310  
 hair root 266  
 hairy root 308, 309, 317  
 hairy root cultures 280  
 half-embryo test 281  
 harmful moulds 312  
 hamster 294, 295  
 hard segment 274  
 harmful reagents 309



hazard analysis 313  
 hazard management system 15  
 HCHO 311  
 health food 316  
 health hazard 15  
 heart 112  
 Heavy Metals Limit Test 279  
 hematology 287  
 hematoporphyrin 275, 276  
 hepatocyte 289  
 herbal medicines 310  
 heterocyclic amine 297  
 high-fat 293  
 high-proliferative potential progenitor cells 287  
 HIV infection 314  
 HIV-1 152  
 HNPPC 315  
 household chemical product 311  
 household product 130, 313  
 HPLC 135, 175, 277, 278, 308, 309  
 Huanarpo 270  
 human chromosome 9 301  
 human GAP homologue 301  
 human growth hormone 302  
 human insulin preparations 140  
 human intestinal microflora 278  
 HUS 312  
 hyaluronate 213  
 hybrid vector 268  
 hydrazine 297  
 hydrocortisone acetate 196  
 hydrogen peroxide 316  
 8-hydroxy-dG 282  
 hyperphosphorylation 269

**I**

IARC 299  
 ICH 291, 292, 298, 299, 314, 315  
 ICH document 267  
 ICH S6 286  
 ICH-TK Guidance 1  
 ICP atomic emission spectrometry 304  
 ICSC 161  
 imaging 310  
 imidazolopyrroloquinoline 302  
 immediate-type hypersensitivity 278  
 immunological adjuvant 273, 274  
 immunotoxicity 292  
 implant tumorigenesis 271  
 impurity test 140  
*in vitro* chromosomal aberration 298  
*in vivo* analysis 287  
 Index Seminum 317  
 indoor air pollution 311  
 indoor environment 311  
 information infrastructure 15  
 inhalation 288  
 insecticidal protein 276  
 instrumental analysis 206  
 insulin 302  
 interdigitation 302  
 intermediates 175  
 international harmonization 210

International harmonization on microbial tests 313  
 international harmonization on pharmacopoeia 313  
 Internet 15, 161  
 ion exchange chromatography 275  
 IPCS 166, 313  
*Ipomoea batatas* 277  
 Irgasan DP300 276  
 irradiated citrus fruit 281  
 IS1 285  
 ischemia-reperfusion damage 269  
 ISO 311  
 ISO and MHW guidelines 311  
 ISO/TC198 275, 311  
 isoflavonoid 308  
 isothiocyanate 294

**J**

Japanese Pharmacopoeia 204, 303, 309, 310, 312, 313, 316  
*Jatropha ciliata* 270  
 JP Reference Standard 196

**K**

karyomegalic alveolar epithelial cell 293  
 karyotypic evolution 301  
 knock-out mice 314  
 kojic acid 279, 298

**L**

L-histidine monohydrochloride 295  
 L-type Ca channels 289  
 L5178Y mouse lymphoma cell 299  
*lacI* transgenic mouse 296, 297  
*lacZ* transgenic mouse 297  
 latex allergy 272  
 LC/MS 280  
 LC-ESI-MS 280  
 lead 275, 279  
*Lecythophora hoffmannii* 271  
 lecythophorin 271  
 lecythoside 271  
 lemon peel extract 280  
 light diffraction 302  
 Liliaceae 285  
*Lilium martagon* 308  
 limit of detection 309  
 lipid A 283  
 lipid peroxidation 282  
 lipids 304  
 lipoprotein lipase 303  
 liposomal membranes 303  
 liposome 302  
 liver 107  
 liver fluke infection 290  
 liver microsomes 276  
*Lobelia erinus* 309  
 Loss on drying 144  
 LPS 283, 284  
 LSD 266  
 LTC4 283  
 lung cancer 293  
 lung fibrosis 295

**M**

MacMic 290  
 macrophage 307  
 macrophage activation 273  
 magnesium 112  
 maltol 279  
 mast cells 282  
 matrixing 265  
 measurement precision 208  
 mechanism 294  
 medical plastics 311  
 medicinal plant 310, 317  
 medium-term rat liver bioassay 291  
 megakaryocytes 49  
 MeIQ 296  
 MeIQx 107  
 melamine resin 279  
 2-mercaptoethane sulfonate 288  
 metabolic cooperation assay 273  
 metabolism 277  
 methamphetamine 266  
 methodology development 313  
 methylation tolerance 315  
 methylenedioxyamphetamines 267  
 MIC 284  
 MIC values 285  
 microbial contamination 271  
 microbial limit test 271, 313  
 Microbial tests 312  
 microbioassay 277  
 micronucleus 297, 299  
 micronucleus assay 315  
 microplate method 152  
 microscopical determination 270  
 mid brain cells 274  
 mineral water 147, 313  
 minor pain 289  
 mismatch repair 300, 301, 315  
 MMS workshop 298  
 MNUR 293  
 MNUR-induced pulmonary inflammatory lesions 293  
 mobility 265  
 modulation 27  
 moist heat sterilization 275  
 molecular interaction 265  
 monascorubrin 280  
 Monascus pigments 280  
 monitoring 311  
 monobenzyl phthalate 306  
 monobutyl phthalate 306  
 monoclonal antibody 27  
 mouse 273  
 mouse limb buds 274  
 mouse lymphoma assay 298, 299  
 mouse micronucleus test 298  
 mouse skin 288  
 MucA'B 300  
 multiresidue pesticide analysis 312  
 murine megakaryoblastic leukemia cell line 287  
 mutagenesis proteins 300  
 mutagenicity 72, 282, 298, 301  
 mutagenicity test 315, 316

mutation spectrum 297  
 myocyte 269

**N**

*N*-acetyl-*S*-nitroso-DL-penicillamine 40  
*N*-acetylcysteine 288  
*N*-acetyltransferase 316  
*n*-hexane/acetonitrile partition 304  
 natural food additives 279  
 Natural Killer cell 269  
 neoflavone 271  
 neurogenic contraction 288  
 neuronal differentiation 274  
 neurotoxicity 292  
 neurotransmission 289  
 neutral steroids 304  
 nickel 273  
 nicotinamide 291  
 NIDDM 302  
 NIH Reference Standard 199  
 nitrosourea 281  
 nitric oxide 40, 281, 282  
 nitro-substituted polynuclear aromatic hydrocarbons 277  
 nitroarene 72, 282  
 nitroarenes 301  
 nitrobenzo[*a*]pyrene 72  
 nitrophenanthrene 72  
 nitroreductase 301  
*N*-nitrosamine 289  
 nitrosourea 40, 281  
*N*-nitrosourea 282  
 NMR 265  
 NO-releasing compound 282  
 nonparenchymal liver cells 270  
 NTP carcinogen 298  
 nucleotide excision repair 301  
 nuts 278

**O**

*o*-phenylphenol 280  
*O*<sup>6</sup>-methylguanine 300  
 ochratoxin A 278  
*Ocimum basilicum* 308  
 official inspection 171  
 okadaic acid 282  
 oltipraz 294  
 onychomycosis 285  
 organ variation 296  
 organotin compounds 277  
 osmolarity 316  
 osmotic pressure 316  
 outgrowth culture 316  
 oxytetracycline 277

**P**

p53 299  
 p53-deficient mice 287  
 paclitaxel 317  
 pancreatic carcinogenesis 291  
 parenteral drug 210  
 passive cutaneous anaphylaxis (PCA) 278  
 patch-clamp 49  
 PBA 306

- PCNA 300  
 PDG 313  
 pectin digests 119  
 PEITC 294  
 penetration resistance 308  
 peptide synthesis 273  
 peripheral blood micronucleus test 296  
 personal computer 290  
 Peruvian medicinal plant 270  
 pesticide 305  
 pesticide residues 311  
 pesticide residues analysis 312  
 pesticides 86, 304  
 pH 269  
 phaffia colour 99  
 pharmaceutical 305  
 pharmacological evaluation of crude drugs 270  
 pharmacological experiment of crude drugs 270  
 pharmacological study of crude drugs 270  
 pharmacology 288, 289  
 pharmacopoeia 266, 309, 310  
 phase separation 265  
 phenolics 308  
 phenothrin 306  
 phenoxy acid herbicide 305  
 phenylpropanoid ester 308  
 phosphatidate 286  
 phosphatidic acid 268  
 phosphatidylethanolamine methylation 283  
 phospholipase C 267  
 phospholipases 286  
 phosphoric acid 308  
 phthalate 270  
 phytochelatin 280  
 pigments 274  
 piperonyl butoxide 291  
 plant biotechnology 317  
 plant medicines 271  
 plant resources 317  
 plastic 147  
 plasticware 281  
 platemethod 286  
 Platycodin D 309  
*Platycodon grandiflorum* 308, 309  
 platycodon Root 317  
*Plesiomonas shigelloides* 284  
 point mutation 300  
 poly (DL-lactic acid) granule 273  
 poly (L-lactic acid) microspheres 274  
 polyacetylene 308, 309  
 polyetherurethane 271  
 polyetherurethanes 274  
 polyethylene 280, 281  
 polyethylene film 273  
 polyethylene terephthalate 147  
 polymorphonuclear leukocyte activation 267, 268  
*Porphyromonas gingivalis* 283  
 powdered crude drugs 270  
 powdered Geranium 270  
 powdered red Ginseng 270  
 pre-implantation loss 307  
 precision 275, 309  
 preclinical safety test 286  
 pregnancy failure 307  
 preparation 307  
 preparedness 286  
 processed foods 304  
 production 171  
 promotion 285  
 propolis 277  
 protein C-activating cofactor activity 268  
 protein kinase C 268  
 protein phosphorylation 312  
 protein release 273  
 protein stability 265  
 pullulan 213  
 pulmonary fibrosis 293, 295  
 pulsed-field gel electrophoresis 281  
 purity determination 305  
 purity test 302  
 purple sweet potato 277  
 pyrethroid pesticides 135  
 pyrogen test 210  
 pyrolysis 266
- Q**
- Qinghai province 317  
 quality assurance system 312  
 quality control 310, 312  
 quality evaluation 181, 184, 187, 190, 193, 196, 199  
 quinone 282
- R**
- radiation leukemogenesis 286  
 radiotherapy 298  
*Raphanus sativus* 278  
 rapid method 313  
 rasH<sub>2</sub> 292  
 rat 112, 119, 287  
 rat hippocampal neuron 289  
 rat vas deference 289  
 rat vas deferens smooth muscle 288  
 RBL-2H3 282  
 reagent 266  
 reagents in pharmacopoeia 309  
 receptor 314  
 recombinant channels 288  
 recombinant erythropoietin 268  
 recombination hotspot 285  
 recommendations 298  
 red radish pigments 278  
 reference standard 181, 184, 187, 190, 193, 202  
 regional difference 289  
 regulation 296  
 regulatory toxicology 314  
 repeated-dose administration 290, 315  
 reproduction 288  
 reproductive toxicity 314  
 residual pesticide 271  
 residual solvents 309  
 residue in food 279  
 restriction endonuclease 284  
 reversed-phase HPLC 305  
*Rheum palmatum* 317  
*Rheum tanguticum* 317  
 rhG-CSF 287

riboflavin 184  
 risk assessment 313  
 risk communication 286, 313  
 rodent micronucleus test 299  
 rosmarinic acid 308  
 RP-HPLC 140, 302  
 rubber 272  
 rubber additive 272  
 rutin 309  
  

S

 safety 275  
 safety management 311  
 salicylic acid 275  
 salt stress 286  
 SamA/B 300  
 Saussureae Radix 307  
*Scedosporium* 285  
 schizophrenic negative symptoms 289  
 seasonal variation 277  
 seawater 277  
 second messenger 312  
 secretion 283  
 seed fraction 270  
 selenomethionine 290  
 Senna 271  
*Sennae Folium* 271  
 sennoside A 271  
 sennoside B 271  
 sensitization test 273  
 Sep-pak silica 305  
 serym-free medium 307  
 SH2 domain 282  
 shelf-life 265  
 Shichimotukoukato 270  
 shoot culture 309  
 sialic acid 268  
 signal transduction 312  
 signalling 314  
 singlet oxygen 282  
 size effect 274  
 size-exclusion chromatography 213  
 skin permeation 275  
 Skin<sup>2</sup> 275  
 sodium chlorite 279  
 sodium selenite 290  
 soft drinks 316  
 soil group 308  
 solid phase extraction 278, 312, 304  
 solvents in pharmaceutical products 309  
 sorbic acid 278  
 specific determination 135  
 spectrophotometer 278  
 sphingomyelin 303  
 spin-spin relaxation time 265  
 spoilage yeasts 284  
 squalene 304  
 stability 86  
 Standard battery 299  
 starting materials 175  
 statistical reliability 206  
 statistically evaluation 297  
 Sterility tests 313

sterilization validation 311  
 steroidal saponins 308  
 steviol 300  
 stevioside 300  
 stomach cancer 294  
 streptococcal pyrogenic exotoxin 307  
 stroke-prone spontaneously hypertensive rats 270  
 structure relationship 266  
*Sty*D4I 284  
 subacute toxicity study 119  
 subchronic toxicity study 93, 99  
 subsidiary color 278  
 subsidiary colors 175  
 substantial equivalence 311  
 sulfite compounds 279  
 sulfur 279  
 Sunset Yellow FCF 278  
 superoxide 72, 269, 282  
 suppository 309  
 surfactant 275  
 suspended particulate matter 275  
 synapse 288  
 systemic exposure 1, 314

T

tandem repeat sequence 269  
 tap root elongation 308  
*Taxus* sp. 317  
 TBTO 277  
 telomere 314  
 teratogenicity 306  
 3-*tert*-butyl-4-hydroxyanisole 285  
 testicular damage 270  
 testicular histopathology 293  
 testicular toxicity 293, 295  
 testis 292  
 tetracycline 277  
 tetraphenylporphyrin 40, 281  
 TGF- $\beta$  287  
 Thailand 290  
 thermal analysis 144, 303  
 Thermogravimetry 144  
 thioproline formation 290  
 thiourea 291, 292  
 thrombin 269  
 thrombomodulin potency 268  
 thymidine kinase (*tk*) 299, 315  
 thyroid carcinogenesis 291  
 thyroid iodine uptake 292  
 tissue accumulation 290  
 tissue culture 308, 317  
 tissue distribution 290, 315  
 tissue engineering products 275  
 titanium 273  
 tobacco 266  
 tocotrienol 305  
 toluene 288  
 toxic microorganisms 313  
 toxicity 107  
 toxicity study 1  
 toxicokinetics 314  
 toxicologic pathology system 290  
 traditional medicines 310

tralomethrin 135  
 transporting equipment 284  
 transgenic 292  
 transgenic animals 314  
 transgenic mice 291  
 transgenic mouse 292, 296, 300  
 transgenic mouse mutation assay 296, 297  
 translocation 299, 312  
 transmission 314  
 transparency 286  
 transposition 285  
 triacetyl- $\beta$ -cyclodextrin 302  
 tributyltin chloride 307  
 trichloroethylene 276  
*Trichosanthes kirilowii* Maxim. 270  
 tricyclazole 305  
 triglyceride 303  
 triphenyltin chloride 307  
 trisodium phosphate 285  
 tropane alkaloid 309  
 trueness 309  
 trypsin 307  
 tumor-initiation 274  
 tumor-promotion 273, 274, 288  
 tyrosine-*O*-sulfate 273  
 tyrosine-phosphorylated protein 267

## U

UJNR 313  
 ulinastatin 199  
 ultrastructure 112  
 ultraviolet stabilizer 280, 281  
 unsulfonated primary aromatic amines 280  
 urea 275  
 uremia 275  
 UV-ion chromatography 279  
 UVA 275, 276  
 UVB 276

## V

validation 311, 315  
 viability 289  
*Vibrionaceae* 284  
 viral safety 267  
 vitamin A 291, 292  
 vitamin C 316  
 vitrification 317  
 VLDL 283  
 VOC 311  
 volatile components 285

## W

water pollution 315  
 Water-content 144  
 Weight Variation Test 204  
 west Bengal in India 311  
 WG4 311  
 whole embryo culture 306  
 World Wide Web 155, 161

## X

Xeroderma Pigmentosum 289

## Y

Y chromosome heterogeneity 299  
 yeast 276

## Z

zinc 289

# 国立医薬品食品衛生研究所報告への投稿について

## 投 稿 規 定

1. **投稿資格**：国立医薬品食品衛生研究所所員とする（共著者はこの限りでない）。
2. **内 容**：原稿は、特論、総説、原著論文、ノート、資料、ステートメントとする。そのほか業務報告、誌上発表、単行本、行政報告、学会発表、レギュラトリーサイエンス関連会議報告などを収載する。
  - 特 論**：国立医薬品食品衛生研究所の研究業務に関連する主題について、ある特定の視点から系統的に整理・論述したもので、編集委員会が執筆を依頼する。
  - 総 説**：数年以上にわたって行われた著者自身の研究や調査を中心にして、特定の主題について包括的・系統的に総括したもので、投稿により受理する。
  - 原著論文**：独創性な内容や新知見を含んだ研究成果をまとめたもので、投稿により受理する。
  - ノ ー ト**：断片的ではあるが独創的な内容や新知見を含んだ研究成果を報告するもので、投稿により受理する。
  - 研究に関する資料**：試験、製造又は調査などで、記録しておく必要のあるもので、投稿により受理する。
  - 標準品に関する資料**：標準品に関する試験、製造又は調査などで、記録しておく必要のあるもので、投稿により受理する。
  - ステートメント**：レギュラトリー関連学会などで発表した内容の報告で、投稿により受理する。
  - 業務報告**：所長、各部長（支所も含む）及び各薬用植物栽培試験場の長が過去1年間（前年度）の業務成績、研究業績をまとめた報告。
  - 誌上発表**：国立医薬品食品衛生研究所報告以外の専門誌に発表したものの報告。
  - 単 行 本**：単独又は共同で執筆し、刊行されたものの報告。
  - 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の報告。
  - 学会発表**：学会で講演したりポスター発表したものの報告。
  - レギュラトリーサイエンス関連会議報告**：レギュラトリー関連会議内容の報告。
3. **用紙及び枚数の制限**：原則としてA4用紙（26字×24行）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（日本語の場合、刷り上がり1ページはA4用紙（26字×24行）で約4枚に相当する）。
  - 特 論**：原稿を依頼するとき別に定める。
  - 総 説**：刷り上がり15ページ以内。
  - 報 文**：刷り上がり8ページ以内。
  - ノート及び資料**：刷り上がり5ページ以内。
  - ステートメント**：刷り上がり2ページ以内。
  - 業務報告**：各部及び各薬用植物栽培試験場について刷り上がり2ページ以内。
  - 誌上発表**：一題目について要約部分が26字×20行以内。
4. **原稿の提出**：原稿はワードプロセッサで作成する。特論、総説、原著論文、ノート、資料、ステートメントでは、表紙（第1頁とする）、英文要旨及びキーワード、本文、文献、図の表題と説明、表の表題と説明、図、表、英文要旨の和訳（参考）の順に通し頁番号を付け、左上をひもなどで綴じて提出する。表紙には、論文タイトル、所属、著者名に加えて、右上部に該当する分類（特論、総説、原著論文、ノート、研究に関する資料、標準品に関する資料、ステートメントなど）を、また右上部に総頁数及び図表のそれぞれの枚数を記入する。
 

提出部数は、特論、総説、原著論文については3部（オリジナル原稿1部及びコピー2部）、また、ノート、資料、ステートメントについては2部（オリジナル原稿1部及びコピー1部）とする。業務報告などの報告類については、オリジナル原稿1部とする。

原稿とは別に、原稿の内容（表紙、英文要旨、本文、文献、図の表題と説明、表の表題と説明など）の入ったフロッピーを添付する。フロッピーのフォーマットなどについては、その年度の「原稿募集について」に従う。

原稿とフロッピーには所長宛の報告書を添えて、定められた原稿締め切り期日までに編集委員（図書

係)宛に提出する。

5. **原稿の審査**：原稿の採否及び分類は、編集委員会が選んだ審査員(特論、総説、原著論文については2名、ノート、研究に関する資料、標準品に関する資料、ステートメントについては1名)の意見に基づき編集委員会が決定する。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，用語**：常用漢字を用い、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。全文を英語で書いてもよい。  
原稿の語句の統一を計るため、おくりがな、かなで書くもの、文字の書き換え並びに述語などについては、原則として文部省用字用語例及び文部省公用文送りがな用例集に従う。(参考：国立医薬品食品衛生研究所報告記載の手引き(用語例))  
なお、学術用語については文部省学術用語集(化学編、植物学編、動物学編、数学編及び物理学編など)に従うことを原則とし、用語集にないものについては学会の慣例に従う。
2. **物質名，化学名**：文中では物質はその名称を漢字、カタカナあるいは英語(アルファベット)で記し、化学式は用いない。例えば塩酸と書き、HCLとしない。英語で書く場合、文中では原則として小文字で始める。
3. **単位，記号，略号，略記**：単位は原則として国際単位系(SI)を用いる。(参考：国立医薬品食品衛生研究所報告記載の手引き(単位，記号，略号))  
数字と単位記号の間は、必ず1文字あける。  
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)などとししない。
4. **句 読 点**：，．を用い、ゝ。としない。
5. **数 字**：算用数字(アラビア数字)を用いる。千の単位にコンマを付ける。また、必要に応じてローマ数字を用いることができ、慣用語などについては和数字を用いる。(例：一般、二酸化イオウ)
6. **繰り返し符号**：「々」、「ゝ」、「ゞ」は、原則として用いない。ただし、慣用語は用いても差し支えない。(例：徐々、各々)
7. **字体の指定**：文字の下に赤で次のように記す。  
ゴ シ ッ ク 体~~~~~例：見出しなど 試薬  
イ タ リ ッ ク 体—————例：学名など Papaver somniferum L.  
スモールキャピタル—————例：著者名など l-ascorbic acid
8. **特論，総説，原著論文，ノート，資料，ステートメントの記載要領**：
  - 8.1 **記載順序**：8.2~8.8の順に書く。
  - 8.2 **題名，著者名**：次の例に従い、表紙(用紙1枚全部)をこれに当てる。なお、所外の共著者の所属は著者名の右肩に\* (複数のときは\*1, \*2, ...)のように記して脚注とする。  
例：医薬品の確認試験法に関する研究(第2報)  
鎮痛剤のクロマトグラフィー  
用賀 衛\*・世田 一郎・東 京子  
Studies on the Identification of Drugs II  
Chromatographic Methods for the Analgesics  
Mamoru Yoga\*, Ichiro Seta and Kyoko Azuma  
また、著者の中の一人を、連絡者(Contact person)に指定し、著者名の右肩に#印を記して脚注とする  
脚注例：# To whom correspondence should be addressed:  
Mamoru Yoga; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo158,  
Japan; Tel: 03-3700-1141 ext. 200; Fax: 03-3707-6950;  
E-mail: mamoru@nihs.go.jp
  - 8.3 **英文要旨**：論文の内容を400words程度で簡潔にまとめる。なお、参考のため和訳を原稿の最後に別紙として付け

る。

8.4 キーワード：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。

英文要旨のあと2行あけて“Keywords”の項目を付ける。固有名詞，略語を除き，小文字で記す。各キーワードはカンマで区切り，続けて記載する。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。

8.5 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。図，又は表がある場合，それらの挿入位置を本文の左側の空欄に明記する。

8.6 文献：本文の引用箇所の右肩に<sup>1), 2), 3), 2-5)</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 及び日本化学総覧の略記法による。外国雑誌名はイタリック体，巻数はゴシック体で表し，単行本は書名を省略せず，編者名や出版地も記載する。

例：

1) Ito, A., Suzuki, B., Tanaka, C. and Kato, D.: *J. Health Sci. Review*, **7**, 1234–1245 (1997).

2) a) Yamada, E. and Takahashi, F.: *Health Sci. Lett.*, **8**, 2345–56 (1996); b) Saito, G., Kimura, H. and Inoue, I.: *Health Science Bull.*, **123**, 3456–67 (1995); c) Ogawa, J.: *ibid.*, **124**, 12–25 (1996).

3) House, J. K.: “Recent Health Science,” 2nd ed., eds. by Morrison, L. and Benjamin, M, Eiken Press Inc., Tokyo, pp. 123–234 (1997).

4) 衛研一郎，厚生花子：衛研雑誌，**234**，456–467 (1990).

5) 東京子，用賀太郎：衛研報告の書き方，衛研出版社，東京，pp. 234–456 (1997).

8.7 図：図 (Fig.) は原則として提出された原稿を70%縮小してそのまま掲載するので，本文とは別に各々一つずつをA4用紙の上に黒で鮮明に作成する。図の作成に際しては刷り上がり一段（幅84mm）か二段（幅175mm）かを考慮し，刷り上がり一段の場合には原図幅120mm，二段の場合には原図幅250mmに収まるようにする。図には通し番号を付ける (Fig. 1., Fig. 2., …)。図の表題，説明は原則として英語で書く。図番号，表題，説明は，別のA4用紙にまとめて書く。なお，表題は大文字ではじめ最後に「.」を付けない。

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

図中の文章は，原則として英語で書き明朝タイプの書体（70%縮小されたときにも読みやすい大きさの文字）を使用する。図に写真を用いる場合には，鮮明に印刷されたものを使用する。用紙の裏には，論文のタイトル，著者名，図番号及び刷り上がり段数（一段又は二段）を黒鉛筆で記入する。また，本文の左側の空欄に図の挿入位置を記入する。

8.8 表：表 (Table) は，本文とは別に各々一つずつをA4用紙の上に作成する。表の作成に際しては刷り上がり一段（幅84mm）か二段（幅175mm）かを考慮する。

表には通し番号を付ける (Table 1., Table 2., …)。表の表題，説明は原則として英語で書く。なお，表題は大文字ではじめ最後に「.」を付けない。

例：Table 1. Classical transgenic mice and carcinogenicity

表中の文章は，原則として英語で書く。表中の項目に関する注は項目の右肩に<sup>a), b), …</sup>の様に記して示す。

例：a) Gonadotropine releasing hormone

表は，図と同じように活字の版組をしないで提出原稿をそのまま掲載することも可能である。その場合には，できるかぎり明朝タイプの書体を用いて作成し，鮮明に書き出したものを提出する。表の中に構造式や数式が含まれていたり表の構成が複雑な場合には，そのまま掲載できるような原稿が提出されるのが好ましい。用紙の裏には，論文のタイトル，著者名及び刷り上がり段数（一段又は二段）を黒鉛筆で記入する（活字の版組をしないでそのまま掲載されることを希望する場合には，その旨も書き加える。）。また，本文の左側の空欄に表の挿入位置を記入する。

9. ステートメントの執筆上の注意：投稿内容が，レギュラトリーサイエンス関連学会などで既に発表したものである場合には，脚注に例として「本ステートメントは，日本薬学会第117回レギュラトリーサイエンス討論会（1997.4, 東京）にて発表した内容をまとめたものである」との説明を加える。



10. 誌上発表などの記載要領：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及び例示に従う。

## 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。

平成9年12月

国立医薬品食品衛生研究所図書委員会

国立医薬品食品衛生研究所報告記載の手引き（用語例）

注：送りがなについて\_アンダーラインは注意して送るもの、□印は送らないもの。

\*印印は特定のものを指すときは漢字でよいもの。

分類	用語	使う字	使わない字 備考	
ア	あかるい	明 <sup>る</sup> い	明い	
	あきらかに	明 <sup>ら</sup> かに	明かに	
	あげる	上げる	上る	
	あたためる	→加温する		
	あたる	当 <sup>た</sup> る	当る	
	あたらしい	新 <sup>し</sup> い	新 <sup>ら</sup> しい	
	あてる	当 <sup>て</sup> る	当る	
	あつかう	扱 <sup>う</sup>	扱 <sup>か</sup> う	
	あつめる	集 <sup>め</sup> る	集る	
	あらかじめ	あらかじめ	予め	
	あらたに	新 <sup>た</sup> に	新 <sup>ら</sup> たに	
	あらためる	改 <sup>め</sup> る		
	あらわす	表（現）す	表（現）わす 表→表面に出し示す。著わす 現→かくさずに示す	
	あらゆる	あらゆる	全る	
	ある	ある	在る，有る	
あるいは	あるいは	或は		
あわ	あわ	泡		
あわす	合 <sup>わ</sup> す	合す		
イ	いう	いう	言う	
	いくぶん	いくぶん	幾分	
	いずれ	いずれ	何れ	
	いちじるしい	著 <sup>し</sup> い	著 <sup>る</sup> しい	
	いっかねん	一カ年	1箇年，一ケ年	
	いっそう	一層	いっそう	
	いったん	一端	いったん	
	いって	いって	行 <sup>っ</sup> て	
	いる	いる	居る	
	いる	入る		
	いれる	入 <sup>れ</sup> る	入る	
	いわゆる	いわゆる	所請	
	ウ	うしなう	失 <sup>う</sup>	
		うすい（物）	薄 <sup>い</sup>	薄 <sup>す</sup> い
		うすい（色）	うすい	
うすめる		→希釈する	薄める	
うちに		うちに	内に，中に	
うながす		促 <sup>す</sup>	促 <sup>か</sup> す 得る（can or may） →える	
うる		うる	潤 <sup>お</sup> す	
うるおす		潤 <sup>す</sup>		
エ		えがく	描 <sup>く</sup>	画 <sup>く</sup>
		えらぶ	選 <sup>ぶ</sup>	
	える	得 <sup>る</sup>	（get）→うる	
オ	おいて	おいて	於 <sup>い</sup> て	
	おおう	覆 <sup>う</sup>	被 <sup>う</sup>	

分類	用語	使う字	使わない字 備考	
オ	おおきい	大きい	大い	
	おおむね	おおむね	概 <sup>ね</sup>	
	おこなう	行 <sup>う</sup>	行 <sup>な</sup> う	
	おこる	起 <sup>こ</sup> る	起る	
	おそらく	恐 <sup>ら</sup> く	恐れ、畏れ	
	おそれ	おそれ	おだやかに	
	おだやかに	穏やかに	おだやかに	
	おとし	落 <sup>と</sup> し	落し	
	おのおの	各々	おのおの	
	おのずから	おのずから	自ら	
カ	おびる	帯 <sup>び</sup> る		
	おもな	主 <sup>な</sup>	おもな	
	およそ	およそ	凡そ	
	および	及 <sup>び</sup>		
	おわる	終 <sup>わ</sup> る	終る	
	かえす	返 <sup>す</sup>	返 <sup>え</sup> す	
	かえって	かえって	却て	
	かかわらず	かかわらず	拘 <sup>ら</sup> ず	
	かける	欠 <sup>け</sup> る	欠る	
	かさねる	重 <sup>ね</sup> る		
かつ	かつ	且 <sup>つ</sup>		
かつしよく	褐色	かつ色		
かならず	必 <sup>ず</sup>	必 <sup>ら</sup> ず		
かねる	兼ねる	兼る		
～から	〇〇から作る。△△から再結晶			
キ	がらす	ガラス	硝子	
	かわる	代 <sup>わ</sup> る	代る （代理・代人など）	
	かわる	変 <sup>わ</sup> る	変る（うつりかわる，変化）	
	カ月	カ月	箇月	
	10カ所	10カ所	10ケ所，10箇所	
	ク	きしゃく	希釈	
		きめる	決 <sup>め</sup> る	決る
		きりあげ	切 <sup>上</sup> げ	切りあげ
	ケ	きわめて	極 <sup>め</sup> て	きわめて
		くふう	工夫	くふう
くらい（助詞）		くらい	位	
コ	くらべる	比 <sup>べ</sup> る	比る	
	くりかえす	繰 <sup>り</sup> 返 <sup>す</sup>	繰返 <sup>え</sup> す	
	くみあわせ	組合せ（名詞） 組み合せ（動詞）		
	けんだく	懸濁	けんだく	
コ	こえる	超 <sup>え</sup> る	越 <sup>え</sup> る	
	こげる	焦 <sup>げ</sup> る	焦る	
	ここ	ここ	此処	
コ	こころみる	試 <sup>み</sup> る	試る	

分類	用 語	使 う 字	使わない字 備考	
コ	こたえ	答 <u>え</u>	答 (表中)	
	こたえる	こたえる	応える	
	こと	こと	事*	
	ごと	ごと	毎	
	ことなる	異なる	異なる	
	ことに	殊に		
	この	この	此の	
	こまかい	細 <u>かい</u>	細い	
	(洗い) こむ	(洗い) 込 <u>む</u>		
	これ	これ	之	
サ	これら	これら	此等, これ等	
	さきに	先に	さきに	
	さける	避 <u>ける</u>	避る	
	さげる	下 <u>げる</u>	下る	
	さしこむ	さし込 <u>む</u>	挿し込む(挿入)	
	さしつかえない	差し支 <u>え</u> ない	差支えない	
	さまざま	様々		
	さら	皿	さら	
	さらに	更に		
	シ	しかし	しかし	然し, 併し, 而し
しがたい		し難い		
しげき		刺 <u>激</u>	刺戟	
したがう		従 <u>う</u>	したがう	
したがって		したがって (接 続詞)		
		従って (動詞)		
したのち (に)		した後 (に)		
しばしば		しばしば	屢々	
しぶい		渋い	しぶい	
しまう		しまう	終う, 了う	
ス	しめす	示 <u>す</u>		
	しめる	湿 <u>る</u>	湿 <small>ぬ</small> る	
	しゃこう	遮光	しゃ光	
	しやすい	しやすい	し易い, 仕易い	
	しゅうまつてん	→終点	終末点	
	じゅうぶん	充分, 十分	じゅうぶん	
	しょうじる	生じる	生ずる	
	じょうりゅう	蒸留	蒸溜	
	じょじょに	徐々に		
	しらべる	調 <u>べる</u>	調る	
セ	すくない	少 <u>ない</u>	少い	
	ずつ	ずつ	宛	
	すてる	捨 <u>てる</u>	捨る	
	すでに	既に	すでに	
	すなわち	すなわち	即ち	
	すべて	すべて	総て, 凡て, 全て	
	すみやかに	速やかに	すみやかに	
	ソ	せん	栓	せん, セン
		せんじょう	洗淨	洗滌
		そう	沿う	
そうにゅう		挿入	そう入	
そこ		そこ	其処	
その		その	其の	
そのほか		そのほか	其の他	

分類	用 語	使 う 字	使わない字 備考	
ソ	それぞれ	それぞれ	夫々	
タ	だいたい	大体	だいたい	
	たいてい	大抵	たいてい	
	たえず	絶 <u>えず</u>	絶ず	
	たがいに	互 <u>いに</u>	たがいに	
	たしかめる	確 <u>か</u> める	確める	
	だす	だ <u>す</u>	出す	
	ただ	た <u>だ</u>	唯, 只	
	ただし	た <u>だ</u> し	但し	
	ただちに	直 <u>ち</u> に	直に	
	たとえば	例 <u>え</u> ば	たとえば	
チ	ために	た <u>め</u> に	為に	
	ちいさい	小 <u>さい</u>	小さい	
	ちかづく	近 <u>づ</u> く	近い	
	ちやうど	ち <u>ょう</u> ど	近付く, 近づく	
	ちよっと	ち <u>ょう</u> と	丁度	
	ちよっと	ち <u>ょう</u> と	一寸	
	ツ	ついて	つ <u>い</u> て	就いて, 付いて
		ついで	次 <u>い</u> で	
		づつ	づ <u>つ</u>	宛
		つぎに	次 <u>に</u>	つぎに
つくる		作 <u>る</u>		
つける		付 <u>け</u> る		
つめる		詰 <u>め</u> る		
つねに		常 <u>に</u>		
テ		ていする	呈 <u>す</u> る	
		できる	で <u>き</u> る	出来る
	ト	とおり	と <u>お</u> り	通り
		とき	と <u>き</u>	時*
		ときどき	時 <u>々</u>	ときどき
		とくに	特 <u>に</u>	
		どこ	ど <u>こ</u>	何処
		ところ	と <u>こ</u> ろ	所*
		ともせん	共 <u>栓</u>	共せん
		ともなう	伴 <u>う</u>	伴 <small>づ</small> う
ともに		共 <u>に</u>		
とりあつかい		取扱 <u>い</u> (名詞) 取り扱 <u>い</u> (動詞)		
ナ	ないし	な <u>い</u> し	乃至	
	なお	な <u>お</u>	尚	
	なかば	半 <u>ば</u>	中ば	
	ながら	な <u>が</u> ら	乍ら	
	なづける	名付 <u>け</u> る	名づける	
	など	な <u>ど</u>	等	
	ならびに	並 <u>び</u> に		
	なるべく	な <u>る</u> べく	成べく, 成る可く	
	ニ	にかわじょう	にかわ状	膠状
		にごる	濁 <u>る</u>	
にそう		二層	2層	
にゅうばち		乳鉢	乳ばち	
ヌ		ぬぐう	ぬ <u>ぐ</u> う	拭う
		ぬらす	ぬ <u>ら</u> す	濡らす

分類	用 語	使 う 字	使わない字 備考	分類	用 語	使 う 字	使わない字 備考
ネ	ねんちゅう	粘稠		モ	もつとも もっぱら もどす もとに もとづく もの もる	最も 専ら 戻す (もどす) 下に 基づく もの 漏る	もっぱら  許に 基く 物*, 者*
ノ	のぞく のちに のべる のり	除く 後に 述べる のり	のちに 述る 糊	ヤ	やすい やはり やむをえず やや やわらかい	やすい やはり やむを得ず やや 柔らかい	易い 矢張り 止むを得ず 稍々 柔い, 軟かい
ハ	はかり はかる  はじめて はじめの はじめの はやい	はかり 量る  初めて 初めの 始める 速い	秤 測る, 計る →当用漢字 初て	ユ	ゆえ ゆく	ゆえ 行く	故
ヒ	ひとしい ひとつ ひとつづつ	等しい 一つ 一つずつ		ヨ	よい ように ようす ようだ (に) ようやく ようゆう よほど よる より	よい 容易に 様子 ようだ (に) ようやく →融解 よほど よる よる 比較するときに用いる. 例: ○○より△△が大きい	好い, 良い  ようす 様だ (に) 漸く 熔融 余程 依る, 因る
フ	ふきん ふくざつ ふたたび ふりまぜる ふれる	付近 複雑 再び 振り混ぜる 触れる	附近  振混ぜる 触る	ラ	ら	ら	等
ホ	ほか ほど ほとんど ほほ	ほか ほど ほとんど ほほ	他, 外 程 殆んど 略々, 略ほ	リ	りゅうぶん りんぱ	留分 リンパ	溜分 淋巴, りんぱ
マ	ますます まぜあわせ  まぜる また または まだ まったく まで まま	ますます 混合せ (名詞) 混ぜ合せ (動詞) 混ぜる また 又は まだ 全く まで まま	益々  混る 又, 亦, 復  未だ  迄 俣	ワ	わかる わける わずかに わたって	わかる 分ける わずかに わたって	分る, 判る, 解る 分る 僅かに 互って
ミ	みたす みとめる みなす	満たす 認める みなす	満す, 充たす 認る 見なす, 見做す	ム	むしろ むずかしい むすぶ	むしろ 難しい 結ぶ	寧ろ 六ヶ敷しい 結ぶ
メ	めずらしい	珍しい	珍しい	メ	めずらしい	珍しい	珍しい
モ	もうしこみ  もえる もし もしくは もちいる もちろん もって	申し込み (申込み, 申込) 燃える もし 若しくは 用いる もちろん もって	燃る 若し  用る 勿論 以て				

国立医薬品食品衛生研究所報告記載の手引き (単位, 記号, 略号)

1. SI 基本単位の名称と記号

量	単位の名称	単位記号	量	単位の名称	単位記号
長さ	メートル	m	熱力学温度	ケルビン	K
質量	キログラム	kg	物質質量	モル	mol
時間	秒	s	光度	カンデラ	cd
電流	アンペア	A			

従来用いられてきた重量はほぼ質量に置き換えられるが、当面は用語を併用できる。

2. SI 接頭語

SI 単位の10の整数乗倍を表すために、SI 接頭語が使われる。それらかの名称と記号は次のとおりである。

倍数	接頭語	記号	倍数	接頭語	記号
10	デカ (deca)	da	10 <sup>-1</sup>	デシ (deci)	d
10 <sup>2</sup>	ヘクト (hecto)	h	10 <sup>-2</sup>	センチ (centi)	c
10 <sup>3</sup>	キロ (kilo)	k	10 <sup>-3</sup>	ミリ (milli)	m
10 <sup>6</sup>	メガ (mega)	M	10 <sup>-6</sup>	マイクロ (micro)	μ
10 <sup>9</sup>	ギガ (giga)	G	10 <sup>-9</sup>	ナノ (nano)	n
10 <sup>12</sup>	テラ (tera)	T	10 <sup>-12</sup>	ピコ (pico)	p
10 <sup>15</sup>	ペタ (peta)	P	10 <sup>-15</sup>	フェムト (femto)	f
10 <sup>18</sup>	エクサ (exa)	E	10 <sup>-18</sup>	アト (atto)	a

例えば、長さの単位 m の10<sup>3</sup>倍はkm, 10<sup>-2</sup>倍はcm, 10<sup>-3</sup>はmm, 10<sup>-6</sup>倍はμm, 10<sup>-9</sup>倍はnmとなる。ただし、質量の単位の整数乗倍は、グラムに接頭語をつけて表示する。例えば、mgはμkgと記さない。

3. 特別の名称と記号を持つ SI 組立単位の例

量	単位の名称	単位の記号	量	単位の名称	単位の記号
周波数	ヘルツ	Hz	電気抵抗	オーム	Ω
力	ニュートン	N	コンダクタンス	ジーメンズ	S
圧力	パスカル	Pa	磁束	ウェーバ	W
エネルギー, 仕事, 熱量	ジュール	J	磁束密度	テスラ	T
仕事率, 電力	ワット	W	インダクタンス	ヘンリー	H
電荷	クーロン	C	セルシウス温度	セルシウス度	°C
電位	ボルト	V	平面角	ラジアン	rad
静電容量	ファラド	F	立体角	ステラジアン	sr
照度	ルクス	lx	光束	ルーメン	lm
吸収線量	グレイ	Gy	放射能	ベクレル	Bq
			線量当量	シーベルト	Sv

4. SI と併用される SI 以外の単位の例

量	単位の名称	単位の記号	量	単位の名称	単位の記号
時間	分	min	質量	トン	t
	時	h	圧力	バール	bar
	日	d	エネルギー	電子ボルト	eV
体積	リットル	l, L	平面角	度	°

また、圧力は SI 単位ではパスカルであるが、血圧等の体内圧力に関しては混乱を避けるため、mmHg を使用できる。

5. その他よく用いられる量と単位記号の例

面積	m <sup>2</sup> , cm <sup>2</sup>	体積	m <sup>3</sup> , cm <sup>3</sup> , l, ml	速さ	m/s
加速度	m/S <sup>2</sup>	波数	cm <sup>-1</sup>	密度	kg/m <sup>3</sup> , g/cm <sup>3</sup> , g/ml
電流密度	A/m <sup>2</sup>	磁場の強さ	A/m	モル濃度	mol/l
輝度	cd/m <sup>2</sup>	粘度	Pa · s	動粘度	m <sup>2</sup> /s
質量百分率	%	質量百万分率	ppm	質量十億分率	ppb
体積百分率	vol%	湿度百分率	%	回転速度	r/s
エンドトキシン単位	EU				

## 6. よく用いられる記号, 略号

融点	mp	ミハエリス定数	$K_m$	標準偏差値	S.D.
分解点	mp (dec.)	Rf 値	$R_f$	標準誤差	S.E.
沸点	bp	保持時間	$t_r$	紫外吸収	UV
凝固点	fp	50%致死量	LD <sub>50</sub>	赤外吸収	IR
比重	$d$	50%有効量	ED <sub>50</sub>	核磁気共鳴	NMR
屈折率	$n$	経口投与	p.o.	電子スピン共鳴	ESR
施光度	$\alpha$	静脈投与	i.v.	施光分散	ORD
吸光度	$A$	腹腔投与	i.p.	円偏光二色性	CD
水素イオン指数	pH	皮下投与	s.c.	マススペクトル	MS
pK 値	$pK$	筋肉投与	i.m.		

## 編集後記

○今年も無事に衛研報告の編集作業が終わりまして何よりです。自分の文章の間違ひには疎いのに、他人の文章の間違ひには目敏くなってしまうのは編集委員の悲しい性でしょうか?とここで、今回、投稿論文の編集にも少々携わらせていただきましたが、「衛研報告」の内容に対する考え方が、投稿者、審査委員、編集委員、皆さんそれぞれ結構異なることを実感致しました。衛研報告の明日はどちらだ!?

(R.K)

○衛生試験所報告(当時)を初めて手にとったのは、学生するとき、大学図書館で、衛生試験所の研究内容を知りたいと思つてのことでした。しかし、多くの研究成果は他の学術雑誌に報告され、衛試報告には一部の研究が掲載されているにすぎません。その点、今回の総説は、所員自身の数年にわたる研究成果を総括的にまとめて投稿することができ、所内外の人に研究内容を知ってもらう意味でも面白い試みだと思います。今後、若手が研究成果をどんどん発表できる場になればいいと思います。

(N.K)

○編集中に、衛生研究所報告の著作権について疑問に思いました。考えてみると、衛生試験所報告の記事についてはcopyright transferの用紙にサインした覚えがないのです。著作権は著者にあることとなります。すると、第三者が衛生研究所報告の図などを引用する場合には、衛生研究所ではなく、著者自身から許可を得なければなりません。もし、著者が既に衛生研究所に所属していない場合には、その人の搜索に手間取る可能性もあるかと思ひました。

(Y.H)

○衛研報告(旧衛試報告)の編集委員になって、三年が経ちました。その間、いろいろな改訂を行い、衛研報告もかなり充実したものになってきたように思ひます(自画自賛?)。あとは、所員の皆さんが、衛研報告に愛着を持って執筆して下されば、衛研報告が今後ますます発展していくこと間違いなし!そう信じています。私も、来年こそは一執筆者に戻って、外から衛研報告を見直してみたいものです。

(S.S)

○研究論文の投稿について、内容の検討が十分なされない状態で投稿された論文が目立ち、審査員の方々には大変ご迷惑をおかけしました。今後はこのようなことのないように、研究論文投稿規定の配布時期を早めるなどの処置を講ずる必要があると思ひます。

(R.H)

○レギュラトリーサイエンス関連会議報告の編集の担当をしました。昨年初めて同じ担当をしましたが、慣れない用語ばかりで苦労しました。今年は2度目で、少しは慣れてきたようです。来年度以降の表紙の色やデザインが斬新なものに変わることを期待しつつ、筆を置きます。

(H.T)

○今回は初めての編集委員ということで戸惑いもあったが、なんとか担当分をこなせることができて、ほっとしている。実際にはノートの部分を担当したが、試験所内では実に様々な分野での研究が行われており、分野ごとの論文に対する考え方の隔たりが、報文や資料との区分けだけをとりつても、編集の調整を難しくしていると感じた。

(A.H)

○執筆規定に目を通すのは気の重い作業ですが、思いこみで間違っている場合もあります。原稿を執筆される際にはもう一度ご確認下さい。ざっと目を通していただくだけで、図書、編集、審査、各委員の負担はかなり軽くなると思ひます。宜しくお願いします。

(T.M)

○今年4月に図書係へ異動になり初めて衛研報告の編集作業に関わりました。編集作業にあたっては、私自身が不慣れなことから編集委員及び著者の方々にはご迷惑をおかけしました。来年は、今年の反省点(校正段階における調整等)を踏まえ編集作業にあたりたいと思ひます。

(S.K)

○組織改革に伴い、本誌の名前が「衛生試験所報告」から「国立医薬品食品衛生研究所報告」と変わりました。名は体を表すといひます。研究所の研究成果の集大成の場として本誌が意義付けされるよう願う次第です。

最後に、衛研報告編集委員の経験が全くない状態で、編集委員会世話人をお引き受けして2年が経ちました。この間、滞りなく衛研報告を発行できたのは、ひとえに編集委員と図書係のお陰です。この場を借りてお礼を述べさせていただきます。

(N.M)

平成9年度図書委員

齋藤行生 \*宮田直樹 神沼二真 \*木倉瑠理  
\*川崎ナナ 小野景義 \*林 讓 内野 正  
松田りえ子 \*佐々木史歩 中島葉子 手島玲子  
鈴木和博 宮原美知子 \*長谷川隆一 津田充宥  
豊田和弘 \*田辺秀之 \*広瀬明彦 \*村井敏美  
下村講一郎 \*川島伸一

(\*は編集委員)

国立医薬品食品衛生研究所報告 第115号

平成9年11月25日 印刷

平成9年12月5日 発行

発行所 国立医薬品食品衛生研究所化学物質情報部  
東京都世田谷区上用賀1丁目18番1号

印刷所 株式会社ソーラン社  
東京都中央区日本橋小伝馬町16-8